



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

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

**ANÁLISE QUIMIOTAXONÔMICA DE DITERPENOS EM
QUATRO GÊNEROS DE EUPHORBIACEAE COM
OCORRÊNCIA NO SEMIÁRIDO BRASILEIRO, ESTUDO
FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA
DE *JATROPHA RIBIFOLIA* (POHL) BAILL.**

THALISSON AMORIM DE SOUZA

João Pessoa - PB

2024

THALISSON AMORIM DE SOUZA

**ANÁLISE QUIMIOTAXONÔMICA DE DITERPENOS EM
QUATRO GÊNEROS DE EUPHORBIACEAE COM
OCORRÊNCIA NO SEMIÁRIDO BRASILEIRO, ESTUDO
FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE
JATROPHA RIBIFOLIA (POHL) BAILL.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro
de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da
Paraíba, como um dos requisitos para obtenção do
título de Doutor em Produtos Naturais e Sintéticos
Bioativos. Área de Concentração: Farmacoquímica.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Sobral da Silva.

Coorientador: Prof. Dr. Lucas Silva Abreu

João Pessoa-PB

2024

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S729a Souza, Thalisson Amorim de.

Análise quimiotaxonômica de diterpenos em quatro gêneros de Euphorbiaceae com ocorrência no semiárido brasileiro, estudo fitoquímico e avaliação da atividade biológica de *Jatropha ribifolia* (Pohl) Baill / Thalisson Amorim de Souza. - João Pessoa, 2024.
210 f. : il.

Orientação: Marcelo Sobral da Silva.

Coorientação: Lucas Silva Abreu.

Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. Fitoquímica - Câncer. 2. Compostos antivirulência. 3. Diterpenos macrocíclicos. 4. Redes neurais. I. Silva, Marcelo Sobral da. II. Abreu, Lucas Silva. III. Título.

UFPB/BC

CDU 581.19(043)

**ANÁLISE QUIMIOTAXONÔMICA DE DITERPENOS EM QUATRO
GÊNEROS DE EUPHORBIACEAE COM OCORRÊNCIA NO SEMIÁRIDO
BRASILEIRO, ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
BIOLÓGICA DE *JATROPHA RIBIFOLIA* (POHL) BAILL.**

THALISSON AMORIM DE SOUZA

Tese defendida e aprovada para obtenção do grau de Doutor em Farmacoquímica.

João Pessoa, 22 de novembro de 2024.

Comissão Examinadora:



Documento assinado digitalmente

JOSEAN FECHINE TAVARES

Data: 25/04/2025 15:50:32-0300

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

Prof. Dr. Josean Fechine Tavares

(Universidade Federal da Paraíba)

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Josean Fechine Tavares'.

Prof. Dr. Ali Tahrioui

(Université de Rouen-Normandie)

Prof. Dr. Sócrates Golzio dos Santos

(Universidade Federal da Paraíba)

Prof. Dr. Francisco Jaime Mendonça Jr.

(Universidade do Estadual da Paraíba)

Prof. Dr. Hector Henrique Ferreira Koolen

(Universidade Federal do Amazonas)

Dedico este trabalho à minha família, em especial aos meus pais Erisvaldo e Ofélia pelo apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

Muitos são os agentes que contribuíram para a concretização deste trabalho de tese. Deste modo, agradeço primeiramente a Deus por me iluminar com seus dons, concedendo sabedoria e inspiração para vislumbrar e compreender a beleza contida nos compostos naturais, reflexo da sublimidade envolta na criação.

À minha família representada pelos meus pais (Maria Ofélia e Erisvaldo) e irmãos (Thenisson e Geisa) por se fazerem sempre presentes por toda esta jornada. Não posso deixar de mencionar as minhas avós (Noelia e Liodete) por todo carinho e suporte desde os meus primeiros anos de vida. E aos demais familiares tios, tias e primos que tem acompanhado e apoiado, mesmo que remotamente, o meu caminhar entre os enredos da vida acadêmica.

Em seguida, gostaria de registrar meu reconhecimento a algumas pessoas que contribuíram com as etapas iniciais da minha formação, ainda no interior da Bahia. O tempo nos permite perceber a importância dessas figuras não apenas na capacitação técnica, mas também na formação de seres humanos livres. Assim, menciono os nomes de alguns dos professores que impactaram positivamente estimulando a busca continuada por conhecimento, nas ciências exatas e sociais, Tadeu Duarte, Roberta Machado, Lígia Calina, Luciana Vilela, e Danila Dourado

“Da minha aldeia vejo quanto da terra se pode ver o Universo”, dizia Fernando Pessoa em um dos seus heterônimos. Porém, na vida, para se tornar do tamanho do que se vê e não do tamanho da própria altura, faz-se necessário enxergar o universo a partir de diferentes perspectivas. E para isso, atravessamos...aldeias, cidades e oceanos em busca de algo maior. Este algo aqui se traduz em conhecimento. Com base nessa premissa, agradeço aos mestres que tem me guiado por esta fascinante travessia, servindo de inspiração como Professores e Pesquisadores. A começar cito o Prof. Eudes Velozo que abriu as portas do Laboratório para um aluno ainda no primeiro semestre da graduação. Em seguida, ao meu Orientador (o Prof. Marcelo Sobral), ao Prof. Josean Fachine e ao meu Coorientador (Prof. Lucas Abreu), pelos quais mantenho profunda admiração. Registro ainda a felicidade de ter partilhado discussões científicas bastante construtivas e ser testemunha do entusiasmo deles no estudo da química de produtos naturais. Incluo também a Prof^a. Silvie Chevalier, que com aprendi um pouco sobre microbiologia e sobre a importância de pensar nas questões adequadas para responder a problemas científicos.

Aos membros do LMCA, com quem tive a oportunidade de conviver e aprender nos últimos anos. Destaco os nomes de alguns que já concluíram seus ciclos formativos: Joanda, Laiane, Juliana, Jordana, Anderson, George, Sabrina, Arthur, Kaio, César, Diego e Pedro. Aos colegas da turma, com quem dividi espaços diariamente durante a pós: Rodrigo, Edileuza, Natanel, Gabriela, Ana Rita, Ranna, Jociano, Thiago, Anauara, Nikole, Emilly e mais recentemente Karoline, Eloiza, Carlos, Luiz, Beatriz e Mariana. Aos servidores Marcelo, Evandro, Yuri e Madalena pela disponibilidade e ajuda, e aos professores Barboza e Humberto. Menciono ainda Sr. Ivan, Rose, Adriano, Anderson e Junior por nos auxiliarem diariamente a manter as estruturas dos laboratórios em pleno funcionamento.

Aos membros da banca examinadora, que prontamente concordaram em avaliar o conteúdo deste trabalho e contribuíram para melhorar sua qualidade por meio de valorosas sugestões.

Ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PgPNSB) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Aos amigos no Chemoinformatics Lab e do ONCOFAR. Tanto na figura dos alunos (Alan, Adiel, Natália, Rafael, Ramon, Paulo, Karinne e Geovanna), quanto dos seus coordenadores (Marianna Sobral, Marcus e Luciana Scotti). Aos amigos de outros grupos: Flávio, Janderson, Wallace, Alisson, Alessya e demais parceiros de pesquisa, os Professores Samuel Cibulski, Fátima Agra, Cristiane Villareal e Walnês Jr.

A toda equipe do CBSA na Université de Rouen por sua hospitalidade e acolhimento. Evidentemente, agradeço também aqueles cuja amizade o intercambio permitiu construir, tanto em meio aos longos experimentos (Anne Sophie, Heloise, Emilly, Clara, Victoire, Madelina, Mathieu, Adrien, Josepin e Meryem) quanto fora do laboratório partilhando bons momentos com Rached, Meilane, Dayana, Vitória, Raimundo Jr. e Cristiane.

Aos meus amigos de fora da dimensão acadêmica, alguns desses já de longa data: Douglas, Railda, Edijane, Rousy, Mylla, Itana, Gustavo, Piero, Dani Pimenta, Dannily, Dani Santana, Dani reis, Camila, Fernanda, Aline, Ellen, Jhon, Guilherme, Maiara, Natália Gaion, Geovana, Elaine, Eugênio, Adileuda e Ygor (os três últimos representam praticamente minha família na Paraíba). E por fim, mas não menos importante, os amigos que tive a oportunidade

de conhecer entre aulas e bailes em João Pessoa nos últimos anos; Michele, Rosilene, Nyedja, Débora, Samir, Marcinho, Silvia, Juju, Carol, Thomaz, Isabela. Poder contar com cada um de vocês foi um presente que a vida me concedeu.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigado

RESUMO

SOUZA, T. A. **Análise quimiotaxonômica de diterpenos em quatro gêneros de Euphorbiaceae com ocorrência no semiárido brasileiro, estudo fitoquímico e avaliação da atividade biológica de *Jatropha ribifolia* (Pohl) Baill.** João Pessoa, 2024. 211p. Tese de Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba.

O presente trabalho demonstra a quimiodiversidade das espécies de Euphorbiaceae com ocorrência no semiárido brasileiro por meio da análise quimiotaxonômica de diterpenos. Além disso, destaca a diversidade estrutural, atividades biológicas e potenciais aplicações farmacêuticas dos diterpenos isolados de espécies de *Jatropha*. Por fim, descreve a investigação fitoquímica e estudos de atividade do extrato e compostos isolados de *Jatropha ribifolia* por meio de análises *in silico* e *in vitro*. Como resultados, o uso da quimiotaxonomia com base em ferramentas de inteligência artificial e dados moleculares permitiram identificar padrões químicos entre *Jatropha*, *Cnidoscopus*, *Sapium* e *Stillingia*, gêneros de Euphorbiaceae com ocorrência na Caatinga, e sugerir relações filogenéticas entre as espécies analisadas. Estes achados, aliados a revisão de literatura, demonstraram grande potencial do gênero *Jatropha* para prospecção de novos agentes citotóxicos e antibacterianos. Estes achados permitiram identificar espécies de *Jatropha* ainda pouco exploradas do ponto de vista químico e farmacológico, levando a *J. ribifolia*. A investigação fitoquímica desta espécie permitiu o isolamento de 17 compostos, sendo sete deles inéditos na literatura, denominados então Ribifolonas A-G. Ensaio por *docking molecular* indicam grande potencial antitumoral para estas novas substâncias. Paralelamente, ensaios com o extrato e o seu composto majoritário, jatrofona, demonstraram atividade antibiofilme contra *P. aeruginosa*. Assim, este trabalho contribui para o conhecimento da quimiodiversidade do semiárido brasileiro e abre caminhos para o desenvolvimento de novas substâncias eficazes no combate a problemas graves de saúde pública na atualidade como o câncer e patógenos multirresistentes.

Palavras-chave: Diterpenos macrocíclicos, compostos antivirulência, redes neurais, fitoquímicos

ABSTRACT

SOUZA, T. A. **Chemotaxonomic analysis of diterpenes in four genera of Euphorbiaceae occurring in the Brazilian semi-arid region, phytochemical study and evaluation of the biological activity of *Jatropha ribifolia* (Pohl) Baill.** João Pessoa, 2024. 211p. Tese de Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba

The present work demonstrates the chemodiversity of Euphorbiaceae species found in the Brazilian semi-arid region through a chemophenetic analysis based on diterpenes. Additionally, it highlights the structural diversity, biological activities, and potential pharmaceutical applications of diterpenes isolated from *Jatropha* species. Finally, it describes the phytochemical investigation and activity studies of the extract and isolated compounds from *Jatropha ribifolia* through *silico* and *in vitro* analyses. As results, the use of chemophenetics based on artificial intelligence tools and molecular data allowed for the identification of chemical patterns among the genera *Jatropha*, *Cnidoscolus*, *Sapium*, and *Stillingia*, Euphorbiaceae genera occurring in the Caatinga, and suggested phylogenetic relationships between the analyzed species. These findings, along with a literature review, indicated the significant potential of the *Jatropha* genus for the identification of new cytotoxic and antibacterial agents. The phytochemical study of *J. ribifolia* led to the isolation of 17 compounds, seven of which are novel in literature, named Ribifolones A-G. Molecular docking assays indicate high cytotoxic potential for these new substances. Assays with the extract and its major compound, jatrophone, demonstrated antibiofilm activity against *P. aeruginosa*. Thus, this work contributes to the understanding of the chemodiversity of the Brazilian semi-arid region and opens avenues for the development of new bioactive agents effective in combating serious current public health challenges, such as cancer and antimicrobial-resistant pathogens.

Keywords: Macrocyclic diterpenes, antivirulence compounds, neural networks; phytochemicals

LISTA DE ABREVIATURAS / SIGLAS

AcOEt	Acetato de etila
APT	<i>Attached Proton Test</i>
BB	<i>Broadband</i>
C	Carbono
¹³C	Carbono 13
CC	Cromatografia em Coluna
CCDA	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
d	Dupleto
dd	Duplo dupleto
ddd	Duplo duplo dupleto
dl	Dupleto largo
dq	Duplo quarteto
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
EM	Espectrometria de massa
EMAR-IES	Espectrometria de massa de alta resolução com ionização porelectrospray
EtOH	Etanol
g	Grama
¹H	Hidrogênio
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>

HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
HRESIMS	<i>High resolution electrospray ionization mass spectroscopy</i>
Hz	Hertz
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento
m	Multiplete
MeOH	Metanol
mg	Miligrama
MHz	Megahertz
mL	Mililitro
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Spectroscopy</i>
ppm	Partes por milhão
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
s	Simpleto
sl	Simpleto largo
t	Triplete
td	Triplo duplete
tl	Triplete largo
UV	Ultravioleta
δ	Deslocamento químico
μm	Micrômetros

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	16
1. CAPÍTULO 1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	21
1.1. Considerações sobre a família Euphorbiaceae.....	21
1.2. Considerações sobre Quimiotaxonomia.....	23
1.3. Considerações sobre o gênero <i>Jatropha</i>	24
1.4. A espécie <i>Jatropha</i> <i>ribifolia</i>	26
1.5. Considerações sobre câncer.....	28
1.6. Considerações sobre resistência aos antimicrobianos (RAM).....	30
2. CAPÍTULO 2. ANÁLISE QUIMIOTAXONÔMICA DE DITERPENOS DE EUFORBIÁCEAS: UM CAMINHO PARA NOVOS AGENTES CITOTÓXICOS	41
2.1 Introdução.....	43
2.2 Metodologia.....	44
2.2.1 Composição da base de dados	44
2.2.2 Reconstrução filogenética	44
2.2.3 Mapas auto-organizáveis (SOM).....	44
2.2.3.1 Obtenção dos descritores moleculares	44
2.2.3.2 Obtenção de SOM.....	45
2.3 Resultados e Discussão	46
2.4 Conclusão	53
3 CAPÍTULO 3. DITERPENOS DA <i>JATROPHA</i> : REVISÃO DA SUA DIVERSIDADE ESTRUTURAL, DESEMPENHO TERAPÊUTICO E FUTURAS APLICAÇÕES FARMACÊUTICAS	59
3.1 Introdução.....	61
3.2 Pesquisa na literatura e análise drug likeness	62
3.2.1 Estratégia de pesquisa na literatura.....	62

3.2.2	Drug likeness de diterpenos de <i>Jatropha</i>	62
3.3	Biossíntese	63
3.4	Extração e isolamento	65
3.5	Diversidade e caracterização estrutural dos diterpenos de <i>Jatropha</i>	88
3.6	Síntese química dos diterpenos de <i>Jatropha</i>	90
3.7	Atividade biológica	90
3.8	Propriedades Drug-likeness.....	95
3.9	Perspectivas.....	99
3.10	Conclusões.....	101
3.11	Informações adicionais.....	124
4.	CAPÍTULO 4. RIBIFOLONAS A-G, NOVOS DITERPENOS COM POTENCIAL CITOTÓXICO ISOLADOS DE <i>JATROPHA RIBIFOLIA</i> (POHL) BAILL (EUPHORBIACEAE)	134
4.1	Introdução.....	136
4.2	Materiais e métodos.....	136
4.2.1	<i>Procedimentos experimentais</i>	136
4.2.2	<i>Material vegetal</i>	137
4.2.3	<i>Extração e isolamento</i>	137
4.2.4	<i>Ancoragem molecular</i>	138
4.3	Resultados e discussão.....	139
4.4	Conclusão	149
5	CAPÍTULO 5. O EXTRATO DE <i>JATROPHA RIBIFOLIA</i> (EUPHORBIACEAE) E O SEU COMPOSTO MAJORITÁRIO APRESENTAM ACTIVIDADE ANTIBIOFILME CONTRA <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	188
5.1	Introdução.....	190
5.2	Materiais and Métodos	191
5.2.1	<i>Quantificação do jatrofona</i>	191

5.2.2	<i>Substância química de referência</i>	191
5.2.3	<i>Solventes e reagentes</i>	191
5.2.4	<i>Método analítico por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC)</i>	191
5.2.5	<i>Capas bacteriana, condições de crescimento e produtos químicos</i>	192
5.2.6	<i>Cinética de crescimento</i>	192
5.2.7	<i>Produção de piocianina</i>	192
5.2.8	<i>Formação de biofilme</i>	193
5.2.9	<i>Dispersão de biofilme</i>	193
5.2.10	<i>Formação de biofilme e microscopia confocal de varredura a laser</i>	194
5.2.11	<i>Anisotropia de fluorescência</i>	194
5.2.12	<i>Dados e análises estatísticas</i>	195
5.3	Resultados	195
5.3.1	<i>O extrato de raízes de J. ribifolia contém níveis elevados de jatrofona</i>	195
5.3.2	<i>A exposição a JRR e JTP não afetou a cinética de crescimento de P. aeruginosa</i>	196
5.3.3	<i>JRR e o JTP não alteraram profundamente a produção de piocianina por P. aeruginosa</i>	197
5.3.4	<i>JRR e o JTP afetam a formação de biofilme de P. aeruginosa</i>	198
5.3.5	<i>JRR e o JTP não afetaram a dispersão do biofilme de P. aeruginosa</i>	199
5.3.6	<i>A exposição a JRR e JTP afeta a fluidez da membrana de P. aeruginosa</i> ...	199
5.4	Discussão	200
5.5	Conclusões	203
	CONCLUSÃO	211

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

Os produtos naturais são substâncias quimicamente diversas obtidas a partir da fauna, flora e microrganismos, como fungos e bactérias. Estes compostos possuem amplo espectro de aplicação tanto do ponto de vista terapêutico quanto industrial. Desde a antiguidade a humanidade faz uso das plantas medicinais como instrumento de práticas curativas em várias culturas (R. ALMEIDA; T. MARTINEZ; C. PINTO, 2017). O advento das técnicas de caracterização e análise tem permitido progressivamente explorar e descobrir novos princípios ativos contidos nas espécies medicinais, levando a descoberta de compostos pertencentes a várias classes de metabólitos bioativos (LOPES; VIEIRA, 2017).

Apesar dos avanços na área farmoquímica, o uso de plantas continua sendo um elemento essencial para o acesso e promoção da saúde. Neste sentido, a Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que entre 88% dos 170 países membros descrevem uso da medicina tradicional, logo das plantas medicinais que dela fazem parte, para o tratamento de diversas afecções (HAMILTON, 2004). Desta forma, a preservação dos biomas associado ao desenvolvimento de modelos de bioeconomia tem se tornado uma demanda crescente na contemporaneidade e presente na definição dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS), adotados desde 2015 pelas Nações Unidas (BIERMANN et al., 2022).

No Brasil, o uso de plantas de medicinais no âmbito da saúde pública foi regulamentado através da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) (Brasil, 2006). A PNPIC busca integrar o uso das plantas medicinais no Sistema Único de Saúde, respaldando o uso tradicional dessas práticas. Com isso, esta política contribui para o fortalecimento da fitoterapia junto à população brasileira e assegura o desenvolvimento de estudos científicos que comprovem eficácia e segurança das espécies medicinais no contexto clínico, criando cenário ideal para o desenvolvimento de novos medicamentos fitoterápicos.

A biodiversidade brasileira é descrita como uma das mais diversas do mundo, apesar disso todos os domínios fitogeográficos têm sido devastados em decorrência das mudanças climáticas e sobretudo da ação antrópica, associada a agricultura e pecuária extensivas. A Caatinga, principal bioma do semiárido brasileiro, conta apenas com 11,04% da sua cobertura vegetal nativa em toda a região (ARAUJO et al., 2023). Desta forma, considerando as preconizações das ODS e o respaldo assegurado pela PNPIC o desenvolvimento de estudos acerca dos princípios ativos contidos nas

plantas medicinais nativas é de grande valia para o desenvolvimento sustentável de produtos com base na biodiversidade abrangendo os âmbitos social, tecnológico, científico e industrial.

Entre as famílias de plantas com ocorrência descritas no Brasil, Euphorbiaceae se destaca devido a sua variedade de espécies e potencial medicinal (SECCO et al., 2012). No semiárido brasileiro muitas plantas deste grupo vegetal são tradicionalmente utilizadas pela população para tratar casos de diarreias, infecções, cefaleia e mesmo câncer. Entre as mais utilizadas, podem ser citadas o velame, pertencente ao gênero *Croton*, a malva, classificada dentro o gênero *Euphorbia*, e também as espécies popularmente conhecidas como “pinhão”, membros do gênero *Jatropha* (CREPALDI et al., 2016). Do ponto de vista químico Euphorbiaceae é capaz de produzir uma miríade de compostos como cumarinas, flavonoides, alcaloides e terpenoides.

Os terpenos compõem classe uma das mais diversas em Euphorbiaceae. Entre eles, os diterpenos se destacam devido ao seu amplo espectro de atividades farmacológicas, mais de 30 esqueletos desta classe são reportados em Euphorbiaceae. Alguns deles possuem apresentam relevância quimiotaxonomica para alguns gêneros (KEMBOI et al., 2021).

Considerando vasto potencial medicinal, farmacológico e químico apresentado pela família Euphorbiaceae em adição as novas tecnologias analíticas empregadas no estudo dos produtos naturais, este trabalho demonstra aplicação de quimiofénética como estratégia para priorização de gêneros ou espécies promissoras para prospecção fitoquímica. Além disso, sumariza os diterpenos do gênero *Jatropha* e descreve o estudo fitoquímico de *Jatropha* *ribifolia*, uma espécie com um grande potencial químico e farmacológico ainda pouco explorado, buscando assim, isolar, identificar e realizar ensaios biológicos das suas substâncias químicas. O presente trabalho contribui com o conhecimento químico e farmacológico da família Euphorbiaceae, estimula a continuidade dos estudos ampliando o trabalho desenvolvido no PPgPNSB.

Referências

ARAUJO, Helder F. P.; CANASSA, Nathália F.; MACHADO, Célio C. C.; TABARELLI, Marcelo. Human disturbance is the major driver of vegetation changes in the Caatinga dry forest region. **Scientific Reports**, vol. 13, no. 1, p. 18440, 27 Oct. 2023. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-45571-9>.

BIERMANN, Frank; HICKMANN, Thomas; SÉNIT, Carole-Anne; BEISHEIM, Marianne; BERNSTEIN, Steven; CHASEK, Pamela; GROB, Leonie; KIM, Rakhyun E.; KOTZÉ, Louis J.; NILSSON, Måns; ORDÓÑEZ LLANOS, Andrea; OKEREKE, Chukwumerije; PRADHAN, Prajal; RAVEN, Rob; SUN, Yixian; VIJGE, Marjanneke J.; VAN VUUREN, Detlef; WICKE, Birka. Scientific evidence on the political impact of the Sustainable Development Goals. **Nature Sustainability**, vol. 5, no. 9, p. 795–800, 20 Jun. 2022. <https://doi.org/10.1038/s41893-022-00909-5>.

CREPALDI, C.G.; CAMPOS, J.L.A.; ALBUQUERQUE, U.P.; SALES, M.F. Richness and ethnobotany of the family Euphorbiaceae in a tropical semiarid landscape of Northeastern Brazil. **South African Journal of Botany**, vol. 102, p. 157–165, Jan. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2015.06.010>.

HAMILTON, Alan C. Medicinal plants, conservation and livelihoods. **Biodiversity and Conservation**, vol. 13, no. 8, p. 1477–1517, Jul. 2004. <https://doi.org/10.1023/B:BIOC.0000021333.23413.42>.

KEMBOI, Douglas; SIWE-NOUNDOU, Xavier; KRAUSE, Rui W. M.; LANGAT, Moses K.; TEMBU, Vuyelwa Jacqueline. Euphorbia Diterpenes: An Update of Isolation, Structure, Pharmacological Activities and Structure–Activity Relationship. **Molecules**, vol. 26, no. 16, p. 5055, 20 Aug. 2021. <https://doi.org/10.3390/molecules26165055>.

LOPES, Norberto P.; VIEIRA, Paulo Cezar. Natural Products Chemistry: What's the Next Step? **ACS Omega**, vol. 2, no. 12, p. 8794–8795, 31 Dec. 2017. <https://doi.org/10.1021/acsomega.7b01671>.

R. ALMEIDA, Márcia; T. MARTINEZ, Sabrina; C. PINTO, Angelo. Chemistry of Natural Products: Plants that Witness Histories. **Revista Virtual de Química**, vol. 9, no. 3, p. 1117–1153, 2017. <https://doi.org/10.21577/1984-6835.20170068>.

SECCO, Ricardo de S.; CORDEIRO, Inês; SENNA-VALE, Luci de; SALES, Margareth F. de; LIMA, Letícia Ribes de; MEDEIROS, Débora; SÁ HAIAD, Bárbara de; OLIVEIRA, Arline Souza de; CARUZO, Maria Beatriz Rossi; CARNEIRO-TORRES, Daniela; BIGIO, Narcisio C. An overview of recent taxonomic studies on Euphorbiaceae s.l. in Brazil. **Rodriguésia**, vol. 63, no. 1, p. 227–242, Mar. 2012. <https://doi.org/10.1590/S2175-78602012000100014>.

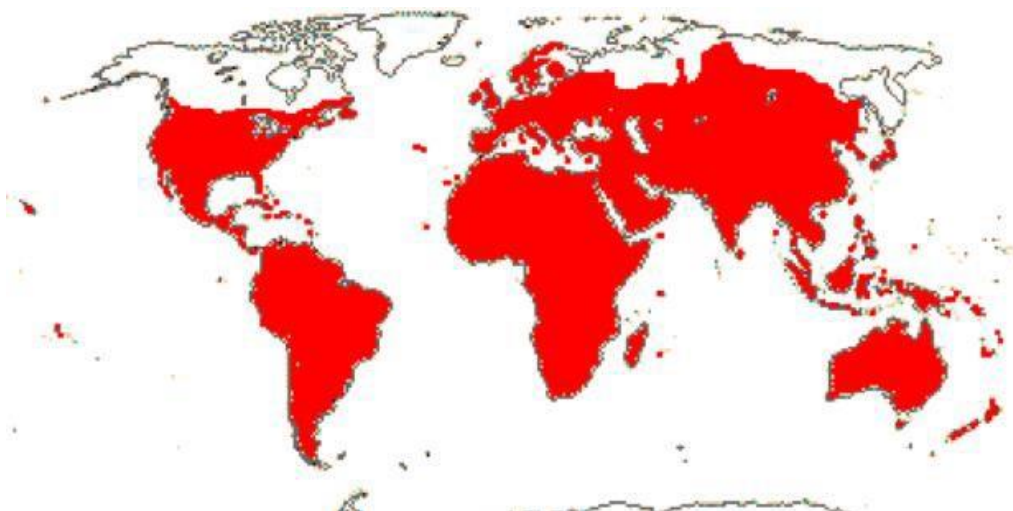
CAPÍTULO 1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1. Considerações sobre a família Euphorbiaceae

A família Euphorbiaceae, da classe dicotiledôneas, é uma das mais amplas e diversificadas famílias entre as plantas angiospermas, abrangem cerca de 300 gêneros e 8000 espécies (SIMPSON, 2010). Compreendem plantas com flores que podem ser encontrados na forma de ervas, arbustos ou árvores (ABOMUGHAI et al., 2024), estas podem se adaptar em zonas temperadas resultando em uma ocorrência cosmopolita, Figura 1. Porém, a maior diversidade ocorre principalmente em regiões tropicais, como florestas da América do Sul, África e Sudeste Asiático (DA SILVA ALMEIDA; RAMALHO; DA SILVEIRA, 2018).

Figura 1. Distribuição geográfica da família Euphorbiaceae



Fonte: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>.

A classificação da família Euphorbiaceae com base em critérios anatômicos apresenta desafios consideráveis devido à enorme diversidade morfológica das plantas que a compõem (WEBSTER, 1994). Como exemplos é possível citar em características como o hábito, estrutura floral e presença de látex, dificultando a criação de critérios anatômicos consistentes para todo o grupo (ALYAS et al., 2024). Com base nas técnicas moleculares, a filogenia se tornou um dos pilares da classificação moderna de plantas, com destaque para esforços globais que culminaram com o sistema APG (Angiosperm Phylogeny Group) (AN ORDINAL CLASSIFICATION FOR THE FAMILIES OF FLOWERING PLANTS, 1998).

O sistema APG surgiu como uma resposta à necessidade de uma classificação mais precisa e baseada em dados genéticos para as Angiospermas. Antes da introdução desse sistema, as classificações botânicas eram amplamente baseadas em características morfológicas e anatômicas, o que levava a inconsistências e revisões frequentes na taxonomia das plantas. De acordo com a última atualização, APG IV (2016), Euphorbiaceae são elas; Acalyphoideae, Crotonoideae, Euphorbioideae e Cheilosoideae (An update of the angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV, 2016). No Brasil, representantes de Euphorbiaceae são reconhecidos devido a sua importância econômica e medicinal, tais como *Ricinus communis* (mamona), *Hevea brasiliensis* (seringueira) e *Manihot esculenta* (mandioca).

Ricinus communis é cultivado principalmente na região nordeste do Brasil devido à sua resistência às condições semiáridas e ao potencial de geração de renda para pequenos produtores (NEVES, Breno Rosa; SANTOS; DONATO, 2013). Segundo a Secretaria da Agricultura, Pecuária, Irrigação, Pesca e Aquicultura a produção de mamona no Estado da Bahia alcançou a marca de 91,4 mil toneladas em 2023. O óleo de mamona, extraído das sementes, é amplamente exportado para a indústria de cosméticos, farmacêutica e de biocombustíveis. *Ricinus communis* possui ainda potencial medicinal significativo, com efeitos promissores contra câncer e úlceras, atuando sobre organismos, bactérias prejudicam a saúde humana (YEBOAH et al., 2021).

Hevea brasiliensis foi fundamental para a história do Brasil, especialmente durante o chamado "Ciclo da Borracha", no final do século XIX e início do século XX. A seringueira é a principal fonte de látex natural, usado na produção de borracha, que passou a ser altamente demandada devido ao desenvolvimento da indústria automobilística. Na medicina popular, o látex de *Hevea brasiliensis* é aplicado topicamente para ajudar na cicatrização de feridas e de infecções causadas por um inseto parasita, conhecida como *boro* por tribos indígenas da Amazonia boliviana (HAJDU; HOHMANN, 2012). Pesquisas mais recentes identificaram peptídeos, similares a heveína, pela primeira vez no látex da seringueira, estes apresentaram atividade antifúngica significativa *in vitro*. O látex também é extensivamente estudado visando desenvolvimento de materiais biocompatíveis, como curativos. Estes achados indicam o potencial medicinal da espécie, que é ainda pouco explorado (GUERRA et al., 2021; MAZURKIEWICZ-PISAREK; BARAN; CIACH, 2023)

Manihot esculenta é uma planta de grande importância histórica e cultural no Brasil, devido ao seu papel como alimento básico para várias populações desde os tempos pré-coloniais. A mandioca é originária da América do Sul, e os povos indígenas brasileiros já a cultivavam e consumiam antes da chegada dos colonizadores. Do ponto de vista medicinal, a planta é utilizada para tratar

abscessos, feridas e lesões externas; as raízes são combinadas com rum e aplicadas topicamente em crianças para tratar erupções cutâneas (MOHIDIN et al., 2023).

A família Euphorbiaceae possui uma presença significativa no semiárido brasileiro, onde várias espécies se adaptaram bem às condições climáticas da região, como altas temperaturas e baixa disponibilidade de água. A Caatinga, um dos biomas mais característicos do semiárido, possui flora e fauna únicas. Neste domínio fitogeográfico gêneros importantes tem sua ocorrência descrita como *Croton*, *Cnidoscolus*, *Jatropha* e *Euphorbia* (ABDELGADIR; VAN STADEN, 2013; MOURA et al., 2019; SÁTIRO; ROQUE, 2008) Devido a ação antrópica muitas espécies de *Euphorbiaceae* na Caatinga enfrentam ameaças, sendo necessário um enfoque na conservação para evitar a perda de biodiversidade local. A restauração de áreas degradadas com espécies nativas dessa família é uma estratégia para ajudar na recuperação ecológica e no desenvolvimento sustentável do semiárido. Dentre os gêneros mencionados, muitas espécies são utilizadas na medicina tradicional local, com destaque para o gênero *Jatropha*.

1.2. Considerações sobre Quimiotaxonomia

A taxonomia de plantas, é o estudo sistemático da classificação dos organismos vegetais, visando organizá-los em categorias com base em suas semelhanças e diferenças. No século XVIII, o botânico Linnaeus estabeleceu o sistema de nomenclatura para classificar espécies segundo características morfológicas, criando um marco na organização das plantas em grupos bem definidos (GODFRAY, 2007) Contudo, a variabilidade morfológica observada em espécies de aparências semelhantes gerou a necessidade de critérios adicionais para melhor elucidar suas relações evolutivas e filogenéticas.

Ainda na primeira metade do século XX, estudos pioneiros lançaram as bases do que seria denominado quimiotaxonomia, ao investigarem o potencial de compostos químicos como marcadores taxonômicos. Nesse contexto, a quimiotaxonomia, também referida como quimiosistemática, foi consolidando-se como campo de pesquisa ao utilizar metabólitos secundários, tais como alcaloides, flavonoides e terpenos, para diferenciar e organizar as plantas em grupos taxonômicos distintos, complementando a taxonomia clássica (ERDTMAN, 1963).

Os trabalhos quimiotaxonomia, inicialmente, centraram-se em plantas de interesse medicinal nas quais compostos como alcaloides e derivados fenólicos foram identificados e analisados por meio de análises comparativas. Verificou-se que tais substâncias possuíam distribuições específicas em

determinadas famílias de plantas, sugerindo que poderiam atuar como indicadores taxonômicos relevantes (ALSTON; MABRY; TURNER, 1963; BOLSANI et al., 1984).

Entre as décadas de 1950 e 1970, a quimiosistemática foi formalmente consolidada como campo científico, auxiliada por técnicas analíticas modernas à época. A introdução da cromatografia como método-padrão possibilitou a separação e análise dos compostos naturais, tornando-se essencial para os estudos de quimiotaxonomia. A implementação da espectroscopia / espectrofotometria também foi fundamental, especialmente na análise de flavonoides e carotenoides (HARBORNE, 1967; LIAAEN-JENSEN, 1979).

No Brasil, os estudos em quimiosistemática ganharam destaque a partir do trabalho do professor Otto Richard Gottlieb, considerado o fundador da quimiosistemática no país, catalogando uma gama de compostos químicos presentes nos biomas brasileiros. Ele investigou o papel dos compostos químicos tanto na classificação das plantas quanto na compreensão de sua ecologia e evolução. Em alguns dos seus trabalhos, o professor Gottlieb observou que o grau de oxidação de certas classes, como flavonoides e diterpenos, poderiam auxiliar na compreensão das relações evolutivas entre plantas (FIGUEIREDO; KAPLAN; GOTTLIEB, 1995).

Com os avanços da biologia molecular, a quimiosistemática foi progressivamente integrando-se com a filogenia molecular, que possibilitou o uso de dados genéticos como ferramenta adicional para a classificação taxonômica (STUESSY; CRAWFORD, 1983; WINK et al., 2010). Análises de DNA passaram a confirmar e complementar as classificações químicas, sendo que muitos dos padrões químicos observados em plantas puderam ser correlacionados com evidências moleculares, aumentando a confiabilidade das classificações taxonômicas. Com isso, a adoção do termo quimiofenética tem sido proposta para contemplar a integração dos estudos fitoquímicos com dados moleculares, obtidos por meio de técnicas ômicas aplicadas a matrizes vegetais (RAMOS et al., 2022; ZIDORN, 2019).

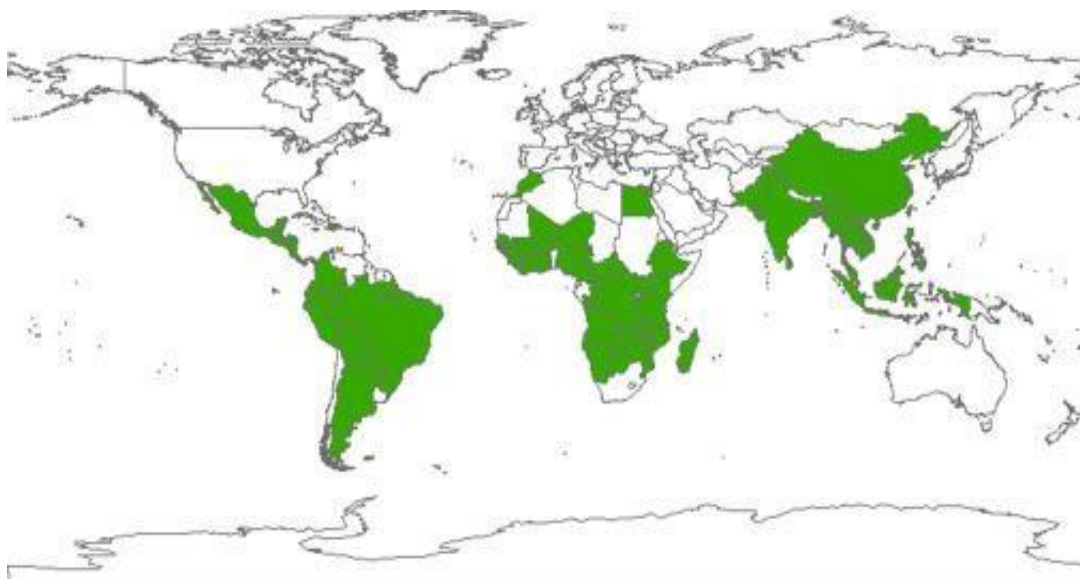
Hoje, a quimiosistemática é de importância incontestável para as ciências biológicas e farmacêuticas. Fornece uma base sólida para a identificação e classificação de plantas, especialmente aquelas com relevância econômica e medicinal. As pesquisas nessa área também favorecem a descoberta de novos compostos com potencial terapêutico, com os constantes avanços nas técnicas analíticas, fortalecendo os apelos contemporâneos a preservação da biodiversidade (CASSAGO et al., 2022; KIM et al., 2016).

1.3. Considerações sobre o gênero *Jatropha*

O termo *Jatropha* tem origem grega e é formado pelas palavras *iatros*, que significa "médico" ou "curador", e *trophe*, que significa "alimento" ou "nutrição". Assim, o nome *Jatropha* pode ser traduzido como "planta medicinal" ou "planta de cura", indicando o uso tradicional e as propriedades terapêuticas atribuídas ao gênero desde a antiguidade (COSTA et al., 2014). Mesmo que algumas espécies sejam tóxicas, as propriedades medicinais são amplamente exploradas em diversas culturas.

O gênero *Jatropha*, abrange aproximadamente 175 espécies encontradas principalmente em regiões tropicais e subtropicais, Figura 2 (RIBEIRO et al., 2024). Espécies deste grupo podem ser encontrados na caatinga, campos limpos, cerrados, florestas ciliares ou de galeria, florestas de terra firme, florestas ombrófilas, restingas e áreas antropizadas. No Brasil, está representado por 22 espécies, das quais nove são endêmicas (MOREIRA et al., 2023). As plantas deste táxon podem variar de pequenos arbustos a árvores de médio porte, com altura que pode chegar a 7 metros, dependendo da espécie. Estudos morfoanatómicos revelaram existência de muitas estruturas secretoras nos órgãos de espécies de *Jatropha*, incluindo cavidades, laticíferos e idioblastos excretorios. Neste mesmo estudo, por meio de histoquímica, os autores indicam o acúmulo de diferentes classes de metabolitos como derivados fenólicos e terpenoides principalmente em idioblastos (SYAHRUNI et al., 2023).

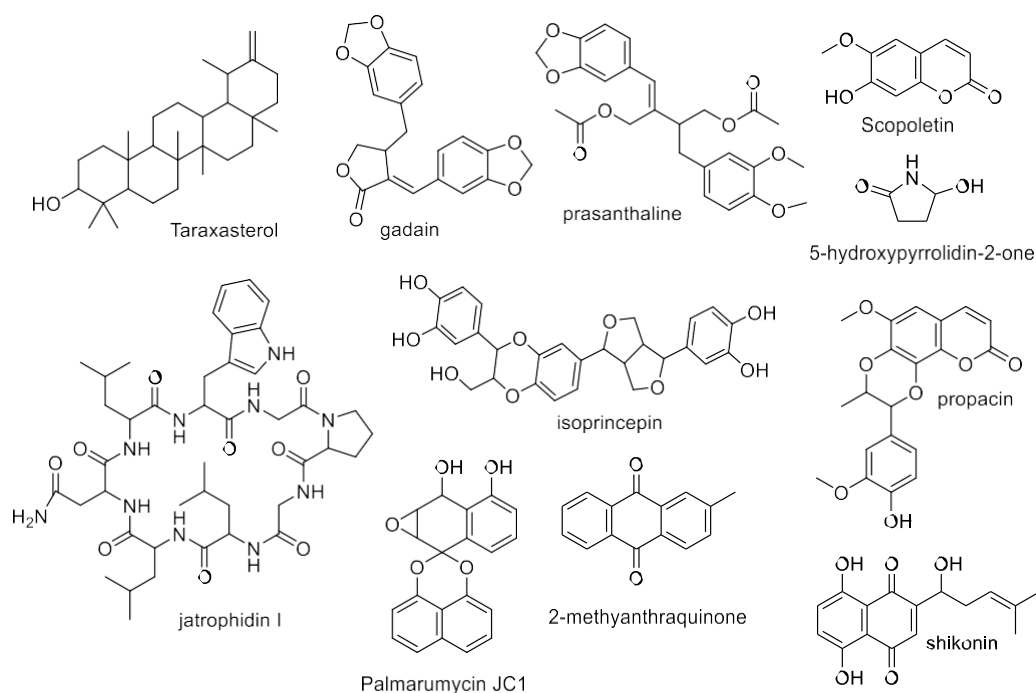
Figura 2. Distribuição geográfica do gênero *Jatropha* (representado por *J. curcas* em verde).



Fonte: adaptado de Eijck et al, 2014.

Jatropha é conhecida tanto pelo potencial medicinal quanto pelo uso de algumas de suas espécies na produção de biocombustíveis (VAN EIJCK et al., 2014). Com relação a sua composição, poucas espécies foram estudadas quimicamente. Apesar disso, compostos de várias classes são descritas nesse gênero como por exemplo; peptídeos, lignanas, flavonoides, cumarinas, alcaloides entre outras. Em meio a variedade de compostos, os terpenoides são os mais relatados (CAVALCANTE; DIEGO DA CONCEIÇÃO SANTOS; GUEDES DA SILVA ALMEIDA, 2020; JUCA et al., 2017), em especial os diterpenos (discutidos em sessão própria adiante), representadas abaixo na figura 3.

Figura 3. Estruturas de algumas substâncias isoladas a partir de espécies de *Jatropha*.



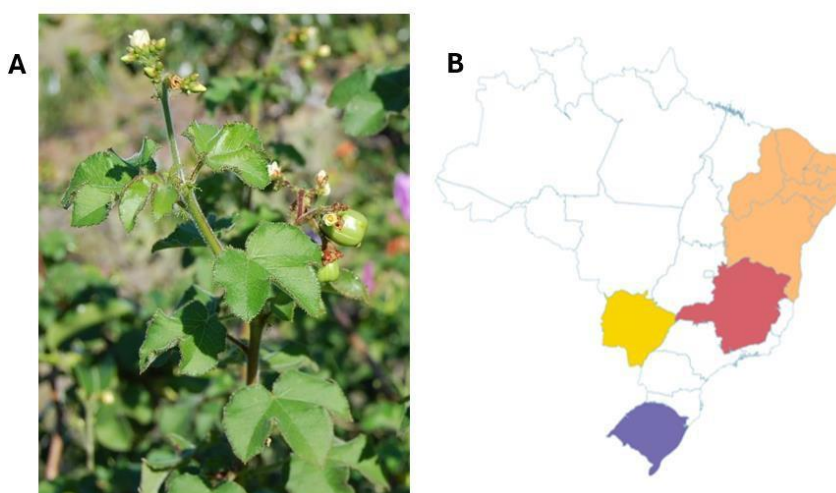
Fonte: Autor, 2024.

1.4. A espécie *Jatropha ribifolia*

Jatropha ribifolia é um arbusto endêmico do Brasil com ocorrência descrita na região Nordeste, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul e Rio Grande do Sul, Figura 4. Popularmente conhecido como “pinhão rasteiro”, “pinhão manso” ou “Minâncora do campo” seu uso medicinal é bastante conhecido, o látex da planta é usado para o tratamento de picadas de cobra (AGRA et al., 2007). Reconhecidas a importância regional da conservação e utilização dos recursos genéticos de plantas medicinais para obtenção de substâncias bioativas, trabalhos sobre comportamento fenológico,

sistemas de reprodução e polinização além de análise dos parâmetros genéticos de frutos, sementes e plântulas são relatados na literatura (NEVES, Edinaldo Luz das; FUNCH; VIANA, 2010). Leal e Agra descreveram as características morfoanatômicas das folhas de duas espécies de *Jatropha*, sendo uma delas *J. ribifolia*, neste trabalho os autores apontam a escassez de estudos fitoquímicos acerca dessas espécies (LEAL; AGRA, 2005).

Figura 4. Espécime de *J. ribifolia* (A), distribuição geográfica de *J. ribifolia* no Brasil (B). Em 4B, se destacam em Laranja – Estados do Nordeste brasileiro, em Rosa – Minas Gerais, em Amarelo – Mato Grosso, e em roxo – Rio Grande do Sul.

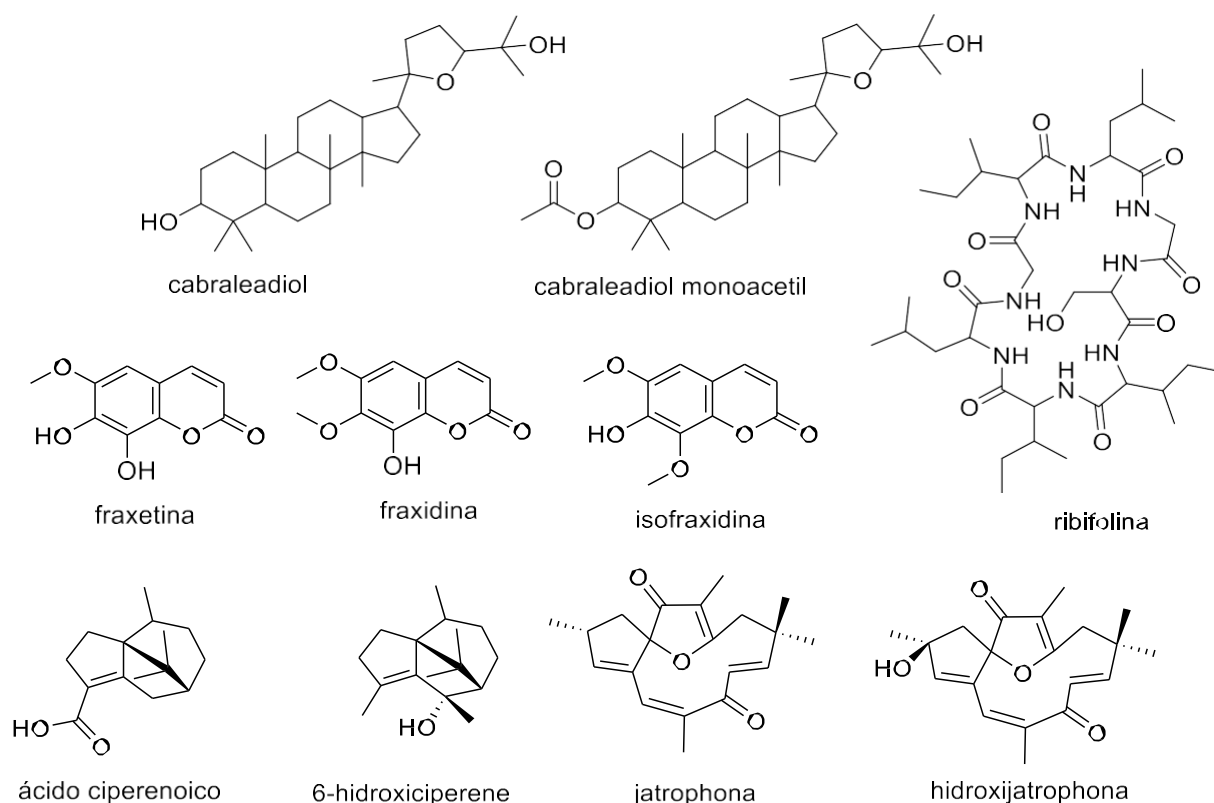


Fonte: <https://reflora.jbrj.gov.br>.

Os relatos acerca da identificação de metabólitos de *J. ribifolia* começaram a ser realizados na última década. Estes estudos culminaram, inicialmente, com o isolamento de um diterpeno do tipo *Jatrophano* (a jatrofona) e ácido ciperanoico, posteriormente triterpenos do tipo damarano e cumarinas foram descritos nas partes subterrâneas. Neste mesmo período, o óleo essencial das raízes também foi caracterizado, revelando a presença de sesquiterpenos (majoritários), monoterpenos e fenilpropanoides. A atividade citotóxica do extrato, óleo essencial e de jatrofona foram avaliados frente a células tumorais demonstrando resultados promissores, principalmente para o composto isolado. Um dos trabalhos mais recentes demonstrou ainda a ocorrência de um orbitídeo (peptídeo cíclico) no extrato das partes aéreas. A purificação subsequente resultou no isolamento de ribifolina, o qual apresentou atividade contra *Plasmodium falciparum*. Ao todo, apenas dez compostos foram isolados de *J. ribifolia*, representadas na Figura 5 (BATISTA et al., 2014; DA SILVA, Celia Eliane de Lara et al., 2013; FERNANDES et al., 2013; PINTO et al., 2015; SILVA, Celia E. L. da et al., 2014).

Estes achados indicam a presença de uma grande diversidade química ainda pouco explorada na espécie.

Figura 5. Substâncias isoladas de *J. ribifolia*



Fonte: Autor, 2024.

1.5. Considerações sobre câncer

O câncer é uma das principais causas de morbidade e mortalidade mundialmente, com repercussão tanto na saúde pública quanto nas esferas econômica e social. Entre os tipos mais prevalentes, destacam-se o câncer de pulmão, mama, cólon, fígado e próstata (SUNG et al., 2021).

O impacto socioeconômico do câncer é amplo e multifacetado, englobando tanto os custos diretos relacionados ao tratamento da doença quanto as perdas indiretas decorrentes da incapacidade laboral, da morte precoce e dos custos com cuidados informais. Estima-se que, apenas nos Estados Unidos, os custos diretos com o tratamento do câncer em 2017 tenham alcançado US\$ 161,2 bilhões (TANG et al., 2023). Este panorama é ainda mais dramático em países de baixa e média renda, onde o acesso a tratamentos adequados é restrito, exacerbando o fardo econômico da doença

A ação de vários fármacos antitumorais resulta na apoptose da célula cancerígena. A morte celular programada, ocorre por meio de duas principais vias: a intrínseca (ou mitocondrial) e a extrínseca (ou mediada por receptores de morte). Ambas desempenham papéis fundamentais na homeostase celular e apresentam relevância no contexto oncológico, dado que disfunções em seus mecanismos são frequentemente associadas à resistência de células tumorais à apoptose, dificultando o tratamento do câncer (LOSSI, 2022; TIAN et al., 2024).

A via intrínseca é acionada por estímulos intracelulares relacionados a danos ao DNA, estresse oxidativo, hipoxia e desequilíbrios na homeostase celular. Essa via é regulada principalmente pela família de proteínas Bcl-2, que inclui tanto as proteínas pró-apoptóticas (como Bax e Bak) quanto antiapoptóticas (como Bcl-2 e Bcl-xL). Em condições normais, essas proteínas mantêm um equilíbrio que preserva a integridade celular. Contudo, em resposta a estresses celulares, as proteínas pró-apoptóticas são ativadas, promovendo a permeabilização da membrana mitocondrial externa. Essa permeabilização permite a liberação de citocromo c para o citoplasma, onde ele se associa a Apaf-1 e à pró-caspase-9, formando o apoptossomo. A ativação subsequente da caspase-9 inicia uma cascata de caspases efetoras, incluindo a caspase-3, resultando na fragmentação controlada do conteúdo celular e, por fim, na apoptose. No câncer, a superexpressão de proteínas antiapoptóticas, como Bcl-2, é uma característica comum. Esse fenômeno impede a liberação do citocromo c e, conseqüentemente, bloqueia a apoptose, promovendo a sobrevivência das células tumorais (JENDROSSEK, 2012).

A via extrínseca é iniciada por estímulos extracelulares e envolve a ativação de receptores de morte na membrana plasmática, a exemplo de DR4 - DR5, e a expressão de p53. A ligação de compostos específicos a esses receptores resulta na formação do complexo de sinalização indutor de morte, que ativa a caspase-8. A caspase-8 pode então ativar diretamente caspases efetoras, como a caspase-3, ou amplificar a via intrínseca (ASHKENAZI, 2008).

Neste contexto, a prospecção de produtos naturais com potencial antitumoral emerge como uma abordagem relevante para o desenvolvimento de novas terapias. Alguns compostos extraídos de espécies vegetais são aplicados no manejo clínico de diferentes tipos de câncer. Destacam-se, dentre essas, os alcaloides derivados de *Catharanthus roseus*, e o paclitaxel, extraído do teixo (*Taxus spp.*) (CHUNARKAR-PATIL et al., 2024). A pesquisa em produtos naturais citotóxicos ganha relevância especialmente diante do crescente desafio representado pela resistência aos tratamentos convencionais. Somado a isso, o desenvolvimento de tecnologias analíticas, como a cromatografia e

a espectrometria de massas, tem permitido a identificação e a caracterização de novos compostos bioativos, ampliando o horizonte de tratamentos possíveis para o câncer (CHEN et al., 2024).

Em meio a diversidade química dos diterpenos descritos em Euphorbiaceae os derivados do casbeno se destacam. Este grupo é caracterizado pela presença de um anel macrocíclico em sua estrutura e apresenta diferentes esqueletos de carbono (C20) tais como; tigliano, ingenano, daphnano, latirano, *Jatrophano*, flexibileno, benzocicloheptano, entre outros (Figura1). Devido a ocorrência restrita a poucos grupos vegetais, alguns destes diterpenos são marcadores químicos importantes (EL-HAWARY et al., 2020; JIMÉNEZ-GONZÁLEZ et al., 2023; WANG et al., 2023; ZI et al., 2023).

Entre os diterpenos macrocíclicos promissores no combate ao cancer é possível citar ingenol A, B e C, derivados semissintéticos das substâncias do látex de *Euphorbia tirucalli*, os quais foram testados contra 70 linhagens de células tumorais e se mostraram ativos contra 15 tipos de câncer, entre eles esôfago, pulmão e pâncreas. O ingenol C (Figura1) promoveu a expressão de proteínas reguladoras do ciclo celular e modulação da PKC (SILVA; ROSA; TANSINI; et al., 2019; SILVA, Viviane A. O; ROSA; MARTINHO; et al., 2019).

A aplicação de uma outra abordagem, a triagem virtual, realizada a partir de uma biblioteca de diterpenoides de Euphorbiaceae levou a identificação do daphnano DD1 (Figura1), o qual é ativo em concentração subnanomolar contra câncer de próstata resistente à castração, sendo capaz de inibir seletivamente a importina- β 1 reduzindo o tumor *in vitro* e *in vivo*, nos últimos anos as importinas vem sendo estudas como alvos terapêuticos no combate ao câncer (CAI et al., 2023; HUANG et al., 2022; MAHIPAL; MALAFA, 2016; VERRICO et al., 2020). Outros ingenanos e daphnanos com potencial citotóxico são reportados na literatura (ALVES et al., 2022; JIN et al., 2019).

O gênero *Jatropha* é rico neste tipo de compostos, e representa uma fonte inestimável para a pesquisa de novos compostos bioativos com potencial antitumoral. O potencial antitumoral dos diterpenos deste grupo vegetal segue discutido em detalhes sessão própria, no capítulo 3.

1.6. Considerações sobre resistência aos antimicrobianos (RAM)

A descoberta dos antibióticos é um dos marcos do século XX, contudo o uso indiscriminado dessas substâncias tem favorecido a prevalência de cepas resistentes e levado a uma grande ameaça à saúde pública na atualidade (MURRAY et al., 2022), a resistência a antimicrobianos (AMR). A AMR ocorre em resposta a modificações genéticas nos microrganismos e resultam na diminuição da eficácia dos medicamentos usados para tratar infecções bacterianas. As consequências da AMR têm grande impacto sobre a mortalidade, a morbidade e a economia global, principalmente em países de

baixa e média renda (IKHIMIUKOR *et al.*, 2022). Estima-se que em 2019 a AMR esteve associada a 4,95 milhões de mortes globalmente, gerando custos anuais de tratamento em torno de US\$ 4,6 bilhões, somente nos Estados Unidos da América (EUA) (BRÜSSOW, 2024; NELSON *et al.*, 2021). Além disso, a análise sistemática sobre AMR 2019-2021 aponta o sul da Ásia, a América Latina e o Caribe dentre as regiões com maiores taxas de mortalidade por AMR, em todas as faixas etárias, estimando mais de 40 milhões de óbitos até 2050 (NAGHAVI *et al.*, 2024).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) relata em vários países altas porcentagens de resistência a cefalosporinas e carbapenêmicos de terceira geração em *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* (ambos Gram-negativos). O aumento de infecções por *Staphylococcus aureus* (Gram-positivo) resistente à metilina (do inglês *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus-MRSA*) também foi relatado (MESTROVIC *et al.*, 2022). Cepas resistentes de *P. aeruginosa* e *MRSA* estão associadas a infecções graves em pulmão e pele, respectivamente, principalmente em ambiente hospitalar e resultam no aumento das taxas de mortalidade podendo alcançar até 30%(BAI *et al.*, 2022; DO REGO; TIMSIT, 2023).

No Brasil, a formalização de uma agenda nacional se concretizou apenas em 2018, com a publicação do Plano de Ação Nacional para Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos no Âmbito do One Health (PAN-BR), atualizado em 2023. O PAN-BR visa reconhecer a AMR como uma questão prioritária e propõe ações de monitoramento e combate a este problema. O mesmo é coordenado pelo Ministério da Saúde e conta com a participação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa) e do Ministério do Meio Ambiente (MMA), seguindo a iniciativa liderada pela OMS (NEGRI *et al.*, 2024). Apesar das ações implementadas recentemente, os impactos da RA em nosso país seguem subestimados e por esta razão demandam pesquisas relacionadas ao tema.

Os mecanismos associados a AMR envolvem diversas estratégias, entre elas a expressão de fatores de virulência e a formação de biofilmes estão entre as vias mais estudadas (RATHER; GUPTA; MANDAL, 2021; SHARMA *et al.*, 2023). A primeira permite ao microrganismo se replicar e se disseminar, em parte subvertendo ou evitando as defesas imunológicas do hospedeiro (CROSS, 2008). Ao passo que o segundo, consiste em aglomerados de bactérias que estão presas a uma superfície e/ou umas às outras e incorporadas em uma matriz complexa composta por diversas substâncias como proteínas e polissacarídeos. Este arranjo protege as bactérias e permite que estas empreguem várias estratégias de sobrevivência para escapar dos sistemas de defesa do hospedeiro e da ação dos antimicrobianos (VESTBY *et al.*, 2020).

Além dos aspectos biológicos, outros fatores limitam o desenvolvimento de novos antimicrobianos, entre eles se destacam a redução do número de empresas, laboratórios e pesquisadores dedicados a descoberta deste tipo de fármaco, resultando em uma linha (do inglês *pipeline*) anêmica que ameaça nosso controle de infecções (COOK; WRIGHT, 2022; PIDDOCK et al., 2024). O futuro dos antibióticos exige inovação em um campo que se baseia em métodos altamente tradicionais de descoberta e desenvolvimento de substâncias bioativas.

Tendo em vista o presente cenário, compostos de origem natural podem atuar sobre diversos alvos moleculares bacterianos (NOURBAKHS et al., 2022), estes são capazes de matar esses organismos resistentes ou ainda reverter a resistência por meio da potencialização do efeito dos antimicrobianos utilizados convencionalmente (DE SOUZA et al., 2023). Além disso, a diversidade de padrões moleculares encontrados nos compostos naturais fornece *in sights* valiosos na descoberta de agentes antimicrobianos inovadores. Como exemplos temos a teixobactina e as malacidinas, duas das mais recentes classes de antibióticos relatadas na literatura (HOVER et al., 2018; PIDDOCK, 2015).

Dentre as bactérias cuja resistência tem aumentado *Pseudomonas aeruginosa* se destaca devido a infecções graves, frequentemente em ambiente hospitalar, e a alta taxa de mortalidade associada a este patógeno (KARRULI et al., 2023). *P. aeruginosa* possui vários mecanismos intrínsecos que dificultam a ação de diversos antibióticos, como exemplos podemos citar a membrana externa impermeável e a expressão de bombas de efluxo. Além disso, este microrganismo é capaz de produzir β -lactamases e formar biofilmes (GAUBA; RAHMAN, 2023).

A presença de biofilmes de *P. aeruginosa* constitui um desafio significativo no tratamento de infecções causadas por essa bactéria. Isto acontece devido a vários fatores, o primeiro deles é que a matriz extracelular do biofilme atua como uma barreira física que limita a difusão dos antibióticos até as camadas mais profundas do biofilme, isso impede que o antibiótico atinja concentrações eficazes nas células bacterianas localizadas no interior do biofilme. Como resultado, muitas das células dentro do biofilme permanecem expostas a concentrações subletais de antibiótico, o que contribui para a persistência e resistência bacteriana. O interior de um biofilme apresenta condições químicas heterogêneas, incluindo gradientes de oxigênio, pH alterado e acumulação de subprodutos metabólicos, que afetam negativamente a atividade dos antibióticos (FERNÁNDEZ-BILLÓN et al., 2023).

Devido aos fatores anteriormente mencionados, as células bacterianas dentro do biofilme podem sobreviver a tratamentos com antibióticos em concentrações elevadas. Quando o tratamento é

interrompido ou a concentração de antibiótico não é suficiente para erradicar todas as células, essas bactérias podem repovoar o local da infecção. Consequentemente, infecções por *P. aeruginosa* podem ser bastante persistentes, marcadas por recaídas e agravamento do quadro do paciente.

Neste sentido, terpenos são uma classe diversificada de metabólitos secundários, amplamente distribuídos em plantas, que desempenham múltiplas funções biológicas, inclusive na modulação de fatores de virulência em patógenos. o que inclui a capacidade de inibir biofilmes, regular a produção de toxinas, interferir na motilidade e no *quorum sensing* bacteriano, inclusive frente a *P. aeruginosa* (DI MATTEO et al., 2024; EL-HOSSEINY et al., 2014).

No que se refere aos diterpenos, os policíclicos e policíclicos aromáticos são mais estudados. Entre os macrocíclicos é sabido que alguns esqueletos, como os mulinanos, apresentam grande potencial frente a inibição de fatores de virulência em *P. aeruginosa* (AZUAMA et al., 2020). Contudo, apesar de promissores os macrocíclicos ainda são pouco investigados frente a essa atividade. Considerando, a ocorrência deste tipo de substância na família Euphorbiaceae e sobretudo no gênero *Jatropha*, evidencia-se um grande potencial bioativo ainda inexplorado para este grupo de plantas.

Referências

ABREU, Lucas Silva; DO NASCIMENTO, Yuri Manguiera; COSTA, Rafael dos Santos; GUEDES, Maria Lenise Silva; SOUZA, Bárbara Nayane Rosário Fernandes; PENA, Lindomar José; COSTA, Vicente Carlos de Oliveira; SCOTTI, Marcus Tullius; BRAZ-FILHO, Raimundo; BARBOSA-FILHO, José Maria; DA SILVA, Marcelo Sobral; VELOZO, Eudes da Silva; TAVARES, Josean Fachine. Tri- and Diterpenoids from *Stillingia loranthea* as Inhibitors of Zika Virus Replication. **Journal of Natural Products**, [s. l.], vol. 82, no. 10, p. 2721–2730, 25 Oct. 2019. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b00251>.

ALLARD, Pierre-Marie; GAUDRY, Arnaud; QUIRÓS-GUERRERO, Luis-Manuel; RUTZ, Adriano; DOUNOUE-KUBO, Miwa; WALKER, Tom W N; DEFOSSEZ, Emmanuel; LONG, Christophe; GRONDIN, Antonio; DAVID, Bruno; WOLFENDER, Jean-Luc. Open and reusable annotated mass spectrometry dataset of a chemodiverse collection of 1,600 plant extracts. **GigaScience**, [s. l.], vol. 12, 28 Dec. 2022. <https://doi.org/10.1093/gigascience/giac124>.

ATHIÊ-SOUZA, Sarah Maria; DE MELO, André Laurênio; DA SILVA, Marcos José; DE SALES, Margareth Ferreira. Taxonomic notes on *Stillingia* (Euphorbiaceae): typifications and a new synonym under *S. salpingadenia*. **Kew Bulletin**, [s. l.], vol. 74, no. 3, p. 45, 9 Sep. 2019. <https://doi.org/10.1007/s12225-019-9834-1>.

BORGES, Ricardo M.; TEIXEIRA, Andrew Magno. On the part that NMR should play in mass spectrometry metabolomics in natural products studies. **Frontiers in Natural Products**, [s. l.], vol. 3, 29 Feb. 2024. <https://doi.org/10.3389/fntpr.2024.1359151>.

CAVALCANTE, Noelly Bastos; DIEGO DA CONCEIÇÃO SANTOS, Alan; GUEDES DA SILVA ALMEIDA, Jackson Roberto. The genus *Jatropha* (Euphorbiaceae): A review on secondary chemical metabolites and biological aspects. **Chemico-Biological Interactions**, [s. l.], vol. 318, p. 108976, Feb. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2020.108976>.

CHENG, Yongxian; QIN, Dapeng. Classification of Diverse Novel Diterpenoids. **Novel Plant Natural Product Skeletons**. Singapore: Springer Nature Singapore, 2024. p. 23–46. https://doi.org/10.1007/978-981-99-7329-3_3.

COUTINHO, Diogenes J. Gusmão; BARBOSA, Mariana O.; SOUZA, Renata J. Carvalho de; SILVA, Adervando Sebastião da; SILVA, Suzene I. da; OLIVEIRA, Antonio

Fernando M. de. Biodiesel potential of the seed oils from some Brazilian native Euphorbiaceae species. **Renewable Energy**, [s. l.], vol. 91, p. 275–281, Jun. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2016.01.064>.

DE BRUYN, Alexandre; MARTIN, Darren P.; LEFEUVRE, Pierre. Phylogenetic Reconstruction Methods: An Overview. [S. l.: s. n.], 2014. p. 257–277. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-767-9_13.

DE OLIVEIRA-JÚNIOR, Raimundo Gonçalves; ALVES FERRAZ, Christiane Adrielly; DE OLIVEIRA, Ana Paula; DA CRUZ ARAÚJO, Edigênia Cavalcante; PRUNIER, Grégoire; BEAUGEARD, Laureen; GROULT, Hugo; PICOT, Laurent; DE ALENCAR FILHO, Edilson Beserra; EL AOUAD, Noureddine; ROLIM, Larissa Araújo; ALMEIDA, Jackson Roberto Guedes da Silva. Bis-nor-diterpene from *Cnidoscolus quercifolius* (Euphorbiaceae) induces tubulin depolymerization-mediated apoptosis in BRAF-mutated melanoma cells. **Chemico-Biological Interactions**, [s. l.], vol. 355, p. 109849, Mar. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2022.109849>.

DE OLIVEIRA-JÚNIOR, Raimundo Gonçalves; FERRAZ, Christiane Adrielly Alves; DE OLIVEIRA, Ana Paula; ARAÚJO, Camila Souza; OLIVEIRA, Layanne Feitosa da Silva; PICOT, Laurent; ROLIM, Larissa Araújo; ROLIM-NETO, Pedro José; ALMEIDA, Jackson Roberto Guedes da Silva. Phytochemical and pharmacological aspects of *Cnidoscolus Pohl* species: A systematic review. **Phytomedicine**, [s. l.], vol. 50, p. 137–147, Nov. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2017.08.017>.

DE SOUZA, Thalisson Amorim; LINS, Francisca Sabrina Vieira; DA SILVA LINS, Jociano; ALVES, Alan Ferreira; CIBULSKI, Samuel Paulo; BRITO, Thiago de Araújo Medeiros; ABREU, Lucas Silva; SCOTTI, Luciana; SCOTTI, Marcus Tullius; DA SILVA, Marcelo Sobral; TAVARES, Josean Fechine. Asclepiadoideae subfamily (Apocynaceae): ethnopharmacology, biological activities and chemophenetics based on pregnane glycosides. **Phytochemistry Reviews**, [s. l.], 22 Mar. 2024. <https://doi.org/10.1007/s11101-024-09914-2>.

DOMINGO-FERNÁNDEZ, Daniel; GADIYA, Yojana; MUBEEN, Sarah; HEALEY, David; NORMAN, Bryan H.; COLLURU, Viswa. Exploring the known chemical space of the plant kingdom: insights into taxonomic patterns, knowledge gaps, and bioactive regions.

Journal of Cheminformatics, [s. l.], vol. 15, no. 1, p. 107, 10 Nov. 2023. <https://doi.org/10.1186/s13321-023-00778-w>.

ERNST, Madeleine; SASLIS-LAGOUDAKIS, C. Haris; GRACE, Olwen M.; NILSSON, Niclas; SIMONSEN, Henrik Toft; HORN, James W.; RØNSTED, Nina. Evolutionary prediction of medicinal properties in the genus *Euphorbia* L. **Scientific Reports**, [s. l.], vol. 6, no. 1, p. 30531, 28 Jul. 2016. <https://doi.org/10.1038/srep30531>.

FATTAHIAN, Maryam; GHANADIAN, Mustafa; ALI, Zulfiqar; KHAN, Ikhlas A. *Jatrophane* and rearranged *Jatrophane*-type diterpenes: biogenesis, structure, isolation, biological activity and SARs (1984–2019). **Phytochemistry Reviews**, [s. l.], vol. 19, no. 2, p. 265–336, 13 Apr. 2020. <https://doi.org/10.1007/s11101-020-09667-8>.

FERNÁNDEZ-TORRAS, Adrià; COMAJUNCOSA-CREUS, Arnau; DURAN-FRIGOLA, Miquel; ALOY, Patrick. Connecting chemistry and biology through molecular descriptors. **Current Opinion in Chemical Biology**, [s. l.], vol. 66, p. 102090, Feb. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2021.09.001>.

FILLBRUNN, Alexander; DIETZ, Christian; PFEUFFER, Julianus; RAHN, René; LANDRUM, Gregory A.; BERTHOLD, Michael R. KNIME for reproducible cross-domain analysis of life science data. **Journal of Biotechnology**, [s. l.], vol. 261, p. 149–156, Nov. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.07.028>.

GARCÍA-SOSA, Karlina; ALDANA-PÉREZ, Rodolfo; MOO, Reyna V. Ek; SIMÁ-POLANCO, Paulino; PEÑA-RODRÍGUEZ, Luis M. Dinimbidiol Ether, a Novel Bioactive Dimeric Diterpene from the Root Extract of *Cnidioscolus souzae*. **Natural Product Communications**, [s. l.], vol. 12, no. 9, p. 1934578X1701200, 1 Sep. 2017. <https://doi.org/10.1177/1934578X1701200903>.

GOMES P. W. P.; HELENA MANNOCHIO-RUSSO; ROBIN SCHMID; SIMONE ZUFFA; TITO DAMIANI; PIETER C. DORRESTEIN. plantMASST - Community-driven chemotaxonomic digitization of plants. **bioRxiv**, [s. l.], May 2024. .

HE, Qiaobian; ZHANG, Li; LI, Ting; LI, Changhao; SONG, Huina; FAN, Peihong. Genus *Sapium* (Euphorbiaceae): A review on traditional uses, phytochemistry, and pharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], vol. 277, p. 114206, Sep. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114206>.

HE, Sijia; LI, Qi; HUANG, Qian; CHENG, Jin. Targeting Protein Kinase C for Cancer Therapy. **Cancers**, [s. l.], vol. 14, no. 5, p. 1104, 22 Feb. 2022. <https://doi.org/10.3390/cancers14051104>.

JILL HARRISON, C.; LANGDALE, Jane A. A step by step guide to phylogeny reconstruction. **The Plant Journal**, [s. l.], vol. 45, no. 4, p. 561–572, 26 Feb. 2006. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02611.x>.

KAPLI, Paschalia; YANG, Ziheng; TELFORD, Maximilian J. Phylogenetic tree building in the genomic age. **Nature Reviews Genetics**, [s. l.], vol. 21, no. 7, p. 428–444, 18 Jul. 2020. <https://doi.org/10.1038/s41576-020-0233-0>.

KATOH, K. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], vol. 30, no. 14, p. 3059–3066, 15 Jul. 2002. <https://doi.org/10.1093/nar/gkf436>.

KOHONEN, Teuvo. Essentials of the self-organizing map. **Neural Networks**, [s. l.], vol. 37, p. 52–65, Jan. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.neunet.2012.09.018>.

KOHONEN, Teuvo. The self-organizing map. **Neurocomputing**, [s. l.], vol. 21, no. 1–3, p. 1–6, Nov. 1998. [https://doi.org/10.1016/S0925-2312\(98\)00030-7](https://doi.org/10.1016/S0925-2312(98)00030-7).

MAURI, Andrea. alvaDesc: A Tool to Calculate and Analyze Molecular Descriptors and Fingerprints. [S. l.: s. n.], 2020. p. 801–820. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0150-1_32.

MAYA-LASTRA, CARLOS A.; STEINMANN, VICTOR W. A Nomenclator of *Cnidoscolus* (Euphorbiaceae). **Phytotaxa**, [s. l.], vol. 346, no. 1, p. 1, 29 Mar. 2018. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.346.1.1>.

MAYA-LASTRA, Carlos A.; STEINMANN, Victor W. Evolution of the untouchables: Phylogenetics and classification of *Cnidoscolus* (Euphorbiaceae). **TAXON**, [s. l.], vol. 68, no. 4, p. 692–713, 10 Aug. 2019. <https://doi.org/10.1002/tax.12093>.

MENDES, Eduarda; RAMALHETE, Cátia; DUARTE, Noélia. Myrsinane-Type Diterpenes: A Comprehensive Review on Structural Diversity, Chemistry and Biological Activities. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], vol. 25, no. 1, p. 147, 21 Dec. 2023. <https://doi.org/10.3390/ijms25010147>.

MENEZES, Renata P.B.; SESSIONS, Zoe; MURATOV, Eugene; SCOTTI, Luciana; SCOTTI, Marcus T. Secondary Metabolites Extracted from Annonaceae and Chemotaxonomy Study of Terpenoids. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [s. l.], vol. 32, no. 11, p. 2061–2070, 2021. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20210097>.

MULLOWNEY, Michael W.; DUNCAN, Katherine R.; ELSAYED, Somayah S.; GARG, Neha; VAN DER HOOFT, Justin J. J.; MARTIN, Nathaniel I.; MEIJER, David; TERLOUW, Barbara R.; BIERMANN, Friederike; BLIN, Kai; DURAIRAJ, Janani; GOROSTIOLA GONZÁLEZ, Marina; HELFRICH, Eric J. N.; HUBER, Florian; LEOPOLD-MESSER, Stefan; RAJAN, Kohulan; DE ROND, Tristan; VAN SANTEN, Jeffrey A.; SOROKINA, Maria; BALUNAS, Marcy J.; BENIDDIR, Mehdi A.; VAN BERGEIJK, Doris A.; CARROLL, Laura M.; CLARK, Chase M.; CLEVERT, Djork-Arné; DEJONG, Chris A.; DU, Chao; FERRINHO, Scarlet; GRISONI, Francesca; HOFSTETTER, Albert; JESPER, Willem; KALININA, Olga V.; KAUTSAR, Satria A.; KIM, Hyunwoo; LEAO, Tiago F.; MASSCHELEIN, Joleen; REES, Evan R.; REHER, Raphael; REKER, Daniel; SCHWALLER, Philippe; SEGLER, Marwin; SKINNIDER, Michael A.; WALKER, Allison S.; WILLIGHAGEN, Egon L.; ZDRAZIL, Barbara; ZIEMERT, Nadine; GOSS, Rebecca J. M.; GUYOMARD, Pierre; VOLKAMER, Andrea; GERWICK, William H.; KIM, Hyun Uk; MÜLLER, Rolf; VAN WEZEL, Gilles P.; VAN WESTEN, Gerard J. P.; HIRSCH, Anna K. H.; LININGTON, Roger G.; ROBINSON, Serina L.; MEDEMA, Marnix H. Artificial intelligence for natural product drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, [s. l.], vol. 22, no. 11, p. 895–916, 11 Nov. 2023. <https://doi.org/10.1038/s41573-023-00774-7>.

NAGARAJAN, Ragupathi; GILL, Kulvinder S. Evolution of Rubisco activase gene in plants. **Plant Molecular Biology**, [s. l.], vol. 96, no. 1–2, p. 69–87, 14 Jan. 2018. <https://doi.org/10.1007/s11103-017-0680-y>.

