



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS  
NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS



DIVERSIDADE QUÍMICA DO GÊNERO *Metternichia* J.C.Mikan E  
ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE LIGNANAMIDAS ISOLADAS DE  
*Metternichia macrocalyx* (SOLANACEAE)

THIAGO ARAÚJO DE MEDEIROS BRITO

JOÃO PESSOA  
2025

**THIAGO ARAÚJO DE MEDEIROS BRITO**

**DIVERSIDADE QUÍMICA DO GÊNERO *Metternichia* J.C.Mikan E  
ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE LIGNANAMIDAS ISOLADAS DE  
*Metternichia macrocalyx* (SOLANACEAE)**

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

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Sobral da Silva

Coorientador: Prof. Dr. Lucas Silva Abreu

**JOÃO PESSOA**

**2025**

**Catálogo na publicação**  
**Seção de Catalogação e Classificação**

B862d Brito, Thiago Araújo de Medeiros.

Diversidade química do gênero *Metternichia* J.C.Mikan e atividade anti-inflamatória de lignanamidas isoladas de *Metternichia macrocalyx* (SOLANACEAE) / Thiago Araújo de Medeiros Brito. - João Pessoa, 2025.

194 f. : il.

Orientação: Marcelo Sobral da Silva.

Coorientação: Lucas Silva Abreu.

Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. Solanaceae - Fitoquímico. 2. Gênero *Metternichia* - Atividade anti-inflamatória. 3. Farmacologia. 4. Lignanmidas. I. Silva, Marcelo Sobral da. II. Abreu, Lucas Silva. III. Título.

UFPB/BC

CDU 582.926.2:581.19(043)

**THIAGO ARAÚJO DE MEDEIROS BRITO**

**DIVERSIDADE QUÍMICA DO GÊNERO *Metternichia* J.C.Mikan E  
ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE LIGNANAMIDAS ISOLADAS DE  
*Metternichia macrocalyx* (SOLANACEAE)**

Data da aprovação: 30/06/2025

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

**Prof. Dr. Josean Fechine Tavares**

Doutor em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos  
Universidade Federal da Paraíba (Presidente)



Documento assinado digitalmente

CLAUDIA QUINTINO DA ROCHA

Data: 27/08/2025 09:00:12-0300

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

---

**Prof. Dra. Cláudia Quintino da Rocha**

Doutora em Química Orgânica  
Universidade Federal do Maranhão (Examinador Externo)



Documento assinado digitalmente

HECTOR HENRIQUE FERREIRA KOOLEN

Data: 27/08/2025 15:54:08-0300

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

---

**Prof. Dr. Héctor Henrique Ferreira Koolen**

Doutor em Química  
Universidade do Estado do Amazonas (Examinador Externo)

---

**Prof. Dr. Sócrates Golzio dos Santos**

Doutor em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos  
Universidade Federal da Paraíba (Examinador Interno)

---

**Prof. Dr. Yuri Manguiera do Nascimento**

Doutor em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos  
Universidade Federal da Paraíba (Examinador Interno)



Dedico este trabalho à minha família, em especial aos meus pais Telma Maria e Maynard, por toda inspiração, por acreditar nos meus sonhos, me apoiar, incentivar e me proporcionar muito amor.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus pela dádiva da vida, por ter sido o meu amparo nas adversidades e por ter me proporcionado todo suporte, fé, esperança e amor, durante essa longa trajetória acadêmica.

À minha querida mãe Telma Maria de Medeiros Fernandes por me inspirar com sua linda trajetória de superação e formação que transformou e transforma nossas vidas. Também por me apoiar, incentivar e acreditar nos meus sonhos, além de todo carinho e amor que me proporcionou.

Ao meu Pai Maynard Araújo Brito por ser a minha referência de dignidade, comportamento e esforço para conquistar os meus sonhos. Agradeço por todos os ensinamentos que nortearam a minha vida, além de todo amor.

Aos meus avós paternos, Manoel Oliveira de Brito e Maria Inês de Araújo Brito, por todas as palavras de apoio, carinho, amor e sua história de superação e exemplo de fé, que fortificam e embasam minha natureza e minha postura no dia a dia.

Aos meus avós maternos, meu avô (*in memoriam*) Francisco Pedro de Medeiros (Chico Pedro da Farmácia), o qual foi fundamental para o meu despertar para busca do conhecimento das ciências naturais e da área da saúde, por meio da sua trajetória de vida profissional, atuando como alternativa à promoção da saúde em uma época em que o acesso era escasso. E à minha avó Francisca Fernandes de Medeiros pelo incentivo, carinho e amor.

Aos meus familiares, ao meu tio Francisco Pedro de Medeiros Fernandes, minhas tias, Maria Olindina de Medeiros e Wanda Maria de Medeiros, Maria Santana de Brito, Maria das Graças de Brito, e aos meus primos por todo apoio. Especialmente a meu primo que tenho como irmão, Vinicius de Brito Medeiros, pela amizade e companheirismo no dia a dia, seja a distância ou presencialmente. Ao meu irmão Jefferson pelas palavras de otimismo. Aos meus queridos tios Lázaro, João Paulo, Walter e José Dantas e meu primo Saulo (*in memoriam*).

À minha namorada, Andréa Cristina da Silva Souza pelas palavras de apoio, todo carinho e companheirismo durante essa trajetória do Doutorado.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcelo Sobral da Silva, pela oportunidade e por tantos momentos marcantes desde a escrita do artigo científico até a elucidação estrutural de substâncias da minha tese e do trabalho dos meus colegas. Minha gratidão por todo conhecimento transmitido. Agradeço pela atenção e a importância

demostrada para com o desenvolvimento do trabalho e a preocupação com a minha formação acadêmica. Tenho o senhor como uma inspiração para minha vida como pesquisador e professor.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Lucas Silva Abreu, o qual eu tenho como um amigo. Agradeço por ter sido fundamental em minha trajetória de Mestrado e Doutorado como um exemplo de assiduidade e paixão pela pesquisa em química de produtos naturais. Por ter me ensinado a operação básica do cromatógrafo líquido de alta eficiência e espectrômetro de massas, além de ter agregado tanto à minha formação teórica e prática, o que me inspirou e possibilitou a base para que eu pudesse alcançar uma formação melhor do que eu sonhei um dia.

Ao Prof. Dr. Josean Fachine Tavares, por acreditar e me incentivar a realizar trabalhos complexos e desafiadores. Por toda inspiração na pesquisa em química de produtos naturais. Além de todo conhecimento transmitido principalmente acerca da elucidação estrutural de metabólitos especializados de plantas, utilizando diversas técnicas como a ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  1D e 2D, o que foi imprescindível para minha formação acadêmica.

À Marcelo Felipe (técnico de laboratório) pela amizade, conselhos e momentos de alegria, ademais por ter me ajudado na obtenção dos espectros e ensinado a operar o espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), considerado um destaque para minha formação acadêmica.

À Evandro (técnico de laboratório) pela confiança e por ter permitido uma irmensão maior na operação do espectrômetro de RMN, além dos ensinamentos acerca desse equipamento e da contribuição na obtenção desses espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .

Aos técnicos Raimundo Nonato da Silva Filho e Gilmário (Gil) por todo suporte fornecido.

Ao técnico Dr. Yuri Manguiera do Nascimento, por todas as contribuições enquanto banca e em relação à operação dos espectrômetros de massas.

Aos meus amigos Jociano, Júnior, Marcelo e Anauara, pela amizade, momentos de alegria, contribuições, oportunidade de ensinar e também de aprender, as dificuldades superadas e tantos outros momentos que compartilhamos ao longo desses anos.

Ao Prof. Dr. Eudes da Silva Velozo, pela realização da coleta do material vegetal utilizado nesse estudo.

Ao Prof. Dr. Domingos Benício Oliveira Silva Cardoso, pela coleta de *M. princeps* e identificação dos materiais vegetais utilizados nesse estudo.

À Prof. Dr. Marianna Vieira Sobral, seu aluno Paulo Bruno Araújo Loureiro e colaborador Francisco Allysson Assis Ferreira Gadelha pela realização da avaliação da atividade anti-inflamatória das lignanamidas.

Ao Prof. Dr. Fernando Martins dos Santos Junior e sua aluna Ana Carolina Ferreira de Albuquerque pela colaboração para realização das análises de dicroísmo circular eletrônico e cálculos de RMN.

A todos aqueles que colaboraram de forma direta ou indiretamente para realização do presente trabalho.

À Universidade Federal da Paraíba.

Aos órgãos de fomento; o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) inclusive pelo provimento da bolsa de doutorado e taxa de bancada; a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro e a colaboração com a Rede Norte-Nordeste de Fitoterápicos (INCT-RENNOFITO).

*Ora, a fé é o firme fundamento das coisas que se esperam, e a prova das coisas que não se veem (Hebreus 11:1).*

## RESUMO

Os estudos fitoquímicos contribuem para o desenvolvimento de novos medicamentos, compreensão de perfil metabólico e quimiotaxonomia. Entre as famílias de plantas de maior interesse fitoquímico destaca-se a família Solanaceae, conhecida pela alta capacidade biossintética de alcaloides, além de outros metabólitos secundários como saponinas, lignanamidas e flavonoides. O gênero *Metternichia* J.C.Mikan é um dos gêneros taxonomicamente complexos e quimicamente pouco estudados da família Solanaceae. O táxon apresenta-se formado pelas espécies *M. macrocalyx* da Caatinga e *M. princeps* da Mata atlântica, habitando ambientes ecológicos e florísticos contrastantes. Para tanto, esse trabalho teve como objetivo estabelecer o perfil químico do gênero *Metternichia* e avaliar a atividade anti-inflamatória de lignanamidas isoladas de *Metternichia macrocalyx*. Nesse trabalho, o extrato seco e pulverizado das raízes de *M. macrocalyx* foi submetido à maceração em etanol 95% por 72 h (3 x 72h). O extrato etanólico bruto (EEB) foi submetido ao particionamento em hexano, clorofórmio e acetato de etila para obtenção das respectivas fases. A fase clorofórmica foi submetida à cromatografia líquida de média pressão (CLMP) e cromatografia de exclusão por tamanho. As frações resultantes foram submetidas à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em escala analítica e preparativa. Esse fracionamento resultou em 5 lignanamidas inéditas, denominadas de metternichiamidas A-E, além da  $N^1, N^5, N^{10}$ -Tri-*p*-cumaroil-espermidina. Nenhum dos compostos testados reduziram significativamente a viabilidade celular (%) de macrófagos RAW 264.7, mas todos reduziram os níveis de óxido nítrico (NO). Nos ensaios de quantificação de citocinas, apenas a metternichiamida B não reduziu significativamente os níveis de interleucina 10 (IL-10). Ademais, as metternichiamidas A-C e E também reduziram os níveis de IL-1 $\beta$ . Esses resultados sugeriram o potencial anti-inflamatório desses compostos. Além disso, o material vegetal seco e pulverizado das folhas de *M. macrocalyx* e *M. princeps* foram submetidos à maceração em etanol 95% (3 x 72h). Os EEBs foram submetidos ao particionamento em hexano, clorofórmio e acetato de etila para obtenção das respectivas fases. A fase acetatoetílica (2,0 g) de *M. macrocalyx* foi fracionada por cromatografia de coluna clássica (CC) em sílica gel utilizando hexano, acetato de etila e metanol, seguido de CLAE para isolamento dos compostos majoritários quercetina-3-O-xilopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-ramnopiranosídeo e kaempferol-3-O-xilopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-ramnopiranosídeo. Posteriormente, foi realizada análise das fases das folhas por CLAE-IES-EM/EM. Os dados foram analisados em comparação com padrões, dados de EM/EM da literatura, com bibliotecas do GNPS, Massbank, MassbankEU e Respect através do MS-DIAL, além de rede molecular, levando à anotação de 49 compostos dessas espécies. Por fim, os dados foram submetidos às análises quimiométricas na obtenção das principais diferenças e semelhanças entre esses perfis químicos. Esse trabalho gerou uma contribuição quimiotaxômica e farmacológica para o gênero *Metternichia*, por meio do estabelecimento do perfil químico das duas espécies do gênero e descoberta de novas lignanamidas com atividade anti-inflamatória.

Palavras-chave: lignanamidas; perfil metabólico; atividade anti-inflamatória.

## ABSTRACT

Phytochemical studies contribute to the development of new drugs, understanding of metabolic profile and chemotaxonomy. Among the plant families of greatest phytochemical interest is the Solanaceae family, known for its high biosynthetic capacity for alkaloids, along with other secondary metabolites such as saponins, lignanamides and flavonoids. The genus *Metternichia* J.C.Mikan is one of the taxonomically complex and relatively understudied chemically genera of the Solanaceae family. The taxon is formed by the species *M. macrocalyx* from the Caatinga and *M. princeps* from the Atlantic Forest, inhabiting contrasting ecological and floristic environments. Therefore, this study focused to establish the chemical profile of the genus *Metternichia* and evaluate the anti-inflammatory activity of lignanamides isolated from *M. macrocalyx*. In this work, the dried and pulverized extract of the roots of *M. macrocalyx* was subjected to maceration in 95% ethanol for 72 h (3 x 72 h). The crude ethanol extract (CEE) underwent to partitioning in hexane, chloroform and ethyl acetate to obtain the respective extracts. The chloroform extract was subjected to medium pressure liquid chromatography (CLMP) and size exclusion chromatography. The resulting fractions underwent to high performance liquid chromatography (HPLC) on an analytical and preparative scale to obtain 5 new lignanamides indicated as metternichiamides A-E, in addition to  $N^1, N^5, N^{10}$ -Tri-*p*-coumaroyl-spermidine. All compounds tested reduced nitric oxide (NO) levels. In cytokine quantification assays, only metternichiamide B did not significantly affect IL-10 levels. Moreover, metternichiamides A-C and E also reduced IL-1 $\beta$  levels. These results suggested the anti-inflammatory potential of these compounds. Additionally, the dried and powdered plant material of *M. macrocalyx* and *M. princeps* leaves were subjected to maceration in 95% ethanol for 72 h (3 x 72 h). The CEEs underwent to partitioning in hexane, chloroform and ethyl acetate to obtain the respective extracts. An ethyl acetate extract (2.0 g) of *M. macrocalyx* was fractionated by classical column chromatography (CC) on silica gel using hexane, ethyl acetate and methanol, followed by HPLC to isolate the major compounds quercetin-3-O-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-rhamnopyranoside and kaempferol-3-O-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-rhamnopyranoside. Subsequently, analysis of the extracts of the leaves was performed by HPLC-IES-MS/MS. The data were analyzed in comparison with standards, MS/MS data from the literature, with libraries from GNPS, Massbank, MassbankEU and Respect through MS-DIAL, in addition to molecular networking, leading to the annotation of 49 compounds of these species. Finally, the data were subjected to chemometric analyses to obtain the main differences and similarities between these chemical profiles. This work generated a chemotaxomic and pharmacological contribution to the genus *Metternichia*, through the establishment of the chemical profile of the two species of the genus and the discovery of new lignanamides with anti-inflammatory activity.

Keywords: lignanamides; metabolic profile; anti-inflammatory activity.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mapa de distribuição de espécies de Solanaceae no mundo. ....	19
Figura 2 - Distribuição geográfica do gênero <i>Metternichia</i> no Brasil. Legenda de cores: laranja-Nordeste e em vermelho-Sudeste. ....	21
Figura 3 – Diagrama de caixa de caracteres morfométricos e palinológicos selecionados. Ao lado de cada gráfico, há fotos da parte da planta, da esquerda para a direita, <i>Metternichia princeps</i> var. <i>macrocalyx</i> e <i>M. princeps</i> var. <i>princeps</i> , respectivamente. A. Comprimento do cálice. B. Largura da sépala. C. Proporção entre o comprimento do fruto e o comprimento do cálice. D. DE (diâmetro equatorial). ....	22
Figura 4 - detalhes da espécie <i>M. macrocalyx</i> . ....	23
Figura 5 - detalhes da espécie <i>M. princeps</i> . ....	24
Figura 6 - Distribuição geográfica das espécies <i>Metternichia macrocalyx</i> (amarelo) e <i>Metternichia princeps</i> (verde) no Brasil. ....	24
Figura 7 - Classificação das lignanamidas em subgrupos. ....	27
Figura 8 - Proposta de via biossintética para lignanamidas em plantas. PAL: Amônia-liase da fenilalanina; C4H: cinamato-4-hidroxilase; LC4: ligase da 4-(hidroxi)-cinamoil-CoA; TIDC: tirosina descarboxilase; THT: transferase de hidroxicinamoil-tiramina/hidroxicinamoil-CoA. ....	29
Figura 9 - Mecanismo biossintético das reações de acoplamento de lignanamidas do tipo tetra-hidrofurano. ....	30
Figura 10 - Mecanismo biossintético das reações de acoplamento de lignanamidas do tipo bis-fenilpropeno. ....	31
Figura 11 - Mecanismo biossintético das reações de acoplamento de lignanamidas do tipo arildi-hidronaftaleno. ....	31
Figura 12 - Mecanismo biossintético das reações de acoplamento de lignanamidas do tipo di-hidrobenzofurano. ....	32
Figura 13 – Experimento de RMN de <sup>1</sup> H da retrojusticidina B adquirido em diferentes temperaturas. ....	36
Figura 14 – Esboço da via biossintética de flavonoides em plantas. Chalcona sintase (CHS); chalcona isomerase (CHI); 2-hidroxi-flavonona sintase (IFS); 2-hidroxiisoflavanona desidratase (HID); flavona sintase I e II (FNS I e II); flavanona 3-hidroxilase (F3H); flavonol 3' -hidroxilase (F3' H); flavonol 3' 5' -hidroxilase (F3' 5' H); flavonol sintase (FLS); di-hidroflavonol 4-redutase (DFR); leucoantocianidina redutase	



(LAR); leucoantocianidina dioxigenase (LDOX); UDP-glicose: flavonoide-3-O-glicosiltransferase (UFGT).....	39
Figura 15 - Mecanismo de glicosilação de flavonoides. a) O-glicosilação com inversão de configuração; b) O-glicosilação conservando configuração original; c) C-glicosilação.....	40
Figura 16 - Obtenção e partição líquido-líquido do EEB das raízes de <i>M. macrocalyx</i> . .....	44
Figura 17 - Obtenção e partição líquido-líquido do EEB das folhas <i>M. macrocalyx</i> . .	55
Figura 18 – Principais correlações de HMBC, <sup>1</sup> H– <sup>1</sup> H COSY e NOESY dos compostos 1-5.....	68
Figura 19 - Comparação dos espectros experimentais de ECD do composto <b>1</b> em diferentes temperaturas: 25 °C (preto), 40 °C (azul) e 60 °C (vermelho). ....	68
Figura 20 - Espectros de ECD experimentais (superior) e calculados (inferior) referente aos compostos 1-6. ....	70
Figura 21 - Efeito inibitório dos compostos 1-5 na produção de NO em macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS e IFN-γ. Os resultados foram apresentados como média ± erro padrão da média (EPM), n = 5. #Diferente do grupo basal (p<0,05) *Diferente do grupo controle.....	75
Figura 22 - Efeito inibitório dos compostos 1-5 sobre os níveis de IL-1β e IL-10 em macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS e IFN-γ. Resultados apresentados como média ± erro padrão da média (EPM), n = 5. #Diferente do grupo basal (p<0,05). *Diferente do grupo controle (p<0,05). Dexametasona: Medicamento padrão (controle positivo, 20 μM). IL: Interleucina.....	76
Figura 23 - Rede molecular dos extratos de <i>M. macrocalyx</i> (vermelho) e <i>M. princeps</i> (azul). A intensidade da cor é diretamente proporcional à polaridade dos extratos. .....	159
Figura 24 - Cromatogramas do pico Base (BPC) das fases de MP ( <i>M. princeps</i> ) e MM ( <i>M. macrocalyx</i> ).....	161
Figura 25 – As pontuações de PCA obtidas a partir de análise quimiométrica entre amostras das fases de MP ( <i>M. princeps</i> ) e MM ( <i>M. macrocalyx</i> ).....	162

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Fracionamento cromatográfico da fase clorofórmica de <i>M. macrocalyx</i> ...	49
Tabela 2 - Fracionamento cromatográfico para reisolamento e isolamentos de novos compostos da fase clorofórmica de <i>M. macrocalyx</i> . ....	50
Tabela 3 - Fracionamento cromatográfico da fase acetatoetílica de <i>M. macrocalyx</i> .	56
Tabela 4 – Dados espectroscópicos de RMN de $^1\text{H}$ dos compostos 1-5 em MeOD.	64
Tabela 5 - Dados espectroscópicos de RMN de $^{13}\text{C}$ dos compostos 1-5 em MeOD.	66
Tabela 6 – Viabilidade celular (%) de macrófagos RAW 264.7 depois do tratamento com os compostos 1-5. ....	73

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIF	análise por injeção em fluxo
calcd.	calculado
CCDA	cromatografia em camada delgada analítica
CHI	chalcona isomerase
CHS	chalcona sintase
DFR	di-hidroflavonol 4-redutase
EEB	extrato etanólico bruto
F3'5'H	flavonol 3' 5' -hidroxilase
F3H	flavanona 3-hidroxilase
F3'H	flavonol 3'-hidroxilase
FAE	fase acetatoetífica
FCL	fase clorofórmica
FHE	fase hidroetanólica
FHX	fase hexânica
FLS	flavonol sintase
FNS I	flavona sintase I
FNS II	flavona sintase II
IDH	Índice de deficiência de hidrogênio
IFS	Isoflavona sintase
LAR	leucoantocianidina redutase
LC4	ligase da 4-(hidroxi)-cinamoil-CoA
LDOX	leucoantocianidina dioxigenase
PAL	fenilalanina amonialiase
SAM	S-Adenosil-L-Metionina
SBF	soro bovino fetal
THT	transferase de hidroxicinamoil-tiramina/hidroxicinamoil-CoA
TIDC	tirosina descarboxilase
T $\beta$ H	tiramina- $\beta$ -hidroxilase
UFGT	difosfato (UDP)-glicose: flavonoide-3-O-glicosiltransferase

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	16
2 REFERENCIAL TEÓRICO .....	19
2.1 Considerações sobre a família Solanaceae A.Juss. ....	19
2.2 Considerações sobre o gênero <i>Metternichia</i> J.C.Mikan.....	20
2.3 Relações entre as tribos Cestreae e Metternichieae e os eventos de intoxicação animal .....	25
2.4 Lignanamidas .....	26
2.4.1 Biossíntese das lignanamidas .....	28
2.5 Atividade anti-inflamatória.....	33
2.6 Atropoisomerismo .....	34
2.7 Flavonoides .....	36
3 OBJETIVOS .....	42
3.1 Objetivo geral.....	42
3.2 Objetivos específicos .....	42
4 METODOLOGIA.....	43
4.1 Coleta do material vegetal de <i>M. macrocalyx</i> .....	43
4.2 Obtenção e partição líquido-líquido do EEB das raízes de <i>M. macrocalyx</i> .....	43
4.3 Materiais e métodos empregados no isolamento, purificação dos constituintes químicos .....	45
4.4 Ressonância Magnética Nuclear (RMN) .....	46
4.5 Espectrometria de Massas de Alta Resolução (EMAR) .....	46
4.6 Espectroscopia na região do infravermelho (IV) .....	46
4.7 Rotação óptica específica (ROE).....	47
4.8 Espectroscopia de Dicroísmo Circular Eletrônico .....	47
4.9 Cálculos de ECD e RMN .....	47
4.10 Fracionamento cromatográfico da FCL das raízes de <i>M. macrocalyx</i> .....	48

4.11 Atividade anti-inflamatória.....	52
4.11.1 Ensaio de citotoxicidade.....	52
4.11.2 Quantificação de nitrito.....	52
4.11.3 Quantificação de citocinas (IL-10 e IL-1 $\beta$ ).....	53
4.11.4 Análise estatística .....	53
4.12 Obtenção e particionamento do EEB das folhas de <i>M. macrocalyx</i> .....	53
4.13 Fracionamento cromatográfico da FAE das folhas de <i>M. macrocalyx</i> .....	54
4.14 Coleta do material vegetal <i>M. princeps</i> .....	56
4.15 Obtenção e particionamento do EEB das folhas de <i>M. princeps</i> .....	56
4.16 Análise de CLAE-IES-QTOF-EM/EM.....	57
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
5.1 Lignanamidas das raízes de <i>Metternichia macrocalyx</i> e sua atividade anti-inflamatória .....	59
5.2 Perfil metabólico de <i>Metternichia macrocalyx</i> e <i>Metternichia princeps</i> (Solanaceae) usando dados de CLAE-IES-Q-TOF-EM/EM em redes moleculares e análise quimiométrica. ....	156
6 CONCLUSÕES .....	184
REFERÊNCIAS.....	185

## 1 INTRODUÇÃO

As plantas representam uma fonte valiosa e diversificada de compostos bioativos. Historicamente os vegetais têm sido utilizados em diversas culturas para produção de remédios, com várias propriedades medicinais relatadas na medicina tradicional. Os compostos biologicamente ativos encontrados em plantas são provenientes do metabolismo especializado e exibem efeitos terapêuticos como citotóxico, anti-inflamatório e antioxidante (KUMAR; GAUTAM; SINGH; KUMAR, 2023).

Os produtos naturais oferecem as melhores opções para busca de novos agentes ou modelos ativos (NEWMAN; CRAGG, 2020). Estima-se que cerca de 35% dos medicamentos se originaram direta ou indiretamente de produtos naturais, incluindo: plantas (25%), microorganismos (13%) e animais (3%) (CALIXTO, 2019). Com a descoberta de novos alvos moleculares proteicos, tem ocorrido uma crescente demanda por maior diversificação química, um anseio que pode ser correspondido pela execução de estudos fitoquímicos, por meio do isolamento e identificação de substâncias bioativas inéditas (CHAACHOUAY; ZIDANE, 2024).

Os métodos utilizados na química de produtos naturais para obtenção e identificação dos metabólitos especializados, são abundantes. As pesquisas antes realizadas exclusivamente por técnicas clássicas de separação cromatográfica, encontraram na sofisticação da cromatografia líquida de alta eficiência, incremento de resolução cromatográfica e otimização no isolamento e purificação de compostos conhecidos e inéditos (LATIF; SARKER, 2012).

Para além da necessidade de isolamento, as técnicas hifenadas como cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em *tandem* (CLAE-EM/EM), possibilitam a identificação de compostos em extratos, fases e frações, aliando eficiência de separação e alta seletividade da CLAE com informações estruturais, massa exata e seletividade adicional da EM (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008; LIMA E SILVA; BRITO; AGRA; SILVA *et al.*, 2024). Ademais, o advento de softwares como MS-DIAL para processamento, alinhamento e deconvolução de dados de EM/EM, têm permitido anotações otimizadas pelo uso de bibliotecas e organização de dados em redes moleculares (KATCHBORIAN-NETO; ALVES; BUENO; DE JESUS NICÁCIO *et al.*, 2024).

Embora esses métodos representem avanços não invalidam a importância do isolamento e purificação para a química de produtos naturais. A ampla diversidade química e complexidade estrutural dos metabolitos especializados eventualmente preconizam uma elucidação por técnicas como ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para determinação estrutural inequívoca, o que faz do isolamento um passo fundamental para descoberta de substâncias inéditas (BRAZ FILHO, 2010).

Entre as famílias de plantas de interesse fitoquímico destaca-se a família Solanaceae, representada no Brasil por cerca de 35 gêneros e 475 espécies (BEZERRA; PINHEIRO; LUCENA, 2023). Fármacos de medicamentos convencionais como atropina e escopolamina foram descobertos nessa família, conhecida pela alta capacidade biossintética de alcaloides (SAHU; PRADHAN; KUMAR, 2022), além de outros metabólitos especializados como saponinas esteroidais, flavonoides, cumarinas, lignanas, lignanamidas, terpenoides, esteroides e outros compostos fenólicos (KAUNDA; ZHANG, 2019).

Uma descoberta pioneira na família Solanaceae foi atribuída às lignanamidas, que são metabólitos secundários de origem vegetal, formados pelo acoplamento oxidativo de amidas fenilpropanoídicas e seus intermediários. A grossamida biossintetizada por monômeros de feruloiltiramina, foi a primeira de muitas lignanamidas identificadas na família. Esses compostos exibiram potencial anti-inflamatório, antioxidante, anticancerígeno, anti-hiperlipidêmicas *in vitro*, cultura de células e estudos *in vivo*, se mostrando promissores como agentes protetores contra doenças crônicas (LEONARD; ZHANG; YING; FANG, 2020).

Apesar de seu grande potencial para biossíntese de compostos bioativos, a família Solanaceae exhibe gêneros taxonomicamente complexos e quimicamente pouco estudados. *Metternichia* J.C.Mikan, por exemplo, acumula várias discussões taxonômicas e atualmente apresenta-se formado por duas espécies de ambientes ecologicamente e floristicamente contrastantes: *M. macrocalyx* e *M. princeps*; espécies que demandam respostas oriundas de pesquisas químicas acerca de seu perfil metabólico e potencial farmacológico de metabólitos especializados (DE SOUZA; ANDRADE; RADAESKI; BAUERMANN *et al.*, 2023).

Diante do exposto, fica evidente a importância de se realizar estudos fitoquímicos em espécies do gênero *Metternichia* J.C.Mikan, vislumbrando o isolamento, identificação de novos compostos bioativos, avaliação do potencial farmacológico e comparação de perfil químico para fins quimiotaxonômicos. Para

tanto, técnicas analíticas clássicas e principalmente modernas foram aplicadas para estabelecer o perfil químico do gênero *Metternichia*, além de isolar e identificar lignanamidas de *M. macrocalyx* e avaliar sua atividade anti-inflamatória.

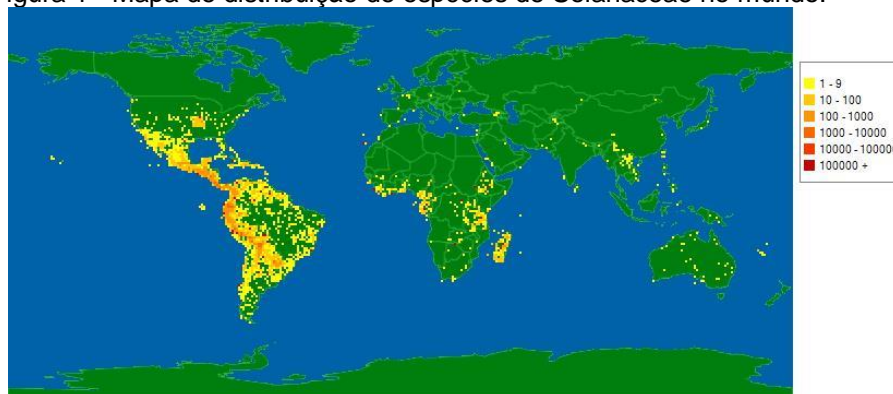


## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Considerações sobre a família Solanaceae A.Juss.

A família Solanaceae A.Juss. abrange 2950 espécies e 94 gêneros distribuídos em todos os continentes do mundo, exceto na Antártida (Figura 1). No entanto, a maior biodiversidade é encontrada na América do Sul e Central. Estima-se que no continente Sul-Americano existam 1680 espécies de Solanaceae, sendo o Brasil e o Chile, os países com maiores números de exemplares endêmicos. A nível de território brasileiro a família Solanaceae compreende 35 gêneros e 475 espécies, constando 47% de espécies endêmicas (BEZERRA; PINHEIRO; LUCENA, 2023; MOTTI, 2021).

Figura 1 - Mapa de distribuição de espécies de Solanaceae no mundo.



Fonte: <https://www.tropicos.org/name/42000282>.

Os membros da família Solanaceae, sendo anuais, bienais ou perenes, habitam áreas distintas, desde ambientes desérticos até florestas tropicais. São herbáceos e exibem grande diversidade florística, características fitoquímicas peculiares e importância etnobotânica (JAN; IRAM; BASHIR; SHAH *et al.*, 2024).

Ademais, são conhecidos como pertencentes à terceira família de plantas com maior importância econômica, incluindo culturas amplamente cultivadas e consumidas, como batata (*Solanum tuberosum*), tomate (*Solanum lycopersicum*), berinjela (*Solanum melongena*) e pimentão (*Capsicum annuum*), todas essenciais para a agricultura global e a nutrição humana (LIU; SHEN; LI; ZHANG *et al.*, 2025). Essa importância econômica se estende às plantas ornamentais como as petúnias e medicinais como mandrágora (*Mandragora officinarum*), beladona (*Atropa belladonna*) e Jimson weed (*Datura stramonium*) (MORRIS; TAYLOR, 2017).

As aplicações medicinais e até tradicionais (medicina tradicional chinesa, Ayurveda, Siddha e Unani), podem ser explicadas pela ampla gama diversificada de metabólitos secundários biossintetizados por plantas da família Solanaceae, como flavonoides, cumarinas, antraquinonas, compostos fenólicos, lignanas, lignanamidas, terpenóides, witanolideos, glicosídeos, amidas, lactonas, fenóis simples e principalmente diversos tipos de alcalóides (AFROZ; AKTER; AHMED; ROUF *et al.*, 2020; LI; HUANG; CHEN; GAO *et al.*, 2023).

Considerando somente o gênero *Solanum*, já foram identificados cerca de 670 compostos, dentre os quais, 134 são saponinas esteroidais, que são consideradas marcadores fitoquímicos do gênero. Os demais compostos tratam-se de 63 alcalóides esteroidais, 31 outros tipos de alcalóides, 13 glicosídeos pregnanos, 128 terpenos, 72 flavonoides, 31 lignanas, 20 cumarinas, 4 cumarinolignóide e cumestanos, 52 outros compostos fenólicos, 66 esteróis, 23 ácidos graxos e ésteres e 30 outros compostos (KAUNDA; ZHANG, 2019).

A família Solanaceae compreende várias espécies complexas com linhagens taxonomicamente desafiadoras, que exigem esforço especializado para delimitações confiáveis e o desenvolvimento de hipóteses suficientemente fundamentadas em nível de espécie. Isso se faz evidente na classificação taxonômica dos exemplares do gênero *Metternichia* (SOUZA; ANDRADE; STEHMANN, 2023).

## 2.2 Considerações sobre o gênero *Metternichia* J.C.Mikan

O gênero *Metternichia* J.C.Mikan teve sua posição sistemática amplamente debatida ao longo dos anos, e devido semelhanças morfológicas com o Gênero *Sessea* Ruiz & Pav. foi classificado inicialmente como pertencente à Tribo Metternichieae Miers., no entanto subsequentemente foi transferido para a Tribo Cestreae G. Don. (LISCOVSKY; COSA; BARBOZA, 2009).

Em uma segunda reclassificação o gênero *Metternichia* foi separado da tribo Cestreae e transferido para a tribo monotípica Metternichieae Miers, motivada pelas diferenças morfológicas da semente, e a escassez de endosperma. O quantitativo de três cromossomos na tribo Metternichieae Miers, frente aos cariótipos com oito cromossomos, comumente encontrados na tribo Cestreae suportaram a proposição (LISCOVSKY; COSA; BARBOZA, 2009; URDAMPILLETA *et al.*, 2014).

O gênero *Metternichia* foi historicamente considerado como monoespecífico, formado por uma única espécie denominada *M. princeps* J. C. Mikan, considerada

uma árvore que se distribuía entre os estados do Rio de Janeiro até a Bahia (Figura 2), conhecida popularmente pelas denominações de “trombeteira”, café-do-mato” e “Jasmin-do-morro” (MARAN; CALDAS; PRADO; GOMES *et al.*, 2012).

Figura 2 - Distribuição geográfica do gênero *Metternichia* no Brasil. Legenda de cores: laranja-Nordeste e em vermelho-Sudeste.

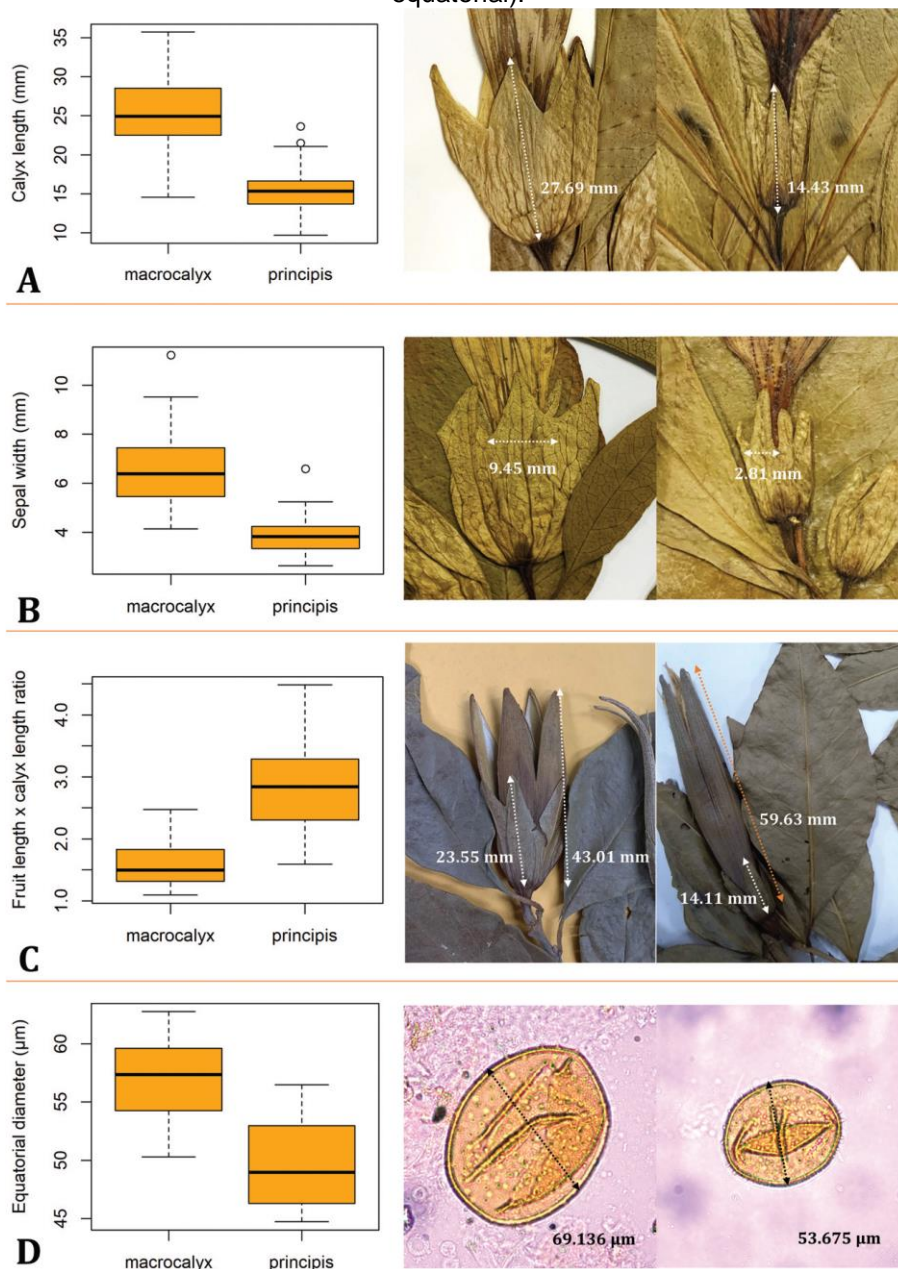


Fonte: Re flora Brasil. Jardim botânico do Rio de Janeiro. Disponível em:  
<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB14673/>. Acesso em: 26 mai.2025.

A espécie *M. princeps* apresentava duas variedades nativas de ambientes geograficamente divergentes: uma variedade típica (*M. princeps* var. *princeps*), encontrada nas florestas úmidas do leste do Brasil (região da Mata Atlântica), e *M. princeps macrocalyx* Carv., com cálix maior e habitando áreas semiáridas (região da Caatinga). Estudos baseados em análises uni e multivariadas de dados ambientais, fenológicos, morfométricos e palinológicos levantaram evidências suficientes para reconhecer duas espécies no gênero: *Metternichia macrocalyx* (Carvalho) L.S. Souza & Stehmann (essencialmente da Caatinga) e *Metternichia princeps* J.C.Mikan (endêmica da Mata Atlântica), em detrimento de uma única espécie com duas variedades. As diferenças morfológicas e palinológicas entre as variedades anteriormente classificadas como *M. princeps* var. *princeps* e *M. princeps* var. *macrocalyx*, foram observadas nas relações entre comprimento e largura da corola,

comprimento do cálice, comprimento da sépala, largura da sépala, entre comprimento e largura da sépala, comprimento do pedicelo, relação entre comprimento do fruto e comprimento do cálice e diâmetro do pólen. Ademais, essas distinções foram corroboradas pela ausência de sobreposição geográfica ao longo da distribuição das duas variedades (Figura 3) (DE SOUZA; ANDRADE; RADAESKI; BAUERMANN *et al.*, 2023).

Figura 3 – Diagrama de caixa de caracteres morfométricos e palinológicos selecionados. Ao lado de cada gráfico, há fotos da parte da planta, da esquerda para a direita, *Metternichia princeps* var. *macrocalyx* e *M. princeps* var. *princeps*, respectivamente. A. Comprimento do cálice. B. Largura da sépala. C. Proporção entre o comprimento do fruto e o comprimento do cálice. D. DE (diâmetro equatorial).



Fonte: (DE SOUZA; ANDRADE; RADAESKI; BAUERMANN *et al.*, 2023).

*M. macrocalyx* é uma espécie nativa e endêmica do Brasil, restrita ao norte do estado de Minas Gerais e região sul e central da Bahia (Figura 6), considerada essencialmente uma espécie da Caatinga, eventualmente encontrada em áreas de transição com os biomas Cerrado e Mata Atlântica. Sua Floração e frutificação são mais intensas nos meses de novembro e abril (Figura 4). *M. macrocalyx* virtualmente não possui registros em unidades de conservação e apresenta uma baixa área de ocorrência. Estes fatores, quando associados ao fato de o bioma Caatinga ser um dos menos protegidos do Brasil e com diversas áreas convertidas para agricultura, fazem com que a espécie atualmente seja considerada ameaçada de extinção de acordo com critérios da União Internacional para Conservação da Natureza (SOUZA; STEHMANN, 2025). A espécie *M. princeps* (Figura 5), encontra-se distribuída principalmente em áreas de Floresta Ombrófila Densa dos estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo (Figura 6). O exemplar é endêmico do bioma Mata Atlântica, que atualmente encontra-se bastante fragmentado e em constante declínio em termos de qualidade de habitats (SOUZA; STEHMANN, 2025). Nessa distribuição territorial descrita, já foram relatados casos de intoxicação animal por ingestão acidental de partes aéreas de espécies de *Meternichia*. Outras espécies da família Solanaceae apresentaram casos similares.

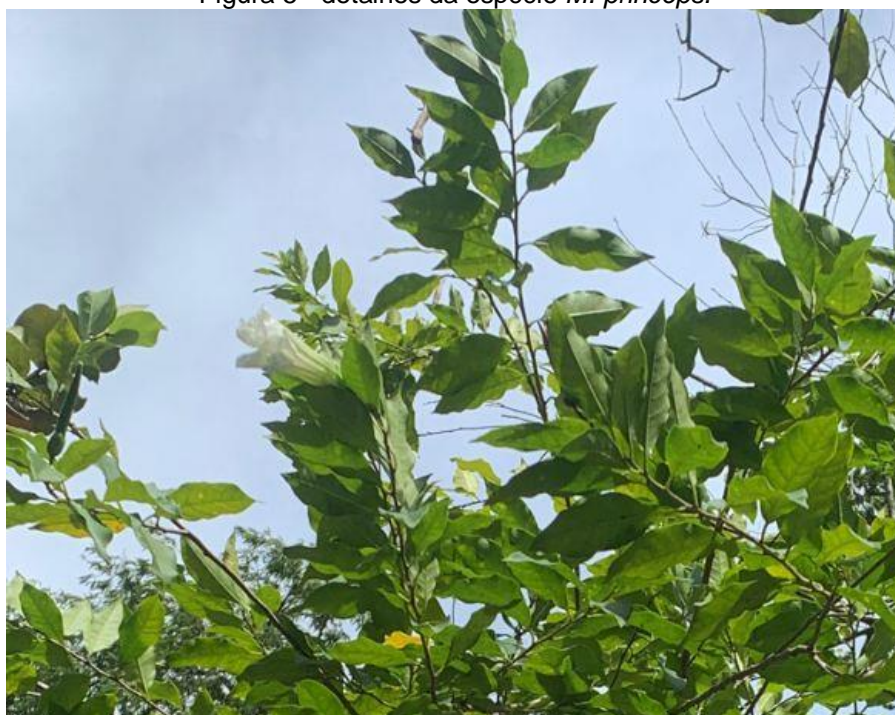
Figura 4 - detalhes da espécie *M. macrocalyx*.



Fonte: Eudes da Silva Velozo.



Figura 5 - detalhes da espécie *M. princeps*.



Fonte: Giulia Cavalcanti Ottino

Figura 6 - Distribuição geográfica das espécies *Metternichia macrocalyx* (amarelo) e *Metternichia princeps* (verde) no Brasil.



Fonte: Adaptado de Re flora Brasil. Jardim botânico do Rio de Janeiro. Disponível em:  
<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB21152/>. Acesso em: 26 mai.2025.

### 2.3 Relações entre as tribos Cestreae e Metternichieae e os eventos de intoxicação animal

A tribo Cestreae se apresenta formada por três gêneros: *Cestrum*, *Sessea* e *Vestia*. O gênero *Sessea* foi separado de *Metternichia* por diferenças morfológicas em traços de pólen, antera e semente. Apesar dessa divisão em tribos, as espécies da tribo Cestreae guardam algumas semelhanças com *Metternichia*. Uma importante similaridade está relacionada aos relatos de intoxicação animal evidenciados principalmente em bovinos, caprinos e ovinos, devido a ingestão dessas espécies (CANELLA; TOKARNIA; DÖBEREINER, 1968).

No gênero *Cestrum* intoxicações naturais em ruminantes foram relatadas em dez estados brasileiros, especialmente no Rio de Janeiro, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Pernambuco. Em geral, envenenamentos por espécies de *Cestrum* causam danos ao fígado e um quadro clínico-patológico caracterizado por insuficiência hepática aguda. O gado é mais suscetível ao envenenamento por essas plantas, mas há relatos de que *C. axillare* também causa intoxicação em cabras e búfalos. Vários constituintes químicos foram identificados em *C. axillare* e *C. parqui*, incluindo carboxiparquina e parquina, além de algumas saponinas que podem estar associadas a casos de intoxicação em rebanhos (BEZERRA; PINHEIRO; LUCENA, 2023). A similaridade ou equivalência entre o quadro da intoxicação causada por *Sessea brasiliensis* em bovinos ao causado por *Cestrum laevigatum* Schlecht. (CANELLA; TOKARNIA; DÖBEREINER, 1968) e até de *Metternichia* tem chamado atenção dos pesquisadores.

Quanto às espécies de *Metternichia*, o primeiro surto de intoxicação de animais relatado se deu em caprinos no município de Itaguaí no estado do Rio de Janeiro (MARAN; CALDAS; PRADO; GOMES *et al.*, 2012). Posteriormente ao caso de Itaguaí, foi evidenciado um surto de intoxicação em caprinos no estado da Bahia. O incidente provocou a morte de 3 dentre 8 caprinos. Na necropsia os rins apresentaram acentuada necrose, coagulação do epitélio tubular, além de túbulos com regeneração epitelial (PEDROSO; SANTOS; SEUS; DA SILVA *et al.*, 2015). Essas evidências de problemas de classificação taxonômica e de eventos de toxicidade análogos podem sugerir algumas semelhanças químicas entre esses gêneros.

No gênero *Vestia*, já foram identificados um flavonoide glicosilado denominado quercetina-3- $\alpha$ -(2-O- $\beta$ -D-glicopiranosil)-D-glicofuranosídeo (ERAZO; GALEFFI; CIASCA RENDINA; DELLE MONACHE, 1971), dois triterpenos pentacíclicos ( $\beta$ -

amirina e ácido oleanólico), fraxetina, 1-acetil-3-carboxi- $\beta$ -carbolina, e a saponina esteroidal diosgenina (FAINI; TORRES; DELLE MONACHE; MARINI-BETTÓLO *et al.*, 2008). Enquanto no gênero *Cestrum*, mais estudado quimicamente na tribo, foram identificados cerca de 77 compostos incluindo saponinas, glicoalcalóides, terpenóides, compostos fenólicos, lignanas e oxilipinas (BEZERRA; PINHEIRO; LUCENA, 2023).

Ressalta-se que a maioria dos compostos identificados nessas espécies possuem atividade farmacológica relatada *in vitro*, em detrimento de toxicidade. Portanto, essas plantas despertam interesse para pesquisa de novos fármacos. As lignanamidas, frequentemente encontradas em exemplares da família Solanaceae, destacam-se por sua atividade anti-inflamatória e variabilidade estrutural. Por sua vez, os flavonoides possuem uma distribuição mais ampla no reino vegetal e apresentam inúmeras aplicações (PAUMGARTTEN; DE SOUZA; DA SILVA; DE-OLIVEIRA, 2022).

## 2.4 Lignanamidás

As lignanamidas são metabólitos secundários de origem vegetal que contém a função amida conectada a pelo menos uma unidade de fenilpropanoide da lignana. O termo lignana refere-se à união de unidades de fenilpropanoides por meio das posições 8 e 8' (C-8 e C-8'). As lignanamidas, são formadas pelo acoplamento oxidativo de monômeros ou dímeros de amidas fenilpropanoídicas (SUN; TONG; TU; CHEN *et al.*, 2024).

O isolamento da grossamida a partir da espécie *Capsicum annuum* (Solanaceae), foi o primeiro relato de identificação de uma lignanamida. O metabólito em questão, seria biossintetizada a partir de monômeros de feruloiltiramina; uma amida fenilpropanoídica de ocorrência comum nos vegetais (YOSHIHARA; KATSUYOSHI; SEIJI; AND SAKAMURA, 1981).

Desde a pioneira descoberta já foram identificadas cerca de 86 lignanamidas em pelo menos 26 espécies de plantas, dentre essas, 42 lignanamidas são oriundas de espécies da família Solanaceae, que tem sido a principal fonte desses metabólitos seguida de Moraceae e Piperaceae (SUN; TONG; TU; CHEN *et al.*, 2024).

De modo geral as lignanamidas podem ser classificadas em grupos cíclicos ou acíclicos. Mas, devido a diversidade estrutural e com base em seu núcleo e tipos de ligações, preconizou-se sua separação nos oito seguintes subgrupos: arilnaftaleno,



arildi-hidronaftaleno, di-hidrobenzofurano, di-hidrobenzodioxina, lactama, fenilpropeno, succinimida e tetra-hidrofurano (Figura 7) (LEONARD; ZHANG; YING; FANG, 2020).

Figura 7 - Classificação das lignanamidas em subgrupos

<p>a) Arilhidronaftaleno</p> <p>Cannabisina A</p>	<p>b) Arildihidronaftaleno</p> <p>Lyciumamida H</p>	<p>c) Dihidrobenzofurano</p> <p>Grossamida</p>
<p>d) Lactama</p> <p>Heliotropamida</p>	<p>e) Succinimida</p> <p>Tribulasamida C</p>	<p>f) Tetrahidrofurano</p> <p>Lyciumamida K</p>
<p>g) Dihidrobenzodioxano</p> <p>Lyciumamida D</p>	<p>h) Fenilpropeno</p> <p>Cannabisina E</p>	

Fonte: Adaptado (LEONARD; ZHANG; YING; FANG, 2020).

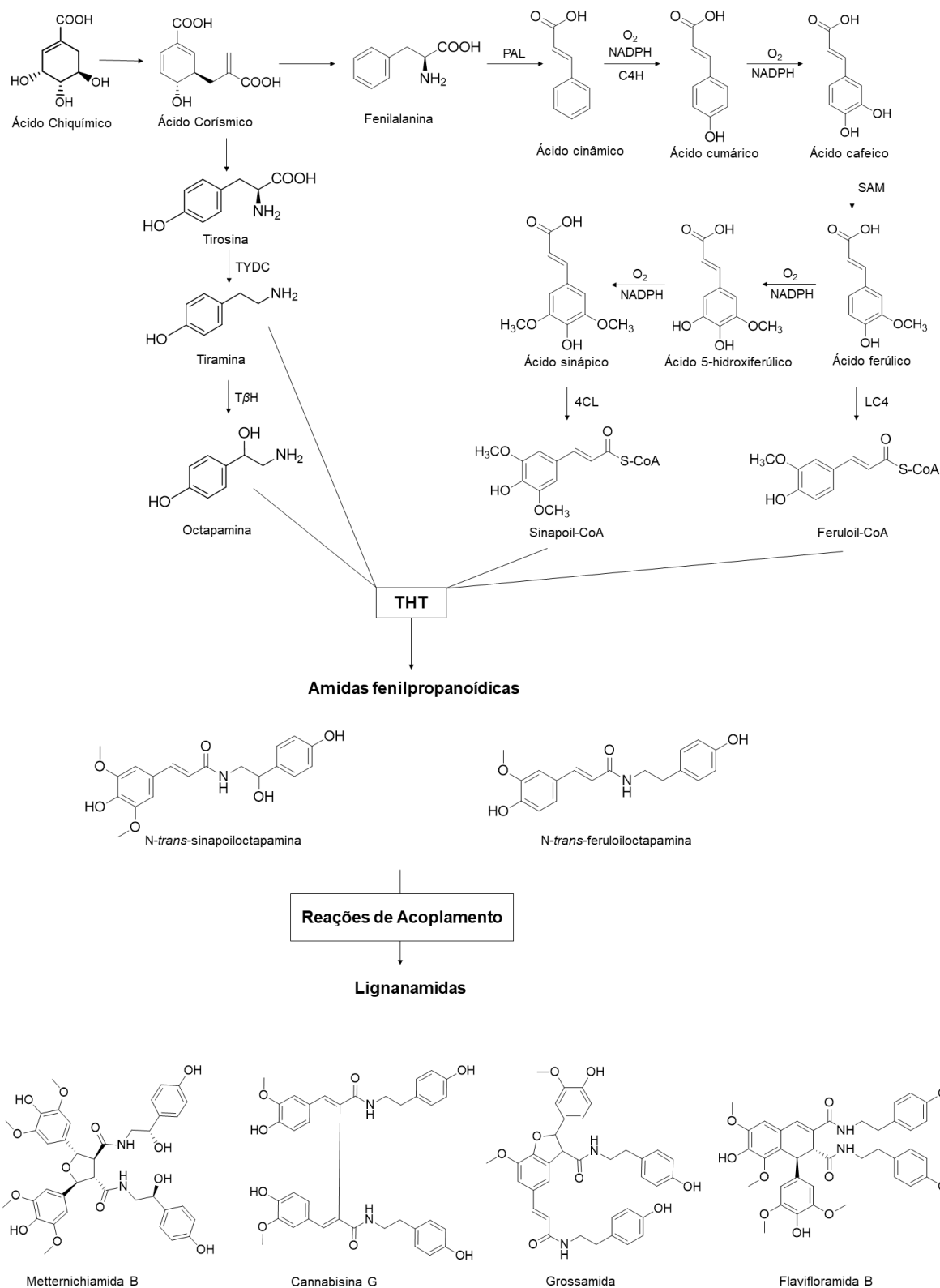
### 2.4.1 Biossíntese das lignanamidas

As lignanamidas são oriundas da via do ácido chiquímico, por meio das vias gerais dos fenilpropanoides e da tirosina. O ácido-*trans*-cinâmico de origem fenilpropanoídica (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>) é gerado mediante desaminação da fenilalanina catalisada pela fenilalanina-amônia-liase (PAL). A cinamato-4-hidroxilase (C4H) catalisa a reação de conversão do ácido-*trans*-cinâmico em ácido *p*-cumárico. Uma nova hidroxilação na posição 3 (C-3) do ácido *p*-cumárico possibilitada pela presença de O<sub>2</sub> e NADPH, seguida de metilação por ação da S-Adenosil-L-Metionina (SAM), converte-o em ácido cafeico e ácido ferúlico, respectivamente. Um processo similar de hidroxilação e metilação ocorre na posição 5 do ácido ferúlico para biossíntese do ácido sinápico. Os ácidos hidroxicinâmicos sofrem esterificação por ação da ligase da 4-(hidroxi)-cinamoil-CoA (LC4), permitindo a formação dos derivados de hidroxicinamoil-CoA, como feruloil-CoA e sinapoil-CoA (DEWICK, 2009; LEONARD; ZHANG; YING; FANG, 2020) (Figura 8).

Em outra via, a tirosina descarboxilase (TDC) viabiliza a conversão da tirosina em tiramina, enquanto a tiramina- $\beta$ -hidroxilase (T $\beta$ H) facilita a hidroxilação na posição  $\beta$  da tiramina culminando na octapamina. A formação das fenetilaminas é uma etapa crucial para reação de condensação entre esses alcaloides e os ésteres de hidroxicinamoil-CoA levando à formação das amidas fenilpropanoídicas (FENG; JIN; CHENG; LI *et al.*, 2024; TELES; PINHEIRO; DIAS; TAVARES *et al.*, 2019). A transferase de hidroxicinamoil-tiramina/hidroxicinamoil-CoA (THT) presente em exemplares da família Solanaceae, catalisa essas reações de condensação que envolve as tiraminas, entretanto, as enzimas envolvidas no mecanismo biossintético das amidas fenilpropanoídicas com octapaminas permanecem indefinidas (Figura 8). Há indicativos de que esses compostos possuam o papel de defesa contra infecções bacterianas em plantas, pois esses processos infecciosos acarretam em acumulação das amidas fenilpropanoídicas, precedida por um aumento da expressão do gene da enzima THT (BERTI; TAMBURELLO; FORZATO, 2025).

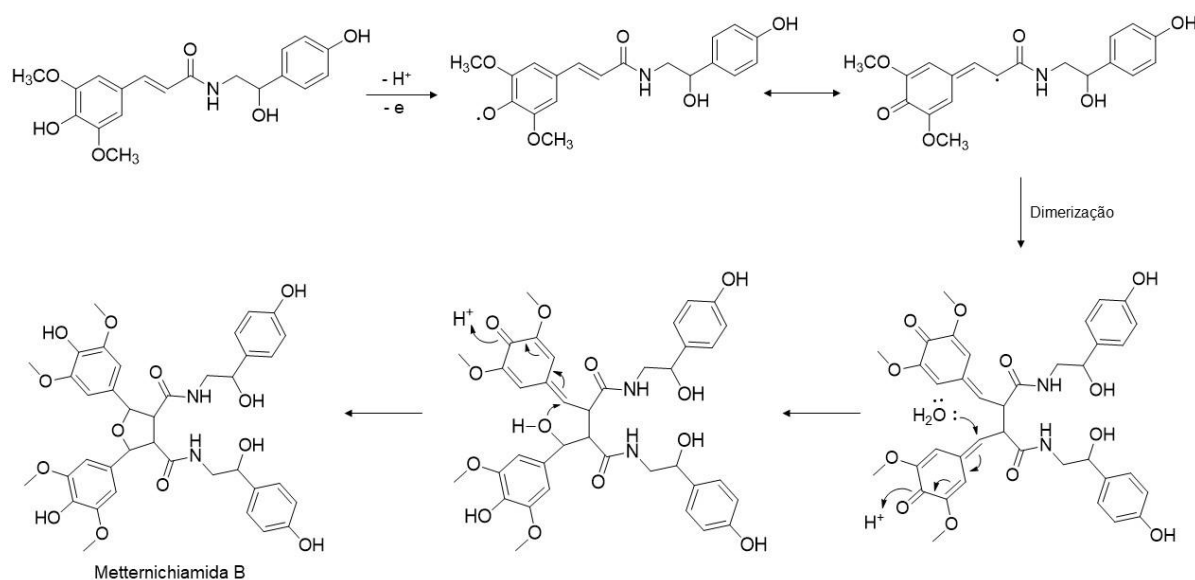
O mecanismo de acoplamento de oxidativo entre duas ou mais amidas fenilpropanoídicas ou envolvendo no mínimo uma unidade de amida com um fenilpropanoide, representa a explicação mais aceita para biossíntese das lignanamidas. Para formação de lignanamidas do tipo tetrahidrofurano, esse mecanismo de acoplamento se inicia através da oxidação do grupo fenol da porção

Figura 8 - Proposta de via biossintética para lignanamidas em plantas. PAL: Amônia-liase da fenilalanina; C4H: cinamato-4-hidroxilase; LC4: ligase da 4-(hidroxi)-cinamoil-CoA; TIDC: tirosina descarboxilase; THT: transferase de hidroxicinamoil-tiramina/hidroxicinamoil-CoA.



cumaroil, feruloil ou sipanoil da amida fenilpropanoídica. Então, o elétron desemparelhado é deslocado para obtenção de diferentes estruturas de ressonância; a mais comum apresentando o radical alílico na posição 8 (C-8), estabilizado por ressonância. Os diversos acoplamentos radiculares, a exemplo da dimerização, geram várias estruturas dotadas de *p*-quinonametidas reativas. Esses grupos são suscetíveis ao ataque nucleofílico de hidroxilas e moléculas de água, que quando sucedem causam o restabelecimento da função fenol da lignanamida (Figura 9).

Figura 9 - Mecanismo biossintético das reações de acoplamento de lignanamidas do tipo tetra-hidrofurano.



As lignanamidas do tipo bis-fenilpropeno com ligação C-C entre os C-8 e C-8' podem ser formadas inicialmente pela oxidação das hidroxilas aromáticas da porção sinapil, seguida da formação de várias estruturas de ressonância, sendo uma delas com radical nos C-8 e C-8'. Um acoplamento radicalar entre esses carbonos promove a dimerização. Subsequentemente, um ataque nucleofílico da água nas estruturas de *p*-quinona-metidas promove o restabelecimento da aromaticidade dos anéis e das hidroxilas aromáticas. Por fim, a oxidação por desidratação culmina na lignanamida do tipo bis-fenilpropeno (Figura 10).

O tipo arildi-hidronaftaleno é biossinteticamente explicado de maneira análoga ao das lignanamidas do tipo bis-fenilpropeno, no entanto após o restabelecimento da aromaticidade dos anéis e oxidação por desidratação, uma reação de Diels-Alder promoveria a formação do anel de seis membros, enquanto um consecutivo rearranjo

envolvendo o hidrogênio gama à dupla ligação entre (C-8 e C-8'), explicaria a formação de uma lignanamida do tipo arildi-hidronaftaleno (Figura 11).

Figura 10 - Mecanismo biossintético das reações de acoplamento de lignanamidas do tipo bis-fenilpropeno.

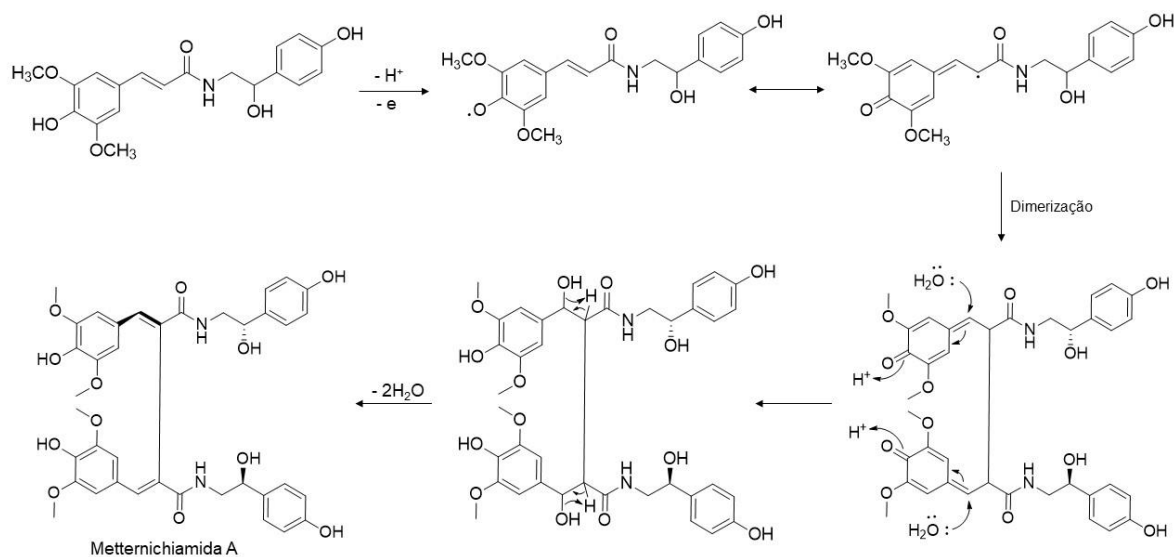
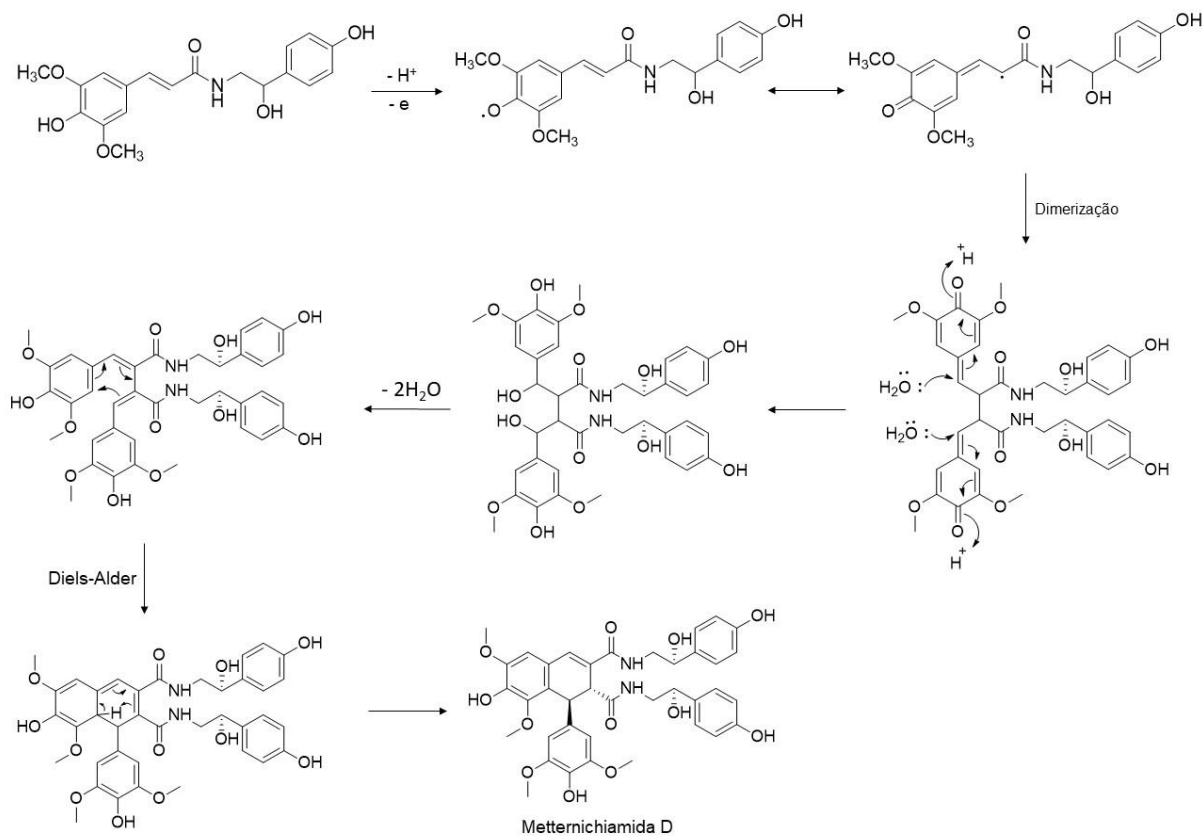
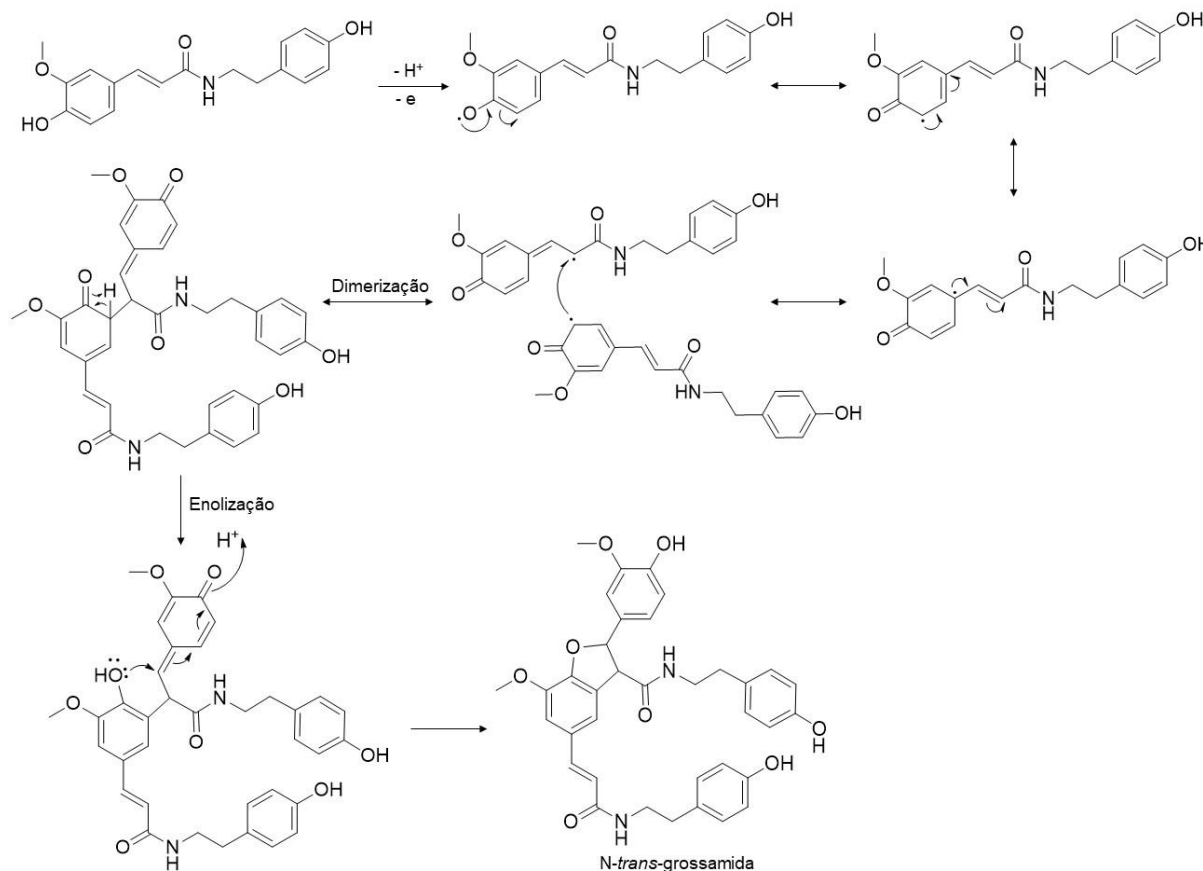


Figura 11 - Mecanismo biossintético das reações de acoplamento de lignanamidas do tipo arildi-hidronaftaleno.



Diferenciando-se das demais, a proposta de mecanismo biossintético de lignanamidas do tipo di-hidrobenzofurano, envolveria a dimerização seguida de enolização da carbonila presente na porção feruloil para formação da hidroxila aromática. Um ataque nucleofílico à *p*-quinona-metida promoveria a ciclização do anel di-hidrofurano e biossíntese dessa lignanamida (Figura 12) (DEWICK, 2009; LEONARD; ZHANG; YING; FANG, 2020).

Figura 12 - Mecanismo biossintético das reações de acoplamento de lignanamidas do tipo di-hidrobenzofurano.



Para esses compostos encontram-se relatos de excelentes propriedades anti-inflamatórias e neuroprotetoras, demonstrando grande potencial para aditivos alimentares, medicamentos e suplementos de saúde. As lignanamidas podem atuar por mecanismos de ação que desencadeiam atividades farmacológicas específicas, como anti-inflamatória, anticancerígena e antioxidante, o que pode ser uma fonte potencial de novos fármacos, protótipos a princípios ativos, cosméticos e suplementos alimentares (MALLARDO; PACIFICO; PICCOLELLA; DI MEO *et al.*, 2024; SUN; TONG; TU; CHEN *et al.*, 2024).

## 2.5 Atividade anti-inflamatória

A inflamação é uma resposta imune inespecífica do organismo. Durante esse processo o sistema imunológico ativa um mecanismo de defesa complexo que envolve a ativação de várias células imunes, bem como a produção de diferentes moléculas de sinalização, incluindo citocinas. As interleucinas (IL) são um tipo de citocina que desempenha um papel crucial na modulação da resposta imune a agentes infecciosos. As interleucinas são produzidas por diferentes células imunes, como células B, células T, células dendríticas e macrófagos. Essas atuam em diferentes células-alvo, incluindo células imunes, células endoteliais e células epiteliais. Várias interleucinas estão envolvidas na resposta imune a agentes infecciosos e podem ser classificadas como pró-inflamatórias ou anti-inflamatórias, dependendo de seus efeitos no sistema imunológico. Fisiologicamente o resultado da inflamação é restaurar a homeostase diante de estímulos patogênicos ou danosos (AL-QAHTANI; ALHAMLAN; AL-QAHTANI, 2024).

Embora a inflamação autolimitada seja uma resposta fisiológica, a persistência do gatilho é prejudicial e uma resolução deficiente do processo pode evoluir para um estado de inflamação crônica de baixo grau, além da possibilidade de prejudicar outros órgãos e desencadear reações sistêmicas. Essa condição está fortemente associada ao desenvolvimento de diversas condições crônicas cada vez mais prevalentes e graves, como obesidade, câncer e doenças cardiovasculares, elevando a morbidade e a mortalidade gerais em todo o mundo. Mais de 50% das mortes atribuídas a doenças relacionadas à inflamação se devem às doenças inflamatórias crônicas, em grande parte devido à possibilidade de progressão de aterosclerose e disfunção endotelial (CIFUENTES; VERDEJO; CASTRO; CORVALAN *et al.*, 2025; ZHAO; WU; LIU; CHEN *et al.*, 2025).

A interrupção da progressão das reações inflamatórias agudas e crônicas frequentemente preconizam intervenções farmacológicas. No entanto, os medicamentos anti-inflamatórios disponíveis acarretam em importantes efeitos colaterais, como ganho de peso, pressão arterial elevada, aumento do risco de catarata e glaucoma e distúrbios gastrointestinais. Por isso, a busca por alternativas farmacoterapêuticas eficazes e mais seletivas tem sido almejada (ZHAO; WU; LIU; CHEN *et al.*, 2025).

Nesse sentido, o uso de metabólitos secundários derivados de raízes, caules e folhas de plantas tem crescido significativamente na medicina moderna. Em muitos casos, esses compostos tornaram-se a escolha preferida, mesmo durante os estágios iniciais da terapia molecular direcionada, devido às suas capacidades em relação à regulação imunológica e anti-inflamatória. Vários compostos de origem natural demonstraram a capacidade de reduzir a inflamação por meio da regulação dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-17, bem como da modulação das vias de sinalização JNK1, NF- $\kappa$ B/p65 e STAT3, o que faz das plantas uma importante fonte para descoberta de novos medicamentos fitoterápicos e fármacos anti-inflamatórios (GANDHI; MOHANA; ATHESH; HILLARY *et al.*, 2023).

A investigação sobre atividade anti-inflamatória de metabólitos secundários exige uma complexa investigação estrutural prévia. Além da possibilidade de vários elementos de quiralidade comuns, os precursores de lignanamidas como as sinapoilactaminas podem ser dotados de grupos volumosos, como as metoxilas aromáticas, as quais em diferentes grupos dessa classe podem ocasionar atropoisomerismo, um tipo de quiralidade axial que interfere diretamente na interação fármaco-receptor (TOENJES; GUSTAFSON, 2018).

## 2.6 Atropoisomerismo

Etimologicamente o atropoisomerismo vem das palavras gregas *a* que significa “não” e *tropos* que pode ser entendido como “giro”. É uma classe de estereoisômeros em que a rotação restrita em torno de uma ligação simples gera quiralidade axial. O tipo mais comum de atropoisomerismo são as bi-arilas, no entanto existem outros tipos não bi-arilas que estão sendo estudados, entre eles, as N-arilas. Outra possibilidade consiste na presença de uma ligação simples (C-C) entre duas duplas ligações não aromáticas (CIOGLI; VIVEK KUMAR; MANCINELLI; MAZZANTI *et al.*, 2016).

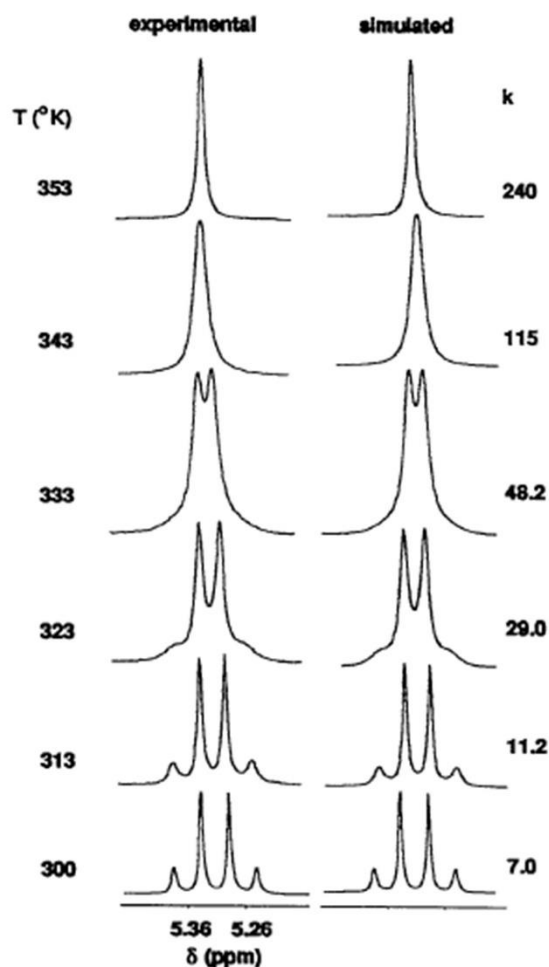
O atropoisomerismo pode ser considerada uma forma dinâmica de quiralidade, visto que a rotação da ligação representa um mecanismo espontâneo de racemização. No entanto, como o nome sugere, a definição arbitrária de atropoisomerismo é a de confôrmeros que tem restrição à interconversão. No padrão clássico eles possuem meia-vida de interconversão maior que 1000 s em temperatura fixa. Os atropoisômeros podem ser classificados com base em sua meia-vida de racemização a 37 °C: classe 1 ( $t_{1/2} < 60$  s;  $\Delta G^\ddagger$  de racemização: 10-20 kcal.mol<sup>-1</sup>), classe 2 (60 s <



$t_{1/2} > 4,5$  anos;  $\Delta G^\ddagger$  de racemização: 20-30 kcal.mol<sup>-1</sup>) e classe 3 ( $t_{1/2} > 4,5$  anos;  $\Delta G^\ddagger$  de racemização: 30-40 kcal.mol<sup>-1</sup>). Os atropoisômeros de classe 1 não atendem à definição clássica de atropisomerismo e são tratados como não quirais, enquanto os atropoisômeros de classe 3 são tratados como enantiômeros estáveis. Os atropoisômeros de classe 2, que podem ser observados por RMN e até isolados, racemizam no intervalo de um minuto a um mês. Essa falta de estabilidade estereoquímica precisa ser compreendida para evitar riscos associados às suas aplicações (BASILAIA; CHEN; SECKA; GUSTAFSON, 2022).

Como mencionado anteriormente, experimentos de RMN de <sup>1</sup>H podem mostrar a duplicação de sinais para alguns deslocamentos químicos. Considerando um grupo fenil monossustituído com atropisomerismo, os carbonos 2 e 3 apresentam um deslocamento químico diferente dos carbonos 6 e 5, embora eles possuam uma relação de equivalência química. Isso significa que a rotação do grupo fenil é lenta o suficiente na escala de tempo de RMN tornar os C-2 e C-3 diasterotópicos em relação aos carbonos C-6 e C-5. Há casos em que se manifestam a duplicação ou até a formação de vários sinais, devido a rotação assimétrica do grupo fenil dando origem a um novo elemento de assimetria e a existência de dois diastereoisômeros distintos, com tempos de meia-vida suficientes para que os isômeros individuais possam ser observados no espectro de RMN. Essas anomalias já foram relatadas em lignanas arilnaftalênicas. A retrojusticidina B foi sintetizada e avaliada quanto por espectroscopia de RMN de <sup>1</sup>H adquiridos em diferentes temperaturas (Figura 13). Os espectros revelaram o rompimento da barreira rotacional e formação de um único sinal em detrimento de quatro sinais, variando a temperatura de 26,8 °C (300 K) até 79,8 °C (353 K) (CHARLTON; OLESCHUK; CHEE, 1996).

