



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
INSTITUTO DE QUÍMICA**

TESE

**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES
BIOLÓGICAS DE *Galianthe matogrossiana* E.L. CABRAL (RUBIACEAE)
E *Crateva tapia* L. (CAPPARACEAE); CONTRIBUIÇÃO NA
ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DO NOVO ALCALOIDE ISOLADO DE
Justicia wasshauseniana PROFICE (ACANTHACEAE)**

MARIELE RONDON SANTOS GONÇALVES

2025



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
INSTITUTO DE QUÍMICA

ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE
Galianthe matogrossiana E.L. CABRAL (RUBIACEAE) E *Crateva tapia* L.
(CAPPARACEAE); CONTRIBUIÇÃO NA ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DO NOVO
ALCALOIDE ISOLADO DE *Justicia wasshauseniana* PROFICE (ACANTHACEAE)

MARIELE RONDON SANTOS GONÇALVES

Sob a Orientação do Professor
Dr. Mário Geraldo de Carvalho

e Co-orientação do Professor
Dr. Raimundo Braz-Filho

Tese submetida como requisito parcial para
obtenção do grau de **Doutora em Química**, no
Programa de Pós-Graduação em Química, Área
de Concentração em Química.

Seropédica, RJ
Agosto de 2025

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

G635e Gonçalves, Mariele Rondon Santos, 1987-
Estudo fitoquímico e avaliação de atividades
biológicas de *Galianthe matogrossiana* E.L. Cabral
(Rubiaceae) e *Crateva tapia* L. (Capparaceae);
contribuição na elucidação estrutural do novo alcaloide
isolado de *Justicia wasshauseniana* PROFICE
(Acanthaceae) / Mariele Rondon Santos Gonçalves. -
Seropédica, 2025.
320 f.: il.

Orientador: Mário Geraldo de Carvalho.
Coorientador: Raimundo Braz Filho.
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em
Química/Química, 2025.

1. Fitoquímica. 2. Bioatividade. 3. *Galianthe*
matogrossiana, *Crateva tapia*, *Justicia wasshauseniana*
. 4. Elucidação estrutural. 5. Biodiversidade. I.
Carvalho, Mário Geraldo de, 1952-, orient. II. Braz
Filho, Raimundo, 1935-, coorient. III Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós
Graduação em Química/Química. IV. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

MARIELE RONDON SANTOS GONÇALVES

Tese submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutora em Química, no
Programa de Pós-Graduação em Química, Área de concentração Química.

TESE APROVADA EM 28/08/2025

Mario Geraldo de Carvalho Dr. UFRRJ
(Orientador)

Thiago Wolff Dr. UFRRJ

Bruno Guimarães Marinho Dr. UFRRJ

Alaíde de Sá Barreto Dra. UERJ

Julio César Escalona Arranz Dr. UCN-Chile



TERMO Nº 733/2025 - PPGQ (12.28.01.00.00.00.60)

(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 29/08/2025 12:10)

BRUNO GUIMARAES MARINHO
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptCF (12.28.01.00.00.00.48)
Matrícula: ###740#3

(Assinado digitalmente em 28/08/2025 15:53)

MARIO GERALDO DE CARVALHO
PROFESSOR TITULAR-LIVRE MAG SUPERIOR
DQO (11.39.00.23)
Matrícula: ###864#1

(Assinado digitalmente em 28/08/2025 16:22)

THIAGO WOLFF
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DQO (11.39.00.23)
Matrícula: ###464#1

(Assinado digitalmente em 17/09/2025 09:33)

ALAIDE DE SÁ BARRETO
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ###.###.527-##

(Assinado digitalmente em 28/08/2025 15:49)

JULIO CÉSAR ESCALONA ARRANZ
ASSINANTE EXTERNO
Passaporte: ##542#0

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrrj.br/documentos/> informando seu número: 733, ano: 2025, tipo: **TERMO**, data de emissão: 28/08/2025 e o código de verificação: **db6dbd41a5**

Dedico este trabalho...

Aos meus filhos, João Rondon e André Leonam, e ao meu esposo, Edivaldo Amaral, minhas inspirações e alicerces, que diariamente me proporcionam risos bobos.

Aos meus familiares e amigos, pelo incentivo, apoio e por sempre celebrarem minhas conquistas.

A todas as pessoas que me fizeram sorrir nesses últimos anos.

E quem diria?

Àqueles que me fizeram chorar, cujas lágrimas plantaram em mim sementes de força.

A todos, com amor e eterna gratidão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, ao Senhor Deus, autor dos planos que me conduziram por caminhos espinhosos e floridos. Em todos estes momentos, Ele guia meus passos, guarda minha vida, é refúgio nas horas incertas e fonte da minha força interior.

Agradeço imensamente ao meu querido orientador, Prof. Dr. Mário Geraldo de Carvalho, por cada ensinamento, pelo apoio, pela confiança e pela paciência. Conhecê-lo tornou minha jornada ainda mais desafiadora, pois sabia que dividiria o dia a dia com um profissional de renome. Além disso, descobri um ser humano extraordinário. Muito obrigada pelos momentos de alegria e pelas trocas enriquecedoras. E, por favor, perdoe minhas brincadeiras, das quais não me arrependo, pois essas histórias ficarão para sempre na memória coletiva do LQPN desses três anos.

Estendo também minha gratidão ao Prof. Dr. Raimundo Braz-Filho, outro mestre que dispensa apresentações. Cada encontro foi marcado por risos, piadas e leveza, mesmo nas discussões mais técnicas. Obrigada pela orientação, pela paciência e, especialmente, por eternizar em meu doutorado aquela frase inesquecível: “Eu lhe acho!”. Espero continuar recebendo inúmeras ligações com essa expressão que marcou minha vida, agora na condição de amigos. Obrigada por me permitir registrar encontros memoráveis, e será um orgulho imenso carregar seu nome como meu orientador.

Aos meus queridos alunos de iniciação científica, Mariana de C. C. Pinto e Luan C. Alves, por todo compromisso e dedicação ao nosso trabalho, pelos momentos de alegria e superação que compartilhamos. Vocês são os responsáveis por me manter na linha e carregam com mérito todo o sucesso dos nossos trabalhos. Juntos voamos! Muito obrigada. Partilhamos momentos de troca de saberes que nos enriqueceram como pessoas e profissionais. Serei eternamente grata a vocês. Também agradeço a Renan Carlos de Oliveira e Geovane de Oliveira, da LPQPN/UFMT, que me socorreram com as extrações dos materiais vegetais.

Aos professores do PPGQ UFRRJ, especialmente Cristiano J. Riger e Marco E. F. de Lima e aos seus alunos Danniel C. N. Grillo, Rodrigo P. Osório e Afonso S. M. M. Velez agradeço a parceria nas atividades biológicas. Agradeço ainda ao Prof. Dr. Bruno G. Marinho e à Isabela M. da Costa pelas colaborações. Amplio meu muito obrigado aos parceiros de publicação: Renata D. Fernandes, Denise M. Braz, Luciano R. Suzart, Tatiane N. Tejero, Glauco F. Bauerfeldt.

À Prof.^a Rosane Nora Castro agradeço pela coordenação das análises da CAM, pelo companheirismo e pelos nossos momentos de café, e ao técnico Vinícius Gomes pelo suporte nas análises de RMN, pelo profissionalismo e pelas conversas descontraídas.

À Prof.^a Dr.^a Vali Joana Pott agradeço pela identificação das espécies e pela atenção dedicada aos meus chamados; às Prof.^a Virgínia Cláudia da Silva e Tereza Auxiliadora Nascimento Ribeiro agradeço pelo apoio constante e pelo incentivo.

Aos membros da banca de qualificação e defesa, agradeço pelas contribuições que elevaram a qualidade deste trabalho: Dra. Áurea Echevarria Aznar Neves Lima, Dra. Helena Regina Pinto Lima, Dra. Alaíde de Sá Barreto, Dra. Virgínia Cláudia P. Silva, Dr. Thiago Wolff, Dr. Julio César Escalona Arranz, Bruno Guimarães Marinho e Luciano R. Suzart.

À Prof.^a Gilda G. Leitão agradeço pelo acolhimento no laboratório de cromatografia em contracorrente, e ao Prof. Lucas S. Abreu pela parceria na obtenção e tratamento dos dados de massas das frações polares, apesar de não exploradas neste trabalho.

Agradeço à Prof.^a Cristina Maria Barra pelo empenho em solucionar meus problemas pessoais, desde sua gestão como diretora do Instituto de Química, e por todos os momentos de conversa e descontração. Gratidão pela orientação e por me mostrar novas possibilidades de escolhas. Minha família será eternamente grata por essa força.

Um agradecimento especial para aqueles que, ao abrirem as portas de suas casas, me acolheram em seus lares, aproximando-me de um ambiente familiar: À querida Valdete S. de Carvalho (Querida Dete) e ao Mário Geraldo, bem como à Cristiane Cardoso e aos José Geraldo e Sheisi, da Química Analítica. Muito obrigada por todo o carinho e receptividade calorosa.

Aos colegas e amigos do LQPN/UFRRJ, agradeço pelas risadas, choros, comilanças e pelos desafios que compartilhamos com Aylla Haick, Igor Oliveira, Vitória Ramos, Ana Paula, Gabriel Ribeiro, Rubens, Nicole Ramos, Victor Martins, Izabel Amilcar, Denis Mezak e Lorrany Teixeira. Momentos que ficarão eternizados em minha vida.

Agradeço a atenção e o apoio recebidos por todos os funcionários terceirizados, bem como aos técnicos do Instituto de Química. Um agradecimento especial ao secretário do PPGQ, Paulo Henrique, por me socorrer com as burocracias, e às técnicas Gabriela Xavier (Gabi) e Érica Cabral, pelos prazerosos momentos de conversas e confraternizações. Vocês são novas amigas que a Rural me deu, e meus bons dias foram todos especiais com vocês!

Aos amigos Jorge Lucas Lacerda, Erica Barbosa, Gabriel Martins, Felipe Pires, Luiz Henrique Oliveto e Francielle Daiane agradeço pelas experiências compartilhadas, pela paciência e pelas muitas histórias.

Às amigas de sempre Genise Vieira Freire, Loraine Ferrari e Francyne Carmem agradeço por me ouvirem chorar, reclamar e sorrir, e por estarem ao meu lado sempre. Esses nomes representam muitos outros que estão ao meu lado sempre.

À Conceição, Patrícia, Lucy e à Aparecida (Cida), agradeço o cuidado e carinho com minha família e meu pequeno nos momentos mais difíceis nessa vivência em Seropédica.

Um agradecimento todo especial ao meu esposo, Edivaldo, e aos meus filhos, André Leonam e João. Meus tesouros, que, apesar da minha ausência, sempre estiveram de braços abertos me dando força, carinho e o apoio necessário para a realização deste trabalho. Por vocês, sou capaz de superar os maiores desafios... só para ser recompensada com um belo sorriso.

A todos os meus familiares que torceram pela minha vitória, me incentivaram e apoiaram nesta etapa e em toda a minha vida, em especial meus tios Dalva e Guilherme (*in memoriam*); minha prima Sandra Azevedo; minha avó Maria; meus tios Cleia e Gilmon; minha tia Rosinei e mãe Marinei; meus irmãos Álvaro e Auro; e meus sogros Maria do Socorro e Joventino. Ao Sr Acássio, às minhas cunhadas, sobrinhos, tios(as) e primos que sempre estiveram ao meu lado. Vocês são exemplos de valores que cultivo em mim e os financiadores das minhas loucuras. Pelo incentivo e cuidados de vocês, carreguei sacos de pedras e de pétalas e cheguei leve até aqui.

Este trabalho teve apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

A todos que contribuíram para a realização deste sonho, meu sincero agradecimento. Como diz a melodia: "...Eu vou me lembrar, sempre agradecer, não vou me enganar, ninguém chega só em algum lugar. Eterna gratidão!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

*És tu, que semeaste girassol em pedras
Ou que floriste na galhada da caatinga,
Reprimindo toda sede de impulso
Ao satirizar-se na gula do escárnio.*

*Clarice, inspirada na alma seca de Macabéa
Não te livrou da labuta das fêmeas
Não suprimiu teus anseios.*

*Pois, sabia que deles brotariam os sonhos.
Não redimiu teus pecados
Já que deles desabrochariam o gozo.*

*Ora calado...disfarçado...
Ora escancarado...lascivo...
Feito mulher.*

(Texto: "Mulher de fato", de Loraine Ferrari Luz).

RESUMO

GONÇALVES, Mariele Rondon Santos. **Estudo fitoquímico e avaliação de atividades biológicas de *Galianthe matogrossiana* E.L. Cabral (Rubiaceae) e *Crateva tapia* L. (Capparaceae); Contribuição na elucidação estrutural do novo alcaloide isolado de *Justicia wasshauseniana* Profice (Acanthaceae).** 2025. 320 p. Tese (Doutorado em Química, Química), Instituto de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica-RJ, 2025.

Esta tese descreve estudo fitoquímico e avaliação de algumas atividades biológicas de duas espécies neotropicais: *Galianthe matogrossiana* E.L. Cabral (Rubiaceae), *Crateva tapia* L. (Capparaceae) e detalha a definição da estrutura molecular de um novo alcaloide isolado de *Justicia wasshauseniana* Profice (Acanthaceae). Além da descrição dos procedimentos experimentais de isolamento descreve-se a identificação de estruturas moleculares de metabólitos especiais das plantas. Utilizaram-se técnicas cromatográficas e análise detalhada de RMN e EM neste trabalho. Fizeram-se avaliações de atividades biológicas como antinociceptiva, antiinflamatória e antioxidante. Identificaram-se 21 compostos nas frações apolares de raízes e partes aéreas de *G. matogrossiana* entre eles ácido graxo, antraquinona, derivado de chalcona e cumarina, derivados de ácido benzóico, esteroides e alguns triterpenos pentacíclicos. Nos ensaios *in vivo* (contorções abdominais, formalina e campo aberto em camundongos Swiss), com exceção da fração hexânica da raiz, as demais frações revelaram forte atividade antinociceptiva e antiinflamatória, inclusive com efeito superior a morfina. A atividade antioxidante, feita *in vitro* (cepas selvagens e *Ayap1* de *Saccharomyces cerevisiae*), revelou que as frações hexânica e diclorometano possuem potentes ações quelantes de radicais. O ácido 3 β -O-acetil-oleanólico inibiu amastigotas de *Trypanosoma cruzi* (IC₅₀ = 11,06 μ M; seletividade = 3,11). Estudos preliminares de *docking* molecular sugeriram afinidade promissora de triterpenos contra Aurora B quinase para aplicações anticâncer. Sobre *C. tapia* avaliou-se atividade antiglicante *in vitro* do extrato bruto de cascas, que não foi muito significativa. Até o momento isolaram-se da fração diclorometano o sitosterol glicosilado e lupeol. A discussão detalhada dos dados espectrométricos do alcaloide, isolado previamente de *J. wasshauseniana*, incluindo cálculos TD-DFT, definiu sua estrutura molecular incluindo a estereoquímica absoluta e foi nomeado como “brazoide E”. Esses resultados trazem informações sobre composição fitoquímica e atividades biológicas de espécies ainda não estudadas previamente.

Palavras-chave: *Galianthe matogrossiana*, *Crateva tapia*, *Justicia wasshauseniana*
Fitoquímica, Bioatividade.

ABSTRACT

GONÇALVES, Mariele Rondon Santos. **Phytochemical study and evaluation of biological activities of *Galianthe matogrossiana* E.L. Cabral (Rubiaceae) and *Crateva tapia* L. (Capparaceae): Contribution to the structural elucidation of a new alkaloid isolated from *Justicia wasshauseniana* Profice (Acanthaceae).** 2025. 320p. Thesis (Doctor in Chemistry, Chemistry), Institute of Chemistry, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica-RJ, 2025.

This thesis describes the phytochemical study and evaluation of some biological activities of two neotropical species: *Galianthe matogrossiana* E.L. Cabral (Rubiaceae) and *Crateva tapia* L. (Capparaceae), and details the definition of the molecular structure of a new alkaloid isolated from *Justicia wasshauseniana* Profice (Acanthaceae). In addition to the description of experimental isolation procedures, the identification of molecular structures of the plants' specialized metabolites is presented. Chromatographic techniques and detailed NMR and MS analyses were employed in this work. Biological activities such as antinociceptive, anti-inflammatory, and antioxidant effects were evaluated. Twenty-one compounds were identified in the nonpolar fractions of roots and aerial parts of *G. matogrossiana*, including fatty acid, anthraquinone, chalcone and coumarin derivatives, benzoic acid derivatives, steroids, and some pentacyclic triterpenes. *In vivo* assays (abdominal writhing, formalin, and open-field tests in Swiss mice), except for the hexane root fraction, the other fractions showed strong antinociceptive and anti-inflammatory activity, even with effects superior to morphine. The *in vitro* antioxidant activity (wild-type and Δ yap1 *Saccharomyces cerevisiae* strains) revealed that the hexane and dichloromethane fractions exhibited potent radical-chelating actions. 3-*O*-acetyl oleanolic acid inhibited *Trypanosoma cruzi* amastigotes (IC_{50} = 11.06 μ M; selectivity = 3.11). Preliminary molecular docking studies suggested promising affinity of triterpenes toward Aurora B kinase for potential anticancer applications. Regarding *C. tapia*, *in vitro* antiglycation activity of the crude bark extract was evaluated and found to be not very significant. So far, β -sitosterol glycoside and lupeol have been isolated from the dichloromethane fraction. A detailed discussion of the spectrometric data of the alkaloid, previously isolated from *J. wasshauseniana*, including TD-DFT calculations, defined its molecular structure, including absolute stereochemistry, and it was named "brazoid E". These results provide valuable information on the phytochemical composition and biological activities of species not previously studied.

Keywords: *Galianthe matogrossiana*, *Crateva tapia*, *Justicia wasshauseniana*
Phytochemistry, Bioactivity.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Um recorte de alguns metabólitos relatados em Rubiaceae na data investigada.	9
Figura 2 - Exemplos de alguns triterpenos das séries ursano, lupano e oleanano.	16
Figura 3 - Mecanismos de acilação de BAHD-ATs e SCPL-ATs.....	17
Figura 4 - Distribuição geográfica de espécies de <i>Galianthe</i>	20
Figura 5 - Compostos isolados de <i>G. brasiliensis</i>	22
Figura 6 - Ciclos peptídeos (CPs) e alcaloides β -carbolínicos isolados de <i>Galianthe</i>	23
Figura 7 - Compostos isolados de <i>G. thalictroides</i>	25
Figura 8 - Compostos isolados de <i>G. ramosa</i>	26
Figura 9 - Arbusto, raiz e ramo floríferos de <i>G. matogrossiana</i>	27
Figura 10 - Compostos isolados das raízes e partes aéreas de <i>G. matogrossiana</i>	40
Figura 11- Estruturas representativas de triterpenos das séries oleananos (a) e ursano (b), com destaque em azul para os principais pontos estruturais utilizados na elucidação por RMN.	41
Figura 12 - Comparação dos espectros de ^{13}C (DEPT-Q, 125 MHz) dos compostos 2, 8, 9 e 10.	43
Figura 13 - Espectros de RMN de ^1H (500 MHz) dos compostos 2, 8, 9 e 10.....	44
Figura 14 - Espectro de massas obtido por HPLC-ESI(-)-QTOF, correspondente ao pico em 7,273 min referente à substância 2.	47
Figura 15 - Espectro de massas obtido por HPLC-ESI(-)-QTOF, correspondente ao pico em 6,655 min referente às substâncias 8 e 9.....	49
Figura 16 - Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) de 11 e 12 na região entre δ_{H} 0,0-9,0 ppm.	53
Figura 17 - Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) de 11 e 12.	54
Figura 18 - Expansão do espectro de HMBC (500/125 MHz, CD_3OD) de 11 e 12 na região entre δ_{H} 0,6-5,60 ppm.	55
Figura 19 - Espectro HRESIMS em modo negativo do ácido betulínico (12), exibindo o pico $[\text{M}-\text{H}]^-$ em m/z 455,3519 [calculado 455.3525]	55
Figura 20 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de 13.....	57
Figura 21 - Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de 13.	57
Figura 22 - Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de 3 e 4 na região entre δ_{H} 0,5-6,0 ppm.	61
Figura 23 - Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de 3 e 4, na região entre δ_{C} 40,00-190,00 ppm.	62
Figura 24 - Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de 3 e 4, na região entre δ_{C} 14,00-39,00 ppm.	62
Figura 25 - Expansão do espectro de HSQC (500/125 MHz, CDCl_3) de 3 e 4, na região entre δ_{H} 0,7 - 2,2 ppm.	63

Figura 26 - Expansão do espectro de HSQC (500/125 MHz, CDCl ₃) de 3 e 4, na região entre δ_H 0,4 - 6,0 ppm.	63
Figura 27- Espectro MS do pico em 9,33 min obtido via HPLC-ESI(-)-QTOF do composto 3.	64
Figura 28 - Espectro MS do pico em 10,21 min obtido via HPLC-ESI(-)-QTOF do composto 4.	64
Figura 29 - Espectro de RMN de ¹ H (500 MHz, CD ₃ OD) de 20 e 21 na região entre δ_H 3,1-5,6 ppm.	69
Figura 30 - Espectro de RMN de ¹ H (500 MHz, CD ₃ OD) de 20 e 21 na região entre δ_H 0,7-3,72 ppm.	69
Figura 31- Espectro de RMN de ¹³ C (125 MHz, CD ₃ OD) de 20 e 21 na região entre δ_C 60,0-127,0 ppm.	70
Figura 32- Espectro de RMN de ¹³ C (125 MHz, CD ₃ OD) de 20 e 21 na região entre δ_C 14,0-58,0 ppm.	70
Figura 33- Espectro de HSQC (500/125 MHz, CD ₃ OD) de 20 e 21 na região entre δ_H 2,6-6,4 ppm.	71
Figura 34 - Espectro de HSQC (500/125 MHz, CD ₃ OD) de 20 e 21 na região entre δ_H 0,3-2,3 ppm.	71
Figura 35 - Principais correlações observadas nos espectros bidimensionais de COSY e HMBC de 20 e 21.....	72
Figura 36 - Espectro de COSY (500, CD ₃ OD) de 20 e 21 na região entre δ_H 0,0-5,6 ppm.	72
Figura 37- Expansão de espectro de COSY (500, CD ₃ OD) de 20 e 21 na região entre δ_H 0,6-3,2 ppm.	73
Figura 38 - Espectro de NOESY (500, CD ₃ OD) de 20 e 21 na região entre δ_H 0,2-5,7 ppm...73	73
Figura 39 - Espectro de NOESY (500, CD ₃ OD) de 20 e 21 na região entre δ_H 0,5-4,8 ppm...74	74
Figura 40 - Espectro de HMBC (500/125 MHz, CD ₃ OD) de 20 e 21 na região entre δ_H 0,7-3,7 ppm.	74
Figura 41 - Espectro de HMBC (500/125 MHz, CD ₃ OD) de 20 e 21 na região entre δ_H 0,7-1,43 ppm.	75
Figura 42 - Espectro HRESIMS em modo positivo do THO (20), exibindo o pico [M+Na] ⁺ em <i>m/z</i> 481,3649.....	75
Figura 43 - Espectro HRESIMS em modo negativo de 21, exibindo o pico [M-H] ⁻ em <i>m/z</i> 455,3527.	76
Figura 44 - Comparação dos espectros de ¹ H (500 MHz) e ¹³ C (125 MHz) dos compostos 5, 6 (em CDCl ₃) e 15 e 16 (em C ₅ D ₅ N).....	77
Figura 45 - Cromatograma a gás da fração GMHR-F1(13-15), mistura contendo 5, 6 e 7.....	81
Figura 46 - Espectro de massas por I.E. (70 eV) de 5,6 e 7.	82
Figura 47 - Espectro HRESIMS em modo negativo de 15, exibindo o pico [M+HCOO] ⁻ em <i>m/z</i> 621,4354.....	83
Figura 48 - Espectro HRESIMS em modo negativo de 16, exibindo o pico [M+HCOO] ⁻ em <i>m/z</i> 619,4191.....	83

Figura 49 - Cromatograma gás e espectro de massas por I.E. (70 eV) de 1.....	85
Figura 50 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de 1.....	86
Figura 51 - Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de 1.....	86
Figura 52 - Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) do espectro contendo de 11 e o 12 (ácido betulínico, AB).....	89
Figura 53 - Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) de 11. AB=ácido betulínico (12, pág. 51)	90
Figura 54 - Espectro de HMBC (500/125 MHz, CD_3OD) de 11 na região entre δ_{H} 0,8-6,2. *.C-10, C-9 e C-7 estão próximos do sinal do lupeol, por isso o $^nJ_{\text{CH}}$ com a metila.	90
Figura 55 - A) Espectro de massas obtido por impacto eletrônico (EI) do composto 11, coincidente com o registrado na biblioteca NIST; B) Espectro de massas de alta resolução por ionização por electrospray (HRESIMS) em modo positivo do composto 11, exibindo o pico $[\text{M}+\text{H}]^+$ em m/z 193,0493.....	91
Figura 56 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) de 17 e 18.....	93
Figura 57- Espectro de RMN de ^{13}C 125 MHz, CD_3OD) de 17 e 18.....	94
Figura 58- Espectro de HSQC (500/125 MHz, CD_3OD) de 17 e 18.....	94
Figura 59 - Expansão do espectro de HMBC (500/125 MHz, CD_3OD) de 17 e 18, na região entre.3,5-8,2.	95
Figura 60 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de 14.....	99
Figura 61 - Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de 14.....	99
Figura 62 - Espectro de HSQC (500/125 MHz, CDCl_3 de 14.....	100
Figura 63 - Expansão do espectro de HMBC (500/125 MHz, CD_3OD) de 14, na região entre.3,5-14,0.	100
Figura 64 - A) Cromatograma PDA (410 nm) e B) espectro de massas (HPLC/ESI/MS) de baixa resolução do composto 14.....	101
Figura 65 - Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) de 19.....	104
Figura 66 - Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) de 19, na região entre δ_{C} 15,00-145,00.	105
Figura 67 - Expansão do espectro de COSY (500 MHz, DEPTQ, CD_3OD) de 19, na região entre δ_{H} 6,7 - 8,7.	105
Figura 68 - Expansão do espectro de HMBC (500/125 MHz, CD_3OD) de 19, na região entre.2,5-9,5.	106
Figura 69 - Espectro HRESIMS em modo positivo de 19, exibindo o pico $[\text{M}-\text{H}]^-$ em m/z 269,0456.	106
Figura 70 - Diagrama demonstrando o experimento de contorções abdominais induzidas por ácido acético.	108
Figura 71 - Protocolo experimental do Modelo da Formalina.	110
Figura 72 - Protocolo experimental do modelo de campo aberto.....	112