NOTHIAS-SCAGLIA, Louis-Félix; PANNECOUQUE, Christophe; RENUCCI, Franck; DELANG, Leen; NEYTS, Johan; ROUSSI, Fanny; COSTA, Jean; LEYSSEN, Pieter; LITAUDON, Marc; PAOLINI, Julien. Antiviral Activity of Diterpene Esters on Chikungunya Virus and HIV Replication. **Journal of Natural Products**, [s. l.], vol. 78, no. 6, p. 1277–1283, 26 Jun. 2015. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00073>.

PRICE, Morgan N.; DEHAL, Paramvir S.; ARKIN, Adam P. FastTree 2 – Approximately Maximum-Likelihood Trees for Large Alignments. **PLoS ONE**, [s. l.], vol. 5, no. 3, p. e9490, 10 Mar. 2010. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009490>.

RAMOS, Ygor Jessé; GOUVÊA-SILVA, João Gabriel; DE BRITO MACHADO, Daniel; FELISBERTO, Jessica Sales; PEREIRA, Renato Crespo; SADGROVE, Nicholas John; DE LIMA MOREIRA, Davyson. Chemophenetic and Chemodiversity Approaches: New Insights on Modern Study of Plant Secondary Metabolite Diversity at Different Spatiotemporal and Organizational Scales. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s. l.], vol. 33, no. 1, p. 49–72, 1 Feb. 2023. <https://doi.org/10.1007/s43450-022-00327-w>.

RUBAIY, Hussein N; LUDLOW, Melanie J; SIEMS, Karsten; NORMAN, Katherine; FOSTER, Richard; WOLF, Dietmar; BEUTLER, John A; BEECH, David J. Tonantzitolone is a nanomolar potency activator of transient receptor potential canonical 1/4/5 channels. **British Journal of Pharmacology**, [s. l.], vol. 175, no. 16, p. 3361–3368, 28 Aug. 2018. <https://doi.org/10.1111/bph.14379>.

SAKUGAWA, Gabriela Cristina; CORDEIRO, Inês; PSCHIEDT, Allan Carlos; ROSSI, Monica Lanzoni; MARTINELLI, Adriana Pinheiro; DA LUZ, Cynthia Fernandes Pinto. Palynotaxonomy of tribe Hippomaneae A. Juss. (Euphorbioideae, Euphorbiaceae). **Grana**, [s. l.], vol. 60, no. 6, p. 424–458, 2 Nov. 2021. <https://doi.org/10.1080/00173134.2021.1923798>.

SECCO, Ricardo de S.; CORDEIRO, Inês; SENNA-VALE, Luci de; SALES, Margareth F. de; LIMA, Letícia Ribes de; MEDEIROS, Débora; SÁ HAIAD, Bárbara de; OLIVEIRA, Arline Souza de; CARUZO, Maria Beatriz Rossi; CARNEIRO-TORRES, Daniela; BIGIO, Narcisio C. An overview of recent taxonomic studies on Euphorbiaceae s.l. in Brazil. **Rodriguésia**, [s. l.], vol. 63, no. 1, p. 227–242, Mar. 2012. <https://doi.org/10.1590/S2175-78602012000100014>.

TODESCHINI, Roberto; CONSONNI, Viviana. **Molecular Descriptors for Chemoinformatics**. [S. l.]: Wiley, 2009. <https://doi.org/10.1002/9783527628766>.

VELA, Fátima; EZZANAD, Abdellah; HUNTER, Alan Christy; MACÍAS-SÁNCHEZ, Antonio José; HERNÁNDEZ-GALÁN, Rosario. Pharmacological Potential of

Lathyrane-Type Diterpenoids from Phytochemical Sources. **Pharmaceuticals**, [s. l.], vol. 15, no. 7, p. 780, 23 Jun. 2022. <https://doi.org/10.3390/ph15070780>.

VESANTO, J.; ALHONIEMI, E. Clustering of the self-organizing map. **IEEE Transactions on Neural Networks**, [s. l.], vol. 11, no. 3, p. 586–600, May 2000. <https://doi.org/10.1109/72.846731>.

VITALE, Giovanni Andrea; GEIBEL, Christian; MINDA, Vidit; WANG, Mingxun; ARON, Allegra T.; PETRAS, Daniel. Connecting metabolome and phenotype: recent advances in functional metabolomics tools for the identification of bioactive natural products. **Natural Product Reports**, [s. l.], 2024. <https://doi.org/10.1039/D3NP00050H>.

WANG, Hong-Bing; WANG, Xiao-Yang; LIU, Li-Ping; QIN, Guo-Wei; KANG, Ting-Guo. Tiglane Diterpenoids from the *Euphorbiaceae* and *Thymelaeaceae* Families. **Chemical Reviews**, [s. l.], vol. 115, no. 9, p. 2975–3011, 13 May 2015. <https://doi.org/10.1021/cr200397n>.

XIAO, Yun-De; CLAUSET, Aaron; HARRIS, Rebecca; BAYRAM, Ersin; SANTAGO, Peter; SCHMITT, Jeffrey D. Supervised Self-Organizing Maps in Drug Discovery. 1. Robust Behavior with Overdetermined Data Sets. **Journal of Chemical Information and Modeling**, [s. l.], vol. 45, no. 6, p. 1749–1758, 1 Nov. 2005. <https://doi.org/10.1021/ci0500839>.

ZHAO, Huan; SUN, Lei; KONG, ChuiHao; MEI, WenLi; DAI, HaoFu; XU, FengQing; HUANG, ShengZhuo. Phytochemical and pharmacological review of diterpenoids from the genus *Euphorbia* Linn (2012–2021). **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], vol. 298, p. 115574, Nov. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2022.115574>.

ZIDORN, Christian. Plant chemophenetics – A new term for plant chemosystematics/plant chemotaxonomy in the macro-molecular era. **Phytochemistry**, [s. l.], vol. 163, p. 147–148, Jul. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2019.02.013>.

**2. CAPÍTULO 2. ANÁLISE QUIMIOTAXONÔMICA
DE DITERPENOS DE EUPHORBIACEAE: UM
CAMINHO PARA NOVOS AGENTES
CITOTÓXICOS.**

Análise quimiotaxonômica de diterpenos de Euphorbiaceae: Um caminho para novos agentes citotóxicos

Resumo

A família Euphorbiaceae é reconhecida por sua ampla diversidade de compostos, principalmente diterpenos, os quais apresentam múltiplas atividades biológicas. No Brasil, os gêneros *Jatropha*, *Cnidoscolus*, *Sapium* e *Stillingia* ocorrem predominantemente na região Nordeste. Apesar do expressivo potencial farmacológico, os perfis químicos dessas espécies permanecem pouco explorados. Nesse contexto, a quimiotaxonomia surge como uma ferramenta útil para identificar marcadores potenciais e estruturas bioativas dentro de um determinado táxon. Com o objetivo de analisar os padrões químicos entre os diterpenos presentes nos quatro gêneros selecionados de Euphorbiaceae, aplicou-se quimiotaxonomia por meio da integração da reconstrução filogenética e de mapas auto-organizáveis (SOMs). Dois conjuntos de dados foram construídos: um contendo 324 estruturas de diterpenos e suas 363 ocorrências botânicas, e outro composto por dados genéticos, abrangendo a sequência de RuBisCO das espécies selecionadas. A reconstrução filogenética revelou uma estreita relação entre *Jatropha* e *Cnidoscolus*, embora não tenha sido capaz de distinguir *Sapium* e *Stillingia*. Por outro lado, os SOMs classificaram os diterpenos em dois grupos: o primeiro contendo compostos derivados de benzeno e o segundo, predominantemente do tipo tigliano, que se destaca como uma assinatura química. Ambos os grupos apresentam substâncias com significativa atividade citotóxica. Este estudo pode orientar a descoberta de novos compostos citotóxicos e fornece novas perspectivas para a sistemática das Euphorbiaceae.

Palavras-chave: Terpenoides, caatinga, semiárido, redes neurais.

2.1 Introdução

Caracterizada por uma distribuição Pantropical, a família Euphorbiaceae compreende aproximadamente 8.000 espécies e 340 gêneros. Essa família destaca-se como uma notável produtora de diterpenos, com mais de 1.000 substâncias classificadas em 30 esqueletos já isoladas. A diversidade estrutural desses compostos é atribuída ao elevado grau de funcionalização e aos rearranjos entre os anéis, o que lhes confere expressivo potencial para o estudo de atividades biológicas (Cheng; Qin, 2024; Mendes; Ramalhet; Duarte, 2023; Zhao et al., 2022).

No Brasil, estima-se a ocorrência de cerca de 1.000 espécies e 65 gêneros de Euphorbiaceae, sobretudo na região Nordeste, com ampla distribuição na Caatinga (Secco et al., 2012). *Euphorbia* é um dos principais e mais estudados táxons dessa família. No entanto, em regiões semiáridas, destacam-se outros gêneros de menor porte, mas com significativa biodiversidade e potencial econômico e medicinal, como *Jatropha*, *Cnidoscolus*, *Stillingia* e *Sapium*, cujas espécies permanecem em grande parte inexploradas sob os aspectos químico, genético e farmacológico.

O uso tradicional de extratos brutos e a análise de diterpenos de algumas espécies desses gêneros revelam notável atividade citotóxica frente a diversas linhagens tumorais. Além disso, essas espécies apresentam potenciais atividades antimicrobiana, antiviral, anti-inflamatória e anti-Leishmania, entre outras (Cavalcante; Diego da Conceição Santos; Guedes da Silva Almeida, 2020; de Oliveira-Júnior et al., 2018; He, Qiaobian et al., 2021). Espécies como *Sapium sebiferum* e *Jatropha curcas* também são amplamente investigadas para a produção de biodiesel. Outro aspecto comum a esse grupo de plantas é a complexidade taxonômica; por muito tempo, a distinção entre *Jatropha* e *Cnidoscolus*, bem como entre *Sapium* e *Stillingia*, permaneceu indefinida (Athiê-Souza et al., 2019; Maya-Lastra; Steinmann, 2018).

Entre os métodos tradicionais de exploração de compostos naturais com potencial bioativo destaca-se a quimiotaxonomia. Investigações metabolômicas, associadas a quimiometria e algoritmos computacionais, têm promovido avanços significativos nessa área (Gomes P. W. P. et al., 2024). Paralelamente, técnicas moleculares têm se consolidado como ferramentas fundamentais na taxonomia vegetal (Kapli; Yang; Telford, 2020).

Apesar dos avanços, a delimitação de determinados gêneros de Euphorbiaceae continua sendo um desafio. Considerando a presença dessas espécies na Caatinga, sua diversidade química, atividades biológicas e as dificuldades inerentes à sua classificação botânica, o

presente estudo tem como objetivo empregar a abordagem quimiotaxonômica para a identificação de potenciais marcadores, por meio de análise assistida por computador e reconstrução filogenética entre os gêneros selecionados.

2.2 Methodologia

2.2.1 Composição do banco de dados

O conjunto de dados químicos foi construído com base em referências voltadas ao isolamento e à caracterização estrutural de diterpenos por RMN, provenientes dos quatro gêneros selecionados: *Jatropha*, *Cnidoscolus*, *Sapium* e *Stillingia*. A busca bibliográfica foi realizada nas plataformas Science Direct, PubMed, SciFinder e Google Scholar. Foram utilizados termos específicos como “diterpenes”, “secondary metabolites”, “chemical profile”, “Euphorbiaceae” e “terpenoids”, aplicados de forma independente e em combinação com o nome de cada gênero, juntamente com o operador lógico “and”, nos campos de título e resumo. Um total de 89 referências, publicadas entre 1970 e 2024, foi incluído neste estudo. Todos os dados reunidos estarão disponíveis na ferramenta Sistemax (<https://sistemax.ufpb.br>).

Para a construção do banco de dados genético, foram obtidas do GenBank sequências representativas do gene da subunidade grande da ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (rbcL), pertencentes aos gêneros selecionados da família Euphorbiaceae.

2.2.2 Reconstrução filogenética

Após a compilação das sequências gênicas, estas foram alinhadas utilizando o software MAFFT, otimizado para alinhamento global preciso (opção “G-INS-i”). O alinhamento resultante foi utilizado para inferência de uma árvore filogenética com máxima verossimilhança aproximada, por meio do software FastTree 2.1.11, utilizando o modelo de substituição GTR (generalized time-reversible). A árvore obtida foi enraizada e visualizada no software FigTree v1.4.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

2.2.3 Mapas Auto-organizáveis

2.2.3.1 Obtenção de descritores moleculares

Para possibilitar a análise dos padrões químicos dos compostos, todas as estruturas de diterpenos foram convertidas em códigos SMILES (Simplified Molecular Input Line Entry

System). Em seguida, esses códigos foram transformados em representações canônicas personalizadas no formato SDF (Structure-Data File). As estruturas compiladas, associadas às ocorrências botânicas, foram submetidas à geração de descritores moleculares utilizando o software alvaDesc (<https://www.alvascience.com>). Os descritores moleculares resultam da aplicação de funções matemáticas sobre representações bem definidas das estruturas químicas, codificando propriedades físico-químicas e moleculares de forma quantitativa (Fernández-Torras et al., 2022; Todeschini; Consonni, 2009), as quais foram utilizadas nas análises subsequentes. O alvaDesc permite o cálculo de 5.666 descritores moleculares relacionados a diferentes abordagens teóricas, classificados em 33 blocos lógicos. Além disso, o software realiza o cálculo de três tipos distintos de fingerprints moleculares. No presente trabalho, os índices constitucionais (Constitutional indices) e os descritores de anéis (Ring descriptors) foram considerados os mais informativos para identificar padrões químicos nas estruturas do conjunto de dados, resultando na seleção de 85 descritores moleculares.

2.2.3.2 Obtenção dos Mapas auto-organizáveis

Os descritores moleculares calculados foram utilizados como dados de entrada no software SOM Toolbox 2.0. O conjunto de dados, composto pelos descritores moleculares, foi apresentado à rede neural SOM sem qualquer ajuste prévio. Em seguida, os dados foram particionados com base nas regiões definidas pelos vetores de peso no mapa SOM durante cada etapa de treinamento. Para garantir a robustez e a precisão estatística, a validação do modelo preditivo é uma etapa essencial. Foi realizada uma validação cruzada do tipo 5-fold nos mapas auto-organizáveis, dividindo-se 80% dos dados para o conjunto de treinamento e 20% para o conjunto de teste, mantendo-se a mesma proporção de cada classe do conjunto original em cada subconjunto. Os detalhes de cada medida estão apresentados na Tabela 1.

Table 1. Validação cruzada dos mapas auto-organizáveis.. Grupo I: *Jatropha* e *Cnidoscolus*.s. Grupo II: *Sapium* e *Stillingia*.

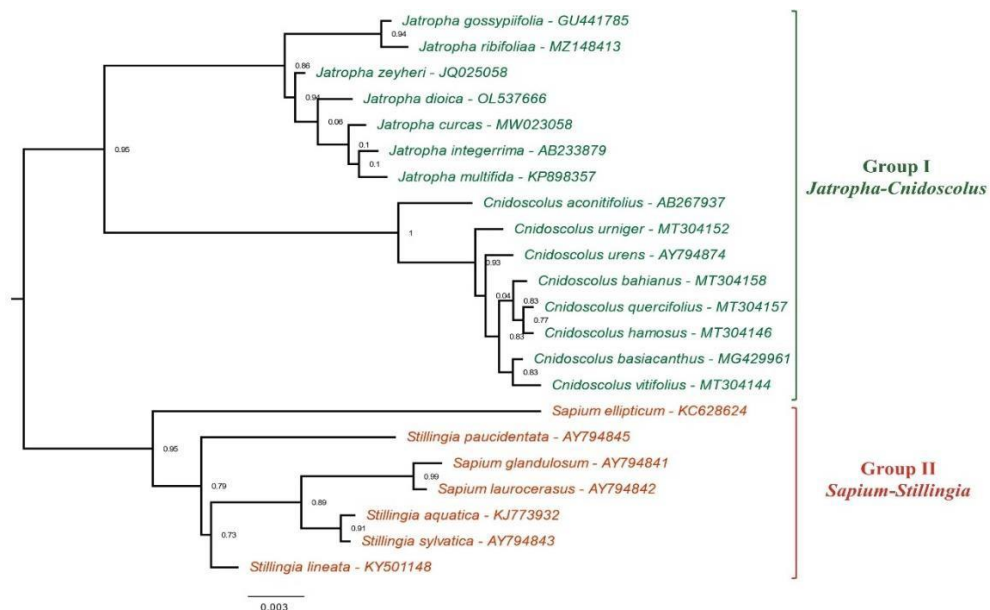
Gênero	Treino 1	Treino 2	Treino 3	Treino 4	Treino 5	Média
Grupo I	90.4%	89.8%	92.7%	92.0%	92.7%	91.5%
Grupo II	95.7%	96.4%	97.1%	97.1%	96.4%	96.5%
Acurácia	93.1%	93.1%	94.9%	94.6%	94.6%	94.1%
Gênero	Teste 1	Teste 2	Teste 3	Teste 4	Teste 5	Média
Grupo I	91.4%	94.1%	82.3%	88.2%	85.3%	88.3%
Grupo II	94.3%	94.3%	94.3%	94.3%	94.3%	94.3%
Acurácia	92.9%	94.2%	88.4%	91.3%	89.9%	91.3%

2.3 Resultados e Discussão

Desenvolvidos para elucidar relações evolutivas com base na ancestralidade comum mais recente, os métodos de reconstrução filogenética têm se beneficiado significativamente dos avanços da biologia molecular e das tecnologias de sequenciamento. Esses avanços possibilitaram o desenvolvimento de novas abordagens para inferência de filogenias a partir de dados macromoleculares. Nesse contexto, a construção de árvores filogenéticas utilizando sequências de genes codificadores de proteínas tem se consolidado como uma alternativa viável ao uso, por exemplo, de sequências intergênicas ou de DNA não codificante. As sequências proteicas apresentam diversas vantagens, como maior grau de conservação, além de estarem diretamente associadas a funções essenciais nos processos biológicos dos organismos (De Bruyn; Martin; Lefeuvre, 2014; Jill Harrison; Langdale, 2006; Kapli; Yang; Telford, 2020).

No presente estudo, foram utilizadas sequências da ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase, comumente conhecida como RuBisCO. Essa enzima desempenha um papel fundamental na fotossíntese, catalisando a fixação de CO₂ e possibilitando a síntese de compostos orgânicos. Apesar das variações evolutivas pontuais observadas no gene da RuBisCO (*rca*), este se mantém altamente conservado entre as plantas superiores, sendo considerado um importante marcador filogenético (Nagarajan; Gill, 2018). A Figura 1 apresenta a árvore filogenética de máxima verossimilhança obtida a partir da análise comparativa das sequências de RuBisCO entre os quatro gêneros de Euphorbiaceae investigados neste estudo.

Figura 1. Árvore filogenética composta pelos gêneros selecionados da família Euphorbiaceae. Os grupos *Jatropha–Cnidoscolus* e *Sapium–Stillingia* estão destacados em verde e vermelho, respectivamente. A árvore filogenética de máxima verossimilhança foi gerada com sequências de RuBisCO obtidas do GenBank (indicadas entre parênteses), utilizando o software FastTree. A árvore resultante foi enraizada e visualizada no programa FigTree.



Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Os resultados da reconstrução filogenética forneceram observações relevantes sobre as relações entre os quatro grupos analisados. Destaca-se, em particular, a estreita relação ancestral observada entre *Jatropha* e *Cnidoscolus*, indicando uma afinidade genética robusta que corrobora achados prévios na literatura. Essa descoberta amplia a compreensão sobre esse grupo taxonômico e contribui para o debate histórico acerca da circunscrição genérica desses táxons, que remonta a Lineu. Somente a partir da segunda metade do século XX, *Cnidoscolus* passou a ser reconhecido de forma consistente como um gênero distinto. Estudos recentes ressaltam ainda que *Cnidoscolus* é endêmico do Novo Mundo, com ocorrência concentrada em regiões áridas do México e do Brasil. Em contraste, *Jatropha* apresenta ampla distribuição em diversas regiões geográficas (Maya-Lastra; Steinmann, 2019).

Em relação a *Sapium* e *Stillingia*, a análise filogenética baseada na sequência da RuBisCO não foi capaz de distingui-los, agrupando ambos os gêneros em um mesmo clado. Esse resultado inesperado sugere uma semelhança genética mais profunda do que aquela inferida com base apenas em características morfológicas. Tal achado evidencia a necessidade de investigações adicionais com o uso de outras sequências gênicas, a fim de identificar marcadores mais precisos que permitam distinguir *Sapium* e *Stillingia*. Estudos sistemáticos envolvendo esses dois gêneros ainda são escassos. Apesar disso, os resultados aqui apresentados estão em consonância com publicações anteriores que destacam as dificuldades inerentes à classificação sistemática dentro da tribo Hippomaneae (Euphorbiaceae) (Sakugawa et al., 2021).

A exploração do espaço químico representado por produtos naturais tem facilitado significativamente a descoberta de compostos promissores e de fármacos. Dentre as metodologias utilizadas para compilar extensos conjuntos moleculares, destacam-se as abordagens baseadas em conhecimento prévio. Essas estratégias integram informações químicas e taxonômicas obtidas na literatura científica, por meio de revisões sistemáticas ou de estudos direcionados a determinados gêneros ou famílias. A incorporação de algoritmos computacionais em associação com padrões filogenéticos tem se mostrado uma ferramenta preditiva valiosa para a identificação de potenciais marcadores químicos e zonas de interesse para a prospecção de fármacos (Allard et al., 2022; Domingo-Fernández et al., 2023; Ernst et al., 2016).

As Self-Organizing Maps (SOM), introduzidas na década de 1990 como método automatizado para análise de dados, tornaram-se uma ferramenta essencial na exploração do espaço químico. Essa técnica tem ampla aplicação na química medicinal e na prospecção de produtos naturais com potencial farmacológico (Mullowney et al., 2023; Xiao et al., 2005). Uma das principais vantagens das SOM é a capacidade de analisar informações multidimensionais preservando as relações topológicas e métricas fundamentais dos dados. (Kohonen, 2013) Essa característica é particularmente útil para identificar similaridades estruturais e agrupá-las de forma eficiente em clusters. Por isso, as SOM apresentam vantagens em relação aos métodos estatísticos multivariados tradicionais.

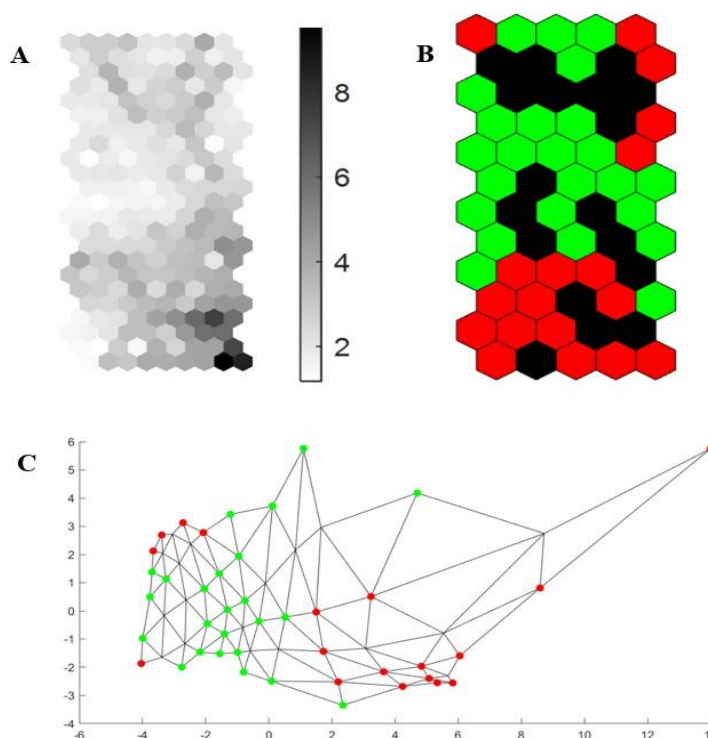
No contexto da quimiotaxonomia, as SOM têm demonstrado eficácia na identificação de padrões entre compostos com características específicas restritas a determinados grupos de plantas (de Souza et al., 2024; Menezes et al., 2021). Para isso, são utilizados descritores moleculares como dados de entrada, permitindo a elucidação de propriedades físico-químicas das substâncias presentes no conjunto químico analisado. Neste estudo, foram compilados 324 diterpenos pertencentes a quatro gêneros da família Euphorbiaceae. Um aspecto relevante desse conjunto é a informação botânica, que indica a ocorrência de um mesmo composto em diferentes espécies, conforme apresentado na Tabela 2.

Tabela 2. Informações botânicas e ocorrência de diterpenos nos gêneros da família Euphorbiaceae considerados neste estudo.

Gênero	Espécies incluídas	Número de diterpenos	Número de ocorrências botânicas
<i>Jatropha</i>	14	140	171
<i>Cnidoscolus</i>	3	13	13
<i>Sapium</i>	10	126	130

Os dados apresentados na **Tabela 2** facilitaram a construção de um SOM (Self-Organizing Map) dos diterpenos, os quais foram posteriormente categorizados com base em suas similaridades químicas. O SOM resultante está ilustrado na **Figura 2**. O modelo matemático mais eficiente obteve uma taxa de acerto de 94%, conseguindo classificar os compostos em dois grupos distintos: o primeiro, composto por *Jatropha* e *Cnidoscolus*, e o segundo, formado por *Sapium* e *Stillingia*. Modelos que atingem taxas de acerto superiores a 70% são considerados de excelente desempenho (de Souza et al., 2024), e todos os testes de validação cruzada geraram taxas de acerto superiores a 90%, conforme mostrado na **Tabela 1**. Esses resultados estão alinhados com as análises moleculares, destacando semelhanças químicas significativas dentro de seus respectivos grupos.

Figura 2. SOMs dos descritores de diterpenos da família Euphorbiaceae. A Unified Distance Matrix (U-matrix) é representada em tons de cinza (A). Os grupos *Jatropha*–*Cnidoscolus* e *Sapium*–*Stillingia* são indicados em verde e vermelho, respectivamente (B). Ao lado, há uma PCA da matriz de correlação usada para gerar o SOM, visualizando a distribuição das características dos descritores em um espaço de alta dimensão, com as mesmas cores utilizadas para caracterizar cada grupo (C).



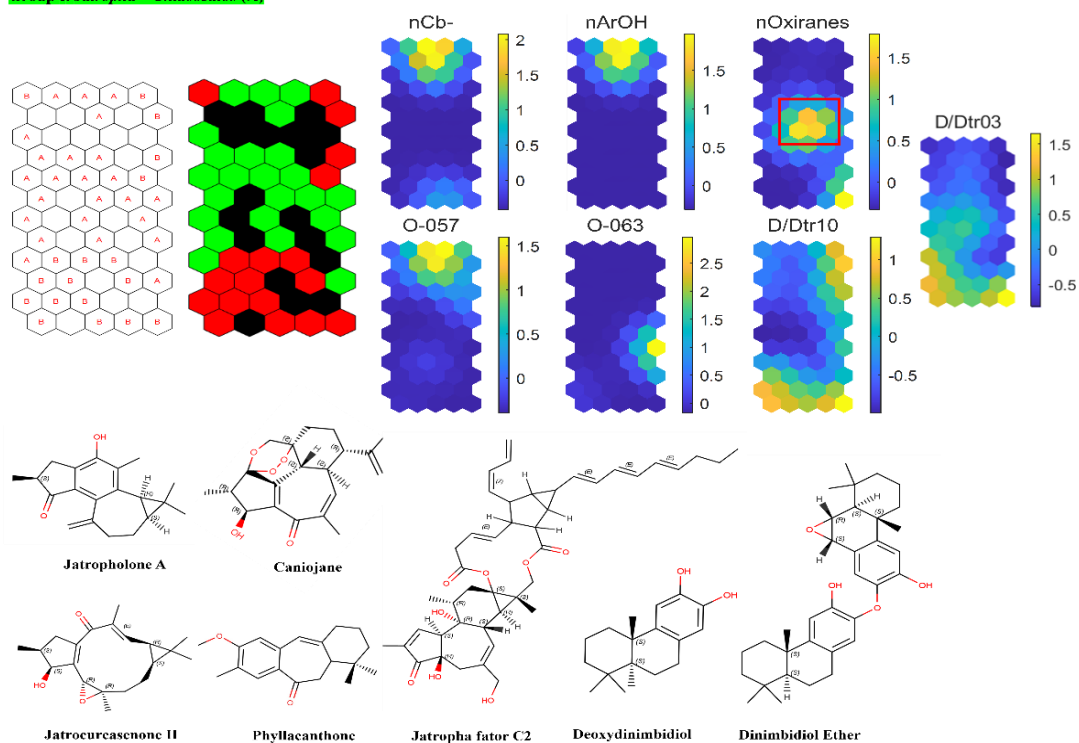
Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

No contexto da representação de mapas auto-organizáveis (SOM), a matriz U (U-matrix) é amplamente utilizada. Na Figura 2A, cores mais claras indicam maior proximidade entre os neurônios no espaço de entrada, enquanto as áreas mais escuras representam as fronteiras que separam os agrupamentos, especificamente os diterpenos analisados neste estudo. Essa matriz sintetiza informações provenientes de todos os descritores utilizados como dados de entrada. Uma das vantagens do uso de SOM é sua capacidade de preservar a topologia da distribuição dos dados, assemelhando-se a um mapa geográfico. Entretanto, a representação final frequentemente passa por uma redução de dimensionalidade para facilitar a visualização da distribuição dos dados, conforme ilustrado na Figura 2B. Nesse caso, diferentes cores possibilitam o reconhecimento de dois grupos distintos, classificados segundo semelhanças entre as características químicas dos diterpenos. Por sua vez, a Figura 2C ilustra a topologia dos dados por meio da Análise de Componentes Principais (PCA), calculada a partir do conjunto de treinamento, utilizando autovetores e seus respectivos valores.

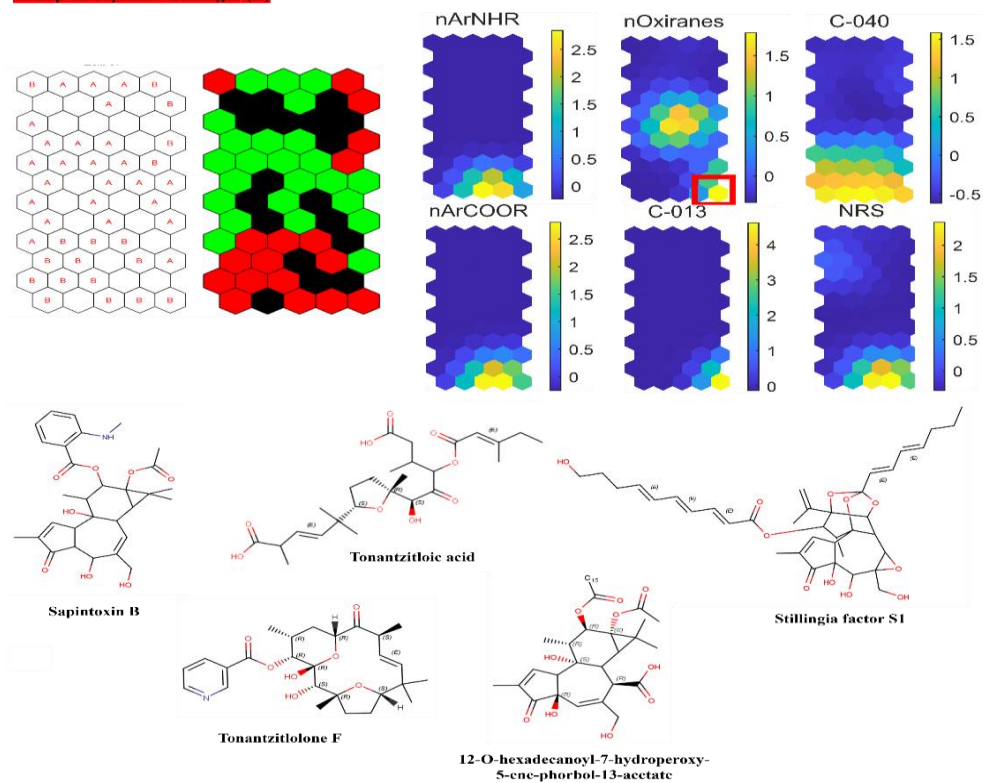
Ao interpretar os mapas, foram analisados os descritores principais e os compostos que mais contribuíram para a formação dos agrupamentos, identificando padrões e substâncias típicas entre os quatro gêneros selecionados. Cada descritor, representado como um mapa de calor associado à U-matrix, fornece informações valiosas sobre o espaço químico ocupado pelos diterpenos da família Euphorbiaceae. Treze descritores foram identificados como particularmente informativos, sendo os compostos correspondentes mostrados na Figura 3.

Figura 3. Mapas de calor resultantes da análise SOM, destacando descritores moleculares selecionados dos esqueletos de diterpenos considerados neste estudo. À esquerda, apresenta-se a U-matrix, onde as letras associadas aos gêneros *Jatropha*–*Cnidoscolus* (Grupo I-A) e *Sapium*–*Stillingia* (Grupo II-B) representam a distribuição dos dados de entrada no espaço da U-matrix, evidenciando os agrupamentos formados por similaridade estrutural. À direita, cada figura colorida representa um descritor molecular; a cor amarela nos mapas de calor indica um alto nível da característica codificada por cada descritor específico. A associação entre ambos os mapas permitiu identificar estruturas de compostos que contribuem para a discriminação entre os clusters formados.

Group I: *Jatropha* – *Cnidoscolus* (A)



Group II: *Sapum* – *Stillingia* (B)



Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Os resultados demonstram uma elevada diversidade química dos diterpenos encontrados entre os gêneros analisados da família Euphorbiaceae. Uma classe proeminente de compostos identificada foi a dos derivados de casbeno, caracterizados por apresentarem um anel macrocíclico e esqueletos carbônicos singulares. Esses diterpenos especializados costumam ser restritos a famílias vegetais específicas. Assim, a análise dos descritores permitiu elucidar os perfis químicos dos diterpenos nos quatro gêneros selecionados de Euphorbiaceae.

Descritores associados à presença de anéis benzênicos indicaram a existência de unidades aromáticas nos diterpenos, particularmente no grupo II. Entre os exemplos destacam-se a filacantona (bis-nor-benzociclo-heptano), o dinimbidiol (podocarpano) e a jatrolona A (jatrolona). Tais descritores também evidenciaram a presença do dinimbidiol éter, um dímero de estrutura química singular, isolado das raízes de *Cnidoscolus souzae*, que apresenta uma rara ligação fenoxietérica, tipo de substância incomum na natureza. Ademais, no grupo I, descritores relacionados a epóxidos/oxiranos possibilitaram a identificação de latifranos, como a jatrocursenona H. A presença de grupos peróxidos também foi observada na análise, permitindo a identificação da canijoana, um ramnofolano.

Por outro lado, o grupo II apresentou maior prevalência de diterpenos do tipo tigliano, isolados de espécies pertencentes aos gêneros *Sapium* e *Stillingia*. Essa característica difere do grupo I, onde poucos compostos dessa classe foram identificados, representados principalmente por fatores de *Jatropha*, com padrão de substituição distinto nas posições C-13 e C-17, conforme ilustrado na Figura 3. Adicionalmente, descritores ligados à presença de nitrogênio aromático e aminas foram observados exclusivamente no grupo II, possibilitando a identificação de sapintoxinas A–C e da tonantzitlolona F, um flexibileno raro na natureza. Outro achado relevante foi o alto grau de oxidação verificado em diversos compostos. Biossinteticamente relacionados aos tiglianos, também se verificou a ocorrência de diterpenos do tipo daphnano nesse grupo.

Os diterpenos macrocíclicos da família Euphorbiaceae são amplamente reconhecidos por sua atividade citotóxica, demonstrada *in vitro* e *in vivo*, em alguns casos com potência na faixa nanomolar. A literatura relata que jatrofanos e lativranos são capazes de reverter resistência a drogas citotóxicas por meio da inibição da bomba de efluxo mediada por glicoproteína-P. Paralelamente, os tiglianos demonstram capacidade de modulação de isoformas da Proteína Quinase C (PKC), um alvo farmacológico associado à carcinogênese. A via da PKC também

está envolvida no desenvolvimento de antivirais, tanto para arbovírus quanto retrovírus, como evidenciado em estudos com o gênero *Stillingia*. Compostos como a filacantona apresentaram atividade contra linhagens de melanoma resistentes, atuando na despolimerização de tubulina, mecanismo semelhante ao de alcaloides da vinca, altamente eficazes na clínica. Esses dados evidenciam padrões químicos distintos entre as classes de diterpenos macrocíclicos nos gêneros estudados, bem como o potencial bioativo frente a alvos moleculares específicos de interesse terapêutico.

Além das similaridades genéticas observadas entre os gêneros, destaca-se que, apesar das diferenças químicas evidentes entre os dois grupos, conforme demonstrado pela análise SOM, a disparidade no número de compostos descritos para *Cnidoscolus* e *Stillingia* limita conclusões mais abrangentes sobre o papel dos diterpenos em contextos sistemáticos. Ainda assim, os resultados apontam para a necessidade de investigações químicas mais abrangentes nesses grupos vegetais. A aplicação de abordagens modernas, como a metabolômica associada à dereplicação por espectrometria de massas ou RMN, combinada à quimiometria, pode ampliar significativamente a compreensão do espaço químico dessas espécies. Essa estratégia pode levar à descoberta de numerosos compostos com potencial bioativo em espécies de Euphorbiaceae, especialmente aquelas nativas da região semiárida brasileira.

2.4 Conclusão

Este estudo oferece uma análise aprofundada dos diterpenos encontrados em quatro gêneros da família Euphorbiaceae: *Jatropha*, *Cnidoscolus*, *Sapium* e *Stillingia*. Por meio da combinação entre reconstrução filogenética e análise computacional, foi conduzida uma investigação quimiotaxonômica com o objetivo de comparar os referidos táxons. Essa abordagem permitiu identificar características intrínsecas entre os grupos, revelando diversos esqueletos bioativos. Curiosamente, observou-se uma proximidade nos perfis moleculares e químicos entre os gêneros, o que resultou na distinção de apenas dois grupos. O primeiro, composto por *Jatropha* e *Cnidoscolus*, apresentou uma ampla diversidade de compostos; o segundo, formado por *Sapium* e *Stillingia*, foi caracterizado pela presença de ésteres de forbol, os quais emergiram como uma assinatura química distinta. Adicionalmente, os compostos identificados em ambos os grupos demonstraram capacidade de modular a atividade de importantes alvos moleculares envolvidos na terapêutica do câncer. No Grupo I, jatrofanos e latiranos estão associados à modulação da P-glicoproteína, enquanto no Grupo II, tiglianos e

daphnanos foram descritos como atuantes sobre as vias da proteína quinase C (PKC). Esses resultados evidenciam padrões moleculares específicos em cada grupo e suas respectivas atividades biológicas. A criação de um banco de dados abrangente contendo 324 diterpenos e suas 363 ocorrências botânicas constitui um recurso valioso para pesquisas futuras sobre espécies de Euphorbiaceae e seus compostos, com potencial aplicação em diversas áreas científicas.

Referências

ABREU, Lucas Silva; DO NASCIMENTO, Yuri Manguiera; COSTA, Rafael dos Santos; GUEDES, Maria Lenise Silva; SOUZA, Bárbara Nayane Rosário Fernandes; PENA, Lindomar José; COSTA, Vicente Carlos de Oliveira; SCOTTI, Marcus Tullius; BRAZ-FILHO, Raimundo; BARBOSA-FILHO, José Maria; DA SILVA, Marcelo Sobral; VELOZO, Eudes da Silva; TAVARES, Josean Fechine. Tri- and Diterpenoids from *Stillingia lorantheae* as Inhibitors of Zika Virus Replication. **Journal of Natural Products**, [s. l.], vol. 82, no. 10, p. 2721–2730, 25 Oct. 2019. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b00251>.

ATHIÊ-SOUZA, Sarah Maria; DE MELO, André Laurênio; DA SILVA, Marcos José; DE SALES, Margareth Ferreira. Taxonomic notes on *Stillingia* (Euphorbiaceae): typifications and a new synonym under *S. salpingadenia*. **Kew Bulletin**, [s. l.], vol. 74, no. 3, p. 45, 9 Sep. 2019. <https://doi.org/10.1007/s12225-019-9834-1>.

BORGES, Ricardo M.; TEIXEIRA, Andrew Magno. On the part that NMR should play in mass spectrometry metabolomics in natural products studies. **Frontiers in Natural Products**, [s. l.], vol. 3, 29 Feb. 2024. <https://doi.org/10.3389/fntpr.2024.1359151>.

CAVALCANTE, Noelly Bastos; DIEGO DA CONCEIÇÃO SANTOS, Alan; GUEDES DA SILVA ALMEIDA, Jackson Roberto. The genus *Jatropha* (Euphorbiaceae): A review on secondary chemical metabolites and biological aspects. **Chemico-Biological Interactions**, [s. l.], vol. 318, p. 108976, Feb. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2020.108976>.

CHENG, Yongxian; QIN, Dapeng. Classification of Diverse Novel Diterpenoids. **Novel Plant Natural Product Skeletons**. Singapore: Springer Nature Singapore, 2024. p. 23–46. https://doi.org/10.1007/978-981-99-7329-3_3.

COUTINHO, Diogenes J. Gusmão; BARBOSA, Mariana O.; SOUZA, Renata J. Carvalho de; SILVA, Adervando Sebastião da; SILVA, Suzene I. da; OLIVEIRA, Antonio Fernando M. de. Biodiesel potential of the seed oils from some Brazilian native Euphorbiaceae species. **Renewable Energy**, [s. l.], vol. 91, p. 275–281, Jun. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2016.01.064>.

DE BRUYN, Alexandre; MARTIN, Darren P.; LEFEUVRE, Pierre. Phylogenetic Reconstruction Methods: An Overview. [S. l.: s. n.], 2014. p. 257–277. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-767-9_13.

DE OLIVEIRA-JÚNIOR, Raimundo Gonçalves; ALVES FERRAZ, Christiane Adrielly; DE OLIVEIRA, Ana Paula; DA CRUZ ARAÚJO, Edigênia Cavalcante; PRUNIER, Grégoire; BEAUGEARD, Laureen; GROULT, Hugo; PICOT, Laurent; DE ALENCAR FILHO, Edilson Beserra; EL AOUAD, Noureddine; ROLIM, Larissa Araújo; ALMEIDA, Jackson Roberto Guedes da Silva. Bis-nor-diterpene from *Cnidoscolus quercifolius* (Euphorbiaceae) induces tubulin depolymerization-mediated apoptosis in BRAF-mutated melanoma cells. **Chemico-Biological Interactions**, [s. l.], vol. 355, p. 109849, Mar. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2022.109849>.

DE OLIVEIRA-JÚNIOR, Raimundo Gonçalves; FERRAZ, Christiane Adrielly Alves; DE OLIVEIRA, Ana Paula; ARAÚJO, Camila Souza; OLIVEIRA, Layanne Feitosa da Silva; PICOT, Laurent; ROLIM, Larissa Araújo; ROLIM-NETO, Pedro José; ALMEIDA, Jackson Roberto Guedes da Silva. Phytochemical and pharmacological aspects of *Cnidoscolus Pohl* species: A systematic review. **Phytomedicine**, [s. l.], vol. 50, p. 137–147, Nov. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2017.08.017>.

DE SOUZA, Thalisson Amorim; LINS, Francisca Sabrina Vieira; DA SILVA LINS, Jociano; ALVES, Alan Ferreira; CIBULSKI, Samuel Paulo; BRITO, Thiago de Araújo Medeiros; ABREU, Lucas Silva; SCOTTI, Luciana; SCOTTI, Marcus Tullius; DA SILVA, Marcelo Sobral; TAVARES, Josean Fechine. Asclepiadoideae subfamily (Apocynaceae): ethnopharmacology, biological activities and chemophenetics based on pregnane glycosides. **Phytochemistry Reviews**, [s. l.], 22 Mar. 2024. <https://doi.org/10.1007/s11101-024-09914-2>.

FATTAHIAN, Maryam; GHANADIAN, Mustafa; ALI, Zulfiqar; KHAN, Ikhlas A. *Jatrophane* and rearranged *Jatrophane*-type diterpenes: biogenesis, structure, isolation,

biological activity and SARs (1984–2019). **Phytochemistry Reviews**, [s. l.], vol. 19, no. 2, p. 265–336, 13 Apr. 2020. <https://doi.org/10.1007/s11101-020-09667-8>.

FERNÁNDEZ-TORRAS, Adrià; COMAJUNCOSA-CREUS, Arnau; DURAN-FRIGOLA, Miquel; ALOY, Patrick. Connecting chemistry and biology through molecular descriptors. **Current Opinion in Chemical Biology**, [s. l.], vol. 66, p. 102090, Feb. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2021.09.001>.

FILLBRUNN, Alexander; DIETZ, Christian; PFEUFFER, Julianus; RAHN, René; LANDRUM, Gregory A.; BERTHOLD, Michael R. KNIME for reproducible cross-domain analysis of life science data. **Journal of Biotechnology**, [s. l.], vol. 261, p. 149–156, Nov. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.07.028>.

GARCÍA-SOSA, Karlina; ALDANA-PÉREZ, Rodolfo; MOO, Reyna V. Ek; SIMÁ-POLANCO, Paulino; PEÑA-RODRÍGUEZ, Luis M. Dinimbidol Ether, a Novel Bioactive Dimeric Diterpene from the Root Extract of *Cnidioscolus souzae*. **Natural Product Communications**, [s. l.], vol. 12, no. 9, p. 1934578X1701200, 1 Sep. 2017. <https://doi.org/10.1177/1934578X1701200903>.

GOMES P. W. P.; HELENA MANNOCHIO-RUSSO; ROBIN SCHMID; SIMONE ZUFFA; TITO DAMIANI; PIETER C. DORRESTEIN. plantMASST - Community-driven chemotaxonomic digitization of plants. **bioRxiv**, [s. l.], May 2024. .

HE, Qiaobian; ZHANG, Li; LI, Ting; LI, Changhao; SONG, Huina; FAN, Peihong. Genus *Sapium* (Euphorbiaceae): A review on traditional uses, phytochemistry, and pharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], vol. 277, p. 114206, Sep. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114206>.

HE, Sijia; LI, Qi; HUANG, Qian; CHENG, Jin. Targeting Protein Kinase C for Cancer Therapy. **Cancers**, [s. l.], vol. 14, no. 5, p. 1104, 22 Feb. 2022. <https://doi.org/10.3390/cancers14051104>.

JILL HARRISON, C.; LANGDALE, Jane A. A step by step guide to phylogeny reconstruction. **The Plant Journal**, [s. l.], vol. 45, no. 4, p. 561–572, 26 Feb. 2006. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02611.x>.

KAPLI, Paschalia; YANG, Ziheng; TELFORD, Maximilian J. Phylogenetic tree building in the genomic age. **Nature Reviews Genetics**, [s. l.], vol. 21, no. 7, p. 428–444, 18 Jul. 2020. <https://doi.org/10.1038/s41576-020-0233-0>.

MAURI, Andrea. alvaDesc: A Tool to Calculate and Analyze Molecular Descriptors and Fingerprints. [S. l.: s. n.], 2020. p. 801–820. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0150-1_32.

MAYA-LASTRA, CARLOS A.; STEINMANN, VICTOR W. A Nomenclator of Cnidoscolus (Euphorbiaceae). **Phytotaxa**, [s. l.], vol. 346, no. 1, p. 1, 29 Mar. 2018. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.346.1.1>.

MENDES, Eduarda; RAMALHETE, Cátia; DUARTE, Noélia. Myrsinane-Type Diterpenes: A Comprehensive Review on Structural Diversity, Chemistry and Biological Activities. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], vol. 25, no. 1, p. 147, 21 Dec. 2023. <https://doi.org/10.3390/ijms25010147>.

NAGARAJAN, Ragupathi; GILL, Kulvinder S. Evolution of Rubisco activase gene in plants. **Plant Molecular Biology**, [s. l.], vol. 96, no. 1–2, p. 69–87, 14 Jan. 2018. <https://doi.org/10.1007/s11103-017-0680-y>.

NOTHIAS-SCAGLIA, Louis-Félix; PANNECOUQUE, Christophe; RENUCCI, Franck; DELANG, Leen; NEYTS, Johan; ROUSSI, Fanny; COSTA, Jean; LEYSSEN, Pieter; LITAUDON, Marc; PAOLINI, Julien. Antiviral Activity of Diterpene Esters on Chikungunya Virus and HIV Replication. **Journal of Natural Products**, [s. l.], vol. 78, no. 6, p. 1277–1283, 26 Jun. 2015. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00073>.

RUBAIY, Hussein N; LUDLOW, Melanie J; SIEMS, Karsten; NORMAN, Katherine; FOSTER, Richard; WOLF, Dietmar; BEUTLER, John A; BEECH, David J. Tonantzitolone is a nanomolar potency activator of transient receptor potential canonical 1/4/5 channels. **British Journal of Pharmacology**, [s. l.], vol. 175, no. 16, p. 3361–3368, 28 Aug. 2018. <https://doi.org/10.1111/bph.14379>.

SECCO, Ricardo de S.; CORDEIRO, Inês; SENNA-VALE, Luci de; SALES, Margareth F. de; LIMA, Letícia Ribes de; MEDEIROS, Débora; SÁ HAIAD, Bárbara de; OLIVEIRA, Arline Souza de; CARUZO, Maria Beatriz Rossi; CARNEIRO-TORRES, Daniela; BIGIO, Narcisio C. An overview of recent taxonomic studies on Euphorbiaceae s.l.

in Brazil. **Rodriguésia**, [s. l.], vol. 63, no. 1, p. 227–242, Mar. 2012. <https://doi.org/10.1590/S2175-78602012000100014>.

TODESCHINI, Roberto; CONSONNI, Viviana. **Molecular Descriptors for Chemoinformatics**. [S. l.]: Wiley, 2009. <https://doi.org/10.1002/9783527628766>.

VELA, Fátima; EZZANAD, Abdellah; HUNTER, Alan Christy; MACÍAS-SÁNCHEZ, Antonio José; HERNÁNDEZ-GALÁN, Rosario. Pharmacological Potential of Lathyrane-Type Diterpenoids from Phytochemical Sources. **Pharmaceuticals**, [s. l.], vol. 15, no. 7, p. 780, 23 Jun. 2022. <https://doi.org/10.3390/ph15070780>.

VESANTO, J.; ALHONIEMI, E. Clustering of the self-organizing map. **IEEE Transactions on Neural Networks**, [s. l.], vol. 11, no. 3, p. 586–600, May 2000. <https://doi.org/10.1109/72.846731>.

VITALE, Giovanni Andrea; GEIBEL, Christian; MINDA, Vidit; WANG, Mingxun; ARON, Allegra T.; PETRAS, Daniel. Connecting metabolome and phenotype: recent advances in functional metabolomics tools for the identification of bioactive natural products. **Natural Product Reports**, [s. l.], 2024. <https://doi.org/10.1039/D3NP00050H>.

WANG, Hong-Bing; WANG, Xiao-Yang; LIU, Li-Ping; QIN, Guo-Wei; KANG, Ting-Guo. Tiglane Diterpenoids from the *Euphorbiaceae* and *Thymelaeaceae* Families. **Chemical Reviews**, [s. l.], vol. 115, no. 9, p. 2975–3011, 13 May 2015. <https://doi.org/10.1021/cr200397n>.

ZHAO, Huan; SUN, Lei; KONG, ChuiHao; MEI, WenLi; DAI, HaoFu; XU, FengQing; HUANG, ShengZhuo. Phytochemical and pharmacological review of diterpenoids from the genus *Euphorbia* Linn (2012–2021). **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], vol. 298, p. 115574, Nov. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2022.115574>.

3 CAPÍTULO 3. DITERPENOS DE *JATROPHA*: UMA REVISÃO SOBRE SUA DIVERSIDADE ESTRUTURAL, DESEMPENHO TERAPÊUTICO E FUTURAS APLICAÇÕES FARMACÊUTICAS

***Diterpenos de Jatropha*: Uma revisão sobre sua diversidade estrutural, desempenho terapêutico e futuras aplicações farmacêuticas**

Resumo

A família Euphorbiaceae constitui uma fonte de terpenoides bioativos. Dentre seus gêneros, *Jatropha* se destaca como um produtor notável de diterpenos, abrangendo aproximadamente 175 espécies, muitas das quais possuem usos medicinais. Até o momento, foram relatados 140 diterpenos isolados de *Jatropha* (JTDs). Considerando sua diversidade estrutural e atividades biológicas relevantes, o presente trabalho tem como objetivo destacar o potencial farmacêutico dos JTDs. Para tanto, foi realizada uma ampla revisão da literatura, incluindo estudos de elucidação estrutural por RMN e ensaios farmacológicos, tanto in vitro quanto in vivo. Com base na análise de 132 artigos selecionados, é apresentada uma discussão abrangente sobre a biossíntese, extração, isolamento e caracterização estrutural dos JTDs, incluindo a compilação dos deslocamentos químicos de ^{13}C -RMN. A revisão também aborda a produção sintética e os efeitos biológicos desses compostos. Adicionalmente, foi realizada uma análise in silico para prever o potencial farmacológico de 140 JTDs, com base em parâmetros de drug-likeness. Destaca-se que, na última década, o número de relatos de diterpenos macrocíclicos dobrou, sendo a compilação dos dados de RMN uma fonte valiosa para pesquisas futuras. Foram identificadas 21 atividades farmacológicas distintas, com destaque para os efeitos citotóxicos, associados a mecanismos e vias moleculares ainda pouco exploradas. Avanços recentes evidenciam as contribuições de abordagens modernas de síntese orgânica e avaliação farmacológica de produtos naturais. A análise de drug-likeness permitiu identificar classes e compostos com características físicoquímicas e propriedades ADMET favoráveis ao desenvolvimento farmacêutico. À luz desses achados, propõe-se a utilização da nanotecnologia como uma estratégia promissora para a continuidade das investigações sobre os JTDs, uma classe fascinante de compostos naturais. Este trabalho abre novas perspectivas para o estudo das espécies da família Euphorbiaceae, em especial do gênero *Jatropha* e seus compostos bioativos.

Palavras-chave: Diterpenos inferiores; câncer; fitoquímica

3.1 Introdução

O câncer é caracterizado pela proliferação descontrolada de células transformadas, submetidas a um processo de evolução impulsionado pela seleção natural (Brown, Joel S. et al., 2023). Capaz de invadir tecidos e órgãos adjacentes, essa condição apresenta graves implicações para a saúde humana e representa uma das principais causas de mortalidade em todo o mundo. Segundo a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer, aproximadamente 19.976.499 casos foram registrados em 2022, sendo que os cânceres de pulmão, colorretal, fígado, mama e estômago foram responsáveis por cerca de 50% de todas as mortes relacionadas à doença (Bray et al., 2024). A busca por terapias eficazes permanece um desafio crítico. Nesse contexto, abordagens modernas têm intensificado o interesse por produtos naturais como fontes promissoras de novos agentes terapêuticos (Huang, Min; Lu; Ding, 2021; Scott et al., 2023). Diante da ampla diversidade química observada na natureza, os diterpenos têm se destacado por suas diversas atividades biológicas e pela capacidade de modular inúmeras vias celulares envolvidas na progressão tumoral e na metástase. Alguns fármacos aprovados são derivados ou inspirados em estruturas de diterpenos, como o paclitaxel (Taxol) e o docetaxel (Taxotere) (Ghosh et al., 2024; Pavithra; Khan; Khan, 2024). O crescente interesse por diterpenos evidencia seu potencial como compostos líderes no desenvolvimento de fármacos antitumorais, ressaltando a relevância dos produtos naturais na oncologia contemporânea.

A família Euphorbiaceae é reconhecida como uma fonte de terpenoides estruturalmente únicos, e entre seus 228 gêneros, *Jatropha* se destaca por seu considerável, embora ainda pouco explorado, potencial terapêutico. O gênero *Jatropha* inclui aproximadamente 175 espécies distribuídas em regiões tropicais e subtropicais (Shari et al., 2024). Muitas dessas espécies têm sido tradicionalmente utilizadas para fins medicinais na África, Ásia e América Latina (Paniagua-Zambrana; Bussmann; Romero, 2020). Entre seus metabólitos secundários, os diterpenos representam uma das principais classes. Até o momento, diterpenos classificados em 15 esqueletos estruturais diferentes tiveram sua ocorrência reportada em *Jatropha*.

Desde a década de 1970, os diterpenos desse táxon vêm demonstrando atividade em diversos processos biológicos, incluindo efeitos anti-inflamatórios, antimicrobianos, antivirais e, notavelmente, citotóxicos contra diferentes tipos de câncer (Cavalcante; Diego da Conceição Santos; Guedes da Silva Almeida, 2020). O potencial antitumoral tem

despertado particular interesse, impulsionando esforços multidisciplinares voltados ao aumento do rendimento desses compostos por meio da síntese orgânica, bem como à elucidação de seus mecanismos de ação. Apesar desses avanços, apenas um número limitado de espécies teve sua composição química investigada.

A diversidade dessas substâncias é vantajosa para estudos de atividade biológica, mas, por outro lado, impõe desafios significativos à sua elucidação estrutural (Hanson, 2001; Zeng et al., 2019). Além disso, há escassez de estudos abordando os parâmetros ADMET (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade) desses compostos, os quais são essenciais para a descoberta de fármacos inovadores. Ademais, embora estruturalmente diversos, muitos diterpenos apresentam baixa solubilidade, o que impacta diretamente os ensaios biológicos e suas aplicações farmacêuticas.

Diante do potencial das espécies de *Jatropha*, o presente trabalho oferece ao leitor uma visão atualizada e multidisciplinar sobre os diterpenos, abordando sua biossíntese, diversidade estrutural — com ênfase nos dados espectroscópicos de ^{13}C -RMN — e atividades biológicas, além de explorar, pela primeira vez, interseções com a síntese orgânica, a química medicinal e a nanotecnologia. Essa perspectiva abrangente visa proporcionar novos insights e incentivar a continuidade dos estudos sobre essa fascinante classe de compostos naturais.

3.2 Estratégia de Busca na Literatura

Os estudos foram reunidos com base em referências focadas no isolamento, caracterização estrutural por RMN e atividade biológica de diterpenos do gênero *Jatropha* (Euphorbiaceae). A busca foi realizada nas bases SciFinder, Science Direct, Google Scholar e PubMed. Termos específicos como “diterpenos”, “metabólitos secundários”, “perfil químico”, Euphorbiaceae e “terpenoides” foram empregados de forma independente e em combinação com o termo “*Jatropha*”, abrangendo estudos publicados entre 1970 e 2024. Para a realização dessa busca, foram utilizados operadores booleanos, combinando os termos descritos com “and” e “or”. Após a remoção de duplicatas, o presente estudo incluiu 132 artigos científicos.

3.2.1 Drug-likeness dos Diterpenos de *Jatropha*

The Simplified Molecular Input Line Entry System (SMILES) codes of *Jatropha* diterpenes were obtained by Jchem software (Csizmadia, 2000). Then, SMILES was converted into the Structure-Data File (SDF) format. The compiled structures were then

subjected to the generation of descriptors using alvaDesc software (Mauri, 2020). In the current work, the druglike descriptors were considered to encode ADMET parameters for the diterpenes, and SwissADME (Daina; Michielin; Zoete, 2017) was applied as previously described (Opretzka et al., 2023). As input data, the same SMILES codes used to generate molecular descriptors were used and then submitted to analysis.

The resulting data of Alvadesk and SwissADME were combined and then analyzed by principal component analysis (PCA), which was carried out using The Unscrambler® software (Brown, Steven D., 1995). The interpretation of the score and weight plots allowed to stablish the relation between the diterpene classes and their potential application in pharmaceuticals..

3.3 Biossíntese

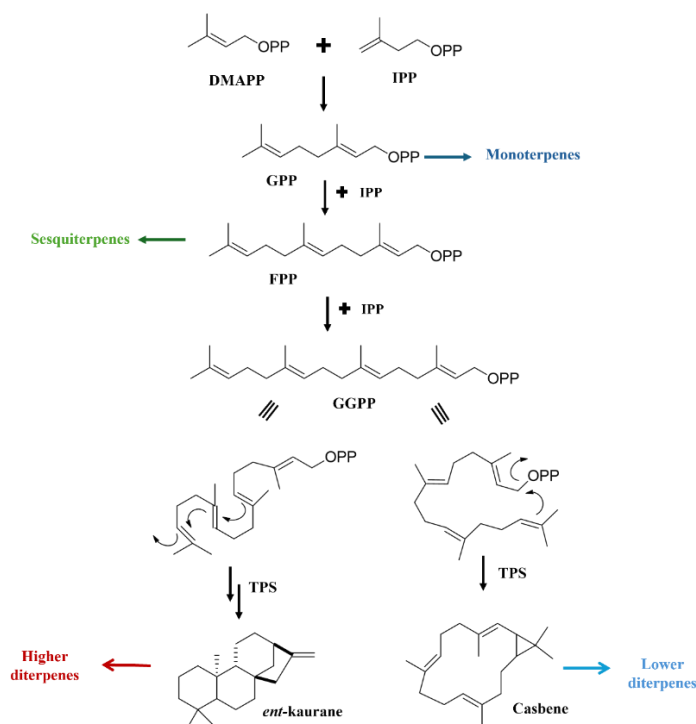
Os terpenoides desempenham papéis cruciais nas interações ecológicas, incluindo ataque, defesa e sinalização em resposta a estresses bióticos e abióticos, cumprindo funções vitais em todos os organismos vivos (Boncan et al., 2020; Muchlinski et al., 2019; Zhang, Jiaming et al., 2023). A via biossintética dos isoprenóides gera uma ampla gama de compostos e é altamente conservada (Holstein, 2011). Essa via segue um princípio biogenético estrutural relativamente simples, no qual precursores lineares com grupos pirofosfato terminais são formados, possibilitando a síntese de mono-, di- e triterpenos por meio de reações intramoleculares. Os precursores universais chave, o difosfato de isopentenila (IPP) e o difosfato de dimetilalila (DMAPP), são produzidos por sintases, enzimas fundamentais nos pontos de ramificação da biossíntese de terpenos (Schmidt; Gershenzon, 2008). Nesse processo, o DMAPP atua como eletrófilo, enquanto o IPP age como nucleófilo, permitindo sua combinação em oligoprenil difosfatos por ação das prenilttransferases. A partir do DMAPP, reações de elongação sequencial com IPP geram inicialmente o precursor dos monoterpenos, o difosfato de geranila (GPP, C10), seguido pelo difosfato de farnesila (FPP, C15), precursor dos sesquiterpenos, e pelo difosfato de geranilgeranila (GGPP, C20), precursor dos diterpenos (C20) (Li, Heng; Dickschat, 2022).

As reações de ciclização do difosfato de geranilgeranila (GGPP), impulsionadas pela formação de carbocátions e pelo potencial para rearranjos de Wagner–Meerwein, resultam em uma ampla variedade de variantes estruturais de diterpenoides (Dewick, 2009). Com base nos métodos de ciclização do GGPP, os diterpenoides podem ser classificados em tipos superiores (high) ou inferiores (low). Em *Jatropha*, os diterpenoides superiores incluem os

esqueletos pimarano, podocaropano e cleistantano, caracterizados por estruturas de anel 6/6/6 formadas por meio da clássica reação em “concertina”. Por outro lado, os diterpenoides inferiores resultam de ciclizações do tipo “cabeça-cauda” (head-to-tail), originando um grupo distinto de compostos conhecidos como diterpenos macrocíclicos, os quais derivam dos diterpenos casbenoides (Xu et al., 2021).

A presença de diterpenoides inferiores nas famílias Euphorbiaceae e Thymelaeaceae constitui uma importante característica quimiotaxonômica para ambos os grupos (Wang, Hong-Bing et al., 2015). Em *Jatropha*, a maioria dos diterpenos corresponde a diterpenoides inferiores, incluindo esqueletos do tipo casbano, rhamnofolano, jatrofano, jatrofolano, lathirano, mirsinol, tigliano e riozolano. Além da reatividade química intrínseca dessa classe, diversos fatores contribuem para a diversidade estrutural dos diterpenos. Dentre eles, destaca-se o papel das enzimas, especialmente as terpeno sintases (TPSs) e as monooxigenases do citocromo P450 (CYPs). As TPSs promovem a ciclização dos terpenos, enquanto as CYPs modificam ainda mais o esqueleto terpênico, aumentando a polaridade da molécula e introduzindo grupos funcionais com atividade biológica (Jia et al., 2022).

Figura 1. Biogênese dos diterpenos de *Jatropha* a partir dos precursores primários..



Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Estudos recentes destacam o papel crucial das terpeno sintases (TPSs) e das monooxigenases do citocromo P450 (CYPs) na evolução das plantas, demonstrando sua participação em redes biossintéticas complexas que se desviam dos modelos tradicionais de vias lineares (Lanier; Andersen; Hamberger, 2023; Rudolf; Chang, 2020; Whitehead et al., 2023; Zerbe; Bohlmann, 2015). De acordo com Christianson (2017), os átomos dos substratos frequentemente sofrem alterações significativas nos estados de ligação ou de hibridização durante a cascata reacional, evidenciando a complexidade química gerenciada pelas TPSs. Além disso, análises filogenéticas revelam que determinadas subfamílias de CYPs se expandiram de maneira taxonômica, contribuindo para a diversificação de classes específicas de diterpenos. Na família Euphorbiaceae, as CYP26As e CYP71Ds destacam-se por sua atuação em reações pós-ciclização (Bathe; Tissier, 2019; Zhang, Zihan et al., 2023).

A compreensão dessas vias biossintéticas tem possibilitado a identificação de enzimas e genes relacionados à produção de terpenoides em diversas plantas de importância econômica e farmacêutica (Kumari et al., 2024). No gênero *Jatropha*, o interesse na produção de biocombustíveis impulsionou a identificação gênica, análises proteômicas e outros estudos analíticos para determinar os perfis químicos e a acumulação de diterpenos, especialmente ésteres de forbol, em diferentes genótipos e tecidos de *J. curcas* (Al-Khayri et al., 2022; Faria-Machado et al., 2019; Farias et al., 2020; Tadano et al., 2021). Esses estudos demonstraram concentrações mais elevadas de tiglanos nas sementes, evidenciando novas oportunidades para a engenharia metabólica de compostos de *Jatropha* e reforçando a diversidade química da espécie como produtora significativa de diterpenos superiores e inferiores. Discussões detalhadas sobre a composição dos diterpenos são apresentadas nas seções seguintes.

3.4 Extração e Isolamento

A extração é essencial para isolar, identificar e separar compostos bioativos antes de sua análise (Chemat; Vian; Cravotto, 2012). Os primeiros relatos sobre diterpenos em *Jatropha* surgiram na década de 1970. Devido às suas características físico-químicas, especialmente a baixa a moderada polaridade, a maioria dos diterpenos tem sido isolada por meio de técnicas tradicionais de extração e cromatografia. Embora essas metodologias possam demandar tempo, ainda são amplamente empregadas devido à sua eficiência e viabilidade econômica, mesmo em estudos recentes voltados à descoberta de novos diterpenos. Nossa revisão

identificou cinco métodos de extração comumente utilizados: a maceração foi a mais frequente (62%), seguida por refluxo com solventes (13%), extração Soxhlet (8%), extração com solvente quente (5%) e percolação (2%).

Todos esses métodos de extração se baseiam no uso de solventes orgânicos, sendo o n-hexano, o éter de petróleo e solventes clorados, como diclorometano e clorofórmio, os mais frequentemente empregados. Esses solventes são utilizados tanto na maceração do material vegetal quanto nas etapas subsequentes de extração líquido-líquido e procedimentos cromatográficos. Essa dependência evidencia a necessidade de explorar métodos alternativos de extração que estejam alinhados aos princípios da química verde.

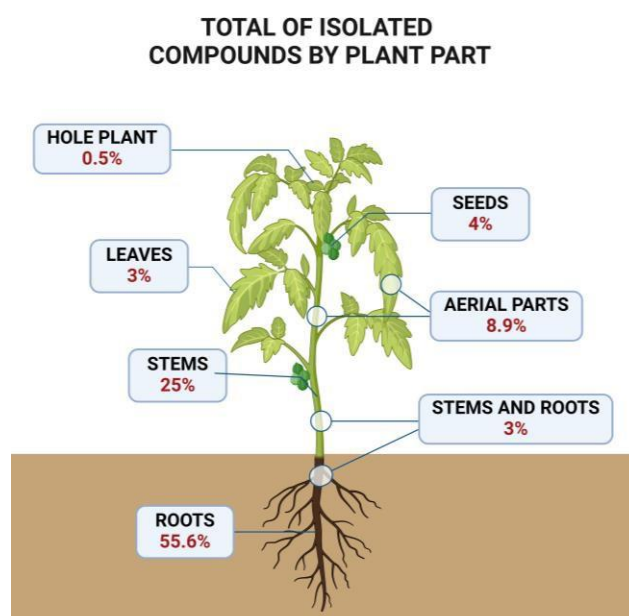
Além disso, aproximadamente 9% dos artigos revisados — especialmente os mais antigos — indicam que a descoberta de novos diterpenos fazia parte de estudos em andamento. Consequentemente, esses trabalhos muitas vezes não apresentam descrições detalhadas das condições de coleta ou extração, fazendo referência a estudos anteriores. No entanto, essas referências geralmente relatam metodologias divergentes, o que dificulta a compreensão e a reprodutibilidade das investigações. Assim, há uma necessidade atual de revisar algumas espécies de *Jatropha* com o objetivo de padronizar os métodos de extração dos compostos de interesse.

Novas técnicas de extração, como o uso de ultrassom e de fluido supercrítico, oferecem melhores rendimentos, maior segurança e aplicações ambientalmente sustentáveis, solucionando limitações clássicas, como a transferência de massa, e promovendo a produção sustentável de compostos químicos verdes (Majid et al., 2023). A presença de ésteres de forbol nas sementes oleaginosas de *Jatropha* comprometeu a utilização de seus subprodutos na indústria. Para enfrentar essa limitação, métodos modernos de extração seletiva de óleo têm sido desenvolvidos. Por exemplo, a extração supercrítica tem sido aplicada em *J. curcas*, e a extração assistida por ultrassom foi empregada em sementes de *J. dioica* e *J. curcas*. Também foram documentados métodos mecânicos de extração de óleo (Abdudeen et al., 2023; Canencia et al., 2023; Khalaf et al., 2023; Mouahid et al., 2018). Apesar desses avanços, a adoção de métodos inovadores na descoberta de novas entidades químicas ainda é limitada. Um dos principais desafios é o alto custo de aquisição e manutenção dos equipamentos necessários, o que favorece a permanência das técnicas convencionais.

As raízes de plantas superiores são conhecidas pela produção de uma ampla variedade de metabólitos secundários (Bais et al., 2001; Touw; van Dam, 2023). Além

disso, o papel dos órgãos subterrâneos na produção de diterpenos macrocíclicos é documentado em diversas espécies da família Euphorbiaceae, como *Euphorbia lathyris* (Ricigliano et al., 2020; Zhao et al., 2022). O uso tradicional das raízes de *Jatropha* como ingrediente ativo em formulações medicinais tem orientado estudos fitoquímicos e contribuído para que essas estruturas estejam entre os principais tecidos vegetais investigados quimicamente. A Figura 2 apresenta a quantidade de compostos identificados, de acordo com as partes da planta.

Figura 2. Partes da planta identificadas como fonte de JDT.



Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Em *Jatropha*, o acúmulo de ésteres de forbol em tecidos específicos em resposta a vários estímulos foi documentado para *J. curcas* (Zhang, Wei et al., 2024). De acordo com de Almeida et al. (2021), os produtos dos genes associados a casbano sintase (CS), uma enzima do tipo terpeno sintase (TPS) responsável pela primeira etapa na biossíntese de diterpenos macrocíclicos, são encontrados exclusivamente nas raízes dessa espécie. Além disso, o uso tradicional das raízes na medicina popular tem historicamente orientado as pesquisas fitoquímicas (Wu et al., 2019). Essas observações podem ajudar a explicar a extensa variedade de diterpenos isolados das partes subterrâneas das espécies de *Jatropha*.

3.5 Diversidade Química e Caracterização Estrutural dos Diterpenos de *Jatropha*

Uma vez isolados, determinar a estrutura química é essencial para descobrir novas moléculas bioativas. Avanços nas técnicas espectroscópicas e espectrométricas aprimoraram muito a capacidade de identificar esses compostos. Entre essas técnicas, a Ressonância Magnética Nuclear (RMN) se destaca como um método crucial para elucidar compostos naturais. Melhorias tanto na instrumentação quanto nos procedimentos experimentais reduziram os tempos de análise e aumentaram a sensibilidade, permitindo um exame mais eficiente de materiais em quantidades de microgramas. A integração das técnicas de RMN com métodos computacionais facilitou o perfilamento químico rápido de extratos, expandindo sua aplicação em metabolômica. Essa abordagem apoia a identificação de novos compostos ativos, avaliação das correlações entre atividade e metabolitos e garante o controle de qualidade das plantas medicinais. Uma vantagem adicional das abordagens modernas, combinando dados de RMN e análise teórica, é a melhoria na determinação da estereoquímica em moléculas complexas, levando os estudos atuais a aumentarem seu foco na revisão estrutural de compostos naturais (Borges et al., 2023; de Albuquerque; Martorano; dos Santos, 2024; de Andrade et al., 2022; Halabalaki et al., 2014; Wolfender et al., 2015).

Estudos que compilam deslocamentos químicos de RMN, particularmente ^{13}C , de compostos isolados de grupos vegetais específicos ou classes químicas têm beneficiado imensamente a comunidade de química de produtos naturais. Esses estudos fornecem informações cruciais sobre padrões moleculares que auxiliam na elucidação estrutural de moléculas complexas, como os diterpenos, que podem ser desafiadoras. Embora a facilidade de acesso às referências e a disponibilidade de ferramentas de software para prever espectros de RMN tenham tornado tais estudos mais escassos, bancos de dados de resultados experimentais de RMN continuam a ser altamente valiosos (Kuhn; Nuzillard, 2023). Eles apoiam diversas aplicações em diferentes campos de pesquisa, incluindo a melhoria de algoritmos de previsão e a facilitação da desreplicação, acelerando assim a descoberta de novas moléculas bioativas (Wolfender et al., 2019).

Até o momento, 140 diterpenos foram descritos no gênero *Jatropha*, o que representa o dobro nos últimos dez anos (Devappa; Makkar; Becker, 2011). Esses incluem tanto terpenoides superiores quanto inferiores, encontrados em aproximadamente 170 ocorrências botânicas. Os terpenoides superiores incluem cleisthantanos, pimaranos e podocarpones. Os diterpenos macrocíclicos constituem a maioria dos compostos desse

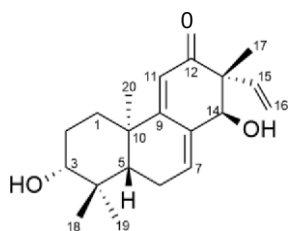
gênero, contribuindo significativamente para a extensa diversidade química observada. Nossa pesquisa identificou diterpenos inferiores provenientes de 12 diferentes esqueletos, incluindo compostos seco e outros derivados.

A elucidação estrutural e a identificação desses compostos isolados geralmente exigem uma combinação de técnicas espectroscópicas, incluindo RMN 1D e 2D, espectrometria de massa (MS) e espectroscopia no infravermelho (IR). Devido a limitações práticas, não é viável apresentar e discutir os dados de RMN para todas as variações estruturais dos diterpenos de *Jatropha* isolados até o momento. Portanto, esta revisão compila as estruturas, conforme ilustrado na Figura 3, e fornece seus deslocamentos químicos de ¹³C RMN correspondentes, conforme detalhado na Tabela 1. Além disso, todos os dados também estarão disponíveis em um banco de dados gratuito de produtos naturais de acesso aberto, o SistematiX (<http://sistematiX.ufpb.br>), oferecendo uma base para futuras pesquisas sobre diterpenos de Euphorbiaceae. O Portal Web SistematiX, lançado em 2018, documenta informações cruciais sobre metabolitos secundários de plantas e inclui 9514 compostos únicos provenientes de 20.934 ocorrências botânicas (Costa et al., 2021).

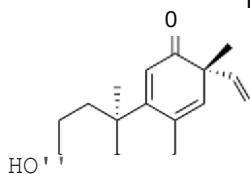
Figure 3. Os 140 diterpenos estruturalmente diversos isolados de espécies de *Jatropha*.