Figura 13 – Experimento de RMN de  $^1\text{H}$  da retrojusticidina B adquirido em diferentes temperaturas.



Fonte: (CHARLTON; OLESCHUK; CHEE, 1996).

## 2.7 Flavonoides

Os flavonoides são um grupo de substâncias polifenólicas naturais abundantes em vegetais, frutas, grãos e chás. Nas plantas são normalmente encontrados em flores, folhas e sementes. Além disso, desempenham papéis essenciais na mediação das respostas das plantas a fatores ambientais biológicos e não biológicos. Por exemplo, eles participam da coloração de frutos e flores para atrair animais e proteger as plantas contra estressores bióticos, como herbívoros, bactérias, fungos, e estressores ambientais abióticos, como a absorção de luz ultravioleta (UV) (SHEN; WANG; GAN; LIU *et al.*, 2022).

Diversos sinais exógenos e endógenos como a luz, temperatura, estado nutricional e fitohormônios, foram relatados como moduladores da biossíntese e do acúmulo de flavonoides. Múltiplos hormônios e vias de sinalização relacionadas ao estresse estão envolvidos na regulação da expressão gênica associada a essa via.

Os reguladores transcricionais pertencentes aos fatores de transcrição da família MYB e bHLH são bem documentados como reguladores diretos dos genes estruturais associados à biossíntese de flavonoides e podem ser regulados por componentes moleculares envolvidos nas vias de sinalização hormonal e de estresse (NAIK; MISRA; TRIVEDI; PANDEY, 2022).

O esqueleto básico de um flavonóide é representado pela flavanona com 15 átomos de carbonos ( $C_6-C_3-C_6$ ), dispostos em dois anéis benzênicos (A e B) unidos por um anel pirano de três carbonos (C). A posição do anel B, no anel C do pirano e o número e a posição dos grupos hidroxila no anel B influenciam a capacidade antioxidante dos flavonoides. Os grupos hidroxila funcionais nos flavonoides podem doar elétrons por ressonância para estabilizar os radicais livres e mediar a proteção antioxidante. Com base na estrutura flavonoides podem ser classificados em seis classes principais: flavan-3-óis, flavonas, flavonóis, flavanonas, isoflavonas e antocianinas (DIAS; PINTO; SILVA, 2021).

A biossíntese de flavonoides ocorre na junção da via do chiquimato com a via do acetato, sendo a via do chiquimato fornecedora do substrato para a síntese de cumaroil-CoA, e a via do acetato fornecendo as unidades de malonil-CoA para a reação de alongamento de  $C_2$  catalisada pela chalcona sintase. A fenilalanina é o produto inicial derivado da via do chiquimato, que gera ácido cinâmico por meio da catálise da fenilalanina amonialiase (PAL). Posteriormente, a cinamato-4-hidroxilase (C4H), facilita a hidroxilação na posição 4 (C-4) do ácido cinâmico para produção do ácido *p*-cumárico. A esterificação por ação da ligase da 4-(hidroxi)-cinamoil-CoA (LC4) converte o ácido *p*-cumárico em *p*-cumaroil-CoA. Enquanto isso, a malonil-CoA está envolvida na produção de flavonoides e na extensão de ácidos graxos de cadeia longa (SHEN; WANG; GAN; LIU *et al.*, 2022).

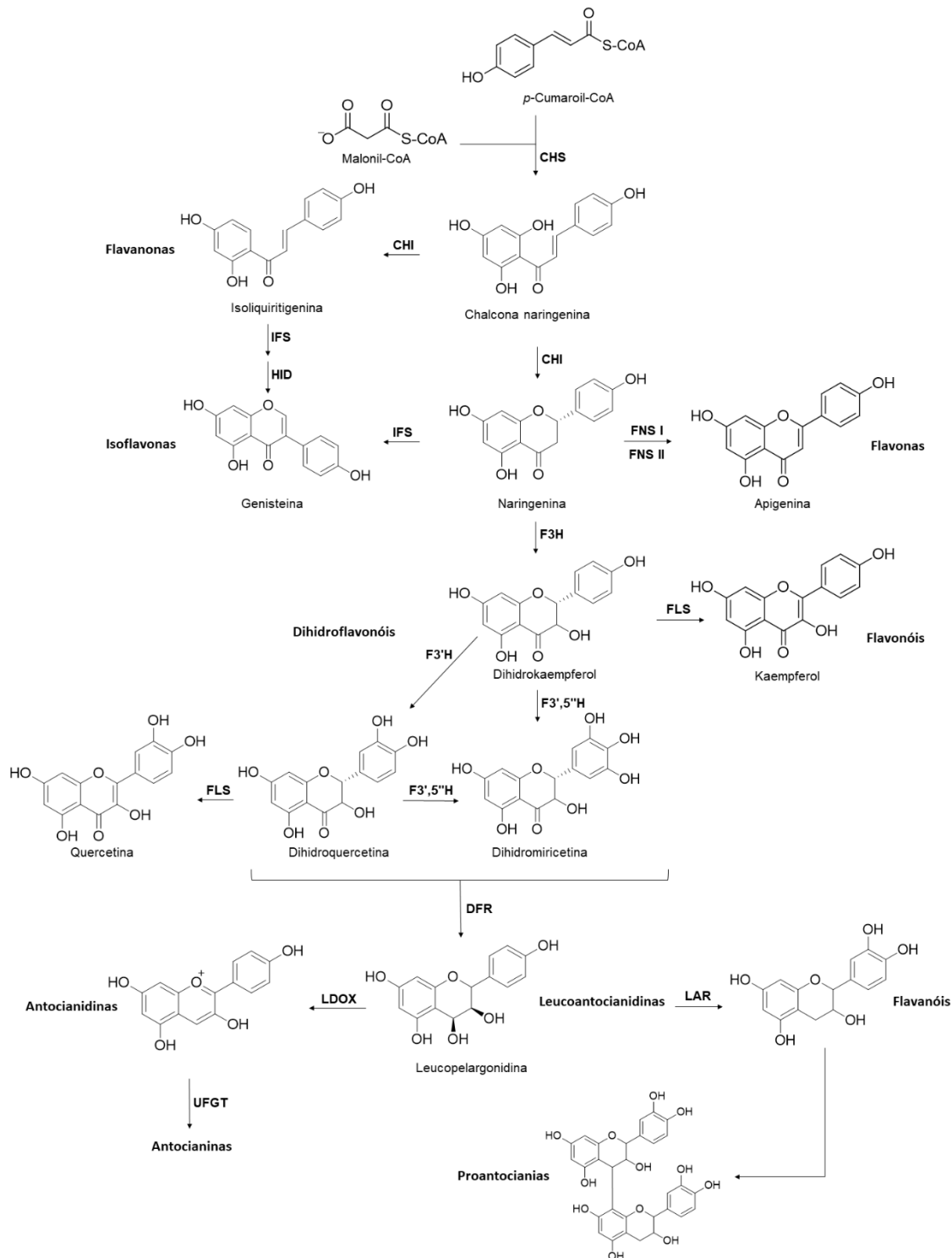
Os metabólitos *p*-cumaroil-CoA e malonil-CoA sofrem condensação e isomerização catalisadas pela chalcona sintase (CHS) para produção da chalcona naringenina. Essa chalcona é precursora de flavanonas biossintetizadas pela ação catalítica da chalcona isomerase (CHI) (KUMAR; KUMAR; BHARDWAJ; SWAPNIL *et al.*, 2024). Ademais, a naringenina chalcona pode sofrer ciclização para formar naringenina sob a rápida ação catalítica da CHI ou até espontaneamente (Figura 14).

A naringenina é o precursor comum da maioria dos metabólitos intermediários e produtos finais na biossíntese de flavonoides. A naringenina pode reagir com a flavona sintase I (FNS I) ou com a flavona sintase II (FNS II) para catalisar a formação

de flavonas, ou com a isoflavona sintase (IFS) para formar isoflavonas. A formação de di-hidroflavonóis, sucedem pela ação da flavanona-3-hidroxilase (F3H) para formação de di-hidrokaempferol, além de di-hidroquercetina e di-hidromiricetina obtidas por meio de reações químicas com a flavonol-3'-hidroxilase (F3'H) e a flavonol 3'5'-hidroxilase (F3'5'H), respectivamente. Sob a influência da flavonol sintase (FLS), os di-hidroflavonóis podem ser convertidos em flavonóis como kaempferol, quercetina e miricetina. Ademais, o di-hidroflavonol pode ser reduzido a leucoantocianidinas sob a atividade catalítica da di-hidroflavonol-4-redutase (DFR); as antocianidinas podem então ser biossintetizadas pela leucoantocianidina dioxigenase (LDOX) e, finalmente, essas antocianinas podem ser glicosiladas com sob catálise da uridina difosfato (UDP)-glicose: flavonoide-3-O-glicosiltransferase (UFGT). Além disso, as leucoantocianidinas podem gerar flavonóis por meio da atividade da leucoantocianidina redutase (LAR), produzindo unidades de flavonóis constituídas por oligômeros ou polímeros de proantocianinas. Por fim, vários tipos de antocianinas e flavonóis podem ser modificados por meio de acilação, metilação e glicosilação para biossintetizar flavonoides relativamente estáveis que podem se acumular nas plantas (Figura 14) (SHEN; WANG; GAN; LIU *et al.*, 2022).

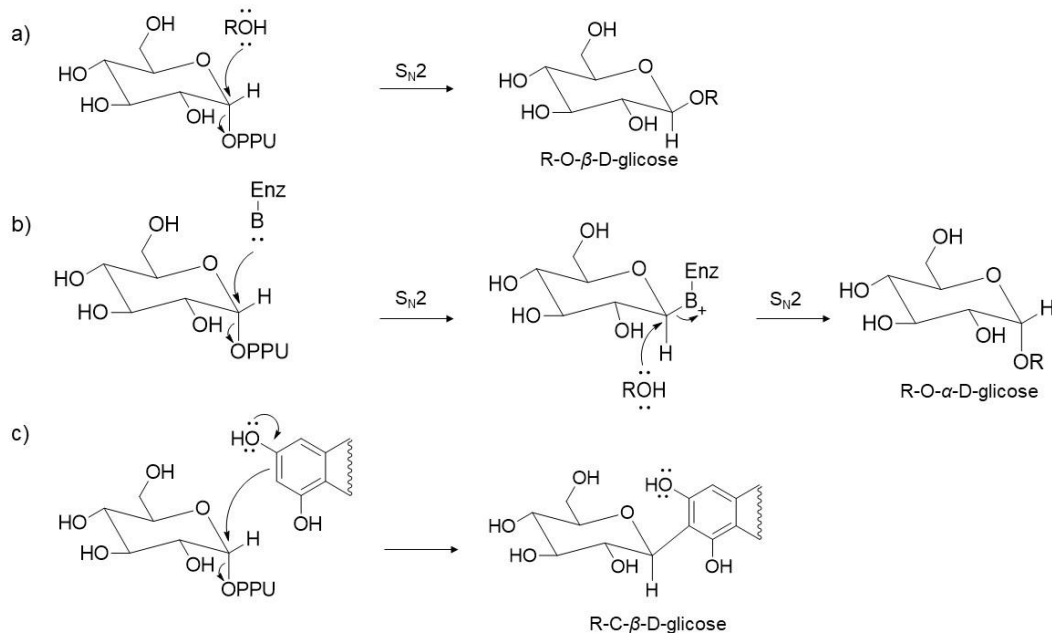
A maioria dessas moléculas existem na natureza como glicosídeos, nos quais os resíduos de açúcar atuam como um fator decisivo em sua complexidade estrutural e bioatividade. Múltiplos grupos hidroxila no esqueleto flavonoídico são alvos de glicosilação, principalmente com glicose, manose ou galactose e seus derivados 6-desoxihexoses (quinovose, fucose e ramnose) e pentoses (arabinose, apiose e xilose). Em casos raros, foi relatada a presença de outros açúcares didesoxihexosídeos, como digitopiranosídeo e boivinopiranosídeo de luteolina e apigenina (VASUDEVAN; LEE, 2020).

Figura 14 – Esboço da via biossintética de flavonoides em plantas. Chalcona sintase (CHS); chalcona isomerase (CHI); 2-hidroxiisoflavanona sintase (IFS); 2-hidroxiisoflavanona desidratase (HID); flavona sintase I e II (FNS I e II); flavanona 3-hidroxilase (F3H); flavonol 3' -hidroxilase (F3' H); flavonol 3' 5' -hidroxilase (F3' 5' H); flavonol sintase (FLS); di-hidroflavonol 4-redutase (DFR); leucoantocianidina redutase (LAR); leucoantocianidina dioxigenase (LDOX); UDP-glicose: flavonoide-3-O-glicosiltransferase (UGT).



A glicosilação depende da existência de um açúcar ligado a um nucleosídeo difosfato, normalmente uridina difosfato (UDP). O derivado UDP-açúcar sofre um ataque nucleofílico, comumente por meio da hidroxila de uma aglicona para formação de um glicosídeo ou de um outro açúcar para formação de oligômeros de açúcares, após eliminação do grupo de saída. Se o mecanismo da reação for do tipo  $S_N2$  culminará em inversão de configuração, gerando um produto com configuração  $\beta$ . Alguns açúcares mantêm configuração  $\alpha$ , após a glicosilação. Esse fenômeno pode ser explicado pela ação enzimática que permite uma segunda reação  $S_N2$ , restabelecendo a configuração original do açúcar (DEWICK, 2009). Além da O-glicosilação citada anteriormente, a C-glicosilação em flavonoides pode ser catalisada pela enzima C-glicosil-transferase de flavonoide (CGT). Essa C-glicosilação ocorre normalmente nas posições 6 e 8 (C-6 e C-8) orietaada pelos grupos *orto* doadores representado pelas hidroxilas nas posições 5 e 7 (C-5 e C-7) (Figura 15).(LI; WU; CHEN; DU *et al.*, 2014).

Figura 15 - Mecanismo de glicosilação de flavonoides. a) O-glicosilação com inversão de configuração; b) O-glicosilação conservando configuração original; c) C-glicosilação.



Fonte: adaptado: (DEWICK, 2009).

Com a crescente demanda por terapias menos tóxicas e mais toleráveis, os flavonoides têm o potencial de modular eficazmente a resposta à terapia convencional e à radioterapia. Seu potencial farmacológico de combater eficazmente o estresse

oxidativo e a inflamação crônica é um ponto-chave, uma vez que são importantes fatores na patogênese e progressão de muitas doenças crônicas, como câncer de mama, rim, pulmão e outras, doenças autoimunes (artrite reumatoide), doenças cardiovasculares (hipertensão, aterosclerose, arritmia), doenças neurodegenerativas (doença de Alzheimer, doença de Parkinson, doença de Huntington), transtornos mentais (depressão, esquizofrenia, transtorno bipolar), distúrbios gastrointestinais (doença inflamatória intestinal, câncer colorretal) e outros transtornos (JOMOVA; ALOMAR; VALKO; LISKA *et al.*, 2025).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Estabelecer o perfil químico das espécies de *Metternichia* J.C.Mikan e avaliar a atividade anti-inflamatória de lignanamidas isoladas de *Metternichia macrocalyx*.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Obter extratos, fases e frações por métodos extrativos e cromatográficos.
- Desenvolver metodologia analítica CLAE-DAD e promover transposição para escala preparativa para isolamento e purificação de metabólitos especializados presentes em *M. macrocalyx*.
- Identificar as estruturas dos compostos isolados por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (uni e bidimensionais), infravermelho, espectroscopia de dicroísmo circular eletrônico, cálculos de RMN e espectrometria de massas de alta resolução.
- Avaliar a atividade anti-inflamatória das lignanamidas isoladas de *M. macrocalyx*.
- Desenvolver metodologia analítica de CLAE-IES-Q-TOF-EM/EM para anotação de substâncias nas fases de *M. macrocalyx* e *M. princeps*.
- Comparar perfil metabólico das espécies de *M. macrocalyx* e *M. princeps* por rede molecular e análise quimiométrica.



## 4 METODOLOGIA

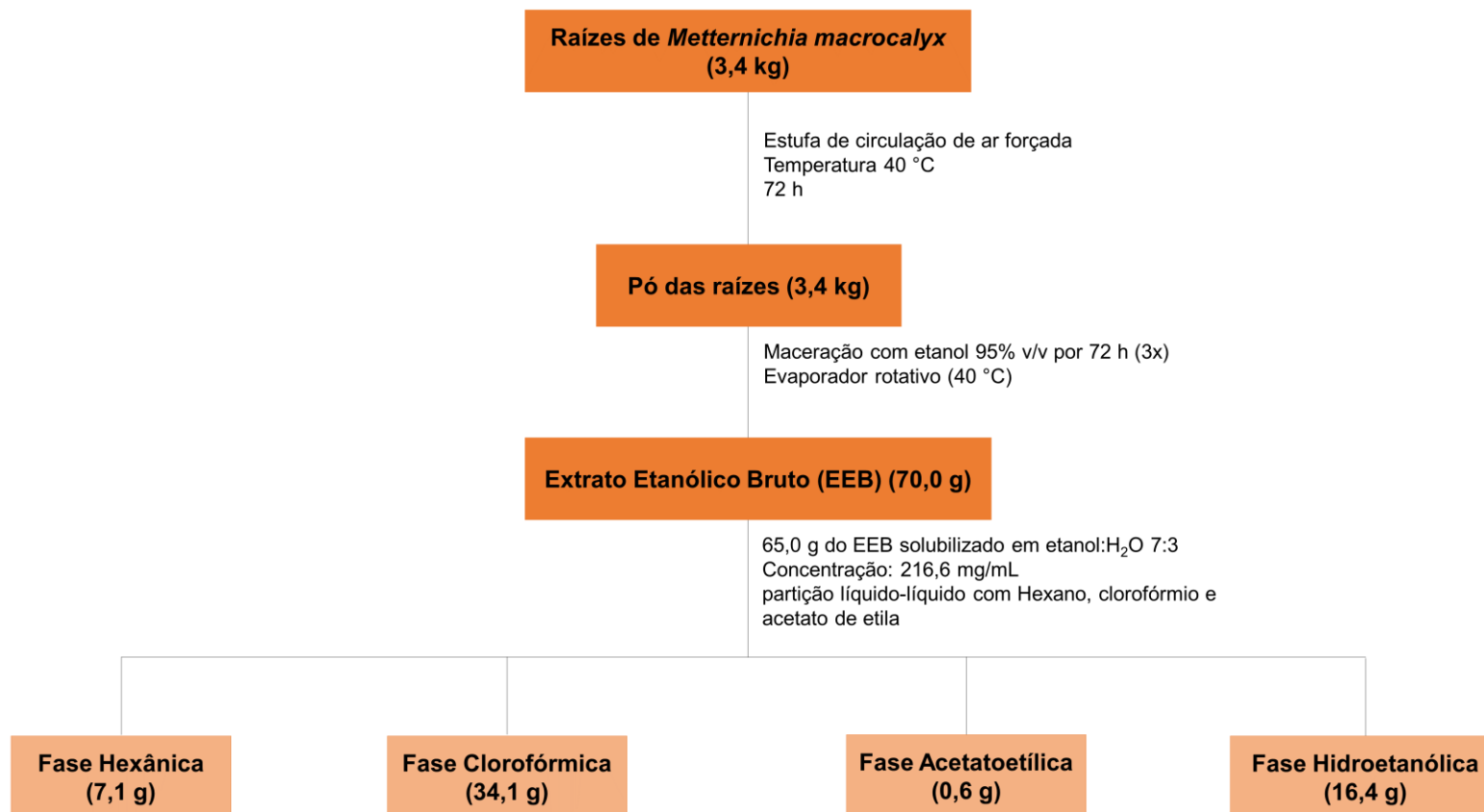
### 4.1 Coleta do material vegetal de *M. macrocalyx*

O material vegetal foi coletado na Fazenda esperança, no município Boa Vista do Tupim, Bahia, Brasil (13°13'15"S, 41°11'08"W) em janeiro de 2019. A espécie foi identificada pelo Prof. Dr. Domingos Benício Oliveira Silva Cardoso do departamento de botânica do instituto de biologia da Universidade Federal da Bahia (UFBA). O registro de acesso no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN) foi obtido sob o número AA54545. Uma exsicata do material coletado foi produzida e depositada no Herbário Alexandre Leal Costa – ALCB da UFBA (código ALCB 138826).

### 4.2 Obtenção e partição líquido-líquido do EEB das raízes de *M. macrocalyx*

O material vegetal foi submetido a um processo de secagem em estufa de circulação de ar forçada, sob uma temperatura média de 40°C, por um período de 72 horas. Esse material desidratado foi triturado em moinho mecânico para obtenção do pulverizado das raízes (3,4 Kg), caules (1,9 Kg), folhas (1,0 Kg) e galhos (1,1 Kg). O pulverizado das raízes (3,4 Kg) foi submetido à maceração em um percolador de aço inoxidável. O material passou por uma extração estática em 5 L de etanol 95% (v/v) por um período de 72 horas. A solução extrativa obtida por filtração comum com papel de filtro qualitativo foi concentrada em evaporador rotativo, a uma temperatura média de 40 °C, culminando na obtenção de 70,0 g de extrato etanólico bruto (EEB), com rendimento de 2,059% em relação ao peso seco do pulverizado das raízes (Figura 16).

Uma quantidade de 65,0 g do EEB foi ressuspensa em 300 mL de uma solução EtOH:H<sub>2</sub>O 7:3 (v/v) e homogeneizada sob agitação mecânica. A solução hidroetanólica foi submetida a uma partição líquido-líquido, em ampola de separação, utilizando 500 mL dos respectivos solventes em gradiente crescente de polaridade: hexano, clorofórmio e acetato de etila. As fases obtidas foram concentradas em evaporador rotativo, a uma temperatura de 40 °C. O líquido residual foi eliminado com auxílio de um dessecador resultando em 7,1 g da fase hexânica (FHX), 34,1 g de fase clorofórmica (FCL), 0,6 g da fase acetatoetílica (FAE) e 16,4 g fase hidroetanólica (FHE) (Figura 16)..

Figura 16 - Obtenção e partição líquido-líquido do EEB das raízes de *M. macrocalyx*.

### 4.3 Materiais e métodos empregados no isolamento, purificação dos constituintes químicos

O fracionamento cromatográfico das fases e frações foi conduzido por meio da cromatografia líquida de média pressão (CLMP) e cromatografia em coluna (CC). Na CLMP foi utilizado um equipamento Buchi com seguintes módulos: duas bombas C-605, a unidade de controle C-620, amostrado automático C-660 e um detector C-635. Uma coluna vidro com 3 cm de diâmetro interno específica para CLMP foi empacotada com sílica gel (Siliaflash, tamanho de partícula 60-200  $\mu\text{m}$ ). A CLMP foi performeda utilizando hexano, acetato de etila e metanol puros ou em misturas binárias. Na CC foram utilizadas colunas de diâmetros variáveis de acordo com a quantidade da amostra empregada na separação cromatográfica. A sílica gel (Siliaflash, tamanho de partícula 60-200  $\mu\text{m}$ ) foi empregada como fase estacionária e alternativamente o sephadex LH-20 como suporte. A cromatografia de exclusão por tamanho em gel de sephadex LH-20 foi realizada no modo isocrático com metanol P.A.

O monitoramento inicial das frações foi realizado por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) utilizando cromatofolhas de alumínio (Whatman, sílica gel 60 F254, espessura de 0,25 mm, suporte de alumínio 20 x 20 cm). A eluição foi realizada com diferentes proporções dos sistemas hexano/acetato de etila ou Acetato de etila/metanol com 0,1% de ácido fórmico.

A CLAE em escala analítica para desenvolvimento de método e monitoramento de frações foi realizada utilizando um sistema cromatográfico CLAE (Shimadzu, Kyoto, Japan) contendo duas bombas de solvente LC-20AD, um sistema de desgaseificação DGU-20A, um autoinjeter SIL-20A, um detector SPD-M20A de arranjo de diodos e uma controladora do sistema CBM-20A. Uma coluna C18 ACE (250 mm x 4,6 mm x 5,0  $\mu\text{m}$ ), C18 YMC (250 mm x 4,6 mm x 5,0  $\mu\text{m}$ ) e C18 GIST (250 mm x 4,6 mm x 5,0  $\mu\text{m}$ ) foi empregada. Os isolamentos cromatográficos em escala preparativa foram realizados em sistema de CLAE (Shimadzu, Kyoto, Japan) com bombas binárias LC-6AD, detector SPD-M10A de arranjo de diodos e uma controladora do sistema SCL-10A. A coluna utilizada foi a C18 ACE (250 mm x 21,2 mm x 5,0  $\mu\text{m}$ ), C18 YMC (250 mm x 20,0 mm x 5,0  $\mu\text{m}$ ), C18 GIST (250 mm x 20,0 mm x 5,0  $\mu\text{m}$ ). Os solventes utilizados na escala analítica e preparativa foram acetonitrila e metanol grau CLAE (LiChrosolv®, Brasil), água ultrapura obtida do sistema de purificação de água Milli-Q (Millipore®), além ácido fórmico grau CLAE como modificador de fase móvel.

#### 4.4 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os experimentos de ressonância magnética nuclear (RMN) unidimensionais e bidimensionais foram realizados em um espectrômetro de RMN Bruker Ascend 400 operando com intensidade de campo de 9,4 T (400 MHz e 100 MHz para  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ) e Bruker AvanceNeo 500 operando com um itensidade de campo de 11,7 T (500 MHz e 125 MHz para  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ). Os espectros foram registrados em MeOD ou DMSO- $d_6$  e referenciados utilizando o sinal residual do solvente MeOD ( $\delta_{\text{H}}$  3,31 e  $\delta_{\text{C}}$  49,00) e DMSO- $d_6$  ( $\delta_{\text{H}}$  2,49 e  $\delta_{\text{C}}$  39,5).

#### 4.5 Espectrometria de Massas de Alta Resolução (EMAR)

Para obtenção dos espectros de massas de alta resolução com a finalidade única de determinação da fórmula molecular de substâncias isoladas, foram realizadas análise por injeção em fluxo (AIF) em alta-resolução. As amostras foram injetadas em um sistema cromatográfico CLAE (Shimadzu, Kyoto, Japan) equipado com duas bombas de solvente LC-20AD, um autoinjeter SIL-20A, e uma controladora do sistema CBM-20A, acoplado a um espectrômetro de massas MicrOTOF II (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA) com uma fonte de ionização electrospray (ESI), operando com a voltagem do capilar: 4,5 kV, IES em modo positivo ou 4,0 kV IES em modo negativo, offset da placa final: 500 V, nebulizador 4,0 bar, gás de secagem ( $\text{N}_2$ ) com fluxo de 8,0 ml/min e temperatura de 200°C. Os espectros ( $m/z$  50-1000) foram registrados a cada 2 segundos. Os dados foram analisados e processados no software DataAnalysis 4.2.

#### 4.6 Espectroscopia na região do infravermelho (IV)

Os espectros de infravermelho (IV) foram registrados em um espectrômetro Shimadzu Proeminence IR Prestige-21 usando grânulos de KBr, e alternativamente em um espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier (IVFT) Shimadzu IRSpirit-T utilizando o acessório QATR-S. As análises de infravermelho foram adquiridas na região do infravermelho médio (MID) na faixa de 400-4000  $\text{cm}^{-1}$ , operando no modo transmitância.

#### 4.7 Rotação óptica específica (ROE)

Um polarímetro Jasco P-2000 (*Easton*, MD, EUA) foi usado para medir as rotações ópticas específicas. Durante as análises foi utilizada uma célula com 100 mm de comprimento de caminho óptico. Alíquotas de 0,9-2,2 mg das amostras foram solubilizadas em 1,0 mL de metanol e analisadas a uma temperatura de 20 °C.

#### 4.8 Espectroscopia de Dicroísmo Circular Eletrônico

Os espectros experimentais de dicroísmo circular eletrônico (ECD) foram registrados em um espectrômetro Jasco J-1100 (Jasco, Tóquio, Japão) na região de 200-400 nm usando os seguintes parâmetros: largura de banda 1 nm; resposta 1,0 s; velocidade de varredura 100 nm.min<sup>-1</sup>; 3 acumulações; temperatura ambiente (25 °C); amostra em solução de metanol; comprimento do caminho da célula de 0,1 cm; concentração de 0,1 mg.ml<sup>-1</sup>. Os espectros foram suavizados no software Origin.

#### 4.9 Cálculos de ECD e RMN

Buscas conformacionais randomizadas foram realizadas para todos os estereoisômeros possíveis usando o algoritmo de Monte Carlo com campo de força MMFF no software SPARTAN '14 (Spartan'14 Wavefunction, Inc. Irvine, CA.). Todos os confórmeros dentro de uma janela relativa de energia livre de 10 kcal.mol<sup>-1</sup> foram selecionados para cálculos de otimização de geometria na fase gasosa, empregando o nível de teoria B3LYP/6-31G(d). Cálculos de frequência vibracional foram realizados no mesmo nível de teoria para confirmar que os pontos estacionários correspondem à energia potencial mínima de superfície. Posteriormente, confórmeros dentro de uma janela de energia relativa de 3 kcal.mol<sup>-1</sup> foram selecionados para simulações de espectros de ECD e/ou cálculos de constantes de blindagem magnética nuclear <sup>13</sup>C e <sup>1</sup>H ( $\sigma$ ). Para simulações de ECD, TD-DFT em nível de teoria foi aplicado: CAM-B3LYP/TZVP, empregando um modelo contínuo polarizável com formalismo de equação integral (IEF-PCM) para simular implicitamente o metanol como solvente. Os espectros de ECD finais foram gerados com base nas estatísticas de Boltzman dos confórmeros selecionados e plotados usando o software Origin 8 (OriginPro 8,

OriginLab Corporation; Northampton, MA, USA, 2020). Os cálculos de blindagem magnética nuclear foram conduzidos usando o nível de teoria GIAO-mPW1PW91/6-31G(d), juntamente com o IEF- Método PCM para simular solvatação por metanol. As constantes de blindagem médias da população foram obtidas assumindo as estatísticas de Boltzmann a uma temperatura de 298 K. Finalmente, os deslocamentos químicos RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$ ) foram obtidos como  $\delta_{\text{calc}} = \sigma_{\text{TMS}} - \sigma$ , onde  $\sigma_{\text{TMS}}$  representa a constante de blindagem do composto de referência (tetrametilsilano, TMS), que foi calculado usando os mesmos níveis de teoria. O método DP4+, que se baseia na análise Bayesiana, foi empregado para estabelecer uma correlação estatística entre os deslocamentos químicos  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  calculados e experimentais. Cada estrutura foi classificada com base nas probabilidades. Probabilidades superiores a 90% indicam um alto nível de confiança de que o candidato exibiu a melhor concordância com os dados experimentais (GRIMBLAT; ZANARDI; SAROTTI, 2015). Todos os cálculos de mecânica quântica foram realizados utilizando o pacote de software Gaussian 16 (FRISCH; TRUCKS; SCHLEGEL; SCUSERIA *et al.*, 2016).

#### 4.10 Fracionamento cromatográfico da FCL das raízes de *M. macrocalyx*

A fase clorofórmica (3,0 g) foi submetida à cromatografia líquida de média pressão (CLMP), utilizando sílica gel G60 com partículas de 60-200  $\mu\text{m}$ , eluída com hexano, acetato de etila e metanol, puro ou em mistura binária, em gradiente crescente de polaridade. Desse procedimento foram obtidas 12 frações (A1-A12) (Tabela 1). As frações A4-6 (130 mg) foram agrupadas por similaridade de perfil cromatográfico em CCDA. A fração A4-6 (130 mg) foi submetida à separação cromatográfica preparativa em CLAE, utilizando coluna C18 (ACE, 250 mm x 21,2 mm x 5,0  $\mu\text{m}$ ) e o seguinte gradiente de eluição: Solvente A =  $\text{H}_2\text{O}:\text{HCOOH}$  0,1% v/v ; Solvente B = MeOH; perfil de eluição = 0,0-45,0 min (5-35% B); 45,0-70,0 min (35-45%B); 70,0-95,0 min (45-70% B); 95,0-100,0 min (70-100% B); 100,0-105,0 min (100% B); 105,0-120,0 min (100% B); 120,0-125,0 min (100-5% B); 125,0-145,0 min (5% B); volume de injeção de 100  $\mu\text{L}$  e fluxo de 8,0 mL/min. Desse processo foram coletadas 15 frações, as quais foram concentradas em evaporador rotativo a 40°C. A análise do espectro de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  das frações isoladas levaram à identificação de dez compostos: **1** (1,3 mg,  $t_R$  = 59.7 min), **6** (6,6 mg,  $t_R$  = 66.7 min), **7** (5,6 mg,  $t_R$  = 65.2 min), **8** (4,8 mg,  $t_R$  = 82.0 min), **9** (3,0 mg,  $t_R$  = 71.1 min), **10** (1,0 mg,  $t_R$  = 79.7

min), bem como mistura de dois isômeros posicionais **11** e **12** (3,2 mg,  $t_R$  = 83.3 min) e dois isômeros geométricos **13** e **14** (3,0 mg,  $t_R$  = 101.2 min). A fração A7 (1,1 g) foi analisada em CLAE-DAD e apresentou um perfil cromatográfico similar ao apresentado pela fração A4-6. Ademais, a fração apresentou no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  em DMSO- $d_6$ , sinais característicos para presença de amidas fenilpropanoídicas em  $\delta_H$  6,55; 6,82, 4,53 e 3,15. A fração A7 (1,1 g) foi filtrada em gel de Sephadex LH-20 e eluída com MeOH para obtenção de 15 frações (B1-15), essas frações foram monitoradas por CLAE-DAD. As frações B8-10 (377,1 mg) com perfis cromatográficos semelhantes foram agrupadas e submetidas à CLAE preparativa, utilizando coluna C18 (ACE, 250 mm x 21,2 mm x 5,0  $\mu\text{m}$ ) e o seguinte gradiente de eluição: Solvente A =  $\text{H}_2\text{O}$ ; Solvente B = MeOH; perfil de eluição = 0,0-45,0 min (5-35% B); 45,0-70,0 min (35-45%B); 70,0-120,0 min (45-60% B); 120-125,0 min (60-100% B); 125,0-140,0 min (100% B); 140,0-145,0 min (5% B); 145,0-165,0 min (5% B). Foram realizadas 19 injeções de 200  $\mu\text{L}$  da amostra com concentração 99,2 mg/mL sob um fluxo de 8,0 mL/min. Desse processo foram coletadas 21 frações. A análise dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  dos picos isolados levaram à identificação dos compostos **2** (6,0 mg,  $t_R$  = 59,9 min), **15** (5,0 mg,  $t_R$  = 109,5 min), além dos compostos reisolados **6** (10,0 mg,  $t_R$  = 68,0 min) e **7** (8,6 mg,  $t_R$  = 66,6 min).

Tabela 1 - Fracionamento cromatográfico da fase clorofórmica de *M. macrocalyx*.

Frações	Proporção de solventes
A1	Hexano:AcOEt (7:3)
A2	Hexano:AcOEt (6:4)
A3	AcOEt:Hexano (6:4)
A4	AcOEt:Hexano (8:2)
A5	AcOEt:Hexano (9:1)
A6	AcOEt:Hexano (95:05)
A7	AcOEt (100%)
A8	AcOEt:MeOH (9:1)
A9	AcOEt:MeOH (8:2)
A10	AcOEt:MeOH (6:4)
A11	AcOEt:MeOH (1:1)
A12	MeOH (100%)

Diante do manifesto potencial de biossíntese de lignanamidas, a necessidade de reisolamento para realização de análises complementares e avaliação de atividade

biológica, quatro gramas da fase clorofórmica foram submetidas a CLMP em sílica gel fase normal com tamanho de partículas de 60-200 µm e eluída em um sistema de eluição em etapas com acetato de etila (Solvente A) e Metanol (solvente B) (Tabela 2). A amostra foi aplicada em fase sólida sendo misturada previamente com sílica gel utilizando grau, pistilo e gotículas de metanol para facilitar homogeneização. Desse procedimento foram obtidas 10 frações (C1-10), as quais foram reunidas em 7 frações de acordo com seu perfil cromatográfico em CLAE-DAD.

Tabela 2 - Fracionamento cromatográfico para reisolamento e isolamentos de novos compostos da fase clorofórmica de *M. macrocalyx*.

Frações	Proporção de solventes
C1	0% B
C2	0% B
C3	3-5% B
C4	5-7% B
C5	10% B
C6	10-15% B
C7	20% B
C8	30% B
C9	40-50% B
C10	100% B

A fração agrupada C4-7 (1,3 g) foi solubilizada em mínima quantidade de metanol, centrifugada e injetada por meio de uma alça de injeção com capacidade para 20 mL. A amostra foi submetida à CLMP em fase reversa (C-18) e eluída com MeOH (Solvente B) e H<sub>2</sub>O (Solvente A), em gradiente linear de 5-100% de B em 90 min, sob um fluxo de 10 mL/min. Desse procedimento foram obtidas 8 frações (D1-8). A fração D2 (148,0 mg) foi submetida à separação cromatográfica preparativa por HPLC utilizando coluna C18 (YMC, 250 mm x 20,0 mm x 5,0 µm) e o seguinte gradiente de eluição: Solvente A = H<sub>2</sub>O; Solvente B = MeOH; perfil de eluição = 0,0-40,0 min (25-40% B); 40,0-70,0 min (40-46%B); 70,0-75,0 min (46-100% B); 75,0-90,0 min (100% B); 90,0-95,0 min (100-25% B); 95,0-115,0 min (25% B); volume de injeção de 100 µL; concentração da amostra 211,4 mg/mL; fluxo de 8,0 mL/min; foram coletadas 16 frações (D2.1 – D2.16). As análises do espectro de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C dos picos isolados levaram à identificação dos compostos **3** (2,6 mg, *t<sub>R</sub>*= 73.5 min), **4** (7.2 mg, *t<sub>R</sub>*= 43.4 min) e **5** (4.4 mg, *t<sub>R</sub>*= 65.9 min), além dos compostos reisolados, **2** (10.4



mg,  $t_R$  = 51.9 min), **6** (16.6 mg,  $t_R$  = 60.6 min) e **7** (8.1 mg,  $t_R$  = 63.0 min). A fração D2.9 (3,1 mg) foi purificada por CLAE semi-preparativo utilizando uma coluna C18 (Venusil, 250 mm x 10,0 mm x 10,0  $\mu$ m) e o seguinte gradiente de eluição: Solvente A = H<sub>2</sub>O; Solvente B = MeOH/ACN 50% v/v; perfil de eluição = 0,0-25,0 min (5-25% B); 25,0-75,0 min (25-40% B); 75,0-80,0 min (40-100% B); 80,0-95,0 min (100% B); 95,0-100,0 min (100-5% B); 100,0-120,0 min (5% B); volume de injeção de 100  $\mu$ L e fluxo de 3,0 mL/min; para obtenção do composto **1** (1,0 mg). A fração D1 (151,0 mg) foi fracionada por CLAE preparativa utilizando MeOH e H<sub>2</sub>O como eluente (8,0 mL/min), por meio de um sistema de gradiente com os seguintes parâmetros: 0,0-83,0 min (25-46% B); 83,0-87,0 min (46-100%B); 87,0-102,0 min (100% B); 102,0-107,0 min (100-25% B); 107,0-127,0 min (25% B); 12 frações (D1.1-D1.12) foram coletadas. Este processo levou ao reisolamento do composto **4** (7.7 mg,  $t_R$  = 38.2 min) e **5** (1.0 mg,  $t_R$  = 59.1 min). Além disso, a fração D1.5 (2,6 mg) foi purificada por CLAE semi-preparativa utilizando MeOH/ACN 50% v/v (solvente B) e H<sub>2</sub>O (solvente A) através de fluxo isocrático de 3,0 mL/min com 30% B e tempo de corrida de 70,0 min, para obtenção do composto **1** (1,2 mg).

## 4.11 Atividade anti-inflamatória

### 4.11.1 Ensaio de citotoxicidade

Células da linhagem RAW264.7 (macrófagos murinos) foram semeadas em placas de 96 poços na concentração de  $1 \times 10^5$  células/mL em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA), suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF; GIBCO, Grand Island, NY, EUA) e 1% de solução de antibióticos (penicilina 10.000 U/mL e estreptomicina 10 mg/mL) (Sigma Aldrich). Após 24 horas, período necessário para a aderência das células à placa de cultivo, as células foram tratadas com diferentes concentrações dos compostos **1**; **2**; **3**; **4** ou **5** (25, 50 ou 100  $\mu$ M), previamente dissolvidos em DMSO, não ultrapassando a concentração final de 0,5%, e mantidas em estufa a 5% de CO<sub>2</sub>, 37°C. Prosseguido o período de 24 horas de tratamento, as placas foram centrifugadas (500 x g, 5 minutos, 25°C), o sobrenadante (110  $\mu$ L) foi removido e, finalmente, 10  $\mu$ L da solução de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio) foi adicionada (5 mg/mL em PBS) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) (MOSMANN, 1983). As placas foram incubadas por quatro horas adicionais, e, em seguida, foi adicionado 100  $\mu$ L de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10% e os cristais de formazan produzidos foram dissolvidos overnight. A absorbância foi mensurada em um espectrofotômetro (leitor de microplacas BioTek Instruments, Sinergy HT, Winooski, VT, EUA) no comprimento de onda de 570 nm.

### 4.11.2 Quantificação de nitrito

Para a quantificação indireta de óxido nítrico (NO), células da linhagem RAW 264.7 foram semeadas em placas de cultura de 96 poços a uma densidade de  $1 \times 10^6$  células/mL em meio DMEM suplementado com 10% de SBF e 1% de antibióticos em incubadora de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C, conforme descrito anteriormente. Após o período de quatro horas, as células foram então estimuladas simultaneamente com LPS (500 ng/mL) e IFN- $\gamma$  (5 ng/mL) na presença dos compostos **1**; **2**; **3**; **4**, **5** (25, 50 ou 100  $\mu$ M) ou dexametasona (20  $\mu$ M, droga padrão). Foram incluídos ainda um grupo controle estimulado (meio de cultura e LPS/IFN- $\gamma$ ) e um grupo basal (não estimulado). Após 24 horas, os sobrenadantes livres de células foram coletados para a quantificação de

nitrito, utilizado como indicador da produção de óxido nítrico, através do método de Griess (GRIESS, 1879). A concentração de nitrito foi avaliada por uma curva padrão de nitrito de sódio (0 a 200  $\mu\text{M}$ ).

#### **4.11.3 Quantificação de citocinas (IL-10 e IL-1 $\beta$ )**

Células da linhagem RAW 264.7 foram cultivadas em placas de 96 poços em uma densidade de  $1 \times 10^6$  células/mL. Após quatro horas de aderência à placa, as células foram tratadas com os compostos **1**; **2**; **3**; **4**, **5** em diferentes concentrações (25, 50 ou 100  $\mu\text{M}$ ) ou dexametasona (20  $\mu\text{M}$ , droga padrão), e simultaneamente incubadas na presença de LPS (500ng/mL) e IFN-  $\gamma$  (5ng/mL) por 24 horas. Foram incluídos ainda um grupo controle estimulado (meio de cultura e LPS/IFN- $\gamma$ ) e um grupo basal (não estimulado). Após esse período, os sobrenadantes de cada poço foram coletados para determinar o conteúdo de IL-10 e IL-1 $\beta$ , de acordo com as instruções do fabricante usando um kit de imunossorvente ligado a enzima (ELISA) (Invitrogen, TermoFisher, Viena, Áustria).

#### **4.11.4 Análise estatística**

Os dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) de cinco replicatas. As comparações entre os grupos foram feitas utilizando análise de variância (ANOVA) one-way com pós-teste de Tukey. As análises foram realizadas utilizando o software Prism 8 (GraphPad, San Diego, CA, EUA) e os grupos foram considerados estatisticamente diferentes quando  $p < 0,05$ .

#### **4.12 Obtenção e particionamento do EEB das folhas de *M. macrocalyx***

As folhas foram submetidas a um processo de secagem em estufa com circulação de ar forçado a 40 °C por 72 h. Esse material vegetal seco e triturado de *M. macrocalyx* (0,8 kg) foi extraído com 3 L de etanol 95% (v/v) (3 vezes por 72 h) à temperatura ambiente em um percolador de aço inoxidável. Os extratos resultantes foram concentrados sob pressão reduzida em evaporador rotativo a 40°C, obtendo-se 120,0 g de extrato etanólico bruto (EEB) de *M. macrocalyx* (Figura 17).

Uma quantidade de 115,0 g do EEB foi ressuspensa em 400 mL de uma solução EtOH:H<sub>2</sub>O 7:3 (v/v) e homogeneizada em agitador mecânico. A solução hidroetanólica foi submetida a uma partição líquido-líquido, em ampola de separação, utilizando 100 mL (cinco repetições) dos respectivos solventes em gradiente crescente de polaridade: hexano, clorofórmio e acetato de etila. As fases obtidas foram concentradas em evaporador rotativo, a uma temperatura de 40 °C. O líquido residual foi eliminado com auxílio de um dessecador resultando em 14,0 g da fase hexânica (FHX), 7,9 g de fase clorofórmica (FCL), 2,4 g da fase acetatoetílica (FAE) e 85,0 g fase hidroetanólica (FHE) (Figura 17).

#### **4.13 Fracionamento cromatográfico da FAE das folhas de *M. macrocalyx***

Um método de fracionamento cromatográfico foi desenvolvido utilizando CCDA e sistemas de hexano:acetato. A fase acetatoetílica (2,0 g) foi submetida à cromatografia de coluna clássica (CC) em sílica gel fase normal e eluída em gradiente dividido em etapas. Desse procedimento foram obtidas 17 frações (E1-E17) (Tabela 3). A fração E13 (315,0 mg) foi submetida à separação cromatográfica preparativa por CLAE, em coluna C18 (GIST, 250 mm x 21,2 mm x 5,0 µm) sob um gradiente linear 40 a 60% de B em 60 min (solvente A = HCOOH:H<sub>2</sub>O 0,1% v/v e solvente B = MeOH); dezesseis injeções (volume: 100 µL) foram realizadas; fluxo de 8,0 mL/min; 12 frações foram obtidas. A análise dos espectros de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C dos picos isolados levou à identificação dos compostos **1** (42,7 mg, *t<sub>R</sub>* = 44,0 min) e **2** (9,0 mg, *t<sub>R</sub>* = 55,5 min).

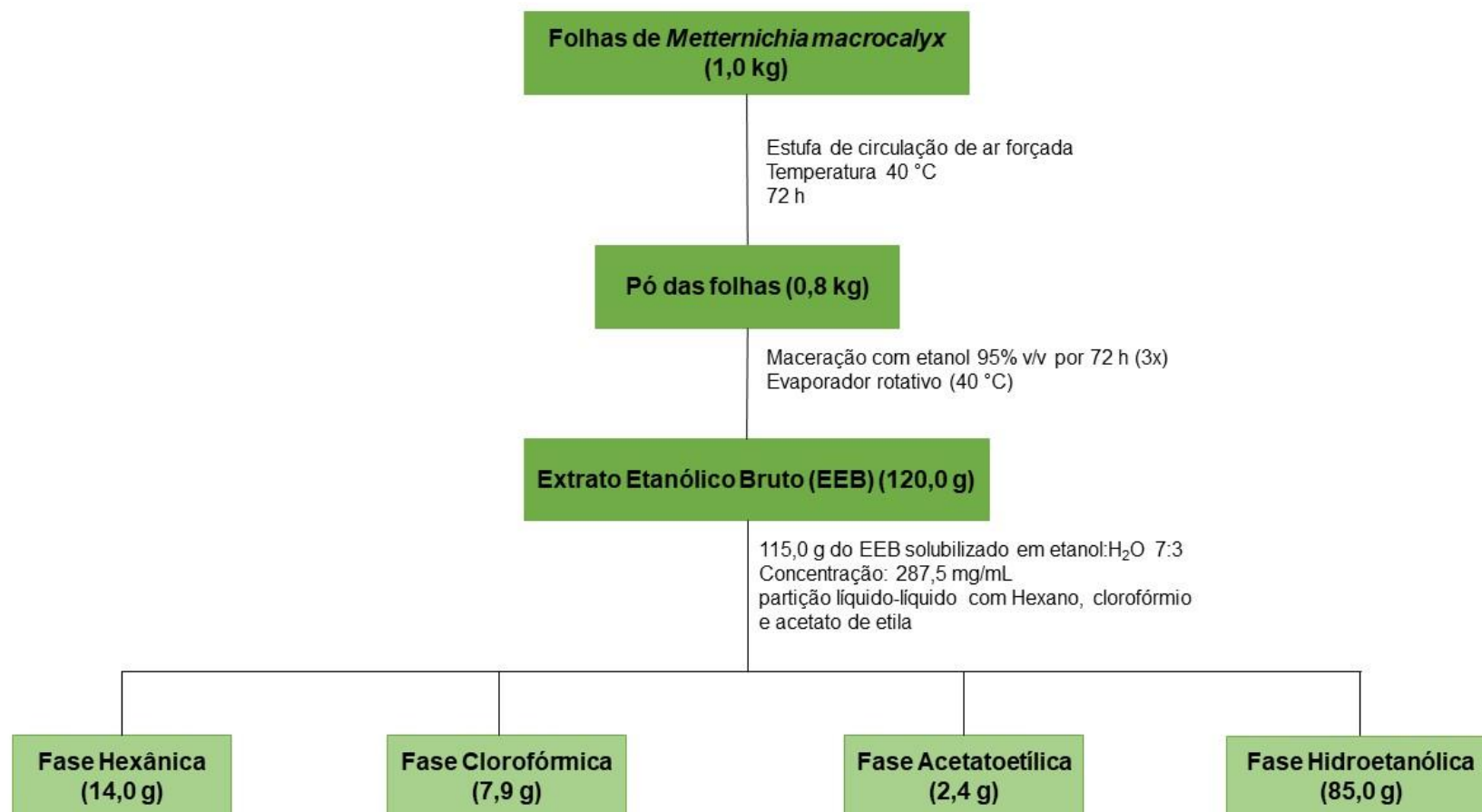
Figura 17 - Obtenção e partição líquido-líquido do EEB das folhas *M. macrocalyx*.

Tabela 3 - Fracionamento cromatográfico da fase acetatoetílica de *M. macrocalyx*.

Frações	Proporção de solventes
E1-3	Hexano:AcOEt (75:25)
E4	Hexano:AcOEt (1:1)
E5-6	Hexano:AcOEt (6:4)
E7	Hexano:AcOEt (7:3)
E8	AcOEt:Hexano (8:2)
E9	AcOEt:Hexano (9:1)
E10	AcOEt100%
E11	AcOEt:MeOH (9:1)
E12	AcOEt:MeOH (8:2)
E13	AcOEt:MeOH (7:3)
E14	AcOEt:MeOH (6:4)
E15	AcOEt:MeOH (1:1)
E16-17	MeOH 100%

#### 4.14 Coleta do material vegetal *M. princeps*

As folhas de *M. princeps* foram coletadas no Jardim Botânico do Rio de Janeiro em abril de 2025. A espécie foi identificada pelo Prof. Dr. Domingos Benício Oliveira Silva Cardoso do departamento de botânica do instituto de biologia da Universidade Federal da Bahia (UFBA). Uma exsicata do material coletado foi produzida e depositada no Herbário RB do Jardim Botânico do Rio de Janeiro com código de registro GC. Ottino 135.

#### 4.15 Obtenção e particionamento do EEB das folhas de *M. princeps*

As folhas foram submetidas a um processo de secagem em estufa com circulação de ar forçado a 40 °C por 72 h. Esse material vegetal seco e triturado de *M. princeps* (264,0 g) foi extraído com 750 mL de etanol 95% (v/v) (3 vezes por 72 h) à temperatura ambiente. Os extratos resultantes foram concentrados sob pressão reduzida em evaporador rotativo a 40°C, resultando no extrato etanólico bruto (EEB) de *M. princeps*.

O EEB de *M. princeps* foi solubilizado em solução de EtOH:H<sub>2</sub>O 7:3 (v/v) na concentração de 287,5 mg/mL. A solução hidroetanólica foi submetida a uma partição

líquido-líquido, em ampola de separação, utilizando os respectivos solventes em gradiente crescente de polaridade: hexano, clorofórmio e acetato de etila. As fases obtidas em estado líquido foram concentradas em evaporador rotativo, a uma temperatura de 40 °C resultando nas fases hexânica (FHX), clorofórmica (FCL), acetatoetílica (FAE) e hidroetanólica (FHE).

#### 4.16 Análise de CLAE-IES-QTOF-EM/EM

Cinco microlitros das amostras (200 µg/mL), foram injetados no LC-40D X3 (Shimadzu) equipado com os módulos CBM-40, DGU-40S, LC 40D X3, SIL-40C X3 e CTD-40S, acoplado a um espectrômetro de massas LCMS-9050 (Shimadzu) com uma fonte de ionização *electrospray* (IES) e um analisador Quadrupole Time-of-Flight (Q-TOF). Experimentos de CLAE foram realizados utilizando uma coluna C18 (Ascentis-150 mm x 4,6 mm x 2,7 µm). A fase móvel consistiu em uma solução ácido fórmico/água 0,1% v/v (Solvente A) e Metanol (Solvente B). Um gradiente linear (15-100%) foi realizado para eluição em 20 min, com um fluxo de 0,3 mL/min e a temperatura da coluna mantida em 40°C. Os parâmetros das análises para espectrômetros de massas foram os seguintes: voltagem do capilar: -3,0 kV ou 4,0 kV, fluxo do gás nebulizador de 3,0 L/min, gás de secagem com fluxo de 10 mL/min e temperatura da interface em 300 °C. As substâncias foram analisadas no modo de ionização negativo e positivo. Os dados de fragmentação foram adquiridos no modo de aquisição independente de dados (DIA), em uma faixa de massa de íons precursores de m/z 100-1000 detectadas em um tempo de evento de 0,10 s. A resolução Q1 foi de 34,6 distribuída em 26 eventos de EM/EM. Por tanto, o método de massas apresentou um *loop time* de 0,906 s e um total de 27 eventos. A fragmentação ocorreu com energia de colisão (CE) em rampa de 5-55 eV e pressão de 230 kPa de Argônio. Foram detectados íons produtos de m/z 50-1000 e o espectrômetro de massas foi configurado para gerar acumulação de dados e obtenção de resultados no formato centróide.

Os arquivos foram carregados no MS-DIAL, no modo SWATH-MS com bibliotecas da *global of natural products social* (GNPS), *Massbank*, *MassbankEU* e *Respect*. Após o processamento, deconvolução e alinhamento, os resultados foram interpretados com auxílio do *Insight Explorer* (Shimadzu), *SciFinder* e dados da literatura. Ademais, uma rede molecular foi gerada e exportada em informações de

nós e rede. Esses arquivos foram carregados no *software cytoscape* v3.10.3 para customização da rede molecular.



## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Lignanamidas das raízes de *Metternichia macrocalyx* e sua atividade anti-inflamatória

Artigo publicado na *ACS Omega*, v. 9, n. 47, p. 47065-47076, 2024: [doi.org/10.1021/acsomega.4c07336](https://doi.org/10.1021/acsomega.4c07336).

Thiago Araújo de Medeiros Brito,<sup>1</sup> Ana Carolina Ferreira de Albuquerque,<sup>2</sup> Fernando Martins dos Santos Junior,<sup>2</sup> Paulo Bruno Araújo Loureiro,<sup>3</sup> Francisco Allysson Assis Ferreira Gadelha,<sup>3</sup> Marianna Vieira Sobral,<sup>3</sup> Domingos Benício Oliveira Silva Cardoso,<sup>5</sup> Eudes da Silva Velozo,<sup>4</sup> Josean Fachine Tavares,<sup>1\*</sup> Lucas Silva Abreu,<sup>2</sup> Marcelo Sobral da Silva.<sup>1</sup>

1. Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análises, Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, 58051-900, Brasil
2. Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Federal Fluminense, Niterói, Rio de Janeiro, 24020-141, Brasil
3. Laboratório de Oncofarmacologia, Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, 58051-900, Brasil
4. Laboratório de Pesquisa em Matéria Médica, Departamento do Medicamento, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, 40170-115, Brasil
5. Instituto de Biologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, 40170-115, Brasil

\*Autor Correspondente: [josean@lbf.ufpb.br](mailto:josean@lbf.ufpb.br)

## RESUMO

Cinco novas lignanamidas (**1-5**) e dez amidas conhecidas (**6-15**) foram isoladas da fase clorofórmica das raízes de *Metternichia macrocalyx*. As estruturas dos novos compostos foram elucidadas por meio de análise de dados espectroscópicos de RMN e espectrometria de massas e as estruturas conhecidas por comparação com dados da literatura. O composto **1** teve sua configuração absoluta estabelecida por meio de experimentos de ECD, cálculos de RMN e cálculos de mecânica quântica. A atividade anti-inflamatória dos compostos (**1-5**) foi avaliada em macrófagos RAW264.7. Todos os compostos testados reduziram os níveis de óxido nítrico (NO). Nos ensaios de quantificação de citocinas, apenas o composto **2** não reduziu significativamente os níveis de IL-10. Além disso, os compostos **1-3** e **5** também reduziram os níveis de IL-1 $\beta$ . Esses resultados sugerem o potencial anti-inflamatório desses compostos.

*Metternichia* J.C.Mikan (Solanaceae) foi historicamente um gênero monoespecífico, formado por duas variedades nativas de ambientes geograficamente contrastantes: uma variedade típica (*M. princeps* var. *princeps*), encontrada nas florestas úmidas do leste do Brasil (região da Mata Atlântica) e *M. princeps macrocalyx* Carv., de áreas semiáridas (região da Caatinga). Recentemente, a variedade *M. princeps macrocalyx* Carv. foi elevada à categoria de espécie com a nova combinação *Metternichia macrocalyx* (DE SOUZA; ANDRADE; RADAESKI; BAUERMANN *et al.*, 2023).

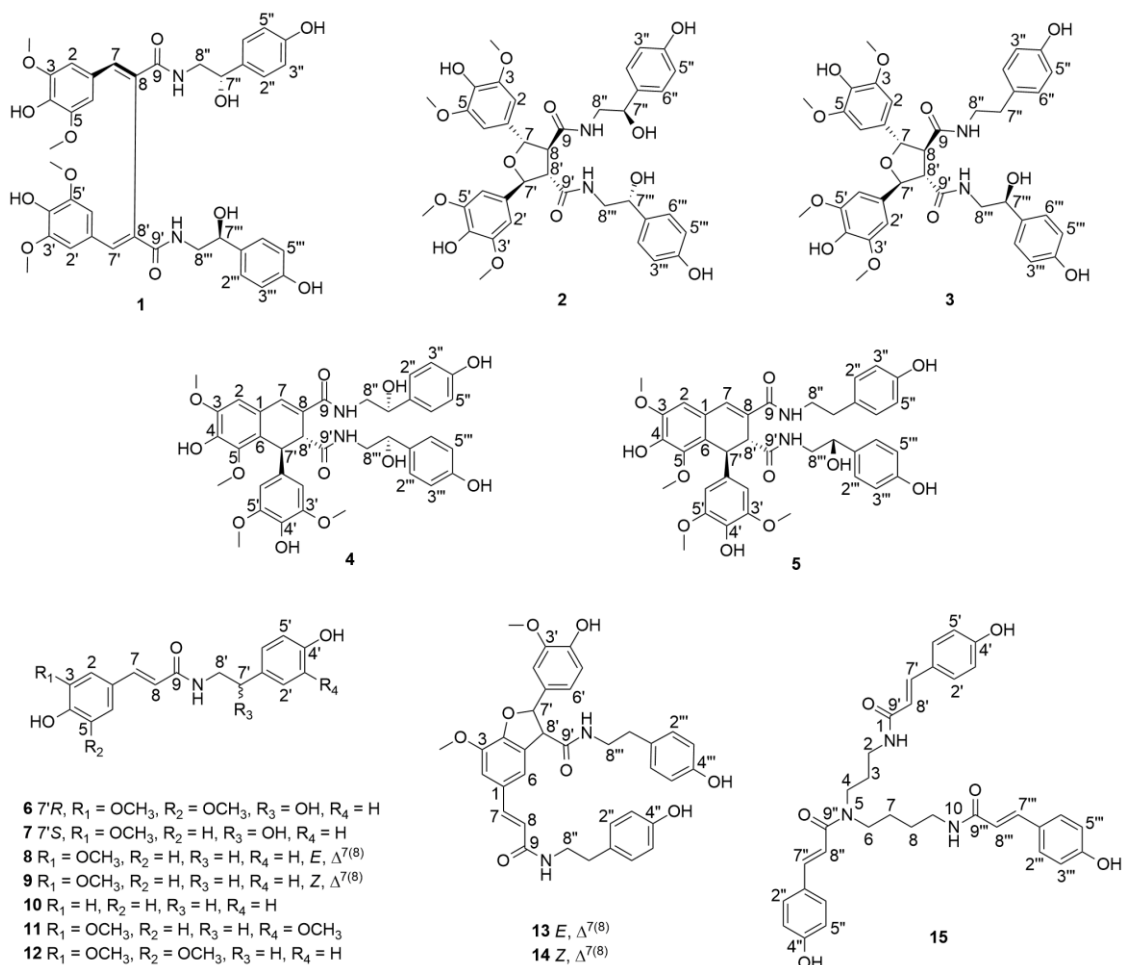
As espécies da família Solanaceae são produtoras de compostos biologicamente ativos (KOWALCZYK; MERECZ-SADOWSKA; RIJO; MORI *et al.*, 2022), entre eles, as lignanamidas, que consistem em uma subclasse de lignanas descobertas pela primeira vez nas raízes de *Capsicum annuum* var. *grossum* (Solanaceae) (LEONARD; ZHANG; YING; FANG, 2020). Sequencialmente, outras lignanamidas foram identificadas por meio de investigações fitoquímicas de vários membros da família Solanaceae, incluindo: *Hyocyamus niger* (MA; LIU; CHE, 2002), *Solanum melongena* (SUN; GU; SU; LI *et al.*, 2014), *Solanum tuberosum* (KING; CALHOUN, 2005), *Lycium yunnanense* (ZHENG; HUANG; LIANG; XU *et al.*, 2018), e *Lycium chinense* (ZHANG; GUAN; FENG; WANG *et al.*, 2013). Esses metabólitos demonstraram atividade anti-inflamatória em modelos *in vivo* e *in vitro* (LUO; YAN; BOBROVSKAYA; JI *et al.*, 2017; SUN; GU; SU; LI *et al.*, 2014; WANG; LUO; FAN,

2019). Em nosso contínuo estudo com espécies brasileiras de regiões semiáridas, relatamos o isolamento e a determinação estrutural de cinco novas lignanamidas (**1-5**), juntamente com dez amidas conhecidas (**6-15**) e a avaliação de sua atividade anti-inflamatória por meio de testes *in vitro*.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A fase clorofórmica das raízes de *Metternichia macrocalyx* foi submetida ao fracionamento por cromatografia líquida de média pressão (CLMP) utilizando sílica gel 60 (70-230 mesh), seguido por CLAE. Esses processos resultaram no isolamento de cinco novas lignanamidas (**1-5**) e dez amidas conhecidas (**6-15**). Além disso, avaliamos suas atividades anti-inflamatórias por meio de testes *in vitro*. As estruturas foram caracterizadas por espectroscopia de RMN unidimensional e bidimensional de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , IES-EMAR, cálculos de RMN, dicroísmo circular eletrônico (ECD), rotação óptica específica e espectroscopia no infravermelho (IV). Os compostos conhecidos N-*trans*-sinapoiloctapamina (**6**) (SUN; HUO; ZHANG; HUANG *et al.*, 2015), N-*trans*-feruloiloctapamina (**7**) (SUN; HUO; ZHANG; HUANG *et al.*, 2015), N-*trans*-feruloiltiramina (**8**) (SUN; HUO; ZHANG; HUANG *et al.*, 2015), N-*cis*-feruloiltiramina (**9**) (SUN; HUO; ZHANG; HUANG *et al.*, 2015), N-*trans*-cumaroiltiramina (**10**) (ZHANG; BAI; LIU; WANG *et al.*, 2011), N-*trans*-feruloil-3-metóxitiramina (**11**) (SUN; HUO; ZHANG; HUANG *et al.*, 2015), N-*trans*-sinapoiloctapamina (**12**), (CHOI; CHO; JIN; LEE *et al.*, 2016; SUN; HUO; ZHANG; HUANG *et al.*, 2015), N-*trans*-grossamida (**13**) (KING; CALHOUN, 2005), N-*cis*-grossamida (**14**) (KING; CALHOUN, 2005), e N<sup>1</sup>,N<sup>6</sup>,N<sup>10</sup>-Tri-*p*-cumaroilespermidina (**15**) (OHTA; FUJIMAKI; UY; YANAI *et al.*, 2007; WERNER; HU; LORENZI-RIATSCH; HESSE, 1995) foram identificados pela comparação de seus dados espectroscópicos (Figura S54-S100) com aqueles relatados na literatura. Além disso, o espectro ECD (Figura 20) estabeleceu a configuração absoluta do composto **6**, que foi isolado pela primeira vez em *Solanum melongena* como R-N-*trans*-sinapoiloctapamina.

Chart. Chemical structures of isolated compounds 1-15 from the roots of *M. macrocalyx*.



O composto **1** foi isolado como um pó amorfo amarelado. Sua fórmula molecular foi estabelecida como  $\text{C}_{38}\text{H}_{41}\text{N}_2\text{O}_{12}$  com base em IES-EMAR ( $[\text{M}+\text{H}]^+$  em  $m/z$  717,2626, calcd. 717,2654,  $\Delta = 3,9$  ppm, com o índice de deficiência de hidrogênio (IDH) igual a vinte; (Figura S9). O espectro infravermelho mostrou absorções em  $3343\text{ cm}^{-1}$  (hidroxila),  $1651\text{ cm}^{-1}$  (carbonila de amida),  $1611$  e  $1514\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{C}=\text{C}$  de anel aromático). O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura S1-S3) mostrou sinais em  $\delta_{\text{H}}$  7,82 (1H, *brs*, H-7) e 7,86 (1H, *brs*, H-7') característicos de prótons olefínicos em sistemas  $\alpha,\beta$  conjugados, sinais de prótons oximetínicos em  $\delta_{\text{H}}$  4,38 (H-7'') e 4,54 (H-7'''), além de um conjunto de sinais de prótons aromáticos em  $\delta_{\text{H}}$  6,87 (*brs*, 4H),  $\delta_{\text{H}}$  6,94 (*d*, 2H,  $J=8,5$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  7,03 (*d*, 2H,  $J=8,4$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  6,63 (*d*, 2H,  $J=8,5$  Hz) e  $\delta_{\text{H}}$  6,69 (*d*, 2H,  $J=8,4$  Hz), indicando a presença de dois pares de anéis aromáticos 1,3,4,5-tetrassubstituídos e 1,4-dissubstituídos (Tabela 4). O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ -APT (Figura S4) mostrou sinais de carbonos olefínicos em  $\delta_{\text{C}}$  142,3 (C-7) e 142,5 (C-7'), 127,4 (C-8) e 127,6 (C-8'), sinais dos carbonos metínicos oxigenados em  $\delta_{\text{C}}$  73,0 (C-

7"), 73,5 (C-7""), além de sinais de carbonos metilênicos em  $\delta_C$  48,5 (C-8",8'") e carbonílicos em  $\delta_C$  168,2 (C-9,9'). No espectro de HSQC (Figura S5), os sinais de correlação em  $\delta_H$  7,82/ $\delta_C$  142,3 (H-7/C-7) e em  $\delta_H$  7,86/ $\delta_C$  142,5 (H-7'/C-7') confirmaram a presença de duas ligações duplas trissubstituídas. Esses dados foram compatíveis com a presença de duas porções sinapoil e octapamina (Tabela 4-5). A fórmula molecular do composto **1** foi consistente com uma lignanamida do tipo bis-fenilpropeno formada por dois monômeros de *N-trans*-sinapoil octapamina, semelhante à cannabisina G (MA; LIU; CHE, 2002; SAKAKIBARA; IKEYA; HAYASHI; OKADA *et al.*, 1995).

No espectro HMBC (Figura 1 e Figura S6), as correlações mútuas entre os sinais de prótons em  $\delta_H$  7,82 (H-7) e  $\delta_H$  7,86 (H-7') com os sinais dos carbonos metínicos aromáticos em  $\delta_C$  108,8 (C-2,6),  $\delta_C$  108,9 (C-2',6'), com os sinais dos carbonos olefínicos não hidrogenados em  $\delta_C$  127,4 (C-8) e 127,6 (C-8') e com o sinal do carbono carbonílico em  $\delta_C$  168,2 (C-9,9') confirmaram os deslocamentos químicos dos H-7 e H-7'. Essas correlações, juntamente com aquelas de  $^4J_{HH}$  COSY (ver Figura 18 e Figura S7) (H-7/H-2, 6 e H-7'/H-2',6'), correspondendo ao acoplamento benzílico, e os espectros de NOESY (Figura S8) (H-2",6"/H- 7"" e H-2'",6'"/H-7'"), foram condizentes com a união das duas unidades monoméricas através dos carbonos C-8 e C-8'. No espectro de RMN de  $^1H$ , pares de sinais de diferentes intensidades ( $\delta_H$  7,819 e 7,857, 7,810 e 7,865) sugeriram quiralidade axial devido à rotação impedida no eixo C-8-C-8', o que foi compatível com atropisomerismo. Além disso, os deslocamentos químicos dos prótons oximetínicos ( $\delta_H$  4,38 e 4,54), juntamente com os pares de sinais dos sistemas AA',BB' (Tabela 4) das unidades de octopamina, foram compatíveis com centros estereogênicos em C-7"" e C7'"". Assim, cálculos de mecânica quântica sobre a barreira de energia livre em função da rotação em torno do ângulo diedro C7-C8-C8'-C7' (Figura S101) estabeleceram o valor de energia livre relativa de 29,04 kcal.mol<sup>-1</sup>, confirmando a ocorrência de quiralidade axial. Para o composto **1**, oito estereoisômeros foram possíveis: (7""R,7'""R,8aS), (7""S,7'""S,8aS), (7""S,7'""R,8aS), (7""R,7'""S,8aS), (7""S,7'""S,8aR), (7""R,7'""R,8aR), (7""R,7'""S,8aR) e (7""S,7'""R,8aR). O espectro de ECD foi predominantemente dominado pela quiralidade axial, como demonstrado por Polavarapu (POLAVARAPU; JEIRATH; KURTAN; PESCIPELLI *et al.*, 2009). Isso se tornou evidente uma vez que os estereoisômeros aS apresentaram similaridade com os espectros experimentais (Figura S10), permitindo-nos determinar a quiralidade axial presente no composto. Entre os quatro

estereoisômeros aS (Figura S11), foi observada similaridade entre os espectros de ECD na região dos efeitos *Cotton* negativos em 315 nm e efeitos *Cotton* positivos em 355 nm, embora exibindo padrões distintos na região do efeito *Cotton* negativo em 240 nm. Assim, pode-se inferir que os dois primeiros estariam intrinsecamente correlacionados com a quiralidade axial da molécula, levando ao fenômeno de atropisomerismo, e o último aos dois centros estereogênicos em 7'' e 7'''. Além disso, foi demonstrado que, ao variar a temperatura de 25 °C a 60 °C (Figura 19), os efeitos *Cotton* observados em 315 nm e 355 nm apresentaram uma diminuição significativa na intensidade em temperaturas mais altas. Por outro lado, o efeito *Cotton* em 240 nm permaneceu inalterado (Figura 19). Esses resultados indicaram plausibilidade de atropisomerismo. Os cálculos dos deslocamentos químicos de RMN de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$ , seguido pela aplicação da metodologia DP4+ (GRIMBLAT; ZANARDI; SAROTTI, 2015; MARCARINO; CICETTI; ZANARDI; SAROTTI, 2022), permitiram a determinação da estereoquímica relativa, com probabilidade de 100% para o estereoisômero com a configuração 7''S\*, 7'''S\*, 8aS (Tabela S1-S3). Esta proposta foi confirmada pelo espectro de ECD simulado, que apresentou maior semelhança com o experimental (Figura 20). Portanto, foi possível estabelecer a configuração absoluta como 7''S, 7'''S, 8aS (Figura 20) e o composto **1** recebeu o nome trivial de metternichiamida A.

Tabela 4 – Dados espectroscópicos de RMN de  $^1\text{H}$  dos compostos **1-5** em MeOD.

	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>	5 <sup>b</sup>
Posição	$\delta_{\text{H}}$ (J in Hz)	$\delta_{\text{H}}$ (J in Hz)	$\delta_{\text{H}}$ (J in Hz)	$\delta_{\text{H}}$ (J in Hz)	$\delta_{\text{H}}$ (J in Hz)
1					
2	6,87, <i>brs</i>	6,73, <i>s</i>	6,71, <i>s</i>	6,77, <i>brs</i>	6,76, <i>brs</i>
3					
4					
5					
6	6,87, <i>brs</i>	6,73, <i>s</i>	6,71, <i>s</i>		
7	7,82, <i>brs</i>	5,27, <i>d</i> (6,3)	5,26, <i>d</i> (6,6)	7,33, <i>brs</i>	7,27, <i>brs</i>
8		3,38, <i>dd</i> (6,3; 2,8)	3,35, <i>m</i>		
9					
1'					
2'	6,87, <i>brs</i>	6,73, <i>s</i>	6,73, <i>s</i>	6,33, <i>s</i>	6,33, <i>s</i>
3'					
4'					

5'					
6'	6,87, <i>brs</i>	6,73, <i>s</i>	6,73, <i>s</i>	6,33, <i>s</i>	6,33, <i>s</i>
7'	7,86, <i>brs</i>	5,29, <i>d</i> (6,3)	5,28, <i>d</i> (6,4)	4,87, <i>brs</i>	4,86, <i>brs</i>
8'		3,38, <i>dd</i> (6,3; 2,8)	3,40, <i>m</i>	3,72, <i>d</i> (1,8)	3,72, <i>d</i> (1,3)
9'					
1"					
2"	6,94, <i>d</i> (8,5)	6,96, <i>d</i> (8,5)	6,83, <i>d</i> (8,5)	7,14, <i>d</i> (8,6)	6,94, <i>d</i> (8,5)
3"	6,63, <i>d</i> (8,5)	6,66, <i>d</i> (8,5)	6,63, <i>d</i> (8,5)	6,72, <i>d</i> (8,6)	6,66, <i>d</i> (8,5)
4"					
5"	6,63, <i>d</i> (8,5)	6,66, <i>d</i> (8,5)	6,63, <i>d</i> (8,5)	6,72, <i>d</i> (8,6)	6,66, <i>d</i> (8,5)
6"	6,94, <i>d</i> (8,5)	6,96, <i>d</i> (8,5)	6,83, <i>d</i> (8,5)	7,14, <i>d</i> (8,6)	6,94, <i>d</i> (8,5)
7"	4,54, <i>m</i>	4,49, <i>t</i> (6,5)		4,68, <i>dd</i> (7,6; 5,1)	2,68, <i>t</i> (7,2)
7a"			2,59, <i>m</i>		
7b"			2,53, <i>m</i>		
8"					3,33-3,43, <i>m</i>
8a"	3,40, <i>m</i>	3,45, <i>dd</i> (13,3; 6,5)	3,37, <i>m</i>	3,39-3,42, <i>m</i>	
8b"	3,40, <i>m</i>	3,22, <i>dd</i> (13,3; 6,5)	3,18, <i>m</i>	3,39-3,42, <i>m</i>	
1'''					
2'''	7,03, <i>d</i> (8,4)	6,96, <i>d</i> (8,5)	6,95, <i>d</i> (8,5)	6,96, <i>d</i> (8,6)	6,83, <i>d</i> (8,5)
3'''	6,69, <i>d</i> (8,4)	6,66, <i>d</i> (8,5)	6,66, <i>d</i> (8,5)	6,67, <i>d</i> (8,6)	6,63, <i>d</i> (8,5)
4'''					
5'''	6,69, <i>d</i> (8,4)	6,66, <i>d</i> (8,5)	6,66, <i>d</i> (8,5)	6,67, <i>d</i> (8,6)	6,63, <i>d</i> (8,5)
6'''	7,03, <i>d</i> (8,4)	6,96, <i>d</i> (8,5)	6,95, <i>d</i> (8,5)	6,96, <i>d</i> (8,6)	6,83, <i>d</i> (8,5)
7'''	4,38, <i>m</i>	4,49, <i>t</i> (6,5)	4,46, <i>t</i> (6,7)	4,53, <i>t</i> (6,2)	4,52, <i>t</i> (6,2)
8a'''	3,37, <i>m</i>	3,45, <i>dd</i> (13,3; 6,5)	3,49, <i>dd</i> (13,3; 6,7)	3,34-3,37, <i>m</i>	3,33-3,38, <i>m</i>
8b'''	3,37, <i>m</i>	3,22, <i>dd</i> (13,3; 6,5)	3,18, <i>dd</i> (13,3; 6,7)	3,25, <i>dd</i> (6,0, 1,6)	3,26, <i>dd</i> (13,4; 6,0)
OCH <sub>3</sub> - 3', 5'	3,75, <i>s</i>	3,87, <i>s</i>	3,86, <i>s</i>	3,68, <i>s</i>	3,70, <i>s</i>
OCH <sub>3</sub> -3	3,75, <i>s</i>	3,87, <i>s</i>	3,88, <i>s</i>	3,92, <i>s</i>	3,92, <i>s</i>
OCH <sub>3</sub> -5	3,75, <i>s</i>	3,87, <i>s</i>	3,88, <i>s</i>	3,58, <i>s</i>	3,53, <i>s</i>

<sup>a</sup>Mensurado em 400 MHz. <sup>b</sup>Mensurado em 500 MHz.

Tabela 5 - Dados espectroscópicos de RMN de  $^{13}\text{C}$  dos compostos 1-5 em MeOD.

	<b>1<sup>a</sup></b>	<b>2<sup>a</sup></b>	<b>3<sup>a</sup></b>	<b>4<sup>a</sup></b>	<b>5<sup>b</sup></b>
Posição	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}$
1	126,7, C	132,3, C	131,0, C	124,2, C	124,2, C
2	108,8, CH	104,8, CH	104,7, CH	109,1, CH	109,1, CH
3	139,0, C	149,4, C	149,5, C	149,3, C	149,3, C
4	149,2, C	136,6, C	136,7, C	143,3, C	143,2, C
5	139,0, C	149,4, C	149,5, C	146,9, C	147,0, C
6	108,8, CH	104,8, CH	104,7, CH	125,2, C	125,3, C
7	142,3, CH	86,3, CH	86,4, CH	135,4, CH	135,0, CH
8	127,4, C	60,3, CH	60,6, CH	126,8, C	127,1, C
9	168,2, C	172,5, C	172,1, C	170,3, C	170,0, C
1'	126,7, C	132,3, C	132,4, C	135,3, C	135,2, C
2'	108,9, CH	104,8, CH	104,9, CH	106,0, CH	106,1, CH
3'	139,1, C	149,4, C	149,4, C	149,0, C	149,0, C
4'	149,2, C	136,6, C	136,7, C	135,3, C	135,3, C
5'	139,1, C	149,4, C	149,4, C	149,0, C	149,5, C
6'	108,9, CH	104,8, CH	104,9, CH	106,0, CH	106,1, CH
7'	142,5, CH	86,3, CH	86,4, CH	41,4, CH	41,4, CH
8'	127,6, C	60,3, CH	60,3, CH	50,2, CH	50,1, CH
9'	168,2, C	172,5, C	172,5, C	174,3, C	174,2, C
1''	134,2, C	134,2, C	130,8, C	134,7, C	131,4, C
2''	128,4, CH	128,5, CH	130,7, CH	128,4, CH	130,7, CH
3''	116,0, CH	116,1, CH	116,2, CH	116,1, CH	116,2, CH
4''	158,0, C	158,0, C	156,9, C	158,0, C	156,8, C
5''	116,0, CH	116,1, CH	116,2, CH	116,1, CH	116,2, CH
6''	128,4, CH	128,5, CH	130,7, CH	128,4, CH	130,7, CH
7''	73,0, CH	73,1, CH	35,7, CH <sub>2</sub>	73,4, CH	35,6, CH <sub>2</sub>
8''	48,5, CH <sub>2</sub>	48,1, CH <sub>2</sub>	42,6, CH <sub>2</sub>	48,4, CH <sub>2</sub>	42,8, CH <sub>2</sub>
1'''	134,3, C	134,2, C	134,5, C	134,3, C	134,4, C
2'''	128,3, CH	128,5, CH	128,5, CH	128,4, CH	130,8, CH
3'''	116,1, CH	116,1, CH	116,1, CH	116,1, CH	116,2, CH
4'''	158,0, C	158,0, C	158,0, C	157,9, C	156,9, C
5'''	116,1, CH	116,1, CH	116,1, CH	116,1, CH	116,2, CH
6'''	128,3, CH	128,5, CH	128,5, CH	128,4, CH	130,8, CH
7'''	73,5, CH	73,1, CH	73,2, CH	72,8, CH	72,8, CH
8'''	48,5, CH <sub>2</sub>	48,1, CH <sub>2</sub>	48,1, CH <sub>2</sub>	48,0, CH <sub>2</sub>	47,9, CH <sub>2</sub>
OCH <sub>3</sub> -3', 5'	56,7, CH <sub>3</sub>	56,8, CH <sub>3</sub>	56,9, CH <sub>3</sub>	56,7, CH <sub>3</sub>	56,7, CH <sub>3</sub>
OCH <sub>3</sub> -3	56,7, CH <sub>3</sub>	56,8, CH <sub>3</sub>	56,8, CH <sub>3</sub>	56,8, CH <sub>3</sub>	56,8, CH <sub>3</sub>
OCH <sub>3</sub> -5	56,7, CH <sub>3</sub>	56,8, CH <sub>3</sub>	56,8, CH <sub>3</sub>	60,8, CH <sub>3</sub>	60,8, CH <sub>3</sub>



<sup>a</sup>Mensurado em 100 MHz. <sup>b</sup>Mensurado em 125 MHz.

