



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
INSTITUTO DE PESQUISA EM FÁRMACOS E
MEDICAMENTOS



PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS

FRANCISCA SABRINA VIEIRA LINS

**Revisão sobre pregnanos glicosídeos da subfamília Asclepiadoideae
(Apocynaceae) e estudo fitoquímico e farmacológico de *Mandevilla
dardanoi***

JOÃO PESSOA, AGOSTO/2023

FRANCISCA SABRINA VIEIRA LINS

Revisão sobre pregnanos glicosídeos da subfamília Asclepiadoideae (Apocynaceae) e estudo fitoquímico e farmacológico de *Mandevilla dardanoi*

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 Doutora em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, área de concentração Farmacoquímica.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Josean Fachine Tavares

JOÃO PESSOA, AGOSTO/2023

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

L759r Lins, Francisca Sabrina Vieira.

Revisão sobre pregnanos glicosídeos da subfamília Asclepiadoideae (Apocynaceae) e estudo fitoquímico e farmacológico de *Mandevilla dardanoi* / Francisca Sabrina Vieira Lins. - João Pessoa, 2023.

232 f. : il.

Orientação: Josean Fechine Tavares.

Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. Produtos naturais. 2. *Mandevilla* - Atividade anti-inflamatório. 3. Asclepiadoideae - Atividades terapêuticas. 4. Apocynaceae - *Mandevilla dardanoi*. 5. Pregnanos glicosídeos. I. Tavares, Josean Fechine. II. Título.

UFPB/BC

CDU 547.9(043)



PgPNBSB

Pós Graduação em Produtos Naturais
e Sintéticos Bioativos

Ata da 364ª (trecentésima sexagésima quarta) Tese de Doutorado do(a) aluno(a) do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos **Francisca Sabrina Vieira Lins**, candidato(a) ao Título de “Doutor(a)” em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos na área de concentração Farmacoquímica.

Às nove horas (09h00) do dia vinte e cinco de agosto do ano dois mil e vinte e três (25/08/2023), em ambiente virtual de videoconferência através do aplicativo Google Meet, link: <https://meet.google.com/jve-mihb-ueu>, reuniram-se em caráter de Solenidade Pública os membros da Comissão designada para examinar o(a) discente **Francisca Sabrina Vieira Lins**, candidato(a) ao Título de “DOCTOR(A)” em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos na área de concentração Farmacoquímica. Foram componentes da Banca Examinadora os pesquisadores Marcelo Cavalcante Duarte, Ph.D em Farmacoquímica, Emmanoel Vilaça Costa, Ph.D em Química, Maria de Fátima Vanderlei de Souza, Ph.D em Química Orgânica, Sócrates Golzio dos Santos, Ph.D em Farmacoquímica, e Josean Fachine Tavares, Ph.D em Farmacoquímica. Sendo o primeiro, integrante do corpo docente da Universidade Federal de Sergipe; o segundo, integrante do corpo docente da Universidade Federal do Amazonas e os demais, integrantes do corpo de pesquisadores da Universidade Federal da Paraíba. Dando início aos trabalhos, o(a) Presidente da Banca, professor(a) Josean Fachine Tavares, após declarar os objetivos da reunião, apresentou o(a) candidato(a) **Francisca Sabrina Vieira Lins**, a quem concedeu a palavra para que dissertasse oral e sucintamente sobre o tema apresentado e intitulado “Revisão sobre pregnanos glicosídeos da subfamília Asclepiadoideae (Apocynaceae) e estudo fitoquímico e farmacológico de *Mandevilla dardanoi*”. Após discorrer sobre o referido tema durante cerca de cinquenta minutos, o(a) candidato(a) foi arguido(a) pelos Examinadores na forma Regimental. Em seguida, passou a comissão, em caráter secreto, a proceder à avaliação e julgamento do trabalho, concluindo por atribuir-lhe o conceito **APROVADO(A)**. Em face da aprovação, declarou o Presidente, achar-se o(a) examinado(a) **Francisca Sabrina Vieira Lins**, legalmente habilitado(a) a receber o Título de “DOCTOR(A)” em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, na Área de Concentração Farmacoquímica, cabendo a Universidade Federal da Paraíba, providências, como de direito, a expedição do Diploma que o(a) mesmo(a) faz jus. Nada mais havendo a tratar, foi lavrada a presente ata que é abaixo assinada pelos membros da Comissão e pelo(a) discente.





PgPNSB

Pós Graduação em Produtos Naturais
e Sintéticos Bioativos

Prof. Dr. Josean Fechine Tavares (Orientador)

Documento assinado digitalmente



JOSEAN FECHINE TAVARES

Data: 26/09/2023 18:48:35-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Marcelo Cavalcante Duarte (Examinador)

Documento assinado digitalmente



MARCELO CAVALCANTE DUARTE

Data: 05/09/2023 16:00:31-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Emmanoel Vilaça Costa (Examinador)

Documento assinado digitalmente



EMMANOEL VILACA COSTA

Data: 05/09/2023 19:40:13-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.^a Dr.^a Maria de Fátima Vanderlei de Souza (Examinador)

Documento assinado digitalmente



MARIA DE FATIMA VANDERLEI DE SOUZA

Data: 05/09/2023 20:44:47-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Sócrates Golzio dos Santos (Examinador)

Documento assinado digitalmente



SOCRATES GOLZIO DOS SANTOS

Data: 12/09/2023 09:27:04-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Francisca Sabrina Vieira Lins (Discente)

Documento assinado digitalmente



FRANCISCA SABRINA VIEIRA LINS

Data: 14/09/2023 16:18:23-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>



*Dedico esta tese aos meus pais Francsica
Ernalda Vieira e Sebastião Vieira, pilares da
minha formação pessoal e profissional.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela inspiração nos momentos difíceis e pelo caminho de luz ao qual sempre me guiou, e pelas coisas e pessoas maravilhosas que Ele colocou em meu caminho.

Aos meus amados pais, Francisca Ernalda e Sebastião, dedico à vocês mais essa vitória.

À minha querida irmã, Samara Vieira, pelo apoio, cumplicidade e amizade incondicional.

À Renê Von Brown Nascimento Machado (*in memorian*), esposo que a vida me presenteou e que, apesar de sua partida tão precoce, me deixou o maior tesouro que eu poderia ganhar, nosso filho Ravi.

Às pessoas que foram rede de apoio, fora da Universidade nos momentos bons e ruins da minha estadia em João Pessoa, meus primos Míriam Gonçalves, Thais Gonçalves e Oscar Gonçalves, minha sogra Maria Auxiliadora e minhas amigas Malu Reis, Érica Lúcio e Neuma. À vocês, minha eterna gratidão.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Josean Fachine Tavares, pela oportunidade de desenvolver este trabalho e por sua amizade, paciência e apoio em todas as fases deste processo.

Ao Prof. Dr. Marcelo Sobral da Silva, pela colaboração indispensável no desenvolvimento deste trabalho, e por estar sempre disposto a ajudar.

Ao Prof. Dr. José Iranildo Miranda de Melo, na Universidade Estadual da Paraíba, pela identificação do material vegetal em estudo.

À Prof. Dra. Cristiane F. Villarreal, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia (UFBA), pela realização dos ensaios da atividade farmacológica.

Ao Prof. Dr. Marcus T. Scotti (UFPB), pela colaboração durante os estudos de quimioinformática.

Ao ex aluno do programa e hoje professor da Universidade Federal Fluminense, Dr. Lucas Silva Abreu, por toda ajuda na realização da pesquisa, análise química e escrita dos artigos.

Ao Prof. Dr. Samuel P. Cibulski, da Universidade Estadual da Paraíba, por sua colaboração nos estudos quimiotaxonômicos.

Aos funcionários do Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise, Marcelo Felipe, Evandro Ferreira e Sócrates Golzio, pela ajuda indispensável durante os experimentos.

À Junior Santos por todos os “cafés” e disposição para ajudar sempre. Aos funcionários Sr. Ivan e Sr. Raimundo Nonato da Silva Filho, pela ajuda sempre necessária no laboratório.

Às secretárias do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos

Bioativos, Caroline Manguiera e Nilmar Medeiros, pelos esclarecimentos e serviços prestados.

À toda equipe do Prof. Dr. Marcelo Sobral, Prof. Dr. Josean Fachine e todos os alunos do laboratório LMCA, entre eles, Jociano, Thiago e, especialmente, Thalisson Amorim de Souza, pois sua dedicação e apoio foram promordiais para a finalização deste trabalho.

Aos ex alunos do programa e também amigos, dos quais sinto muita saudade: Joanda, Laiane, Lucas, George, Yuri, Anderson, Jordana e Roseana, por todo apoio e pelos inúmeros “cafés” que foram indispensáveis para as longas jornadas de trabalho nas madrugadas, finais de semanas e feriados, em que precisamos estar no laboratório.

À todos os alunos de iniciação científica e pós-graduandos que fazem parte do Laboratório de Fitoquímica do PPgPNSB, pelo convívio, apoio e amizade.

À todos os professores do PPgPNSB, pelos valiosos ensinamentos, e por me ensinarem o amor pela docência, pesquisa e aos produtos naturais.

À todos aqueles que colaboraram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte técnico científico através do Portal Periódicos.

Muito obrigada!

RESUMO

Apocynaceae, uma das maiores famílias de plantas com mais de 5.100 espécies amplamente distribuídas, serve como um modelo significativo para estudos evolutivos e bioquímicos. Dentro desta família, foram isolados compostos como alcaloides, flavonoides e terpenoides com potenciais atividades terapêuticas. Entre as suas subfamílias, Asclepiadoideae é reconhecida como uma fonte rica de derivados pregnanos C₂₁. *Mandevilla Lindl* é um importante gênero da família Apocynaceae, não apenas como planta ornamental, mas também por seus usos medicinais. No Brasil, as espécies de *Mandevilla* são indicadas para o tratamento de asma e infecções de pele, e seu potencial anti-inflamatório e de cicatrização de feridas também são relatados na literatura. No que diz respeito à sua composição química, este grupo de plantas é um produtor notável de pregnanos glicosídeos. *Mandevilla dardanoi* é uma espécie endêmica do semiárido brasileiro não estudada por nenhum método fitoquímico. Esta pesquisa foi dividida em duas fases, na primeira foi realizada uma revisão abrangente dos pregnanos glicosídeos (PG) obtidos de Asclepiadoideae, empregando uma abordagem interdisciplinar que combina quimiofenética com análise de dados de redes neurais para identificar espécies promissoras e compostos bioativos. Para isto, foi compilado um conjunto de dados que incluiu 643 PGs únicos e 706 ocorrências botânicas. Os aspectos etnofarmacológicos, bem como a extração, o isolamento e a atividade biológica dos PGs, foram analisados e discutidos. A análise quimiofenética usando mapas auto-organizáveis (SOM) e a reconstrução filogenética revelaram semelhanças entre as tribos Marsdenia-Ceropegiae e destacaram a ocorrência dos tipos seco e diseco pregnano, predominantemente, na tribo Asclepiadeae. Ambas as estruturas apresentaram características intrigantes e os seus derivados demonstraram atividades anti-inflamatórias e citotóxicas. Tais resultados fornecem informações valiosas para investigação futura sobre estes compostos e as suas fontes vegetais medicinais. Além disso, no estudo filogenético constatou-se apenas uma espécie de *Mandevilla*, permitindo uma escolha mais assertiva da espécie a ser estudada, no que diz respeito ao isolamento de pregnanos com agliconas de esqueletos diferenciados. Na segunda fase do estudo, tendo em vista o potencial medicinal das espécies de *Mandevilla*, o objetivo foi isolar novos pregnanos glicosídeos de *M. dardanoi*. Para atingir este objetivo principal, foram utilizadas técnicas modernas de cromatografia. Cinco novos pregnanos glicosídeos, dardanois A-E, foram isolados das raízes através de CLAE. As suas estruturas foram determinadas utilizando dados de RMN 1D e 2D e de espectrometria de massas (MSn e HRESIMS). A citotoxicidade e o potencial anti-inflamatório destes compostos foram avaliados através da medição de citocinas pró-inflamatórias e da produção de óxido nítrico por macrófagos estimulados. Os dardanois foram capazes de inibir a produção de óxido nítrico e reduzir a IL-1 β e o TNF- α . O presente trabalho demonstra a quimiodiversidade de espécies do semiárido brasileiro e contribui para ampliar o conhecimento sobre o potencial biológico do gênero *Mandevilla*.

Palavras-chave: Asclepiadoideae; Apocynaceae; Anti-inflamatório; Inteligência Artificial; *Mandevilla dardanoi*; Pregnanos glicosídeos; Quimiofenética.

ABSTRACT

Apocynaceae, one of the largest plant families with more than 5,100 widely distributed species, serves as a significant model for evolutionary and biochemical studies. Within this family, compounds such as alkaloids, flavonoids and terpenoids with potential therapeutic activities have been isolated. Among its subfamilies, Asclepiadoideae is recognized as a rich source of C21 pregnane derivatives. *Mandevilla* Lindl is an important genus of the Apocynaceae family, not only as an ornamental plant, but also for its medicinal uses. In Brazil, *Mandevilla* species are indicated for the treatment of asthma and skin infections, and their anti-inflammatory and wound healing potential are also reported in the literature. With regard to their chemical composition, this group of plants is a notable producer of pregnane glycosides. *Mandevilla dardanoi* is an endemic species of the Brazilian semiarid region not studied by any phytochemical method. This research was divided into two phases, in the first a comprehensive review of pregnane glycosides (PG) obtained from Asclepiadoideae was performed, employing an interdisciplinary approach combining chemophenetics with neural network data analysis to identify promising species and bioactive compounds. For this, a dataset including 643 unique PGs and 706 botanical occurrences was compiled. Ethnopharmacological aspects as well as extraction, isolation and biological activity of PGs were analyzed and discussed. Chemophenetic analysis using self-organizing maps (SOM) and phylogenetic reconstruction revealed similarities between the tribes Marsdenia-Ceropegiae and highlighted the occurrence of the dry and diseco pregnane types, predominantly, in the tribe Asclepiadeae. Both structures showed intriguing features and their derivatives demonstrated anti-inflammatory and cytotoxic activities. Such results provide valuable information for future research on these compounds and their medicinal plant sources. Furthermore, the phylogenetic study found only one species of *Mandevilla*, allowing a more assertive choice of the species to be studied, with respect to the isolation of pregnanes with aglycones from differentiated skeletons. In the second phase of the study, in view of the medicinal potential of *Mandevilla* species, the aim was to isolate new pregnane glycosides from *M. dardanoi*. To achieve this main objective, modern chromatographic techniques were used. Five new pregnane glycosides, dardanols A-E, were isolated from the roots by HPLC. Their structures were determined using 1D and 2D NMR and mass spectrometry (MSn and HRESIMS) data. The cytotoxicity and anti-inflammatory potential of these compounds were evaluated by measuring pro-inflammatory cytokines and nitric oxide production by stimulated macrophages. Dardanols were able to inhibit nitric oxide production and reduce IL-1 β and TNF- α . The present work demonstrates the chemodiversity of species from the Brazilian semiarid region and contributes to expand the knowledge about the biological potential of the genus *Mandevilla*.

Keywords: Asclepiadoideae; Apocynaceae; Anti-inflammatory; Artificial Intelligence; *Mandevilla dardanoi*; Pregnane glycosides; Chemophenetics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fórmulas estruturais dos compostos estrofantidina, reserpina, vincristina e vimblastina, isoladas de espécies da família Apocynaceae.	21
Figura 2	Fórmulas estruturais com compostos MV 8608 (velutinol A) e MV 8612 isolados de <i>Mandevilla velutina</i>	22
Figura 3	Fórmulas estruturais dos compostos ilustról, ácido cafeico, acetililustról e β -D-oleandro-piranosil-ilustról.	24
Figura 4	Compostos isolados de <i>Mandevilla petraea</i>	26
Figura 5a	Triterpenos pentacíclicos isolados de <i>Mandevilla petraea</i>	27
Figura 5b	Triterpenos pentacíclicos isolados de <i>Mandevilla petraea</i>	28
Figura 6	Esteroides isolados de <i>Mandevilla petraea</i>	28
Figura 7	Compostos cardenolídeos isolados de <i>Mandevilla pentladiana</i>	30
Figura 8	Sesquiterpeno isolado de <i>Mandevilla pentladiana</i>	31
Figura 9	a) Aspecto geral de uma das ilhas na qual a espécie pode ser coletada (Serra do Jatobá- Serra Branca-PB); b-g) <i>Mandevilla dardanoi</i> : b) hábito; c e d) detalhe da flor; e) flores e frutos; f) frutos maduros; g) sementes	32
Figura 10	Distribuição geográfica de <i>M. dardanoi</i> no Brasil, representada pelos pontos amarelos.	33
Figura 11	Biossíntese do colesterol	34
Figura 12	Diferentes tipos de esqueletos esteroidais	35
Figura 13	Resumo da biossíntese do esqueleto pregnenolona	37
Figura 14	Localização da Serra do Jatobá (Serra Branca-PB)	42
Figura 15	Número de estudos baseados no isolamento de PGs de espécies de Asclepiadoidea por região geográfica.	51
Figura 16	Origem do esqueleto pregnano	60

Figura 17	Análise temporal das publicações que relatam o isolamento e a caracterização estrutural dos PGs das espécies da tribo principal Asclepiadoidea	61
Figura 18	Partes da planta identificadas como fontes de PGs	62
Figura 19	PGs promissores com potenciais aplicações em vários domínios. As estruturas apresentadas representam compostos identificados em nossa análise como tendo um potencial significativo em diferentes atividades. Estes compostos exemplificam a gama diversificada de aplicações dos PGs	72
Figura 20	SOMs de descritores de glicosídeos pregnanos de Asclepiadoidea. A Matriz de Distâncias Unificadas (U-matrix) está representada pela cor cinza, enquanto as tribos selecionadas, nomeadamente Asclepiadeae (A), Ceropegieae (C) e Marsdenieae (M), estão indicadas pelas cores correspondentes (vermelho, verde e azul, respetivamente)	74
Figura 21	Estruturas representativas de PGs destacando algumas características estruturais específicas ao longo das três principais tribos da subfamília Asclepiadoidea identificadas por descritores moleculares.	76
Figura 22	Mapas resultantes da análise de SOMs, mostrando os descritores moleculares selecionados dos esqueletos de Glicosídeos Pregnanos de cada tribo da subfamília Asclepiadoidea, selecionada para este estudo	77
Figura 23	Árvore filogenética compreendendo espécies das principais tribos de Asclepiadoidea.	79
Figura 24	Espectro ESI-HRMS do composto 1	136
Figura 25	Estruturas dos novos pregnanos glicosídeos (1-5) isolados de <i>M. dardanoi</i>	142
Figura 26	Correlações HMBC e TOCSY dos compostos 1, 3 e 5	143
Figura 27	Espectro ESI-HRMS do composto 2	144
Figura 28	Figure 28: Espectro ESI-HRMS do composto 3	146
Figura 29	Espectro ESI-HRMS do composto 4	148
Figura 30	Espectro ESI-HRMS do composto 5	149

Figura 31 Efeito inibitório dos compostos **1, 2, 3 e 5** na produção de óxido nítrico **152**
por macrófagos J774 estimulados. Os gráficos A-D mostram os níveis de nitritos determinados pelo método de Griess. Diferentes concentrações de **1, 2, 3 e 5** (200 - 25 μ M) ou dexametasona (Dex; 20 μ M, medicamento de referência) foram adicionadas a culturas de macrófagos J774 na presença de LPS (500 ng/mL) + IFN- γ (5 ng/mL). As quantificações de nitritos foram medidas 24 horas após os tratamentos. O grupo controle (Ctrl) representa células tratadas com veículo estimuladas com LPS + IFN- γ . O grupo basal (B) apresenta dados de células não tratadas e não estimuladas.

Figura 32 Os compostos **1, 2, 3 e 5** exibem um efeito modulador sobre a produção **56**
de TNF- α e IL-1 β em macrófagos J774 estimulados. São apresentados dados de quantificação por ELISA de TNF- α (gráficos A-D) e IL-1 β (gráficos E-H). Diferentes concentrações de **1, 2, 3 e 5** (200 - 25 μ M) ou dexametasona (Dex; 20 μ M, medicamento de referência) foram adicionadas a culturas de macrófagos J774 estimuladas com LPS + IFN- γ . O grupo controle (CTRL) representa células não tratadas estimuladas com LPS + IFN- γ . O grupo basal (B) apresenta dados de células não tratadas e não estimuladas. Os níveis de TNF- α e IL-1 β foram determinados 4h e 24 h após os tratamentos, respectivamente.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Informações botânicas e ocorrência dos glicosídeos pregnanos considerados neste estudo, para as três principais tribos de Asclepiadoideae	73
Tabela 2	Resultado da validação cruzada de 5 vezes dos mapas auto-organizados	75
Tabela 3	Dados espectroscópicos de RMN de ^1H dos compostos 1-5 (piridina- d_5)	139
Tabela 4	Dados espectroscópicos de RMN de ^{13}C dos compostos 1-5 (piridina- d_5)	141

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Utilização medicinal de espécies da subfamília Asclepiadoideae produtoras de pregnanos glicosídeos.	51
Quadro 2	Lista de pregnanos isolados cujas atividades biológicas foram avaliadas.	63

LISTA DE FLUXOGRAMAS

- Fluxograma 1** Obtenção do EEB-Md e das fases provenientes das raízes de *M. dardanoi* 44
- Fluxograma 2** Fracionamento cromatográfico da fase clorofórmica de *M. dardanoi*. 45
- Fluxograma 3** Fracionamento cromatográfico da fração Md-18.1-Md18.6 de *M. dardanoi* por CLAE preparativa 46

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

APT: Attached Proton Test

BB: Broadband

C₅D₅N: Piridina deuterada

CCDA: Cromatografia em Camada Delgada Analítica

CG: Cromatografia gasosa

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CLAE-EM: Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas

COSY: ¹H–¹H Correlation Spectroscopy

DAD: Arranjo de diodos

DEPT - Distortionless Enhancement by Polarization Transfer

DIC: Detector de Ionização de Chamas

EEB-Md: extrato etanólico bruto de *Mandevilla dardanoi*

EM: Espectrometria de Massas

EtOH: Etanol

Fr.: Frações

Hex: Hexano

HMBC: Heteronuclear Multiple Bond Correlation

HSQC: Heteronuclear Single-Quantum Correlation

Hz: Hertz

J: Constante de acoplamento

MeOH: Metanol

MHz: Megahertz

n-BuOH: n-butanol/n-butanólica

NOESY: ¹H–¹H Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy

PG: Pregnanos glicosídeos

RMN ¹³C: Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13

RMN ^1H : Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

SOMs: Mapas auto-organizados

TOCSY: ^1H - ^1H Total Correlation Spectroscopy

UV: Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REFERENCIAL TEÓRICO	20
2.1 Considerações sobre a família Apocynaceae:	20
2.2 Considerações sobre o gênero <i>Mandevilla</i> Lindl.	21
2.3 Considerações sobre a espécie <i>Mandevilla dardanoi</i> M. F. Sales, Kin-Gouv. & A. O. Simões:	31
2.4 Considerações sobre esteroides	33
2.4.1 Considerações sobre esteroides da classe pregnano	35
3 OBJETIVOS	38
3.1 Objetivo Geral	38
3.2 Objetivos Específicos	38
4 PARTE EXPERIMENTAL	39
Manuscrito: “Subfamília Asclepiadoideae (Apocynaceae): Etnofarmacologia, Atividades Biológicas e Quimiofenética Baseadas em Glicosídeos Pregnanos”.	39
4.1 Critérios de pesquisa e construção da base de dados	
4.2 Mapas auto-organizáveis (SOM)	39
4.2.1 Geração de descritores moleculares	39
4.2.2 Obtenção de SOMs	39
4.2.3 Reconstrução filogenética	40
Manuscrito: “Novos glicosídeos pregnanos de <i>Mandevilla dardanoi</i> e sua atividade anti-inflamatória”	40
4.3 Métodos de purificação, identificação e caracterização dos metabólitos secundários	41
4.3.1 Pré-purificação dos compostos	41
4.3.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	41
4.3.3 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	41
4.3.4 Espectrometria de Massas (EM)	41
4.4 Estudo fitoquímico	42
4.4.1 Coleta e identificação do material botânico	42
4.4.2 Processamento das raízes, obtenção do extrato e das fases de <i>M. dardanoi</i>	43
4.4.3 Fracionamento cromatográfico da fase clorofórmica de <i>M. dardanoi</i>	
4.5 Atividade farmacológica	44
4.5.1 Ensaio de Citotoxicidade	46
4.5.2 Avaliação da produção de citocinas e de óxido nítrico por macrófagos	46
4.5.3 Análise estatística	47
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48

5.1 Manuscrito: Subfamília Asclepiadoideae (Apocynaceae): Etnofarmacologia,	48
Atividades Biológicas e Quimiofenética Baseadas em Pregnanos glicosídeos	50
(Revista <i>Phytochemistry Reviews</i>).	
5.1.1 Distribuição e utilização tradicional	50
5.1.2 Biossíntese, extração e isolamento	59
5.1.3 Atividades biológicas	63
5.1.4 SOMs	73
5.1.5 Reconstrução filogenética	78
5.1.6 Conclusões	80
Material Suplementar	82
5.2 Manuscrito: Novos glicosídeos pregnanos de <i>Mandevilla dardanoi</i> e sua	
atividade anti-inflamatória	133
5.2.1 Elucidação estrutural	
5.2.2 Atividade Farmacológica	135
5.2.3 Conclusões	150
Material Suplementar	155
	156
REFERÊNCIAS	214

1 INTRODUÇÃO

A biodiversidade em ambientes tropicais e equatoriais oferece um potencial particularmente rico em compostos biologicamente ativos. Isto ocorre devido a variedade de espécies de plantas nessa região e suas diferentes vias biossintéticas capazes de produzir a ampla diversidade química, que pode ser usada como modelos para a descoberta de fármacos (VALLI; YONG e BOLZANI, 2016; PINHEIRO et al., 2020).

Atualmente, estima-se que mais de 50% do total de novos fármacos aprovados entre 1981 e 2022 são produtos naturais ou seus derivados, e 30% dos medicamentos sintéticos utilizaram como protótipo uma molécula de origem natural (PEREIRA et al., 2020; NEWMAN; CRAGG, 2020; TRIVELLA et al., 2022).

Diferentes estratégias são utilizadas para o isolamento e/ou identificação de novos fármacos a partir de produtos naturais. Entre elas, destacam-se as técnicas cromatográficas, como cromatografia gasosa (CG) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Além disso, são empregadas técnicas hífenadas a diversos detectores, visando aumentar a resolução e capacidade de separação de constituintes de matrizes complexas, a exemplo de detectores ultravioleta (UV), arranjo de diodos (DAD), ressonância magnética nuclear (RMN) e espectrometria de massas (EM) (JIANG et al., 2019; ZHU et al., 2022).

No Brasil, várias pesquisas são realizadas com contribuições relevantes sobre o estudo de plantas com fins medicinais, não só quanto a aspectos fitoquímicos, mas também quanto à atividade biológica de plantas existentes nos diferentes ecossistemas brasileiros (LIMA et al., 2006; BESSA et al., 2013; SANTOS et al., 2022).

Na região Nordeste, o estudo dos usos tradicionais de plantas e seus produtos têm aumentado gradualmente nos últimos anos. Isso pode ser evidenciado pelo número de publicações nessa área (RODRIGUES, 2016). Nessa região, onde o bioma prevalente é a caatinga, existe uma vegetação ameaçada e, ao mesmo tempo, uma fonte valiosa de recursos naturais pouco estudados (AGRA et al., 2007; MAGALHÃES et al., 2020).

Entre as plantas de ampla ocorrência no semiárido, destaca-se a família Apocynaceae, considerada uma das 10 maiores famílias de angiospermas do reino vegetal e, de acordo com classificação recente, essa família possui 424 gêneros com mais de 5100 espécies, distribuídas em cinco subfamílias (BHADANE et al., 2018; HAMMADI et al., 2022). No Brasil, as subfamílias Rauvolfioideae, Apocynoideae e Asclepiadoideae são apresentadas com um total de 975 espécies e 98 gêneros (SILVA-MONTEIRO et al., 2017). Essas espécies são fontes de

constituintes químicos bastante usados na medicina contemporânea (OLIVEIRA e ALMEIDA, 2016).

Mandevilla Lindl. é o maior gênero neotropical da subfamília Apocynoideae, com cerca de 190 espécies, distribuídas do México até a Argentina, das quais 66 foram relatadas no Brasil (SIMÕES et al., 2004; DA SILVA-MONTEIRO et al., 2017; FLORA E FUNGA DO BRASIL 2022). Seus representantes destacam-se pelo potencial paisagístico e medicinal e alguns são utilizados na medicina tradicional no tratamento contra venenos de cobras, cicatrização de feridas e inflamações da pele (MORALES et al., 2020). Estudos mostram que, no extrato das raízes tuberosas de espécies de *Mandevilla*, foram encontrados compostos terpenoides, bem como esteroides do tipo pregnano (C₂₁) e seco-pregnano (NIERO, 2002; MARTINS e ALVES, 2008; HAMMADI et al., 2022).

As informações obtidas a partir de estruturas químicas de espécies e gêneros diferentes foram e continuam sendo utilizadas em estudos quimiotaxonômicos, ou seja, para determinar os padrões filogenéticos químicos de uma determinada família (SCOTTI, et al., 2012; MENEZES, et al, 2021).

A quimiofenética visa descrever uma série de metabólitos secundários especializados em um determinado táxon (ZIDORN, 2019). Na era da inteligência artificial (IA), alguns algoritmos têm contribuído para o desenvolvimento de novos estudos em produtos naturais, incluindo níveis metabólicos (SALDÍVAR-GONZÁLEZ et al., 2022). Entre eles, mapas auto-organizados (SOMs) têm sido aplicados com sucesso para revelar semelhanças químicas ao longo de diferentes táxons de plantas e classes de metabólitos (MENEZES et al., 2021).

Para além dos estudos químicos, atualmente há um crescente interesse na descoberta de moléculas bioativas com potencial anti-inflamatório, visto que a produção de citocinas, prostaglandinas, óxido nítrico e outros fatores pró-inflamatórios estão relacionados ao agravamento de muitas doenças (SANTOS et al., 2022). Os macrófagos apresentam papel essencial na iniciação e manutenção da inflamação, por serem fonte de mediadores inflamatórios. Diante disto, investigações farmacológicas têm utilizado macrófagos ativados para a realização de *screening* e identificação de novos compostos com potencial anti-inflamatório (PEREIRA et al., 2020).

M. dardanoi M.F. Sales, Kin.-Gouv. & A.O. Simões é uma espécie endêmica do semiárido brasileiro e não há estudos sobre sua composição química ou atividade farmacológica (DA SILVA-MONTEIRO et al., 2017).

Considerando o potencial medicinal das espécies de *Mandevilla*, o presente estudo teve como objetivos realizar uma revisão abrangente dos pregnanos glicosídeos (PG) obtidos de Asclepiadoideae, empregando uma abordagem interdisciplinar, que combina quimiofenética

com análise de dados de redes neurais, para identificar espécies promissoras e compostos bioativos, bem como isolar novos derivados pregnanos bioativos das raízes de *M. dardanoi* e avaliar a citotoxicidade e a atividade anti-inflamatória das moléculas elucidadas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Considerações sobre a família Apocynaceae

A família Apocynaceae pertence à ordem Gentiales e subclasse Asteridae (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002). É uma das famílias mais representativas das Angiospermas, com mais de 424 gêneros e cerca de 5100 espécies, de distribuição marcadamente tropical e subtropical em todo mundo (JUDD et al., 2009; SANTOS, et al., 2013; HAMMADI et al., 2022).

Apocynaceae apresenta morfologia floral peculiar dentro das Angiospermas, fator investigado tanto do ponto de vista evolutivo, quanto taxonômico (MATOZINHOS e KONNO, 2011; FLORA E FUNGA DO BRASIL, 2022).

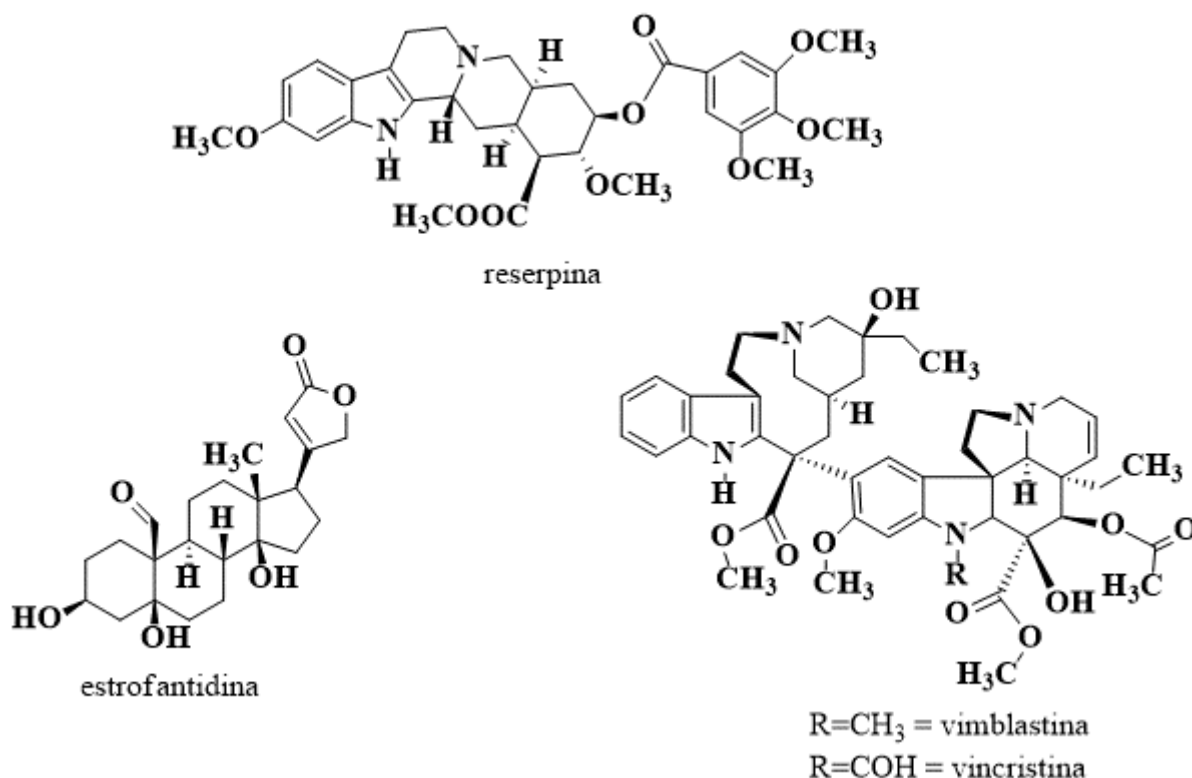
No Brasil, as subfamílias Rauvolfioideae, Apocynoideae e Asclepiadoideae são apresentadas com um total de 975 espécies e 98 gêneros (DA SILVA-MONTEIRO et al., 2017), sendo alvos de estudos principalmente em tratamentos taxonômicos para floras locais e, mais recentemente, em estudos filogenéticos (SOUZA; LORENZI, 2008; MATOZINHOS; KONNO, 2011).

Muitas espécies desta família são utilizadas na medicina moderna, destacando-se principalmente os gêneros *Allamanda*, *Alstonia*, *Aspidosperma*, *Catharanthus*, *Hancornia*, *Himatanthus*, *Mandevilla*, *Nerium*, *Plumeria*, *Rauwolfia* e *Strophantus* (ABDEL-SATTAR et al., 2022). São plantas de hábitos variados, ervas, arbustos, árvores, com ocorrência tanto nos campos quanto nas matas (MOREIRA et al., 2004; BHADANE et al., 2018).

As espécies de Apocynaceae se destacam especialmente por serem produtoras de substâncias bioativas, como iridoides, flavonoides, ácido fenólicos, alcaloides (especialmente os alcaloides indólicos), triterpenos, esteroides, glicosídeos cardioativos e compostos pregnanos (BHUSHAN et al., 2018).

Alguns exemplos de substâncias isoladas desta família, já bem descritas na literatura são: o glicosídeo cardiotônico de *Strophantus* (estrofantidina, figura 1), os alcaloides isolados do gênero *Catharanthus* (vimblastina e vincristina, figura 1), que possuem ação antitumoral, e o alcaloide de *Rauwolfia*, (reserpina, figura 1), utilizado contra casos de hipertensão e arritmias cardíacas (SIMÕES et al., 2017).

Figura 1: Fórmulas estruturais dos compostos estrofantidina, reserpina, vincristina e vimblastina, isoladas de espécies da família Apocynaceae.



(SIMÕES et al., 2017)

2.2 Considerações sobre o gênero *Mandevilla* Lindl.

O gênero *Mandevilla* Lindl. é também descrito em publicações com o nome *Macrosiphonia*. Esta sinonímia se deve ao preceito de monofiletismo (espécies derivadas de uma única espécie ancestral) (SIMÕES, 2007), e é o maior gênero neotropical da família Apocynaceae, com cerca de 190 espécies distribuídas do México até a Argentina. As flores dessas espécies são vistosas e coloridas, o que lhes confere potencial ornamental (COUTINHO e LOUZADA, 2022).

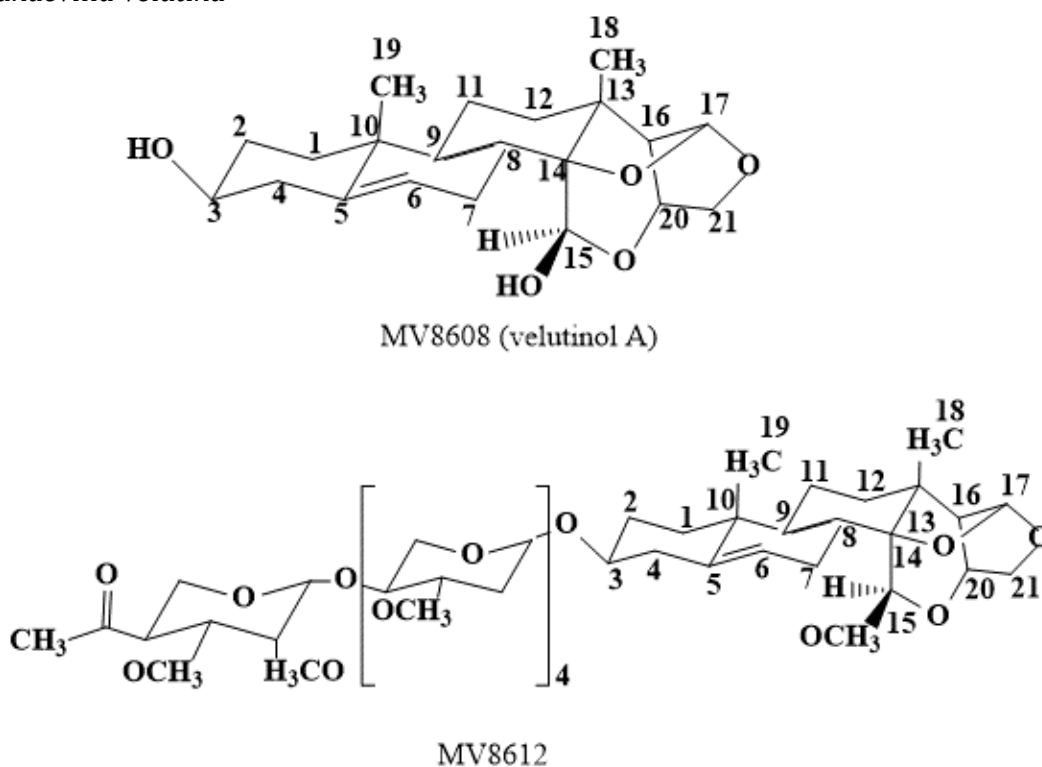
Esse gênero está bem representado no Brasil, e pelo menos 66 espécies já foram registradas, principalmente em áreas de Mata Atlântica, em áreas costeiras, conhecidos como "restingas", solos rochosos e inselbergs (VITAL, 2019). Espécies de *Mandevilla* sofrem adaptações morfológicas e anatômicas em resposta a condições de seca e luz solar intensa, tais como a presença de um xilopódio e folhas decíduas ou xeromórficas (ENDRESS et al., 2014). É representado por espécies de pequeno porte, arbustos ou subarbustos. São utilizadas tradicionalmente com fins medicinais, principalmente os extratos das raízes tuberosas e o látex,

para tratar asma e infecções cutâneas. Seu potencial anti-inflamatório e propriedades cicatrizantes também são relatados na literatura (SIMÕES, 2004).

Destacam-se três espécies desse gênero, sendo duas utilizadas na medicina popular contra mordidas de cobras e como anti-inflamatório, são elas: *Mandevilla velutina* e *Mandevilla illustris* (NEIRO et al., 2002) e a terceira, *Mandevilla velame*, que é utilizada como anti-inflamatória, analgésica, antissifilítica e antirreumática na medicina tradicional (RIBEIRO, 2010).

Calixto et al. (1988), isolaram os compostos pregnanos MV 8608 (chamado em outros estudos de velutanol A) e MV 8612 (figura 2) a partir do extrato diclorometânico dos rizomas de *Mandevilla velutina*.

Figura 2: Fórmulas estruturais com compostos MV 8608 (velutanol A) e MV 8612 isolados de *Mandevilla velutina*



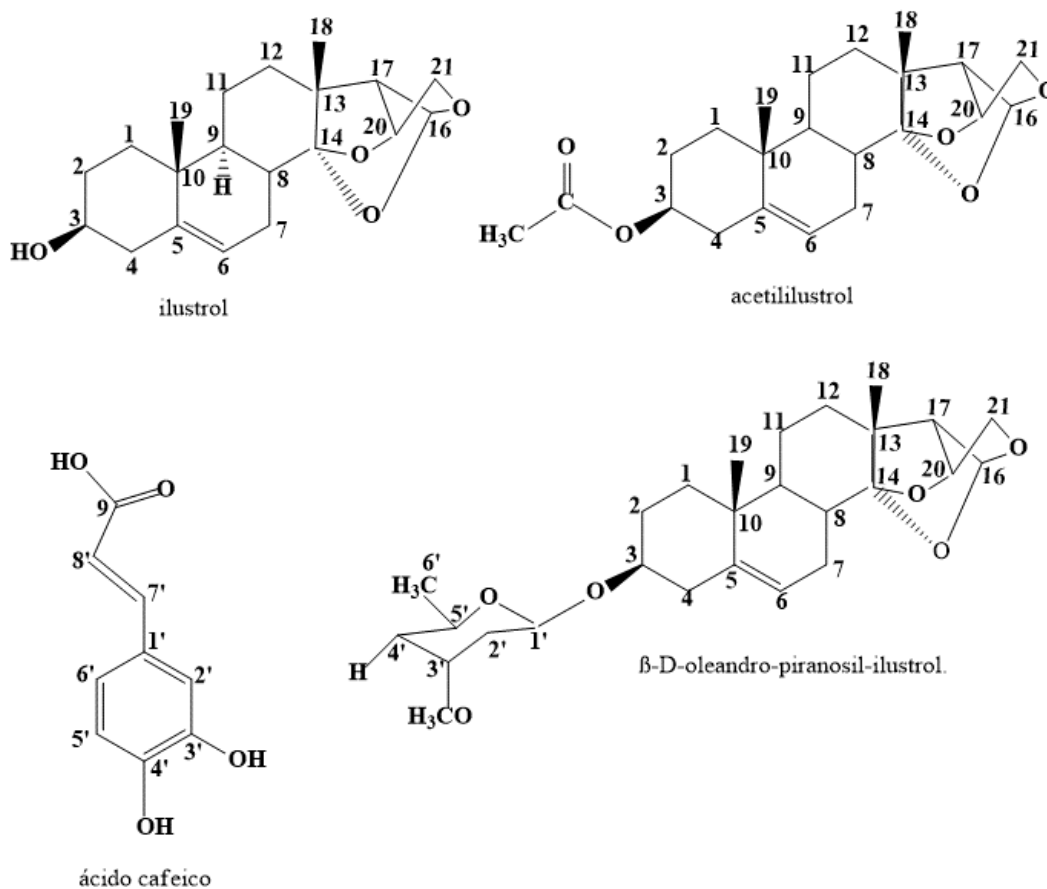
(CALIXTO et al., 1988)

Mattos et al. (2006) mostrou em seu estudo que o composto velutanol A apresentou potencial antinociceptivo periférico a partir das vias de sinalização intracelular envolvidas na nocicepção periférica, produzida por bradicinina, prostaglandinas E_2 e acetato de forbolmiristato (PMA), frente à modelos animais.

Posteriormente, os compostos pregnanos MV 8608 (velutinol A) e MV 8612 foram alvos de estudos que avaliaram a atividade antinociceptiva e anti-inflamatória, demonstrando que as mesmas foram capazes inibir contrações induzidas por cininas em útero de cobaias *in vitro*, bem como apresentaram potencial antinociceptivo e anti-inflamatório frente à quadro de cistite hemorrágica (CH) causada por quimioterapia com ciclofosfamida (CYP), em modelos animais (SANTOS et al., 2010).

A espécie *Mandevilla illustris* ocorre nos estados de São Paulo, Goiás, Mato Grosso e, principalmente em Minas Gerais. Conhecida popularmente como Purga-do-Campo ou Rosa-do-Campo apresenta-se como erva ou subarbusto com até 80 cm de altura e possui raízes tuberosas (RIBEIRO, 2010). Em estudo realizado por Niero (2000), a partir do extrato dos rizomas frescos, preparado com acetato de etila e submetido à cromatografia em coluna, utilizando como solvente o diclorometano, tornou possível o isolamento dos compostos ilustról, ácido cafeico, acetililustról e β -D-oleandro-piranosil-ilustról (figura 3).

Figura 3: Fórmulas estruturais dos compostos ilustról, ácido cafeico, acetililustról e β -D-oleandro-piranosil-ilustról.



(NIERO, 2000)

No mesmo estudo foi testada a atividade anti-inflamatória desses compostos em modelos de edema de pata causado por carragenina e dextrana em animais. Os resultados mostraram que esses compostos apresentaram percentuais de inibição do edema semelhantes aos fármacos indometacina e ibuprofeno, usados na clínica (NIERO, 2000).

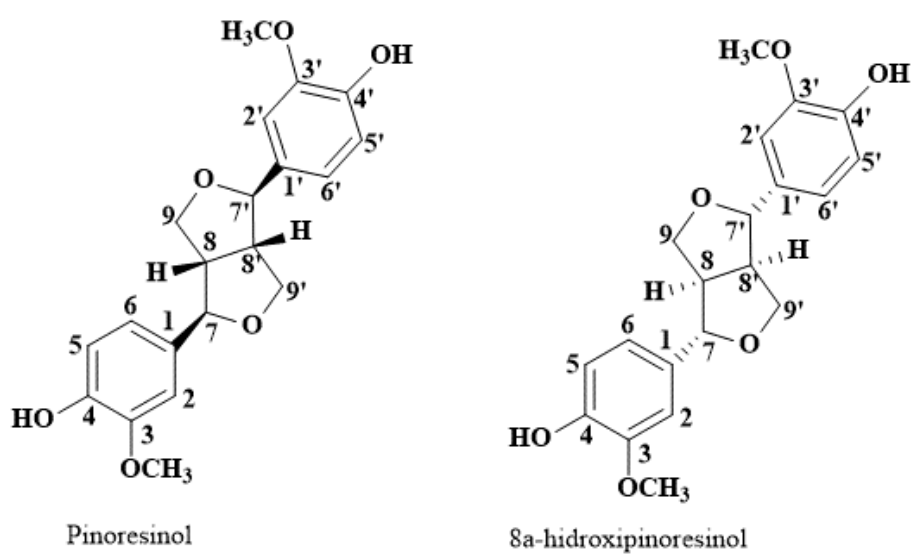
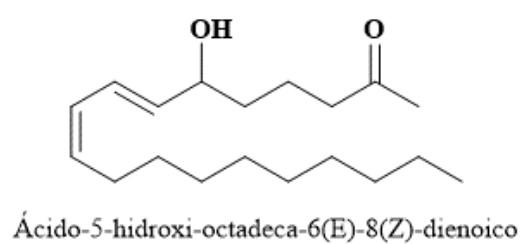
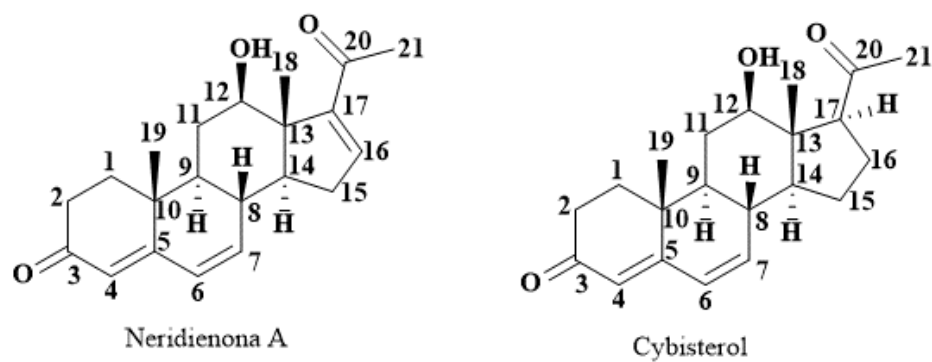
Pesquisa realizada por Violante et al. (2008), com a espécie *Mandevilla velame*, relatou por análise qualitativa, a presença alcaloides, flavonoides e taninos, bem como a ausência de cumarinas.

Ribeiro et al. (2010), estudaram os efeitos biológicos do extrato hidroetanólico de *Mandevilla velame* em modelo animal. Os resultados sugeriram atividade anti-inflamatória sistêmica e tópica, quando avaliados os testes de edema de pata, mostrando atividade tanto na dor de origem inflamatória como neurogênica, nos experimentos de nocicepção, atuando ainda como bloqueador da hipertermia induzida por levedura de cerveja, demonstrando ação antipirética.

Outra espécie desse gênero, que também foi alvo de estudos, é *Mandevilla petraea* (A. St.-Hil.) Kuntze, uma planta popularmente conhecida como "velame". A infusão da sua raiz é usada na medicina popular em Mato Grosso do Sul e comercializada por raizeiros, sendo indicada para tratamento de inflamações, através da ingestão do chá de suas raízes tuberosas (DE ASSIS JUNIOR; GARCEZ e GARCEZ, 2013).

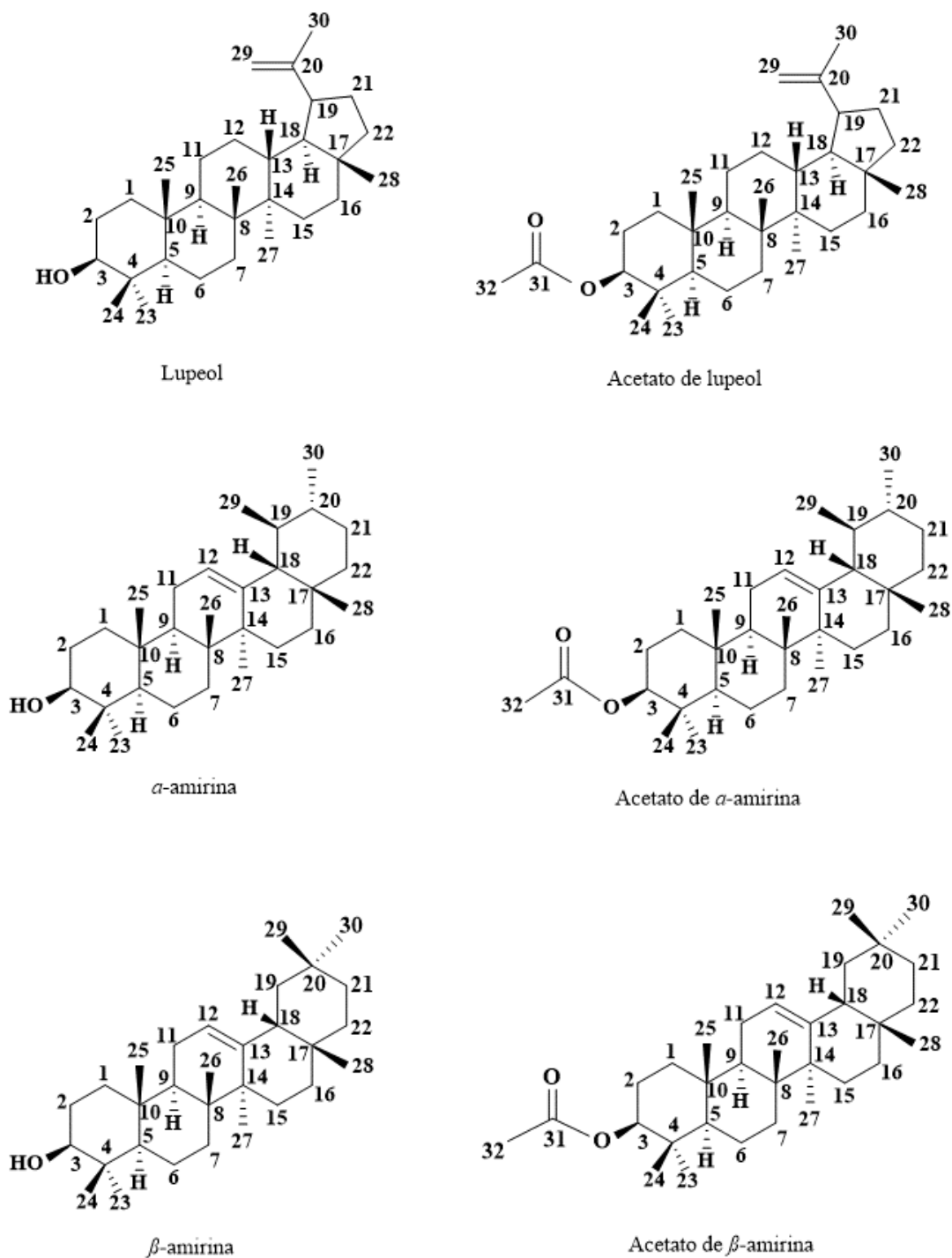
De Assis Junior e colaboradores (2013), realizaram investigação fitoquímica das frações retiradas com solvente acetato de atila, a partir de extrato hidroalcoólico das raízes desta espécie, levando à identificação de 17 compostos pertencentes a quatro classes diferentes: dois pregnanos [12- β -hidroxipregna-4,6,16-trieno-3,20-diona (neridienona) e 12 β -hidroxipregna-4,6-dieno-3,20-diona (cybisterol)], um ácido hidroxilado (5-hidroxi-octadeca-6(E)-8(Z)-ácido dienóico), dois lignoides (pinoresinol e 8a-hydroxypinoresinol) (figura 4), dez triterpenoides pentacíclicos (figuras 5a e 5b), e dois esteroides (figura 6).

Figura 4: Compostos isolados de *Mandevilla petraea*



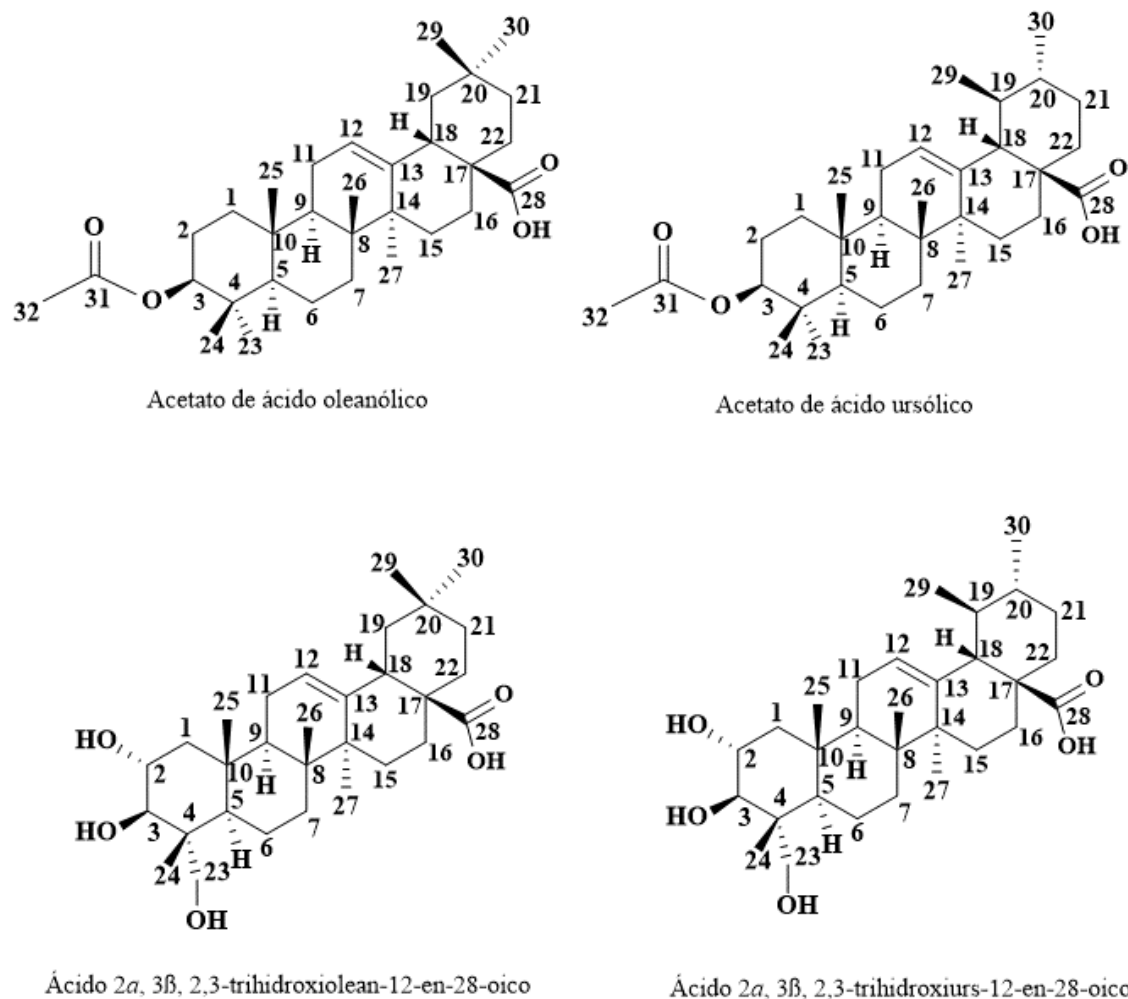
(DE ASSIS JUNIOR E COLABORADORES, 2013.

Figura 5a: Triterpenos pentacíclicos isolados de *Mandevilla petraea*



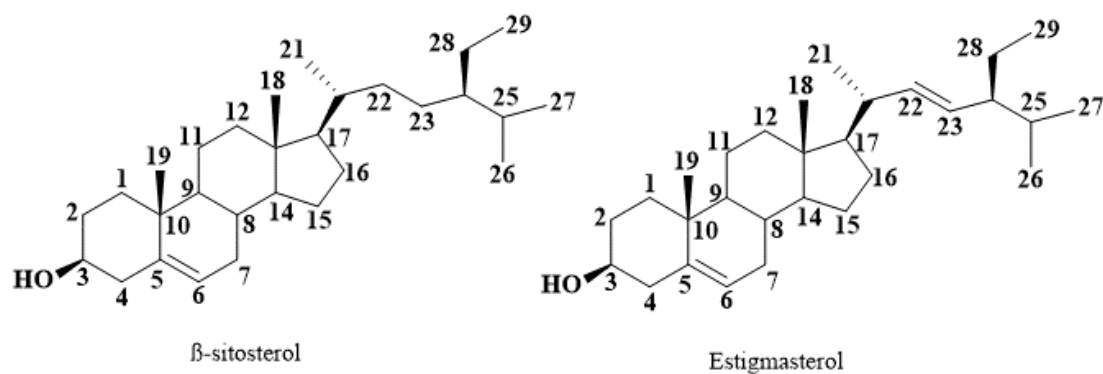
(DE ASSIS JUNIOR E COLABORADORES, 2013).

Figura 5b: Triterpenos pentacíclicos isolados de *Mandevilla petraea*



(DE ASSIS JUNIOR et al., 2013).

Figura 6: Esteroides isolados de *Mandevilla petraea*



(DE ASSIS JUNIOR E COLABORADORES, 2013).

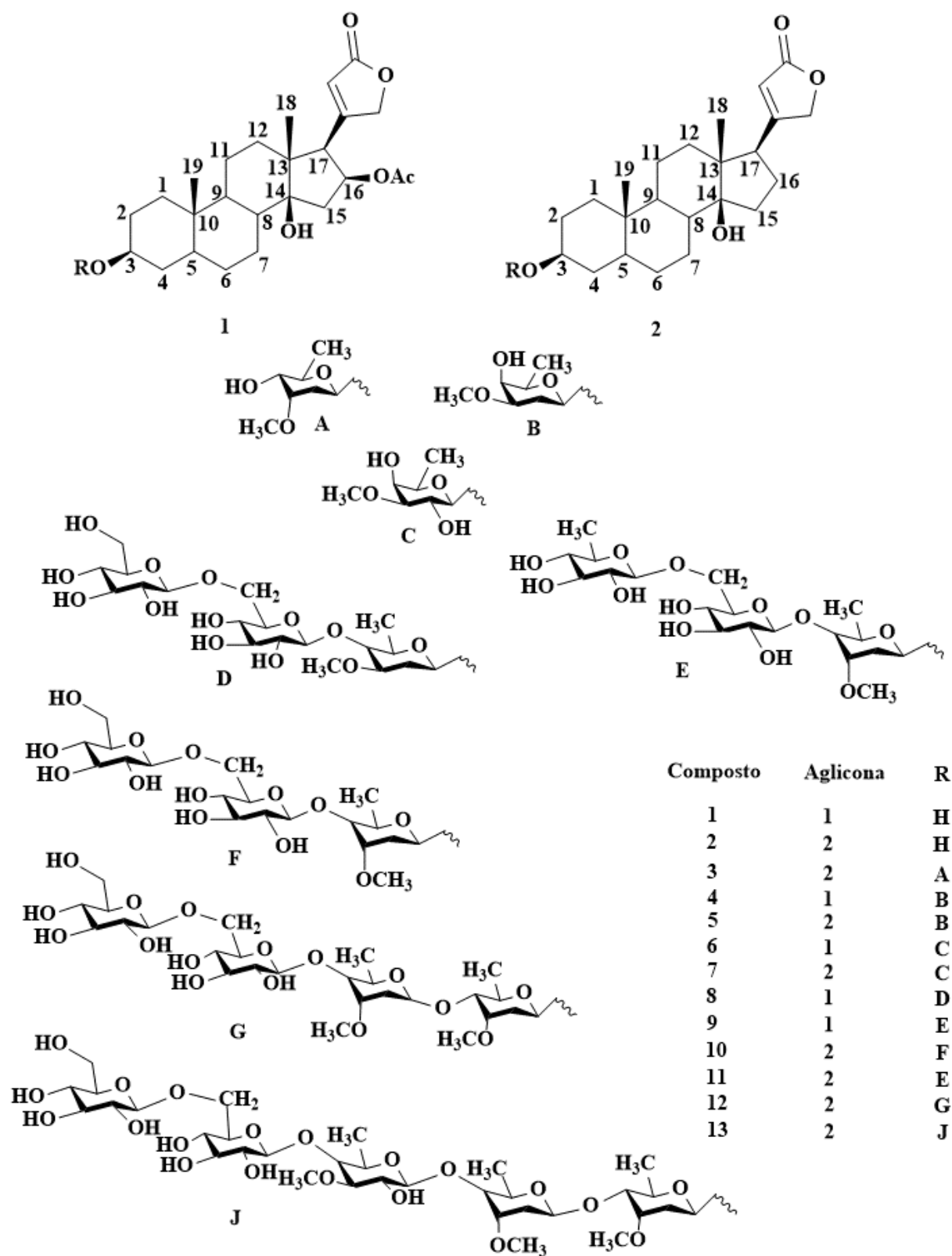
Em estudo realizado por De Assis Junior (2012), diferentes concentrações dos extratos aquoso e etanólico (1,25 mg/mL; 2,5 mg/mL e 5 mg/mL), obtidos da raiz de *M. petraea*, foram

utilizados para tratar as larvas de *Drosophila melanogaster*, para investigar a atividade genotóxica dos extratos, a partir do teste SMART (DRAF et al., 1998). Os extratos foram utilizados para tratar as larvas de *D. melanogaster* de terceiro estágio de desenvolvimento, obtidas dos cruzamentos padrão (ST) e de alta bioativação (HB). Os resultados mostraram que os dois extratos apresentaram atividade genotóxica, a qual é acentuada após sua metabolização.

Em um estudo realizado por Martins (2014), a atividade anticâncer de *M. petraea* foi avaliada frente à diferentes linhagens de células neoplásicas. No estudo foi utilizado o extrato etanólico das raízes e fases provenientes da partição. Os resultados mostraram que a fase acetato de etila foi a que apresentou melhor atividade antiproliferativa, corroborando com os resultados de De Assis Junior (2013), já citado anteriormente, que mostrou a presença de compostos pregnanos isolados desta mesma fase. Esses resultados podem sugerir que o potencial anticâncer esteja relacionado com presença destes pregnanos.

A classe de compostos pregnanos é precursora dos cardenolídeos, um importante grupo de substâncias que abrange alguns com propriedades tóxicas (BHUSHAN, et al., 2018). Cabrera et al. (1993), isolaram a partir do extrato etanólico bruto das raízes da espécie *Mandevilla pentladiana*, os compostos oleandrigenina (1), digitoxigenina (2) e 11 derivados [mono, tri e tetra-pentaglicosídicos (3-13)], que podem ser visualizados na figura 7.

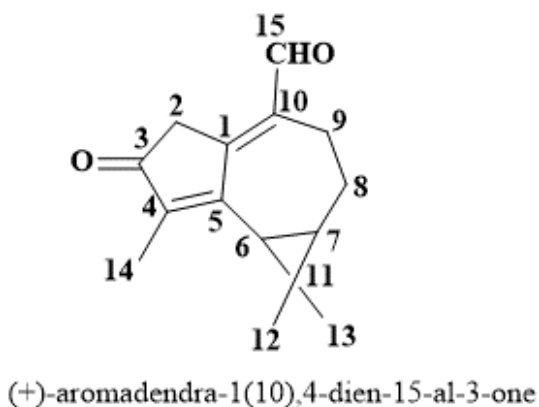
Figura 7: Compostos cardenolídeos isolados de *Mandevilla pentladiana*



(CABRERA et al., 1993).

Outro estudo realizado por Cabrera et al. (1993), também utilizando extrato etanólico bruto das raízes de *Mandevilla pentladiana*, tornou possível o isolamento do sesquiterpeno (+)-aromadendra-1(10),4-dien-15-al-3-one (Figura 8).

Figura 8: Sesquiterpeno isolado de *Mandevilla pentladiana*



(CABRERA et al., 1993).

Ferreira et al. (2016), avaliou a atividade antioxidante do extrato hidralcoólico, bem como das fases particionadas, provenientes das folhas de *Mandevilla moricandiana*. Os resultados mostraram um potencial antioxidante significativo tanto do extrato hidroalcoólico quanto das fases diclorometano e acetato de etila. Essas atividades foram associadas à presença sugestiva das substâncias quercetina-3-*O*-pentosil-hexosídeo, luteolina-7-*O*-pentosil-hexosídeo, quercetina-3-glicuronil-pentosídeo e luteolina-7-*O*-hexosídeo, no extrato hidralcoólico, quando comparadas com substâncias padrões vistas em cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (CLAE-EM). Essas substâncias são relatadas na literatura por atuarem no tratamento de condições associadas a estresse oxidativo (FROMBAUM et al., 2012).

2.3 Considerações sobre a espécie *Mandevilla dardanoi* M. F. Sales, Kin-Gouv. & A. O. Simões:

Reino: Plantae
Phylum: Thacheophyta
Classe: Magnolipsida
Ordem: Gentinales
Família: Apocynaceae
Subfamília: Apocynoideae

Gênero: *Mandevilla*

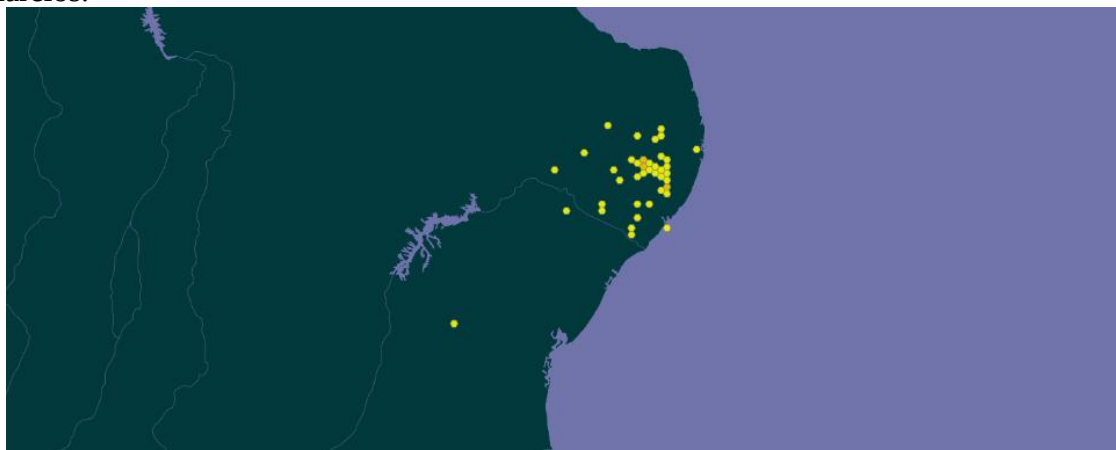
Algumas plantas gênero *Mandevilla* podem apresentar hábito arbustivo e depois tornar-se “arbustos lianescentes”, como observado em *M. dardanoi* (figura 9) (MARTINS e ALVES, 2008). Esta espécie é considerada endêmica dos inselbergues ocorrentes na formação geológica no nordeste do Brasil, mais precisamente nos estados Paraíba e, mais frequentemente, Pernambuco (figura 10) (SILVA-MONTEITO et al., 2017). De acordo com as buscas na literatura, até a execução desta pesquisa, não havia nenhum estudo fitoquímico e/ou farmacológico a partir dessa espécie.

Figura 9: a) Aspecto geral de uma das ilhas na qual a espécie pode ser coletada (Serra do Jatobá- Serra Branca-PB); b-g) *Mandevilla dardanoi*: b) hábito; c e d) detalhe da flor; e) flores e frutos; f) frutos maduros; g) sementes



(SILVA-MONTEITO, et al., 2017)

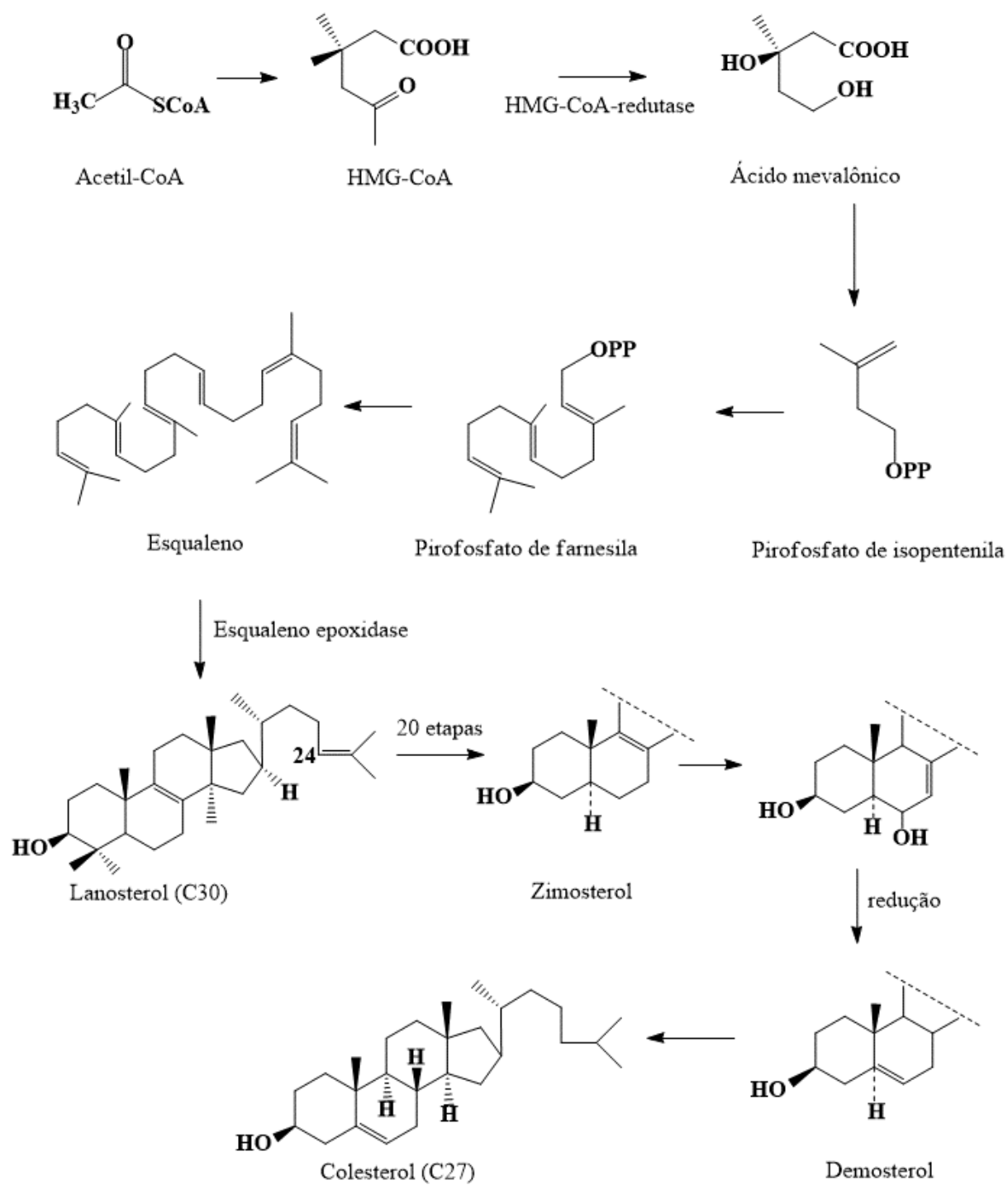
Figura 10: Distribuição geográfica de *M. dardanoi* no Brasil, representada pelos pontos amarelos.



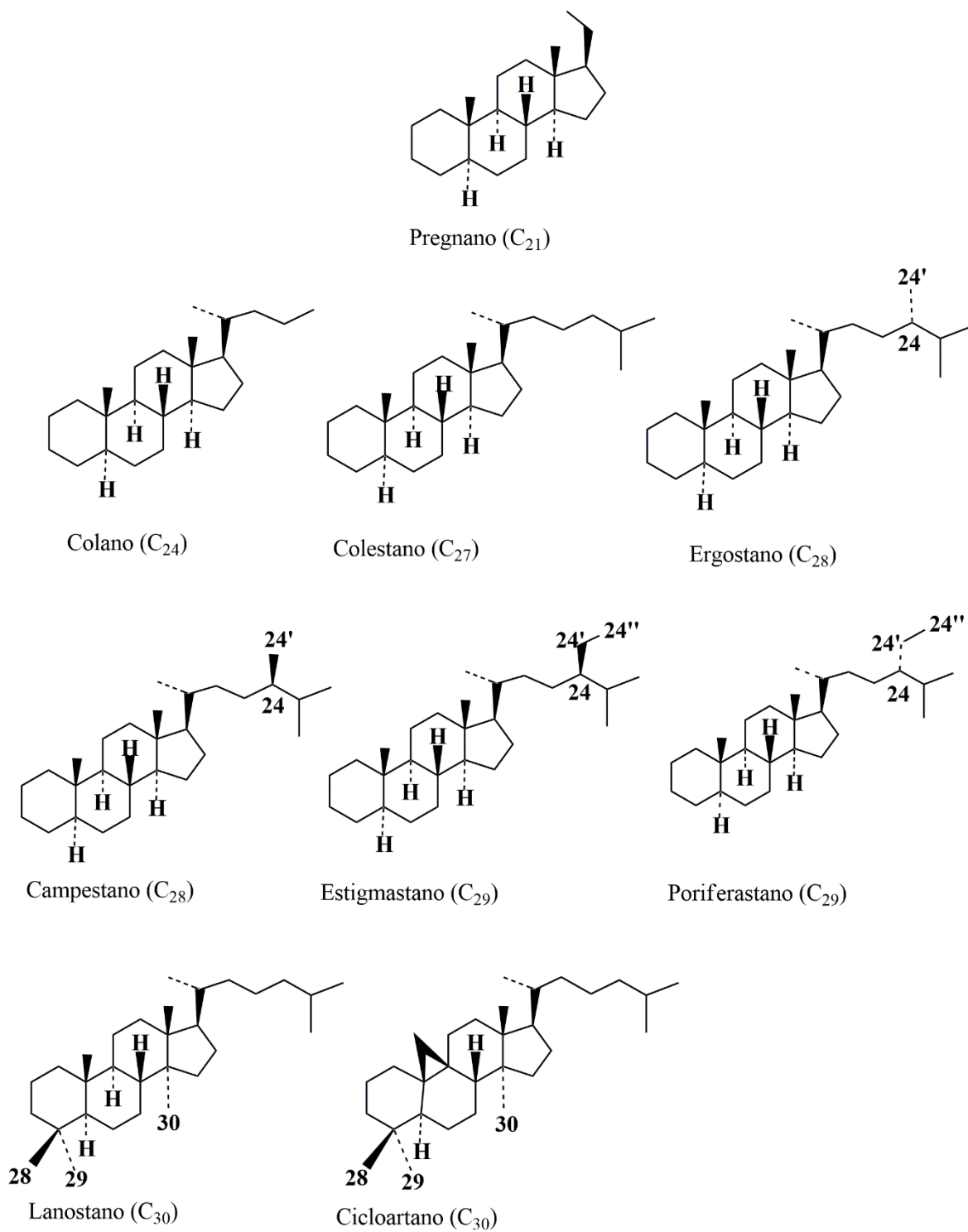
Fonte: Global Biodiversity Information Facility (<http://www.gbif.org/species/3618493>), acesso em 17/07/23.

2.4 Considerações sobre esteroides:

Os esteroides são triterpenoides modificados que possuem um sistema de anel tetracíclico ciclopentanoperidrofenantreno (três ciclohexanos e um ciclopentano). Esses compostos são formados a partir da acetil CoA via biossíntese do colesterol (DEWICK, p. 35, 2002). Apresentam 27 átomos de carbono e são os composto mais representativos deste grupo de moléculas (figura 11) (HALBE, 1993). Sua estrutura fundamental pode sofrer modificações, especialmente na cadeia lateral, dando origem a uma ampla gama de produtos naturais biologicamente importantes, a exemplo das saponinas esteroidais e dos glicosídeos cardioativos. A nomenclatura sistemática dos diferentes esteroides é baseada em uma série de hidrocarbonetos de estrutura fixa, que podem variar de acordo com as substituições, incluindo os núcleos: estrano, androstano, pregnano, colano, colestano, ergostano, campestano, estigmastano e poriferastano, lanostano e cicloartano (figura 12) (DEWICK, p. 248, 2002).

Figura 11: Biossíntese do colesterol

(HALBE, 1993; DEWICK, 2002).

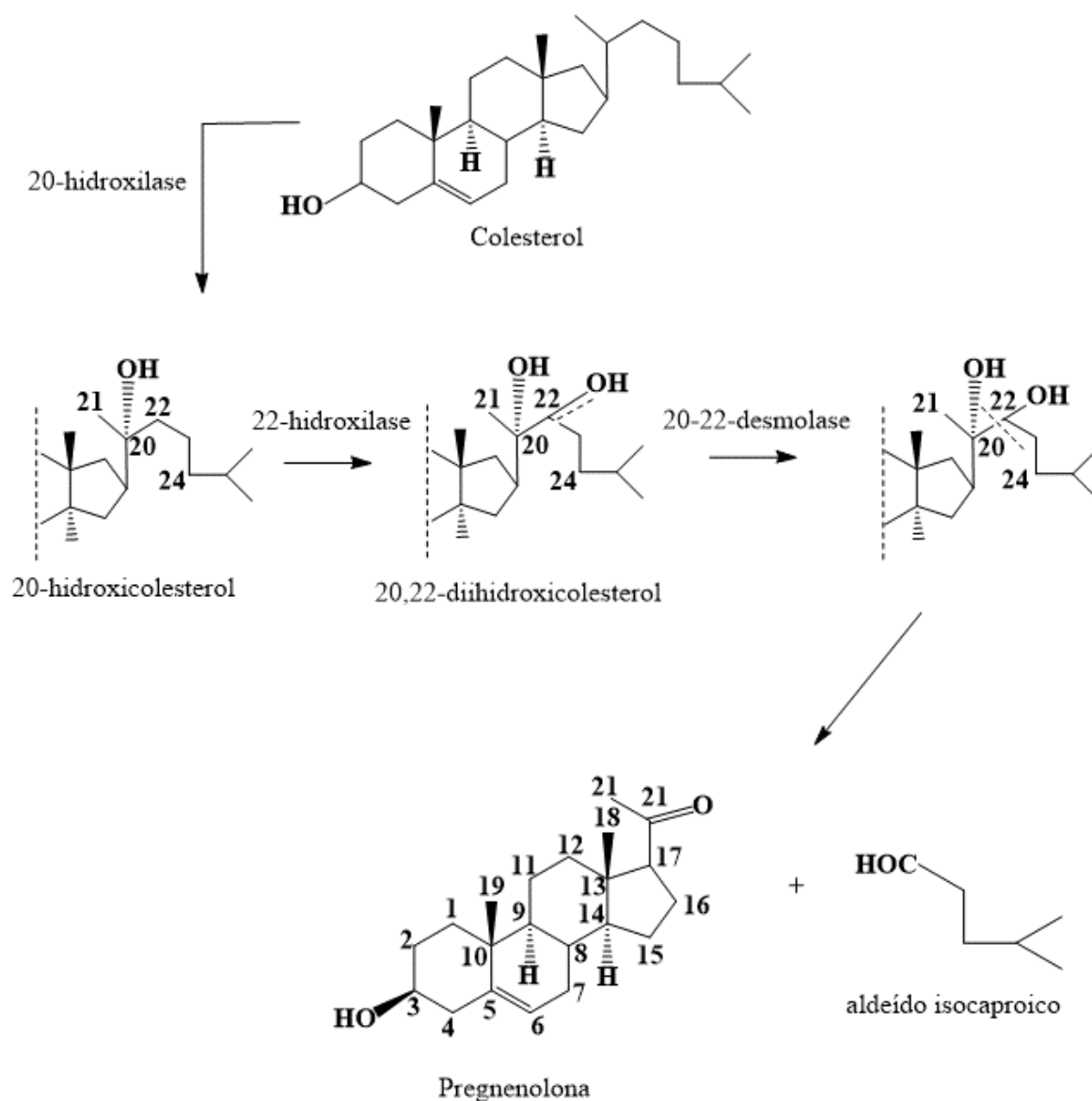
Figura 12: Diferentes tipos de esqueletos esteroidais:

(DEWICK, 2002)

2.4.1 Considerações sobre esteroides da classe pregnano:

Os esteroides pregnanos são uma importante classe de compostos bioativos, que apresentam variadas atividades farmacológicas, o que tem proporcionado um elevado interesse no desenvolvimento de novos fármacos (HAMMADI et al., 2022).

Após cerca de 30 reações enzimáticas, que levam à formação do colesterol, este por sua vez sofre perda de sua cadeia lateral a partir da enzima 20-22-desmolase, dando origem a um produto com 21 átomos de carbono, chamado de pregnenolona (figura 13) (LEDNICER et al., 2009). Essa estrutura apresenta os anéis A, B, C (ciclohexanos) e D (ciclopentano), comum aos demais esteroides, bem como duas metilas ligadas aos carbonos C-10 e C-13, uma ligação dupla entre os carbonos C-5 e C-6, uma hidroxila ligada ao carbono C-3 do anel A e um grupo acetil ligado ao carbono C-17. Quando na presença de unidades osídicas, ligadas geralmente ao oxigênio do carbono C-3, esses compostos são denominados pregnanos glicosídeos (FERNANDES et al., 2003; LEDNICER et al., 2009).

Figura 13: Resumo da biossíntese do esqueleto pregnenolona

(HALBE, 1993; DEWICK, 2002).

Alterações na parte terminal da molécula podem levar à formação de pregnanos de estrutura modificada, a exemplo dos compostos velutinol e ilustrol (mostrados na figura 2 e 3). Os pregnanos glicosídeos, por exemplo, são usados na medicina tradicional chinesa e são isolados principalmente de espécies da família Asclepiadaceae. Apresentam importantes atividades anticancerígenas, antiinflamatória, antiasmáticas, antifúngicas, entre outras (WILLIAMS et al, 2012).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Contribuir para o conhecimento da família Apocynaceae, bem como do gênero *Mandevilla*, através do isolamento e elucidação de novos pregnanos bioativos, das raízes de *M. dardanoi*.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o estado da arte relacionado aos glicosídeos pregnanos (PG) obtidos de Asclepiadoideae, através de uma revisão da literatura;
- Aplicar uma abordagem interdisciplinar para indicar espécies ricas em PG a partir de quimiofenética aliada à análise de dados de redes neurais;
- Extrair, isolar e purificar novos PGs encontrados na espécie *M. dardanoi*;
- Caracterizar os constituintes químicos isolados por espectrometria de massas de alta resolução e ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C e bidimensionais;
- Avaliar o potencial anti-inflamatório dos novos PGs isolados, através da inibição da produção de óxido nítrico e de citocinas pró-inflamatórias, utilizando macrófagos da linhagem J774 estimulados.

4 PARTE EXPERIMENTAL

A parte experimental a seguir corresponde à metodologia utilizada para avaliação do estado da arte relacionado aos PGs obtidos de Asclepiadoideae, através de uma revisão da literatura e aplicação de uma abordagem interdisciplinar para indicar espécies ricas em PGs, a partir de quimiofenética aliada à análise de dados de redes neurais. Esta etapa da pesquisa proporcionou a produção do manuscrito: **“Subfamília Asclepiadoideae (Apocynaceae): Etnofarmacologia, Atividades Biológicas e Quimiofenética Baseadas em Glicosídeos Pregnanos”**.

4.1 Critérios de pesquisa e construção da base de dados

Foi efetuada uma compilação abrangente de PGs da subfamília Asclepiadoideae (Apocynaceae) para criar um conjunto de dados sobre as espécies produtoras de pregnanos. Estas referências englobam estudos sobre isolamento, caracterização estrutural por RMN e investigações biológicas. A pesquisa foi efetuada nas seguintes bases de dados: Science Direct, PubMed, SciFinder e Google Scholar. Foram utilizados os seguintes termos de pesquisa: "Apocynaceae," "Asclepiadoidea," "química," "metabolitos secundários," "pregnanos glicosídeos," e "esteroides glicosídeos." Adicionalmente, os nomes de cada gênero classificado dentro das três principais tribos de Asclepiadoideae foram incluídos como termos de pesquisa, tanto isoladamente como em combinação com os termos anteriormente mencionados, concentrando-se nos campos do título e do resumo. Após a eliminação de duplicatas e avaliação do conteúdo, um total de 122 referências, variando de 1984 a outubro de 2022, foram incluídas no estudo. Os dados encontrados ficarão acessíveis através da ferramenta Sistematrix (<https://sistematrix.ufpb.br>).

4.2 Mapas auto-organizáveis (SOMs)

4.2.1 Geração de descritores moleculares

Para permitir a análise de estruturas químicas, todas as estruturas de PGs foram convertidas em códigos do Sistema Simplificado de Entrada de Linha de Entrada Molecular (SMILES) (FILLBRUNN et al. 2017). Estes códigos SMILES serviram como dados de entrada para o software Knime, que facilitou a conversão das estruturas químicas em representações canônicas personalizadas no formato Structure-Data File (SDF). As estruturas químicas compiladas, correspondentes às ocorrências botânicas, foram então submetidas à geração de 70 descritores moleculares utilizando o software alvaDesc (MAURI e BERTOLA 2022).

(<https://www.alvascience.com>). Estes descritores fornecem representações quantitativas de várias propriedades moleculares e foram utilizados para análises subsequentes.

4.2.2 Obtenção de SOMs

Os descritores moleculares calculados foram utilizados como dados de entrada para o software SOM Toolbox 2.0 (VESANTO, 1999). O conjunto de dados, constituído pelos descritores moleculares, foi apresentado à rede neural SOM sem quaisquer ajustes prévios. Subsequentemente, o grupo de dados foi particionado com base nas regiões definidas pelos vetores de peso no mapa SOM, durante cada fase de treino. A precisão da previsão dos conjuntos particionados e a precisão geral da previsão do composto foram avaliadas conforme relatado anteriormente (CAVALCANTI et al., 2021).

4.2.3 Reconstrução filogenética

As sequências representativas do gene da ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase subunidade grande (rbcL) de Asclepiadoideae foram obtidas do GenBank e alinhadas utilizando o software MAFFT (KATO et al., 2002), otimizado para um alinhamento global preciso (opção "G-INS-i"). O alinhamento resultante foi usado para gerar uma árvore bayesiana usando o software MrBayes 3.2.6 (RONQUIST et al., 2012) com as seguintes configurações: modelo de substituição: GTR; variação de taxa: gama; categorias de gama: 4; comprimento da cadeia: 1.100.000; frequência de subamostragem: 200; burn-in: 100.000.

A árvore resultante foi enraizada e visualizada com o software FigTree v1.4.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

A parte experimental descrita abaixo, corresponde ao estudo fitoquímico, isolamento e elucidação estrutural dos novos PGs de *Mandevilla dardanoi*. Esta etapa do trabalho permitiu a produção do manuscrito: “**Novos glicosídeos pregnanos de *Mandevilla dardanoi* e sua atividade anti-inflamatória**”.

4.3 Métodos de purificação, identificação e caracterização dos metabólitos secundários

4.3.1 Pré-purificação dos compostos

Para pré-purificação dos compostos foram utilizadas colunas preparadas com Gel Sephadex LH-20 (Merck, Kenilworth, NJ, EUA) e, posteriormente, cartuchos comerciais de sílica funcionalizada com octadecilsilano ISOLUTE® C18 (EC) 500 mg/6 mL.

4.3.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

As análises por CLAE em escala analítica foram efetuadas em cromatógrafo Shimadzu Prominence, (fluxo de 600 $\mu\text{L}/\text{min}^{-1}$) e injeções de 20 μL , utilizando uma coluna analítica de fase reversa (YMC, 250 x 4,6 mm e tamanho de partícula de 5 μC18). A análise por CLAE preparativa foi efetuada em equipamento Shimadzu Proeminence e coluna de fase reversa (YMC, 250 x 21,2 mm e tamanho de partícula de 5 μC18). Os solventes utilizados foram acetonitrila (grau HPLC, Tedia®, Cincinnati, OH, EUA) e água ultrapura, obtida com um Milli-Q (Millipore®).

4.3.3 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

As experiências de RMN 1D e 2D foram efetuadas com Bruker Avance III HD (400 e 100 MHz para ^1H e ^{13}C , respectivamente) e Varian NMR (500 e 125 MHz para ^1H e ^{13}C , respectivamente). O solvente utilizado para as análises foi piridina deuterada ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$). Os picos residuais do solvente foram tomados como pontos de referência e os desvios químicos foram indicados em ppm (partes por milhão) e constantes de acoplamento (J) em Hz. As multiplicidades no espectro de RMN de ^1H foram indicadas segundo as convenções: *s* (singleto), *sl* (singleto largo), *d* (dubleto), *dl* (dubleto largo), *dd* (duplo dubleto), *t* (triplete) e *m* (multiplete). Os espectros de RMN de ^{13}C foram obtidos utilizando-se a técnica de APT, BB e DEPT-135.

4.3.4. Espectrometria de Massas (EM)

Para realizar análise de espectrometria de massas em tandem (ESI-MSn) foi utilizado um HPLC Shimadzu (Quioto, Japão) acoplado a um Amazon X (Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA) com uma fonte de íons de eletrospray (ESI). Os parâmetros de análise foram os seguintes: capilar 4,5 kV, ESI (modo positivo), offset da placa final 500 V, nebulizador de 40 psi, gás seco (N_2) com um fluxo de 8 mL/min e uma temperatura de 200°C.

A fragmentação por dissociação induzida por colisão (CID) foi efetuada no Amazon X em modo autoMS/MS, utilizando o modo de resolução avançada. Os espectros de massas (m/z 50-1300) foram registrados a cada 2s. Além disso, estas amostras foram novamente injetadas em um sistema CLAE acoplado a um espectrômetro de massa microTOF II (Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA) para análises de espectrometria de massa com ionização por electrospray de alta resolução (HRESIMS), utilizando o mesmo método anteriormente descrito (CABRAL et al., 2021).

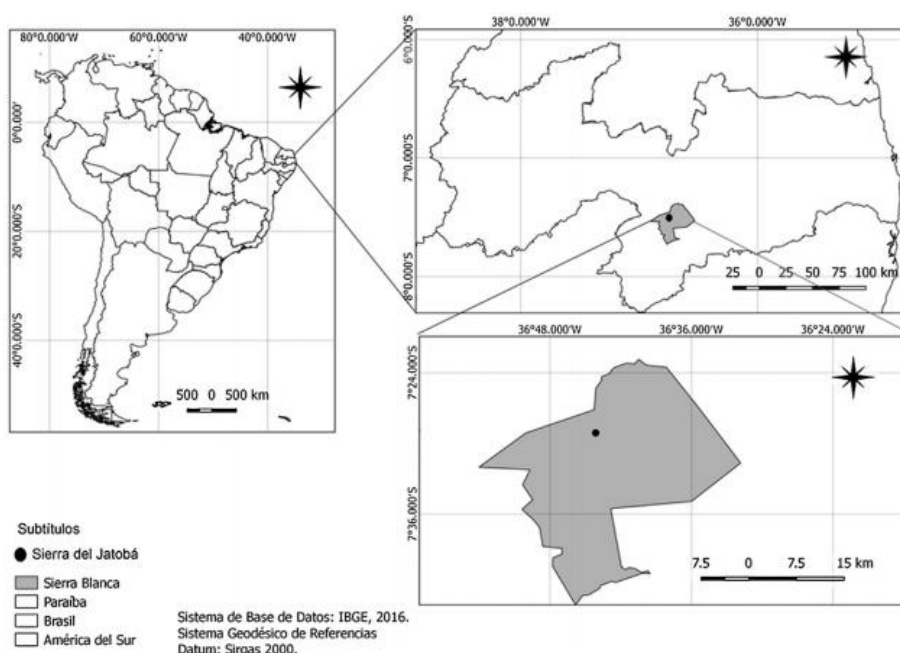
4.4 Estudo fitoquímico

4.4.1 Coleta e identificação do material botânico

A coleta das raízes de *M. dardanoi* foi realizada na Serra do Jatobá (07°29'00"S, 36°39'54"W) (figura 14), no município de Serra Branca-PB (localizado no planalto da

Borborema, com área de 739,26 km²) (SILVA-MONTEIRO et al., 2017). O material botânico foi identificado pelo Prof^o. Dr. José Iranildo Miranda de Melo, do departamento de Ciências Biológicas da Universidade Estadual da Paraíba e, posteriormente, depositado no Herbário Prof^o. Lauro Pires Xavier, do Centro de Ciências Exatas e da Natureza (UFPB), onde foi produzida a exsicata de número 1663. O registro de acesso no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN) foi obtido sob número A5B0BFC.