HIGH DITERPENES

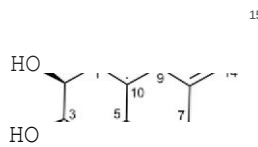
PIMARANES



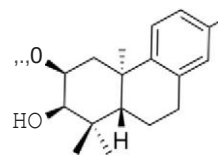
ent-3b,14-a-hydroxypimara-7,9(11),15-triene-12-one (1)



ent-15(13---+ 8) abeo-813 (ethyl)-pimarane (2)

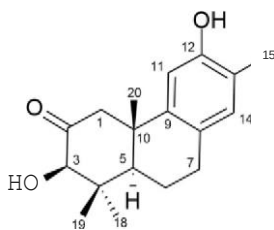


(2S,3R,5S,10R)-2,3-dihydroxy-15,16-dinor-*ent*-pimar-8,11,13-triene (3)

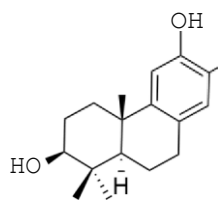


(2S,3R,5S,10R)-2-acetoxy-3-hydroxy-15,16-dinor-*ent*-pimar-8,11,13-triene (4)

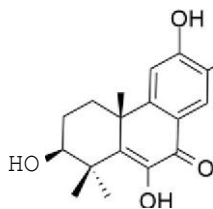
PODOCARPANES



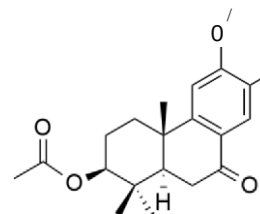
Jatromulone A (5)



3r..-12-hydroxy-13-methyl-podocarpa-8,10,13-triene (6)

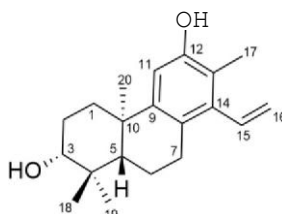


Gossweilone (7)

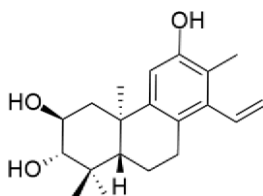


3r..-Acetoxy-12-methoxy-13-methyl-podocarpa-8,11,13-triene-7-one (8)

CLEISTHANTANE

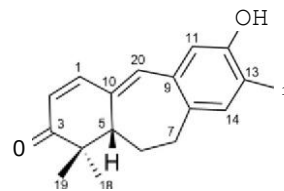


Spruceanol (9)



Cleistanthol (10)

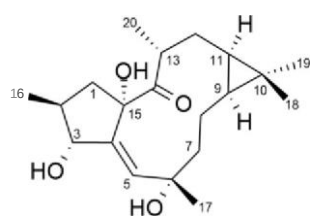
DINORDITERPENES



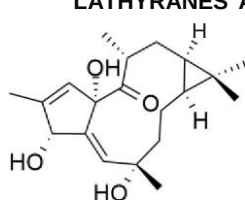
Heudelotinone (11)

LOW DITERPENES

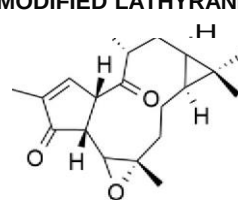
LATHYRANES AND MODIFIED LATHYRANES



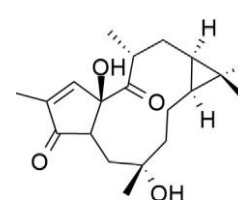
Multifidanol (12)



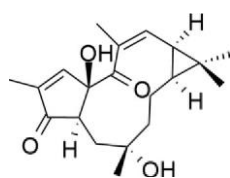
Multifidenol (13)



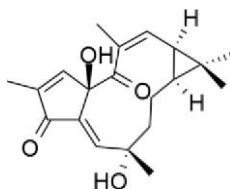
Jatrowedione (14)



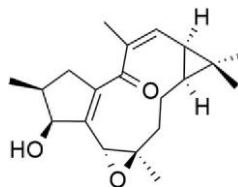
Jatrowediol (15)



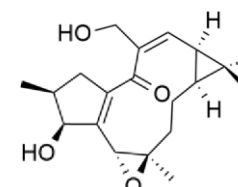
Jatroitelone A (16)



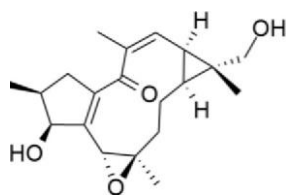
Jatroitelone B (17)



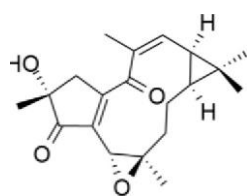
Jatroitelone C (18)



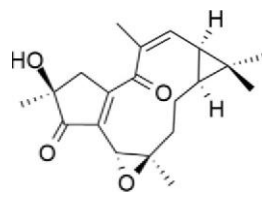
Jatroitelone D (19)



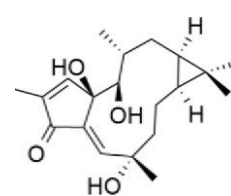
Jatroitelone E (20)



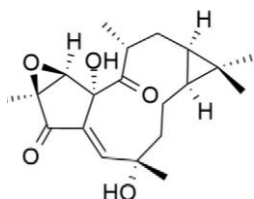
Jatroitelone F (21)



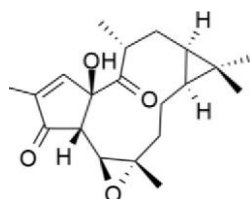
Jatroitelone H (22)



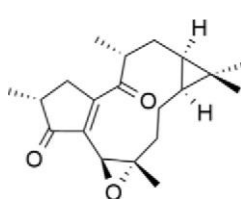
Multifolone (23)



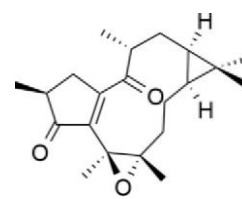
Japodagrins (24)



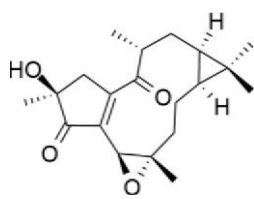
Jatrogrossidins (25)



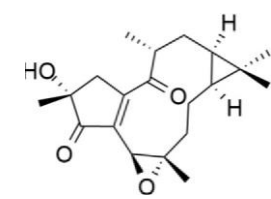
Isojatrogrossidins (26)



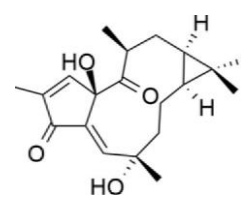
2-epi-isojatrogrossidins (27)



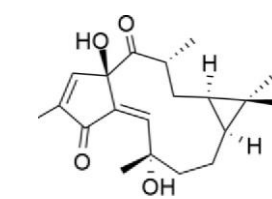
2-epi-hydroxyisojatrogrossidins (28)



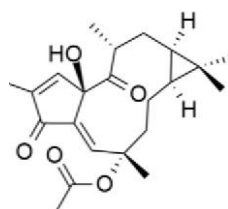
2-hydroxyisojatrogrossidins (29)



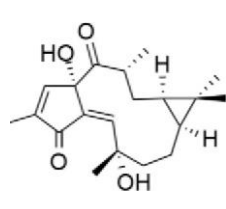
4E-jatrogrossidentadins (30)



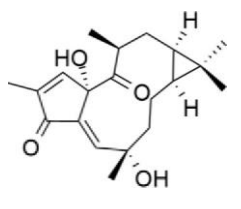
4Z-jatrogrossidentadins (31)



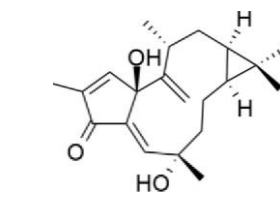
4E-jatrogrossidentadins acetate (32)



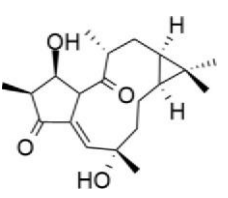
15-epi-4Z-jatrogrossidentadins (33)



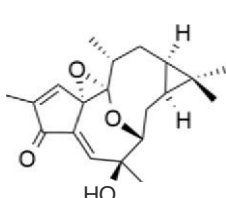
15-epi-4E-jatrogrossidentadins (34)



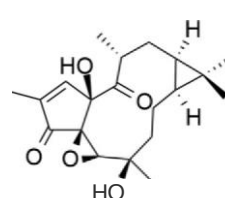
14-deoxy-1hydroxy-(4E)-jatrogrossidentadins (35)



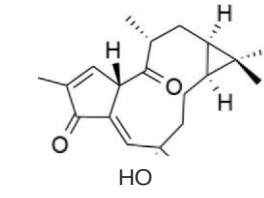
15-deoxy-1hydroxy-4(4E)-jatrogrossidentadins (36)



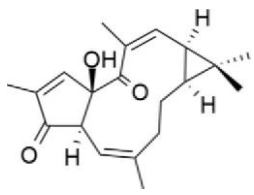
Jatrocursenone A (37)



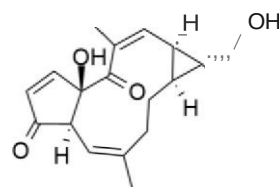
Jatrocursenone B (38)



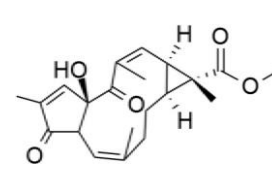
Jatrocursenone C (39)



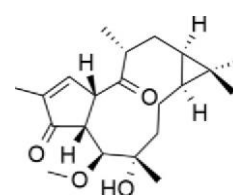
Jatrocursenone D (40)



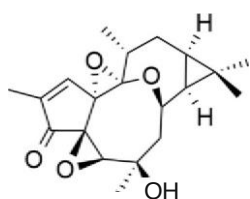
Jatrocursenone E (41)



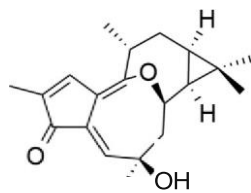
Jatrocursenone F (42)



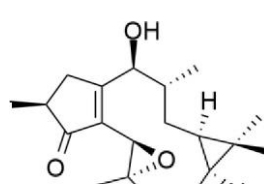
Jatrocursenone G (43)



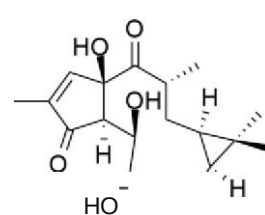
Jatrocursenone H (44)



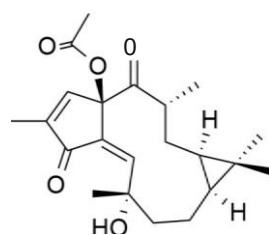
Jatrocursenone I (45)



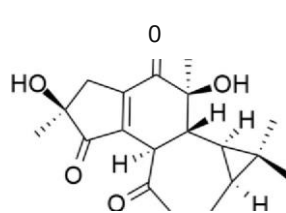
Jatromultone G (46)



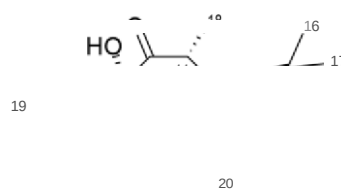
Jatromultone H (47)



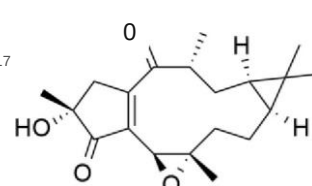
Jatromultone I (48)



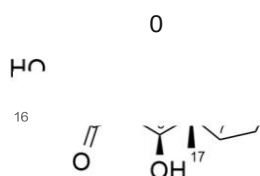
Jatrophalone (49)



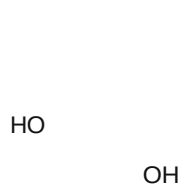
Curculathyrane A (50)



Curculathyrane B (51)



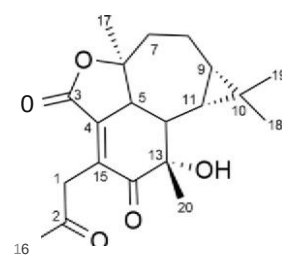
Jatromultone A (52)



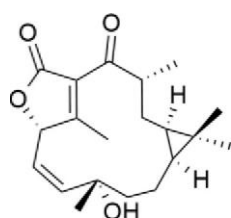
Jatromultone B (53)



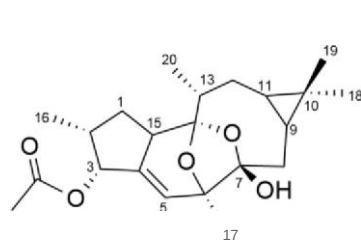
Jatrophalactam (54)



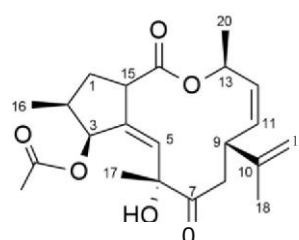
Jatrophalactone (55)



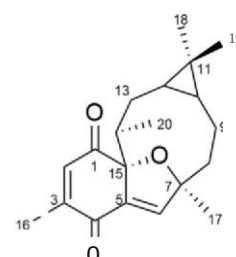
Lathyranolactone (56)



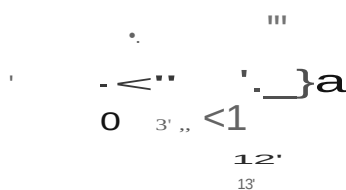
Jatrofoliane A (57)



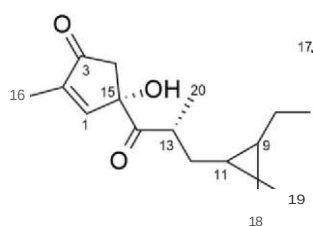
Jatrofoliane B (58)



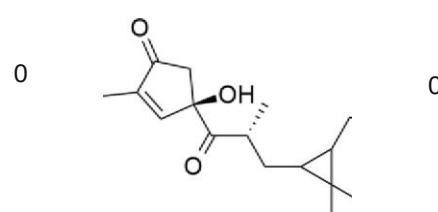
Multifidone (59)



Multidione (60)

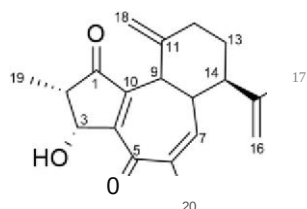


Japodagriconone A (61)

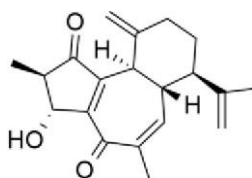


Japodagriconone B (62)

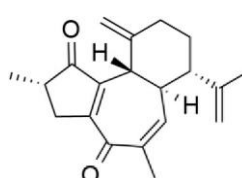
RHAMNOPHOLANE



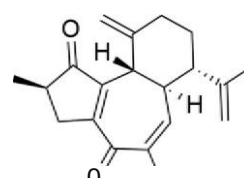
Jatrogrossidione (**63**)



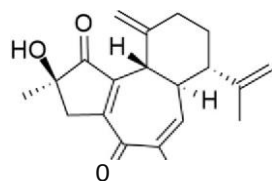
2-epi-Jatrogrossidione (**64**)



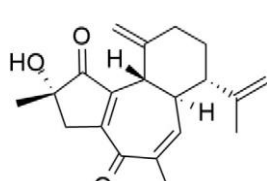
Curcusone A (**65**)



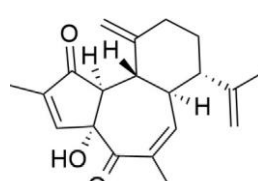
Curcusone B (**66**)



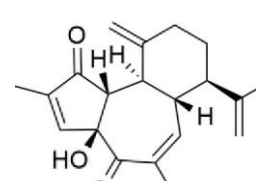
Curcusone C (**67**)



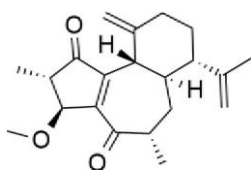
Curcusone D (**68**)



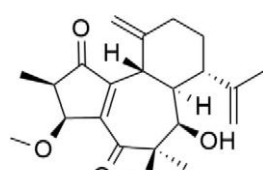
Curcusone E (**69**)



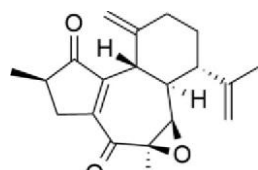
4-epi-curcusone E (**70**)



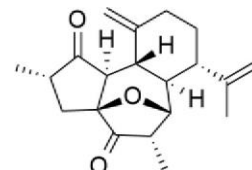
Curcusone F (**71**)



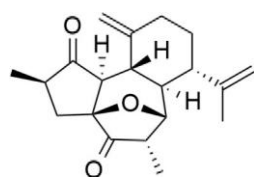
Curcusone G (**72**)



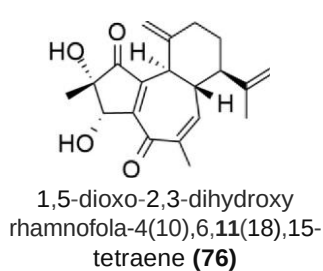
Curcusone H (**73**)



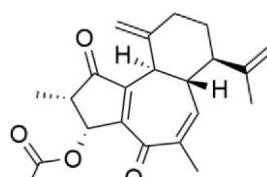
Curcusone I (**74**)



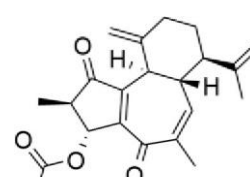
Curcusone J (**75**)



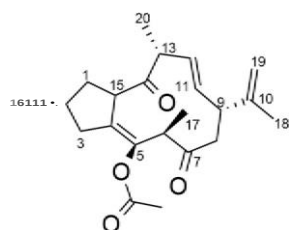
1,5-dioxo-2,3-dihydroxy
rhamnofola-4(10),6,11(18),15-
tetraene (**76**)



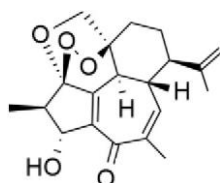
Jatromultone C (**77**)



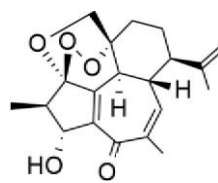
Jatromultone D (**78**)



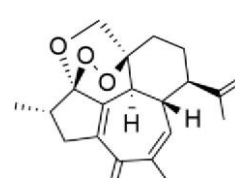
Jatrophene (**79**)



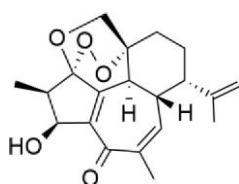
Caniojane (**80**)



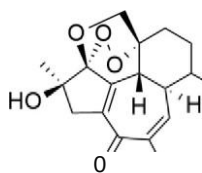
1,11-Bisepicaniojane (**81**)



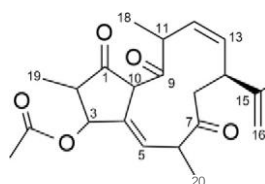
3-dehydroxy-2-
epi-caniojane (**82**)



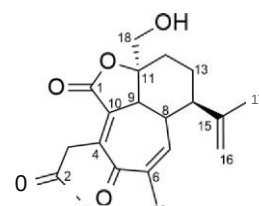
2-epi-caniojane (83)



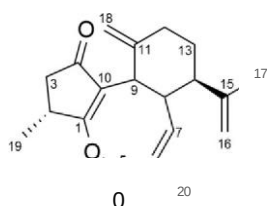
2-hydroxy-3-dehydroxycaniojane (84)



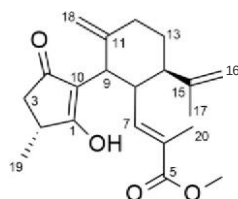
Integerrimene (85)



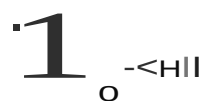
Curcusecon A (86)



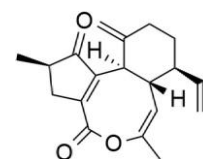
Curcusecon B (87)



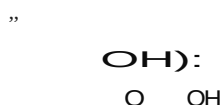
Curcusecon C (88)



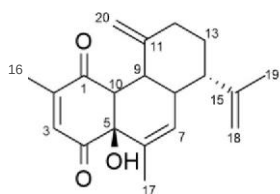
Curcusecon D (89)



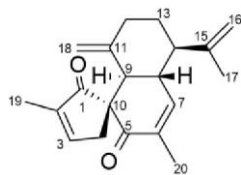
Curcusecon E (90)



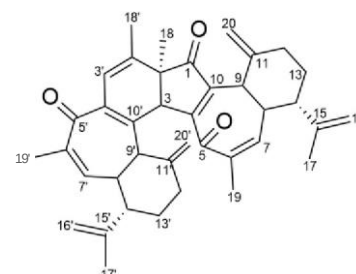
Jatrophacine (91)



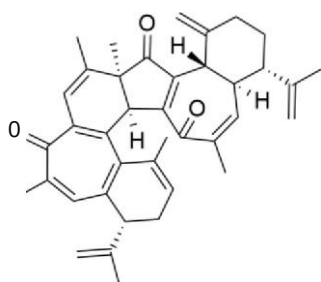
Jatrophadiketone (92)



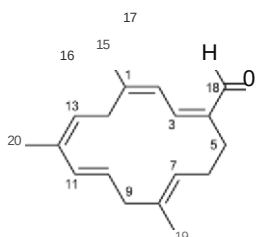
Spirocurcasone (93)



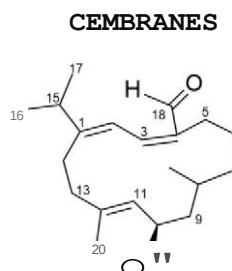
Dimericursone A (94)



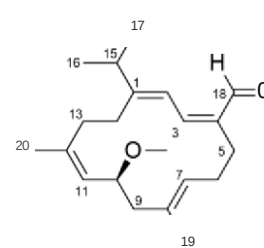
Dimericursone B (95)



Jatrophainolide A (96)



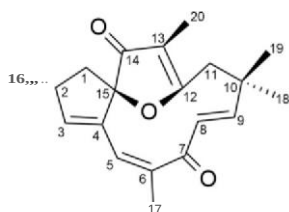
Jatrophainolide B (97)



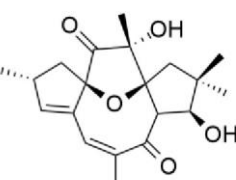
Jatrophainolide C (98)

CEMBRANES

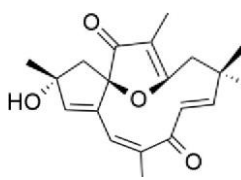
JATROPHANE



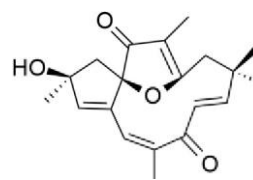
Jatrophone (99)



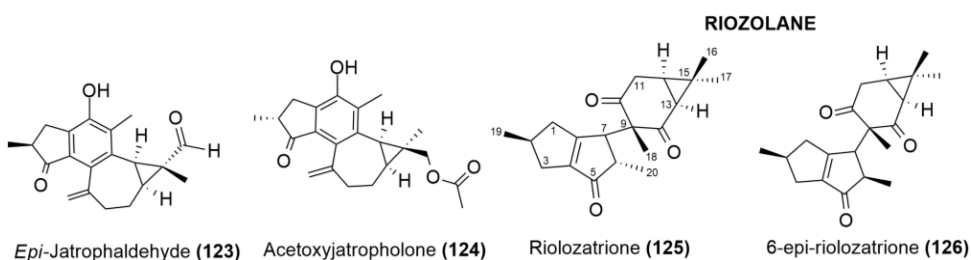
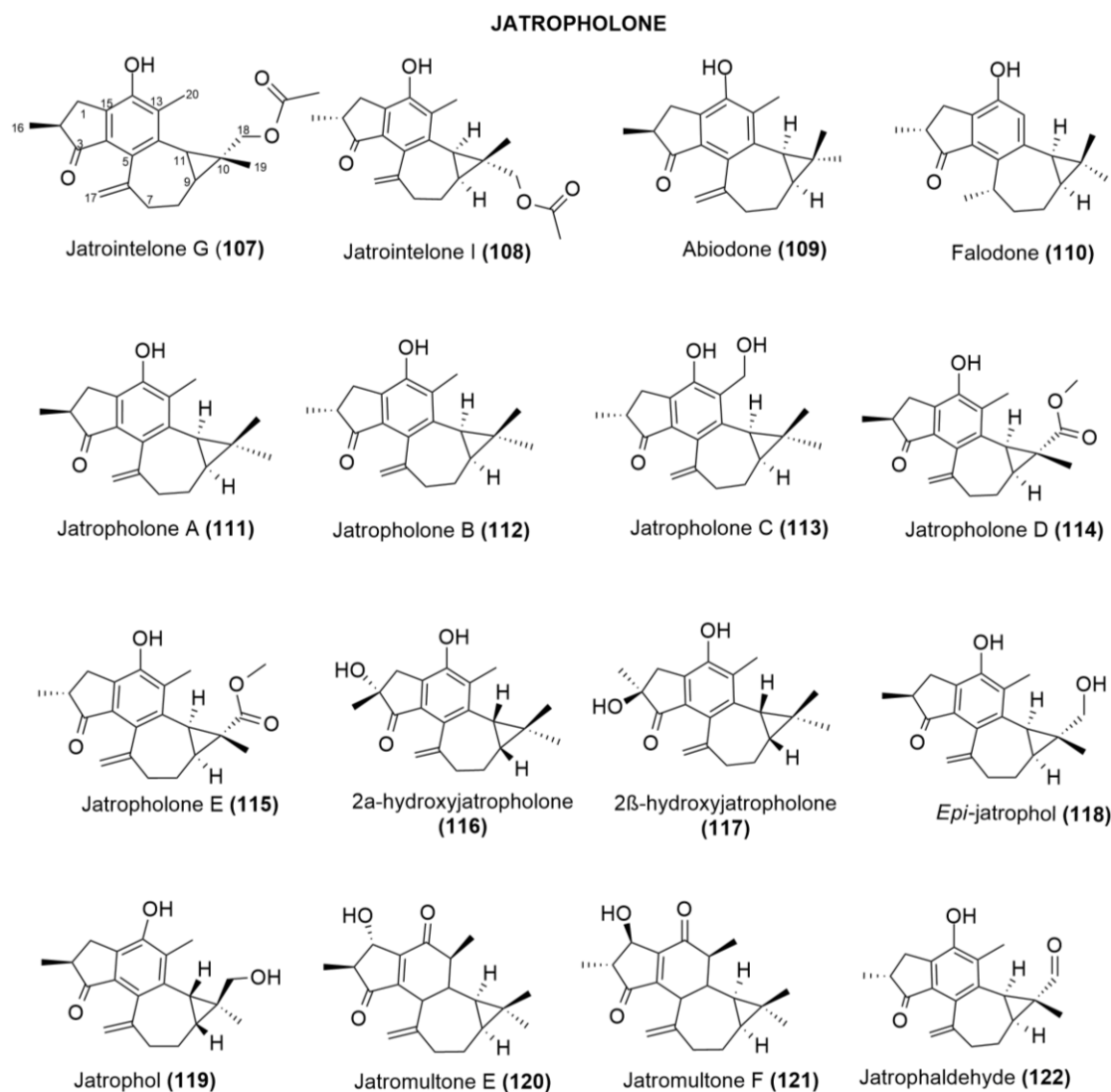
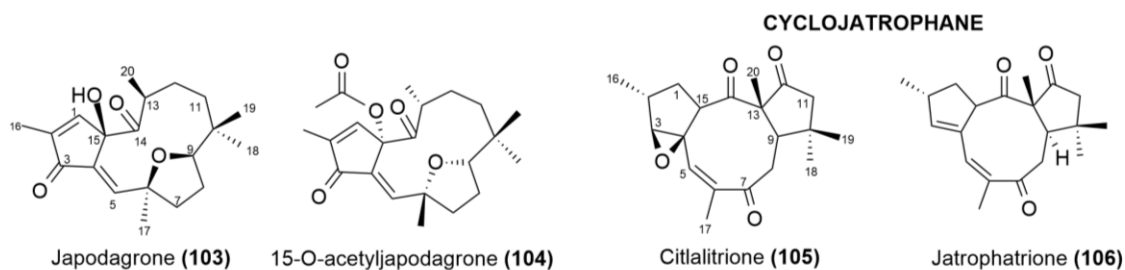
91s,13a-dihydroxyisabellione (100)



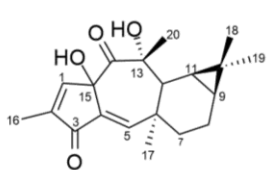
2a-hydroxyjatrophone (101)



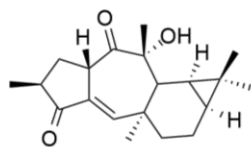
2fs-hydroxyjatrophone (102)



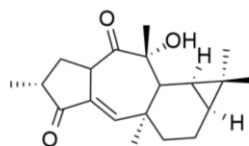
MIRSINANE



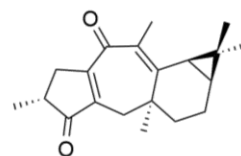
Jatrophodione A (127)



Jatrophodione B (128)

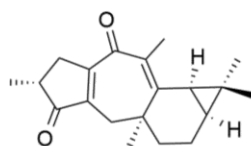


Jatrophodione C (129)

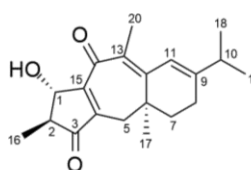


Jatrophodione D (130)

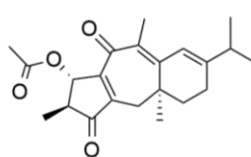
PREMIRSINANE



Jatrophodione E (131)

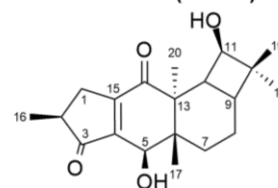


Jatrocucadione A (132)



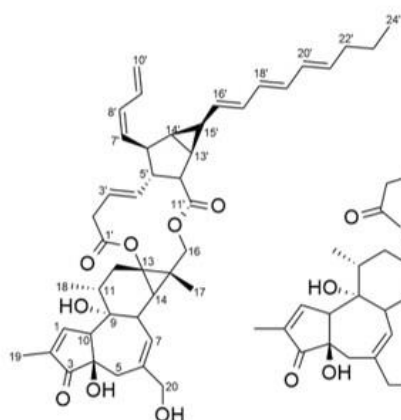
Jatrocucadione B (133)

TETRACYCLE (5/6/6/4)

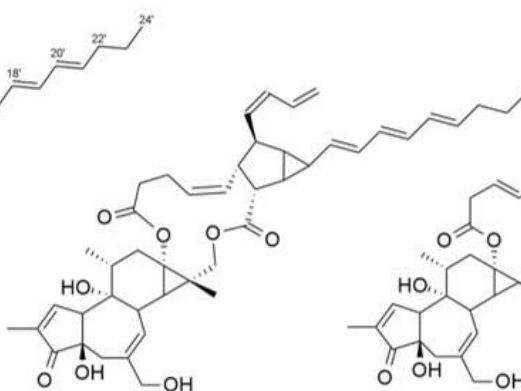


Jatrogicaine A (134)

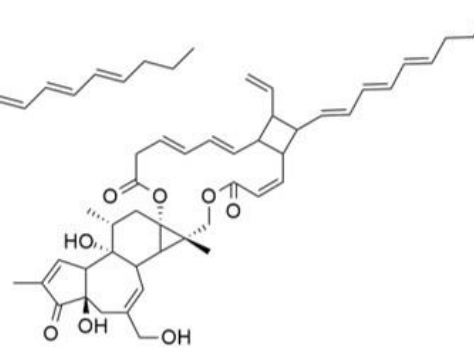
TIGLIANES



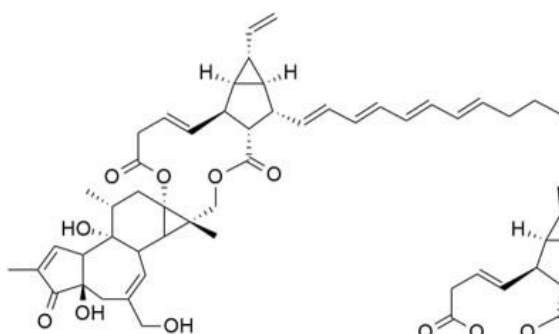
Jatropa factor C1 (135)



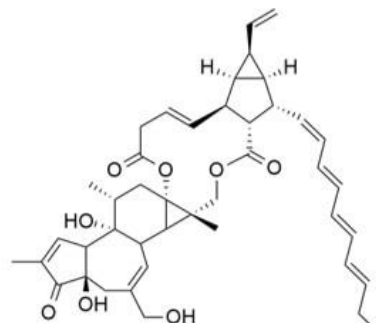
Jatropa factor C2 (136)



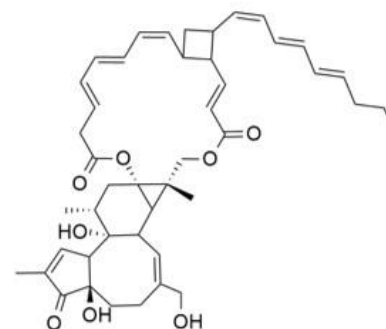
Jatropa factor C3 (137)



Jatropa factor C4 (138)



Jatropa factor C5 (139)



Jatropa factor C6 (140)

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Tabela 1. Deslocamentos químicos de ^{13}C de JTD, δ em ppm.

Composto	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
C1	34.4	36.0	40.4	36.5	51.7	37.0	34.5	35.9	37.3	44.4	149.6	42.0	128.6	156.0
C2	27.3	27.4	67.2	71.6	210.6	27.9	34.1	24.0	27.9	72.5	138.1	40.2	148.5	140.5
C3	78.2	78.3	79.0	76.8	82.7	78.8	217.8	79.8	78.8	79.4	207.1	82.9	80.0	211.9
C4	39.3	39.6	38.5	38.7	44.9	38.9	49.0	37.7	38.9	39.3	45.4	145.1	145.2	47.6
C5	47.9	53.1	43.1	43.1	49.2	49.8	138.7	49.0	49.3	51.1	49.2	134.5	137.5	79.2
C6	24.0	17.9	18.6	18.5	19.1	18.9	144.5	35.3	19.0	20.0	28.5	74.5	73.6	73.6
C7	131.7	33.7	30.2	30.1	29.4	29.7	181.4	197.6	29.2	30.4	32.5	41.8	42.1	41.3
C8	131.0	47.0	134.8	134.9	126.7	126.8	121.7	125.3	125.0	124.4	124.7	19.3	19.4	18.9
C9	164.2	172.7	146.4	146.2	145.8	121.2	152.9	123.6	147.6	149.5	132.3	27.1	27.3	28.6
C10	37.3	41.4	38.7	38.8	43.4	37.3	41.0	38.0	37.5	38.3	136.3	17.5	17.2	16.0
C11	116.7	122.0	124.2	124.1	110.3	110.6	112.5	104.0	109.7	110.8	117.5	19.0	19.2	19.9
C12	202.2	88.7	126.8	126.8	152.2	148.3	162.7	162.6	152.1	154.3	153.0	28.1	28.5	28.3
C13	73.1	131.4	135.1	135.2	122.2	151.9	126.8	155.6	119.3	119.3	132.6	38.9	38.1	43.8
C14	55.5	150.9	129.8	129.9	131.5	131.1	130.5	129.8	139.1	140.0	130.5	212.8	212.3	210.5
C15	138.9	140.0	-	-	15.2	15.3	27.1	16.1	135.1	137.0	22.6	83	87.8	51.5
C16	117.9	113.7	-	-	-	-	-	-	119.5	120.4	-	16.9	13.9	10.1
C17	14.0	15.2	21.0	21.0	-	-	-	-	12.9	13.3	-	29.7	29.3	26.0
C18	27.4	28.3	28.5	28.4	29.2	28.1	21.8	27.5	28.1	30.2	19.8	28.5	28.8	28.9
C19	15.5	15.6	21.8	21.9	16.2	15.3	25.2	15.6	15.4	17.3	15.4	14.9	14.9	15.0
C20	20.7	21.4	25.8	25.7	25.9	24.8	16.3	23.4	24.9	27.4	122.5	16.9	16.6	13.4
-OCH ₃							-	55.6			-	-	-	-
-OCOCH ₃							-	170.8			-	-	-	-
-OCOCH ₃							-	21.2			-	-	-	-
Solvente	CDC ₃ 125MHz	CDC ₃ 125 MHz	CDCl ₃ 100 MHz	CDCl ₃ 100 MHz	CDCl ₃ 100 MHz	CDCl ₃ 125 MHz	CD ₃ OD 125 MHZ	CDCl ₃ 125 MHZ	CDCl ₃ 125 MHz	CDCl ₃ 125 MHz	CDCl ₃ - CD ₃ OD 50 MHz	CDCl ₃ 100 MHz	CDCl ₃ 100 MHz	Pyridine-d ₅ N. I
Referência	[56]	[56]	[57]	[57]	[58]	[59]	[60]	[59]	[56]	[56]	[61]	[62]	[62]	[63]

Composto	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
C1	154.3	160.2	151.8	38.6	38.7	38.5	42.3	42.5	155.7	64.0	152.7	36.6	36.4	43.1
C2	140.4	140.3	145.4	39.7	39.6	39.7	75.5	75.2	143.6	62.5	142.7	43.6	43.5	75.4
C3	210.5	213.2	195.7	87.5	87.7	87.5	208.8	208.4	195.5	195.6	203.4	208.9	208.9	217.3
C4	47.8	47.9	139.9	148.3	149.1	148.8	162.2	164.8	137.4	134.3	62.4	167.2	166.3	164.9
C5	34.9	33.4	149.9	63.6	63.6	63.6	60.6	61.6	141.9	151.5	57.7	56.3	56.2	55.8
C6	71.5	71.6	75.9	65.2	65.4	65.2	63.1	63.8	74.9	75.6	58.6	60.4	60.4	60.8
C7	41.0	37.8	41.4	37.9	37.6	37.9	36.9	37.0	42.9	41.9	41.0	40.5	40.5	40.3
C8	17.5	20.9	19.6	19.1	19.1	18.8	19.2	19.3	20.5	19.3	18.4	19.5	19.5	19.5
C9	27.1	35.8	38.1	35.1	36.2	30.8	36.9	37.3	26.0	26.9	29.1	28.3	28.3	28.3
C10	15.7	28.8	26.9	24.6	26.3	30.1	26.8	27.6	17.3	17.7	16.5	18.0	18.0	18.1
C11	20.0	28.6	28.9	27.7	27.9	23.9	29.1	29.2	21.5	19.2	18.7	23.5	23.4	23.4
C12	28.2	149.5	153.5	137.6	142.8	135.0	145.8	148.4	24.9	28.7	24.3	26.6	26.4	26.5
C13	40.3	132.5	128.4	137.9	140.8	138.8	137.8	137.7	30.5	41.2	37.6	40.6	40.3	43.6
C14	213.3	199.3	199.0	195.0	194.4	195.2	192.5	192.1	81.5	209.2	214.0	208.3	207.3	207.6
C15	85.9	81.8	82.6	141.5	141.9	141.4	136.2	135.2	79.3	82.3	86.4	136.5	135.7	134.1
C16	9.9	10.1	10.8	18.2	18.3	18.2	26.1	25.0	10.5	10.1	10.2	17.2	15.7	26.2
C17	29.0	29.0	25.5	17.8	17.9	17.8	17.4	17.1	29.5	28.9	18.3	18.5	18.3	18.5
C18	28.9	29.1	28.5	29.0	29.0	71.9	29.1	29.9	28.7	28.3	28.2	28.8	28.8	28.8
C19	15.1	16.4	15.5	16.1	16.2	11.8	16.4	16.5	14.5	14.9	15.4	15.0	15.0	15.0
C20	15.4	11.7	12.0	13.6	58.6	13.8	12.7	12.5	21.3	17.0	14.6	17.8	17.6	17.1
Solvente	Pyridine-d ₅ 75 MHz	CDCl ₃ 100MHZ	CDCl ₃ 100MHZ	CDCl ₃ 100MHZ	CDCl ₃ 100MHZ	CDCl ₃ 100MHZ	CDCl ₃ 100MHZ	CDCl ₃ 100MHZ	CDCl ₃ 100MHZ	CDCl ₃ 100MHZ	CDCl ₃ 100 MHz	CDCl ₃ 100 MHz	CDCl ₃ -DMSO- d ₆ (9:1) 100 MHz	CDCl ₃ 100 MHz
Referência	[64]	[65]	[65]	[65]	[65]	[65]	[65]	[65]	[66]	[67]	[68]	[68]	[68]	[68]

Composto	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
C1	43.5	150.6	149.5	151.0	149.9	151.5	155.5	42.0	146.6	156.4	151.6	155.3	157.5	154.8
C2	75.5	149.2	146.8	145.3	148.7	146.6	143.8	40.4	149.2	144.8	144.9	141.3	139.5	141.5
C3	208.8	195.7	196.4	195.4	194.2	195.7	195.7	82.9	194.1	200.9	197.3	197.9	199.7	207.9
C4	166.7	132.2	134.6	132.0	133.1	137.0	137.6	145.3	130.4	70.4	134.0	54.7	55.1	54.5
C5	56.2	145.5	153.7	145.8	149.0	144.0	141.8	134.6	140.8	75.0	145.0	117.3	120.0	117.9
C6	61.0	73.5	73.9	84.4	75.7	76.0	74.6	74.5	75.0	73.9	75.0	146.7	144.7	146.1
C7	40.5	43.6	43.5	36.9	41.8	41.5	42.7	41.6	83.1	37.85	42.9	36.9	37.2	36.3
C8	19.4	18.1	19.0	18.1	19.0	19.5	20.6	19.5	22.8	20.7	20.5	28.6	28.8	27.8
C9	28.6	27.4	24.8	27.1	24.0	26.9	26.2	27.3	25.8	37.88	28.5	34.9	30.4	32.9
C10	18.1	17.8	16.9	17.5	17.4	17.9	17.0	17.8	16.3	27.7	17.2	25.6	31.4	30.2
C11	23.0	20.1	22.1	20.1	20.9	19.4	21.5	19.3	20.3	28.3	20.9	30.1	26.5	30.7
C12	26.1	30.0	28.3	29.5	27.9	29.6	24.8	28.4	27.5	151.3	29.6	152.3	150.0	146.1
C13	43.9	38.6	37.4	43.6	38.1	38.2	30.5	38.9	36.6	132.2	38.9	131.9	132.5	134.5
C14	207.0	213.5	210.8	212.0	211.1	210.9	81.4	210.6	92.3	195.0	209.8	208.5	208.5	198.1
C15	133.2	85.0	84.1	85.3	83.3	84.2	79.8	84.6	68.0	79.2	59.6	84.9	84.9	84.7
C16	25.0	10.7	10.8	10.7	10.9	10.9	10.4	17.2	11.2	11.3	11.0	10.7	12.3	10.6
C17	18.2	29.2	29.0	23.7	29.1	29.0	29.3	29.8	29.2	20.7	31.2	20.5	20.5	20.4
C18	28.7	28.8	28.7	29.0	28.7	28.3	28.5	28.5	28.0	28.5	28.6	29.3	70.8	Acetato
C19	15.1	14.9	15.5	14.9	15.7	14.9	14.3	14.6	15.5	16.0	15.3	16.4	12.6	10.2
C20	17.1	16.7	19.4	16.5	18.6	16.9	21.4	17.2	11.5	11.6	18.1	11.8	10.5	12.1
-OCH ₃	-	-	-										-	
-OCOCH ₃	-	-	-	170.1									-	175.6
-OCOCH ₃				22.1										52.5
Solvente	CDCl ₃ 100 MHz	CDCl ₃ 100 MHz	CDCl ₃ 100 MHz	CDCl ₃ 100 MHz	CDCl ₃ 100 MHz	CDCl ₃ 100 MHz	CDCl ₃ 100 MHz	CDCl ₃ 100 MHz	pyridine-d ₅ 150 MHz	CDCl ₃ 150 MHz	pyridine-d ₅ 150 MHz	CDCl ₃ 150 MHz	pyridine-d ₅ 150 MHz	CDCl ₃ 125 Mhz
Referência	[68]	[68]	[68]	[68]	[68]	[68]	[69]	[69]	[70]	[70]	[70]	[70]	[70]	[71]

Composto	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56
C1	154.2	152.2	147.6	35.6	159.8	159.8	39.0	n.i	n.i	39.1	39.0	171.9	38.6	171.0
C2	140.2	149.4	129.3	40.4	143.8	143.8	75.4	n.i	n.i	76.5	76.4	131.0	203.5	170.4
C3	211.1	199.0	194.9	208.2	210.2	210.2	208.5	146.7	164.9	212.9	213.1	60.3	168.1	82.0
C4	45.6	61.2	136.1	130.7	53.9	53.9	151.0	n.i	n.i	155.5	155.3	123.8	145.2	121.3
C5	89.2	63.5	135.7	57.7	71.8	71.8	44.8	n.i	55.7	70.3	70.7	138.1	55.0	137.6
C6	74.0	70.9	74.2	60.4	75.1	75.1	152.7	n.i	n.i	50.2	50.1	73.7	88.8	73.7
C7	40.0	84.7	84.8	40.5	41.2	41.2	40.4	41.6	n.i	32.5	32.4	42.2	38.8	45.7
C8	17.9	23.5	22.8	19.5	16.1	16.1	26.8	29.7	26.5	19.6	19.9	20.0	20.1	20.1
C9	27.7	25.9	27.1	28.6	28.7	28.7	27.1	195.8	207.6	27.6	27.6	27.0	24.9	26.77
C10	16.1	16.5	17.6	18.2	17.1	17.1	20.0	n.i	n.i	20.5	20.5	18.4	19.7	18.9
C11	19.3	20.1	21.8	23.6	19.4	19.4	27.2	38.2	43.6	22.2	22.2	21.8	27.7	21.8
C12	28.1	27.1	35.1	26.8	24.3	24.3	48.6	19.6	19.5	25.1	25.2	28.4	41.1	30.1
C13	44.0	37.2	34.2	36.5	38.7	38.7	77.0	27.0	28.2	55.7	55.6	47.7	75.3	44.8
C14	209.6	90.9	158.0	69.6	213.5	213.5	203.6	19.5	23.4	203.6	203.4	205.8	202.6	202.2
C15	51.1	66.9	116.6	180.5	84.0	84.0	154.9	18.0	18.1	144.7	143.4	157.4	133.5	126.7
C16	10.4	11.3	10.8	17.7	10.0	10.0	24.6	17.0	18.5	25.4	25.3	14.7	30.3	13.8
C17	25.3	26.8	29.8	29.1	23.9	23.9	111.7	15.0	17.7	13.7	13.8	22.1	20.6	26.80
C18	28.9	28.9	29.4	15.3	15.6	15.6	16.5	10.9	15.0	29.0	29.0	29.4	16.4	29.2
C19	15.1	15.4	15.8	17.3	28.3	28.3	28.7	29.1	28.8	15.6	15.6	15.6	28.7	15.8
C20	13.3	11.9	12.8	13.9	14.9	14.9	21.7	28.4	26.2	17.7	18.0	13.7	21.3	11.8
-OCH ₃	60.3	-	-	-	-	-								
-OCOCH ₃	-	-	-	-	-	171.0								
-OCOCH ₃	-	-	-	-	-	20.9								
Solvente	CDCl ₃ 125 MHz	CDCl ₃ 125 MHz	CDCl ₃ 125 MHz	CDCl ₃ 100 MHz	CDCl ₃ 100 MHz	CDCl ₃ 100 MHz	CDCl ₃ 150 MHz	CDCl ₃ 100 MHz	CDCl ₃ 100 MHz	CDCl ₃ 100 MHz	CDCl ₃ 100 MHz	CDCl ₃ 100 MHz	CDCl ₃ 150 MHz	CDCl ₃ 150 MHz
Referência	[71]	[71]	[71]	[72]	[72]	[72]	[73]	[74]	[74]	[72]	[72]	[75]	[73]	[70]

Composto	57	58	59	60	61	62	64	65	66	67	68	69	70	71
C1	34.4	35.9	152.7	158.8	154.5	154.7	209.6	212.7	212.1	212.3	209.3	204.1	203.3	204.7
C2	36.2	37.5	142.7	124.2	146.3	146.2	48.3	39.2	39.8	74.7	73.0	145.7	144.8	49.2
C3	74.1	81.8	203.4	131.8	205.5	205.7	76.8	36.3	36.4	43.7	43.1	152.1	152.6	80.3
C4	148.0	137.8	62.4	129.4	45.8	46.3	148.4	160.5	158.6	158.1	158.4	88.9	86.3	160.0
C5	122.4	135.0	57.7	128.3	209.2	209.0	198.4	199.1	198.5	198.4	197.5	206.3	208.0	209.6
C6	79.2	80.7	58.6	114.7	44.2	44.1	141.3	141.2	141.0	141.2	140.9	131.2	136.3	37.3
C7	110.1	213.7	41.0	15.8	18.8	18.9	137.2	136.4	136.7	136.9	137.5	139.0	134.4	33.8
C8	29.8	37.8	18.4	203.8	26.0	26.1	43.7	43.9	43.8	43.5	43.8	45.7	45.5	45.0
C9	21.8	46.6	29.1	40.3	17.8	17.7	45.4	45.6	46.0	45.4	45.6	42.8	43.8	40.6
C10	17.7	145.7	16.5	29.0	24.8	24.1	160.5	149.0	149.0	148.7	148.3	57.4	59.1	142.7
C11	21.9	138.8	18.7	24.5	29.1	29.5	148.9	147.7	148.8	146.8	146.9	148.7	146.7	147.7
C12	25.6	129.8	24.3	17.3	39.8	39.2	36.4	36.7	36.7	36.7	36.4	36.9	36.4	34.2
C13	37.9	72.4	37.6	25.9	213.3	213.6	34.3	34.6	34.6	34.6	34.3	34.4	33.7	32.3
C14	107.0	176.2	214.0	19.1	82.6	82.7	51.4	51.9	51.9	52.0	51.5	53.7	51.9	48.4
C15	47.7	46.7	86.4	44.1	10.5	10.5	146.6	147.0	147.0	145.4	146.0	146.8	150.1	145.4
C16	14.2	12.9	10.2	209.8	30.3	30.3	113.4	113.4	113.4	113.6	113.5	112.5	112.5	111.7
C17	15.9	27.6	18.3	29.9	29.3	29.4	18.7	18.8	18.8	18.9	18.8	20.2	18.7	17.6
C18	29.3	21.5	28.2	17.4	14.8	14.8	108.4	108.2	108.3	108.3	109.1	108.0	107.0	104.7
C19	15.1	110.5	15.4	29.0	19.0	18.4	14.5	17.8	14.7	26.3	24.0	10.8	10.6	12.9
C20	14.8	19.4	14.6	14.7			18.9	19.6	19.6	19.6	19.7	22.0	19.0	15.5
-OCH ₃			-	-	-	-	-	-						
-OCOCH ₃	170.8	170.4	-	-	-	-	-	-						
-OCOCH ₃	21.0	21.2												
Solvente	CDCl ₃ 125 MHz	CDCl ₃ 125 MHz	CDCl ₃ 100 MHz	CDCl ₃ 100 MHz	CDCl ₃ 150 MHz	CDCl ₃ 125 MHz	CDCl ₃ 125 MHz	CDCl ₃ 125 MHz	CDCl ₃ 125 MHz	CDCl ₃ 125 MHz	CDCl ₃ 125 MHz	CDCl ₃ 125 MHz	CDCl ₃ 150 MHz	CDCl ₃ 150 MHz
Referência	[76]	[76]	[77]	[78]	[79]	[79]	[80]	[81]	[81]	[81]	[81]	[82]	[83]	[83]

Composto	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85
C1	209.9	210.9	210.3	211.9	209.5	208.6	208.3	36.9	104.9	104.0	108.6	108.0	103.8	37.2
C2	40.7	40.3	40.4	42.2	74.0	47.1	47.3	37.4	47.7	45.9	38.6	40.8	77.6	37.8
C3	34.0	36.0	33.0	31.4	NI	72.2	77.8	91.0	80.4	80.3	37.3	74.9	43.9	81.4
C4	167.9	153.8	84.1	86.6	157.9	150.7	149.5	140.0	138.3	NI	136.1	135.4	138.9	140.1
C5	207.7	204.5	217.6	215.4	198.2	197.3	198.0	139.7	192.1	191.5	190.3	192.0	193.6	131.5
C6	81.9	64.2	42.1	42.1	142.0	141.7	142.0	48.9	135.6	138.0	138.1	138.2	137.1	49.3
C7	70.2	65.5	82.1	80.4	136.0	135.1	134.4	210.4	141.4	140.1	140.0	141.6	138.6	211.7
C8	47.1	41.2	47.2	41.6	43.6	43.5	43.7	46.2	37.2	38.4	37.2	37.2	35.3	46.6
C9	39.0	43.5	39.5	39.2	45.0	51.7	51.7	46.8	43.4	44.6	43.6	43.5	47.2	210.4
C10	140.5	147.6	55.5	51.9	146.8	146.6	146.6	145.9	151.4	149.0	149.5	150.1	147.3	51.6
C11	146.8	149.5	146.3	142.8	148.1	34.3	34.4	134.2	75.7	75.7	75.6	75.4	69.8	53.7
C12	36.3	36.7	35.3	35.2	36.5	36.5	36.6	131.2	28.8	28.7	25.6	25.6	32.2	131.9
C13	34.0	35.6	33.3	33.5	34.3	148.2	148.0	53.4	25.6	27.8	28.7	28.8	25.7	134.6
C14	47.5	51.9	47.9	48.1	51.9	45.3	45.0	211.0	49.0	49.5	48.8	49.0	51.3	48.9
C15	146.7	146.6	146.0	146.4	146.5	156.0	157.4	51.2	145.8	146.0	146.0	145.8	146.5	146.3
C16	112.9	114.3	112.5	112.4	113.3	8.4	15.3	13.6	114.1	114.5	113.9	114.1	113.3	110.5
C17	19.1	19.6	18.2	18.5	18.6	18.8	18.5	16.8	20.4	19.2	18.9	19.0	18.9	21.7
C18	106.8	108.4	106.5	109.0	108.3	113.3	113.3	21.3	73.4	68.8	73.3	73.7	70.0	17.1
C19	18.2	14.8	14.5	18.0	24.0	18.6	18.6	110.1	19.0	10.1	11.0	7.7	23.6	14.0
C20	26.8	17.3	15.2	15.6	18.7	108.4	108.2	17.7	9.0	20.8	20.8	20.5	20.5	18.1
-OCH ₃			-	-	-				-	-	-	-	-	
-OCOCH ₃			-	-	-	169.9	170.1	170.8	-	-	-	-	-	171.2
-OCOCH ₃						20.4	20.6	21.3						21.6
Solvente	CDCl ₃ 150 MHz	CDCl ₃ 150 MHz	CDCl ₃ 150 MHz	CDCl ₃ 150 MHz	CDCl ₃ 100 MHz	CDCl ₃ 100 MHz	CDCl ₃ 100 MHz	CDCl ₃ 125 Mhz	CDCl ₃ 100 MHz	CDCl ₃ 100 Mhz	CDCl ₃ 150 MHz	CDCl ₃ 100 MHz	CDCl ₃ 150 MHz	CDCl ₃ 100 MHz
Referência	[83]	[83]	[83]	[83]	[84]	[72]	[72]	[85]	[86]	[87]	[83]	[87]	[88]	[87]

Composto	86	87	88	89	90	91	92	93	93	94	95	96	97	98
C1	169.1	180.6	207.0	210.3	209.9	199.6	194.3	208.8	208.7	207.4	206.2	158.7	158.6	157.8
C2	205.2	35.0	38.8	39.3	40.2	36.8	153.1	144.3	144.2	59.2	58.7	112.8	120.2	119.4
C3	42.5	42.3	41.6	38.1	38.4	38.4	132.1	153.4	153.6	53.7	52.7	141.8	146.7	145.1
C4	142.6	205.1	200.3	142.7	143.1	190.0	201.2	33.0	33.1	144.7	136.2	135.2	138.6	138.9
C5	193.6	167.2	170.9	167.5	167.5	169.0	79.3	199.7	199.5	203.1	200.7	30.6	23.2	24.1
C6	137.0	126.2	127.4	147.7	147.6	127.1	133.6	133.5	133.4	142.9	142.8	26.7	26.9	25.9
C7	145.0	138.1	147.5	118.0	118.1	144.2	131.2	146.6	146.8	130.2	129.8	126.9	125.6	125.9
C8	40.9	45.4	44.9	46.3	46.5	43.1	39.3	40.9	41.1	44.0	43.9	135.2	132.3	130.9
C9	46.9	43.3	43.9	41.7	41.6	42.5	41.2	47.9	48.1	46.0	45.5	41.5	47.2	46.0
C10	137.5	129.4	114.2	153.6	152.8	114.7	55.4	60.7	60.7	162.8	162.5	129.1	75.5	75.6
C11	83.3	145.6	146.6	146.8	146.7	144.2	146.9	145.3	145.6	148.7	147.8	126.8	129.3	124.9
C12	28.3	35.3	36.8	35.5	35.5	35.4	35.6	36.8	37.0	36.6	36.4	135.5	136.4	137.3
C13	25.9	32.9	32.7	33.2	33.1	31.6	33.0	33.6	33.8	34.3	34.3	123.0	38.6	34.4
C14	46.4	51.8	54.5	51.4	51.4	52.4	50.7	50.4	50.6	51.5	51.4	27.6	28.4	26.7
C15	145.6	146.7	150.4	147.1	147.1	148.5	146.8	146.2	146.3	146.9	146.7	33.7	33.3	29.9
C16	114.6	112.4	111.1	112.0	112.0	111.1	16.7	113.4	113.5	113.3	113.0	22.1	23.3	21.4
C17	18.8	18.6	19.6	18.5	18.5	19.3	19.0	19.4	19.4	18.7	18.4	22.1	20.8	21.2
C18	69.4	108.1	108.6	107.9	108.1	108.2	19.3	106.7	106.9	21.1	19.7	190.7	195.1	195.4
C19	30.2	17.8	19.0	17.3	15.7	17.8	112.2	10.5	10.5	17.9	17.9	16.0	15.9	16.3
C20	21.5	18.9	21.5	19.8	19.7	21.6	106.0	16.1	16.2	108.2	108.5	20.2	16.4	18.0
-OCH ₃	-	-	-	-									55.3	55.5
-OCOCH ₃	-	-	-	-									-	-
-OCOCH ₃													-	-
Solvente	CDCl ₃ 150 MHz	CDCl ₃ 150 MHz	MeOD-d ₄ 150 MHz	CDCl ₃ 150 MHz	CDCl ₃ 150 MHZ	DMSO 1% TFA-d 125MHz	CDCl ₃ 150MHz	CDCl ₃ 125MHz	CDCl ₃ 125 MHz	CDCl ₃ 150 MHz	CDCl ₃ 150 MHz	CDCl ₃ 125 MHz	CDCl ₃ 125 MHz	CDCl ₃ 125 MHz
Referência	[83]	[83]	[83]	[83]	[83]	[89]	[73]	[82]	[81]	[90]	[90]	[91]	[91]	[91]

Composto	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112
C1	42.5	49.9	49.4	48.6	153.8	150.3	216.9	218.0	30.3	30.1	208.2	208.2	30.3	30.5
C2	38.3	37.8	81.2	80.8	143.9	144.7	213.8	215.6	42.5	42.4	42.5	42.6	42.2	40.0
C3	123.7	154.7	122.8	122.5	196.7	195.2	207.2	210.6	207.7	208.1	30.2	30.1	208.4	208.0
C4	137.1	138.8	137.3	140.3	136.0	132.5	144.7	144.5	136.9	137.5	134.3	134.3	146.0	145.5
C5	147.0	131.3	147.6	146.0	139.5	139.7	129.1	138.4	134.3	134.4	146.1	150.1	133.1	133.0
C6	141.8	136.8	142.8	142.9	82.8	81.6	72.5	135.9	145.5	145.0	114.8	114.8	145.5	145.5
C7	201.8	202.9	201.3	201.3	37.6	37.6	67.8	128.1	33.4	33.3	137.4	137.1	33.2	33.3
C8	128.7	66.7	128.7	128.7	25.6	25.5	65.6	64.5	20.8	20.8	25.9	25.9	21.1	21.1
C9	158.7	79.9	159.1	159.9	88.5	88.1	55.5	55.5	23.1	23.1	16.1	16.1	25.5	25.5
C10	36.6	37.0	36.7	37.0	36.0	35.7	52.9	51.4	23.0	23.0	19.4	19.5	19.0	19.0
C11	41.3	43.3	41.3	41.6	34.5	34.4	46.8	51.0	25.9	25.8	15.8	15.8	27.8	27.8
C12	183.1	76.9	183.9	183.4	31.3	30.9	38.0	39.8	135.4	135.3	33.4	33.5	136.7	136.7
C13	112.4	87.7	112.4	113.0	42.0	43.5	37.0	38.3	130.6	131.0	150.1	42.4	131.7	131.3
C14	203.8	213.7	203.2	203.4	211.8	204.6	35.0	38.0	150.1	150.3	131.1	131.8	150.7	150.6
C15	99.8	91.4	97.7	97.9	82.4	88.9	34.2	37.4	132.7	131.8	145.5	145.6	130.5	130.5
C16	18.9	19.2	26.9	27.1	10.6	10.7	27.7	27.9	15.8	17.0	13.2	13.3	16.7	15.5
C17	20.7	21.9	20.7	21.1	24.2	24.0	23.2	23.6	115.2	115.5	115.8	28.2	114.5	114.2
C18	30.4	27.5	30.2	30.5	24.1	28.2	20.2	20.7	73.8	73.8	17.1	17.1	28.0	28.0
C19	26.9	22.0	26.7	27.1	28.4	23.4	16.2	20.5	12.1	12.1	17.3	21.4	15.8	15.8
C20	6.0	14.2	5.9	6.3	20.6	20.6	14.7	14.0	12.6	12.6	13.2		13.3	13.3
-OCH ₃	-	-	-	-	-	-	-	-			-	-	-	-
-OCOCH ₃	-	-	-	-	-	169.3	-	-	171.3	171.3	-	-	-	-
-OCOCH ₃	-	-	-	-	-	22.1			20.9	20.9				
Solvente	CDCl ₃ 62,9 MHz	CDCl ₃ 100 MHz	CDCl ₃ 62,9 MHz	CDCl ₃ 125 MHz	CDCl ₃ 90/150 MHz	CDCl ₃ 100 MHz	C ₆ D ₆ 150 MHz	CDCl ₃ 125 MHz	CDCl ₃ 100 MHz	CDCl ₃ 100 MHz	CDCl ₃ 75 MHz	CDCl ₃ 100 MHz	CDCl ₃ 50 MHz	CDCl ₃ 50 MHz
Referência	[92]	[93]	[92]	[94]	[95]	[96]	[97]	[91]	[92]	[93]	[92]	[94]	[95]	[96]

Composto	126	126	127	128	129	130	131	132	133	134
C1	40.4	41.5	150.9	27.3	27.8	34.3	34.3	75.7	77.0	31.6
C2	37.8	39.1	144.6	41.6	42.8	39.7	39.5	51.0	48.3	41.5
C3	32.7	33.6	195.2	207.3	205.3	213.1	213.1	209.2	207.9	214.8
C4	149.3	150.0	129.8	128.7	129.5	142.0	142.0	142.3	145.3	157.6
C5	203.3	206.6	149.3	148.5	147.9	33.9	34.0	35.5	35.3	71.0
C6	50.3	51.8	39.4	38.4	38.1	38.5	38.4	39.8	39.3	48.0
C7	45.6	46.9	37.9	38.0	38.4	38.1	38.0	39.3	39.0	30.4
C8	180.6	184.1	16.0	16.0	16.1	16.4	16.4	24.3	24.0	21.2
C9	68.6	70.2	19.2	19.3	19.4	24.0	23.8	157.7	158.0	37.1
C10	205.3	207.5	17.4	17.3	17.1	21.7	21.7	36.7	36.5	44.0
C11	33.2	34.5	20.9	20.4	20.0	29.9	29.5	121.8	121.3	73.7
C12	21.8	23.3	40.9	42.1	42.1	157.7	157.7	155.8	155.7	45.3
C13	37.8	38.0	81.7	81.8	81.7	137.2	137.2	132.1	131.6	54.0
C14	206.8	209.5	208.3	208.5	209.1	192.3	192.5	191.3	188.6	204.9
C15	26.3	27.4	81.3	43.1	44.1	161.3	161.3	163.4	158.4	147.6
C16	28.4	28.6	10.8	16.4	14.2	16.4	16.3	14.3	14.7	16.1
C17	16.5	16.9	19.4	19.4	18.9	24.6	24.4	20.7	20.7	14.3
C18	10.7	11.0	15.7	28.6	28.8	28.6	28.7	21.9	21.2	28.3
C19	21.5	22.1	28.5	15.7	15.7	16.1	16.1	21.6	21.4	15.1
C20	11.8	12.1	27.7	26.9	27.0	17.0	16.9	16.2	16.0	14.0
-OCH ₃	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-OCOCH ₃	-	-	-	-	-	-	-	-	170.8	-
-OCOCH ₃									20.8	
Solvente	CDCl ₃ 100 MHz	MeOD-d ₄ 100 MHz	CDCl ₃ 125 MHz	CDCl ₃ 150 MHz	CDCl ₃ 150 MHz	CDCl ₃ 125 MHz	CDCl ₃ 125 MHz	Pyridine-d ₅ 100 MHz	Pyridine-d ₅ 150 MHz	CDCl ₃ 125 MHz
Referência	[101]	[101]	[102]	[70]	[70]	[70]	[70]	[103]	[103]	[104]

Compound	135				136				137						
	C1	161.2	C1'	173.3	C1	161.2	C1'	173.7	C1	160.8	C1'	173.8			
	C2	133.4	C2'	38.1	C2	133.0	C2'	38.1	C2	133.1	C2'	38.6			
	C3	208.7	C3'	125.0	C3	208.8	C3'	121.8	C3	208.7	C3'	123.3			
	C4	74.0	C4'	136.8	C4	73.6	C4'	135.9	C4	74.0	C4'	133.9			
	C5	39.1	C5'	51.7	C5	38.8	C5'	132.6	C5	38.9	C5'	129.8			
	C6	140.9	C6'	45.0	C6	140.4	C6'	128.9	C6	140.7	C6'	131.6			
	C7	129.5	C7'	133.0	C7	129.4	C7'	47.0	C7	129.1	C7'	48.9			
	C8	38.9	C8'	131.0	C8	38.3	C8'	49.2	C8	38.5	C8'	47.1			
	C9	76.4	C9'	133.1	C9	75.9	C9'	139.4	C9	76.0	C9'	137.7			
	C10	56.1	C10'	118.1	C10	55.7	C10'	115.8	C10	55.9	C10'	115.9			
	C11	36.7	C11'	175.2	C11	36.3	C11'	174.8	C11	36.5	C11'	166.6			
	C12	32.0	C12'	51.1	C12	31.7	C12'	53.6	C12	31.9	C12'	119.0			
	C13	63.4	C13'	26.8	C13	64.3	C13'	30.0	C13	64.4	C13'	145.9			
	C14	33.4	C14'	32.3	C14	30.0	C14'	35.3	C14	30.2	C14'	42.1			
	C15	25.9	C15'	23.3	C15	26.1	C15'	24.4	C15	26.3	C15'	44.1			
	C16	74.0	C16'	130.0	C16	68.7	C16'	134.1	C16	69.4	C16'	132.0			
	C17	12.0	C17'	134.9	C17	10.6	C17'	128.8	C17	10.9	C17'	130.4 or 132.7			
	C18	18.7	C18'	130.8	C18	18.4	C18'	130.7	C18	18.6	C18'	130.4 or 132.8			
	C19	10.1	C19'	131.8	C19	10.2	C19'	130.7	C19	10.2	C19'	130.4 or 132.9			
	C20	68.4	C20'	131.0	C20	68.2	C20'	130.7	C20	68.2	C20'	130.7			
			C21'	135.8			C21'	134.6			C21'	135.6			
			C22'	35.3			C22'	35.0			C22'	35.3			
			C23'	22.9			C23'	22.6			C23'	23.0			
			C24'	13.9			C24'	14.0			C24'	14.0			
Solvent		CDCl ₃ / 125 MHz					CDCl ₃ 125 MHz					CDCl ₃ 125 MHz			
Reference		[105]					[105]					[105]			

3.6 Síntese Química de Diterpenos de *Jatropha*

As características estruturais únicas dos produtos naturais, aliadas à sua diversidade de atividades biológicas, têm impulsionado o desenvolvimento de novas estratégias em síntese orgânica (Shenvi, 2024). Nesse contexto, a síntese de terpenos é uma área de destaque na química sintética moderna. No caso dos diterpenos de *Jatropha*, embora os latifiranos sejam os compostos isolados com maior frequência, a síntese total de jatrofanos e rhamnofolanos é a mais bem documentada. Compostos como jatrofona, jatrofatriona, citlalitriona, jatrofolanos A–B e, mais recentemente, a série de spruceanol e curcusionas, tiveram rotas sintéticas descritas.

Para evidenciar o impacto da síntese orgânica nessa área, traçamos os avanços desde a década de 1970, com ênfase na síntese total da jatrofona. Inicialmente isolada de *J. gossypifolia* L., a jatrofona foi o primeiro composto de sua classe a ser sintetizado. Sua estrutura macrocíclica e o anel 3(2H)-furanona, também presente em outros compostos citotóxicos da época, motivaram estudos adicionais de atividade e levaram à identificação de novos agentes antitumorais. Esses primeiros esforços geraram várias tentativas — muitas delas infrutíferas, conforme relatado por Smith III em 1984 (Smith, 1984). As mesmas características estruturais que atraíam os pesquisadores também apresentavam grandes desafios, até que a jatrofona foi finalmente sintetizada, conforme descrito brevemente a seguir.

A primeira síntese total da jatrofona foi realizada por meio de um projeto em três fases. A primeira fase concentrou-se no desenvolvimento do anel 3(2H)-furanona; a segunda, na construção do macrociclo; e a terceira, no controle da estereoquímica da reação para reproduzir com fidelidade o composto natural. Esse projeto resultou na síntese bem-sucedida da jatrofona e de diversos derivados relacionados, incluindo a normetiljatrofona, seus derivados *cis* e *trans*, e os derivados hidroxilados em C2 (2 α - e 2 β -hidroxijatrofona) (Smith et al., 1989; Smith; Malamas, 1982). Na década de 1990, novos protocolos para a síntese da jatrofona e seus epímeros foram propostos. O primeiro utilizava acoplamento carbonilativo catalisado por paládio entre triflatos vinílicos e estanóis vinílicos para formar o macrociclo, enquanto o segundo empregava uma variante de Wadsworth–Horner–Emmons para construir o anel C da jatrofona, incorporando a ligação dupla C5–C6 com estereoquímica *Z* por meio de acoplamento cruzado catalisado por Pd, formando o macrociclo via condensação de um aldeído acetilênico (Gyorkos; Stille; Hegedus, 1990; Han; Wiemer, 1992).

Desde então, a síntese de diterpenos jatrofanos expandiu-se além de um único composto. Químicos sintéticos demonstraram interesse em outras substâncias bioativas, especialmente aquelas do gênero *Euphorbia*, como as encontradas em *E. characias*. Uma discussão abrangente sobre as estratégias e reações utilizadas até a última década pode ser encontrada em publicações anteriores (Lentsch et al., 2014; Mohan; Koushik; Fuertes, 2015; Rinner, 2015). Após a jatrofona, foi realizada a síntese dos jatrofolanos A–B, também isolados de *J. gossypifolia* L. Essa síntese envolveu 12 etapas, com rendimento global de 6%, a partir da 1-pirrolidinociclopenteno, e demonstrou a aplicação de reações de Diels–Alder sob alta pressão na síntese de produtos naturais (Smith et al., 1985).

Após um hiato, a síntese de diterpenos de *Jatropha* foi retomada com a produção de ciclojatrofanos, jatrofatriona e citlalitriona, conforme relatado em 2003. Os autores desenvolveram uma estratégia de síntese linear com 20 etapas para obter esses compostos. Por meio da análise retrosintética, identificaram-se fatores-chave para a formação do esqueleto tricíclico, introduzindo-se posteriormente os grupos funcionais restantes. O protocolo começou com um rearranjo aniônico tipo oxy-Cope, gerando uma estrutura tetracíclica, seguido de hidroxilação em C12 e C14 por hidrossililação intramolecular. O álcool alílico resultante permitiu desidratação regioseletiva, e o segmento 1,3-dicetona foi adicionado para produzir jatrofatriona. A oxidação com perácido da jatrofatriona resultou na obtenção de (±)-citlalitriona (Yang; Long; Paquette, 2003).

A literatura recente apresentou protocolos para a síntese do spruceanol, um diterpeno cleistantano, e das curcusionas A–D, J e I, diterpenos macrocíclicos do tipo rhamnofolano. Para o spruceanol, a síntese foi realizada em 13 etapas a partir do diterpeno natural entlabdano andrographolida, com rendimento global de 9%. A síntese envolveu cicloadição Diels–Alder regioseletiva controlada por ácido de Lewis e técnicas de olefinação de Wittig para construir o esqueleto do composto-alvo (Cai et al., 2020).

Quanto às curcusionas A–D, três diferentes abordagens foram relatadas. A primeira envolve a construção do núcleo carbocíclico 5-7-6 por meio de anelação tipo Stetter ou descontinuidades via metátese de anelamento, com destaque para o uso de acoplamento cruzado entre eletrófilos. Uma abordagem alternativa, do mesmo período, emprega acoplamento de Suzuki, ciclopropanação intramolecular e um rearranjo divinilciclopropano crucial. A terceira abordagem, descrita em outro estudo, utiliza rearranjo sigmatrópico térmico [3,3] e uma nova reação em cascata catalisada por FeCl₃ para formar rapidamente o núcleo essencial cicloheptadienona das curcusionas, resultando nas curcusionas A e B em 9 etapas, C e D em 10 etapas e na dimericursone A em 12 etapas. Além disso, as curcusionas I

e J foram sintetizadas por meio de formação de furano catalisada por ouro, seguida de cicloadição furano-alceno tipo [4+3], e uma reação de Diels–Alder exo para formar o anel de seis membros (Cui et al., 2021; Li, Yong; Dai, 2017; Wright; Lee; Stoltz, 2019; Wright; Stoltz, 2019).

A síntese de precursores biossintéticos como casbano, bem como de diterpenos com esqueletos diferentes, como tiglianos e mirsinanos, ressalta a importância dos terpenoides das Euphorbiaceae no domínio da síntese orgânica (Löffler; Wirtz; Fürstner, 2021; Watanabe; Hikone; et al., 2024; Watanabe; Nagatomo; et al., 2024). Nesse sentido, as contribuições da área para a pesquisa de produtos naturais têm se consolidado por meio dos esforços para aumentar os rendimentos desses compostos, expandir sua diversidade estrutural e melhorar a compreensão de sua biossíntese. Exemplos desse progresso incluem a síntese bioinspirada, métodos quimioenzimáticos e abordagens de biologia sintética para produção de terpenos (Chen et al., 2024; Schneider et al., 2024; Sun et al., 2024). Além disso, a síntese bem-sucedida sustenta estudos biológicos em andamento, conforme discutido na próxima seção.

3.7 Atividade Biológica

A revisão das análises biológicas dos diterpenos isolados identificou 21 diferentes modelos de atividade e revelou que apenas 15 compostos desse grupo permanecem não testados. Essa situação contrasta com outras classes de produtos naturais, como os glicosídeos de pregnano da família Apocynaceae, que, apesar de sua extensa diversidade química, foram minimamente explorados do ponto de vista farmacológico (de Souza et al., 2024). Essa discrepância pode ser atribuída à disponibilidade desses compostos por meio da síntese orgânica e à sua ocorrência em outras espécies da família Euphorbiaceae, particularmente nos gêneros *Euphorbia* e *Croton*, que são mais amplamente estudados tanto química quanto biologicamente (Moremi et al., 2021; Rojas-Jiménez et al., 2024; Xu et al., 2021).

Entre os diversos ensaios realizados, a citotoxicidade contra linhagens celulares tumorais (in vitro) é a mais comumente testada, com os grupos de diterpenos lathyranos e rhamnofolanos sendo os mais proeminentes, seguidos pelos jatrofanos. Um resumo dos compostos mais potentes é apresentado na Tabela 2. Embora promissores, modelos bem definidos de relação estrutura–atividade (SAR) para essas classes de diterpenos ainda são escassos na literatura. Fatores como a heterogeneidade das linhagens celulares e os baixos rendimentos podem contribuir para o progresso limitado nessa área.

Table 2. Dez principais diterpenos de *Jatropha* com notável atividade citotóxica.

Composto	IC ₅₀ (linhagens de célula)*	Ensaio**	Referências
Curcusone C	0.08 µM (HEPG2) 0.25 µM (L5178y)	MTT	(Aiyelaagbe <i>et al.</i> , 2011; Liu, Jie-Qing <i>et al.</i> , 2013)
Curcusone D	0.15 µM (HEPG2) 0.51 µM (L5178y)	MTT	(Aiyelaagbe <i>et al.</i> , 2011; Liu, Jie-Qing <i>et al.</i> , 2013)
Curcusone B	0.70 µM (L5178y) 2.64 µM (HL-60)	MTT	(Zhang, Jun-Sheng <i>et al.</i> , 2018)
Curcusone A	0.91 µM (L5178y) 1.63 µM (HL-60)	MTT	(Zhang, Jun-Sheng <i>et al.</i> , 2018)
Jatrophone	1.80 µM (MCF-7) 1.82 µM (U-251)	SRB	(Fernandes <i>et al.</i> , 2013; Shari <i>et al.</i> , 2023)
Jatromultone D	2.69 µM (A549)	MTT	(Zhang, Jun-Sheng <i>et al.</i> , 2018)
Jatrogrossidione	2.6 µM (RKO)	CKK-8	(Zhang, Chun-Yan <i>et al.</i> , 2018)
15- <i>epi</i> -4Z-Jatrogrossidentadion	2.61 µM (HEPG2)	MTT	(Zhang, Jun-Sheng <i>et al.</i> , 2018)
2- <i>epi</i> -hydroxyisojatrogrossidion	2.67 µM (HEPG2) 3.20 µM (HL-60) 3.20 µM (MCF-7)	MTS	(Zhang, Jun-Sheng <i>et al.</i> , 2018)
3-dehydroxy-2- <i>epi</i> -caniojane	2.86 µM (HL-60)	MTT	(Liu, Jie-Qing <i>et al.</i> , 2013)

* **Linhagens celulares:** HEPG2 — hepatocarcinoma humano; L5178y — leucemia murina; HL-60 — leucemia humana; MCF-7 — câncer de mama; U-251 — glioblastoma maligno humano; A549 — carcinoma pulmonar humano; RKO — carcinoma colorretal humano.

****Ensaio:** MTT — (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difenil-tetrazólio); MTS — (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio); SBR — Sulforodamina B; CCK-8 — Kit de Contagem Celular-8.

Com base no exposto, três esqueletos de diterpenos do tipo jatrofano (JTDs) — rhamnofolanos, jatrofanos e lathyranos — destacam-se como os compostos mais citotóxicos identificados no gênero. Sua atividade inclui também eficácia contra alguns dos tipos de câncer mais prevalentes e com maiores taxas de mortalidade, como os carcinomas de mama, pulmão e colorretal (Bray *et al.*, 2024). A eficácia desses compostos foi avaliada principalmente por ensaios colorimétricos. Entre os dez compostos mais ativos (vide supra), o método MTT foi o mais aplicado. As vantagens desses ensaios estão associadas à rapidez, baixo custo e sensibilidade, oferecendo uma forma ágil de quantificar a viabilidade celular, a proliferação ou a morte (Sanjai *et al.*, 2024). Além disso, culturas *in vitro* proporcionam relevância biológica e controle experimental preciso, permitindo testar a seletividade e a eficácia contra diversos tipos de câncer, além de possibilitar investigações mais detalhadas

dos mecanismos de ação (Atanasov et al., 2021). A combinação dessas abordagens é útil na descoberta de novos compostos com potencial antitumoral, iniciando com triagens rápidas por ensaios colorimétricos em linhagens celulares e avançando para modelos in vivo.