O composto **2** foi isolado como um pó amorfo branco. Sua fórmula molecular foi estabelecida como C<sub>38</sub>H<sub>42</sub>N<sub>2</sub>O<sub>13</sub> com base em IES-EMAR ([M+Na]<sup>+</sup> a *m/z* 757,2528, calcd. 757,2579, Δ = 2,8 ppm; IDH = 19; Figura S21). O espectro de RMN de <sup>1</sup>H (Figura S12-14) mostrou sinais de prótons aromáticos em δ<sub>H</sub> 6,73 (s, 4H), δ<sub>H</sub> 6,96 (*d*, 4H, *J*=8,5 Hz) e δ<sub>H</sub> 6,66 (*d*, 4H, *J*=8,5 Hz), sugerindo a presença de anéis aromáticos 1,3,4,5-tetrassubstituídos e 1,4-dissubstituídos. O espectro de IV mostrou absorções em 3306 cm<sup>-1</sup> (hidroxíla), 1659 cm<sup>-1</sup> (carbonila de amida), 1612 e 1516 cm<sup>-1</sup> (C=C de anel aromático). No espectro de RMN de <sup>13</sup>C-BB e DEPT135 (Figura S15-S16), os sinais dos carbonos oximetínicos em δ<sub>C</sub> 73,1 (C-7'', 7''') e dos carbonos metilênicos em δ<sub>C</sub> 48,1 (C-8'', C8''') sugeriram a presença da porção octopamina (SUN; HUO; ZHANG; HUANG *et al.*, 2015). No espectro de HSQC (Figura S17), foram observadas correlações em δ<sub>H</sub> 3,38 (*dd*, *J*=6,3; 2,8 Hz)/δ<sub>C</sub> 60,3 (H-8,8'/C-8,8'), δ<sub>H</sub> 5,27 (*d*, *J*=6,3 Hz)/δ<sub>C</sub> 86,3 (H-7/C-7) e em δ<sub>H</sub> 5,29 (*d*, *J*=6,3 Hz)/δ<sub>C</sub> 86,3 (H-7'/C-7'), as quais foram compatíveis com uma lignana do tipo tetra-hidrofurano (ZHENG; HUANG; LIANG; XU *et al.*, 2018) (Figura 17). Os sinais sobrepostos de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C sugeriram que o composto **2** seria um dímero de simetria C2 semelhante à liciumamida K (ZHENG; HUANG; LIANG; XU *et al.*, 2018), exceto pelo monômero constituinte ser a *N-trans*-sinapolictopamina.

Figura 18 – Principais correlações de HMBC,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY e NOESY dos compostos 1-5.

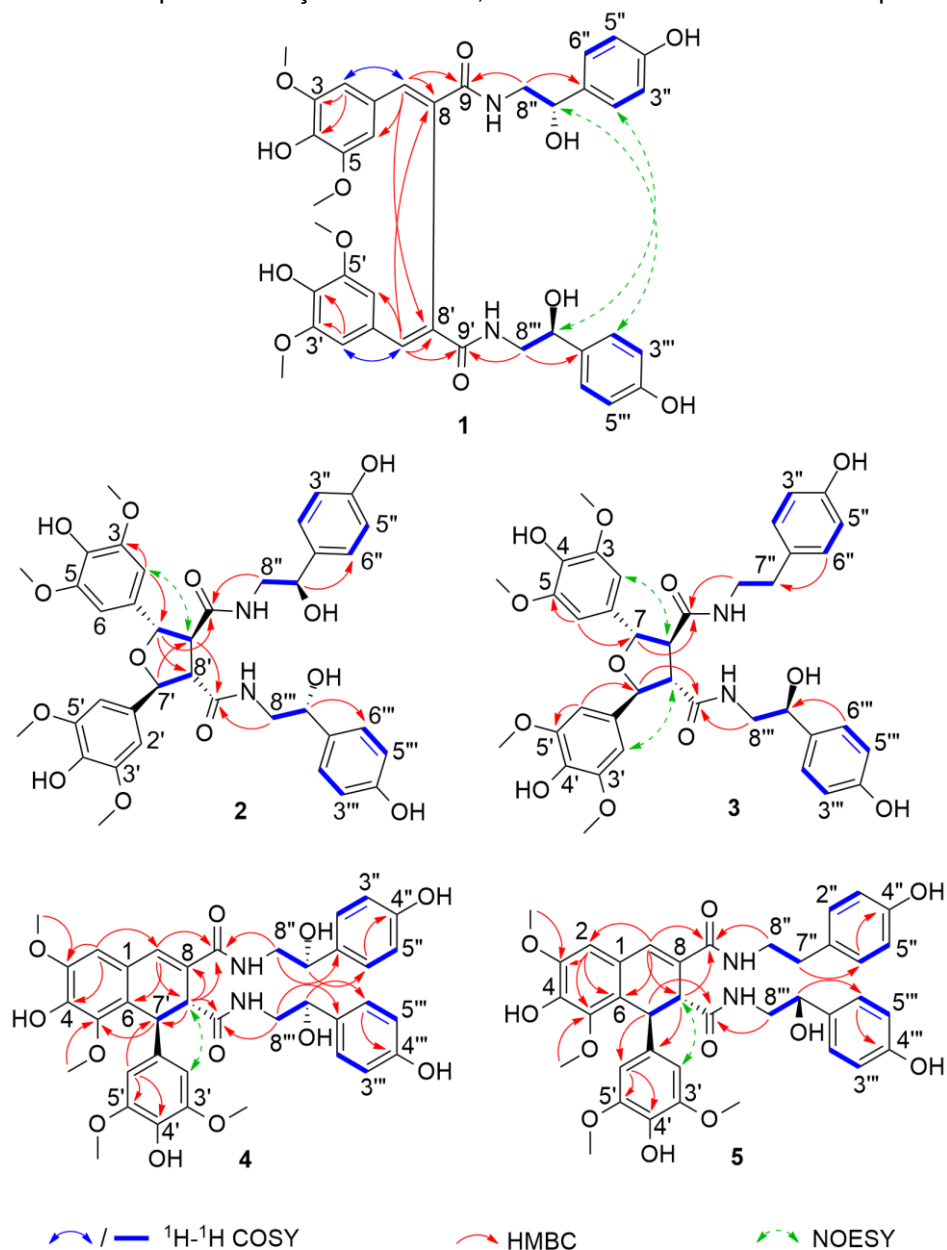
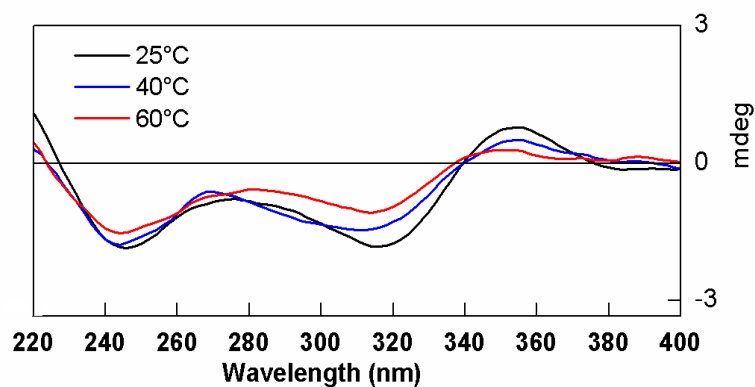


Figura 19 - Comparação dos espectros experimentais de ECD do composto 1 em diferentes temperaturas: 25 °C (preto), 40 °C (azul) e 60 °C (vermelho).

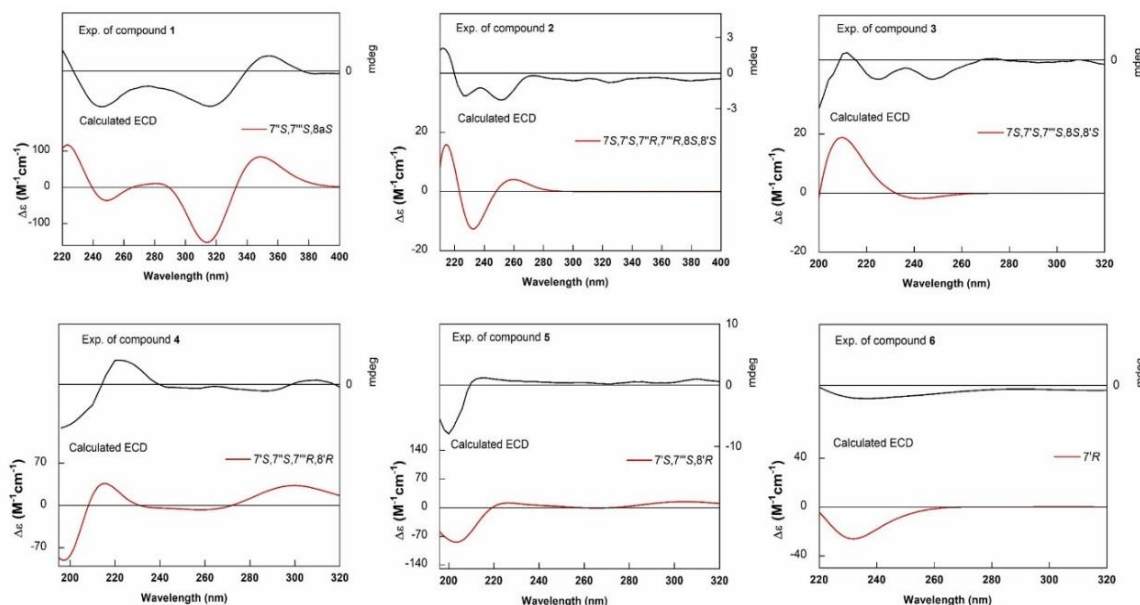


No espectro HMBC (Figura 18 e Figura S18), correlações mútuas dos prótons H-7 ( $\delta_H$  5,27), H-7' ( $\delta_H$  5,29), com sinais em  $\delta_C$  60,3 (C-8,8'), 132,3 (C-1,1'), 104,8 (C-2,2',6,6') e 172,5 (C-9, C-9'), confirmaram a presença de uma lignana do tipo tetra-hidrofurano. No espectro de COSY (Figura S19), as correlações entre H-7/H-8 e H-7'/H-8'; H-7'' com H2-8'', e de H-7''' com H2-8''', corroboraram a proposta para o composto **2**. Sua configuração relativa foi estabelecida com base em constantes de acoplamento escalar (Tabela 4) e nas correlações NOESY (Figura S20). Interações NOE entre H-8 e os prótons aromáticos H-2,6 ( $\delta_H$  6,73) sugeriram orientação *syn*, analogamente a H-2',6' com H-8' (Figura 18). Isso foi consistente com um arranjo *trans* entre os prótons H-7 ( $\delta_H$  5,27) e H-7' ( $\delta_H$  5,29), ambos com  $^3J_{HH} = 6,3$  Hz. A configuração relativa proposta foi confirmada pelos cálculos de deslocamentos químicos de RMN de  $^{13}C$  e  $^1H$ . Com base nos dados espectroscópicos, foram calculados quatro possíveis diastereoisômeros para o composto **2**: ( $7S^*, 7'S^*, 7''S^*, 7'''R^*, 8S^*, 8'S^*$ ), ( $7S^*, 7'S^*, 7''R^*, 7'''S^*, 8S^*, 8'S^*$ ), ( $7S^*, 7'S^*, 7''R^*, 7'''R^*, 8S^*, 8'S^*$ ) e ( $7S^*, 7'S^*, 7''S^*, 7'''S^*, 8S^*, 8'S^*$ ) (Tabela S5-S6). A metodologia DP4+ (GRIMBLAT; ZANARDI; SAROTTI, 2015; MARCARINO; CICETTI; ZANARDI; SAROTTI, 2022; ZHENG; HUANG; LIANG; XU *et al.*, 2018) foi aplicada e produziu uma probabilidade de 100% para o candidato  $7S^*, 7'S^*, 7''R^*, 7'''R^*, 8S^*, 8'S^*$  (Tabela S4). Pela comparação do ECD simulado e experimental, a configuração absoluta foi determinada como  $7S, 7'S, 7''R, 7'''R, 8S, 8'S$  (Figura 20). Assim, o composto **2** foi identificado como uma nova lignanamida, recebendo o nome trivial de metternichiamida B.

O composto **3** foi isolado como um pó amorfo branco. Sua fórmula molecular foi estabelecida como  $C_{38}H_{42}N_2O_{12}$  com base em IES-EMAR ( $[M+H]^+$  a  $m/z$  719,2797, calcd. 719,2811,  $\Delta = 1,9$  ppm; IDH = 19; Figura S31). A análise dos dados de RMN revelou que o composto **3** era semelhante ao composto **2** (Tabela 4-5), mas não consistia em um homodímero. O espectro de RMN de  $^1H$  (Figuras S22-S24) exibiu os sinais que corresponderam aos prótons aromáticos característicos de dois anéis aromáticos 1,3,4,5-tetrassubstituídos e dois anéis 1,4-dissubstituídos (Tabela 4). No espectro de RMN de  $^{13}C$ -BB e DEPT135 (Figura S25-S26), os sinais de carbono metínico em  $\delta_C$  73,2 (C-7''') e três carbonos metilênicos em  $\delta_C$  35,7 (C-7''), 42,6 (C-8'') e 48,1 (C-8''') sugeriram a presença de unidades de octopamina e tiramina. No espectro HSQC (Figura S27), o conjunto de correlações dos sinais em  $\delta_H$  3,35,  $m/\delta_C$  60,6 (H-8/C-8),  $\delta_H$  3,40,  $m/\delta_C$  60,3 (H-8'/C-8'),  $\delta_H$  5,26,  $d$ ,  $J=6,6$  Hz/ $\delta_C$  86,4 (H-7/C-7),

e  $\delta_H$  5,28,  $d$ ,  $J=6,4$  Hz/ $\delta_C$  86,4 (H-7'/C-7') corroborou a presença de carbonos oxigenados, que são característicos de lignanas do tipo tetra-hidrofurano.

Figura 20 - Espectros de ECD experimentais (superior) e calculados (inferior) referente aos compostos 1-6.



Nos espectros HMBC (Figura 18 e Figura S28), as correlações mútuas de H-7 ( $\delta_H$  5,26), H-8a'' ( $\delta_H$  3,37,  $m$ ), H-8b'' ( $\delta_H$  3,18,  $m$ ) com o sinal em  $\delta_C$  172,1 (C-9), e H-7' ( $\delta_H$  5,28), H-8a''' ( $\delta_H$  3,49), H-8b''' ( $\delta_H$  3,18) com o sinal em  $\delta_C$  172,5 (C-9') confirmaram a união dos dois monômeros (*N-trans*-sinapolitiramina e *N-trans*-sinapolictopamina) por meio do núcleo tetra-hidrofurano. No espectro COSY (Figura S29), as correlações entre H-7/H-8 e H-7'/H-8', aquelas dos sinais H-7a'' e H-7b'' com H-8a'' e H-8b'', e entre H-7''', H-8a''' e H-8b''', apoiaram a estrutura proposta de uma lignana do tipo tetra-hidrofurano (Figura 18). O espectro NOESY (Figura 1 e Figura S30) revelou correlações de H-2,6 e H-2',6' com H-8 e H-8', respectivamente, sugerindo que eles possuem orientação *syn*. Dessa forma, quatro estereoisômeros foram possíveis para o composto **3**: (7S,7'S,7''S,8S,8'S), (7R,7'R,7'''R,8R,8'R), (7S,7'S,7'''R,8S,8'S) e (7R,7'R,7''S,8R,8'R). O espectro ECD (Figura S32) indicou que, especificamente, dois estereoisômeros, 7S,7'S,7''S,8S,8'S e 7R,7'R,7'''S,8R,8'R, apresentaram melhor equivalência com os dados experimentais. Portanto, os deslocamentos químicos de RMN de  $^1H$  e  $^{13}C$  foram calculados usando um GIAO-HDFT em nível teórico (COSTA; DE ALBUQUERQUE; FIOROT; LIÃO *et al.*, 2021) e

foram comparados com os dados experimentais (Tabela S8-S9). Após as simulações, a metodologia DP4+ (GRIMBLAT; ZANARDI; SAROTTI, 2015; MARCARINO; CICETTI; ZANARDI; SAROTTI, 2022) foi aplicada, resultando em 100% de probabilidade para o estereoisômero com a configuração 7*S*,7'*S*,7'''*S*,8*S*,8'*S* (Tabela S7 e Figura 20). Com base nesses dados espectrais, o composto **3** foi determinado como uma nova lignanamida tetra-hidrofurânica com o nome trivial de metternichiamida C.

O composto **4** foi isolado como um pó amorfo branco. Sua fórmula molecular foi estabelecida como C<sub>38</sub>H<sub>40</sub>N<sub>2</sub>O<sub>12</sub> com base em IES-EMAR ([M+H]<sup>+</sup> a *m/z* 717,2634, calcd. 717,2654, Δ = 2,8 ppm; IDH = 20; Figura S42). No espectro de RMN de <sup>1</sup>H (Figuras S33-S35), o conjunto de dupletos entre δ<sub>H</sub> 6,67 e 7,14, além dos sinais em δ<sub>H</sub> 4,68 (1H, *dd*, *J*=7,6; 5,1 Hz), 4,53 (1H, *t*, *J*=6,2 Hz), 3,39-3,42 (*m*), 3,34-3,37 (*m*), 3,25 (*dd*, 6,0; 1,6 Hz), foram compatíveis com uma lignana formada por duas porções octopamina. Além disso, foram observados sinais em δ<sub>H</sub> 4,87 (1H, *brs*) e δ<sub>H</sub> 3,72 (1H, *d*, *J*=1,8 Hz), referentes aos prótons da unidade arildi-hidronaftaleno (LEONARD; ZHANG; YING; FANG, 2020; SAKAKIBARA; IKEYA; HAYASHI; MITSUHASHI, 1992), além dos sinais em δ<sub>H</sub> 3,92 (3H, *s*), 3,68 (6H, *s*), 3,58 (3H, *s*), correspondendo a quatro metoxilas. Os dados espectroscópicos de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C (Tabela 4-5 e Figuras S33-S37) do composto **4** foram semelhantes aos da flavifloramida B (WU; ZHENG; DENG; QIN, 2013), diferindo apenas pela inserção de hidroxilas nos carbonos C-7'',7'''. O espectro HSQC (Figura S38) mostrou as correlações de δ<sub>H</sub> 4,87, *brs*/δ<sub>C</sub> 41,4 (H-7'/C-7') e δ<sub>H</sub> 3,72, *d*/δ<sub>C</sub> 50,2 (H-8'/C-8') e no COSY (Figura 18 e Figura S40) entre os prótons do H-7'' e H-7''' com H-8'' e H-8''', respectivamente. No espectro HMBC (Figura 18 e Figura S39), as correlações mútuas de H-7'' com C-2'',6'' e C-8'', e H-7''' com C-2''',6''' e C-8''', confirmaram as hidroxilas nos carbonos C-7'' e C-7'''. No espectro NOESY (Figura 18 e Figura S41), a correlação de H-2'-6' com H-7 e H-8' inferiu a configuração *trans* relativa entre H-7' e H-8'. Portanto, existiriam quatro possíveis estereoisômeros para o composto **4**, (7'*S*\*,7''*R*\*,7'''*R*\*,8'*R*\*), (7'*S*\*,7''*S*\*,7'''*S*\*,8'*R*\*), (7'*S*\*,7''*R*\*,7'''*S*\*,8'*R*\*) e (7'*S*\*,7''*S*\*,7'''*R*\*,8'*R*\*). Entre estes, os deslocamentos químicos calculados de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, juntamente com o método DP4+ (GRIMBLAT; ZANARDI; SAROTTI, 2015; MARCARINO; CICETTI; ZANARDI; SAROTTI, 2022), definiram o candidato 7'*S*\*,7''*R*\*,7'''*S*\*,8'*R*\* com uma probabilidade de 100% (Tabela S10-S12). A comparação entre os espectros de ECD simulados e experimentais definiu a

configuração absoluta do composto **4** como 7'*R*,7''*S*,7'''*R*,8'*S* (Figura 20). Essa nova lignanamida recebeu o nome trivial de metternichiamida D.

O composto **5** foi isolado como um pó amorfo branco. Sua fórmula molecular foi estabelecida como C<sub>38</sub>H<sub>40</sub>N<sub>2</sub>O<sub>11</sub> com base em IES-EMAR ([M+H]<sup>+</sup> em *m/z* 701,2674, calcd. 701,2705, Δ = 4,5 ppm, IDH = 20; Figura S53). A análise dos dados de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C-BB e DEPT135 (Figura S43-S47) indicou que o composto **5** era semelhante ao composto **4** (Tabela 4-5), diferindo apenas pela presença de um único sinal de próton oximetínico em δ<sub>H</sub> 4,52 (*t*, *J*=6,2 Hz) e três sinais de carbonos metilênicos em δ<sub>C</sub> 35,6 (C-7''), δ<sub>C</sub> 42,8 (C-8'') e δ<sub>C</sub> 47,9 (C-8'''). As correlações no espectro HSQC (Figura S48) em δ<sub>H</sub> 2,68, *t*, *J*=7,2 Hz/δ<sub>C</sub> 35,6 (H<sub>2</sub>-7''/C-7'') em δ<sub>H</sub> 3,33-3,43 *m*/δ<sub>C</sub> 42,8 (H<sub>2</sub>-8''/C-8''), em δ<sub>H</sub> 4,52/δ<sub>C</sub> 72,8 (H-7'''/C-7''') e em δ<sub>H</sub> 3,33-3,38, *m* e δ<sub>H</sub> 3,26, *dd*, *J*=13,4; 6,0 Hz,/δ<sub>C</sub> 47,9 (H-8a''' , H-8b'''/C-8'''), associadas com aquelas do espectro de HMBC (Figura 18 e Figura S49) dos prótons H<sub>2</sub>-8'' com o carbono em δ<sub>C</sub> 170,0 (C-9) e de H-8a''' e H-8b''' com δ<sub>C</sub> 174,2 (C-9') confirmaram a presença de uma porção tiramina e uma porção octopamina conectadas em C-9 e C-9', respectivamente. A configuração relativa de C-7', C-7''' e C-8' foi determinada inequivocamente por cálculos de deslocamentos químicos de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C (Tabelas S14-S15). Posteriormente, a metodologia DP4+(GRIMBLAT; ZANARDI; SAROTTI, 2015; MARCARINO; CICETTI; ZANARDI; SAROTTI, 2022) foi aplicada, resultando em uma probabilidade de 100% para o candidato com configuração 7'*S*\*,7'''*S*\*,8'*R*\* (Tabela S13), conforme indicado pelo espectro NOESY (Figuras S51-S52). A análise dos dados de ECD estabeleceu a configuração absoluta como 7'*S*,7'''*S*,8'*R* (Figura 20), e o composto **5** recebeu o nome trivial de metternichiamida E.

O ensaio MTT, um teste colorimétrico para avaliar a atividade metabólica celular, foi utilizado para estabelecer concentrações não citotóxicas dos compostos **1-5** em macrófagos RAW 264.7. Nenhum dos compostos reduziu significativamente a viabilidade celular até uma concentração de 100 μM (concentração citotóxica de 50% - CC<sub>50</sub> > 100 μM) (Tabela 6). Em seguida, o efeito dos compostos **1-5** na produção de NO, IL-1β e IL-10 foi avaliado na linhagem celular RAW 264.7 estimulada com LPS e IFN-γ.

Tabela 6 – Viabilidade celular (%) de macrófagos RAW 264.7 depois do tratamento com os compostos **1-5**.

Composto	Viabilidade celular (%)		
	25 $\mu$ M	50 $\mu$ M	100 $\mu$ M
Control	100 $\pm$ 1,3		
<b>1</b>	95,3 $\pm$ 1,7	96,9 $\pm$ 2,8	101,8 $\pm$ 6,0
<b>2</b>	102,3 $\pm$ 1,3	100,5 $\pm$ 1,3	103,4 $\pm$ 1,7
<b>3</b>	102,1 $\pm$ 5,8	109,1 $\pm$ 3,0	114,6 $\pm$ 1,4
<b>4</b>	103,6 $\pm$ 2,4	104,1 $\pm$ 3,5	92,6 $\pm$ 3,1
<b>5</b>	92,3 $\pm$ 1,5	94,8 $\pm$ 0,7	98,1 $\pm$ 1,8

Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média (EPM),  $n = 5$ .

Os compostos **1** e **3** reduziram os níveis de nitrito em comparação ao grupo estimulado ( $p < 0,05$ ) em todas as concentrações testadas (25, 50 e 100  $\mu$ M) (Figura 21). O efeito significativo dos compostos **2**, **4** e **5** na redução dos níveis de nitrito foi observado em 50 e 100  $\mu$ M ( $p < 0,05$ ). Como esperado, o fármaco padrão dexametasona (20  $\mu$ M) reduziu significativamente os níveis de nitrito em células RAW 264.7 estimuladas ( $p < 0,05$ ). O óxido nítrico desempenha um papel crucial na regulação da inflamação (FRIEBE; ENGLERT, 2022; GOSHI; ZHOU; HE, 2019); portanto, nossos resultados sugerem efeito anti-inflamatório para os compostos **1** a **5**.

Em relação à análise de citocinas, apenas **2** não apresentou alteração significativa nos níveis de IL-10 em comparação ao grupo controle tratado com veículo (Figura 22). Os efeitos inibitórios máximos na produção de IL-10 para os compostos **1**, **3** e **4** a 100  $\mu$ M foram de 26,1%, 37,2% e 31,9%, respectivamente. Para **5**, o efeito inibitório máximo foi de 89,6% a 25  $\mu$ M, e a dexametasona (20  $\mu$ M) reduziu os níveis de IL-10 em 17,2%. A IL-10 é classicamente definida como uma citocina anti-inflamatória; entretanto, dados da literatura de estudos experimentais e clínicos têm mostrado que em algumas condições patológicas os níveis de IL-10 podem estar elevados, potencialmente produzindo efeitos prejudiciais (SURBATOVIC; POPOVIC; VOJVODIC; MILOSEVIC *et al.*, 2015). De fato, a redução dos níveis de IL-10 tem sido associada ao efeito anti-inflamatório de fármacos farmacologicamente ativos testados *in vivo* (KALECHMAN; GAFTER; GAL; RUSHKIN *et al.*, 2002), ou *in vitro* (macrófagos RAW 264.7) (GUTIERREZ; HOYO-VADILLO, 2017; QIN; JIANG; JIANG; WANG *et al.*, 2016).

Além disso, apenas **4** não alterou os níveis de IL-1 $\beta$ . Os outros compostos reduziram a medição de IL-1 $\beta$  em todas as concentrações testadas (25, 50 e 100  $\mu$ M) em comparação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ) (Figura 22). Os efeitos inibitórios máximos nos níveis de IL-1 $\beta$  foram de 52,6%, 57,7%, 66,4%, 36,9% e 70% para **1**, **2** e **3** em 100  $\mu$ M, **5** (25  $\mu$ M) e dexametasona (20  $\mu$ M), respectivamente (Figura 22). Considerando que a redução dos níveis de IL-1 $\beta$  é crucial para atenuar a inflamação (MA; TANG; SHENG; WANG *et al.*, 2018), nossos resultados para a produção de IL-1 $\beta$  no modelo de macrófagos RAW 264.7 reforçam o potencial anti-inflamatório desses compostos.



Figura 21 - Efeito inibitório dos compostos 1-5 na produção de NO em macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS e IFN- $\gamma$ . Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM), n = 5. #Diferente do grupo basal ( $p < 0,05$ ) \*Diferente do grupo controle.

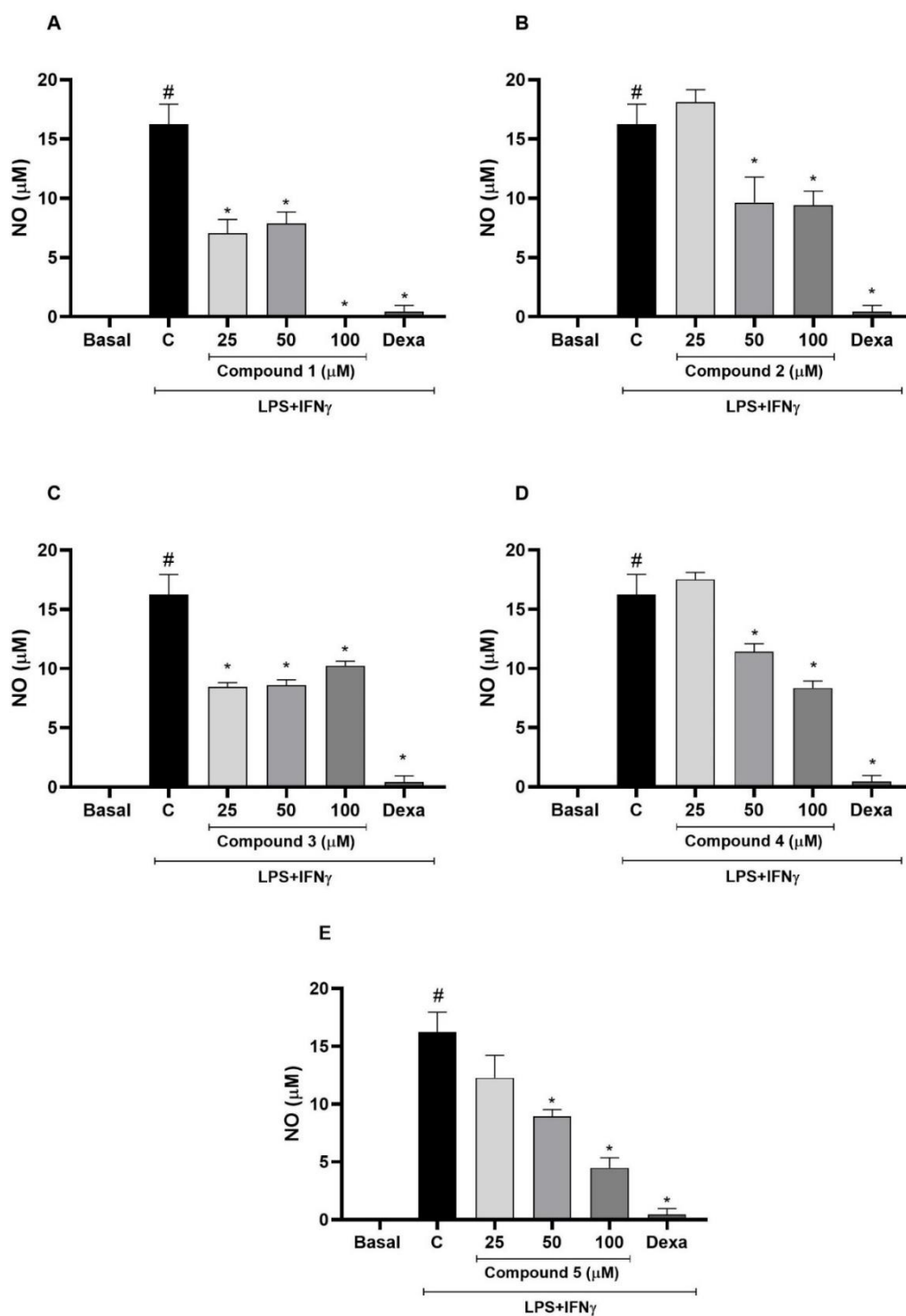
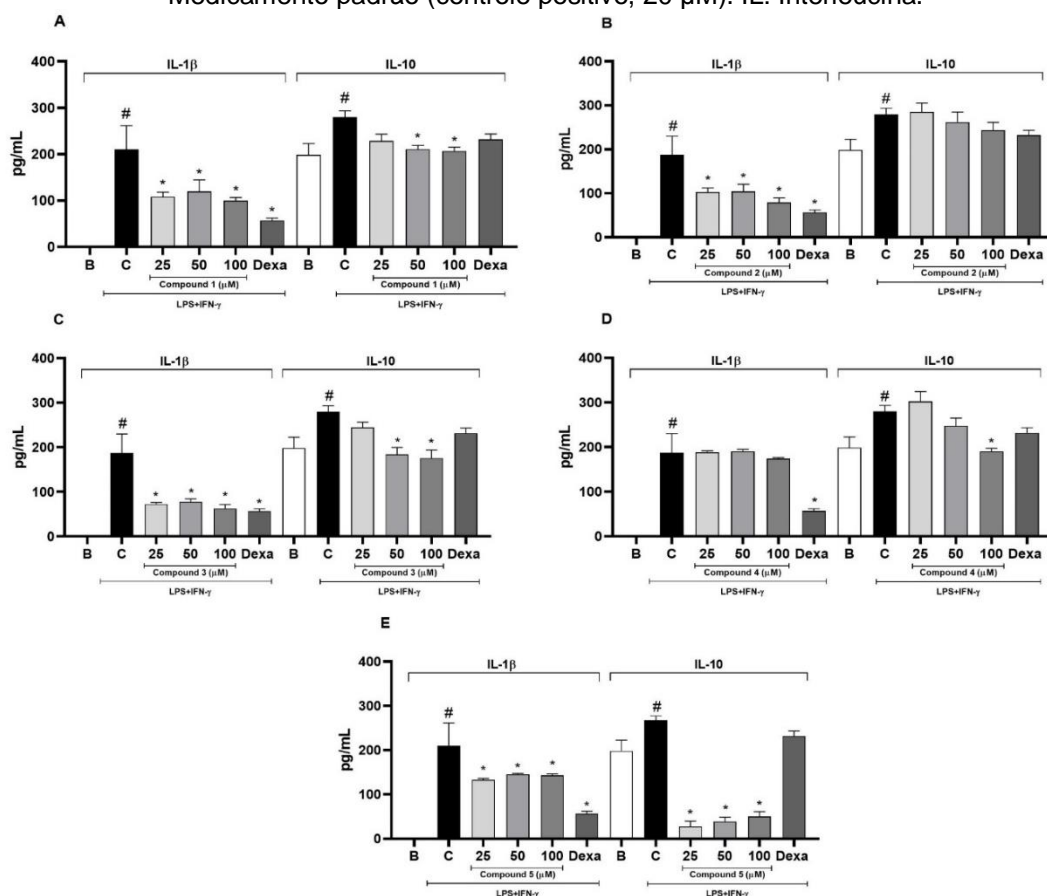


Figura 22 - Efeito inibitório dos compostos 1-5 sobre os níveis de IL-1 $\beta$  e IL-10 em macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS e IFN- $\gamma$ . Resultados apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM), n = 5. #Diferente do grupo basal (p<0,05). \*Diferente do grupo controle (p<0,05). Dexa: Medicamento padrão (controle positivo, 20  $\mu$ M). IL: Interleucina.



## SEÇÃO EXPERIMENTAL

**Procedimentos Experimentais Gerais.** Os espectros experimentais de ECD foram registrados por meio de um espectrômetro Jasco J-1100 (Jasco, Tóquio, Japão) na região de 200-400 nm usando os seguintes parâmetros: largura de banda 1 nm; resposta 1 s; velocidade de varredura 100 nm.min<sup>-1</sup>; 3 acumulações; temperatura ambiente (25 °C); amostra em solução de metanol; comprimento do caminho da célula de 0,1 cm; concentração 0,1 mg.ml<sup>-1</sup>. Os espectros foram suavizados no software Origin 8. (OriginPro 8, OriginLab Corporation; Northampton, MA, USA, 2020) foi usado para medir a rotação óptica a 20 °C. Os espectros de IV foram registrados em um espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier (Shimadzu Proeminence IR Prestige-21) usando grânulos de KBr, bem como em um espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier (IVFT). Os espectros de RMN foram obtidos nos espectrômetros de ressonância magnética

nuclear (Bruker Ascend – 400 MHz e 100 MHz para  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e Bruker AvanceNeo 500 – 500 MHz e 125 MHz para  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ). Os deslocamentos químicos da RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foram referenciados aos picos do solvente para MeOD interno residual em  $\delta_{\text{H}}$  3,31 e  $\delta_{\text{C}}$  49,00. Um espectrômetro de massas (MicroTOF II, Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA) com uma fonte de íons por eletrospray (ESI) foi utilizado para realizar a análise IES-TOF-EM. O isolamento, a purificação e a análise dos constituintes químicos foram conduzidos usando vários métodos cromatográficos, incluindo cromatografia líquida de média pressão (CLMP), cromatografia em coluna (CC), cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Uma coluna preparativa C18 (ACE, 250 mm x 21,2 mm x 5,0  $\mu\text{m}$ ) e uma coluna preparativa C18 (YMC, 250 mm x 20,0 mm x 5,0  $\mu\text{m}$ ) foram usadas para o isolamento em escala preparativa. Sílica gel (*Siliaflash*, tamanho de partícula 0,060-0,200 mm) foi a fase estacionária utilizada na CLMP, enquanto o suporte de Sephadex LH-20 foi usado na CC. Placas comerciais de sílica gel (*Whatman*) foram usadas na CCDA em camadas com espessura de 0,25 mm em um suporte de alumínio (20 x 20 cm). As substâncias foram analisadas por meio de radiação ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 e 366 nm (aparelho da marca *Botton*).

**Material Vegetal.** O material vegetal foi coletado na Fazenda Esperança, no município de Boa Vista do Tupim, Bahia, Brasil (13°13'15"S, 41°11'08"W) em janeiro de 2019. A espécie foi identificada pelo Prof. Dr. Domingos Benício Oliveira Silva Cardoso do Departamento de Botânica do Instituto de Biologia da Universidade Federal da Bahia (UFBA). O registro de acesso no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN) foi obtido sob o número AA54545. Uma exsicata do material coletado foi produzida e depositada no Herbário Alexandre Leal Costa (ALCB) da UFBA. O material vegetal passou por um processo de secagem em estufa com circulação de ar a uma temperatura de 40 °C por 72 h.

**Extração e Isolamento.** As raízes secas e moídas de *M. macrocalyx* (3,4 kg) foram extraídas com EtOH (x3 por 72 h) à temperatura ambiente. O extrato resultante foi concentrado sob pressão reduzida em evaporador rotativo a 40 °C para obtenção de 70,0 g de extrato etanólico bruto. Uma alíquota de 65,0 g foi ressuspensa em solução de EtOH:H<sub>2</sub>O (7:3) e particionada sucessivamente com n-hexano, CHCl<sub>3</sub>, AcOEt, culminando em 7,1, 34,1, 0,6 g das respectivas fases e 16,4 g da fase hidroetanólica. A fase clorofórmica (3,0 g) foi submetida à CLMP em sílica gel e eluída

com hexano, AcOEt e MeOH, puros ou em mistura binária, em gradiente crescente de polaridade. A partir deste procedimento, foram obtidas 12 frações que foram agrupadas em 10 grupos (A1-12) de acordo com seu perfil cromatográfico em CCD. O grupo da fração A4-6 (130,0 mg) foi submetido à separação cromatográfica preparativa por CLAE, em coluna C18 (ACE, 250 mm x 21,2 mm x 5 µm) e o seguinte gradiente de eluição: solvente A = HCOOH:H<sub>2</sub>O 0,1% v/v; solvente B = MeOH; perfil de eluição = 0,0-45,0 min (5-35% B); 45,0-70,0 min (5-35% B); 35-45% B); 70,0-95,0 min (45-70% B); 95,0-100,0 min (70-100% B); 100,0-105,0 min (100% B); 105,0-120,0 min (100% B); 120,0-125,0 min (100-5% B); 125,0-145,0 min (5% B); volume de injeção de 100 µL e fluxo de 8,0 mL/min; foram obtidas 15 frações. A análise dos espectros de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C dos picos isolados levou à identificação de dez compostos: **1** (1,3 mg, t<sub>R</sub> = 59,7 min), **6** (6,6 mg, t<sub>R</sub> = 66,7 min), **7** (5,6 mg, t<sub>R</sub> = 65,2 min), **8** (4,8 mg, t<sub>R</sub> = 82,0 min), **9** (3,0 mg, t<sub>R</sub> = 71,1 min), **10** (1,0 mg, t<sub>R</sub> = 79,7 min), bem como uma mistura de dois isômeros posicionais **11** e **12** (3,2 mg, t<sub>R</sub> = 83,3 min) e dois isômeros geométricos **13** e **14** (3,0 mg, t<sub>R</sub> = 101,2 min). A fração rica em amida A7 (1,1 g) foi separada em Sephadex LH-20 e eluída com MeOH para obter 15 frações (B1-15), as quais foram monitoradas via CLAE-DAD. As frações B8-10 (377,1 mg) com perfis cromatográficos semelhantes foram reunidas e submetidas à separação cromatográfica preparativa usando CLAE, em uma coluna C18 (ACE, 250 mm x 21,2 mm x 5 µm) e o seguinte gradiente de eluição: solvente A = H<sub>2</sub>O; solvente B = MeOH; perfil de eluição = 0,0-45,0 min (5-35% B); 45,0-70,0 min (5-35% B); 35-45% B); 70,0-120,0 min (45-60% B); 120-125,0 min (60-100% B); 125,0-140,0 min (100% B); 140,0-145,0 min (5% b); 145,0-165,0 min (5% B); volume de injeção de 200 µL e fluxo de 8,0 mL/min; foram obtidas 21 frações. A análise dos espectros de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C dos picos isolados levou à identificação dos compostos **2** (6,0 mg, t<sub>R</sub> = 59,9 min) e **15** (5,0 mg, t<sub>R</sub> = 109,5 min), além dos compostos reisolados **6** (10 mg, t<sub>R</sub> = 68,0 min) e **7** (8,6 mg, t<sub>R</sub> = 66,6 min). Devido ao potencial manifesto para biossíntese de novas lignanamidas, e a necessidade de reisolamento, para análise complementar e avaliação da atividade biológica, uma alíquota da fase clorofórmica (4,0 g) foi submetida à CLMP em sílica gel e eluída com hexano, AcOEt e MeOH, puros ou em mistura binária em gradiente crescente de polaridade. A partir deste procedimento, foram obtidas 10 frações (C1-10), que foram combinadas em 7 frações de acordo com seu perfil cromatográfico em CLAE-DAD. A fração do grupo C4-7 (1,3 g) foi submetida à CLMP de fase reversa (C18) e eluída com MEOH e H<sub>2</sub>O em uma mistura binária por

meio de um gradiente crescente de polaridade até 100% de MeOH. A partir deste procedimento, 8 frações (D1-8) foram obtidas. A fração D2 (148,0 mg) foi submetida à separação cromatográfica preparativa usando CLAE em uma coluna C18 (YMC, 250 mm x 20,0 mm x 5,0  $\mu$ m) e o seguinte gradiente de eluição: solvente A = H<sub>2</sub>O; solvente B = MeOH; perfil de eluição = 0,0-40,0 min (25-40% B); 40,0-70,0 min (40-46% B); 70,0-75,0 min (46-100% B); 75,0-90,0 min (100% B); 90,0-95,0 min (100-25% B); 95,0-115,0 min (25% B); volume de injeção de 100  $\mu$ L e vazão de 8,0 mL/min; 16 frações foram obtidas (D2.1 – D2.16). A análise do espectro de RMN de <sup>1</sup>H dos picos isolados levou à identificação dos compostos **3** (2,6 mg,  $t_R$  = 73,5 min), **4** (7,2 mg,  $t_R$  = 43,4 min) e **5** (4,4 mg,  $t_R$  = 65,9 min), além dos compostos reisolados, **2** (10,4 mg,  $t_R$  = 51,9 min), **6** (16,6 mg,  $t_R$  = 60,6 min) e **7** (8,1 mg,  $t_R$  = 63,0). A fração D2.9 (3,1 mg) foi purificada usando CLAE semipreparativa em uma coluna C18 (Venusil, 250 mm x 10,0 mm x 10,0  $\mu$ m) e o seguinte gradiente de eluição: solvente A = H<sub>2</sub>O; solvente B = MeOH/ACN 50% v/v; perfil de eluição = 0,0-25,0 min (5-25% B); 25,0-75,0 min (25-40% B); 75,0-80,0 min (40-100% B); 80,0-95,0 min (100% B); 95,0-100,0 min (100-5% B); 100,0-120,0 min (5% B); volume de injeção de 100  $\mu$ L e um fluxo de 3,0 mL/min para obtenção do composto **1** (1,0 mg). Fração D1 (151,0 mg) foi fracionado via CLAE preparativa usando MeOH e H<sub>2</sub>O como eluente (8,0 mL/min), por meio do seguinte sistema de gradiente: 0,0-83,0 min (25-46% B); 83,0-87,0 min (46-100% B); 87,0-102,0 min (100% B); 102,0-107,0 min (100-25% B); 107,0-127,0 min (25% B); 12 frações (D1.1-D1.12) foram obtidas. Este processo levou ao reisolamento do composto **4** (7,7 mg,  $t_R$  = 38,2 min) e **5** (1,0 mg,  $t_R$  = 59,1 min). Além disso, a fração D1.5 (2,6 mg) foi purificada via CLAE semipreparativa usando MeOH/ACN 50% v/v (solvente B) e H<sub>2</sub>O (solvente A) sob um fluxo de 3 mL/min no modo isocrático com 30% de B e um tempo de corrida cromatográfica de 70,0 min para obtenção do composto **1** (1,2 mg).

Metternichiamida A (**1**): pó amorfo amarelado;  $[\alpha]_D^{22} +4$  (c 0.1, MeOH); IV (ATR)  $\nu_{\max}$  3343, 1651, 1611, 1514  $\text{cm}^{-1}$ ; ponto de fusão: 131,0 °C; dados de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, ver Tabela 4-5; modo positivo IES-EMAR  $m/z$  717,2626  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (calcd. para C<sub>38</sub>H<sub>41</sub>N<sub>2</sub>O<sub>12</sub>, 717,2654,  $\Delta$  = 3.9 ppm).

Metternichiamida B (**2**): pó amorfo branco;  $[\alpha]_D^{20} +15$  (c 0.09, MeOH); IV (KBr)  $\nu_{\max}$  3306, 1659, 1612 and 1516  $\text{cm}^{-1}$ ; ponto de fusão: 148,0 °C; dados de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, ver Tabela 4-5; modo positivo IES-EMAR  $m/z$  757.2528  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (calcd. para C<sub>38</sub>H<sub>42</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>13</sub>, 757.2579,  $\Delta$  = 2.8 ppm).

Metternichiamida C (**3**) pó amorfo branco;  $[\alpha]^{20}_D +6$  (c 0.22, MeOH); IR (KBr)  $\nu_{\max}$  3310, 1659, 1612 and 1516  $\text{cm}^{-1}$ ; ponto de fusão: 124,0 °C; dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , ver Tabela 4-5; modo positivo IES-EMAR  $m/z$  719.2797  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (calcd. para  $\text{C}_{38}\text{H}_{43}\text{N}_2\text{O}_{12}$ , 719.2811,  $\Delta = 1.9$  ppm).

Metternichiamida D (**4**): pó amorfo branco;  $[\alpha]^{20}_D -21$  (c 0.37, MeOH); IR (KBr)  $\nu_{\max}$  3275, 2920, 2847, 1639, 1609, 1512, 1454, 1223, 1111 and 833  $\text{cm}^{-1}$ ; ponto de fusão: 147,0 °C; dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , ver Tabela 4-5; modo positivo IES-EMAR  $m/z$  717.2634  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (calcd. Para  $\text{C}_{38}\text{H}_{41}\text{N}_2\text{O}_{12}$ , 757.2654,  $\Delta = 2.8$  ppm).

Metternichiamida E (**5**): pó amorfo branco;  $[\alpha]^{20}_D -10$  (c 0.26, MeOH); IR (KBr)  $\nu_{\max}$  3418, 1597, 1512, 1458, 1223 and 1111  $\text{cm}^{-1}$ ; ponto de fusão: 136,0 °C; dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , ver Tabela 4-5; modo positivo IES-EMAR  $m/z$  701.2674  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (calcd. para  $\text{C}_{38}\text{H}_{41}\text{N}_2\text{O}_{11}$ , 701.2705,  $\Delta = 4.5$  ppm).

**Cálculos de ECD e RMN.** Buscas conformacionais aleatórias foram realizadas para todos os estereoisômeros possíveis usando o algoritmo de Monte Carlo com um campo de força MMFF no software SPARTAN '14. Todos os confórmeros dentro de uma janela de energia livre relativa de 10  $\text{kcal.mol}^{-1}$  foram selecionados para cálculos de otimização geométrica em fase gasosa, empregando o nível teórico B3LYP/6-31G(d). Cálculos de frequência vibracional foram realizados no mesmo nível teórico para confirmar que pontos estacionários correspondem a mínimos na superfície de energia potencial. Subsequentemente, confórmeros dentro de uma janela de energia relativa de 3  $\text{kcal.mol}^{-1}$  foram selecionados para simulações de espectros de ECD e/ou cálculos de constantes de blindagem magnética nuclear de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  ( $\sigma$ ). Para as simulações de ECD, o nível teórico TD-DFT foi aplicado: CAM-B3LYP/TZVP, empregando um modelo contínuo polarizável com formalismo de equação integral (IEF-PCM) para simular implicitamente MeOH como solvente. Os espectros finais de ECD foram gerados com base nas estatísticas de Boltzman dos confórmeros selecionados e plotados usando o software Origin 8 (OriginPro 8, OriginLab Corporation; Northampton, MA, USA, 2020). Os cálculos de blindagem magnética nuclear foram conduzidos usando o nível teórico GIAO-mPW1PW91/6-31G(d), juntamente com o método IEF-PCM para simular a solvatação por MeOH. As constantes médias de blindagem da população foram obtidas assumindo as estatísticas de Boltzmann a uma temperatura de 298 K. Finalmente, os deslocamentos químicos de RMN de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  ( $\delta$ ) foram obtidos como  $\delta_{\text{calc}} = \sigma_{\text{TMS}} - \sigma$ , onde  $\sigma_{\text{TMS}}$  representa a constante de blindagem do composto de referência (tetrametilsilano,

TMS), que foi calculado usando os mesmos níveis teóricos. O método DP4+, que se baseia na análise bayesiana, foi usado para estabelecer uma correlação estatística entre os deslocamentos químicos calculados e experimentais de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$ . Cada estrutura foi classificada com base em probabilidades, e probabilidades maiores que 90% indicaram um alto nível de confiança em que o candidato exibiu a melhor concordância com os dados experimentais (GRIMBLAT; ZANARDI; SAROTTI, 2015; MARCARINO; CICETTI; ZANARDI; SAROTTI, 2022). Todos os cálculos mecânicos quânticos foram realizados usando o pacote de software Gaussian 16 (FRISCH; TRUCKS; SCHLEGEL; SCUSERIA *et al.*, 2016).

**Ensaio de Citotoxicidade.** O ensaio MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) foi usado para avaliar a citotoxicidade dos compostos **1-5** (MOSMANN, 1983). A linhagem celular murina RAW 264.7 semelhante a macrófagos foi obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), Brasil, e cultivada em Meio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA), suplementado com 10% de soro bovino fetal (FBS; GIBCO, Grand Island, NY, EUA) e 1% de penicilina-estreptomicina (Sigma Aldrich) a 37 °C com 5% de  $\text{CO}_2$ . As células foram semeadas em placas de 96 poços a uma densidade celular de  $1 \times 10^5$  células/mL e incubadas durante a noite. Os compostos **1-5** foram adicionados em três concentrações (25, 50 ou 100  $\mu\text{M}$ ) em cinco replicatas, e as placas foram incubadas por 24 h. Após os tratamentos, o sobrenadante (110  $\mu\text{L}$ ) foi removido e 10  $\mu\text{L}$  de solução de MTT (5 mg/mL) foram adicionados (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA). As placas foram incubadas por mais quatro horas, e o dodecil sulfato de sódio (SDS) (100  $\mu\text{L}$ /poço) foi adicionado para dissolver a formazana. As densidades ópticas foram medidas em um espectrofotômetro (leitor de microplacas BioTek Instruments, Synergy HT, Winooski, VT, EUA) a um comprimento de onda de 570 nm.

**Ensaios de Produção de Óxido Nítrico e Citocinas.** Para as determinações de NO, IL-1 $\beta$  e IL-10, as células RAW 264.7 foram semeadas em placas de cultura de 96 poços a uma densidade de  $1 \times 10^6$  células/mL em meio DMEM suplementado com 10% de SBF e 1% de penicilina-estreptomicina em uma incubadora com 5% de  $\text{CO}_2$  a 37 °C, conforme descrito anteriormente. Após um período de quatro horas, as células foram estimuladas com LPS (500 ng/mL, Sigma Aldrich) e IFN- $\gamma$  (5 ng/mL, Thermofisher) na presença dos compostos **1-5** (25, 50 ou 100  $\mu\text{M}$ ) ou dexametasona (20  $\mu\text{M}$ ) em cinco replicatas. Além disso, um grupo controle estimulado (LPS/IFN- $\gamma$ ) e tratado com veículo foi incluído. Após 24 horas, os sobrenadantes livres de células

foram coletados para quantificação de NO pelo método de Griess (GRIESS, 1879), ou mantidos a  $-80^{\circ}\text{C}$  para determinação das concentrações de citocinas. As concentrações de IL-1 $\beta$  e IL-10 nos sobrenadantes da cultura de macrófagos foram determinadas por ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizando o kit Invitrogen (ThermoFisher, VIE, Áustria).

**Análise estatística.** Os dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). As comparações entre os grupos foram realizadas por meio de análise de variância (ANOVA) unidirecional com pós-teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). A análise estatística foi realizada utilizando o GraphPad Prism 8.0.2 (Graphpad Software Inc., San Diego, CA, EUA).

## CONTEÚDO ASSOCIADO

### Informações de suporte

As informações de suporte estão disponíveis gratuitamente em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsomega.4c07336>.

Os dados de EM e RMN dos compostos **1-15** estão disponíveis nas informações de suporte.

## INFORMAÇÕES DO AUTOR

### Autor Correspondente

\*Tel: +55 83 32167427. E-mail: [josean@lft.ufpb.br](mailto:josean@lft.ufpb.br)

### Contribuições dos Autores

O manuscrito foi escrito com a contribuição de todos os autores, que aprovaram a versão final do manuscrito e contribuíram igualmente.

### Notas

Os autores declaram não possuir conflito de interesses.

## AGRADECIMENTOS



Os autores gostariam de agradecer às agências brasileiras Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES) (Código Financeiro 001) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro e bolsas; ao Instituto de Química – Campus de Niterói – Universidade Federal Fluminense pelas análises de dicroísmo circular eletrônico; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro – FAPERJ (bolsa nº E-26/210–313/2022). Pesquisa desenvolvida com apoio do Núcleo Avançado de Computação de Alto Desempenho (NACAD) da COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Agradecemos também a colaboração com a Rede Norte-Nordeste de Fitoterápicos (INCT-RENNOFITO).

## INFORMAÇÕES DE SUPORTE

### Lignanâmidas das raízes de *Metternichia macrocalyx* e sua atividade anti-inflamatória

Thiago Araújo de Medeiros Brito,<sup>1</sup> Ana Carolina Ferreira de Albuquerque,<sup>2</sup> Fernando Martins dos Santos Junior,<sup>2</sup> Paulo Bruno Araújo Loureiro,<sup>3</sup> Francisco Allysson Assis Ferreira Gadelha,<sup>3</sup> Marianna Vieira Sobral,<sup>3</sup> Domingos Benício Oliveira Silva Cardoso,<sup>5</sup> Eudes da Silva Velozo,<sup>4</sup> Josean Fachine Tavares,<sup>1\*</sup> Lucas Silva Abreu,<sup>2</sup> Marcelo Sobral da Silva.<sup>1</sup>

## SUMÁRIO

Figura S1 – Espectro de RMN de <sup>1</sup> H do composto <b>1</b> (400 MHz, MeOD). .....	90
Figura S2 - Expansão do espectro de RMN de <sup>1</sup> H do composto <b>1</b> (400 MHz, MeOD). .....	90
Figura S3 - Expansão do espectro de RMN de <sup>1</sup> H do composto <b>1</b> (400 MHz, MeOD). .....	91
Figura S4 – Espectro de RMN de <sup>13</sup> C-APT do composto <b>1</b> (100 MHz, MeOD).....	91
Figura S5 – Espectro de HSQC do composto <b>1</b> (400/100 MHz, MeOD). .....	92
Figura S6 - Espectro de HMBC do composto <b>1</b> (400/100 MHz, MeOD).....	92
Figura S7 – Espectro de COSY do composto <b>1</b> (400 MHz, MeOD). .....	93
Figura S8 - Espectro de NOESY do composto <b>1</b> (400 MHz, MeOD).....	93
Figura S9 – Espectro de ISE-EMAR do composto <b>1</b> ([M + H] <sup>+</sup> , modo positivo).....	94
Figura S10 – Espectro de ECD Experimental (superior) e Calculado (inferior) de todos os possíveis estereoisômeros do composto <b>1</b> . Atropisômeros aS foram marcados em vermelho e atropoisômeros aR foram marcados em azul. ....	95
Figura S11 – Espectro de ECD Experimental (superior) e calculado (inferior) dos atropoisômeros aS do composto <b>1</b> . ....	96
Figura S12 - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H do composto <b>2</b> (400 MHz, MeOD). .....	96
Figura S13 – Expansão do espectro de RMN de <sup>1</sup> H do composto <b>2</b> (400 MHz, MeOD). .....	97
Figura S14 - Expansão do espectro de RMN de <sup>1</sup> H do composto <b>2</b> (400 MHz, MeOD). .....	97

Figura S15 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do composto <b>2</b> (100 MHz, MeOD).....	98
Figura S16 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ -DEPT135 do composto <b>2</b> (100 MHz, MeOD). .....	98
Figura S17 – Espectro de HSQC do composto <b>2</b> (400/100 MHz, MeOD).....	99
Figura S18 - Espectro de HMBC do composto <b>2</b> (400/100 MHz, MeOD).....	99
Figura S19 – Espectro de COSY do composto <b>2</b> (400 MHz, MeOD). ....	100
Figura S20 - Espectro de NOESY do composto <b>2</b> (400 MHz, MeOD).....	100
Figura S21 - Espectro de IES-EMAR do composto <b>2</b> ( $[\text{M} + \text{Na}]^+$ , modo positivo)....	101
Figura S22 – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto <b>3</b> (400 MHz, MeOD). ....	101
Figura S23 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto <b>3</b> (400 MHz, MeOD). ....	102
Figura S24 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto <b>3</b> (400 MHz, MeOD). ....	102
Figura S25 – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ -BB do composto <b>3</b> (100 MHz, MeOD). ....	103
Figura S26 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ -DEPT135 do composto <b>3</b> (100 MHz, MeOD). .....	103
Figura S27 – Espectro de HSQC do composto <b>3</b> (400/100 MHz, MeOD).....	104
Figura S28 - Espectro de HMBC do composto <b>3</b> (400/100 MHz, MeOD).....	104
Figura S29 – Espectro de COSY do composto <b>3</b> (400 MHz, MeOD). ....	105
Figura S30 - Espectro de NOESY do composto <b>3</b> (400 MHz, MeOD).....	105
Figura S31 – Espectro de IES-EMAR do composto <b>3</b> ( $[\text{M} + \text{H}]^+$ , modo positivo)....	106
Figura S32 – Espectro de ECD Experimental (superior) e Calculado (inferior) de todos os estereoisômeros possíveis para o composto <b>3</b> .....	106
Figura S33 – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto <b>4</b> (400 MHz, MeOD). ....	107
Figura S34 – Expansão do espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto <b>4</b> (400 MHz, MeOD). .....	107
Figura S35 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto <b>4</b> (400 MHz, MeOD). ....	108
Figura S36 – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ -BB do composto <b>4</b> (100 MHz, MeOD). ....	108
Figura S37 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ -DEPT135 do composto <b>4</b> (100 MHz, MeOD). .....	109
Figura S38 – Espectro de HSQC do composto <b>4</b> (400/100 MHz, MeOD).....	109
Figura S39 - Espectro de HMBC do composto <b>4</b> (400/100 MHz, MeOD).....	110
Figura S40 – Espectro de COSY do composto <b>4</b> (400 MHz, MeOD). ....	110
Figura S41 - Espectro de NOESY do composto <b>4</b> (400 MHz, MeOD).....	111
Figura S42 – Espectro de IES-EMAR do composto <b>4</b> ( $[\text{M} + \text{H}]^+$ , modo positivo)....	111
Figura S43 – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto <b>5</b> (500 MHz, MeOD).....	112

Figura S44 – Expansão do espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto <b>5</b> (500 MHz, MeOD).	112
Figura S45 - Expansão do espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto <b>5</b> (500 MHz, MeOD).	113
Figura S46 – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ -BB do composto <b>5</b> (125 MHz, MeOD).	113
Figura S 47 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ -DEPT135 do composto <b>5</b> (125 MHz, MeOD).	114
Figura S48 – Espectro de HSQC do composto <b>5</b> (500/125 MHz, MeOD).	114
Figura S49 - Espectro de HMBC do composto <b>5</b> (500/125 MHz, MeOD).	115
Figura S50 – Espectro de COSY do composto <b>5</b> (500 MHz, MeOD).	115
Figura S51 - Espectro de NOESY do composto <b>5</b> (500 MHz, MeOD).	116
Figura S52 – Expansão do espectro de NOESY do composto <b>5</b> (500 MHz, MeOD).	116
Figura S53 – Espectro de IES-EMAR do composto <b>5</b> ( $[\text{M} + \text{H}]^+$ , modo positivo).	117
Figura S54 – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto <b>6</b> (400 MHz, MeOD).	117
Figura S55 – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ -APT do composto <b>6</b> (100 MHz, MeOD).	118
Figura S56 – Espectro de HSQC do composto <b>6</b> (400/100 MHz, MeOD).	118
Figura S57 – Espectro de COSY do composto <b>6</b> (400 MHz, MeOD).	119
Figura S58 - Espectro de NOESY do composto <b>6</b> (400 MHz, MeOD).	119
Figura S59 – Espectro de IES-EMAR do composto <b>6</b> ( $[\text{M} + \text{Na}]^+$ , modo positivo).	120
Figura S60 – Espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto <b>7</b> (400 MHz, MeOD).	120
Figura S61 – Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ -BB do composto <b>7</b> (100 MHz, MeOD).	121
Figura S62 – Espectro de IES-EMAR do composto <b>7</b> ( $[\text{M} + \text{Na}]^+$ , modo positivo).	121
Figura S63 – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto <b>8</b> (400 MHz, MeOD).	122
Figura S64 – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ -APT do composto <b>8</b> (100 MHz, MeOD).	122
Figura S65 – Espectro de HSQC do composto <b>8</b> (400/100 MHz, MeOD).	123
Figura S66 - Espectro de HMBC do composto <b>8</b> (400/100 MHz, MeOD).	123
Figura S67 – Espectro de COSY do composto <b>8</b> (400 MHz, MeOD).	124
Figura S68 - Espectro de NOESY do composto <b>8</b> (400 MHz, MeOD).	124
Figura S69 – Espectro de IES-EMAR do composto <b>8</b> ( $[\text{M} + \text{Na}]^+$ , modo positivo).	125
Figura S70 – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto <b>9</b> (400 MHz, MeOD).	125
Figura S71 – Espectro de HSQC do composto <b>9</b> (400/100 MHz, MeOD).	126
Figura S72 - Espectro de HMBC do composto <b>9</b> (400/100 MHz, MeOD).	126
Figura S73 – Espectro de COSY do composto <b>9</b> (400 MHz, MeOD).	127

Figura S74 – Espectro de NOESY do composto <b>9</b> (400 MHz, MeOD).....	127
Figura S75 – Espectro de IES-EMAR do composto <b>9</b> ([M + H] <sup>+</sup> , modo positivo).....	128
Figura S76 – Espectro de RMN de <sup>1</sup> H do composto <b>10</b> (400 MHz, MeOD). ....	128
Figura S77 – Espectro de HSQC do composto <b>10</b> (400/100 MHz, MeOD). ....	129
Figura S78 - Espectro de HMBC do composto <b>10</b> (400/100 MHz, MeOD).....	129
Figura S79 – Espectro de COSY do composto <b>10</b> (400 MHz, MeOD). ....	130
Figura S80 - Espectro de NEOSY do composto <b>10</b> (400 MHz, MeOD).....	130
Figura S81 – Espectro de IES-EMAR do composto <b>10</b> ([M + H] <sup>+</sup> , modo positivo....	131
Figura S82 – Espectro de RMN de <sup>1</sup> H do composto <b>11,12</b> (400 MHz, MeOD). ....	132
Figura S83 – Expansão do espectro de RMN de <sup>1</sup> H do composto <b>11,12</b> (400 MHz, MeOD).....	133
Figura S84 – Espectro de RMN de <sup>13</sup> C-APT do composto <b>11,12</b> (100 MHz, MeOD). ....	133
Figura S85 – Espectro de HMBC do compostos <b>11,12</b> (400/100 MHz, MeOD). ....	134
Figura S86 – Espectro de IES-EMAR dos compostos <b>11,12</b> ([M + H] <sup>+</sup> , modo positivo). ....	134
Figura S87 – Espectro de RMN de <sup>1</sup> H do compostos <b>13,14</b> (400 MHz, MeOD).....	135
Figura S88 – Expansão do espectro de RMN de <sup>1</sup> H do compostos <b>13,14</b> (400 MHz, MeOD).....	135
Figura S89 – Expansão do espectro de RMN de <sup>1</sup> H do compostos <b>13,14</b> (400 MHz, MeOD).....	136
Figura S90 – Espectro de RMN de <sup>13</sup> C-APT dos compostos <b>13,14</b> (100 MHz, MeOD). ....	136
Figura S91 – Espectro de HSQC do compostos <b>13,14</b> (400/100 MHz, MeOD). ....	137
Figura S92 - Espectro de HMBC do compostos <b>13,14</b> (400/100 MHz, MeOD).....	137
Figura S93 – Espectro de COSY do compostos <b>13,14</b> (400 MHz, MeOD).....	138
Figura S94 - Espectro de NOESY do compostos <b>13,14</b> (400 MHz, MeOD). ....	138
Figura S95 – Espectro de IES-EMAR dos compostos <b>13,14</b> ([M + H] <sup>+</sup> , modo positivo). ....	139
Figura S96 – Expansão do espectro de RMN de <sup>1</sup> H do composto <b>15</b> (400 MHz, MeOD). ....	140
Figura S97 – Espectro de RMN de <sup>13</sup> C-APT do composto <b>15</b> (100 MHz, MeOD)...	140
Figura S98 – Espectro de HSQC do composto <b>15</b> (400/100 MHz, MeOD). ....	141
Figura S99 - Espectro de HMBC do composto <b>15</b> (400/100 MHz, MeOD).....	141

Figura S100 – Espectro de COSY do composto 15 (400 MHz, MeOD). .....	142
Figura S101 – Espectro de IES-EMAR do composto <b>15</b> ([M + Na] <sup>+</sup> , modo positivo). .....	142
Figura S102 – Níveis de energia calculados (in kcal.mol <sup>-1</sup> ) para os confórmeros do composto <b>1</b> em função da rotação em torno do ângulo diedro C7-C8-C8'-C7'. .....	143
 Tabela S1 - Probabilidades DP4+ obtidas pela correlação dos deslocamentos químicos calculados de RMN de <sup>13</sup> C e <sup>1</sup> H dos 4 possíveis diastereoisômeros (aS) do composto <b>1</b> com os dados experimentais de RMN do produto natural isolado. ....	144
Tabela S2 - Deslocamentos químicos calculados de RMN de <sup>1</sup> H [GIAO- mPW1PW91/6-31G(d)-PCM//B3LYP/6-31G(d)] (em ppm), obtidos para os 4 diastereoisômeros do composto <b>1</b> , e dados experimentais do produto natural isolado. .....	144
Tabela S3 – Deslocamentos químicos calculados de RMN de <sup>13</sup> C [GIAO- mPW1PW91/6-31G(d)-PCM//B3LYP/6-31G(d)] (em ppm), obtidos para os 4 diastereoisômeros do composto <b>1</b> , e dados experimentais do produto natural isolado. .....	145
Tabela S4 - Probabilidades de DP4+ obtidas pela correlação dos deslocamentos químicos de RMN de <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C dos 4 possíveis diastereoisômeros do composto <b>2</b> com os dados experimentais de RMN do produto natural isolado. ....	147
Tabela S5 – Cálculos de deslocamentos químicos de <sup>1</sup> H [GIAO-mPW1PW91/6- 31G(d)-PCM//B3LYP/6-31G(d)] (em ppm), obtidos para os 4 diastereoisômeros do composto <b>2</b> , e dados experimentais do produto natural isolado.....	147
Tabela S6 - Cálculos de deslocamentos químicos de <sup>13</sup> C [GIAO-mPW1PW91/6- 31G(d)-PCM//B3LYP/6-31G(d)] (em ppm), obtidos para os 4 diastereoisômeros do composto <b>2</b> , e dados experimentais do produto natural isolado.....	148
Tabela S7 - Probabilidades de DP4+ obtidas pela correlação dos deslocamentos químicos calculados de RMN de <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C de ambos os estereoisômeros do composto <b>3</b> com os dados experimentais de RMN do produto natural isolado. ....	149
Tabela S8 – Cálculos de deslocamentos químicos de RMN de <sup>1</sup> H [GIAO- mPW1PW91/6-31G(d)-PCM//B3LYP/6-31G(d)] (em ppm), obtidos para ambos os diastereoisômeros do composto <b>3</b> e dados experimentais do produto natural isolado. .....	149

Tabela S9 – Cálculos de deslocamentos químicos de RMN de  $^{13}\text{C}$  [GIAO-mPW1PW91/6-31G(d)-PCM//B3LYP/6-31G(d)] (em ppm), obtidos para ambos os diastereoisômeros do composto **3** e dados experimentais do produto natural isolado.

.....150

Tabela S10 - Probabilidades de DP4+ obtidas pela correlação dos deslocamentos químicos calculados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  dos 4 possíveis diastereoisômeros do composto **4** com os dados experimentais de RMN do produto natural isolado. ....151

Tabela S11 – Cálculos de deslocamentos químicos de RMN de  $^1\text{H}$  [GIAO-mPW1PW91/6-31G(d)-PCM//B3LYP/6-31G(d)] (em ppm), obtidos para os 4 diastereoisômeros do composto **4**, e dados experimentais do produto natural isolado.

.....151

Tabela S12 - Cálculos de deslocamentos químicos de RMN de  $^{13}\text{C}$  [GIAO-mPW1PW91/6-31G(d)-PCM//B3LYP/6-31G(d)] (em ppm), obtidos para os 4 diastereoisômeros do composto **4**, e dados experimentais do produto natural isolado.

.....152

Tabela S13 - Probabilidades de DP4+ obtidas pela correlação dos deslocamentos químicos calculados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de ambos os diastereoisômeros do composto **5** com os dados experimentais de RMN do produto natural isolado .....154

Tabela S14 - Deslocamentos químicos de RMN de  $^1\text{H}$  calculados [GIAO-mPW1PW91/6-31G(d)-PCM//B3LYP/6-31G(d)] (em ppm), obtidos para ambos os diastereoisômeros do composto **5** e dados experimentais do produto natural isolado.

.....154

Tabela S15 - Deslocamentos químicos de RMN de  $^{13}\text{C}$  calculados [GIAO-mPW1PW91/6-31G(d)-PCM//B3LYP/6-31G(d)] (em ppm), obtidos para ambos os diastereoisômeros do composto **5** e dados experimentais do produto natural isolado.

.....155

## Dados espectroscópicos do composto 1

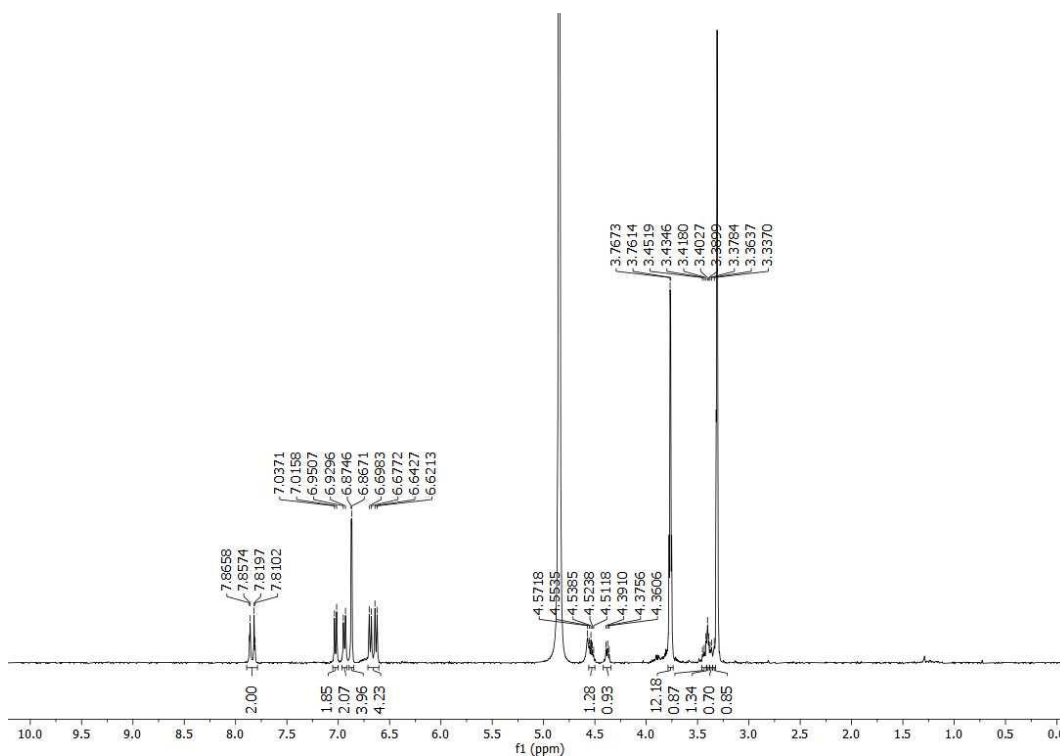


Figura S1 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto 1 (400 MHz, MeOD).

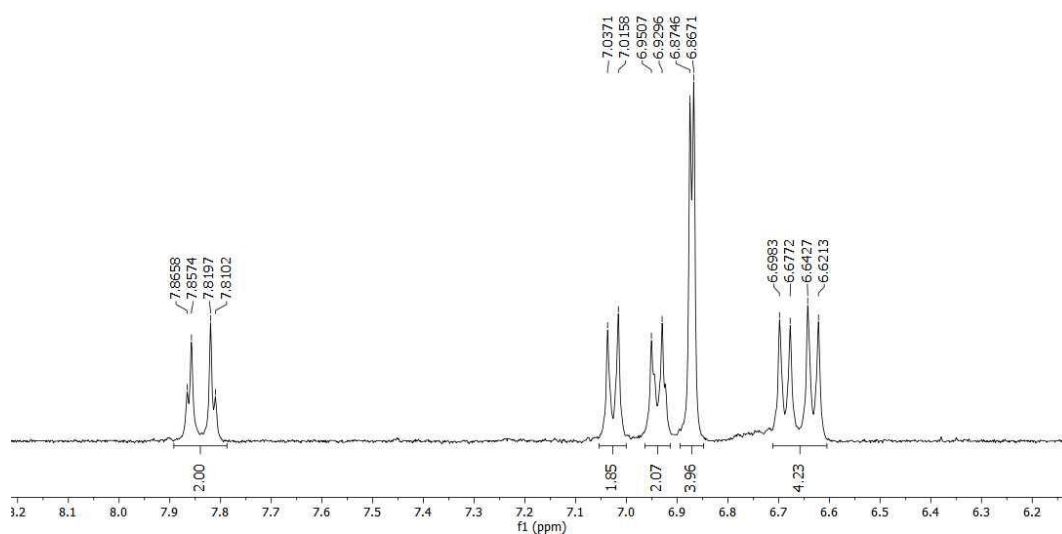


Figura S2 - Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto 1 (400 MHz, MeOD).



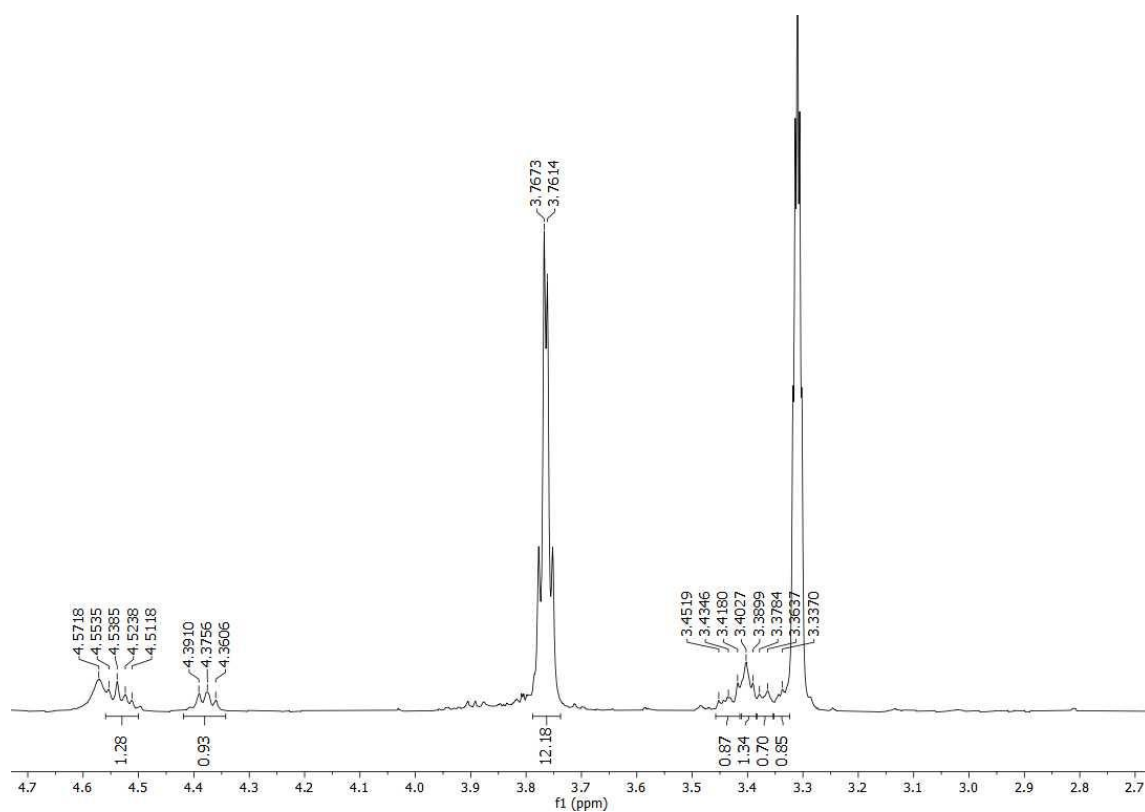


Figura S3 - Expansão do espectro de RMN de <sup>1</sup>H do composto 1 (400 MHz, MeOD).