Figura 73 - Esquema do cultivo de células e parasitas e da metodologia dos ensaios biológicos com amastigotas de <i>T. cruzi</i>	118
Figura 74 - Estrutura molecular dos triterpenos testados e seus SMILES.	121
Figura 75 : Consequências funcionais da interação entre p53 e Aurora B124	
Figura 76 - Ancoragem de compostos no sítio de ligação da Aurora quinase B. (A) Composto VX-680 (ASHRAF, <i>et al.</i> , 2021) e (B) Simulado no software Discovery Studio visualizer, v 24.1	125
Figura 77 - Proteína-alvo de interesse 4AF3 obtida no site RCSB Protein Data Bank.....	126
Figura 78 - Software Avogadro utilizado para desenho e obtenção da conformação de menor energia do ligante.....	127
Figura 79 - Software AutoDockTools; a – tratamento da proteína; b – fixação das ligações para não-rotacionáveis; c – criação da grid-box do sítio ativo.	127
Figura 80 - Janela do terminal onde foram executados os cálculos de docagem.	128
Figura 81 - Arquivo de saída do cálculo de docagem contendo as tabelas do ranking e o RMSD.....	128
Figura 82 - Análise dos resultados utilizando o software Discovery Studio.	129
Figura 83 - Ancoragem de compostos no sítio de ligação da Aurora quinase B em sua forma original e calculada.	130
Figura 84 - Dados de Score obtidos para os triterpenos testados utilizando o GOLD com interações com a proteína alvo. Resultados de <i>docking</i> molecular obtidos para os triterpenos 3-O-acetil-oleanólico (AOA), ácido oleanólico (AO), ácido ursólico (AU) e ácido 3-O-acetil-ursólico (APA) utilizando o software GOLD, destacando os valores de score e as principais interações estabelecidas com a proteína-alvo..	131
Figura 85 <i>Crateva tapia</i> . A – Árvore; B – Polpa madura; C – Polpa verde; D – Frutos; E – Folha	136
Figura 86 - Substâncias isoladas de frutos, raízes, entrecascas e folhas de <i>C. tapia</i>	139
Figura 87 - Esquema de formação de AGEs. Abreviações: derivados de glicose (Glu-AGEs), derivados de frutose (Fru-AGE), derivados de glicoxal (GO-AGEs), derivados de metilglioxal (MGO-AGEs), derivados de gliceraldeído (Glycer-AGEs), derivados de glicolaldeído (Glycol-AGEs) e derivados de 3-desoxiglucosona (3-DG-AGEs).	143
Figura 88 - Níveis de AGEs fluorescentes em incubações contendo BSA (na ausência de metilglioxal) e extrato metanólico de folhas de <i>C. tapia</i> (EBMF). A fluorescência dos AGEs foi determinada nos dias 0, 1, 2, 4 e 8 de incubação. Os grupos experimentais incluem: grupo controle positivo (BSA + MG), grupos controles negativos (BSA e BSA + AG) e os grupos com diferentes concentrações de EBMF (62,5, 125 e 250 µg/mL). Os resultados são expressos como média ± desvio padrão de experimentos independentes realizados em triplicata (n = 3). A análise estatística foi realizada por ANOVA one-way, seguida pelo teste de Newman-Keuls (p < 0,05). Barras compartilhando a mesma letra não diferem significativamente entre si. Fonte: Brandão da Silva, 2023.....	156
Figura 89 - Níveis de AGEs fluorescentes em incubações contendo BSA + metilglioxal (MG) e extrato metanólico de folhas de <i>C. tapia</i> (EBMF). A fluorescência dos AGEs foi	

determinada nos dias 0, 1, 2, 4 e 8 de incubação. Os grupos experimentais incluem: grupos controles positivos (BSA + MG e BSA + MG + AG), grupo controle negativo (BSA), e os grupos com diferentes concentrações de EBMF (62,5, 125 e 250 µg/mL). Os resultados são expressos como média ± desvio padrão de experimentos independentes realizados em triplicata (n = 3). A análise estatística foi realizada por ANOVA one-way, seguida pelo teste de Newman-Keuls (p < 0,05). Barras compartilhando a mesma letra não diferem significativamente entre si. 157

Figura 90 - Níveis de N'-formilquinurenina em incubações contendo BSA + metilglioxal (MG) e extrato metanólico de folhas de *C. tapia* (EBMF). A fluorescência de N'-formilquinurenina foi determinada nos dias 0, 1, 2, 4 e 8 de incubação. Os grupos experimentais incluem: grupos controles positivos (BSA + MG e BSA + MG + AG), grupo controle negativo (BSA), e os grupos com diferentes concentrações de EBMF (62,5, 125 e 250 µg/mL). Os resultados são expressos como média ± desvio padrão de experimentos independentes realizados em triplicata (n = 3). A análise estatística foi realizada por ANOVA one-way, seguida pelo teste de Newman-Keuls (p < 0,05). Barras compartilhando a mesma letra não diferem significativamente entre si..... 158

Figura 91 - Níveis de quinurenina em incubações contendo BSA + metilglioxal (MG) e extrato metanólico de folhas de *C. tapia* (EBMF). A fluorescência de quinurenina foi determinada nos dias 0, 1, 2, 4 e 8 de incubação. Os grupos experimentais incluem: grupos controles positivos (BSA + MG e BSA + MG + AG), grupo controle negativo (BSA), e os grupos com diferentes concentrações de EBMF (62,5, 125 e 250 µg/mL). Os resultados são expressos como média ± desvio padrão de experimentos independentes realizados em triplicata (n = 3). A análise estatística foi realizada por ANOVA one-way, seguida pelo teste de Newman-Keuls (p < 0,05). Barras compartilhando a mesma letra não diferem significativamente entre si. 159

Figura 92 - – Níveis de ditirosina em incubações contendo BSA + metilglioxal (MG) e extrato metanólico de folhas de *C. tapia* (EBMF). A fluorescência de ditirosina foi determinada nos dias 0, 1, 2, 4 e 8 de incubação. Os grupos experimentais incluem: grupos controles positivos (BSA + MG e BSA + MG + AG), grupo controle negativo (BSA), e os grupos com diferentes concentrações de EBMF (62,5, 125 e 250 µg/mL). Os resultados são expressos como média ± desvio padrão de experimentos independentes realizados em triplicata (n = 3). A análise estatística foi realizada por ANOVA one-way, seguida pelo teste de Newman-Keuls (p < 0,05). Barras compartilhando a mesma letra não diferem significativamente entre si.. ... 160

Figura 93 - Níveis de AGEs fluorescentes em incubações contendo BSA + metilglioxal (MG) e extrato metanólico de entrecasas de *C. tapia* (EBME). A fluorescência dos AGEs foi determinada nos dias 0, 1, 2, 4 e 8 de incubação. Os grupos experimentais incluem: grupos controles positivos (BSA + MG e BSA + MG + AG), grupo controle negativo (BSA), e os grupos com diferentes concentrações de EBME (62,5, 125 e 250 µg/mL). Os resultados são expressos como média ± desvio padrão de experimentos independentes realizados em triplicata (n = 3). A análise estatística foi realizada por ANOVA one-way, seguida pelo teste de Newman-Keuls (p < 0,05). Barras compartilhando a mesma letra não diferem significativamente entre si. 162

Figura 94 - Níveis de N'-formilquinurenina em incubações contendo BSA + metilglioxal (MG) e extrato metanólico de entrecasas de *C. tapia* (EBME). A fluorescência de N'-formilquinurenina foi determinada nos dias 0, 1, 2, 4 e 8 de incubação. Os grupos experimentais incluem: grupos controles positivos (BSA + MG e BSA +

MG + AG), grupo controle negativo (BSA), e os grupos com diferentes concentrações de EBME (62,5, 125 e 250 µg/mL). Os resultados são expressos como média ± desvio padrão de experimentos independentes realizados em triplicata (n = 3). A análise estatística foi realizada por ANOVA one-way, seguida pelo teste de Newman-Keuls ($p < 0,05$). Barras compartilhando a mesma letra não diferem significativamente entre si. 163

Figura 95 - Níveis de quinurenina em incubações contendo BSA + metilglioxal (MG) e extrato metanólico de entrecascas de *C. tapia* (EBME). A fluorescência de quinurenina foi determinada nos dias 0, 1, 2, 4 e 8 de incubação. Os grupos experimentais incluem: grupos controles positivos (BSA + MG e BSA + MG + AG), grupo controle negativo (BSA), e os grupos com diferentes concentrações de EBME (62,5, 125 e 250 µg/mL). Os resultados são expressos como média ± desvio padrão de experimentos independentes realizados em triplicata (n = 3). A análise estatística foi realizada por ANOVA one-way, seguida pelo teste de Newman-Keuls ($p < 0,05$). Barras compartilhando a mesma letra não diferem significativamente entre si. 163

Figura 96 - Níveis de ditirosina em incubações contendo BSA + metilglioxal (MG) e extrato metanólico de entrecascas de *C. tapia* (EBME). A fluorescência de ditirosina foi determinada nos dias 0, 1, 2, 4 e 8 de incubação. Os grupos experimentais incluem: grupos controles positivos (BSA + MG e BSA + MG + AG), grupo controle negativo (BSA), e os grupos com diferentes concentrações de EBME (62,5, 125 e 250 µg/mL). Os resultados são expressos como média ± desvio padrão de experimentos independentes realizados em triplicata (n = 3). A análise estatística foi realizada por ANOVA one-way, seguida pelo teste de Newman-Keuls ($p < 0,05$). Barras compartilhando a mesma letra não diferem significativamente entre si. 164

Figura 97 - Níveis de proteínas carboniladas (PCO) em incubações contendo BSA + metilglioxal (MG) e extrato metanólico de entrecascas de *C. tapia* (EBME). A fluorescência de ditirosina foi determinada nos dias 0, 1, 2, 4 e 8 de incubação. Os grupos experimentais incluem: grupos controles positivos (BSA + MG e BSA + MG + AG), grupo controle negativo (BSA), e os grupos com diferentes concentrações de EBME (62,5, 125 e 250 µg/mL). Os resultados são expressos como média ± desvio padrão de experimentos independentes realizados em triplicata (n = 3). A análise estatística foi realizada por ANOVA one-way, seguida pelo teste de Newman-Keuls ($p < 0,05$). Barras compartilhando a mesma letra não diferem significativamente entre si. 165

Figura 98 - *Cross-link* proteico em incubações contendo BSA + metilglioxal (MG) e extrato metanólico de entrecascas de *C. tapia* (EBME). Linhas: (1) BSA; (2) BSA + MG; (3) BSA + AG; (4) BSA + MG + AG; (5) BSA + EBME 250 µg/mL; (6) BSA + MG + EBME 250 µg/mL; (7) BSA + EBME 125 µg/mL; (8) BSA + MG + EBME 125 µg/mL; (9) BSA + EBME 62,5 µg/mL; (10) BSA + MG + EBME 62,5 µg/mL. Fonte: RODRIGUES, 2024. 167

Figura 99 - Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de 13 reisolado em *C. tapia*. 169

Figura 100 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de 13 reisolado em *C. tapia*. 170

Figura 101 - Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de 15 isolado em *C. tapia*. 171

Figura 102 - Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de 15 isolado em *C. tapia*. 172

Figura 103 - Representação de um derivado de estirilactona. (A) Molécula com centros estereogênicos destacados em azul, sem definição de configuração absoluta. (B) e (C) Par de enantiômeros da molécula (A).	178
Figura 104 - Figura esquemática de uma onda eletromagnética, em que λ indica um comprimento de onda.	179
Figura 105 - Classificação da polarização.	180
Figura 106 - Equação de Fresnel	181
Figura 107 - Absorção diferente dos componentes polarizados esquerdo e direito leva à elipticidade (CD).	181
Figura 108 - Diferença de absorção da luz circularmente polarizada – Dicroísmo Circular.	181
Figura 109 - Padrão geral dos espectros de CD e UV.	183
Figura 110 - Espectros de ECD experimentais e calculados do composto estirilactona (4R,5R,6S,7R,8S).	184
Figura 111 - Estrutura de 6 e seu derivado acetilado (6a).	190
Figura 112 - Correlações selecionadas de HMBC e ^1H - ^1H COSY para o composto 6 e seu derivado acetilado (6a).	193
Figura 113 - Representação das espectroscopias experimental e teórica de 6; (a) espectros experimentais de UV (A) e DC (B) do composto 6 em metanol; (b) espectros de DC simulados para CPCM/TDDFT os isômeros de 6 do nível CPCM/TDDFT wB97X-D/ def2- PVTZ: (A) (8S,10S); (B) (8R,10R); (c) espectro UV teórico de 6, obtido no nível CPCM/TDDFT wB97X-D/def2-PVTZ.	195

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 Dados de RMN de ^{13}C (125 MHz, DEPTQ) das substâncias 2, 8, 9 e 10 em comparação com dados da literatura (*SEEBACHER <i>et al.</i> , 2003; ** FREITAS <i>et al.</i> , 2014; ***ASSIS JUNIOR <i>et al.</i> , 2013).....	45
Tabela 2 Dados de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) das substâncias 2, 8, 9 e 10 em comparação com dados da literatura (*SEEBACHER <i>et al.</i> , 2003; **FADIPE <i>et al.</i> , 2020).	46
Tabela 3. Dados de RMN de ^{13}C (125 MHz, DEPTQ, CD_3OD) e ^1H (500 MHz, D_3COD) das substâncias 12 e 13 em comparação com dados da literatura (CANTANHEDE-FILHO <i>et al.</i> , 2017) [300 MHz e 75 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$].	52
Tabela 4. Dados de RMN de ^{13}C (125 MHz, DEPTQ, CDCl_3) e ^1H (500 MHz, CDCl_3) das substâncias 3 e 4 em comparação com dados da literatura (SONG ., 2013; SIDDIQUI., 1986; MAHATO e KUNDU, 1994) [400 MHz e 100, CDCl_3].	60
Tabela 5 Dados de RMN de ^{13}C (125 MHz, DEPTQ, CDCl_3) e ^1H (500 MHz, CDCl_3) das substâncias 20 e 21 em comparação com dados da literatura (GOMES CASTRO <i>et al.</i> , 2021; * TRANG <i>et al.</i> , 2024) [CDCl_3 ,]*[600 MHz e 150 MHz, CD_3OD].	68
Tabela 6: Dados de RMN de ^{13}C (125 MHz, DEPTQ, CDCl_3 e $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) e ^1H (500 MHz, CDCl_3 e $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) das substâncias 5, 6, 15 e 16 em comparação com dados da literatura (* PESHIN e KAR, 2017; **GIPREEL <i>et al.</i> , 2021) [*400 e 100 MHz, CDCl_3 ; **500 e 125 MHz].	80
Tabela 7 Dados de RMN de ^{13}C (125 MHz, DEPTQ, CDCl_3) e ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância 1 em comparação com dados da literatura (SILVA <i>et al.</i> , 2022) [CDCl_3 , 500 MHz; CDCl_3 , 125 MHz].	85
Tabela 8 Dados de RMN de ^{13}C (125 MHz, DEPTQ, CD_3OD) e ^1H (500 MHz, CD_3OD) da substância 11 em comparação com dados da literatura (*CARVALHO <i>et al.</i> , 2006; **JEREZANO <i>et al.</i> , 2011) [CD_3OD , 200 MHz; $\text{DMSO}-d_6$, 125 MHz].	88
Tabela 9. Dados de RMN de ^{13}C (125 MHz, DEPTQ, CD_3OD) e ^1H (500 MHz, CD_3OD) da substância 17 e 18 em comparação com dados da literatura [Maia, 2011(500 e 125MHz); Zhang ., 2009 (400 MHz e 100, CD_3OD)].	93
Tabela 10 Dados de RMN de ^{13}C (125 MHz, DEPTQ, CDCl_3) e ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância 14 em comparação com dados da literatura (VAN DER WESTHUIZEN <i>et al.</i> , 1980, Simulador Chemdraw) [80 MHz, acetona- d_6].	98
Tabela 11 Dados de RMN de ^{13}C (125 MHz, DEPTQ, CD_3OD) e ^1H (500 MHz, CD_3OD) da substância 19 em comparação com dados da literatura (Li ., 2019) [400 MHz e 150, $\text{DMSO}-d_6$].	104
Tabela 12 Análise <i>in silico</i> de atividade antitumoral obtida com o CLC-Pred (Way2Drug ©).	122
Tabela 13 Resumo das informações econômicas, socioculturais e medicinais atribuídas a C. <i>tapia</i> ¹ . Autoria: Tabela elaborada pela autora (2025) com base na literatura ¹	138
Tabela 14 Análise densitométrica das bandas referentes ao <i>cross-linking</i> proteicos presentes no gel contendo as amostras após 8 dias de incubação.	167

Tabela 15 Dados de RMN de ^{13}C (125 MHz, DEPTQ, CD_3OD) e ^1H (500 MHz, CD_3OD) obtidos para o composto 6 e seu derivado acetilado 6a (CDCl_3).	192
Tabela 16 Pontos estacionários obtidos nos níveis CPCM(metanol)/X/aug-cc-pVDZ, com X = M06-2X e wB97X-D, como possíveis conformações do isômero (8S,10S) do composto 6.....	194

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Publicação de artigos científicos sobre a família Rubiaceae de janeiro de 1900 a 2025, de acordo com levantamento realizado pelo SciFinder Scholar®.....	7
Gráfico 2 - Efeito antinociceptivo dos extratos e frações de partes aéreas (A) e raízes (B) de <i>G. matogrossiana</i> no modelo de contorções abdominais induzidos por ácido acético. Os animais foram tratados por via oral com os extratos e frações na dose de 100 mg.kg ⁻¹ , além de solução salina, veículo e morfina (3 mg.kg ⁻¹). Os resultados são expressos como média ± E.P.M. (n = 6) do número de contorções. A significância estatística (*p < 0,05 e ***p < 0,001) foi calculada entre o grupo controle e os grupos tratados com morfina, veículo, extratos e frações de partes aéreas e raízes de <i>G. matogrossiana</i> , por One Way ANOVA acompanhado pelo teste de Bonferroni.	109
Gráfico 3 - Efeito antinociceptivo dos extratos e frações de partes aéreas (A) e raízes (B) de <i>G. matogrossiana</i> no modelo de formalina. Os animais foram tratados por via oral com solução salina, veículo, morfina (3 mg.kg ⁻¹), ácido acetilsalicílico (AAS - 100 mg.kg ⁻¹) e extratos e frações de partes aéreas e raízes na dose de 100 mg.kg ⁻¹ . Os resultados são expressos como média ± E.P.M. (n = 6) do tempo de lambertura. A significância estatística (*p < 0,001) foi calculada entre o grupo controle e os grupos tratados com veículo, morfina, ácido acetilsalicílico, extratos e frações de partes aéreas e raízes de <i>G. matogrossiana</i> , por One-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni.....	111
Gráfico 4 - Efeito dos extratos e frações de partes aéreas (A) e raízes (B) de <i>G. matogrossiana</i> no modelo de campo aberto. Os animais foram tratados por via oral com solução salina, veículo, diazepam (3 mg.kg ⁻¹), extratos e frações de partes aéreas e raízes na dose de 100 mg.kg ⁻¹ . Os resultados são expressos como média ± E.P.M. (n = 6) do número de quadrados percorridos. A significância estatística (**p < 0,01) foi calculada entre o grupo controle e os grupos tratados com veículo, diazepam, extratos e frações de partes aéreas e raízes de <i>G. matogrossiana</i> , por One-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni.	112
Gráfico 5 - Curva de crescimento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (cepa BY4741) ao longo de 24 horas na presença do extrato bruto das raízes de <i>G. matogrossiana</i> nas concentrações de 17,5 µg.mL ⁻¹ e 35 µg.mL ⁻¹ . As culturas foram incubadas a 28 °C sob agitação (160 rpm), com leituras da densidade óptica a 570 nm realizadas nos tempos de 0, 2, 4, 6, 22 e 24 horas. Os valores estão expressos como média ± desvio padrão de três experimentos independentes (n = 3).....	114
Gráfico 6 - Inibição da oxidação intracelular por frações do extrato bruto e subfrações das raízes de <i>G. matogrossiana</i> nas cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> BY4741 (A) e <i>Δyap1</i> (B). As células foram expostas às amostras vegetais por 2 horas, seguidas de tratamento com peróxido de hidrogênio (2,0 mM) e marcação com H ₂ DCFDA (20 µM). A fluorescência foi medida (excitação 488 nm, emissão 520 nm), e os resultados expressos como taxa de inibição da oxidação intracelular por micrograma de extrato testado (µg ⁻¹). Valores representados como média ± desvio padrão de três experimentos independentes (n = 3).....	115
Gráfico 7 - Efeito citotóxico do ácido oleanólico acetilado em: (A) células LLC-MK2 e (B) formas amastigotas de <i>T. cruzi</i> (cepa Tulahuen C2C4 LacZ).	119

Gráfico 8 - Resultados da predição com o número total de linhagens celulares de câncer a partir da análise empregando CLC-Pred. Valores de Pa > Pi.....	122
Gráfico 9 - Trabalhos acadêmicos e artigos disponíveis, com e seus respectivos anos, nos bancos de dados consultados sobre <i>C. tapia</i> . Autoria: Grafico elaborado pela autora (2025) com base na literatura ¹	137
Gráfico 10 - Partes de <i>C. tapia</i> estudadas ¹ . Autoria: Grafico elaborada pela autora (2025) com base na literatura ¹	137
Gráfico 11 - Espectro de absorbância do extrato metanólico de folhas de <i>C. tapia</i> em concentrações de 50 a 300 µg/mL. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro de placas BioTek®, contemplando comprimentos de onda de 300 a 500 nm com intervalos de 10 nm. Fonte: Brandão da Silva, 2023.	154

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AG** – Aminoguanidina
- AGEs** – *Advanced Glycation End-products* (Produtos Finais de Glicação Avançada)
- ANOVA** – Análise de Variância
- AO** – Ácido Oleanólico
- AOA** – Ácido Oleanólico Acetilado
- APA** – Ácido 3 β -O-acetil-pomólico
- BAHD-ATs** – *BAHD Acyltransferases*
- BSA** – *Bovine Serum Albumin* (Albumina Sérica Bovina)
- CAM** – Central Analítica Multiusuário
- CAT** – Carcinoma Anaplásico da Tireoide
- CC** – Coluna Cromatográfica Clássica
- CCDA** – Cromatografia em Camada Delgada Analítica
- CCDP** – Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
- CG** – Cromatografia Gasosa
- CLC-Pred** – *Cell Line Cytotoxicity Predictor* (Preditor de Citotoxicidade em Linhagem Celular)
- CNPq** – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- COSY** – *Correlation Spectroscopy* (Espectroscopia de Correlação)
- COVID-19** – *Coronavirus Disease 2019*
- CPRG** – Vermelho de Clorofenol - β -D-galactopiranosídeo
- CPRs** – Citocromo P450 Redutases
- CPs** – Ciclos Peptídeos
- CTAE** – Subfração Acetato de Etila das Entrecascas de *C. tapia*
- CTDE** – Subfração Diclorometano das Entrecascas de *C. tapia*
- CTDF** – Subfração Diclorometano das Folhas de *C. tapia*
- CTHE** – Subfração Hexânica das Entrecascas de *C. tapia*
- CTHF** – Subfração Hexânica das Folhas de *C. tapia*
- DC** – Dicroísmo Circular
- DCFH-DA** – Diclorofluoresceína Diacetato
- DEPTQ** – *Distortionless Enhancement by Polarization Transfer Quaternary*
- DENV-2** – Vírus da Dengue tipo 2
- DM** – Diabetes Mellitus
- DMAPP** – Dimetilalila Pirofosfato

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO – Dimetilsulfóxido

EBME – Extrato Bruto Metanólico de Entrecascas

EBMF – Extrato Bruto Metanólico de Folhas

EBMeOHPA – Extrato Bruto Metanólico de Partes Aéreas

EBMeOHR – Extrato Bruto Metanólico de Raízes

EC – Efeito Cotton

ECD – Dicroísmo Circular Eletrônico

EM – Espectrometria de Massas

EPM – Erro Padrão da Média

ESI – *Electrospray Ionization* (Ionização por Elétron Spray)

FPP – Farnesil Pirofosfato

GC-MS – Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas

GGPP – Geranilgeranil Pirofosfato

GMAR – Subfração Acetato de Etila das Raízes de *G. matogrossiana*

GMAPA – Subfração Acetato de Etila das Partes Aéreas de *G. matogrossiana*

GMDR – Subfração Diclorometano das Raízes de *G. matogrossiana*

GMDPA – Subfração Diclorometano das Partes Aéreas de *G. matogrossiana*

GMHR – Subfração Hexânica das Raízes de *G. matogrossiana*

GMHPA – Subfração Hexânica das Partes Aéreas de *G. matogrossiana*

GMRHR – Resíduo Hidrometanólico das Raízes de *G. matogrossiana*

GMRHPA – Resíduo Hidrometanólico das Partes Aéreas de *G. matogrossiana*

GPP – Geranil Pirofosfato

HIV – *Human Immunodeficiency Virus* (Vírus da Imunodeficiência Humana)

HMBC – *Heteronuclear Multiple Bond Correlation* (Correlação Heteronuclear de Múltiplas Ligações)

HMG-CoA – 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A

HOMO – *Highest Occupied Molecular Orbital* (Orbital Molecular Ocupado de Mais Alta Energia)

HPLC/MS – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas

HPLC-ESI-QTOF – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Ionização por Eletrospray e Analisador de Massa Quadrupolo-Tempo de Voo

HRESIMS – *High-Resolution Electrospray Ionization Mass Spectrometry* (Espectrometria de Massas de Alta Resolução com Ionização por Eletrospray)

HSQC – *Heteronuclear Single Quantum Coherence* (Coerência Quântica Heteronuclear Simples)

I.E. – Impacto de Elétrons

INPE – Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais

IPP – Isopentenil Pirofosfato

IS – Índice de Seletividade

LCD – Luz Circularmente Polarizada à Direita

LCE – Luz Circularmente Polarizada à Esquerda

LC-QTOF/MS – Cromatografia Líquida acoplada a Espectrômetro de Massa Quadrupolo de Tempo de Voo

LQPN – Laboratório de Química de Produtos Naturais

LPQPN/UFMT – Laboratório de Pesquisa em Química de Produtos Naturais/Universidade Federal de Mato Grosso

LUMO – *Lowest Unoccupied Molecular Orbital* (Orbital Molecular Desocupado de Mais Baixa Energia)

MEP – Via do Metileritriol Fosfato

MEV – Via do Mevalonato

MG – Metilglioxal

MS – *Mass Spectrometry* (Espectrometria de Massas)

MTT – Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

MVA – Ácido Mevalônico

NOESY – *Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy* (Espectroscopia de Efeito Nuclear Overhauser)

OMS – Organização Mundial da Saúde

P.A – Para Análise

PCM – Paracoccidiodomicose

PDA – *Photodiode Array* (Arranjo de Fotodiodos)

PDB ID – *Protein Data Bank Identifier* (Identificador do Banco de Dados de Proteínas)

PNS – Pesquisa Nacional de Saúde

PPGQ UFRRJ – Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

RCSB – *Research Collaboratory for Structural Bioinformatics*

Rf – Fator de Retenção

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

RMSD – *Root Mean Square Deviation* (Desvio Médio Quadrático)

ROS – *Reactive Oxygen Species* (Espécies Reativas de Oxigênio)

SCPL-ATs – *Serine Carboxypeptidase-Like Acyltransferases*

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio

SFB – Soro Fetal Bovino

SisGen – Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado

SMART – *Somatic Mutation and Recombination Test* (Ensaio de Mutação e Recombinação Somática)

SMILES – *Simplified Molecular-input Line-entry System*

TCC – Trabalho de Conclusão de Curso

TD-DFT – *Time-Dependent Density Functional Theory* (Teoria do Funcional da Densidade Dependente do Tempo)

TMS – Tetrametilsilano

UDP – Uridina Difosfato

UGTs – Glicosiltransferases Dependentes de UDP

UV – Radiação Ultravioleta

ZIKV – Zika Vírus

LISTA DE SÍMBOLOS

$^{\circ}\text{C}$ – Graus Celsius

1D/2D – Unidimensional / Bidimensional

α – Alfa (utilizado em estereoquímica e rotação óptica)

β – Beta (utilizado em estereoquímica)

γ – Gama (utilizado em espectroscopia)