Isolados das raízes de *J. curcas*, os rhamnofolanos curcusonas A–D foram descobertos pela primeira vez em 1986, embora o interesse por esses compostos tenha sido renovado apenas recentemente (Cui et al., 2021). As pesquisas sobre esses compostos oferecem importantes insights estruturais sobre sua atividade citotóxica. Destacam-se, notadamente, a formação de um anel de sete membros pela ligação C8–C14 e a presença do sistema dienona no anel B. A configuração relativa do grupo metila em C-19 e da hidroxila em C-2 influencia sua potência contra linhagens celulares de carcinoma hepatocelular e linfoma, embora a atividade geral seja mantida. Para os lathyranos, derivados de jatrogrossidiona, a presença do sistema de anéis 5/11/3, da epóxi ou da dupla ligação em C-5 foram observadas como elementos importantes para a manutenção da atividade, já que a presença de 5-OH mostrou-se prejudicial (Liu, Jie-Qing et al., 2013; Zhang, Jun-Sheng et al., 2018).

Quanto aos mecanismos de ação, a proteômica química tem se destacado como uma abordagem de ponta para rastrear sistematicamente e identificar as proteínas-alvo de pequenas moléculas ativas (Wang, Xin et al., 2024). Essa abordagem integra a química de produtos naturais e o design de sondas por síntese com a proteômica, tendo sido aplicada com sucesso às curcusonas. Especificamente, demonstrou-se que a curcusona C induz dano mitocondrial e ativa a via mitocondrial de apoptose em células de câncer de próstata e endométrio. Seu mecanismo envolve a via de sinalização TGF/Smad e a desregulação do balanço Bax/Bcl-2, ao inibir a expressão da proteína-alvo PCBP2 (proteína ligante de poli(rC) 2). Estudos adicionais sugerem que a curcusona C também interage com o fator 2 de repetição telomérica (TRF2), induzindo resposta de dano ao DNA telomérico, inibindo a proliferação de células tumorais e promovendo a parada do ciclo celular, o que culmina em apoptose (An; Li; Zhang, 2021; Huang, Lan et al., 2023; Wang, Mingxue et al., 2017; Yuan; Chen; Cai, 2021). A capacidade de atingir proteínas específicas representa um avanço significativo nas estratégias terapêuticas contra o câncer.

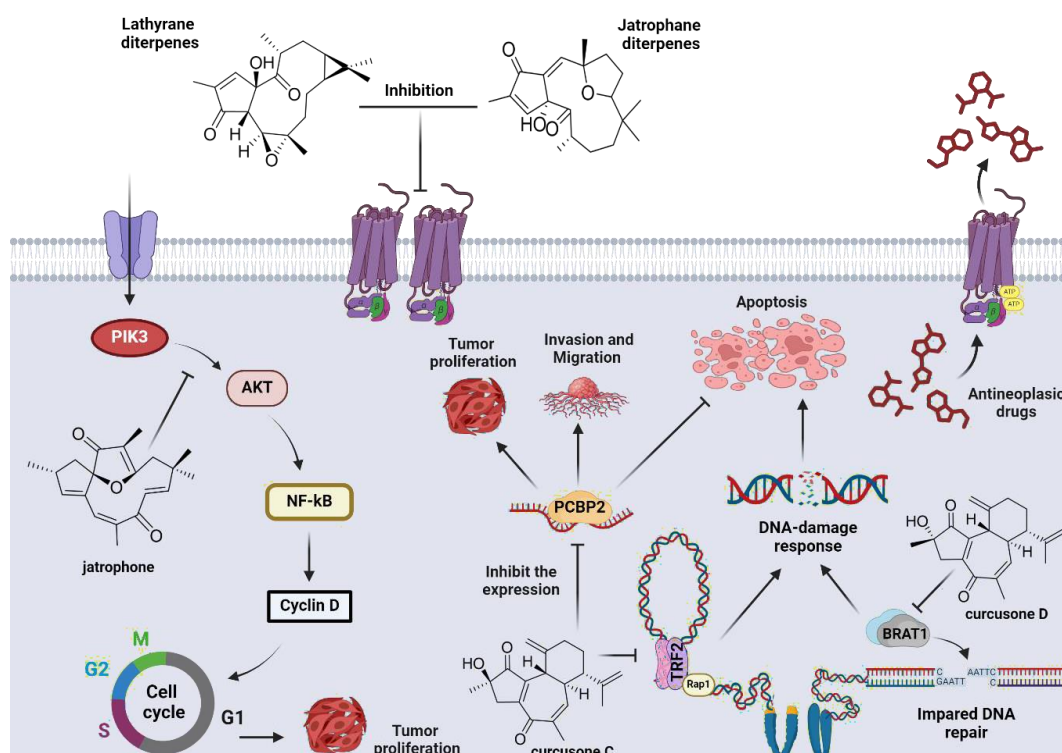
A curcusona D foi identificada como um inibidor do ativador da ATM associada à BRCA1 (BRAT1), um alvo importante anteriormente considerado “não farmacológico”. Essa inibição resulta em resposta prejudicada ao dano no DNA e redução da migração celular, além de aumentar a eficácia do fármaco etoposídeo, que causa dano genético. Em mieloma múltiplo, a curcusona D também inibe o crescimento celular e induz apoptose ao atuar como inibidor da via ubiquitina-proteassoma. A identificação dos alvos moleculares da

curcusona D destaca o potencial dos produtos naturais para abrir novas frentes no tratamento do câncer e superar a resistência à quimioterapia convencional (Cao et al., 2014; Cui et al., 2021). De maneira semelhante à curcusona D, a jatrogrossidiona também apresenta atividade antitumoral mediada por inibição do crescimento celular e indução de apoptose. Segundo Zhang et al. (2018), a jatrogrossidiona inibe a proliferação de células RKO por meio da indução da parada do ciclo celular na fase G2/M e promove aumento significativo da apoptose de forma dependente da dose. No entanto, diferentemente da curcusona D, os alvos moleculares envolvidos nessa atividade ainda não foram descritos.

Para os diterpenos do tipo jatrofano, foi demonstrado que a jatrofona inibe a proliferação de células MCF-7/ADR em baixas concentrações micromolares, por um mecanismo relacionado à via PI3K/Akt/NF- κ B (Liu, Rui et al., 2020; Shari et al., 2023). A ativação da PI3K/Akt é conhecida por promover o crescimento, proliferação, invasão e metástase de células tumorais, além de inibir a apoptose. Em contrapartida, embora lathyranos como os derivados de jatrogrossidiona apresentem relevante potencial citotóxico, os mecanismos precisos que explicam essa atividade ainda não estão claramente definidos, embora alguns autores associem esses efeitos à inibição da glicoproteína-P (Kopecka et al., 2020).

Lathyranos e jatrofanos também demonstraram eficácia como agentes anti-MDR (resistência múltipla a fármacos mediada por glicoproteína-P). Estudos envolvendo espécies de Euphorbiaceae foram fundamentais para a identificação de elementos farmacofóricos nesses esqueletos e para o desenvolvimento de modelos QSAR (Fattahian et al., 2020; Sousa et al., 2013; Vela et al., 2022). Apesar do seu potencial, apenas um número limitado de JTDs foi avaliado quanto à sua eficácia contra MDR. O direcionamento desse mecanismo molecular é terapeuticamente relevante, pois visa superar a resistência a diversos quimioterápicos e aumentar os efeitos citotóxicos por meio do aumento da concentração intracelular de fármacos antineoplásicos e da restauração da morte celular imunogênica (Kar et al., 2024; Nanayakkara et al., 2018). A Figura 4 apresenta uma visão geral dos principais alvos moleculares.

Figura 4. Principais alvos envolvidos nas atividades antitumoral e anti-MDR dos diterpenos de *Jatropha* (JDT).



Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Além de suas propriedades citotóxicas, alguns diterpenos demonstraram eficácia contra doenças como leishmaniose, tuberculose e malária. Modificações estruturais da jatrofona mostraram que a ligação olefínica entre C8 e C9, juntamente com o esqueleto molecular, contribui para sua atividade antimalárica. Compostos como caniojano e outros diterpenos contendo pontes de peróxido apresentaram fortes efeitos antiplasmodiais. Pesquisas adicionais reforçam o potencial dos diterpenos no combate a diversas doenças tropicais negligenciadas (Barros de Alencar et al., 2017; Soto-Sánchez, 2024), embora os estudos focados especificamente em diterpenos macrocíclicos ainda sejam limitados em comparação com outras classes, como lactonas sesquiterpênicas da família Asteraceae ou compostos sintéticos (Luna et al., 2023; Sülsen, 2021; Valli et al., 2024).

Os numerosos estudos in vitro destacam os benefícios desses métodos na pesquisa com produtos naturais. No entanto, há uma carência notável de estudos in vivo, ex vivo ou com modelos alternativos. Alguns compostos, como 9 β ,13 α -diidroxiiisabeliona, jatrofona e jatrofolonas A–B, foram avaliados quanto a seus efeitos gastroprotetores. Por exemplo, a jatrofolona B e a jatrofona demonstraram atividade dose-dependente, reduzindo as lesões gástricas em 91% e 93%, respectivamente, na maior concentração testada (100 mg/kg). Além disso, os efeitos da jatrofona sobre a contração do músculo liso e cardíaco foram relatados, mostrando que o composto inibe diretamente as contrações musculares, com variação de

potência conforme o tecido e o estímulo utilizados (Calixto; Sant’Ana, 1987; Calixto; Sant’Ana, 1990; Silva; Brum; Calixto, 1995).

Compostos como jatrofona, jatrofolonas A–B e spruceanol têm sido extensivamente testados para diversas atividades e demonstraram resultados promissores. Embora esses achados levantem questões sobre seletividade, também revelam padrões estruturais com potencial para aplicações em diferentes alvos moleculares. Isso levou ao desenvolvimento do conceito de fármacos multitarget, ou seja, compostos capazes de interagir simultaneamente com múltiplos alvos. Tal abordagem se mostra promissora no enfrentamento de doenças complexas, oferecendo vantagens como maior eficácia, perfis de segurança aprimorados e administração simplificada (Bizzarri et al., 2020; Zhang, Weilin; Pei; Lai, 2017). Nesse contexto, os diterpenos do tipo *Jatropha* (JTD) podem ser considerados candidatos promissores. A compreensão de seus mecanismos de ação e a avaliação de sua toxicidade são cruciais para explorar seu potencial em aplicações farmacêuticas.

Os dados apresentados nesta revisão reforçam a importância de continuar a busca por novas substâncias bioativas naturais, paralelamente ao estudo de moléculas já bem estabelecidas. Uma lista completa das atividades relatadas para cada composto está disponível no Material Suplementar (Tabela S1 – Material Suplementar). Para mais detalhes sobre os testes e atividades biológicas de extratos e frações, recomenda-se a consulta aos artigos previamente publicados (Abdelgadir; Van Staden, 2013; Cavalcante; Diego da Conceição Santos; Guedes da Silva Almeida, 2020; Sabandar et al., 2013; Wu et al., 2019).

3.8 Propriedades Drug-likeness

É bem estabelecido, de uma forma ou de outra, que os produtos naturais desempenharam historicamente um papel essencial na descoberta de medicamentos, fornecendo consistentemente novos agentes terapêuticos. As pressões biológicas impostas pela natureza contribuem para a diversidade molecular e refinam esses compostos para interagir com alvos moleculares. Por exemplo, mais de 30% de todas as novas entidades moleculares aprovadas pelo FDA são derivadas ou inspiradas em espécies microbianas e vegetais (Newman & Cragg, 2020; Patridge et al., 2016). No entanto, levar uma molécula até os ensaios clínicos também depende de suas características físico-químicas, conhecidas coletivamente como seu perfil “semelhante a fármaco”.

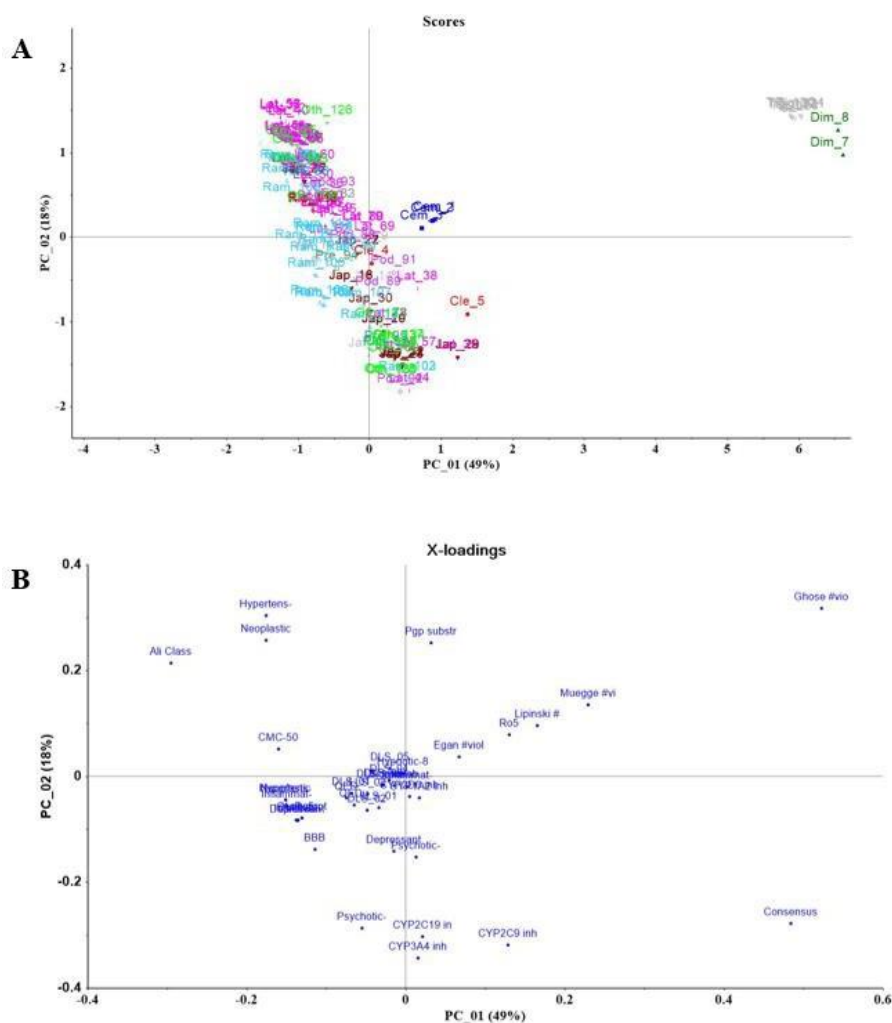
O conceito de "semelhança a fármaco" foi desenvolvido com base nas propriedades físico-químicas comumente encontradas em medicamentos aprovados, como peso

molecular, hidrofobicidade e polaridade. Estudos clássicos identificaram padrões compartilhados entre esses compostos e propuseram faixas aceitáveis, sendo a mais conhecida a Regra dos Cinco (Ro5) (Lipinski et al., 2001). Substâncias dentro dessa faixa são consideradas “semelhantes a fármacos” e têm maior probabilidade de exibir boa biodisponibilidade. Avaliar atributos de semelhança a fármaco tornou-se uma prática padrão em química medicinal. Algoritmos avançados para prever essas propriedades foram aplicados a grandes conjuntos de dados moleculares, incluindo bibliotecas de produtos naturais (NPLs), para apoiar a identificação e seleção de candidatos promissores (Bickerton et al., 2012; Camp et al., 2012; Shultz, 2019).

Dentre as metodologias utilizadas para construir NPLs, destacam-se as abordagens baseadas em conhecimento, que combinam dados químicos e taxonômicos. Esses métodos ajudam a identificar regiões dentro do espaço químico onde compostos bioativos provavelmente se agrupam. Além disso, entender a relação entre os clusters gênicos biossintéticos e as estruturas moleculares dos metabólitos secundários pode avançar significativamente na descoberta e engenharia de produtos naturais (Domingo-Fernández et al., 2023; Talevi & Bellera, 2024).

As revisões da literatura são recursos valiosos para apoiar estratégias baseadas em conhecimento. Uma revisão sistemática recente de Obende et al. (2024) sobre metabólitos secundários de Croton (Euphorbiaceae) incluiu previsões de suas propriedades ADME/Tox. O estudo revelou que 38% dos compostos aderem à Regra dos Cinco, e 76,37% exibem perfis físico-químicos semelhantes aos de medicamentos aprovados pelo FDA, agrupando-se no mesmo espaço químico. Com base nas vantagens das NPLs e dos critérios de semelhança a fármaco para identificar candidatos promissores, montamos um pequeno conjunto de dados de JTD e realizamos previsões in silico de suas propriedades ADMET e semelhança a fármaco. Os resultados são apresentados no gráfico de análise de componentes principais (PCA) mostrado na Figura 5.

Figure 5. Análise de componentes principais das propriedades drug likeness dos diterpenos de *Jatropha* JTDs. A figura 5(A) representa o gráfico de pontuação (scores), nele os compostos foram organizados de acordo com suas subclasses representadas pelas cores e rótulos contendo as letras iniciais de cada grupo seguidas pelo número na lista de identificação. Em 5(B), observa-se o gráficos de pesos (loadings) demonstrando os descritores qualitativos de ADMET e o espaço químico composto por CMC (80% ou 50%) ou um dos sub-sets que indicam classes de fármacos.



A análise do gráfico de pontuação na Figura 5A revela uma variância total de 67%, distinguindo claramente os diterpenos do tipo cembrano, tiglianos e dimers de rhamnofolano dos outros compostos. Quando esses achados são comparados com o gráfico de carga (B), fica evidente que essas substâncias estão fora do intervalo ideal para compostos com propriedades de fármaco, conforme previsto por diversos algoritmos. Estes incluem a Regra dos Cinco (R05), a regra de Egan, a regra de Ghose, a regra de Veber e a regra de Muegge, juntamente com as violações observadas (representadas por #). Os parâmetros de saída consideram fatores como o coeficiente de partição octanol/água ($\log P_{o/w}$), peso molecular (MW), o número de ligações de hidrogênio doadas/aceitas pelo soluto em solução aquosa, o número de ligações rotacionáveis (RB) e o coeficiente de partição cérebro-sangue previsto (BBB) (Daina; Michielin; Zoete, 2017).

A literatura identifica a proteína quinase C (PKC) como um alvo molecular para os diterpenos tiglianos. Embora os avanços na caracterização estrutural das isoformas

de PKC e as variações na sua expressão em células tumorais sugeriram que os tiglianos possam exibir atividade citotóxica seletiva, estudos anteriores sobre frações enriquecidas indicam que os compostos tiglianos presentes nas sementes de óleo de *Jatropha* possuem propriedades irritantes e toxicidade inerente. Como resultado, esses compostos são geralmente excluídos da consideração como candidatos promissores para o desenvolvimento farmacêutico (Otsuki; Li, 2023; Parker et al., 2021).

Outra variável que desempenha um papel significativo nas diferenças observadas na PCA é a “consenso”, que reflete o valor médio do LogP (coeficiente de partição octanol-água) previsto pelos algoritmos mencionados anteriormente. Em resumo, compostos com valores mais altos de LogP tendem a se agrupar nos quadrantes 2 e 4, enquanto os dimers e tiglianos apresentam valores extremos de LogP, respectivamente. Embora existam métodos mais avançados para calcular a lipofilicidade de uma substância, o LogP continua sendo um parâmetro padrão correlacionado com a biodisponibilidade. Esta análise demonstra que, em comparação com bancos de dados de medicamentos focados em atividades terapêuticas específicas, os compostos com os perfis mais favoráveis estão agrupados nos quadrantes 1 e 3.

Uma análise cuidadosa dos descritores moleculares sugere que as variáveis localizadas no primeiro quadrante (gráfico de carga B) caem dentro do intervalo de propriedades entre 80% ou 50% do CMC total (espaço químico de seus subconjuntos), o que inclui fármacos aprovados como antineoplásicos (Neoplastic-50) e anti-hipertensivos (Hypertens-50). À medida que a distribuição se move em direção ao centro do gráfico (gráfico de pontuação A), o limiar aumenta, juntamente com a lipofilicidade, atingindo pelo menos 80% de similaridade com as mesmas classes, incluindo fármacos anti-inflamatórios e anti-infecciosos (Neoplastic-80, Hypertens-80, Antiinflammat-80 e CMC-80). Consequentemente, como representado pelas variáveis de ADMET (Biodisponibilidade, Absorção GI e R05), esse conjunto está em conformidade com a Regra dos Cinco de Lipinski (cR05), mostrando valores ideais para absorção GI e boa biodisponibilidade estimada. Entre as substâncias promissoras estão os rhamnopholanos, como curcusones C–H, caniojane e seus derivados, seguidos pelos jatrofanos derivados de jatrofone, multifidona e epi-jatrophol—um lathyrano e jatrolone, respectivamente.

O alinhamento das previsões de ADMET com os descritores dos bancos de medicamentos também sugere que moléculas capazes de cruzar a barreira hematoencefálica (BBB) seriam candidatas ao desenvolvimento de agentes antidepressivos e antipsicóticos, como indicado pelos rótulos no gráfico de carga (BBB, Depressant-50 e Psychotic-50). As características estruturais dos diterpenos podem explicar alguns desses achados, como o arranjo dos anéis, que se assemelha a compostos antidepressivos conhecidos. No entanto, é importante observar que, à medida que a distribuição das moléculas se desloca em direção ao quarto quadrante, o potencial inibidor delas para as enzimas CYP—especificamente, CYP3A4, CYP2C9 e CYP2C19—também aumenta. Essas enzimas desempenham um papel crucial no metabolismo de medicamentos e xenobióticos e estão implicadas em várias interações medicamentosas clinicamente significativas. Versões expandidas da Figura 5A,B são fornecidas como informações suplementares para análise adicional

3.9 Perspectivas

Os esqueletos macrocíclicos representam a estrutura primária dos diterpenos encontrados em *Jatropha*. Apesar dos contínuos esforços de pesquisa, sua descoberta ainda depende em grande parte de técnicas tradicionais de extração e isolamento. No entanto, os avanços em métodos de derepicação utilizando MS e RMN expandiram significativamente o potencial para acelerar e priorizar a descoberta de novos compostos, especialmente entre os diterpenos de Euphorbiaceae.

Ao avaliar seu potencial bioativo, como mencionado anteriormente, a maioria dos estudos focou principalmente em ensaios in vitro, especialmente para medir a citotoxicidade contra células tumorais. Uma limitação notável é que muitos compostos não foram testados quanto à viabilidade celular em células normais. Além disso, faltam estudos pré-clínicos e clínicos, embora esses passos sejam cruciais para o desenvolvimento de fitomedicamentos e produtos farmacêuticos. Questões como baixa solubilidade aquosa, biodisponibilidade limitada, toxicidade não seletiva potencial e farmacocinética também apresentam desafios. Dadas essas limitações, a nanotecnologia poderia oferecer estratégias promissoras para superar esses obstáculos e aprimorar o potencial terapêutico dos diterpenos de *Jatropha*.

Os sistemas nanotecnológicos, que variam de 1 a 1000 nm, oferecem o potencial para melhorar as propriedades de biocompatibilidade dessas moléculas, protegendo-

as de fatores biológicos e ambientais externos e aumentando sua permeabilidade através de barreiras fisiológicas, aumentando assim a biodisponibilidade. Ao promover um perfil de liberação controlada, esses sistemas também podem reduzir a toxicidade ao aumentar a seletividade para células tumorais.

Nesta revisão, vários compostos citotóxicos demonstraram um potencial significativo, particularmente das classes de rhamnolano, jatrofano e lathyrano. Entre eles, curcusones C e D se destacam como os mais potentes. Embora as previsões *in silico* sugiram que exibem boa solubilidade aquosa, outras limitações, como as mencionadas anteriormente, ainda precisam ser abordadas. Para esses compostos, as nanopartículas poliméricas criadas por meio de um processo de emulsificação dupla oferecem uma solução promissora. Esses sistemas consistem em uma fase aquosa interna (W1), onde a molécula é dispersa em uma fase orgânica (O) contendo um solvente que dissolve o polímero. Isso forma uma emulsão primária (W1/O), que é então dispersa em uma fase aquosa secundária (W2), resultando em uma emulsão múltipla (W1/O/W2) por meio de um processo de emulsificação e evaporação do solvente. Essa abordagem pode levar a uma alta eficiência de encapsulação desses diterpenos, aumentando seu potencial terapêutico.

Para diterpenoides com solubilidade aquosa moderada, como jatrofano, jatromultona D e jatrogrossidiona, sistemas de liberação à base de lipídios, como microemulsões (10–100 nm) e nanoemulsões (50–500 nm), são recomendados. Esses sistemas consistem em gotas de óleo dispersas em uma fase aquosa estabilizada por surfatantes. Eles diferem na concentração de surfatante e na natureza termodinâmica dos sistemas. Essa configuração não apenas melhora a solubilidade da molécula encapsulada, mas também aumenta a área de superfície, aumentando assim a atividade biológica.

Para moléculas mais hidrofóbicas, as nanopartículas lipídicas, como as nanopartículas de lipídios sólidos (SLNs) e os transportadores lipídicos nanoestruturados (NLCs), são alternativas viáveis. Esses sistemas podem encapsular diterpenos dentro de uma matriz lipídica composta por lipídios sólidos (em SLNs) ou uma mistura de lipídios sólidos e líquidos (em NLCs). Além disso, sistemas nanoparticulados core-shell, como as nanocápsulas, oferecem uma outra abordagem promissora. Elas possuem um núcleo oleoso que solubiliza a molécula e uma cobertura polimérica que proporciona proteção e controla a liberação. Além da encapsulação, esses sistemas permitem a adsorção superficial de diterpenoides, bem

como a funcionalização com substâncias que promovem propriedades de disfarce, entrega direcionada a células específicas e aumento da absorção celular.

Assim, considerando a ampla gama de sistemas nanotecnológicos disponíveis, sua aplicação a esses compostos é fortemente recomendada como uma nova e promissora estratégia para aproveitar suas propriedades biológicas de maneira mais eficaz. Essa abordagem tem o potencial de avançar em direção a um uso mais preciso e translacional, abrindo caminho para o desenvolvimento de fitomedicamentos que podem ser produzidos e utilizados de forma eficiente.

3.10 Conclusões

A presente revisão destaca a ampla quimiodiversidade dos diterpenos de *Jatropha* (JTD), apresentando suas vias biossintéticas, extração e isolamento, características estruturais e efeitos biológicos. Um total de 140 JTDs foi considerado para este trabalho, a compilação de seus deslocamentos químicos de ^{13}C RMN provê informações essenciais para orientar a descoberta de novas entidades químicas de espécies de *Jatropha*. A importância farmacológica dos JTDs é enfatizada pela sua capacidade de interagir com novos alvos moleculares e exibir potentes bioatividades, o que reforça seu papel no desenvolvimento de agentes terapêuticos potenciais, especialmente contra o câncer. Além disso, o papel da síntese orgânica na obtenção de JTD ilustra estratégias modernas que levaram a alguns dos compostos mais promissores relatados no gênero, como jatrofona e curcusonas A–D. Aliada à análise *in silico*, a presente pesquisa oferece insights valiosos sobre as propriedades ADMET e a similaridade com fármacos dos JTDs, fornecendo uma base para aplicações farmacêuticas futuras, particularmente como novos agentes citotóxicos. Entre as classes abordadas, os rhamnofolanos se destacam como uma das estruturas mais interessantes para o desenvolvimento adicional devido às suas propriedades físico-químicas favoráveis, quando comparadas aos medicamentos aprovados, e seu potencial citotóxico. Além disso, os autores preveem o uso das tecnologias atuais para orientar a descoberta de novos diterpenos de fontes naturais e abordagens nanotecnológicas para melhorar as propriedades biofarmacêuticas das moléculas mais ativas. Esses resultados destacam a necessidade de pesquisa contínua nesta área

e abrem caminho para futuras investigações em espécies de Euphorbiaceae, principalmente aquelas dentro do gênero *Jatropha*.

.

Referências

ABDELGADIR, H.A.; VAN STADEN, J. Ethnobotany, ethnopharmacology and toxicity of *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae): A review. **South African Journal of Botany**, [s. l.], vol. 88, p. 204–218, Sep. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2013.07.021>.

ABDUDEEN, Asarudheen; SELIM, Mohamed Y. E.; SEKAR, Manigandan; ELGENDI, Mahmoud. *Jatropha's* Rapid Developments and Future Opportunities as a Renewable Source of Biofuel—A Review. **Energies**, [s. l.], vol. 16, no. 2, p. 828, 11 Jan. 2023. <https://doi.org/10.3390/en16020828>.

AIYELAAGBE, Olapeju O.; HAMID, Amao A.; FATTORUSSO, Ernesto; TAGLIALATELA-SCAFATI, Orazio; SCHRÖDER, Heinz C.; MÜLLER, Werner E. G. Cytotoxic Activity of Crude Extracts as well as of Pure Components from *Jatropha* Species, Plants Used Extensively in African Traditional Medicine. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, [s. l.], vol. 2011, no. 1, 15 Jan. 2011. <https://doi.org/10.1155/2011/134954>.

AL-KHAYRI, Jameel M.; SUDHEER, Wudali N.; PREETHA, Thenmozhi R.; NAGELLA, Praveen; REZK, Adel A.; SHEHATA, Wael F. Biotechnological Research Progress in *Jatropha*, a Biodiesel-Yielding Plant. **Plants**, [s. l.], vol. 11, no. 10, p. 1292, 12 May 2022. <https://doi.org/10.3390/plants11101292>.

AN, Junxia; LI, Lifei; ZHANG, Xuehong. Curcusone C induces apoptosis in endometrial cancer cells via mitochondria-dependent apoptotic and ERK pathway. **Biotechnology Letters**, [s. l.], vol. 43, no. 1, p. 329–338, 27 Jan. 2021. <https://doi.org/10.1007/s10529-020-03027-4>.

ATANASOV, Atanas G.; ZOTCHEV, Sergey B.; DIRSCH, Verena M.; SUPURAN, Claudiu T. Natural products in drug discovery: advances and opportunities. **Nature Reviews Drug Discovery**, [s. l.], vol. 20, no. 3, p. 200–216, 28 Mar. 2021. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-00114-z>.

BAIS, Harsh Pal; LOYOLA-VARGAS, Victor M.; FLORES, Hector E.; VIVANCO, Jorge M. Root-specific metabolism: The biology and biochemistry of underground organs. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, [s. l.], vol. 37, no. 6, p. 730–741, Nov. 2001. <https://doi.org/10.1007/s11627-001-0122-y>.

BARROS DE ALENCAR, Marcus Vinícius Oliveira; DE CASTRO E SOUSA, João Marcelo; ROLIM, Hercília Maria Lins; DE MEDEIROS, Maria das Graças Freire; CERQUEIRA, Gilberto Santos; DE CASTRO ALMEIDA, Fernanda Regina; CITÓ, Antônia Maria das Graças Lopes; FERREIRA, Paulo Michel Pinheiro; LOPES, José Arimatéia Dantas; DE CARVALHO MELO-CAVALCANTE, Ana Amélia; ISLAM, Md. Torequl. Diterpenes as lead molecules against neglected tropical diseases. **Phytotherapy Research**, [s. l.], vol. 31, no. 2, p. 175–201, Feb. 2017. <https://doi.org/10.1002/ptr.5749>.

BATHE, Ulschan; TISSIER, Alain. Cytochrome P450 enzymes: A driving force of plant diterpene diversity. **Phytochemistry**, [s. l.], vol. 161, p. 149–162, May 2019. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2018.12.003>.

BICKERTON, G. Richard; PAOLINI, Gaia V.; BESNARD, Jérémy; MURESAN, Sorel; HOPKINS, Andrew L. Quantifying the chemical beauty of drugs. **Nature Chemistry**, [s. l.], vol. 4, no. 2, p. 90–98, 24 Feb. 2012. <https://doi.org/10.1038/nchem.1243>.

BIZZARRI, Mariano; GIULIANI, Alessandro; MONTI, Noemi; VERNA, Roberto; PENSOTTI, Andrea; CUCINA, Alessandra. Rediscovery of natural compounds acting via multitarget recognition and noncanonical pharmacodynamical actions. **Drug Discovery Today**, [s. l.], vol. 25, no. 5, p. 920–927, May 2020. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2020.02.010>.

BONCAN, Delbert Almerick T.; TSANG, Stacey S.K.; LI, Chade; LEE, Ivy H.T.; LAM, Hon-Ming; CHAN, Ting-Fung; HUI, Jerome H.L. Terpenes and Terpenoids in Plants: Interactions with Environment and Insects. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], vol. 21, no. 19, p. 7382, 6 Oct. 2020. <https://doi.org/10.3390/ijms21197382>.

BORGES, Ricardo Moreira; FERREIRA, Gabriela de Assis; CAMPOS, Mariana Martins; TEIXEIRA, Andrew Magno; COSTA, Fernanda das Neves; DAS CHAGAS, Fernanda Oliveira; COLONNA, Maxwell. NMR as a tool for compound identification in mixtures. **Phytochemical Analysis**, [s. l.], vol. 34, no. 4, p. 385–392, 2 Jun. 2023. <https://doi.org/10.1002/pca.3229>.

BRAY, Freddie; LAVERSANNE, Mathieu; SUNG, Hyuna; FERLAY, Jacques; SIEGEL, Rebecca L.; SOERJOMATARAM, Isabelle; JEMAL, Ahmedin. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, [s. l.], vol. 74, no. 3, p. 229–263, 4 May 2024. <https://doi.org/10.3322/caac.21834>.

BROWN, Joel S.; AMEND, Sarah R.; AUSTIN, Robert H.; GATENBY, Robert A.; HAMMARLUND, Emma U.; PIENTA, Kenneth J. Updating the Definition of Cancer. **Molecular Cancer Research**, [s. l.], vol. 21, no. 11, p. 1142–1147, 1 Nov. 2023. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-23-0411>.

BROWN, Steven D. The Unscrambler[®], Version 5.5. Multivariate analysis software for MS-DOS. Available from CAMO A/S, Olav Tryggvasons Gate 24, N-7011 Trondheim, Norway (Telephone: (+47) 7351 4966, Fax: (+47) 7351 4257) or from CAMO USA, 435 Blake Street, Menlo Park, CA 94025, U.S.A. (Telephone/Fax: (+1 415) 324–4286, Internet: teledyn@netcom.com). Single-copy price NOK 26 900 commercial, NOK 18 800 non-commercial, NOK 11 900 academic. **Journal of Chemometrics**, [s. l.], vol. 9, no. 6, p. 527–529, 30 Nov. 1995. <https://doi.org/10.1002/cem.1180090612>.

CAI, Wei; HUANG, Sujie; WU, Jiajia; SONG, Zhiqiang; XIN, Zhengyuan; LI, Jiabin; XUE, Xiaowen. Synthesis of *ent*-Cleistanthane Diterpenoid Spruceanol: Construction of an Aromatic C Ring *via* Lewis Acid-Controlled Regioselective Diels–Alder Cycloaddition. **The Journal of Organic Chemistry**, [s. l.], vol. 85, no. 10, p. 6709–6718, 15 May 2020. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.0c00713>.

CALIXTO, João B.; SANT’ANA, Antonio E. G. Pharmacological analysis of the inhibitory effect of jatrophone, a diterpene isolated from *Jatropha elliptica*, on

smooth and cardiac muscles. **Phytotherapy Research**, [s. l.], vol. 1, no. 3, p. 122–126, 11 Sep. 1987. <https://doi.org/10.1002/ptr.2650010306>.

CALIXTO, João B.; SANT'ANA, Antônio E.G. Evidence for the mechanism of the inhibitory action of jatrophone in the isolated rat uterine muscle. **General Pharmacology: The Vascular System**, [s. l.], vol. 21, no. 1, p. 117–122, Jan. 1990. [https://doi.org/10.1016/0306-3623\(90\)90605-L](https://doi.org/10.1016/0306-3623(90)90605-L).

CAMP, David; DAVIS, Rohan A.; CAMPITELLI, Marc; EBDON, James; QUINN, Ronald J. Drug-like Properties: Guiding Principles for the Design of Natural Product Libraries. **Journal of Natural Products**, [s. l.], vol. 75, no. 1, p. 72–81, 27 Jan. 2012. <https://doi.org/10.1021/np200687v>.

CANENCIA, Christian D.; ANO, Anna Bella S.; GAYAS, Eddie Alberto D.; BUNTAS, Roniel Jay P.; ALVAREZ, Paolo V.; IDO, Alexander L.; ARAZO, Renato O.; MABAYO, Val Irvin F. Response surface optimization of the bio-oil yield from *Jatropha gossypifolia* L. seeds through ultrasonic-assisted solvent extraction. **Biomass Conversion and Biorefinery**, [s. l.], vol. 13, no. 12, p. 10971–10984, 26 Aug. 2023. <https://doi.org/10.1007/s13399-021-02101-9>.

CAO, Mei-Na; ZHOU, Yu-Bo; GAO, An-Hui; CAO, Jia-Yi; GAO, Li-Xin; SHENG, Li; XU, Lei; SU, Ming-Bo; CAO, Xian-Chao; HAN, Meng-meng; WANG, Ming-Kui; LI, Jia. Curcusone D, a novel ubiquitin–proteasome pathway inhibitor via ROS-induced DUB inhibition, is synergistic with bortezomib against multiple myeloma cell growth. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, [s. l.], vol. 1840, no. 6, p. 2004–2013, Jun. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.02.006>.

CAVALCANTE, Noelly Bastos; DIEGO DA CONCEIÇÃO SANTOS, Alan; GUEDES DA SILVA ALMEIDA, Jackson Roberto. The genus *Jatropha* (Euphorbiaceae): A review on secondary chemical metabolites and biological aspects. **Chemico-Biological Interactions**, [s. l.], vol. 318, p. 108976, Feb. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2020.108976>.

CHEMAT, Farid; VIAN, Maryline Abert; CRAVOTTO, Giancarlo. Green Extraction of Natural Products: Concept and Principles. **International Journal of**

Molecular Sciences, [s. l.], vol. 13, no. 7, p. 8615–8627, 11 Jul. 2012. <https://doi.org/10.3390/ijms13078615>.

CHEN, Rong; WANG, Ming; KEASLING, Jay D.; HU, Tianyuan; YIN, Xiaopu. Expanding the structural diversity of terpenes by synthetic biology approaches. **Trends in Biotechnology**, [s. l.], vol. 42, no. 6, p. 699–713, Jun. 2024. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2023.12.006>.

CHRISTIANSON, David W. Structural and Chemical Biology of Terpenoid Cyclases. **Chemical Reviews**, [s. l.], vol. 117, no. 17, p. 11570–11648, 13 Sep. 2017. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00287>.

COSTA, Renan P. O.; LUCENA, Lucas F.; SILVA, Lorena Mara A.; ZOCCOLO, Guilherme Julião; HERRERA-ACEVEDO, Chonny; SCOTTI, Luciana; DA-COSTA, Fernando Batista; IONOV, Nikita; POROIKOV, Vladimir; MURATOV, Eugene N.; SCOTTI, Marcus T. The Sistemax Web Portal of Natural Products: An Update. **Journal of Chemical Information and Modeling**, [s. l.], vol. 61, no. 6, p. 2516–2522, 28 Jun. 2021. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.1c00083>.

CSIZMADIA, Ferenc. JChem: Java Applets and Modules Supporting Chemical Database Handling from Web Browsers. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, [s. l.], vol. 40, no. 2, p. 323–324, 1 Mar. 2000. <https://doi.org/10.1021/ci9902696>.

CUI, Chengsen; DWYER, Brendan G.; LIU, Chang; ABEGG, Daniel; CAI, Zhong-Jian; HOCH, Dominic G.; YIN, Xianglin; QIU, Nan; LIU, Jie-Qing; ADIBEKIAN, Alexander; DAI, Mingji. Total Synthesis and Target Identification of the Curcusone Diterpenes. **Journal of the American Chemical Society**, [s. l.], vol. 143, no. 11, p. 4379–4386, 24 Mar. 2021. <https://doi.org/10.1021/jacs.1c00557>.

DAINA, Antoine; MICHIELIN, Olivier; ZOETE, Vincent. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific Reports**, [s. l.], vol. 7, no. 1, p. 42717, 3 Mar. 2017. <https://doi.org/10.1038/srep42717>.

DE ALBUQUERQUE, Ana Carolina F.; MARTORANO, Lucas H.; DOS SANTOS, Fernando M. Are we still chasing molecules that were never there? The role of quantum chemical simulations of NMR parameters in structural reassignment of natural products. **Frontiers in Natural Products**, [s. l.], vol. 2, 3 Jan. 2024. <https://doi.org/10.3389/fntpr.2023.1321043>.

DE ALMEIDA, Natália Pinto; NETO, Domingos Ferreira Mélo; CARNEIRO, Gabriel Reis Alves; DE FARIAS, Andreza Raquel Barbosa; DOMONT, Gilberto Barbosa; DE PAIVA CAMPOS, Francisco de Assis; NOGUEIRA, Fábio César Sousa. Monitoring casbene synthase in *Jatropha curcas* tissues using targeted proteomics. **Plant Methods**, [s. l.], vol. 17, no. 1, p. 1–13, 6 Dec. 2021. <https://doi.org/10.1186/s13007-021-00716-7>.

DE ANDRADE, Rodrigo Silva; SALES, Kaio Aragão; ABREU, Lucas Silva; CAMPOS, Vinícius Rangel; DOS SANTOS JUNIOR, Fernando Martins; BRAZ-FILHO, Raimundo; SCOTTI, Marcus Tullius; TAVARES, Josean Fachine; DA SILVA, Marcelo Sobral. Structure Revision of the Sesquiterpene Nordine Based on NMR Spectroscopic Analysis and X-ray Crystallography. **Journal of Natural Products**, [s. l.], vol. 85, no. 10, p. 2480–2483, 28 Oct. 2022. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.2c00828>.

DE SOUZA, Thalisson Amorim; LINS, Francisca Sabrina Vieira; DA SILVA LINS, Jociano; ALVES, Alan Ferreira; CIBULSKI, Samuel Paulo; BRITO, Thiago de Araújo Medeiros; ABREU, Lucas Silva; SCOTTI, Luciana; SCOTTI, Marcus Tullius; DA SILVA, Marcelo Sobral; TAVARES, Josean Fachine. Asclepiadoideae subfamily (Apocynaceae): ethnopharmacology, biological activities and chemophenetics based on pregnane glycosides. **Phytochemistry Reviews**, [s. l.], 22 Mar. 2024. <https://doi.org/10.1007/s11101-024-09914-2>.

DEVAPPA, Rakshit K.; MAKKAR, Harinder P. S.; BECKER, Klaus. *Jatropha* Diterpenes: a Review. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, [s. l.], vol. 88, no. 3, p. 301–322, 28 Mar. 2011. <https://doi.org/10.1007/s11746-010-1720-9>.

DEWICK, Paul M. **Medicinal Natural Products**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2009. vol. 1, . DOI 10.1002/9780470742761. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/9780470742761>.

DOMINGO-FERNÁNDEZ, Daniel; GADIYA, Yojana; MUBEEN, Sarah; HEALEY, David; NORMAN, Bryan H.; COLLURU, Viswa. Exploring the known chemical space of the plant kingdom: insights into taxonomic patterns, knowledge gaps, and bioactive regions. **Journal of Cheminformatics**, [s. l.], vol. 15, no. 1, p. 107, 10 Nov. 2023. <https://doi.org/10.1186/s13321-023-00778-w>.

FARIA-MACHADO, Adelia F.; LICURGO, Flávia M.S.; PIRES, Josi M.F.; CAMPOS, Rodrigo da Silveira; WILHELM, Allan E.; DE SOUZA, Maria de Lourdes M.; ANTONIASSI, Rosemar. Method validation for analysis of phorbol esters from *Jatropha curcas*. **Industrial Crops and Products**, [s. l.], vol. 140, p. 111627, Nov. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111627>.

FARIAS, Andreza Raquel Barbosa de; ALMEIDA, Natália P.; DOMONT, Gilberto B.; NOGUEIRA, Fábio C. S.; CAMPOS, Francisco A. P. Quantitative Proteome Analysis of *Jatropha curcas* L. Genotypes with Contrasting Levels of Phorbol Esters. **PROTEOMICS**, [s. l.], vol. 20, no. 14, 2 Jul. 2020. <https://doi.org/10.1002/pmic.201900273>.

FATTAHIAN, Maryam; GHANADIAN, Mustafa; ALI, Zulfiqar; KHAN, Ikhlas A. *Jatrophane* and rearranged *Jatrophane*-type diterpenes: biogenesis, structure, isolation, biological activity and SARs (1984–2019). **Phytochemistry Reviews**, [s. l.], vol. 19, no. 2, p. 265–336, 13 Apr. 2020. <https://doi.org/10.1007/s11101-020-09667-8>.

FERNANDES, Elaine de S.; RODRIGUES, Fátima A.; TÓFOLI, Danilo; IMAMURA, Paulo M.; DE CARVALHO, João E.; RUIZ, Ana L.T.G.; FOGLIO, Mary A.; MINGUZZI, Sandro; SILVA, Rogério C.L. Isolation, structural identification and cytotoxic activity of hexanic extract, cyperenoic acid, and jatrophane terpenes from *Jatropha ribifolia* roots. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s. l.], vol. 23, no. 3, p. 441–446, May 2013. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2013005000026>.

GHOSH, Sumit; DAS, Sanjib Kumar; SINHA, Krishnendu; GHOSH, Biswatosh; SEN, Koushik; GHOSH, Nabanita; SIL, Parames C. The Emerging Role of Natural Products in Cancer Treatment. **Archives of Toxicology**, [s. l.], vol. 98, no. 8, p. 2353–2391, 25 Aug. 2024. <https://doi.org/10.1007/s00204-024-03786-3>.

GYORKOS, Albert C.; STILLE, John K.; HEGEDUS, Louis S. The total synthesis of (+-)-epi-jatrophone and (+-)-jatrophone using palladium-catalyzed carbonylative coupling of vinyl triflates with vinyl stannanes as the macrocycle-forming step. **Journal of the American Chemical Society**, [s. l.], vol. 112, no. 23, p. 8465–8472, 1 Nov. 1990. <https://doi.org/10.1021/ja00179a035>.

HALABALAKI, Maria; VOUGOGIANNOPOULOU, Konstantina; MIKROS, Emmanuel; SKALTSOUNIS, Alexios Leandros. Recent advances and new strategies in the NMR-based identification of natural products. **Current Opinion in Biotechnology**, [s. l.], vol. 25, p. 1–7, Feb. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.08.005>.

HAN, Qi; WIEMER, David F. Total synthesis of (+)-jatrophone. **Journal of the American Chemical Society**, [s. l.], vol. 114, no. 20, p. 7692–7697, 1 Sep. 1992. <https://doi.org/10.1021/ja00046a014>.

HANSON, J. R. The development of strategies for terpenoid structure determination. **Natural Product Reports**, [s. l.], vol. 18, no. 6, p. 607–617, 11 Dec. 2001. <https://doi.org/10.1039/b103772m>.

HOLSTEIN, Sarah A. The Isoprenoid Biosynthetic Pathway and Statins. **The Enzymes**. [S. l.]: Elsevier, 2011. vol. 30, p. 279–299. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415922-8.00012-4>.

HUANG, Lan; MA, Buqing; ZHANG, Chong; SHI, Jiaqi; SHEN, Rui; ZHANG, Erci; LIAN, Chenlei; WANG, Cuifang; LIU, Jieqing. Unveiling poly(rC)-binding protein 2 as the target protein for curcucione C against prostate cancer: mechanism validation through click chemistry-activity based proteomics profiling approach. **BMC Cancer**, [s. l.], vol. 23, no. 1, p. 957, 9 Oct. 2023. <https://doi.org/10.1186/s12885-023-11467-0>.

HUANG, Min; LU, Jin-Jian; DING, Jian. Natural Products in Cancer Therapy: Past, Present and Future. **Natural Products and Bioprospecting**, [s. l.], vol. 11, no. 1, p. 5–13, 3 Feb. 2021. <https://doi.org/10.1007/s13659-020-00293-7>.

JIA, Qidong; BROWN, Reid; KÖLLNER, Tobias G.; FU, Jianyu; CHEN, Xinlu; WONG, Gane Ka-Shu; GERSHENZON, Jonathan; PETERS, Reuben J.; CHEN, Feng. Origin and early evolution of the plant terpene synthase family. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], vol. 119, no. 15, p. 1–9, 12 Apr. 2022. <https://doi.org/10.1073/pnas.2100361119>.

KAR, Animesh; AGARWAL, Shivam; SINGH, Agrata; BAJAJ, Avinash; DASGUPTA, Ujjaini. Insights into molecular mechanisms of chemotherapy resistance in cancer. **Translational Oncology**, [s. l.], vol. 42, p. 101901, Apr. 2024. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2024.101901>.

KHALAF, Mohammed; ABDEL-FADEEL, Waleed; HASHISH, H. M. Abu; WAPET, Daniel Eutyche Mbadjoun; MAHMOUD, Mohamed Metwally; ELHADY, Salama Abd; ESMAIL, Mohamed F. C. Experimental Investigation of Different Extraction Methods for Producing Biofuel from *Jatropha* Seeds and Castor Seeds. **International Journal of Energy Research**, [s. l.], vol. 2023, p. 1–15, 20 Jun. 2023. <https://doi.org/10.1155/2023/1780536>.

KOPECKA, Joanna; GODEL, Martina; DEI, Silvia; GIAMPIETRO, Roberta; BELISARIO, Dimas Carolina; AKMAN, Muhlis; CONTINO, Marialessandra; TEODORI, Elisabetta; RIGANTI, Chiara. Insights into P-Glycoprotein Inhibitors: New Inducers of Immunogenic Cell Death. **Cells**, [s. l.], vol. 9, no. 4, p. 1033, 22 Apr. 2020. <https://doi.org/10.3390/cells9041033>.

KUHN, Stefan; NUZILLARD, Jean-Marc. Easy Structural Dereplication of Natural Products by Means of Predicted Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy Data**. **Chemistry–Methods**, [s. l.], vol. 3, no. 4, 7 Apr. 2023. <https://doi.org/10.1002/cmt.d.202200054>.

KUMARI, Megha; CHECKER, Vibha Gulyani; KATHPALIA, Renu; SRIVASTAVA, Vikas; SINGH, Indrakant Kumar; SINGH, Archana. Metabolic engineering for enhanced terpenoid production: Leveraging new horizons with an old technique.

Plant Physiology and Biochemistry, [s. l.], vol. 210, p. 108511, May 2024.
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2024.108511>.

LANIER, Emily R.; ANDERSEN, Trine Bundgaard; HAMBERGER, Björn. Plant terpene specialized metabolism: complex networks or simple linear pathways? **The Plant Journal**, [s. l.], vol. 114, no. 5, p. 1178–1201, 29 Jun. 2023.
<https://doi.org/10.1111/tpj.16177>.

LENTSCH, Christoph; FÜRST, Rita; MULZER, Johann; RINNER, Uwe. *Jatrophane* Diterpenes: Preparation of the Western Fragment of Pl-3. **European Journal of Organic Chemistry**, [s. l.], vol. 2014, no. 5, p. 919–923, 8 Feb. 2014.
<https://doi.org/10.1002/ejoc.201301616>.

LI, Heng; DICKSCHAT, Jeroen S. Diterpene Biosynthesis from Geranylgeranyl Diphosphate Analogues with Changed Reactivities Expands Skeletal Diversity. **Angewandte Chemie International Edition**, [s. l.], vol. 61, no. 43, p. 1–8, 24 Oct. 2022. <https://doi.org/10.1002/anie.202211054>.

LI, Yong; DAI, Mingji. Total Syntheses of the Reported Structures of Curcusones I and J through Tandem Gold Catalysis. **Angewandte Chemie International Edition**, [s. l.], vol. 56, no. 38, p. 11624–11627, 11 Sep. 2017.
<https://doi.org/10.1002/anie.201706845>.

LIPINSKI, Christopher A; LOMBARDO, Franco; DOMINY, Beryl W; FEENEY, Paul J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings 1PII of original article: S0169-409X(96)00423-1. The article was originally published in *Advanced Drug Delivery Reviews* 23 (1997) 3–25. 1. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s. l.], vol. 46, no. 1–3, p. 3–26, Mar. 2001. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(00\)00129-0](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(00)00129-0).

LIU, Jie-Qing; YANG, Yuan-Feng; LI, Xu-Yang; LIU, En-Qian; LI, Zhong-Rong; ZHOU, Lin; LI, Yan; QIU, Ming-Hua. Cytotoxicity of naturally occurring rhamnofolane diterpenes from *Jatropha curcas*. **Phytochemistry**, [s. l.], vol. 96, p. 265–272, Dec. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.09.008>.

LIU, Rui; CHEN, Youwen; LIU, Guangzhi; LI, Chenxi; SONG, Yurong; CAO, Zhiwen; LI, Wen; HU, Jinghong; LU, Cheng; LIU, Yuanyan. PI3K/AKT pathway as a key link modulates the multidrug resistance of cancers. **Cell Death & Disease**, [s. l.], vol. 11, no. 9, p. 797, 24 Sep. 2020. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-02998-6>.

LÖFFLER, Lorenz E.; WIRTZ, Conny; FÜRSTNER, Alois. Collective Total Synthesis of Casbane Diterpenes: One Strategy, Multiple Targets. **Angewandte Chemie International Edition**, [s. l.], vol. 60, no. 10, p. 5316–5322, 28 Mar. 2021. <https://doi.org/10.1002/anie.202015243>.

LUNA, Isadora Silva; SOUZA, Thalisson Amorim de; DA SILVA, Marcelo Sobral; FRANCA RODRIGUES, Klinger Antonio da; SCOTTI, Luciana; SCOTTI, Marcus Tullius; MENDONÇA-JUNIOR, Francisco Jaime Bezerra. Computer-Aided drug design of new 2-amino-thiophene derivatives as anti-leishmanial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], vol. 250, p. 115223, Mar. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2023.115223>.

MAJID, Ishrat; KHAN, Shafat; ALADEL, Alanoud; DAR, Aamir Hussain; ADNAN, Mohd; KHAN, Mohammad Idrees; MAHGOUB AWADELKAREEM, Amir; ASHRAF, Syed Amir. Recent insights into green extraction techniques as efficient methods for the extraction of bioactive components and essential oils from foods. **CyTA - Journal of Food**, [s. l.], vol. 21, no. 1, p. 101–114, 31 Dec. 2023. <https://doi.org/10.1080/19476337.2022.2157492>.

MAURI, Andrea. alvaDesc: A Tool to Calculate and Analyze Molecular Descriptors and Fingerprints. [S. l.: s. n.], 2020. p. 801–820. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0150-1_32.

MOHAN, Priya; KOUSHIK, Krishna; FUERTES, Michael J. Synthetic studies directed toward the total synthesis of a *Jatrophone* diterpene. **Tetrahedron Letters**, [s. l.], vol. 56, no. 1, p. 61–65, Jan. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2014.09.128>.

MOREMI, Matenyane P.; MAKOLO, Felix; VILJOEN, Alvaro M.; KAMATOU, Guy P. A review of biological activities and phytochemistry of six ethnomedicinally

important South African Croton species. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], vol. 280, p. 114416, Nov. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114416>.

MOUAHID, Adil; BOUANGA, Halima; CRAMPON, Christelle; BADENS, Elisabeth. Supercritical CO₂ extraction of oil from *Jatropha curcas*: An experimental and modelling study. **The Journal of Supercritical Fluids**, [s. l.], vol. 141, p. 2–11, Nov. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.11.014>.

MUCHLINSKI, Andrew; CHEN, Xinlu; LOVELL, John T.; KÖLLNER, Tobias G.; PELOT, Kyle A.; ZERBE, Philipp; RUGGIERO, Meredith; CALLAWAY, LeMar; LALIBERTE, Suzanne; CHEN, Feng; THOLL, Dorothea. Biosynthesis and Emission of Stress-Induced Volatile Terpenes in Roots and Leaves of Switchgrass (*Panicum virgatum* L.). **Frontiers in Plant Science**, [s. l.], vol. 10, 19 Sep. 2019. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01144>.

NANAYAKKARA, Amila K.; FOLLIT, Courtney A.; CHEN, Gang; WILLIAMS, Noelle S.; VOGEL, Pia D.; WISE, John G. Targeted inhibitors of P-glycoprotein increase chemotherapeutic-induced mortality of multidrug resistant tumor cells. **Scientific Reports**, [s. l.], vol. 8, no. 1, p. 967, 17 Jan. 2018. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19325-x>.

NEWMAN, David J.; CRAGG, Gordon M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, [s. l.], vol. 83, no. 3, p. 770–803, 27 Mar. 2020. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285>.

OBENDE, Samphelix O.; OCHIENG, Charles O.; SHIKANGA, Emmanuel A.; CRUZ, Jorddy N.; SANTOS, Cleydson B.R.; KIMANI, Njogu M. Croton's therapeutic promise: A review of its phytochemistry and critical computational ADME/Tox analysis. **South African Journal of Botany**, [s. l.], vol. 171, p. 648–672, Aug. 2024. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2024.06.031>.

OPRETZKA, Luíza Carolina França; VIANA, Max Denisson Maurício; DE LIMA, Alyne Almeida; DE SOUZA, Thalisson Amorim; SCOTTI, Marcus Tullius; TAVARES, Josean Fechine; DA SILVA, Marcelo Sobral; SOARES, Milena Botelho Pereira; VILLARREAL, Cristiane Flora. Cleomin Exerts Acute Antinociceptive Effects

in Mice via GABAB and Muscarinic Receptors. **Pharmaceuticals**, [s. l.], vol. 16, no. 11, p. 1547, 2 Nov. 2023. <https://doi.org/10.3390/ph16111547>.

OTSUKI, Kouharu; LI, Wei. Tiglane and daphnane diterpenoids from Thymelaeaceae family: chemistry, biological activity, and potential in drug discovery. **Journal of Natural Medicines**, [s. l.], vol. 77, no. 4, p. 625–643, 9 Sep. 2023. <https://doi.org/10.1007/s11418-023-01713-x>.

PANIAGUA-ZAMBRANA, Narel Y.; BUSSMANN, Rainer W.; ROMERO, Carolina. *Jatropha curcas* L. *Jatropha gossypifolia* L. *Jatropha multifida* L. Euphorbiaceae. In: NAREL Y. PANIAGUA-ZAMBRANA, Rainer W. Bussmann (ed.). **Ethnobotany of the Andes**. Switzerland: Springer, Cham, 2020. p. 1007–1015. https://doi.org/10.1007/978-3-319-77093-2_154-1.

PARKER, Peter J.; BROWN, Sophie J.; CALLEJA, Veronique; CHAKRAVARTY, Probir; COBBAUT, Mathias; LINCH, Mark; MARSHALL, Jacqueline J. T.; MARTINI, Silvia; MCDONALD, Neil Q.; SOLIMAN, Tanya; WATSON, Lisa. Equivocal, explicit and emergent actions of PKC isoforms in cancer. **Nature Reviews Cancer**, [s. l.], vol. 21, no. 1, p. 51–63, 11 Jan. 2021. <https://doi.org/10.1038/s41568-020-00310-4>.

PATRIDGE, Eric; GAREISS, Peter; KINCH, Michael S.; HOYER, Denton. An analysis of FDA-approved drugs: natural products and their derivatives. **Drug Discovery Today**, [s. l.], vol. 21, no. 2, p. 204–207, Feb. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2015.01.009>.

PAVITHRA, R.; KHAN, Mohammad Rashid; KHAN, Mohd Shahanbaj. Recent advancements in natural compounds for cancer therapy and prevention. **Phytochemistry Reviews**, [s. l.], vol. 23, p. 1–25, 28 Mar. 2024. <https://doi.org/10.1007/s11101-024-09940-0>.

RICIGLIANO, Vincent A.; SICA, Vincent P.; KNOWLES, Sonja L.; DIETTE, Nicole; HOWARTH, Dianella G.; OBERLIES, Nicholas H. Bioactive diterpenoid metabolism and cytotoxic activities of genetically transformed *Euphorbia lathyris* roots. **Phytochemistry**, [s. l.], vol. 179, p. 112504, Nov. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2020.112504>.

RINNER, Uwe. Progress in the Preparation of *Jatrophone* Diterpenes. **European Journal of Organic Chemistry**, [s. l.], vol. 2015, no. 15, p. 3197–3219, 19 May 2015. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201403598>.

ROJAS-JIMÉNEZ, Sarai; VALLADARES-CISNEROS, María Guadalupe; SALINAS-SÁNCHEZ, David Osvaldo; PÉREZ-RAMOS, Julia; SÁNCHEZ-PÉREZ, Leonor; PÉREZ-GUTIÉRREZ, Salud; CAMPOS-XOLALPA, Nimsi. Anti-Inflammatory and Cytotoxic Compounds Isolated from Plants of Euphorbia Genus. **Molecules**, [s. l.], vol. 29, no. 5, p. 1083, 29 Feb. 2024. <https://doi.org/10.3390/molecules29051083>.

RUDOLF, Jeffrey D.; CHANG, Chin-Yuan. Terpene synthases in disguise: enzymology, structure, and opportunities of non-canonical terpene synthases. **Natural Product Reports**, [s. l.], vol. 37, no. 3, p. 425–463, 2020. <https://doi.org/10.1039/C9NP00051H>.

SABANDAR, Carla W.; AHMAT, Norizan; JAAFAR, Faridahanim Mohd; SAHIDIN, I. Medicinal property, phytochemistry and pharmacology of several *Jatropha* species (Euphorbiaceae): A review. **Phytochemistry**, [s. l.], vol. 85, p. 7–29, Jan. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.10.009>.

SANJAI, Chetana; HAKKIMANE, Sushruta S.; GURU, Bharath Raja; GAONKAR, Santosh L. A comprehensive review on anticancer evaluation techniques. **Bioorganic Chemistry**, [s. l.], vol. 142, p. 106973, Jan. 2024. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2023.106973>.

SCHMIDT, Axel; GERSHENZON, Jonathan. Cloning and characterization of two different types of geranyl diphosphate synthases from Norway spruce (*Picea abies*). **Phytochemistry**, [s. l.], vol. 69, no. 1, p. 49–57, Jan. 2008. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.06.022>.

SCHNEIDER, Andreas; LYSTBÆK, Thomas B.; MARKTHALER, Daniel; HANSEN, Niels; HAUER, Bernhard. Biocatalytic stereocontrolled head-to-tail cyclizations of unbiased terpenes as a tool in chemoenzymatic synthesis. **Nature Communications**, [s. l.], vol. 15, no. 1, p. 4925, 10 Jun. 2024. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-48993-9>.

SCOTT, Emma C.; BAINES, Andrea C.; GONG, Yutao; MOORE, Rodney; PAMUK, Gulsum E.; SABER, Haleh; SUBEDEE, Ashim; THOMPSON, Matthew D.; XIAO, Wenming; PAZDUR, Richard; RAO, V. Ashutosh; SCHNEIDER, Julie; BEAVER, Julia A. Trends in the approval of cancer therapies by the FDA in the twenty-first century. **Nature Reviews Drug Discovery**, [s. l.], vol. 22, no. 8, p. 625–640, 21 Aug. 2023. <https://doi.org/10.1038/s41573-023-00723-4>.

SHARI, Khawlah; EL GEDAILY, Rania A.; ALLAM, Rasha M.; MESELHY, Khaled M.; KHALEEL, Amal E.; ABDEL-SATTAR, Essam. Jatrophone: a cytotoxic macrocyclic diterpene targeting PI3K/AKT/NF- κ B pathway, inducing apoptosis and autophagy in resistant breast cancer cells. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, [s. l.], vol. 23, no. 1, p. 293, 22 Aug. 2023. <https://doi.org/10.1186/s12906-023-04113-6>.

SHARI, Khawlah; MOHAMED, Osama G.; MESELHY, Khaled M.; TRIPATHI, Ashootosh; KHALEEL, Amal E.; ABDEL-SATTAR, Essam; GEDAILY, Rania A. El. Cytotoxic and antiviral activities of *Jatropha variegata* and *Jatropha spinosa* in relation to their metabolite profile. **Scientific Reports**, [s. l.], vol. 14, no. 1, p. 4846, 28 Feb. 2024. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-55196-1>.

SHENVI, Ryan A. Natural Product Synthesis in the 21st Century: Beyond the Mountain Top. **ACS Central Science**, [s. l.], vol. 10, no. 3, p. 519–528, 27 Mar. 2024. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.3c01518>.

SHULTZ, Michael D. Two Decades under the Influence of the Rule of Five and the Changing Properties of Approved Oral Drugs. **Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], vol. 62, no. 4, p. 1701–1714, 28 Feb. 2019. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00686>.

SILVA, Ana M.; BRUM, Rosinei L.; CALIXTO, João B. The relaxant action of jatrophone in rat portal vein. A comparison with protein kinase C inhibitors. **Life Sciences**, [s. l.], vol. 57, no. 9, p. 863–871, Jul. 1995. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(95\)02019-F](https://doi.org/10.1016/0024-3205(95)02019-F).

SMITH, Amos B. Evolution of a Synthetic Strategy: Total Synthesis of Jatrophone. [S. l.: s. n.], 1984. p. 223–274. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-450280-2.50013-2>.

SMITH, Amos B.; LIVERTON, Nigel J.; HRIB, Nicholas J.; SIVARAMAKRISHNAN, Hariharan; WINZENBERG, Kevin. Total synthesis of (+)-jatropholone A and B. **The Journal of Organic Chemistry**, [s. l.], vol. 50, no. 17, p. 3239–3241, 1 Aug. 1985. <https://doi.org/10.1021/jo00217a054>.

SMITH, Amos B.; LUPO, Andrew T.; OHBA, Masashi; CHEN, Kwunmin. Total synthesis of (+)-hydroxyjatrophone A and (+)-hydroxyjatrophone B. **Journal of the American Chemical Society**, [s. l.], vol. 111, no. 17, p. 6648–6656, 1 Aug. 1989. <https://doi.org/10.1021/ja00199a026>.

SMITH, Amos B.; MALAMAS, Michael S. Jatrophone analogs: synthesis of cis- and trans-normethyljatropholactones. **The Journal of Organic Chemistry**, [s. l.], vol. 47, no. 18, p. 3442–3447, 1 Aug. 1982. <https://doi.org/10.1021/jo00139a011>.

SOTO-SÁNCHEZ, Jacqueline. Could natural terpenes be an alternative for the treatment of neglected tropical diseases? **Chemical Biology & Drug Design**, [s. l.], vol. 103, no. 2, 2 Feb. 2024. <https://doi.org/10.1111/cbdd.14470>.

SOUSA, Inês J.; FERREIRA, Maria-José U.; MOLNÁR, Joseph; FERNANDES, Miguel X. QSAR studies of macrocyclic diterpenes with P-glycoprotein inhibitory activity. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], vol. 48, no. 3, p. 542–553, Feb. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2012.11.012>.

SÜLSEN, Valeria P. Sesquiterpene Lactones and Diterpenes: Promising Therapeutic Candidates for Infectious Diseases, Neoplasms and Other Chronic Disorders. **Molecules**, [s. l.], vol. 26, no. 5, p. 1251, 26 Feb. 2021. <https://doi.org/10.3390/molecules26051251>.

SUN, Lian; WANG, Xin-Ming; TANG, Qianhui; XIAO, Yao; XU, Jin-Bu; ZHANG, Tong-Tong; LIU, Yan-Jun; LI, Xiaohuan; GAO, Feng. Lathyrane and premysrinane Euphorbia diterpenes against Alzheimer's disease: Bioinspired synthesis, anti-

cholinesterase and neuroprotection bioactivity. **Bioorganic Chemistry**, [s. l.], vol. 147, p. 107377, Jun. 2024. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2024.107377>.

TADANO, Shota; CHIYAPO, Gwafila; ISHIMOTO, Yudai; KONAKA, Takafumi; MAZEREKU, Charles; TSUJIMOTO, Hisashi; AKASHI, Kinya. Multivariate Analysis of Seed Chemical Diversity among *Jatropha curcas* in Botswana. **Agronomy**, [s. l.], vol. 11, no. 8, p. 1570, 6 Aug. 2021. <https://doi.org/10.3390/agronomy11081570>.

TALEVI, Alan; BELLERA, Carolina L. Clustering of small molecules: new perspectives and their impact on natural product lead discovery. **Frontiers in Natural Products**, [s. l.], vol. 3, 15 Mar. 2024. <https://doi.org/10.3389/fntpr.2024.1367537>.

TOUW, Axel J.; VAN DAM, Nicole M. Optimal chemical defence allocation in roots: where, why and how? **Phytochemistry Reviews**, [s. l.], , p. 1, 28 Apr. 2023. <https://doi.org/10.1007/s11101-023-09872-1>.

VALI, Marilia; DÖRING, Thiago H.; MARX, Edgard; FERREIRA, Leonardo L. G.; MEDINA-FRANCO, José L.; ANDRICOPULO, Adriano D. Neglected Tropical Diseases: A Chemoinformatics Approach for the Use of Biodiversity in Anti-Trypanosomatid Drug Discovery. **Biomolecules**, [s. l.], vol. 14, no. 8, p. 1033, 20 Aug. 2024. <https://doi.org/10.3390/biom14081033>.

VELA, Fátima; EZZANAD, Abdellah; HUNTER, Alan Christy; MACÍAS-SÁNCHEZ, Antonio José; HERNÁNDEZ-GALÁN, Rosario. Pharmacological Potential of Lathyrane-Type Diterpenoids from Phytochemical Sources. **Pharmaceuticals**, [s. l.], vol. 15, no. 7, p. 780, 23 Jun. 2022. <https://doi.org/10.3390/ph15070780>.

WANG, Hong-Bing; WANG, Xiao-Yang; LIU, Li-Ping; QIN, Guo-Wei; KANG, Ting-Guo. Tiglane Diterpenoids from the *Euphorbiaceae* and *Thymelaeaceae* Families. **Chemical Reviews**, [s. l.], vol. 115, no. 9, p. 2975–3011, 13 May 2015. <https://doi.org/10.1021/cr200397n>.

WANG, Mingxue; CAO, Jiaojiao; ZHU, Jian-Yong; QIU, Jun; ZHANG, Yan; SHU, Bing; OU, Tian-Miao; TAN, Jia-Heng; GU, Lian-Quan; HUANG, Zhi-Shu; YIN, Sheng; LI, Ding. Curcusone C induces telomeric DNA-damage response in cancer

cells through inhibition of telomeric repeat factor 2. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, [s. l.], vol. 1865, no. 11, p. 1372–1382, Nov. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2017.08.022>.

WANG, Xin; IZZO, Angelo A.; PAPAPETROPOULOS, Andreas; ALEXANDR, Steve P. H.; CORTESE-KROTT, Miriam; KENDALL, Dave A.; MARTEMYANOV, Kirill A.; MAURO, Claudio; PANETTIERI, Reynold A.; PATEL, Hemal H.; SCHULZ, Rainer; STEFANSKA, Barbara; STEPHENS, Gary J.; TEIXEIRA, Mauro M.; VERGNOLLE, Nathalie; FERDINANDY, Péter. Natural product pharmacology: the British Journal of Pharmacology perspective. **British Journal of Pharmacology**, [s. l.], vol. 181, no. 19, p. 3547–3555, 11 Oct. 2024. <https://doi.org/10.1111/bph.17300>.

WATANABE, Ayumu; HIKONE, Yuto; NAGATOMO, Masanori; INOUE, Masayuki. Conversion of Phorbol into Des-D-Ring Tricycle and Crotonianoid B via Peroxidation Reaction. **Organic Letters**, [s. l.], vol. 26, no. 20, p. 4335–4339, 24 May 2024. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.4c01363>.

WATANABE, Ayumu; NAGATOMO, Masanori; HIROSE, Akira; HIKONE, Yuto; KISHIMOTO, Naoki; MIURA, Satoshi; YASUTAKE, Tae; ABE, Towa; MISUMI, Shogo; INOUE, Masayuki. Total Syntheses of Phorbol and 11 Tiglane Diterpenoids and Their Evaluation as HIV Latency-Reversing Agents. **Journal of the American Chemical Society**, [s. l.], vol. 146, no. 12, p. 8746–8756, 27 Mar. 2024. <https://doi.org/10.1021/jacs.4c01589>.

WHITEHEAD, Joshua N.; LEFERINK, Nicole G. H.; JOHANNISSEN, Linus O.; HAY, Sam; SCRUTTON, Nigel S. Decoding Catalysis by Terpene Synthases. **ACS Catalysis**, [s. l.], vol. 13, no. 19, p. 12774–12802, 6 Oct. 2023. <https://doi.org/10.1021/acscatal.3c03047>.

WOLFENDER, Jean-Luc; MARTI, Guillaume; THOMAS, Aurélien; BERTRAND, Samuel. Current approaches and challenges for the metabolite profiling of complex natural extracts. **Journal of Chromatography A**, [s. l.], vol. 1382, p. 136–164, Feb. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.10.091>.

WOLFENDER, Jean-Luc; NUZILLARD, Jean-Marc; VAN DER HOOFT, Justin J. J.; RENAULT, Jean-Hugues; BERTRAND, Samuel. Accelerating Metabolite

Identification in Natural Product Research: Toward an Ideal Combination of Liquid Chromatography–High-Resolution Tandem Mass Spectrometry and NMR Profiling, *in Silico* Databases, and Chemometrics. **Analytical Chemistry**, [s. l.], vol. 91, no. 1, p. 704–742, 2 Jan. 2019. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b05112>.

WRIGHT, Austin C.; LEE, Chung Whan; STOLTZ, Brian M. Progress toward the Enantioselective Synthesis of Curcusones A–D via a Divinylcyclopropane Rearrangement Strategy. **Organic Letters**, [s. l.], vol. 21, no. 23, p. 9658–9662, 6 Dec. 2019. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.9b03829>.

WRIGHT, Austin C.; STOLTZ, Brian M. Enantioselective construction of the tricyclic core of curcusones A–D *via* a cross-electrophile coupling approach. **Chemical Science**, [s. l.], vol. 10, no. 45, p. 10562–10565, 2019. <https://doi.org/10.1039/C9SC04127C>.

WU, Qinghua; PATOCKA, Jiri; NEPOVIMOVA, Eugenie; KUCA, Kamil. *Jatropha gossypifolia* L. and its biologically active metabolites: A mini review. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], vol. 234, p. 197–203, Apr. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.01.022>.

XU, Yang; TANG, Peiyu; ZHU, Man; WANG, Yali; SUN, Dejuan; LI, Hua; CHEN, Lixia. Diterpenoids from the genus *Euphorbia*: Structure and biological activity (2013–2019). **Phytochemistry**, [s. l.], vol. 190, p. 112846, Oct. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2021.112846>.

YANG, Jiong; LONG, Yun Oliver; PAQUETTE, Leo A. Concise Total Syntheses of the Bioactive Mesotricyclic Diterpenoids *Jatrophatrione* and *Citlaltione*. **Journal of the American Chemical Society**, [s. l.], vol. 125, no. 6, p. 1567–1574, 1 Feb. 2003. <https://doi.org/10.1021/ja021177r>.

YUAN, Chendong; CHEN, Mingxiang; CAI, Xiaolu. Advances in poly(rC)-binding protein 2: Structure, molecular function, and roles in cancer. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [s. l.], vol. 139, p. 111719, Jul. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111719>.

ZENG, Tao; LIU, Zhihong; LIU, Huawei; HE, Wengan; TANG, Xiaowen; XIE, Liwei; WU, Ruibo. Exploring Chemical and Biological Space of Terpenoids. **Journal of Chemical Information and Modeling**, [s. l.], vol. 59, no. 9, p. 3667–3678, 23 Sep. 2019. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.9b00443>.

ZERBE, Philipp; BOHLMANN, Jörg. Plant diterpene synthases: exploring modularity and metabolic diversity for bioengineering. **Trends in Biotechnology**, [s. l.], vol. 33, no. 7, p. 419–428, Jul. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.04.006>.

ZHANG, Chun-Yan; ZHANG, Li-Jun; LU, Zhi-Cheng; MA, Chen-Yun; YE, Ying; RAHMAN, Khalid; ZHANG, Hong; ZHU, Jian-Yong. Antitumor Activity of Diterpenoids from *Jatropha gossypifolia* : Cell Cycle Arrest and Apoptosis-Inducing Activity in RKO Colon Cancer Cells. **Journal of Natural Products**, [s. l.], vol. 81, no. 8, p. 1701–1710, 24 Aug. 2018. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.7b01036>.

ZHANG, Jiaming; LIU, Jiayi; LI, Hongdi; HUA, Juan; LUO, Shihong. Esterification with a Long-Chain Fatty Acid Elevates the Exposure Toxicity of Tiglane Diterpenoids from *Euphorbia fischeriana* Roots against Nematodes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], vol. 71, no. 34, p. 12730–12740, 30 Aug. 2023. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.3c03460>.

ZHANG, Jun-Sheng; ZHANG, Yao; LI, Shen; AHMED, Abrar; TANG, Gui-Hua; YIN, Sheng. Cytotoxic macrocyclic diterpenoids from *Jatropha multifida*. **Bioorganic Chemistry**, [s. l.], vol. 80, p. 511–518, Oct. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2018.06.025>.

ZHANG, Wei; WEI, Lei; LI, Shijuan; CHEN, Fang; XU, Ying. Tissue-Specific Accumulation Profiles of Phorbol Esters in Response to Abiotic and Biotic Stresses in *Jatropha curcas*. **Seeds**, [s. l.], vol. 3, no. 3, p. 324–340, 2 Jul. 2024. <https://doi.org/10.3390/seeds3030024>.