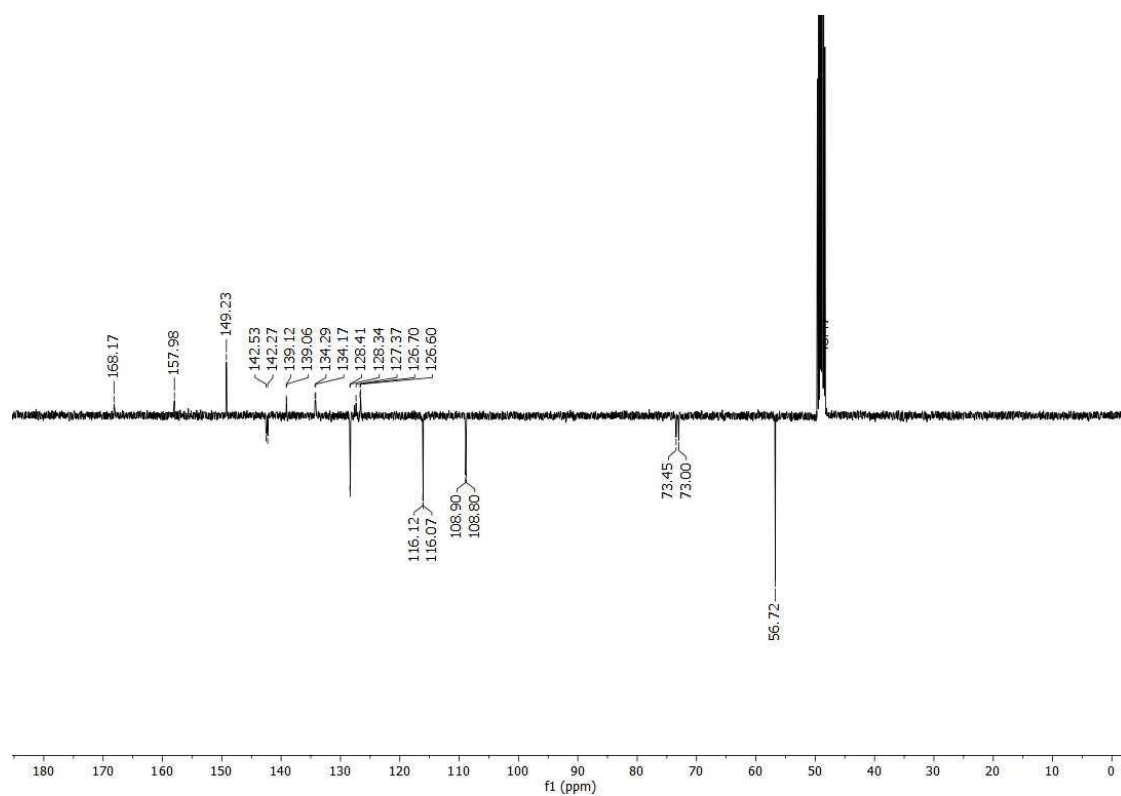


Figura S4 – Espectro de RMN de <sup>13</sup>C-APT do composto 1 (100 MHz, MeOD).

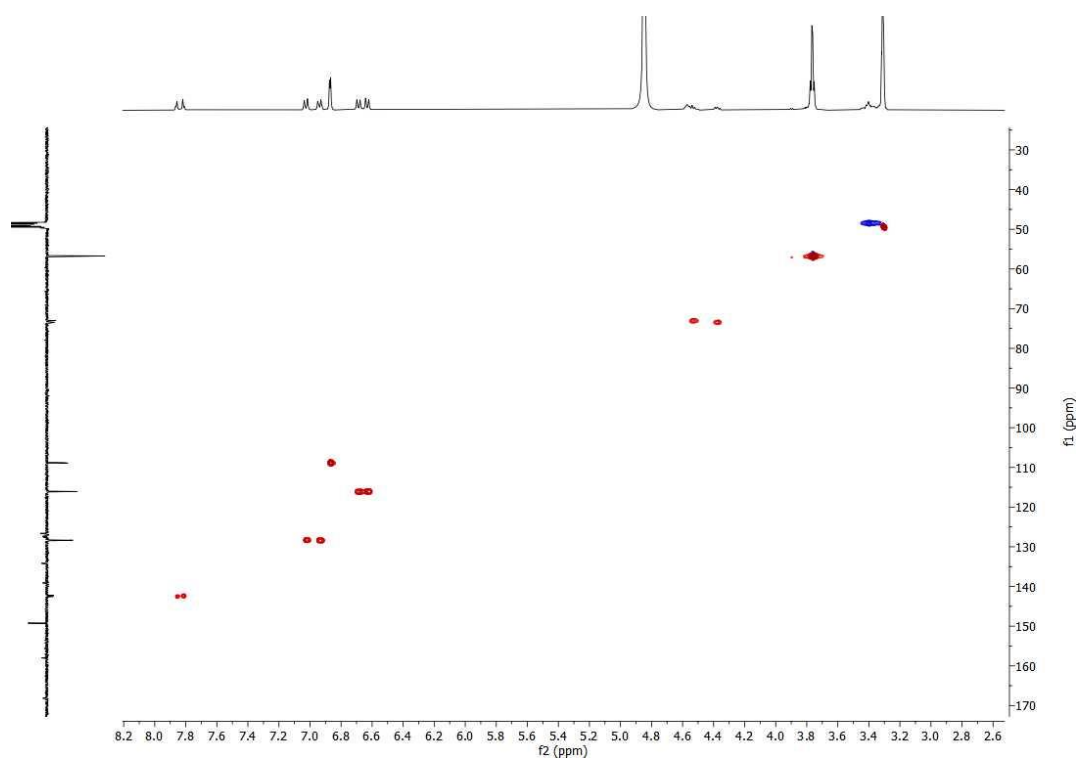


Figura S5 – Espectro de HSQC do composto 1 (400/100 MHz, MeOD).

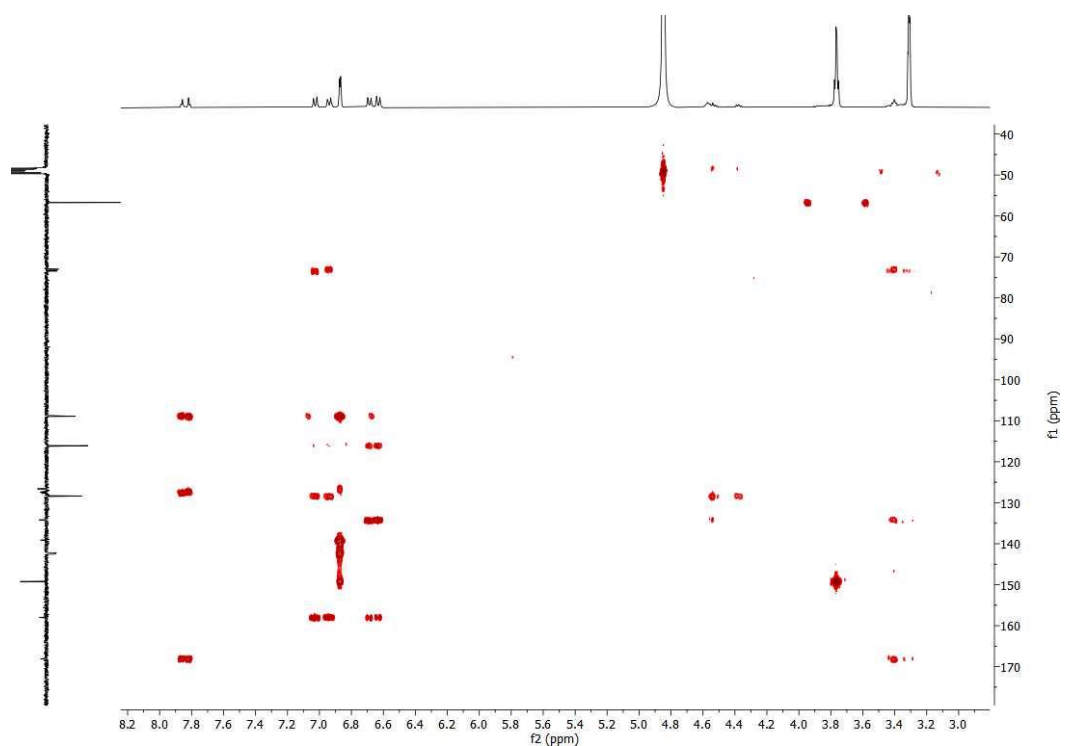


Figura S6 - Espectro de HMBC do composto 1 (400/100 MHz, MeOD).

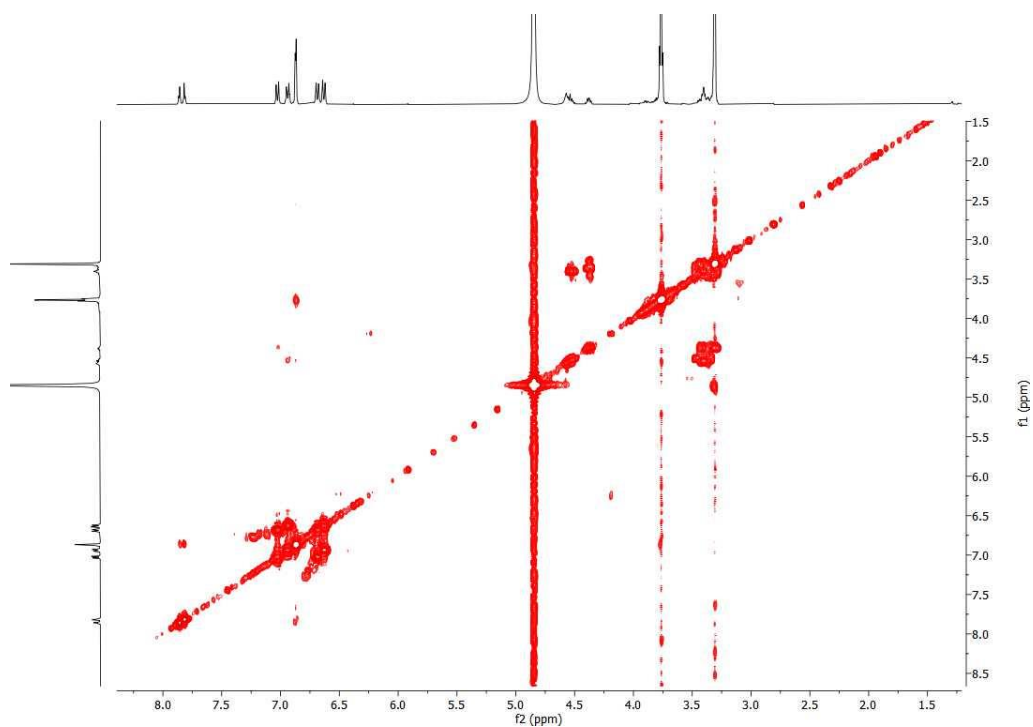


Figura S7 – Espectro de COSY do composto 1 (400 MHz, MeOD).

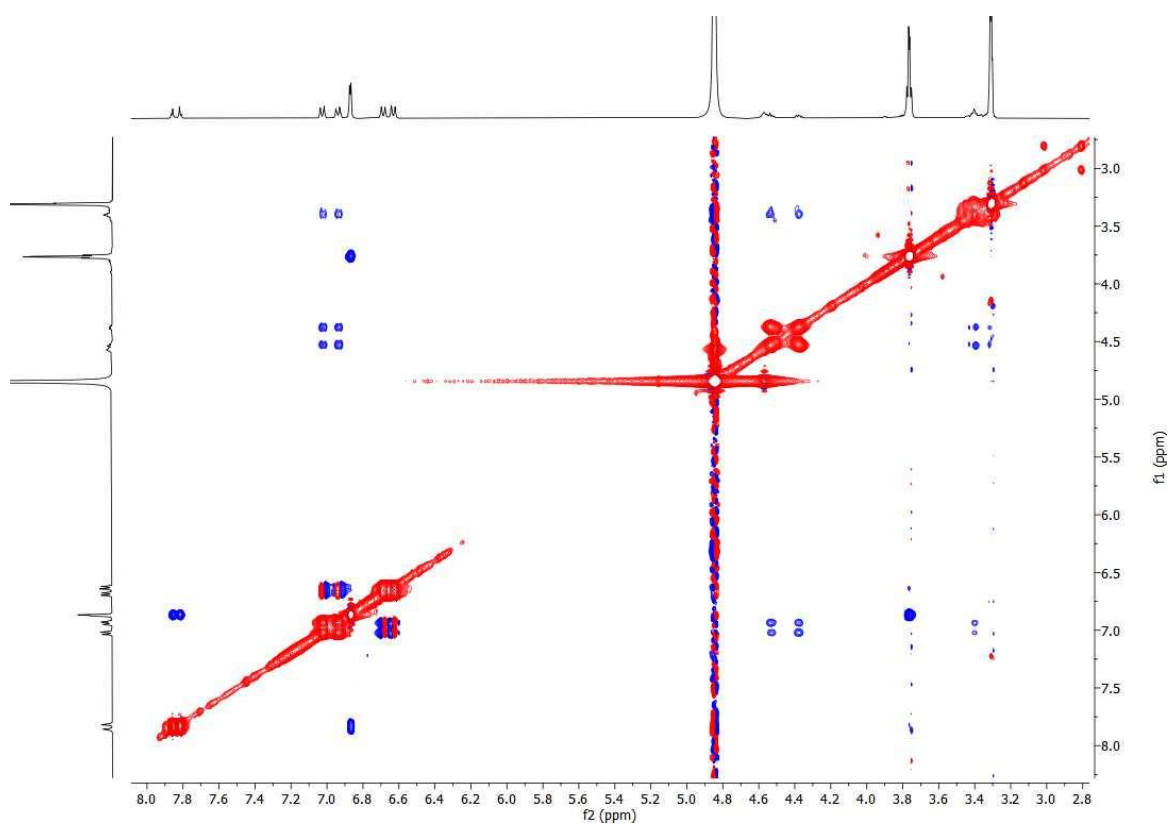


Figura S8 - Espectro de NOESY do composto 1 (400 MHz, MeOD).

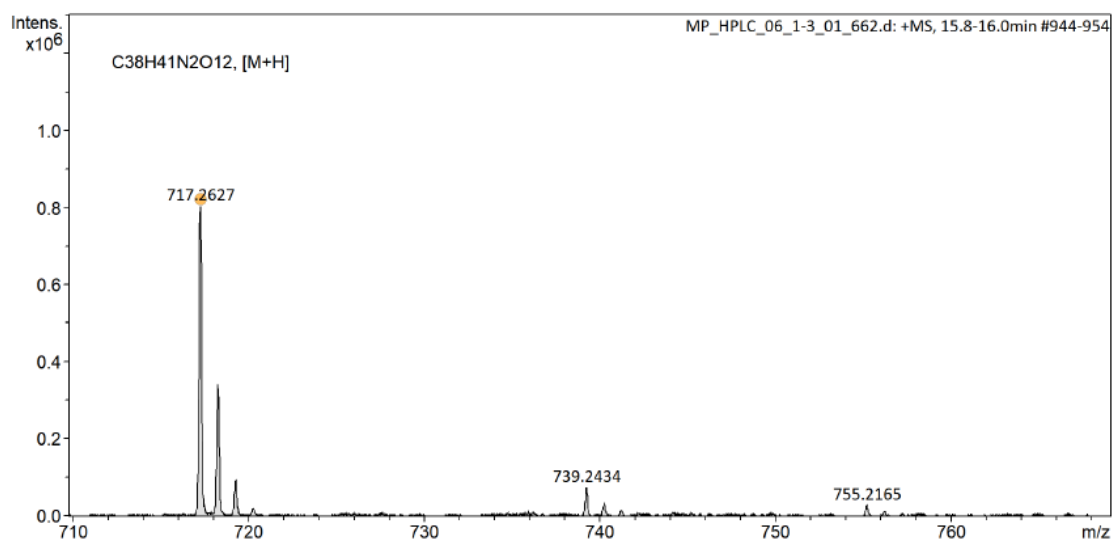


Figura S9 – Espectro de ISE-EMAR do composto **1** ( $[M + H]^+$ , modo positivo).

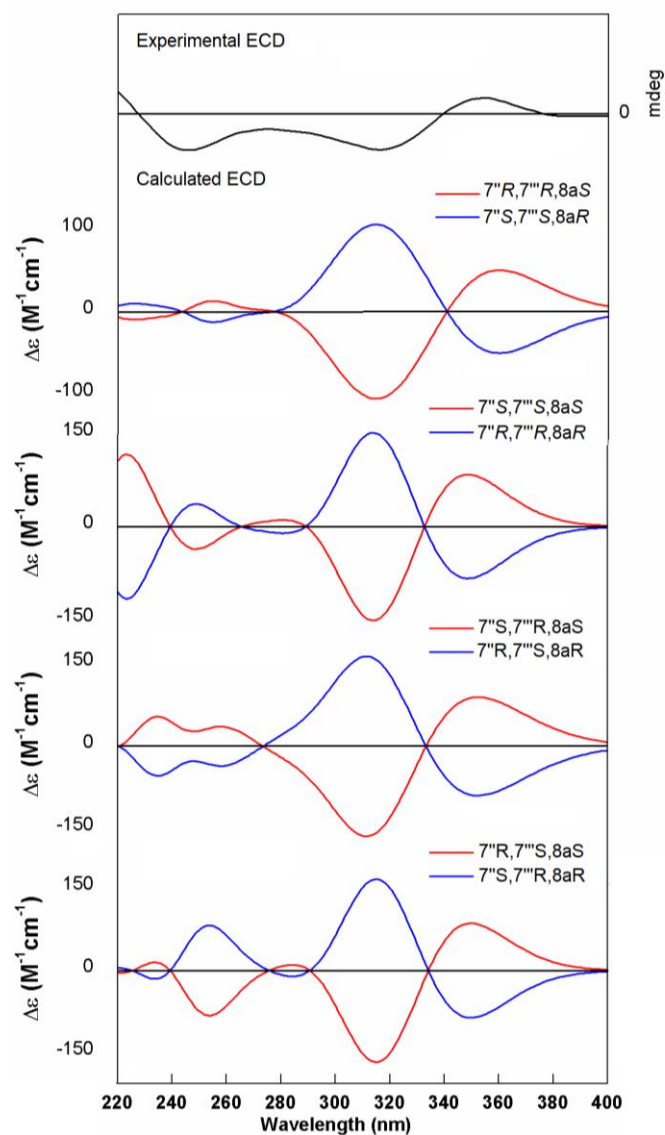


Figura S10 – Espectro de ECD Experimental (superior) e Calculado (inferior) de todos os possíveis estereoisômeros do composto **1**. Atropisômeros aS foram marcados em vermelho e atropisômeros aR foram marcados em azul.

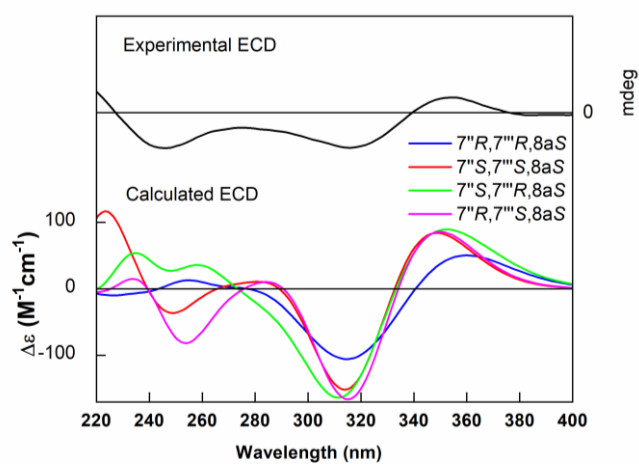


Figura S11 – Espectro de ECD Experimental (superior) e calculado (inferior) dos atropoisômeros aS do composto **1**.

## Dados espectroscópicos do composto **2**

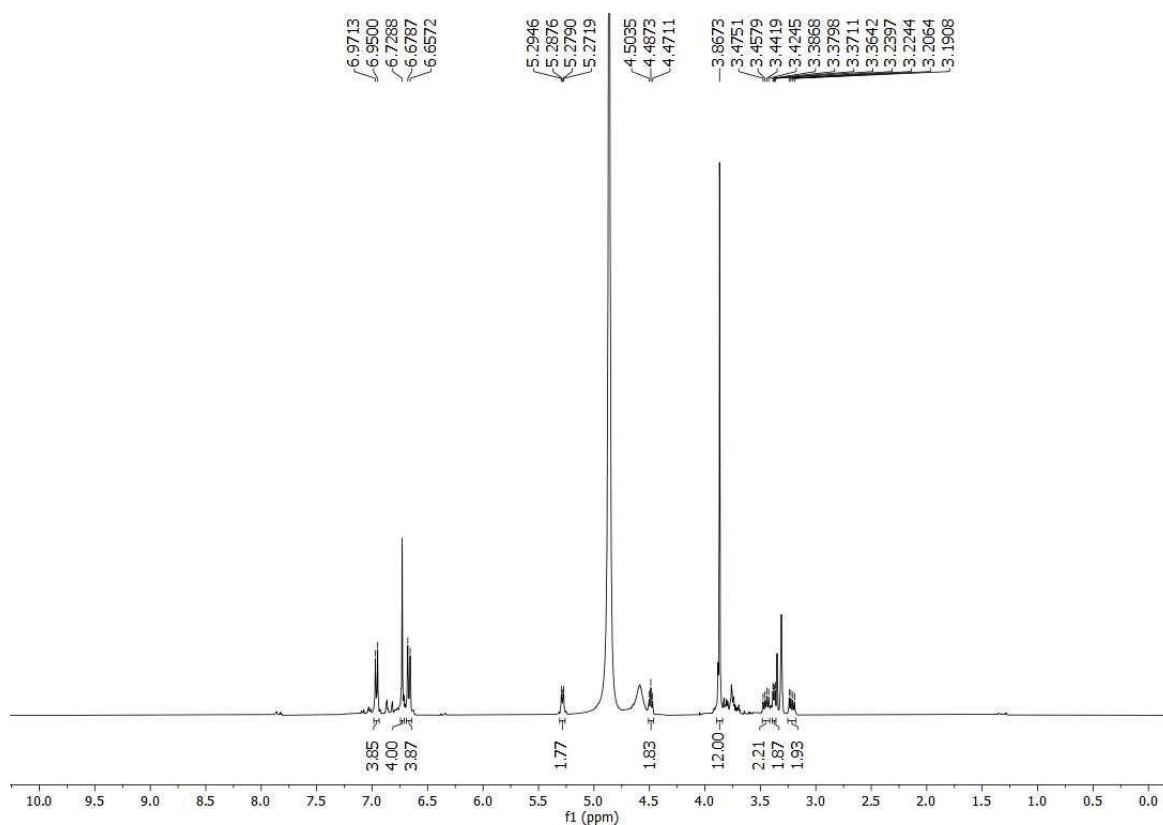


Figura S12 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto **2** (400 MHz, MeOD).

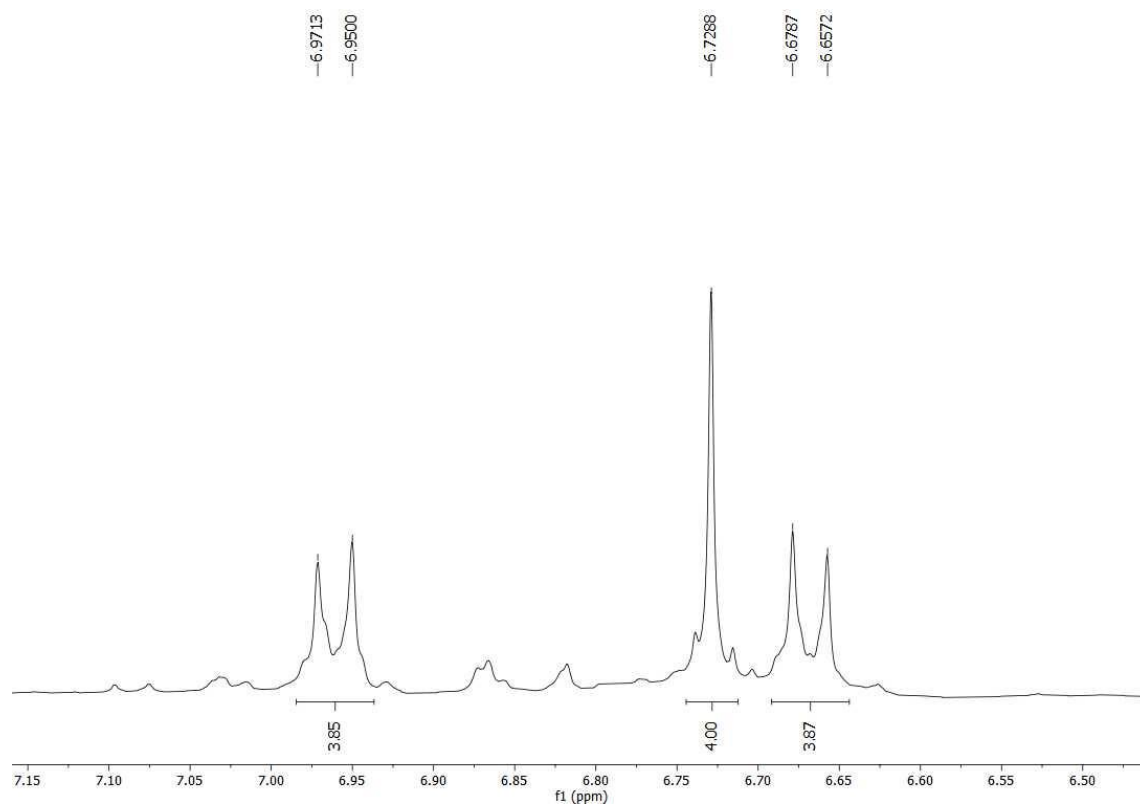


Figura S13 – Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto **2** (400 MHz, MeOD).

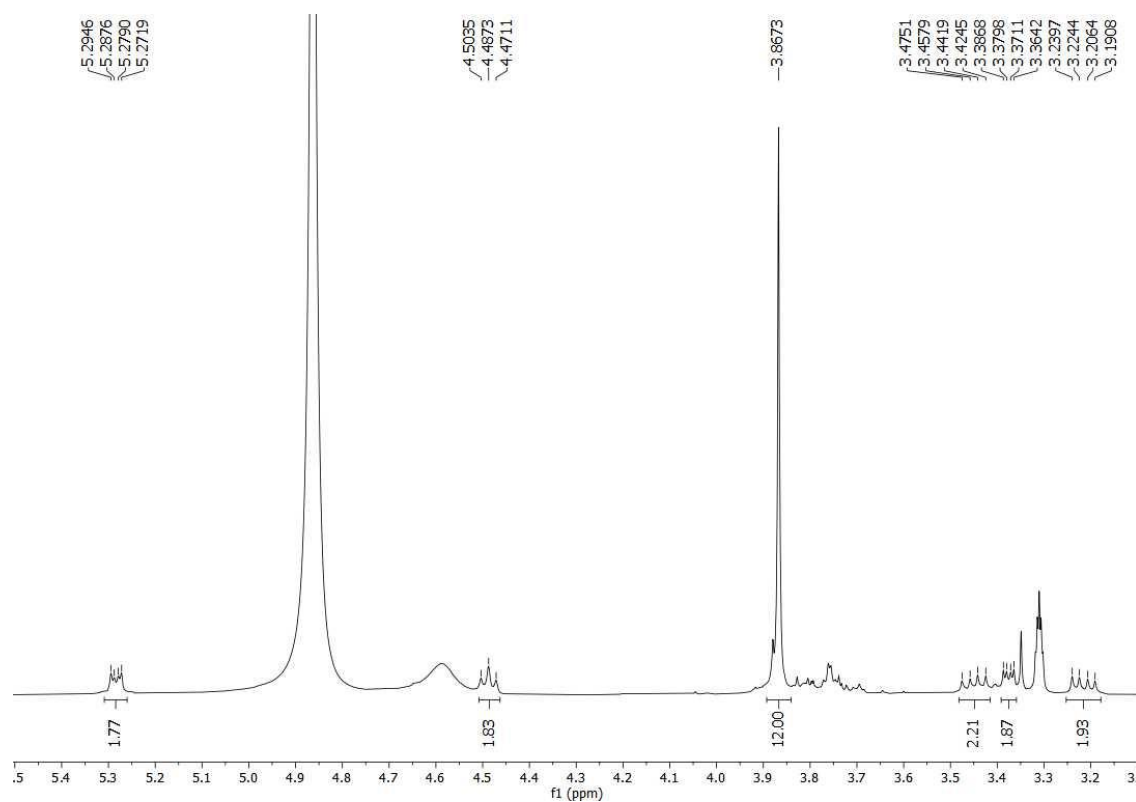


Figura S14 - Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto **2** (400 MHz, MeOD).

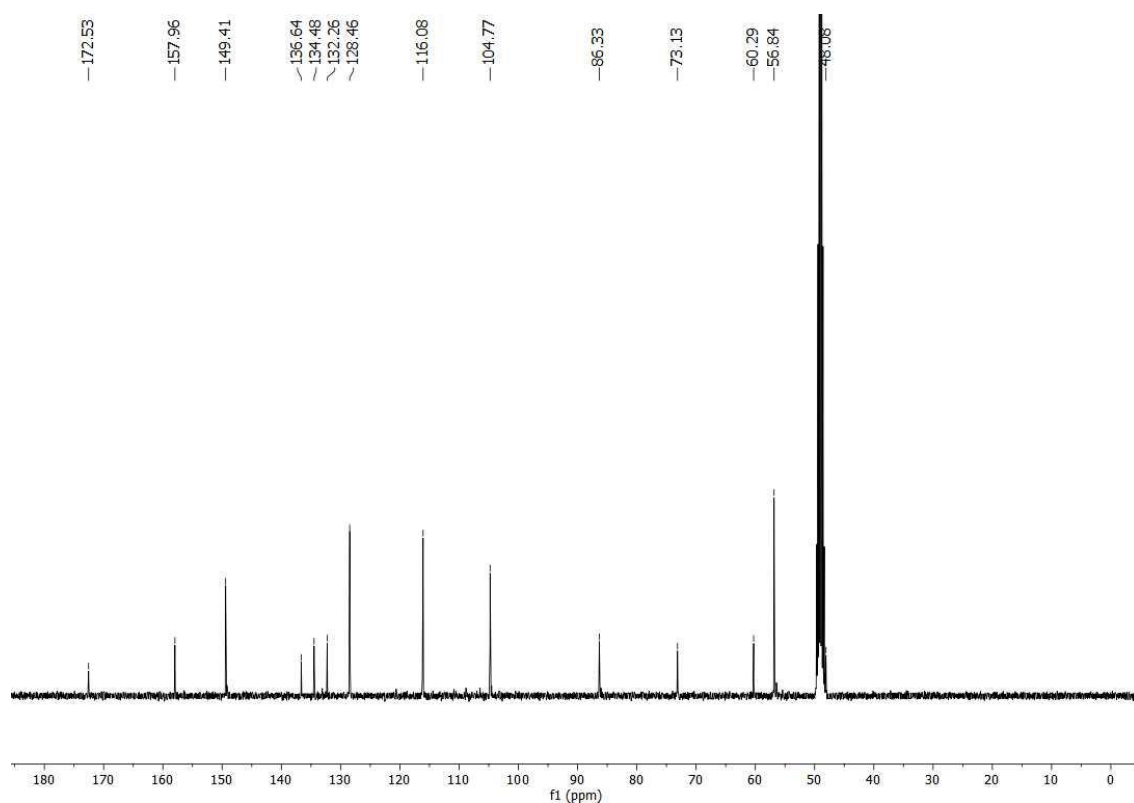


Figura S15 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do composto **2** (100 MHz, MeOD).

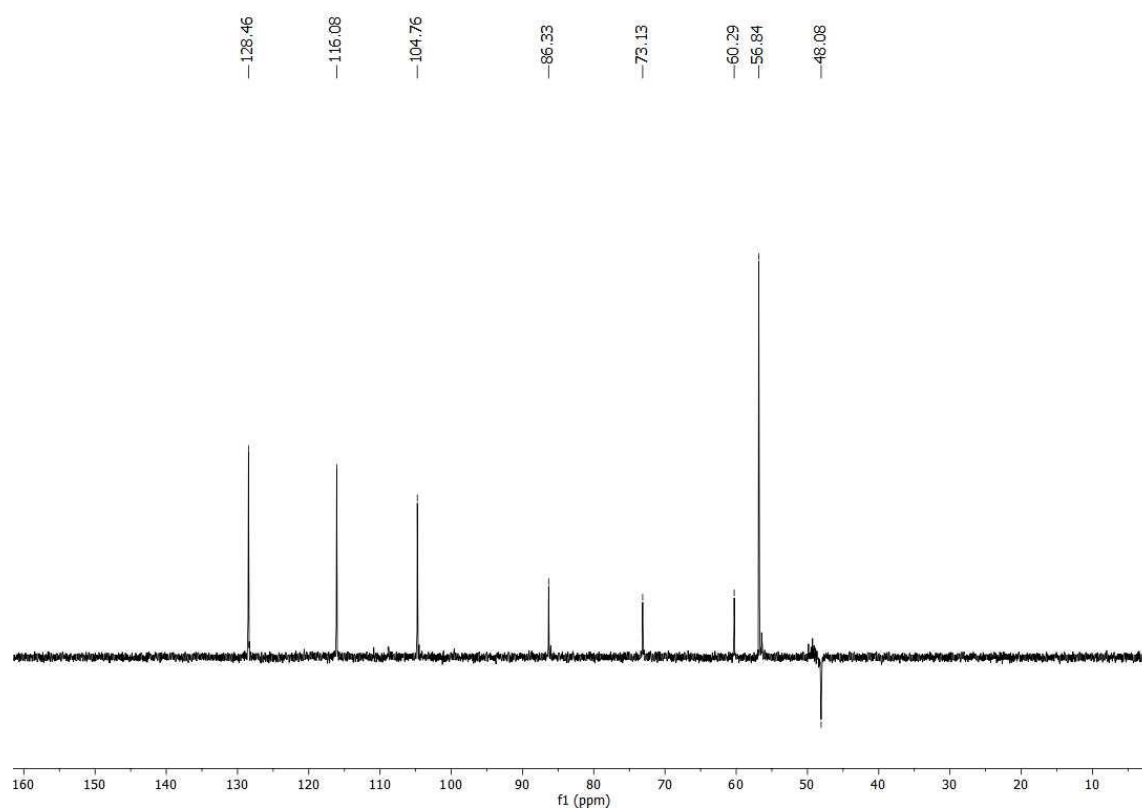


Figura S16 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ -DEPT135 do composto **2** (100 MHz, MeOD).



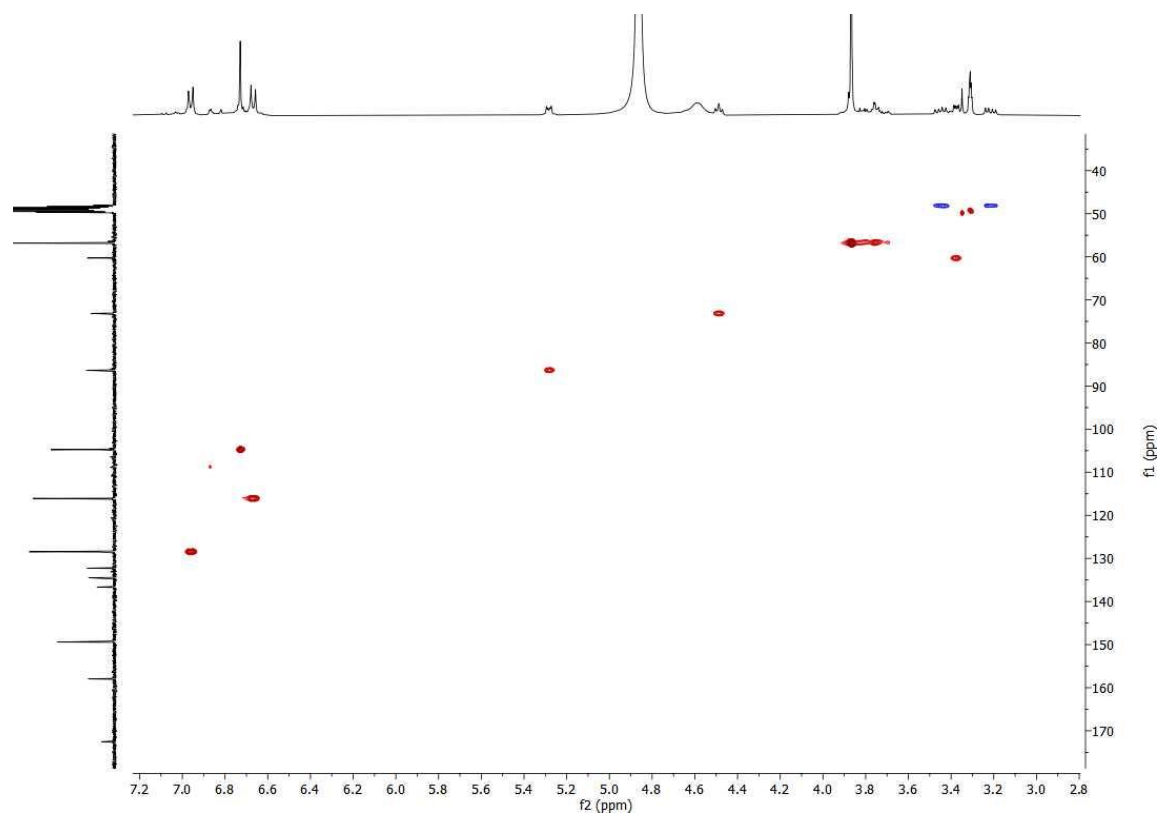


Figura S17 – Espectro de HSQC do composto 2 (400/100 MHz, MeOD).

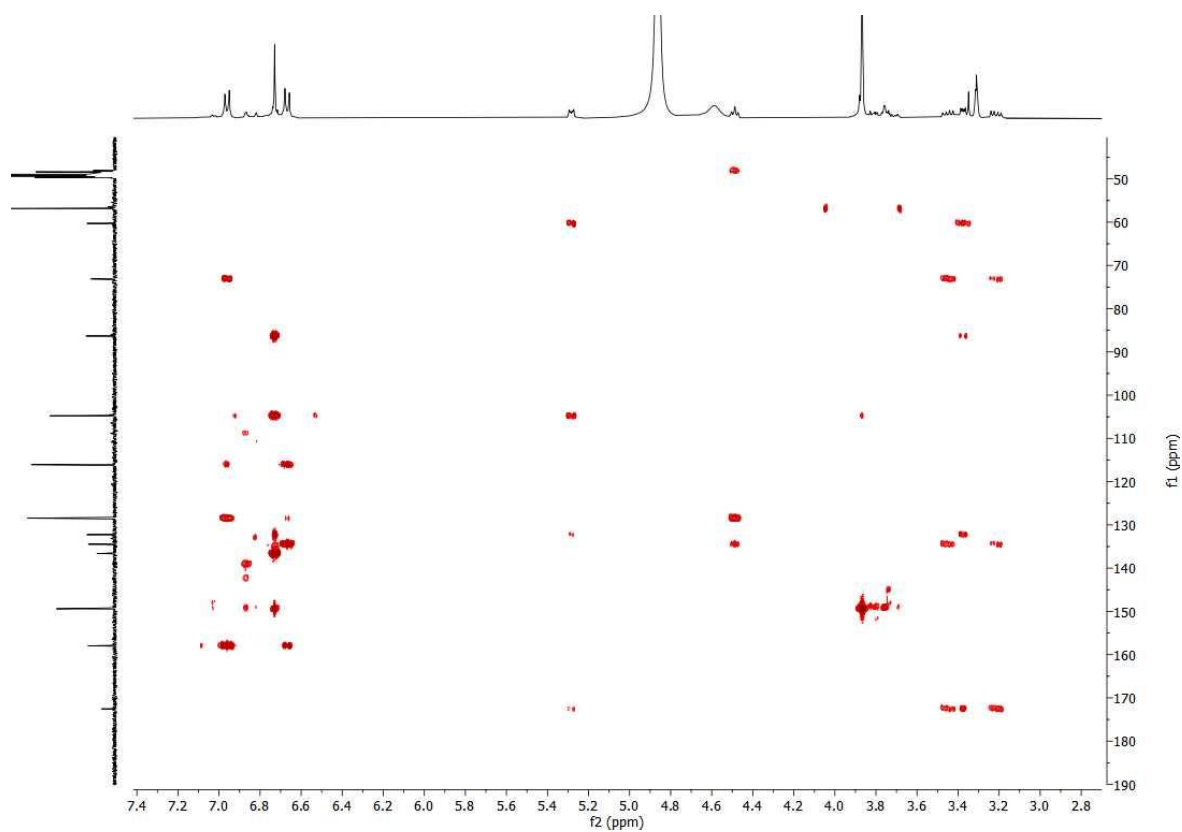


Figura S18 - Espectro de HMBC do composto 2 (400/100 MHz, MeOD).

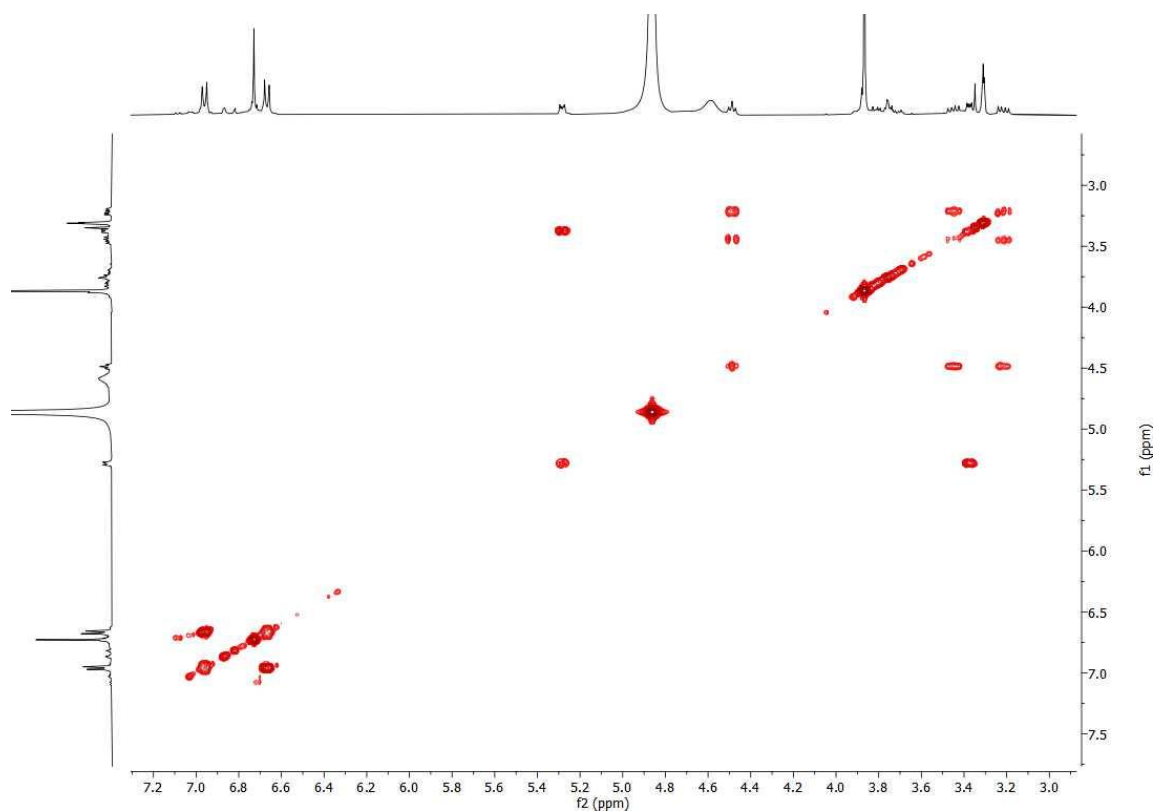


Figura S19 – Espectro de COSY do composto **2** (400 MHz, MeOD).

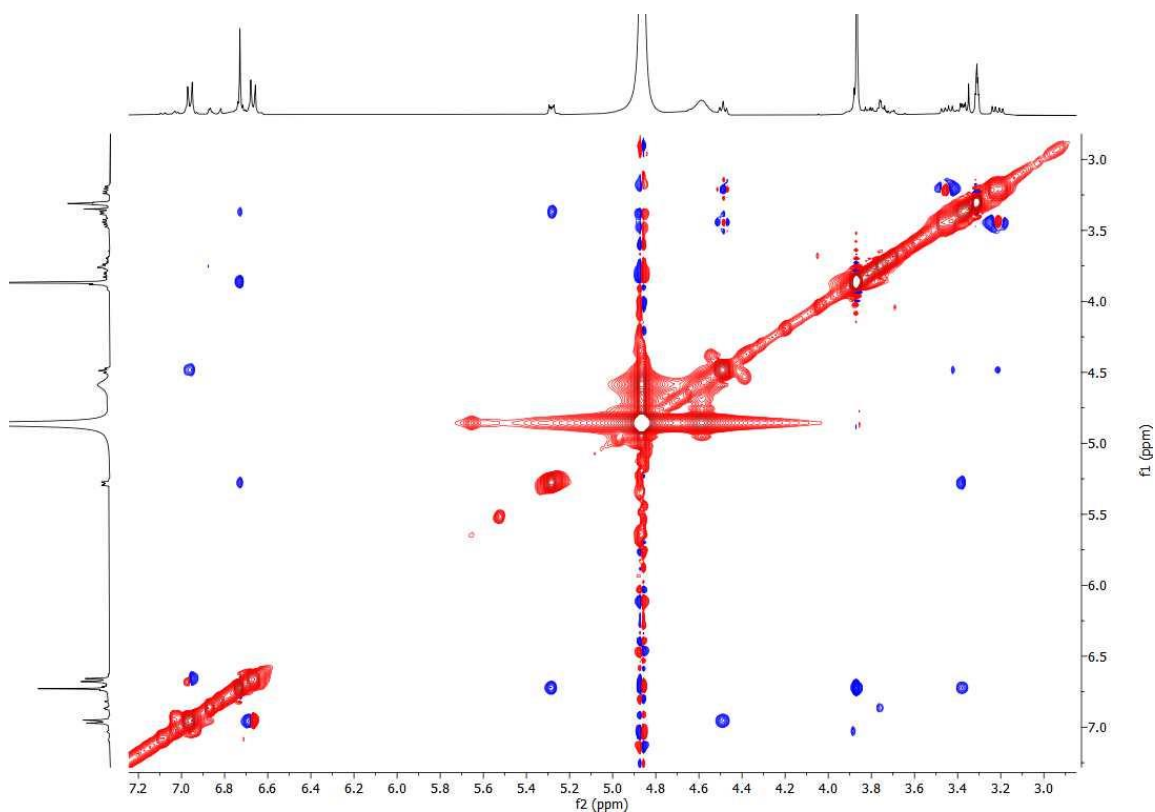


Figura S20 - Espectro de NOESY do composto **2** (400 MHz, MeOD).

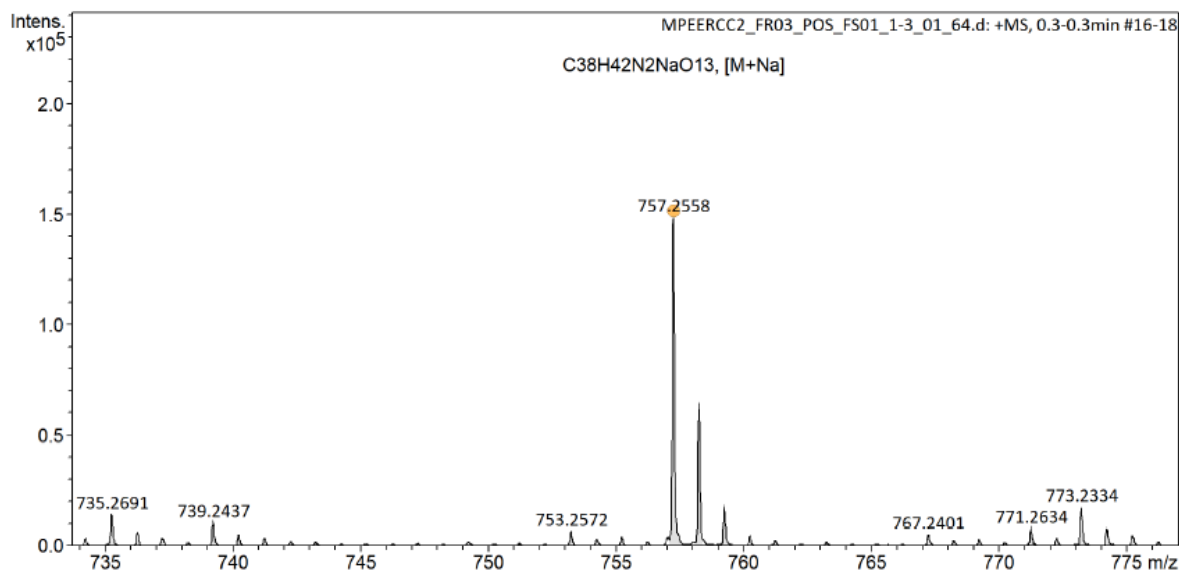


Figura S21 - Espectro de IES-EMAR do composto **2** ( $[M + Na]^+$ , modo positivo).

### Dados espectroscópicos do composto **3**

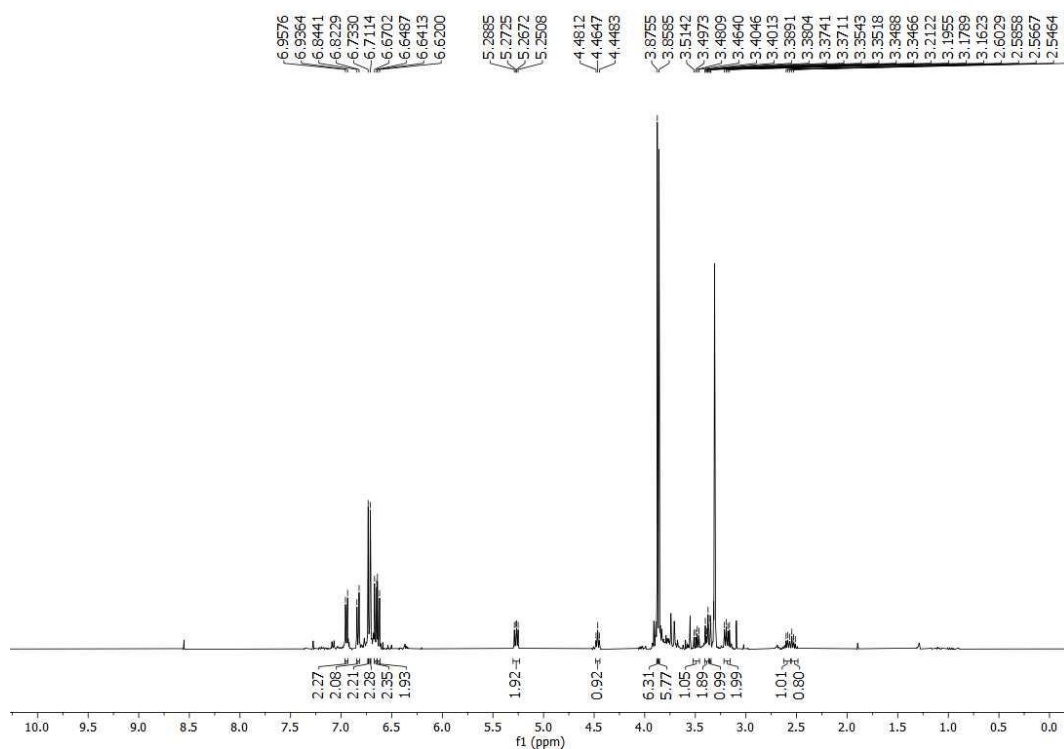


Figura S22 – Espectro de RMN de  $^1H$  do composto **3** (400 MHz, MeOD).

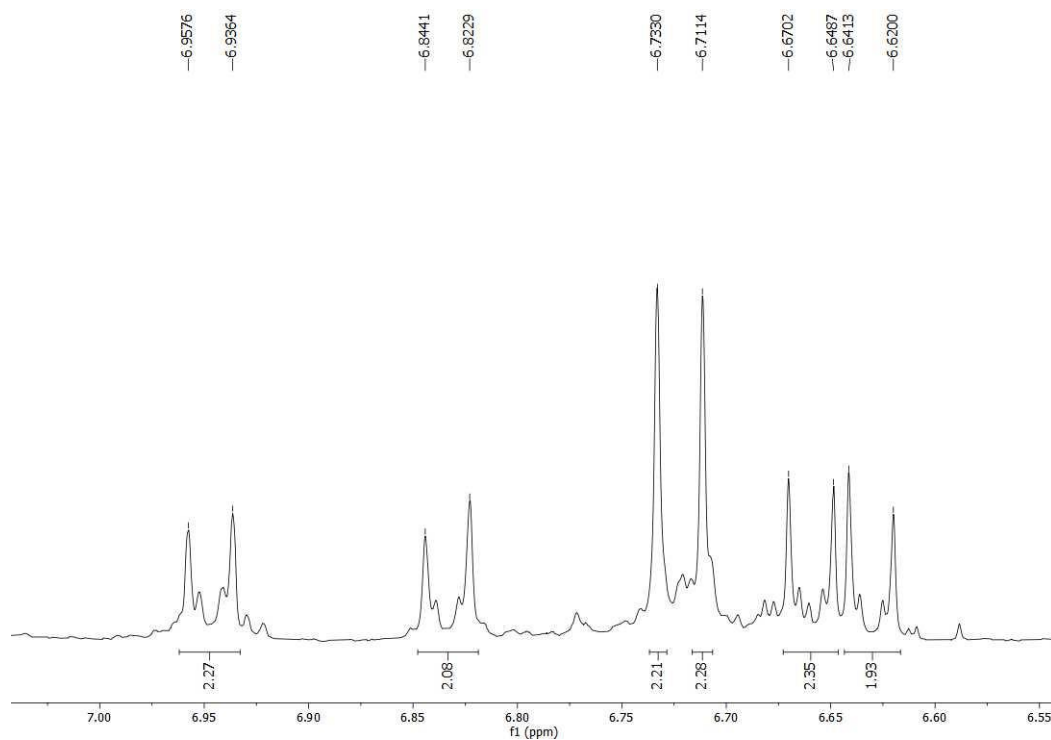


Figura S23 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto **3** (400 MHz, MeOD).

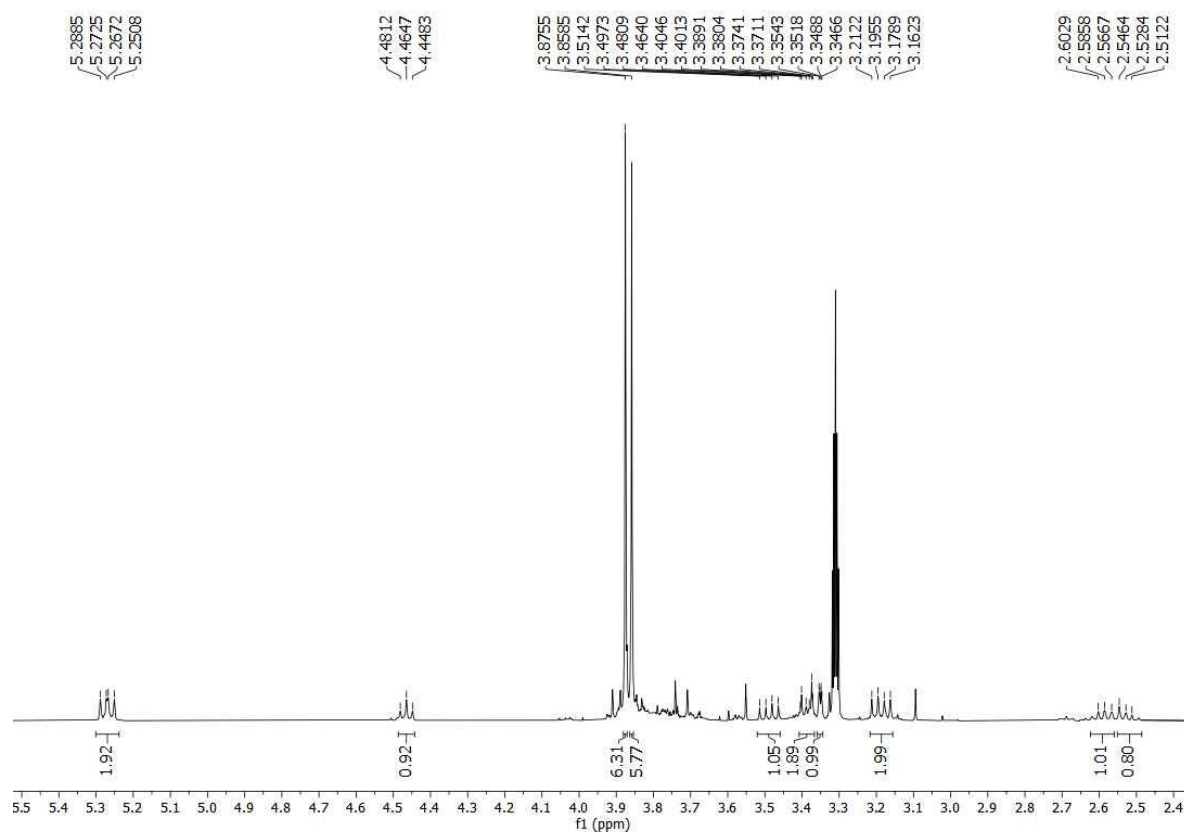


Figura S24 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto **3** (400 MHz, MeOD).

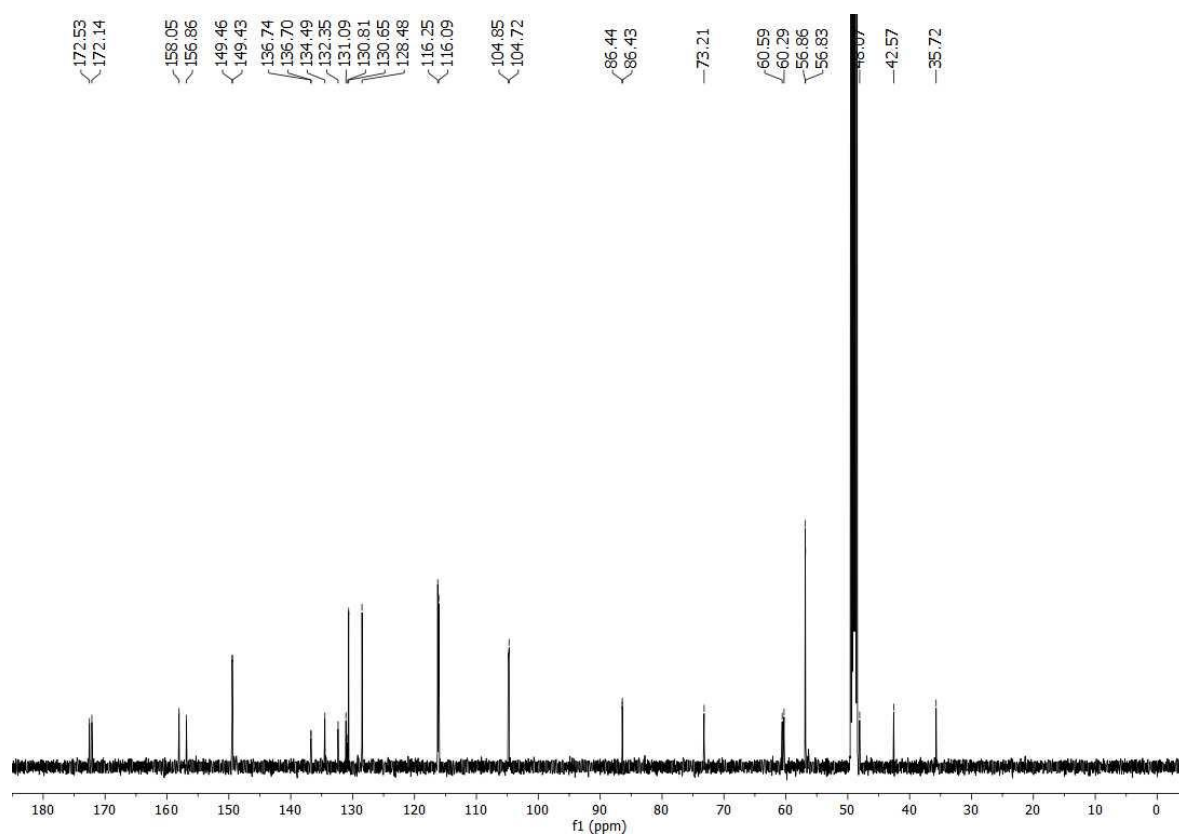


Figura S25 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ -BB do composto **3** (100 MHz, MeOD).

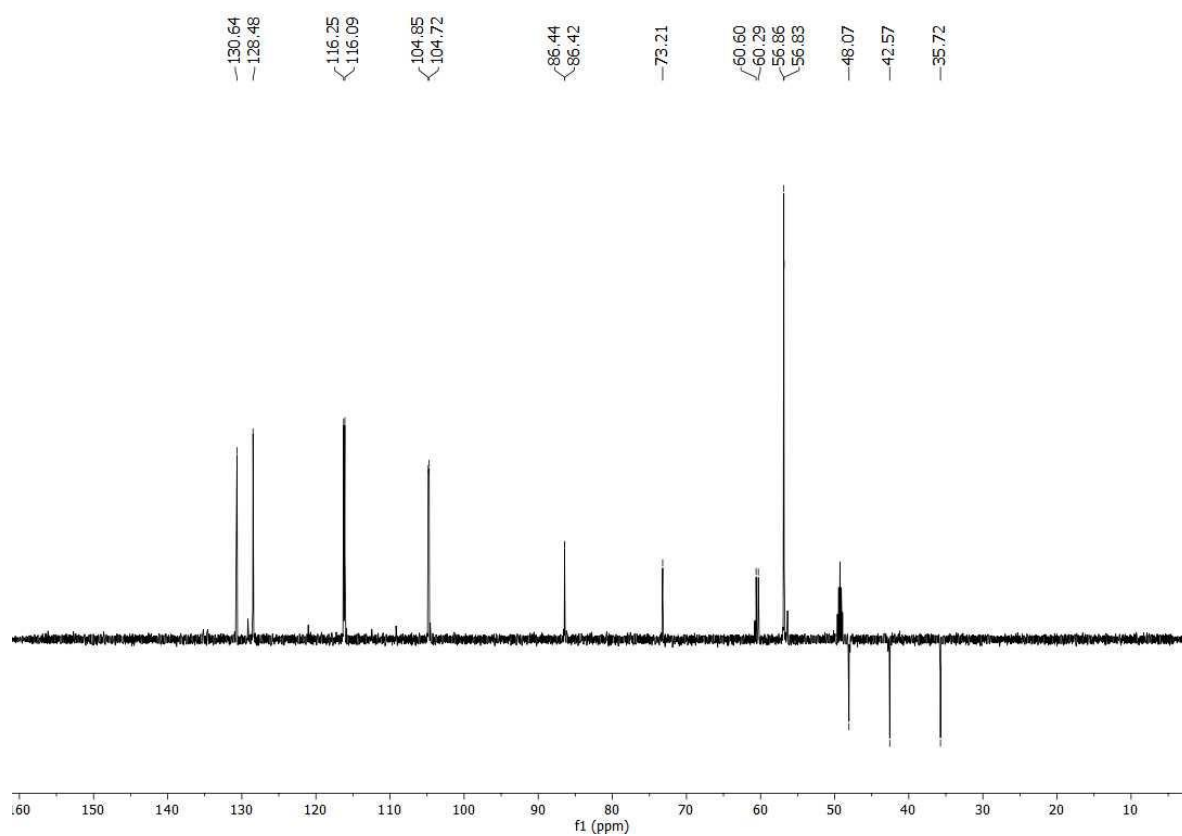


Figura S26 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ -DEPT135 do composto **3** (100 MHz, MeOD).

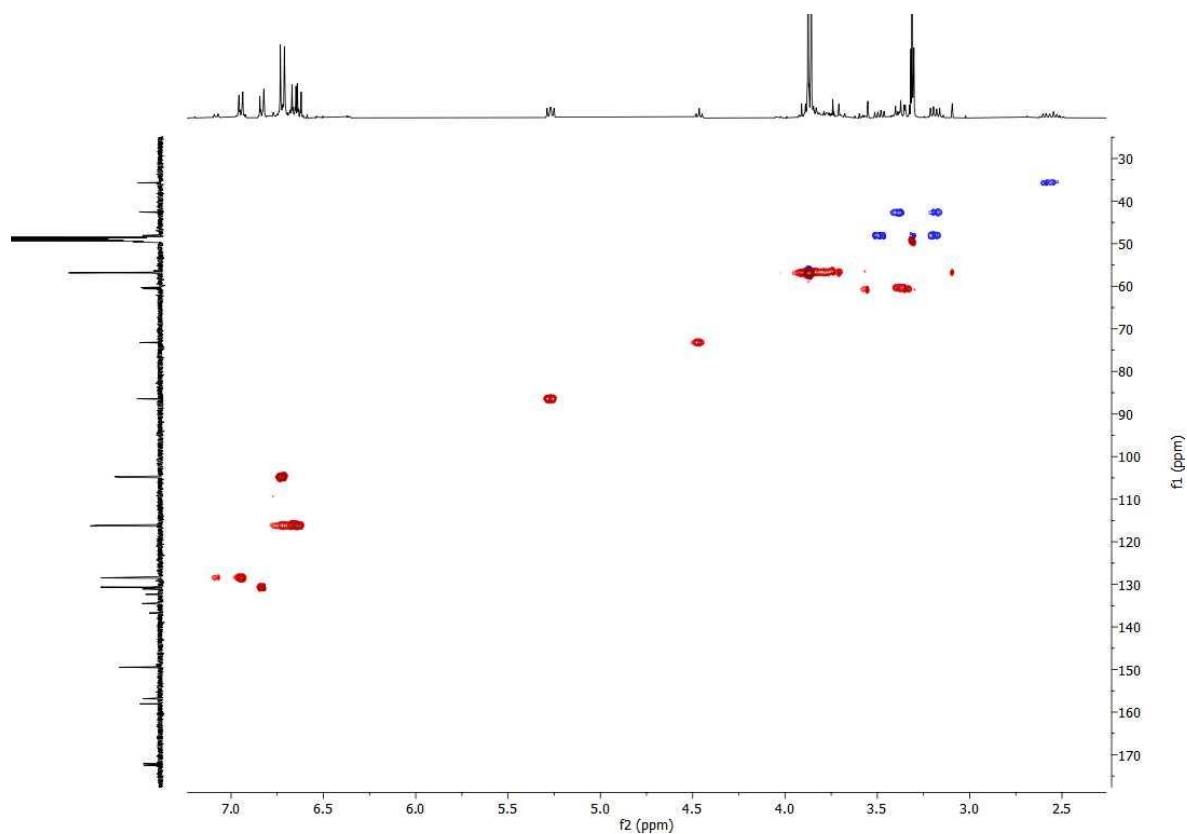


Figura S27 – Espectro de HSQC do composto **3** (400/100 MHz, MeOD).

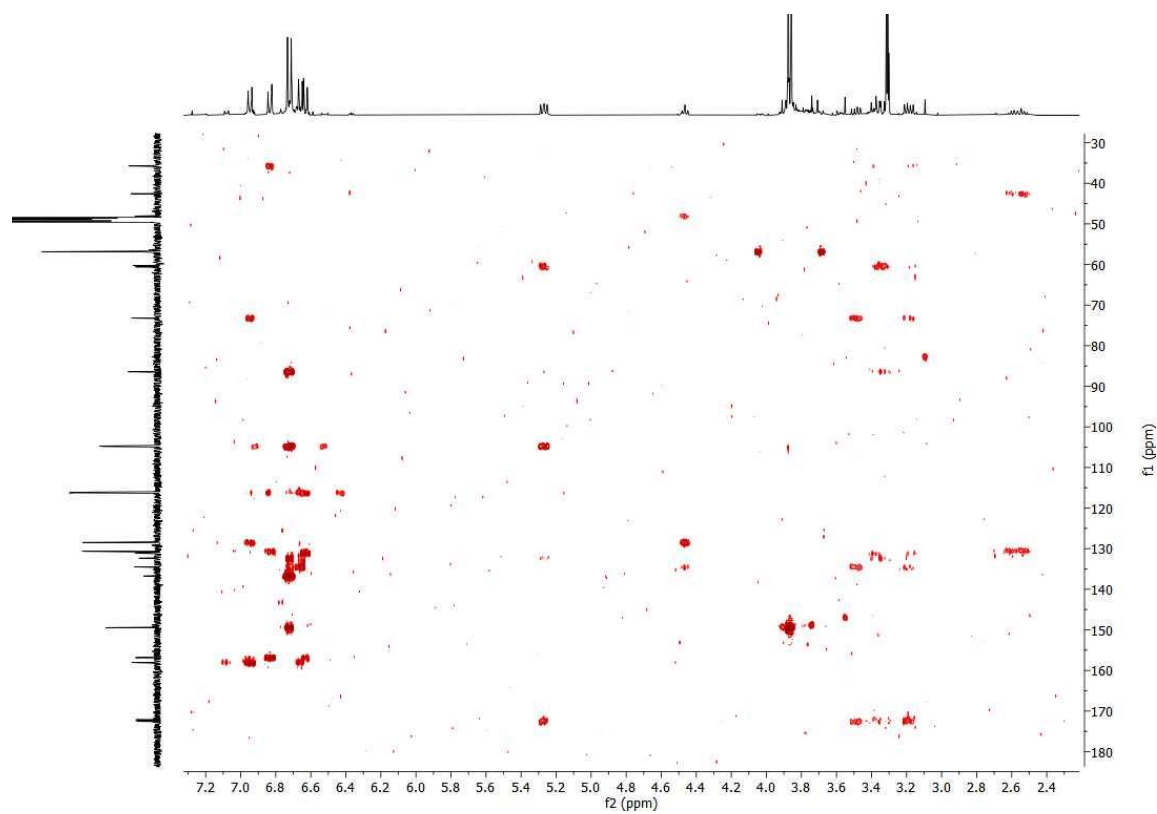


Figura S28 - Espectro de HMBC do composto **3** (400/100 MHz, MeOD).

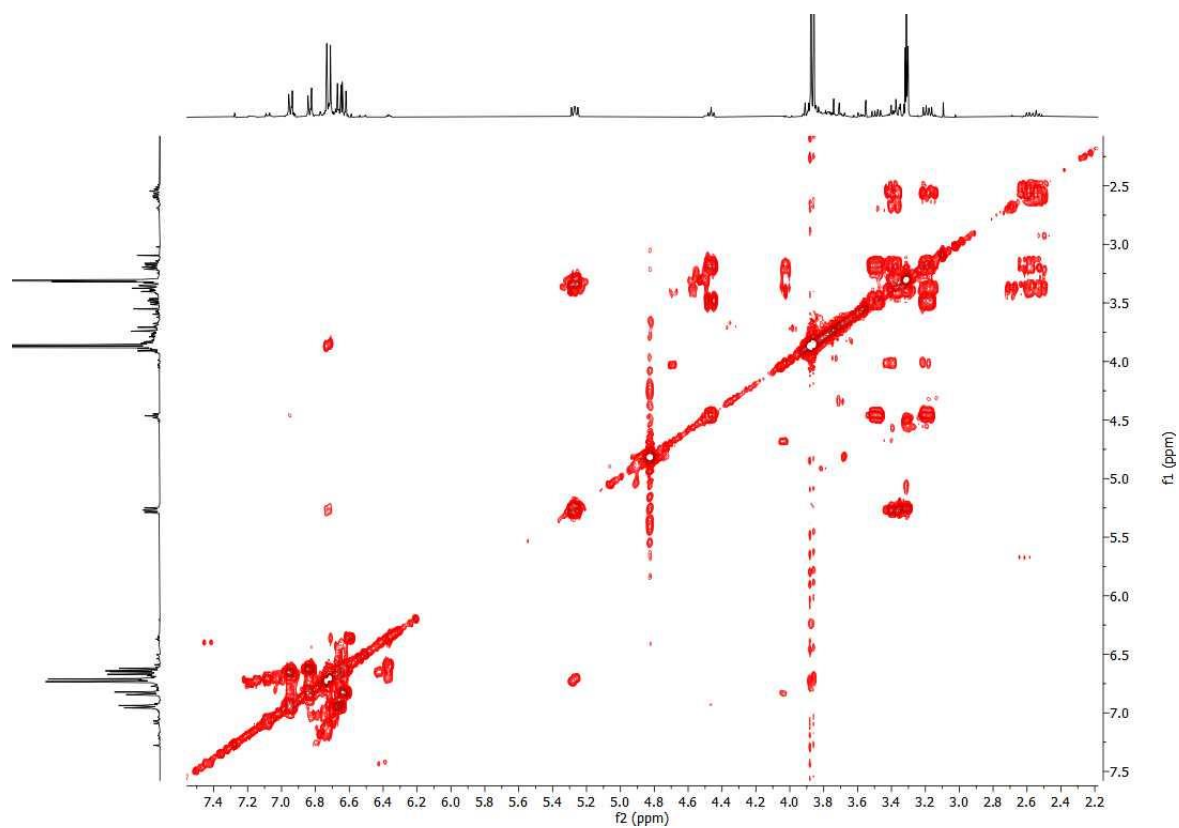


Figura S29 – Espectro de COSY do composto **3** (400 MHz, MeOD).

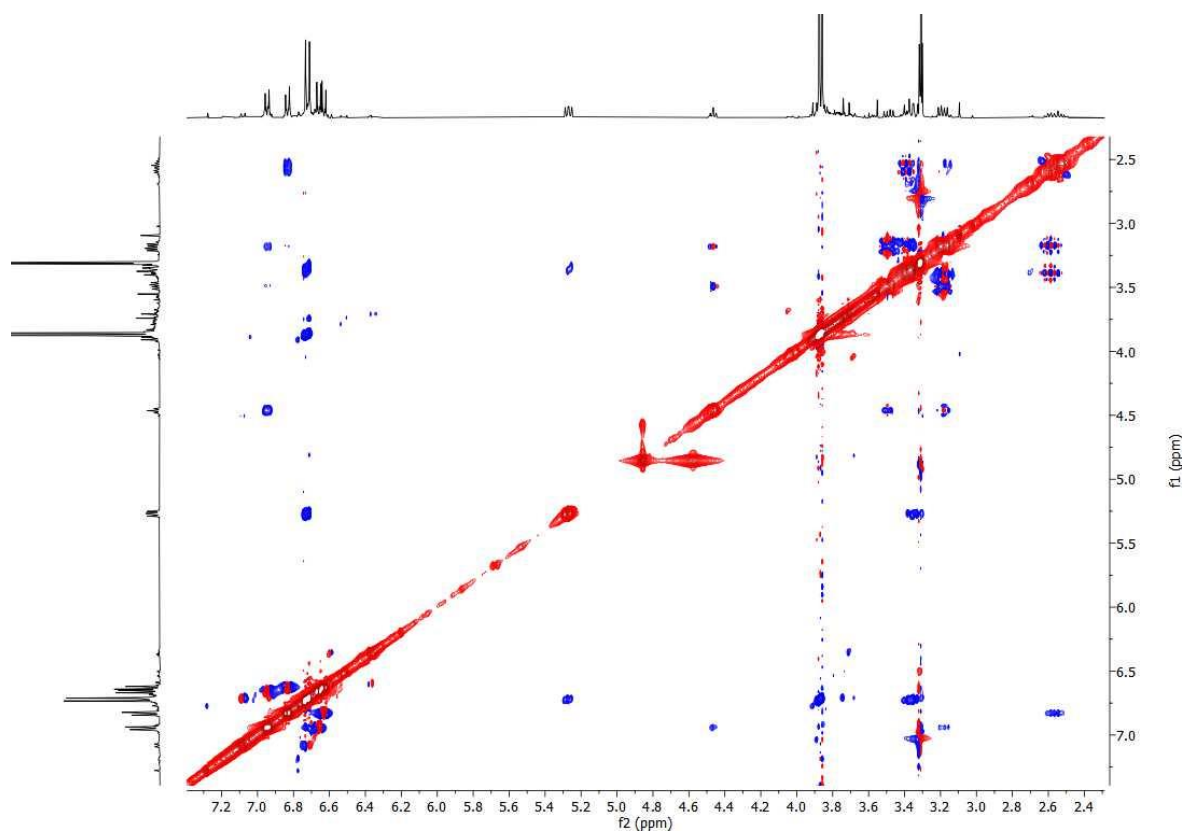


Figura S30 - Espectro de NOESY do composto **3** (400 MHz, MeOD).

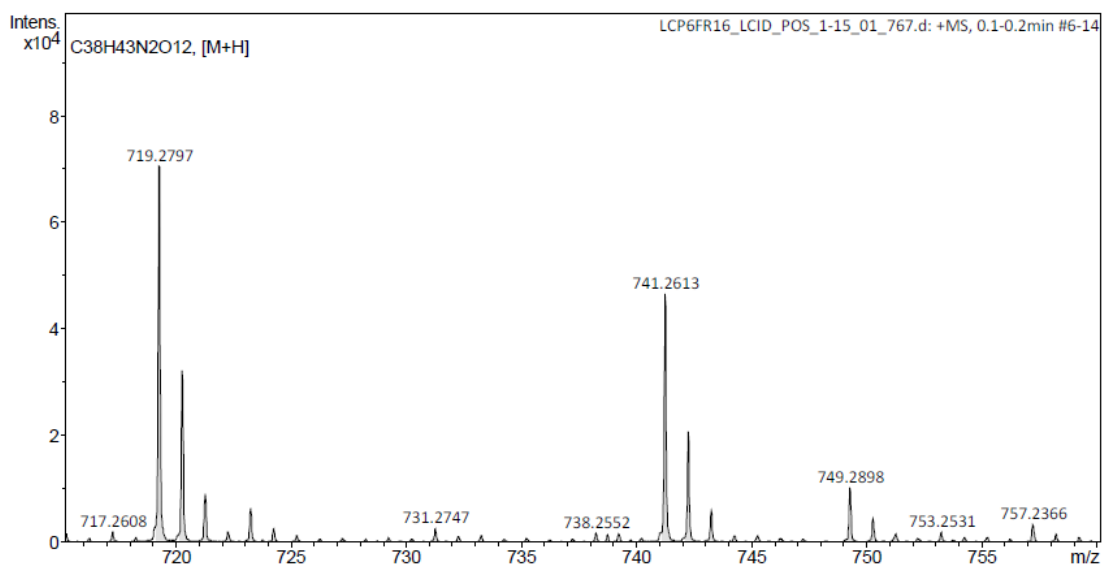


Figura S31 – Espectro de IES-EMAR do composto **3** ( $[M + H]^+$ , modo positivo).

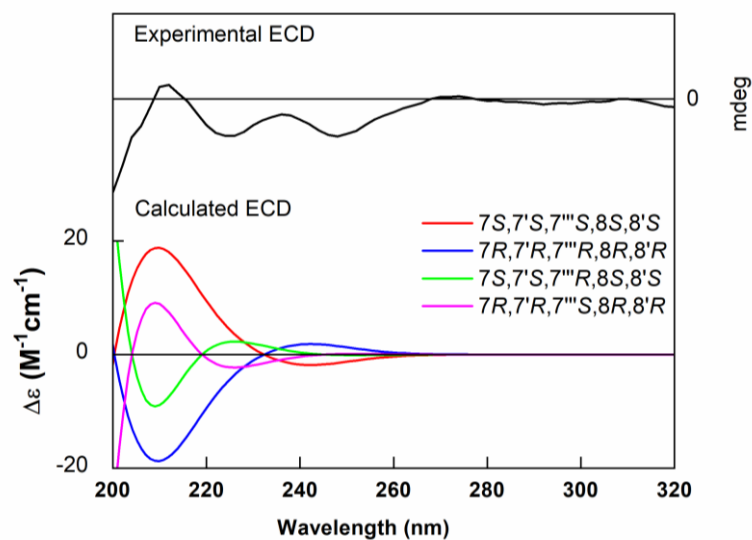


Figura S32 – Espectro de ECD Experimental (superior) e Calculado (inferior) de todos os estereoisômeros possíveis para o composto **3**.