ΔA – Diferença de Absorbância

$\Delta\epsilon$ – Absorção Dicroica Diferencial

δ – Deslocamento Químico em RMN

IC₅₀ – Concentração que inibe 50% de uma atividade biológica

J – Constante de Acoplamento em RMN

Hz – Hertz

kg – Quilograma

m/z – Relação Massa/Carga

mg.kg⁻¹ – Miligrama por quilograma

mL – Mililitro

mM – Milimolar

nm – Nanômetro

ppm – Partes por milhão

μg.mL⁻¹ – Microgramas por mililitro

μM – Micromolar

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. CAPÍTULO I	5
2.1. INTRODUÇÃO	5
2.1.1. Generalidades da família Rubiaceae.....	5
2.1.2. Triterpenos: Uma Classe Representativa de Metabólitos na Família Rubiaceae 12	
2.1.3. Gênero <i>Galianthe</i> Griseb.	19
2.1.4. A espécie <i>Galianthe matogrossiana</i> E.L. Cabral; Informações e justificativa para o estudo fitoquímico.	26
2.2. MATERIAIS E MÉTODOS	28
2.2.1. Reagentes e equipamentos	28
2.2.2. Material vegetal	30
2.2.2.1. Preparo do extrato bruto metanólico de raízes (EBMeOHR) e partes aéreas (EBMeOHPA) de <i>G. matogrossiana</i>	30
2.2.2.2. Estudo Fitoquímico de GMHR (Subfração hexânica de raízes)	32
2.2.2.3. Estudo Fitoquímico de GMDR (Subfração diclorometano de raízes).....	33
2.2.2.4. Estudo Fitoquímico das Subfrações das partes aéreas	36
2.2.2.5. Estudo Fitoquímico das Amostras polares das Raízes e Partes Aéreas.....	38
2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
2.3.1. Elucidação estrutural dos compostos isolados de <i>Galianthe matogrossiana</i> ...	39
2.3.1.1. Elucidação estrutural dos triterpenos isolado do tipo ursanos e oleananos relatados na literatura: 2	42
2.3.1.2. Elucidação estrutural dos triterpenos ursanos e oleananos relatados na literatura: 8 e 9	47
2.3.1.3. Elucidação estrutural dos triterpenos ursanos e oleananos relatados na literatura: 10	49
2.3.1.4. Elucidação estrutural dos triterpenos lupanos relatados na literatura: 12 e 13 50	
2.3.1.5. Elucidação estrutural das misturas contendo novos triterpenos: 3 e 4	58
2.3.1.6. Elucidação estrutural das misturas contendo novos triterpenos: 20 e 21 ...	65
2.3.1.7. Elucidação estrutural dos esteroides: 5, 6, 7, 15 e 16	76
2.3.1.8. Elucidação estrutural do ácido graxo (éster metílico de ácido palmítico): 1 83	
2.3.1.9. Elucidação estrutural dos compostos fenólicos isolados	87
2.3.1.9.1. Elucidação estrutural da cumarina: 11	87

2.3.1.9.2.	Elucidação estrutural dos derivados do ácido benzoico: 17 e 18	91
2.3.1.9.3.	Elucidação estrutural do derivado análogo de uma <i>trans</i> -chalcona trans: 14	95
2.3.1.9.4.	Elucidação estrutural da antraquinona: 19	102
2.3.2.	Explorando o potencial biológico de extratos, frações e isolados de <i>Galianthe matogrossiana</i>	107
2.3.2.1.	Experimentos envolvendo extratos e frações: Atividades antinociceptiva e anti-inflamatória dos extratos metanólico das raízes e de partes aéreas de <i>Galianthe matogrossiana</i>	107
2.3.2.2.	Experimentos envolvendo extratos e frações: Atividade antioxidante do extrato e frações das raízes de <i>Galianthe matogrossiana</i> em modelo com <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	113
2.3.2.3.	Experimentos isolados: Avaliação do ácido oleanólico acetilado isolado de <i>Galianthe matogrossiana</i> com potencial atividade contra amastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	116
2.3.2.4.	Seleção de potenciais agentes anticâncer: Abordagem <i>In Silico</i> de docking molecular com triterpenos de <i>Galianthe matogrossiana</i> contra a Aurora Kinase B	120
2.3.2.5.	Metodologia: Redocking e Docking Molecular	125
2.4.	CONCLUSÕES	132
3.	CAPÍTULO II.....	134
3.1.	INTRODUÇÃO/ JUSTIFICATIVA.....	134
3.1.1.	Revisão e Perspectivas para <i>Crateva tapia</i> L.	135
3.1.1.1.	Glicação e AGEs: Implicações para o Controle do Diabetes	141
3.2.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	146
3.2.1.	Reagentes e equipamentos	146
3.2.2.	Material vegetal	147
3.2.3.	Preparo dos extratos bruto metanólico de folhas (EBMF) e entrecascas (EBME) de <i>C. tapia</i>	147
3.2.4.	Estudo fitoquímico das subfrações hexânica (CTHF) e diclorometano das folhas (CTDF) e entrecascas (CTDE)	148
3.2.5.	Metodologia de avaliação da atividade antiglicante das folhas e entrecascas	149
3.2.6.	Teste de solubilidade dos extratos.....	150
3.2.7.	Determinação da capacidade de inibição da glicação proteica <i>in vitro</i> dos extratos	150
3.2.8.	Determinação de AGEs fluorescentes e marcadores de oxidação de resíduos de aminoácidos dos extratos.....	151
3.2.9.	Quantificação de proteínas carboniladas do EBME	152
3.2.10.	Inibição do <i>Cross-Linking</i> Proteico pelo extrato da entrecasca de <i>Crateva tapia</i>	152

3.3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	154
3.3.1.	Atividade antiglicação <i>in vitro</i> de extratos das folhas (EBMF) de <i>C. tapia</i> ...	154
3.3.1.1.	Teste de solubilidade de EBMF	154
3.3.1.2.	Determinação da formação de AGEs fluorescentes	155
3.3.1.3.	Determinação da formação de marcadores de oxidação de resíduos de aminoácidos de EBMF	157
3.3.2.	Efeitos Glicooxidativos do extrato das entrecasas (EMBE) de <i>C. tapia</i> em Sistema Modelo de Glicação Proteica	161
3.3.2.1.	Determinação da formação de AGEs fluorescentes	161
3.3.3.	Determinação da formação de marcadores de oxidação de resíduos de aminoácidos de EBME	162
3.3.4.	Efeitos do Extrato de Entrecasca de <i>Crataeva tapia</i> na Carbonilação Proteica e Inibição do <i>Cross-Linking</i> em Modelo de Glicoxidação <i>In Vitro</i>	164
3.3.5.	Elucidação estrutural dos isolados de CTDE.....	168
3.4.	CONCLUSÕES	173
4.	CAPÍTULO III	175
4.1.	INTRODUÇÃO/ JUSTIFICATIVA.....	175
4.2.	FUNDAMENTOS TEÓRICOS.....	177
4.2.1.	Quiralidade, Luz Polarizada e Introdução ao Estudo de Caso.....	177
4.2.1.1.	Quiralidade Molecular e Propriedades Ópticas	177
4.2.1.2.	Natureza da Luz e Polarização.....	179
4.2.1.3.	Dicroísmo Circular: Significado, Interpretação de Gráficos, Cálculos Teóricos e Fechamento do Estudo de Caso.....	182
4.2.2.	ESTUDO DE CASO – O ALCALOIDE “BRAZOIDE E” DE <i>Justicia wasshauseniana</i>	184
4.2.2.1.	Descrições retiradas do trabalho de R. D Fernandes (2016) acrescidas de informações atualizados	184
4.3.	MATERIAIS E MÉTODOS	185
4.3.1.	Reagentes e equipamentos	186
4.3.2.	Material vegetal	187
4.3.2.1.	Procedimentos interpretados do trabalho de R.D. Fernandes (2016)	188
4.4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	189
4.5.	CONCLUSÕES	197
5.	REFERÊNCIAS	198
6.	ANEXO 1.....	220
7.	ANEXO 2.....	221
8.	ANEXO 3.....	240

9. ANEXO 4.....	243
-----------------	-----

1. INTRODUÇÃO GERAL

A química de produtos naturais é uma área que integra conhecimentos técnicos e científicos, estando fortemente relacionada ao conhecimento tradicional e empírico de diversas culturas ao redor do mundo, especialmente no uso terapêutico de plantas, e entendimento de suas propriedades. Essa relação se manifesta em diversas práticas culturais como a culinária, o artesanato, e diversas áreas científicas como ciências ambientais, agropecuárias, ecologia, etc. Dentre essas práticas, a medicina tradicional é a mais recorrente, pois a flora se apresenta como a fonte mais acessível, sobretudo para grupos cujo acesso ao sistema de saúde e a medicamentos sintéticos é limitado (PATIL e GAIKWAD, 2012). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2008), 80% da população de países em desenvolvimento, que enfrentam dificuldades econômicas para adquirir medicamentos farmacêuticos, depende da medicina tradicional para tratar questões de saúde.

O uso de produtos naturais com finalidades terapêuticas remonta à antiguidade e permanece relevante até os dias atuais, sendo intensificado em contextos recentes, como durante a pandemia de COVID-19, quando fitoterápicos e plantas medicinais foram amplamente empregados no alívio de sintomas (MENDONÇA NETO *et al.*, 2022). Esse cenário destaca a importância dos estudos científicos sobre a composição química e as propriedades biológicas de metabólitos isolados de plantas, garantindo evidências para o uso seguro e eficaz desses recursos naturais.

Pesquisas conduzidas por Newman e Cragg (2020) reforçam a contínua contribuição dos produtos naturais na descoberta de novos medicamentos. No contexto global, particularmente na área oncológica, 53,3% dos fármacos antitumorais, de moléculas pequenas, aprovados no período de 1946 a 1981 originaram-se de produtos naturais ou seus derivados. Dados atualizados indicam que, entre 1981 e 2019, 33,5% dos fármacos antitumorais de pequenas moléculas aprovados, foram provenientes dessa mesma fonte (NEWMAN e CRAGG, 2020). Embora esse percentual tenha diminuído, os produtos naturais seguem sendo fontes indispensáveis para a descoberta de fármacos. Essa redução reflete uma maior diversificação de fontes, mas sem comprometer a influência estrutural dos produtos naturais (NEWMAN e CRAGG, 2020). A pesquisa multidisciplinar, que combina produtos naturais com técnicas sintéticas e manipulação biossintética, continua sendo uma abordagem crucial para o desenvolvimento de novos tratamentos, ressaltando a relevância da exploração desses recursos no avanço terapêutico.

Sob essa perspectiva, a biodiversidade brasileira representa um potencial estratégico para as pesquisas em química de produtos naturais, oferecendo uma variedade de espécies com potencial biológico ainda pouco explorado. O estudo dessa biodiversidade é crucial para a promoção da saúde humana e a compreensão da composição química das espécies nativas, contribuindo para diversas áreas de conhecimento (FELISBERTO *et al.*, 2022). A riqueza natural do Brasil proporciona oportunidades promissoras para a descoberta de moléculas bioativas com aplicações tanto na medicina tradicional quanto no desenvolvimento de novos fármacos.

Para que esse potencial seja plenamente aproveitado, o desenvolvimento sustentável deve ser apoiado por políticas eficazes em educação, ciência e inovação, com ênfase na preservação ambiental e no uso responsável dos recursos naturais. A fitoquímica, nesse cenário, desempenha um papel central ao viabilizar a exploração da flora e de seus compostos químicos. A química de produtos naturais, especialmente focada na caracterização e avaliação das substâncias produzidas pelo metabolismo secundário das plantas, é fundamental para a aplicação e valorização desse patrimônio biológico, contribuindo para as diversas áreas da ciência (BRAZ-FILHO, 2010).

Considerando a vasta diversidade da flora regional, aumenta-se a responsabilidade pela gestão desse patrimônio. Estratégias inadequadas de conservação podem levar à destruição de ecossistemas vitais, desencadeando desequilíbrios ecológicos significativos. A perda contínua de habitats ameaça espécies vegetais de importância social, científica e medicinal, cujas potencialidades científicas e farmacológicas poderiam ser exploradas no futuro.

O panorama apresentado ressalta a importância de pesquisas voltadas para espécies da família Rubiaceae, amplamente distribuídas em diversos biomas da flora brasileira e reconhecida como produtora de uma fonte inestimável de biomoléculas. De maneira semelhante, a família pantropical de angiospermas Capparaceae reúne 12 gêneros e 30 espécies que compõem a biodiversidade nacional, metade delas presentes na Floresta Atlântica, com destaque para os fitoconstituintes responsáveis por seu valor medicinal (SOARES NETO e LUBER, 2020; DHAKAD *et al.*, 2016). Já as floras locais no Brasil têm se mostrado fundamentais para o conhecimento da família Acanthaceae, contribuindo para o esclarecimento de questões taxonômicas e apresentando ampla representatividade em praticamente todos os tipos de vegetação, sobretudo em áreas com elevado grau de preservação (BRAZ e AZEVEDO, 2016). Em conjunto, essas três famílias botânicas exemplificam a riqueza incontestável da

biodiversidade brasileira e mantêm uma conexão intrínseca com a sociedade, o território e a identidade do país, reforçando o potencial para descobertas científicas a partir dessa diversidade. Esses aspectos fundamentam e motivam os trabalhos desenvolvidos nesta tese.

A presente tese está dividida em três capítulos, o primeiro deles, Capítulo I (pág. 5), detalha a investigação fitoquímica abrangente de *Galianthe matogrossiana* (Rubiaceae). Descreve-se o processo de isolamento e caracterização de metabólitos especiais obtidos de frações apolares de raízes e partes aéreas da planta, com foco na elucidação estrutural de triterpenos (principalmente lupano, ursano e oleanano) e outros constituintes. Em seguida, este capítulo apresenta uma avaliação abrangente do potencial biológico desses extratos e metabólitos. As atividades biológicas investigadas incluem ensaios antinociceptivos e antiinflamatórios *in vivo*; o potencial antioxidante em modelo com *Saccharomyces cerevisiae*; a atividade tripanocida do ácido oleanólico acetilado contra amastigotas de *Trypanosoma cruzi*; e uma abordagem *in silico* de *docking* molecular utilizando triterpenos selecionados contra a Aurora Quinase B, um alvo para potenciais agentes anticâncer (especificamente ao carcinoma anaplásico da tireoide).

O Capítulo II (pág. 134) disserta sobre a investigação do potencial glicooxidativo de *Crataeva tapia* L. (Capparaceae), correlacionando sua composição fitoquímica com os efeitos antiglicantes *in vitro* dos extratos metanólicos de folhas e entrecascas do caule. Destaca-se a urgência de explorar espécies do Pantanal, enfatizando a relevância econômica, medicinal e cultural de *C. tapia* que, apesar de seu uso tradicional em desordens metabólicas ainda não foi estudada com trabalhos científicos. O capítulo também apresenta dados de um estudo fitoquímico inicial da fração diclorometano das entrecascas, com isolamento preliminar do sitosterol glicosilado e o triterpeno lupeol (descrito para *G. matogrossiana*), lançando as bases para inicialização de discussões acerca dos mecanismos antiglicantes e das moléculas bioativas da planta.

A terceira parte desta tese, o Capítulo III (pág. 175), retoma a pesquisa fitoquímica conduzida pelo LQPN-UFRRJ em 2016 (FERNANDES, R. D., 2016), que resultou no isolamento de um alcaloide junto com outros compostos de *Justicia wasshauseniana* (Acanthaceae), cujas estruturas preliminares foram estabelecidas por espectroscopia de infravermelho, RMN 1D/2D e espectrometria de massas. Sendo, então, concluída a estrutura do alcaloide como o novo composto com estereoquímica absoluta definida e informações não descritas no trabalho original que, inclusive, contribuiu para a definição do nome “Brazoide E”.

Nesse contexto, esse capítulo revela a colaboração na definição desse novo alcaloide descrevendo mais detalhes nas interpretações dos espectros incluindo a técnica de dicroísmo circular e análises com cálculos teóricos de TDDFT. Metodologia não aplicada nas elucidações reportadas nos capítulos anteriores dessa tese, mas reconhecida como ferramenta essencial para determinar a estereoquímica de compostos quirais. Esse detalhamento da definição estrutural desse novo composto conduziu para a primeira publicação do artigo do trabalho com *J. wasshauseniana*, “Brazoide E, a New Alkaloid and Other Compounds from *Justicia wasshauseniana* (Acanthaceae)”, publicado no *Journal of the Brazilian Chemical Society* (FERNANDES, *et al.*, 2025; DOI: 10.21577/0103-5053.20240166).

Convida-se o leitor a mergulhar nestes três capítulos que celebram a riqueza de nossos *hotspots* biogeográficos, do Cerrado ao Pantanal, até as margens subtropicais da Acanthaceae. Aqui, cada página desenha roteiros fitoquímicos, revela a contextualização do dicroísmo circular e tece pontes entre a luz polarizada e o mundo quiral do alcaloide. Ao explorar *Galianthe matogrossiana*, *Crataeva tapia* e *Justicia wasshauseniana*, a jornada atravessa paisagens de rara beleza e aprofunda o entendimento sobre metabólitos especiais, elucidações, estereoquímicas e potenciais biológicos. Deixe-se guiar por este tributo à biodiversidade nacional, onde ciência e poesia se encontram na descoberta de novas moléculas e na inspiração de futuras investigações.

2. CAPÍTULO I

Fitoquímica de Raízes e Partes Aéreas de *Galianthe matogrossiana* (Rubiaceae): Isolamento de Metabólitos e Investigação de Atividades Biológicas

2.1. INTRODUÇÃO

2.1.1. Generalidades da família Rubiaceae

A família Rubiaceae está inserida no clado das Eudicotiledôneas e pertence à ordem Gentianales, ocupando a quarta posição em diversidade de espécies entre as Angiospermas, compreendendo aproximadamente 14.000 espécies e 615 gêneros distribuídos globalmente (FLORA DO BRASIL, 2025; VARGAS e MARTINS, 2020). Embora ocorra em todos os continentes, a maior concentração de espécies encontra-se em regiões tropicais e subtropicais (VARGAS e MARTINS, 2020; DELPRETE E JARDIM, 2012; CLAUDE *et al.*, 2023; RAZAFIMANDIMBISON e RYDIN, 2024). Seus representantes exibem grande variedade de hábitos, incluindo árvores, ervas, arbustos, lianas e até espécies aquáticas, com ampla distribuição ecológica em diversos habitats, desde ambientes litorâneos até regiões montanhosas, abrangendo áreas áridas, desérticas e florestas tropicais (CLAUDE *et al.*, 2023; VARGAS E MARTINS, 2020; RAZAFIMANDIMBISON e RYDIN, 2024).

No Brasil, a família é particularmente rica e bem representada, com 130 gêneros e 1.427 espécies catalogadas, das quais 17 gêneros e 704 espécies são considerados endêmicos, ocorrendo em todos os estados, biomas e praticamente todas as fitofisionomias (FLORA DO BRASIL, 2025), evidenciando sua significativa importância ecológica no cenário nacional.

Para além da relevância ecológica, a família Rubiaceae possui considerável importância econômica e cultural. Diversas espécies são valorizadas por seus usos ornamentais, medicinais e industriais (MARTINS e NUNES, 2015). Entre suas espécies mais notáveis, *Coffea arabica* se sobressai como a alma da indústria cafeeira, cujo principal constituinte químico, a cafeína, se dissolve nos aromas e nos sabores do cafezinho (MARTINS e NUNES, 2015). Presente em cada xícara que aquece os lares de diversas sociedades ao redor do mundo, é sob esse contexto que a família carrega seu nome, como um tributo aos encontros que o café

proporciona, sempre repletos de história e sabor, conferindo à família o cognome popular de 'família do café' (SIMPSON, 2010; CLAUDE *et al.*, 2024).

Além do café, outras espécies da família também possuem aplicações nos setores medicinal, alimentício, industrial, cultural e científico, devido à sua vasta gama de compostos bioativos (DUBEY e PRAKASH, 2021; KAGISHA *et al.*, 2021; CHANIAD *et al.*, 2022; GONZÁLEZ-CASTELAZO *et al.*, 2023; JAAFAR *et al.*, 2023; ROY *et al.*; RUSHDAN *et al.*, 2023; JOSEPH *et al.*, 2024). No paisagismo, sobressaem algumas das plantas tropicais ornamentais mais populares, pertencentes aos gêneros *Ixora*, *Gardenia*, *Mussaenda*, *Portlandia* e *Serissa* (MAITI *et al.*, 2015; PUTRI *et al.*, 2021). Um caso ilustrativo é a *Ixora coccinea* (nome popular: ixoravermelha, ixoracoral), arbusto de flores alaranjadas intensas que ornamenta cercas vivas vibrantes (PAIVA *et al.*, 2009; CIRILO *et al.*, 2024). Sua copa, habilmente esculpida pela topiaria, assume formas variadas, conferindo charme e adaptabilidade a praças e parques, sempre harmonizada ao ambiente (BEZERRA *et al.*, 2017; MARIA *et al.*, 2021).

Essa família é uma fonte reconhecida de plantas medicinais extensivamente estudadas, com diversos efeitos farmacológicos relatados e cientificamente comprovados. Muitas dessas espécies são amplamente utilizadas em sistemas de medicina tradicional ao redor do mundo. Folhas, caules e raízes são as partes mais empregadas para fins medicinais, frequentemente preparadas na forma de pós, infusões ou decocções, devido às suas ações antiinflamatória, analgésica, antibacteriana, mutagênica, antiviral, antioxidante, além de efeitos em doenças vasculares, bem como atividade no sistema nervoso central (KAROU *et al.*, 2011; MARTINS e NUNEZ, 2015). Estudos científicos sustentam essas narrativas ao comprovar que extratos e compostos isolados de rubiáceas apresentam propriedades anti-hipertensivas, hipolipemiantes, antiplasmodial, antitumoral, antidiabéticas, antioxidantes, antiinflamatórias e anticancerígenas. (GONZÁLEZ-CASTELAZO *et al.*, 2023, PHAM *et al.*, 2021; NKOUAYEB NANGMOU *et al.*, 2023).

A diversidade biológica e farmacológica da família Rubiaceae está diretamente relacionada à sua complexidade fitoquímica. As espécies desta família produzem uma vasta gama de metabólitos secundários, cujo estudo é fundamental não apenas para a descoberta de novas moléculas bioativas, mas também para a quimiotaxonomia. Esses compostos auxiliam na distinção de subfamílias, tribos e gêneros dentro da família, alinhando-se aos sistemas taxonômicos modernos (FARIAS, 2006; MARTINS e NUNEZ, 2015). Entre as principais

classes de metabólitos secundários identificados em Rubiaceae estão os iridoides, alcalóides indólicos, terpenoides (diterpenos e triterpenos), antraquinonas, flavonoides, saponinas, esteroides e outros derivados fenólicos, muitos dos quais possuem propriedades biológicas comprovadas (NKOUAYEB NANGMOU *et al.*, 2023; MARTINS e NUNEZ, 2015; WANG *et al.*, 2023).

A análise da produção científica sobre Rubiaceae evidencia o crescimento consistente nesse grupo botânico ao longo das décadas. Uma busca na base de dados do SciFinder Scholar® (utilizando a palavra-chave "Rubiaceae" até março de 2025) revela um total de 4.775 publicações desde 1900. O número anual de artigos manteve-se relativamente baixo até 1994 (menos de 23 por ano), contudo, a partir desse período observou-se um crescimento exponencial, atingindo um pico entre 2020 e 2022, com mais de 220 publicações anuais (Gráfico 1, pág. 7). Esses estudos abordam diversas temáticas, correlacionando conceitos biológico, farmacológicos e químicos, com foco no isolamento de metabólitos especiais, evidenciando a riqueza de compostos bioativos isolados.

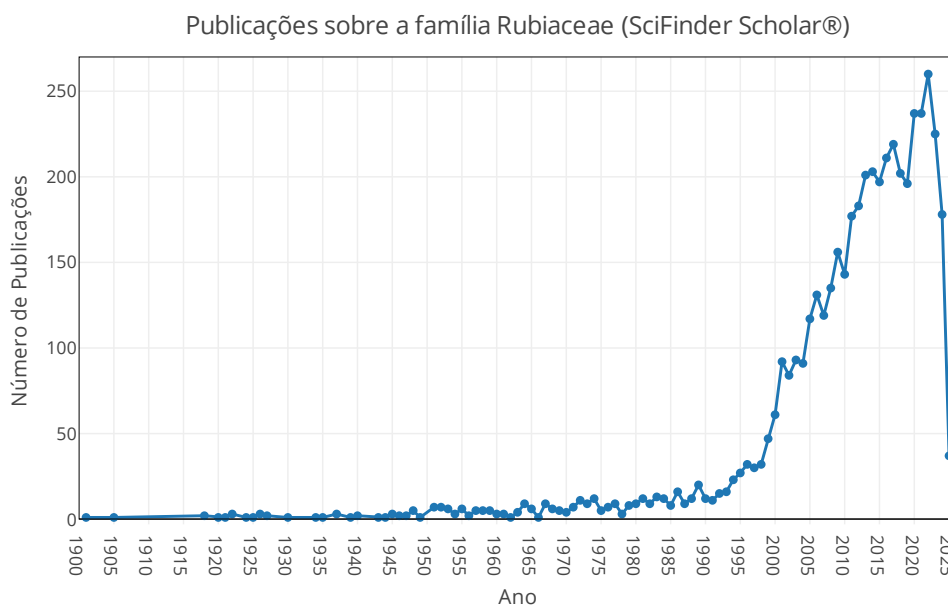


Gráfico 1 - Publicação de artigos científicos sobre a família Rubiaceae de janeiro de 1900 a 2025, de acordo com levantamento realizado pelo SciFinder Scholar®.

Embora já exista um volume expressivo de pesquisas, a última revisão focada nos estudos fitoquímicos de espécies de *Rubiaceae*, foi publicada em 2015, incluindo dados de 1990 a 2014 (MARTINS e NUNEZ, 2015). Uma análise preliminar da produção científica mais

recente (janeiro de 2024 a março de 2025) na mesma plataforma listou 215 novas publicações, explorando estudos biológicos, revisões de gêneros, prospecções fitoquímicas e caracterizações estruturais. Dentre estes, aproximadamente 15% dos trabalhos estão pautados em isolamento de compostos, reforçando o contínuo potencial da família como fonte para a descoberta de novos fármacos. O Gráfico 1 (pág.7) ilustra a evolução anual de publicações, enquanto a Tabela (disponível Anexo 4) organiza, para o período de janeiro de 2024 a março de 2025, os metabólitos isolados, suas classes químicas, as espécies de origem, as partes vegetais utilizadas e as respectivas atividades biológicas relatadas. Devido à complexidade desses dados, optou-se por apresentar de forma mais detalhada essas informações em anexo 4.

No período examinado, destacam-se classes como cumarinas, nucleosídeos, bases nitrogenadas, compostos fenólicos, carotenoides, glicosídeos, naftoquinonas, iridoide, saponinas, entre outras. Observa-se ainda uma elevada ocorrência de alcaloides (com destaque para variações de indólicos), flavonoides, antraquinonas e terpenos, muitos dos quais apresentam atividades biológicas relevantes, conforme sintetizado na Tabela (Anexo 4 e Figura 1, pág. 9).

Entre essas classes, os alcaloides se sobressaem como uma das classes mais abundantes e diversificadas em Rubiaceae, principais marcadores químicos desta família, com várias descobertas recentes que reforçam seu potencial farmacológico (MARTINS e NUNES, 2015). Em *Ophiorrhiza japonica* e *Uncaria rhynchophylla*, várias ofiorglucidinas (A-E) e derivados foram isolados, entre os quais ofiorglucidinas B e C (**R1** e **R2**) demonstraram inibição significativa da xantina oxidase, sugerindo potencial aplicação no tratamento da hiperuricemia e gota (SHI *et al.*, 2024). A naucloficina B (**R3**) apresentou efeito antiinflamatório relevante, e alcaloides indólicos isolados de *Nauclea officinalis* tais como naucleamida H (**R4**) e (±)-19-O-butilangustolina (**R5**), revelaram citotoxicidade contra células HepG2, reforçando interesse terapêutico desse grupo frente ao câncer hepático (WANG *et al.*, 2024). Esses achados ilustram a produtividade contínua na identificação de alcaloides com propriedades biológicas relevantes em gêneros distintos de Rubiaceae.