Figura 14: Localização da Serra do Jatobá (Serra Branca-PB)



(SILVA-MONTEIRO et al., 2017).

4.5.4 Processamento das raízes, obtenção do extrato e das fases de *M. dardanoi*

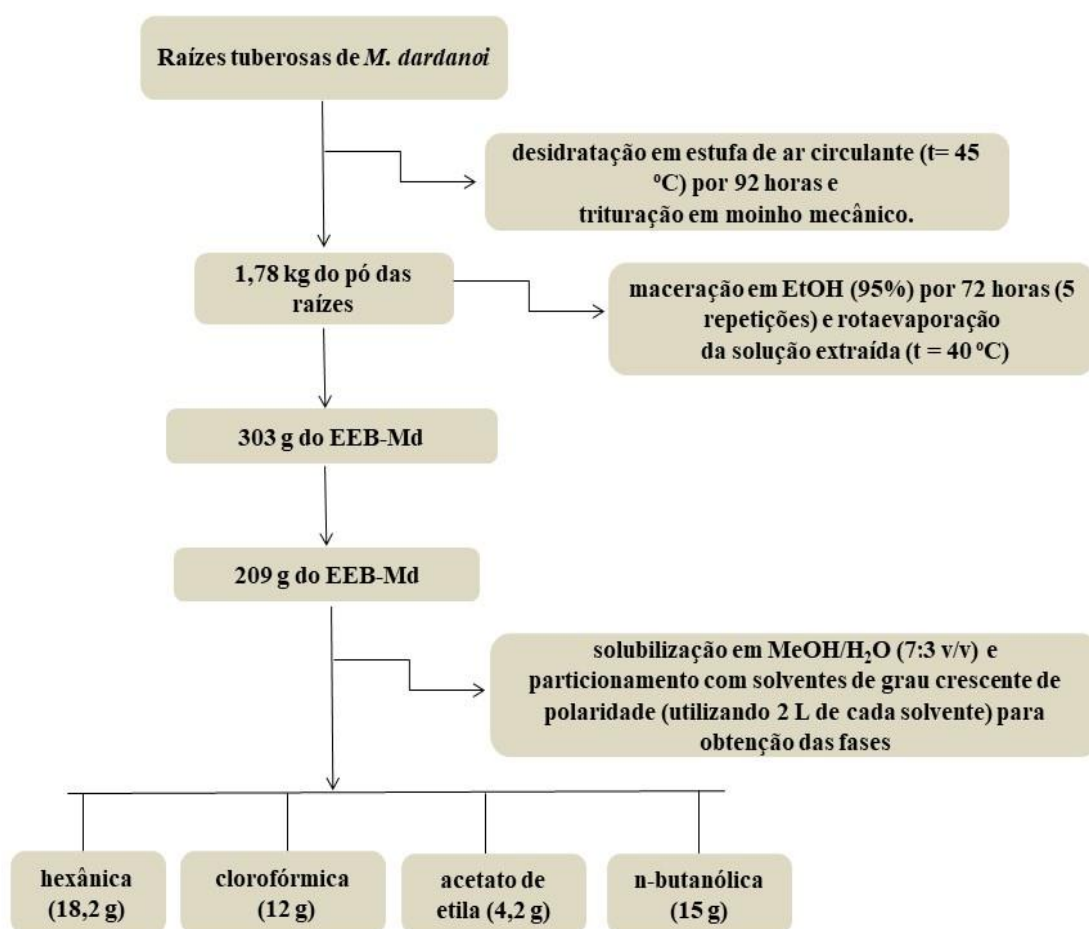
As raízes foram a processo de desidratação em estufa de ar circulante ($t = 45^{\circ}\text{C}$) por 92 horas e, posteriormente, pulverizadas em moinho mecânico do tipo Harley, reduzindo-as à forma de pó seco (1,78 kg).

O pó das raízes foi submetido à maceração em etanol (95%) em um recipiente de aço inoxidável durante 72 horas. Este processo foi repetido por cinco vezes.

A solução extrativa resultante da maceração foi concentrada em rotaevaporador (Buchi® R-100) sob pressão reduzida, a uma temperatura média de 40°C , sendo obtido 303 g do extrato etanólico bruto de *M. dardanoi* (EEB-Md), com rendimento 17,02% em relação ao peso seco da planta.

Posteriormente, 290 g do EEB-Md foram solubilizados em MeOH/H₂O (7:3, v/v). Esta solução foi submetida a uma partição com solventes de grau crescente de polaridade (utilizando 2 L de cada solvente). A partição permitiu obter as seguintes fases: hexano (18,2 g), clorofórmio (12 g), acetato de etilo (4,2 g) e n-butanol (15 g) (fluxograma 1).

Fluxograma 1: Obtenção do EEB e das fases provenientes das raízes de *M. dardanoi*

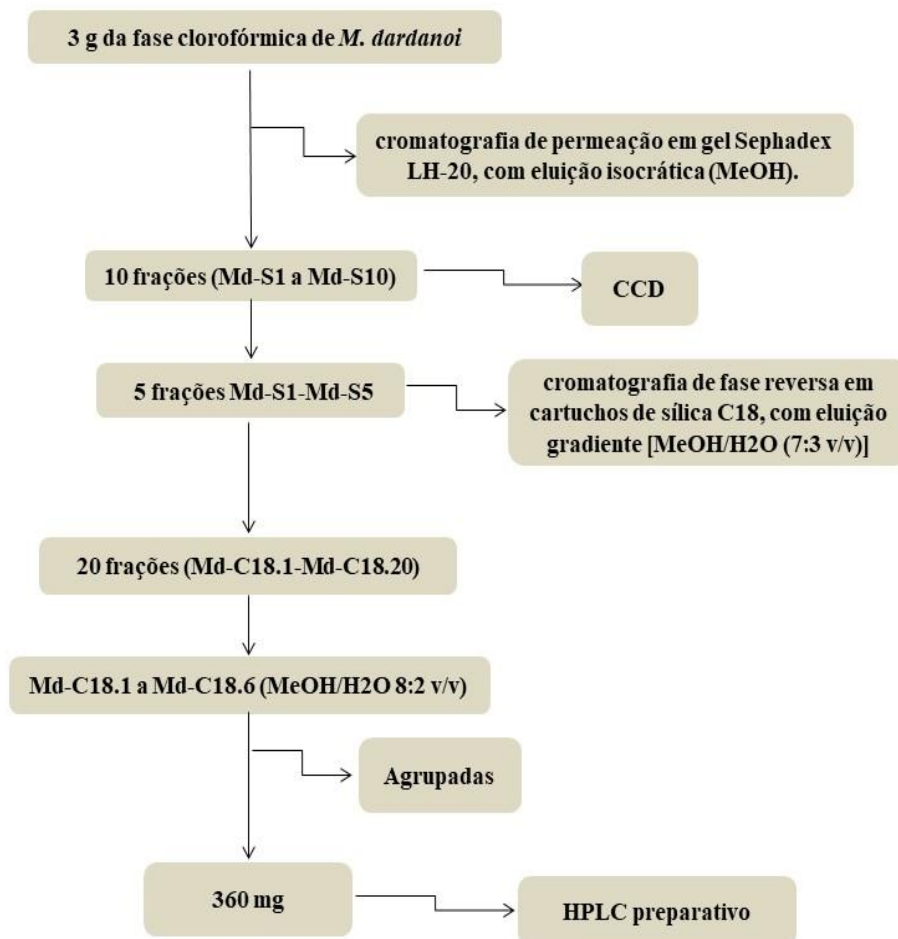


4.4.3. Fracionamento cromatográfico da fase clorofórmica de *M. dardanoi*

Para o fracionamento da fase clorofórmica, 3 g foram submetidos a cromatografia de permeação em gel Sephadex LH-20, com eluição isocrática (MeOH). Este método permitiu o isolamento de 10 frações (Md-S1 a Md-S10), que foram analisadas através de CCDA e RMN de ¹H, e reunidas quando semelhantes e de acordo com seus R_f, após visualização na luz ultravioleta. As frações Md-S1-Md-S5 foram submetidas a cromatografia de fase reversa em cartuchos comerciais de sílica funcionalizada com octadecilsilano, com eluição gradiente, utilizando MeOH/H₂O (7:3 v/v), obtendo-se 20 frações (Md-C18.1-Md-C18.20). Destas, as

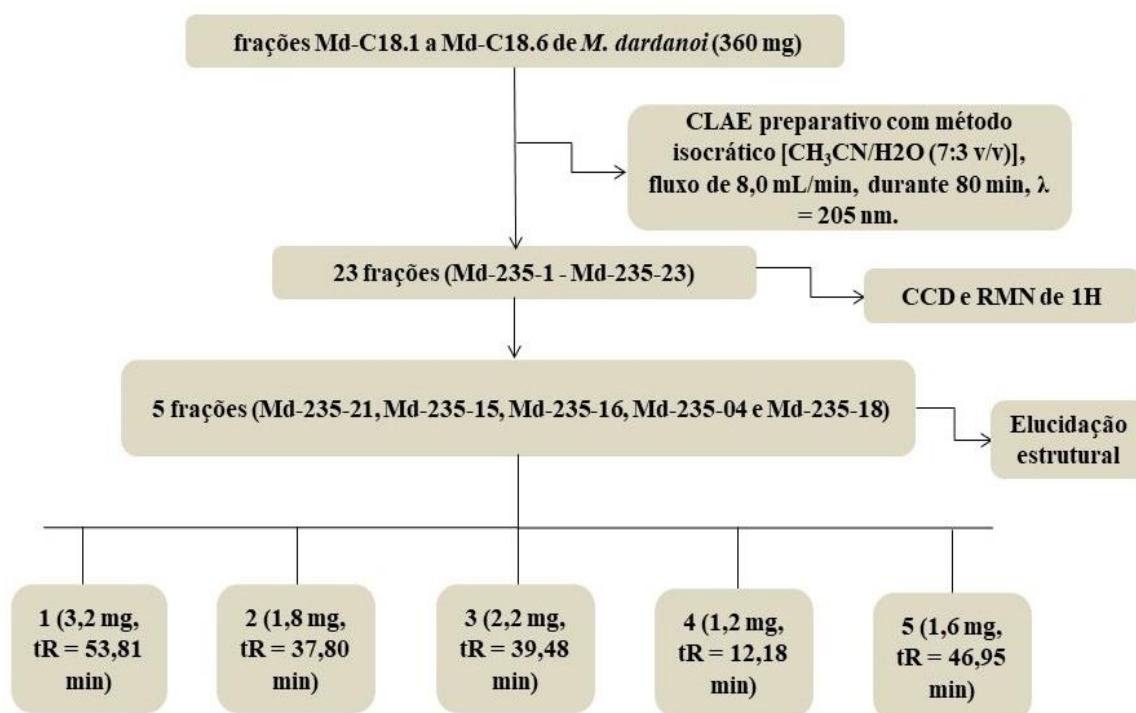
frações Md-C18.1 a Md-C18.6 (MeOH/H₂O 8:2 v/v) foram agrupadas, obtendo-se 360 mg (fluxograma 2). Esta fração agrupada foi concentrada em rotaevaporador a temperatura média de 35 °C e posteriormente submetida a CLAE preparativo.

Esquema 2: Fracionamento cromatográfico da fase clorofórmica de *M. dardanoi*.



Na análise de CLAE preparativa, a fase móvel foi composta por uma mistura binária de água e acetonitrila (70:30, v/v), através do modo de eluição isocrático, com um fluxo de 8,0 mL/min, durante 80 min. O comprimento de onda utilizado foi de 205 nm, obtendo-se no final 23 frações (Md-235-1 - Md-235-23). As frações Md-235-21, Md-235-15, Md-235-16, Md-235-04 e Md-235-18, depois de submetidas a técnicas de elucidação estrutural, forneceram os compostos **1** (3,2 mg, t_R = 53,81 min), **2** (1,8 mg, t_R = 37,80 min), **3** (2,2 mg, t_R = 39,48 min), **4** (1,2 mg, t_R = 12,18 min) e **5** (1,6 mg, t_R = 46,95 min), respectivamente (fluxograma 3).

Fluxograma 3: Fracionamento cromatográfico da fração Md-18.1-Md18.6 de *M. dardanoi* por CLAE preparativa



4.6 Atividade farmacológica

4.5.1 Ensaio de Citotoxicidade

Para determinar a citotoxicidade dos compostos, macrófagos murinos da linhagem de células J774 foram semeados em placas de 96 poços a densidade de células de 2×10^5 células/poço em meio Eagle modificado por Dulbecco's (DMEM; Life Technologies, GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB; GIBCO) e 50 µg/mL de gentamicina (Novafarma, Anápolis, GO, Brasil), e incubada durante a noite a 37 °C e 5% de CO₂. As células foram estimuladas com LPS (500 ng/mL, Sigma) e IFN-γ (5 ng/mL; Sigma). Os compostos **1**, **2**, **3** e **5** foram adicionados ao meio em cinco concentrações, de 25 a 200 µM, em triplicado e incubados durante 72 h. Alamar Blue (Invitrogen, Carlsbad, CA) foi adicionado às placas (20 µL/poço), seguido por incubação por 6 h. As placas foram lidas a 570 nm e 600 nm. Violeta genciana (Synth, São Paulo, Brasil) a 10 M foi utilizada como

controle positivo. Três experimentos independentes foram realizados (OPRETZKA et al., 2019).

4.6.2 Avaliação da produção de citocinas e de óxido nítrico por macrófagos

Para a avaliação das citocinas e de óxido nítrico, as células J774 foram semeadas em placas de cultura de tecidos de 96 poços a 2×10^5 células/poço em meio DMEM suplementado com 10% de SBF e 50 $\mu\text{g/mL}$ de gentamicina por 2 h a 37 °C e 5% de CO_2 (ESPÍRITO-SANTO et al., 2017).

As células foram então estimuladas com LPS (500 ng/mL, Sigma) e IFN- γ (5 ng/mL; Sigma) na presença dos compostos 1, 2, 3 e 5, testados em diferentes concentrações (25 a 200 μM); dexametasona (20 μM , fármaco padrão-ouro) ou veículo e incubados a 37 °C. Sobrenadantes sem células foram recolhidos 4 h após a incubação para quantificação de TNF- γ , ou 24 h após a incubação para quantificação de IL-1 β e óxido nítrico.

As concentrações de citocinas nos sobrenadantes das culturas de J774 foram determinadas por ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), utilizando o kit DuoSet da R&D Systems (Minneapolis, MN), de acordo com as instruções do fabricante. Os resultados foram expressos em picogramas de IL-1 β por miligramas de proteína. A quantificação de nitritos como indicador da produção de NO foi efetuada utilizando o método de Griess (GREEN et al., 1982).

4.5.3 Análise estatística

Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. As comparações entre grupos foram efetuadas utilizando ANOVA unidirecional com o teste post-hoc de Tukey. As análises foram efetuadas utilizando o Software Prism 8 Computer (GraphPad, San Diego, CA, EUA), com uma significância estatística de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Manuscrito: Subfamília Asclepiadoideae (Apocynaceae): Etnofarmacologia, Atividades Biológicas e Quimiofenética Baseadas em Pregananos glicosídeos (Revista *Phytochemistry Reviews*).

Thalisson Amorim de Souza¹, Francisca Sabrina Vieira Lins¹, Jociano da Silva Lins¹, Alan Ferreira Alves², Samuel P. Cibulski³, Thiago de Araújo Medeiros Brito¹, Lucas Silva Abreu⁴, Luciana Scotti², Marcus Tullius Scotti², Marcelo Sobral da Silva¹, Josean Fachine Tavares*¹.

¹ Universidade Federal da Paraíba, Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PgPNSB), Centro de Ciências da Saúde, João Pessoa-PB, Brasil.

² Universidade Federal da Paraíba, Laboratório de Quimioinformática, Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PgPNSB), Centro de Ciências da Saúde, João Pessoa-PB, Brasil.

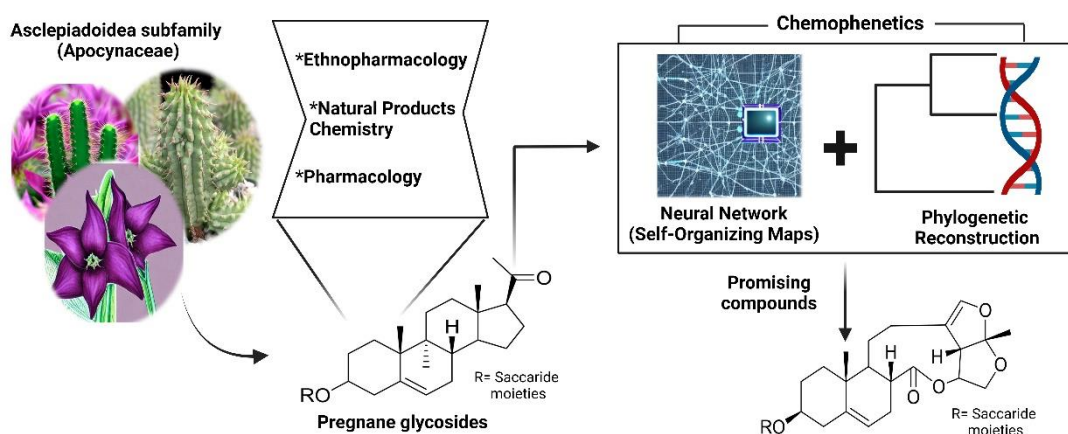
³ Universidade Estadual da Paraíba, Departamento de Farmácia, Campina Grande-PB, Brasil.

⁴ Universidade Federal Fluminense, Departamento de Química Orgânica, Niterói-RJ, Brasil.

* Autor correspondente: Josean Fachine Tavares

E-mail: josean@lft.ufpb.br

Resumo gráfico



Resumo

Apocynaceae, uma das maiores famílias de plantas com mais de 5.100 espécies amplamente distribuídas, serve como um modelo significativo para estudos evolutivos e bioquímicos. Dentro desta família, foram isolados compostos como alcaloides, flavonoides e terpenoides com potenciais atividades terapêuticas. Entre as suas subfamílias, Asclepiadoideae é reconhecida como uma fonte rica de derivados pregnanos C_{21} . Este trabalho apresenta uma revisão abrangente dos pregnanos glicosídeos (PG) obtidos de Asclepiadoideae, empregando uma abordagem interdisciplinar que combina quimiofenética com análise de dados de redes neurais para identificar espécies promissoras e compostos bioativos. Para isto, foi compilado um conjunto de dados que inclui 643 PGs únicos e 706 ocorrências botânicas. Os aspectos etnofarmacológicos, bem como a extração, o isolamento e a atividade biológica dos PGs, foram analisados e discutidos. A análise quimiofenética usando mapas auto-organizáveis (SOMS) e a reconstrução filogenética revelaram semelhanças entre as tribos Marsdenia-Ceropegiae e destacaram a ocorrência dos tipos seco e diseco pregnano, predominantemente, na tribo Asclepiadeae. Ambas as estruturas apresentaram características intrigantes e os seus derivados demonstraram atividades anti-inflamatórias e citotóxicas. Tais resultados fornecem informações valiosas para investigação futura sobre estes compostos e as suas fontes vegetais medicinais.

Palavras-chave: Produtos naturais; Esteroides; Inteligência artificial; Anti-tumoral.

Introdução

Apocynaceae, compreendendo 424 gêneros e mais de 5.100 espécies, representa uma das famílias de plantas mais significativas, englobando árvores, arbustos, ervas, e lianas distribuídas em áreas temperadas, tropicais e secas (NAZAR et al., 2013). Notáveis por sua beleza, estas plantas são também conhecidas pelas suas propriedades terapêuticas, amplamente utilizadas em vários sistemas de medicina tradicional, como o chinês, o indiano, o Unani e o tailandês (ACEVEDO-RODRÍGUEZ, 2021). Além disso, Apocynaceae exibe diversas características anatômicas e bioquímicas, levando à descoberta de uma notável diversidade química, incluindo alcaloides, compostos fenólicos e terpenoides (NIERO et al., 2002).

A classificação das Apocynaceae reconhece cinco subfamílias: Apocynoideae, Asclepiadoideae, Periplocoideae, Rauvolfioideae e Secamonoideae. Entre estas subfamílias, Asclepiadoideae (anteriormente conhecida como a família Asclepiadaceae) emergiu como uma fonte bem conhecida de derivados de pregnanos C_{21} (BHADANE et. al., 2018).

Nomeadamente, entre os terpenoides registrados em Apocynaceae, os glicosídeos pregnanos (PGs) ganharam destaque devido ao seu potencial farmacológico (BRUYNS et al., 2017).

Os pregnanos são compostos derivados do anel esteroidal ciclopentanoperidrofenantreno, que sofrem modificações no anel D, resultando em um produto

com 21 átomos de carbono. A estrutura central contém um grupo hidroxila ligado ao carbono C-3 do anel A e um grupo acetil ligado ao carbono C-17. Quando estão presentes unidades osídicas, normalmente ligadas ao oxigênio do carbono C-3, estes compostos são designados por pregnano glicosídeos. As alterações na porção terminal da molécula de aglicona podem dar origem a várias classes de metabolitos secundários (SI et al., 2022).

A quimiofenética tem como objetivo descrever uma gama de metabolitos secundários especializados dentro de um táxon específico (ZIDORN et al., 2019). Na era da inteligência artificial (IA), certos algoritmos contribuíram para o desenvolvimento de novos estudos sobre produtos naturais, incluindo a análise dos níveis metabólicos (SALDÍVAR-GONZÁLEZ et al., 2022). Entre estes algoritmos, os mapas auto-organizáveis (SOMS) têm sido aplicados com sucesso para revelar semelhanças químicas entre diferentes espécies de plantas e classes de metabolitos secundários (SCOTTI et al., 2012; MENEZES et al., 2021).

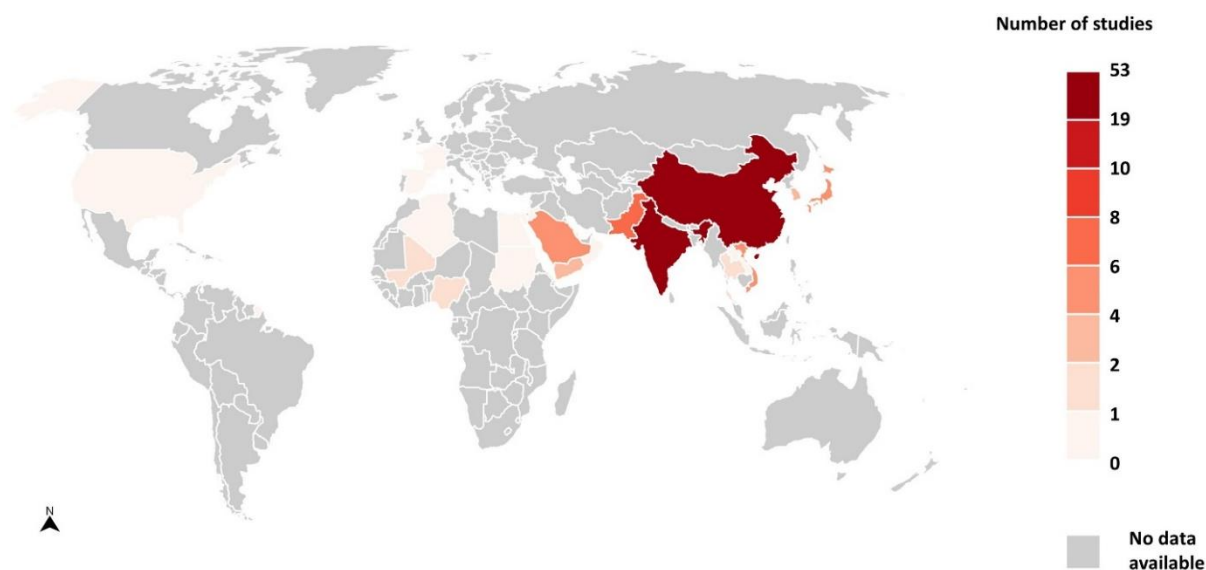
Na nossa busca contínua e sistemática de compostos bioativos, o objetivo deste estudo foi compilar glicosídeos pregnanos da subfamília Asclepiadoideae (Apocynaceae) em um conjunto de dados, com o objetivo de avaliar o estado atual da arte em relação à sua utilização tradicional, isolamento e atividades biológicas, e realizar uma análise quimiofenética utilizando dados genéticos e SOM para identificar potenciais quimiomarcadores e estruturas bioativas promissoras. Esperamos que este trabalho forneça orientações valiosas para estudos futuros sobre o desenvolvimento de novos produtos baseados em Apocynaceae, particularmente em espécies de Asclepiadoideae e seus compostos.

Resultados e discussão

5.1.1 Distribuição e utilização tradicional

Neste estudo, foi incluído um total de sessenta e cinco espécies classificadas em vinte e sete gêneros. Relativamente à sua distribuição, as espécies de Asclepiadoideae são mais diversificadas no Velho Mundo, particularmente na China e na Índia (KOCH et al., 2012). A Figura 15 ilustra o número de estudos realizados sobre o isolamento de PGs de espécies de Asclepiadoideae em diferentes regiões geográficas.

Figura 15. Número de estudos baseados no isolamento de PGs de espécies de Asclepiadoidea por região geográfica.



A etnofarmacologia constitui uma valiosa fonte de informação para orientar a seleção de plantas e organismos com vista à identificação de compostos bioativos, preservando práticas medicinais antigas (WAINWRIGHT et al., 2022). Muitas moléculas bem conhecidas, como a artemisinina, a morfina e a escopolamina foram descobertas através de abordagens etnofarmacológicas. No contexto da importância das espécies de Asclepiadoidea como medicamentos à base de plantas, o nosso banco de dados indicou que cinquenta e uma das espécies incluídas são tradicionalmente utilizadas para fins medicinais (Quadro 1). A utilização de espécies que contêm PGs na Ayurveda e na Medicina Tradicional Chinesa poderia explicar a elevada ocorrência de estudos químicos e farmacológicos baseados nestas plantas.

Quadro 1. Utilização medicinal de espécies da subfamília Asclepiadoidea produtoras de pregnanos glicosídeos.

Espécies	Uso etnofarmacológico	Parte da planta	Referência
<i>Adelostemma</i>			
<i>A. gracillimum</i>	Anticonvulsivante	raízes	(Mu et al. 1992)
<i>Asclepias</i>			
<i>A. curassavica</i>	Antiparasitário, antiasmático, antiflogístico contra a dor e inflamação	planta inteira	(Sharma et al. 2019; Alonso-Castro et al. 2021)

<i>A. verticillata</i>	Aumenta a produção de leite materno, para tratar picadas de cobra	planta inteira	(Araya et al. 2012)
<i>Caralluma</i>			
<i>C. arabica</i>	Antipirético, antirreumático e anti-inflamatório	partes aéreas	(Zakaria et al. 2001)
<i>C. dalzielii</i>	Anti-helmíntico, antifúngico, anti-inflamatório e contra dores epigástricas fortes, antiespasmódico e analgésico	planta inteira	(DELEO et al. 2005; Ugwah-Oguejiofor et al. 2013)
<i>C. hexagona</i>	Antidiabetogênico, dores abdominais e úlceras gástricas	caules	(Al-Fatimi 2019)
<i>C. negevensis</i>	Antitumoral	planta inteira	(Devendar Reddy Kommidi et al. 2016)
<i>C. quadrangula</i>	Cicatrizante de feridas, anti-hiperglicêmico e antioxidante	planta inteira	(Adnan et al. 2014; Abdel-Sattar et al. 2017)
<i>C. retrospiences</i> var. <i>russeliana</i>	Cicatrização de feridas	caules	(Makeen et al. 2020)
<i>C. sinaica</i>	Antiprotozoário, anti-hiperglicêmico	planta inteira	(Habibuddin et al. 2008; Al-Musayeib et al. 2012; Ullah et al. 2020)
<i>C. tuberculata</i>	Tratamento de reumatismo, lepra e como antipirético, anti-hiperglicêmico	planta inteira	(Abdel-Sattar et al. 2013; Haider et al. 2022)
<i>C. fimbriata</i>	Inibidor de apetite, promotor de perda de peso	planta inteira	(Tambe et al. 2010)

<i>C. pauciflora</i>	Nutrição e fonte de energia	caules	(Adnan et al. 2014)
<i>C. penicillata</i>	Tratamento da úlcera péptica e como anti-hiperglicêmico	partes aéreas	(Albaser et al. 2014)
<i>C. umbellata</i>	Anti-ulcerogênico	raízes	(Babu 2014; Adnan et al. 2014)
<i>C. lasiantha</i>	Anti-inflamatório, para tratar a febre	raízes	(Sireesha et al. 2018)
<i>Ceropegia</i>			
<i>C. fusca</i>	Cicatrizante, hemostático e quimioterapêutico	caules	(Herrera et al. 1996)
<i>Cynanchum</i>			
<i>C. atratum</i>	Congestão pulmonar e artrite reumatoide	raízes	(Zhang et al. 2022b)
<i>C. bungei</i>	Fortalecedor de ossos e músculos e inibidor de dores no estômago	raízes	(Chen et al. 2019)
<i>C. stauntonii</i>	Efeitos antitussígeno, analgésico, anti-inflamatórios e antitrombóticos	planta inteira	(Sutcharitchan et al. 2018)
<i>C. auriculatum</i>	Regulação imunológica, anti-inflamação e antioxidante	raízes	(Ji et al. 2012; Fan et al. 2022)
<i>C. otophyllum</i>	Dor óssea reumatoide, prurido de rubéola, picadas de cobra	raízes	(Han et al. 2018)
<i>C. paniculatum</i>	Anti-inflamatório, artralgia reumática, odontalgia, diarreia, malária, dor abdominal, dor no peito	raízes	(Chen et al. 2020; Zhou et al. 2020)
<i>C. saccatum</i>	Dor lombar, nefropatia e artralgia	raízes	(Chen et al. 2021)

<i>C. wilfordii</i>	Doenças vasculares, diabetes mellitus, doenças induzidas por isquemia, neurastenia, dor lombar e abscessos	raízes	(Huang et al. 2015; Jiang et al. 2019)
<i>C. forrestii</i>	Antifebril, diurético e analgésico	raízes	(Liu et al. 2008)
<i>C. komarovii</i>	Para tratar a febre, a diarreia e a colecistite	raízes	(An et al. 2001)
<i>Desmidorchis</i>			
<i>D. flava</i>	Refrescante para pele com comichão e queimaduras	planta inteira	(Ghazanfar 2018)
<i>Dregea</i>			
<i>D. sinensis</i>	Antiepiléptico e diurético	raízes	(Liu et al. 2009)
<i>D. volubilis</i>	Para tratar as picadas de cobra, controlar a hipertensão, tratar a febre e a diabetes	raízes	(Kamble et al. 2008; Félix-Silva et al. 2017; Aumeeruddy and Mahomoodally 2020)
<i>Gongronema</i>			
<i>G. latifolium</i>	Para tratar a malária, a diabetes, a hipertensão, as náuseas e obstipação	folhas	(Morebise 2015; Ojo et al. 2020)
<i>G. napalense</i>	Para tratar a leucorreia, a blenorreia e as lesões traumáticas	planta inteira	(Yulin et al. 2021)
<i>Gymnema</i>			
<i>G. sylvestre</i>	Diabetes, malária e picadas de cobra	folhas	(Khan et al. 2019)

<i>G. alternifolium</i>	Eliminação do edema e da febre	raízes	(YOSHIKAWA et al. 1998)
<i>G. inodorum</i>	Para tratar diabetes	planta inteira	(Kahksha et al. 2022)
<i>Hoodia</i>			
<i>H. gordonii</i>	Suprimir a fome e a sede	partes aéreas	(Smith and Krygsman 2014)
<i>Hoya</i>			
<i>H. carnosa</i>	Anti-inflamatório e cicatrizante	planta inteira	(Ye et al. 2022)
<i>H. kerrii</i>	Anti-inflamatório, cicatrização de feridas, diabetes, artrite	planta inteira	(Seeka et al. 2017)
<i>Jasminanthes</i>			
<i>J. tuyetanhiiae</i>	Para tratar a tosse	partes aéreas	(Nam et al. 2022)
<i>Leptadenia</i>			
<i>L. pyrotechnica</i>	Expectorante, para tratar a gota, o reumatismo e as afecções do estômago	partes aéreas	(El-Fitany and Khasawneh 2022)
<i>L. reticulata</i>	Tuberculose, hematopoiese, tosse, dispneia, febre, cancro	partes aéreas	(Mohanty et al. 2017)
<i>Marsdenia</i>			
<i>M. tinctoria</i>	Para tratar as doenças reumáticas e a hepatomegalia	partes aéreas	(Mohd Nasuha and Choo 2016)
<i>M. roylei</i>	Para tratar gonorreia	partes aéreas	(Gupta et al. 2003)
<i>M. tenacissima</i>	Anticâncer	caule	(Li et al. 2022; Chen et al. 2022)
<i>M. cundurango</i>	Problemas estomacais	caule	(XVII Japanese Pharmacopeia, 2016)

<i>Oxystelma</i>			
<i>O. esculentum</i>	Antiulceroso, expetorante, anti-helmíntico, dores musculares	planta inteira	(Pandya and Anand 2011)
<i>Pergularia</i>			
<i>P. pallida</i> (syn. <i>telosma pallida</i>)	Leucoderma, galactagogo	látex de frutos e raízes	(Kanakhara et al. 2018)
<i>Solenostemma</i>			
<i>S. argel</i>	Tratamento da tosse, purgativo, antipirético, expetorante, antiespasmódico, suprime as dores de estômago e melhorar o apetite	folhas	(Hamed 2001; Kamel 2003)
<i>Stapelia</i>			
<i>S. gigantean</i>	Para tratar a histeria, analgésico e purgativo	caule	(SOBIECKI 2002; Stafford et al. 2008)
<i>Stephanotis</i>			
<i>S. mucronata</i>	Tratamento da artrite reumatoide e das dores reumáticas	raízes	(Chen et al. 2008)
<i>Vincetoxicum</i>			
<i>V. hirundinaria</i>	Tratamento de contusões	planta inteira	(Slapšytė et al. 2019; Mautone et al. 2019)

A análise do quadro 1 revelou que as propriedades medicinais mais frequentemente citadas das espécies que contêm PGs estão relacionadas com o tratamento do câncer e atividade anti-inflamatória, tanto em situações agudas como em associação com doenças crônicas. Estudos recentes demonstraram o uso potencial de muitas destas plantas medicinais, sendo

As espécies de *Cynanchum* ocorrem predominantemente na China, com uma longa história de utilização na medicina popular. Entre elas, as raízes de três espécies: *C. auriculatum*, *C. bungen* e *C. wilfordii*, são ingredientes ativos na preparação conhecida como Baishouwu. Este remédio tradicional tem sido indicado para várias doenças e extensivamente estudado nos campos da farmacologia e da química, fornecendo provas das suas atividades antitumorais eficazes (ZHANG et al., 2022A; LI et al., 2023).

Caralluma é comumente encontrada na Ásia, bem como em certas regiões de África e do Médio Oriente. Estas plantas são tipicamente espécies perenes semelhantes a cactos, e muitas delas são comestíveis, frequentemente consumidas depois de cozinhadas e misturadas com legumes (ANSARI et al., 2022). Mais de trinta espécies de *Caralluma* demonstraram várias atividades biológicas, algumas das quais se alinham com a sua utilização tradicional (MALLADI et al., 2018).

Apesar dos avanços valiosos que demonstram o valor medicinal destas espécies e das suas preparações tradicionais, apenas um número limitado de ensaios clínicos está disponível na literatura. Especificamente, foram registrados estudos para apenas duas espécies: *Caralluma fimbriata* e *Hoodia gordonii*, ambas avaliadas para o tratamento da obesidade.

Uma meta-análise identificou *C. fimbriata* como um agente eficaz no controle da obesidade e da síndrome metabólica, capaz de reduzir o apetite (PAYAB et al., 2020). Os estudos incluídos mencionam a utilização de partes aéreas da planta para a extração de *C. fimbriata*, mas não especificam se refere-se à flor, às folhas ou ao caule. Além disso, há inconsistência na comunicação do processo de extração e do solvente utilizado em todos os estudos. Alguns estudos relataram obstipação, diarreia e náuseas como efeitos secundários da ingestão de *C. fimbriata* (JAYAWARDENA et al., 2021).

Estes resultados sublinham a necessidade de mais investigação para estabelecer a *C. fimbriata* e os seus derivados como suplementos eficazes e seguros para a perda de peso e supressores do apetite. Além disso, o potencial da *C. fimbriata* na redução da ansiedade e do stress também foi avaliado, com um ensaio clínico randomizado controlado por placebo indicando uma redução nos níveis de ansiedade e estresse entre adultos saudáveis (KELL et al., 2019), sugerindo potenciais novas aplicações para esta planta medicinal.

Bitterghaap (*Hoodia gordonii*), tradicionalmente utilizado pelas comunidades Khoi e San na África do Sul e na Namíbia como supressor do apetite, tem atraído a atenção do mercado comercial como suplemento alimentar com propriedades de controlo de peso. A sua atividade tem sido atribuída aos glicosídeos P57 e P57AS3 (VILJOEN et al., 2022). Apesar de

numerosas preparações comerciais na última década, nenhum produto foi desenvolvido devido a preocupações de segurança e questões legais relativas a acordos de partilha de benefícios com comunidades tradicionais (VERMAAK et al., 2023; WYNBERG, 2023). São ainda necessários mais estudos para elucidar o mecanismo de ação e avaliar o potencial do amargoso como suplemento alimentar funcional.

Outro desafio no estudo das espécies de Asclepiadoideae reside na padronização. Embora estas plantas apresentem um potencial biológico bem conhecido, a comunicação quantitativa de marcadores (químicos e/ou biológicos) continua a ser insuficiente. A padronização é essencial para garantir a reprodutibilidade das experiências farmacológicas e para atribuir propriedades específicas a uma determinada planta (INDRAYANTO, 2022). Neste sentido, Zhang et al. (2022) concluíram que as provas utilizadas para estabelecer o padrão de qualidade dos materiais medicinais para *C. atratum* eram inadequadas.

Ainda a este respeito, os extratos de plantas e as preparações à base de plantas são matrizes complexas (MUYUMBA et al. 2021). Considerando os PGs e suas agliconas como compostos ativos, a análise por métodos convencionais pode ser uma tarefa desafiadora. Nesse sentido, o advento do LC-MS parece atenuar o problema, pois permitiu a rápida caracterização de perfis químicos para diversas espécies, como *Dregea*, *Cynanchum* e *Marsdenia* (TAI et al. 2006; MCGARVEY et al. 2012; JIA et al. 2017; LI et al. 2023). No entanto, a maioria desses estudos não tem como objetivo medir ou propor quaisquer marcadores, e os estudos farmacocinéticos e de toxicidade também são raramente relatados, justificando mais esforços. Tendo em vista o cenário atual, a aplicação de ferramentas analíticas rápidas e precisas para quantificar os compostos de Asclepiadoideae deve estimular estudos futuros para desenvolver produtos à base de plantas.

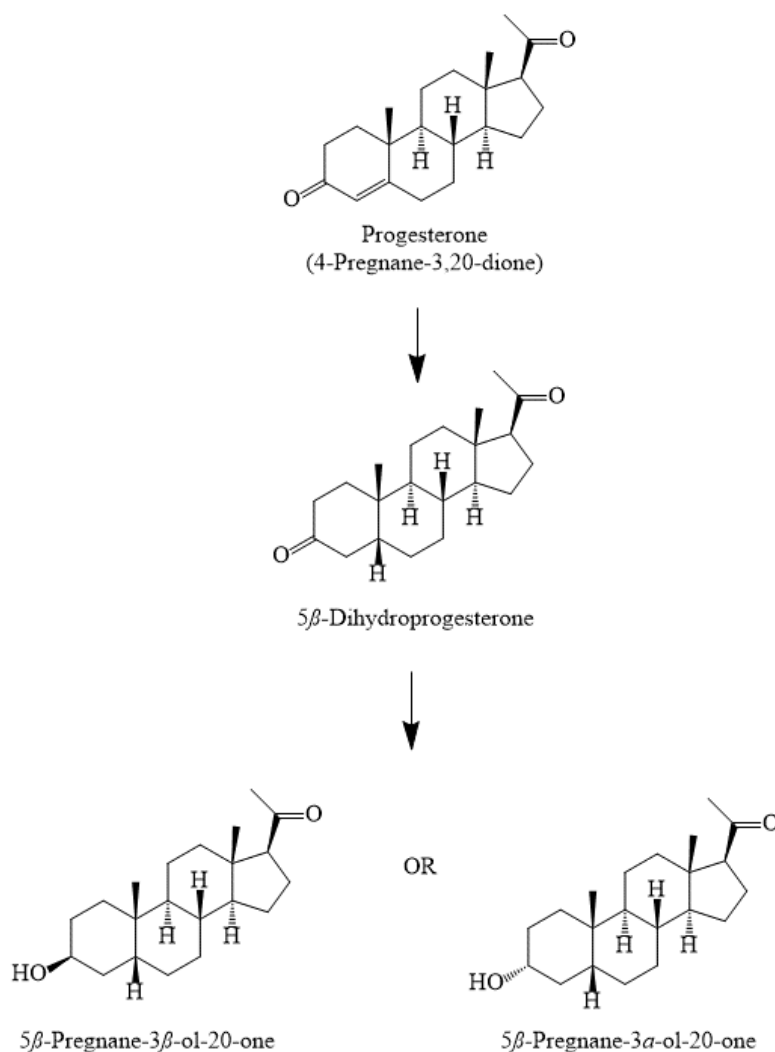
Os metabólitos secundários são os principais responsáveis pelas respostas farmacológicas e elementos fundamentais para o desenvolvimento de produtos derivados de plantas. Após a pesquisa de informações etnofarmacológicas, o nosso objetivo foi avaliar os aspectos químicos relacionados com os compostos notáveis da subfamília Asclepiadoideae, os glicosídeos pregnânicos.

5.1.2 Biossíntese, extração e isolamento

Os PGs são derivados de uma estrutura esteroidal, semelhante a algumas saponinas e glicosídeos cardiotônicos, que são biossintetizados a partir da progesterona (Figura 16). A presença de hormônios mamíferos em plantas tem sido investigada desde o século passado, e

estudos recentes usando técnicas moleculares e analíticas forneceram novos insights que fortalecem essa hipótese e explicam a diversidade e o acúmulo de derivados esteroides em órgãos vegetais, bem como seu papel na fisiologia vegetal (UPADHYAY et al. 2018; TARKOWSKÁ 2019; LI et al. 2023). De acordo com Lindemann (2015), a ocorrência de pregnenolona ou progesterona no reino vegetal parece estar mais relacionada ao estresse, principalmente na forma de seca (LINDEMANN 2015).

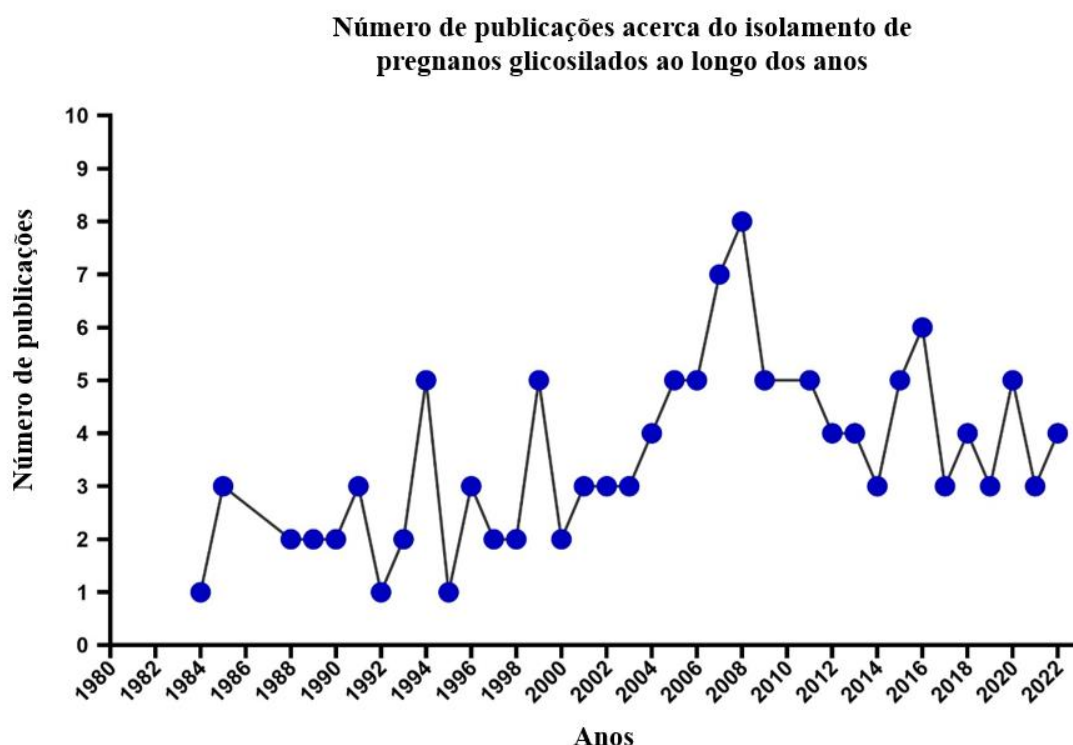
Figura 16. Origem do esqueleto pregnano.



(LINDEMANN, 2015)

Com relação à diversidade dos PGs, o presente trabalho revelou 643 compostos únicos (Figura S1). A análise temporal das publicações que relatam dados estruturais de PG demonstra um interesse crescente por essa classe de metabólitos secundários nas últimas três décadas (Figura 17). Uma explicação plausível para essa tendência é a atividade biológica diversificada das espécies de Apocynaceae (WEN et al. 2016; ANAND et al. 2020) e a melhoria dos métodos analíticos, especialmente em RMN, que permitiram o estudo e a atribuição estrutural de moléculas complexas, mesmo em pequenas quantidades.

Figura 17. Análise temporal das publicações que relatam o isolamento e a caracterização estrutural dos PGs das espécies da tribo principal Asclepiadoidea.

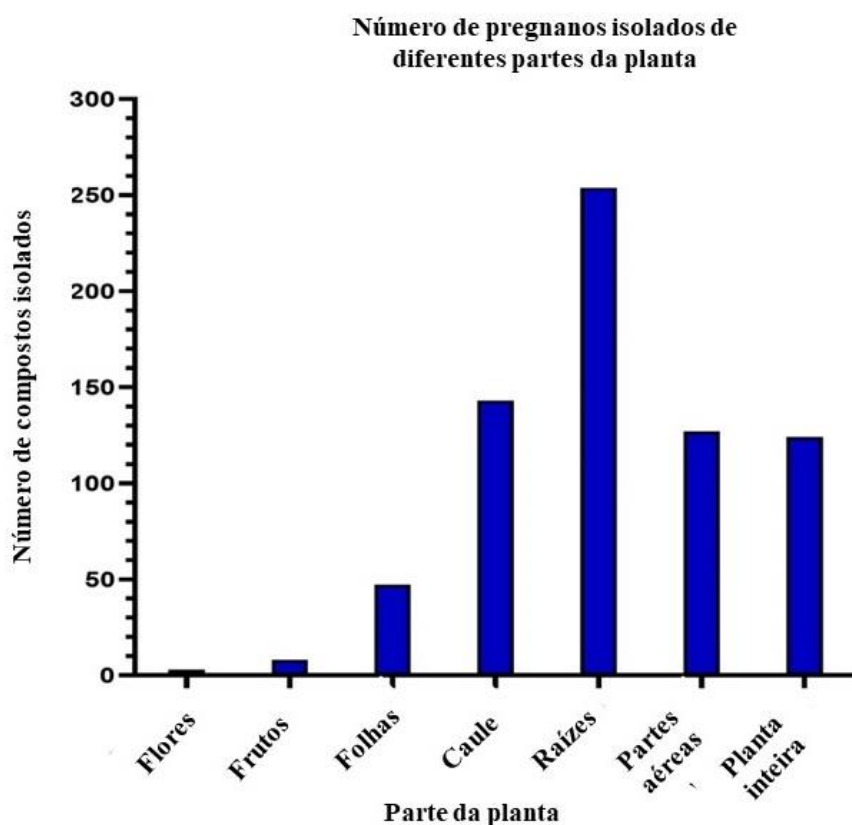


De forma paradoxal, ao contrário dos glicosídeos comuns, que possuem características mais polares, os glicosídeos pregnanos, além da glicose e da fucose, diferenciam-se pela presença de monossacarídeos metilados, principalmente em C-3, conferindo a estas estruturas um caráter mais apolar. Essa característica particular reflete nos seus métodos de extração. O advento de novas tecnologias contribuiu para melhorar o rendimento dos extratos de plantas e as aplicações industriais das espécies medicinais. No entanto, os métodos clássicos ainda são aplicados, especialmente na investigação e na descoberta de metabolitos secundários (FIERASCU et al. 2020; SÁNCHEZ-CAMARGO et al. 2020).

A nossa análise indicou oito métodos como os mais frequentemente utilizados para a extração de PGs: micro-ondas, ultra-sons, turbólise, percolação, extração com solventes quentes, refluxo e maceração. Entre estes métodos, os três últimos, seguidos da extração líquido-líquido (ELL), foram os mais frequentemente aplicados. Além disso, 57% dos trabalhos que utilizaram ELL obtiveram PGs a partir de frações solúveis cloradas (clorofórmio e diclorometano), após procedimentos cromatográficos adicionais. Este resultado alerta os químicos de produtos naturais para a necessidade de desenvolver métodos de extração alternativos de acordo com as atuais exigências ecológicas.

Relativamente às partes utilizadas para a investigação fitoquímica com base no isolamento dos compostos, as raízes representam a principal fonte de PGs (Figura 18). As raízes das plantas superiores constituem um tecido metabolicamente ativo e são conhecidas pela sua capacidade de produzir um grupo diversificado de metabolitos secundários (BAIS et al. 2001).

Figura 18. Partes da planta identificadas como fonte de PGs.



Em muitas plantas, as saponinas e outros glicosídeos são, principalmente, sintetizados e armazenados em órgãos subterrâneos (MOSES et al., 2014). Desempenham um papel fundamental na defesa contra microorganismos patogênicos e parasitas. Além disso, ferimentos ou danos também levam a uma acumulação destes glicosídeos, como ocorre em espécies de *Calotropis* (Apocynaceae) (PANDEY et al., 2016). Além disso, a etnofarmacologia aponta as raízes como ingredientes ativos em muitas preparações tradicionais. Isso poderia explicar o interesse e o isolamento de PGs nesta parte. Além disso, as diferenças nas cadeias laterais dos PGs e nas porções de açúcar fornecem uma infinidade de compostos, muitos dos quais apresentam atividades biológicas importantes.

5.1.3 Atividades biológicas

Os PGs têm demonstrado uma ampla gama de efeitos biológicos. A nossa pesquisa identificou mais de 30 atividades biológicas associadas a esta classe de compostos, destacando-se quatro delas como as mais extensivamente estudadas: as atividades citotóxica, antiproliferativa, imunomoduladora e neuroprotetora. Entre estas, a atividade citotóxica foi a que recebeu mais atenção, o que é consistente com dados anteriores. Os pregnanos encontrados na literatura, que passaram por estudos biológicos, bem como seus IDs estão descritos no quadro 2.

Quadro 2. Lista de pregnanos isolados cujas atividades biológicas foram avaliadas.

ID	Nome do composto	Atividade biológica	Referência
608	Acetyl-royleneine	Antioxidante	(Sethi et al. 2008a)
620	Alpinoside C	Antibacteriano	(Hamed 2001)
624	Argeloside C	Antioxidante Antiproliferativa	(Plaza et al. 2005; Ounaissia et al. 2016)
625	Argeloside F	Antioxidante Antiproliferativa	(Plaza et al. 2005; Ounaissia et al. 2016)
47, 48, 49, 50, 51	Caradalzieloside C-D	Anti-Tripanossoma Citotóxico	(Abdel-Sattar et al. 2009a)
176, 174	Caratuberside C-D	Anti-Tripanossoma Citotóxico	(Abdel-Sattar et al. 2008)
182, 175, 178	Caratuberside E-G	Anti-Tripanossoma	(Abdel-Sattar et al. 2008)

129	Caretroside A	Anticâncer	(Halim and Khalil 1996)
185	Carumbelloside I	Anti-inflamatório Anti-Nociceptivo	(Ramesh et al. 1999)
188	Condurangoside C	indução da diferenciação celular na leucemia mieloide	(Umehara et al. 1994)
7	Curassavoside A	Citotóxico	(Li et al. 2008)
271, 272, 273	Cynabungoside A-C	Imunomoduladora	(Qin et al. 2018)
276, 277, 278	Cynanauriculoside C-E	Antidepressivo	(Yang et al. 2011)
331	Cynauricuoside C	Antidepressivo	(Yang et al. 2011)
227, 217, 218, 225, 220, 221, 222, 223, 224	Cynanoside A-J	Anti-TMV	(Yan et al. 2014)
200, 202	Cynanoside P1 and P3	Inibidor da melanogênese	(Jin et al. 2018)
309	Cynanversicoside A	Inibidor da melanogênese	(Jin et al. 2018)
209, 210	Cynanoside R1-R2	Citotóxico	(Bai et al. 2009)

261	Cynascyroside C	Imunomoduladora	(Li et al. 2006a)
310	Cynatratoside B	Relaxante da musculatura respiratória	(Leon et al. 2008)
268	Cynatroside B	Inibição da Ache Anti-Amnésico	(Lee et al. 2005)
337	Cynauricoside A	Antiepiléptico	(Li et al. 2016a)
352	Cynawilfoside A	Antiepiléptico	(Li et al. 2016a)
315, 324, 320	Cynsaccatol A, D-E	Citotóxico	(Zhang et al. 2015b)
322, 321, 248, 241, 232	Cynsaccatol I, N, O, Q, S	Neuroprotetivo	(Qian et al. 2017)
386, 387	Desmiflavaside C-D	Antiproliferativo	(Raees et al. 2016)
490, 501	Dregeoside Ap1, Ao1	Anti-Câncer	(Yoshimura et al. 1983)
418	Drevoluoside N	Anti- α -Glucosidase	(Thuy et al. 2020)
419	Drevoluoside Q	Inibição de α -Amilase	(Thuy et al. 2021)

265	Glaucoside H	Imunomodulador Citotóxico	(Wang et al. 2017) (Li et al. 2006a)
435	Gongroneside A	Antimalárico Anti- α Glucosidase	(Libman et al. 2008)
462, 463	Gyminoside A-B	Anti- α Glucosidase	(Trang et al. 2021)
466	Gymnepregoside F	Anti- α Glucosidase Anti-Glicêmica	(Trang et al. 2021)
490	Hoyacarnoside G	Anti- α Glucosidase	(Thuy et al. 2021)
521	Huernioside A	Anti- α -Glucosidase Inibidor da lipase	(El Sayed et al. 2020)
432	Iloneoside	Anticâncer	(Gyebi et al. 2018)
579	Marsdekoiside A	Anti-fertilidade	(Jin-Ian et al. 1991)
546, 547	Marsdenoside A-B	Anticâncer	(Liu et al. 2021)
584	Marsdeoreophiside B	Anti-Fertilidade	(Zhang et al. 1994)
673, 679	Mucronatoside E-H	Imunomodulador	(Li et al. 2006b)
	Otophyllaside B	Antiepiléptico Antitumorai	(Li et al. 2015; Yang et al. 2015, 2017;

282		Citotóxico Antiepilético Proteção contra a toxicidade A β (doença de Alzheimer)	Dong et al. 2018, 2020)
276	Otophyllósido L	Antidepressivo	(Yang et al. 2011)
298	Otophyllósido N	Neuroprotetivo Citotóxico	(Zhang et al. 2015a; Li et al. 2016c)
299	Otophyllósido O	Citotóxico	(Zhang et al. 2015a)
118-124	Penicillosido A-G	Anti-Tripanossoma Citotóxico	Abdel-Sattar et al., 2002
608	Roylenine	Anti-Obesidade	(Sethi et al. 2008b)
141	Russeliosido B	Anti-hiperglicêmico Gastroprotector e antiulceroso Anti-artrítico Antibacteriano	(Abdel-Sattar and Ali 2022)
139	Russeliosido C	Antibiofilme contra <i>S. aureus</i> resistente	(Abdel-Sattar and Ali 2022)
145	Russeliosido E	Anti-Tripanossoma	(Abdel-Sattar et al. 2009b)
256, 257, 258, 259, 260	Saccatol G-K	Neuroprotetiva	(Qian et al. 2017)

242	Sinomarinoside A	Imunomoduladora	(Li et al. 2005)
328	Stauntoside D3	Anti-Inflamatório	(Lai et al. 2016)
675	Stemucronatoside A	Atividade hemolítica	(Wang and Ye 2005)
675, 676, 677, 680, 666, 668, 658, 681, 658, 664, 672	Stemucronatoside A-L	Imunomodulador	(Ye et al. 2004, 2008; Wang and Ye 2005; Li et al. 2006a; Chen et al. 2010)
563	Stephanoside B	Hipolipemiante	(Saiki et al. 2020)
562	Stephanoside E	Imunomodulador	(Chen et al. 2010)
698	Telosmoside A15	Melhorador de adoçante	(Huan et al. 2001)
555	Tenacissoside B	Reversão da resistência a múltiplos fármacos	(Hu et al. 2008)
558	Tenacissoside G	Reversão da resistência a múltiplos fármacos na glicoproteína P (Pgp)	(Wang et al. 2021)
		Anticancerígeno	

553	Tenacissoside H	Neuroprotector Anti-inflamatório Melhora o tratamento Reversão da resistência a múltiplos fármacos na glicoproteína P (Pgp)	(To et al. 2017; Lin et al. 2021; Zhang et al. 2021)
559	Tenacissoside I	Reversão da resistência a múltiplos fármacos na glicoproteína P (Pgp)	(To et al. 2017)
464	Tinctoroside B-C	Anti- α Glucosidase	(Trang et al. 2021)
57	Tomentogenin3-O- β - thevetopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- β - oleandropyranoside	Antiproliferativo	(Deleo et al. 2005)
418	Volubiloside A	Anti- α Glucosidase	(Thuy et al. 2020)
347	Wilfoside C1G	Antifúngico	(Yoon et al. 2011)
349	Wilfoside C3N	Antiepiléptico Anticâncer	(Liu et al. 2010; Li et al. 2015)
350	Wilfoside K1N	Supressor do apetite Antifúngico Citotóxico Antiepiléptico Antitumoral	(Kim et al. 2005; Liu et al. 2013; Li et al. 2016b; Wu et al. 2018)
	11 α -Acetoxy-12 β -[((E)-cinnamoyl) oxy]-8 β ,14 β -dihydroxy-20-oxo-pre	Citotóxico	

573	gn-5-en-3 β -ylO- β --cymaropyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- β d-cymaropyranoside		(Tatsuno et al. 2019)
128	12,20-di-O-benzoyl-3b,5a,12b,14b,20-pentahydroxy-(20R)-pregn-6-ene-3-O-b-D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-b-D-digitoxopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-b-D-canaropyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-b-D-cymaropyranoside	Citotóxico	(Abdallah et al. 2013)
125	12,20-di-O-benzoylboucerin 3-O-b-D-cymaropyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-b-D-canaropyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-b-D-cymaropyranoside	Citotóxico	(Abdallah et al. 2013)
127	12,20-di-O-benzoylboucerin 3-O-b-D-digitoxopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-bD-canaropyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-b-D-cymaropyranoside	Anti-inflamatório	(Liu et al. 2008)
-	Compostos 1-16, 18-23, 25-26	Antiproliferatio	(Deleo et al. 2005)

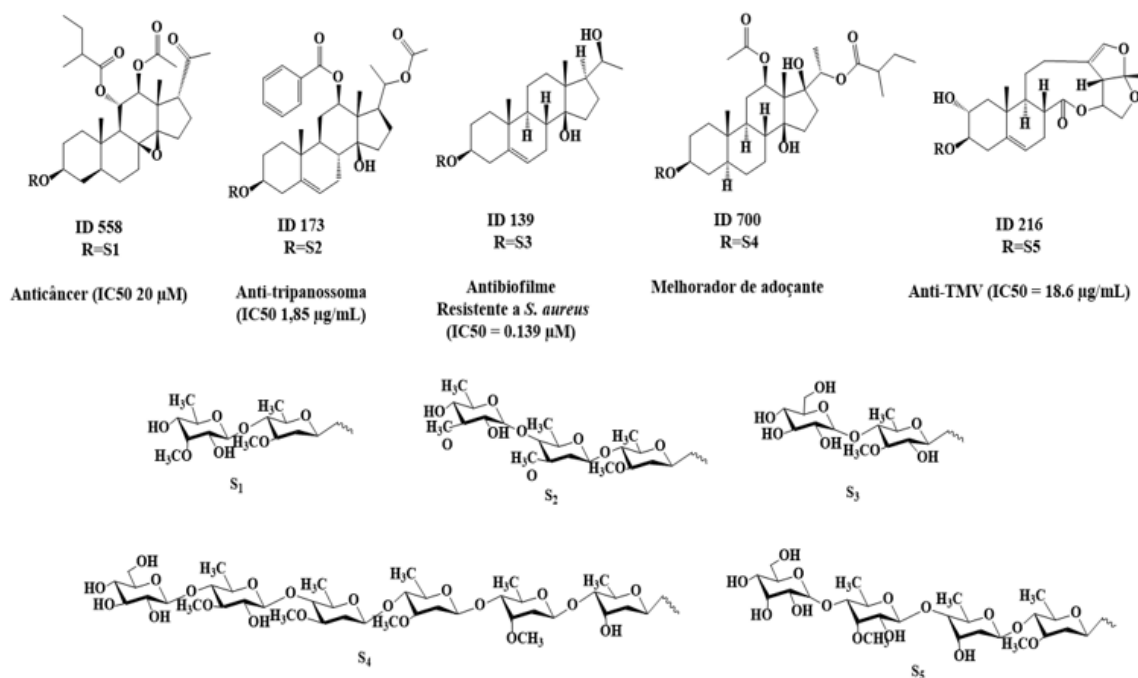
A compreensão dos alvos moleculares subjacentes às atividades biológicas dos produtos naturais tornou-se crucial para a elucidação dos seus mecanismos de ação (ZHU et al. 2022). No caso dos PGs, estudos têm investigado os mecanismos associados aos seus efeitos antitumorais, destacando-se o envolvimento de proteínas específicas como a ABCB1 e a tirosina fosfatase (RAEES et al. 2016; WU et al. 2021). ABCB1, também conhecido como MDR1/P-gp, é um transportador de membrana dependente de ATP de 170-kDa pertencente à família de transportadores ABC ou cassetes de ligação de ATP. As tirosina fosfatases, por outro lado, catalisam a desfosforilação de proteínas tirosina quinases (PTKs) e desempenham papéis reguladores cruciais em múltiplas vias de transdução de sinais (XIE et al. 2021). A inibição destes alvos pode sensibilizar as células resistentes a medicamentos aprovados utilizados no tratamento do câncer e prevenir o desenvolvimento de resistência aos inibidores da tirosina quinase nos linfomas anaplásicos de grandes células.

As características estruturais dos PGs fornecem informações valiosas para o desenvolvimento de agentes anticancerígenos. Por exemplo, o Tenacissoside H (figura 19, ID 558) mostrou-se promissor como um composto com atividade em diferentes tipos de células, sugerindo uma atividade multi-alvo, que poderia ser explorada para o desenvolvimento de terapias anticâncer e outras doenças complexas (PATEL et al., 2022). Estudos de relação estrutura-atividade em polioxipregnanos isolados de *Marsdenia tenacissima* elucidaram os grupos essenciais necessários para os efeitos antitumorais desses compostos (TO et al. 2017). No entanto, a literatura ainda carece de informações abrangentes sobre os mecanismos e requisitos estruturais para outras moléculas de pregnanos, bem como a validação adequada por meio de ensaios *in vitro* e *in vivo*.

Para além do seu potencial como agentes anticancerígenos, os PGs também demonstraram atividade contra outras doenças. Por exemplo, o caratubersídeo C (figura 19, ID 173) demonstrou atividade contra a tripanossomíase, uma doença que continua a afetar milhões de pessoas, particularmente nos países em desenvolvimento (ABDEL-SATTAR et al. 2008; FRANCO et al., 2022). Os PGs também demonstraram potencial contra bactérias multirresistentes, o que é um problema global significativo. Os Russeliosídeos A-E, por exemplo, demonstraram atividade contra *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina, sendo o Russeliosídeo C (figura 19, ID 139) o mais potente (EL-SHIEKH et al. 2021).

Além disso, alguns compostos PG demonstraram aplicações potenciais para além do desenvolvimento de medicamentos. O telosmosídeo A15 (figura 19, ID 700) demonstrou uma atividade potenciadora da doçura, o que o torna um elemento útil para a indústria alimentar (HUAN et al. 2001). Os cianósidos, por outro lado, demonstraram a capacidade de inibir o vírus do mosaico do tabaco, uma praga que afeta a produtividade e o rendimento de várias plantas, o que os torna uma alternativa sustentável para a gestão das culturas. O Cynanoside G (figura 19, ID 216) foi considerado o mais potente entre eles, com um IC_{50} de 18,6 $\mu\text{g/mL}$ (YAN et al. 2022). Apesar destas descobertas promissoras, muito se tem a investigar, uma vez que, apenas 24% dos compostos incluídos neste estudo foram testados.

Figura 19. PGs promissores com potenciais aplicações em vários domínios. As estruturas apresentadas representam compostos identificados em nossa análise como tendo um potencial significativo em diferentes atividades. Estes compostos exemplificam a gama diversificada de aplicações dos PGs.



Esses resultados revelam um cenário intrigante, pois uma parte significativa dos PGs isolados da subfamília Asclepiadoideae carece de informações biológicas. Para acelerar a descoberta de compostos ativos, uma combinação de técnicas como NMR e LC-MS, ensaios *in vitro*, triagem *in silico*, mineração de genoma e aprendizagem automática (ML) foi proposta como estratégias inovadoras, particularmente à luz da pandemia de SARS-CoV-2, que começou em 2019 (ATANASOV et al. 2021; SILVA et al. 2021; DZOBO 2022).

A aprendizagem automática refere-se ao estudo e à aplicação de algoritmos que efetuam tarefas de classificação e previsão com base no reconhecimento de padrões, sem depender de regras explicitamente definidas (PRIHODA et al., 2021). Os métodos de aprendizagem automática, como as redes neurais, têm sido cada vez mais utilizados pela comunidade de investigação de produtos naturais para explorar o genoma e a diversidade química de vários organismos. Estes métodos têm facilitado o desenvolvimento de bases de dados ômicas e de produtos naturais, permitindo a identificação de clusters biossintéticos e a descoberta de compostos bioativos promissores (CECH et al. 2021; JIA et al. 2022). No entanto, a disponibilidade e a qualidade dos dados são cruciais para o desenvolvimento de conjuntos de treinamentos robustos. A este respeito, a etnofarmacologia combinada com a quimiofenética surge como uma fonte valiosa de dados de entrada para a análise de ML.

A quimiofenética propõe a exploração de um conjunto de metabólitos secundários em, contribuindo para a caracterização do táxon e a busca racional de metabólitos naturais bioativos (RAMOS et al., 2023). Com base nisso, com o intuito de contribuir com o estudo de Asclepiadoideae, os PGs foram compilados e posteriormente analisados por Mapas Auto-Organizáveis (SOMs), um método de rede neural não supervisionado.

5.1.4 SOMs

O uso de SOM na análise do espaço químico tem sido amplamente reconhecido e adotado nos campos da química medicinal e da ciência de dados, permitindo a exploração e visualização de conjuntos de dados moleculares complexos (OLIVEIRA et al. 2023). Essa abordagem provou ser particularmente valiosa na identificação de semelhanças estruturais, na descoberta de clusters químicos e no design de bibliotecas de compostos focados para triagem e otimização. Além disso, com base nas propriedades físico-químicas codificadas a partir de estruturas químicas, os SOMs são uma ferramenta útil para procurar compostos com características definidas usando dados taxonômicos e geográficos (SILVA CAVALCANTI et al., 2019).

Entre estas tribos da subfamília Asclepiadoideae, Asclepiadeae, Marsdeniae e Ceropegieae, compreendem a maioria das espécies e são as mais estudadas, em termos de composição química. No presente estudo, foi identificado um total de 643 estruturas químicas únicas de PGs, com 706 ocorrências botânicas nas três tribos. É de notar que uma ocorrência botânica indica a presença dos mesmos compostos em diferentes espécies. A Tabela 1 fornece mais informações sobre a distribuição e a diversidade das quantidades de compostos em cada grupo.

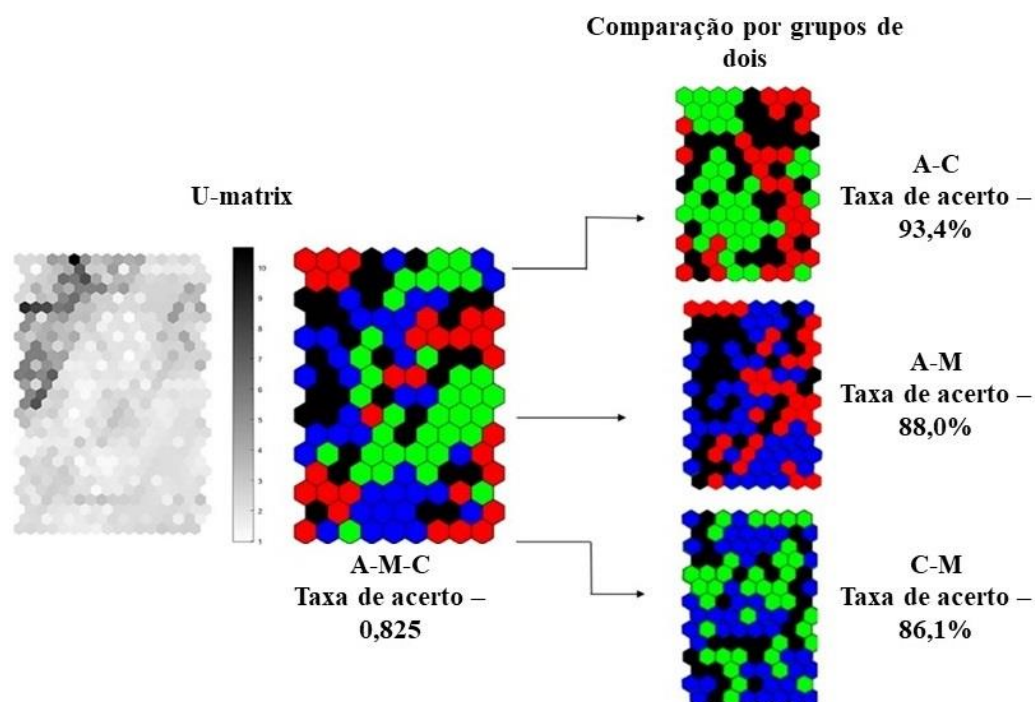
Tabela 1. Informações botânicas e ocorrência dos glicosídeos pregnanos, considerados neste estudo, para as três principais tribos de Asclepiadoideae.

Tribo	Gênero	Espécies	Glicosídeos pregnanos	Ocorrências
Asclepiadeae	8	17	210	222
Marsdeniae	11	23	224	255
Ceropegieae	8	25	209	229

As ocorrências botânicas foram classificadas nas três tribos selecionadas, e os valores dos descritores moleculares foram utilizados como dados de entrada no software SOM Toolbox. Isto permitiu a geração de uma matriz auto-organizada de PGs, que foram

posteriormente classificados nas suas respectivas tribos com base na sua semelhança química. Os SOMs resultantes dos descritores de glicosídeos pregnanos de Asclepiadoidea estão representados na Figura 20.

Figura 20. SOMs de descritores de glicosídeos pregnanos de Asclepiadoidea. A Matriz de Distâncias Unificadas (U-matrix) está representada pela cor cinza, enquanto as tribos selecionadas, nomeadamente Asclepiadeae (A), Ceropegieae (C) e Marsdenieae (M), estão indicadas pelas cores correspondentes (vermelho, verde e azul, respetivamente)



O SOM treinado foi analisado posteriormente para identificar regiões no mapa que correspondiam a características estruturais específicas dos PGs. A matriz U é uma ferramenta de visualização comumente usada para SOMs e exibe as distâncias espaciais dos dados de entrada (LÖTSCH e ULTSCH, 2014). Na Figura 20, a matriz U é representada em escala cinza, com cores mais claras para indicar uma maior proximidade entre os neurônios no espaço de entrada, enquanto os pontos mais escuros representam limites que separam grupos de PGs. Esta apresentação da matriz U permite uma análise rápida da classificação e distribuição dos dados de entrada, especificamente os descritores dos PGs entre as tribos.

Ao examinar a matriz U na Figura 20, os principais grupos de PGs podem ser identificados com base na sua proximidade no mapa, que é indicada por cores diferentes. Além disso, a taxa de acerto obtida a partir dos descritores gerados pelo alvaDesc 2.0 foi superior a 80%, indicando um elevado nível de precisão na classificação das tribos pelo modelo. Modelos com taxas de acerto superiores a 70% são considerados de excelente desempenho. Além disso, a comparação das taxas de acerto entre as tribos revelou padrões distintos, com Asclepiadeae

apresentando características únicas, apesar do menor número de PGs no conjunto de dados. Por outro lado, Marsdenieae apresentou semelhanças com Ceropegieae e Asclepiadeae, como evidenciado pelas taxas de acerto de 88% e 86,1%, respectivamente. A similaridade química entre Marsdenieae e Ceropegieae foi maior. Para garantir a robustez e a precisão estatística do modelo, foi efetuada uma validação cruzada de 5 vezes dos mapas auto-organizados e os resultados podem ser visualizados na tabela 2.

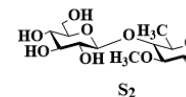
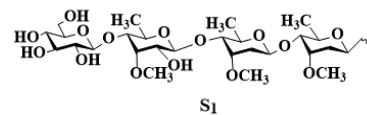
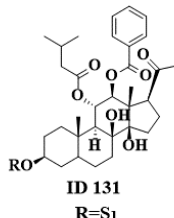
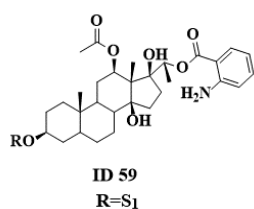
Tabela 2. Resultado da validação cruzada de 5 vezes dos mapas auto-organizados.

Tribo	Treino 1	Treino 2	Treino 3	Treino 4	Treino 5	Média
Asclepiadeae	0.907	0.834	0.852	0.846	0.858	0.859
Marsdenieae	0.777	0.798	0.813	0.821	0.830	0.807
Ceropegieae	0.802	0.774	0.816	0.791	0.791	0.794
Accuracy	0.824	0.798	0.826	0.818	0.826	0.818
Tribo	Teste 1	Teste 2	Teste 3	Teste 4	Teste 5	Média
Asclepiadeae	0.925	0.925	0.825	0.725	0.850	0.850
Marsdenieae	0.596	0.673	0.750	0.769	0.769	0.711
Ceropegieae	0.804	0.760	0.913	0.630	0.847	0.790
Accuracy	0.760	0.775	0.826	0.710	0.818	0.777

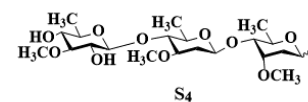
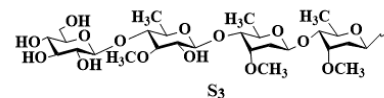
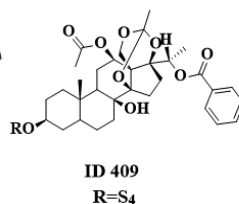
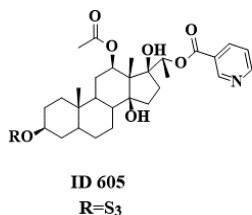
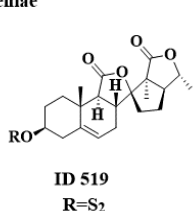
Para identificar os compostos característicos de cada tribo, foi efetuada uma análise detalhada dos principais descritores moleculares. Vinte descritores foram considerados os mais informativos, levando à identificação de diferentes estruturas associadas às tribos Ceropegieae, Marsdenieae e Asclepiadeae. Estes esqueletos estão representados na Figura 21.

Figura 21. Estruturas representativas de PGs destacando algumas características estruturais específicas ao longo das três principais tribos da subfamília Asclepiadoidea identificadas por descritores moleculares.

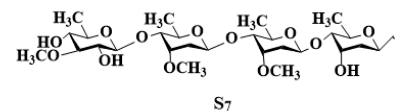
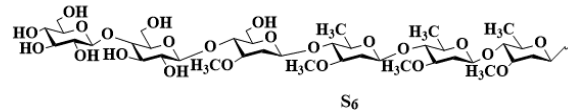
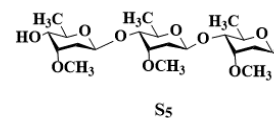
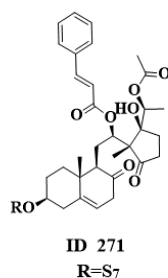
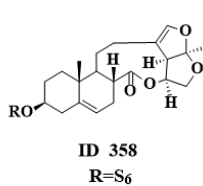
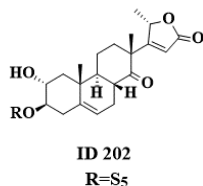
Ceropegieae



Marsdeniae

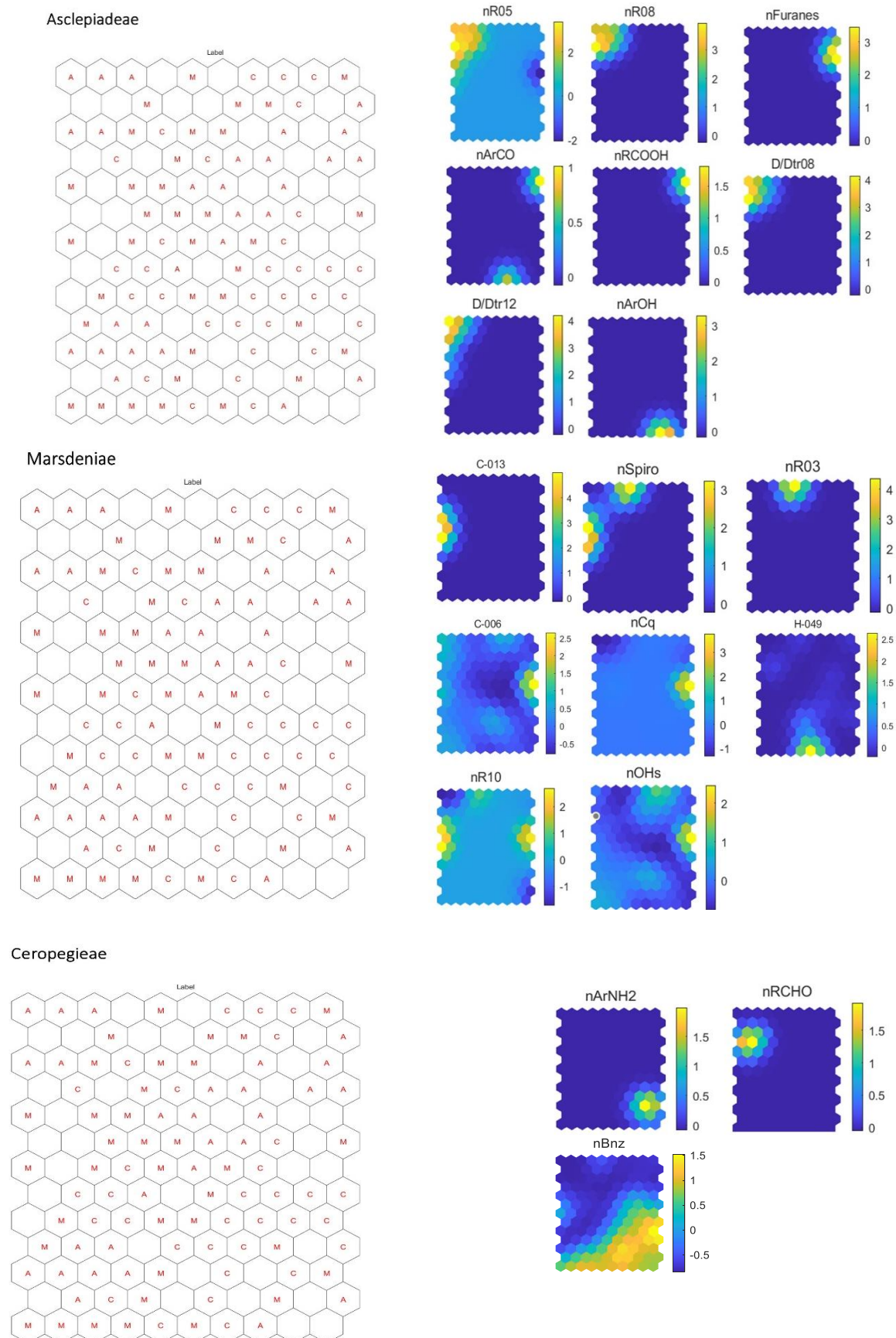


Asclepiadeae



O mapa de acertos de cada descritor e a localização dos compostos selecionados na matriz U podem ser visualizados na figura 22, onde, no lado esquerdo, há uma representação da matriz U, e as letras associadas a cada uma das tribos A - Asclepiadeae, M- Masdeniae e C - Ceropegieae representam a distribuição dos dados de entrada no espaço da matriz, evidenciando os agrupamentos formados por semelhanças nas estruturas dos PGs. No lado direito, cada figura colorida representa um descritor molecular, sendo que a cor amarela nos mapas de calor mostra o alto nível das características codificadas por cada característica molecular específica. A associação de ambos os mapas levou à identificação das estruturas dos compostos que contribuem para discriminar cada grupo. A análise destes esqueletos fornece informações valiosas sobre a diversidade estrutural dos PGs dentro de cada tribo.

Figura 22. Mapas de calor resultantes da análise de SOMs, mostrando os descritores moleculares selecionados dos esqueletos de Glicosídeos Pregnanos de cada tribo da subfamília Asclepiadoidea, selecionada para este estudo.



Em relação aos aspectos estruturais, aproximadamente seis tipos de esqueletos de PGs foram relatados na literatura (SI et al., 2022). Entre eles, os tipos polioxi, seco e diseco são frequentemente encontrados nas principais tribos de Asclepiadoidea, conforme ilustrado na Figura 20. Este fato realça a quimiodiversidade dos PGs dentro deste grupo de plantas. Além disso, os compostos que partilham alguns destes tipos de esqueletos foram mencionados como promissores para várias aplicações.

Os descritores relacionados com a presença de anéis benzeno indicam a ocorrência de PGs contendo grupos aromáticos, particularmente em Ceropegieae e Marsdenieae (Figura 22). Outra característica associada a estas duas tribos é a presença de compostos contendo nitrogênio; foram encontradas aminas aromáticas no grupo Ceropegieae, representado pelo ID 59 (Figura S1). Entretanto, a porção piridina é frequentemente observada em Marsdenia, como demonstrado por ID 605 (figura 1 do suplemento). Além disso, PGs compostos por agliconas $12\alpha,20\alpha$ -epoxi- 14β -hidroxipregn-5-en-11-ona, isoladas dos caules de *Hoya kerrii*, foram identificados (ID 519) (figura 1 do suplemento) devido à presença de carbonos espiro em suas estruturas (SEEKA et al. 2017). Essas descobertas contribuem para uma melhor compreensão das semelhanças e diferenças nos perfis químicos entre Ceropegieae e Marsdenieae.

No caso de Asclepiadeae, apesar da ocorrência de tipos comuns de PGs, ela difere das outras tribos devido à presença de seco e diseco pregnanos, que exibem modificações estruturais notáveis. Substâncias compostas por esses núcleos foram isoladas de espécies tradicionalmente utilizadas, a exemplo do gênero *Cynanchum* (Figura S1) e mostraram efeitos antiproliferativos em linfócitos, propriedades anti-inflamatórias e potencial citotóxico (BAI et al. 2009; QIN et al. 2018; ZHAO et al. 2018). Esses resultados ressaltam o potencial biológico dos PGs e seus núcleos, orientando estudos futuros para o isolamento de novos compostos bioativos e auxiliando na determinação de marcadores químicos e farmacológicos em espécies de Asclepiadoidea.

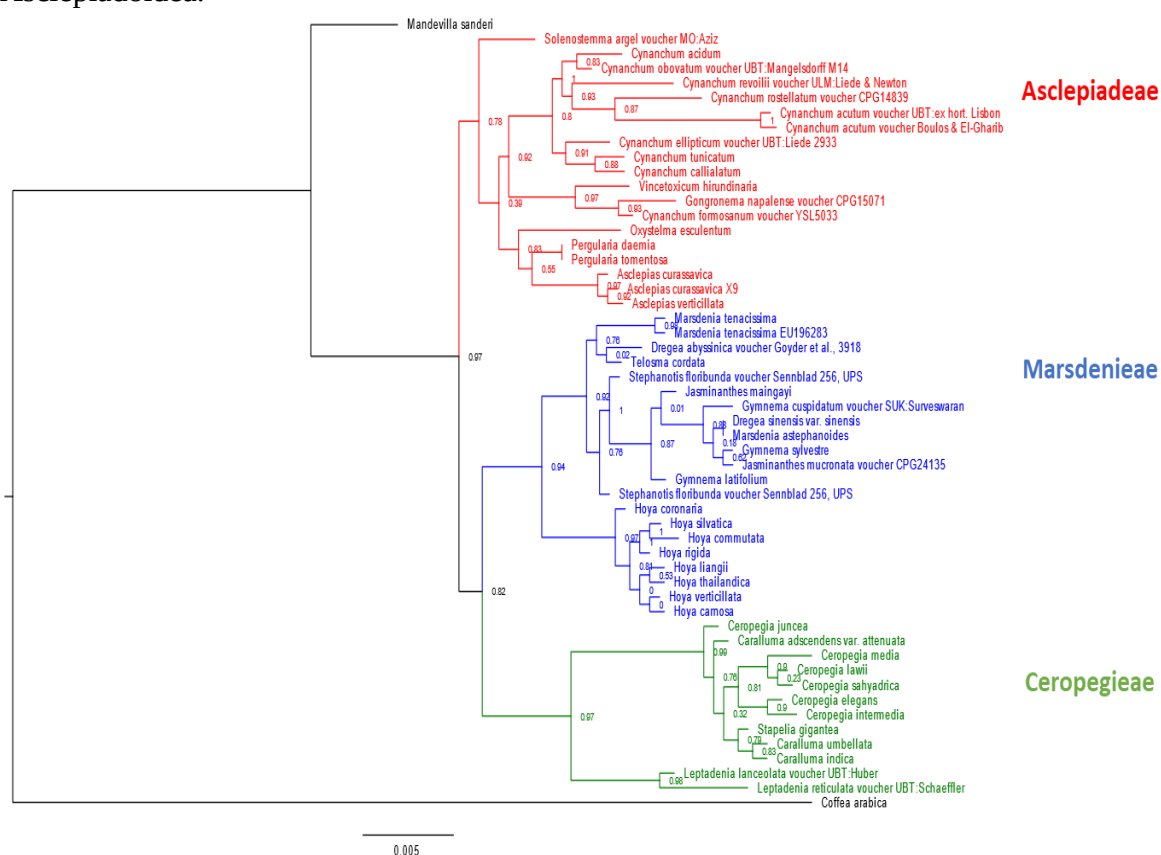
Diante dos resultados obtidos com a análise SOM, vale ressaltar que a abordagem quimiofenética também se refere à relação entre dados químicos e estudos macromoleculares, especialmente aqueles que envolvem a filogenética. Para corroborar com os achados acima mencionados, foi realizada uma reconstrução filogenética, comparando alguns gêneros e espécies incluídos no presente estudo.

5.1.5 Reconstrução filogenética

Os resultados da nossa análise de reconstrução filogenética revelaram informações interessantes sobre as relações entre as tribos de Asclepiadoideae. Especificamente,

observamos uma estreita relação ancestral entre Marsdenieae e Ceropegieae, indicando uma afinidade genética. Além disso, Marsdenieae ocupou uma posição intermediária entre Ceropegieae e Asclepiadoideae, como mostra a figura 23.

Figura 23. Árvore filogenética compreendendo espécies das principais tribos de Asclepiadoidea.



Estas descobertas se alinham com análises filogenéticas abrangentes anteriores de Apocynaceae, que incluíram um número maior de táxons (FISHBEIN et al., 2018; NAZAR NAZIA et al., 2019; WANG et al., 2023). Tais descobertas têm implicações significativas para a classificação e posicionamento taxonômico de certas espécies que ainda estão em estudo, incluindo os gêneros *Hoya* e *Leptadenia* (ODAGO et al., 2022; BRUYNS et al., 2023). Além disso, nossos resultados corroboraram com as descobertas dos mapas auto-organizados (SOMs), fornecendo mais evidências da estreita semelhança química entre Marsdenieae e Ceropegieae.

A integração da análise filogenética com dados químicos provou ser uma abordagem valiosa na compreensão das relações evolutivas e químicas dentro dos táxons de plantas. Combinando dados moleculares da sequenciação RubisCO (enzima mais abundante nas plantas e, por conseguinte, a proteína mais abundante no planeta) com os perfis químicos dos

glicosídeos pregnanos, conseguimos obter uma compreensão mais abrangente da subfamília Asclepiadoideae. Esta abordagem multidisciplinar fornece uma estrutura poderosa para estudar a diversificação e a evolução dos metabólitos secundários dentro deste grupo de plantas. Além disso, oferece uma visão sobre o potencial significado funcional e ecológico destes compostos em relação à história evolutiva da planta.

A congruência entre nossos resultados filogenéticos e os perfis químicos observados através da análise SOM destaca a interconexão entre as relações genéticas e a diversidade química em Asclepiadoideae. A estreita associação entre certas tribos e características químicas específicas sugere que a biossíntese e a acumulação de glicosídeos pregnanos são influenciadas por fatores genéticos. Estes resultados contribuem para a nossa compreensão dos processos evolutivos e das adaptações ecológicas na subfamília Asclepiadoideae. Enfatizam a importância de considerar dados genéticos e químicos em estudos futuros destinados a elucidar os papéis funcionais e as aplicações potenciais dos glicosídeos pregnanos neste grupo de plantas.

Além disso, no estudo filogenético constatou-se apenas uma espécie de *Mandevilla*, permitindo uma escolha mais assertiva da espécie a ser estudada, no que diz respeito ao isolamento de pregnanos com agliconas de esqueletos diferenciados.

5.1.6 Conclusões

Em conclusão, este estudo abrangente fornece uma exploração detalhada da etnofarmacologia, fitoquímica e atividades biológicas das espécies de Asclepiadoideae, com um foco específico nos seus glicosídeos pregnanos. A integração do conhecimento tradicional, de métodos fitoquímicos avançados e da quimiofenética permitiu a identificação de potenciais estruturas bioativas nas três principais tribos da subfamília Asclepiadoideae. Nomeadamente, na tribo Asclepiadeae, a ocorrência dos tipos seco e diseco pregnano destaca-se como um padrão químico distinto, que contribui para as suas atividades biológicas únicas e para o potencial de novos conhecimentos em química medicinal. Além disso, o desenvolvimento de uma base de dados abrangente que inclui 643 glicosídeos pregnanos e as suas 706 ocorrências botânicas constitui um recurso valioso para orientar futuras investigações que envolvam espécies de Apocynaceae e os seus compostos em vários campos de estudo. Ao associar o conhecimento tradicional a abordagens científicas modernas, este trabalho abre novas vias para a exploração e utilização de produtos naturais de espécies de Asclepiadoideae.

Conflito de interesse

Os autores declaram não ter qualquer interesse comercial ou associativo que represente um conflito de interesses em relação ao trabalho apresentado.

Financiamento

Este trabalho foi apoiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES, Finance Code 001) e a Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) por meio do INCT-RENNOFITO.

Contribuições dos autores

TAS, FSVL: Contribuíram igualmente na concepção do estudo, na análise dos dados e na redação da primeira versão do manuscrito; SPC: Reconstrução filogenética; JSL, AFA, TAMB: Levantamento e análise de dados; MTS: Machine Learning; LSA e MSS: Leitura crítica da primeira versão do manuscrito; JFT: Supervisão do trabalho.