## Dados espectroscópicos do composto 4

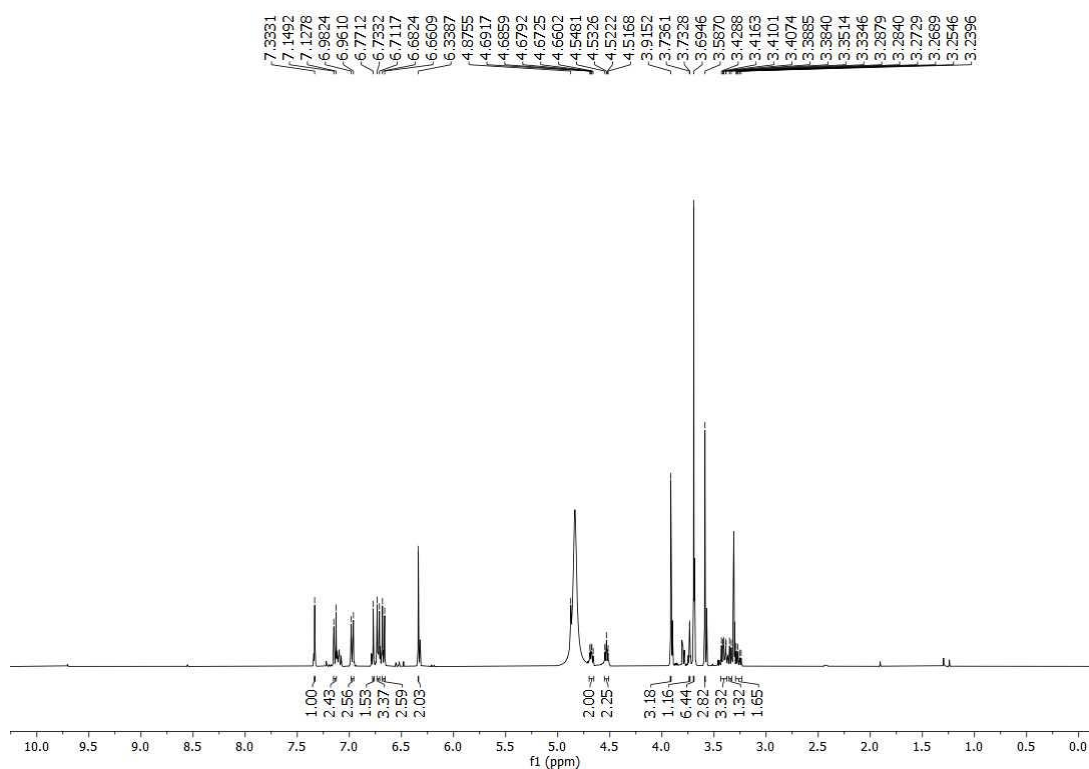


Figura S33 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto 4 (400 MHz, MeOD).

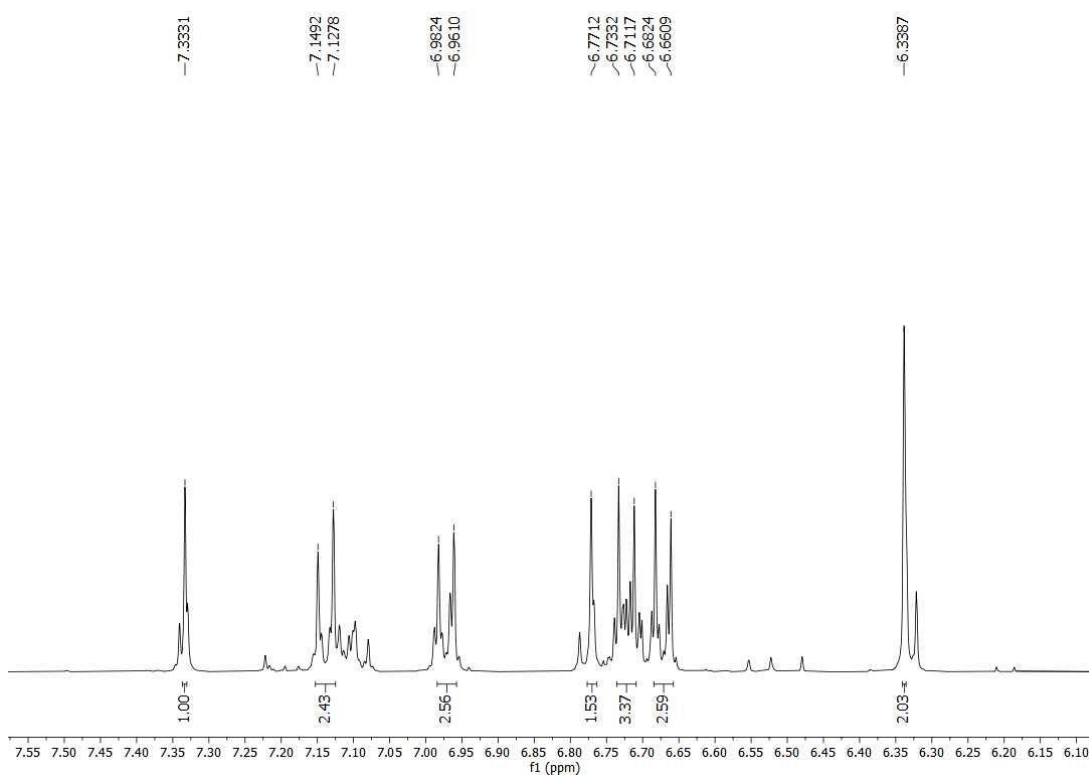


Figura S34 – Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto 4 (400 MHz, MeOD).

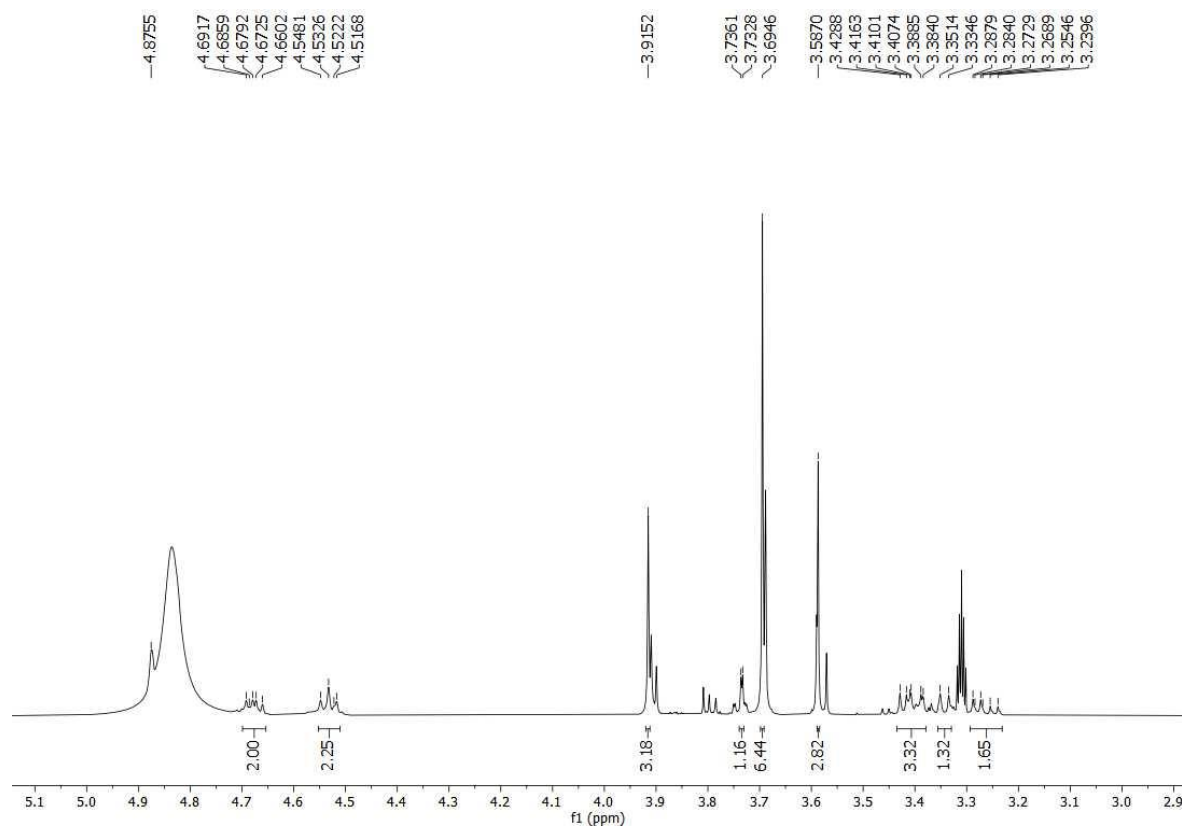


Figura S35 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto **4** (400 MHz, MeOD).

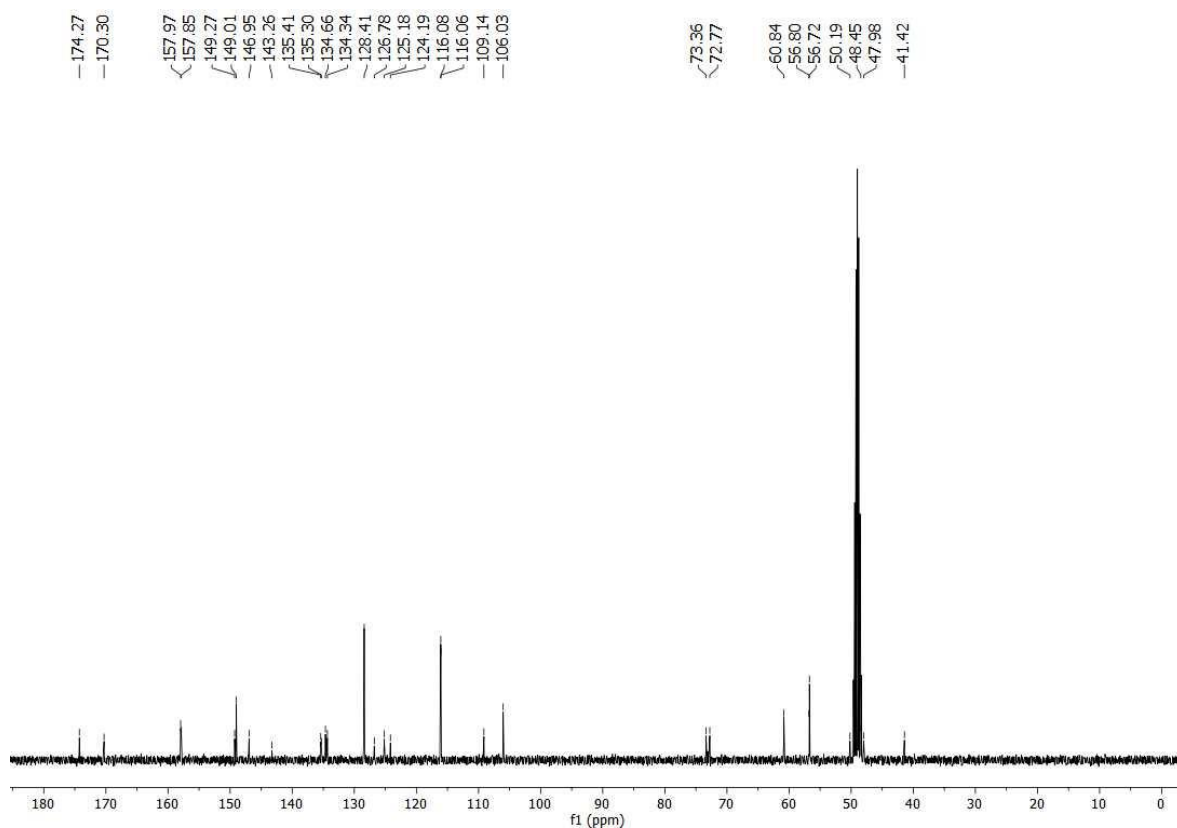


Figura S36 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ -BB do composto **4** (100 MHz, MeOD).

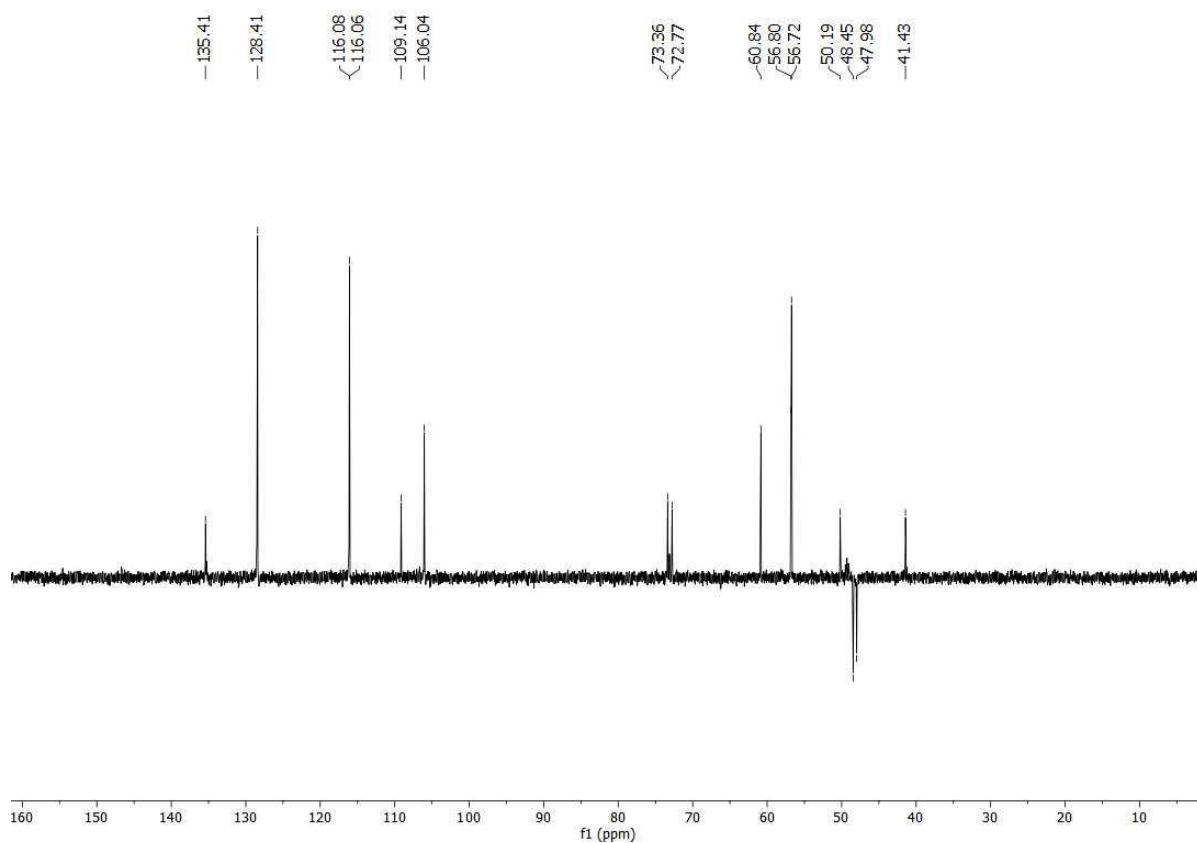


Figura S37 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ -DEPT135 do composto **4** (100 MHz, MeOD).

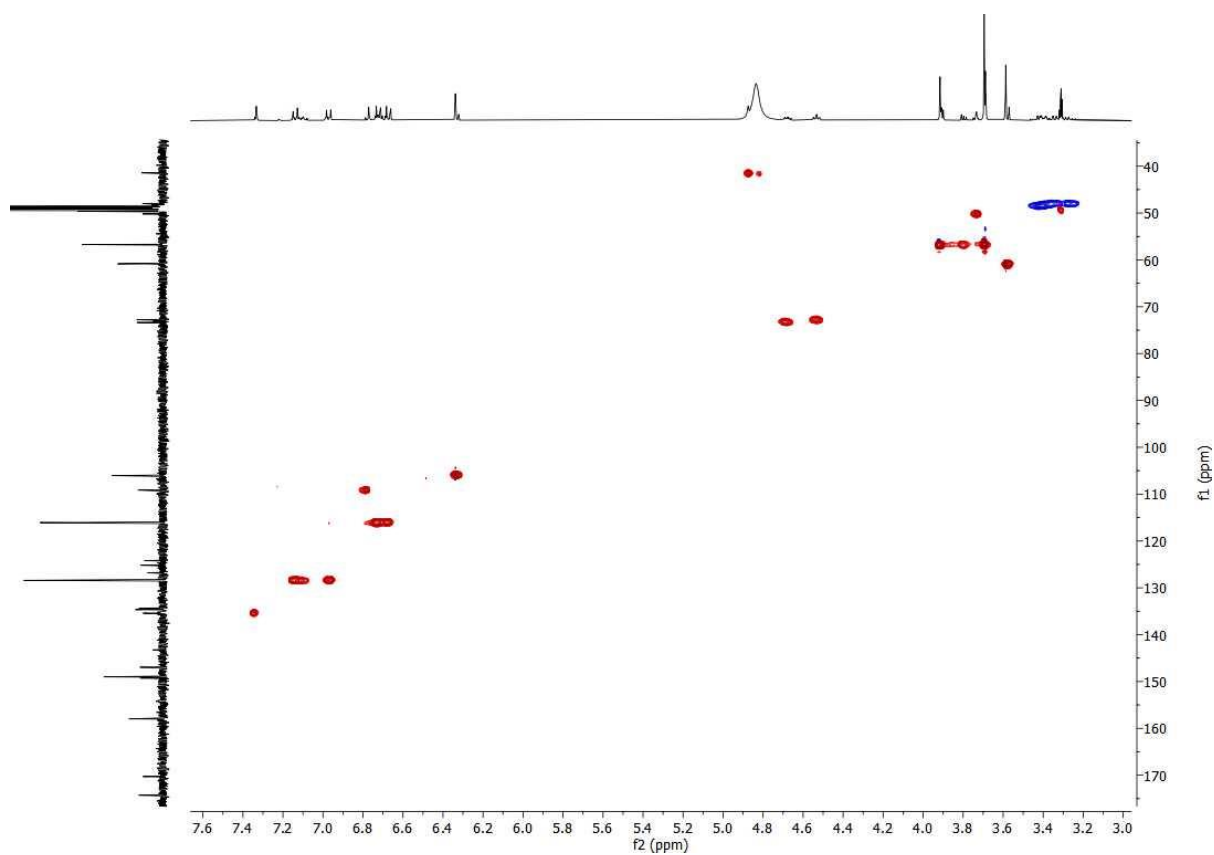


Figura S38 – Espectro de HSQC do composto **4** (400/100 MHz, MeOD).

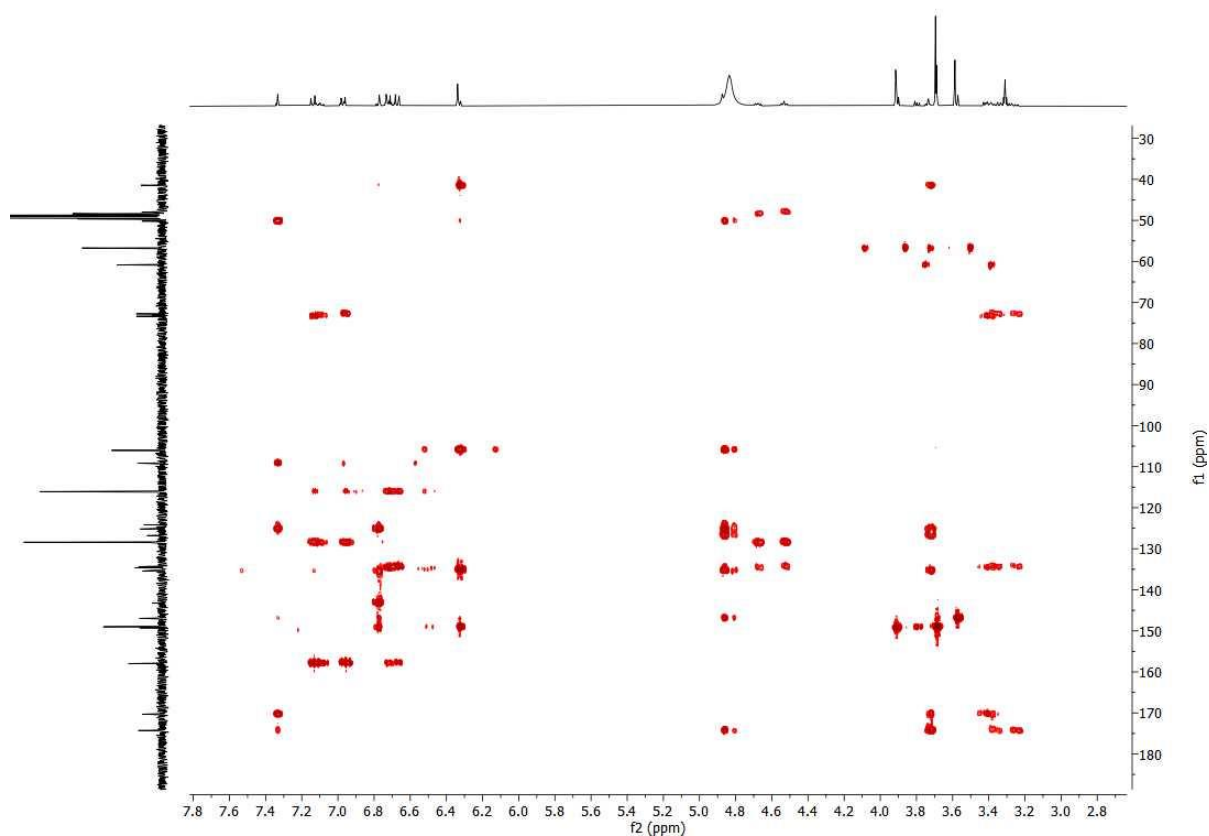


Figura S39 - Espectro de HMBC do composto **4** (400/100 MHz, MeOD).

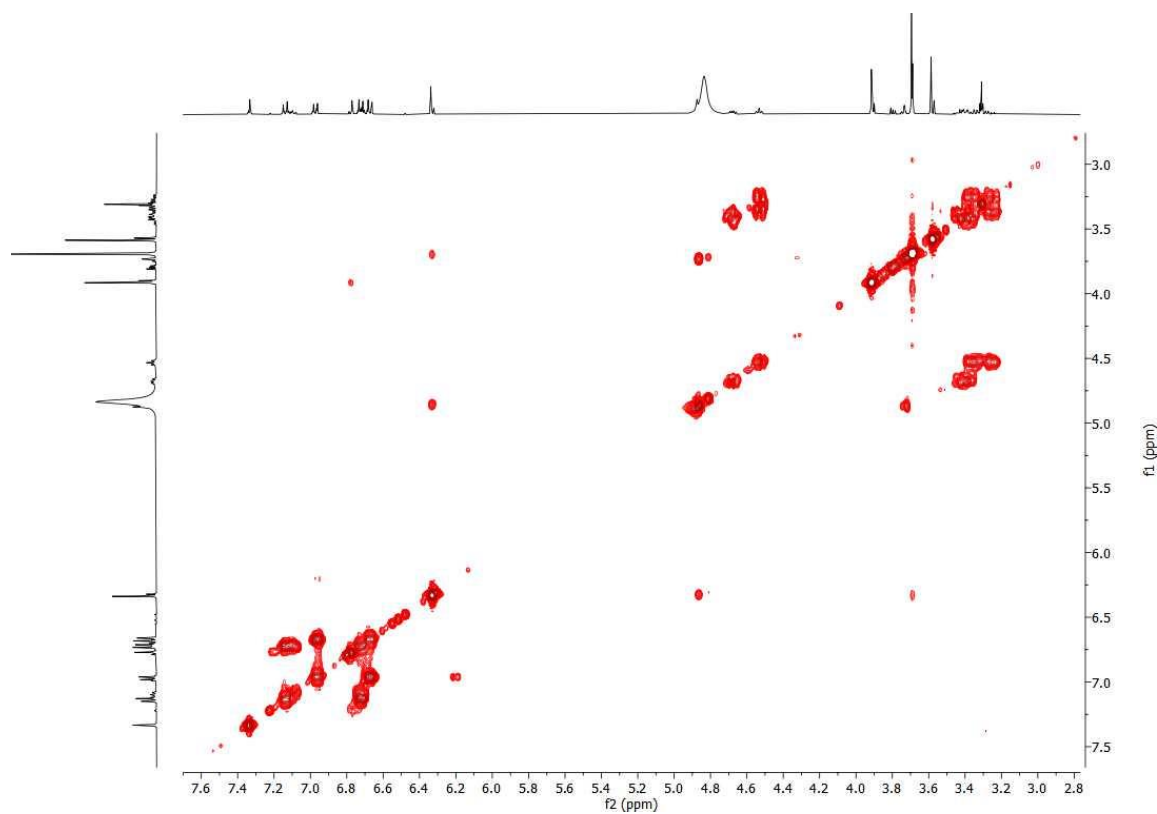


Figura S40 – Espectro de COSY do composto **4** (400 MHz, MeOD).

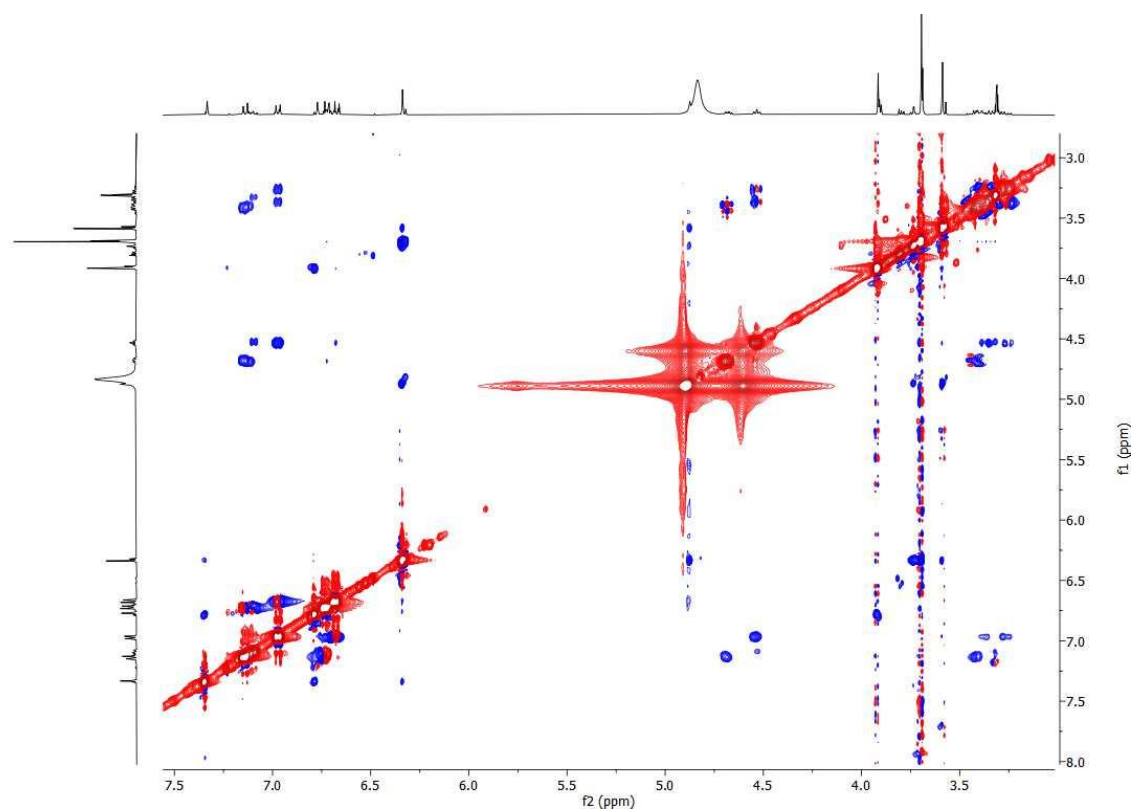


Figura S41 - Espectro de NOESY do composto **4** (400 MHz, MeOD).

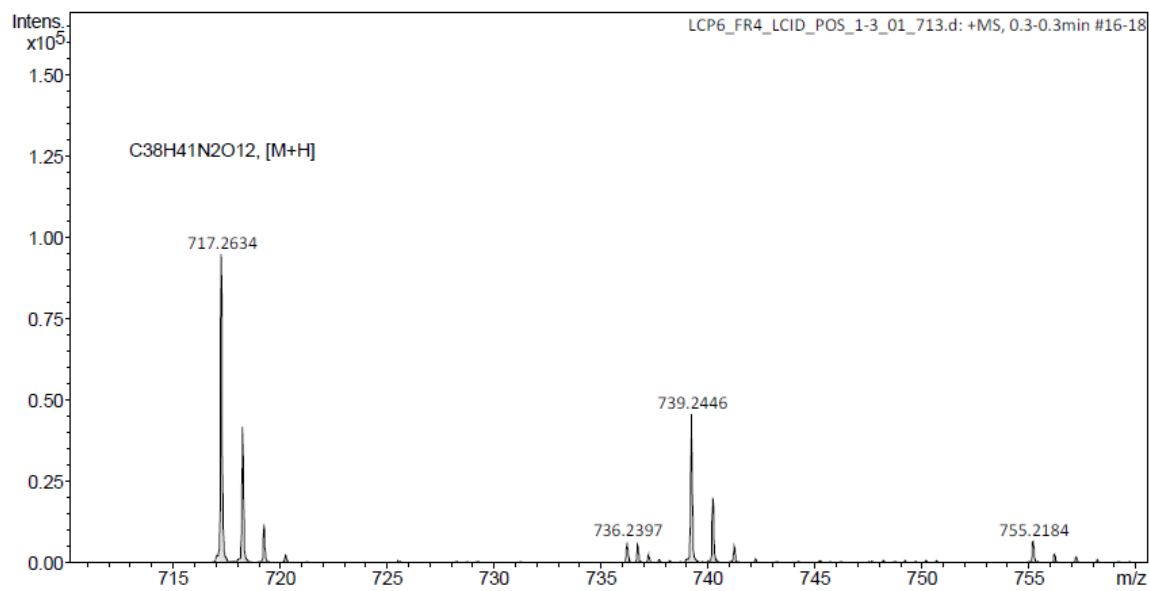


Figura S42 – Espectro de IES-EMAR do composto **4** ([M + H] $^+$ , modo positivo).

## Dados espectroscópicos do composto 5

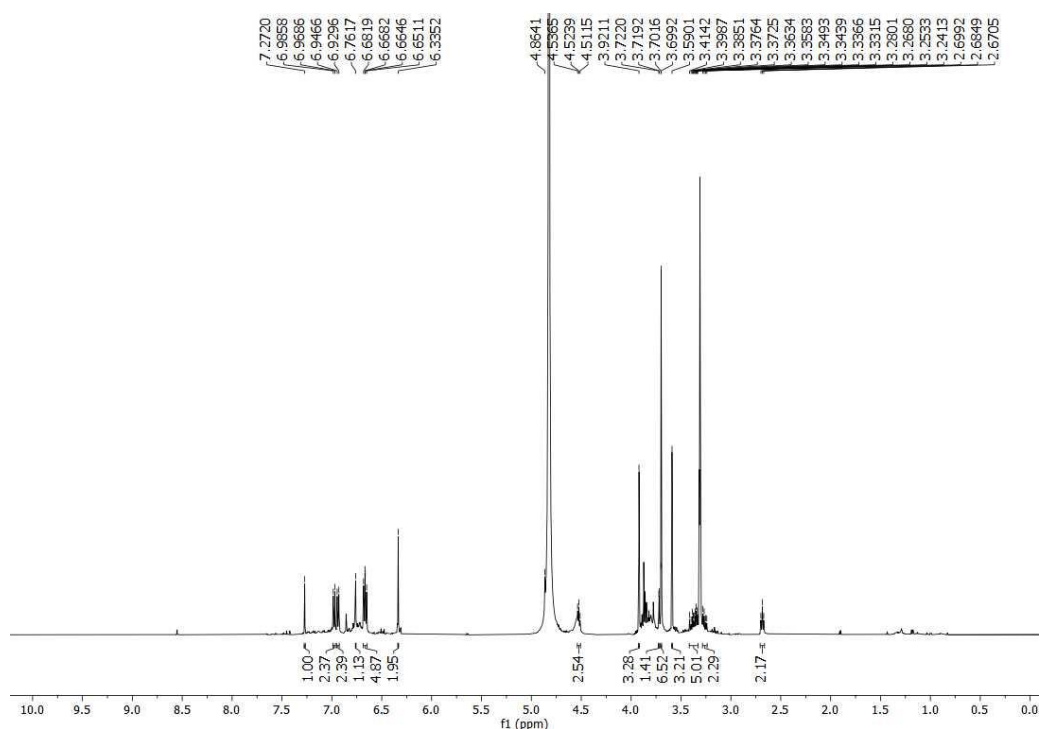


Figura S43 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto **5** (500 MHz, MeOD).

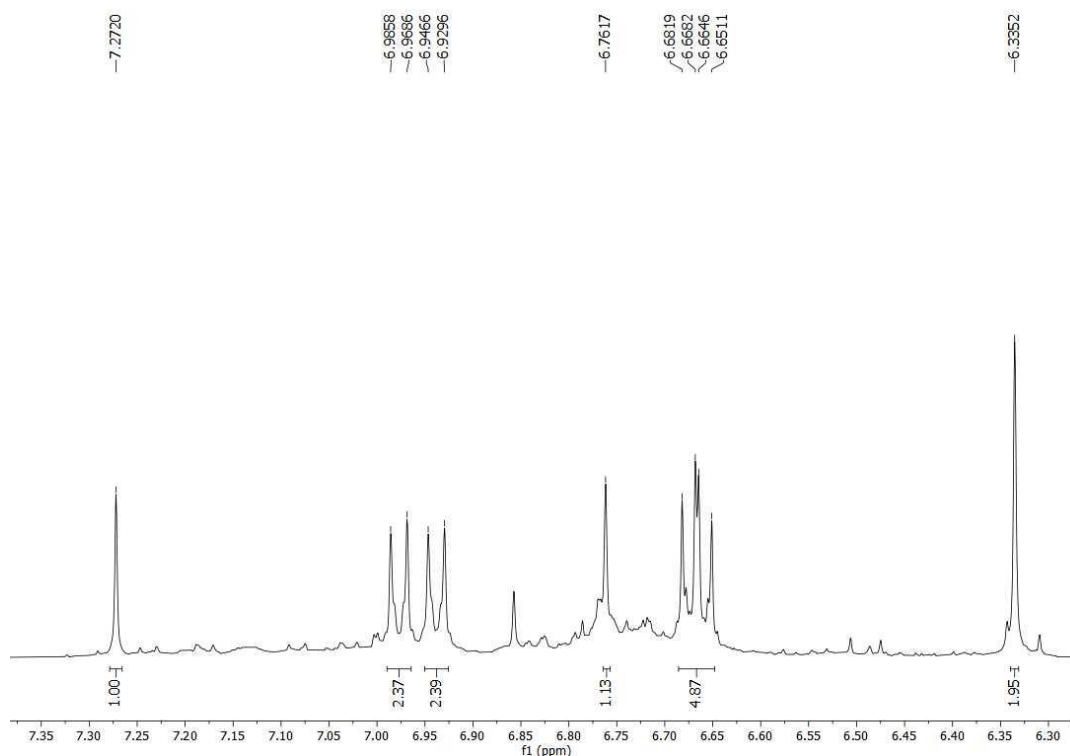


Figura S44 – Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto **5** (500 MHz, MeOD).

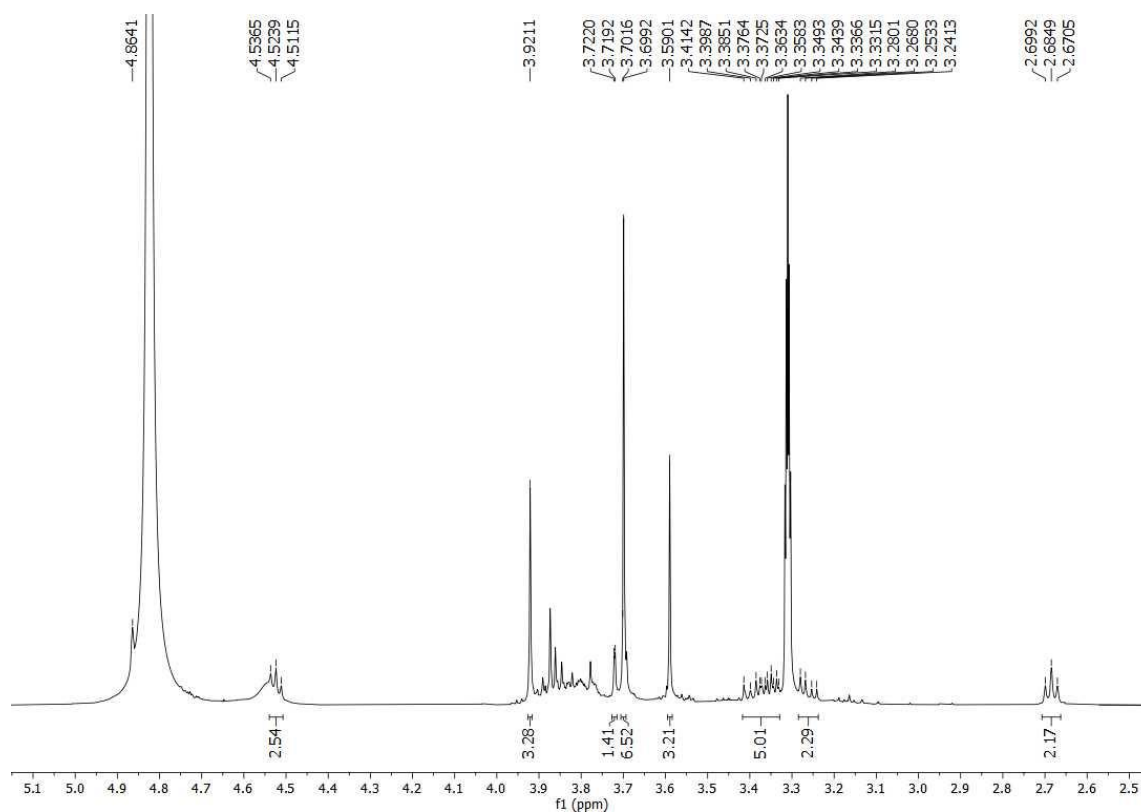


Figura S45 - Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto **5** (500 MHz, MeOD).

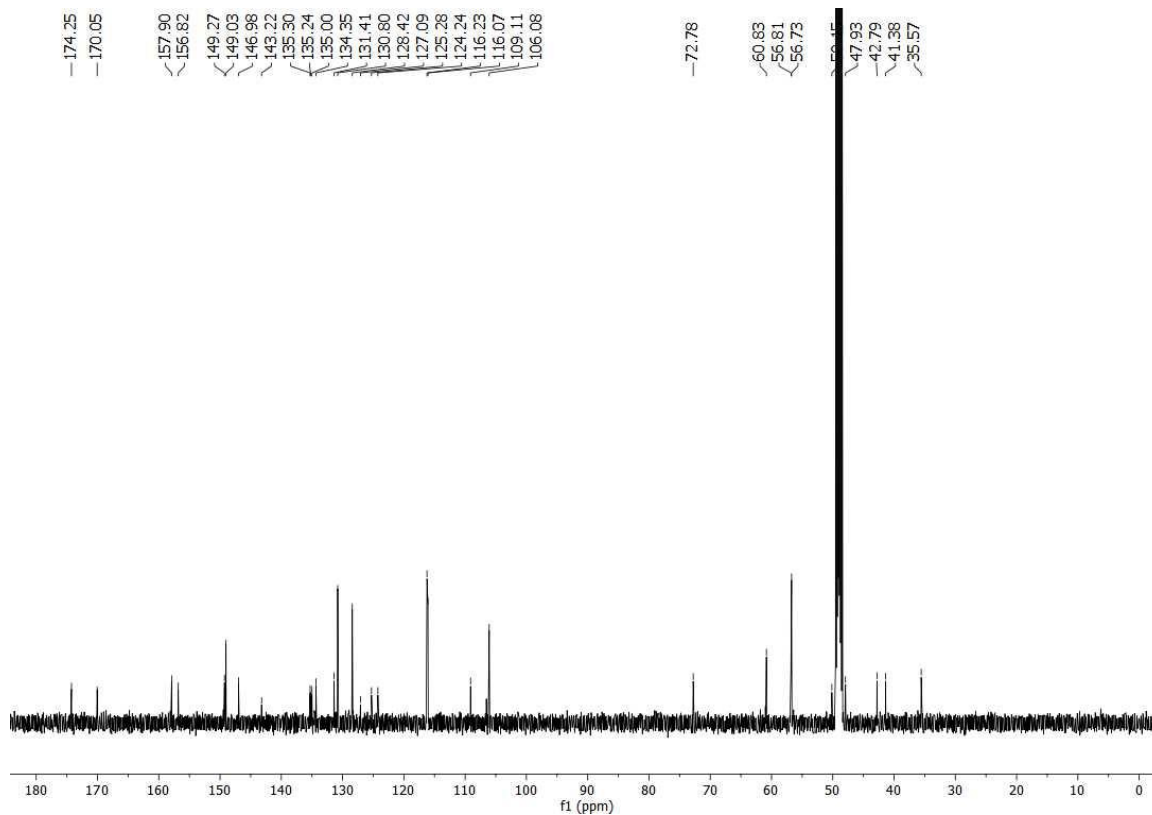


Figura S46 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ -BB do composto **5** (125 MHz, MeOD).

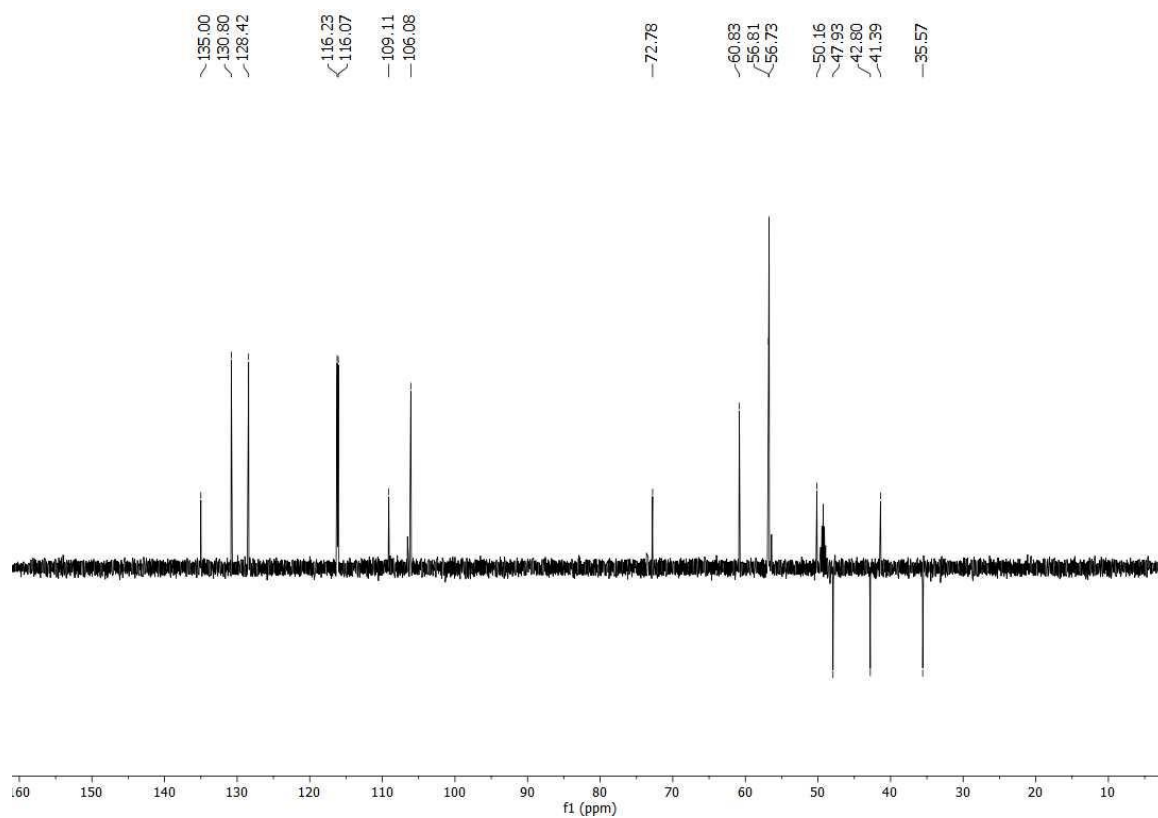


Figura S 47 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ -DEPT135 do composto **5** (125 MHz, MeOD).

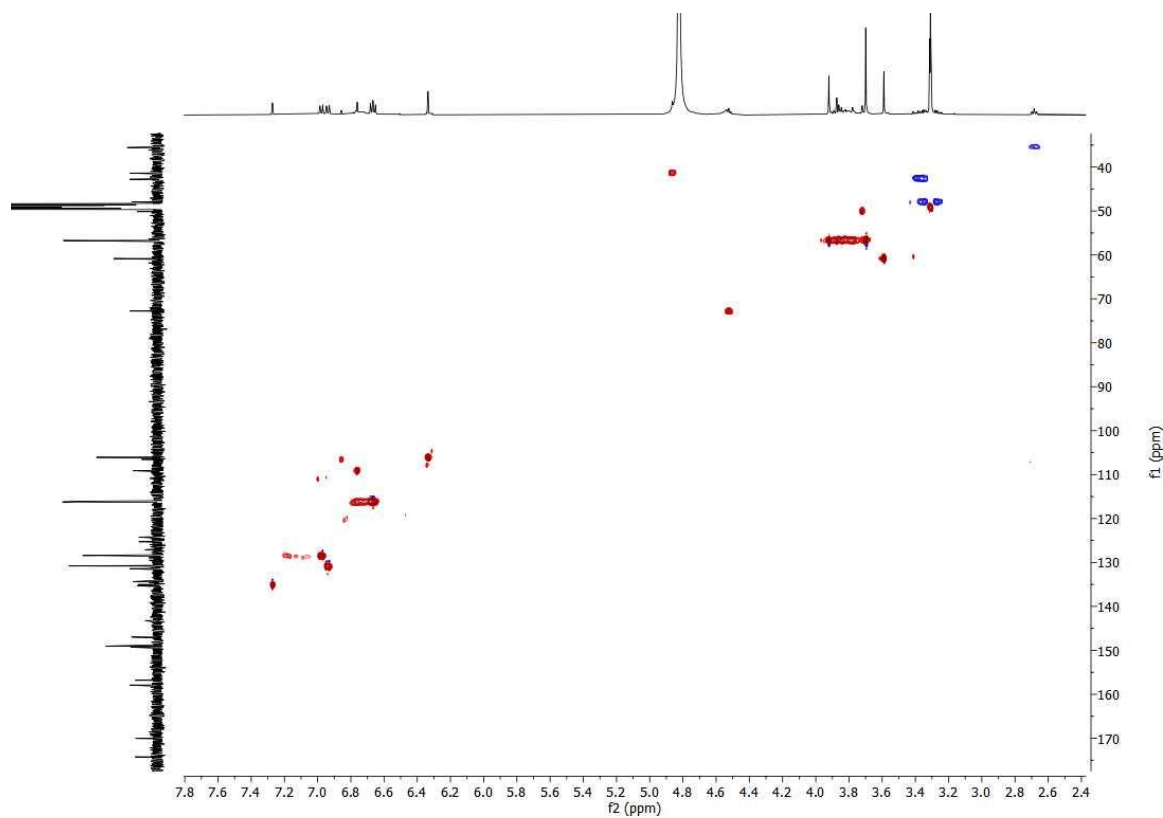


Figura S48 – Espectro de HSQC do composto **5** (500/125 MHz, MeOD).



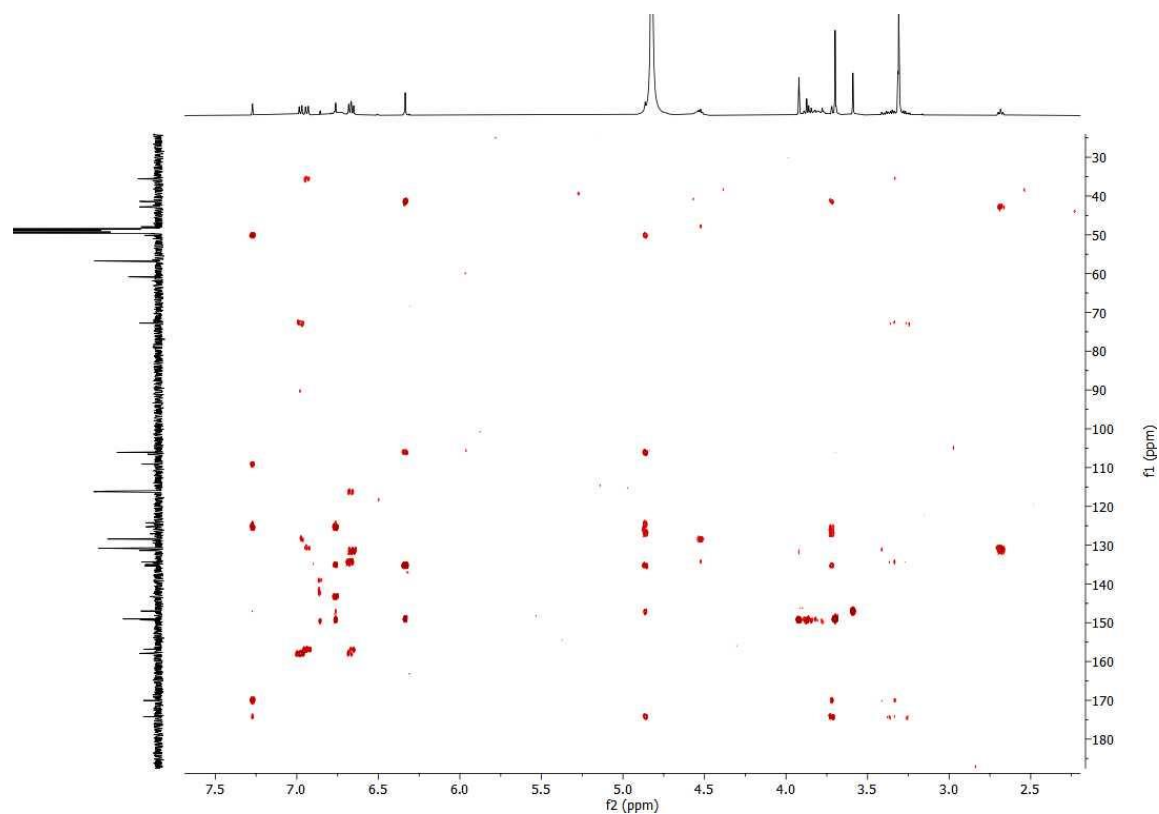


Figura S49 - Espectro de HMBC do composto **5** (500/125 MHz, MeOD).

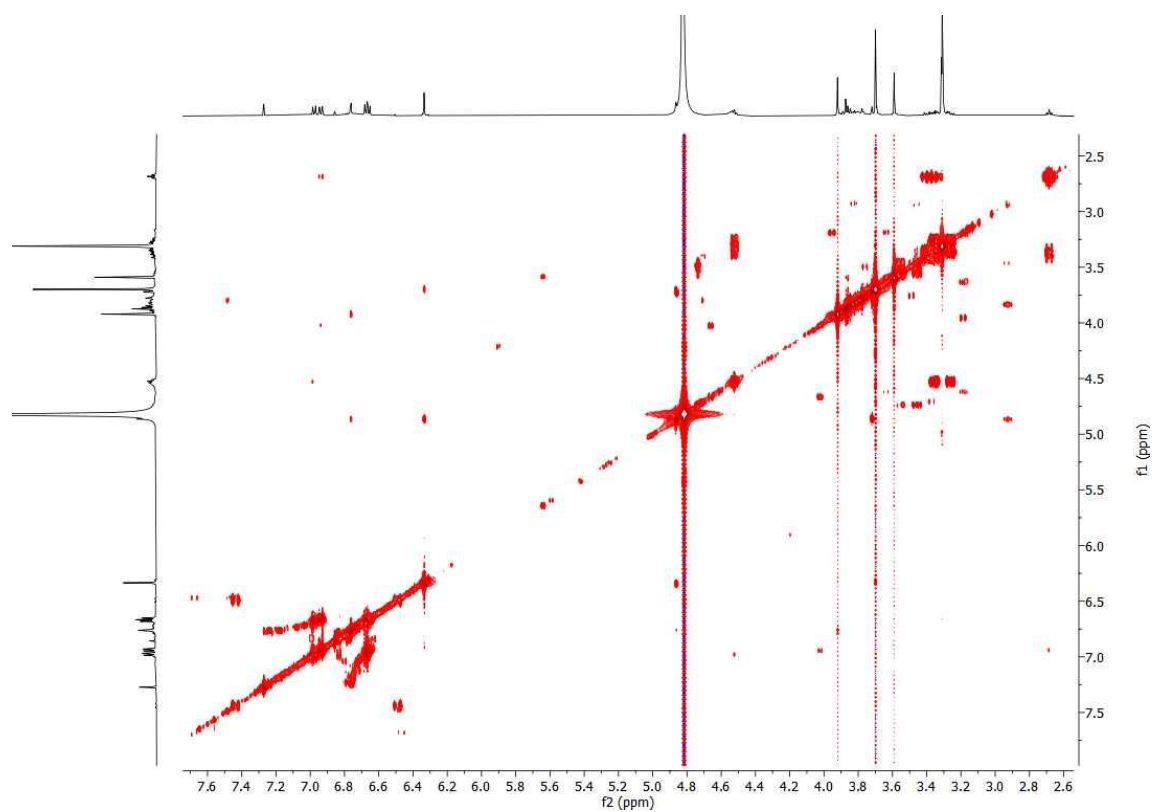


Figura S50 – Espectro de COSY do composto **5** (500 MHz, MeOD).

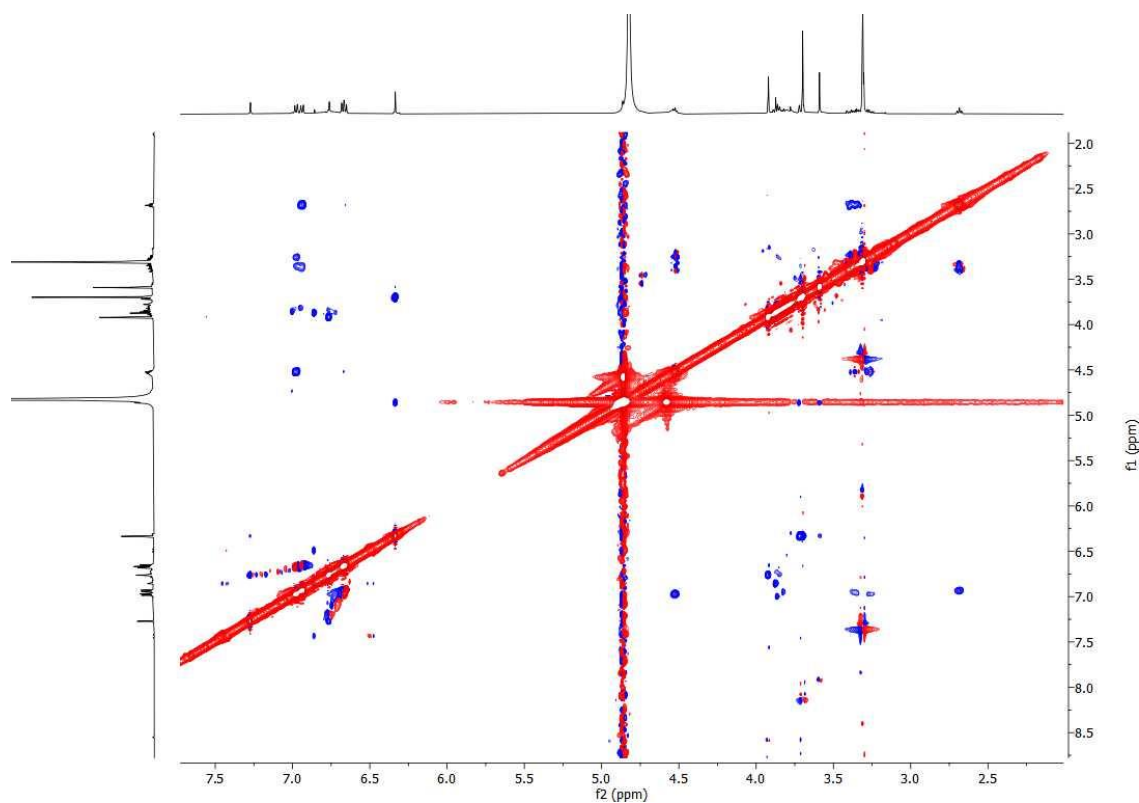


Figura S51 - Espectro de NOESY do composto **5** (500 MHz, MeOD).

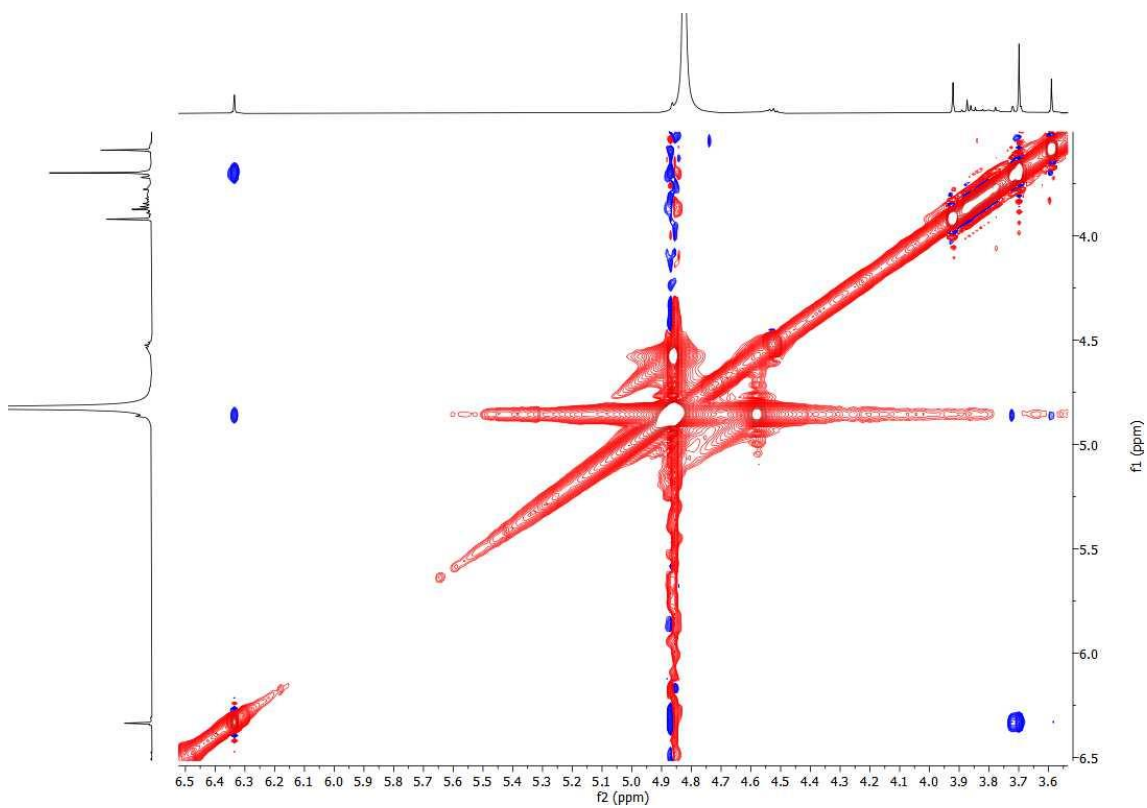


Figura S52 – Expansão do espectro de NOESY do composto **5** (500 MHz, MeOD).

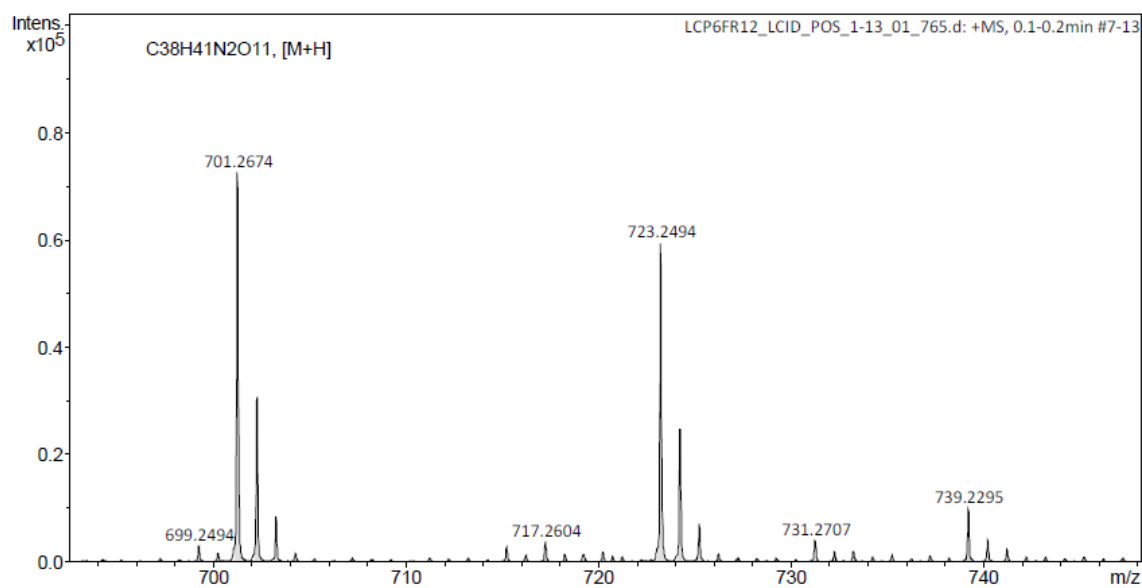


Figura S53 – Espectro de IES-EMAR do composto **5** ( $[M + H]^+$ , modo positivo).

### Dados espectroscópicos do composto **6**

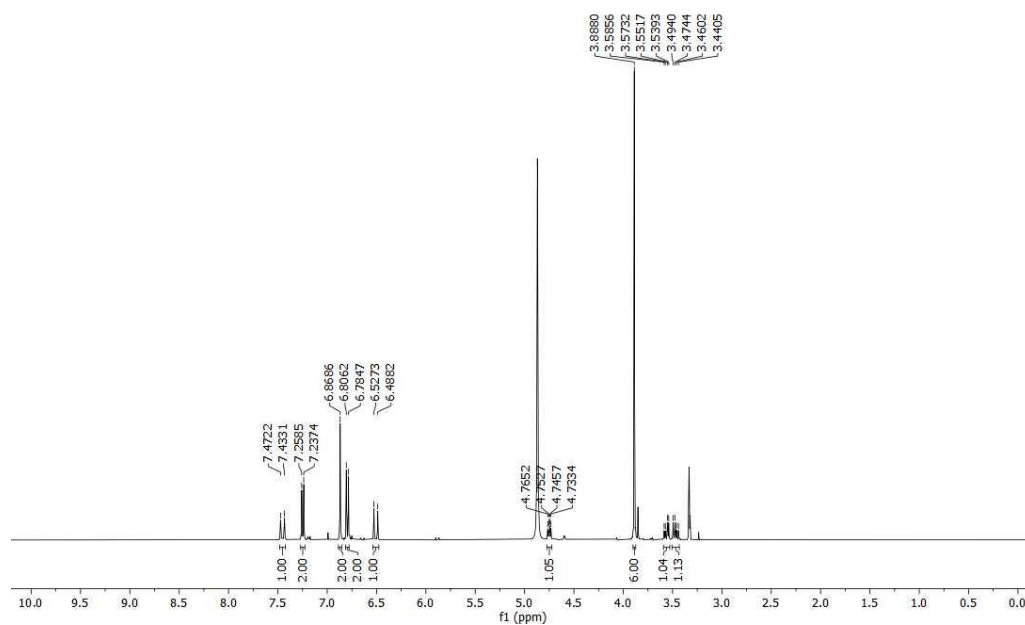


Figura S54 – Espectro de RMN de  $^1H$  do composto **6** (400 MHz, MeOD).

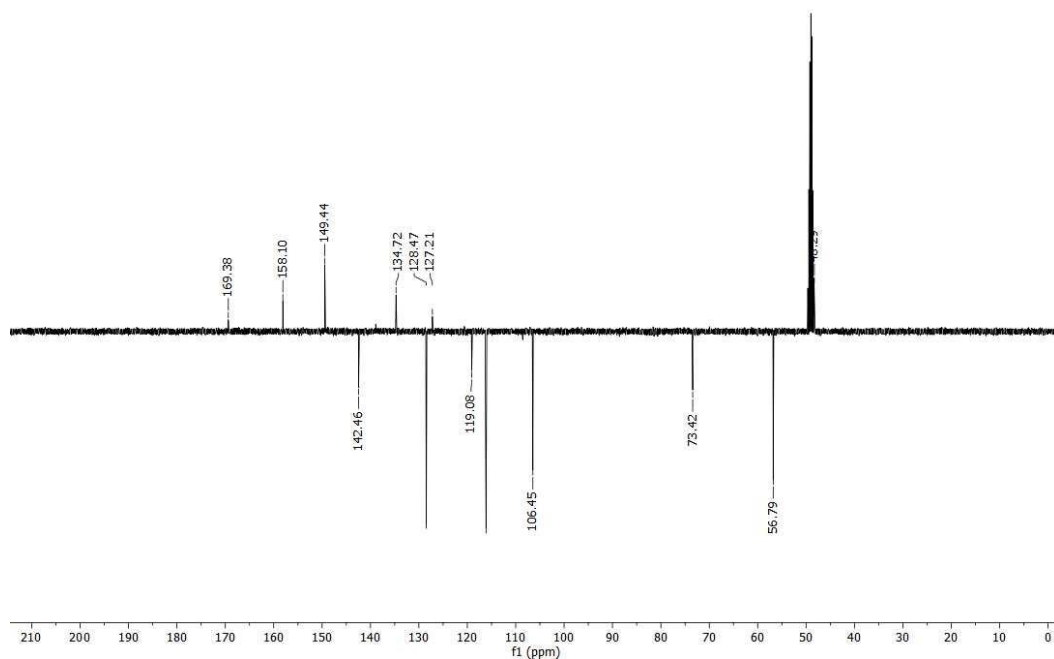


Figura S55 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ -APT do composto **6** (100 MHz, MeOD).

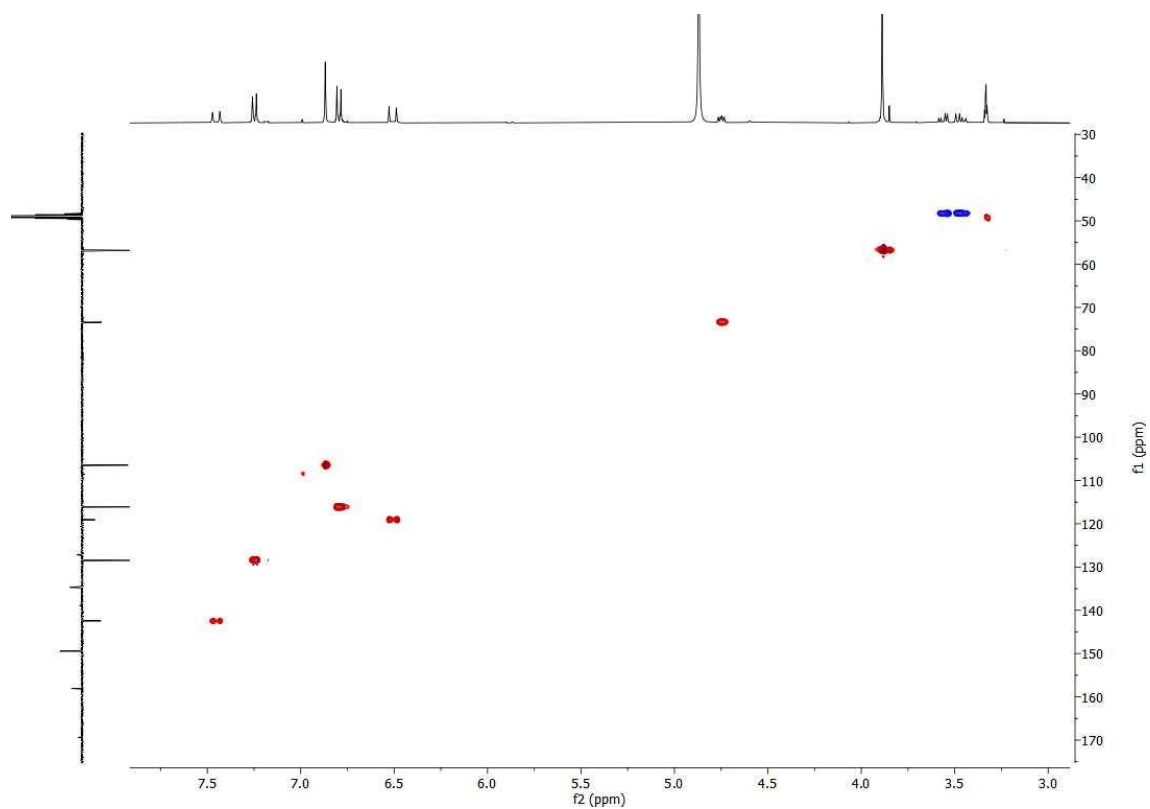


Figura S56 – Espectro de HSQC do composto **6** (400/100 MHz, MeOD).

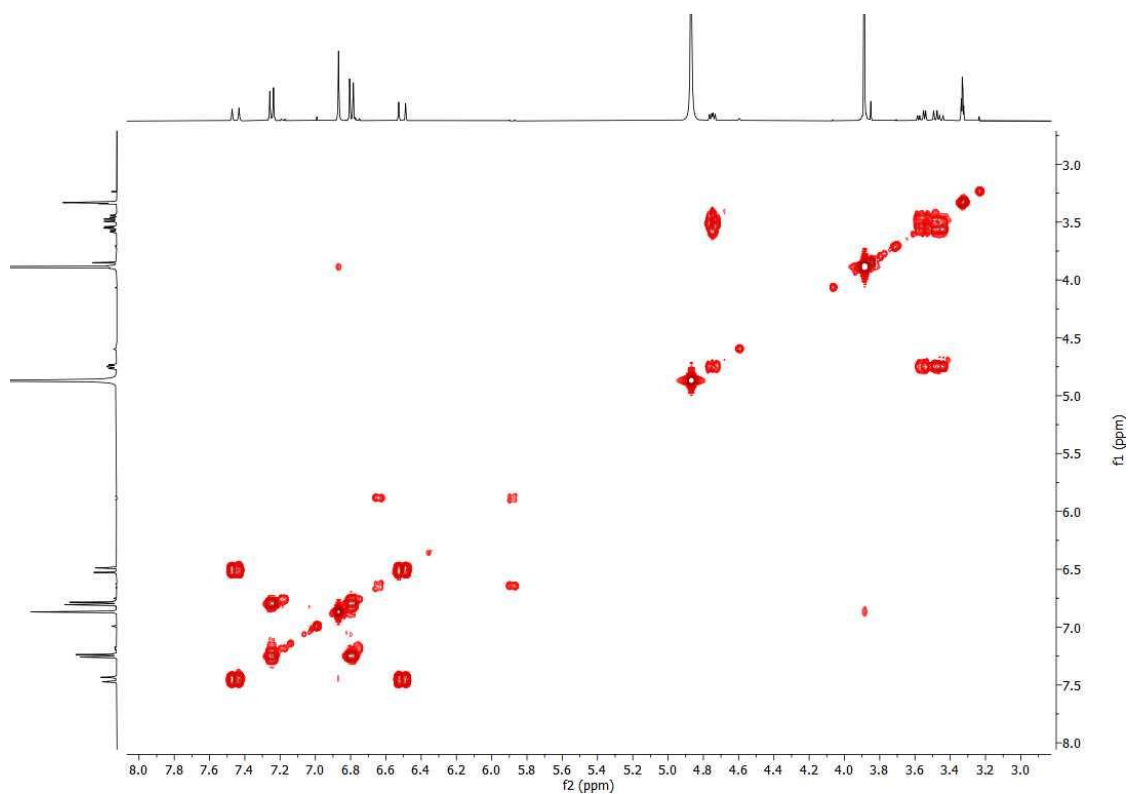


Figura S57 – Espectro de COSY do composto **6** (400 MHz, MeOD).

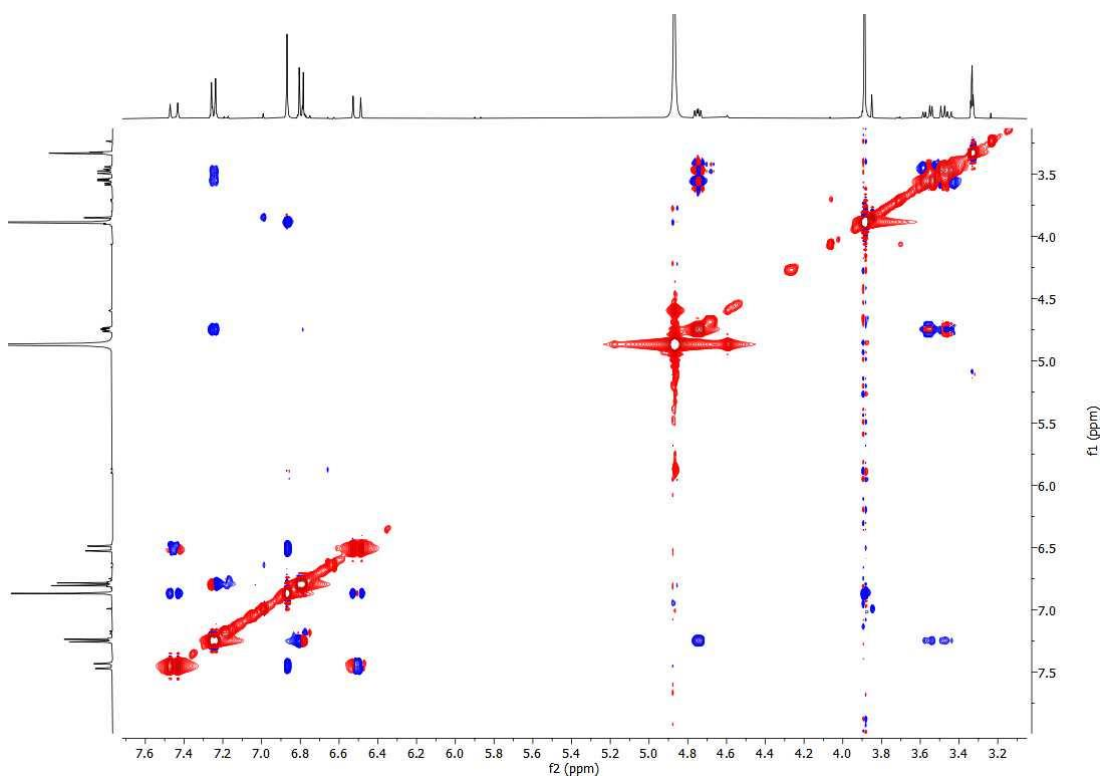


Figura S58 - Espectro de NOESY do composto **6** (400 MHz, MeOD).

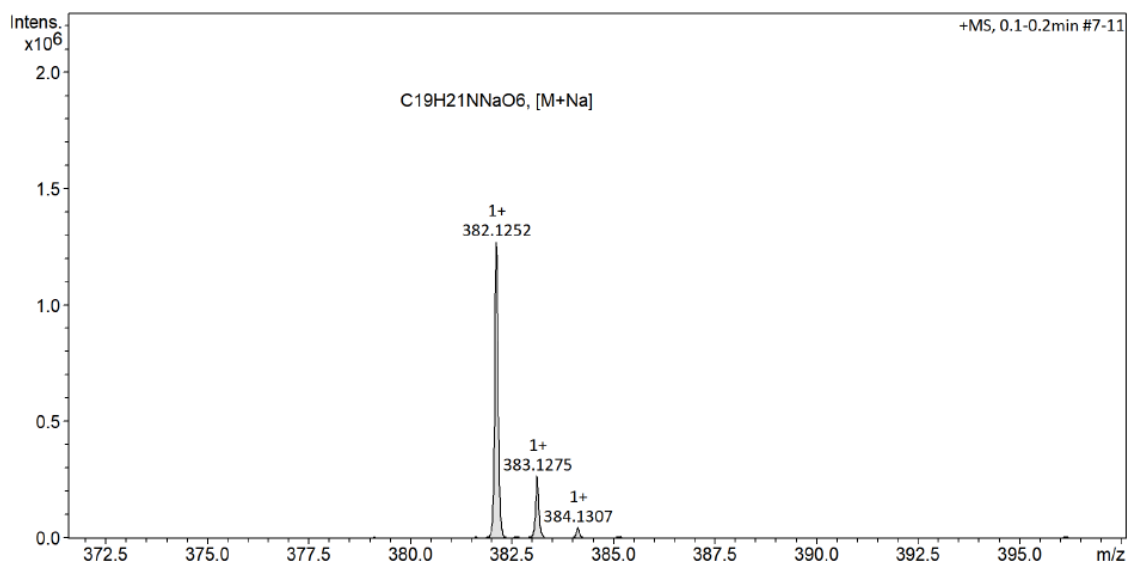


Figura S59 – Espectro de IES-EMAR do composto 6 ( $[M + Na]^+$ , modo positivo).

### Dados espectroscópicos do composto 7

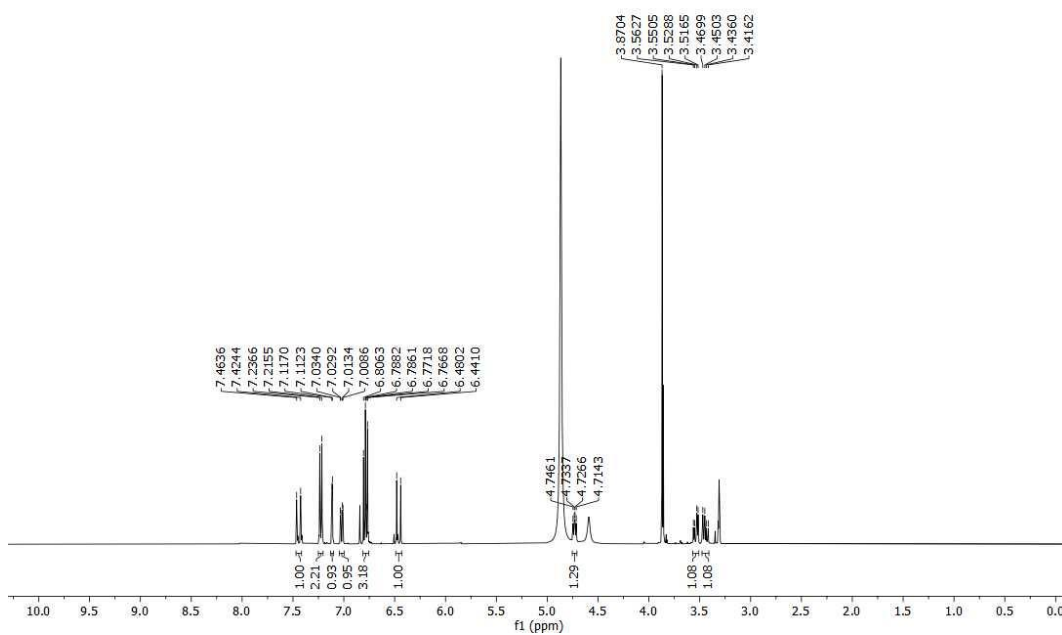


Figura S60 – Espectro de RMN  $^1H$  do composto 7 (400 MHz, MeOD).