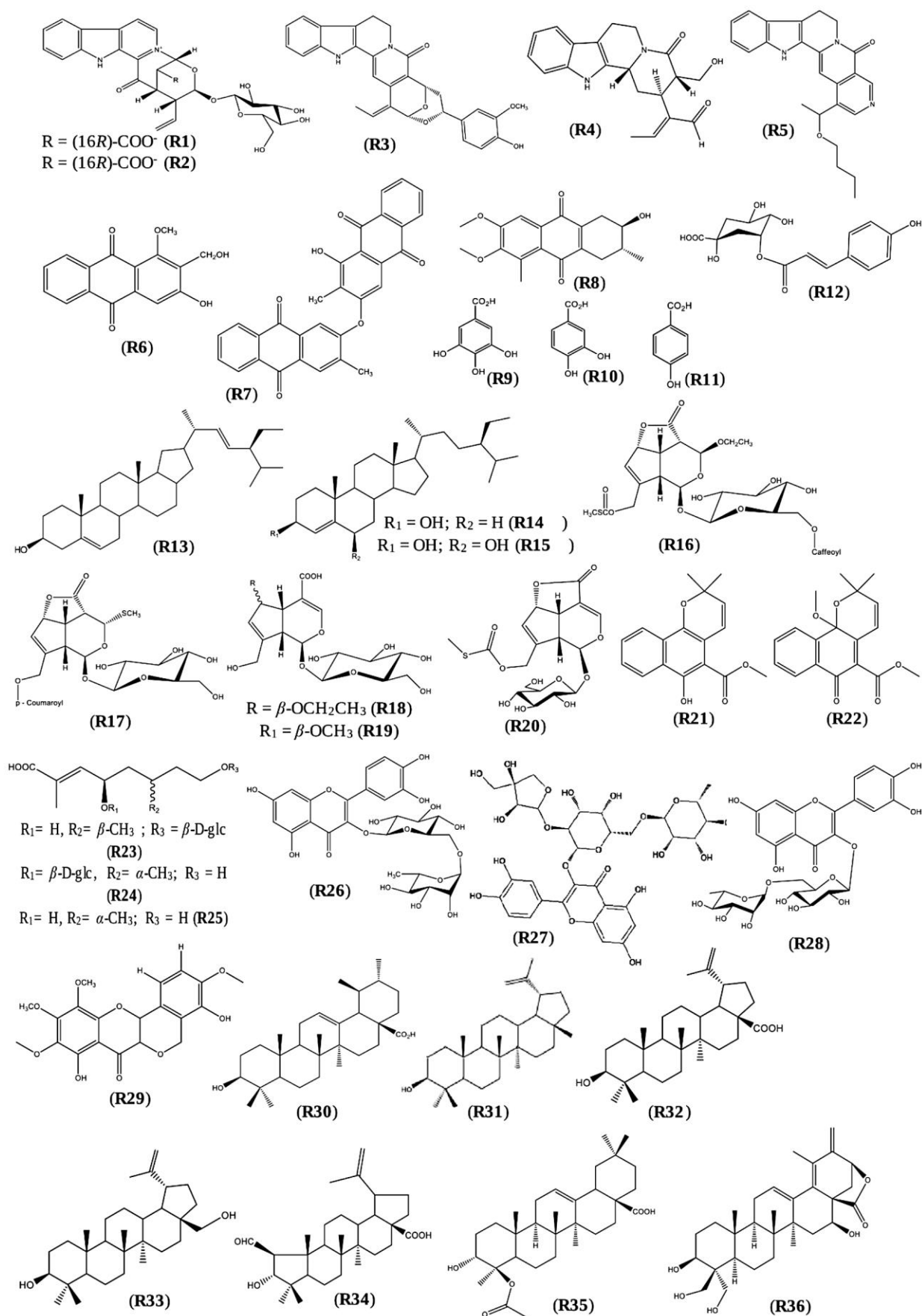


Figura 1 - Um recorte de alguns metabólitos relatados em Rubiaceae na data investigada.

As antraquinonas e seus derivados são frequentes nesses estudos recentes, apresentando atividades que vão desde inibição enzimática até ações antiproliferativas. Em *Phylloentas schimperi*, compostos como damnacanthol (**R6**) e esquimperiquinona A (**R7**), extraídos de uma mistura combinada de cascas do caule e raízes, inibiram de forma potente a urease, indicando potencial para o controle de infecções urinárias (DONFACK NANFACK *et al.*, 2024). Do gênero *Prismatomeris*, tetrahydroantraquinonas como a prisconnatanona J (**R8**), mostraram efeito antiproliferativo seletivo contra células tumorais HGC27, sem afetar células gástricas normais (GES-1), sugerindo um potencial antitumoral (CHEN *et al.*, 2024).

Nos derivados fenólicos e esteróides, compostos como os ácidos gálico (**R9**), protocatecuico (**R10**), *p*-hidroxibenzoico (**R11**) e o 3-*O-p*-cumaroilquínico (**R12**) foram isolados de *Galium aparine* e *Palicourea tomentosa* (WU *et al.*, 2025; CECATTO *et al.*, 2025). Entre esteroides específicos, a identificação de estigmasterol (**R13**) e β -sitosterol (**R14**) em *Brenania brieyi* e de estigmast-4-eno-3 β ,6 β -diol (**R15**) em *Ophiorrhiza chinensis*, este último com capacidade de inibição moderada da tirosinase, reforça seu uso potencial em formulações antienvhecimento e para fotoproteção (MATEFO *et al.*, 2025; BU *et al.*, 2024).

No que se refere aos iridoide, compostos igualmente representativos em Rubiaceae, destacam-se glicosídeos isolados de *Paederia foetida*, como 6'-*O-trans*-cafeoil-(4S,6R)-3,4-di-hidro-2'-*O*-3 α -pederosídeo (**R16**) e 10-*O-trans-p*-cumaroil (4R,6R)-3,4-di-hidro-3 α -metiltiopederósídeo (**R17**), os quais exibiram atividades antinociceptiva e citotóxicas promissoras (LI *et al.*, 2025; CHEN *et al.*, 2024; HU *et al.*, 2024). Em *Morinda officinalis* (6R)-6-etoxi geniposídico (**R18**) e o 9-epi-6 α -metoxigeniposídico (**R19**) evidenciaram notável atividade antiinflamatória e inibição de produção de óxido nítrico (JIANG *et al.*, 2024). Iridoides glicosídeos de *Paederia scandens*, como Pederósídeo (**R20**), revelaram efeitos anticancerígenos (FUKAYA *et al.*, 2025).

Além das classes descritas anteriormente, outras classes também têm se mostrado promissoras. Naftoquinonas e flavonoides, por exemplo, vêm sendo alvo de novas descobertas que evidenciam atividades anti-inflamatórias, anticâncer e outras ações farmacológicas. Naftoquinonas extraídas de *Rubia cordifolia*, incluindo mollugin (**R21**) e 4-metoxi-oxomolugina (**R22**), exibiram capacidade de inibir a produção de NO, reforçando seu potencial anti-inflamatório (ZHANG *et al.*, 2024). Morindacinas B-D (**R23-R25**), monoterpenoides acíclicos de *M. officinalis*, também foram relatadas recentemente, adicionando ao acervo de

monoterpenos com possíveis aplicações farmacológicas (JIANG *et al.*, 2024). Na classe dos flavonoides, evidencia-se rutina (**R26**), quercetina 3-O- β D galactopiranosil (1 $\rightarrow$ 2) α apiopiranosil (1 $\rightarrow$ 6) α L ramnopiranosideo (**R27**) e derivados de kaempferol isolados de *Galium*, *Cordia* e *Rubia* (WU *et al.*, 2025; RODRIGUES *et al.*, 2024; ZHANG *et al.*, 2024). A quercetina (**R28**), em particular exibiu ação anti-inflamatória, pelo mesmo mecanismo do composto **R22** (ZHANG *et al.*, 2024). Além disso, a brenaniol A (**R29**), isolada de *Brenania brieyi* exibiu potente atividade antibacteriana (MATEFO *et al.*, 2025).

A classe dos triterpenos merece destaque especial devido à abundância e diversidade estrutural, bem como à ampla gama de bioatividades descritas. Compostos comuns como ácido ursólico (**R30**), lupeol (**R31**), ácido betulinico (**R32**) e betulina (**R33**) revelam forte ação antiplasmodial contra *Plasmodium falciparum*. O ácido ziziberanólico (**R34**), também demonstrou ação antibacteriana (MATEFO *et al.*, 2025). Em *Ophiorrhiza chinensis*, o triterpeno 24-acetoxi-3 α -hidroxioleano-12-en-28-óico (**R35**) inibiu moderadamente a tirosinase em ensaio *in situ*, sugerindo aplicações em cosméticos e conservação de alimentos (BU *et al.*, 2024). O ácido 3 β ,16 β ,21 β ,23,24-penta-hidroxi-urs-12,18,20-trien-28-óico- γ -lactona (**R36**), isolado de *Gardenia angkorensis*, mostrou citotoxicidade fraca contra linhagens KB e Hep G2, indicando baixo potencial tóxico contra células tumorais (HOANG *et al.*, 2024). As saponinas triterpênicas destacam-se pelo potencial terapêutico: o ácido 19 α -hidroxioleanólico 3-O- β -D-glucuronopiranosídeo (**R37**) de *Gardenia angkorensis* inibiu moderadamente a α -glicosidase, sugerindo aplicação no controle glicêmico e tratamento de diabetes (HOANG *et al.*, 2024), enquanto saponinas de *Mussaenda densiflora* demonstraram efeitos anti-inflamatórios, imunossupressores, hepatoprotetores e antioxidantes, sublinhando seu valor como base para novos agentes terapêuticos (DU *et al.*, 2024).

Em consonância com esses achados, ressalta-se a ampla versatilidade bioativa das diferentes classes de metabólitos em Rubiaceae, o que abre inúmeras possibilidades para investigação de novas moléculas com aplicações farmacológicas, cosméticas, agrícolas (inseticidas, pesticidas) e alimentares. Dentre esses grupos, os triterpenos merecem destaque especial: além de serem amplamente distribuídos na família, mostraram-se particularmente representativos em frações apolares de *Galianthe matogrossiana*, planta alvo desta tese. Na próxima seção, examinaremos detalhadamente sua biossíntese, diversidade estrutural e correlações com atividades biológicas, estabelecendo as bases para compreender seu papel central tanto na química do gênero quanto em potenciais aplicações farmacológicas.

2.1.2. **Triterpenos: Uma Classe Representativa de Metabólitos na Família Rubiaceae**

Os triterpenos constituem uma classe de metabólitos secundários abundantemente encontrado na família Rubiaceae e em inúmeras outras famílias botânicas. Eles se destacam como um dos maiores grupos de compostos em plantas, com mais de 20.000 estruturas diferentes descritas (JOSHI, R.K., 2023). Atualmente, a produção de vários triterpenos é realizada principalmente por extração de tecidos vegetais (GUO *et al.*, 2024).

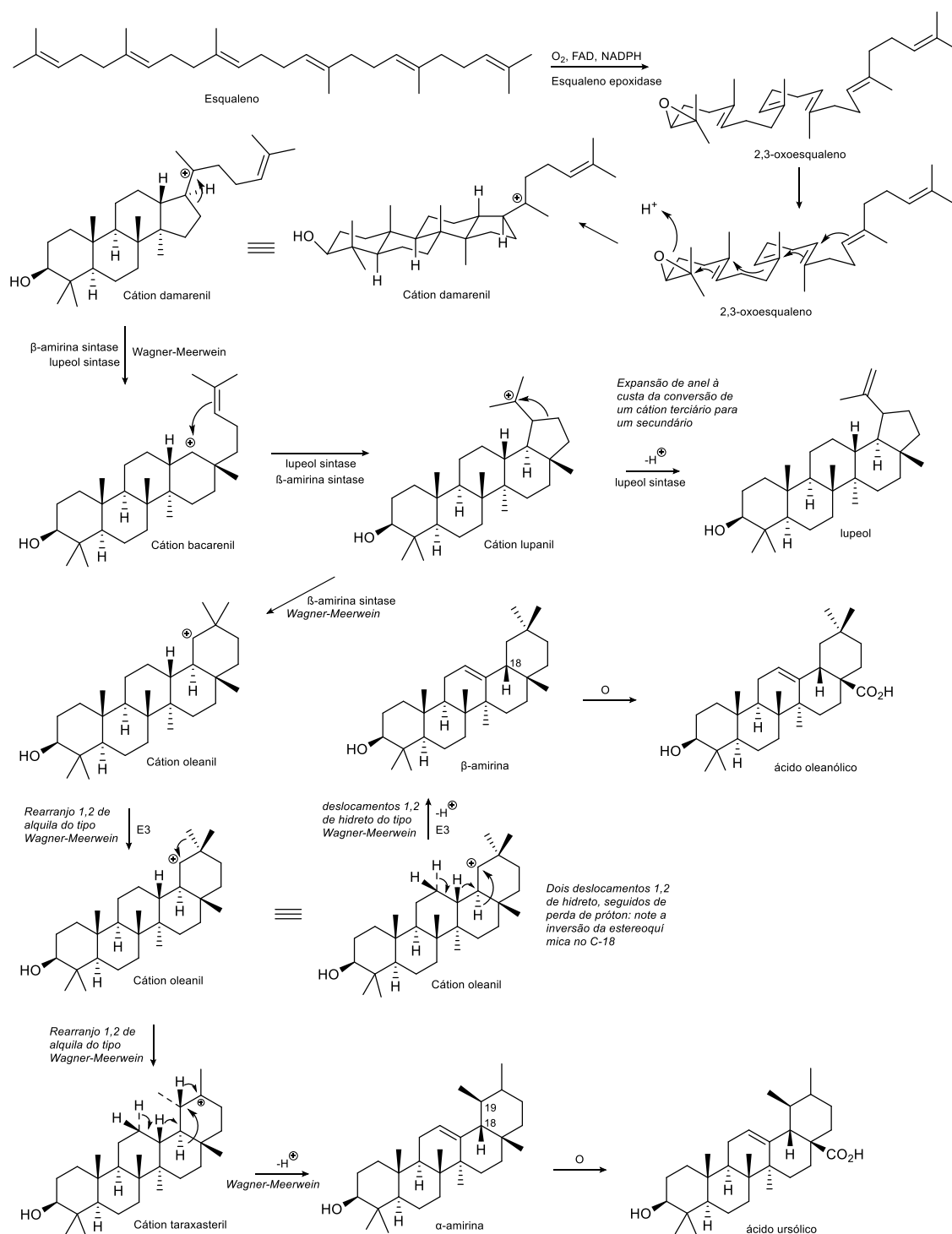
Do ponto de vista estrutural, essa classe é caracterizada por um núcleo com 30 átomos de carbono, formado por seis unidades de isopreno organizadas em cinco anéis interconectados (NISTOR *et al.*, 2023). Essas estruturas cíclicas relativamente complexas, geralmente apresentam grupos funcionais como álcoois, aldeídos ou ácidos carboxílicos substituindo o núcleo básico (HARBORNE, 1998).

Geralmente, estes compostos, assim como outros terpenoides, são biossintetizados por duas possíveis rotas metabólicas principais: a via do mevalonato (MEV), que ocorre no citosol e utiliza como precursor acetil coenzima A (acetil-CoA), e a via independente do mevalonato, também conhecida como a via do metileritriol fosfato (MEP), cujos precursores são o piruvato e a gliceraldeído-3-fosfato (DEWICK, 2009). Ambas podem coexistir simultaneamente em um mesmo organismo vegetal e, apesar de seguirem caminhos distintos, fornecem as mesmas unidades básicas: o isopentenil pirofosfato (IPP) e o seu isômero dimetilalila pirofosfato (DMAPP). Entretanto, considera-se a rota do mevalonato como a principal rota dos triterpenoides, sendo a via MEP uma rota alternativa (CHENG *et al.*, 2007; MAFFEI *et al.*, 2011).

Na via do mevalonato, três moléculas de acetil-CoA se condensam, originando o intermediário HMG-CoA, que é reduzido a ácido mevalônico (MVA). Este sofre fosforilação, descarboxilação e desidratação, formando o isopentenil difosfato (IPP). Uma isomerização enzimática converte o IPP no seu isômero ativo, o dimetilalila difosfato (DMAPP), que participa das condensações que originam o geranyl pirofosfato (GPP), farnesil pirofosfato (FPP) e geranylgeranyl pirofosfato (GGPP) (Esquema 1, pág. 13), precursores para diferentes classes de terpenoides (DEWICK, 2009).

ação da esqualeno epoxidase. O dobramento dessa molécula e sua interação com enzimas ciclases geram diferentes esqueletos triterpênicos, contribuindo para a grande diversidade de estruturas observadas na natureza (Esquema 2, pág. 15) (PHILLIPS *et al.*, 2006). A maioria dos triterpenoides e esteróis naturais contém um grupo 3-hidroxila, proveniente do oxigênio do epóxido original do oxidoesqualeno. A formação dos esqueletos ocorre por meio de diversas ciclagens carbocatiônicas e rearranjos de Wagner-Meerwein, a partir do 2,3-oxidoesqualeno (DEWICK, 2009).

A conformação do 2,3-oxidoesqualeno ao se dobrar na ciclase determina o tipo de cátion intermediário gerado. Quando esse intermediário assume a conformação cadeira-cadeira-cadeira-bote, forma-se o cátion dammarenílico, que pode originar tetracíclicos do tipo dammarano ou, por expansão de anel, gerar o cátion bacarenil. Este alivia tensões estruturais ao formar um anel de seis membros, embora transforme um carbocátion terciário em secundário. A partir do cátion bacarenil, pode ocorrer uma nova ciclização sobre uma ligação dupla, gerando um anel de cinco membros e o cátion lupanil. A perda de um próton desse cátion leva à formação do lupeol (Esquema 2, pág. 15) (DEWICK 2009; WOŹNIAK *et al.*, 2015; GUO *et al.* 2024). O cátion bacarenil é, portanto, precursor dos esqueletos pentacíclicos das séries lupano, oleanano, ursano e friedelano (GOU *et al.*, 2024). Após a formação do esqueleto, ocorrem modificações estruturais catalisadas por enzimas como monooxigenases do citocromo P450, redutases associadas (CPRs) e glicosiltransferases dependentes de UDP (UGTs), promovendo hidroxilações, oxidações e glicosilações que aumentam a diversidade estrutural dos triterpenoides pentacíclicos (XU *et al.*, 2004; GUO *et al.*, 2024).



Esquema 2 - Rota biossintética do esqualeno até a formação dos triterpenos das séries lupano, oleanano e ursano (DEWICK, 2009).

Triterpenóides com um a três anéis são menos comuns que os tetra e pentacíclicos. Há cinco subclasses principais de triterpenos pentacíclicos, sendo as mais conhecidas os lupanos (lupeol [R31], betulina [R33] e ácido betulinico [R32]), os oleananos (ácido oleanólico [T1], β-amirina [T2], eritrodiol [T3] (Figura 2, pág. 16) e os ursanos (ácido ursólico [R30], α-amirina

[T4], uvaol [T5], que juntos representam mais de 95 % dos triterpenos pentacíclicos conhecidos (NISTOR *et al.*, 2023; LIU *et al.*, 2024).

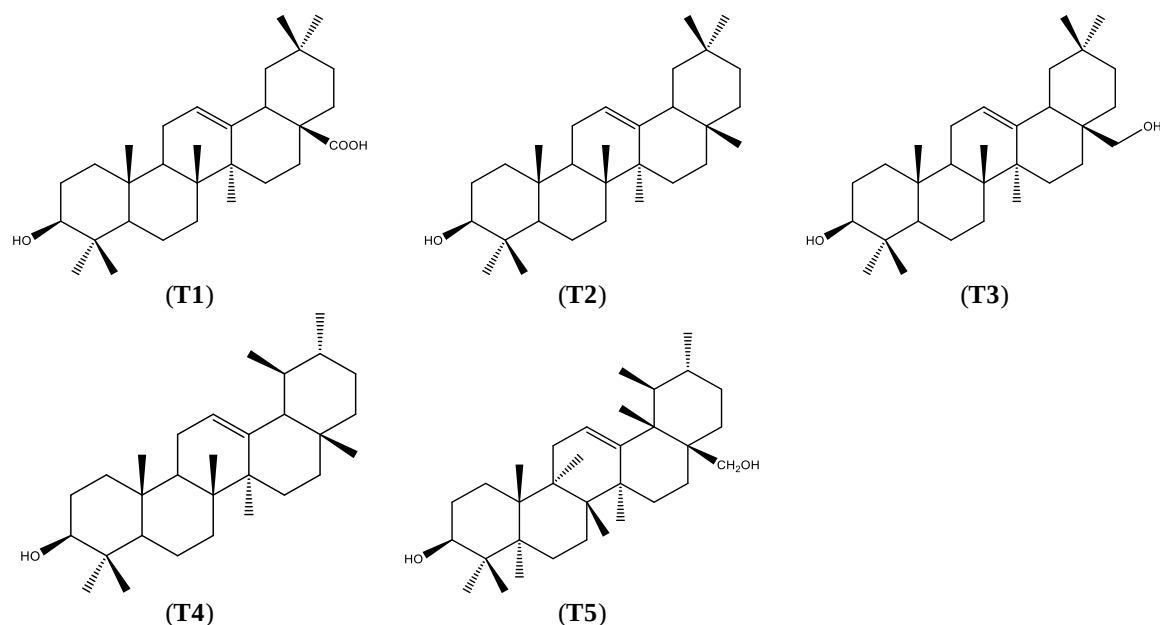


Figura 2 - Exemplos de alguns triterpenos das séries ursano, lupano e oleanano.

Além disso, muitos desses esqueletos sofrem esterificação em hidroxilas, principalmente na posição C-3, o que amplia ainda mais sua diversidade estrutural e funcional. Esse processo é catalisado por duas famílias de aciltransferases: as BAHD acyltransferases (BAHD-ATs), que utilizam acetil-CoA como doador de acila no citosol, e as serine carboxypeptidase-like acyltransferases (SCPL-ATs), localizadas no vacúolo e que empregam ésteres de glicose como fonte de acila (Figura 3, pág. 17) (LIU *et al.*, 2024).

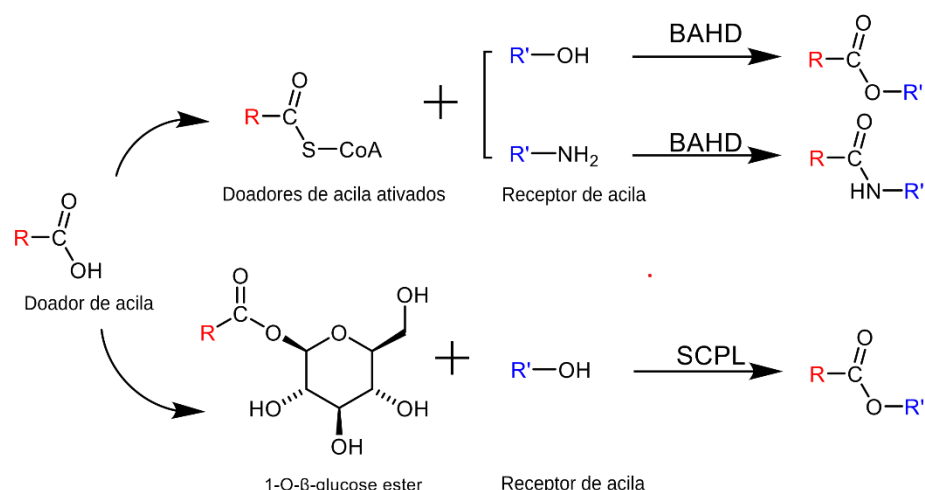


Figura 3 - Mecanismos de acilação de BAHD-ATs e SCPL-ATs. Fonte: LIU *et al.*, 2024 (Traduzida).

Os triterpenos pentacíclicos ocorrem naturalmente em frutas, vegetais e plantas medicinais, atuando como compostos defensivos contra patógenos, pragas e danos físicos (por exemplo, como componentes da cutícula), além de modularem interações com microrganismos radiculares (NISTOR *et al.*, 2023; HUANG *et al.*, 2019). O interesse por esses compostos cresceu após 1995, quando se comprovou a citotoxicidade da betulina (**R33**) e do ácido betulinico (**R32**) contra linhagens de melanoma humano, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (PISHA *et al.*, 1995; FURTADO *et al.*, 2017). Desde então, a classe passou a ser vista como um alvo de alto valor comercial, devido às diversas possibilidades de aplicação nas indústrias alimentícia, cosmética, farmacêutica e agrícola (XU *et al.*, 2004; LIU *et al.*, 2023, 2024; AGRA *et al.*, 2015).

Do ponto de vista farmacológico, esses compostos naturais exibem atividades que incluem anticâncer, antimalárica, anti-HIV, antibacteriana, anti-inflamatória, antioxidante, cardioprotetora, neuroprotetora, hepatoprotetora, inseticida, antidiabética e citotóxica (JOSHI, R.K., 2023). Revisões recentes detalham seus efeitos anticancerígenos (HILL e CONNOLLY, 2018, 2020), antivirais e em distúrbios neurodegenerativos (GUDOITYTE *et al.*, 2021; ZHANG *et al.*, 2022). Em modelos de artrite, diversos triterpenos reduziram a inflamação sem evidenciar citotoxicidade significativa (FAUSTINO *et al.*, 2024), e, em ensaios de cicatrização de feridas, aceleram o fechamento por meio da modulação de espécies reativas de oxigênio, migração e proliferação celular e deposição de colágeno (AGRA *et al.*, 2015). Pesquisas atuais revelam terpenoides e saponinas triterpenoides com atividade antidepressiva, embora mais

avaliações sejam necessárias para confirmar seu uso promissor como medicamentos antidepressivos, um transtorno global em crescimento (MANDO *et al.*, 2024).

Especificamente, o lupeol (**R31**) pode ser encontrado em alimentos (mangas, uvas, morango, pimentão verde e azeite) e remédios botânicos, apresentando propriedades anti-inflamatórias, antimutagênicas, antimaláricas, antioxidantes, antihiperglicêmicas e antidislipidêmicas (JOSHI, R.K., 2023). Já a betulina (**R33**) e ácido betulinico (**R32**) destacam-se como candidatas a agentes anticâncer e anti-HIV (SANTIVANEZ e FIGUEIREDO, 2025; JOSHI, R.K., 2023). O ácido ursólico (**R30**) (ursano) foi proposto como candidato para o tratamento de vários tipos de câncer, doenças inflamatórias, diabetes, Parkinson, Alzheimer e enfermidades hepáticas em humanos (FARZAN *et al.* 2023; LIU *et al.*, 2025). O ácido ursólico também é utilizado na pecuária como agente anti-inflamatório e antiviral (LIU *et al.*, 2023). O ácido oleanólico (**T1**) possui diversas atividades protetoras (neuroprotetor, hepatoprotetor e imunoprotetor) e terapêuticas (anti-inflamatório, antidiabético e antitumoral) (SHAHARYAR *et al.*, 2025). Os triterpenos também modulam a produção de ROS no microambiente da ferida, acelerando o processo de reparo tecidual. Eles também podem induzir migração celular, proliferação celular e deposição de colágeno (AGRA *et al.*, 2015). Além disso, esses ésteres triterpênicos atuam como barreira contra a perda de água e invasão de patógenos durante o crescimento e desenvolvimento das plantas (LIU *et al.*, 2023).