ZHANG, Weilin; PEI, Jianfeng; LAI, Luhua. Computational Multitarget Drug Design. **Journal of Chemical Information and Modeling**, [s. l.], vol. 57, no. 3, p. 403–412, 27 Mar. 2017. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.6b00491>.

ZHANG, Zihan; WU, Qing-Yang; GE, Yue; HUANG, Zheng-Yu; HONG, Ran; LI, Aitao; XU, Jian-He; YU, Hui-Lei. Hydroxylases involved in terpenoid biosynthesis: a review. **Bioresources and Bioprocessing**, [s. l.], vol. 10, no. 1, p. 39, 13 Jul. 2023. <https://doi.org/10.1186/s40643-023-00656-1>.

ZHAO, Wanli; PENG, Jian; WANG, Fan; TIAN, Mei; LI, Pirui; FENG, Boya; YIN, Min; XU, Yannan; XUE, Jia-Yu; XUE, Jianhui; FENG, Xu; CHEN, Yu. Integrating metabolomics and transcriptomics to unveil the spatiotemporal distribution of macrocyclic diterpenoids and candidate genes involved in ingenol biosynthesis in the medicinal plant *Euphorbia lathyris* L. **Industrial Crops and Products**, [s. l.], vol. 184, p. 115096, Sep. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.115096>.

3.11 Informações adicionais

Atividade Biológica

Tabela S1. Lista de atividades biológicas de diterpenos isolados de espécies de *Jatropha*..

Name of the compound	Biological activity
Jatrogrossidione	Leishmanicidal
	Trypanocidal
	Cytotoxicity
	Cytotoxicity/Apoptosis induction
	Thioredoxin reductase inhibition
2-epi-jatrogrossidione	Anti-inflammatory/Inhibition of NO production
	Cytotoxicity
	Thioredoxin reductase inhibition
Caniojane	Anti-inflammatory/Inhibition of NO production
	Antimicrobial
	Cytotoxicity
	Antiplasmodial
1,11-bisepicaniojane	Antituberculosis
	Cytotoxicity
	Antiplasmodial
Jatrogrossidion	Antituberculosis
	Cytotoxicity
	Antiherpes (HSV-1)
Isojatrogrossidion	Cytotoxicity
	Antiproliferative
2-epi-isojatrogrossidion	Cytotoxicity
	Cytotoxicity
	Antimicrobial
	Antiherpes (HSV-1)
	Antiproliferative
2-epi-hydroxyisojatrogrossidion	Cytotoxicity
	Cytotoxicity
	Antimicrobial
	Antiherpes (HSV-1)
2-hydroxyisojatrogrossidion	Antiproliferative
	Cytotoxicity
	Cytotoxicity
Jatrophalactone	Antimicrobial
	Cytotoxicity
Jatrophalone	Cytotoxicity
	Cytotoxicity
Jatrophadiketone	Analgesic

	Anti-inflammatory
	Antipyretic
	NO elimination
Curcusone A	Cytotoxicity
	Cytotoxicity
	Thioredoxin reductase inhibition
	Cytotoxicity
	Cytotoxicity
Curcusone B	Thioredoxin reductase inhibition
	Antimetastatic
	Antiproliferative
	Cytotoxicity
	Cytotoxicity
Curcusone C	Thioredoxin reductase inhibition
	Cytotoxicity
	Antiproliferative and apoptotic
	Antitumoral - prostate cancer
	Cytotoxicity
	Cytotoxicity
Curcusone D	Thioredoxin reductase inhibition
	Cytotoxicity
	Antitumoral
Curcusone E	Cytotoxicity
	Cytotoxicity
Curcusone F	Cytotoxicity
Curcusone G	Cytotoxicity
Curcusone H	Cytotoxicity
Curcusone I	Cytotoxicity
Curcusone J	Cytotoxicity
3-dehydroxy-2-epi-caniojane	Cytotoxicity
4-epi-curcusone E	Cytotoxicity
	Antibacterial
4Z-jatrogrossidentadione	Antiherpes (HSV-1)
	Cytotoxicity
	Cytotoxicity
	Cytotoxicity
	Antiherpes (HSV-1)
4E-jatrogrossidentadione	Cytotoxicity
	Cytotoxicity
	Cytotoxicity
	Cytotoxicity
15-epi-4E-jatrogrossidentadion	Antiherpes (HSV-1)
	Cytotoxicity
	Cytotoxicity

	Cytotoxicity
	Cytotoxicity
15-epi-4Z-jatrogrossidentadion	Antiherpes (HSV-1) Cytotoxicity Antibacterial Cytotoxicity
Japodagrין	Antibacterial
Multidione	Cytotoxicity
Multifidanol	Cytotoxicity Antimicrobial
Multifidenol	Cytotoxicity Antimicrobial
Multifidone	Cytotoxicity
14-deoxy-1β-hydroxy-4(4E)-jatrogrossidentadione	Antimalarial Antimicrobial Antileishmanial
15-deoxy-1β-hydroxy-4(4E)-jatrogrossidentadione	Antimalarial Antimicrobial Antileishmanial
Jatrocurcasenone A	Cytotoxicity
Jatrocurcasenone B	Cytotoxicity
Jatrocurcasenone C	Cytotoxicity
Jatrocurcasenone D	Cytotoxicity
Jatrocurcasenone E	Cytotoxicity
Jatrocurcasenone F	Anti-inflammatory
Jatrocurcasenone G	Anti-inflammatory
Jatrocurcasenone H	Anti-inflammatory
Jatrocurcasenone I	Anti-inflammatory
Japodagriganone A	Cytotoxicity
Japodagriganone B	Cytotoxicity Antimicrobial
Jatointelone A	Thioredoxin reductase inhibition Thioredoxin reductase inhibition
Jatointelone B	Thioredoxin reductase inhibition
Jatointelone C	Thioredoxin reductase inhibition
Jatointelone D	Thioredoxin reductase inhibition
Jatointelone E	Thioredoxin reductase inhibition
Jatointelone F	Thioredoxin reductase inhibition
Jatointelone I	Thioredoxin reductase inhibition
Jatropha factor C1	Effect on platelet aggregation
Jatropha factor C2	Effect on platelet aggregation
Jatropha factor C3	Effect on platelet aggregation

<i>Jatropha</i> factor C4	Effect on platelet aggregation
<i>Jatropha</i> factor C5	Effect on platelet aggregation
Jatrophene	Antimicrobial
Jatrophone	Leishmanicidal
	Insulin release inhibition
	Uterine muscle contraction inhibition
	Effect on smooth and cardiac muscle
	Portal vein contraction inhibition
	Molluscicidal
	Vasorelaxant in isolated rat aorta
	Cytotoxicity
	Lymphocyte activation inhibition
	Platelet aggregation inhibition
	Antiproliferative and antimigratory
	Gastroprotective
	Glutamate and GMP-PNP binding inhibition
	Antiviral and anti-inflammatory
Japodagrone	Antiproliferative
	Cytotoxicity
9β,13α-dihydroxyisabellione	Cytotoxicity
Jatropholone A	Antibacterial
	Gastroprotective
	Antiproliferative
	Molluscicidal
	Gastroprotective
	Antiplasmodial
	Antituberculosis
	Cytotoxicity
	Cytotoxicity
	Cytotoxicity
	Thioredoxin reductase inhibition
	Gastroprotective
	Cytotoxicity
	Cytotoxicity
Jatropholone B	Anti-inflammatory
	Antiproliferative
	Cytotoxicity
	Molluscicidal
	Gastroprotective
	Antiplasmodial
	Antituberculosis
	Cytotoxicity
	Cytotoxicity
	Thioredoxin reductase inhibition
	Gastroprotective

	Cytotoxicity
	Antiproliferative
	Cytotoxicity
	Anti-inflammatory
	Cytotoxicity
Jatropholone C	Cytotoxicity
Jatropholone D	Cytotoxicity
Jatropholone E	Cytotoxicity
2α-hydroxyjatropholone	Antiplasmodial
	Antituberculosis
	Cytotoxicity
2β-hydroxyjatropholone	Antiplasmodial
	Antituberculosis
	Cytotoxicity
epi-jatrophol	Cytotoxicity
Jatrophaldehyde	Cytotoxicity
	Cytotoxicity
Epi-Jatrophaldehyde	Cytotoxicity
	Cytotoxicity
	Antibacterial
Jatromulone A	Thioredoxin reductase inhibition
	Cytotoxicity
	Growth inhibition
	Cytotoxicity
	Cytotoxicity
	Antioxidant
	Cytotoxicity
	NO inhibition
Spruceanol	Cytotoxicity
	RANKL-induced osteoclastogenesis
	Cytotoxicity
	Antimicrobial
	Anti-HCV
	Cytotoxicity
	NO production inhibition
	Antitumoral
Cleistanthol	Cytotoxicity
	Antitumoral
	Cytotoxicity
	Antioxidant
	RANKL-induced osteoclastogenesis
	Cytotoxicity
	Antibacterial
	Antiviral
Jatrocurcadiones A and B	Thioredoxin reductase inhibition
Lathyranolactone	Cytotoxicity

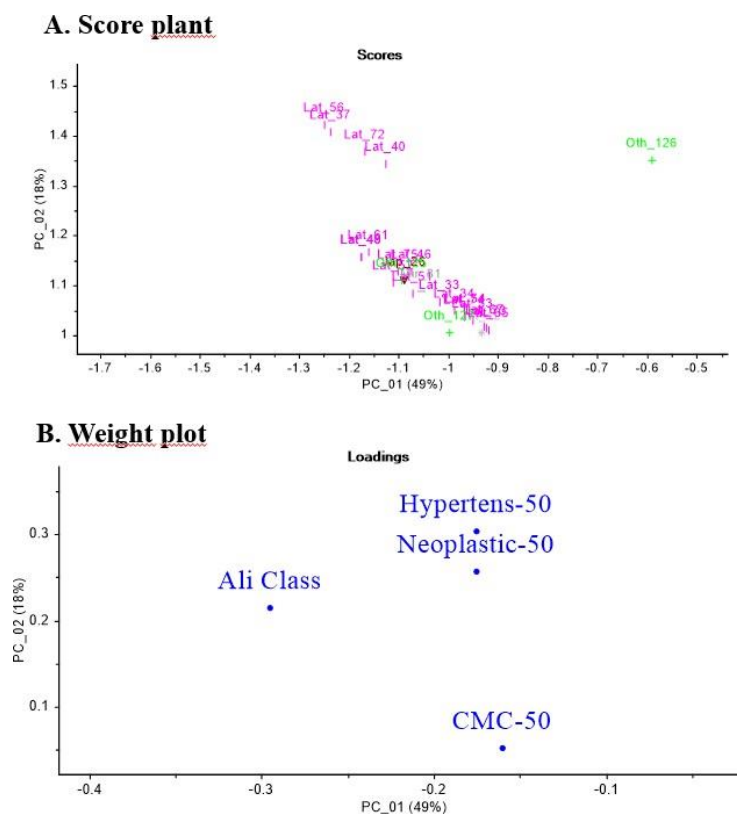
Jatrophodione A	Cytotoxicity
	Cytotoxicity
	Thioredoxin reductase inhibition
Jatrophodione B	Cytotoxicity
Jatrophodione C	Cytotoxicity
Jatrophodione D	Cytotoxicity
Jatrophodione E	Cytotoxicity
Jatrophalactam	Cytotoxicity
Heudelotinone	Cytotoxicity
	Thioredoxin reductase inhibition
Riolozatrione	Cytotoxicity
	Antiviral (Antiherpes)
	Cytotoxicity
	Antiviral (Antiherpes)
6-epi-riolozatrione	Cytotoxicity
	Antiviral (Antiherpes)
Jatrophatrione	Antitumoral (Lymphocytic Leukemia)
	Cytotoxicity
	Antiherpes
Citlaltione	Cytotoxicity
	Antiherpes
	Cytotoxicity
	Cytotoxicity
Falodone	Cytotoxicity
Jatromultone A	Cytotoxicity
Jatromultone B	Cytotoxicity
Jatromultone C	Cytotoxicity
Jatromultone D	Cytotoxicity
Jatromultone F	Cytotoxicity
Jatromultone G	Cytotoxicity
Jatromultone H	Cytotoxicity
Jatromultone I	Cytotoxicity
Jatroglicaine A	Anti-inflammatory
Jatrololone A	Reversal of multidrug resistance (MDR) in cancer cells
Jatrololone B	Reversal of multidrug resistance (MDR) in cancer cells
Jatrolololide A	PTP1B enzyme inhibition (Type 2 diabetes and obesity)
Jatrolololide B	PTP1B enzyme inhibition (Type 2 diabetes and obesity)
Jatrolololide C	PTP1B enzyme inhibition (Type 2 diabetes and obesity)
Jatrololone	Anti-inflammatory
Integerrimene	Cytotoxicity
	Cytotoxicity
Jatrolololone	Thioredoxin reductase inhibition
Jatrololone	Antimicrobial and Antifungal
Jatrolololone	Cytotoxicity
	Antibacterial
Abiodone	Cytotoxicity
Curcusecon A	Cytotoxicity

Curcusecon B	Cytotoxicity
Curcusecon C	Cytotoxicity
Curcusecon D	Cytotoxicity
Curcusecon E	Cytotoxicity

ADMET e Druglikeness

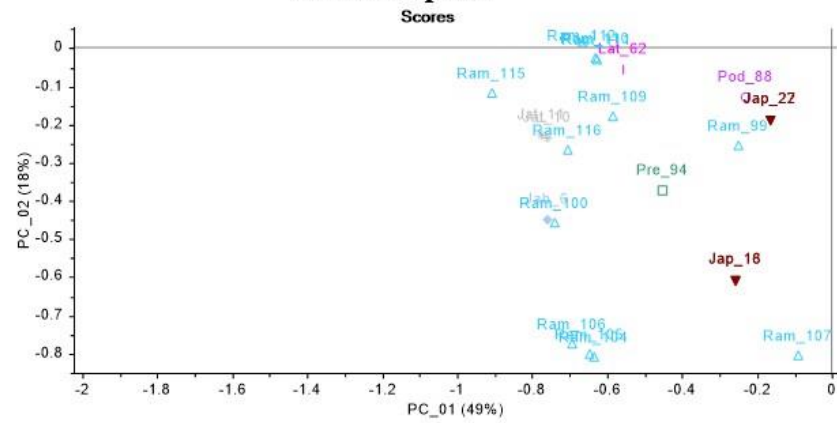
Expansões da figura 5. No gráfico de pontuação, cada composto representa uma amostra, sendo que os códigos são compostos por três letras seguidas de números. As letras correspondem ao nome da espinha dorsal de cada diterpeno, e o número indica a posição ocupada por cada um deles no conjunto de dados utilizado para gerar os descritores moleculares. Essa representação nos permite identificar exatamente qual composto apresenta características distintas ao interpretarmos os gráficos de pontuação e pesos da PCA.

Quadrante 1

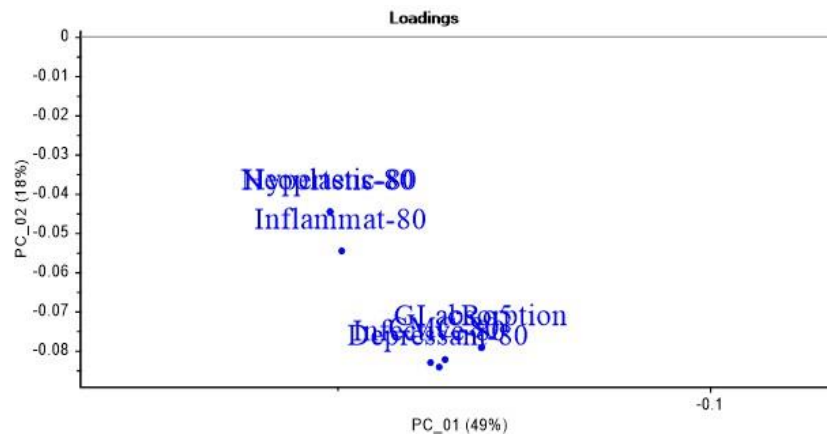


A expansão do gráfico de pontuação mostra a presença de diterpenos do tipo latirano ("Lat"), em rosa, concentrados no quadrante 1. Além desses, em verde, há alguns compostos representados pela sigla "Oth", atribuídos a diterpenos da série seco ou muito modificada. Também é possível observar substâncias dos tipos mirsinano (Myr), jatropano (Jat) e jatrofolano (Jap), sobrepondo-se, o que indica sua similaridade em termos de características físico-químicas.

A. Score plant

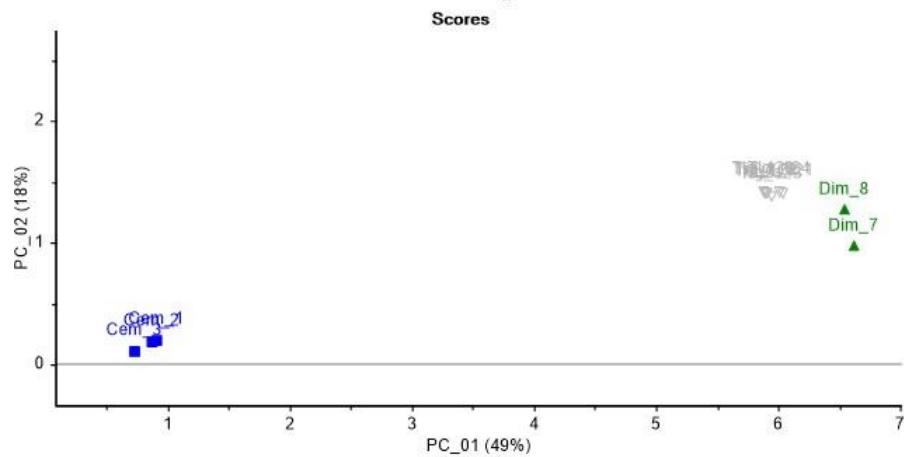


B. Weight plot

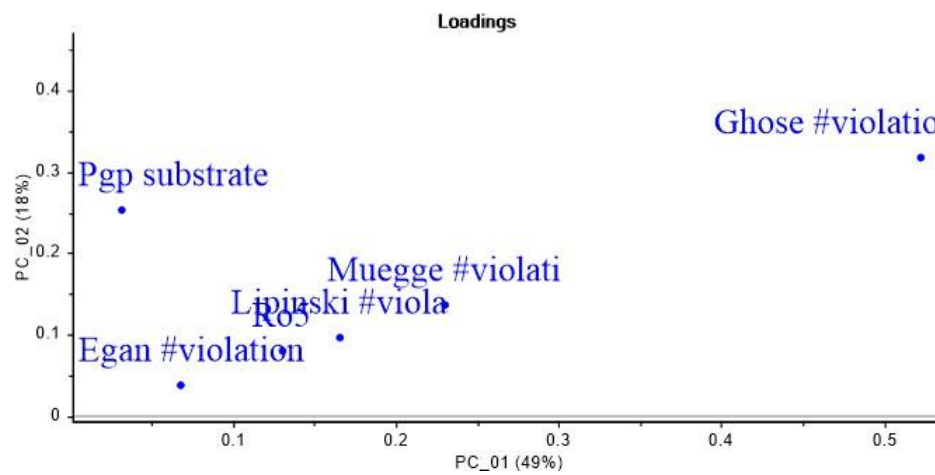


Quadrant 3

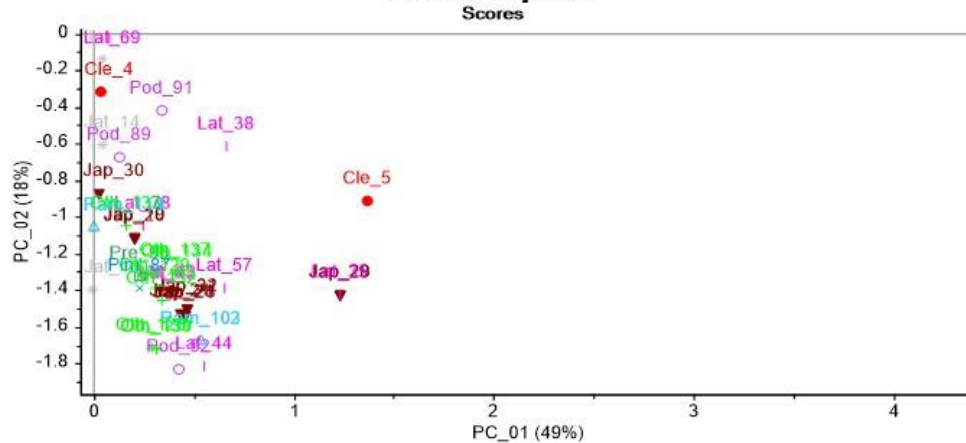
A. Score plant



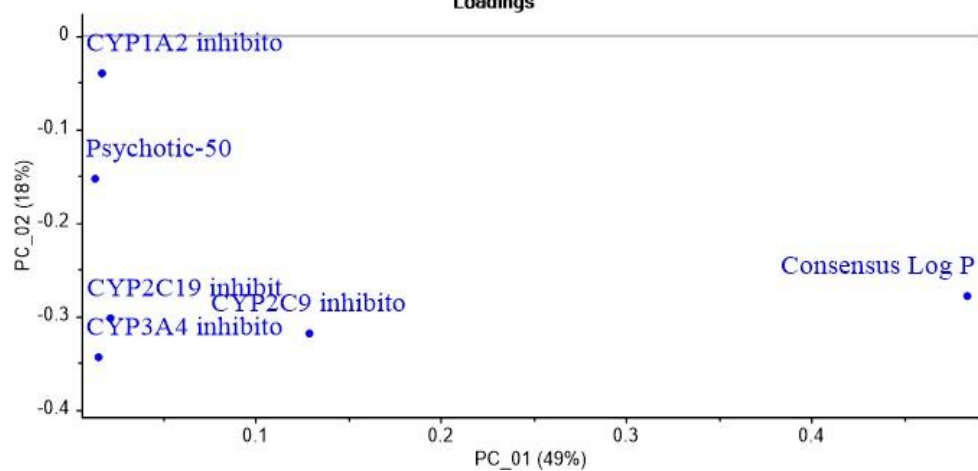
B. Weight plot



A. Score plant



Loadings



**4. CAPÍTULO 4. RIBIFOLONAS A-G, NOVOS
DITERPENOS COM POTENCIAL
CITOTÓXICO ISOLADOS DE *JATROPHA*
RIBIFOLIA (POHL) BAILL
(EUPHORBIACEAE)**

Ribifolonas A-G, novos diterpenos com potencial citotóxico isolados de *Jatropha ribifolia* (pohl) baill (euphorbiaceae)

Abstract

The genus *Jatropha* is a promising source for discovering new compounds with antitumor potential. *Jatropha ribifolia* is an endemic species traditionally used in folk medicine in the semi-arid region of Brazil. Few chemical and pharmacological studies have been conducted on this plant. Thus, the aim of this work is to expand the knowledge of the *Jatropha* genus by isolating and structurally characterizing the chemical constituents of *J. ribifolia* and assessing the cytotoxic potential of the isolated compounds through *silico* analyses. To achieve these main goals, the plant was collected in Maturéia, Paraíba Brazil, after that it was dried, and stabilized. The plant material was then extracted with hexane, and then with methanol. Fractionation of the hexane extract, using classical and instrumental chromatographic techniques, together with one- and two-dimensional NMR experiments, led to the identification of 17 compounds, seven of which are diterpenes previously unreported in the literature, named ribifolones A-G. Molecular docking experiments on apoptosis-related targets suggest that the structural modifications in ribifolones enhance cytotoxic activity compared to jatrophone, a compound with well-documented antitumor activity. *In vitro* studies will be conducted to confirm the activity of these new compounds. This work demonstrates the chemodiversity and opens new perspectives for the discovery of cytotoxic compounds from Euphorbiaceae species found in the Caatinga, particularly from the *Jatropha* genus.

Keywords: Terpenoids, phytochemicals, macrocyclic diterpenes

4.1 Introduction

Distributed across tropical and subtropical areas, *Jatropha* genus (Euphorbiaceae) includes approximately 175 species (Ramadan Hassanien, 2023). In Brazil, the semi-arid region is home to a diverse range of endemic species, many of which remains poorly investigated regarding their chemical and pharmacological potential. Among these plants, *Jatropha ribifolia* (Pohl) Baill. stands out as a promising species to the discovery of new bioactive compounds.

Conventionally known as “pinhão-mansô”, *J. ribifolia* latex is widely used throughout northeastern Brazil due to its antivenom activity. Moreover, its seeds are a source for oil production and are also used in veterinary fields as purgative. Previous studies led to the isolation of ten compounds such as coumarins, an orbitide-type peptide and terpenoids (Pinto et al., 2015). The genus *Jatropha* is an inestimable reservoir of diterpenes with remarkable cytotoxic activity. However, to date only jatrophone and 2-hydroxyjatrophone derivatives were reported in *J. ribifolia*.

For the last 40 years our research group have investigated the chemodiversity encompassed by Brazilian Caatinga unveiling its bioactivity. Therefore, the main goals of the current work were to isolate, characterize and evaluate the cytotoxic potential of new macrocyclic diterpenes from *J. ribifolia* by *in silico* analysis.

4.2 Materials and methods

4.2.1 General Experimental Procedures

Isolation and purification were performed by several chromatographic methods, including column chromatography (CC) and thin-layer chromatography (TLC). Silica gel (Silicycle, particle size of 0.040–0.063 mm) was used in CC. Commercial silica gel (Whatman) plates were used in TLC in layers with a thickness of 0.25 mm on an aluminum support (20 × 20 cm). The spots in TLC were analyzed by using ultraviolet radiation at wavelengths of 254 and 366 nm (Boitton brand apparatus). Additionally, a high-performance liquid chromatography (HPLC) apparatus coupled with photodiode array detectors

(PDA) was also applied, separations were carried out using analytical C₁₈ (YMC; 250 mm × 4.6 mm × 5 µm) and preparative C₁₈ (YMC; 250 mm × 21.2 mm × 5 µm) columns. The 1D and 2D NMR spectra were obtained using Bruker Avance III HD 400 MHz instrument. The residual nondeuterated solvent peaks were used as references.

4.2.2 Plant material

The botanical material of the species was collected in the city of Pocinhos-PB in March 2016 and identified by Prof. Maria de Fátima Agra. The voucher specimen was deposited at the Lauro Pires Xavier Herbarium (UFPB) under voucher number 123491. The access registration in the National System for the Management of Genetic Heritage and Associated Traditional Knowledge (SISGEN) was obtained under number A22E9B0.

4.2.3 Extraction and isolation

The underground parts were dried at room temperature for 72 hours, yielding 245.0 g. The botanical material was then ground and macerated with hexane (3 L) for 7 days, with this process repeated three times. The extract solutions were filtered and concentrated under reduced pressure at 40 °C, resulting in 2.53 g of hexane extract from the roots (JRRHx). After that the process of extraction was repeated with methanol, resulting in roots methanolic extract.

Initially, 2.45 g of JRRHx was subjected to column chromatography (CC) using silica gel 60 (0.063–0.2 mm) as the stationary phase. The extract was eluted with hexane, ethyl acetate, or binary mixtures in a gradient of increasing polarity; 150 mL were collected for each fraction, and the column was completed with pure methanol, yielding 33 fractions. The fractions were then analyzed by TLC, using plates eluted with a hexane and ethyl acetate gradient and visualized under UV light at 296 and 364 nm. Subsequently, the fractions were analyzed by analytical-scale HPLC with exploratory gradients ranging from 50% to 100% acetonitrile (ACN) and ultrapure water over 60 minutes. The fractions were also subjected to ¹H NMR analysis in CDCl₃-33. Fraction F9 (99.0 mg) showed a single peak on HPLC and was thus directly analyzed by NMR. The remaining fractions were grouped based on their similarity, resulting in the following sets: FR 3-5 (135.0 mg), FR 11-13 (352 mg), FR-15-16 (50 mg), FR-17 (28 mg, ungrouped), and FR-

20-22 (95 mg). All samples mentioned were subsequently subjected to exploration analyses on analytical HPLC and further fractionated on preparative-scale HPLC. The chromatographic conditions for each sample are provided in detail in the supplementary material, along with the respective chromatograms.

4.2.4 Molecular docking

The new compounds obtained, were modeled using MarvinSketch v.23.14. They were optimized using the semi-empirical MMFF method implemented in Spartan '14'. The crystallographic structure of three targets involved in apoptosis were retrieved from the Protein Data Bank (PDB) (Table 1). The RMSD values herein presented serve as parameters to quantify the similarity of the pose predicted by the software and the experimental pose of the ligand co-crystallized with the protein. Low RMSD values indicate proximity between the experimental and predicted poses (López-Camacho et al., 2016).

Table 1. Targets and ligands used in molecular docking

Target	PDB ID	Resolution	Ligand	RMSD
MAPK14	7BDO	2.70 Å	TBK	0.92
IKKB	4KIK	2.83 Å	KSA_700	0.23
NF-kB	1NFK	2.30 Å	-----	-----

Molegro Virtual Docker 6.0 was employed to perform molecular docking. All water molecules and cofactors were excluded from the workspace. Prior to molecular docking, a redocking step was conducted for the assessment of the accuracy and reliability of the docking results, and the Root Mean Square Deviation (RMSD) was calculated. RMSD is a crucial step to verify whether the algorithm was able to generate the same pose of the PDB file and values ≤ 2 Å are considered acceptable (Hevener et al., 2009).

The simulation was conducted using default parameters. The MolDock Score function was used to evaluate ligand poses, considering internal energy, hydrogen bonding, and torsional energy contributions. Twenty independent docking runs were performed using the MolDock SE algorithm, and the top poses were retained. A grid with a radius of 15 Å and a resolution of 0.30 Å was generated centered on the positions of the crystallographic ligands in the selected

proteins, with the exception of the NF- κ B whose crystallographic data does not include a crystallized ligand, the grid was generated based on the amino acid sequence found in the active site. The specific sequence was previously described (Piccagli et al., 2008). The docked poses were subsequently analyzed using Discovery Studio Visualizer. Jatrophone was used as positive control to compare the activity on the selected targets.

4.3 Results and discussion

From fractions FR 11-13 and FR 15-16, seven peaks displayed NMR data not reported in the literature, suggesting the possible presence of novel compounds. The ^1H and ^{13}C NMR analyses of compound 1 revealed twenty carbon signals in the ^{13}C NMR spectrum. Among them, signals at δC 212.4 and 202.7 were assigned to ketone and conjugated ketone carbonyl groups, respectively. Additionally, two olefinic carbon signals, four carbinolic carbons, two methylene carbons, and five methyl carbons were observed. In the ^1H NMR spectrum, methyl hydrogen signals appeared at δH 1.83 (d, $J = 1.3$ Hz), 1.16 (s), 1.13 (s), 1.13 (d, $J = 6.7$ Hz), and 1.11 (s). Olefinic hydrogen signals were detected at δH 5.63 (ql, $J = 1.3$ Hz), alongside oximethinic hydrogens at δH 4.06 (d, $J = 12.0$ Hz) and 3.34 (s). Analysis of the NMR data (Tables 1 and 2), combined with a comparison to literature data, identified compound 1 as a macrocyclic diterpene analogous to $9\beta,13\alpha$ -Dihydroxyisabellione. Differences between the compounds included the absence of olefinic signals at C-3 and C-4 and the presence of carbinolic signals at δC 75.5 (C-3) and 64.1 (C-4), indicating oxidation at these positions and the formation of an epoxide group. COSY, HSQC, and HMBC spectra confirmed the proposed structure, while NOESY spectra showed cross-peaks between H-3 $\rightarrow$ Me-16 $\rightarrow$ H-1 β ; H-9 $\rightarrow$ Me-18 $\rightarrow$ H-11 α $\rightarrow$ Me-20; and H-8 $\rightarrow$ Me-19. The compound was named Ribifolone A, a novel natural product.

Compound 2 exhibited twenty carbon signals in its ^{13}C NMR spectrum, including δC 206.8 and 199.8, attributed to ketone and conjugated ketone carbonyl groups, respectively. It also displayed four olefinic carbon signals and three carbinolic carbon signals, differentiating it from Ribifolone A. Additionally, two methylenic carbons and five methyl carbons were identified. In the ^1H NMR spectrum, methyl hydrogen signals were observed at δH 1.06 (d, $J = 5.6$), 1.98 (s),

1.22 (s), 0.94 (s), and 1.52 (s), with olefinic hydrogens at δ H 6.15 (d, $J = 2.0$) and 6.51 (s), and an oxymethine hydrogen at δ H 4.81 (t). The shared similarities between the NMR spectra of Ribifolone A, 9 β ,13 α -Dihydroxyisabellione, and compound 2 enabled its identification as a macrocyclic diterpene. Distinct differences included signals at δ C 91.1 (C-15) and δ C 91.2 (C-12), indicating lactone cleavage and the presence of two oxidized quaternary carbons. DEPT-135 analysis, coupled with COSY, HSQC, and HMBC experiments, and a comparison with the literature, confirmed that compound 2 is a new diterpene, named Ribifolone B.

Compound 3 featured twenty carbon signals in its ^{13}C NMR spectrum, with δ C 204.4 and 202.3 attributed to ketone and conjugated ketone carbonyl groups, respectively. The spectrum also showed two methylenic carbons, eight olefinic carbons, and five methyl carbons. In the ^1H NMR spectrum, methyl hydrogen signals were observed at δ H 1.95 (s), 1.33 (s), 1.21 (s), and 1.73 (s). Olefinic hydrogens were identified at δ H 6.11 (bs), 6.10 (s), 6.00 (d, $J = 13.2$ Hz), and 6.5 (d, $J = 13.2$ Hz). The absence of oximethinic proton signals and the presence of olefinic signals suggested a higher degree of conjugation, distinct from Ribifolones A and B. Comparison of ^1H and ^{13}C NMR data with literature indicated structural similarities to jatrophone. Notable differences included a signal at δ C 93.4 (C-4), indicative of oxidation, and δ H 1.65 (s), attributed to an additional methyl group on a double bond. Bidimensional NMR experiments (COSY, HSQC, and HMBC) corroborated the findings, identifying compound 3 as a new diterpene named Ribifolone C.

Compound 4 displayed twenty carbon signals in its ^{13}C NMR spectrum, including three carbonyl signals at δ C 214.7, 211.5, and 211.2, corresponding to two ketones and one conjugated ketone. Additionally, olefinic carbon signals were detected at δ C 139.1 and 129.1. These signals suggested a unique skeletal structure compared to the previous compounds. Analysis of the spectroscopic data, supplemented by a comparison with the literature, revealed that compound 4 closely resembled citlalitrione, with differences in the signals for carbons C-3, C-4, and Me-16 (Table 2). Stereochemical inversions of the epoxide between C-3 and C-4, as well as the methyl group Me-16, were proposed. The NOESY spectrum confirmed these inversions, showing cross-peaks between H-3 and Me-16.

Consequently, compound 4 was identified as a novel diterpene, named Ribifolone D.

Compound 5 exhibited ^1H and ^{13}C NMR spectra similar to jatrophone. The ^{13}C NMR spectrum revealed twenty carbon signals, including δC 204.3 and 201.3, corresponding to conjugated ketone carbonyl groups. Additionally, six olefinic carbon signals were observed between δC 112.2 and 185.3. Analysis of the NMR data (Tables 1 and 2), along with comparisons to the literature, showed that the main difference between Ribifolone E and jatrophone was the absence of olefinic signals at C-3 and C-4 (reported for jatrophone) and the presence of carbinolic signals at δC 69.1 (C-3) and 67.1 (C-4). This indicated oxidation at these positions and the formation of an epoxide group. COSY, HSQC, and HMBC spectra confirmed this substitution, while NOESY spectra showed cross-peaks between $\text{H-3} \rightarrow \text{Me-16} \rightarrow \text{H-1}\beta$; $\text{H-9} \rightarrow \text{Me-18} \rightarrow \text{H-11}\alpha \rightarrow \text{Me-20}$; and $\text{H-8} \rightarrow \text{Me-19}$. These findings led to the identification of Ribifolone E, a novel macrocyclic diterpene.

Compound 6 exhibited twenty carbon signals in its ^{13}C NMR spectrum, including δC 203.2 and 201.9, corresponding to two conjugated ketone carbonyl groups. Additionally, ten olefinic carbon signals and four methyl carbon signals were observed. The ^1H NMR spectrum displayed four methyl hydrogen signals at δH 1.98 (d, $J = 0.8$), 1.23 (s), 1.36 (s), and 1.77 (s). These data suggested a resemblance to jatrophone. Differences between compound 6 and jatrophone were indicated by signals at δC 148.9 (C-2) and δC 109.6 (C-16), suggesting the presence of an exocyclic double bond. This was supported by hydrogen signals at δH 5.10 (s) and 5.25 (bs). COSY, HSQC, and HMBC analyses reinforced this structural proposal. For instance, HMBC contour maps showed correlations between δH 5.1 and 5.2 with δC 138.9 (C-3) and 37.1 (C-1). Thus, compound 6 was identified as a new *Jatrophane* diterpene, named Ribifolone F.

Compound 7 displayed twenty carbon signals in its ^{13}C NMR spectrum, including three carbonyl signals at δC 214.7, 211.3, and 209.1, corresponding to two ketones and one conjugated ketone. These findings suggested a resemblance to Ribifolone D, a cyclo*Jatrophane*. The distinction between compound 7 and the previously identified substance was observed in four olefinic carbon signals at δC 125.2 (C-5), 143.6 (C-6), 143.0 (C-4), and 139.7 (C-5), the absence of a carbinolic

hydrogen signal at δ H 3.4 (C-15), and differences in the chemical shift of the oxymethine proton from δ H 3.16 (s) to δ H 4.27 (d, $J = 4.0$). The shift in the C-3 carbon signal from δ C 65.8 to δ C 86.9 further supported this distinction. These findings were confirmed by COSY, HSQC, HMBC, and NOESY analyses. Consequently, compound 7 was identified as a novel natural product named Ribifolone G. Figure 1 presents the structures of the new compounds, and the ^1H and ^{13}C NMR data are summarized in Tables 1 and 2.

Figure 1. Structure of Ribifolones A-G

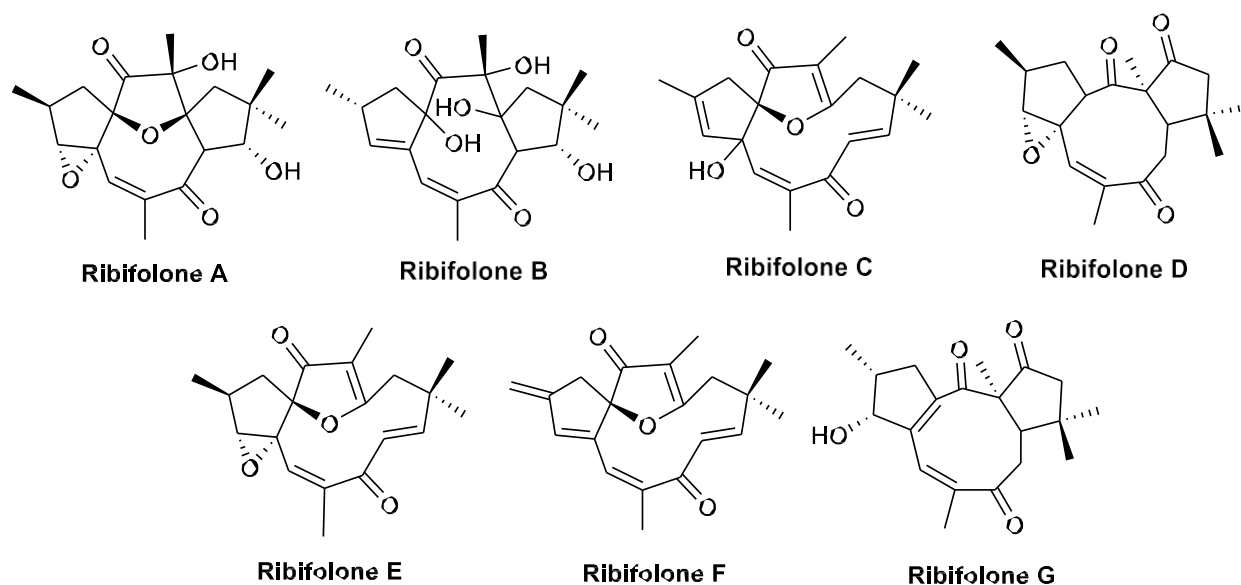


Table 2. ¹H NMR data at 400 MHz (CDCl₃) for Ribifolones A-G (J in Hz).

	Rib A	Rib B	Rib C	Rib D	Rib E	Rib F	Rib G
No.	δ_H	δ_H	δ_H	δ_H	δ_H	δ_H	δ_H
1 α	2,22 dd (14,4; 8,4)	2,43 m	2.6 d (12)	1,24 d (13,3)	1,67 m	2,99 t	2,71 m
1 β	1,89 d (14,4)	2,11 d (4,4; 4,4)	2.2 d (12)	1,64-1,54 m	2,04 dd (14,3; 8,3)	2,83 m	2,11 m
2	2,38 m	2,99 m	-	2,12-2,06 m	2,48 m	-	2.12-2,08 m
3	3,34 s	6.15 d (2,0)	6.11 bs	3,16 sl	3,03 s	6.6 s	4,27 d (4,0)
4	-	-	-	-	-	-	-
5	5,63 ql (1,3)	6,51 s	6.10 s	5,24 ql (1,6)	5,74 dd (3,22, 1,6)	6.3 s	5.99 s
6	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-
8	3,82 d (11,3)	3,31 d (1,6)	6,0 d (13,2)	2,56-2,50 m	6,23 d (16,5)	6,01 d (12,0)	2,78 d 2,81 d (1,6)
9	4,05 d (11,3)	4,81 t	6,5 d (13,2)	2,84 dd (10,0; 1,7)	6,41 d (16,5)	6,54 d (12,0)	2,59 d (2,0) (5,0)
10	-	-	-	-	-	-	-
11 α	2,13 d (15,3)	2,30 dd (1,6; 1,6)	2,7 d (12,0)	2,43 d (16,0)	2,48 dd (0,8; 0,8)	2,80 m	2,49 d (10,8)
11 β	1,86 d (15,3)	2,60 d (13,6)	2,4 d (12,0)	2,24 d (16,0)	2,86 d (14,8)	2,50 m	2.23 d (12,8)
12	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	3,41 dd (10,0; 7,5)	-	-	-
16	1,12 d (6,6)	1.06 d (5,6)	1,65 s	1,05 d (7,5)	1,20 d (7,6)	5,10 s 5,25 bs	1,14 d (5,2)
17	1,83 d (1,3)	1,98 s	1,95 s	1,90 d (1,6)	1,83 d (1,5)	1,98 d (0,8)	1,95 s
18	1,11 s	1,22 s	1,33 s	0,84 s	1,22 s	1,23 s	0,88
19	1,13 s	0,94 s	1,21 s	1,21 s	1,41 s	1,36 s	1,28
20	1,16 s	1,52 s	1,73 s	1,34 s	1,70 d (0,7)	1,77 s	1,32 s

Table 3. ^{13}C NMR data at 100 MHz (CDCl_3) for Ribifolones A-G.

	Rib A	Rib B	Rib C	Rib D	Rib E	Rib F	Rib G
No.	δ_{C}	δ_{C}	δ_{C}	δ_{C}	δ_{C}	δ_{C}	δ_{C}
1	44,4	46,0	41,5	33,6	37,6	37,1	41.6
2	31,0	37,0	139,0	34,9	33,2	148,9	43.0
3	75,6	148,9	136,2	65,8	69,2	135,9	86.9
4	64,0	140,8	93,9	66,8	68,4	142,1	143.0
5	131,4	127,3	136,3	129,1	122,9	137,2	125.2
6	143,5	137,7	143,9	139,1	142,3	142,2	143.6
7	202,7	199,8	202,3	211,2	201,3	201,9	209.1
8	66,5	66,9	128,7	38,8	129,7	128,3	38.9
9	79,9	80,8	158,6	49,2	158,3	157,7	51.1
10	37,2	37,8	40,9	37,6	36,7	40,8	37.4
11	43,2	48,9	43,3	55,2	41,7	43,2	55.4
12	77,6	91,1	185,6	214,7	185,3	185,3	214.7
13	87,0	88,0	113,4	64,0	112,2	113,1	64.2
14	212,4	206,8	204,4	211,5	204,4	203,2	211.3
15	89,4	91.0	97,7	45,6	94,8	98,5	139.7
16	16,5	20.4	24,2	14,9	17,2	109,6	18.2
17	22,3	20.7	13,3	21,2	21,4	13,1	19.2
18	27,6	25.3	30,4	27,6	30,8	30,3	27.3
19	22,1	28.0	26,5	23,6	27,2	26,3	23.6
20	14,0	17,3	7,3	14,2	6,1	7,2	14.5

In recent research paper the authors demonstrated the involvement of NF- κ B pathway to arrest cancer cells proliferation in the in a triple resistant lineage of breast cancer treated with jatrophone (Shari et al., 2023). Based on that, and considering the structural similarities of Ribifolones with jatrophone, after characterized the compounds, *in silico* analysis were carried out by Molecular docking. In the current study NF- κ B and other two apoptosis related targets were selected. This analysis may shed light over the cytotoxic potential of the new compounds.

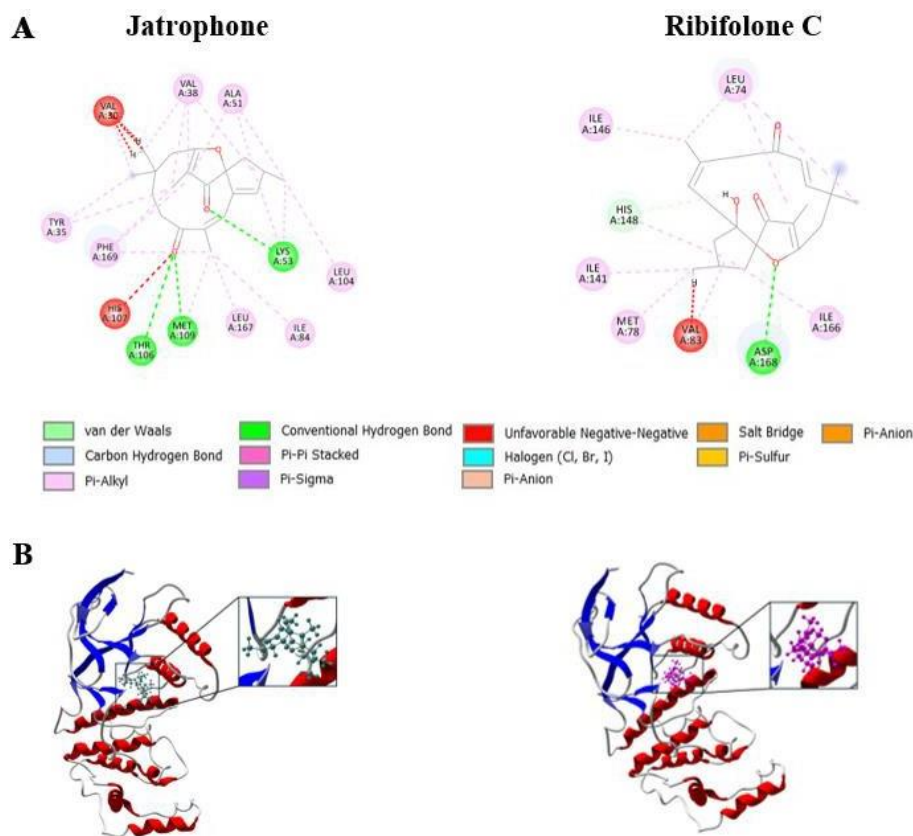
The results of molecular docking follow summarized in Table 3. They provide estimations of the binding energies for complexes formed between the ligands and the selected molecular targets. Negative binding energy values suggest more stable complexes (Prieto-Martínez et al., 2018).

Table 4. Binding energy for complexes formed between the ligands.

Target	PDB ID	Ligands	Moldock Score
MAPK14	7BDQ	Jatrophone	-106.09
		Ribifolone A	-113.74
		Ribifolone B	-118.76
		Ribifolone C	-126.74
		Ribifolone D	-118.88
		Ribifolone E	-112.01
		Ribifolone F	-107.40
		Ribifolone G	-125.78
IKK β	8DC7	Jatrophone	-87.51
		Ribifolone A	-73.88
		Ribifolone B	-105.33
		Ribifolone C	-102.55
		Ribifolone D	-96.97
		Ribifolone E	-81.08
		Ribifolone F	-88.85
		Ribifolone G	-93.81
NF- κ B	1QTN	Jatrophone	102.76
		Ribifolone A	-104.89
		Ribifolone B	-104.89
		Ribifolone C	-109.63
		Ribifolone D	-111.39
		Ribifolone E	-104.00
		Ribifolone F	-102.76
		Ribifolone G	-110.38

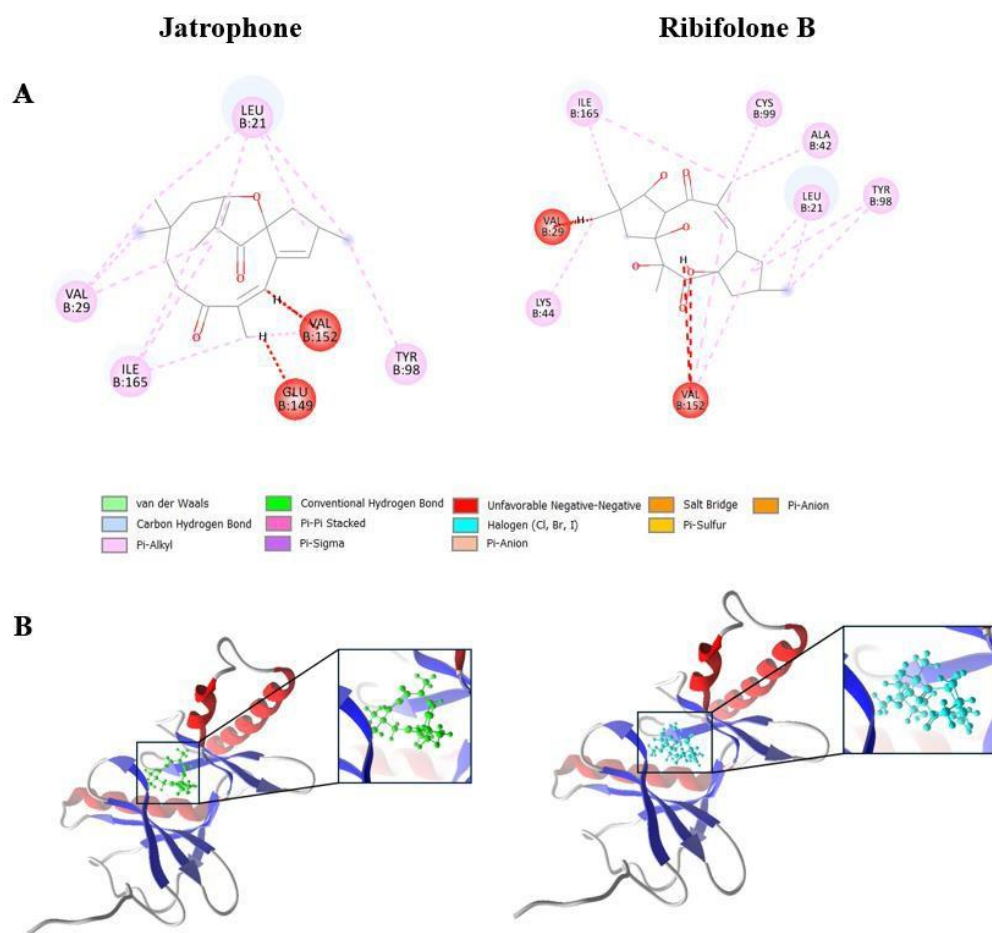
After obtained the energies values were analyzed to identify the best molecules fit and estimated the most promising compounds. The first analysis was MAPK14. The analysis of the complex formed with, and Ribifolone C exhibited a significantly lower MolDock Score (-126.73) compared to the complex formed between the protein and Jatrophone (-105.54) (Röhm et al., 2021). This finding suggests that Ribifolone C binds to the MAPK14 receptor with a substantially higher affinity than the positive control Jatrophone. The lowest score presented by the interaction with Ribifolone C may be related to the lower number of Unfavorable Negative-Negative interactions. The interactions are visualized in Figure 2A, the three-dimensional spatial arrangement of the ligands in relation to the enzyme is depicted in Figure 2B.

Figure 2. Interactions of Ribifolone C and the molecular target MAPK14. A- Amino acids involved in complexes formed between ligand and target. B. three-dimensional spatial arrangement of jatrophone and Ribifolone C.



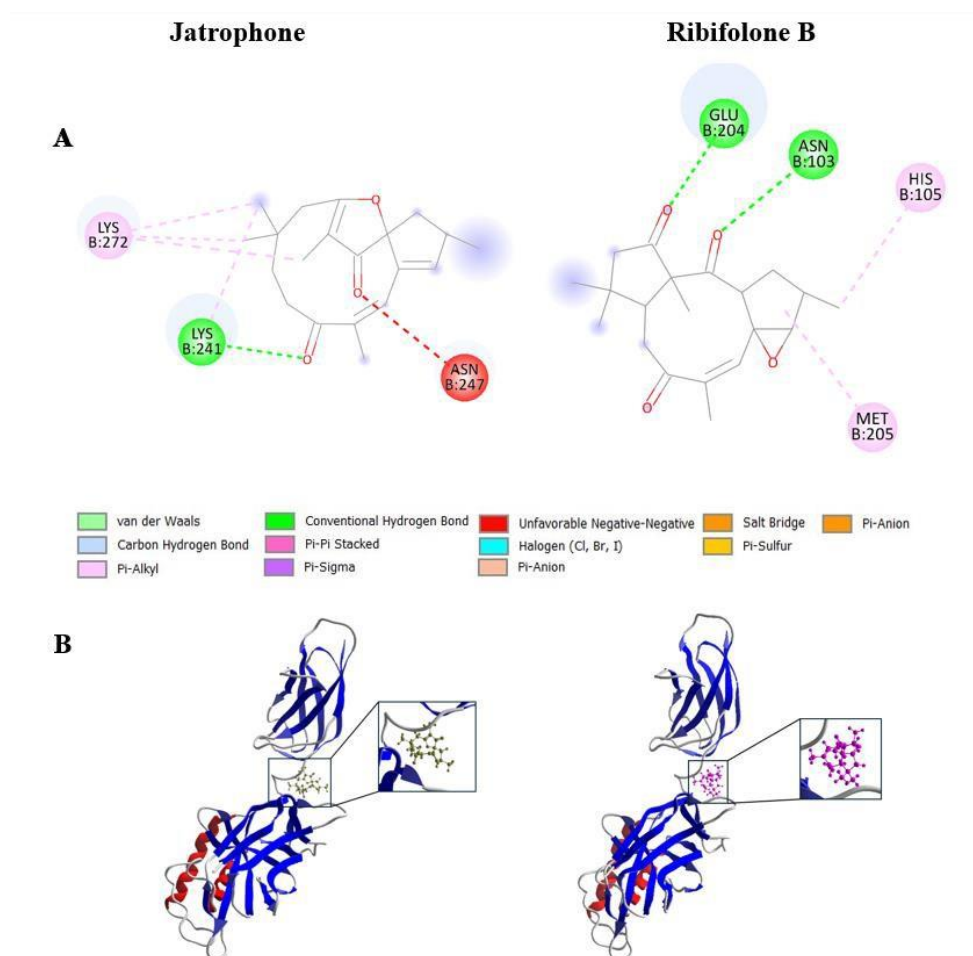
Concerning to the second target, the protein IKKB, the analysis revealed the complex formed with and Ribifolone B exhibited a significantly lower MolDock Score (-105.33) compared to the complex formed with jatrophone (-87.51) (Liu et al., 2013). This result suggests Ribifolone B binds to the receptor with a substantially higher affinity than the control molecule. The lower score observed might be associated to the higher number of sites able to interact by means of Pi-alkyl with amino acid residues. These interactions follow represented below in Figure 3A, and the position of the ligand in three dimensions is represented in Figure 3B.

Figure 3. Interactions of Ribifolone B and IKKB. In A. Amino acids involved in complexes formed with IKKB are visualized by a 2D plot. In B three-dimensional spatial arrangement.

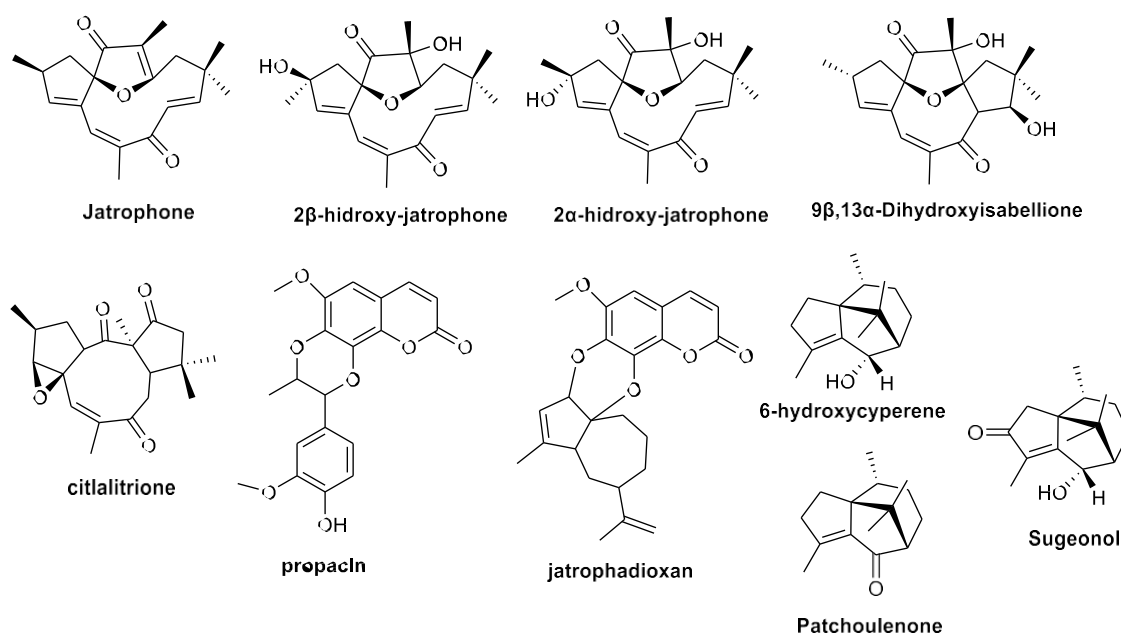


The results for the last target, NF- κ B, revealed better values of energy to the complex with Ribifolone D whose MolDock Score (-111.39) was the lowest, taking as reference the complex of NF- κ B and Jatrophone (-102.76) (Ghosh et al., 1995). The results indicate Ribifolone D shows higher affinity to the target than the control molecule. The lower score values of Ribifolone D complex may be explained by the absence of Unfavorable Negative-Negative interactions and the higher number of hydrogen interactions formed with the aminoacid residues. These interactions are depicted in Figure 4.

Figure 4. Interactions of Ribifolone B and NF-kB. In A, Amino acids are involved in complexes formed between Ribifolone B and NF-kB. In B. Three-dimensional representation of the interaction of micro and macromolecules.



In addition to the ribifolones, the purification of other fractions resulted in the isolation of 10 compounds. After comparison of the ^1H and ^{13}C data with literature, jatrophone, $9\beta,13\alpha$ -dihydroxyisabellione, 2α - and 2β -hydroxyjatrophone, citlaltione, 6-hydroxycyperene, patchoulone, sugeonol, propacin, and *Jatrophadioxan* were identified. Figure 5 represents the structure of the additional isolated compounds in the present study.



4.4 Conclusion

The present work unveils the chemodiversity of *Jatropha ribifolia*, leading to the identification of seven novel diterpenes, ribifolones A-G, through uni and bidimensional NMR techniques. The structural elucidation followed by in silico analysis revealed enhanced cytotoxic potential of these compounds through three apoptosis-related molecular targets, when compared to jatrophone a known antitumoral *Jatropha* diterpene. Further experiments are required to comprehensively characterize these new compounds, in vitro investigations are also warranted to validate the antitumor activity of the ribifolones and advance with their development as therapeutic agents. These findings contribute to expand the knowledge about *Jatropha* genus and highlights the importance to preserve and study Euphorbiaceous species occurring in Brazilian semiarid region.

References

- Fernandes, E. de S., Rodrigues, F. A., Tófoli, D., Imamura, P. M., de Carvalho, J. E., Ruiz, A. L. T. G., Foglio, M. A., Minguzzi, S., & Silva, R. C. L. (2013). Isolation, structural identification and cytotoxic activity of hexanic extract, cyperenoic acid, and jatrophone terpenes from *Jatropha ribifolia* roots. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 23(3), 441–446. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2013005000026>
- Ghosh, G., Duyne, G. Van, Ghosh, S., & Sigler, P. B. (1995). Structure of NF- κ B p50 homodimer bound to a κ B site. *Nature*, 373(6512), 303–310. <https://doi.org/10.1038/373303a0>
- Hevener, K. E., Zhao, W., Ball, D. M., Babaoglu, K., Qi, J., White, S. W., & Lee, R. E. (2009). Validation of Molecular Docking Programs for Virtual Screening against Dihydropteroate Synthase. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 49(2), 444–460. <https://doi.org/10.1021/ci800293n>
- Hikino, H., Aota, k., Takemoto, T. (1968). Structure and Absolute Configuration of Sugeonol. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 16(1), 52–55. <https://doi.org/10.1248/cpb.16.52>
- Liu, S., Misquitta, Y. R., Olland, A., Johnson, M. A., Kelleher, K. S., Kriz, R., Lin, L. L., Stahl, M., & Mosyak, L. (2013). Crystal Structure of a Human I κ B Kinase β Asymmetric Dimer. *Journal of Biological Chemistry*, 288(31), 22758–22767. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.482596>
- López-Camacho, E., García-Godoy, M. J., García-Nieto, J., Nebro, A. J., & Aldana-Montes, J. F. (2016). A New Multi-objective Approach for Molecular Docking Based on RMSD and Binding Energy (pp. 65–77). https://doi.org/10.1007/978-3-319-38827-4_6
- Pertino, M., Schmeda-Hirschmann, G., Rodríguez, J. A., & Theoduloz, C. (2007). Gastroprotective effect and cytotoxicity of terpenes from the Paraguayan crude drug “yagua rova” (*Jatropha isabelli*). *Journal of Ethnopharmacology*, 111(3), 553–559. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.01.003>
- Piccagli, L., Fabbri, E., Borgatti, M., Bezzerri, V., Mancini, I., Nicolis, E., Dehecchi, M. C., Lampronti, I., Cabrini, G., & Gambari, R. (2008). Docking of molecules

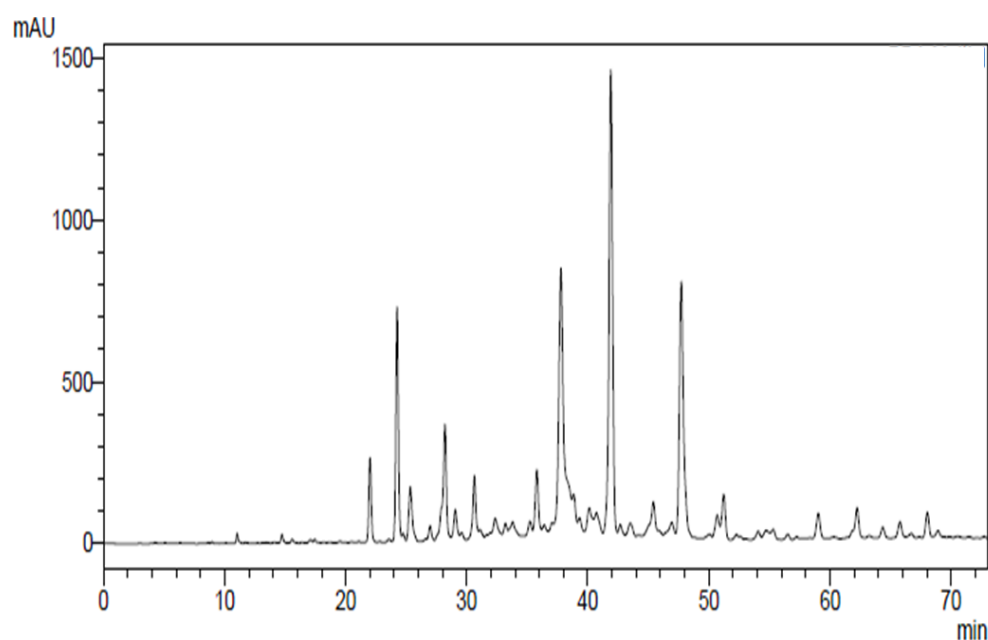
- identified in bioactive medicinal plants extracts into the p50 NF-kappaB transcription factor: correlation with inhibition of NF-kappaB/DNA interactions and inhibitory effects on IL-8 gene expression. *BMC Structural Biology*, 8(1), 38. <https://doi.org/10.1186/1472-6807-8-38>
- Pinto, M. E. F., Batista, J. M., Koehbach, J., Gaur, P., Sharma, A., Nakabashi, M., Cilli, E. M., Giesel, G. M., Verli, H., Gruber, C. W., Blanch, E. W., Tavares, J. F., Silva, M. S. da, Garcia, C. R. S., & Bolzani, V. S. (2015). Ribifolin, an Orbitide from *Jatropha ribifolia*, and Its Potential Antimalarial Activity. *Journal of Natural Products*, 78(3), 374–380. <https://doi.org/10.1021/np5007668>
- Prieto-Martínez, F. D., Arciniega, M., & Medina-Franco, J. L. (2018). Acoplamiento Molecular: Avances Recientes y Retos. *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 21. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2018.0.143>
- Ramadan Hassanien, M. F. (2023). *Bioactive Phytochemicals from Jatropha (Jatropha curcas L.) Oil Processing By-products* (pp. 485–503). https://doi.org/10.1007/978-3-030-91381-6_22
- Röhm, S., Berger, B.-T., Schröder, M., Chatterjee, D., Mathea, S., Joerger, A. C., Pinkas, D. M., Bufton, J. C., Tjaden, A., Kovooru, L., Kudolo, M., Pohl, C., Bullock, A. N., Müller, S., Laufer, S., & Knapp, S. (2021). Development of a Selective Dual Discoidin Domain Receptor (DDR)/p38 Kinase Chemical Probe. *Journal of Medicinal Chemistry*, 64(18), 13451–13474. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c00868>
- Shari, K., El Gedaily, R. A., Allam, R. M., Meselhy, K. M., Khaleel, A. E., & Abdel-Sattar, E. (2023). Jatrophone: a cytotoxic macrocyclic diterpene targeting PI3K/AKT/NF-κB pathway, inducing apoptosis and autophagy in resistant breast cancer cells. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 23(1), 293. <https://doi.org/10.1186/s12906-023-04113-6>
- Yang, J., Long, Y. O., & Paquette, L. A. (2003). Concise Total Syntheses of the Bioactive Mesotricyclic Diterpenoids *Jatrophatrione* and *Citlaltione*. *Journal of the American Chemical Society*, 125(6), 1567–1574. <https://doi.org/10.1021/ja021177r>

Supporting information

Ribifolones A-G, new diterpenes with cytotoxic potential isolated from *Jatropha ribifolia* (Pohl) Baill -(Euphorbiaceae)

Thalisson Amorim de Souza¹, Thiago Araújo de Medeiros Brito¹, Adiel Henrique de Oliveira Pontes¹, Maria de Fátima Agra, Marcus Tullius Scotti¹, Lucas Silva Abreu³, Josean Fachine Tavares¹, Marcelo Sobral da Silva¹.

Figure 1. Chromatograms and chromatographic methods for the fraction groups:



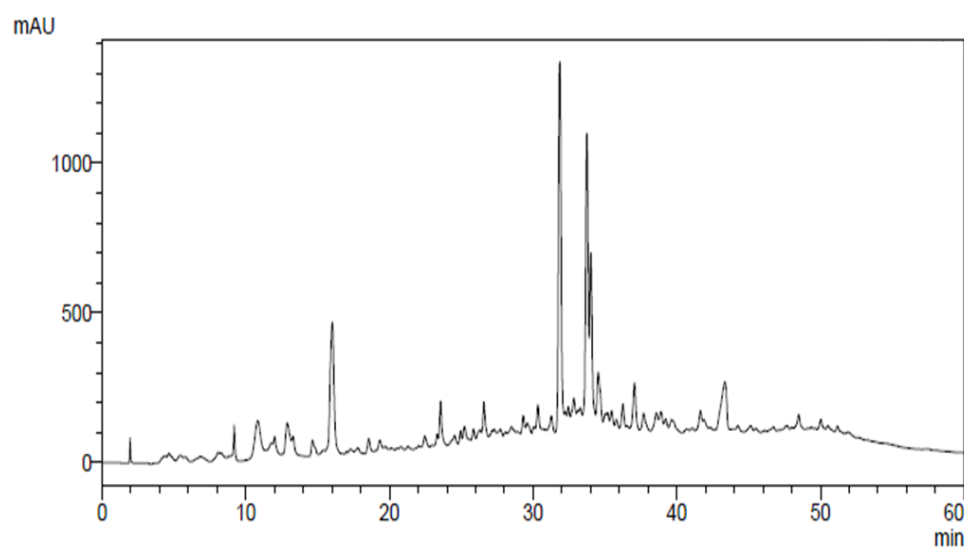
FR 13-14

***Method:**

-35% to 100% Acetonitrile in 75 min-

*Injection volume 100 microliters

*Flow rate 8ml per min



FR 15-16

***Method:**

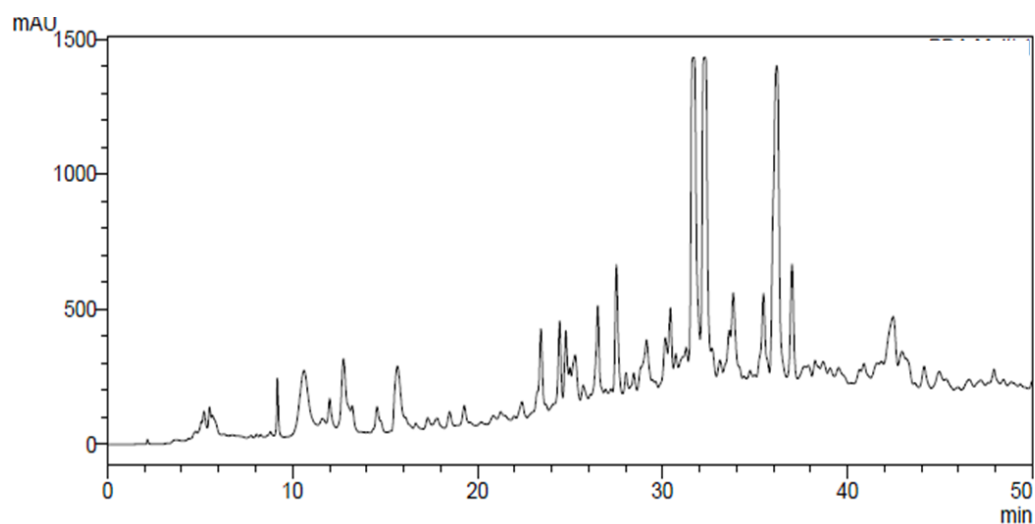
-10% to 80% Acetonitrile in 40 min

-80% to 100% Acetonitrile in 5 min

-100% acetonitrile for 15min

*Injection volume 100 microliters

*Flow rate 8ml per min

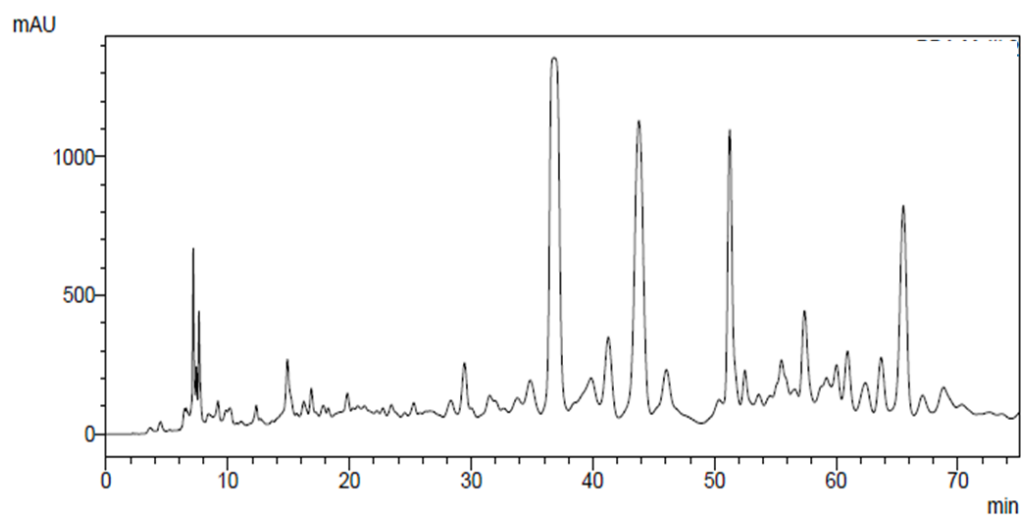


FR 17

***Method:**

-10% to 80% Acetonitrile in 40 min
 -80% to 100% Acetonitrile in 5 min
 -100% acetonitrile for 10min

*Injection volume 100 microliters
 *Flow rate 8ml per min



FR 20-23

***Method:**

-35% Acetonitrile for 40 min
 -35% to 45% Acetonitrile in 5 min
 -45% Acetonitrile up to min 75

*Injection volume 100 microliters
 *Flow rate 8ml per min

***NMR data**

Figure 2. ^1H spectrum of Ribifolone A, 400MHz in CDCl_3 .

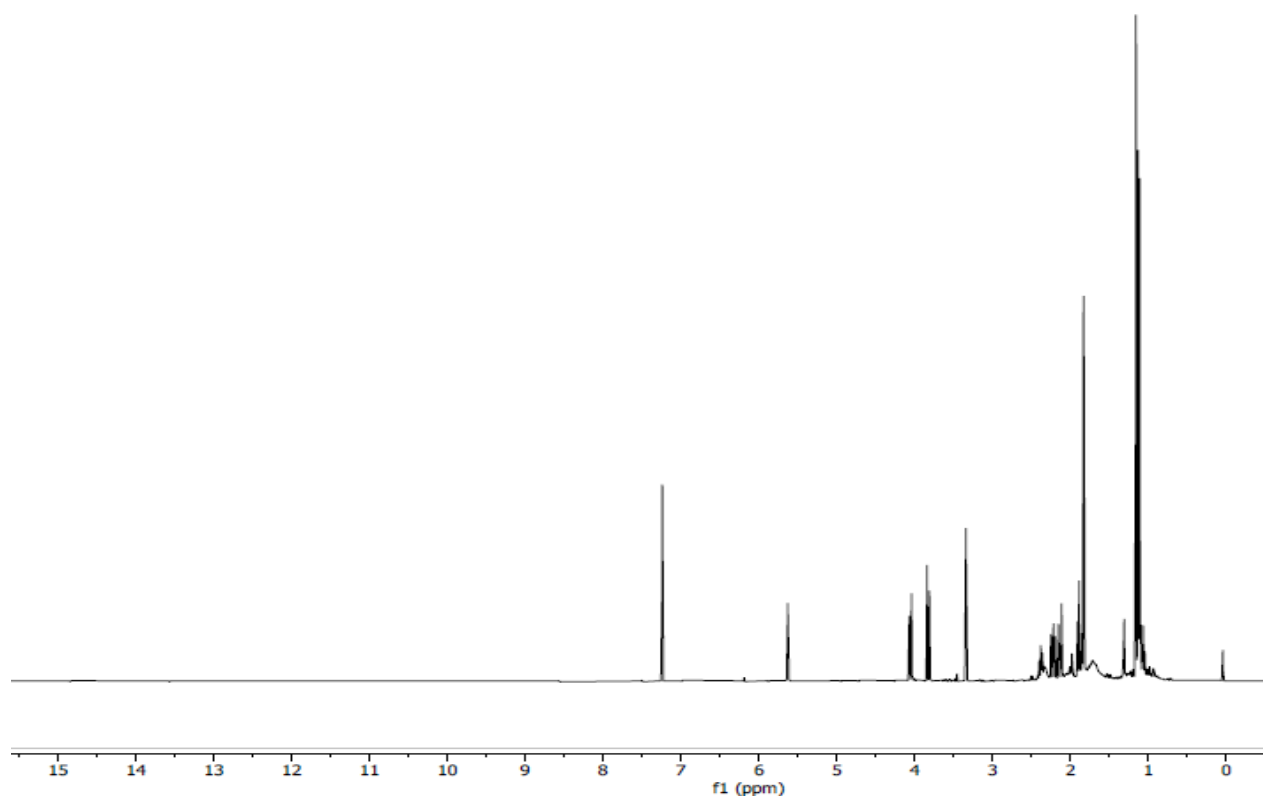


Figure 3. Expansion of ^1H spectrum of Ribifolone A, 400MHz in CDCl_3 .