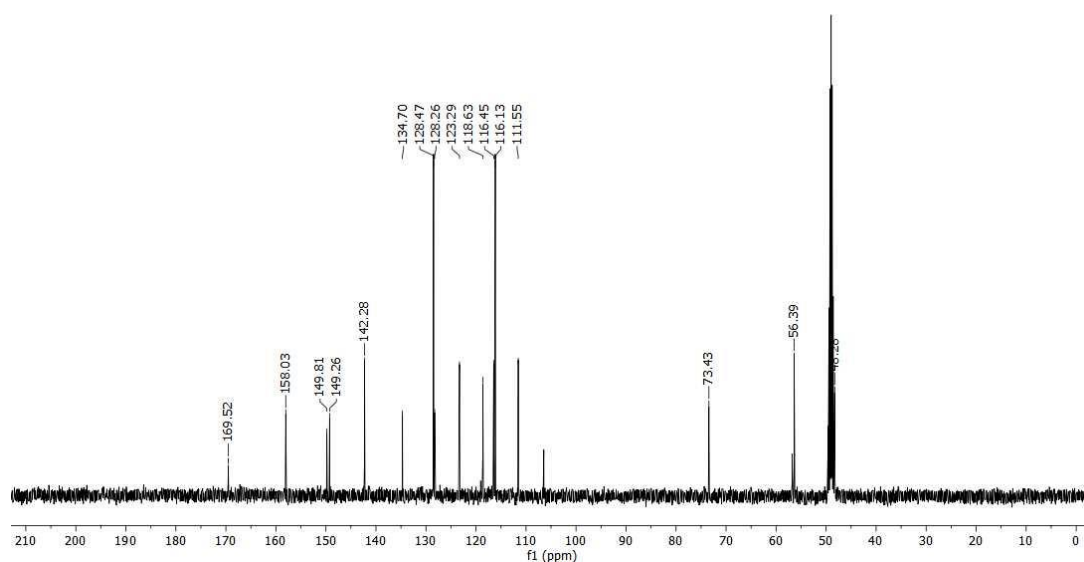


Figura S61 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -BB do composto **7** (100 MHz, MeOD).

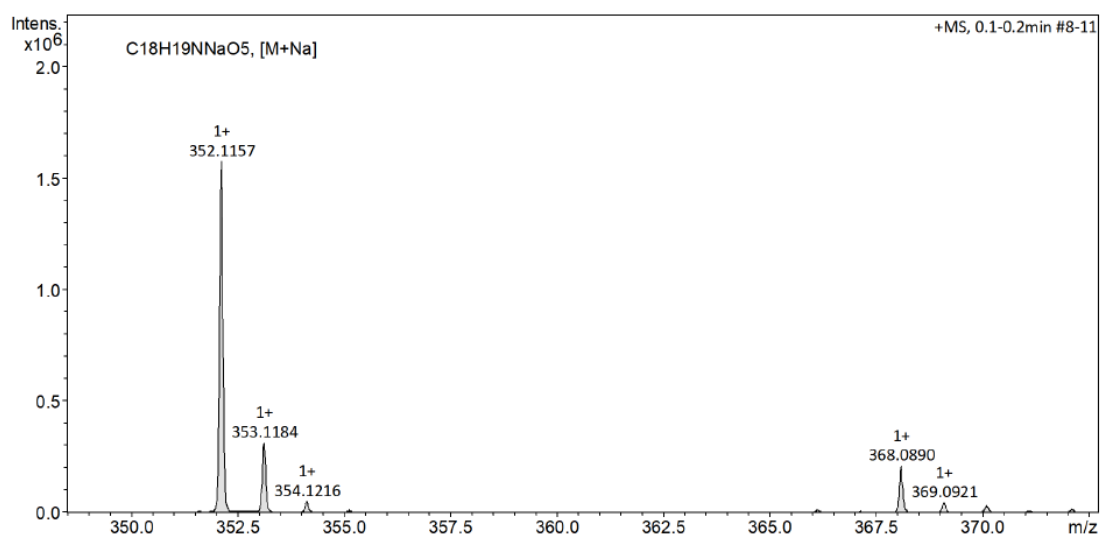
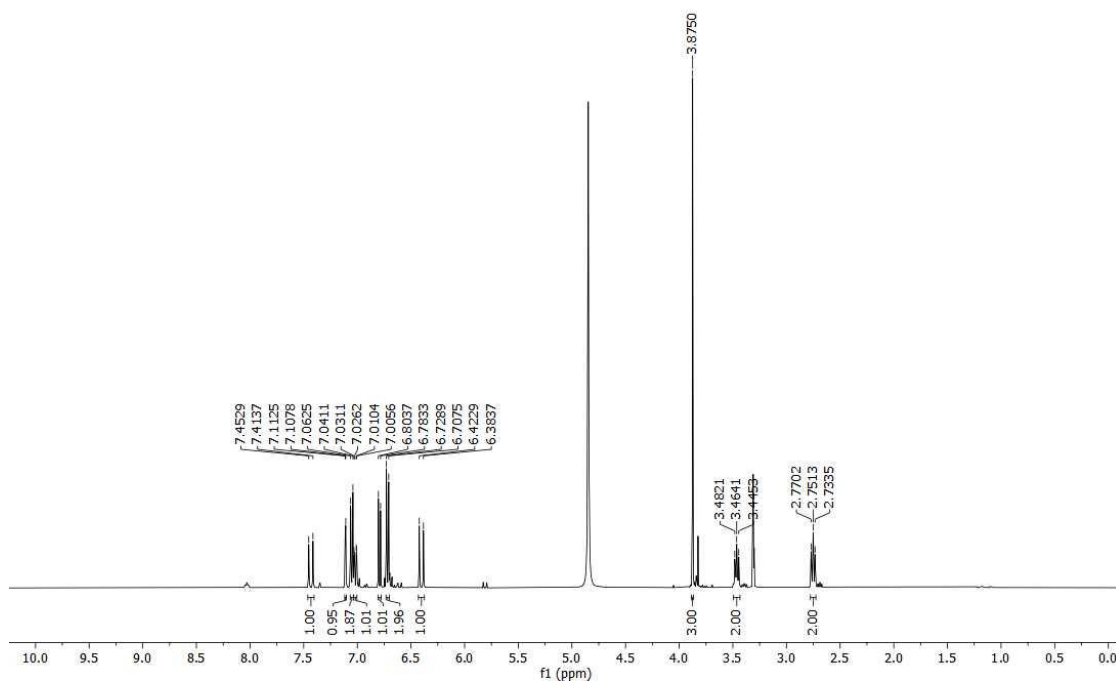
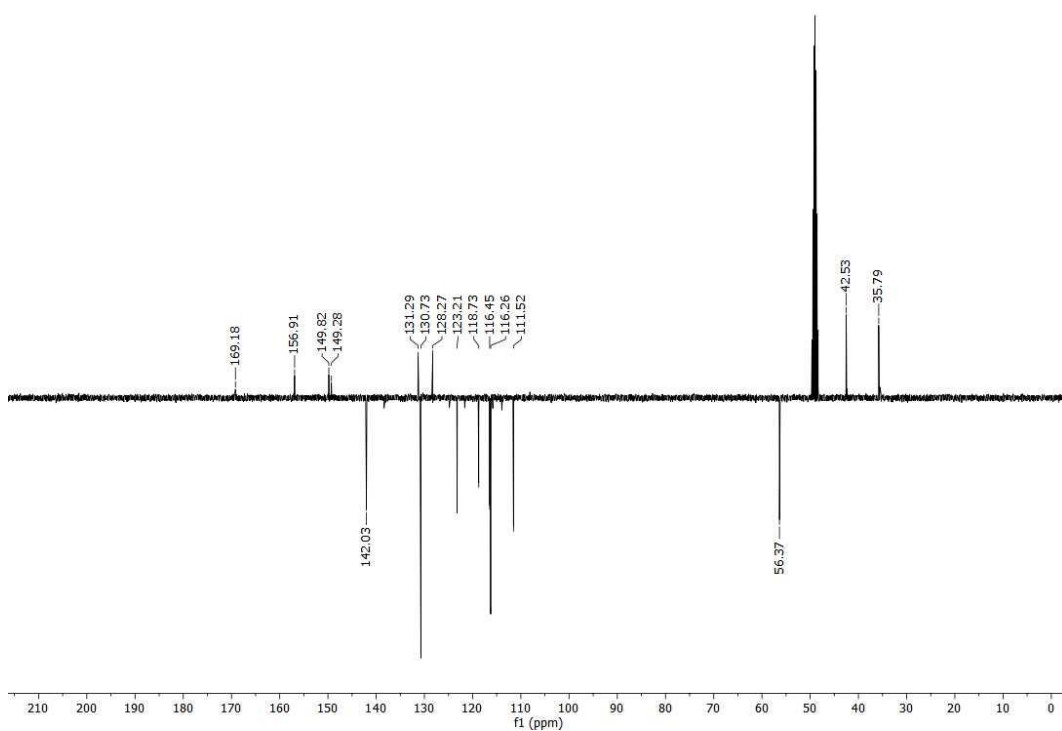


Figura S62 – Espectro de IES-EMAR do composto **7** ( $[\text{M} + \text{Na}]^+$ , modo positivo).

Dados espectroscópicos do composto **8**Figura S63 – Espectro de RMN de <sup>1</sup>H do composto **8** (400 MHz, MeOD).Figura S64 – Espectro de RMN de <sup>13</sup>C-APT do composto **8** (100 MHz, MeOD).



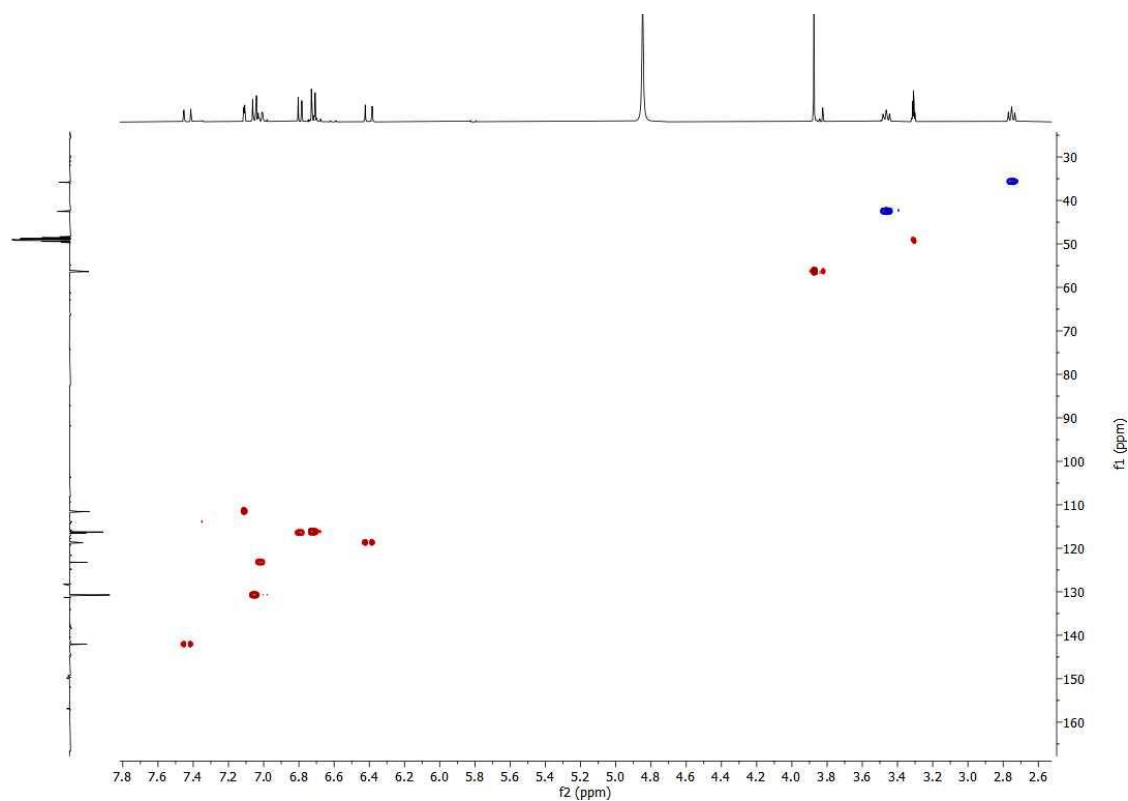


Figura S65 – Espectro de HSQC do composto **8** (400/100 MHz, MeOD).

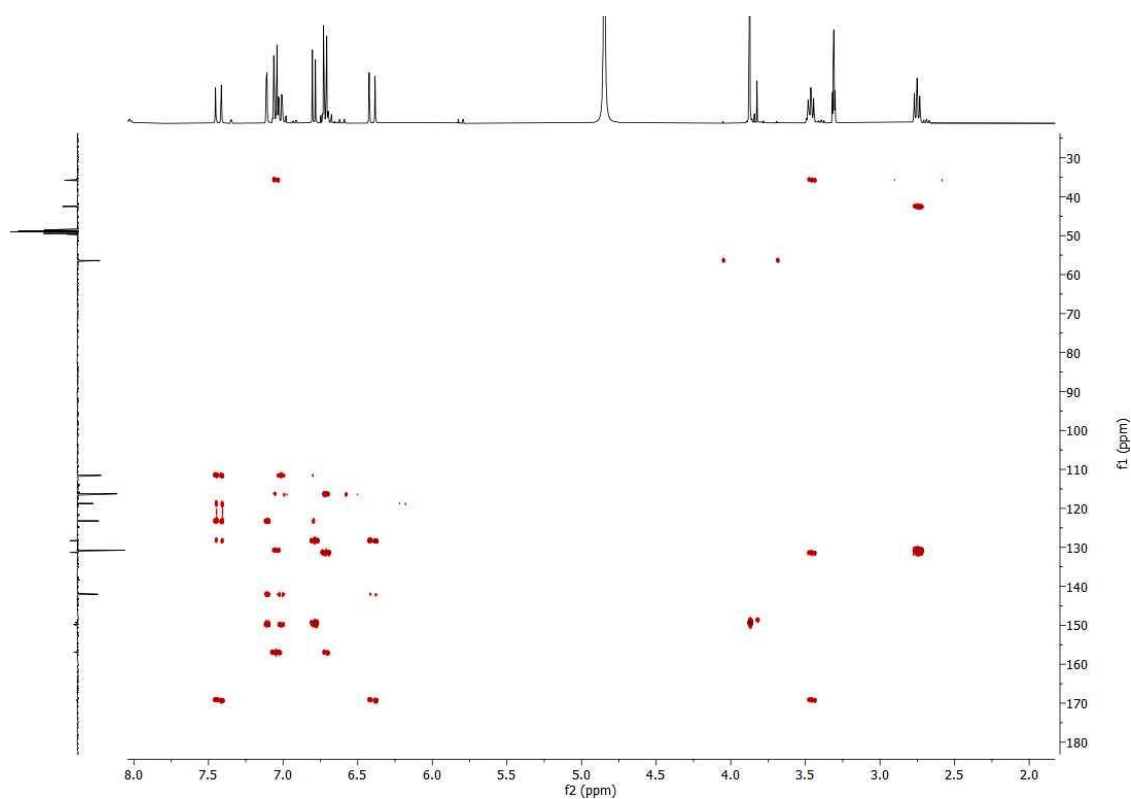


Figura S66 - Espectro de HMBC do composto **8** (400/100 MHz, MeOD).

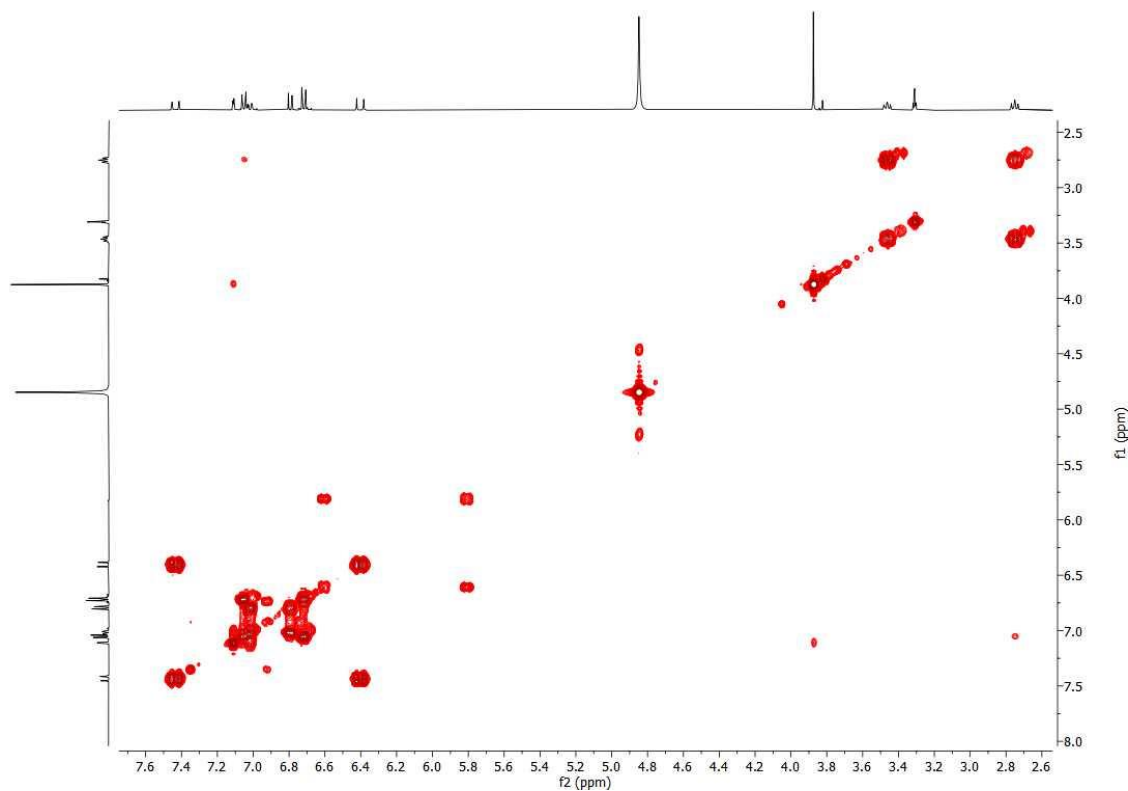


Figura S67 – Espectro de COSY do composto **8** (400 MHz, MeOD).

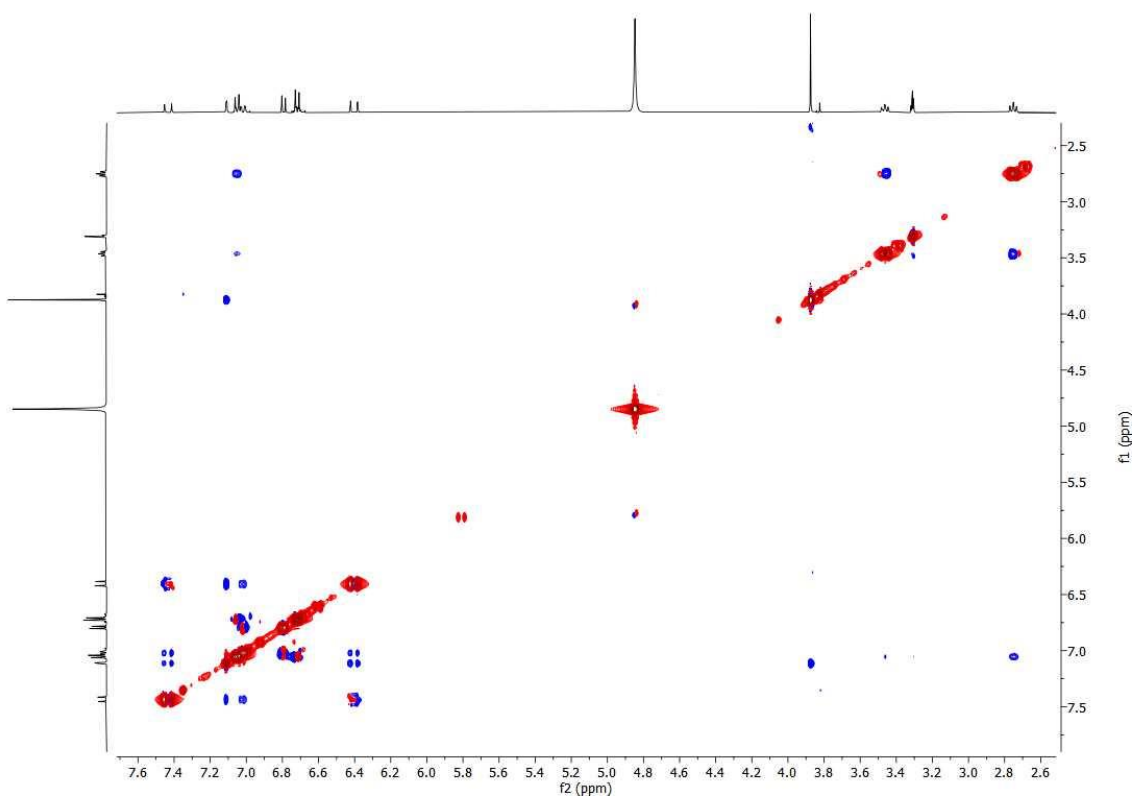


Figura S68 - Espectro de NOESY do composto **8** (400 MHz, MeOD).

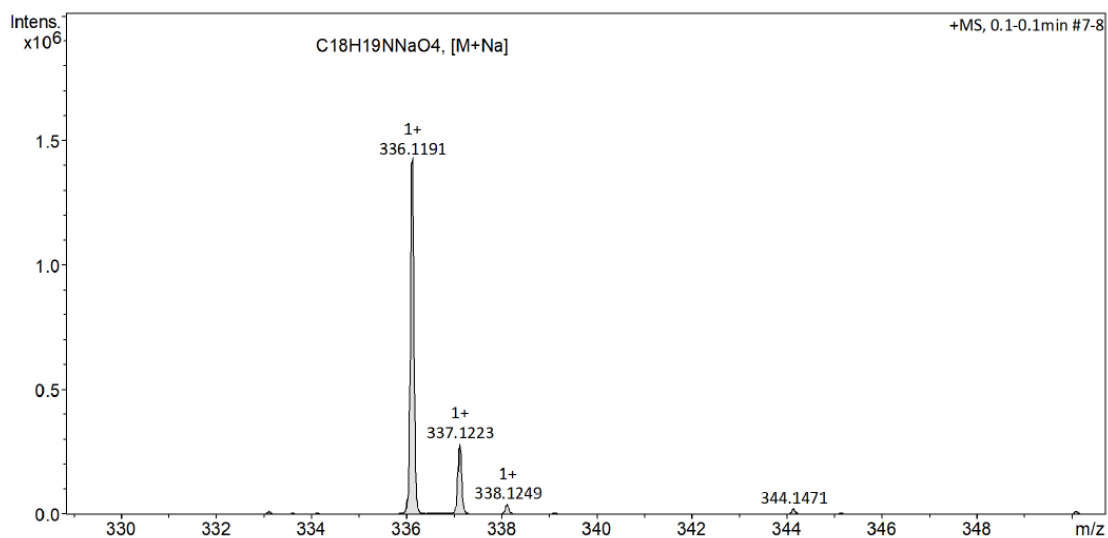


Figura S69 – Espectro de IES-EMAR do composto **8** ( $[M + Na]^+$ , modo positivo).

### Dados espectroscópicos do composto **9**

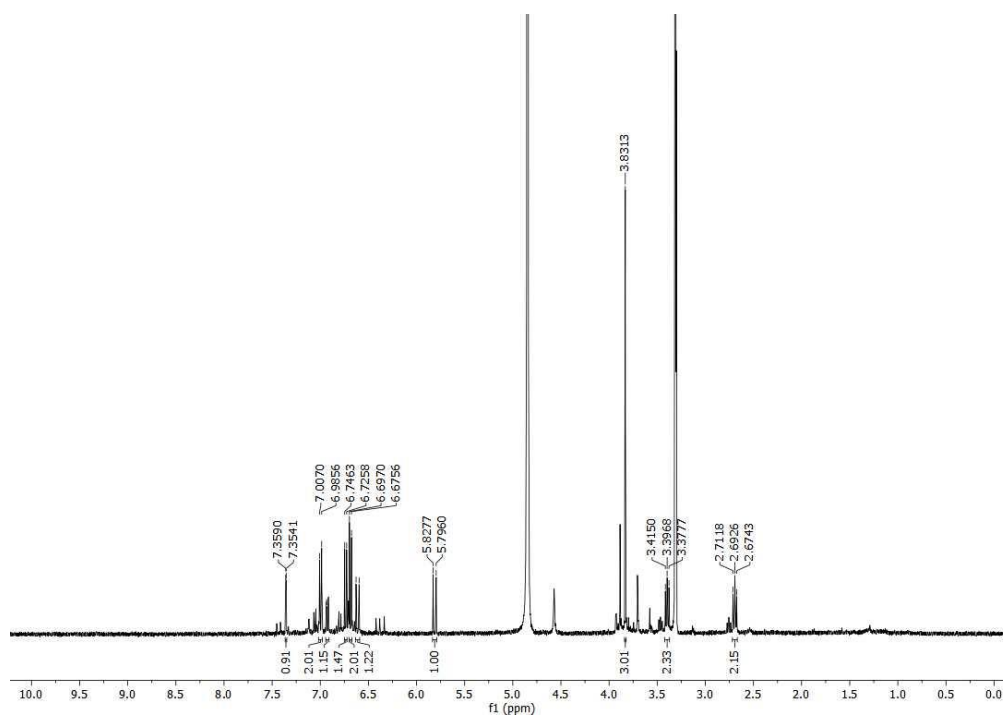


Figura S70 – Espectro de RMN de  $^1H$  do composto **9** (400 MHz, MeOD).

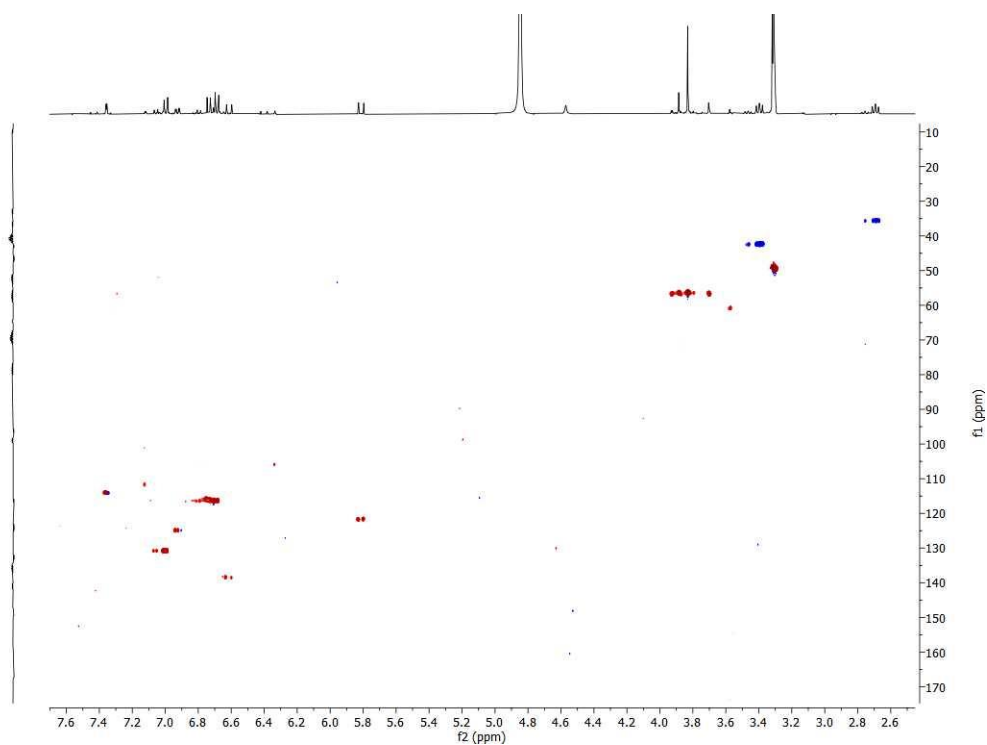


Figura S71 – Espectro de HSQC do composto **9** (400/100 MHz, MeOD).

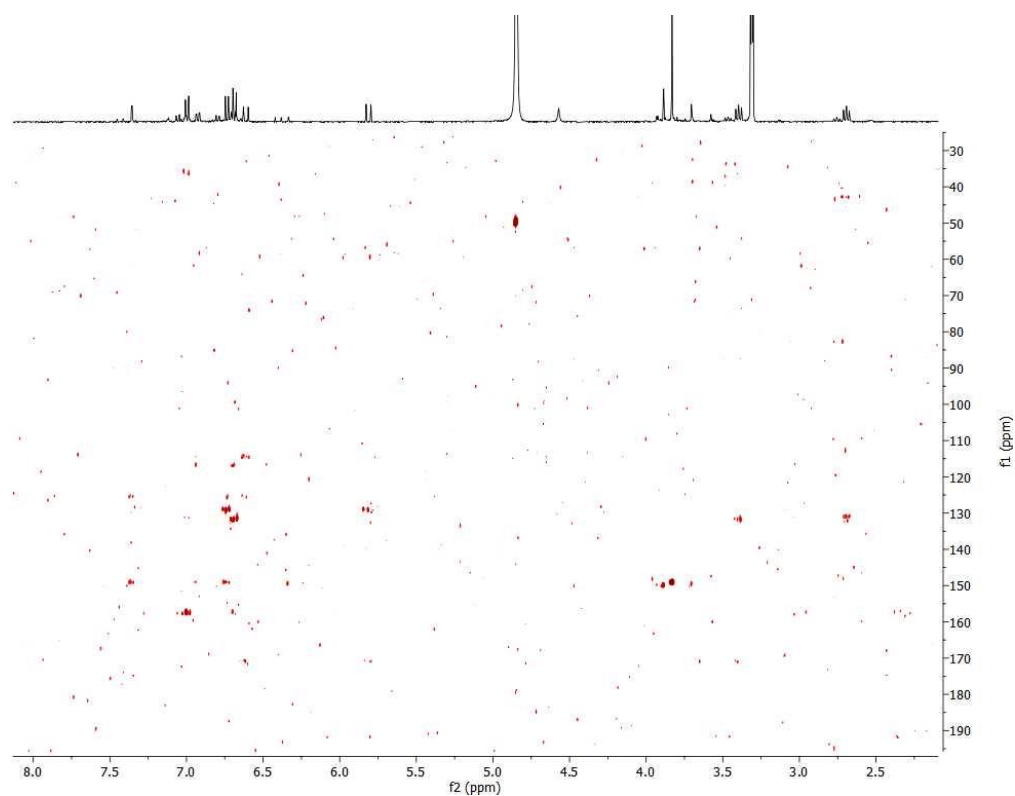


Figura S72 - Espectro de HMBC do composto **9** (400/100 MHz, MeOD).

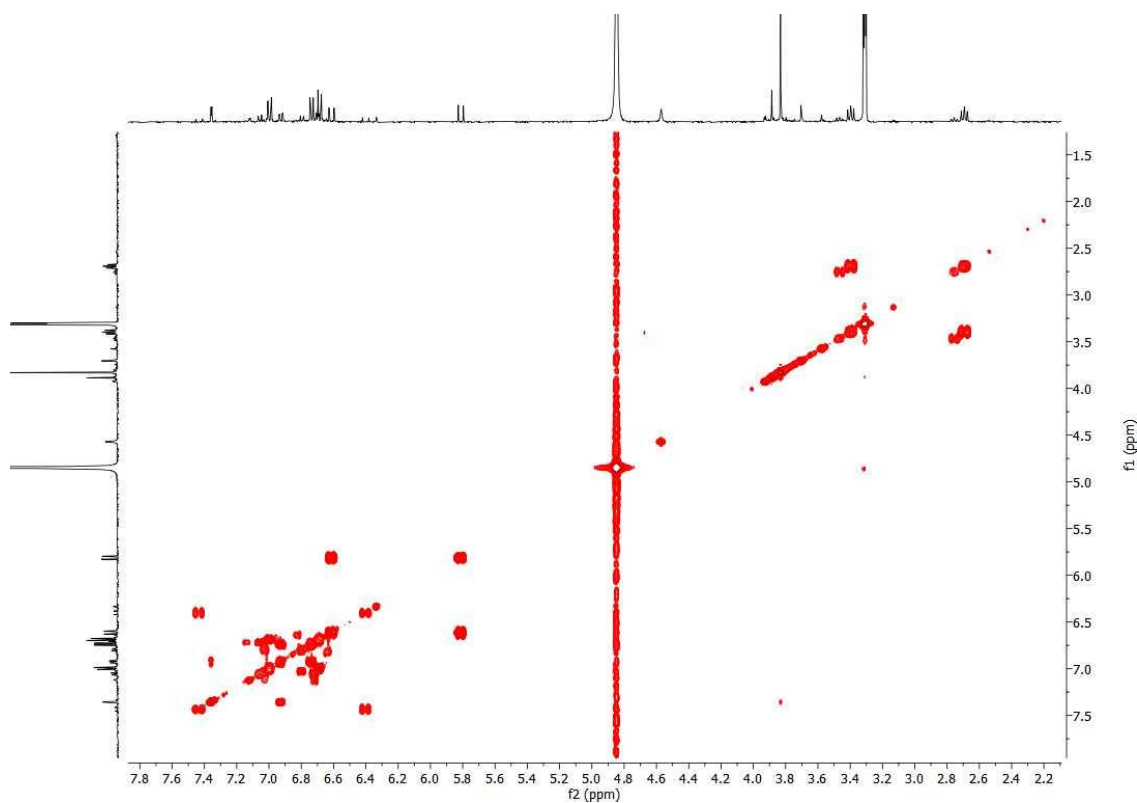


Figura S73 – Espectro de COSY do composto **9** (400 MHz, MeOD).

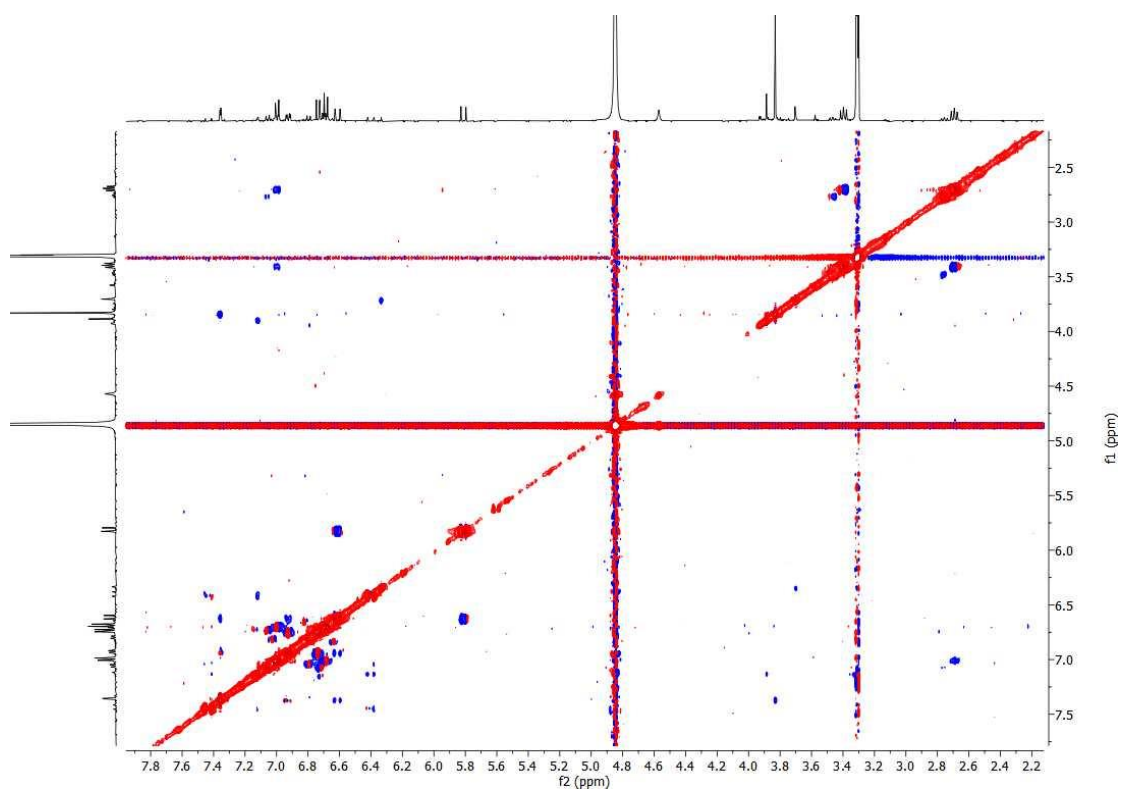


Figura S74 – Espectro de NOESY do composto **9** (400 MHz, MeOD).

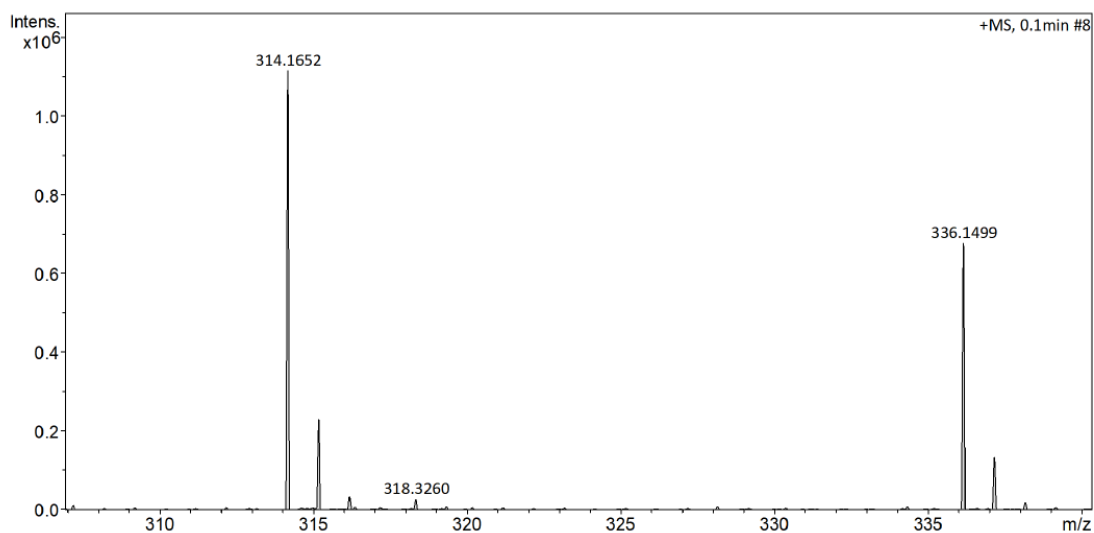


Figura S75 – Espectro de IES-EMAR do composto **9** ( $[M + H]^+$ , modo positivo).

### Dados espectroscópicos do composto **10**

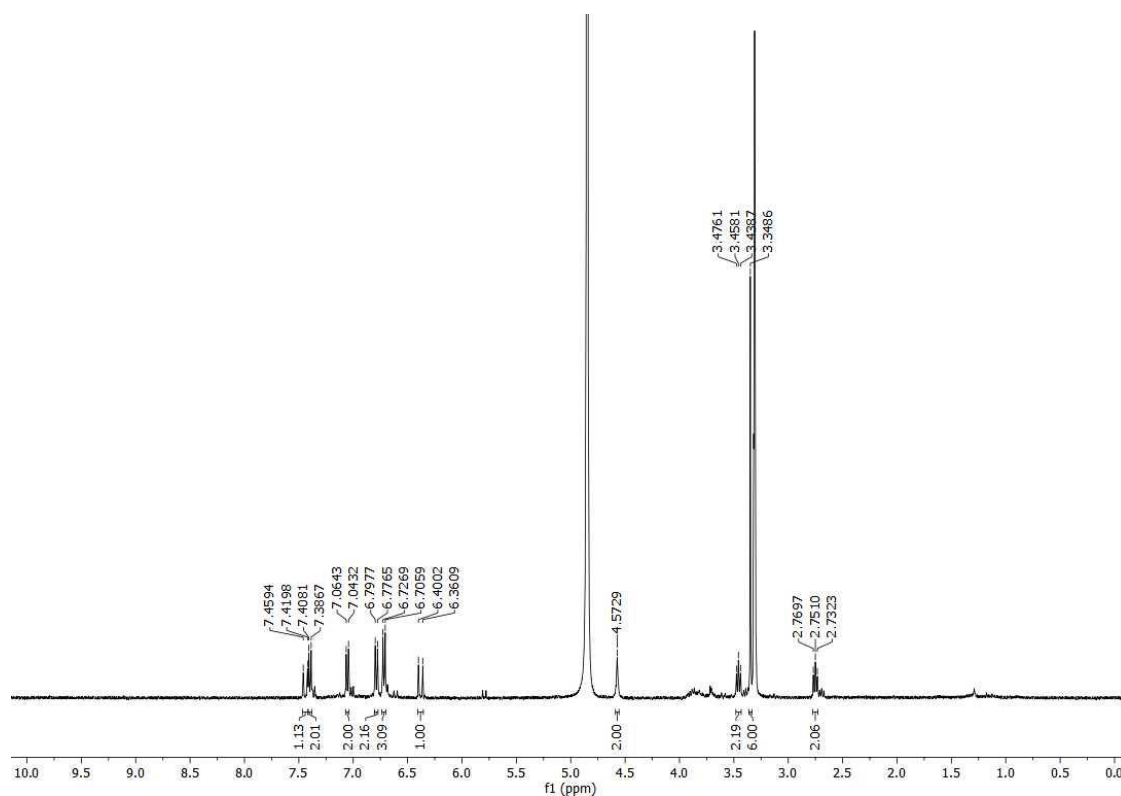


Figura S76 – Espectro de RMN de <sup>1</sup>H do composto **10** (400 MHz, MeOD).

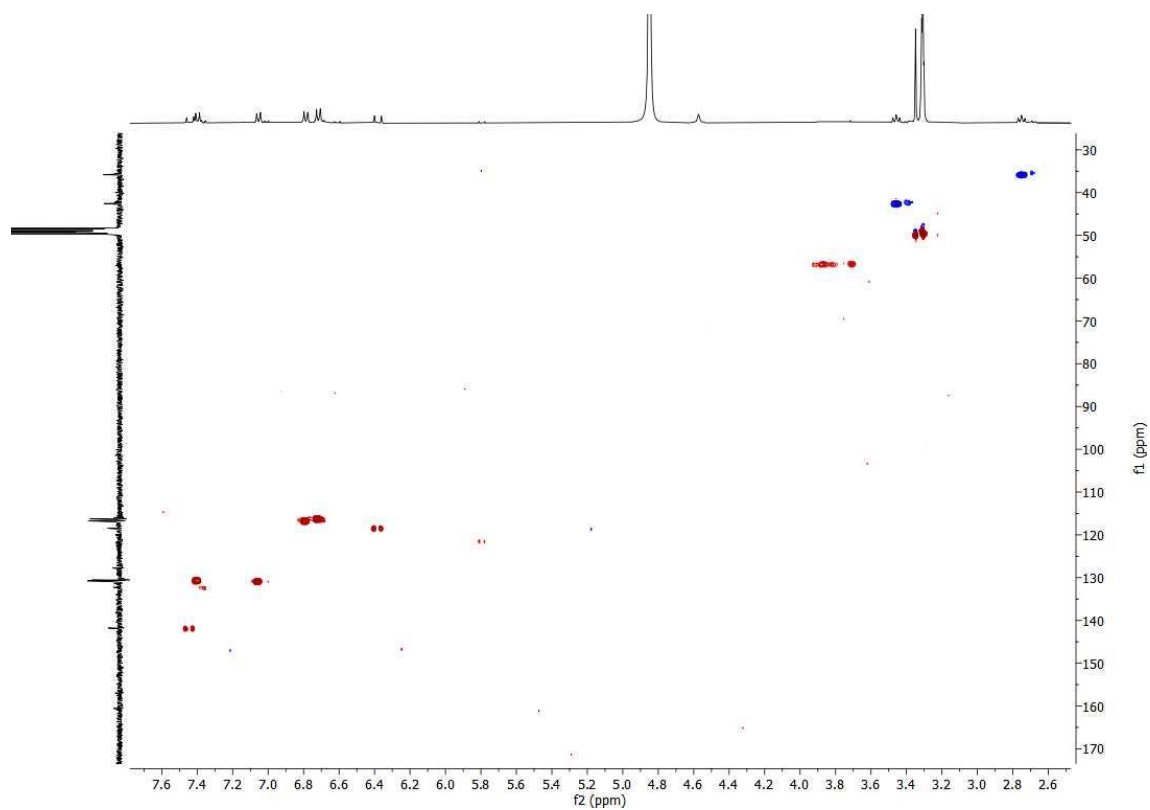


Figura S77 – Espectro de HSQC do composto **10** (400/100 MHz, MeOD).

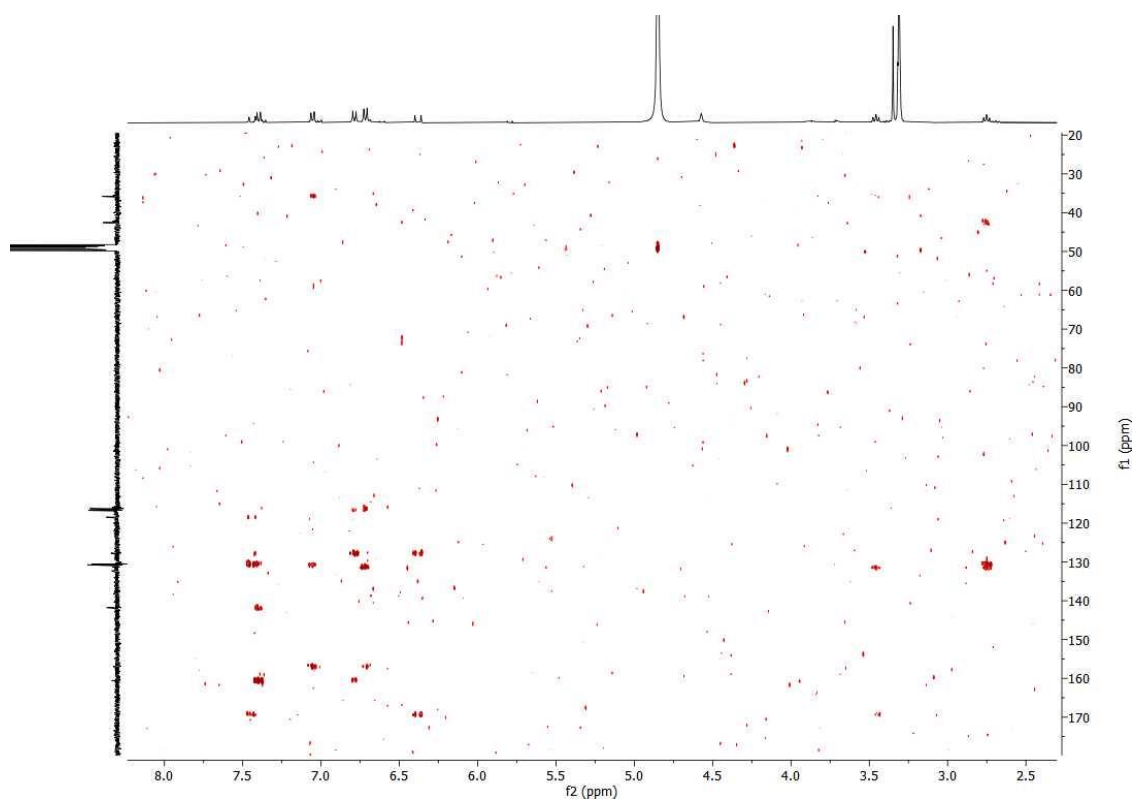


Figura S78 - Espectro de HMBC do composto **10** (400/100 MHz, MeOD).

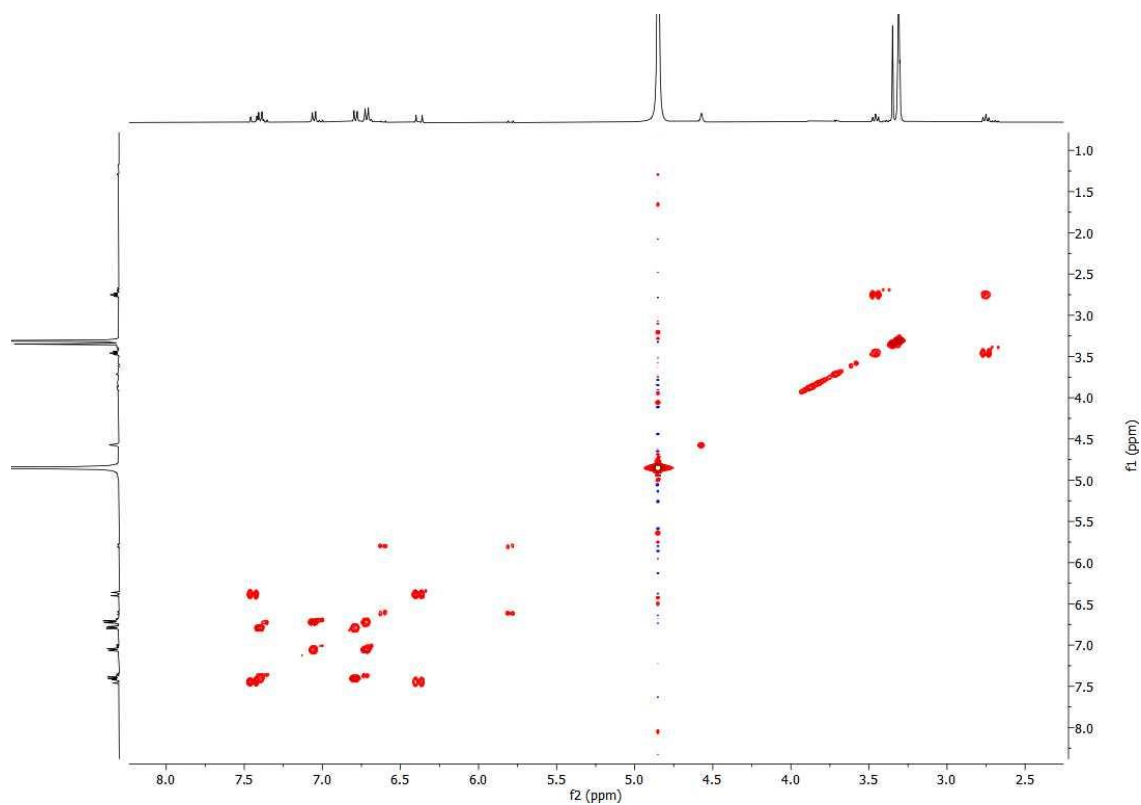


Figura S79 – Espectro de COSY do composto **10** (400 MHz, MeOD).

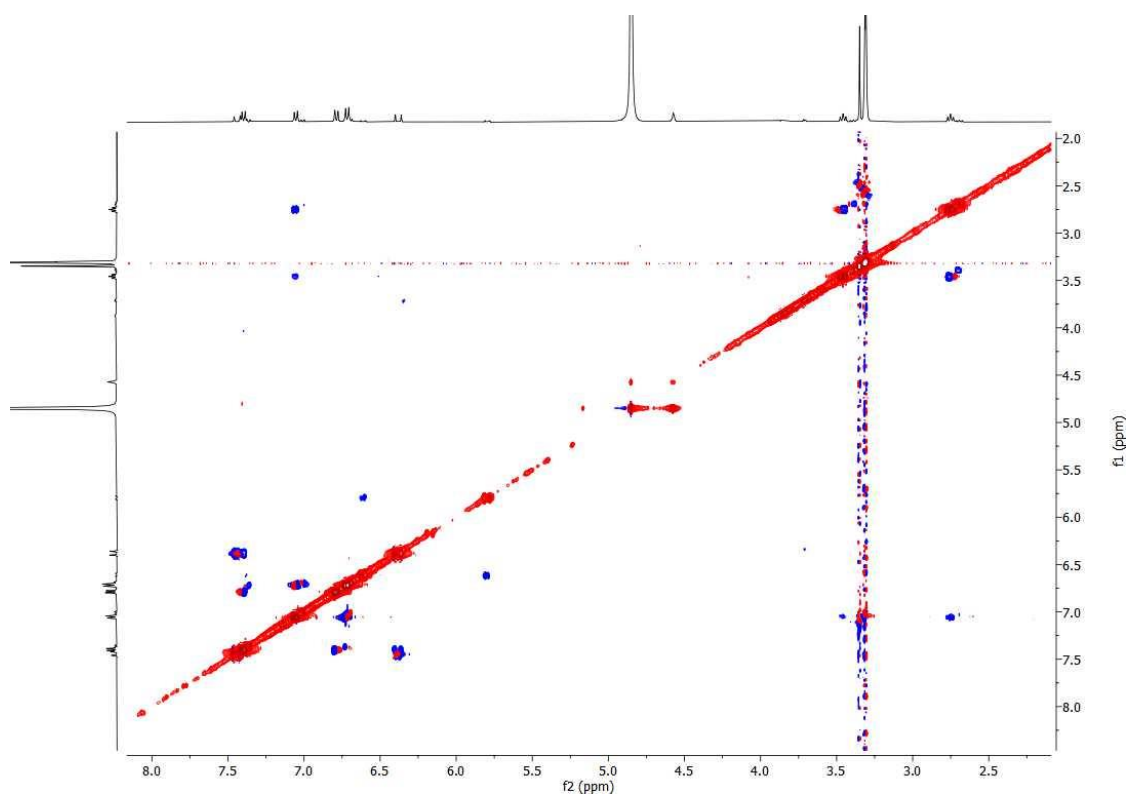


Figura S80 - Espectro de NEOSY do composto **10** (400 MHz, MeOD).



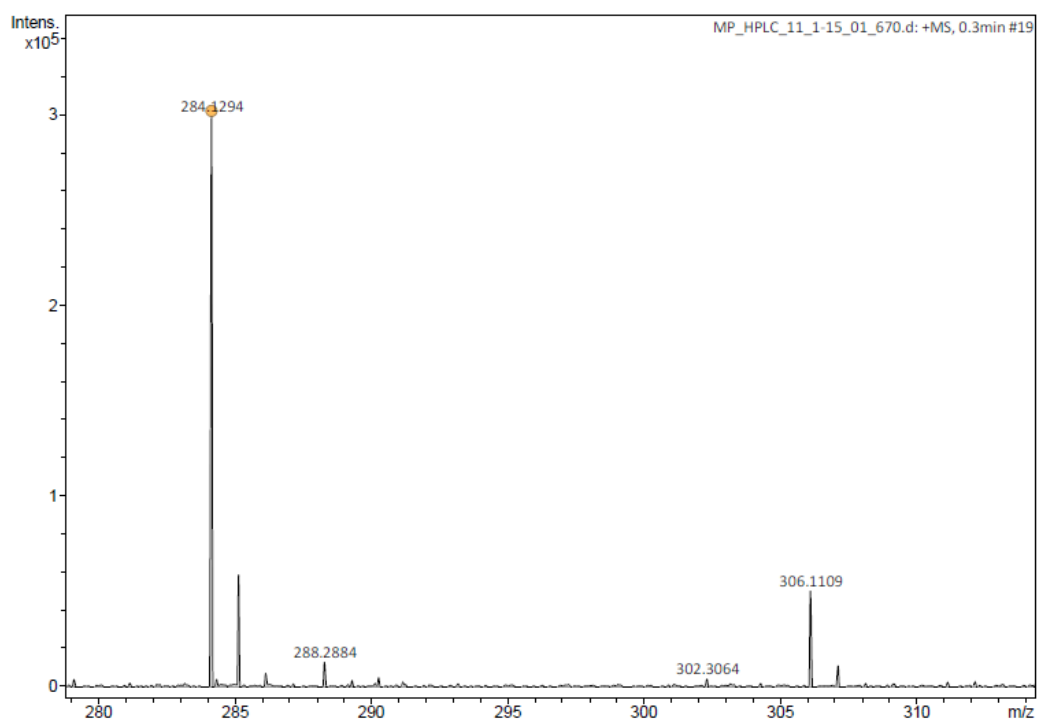


Figura S81 – Espectro de IES-EMAR do composto 10 ( $[M + H]^+$ , modo positivo).

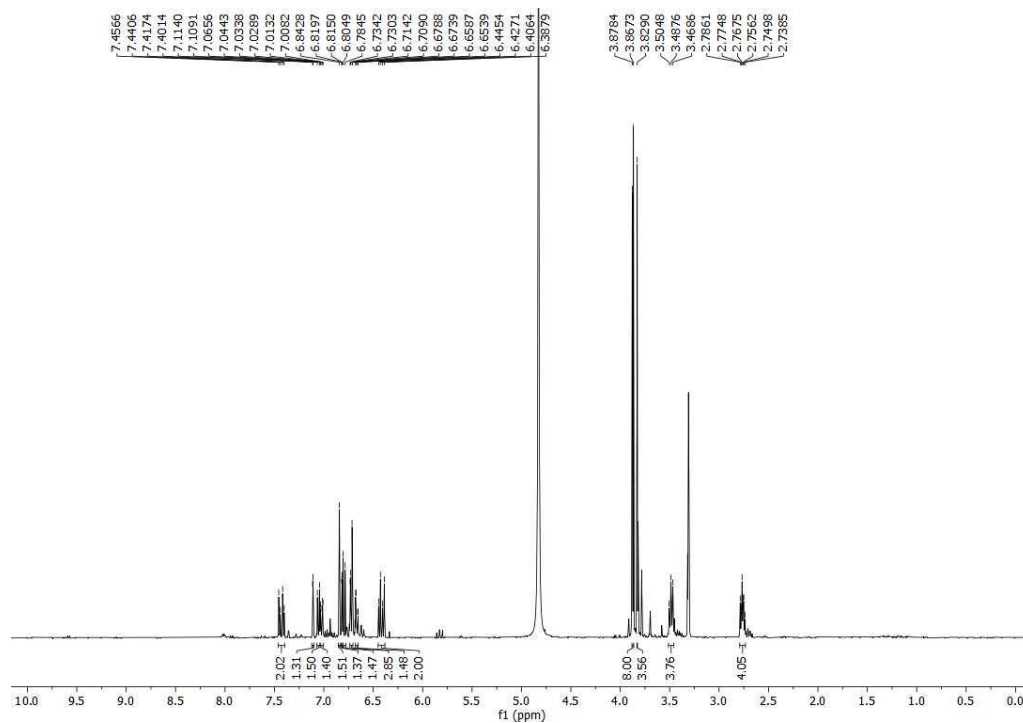
**Dados espectroscópicos dos compostos 11,12**

Figura S82 – Espectro de RMN de <sup>1</sup>H do composto 11,12 (400 MHz, MeOD).

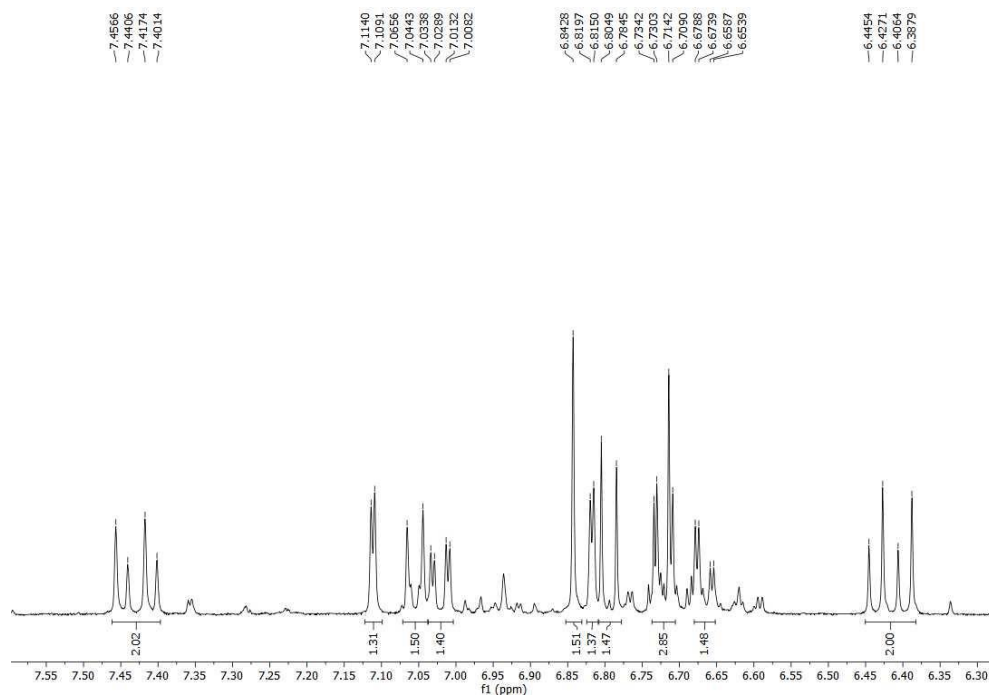


Figura S83 – Expansão do espectro de RMN de <sup>1</sup>H do composto **11,12** (400 MHz, MeOD).

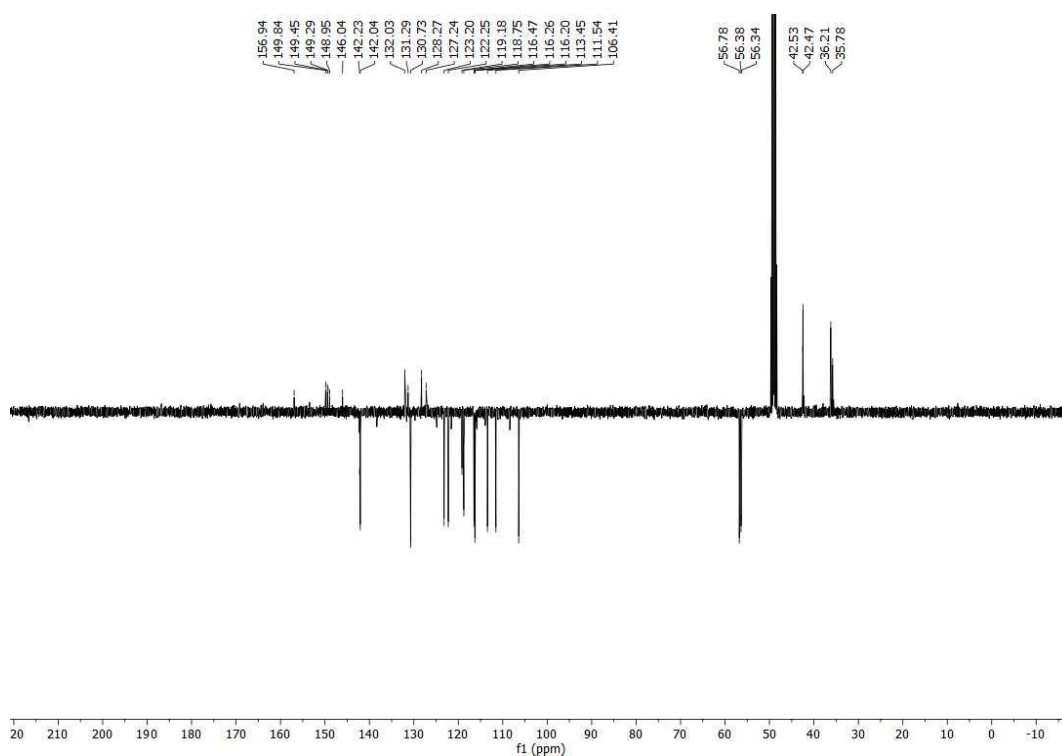


Figura S84 – Espectro de RMN de <sup>13</sup>C-APT do composto **11,12** (100 MHz, MeOD).

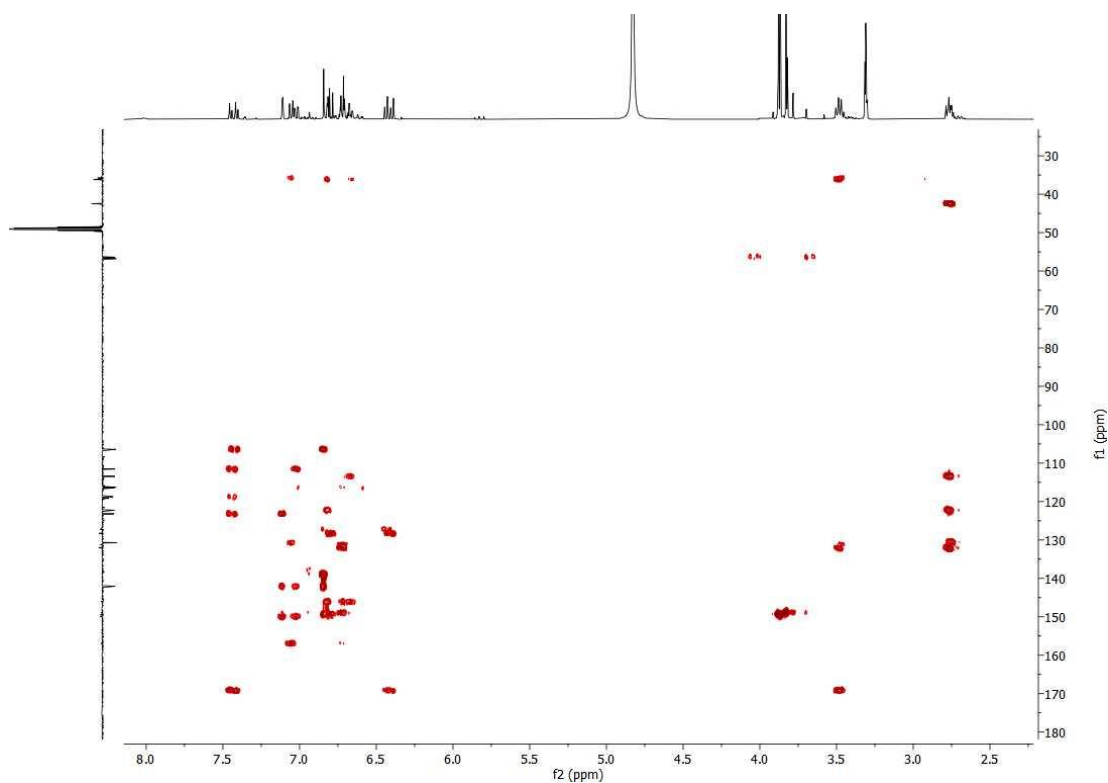


Figura S85 – Espectro de HMBC do compostos **11,12** (400/100 MHz, MeOD).

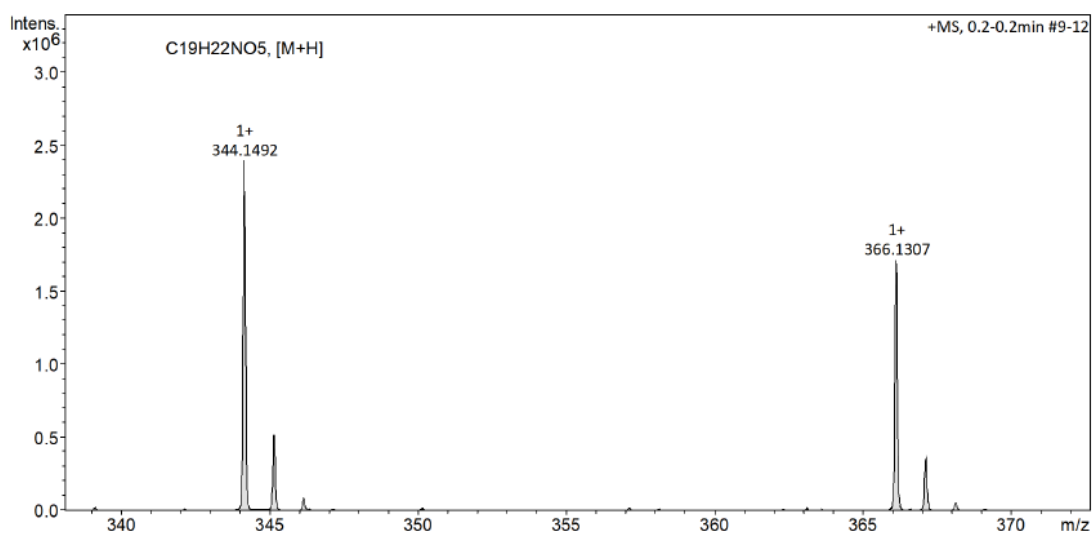


Figura S86 – Espectro de IES-EMAR dos compostos **11,12** ([M + H]<sup>+</sup>, modo positivo).

## Dados espectroscópicos dos compostos **13,14**

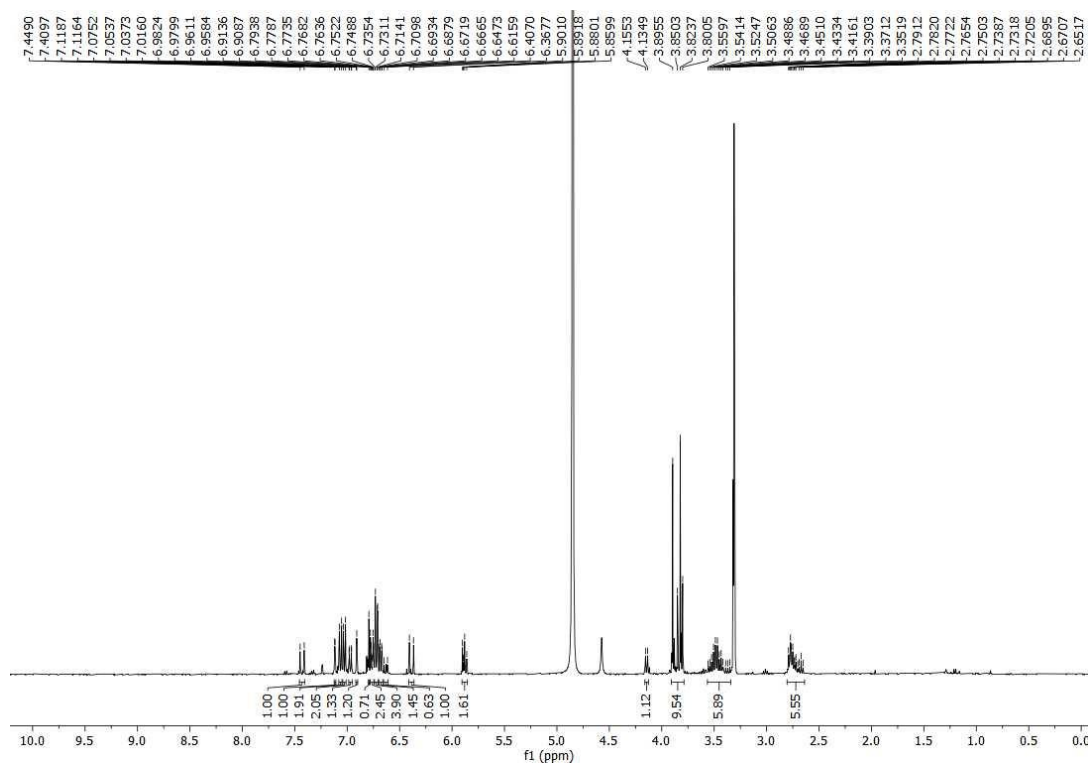


Figura S87 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do compostos **13,14** (400 MHz, MeOD).

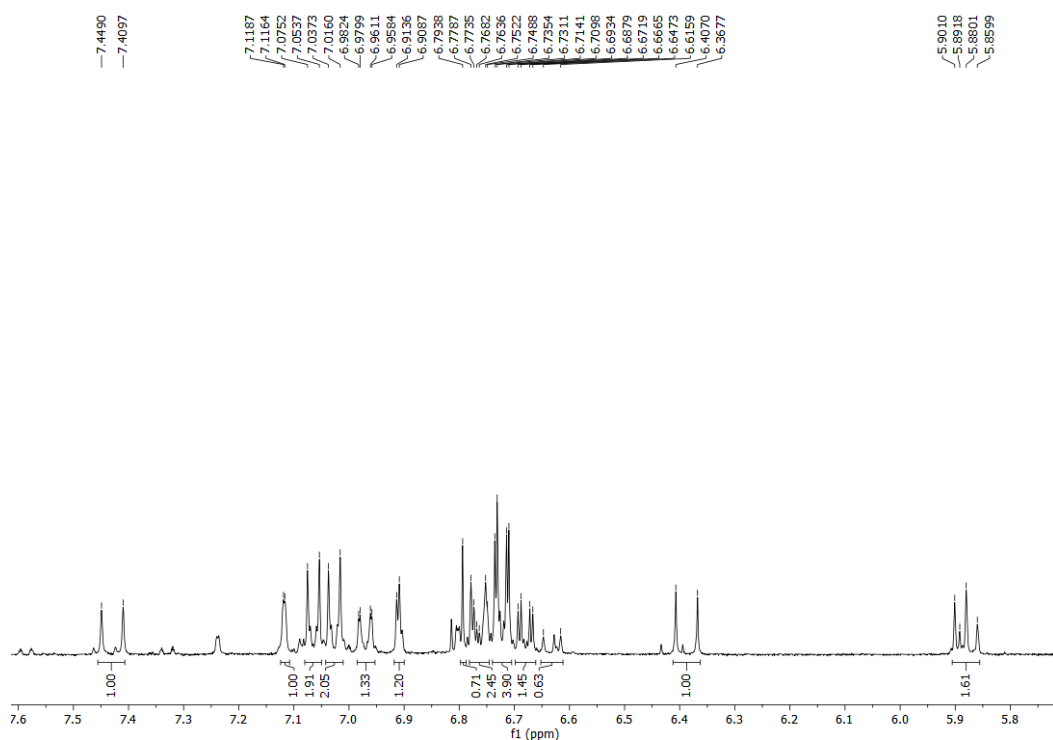


Figura S88 – Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do compostos **13,14** (400 MHz, MeOD).

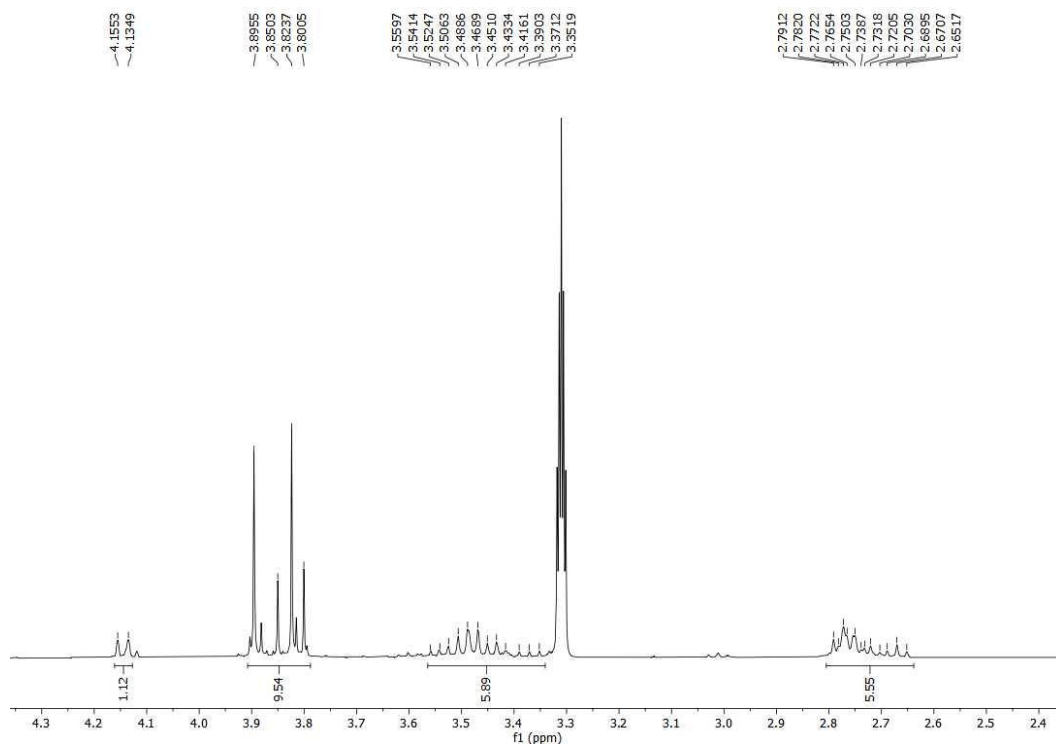


Figura S89 – Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do compostos **13,14** (400 MHz, MeOD).

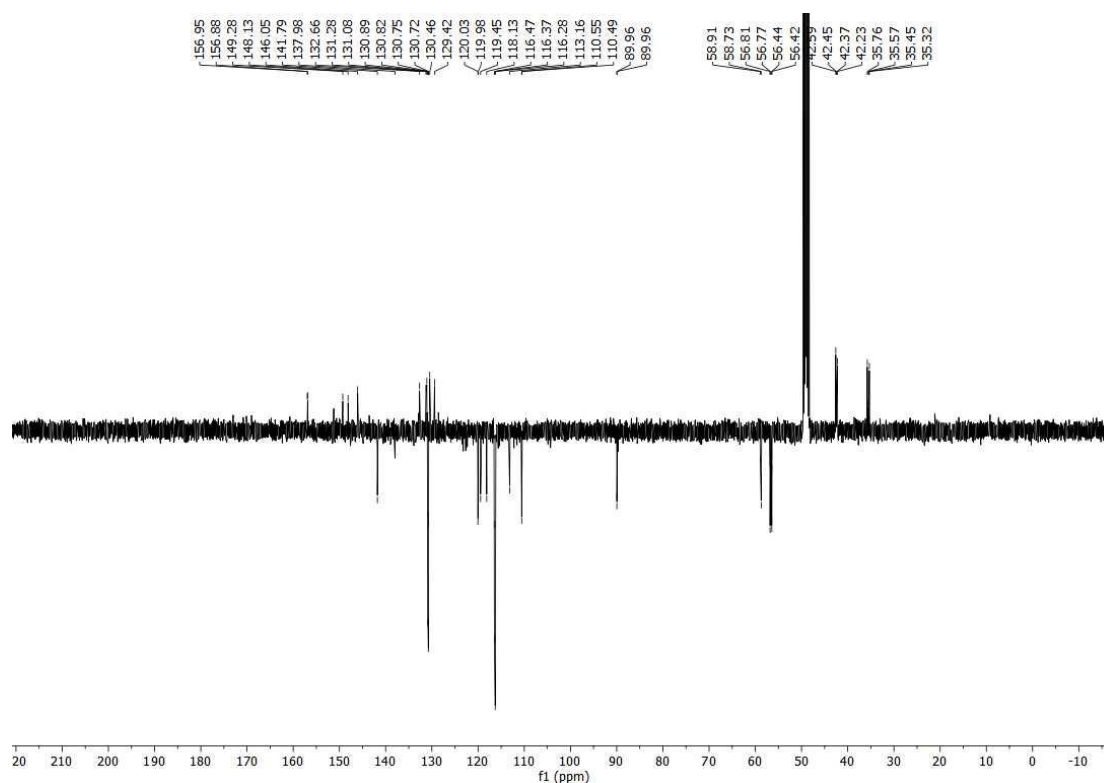


Figura S90 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ -APT dos compostos **13,14** (100 MHz, MeOD).

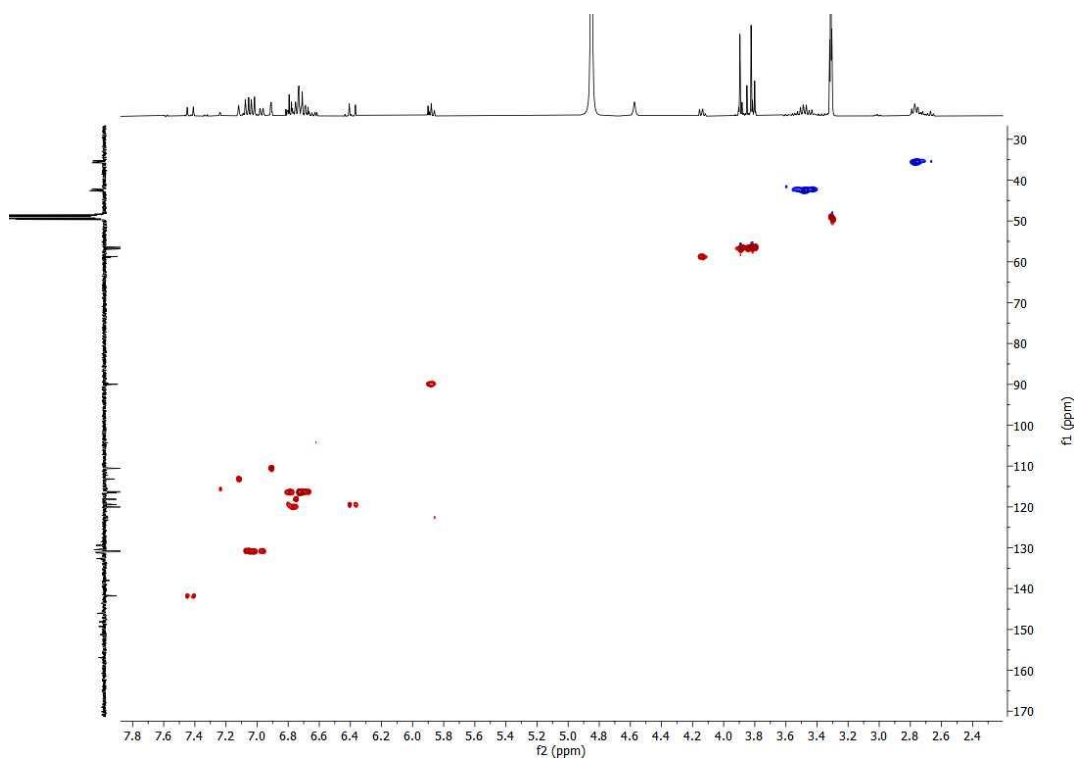


Figura S91 – Espetro de HSQC do compostos **13,14** (400/100 MHz, MeOD).