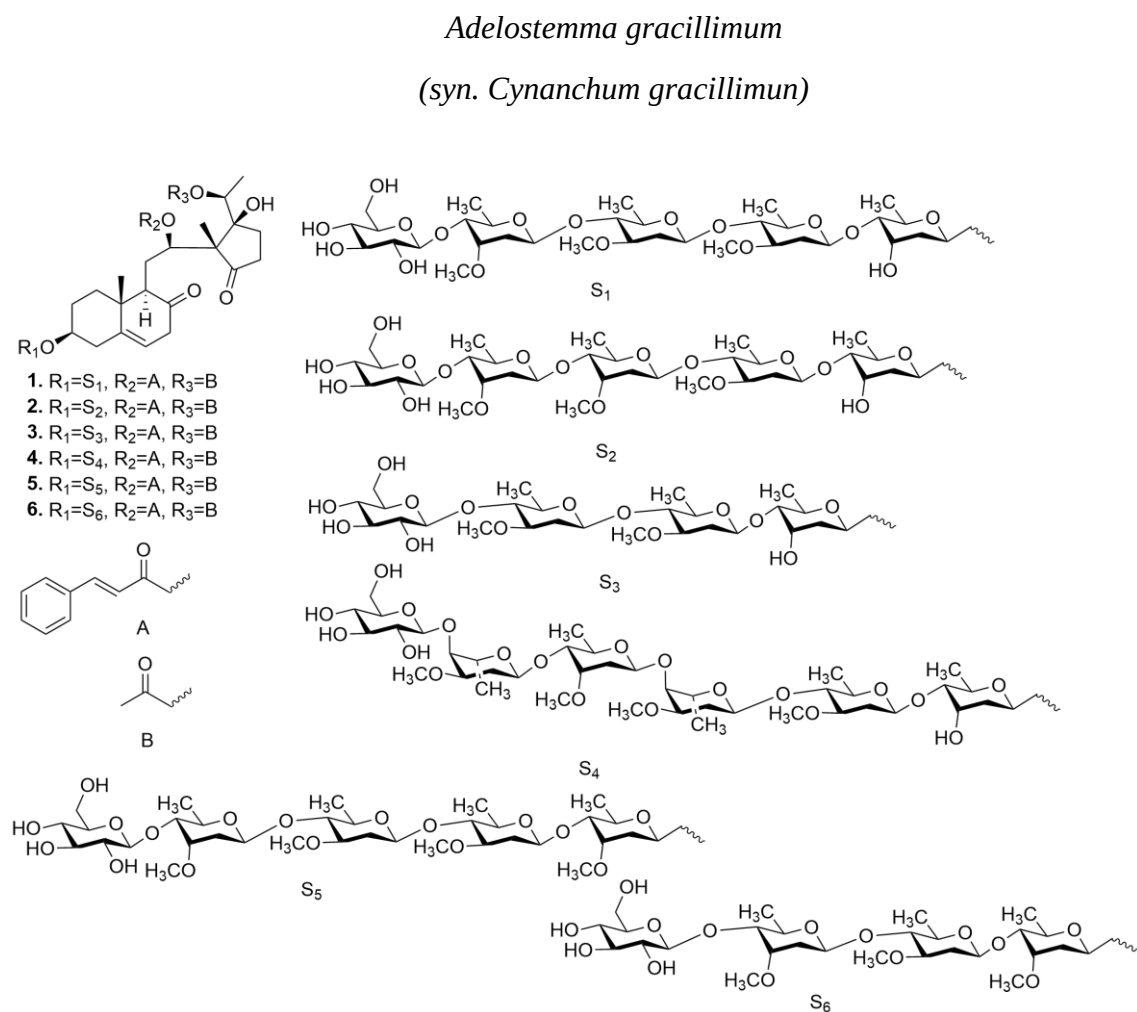
Consentimento

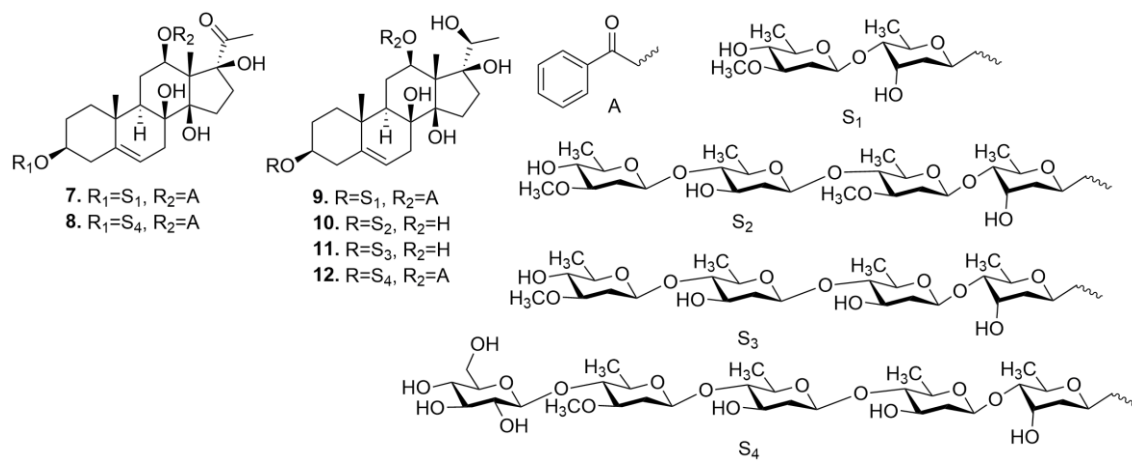
Todos os autores leram o manuscrito final e aprovaram a sua submissão.

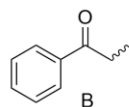
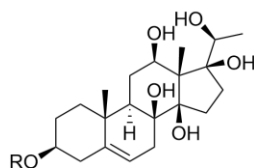
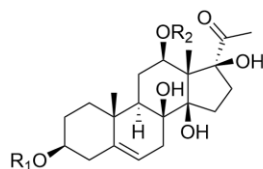
MATERIAL SUPLEMENTAR

Manuscrito: **Subfamília Asclepiadoideae (Apocynaceae): Etnofarmacologia, Atividades Biológicas e Químiofenética Baseadas em Glicosídeos Pregnanos.**

Figure S1. Estruturas químicas dos PGs incluídos no presente trabalho, ordenadas por espécie.



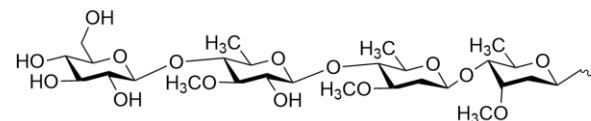
Asclepias curassavica

Asclepias verticillata

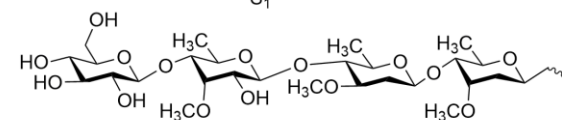
13. $R_1=S_1$, $R_2=A$
 14. $R_1=S_2$, $R_2=A$
 15. $R_1=S_3$, $R_2=A$
 16. $R_1=S_4$, $R_2=A$
 17. $R_1=S_1$, $R_2=H$

18. $R_1=S_2$, $R_2=H$
 19. $R_1=S_3$, $R_2=H$
 20. $R_1=S_1$, $R_2=B$
 21. $R_1=S_2$, $R_2=B$
 22. $R_1=S_4$, $R_2=B$

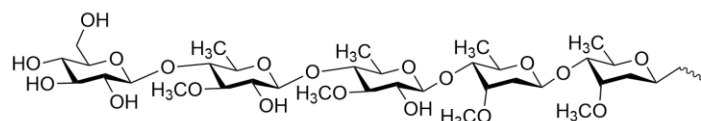
23. $R=S_1$
 24. $R=S_2$
 25. $R=S_3$



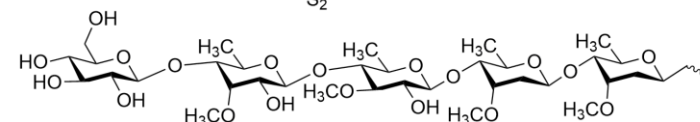
S_1



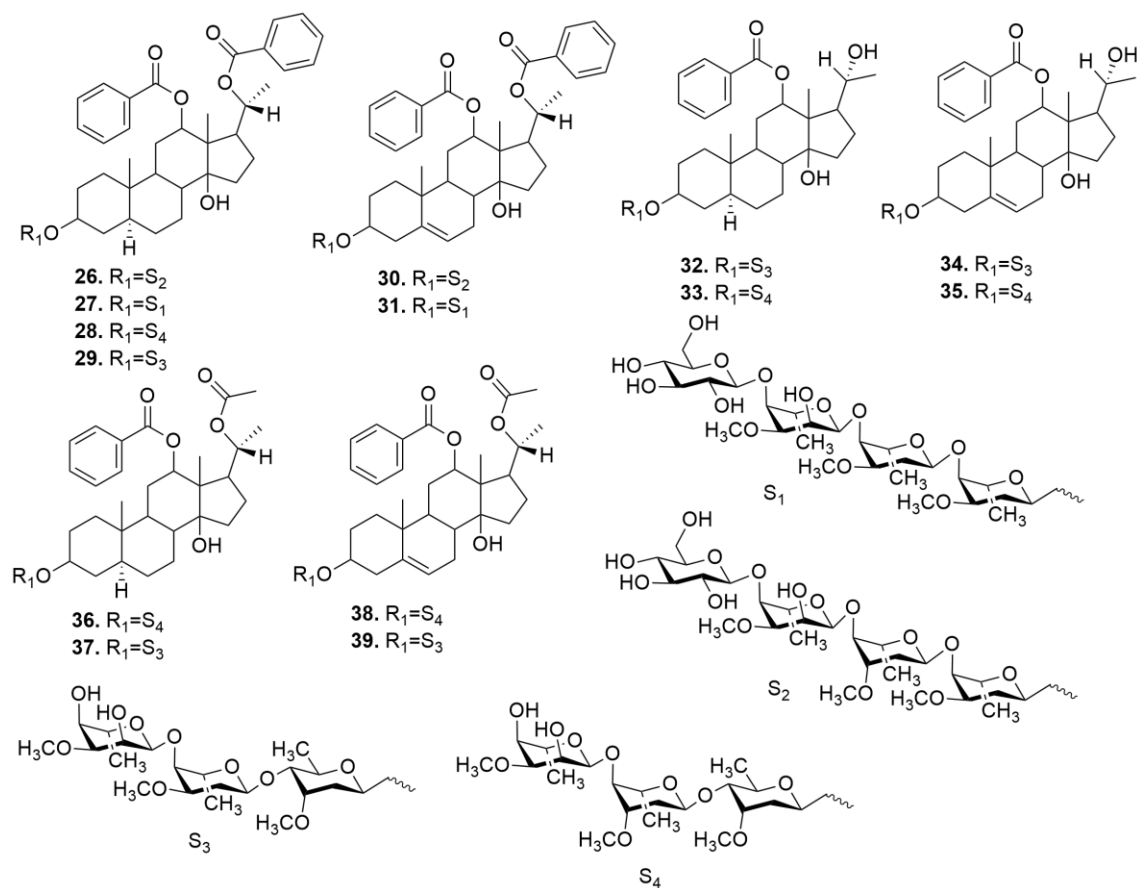
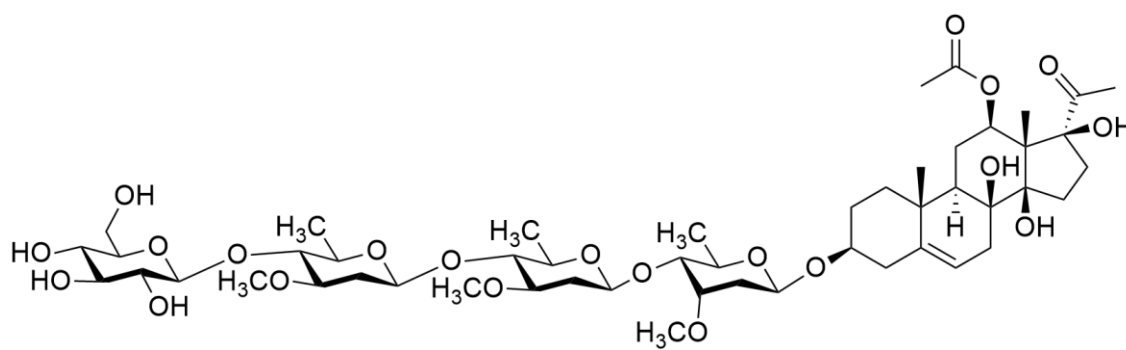
S_2

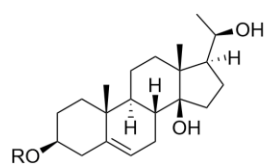
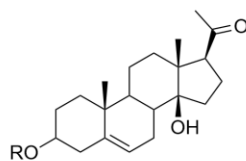
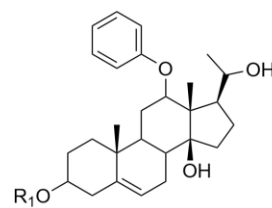
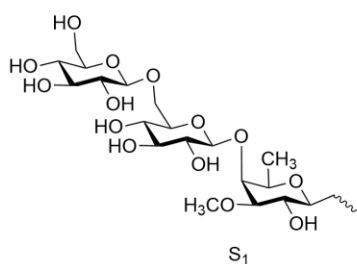
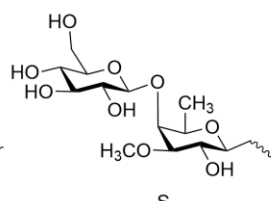
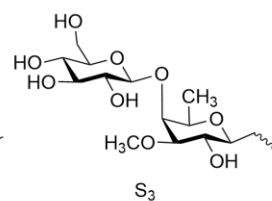
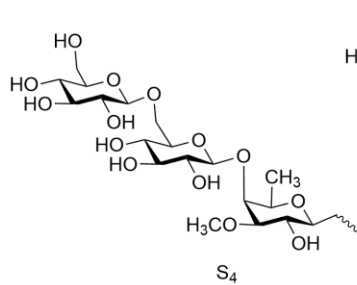
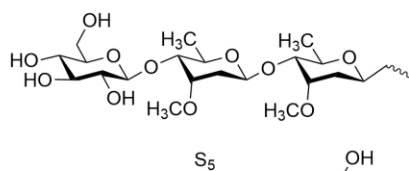
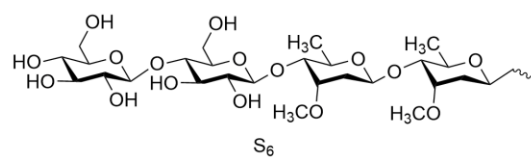


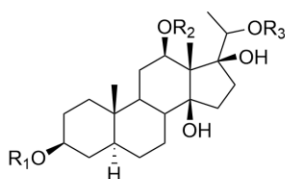
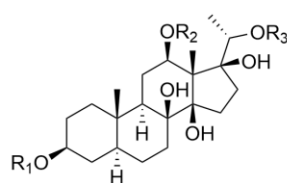
S_3



S_4

Boucerosia aucheriana*Caralluma adscendens*

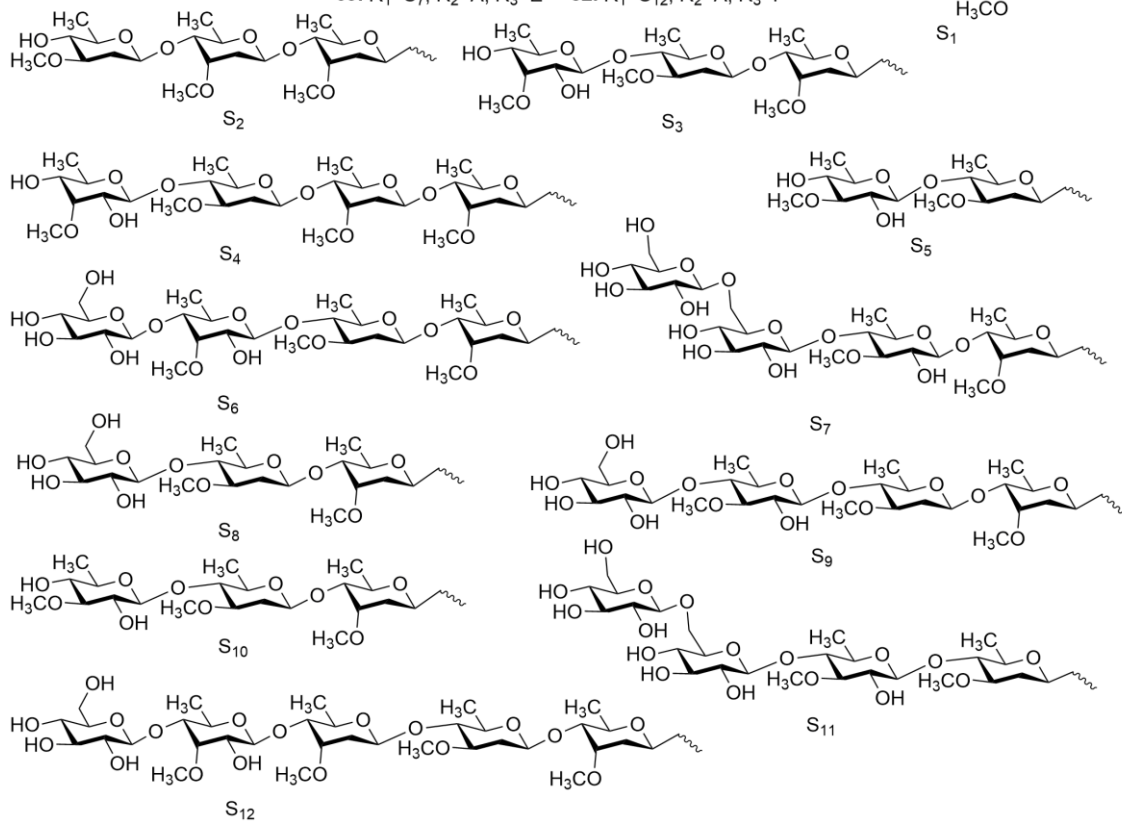
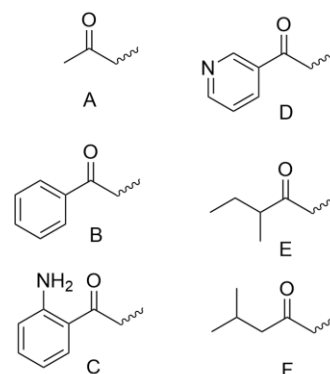
Caralluma arabica41. $R_1=S_1$ 42. $R_1=S_2$ 43. $R_1=S_3$ 44. $R_1=S_4$ 45. $R_1=S_5$ 46. $R_1=S_6$  S_1  S_2  S_3  S_4  S_5  S_6

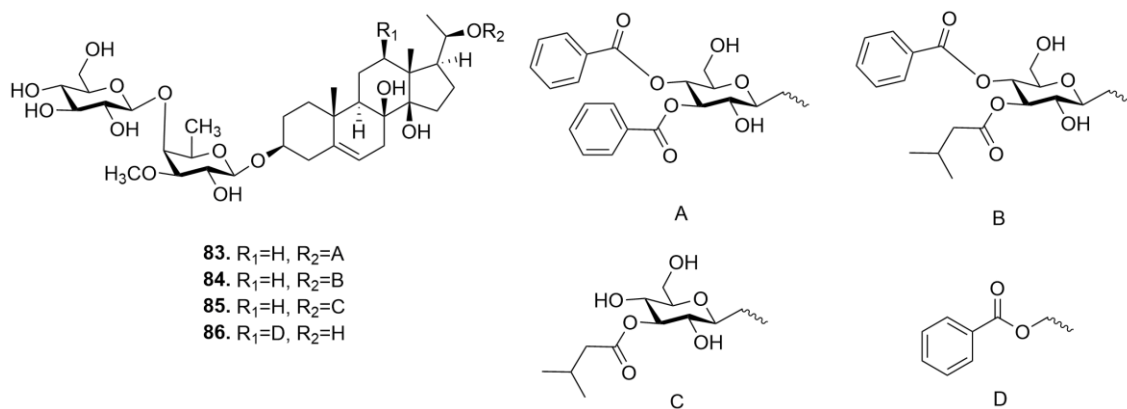
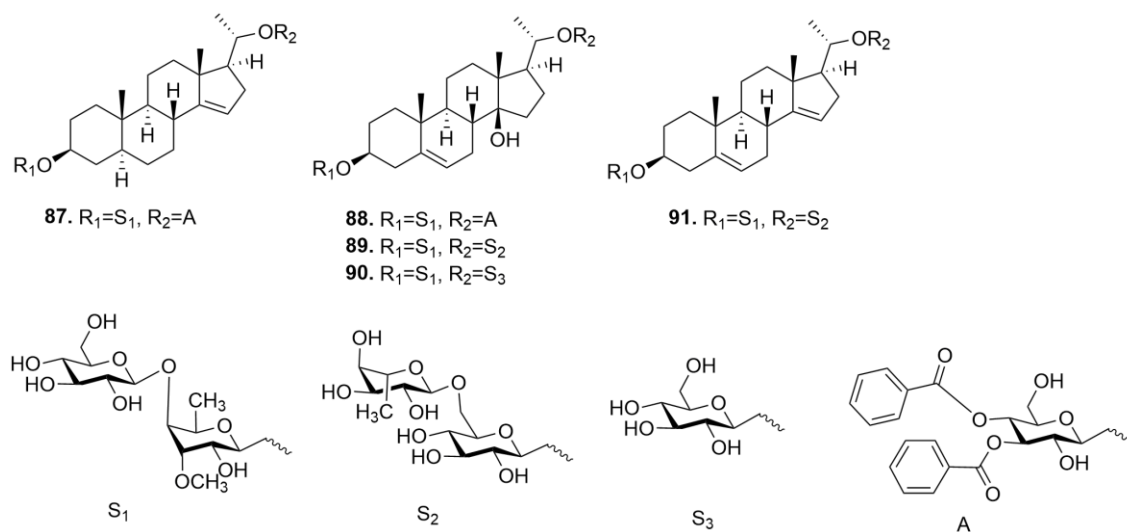
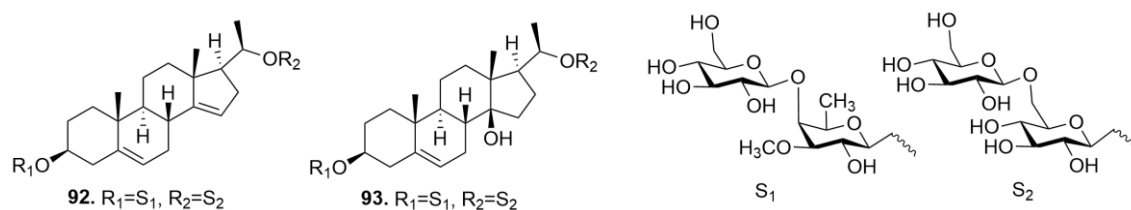
Caralluma dalzielii

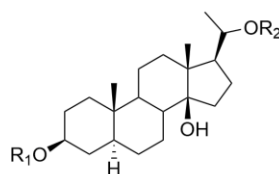
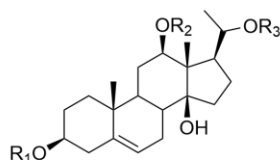
47. $R_1=S_1, R_2=A, R_3=B$
 48. $R_1=S_2, R_2=A, R_3=B$
 49. $R_1=S_2, R_2=B, R_3=B$
 50. $R_1=S_3, R_2=A, R_3=B$
 51. $R_1=S_4, R_2=B, R_3=B$
 52. $R_1=S_1, R_2=A, R_3=B$
 53. $R_1=S_2, R_2=A, R_3=B$
 54. $R_1=S_2, R_2=B, R_3=B$
 55. $R_1=S_3, R_2=A, R_3=B$
 56. $R_1=S_4, R_2=B, R_3=B$

57. $R_1=S_5, R_2=H, R_3=H$
 58. $R_1=S_6, R_2=A, R_3=B$
 59. $R_1=S_6, R_2=A, R_3=C$
 60. $R_1=S_6, R_2=A, R_3=D$
 61. $R_1=S_6, R_2=A, R_3=E$
 62. $R_1=S_3, R_2=A, R_3=B$
 63. $R_1=S_3, R_2=A, R_3=C$
 64. $R_1=S_3, R_2=A, R_3=D$
 65. $R_1=S_3, R_2=A, R_3=E$
 66. $R_1=S_7, R_2=A, R_3=B$
 67. $R_1=S_7, R_2=A, R_3=C$
 68. $R_1=S_7, R_2=A, R_3=D$
 69. $R_1=S_7, R_2=A, R_3=E$

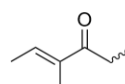
70. $R_1=S_7, R_2=A, R_3=F$
 71. $R_1=S_8, R_2=A, R_3=B$
 72. $R_1=S_8, R_2=A, R_3=E$
 73. $R_1=S_9, R_2=A, R_3=B$
 74. $R_1=S_9, R_2=A, R_3=D$
 75. $R_1=S_{10}, R_2=A, R_3=D$
 76. $R_1=S_{11}, R_2=A, R_3=B$
 77. $R_1=S_{11}, R_2=A, R_3=D$
 78. $R_1=S_{11}, R_2=A, R_3=B$
 79. $R_1=S_{11}, R_2=A, R_3=D$
 80. $R_1=S_{12}, R_2=A, R_3=B$
 81. $R_1=S_{12}, R_2=A, R_3=C$
 82. $R_1=S_{12}, R_2=A, R_3=F$



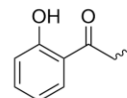
Caralluma hexagona*Caralluma indica**Caralluma lasiantha*

Caralluma negevensis94. $R_1=S_5$, $R_2=B$, $R_3=A$ 104. $R_1=S_5$, $R_2=B$, $R_3=B$ 95. $R_1=S_5$, $R_2=A$, $R_3=H$ 105. $R_1=S_7$, $R_2=H$, $R_3=B$ 96. $R_1=S_5$, $R_2=C$, $R_3=H$ 106. $R_1=S_3$, $R_2=H$, $R_3=S_1$ 97. $R_1=S_5$, $R_2=B$, $R_3=B$ 107. $R_1=S_3$, $R_2=H$, $R_3=S_4$ 98. $R_1=S_6$, $R_2=B$, $R_3=H$ 108. $R_1=S_2$, $R_2=H$, $R_3=A$ 99. $R_1=S_6$, $R_2=B$, $R_3=H$ 109. $R_1=S_9$, $R_2=B$, $R_3=A$ 100. $R_1=S_6$, $R_2=B$, $R_3=B$ 110. $R_1=S_{10}$, $R_2=B$, $R_3=B$ 101. $R_1=S_6$, $R_2=C$, $R_3=H$ 111. $R_1=S_{10}$, $R_2=H$, $R_3=B$ 102. $R_1=S_6$, $R_2=H$, $R_3=H$ 112. $R_1=S_5$, $R_2=B$, $R_3=B$ 103. $R_1=S_7$, $R_2=B$, $R_3=A$ 113. $R_1=S_5$, $R_2=B$, $R_3=A$ 114. $R_1=S_2$, $R_2=S_1$ 

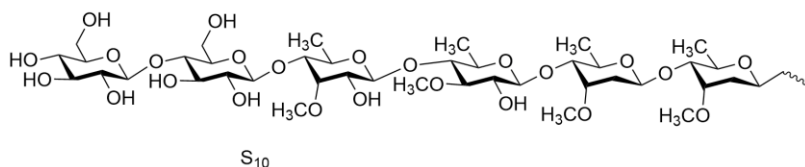
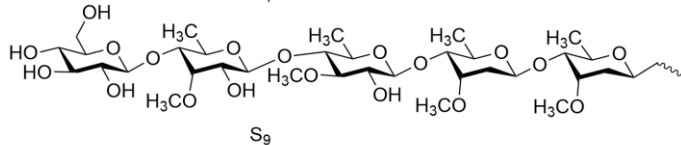
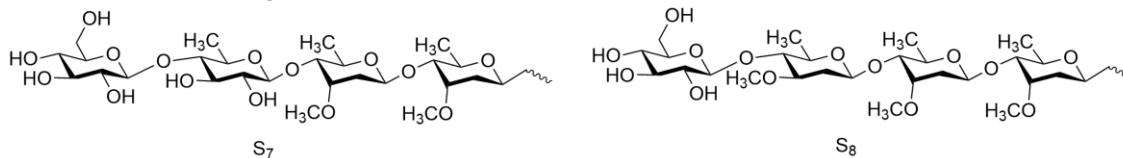
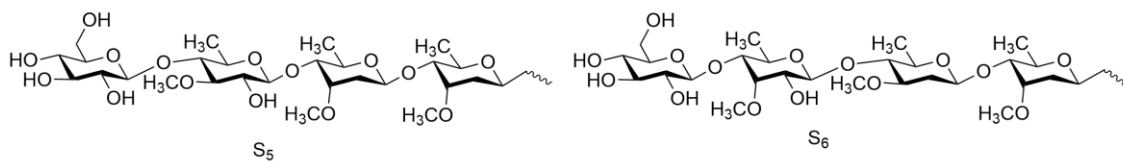
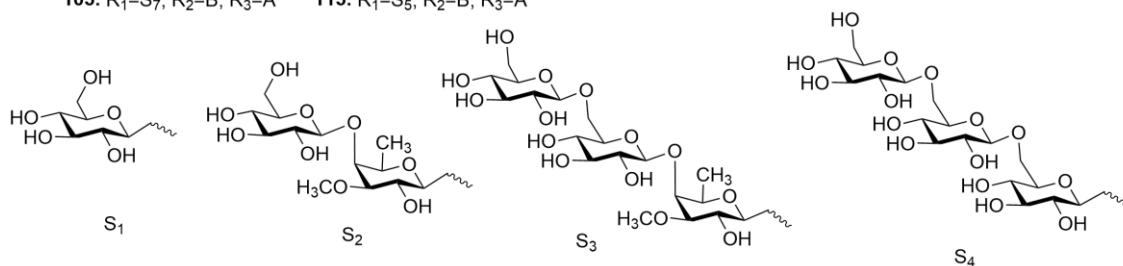
A

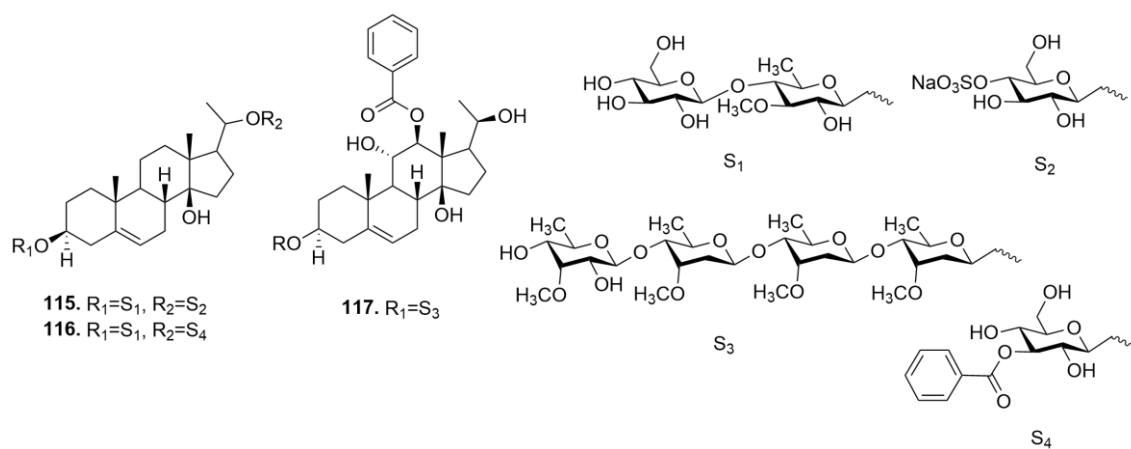
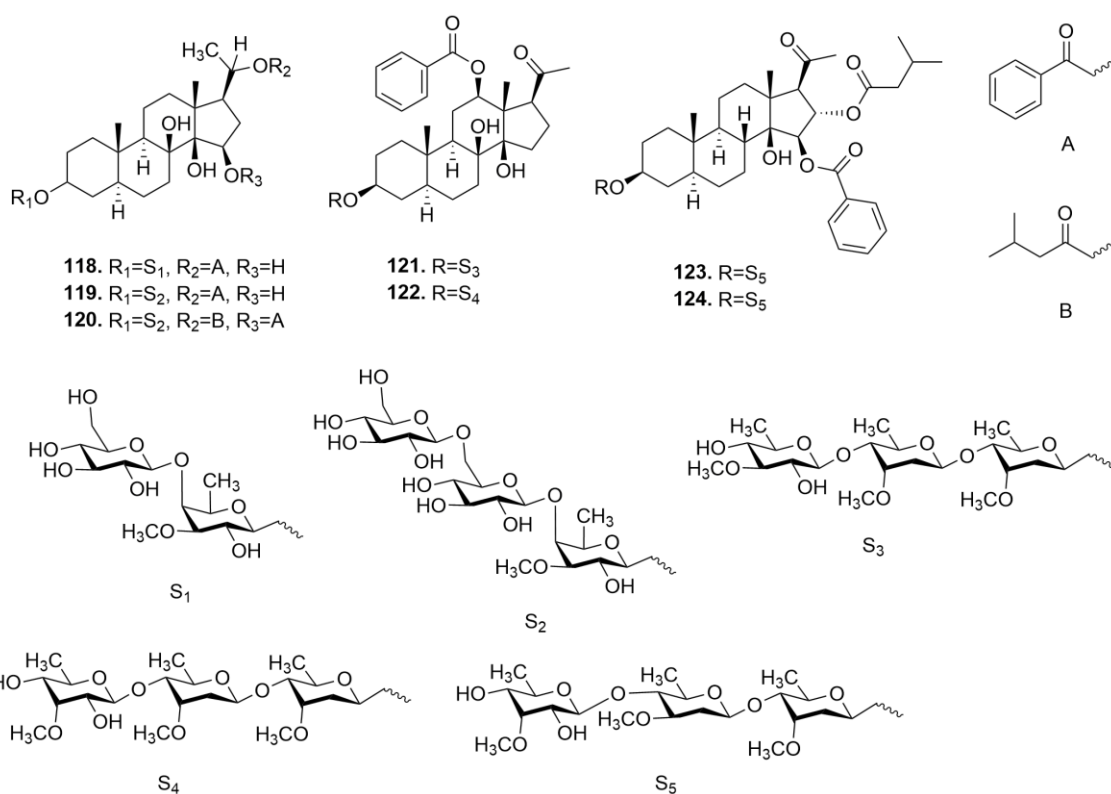


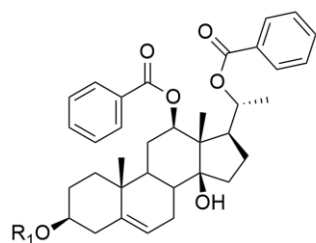
B



C



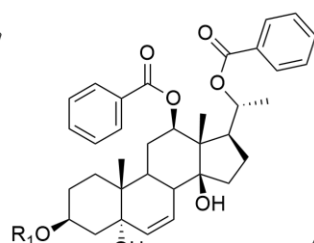
Caralluma pauciflora*Caralluma penicillata*

Caralluma quadrangula

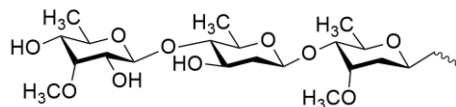
125. R=S₁

126. R=S₂

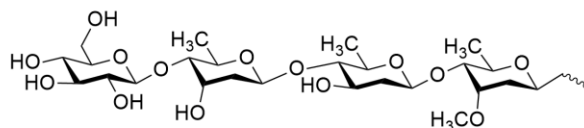
127. R=S₃



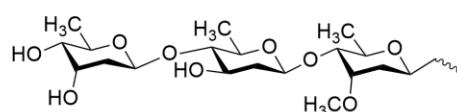
128. R=S₂



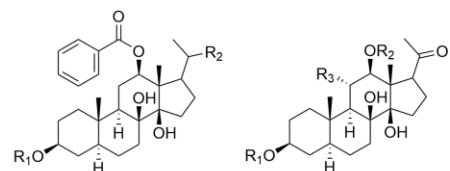
S₁



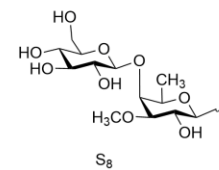
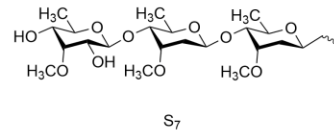
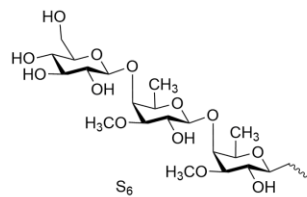
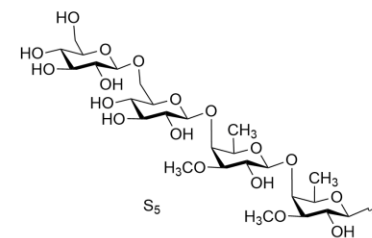
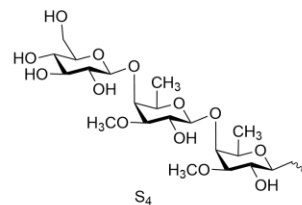
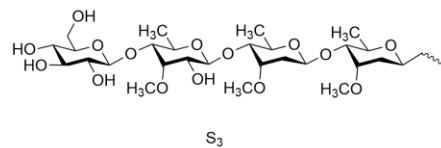
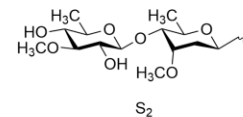
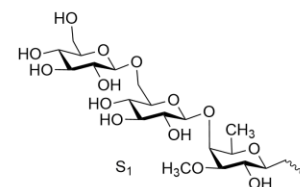
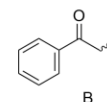
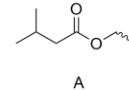
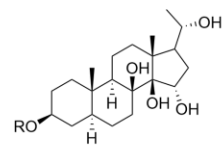
S₂

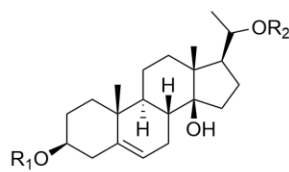
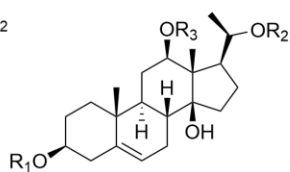
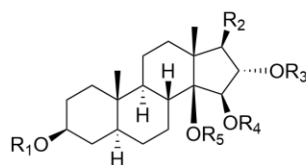
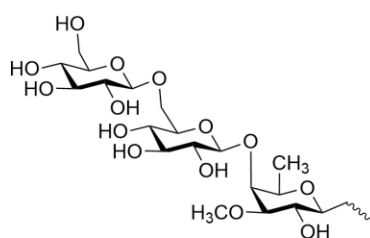
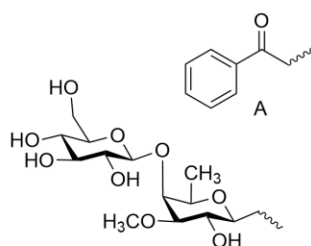
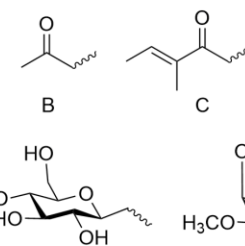
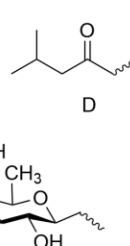
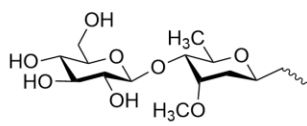
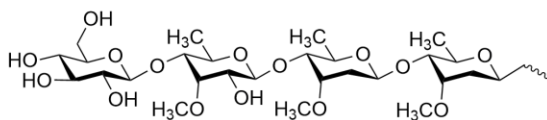
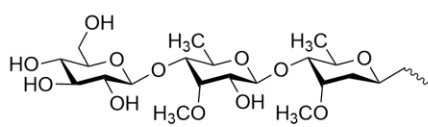
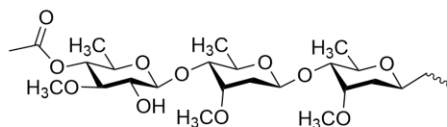
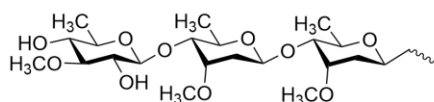


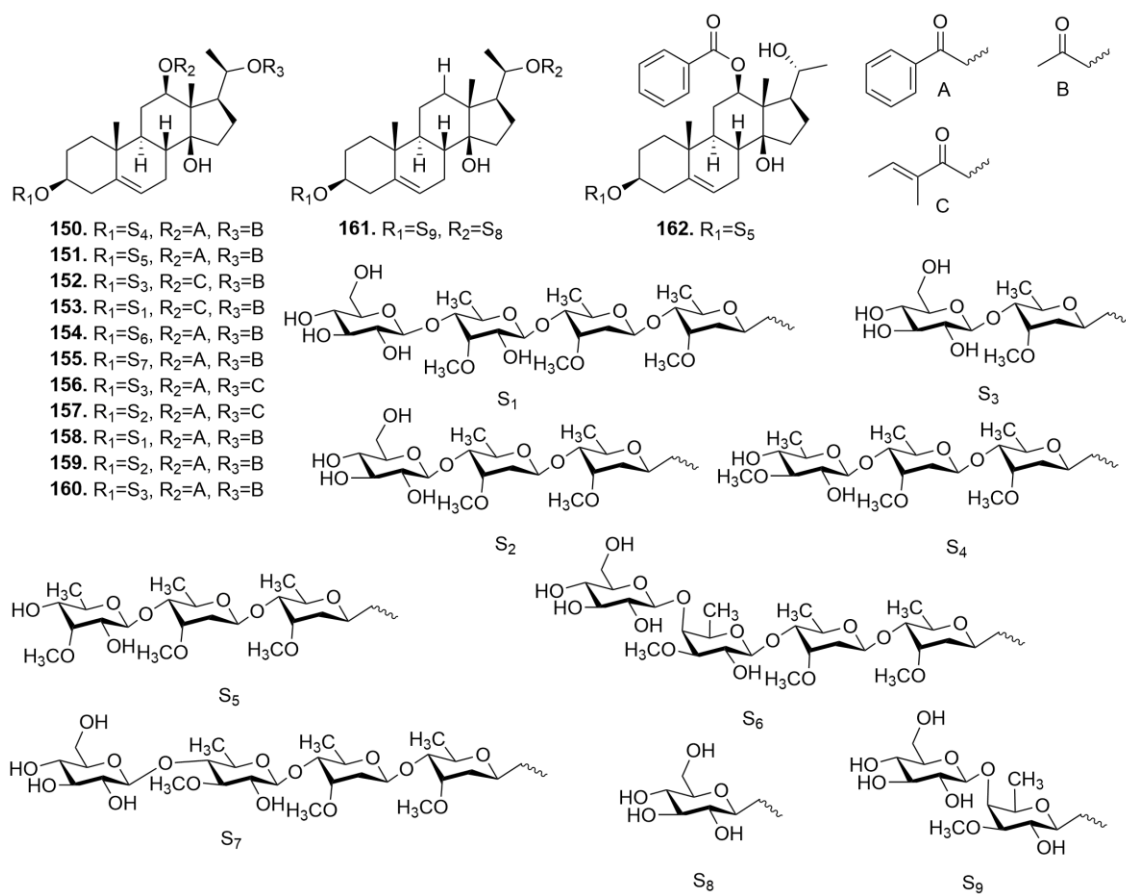
S₃

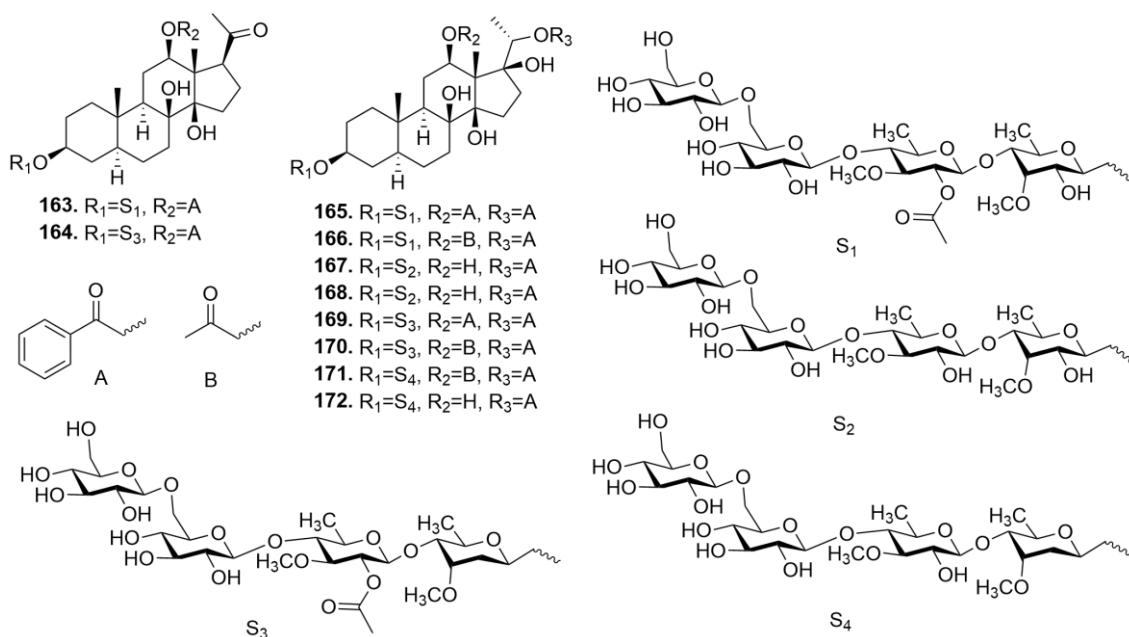
Caralluma retropiciens

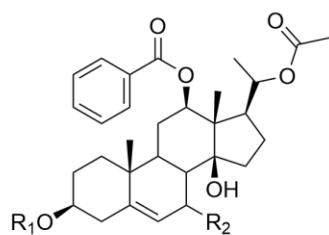
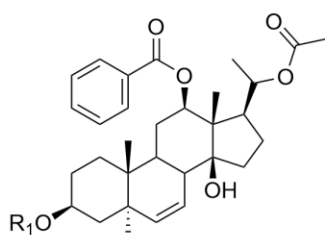
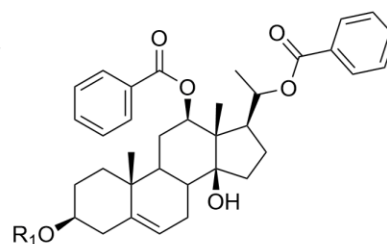
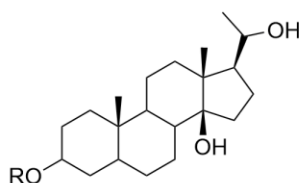
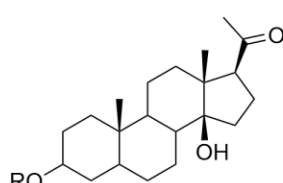
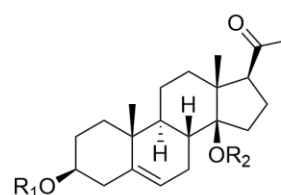
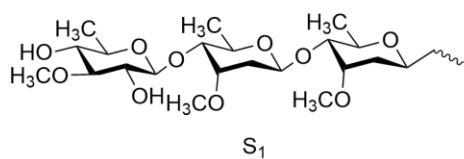
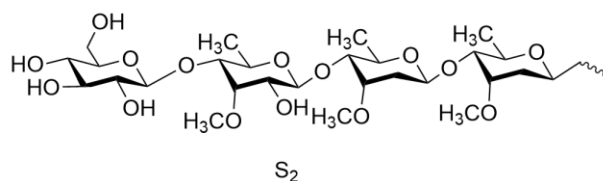
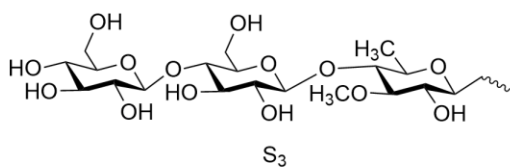
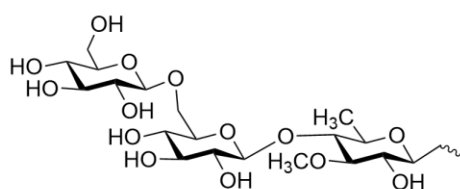
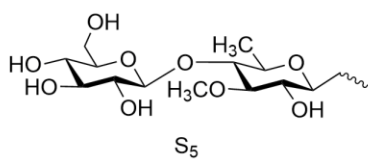
131. $R_1=S_3$, $R_2=B$, $R_3=A$
 132. $R_1=S_4$, $R_2=B$, $R_3=A$
 133. $R_1=S_5$, $R_2=B$, $R_3=H$
 134. $R_1=S_6$, $R_2=B$, $R_3=H$
 135. $R_1=S_3$, $R_2=B$, $R_3=H$
 136. $R_1=S_7$, $R_2=B$, $R_3=H$

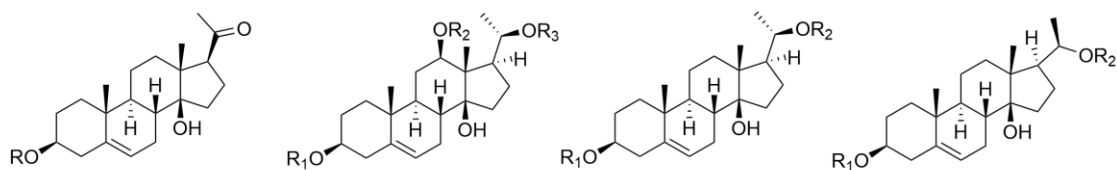


Caralluma russeliana138. $R_1=S_1$, $R_2=H$ 139. $R_1=S_2$, $R_2=H$ 140. $R_1=S_4$, $R_2=S_3$ 141. $R_1=S_2$, $R_2=S_3$ 142. $R_1=S_5$, $R_2=B$, $R_3=A$ 143. $R_1=S_7$, $R_2=B$, $R_3=A$ 144. $R_1=S_6$, $R_2=B$, $R_3=A$ 145. $R_1=S_6$, $R_2=C$, $R_3=A$ 146. $R_1=S_8$, $R_2=B$, $R_3=B$, $R_4=C$, $R_5=D$ 147. $R_1=S_8$, $R_2=B$, $R_3=B$, $R_4=D$, $R_5=A$ 148. $R_1=S_8$, $R_2=B$, $R_3=H$, $R_4=A$, $R_5=D$ 149. $R_1=S_8$, $R_2=B$, $R_3=H$, $R_4=D$, $R_5=A$ S₁S₂S₃S₄S₅S₆S₇S₈S₉

Caralluma sinaica

Caralluma stalagmifera

Caralluma tuberculata173. R₁=S₁, R₂=H174. R₁=S₁, R₂=OH175. R₁=S₂, R₂=H176. R₁=S₁177. R₁=S₂178. R₁=S₂179. R=S₃180. R=S₄181. R=S₅182. R=S₅183. R=S₅S₁S₂S₃S₄S₅

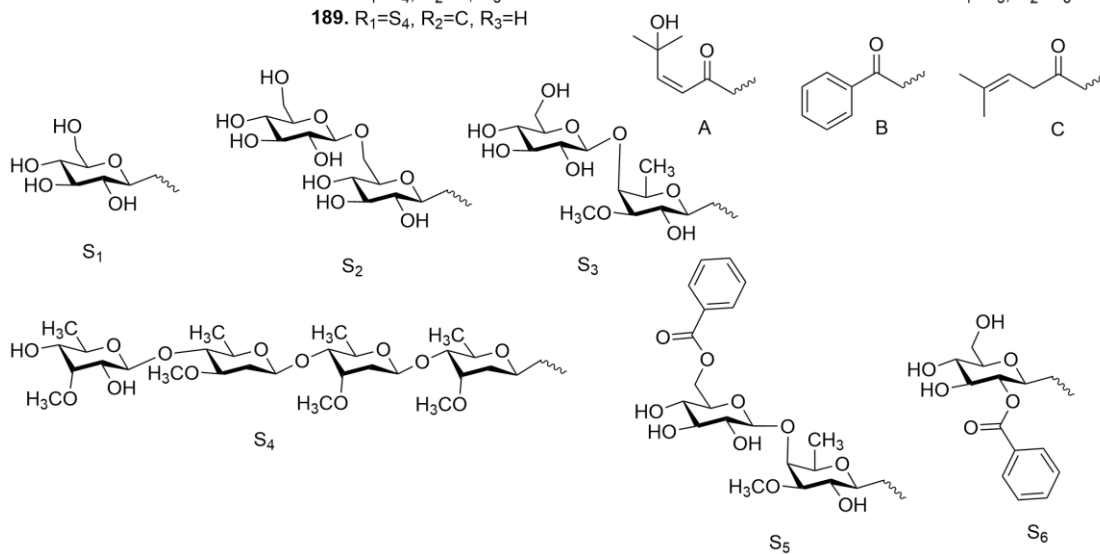
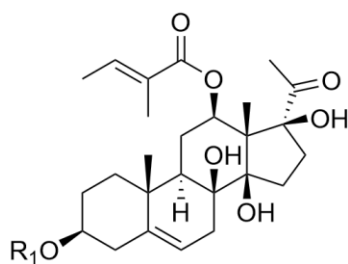
Caralluma umbellata

184. $R_1=S_1$
185. $R_1=S_2$

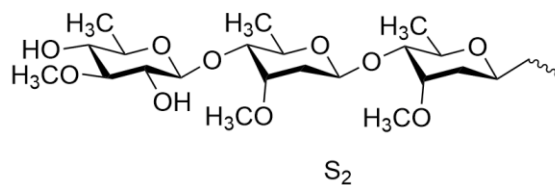
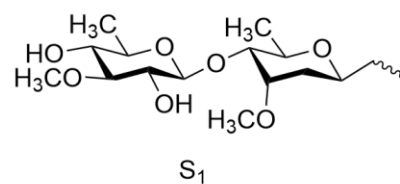
186. $R_1=S_4, R_2=H, R_3=H$
187. $R_1=S_4, R_2=A, R_3=H$
188. $R_1=S_4, R_2=B, R_3=H$
189. $R_1=S_4, R_2=C, R_3=H$

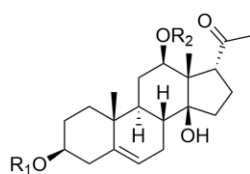
190. $R_1=S_3, R_2=S_2$

191. $R_1=S_3, R_2=S_1$
192. $R_1=S_3, R_2=S_6$
193. $R_1=S_5, R_2=S_6$

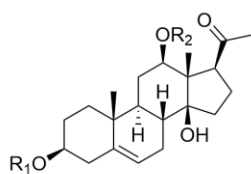
*Caralluma wissmannii*

194. $R_1=S_1, R_2=A$
195. $R_1=S_1, R_2=B$

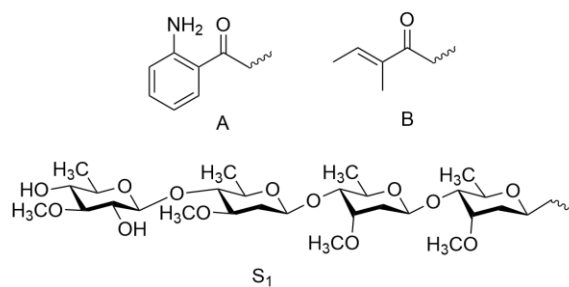


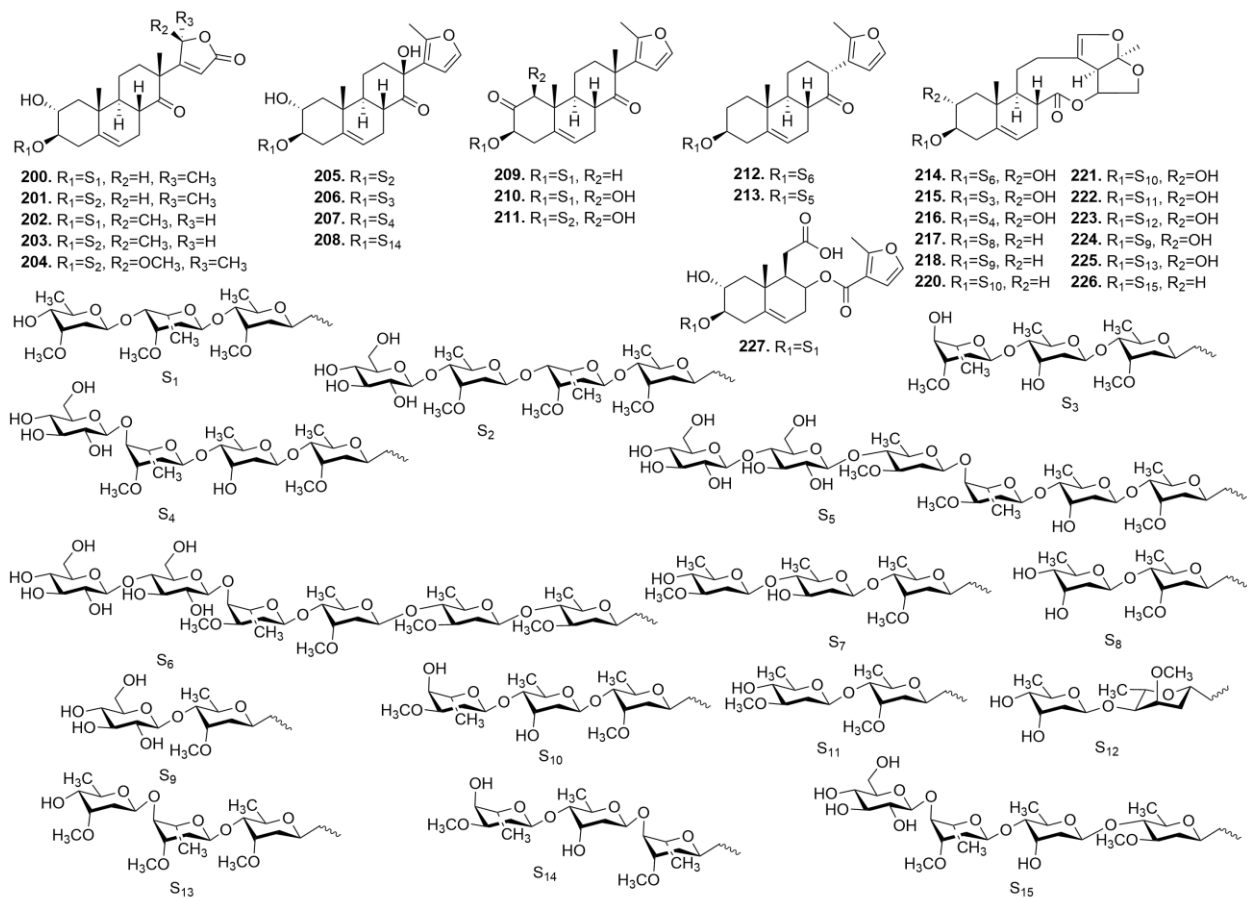
Ceropegia fusca

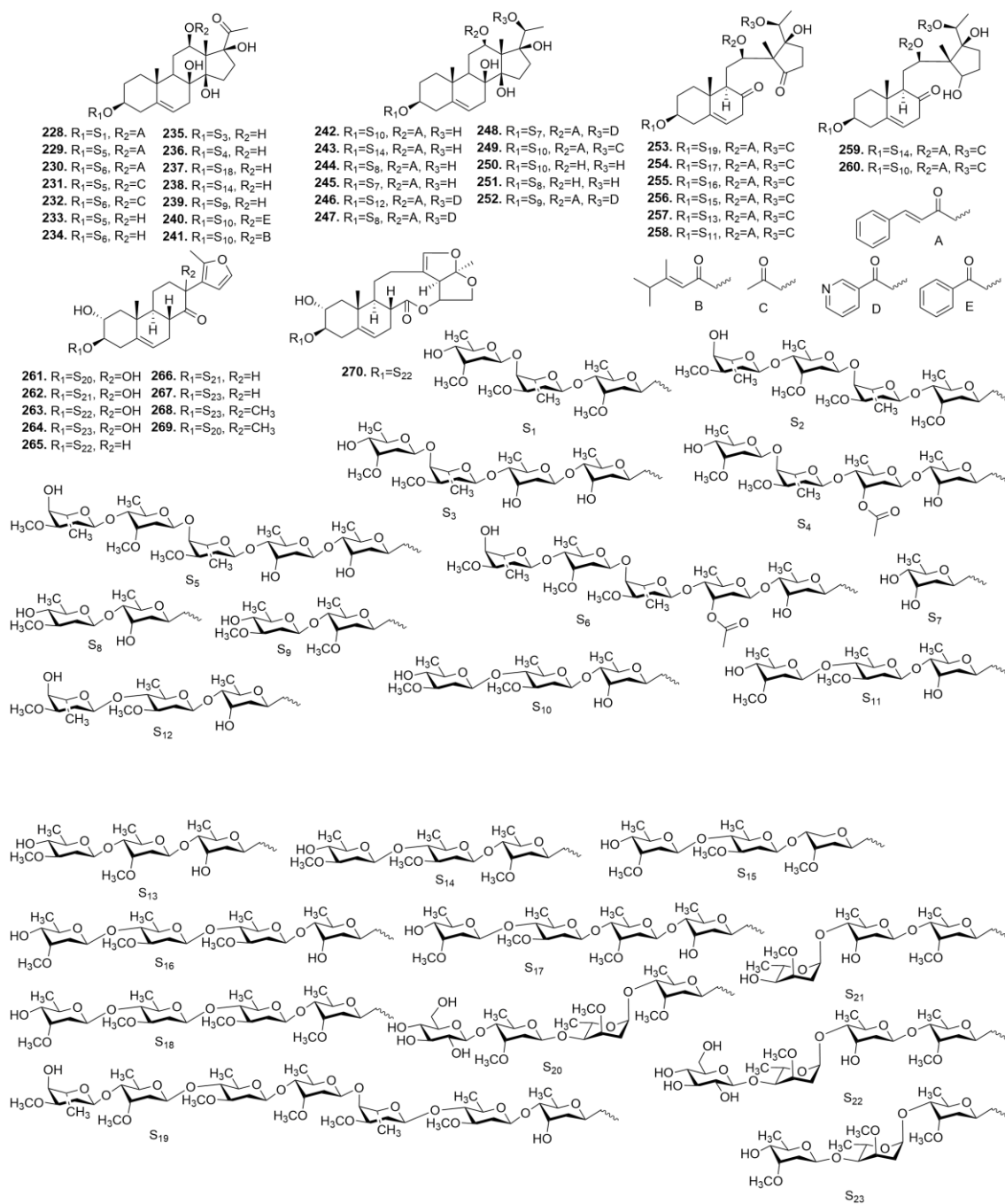
- 196.** $R_1=S_1$, $R_2=B$
197. $R_1=S_1$, $R_2=A$
198. $R_1=S_1$, $R_2=H$

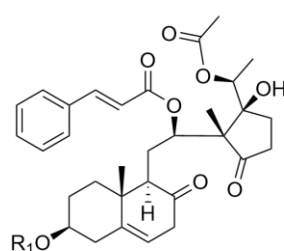


- 199.** $R_1=S_1$, $R_2=H$



Cynanchum atratum

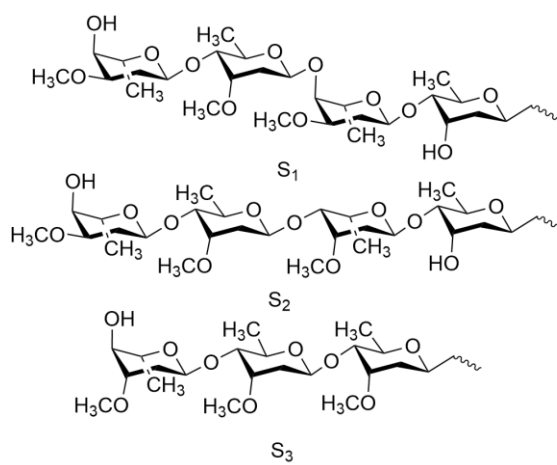
Cynanchum auriculatum

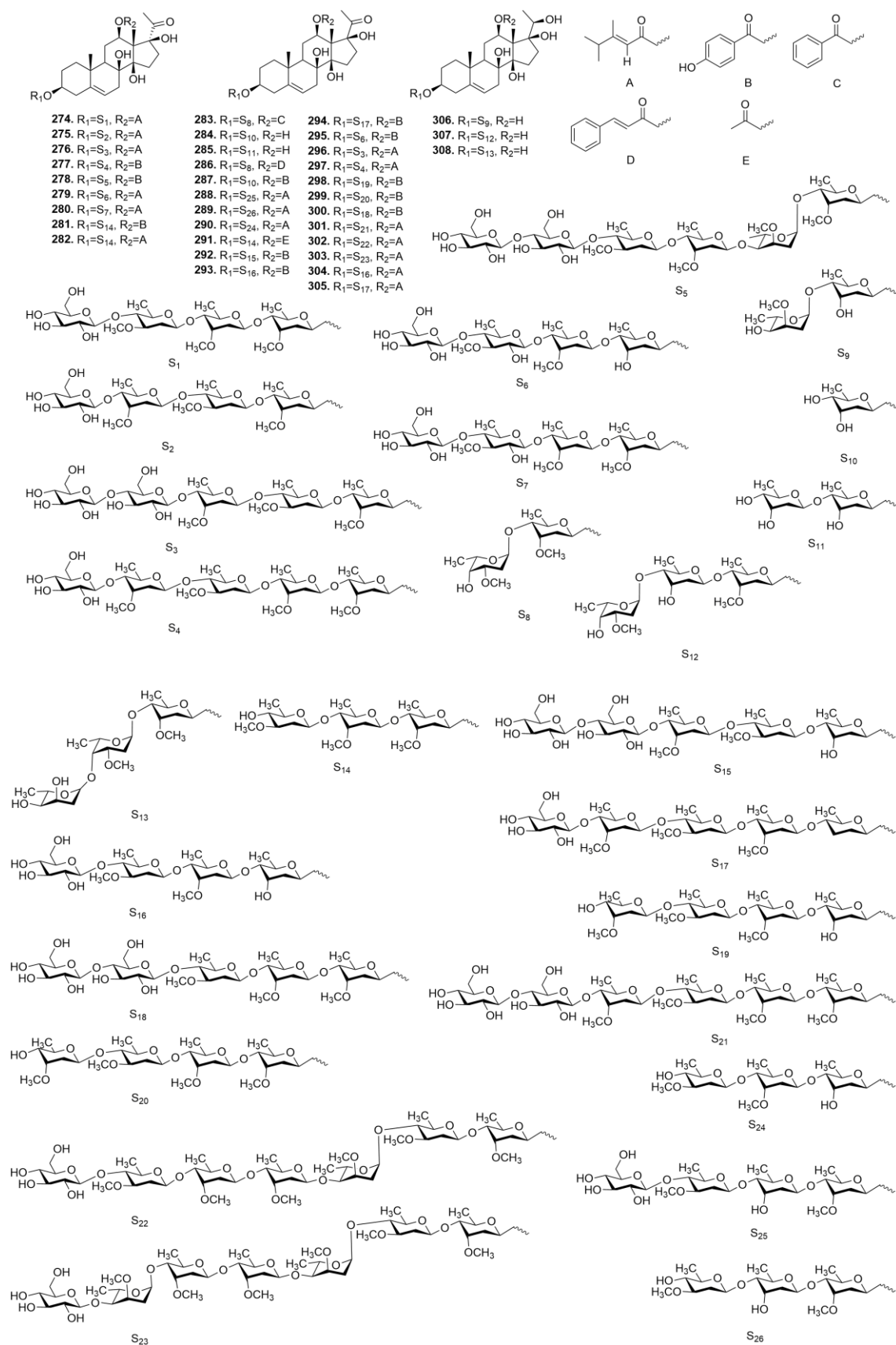
Cynanchum bungei

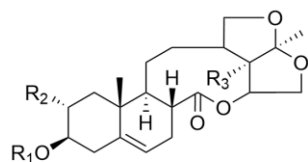
271. $R_1=S_2$

272. $R_1=S_3$

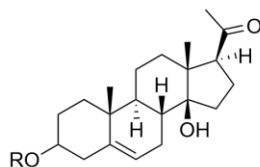
273. $R_1=S_4$



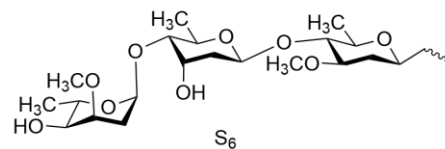
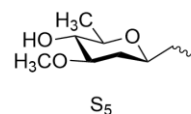
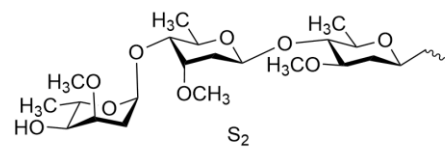
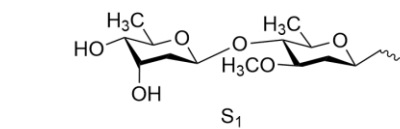
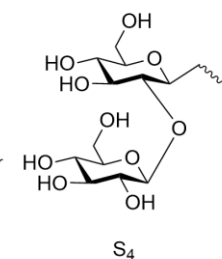
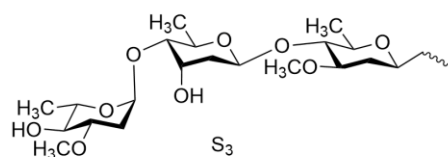


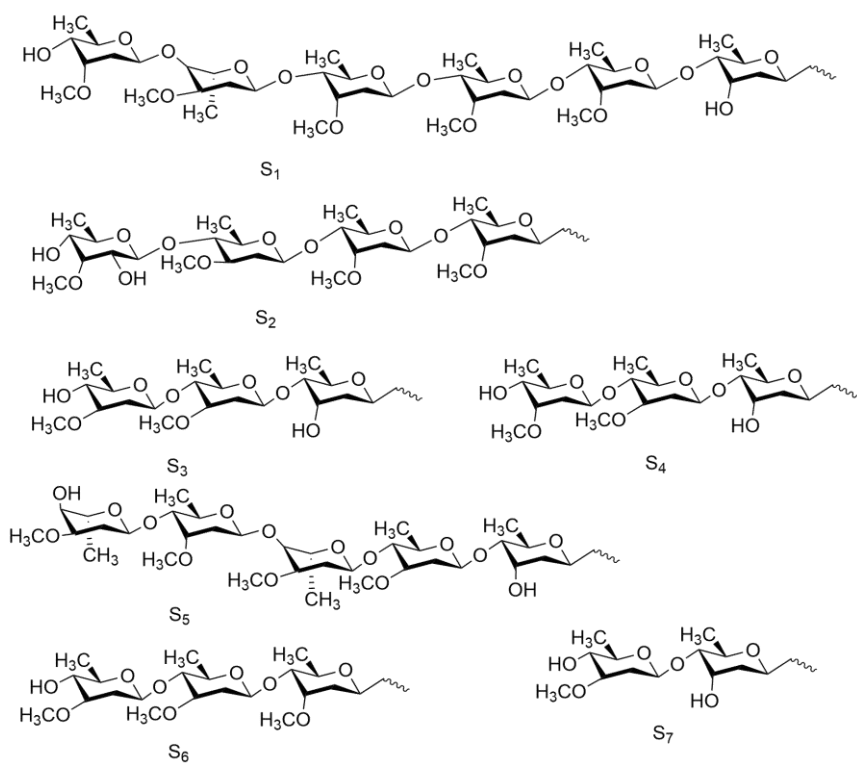
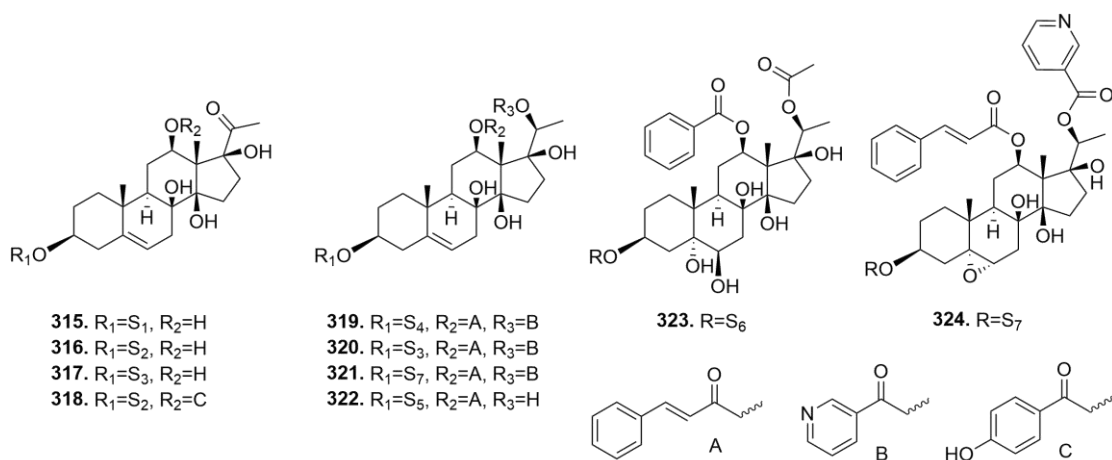
Cynanchum paniculatum

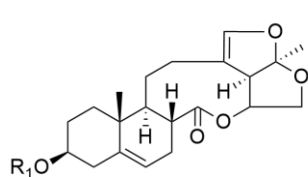
- 309.** $R_1=S_1$, $R_2=H$, $R_3=H$
310. $R_1=S_2$, $R_2=H$, $R_3=OH$
311. $R_1=S_3$, $R_2=H$, $R_3=OH$
312. $R_1=S_5$, $R_2=OH$, $R_3=H$
313. $R_1=S_6$, $R_2=H$, $R_3=H$



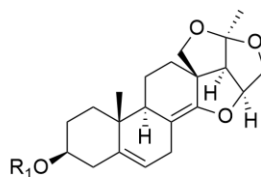
314. $R_1=S_4$



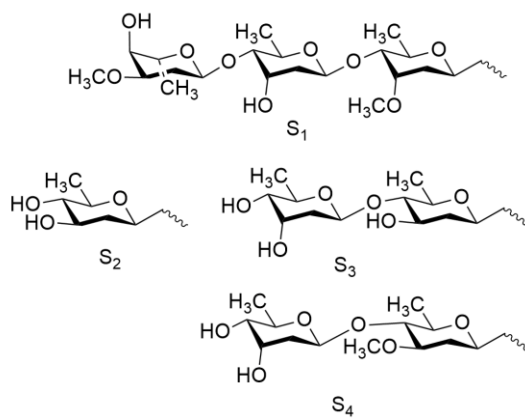
Cynanchum saccatum

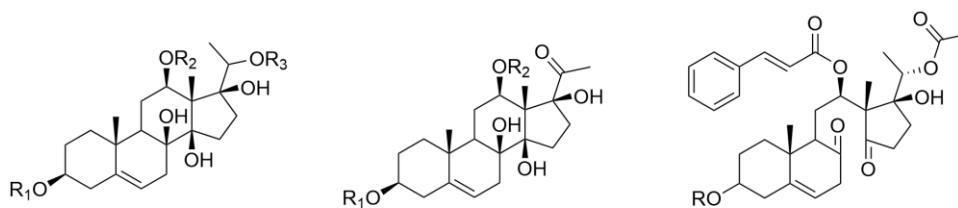
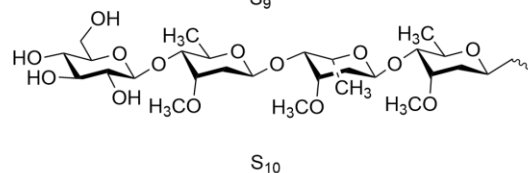
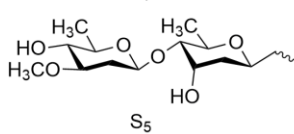
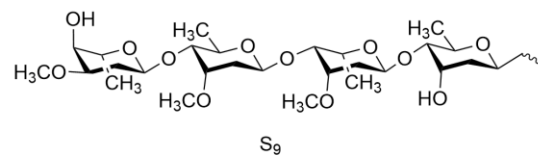
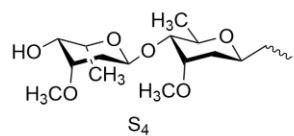
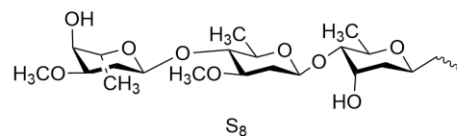
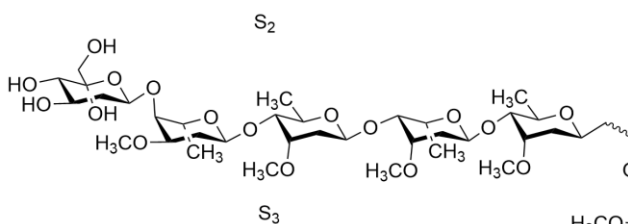
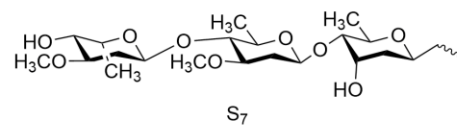
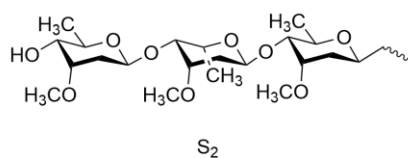
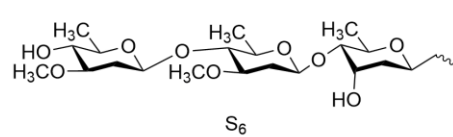
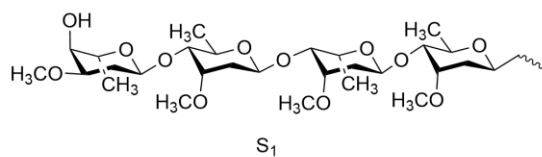
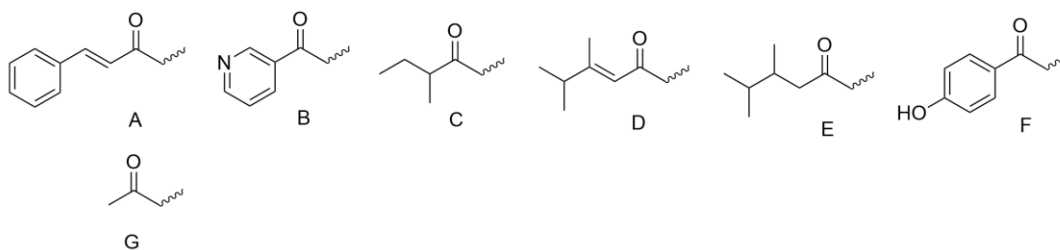
Cynanchum stauntonii

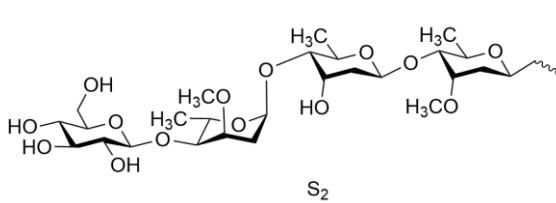
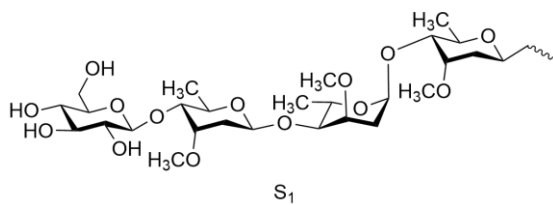
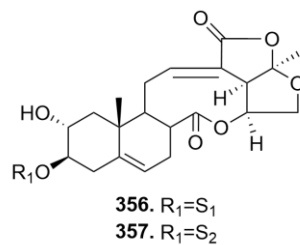
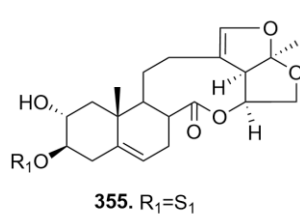
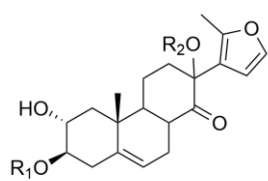
325. $R_1=S_1$
326. $R_1=S_2$
327. $R_1=S_3$
328. $R_1=S_4$

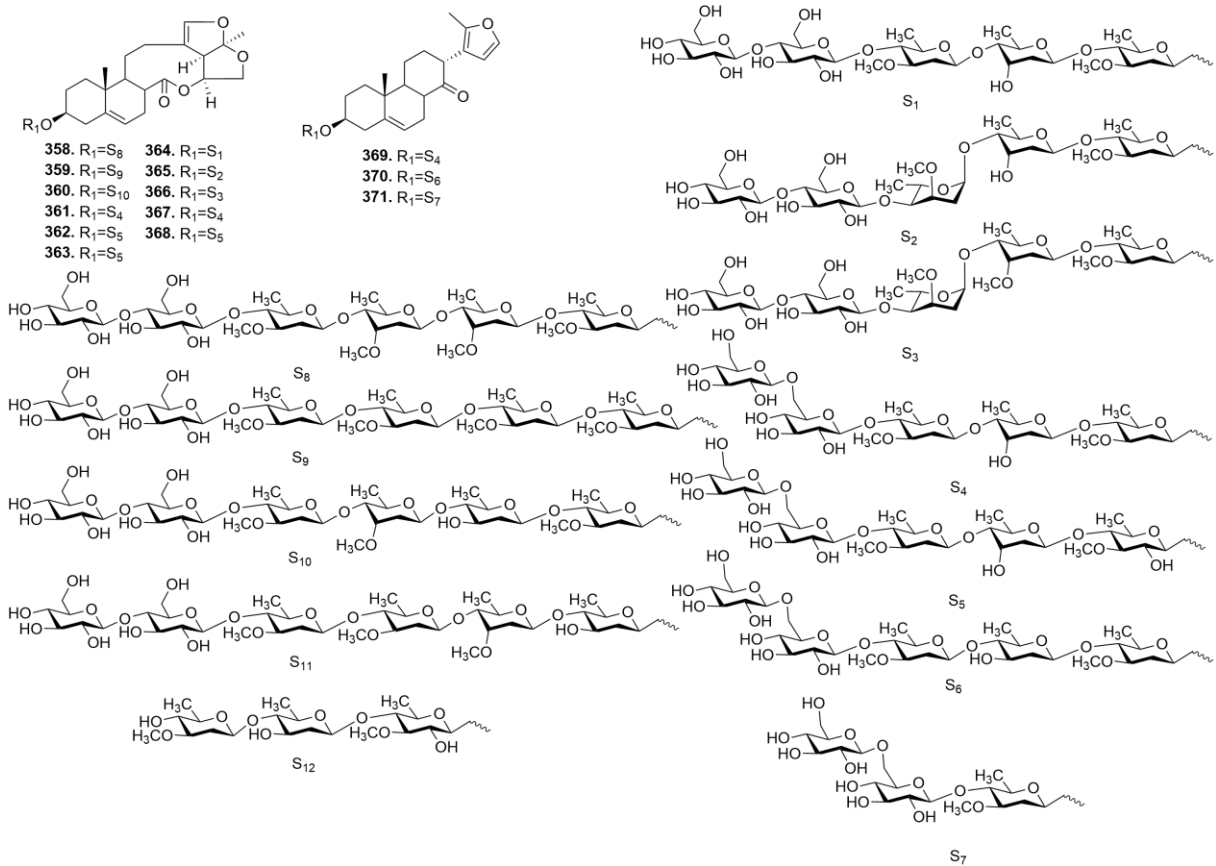


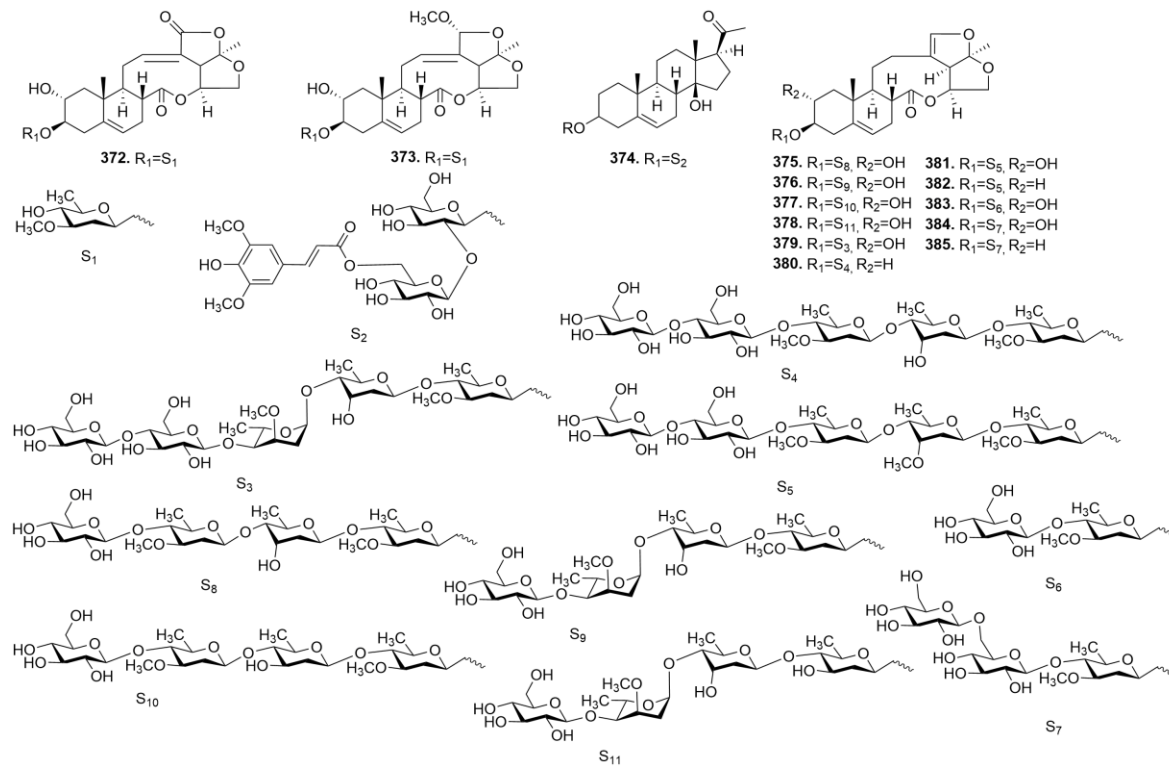
329. $R_1=S_2$
330. $R_1=S_4$

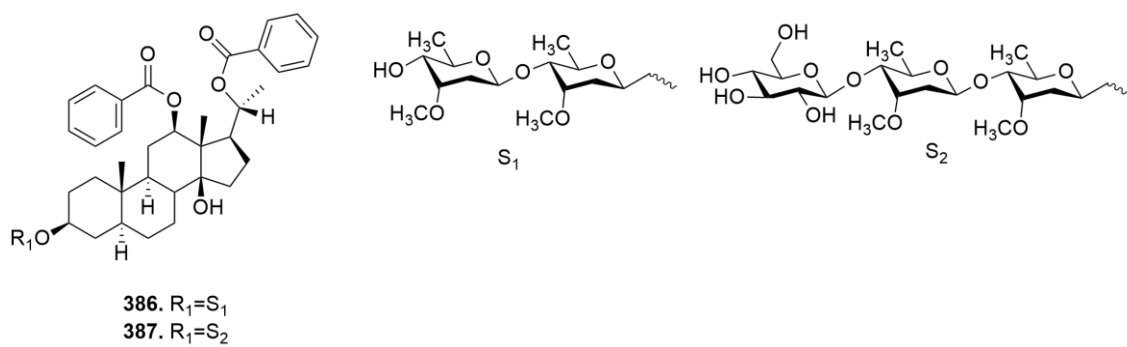
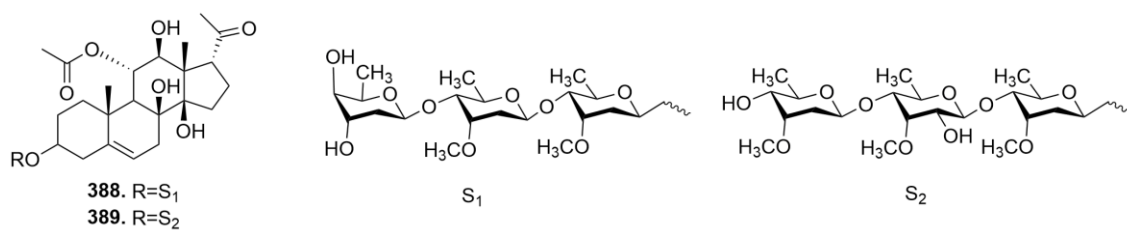


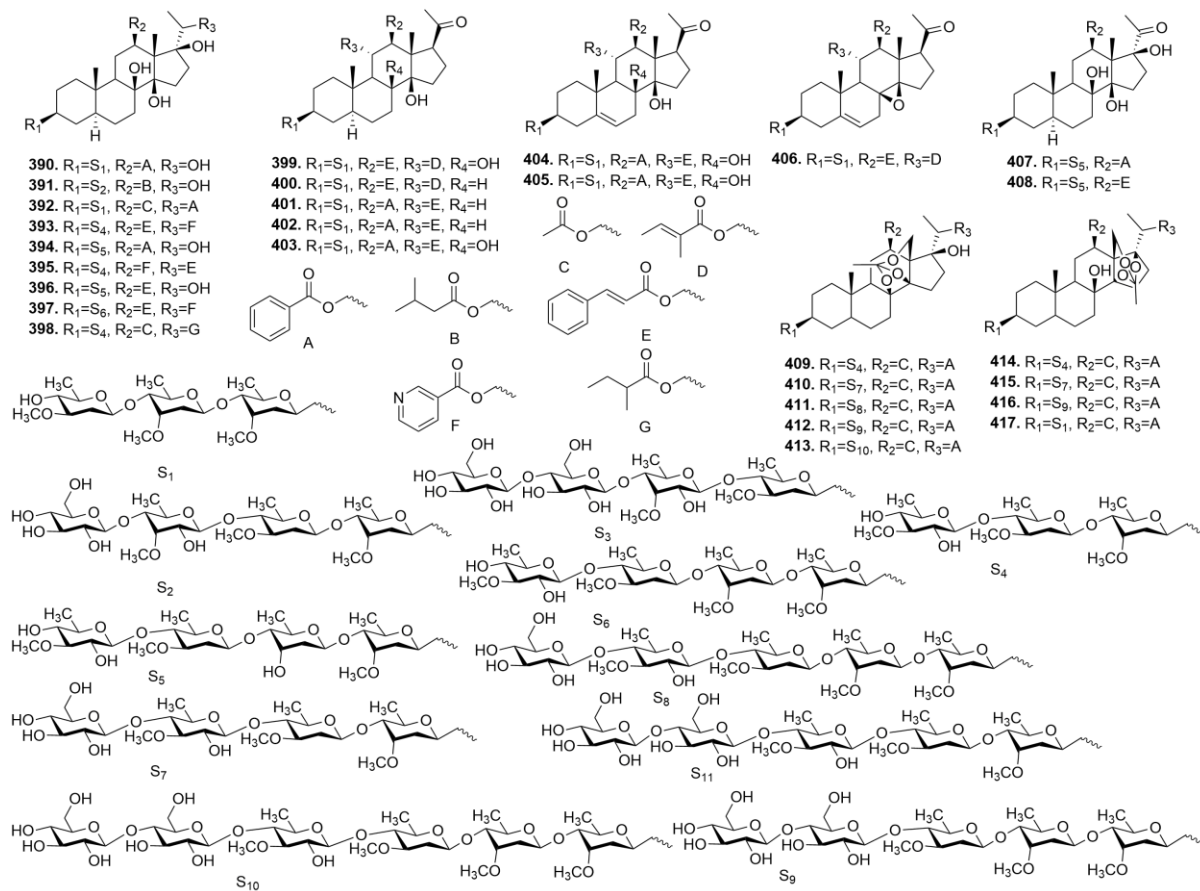
Cynanchum wilfordii331. $R_1=S_1$, $R_2=A$, $R_3=B$ 332. $R_1=S_1$, $R_2=A$, $R_3=C$ 333. $R_1=S_1$, $R_2=H$, $R_3=D$ 334. $R_1=S_1$, $R_2=H$, $R_3=E$ 335. $R_1=S_8$, $R_2=A$, $R_3=B$ 336. $R_1=S_1$, $R_2=A$, $R_3=B$ 337. $R_1=S_2$, $R_2=A$ 338. $R_1=S_3$, $R_2=A$ 339. $R_1=S_3$, $R_2=A$ 340. $R_1=S_1$, $R_2=G$ 341. $R_1=S_4$, $R_2=D$ 342. $R_1=S_2$, $R_2=H$ 343. $R_1=S_5$, $R_2=F$ 344. $R_1=S_6$, $R_2=F$ 345. $R_1=S_7$, $R_2=D$ 346. $R_1=S_8$, $R_2=D$ 347. $R_1=S_3$, $R_2=D$ 348. $R_1=S_{10}$, $R_2=D$ 349. $R_1=S_2$, $R_2=D$ 350. $R_1=S_1$, $R_2=A$ 351. $R_1=S_1$, $R_2=H$ 352. $R=S_1$ 

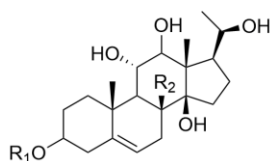
Cynanchum chekiangense

Cynanchum forestii

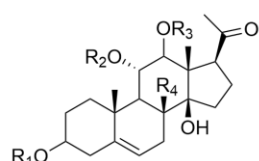
Cynanchum komarovii

Desmidorchis flava*Dregea lanceolata*

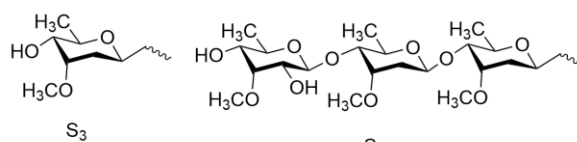
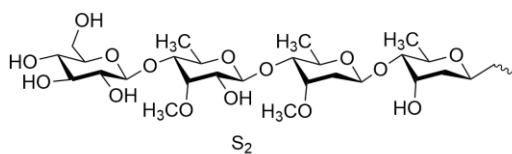
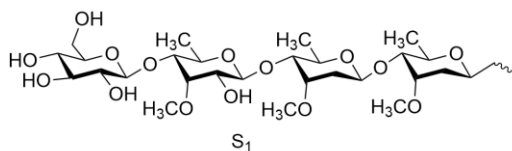
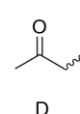
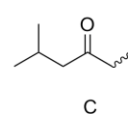
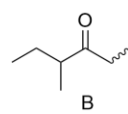
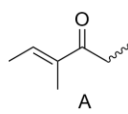
Dregea sinensis var. *currugata*_

Dregea volubilis

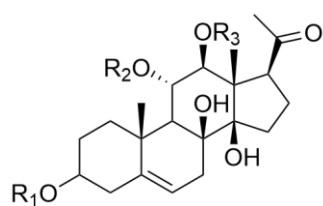
418. $R_1=S_1$, $R_2=H$
 419. $R_1=S_2$, $R_2=H$
 420. $R_1=S_1$, $R_2=OH$
 421. $R_1=S_3$, $R_2=OH$
 422. $R_1=S_4$, $R_2=OH$
 423. $R_1=S_4$, $R_2=H$



424. $R_1=S_1$, $R_2=H$, $R_3=H$, $R_4=H$
 425. $R_1=S_4$, $R_2=H$, $R_3=H$, $R_4=H$
 426. $R_1=S_1$, $R_2=A$, $R_3=H$, $R_4=H$
 427. $R_1=S_1$, $R_2=D$, $R_3=D$, $R_4=H$
 428. $R_1=S_1$, $R_2=D$, $R_3=B$, $R_4=H$
 429. $R_1=S_1$, $R_2=D$, $R_3=C$, $R_4=H$
 430. $R_1=S_4$, $R_2=H$, $R_3=H$, $R_4=OH$
 431. $R_1=S_4$, $R_2=H$, $R_3=H$, $R_4=OH$



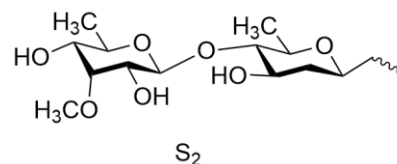
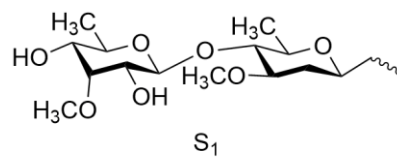
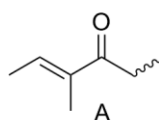
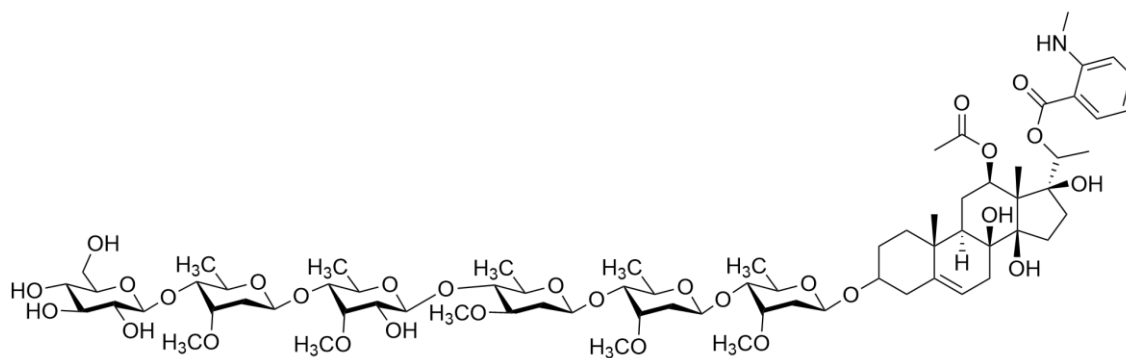
S_4