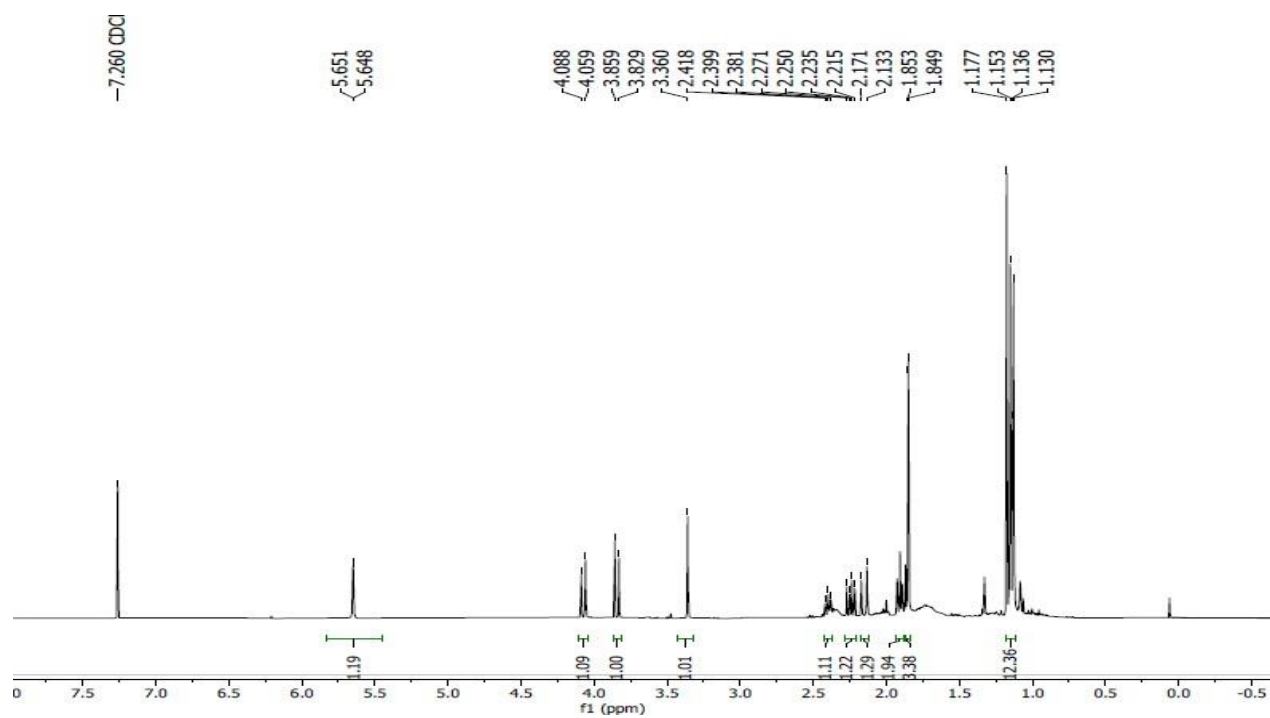


Figure 4. Expansion of ^1H spectrum of Ribifolone A, 400MHz in CDCl_3 (0.9-2.6ppm).

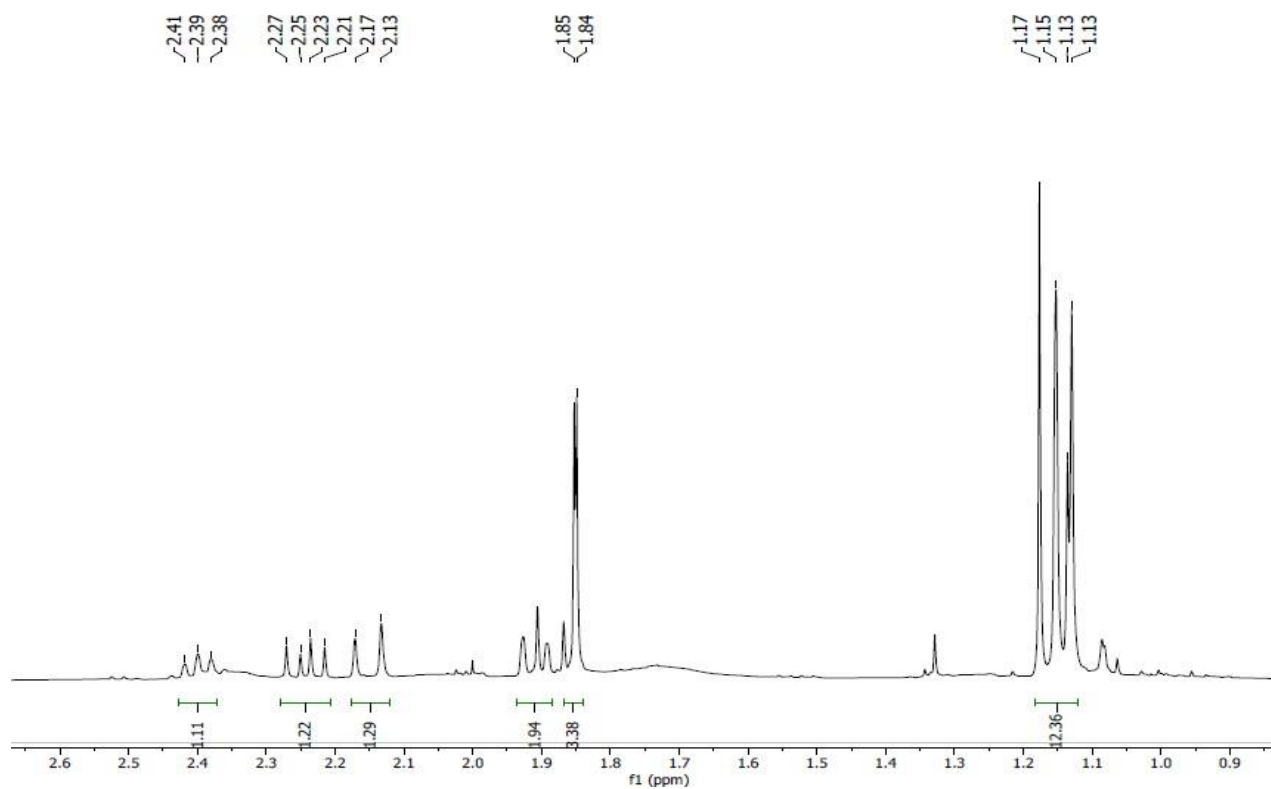


Figure 5. Expansion of ^1H spectrum of Ribifolone A, 400MHz in CDCl_3 (3.1-5.9 ppm).

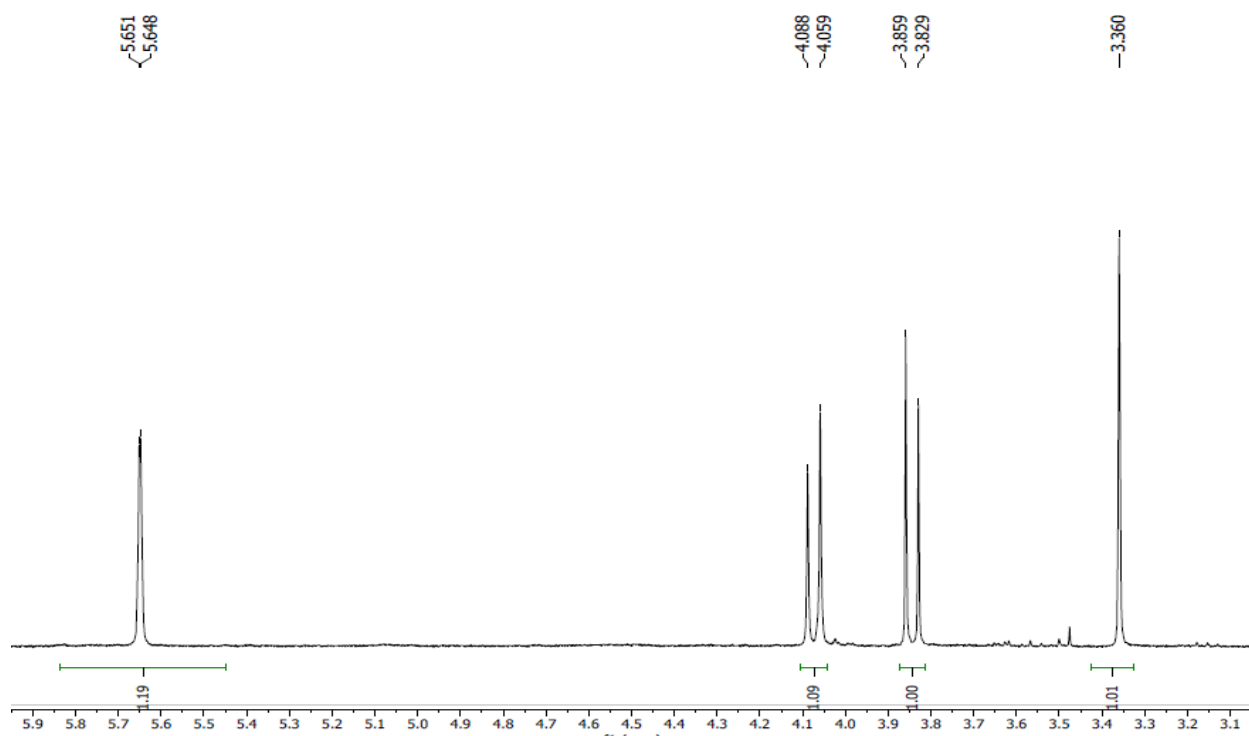


Figure 6. ^{13}C spectrum of Ribifolone A, 400MHz in CDCl_3 .

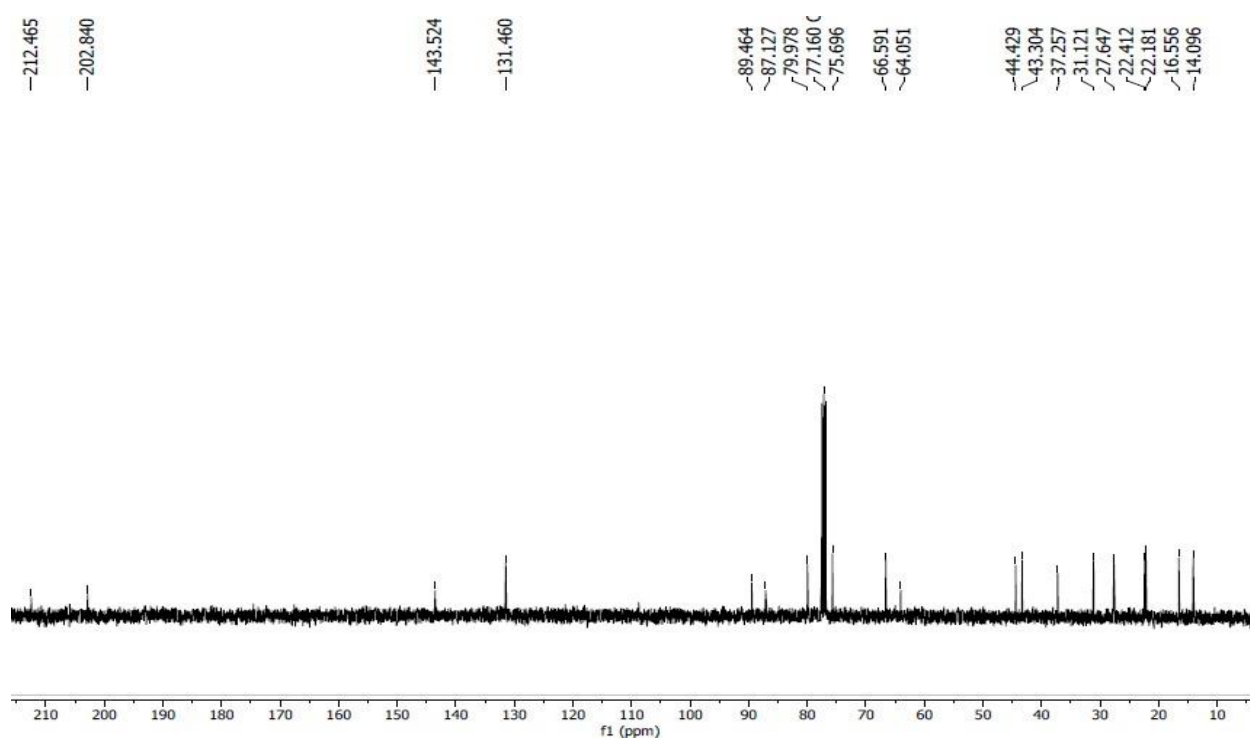


Figure 7. Dept spectrum of Ribifolone A, 400MHz in CDCl_3 .

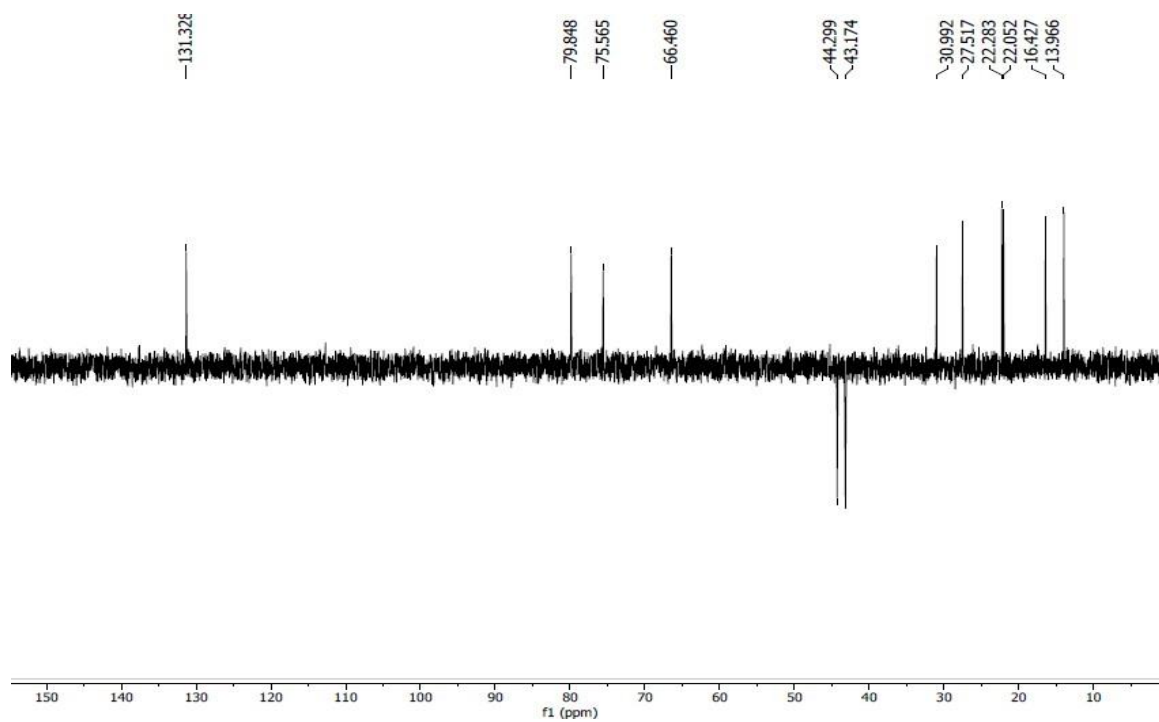


Figure 8. Cosy spectrum of Ribifolone A, 400MHz in CDCl₃.

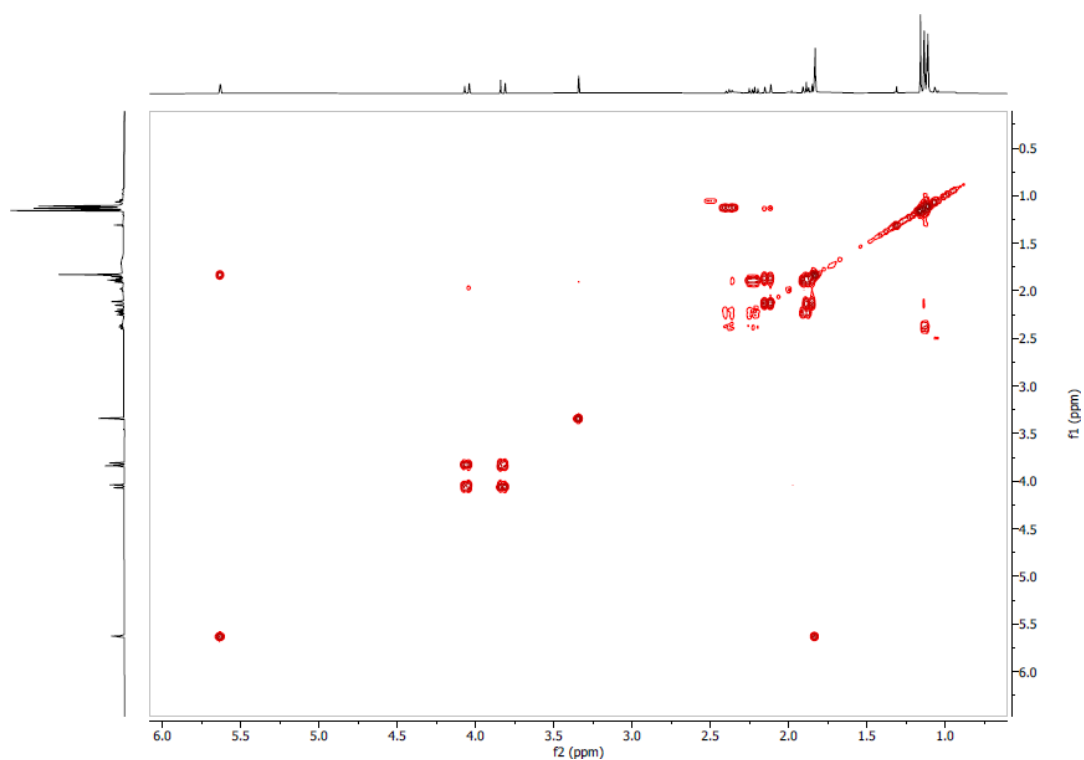


Figure 9. HMBC contour map of Ribifolone A, 400MHz in CDCl₃.

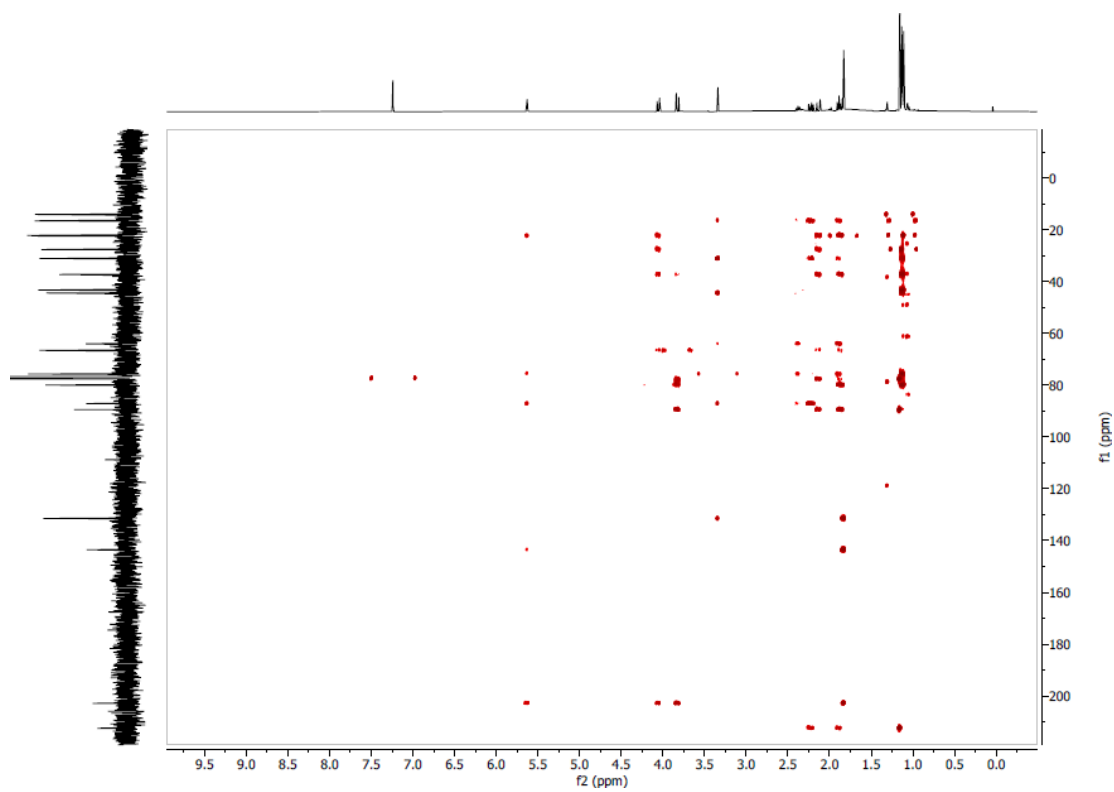


Figure 10. HSQC contour map of Ribifolone A, 400MHz in CDCl₃.

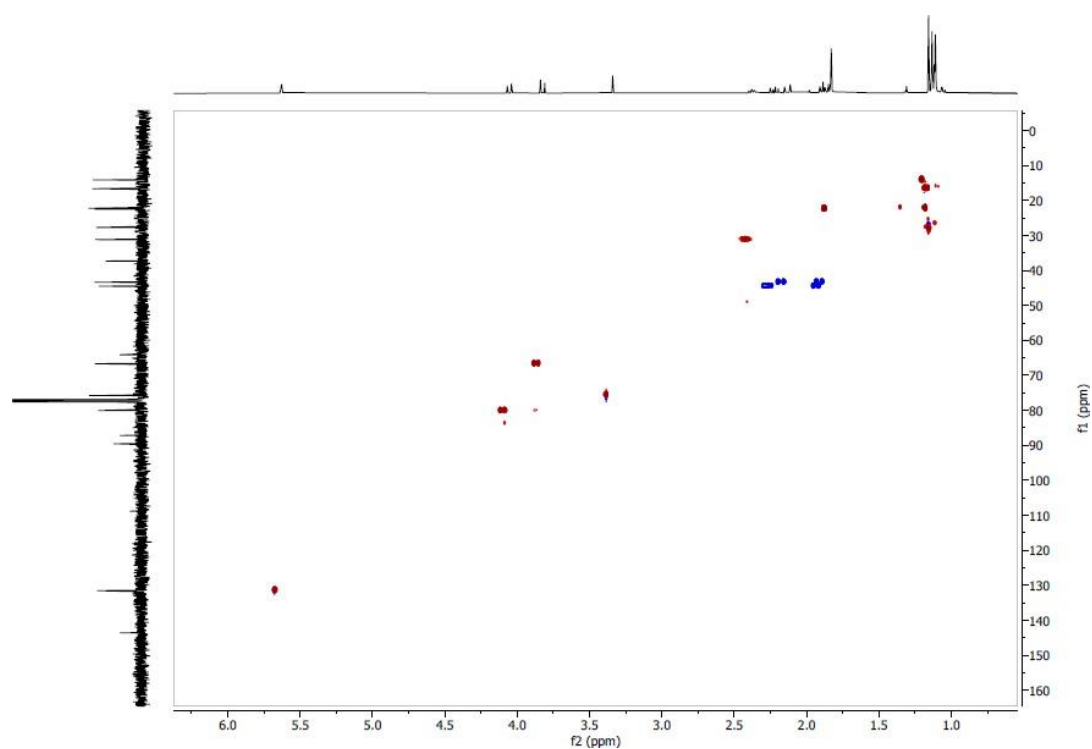


Figure 11. Noesy spectrum of Ribifolone A, 400MHz in CDCl₃.

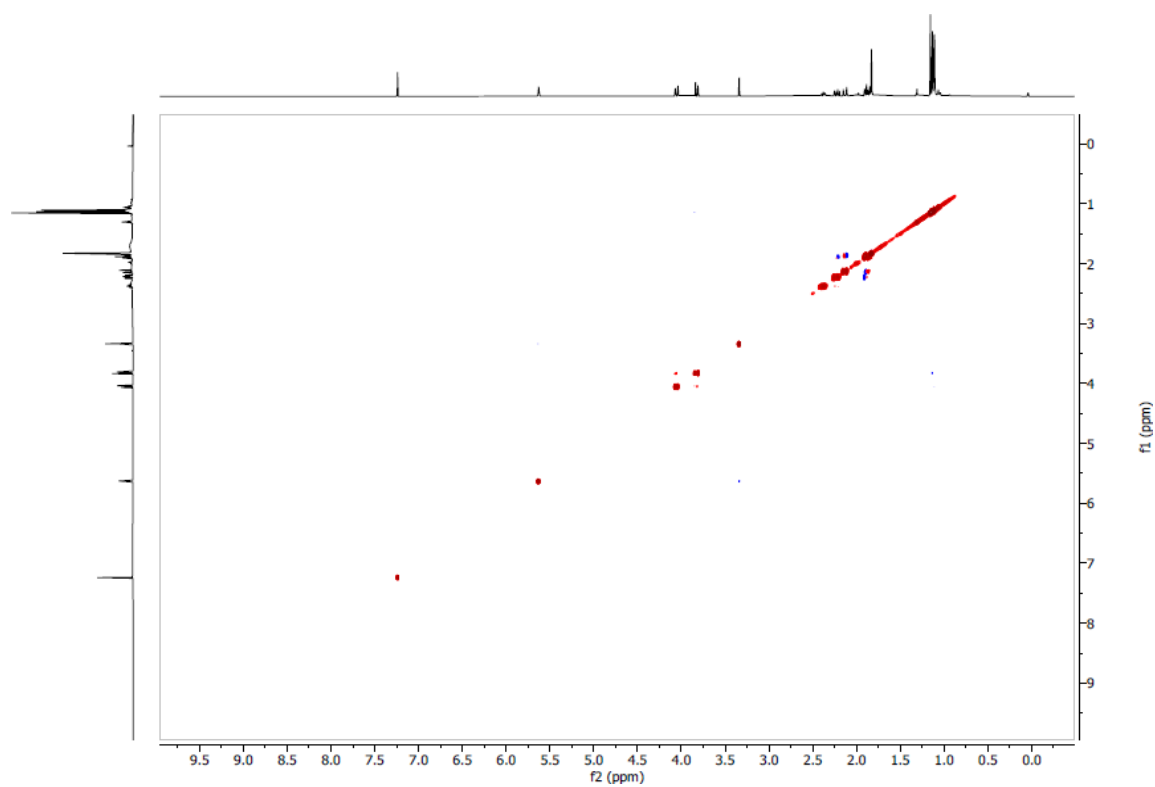


Figure 12. Noesy spectrum expansion of Ribifolone A, 400MHz in CDCl₃.

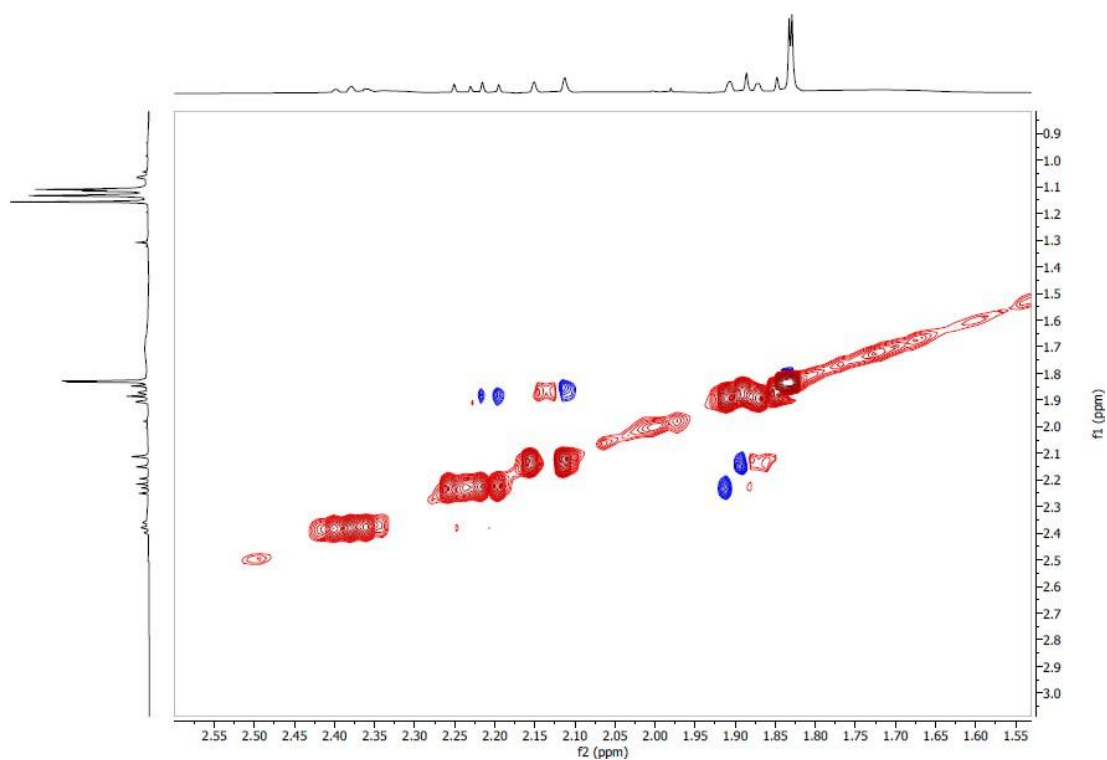


Figure 13. ¹H spectrum of Ribifolone B, 400MHz in CDCl₃.

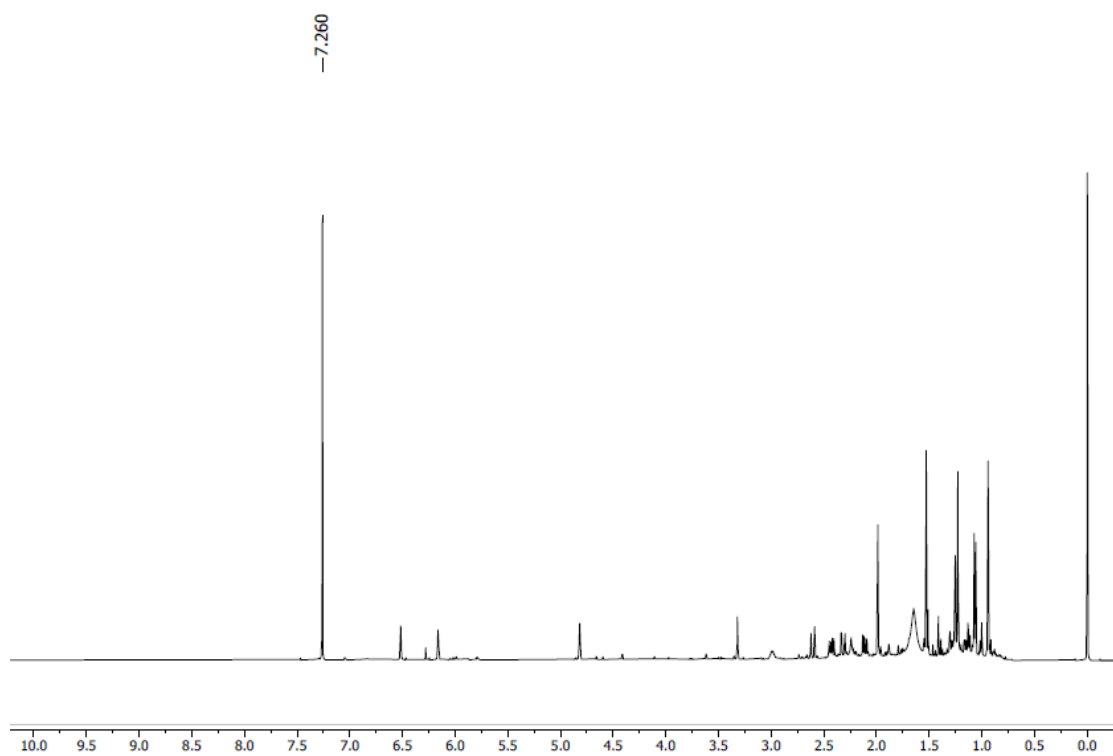


Figure 14. Expansion ^1H spectrum of Ribifolone B, 400MHz in CDCl_3 (0.8-2.8 ppm).

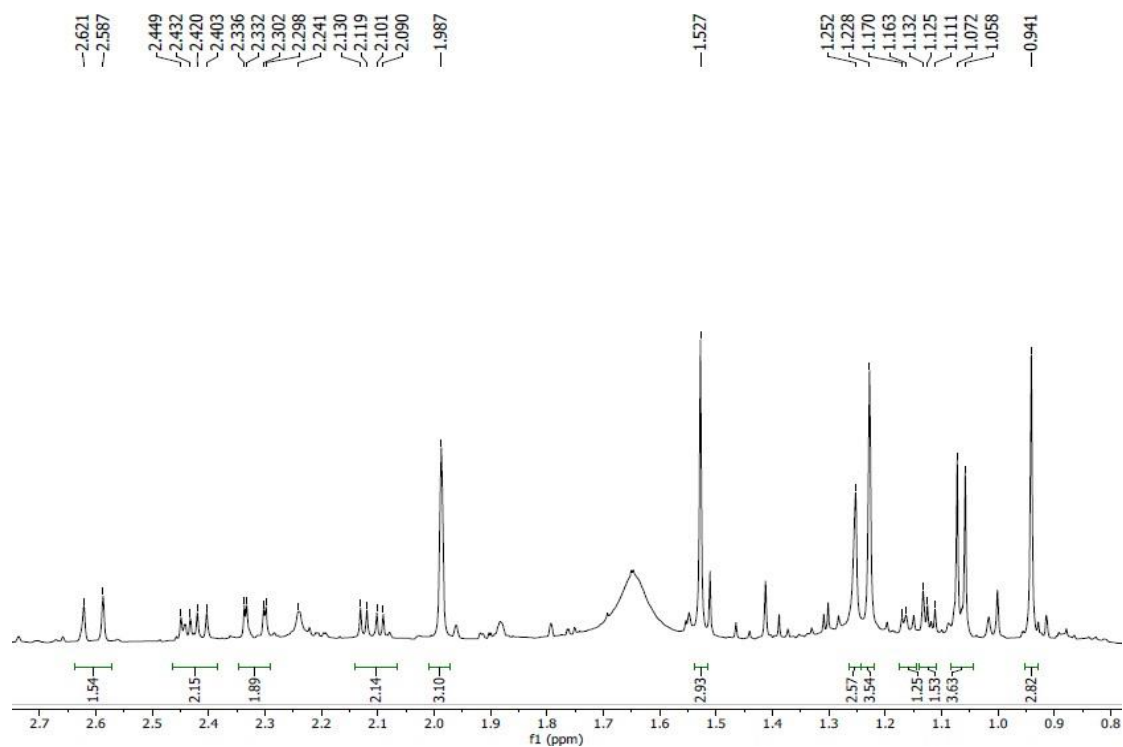


Figure 15. Expansion ^1H spectrum of Ribifolone B, 400MHz in CDCl_3 (2.9-4.8 ppm).

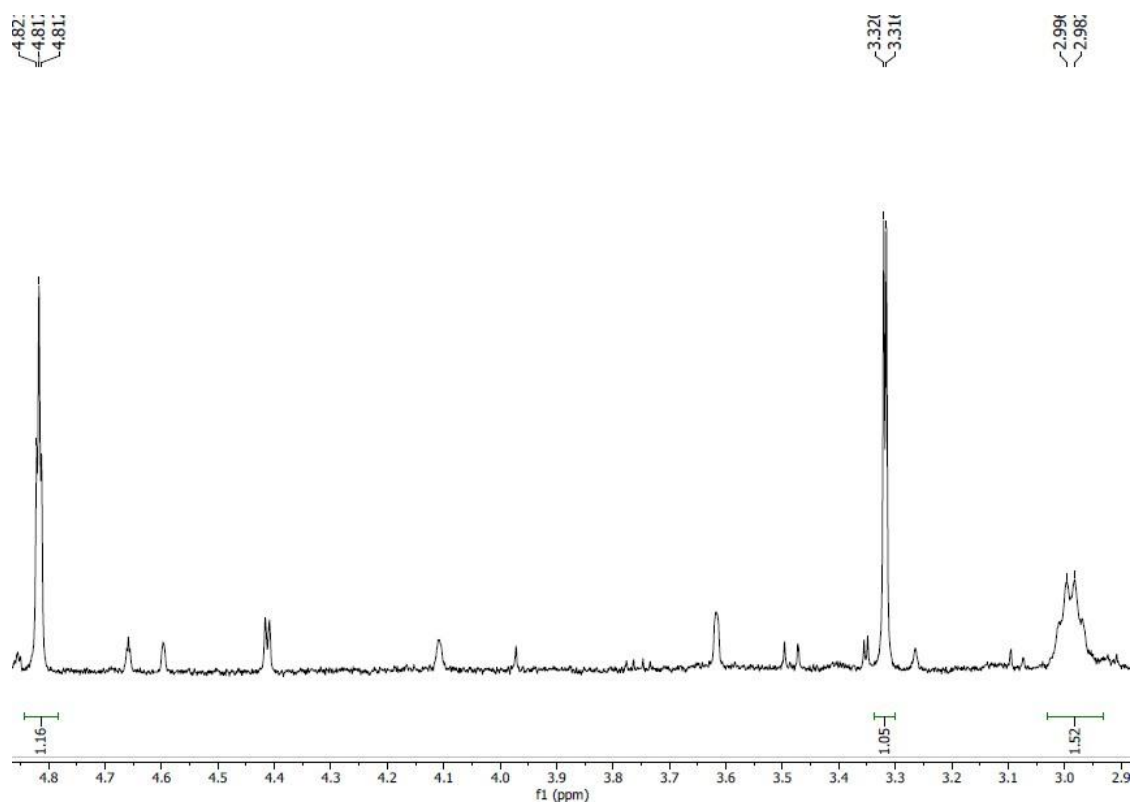


Figure 16. Expansion ^1H spectrum of Ribifolone B, 400MHz in CDCl_3 (6.1-6.8 ppm)

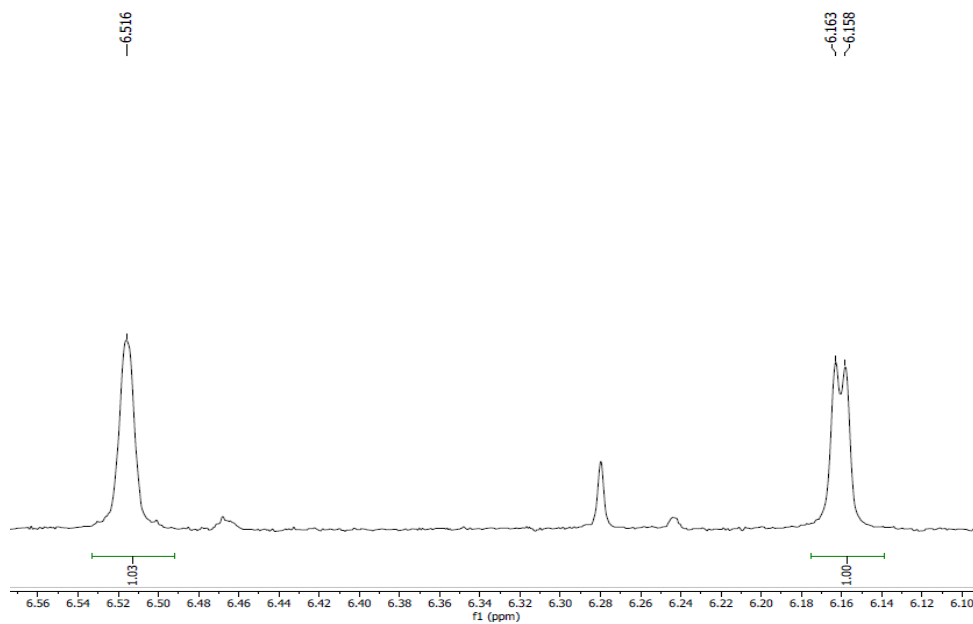


Figure 17. ^{13}C spectrum of Ribifolone B, 400MHz in CDCl_3 .

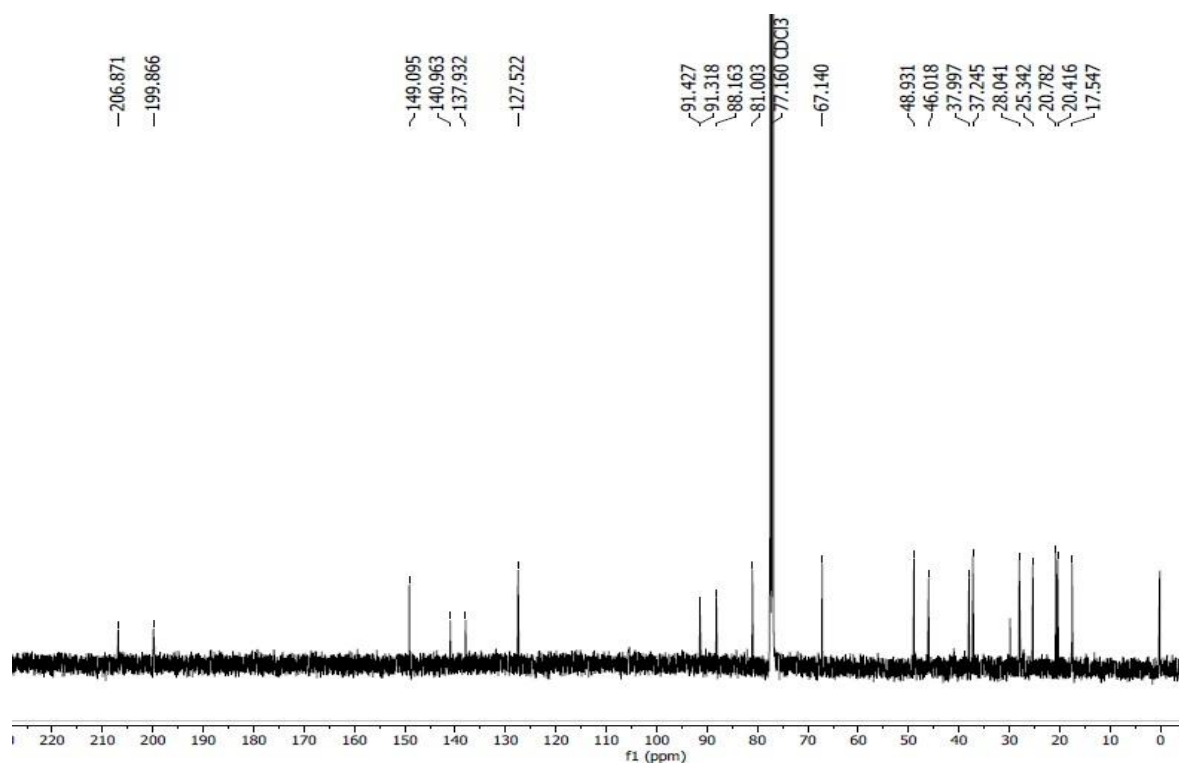


Figure 18. Dept spectrum of Ribifolone B, 400MHz in CDCl₃.

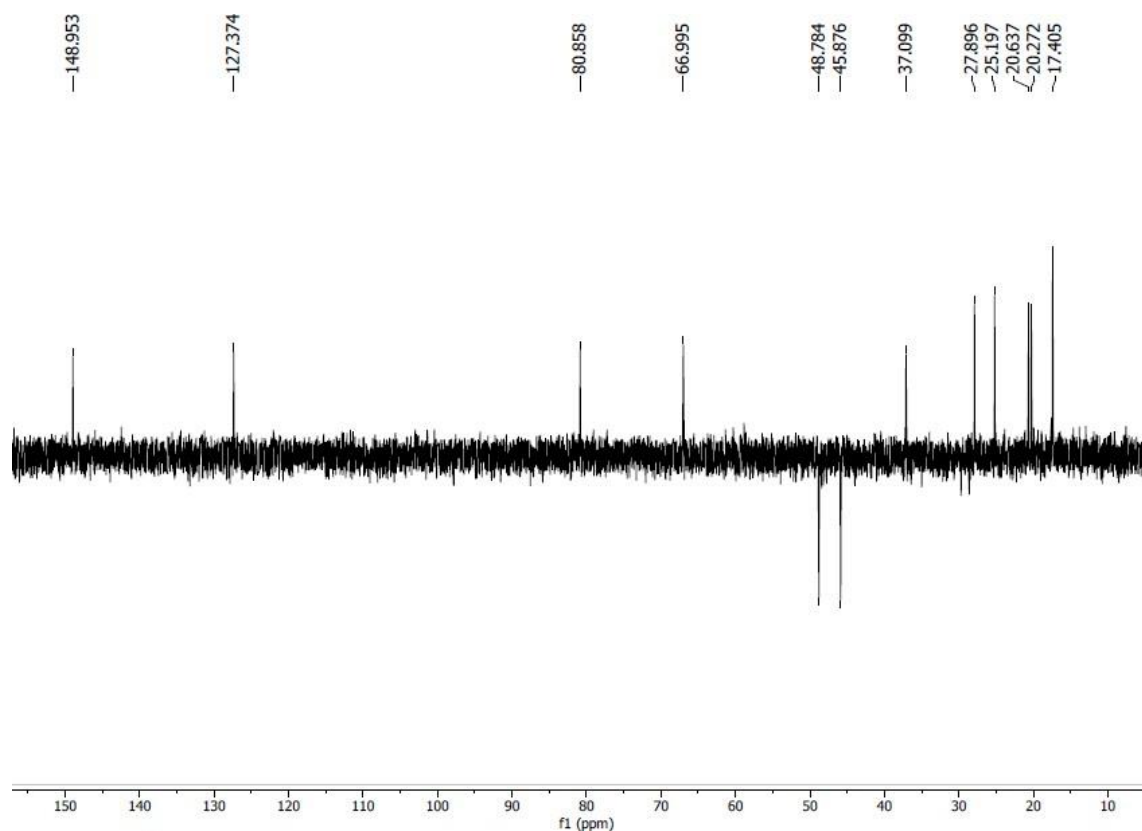


Figure 19. Cosy spectrum of Ribifolone B, 400MHz in CDCl₃.

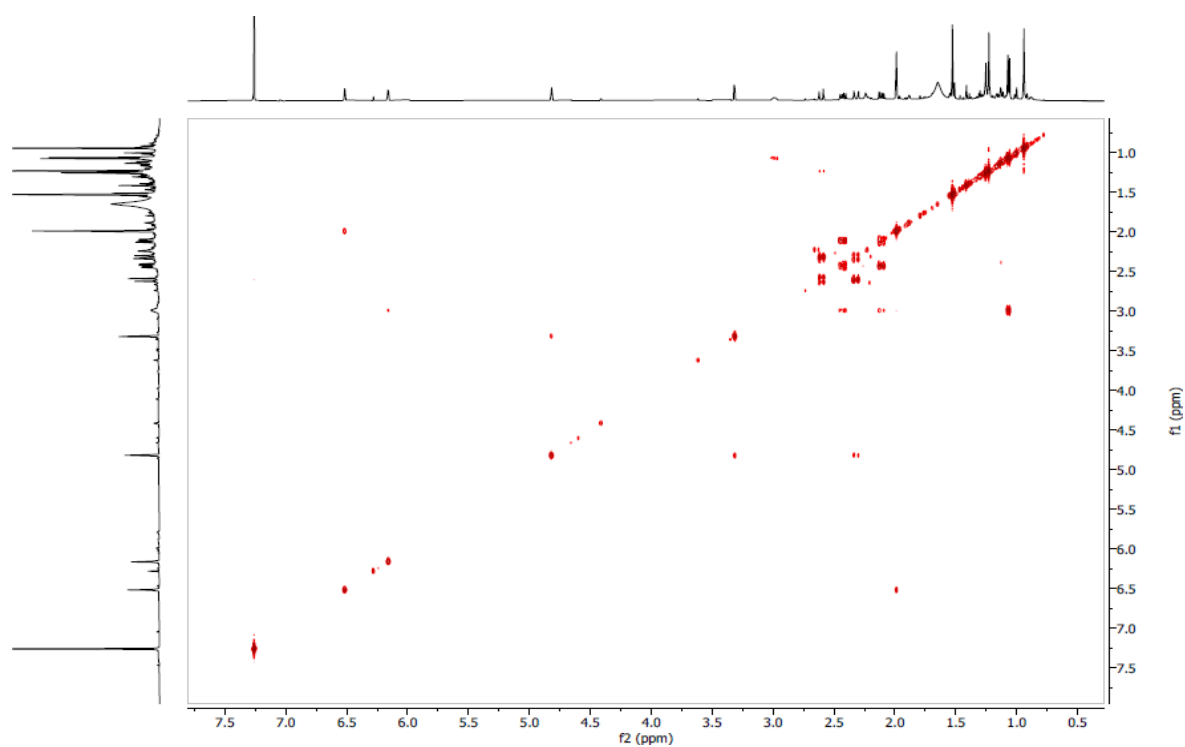


Figure 20. HMBC contour map of Ribifolone B, 400MHz in CDCl₃.

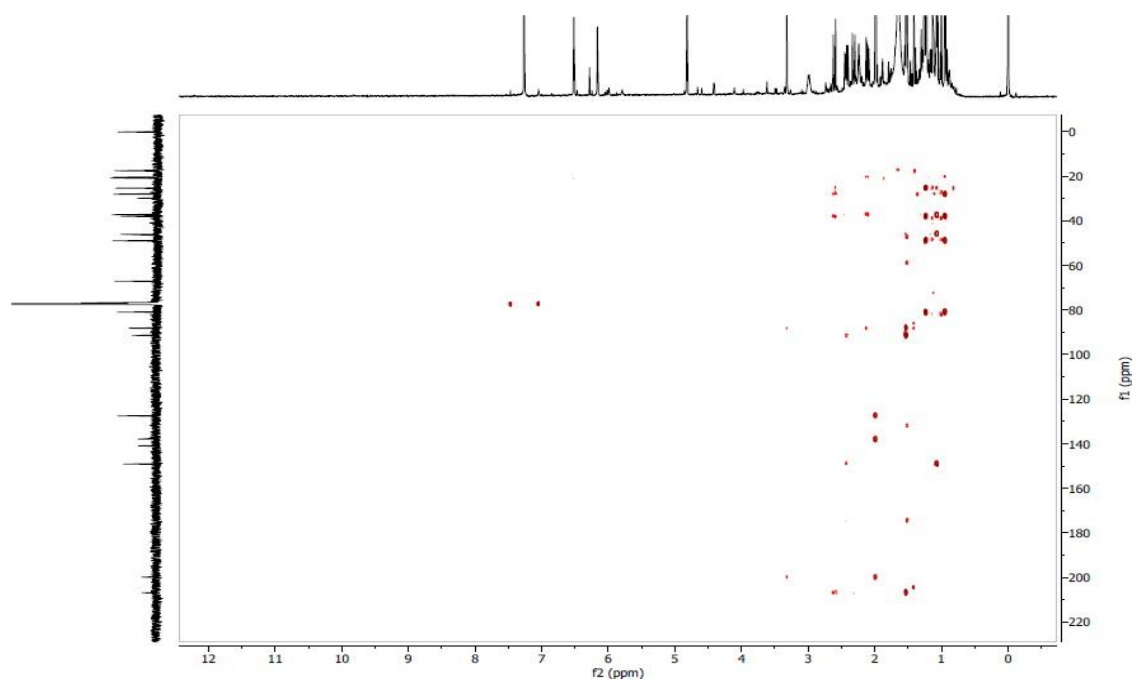


Figure 21. Expansion of HMBC contour map of Ribifolone B, 400MHz in CDCl₃.

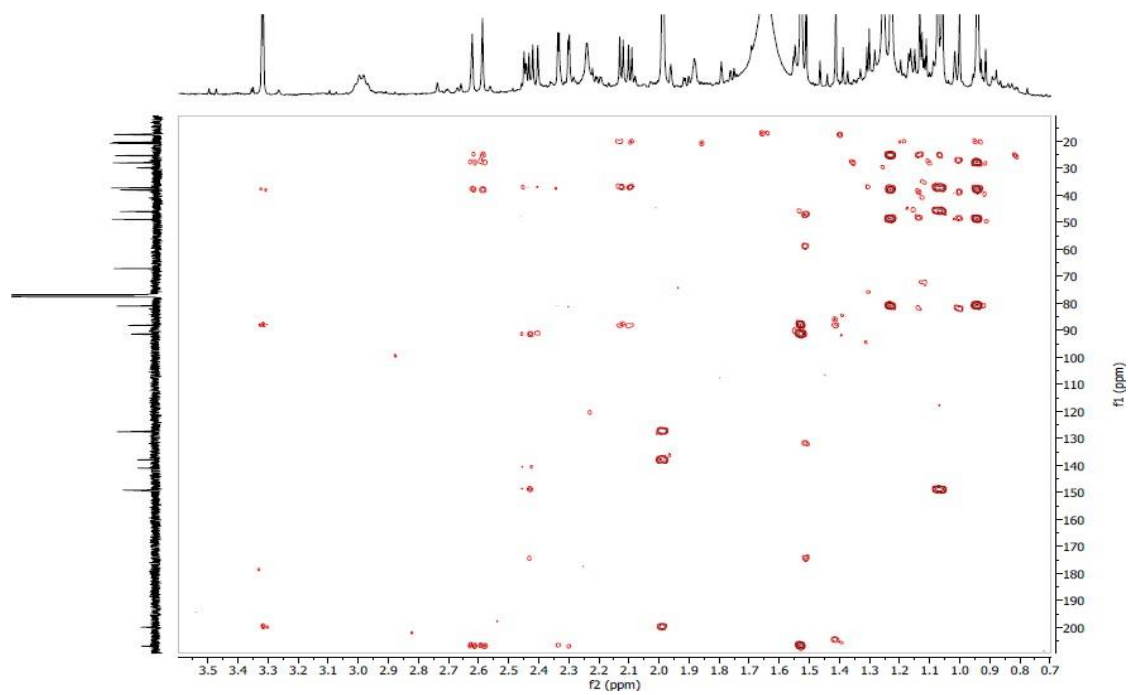


Figure 22. HSQC contour map of Ribifolone B, 400MHz in CDCl₃.

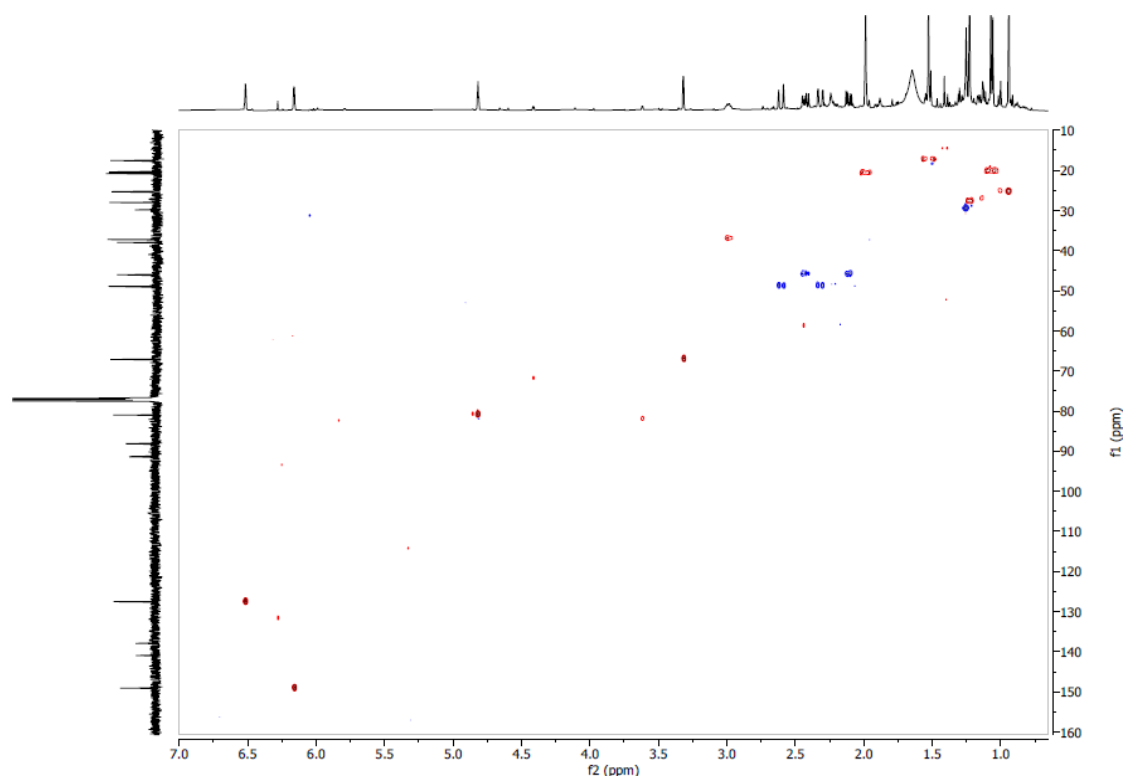


Figure 23. ¹H spectrum of Ribifolone C, 400MHz in CDCl₃.

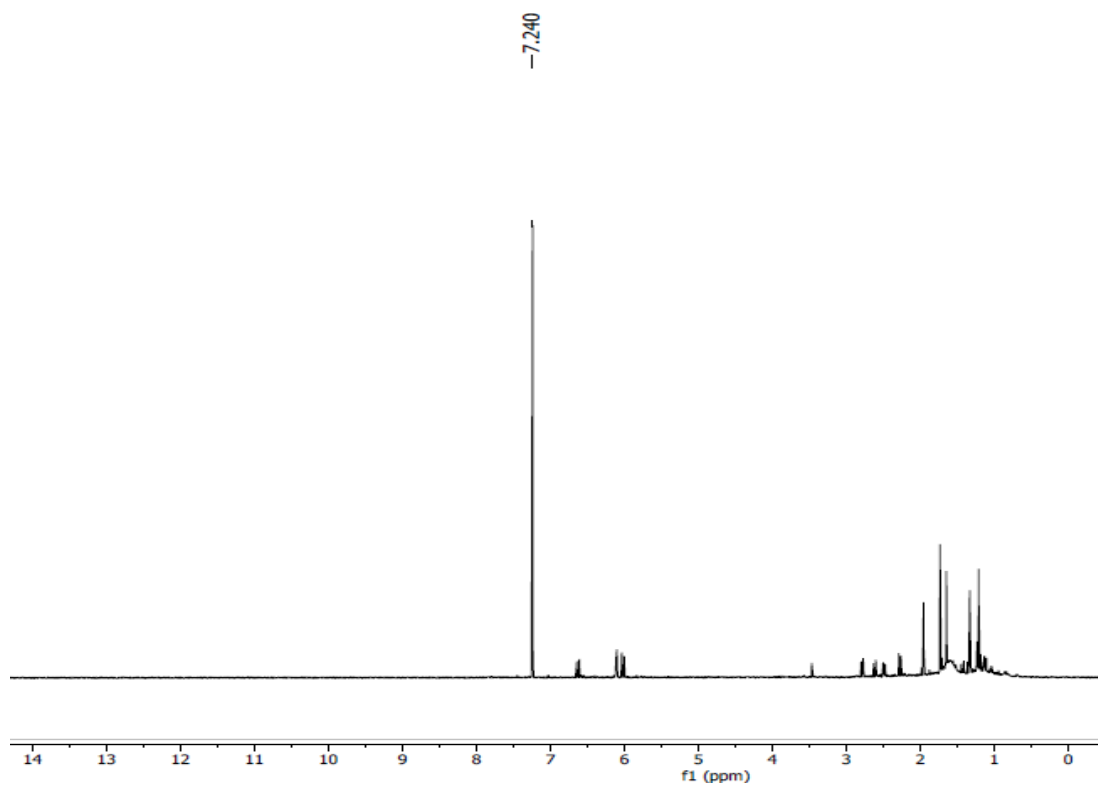


Figure 24. Expansion ^1H spectrum of Ribifolone C, 400MHz in CDCl_3 .

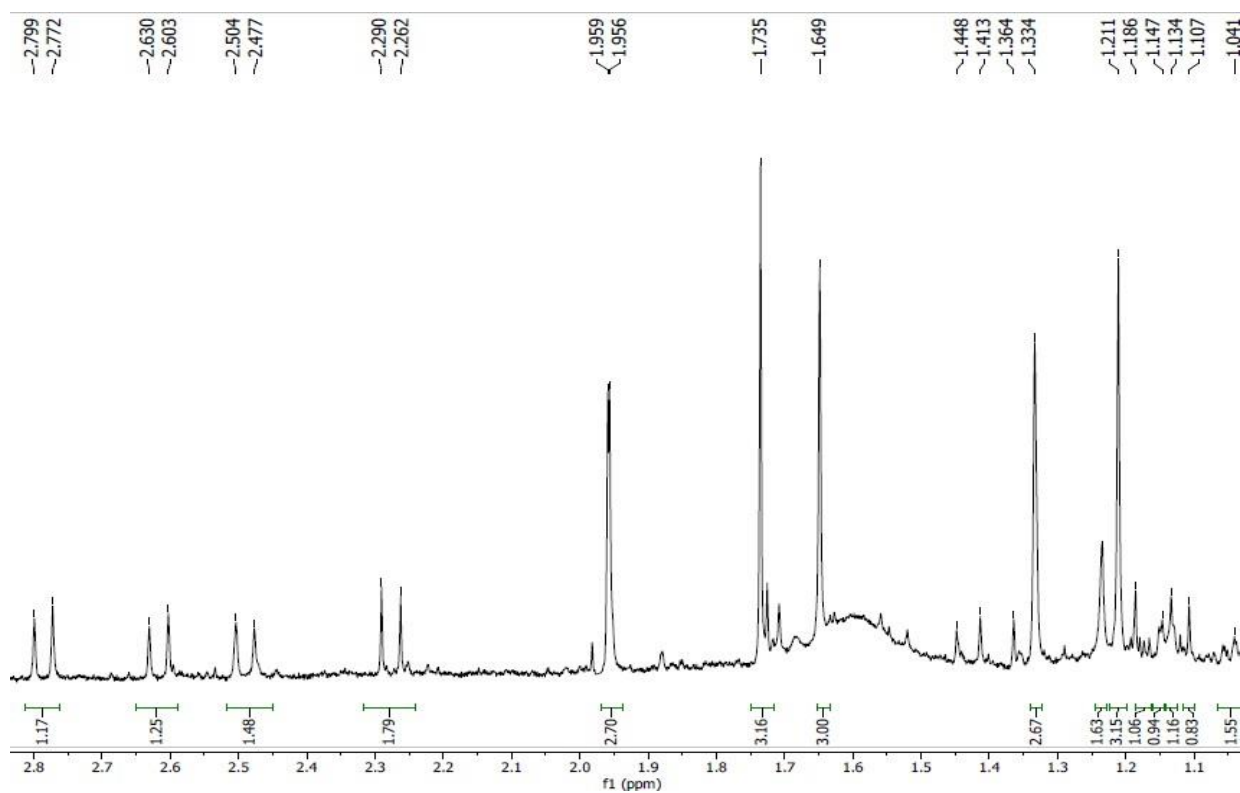


Figure 25. ^{13}C spectrum of Ribifolone C, 400MHz in CDCl_3 .

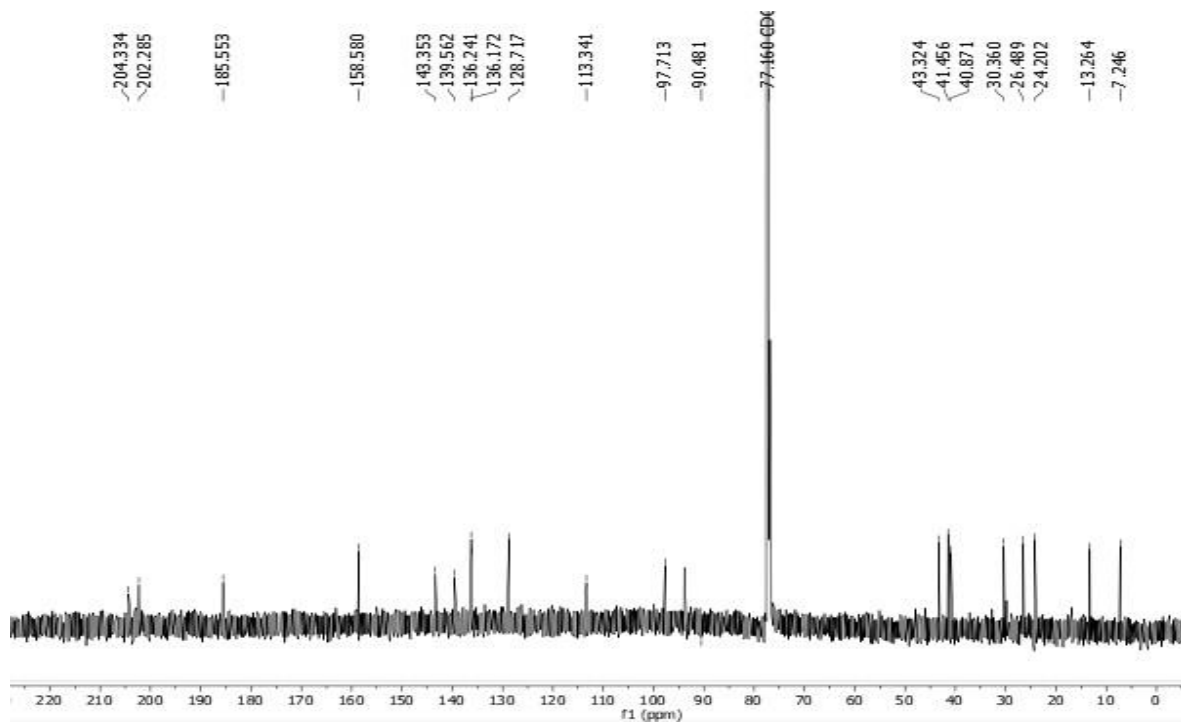


Figure 26. Dept spectrum of Ribifolone C, 400MHz in CDCl₃.

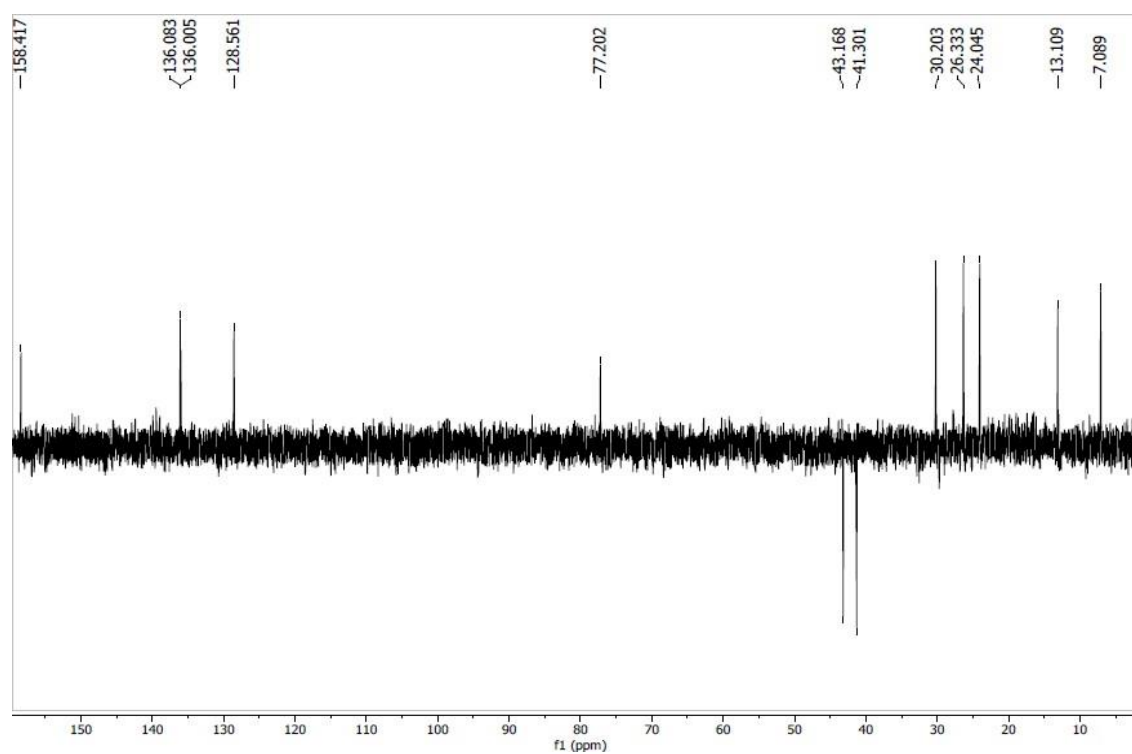


Figure 27. Cosy spectrum of Ribifolone C, 400MHz in CDCl₃.

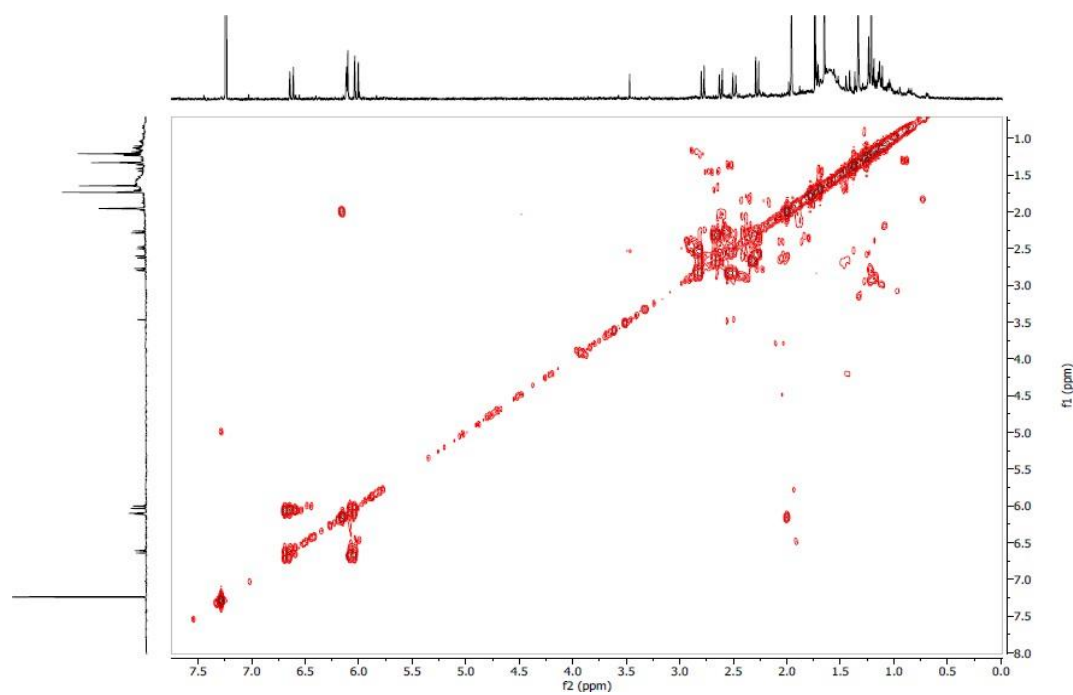


Figure 28.HMBC contour map of Ribifolone C, 400MHz in CDCl₃.

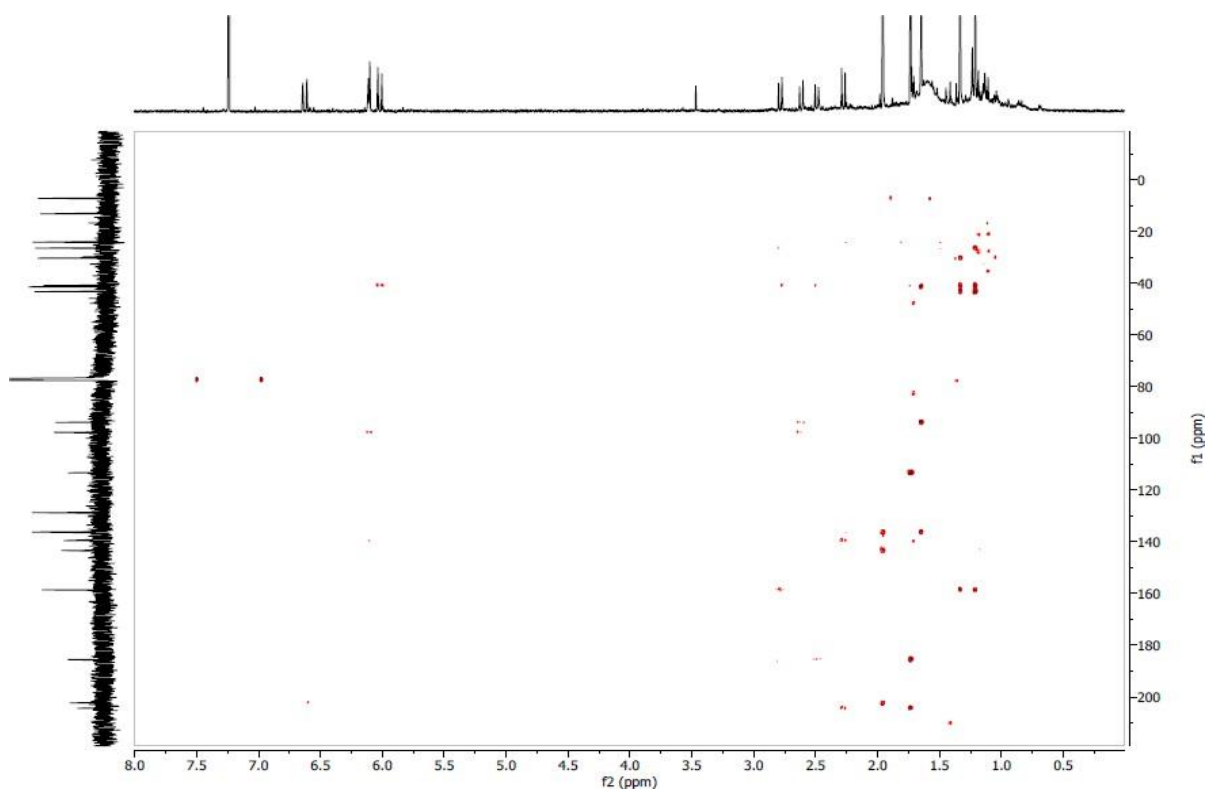


Figure 29. Expansion of HMBC contour map of Ribifolone C, 400MHz in CDCl₃.

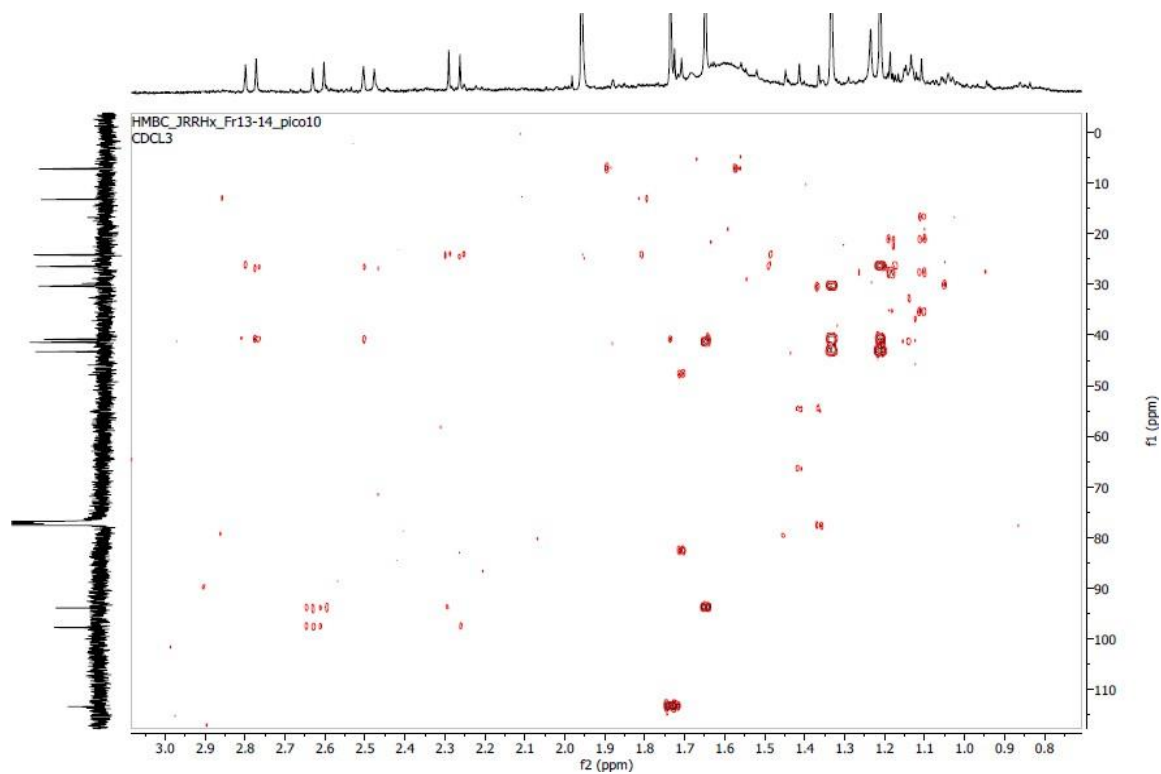


Figure 30. Expansion of HMBC contour map of Ribifolone C, 400MHz in CDCl₃.

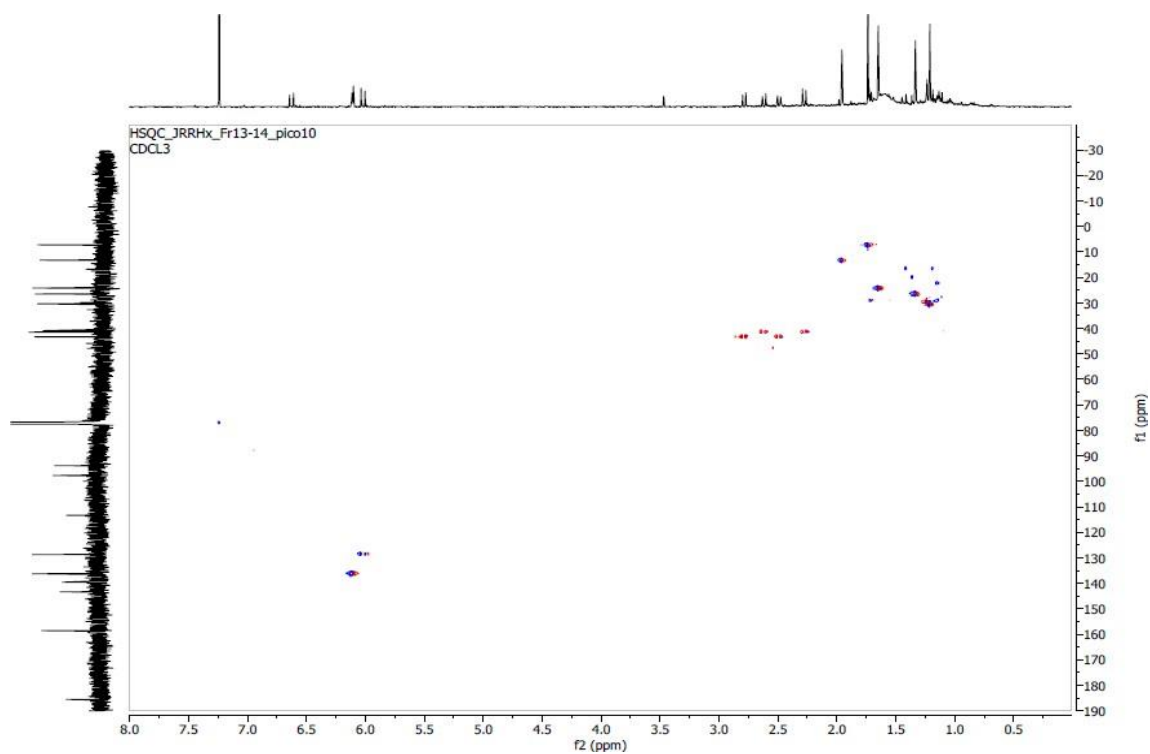


Figure 31. NOESY spectrum of Ribifolone C, 400MHz in CDCl₃.