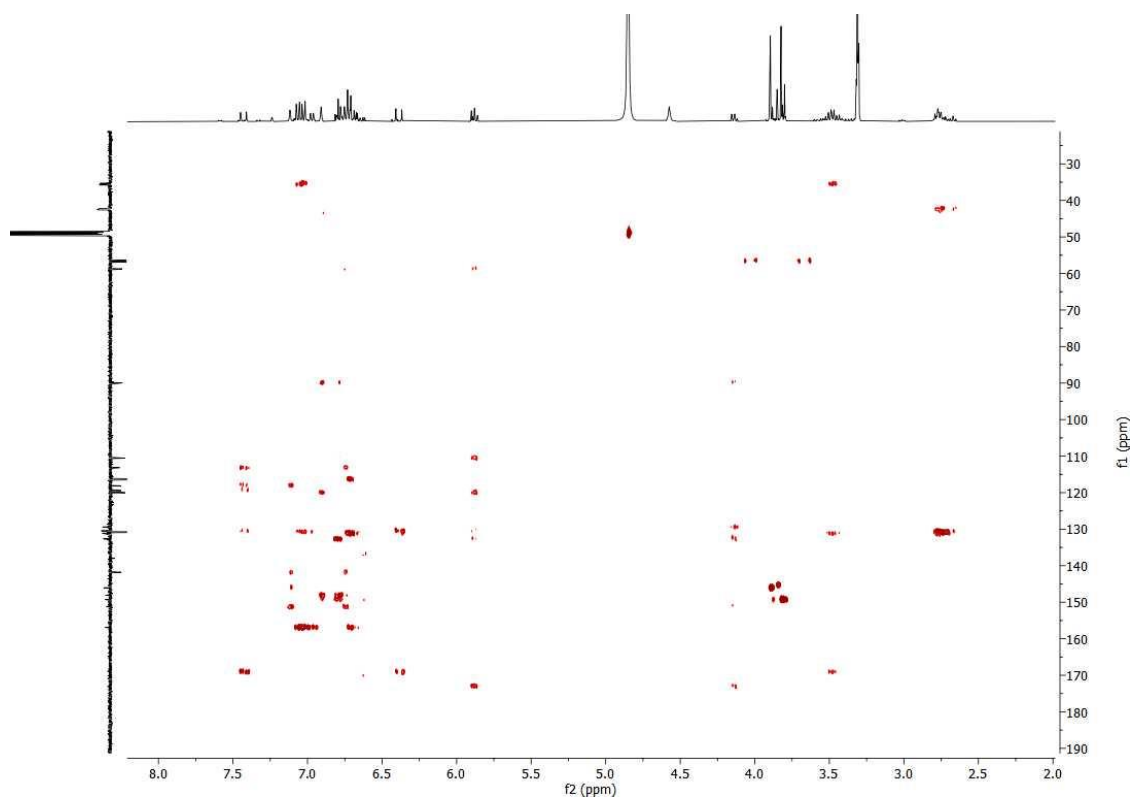


Figura S92 - Espetro de HMBC do compostos **13,14** (400/100 MHz, MeOD).

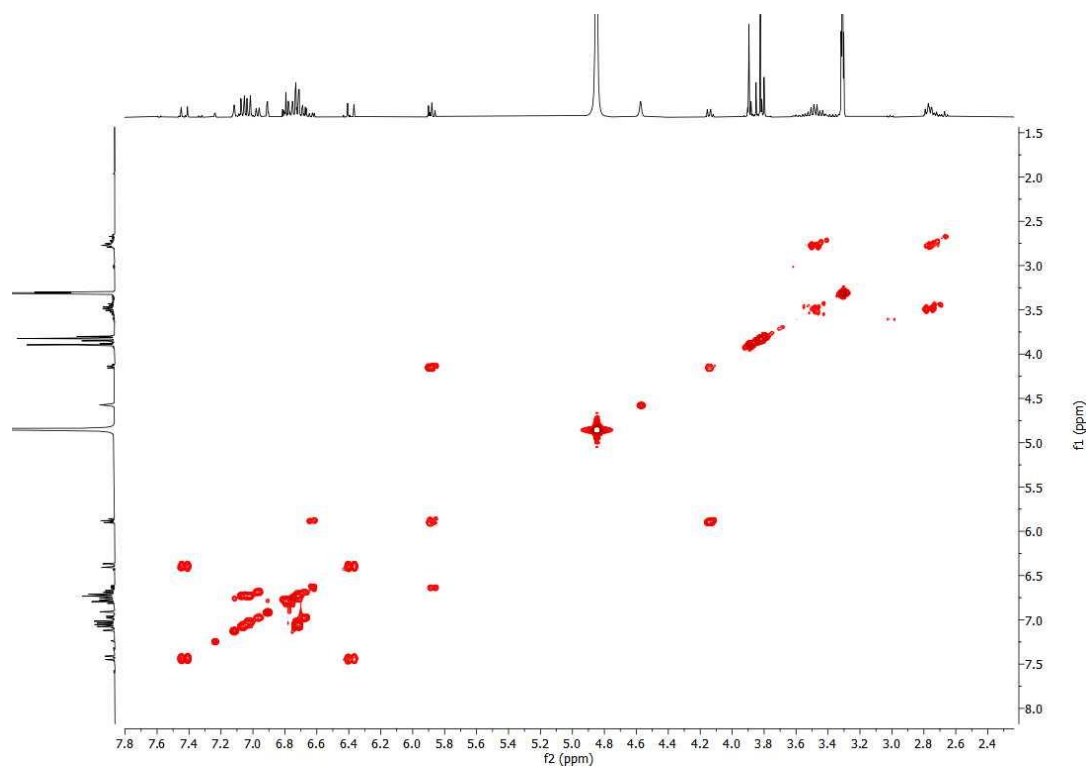


Figura S93 – Espectro de COSY do compostos **13,14** (400 MHz, MeOD).

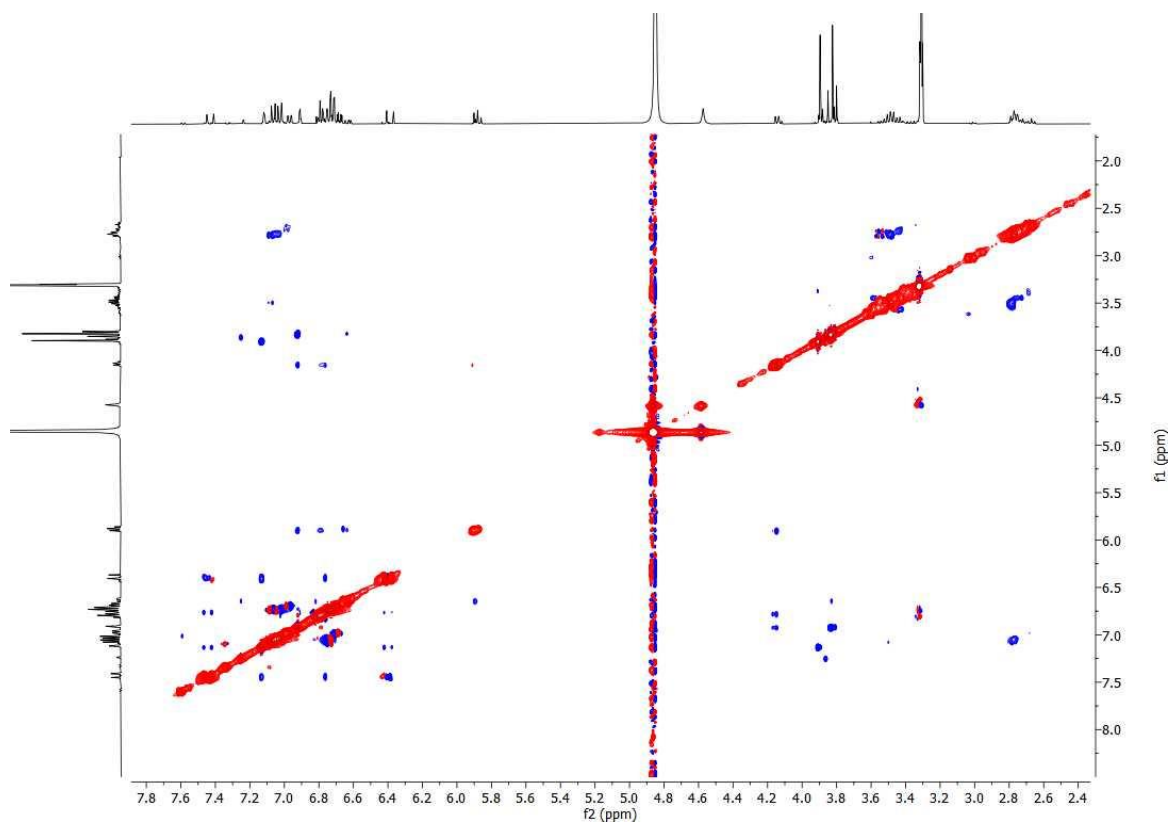


Figura S94 - Espectro de NOESY do compostos **13,14** (400 MHz, MeOD).



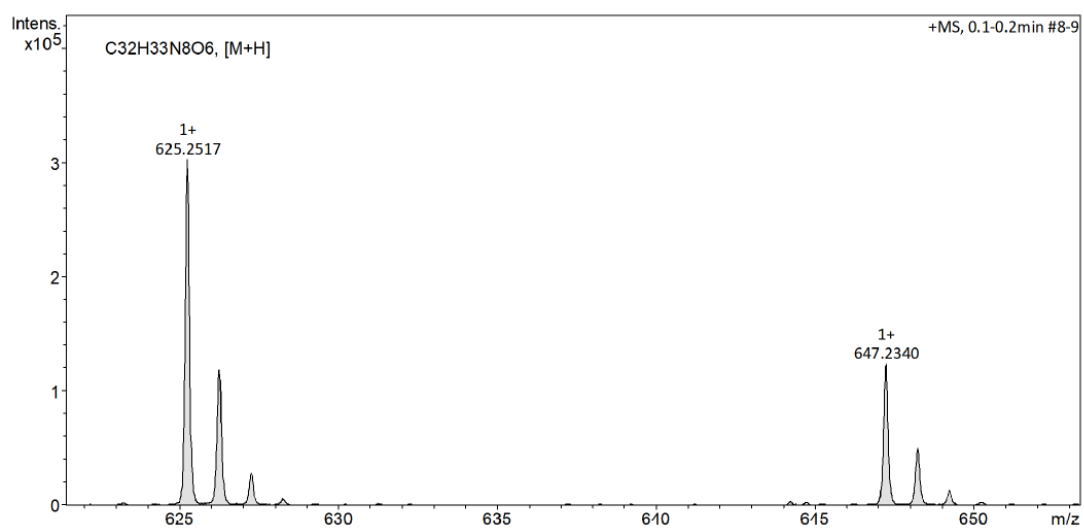


Figura S95 – Espectro de IES-EMAR do compostos **13,14** ([M + H]<sup>+</sup>, modo positivo).

## Dados espectroscópicos do composto 15

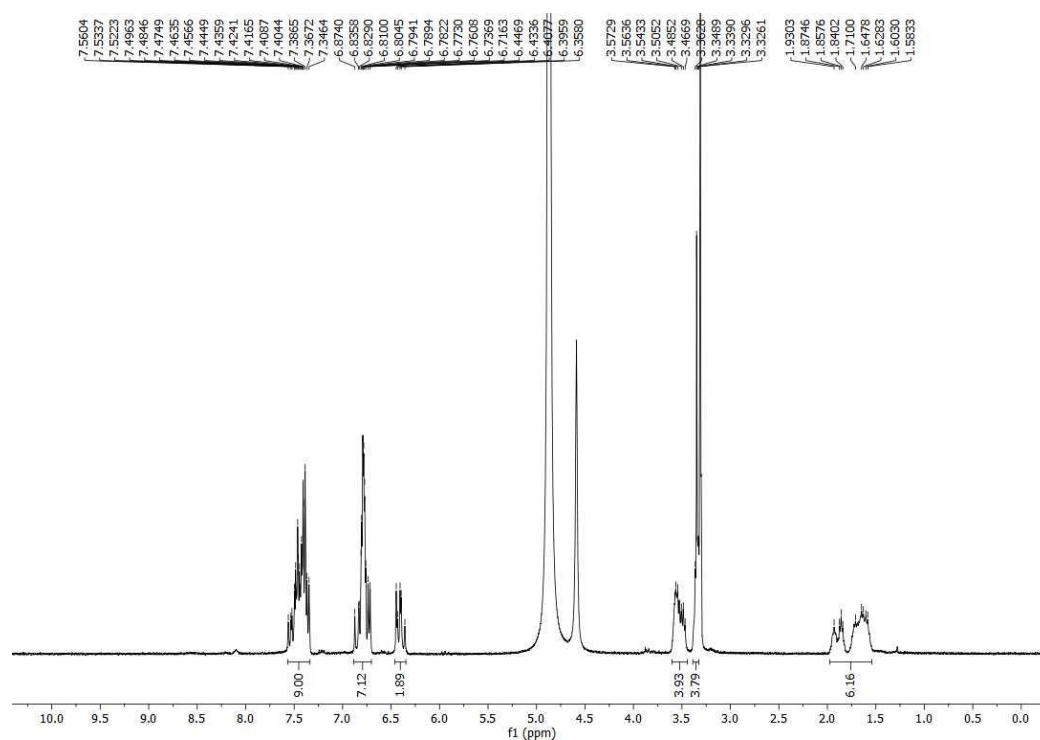


Figura S96 – Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto 15 (400 MHz, MeOD).

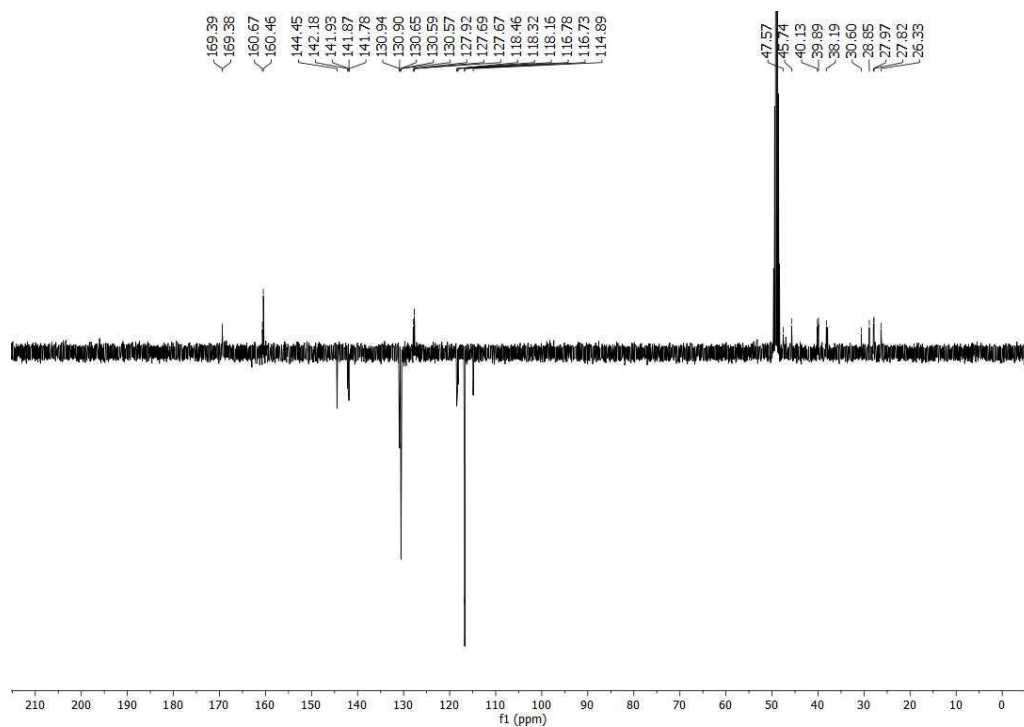


Figura S97 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ -APT do composto 15 (100 MHz, MeOD).

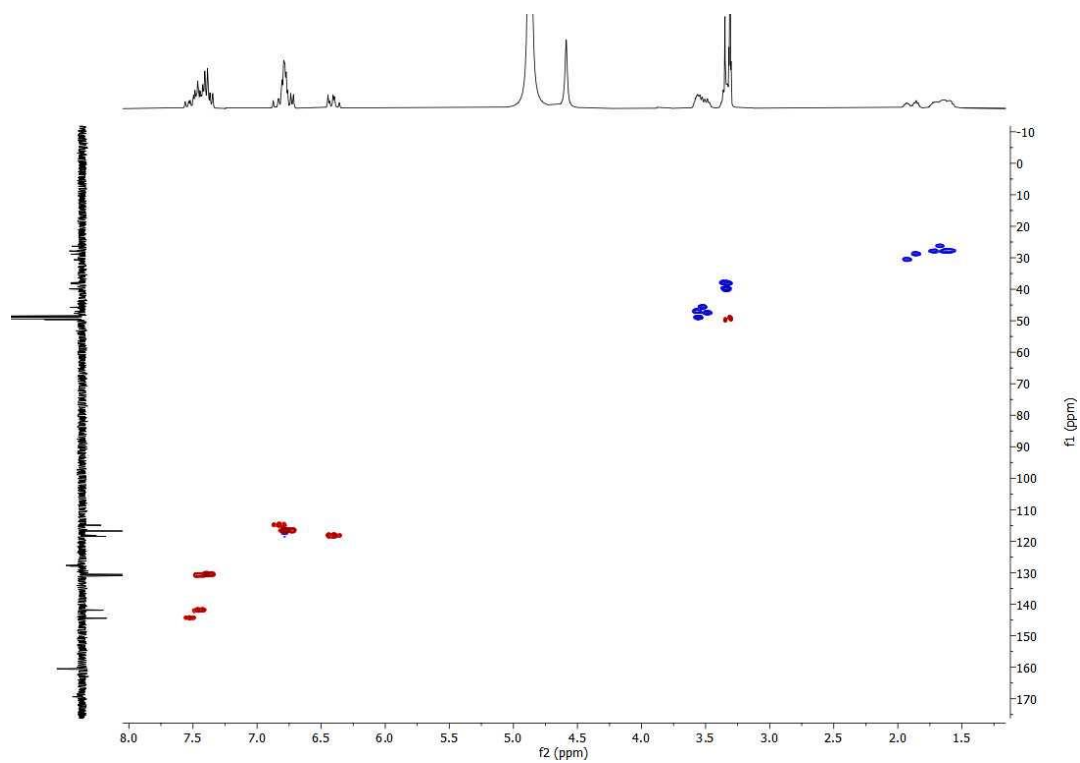


Figura S98 – Espectro de HSQC do composto **15** (400/100 MHz, MeOD).

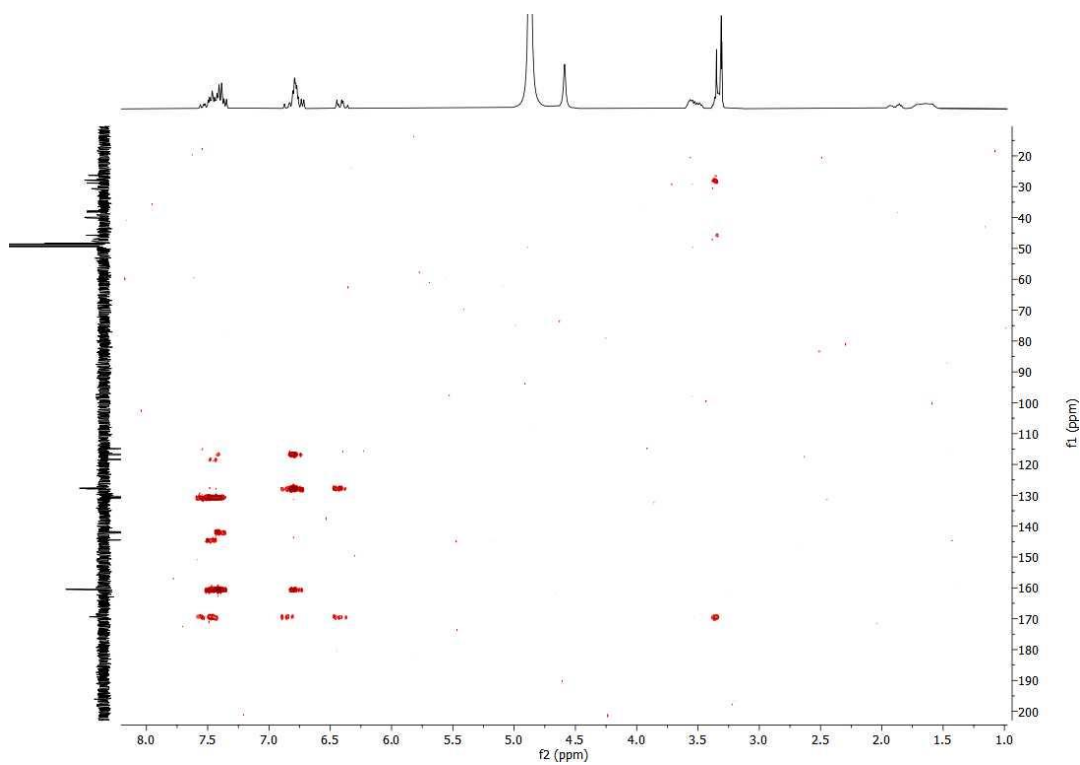


Figura S99 - Espectro de HMBC do composto **15** (400/100 MHz, MeOD).

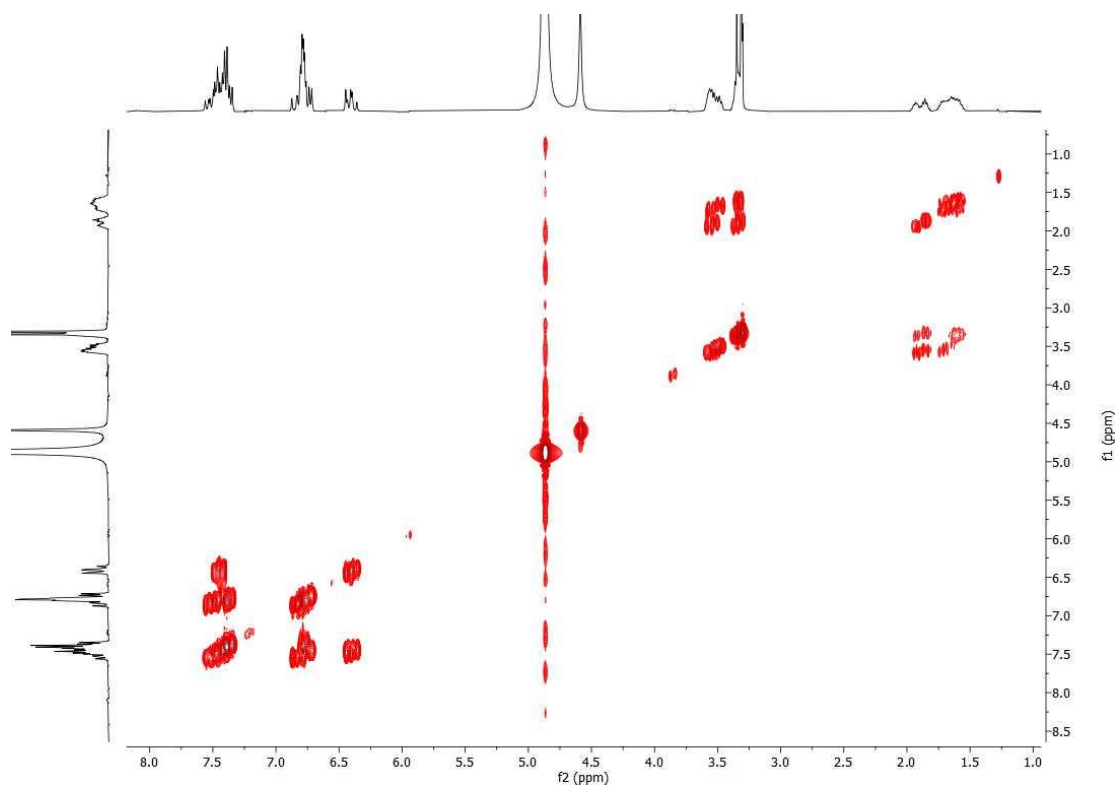


Figura S100 – Espectro de COSY do composto 15 (400 MHz, MeOD).

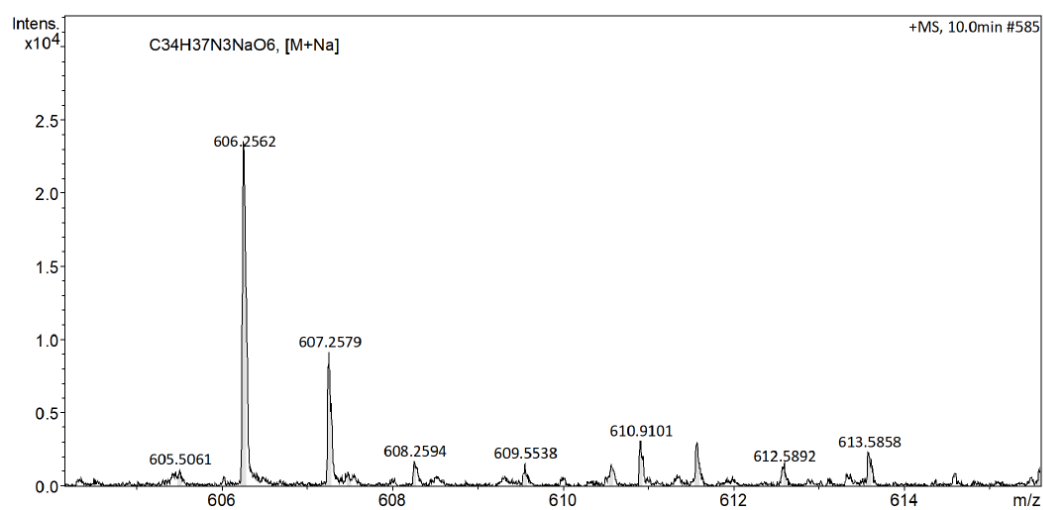


Figura S101 – Espectro de IES-EMAR do composto 15 ( $[M + Na]^+$ , modo positivo).

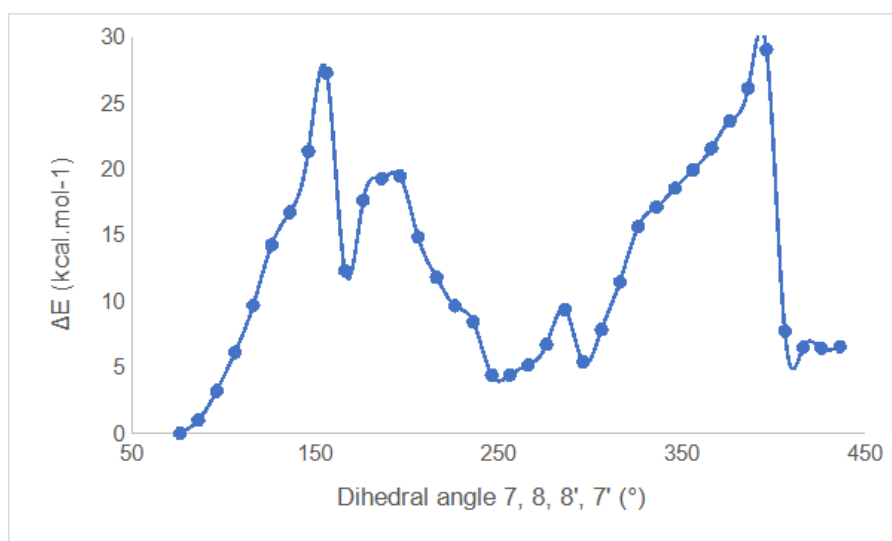
**Cálculos de mecânica quântica do composto 1**

Figura S102 – Níveis de energia calculados (in kcal.mol<sup>-1</sup>) para os confôrmeros do composto **1** em função da rotação em torno do ângulo diedro C7-C8-C8'-C7'.

## Dados de cálculos de RMN do composto 1

Tabela S1 - Probabilidades DP4+ obtidas pela correlação dos deslocamentos químicos calculados de RMN de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  dos 4 possíveis diastereoisômeros (aS) do composto 1 com os dados experimentais de RMN do produto natural isolado.

	$7''R^*,7'''R^*,8aS$	$7''S^*,7'''S^*,8aS$	$7''R^*,7'''S^*,8aS$	$7''S^*,7'''R^*,8aS$
<b>Probabilidades DP4+</b>	0,00%	100,00%	0,00%	0,00%

Tabela S2 - Deslocamentos químicos calculados de RMN de  $^1\text{H}$  [GIAO-mPW1PW91/6-31G(d)-PCM//B3LYP/6-31G(d)] (em ppm), obtidos para os 4 diastereoisômeros do composto 1, e dados experimentais do produto natural isolado.

Núcleos	$\delta_{\text{calc}}$ [ $7''R^*,7'''R^*,8aS$ ]	$\delta_{\text{calc}}$ [ $7''S^*,7'''S^*,8aS$ ]	$\delta_{\text{calc}}$ [ $7''R^*,7'''S^*,8aS$ ]	$\delta_{\text{calc}}$ [ $7''S^*,7'''R^*,8aS$ ]	$\delta_{\text{exp}}$
2	8,45	6,13	6,70	6,65	6,87
6	7,62	6,99	6,37	6,66	6,87
7	8,06	6,53	7,71	6,44	7,82
2'	7,57	6,30	6,50	6,87	6,87
6'	7,41	6,65	7,17	8,06	6,87
7'	7,85	7,54	6,81	7,26	7,86
2''	8,23	7,84	7,21	7,52	6,94
3''	7,83	7,29	6,80	6,73	6,63
5''	7,39	6,59	6,30	6,93	6,63
6''	8,31	7,58	7,44	7,49	6,94
7''	6,13	4,85	5,08	4,87	4,38
8a''	4,35	4,05	2,98	3,95	3,40
8b''	5,58	3,35	4,42	2,68	3,40
2'''	8,50	7,22	7,36	7,59	7,03
3'''	7,86	6,95	6,88	6,82	6,69
5'''	7,67	6,67	6,75	6,81	6,69
6'''	8,49	7,29	7,85	7,24	7,03
7'''	6,03	4,98	5,08	5,29	4,54
8a'''	3,76	4,00	4,00	2,93	3,37
8b'''	4,91	3,02	2,70	4,36	3,37
3',5'-OCH <sub>3</sub>	4,92	3,84	3,99	3,94	3,75
3-OCH <sub>3</sub>	4,87	3,78	3,86	4,03	3,75
5-OCH <sub>3</sub>	4,86	3,94	3,79	3,65	3,75

Tabela S3 – Deslocamentos químicos calculados de RMN de  $^{13}\text{C}$  [GIAO-mPW1PW91/6-31G(d)-PCM//B3LYP/6-31G(d)] (em ppm), obtidos para os 4 diastereoisômeros do composto **1**, e dados experimentais do produto natural isolado.

Núcleos	$\delta_{\text{calc}}$ [7''R*,7'''R*, 8aS]	$\delta_{\text{calc}}$ [7''S*,7'''S*, 8aS]	$\delta_{\text{calc}}$ [7''R*,7'''S*, 8aS]	$\delta_{\text{calc}}$ [7''S*,7'''R*, 8aS]	$\delta_{\text{exp}}$
1	119,5	115,6	118,3	116,3	126,7
2	104,1	103,5	109,6	114,1	108,8
3	139,1	136,1	134,1	134,3	139,0
4	134,3	128,5	131,5	132,5	149,2
5	137,9	136,7	137,9	137,7	139,0
6	111,1	98,7	101,2	97,5	108,8
7	136,6	130,5	134,2	123,1	142,3
8	125,4	122,1	126,0	125,9	127,4
9	166,2	160,9	163,3	160,1	168,2
1'	120,2	117,3	116,3	116,9	126,7
2'	104,0	99,6	113,7	107,5	108,9
3'	138,7	137,8	135,7	136,1	139,1
4'	132,5	130,1	132,9	131,8	149,2
5'	138,2	135,5	138,1	137,5	139,1
6'	107,6	108,6	100,5	100,4	108,9
7'	131,7	136,1	130,8	135,9	142,5
8'	130,5	124,1	123,1	123,3	127,6
9'	164,1	162,0	161,6	161,5	168,2
1''	125,5	126,6	124,9	123,0	134,2
2''	121,7	120,9	119,2	118,4	128,4
3''	109,5	107,6	105,5	105,5	116,0
4''	146,8	144,2	144,7	144,9	158,0
5''	108,9	104,7	104,9	105,9	116,0
6''	121,9	122,5	120,2	118,7	128,4
7''	75,9	70,4	71,7	68,8	73,0
8''	49,2	43,8	45,7	45,1	48,5
1'''	128,0	125,1	124,7	121,8	134,3
2'''	121,5	118,3	119,0	117,7	128,3
3'''	108,6	106,5	105,8	107,6	116,1

<b>4'''</b>	146,5	145,1	145,0	145,5	158,0
<b>5'''</b>	108,9	105,7	105,6	108,0	116,1
<b>6'''</b>	121,7	119,3	118,8	118,7	128,3
<b>7'''</b>	72,1	70,0	67,6	67,1	73,5
<b>8'''</b>	51,3	47,0	43,6	44,7	48,5
<b>3',5'-OCH<sub>3</sub></b>	56,0	50,4	52,8	52,0	56,7
<b>3-OCH<sub>3</sub></b>	56,3	49,7	53,9	53,6	56,7
<b>5-OCH<sub>3</sub></b>	57,3	51,7	50,4	50,5	56,7

---



## Dados de cálculos de RMN de composto 2.

Tabela S4 - Probabilidades de DP4+ obtidas pela correlação dos deslocamentos químicos de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  dos 4 possíveis diastereoisômeros do composto **2** com os dados experimentais de RMN do produto natural isolado.

	$7S^*,7'S^*,7''S^*,7'''R^*,8S^*,8'S^*$	$7S^*,7'S^*,7''R^*,7'''S^*,8S^*,8'S^*$	$7S^*,7'S^*,7''R^*,7'''R^*,8S^*,8'S^*$	$7S^*,7'S^*,7''S^*,7'''S^*,8S^*,8'S^*$
Probabilidades DP4+	0,00%	0,00%	100,00%	0,00%

Tabela S5 – Cálculos de deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$  [GIAO-mPW1PW91/6-31G(d)-PCM//B3LYP/6-31G(d)] (em ppm), obtidos para os 4 diastereoisômeros do composto **2**, e dados experimentais do produto natural isolado.

Núcleos	$\delta_{\text{calc}}$ $[7S^*,7'S^*,7''S^*,7'''R^*,8S^*,8'S^*]$	$\delta_{\text{calc}}$ $[7S^*,7'S^*,7''R^*,7'''S^*,8S^*,8'S^*]$	$\delta_{\text{calc}}$ $[7S^*,7'S^*,7''R^*,7'''R^*,8S^*,8'S^*]$	$\delta_{\text{calc}}$ $[7S^*,7'S^*,7''S^*,7'''S^*,8S^*,8'S^*]$	$\delta_{\text{exp}}$
<b>2</b>	6,00	5,88	6,39	6,71	6,73
<b>6</b>	6,98	7,00	7,08	6,96	6,73
<b>7</b>	5,46	5,52	5,20	6,18	5,27
<b>8</b>	1,62	1,20	2,81	3,16	3,38
<b>2'</b>	5,89	6,98	6,97	7,18	6,73
<b>6'</b>	6,98	6,00	6,84	6,82	6,73
<b>7'</b>	5,53	5,46	6,13	4,78	5,29
<b>8'</b>	1,17	1,63	3,55	2,23	3,38
<b>2''</b>	7,18	7,99	7,25	7,46	6,96
<b>3''</b>	6,18	7,04	7,02	6,96	6,66
<b>5''</b>	7,07	6,28	6,89	7,41	6,66
<b>6''</b>	7,52	7,20	7,79	7,91	6,96
<b>7''</b>	5,00	5,18	4,22	5,33	4,49
<b>8a''</b>	3,67	3,06	2,69	3,70	3,45
<b>8b''</b>	3,46	4,47	3,70	4,13	3,22
<b>2'''</b>	7,26	7,19	7,75	7,65	6,96
<b>3'''</b>	6,35	6,24	7,00	7,11	6,66
<b>5'''</b>	6,97	7,08	6,79	7,16	6,66
<b>6'''</b>	7,92	7,54	7,71	7,85	6,96
<b>7'''</b>	5,18	5,00	4,88	5,51	4,49
<b>8a'''</b>	4,47	3,67	4,54	3,24	3,45
<b>8b'''</b>	3,05	3,46	3,25	4,55	3,22
<b>3',5'-OCH<sub>3</sub></b>	4,08	3,94	4,04	4,58	3,87
<b>3-OCH<sub>3</sub></b>	4,10	4,10	4,07	4,19	3,87
<b>5-OCH<sub>3</sub></b>	3,94	3,95	4,12	4,46	3,87

Tabela S6 - Cálculos de deslocamentos químicos de  $^{13}\text{C}$  [GIAO-mPW1PW91/6-31G(d)-PCM//B3LYP/6-31G(d)] (em ppm), obtidos para os 4 diastereoisômeros do composto **2**, e dados experimentais do produto natural isolado.

Núcleos	$\delta_{\text{calc}}$ [7S*,7'S*,7''S*, 7'''R*,8S*,8'S*]	$\delta_{\text{calc}}$ [7S*,7'S*,7''R*, 7'''S*,8S*,8'S*]	$\delta_{\text{calc}}$ [7S*,7'S*,7''R*, 7'''R*,8S*,8'S*]	$\delta_{\text{calc}}$ [7S*,7'S*,7''S*, 7'''S*,8S*,8'S*]	$\delta_{\text{exp}}$
1	126,0	125,3	123,1	128,7	132,3
2	104,8	105,4	107,0	97,8	104,8
3	134,8	134,1	135,6	138,6	149,4
4	129,4	130,0	130,9	130,2	136,6
5	137,6	137,4	138,6	135,1	149,4
6	96,3	97,9	95,8	103,5	104,8
7	75,9	76,0	79,3	76,7	86,3
8	56,4	55,7	57,5	54,6	60,3
9	163,5	159,7	163,1	163,9	172,5
1'	125,4	126,0	124,7	122,7	132,3
2'	104,5	96,3	95,6	108,4	104,8
3'	134,3	137,6	138,1	136,6	149,4
4'	129,6	129,4	130,2	132,3	136,6
5'	137,4	134,8	136,3	138,4	149,4
6'	97,5	104,8	105,1	101,5	104,8
7'	76,0	75,9	77,9	80,2	86,3
8'	55,9	56,4	53,5	56,3	60,3
9'	159,7	163,5	158,6	162,5	172,5
1''	124,2	120,4	123,8	125,2	134,2
2''	118,9	119,1	119,6	119,3	128,5
3''	107,1	107,6	106,5	107,8	116,1
4''	145,8	146,1	145,4	145,8	158,0
5''	107,0	107,4	106,0	107,3	116,1
6''	118,7	119,3	119,5	119,5	128,5
7''	67,2	69,0	71,7	69,7	73,1
8''	46,1	40,5	47,5	48,1	48,1
1'''	120,4	124,1	124,7	121,1	134,2
2'''	119,3	118,9	121,0	119,6	128,5
3'''	107,4	107,3	106,7	107,5	116,1
4'''	146,1	145,9	145,2	146,6	158,0
5'''	107,6	107,0	106,2	108,5	116,1
6'''	119,1	118,8	120,6	120,7	128,5
7'''	69,0	67,2	68,1	69,6	73,1
8'''	40,4	46,1	39,8	44,7	48,1
3',5'-OCH <sub>3</sub>	52,3	52,3	52,1	54,1	56,8
3-OCH <sub>3</sub>	54,2	54,2	53,4	52,1	56,8

5-OCH <sub>3</sub>	50,4	50,6	51,1	55,6	56,8
--------------------	------	------	------	------	------

### NMR calculation data for compound 3.

Tabela S7 - Probabilidades de DP4+ obtidas pela correlação dos deslocamentos químicos calculados de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C de ambos os estereoisômeros do composto **3** com os dados experimentais de RMN do produto natural isolado.

	<b>7S,7'S,7'''S,8S,8'S</b>	<b>7R,7'R,7'''S,8R,8'R</b>
<b>Probabilidades DP4+</b>	100,00%	0,00%

Tabela S8 – Cálculos de deslocamentos químicos de RMN de <sup>1</sup>H [GIAO-mPW1PW91/6-31G(d)-PCM//B3LYP/6-31G(d)] (em ppm), obtidos para ambos os diastereoisômeros do composto **3** e dados experimentais do produto natural isolado.

Núcleos	$\delta_{\text{calc}}$ [7S,7'S,7'''S,8S,8'S]	$\delta_{\text{calc}}$ [7R,7'R,7'''S,8R,8'R]	$\delta_{\text{exp}}$
2	6,49	6,25	6,71
6	7,13	6,89	6,71
7	5,55	5,34	5,26
8	2,22	0,87	3,35
2'	6,26	6,61	6,73
6'	7,09	6,58	6,73
7'	5,45	5,63	5,28
8'	1,76	1,38	3,40
2''	7,38	7,52	6,83
3''	6,53	6,92	6,63
5''	7,02	6,36	6,63
6''	7,24	6,99	6,83
7a''	2,87	2,64	2,59
7b''	2,40	3,02	2,53
8a''	2,80	3,77	3,37
8b''	4,28	3,00	3,18
2'''	7,60	7,12	6,95
3'''	7,22	6,26	6,66
5'''	6,72	6,82	6,66
6'''	7,49	7,81	6,95
7'''	5,15	5,13	4,46
8a'''	3,38	4,38	3,49
8b'''	3,89	3,05	3,18
3,5-OCH <sub>3</sub>	4,12	4,03	3,88
3',5'-OCH <sub>3</sub>	4,07	4,00	3,86

Tabela S9 – Cálculos de deslocamentos químicos de RMN de  $^{13}\text{C}$  [GIAO-mPW1PW91/6-31G(d)-PCM//B3LYP/6-31G(d)] (em ppm), obtidos para ambos os diastereoisômeros do composto **3** e dados experimentais do produto natural isolado.

Núcleos	$\delta_{\text{calc}}$ [7S,7'S,7'''S,8S,8'S]	$\delta_{\text{calc}}$ [7R,7'R,7'''S,8R,8'R]	$\delta_{\text{exp}}$
1	123,2	126,3	131,0
2	103,7	98,7	104,7
3	136,0	135,7	149,5
4	129,2	127,7	136,7
5	138,2	136,8	149,5
6	95,2	97,9	104,7
7	78,3	79,1	86,4
8	58,4	58,4	60,6
9	159,1	160,1	172,1
1'	125,6	126,8	132,4
2'	105,3	101,1	104,9
3'	135,2	136,0	149,4
4'	129,8	129,3	136,7
5'	137,9	136,0	149,4
6'	96,8	100,6	104,9
7'	77,6	78,5	86,4
8'	56,2	56,6	60,3
9'	165,9	161,1	172,5
1''	120,3	121,0	130,8
2''	121,9	121,8	130,7
3''	108,2	106,7	116,2
4''	145,6	145,3	156,9
5''	106,9	107,3	116,2
6''	122,3	122,5	130,7
7''	32,5	31,1	35,7
8''	33,8	37,0	42,6
1'''	126,5	121,0	134,5
2'''	119,5	118,7	128,5
3'''	107,3	106,9	116,1
4'''	145,2	145,5	158,0
5'''	106,0	106,5	116,1
6'''	118,8	118,8	128,5
7'''	68,4	68,4	73,2
8'''	47,2	41,2	48,1
3,5-OCH <sub>3</sub>	51,2	70,9	56,8
3',5'-OCH <sub>3</sub>	54,6	51,8	56,9

### Dados de cálculos de RMN do composto 4

Tabela S10 - Probabilidades de DP4+ obtidas pela correlação dos deslocamentos químicos calculados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  dos 4 possíveis diaesterioisômeros do composto 4 com os dados experimentais de RMN do produto natural isolado.

	$7'S^*,7''R^*,$ $7'''R^*,8'R^*$	$7'S^*,7''S^*,$ $7'''S^*,8'R^*$	$7'S^*,7''R^*,$ $7'''S^*,8'R^*$	$7'S^*,7''S^*,$ $7'''R^*,8'R^*$
Probabilidades DP4+	0,00%	0,00%	100,00%	0,00%

Tabela S11 – Cálculos de deslocamentos químicos de RMN de  $^1\text{H}$  [GIAO-mPW1PW91/6-31G(d)-PCM//B3LYP/6-31G(d)] (em ppm), obtidos para os 4 diastereoisômeros do composto 4, e dados experimentais do produto natural isolado.

Núclei	$\delta_{\text{calc}}$ [ $7'S^*,7''R^*,$ $7'''R^*,8'R^*$ ]	$\delta_{\text{calc}}$ [ $7'S^*,7''S^*,$ $7'''S^*,8'R^*$ ]	$\delta_{\text{calc}}$ [ $7'S^*,7''R^*,$ $7'''S^*,8'R^*$ ]	$\delta_{\text{calc}}$ [ $7'S^*,7''S^*,$ $7'''R^*,8'R^*$ ]	$\delta_{\text{exp}}$
2	6,59	6,53	6,84	6,57	6,77
7	7,02	6,76	7,47	7,37	7,33
2'	5,66	6,82	6,45	6,59	6,33
6'	6,49	7,07	6,22	5,95	6,33
7'	5,25	4,67	4,87	4,61	4,87
8'	3,60	3,87	3,37	2,59	3,72
2''	7,15	7,40	7,46	7,07	7,14
3''	6,80	6,91	6,66	6,25	6,72
5''	6,38	6,73	6,81	6,89	6,72
6''	7,13	7,62	7,39	7,24	7,14
7''	5,03	5,19	5,11	5,09	4,68
8a''	3,29	2,70	3,23	3,33	3,39
8b''	4,08	3,58	3,22	4,05	3,39
2'''	7,49	7,55	7,21	7,25	6,96
3'''	6,71	6,87	6,74	6,89	6,67
5'''	6,91	6,78	6,92	6,70	6,67
6'''	7,54	7,26	7,44	7,25	6,96
7'''	4,85	4,42	4,84	5,02	4,53
8a'''	3,51	3,66	3,38	4,06	3,34
8b'''	2,87	2,91	3,29	3,12	3,25

<b>3',5'-OCH<sub>3</sub></b>	3,66	3,89	3,90	4,18	3,68
<b>3-OCH<sub>3</sub></b>	3,97	3,95	4,04	4,15	3,92
<b>5-OCH<sub>3</sub></b>	4,05	3,89	3,49	3,63	3,58

Tabela S12 - Cálculos de deslocamentos químicos de RMN de <sup>13</sup>C [GIAO-mPW1PW91/6-31G(d)-PCM//B3LYP/6-31G(d)] (em ppm), obtidos para os 4 diastereoisômeros do composto **4**, e dados experimentais do produto natural isolado.

Núclei	$\delta_{\text{calc}}$	$\delta_{\text{calc}}$	$\delta_{\text{calc}}$	$\delta_{\text{calc}}$	$\delta_{\text{exp}}$
	[7''R*,7'''R*, 8aS]	[7''S*,7'''S*, 8aS]	[7''R*,7'''S*, 8aS]	[7''S*,7'''R*, 8aS]	
<b>1</b>	115,4	113,9	116,0	116,9	124,2
<b>2</b>	100,7	99,6	109,2	101,3	109,1
<b>3</b>	136,9	137,1	137,1	137,8	149,3
<b>4</b>	135,5	133,1	137,2	134,4	143,3
<b>5</b>	135,1	135,5	136,9	135,3	146,9
<b>6</b>	119,8	115,9	118,1	114,1	125,2
<b>7</b>	129,9	121,7	129,9	129,6	135,4
<b>8</b>	117,9	124,7	118,8	118,4	126,8
<b>9</b>	164,4	161,7	160,0	158,8	170,3
<b>1'</b>	126,9	129,0	126,9	125,2	135,3
<b>2'</b>	99,5	106,1	100,5	103,5	106,0
<b>3'</b>	136,5	135,7	136,6	136,3	149,0
<b>4'</b>	123,7	129,8	125,8	128,6	135,3
<b>5'</b>	137,6	137,7	137,0	137,3	149,0
<b>6'</b>	96,6	98,4	96,2	99,4	106,0
<b>7'</b>	36,4	36,0	38,0	37,7	41,4
<b>8'</b>	47,6	49,1	48,9	47,5	50,2
<b>9'</b>	163,6	165,2	162,3	166,7	174,3
<b>1''</b>	123,6	124,1	123,5	125,2	134,7
<b>2''</b>	117,5	119,3	119,6	118,2	128,4
<b>3''</b>	107,0	105,7	106,0	106,3	116,1
<b>4''</b>	145,5	144,9	145,5	145,1	158,0
<b>5''</b>	106,4	105,7	106,2	106,9	116,1
<b>6''</b>	118,3	118,4	119,6	117,8	128,4
<b>7''</b>	69,4	67,0	68,3	69,5	73,4

<b>8"</b>	47,2	47,1	48,1	46,7	48,4
<b>1'''</b>	125,7	124,2	123,1	125,1	134,3
<b>2'''</b>	119,2	118,9	119,0	118,9	128,4
<b>3'''</b>	105,4	106,6	106,9	106,5	116,1
<b>4'''</b>	144,9	145,5	145,8	144,4	157,9
<b>5'''</b>	105,8	105,7	107,4	105,7	116,1
<b>6'''</b>	119,4	120,8	119,5	118,7	128,4
<b>7'''</b>	71,7	70,6	69,1	69,3	72,8
<b>8'''</b>	49,7	43,6	44,1	46,4	48,0
<b>3',5'-OCH<sub>3</sub></b>	50,6	51,3	50,2	51,1	56,7
<b>3-OCH<sub>3</sub></b>	50,5	50,2	52,1	51,1	56,8
<b>5-OCH<sub>3</sub></b>	53,6	53,0	54,9	53,4	60,8

---

## Dados de cálculos de RMN do composto 5

Tabela S13 - Probabilidades de DP4+ obtidas pela correlação dos deslocamentos químicos calculados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de ambos os diastereoisômeros do composto **5** com os dados experimentais de RMN do produto natural isolado

	<b>7'S*,7'''R*,8'R*</b>	<b>7'S*,7'''S*,8'R*</b>
<b>Prababilidades DP4+</b>	0,00%	100,00%

Tabela S14 - Deslocamentos químicos de RMN de  $^1\text{H}$  calculados [GIAO-mPW1PW91/6-31G(d)-PCM//B3LYP/6-31G(d)] (em ppm), obtidos para ambos os diastereoisômeros do composto **5** e dados experimentais do produto natural isolado.

<b>Núcleos</b>	<b><math>\delta_{\text{calc}}</math> [7'S,7'''R,8'R]</b>	<b><math>\delta_{\text{calc}}</math> [7'S,7'''S,8'R]</b>	<b><math>\delta_{\text{exp}}</math></b>
<b>2</b>	6,41	6,62	6,76
<b>7</b>	6,20	6,88	7,27
<b>7'</b>	5,08	5,31	4,90
<b>8'</b>	3,28	3,44	3,72
<b>2',6'</b>	6,04	6,24	6,33
<b>2'',6''</b>	7,06	7,17	6,94
<b>3'',5''</b>	6,65	6,67	6,66
<b>7''</b>	2,82	2,22	2,68
<b>8''</b>	3,46	3,70	3,38
<b>2''',6'''</b>	7,39	7,52	6,98
<b>3''',5'''</b>	6,53	6,85	6,67
<b>7'''</b>	4,79	3,12	4,52
<b>8a'''</b>	3,90	4,15	3,35
<b>8b'''</b>	3,22	3,35	3,26
<b>3'-OCH3</b>	4,06	4,05	3,70
<b>5'-OCH3</b>	3,39	3,87	3,70
<b>3-OCH3</b>	4,05	4,24	3,92
<b>5-OCH3</b>	4,05	4,11	3,53



Tabela S15 - Deslocamentos químicos de RMN de  $^{13}\text{C}$  calculados [GIAO-mPW1PW91/6-31G(d)-PCM//B3LYP/6-31G(d)] (em ppm), obtidos para ambos os diastereoisômeros do composto **5** e dados experimentais do produto natural isolado.

Núcleos	$\delta_{\text{calc}}$ [7'S,7'''R,8'R]	$\delta_{\text{calc}}$ [7'S,7'''S,8'R]	$\delta_{\text{exp}}$
1	116,1	116,3	124,2
2	110,1	102,2	109,1
3	135,5	136,7	149,3
4	137,0	135,3	143,2
5	136,8	135,3	147,0
6	119,4	119,9	125,3
7	124,9	127,5	135,0
8	121,5	121,5	127,1
9	163,4	162,9	170,0
1'	126,2	127,9	135,2
2',6'	100,3	98,6	106,1
3',5'	136,7	137,3	149,0
4'	126,0	124,5	135,3
7'	36,0	37,9	41,4
8'	47,7	49,0	50,1
9'	159,5	158,9	174,2
1''	117,8	120,1	131,4
2'',6''	121,9	122,3	130,8
3'',5''	107,4	107,7	116,2
4''	145,6	145,8	156,8
7''	28,7	31,8	35,6
8''	36,9	40,8	42,8
1'''	123,3	125,9	134,4
2''',6'''	119,2	121,3	128,4
3''',5'''	106,3	123,8	116,0
4'''	145,0	145,6	157,9
7'''	68,7	70,8	72,8
8'''	41,6	43,1	47,9
3'-OCH <sub>3</sub>	52,4	51,5	56,7
5'-OCH <sub>3</sub>	49,8	51,6	56,7
3-OCH <sub>3</sub>	52,9	52,1	56,8
5-OCH <sub>3</sub>	55,5	54,7	60,8

## 5.2 Perfil metabólico de *Metternichia macrocalyx* e *Metternichia princeps* (Solanaceae) usando dados de CLAE-IES-Q-TOF-EM/EM em redes moleculares e análise quimiométrica.

Artigo submetido na *Natural Product Research*.

Thiago Araújo de Medeiros Brito<sup>a</sup>, Anauara Lima e Silva<sup>a</sup>, Yasmin Ferreira de Araújo<sup>a</sup>, Natyele Rodrigues Fonseca<sup>b</sup>, Giulia Cavalcanti Ottino<sup>d</sup>, Domingos Benício Oliveira Silva Cardoso<sup>c</sup>, Josean Fechine Tavares<sup>a\*</sup>, Lucas Silva Abreu<sup>b</sup> and Marcelo Sobral da Silva<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análises, Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, 58051-900, Brazil;

<sup>b</sup>Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Federal Fluminense, Niterói, Rio de Janeiro, 24020-141, Brazil;

<sup>c</sup>Instituto de Biologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, 40170-115, Brazil;

<sup>d</sup>Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 22460-030, Brazil.

\*Autor Correspondente: [josean@ltf.ufpb.br](mailto:josean@ltf.ufpb.br)

## RESUMO

Os biomas brasileiros Caatinga e Mata Atlântica, ecologicamente e floristicamente contrastantes, têm sido pouco explorados fitoquimicamente. Evidências provenientes de estudos baseados em análises uni e multivariadas de dados ambientais, fenológicos, morfométricos e palinológicos reconheceram *Metternichia macrocalyx* e *Metternichia princeps* como duas espécies do gênero *Metternichia* habitando esses diferentes biomas, porém sem dados químicos que corroborem essa informação. Diante disso, nós realizamos um estudo do perfil metabólico de *M. macrocalyx* e *M. Princeps* por CLAE-ESI-Q-TOF-EM/EM e análise de dados no MS-DIAL com bibliotecas do GNPS, Massbank, MassbankEU e Respect, além da geração de rede molecular levando a anotação de 49 compostos nessas espécies. Ademais, os dados foram submetidos à análise de componentes principais para mostrar as principais diferenças e semelhanças entre esses perfis metabólicos.

Palavras-chave: flavonoides glicosilados; perfil metabólico; quimiotaxonomia.

## INTRODUÇÃO

Os domínios fitogeográficos da Caatinga brasileira e da Mata Atlântica apresentam características ecológicas e florísticas contrastantes. O primeiro ocorre em clima semiárido e é considerado o núcleo mais rico em espécies de florestas tropicais sazonalmente secas da região Neotropical (FERNANDES; CARDOSO; PENNINGTON; DE QUEIROZ, 2022; QUEIROZ; CARDOSO; FERNANDES; MORO, 2017), enquanto o último é a segunda maior floresta tropical da América do Sul, formada por variadas e exuberantes formações florestais (BFG, 2022; BORMA; COSTA; DA ROCHA; ARIEIRA *et al.*, 2022). Apesar das diferenças marcantes, ambos os biomas apresentam alto nível de endemismo e biodiversidade vegetal (BORMA; COSTA; DA ROCHA; ARIEIRA *et al.*, 2022; FERNANDES; CARDOSO; PENNINGTON; DE QUEIROZ, 2022).

O gênero *Metternichia* J.C.Mikan (família Solanaceae) foi historicamente classificado como um gênero monoespecífico, distribuído entre esses diferentes biomas. Entretanto, estudos baseados em análises uni e multivariadas de dados ambientais, fenológicos, morfométricos e palinológicos levantaram evidências

suficientes para reconhecer duas espécies no gênero, sendo elas *M. macrocalyx* (Carvalho) L.S.Souza & Stehmann da Caatinga e *M. princeps* Miers da Mata Atlântica (DE SOUZA; ANDRADE; RADAESKI; BAUERMANN *et al.*, 2023).

A primeira investigação fitoquímica das raízes de *M. macrocalyx* permitiu o isolamento e identificação de cinco novas lignanamidas com atividade anti-inflamatória, além de outras dez amidas conhecidas (BRITO; DE ALBUQUERQUE; DOS SANTOS JUNIOR; LOUREIRO *et al.*, 2024), enquanto o conhecimento da composição química da espécie *M. princeps* ainda permanece desconhecida. Apesar dos estudos botânicos sustentarem essa classificação em duas espécies, não há evidências na literatura do gênero *Metternichia* que forneçam comparação de perfil químico descrevendo os metabólitos especializados que caracterizem esse gênero e suas duas espécies.

Este estudo fitoquímico se concentrou na anotação de constituintes químicos e comparação do perfil metabólico de *M. macrocalyx* e *M. princeps* por CLAE-IES-Q-TOF-EM/EM usando redes moleculares geradas no *software* MS-DIAL (bibliotecas de GNPS, MassBank, MassBankEU e Respect), análise quimiométrica e isolamento de dois compostos majoritários de *M. macrocalyx*.

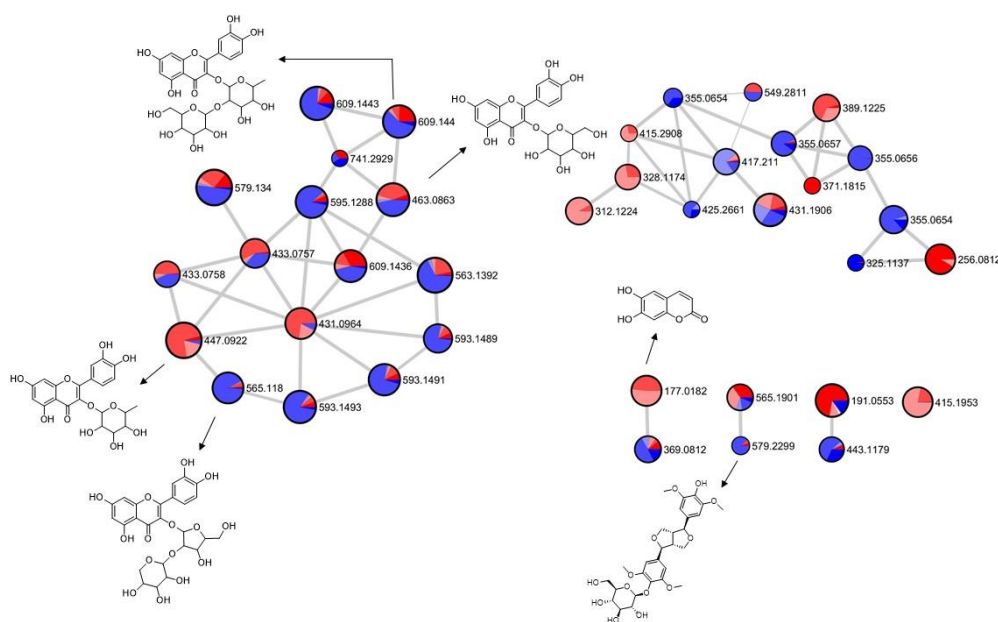
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Anotação de compostos de *M. macrocalyx* e *M. princeps* por análise de CLAE-IES-EM/EM.

Considerando os recursos para aprimoramento do nível de confiança de anotações realizadas por espectrometria de massas, foi realizado o isolamento de dois compostos majoritários: quercetina-3-O-xilopiranosil-(1 → 2)-ramnopiranosídeo (**1**) and kaempferol-3-O-xilopiranosil-(1 → 2)-ramnopiranosídeo (**2**), os quais foram caracterizados por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  uni e bidimensionais e espectrometria de massas de alta resolução, além da comparação com dados da literatura (ÜRMÉNYI; SARAIVA; CASANOVA; MATOS *et al.*, 2016) e com padrões de substâncias previamente isoladas (BRITO; DE ALBUQUERQUE; DOS SANTOS JUNIOR; LOUREIRO *et al.*, 2024). Esses compostos foram reportados pela primeira vez no gênero *Metternichia*.

A organização de dados em rede molecular e a análise comparativa de dados com bibliotecas de EM/EM (GNPS, Massbank, MassbankEU e Respect) foi realizada no software MS-DIAL para otimizar a anotação dos compostos e comparação de perfil metabólico entre as duas espécies (Figura 23). Antes da obtenção da rede molecular, os dados de EM e EM/EM foram examinados (Figura M1), revelando a presença de vários flavonóis glicosilados. Para abordar a atribuição correta desses compostos e aumentar o nível de confiança das anotações, uma rede molecular foi construída usando o software MS-DIAL por meio do processamento, deconvolução e alinhamento de dados de espectrometria de massas, permitindo a anotação de 49 compostos (Tabela M1).

Figura 23 - Rede molecular dos extratos de *M. macrocalyx* (vermelho) e *M. princeps* (azul). A intensidade da cor é diretamente proporcional à polaridade dos extratos.



Os metabólitos especializados mais abundantes no extrato das folhas de *M. macrocalyx* foram os flavonoides, representados pela subclasse de flavonóis glicosilados com aglicona do tipo quercetina ou kaempferol conectados a uma ou até três unidades de açúcares. Foram detectados possíveis isômeros de posição, onde compostos anotados apresentaram mesma fórmula molecular, padrão similar de fragmentação e diferentes tempos de retenção (Figura M2).

A anotação dos flavonóis glicosilados por análise de dados de LC-ESI-MS/MS envolveu a detecção de fragmentos formados pela perda neutra de resíduo de hexose  $[M-H-162]^-$ , deoxyhexose  $[M-H-146]^-$  e pentose  $[M-H-132]^-$ , assim como pela

eliminação radicalar desses açúcares, os quais forneceram dados sobre o padrão de glicosilação das substâncias. A determinação da aglicona foi realizada pela detecção dos fragmentos em  $m/z$  300 atribuído à quercetina ou em  $m/z$  284 atribuído ao kaempferol, além do fragmento diagnóstico da reação de retro-Diels-Alder [ $^{1,3}\text{A-H}$ ] $^-$ , concernente com a subclasse dos flavonóis. Ademais, os fragmentos formados pelas perdas sequenciais de  $\text{H}_2\text{O}$  (-18 Da),  $\text{CO}$  (-28 Da) e  $\text{CH}_2\text{O}$  (-30 Da), corroboraram essas proposições (JIANG; LI; WANG; PI *et al.*, 2024). Os flavonoides glicosilados anotados diferiram quanto à posição e tipo de açúcar conectados à quercetina ou kaempferol (Figura M2-M5).

As substâncias 6,7-di-hidroxycumarina (**10**) ( $m/z$  177,01844), acantosídeo B ( $m/z$  579,20631) (**25**) e os flavonóis glicosilados quercetina-pentosil-pentosídeo (**26**) ( $m/z$  565,11825), quercetina-hexosídeo I (**28**) ( $m/z$  463,08689), quercetina-deoxihexosil-hexosídeo I (**31**) ( $m/z$  609,14449) e quercetina-deoxihexosídeo (**39**) ( $m/z$  447,09279) foram anotadas usando as bibliotecas do GNPS, Massbank, MassbankEU ou Respect no software MS-DIAL (Figura M6). A anotação com auxílio de bibliotecas, juntamente com os compostos anotados em comparação com dados de EM/EM da literatura (Tabela M1), corresponderam a uma anotação em nível 2 de confiança (SCHYMANSKI; JEON; GULDE; FENNER *et al.*, 2014).

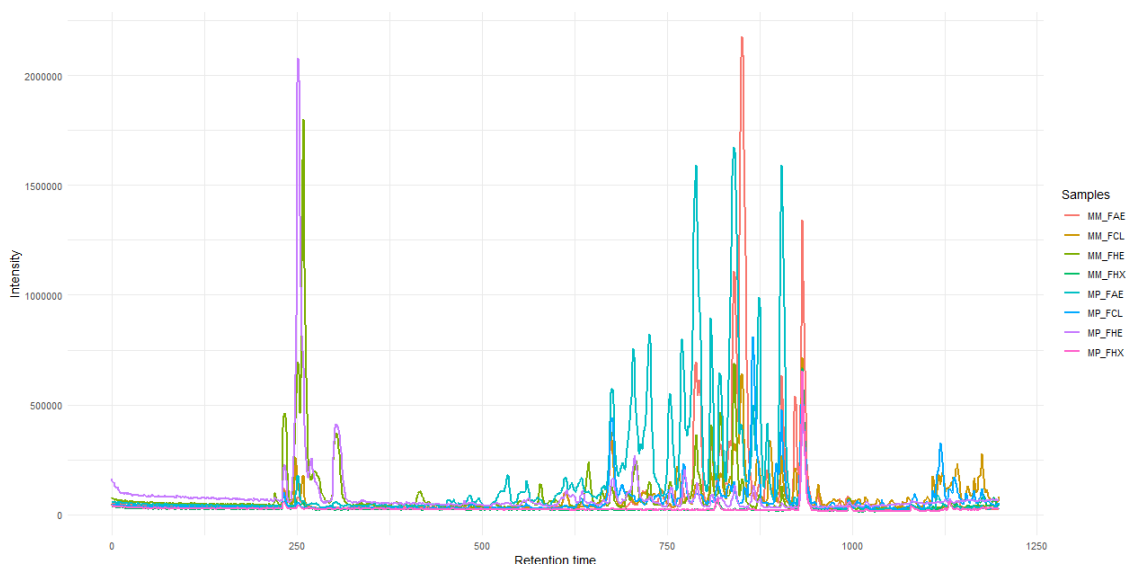
No modo negativo o íon precursor de  $m/z$  328,11764 apresentou fragmentos em  $m/z$  310 [ $\text{M-H-H}_2\text{O}$ ] $^-$ ,  $m/z$  161 [ $\text{M-H-CH}_3\text{-C}_8\text{H}_{10}\text{NO}_2$ ] $^{--}$  e  $m/z$  133 [ $\text{M-H-H}_2\text{O-C}_9\text{H}_7\text{O}_3$ ] $^{--}$ , correspondendo à N-trans-feruloilactapamina, enquanto o íon precursor de  $m/z$  312,12286 correspondeu à N-trans-feruloiltiramina caracterizada principalmente pelo fragmento sugestivo da porção tiramina em  $m/z$  135 [ $\text{M-H-C}_{10}\text{H}_9\text{O}_3$ ] $^{--}$  (CAROLI; BRIGHENTI; CATTIVELLI; SALAMONE *et al.*, 2023). Esses compostos, incluindo o ácido *p*-cumárico (**22**) e rutina (**29**) ( $m/z$  609,14418) foram anotados em nível 1 de confiança por meio da utilização de padrões.

Ademais, no modo positivo foi anotada a N-metil-4-hidroxirolina (**1**) ( $m/z$  146,08052) exibindo perda neutra de  $\text{H}_2\text{O}$  (-18 Da) e  $\text{CO}$  (-28 Da), enquanto no modo negativo foram anotadas a quercetina-3-O-xilopiranosil-(1-2)-ramnosídeo (**38**) ( $m/z$  579,13451) e o kaempferol-3-O-xilopiranosil-(1-2)-ramnosídeo (**48**) ( $m/z$  563,13909). Nesses casos, a anotação correspondeu aos compostos isolados, resultando em uma anotação com nível 1 de confiança.

## Comparação das espécies *M. macrocalyx* e *M. princeps* por análises quimiométricas

O gênero *Metternichia* foi considerado historicamente como monotípico incluindo apenas a espécie *M. princeps*, estudos recentes considerando aspectos morfológicos, ecológicos e fenológicos respaldaram a elevação de *M. macrocalyx* à condição de uma espécie distinta, reconhecendo-a como uma segunda espécie, anteriormente considerada uma variedade. Análises quimiométricas usando dados de CLAE-IES-EM/EM foram realizadas a fim de avaliar diferenças e semelhanças entre esses perfis metabólicos (Figura 24).

Figura 24 - Cromatogramas do pico Base (BPC) das fases de MP (*M. princeps*) e MM (*M. macrocalyx*).



Inicialmente foi realizada uma análise de componentes principais (PCA) entre amostras de extratos das duas espécies, MP (*M. princeps*) e MM (*M. macrocalyx*), como grupos distintos, não sendo clara a distinção entre eles, observada pela sobreposição das elipses, indicando que as espécies compartilham características semelhantes em termos de metabólitos analisados (Figura M7).

Entretanto, embora exista sobreposição entre MM e MP, há também indícios de diferenças que podem ser exploradas para distinção entre suas fases, e similaridade entre as mesmas fases de duas espécies, em termos dos metabólitos analisados. Com base nisso, foi realizada uma análise entre fases similares de espécies distintas, resultando então em quatro grupos de amostras comparados entre

si. As componentes PC1 e PC2 explicaram, respectivamente, 25,2% e 24,0% da variação total nos dados (Figura 25).

Figura 25 – As pontuações de PCA obtidas a partir de análise quimiométrica entre amostras das fases de MP (*M. princeps*) e MM (*M. macrocalyx*).



As amostras de FAE apresentaram maior dispersão, indicando variabilidade considerável dentro do mesmo grupo. Já as amostras FHE encontram-se relativamente separadas das demais ao longo de PC1, evidenciando características diferentes quanto aos metabólitos analisados. Similarmente à FHE, as fases FHX e FCL ocupam uma posição distinta no gráfico, sugerindo a existência de diferenças entre as fases, embora quando comparadas a FAE demonstrem maior similaridade mútua.

As análises quimiométricas evidenciaram a sobreposição entre as amostras das espécies (MM x MP), mas a distinção entre as fases (FHX x FHE x FCL x FAE) das duas espécies, ressaltando padrões de similaridade e dissimilaridade nos perfis químicos das amostras estudadas.

A análise de componentes principais também resultou em um gráfico de *loadings* permitindo identificar as *m/z* (metabólitos) que contribuíram para o agrupamento e separação das amostras (Figura M8). Por exemplo, a proximidade das fases FHE, FCL e FHX pode ser observada pelos íons de *m/z* 191,0554 [M-H]<sup>-</sup> e *m/z* 169,0135 [M-H]<sup>-</sup> anotados como ácido quínico e ácido gálico, que estão presentes nas três fases relacionadas. Já o íon de *m/z* 433,0756, que corresponde a quercetina-pentosídeo II, está presente apenas em FAE, como observado nos metabólitos



anotados e parece contribuir com a distinção desse grupo. Os compostos anotados como fraxina de  $m/z$  369,0814  $[M-H]^-$  e kaempferol-3-O-xilopiranosil-(1-2)-ramnosídeo de  $m/z$  563,1390  $[M-H]^-$  apresentaram-se em todas as fases, exceto em FHX e parecem contribuir pouco com o agrupamento e distinção das amostras. Isso ficou evidente no gráfico de *loadings*, onde manifestam-se em quadrantes opostos a todos as fases analisadas.

## CONCLUSÕES

Neste trabalho, investigamos o perfil metabólico de *M. macrocalyx* da Caatinga e *M. princeps* da Mata Atlântica. As análises de CLAE-IES-EM/EM e redes moleculares descreveram uma vasta quantidade de flavonóis glicosilados, além de amidas fenilpropanóides, lignanas e compostos fenólicos. As redes moleculares desenvolvidas no *software* MS-DIAL e as análises quimiométricas foram combinadas para comparar as duas espécies e mostrar as semelhanças e diferenças entre seus perfis químicos, levando a uma delimitação quimiotaxonômica do gênero *Metternichia* baseado em perfil metabólico.

## AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer às agências brasileiras Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES) (Código Financeiro 001) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro e bolsas; agradecemos também a colaboração com a Rede Norte-Nordeste de Fitoterápicos (INCT-RENNOFITO).

## Declaração sobre conflito de interesses

Os autores declaram não possuir conflito de interesses.

## MATERIAL SUPLEMENTAR

Perfil metabólico de *Metternichia macrocalyx* e *Metternichia princeps* (Solanaceae) usando dados de CLAE-IES-Q-TOF-EM/EM em redes moleculares e análise quimiométrica.

Thiago Araújo de Medeiros Brito<sup>a</sup>, Anauara Lima e Silva<sup>a</sup>, Yasmin Ferreira de Araújo<sup>a</sup>, Natyele Rodrigues Fonseca<sup>b</sup>, Giulia Cavalcanti Ottino<sup>d</sup>, Domingos Benício Oliveira Silva Cardoso<sup>c</sup>, Josean Fachine Tavares<sup>a\*</sup>, Lucas Silva Abreu<sup>b</sup> and Marcelo Sobral da Silva<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análises, Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, 58051-900, Brasil;

<sup>b</sup>Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Federal Fluminense, Niterói, Rio de Janeiro, 24020-141, Brasil;

<sup>c</sup>Instituto de Biologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, 40170-115, Brasil;

<sup>d</sup>Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 22460-030, Brasil.

**Resumo:** os biomas brasileiros Caatinga e Mata Atlântica, ecologicamente e floristicamente constrantes, têm sido pouco explorados fitoquimicamente. Evidências provenientes de estudos baseados em análises uni e multivariadas de dados ambientais, fenológicos, morfométricos e palinológicos reconheceram *Metternichia macrocalyx* e *Metternichia princeps* como duas espécies do gênero *Metternichia* habitando esses diferentes biomas, porém sem dados químicos que corroborem essa informação. Diante disso, nós realizamos um estudo do perfil metabólico de *M. macrocalyx* e *M. Princeps* por CLAE-ESI-Q-TOF-EM/EM e análise de dados no MS-DIAL com bibliotecas do GNPS, Massbank, MassbankEU e Respect, além da geração de rede molecular levando a anotação de 49 compostos nessas espécies. Ademais,

os dados foram submetidos à análise de componentes principais para mostrar as principais diferenças e semelhanças entre esses perfis metabólicos.

Palavras-chave: flavonoides glicosilados; perfil metabólico; quimiotaonomia.

## SUMÁRIO

Figura M1 - Cromatograma de íons totais de CLAE-Q-TOF-EM/EM das fases de <i>M. macrocalyx</i> (a) e <i>M. princeps</i> (b). Legenda de cores: preto-FHE, vermelho-FAE, azul-FCL, verde-FHX. ....	170
Figura M2 - Espectro de fragmentação do íon precursor $m/z$ 463,08689 [M-H] <sup>-</sup> .....	171
Figura M3 - Espectro de fragmentação do íon precursor $m/z$ 549,12315 [M-H] <sup>-</sup> .....	172
Figura M4 - Esquema de fragmentação do íon precursor $m/z$ 463,08689 [M-H] <sup>-</sup> ....	173
Figura M5 - Esquema de fragmentação do íon precursor $m/z$ 431,09695 [M-H] <sup>-</sup> ....	174
Figura M6 – Combinação dos espectros de massa das substâncias 6,7-dihidroxycumarina (a), acantosídeo B (b), quercetina-pentosil-pentosídeo (c), quercetina-hexosídeo I (d), quercetina-desoxihexosil-hexosídeo I (e), quercetina-desoxihexosídeo (f) com os espectros de massa das bibliotecas do GNPS, Massbank, MassbankEU e Respect no software MS-DIAL. ....	175
Figura M7 - Análise de componentes principais obtida por análise quimiométrica entre amostras de MP ( <i>M. princeps</i> ) e MM ( <i>M. macrocalyx</i> ). ....	176
Figura M8 - Loadings de PCA obtidas a partir de análise quimiométrica entre amostras de extrato de MP ( <i>M. princeps</i> ) e MM ( <i>M. macrocalyx</i> ). ....	176
Tabela M1 - Compostos anotados por meio das análises de CLAE-IES-EM/EM de extratos e frações de <i>M. macrocalyx</i> [MM-FHE (1); MM-FAE (2); MM-FCL (3); MM-FHX (4); MP-FHE (5); MP-FAE (6); MP-FCL (7), MP-FHX (8)]. ....	177

## EXPERIMENTAL

### Procedimento experimentais gerais

Experimentos de RMN 1D e 2D foram realizados utilizando um espectrômetro de RMN Bruker Ascend 400 (400 MHz e 100 MHz para  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ) e um espectrômetro de RMN Bruker AvanceNeo 500 (500 MHz e 125 MHz para  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ). Os desvios químicos foram referenciados aos sinais residuais de DMSO deuterado a  $\delta_{\text{H}}$  2,49 e  $\delta_{\text{C}}$  39,5 ppm. As análises CLAE-IES-EM/EM foram realizadas em um LC-40D X3 (Shimadzu) equipado com os módulos CBM-40, DGU-40S, LC 40D X3, SIL-40C X3 e CTD-40S, acoplado a um espectrômetro de massas LCMS-9050 (Shimadzu). Nestas análises, uma coluna C18 (Ascentis-150 mm x 4,6 mm x 2,7  $\mu\text{m}$ ) foi eluída com uma fase móvel composta por uma solução de ácido fórmico/água a 0,1% v/v (Solvente A) e Metanol (Solvente B). O isolamento, a purificação e a análise dos constituintes químicos foram realizados por cromatografia em coluna clássica (CC) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A Sílica gel (Siliaflash, tamanho de partícula 0,060–0,200 mm) foi a fase estacionária utilizada na CC, enquanto uma coluna C18 preparativa (GIST, 250 mm x 21,2 mm x 5,0  $\mu\text{m}$ ) foi utilizada para o isolamento via CLAE.

### Material vegetal

As folhas de *M. macrocalyx* foram coletadas na Fazenda Esperança, no município de Boa Vista do Tupim, Bahia, Brasil (13°13'15"S, 41°11'08"W) em janeiro de 2019 e as folhas de *M. princeps* foram coletadas em abril de 2025 no Jardim Botânico do Rio de Janeiro. O botânico Domingos Benício Oliveira Silva Cardoso, do departamento de botânica do instituto de biologia da Universidade Federal da Bahia (UFBA), identificou a espécie. Essa atividade foi registrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN) por meio do código AA54545. As exsiccatas do material coletado de *M. macrocalyx* e *M. princeps* foram armazenadas no Herbário Alexandre Leal Costa (ALCB) da UFBA sob código de registro ALCB 138826 e no Herbário RB do Jardim Botânico do Rio de Janeiro sob código de registro GC. Ottino 135, respectivamente.