Gongronema latifolium

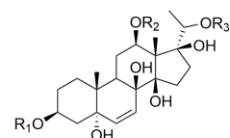
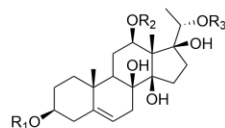
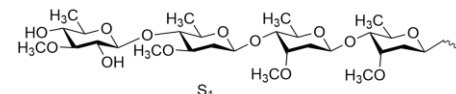
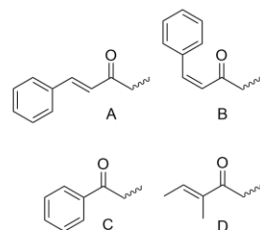
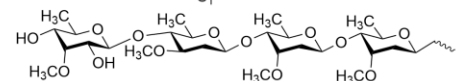
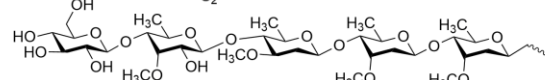
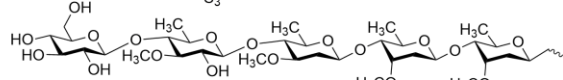
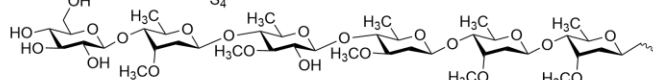
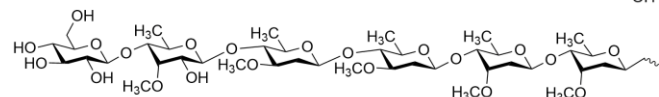
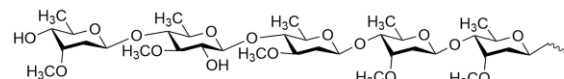
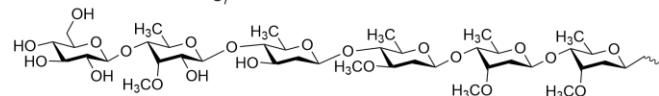
432. R₁=S₁, R₂=A, R₃=A

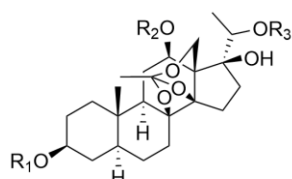
433. R₁=S₁, R₂=H, R₃=H

434. R₁=S₂, R₂=H, R₃=H

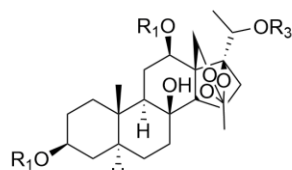
*Gongronema napalense*

435

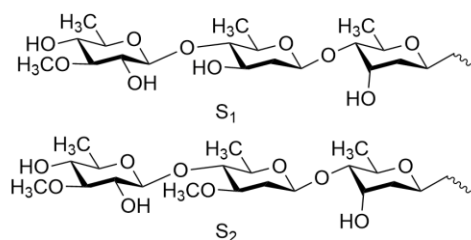
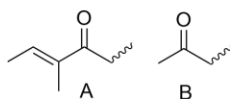
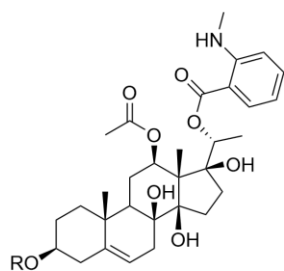
Gymnema alternifolium436. $R_1=S_2$, $R_2=A$, $R_3=D$ 437. $R_1=S_3$, $R_2=A$, $R_3=D$ 438. $R_1=S_1$, $R_2=A$, $R_3=H$ 439. $R_1=S_2$, $R_2=A$, $R_3=H$ 440. $R_1=S_3$, $R_2=A$, $R_3=C$ 441. $R_1=S_1$, $R_2=H$, $R_3=H$ 442. $R_1=S_2$, $R_2=H$, $R_3=H$ 443. $R_1=S_3$, $R_2=A$, $R_3=H$ 444. $R_1=S_4$, $R_2=A$, $R_3=H$ 445. $R_1=S_4$, $R_2=A$, $R_3=D$ 446. $R_1=S_2$, $R_2=A$, $R_3=C$ 447. $R_1=S_5$, $R_2=A$, $R_3=H$ 448. $R_1=S_6$, $R_2=A$, $R_3=H$ 449. $R_1=S_7$, $R_2=B$, $R_3=H$ 450. $R_1=S_8$, $R_2=A$, $R_3=H$ 451. $R_1=S_8$, $R_2=A$, $R_3=D$ 452. $R_1=S_2$, $R_2=A$, $R_3=H$ 453. $R_1=S_2$, $R_2=H$, $R_3=H$ S₁S₂S₃S₄S₅S₆S₇S₈

Gymnema griffithii

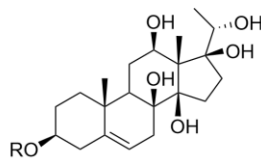
454. $R_1=S_1$, $R_2=B$, $R_3=B$
 455. $R_1=S_1$, $R_2=H$, $R_3=B$
 456. $R_1=S_1$, $R_2=B$, $R_3=A$
 457. $R_1=S_2$, $R_2=B$, $R_3=B$
 458. $R_1=S_2$, $R_2=H$, $R_3=B$
 459. $R_1=S_2$, $R_2=B$, $R_3=A$



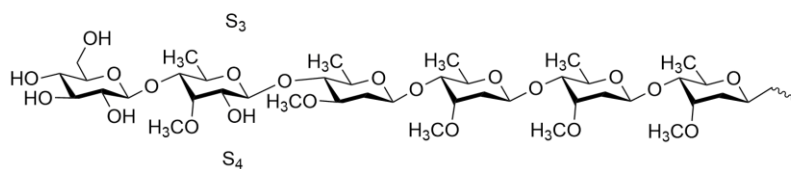
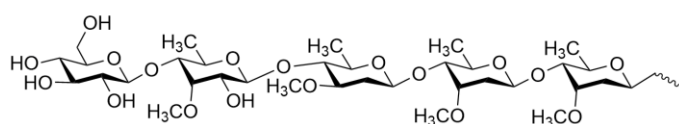
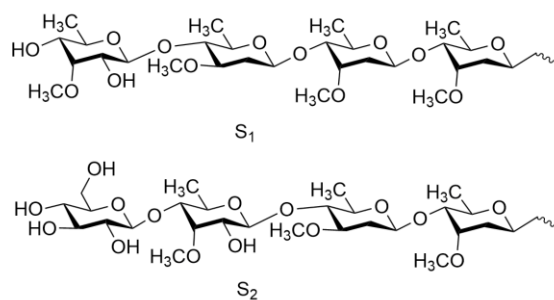
460. $R_1=S_1$, $R_2=B$, $R_3=B$
 461. $R_1=S_2$, $R_2=B$, $R_3=B$

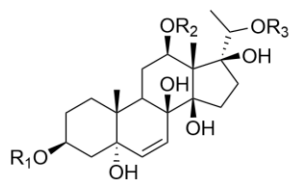
*Gymnema inodorum*

462. $R=S_3$
 463. $R=S_4$
 464. $R=S_1$
 465. $R=S_2$



466. $R=S_1$



Gymnema sylvestre

467. R₁=S₁, R₂=A, R₃=B

468. R₁=S₁, R₂=A, R₃=C

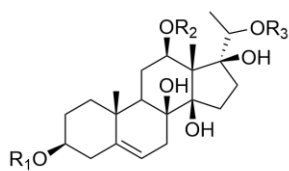
469. R₁=S₁, R₂=A, R₃=H

470. R₁=S₂, R₂=A, R₃=B

471. R₁=S₁, R₂=A, R₃=B

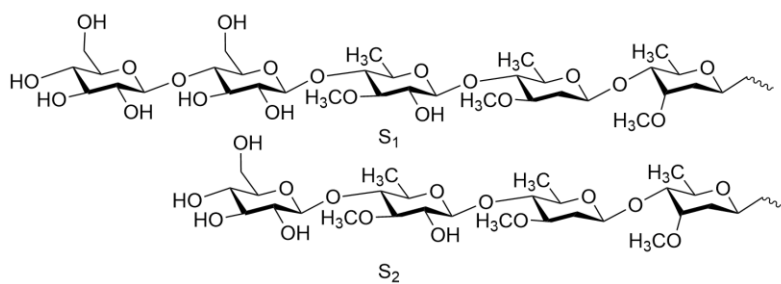
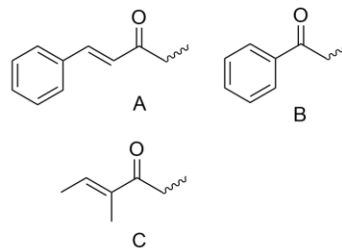
472. R₁=S₁, R₂=A, R₃=C

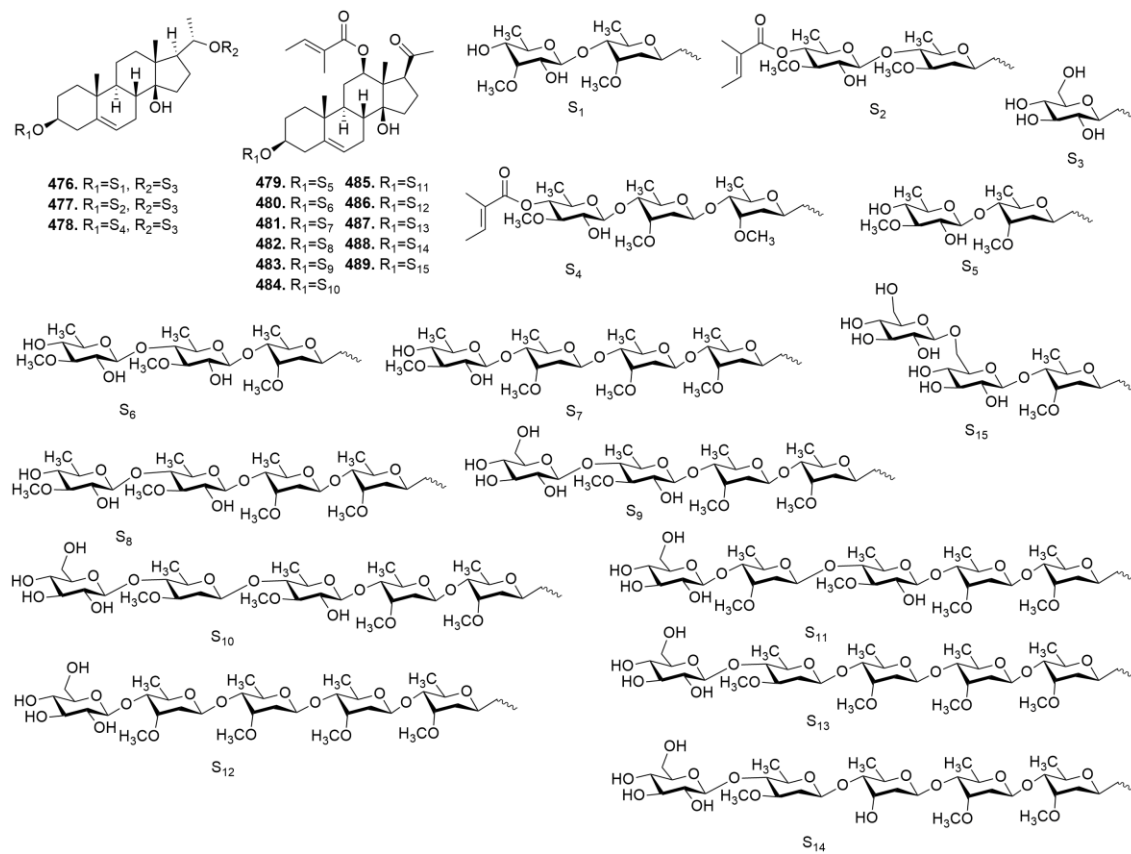
473. R₁=S₁, R₂=A, R₃=H

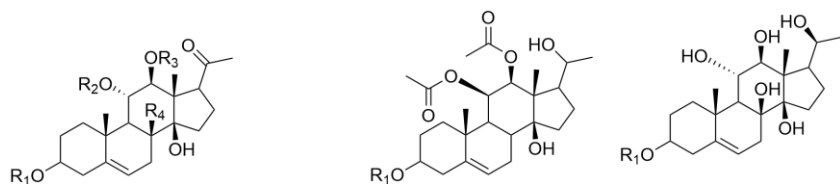


474. R₁=S₁, R₂=A, R₃=B

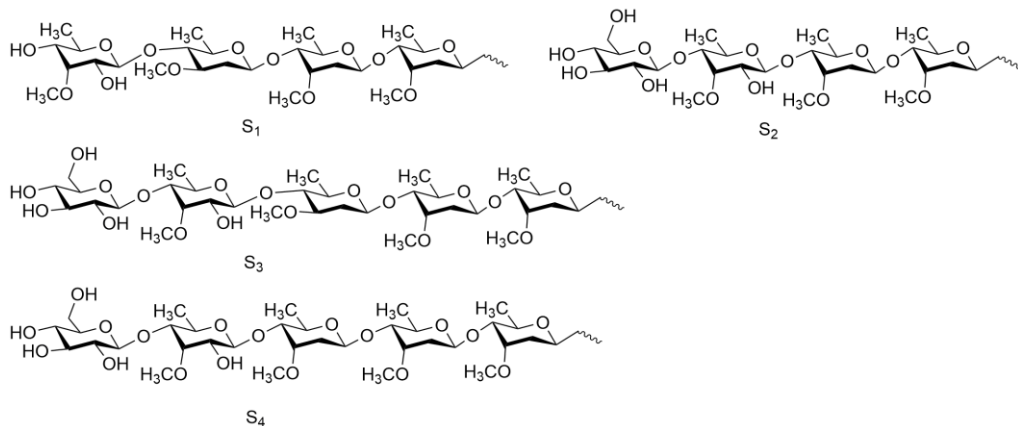
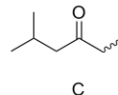
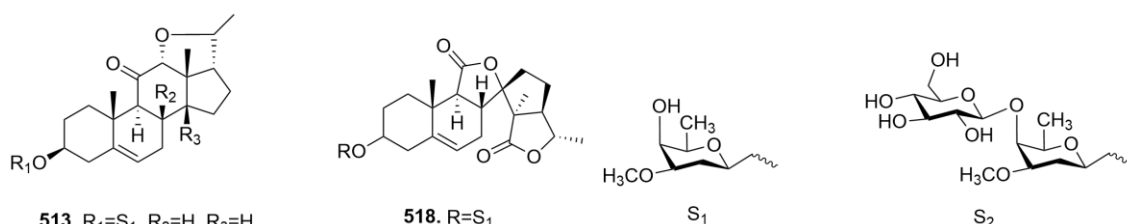
475. R₁=S₁, R₂=A, R₃=B



Hoodia gordonii

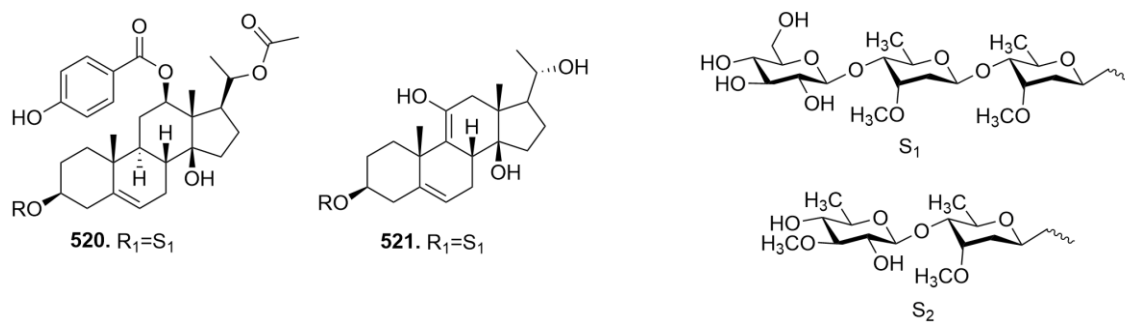
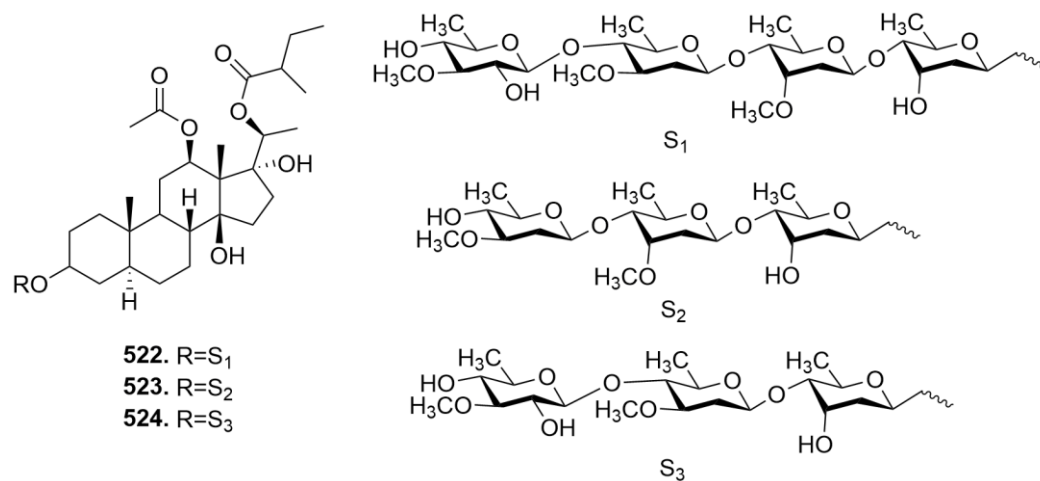
Hoya carnosai

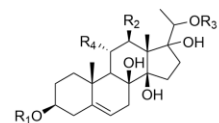
490. $R_1=S_1, R_2=H, R_3=H, R_4=H$
 491. $R_1=S_2, R_2=H, R_3=H, R_4=H$
 492. $R_1=S_3, R_2=H, R_3=H, R_4=H$
 493. $R_1=S_1, R_2=A, R_3=A, R_4=H$
 494. $R_1=S_3, R_2=A, R_3=A, R_4=H$
 495. $R_1=S_1, R_2=H, R_3=H, R_4=OH$
 496. $R_1=S_2, R_2=H, R_3=H, R_4=OH$
 497. $R_1=S_4, R_2=H, R_3=H, R_4=OH$
 498. $R_1=S_1, R_2=A, R_3=A, R_4=OH$
 499. $R_1=S_2, R_2=A, R_3=A, R_4=OH$
 500. $R_1=S_3, R_2=A, R_3=A, R_4=OH$
 501. $R_1=S_1, R_2=A, R_3=C, R_4=H$
 502. $R_1=S_3, R_2=A, R_3=C, R_4=H$
 503. $R_1=S_1, R_2=A, R_3=B, R_4=OH$
 504. $R_1=S_3, R_2=A, R_3=B, R_4=OH$
 505. $R_1=S_1, R_2=A, R_3=C, R_4=OH$
 506. $R_1=S_3, R_2=A, R_3=C, R_4=OH$
 507. $R_1=S_3, R_2=H, R_3=H, R_4=OH$
 508. $R=S_1$
 509. $R=S_3$
 510. $R_1=S_3, R_2=H, R_3=H, R_4=OH$
 511. $R_1=S_1, R_2=A, R_3=A, R_4=OH$
 512. $R_1=S_1, R_2=A, R_3=A, R_4=OH$

*Hoya kerrii*

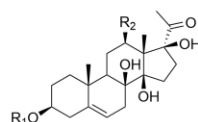
513. $R_1=S_1, R_2=H, R_3=H$
 514. $R_1=S_1, R_2=OH, R_3=H$
 515. $R_1=S_1, R_2=H, R_3=OH$
 516. $R_1=S_2, R_2=H, R_3=H$
 517. $R_1=S_2, R_2=OH, R_3=H$

518. $R=S_1$
 519. $R=S_2$

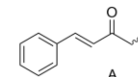
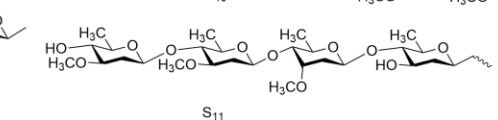
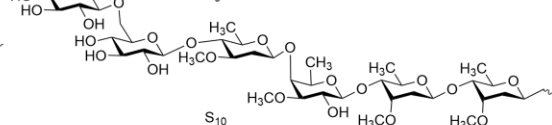
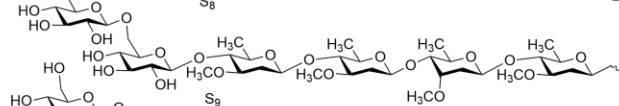
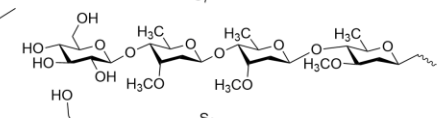
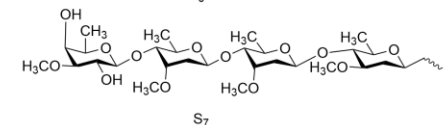
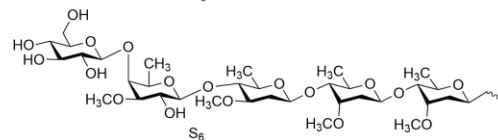
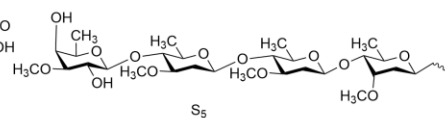
Huernia saudi-arabica*Jasminanthus tuyetanhae*

Leptadenia pyrotechnica

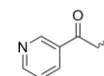
525. $R_1=S_1$, $R_2=A$, $R_3=B$, $R_4=H$
 526. $R_1=S_3$, $R_2=A$, $R_3=H$, $R_4=H$
 527. $R_1=S_4$, $R_2=A$, $R_3=H$, $R_4=OH$
 528. $R_1=S_2$, $R_2=A$, $R_3=C$, $R_4=H$
 529. $R_1=S_2$, $R_2=A$, $R_3=H$, $R_4=H$
 530. $R_1=S_2$, $R_2=C$, $R_3=C$, $R_4=H$
 531. $R_1=S_7$, $R_2=C$, $R_3=C$, $R_4=H$
 532. $R_1=S_{10}$, $R_2=A$, $R_3=H$, $R_4=H$
 533. $R_1=S_9$, $R_2=A$, $R_3=H$, $R_4=H$



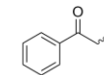
534. $R_1=S_6$, $R_2=A$
 535. $R_1=S_3$, $R_2=A$
 536. $R_1=S_1$, $R_2=A$
 537. $R_1=S_2$, $R_2=A$
 538. $R_1=S_5$, $R_2=D$
 539. $R_1=S_8$, $R_2=E$
 540. $R_1=S_9$, $R_2=A$
 541. $R_1=S_{10}$, $R_2=A$
 542. $R_1=S_{11}$, $R_2=D$



A



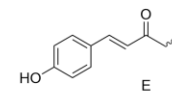
B



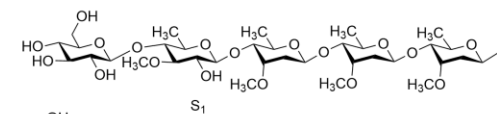
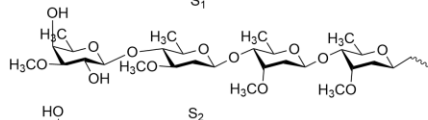
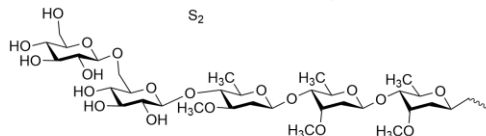
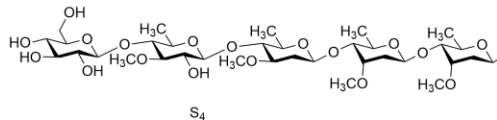
C

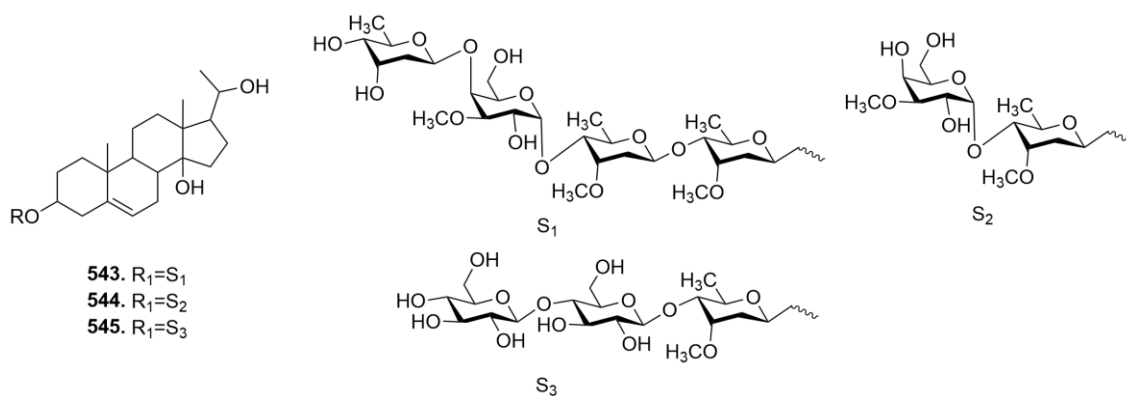
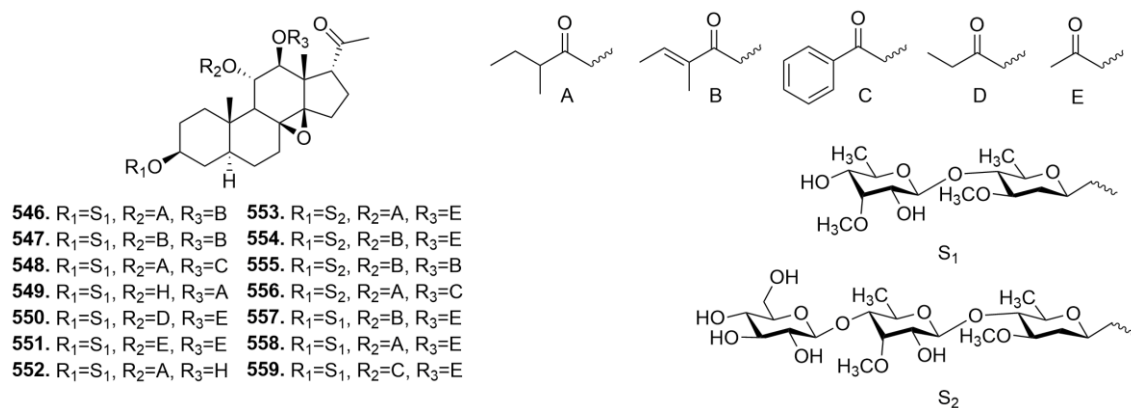


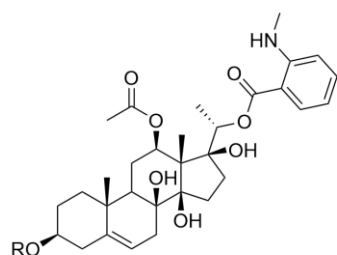
D



E

S₁S₂S₃S₄

Leptadenia reticulata*Marsdenia tenacissima*

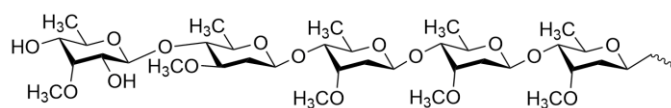
Marsdenia tinctoria

560. R=S₁

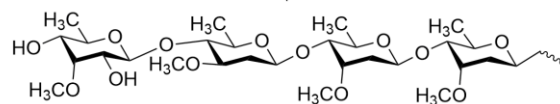
561. R=S₂

562. R=S₃

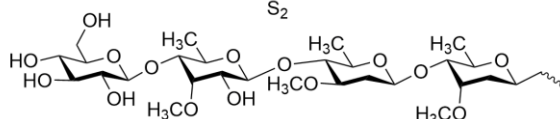
563. R=S₄



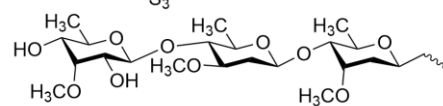
S₁



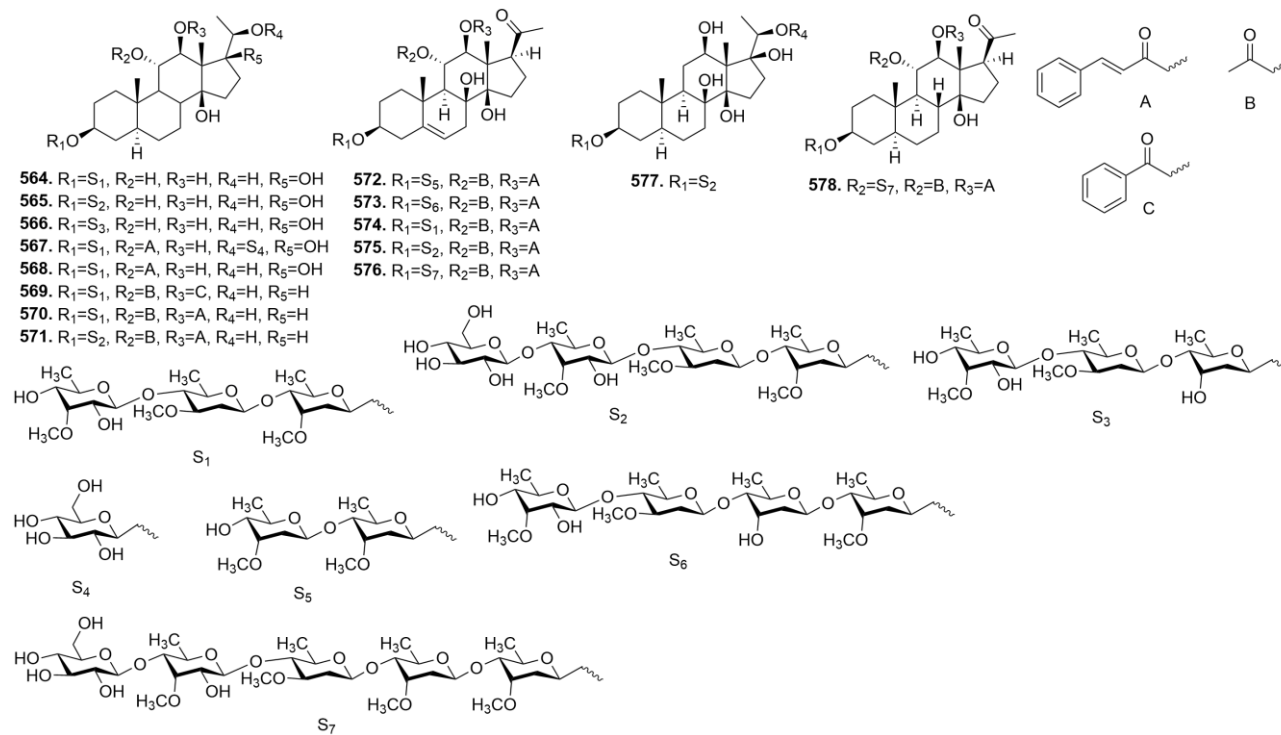
S₂

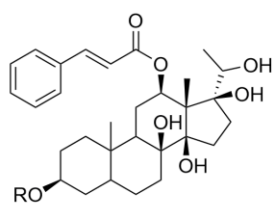
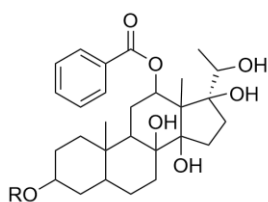
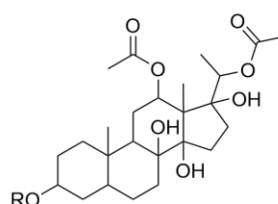
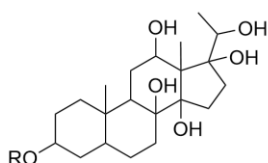
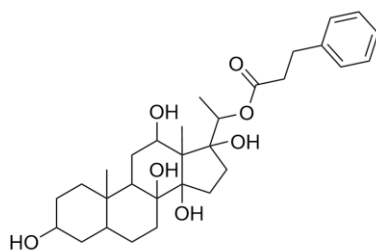
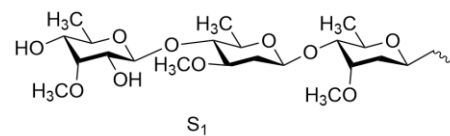
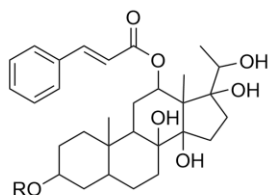
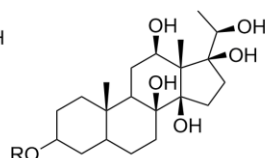
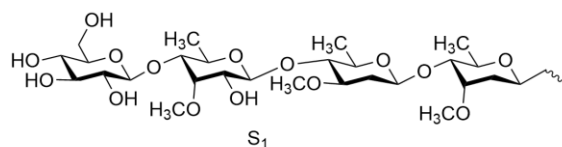


S₃

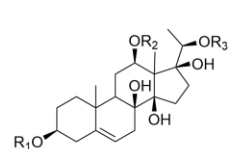


S₄

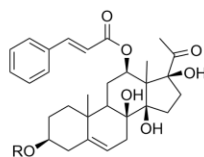
Marsdenia cundurango

Marsdenia koi579. R=S₁580. R=S₁581. R=S₁582. R=S₁583. R=S₁S₁*Marsdenia oreophilai*584. R=S₁585. R=S₁S₁

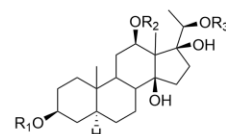
Marsdenia tomentosa



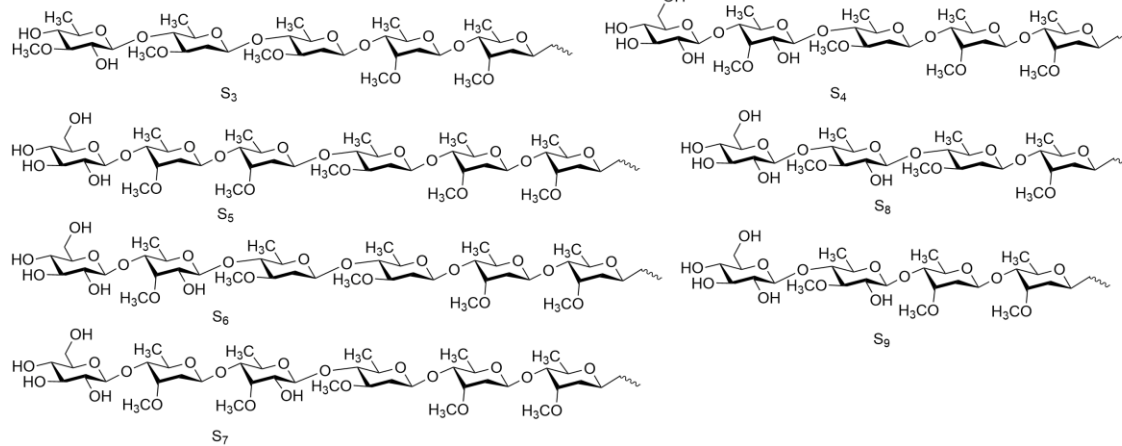
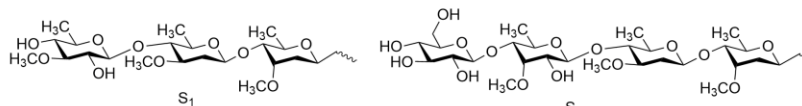
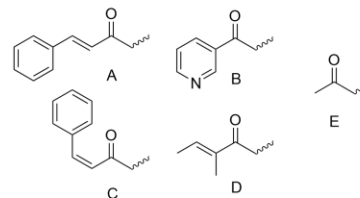
586. $R_1=S_3$, $R_2=A$, $R_3=B$
 587. $R_1=S_1$, $R_2=A$, $R_3=H$
 588. $R_1=S_2$, $R_2=A$, $R_3=H$
 589. $R_1=S_5$, $R_2=A$, $R_3=H$
 590. $R_1=S_6$, $R_2=A$, $R_3=H$
 591. $R_1=S_7$, $R_2=A$, $R_3=H$
 592. $R_1=S_2$, $R_2=E$, $R_3=D$
 593. $R_1=S_6$, $R_2=E$, $R_3=D$
 594. $R_1=S_7$, $R_2=E$, $R_3=D$
 595. $R_1=S_8$, $R_2=C$, $R_3=B$
 596. $R_1=S_9$, $R_2=A$, $R_3=H$
 597. $R_1=S_8$, $R_2=A$, $R_3=B$

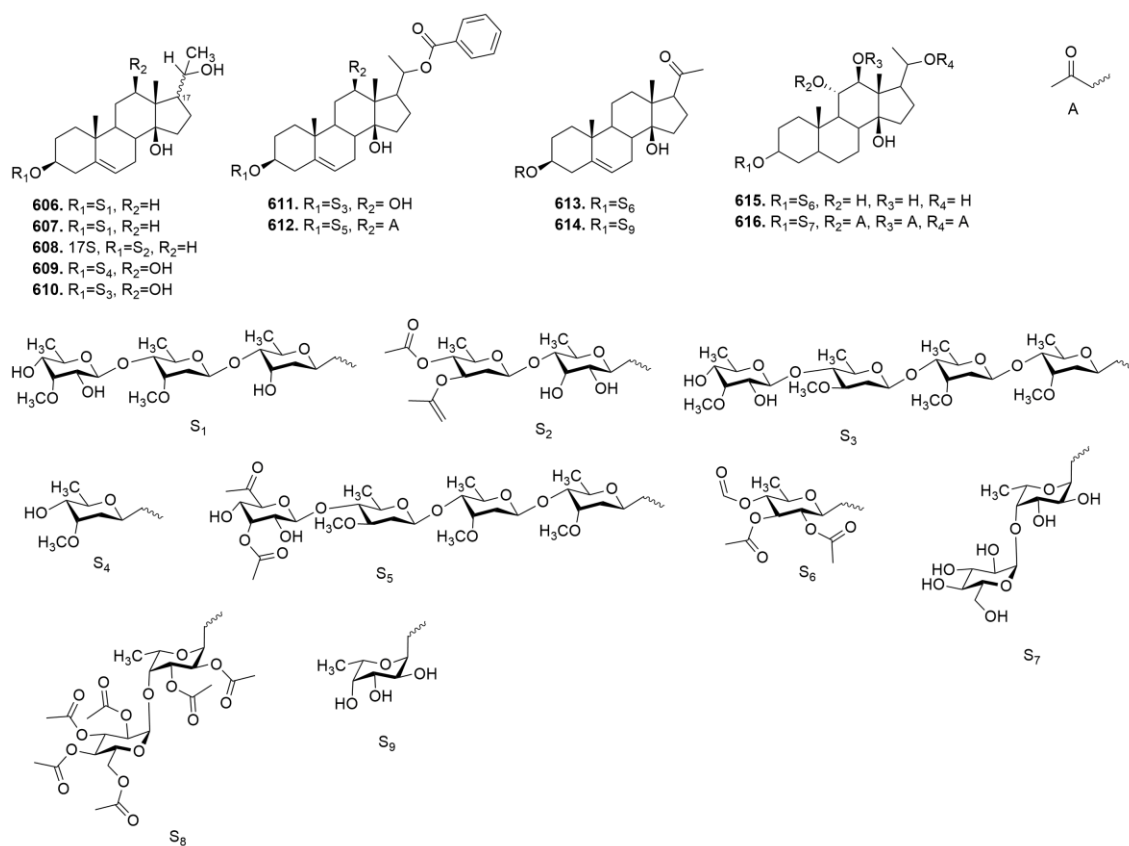
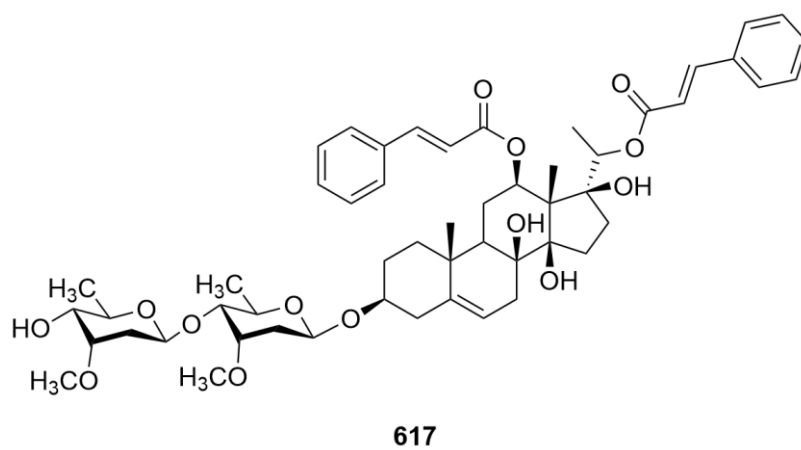


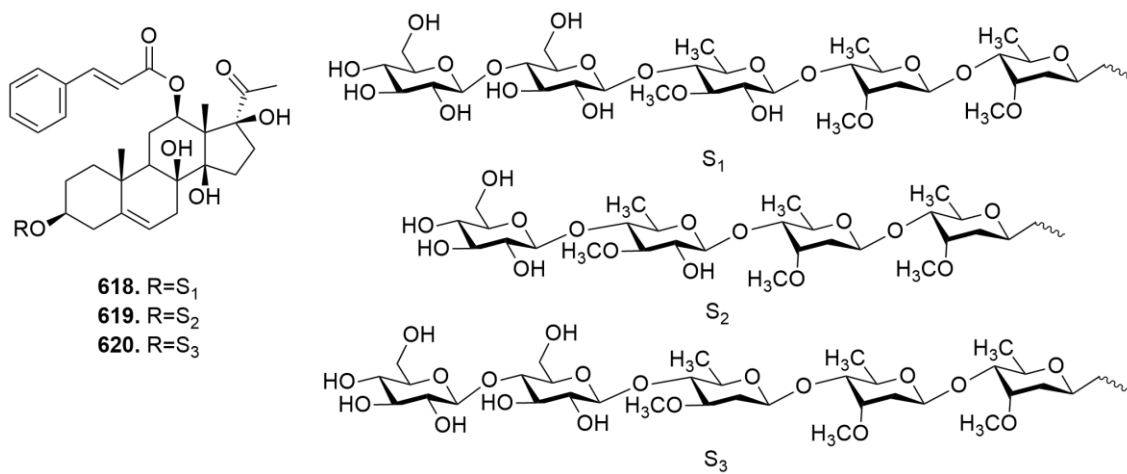
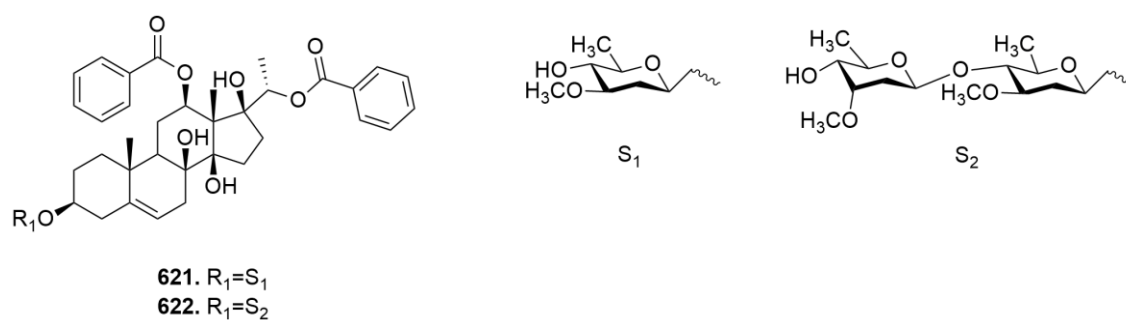
598. $R=S_2$
599. $R=S_5$
600. $R=S_9$

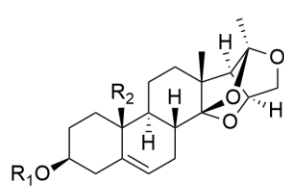


601. $R_1=S_1$, $R_2=A$, $R_3=B$
 602. $R_1=S_2$, $R_2=A$, $R_3=B$
 603. $R_1=S_1$, $R_2=D$, $R_3=H$
 604. $R_1=S_2$, $R_2=D$, $R_3=H$
 605. $R_1=S_9$, $R_2=A$, $R_3=B$



Masdenia roylei*Orthenthera viminea*

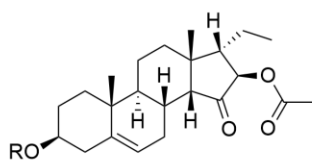
Oxystelma esculentum*Pergularia palida*

Solenostemma argel

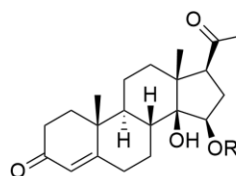
623. $R_1=S_1$, $R_2=A$

624. $R_1=S_4$, $R_2=CH_3$

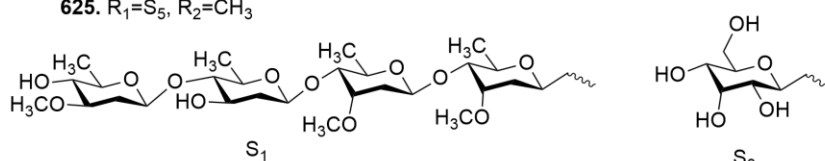
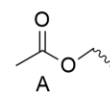
625. $R_1=S_5$, $R_2=CH_3$



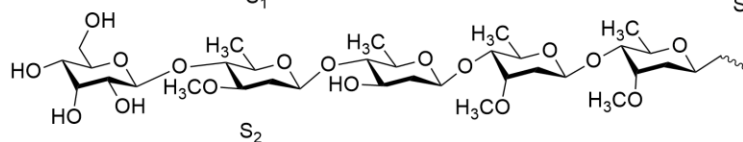
626. $R=S_2$



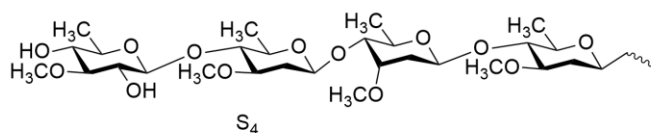
627. $R=S_3$



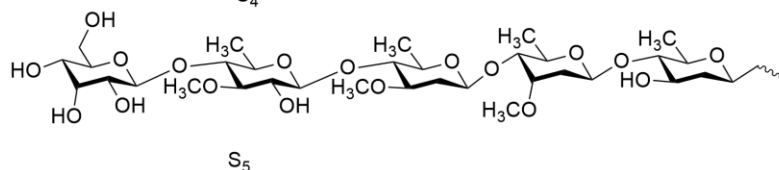
S_3



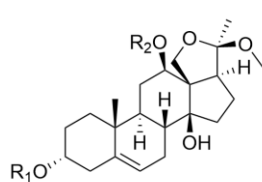
S_2



S_4

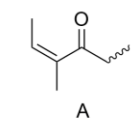


S_5

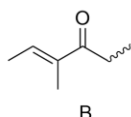
Stapelia gigantea

628. $R_1=S_1$, $R_2=A$

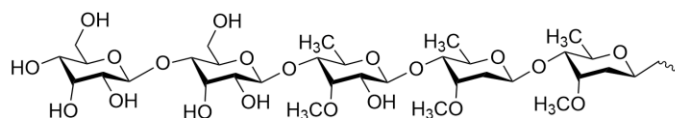
629. $R_1=S_2$, $R_2=B$



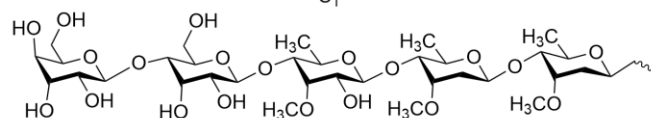
A



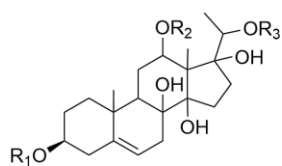
B



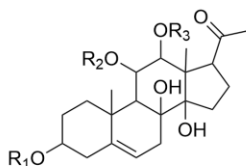
S_1



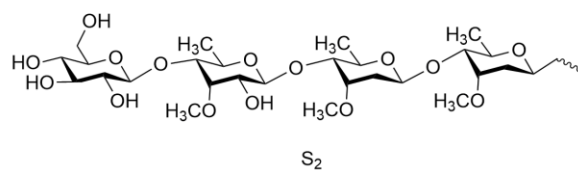
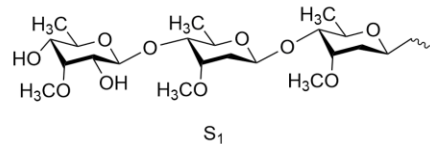
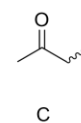
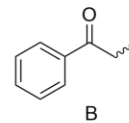
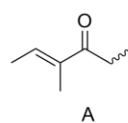
S_2

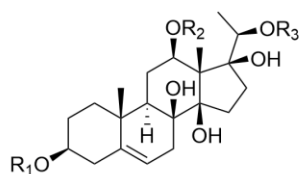
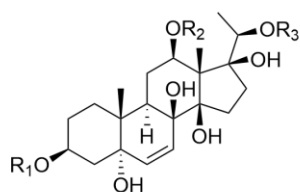
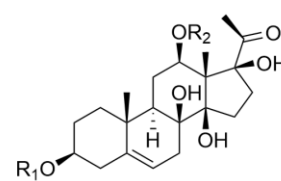
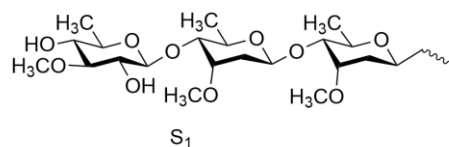
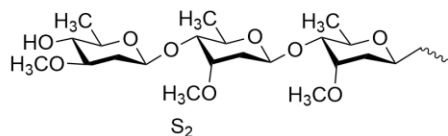
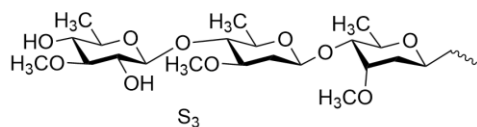
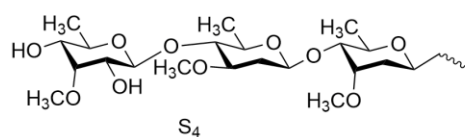
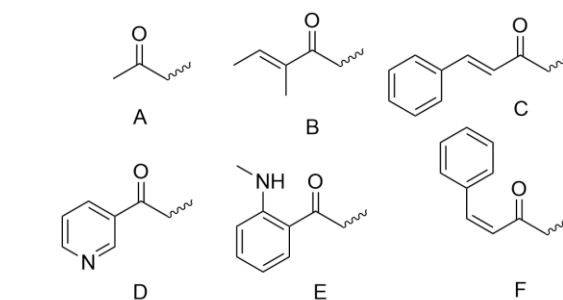
Stapelia variegata

630. $R_1=S_1$, $R_2=A$, $R_3=B$
 631. $R_1=S_1$, $R_2=A$, $R_3=A$
 632. $R_1=S_1$, $R_2=B$, $R_3=A$
 633. $R_1=S_1$, $R_2=C$, $R_3=C$



634. $R_1=S_1$, $R_2=C$, $R_3=B$
 635. $R_1=S_1$, $R_2=C$, $R_3=A$
 636. $R_1=S_1$, $R_2=C$, $R_3=C$
 637. $R_1=S_1$, $R_2=H$, $R_3=H$
 638. $R_1=S_1$, $R_2=A$, $R_3=B$
 639. $R_1=S_2$, $R_2=C$, $R_3=B$
 640. $R_1=S_2$, $R_2=C$, $R_3=A$



Stephanotis lutchuensis641. $R_1=S_5$, $R_2=A$, $R_3=E$ 642. $R_1=S_4$, $R_2=A$, $R_3=E$ 643. $R_1=S_3$, $R_2=A$, $R_3=E$ 644. $R_1=S_2$, $R_2=A$, $R_3=E$ 645. $R_1=S_1$, $R_2=A$, $R_3=E$ 646. $R_1=S_5$, $R_2=C$, $R_3=D$ 647. $R_1=S_3$, $R_2=C$, $R_3=D$ 648. $R_1=S_1$, $R_2=C$, $R_3=D$ 649. $R_1=S_5$, $R_2=C$, $R_3=H$ 650. $R_1=S_6$, $R_2=F$, $R_3=H$ 651. $R_1=S_3$, $R_2=C$, $R_3=B$ 652. $R_1=S_3$, $R_2=C$, $R_3=D$ 653. $R_1=S_1$, $R_2=C$, $R_3=B$ 654. $R_1=S_1$, $R_2=C$, $R_3=D$ 655. $R_1=S_5$, $R_2=C$, $R_3=B$ 656. $R_1=S_5$, $R_2=C$, $R_3=D$ 657. $R_1=S_5$, $R_2=C$  S_1  S_2  S_3  S_4 

A

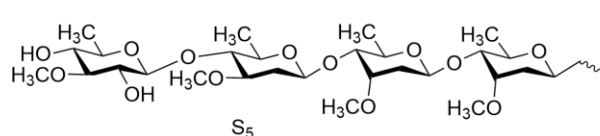
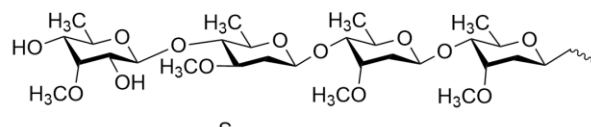
B

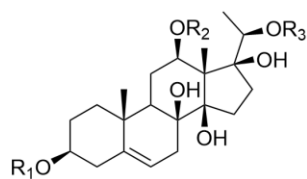
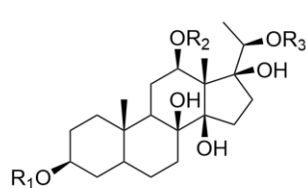
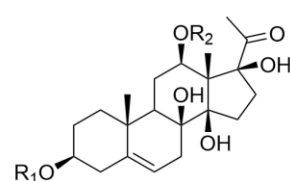
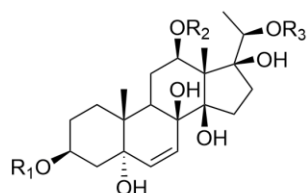
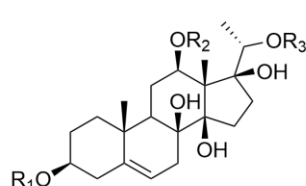
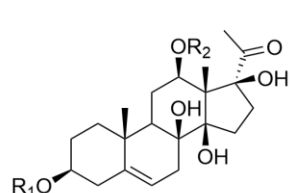
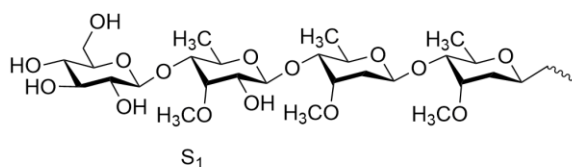
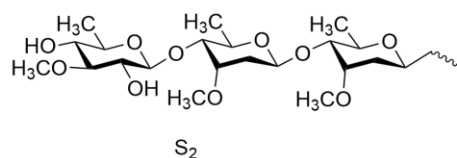
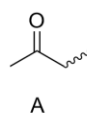
C

D

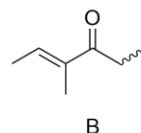
E

F

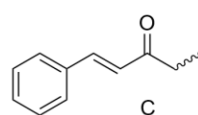
 S_5  S_6

Stephanotis mucronata658. $R_1=S_2$, $R_2=B$, $R_3=A$ 659. $R_1=S_1$, $R_2=H$, $R_3=H$ 660. $R_1=S_2$, $R_2=B$, $R_3=H$ 661. $R_1=S_1$, $R_2=B$, $R_3=H$ 662. $R_1=S_2$, $R_2=H$, $R_3=H$ 663. $R_1=S_2$, $R_2=E$, $R_3=H$ 664. $R_1=S_1$, $R_2=A$, $R_3=E$ 665. $R_1=S_2$, $R_2=A$, $R_3=E$ 666. $R_1=S_1$, $R_2=D$, $R_3=C$ 667. $R_1=S_2$, $R_2=A$, $R_3=B$ 668. $R_1=S_1$, $R_2=C$, $R_3=B$ 669. $R_1=S_2$, $R_2=B$, $R_3=H$ 670. $R_1=S_1$, $R_2=A$, $R_3=B$ 671. $R_1=S_1$, $R_2=A$, $R_3=B$ 672. $R_1=S_1$, $R_2=A$, $R_3=E$ 673. $R_1=S_1$, $R_2=A$ 674. $R_1=S_2$, $R_2=B$ 675. $R_1=S_2$, $R_2=H$ 676. $R_1=S_2$, $R_2=H$ 677. $R_1=S_1$, $R_2=A$ 678. $R_1=S_1$, $R_2=C$, $R_3=B$ 679. $R_1=S_2$, $R_2=C$, $R_3=A$ 680. $R_1=S_2$, $R_2=H$, $R_3=B$ 681. $R_1=S_1$, $R_2=A$, $R_3=B$ 682. $R_1=S_2$, $R_2=D$  S_1  S_2 

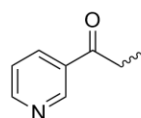
A



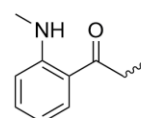
B



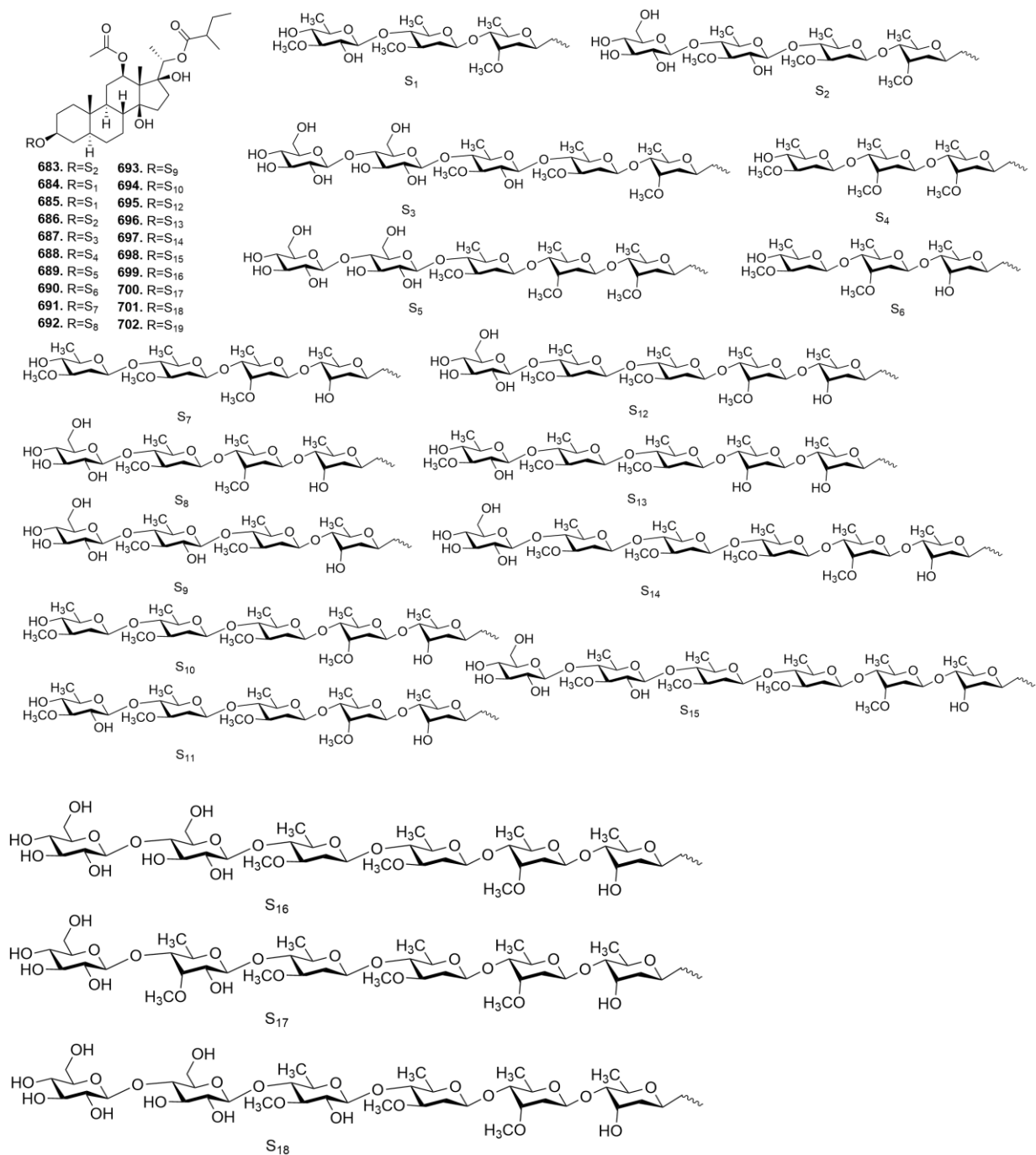
C

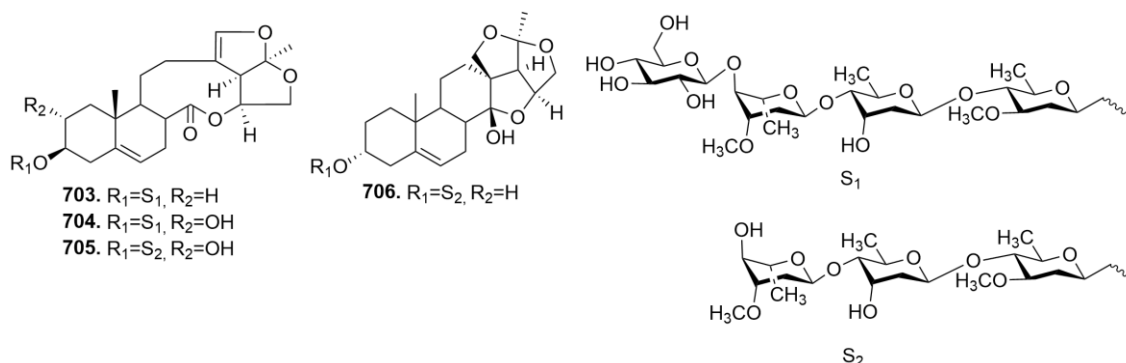


D



E

Telosma procumbens

Vincetoxicum hirundinaria

5.2 Manuscrito: Novos glicosídeos pregnanos de *Mandevilla dardanoi* e sua atividade anti-inflamatória (Revista *Molecules*, <https://doi.org/10.3390/molecules27185992>)

Francisca S. V. Lins ¹, Thalisson A. de Souza ¹, Luiza C. F. Oprestzka ², Joanda P. R. e Silva ¹, Laiane C. O. Pereira ¹, Lucas S. Abreu ³, Anderson A. V. Pinheiro ¹, George L. D. dos Santos ¹, Yuri M. do Nascimento ¹, José I. M. de Melo ⁴, Raimundo Braz-Filho ⁵, Cristiane F. Villarreal ², Marcelo S. da Silva ¹ and Josean F. Tavares ^{1,*}

1 Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brasil;

2 Escola de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brasil.

3 Departamento de Química, Instituto de Química, Universidade Federal Fluminense, Niterói, Brasil;

4 Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande-PB, Brasil;

5 Departamento de Química, Instituto de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Brasil.

* Correspondência: josean@lft.ufpb.br;

Resumo:

Mandevilla Lindl é um importante gênero da família Apocynaceae, não apenas como planta ornamental, mas também por seus usos medicinais. No Brasil, as espécies de *Mandevilla* são indicadas para o tratamento de asma e infecções de pele, e seu potencial anti-inflamatório e de cicatrização de feridas também são relatados na literatura. No que diz respeito à sua composição química, este grupo de plantas é um produtor notável de pregnanos glicosídeos. *Mandevilla dardanoi* é uma espécie endêmica do semiárido brasileiro não estudada por nenhum método fitoquímico. Tendo em vista o potencial medicinal das espécies de *Mandevilla*, este estudo teve como objetivo isolar novos pregnanos glicosídeos de *M. dardanoi*. Para atingir este objetivo principal, foram utilizadas técnicas modernas de cromatografia. Cinco novos pregnanos glicosídeos, dardanois A-E, foram isolados das raízes de através de CLAE. As suas estruturas foram determinadas utilizando dados extensivos de RMN 1D e 2D e de espectrometria de massas (MSn e HRESIMS). A citotoxicidade e o potencial anti-inflamatório destes compostos foram avaliados através da medição de citocinas pró-inflamatórias e da produção de óxido nítrico por macrófagos estimulados. Os dardanois foram capazes de inibir a produção de óxido nítrico e reduzir a IL-1 β e o TNF- α . O presente trabalho demonstra a quimiodiversidade de espécies do semiárido brasileiro e contribui para ampliar o conhecimento sobre o potencial biológico do gênero *Mandevilla*.

Palavras-chave: *Mandevilla dardanoi*; Apocynaceae; Pregnanos glicosídeos, Anti-inflamatório.

Introdução

A família Apocynaceae compreende aproximadamente 355 gêneros e 3700 espécies distribuídas por todo o mundo, principalmente em áreas tropicais. Muitas destas espécies têm sido utilizadas na medicina popular para infecções do trato urinário, picadas de cobra, diarreia, asma, dores de dentes, infecções cutâneas e cicatrização de feridas. Além disso, o desenvolvimento de técnicas analíticas para isolamento e determinação estrutural conduziu a novos compostos ativos com propriedades farmacológicas a partir destas espécies (BHADANE et al., 2018; WANG et al., 2020).

Mandevilla Lindl. é o maior gênero neotropical da subfamília Apocynoideae e contém aproximadamente 190 espécies distribuídas do México à Argentina, das quais 66 foram relatadas no Brasil (HERRERA-CALDERÓN et al., 2021). No estado da Paraíba, existem 6 espécies de *Mandevilla* distribuídas na Caatinga e Mata Atlântica (DA SILVA-MONTEIRO et al., 2017).

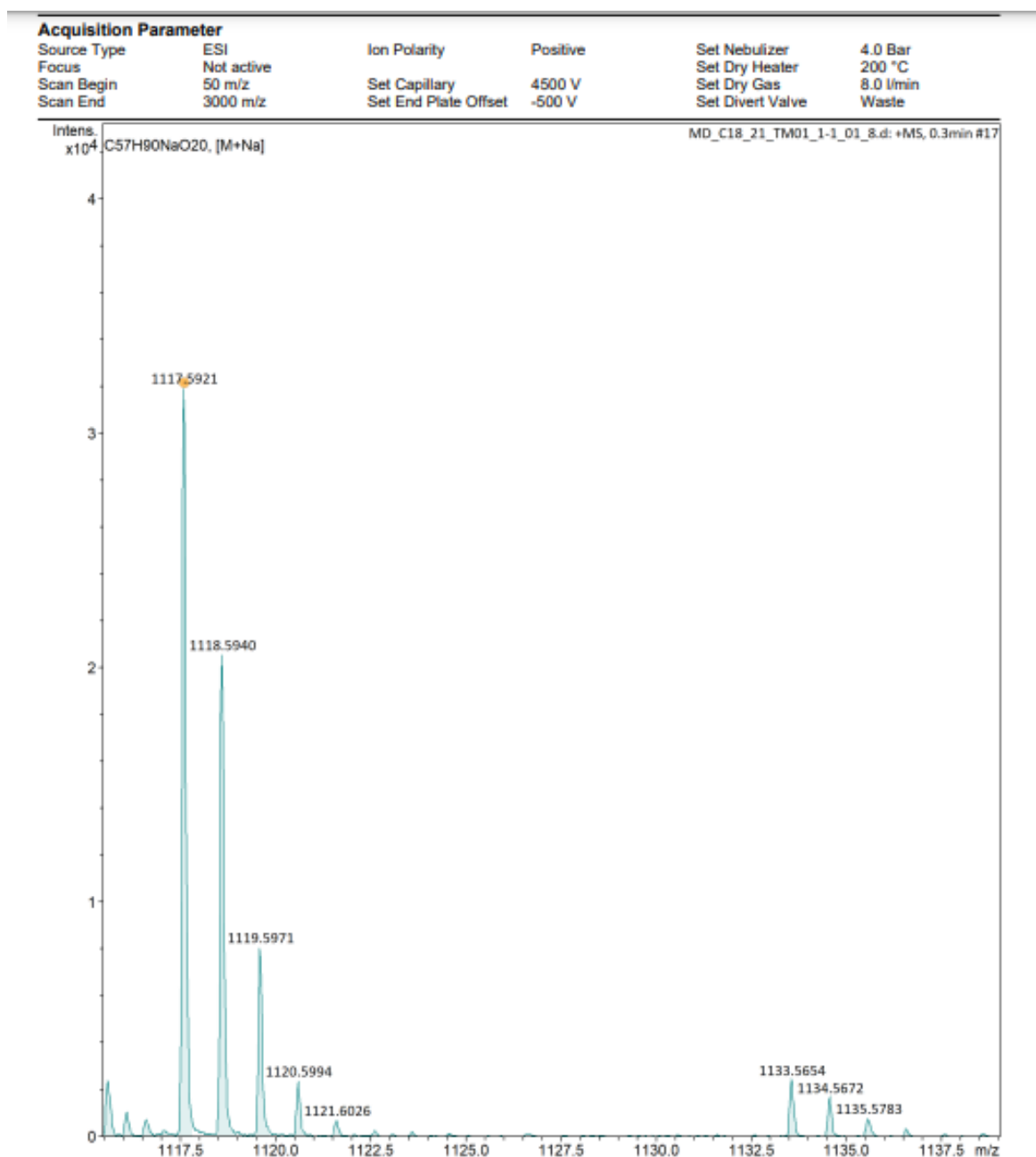
Neste gênero, as raízes tuberosas são ricas em esteroides, terpenoides e pregnanos glicosídeos (TATSUZAWA et al., 2021). Os pregnanos glicosídeos são uma classe de compostos originados do ciclopentanoperidrofenantreno e têm atraído considerável atenção nos últimos anos devido às suas notáveis atividades biológicas, incluindo propriedades anticancerígenas, antinociceptivas, anti-inflamatórias e antibacterianas (SHI et al., 2022;

ABDEL-SATTAR et al., 2022). Estes compostos estão relacionados com a atividade biológica de muitas espécies de *Mandevilla*.

A *Mandevilla dardanoi* é uma espécie endêmica do semiárido brasileiro e foi registrada pela primeira vez em 2017. Não há estudos sobre sua composição química ou atividades farmacológicas (DA SILVA-MONTEIRO et al., 2017). Considerando o potencial medicinal do gênero *Mandevilla*, este estudo teve como objetivo identificar e isolar novos derivados pregnanos bioativos das raízes de *M. dardanoi*. Cinco novos pregnanos glicosídeos, dardanois A-E, foram isolados e caracterizados por análise espectroscópica e espectrométrica. A citotoxicidade e a atividade anti-inflamatória dos dardanois A, B, C e E foram também avaliadas. Todos os compostos testados foram ativos nos modelos aplicados.

5.2.1 Elucidação estrutural

O composto 1 foi isolado como um sólido amorfo branco com uma rotação óptica positiva de $[\alpha]^{25}_D +14$ (c 0,1, piridina). A sua fórmula molecular foi determinada como sendo $C_{57}H_{90}O_{20}$ pelo íon do aduto sódio em m/z 1117,5921 $[M + Na]^+$ (calcd. Para $C_{57}H_{90}NaO_{20}$, 1117,5917, $\Delta = 0,3$ ppm) (figura 24), através de HRESIMS, indicando 13 índices de deficiência de hidrogênio (IHD).

Figure 24: Espectro ESI-HRMS do composto **1**

Os dados de RMN de ^1H e ^{13}C (tabelas 3 e 4 e figuras S2-S10) mostraram sinais característicos de pregnanos glicosídeos já isolados do gênero *Mandevilla*. Os sinais de hidrogênio em δH 5,75 (d, $J = 2,5$ Hz, H-16) correspondentes a um hidrogênio do grupo acetal, δH 5,41 (m, H-6), um hidrogênio olefínico, δH 4,58 (t, $J = 2,4$ Hz, H-20) e 3,81 (m, H-3), hidrogênios oximetínicos, 1,06 (s, CH_3 -18) e 0,94 (s, CH_3 -19), hidrogênios metílicos, associados aos respectivos carbonos a δC 104,2 (C-16), 122,1 (C-6), 78,9 (C-20), 77,5 (C-3), 16,9 (C-18) e 19,7 (C-19), estão de acordo com os valores descritos para a aglicona do composto illustrol, um derivado seco-norpregnano, isolado de *M. illustris* e relatado apenas uma vez

(YUNES et al., 1993). Os cinco sinais de hidrogênios anoméricos em δH 4,76 (dd, $J = 9,5, 2,0$ Hz, H-1'), 5,47 (dd, $J = 4,4, 2,2$ Hz, H-1''), δH 5,15 (dd, $J = 9,6, 1,6$ Hz, H-1'''), δH 5,08 (dd, $J = 9,6, 1,7$ Hz, H-1''') e 4,71 (dd, $J = 9,7, 2,0$ Hz, H'''), bem como a presença dos sinais dos hidrogênios metílicos δH 1,49 (3H, d, $J = 6,4$ Hz, C-6'), 1,33 (6H, d, $J = 6,2$ Hz, C-6'' e C-6'''), 1,39 (3H, d, $J = 6,2$ Hz, C-6''') e 1,29 (3H, d, $J = 6,4$ Hz, C-6'''), e os hidrogênios dos grupos metoxi em δH 3,33 (s, OCH₃'), δH 3,39 (s, OCH₃''), δH 3,60 (s, OCH₃'''), δH 3,46 (s, OCH₃''') e δH 3,38 (s, OCH₃''') indicaram a existência de cinco unidades osídicas na estrutura de **1**.

Esta evidência foi corroborada pela presença dos sinais no espectro de RMN de ¹³C correspondentes a cinco carbonos anoméricos em δC 102,9, 100,9, 100,8, 99,0, e 97,3, cinco carbonos metílicos em δC 19,0, δC 18,9, δC 18,4, δC 17,5, e δC 17,2, e cinco carbonos metoxi em δC 59,3, δC 58,9, δC 56,8, δC 56,7, e δC 56,5.

No espectro HSQC (S11-S15), o hidrogênio anomérico em δH 4,76 (dd, $J = 9,5, 2,0$ Hz) correlacionou-se com o sinal do carbono em δC 99,0. No espectro HMBC (figuras S16-S19), este mesmo hidrogênio mostrou uma correlação de longa distância com o carbono a δC 77,6 (C-3), sendo assim atribuído a H-1'. Por outro lado, o sinal de hidrogênio a δH 3,81 (H-3) correlacionou-se com o carbono a δC 99,0, confirmando a ligação da primeira unidade de osídica à porção de aglicona. Além disso, esta atribuição foi corroborada através de correlações cruzadas de δH 3,81 (H-3) e δH 5,41 (H-6) com δC 39,6 (C-4). No espectro COSY, observou-se uma correlação do sinal em δH 4,76 (H-1) com δH 2,22 (H-2') e daquele com δH 3,41 (H-3'). No espectro HSQC, H-2' e H-3' correlacionaram-se com os carbonos em δC 28,7 (C-2') e δC 81,3, respectivamente. Estes dados, comparados com a literatura, permitiram-nos atribuir a unidade osídica I como sendo diginopiransídeo (LIU et al., 2013). As constantes de acoplamento H-1' a $J = 9,7$ e $2,0$ Hz são compatíveis com ligação β -glicosídica. De acordo com a literatura, um desvio químico de C-2 das unidades osídicas inferior a 34 ppm corresponde a uma configuração L e superior a 35 ppm a uma configuração D (GAN et al., 2008). Este efeito está associado à orientação do grupo éter no eixo axial presente em C-4, o que provoca um efeito de proteção gama em C-20. Assim, com o deslocamento químico de C-2' sendo igual a δC 28,7, foi possível atribuir a configuração da unidade osídica I como β -L-diginopiranosil.

No espectro HSQC, o hidrogênio anomérico a δH 5,47 (dd, $J = 4,4$ e $2,2$ Hz) está correlacionado com o carbono a δC 97,3. No espectro HMBC, o mesmo sinal correlacionado com o carbono a δC 71,0 (C-4') foi atribuído a H-1'', confirmando a união dos açúcares através de ligações 1-4.

No espectro COSY (figura S20), foi observada uma correlação do hidrogênio H-1'' com o sinal a δH 2,18 e deste com o sinal a δH 3,96, que foram atribuídos a H-2'' e H-3''. No espectro HSQC, H-2'' e H-3'' correlacionam-se com os carbons em δC 33,8 e δC 76,3, respectivamente. Assim, comparando os outros dados que estão apresentados na Tabela 2 com os dados presentes na literatura, é possível atribuir a unidade osídica II como sendo o sarmentopiranosídeo [11]. As constantes de acoplamento em $J = 4,4$ e $2,2$ Hz são compatíveis com ligação α -glicosídica e o valor de C-2'' em δC 33,8 com a configuração L para a unidade osídica II, que foi atribuída como β -L-sarmentopiranosil.

No espectro HSQC, o hidrogênio anomérico a δH 5,15 (dd, $J = 9,6$ e $1,6$, H-1''') correlacionou-se com o carbono a δC 100,8. No espectro HMBC, observou-se uma correlação do sinal em δH 3,73 (H-4'') com o carbono em δC 100,8, confirmando a ligação da unidade osídica II a III através de ligações 1-4. À semelhança das atribuições efetuadas anteriormente, os espectros COSY e HSQC foram analisados em conjunto para efetuar as atribuições 1H e ^{13}C da unidade osídica III (tabelas 2 e 3). Comparando estes dados com a literatura, é possível atribuir a unidade osídica III como um cimaropiranosídeo (LIU et al., 2013). As constantes de acoplamento a $9,6$ e $1,6$ Hz são compatíveis com ligações β -glicosídicas, e o valor do desvio químico de C-2''' a δH 37,0 permitiu-nos atribuir a configuração da unidade osídica III como β -D-cimaropiranosil.

Para a unidade osídica IV, observou-se que o sinal do hidrogênio anomérico em δH 5,08 (dd, $J = 9,6$ e $1,7$ Hz, H-1''') se correlaciona no espectro HSQC com o carbono em δC 100,9. No espectro HMBC, observou-se uma correlação do sinal em δH 3,48 (H-4''') com o carbono em δC 100,9, que foi atribuído a C-1''', confirmando a união das unidades osídicas III e IV. No espectro COSY, observou-se uma correlação de δH 5,08 (H-1''') com δH 2,35 (H-2''') e deste com δH 4,01 (H-3'''). Na análise do espectro HSQC, foi possível atribuir os respectivos carbonos das unidades osídicas IV (tabela 3). Comparando os dados nas Tabelas 2 e 3 com a literatura, foi possível marcar a unidade osídica IV como oleandropiranosídeo (LIU et al., 2013). A constante de acoplamento a $9,6$ e $1,7$ Hz foi compatível com ligação β -glicosídica, e o valor de C-2''' a δC 38,1 permitiu a atribuição da configuração da unidade osídica IV como β -D-oleandropiranosil.

Finalmente, foi também observado um hidrogênio anomérico a δH 4,71 (dd, $J = 9,7$ e $2,0$ Hz, H-1''') que se correlaciona no espectro HSQC com o carbono a δC 102,9. No HMBC, foi observada uma correlação do sinal em δH 3,48 (H-4''') com o carbono em δC 102,9, confirmando a ligação entre as unidades osídicas IV e V. Foi observada uma correlação de δH

5,15 (H-1''''') com δ H 2,25 (H-2''''') em COSY, cujo carbono correspondente foi sinalizado pela correlação observada no espectro HSQC com o carbono em δ C 34,2 (C-2'''''). Os demais dados (Tabela 3 e 3), comparados com a literatura, permitiram-nos atribuir a unidade glicosídica V como sarmentopiranosídeo. A constante de acoplamento a 9,7 e 2,0 Hz foi compatível com ligação β -glicosídica, e o valor de C-2''''' a δ C 34,2 permitiu atribuir a configuração da unidade osídica V como β -L-sarmentopiranosil. O sinal a δ H 5,38 (d, $J = 2,9$ Hz) foi atribuído a H-4''''', cujo carbono correspondente foi marcado a δ C 68,5 por HSQC. Em HMBC, observou-se uma correlação do sinal em δ H 1,29 (d, $J = 6,4$ Hz, 3H-6''''') com δ C 68,5 (C-4''''') e de δ H 5,38 (H-4''''') com o carbono em δ C 171,2, confirmando a posição do grupo acetil na unidade osídica V em C-4'''''.

Após uma extensa análise por RMN, determinou-se que a estrutura de **1** era ilustrol-3-O- β -L-diginopiranosil-(1-4)- α -L-sarmentopiranosil-(1-4)- β -D-cymaropiranosil-(1-4)- β -D-oleandropiranosil-(1-4)- β -L-4-acetoxilsarmentopiranosil, um novo produto natural denominado dardanol A (figuras 25).

As correlações encontradas nos espectros de HMBC (S11-S15) e COSY (figura (figura S20) podem ser visualizadas na estrutura do composto **1** presente na figura 26.

Tabela 3. Dados espectroscópicos de RMN de ^1H dos compostos **1-5** (piridina- d_5)

Posição	1 ^a	2 ^a	3 ^b	4 ^b	5 ^b
1	1.75; 1.04 (m)	1.74; 1.04 (m)	1.76, 1.05 (m)	1.76; 1.05 (m)	1.76 (m); 1.04 (m)
2	2.04; 1.67 (m)	2.04; 1.68 (m)	2.04, 1.68 (m)	2.08; 1.73 (m)	1,90; 1.65 (m)
3	3.81 (m)	3.83 (m)	3.84(m)	3.80 (m)	3.81 (m)
4	2.56 (ddd, 13.4, 4.6, 2.2)	2.56 (m)	2.59 (m)	2.36 (ddd, 13.1, 4.8, 2.2); 2.60 (dd, 13.1, 11.2)	2.46 (m)
	2.38 (m)	2.38 (m)	2.38 (m)		2.36 (m)
5	-	-	-	-	-
6	5.41 (m)	5.42 (m)	5.50 (br s)	5.51 (m)	5.39 (d, 2.84)
7	2.50; 2,28 (m)	2.50; 2,28 (m)	2.64 (m)	2.67 (m)	2.56 (m); 2,30 (m)
8	2.02 (m)	2.02 (m)	2.04 (m)	1.81 (m)	2.05 (m)
9	1.55 (m)	1.57 (m)	1.44 (m)	1.46 (m)	1.55
10	-	-	-	-	-
11	1.45 (m)	1.45 (m)	1.53, 1.30 (m)	1.53, 1.38 (m)	1.65 (m)
12	1.54; 1.44 (m)	1.52; 1.46 (m)	1.95; 1.45 (m)	1.99, 1.45 (m)	2.05 (m); 2.28 (m)
13	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	5.00 (d, 11.5)
16	5.75 (d, 2.5)	5.76 (d, 2.5)	5.17 (s)	5.18 (s)	5.89 (d, 4.4)
17	2.52 (t, 2.7)	2.52 (t, 2.7)	3.23 (d, 8.0)	3.25 (d, 8.0)	2.46 (dd, 4.4, 6.0)
18	1.06 (s)	1.06 (s)	1.40 (s)	1.42 (s)	1.02 (s)
19	0.94 (s)	0.94 (s)	0.95 (s)	0.98 (s)	1.00 (s)
20	4.58 (t, 2,4)	4.58 (m)	5.08 (m)	5.10 (ddd, 8.0, 5.2, 1.2)	4.55 (dd, 3.3, 6.2)
21	4.20 (d, 9.9)	4.21 (d, 9.9)	4.12 (br d, 9.2)	4.23 (dd, 10.1, 1.7)	4.38 (d, 9.7)
	3.92 (dd, 9.9, 2.5)		4.03 (m)	4.05 (dd, 10.1, 5.3)	

		3.93 (dd, 9.9, 2.5)			3.81 (dd, 9.84, 3.48)
MeO-16	-	-	3.34 (s)	3.34 (s,)	-
OH-14	-	-	6.88 (s)	6.90 (s)	-
Unidades osídicas					
A					
1'	4.76 (dd, 9.5, 2.0)	4.78 (dd, 9.5, 2.0)	4.75 (dd, 9.3, 2.2)	4.81 (dd, 11.6, 4.0)	4.74 (dd, 9.5, 2.0)
2'	2.20, 2.13 (m)	2.20, 2.15 (m)	2.16 (m)	2.32 (m);	2.20, 2.10
3'	3.41(m)	3.41(m)	3.37 (m)	2.16 (m) 3.43 (ddd, 12.0, 4.6, 2.9)	3.41
4'	3.94 (m)	3.96 (m)	3.97 (br s)	3.90 (m)	3.94
5'	3.56 (qd, 6.4)	3.57 (qd, 6.4)	3.50 (m)	3.56 (dq, 6.5, 1.2)	3.56 (qd, 6.4)
6'	1.49 (d, 6.4)	1.51 (d, 6.4)	1.29 (d, 6.3)	1.55 (d, 6.5)	1.49 (d, 6.4)
MeO	3.33 (s)	3.33 (s)	3.32 (s)	3.40 (s)	3.35 (s)
OH-4'	-	-	-	5.91 (m)	
B					
1''	5.47 (dd, 4.4, 2.2)	5.40 (dd, 4.4, 2.2)	5.47 (dd, 4.7, 2.6)	-	5.50 (m)
2''	2.21, 2.12 (m)	2.20, 2.12 (m)	2.15 (m)	-	2.18, 2.10
3''	3.96 (m)	3.99 (m)	3.97 (m)	-	3.96
4''	3.73 (m)	3.75 (m)	3.73 (m)	-	3.73 (m)
5''	4.56 (dd, 6.6, 1.3)	4.56 (m)	4.56 (dq, 6.1, 1.7)	-	4.56 (dd, 6.6, 1.3)
6''	1.33 (d, 6.2)	1.34 (d, 6.2)	1.32 (d, 6.1)	-	1.33 (d, 6.2)
MeO/Ac	3.39 (s)	3.39 (s)	3.39 (s)	-	3.39 (s)
C					
1'''	5.15 (dd, 9.6, 1.6)	5.15 (dd, 9.6, 1.7)	5.15 (dd, 9.5, 1.9)	-	5.08 (dd, 9.6, 1.6)
2'''	2.30, 1.90	2.38, 1.86 (m)	2.34, 1.87 (m)	-	2.30, 1.90
3'''	4.07 (m)	4.03 (m)	4.05 (m)	-	4.08 (m)
4'''	3.48 (m)	3.52 (m)	3.45 (m)	-	3.48 (m)
5'''	4.16 (m)	4.19 (m)	4.16 (m)	-	4.16 (m)
6'''	1.33 (d, 6.2)	1.39 (d, 6.2)	1.33 (d, 6.1)	-	1.33 (d, 6.2)
MeO	3.60 (s)	3.46 (s)	3.60 (s)	-	3.61 (s)
D					
1''''	5.08 (dd, 9.6, 1.7)	4.71 (dd, 9.7, 2.0)	5.09 (dd, 9.7, 2.2)	-	5.15 (dd, 9.6, 1.7)
2''''	2.38, 1.80 (m)	2.20, 2.05 (m)	2.31, 1.78 (m)	-	2.35, 1.80
3''''	4.01 (m)	3.50 (m)	3.99 (m)	-	4.01 (m)
4''''	3.48 (m)	5.38 (d, 2.9)	3.45 (m)	-	3.48 (m)
5''''	4.17 (m)	3.67 (dq, 6.4, 0.9)	4.16 (m)	-	4.15 (m)
6''''	1.39 (d, 6.2)	1.28 (d, 6.4)	1.38 (d, 6.2)	-	1.39 (d, 6.2)
MeO	3.46 (s)	3.38 (s)	3.46 (s)	-	3.49 (s)
E					
1'''''	4.71 (dd, 9.7, 2.0)	-	4.71 (dd, 9.6, 2.1)	-	4.71 (dd, 9.7, 2.0)
2'''''	2.21, 2.05 (m)	-	2.17, 2.04 (m)	-	2.25, 2.10
3'''''	3.52 (m)	-	3.48 (m)	-	3.52 (m)
4'''''	5.38 (d, 2.9)	-	5.37 (d, 3.0)	-	5.38 (d, 2.9)
5'''''	3.69 (dq, 6.4, 0.9)	-	3.68 (dq, 6.5, 1.2)	-	3.70 (m)
6'''''	1.29 (d, 6.4)	-	1.50 (d, 6.5)	-	1.30 (d, 6.4)
MeO	3.38 (s)	-	3.32 (s)	-	3.41 (s)
Ac					
4'''''a	-	-	-	-	-

4''''b	2.02 (s)	2.01 (s)	2.01 (s)	-	2.02 (s)
--------	----------	----------	----------	---	----------

^aMedido a 500 MHz. ^bMedido a 400 MHz.

Tabela 4. Dados espectroscópicos de RMN de ¹³C dos compostos **1-5** (piridina-d₅).

Posição	1 ^a	2 ^a	3 ^b	4 ^b	5 ^b
1	37.1	36.8	37.7	37.7	37.11
2	30.7	30.7	30.5	30.7	30.5
3	77.5	77.6	77.6	77.6	77.4
4	39.8	39.8	39.6	39.7	39.6
5	140.7	140.8	140.2	140.2	140.39
6	122.1	122.2	122.6	122.6	122.28
7	26.0	26.0	26.0	26.0	27.0
8	32.1	32.1	38.9	39.0	34.4
9	46.6	46.7	46.6	46.6	46.5
10	37.4	37.4	37.4	37.4	38.5
11	21.1	21.1	21.9	21.9	19.3
12	30.9	31.0	31.1	31.1	27.2
13	49.1	49.1	46.0	46.0	44.2
14	109.0	109.1	110.1	110.2	87.8
15	-	-	-	-	93.48
16	104.2	104.2	105.8	105.9	109.7
17	56.6	56.7	62.5	62.5	52.9
18	16.9	17.0	20.7	20.7	21.9
19	19.7	19.7	19.7	19.7	19.5
20	78.9	79.0	80.3	80.3	74.7
21	73.9	73.9	71.4	71.4	78.8
MeO-16	-	-	54.4	54.5	-
OH-14	-	-	-	-	-
Unidades osídicas					
A					
1'	99.0	99.0	98.9	99.0	98.9
2'	28.7	28.8	28.6	33.5	28.70
3'	81.4	81.4	81.3	79.5	81.34
4'	71.0	71.0	70.9	67.4	71.02
5'	71.5	71.5	71.4	71.7	71.51
6'	17.5	17.5	17.4	18.0	17.4
MeO	56.5	56.5	56.5	55.6	56.6
B					
1''	97.3	97.3	97.2	-	97.3
2''	33.8	33.9	33.7	-	33.83
3''	76.3	76.4	76.2	-	76.30
4''	78.6	78.6	78.5	-	78.6
5''	63.5	63.6	63.4	-	63.52
6''	18.4	18.4	18.3	-	18.30
MeO	56.8	56.8	56.7	-	56.7
C					
1'''	100.8	-	100.7	-	100.83
2'''	37.0	-	36.9	-	37.03
3'''	78.4	-	78.3	-	78.30
4'''	83.7	-	83.6	-	83.70
5'''	69.4	-	69.5	-	69.5
6'''	18.9	-	18.8	-	18.8
MeO	59.3	-	59.2	-	59.30

D				-	
1''''	100.9	100.8	100.8	-	100.8
2''''	38.1	38.1	37.0	-	38.1
3''''	78.1	78.2	78.0	-	78.15
4''''	83.6	83.8	83.5	-	83.59
5''''	69.6	69.5	69.3	-	69.58
6''''	19.0	19.0	18.9	-	18.99
MeO	58.9	58.9	58.8	-	58.92
E					
1'''''	102.9	103.0	102.8	-	102.90
2'''''	34.2	34.2	34.1	-	34.20
3'''''	77.4	77.4	77.3	-	77.35
4'''''	68.5	68.5	68.4	-	68.48
5'''''	71.0	71.2	70.0	-	70.1
6'''''	17.2	17.2	17.1	-	17.25
MeO	56.7	56.7	56.5	-	56.65
Ac					
4''''' ^a	171.2	171.2	171.1	-	171.1
4''''' ^b	21.0	21.2	21.0	-	21.1

^aMedido a 125 MHz. ^bMedido a 100 MHz

Figura 25. Estruturas dos novos pregnanos glicosídeos (**1-5**) isolados de *M. dardanoi*.