No entanto, esses compostos apresentam forte hidrofobicidade, baixa permeabilidade e rápido metabolismo, o que resulta em baixa biodisponibilidade oral e restringe sua aplicabilidade terapêutica, dificultando o avanço de pesquisas sobre sua eficácia. A associação com nanotecnologia, entretanto, tem se mostrado estratégia promissora para superar essas limitações (SHAHARYAR *et al.*, 2025; NISTOR, *et al.*, 2023).

Embora já existam avanços, o reservatório natural de triterpenos permanece vasto e pouco explorado, sobretudo em relação aos ésteres, cujo potencial bioquímico e farmacológico exige investigação mais aprofundada (THIMMAPPA *et al.*, 2014; LIU *et al.*, 2024). Além disso, há lacunas quanto à distribuição geográfica, caracterização morfoanatômica e marcadores moleculares necessários para a classificação taxonômica de diversos gêneros e espécies da Rubiaceae (MARTINS e NÚÑEZ, 2015). Nesse contexto, o gênero *Galianthe* Griseb. surge como uma alternativa promissora e pouco estudada em investigações químicas e farmacológicas, apontando para novas possibilidades de pesquisa.

2.1.3. Gênero *Galianthe* Griseb.

O gênero *Galianthe* Griseb. (Rubiaceae, Spermacoceae) é monofilético, formado por um grupo com aspectos morfológicos e moleculares bem definidos (FLORENTÍN ., 2022; SALAS ., 2020). Este gênero Neotropical é composto por 56 espécies, distribuídas em dois subgêneros: *Galianthe* subgen. *Ebelia*, que detém cerca de 26% das espécies, e *G.* subgen. *Galianthe*, que apresenta o maior número de espécies, com aproximadamente 74%, sendo exclusivamente sul-americanas, encontradas na Argentina, Bolívia, Brasil, Paraguai, Peru e Uruguai (Figura 4, pág. 20) (CABRAL, E.L., 2009).

Espécies de *Galianthe* também são encontradas no Centro-Oeste do Brasil. Delprete e Cortés-B (2007) em uma sinopse de Rubiaceae para Mato Grosso e Mato Grosso do Sul relatou a ocorrência de seis exemplares pertencente ao gênero em estudo: *G. brasiliensis*, *G. cristata*, *G. eupathorioides*, *G. fastigiata*, *G. pseudopetiolata* e *G. verbenoide*. Portanto, pode-se afirmar que se trata-se de um gênero relativamente pequeno, com 39 espécimes em território nacional, composto principalmente por herbáceas com principal centro de diversidade para o Centro-Oeste e Sudeste do Brasil (FLORENTÍN *et al.*, 2022; DELPRETE e CORTÉS-B, 2006; CABRAL, E.L., 2009). Na publicação de Florentín *et al.* (2022), os autores analisaram os dados de distribuição e endemismo de todas as espécies de *Galianthe* e pela primeira vez delimitaram o estado de conservação de 45 spp., revelando que há 12 áreas de endemismo na parte leste do Paraguai e sul do Brasil, bem como 23 espécimes em áreas brasileiras na listagem de plantas ameaçadas de extinção decorrente das ações humanas capazes de destruir áreas e afetar a vida nesses habitats. Diante do exposto alerta-se para o fato de que na América do Sul são comuns espécies únicas e raras, com risco de redução acelerada e extinção em resposta aos impactos em seus ecossistemas e para a necessidade de planos de ações que objetivam resguardar esse patrimônio global (FLORENTÍN ., 2022; ENQUIST ., 2019)

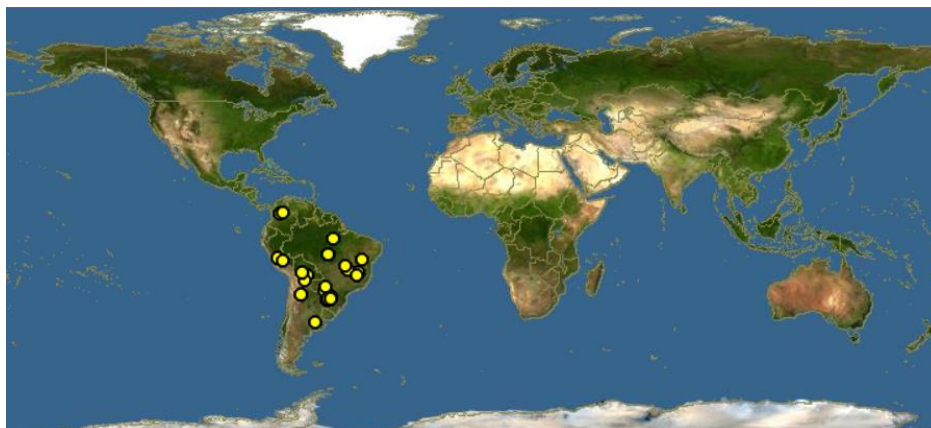


Figura 4 - Distribuição geográfica de espécies de *Galianthe*. Fonte: <https://www.discoverlife.org/mp/20m?kind=Galianthe+armente>

O gênero *Galianthe* é representado por subarbustos ou pequenos arbustos eretos, raramente trepadeiras ou rizomatosos decumbentes, com ou sem xilopódio (SALAS, 2023). Se caracteriza morfológicamente por inflorescências laxas, flores heterostiladas, estigma bífido, grãos de pólen com retículo duplo, frutos com uma semente, podendo ser encontrado em habitats de Campos Rupestres, Campos Baixos, Cerrado, em solos lateríticos, arenosos ou com afloramentos rochosos e em vegetação secundária perturbada (CABRAL, 2009). Essa disseminação por várias ambiências é favorecida pela presença de xilopódio, cujo armazenamento de água e sais minerais possibilita que suas plantas sobrevivam de forma isolada e resistam a incêndios e solos diversificados (CABRAL, E.L., 2009).

Pesquisas que exploram plantas pertencentes ao gênero são extremamente necessárias, haja visto que, dentre poucos acervos disponíveis para consultas sabe-se que espécies do gênero *Spermacoce* apresentam propriedades etnomedicinais, químicas e atividades biológicas que podem ser promissoras para a pesquisa científica. (CONSERVA e FERREIRA, 2012). Destaca-se a possibilidade de inserção de tais espécimes em projetos de arborizações e paisagismos, pois, assim como a poaia-do-campo (*G. brasiliensis*) que é uma planta ornamental, outras do gênero possuem beleza similar e podem ser cultivadas para tal finalidade agregando valores econômicos em um setor até então pouco explorado (LORENZI e SOUZA, 1999).

Levantamento bibliográfico demonstra a relevância etnomedicinal de ssp. de *Galianthe*, com ampla utilização medicinal para o tratamento de gripes, infecções, pneumonias, câncer, reumatismos, diarreias, úlceras gástricas, urticárias, dores de ouvido e dores abdominais (MENT *et al.*, 1997; FIGUEIREDO *et al.*, 2011). Bem como a utilização *G. brasiliensis* por

sua ação emética e o uso das raízes de *G. verbenoides* na forma de decocção para minimizar males provocados por moléstias venéreas e do aparelho urinário (MOURA *et al.*, 2006; MENTZ *et al.*, 1997).

Na Argentina, raízes em decocto de *G. centranthoides* são utilizadas na medicina popular como diurético, abortivo, purgativo, para icterícia e asma, enquanto no Brasil ela é aplicada para sanar males do fígado e urinários (MARTÍNEZ CROVETTO, 1981 *apud* CABRAL., E.L., 2009). As narrativas de uso tradicional inspiraram alguns pesquisadores a investigarem as relações fitofarmacológicas de algumas espécies de *Galianthe*, corroborando com informações seguras sobre o uso indiscriminado de tais plantas enquanto fontes promissoras na cura ou tratamento de doenças, a exemplo destaca-se *G. palustris*, herbácea estudada por Denardin (2018), que comprovaram atividade enzimática e potencial alelopático. O estudo químico realizado Moura e col. (2006) demonstrou que o extrato bruto metanólico de partes aéreas de *G. brasiliensis* apresentou potencial antiproliferativo em várias linhagens de células tumorais humanas. Esses resultados estão coerentes com a pesquisa desenvolvida por Figueiredo e colaboradores (2011), cuja investigação das raízes de *G. thalictroides* como promissora fonte de novos agentes antineoplásicos, comprovaram significativa ação citotóxica da fração CHCl₃ frente as três linhagens de células cancerígenas testadas (MOURA *et al.*, 2006; FIGUEIREDO *et al.*, 2011).

Considerando que atualmente extinguir a dengue continua sendo um desafio a ser vencido e que é uma doença que sobrecarrega todo o sistema de saúde pública, exige-se meios de combater sua disseminação e tratamento que sejam mais, acessíveis, baratos e eficientes. Apesar de não haver indicação popular para o gênero, o extrato do caule de espécies de *Galianthe* foi ativo contra DENV-2 e ZIKV, vírus responsáveis pela Dengue-tipo2 e a Zica Vírus, ampliando as possibilidades de estudos sobre suas atividades virucidas, bem como para diversas outras não relatadas na medicina tradicional ou mesmo na literatura (BARBOSA, 2019).

Neste contexto, destaca-se a importância biológica atribuída ao gênero advertindo-se para o fato de que poucos são registros relacionados a estudos químicos/biológicos para este grupo. Até o momento foram exploradas apenas *G. ramosa*, *G. brasiliensis* e *G. thalictroides*, das quais isolaram-se várias substâncias com propriedades químicas específicas que possibilitam interpretar e desmistificar as narrativas de uso medicinais descritas. Dentre os metabólitos especiais comprovados em *Galianthe* cita-se; ciclopeptídeos, alcaloides,

antraquinonas, cumarinas, álcool homovanílico, flavonoides, esteroides e iridóides glicosilados (FIGUEIREDO *et al.*, 2015, 2014; MOURA *et al.*, 2005, 2006).

O estudo de partes aéreas de *G. brasiliensis* resultou no isolamento de iridoides glicosilados, asperulosídeo (**G1**) e deacetilasperulosídeo (**G2**), a mistura de éster metílico 6-*O*-(*Z*-*p*-coumaroil)-escandosídeo (**G3**) e 6-*O*-(*E*-*p*-coumaroil)-escandosídeo (**G4**), o triterpeno ácido ursólico (**R30**) e os esteroides estigmasterol (**R13**), campesterol (**G5**), β -sitosterol (**R14**) e sitosterol 3-*O*- β -glicopiranosídeo (**G6**) (Figura 5, pág. 22). A comprovação de significativo potencial antiproliferativo para as linhagens tumorais humanas de melanoma (UACC62), mama (MCF7), pulmão (NCI460), leucemia (K562), ovário (OVCAR), próstata (PCO3), cólon (HT29), rim (786) e mama resistente (NCIADR), podem estar relacionadas a presença dos antitumorais ácido ursólico e asperulosídeo (MOURA *et al.*, 2006).

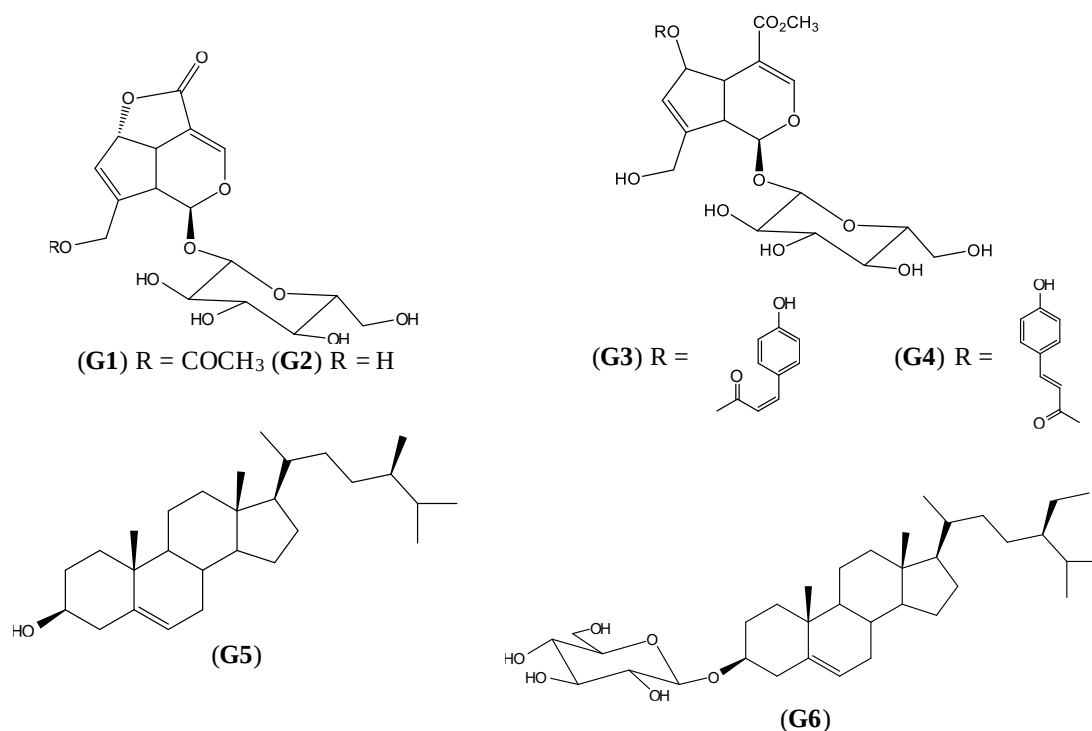


Figura 5 - Compostos isolados de *G. brasiliensis*.

Dois ciclos peptídeos (CPs) isolados do extrato em CHCl₃ das raízes de *G. thalictroides* são considerados bioativos de Rubiaceae, 6-*O*-metilbouvardina (**G7**) e o inédito 5 β -hidroxi-RA-III (**G8**) (Figura 6, pág. 23), ambos até o presente momento, exclusivos nos gêneros *Rubia* e *Bouvardia* (subfamília Rubioidea, tribos Rubieae e Spermacoceae) (BREMER e ERIKSSON, 2009). A respectiva fração e isolados apresentaram promissora atividade

citotóxica quando testados frente as linhagens celulares cancerígenas 786-0 (carcinoma renal), PC-3 (carcinoma da próstata) e HT-29 (carcinoma do cólon) (FIGUEIREDO *et al.*, 2015).

Outra classe representativa entre isolados nos gêneros são os alcaloides do tipo β -carbolínicos, moléculas que possuem um núcleo indol-monoterpenico com potencial atividade para o tratamento de câncer, malária e doenças infecciosas, sendo isolados em duas espécies de *Galianthe*: *Galianthe ramosa* e *G. thalictroides* (FRÉDÉRICH *et al.*, 2003; PHILIPPE *et al.*, 2006, 2007). Investigação envolvendo raízes de *G. thalictroides* realizadas por Figueiredo e col (2011 e 2014) proporcionou o isolamento de dois alcaloides inéditos para esta classe, sendo 1-metil-3-(2-hidroxiopropan-2-il)-2-(5-metoxi-9H- β -carbolin-1-il)-ciclopentanol (**G9**) e 1-(hidroximetil)-3-(2-hidroxiopropan-2-il)-2-(5-metoxi-9H- β -carbolin-1-il)-ciclopentanol (**G10**), ambos os alcaloides apresentaram atividade citotóxica contra três linhas de células de câncer humano (MCF-7, 786-0 e UACC62) que podem justificar seu poder como agente medicinal anticanceroso em consonância aos ditos populares. Sabe-se que um mecanismo de ação dessas substâncias pode ser a inibição de topoisomerasas do tipo I e II- α , comprometendo etapas da divisão celular e assim assegurando alta toxicidade (FIGUEIREDO *et al.*, 2014). O potencial citotóxico dos isolados foi menor em comparação a fração testada CHCl_3 , que pode ser atribuída a existência de efeitos sinérgicos ou a presença de metabólitos mais ativos como os ciclopeptídeos (FIGUEIREDO *et al.*, 2011, 2014; 2015).

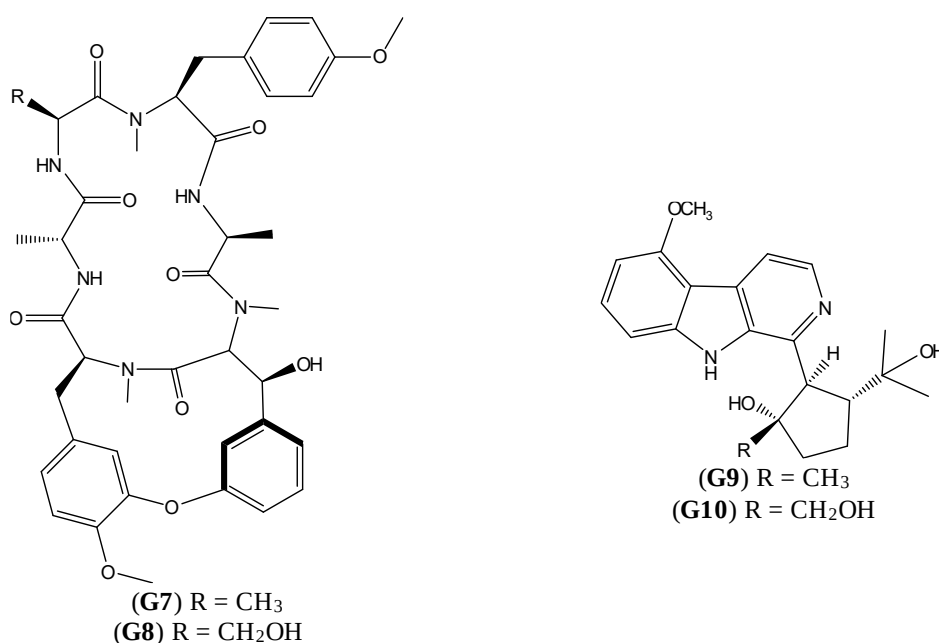


Figura 6 - Ciclos peptídeos (CPs) e alcaloides β -carbolínicos isolados de *Galianthe*.

Evidências de toxicidades altas para alcaloides indolmonoterpênicos em rubiácea alertam quanto ao uso indiscriminado de espécies do gênero pela população, cuja segurança de uso exige novos estudos farmacológicos sobre essa problemática; objetivando avaliar seus potenciais riscos à saúde humana. Neste sentido, a avaliação da atividade genotóxica/antigenotóxica pode fornecer relevantes respostas e interpretações, contudo para *Galianthe*, este tipo de pesquisa não é habitual. Um único estudo foi desenvolvido por Fernandes e col. (2013), cuja avaliação da genotoxicidade de extrato bruto etanólico, da fração CHCl₃ e dos alcaloides de raiz de *G. thalictroides* por meio do ensaio SMART (*Somatic Mutation and Recombination Test*) com células de asas de *Drosophila melanogaster*. Esse estudo revelou atividade mutagênica e recombinogênica para essa espécie vegetal e alcaloides isolados (FERNANDES *et al.*, 2013). Outros metabólitos são reportados para *G. thalictroides* como o alcaloide (rel)-[(1S, 2R, 5R)-1-(hidroximetil)-2-(1-hidróxi-1-metiletil)-5-(5-metóxi)-9H-β-carbolin-1-il)-ciclopentanol] (**G11**), a cumarina escopoletina (**G12**), o álcool homovanílico (**G13**), as antraquinonas 1-metilizarina (**G14**) e morindaparvina-A (**G15**), e os esteroides estigmast-4-en-3-ona (**G16**), estigmasta-4,22-dien-3-ona (**G17**), campest-4-en-3-ona (**G18**), estigmast-4-en-3,6-diona (**G19**), e 6-β-hidróxi-estigmast-4-en-3-ona (**G20**) (Figura 7, pág. 25) (FIGUEIREDO, 2014; GARCEZ *et al.*, 2016).

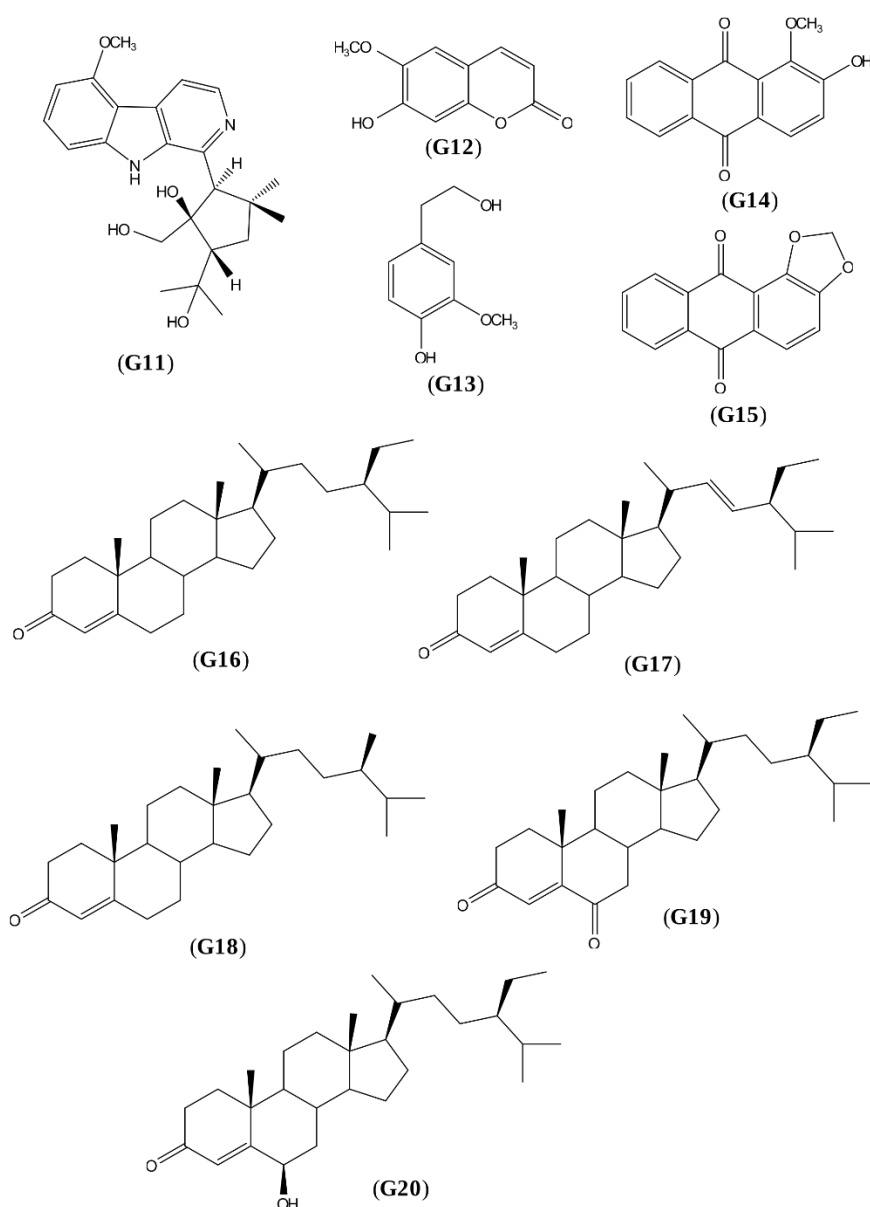


Figura 7 - Compostos isolados de *G. thalictroides*.

Foram descobertos alcaloides β -carbolínicos em *G. ramosa*, durante um estudo fitoquímico que investigou as raízes, folhas e flores da planta. Dois novos alcaloides com um esqueleto terpênico inédito foram isolados, porém ainda não receberam nomenclatura específica (G21) e (G22) (Figura 8, pág. 26). Um desses alcaloides, o 9-metoxiindol, apresentou uma notável capacidade de inibição da malato sintase do fungo patogênico *Paracoccidioides* spp. - o principal causador de paracoccidioidomicose (PCM), uma micose sistêmica que é uma das dez principais causas de morte por doenças infecciosas e parasitárias crônicas e recorrentes

no Brasil (FREITAS *et al.*, 2014). E ainda revela ocorrência de outros metabólitos como o flavonoide epi-catequina (**G23**) e o triterpeno ácido oleanólico (**T1**) (Figura 8, pág. 26) .

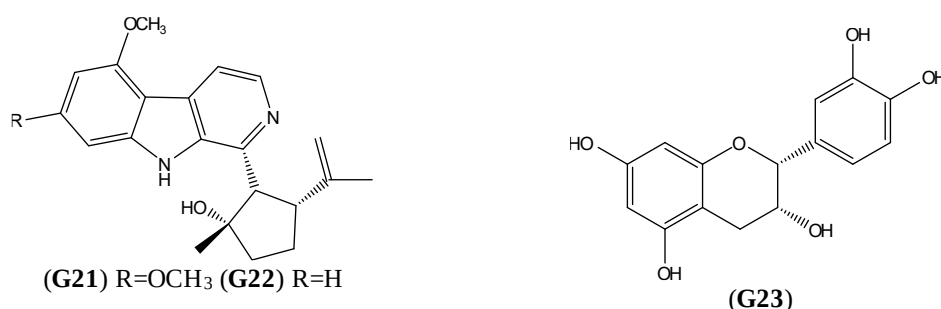


Figura 8 - Compostos isolados de *G. ramosa*.

O resgate das informações sobre a família Rubiaceae e o gênero *Galianthe* evidencia um desafio metodológico para estudos preliminares de desreplicação e metabolômica. Por um lado, o reduzido número de espécies descritas em *Galianthe* limita a disponibilidade de dados químicos, comprometendo o mapeamento comparativo do perfil metabólico em amostras vegetais. Por outro, estender essa triagem a toda a Rubiaceae torna-se excessivamente complexo em razão da grande diversidade de constituintes químicos já relatados, o que dificulta a interpretação simultânea de espectros de RMN e de espectrometria de massas. Nesse contexto, a fitoquímica do gênero, ainda pouco explorada, assume importância estratégica ao fornecer novas referências para avançar na aplicação dessas metodologias nas espécies do gênero.

Dada a relevância do gênero, este trabalho propõe-se a respaldar os relatos de uso popular e avanços quimiosistemáticos por meio da investigação fitoquímica de *Galianthe matogrossiana*. Não foram encontrados registros etnofarmacológicos ou estudos prévios de isolamento e avaliação de atividades biológicas dessa espécie, o que a torna uma fonte promissora na busca por novos compostos bioativos.

2.1.4. A espécie *Galianthe matogrossiana* E.L. Cabral; Informações e justificativa para o estudo fitoquímico.

A espécie *G. matogrossiana* é uma planta endêmica do Brasil com ocorrência restrita para o Centro-Oeste, habitando exclusivamente o cerrado de Mato Grosso. Vale ressaltar que,

até o presente momento, a flora do Brasil registra a espécie apenas para o estado de MS. Entretanto, as coordenadas geográficas disponíveis em exsicatas nos herbários virtuais referenciam o município de Chapada dos Guimarães, em Mato Grosso, o que não sugere indícios de ocorrência em Mato Grosso do Sul. Assim, os dados obtidos neste trabalho, em que a coleta foi realizada no estado de Mato Grosso, representam um novo registro de distribuição a ser atualizado, contribuindo para o conhecimento e estudos sobre o gênero *Galianthe*. A referida espécie floresce e frutifica no mês de abril (CABRAL, E.L., 2004; SALAS *et al.*, 2023).