## Extração e isolamento

As folhas foram submetidas a um processo de secagem em estufa de ar circulante a 40 °C por 72h. Os materiais vegetais secos e triturados de *M. macrocalyx* (0,8 kg) e *M. princeps* (264,0 g) foram extraídos com etanol 95% (v/v) (3 vezes por 72 h) à temperatura ambiente. Os extratos resultantes foram concentrados sob pressão reduzida em evaporador rotativo a 40 °C, obtendo-se 120,0 g de extrato etanólico bruto (EEB) de *M. macrocalyx* e o EEB de *M. princeps*. O EEB de *M. macrocalyx* (115,0 g) foi ressuspendido em solução de EtOH-H<sub>2</sub>O (7:3) e particionado sucessivamente com n-hexano, clorofórmio, acetato de etila, resultando em 14,0, 7,9, 2,4 g das respectivas fases e 85,0 g da fase hidroetanólica. A fase acetatoetílica de *M. macrocalyx* (2,0 g) foi submetida à CC em sílica gel e eluída com hexano, AcOEt e MeOH, puros ou em mistura binária, em gradiente crescente de polaridade. Este procedimento resultou em 17 frações (E1-17). A fração E13 (315,0 mg) foi submetida à separação cromatográfica preparativa em CLAE. Uma coluna C18 (GIST, 250 mm x 21,2 mm x 5,0 µm), gradiente linear de 40 a 60%B em 60 min (solvente A = HCOOH:H<sub>2</sub>O 0,1% v/v e solvente B = MeOH), dezesseis injeções (volume: 100 µL) e fluxo de 8,0 mL/min, foram empregados para separação cromatográfica preparativa. Esse procedimento resultou em 12 frações. A análise dos espectros de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C dos picos isolados levou à identificação dos compostos **1** (42,7 mg, t<sub>R</sub> = 44,0 min) e **2** (9,0 mg, t<sub>R</sub> = 55,5 min).

## Análises de CLAE-IES-EM/EM

Cinco microlitros das amostras (200 µg/mL) foram injetadas no LC-40D X3 (Shimadzu) equipado com os módulos CBM-40, DGU-40S, LC 40D X3, SIL-40C X3 e CTD-40S, acoplado a um espectrômetro de massas LCMS-9050 (Shimadzu) com uma fonte de ionização por eletrospray (IES) e um analisador *Quadrupole Time-of-Flight* (Q-TOF). Os experimentos de CLAE foram realizados utilizando uma coluna C18 (Ascentis-150 mm x 4,6 mm x 2,7 µm). A fase móvel foi composta por uma solução de ácido fórmico/água a 0,1% (v/v) (solvente A) e metanol (solvente B). Um gradiente linear (15-100%) foi realizado para eluição em 20 min, com uma fluxo de 0,3 mL/min e a temperatura da coluna mantida em 40 °C. Os parâmetros de análise para espectrômetros de massa foram os seguintes: voltagem capilar: -3,0 kV, fluxo do gás

nebulizador 3,0 L/min, fluxo do gás de secagem 10 mL/min e temperatura da interface em 300 °C. As substâncias foram analisadas no modo de ionização negativo e positivo ( $m/z$  100-1000). Os dados obtidos foram interpretados com auxílio do SciFinder, dados de literatura, padrões e MS-DIAL com dados da biblioteca global de produtos naturais sociais (GNPS), Massbank, MassbankEU e Respect.

### Processamento de dados de EM/EM para análises estatísticas

Os dados foram adquiridos no formato .lcd e convertidos para mzML usando o *software LabSolutions WorkStation* (Shimadzu). Os arquivos foram abertos para inspeção visual no *software* MS-DIAL, e o processamento dos dados foi realizado no *software* estatístico R (versão 4.5.1) usando os pacotes xcms, msdata e MSnbase, utilizando a interface de funcionalidade do *software* RStudio (versão 2025.05.1 + 513).

### Dados de RMN de compostos isolados

#### Quercetina-3-O-xilopiranosil-(1 → 2)-ramnopiranosídeo (1):

RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ , ppm,  $J/\text{Hz}$ ):  $\delta_{\text{H}}$  7,34 (1H,  $d$ ,  $J = 2,3$  Hz, H-2'),  $\delta_{\text{H}}$  7,25 (1H,  $d$ ,  $J = 8,3$ ; 2,3 Hz, H-3'),  $\delta_{\text{H}}$  6,88 (1H,  $d$ ,  $J = 8,3$  Hz, H-5'),  $\delta_{\text{H}}$  6,37 (1H,  $d$ ,  $J = 2,0$  Hz, H-8),  $\delta_{\text{H}}$  6,18 (1H,  $d$ ,  $J = 2,0$  Hz, H-6),  $\delta_{\text{H}}$  5,28 (1H,  $d$ ,  $J = 1,4$  Hz, H-1''),  $\delta_{\text{H}}$  4,14 (1H,  $d$ ,  $J = 7,6$  Hz, H-1''');  $\delta_{\text{H}}$  4,03 (1H,  $d$ ,  $J = 3,6$ ; 1,4 Hz, H-2''),  $\delta_{\text{H}}$  3,59-3,63 (1H,  $m$ , H-5''),  $\delta_{\text{H}}$  3,55-3,60 (1H,  $m$ , H-3''),  $\delta_{\text{H}}$  3,46 (1H,  $m$ , H-5a'''),  $\delta_{\text{H}}$  3,17-3,22 (1H,  $m$ , H-4'''),  $\delta_{\text{H}}$  3,14-3,08 (1H,  $m$ , H-4''),  $\delta_{\text{H}}$  3,09-3,02 (1H,  $m$ , H-3'''), 2,92-2,97 (1H,  $m$ , H-5'''),  $\delta_{\text{H}}$  2,91 (1H,  $m$ , H-5b'''),  $\delta_{\text{H}}$  0,89 (3H,  $d$ ,  $J = 6.2$  Hz, H-6'').

RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz):  $\delta_{\text{C}}$  177,9 (C-4),  $\delta_{\text{C}}$  164,5 (C-7),  $\delta_{\text{C}}$  161,4 (C-5),  $\delta_{\text{C}}$  157,0 (C-2),  $\delta_{\text{C}}$  156,5 (C-9),  $\delta_{\text{C}}$  148,8 (C-4'),  $\delta_{\text{C}}$  145,3 (C-3'),  $\delta_{\text{C}}$  134,3 (C-3),  $\delta_{\text{C}}$  115,7 (C-5'),  $\delta_{\text{C}}$  115,5 (C-2'),  $\delta_{\text{C}}$  120,9 (C-6'),  $\delta_{\text{C}}$  120,5 (C-1'),  $\delta_{\text{C}}$  106,7 (C-1'''),  $\delta_{\text{C}}$  103,9 (C-10),  $\delta_{\text{C}}$  101,0 (C-1''),  $\delta_{\text{C}}$  98,8 (C-6),  $\delta_{\text{C}}$  93,8 (C-8),  $\delta_{\text{C}}$  80,7 (C-2''),  $\delta_{\text{C}}$  76,3 (C-3'''),  $\delta_{\text{C}}$  73,8 (C-2'''),  $\delta_{\text{C}}$  71,8 (C-4''),  $\delta_{\text{C}}$  70,4 (C-5''),  $\delta_{\text{C}}$  70,3 (C-3''),  $\delta_{\text{C}}$  69,3 (C-4'''),  $\delta_{\text{C}}$  65,8 (C-5'''),  $\delta_{\text{C}}$  17,5 (C-6'').

#### Kaempferol-3-O-xilopiranosil-(1 → 2)-ramnopiranosídeo (2):

RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ , ppm,  $J/\text{Hz}$ ):  $\delta_{\text{H}}$  7,75 (2H,  $d$ ,  $J = 8,7$  Hz, H-2'-6'),  $\delta_{\text{H}}$  6,91 (2H,  $d$ ,  $J = 8,7$  Hz, H-3'-5'),  $\delta_{\text{H}}$  6,39 (1H,  $d$ ,  $J = 2,1$  Hz, H-8),  $\delta_{\text{H}}$  6,19 (1H,  $d$ ,  $J =$

2,1 Hz, H-6),  $\delta_{\text{H}}$  5,36 (1H, *d*,  $J = 1,4$  Hz, H-1''),  $\delta_{\text{H}}$  4,17 (1H, *d*,  $J = 7,6$  Hz, H-1'''),  $\delta_{\text{H}}$  4,00 (1H, *d*,  $J = 1,4$ ; 1,6 Hz, H-2''),  $\delta_{\text{H}}$  3,56-3,50 (1H, *m*, H-4'''),  $\delta_{\text{H}}$  3,55-3,48 (1H, *m*, H-5a'''),  $\delta_{\text{H}}$  3,45-3,36 (1H, *m*, H-3''),  $\delta_{\text{H}}$  3,23-3,18 (1H, *m*, H-5''), 3,14-3,07 (1H, *m*, H-4''),  $\delta_{\text{H}}$  3,11-3,03 (1H, *m*, H-3'''),  $\delta_{\text{H}}$  2,97-2,90 (1H, *m*, H-2''),  $\delta_{\text{H}}$  2,92 (1H, *m*, H-5b'''),  $\delta_{\text{H}}$  0,86 (3H, *d*,  $J = 6,2$  Hz, H-6'').

RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz):  $\delta_{\text{C}}$  177,7 (C-4),  $\delta_{\text{C}}$  164,7 (C-7),  $\delta_{\text{C}}$  160,3 (C-4'),  $\delta_{\text{C}}$  161,3 (C-5),  $\delta_{\text{C}}$  157,0 (C-2),  $\delta_{\text{C}}$  156,6 (C-9),  $\delta_{\text{C}}$  130,6 (C-2',6'),  $\delta_{\text{C}}$  134,3 (C-3),  $\delta_{\text{C}}$  120,3 (C-1'),  $\delta_{\text{C}}$  115,5 (C-3',5'),  $\delta_{\text{C}}$  106,4 (C-1'''),  $\delta_{\text{C}}$  103,9 (C-10),  $\delta_{\text{C}}$  100,8 (C-1''),  $\delta_{\text{C}}$  98,9 (C-6),  $\delta_{\text{C}}$  93,9 (C-8),  $\delta_{\text{C}}$  80,6 (C-2''),  $\delta_{\text{C}}$  76,3 (C-3'''),  $\delta_{\text{C}}$  73,8 (C-2'''),  $\delta_{\text{C}}$  71,7 (C-4''),  $\delta_{\text{C}}$  70,4 (C-3''),  $\delta_{\text{C}}$  70,3 (C-4'''),  $\delta_{\text{C}}$  65,8 (C-5'''),  $\delta_{\text{C}}$  69,4 (C-5''),  $\delta_{\text{C}}$  17,4 (C-6'').

## Dados de espectrometria de massas

Figura M1 - Cromatograma de íons totais de CLAE-Q-TOF-EM/EM das fases de *M. macrocalyx* (a) e *M. princeps* (b). Legenda de cores: preto-FHE, vermelho-FAE, azul-FCL, verde-FHX.

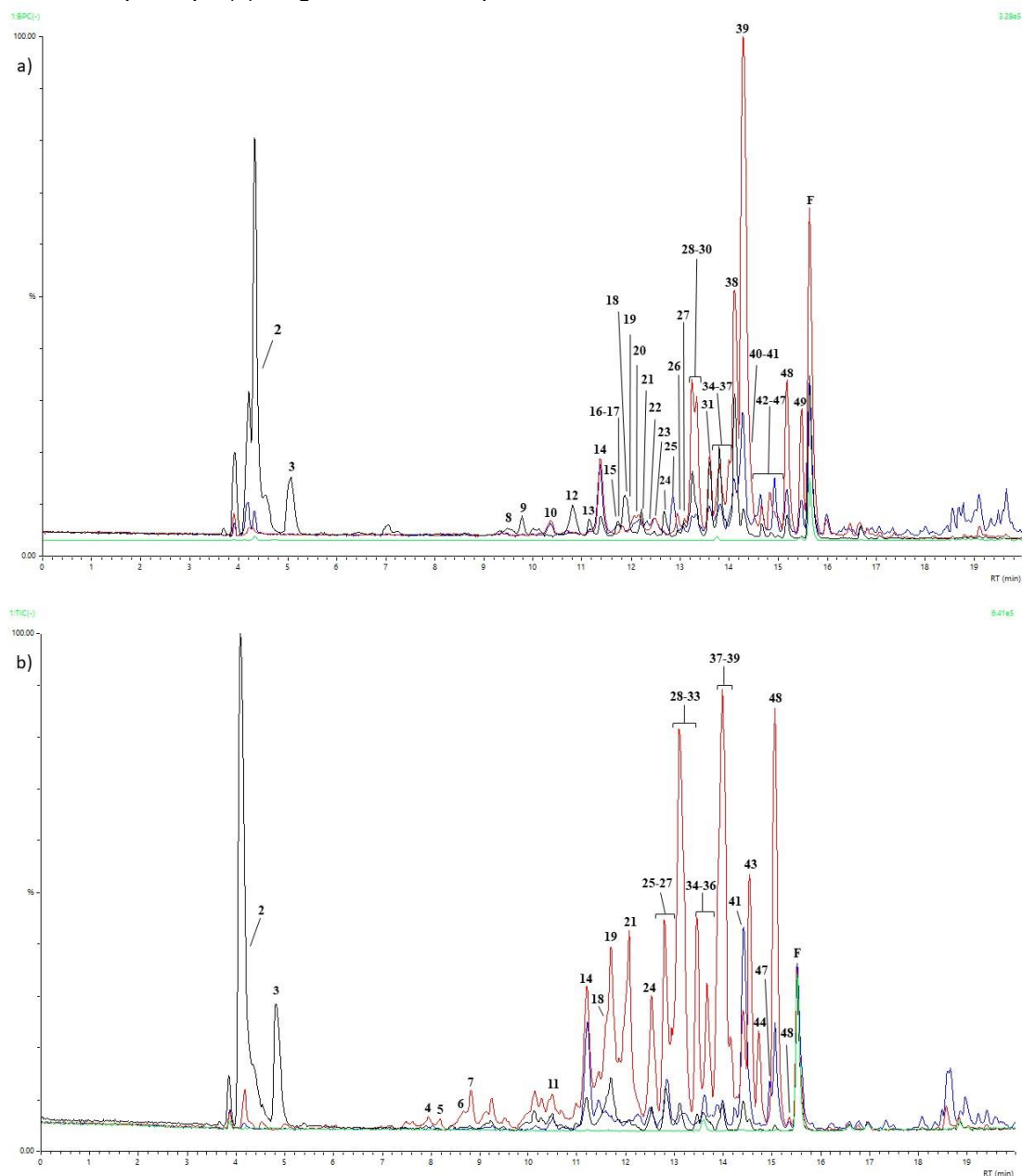




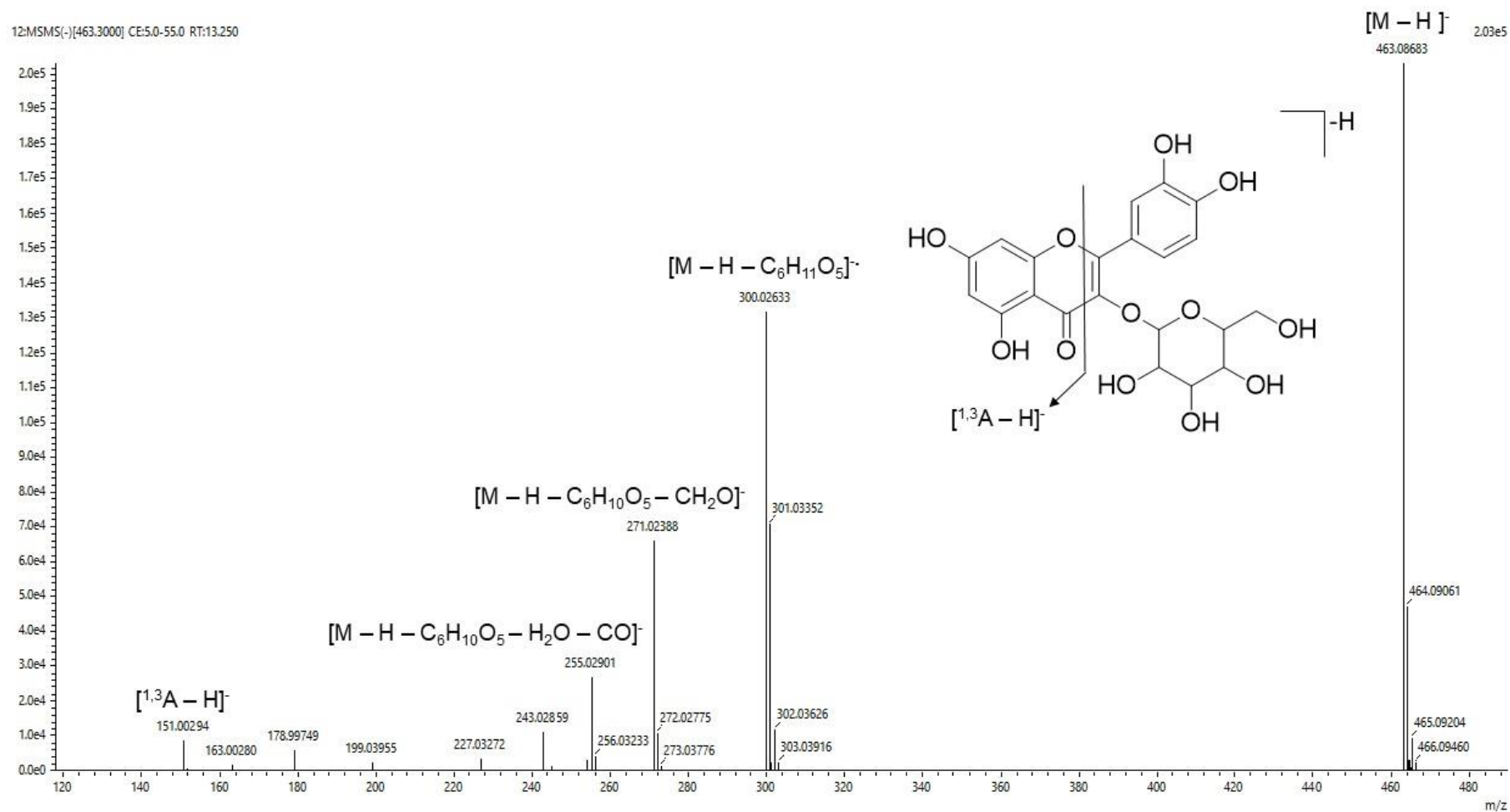
Figura M2 - Espectro de fragmentação do íon precursor  $m/z$  463,08689  $[M-H]^-$ .

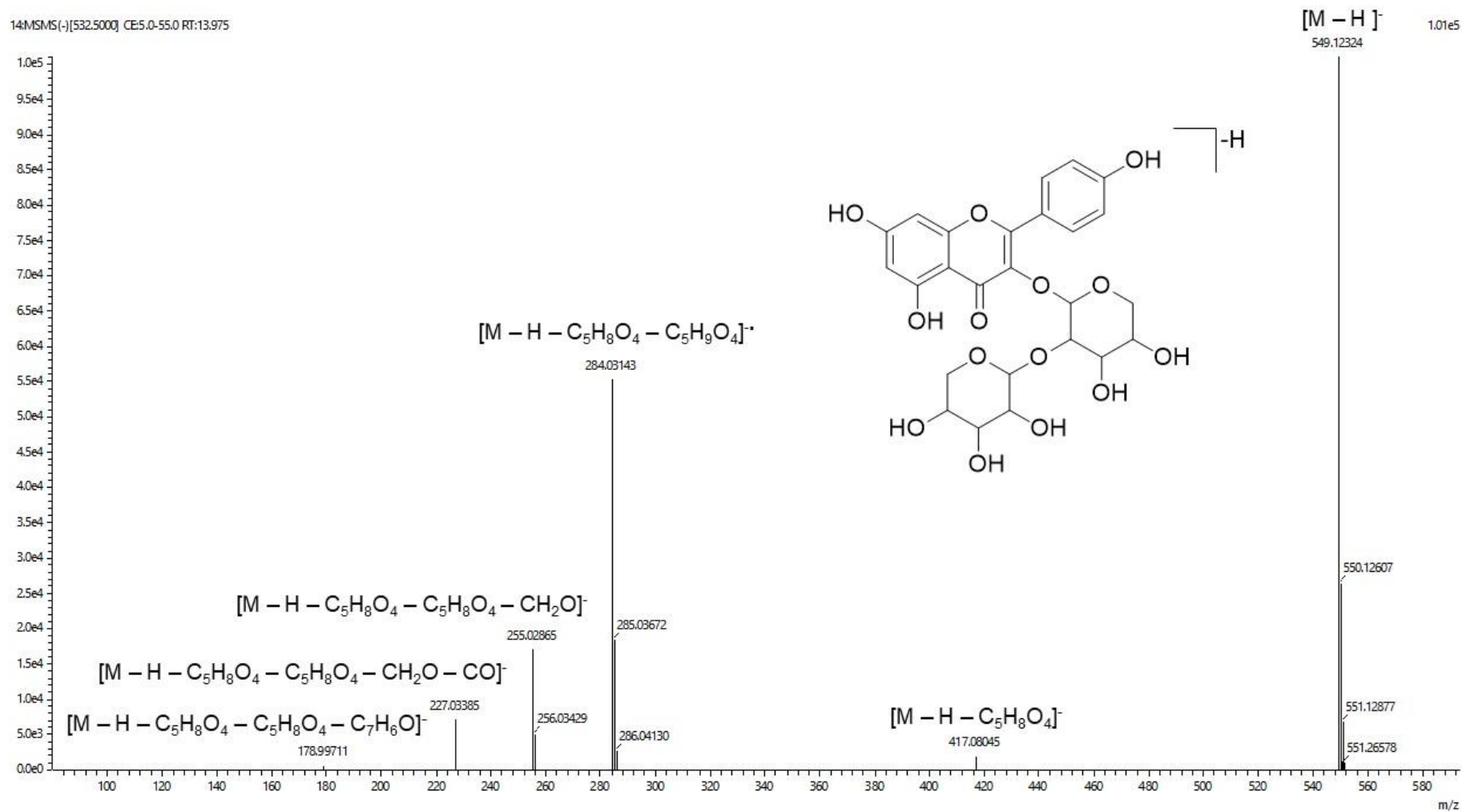
Figura M3 - Espectro de fragmentação do íon precursor  $m/z$  549,12315  $[M-H]^-$ .

Figura M4 - Esquema de fragmentação do íon precursor  $m/z$  463,08689  $[M-H]^-$ .

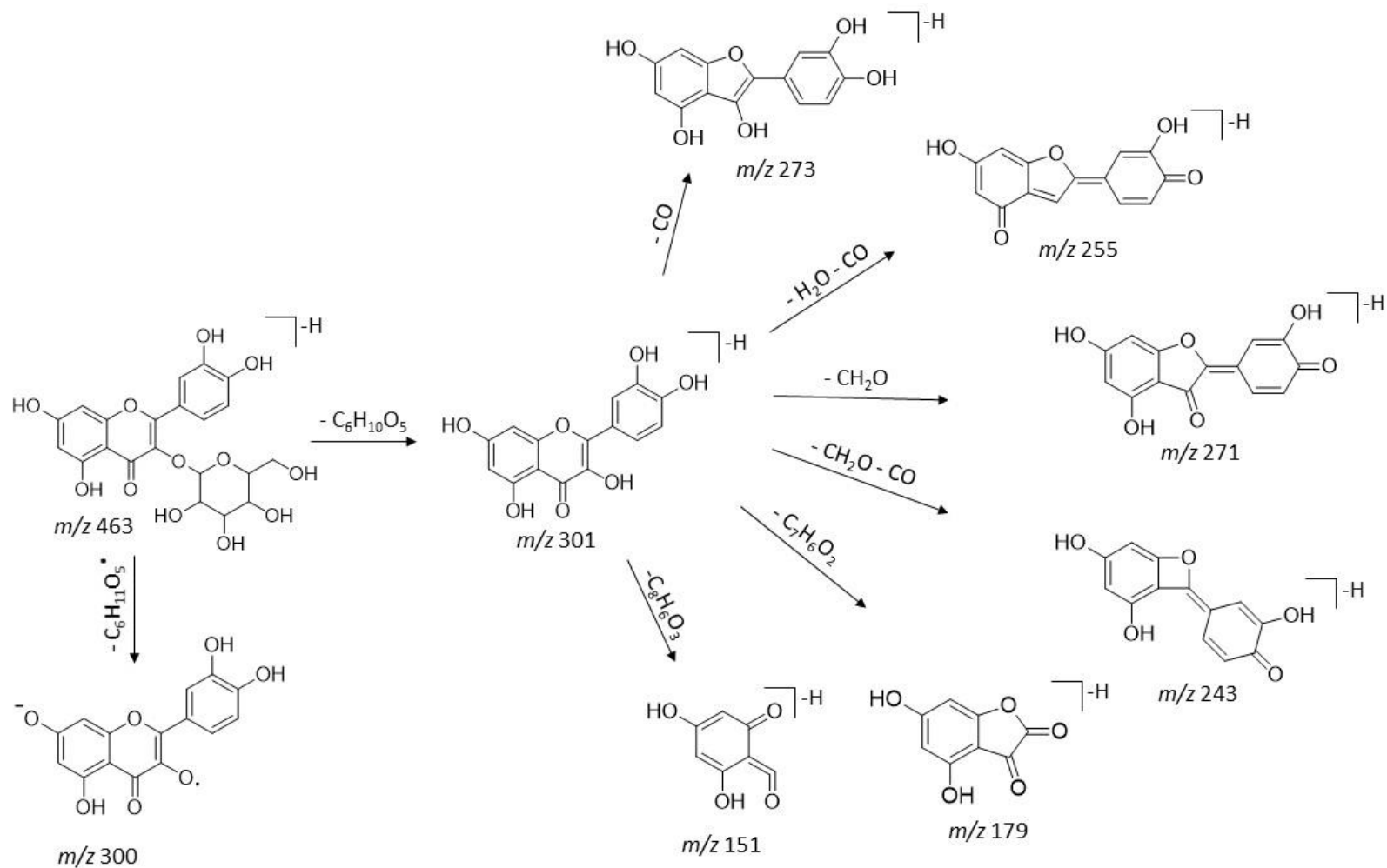


Figura M5 - Esquema de fragmentação do íon precursor  $m/z$  431,09695  $[M-H]^-$ .

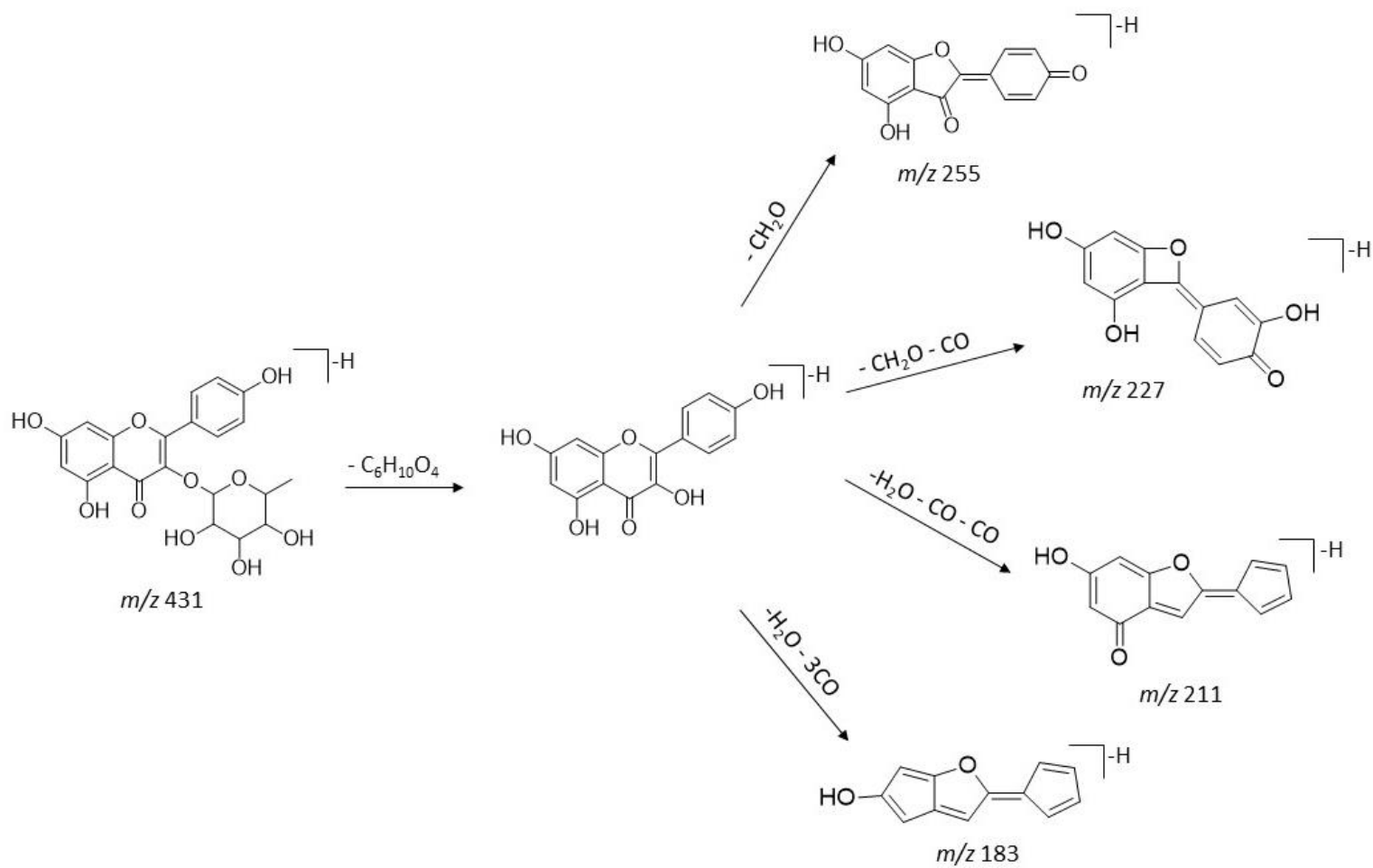


Figura M6 – Combinação dos espectros de massa das substâncias 6,7-di-hidroxycumarina (a), acantosídeo B (b), quercetina-pentosil-pentosídeo (c), quercetina-hexosídeo I (d), quercetina-desoxihexosil-hexosídeo I (e), quercetina-desoxihexosídeo (f) com os espectros de massa das bibliotecas do GNPS, Massbank, MassbankEU e Respect no software MS-DIAL.

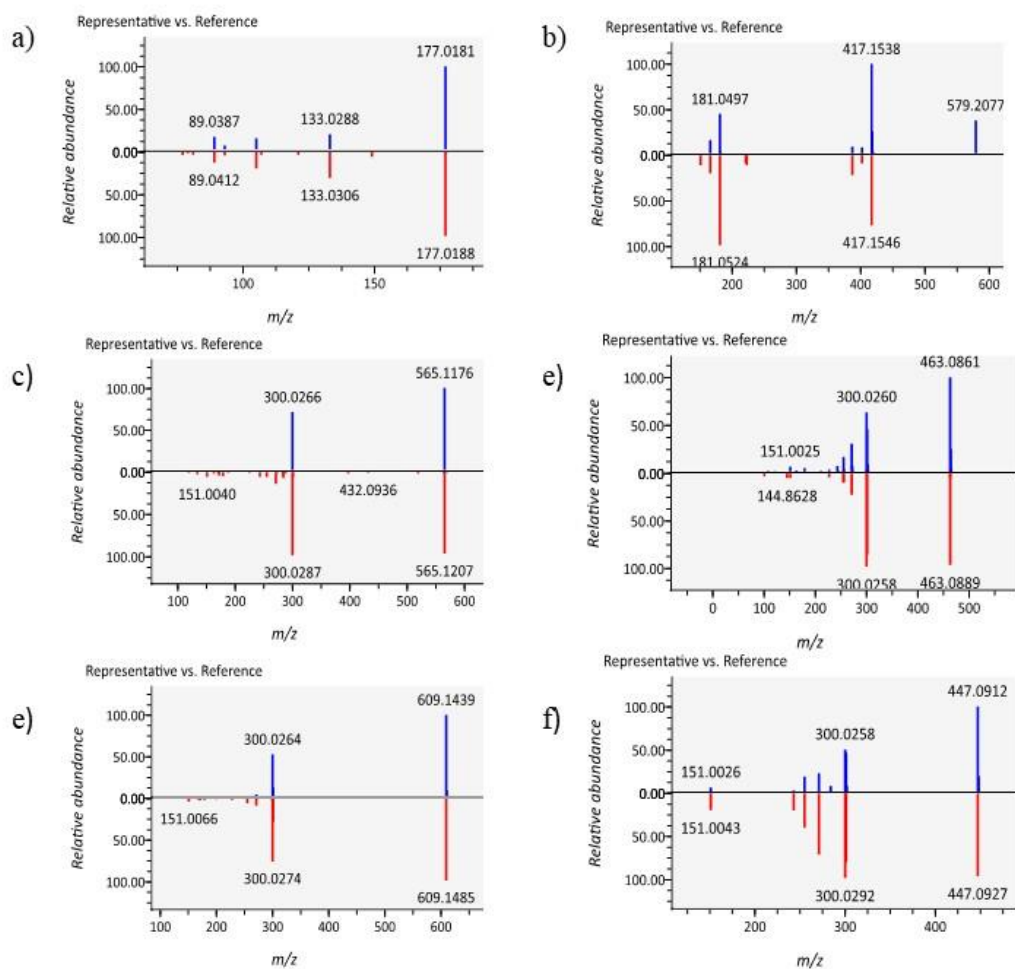


Figura M7 - Análise de componentes principais obtida por análise quimiométrica entre amostras de MP (*M. princeps*) e MM (*M. macrocalyx*).

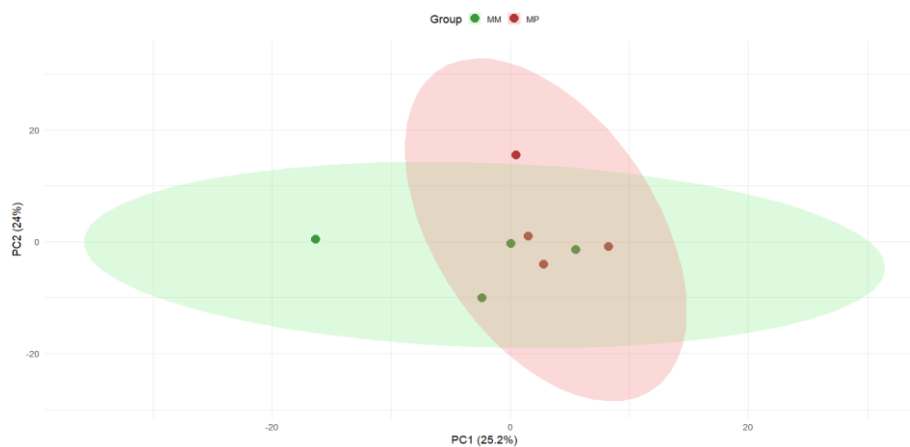


Figura M8 - Loadings de PCA obtidas a partir de análise quimiométrica entre amostras de extrato de MP (*M. princeps*) e MM (*M. macrocalyx*).

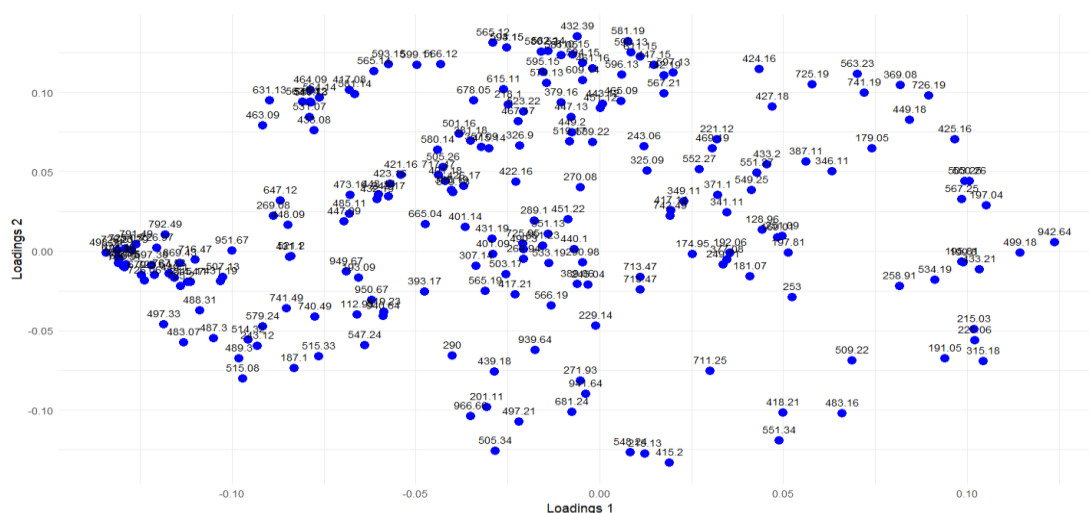


Tabela M1 - Compostos anotados por meio das análises de CLAE-IES-EM/EM de extratos e frações de *M. macrocalyx* [MM-FHE (1); MM-FAE (2); MM-FCL (3); MM-FHX (4); MP-FHE (5); MP-FAE (6); MP-FCL (7), MP-FHX (8)].

Pico nº	t <sub>R</sub> (min)	Compostos	Fórmula Molecular	EM ( - )	EM ( + )	m/z mensurada	EM/EM	Erro (ppm)	Amostras	Nível da anotação	Referências
1	4.13	N-metil-4-hidroxiprolina	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>	-	[M+H] <sup>+</sup>	146,08052	128, 118, 100	-4,4	1, 3, 5	1	(HARAGUCHI; GORNIK; IKEDA; MINAMI <i>et al.</i> , 2003)
2	4.31	Ácido quínico	C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	-	191,05549	173, 127, 111, 93, 85, 59	-3,2	1, 3, 4, 5	2	(CHANSRINIYOM; NOOIN; NUENGCHAMNONG; WONGWANAKUL <i>et al.</i> , 2021)
3	5.06	Ácido gálico	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	-	169,01350	125	-4,4	1, 5	2	(ŚWIĄTEK; SIENIAWSKA; SINAN; MACIEJEWSKA-TURSKA <i>et al.</i> , 2021)
4	7.97	Ácido cafeico-hexosídeo carboxílico I	C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> O <sub>10</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	-	355,06540	193, 179	-4,7	5, 6	2	(YUAN; WANG; MI; ZHANG <i>et al.</i> , 2021)
5	8.17	Ácido cafeico-hexosídeo carboxílico II	C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> O <sub>10</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	-	355,06573	193, 179	-3,8	5, 6	2	(YUAN; WANG; MI; ZHANG <i>et al.</i> , 2021)

6	8.63	Ácido cafeico-hexosídeo carboxílico III	C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> O <sub>10</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	-	355,06540	193, 179	-4,7	5, 6	2	(YUAN; WANG; MI; ZHANG <i>et al.</i> , 2021)
7	8.82	Ácido cafeico-hexosídeo carboxílico IV	C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> O <sub>10</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	-	355,06533	193, 179	-4,9	5, 6	2	(YUAN; WANG; MI; ZHANG <i>et al.</i> , 2021)
8	9.45	Fraxina	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>10</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	-	369,08142	207, 192, 135	-3,5	1, 2, 3, 5, 6, 7	2	(WANG; XIAO; HAO; SUN, 2016)
9	9.78	Ácido cumárico glucosídeo	C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	-	325,09191	163, 119	-3,0	1, 6	2	(BREAUD; LALLEMAND; MARES; MABROUKI <i>et al.</i> , 2022)
10	10.36	6,7-Dihidroxycumarina	C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	-	177,01844	133, 105, 93, 89	-5,0	2, 3	2	-
11	10.51	Não anotado	C <sub>16</sub> H <sub>28</sub> O <sub>10</sub>	[M+COOH] <sup>-</sup>	-	425,16468	379, 149	-4,1	1, 5, 6, 7	-	-
12	10.81	Não anotado	C <sub>11</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>6</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	-	256,08166	212, 196, 143, 99	-3,9	1, 3	-	-
13	11.16	Liriodendrina	C <sub>34</sub> H <sub>46</sub> O <sub>18</sub>	[M+COOH] <sup>-</sup>	-	787,26430	579, 417	-2,9	1, 3, 5	3	(JUNG; PARK; KIM; SHIN <i>et al.</i> , 2003)
14	11.38	Roseosídeo	C <sub>19</sub> H <sub>30</sub> O <sub>8</sub>	[M+COOH] <sup>-</sup>	-	431,19101	385, 223, 205, 179, 161, 153	-2,9	1, 2, 3, 6, 7, 8	2	(MORCOL; WYSOCKI; SANKARAN; MATTHEWS <i>et al.</i> , 2020)
15	11.70	Matairesinosídeo	C <sub>26</sub> H <sub>32</sub> O <sub>11</sub>	[M+COOH] <sup>-</sup>	-	565,19112	327	-2,7	1, 3, 6	3	(LIU; LIN, 2024)



16	11.81	Ácido 3-O-sinapoilquínico	$C_{18}H_{22}O_{10}$	$[M+COOH]^-$	-	443,11849	237	-2,3	1	3	(EL-TABAKH; ELHAWARY; HWIHY; DARWEESH <i>et al.</i> , 2023)
17	11.84	Lariciresinol-4-O-hexosídeo	$C_{26}H_{34}O_{11}$	$[M-H]^-$	-	521,20120	329	-3,1	1, 2, 3	3	(LIU; LIN, 2024)
18	11.87	not annotated	$C_{16}H_{20}O_{10}$	$[M-H]^-$	-	371,09710	249, 121	-3,4	2, 3	5	-
19	11.93	Quercetin-O-pentosil-desoxihexosil-hexosídeo	$C_{32}H_{38}O_{20}$	$[M-H]^-$	-	741,18672	300, 271, 179	-2,2	1, 5, 6	2	(LARBAT; PARIS; LE BOT; ADAMOWICZ, 2014)
20	12.05	Não anotado	$C_{20}H_{22}O_8$	$[M-H]^-$	-	389,12309	341, 193, 165, 150, 135	-2,8	2, 3	5	-
21	12.23	Quercetina-pentosil-hexosídeo	$C_{26}H_{28}O_{16}$	$[M-H]^-$	-	595,12878	300, 271, 255	-3,5	1, 2, 5, 6	2	(SOUZA; SANTOS; MONTEIRO; ESPINDOLA <i>et al.</i> , 2022)
22	12.47	Ácido p-cumarico	$C_9H_8O_3$	$[M-H]^-$	-	163,03935	119, 93	-4,4	2, 3	1	(SINOSAKI; TONIN; RIBEIRO; POLISELI <i>et al.</i> , 2020)
23	12.50	N-trans-feruloilactapamina	$C_{18}H_{19}NO_5$	$[M-H]^-$	-	328,11764	310, 161, 133	-4,3	3	1	(CAROLI; BRIGHENTI; CATTIVELLI; SALAMONE <i>et al.</i> , 2023)

24	12.68	Kaempferol-desoxihexosídeo-pentosil-hexosídeo	C <sub>32</sub> H <sub>38</sub> O <sub>19</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	-	725,19147	284, 255, 179	-2,7	1, 2, 3, 5, 6	2	(OZKAN; YILMAZ; SIENIAWSKA; HRYĆ <i>et al.</i> , 2024)
25	12.85	Acantosídeo B	C <sub>28</sub> H <sub>36</sub> O <sub>13</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	-	579,20631	417, 402, 387, 181	-3,4	3, 7	2	(KARTHIVASHAN; KWEON; PARK; KIM <i>et al.</i> , 2019)/
26	12.94	Quercetina-pentosil-pentosídeo	C <sub>25</sub> H <sub>26</sub> O <sub>15</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	-	565,11825	300, 284, 271, 255	-2,9	1, 2, 5, 6, 7	2	-
27	13.08	Quercetina-pentosídeo-hexosídeo	C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> O <sub>15</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	-	579,13322	447, 387, 284, 255, 227	-4,0	1, 2, 6	3	(KIM; KOH; FUKAMI, 1985)
28	13.24	Quercetina-Hexosídeo I	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	-	463,08689	300, 271, 255, 151	-2,8	1, 2, 3, 6	2	(SOUZA; SANTOS; MONTEIRO; ESPINDOLA <i>et al.</i> , 2022)
29	13.26	Rutina	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	-	609,14418	343, 300, 271, 255, 179, 151	-3,2	1, 2, 3, 5, 6, 7	1	(JIANG; LI; WANG; PI <i>et al.</i> , 2024)
30	13.33	Quercetina-Hexosídeo II	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	-	463,08697	300, 271, 255	-2,6	1, 2, 3, 6	2	(SOUZA; SANTOS; MONTEIRO; ESPINDOLA <i>et al.</i> , 2022)
31	13.59	Quercetina-desoxihexosil-hexosídeo I	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	-	609,14449	447, 300, 271, 255, 179, 151	-2,6	1, 2, 3, 6, 7	2	(JIANG; LI; WANG; PI <i>et al.</i> , 2024)
32	13.62	Quercetina-Pentosídeo I	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>11</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	-	433,07593	300, 271, 255, 243, 179, 151	-3,9	1, 2, 6	2	(LI; MENG; ZHANG; SUN <i>et al.</i> , 2016)

33	13.73	Quercetina- Pentosídeo II	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>11</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	-	433,07561	300, 271, 255, 243, 179, 151	-4,6	6	2	(LI; MENG; ZHANG; SUN <i>et al.</i> , 2016)
34	13.80	Quercetina- desoxihexosil- hexosídeo II	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	-	609,14449	429, 300, 271, 243, 255, 179, 151	-2,6	1, 2, 3, 5, 6	2	(JIANG; LI; WANG; PI <i>et al.</i> , 2024)
35	13.91	Quercetina- desoxihexosil- hexosídeo III	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	-	609,14428	301, 300, 271, 179, 151	-3,0	1, 2, 3, 6	2	(JIANG; LI; WANG; PI <i>et al.</i> , 2024)
36	13.98	Kaempferol- dipentosídeo	C <sub>25</sub> H <sub>26</sub> O <sub>14</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	-	549,12315	417, 284, 255, 227, 179	-3,3	1, 2, 3, 6	2	(FETNI; BERTELLA; OUAHAB, 2020)
37	14.03	Kaempferol- desoxihexosil- hexosídeo I	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	-	593,14955	284, 255, 227	-2,7	1, 2, 3, 5, 6	2	(JIANG; LI; WANG; PI <i>et al.</i> , 2024)
38	14.10	Quercetina-3-O- xilopiranosil-(1-2)- ramnosídeo	C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> O <sub>15</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	-	579,13451	429, 300, 271, 255, 243, 179, 151	-1,7	1, 2, 3, 5, 6	1	(ÜRMÉNYI; SARAIVA; CASANOVA; MATOS <i>et al.</i> , 2016)
39	14.28	Quercetina- desoxihexosídeo	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	-	447,09279	301, 300, 271, 255, 243, 179, 151, 121	-1,1	1, 2, 3, 6	2	(SOUZA; SANTOS; MONTEIRO; ESPINDOLA <i>et al.</i> , 2022)
40	14.34	Kaempferol- pentosil- desoxihexosídeo	C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> O <sub>15</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	-	579,13359	301	-3,3	1, 2, 3, 6	2	(ÜRMÉNYI; SARAIVA; CASANOVA; MATOS <i>et al.</i> , 2016)
41	14.41	Leeaosídeo	C <sub>24</sub> H <sub>40</sub> O <sub>11</sub>	[M+COOH] <sup>+</sup>	-	549,25313	503, 371, 209	-3,8	1, 5, 6, 7	3	-

42	14.60	N-Trans-feruloiltiramina	C <sub>18</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>4</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	-	312,12286	297, 190, 178, 148, 135	-4,0	3	1	(CAROLI; BRIGHENTI; CATTIVELLI; SALAMONE <i>et al.</i> , 2023)
43	14.66	Kaempferol-desoxihexosil-hexosídeo II	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	-	593,14908	431, 413, 284, 255, 227, 151	-3,5	1, 2, 5, 6	2	(JIANG; LI; WANG; PI <i>et al.</i> , 2024)
44	14.86	Kaempferol-desóxihexosil-hexosídeo III	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	-	593,14977	284, 255, 227	-2,3	1, 2, 5, 6	2	(JIANG; LI; WANG; PI <i>et al.</i> , 2024)
45	14.93	3-Oxo-ionol-glucopiranosídeo	C <sub>19</sub> H <sub>30</sub> O <sub>7</sub>	[M+COOH] <sup>-</sup>	-	415,19581	179	-3,7	1, 2, 5, 6	3	(THAO; LUYEN; TAI; YANG <i>et al.</i> , 2014)
46	15.00	Kaempferol-desóxihexosil-hexosídeo IV	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	-	593,14935	285	-3,1	1, 2, 6	2	(JIANG; LI; WANG; PI <i>et al.</i> , 2024)
47	15.04	Bizantionosídeo B	C <sub>19</sub> H <sub>32</sub> O <sub>7</sub>	[M+COOH] <sup>-</sup>	-	417,21099	371	-4,8	3, 6, 7	5	(SAMY; KHALIL; SUGIMOTO; MATSUNAMI <i>et al.</i> , 2011)
48	15.17	Kaempferol-3-O-xilopiranosil-(1-2)-ramnosídeo	C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> O <sub>14</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	-	563,13909	431, 413, 284, 255, 227, 179, 151	-2,7	1, 2, 3, 5, 6, 7	1	(ÜRMÉNYI; SARAIVA; CASANOVA; MATOS <i>et al.</i> , 2016)
49	15.48	Kaempferol-desoxihexosídeo	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	-	431,09695	285, 255, 227, 211	-3,3	2, 3, 6	2	(SOUZA; SANTOS; MONTEIRO;

											ESPINDOLA <i>et al.</i> , 2022)
--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------------------------------------

## 6 CONCLUSÕES

A investigação fitoquímica das raízes de *M. macrocalyx* possibilitou o isolamento da amida  $N^1, N^5, N^{10}$ -Tri-*p*-cumaroil-espermidina e cinco novas lignanamidas, sendo uma delas tipo bis-fenilpropeno atropoisomérica, duas lignanamidas do tipo tetra-hidrofurano e duas lignanamidas do tipo aril-dihidronaftaleno, trivialmente denominadas de metternichiamidas A-E. Esses compostos apresentaram atividade anti-inflamatória frente à linhagem celular de macrófagos murinos (RAW 264.7).

As análises de CLAE-IES-Q-TOF-EM/EM permitiram a anotação de 49 substâncias nas fases de *M. macrocalyx* e *M. princeps*. O nível de confiança dessas anotações foi respaldado pelas substâncias isoladas (quercetina-3-O-xilopiranosil-(1→2)-ramnopiranosídeo e kaempferol-3-O-xilopiranosil-(1→2)-ramnopiranosídeo), padrões, bibliotecas de EM/EM no software MS-DIAL e dados de EM/EM da literatura. As análises quimiométricas mostraram similaridades e diferenças entre o perfil metabólico de *M. macrocalyx* e *M. princeps*. A maior separação entre os grupos foi exibida pela comparação entre as mesmas fases de espécies distintas, enquanto a análise entre as duas espécies mostrou sobreposição de dados. Em suma, os resultados evidenciaram mais similaridades do que diferenças entre os perfis químicos dessas espécies, em conformidade com a antiga proposta de um gênero monotípico.

Por fim, esses trabalhos contribuíram com o conhecimento químico e farmacológico da espécie *M. macrocalyx*, por meio da identificação de novas lignanamidas com atividade anti-inflamatória e promoção do conhecimento quimiotaxonômico do gênero *Metternichia* e de suas espécies, por meio do estabelecimento do perfil químico de seus exemplares, além da comparação desses perfis por análises quimiométricas.

## REFERÊNCIAS

- AFROZ, M.; AKTER, S.; AHMED, A.; ROUF, R. *et al.* Ethnobotany and Antimicrobial Peptides From Plants of the Solanaceae Family: An Update and Future Prospects. **Front Pharmacol**, 11, p. 565, 2020.
- AL-QAHTANI, A. A.; ALHAMLAN, F. S.; AL-QAHTANI, A. A. Pro-Inflammatory and Anti-Inflammatory Interleukins in Infectious Diseases: A Comprehensive Review. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v.9, n. 1, p. 13, 2024.
- BASILAI, M.; CHEN, M. H.; SECKA, J.; GUSTAFSON, J. L. Atropisomerism in the Pharmaceutically Relevant Realm. **Accounts of Chemical Research**, 55, n. 20, p. 2904-2919, 2022.
- BERTI, F.; TAMBURELLO, E. M.; FORZATO, C. p-Coumaroyl Amides from the Plant Kingdom: A Comprehensive Review of Natural Sources, Biosynthesis, and Biological Activities. **Molecules**, v.30, n. 6, p. 1259, 2025.
- BEZERRA, J. J. L.; PINHEIRO, A. A. V.; LUCENA, R. B. d. Poisoning in ruminants caused by species of the genus *Cestrum* L. (Solanaceae) in Brazil: A review of toxicological and phytochemical evidence. **Toxicon**, 236, p. 107348, 2023.
- BFG. Brazilian Flora 2020: Leveraging the power of a collaborative scientific network. **Taxon**, 71, n. 1, p. 178-198, 2022.
- BORMA, L. S.; COSTA, M. H.; DA ROCHA, H. R.; ARIEIRA, J. *et al.* Beyond Carbon: The Contributions of South American Tropical Humid and Subhumid Forests to Ecosystem Services. **Reviews of Geophysics**, 60, n. 4, p. e2021RG000766, 2022.
- BRAZ FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, 33, p. 229-239, 2010.
- BREAUD, C.; LALLEMAND, L.; MARES, G.; MABROUKI, F. *et al.* LC-MS Based Phytochemical Profiling towards the Identification of Antioxidant Markers in Some Endemic Aloe Species from Mascarene Islands. **Antioxidants (Basel)**, 12, n. 1, p. 50, 2022.
- BRITO, T. A. d. M.; DE ALBUQUERQUE, A. C. F.; DOS SANTOS JUNIOR, F. M.; LOUREIRO, P. B. A. *et al.* Lignanamides from the Roots of *Metternichia macrocalyx* and Their Anti-inflammatory Activity. **ACS Omega**, 9, n. 47, p. 47065-47076, 2024.
- CALIXTO, J. B. The role of natural products in modern drug discovery. **An Acad Bras Cienc**, 91 Suppl 3, p. e20190105, 2019.
- CANELLA, C. F.; TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J. J. P. A. B. Intoxicação por *Sessea brasiliensis* Toledo em bovinos. 3, n. 1, p. 333-340, 1968.
- CAROLI, C.; BRIGHENTI, V.; CATTIVELLI, A.; SALAMONE, S. *et al.* Identification of phenolic compounds from inflorescences of non-psychoactive *Cannabis sativa* L. by

UHPLC-HRMS and *in vitro* assessment of the antiproliferative activity against colorectal cancer. **J Pharm Biomed Anal**, 236, p. 115723, 2023.

CHAACHOUAY, N.; ZIDANE, L. Plant-Derived Natural Products: A Source for Drug Discovery and Development. **Drugs and Drug Candidates**, v.3, n. 1, p. 184-207, 2024.

CHANSRINIYOM, C.; NOOIN, R.; NUENGCHAMNONG, N.; WONGWANAKUL, R. *et al.* Tandem mass spectrometry of aqueous extract from *Ficus dubia* sap and its cell-based assessments for use as a skin antioxidant. **Scientific Reports**, 11, n. 1, p. 16899, 2021.

CHARLTON, J. L.; OLESCHUK, C. J.; CHEE, G.-L. Hindered Rotation in Arylnaphthalene Lignans. **The Journal of Organic Chemistry**, 61, n. 10, p. 3452-3457, 1996.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química nova**, 31, p. 623-636, 2008.

CHOI, H. S.; CHO, J. Y.; JIN, M. R.; LEE, Y. G. *et al.* Phenolics, acyl galactopyranosyl glycerol, and lignan amides from *Tetragonia tetragonioides* (Pall.) Kuntze. **Food Sci Biotechnol**, 25, n. 5, p. 1275-1281, 2016.

CIFUENTES, M.; VERDEJO, H. E.; CASTRO, P. F.; CORVALAN, A. H. *et al.* Low-Grade Chronic Inflammation: a Shared Mechanism for Chronic Diseases. **Physiology (Bethesda)**, 40, n. 1, p. 4-25, 2025.

CIOGLI, A.; VIVEK KUMAR, S.; MANCINELLI, M.; MAZZANTI, A. *et al.* Atropisomerism in 3-arylthiazolidine-2-thiones. A combined dynamic NMR and dynamic HPLC study. **Organic & Biomolecular Chemistry**, 14, n. 47, p. 11137-11147, 2016.

COSTA, F. L.; DE ALBUQUERQUE, A. C.; FIOROT, R. G.; LIÃO, L. M. *et al.* Structural characterisation of natural products by means of quantum chemical calculations of NMR parameters: new insights. **Organic Chemistry Frontiers**, 8, n. 9, p. 2019-2058, 2021.

DE SOUZA, L. d. S.; ANDRADE, B. O.; RADAESKI, J. N.; BAUERMANN, S. G. *et al.* Revisiting *Metternichia* (Solanaceae) Through an Integrative Approach: A Monotypic Genus? **Systematic Botany**, 48, n. 3, p. 419-434, 2023.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 3rd ed. United Kingdom: John Wiley & Sons Ltd, 2009. 539 p. 978-0-470-74168-9.

DIAS, M. C.; PINTO, D. C. G. A.; SILVA, A. M. S. Plant Flavonoids: Chemical Characteristics and Biological Activity. **Molecules**, v.26, n. 17, p. 5377, 2021.



EL-TABAKH, M. A. M.; ELHAWARY, E. A.; HWIHY, H. M.; DARWEESH, K. F. *et al.* UPLC/ESI/MS profiling of red algae *Galaxaura rugosa* extracts and its activity against malaria mosquito vector, *Anopheles pharoensis*, with reference to *Danio rerio* and *Daphnia magna* as bioindicators. **Malaria Journal**, 22, n. 1, p. 368, 2023.

ERAZO, S.; GALEFFI, C.; CIASCA RENDINA, M.; DELLE MONACHE, E. 3- $\alpha$ -(2-O- $\beta$ -D-glucopiranosil)-D-glucofuranoside della quercetina: nuovo glucoside flavonico della *Vestia lycioides*. **Ann. Ist. Super. Sanità**, 7, p. 23-30, 1971.

FAINI, F.; TORRES, R.; DELLE MONACHE, F.; MARINI-BETTÓLO, G. *et al.* 1-Acetyl-3-Carboxy- $\beta$ -Carboline, a New Acid and Other Constituents of *Vestia lycioides*. **Planta Medica**, 38, n. 02, p. 128-132, 2008.

FENG, J.; JIN, R.; CHENG, S.; LI, H. *et al.* Establishing an Artificial Pathway for the Biosynthesis of Octopamine and Synephrine. **ACS Synthetic Biology**, 13, n. 6, p. 1762-1772, 2024.

FERNANDES, M. F.; CARDOSO, D.; PENNINGTON, R. T.; DE QUEIROZ, L. P. The Origins and Historical Assembly of the Brazilian Caatinga Seasonally Dry Tropical Forests. **Frontiers in Ecology and Evolution**, 10, p. 723286, 2022.

FETNI, S.; BERTELLA, N.; OUAHAB, A. LC-DAD/ESI-MS/MS characterization of phenolic constituents in *Rosa canina* L. and its protective effect in cells. **Biomed Chromatogr**, 34, n. 12, p. e4961, 2020.

FRIEBE, A.; ENGLERT, N. NO-sensitive guanylyl cyclase in the lung. **Br J Pharmacol**, 179, n. 11, p. 2328-2343, 2022.

FRISCH, M.; TRUCKS, G.; SCHLEGEL, H.; SCUSERIA, G. *et al.* Gaussian 16 Rev. C. 01, Wallingford, CT. **J Wallingford**, 2016.

GANDHI, G. R.; MOHANA, T.; ATHESH, K.; HILLARY, V. E. *et al.* Anti-inflammatory natural products modulate interleukins and their related signaling markers in inflammatory bowel disease: A systematic review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, 13, n. 12, p. 1408-1428, 2023.

GOSHI, E.; ZHOU, G.; HE, Q. Nitric oxide detection methods *in vitro* and *in vivo*. **Med Gas Res**, 9, n. 4, p. 192-207, 2019.

GRIESS, P. Bemerkungen zu der Abhandlung der HH. Weselsky und Benedikt „Ueber einige Azoverbindungen“. **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft**, 12, n. 1, p. 426-428, 1879.

GRIMBLAT, N.; ZANARDI, M. M.; SAROTTI, A. M. Beyond DP4: an Improved Probability for the Stereochemical Assignment of Isomeric Compounds using Quantum Chemical Calculations of NMR Shifts. **J Org Chem**, 80, n. 24, p. 12526-12534, 2015.

GUTIERREZ, R. M. P.; HOYO-VADILLO, C. Anti-inflammatory Potential of *Petiveria alliacea* on Activated RAW264.7 Murine Macrophages. **Pharmacogn Mag**, 13, n. Suppl 2, p. S174-S178, 2017.

HARAGUCHI, M.; GORNIK, S. L.; IKEDA, K.; MINAMI, Y. *et al.* Alkaloidal Components in the Poisonous Plant, *Ipomoea carnea* (Convolvulaceae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 51, n. 17, p. 4995-5000, 2003.

JAN, S.; IRAM, S.; BASHIR, O.; SHAH, S. N. *et al.* Unleashed Treasures of Solanaceae: Mechanistic Insights into Phytochemicals with Therapeutic Potential for Combatting Human Diseases. **Plants**, v.13, n. 5, p. 724, 2024.

JIANG, T.; LI, X.; WANG, H.; PI, M. *et al.* Identification and quantification of flavonoids in edible dock based on UPLC-qTOF MS/MS and molecular networking. **Journal of Food Composition and Analysis**, 133, p. 106399, 2024.

JOMOVA, K.; ALOMAR, S. Y.; VALKO, R.; LISKA, J. *et al.* Flavonoids and their role in oxidative stress, inflammation, and human diseases. **Chemico-Biological Interactions**, 413, p. 111489, 2025.

JUNG, H. J.; PARK, H. J.; KIM, R. G.; SHIN, K. M. *et al.* *In vivo* anti-inflammatory and antinociceptive effects of liriiodendrin isolated from the stem bark of *Acanthopanax senticosus*. **Planta Med**, 69, n. 7, p. 610-616, 2003.

KALECHMAN, Y.; GAFTER, U.; GAL, R.; RUSHKIN, G. *et al.* Anti-IL-10 therapeutic strategy using the immunomodulator AS101 in protecting mice from sepsis-induced death: dependence on timing of immunomodulating intervention. **J Immunol**, 169, n. 1, p. 384-392, 2002.

KARTHIVASHAN, G.; KWEON, M. H.; PARK, S. Y.; KIM, J. S. *et al.* Cognitive-enhancing and ameliorative effects of acanthoside B in a scopolamine-induced amnesic mouse model through regulation of oxidative/inflammatory/cholinergic systems and activation of the TrkB/CREB/BDNF pathway. **Food Chem Toxicol**, 129, p. 444-457, 2019.

KATCHBORIAN-NETO, A.; ALVES, M. F.; BUENO, P. C. P.; DE JESUS NICÁCIO, K. *et al.* Integrative open workflow for confident annotation and molecular networking of metabolomics MSE/DIA data. **Briefings in Bioinformatics**, 25, n. 2, p. bbae013, 2024.

KAUNDA, J. S.; ZHANG, Y. J. The Genus *Solanum*: An Ethnopharmacological, Phytochemical and Biological Properties Review. **Nat Prod Bioprospect**, 9, n. 2, p. 77-137, 2019.

KIM, M.; KOH, H.-S.; FUKAMI, H. Isolation of C-glycosylflavones as probing stimulant of planthoppers in rice plant. **Journal of Chemical Ecology**, 11, n. 4, p. 441-452, 1985.

KING, R. R.; CALHOUN, L. A. J. P. Characterization of cross-linked hydroxycinnamic acid amides isolated from potato common scab lesions. **Phytochemistry**, 66, n. 20, p. 2468-2473, 2005.

KOWALCZYK, T.; MERECZ-SADOWSKA, A.; RIJO, P.; MORI, M. *et al.* Hidden in plants—a review of the anticancer potential of the Solanaceae family in *in vitro* and *in vivo* studies. **Cancers**, 14, n. 6, p. 1455, 2022.

KUMAR, G. A.; KUMAR, S.; BHARDWAJ, R.; SWAPNIL, P. *et al. et al.* Recent advancements in multifaceted roles of flavonoids in plant–rhizomicrobiome interactions. **Frontiers in Plant Science**, v. 14, p. 1297706, 2024.

KUMAR, S.; GAUTAM, V.; SINGH, B. P.; KUMAR, D. Editorial: Investigating the impact of bioactive metabolites and extracts in human health and disease. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 10, p. 1244316, 2023.

LARBAT, R.; PARIS, C.; LE BOT, J.; ADAMOWICZ, S. Phenolic characterization and variability in leaves, stems and roots of Micro-Tom and patio tomatoes, in response to nitrogen limitation. **Plant Sci**, 224, p. 62-73, 2014.

LATIF, Z.; SARKER, S. D. Isolation of Natural Products by Preparative High Performance Liquid Chromatography (Prep-HPLC). *In*: SARKER, S. D. e NAHAR, L. (Ed.). **Natural Products Isolation**. Totowa, NJ: Humana Press, p. 255-274, 2012.

LEONARD, W.; ZHANG, P.; YING, D.; FANG, Z. Lignanamides: sources, biosynthesis and potential health benefits - a minireview. **Crit Rev Food Sci Nutr**, 61, n. 8, p. 1404-1414, 2020.

LI, J.; HUANG, Y.; CHEN, L.; GAO, S. *et al.* Understory plant diversity and phenolic allelochemicals across a range of *Eucalyptus grandis* plantation ages. **Journal of Forestry Research**, 34, n. 5, p. 1577-1590, 2023.

LI, S.-S.; WU, J.; CHEN, L.-G.; DU, H. *et al.* Biogenesis of C-Glycosyl Flavones and Profiling of Flavonoid Glycosides in Lotus (*Nelumbo nucifera*). **PLOS ONE**, 9, n. 10, p. e108860, 2014.

LI, Z.; MENG, F.; ZHANG, Y.; SUN, L. *et al.* Simultaneous quantification of hyperin, reynoutrin and guaijaverin in mice plasma by LC-MS/MS: application to a pharmacokinetic study. **Biomed Chromatogr**, 30, n. 7, p. 1124-1130, 2016.

LIMA E SILVA, A.; BRITO, T. A. M.; AGRA, M. F.; SILVA, M. S. *et al.* Molecular Networks as Strategy for Dereplication of Steroidal Alkaloids of Herbarium Samples of *Solanum jabrense* Agra and M. Nee, an Endemic and Unexplored Species. **Chem Biodivers**, p. e202402513, 2024.

LISCOVSKY, I. J.; COSA, M. T.; BARBOZA, G. E. Flower vascularisation in Solanaceae: a particular pattern in Metternichia J.G.Mikan. **Adansonia**, 31, n. 2, p. 413-425, 2009.

LIU, T.; LIN, S. Comprehensive characterization of the chemical constituents of Lianhua Qingwen capsule by ultra high performance liquid chromatography coupled with Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. **Heliyon**, 10, n. 6, p. e27352, 2024.

LIU, Z.; SHEN, S.; LI, C.; ZHANG, C. *et al.* SolR: a comprehensive Solanaceae information resource for comparative and functional genomic study. **Nucleic Acids Research**, 53, n. D1, p. D1623-D1632, 2025.

LUO, Q.; YAN, X.; BOBROVSKAYA, L.; JI, M. *et al.* Anti-neuroinflammatory effects of grossamide from hemp seed via suppression of TLR-4-mediated NF- $\kappa$ B signaling pathways in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglia cells. **Molecular and Cellular Biochemistry** 428, p. 129-137, 2017.

MA, C. Y.; LIU, W. K.; CHE, C. T. Lignanamides and nonalkaloidal components of *Hyoscyamus niger* seeds. **J Nat Prod**, 65, n. 2, p. 206-209, 2002.

MA, Y.; TANG, T.; SHENG, L.; WANG, Z. *et al.* Aloin suppresses lipopolysaccharide-induced inflammation by inhibiting JAK1-STAT1/3 activation and ROS production in RAW264.7 cells. **Int J Mol Med**, 42, n. 4, p. 1925-1934, 2018.

MALLARDO, M.; PACIFICO, S.; PICCOLELLA, S.; DI MEO, I. *et al.* Exploring the neuroprotective activity of a lignanamides-rich extract in human neuroblastoma SH-SY5Y cells under dimethyl sulfoxide-induced stress. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 12, p. 1374626, 2024.

MARAN, N. B.; CALDAS, S. A.; PRADO, J. S.; GOMES, A. D. *et al.* Intoxicação experimental por *Metternichia princeps* (Solanaceae) em coelhos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 32, n. 9, p. 872-880, 2012.

MARCARINO, M. O.; CICETTI, S.; ZANARDI, M. M.; SAROTTI, A. M. A critical review on the use of DP4+ in the structural elucidation of natural products: the good, the bad and the ugly. A practical guide. **Nat Prod Rep**, 39, n. 1, p. 58-76, 2022.

MORCOL, T. B.; WYSOCKI, K.; SANKARAN, R. P.; MATTHEWS, P. D. *et al.* UPLC-QToF-MS(E) Metabolomics Reveals Changes in Leaf Primary and Secondary Metabolism of Hop (*Humulus lupulus* L.) Plants under Drought Stress. **J Agric Food Chem**, 68, n. 49, p. 14698-14708, 2020.

MORRIS, W. L.; TAYLOR, M. A. The Solanaceous Vegetable Crops: Potato, Tomato, Pepper, and Eggplant. *In*: THOMAS, B.; MURRAY, B. G., *et al* (Ed.). **Encyclopedia of Applied Plant Sciences (Second Edition)**. Oxford: Academic Press, 2017. p. 55-58.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MOTTI, R. The Solanaceae Family: Botanical Features and Diversity. *In*: CARPUTO, D.; AVERSANO, R., *et al* (Ed.). **The Wild Solanums Genomes**. Cham: Springer International Publishing, 2021. p. 1-9.

NAIK, J.; MISRA, P.; TRIVEDI, P. K.; PANDEY, A. Molecular components associated with the regulation of flavonoid biosynthesis. **Plant Science**, 317, p. 111196, 2022.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, 83, n. 3, p. 770-803, 2020.

OHTA, S.; FUJIMAKI, T.; UY, M. M.; YANAI, M. *et al.* Antioxidant hydroxycinnamic acid derivatives isolated from Brazilian bee pollen. **Nat Prod Res**, 21, n. 8, p. 726-732, 2007.

OriginPro 8, OriginLab Corporation; Northampton, MA, USA. 2020.

OZKAN, G.; YILMAZ, M. T.; SIENIAWSKA, E.; HRYĆ, B. *et al.* Lc-Esi-MS/MS Phenolic Profiling of Newly-Formulated Legume-Based Functional Infusions and Effect of in Vitro Gastrointestinal Digestion. 2024.

PAUMGARTTEN, F. J. R.; DE SOUZA, G. R.; DA SILVA, A. J. R.; DE-OLIVEIRA, A. C. A. X. Chapter 39 - Analgesic properties of plants from the genus *Solanum* L. (Solanaceae). *In*: RAJENDRAM, R.; PATEL, V. B., *et al* (Ed.). **Treatments, Mechanisms, and Adverse Reactions of Anesthetics and Analgesics**: Academic Press, 2022. p. 457-471.

PEDROSO, P. M.; SANTOS, M. V.; SEUS, V. G.; DA SILVA, R. M. *et al.* Intoxicação por *Metternichia princeps* (Solanaceae) em caprinos no Estado da Bahia. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 35, p. 448-450, 2015.

POLAVARAPU, P. L.; JEIRATH, N.; KURTAN, T.; PESCITELLI, G. *et al.* Determination of the absolute configurations at stereogenic centers in the presence of axial chirality. **Chirality**, 21 Suppl 1, n. 1E, p. E202-207, 2009.

QIN, X.; JIANG, X.; JIANG, X.; WANG, Y. *et al.* Micheliolide inhibits LPS-induced inflammatory response and protects mice from LPS challenge. **Sci Rep**, 6, n. 1, p. 23240, 2016.

QUEIROZ, L. P.; CARDOSO, D.; FERNANDES, M. F.; MORO, M. F. Diversity and Evolution of Flowering Plants of the Caatinga Domain. *In*: SILVA, J. M. C. d.; LEAL, I. R., *et al* (Ed.). **Caatinga: The Largest Tropical Dry Forest Region in South America**. Cham: Springer International Publishing, 2017. p. 23-63.

SAHU, P. K.; PRADHAN, S. P.; KUMAR, P. S. Chapter 10 - Isolation, elucidation, and structure–activity relationships of phytoalkaloids from Solanaceae. *In*: ATTA UR, R. (Ed.). **Studies in Natural Products Chemistry**: Elsevier, 2022. v. 72, p. 371-389.

SAKAKIBARA, I.; IKEYA, Y.; HAYASHI, K.; MITSUHASHI, H. Three phenyldihydronaphthalene lignanamides from fruits of *Cannabis sativa*. **Phytochemistry**, 31, n. 9, p. 3219-3223, 1992.

SAKAKIBARA, I.; IKEYA, Y.; HAYASHI, K.; OKADA, M. *et al.* Three acyclic bis-phenylpropane lignanamides from fruits of *Cannabis sativa*. **Phytochemistry**, 38, n. 4, p. 1003-1007, 1995.

SAMY, M. N.; KHALIL, H. E.; SUGIMOTO, S.; MATSUNAMI, K. *et al.* Three new flavonoid glycosides, byzantionoside B 6'-O-sulfate and xyloglucoside of (Z)-hex-3-en-1-ol from *Ruellia patula*. **Chem Pharm Bull (Tokyo)**, 59, n. 6, p. 725-729, 2011.

SCHYMANSKI, E. L.; JEON, J.; GULDE, R.; FENNER, K. *et al.* Identifying Small Molecules via High Resolution Mass Spectrometry: Communicating Confidence. **Environmental Science & Technology**, 48, n. 4, p. 2097-2098, 2014.

SHEN, N.; WANG, T.; GAN, Q.; LIU, S. *et al.* Plant flavonoids: Classification, distribution, biosynthesis, and antioxidant activity. **Food Chemistry**, 383, p. 132531, 2022.

SINOSAKI, N. B. M.; TONIN, A. P. P.; RIBEIRO, M. A. S.; POLISELI, C. B. *et al.* Structural Study of Phenolic Acids by Triple Quadrupole Mass Spectrometry with Electrospray Ionization in Negative Mode and H/D Isotopic Exchange. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 31, n. 2, p. 402-408, 2020.

SOUZA, L. d. S. d.; ANDRADE, B. O.; STEHMANN, J. R. An overview on studies of species complexes in Solanaceae. **Acta Botanica Brasilica**, 37, p. e20230032, 2023.

SOUZA, L. S.; STEHMANN, J. R. **Metternichia in Flora e Funga do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2025. Disponível em: <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB21152>. Acesso em: 26 mai. 2025.

SOUZA, P.; SANTOS, M.; MONTEIRO, R.; ESPINDOLA, M. *et al.* TANINOS E FLAVONOIDES DAS FLORES DE *Eugenia uniflora* (MYRTACEAE). **Química Nova**, 45, n. 9, p. 1083-1091, 2022.

Spartan'14 Wavefunction, Inc. Irvine, CA.

SUN, J.; GU, Y. F.; SU, X. Q.; LI, M. M. *et al.* Anti-inflammatory lignanamides from the roots of *Solanum melongena* L. **Fitoterapia**, 98, p. 110-116, 2014.

SUN, J.; HUO, H.-X.; ZHANG, J.; HUANG, Z. *et al.* Phenylpropanoid amides from the roots of *Solanum melongena* L. (Solanaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, 58, p. 265-269, 2015.

SUN, J.; TONG, L.-T.; TU, P.-F.; CHEN, L.-L. *et al.* Lignanamide: A comprehensive review of chemical constituents, biological activities, extraction methods and synthetic pathway. **Food Chemistry**, 460, p. 140459, 2024.

SURBATOVIC, M.; POPOVIC, N.; VOJVODIC, D.; MILOSEVIC, I. *et al.* Cytokine profile in severe Gram-positive and Gram-negative abdominal sepsis. **Sci Rep**, 5, n. 1, p. 11355, 2015.

ŚWIĄTEK, Ł.; SIENIAWSKA, E.; SINAN, K. I.; MACIEJEWSKA-TURSKA, M. *et al.* LC-ESI-QTOF-MS/MS Analysis, Cytotoxic, Antiviral, Antioxidant, and Enzyme Inhibitory Properties of Four Extracts of *Geranium pyrenaicum* Burm. f.: a Good Gift from the Natural Treasure. **International Journal of Molecular Sciences**, v.22, n. 14, p. 7621, 2021.

TELES, M. M. R. S.; PINHEIRO, A. A. V.; DIAS, C. D. S.; TAVARES, J. F. *et al.* Alkaloids of the Lauraceae. **Alkaloids Chem Biol**, 82, p. 147-304, 2019.

THAO, N. P.; LUYEN, B. T.; TAI, B. H.; YANG, S. Y. *et al.* Rat intestinal sucrase inhibition of constituents from the roots of *Rosa rugosa* Thunb. **Bioorg Med Chem Lett**, 24, n. 4, p. 1192-1196, 2014.

TOENJES, S. T.; GUSTAFSON, J. L. Atropisomerism in medicinal chemistry: challenges and opportunities. **Future Med Chem**, 10, n. 4, p. 409-422, 2018.

ÜRMÉNYI, F. G.; SARAIVA, G. D.; CASANOVA, L. M.; MATOS, A. D. *et al.* Anti-HSV-1 and HSV-2 Flavonoids and a New Kaempferol Triglycoside from the Medicinal Plant *Kalanchoe daigremontiana*. **Chem Biodivers**, 13, n. 12, p. 1707-1714, 2016.

VASUDEVAN, U. M.; LEE, E. Y. Flavonoids, terpenoids, and polyketide antibiotics: Role of glycosylation and biocatalytic tactics in engineering glycosylation. **Biotechnology Advances**, 41, p. 107550, 2020.

WANG, H.; XIAO, B.; HAO, Z.; SUN, Z. Simultaneous determination of fraxin and its metabolite, fraxetin, in rat plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and its application in a pharmacokinetic study. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, 1017-1018, p. 70-74, 2016.

WANG, S.; LUO, Q.; FAN, P. J. I. J. o. M. S. Cannabisin F from hemp (*Cannabis sativa*) seed suppresses lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in BV2 microglia as SIRT1 modulator. **International Journal of Molecular Sciences**, 20, n. 3, p. 507, 2019.

WERNER, C.; HU, W.; LORENZI-RIATSCH, A.; HESSE, M. J. P. Di-coumaroylspermidines and tri-coumaroylspermidines in anthers of different species of the genus *Aphelandra*. **Phytochemistry**, 40, n. 2, p. 461-465, 1995.

WU, Y.; ZHENG, C.-J.; DENG, X.-H.; QIN, L.-P. Two New Bis-alkaloids from the Aerial Part of *Piper flaviflorum*. **Helvetica Chimica Acta**, 96, n. 5, p. 951-955, 2013.

YOSHIHARA, T.; KATSUYOSHI, Y.; SEIJI, T.; AND SAKAMURA, S. A New Lignan Amide, Grossamide, from Bell Pepper (*Capsicum annuum* var. *grossurri*). **Agricultural and Biological Chemistry**, 45, n. 11, p. 2593-2598, 1981/11/01 1981.

YUAN, J. Q.; WANG, Y. T.; MI, S. Q.; ZHANG, J. Y. *et al.* Rapid screening and characterization of caffeic acid metabolites in rats by UHPLC-Q-TOF mass spectrometry. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, 20, n. 2, p. 389-401, 2021.

ZHANG, J.-X.; GUAN, S.-H.; FENG, R.-H.; WANG, Y. *et al.* Neolignanamides, lignanamides, and other phenolic compounds from the root bark of *Lycium chinense*. **Journal of Natural Products**, 76, n. 1, p. 51-58, 2013.

ZHANG, L.; BAI, B.; LIU, X.; WANG, Y. *et al.*  $\alpha$ -Glucosidase inhibitors from Chinese Yam (*Dioscorea opposita* Thunb.). **Food Chemistry**, 126, n. 1, p. 203-206, 2011.

ZHAO, Y.; WU, J.; LIU, X.; CHEN, X. *et al.* Decoding nature: multi-target anti-inflammatory mechanisms of natural products in the TLR4/NF- $\kappa$ B pathway. **Frontiers in Pharmacology**, Volume 15 - 2024, 2025.

ZHENG, X. H.; HUANG, Y. P.; LIANG, Q. P.; XU, W. *et al.* A New Lignanamide from the Root of *Lycium yunnanense* Kuang and Its Antioxidant Activity. **Molecules**, 23, n. 4, p. 770, 2018.