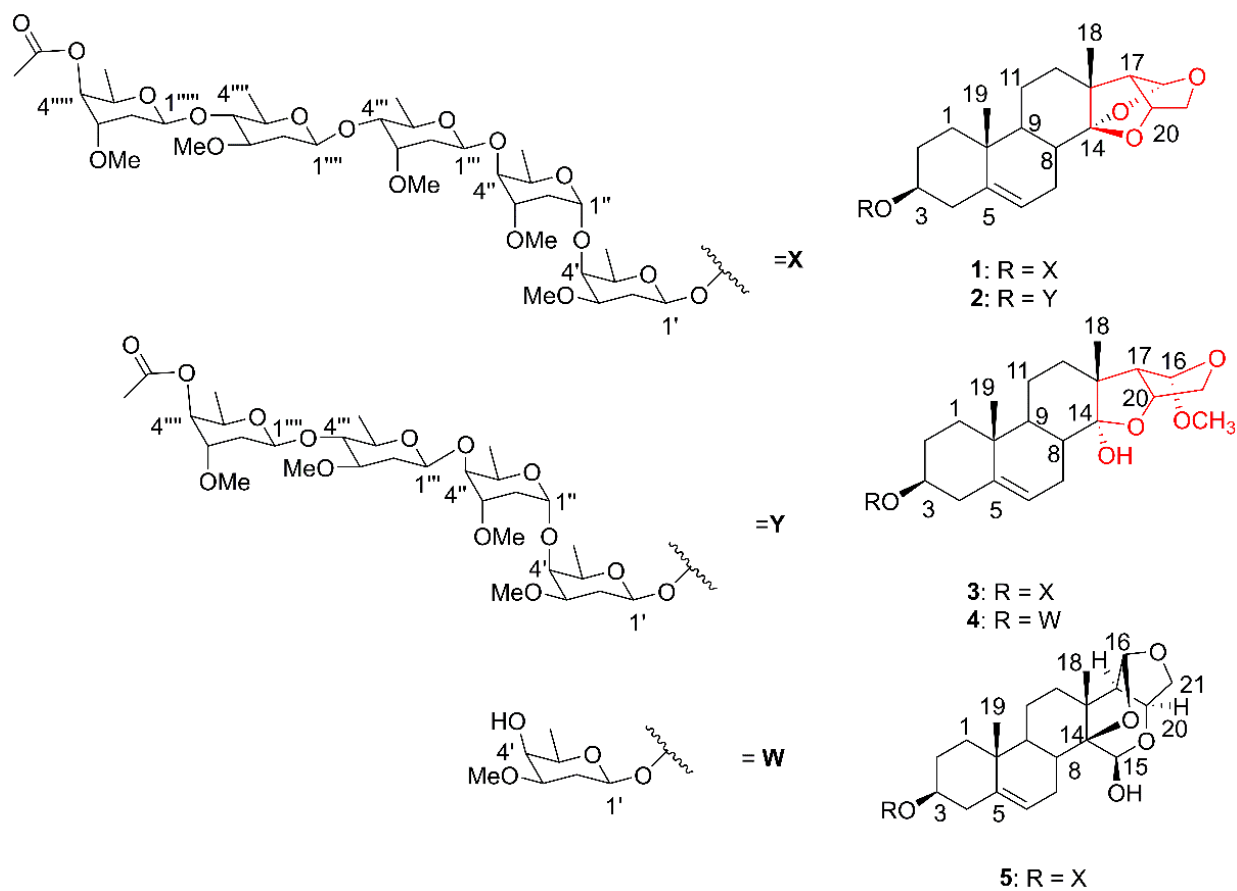
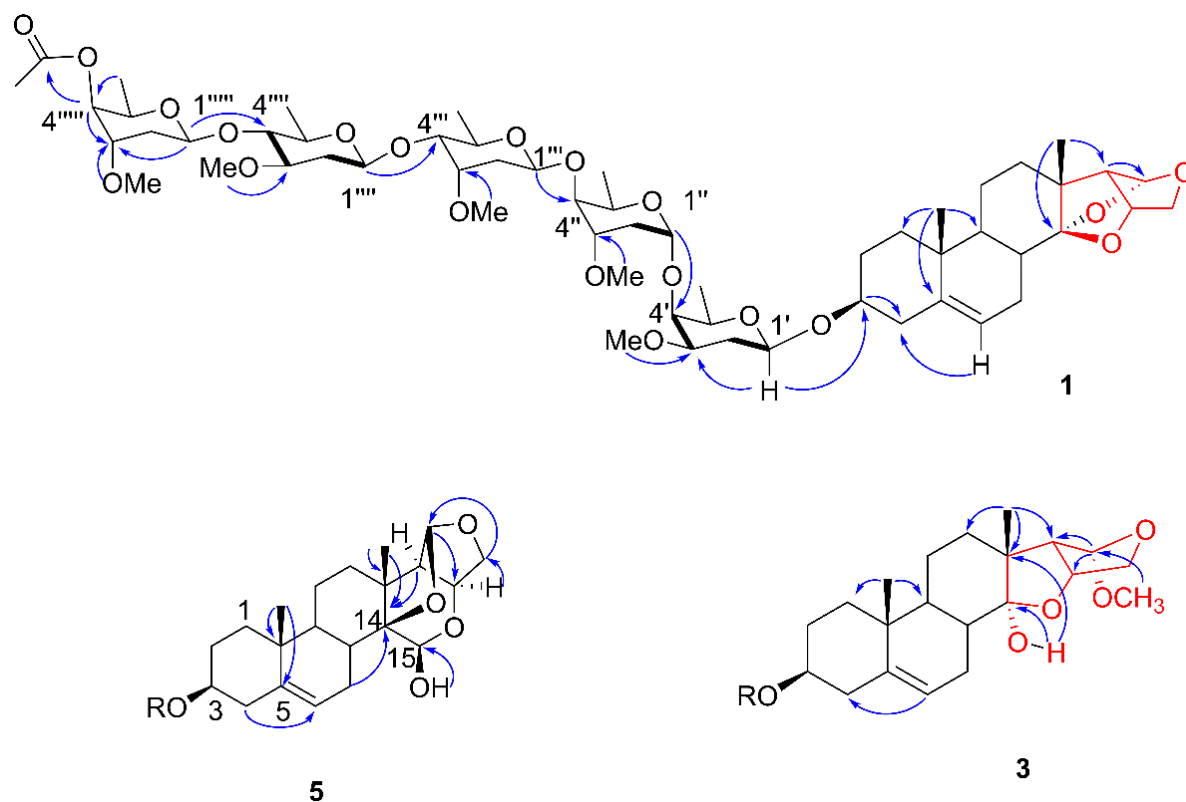
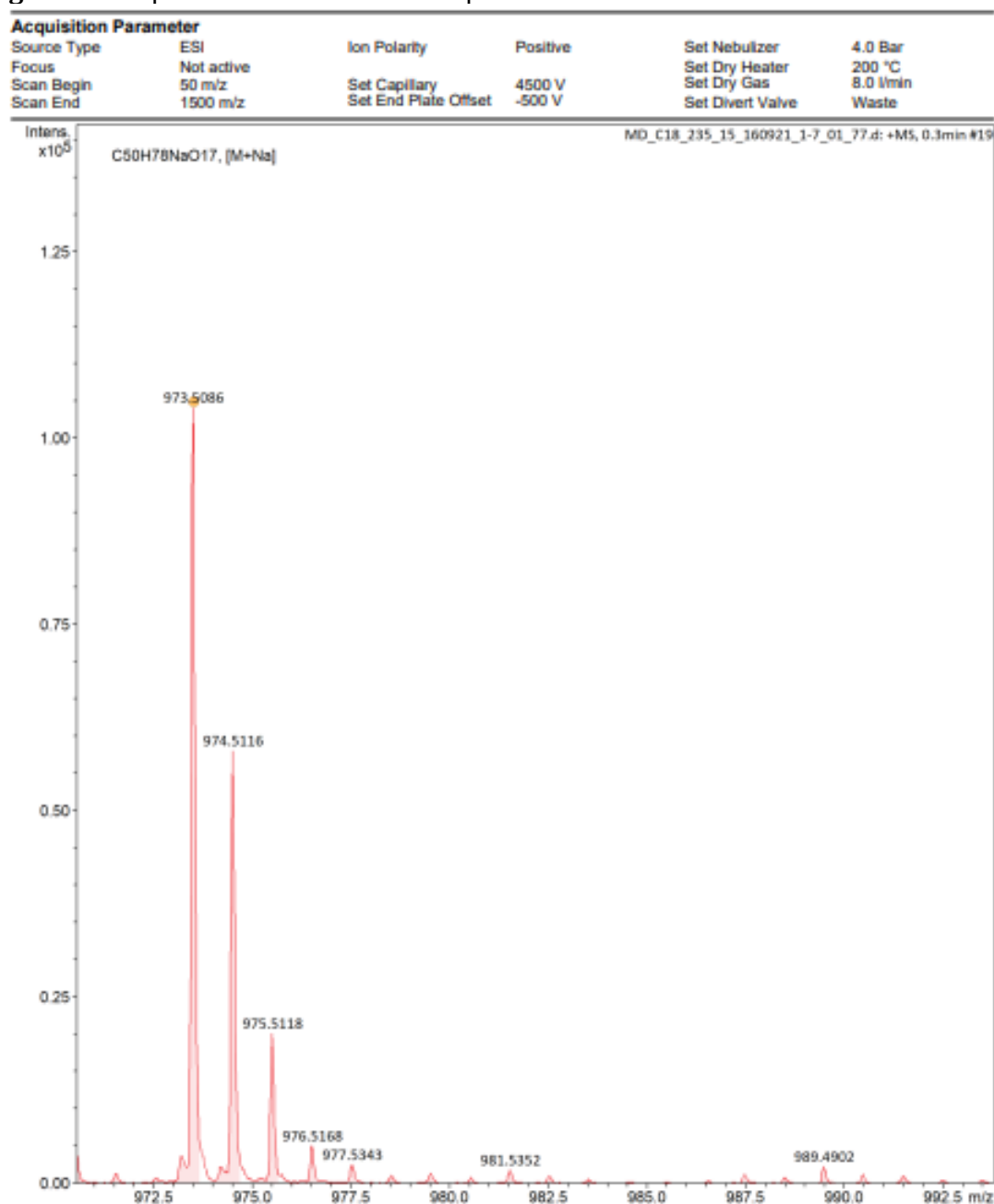


Figura 26. Correlações HMBC e TOCSY dos compostos **1**, **3** e **5**.



O composto **2** foi isolado como um sólido amorfo branco com uma rotação óptica positiva de $[\alpha]^{25}_D +18$ (c 0,1, piridina). A sua fórmula molecular foi determinada como sendo $C_{50}H_{78}O_{17}$ por HRESIMS, com m/z 973,5086 $[M + Na]^+$ (calcd para $C_{50}H_{78}NaO_{17}$, 973,5131, $\Delta = 4,7$ ppm) (figura 27), indicando 12 índices de deficiência de hidrogénio (IDH).

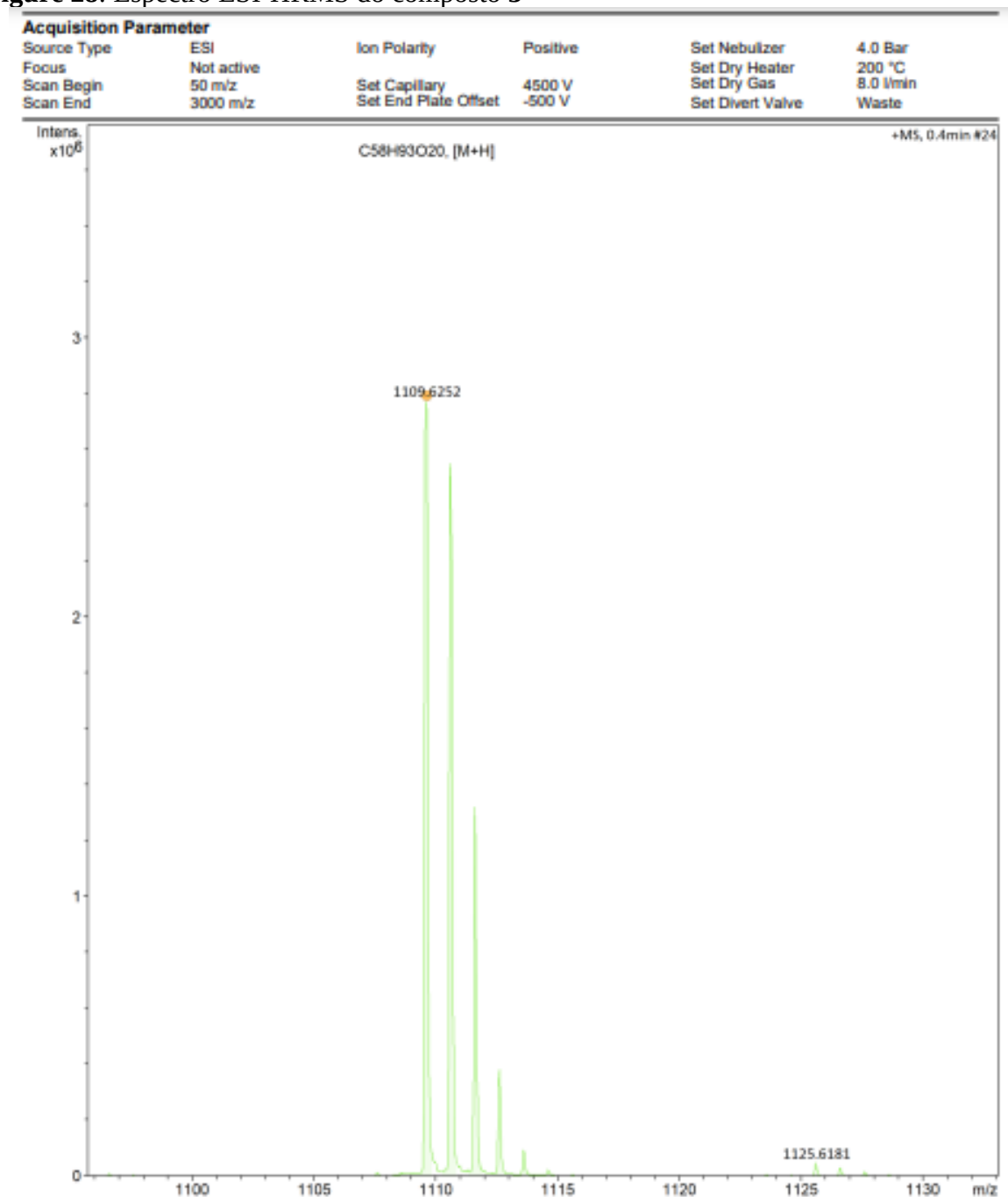
Figura 27: Espectro ESI-HRMS do composto **2**

Os dados de RMN de ^1H e ^{13}C (figuras S23-29) foram semelhantes aos do composto **1**, sendo atribuídos a uma aglicona do tipo ilustról (tabelas 2 e 3). Quando comparado com o composto **1**, foi observada uma diferença de 144 Da no espectro HRMS do composto **2**, atribuída à ausência de uma unidade osídica não terminal. Esta diferença também pode ser visualizada pela presença do conjunto de sinais no espectro de RMN de ^1H , onde são visualizados quatro sinais de hidrogênio anomérico a δH 4,71 (dd, $J = 9.7, 2.0$ Hz), 4,78 (dd, $J = 9.5, 2.0$), 5,15 (dd, $J = 9.6, 1.6$ Hz), e 5,40 (dd, $J = 4.4, 2.2$ Hz), bem como a presença de sinais de hidrogênios

metilados a δH 1,51 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, C-6'), 1,34 (3H, d, $J = 6,2$ Hz, C-6''), 1,39 (3H, d, $J =$ Hz, C-6''') e 1,28 (3H, d, $J = 6,2$ Hz, C-6'''), e dos hidrogênios dos grupos metoxi a δH 3.33 (s, OCH₃'), δH 3,39 (s, OCH₃''), δH 3,46 (s, OCH₃'') e δH 3,38 (s, OCH₃'''), indicaram a existência de quatro unidades osídicas no composto **2**. Os espectros bidimensionais do composto **2** podem ser visualizados nas figuras S30-S36.

Os dados de RMN de ¹H e ¹³C das unidades osídicas também se assemelham ao composto **1**, permitindo-nos estabelecer **2** como illustrol-3-O- β -L-diginopiranosil-(1-4)- α -L-sarmentopiranosil-(1-4)- β -D-cimaropiranosil-(1-4)- β -L-4-acetoxilsarmentopiranosil, um novo produto natural denominado dardanol B (figura 25).

O composto **3** foi isolado como um sólido amorfo branco com uma rotação ótica positiva de $[\alpha]^{25}_D +13$ (c 0,1, piridina). A sua fórmula molecular foi determinada como sendo C₅₈H₉₄O₂₁ por HRESIMS, com m/z 1109,6252 [M - H₂O + H]⁺ (calcd para C₅₈H₉₃O₂₀, 1109,6254, $\Delta = 1,0$ ppm), indicando 12 índices de deficiência de hidrogénio (IDH) (figura 28).

Figure 28: Espectro ESI-HRMS do composto 3

Os dados de RMN de ¹H e ¹³C (figuras S37-S43) assemelham-se aos da aglicona illustrol, no entanto, foram observadas algumas diferenças para os carbonos a δ C 38,9, 46 e 62,5, atribuídos a C-8, C-13 e C-17, respetivamente, sendo C-8 e C-17 desprotegidos e C-13 protegido quando comparados com os deslocamentos químicos destes carbonos no composto

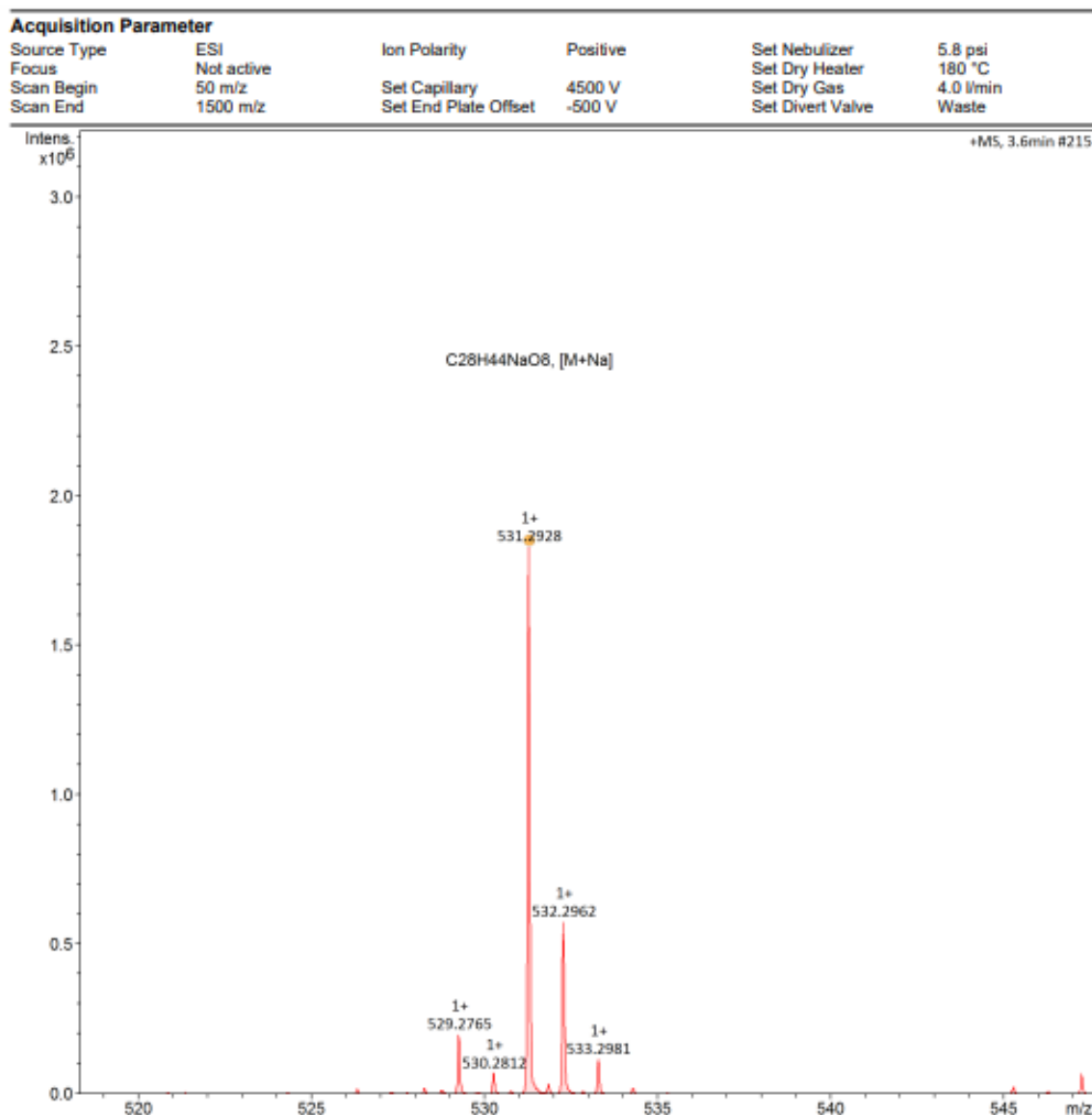
1. Estes dados foram associados a um índice de deficiência de hidrogénio mais baixo em comparação com o composto **1**, sugerindo a abertura do epóxido C-14-O-C-16.

O sinal em δH 6,88 (s), não correlacionado no espectro HSQC (figuras S44-S48), foi atribuído ao OH localizado em C-14. Este sinal mostrou correlações no espectro HMBC (figuras S49-S51) com os sinais em δC 46,0 e 110,1 que foram atribuídos a C-13 e C-14, respetivamente. Adicionalmente, no espectro HMBC, observamos correlações do sinal em δH 1,40 (3H-18) com os carbons em δC 110,1 (C-14) e no espectro HMBC em δC 46,0 (C-13) e com δC 62,5, que foi atribuído a C-17. O sinal em δH 5,17, cujo carbono correspondente no espectro HSQC era δC 105,8, foi atribuído a C-16. O sinal em δH 5,17 correlacionou-se com δC 46,0 (C-13) e com δC 62,5 (C-17). Foi também observada uma correlação deste sinal com δC 71,4, atribuído a C-21, bem como uma correlação com o sinal em δC 54,5 que foi atribuído à ligação metoxi na posição 16. A constante de acoplamento de H-17 (d, $J = 8,0$) e um singlete para H-16 demonstraram uma angulação de quase 90 graus entre estes hidrogénios e, assim, a aglicona foi definida como se mostra na Figura 25. Até onde procuramos, não foram encontrados registos para este tipo de aglicona. Os dados de RMN (tabelas 2 e 3), juntamente com dados da literatura, comparados com os dados do composto **1** e espectrometria de massa de alta resolução, confirmaram a presença de cinco unidades osídicas ligadas 1-4 idênticas ao composto **1** e inseridas em C-3 (Tabela 3).

Para descartar a possibilidade da aglicona ter se formado no processo de separação dos compostos, foi realizada uma infusão direta no ESIMS/MS com o extrato etanólico bruto. Foi identificada a presença do íon em m/z 1144,44 $[M + NH_4]^+$, correspondente ao composto **3**. Assim, o composto **3** foi identificado como seco-ilustrol-3-O- β -L-diginopiranosil-(1-4)- α -L-sarmentopiranosil-(1-4)- β -D-cimaropiranosil-(1-4)- β -D-oleandropiranosil-(1-4)- β -L-4-acetoxilsarmentopiranosil, um novo produto natural denominado dardanol C (figura 25).

As correlações encontradas nos espectros de HMBC e COSY do composto **3** podem ser visualizadas na figura 26.

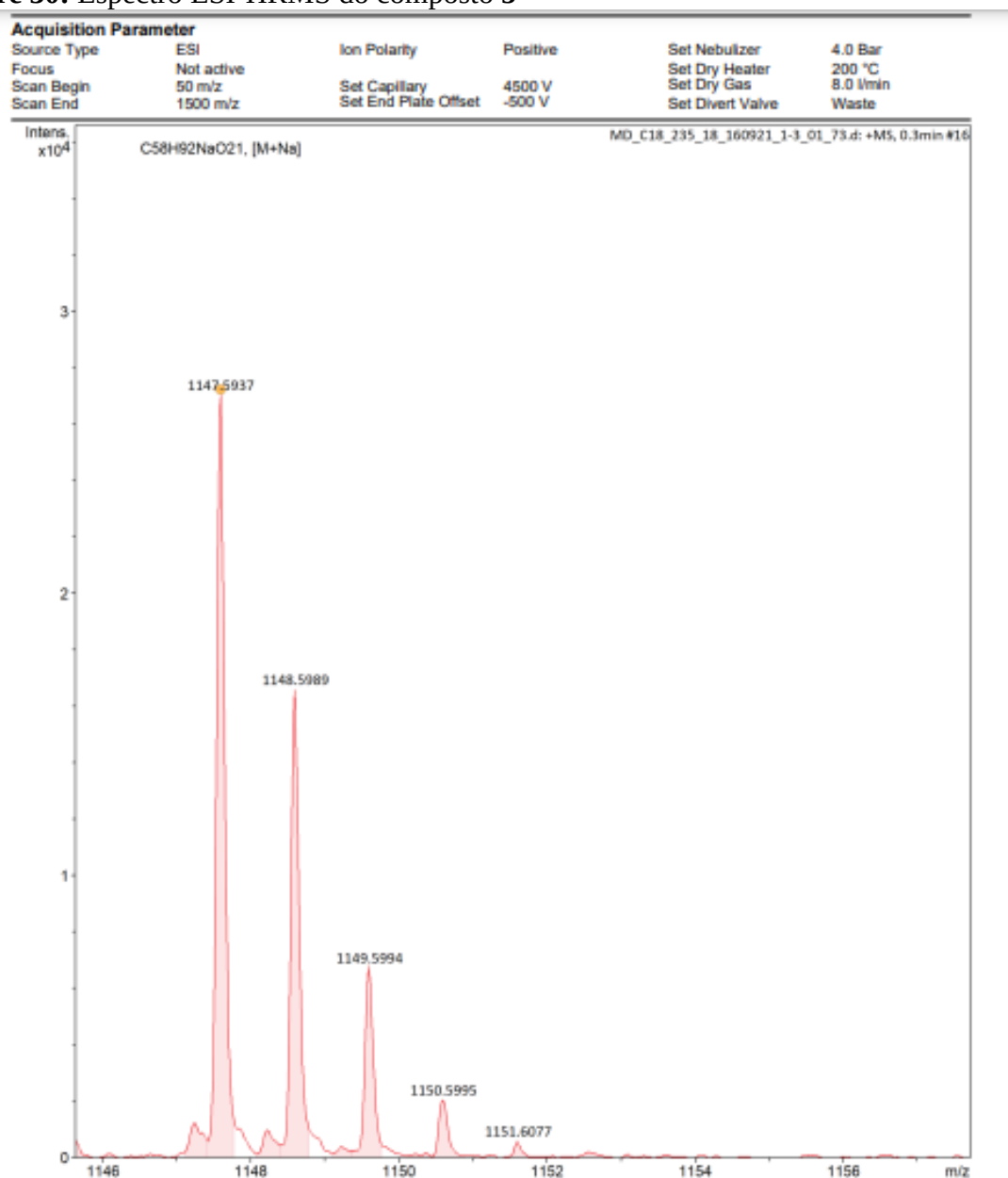
O composto **4** foi isolado como um sólido amorfo branco com uma rotação ótica positiva de $[\alpha]^{25}_D +17$ (c 0,1, piridina). A sua fórmula molecular foi determinada como sendo $C_{28}H_{44}O_8$ por HRESIMS, m/z 531,2923 $[M + Na]^+$ (calcd para $C_{28}H_{44}NaO_8$, 531,2928, $\Delta = 4,2$ ppm), indicando 7 índices de deficiência de hidrogénio (IDH) (figura 29).

Figura 29: Espectro ESI-HRMS do composto **4**

Os dados de RMN de ¹H e ¹³C (figuras S53-59) da aglicona deste composto são semelhantes aos do composto **3**, podendo concluir que é do mesmo tipo, com OH em C-14 e OCH₃ em C-16. No espectro de RMN de ¹³C, foi possível observar seis carbonos a δC 99,0, 33,2, 79,4, 67,4, 71,4 e 20,4, para além de um sinal para metoxila a δC 55,3, em comparação com a literatura, e as outras unidades osídicas dos compostos **1-3** foram marcadas como diginopiranosil. A constantes de acoplamento H-1' a 11,6 e 4,0 Hz foi compatível com a ligação β-glicosídica, e o valor C-2' a δC 33,5 permitiu que a configuração da unidade osídica fosse atribuída como L-diginopiranosil. A massa molecular deste composto também foi encontrada na análise do extrato bruto por ESIMS/MS, o que mais uma vez rejeitou a possibilidade de artefatos. Assim, o composto **4** foi identificado como seco-ilustrol-3-O-β-L-diginopiranosil, um novo produto natural denominado dardanol D (figura 25).

O composto 5 foi isolado como um sólido amorfo branco com uma rotação óptica positiva de $[\alpha]^{25}_D +19$ (c 0,1, piridina). A sua fórmula molecular foi determinada como sendo $C_{58}H_{92}O_{21}$ por HRESIMS, com m/z 1147.6037 $[M + Na]^+$ (calcd para $C_{57}H_{90}NaO_{20}$, 1147.6023, $\Delta = 4.8$ ppm) indicando 13 índices de deficiência de hidrogénio (IDH) (figura 30).

Figure 30: Espectro ESI-HRMS do composto 5



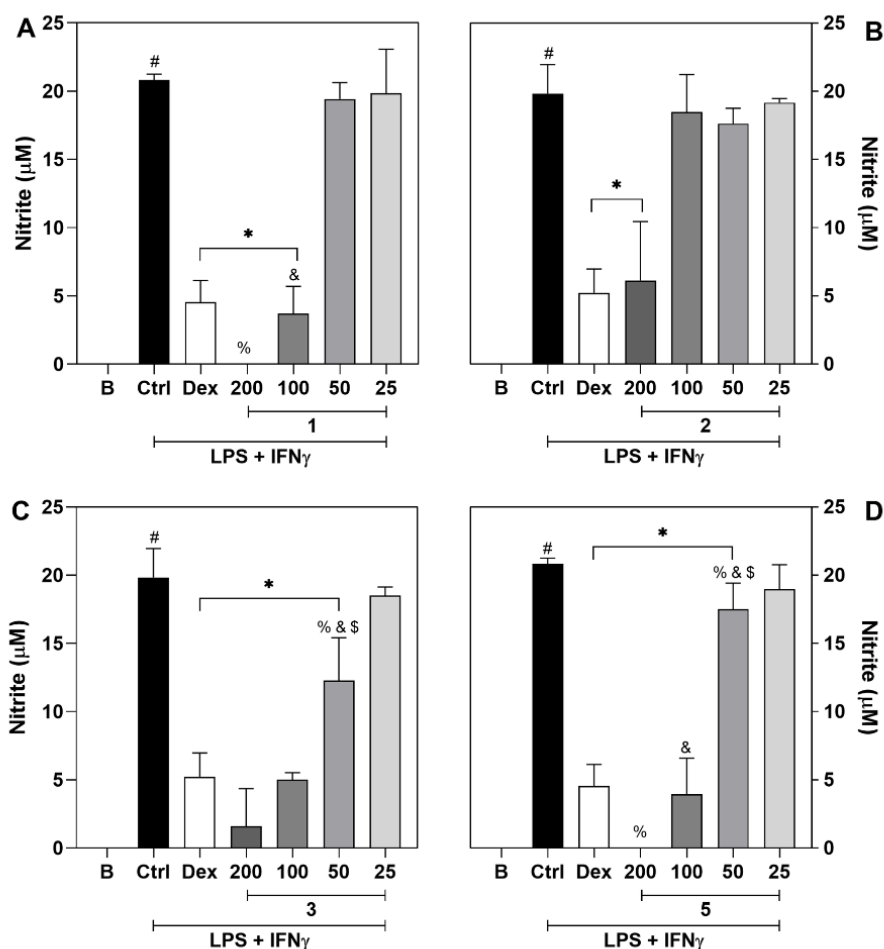
Os dados de RMN de 1H e ^{13}C (S67-S74) mostraram sinais característicos de glicosídeos pregnanos. Os sinais de hidrogénio em δ_H 5,00 (d, $J = 11,5$ Hz), 5,89 (d, $J = 4,4$ Hz) e 4,55 (dd, $J = 6,2$ e $3,3$ Hz), juntamente com os carbonos em δ_C 93,5, 109,7 e 74,7 estão de acordo com os valores descritos para o aglicona velutinol, relatado apenas em *M. velutina* (YUNES et al.,

1993). No espectro de ^1H do RMN, foi possível observar cinco sinais para hidrogênios anoméricos a δH 4,74 (dd, $J = 9,5$ e $2,0$ Hz), 5,50 (m), 5,08 (dd, $J = 9,6$ e $1,6$ Hz), 5,15 (dd, $J = 9,6$ e $1,7$ Hz) e 4,71 (dd, $J = 9,7$ e $2,0$ Hz). Estes dados, comparados com os do composto **1** (tabelas 2 e 3), permitiram-nos atribuir as mesmas unidades glicosídicas, com a mesma sequência de ligações entre elas e a mesma configuração. Assim, o composto **5** foi determinado como sendo velutionol-3-O- β -L-diginopiranosil-(1-4)- α -L-sarmentopiranosil-(1-4)- β -D-cimaropiranosil-(1-4)- β -D-oleandropiranosil-(1-4)- β -L-4-acetoxilsarmentopiranosil, denominado dardanol E (figura 25). As correlações encontradas nos espectros de HMBC e COSY do composto **5** podem ser visualizadas na figura 26.

5.2.2 Atividade Farmacológica

Para avaliar o potencial anti-inflamatório dos compostos, foram utilizados macrófagos J774 como modelo *in vitro*. Os macrófagos desempenham um papel fundamental nos processos de inflamação e de regulação imunitária, contribuindo para a homeostasia dos tecidos (WATANABE et al., 2019). São células imunitárias residentes ou infiltradas nos tecidos, ativadas por estimulação de um grande número de mediadores pró-inflamatórios, tais como quimiocinas, citocinas e óxido nítrico (NO) (WATANABE et al., 2019). Aqui, foi avaliada a produção de óxido nítrico por macrófagos estimulados com LPS e IFN- γ . Os macrófagos estimulados que receberam veículo como tratamento (grupo controle) apresentam um aumento dos níveis de NO em comparação com os macrófagos não estimulados (grupo basal, $p < 0,01$, Figura 31).

Figura 31. Efeito inibitório dos compostos **1**, **2**, **3** e **5** na produção de óxido nítrico por macrófagos J774 estimulados. Os gráficos A-D mostram os níveis de nitritos determinados pelo método de Griess. Diferentes concentrações de **1**, **2**, **3** e **5** (200 - 25 μ M) ou dexametasona (Dex; 20 μ M, medicamento de referência) foram adicionadas a culturas de macrófagos J774 na presença de LPS (500 ng/mL) + IFN- γ (5 ng/mL). As quantificações de nitritos foram medidas 24 horas após os tratamentos. O grupo de controle (Ctrl) representa células tratadas com veículo estimuladas com LPS + IFN- γ . O grupo basal (B) apresenta dados de células não tratadas e não estimuladas.



#Diferença do grupo não estimulado (B) ($p < 0,05$). *Diferença do grupo de controle (Ctrl) ($p < 0,01$). % Diferença do grupo Dex ($p < 0,05$). & Diferente do grupo 200 μ M ($p < 0,05$). \$ Diferença do grupo 100 μ M ($p < 0,05$).

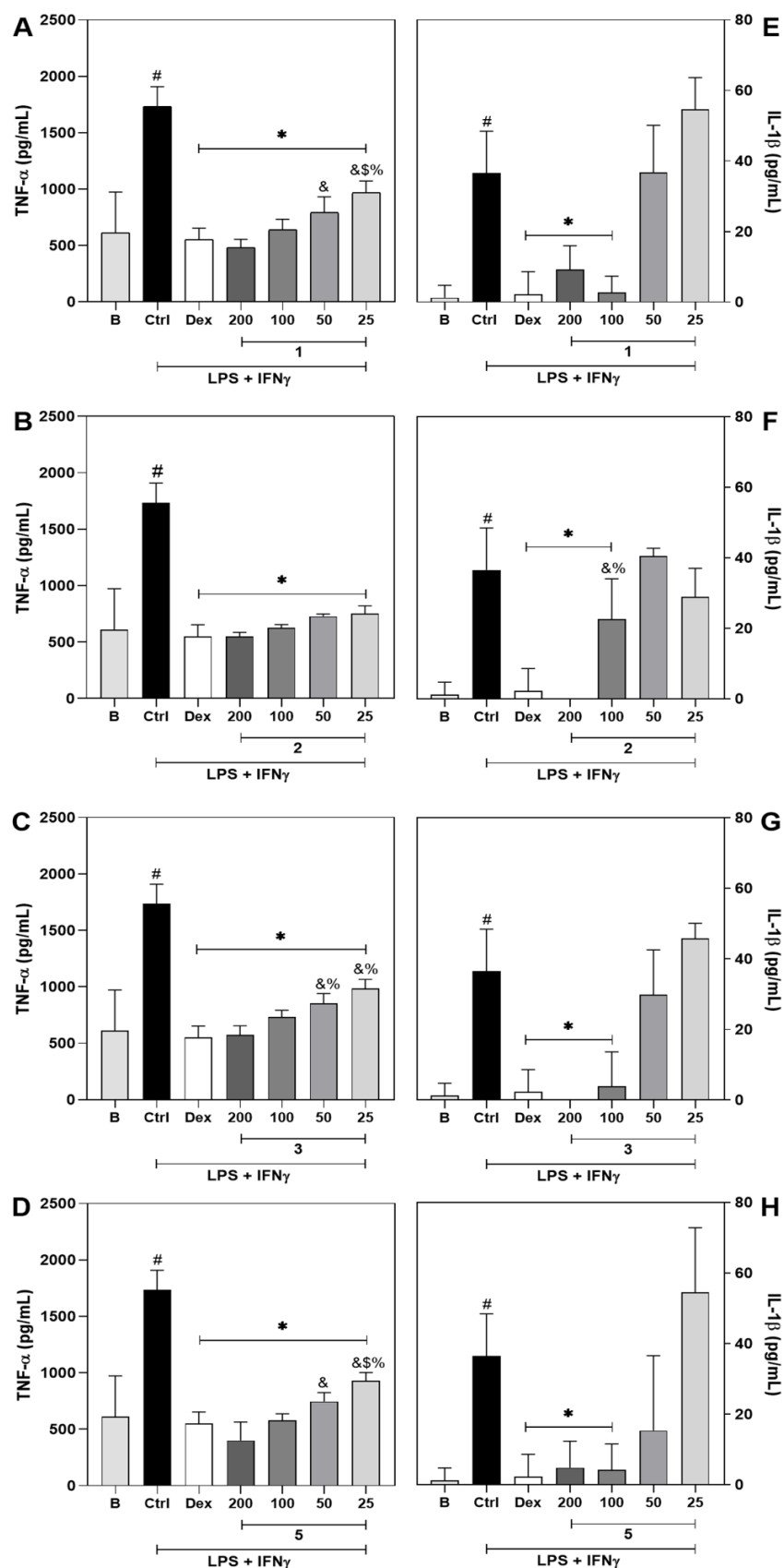
O tratamento com todos os compostos testados inibiu a produção de óxido nítrico a uma concentração de 200 μ M em comparação com células estimuladas tratadas com veículo (figura 31). Curiosamente, os compostos apresentaram diferentes perfis de inibição. O composto **2** reduziu a quantidade de NO no sobrenadante de células estimuladas apenas na concentração de 200 μ M (figura 31B; $p < 0,01$), enquanto o composto **1** exibiu um efeito dose-dependente a 200 e 100 μ M (figura 31A; $p < 0,01$). Além disso, os compostos **3** e **5** foram capazes de reduzir a produção de NO na faixa de 200 μ M a 50 μ M (figura 31C e 31D, respectivamente; $p < 0,01$), de

maneira dependente da dose. A dexametasona (20 μ M), droga padrão-ouro, também foi capaz de reduzir os níveis de NO quando comparada às células não tratadas, como esperado (Figura 31A-D; $p < 0,001$). Notavelmente, na concentração de 200 μ M, os compostos **5** e **1** mostraram uma eficácia maior em comparação com a dexametasona ($p < 0,05$), enquanto **2** e **3** exibiram uma eficácia semelhante à da dexametasona ($p < 0,05$).

É importante ressaltar que os dados do ensaio de citotoxicidade celular mostraram que, dentro da faixa de concentração testada (200 a 25 μ M), não houve redução da viabilidade celular (dados não mostrados nas figuras). Estes dados corroboram a interpretação dos resultados do ensaio de NO, uma vez que a diminuição da viabilidade celular poderia reduzir a produção de mediadores inflamatórios, podendo ser erradamente reconhecida como atividade anti-inflamatória. O NO tem um papel ubíquo na manutenção da homeostase, mas, perante estímulos inflamatórios, terá sobretudo um papel pró-inflamatório. Durante a resposta inflamatória, atuará como agente oxidante ou mediador de sinalização, ativando cascatas que levam à produção de mais mediadores inflamatórios (CINELLI et al., 2020). Por conseguinte, a capacidade de reduzir a produção deste mediador durante a inflamação é uma característica interessante para os compostos anti-inflamatórios.

Foi ainda avaliado o efeito modulador de **1**, **2**, **3** e **5** na produção de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos estimulados. As células não tratadas estimuladas com LPS e IFN- γ (grupo de controle) mostram um aumento dos níveis de TNF- α e IL-1 β em comparação com os macrófagos não estimulados (grupo basal, $p < 0,01$; figura 32A-H).

Figura 32. Os compostos **1**, **2**, **3** e **5** exibem um efeito modulador sobre a produção de TNF- α e IL-1 β em macrófagos J774 estimulados. São apresentados dados de quantificação por ELISA de TNF- α (gráficos A-D) e IL-1 β (gráficos E-H). Diferentes concentrações de **1**, **2**, **3** e **5** (200 - 25 μ M) ou dexametasona (Dex; 20 μ M, medicamento de referência) foram adicionadas a culturas de macrófagos J774 estimuladas com LPS + IFN- γ . O grupo de controlo (CTRL) representa células não tratadas estimuladas com LPS + IFN- γ . O grupo basal (B) apresenta dados de células não tratadas e não estimuladas. Os níveis de TNF- α e IL-1 β foram determinados 4h e 24 h após os tratamentos, respetivamente.



#Diferença do grupo não estimulado (B) ($p < 0,05$). *Diferença do grupo de controle (Ctrl) ($p < 0,01$). %Diferença do grupo Dex ($p < 0,05$). Diferença em relação ao grupo 200 μ M ($p < 0,05$). & Diferença em relação ao grupo 200 μ M ($p < 0,05$). \$ Diferença em relação ao grupo 100 μ M ($p < 0,05$).

O tratamento com todas as concentrações testadas (25 - 200 μ M) dos compostos testados resultou na inibição da produção de TNF- α (Figura 32A-D, $p < 0,01$). Dentro da gama testada, a maioria das moléculas mostrou um efeito dependente da dose, exceto o composto **2** que não mostrou qualquer diferença na magnitude do seu efeito entre as concentrações testadas. A dexametasona, o medicamento padrão, também inibiu a produção de TNF- α . É importante ressaltar que o efeito dos compostos **1, 2, 3 e 5** (Figura 32A; $p < 0,01$) foi comparável ao da dexametasona.

A produção de IL-1 β também foi modulada pelos compostos testados (Figura 32E-H). Os compostos **1, 3 e 5 e 1**, por outro lado, apresentam um perfil semelhante. Estes compostos diminuíram a quantidade de IL-1 β nas concentrações de 200 e 100 μ M (Figura 32E-H, $p < 0,01$) numa magnitude semelhante à da dexametasona, mas não apresentaram qualquer dependência da dose. Semelhante, mas não o mesmo, o composto **2** inibiu a produção de IL-1 β nas concentrações de 200 e 100 μ M (Figura 32F, $p < 0,01$), e mostrou um perfil dose-dependente com um efeito semelhante ao da dexametasona.

Juntamente com o NO, o TNF- α e a IL-1 β são mediadores importantes da resposta inflamatória. O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória produzida principalmente por monócitos/macrófagos e desempenha um papel fundamental na modulação das respostas imunitárias e na indução da inflamação. Após a ativação do seu receptor, inicia-se uma cascata de eventos que conduz à produção de mais mediadores pró-inflamatórios (HOLBROOK et al., 2019). Além disso, verificou-se que o TNF- α é um alvo para o tratamento de várias doenças inflamatórias, como a artrite reumatoide, as doenças inflamatórias intestinais, a espondilite anquilosante e a psoríase (MCINNES et al., 2019). Da mesma forma, a IL-1 β também é reconhecida como uma citocina importante para eventos inflamatórios. É principalmente uma citocina pró-inflamatória capaz de induzir a sua própria produção, num ciclo de feedback positivo que amplifica a sinalização inflamatória (DINARELLO et al., 2018). Além disso, a secreção aumentada de IL-1 β tem sido associada à patogênese de doenças auto-inflamatórias, síndromes metabólicas, inflamação aguda, inflamação crónica e malignidade (KANEKO et al., 2019).

Por conseguinte, a capacidade de **1, 2, 3 e 5** para reduzir a produção/libertação de IL-1 β e TNF- α reforça a potencial atividade anti-inflamatória anteriormente demonstrada pela redução da quantidade de NO libertada por macrófagos estimulados. Curiosamente, foi relatado que o velutinol A, um composto esteroide, que apresenta aglicona com uma estrutura semelhante à dos compostos testados, inibiu as respostas inflamatórias mediadas pelo receptor

B1 de cinina *in vivo* (MATTOS et al., 2006). O recetor B1 da cinina é um recetor induzível que tem sido implicado no processo de estimulação e libertação de IL-1 β e TNF- α dos macrófagos (TIFFANY et al., 1989).

Os dados apresentados aqui demonstram que os compostos **1, 2, 3 e 5** são capazes de inibir a produção/libertação de mediadores pró-inflamatórios, o que é um atributo importante dos compostos anti-inflamatórios. Além disso, os compostos testados apresentam uma eficácia semelhante ou até superior à da dexametasona, considerada o fármaco padrão-ouro nos testes. Portanto, estes resultados evidenciam o potencial anti-inflamatório destes compostos.

5.2.3 Conclusões

A primeira análise fitoquímica da fração solúvel em clorofórmio obtida a partir das raízes de *M. dardanoi* levou ao isolamento e atribuição de cinco novos pregnanos glicosídeos, designados dardanois A-E. Entre eles, os dardanois A, B, C e E apresentaram um potencial anti-inflamatório, inibindo a produção de óxido nítrico e reduzindo as citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α .

Contribuições dos autores

Identificação do material vegetal, J.I.M. de M.; métodos químicos, F.S.V.L., J.P.R. e S., L.C.O.P., L.S.A., T.A. de S., A.A.V.P., G.L.D.S. e Y.M. do N.; ensaios biológicos e interpretação de dados, L.C.F.O. e C.F.V.; análise de dados e elucidação estrutural, L.S.A., T.A. de S., R.B.-F., M.S. da S. e J.F.T.

Financiamento:

Esta pesquisa foi financiada por: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES) (Código Financeiro 001), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e FINEP por meio da Rede Norte-Nordeste de Fitoterápicos (INCT-RENNOFITO).

Conflitos de Interesse:

Os autores declaram não haver conflito de interesse.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Manuscrito: **Novos glicosídeos pregnanos de *Mandevilla dardanoi* e sua atividade anti-inflamatória**

- Figure S2** Espectro de RMN de ^1H (piridina- d_5 , 500 MHz) do composto 1
- Figure S3** Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, piridina- d_5) do composto 1
- Figure S4** Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, piridina- d_5) do composto 1
- Figure S5** Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, piridina- d_5) do composto 1
- Figure S6** Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, piridina- d_5) do composto 1
- Figure S7** Espectro de RMN APT (piridina- d_5 , 125 MHz) do composto 1
- Figure S8** Ampliação do espectro de RMN APT (piridina- d_5 , 125 MHz) do composto 1
- Figure S9** Ampliação do espectro de RMN APT (piridina- d_5 , 125 MHz) do composto 1
- Figure S10** Ampliação do espectro de RMN APT (piridina- d_5 , 125 MHz) do composto 1
- Figure S11** Espectro HSQC (500 e 125 MHz, piridina- d_5) do composto 1.
- Figure S12** Ampliação do espectro de HSQC (500 e 125 MHz, piridina- d_5) do composto 1
- Figure S13** Ampliação do espectro de HSQC (500 e 125 MHz, piridina- d_5) do composto 1
- Figure S14** Ampliação do espectro de HSQC (500 e 125 MHz, piridina- d_5) do composto 1
- Figure S15** Ampliação do espectro de HSQC (500 e 125 MHz, piridina- d_5) do composto 1
- Figure S16** Espectro HMBC (500 e 125 MHz, piridina- d_5) do composto 1
- Figure S17** Ampliação do espectro HMBC (500 e 125 MHz, piridina- d_5) do composto 1
- Figure S18** Ampliação do espectro HMBC (500 e 125 MHz, piridina- d_5) do composto 1
- Figure S19** Ampliação do espectro HMBC (500 e 125 MHz, piridina- d_5) do composto 1
- Figure S20** Espectro COSY (piridina- d_5 , 500 MHz) do composto 1
- Figure S21** Espectro NOESY (piridina- d_5 , 500 MHz) do composto 1
- Figure S22** Espectro TOCSY (piridina- d_5 , 500 MHz) do composto 1
- Figure S23** Espectro de RMN de ^1H (piridina- d_5 , 500 MHz) do composto 2
- Figure S24** Ampliação do espectro de RMN de ^1H (piridina- d_5 , 500 MHz) do composto 2
- Figure S25** Ampliação do espectro de RMN de ^1H (piridina- d_5 , 500 MHz) do composto 2
- Figure S26** Ampliação do espectro de RMN de ^1H (piridina- d_5 , 500 MHz) do composto 2
- Figure S27** Espectro de RMN de Dept 135 (piridina- d_5 , 500 MHz) do composto 2
- Figure S28** Ampliação do espectro de RMN de Dept 135 (piridina- d_5 , 500 MHz) do composto 2
- Figure S29** Ampliação do espectro de RMN de Dept 135 (piridina- d_5 , 500 MHz) do composto 2
- Figure S30** Espectro HSQC (500 e 125 MHz, piridina- d_5) do composto 2.
- Figure S31** Ampliação do espectro de HSQC (500 e 125 MHz, piridina- d_5) do composto 2
- Figure S32** Ampliação do espectro de HSQC (500 e 125 MHz, piridina- d_5) do composto 2
- Figure S33** Espectro HMBC (500 e 125 MHz, piridina- d_5) do composto 2
- Figure S34** Ampliação do espectro HMBC (500 e 125 MHz, piridina- d_5) do composto 2
- Figure S35** Ampliação do espectro HMBC (500 e 125 MHz, piridina- d_5) do composto 2
- Figure S36** Espectro COSY (500 e 125 MHz, piridina- d_5) do composto 2
- Figure S37** Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, piridina- d_5) do composto 3
- Figure S38** Ampliação do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, piridina- d_5) do composto 3
- Figure S39** Ampliação do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, piridina- d_5) do composto 3
- Figure S40** Espectro de RMN APT (400 MHz, piridina- d_5) do composto 3
- Figure S41** Ampliação do espectro de RMN APT (400 MHz, piridina- d_5) do composto 3
- Figure S42** Ampliação do espectro de RMN APT (400 MHz, piridina- d_5) do composto 3
- Figure S43** Ampliação do espectro de RMN APT (400 MHz, piridina- d_5) do composto 3

- Figure S44** Espectro de HSQC (400 e 100 MHz, piridina-d₅) do composto 3
- Figure S45** Ampliação do espectro de HSQC (400 e 100 MHz, piridina-d₅) do composto 3
- Figure S46** Ampliação do espectro de HSQC (400 e 100 MHz, piridina-d₅) do composto 3
- Figure S47** Ampliação do espectro de HSQC (400 e 100 MHz, piridina-d₅) do composto 3
- Figure S48** Ampliação do espectro de HSQC (400 e 100 MHz, piridina-d₅) do composto 3
- Figure S49** Espectro HMBC (400 e 100 MHz, piridina-d₅) do composto 3
- Figure S50** Ampliação do espectro HMBC (400 e 100 MHz, piridina-d₅) do composto 3
- Figure S51** Ampliação do espectro HMBC (400 e 100 MHz, piridina-d₅) do composto 3
- Figure S52** Espectro COSY (400 MHz, piridina-d₅) do composto 3
- Figure S53** Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, piridina-d₅) do composto 4
- Figure S54** Ampliação do espectro de RMN de ¹H (400 MHz, piridina-d₅) do composto 4
- Figure S55** Ampliação do espectro de RMN de ¹H (400 MHz, piridina-d₅) do composto 4
- Figure S56** Ampliação do espectro de RMN de ¹H (400 MHz, piridina-d₅) do composto 4
- Figure S57** RMN ¹³C de Broadband (100 MHz, piridina-d₅) do composto 4
- Figure S58** Espectro DEPT 135 (100 MHz, piridina-d₅) do composto 4
- Figure S59** Expansão do espectro DEPT 135 (100 MHz, piridina-d₅) do composto 4
- Figure S60** Espectro de HSQC (400 e 100 MHz, piridina-d₅) do composto 4
- Figure S61** Expansão do espectro HSQC (400 e 100 MHz, piridina-d₅) do composto 4
- Figure S62** Expansão do espectro HSQC (400 e 100 MHz, piridina-d₅) do composto 4
- Figure S63** Espectro HMBC (400 e 100 MHz, piridina-d₅) do composto 4
- Figure S64** Expansão do espectro HMBC (400 e 100 MHz, piridina-d₅) do composto 4
- Figure S65** Expansão do espectro HMBC (400 e 100 MHz, piridina-d₅) do composto 4
- Figure S66** Espectro COSY (400 MHz, piridina-d₅) do composto 4
- Figure S67** Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, piridina-d₅) do composto 5
- Figure S68** Ampliação do espectro de RMN de ¹H (400 MHz, piridina-d₅) do composto 5
- Figure S69** Ampliação do espectro de RMN de ¹H (400 MHz, piridina-d₅) do composto 5
- Figure S70** Espectro de RMN de ¹³C (100 MHz, piridina-d₅) do composto 5
- Figure S71** Ampliação do espectro de RMN de ¹³C (100 MHz, piridina-d₅) do composto 5
- Figure S72** Ampliação do espectro de RMN de ¹³C (100 MHz, piridina-d₅) do composto 5
- Figure S73** Espectro DEPT (100 MHz, piridina-d₅) do composto 5
- Figure S74** Ampliação do espectro DEPT (100 MHz, piridina-d₅) do composto 5
- Figure S75** Espectro de HSQC (400 e 100 MHz, piridina-d₅) do composto 5
- Figure S76** Espectro de HSQC (400 e 100 MHz, piridina-d₅) do composto 5
- Figure S77** Espectro HSQC (400 e 100 MHz, piridina-d₅) do composto 5
- Figure S78** Espectro HMBC (400 e 100 MHz, piridina-d₅) do composto 5 em piridina-d₅, 400 MHz
- Figure S79** Espectro HMBC (400 e 100 MHz, piridina-d₅) do composto 5
- Figure S80** Espectro HMBC (400 e 100 MHz, piridina-d₅) do composto 5
- Figure S81** Espectro COSY (400 MHz, piridina-d₅) do composto 5

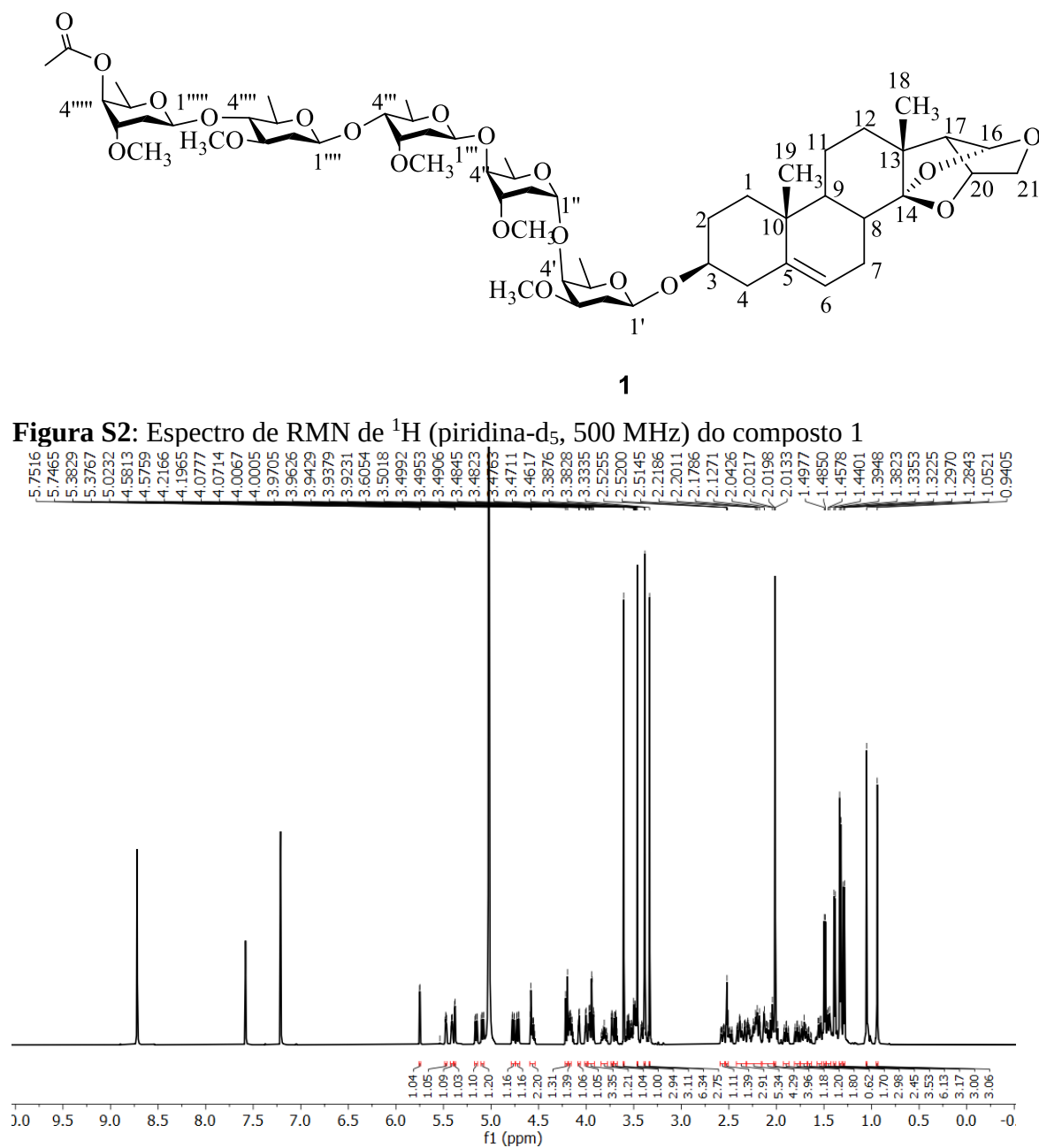


Figura S3: Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, piridina- d_5) do composto 1.

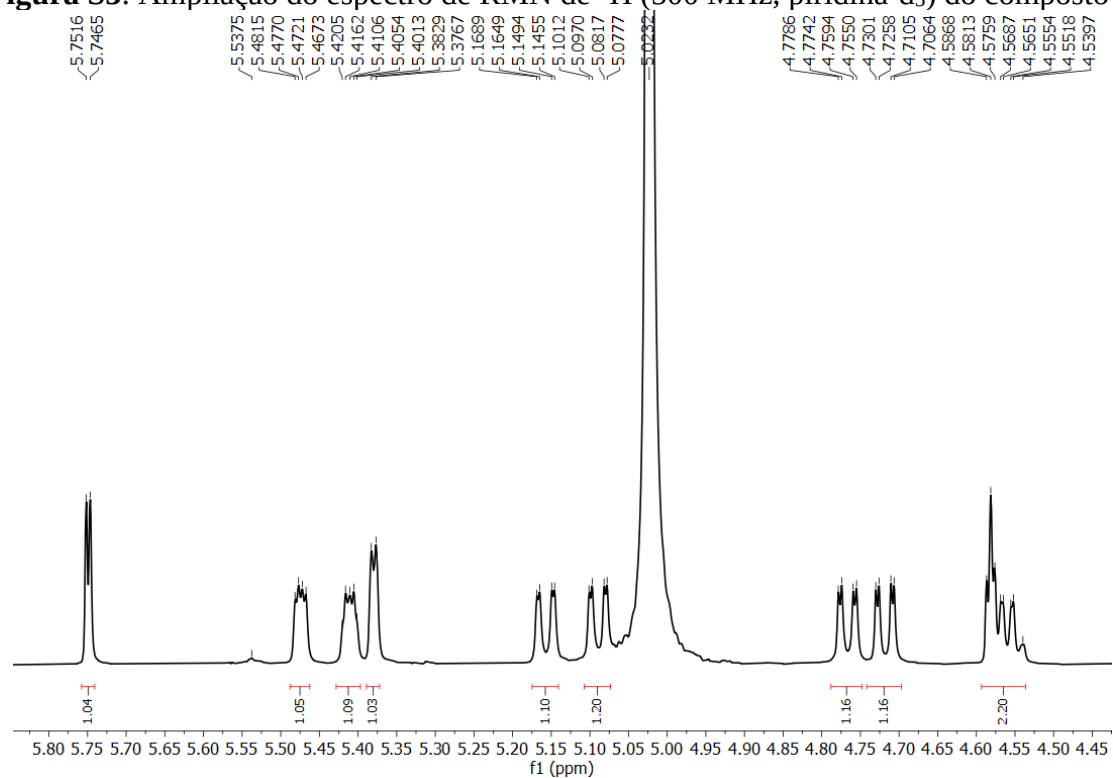


Figura S4: Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, piridina- d_5) do composto 1.

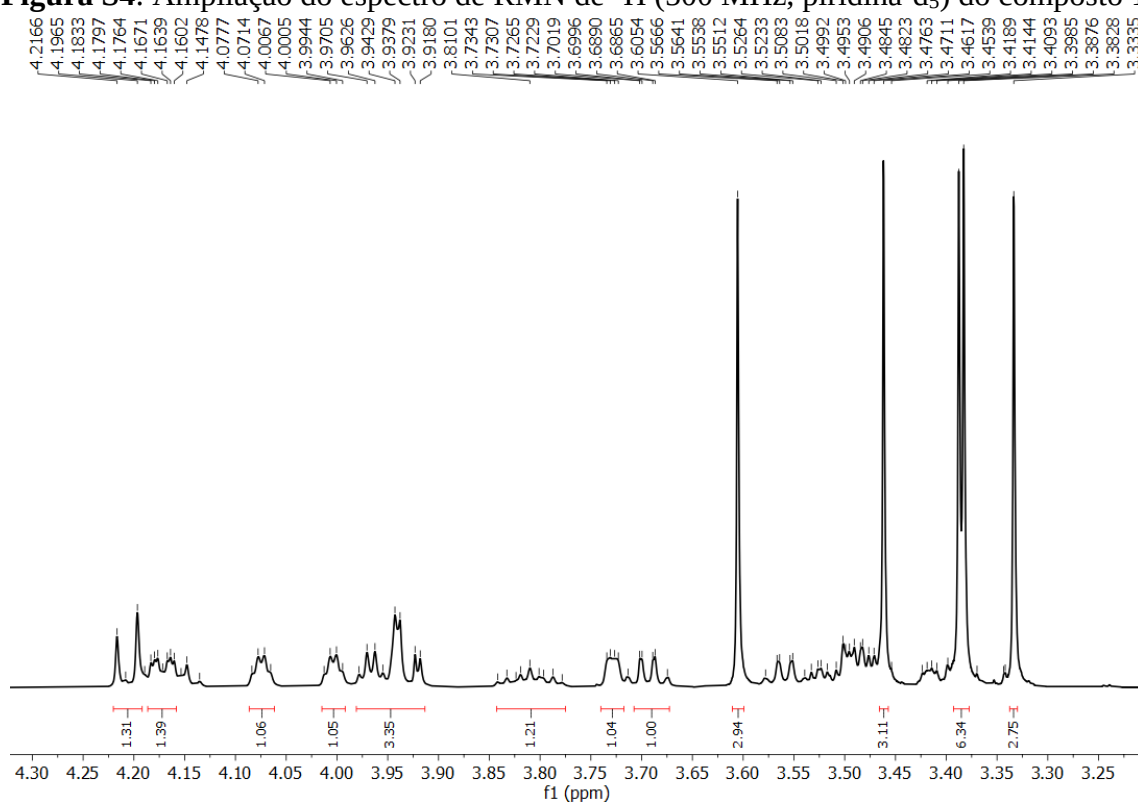


Figura S5: Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, piridina- d_5) do composto 1.

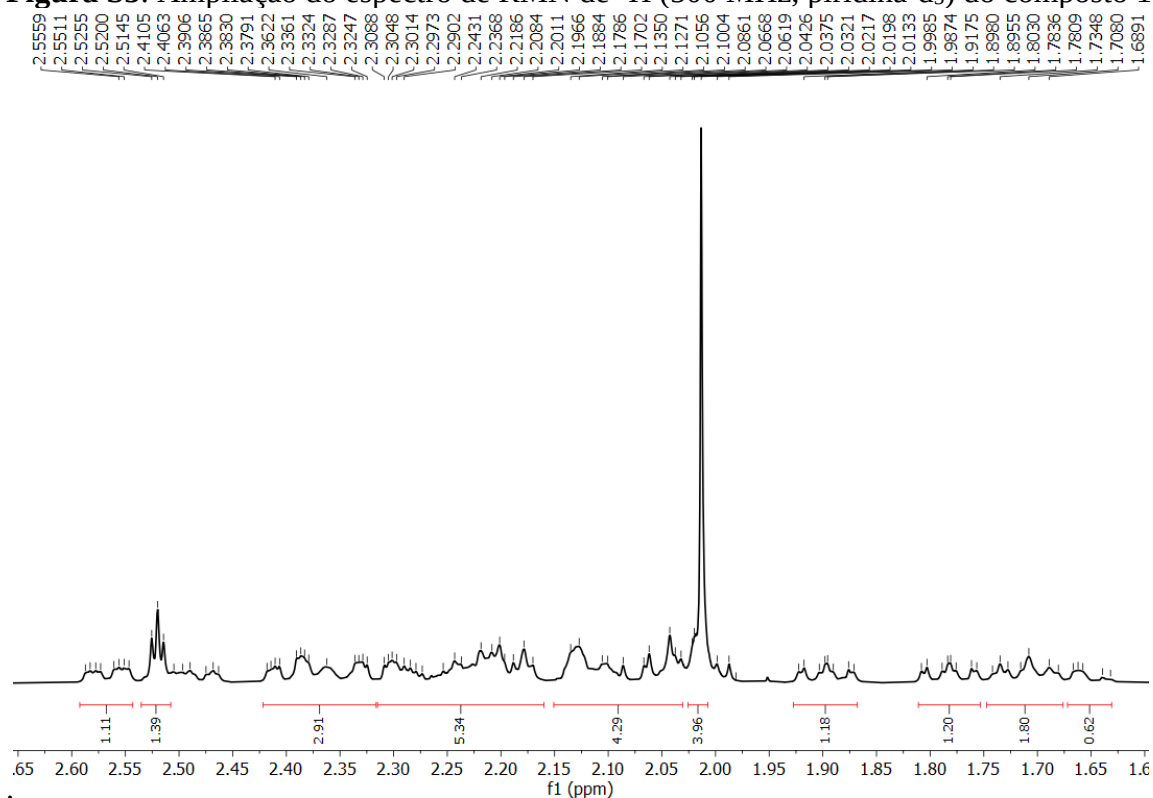
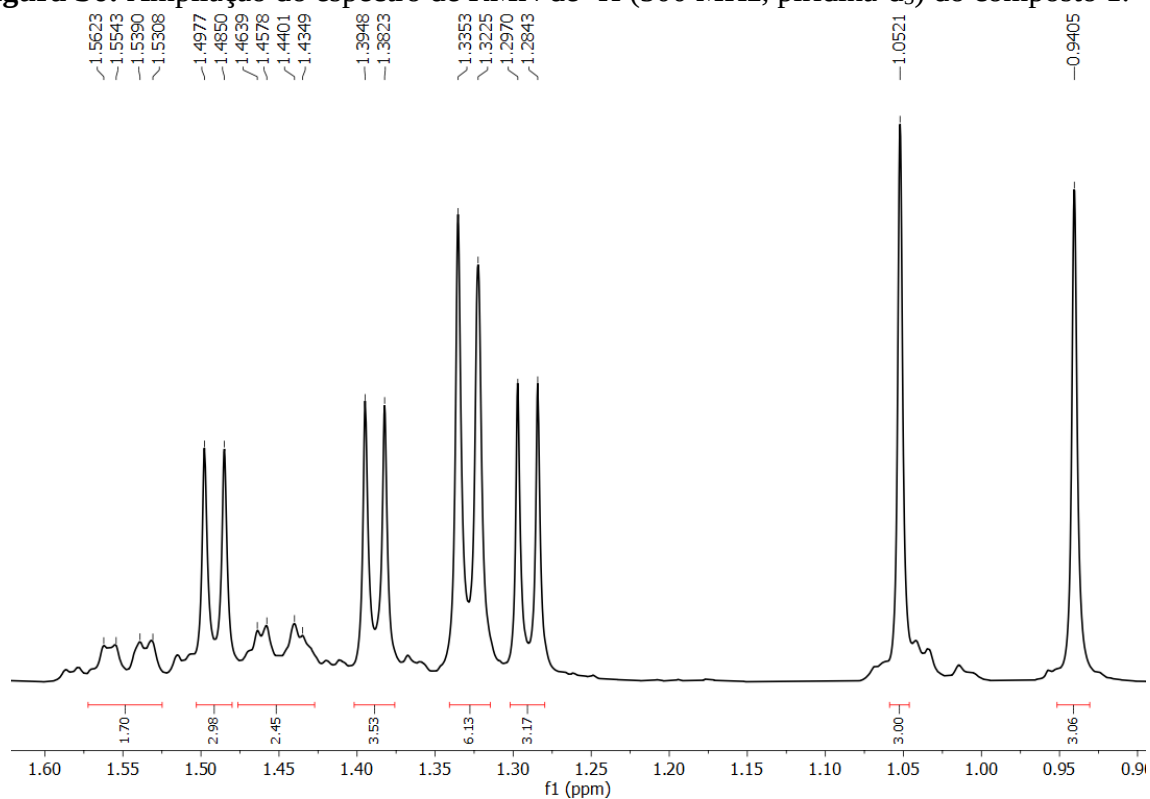


Figura S6: Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, piridina- d_5) do composto 1.



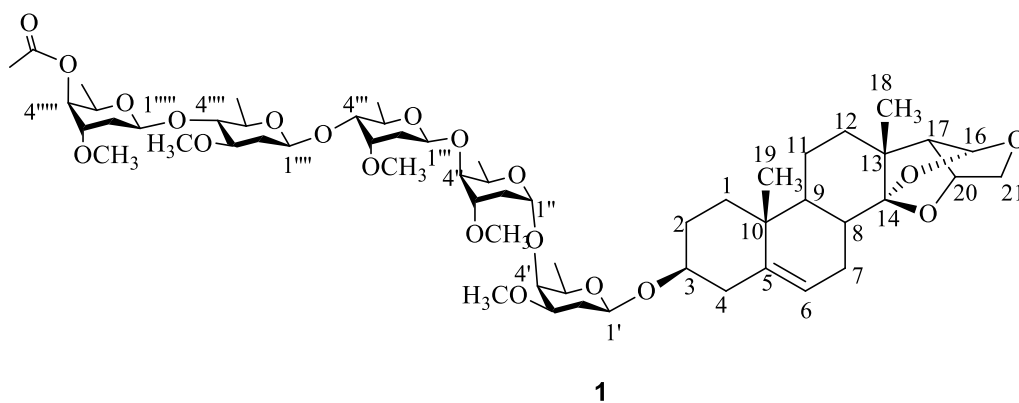


Figura S7: Espectro de RMN APT (piridina-d₅, 125 MHz) do composto 1.

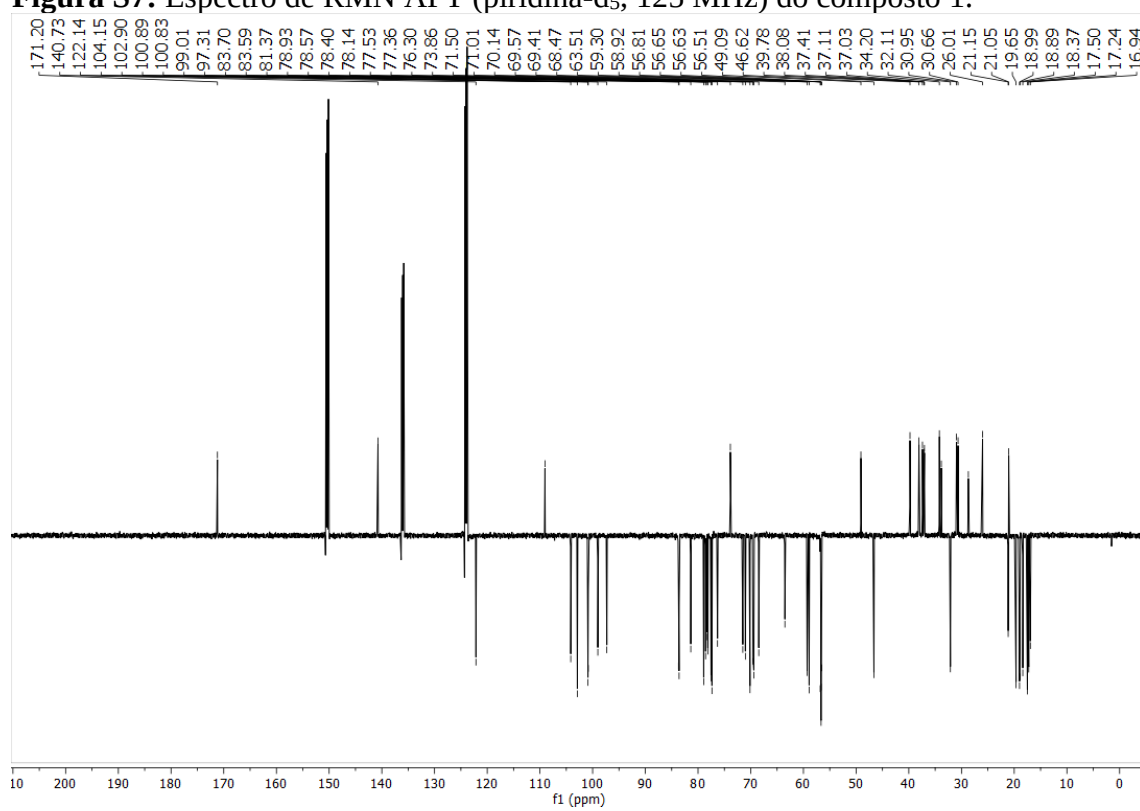


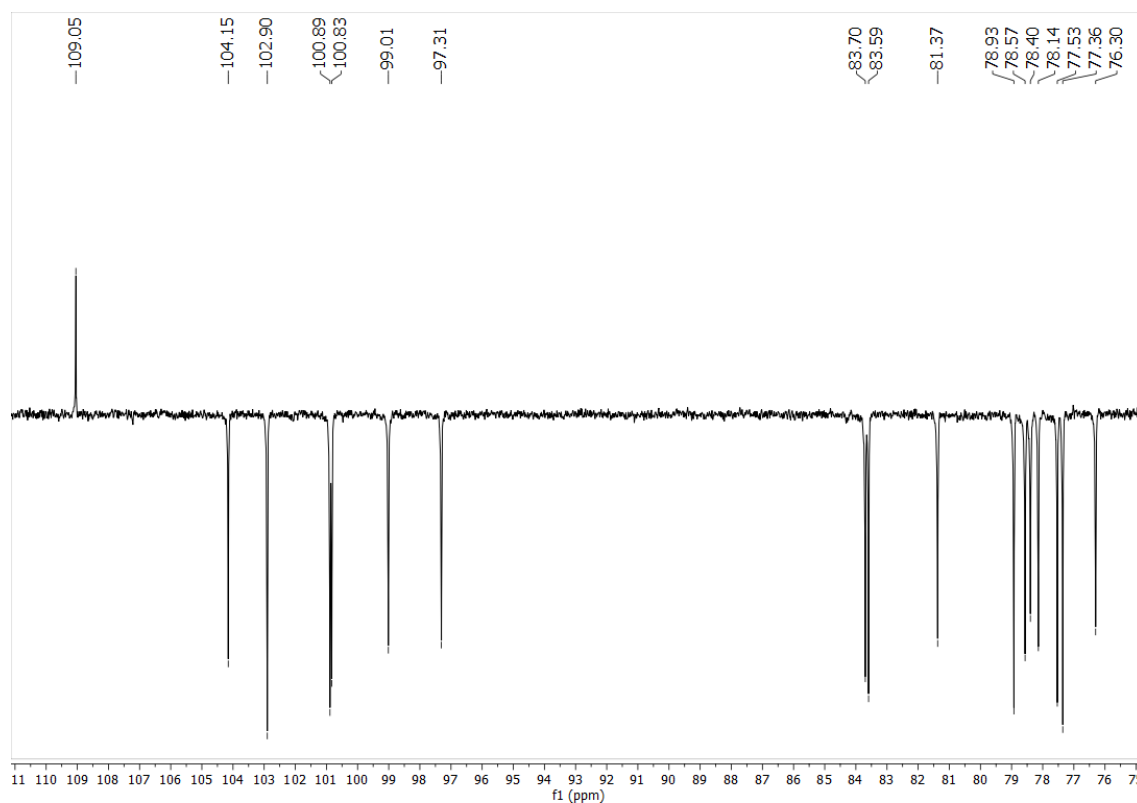
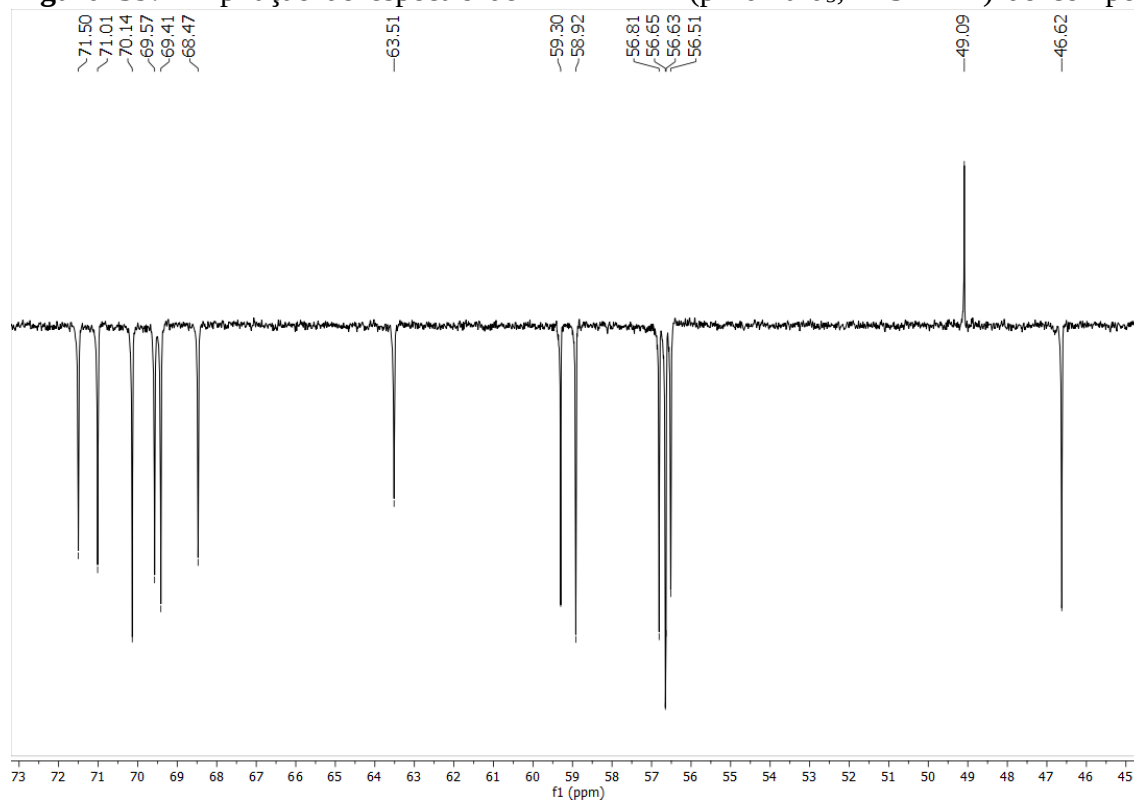
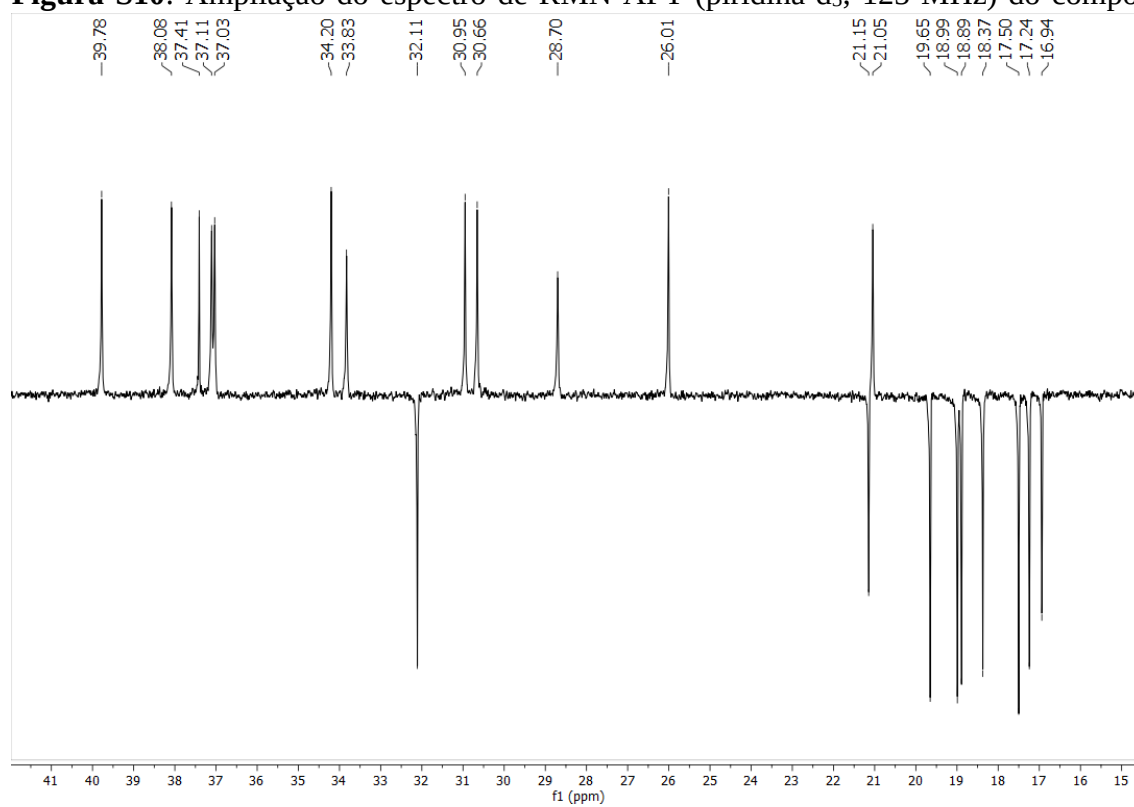
Figura S8: Ampliação do espectro de RMN APT (piridina-d₅, 125 MHz) do composto 1.**Figura S9:** Ampliação do espectro de RMN APT (piridina-d₅, 125 MHz) do composto 1.

Figura S10: Ampliação do espectro de RMN APT (piridina-d₅, 125 MHz) do composto 1.



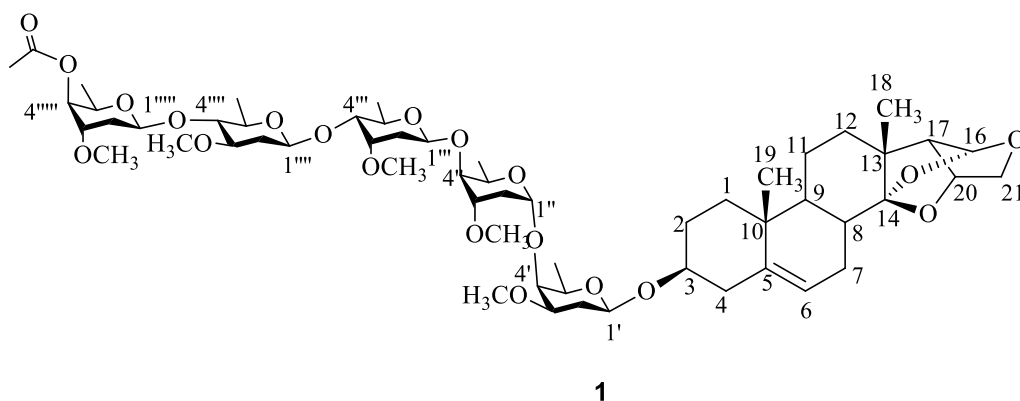


Figura S11: Espectro HSQC (500 e 125 MHz, piridina-d₅) do composto 1.

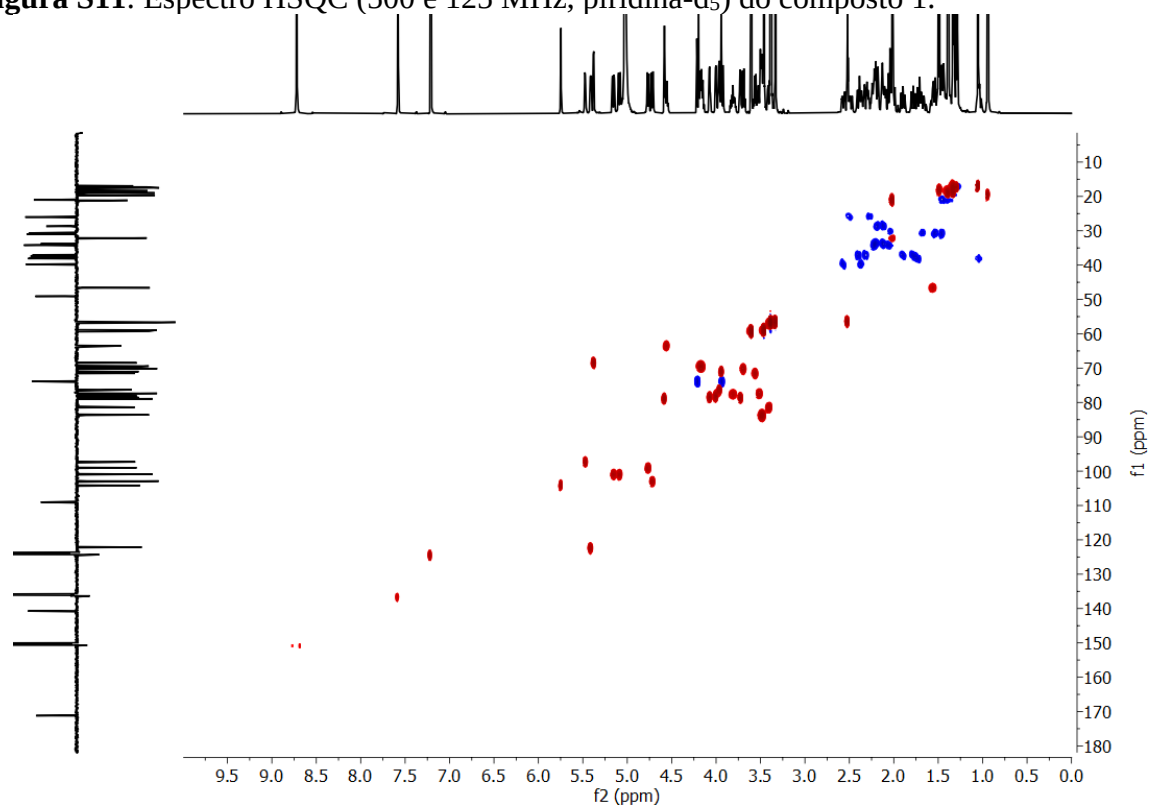


Figura S12: Ampliação do espectro de HSQC (500 e 125 MHz, piridina-d₅) do composto **1**.

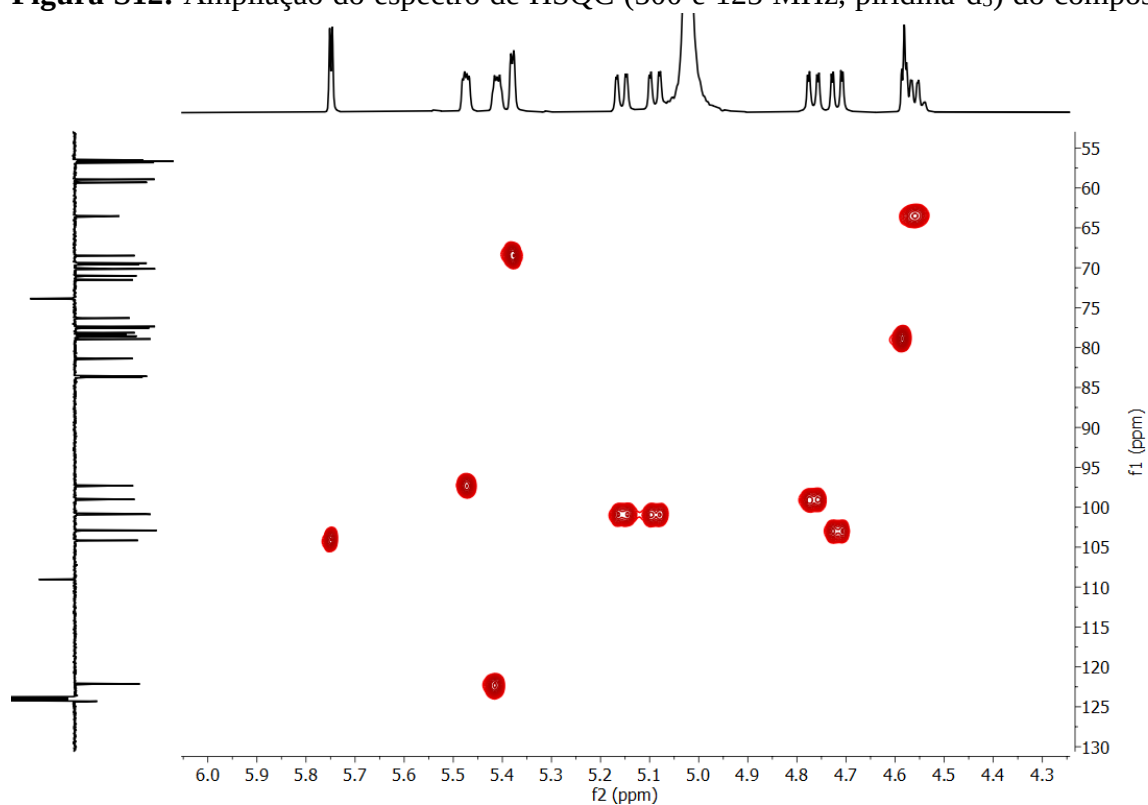


Figura S13: Ampliação do espectro de HSQC (500 e 125 MHz, piridina-d₅) do composto **1**.

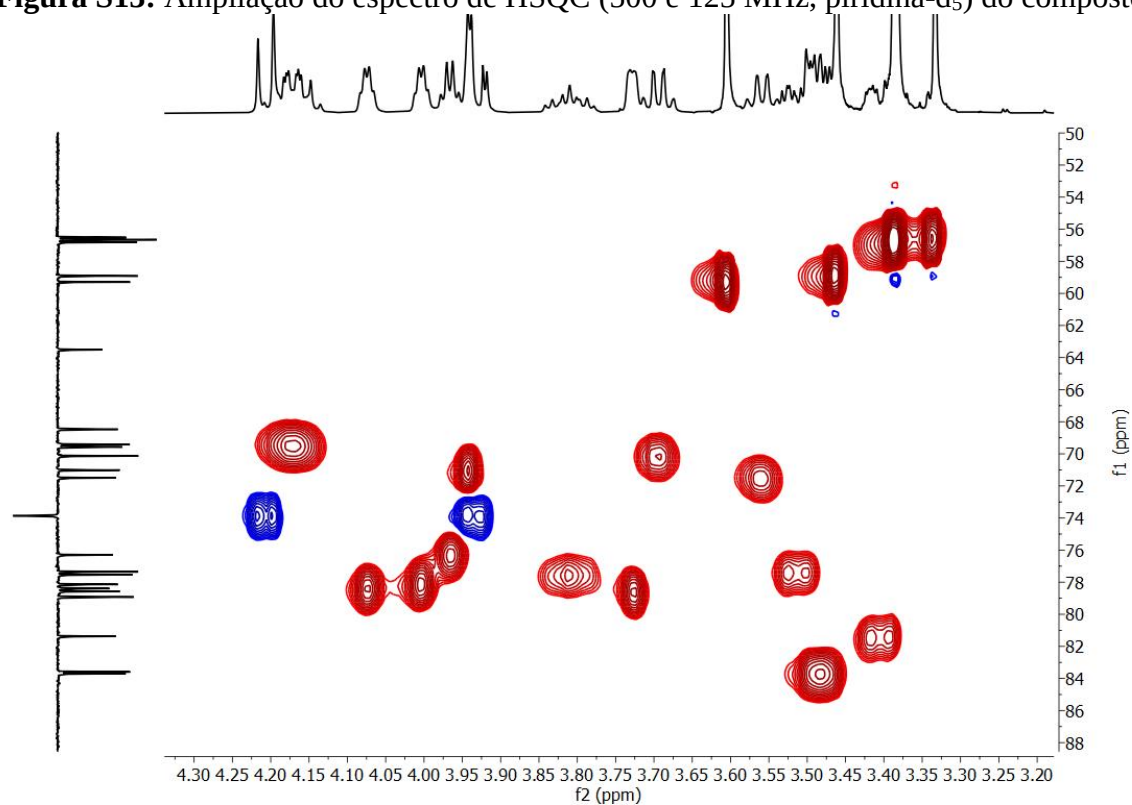


Figure S14 Ampliação do espectro de HSQC (500 e 125 MHz, piridina-d₅) do composto 1.