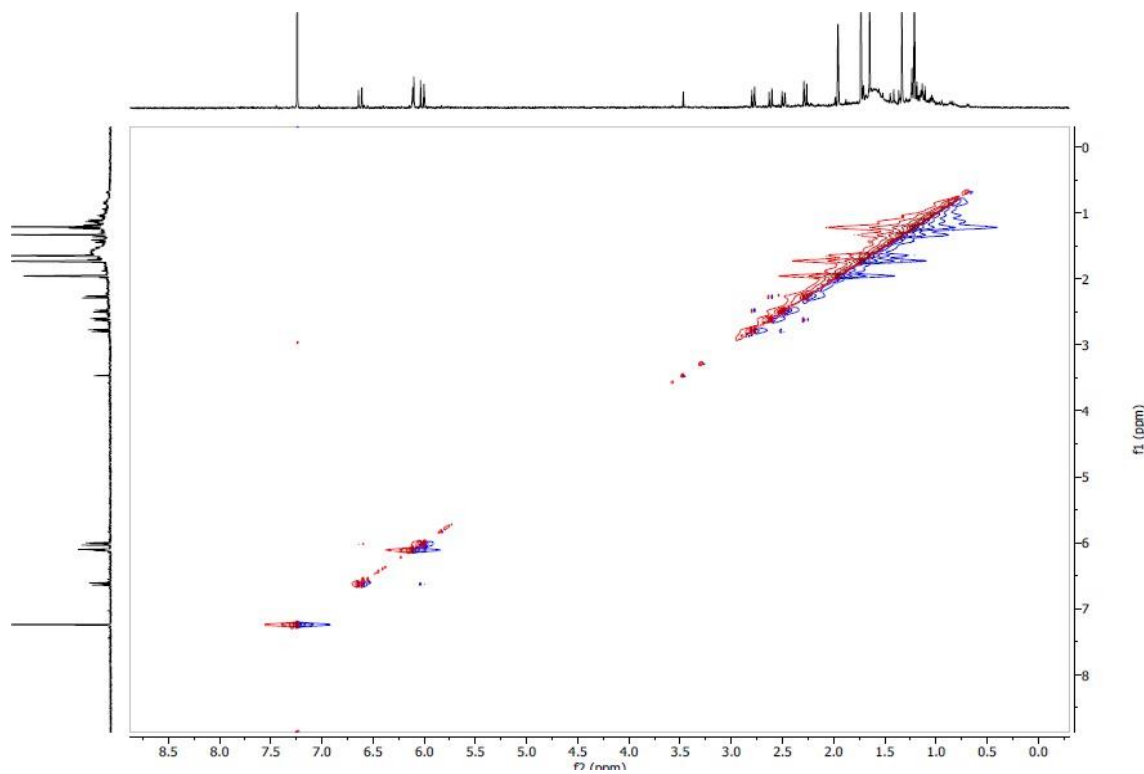


Figure 32. ^1H spectrum of Ribifolone D, 400MHz in CDCl_3 .

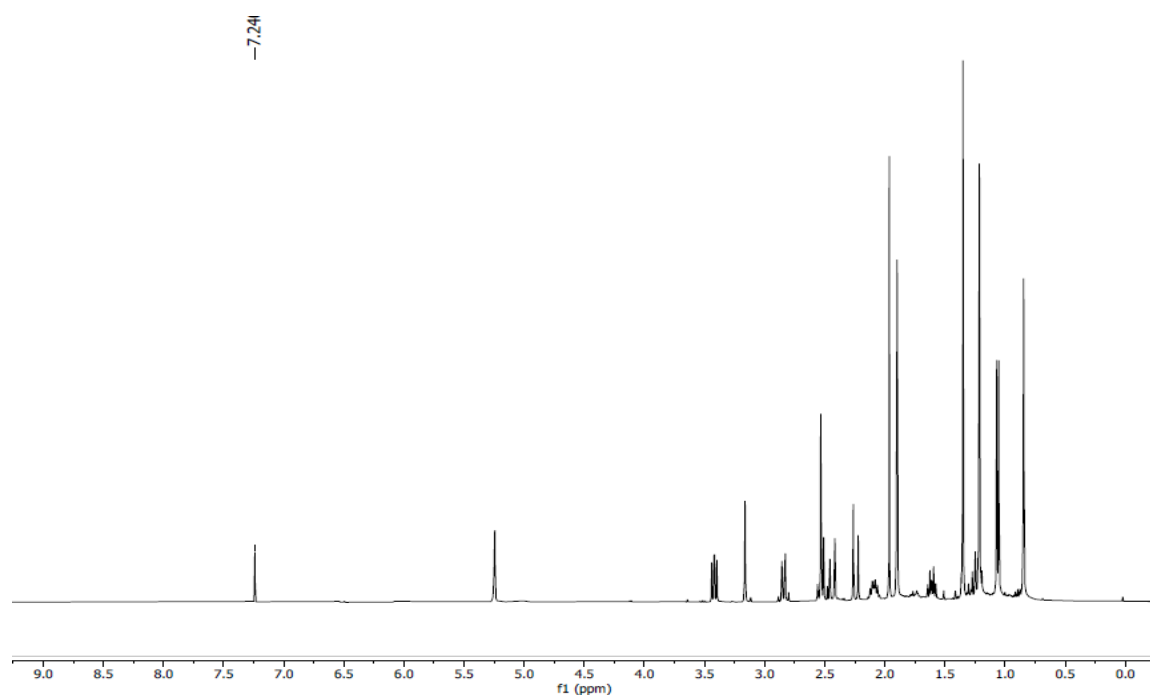


Figure 33. Expansion of ^1H spectrum of Ribifolone D, 400MHz in CDCl_3 (0.8-2.0 ppm).