A espécie caracteriza-se por subarbusto com xilopódio, podendo atingir 0,8-1 m de altura, constituída por 1-2 caules, subtetrágono, fistuloso, glabro com entrenós com 5-13 cm de comprimento. As folhas simples, opostas, com 5,5-9 X 0,1-2,6 cm, elítico-lanceoladas, face adaxial lustrosa e abaxial opaca, venação pregueada, eucamptódroma, com nervura-central proeminente, 4-5 pares de nervuras laterais subopostas evidentes, bainha estipular prolongada acima da separação do par de folhas, com lacínias central mais desenvolvida, com 6-7 cm de comprimento e 2(-4) laterais mais curtas, com 2-5 mm comprimento, estípulas multifidas prolongadas, interpeciolares, envolvendo o caule. Flores heterostiladas, com cálice tetrâmero, com 1-1,5 mm de comprimento, sépalas triangulares; corola branca, com 5-6 mm comprimento, urceoladas ou tubulosas. Frutos cápsulas, com 4-4,5 mm comprimento, bicarpelares, uma semente por carpelo. Sementes achatadas, elíticas, com 3-3,5 mm de comprimento (Figura 9, pág. 27) (CABRAL, E.L., 2004; SALAS *et al.*, 2023)

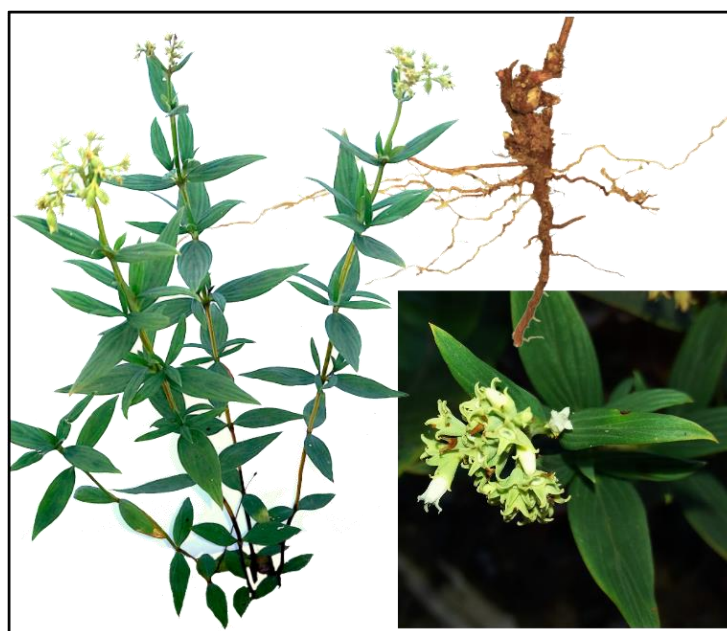


Figura 9 - Arbusto, raiz e ramo floríferos de *G. matogrossiana*. Fonte: Autoria própria.

Como revelado acima, há poucos estudos sobre a farmacologia, o isolamento e a determinação de metabólitos especiais de espécies de *Galianthe*. No caso específico de *Galianthe matogrossiana*, não consta relatos de uso popular ou pesquisas químicas sobre a planta. Florentín e col. (2022) investigaram o endemismo e as áreas de conservação desse gênero no Brasil, que detém 23 espécies endêmicas em uma população de 56 espécies neotropicais. O estudo destacou que *G. matogrossiana* é uma planta com poucas documentações científicas disponíveis, composto por apenas dois registros nos acervos botânicos, o que evidencia a necessidade de sua inclusão em planos de conservação (FLORENTÍN *et al.*, 2022).

Nesse contexto, propõe-se a realização de um estudo fitoquímico de frações de raízes e partes aéreas de *G. matogrossiana*, visando contribuir para o conhecimento científico sobre sua caracterização química e biológica e reforçar a importância de sua preservação como uma valiosa fonte de substâncias com potencial medicinal, uma vez que, como revelado acima, o gênero *Galianthe* é muito relevante nesse contexto.

2.2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1. Reagentes e equipamentos

O material vegetal foi moído em moinho de facas da marca Marconi, modelo MA 580/E. Para a separação das substâncias foram utilizadas colunas em vidro de vários tamanhos e diâmetros, empacotadas com gel de sílica 60 (70-230 mesh ou 230-400 flash), das marcas Macherey-Nagel e Carvalhaes, eluídas a pressão atmosférica. Também foram utilizados como adsorvente SephadexTM LH-20 da Sigma/Aldrich.

Para as análises cromatográficas em camada delgada preparativa (CCDP) foram preparadas placas de vidro 20 x 20 cm com uma suspensão de água destilada e 15 g de sílica gel 60 (9 g PF254 e 6 g G) ambas das marcas Vetec e Merck e 12 g de sílica gel 60 preparativa com PF254, da marca Macherey-Nagel. Após secagem em temperatura ambiente as placas foram ativadas por 2 horas a 100 °C em estufa. A recuperação da amostra aplicada foi feita com solventes orgânicos.

Nas análises comparativas das frações por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) foram utilizadas cromatoplasmas de alumínio 20x20 cm revestidas com sílica gel 60 F254 da Merck e Silicycle.

Os solventes utilizados para extração, fracionamento, purificação e reações foram de grau P.A das marcas Vetec, ACMA labs, Anidrol e Neon. As placas foram padronizadas em tamanho 5x7cm, com plotagem das amostras a 0,5cm da base.

As revelações das substâncias foram efetuadas mediante radiação UV no comprimento de onda 254 e 365 nm, bem como vanilina sulfúrica, anisaldeído sulfúrico, ninidrina, dragendorff e vapores de iodo.

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e de ^{13}C , incluindo os experimentos em 2D, foram obtidos em espectrômetros Bruker DRX-500 (500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C), utilizando o tetrametilsilano (TMS) como padrão interno. Os solventes deuterados utilizados foram clorofórmio (CDCl_3), metanol- d_4 (CD_3OD), piridina- d_5 e dimetilsulfóxido- d_6 das marcas *Cambridge Isotope Laboratories (CIL)*, Deutero e Merck. Os deslocamentos químicos (δ) são indicados em parte por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz). Equipamento pertencente à CAM/UFRRJ.

A análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foi realizada com a amostra (1 mg.mL^{-1}) em sistema Shimadzu LCMS-2020 Prominence, equipado com bomba LC-20AD, detector de arranjo de diodos (SPD-M20A), módulo de comunicação CBM-20A, forno de coluna CTO-20A e injetor automático SIL-10AF. Utilizou-se coluna Kromasil C18 ($150 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$), mantida a 40°C . A fase móvel utilizada foi água acidificada com 1% de ácido acético (solvente A) e acetonitrila (solvente B), com vazão constante de 1 mL/min , sendo o volume de amostra injetada de $15 \mu\text{L}$. O gradiente iniciou com 45% do solvente B, aumentando para 60% em 2 min, depois 85% em 5 min, 90% em 6 min, mantendo essa proporção por 2 min e retornando para 45% em 8 min, sendo mantido por mais 2 min. O espectrômetro de massas foi operado com fonte de ionização por eletrospray (ESI), em modo positivo, com gás de nebulização a $1,5 \text{ L/min}$, temperatura do duto de interface (DL) de 250°C , bloco de aquecimento a 200°C e tensão do detector (DV) de $1,25 \text{ kV}$. Os dados cromatográficos e espectrométricos foram adquiridos e processados pelo software LabSolutions (versão 4.30, Shimadzu).

Os espectros de massas de baixa resolução (EIMS) foram registrados em cromatógrafo gasoso (CG) acoplado a espectrômetro de massas com ionização por impacto de elétrons a 70 e.V, modelo Shimadzu GCMS-QP2010. Os dados foram adquiridos e processados pelo *software* LabSolution (versão 4.30, Shimadzu).

O espectro de massas de alta resolução foram obtidos mediante equipamento LC-QTOF/MS (LCAgilent 1290 Infinity II) configurado com espectrômetro de massa quadrupolo de tempo de voo (QTOF) da Agilent 6530 (Agilent, Santa Clara, CA, EUA). Os experimentos de MS foram realizados com fonte de ionização por elétron spray (ESI) e detecção de íons em modos negativo e positivo. Todas as operações, aquisição e análise de dados foram realizadas no *software* Mass-hunter acquisition versão 11.0.

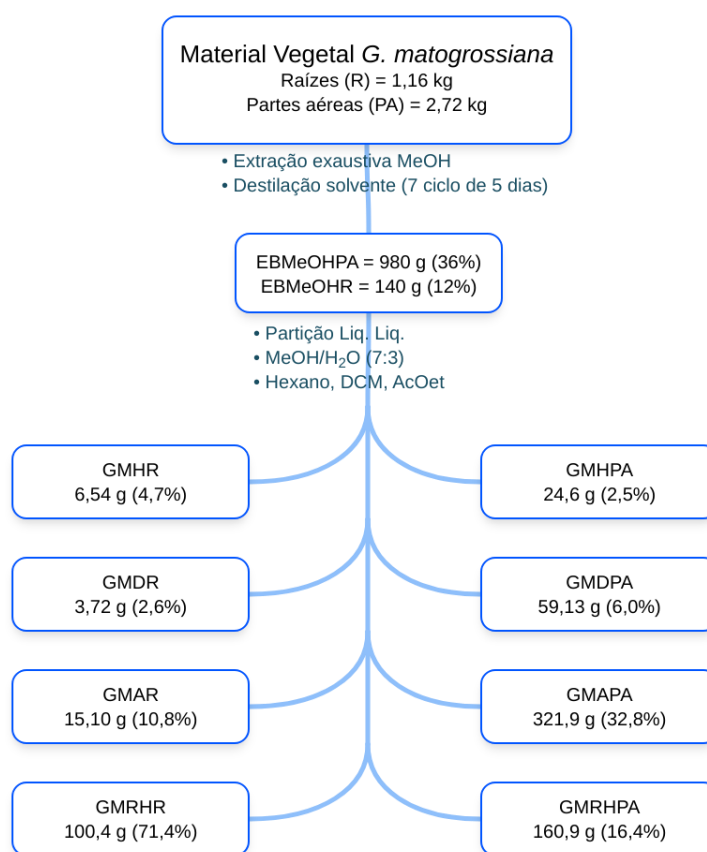
2.2.2. Material vegetal

As raízes (1,16 Kg) e partes aéreas (2,72 kg) de *Galianthe matogrossiana* foram coletadas em julho de 2021, no Mirante do Geodésico em Chapada dos Guimarães - MT (Coord. Geog.: 15°28'42.0"S e 55°41'05.4"W). A coleta foi realizada no início da estação seca do Cerrado, quando a planta se apresentava como um subarbusto de 0,3–0,5 m de altura, com ramos floríferos e flores brancas, em solo argilo-arenoso, vermelho-amarelo recoberto por gramíneas (capim-barba-de-bode) de folhas estreitas e alongadas, típicas de savanas abertas (Cerradão) da região, que aparentava servir de proteção para a espécie, frente ao clima seco. A identificação de *G. matogrossiana* foi realizada por Vali Joana Pott (Herbário CGMS - UFMS), confirmada pela especialista Elza L. Cabral (*Instituto Nacional de Botánica del Nordeste* [UNNE]-Argentina). Um espécime testemunho (n°79574) foi depositado no herbário CGMS da UFMS e registrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen, n°A129410).

2.2.2.1. Preparo do extrato bruto metanólico de raízes (EBMeOHR) e partes aéreas (EBMeOHPA) de *G. matogrossiana*

Ambas as partes da planta, após secagem e pulverização foram submetidas separadamente à extração a frio com metanol (5L raízes; 10L partes aéreas) por sete ciclos de

cinco dias. Os solventes das extrações foram filtrados e concentrados em evaporador rotatório a 40°C sob pressão reduzida até o esgotamento do material, resultando em 140 g do extrato bruto de raízes (EBMeOHR) e 980 g para as partes aéreas (EBMeOHPA). Uma alíquota de EBMeOHR (127,4 g) foi suspensa em 400 mL da mistura MeOH/H₂O (7:3) e submetido à partição líquido-líquido com os solventes hexano [(250 mL) x 3], CH₂Cl₂ [(250 mL) x 3] e AcOEt [(250 mL) x 3]]. Após esta extração, obtiveram-se as respectivas subfrações para as raízes: hexânica (GMHR; 6,54 g), diclorometano (GMDR; 3,72 g), acetato de etila (GMAR; 15,10 g) e o resíduo hidrometanólico (GMRHR; 100,40 g). Condições semelhantes foram mantidas para o particionamento do EBMeOHPA (570,0 g), obtendo-se as subfrações GMHPA (24,60 g); GMDPA (59,13 g), GMAPA (321,9 g) e o resíduo GMRHPA (160,9 g). As etapas de preparo do extrato bruto e das subfrações das raízes e partes aéreas da espécie em estudo seguem descrita no Esquema 3 (pág. 31).

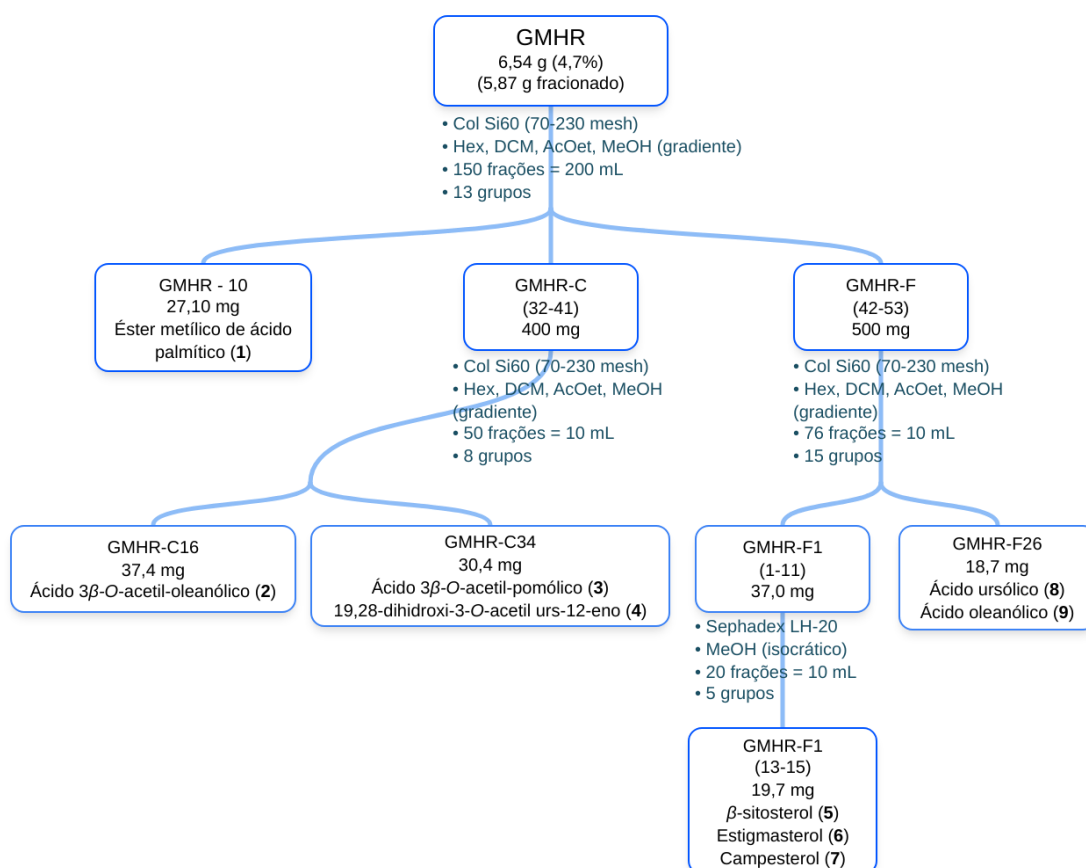


Esquema 3 - Fracionamento do extrato metanólico de raízes e partes aéreas de *G. matogrossiana*.

2.2.2.2. *Estudo Fitoquímico de GMHR (Subfração hexânica de raízes)*

A fração GMHR (5,87g) foi submetida á fracionamento em coluna cromatográfica clássica (CC) utilizando sílica gel 60 (mesh) e eluída com sistema de polaridade gradiente de solventes: hexano, diclorometano, acetato de etila, e metanol 100%. Após análise por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA), as 150 frações obtidas de 200mL foram agrupadas de acordo com sua similaridade de R_f, resultando em 13 grupos (GMHR-A a GMHR-M). Destas, a fração 10 (GMHR-10, 27,10 mg) apresentou-se mais pura que as demais, conforme perfil definido em CCDA, e não foi agrupada. Trata-se de um precipitado oleoso amarelo, solúvel em diclorometano e clorofórmio, o qual foi encaminhado para análises espectroscópicas (RMN de ¹H e ¹³C) e espectrometria de massas (MS), cuja análise condiziu à identificação do composto **1**.

O grupo GMHR-C (32-41; 400,0 mg) foi submetido a novo fracionamento sob as mesmas condições cromatográficas mencionadas anteriormente, resultando em 50 frações de aproximadamente 10 mL, analisadas por CCDA (Esquema 4, pág. 33). Destas, as frações 16 (GMHR-C16; 37,4 mg) e 34 (GMHR-C34; 30,40 mg) apresentaram-se mais puras que as demais, portanto não foram agrupadas. As demais frações resultaram em 8 grupos, de acordo com a CCDA. Os precipitados amorfos brancos, GMHR-C16(**2**) e GMHR-C34(**3** e **4**), solúveis em diclorometano e clorofórmio foram encaminhados para análise espectroscópica de RMN de ¹H e ¹³C. A análise desses espectros e comparação com dados da literatura, conduziram à identificação da substância **2** e da mistura de **3** e **4**. Procedimentos adicionais foram realizados no grupo de frações GMHR-F (42-53; 500 mg) (Esquema 4) por cromatografia em coluna de sílica gel, o que resultou em dois conjuntos de frações promissoras. O primeiro, reunindo as frações 1-11 (GMHR-F1, 37 mg), foi eluído com MeOH em coluna de Sephadex LH-20, originando 19,7 mg de precipitado branco amorfo (GMHR-F1 (13-15)). O segundo, correspondente à GMHR-F 26, rendeu 18,7 mg de precipitado. Ambas as subfrações foram analisadas por RMN de ¹H e ¹³C uni e bidimensionais e identificadas como a mistura dos esteroides **5** + **6** + **7** (GMHR-F1 (13-15; 19,7 mg) e a mistura de triterpenos **8** + **9** (GMHR-F 26; 18,7 mg), respectivamente. Estruturas apresentadas na Figura 10, página 40.



Esquema 4 - Processamento da fração GMHR.

2.2.2.3. Estudo Fitoquímico de GMDR (Subfração diclorometano de raízes)

Inicialmente, o fracionamento cromatográfico da subfração GMDR (3,3 g) foi realizado por cromatografia em coluna aberta, utilizando sílica gel (70–230 mesh), eluída com solventes em ordem crescente de polaridade: hexano, CH₂Cl₂, AcOEt e MeOH 100% (Esquema 5, pág. 35). Foram coletadas 54 frações de 250 mL, que, após monitoramento por cromatografia em camada fina, foram agrupadas em sete subfrações (GMDR-A a GMDR-G). Dentre estas, três subfrações promissoras foram selecionadas para purificação: GMDR-C (16-23; 930,0 mg), GMDR-D (24-26; 251,9 mg) e GMDR-E (27-42; 1677,0 mg).

A fração GMDR-C foi submetida à cromatografia em gel Sephadex LH-20, eluída com metanol (100%), fornecendo GMDR-C2 (3-8; 153,8 mg). Em seguida, GMDR-C2 foi fracionada por cromatografia em coluna com gel de sílica (70–230 mesh), utilizando um sistema de solvente gradiente CH₂Cl₂/MeOH, resultando na obtenção de 21 frações de 15 mL. Após

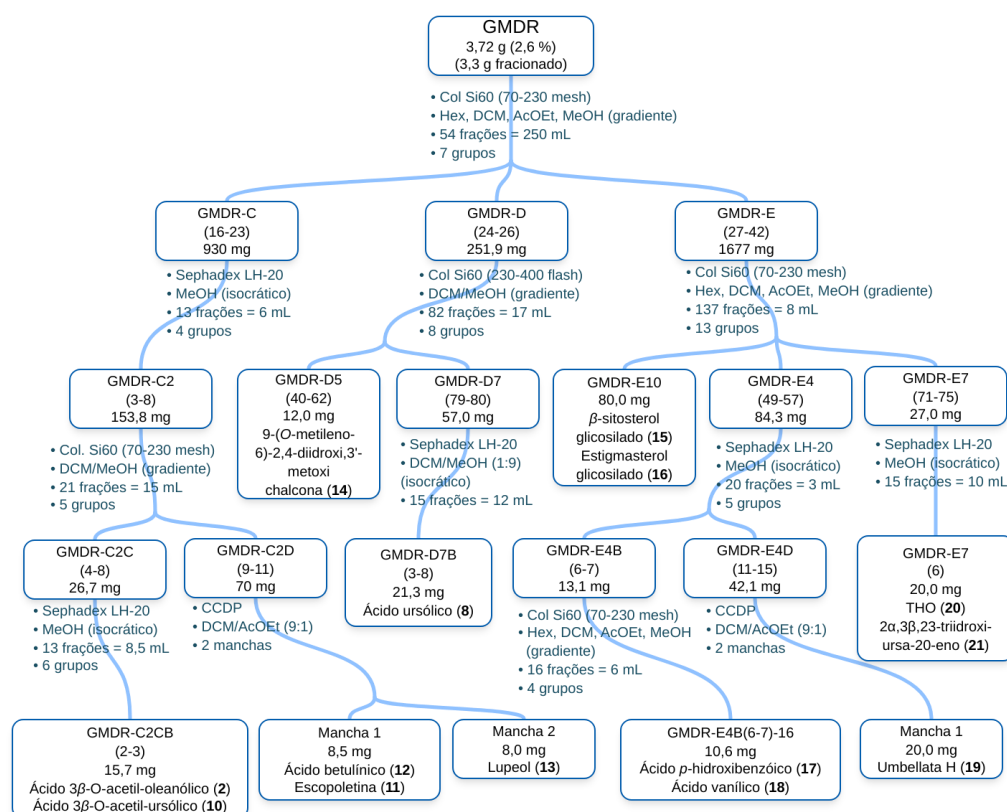
monitoramento por CCDA, cinco grupos foram formados, sendo GMDR-C2C (4-8; 26,7mg) submetida a uma purificação adicional em gel Sephadex LH-20, eluída em modo isocrático com MeOH. Esse processo resultou em 13 frações de 8,5 mL, das quais, após análise por CCDA obteve-se um precipitado branco amorfo da fração GMDR-C2CB(2-3; 15,7 mg), solúvel em clorofórmio, constituído por uma mistura dos triterpenos **2** e **10**. GMDR-C2D (9-11; 70 mg) foi purificada por cromatografia em camada delgada preparativa em gel de sílica, eluída em modo isocrático com CH₂Cl₂/AcOet (9:1), gerando duas manchas. A mancha 1 (8,5 mg), quando visualizada sob luz ultravioleta (365 nm) apresentou fluorescência azul intensa, característico da cumarina **11**, em mistura com o triterpeno **12**. Já a mancha 2 (8,0 mg), formou um precipitado branco amorfo, que foi identificado como sendo o composto **13**. Estruturas apresentadas na Figura 10, página 40.

A purificação de GMDR-D ocorreu mediante fracionamento em coluna aberta, utilizando sílica gel 60 (230-400, flash), eluída com CH₂Cl₂/MeOH em gradiente de polaridade de 0,5:95,0 até MeOH 100%. Foram coletadas 82 frações de aproximadamente 17 mL. A análise em CCDA permitiu o agrupamento das frações, com base na similaridade dos perfis cromatográficos, em oito grupos denominados GMDR-D1 a GMDR-D8. O grupo GMDR-D5 (40-62, 12,0 mg) apresentou-se como um precipitado amorfo de coloração amarela, com fluorescência quando solubilizado em solventes orgânicos, como o clorofórmio, no qual é solúvel, sendo identificado como o composto **14**. As frações 79-80 (GMDR-D7, 57 mg), foram submetidas a uma nova cromatografia em Sephadex LH-20, eluída em sistema isocrático CH₂Cl₂/MeOH (1:9), culminando em 15 frações de aproximadamente 12 ml cada. Destacou-se a precipitação de um sólido branco amorfo nas frações 3-8 (GMDR-D7B, 21,3 mg), que revelaram resultado positivo para triterpenos no reagente de anisaldeído e foram caracterizadas como o composto puro **8**, anteriormente isolado em mistura na fração hexânica.

Realizou-se o fracionamento de GMDR-E sob as mesmas condições de eluição e fase estacionária descritas para GMDR, obtendo-se 137 frações de 8mL. A fração 10 (GMDR-E10; 80,0 mg) apresentou-se como um precipitado branco amorfo, solúvel em piridina, correspondente à mistura dos esteroides glicosilados **15** e **16**. Após análise por CCDA, as demais frações foram agrupadas em 12 grupos, sendo GMDR-E4 (49-57; 84,3 mg) e GMDR-E7 (71-75; 27,0 mg) selecionadas para prosseguir com o fracionamento. O grupo GMDR-E4 foi submetido à filtração em Sephadex LH-20, eluída em modo isocrático com MeOH, obtendo-se 20 frações de 3 mL, posteriormente agrupadas em (GMDR-E4A a GMDR-E4E). Dentre essas, GMDR-E4B (6-7; 13,1 mg) e GMDR-E4D (11-15; 42,1 mg) apresentaram, em CCDA,

perfis promissores para purificação. A purificação de GMDR-E4B foi realizada por cromatografia em coluna com sílica gel (70–230 mesh), utilizando um sistema de eluição em gradiente de polaridade iniciando com Hexano e finalizando com MeOH. Essa purificação resultou em 16 frações de 6 mL, das quais GMD-E4B(6-7)-16 (10,6 mg) se apresentou como um precipitado amorfo marrom, identificado como uma mistura dos derivados do ácido benzoico **17** e **18**. Já A fração GMDR-E4D foi purificada por CCDP, eluída em modo isocrático com CH₂Cl₂/AcOEt (9:1). A mancha majoritária, visualizada sob UV 254 nm, foi extraída com MeOH, resultando em um precipitado vermelho-tijolo, que foi identificado como a substância **19** (20,0 mg).

GMDR-E7 foi cromatografada em uma coluna com Sephadex LH-20, eluída em modo isocrático com MeOH, resultando em 15 frações de 10 mL. Dentre essas, a fração 6 (GMDR-E7-6; 20 mg) apresentou-se como um precipitado sólido marrom, solúvel em MeOH, sendo caracterizado como a mistura dos triterpenos **20** e **21**. Figura 10, página 40.



Esquema 5 - Processamento da fração GMDR.