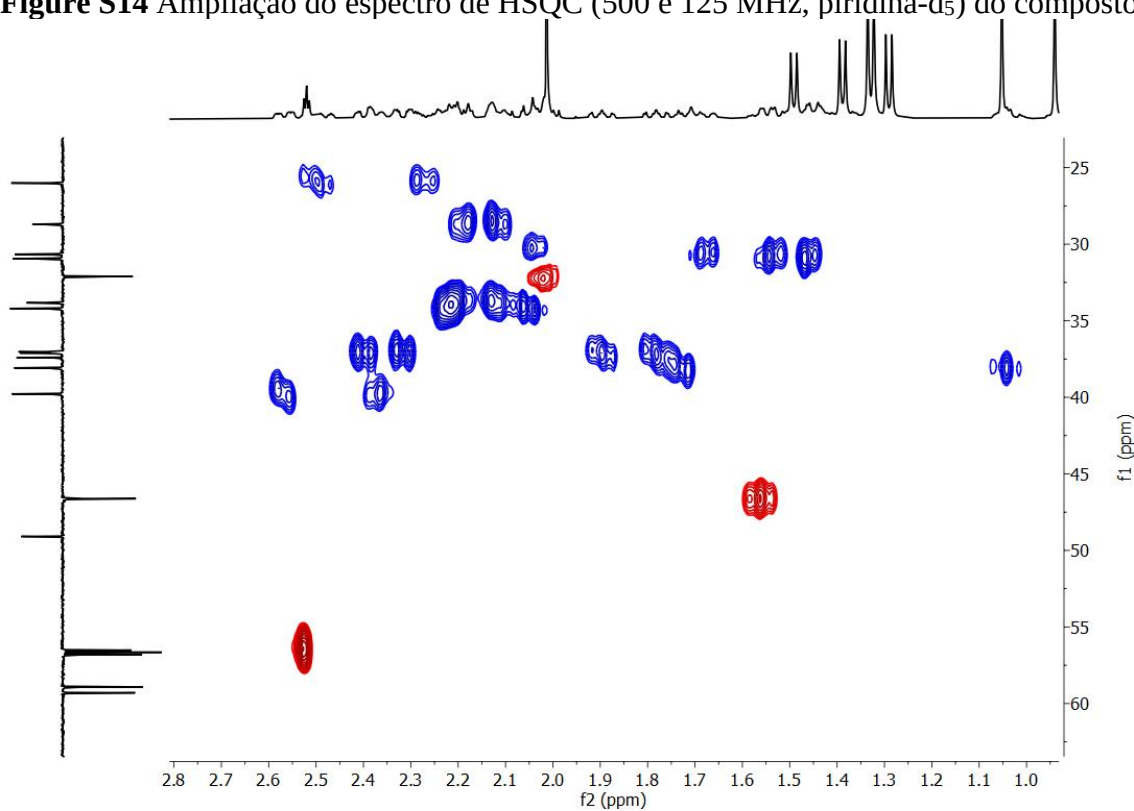
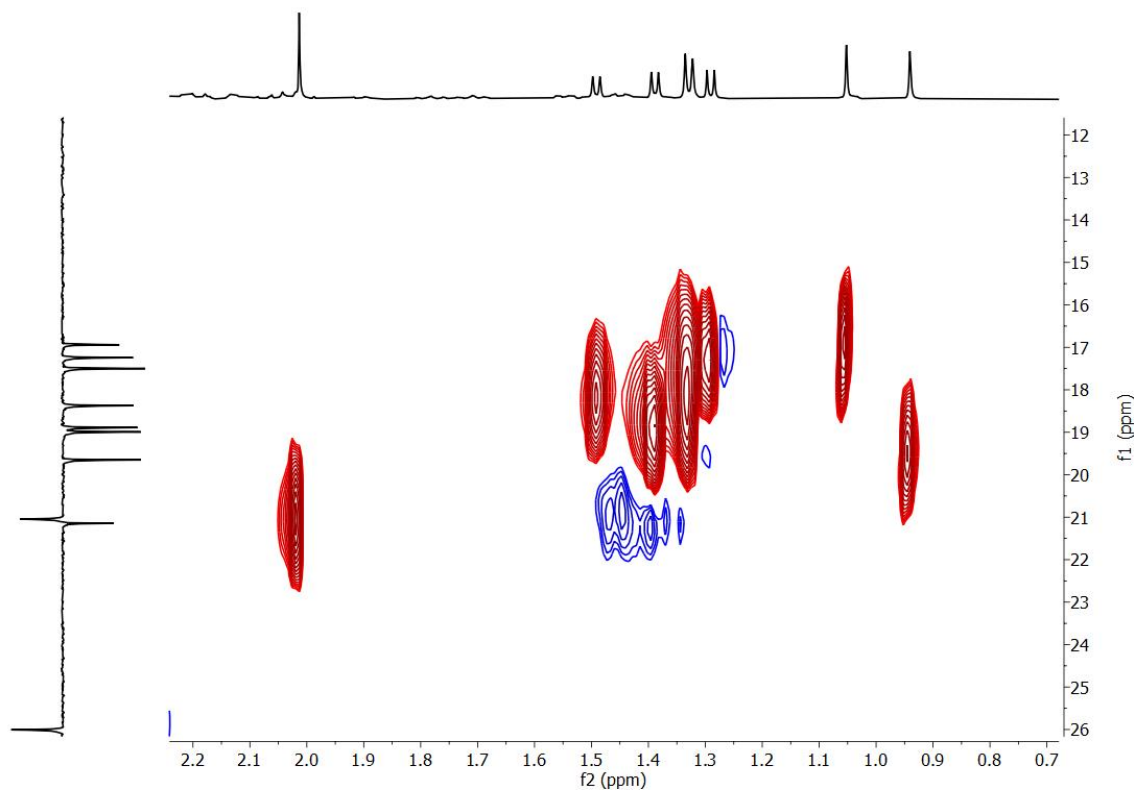


Figure S15: Ampliação do espectro de HSQC (500 e 125 MHz, piridina-d₅) do composto 1.



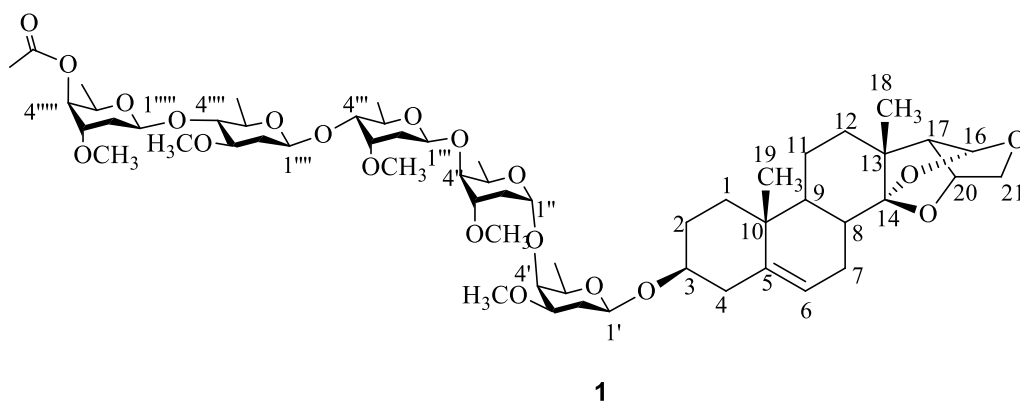


Figura S16: Espetro HMBC (500 e 125 MHz, piridina-d₅) do composto 1.

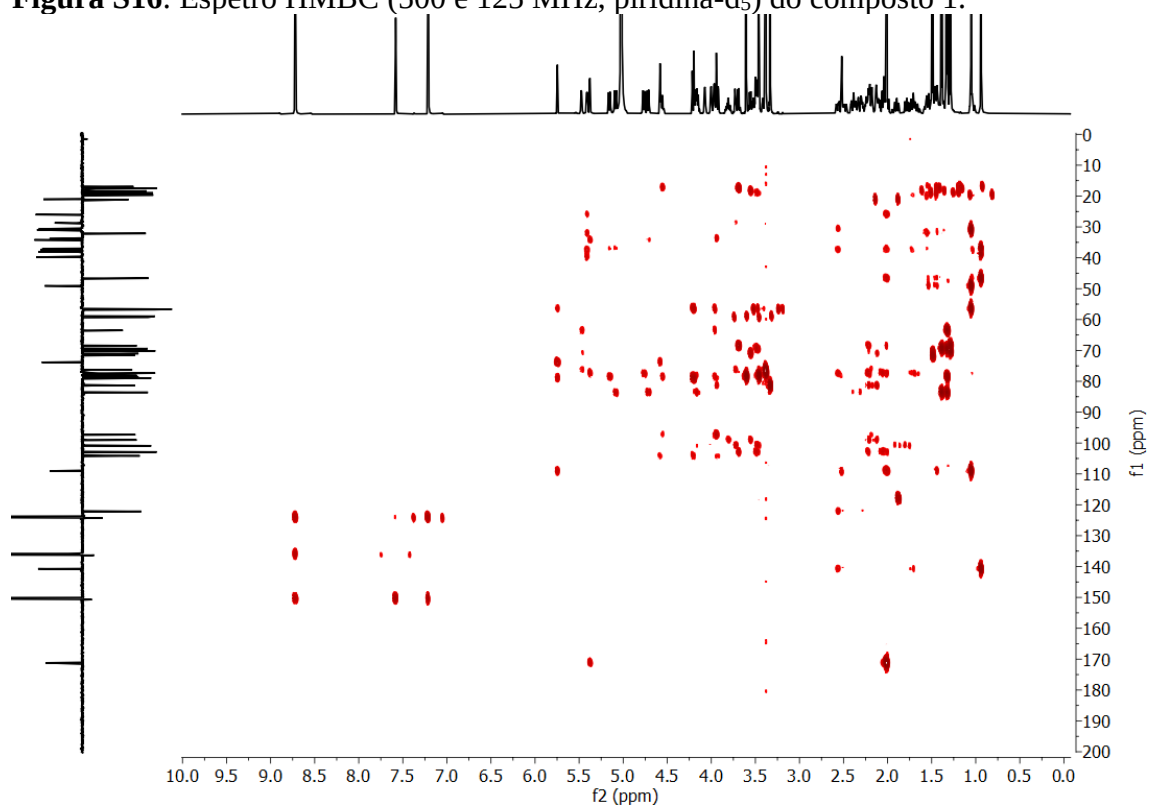


Figura S17: Ampliação do espectro HMBC (500 e 125 MHz, piridina-d₅) do composto **1**.

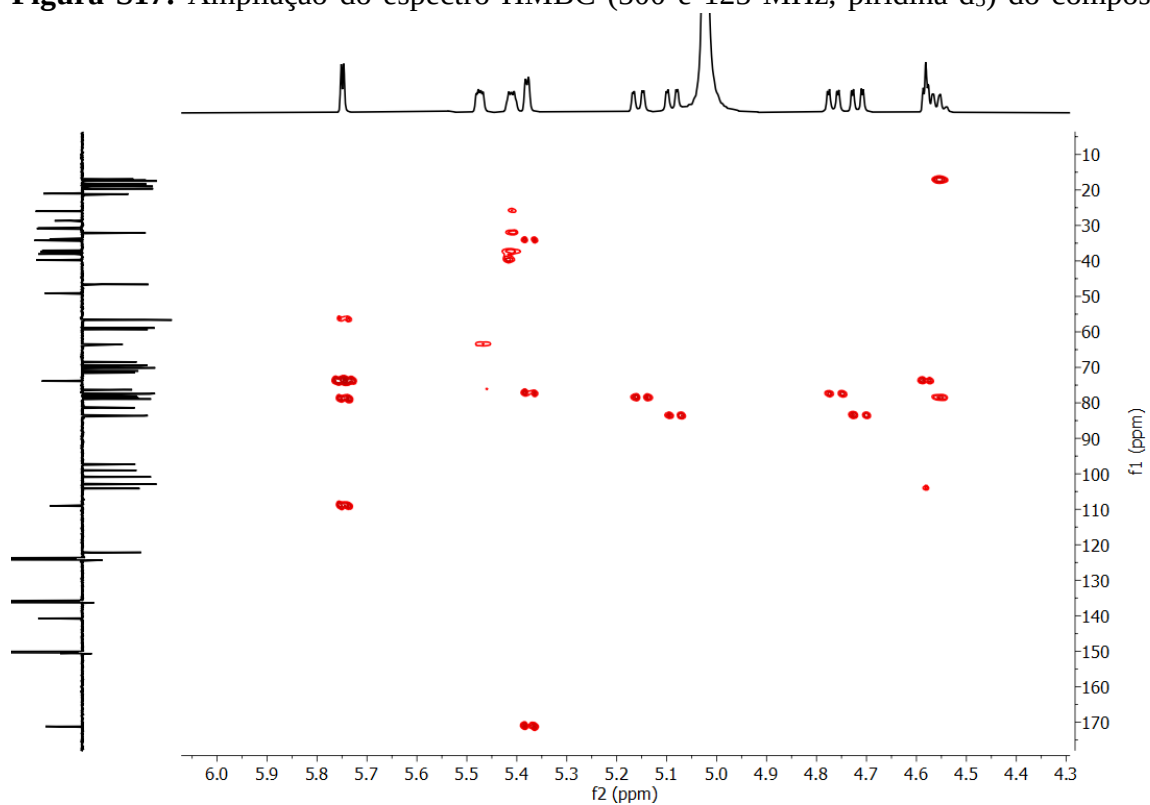


Figura S18: Ampliação do espectro HMBC (500 e 125 MHz, piridina-d₅) do composto **1**.

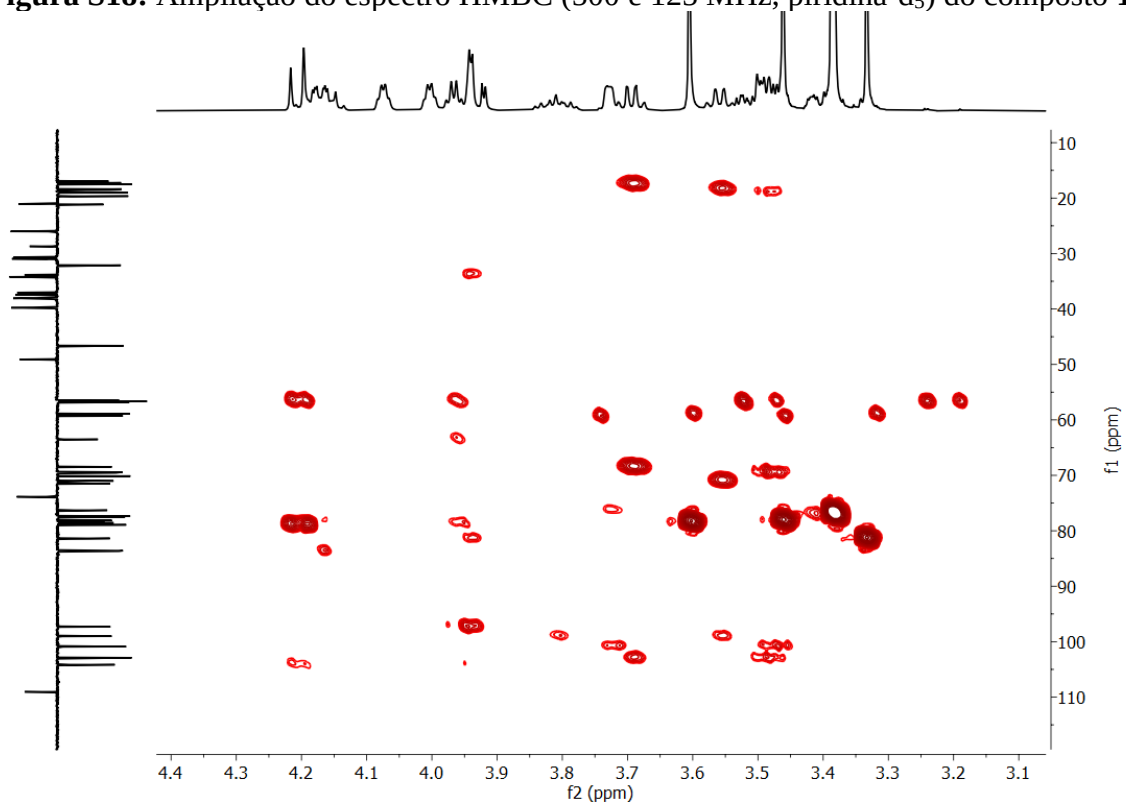
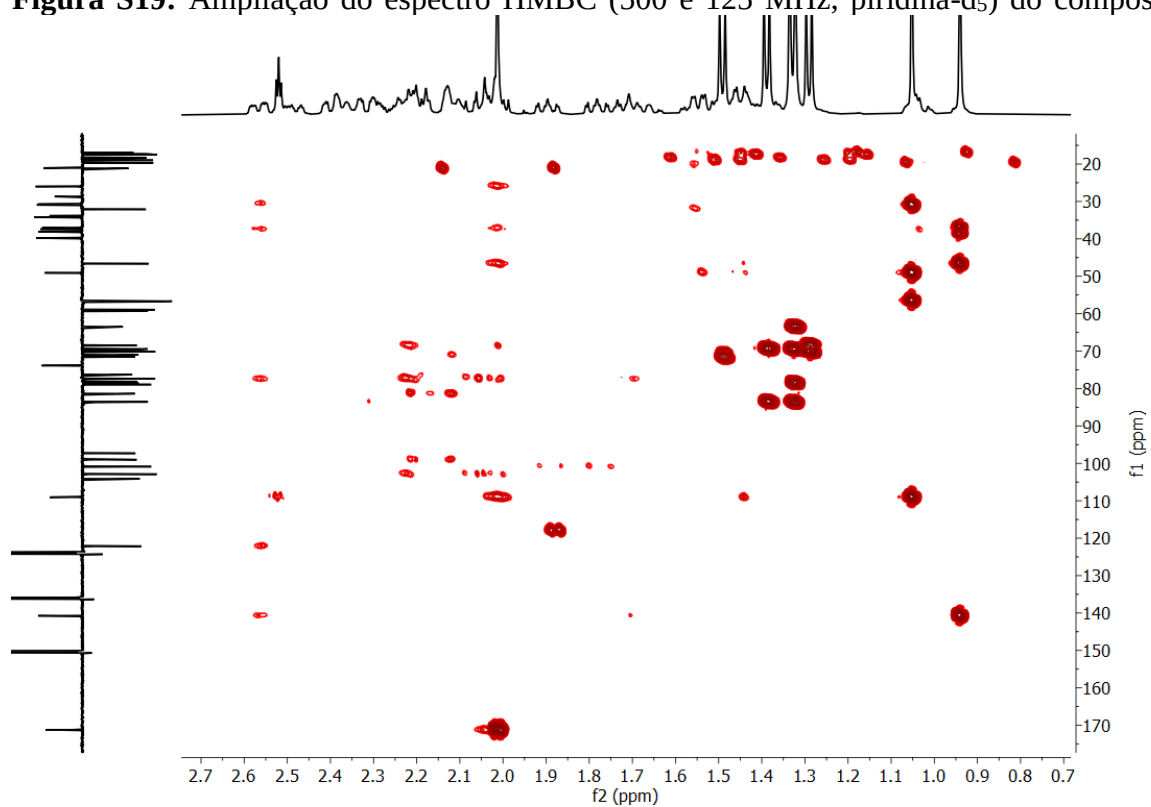


Figura S19: Ampliação do espectro HMBC (500 e 125 MHz, piridina-d₅) do composto **1**..



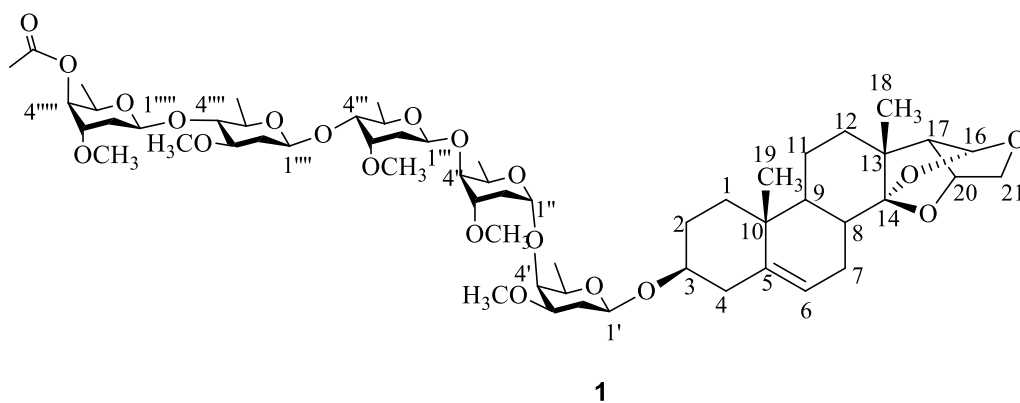
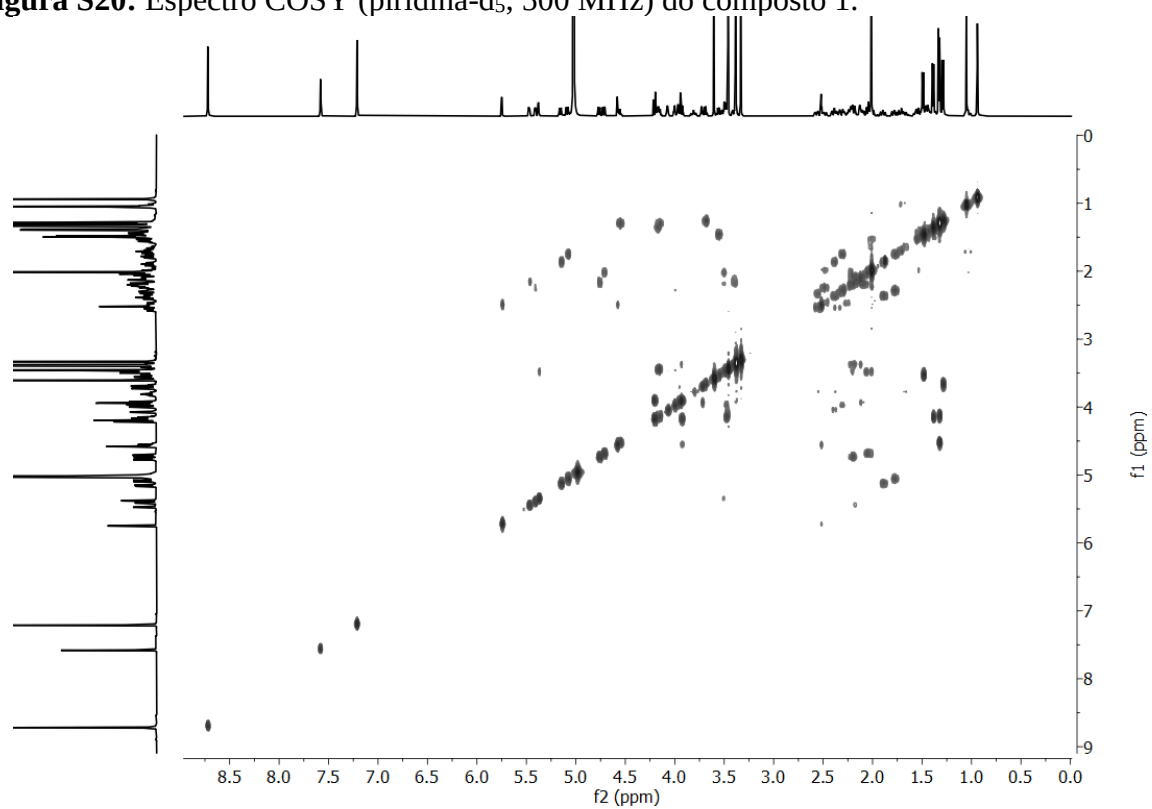


Figura S20: Espectro COSY (piridina-d₅, 500 MHz) do composto 1.



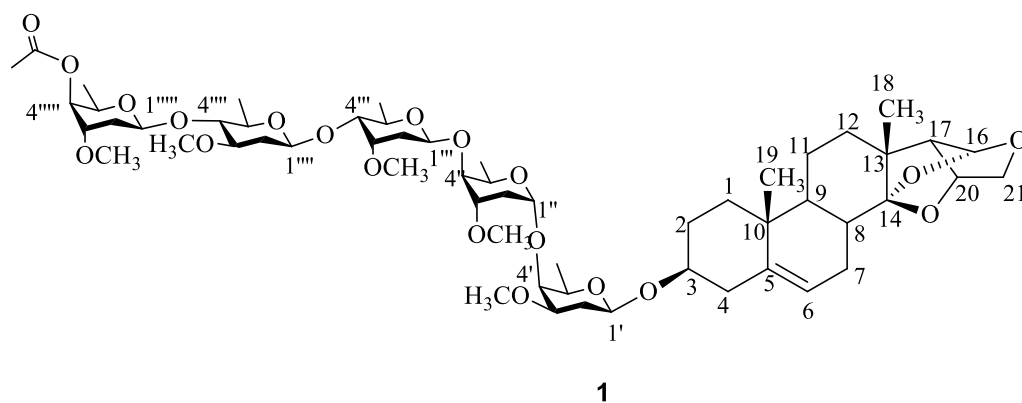
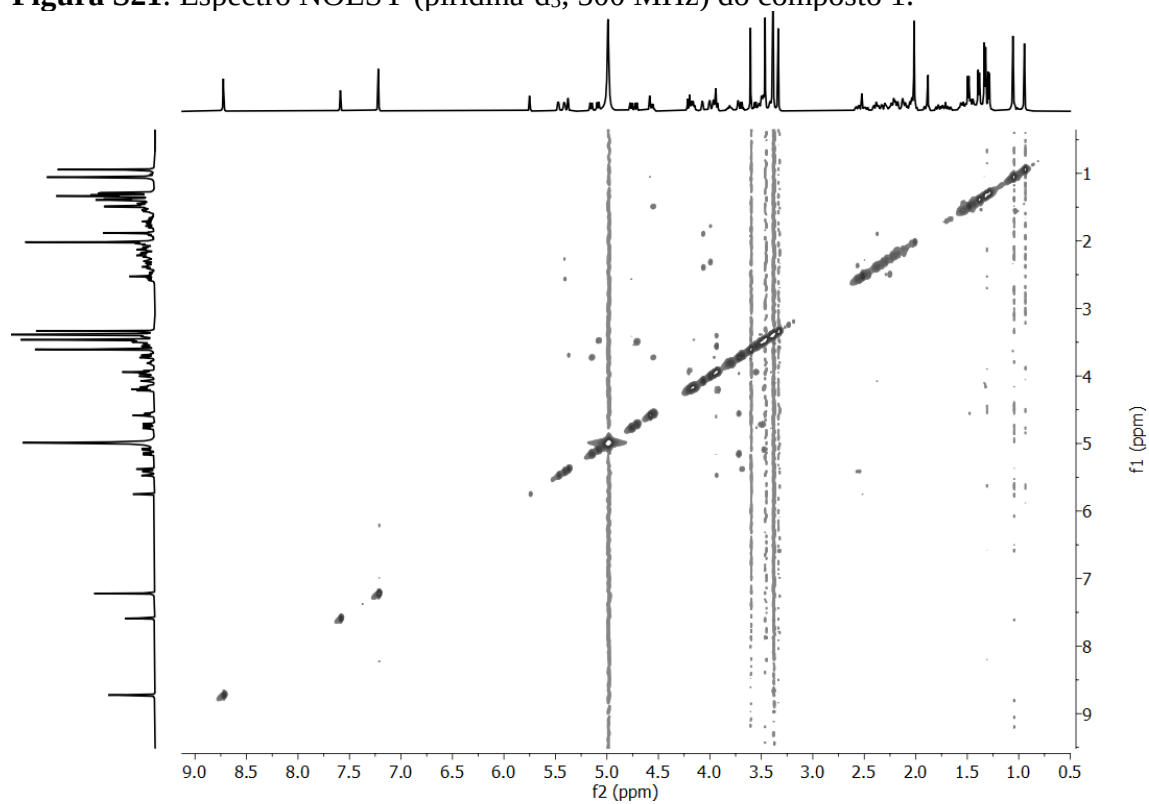


Figura S21: Espectro NOESY (piridina-d₅, 500 MHz) do composto 1.



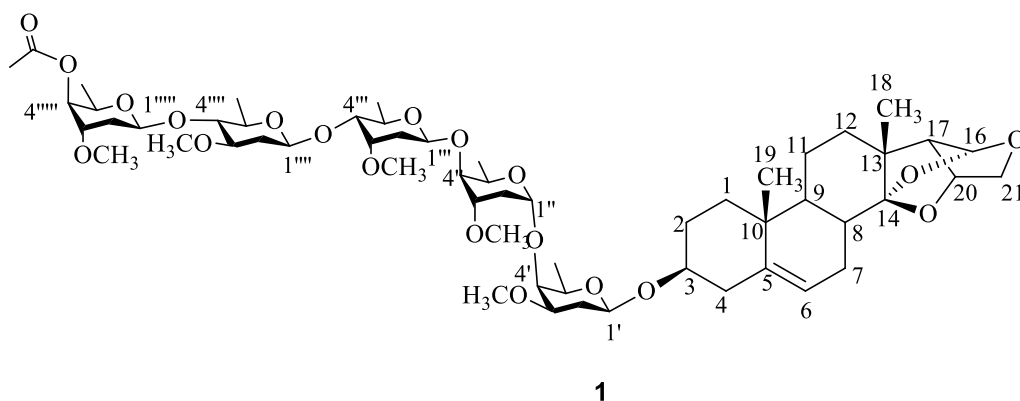
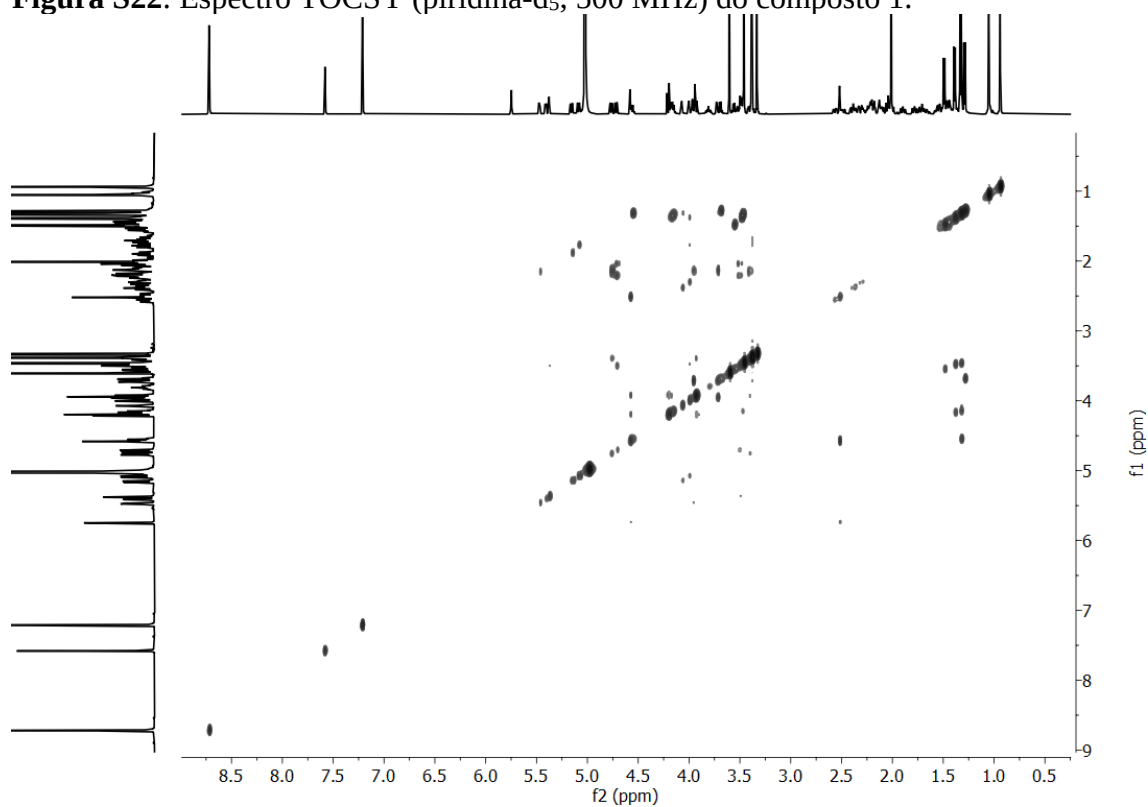


Figura S22: Espectro TOCSY (piridina-d₅, 500 MHz) do composto 1.



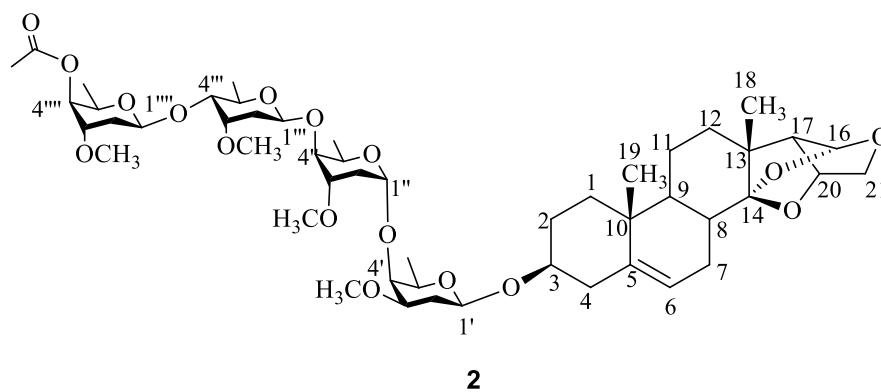


Figura S23: Espectro de RMN de ^1H (piridina- d_5 , 500 MHz) do composto **2**.

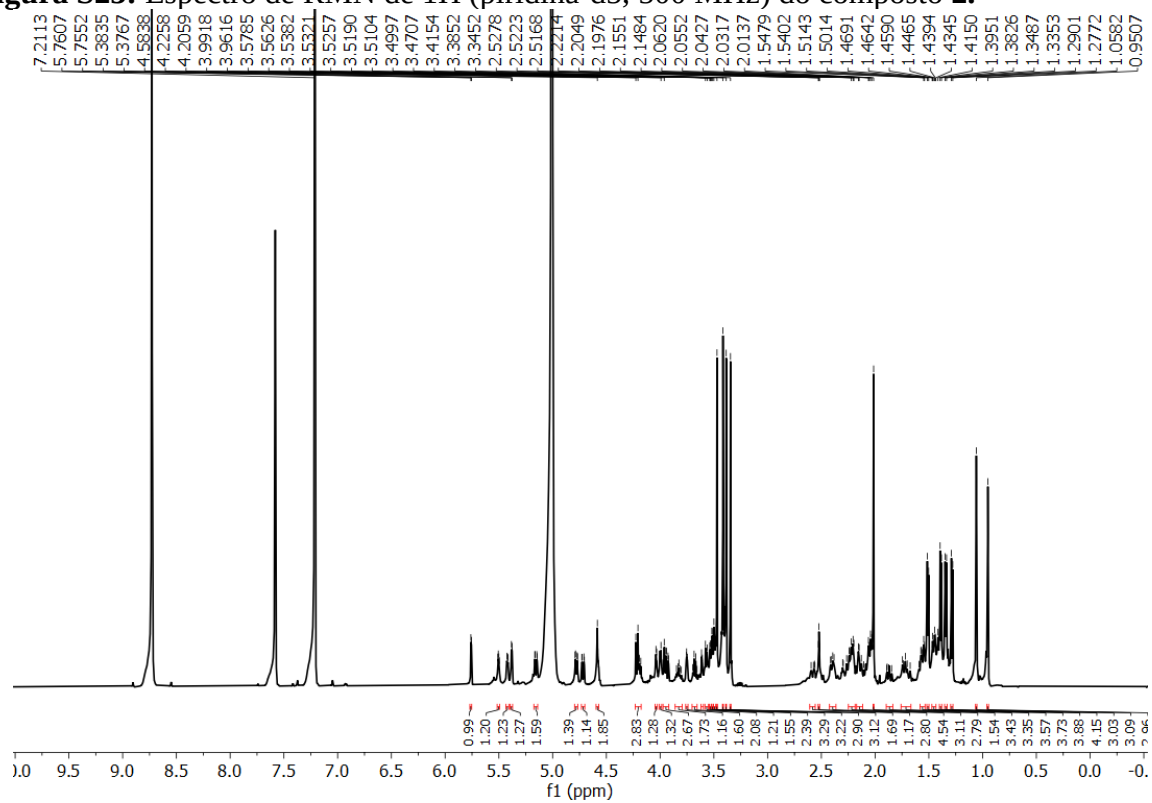


Figura S24: Ampliação do espectro de RMN de ^1H (piridina- d_5 , 500 MHz) do composto **2**.

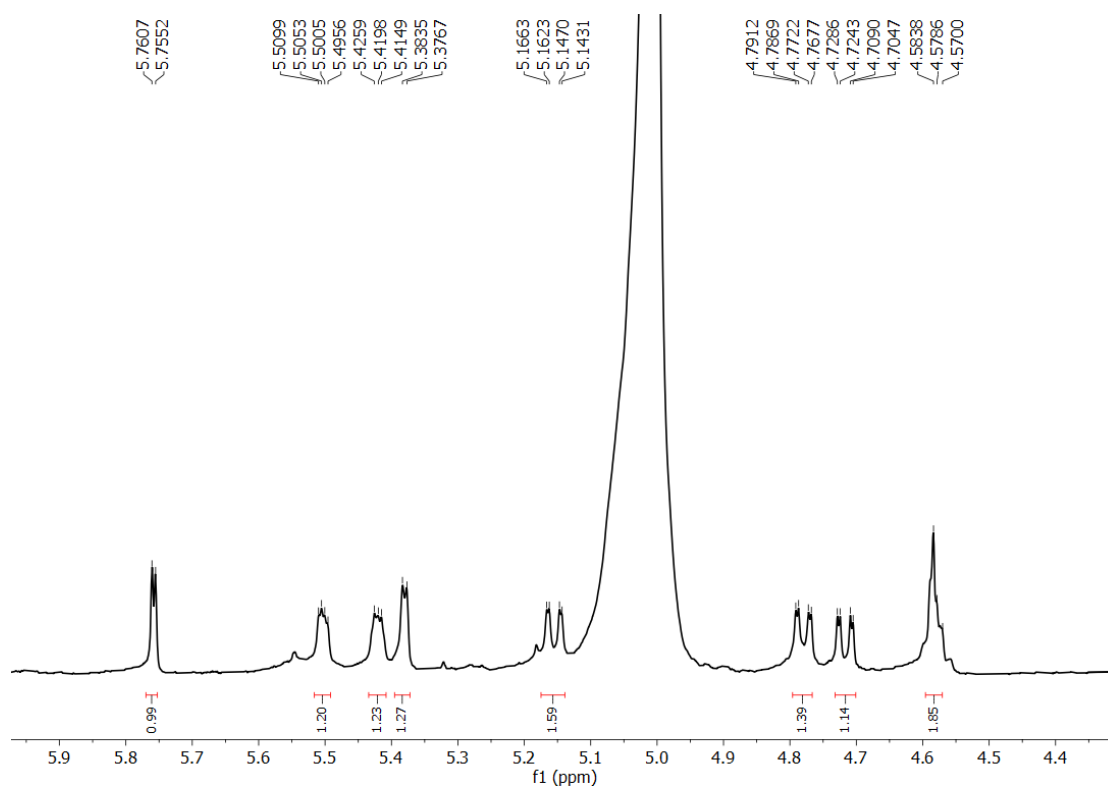


Figura S25: Ampliação do espectro de RMN de ^1H (piridina- d_5 , 500 MHz) do composto **2**.

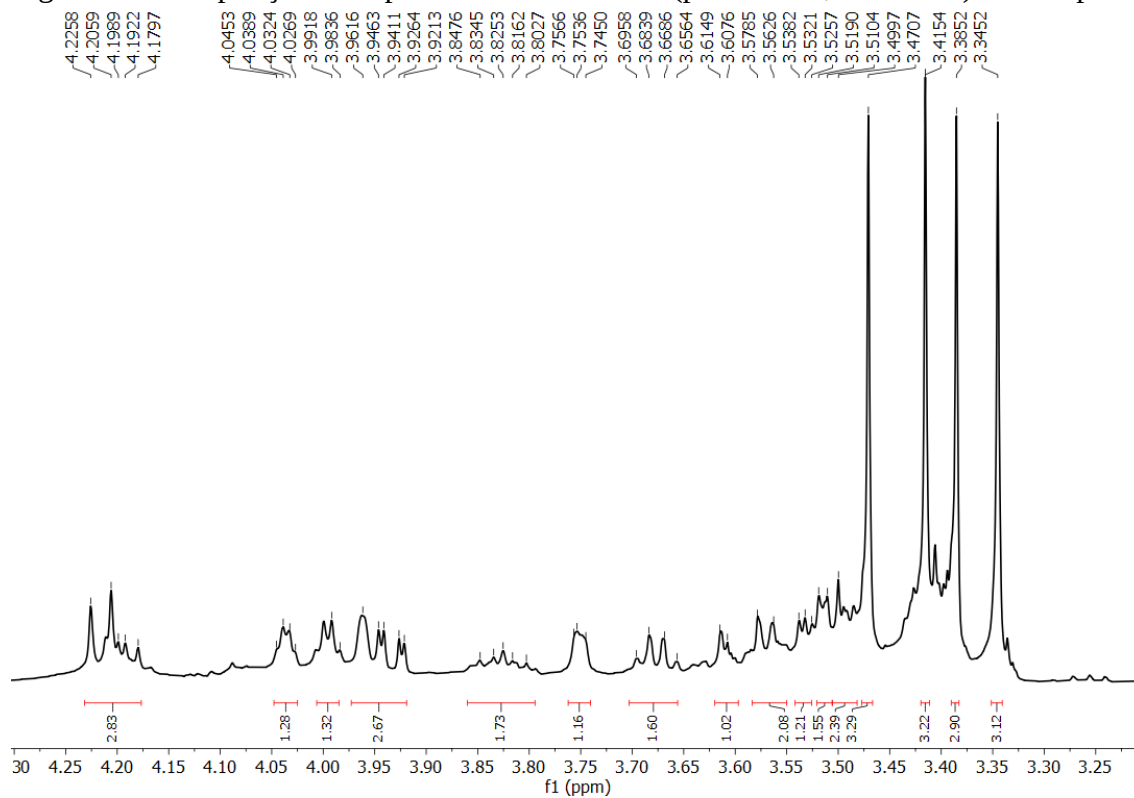
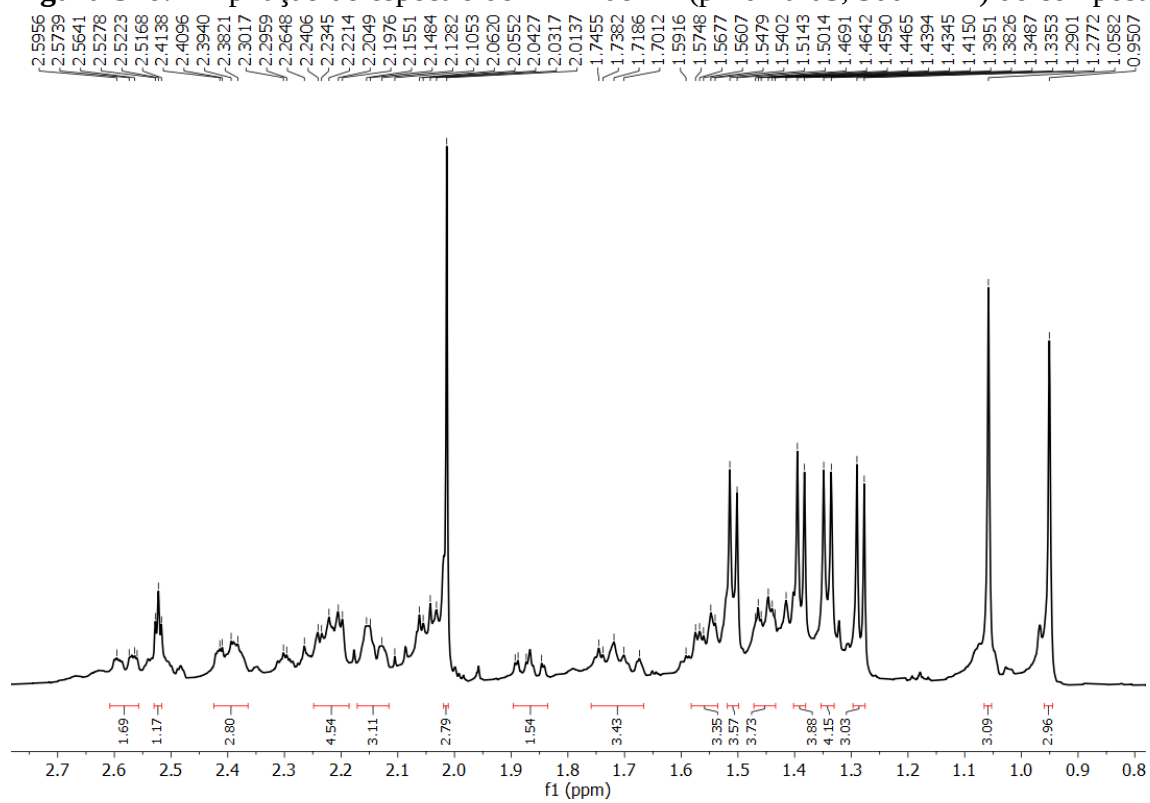


Figura S26: Ampliação do espectro de RMN de ^1H (piridina- d_5 , 500 MHz) do composto 2.

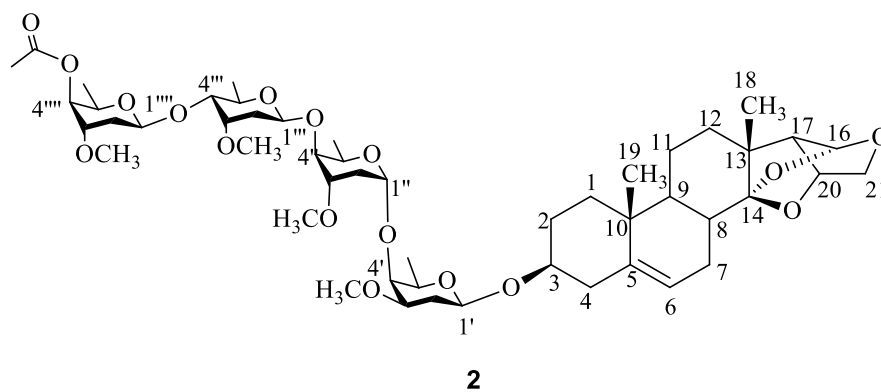


Figura S27: Espectro de RMN de Dept 135 (piridina-d₅, 500 MHz) do composto 2.

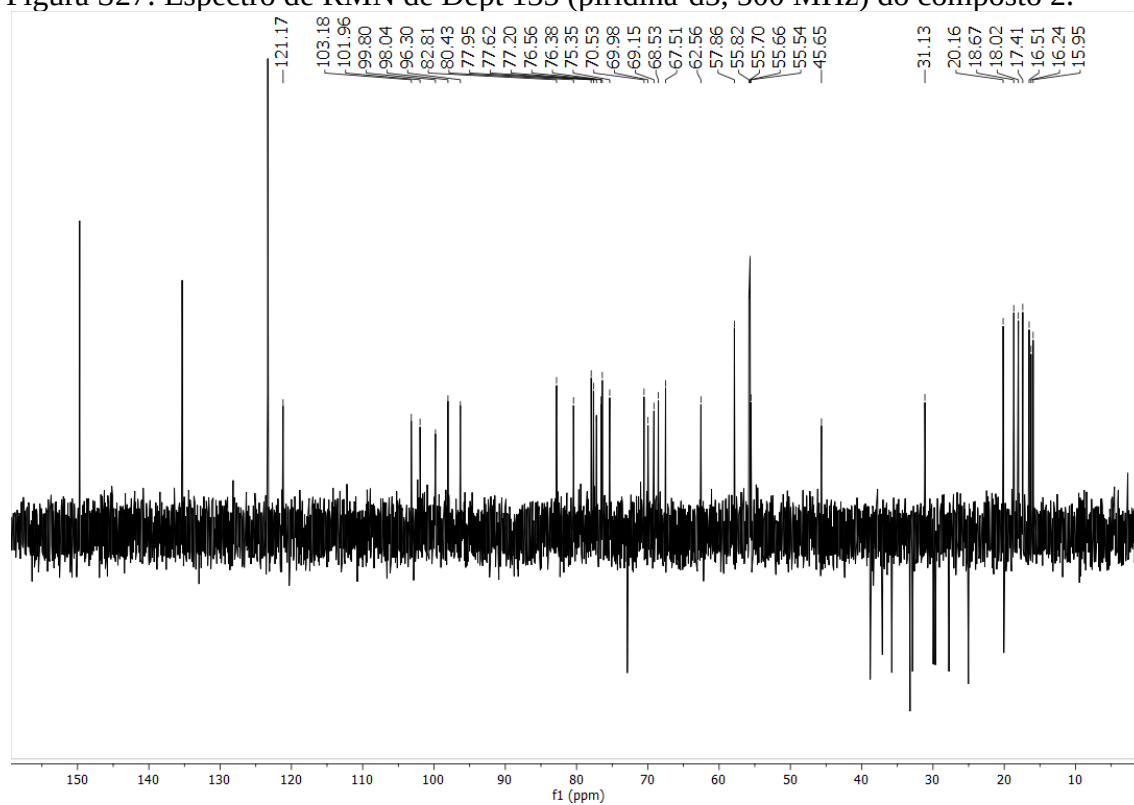


Figura S28: Ampliação do espectro de RMN de Dept 135 (piridina-d₅, 500 MHz) do composto 2.

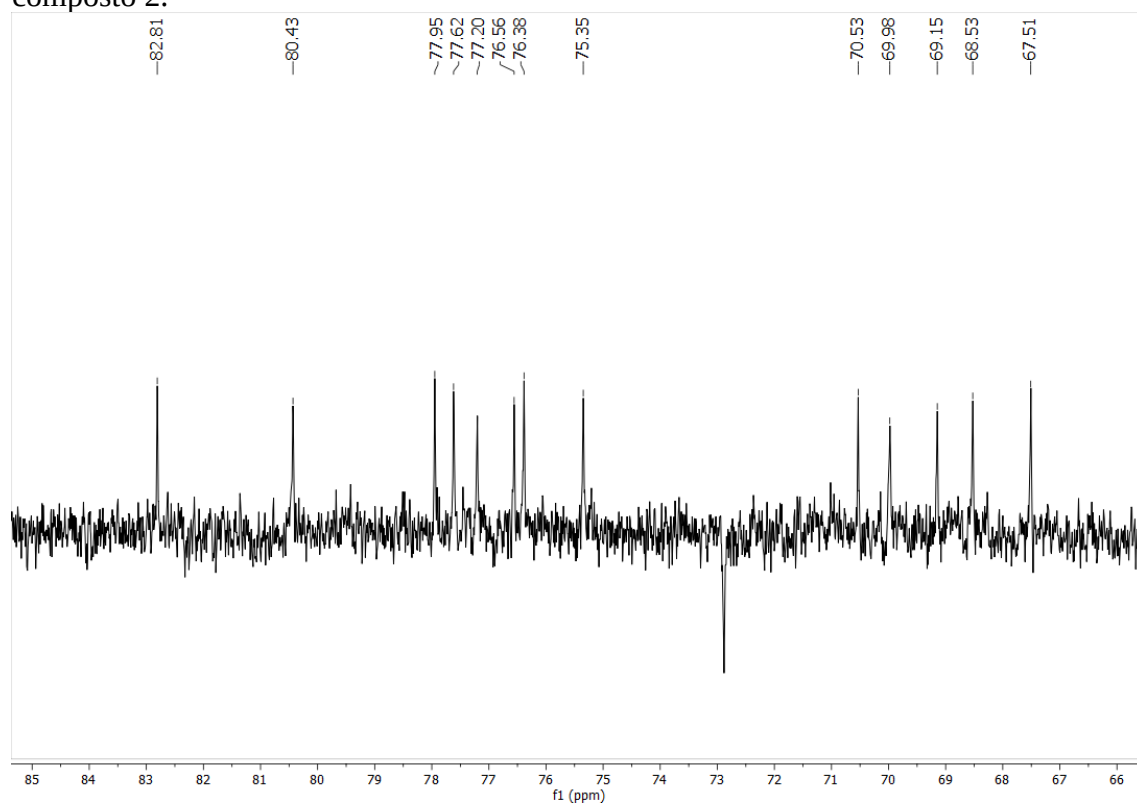
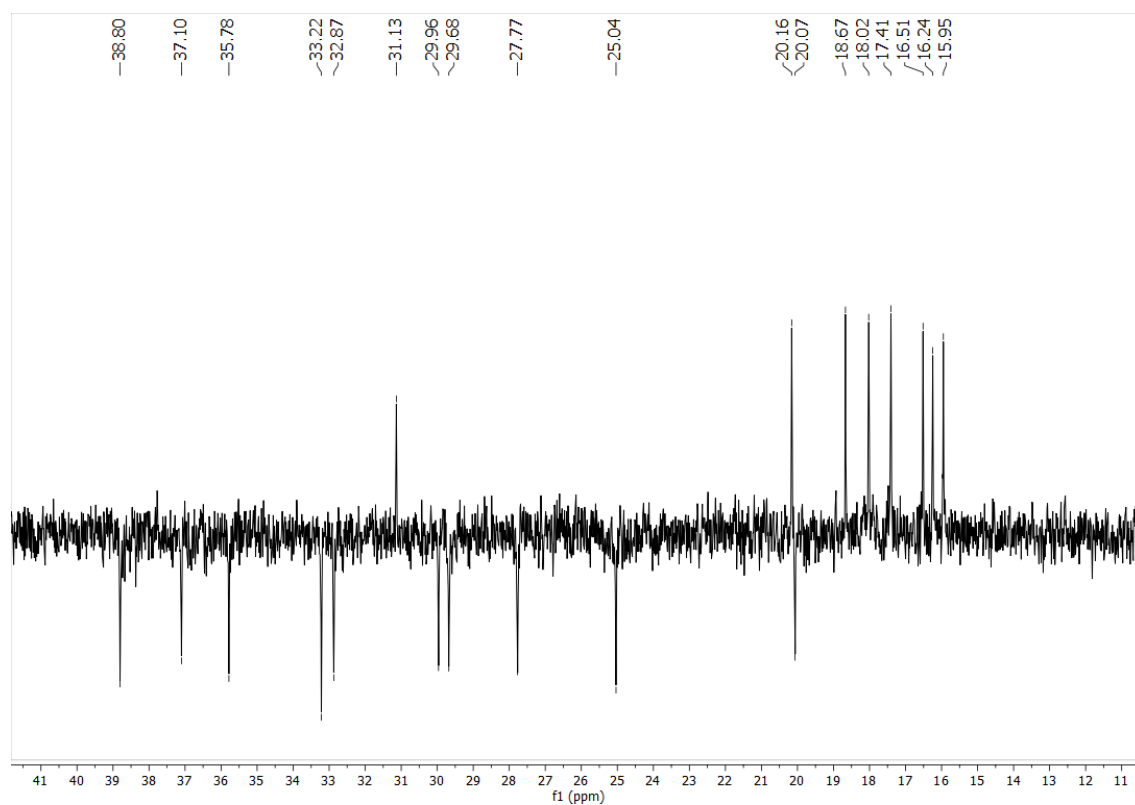


Figura S29: Ampliação do espectro de RMN de Dept 135 (piridina-d₅, 500 MHz) do composto 2.



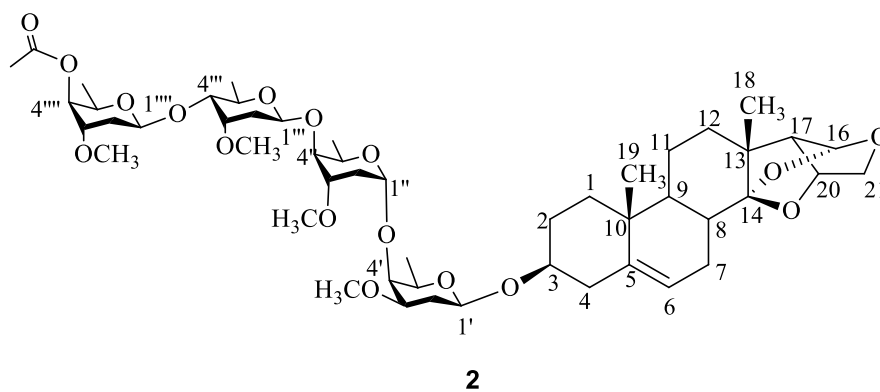


Figura S30: Espectro HSQC (500 e 125 MHz, piridina-d₅) do composto 2.

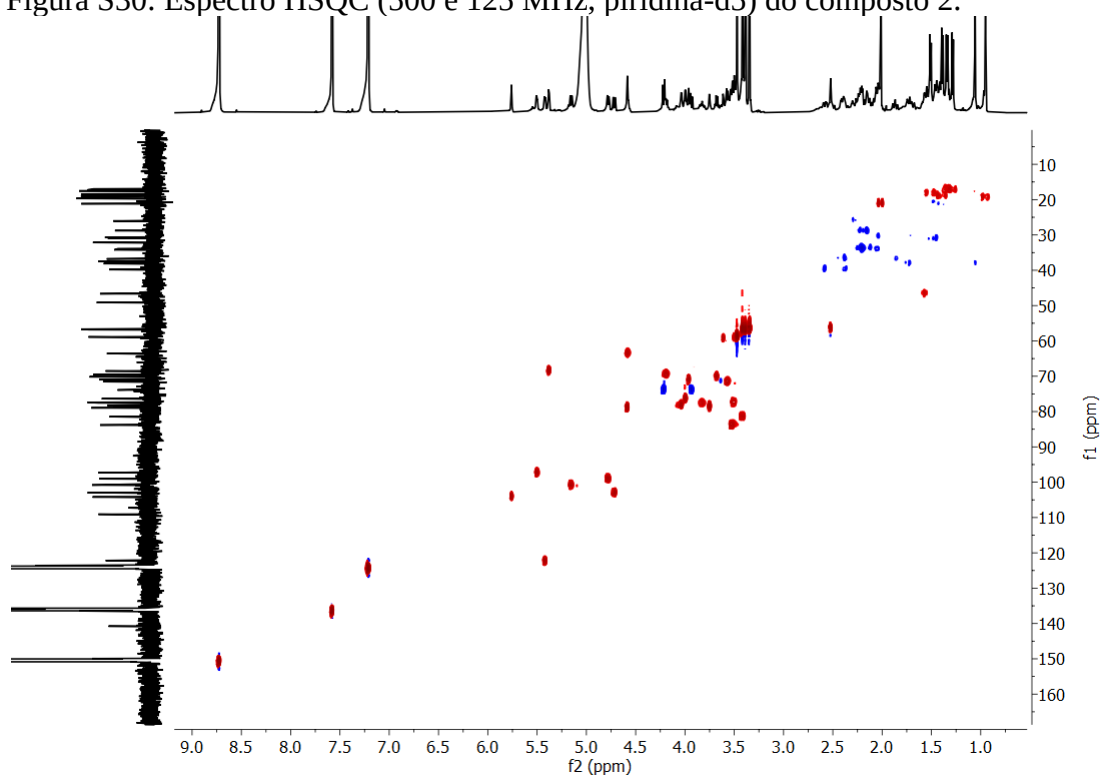
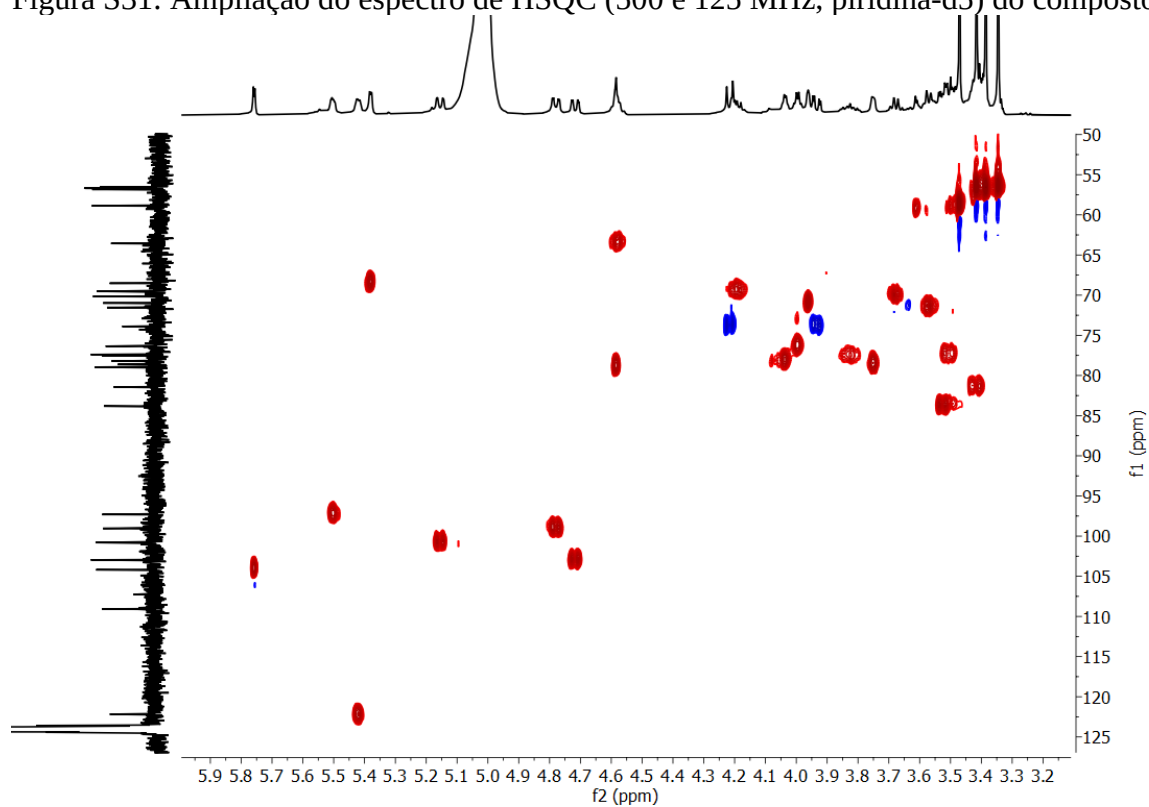
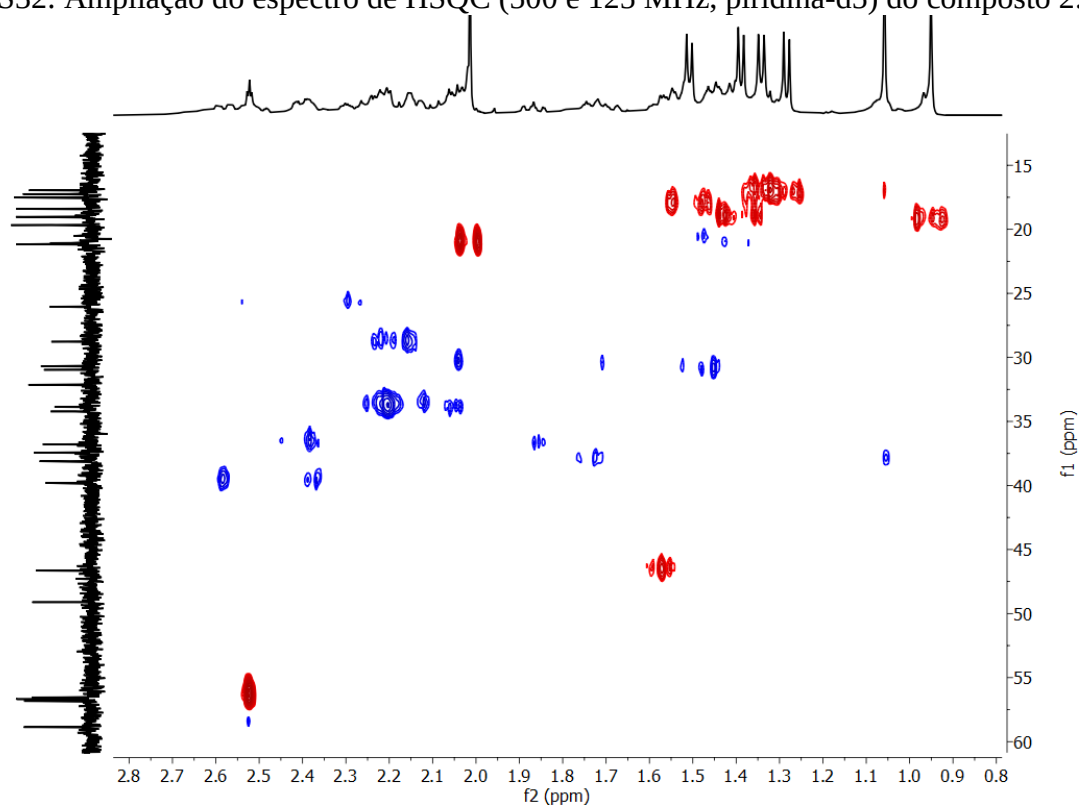


Figura S31: Ampliação do espectro de HSQC (500 e 125 MHz, piridina-d₅) do composto 2.Figura S32: Ampliação do espectro de HSQC (500 e 125 MHz, piridina-d₅) do composto 2.

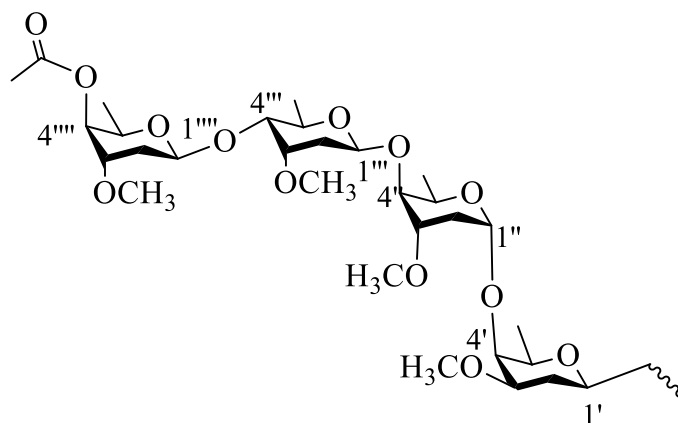


Figura S33: Espectro HMBC (500 e 125 MHz, piridina-d5) do composto 2.

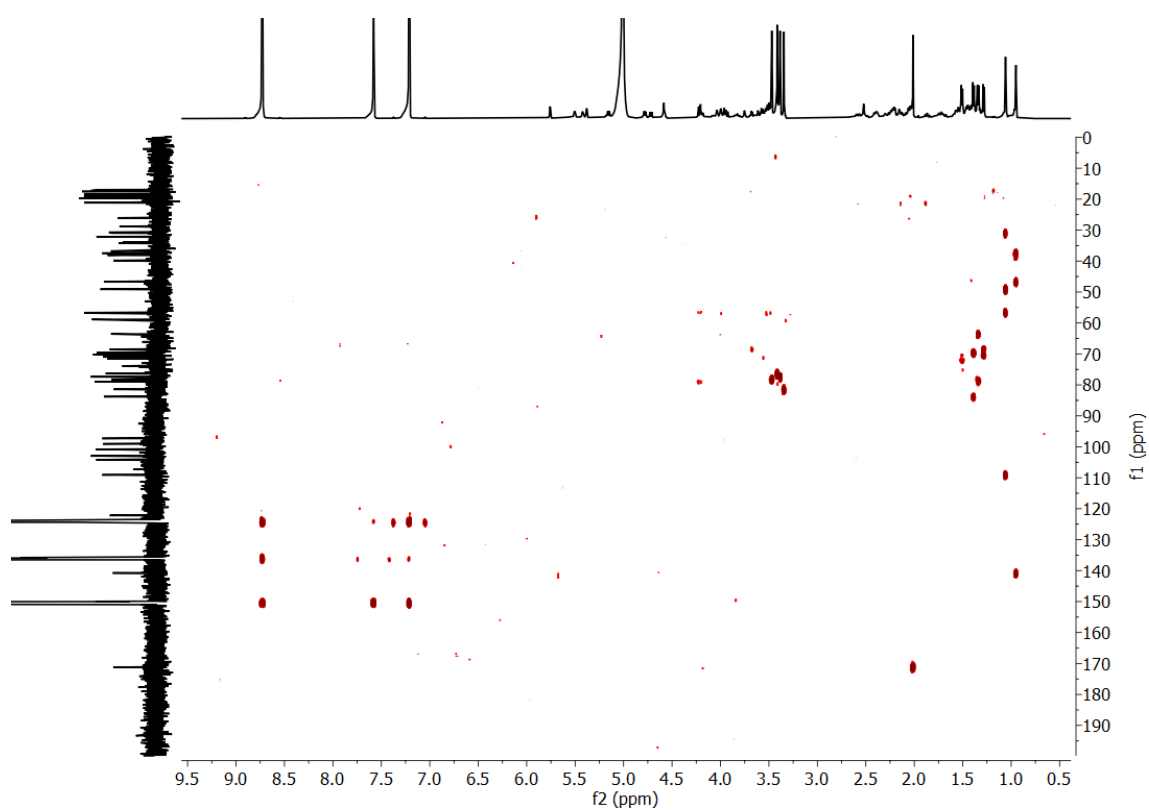


Figura S34: Ampliação do espectro HMBC (500 e 125 MHz, piridina-d5) do composto 2.

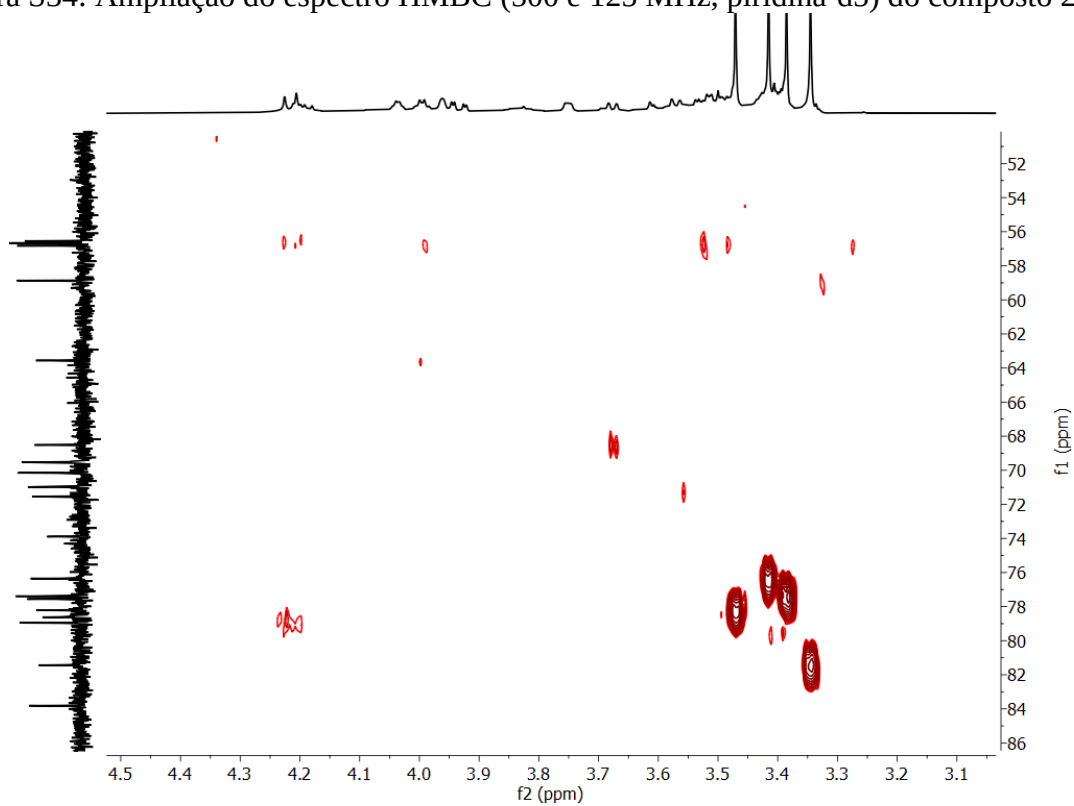
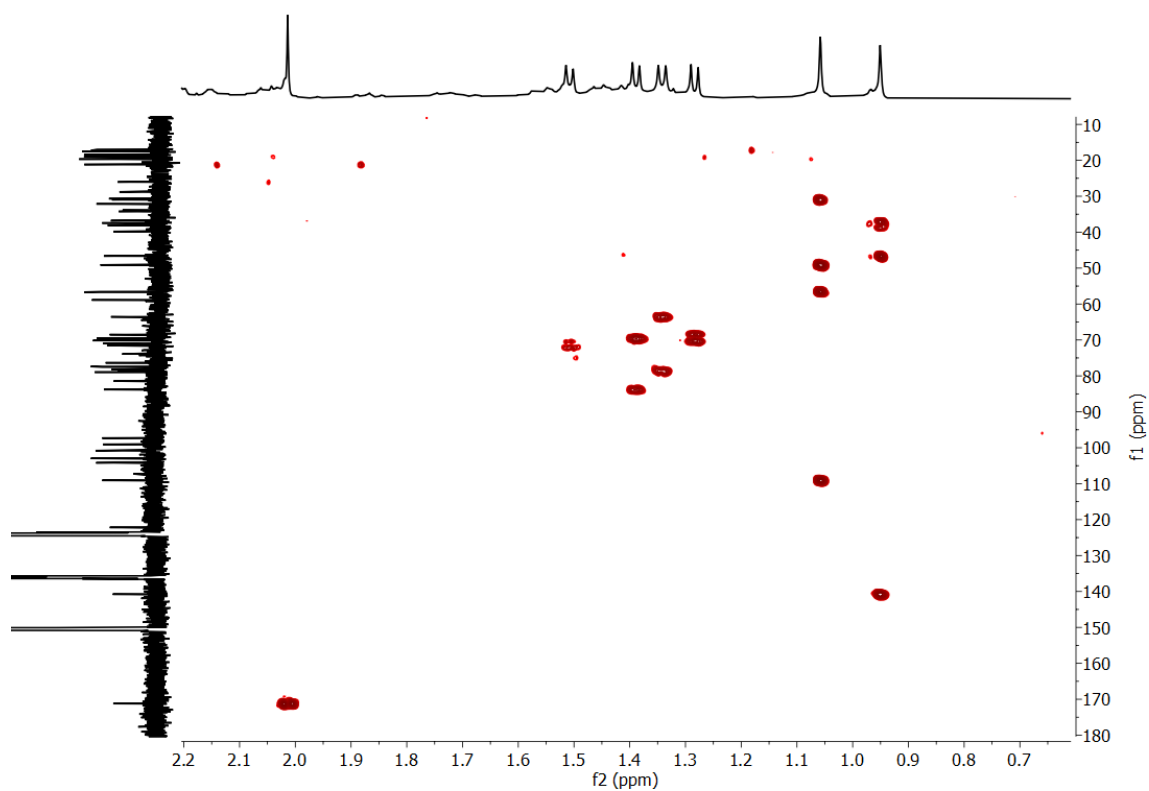


Figura S35: Ampliação do espectro HMBC (500 e 125 MHz, piridina-d5) do composto 2.



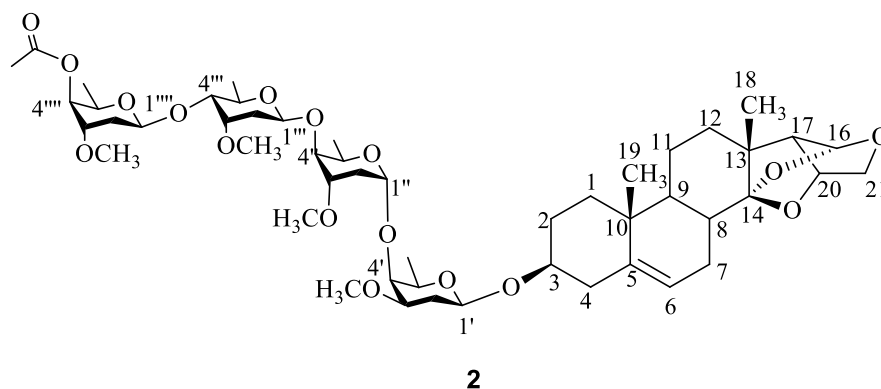
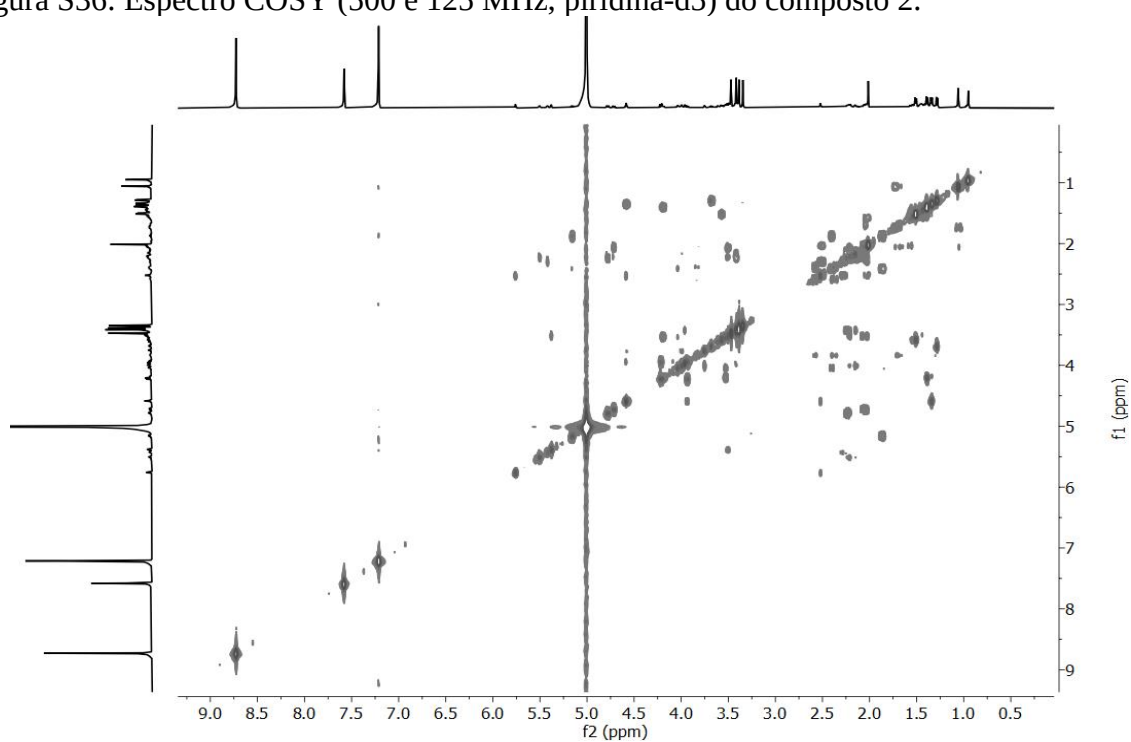


Figura S36: Espectro COSY (500 e 125 MHz, piridina-d5) do composto 2.



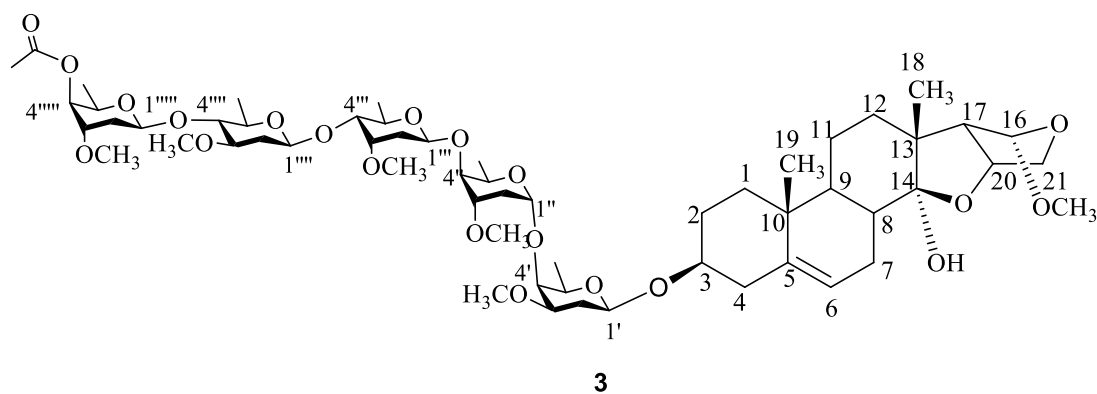


Figura S37: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, piridina- d_5) do composto 3.

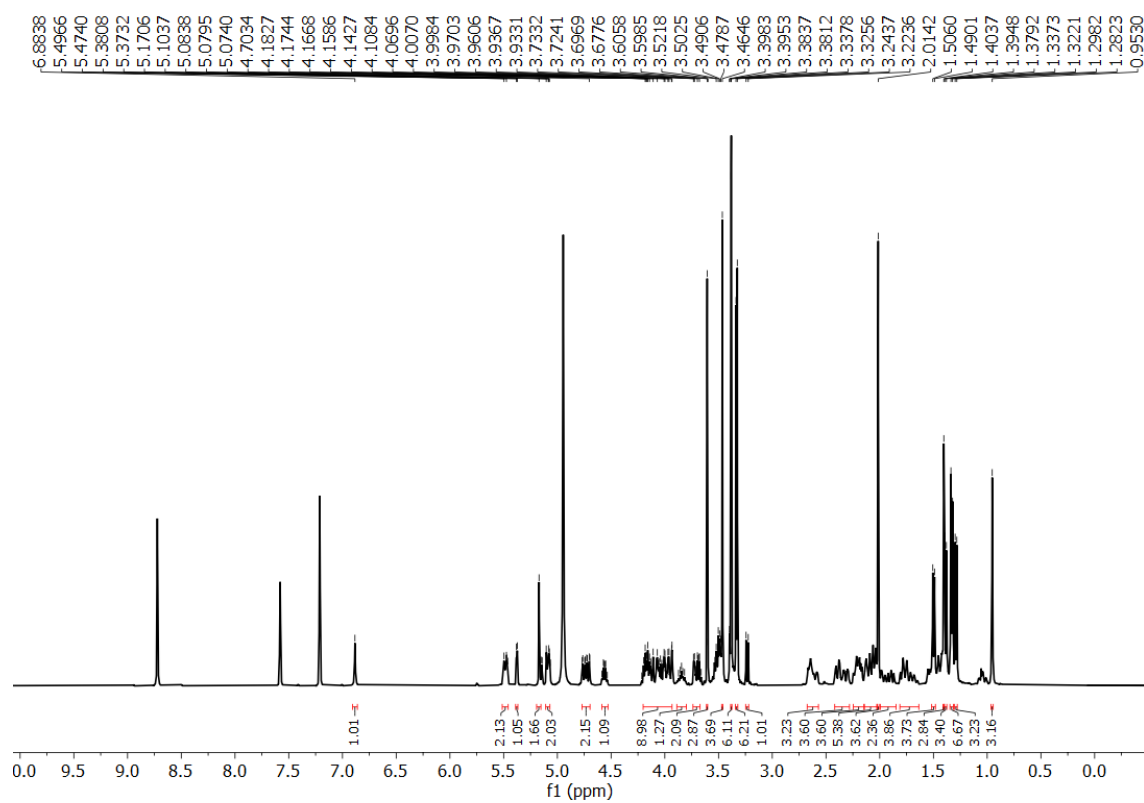


Figura S38: Ampliação do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, piridina- d_5) do composto 3.

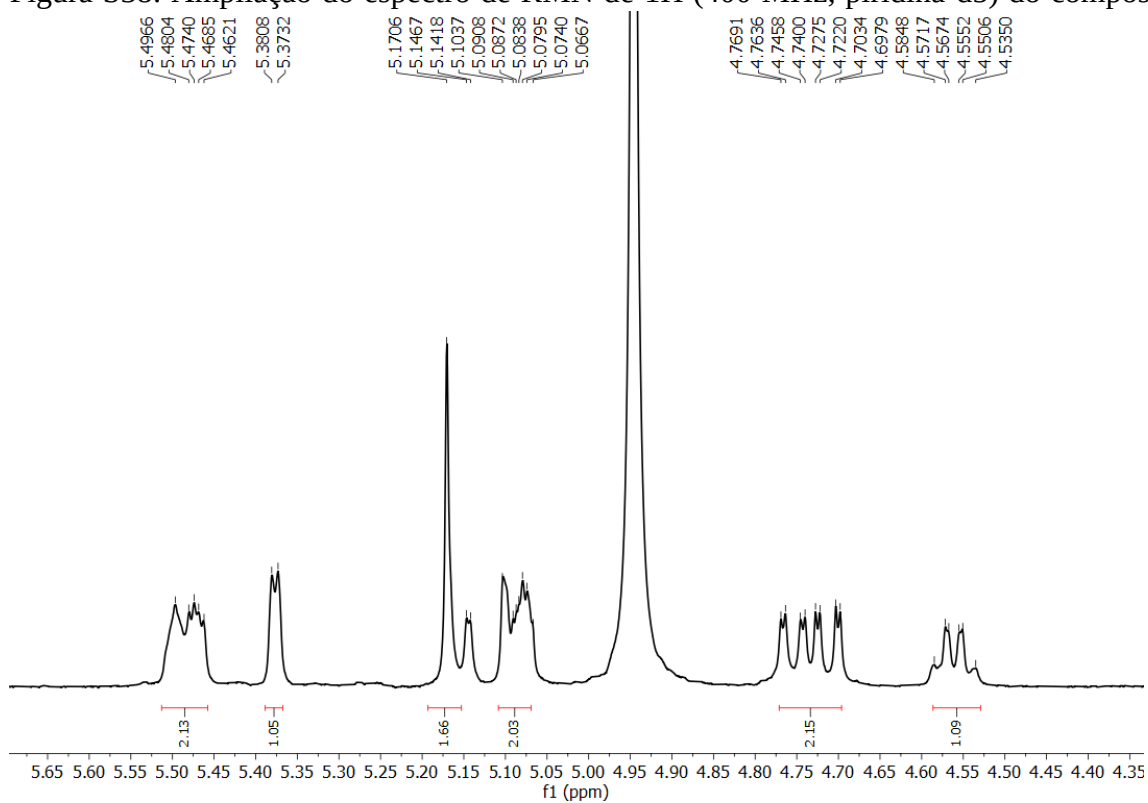


Figura S39: Ampliação do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, piridina- d_5) do composto 3.

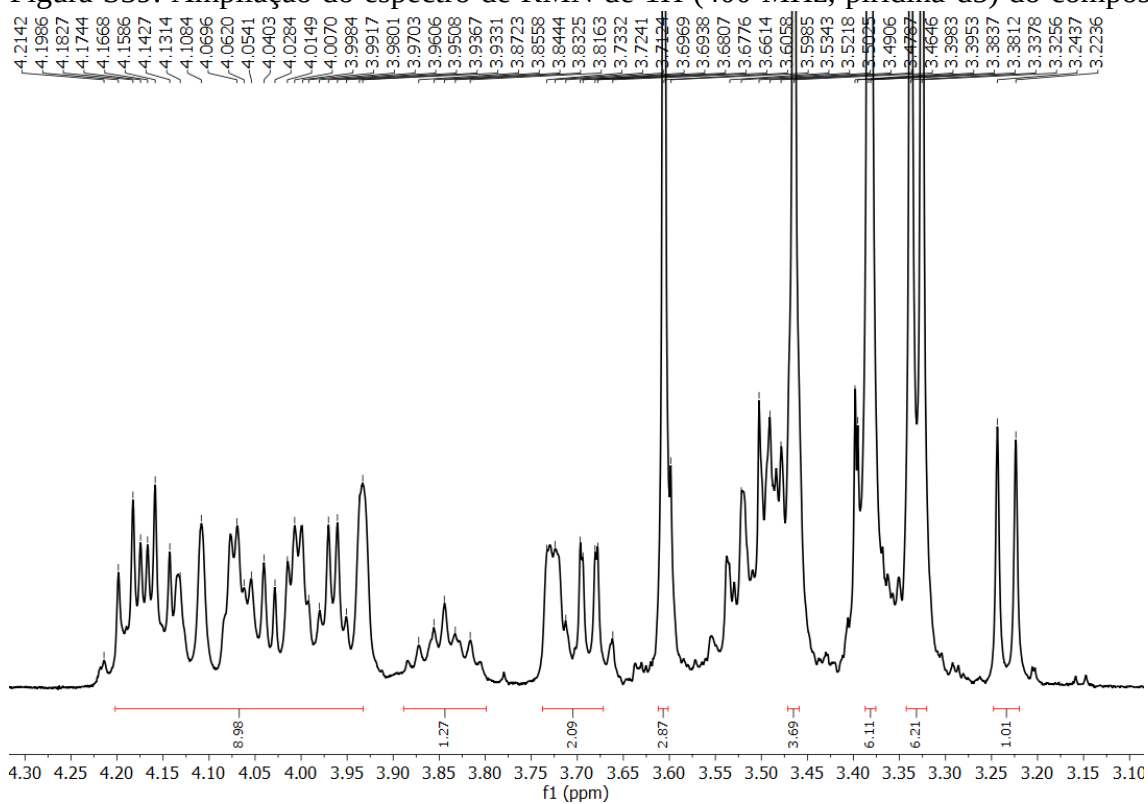
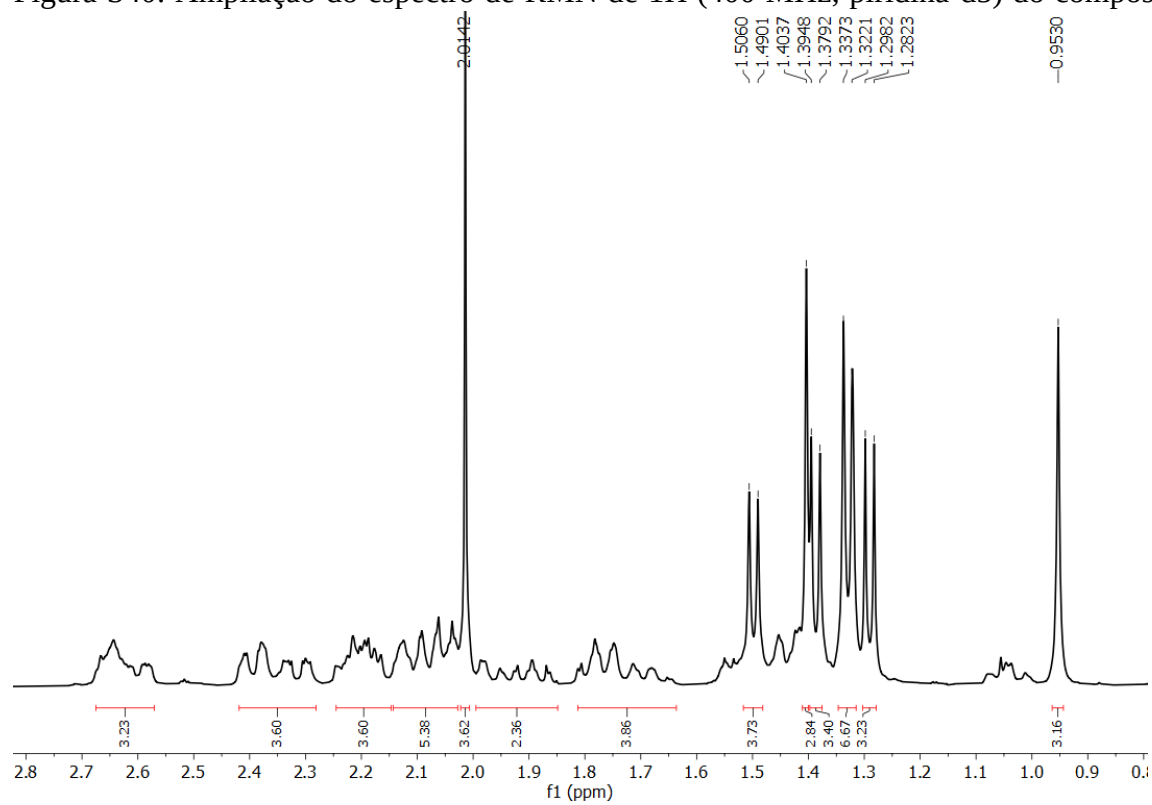


Figura S40: Ampliação do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, piridina- d_5) do composto 3.

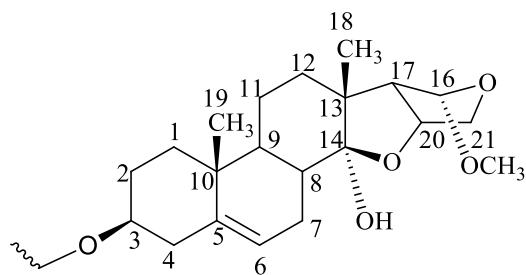


Figura S41: Espectro de RMN APT (400 MHz, piridina-d5) do composto 3.

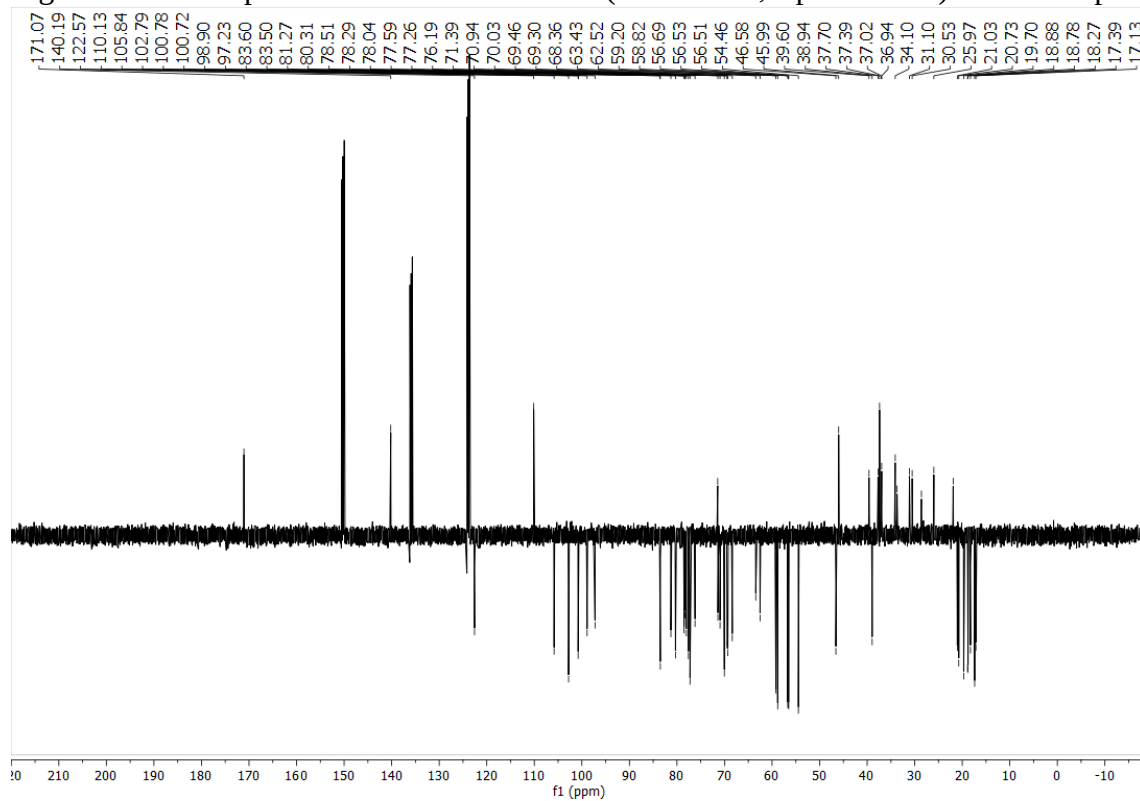


Figura S42: Ampliação do espectro de RMN APT (400 MHz, piridina-d5) do composto 3.