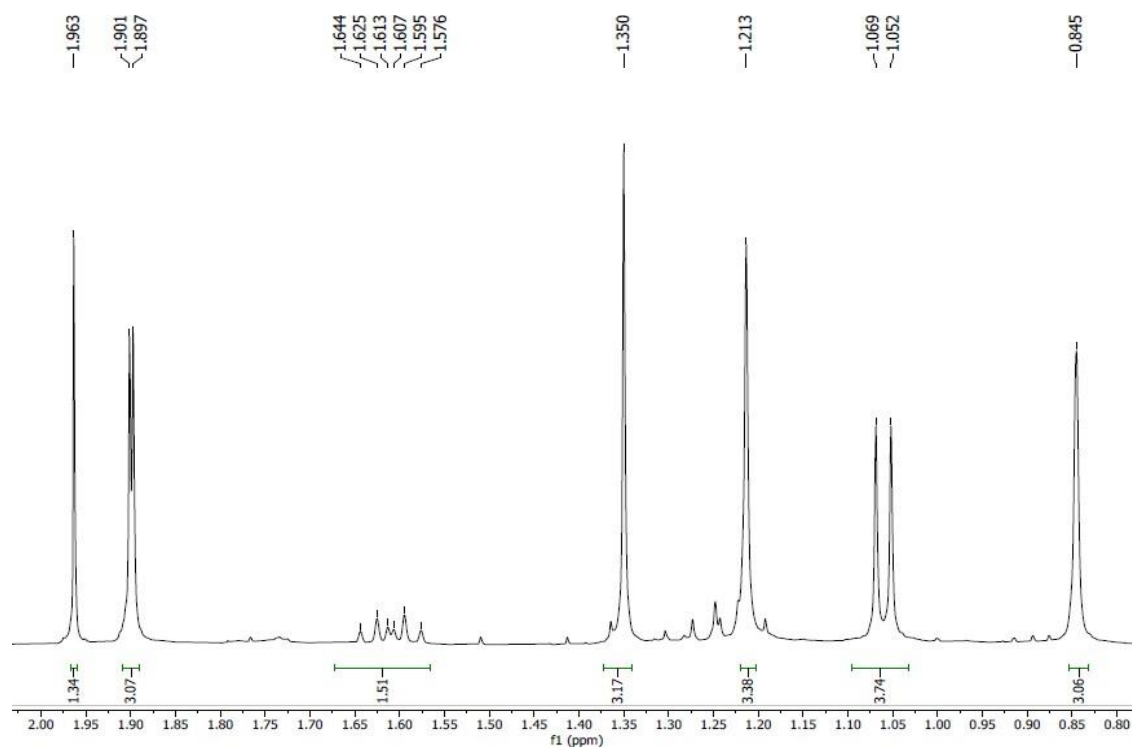


Figure 34. ^{13}C spectrum of Ribifolone D, 400MHz in CDCl_3

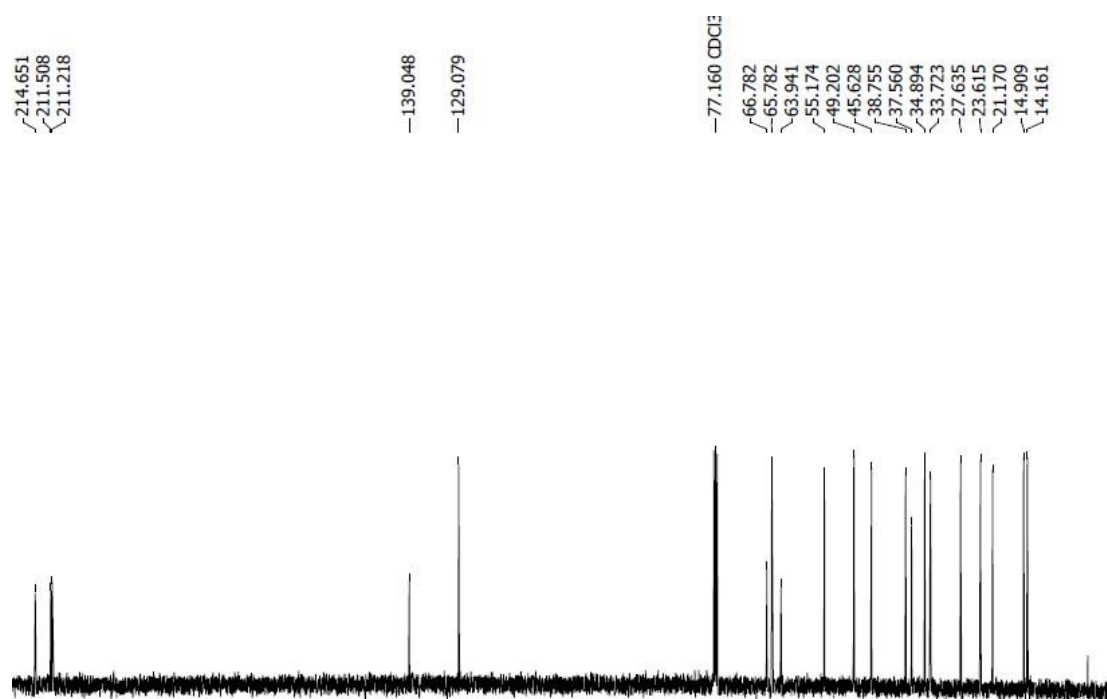


Figure 35. Dept spectrum of Ribifolone D, 400MHz in CDCl_3

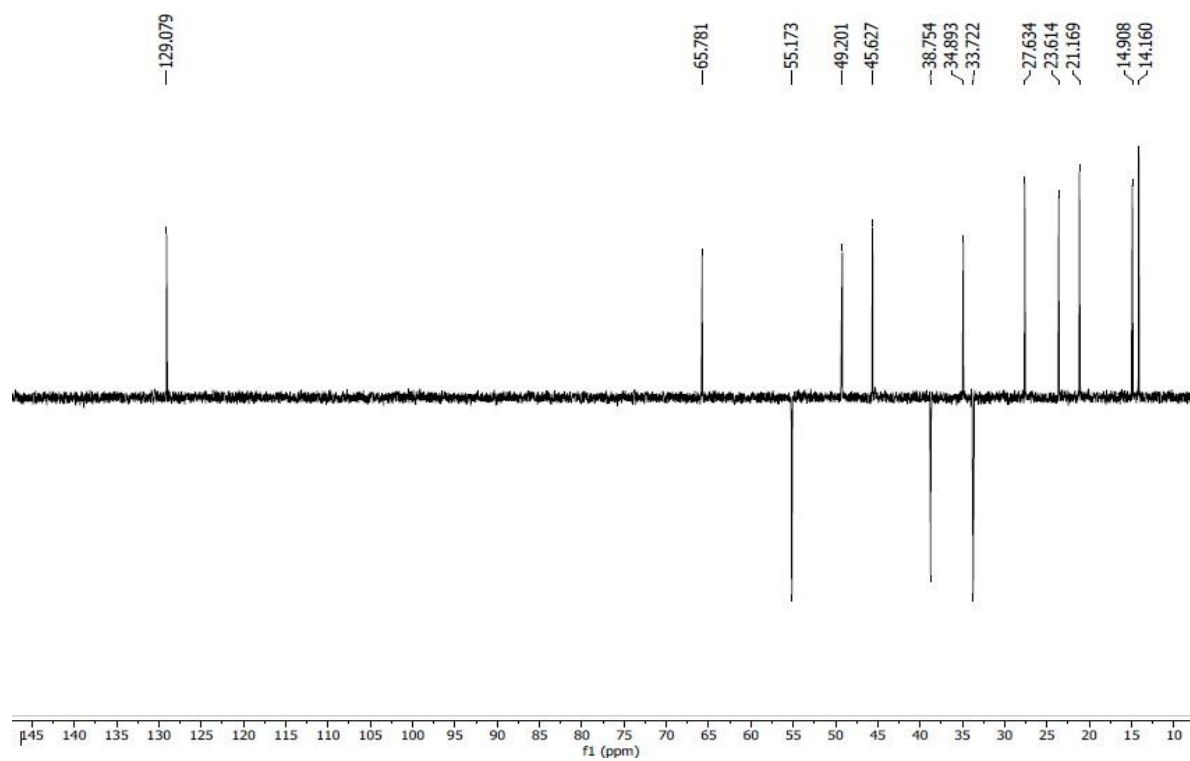


Figure 36. Cosy spectrum of Ribifolone D, 400MHz in CDCl₃

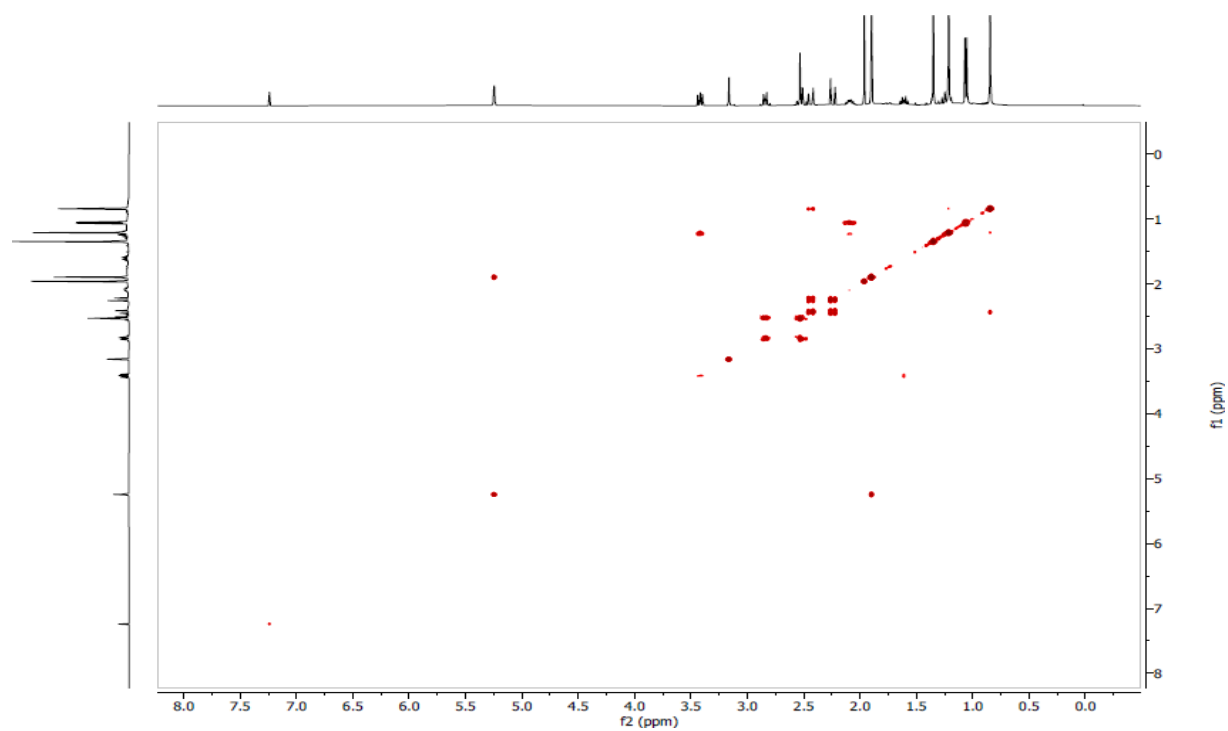


Figure 37. HMBC contour map of Ribifolone D, 400MHz in CDCl₃

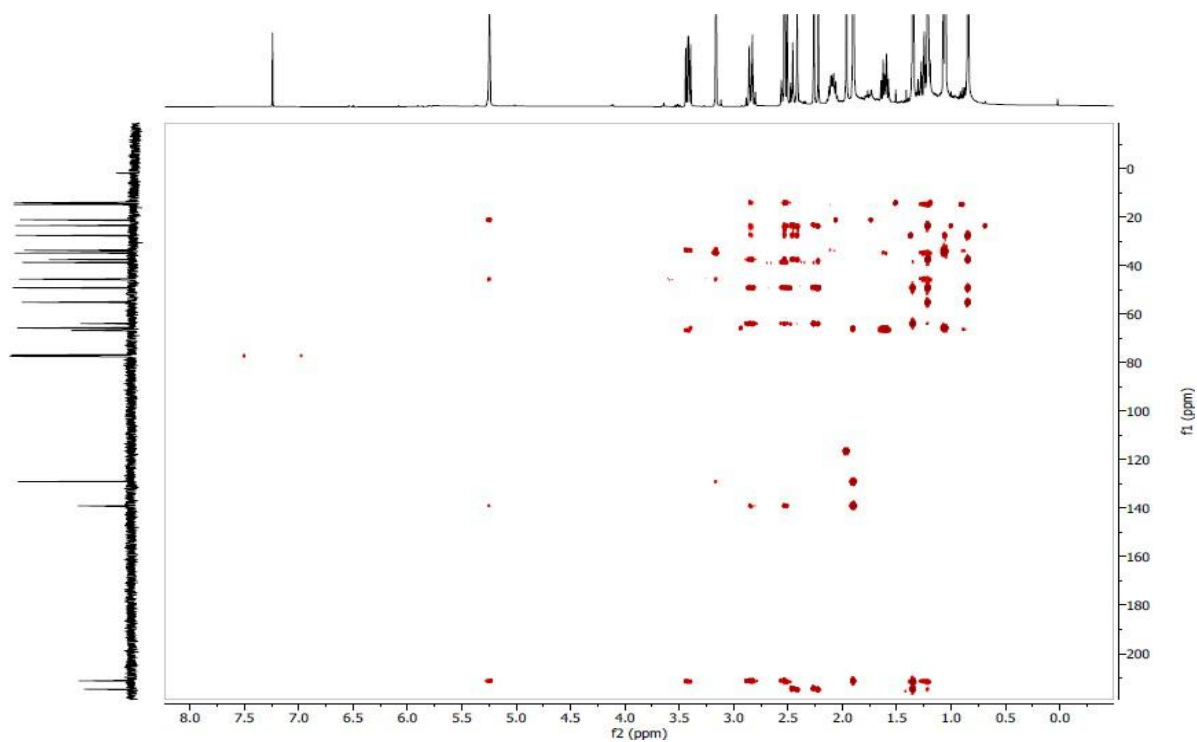


Figure 38. HSQC contour map of Ribifolone D, 400MHz in CDCl₃

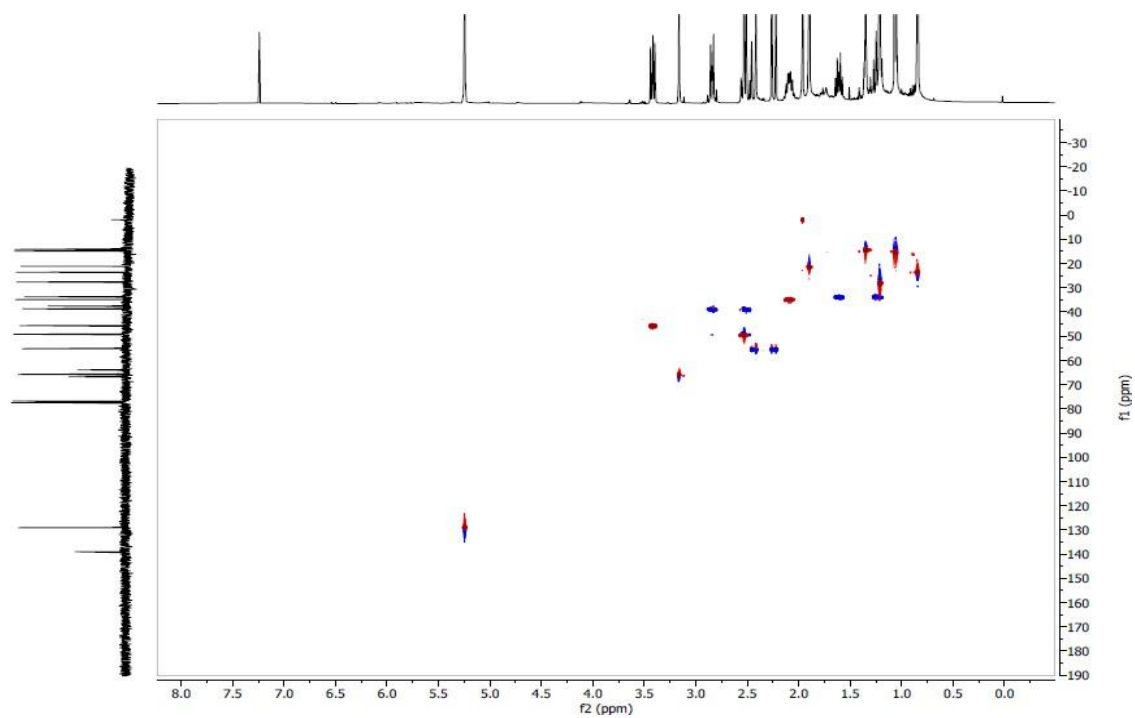


Figure 39. NOESY spectrum of Ribifolone D, 400MHz in CDCl₃

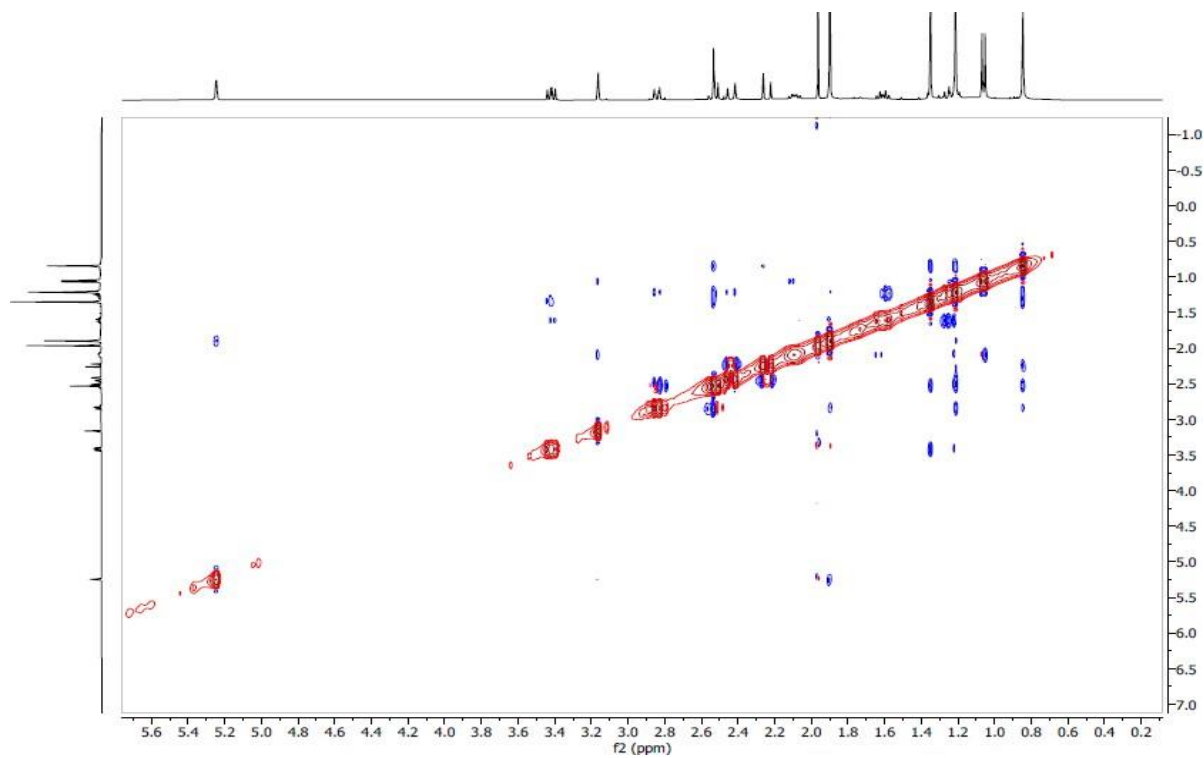


Figure 40. ^1H spectrum of Ribifolone E, 400MHz in CDCl_3

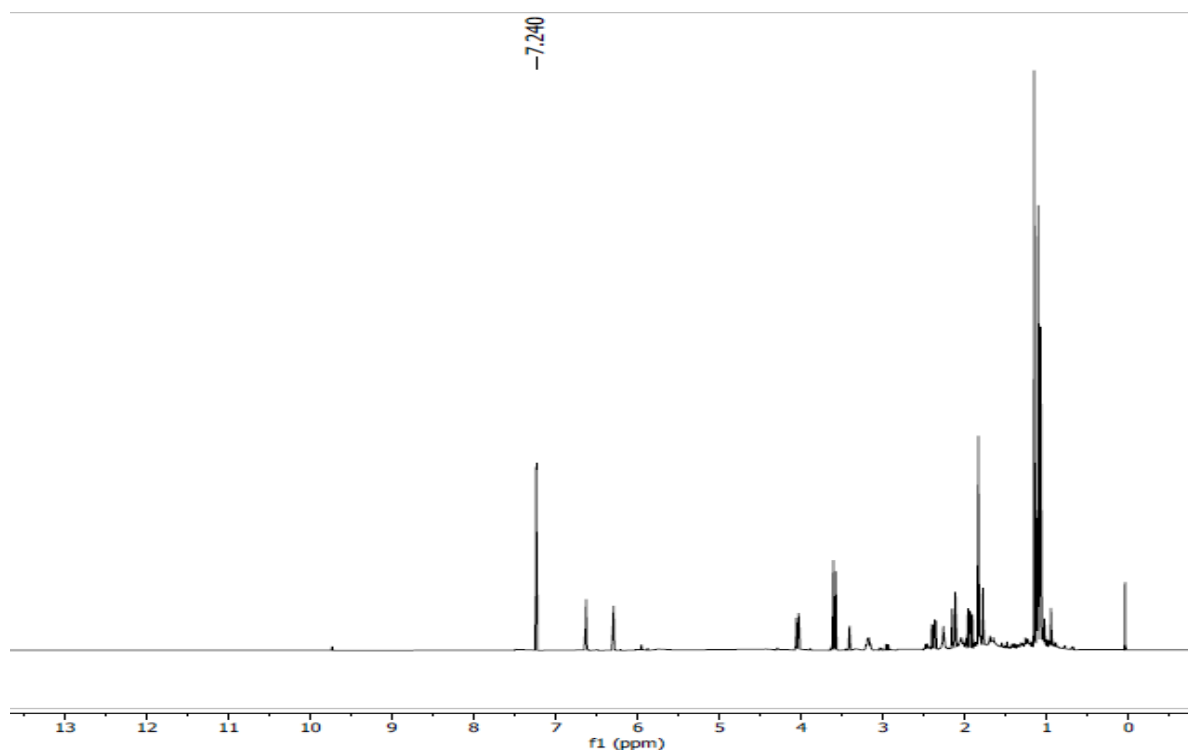


Figure 41. Expansion of ^1H spectrum of Ribifolone E, 400MHz in CDCl_3

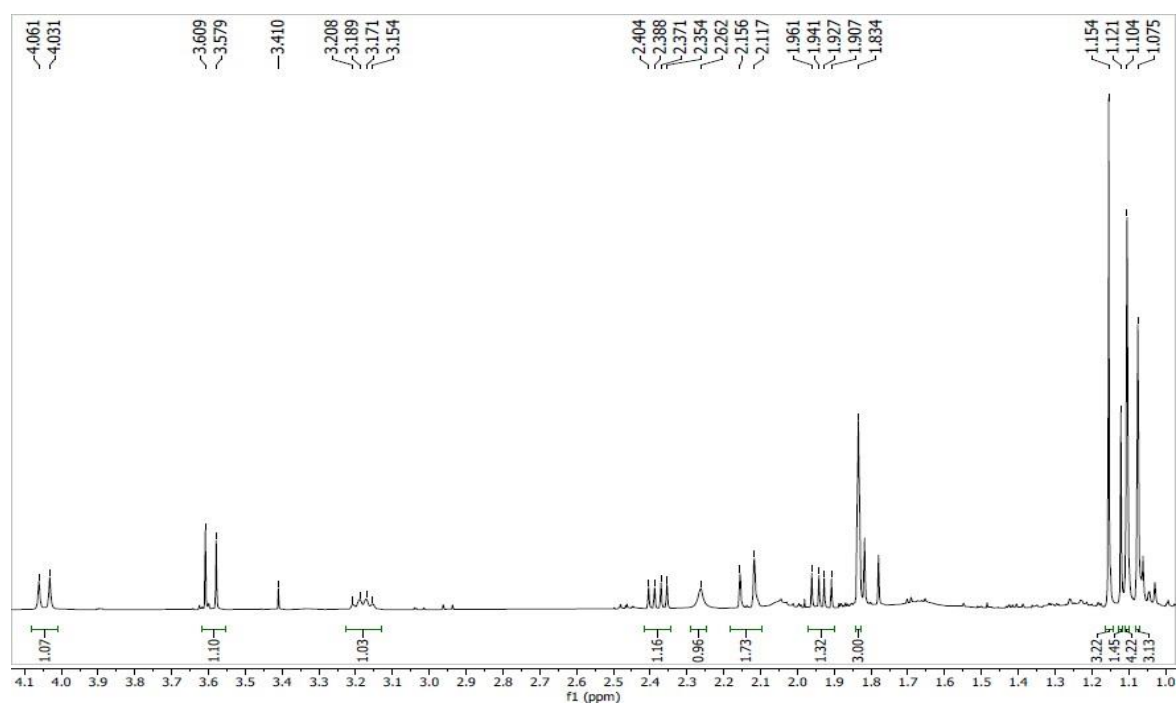


Figure 42. Expansion of ^1H spectrum of Ribifolone E, 400MHz in CDCl_3

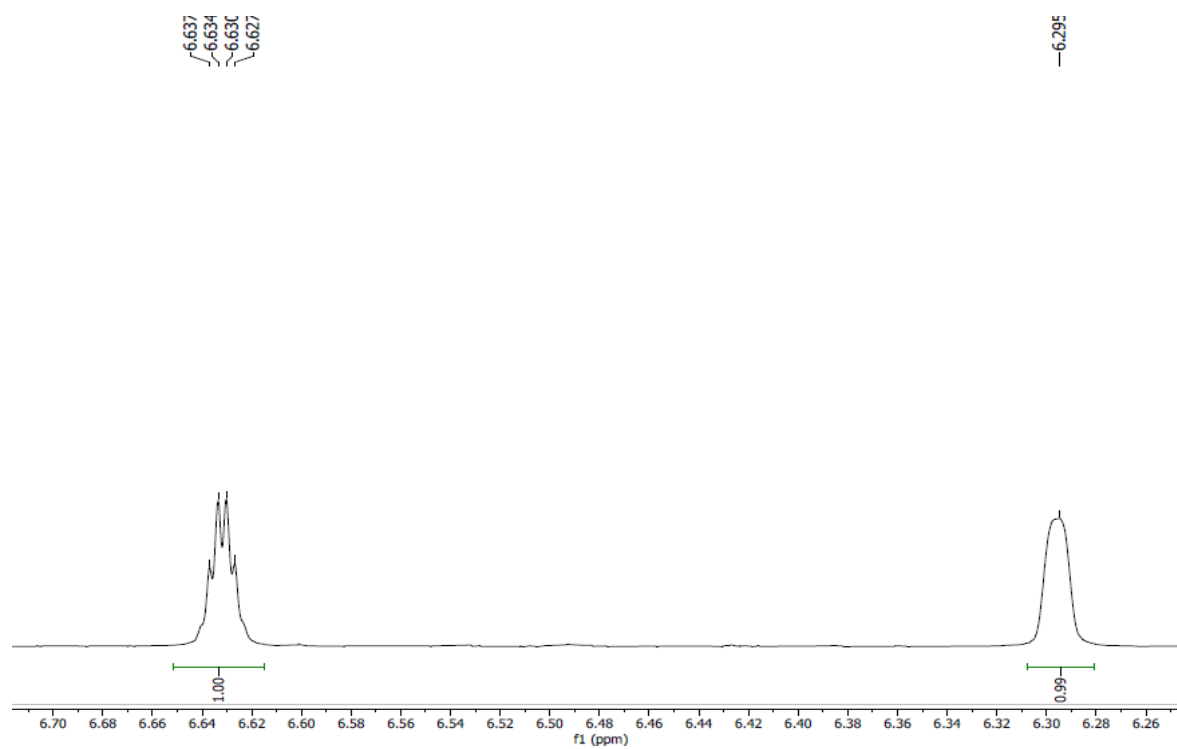


Figure 43. ^{13}C spectrum of Ribifolone E, 400MHz in CDCl_3

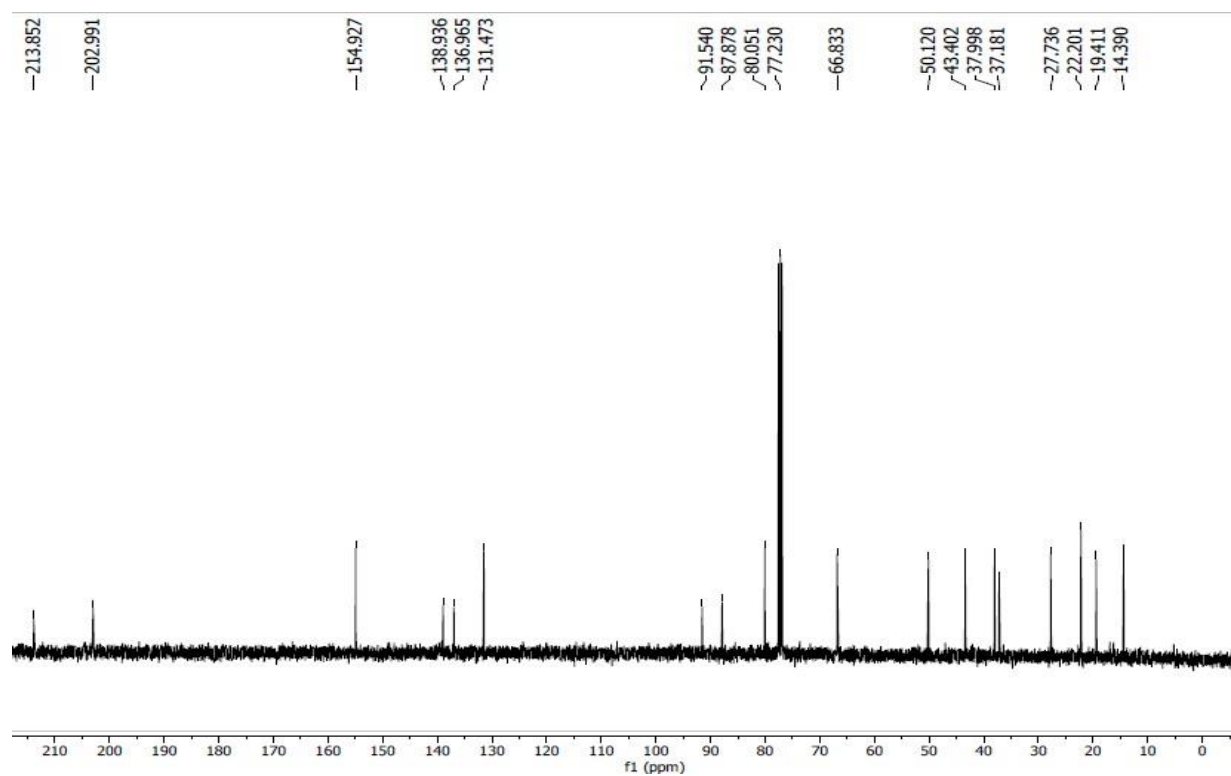


Figure 44. Dept spectrum of Ribifolone E, 400MHz in CDCl₃

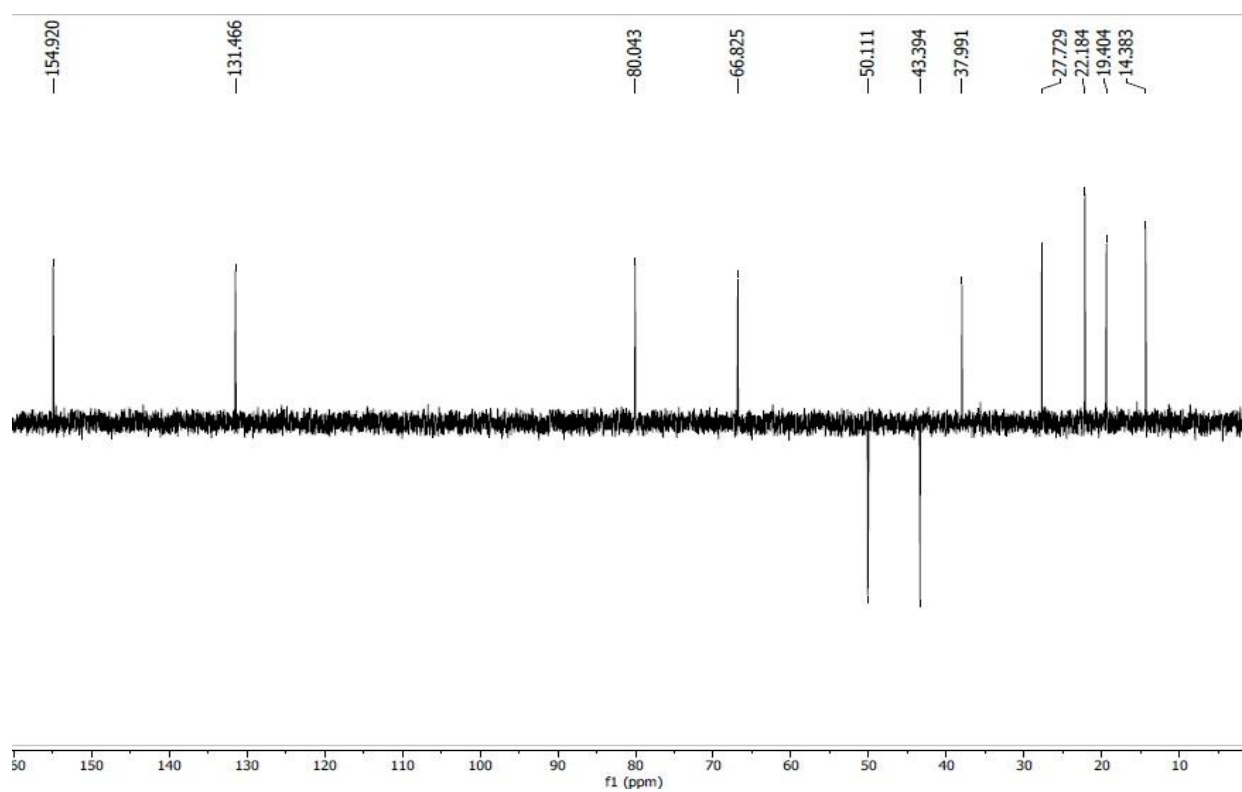


Figure 45. Cosy spectrum of Ribifolone E, 400MHz in CDCl₃

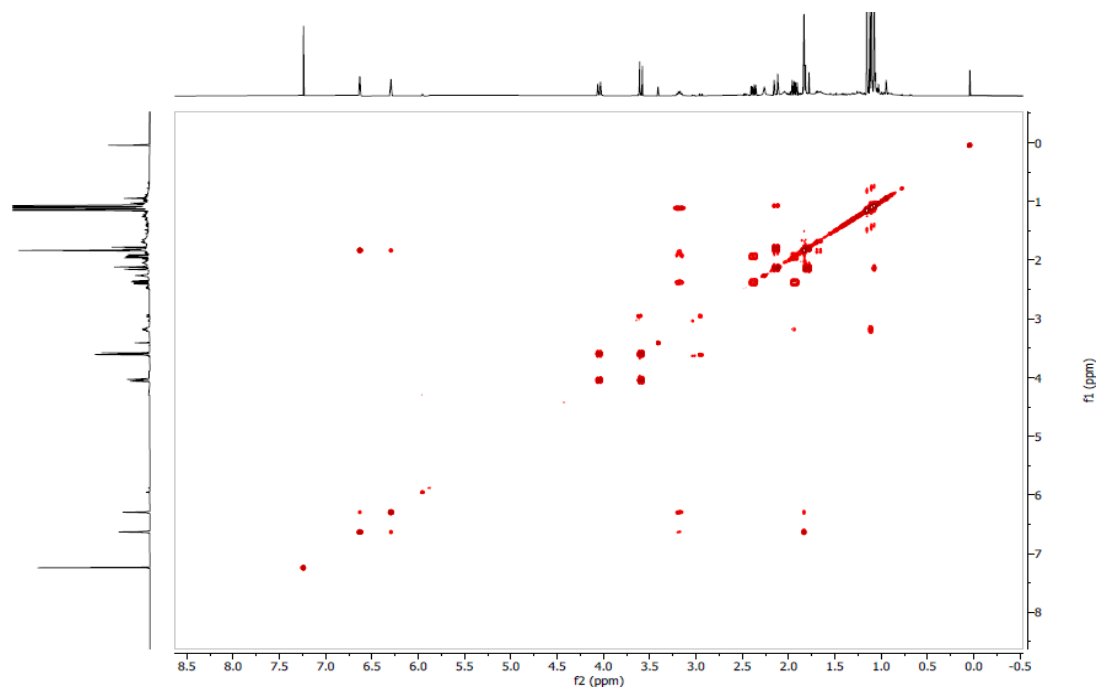


Figure 46. HMBC contour map of Ribifolone E, 400MHz in CDCl₃

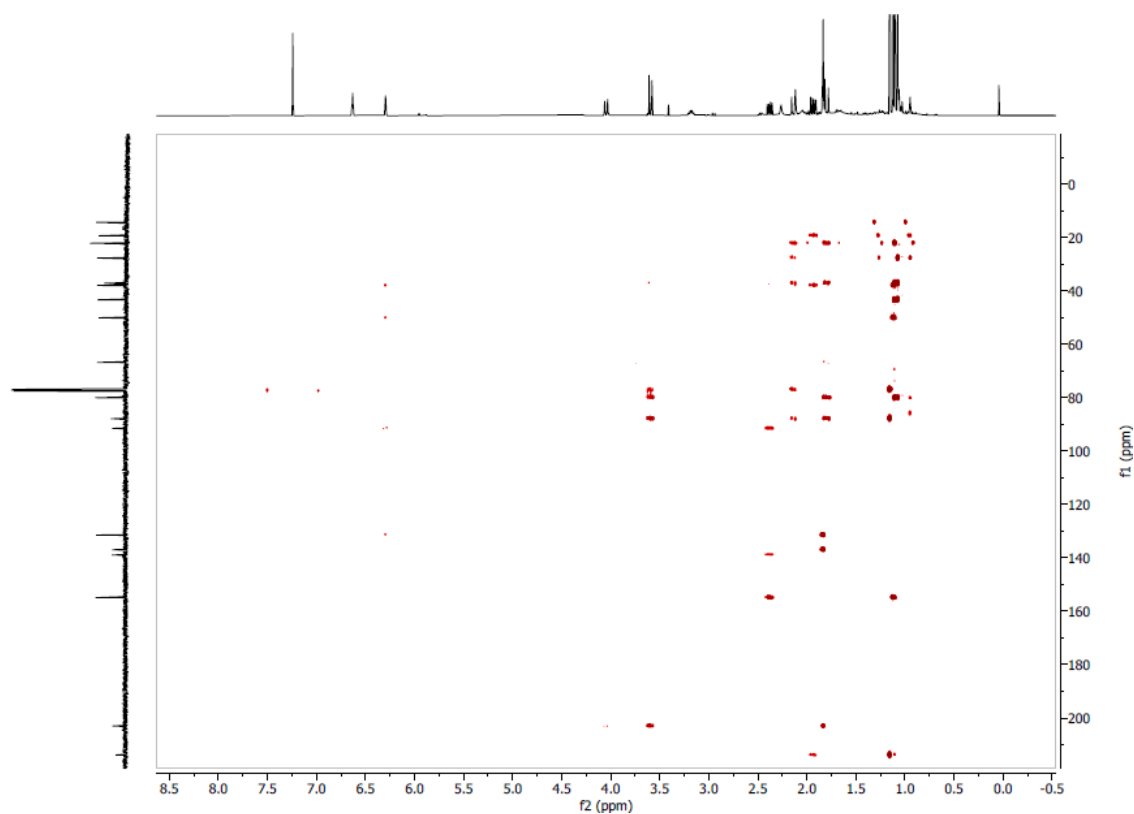


Figure 47. Expansion of HMBC contour map of Ribifolone E, 400MHz in CDCl₃

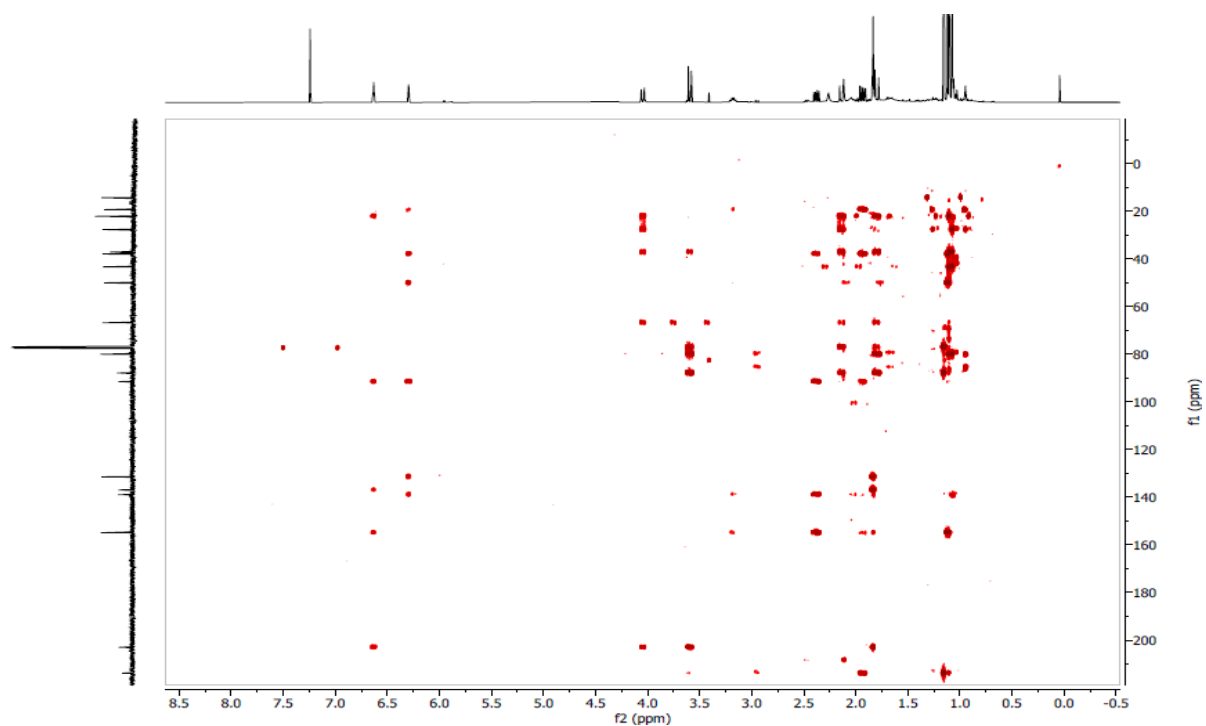


Figure 48. HSQC contour map of Ribifolone E, 400MHz in CDCl₃

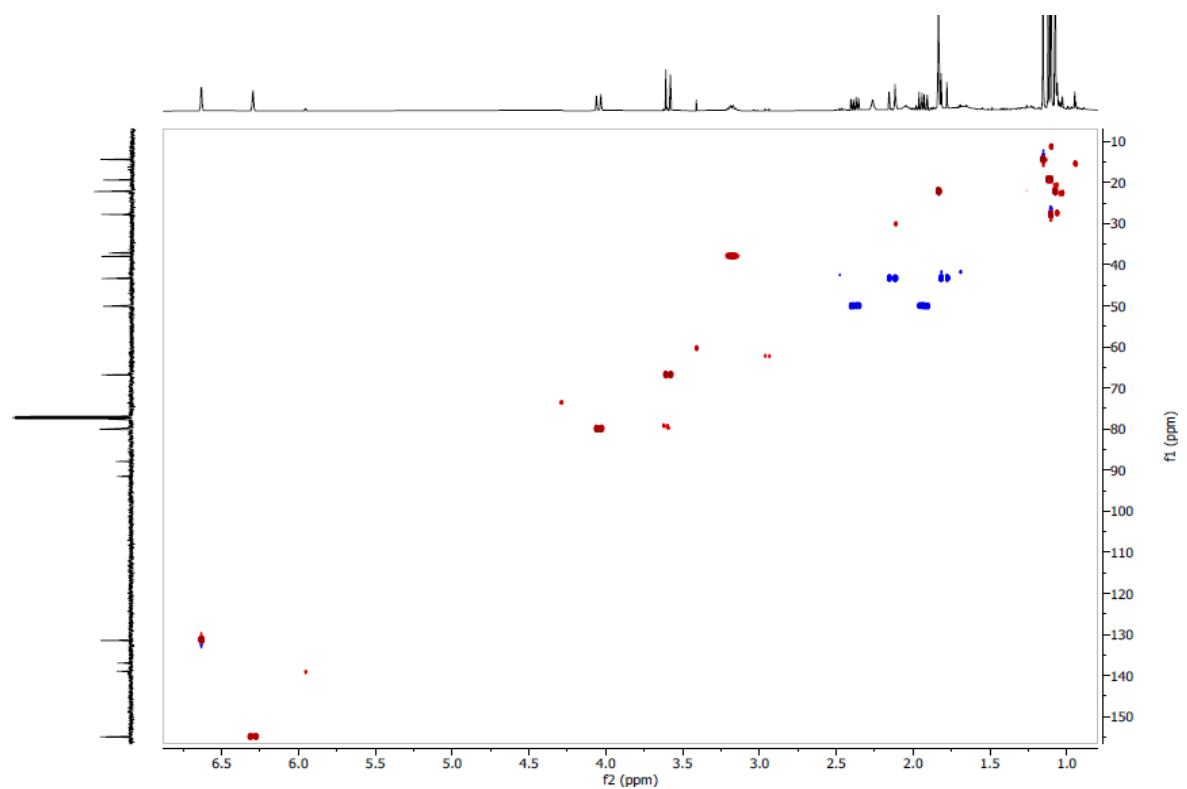


Figure 49. NOESY contour map of Ribifolone E 400MHz in CDCl₃

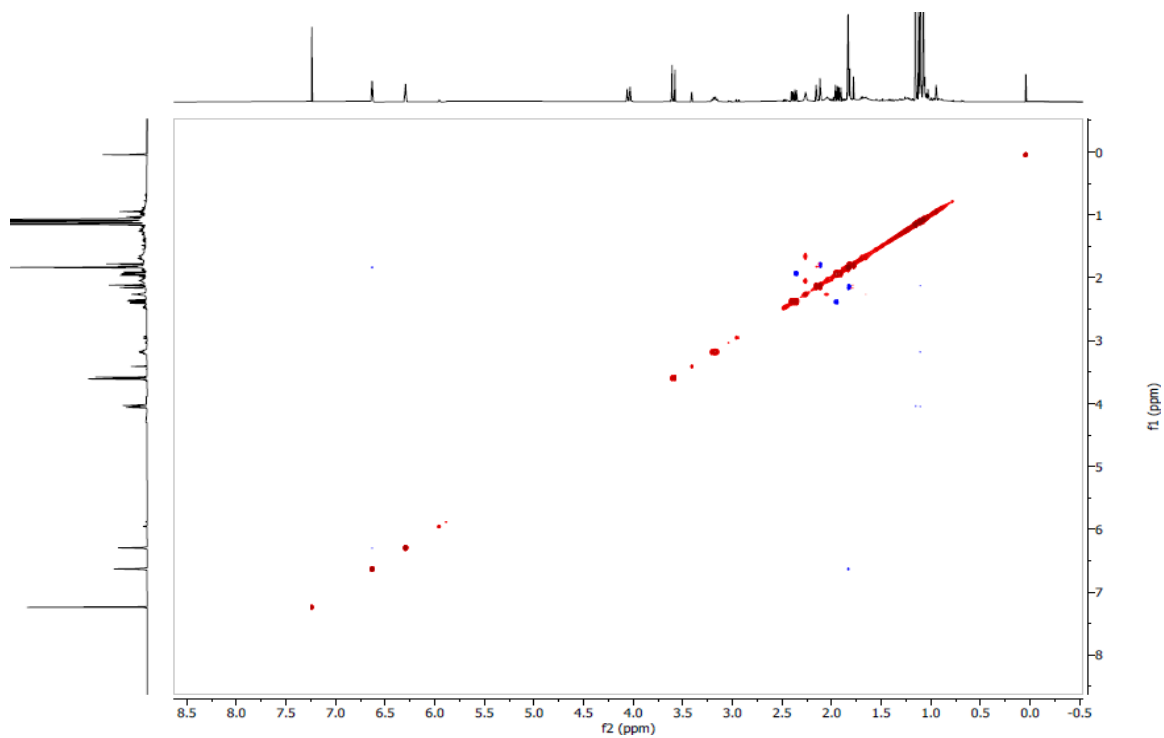


Figure 50. ^1H spectrum of Ribifolone F, 400MHz in CDCl_3

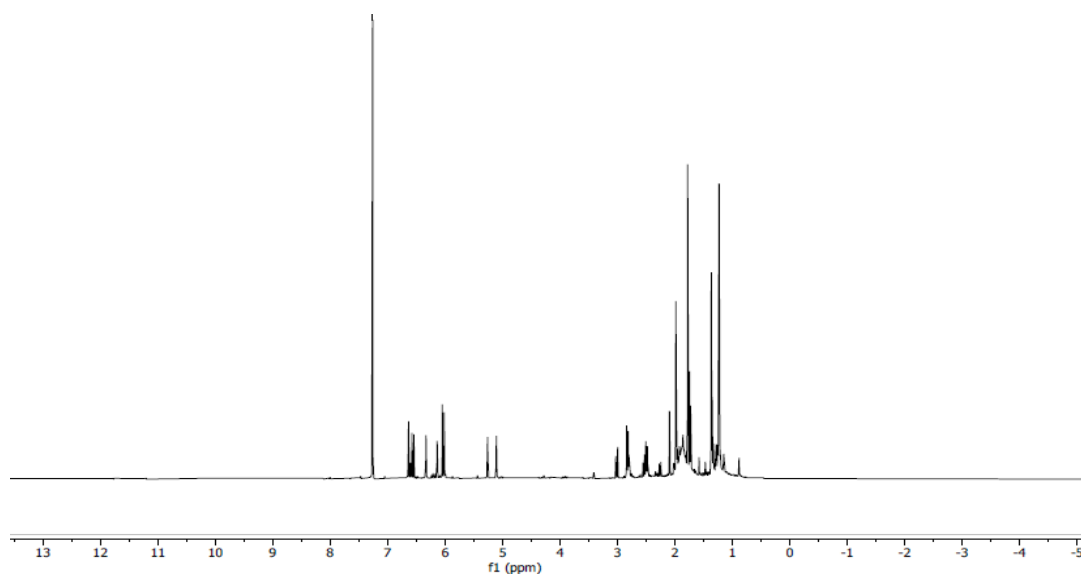


Figure 51. Expansion of ^1H spectrum of Ribifolone F, 400MHz in CDCl_3

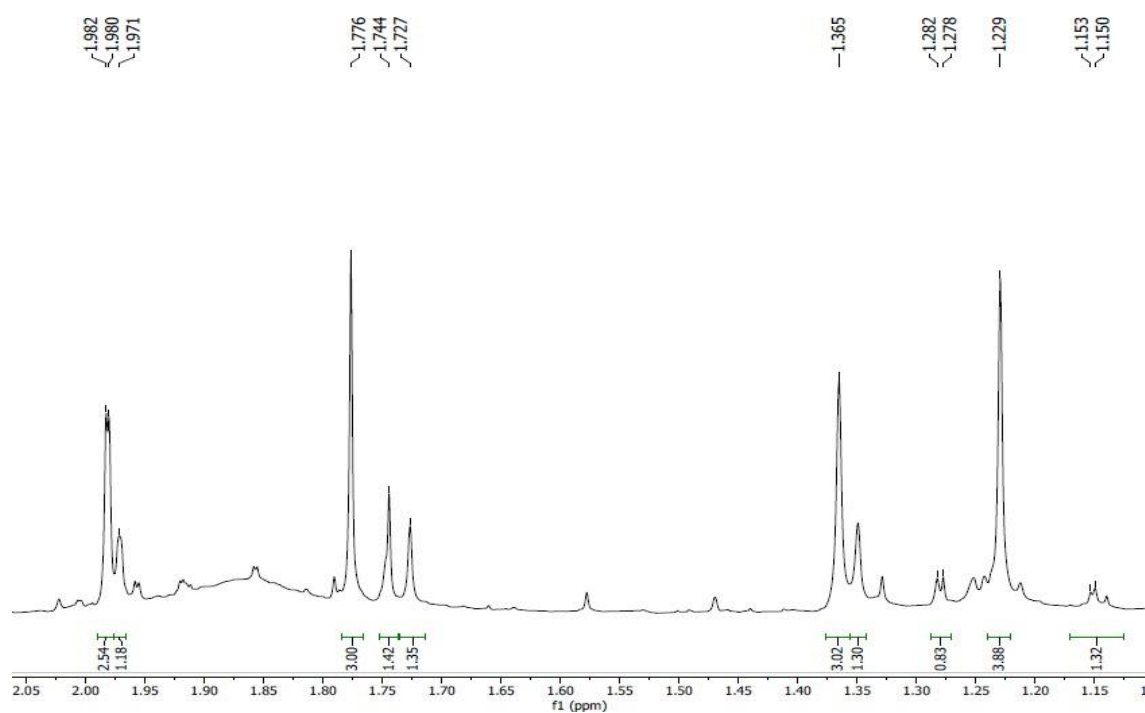


Figure 52. Expansion of ^1H spectrum of Ribifolone F, 400MHz in CDCl_3

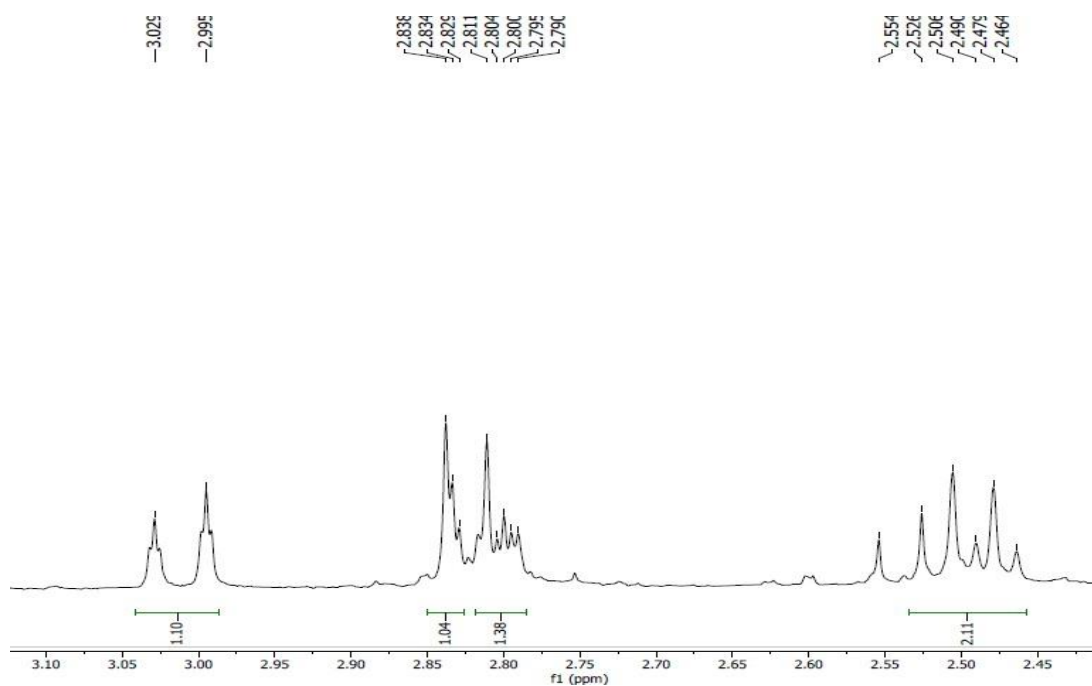


Figure 53. Expansion of ^1H spectrum of Ribifolone F, 400MHz in CDCl_3

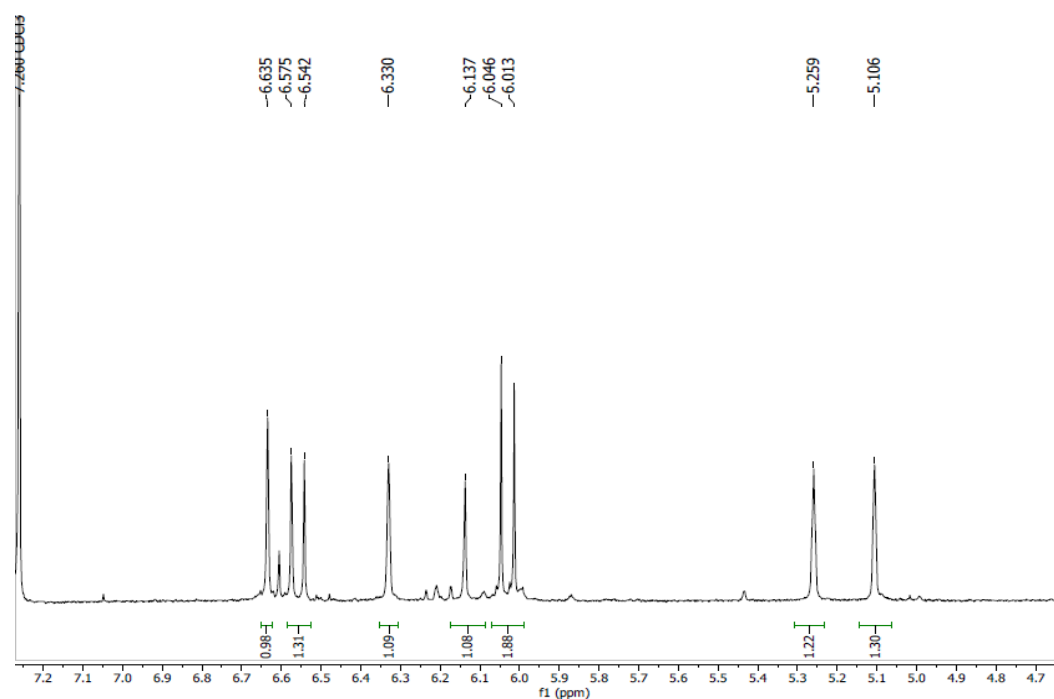


Figure 54. ^{13}C spectrum of Ribifolone F, 400MHz in CDCl_3

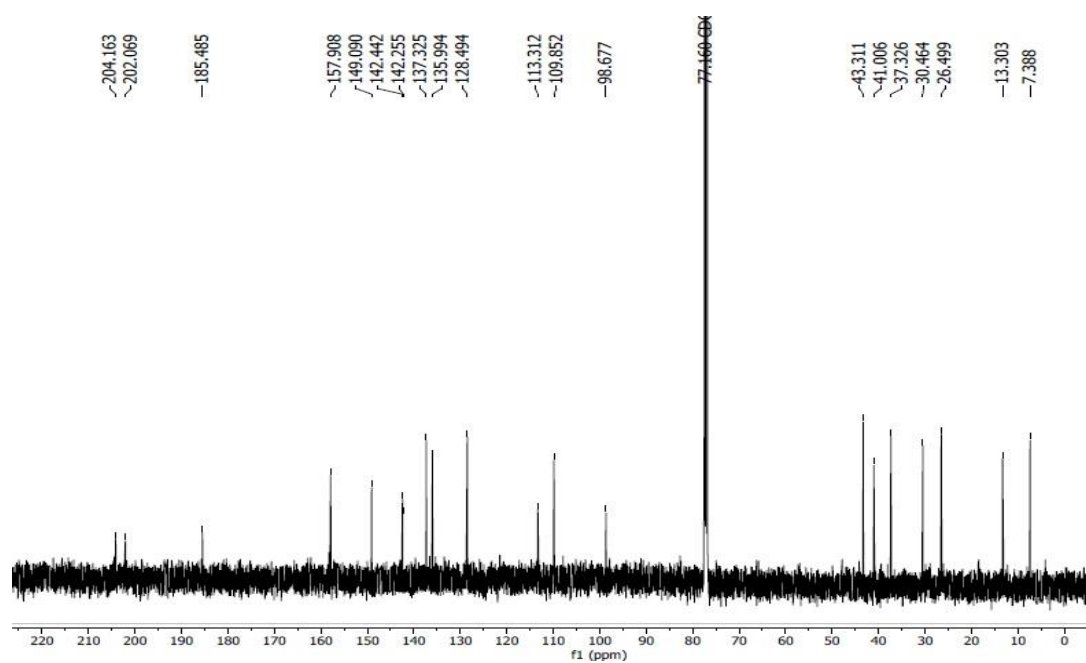


Figure 55. Dept spectrum of Ribifolone F, 400MHz in CDCl_3

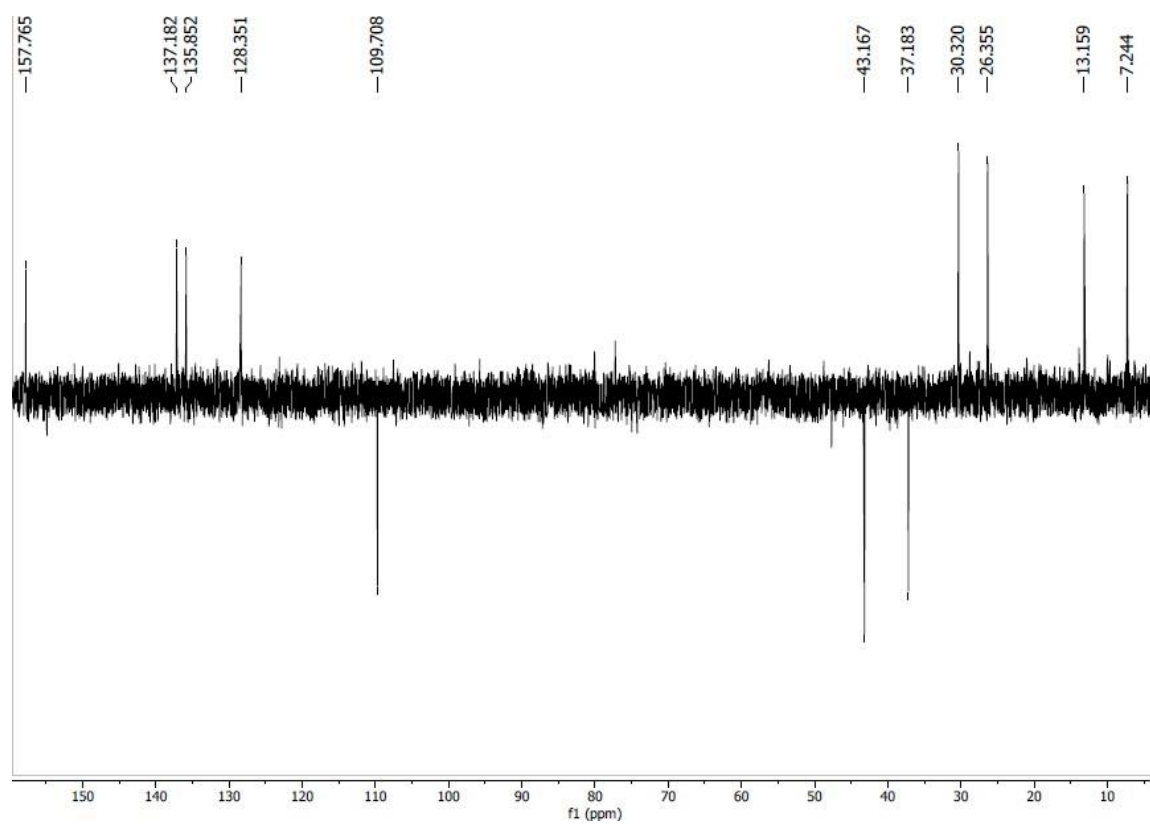


Figure 56. Cosy spectrum of Ribifolone F, 400MHz in CDCl₃

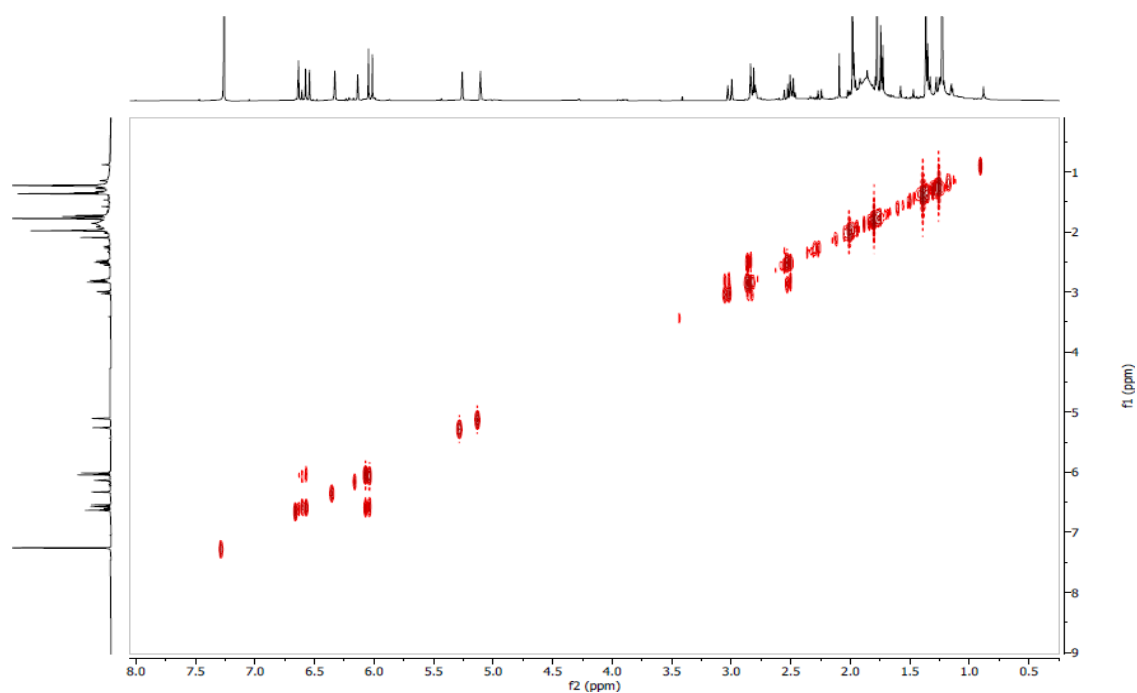


Figure 57. HMBC spectrum of Ribifolone F, 400MHz in CDCl₃

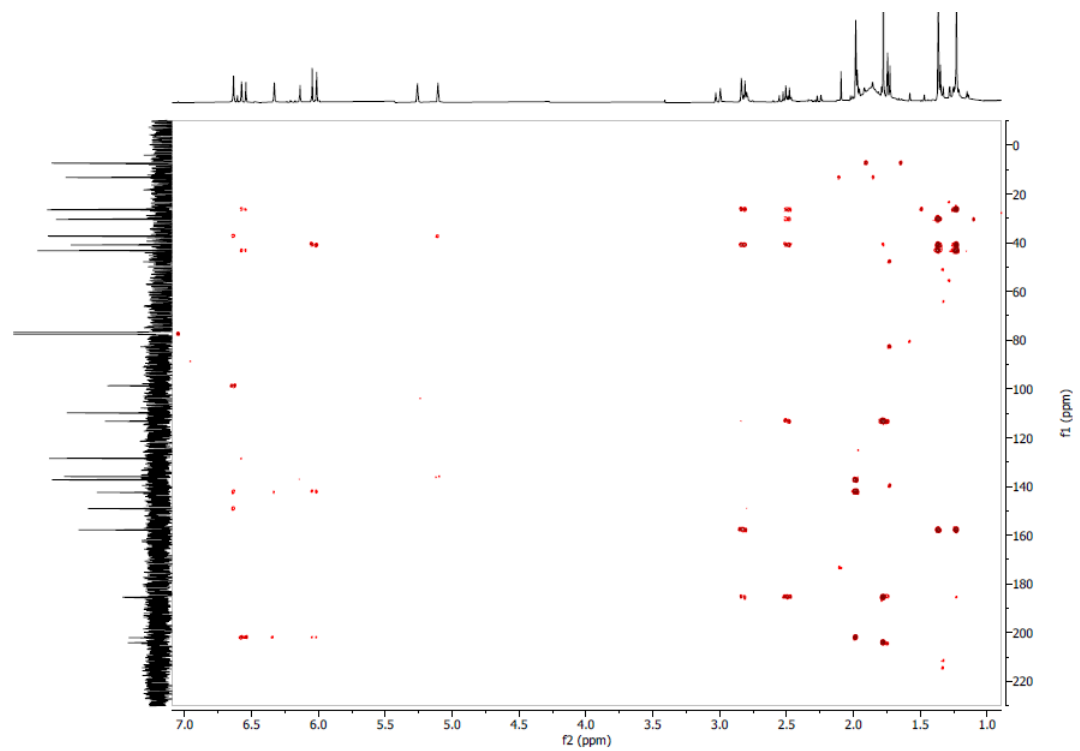


Figure 58. HSQC spectrum of Ribifolone F, 400MHz in CDCl₃

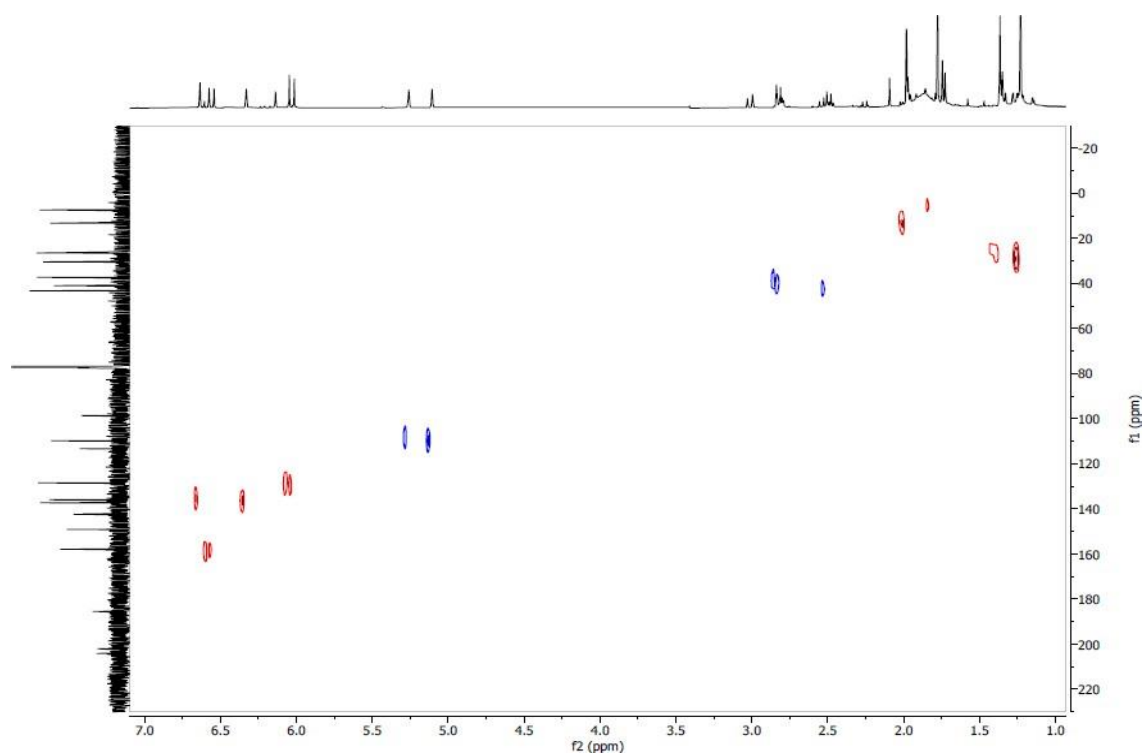


Figure 59. ¹H spectrum of Ribifolone G, 400MHz in CDCl₃

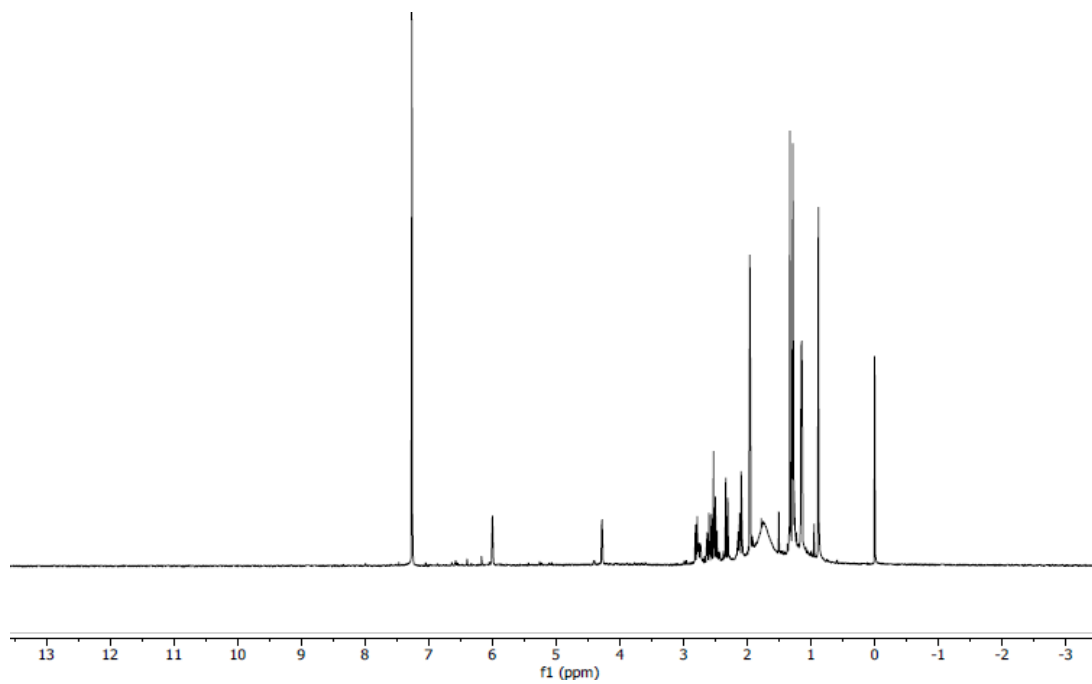


Figure 60. Expansion of ^1H spectrum of Ribifolone G 400MHz in CDCl_3

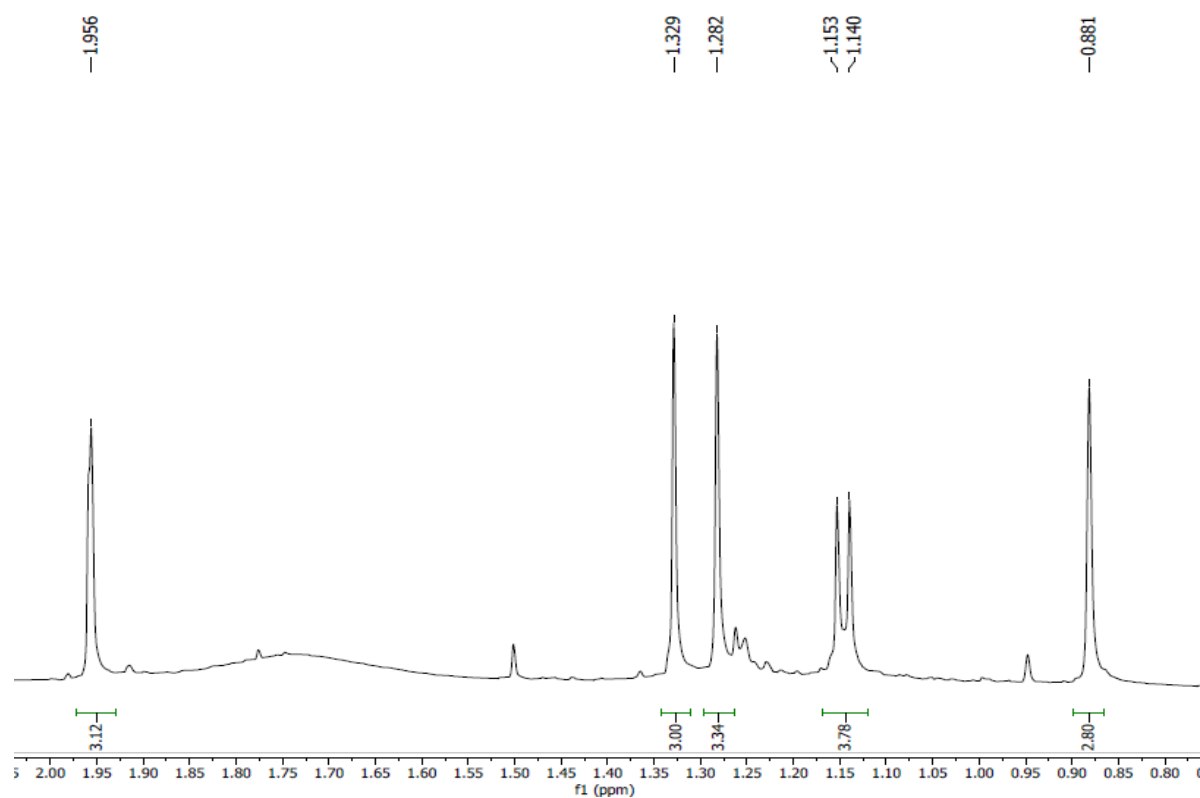


Figure 61. Expansion of ^1H spectrum of Ribifolone G, 400MHz in CDCl_3

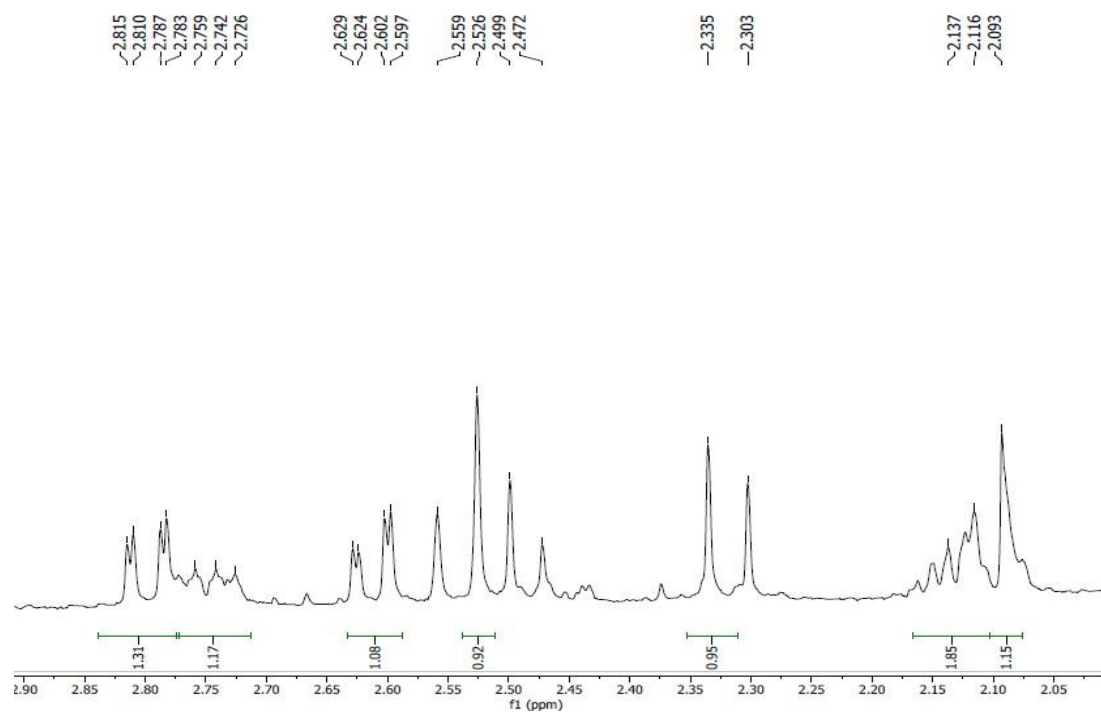


Figure 62. Expansion of ^1H spectrum of Ribifolone G, 400MHz in CDCl_3

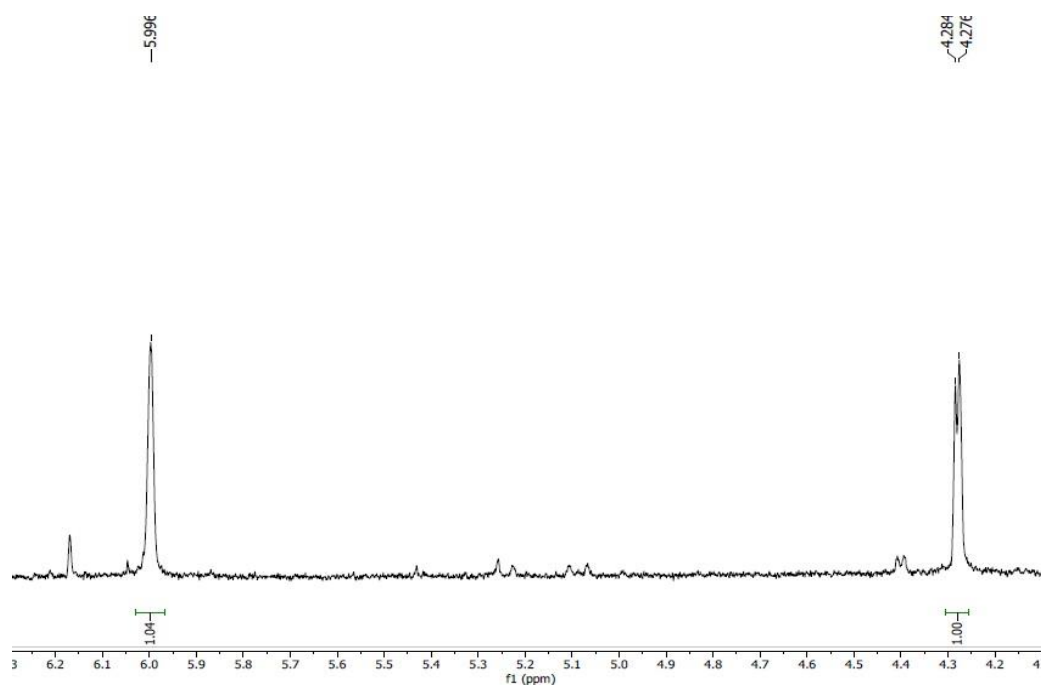


Figure 63. ^{13}C spectrum of Ribifolone G, 400MHz in CDCl_3

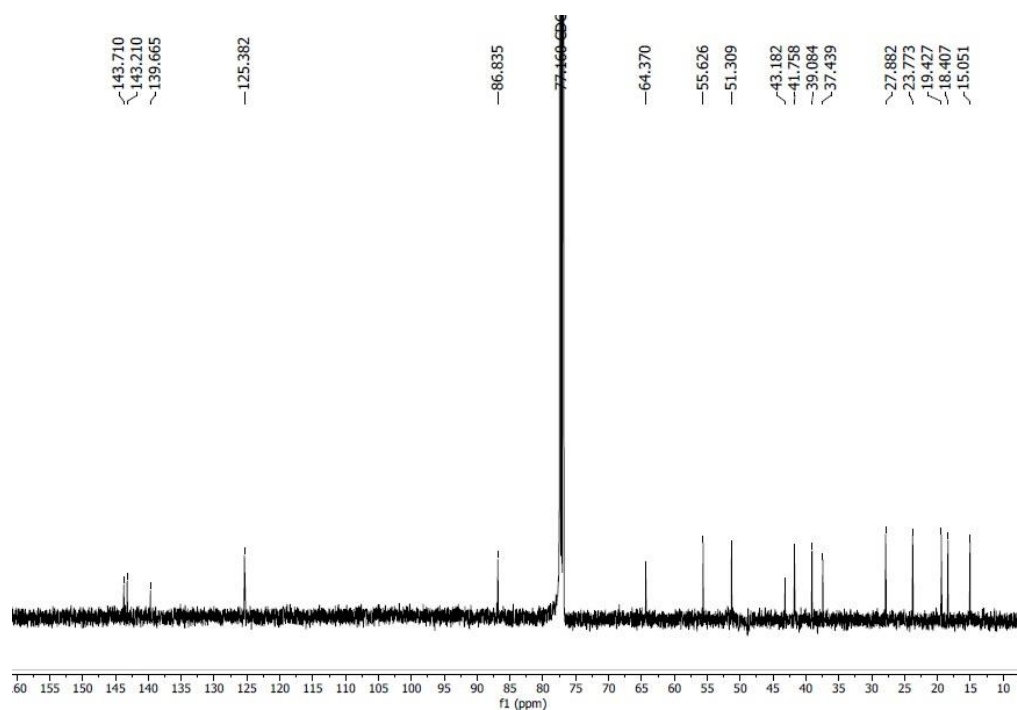


Figure 64. Dept spectrum of Ribifolone G, 400MHz in CDCl₃

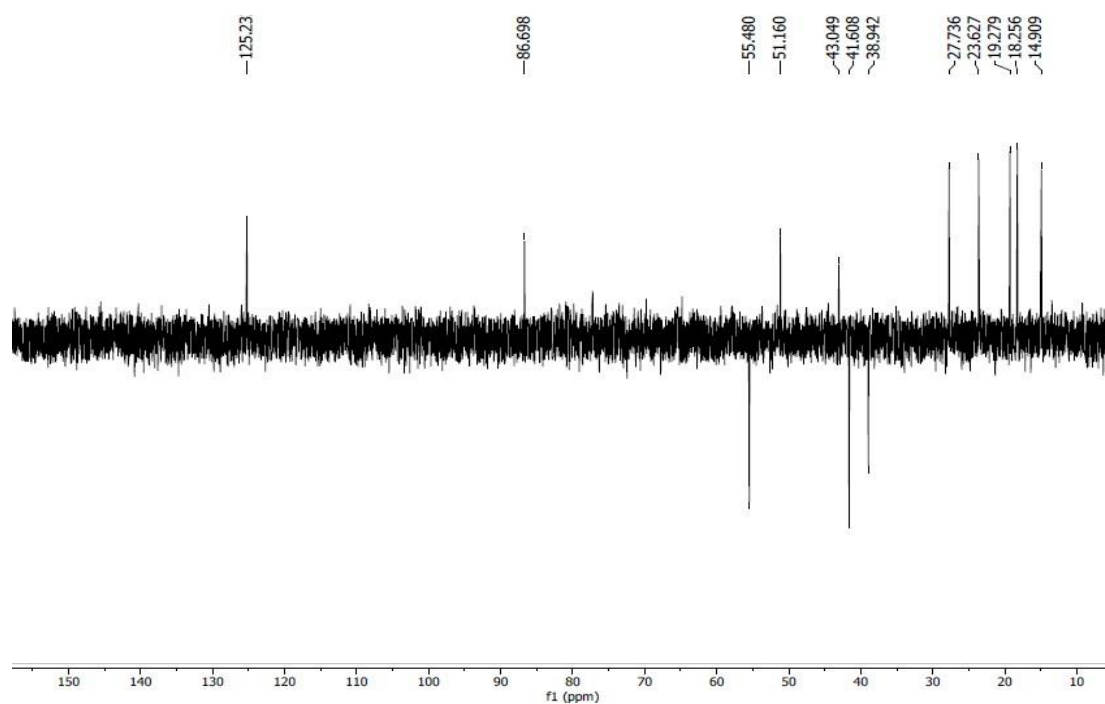


Figure 65. Cosy spectrum of Ribifolone G, 400MHz in CDCl₃

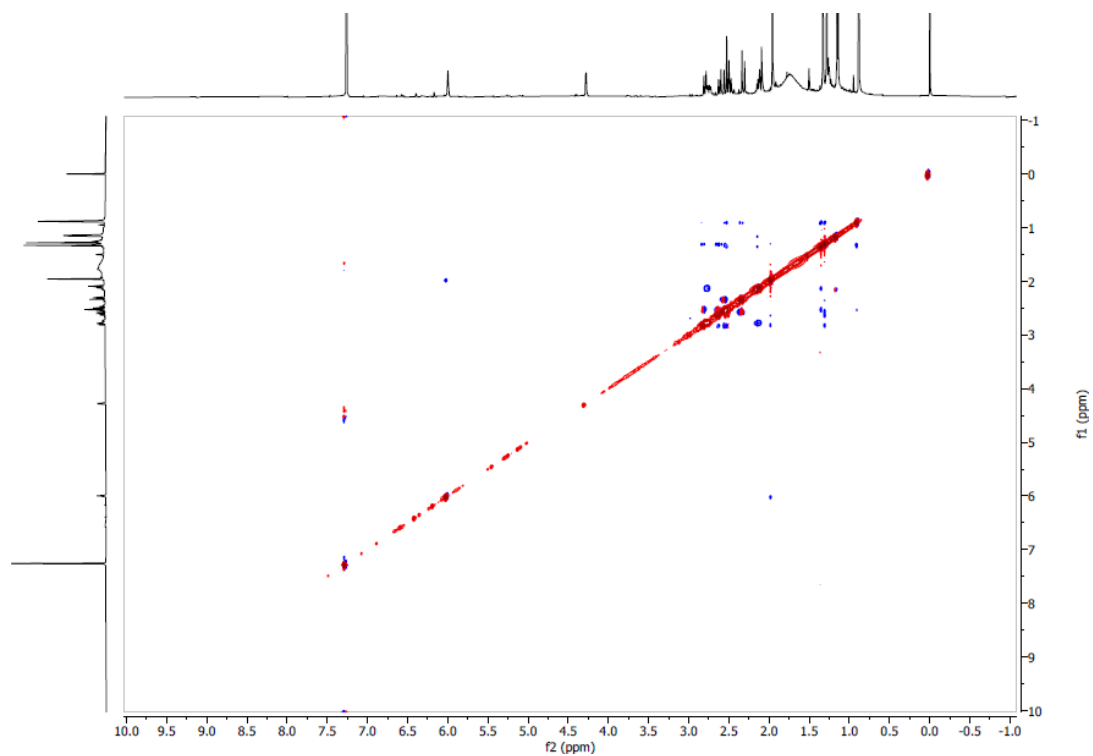


Figure 66. HMBC contour map of Ribifolone G, 400MHz in CDCl₃

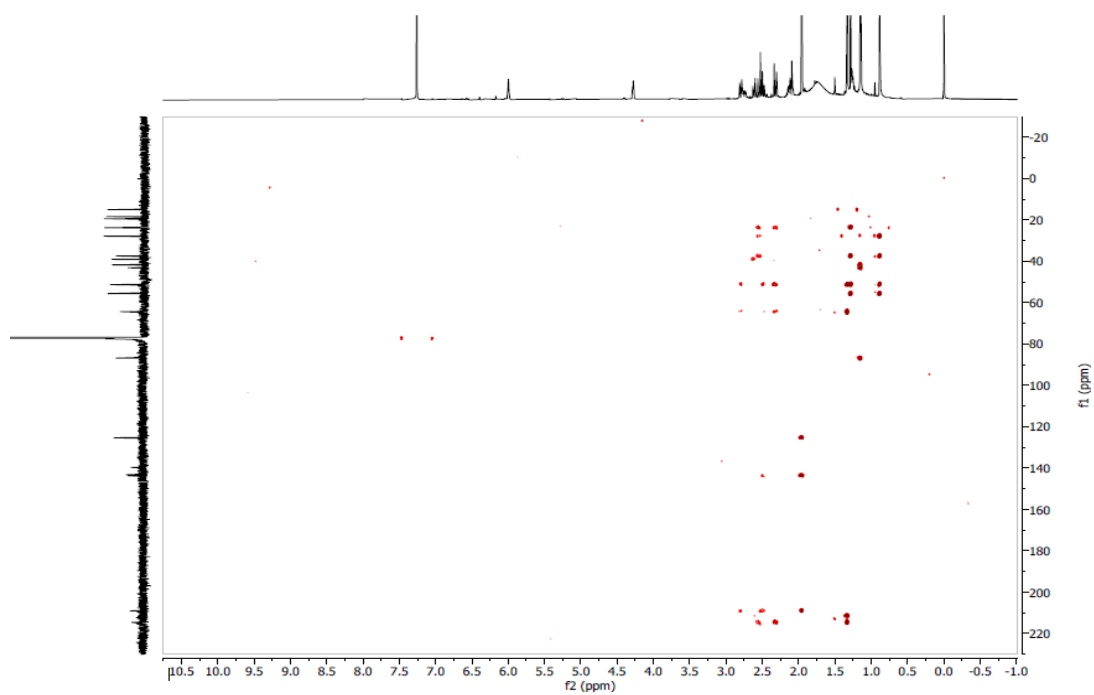


Figure 67. HMBC contour map expansion of Ribifolone G, 400MHz in CDCl₃

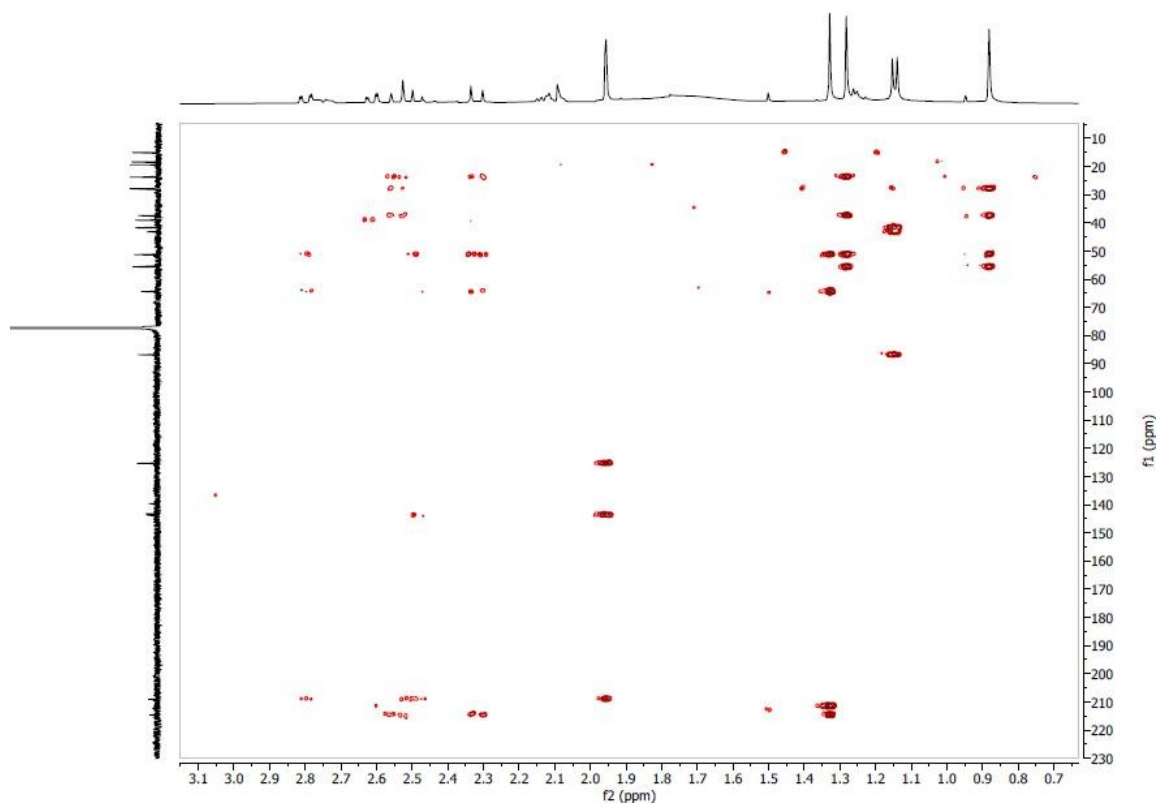
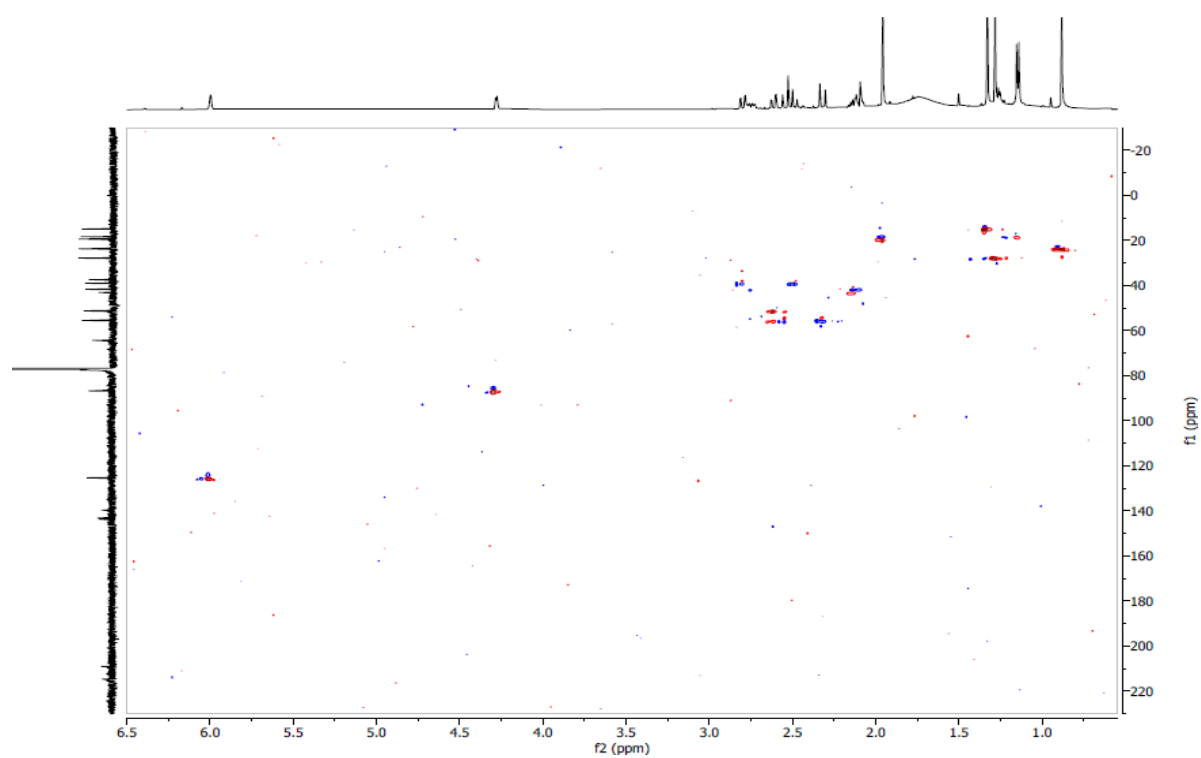


Figure 68. HSQC contour map of Ribifolone G 400MHz in CDCl₃



**5 CAPÍTULO 5. O EXTRATO DE *JATROPHA*
RIBIFOLIA (EUPHORBIACEAE) E SEU
COMPOSTO MAJORITÁRIO APRESENTAM
ATIVIDADE ANTIBIOFILME CONTRA
*PSEUDOMONAS AERUGINOSA***

Jatropha ribifolia* (Euphorbiaceae) extract and its main compound display antibiofilm activity against *Pseudomonas aeruginosa

Abstract

Antimicrobial resistance (AMR) is a current public health challenge. Among bacterial strategies to evade the effects of antibiotics, the expression of virulence factors and biofilm formation stands out as some of the most studied. *Pseudomonas aeruginosa*, a gram-negative bacterium, is notorious for nosocomial infections and the occurrence of highly multidrug-resistant strains. Natural products have been a valuable source for identifying new virulence arresting compounds. In this context, terpenoids display significant activities against resistant bacteria. Brazilian semi-arid region harbors numerous unexplored terpenoid enriched plants with bioactive potential, including *Euphorbiaceae* species. Based on that, the current study aims to assess the antibiofilm and antivirulence properties of the root extract of *Jatropha ribifolia* (JRR) and its major compound, jatrophone (JTP), against *P. aeruginosa* biofilm. Antibiofilm activity was evaluated through biofilm formation and dispersion crystal violet assays, with additional analysis by confocal microscopy. Fluorescence anisotropy was carried out to measure membrane fluidity. Moreover, to associate the activity with extract composition the content of JTP was quantified by HPLC-PDA. As a result, 422 mg/g of JTP was quantified by HPLC analysis. JRR and JTP did not affect bacterial growth but moderately reduced pyocyanin and biofilm formation. Membrane rigidification, observed in treated cultures, suggesting an involvement of membrane homeostasis-associated genes in the activity. Confocal microscopy and COMSTAT analysis have confirmed the reduction in biofilm formation. This research demonstrates the antibiofilm activity of JRR and JTP against *P. aeruginosa*, offering new perspectives for the study of macrocyclic diterpenes and contributing to the understanding of the bioactive potential of *Euphorbiaceae* species from the Caatinga.

Key words: Phytochemicals; Antibacterial activity; Terpenoids

5.1 Introduction

The discovery of antibiotics is one of the milestones of the 20th century. However, the indiscriminate use of these substances has favored the prevalence of resistant strains, leading to a major public health threat today: antimicrobial resistance (AMR) [1]. The consequences of AMR have a particularly severe impact on low- and middle-income countries [2]. The systematic analysis on AMR from 2019 to 2021 identifies South Asia, Latin America, and the Caribbean as regions with the highest mortality rates due to AMR across all age groups, with an estimated death toll exceeding 40 million by 2050 [3].

The mechanisms associated with AMR involve several strategies, with the expression of virulence factors and biofilm formation being among the most extensively studied pathways [4,5]. These mechanisms allow the pathogen to employ survival strategies, either through replication and dissemination or by protecting the bacteria from the action of antibiotics. Consequently, they enable the microorganism to subvert host defense mechanisms, resulting in severe infections [6,7]. Identifying molecules active against these evasive strategies opens new avenues for the development of more effective antimicrobial agents. In this regard, the diversity of molecular patterns found in natural compounds provides valuable insights and may aid in this endeavor.

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic human pathogen, responsible for acute nosocomial lungs, soft tissue, and systemic infections. It is also associated with chronic pulmonary infections in individuals with underlying inflammatory lung diseases and in those with indwelling medical devices (e.g., catheters, prosthetic joints, and surgical implants) [8,9]. This pathogen is responsible for over 500,000 deaths annually [10]. One of the most striking features of *P. aeruginosa* is its intrinsic resistance to many antibiotics. Furthermore, through chromosomal gene mutations and the acquisition of resistance markers via horizontal transfer, its ability to develop resistance to nearly all available antibiotics has led to the global spread of multidrug-resistant strains [11,12].

Among the many classes of natural products, terpenoids exhibit remarkable activity against resistant microorganisms [13,14]. Diterpenes are promising agents in the fight against *P. aeruginosa* because, in addition to their structural diversity,

they can target biofilm and virulence factors [15,16]. Rich in diterpenes, species from the Euphorbiaceae family may serve as a source for the discovery of new virulence arresting compounds. Among its many genera, *Jatropha* stands out for its production of macrocyclic diterpenes. Nevertheless, only a small number of these compounds had their antimicrobial and antivirulence potential assessed.

J. ribifolia (Pohl) Baill is a Brazilian endemic species, previous investigation has been focused mainly on the evaluation of its cytotoxic activity [17]. Moreover, the role that this plant may exert in pathogenic bacteria virulence factors and biofilms is completely unknown. Therefore, this study aims to assess the antibiofilm and antivirulence properties of the root extract of *Jatropha ribifolia* (JRR) and its major compound, jatrophone (JTP), against *P. aeruginosa*.

5.1 Materials and Methods

5.1.1 Quantification of jatrophone

The obtention of the *J. ribifolia* roots extract and their main compound were previously described. The method for quantifying JTP was developed using HPLC-PDA, adhering to the linearity parameter established by ANVISA, as described in RDC No. 166 of July 24, 2017 [18]. The external standard method was chosen.

5.1.2 Reference Chemical Substance

The chemical compound used as a standard for analysis through high-performance liquid chromatography (HPLC) was jatrophone (JTP), obtained from previous chromatographic processes and spectroscopic characterization.

5.1.3 Solvents and reagents

Solvents used were ultrapure water, acetonitrile (Biograde®) and formic acid (J. T. Baker®). All of them meet the purity HPLC-grade. Prior to use, the solvents were exposed to ultrasonic cavitation for 20min, for this step a Q13L/37 ultrasonic cleaner (Eco-sonics®) was used.

5.1.4 High Performance Liquid Chromatography (HPLC) analytical method

An analytical chromatograph Proeminence (Shimadzu®) with an auto-injector was used for the analyses, equipped with a GIST C-18 reversed-phase column (Shimadzu®) with a particle size of 5 µm and dimensions of 250 mm x 4.6 mm. The elution was composed by (A) water acidified with 0.1% formic acid (J. T. Baker®) (v/v) and (B) acetonitrile, isocratic elution composed by 60% of B ranging from 0 to 25 min was used. After that, the column was cleaned and reconditioned for the next chromatographic run. Analyses were carried out in triplicate, the injection volume of 10 µL and a flow rate of 0.6 mL/min were applied.

A stock solution of the standard compound was prepared at a concentration of 1.2 mg/mL in MeOH, from which dilutions were made to prepare concentrations of 228.9, 343.4, 457.8, 572.25, and 686.7 µg/mL. Similarly, a calibration curve was obtained to JRR. A stock solution of 3 mg/mL was prepared by dissolving the extract in methanol (MeOH). Then, serial dilutions (from the stock) were performed to achieve final concentrations of 500, 750, 1000, 1250, and 1500 µg/mL.

5.1.5 Bacterial strain, growth conditions and chemicals

The bacterium *P. aeruginosa* H103, a phototroph of the wild type of strain PAO1, was used in the current study. The bacteria strain stored in -80°C were cultured in LB medium (Difco, BD) at 37°C in shaking condition (180rpm). The hexanic extract of *J. ribifolia* (JRR) and jatrophone (JTP) were obtained as previously described. The samples were suspended in DMSO at a concentration of 10 mg/mL and stored at 4°C.

5.1.6 Kinetics growth

To visualize the effect of compounds on *Pseudomonas aeruginosa* viability, growth kinetics were performed with different concentrations [25µg/ml, 50 µg/ml and 100 µg/ml] of JRR and JTP. An overnight culture grown in LB medium and adjusted at an OD_{580nm} of 0.08 was incubated at 37°C during 24h. The absorbance was recorded every 15mn with shaking using the Spark 20 M multimode Microplate Reader, equipped with an active temperature regulation system (Te-Cool™, Tecan Group Ltd., Männedorf, Switzerland).

5.1.7 Pyocyanin production

Pyocyanin is one of the main virulence factors in *P. aeruginosa*. To evaluate the effect of samples on the virulence of the bacterium, the pyocyanin was extracted from untreated and treated culture. An overnight culture, adjusted to an OD_{580nm} of 0.08, was incubated with or without 25, 50, 100 µg/ml of samples in 96-well-plates at 37°C during 24h with shaking conditions. The pyocyanin quantification assay was carried out as previously described [16]. Briefly, one volume of chloroform was added to the culture supernatants. After centrifugation, the chloroform layer (blue layer) was collected and half a volume of 0.5M HCl was added. After a second centrifugation, the HCl layer (red-pink layer) was collected and the OD_{520nm} was measured using the Spark 20M multimode Microplate Reader controlled by Spark Control™ software Version 2.1. The data were normalized for bacterial cell density and expressed as a percentage of the control value.

5.1.8 Biofilm formation

To assess the impact of samples on biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* H103, a bacterial culture adjusted to OD = 0.08 was grown with or without 25, 50 or 100 µg/ml of samples. Cultures were incubated under static conditions at 37°C for 24h in 96-well plates, and optical density at 580 nm was measured before and after the 24h incubation.

The biofilm was then revealed by crystal violet staining. Briefly, after 2 rinses with physiological water (9g/L NaCl) removed planktonic cells, the biofilm was marked with 0.1% crystal violet. After 15 min incubation at room temperature, the biofilms were rinsed with MilliQ water, and the stain was resolubilized in 30% acetic acid. Optical density at 595nm was then measured using the Spark 20 M multimode Microplate Reader controlled by Spark Control™ software Version 2.1. Results were normalized for bacterial cell density and expressed as a percentage of the control value.

5.1.9 Biofilm dispersion

Biofilm dispersion of *Pseudomonas aeruginosa* H103 was explored with 25, 50 and 100 µg/ml of the samples. A bacterial culture adjusted to an OD_{580nm} = 0.08 was grown under static conditions at 37°C in 96-well plates with peg lids (Inovotech®).

After 24 h, the biofilm clinging to the pegs was rinsed with physiological water (9g/L NaCl) and then incubated again for 24 h at 37°C in static condition with and without compounds. The crystal violet staining method was then used. Briefly, biofilms were rinsed three times with ultrapure water before and after staining with 0.1% crystal violet. The stain was resolubilized in 30% acetic acid. Optical density at 595nm was then measured using the Spark 20 M multimode Microplate Reader controlled by Spark Control™ software Version 2.1. Results were expressed as percentage relative to control.

5.1.10 Biofilm formation and Confocal Laser Scanning Microscopic (CLSM)

For CLSM imaging, a bacterial culture was adjusted to an OD_{580nm} of 0.08 in absence or in presence of 100 µg/mL of the samples in a 24-well plate and incubated for 24h at 37°C under static conditions. Planktonic cells were removed and after 2 rinses with physiological water, the biofilm was stained with SYTO9. The CLSM observations were carried out with a Zeiss LSM710 (Carl Zeiss Microscopy, Oberkochen, Germany) using a 63x oil immersion objective. Images were taken every micrometer throughout the whole biofilm depth. For visualization and processing of three-dimensional (3D) images, the Zen 2.1 SP1 zen software (<https://www.zeiss.com/microscopy/int/downloads/zen.html>) (Carl Zeiss Microscopy, Oberkochen, Germany) was used. Quantitative analysis of images stacks was performed using the COMSTAT software (<http://www.imageanalysis.dk/>). At least five image stacks from each of three independent experiments (15 in total) were used for each analysis.

5.1.11 Fluorescence Anisotropy

To assess membrane fluidity in bacteria treated with samples (25, 50 and 100 µg/mL), the fluorescence anisotropy technique was used as previously described [16]. A static 24h culture, adjusted at OD₅₈₀ = 0.1 and incubate at 37°C, was treated for 2h with the samples. The cells were then centrifuged and the pellet rinsed 2 times with 10 mM MgSO₄. After dilution of the suspensions to OD₅₈₀ = 0.1 with the same solvent, 1 µL of 4mM 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) dissolved in tetrahydrofuran was added and the suspensions were incubated at

37°C for 1h to allow the probe to incorporate into the bacterial membrane. Fluorescence polarization was measured using Spark 20M multimode Microplate Reader, equipped with an active temperature regulation system (Te-Cool™, Tecan Group Ltd., Männedorf, Switzerland) with wavelengths of excitation and emission set at 365 and 425nm, respectively. The relationship between anisotropy and membrane fluidity is an inverse one, where decreasing anisotropy values correspond to a more fluid membrane and vice versa.

5.1.12 Data and Statistical analyses

The chromatographic runs were obtained at a wavelength of 208 nm, the peak areas were obtained based on the standard substance (jatrophone), which were analyzed in five concentration levels (50% to 150%). The areas were then plotted on a linear regression graph to obtain the regression equation and correlation coefficients (R^2). For biological tests, all experiments were carried out at least three times independently and the meaning with standard error of the mean (SEM) were calculated and plotted. Statistical significance was evaluated using Prism GraphPad software version 9.0. The data were statistically analyzed using ordinary one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's multiple comparisons test, to calculate p values. Significance was considered at ****, $p < 0.0001$; ***, $p = 0.0001-0.001$; **, $p = 0.001-0.01$; *, $p = 0.01-0.05$; NS: (not significant), $p > 0.05$.

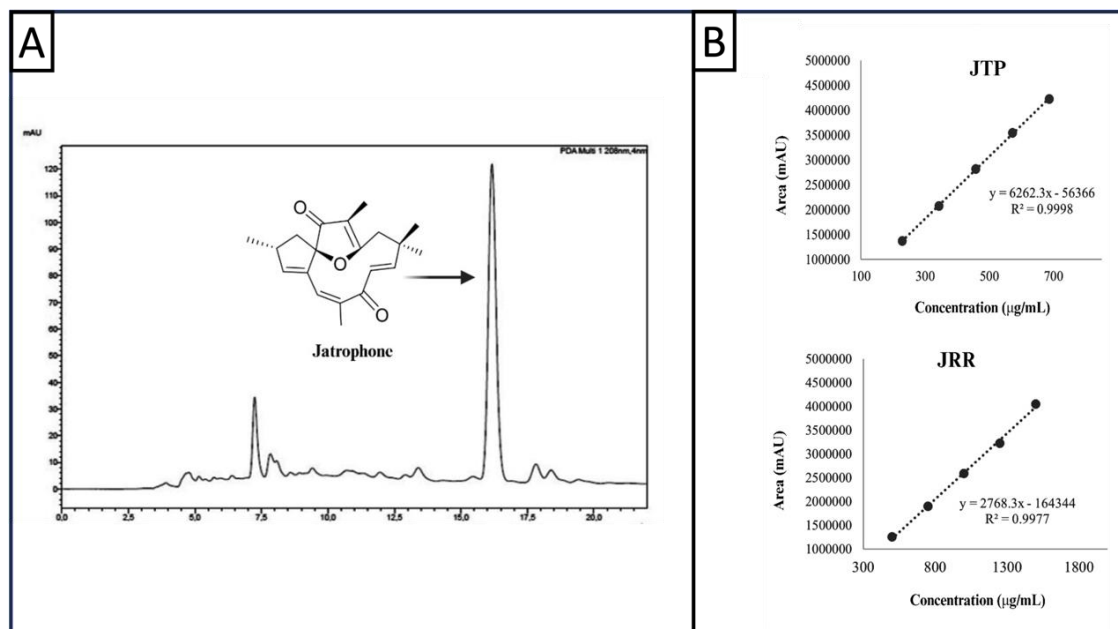
5.2 Results

5.2.1 *J. ribifolia* roots extract contains high levels of jatrophone

With the aim of correlating the activity exhibited by the extract with the concentration levels of the constituent compounds, a quantitative determination was carried out by an analytical approach. The calibration curve was constructed using five concentrations JTP standard, it was observed that the relative standard deviations were $< 5\%$. The equation of the line was obtained, and the correlation coefficient (r) was determined to be 0.9998. Statistical analysis of linear regression was performed, and the residuals were examined, showing a close-to-zero random distribution and the absence of outlier samples. Therefore, it can be affirmed that the method's linearity complies with the recommendations given by RE n° 166/2017. Also, JTP content in *Jatropha ribifolia* extract was found to be 422.5

mg/g. Figure 1A depicts the chromatogram showing the large presence of jatrophone at the root extract and Figure 1B the linear regression curves.

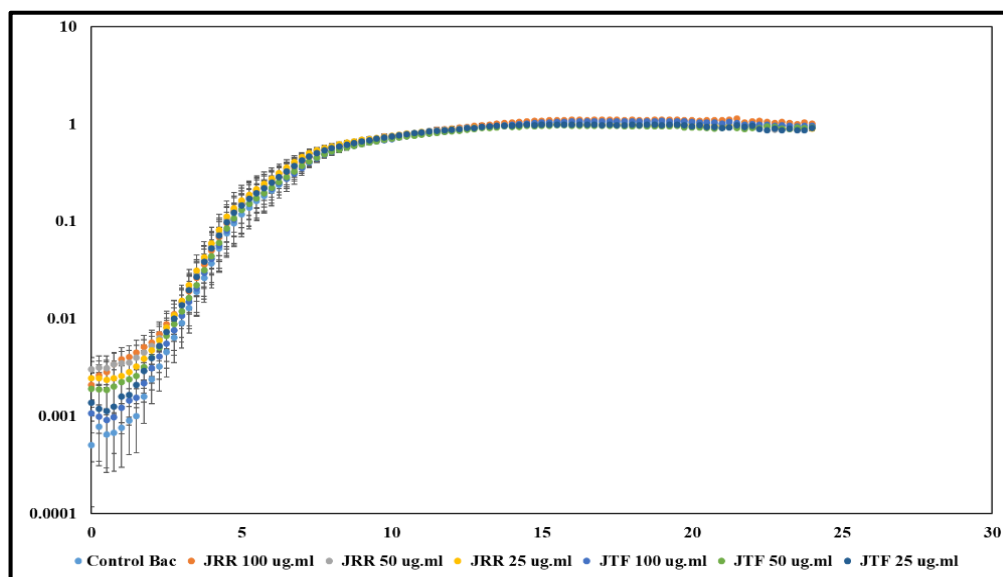
Figure 1. (A) Chromatogram of *J. ribifolia* extract (JRR) (B) Regression curves of JRR and JTP.



5.2.2 Exposure to JRR and JTP Did Not Affect *P. aeruginosa* Growth Kinetic

Since the aim of this study was to evaluate the response of *J. ribifolia* extract (JRR) and its main compound (JTP) exposure on *P. aeruginosa*, the antibacterial activity of the two samples were evaluated. The bacterium was grown with or without 25, 50 and 100 µg/ml of the samples. In the conditions analyzed, the samples were not able to interfere in the growth of *P. aeruginosa* H103 at any concentration (Figure 2)

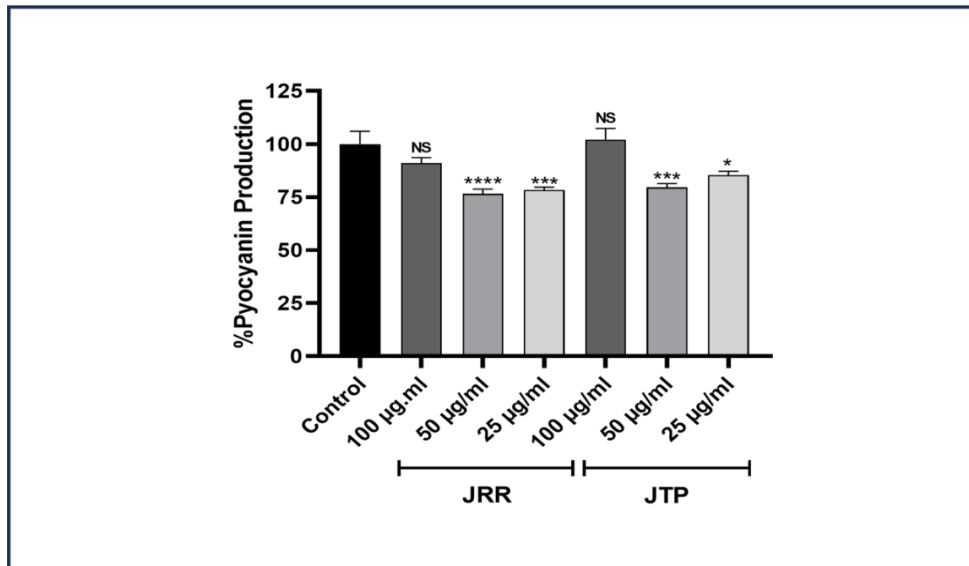
Figure 2. Growth curve of *P. aeruginosa* H103 exposed or not to 25, 50 and 100 µg/ml of JRR and JTP.



5.2.3 JRR and JTP Did Not Deeply Alter the Production of Pyocyanin by *P. aeruginosa*

Pyocyanin is a natural phenazine and composes one of the major virulence factors of *P. aeruginosa*. Capable of interacting with biological membranes, it triggers oxidative stress pathways at the host, acting as a pathogen defense line. Moreover, pyocyanin plays an essential role in *quorum sensing* mechanisms [19,20]. Reducing pyocyanin levels is a promising strategy to attenuate *P. aeruginosa* pathogenicity. The effects of JRR and JTP over pyocyanin were assessed, as results we observed a significant reduction around 25% for both samples at 50 and 25 µg/ml. The extract and the isolate compound have not reduced the pigment production at 100 µg/ml. (Figure 3)

Figure 3. Effect of JRR and JTP on pyocyanin production of *P. aeruginosa* H103. OD520nm was normalized to bacteria growth and was exprimed as the percentage of the control untreated. Quantifications are the meaning of 3 independent experiments and error bars represent the mean SEM standard error. Significance was considered at **, $p < 0.0001$; ***, $p = 0.0001-0.001$; *, $p = 0.01-0.05$; NS: (not significant), $p > 0.05$.**

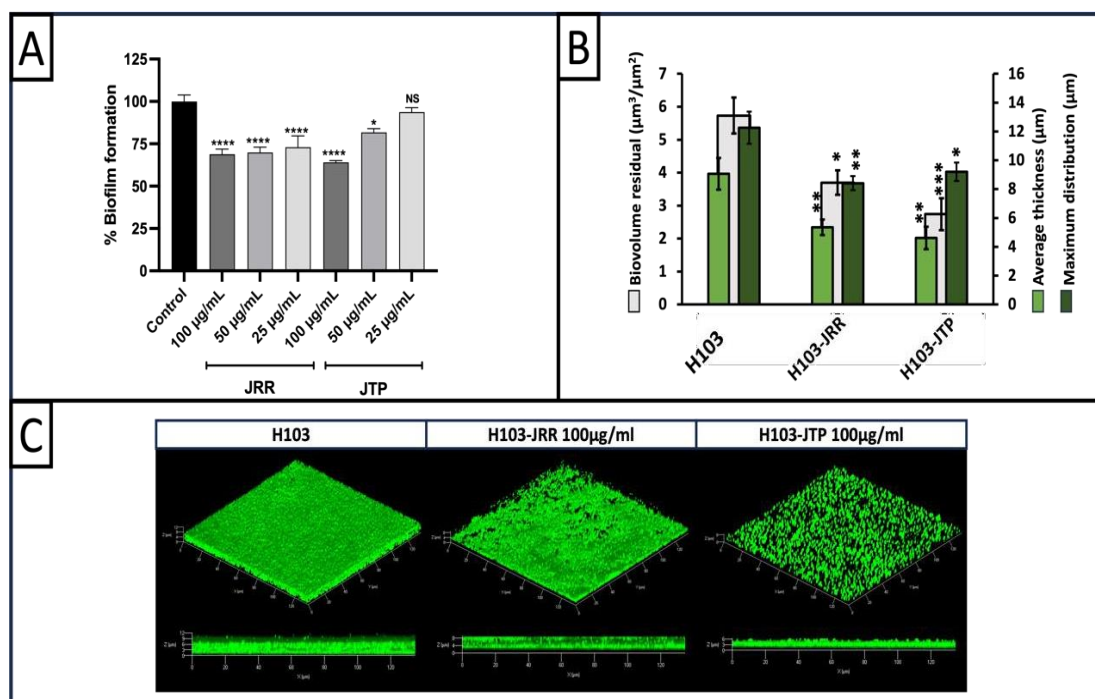


5.2.4 JRR and JTP Affect *P. aeruginosa* Biofilm Formation

Biofilm formation is an adaptive mechanism, it is also considered as the key pathogenicity factor enhancing the survival of exposure to antibiotics and initiating chronic infections [21]. The effects of JRR and JTP were first screened by crystal violet method and a reduction around 35 % were registered to the extract and jatrophone at 100 µg/ml, respectively. A dose-dependent relation was observed to JTP at the conditions tested, results are depicted in Figure 4A. In order to verify the morphological changes in the *P. aeruginosa* biofilm treated with JRR and JTP, confocal microscopy observations were carried out. The images obtained demonstrate a clear effect, especially over the cultures treated with the isolated compound, Figure 4B. Associated to COMSTAT analysis, the mitigation of biofilm production was corroborated, represented by three parameters: Biovolume, average and maximum thickness. (Figure 4C).

Figure 4. JRR and JTP inhibit the biofilm formation of *P. aeruginosa*. (A) Effect of JRR and JTP on biofilm formation by using crystal violet assay tests. OD595nm normalized to the growth bacterium was presented as percentage of the control untreated. Data is presented as a mean of three independent experiments and the error bar corresponds to the mean standard error (SEM). Significance was considered at **, $p < 0.0001$; *, $p = 0.01-0.05$; NS: (not significant), $p > 0.05$. (B) COMSTAT analyses were performed to analyze the biovolume ($\mu\text{m}^3 \cdot \mu\text{m}^{-2}$), average and maximum thickness (μm) of biofilm untreated and treated with 100µg/ml of JRR or 100µg/ml of JTP. Data are exprimed as the mean of at least five views of three independent experiments and the error bar represents the mean standard error. Significance was considered at ***, $p = 0.0001-0.001$ **, $p = 0.001-0.01$ *, $p = 0.01-0.05$. (C) 3D**

view of 24-old-biofilm untreated and treated with 100 μ g/ml of JRR or 100 μ g/ml of JTP. Bacteria cells were stained with SYTO9 and were visualized by CLSM.



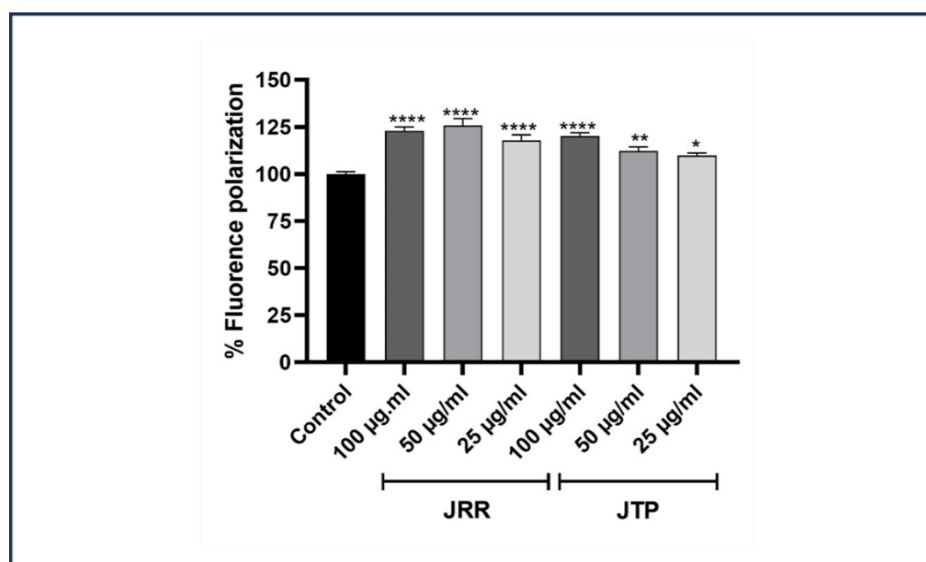
5.2.5 JRR and JTP Did not Affect *P. aeruginosa* Biofilm dispersion

Biofilm dispersal can occur because of mechanical breakage of biofilms due to flow or shear stresses. Furthermore, dispersal could be induced by the biofilm itself in response to environmental cues [22]. Auto induced dispersion requires a previous formed biofilm, many molecular signals have been described in that process, such as c-di-GMP [23]. The dispersion induced by exogen compounds could change the molecular balance into to the biofilm architecture and aid to disrupt its complex matrix, allowing the action of antimicrobials agents. Considering the activity of JRR and JTP in biofilm formation, their potential to disperse *P. aeruginosa* biofilm was also evaluated by using crystal violet method. However, no significant effects were observed (data not shown).

5.2.6 JRR and JTP Exposure Affect *P. aeruginosa* Membrane Fluidity

The membrane performs essential functions for the microorganism's survival and virulence. Among these functions, it confers resistance to many antimicrobials and enables biofilm formation through membrane-anchored proteins that assist in adhesion to different surfaces. Membrane homeostasis is directly related to its fluidity [24], analyzing changes in membrane fluidity aids in understanding potential mechanisms associated with the activity of antibiofilm compounds. To assess membrane fluidity in *P. aeruginosa*, the fluorescence anisotropy method was used. The results indicated that cultures treated with JRR and JTP experienced membrane stiffening approximately in 20% compared to the control. The analysis of these results is based on an inverse relationship between fluidity and fluorescence polarization [25], revealing physiological changes and adaptations in the cellular envelope of H103 in response to JRR and JTP exposure. Below, Figure 5 illustrates the effect of JRR and JTP at three concentrations, a dose-dependent response seems to occur for the isolated compound (JTP).

Figure 5. Anisotropy fluorescence of *P. aeruginosa* H103 treated with JRR and JTP. The DPH fluorescent probe, inserted into the bacterial membrane, was used to measure fluorescence anisotropy. Quantifications are the mean of three independent experiments and error bars represent the mean SEM standard error. Significance was considered at **, $p < 0.0001$; **, $p = 0.001–0.01$; *, $p = 0.01–0.05$; NS: (not significant), $p > 0.05$.**



5.3 Discussion

Plant extracts are complex matrices resulting from the combination of many compounds. Thus, defining markers (chemical or pharmacological) aids in understanding activity, ensures greater reproducibility in assays, and provides information for assessing the potential toxicity of these extracts [26,27]. In this regard, regulatory agencies recommend the use of analytical methods to characterize and quantify these markers [28,29]. In the present study, jatrophone (JTP) was quantified using HPLC-PDA.

The linearity assays indicated that 42.2% of the JRR mass consists of JTP. This result is noteworthy, as, to our knowledge, other species within the same genus contain only small quantities of JTP. As demonstrated by Pletsch and Charlwood (1997), these authors evaluated the presence of JTP in root callus cell lines of eight different *Jatropha* species and concluded that no JTP, or only trace amounts, were found in the analyzed material [30]. In *J. isabellei* roots, previously reported as a source of JTP, the content was 90 µg/mg in the dichloromethane phase [31]. Based on these results, it is possible to infer that extracting the plant material directly with hexane is a favorable condition for obtaining JTP.

Regarding *P. aeruginosa* growth, To assess growth kinetics is an essential tool to understand the effects of a substance over the virulence of microorganisms, without necessarily compromising their growth, and to develop more specific and safer therapeutic approaches. The exposure of cultures to JRR and JTP did not interfere with bacterial growth. Literature indicates that some diterpenes, including macrocycles, are inactive or weakly active against *P. aeruginosa* growth [32]. Previous studies on hexanic extracts from different *Jatropha* species also showed reduced growth inhibition [33,34]. The virulence-arresting strategy does not aim to directly exterminate pathogens but rather to inhibit their mediated resistance factors. This approach implies that sub-inhibitory concentrations should be used in subsequent experiments. Among the advantages of seeking compounds with selective activity against pathogenicity factors are their lower susceptibility to promoting antimicrobial resistance (AMR) production [35]. Additionally, targeting virulence or biofilm traits increases the number and diversity of therapeutic targets. Over the past five years, more than 20% of the U.S. Federal Drug Agency approvals for first-in-class antimicrobial agents have been for virulence-arresting drugs [36]. Subsequently, JRR and JTP were tested for their

effects on pyocyanin production and biofilm formation and dispersion at sub-inhibitory concentrations.

Quorum sensing (QS) is the bacterial communication pathway. In biofilms, QS chemical signals play essential roles in intra- and interspecies communication. Most pathogenic bacteria orchestrate their virulence factors, biofilm formation, and antibiotic resistance through QS systems [37]. In *P. aeruginosa*, pyocyanin production occurs at different regulatory levels controlled by the main QS systems: Las, Rhl, and PQS. Pyocyanin production is associated with bacterial density, so variations in its levels affect biofilm formation and other previously mentioned resistance mechanisms [38]. The samples tested, JRR and JTP, showed moderate activity on pyocyanin production. However, this finding differs from what was observed for mulinane-type macrocyclic diterpenes, which significantly reduced pyocyanin levels by approximately 70% [16]. These results encourage further studies on the structural characteristics involved in the response triggered by macrocyclic diterpenes on the virulence factors of *P. aeruginosa*.

Biofilms are surface-associated communities enclosed within an extracellular matrix primarily composed of polysaccharides, proteins, nucleic acids, lipids, and other macromolecules and chemicals [39]. Among the mechanisms associated with diterpenes on biofilms, there is inhibition of adhesin expression, essential proteins for bacterial attachment in the initial phase, and interactions with extracellular matrices through polar group interactions decorating the structural nuclei [40]. Additionally, diterpenes may also interact with membranes. In this study, biofilm formation activity was observed for both JRR and JTP at 100 µg/mL. Morphological changes included a reduction in biofilm biovolume and thickness, as well as an increase in maximum distribution. Together, the analysis of these parameters confirms the biofilm reduction. To investigate potential mechanisms involved in this response, the action of the samples on the *P. aeruginosa* membrane was also evaluated using fluorescence anisotropy.

Fluorescence polarization experiments are well established in the literature for evaluating membrane fluidity in biological systems [41]. Bacteria actively adjust membrane fluidity by changing lipid composition in response to temperature, pressure, ion concentrations, pH, nutrient availability, and

xenobiotics. *Pseudomonas* can modulate their gene expression in response to a wide range of environmental stressors, enabling effective physiological and biochemical adaptation [42]. Among the genes involved in this response SigX is related to the synthesis of lipids in *P. aeruginosa* [43]. Our data suggest that the membrane stiffening caused by JRR and JTP in *P. aeruginosa* could be associated with these mechanisms; additional experiments are needed to confirm this hypothesis.

5.4 Conclusions

The results obtained in the current study indicate that *J. ribifolia* extract (JRR) and its main compound, jatrophone (JTP) did not demonstrate a direct inhibitory effect on growth of *P. aeruginosa*. On the other hand, they exhibited moderate activity on pyocyanin production and caused significant morphological changes in biofilms, such as a reduction in biovolume and thickness. This finding suggests *Jatrophane* scaffold as effective as antibiofilm agents, contributing to the search for alternative strategies for controlling *P. aeruginosa* infections. The fluorescence anisotropy analysis also suggests that JRR and JTP may induce membrane stiffening on the treated strains, possibly influencing the expression of genes related to lipid synthesis. These findings open new perspectives for further investigations into the structural characteristics and mechanisms of action of diterpenes on pathogenicity factors in Gram-negative pathogenic bacteria, thus expanding therapeutic options in the fight against antimicrobial resistance (AMR) using plant species found in the Brazilian semi-arid region, particularly representatives of the Euphorbiaceae family. Further analysis based on omics methods, such as transcriptomics, may be useful tools to provide evidence of the genes implicated in the activity of JRR and JTP and elucidate their mechanisms, leading to potential candidates for inhibiting *P. aeruginosa* biofilm.

References

1. Murray, C.J.L.; Ikuta, K.S.; Sharara, F.; Swetschinski, L.; Robles Aguilar, G.; Gray, A.; Han, C.; Bisignano, C.; Rao, P.; Wool, E.; et al. Global Burden of Bacterial Antimicrobial Resistance in 2019: A Systematic Analysis. *The Lancet* 2022, 399, 629–655, doi:10.1016/S0140-6736(21)02724-0.
2. Ikhimiukor, O.O.; Odih, E.E.; Donado-Godoy, P.; Okeke, I.N. A Bottom-up View of Antimicrobial Resistance Transmission in Developing Countries. *Nat Microbiol* 2022, 7, 757–765, doi:10.1038/s41564-022-01124-w.
3. Naghavi, M.; Vollset, S.E.; Ikuta, K.S.; Swetschinski, L.R.; Gray, A.P.; Wool, E.E.; Robles Aguilar, G.; Mestrovic, T.; Smith, G.; Han, C.; et al. Global Burden of Bacterial Antimicrobial Resistance 1990–2021: A Systematic Analysis with Forecasts to 2050. *The Lancet* 2024, 404, 1199–1226, doi:10.1016/S0140-6736(24)01867-1.
4. Sharma, S.; Mohler, J.; Mahajan, S.D.; Schwartz, S.A.; Bruggemann, L.; Aalinkeel, R. Microbial Biofilm: A Review on Formation, Infection, Antibiotic Resistance, Control Measures, and Innovative Treatment. *Microorganisms* 2023, 11, 1614, doi:10.3390/microorganisms11061614.
5. Rather, M.A.; Gupta, K.; Mandal, M. Microbial Biofilm: Formation, Architecture, Antibiotic Resistance, and Control Strategies. *Brazilian Journal of Microbiology* 2021, 52, 1701–1718, doi:10.1007/s42770-021-00624-x.
6. Cross, A.S. What Is a Virulence Factor? *Crit Care* 2008, 12, 197, doi:10.1186/cc7127.
7. Vestby, L.K.; Grønseth, T.; Simm, R.; Nesse, L.L. Bacterial Biofilm and Its Role in the Pathogenesis of Disease. *Antibiotics* 2020, 9, 59, doi:10.3390/antibiotics9020059.
8. Weimann, A.; Dinan, A.M.; Ruis, C.; Bernut, A.; Pont, S.; Brown, K.; Ryan, J.; Santos, L.; Ellison, L.; Ukor, E.; et al. Evolution and Host-Specific Adaptation of *Pseudomonas Aeruginosa*. *Science* (1979) 2024, 385, doi:10.1126/science.adi0908.

9. Fernández-Billón, M.; Llambías-Cabot, A.E.; Jordana-Lluch, E.; Oliver, A.; Macià, M.D. Mechanisms of Antibiotic Resistance in *Pseudomonas Aeruginosa* Biofilms. *Biofilm* 2023, 5, 100129, doi:10.1016/j.biofilm.2023.100129.
10. Ikuta, K.S.; Swetschinski, L.R.; Robles Aguilar, G.; Sharara, F.; Mestrovic, T.; Gray, A.P.; Davis Weaver, N.; Wool, E.E.; Han, C.; Gershberg Hayoon, A.; et al. Global Mortality Associated with 33 Bacterial Pathogens in 2019: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet* 2022, 400, 2221–2248, doi:10.1016/S0140-6736(22)02185-7.
11. del Barrio-Tofiño, E.; López-Causapé, C.; Oliver, A. *Pseudomonas Aeruginosa* Epidemic High-Risk Clones and Their Association with Horizontally-Acquired β -Lactamases: 2020 Update. *Int J Antimicrob Agents* 2020, 56, 106196, doi:10.1016/j.ijantimicag.2020.106196.
12. Langendonk, R.F.; Neill, D.R.; Fothergill, J.L. The Building Blocks of Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas Aeruginosa*: Implications for Current Resistance-Breaking Therapies. *Front Cell Infect Microbiol* 2021, 11, doi:10.3389/fcimb.2021.665759.
13. Song, X.; Xia, Y.-X.; He, Z.-D.; Zhang, H.-J. A Review of Natural Products with Anti-Biofilm Activity. *Curr Org Chem* 2018, 22, 789–817, doi:10.2174/1385272821666170620110041.
14. Khare, T.; Anand, U.; Dey, A.; Assaraf, Y.G.; Chen, Z.-S.; Liu, Z.; Kumar, V. Exploring Phytochemicals for Combating Antibiotic Resistance in Microbial Pathogens. *Front Pharmacol* 2021, 12, doi:10.3389/fphar.2021.720726.
15. Quaglio, D.; Mangoni, M.L.; Stefanelli, R.; Corradi, S.; Casciaro, B.; Vergine, V.; Lucantoni, F.; Cavinato, L.; Cammarone, S.; Loffredo, M.R.; et al. Ent-Beyerane Diterpenes as a Key Platform for the Development of ArnT-Mediated Colistin Resistance Inhibitors. *J Org Chem* 2020, 85, 10891–10901, doi:10.1021/acs.joc.0c01459.
16. Azuama, O.C.; Ortiz, S.; Quirós-Guerrero, L.; Bouffartigues, E.; Tortuel, D.; Maillot, O.; Feuilloley, M.; Cornelis, P.; Lesouhaitier, O.; Grougnet, R.; et al. Tackling *Pseudomonas Aeruginosa* Virulence by Mulinane-Like Diterpenoids

- from Azorella Atacamensis. *Biomolecules* 2020, 10, 1626, doi:10.3390/biom10121626.
17. Souza, T.A. de; Pereira, L.H.A.; Alves, A.F.; Dourado, D.; Lins, J. da S.; Scotti, M.T.; Scotti, L.; Abreu, L.S.; Tavares, J.F.; Silva, M.S. *Jatropha* Diterpenes: An Updated Review Concerning Their Structural Diversity, Therapeutic Performance, and Future Pharmaceutical Applications. *Pharmaceuticals* 2024, 17, 1399, doi:10.3390/ph17101399.
 18. BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária *Resolução da Diretoria Colegiada - RDC no 166, de 24 de julho de 2017*; Brasília, 2017;
 19. Jayaseelan, S.; Ramaswamy, D.; Dharmaraj, S. Pyocyanin: Production, Applications, Challenges and New Insights. *World J Microbiol Biotechnol* 2014, 30, 1159–1168, doi:10.1007/s11274-013-1552-5.
 20. Mudaliar, S.B.; Bharath Prasad, A.S. A Biomedical Perspective of Pyocyanin from *Pseudomonas Aeruginosa*: Its Applications and Challenges. *World J Microbiol Biotechnol* 2024, 40, 90, doi:10.1007/s11274-024-03889-0.
 21. Qin, S.; Xiao, W.; Zhou, C.; Pu, Q.; Deng, X.; Lan, L.; Liang, H.; Song, X.; Wu, M. *Pseudomonas Aeruginosa*: Pathogenesis, Virulence Factors, Antibiotic Resistance, Interaction with Host, Technology Advances and Emerging Therapeutics. *Signal Transduct Target Ther* 2022, 7, 199, doi:10.1038/s41392-022-01056-1.
 22. Thi, M.T.T.; Wibowo, D.; Rehm, B.H.A. *Pseudomonas Aeruginosa* Biofilms. *Int J Mol Sci* 2020, 21, 8671, doi:10.3390/ijms21228671.
 23. Ha, D.-G.; O'Toole, G.A. C-Di-GMP and Its Effects on Biofilm Formation and Dispersion: A *Pseudomonas Aeruginosa* Review. *Microbiol Spectr* 2015, 3, doi:10.1128/microbiolspec.MB-0003-2014.
 24. Mozaheb, N.; Van Der Smissen, P.; Opsomer, T.; Mignolet, E.; Terrasi, R.; Paquot, A.; Larondelle, Y.; Dehaen, W.; Muccioli, G.G.; Mingeot-Leclercq, M.-P. Contribution of Membrane Vesicle to Reprogramming of Bacterial Membrane Fluidity in *Pseudomonas Aeruginosa*. *mSphere* 2022, 7, doi:10.1128/msphere.00187-22.

25. Tahrioui, A.; Ortiz, S.; Azuama, O.C.; Bouffartigues, E.; Benalia, N.; Tortuel, D.; Maillot, O.; Chemat, S.; Kritsanida, M.; Feuilloley, M.; et al. Membrane-Interactive Compounds From Pistacia Lentiscus L. Thwart Pseudomonas Aeruginosa Virulence. *Front Microbiol* 2020, *11*, doi:10.3389/fmicb.2020.01068.
26. Patel, D.; Sorkin, B.C.; Mitchell, C.A.; Embry, M.R.; Rina-Kong, S.; Adams, R.E.; DeTemple, E.R.; Reddam, A.; Gafner, S.; Kelber, O.; et al. Improving the Rigor and Utility of Botanical Toxicity Studies: Recommended Resources. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 2023, *144*, 105471, doi:10.1016/j.yrtph.2023.105471.
27. Heinrich, M.; Jalil, B.; Abdel-Tawab, M.; Echeverria, J.; Kulić, Ž.; McGaw, L.J.; Pezzuto, J.M.; Potterat, O.; Wang, J.-B. Best Practice in the Chemical Characterisation of Extracts Used in Pharmacological and Toxicological Research—The ConPhyMP—Guidelines12. *Front Pharmacol* 2022, *13*, doi:10.3389/fphar.2022.953205.
28. Balekundri, A.; Mannur, V. Quality Control of the Traditional Herbs and Herbal Products: A Review. *Futur J Pharm Sci* 2020, *6*, 67, doi:10.1186/s43094-020-00091-5.
29. Thakkar, S.; Anklam, E.; Xu, A.; Ulberth, F.; Li, J.; Li, B.; Hugas, M.; Sarma, N.; Crerar, S.; Swift, S.; et al. Regulatory Landscape of Dietary Supplements and Herbal Medicines from a Global Perspective. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 2020, *114*, 104647, doi:10.1016/j.yrtph.2020.104647.
30. Pletsch, M.; Charlwood, B. V. Accumulation of Diterpenoids in Cell and Root-Organ Cultures of *Jatropha* Species. *J Plant Physiol* 1997, *150*, 37–45, doi:10.1016/S0176-1617(97)80178-2.
31. Fröhlich, J.K.; Stein, T.; da Silva, L.A.; Biavatti, M.W.; Tonussi, C.R.; Lemos-Senna, E. Antinociceptive and Anti-Inflammatory Activities of the *Jatropha Isabellei* Dichloromethane Fraction and Isolation and Quantitative Determination of Jatrophone by UFLC-DAD. *Pharm Biol* 2017, *55*, 1215–1222, doi:10.1080/13880209.2017.1295999.
32. Vasconcelos, M.A.; Arruda, F.V.S.; Santos, H.S.; Rodrigues, A.S.; Bandeira, P.N.; Albuquerque, M.R.J.R.; Cavada, B.S.; Teixeira, E.H.; Henriques, M.; Pereira,

- M.O. Effect of a Casbane Diterpene Isolated from *Croton Nepetaefolius* on the Prevention and Control of Biofilms Formed by Bacteria and *Candida* Species. *Ind Crops Prod* 2014, 61, 499–509, doi:10.1016/j.indcrop.2014.07.027.
33. Arekemase, M.O.; Kayode, R.M.O.; Ajiboye, A.E. Antimicrobial Activity and Phytochemical Analysis of *Jatropha Curcas* Plant against Some Selected Microorganisms. *Int J Biol* 2011, 3, doi:10.5539/ijb.v3n3p52.
 34. Viswanathan, M.B. gowdu; Jeya Ananthi, J.D.; Sathish Kumar, P. Antimicrobial Activity of Bioactive Compounds and Leaf Extracts in *Jatropha Tanjorensis*. *Fitoterapia* 2012, 83, 1153–1159, doi:10.1016/j.fitote.2012.07.007.
 35. Totsika, M. Disarming Pathogens: Benefits and Challenges of Antimicrobials That Target Bacterial Virulence Instead of Growth and Viability. *Future Med Chem* 2017, 9, 267–269, doi:10.4155/fmc-2016-0227.
 36. Lu, L.; Wang, J.; Wang, C.; Zhu, J.; Wang, H.; Liao, L.; Zhao, Y.; Wang, X.; Yang, C.; He, Z.; et al. Plant-derived Virulence Arresting Drugs as Novel Antimicrobial Agents: Discovery, Perspective, and Challenges in Clinical Use. *Phytotherapy Research* 2024, 38, 727–754, doi:10.1002/ptr.8072.
 37. Gökalsın, B.; Berber, D.; Sesal, N.C. *Pseudomonas Aeruginosa* Quorum Sensing and Biofilm Inhibition. In *Quorum Sensing*; Elsevier, 2019; pp. 227–256.
 38. Tuon, F.F.; Dantas, L.R.; Suss, P.H.; Tasca Ribeiro, V.S. Pathogenesis of the *Pseudomonas Aeruginosa* Biofilm: A Review. *Pathogens* 2022, 11, 300, doi:10.3390/pathogens11030300.
 39. Rasamiravaka, T.; Vandeputte, O.M.; Pottier, L.; Huet, J.; Rabemanantsoa, C.; Kiendrebeogo, M.; Andriantsimahavandy, A.; Rasamindrakotroka, A.; Stévinny, C.; Duez, P.; et al. *Pseudomonas Aeruginosa* Biofilm Formation and Persistence, along with the Production of Quorum Sensing-Dependent Virulence Factors, Are Disrupted by a Triterpenoid Coumarate Ester Isolated from *Dalbergia Trichocarpa*, a Tropical Legume. *PLoS One* 2015, 10, e0132791, doi:10.1371/journal.pone.0132791.
 40. Apaza Ticona, L.; Martínez Noguerón, A.; Sánchez Sánchez-Corral, J.; Montoto Lozano, N.; Ortega Domenech, M. Anti-Inflammatory, Antibacterial, Anti-Biofilm, and Anti-Quorum Sensing Activities of the Diterpenes Isolated from

- Clinopodium Bolivianum. *Pharmaceutics* 2024, 16, 1094, doi:10.3390/pharmaceutics16081094.
41. Mykytczuk, N.C.S.; Trevors, J.T.; Leduc, L.G.; Ferroni, G.D. Fluorescence Polarization in Studies of Bacterial Cytoplasmic Membrane Fluidity under Environmental Stress. *Prog Biophys Mol Biol* 2007, 95, 60–82, doi:10.1016/j.pbiomolbio.2007.05.001.
 42. Baysse, C.; O’Gara, F. Role of Membrane Structure During Stress Signalling and Adaptation in *Pseudomonas*. In *Pseudomonas*; Springer Netherlands: Dordrecht, 2007; pp. 193–224.
 43. Bouffartigues, E.; Si Hadj Mohand, I.; Maillot, O.; Tortuel, D.; Omnes, J.; David, A.; Tahrioui, A.; Duchesne, R.; Azuama, C.O.; Nusser, M.; et al. The Temperature-Regulation of *Pseudomonas Aeruginosa* CmaX-CfrX-CmpX Operon Reveals an Intriguing Molecular Network Involving the Sigma Factors AlgU and SigX. *Front Microbiol* 2020, 11, doi:10.3389/fmicb.2020.579495.

CONCLUSÃO

Conclusão

A partir da integração de conceitos clássicos da química de produtos naturais, como a quimiotaxonomia, com os avanços tecnológicos contemporâneos, o presente trabalho fornece base para o desenvolvimento de estratégias eficazes para seleção de gêneros e priorização de espécies. Além disso, destaca a quimiodiversidade e o potencial bioativo de espécies do gênero *Jatropha* e outras espécies de Euphorbiaceae, particularmente encontradas na região do semiárido Brasileiro. Por fim, com base nos estudos de atividade in sílico e in vitro do extrato e compostos de *J. ribifolia* oferece perspectivas valiosas para o desenvolvimento de novos agentes citotóxicos e antimicrobianos ativos contra patógenos multirresistentes.