2.2.2.4. *Estudo Fitoquímico das Subfrações das partes aéreas*

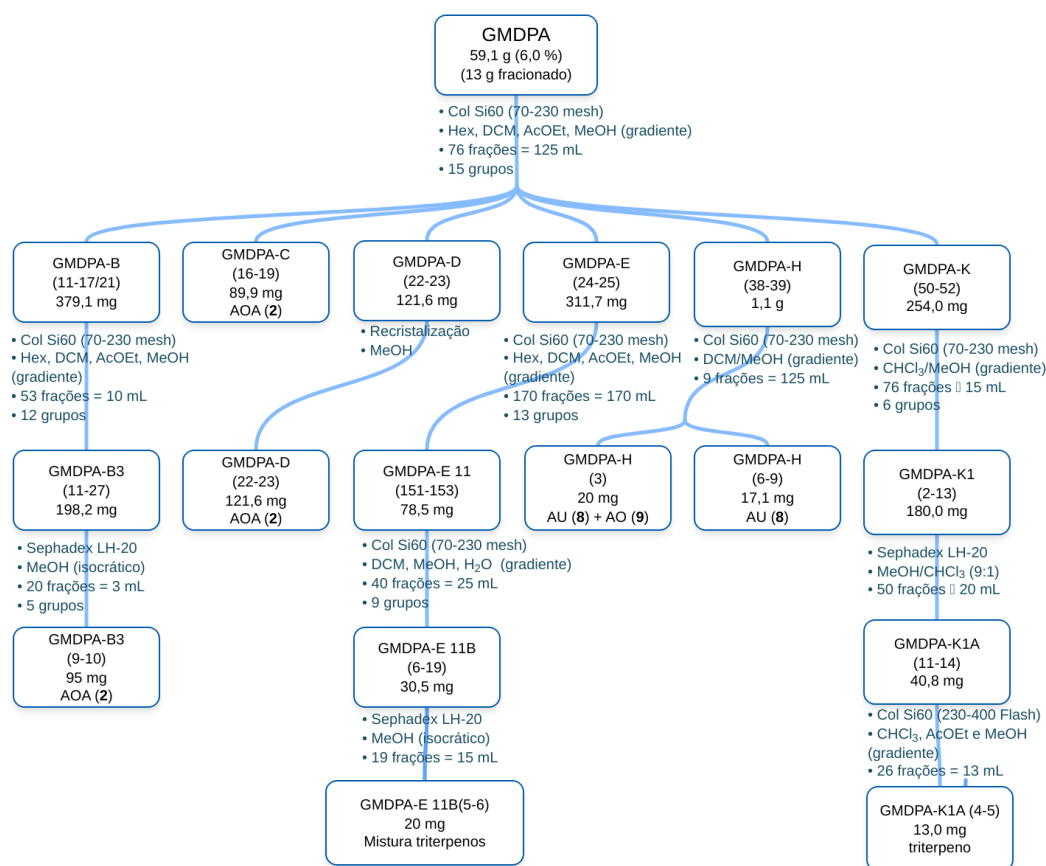
Uma porção da fração GMDPA (13,0 g) foi submetida a fracionamento por cromatográfica em coluna clássica, eluída com solventes em modo gradiente de polaridade: hexano, diclorometano, acetato de etila até metanol (Esquema 6, pág. 38). Assim, foram obtidas 76 frações de aproximadamente 125 mL, que, após análise em CCDA e comparação dos valores de R_f , foram agrupadas em 15 grupos (GMDPA-A a GMDPA-O). A coloração amarelada e a análise do perfil químico por CCDA com revelador de anisaldeído demonstraram que as frações 11, 15, 17 e 21 necessitavam de purificação, uma vez que apresentaram reação positiva para triterpenos e perfil químico semelhante, porém com indícios de impurezas. Essas frações foram agrupadas, originando o grupo GMDPA-B (11-17/21-379,1 mg). A purificação foi realizada por CC empacotada com sílica gel 60 (70-230 mesh), eluída em modo gradiente com hexano, CH_2Cl_2 , AcOEt e metanol 100% (Esquema 6, pág. 38). Retirou-se 53 frações de aproximadamente 10 mL, posteriormente reunidas em 12 grupos. Dentre estes, o grupo GMDPA-B3 (11-27, 198,2 mg) foi recromatografado em Sephadex LH-20, eluída com MeOH, resultando em 20 frações de 3mL. Desta, as frações 9-10 (95,0 mg), apresentaram um sólido branco amorfo, designado como a substância 2. Esta substância já havia sido identificada anteriormente na fração hexânica das raízes, mas, neste caso, se mostrou como um composto majoritário nas partes aéreas, permitindo sua obtenção em maior quantidade. O mesmo precipitado foi evidenciado nas frações 16, 18, e 19, as quais foram reunidas no grupo GMDPA-C (16-19, 89,9 mg), e também obtido por recristalização do GMDPA-D (22-23, 121,6 mg) em metanol.

As amostras promissoras selecionadas para prosseguir nas etapas de purificação foram os grupos GMDPA-E (24-25; 311,7 mg), GMDPA-H (38-39; 1,1 g) e GMDPA-K (50-52; 254,0 mg). As frações 24/25 (GMDPA-E) foram submetidas ao fracionamento em CC, utilizando gel de sílica 60 (70-230, mesh), como fase estacionária, e eluição em gradiente de polaridade com solventes desde hexano até MeOH 100%. Foram coletadas 170 frações de 150 mL, das quais as frações 151-153 (GMDPA-E11,78,5 mg) apresentaram um precipitado. Esse material foi filtrado em uma CC com sílica gel (mesh), eluída em gradiente de polaridade com $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$, resultando em 40 frações de aproximadamente 25 mL, posteriormente reunidas em 9 grupos. Desse fracionamento, precipitados amorfos de coloração laranja presente nas frações 6-19 (GMDPA-E11B, 30,5 mg), impuros conforme perfil observado em CCDA, foram eluídos com MeOH em Sephadex LH-20, retirando-se 19 frações de cerca de 15 mL. As

frações geradas nesta etapa foram analisadas por CCDA e, após a reunião das frações 5-6, obteve-se um sólido amorfo branco (20,0 mg). A amostra foi submetida à análise de RMN ^1H e ^{13}C unidimensional e bidimensional permitindo propor uma mistura de três triterpenos, sendo dois deles identificados como um núcleo semelhante aos ácidos ursólico e oleanólico, diferenciando-se pela presença de um carbono carbinólico em C-10. O terceiro triterpeno, do tipo oleanano, apresenta-se estruturalmente distinto pela presença de uma dupla ligação entre C-11 e C-12, um grupo éster entre C-8 e C-13, um grupo metila em C-28 e um substituinte carbinólico em C-10. A estrutura proposta para essa molécula encontra-se em Anexo 1, mas não foi discutida nesta tese devido à necessidade de dados complementares de espectrometria de massas para sua confirmação.

GMDPA-H foi fracionado em coluna de sílica gel (70-230 mesh), empregando- CH_2Cl_2 e MeOH em ordem crescente de polaridade, obtendo-se 9 frascos de 125 mL. As frações 3 e 6-9, apresentaram precipitados branco amorfos, e diferentes perfis químico em CCDA, foram encaminhadas para análises espectroscópicas de RMN ^1H e ^{13}C . Os resultados indicaram o isolamento dos compostos: na fração 3, uma mistura de **8** e **9** (20,0 mg), e nas frações 6-9, o composto **8** puro (17,1 mg). Um novo fracionamento, conduzido sob condições semelhantes, resultou na obtenção de mais um grupo desse composto puro, correspondente às frações 12-15 (16,0 mg).

O resíduo do grupo GMDPA-K foi submetido à CC com sílica gel (70-230 mesh), eluída com CHCl_3 :MeOH em polaridade crescente, obtendo-se 76 frações de 15 mL cada. As frações foram analisadas por CCDA e reunidas com base na similaridade de perfis químicos em 6 grupos (GMDPA-K1 a GMDPA-K6). As frações do grupo GMDPA-K1 (2-13, 180 mg) continham um precipitado que, com base na informação de CCDA, apresentou-se impuro. Esse grupo foi recromatografado em Sephadex LH-20, eluído em modo isocrático com MeOH: CHCl_3 (9:1), obtendo-se 50 frações de 20 mL. Dentre as frações coletadas, as frações 11-14 (GMDPA-K1A, 40,8 mg) foram submetidas a nova purificação em coluna preenchida com sílica gel 60 (flash), utilizando eluição em gradiente de polaridade com CHCl_3 , AcOEt e MeOH, resultando na obtenção de 26 frações de 13 mL. A análise em CCDA dessas frações, indicou que as frações 4-5 (13,0 mg) estavam puras e, após identificação estrutural por RMN, foi designada como um triterpeno do tipo ursano, diferenciado dos compostos anteriormente relatados neste trabalho pela presença de uma hidroxila na posição C11. No entanto, a confirmação estrutural completa depende de dados adicionais de espectrometria de massas, motivo pelo qual a proposta estrutural segue apenas citada no anexo 1.



Esquema 6 - Processamento da fração GMDPA.

2.2.2.5. Estudo Fitoquímico das Amostras polares das Raízes e Partes Aéreas

O fracionamento cromatográfico de GMAR (subfração acetato de etila das raízes) foi iniciado, entretanto, a alta polaridade do material e baixo rendimento das frações coletadas dificultaram a continuidade do estudo. A possibilidade de realizar procedimentos adicionais de purificação, como o uso de instrumentação analítica, por exemplo, cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa (CLAE/MS), para caracterização ou isolamento de compostos puros dessa fração, foi inviabilizada por limitações operacionais da estrutura analítica. O mesmo ocorreu com as amostras GMRHR (resíduo hidroalcólico das raízes) e GMAPA e GMRHPA (subfração acetato de etila e resíduo hidroalcólico das partes aéreas).

2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1. Elucidação estrutural dos compostos isolados de *Galianthe matogrossiana*

O fracionamento dos extratos obtidos com solventes orgânicos das raízes e partes aéreas de *Galianthe matogrossiana* resultou na identificação de 21 substâncias, como um ácido graxo, uma antraquinona, um derivado de chalcona, uma cumarina, dois derivados do ácido benzoico, cinco esteroides, dez triterpenos elucidados e, no mínimo, outros três triterpenos que não foram descritos neste trabalho por depender de análise complementar por espectrometria de massas (Figura 10, página 40).

Com exceção do campesterol (7), cuja estrutura não foi plenamente elucidada por RMN em razão da semelhança do núcleo esteroidal com o de outros esteroides presentes na mistura, o que dificultou a diferenciação a partir dos dados disponíveis na literatura, a determinação estrutural dos demais compostos foi validada por análise de RMN, com comparação aos dados descritos na literatura para os compostos conhecidos. Em alguns casos utilizaram-se apenas técnicas unidimensionais; em outros, incluíram-se análise de RMN bidimensionais, cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) e espectrometria de massas com sistema de cromatografia líquida acoplada a analisador quadrupolo-tempo de voo (LC-QTOF-MS), em modos positivo e/ou negativo. Em alguns casos utilizou-se cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (HPLC/MS), para confirmação estrutural e identificação dos metabólitos. Entre as substâncias isoladas, ressaltam-se os triterpenos, principalmente das séries ursano e oleanano, com menor ocorrência de lupanos. Esses compostos apresentam um esqueleto pentacíclico com grupos hidrofóbicos que lhes confere elevada lipossolubilidade, aspecto relevante do ponto de vista farmacocinético e bioativo. Além dessa característica, exibem valiosos atributos espectroscópicos a serem discutidos para a elucidação estrutural. Como será discutido a seguir.

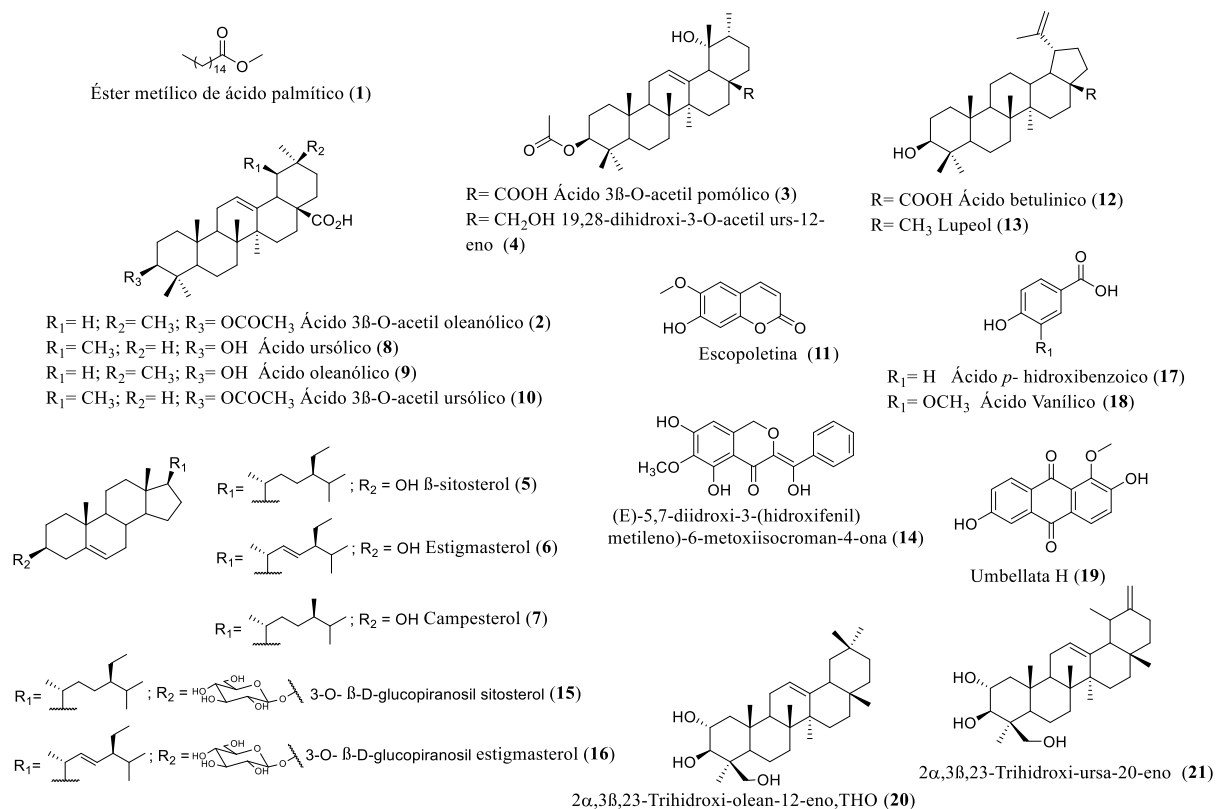


Figura 10 - Compostos isolados das raízes e partes aéreas de *G. matogrossiana*.

Embora a elucidação estrutural dos triterpenos isolados neste estudo tenha sido realizada mediante dados obtidos via as técnicas espectroscópicas e espectrométricas citadas anteriormente, a ressonância magnética nuclear (RMN), especialmente de ^{13}C , demonstrou-se particularmente informativa na diferenciação entre as séries ursano e oleanano, amplamente representadas neste estudo. Ambas compartilham um núcleo triterpênico pentacíclico com características estruturais comuns (Figura 11, pag. 41), como a presença de uma dupla ligação entre C-12 e C-13 e um hidrogênio metínico (H-18) próximo ao carbono C-19. Além disso, revela acúmulo de sinais intensos de metilas com deslocamentos químicos em campo alto (entre δ_H 1,8 e 0,7), característicos de hidrogênios metílicos, bem como outros sinais de menor intensidade de hidrogênios metilênicos e metínicos que compõem esses núcleos triterpênicos.

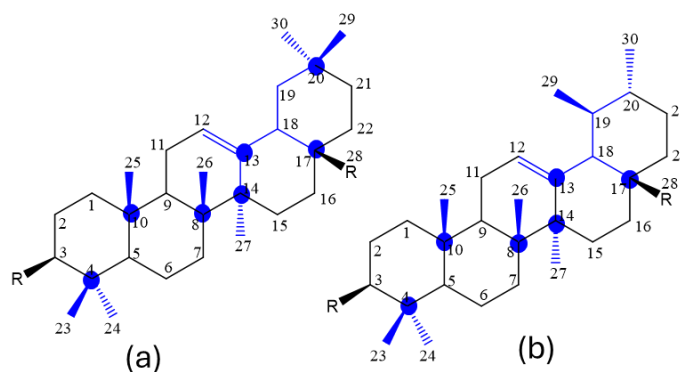


Figura 11- Estruturas representativas de triterpenos das séries oleananos (a) e ursano (b), com destaque em azul para os principais pontos estruturais utilizados na elucidação por RMN.

As distinções estruturais mais relevantes entre essas subclasses são evidentes nos espectros de RMN de carbono-13. Nos triterpenos do tipo oleanano, observam-se sete carbonos não hidrogenados, enquanto nos ursanos esse número reduz para seis, diferença associada à posição relativa das metilas em C-19 e C-20. Nos oleananos, a disposição germinal dessas metilas em C-20 influencia a multiplicidade do H-18, resultando em um sinal do tipo duplo duplete. Já nos ursanos, as metilas vicinais em C-19 e C-20 geram um padrão de duplete para o mesmo hidrogênio. Ainda, os deslocamentos químicos de C-12 e C-13 também fornecem fundamentos importantes para a diferenciação entre as séries. Nos triterpenos ursanos, observa-se valor de deslocamento químico em campo mais baixo para C-12 (cerca de δ 125 ppm, diferença de aproximadamente 2 ppm) e em campo mais alto para C-13 (cerca de δ 140 ppm, até 5 ppm) quando comparados aos oleananos. Esse efeito é atribuído à proximidade espacial da metila em C-19 com a ligação dupla, gerando um efeito de proteção γ sobre C-13 e desproteção δ sobre C-12, efeito ausente nos oleananos, cuja disposição das metilas não favorece tal interação (DODDRELL *et al.*, 1974; MAHATO e KUNDU, 1994; MAHATO e SEN, 1997).

Um outro ponto chave para essa distinção é constatada nos valores de deslocamentos químicos de C-18, que sofre variação decorrentes da orientação espacial das metilas vizinhas. Nos triterpenos ursanos, a metila equatorial em C-19, exerce efeito de desproteção β sobre C-18, resultando em sinal em δ_c 52,8. Enquanto nos oleananos, a metila axial em C-20 confere efeito protetor por meio de interação γ gauche, fazendo com que o sinal de C-18 apareça em δ_c 41,3, uma diferença de aproximadamente 11,5 ppm entre as subclasses.

Assim, ainda que auxiliada por outras técnicas, o RMN de ^{13}C mostrou-se determinante na elucidação estrutural dos triterpenos, incluindo os tipos ursanos e oleananos. A seguir, apresentam-se discussões mais específicas com detalhes relevantes para a identificação das substâncias isoladas através desse trabalho.

2.3.1.1. *Elucidação estrutural dos triterpenos isolado do tipo ursanos e oleananos relatados na literatura: 2*

A amostra GMHR-C16(2; 37,4 mg), um precipitado amorfo branco, foi analisada com RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) e ^{13}C (125 MHz, DEPTQ, CDCl_3), permitindo a identificação de um triterpeno pentacíclico acetilado pertencente à classe dos oleananos (Tabelas 1 e 2). A partir da análise do espectro de RMN de ^{13}C (Figura 12, pág. 43 e Tabela 1, pág. 46), notou-se oito sinais de carbono metílico entre 15,00 e 33,1 ppm., além de nove sinais de carbonos não hidrogenados, sendo sete referente ao núcleo comum dos oleananos e dois adicionais, atribuídos a novos substituintes. Destaca-se o sinal em δ_{C} 80,93 atribuído ao carbono oximetínico (C-3), mais desblindado em relação ao que seria esperado para um carbono carbinólico nessa posição, o que se justifica pela proximidade do grupo acetil, retirador de densidade eletrônica, confirmando a acetilação do triterpeno. Observaram-se sinais em 122,73 e 143,59 ppm correspondentes aos carbonos sp^2 , C-12 e C-13, respectivamente. Esses valores são compatíveis com o esqueleto oleanano e refletem a ausência de metila em C-19, o que impede os efeitos de proteção γ sobre C-13 e de desproteção δ sobre C-12, observados na série ursano. Dessa forma, os deslocamentos para C-12 e C-13 reforçam a classificação do composto como um triterpeno oleanano.

Além disso, foram identificados sinais correspondentes a uma carboxila de ácido em δ_{C} 182,90 (C-28 do núcleo pentacíclico), e uma carboxila de éster em δ_{C} 171,03 (C-1'), atribuída ao substituinte acetil ligado a C-3, justificando a presença de dois carbonos não hidrogenados adicionais no oleananos. O sinal do carbono metínico C-18, em 41,00 ppm, é crucial para a confirmação do esqueleto oleanano, pois é justificado pelo efeito de proteção exercido pela metila axial em C-20 sobre esse carbono (interação γ gauche). Esse dado, aliado à existência da multiplicidade (*dd*) para o H-18 no espectro de RMN ^1H , reforça a atribuição à série oleananos para o composto 2 (Figura 13, pág.44, Tabela 2, pág. 46).

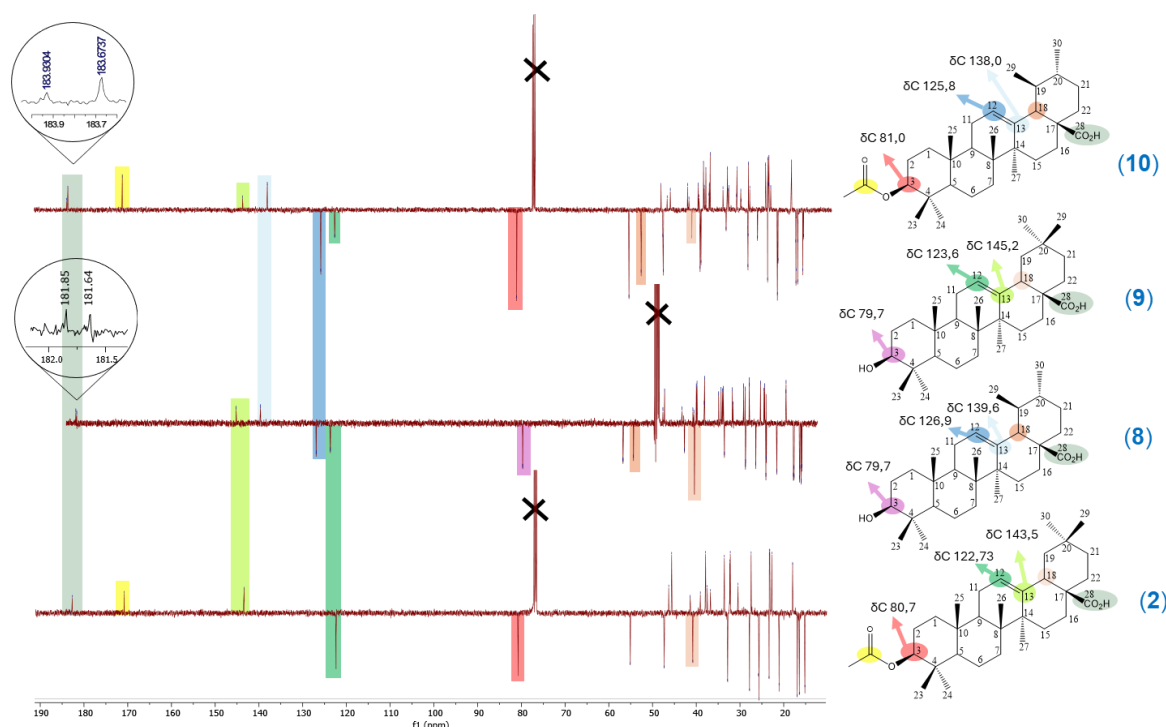


Figura 12 - Comparação dos espectros de ^{13}C (DEPT-Q, 125 MHz) dos compostos **2**, **8**, **9** e **10**.

Pela análise do espectro de RMN ^1H (Figura 13, pág.44 e Tabela 2, pág.46), observou-se a existência de um tripleto $\delta_{\text{H}} 5,29$ (1H, *t*, *J* 3,9 Hz), atribuído ao hidrogênio olefínico H-12. Além disso, foram observados sete simpletos intensos entre 0,76 e 1,14 ppm, atribuídos aos hidrogênios metílicos, dando características ao esqueleto triterpênico pentacíclico. O espectro apresentou um sinal em $\delta_{\text{H}} 4,51$ (1H, *t*, *J* 6,3 Hz), referente ao hidrogênio do carbono oximetínico atribuído ao H-3. Esse valor de deslocamento químico justifica tratar-se de um derivado acetilado estando mais desblindado do que o esperado para oleananos com uma hidroxila nessa posição. Os valores da constante de acoplamento de 6,5 sugerem a configuração desse hidrogênio como axial, confirmando a acetilação do triterpeno na posição 3 β . Essa observação é reforçada pela existência de um simpleto em $\delta_{\text{H}} 2,06$, com integração para três hidrogênios, mais desprotegido do que os demais hidrogênios metílicos, comprovando a presença do grupo acetila. Em $\delta_{\text{H}} 2,83$ (1H, *dd*, *J* 14,2 e 5,0 Hz), observou-se o sinal referente ao hidrogênio metínico H-18, apresentando-se como um duplo duplo, característico do esqueleto oleanano, devido à presença de dois hidrogênios vizinhos no C-19, que sentem de forma diferente o efeito anisotrópico, alterando a multiplicidade do sinal. Outros espectros dessas amostras foram obtidos mas, apesar de serem úteis nas conclusões, não estão apresentados nessa tese, uma vez que são substâncias conhecidas na literatura. Dados apresentados nas Tabela 1 e Tabela 2, pág.45 e 46.

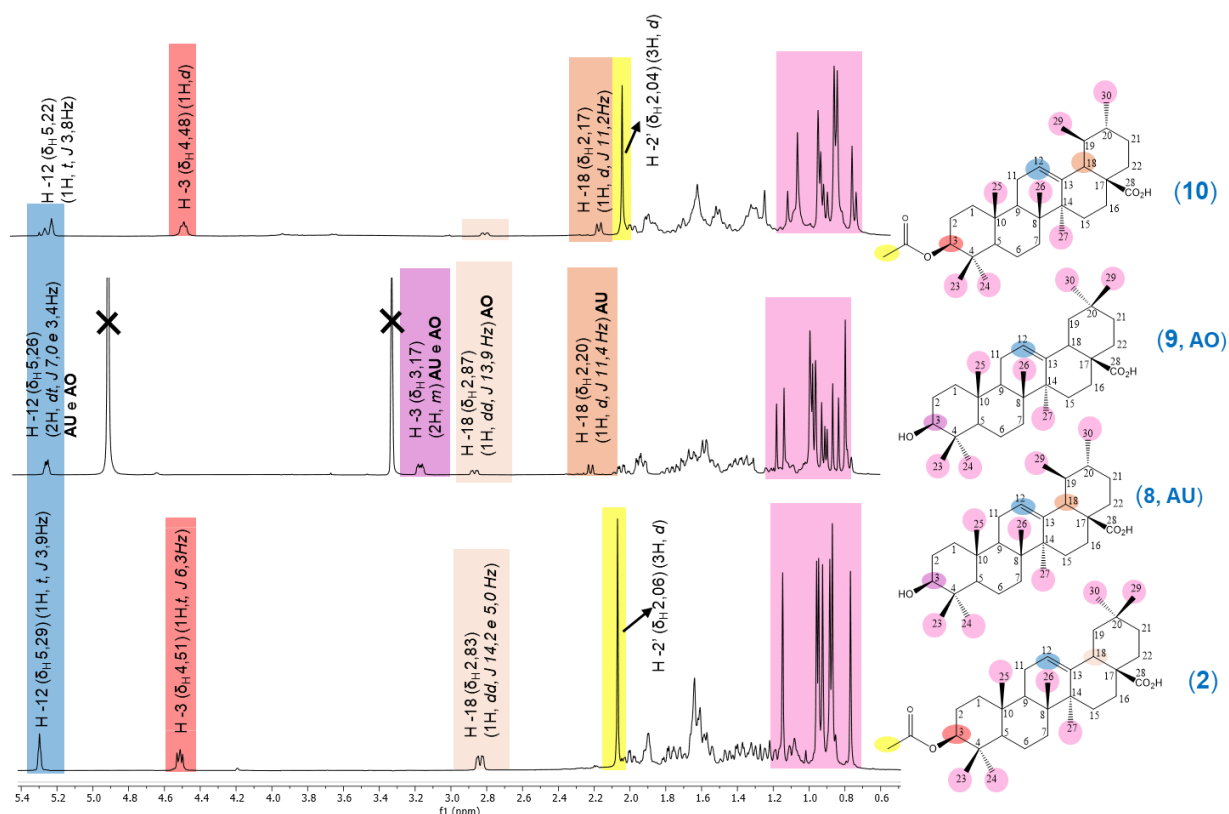
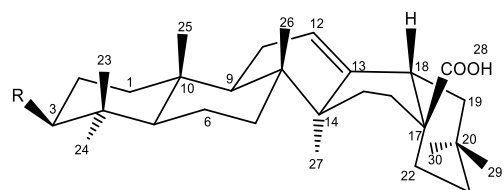


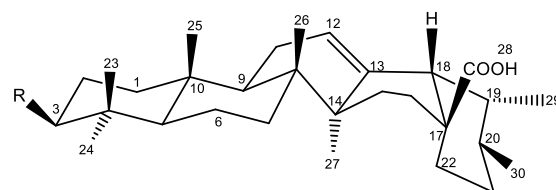
Figura 13 - Espectros de RMN de ^1H (500 MHz) dos compostos **2**, **8**, **9** e **10**.