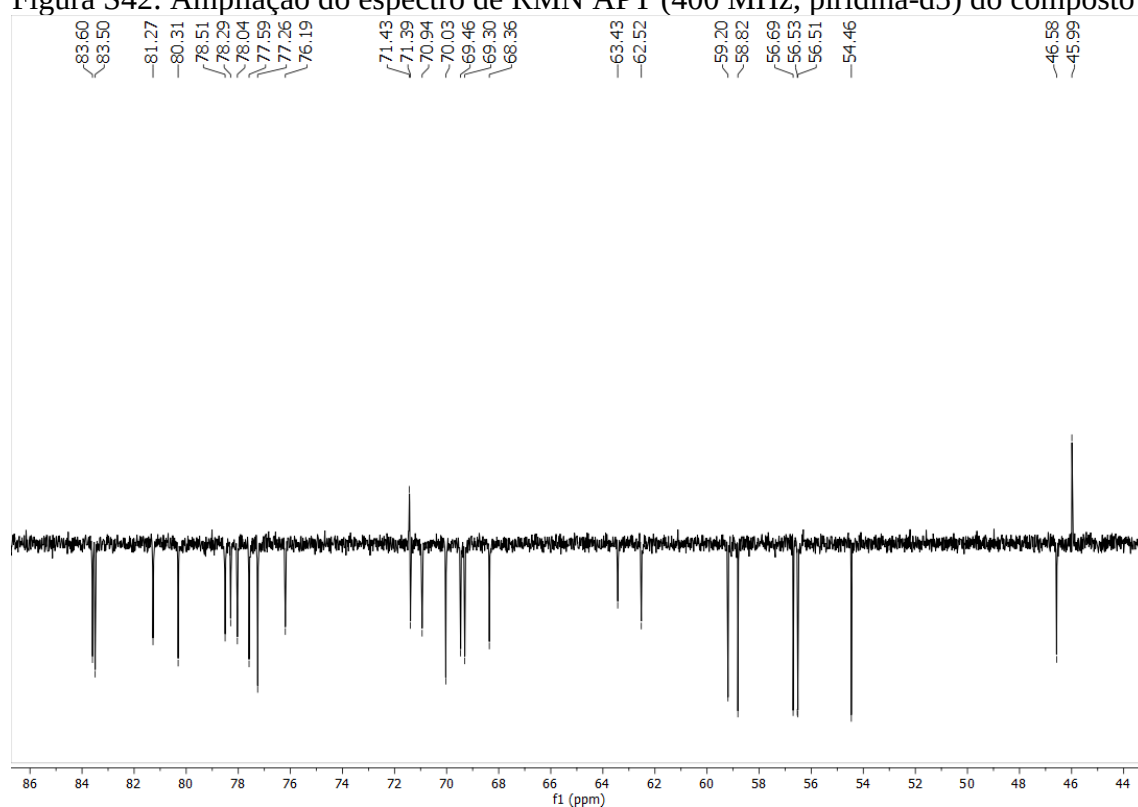
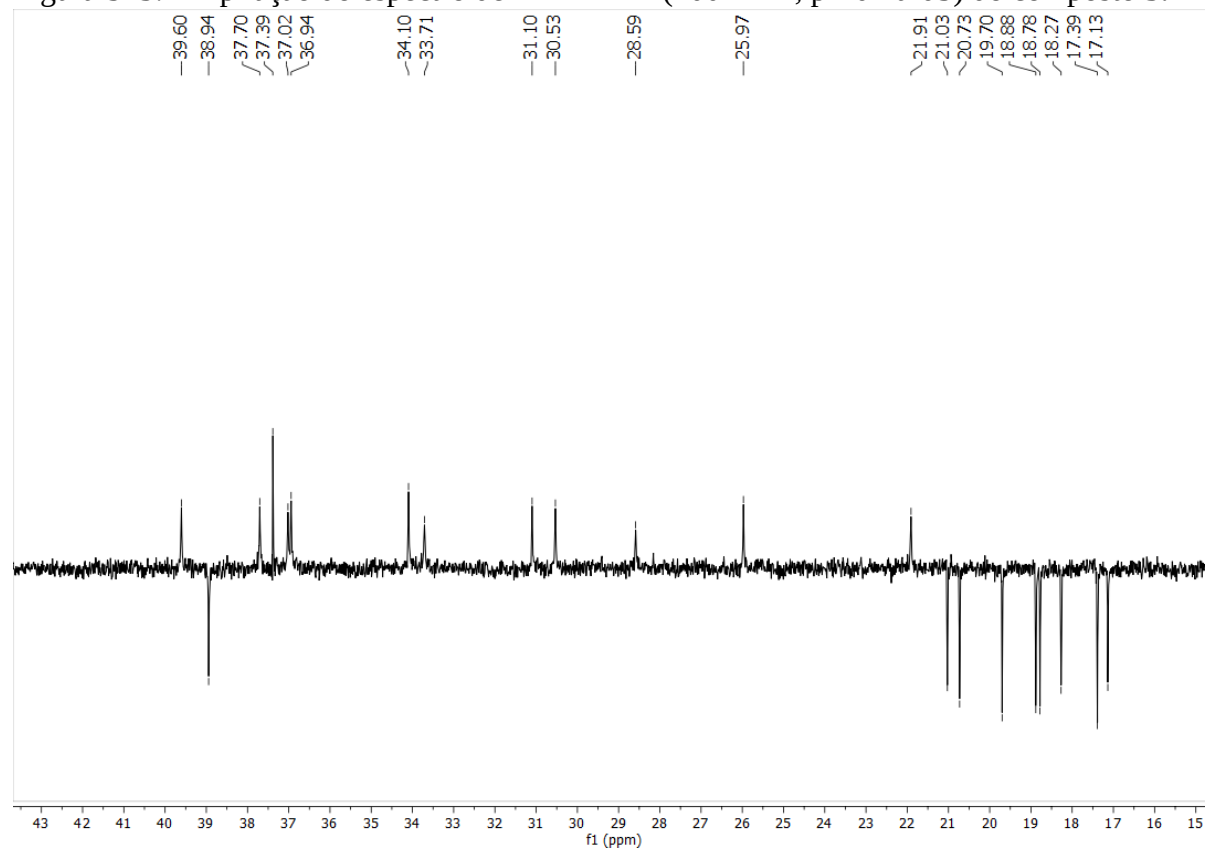


Figura S43: Ampliação do espectro de RMN APT (400 MHz, piridina-d5) do composto 3.



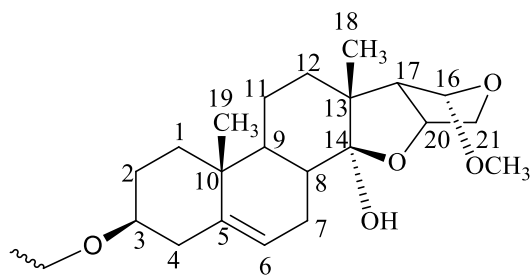


Figura S44: Espectro de HSQC (400 e 100 MHz, piridina-d₅) do composto 3

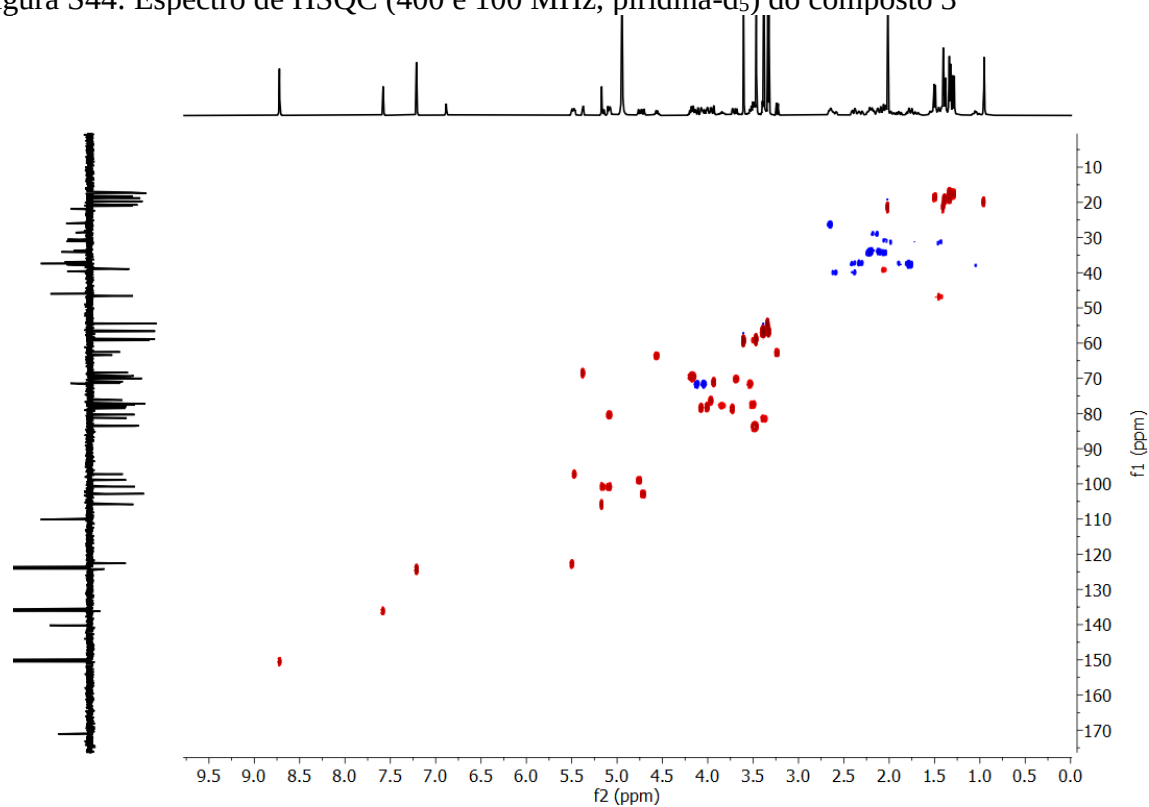


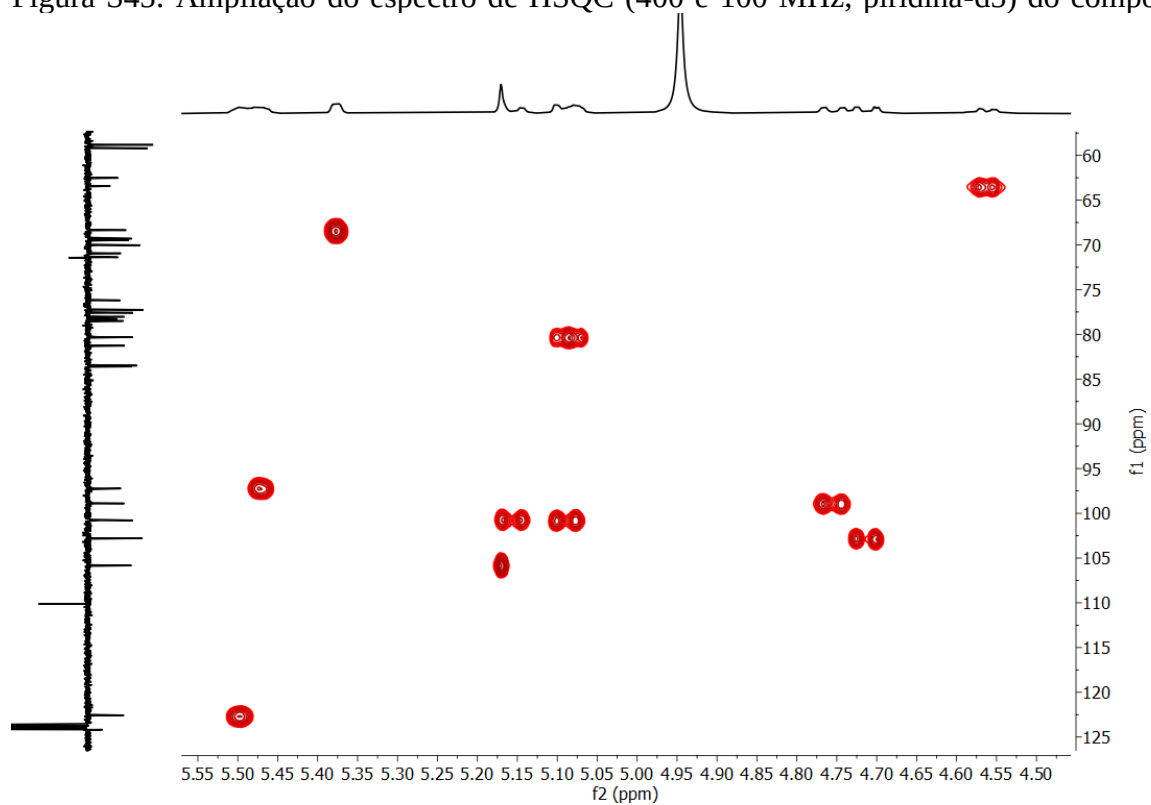
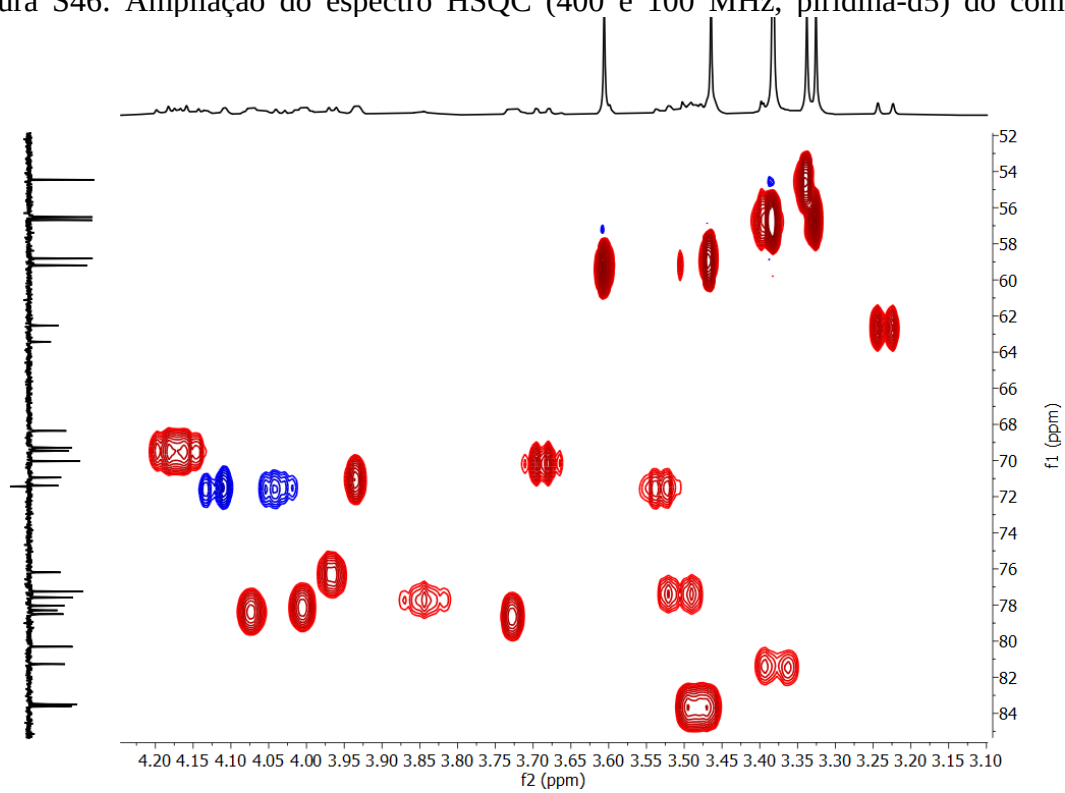
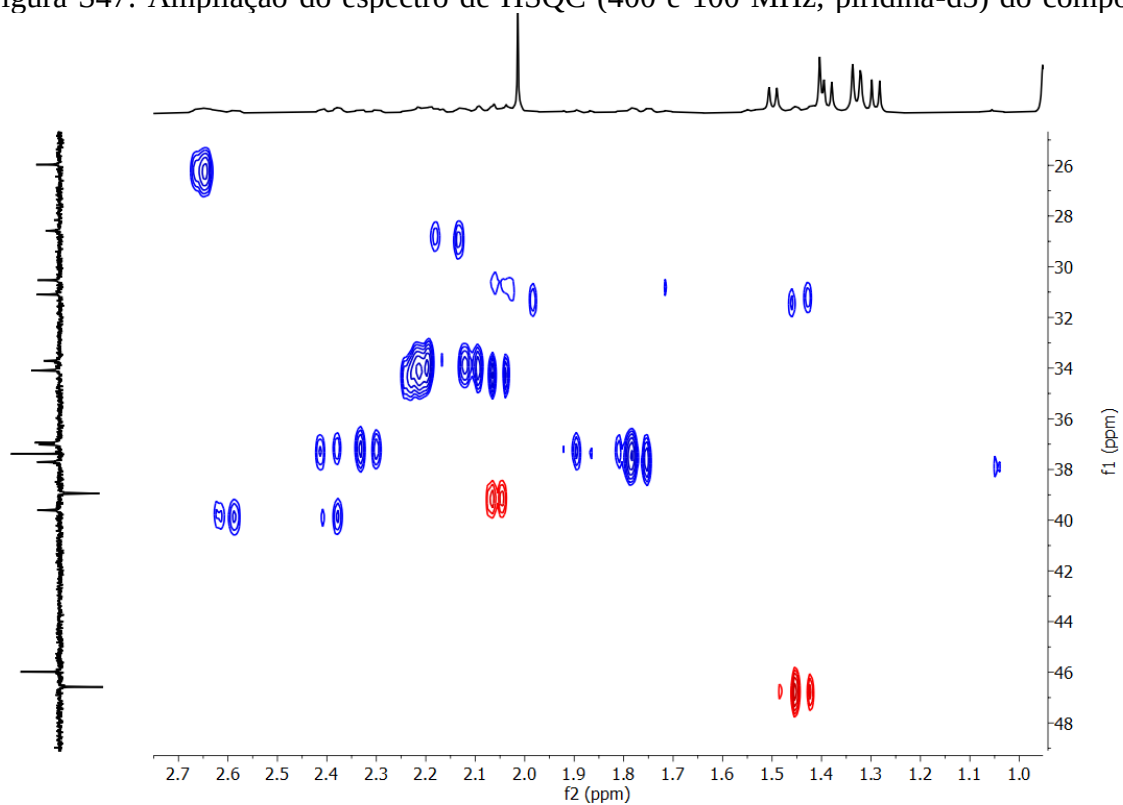
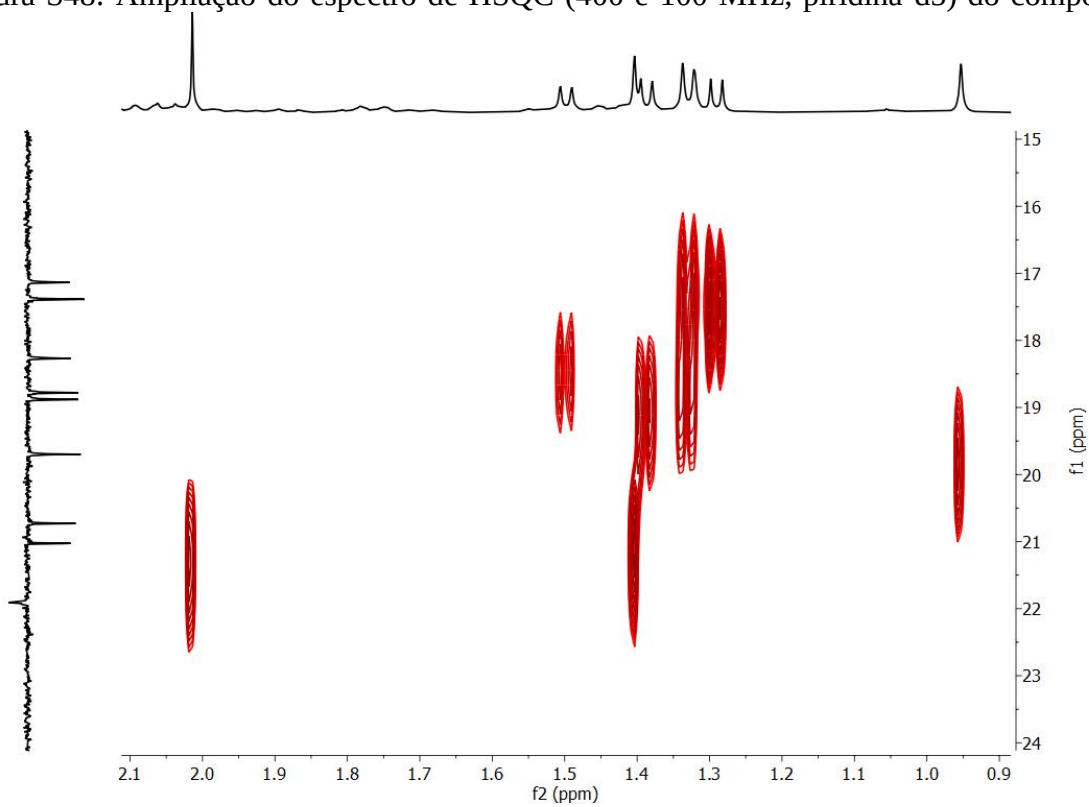
Figura S45: Ampliação do espectro de HSQC (400 e 100 MHz, piridina-d5) do composto **3**Figura S46: Ampliação do espectro HSQC (400 e 100 MHz, piridina-d5) do composto **3**

Figura S47: Ampliação do espectro de HSQC (400 e 100 MHz, piridina-d₅) do composto **3**Figura S48: Ampliação do espectro de HSQC (400 e 100 MHz, piridina-d₅) do composto **3**

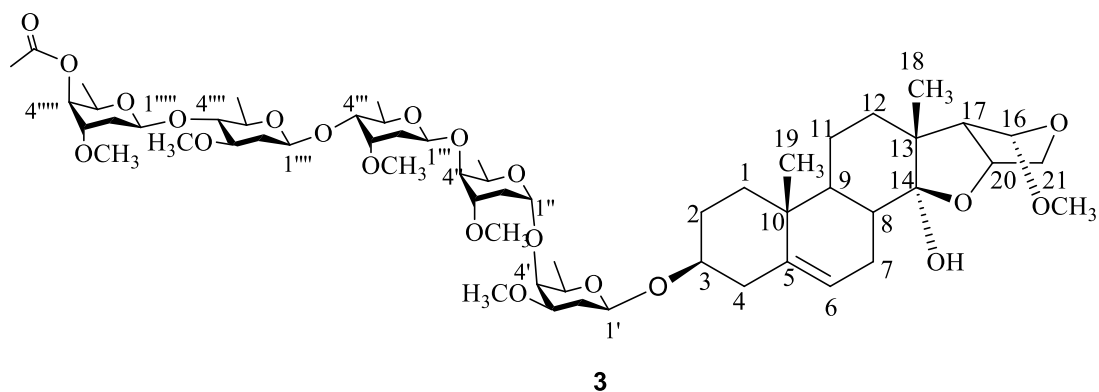


Figura S49: Espectro HMBC (400 e 100 MHz, piridina-d5) do composto 3

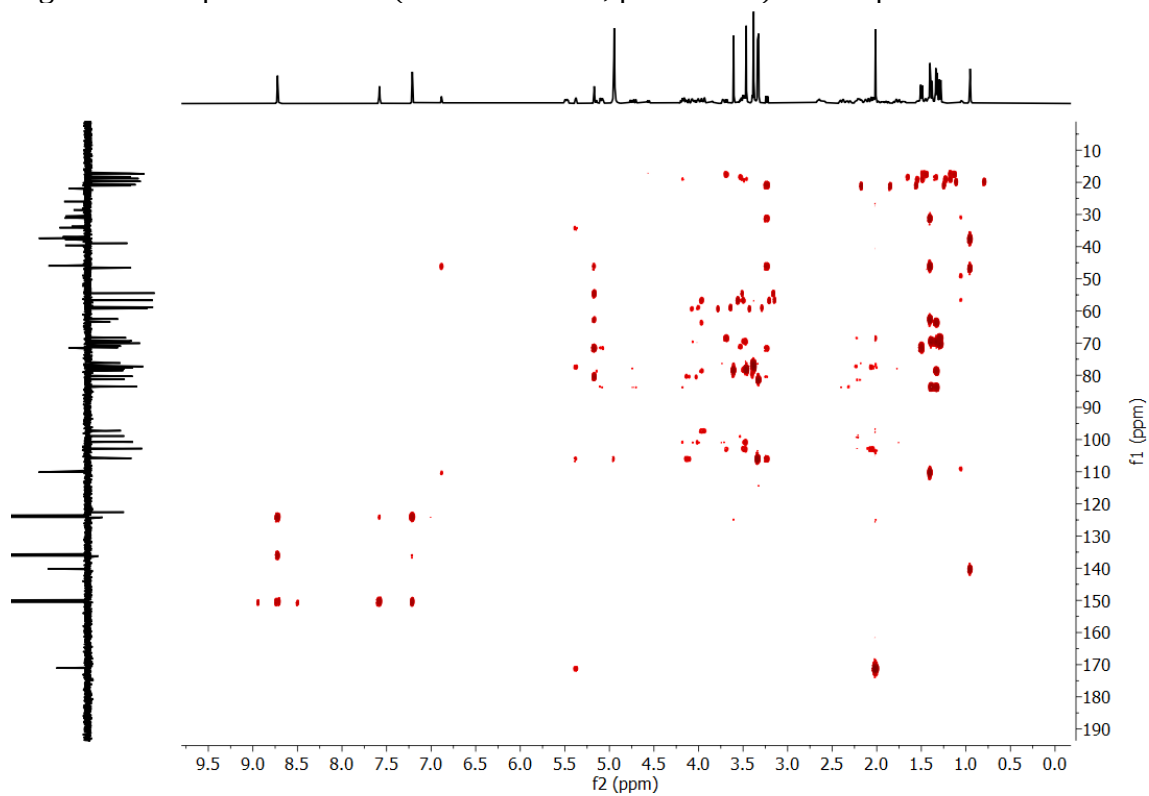


Figura S50: Ampliação do espectro HMBC (400 e 100 MHz, piridina-d5) do composto 3

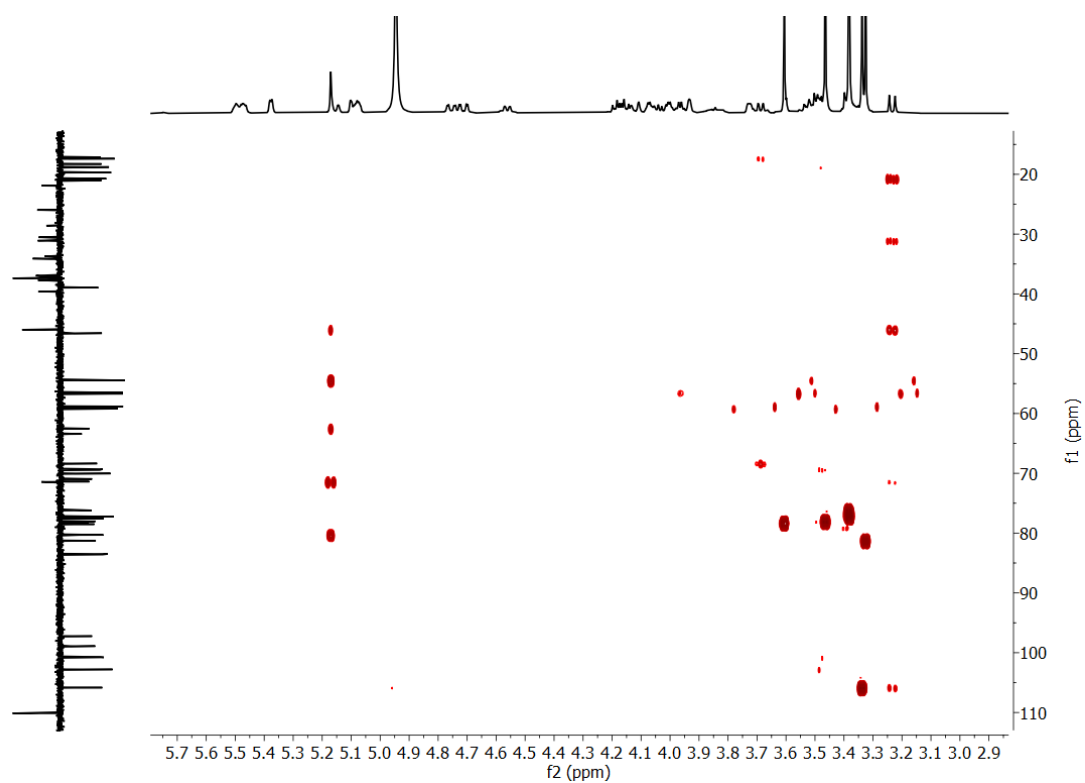
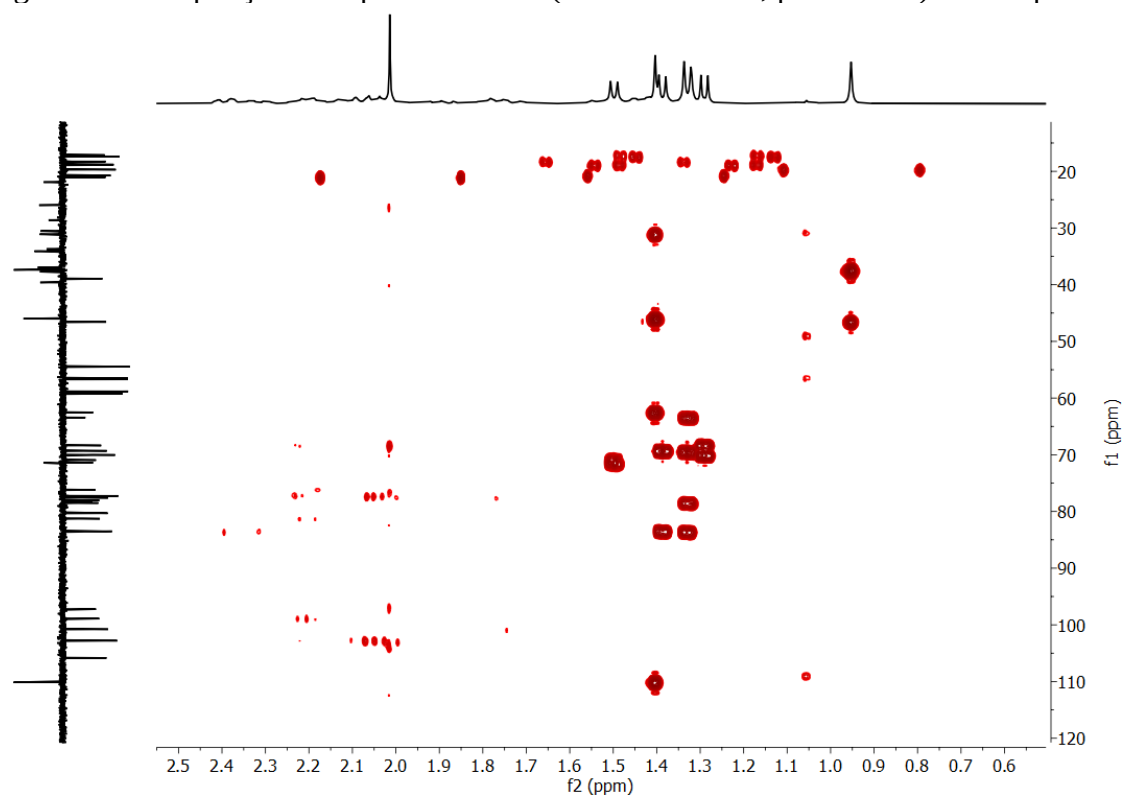


Figura S51: Ampliação do espectro HMBC (400 e 100 MHz, piridina-d₅) do composto 3



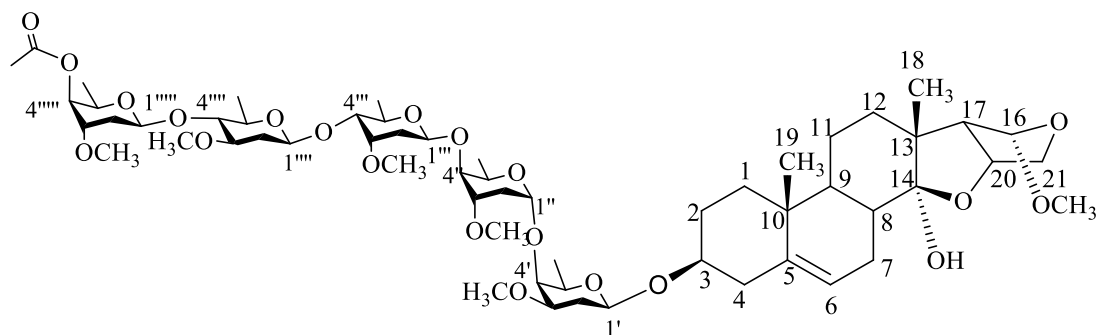


Figura S52: Espectro COSY (400 MHz, piridina-d5) do composto 3

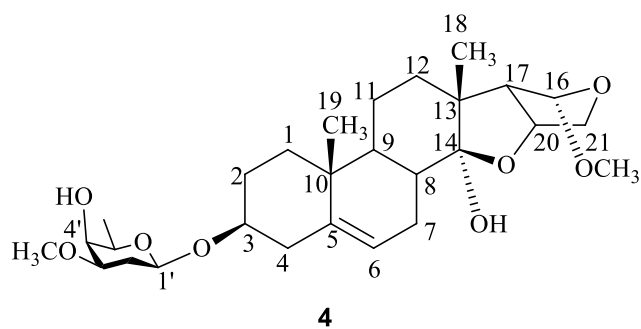
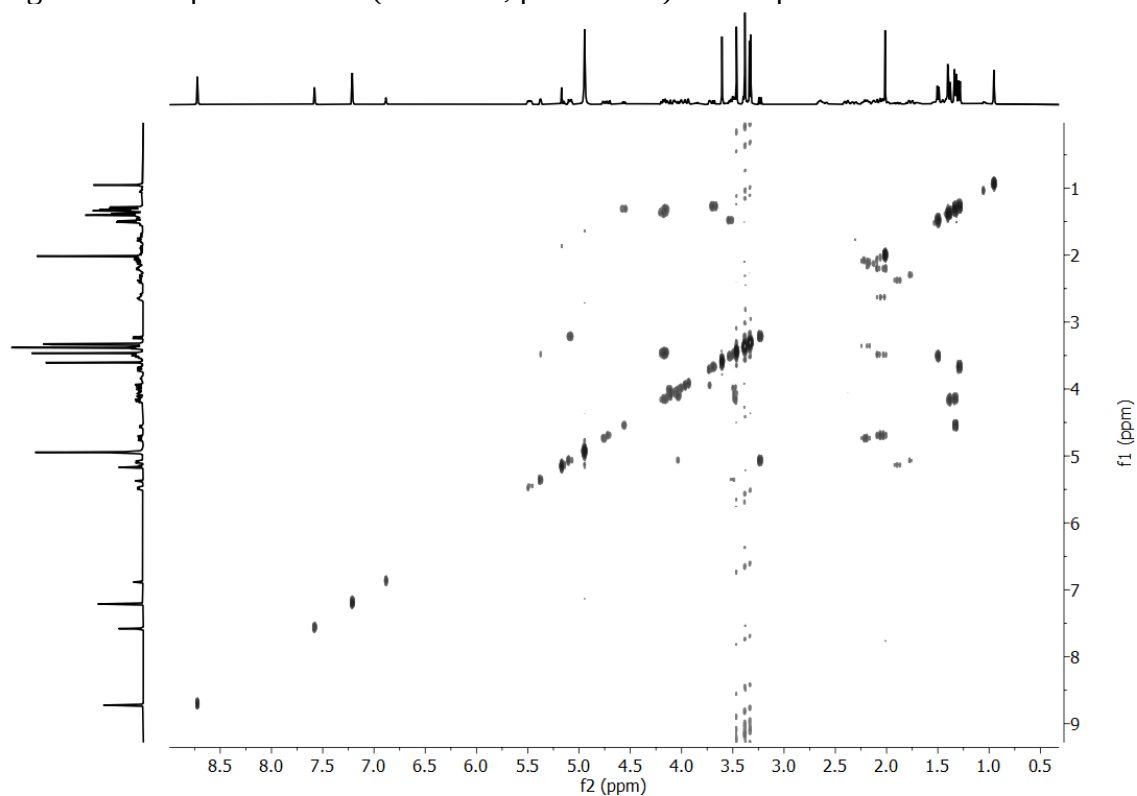


Figura S53: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, piridina- d_5) do composto 4

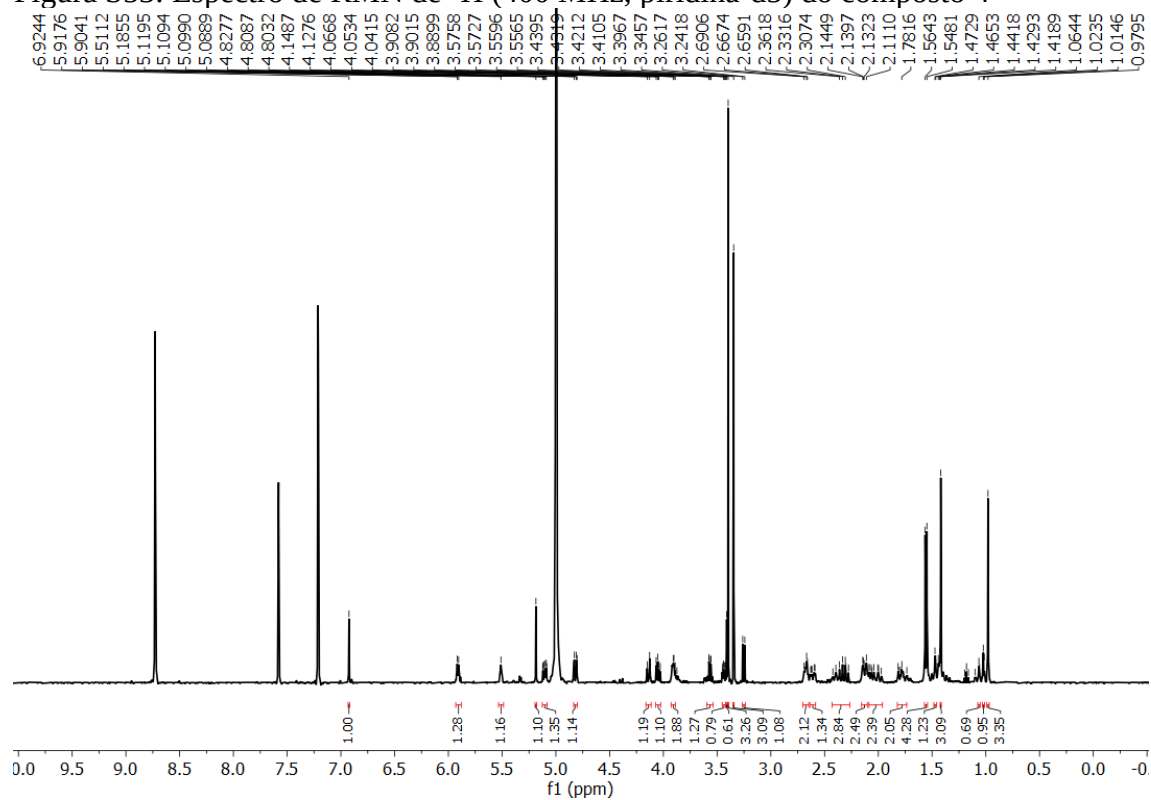


Figura S54: Ampliação do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, piridina- d_5) do composto 4

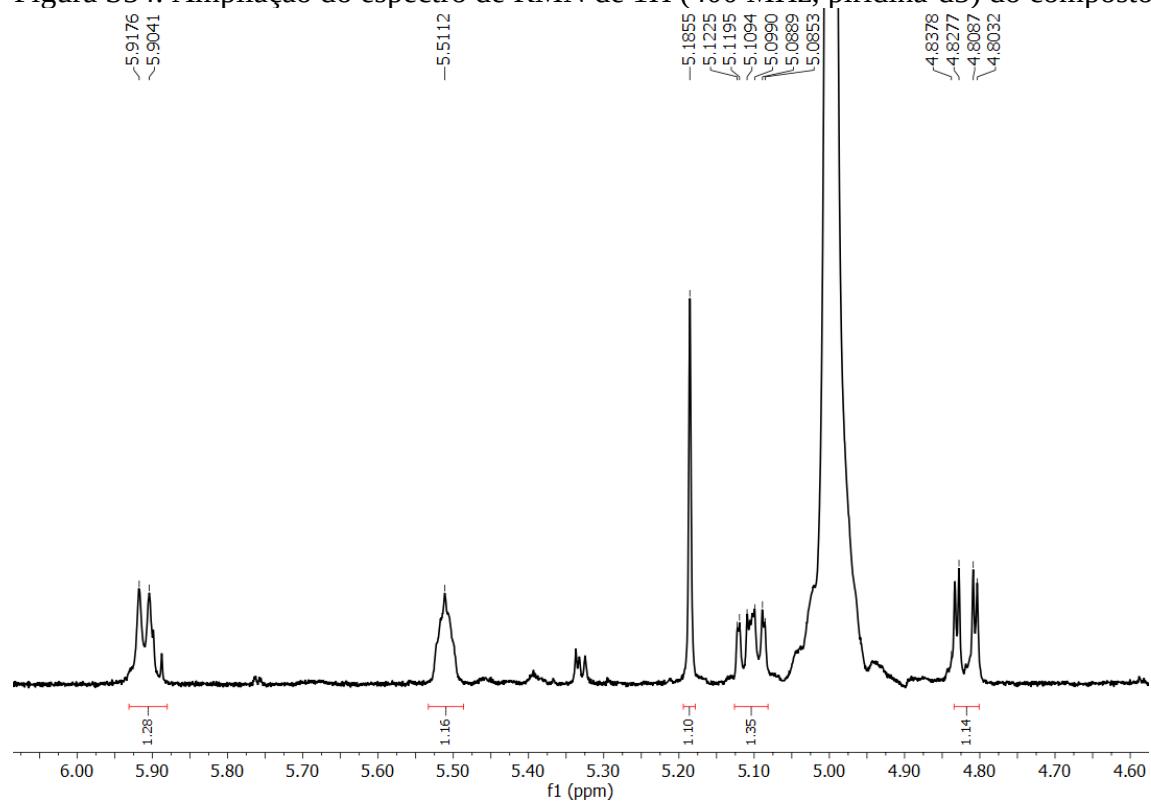


Figura S55: Ampliação do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, piridina- d_5) do composto 4

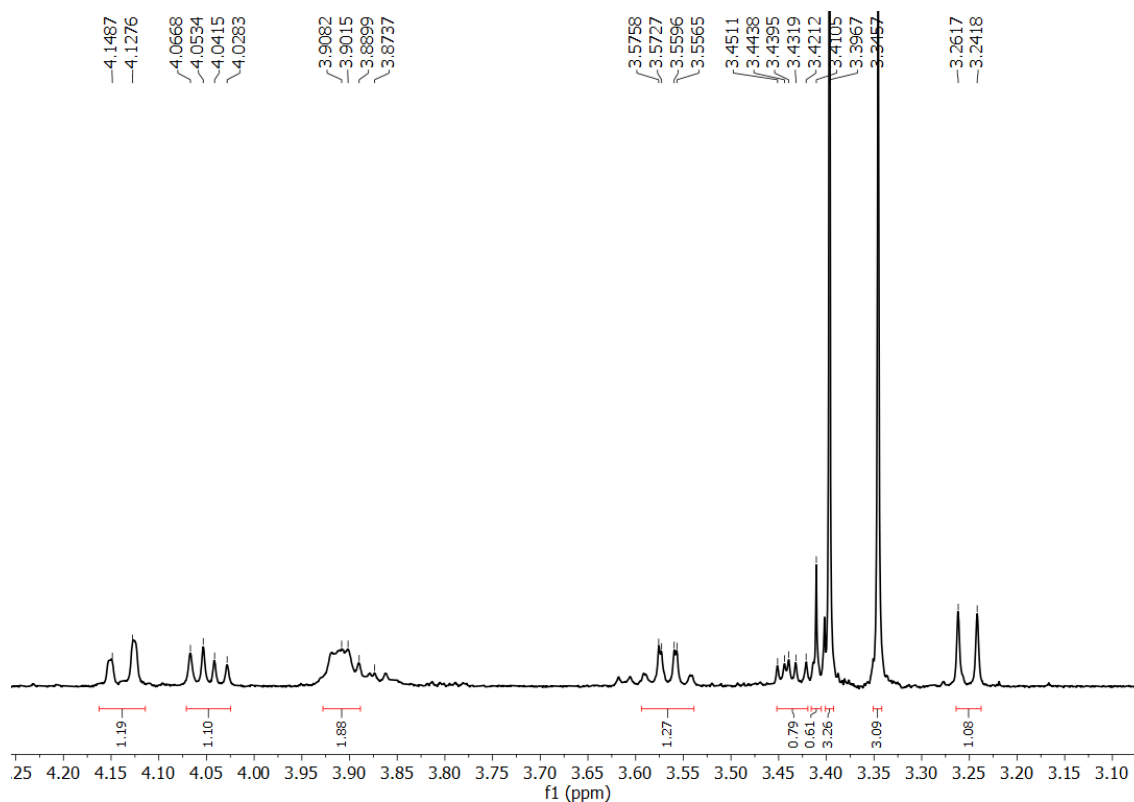
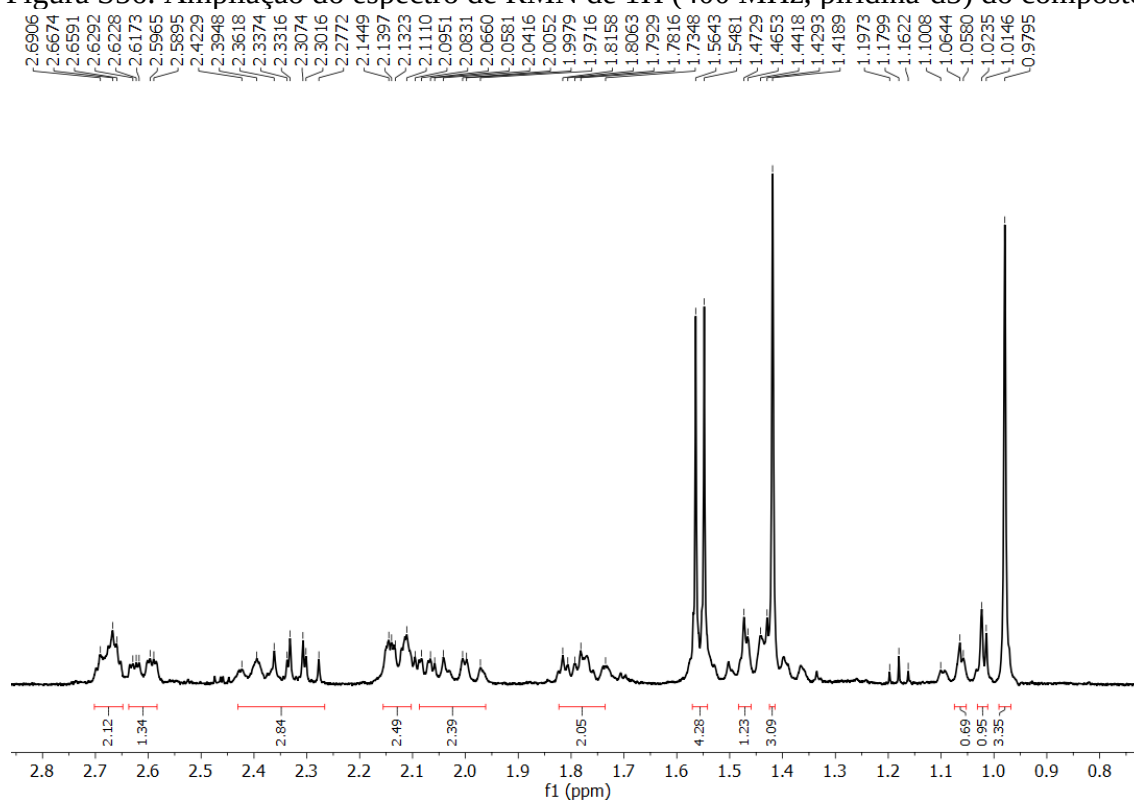


Figura S56: Ampliação do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, piridina- d_5) do composto 4



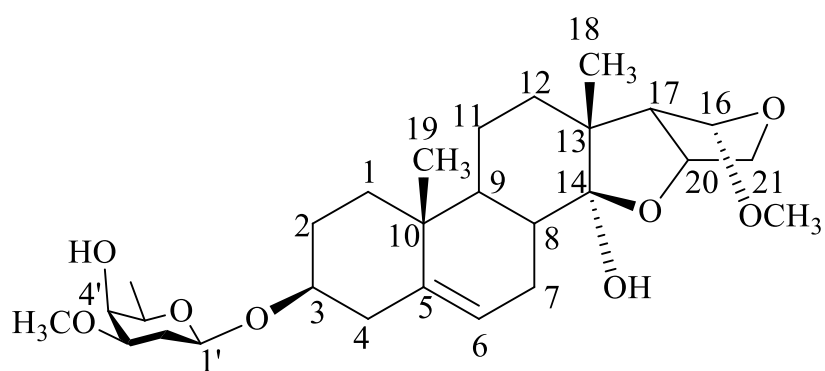


Figura S57: RMN ^{13}C de Broadband (100 MHz, piridina-d₅) do composto 4

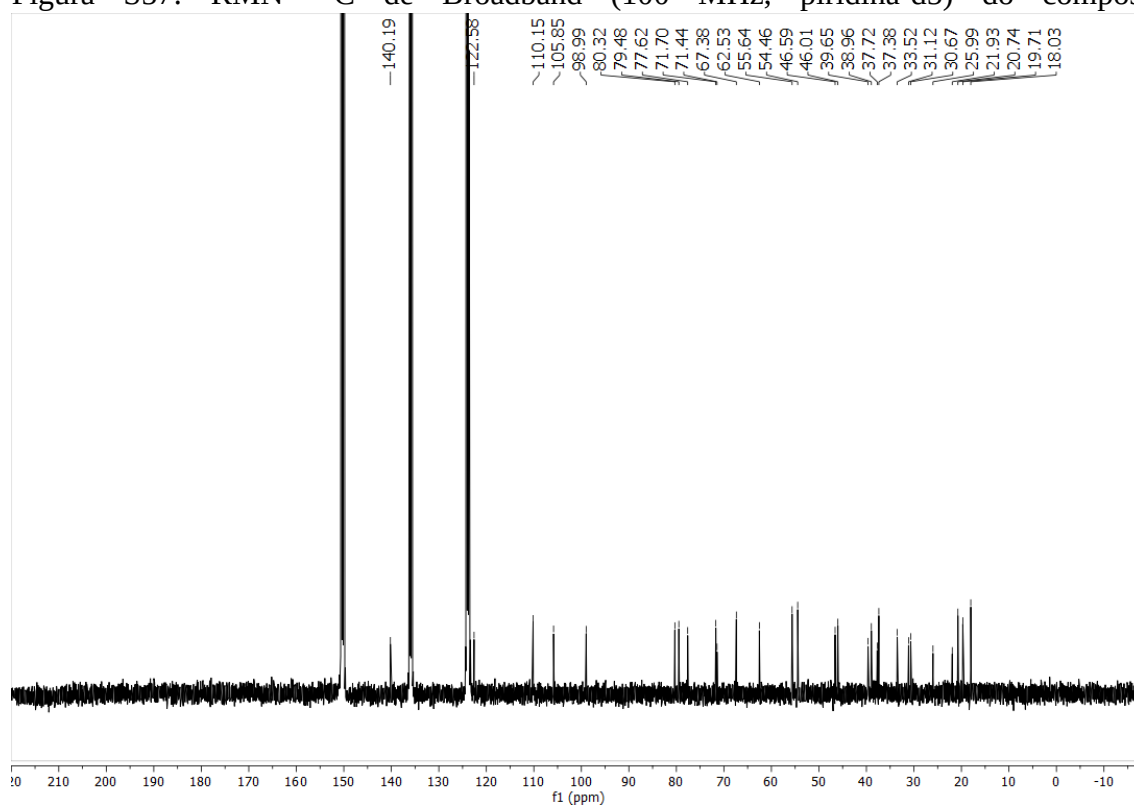


Figura S58: Espectro DEPT 135 (100 MHz, piridina-d₅) do composto 4

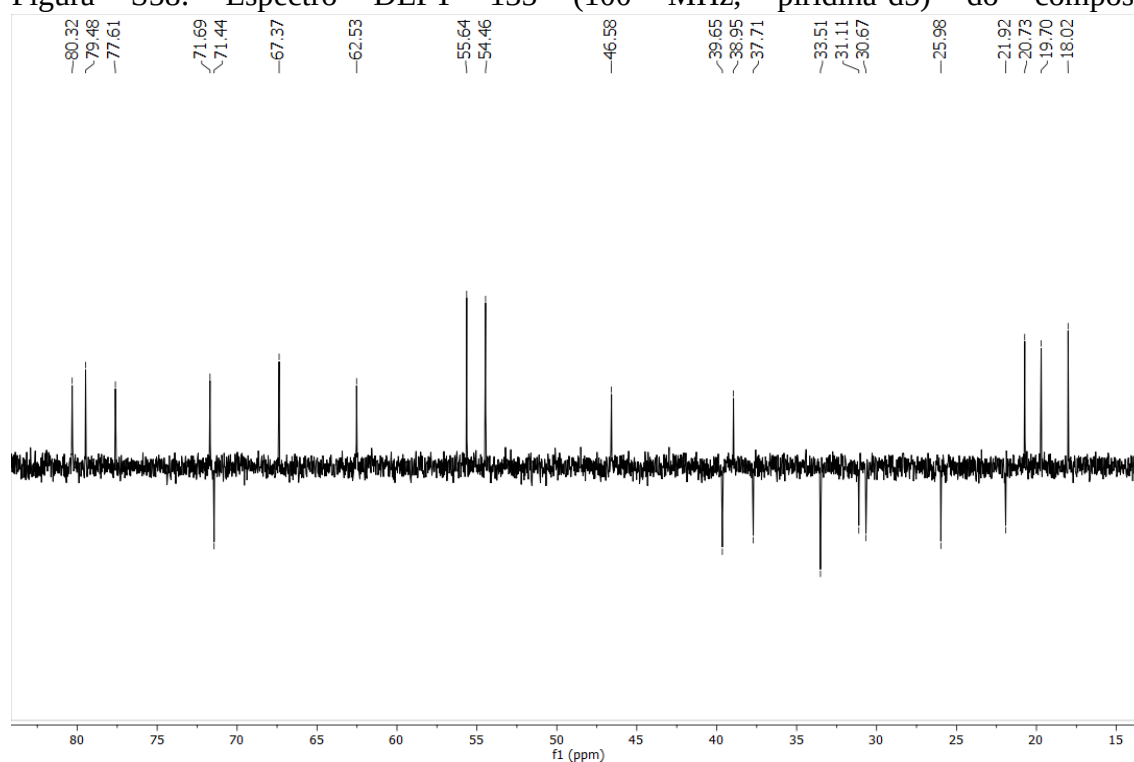


Figura S59: Expansão do espectro DEPT 135 (100 MHz, piridina-d₅) do composto 4

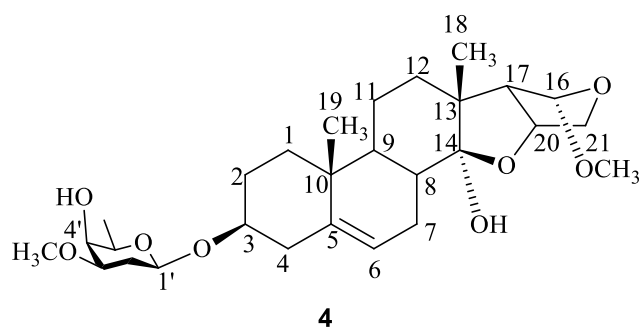
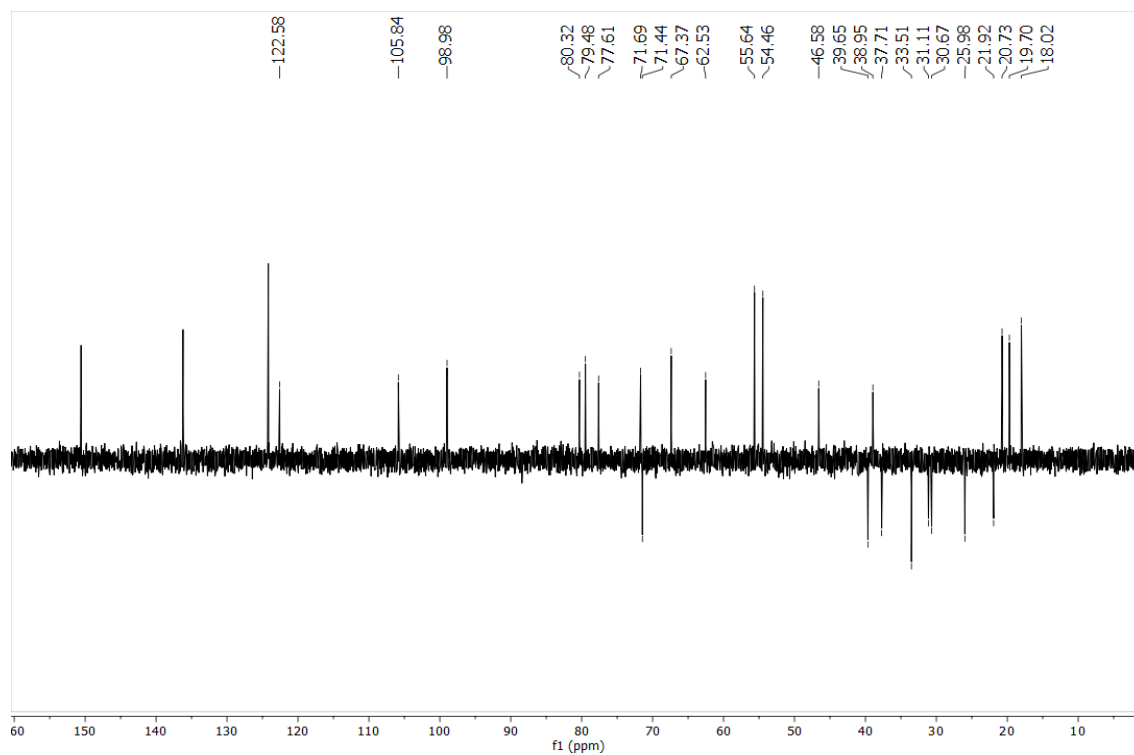


Figura S60: Espectro de HSQC (400 e 100 MHz, piridina-d₅) do composto 4

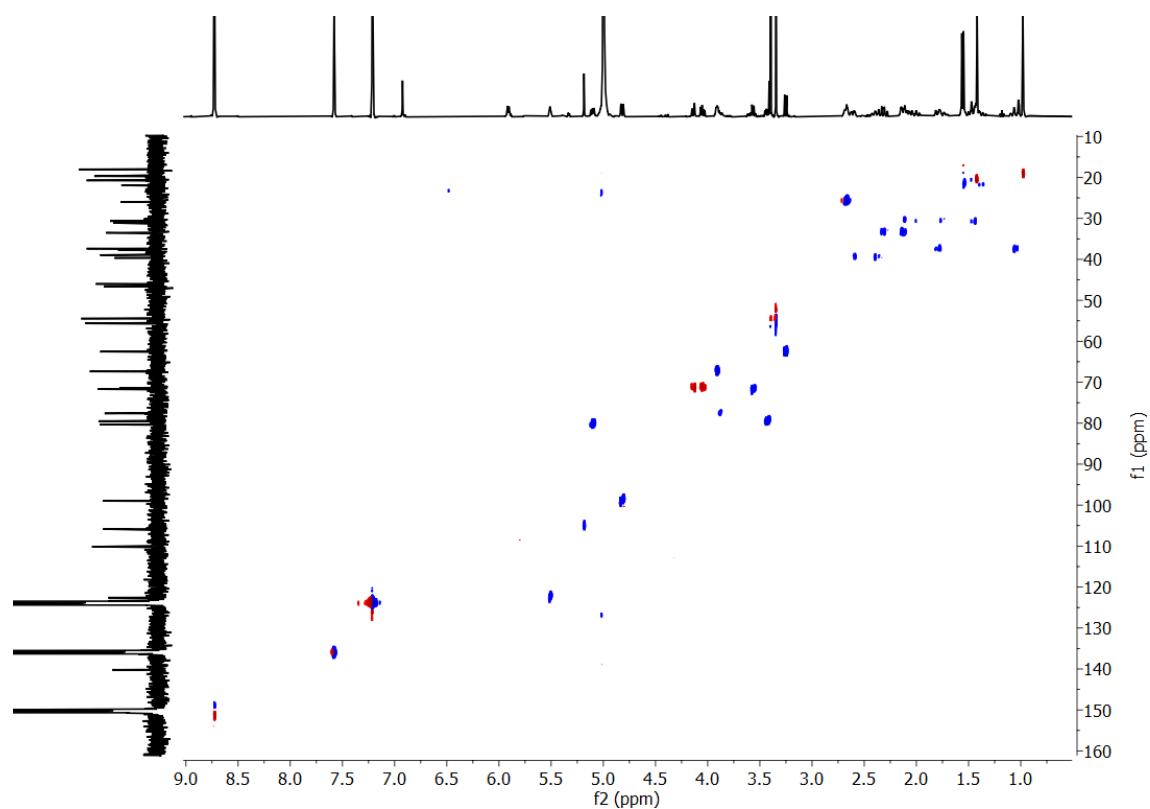


Figura S61: Expansão do espectro HSQC (400 e 100 MHz, piridina-d₅) do composto 4

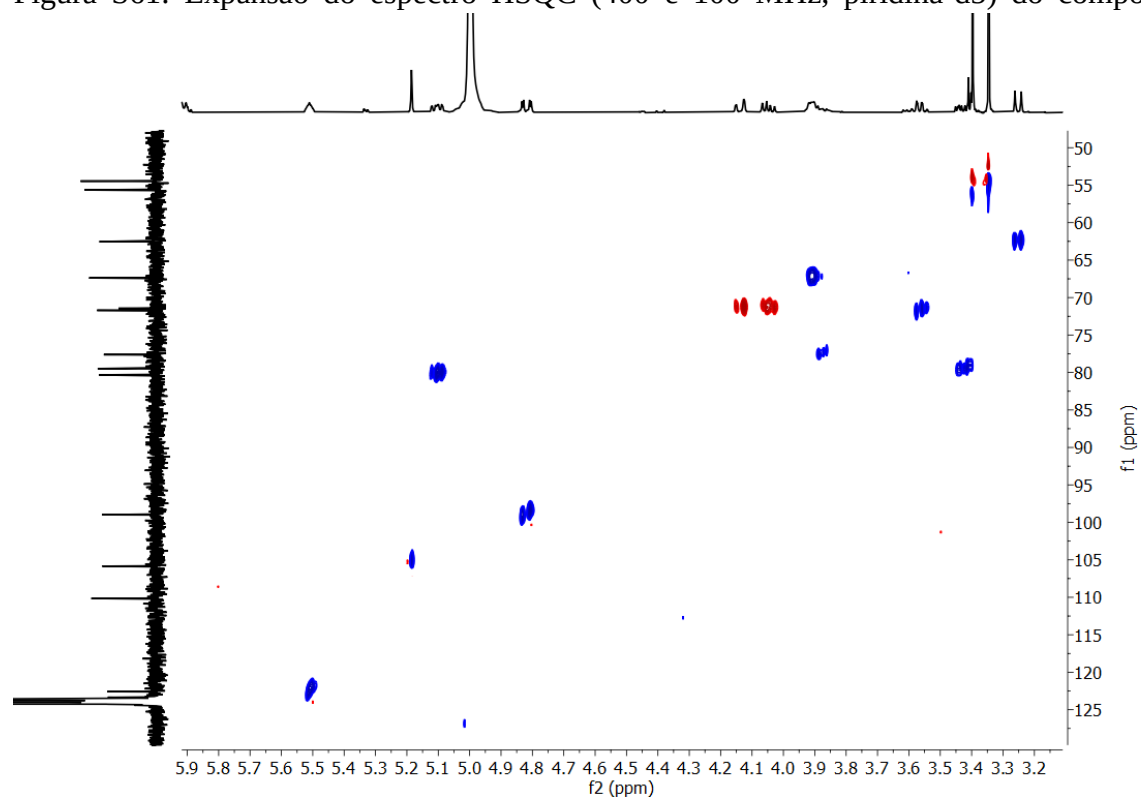


Figura S62: Expansão do espectro HSQC (400 e 100 MHz, piridina-d₅) do composto 4

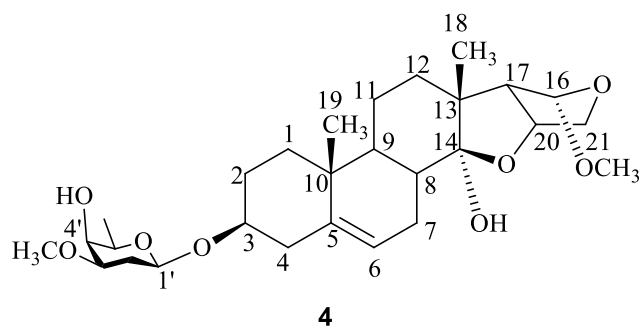
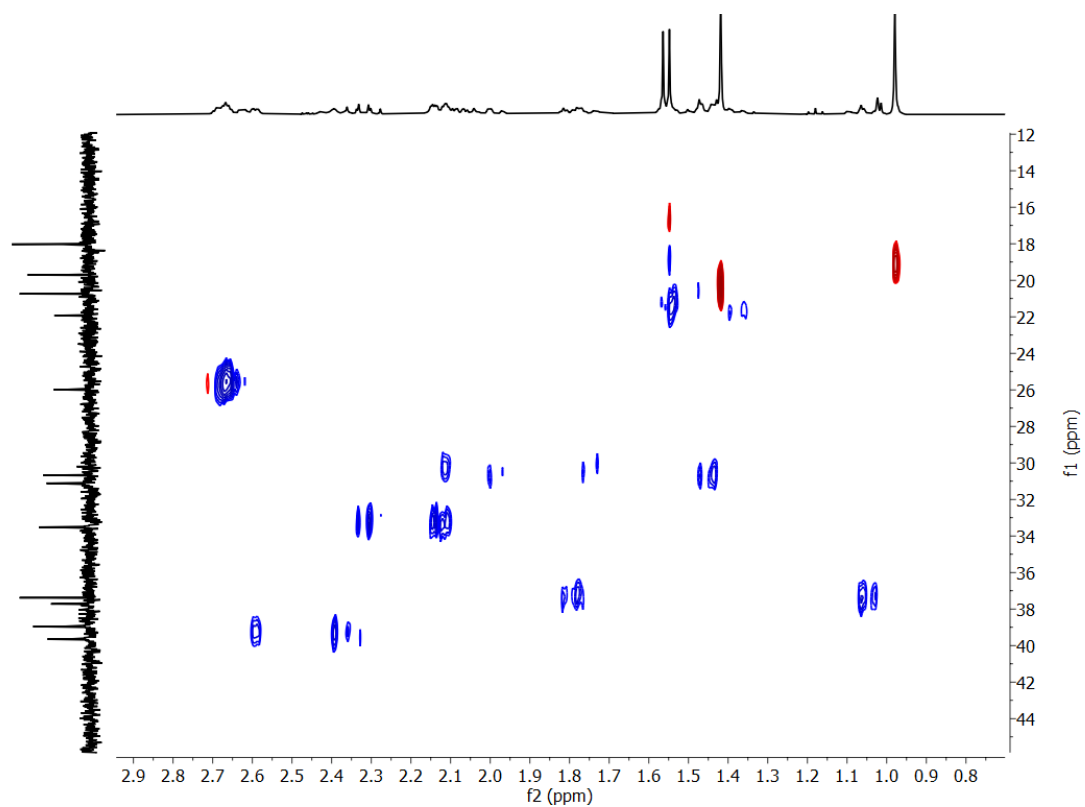


Figura S63: Espectro HMBC (400 e 100 MHz, piridina-d₅) do composto 4

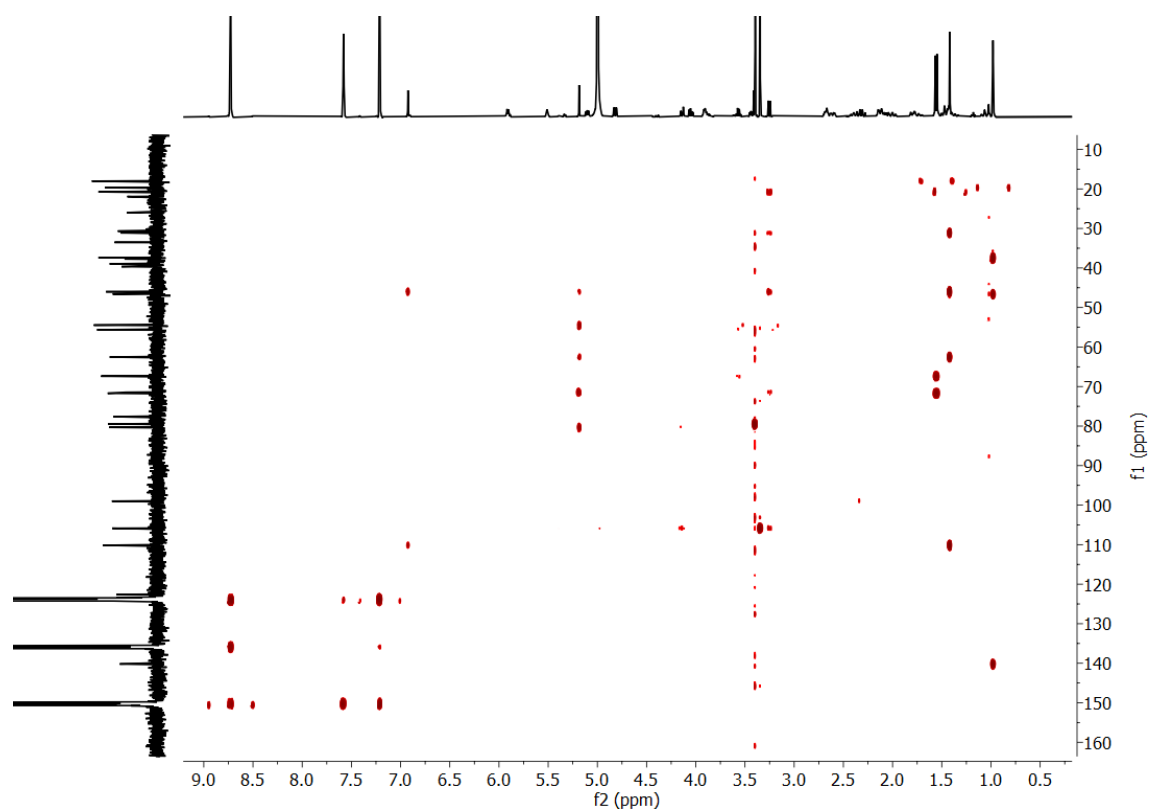


Figura S64: Expansão do espectro HMBC (400 e 100 MHz, piridina-d5) do composto 4

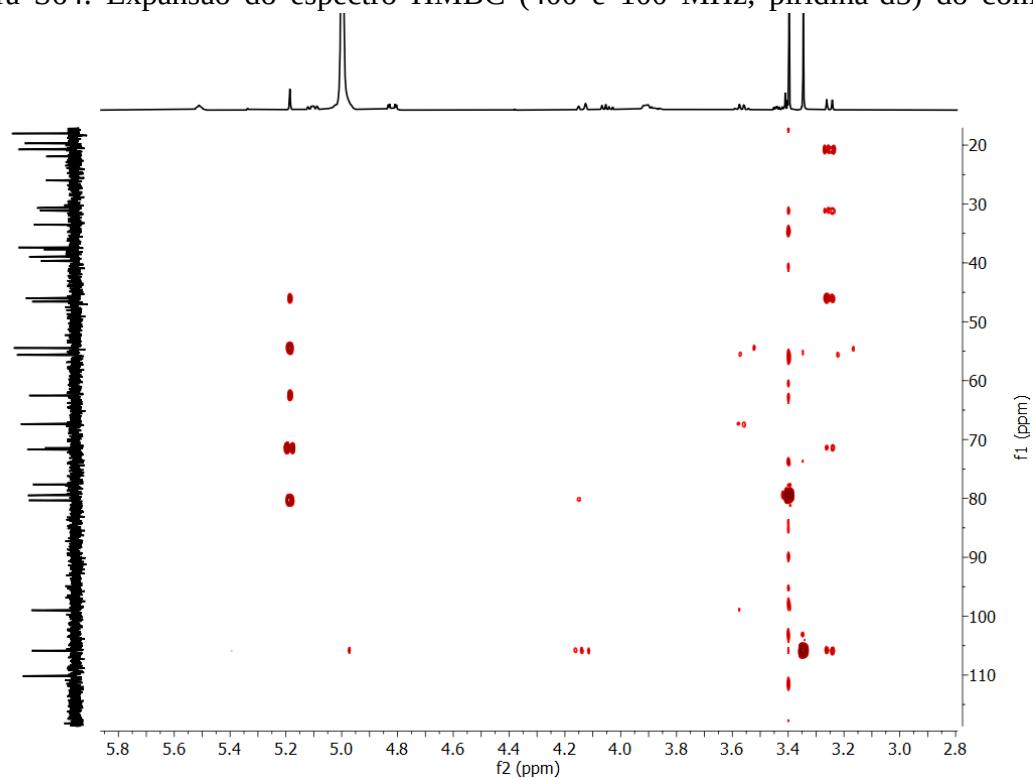


Figura S65: Expansão do espectro HMBC (400 e 100 MHz, piridina-d5) do composto 4

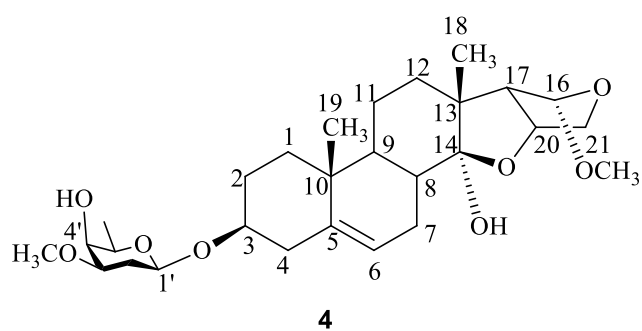
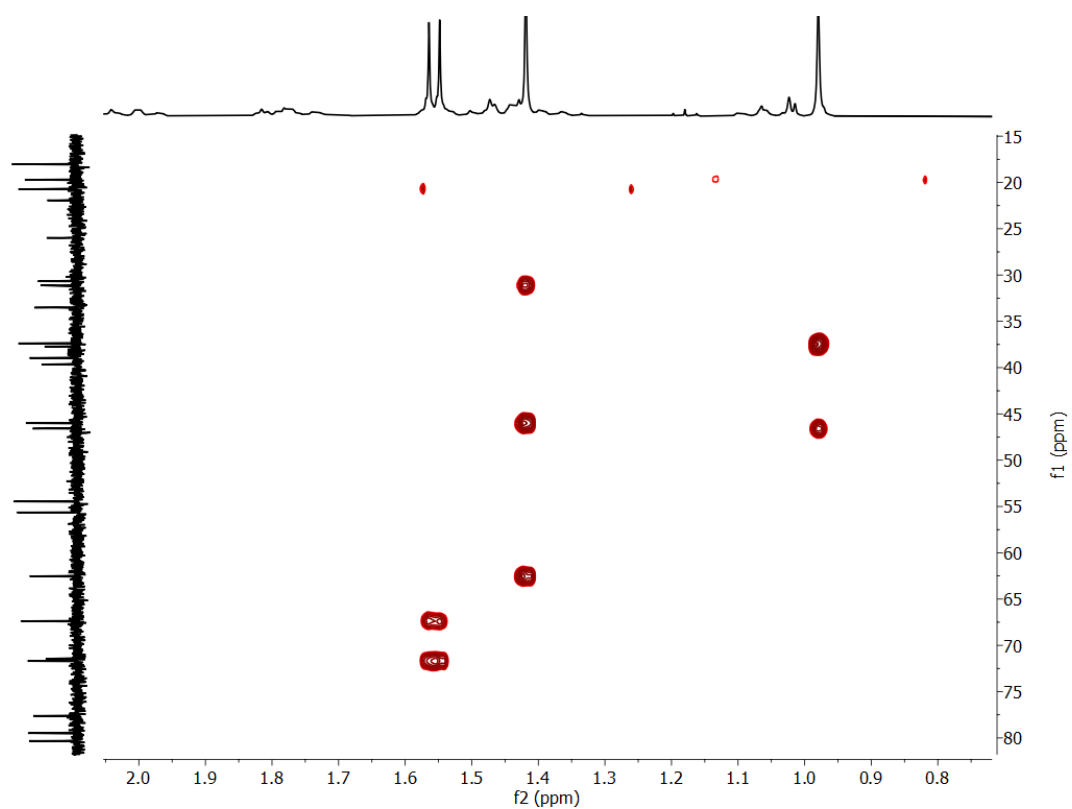


Figura S66: Espectro COSY (400 MHz, piridina-d5) do composto 4

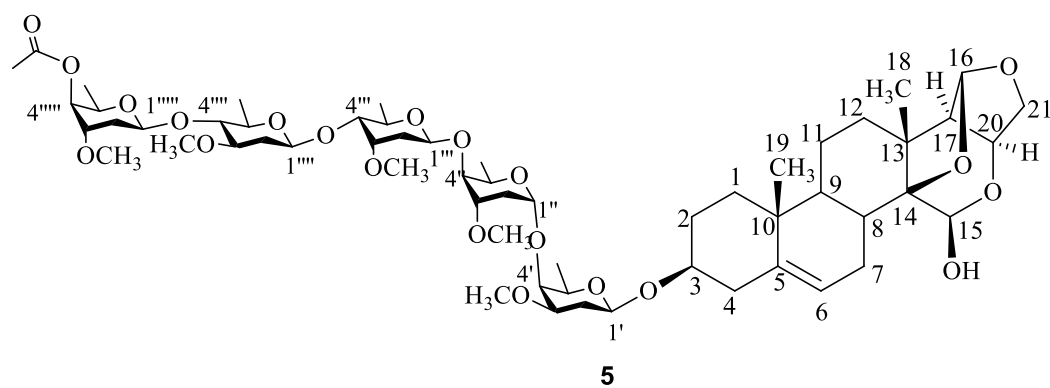
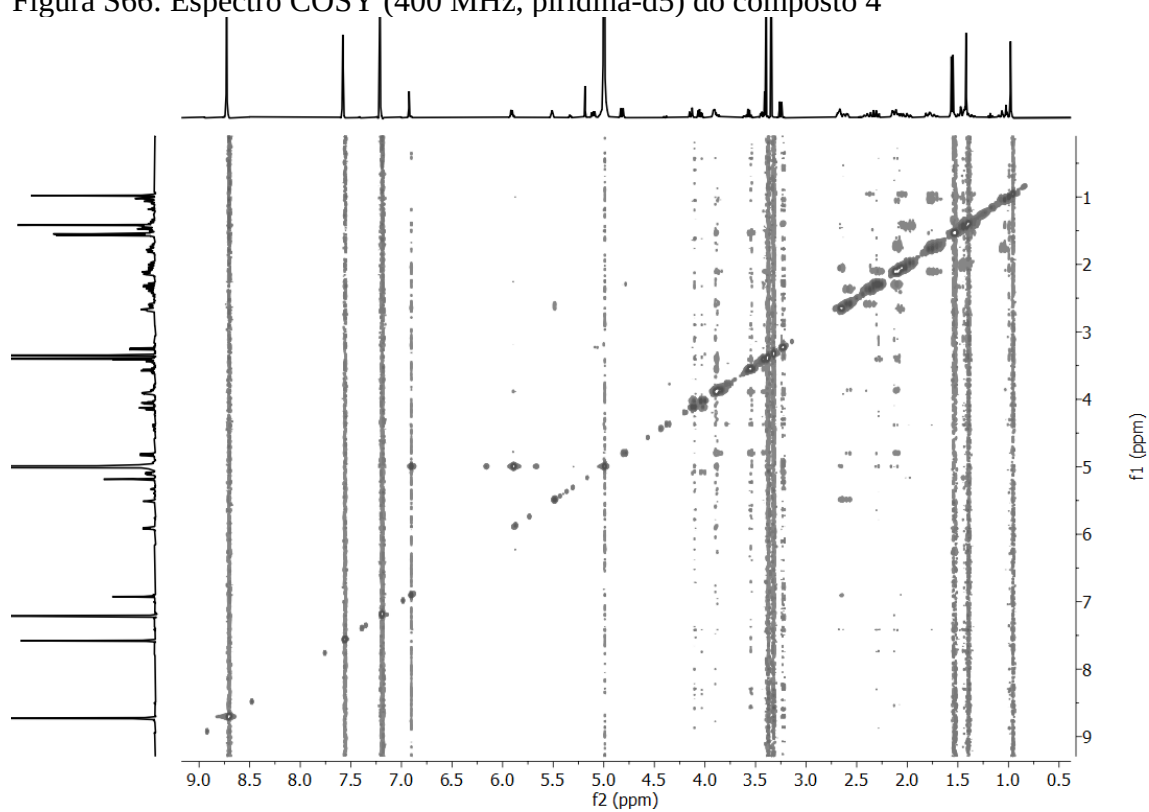
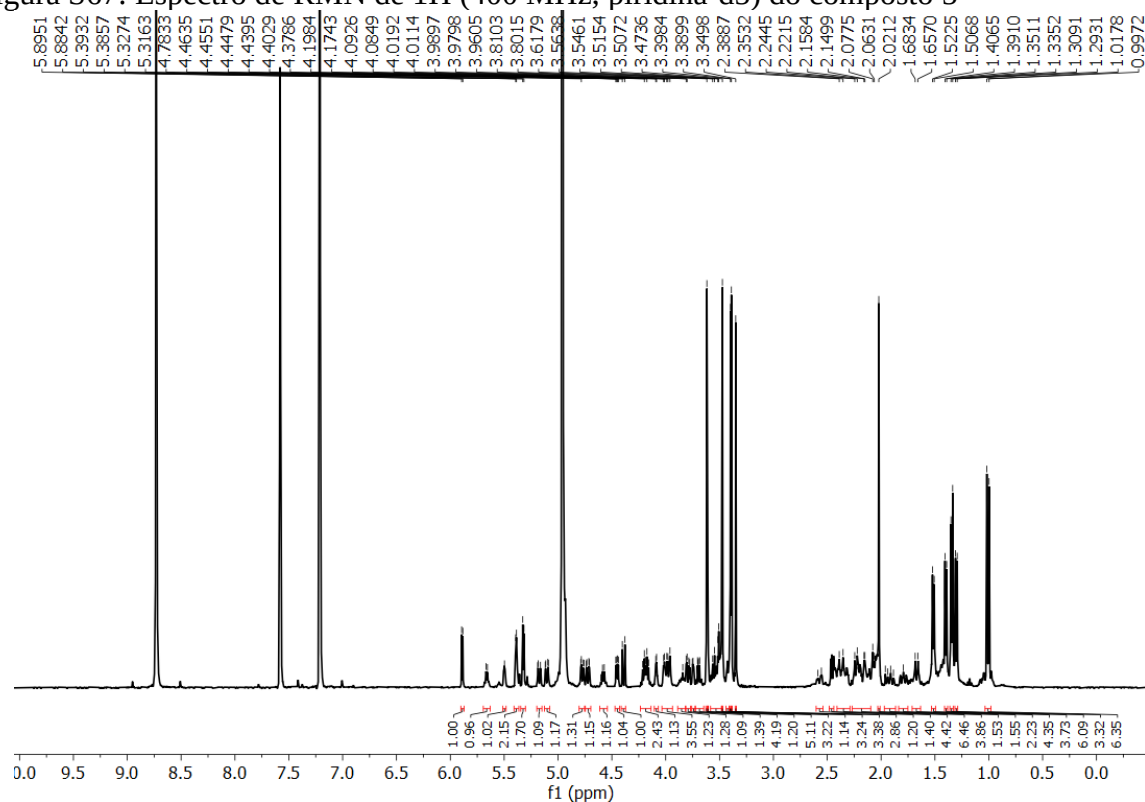
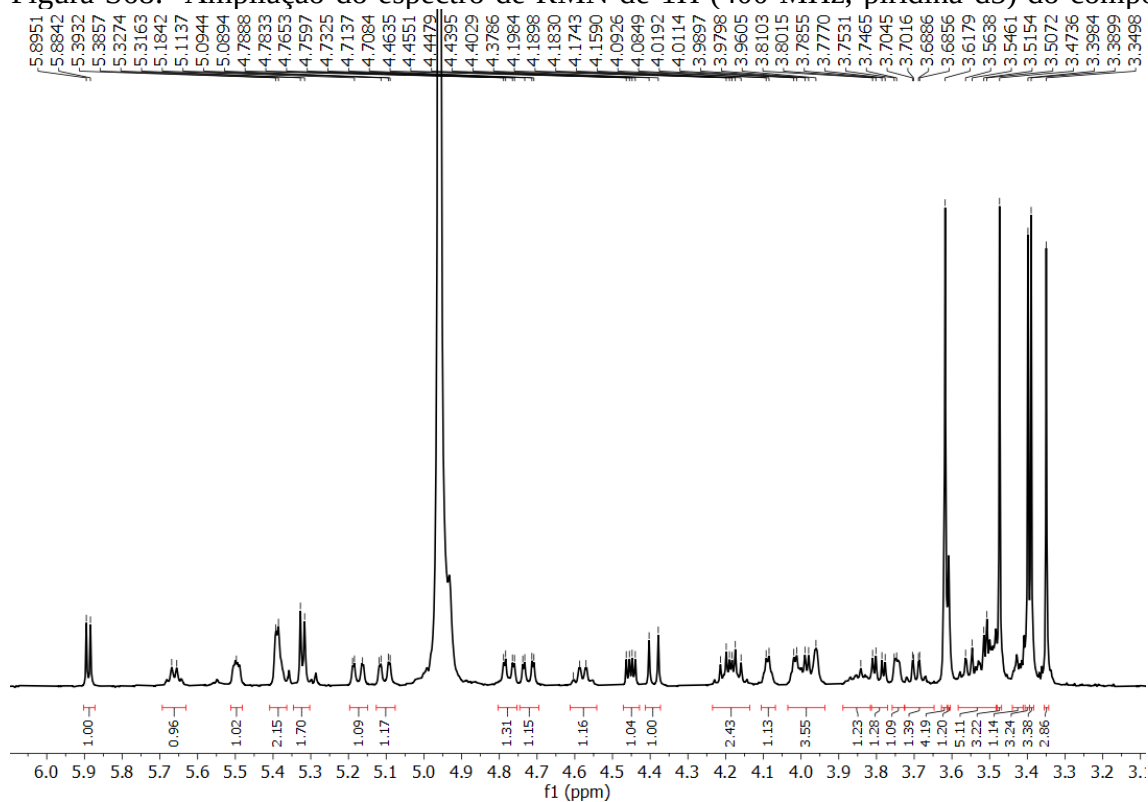


Figura S67: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, piridina- d_5) do composto 5Figura S68: Ampliação do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, piridina- d_5) do composto 5Figura S69: Ampliação do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, piridina- d_5) do composto 5

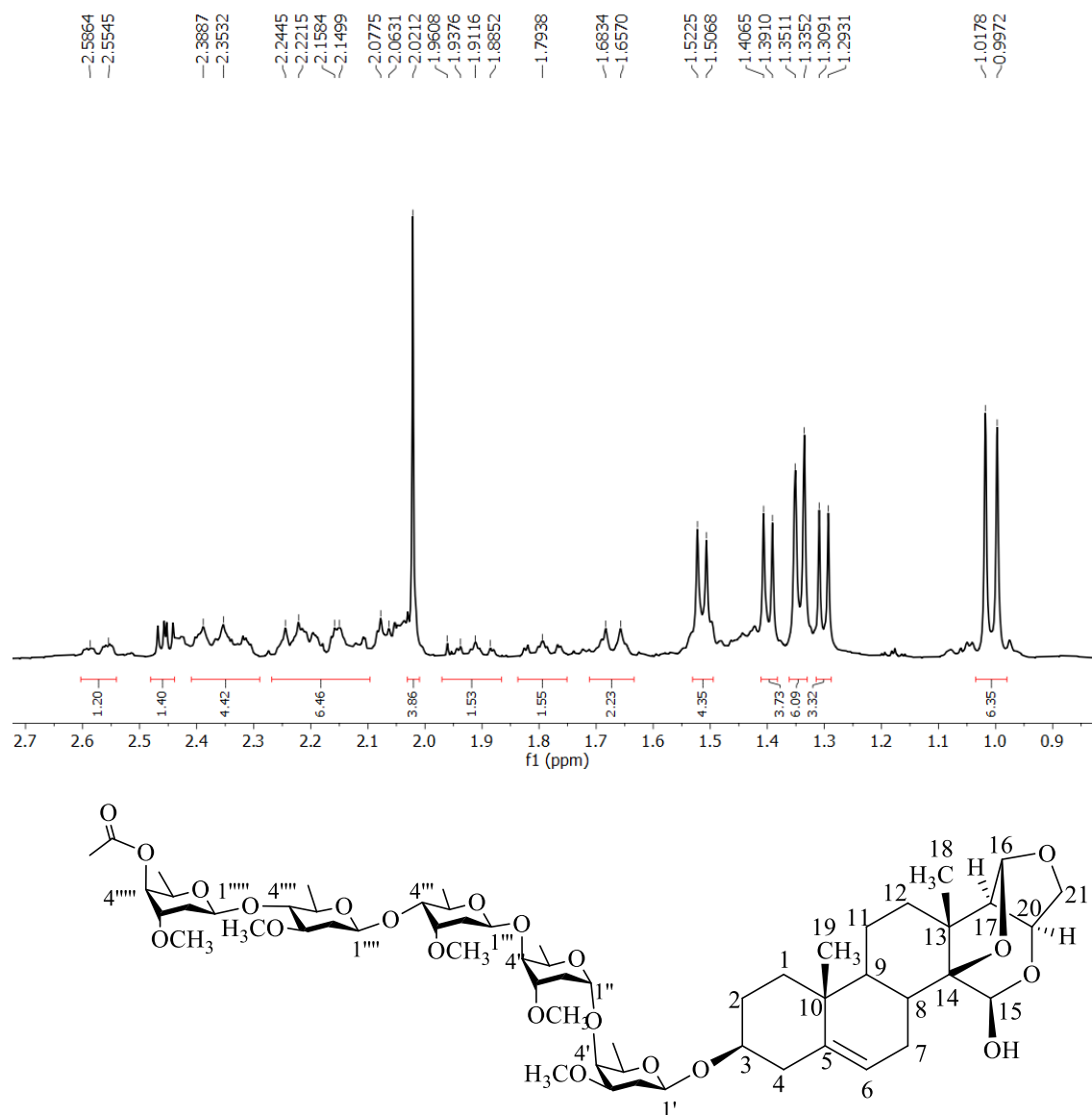


Figura S70: Espectro de RMN de ¹³C (100 MHz, piridina-d₅) do composto 5

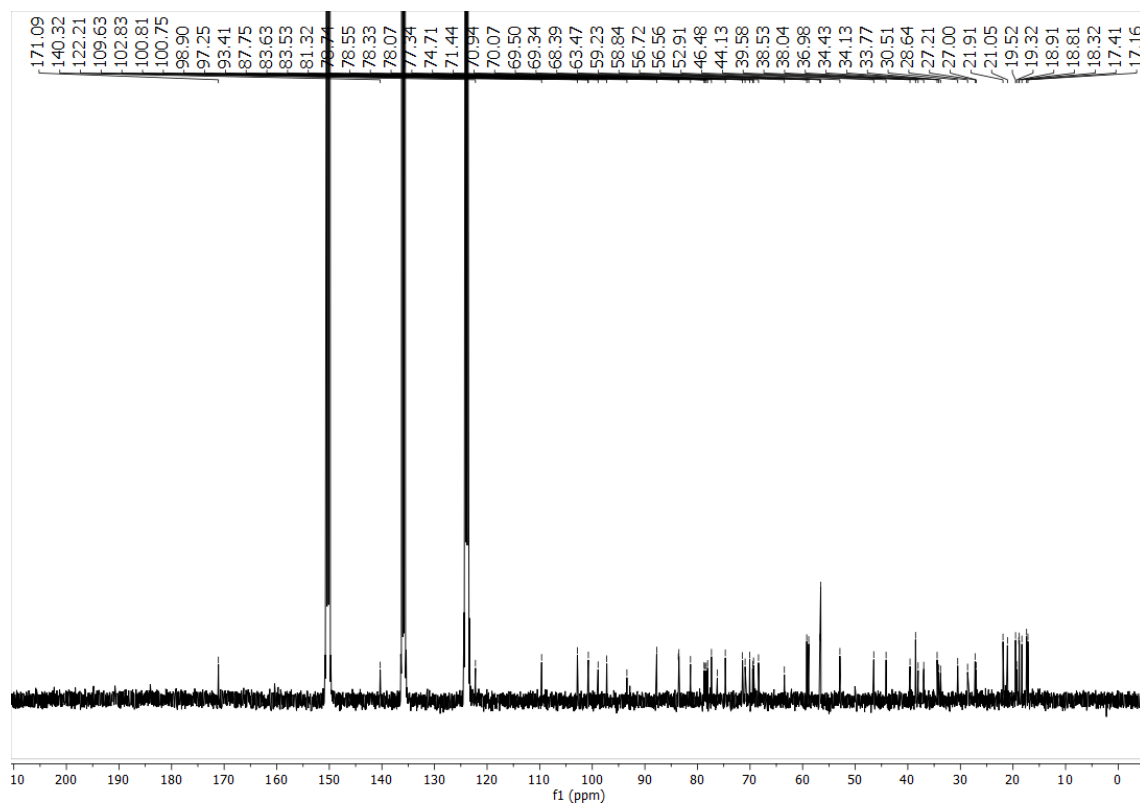


Figura S71: Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, piridina- d_5) do composto 5

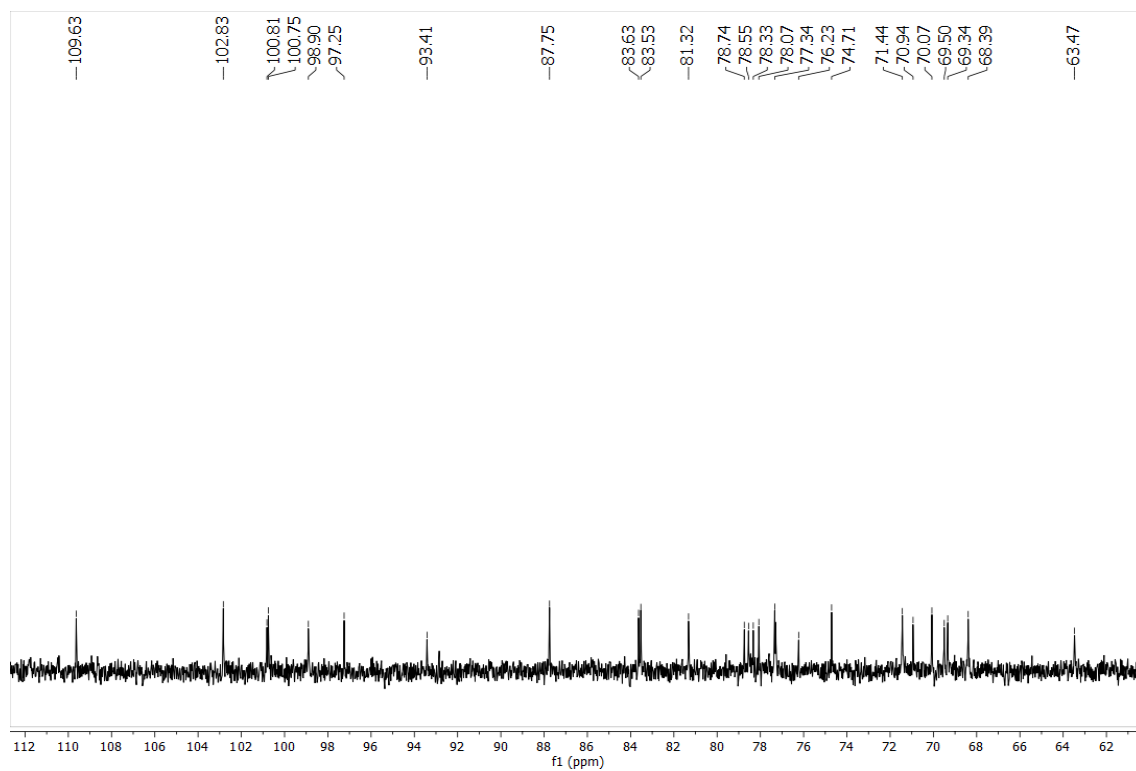


Figura S72: Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, piridina- d_5) do composto 5

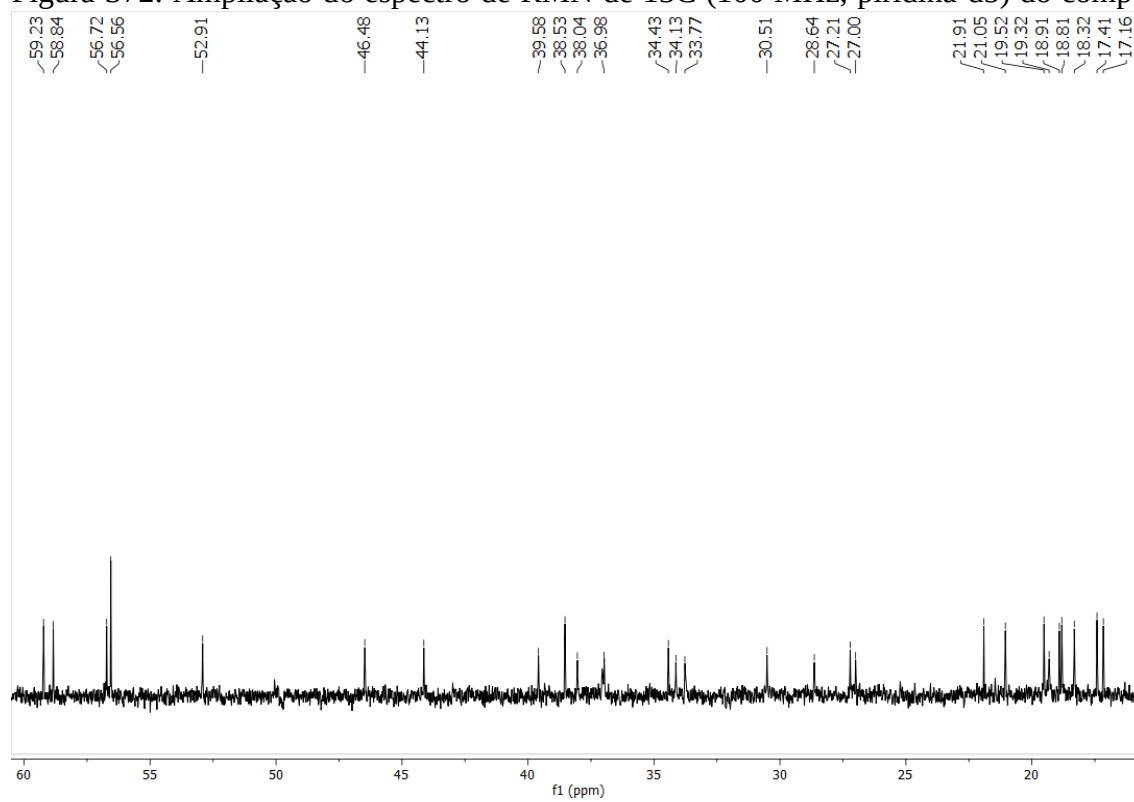


Figura S73: Espectro DEPT (100 MHz, piridina-d5) do composto 5

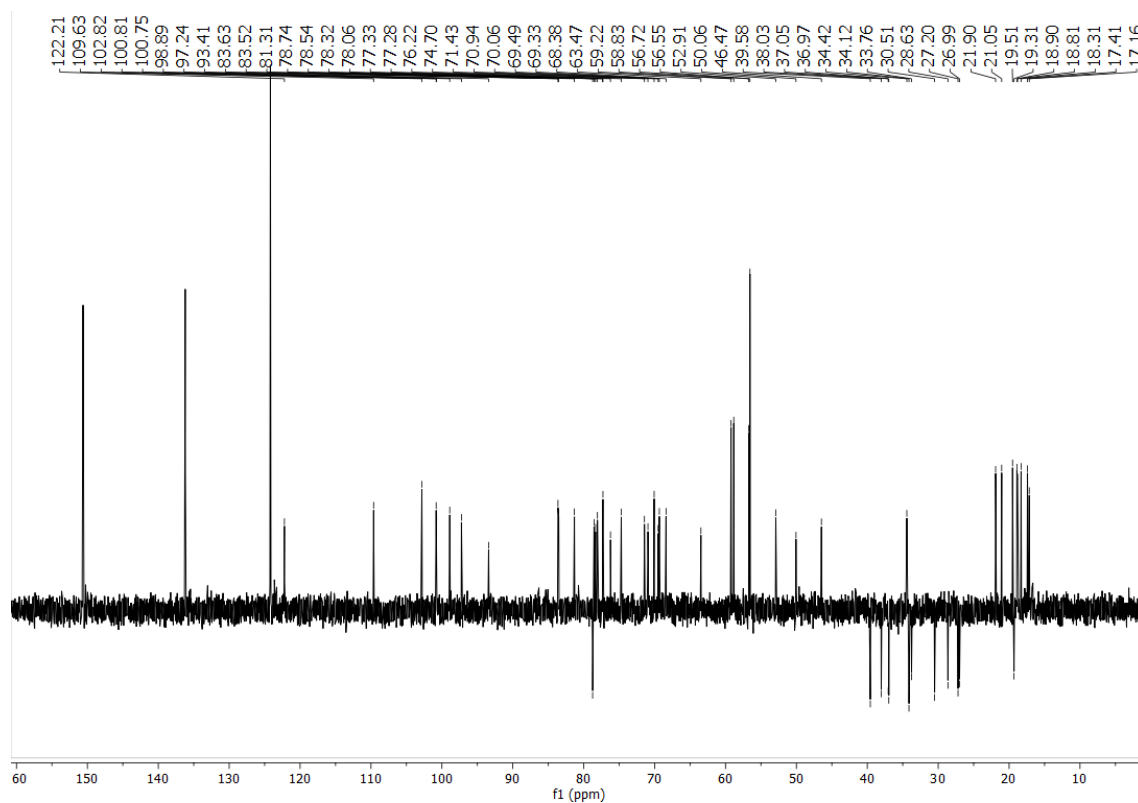
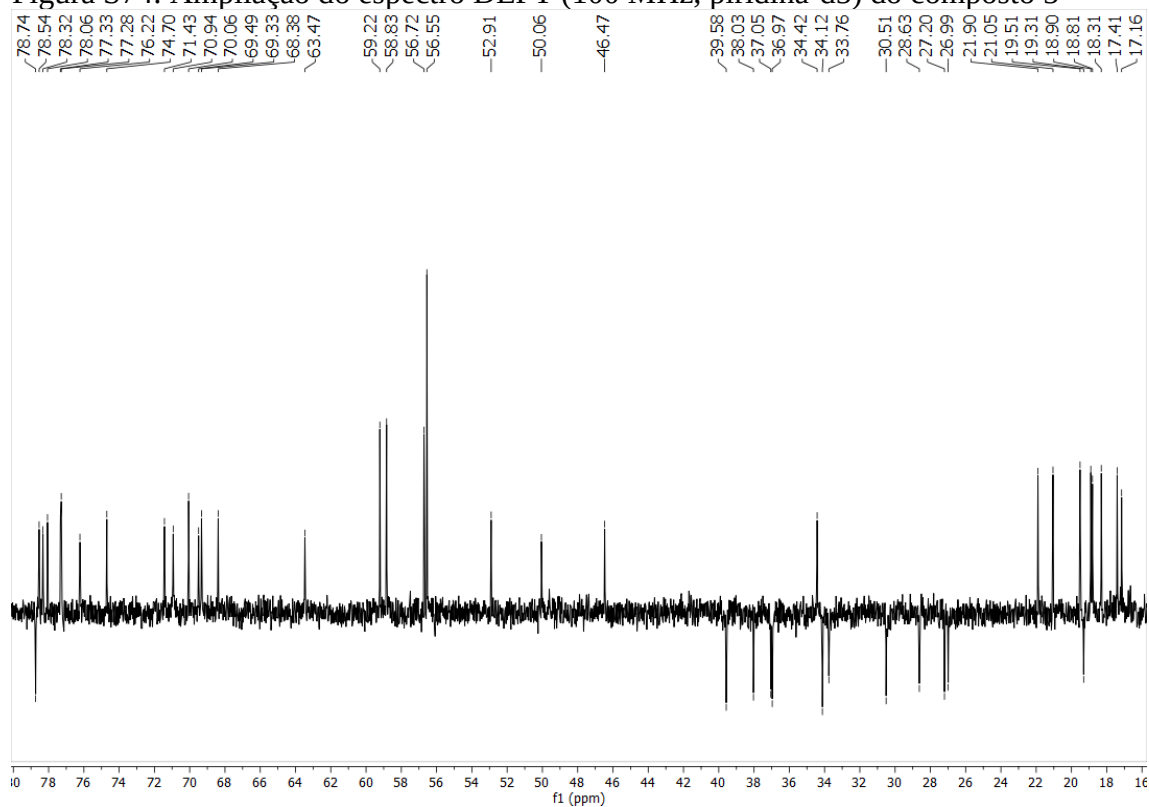


Figura S74: Ampliação do espectro DEPT (100 MHz, piridina-d5) do composto 5



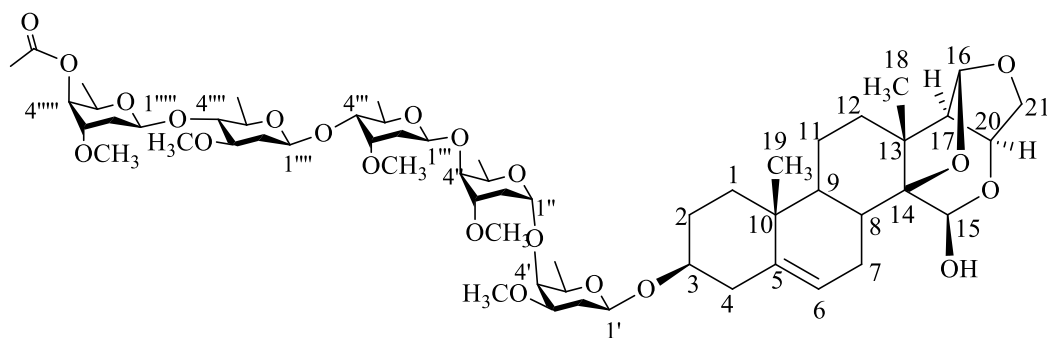


Figura S75: Espectro de HSQC (400 e 100 MHz, piridina-d₅) do composto 5

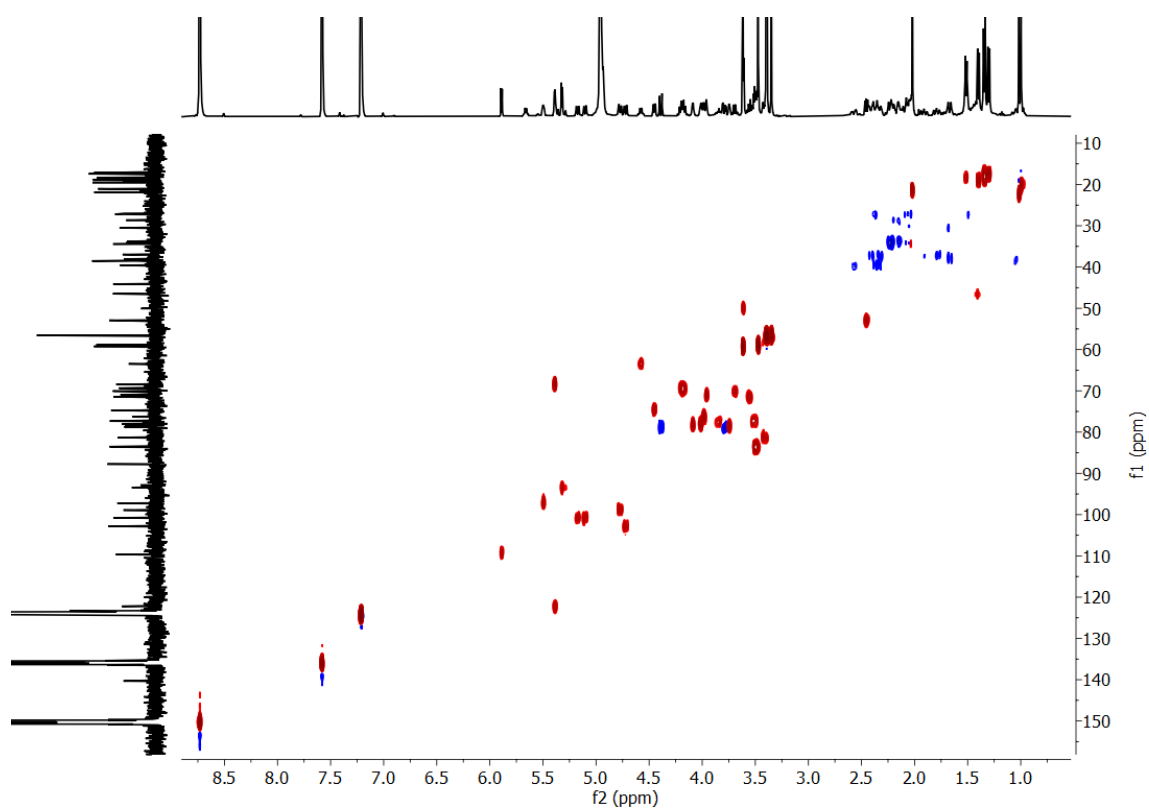


Figura S76: Espectro de HSQC (400 e 100 MHz, piridina-d₅) do composto 5

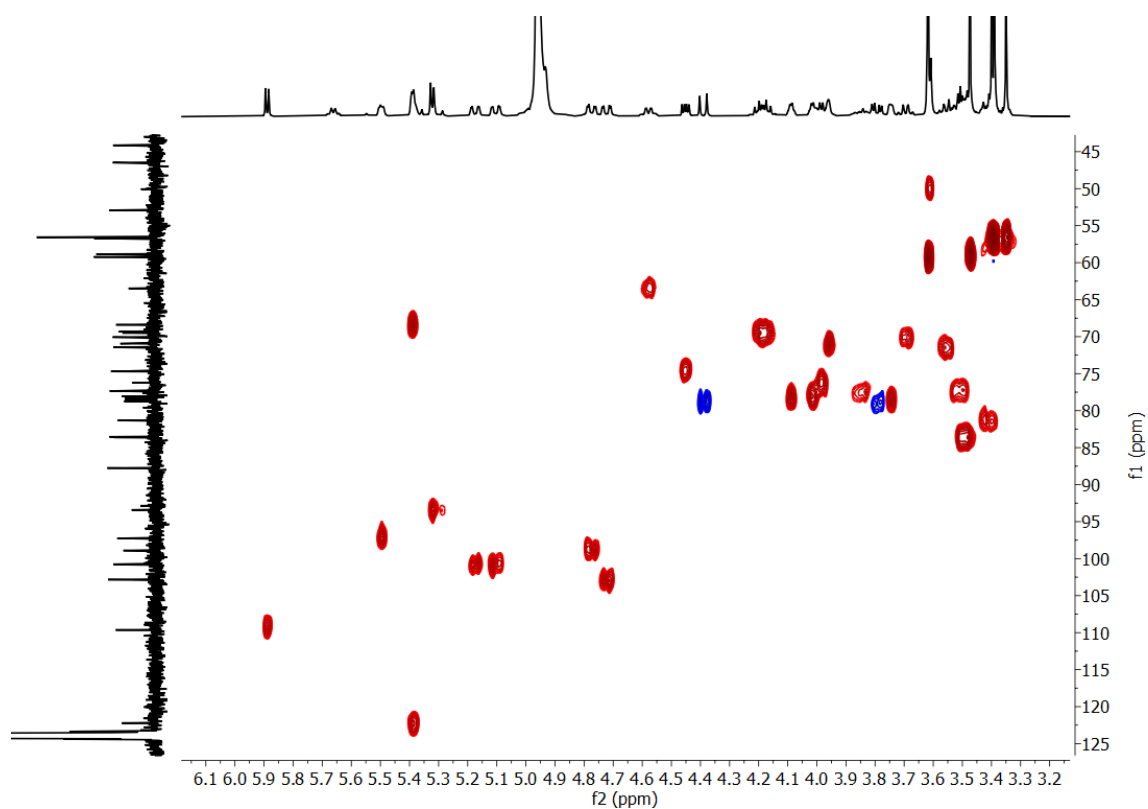
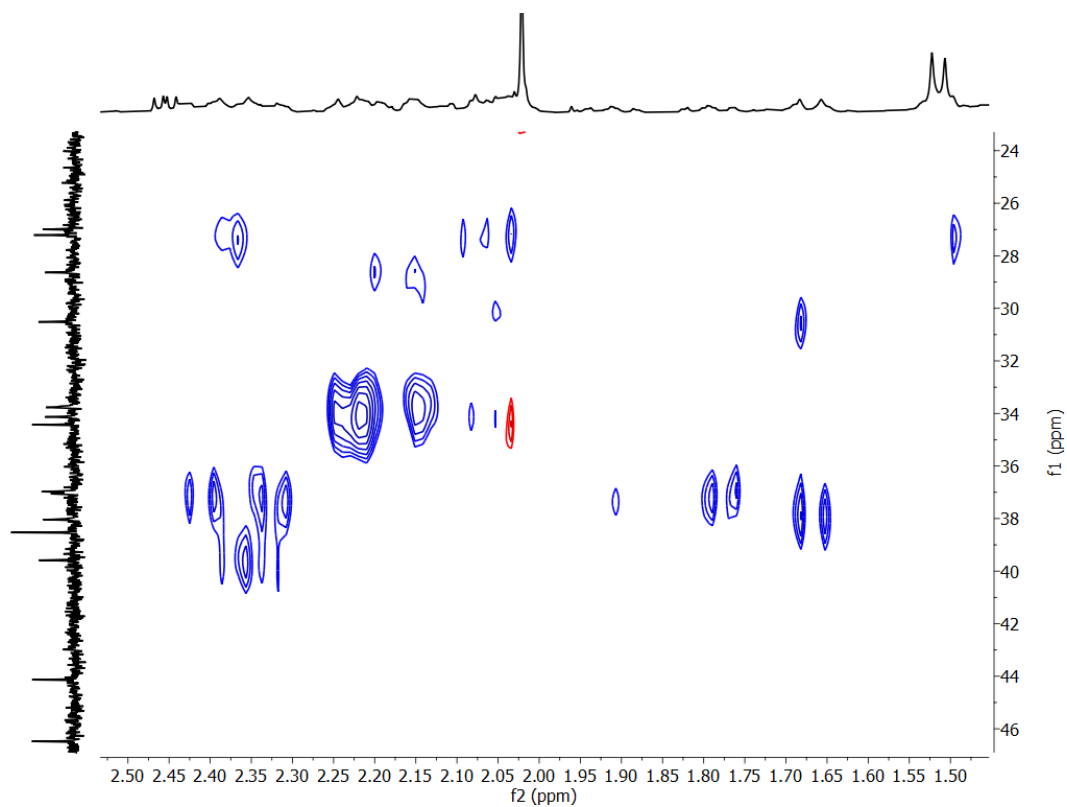


Figura S77: Espectro HSQC (400 e 100 MHz, piridina-d₅) do composto 5



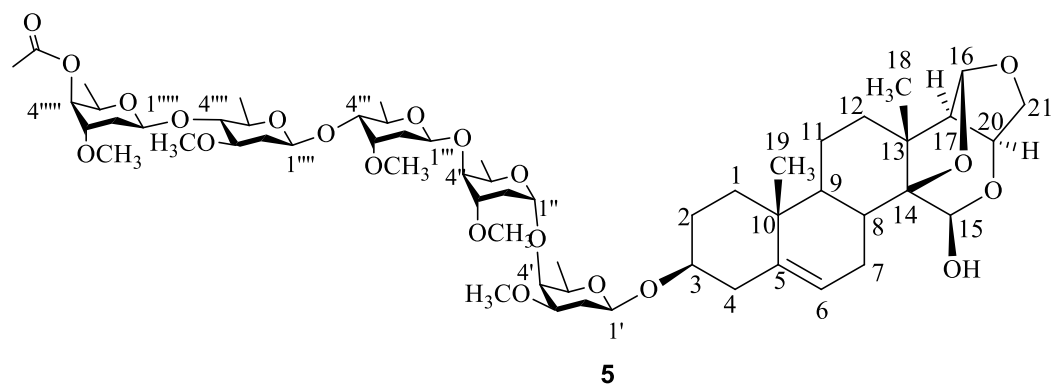


Figura S78: Espectro HMBC (400 e 100 MHz, piridina-d₅) do composto 5 em piridina-d₅, 400 MHz

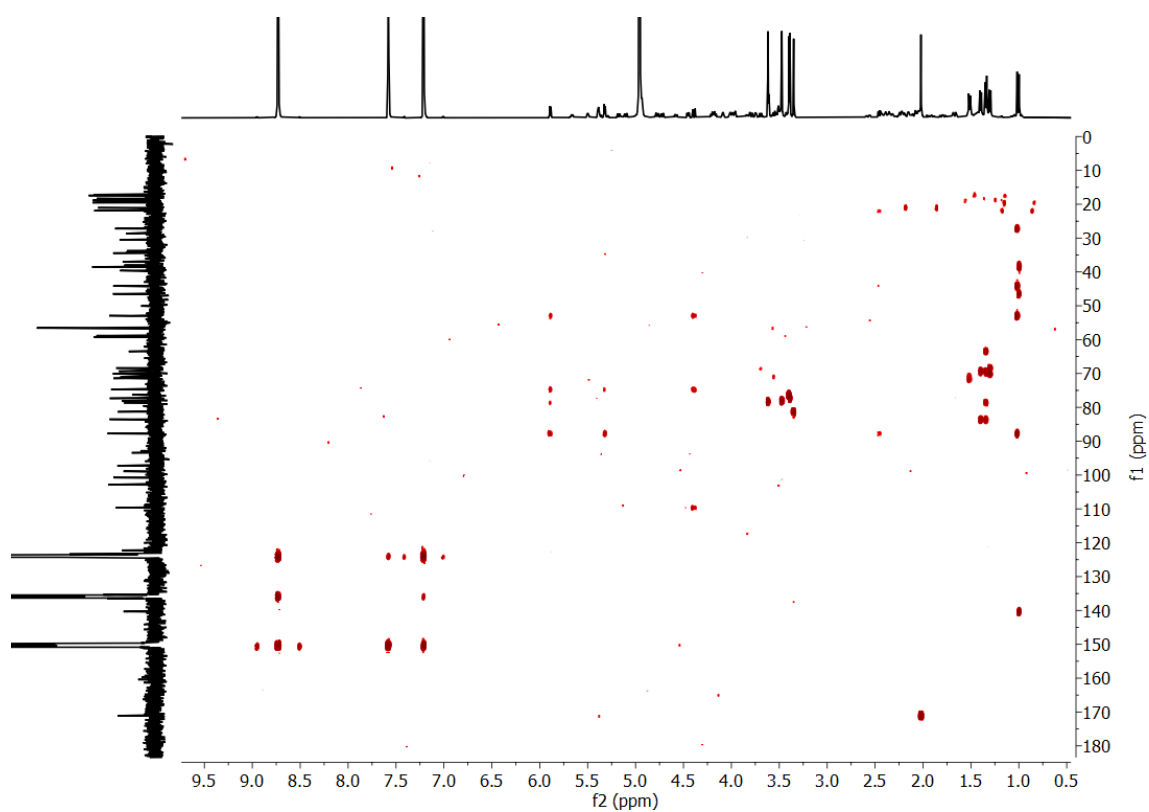


Figura S79: Espectro HMBC (400 e 100 MHz, piridina-d5) do composto 5

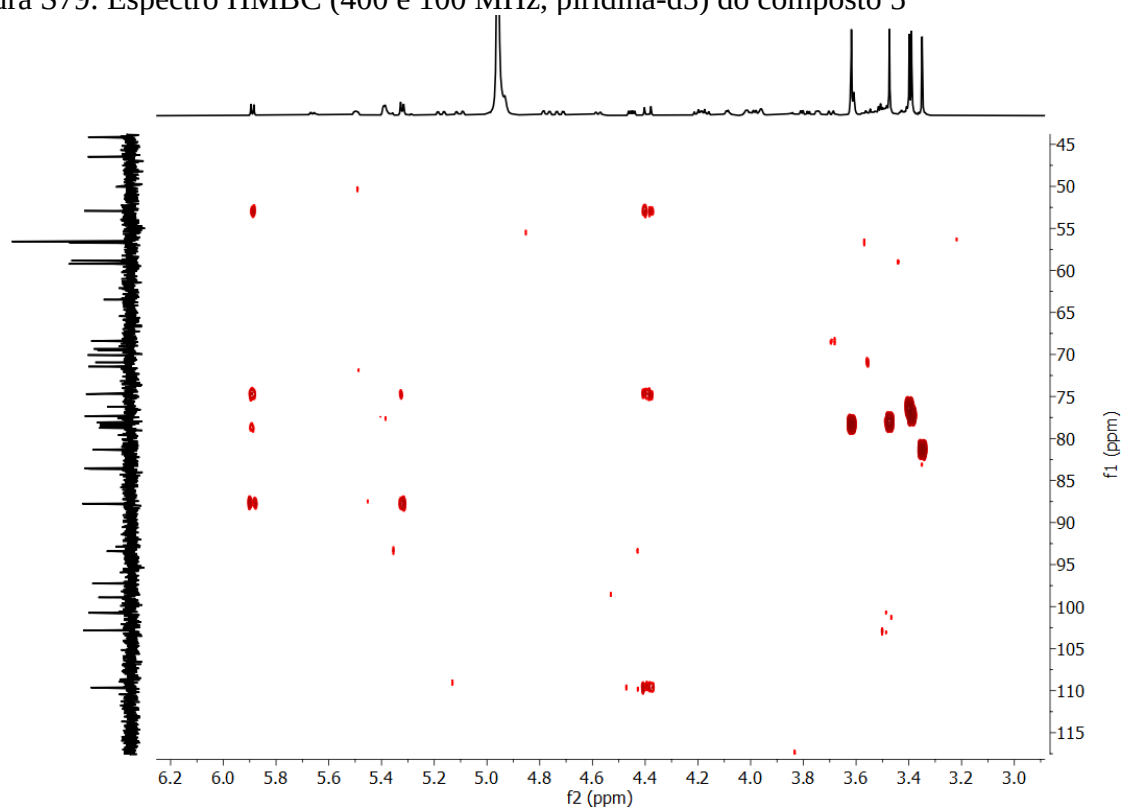
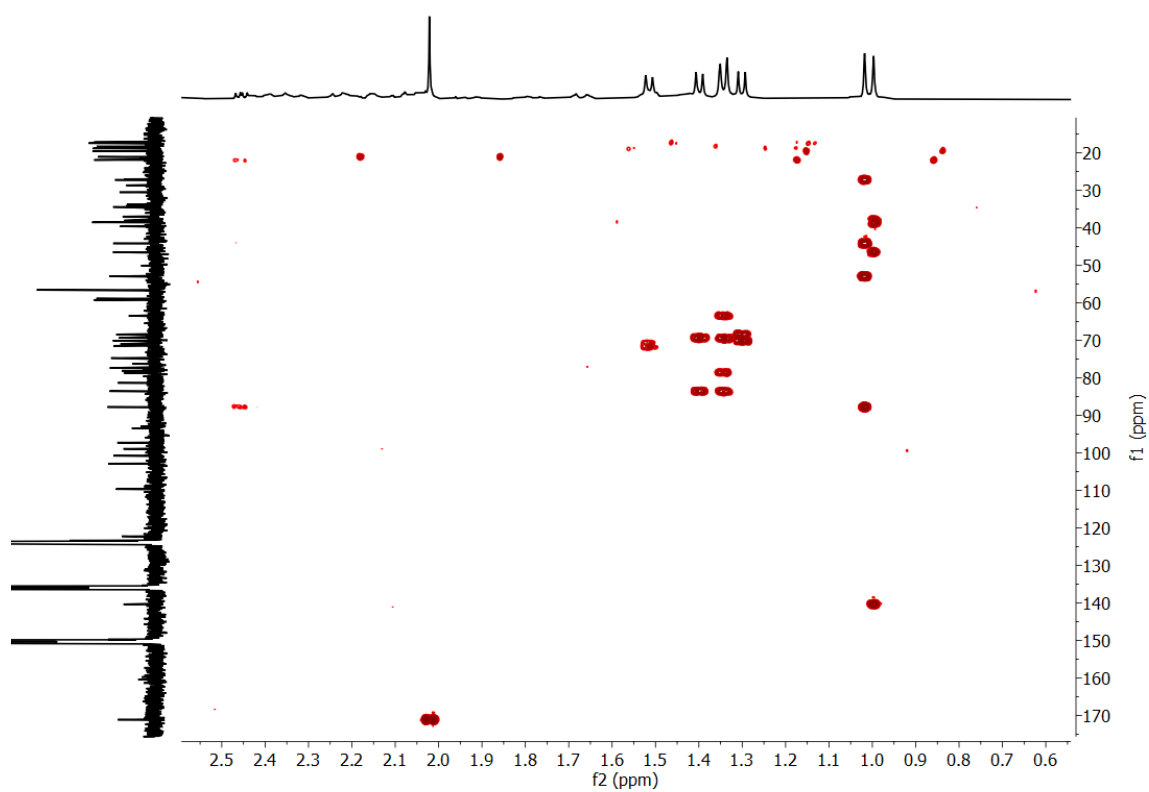


Figura S80: Espectro HMBC (400 e 100 MHz, piridina-d5) do composto 5



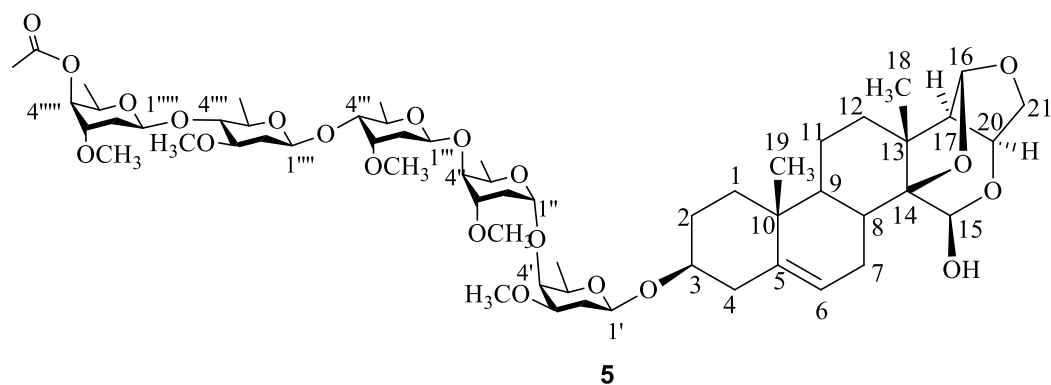
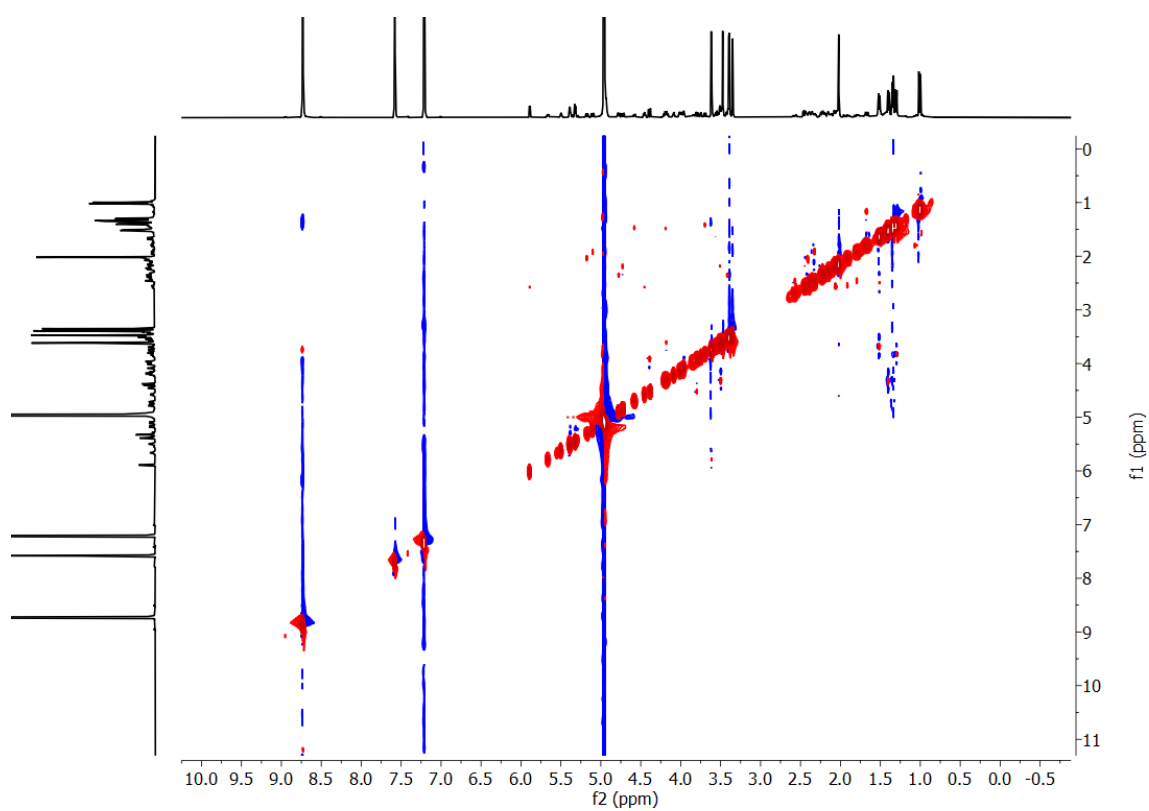


Figura S81: Espectro COSY (400 MHz, piridina-d5) do composto 5



REFERÊNCIAS

- ABDEL-SATTAR E.; EL-MARAGHY SA.; EL-DINE RS, RIZK SM. Antihyperglycemic activity of *Caralluma quadrangula* in streptozotocin-induced diabetic rats. **Bulletin of Faculty of Pharmacy**, Cairo University. v. 55, p. 269–272, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.bfopcu.2017.07.002>
- ABDEL-SATTAR E.; HARRAZ FM.; AL-ANSARI SMA, et al. Acylated pregnane glycosides from *Caralluma tuberculata* and their antiparasitic activity. **Phytochemistry**, v. 69, p. 2180–2186, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2008.05.017>
- ABDEL-SATTAR EA.; ABDALLAH HM.; KHEDR A, et al. Antihyperglycemic activity of *Caralluma tuberculata* in streptozotocin-induced diabetic rats. **Food and Chemical Toxicology** v. 59, p.111–117, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.05.060>
- ABDEL-SATTAR, E.; ALI, D.E. RUSSELIOSIDE B: A Pregnane Glycoside with Pharmacological Potential. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, n. 32, p. 188–200, 2022. doi:10.1007/s43450-022-00245-x.
- ACEVEDO-RODRÍGUEZ, P. Transfer of West Indian *Marsdenia* to *Ruehssia* (Apocynaceae Asclepiadoideae). **Phytotaxa**, v. 524, p. 212– 215, 2021. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.524.3.7>
- ADNAN M, JAN S, MUSSARAT S, et al. A review on ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of plant genus *C aralluma* R. Br. **Journal of Pharmacy and Pharmacology** 66:1351–1368, 2014. <https://doi.org/10.1111/jphp.122654>
- AGRA, Maria de Fátima et al. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 114-140, 2007.
- ALBASER N, GHANEM N, SHEHAB M, et al (2014) Investigation of Pharmacological Activity of *Caralluma penicillata* : Anti-Inflammatory Properties and Gastritis Protection against Indomethacin in Adult Guinea Pigs. **Int Sch Res Notices**. p. 1–9, 2014, <https://doi.org/10.1155/2014/738493>.
- AL-FATIMI M. Ethnobotanical survey of medicinal plants in central Abyan governorate, Yemen. **J Ethnopharmacol**. n. 241, p. 111973, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.111973>.
- AL-MUSAYEIB NM, MOTHANA RA, AL-MASSARANI S, et al. Study of the in Vitro Antiplasmodial, Antileishmanial and Antitrypanosomal Activities of Medicinal Plants from Saudi Arabia. **Molecules**. v. 17, p. 11379–11390, 2012. <https://doi.org/10.3390/molecules171011379>
- ALONSO-CASTRO AJ, ARANA-ARGÁEZ V, YÁÑEZ-BARRIENTOS E, et al Pharmacological activities of *Asclepias curassavica* L. (Apocynaceae) aerial parts. **J Ethnopharmacol**. v. 281, p. 114554, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114554>

ALVARADO-CÁRDENAS, L.O.; LOZADA-PÉREZ, L. A New Species of *Mandevilla* (Apocynaceae; Apocynoideae) from Mexico. **Phytotaxa**, v. 319, p. 93, 2017.

AN T, HUANG R, YANG Z, et al. Alkaloids from *Cynanchum komarovii* with inhibitory activity against the tobacco mosaic virus. **Phytochemistry**, v. 58, p 1267–1269, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(01\)00382-X](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00382-X)

ANAND U, NANDY S, MUNDHRA A, et al. A review on antimicrobial botanicals, phytochemicals and natural resistance modifying agents from Apocynaceae family: Possible therapeutic approaches against multidrug resistance in pathogenic microorganisms. **Drug Resistance Updates** 51, 2020.

ANSARI B, BEHL T, PIRZADA AS, KHAN H. *Caralluma edulis* (Apocynaceae): A Comprehensive Review on its Traditional Uses, Phytochemical Profile and Pharmacological Effects. **Curr Top Med Chem**, v. 22, p. 1501–1514, 2022. <https://doi.org/10.2174/1568026622666220527092825>

ARAYA JJ, BINNS F, KINDSCHER K, TIMMERMAN BN Verticillosides A–M: Polyoxygenated pregnane glycosides from *Asclepias verticillata* L. **Phytochemistry**, v. 78, p. 179–189, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.02.019>

Atanasov AG, Zotchev SB, Dirsch VM, et al (2021) Natural products in drug discovery: advances and opportunities. *Nat Rev Drug Discov* 20:200–216

AUMEERUDDY MZ, MAHOMOODALLY MF. Traditional herbal therapies for hypertension: A systematic review of global ethnobotanical field studies. **South African Journal of Botany**, n. 135, p. 451–464, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.09.008>

BABU K. Evaluation of in Vitro Antibacterial Activity of *Caralluma umbellata* Haw Used in Traditional Medicine by Indian Tribes. **Annu Res Rev Biol**, v. 4, p. 840–855, 2014. <https://doi.org/10.9734/ARRB/2014/6401>

BAI H, LI W, ASADA Y, et al. Twelve pregnane glycosides from *Cynanchum atratum*. **Steroids**, v. 74, p 198–207, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2008.10.007>

BAIS HP, LOYOLA-VARGAS VM, FLORES HE, VIVANCO JM. Root-specific metabolism: The biology and biochemistry of underground organs. *In Vitro Cellular & Developmental Biology* – **Plant**, n. 37, p. 730–741, 2021. <https://doi.org/10.1007/s11627-001-0122-y>

BESSA, N.G.F.; BORGES, J.C.M.; BESERRA, F.P.2; CARVALHO, R.H.A.; PEREIRA, M.A.B.; FAGUNDES, R.; CAMPOS, S.L.; RIBEIRO, L.U.; QUIRINO, M.S; CHAGAS JUNIOR, A. F; ALVES. Prospecção fitoquímica preliminar de plantas nativas do cerrado de uso popular medicinal pela comunidade rural do assentamento vale verde – Tocantins. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v.15, n.4, supl.I, p.692-707, Campinas, 2013. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722013000500010>

BHADANE, B.S.; PATIL, M.P.; MAHESHWARI, V.L.; PATIL, R.H. Ethnopharmacology, Phytochemistry, and Biotechnological Advances of Family Apocynaceae: **A Review. Phytotherapy Research**, n. 32, p. 1181–1210, 2018,

BHUSHAN, S. B.; PATIL, M. P.; MAHESHWARI, V.; PATIL, R. H. Ethnopharmacology, phytochemistry, and biotechnological advances of family Apocynaceae: A review. **Phytotherapy Research**, p. 1-30, 2018.

BRUYNS P V., HANÁČEK P, KLAKE C. A new concept of *Leptadenia* (Apocynaceae). **Taxon** v. 72, p. 126–150, 2023. <https://doi.org/10.1002/tax.12827>.

BRUYNS, P.V.; KLAKE, C.; HANÁČEK, P. A revised, phylogenetically-based concept of *Ceropegia* (Apocynaceae). **S. African J. Bot.** v. 112, p. 399– 436, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2017.06.021>.

CABRAL, B.; GONÇALVES, T.A.F.; ABREU, L.S.; ANDRADE, A.W.L.; DE AZEVEDO, F.D.L.A.A.; DE CASTRO, F.D.; TAVARES, J.F.; GUERRA, G.C.B.; DE REZENDE, A.A.; DE MEDEIROS, I.A.; et al. Cardiovascular Effects Induced by Fruit Peels from *Passiflora Edulis* in Hypertensive Rats and Fingerprint Analysis by HPLC-ESI-MSn Spectrometry. **Planta Med.** V. 88, v. 356–366, 2021. doi:10.1055/a-1385-8863.

CABRERA, G. M.; DE LUCA, M. E.; SELDES, A. M.; GROS, E. G.; OBERT, J. C.; CROCKETT, J; GROSS, M. Cardenolide glycosides from the roots of *Mandevilla Pentladiana*. **Phytochemistry**, v. 32, n. 5, p 12531-2591, 1993.

CABRERA, G. M.; OBERTI, J. C.; GROS, E. G.; SELDES, A. S. Aromadendrane sesquiterpene from *Mandevilla pentladiana*. **Phytochemistry**, v. 34, n. 6, p.1642-1643, 1993.

CALIXTO, J. B.; PIZZOLATTI, M. G.; YUNES, R. The competitive antagonistic effect of compounds from *Mandevilla velutina* on kinin-induced contractions of rat uterus and guinea-pig ileum in vitro. **J. Pharmacol.** v. 94, p. 1133-1142, 1988.

CAMEL V, ZOLLA G. An insight of rubisco evolution through a multilevel approach. **Biomolecules**, v. 11, 2021. <https://doi.org/10.3390/biom11121761>.

CAVALCANTI, A. B. SILVA. Computer-Aided Chemotaxonomy and Bioprospecting Study of Diterpenes of the Lamiaceae Family. **Molecules**, v. 24, p. 3908, 2019. doi:10.3390/molecules24213908

CECH NB, MEDEMA MH, CLARDY J. Benefiting from big data in natural products: importance of preserving foundational skills and prioritizing data quality. *Nat Prod Rep* v. 38, p. 1947–1953, 2021, <https://doi.org/10.1039/D1NP00061F>

CHEN J, CHENG C, CHEN J, et al. *Cynanchum paniculatum* and Its Major Active Constituents for Inflammatory-Related Diseases: A Review of Traditional Use, Multiple Pathway Modulations, and Clinical Applications. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p. 1–16, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/7259686>

CHEN J, YE Y, SUN C, PAN Y. Rapid identification of oleanane-type saponins in the roots of *Stephanotis mucronata* by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. **Anal Chim Acta**, v. 613, p. 74–82, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.02.052>

CHEN W, ZHANG Z, BAN Y, et al, *Cynanchum bungei* Decne and its two related species for “Baishouwu”: A review on traditional uses, phytochemistry, and pharmacological activities. **J Ethnopharmacol**, v. 243, p. 112110, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112110>

CHEN W-Y, YANG T, YANG J, et al. Wild plants used by the Lhoba people in Douyu Village, characterized by high mountains and valleys, in southeastern Tibet, China. **J Ethnobiol Ethnomed**, v. 17, n. 46, 2021, <https://doi.org/10.1186/s13002-021-00472-x>

CHEN X, LUO Z, LIU X, et al. *Marsdenia tenacissima* (Roxb.) Moon injection exerts a potential anti-tumor effect in prostate cancer through inhibiting ErbB2-GSK3 β -HIF1 α signaling axis. **J Ethnopharmacol**, v. 295, p. 115381, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2022.115381>

CINELLI, M.A.; DO, H.T.; MILEY, G.P.; SILVERMAN, R.B. Inducible Nitric Oxide Synthase: Regulation, Structure, and Inhibition. **Med. Res. Rev**, v. 40, p. 158–189, 2020.

CORDEIRO, S.Z.; SATO, A.; ARRUDA, R.; DE OLIVEIRA ARRUDA, R.D.C.; SIMAS, N.K. Volatile Compounds of *Mandevilla guanabara* (Apocynoideae, Apocynaceae) from Three Restingas in Rio de Janeiro, **Brazil. Biochem. Syst. Ecol.** v. 45, p. 102–107, 2020.

CORNELIUS, M. T. F. Atividade Biológica e Identificação dos Constituintes Químicos das Isolados das Espécies Vegetais: *Plumerialancifolia* MULL. ARG. (Apocynaceae) e *Solanum crinitum* LAM. (Solanaceae) e Identificação da Acetanilida Exsudada por *Xenohylatruncata* (Izecksohn, 1998). **Tese de Doutorado**, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2006.

COUTINHO, T. S.; LOUZADA, R. B. Flora da Usina São José, Igarassu, Pernambuco: Apocynaceae. **Rodriguésia**, v. 69, p. 699–714. 2018. doi: 10.1590/2175-7860201869231.

DA SILVA-MONTEIRO, F.K.; DE MORAIS-RODRIGUES, E.; MANGUEIRA-DO NASCIMENTO, Y.; MIRANDA-DE MELO, J.I. Primer Registro de *Mandevilla dardanoi* (Apocynaceae) Para El Estado de Paraíba, Brasil. **Revista Mexicana de Biodiversidad**. v. 88, p. 755–758, 2017, doi:10.1016/j.rmb.2017.06.007.

DE ALMEIDA, D.A.T.; ROSA, S.I.G.; DA CRUZ, T.C.D.; PAVAN, E.; SABINO DAMAZO, A.; SOARES, I.M.; ASCÊNCIO, S.D.; MACHO, A.; DE OLIVEIRA MARTINS, D.T. *Mandevilla longiflora* (Desf.) Pichon Improves Airway Inflammation in a Murine Model of Allergic Asthma. **J. Ethnopharmacol.** v. 200, p. 51–59, 2017.

DE ASSIS JUNIOR, L. R. Estudo fitoquímico e de genotoxicidade das raízes da *Macrosiphonia petraea*, Apocynaceae. **Dissertação (Mestrado em Química)** - Programa de Pós Graduação em Química, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS, Campo Grande, MS, 2012.

DE ASSIS JUNIOR, L. R.; GARCEZ, F. R.; GARCEZ, W. S.; DA ROSA GUTERRES, Z. Pregnanos e outros constituintes das raízes de *Macrosiphonia petraea* (A. St.-Hil.) Kuntze (Apocynaceae). **Química Nova**, v.36, n.4, p.519-523, 2013.

DE BRUYN A, MARTIN DP, LEFEUVRE P. Phylogenetic reconstruction methods: An overview. **Methods in Molecular Biology**, v. 1115, p. 257–277, 2014. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-767-9_13.

DELEO M, DETOMMASI N, SANOGO R, et al. New pregnane glycosides from *Caralluma dalzielii*. **Steroids**, v. 70, p. 573–585, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2005.03.013>

DEVENDAR REDDY KOMMIDI, NEIL A KOORBANALLY, BRENDA MOODLEY. Lung Cancer Activity of *Caralluma* Species, an Overview. **Austin Journal of Lung Cancer Research**, v. 1, p. 1–5, 2016.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. p. 121, 2^a ed., Copyright, 2002.

DI STASI, L.C., HIRUMA-LIMA, C.A. **Plantas Medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2.ed. rev. ampl. Editora UNESP, p.372-393, São Paulo, 2002.

DUARTE, M.C.T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **Revista MultiCiência**, n. 7, 2006.

DZOBO, K. The Role of Natural Products as Sources of Therapeutic Agents for Innovative Drug Discovery. In: **Comprehensive Pharmacology**. Elsevier, p 408–422, 2022.

EL-FITIANY, R.A.; KHASAWNEH, M.A. *Leptadenia Pyrotechnica* (Forsk.) Decne: From Edibility to Drug Discovery (A Comprehensive Review). **Food Reviews International**, p. 1–53. 2022. <https://doi.org/10.1080/87559129.2022.2126853>

EL-SHIEKH RA, HASSAN M, HASHEM RA, ABDEL-SATTAR E. Bioguided Isolation of Antibiofilm and Antibacterial Pregnane Glycosides from *Caralluma quadrangula*: Disarming Multidrug-Resistant Pathogens. **Antibiotics** v. 10, p. 811, 2021. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10070811>

EL-SHIEKH, R.A.; HASSAN, M.; HASHEM, R.A.; ABDEL-SATTAR, E. Bioguided Isolation of Antibiofilm and Antibacterial Pregnane Glycosides from *Caralluma quadrangula*: Disarming Multidrug-Resistant Pathogens. **Antibiotics** 2021, 10, 811. [CrossRef] [PubMed] 17. Yunes, R.A.; Brum, R.L.; Calixto, J.B.; Rimplert, H. Illustrol, a Seco-Norpregnane Derivative from *Mandevilla illustris*. **Phytochemistry**, n. 34, p. 787–790, 1993.

ENDRESS, M.E.; LIEDE-SCHUMANN, S.; MEVE, U. An updated classification for Apocynaceae. **Rev. Phytoaxa**. v. 159, n. 3, p. 175-194, 2014.

ENDRESS, M.E.; MEVE, U.; MIDDLETON, D.J.; LIEDE-SCHUMANN, S. Apocynaceae. In Flowering Plants. Eudicots; Springer International Publishing: **Cham, Switzerland**, p. 207–411, 2018.

ENEGIDE, C.; OKHALE, S. E. Ethnomedicinal, phytochemical, and pharmacological review of asclepiadaceae. *Journal of Preventive, Diagnostic and Treatment Strategies in Medicine*, n. 2, p. 3–18, 2023.

ERB, T.J.; ZARZYCKI, J. A short history of RubisCO: the rise and fall of Nature's predominant CO₂ fixing enzyme. *Curr Opin Biotechnol* v. 49, p. 100–107, 2018.

ESPIRITO-SANTO R.F., MEIRA C.S., COSTA R.D.S., SOUZA FILHO O.P., EVANGELISTA A.F., TROSSINI G.H.G., FERREIRA G.M., VELOZO E.D.S., VILLARREAL C.F., PEREIRA SOARES M.B. The anti-inflammatory and immunomodulatory potential of braylin: Pharmacological properties and mechanisms by in silico, in vitro and *in vivo* approaches. *PLoS ONE*, v. 12, 2017, e0179174. doi: 10.1371/journal.pone.0179174.

FAN, Y.; JIN, J.; JIAN, J., et al. Three New Pregnanes Isolated from the *Cynanchum auriculatum*. *Chem Biodivers*, v. 19, 2022. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202200243>

FÉLIX-SILVA J, SILVA-JUNIOR AA, ZUCOLOTTO SM, FERNANDES-PEDROSA M DE F. Medicinal Plants for the Treatment of Local Tissue Damage Induced by Snake Venoms: An Overview from Traditional Use to Pharmacological Evidence. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, p.1–52, p. 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/5748256>

FERNANDES, P. A. CRUZ, et al. Microbial conversion of steroid compounds: recent developments. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 32, p. 688-705, 2003.

FERREIRA, L. L. D. M.; PEREIRA, R. V.; MUZITANO, M. F.; GUIMARÃES, D. O.; RAIMUNDO, J. M.; LEAL, I. C. R. Avaliação da Atividade Antioxidante do Extrato Hidroalcoólico e partições das folhas *Mandevilla moricandiana* (Apocynaceae), *Sociedade Brasileira de Química (SBQ)*. 39ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química: Criar e Empreender, Goiânia, 2016.

FERREIRA, L.L.D.M.; DE LEÃO, V.F.; DE MELO, C.M.; DE MACHADO, T.B.; AMARAL, A.C.F.; DA SILVA, L.L.; SIMAS, N.K.; MUZITANO, M.F.; LEAL, I.C.R.; RAIMUNDO, J.M. Ethyl Acetate Fraction and Isolated Phenolics Derivatives from *Mandevilla moricandiana* Identified by UHPLC-DAD-ESI-MSn with Pharmacological Potential for the Improvement of Obesity-Induced Endothelial Dysfunction. *Pharmaceutics*, n. 13, p. 1103, 2021.

FIERASCU RC, FIERASCU I, ORTAN A, et al. Innovative approaches for recovery of phytoconstituents from medicinal/aromatic plants and biotechnological production. *Molecules*, n. 25, 2020.

FILLBRUNN, A.; DIETZ, C.; PFEUFFER, J.; RAHN, R.; LANDRUM, G. A.; BERTHOLD, M. R. KNIME for reproducible cross-domain analysis of life science data. *Journal of Biotechnology*, v. 261, p 149–156, 2017.

FISHBEIN M, LIVSHULTZ T, STRAUB SCK, et al. Evolution on the backbone: Apocynaceae phylogenomics and new perspectives on growth forms, flowers, and fruits. *Am J Bot*, n. 105, v. 495–513, 2018. <https://doi.org/10.1002/ajb2.1067>.

FLORA E FUNGA DO BRASIL. Base de dados [internet]. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro (JBRJ). Disponível em: <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB4621>.

FRANCO JR, CECCHI G, PAONE M, et al. The elimination of human African trypanosomiasis: Achievements in relation to WHO road map targets for 2020. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 16, 2022. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010047>.

FROMBAUM, M.; CLANCHE, S.L.; BONNEFONT-ROUSSELOT, D.; BORDERIE, D. BIOCHIMIE. **Free Radical Research**. n. 94, p. 269-276, 2012.

FUJIWARA, N.; KOBAYASHI, K. Macrophages in Inflammation. *Curr. Drug Targets-Inflamm. Allergy*, n. 4, p. 281–286, 2005.

GAN, H.; XIANG, W.-J.; MA, L.; HU, L.-H. Six New C 21 Steroidal Glycosides from *Cynanchum bungei* Decne. *Helv. Chim. Acta*, v. 91, p. 2222–2234, 2008.

GHAZANFAR, S. A. Edible Wild Plants: A Case Study from Oman. In: *Global Perspectives on Underutilized Crops*. Springer International Publishing, Cham, p 207–216. 2018.

GREEN, L.C.; WAGNER, D.A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P.L.; WISHNOK, J.S.; TANNENBAUM, S.R. Analysis of Nitrate, Nitrite, and Nitrate in Biological Fluids. **Anal. Biochem.** v. 126, p. 131–138, 1982.

GUPTA VS, KUMAR A, DEEPAK D, et al. Pregnanes and pregnane glycosides from *Marsdenia roylei*. **Phytochemistry**, v. 64, p. 1327–1333, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(03\)00468-0](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00468-0)

HABIBUDDIN M, DAGHRIRI HA, HUMAIRA T, et al. Antidiabetic effect of alcoholic extract of *Caralluma sinaica* L. on streptozotocin-induced diabetic rabbits. **J Ethnopharmacol**, v. 117, p. 215–220, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.01.021>

HAIDER SI, ASIF A, RASHEED HMF, et al. *Caralluma tuberculata* exhibits analgesic and anti-arthritic potential by downregulating pro-inflammatory cytokines and attenuating oxidative stress. **Inflammopharmacology**, n. 30, p. 621–638, 2022. <https://doi.org/10.1007/s10787-022-00949-5>

HALBE, H. W. **Tratado de Ginecologia**. 2. ed., Cap 22, p.142, São Paulo: Roca, 1993.

HAMED, A. I. New steroids from *Solenostemma argel* leaves. **Fitoterapia**, v. 72, p. 747–755, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0367-326X\(01\)00308-2](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(01)00308-2).

HAMMADI, R.; KÚSZ, N.; DÁVID, C.Z.; MWANGI, P.W.; BERKECZ, R.; SZEMERÉDI, N.; SPENGLER, G.; HOHMANN, J.; VASAS, A. Polyoxypregnane Ester Derivatives and Lignans from *Euphorbia gossypina* var. *coccinea* Pax. **Plants**, n. 11, p. 1299, 2022. DOI: [10.3390/plants11101299](https://doi.org/10.3390/plants11101299).

HAN L, ZHOU X, YANG M, et al. Ethnobotany, Phytochemistry and Pharmacological Effects of Plants in Genus *Cynanchum* Linn. (Asclepiadaceae). **Molecules**, v. 23, p. 1194, 2018. <https://doi.org/10.3390/molecules23051194>.

HERRERA, R. M.; PÉREZ, M.; MARTÍN-HERRERA, D. A, et al. Antimicrobial Activity of Extracts from Plants Endemic to the Canary Islands. **Phytotherapy Research** 10:364–366, 1996. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1573\(199606\)10:4<364::AID-PTR846>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1573(199606)10:4<364::AID-PTR846>3.0.CO;2-B)

HERRERA-CALDERÓN et al., Phytochemical Screening of *Himatanthus sucuuba* (Spruce) Woodson (Apocynaceae) Latex, In Vitro Cytotoxicity and Incision Wound Repair in Mice. **Plants**, v. 10, p. 2197, 2021. <https://doi.org/10.3390/plants10102197>.

HOLBROOK, J.; LARA-REYNA, S.; JAROSZ-GRIFFITHS, H.; MCDERMOTT, M. Tumour Necrosis Factor Signalling in Health and Disease [Version 1; Referees: 2 Approved], v. 28, 2019. DOI: [10.12688/f1000research.17023.1](https://doi.org/10.12688/f1000research.17023.1).

HUAN VD, OHTANI K, KASAI R, et al. Sweet Pregnane Glycosides from *Telosma procumbens*. **Chem Pharm Bull** (Tokyo), v. 49, p. 453–460, 2001. <https://doi.org/10.1248/cpb.49.453>.

HUANG L-J, WANG B, ZHANG J, et al (2015) Studies on cytotoxic pregnane sapogenins from *Cynanchum wilfordii*. **Fitoterapia**, v. 101, p. 107–116. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2014.10.014>.

INDRAYANTO, G. The importance of method validation in herbal drug research. **J Pharm Biomed Anal**, v. 214, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2022.114735>

JAYAWARDENA R, FRANCIS T V., ABHAYARATNA S, RANASINGHE P. The use of *Caralluma fimbriata* as an appetite suppressant and weight loss supplement: a systematic review and meta-analysis of clinical trials. **BMC Complement Med Ther**, v. 21, p. 279, 2021. <https://doi.org/10.1186/s12906-021-03450-8>

Ji, C. X.; LI, X.Y.; JIA, S. B, et al. The antidepressant effect of *Cynanchum auriculatum* in mice. **Pharm Biol**, v. 50, p. 1067–1072, 2012. <https://doi.org/10.3109/13880209.2012.656848>

JIA S, SONG J, DAI R, et al. Structural deduction of pregnane glycosides from *Dregea sinensis* Hemsl by high-performance liquid chromatography and electrospray ionization-tandem mass spectrometry. **Int J Mass Spectrom**, n. 415, n. 38–43, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2017.01.018>

JIA, X. N.; WANG, W. J.; YIN, B., et al. Deep Learning Promotes the Screening of Natural Products with Potential Microtubule Inhibition Activity. **ACS Omega**, n. 7, p. 28334–28341, 2022. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c02854>.

JIANG H-W, GU S-S, CAO L, et al. Potential hypoglycemic effect of acetophenones from the root bark of *Cynanchum wilfordii*. **Nat Prod Res**, n. 33, p. 2314–2321, 2019. <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1443100>.

JUDD, W.S., CAMPBELL, C.S., KELLOGG, E.A., STEVENS P.F.; DONGHUE, M.J. **Sistemática vegetal: um enfoque filogenético**. 3 ed. Artmed, Porto Alegre, 2009.

KAHKSHA, A. O.; NAAZ, S., et al. Recent developments made in the assessment of the antidiabetic potential of gymnema species - From 2016 to 2020. **J Ethnopharmacol**, n. 286, p. 114908, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114908>.

KAMBLE, M.Y.; MANE, S.S.; MURUGAN, C.; JAISANKAR, I. Diversity of Ethno-Medicinal Plants of Tropical Islands – With Special Reference to Andaman and Nicobar Islands. In: **Biodiversity and Climate Change Adaptation in Tropical Islands**. Elsevier, p 55–103, 2008.

KAMEL, M. S. Acylated phenolic glycosides from *Solenostemma argel*. **Phytochemistry**, v. 62, p. 1247–1250, 2003, [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(03\)00022-0](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00022-0).

KANAKHARA, R.; RUDRAPP, A. H.; SHUKLA, V.; ACHARYA, R. Detail pharmacognostical and analytical profile of *Telosma pallida* (L.) kurz. (leaf): A folklore medicinal plant of Gujarat State. **Ancient Science of Life**, v. 37, p 120-126, 2018. https://doi.org/10.4103/asl.ASL_97_17

KANEKO, N.; KURATA, M.; YAMAMOTO, T.; MORIKAWA, S.; MASUMOTO, J. The Role of Interleukin-1 in General. **Pathology. Inflamm. Regen.** V. 39. P. 12, 2019.

KATOH, K. et al., MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 14, 15, p. 3059–3066, 2002. <https://doi.org/10.1093/nar/gkf436>

KELL, G.; RAO, A.; KATSIKITIS, M. A randomised placebo controlled clinical trial on the efficacy of *Caralluma fimbriata* supplement for reducing anxiety and stress in healthy adults over eight weeks. **J Affect Disord**, n. 246, p. 619–626, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2018.12.062>.

KHAN, F.; SARKER, M. D. M. R.; MING, L. C, et al. Comprehensive Review on Phytochemicals, Pharmacological and Clinical Potentials of *Gymnema sylvestre*. **Front Pharmacol**, v. 10, 2019. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01223>

KOCH, I.; RAPINI, A.; KINOSHITA, L.S.; SIMÕES, A.O. & SPINA, A.P. Apocynaceae. In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, 2012. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB000048> (acesso em 25/06/2023).

KONRATH, E.L.; STRAUCH, I.; BOEFF, D.D.; ARBO, M.D. The Potential of Brazilian Native Plant Species Used in the Therapy for Snakebites: A Literature Review. **Toxicon**, v. 217, p. 17–40, 2022. DOI: [10.1016/j.toxicon.2022.08.002](https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2022.08.002)

LEDNICER, D., **Strategies for Organic Drug Synthesis and Design**. Cap. 4 e 5, p. 84-145, 2009.

LI, S.; PEI, W.; YUAN, W., et al. Multi-omics joint analysis reveals the mechanism of action of the traditional Chinese medicine *Marsdenia tenacissima* (Roxb.) Moon in the treatment of

hepatocellular carcinoma. **J Ethnopharmacol**, v. 293, n.115285, 2022.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2022.115285>

LI, X.; LIANG, H.; WU, J. et al. Investigation of herbal plant medicines Baishouwu on the mechanism of the digestion of body: **A review. J Funct Foods**, v. 100, 2023.
<https://doi.org/10.1016/j.jff.2022.105379>

LI, X.; ZHANG, J. J.; LI, Y. H.; YANG, Q. X. Cynanotophyllosides E-F, two minor pregnane glycosides from the roots of cultivated *Cynanchum otophyllum*. **J Asian Nat Prod Res**, p. 1–11, 2023. <https://doi.org/10.1080/10286020.2022.2158085>

LI, Y.; YANG, H.; LI, Z., et al. Advances in the Biosynthesis and Molecular Evolution of Steroidal Saponins in Plants. **Int J Mol Sci**, n. 24, 2023.
<https://doi.org/10.3390/ijms24032620>.

LIEDE-SCHUMANN, S.; REUSS, S. J.; MEVE, U. et al. Phylogeny of Marsdenieae (Apocynaceae, Asclepiadoideae) based on chloroplast and nuclear loci, with a conspectus of the genera. **Taxon**, n. 71, p. 833–875, 2022. <https://doi.org/10.1002/tax.12713>

LIMA, M. D. S. et al. Antinociceptive properties of physalins from *Physalisangulata*. **Journal of Natural Products**, v. 77, n. 11, p. 2397–2403, 2014. ISSN: 15206025, DOI: 10.1021/np5003093.

LINDEMANN, P. Steroidogenesis in plants – Biosynthesis and conversions of progesterone and other pregnane derivatives. **Steroids**. v. 103, p. 145–152, 2015.
<https://doi.org/10.1016/j.steroids.2015.08.007>.

LIU, Y.; LI, J.; YU, S, et al. Rapid structural determination of modified pregnane glycosides from *Cynanchum forrestii* by liquid chromatography–diode-array detection/electrospray ionization multi-stage tandem mass spectrometry. **Anal Chim Acta**, v. 611, p.187–196, 2008.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.01.076>

LIU, Y. B.; SU, E. N.; LI, J. B, et al. Steroidal Glycosides from *Dregea sinensis* var. *corrugata* Screened by Liquid Chromatography–Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. **J Nat Prod**, n. 72, p. 229–237, 2009. <https://doi.org/10.1021/np800048n>.

LIU, S.; CHEN, Z.; WU, J.; WANG, L.; WANG, H.; ZHAO, W. Appetite Suppressing Pregnane Glycosides from the Roots of *Cynanchum auriculatum*. **Phytochemistry**, n. 93, p. 144–153, 2013.

LÖTSCH, J.; ULTSCH, A. Exploiting the Structures of the U-Matrix. **Springer International Publishing Switzerland**, p 249–257, 2013. DOI: 10.1007/978-3-319-07695-9_24.

MAGALHÃES, K. N. **Plantas medicinais da caatinga do nordeste brasileiro** [livro eletrônico]: etnofarmacopeia do Professor Francisco José de Abreu Matos / Karla do Nascimento Magalhães, Mary Anne Medeiros Bandeira e Mirian Parente Monteiros, p. 24, Fortaleza: Imprensa Universitária, 2020.

MAKEEN, H.A.; MENACHERY, S.J.; MONI, S.S., et al. Documentation of bioactive principles of the exudate gel (EG) from the stem of *Caralluma retrospiciens* (Ehrenb) and *in vitro* antibacterial activity – **Part A. Arabian Journal of Chemistry**, v. 13, p. 6672–6681, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2020.06.022>.

MALLADI, S.; NADH R. V.; SURESH, B. K.; SREENIVASULU, M. Pharmacological Review of *Caralluma* r.br: A Potential Herbal Genus. **Asian Journal of Pharmaceutics Supplementary issue**, v. 12 n. 04, 2018.

MARTINS, L. A. V. Avaliação do potencial anticâncer de espécies de Mato Grosso do Sul. **Dissertação de Mestrado** de Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2014.

MARTINS, S.; ALVES, M. Aspectos anatômicos de espécies simpátricas de *Mandevilla* (apocynaceae) ocorrentes em inselbergues de Pernambuco – Brasil. **Rodriguésia**. n.59, n. 2, p. 369-380, 2008.

MATOZINHOS, C. N.; KONNO, T. U. P. Diversidade taxonômica de Apocynaceae na Serra Negra, MG, Brasil. **Hoehnea**, v. 38, n. 4, p. 569-595, 2011.

MATTOS, W.M.; CAMPOS, M.M.; FERNANDES, E.S.; RICHETTI, G.P.; NIERO, R.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Anti-Edematogenic Effects of Velutinol A Isolated from *Mandevilla Velutina*: Evidence for a Selective Inhibition of Kinin B1 Receptor-Mediated Responses. **Regulatory Peptides**. n. 136, p. 98–104, 2006. doi:10.1016/j.regpep.2006.04.011.

MAURI, A.; BERTOLA, M. Alvascience: A New Software Suite for the QSAR Workflow Applied to the Blood–Brain Barrier Permeability. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 21, p. 1288, 2022. <https://doi.org/10.3390/ijms232112882>).

MAUTONE, M.; DE MARTINO, L.; DE FE, V. Ethnobotanical research in Cava de' Tirreni area, Southern Italy. **J Ethnobiol Ethnomed**, v. 15, p. 50, 2019. <https://doi.org/10.1186/s13002-019-0330-3>

MCGARVEY, B. D.; LIAO, H.; DING, K.; WANG, X. Dereplication of known pregnane glycosides and structural characterization of novel pregnanes in *Marsdenia tenacissima* by high-performance liquid chromatography and electrospray ionization-tandem mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 47, p. 687–693, 2012. <https://doi.org/10.1002/jms.2991>

MCINNES, I.B.; GRAVALLESE, E.M. Immune-Mediated Inflammatory Disease Therapeutics: Past, Present and Future. **Nat. Rev. Immunol.** v. 21, p. 680–686, 2021. DOI: [10.1038/s41577-021-00603-1](https://doi.org/10.1038/s41577-021-00603-1).

MENEZES, R. P. B.; SESSIONS, Z.; MURATOV, E.; SCOTTI, L.; SCOTTI, M. T. Secondary Metabolites Extracted from Annonaceae and Chemotaxonomy Study of Terpenoid. **J Braz Chem Soc.** v. 32, p. 2061, 2021. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20210097>

MEVE, U.; HEIDUK, A.; LIEDE-SCHUMANN, S. Origin and early evolution of Ceropegieae (Apocynaceae-Asclepiadoideae). **Syst Biodivers**, v. 15, p. 143–155, 2017. <https://doi.org/10.1080/14772000.2016.1238019>

MOHANTY SK, SWAMY MK, SINNIHA UR, ANURADHA M, *Leptadenia reticulata* (Retz.) Wight & Arn. (Jivanti): Botanical, Agronomical, Phytochemical, Pharmacological, and Biotechnological Aspects. **Molecules**, v. 2, 1019, 2017. <https://doi.org/10.3390/molecules22061019>.

MOHD, N. N. A.; CHOO, Y. M. A new flavone from Malaysia Borneo *Marsdenia tinctoria*. **Nat Prod Res**, v. 30, p. 1532–1536, 2016. <https://doi.org/10.1080/14786419.2015.1118629>
MORALES, J.F.; DE MORAIS, I.L. Studies in the Neotropical Apocynaceae LV: A New *Mandevilla* from Bahia, Brazil, with Notes on the Diversity of the Genus. **Syst. Bot.** v. 45, p. 183–189, 2020.

MOREBISE, O. A Review on *Gongronema latifolium*, an Extremely Useful Plant with Great Prospects. **European J Med Plants**, v. 10, p. 1–9, 2015. <https://doi.org/10.9734/EJMP/2015/19713>

MOREIRA, F.F.; MENDONÇA, C.B.F.; PEREIRA, J.F.; ESTEVES, V.G. Polinotaxonomia de espécies de Apocynaceae ocorrentes na restinga de Carapebus, RJ, Brasil. **Acta botanica Brasileira**, v. 18, p. 711–721, 2004.

MOSES, T.; PAPADOPOULOU, K. K.; OSBOURN, A. Metabolic and functional diversity of saponins, biosynthetic intermediates and semi-synthetic derivatives. **Crit Rev Biochem Mol Biol**, v. 49, p. 439–462. <https://doi.org/10.3109/10409238.2014.953628>.

MU, Q.; SHEN, Y.; ZHOU, Q, et al. Studies on the Constituents of *Adelostemma gracillimum*. **Planta Med**, v. 58, p. 200–204, 2015. <https://doi.org/10.1055/s-2006-961429>

MUYUMBA, N. W.; MUTOMBO, S. C.; SHERIDAN, H, et al. Quality control of herbal drugs and preparations: The methods of analysis, their relevance and applications. **Talanta Open**, v. 4, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.talo.2021.100070>

NAM, N. B.; TRIEU, L. N; VU, N. T, et al Micropropagation of *Jasminanthes tuyetanhiae*: an endemic and valuable herb in Vietnam. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 148, p.35–44, 2022. <https://doi.org/10.1007/s11240-021-02158-4>

NAZAR, N.; CLARKSON, J. J.; GOYDER, D., et al. Phylogenetic relationships in Apocynaceae based on nuclear PHYA and plastid trnL-F sequences, with a focus on tribal relationships. **Caryologia**. v. 72, p. 55–81, 2019. <https://doi.org/doi: 10.13128/cayologia-251>.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, v.83, n° 3, p. 770–803, 2020. ISSN: 15206025, DOI: 10.1021/acs.jnatprod.9b01285.

NIERO, R.; ALVES, R.V.; FILHO, V.C.; CALIXTO, J.B.; HAWKES, J.E.; SANT'ANA, A.E.; YUNES, R.A. A New Anti-Oedematogenic Nor-Pregnane Derivative Isolated from *Mandevilla Illustris*. **Planta Medica**, v. 68, p. 850–853, 2002. doi:10.1055/s-2002-34409.

ODAGO, W. O.; WASWA, E. N.; NANJALA, C, et al , Analysis of the Complete Plastomes of 31 Species of Hoya Group: Insights Into Their Comparative Genomics and Phylogenetic Relationships. **Front Plant Sci**, v. 12, 2022. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.814833>

OJO, O. A.; OKESOLA, M. A.; EKAKITIE, L. I., et al. *Gongronema latifolium* Benth. leaf extract attenuates diabetes-induced neuropathy via inhibition of cognitive, oxidative stress and inflammatory response. **J Sci Food Agric**, v. 100, p. 4504–4511, 2020. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10491>

OLIVEIRA, N. T.; ALMEIDA, S. S. M. S. Análise fitoquímica, citotóxica e antimicrobiana do extrato bruto etanólico das folhas da espécie *Ambelania acida* Aublet (Apocynaceae). **Biota Amazônica**. v. 6, n. 1, p. 20-25, Macapá, 2016.

OLIVEIRA, T.A.D.; SILVA, M.P.D.; MAIA, E.H.B.; SILVA, A.M.D.; TARANTO, A.G. Virtual Screening Algorithms in Drug Discovery: A Review Focused on Machine and Deep Learning Methods. **Drugs and Drug Candidates**, v. 2, p. 311-334, 2023. <https://doi.org/10.3390/ddc2020017>

OPRETZKA, L.C.F.; DO ESPÍRITO-SANTO, R.F.; NASCIMENTO, O.A.; ABREU, L.S.; ALVES, I.M.; DÖRING, E.; SOARES, M.B.P.; VELOZO, E.D.S.; LAUFER, S.A.; VILLARREAL, C.F. Natural Chromones as Potential Anti-Inflammatory Agents: Pharmacological Properties and Related Mechanisms. **Int. Immunopharmacol**, v. 72, p. 31–39, 2019. doi:10.1016/j.intimp.2019.03.044.

PANDEY, A.; SWARNKAR, V.; PANDEY, T., et al . Transcriptome and Metabolite analysis reveal candidate genes of the cardiac glycoside biosynthetic pathway from *Calotropis procera*. **Sci Rep**, n. 6, 2019. <https://doi.org/10.1038/srep34464>

PANDYA D, ANAND I. A Complete Review on *Oxystelma esculentum* R. Br. **Pharmacognosy Journal**, v. 3, p. 87–90, 2011. <https://doi.org/10.5530/pj.2011.19.16>

PATEL, V. K.; SHIRBHATE, E.; TIWARI, P., et al. Multi-targeted HDAC Inhibitors as Anticancer Agents: Current Status and Future Prospective. **Curr Med Chem**, v. 30, p. 2762–2795, 2022. <https://doi.org/10.2174/0929867329666220922105615>

PAYAB, M.; HASANI-RANJBAR, S.; SHAHBAL, N., et al. Effect of the herbal medicines in obesity and metabolic syndrome: A systematic review and meta-analysis of clinical trials. **Phytotherapy Research**, v. 34, p. 526–545, 2020. <https://doi.org/10.1002/ptr.6547>

PEREIRA, L. C. O.; ABREU, L. S. ; SILVA, J. P. R. E ; LINS, F. S. V. L. ; QUEIROGA, C. S. ; DO ESP"RITO-SANTO, R. F. ; AGNELO-SILVA, D. F. DE ; VILLARREAL, C. F. ; AGRA, M. F. ; SCOTTI, M. T. ; COSTA, V. C. DE O. ; TAVARES, J. F. ; SILVA, M. S. Bioactive Compounds from the Aerial Parts of *Evolvulus linarioides*. **Journal of Natural Products**, v. 83, p. 1515-1523, 2020. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01189>

PINHEIRO, A. A. V.; BARROS, R. P. C.; DE ASSIS, E. B.; MAIA, M. S.; ARAÚJO, D. I. A. F.; SALES, K. A.; SCOTTI, L.; TAVARES, J. F.; SCOTTI, M. T.; SILVA, M. S. Virtual Screening of Secondary Metabolites of the Family Velloziaceae J. Agardh with Potential Antimicrobial Activity. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 31, n. 10, p. 2114-2119, 2020. <https://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20200112>.

PRIHODA, D.; MARITZ, J. M.; KLEMPER, O., et al. The application potential of machine learning and genomics for understanding natural product diversity, chemistry, and therapeutic translatability. **Nat Prod Rep**, n. 38, p.1100–1108, 2021. <https://doi.org/10.1039/D0NP00055H>

QIN, J. J.; CHEN, X.; LIN, Z. M., et al. C₂₁-steroidal glycosides and sesquiterpenes from the roots of *Cynanchum bungei* and their inhibitory activities against the proliferation of B and T lymphocytes. **Fitoterapia**, v. 124, p. 193–199, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2017.11.014>

RAEES, M. A.; HUSSAIN, H., AL-RAWAHI, A., et al. Anti-proliferative and computational studies of two new pregnane glycosides from *Desmidorchis flava*. **Bioorg Chem**, v. 67, p.95–104, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2016.05.008>

RAMOS, Y. J.; GOUVÊA-SILVA, J. G.; DE BRITO MACHADO, D., et al. Chemophenetic and Chemodiversity Approaches: New Insights on Modern Study of Plant Secondary Metabolite Diversity at Different Spatiotemporal and Organizational Scales. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 33, p. 49–72, 2023.

RAPINI, A. **Sistemática vegetal: embriófitas**, Universidade Estadual de Feira de Santana, 2012.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 830, 2007.

RIBEIRO, R.V.; MARIANO, D.B.; ARUNACHALAM, K.; SOARES, I.M.; DE AGUIAR, R.W.S.; ASCÊNCIO, S.D.; MARLON, R.; COLODEL, E.M.; DE OLIVEIRA MARTINS, D.T. Chemical Characterization and Toxicological Assessment of Hydroethanolic Extract of *Mandevilla Velame Xylopodium*. **Rev. Bras. Farmacogn.** v. 29, p. 605–612, 2019.

RIBEIRO, R.V.; SILVA, R.M. DA; LIMA, J.C. DA S.; MARTINS, D.T. DE O. Antiinflammatory, Antinociceptive and Antipyretic Effects of Hydroethanolic Extract from *Macrosiphonia Velame* (A. St.-Hil.) M. Arg. in Animal Models. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. n. 46, p. 515–523, 2010, doi:10.1590/S1984-82502010000300015.

RODRIGUES, C. M. S C. Estudo fitoquímico e avaliação da atividade biológica de *Annonaleptopetala* (Annonaceae). **Dissertação de Mestrado** Recursos em Naturais do Semiárido da Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, 2016.

RONQUIST, F. et al. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space. **Systematic Biology**, v. 61, n. 3, p. 539–542, 2012. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>

SALDÍVAR-GONZÁLEZ, F. I.; ALDAS-BULOS, V. D.; MEDINA-FRANCO, J. L.; PLISSON, F. Natural product drug discovery in the artificial intelligence era. **Chemical Science**, v. 13, p. 1526–1546, 2022. <https://doi.org/10.1039/D1SC04471K>.

SÁNCHEZ-CAMARGO, A. P.; MONTERO, L.; MENDIOLA JA, et al. Extraction Techniques for Bioactive Compounds from Herbs and Spices, v. 21, 2020. <https://doi.org/10.1002/9781119036685.ch5>

SANTOS JR, A.; LEAL, P. C.; ADELWEISS, M. I. A.; LOPES, T. G.; CALIXTO, J. B.; MORRONE, F. B.; CAMPOS, M. M. Effects of the compounds MV8608 and MV8612 obtained from *Mandevilla velutina* in the model of hemorrhagic cystitis induced by cyclophosphamide in rats. **ArchPharmacol**, v. 382, p.399–407, 2010. doi: 10.1007/s00210-010-0555-0

SANTOS, G. L. D., et al. Sucrose Diester of Aryldihydronaphthalene-Type Lignan with Anti-inflammatory Activity from *Heliotropium angiospermum*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 32, p. 734–740, 2022.

SCOTTI, L.; TAVARES, J. F.; da SILVA, M. S.; FALCÃO, E. V.; SILVA, L. de M.; SOARES, G. C. da S.; SCOTTI, M. T. Chemotaxonomy of three genera of the Annonaceae family using self-organizing maps and ¹³C NMR data of diterpenes. **Química Nova**, v. 35, n. 11, p. 2146-2152, 2012.

SEEKA, C.; PRABPAI, S.; KONGSAERE, P., et al . Anti-inflammatory 12,20-Epoxypregnane and 11,12- seco -Pregnane Glycosides from the Stems of *Hoya kerrii*. **J Nat Prod**, v. 80, p. 1714–1724, 2017. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b00730>

SHARMA, P.; SARMA, J.; SARMA, C. M. Ethnobotany and micropropagation of *Asclepias curassavica* L. (Apocynaceae) – a medicinally potent naturalized plant in India. **Pleione**, n. 13, v. 227, 2019. <https://doi.org/10.26679/Pleione.13.2.2019.227-235>

SI, Y.; SHA, X.-S.; SHI, L.-L.; WEI, H.-Y.; JIN, Y.-X.; MA, G.-X.; ZHANG, J. Review on Pregnane Glycosides and Their Biological Activities. **Phytochem. Lett.**, n. 47, p. 1–17, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2021.10.007>

SILVA, C. A. B.; COSTA, B. R. P.; DE OLIVEIRA, C. V. C., et al. Computer-aided chemotaxonomy and bioprospecting study of diterpenes of the Lamiaceae family. **Molecules**, v. 24, 2019. <https://doi.org/10.3390/molecules24213908>

SILVA, J. P. R.; ACEVEDO, C. A. H.; DE SOUZA, T. A., et al. Natural Products as Potential Agents against SARS-CoV and SARSCoV- 2. **Curr Med Chem**, v. 28, p. 5498–5526, 2021, <https://doi.org/10.2174/0929867328666210125113938>.

SIMÕES, A. O.; KINOSHITA, L. S. The Apocynaceae of the Carrancas region, Brazil. **Darwiniana**. n.40, p.127-169, 2004.

SIMÕES, A. O.; KINOSHITA, L. S.; ENDRESS, M. E. New combinations in *Mandevilla* Lindley (Apocynaceae), **Novonn**. v. 17, p. 87-90, 2007.

SIMÕES, C. M. O, et al. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**, Artmed Editora Ltda, 1ª Ed, Porto Alegre, 2017.

SIREESHA, M.; VENKATA, N. R.; SURESH, B. K, SREENIVASULU, M. Phytochemical library of *Caralluma* genus. **International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences** v. 9, p. 1201–1213, 2018.

SLAPŠYTĖ, G.; DEDONYTĖ, V.; ADOMĖNIENĖ, A., et al. Genotoxic properties of *Betonica officinalis*, *Gratiola officinalis*, *Vincetoxicum luteum* and *Vincetoxicum hirundinaria* extracts. **Food and Chemical Toxicology**, n. 134, p. 110815, 2019, <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110815>.

SMITH, C.; KRYGSMAN, A. *Hoodia gordonii*: To eat, or not to eat. **J Ethnopharmacol.** v. 155, p. 987–991, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.06.033>.

SOBIECKI, J. F. A preliminary inventory of plants used for psychoactive purposes in southern African healing traditions. **Transactions of the Royal Society of South Africa**, v. 57, p. 1–24, 2002. <https://doi.org/10.1080/00359190209520523>

SOUZA, V. C. & LORENZI, H. Botânica Sistemática: guia de ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II. **Instituto Plantarum**, 2 ed. São Paulo, p. 704, 2008. ISBN: 9788586714399.

STAFFORD, G. I.; PEDERSEN, M. E.; VAN STADEN, J.; JÄGER, A. K. Review on plants with CNS-effects used in traditional South African medicine against mental diseases. **J Ethnopharmacol**, v. 119, p. 513–537, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.08.010>

SUTCHARITCHAN, C.; WANG, L.; ZHANG, H. et al. Pharmacognostical study of *Cynanchum stauntonii* and *Cynanchum glaucescens*, botanical sources of TCM Baiqian. **Chin Herb Med**, v. 10, p. 379–387, 2018, <https://doi.org/10.1016/j.chmed.2018.08.001>

TAI, Y.; CAO, X.; LI, X.; PAN, Y. Identification of C-21 steroidal glycosides from the roots of *Cynanchum chekiangense* by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Anal Chim Acta**, v. 572, p. 230–236, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.05.044>

TAMBE, D. A.; CHAUDHARI, T. B.; CHAUDHARI, S. R. Phyto-Pharmacology of *Caralluma adscendens* Roxb: A Review. **Pharmacognosy Journal**, n. 2, p. 33–38, 2010. [https://doi.org/10.1016/S0975-3575\(10\)80069-0](https://doi.org/10.1016/S0975-3575(10)80069-0)

TARKOWSKÁ, D. Plants are Capable of Synthesizing Animal Steroid Hormones. **Molecules** v. 24, p. 2585, 2010. <https://doi.org/10.3390/molecules24142585>

TATSUZAWA, F.; YOSHIKOSHI, A.; TAKEHARA, A.; SUZUKI, S. Flavonoids from the Flowers of *Adenium obesum* (Forssk.) Roem. & Schult., *Mandevilla sanderi* (Hemsl.) Woodson, and *Nerium oleander* L. (Apocynaceae). **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 99, 104347, 2021.

JP XVII THE JAPANESE PHARMACOPOEIA, SEVENTEENTH EDITION, Official from, April 1, 2016. <https://www.pmda.go.jp/files/000217650.pdf>

TIFFANY, C.W.; BURCH, R.M. Bradykinin Stimulates Tumor Necrosis Factor and Interleukin-1 Release from Macrophages. **FEBS Lett.** v. 247, p. 189–192, 1989.

TO, K. K. W.; WU, X.; YIN, C., et al. Reversal of multidrug resistance by *Marsdenia tenacissima* and its main active ingredients polyoxypregnanes. **J Ethnopharmacol**, v. 203, p. 110–119, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.03.051>

TRIVELLA, D. B. B. et al. Descoberta de fármacos a partir de produtos naturais e a abordagem Molecular Power House (MPH). **Revista Fitos**, p. 176-192, 2022.

UGWAH-OGUEJIOFOR, C. J.; ABUBAKAR, K.; UGWAH, M. O.; NJAN, A. A. Evaluation of the antinociceptive and anti-inflammatory effect of *Caralluma dalzielii*. **J. Ethnopharmacol**, v. 150, p. 967–972, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.09.049>

ULLAH, R.; ALQAHTANI, A. S.; NOMAN, O. M. A, et al. A review on ethno-medicinal plants used in traditional medicine in the Kingdom of Saudi Arabia. **Saudi J Biol Sci** n. 27, p. 2706–2718, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.06.020>.

UPADHYAY, S.; JEENA, G. S.; SHIKHA, S. R. K. Recent advances in steroidal saponins biosynthesis and *in vitro* production. **Planta**, v. 248, p. 519–544, 2018.

VALLI, M.; YONG, M. C. M.; BOLZANI, V. S. A Beleza Invisível da Biodiversidade: O Táxon Rubiaceae. **Rev. Virtual Quim.**, v. 8, n.1, p. 296-310, 2016. doi.org/10.5935/1984-6835.20160020.

VERMAAK, I.; MULAUDZI, N.; FOUCHE, G. *Hoodia gordonii*. In: **The South African Herbal Pharmacopoeia**. Elsevier, p 271–291, 2023.

VESANTO J. SOM-Based Visualization Methods. **Intelligent Data Analysis**, v.3, p. 111-126, 1999. [doi.org/10.1016/S1088-467X\(99\)00013-X](https://doi.org/10.1016/S1088-467X(99)00013-X)

VILJOEN, A.; CHEN, W.; MULAUDZI, N., et al. *Hoodia gordonii*. In: Phytochemical Profiling of Commercially Important South African **Plants**. Elsevier, p.129–135, 2022. ISBN: 978012823779

VIOLANTE, I. M. P.; SOUZA, I. M.; VENTURINI, C. L.; RAMALHO, A. F. S.; SANTOS, R. A. N.; FERRARI, M. Avaliação *in vitro* da atividade fotoprotetora de extratos vegetais do cerrado de Mato Grosso. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 19, p. 452-457, 2008. doi.org/10.1590/S0102-695X2009000300020.

VITAL, F. A. Z. Occurrence of species of *Mandevilla* Lindl. (Apocynaceae Juss.: Apocynoideae) in Lavras (MG), Brazil: ecological and taxonomical implications Scientific Electronic Archives Issue, **Sci. Elec. Arch.** v. 12, 2019. <https://doi.org/10.36560/1242019738>

WAINWRIGHT, C. L., et al. Future directions for the discovery of natural product-derived immunomodulating drugs: an IUPHAR positional review. **Pharmacological Research**. v. 177, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2022.106076>.

WANG, Y.; ZHANG, C. F.; OCHIENG, O. W., et al. Evolution of 101 Apocynaceae plastomes and phylogenetic implications. **Mol Phylogenet Evol.** v. 180:107688, 2023, <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2022.107688>

WANG, Y. B.; ZHAO, D.; SU, S. S.; CHEN, G.; WANG, H. F.; PEI, Y. H. Twelve New Seco-Pregnane Glycosides from *Cynanchum taihangense*. **Molecules**, v. 27, 5500, 2022. <https://doi.org/10.3390/molecules27175500>

WATANABE, S.; ALEXANDER, M.; MISHARIN, A.V.; BUDINGER, G.R.S. The Role of Macrophages in the Resolution of Inflammation. **J. Clin. Investig.** v. 129, p. 2619–2628, 2019. <https://doi.org/10.1172/JCI124615>

WEN, S.; CHEN, Y.; LU, Y., et al. Cardenolides from the Apocynaceae family and their anticancer activity. **Fitoterapia**, v. 112, p. 74–84, 2016, <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2016.04.023>

WILLIAMS, T. L. D. et al. **Foye's principles of chemistry: seventh edition**. Ed. Lww, Jan, 2012.

WU, X.; YIN, C.; MA, J., et al. Polyoxypregnanes as safe, potent, and specific ABCB1-inhibitory pro-drugs to overcome multidrug resistance in cancer chemotherapy *in vitro* and *in vivo*. **Acta Pharm Sin B**, v. 11, p. 1885–1902, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2020.12.021>.

WYNBERG, R. Biopiracy: Crying wolf or a lever for equity and conservation? **Res Policy**, v. 52, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.respol.2022.104674>

XIE, F.; DONG, H.; ZHANG, H. Regulatory Functions of Protein Tyrosine Phosphatase Receptor Type O in Immune Cells. **Front Immunol**, v. 12, 2021. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.783370>.

YAN, Y.; TANG, P.; ZHANG, X.; WANG, D.; PENG, M.; YAN, X.; HU, Z.; TANG, L.; HAO, X. Anti-TMV Effects of Seco-Pregnane C₂₁ Steroidal Glycosides Isolated from the Roots of *Cynanchum paniculatum*. **Fitoterapia**, v. 161, 105225, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2022.105225>

YE, H.; LI, C.; YE, W., et al. Medicinal Angiosperms of Asclepiadaceae and Periplocaceae. In: Common Chinese Materia Medica. **Springer Nature Singapore**, p. 539–598, 2022. http://dx.doi.org/10.1007/978-981-16-5892-1_10.

YOSHIKAWA K, OGATA H, ARIHARA S, et al. Antisweet Natural Products. XIII. Structures of Alternosides I-X from *Gymnema alternifolium*. **Chem Pharm Bull**, v. 46, p. 1102–1107, 1998. <https://doi.org/10.1248/cpb.46.1102>.

YULIN, R.; BETHANY, G. E.; JOSHUA, M. H., et al. Bioactive small-molecule constituents of Lao plants. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 15, p. 540–559, 2021. <https://doi.org/10.5897/JMPR2021.7137>.

YUNES, R.A.; PIZZOLATTI, M.G.; SANT'ANAB, A.E.G.; HAWKESC, G.E.; CALIXTOD, J.B. The Structure of Velutinol A, an Anti-Inflammatory Compound with a

Novel Pregnane Skeleton. **Phytochem. Anal.** v. 4, p. 76–81, 1993.
<https://doi.org/10.1002/pca.2800040205>

ZAKARIA, M. N. M.; ISLAM, M. W.; RADHAKRISHNAN, R, et al. Anti-nociceptive and anti-inflammatory properties of *Caralluma arabica*. **J Ethnopharmacol**, v. 76, p.155–158, 2001, [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(01\)00208-2](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(01)00208-2).

ZHANG, X.; GAO, M.; RAO, Z, et al. The antitumour activity of C₂₁ steroidal glycosides and their derivatives of Baishouwu: A review. **J Ethnopharmacol**, n. 293, 2022.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2022.115300>

ZHANG, Y.; YANG, Y.; YAN, C., et al. A review of the ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of *Cynanchum atratum*. **J Ethnopharmacol**, 284, 2022.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114748>

ZHAO, D.; SU, S. S.; CHEN, S. F., et al. Two new C₂₁ steroidal glycosides isolated from *Cynanchum komarovii*. **Chin J Nat Med**, v. 16, p. 610–614, 2018.
[https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(18\)30098-0](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(18)30098-0)

ZHOU, X.; XIA, W.; ZHANG, Y., et al. *Cynanchum paniculatum* (Bunge) Kitag. ex H. Hara: A review of its ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology. **J Ethnopharmacol**. 260:112994, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112994>.

ZHU, Y.; OUYANG, Z.; DU, H., et al. New opportunities and challenges of natural products research: When target identification meets single-cell multiomics. **Acta Pharm Sin B** v. 12, p. 4011–4039, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2022.08.022>.

ZIDORN, C. Plant chemophenetics – A new term for plant chemosystematics/plant chemotaxonomy in the macro-molecular era. **Phytochemistry**, p. 163-147, 2019.
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2019.02.013>.