Análise por HPLC-ESI (–)-QTOF (Figura 14, pág. 47) desse precipitado revelou um pico em m/z 497,3622 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (Rt 7,27 min), compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{32}\text{H}_{50}\text{O}_4$, correspondente ao 3 β -O-acetil oleanólico (**2**), a registrada em espécies da família Rubiaceae.



R = OH, Ácido oleanólico (**9**)

R = OOCCH_3 , Ácido 3 β -O-acetil oleanólico (**2**)



R = OH, Ácido ursólico (**8**)

R = OOCCH_3 , Ácido 3 β -O-acetil ursólico (**10**)

Tabela 1 Dados de RMN de ^{13}C (125 MHz, DEPTQ) das substâncias **2**, **8**, **9** e **10** em comparação com dados da literatura (*SEEBACHER *et al.*, 2003; ** FREITAS *et al.*, 2014; ***ASSIS JUNIOR *et al.*, 2013).

	Triterpenos isolados				Literatura			
	δ_{C}							
	2 [125 MHz, CDCl_3]	8 [125 MHz, CD_3OD]	9 [125 MHz, CD_3OD]	10 [125 MHz, CDCl_3]	***AOA [75 MHz, CDCl_3]	**AU [125 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}/\text{CDCl}_3$]	*AO [50 MHz, piridina- d_5]	***AUA [75 MHz, CDCl_3]
C								
4	37,69	40,77	-	37,10	37,7	40,5	39,4	37,7
8	39,29	40,55	R	41,68	39,3	40,9	39,8	39,5
10	36,98	38,17	38,17	37,06	36,9	38,3	37,4	36,9
13	143,59	139,63	145,20	138,07	143,6	139,7	144,8	137,9
14	41,59	43,24	-	42,00	41,8	43,4	42,2	41,6
17	46,52	-	47,63	48,06	46,5	49,2	46,7	47,9
20	30,66	-	31,62	-	30,7	-	31,0	-
28	182,90	181,85	181,64	183,67	183,1	182,0	180,0	183,4
1'	171,03	-	-	171,22	171,0	-	-	171,0
CH								
3	80,77	79,70	79,70	81,07	80,9	80,0	78,2	80,9
5	55,30	56,75	56,74	55,4	55,3	56,8	55,9	55,3
9	47,55	-	-	47,56	47,4	49,1	48,2	47,5
12	122,73	126,90	123,66	125,85	122,5	127,0	122,6	125,7
18	41,00	54,36	42,72	52,6	38,8	54,4	42,1	52,8
19	-	40,42	-	39,13	-	40,4	-	40,9
20	-	40,42	-	38,94	-	40,2	-	39,0
CH₂								
1	38,08	39,99	39,33	38,36	38,2	40,1	39,0	38,1
2	23,40	27,86	25,31	23,39	23,3	28,1	28,1	23,4
6	18,19	19,47	19,50	18,27	18,2	19,7	18,8	18,2
7	33,79	34,89	34,01	32,93	32,5	34,5	33,4	32,4
11	22,93	24,36	27,89	23,71'	24,1	24,6	28,4	23,5
15	23,52	29,20	28,83	28,09	27,7	29,4	28,4	29,7
16	32,44	24,52	24,04	24,17	22,9	25,6	23,8	27,4
19	45,85	-	47,24	-	45,8	-	46,6	-
21	32,56	31,77	34,33	30,71	33,8	32,0	34,3	30,6
22	27,67	38,11	33,82	36,83	32,8	38,2	33,2	36,7
CH₃								
23	28,04	28,76	28,73	28,20	23,6	29,2	28,8	33,0
24	17,13	16,38	16,32	17,22	15,1	16,8	16,5	17,0
25	15,38	16,02	15,89	15,66	15,5	16,5	15,6	15,4
26	16,66	17,79	17,71	17,15	17,1	18,1	17,5	17,1
27	23,56	24,08	26,39	23,71	25,9	24,7	26,2	23,6
29	33,04	17,64	33,56	16,83	33,6	18,1	33,4	16,6
30	25,88	21,57	23,97	21,32	21,2	22,1	23,8	21,2
2'	21,30	-	-	21,47	21,3	-	-	21,3

AO: ácido oleanólico; AU: ácido ursólico; AOA: Acetato do ácido oleanólico.

Tabela 2 Dados de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) das substâncias **2**, **8**, **9** e **10** em comparação com dados da literatura (*SEEBACHER *et al.*, 2003; **FADIPE *et al.*, 2020).

	Triterpenos isolados				Literatura		
	2 [500 MHz, CDCl_3]	8 [500 MHz, CD_3OD]	9 [500 MHz, CD_3OD]	10 [500 MHz, CDCl_3]	**AOA [400 MHz, CDCl_3]	*AU [600 MHz, piridina- d_5]	*AO [600 MHz, piridina- d_5]
CH							
3	4,51 (1H, t, J 6,3 Hz)	3,17 (2H, m)	3,17 (2H, m)	4,48 (1H, d)	4,5 (t)	α 3,44 (dd)	α 3,44 (dd)
5	0,85* sobreposto	-	-	-	-	α 0,88 (d)	α 0,88 (d)
9	1,58 (2H, d)	-	-	-	-	α 1,65	α 1,71 (t)
12	5,29 (1H, t, J 3,9 Hz)	5,26 (2H, dt, J 7,0 e 3,4 Hz)	5,26 (2H, dt, J 7,0 e 3,4 Hz)	5,22 (1H, t, 3,8 Hz)	5,55 (br)	5,49 (s)	5,49 (s)
18	2,83 (1H, dd, J 14,2 e 5,0 Hz)	2,20 (1H, d, J 11,4 Hz)	2,87 (1H, dd, J 13,9 e 4,2 Hz)	2,17 (1H, d, J 11,2 Hz)	2,8 (d, 13,8 Hz)	β 2,63 (d)	β 3,30 (dd)
19	-	-	-	-	-	α 1,49	-
20	-	-	-	-	-	β 1,05	-
CH₂							
1	1,63 (m)	-	-	-	-	α 1,00 β 1,58	α 1,02 β 1,57
2	1,64	-	-	-	-	1,81	1,82
6	-	-	-	-	-	α 1,58 β 1,39	α 1,58 β 1,39
7	-	-	-	-	-	α 1,59 β 1,39	α 1,53 β 1,33
11	1,89 (sl)	-	-	-	-	1,96	1,96
15	-	-	-	-	-	α 1,22 β 2,33 (t)	α 1,22 β 2,19
16	-	-	-	-	-	α 2,14 (t) β 2,01	α 2,12 (t) β 1,96
19	-	-	-	-	-	-	α 1,83 β 1,32
20	-	-	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-	α 1,40 β 1,49	α 1,46 β 1,23
22	-	-	-	-	-	1,97	α 1,82 β 2,04
CH₃							
23	0,86 (3H, s)	1,14 (3H, s)	0,91(s)	0,94 (3H, s)	0,90(s)	α 1,24 (s)	α 1,24 (s)
24	0,76 (3H, s)	0,99 (3H, s)	0,89 (s)	0,75 (s)	0,86 (s)	β 1,02 (s)	β 1,02 (s)
25	0,95 (3H, s)	0,96 (s)	0,92 (3H, s)	0,84 (s)	0,93(s)	β 0,92 (s)	β 0,93 (s)
26	0,88 (3H, s)	0,86 (3H, s)	0,79 (3H, s)	1,06 (3H, s)	0,75(s)	β 1,06 (s)	β 1,04 (s)
27	0,94 (3H, s)	0,99 (3H, s)	1,18 (3H, s)	0,93 (s)	1,16(s)	α 1,24 (s)	α 1,30 (s)
29	0,92 (3H, s)	0,97 (3H, s)	0,83 (3H, s)	-	0,85(s)	β 1,02 (d)	α 0,97 (s)
30	1,15 (3H, s)	0,79 (3H, s)	0,96 (s)	0,85 (s)	0,92(s)	α 0,97 ds)	β 1,02 (s)
2'	2,06 (3H, s)	-	-	2,04 (3H, s)	-	-	-

AO: ácido oleanólico; AU: ácido ursólico; AOA: Acetato do ácido oleanólico.

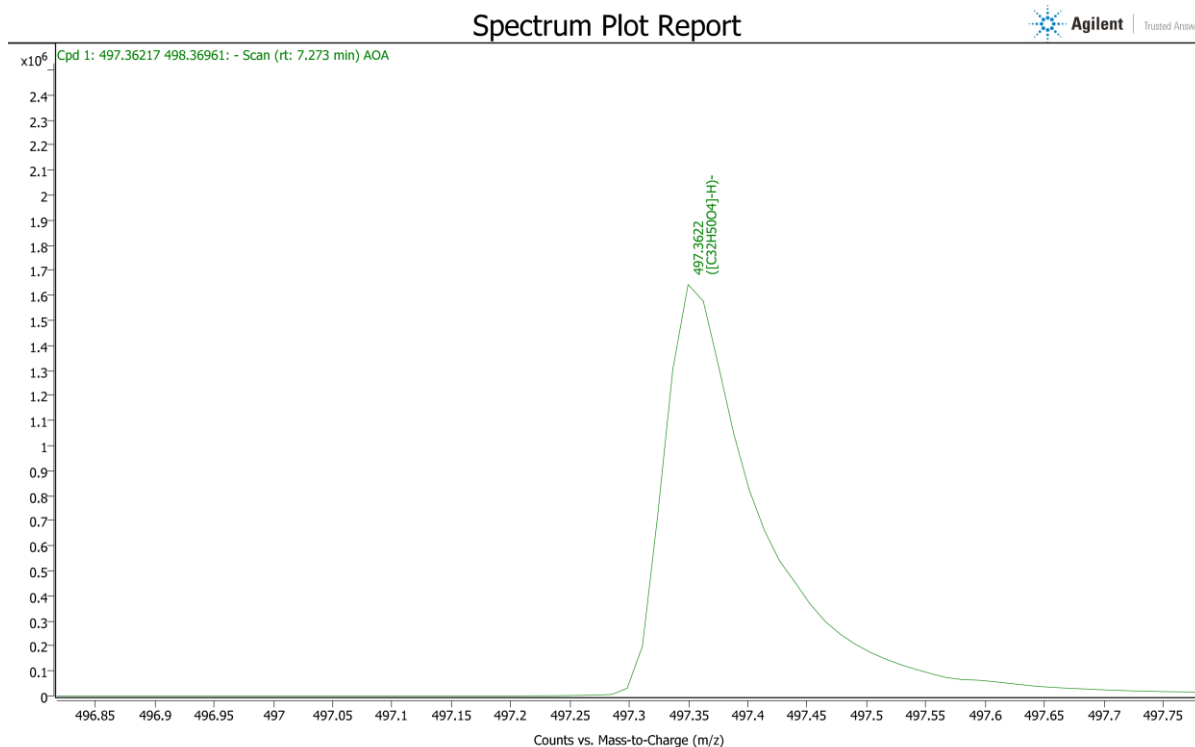


Figura 14 - Espectro de massas obtido por HPLC-ESI(-)-QTOF, correspondente ao pico em 7,273 min referente à substância **2**.

2.3.1.2. Elucidação estrutural dos triterpenos ursanos e oleananos relatados na literatura: **8** e **9**

A análise dos dados de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) e ^{13}C (125 MHz, DEPTQ, CD_3OD), da fração (GMHR-F 26; 18,7 mg) (Figura 12 e Figura 13, pág. 43 e 44) e comparação com valores da literatura (FREITAS *et al.*, 2014; ASSIS JUNIOR *et al.*, 2013), sinalizou tratar-se de uma mistura de triterpenos pertencentes às séries ursano e oleanano. Como observado na Figura 12, em comparação com o triterpeno **2** além de outras correlações. O espectro de ^{13}C (125 MHz, DEPTQ, CD_3OD) apresenta dois sinais típicos de grupos carboxilas de ácido em δ_{C} 181,85 e 181,64 ppm, atribuídos às posições C-28 dos compostos **8** e **9**, respectivamente. (Figura 12, pág. 43 e Tabela 1, pág. 45).

Adicionalmente, foram observados deslocamentos químicos distintos para os carbonos sp^2 olefínicos, C-12 e C-13, com sinais em δ_{C} 126,9 e 123,6 ppm (C-12), e δ_{C} 139,6 e 145,2 ppm (C-13). Esses valores refletem o efeito de blindagem e desblindagem resultantes da proximidade da metila em C-19 sobre o sistema de ligação dupla. No caso do composto **8** (núcleo ursano), a presença da metila axial em C-19 promove efeito de desproteção do C-12

(δ_C 126,9) e proteção do C-13 (δ_C 139,6), conforme esperado para essa série. Já para o composto **9** (núcleo oleanano), os valores de C-12 (δ_C 123,6) e C-13 (δ_C 145,2) mantêm-se próximo aos observados para o composto **2**, pois a ausência da metila em C-19 impede os efeitos de proteção e desproteção característicos do esqueleto ursano.

No espectro Dept-Q, dos compostos **8** e **9**, observaram-se um sinal em δ_C 79,7 atribuído ao carbono oximetínico (C-3), valor condizente com a presença de um carbono ligado a uma hidroxila em equatorial, diferentemente do observado para o composto **2**, em que C-3 está acetilado. Também observam-se dois sinais de carbonos metínicos (CH) em δ_C 54,36 e 42,72, atribuídos ao C-18. A desproteção em 54,36 ppm é compatível com o núcleo ursano do composto **8**, enquanto o sinal em 42,72 ppm é justificado pelo efeito de proteção exercido pela metila axial em C-20 sobre esse carbono, típico do núcleo oleanano do composto **9**.

Pela análise do espectro de RMN 1H (Figura 13, pág. 44, Tabela 2, pág. 46), observaram-se sinais simpletos intensos entre 0,76 a 1,18 ppm, confirmando a presença de triterpenos das séries ursano e oleanano não acetilados. Esses sinais estão em consonância com as discussões anteriores relativas ao carbono metílico, representando um ponto de diferenciação em relação ao composto **2**, cuja metila do grupo acetil aparece mais desprotegida, em δ_H 2,06 ppm, sinal ausente na mistura dos compostos **8** e **9**. Além disso, detectou-se um duplo tripleto δ_H 5,26 (2H, *dt*, *J* 7,0 e 3,4 Hz), cuja multiplicidade pode ser interpretada como a sobreposição de dois tripletos cada um integrando para um hidrogênio metínico olefínico (C12) dos esqueletos triterpênicos presentes na mistura, com valores próximos aos registados para o composto **2**.

Outros sinais relevantes incluíram um multipletto, com integração para dois hidrogênios, em uma região mais blindada do que aquela observada para **2**, indicando a presença dos hidrogênios oximetínicos C-3 nos esqueletos ursanos e oleananos de **8** e **9**, respectivamente. Um sinal em δ_H 2,20 (1H, *d*, *J* = 11,4 Hz) foi atribuído ao hidrogênio metínico H-18 do núcleo ursano (**8**), compatível com o acoplamento a um CH vizinho. Esse valor é comparável aos de H-18 observados para os compostos **2** (δ_H 2,83, *dd*) e **9** (δ_H 2,87; 1H, *dd*, *J* = 13,9 e 4,2 Hz), coerentes com o núcleo oleanano, em que o H-18 está adjacente a um grupo CH₂. Essas informações, somadas à comparação com dados disponíveis na literatura (FREITAS *et al.*, 2014; ASSIS JUNIOR *et al.*, 2013), foram essenciais para elucidar a configuração estrutural dos compostos **8** e **9**, identificados, respectivamente, como ácido ursólico e ácido oleanólico (Tabelas 1 e 2). De forma adicional, o espectro de massas (HPLC-ESI(-)-QTOF), no

modo negativo, registou um pico majoritário em t_R 6,655 minutos (Figura 15, pág.49), com m/z 455,3521 $[M-H]^-$ compatível para a fórmula molecular $C_{30}H_{48}O_3$ característica de ambos os isômeros triterpênicos.

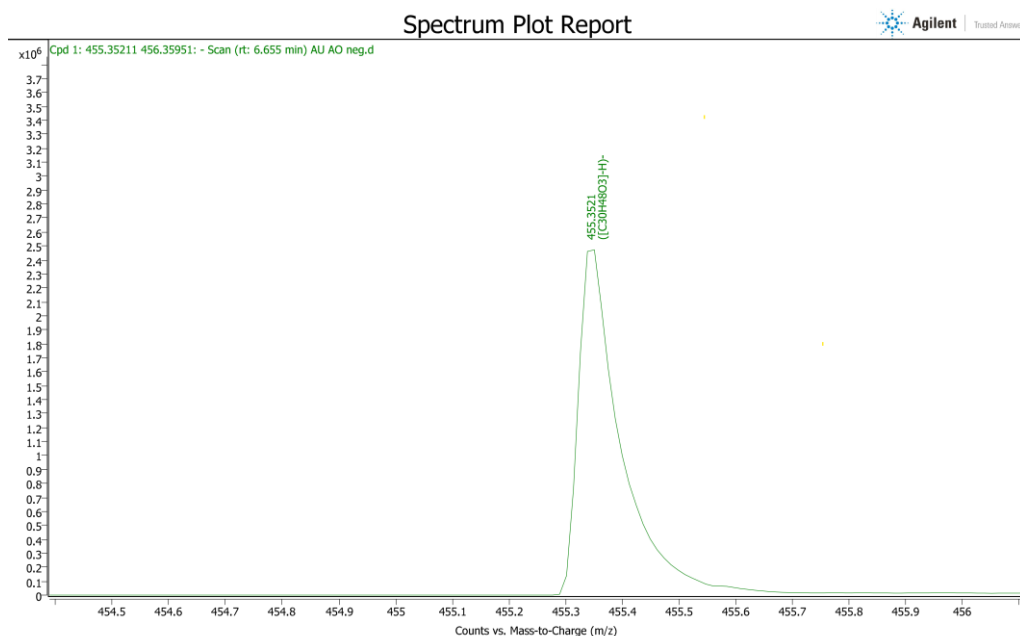


Figura 15 - Espectro de massas obtido por HPLC-ESI(-)-QTOF, correspondente ao pico em 6,655 min referente às substâncias **8** e **9**.

2.3.1.3. Elucidação estrutural dos triterpenos ursanos e oleananos relatados na literatura: **10**

A interpretação dos espectros de RMN 1H (500 MHz, $CHCl_3$) e ^{13}C (125 MHz, DEPTQ, $CDCl_3$) do precipitado sólido branco (GMDR-C2CB(2-3); 15,7 mg), (Figuras 12 e 13), em consonância com a literatura (ASSIS JUNIOR *et al.*, 2013; FADIPE *et al.*, 2020) indicou tratar-se de uma mistura de triterpenos ursano e oleanano, ambos acetilados.

No DEPTQ (Figura 12 e Tabela 1, pág. 45), a confirmação da mistura baseia-se nos dois sinais de carboxilas em δ_C 183,67 (C-28, **10**) e 183,93 (C-28, **2**), sendo o sinal em 183,67 ppm mais intenso, o que indica ser o constituinte majoritário. O sinal em δ_C 171,22, de intensidade superior à dos demais carbonos quaternário presentes no espectro, indica a existência de dois grupos acetil (C-1'), comuns a ambos os constituintes da mistura.

Ainda, no espectro DEPTQ, coerente com o núcleo ursano (**10**), aparecem os sinais, δ_C 52,6 pp, atribuído ao grupo CH do C-18, e os sinais de carbonos olefínicos C-12 e C-13 em

125,85 e 138,07 ppm. Para o oleanano (**2**), aparentemente minoritário e já isolado anteriormente, esses mesmos carbonos aparecem em δ_C 41,04, 122,66 e 143,72.

No espectro de RMN 1H (Figura 13, pág. 44 e Tabela 2, pág. 46), destacam-se acúmulo de simpletos intensos entre 0,73 e 1,11 ppm, referentes às sete metilas presentes em cada núcleo triterpênico, além de um simpleto em 2,04 ppm, mais desblindado que os demais, atribuído a metila do grupo acetil (3H-2'), existente em ambos os compostos. Um tripleto majoritário em δ_H 5,22 (3H, t, 3,8 Hz) foi atribuído ao H-12 de **10**, enquanto um sinal minoritário, de mesma multiplicidade, em δ_H 5,26 corresponde ao H-12 de **2**.

As diferenças entre os constituintes da mistura no espectro de RMN 1H também são constatadas nos sinais de H-18: um duplete em δ_H 2,17 (1H, d, J 11,2 Hz) para **10**, e um duplo duplete, de menor intensidade, em 2,79 ppm para **2**.

O H-3 de **10** aparece como um duplete em δ_H 4,48 (1H, d), coerente como o deslocamento causado por um grupo de desproteção, como o acetil ligado nessa posição. Esses dados permitiram identificar os constituintes da fração como ácido 3 β -O-acetil ursólico (**10**) em mistura com o já isolado ácido 3 β -O-acetil oleanólico (**2**).

2.3.1.4. Elucidação estrutural dos triterpenos lupanos relatados na literatura: **12** e **13**

No caso dos triterpenos pentacíclicos do tipo lupano, um precipitado branco amorfo (8,5 mg), foi analisado por RMN 1D e 2D, demonstrando, mais uma vez, tratar-se de uma mistura. Essa análise possibilitou propor a presença do composto **11** correspondente a um metabólito fenólico, cuja discussão será aprofundada na seção 2.3.1.9.1 (pág. 87), jundo com um triterpeno diferente dos anteriores e compatível com um da série lupanos, composto **12**. Na Tabela 3 apresentam-se os deslocamentos químicos de RMN (técnicas uni- e bidimensionais) comparados com os dados da literatura para **12** (CANTANHEDE-FILHO *et al.*, 2017). O espectro de RMN 1H (Figura 16, pág. 53, Tabela 3, pág. 52), apresentou cinco sinais em campo baixo (δ_H 5,9-8,5 ppm), além de um sinal em 3,87, que não foram atribuídos a **12**. Os demais sinais, entre δ_H 0,5 e 5,0 ppm, correspondem ao esqueleto lupano de **12**. Destacam-se vários simpletos intensos em δ_H 0,74-1,68, cada um integrando para três hidrogênios e atribuídos a metilas; um desses simpletos, mais desblindado em δ_H 1,68 (H-30), é um dado relevante na identificação do mesmo, pois é coerente com metila ligada ao carbono sp^2 . O duplo duplete em

δ_H 3,11 (1H, J 11,4 e 4,7 Hz) foi atribuído ao hidrogênio oximetínico axial em C-3. Além disso, aparecem dois simpletos largos em δ_H 4,68 e 4,54 correspondentes aos hidrogênios metilenos do grupo vinilidina (H-29a e H-29b).

No espectro DEPTQ (Figura 17, pág. 54) de **12**, observa-se um sinal em δ_C 78,31, compatível com um carbono carbinólico (C-3), comum em triterpenos sem grupo *O*-acetil nessa posição. Além disso, um sinal de carbono sp^2 em 108,10 ppm, e um sinal mais intenso que demais quaternários, em δ_C 151,65 (indicativo de sobreposição de dois carbonos sp^2), juntamente com correlações HMBC com H-18 e 2H-21 (Figura 18, pág. 55), confirmam a presença do grupo vinilidina. Assim os sinais em δ_{CH_2} 108,10 e δ_C 151,65 foram respectivamente, correlacionados aos carbonos C-29 e C-20. Esse aspecto é característico dos triterpenos da série lupano e difere dos triterpenos ursanos e oleananos, cuja insaturação ocorre entre C-12 e C-13. Apesar de não se observar o sinal da carboxila ácida, o deslocamento químico do carbono quaternário C-17 em δ_C 57,26 indica ligação a um grupo carboxílico.

Os experimentos de HMBC (Figura 18, pág. 55) validaram essa hipótese ao evidenciar correlações (J^3) entre o sinal em δ_C 179,02 (C-28) com 2H-22, confirmando essa atribuição. Também se observou acúmulo de sinais na região entre δ_C 102,91 e 168,93 ppm. Nessa faixa, apenas os sinais em δ_C 108,10 e 151,65 ppm foram atribuídos a substância **12**, os demais sinais pertencem ao outro componente da mistura. Sinais restantes, foram atribuídos aos carbonos sp^3 metínicos, metilênicos e metílicos do esqueleto lupano, exceto o carbono metínico sp^3 em 55,07 ppm. Essas informações, fornecidas pelos espectros de RMN 1D e 2D, sugeriram que a substância **12** corresponde ao triterpeno ácido betulínico. A atribuição foi confirmada por HRESIMS, que apresentou pico de $[M-H]^-$ em m/z 455,3519 (calc. 455.3525), compatível com a fórmula molecular $C_{30}H_{48}O_3$ do ácido betulínico (Figura 19, pág. 55). Esses dados justificam a presença do lupeol (**13**) na mistura.

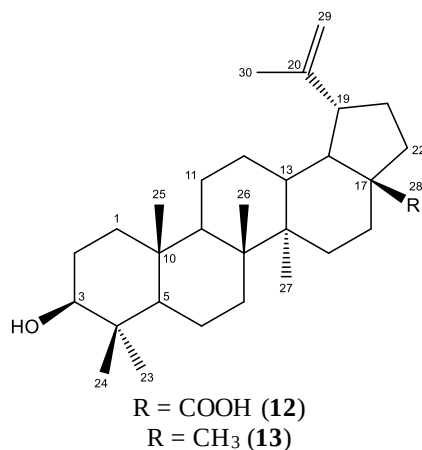


Tabela 3. Dados de RMN de ^{13}C (125 MHz, DEPTQ, CD_3OD) e ^1H (500 MHz, D_3COD) das substâncias **12** e **13** em comparação com dados da literatura (CANTANHEDE-FILHO *et al.*, 2017) [300 MHz e 75 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$].

	Substância 12				Substância 13		Literatura			
	HSQC		HMBC		HSQC		[Ácido betulínico] Cantanhede-Filho., 2017		[Lupeol] Cantanhede-Filho., 2017	
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	
C										
4	38,5	-	H-3; 3H-23; 3H-24	2H-2	-	-	39,7	-	40,0	
8	40,56	-	3H-26	3H-27	-	-	41,3	-	39,9	
10	42,20	-	3H-25	2H-2	37,04	-	37,7	-	38,1	
14	36,92	-	H-9; 3H-27	H-12 H-18; 3H-26	-	-	43,0	-	43,2	
17	57,26	-	H-18	-	-	-	56,8	-	44,0	
20	151,65 *	-	-	H-18; 2H-21	150,45	-	151,5	-	152,0	
28	179,02*	-	-	2H-22	-	-	179,0	-	-	
CH										
3	78,31	3,11 (<i>dd</i> , <i>J</i> 11,4 e 4,7 Hz)	-	2H-1; 3H-23; 3H-24	79,03	3,21 (<i>dd</i>)	78,3	3,48 (<i>dd</i> ; 9,0 e 1,8; Hz)	79,6	3,17 (<i>dd</i> , <i>J</i> 11,1 e 5,4 Hz)
5	55,52	0,69 (<i>d</i>)	-	3H-23; 3H-24	55,3	-	56,1	-	41,8	
9	50,77	1,28 (<i>s</i>)	-	3H-25; 3H-26	50,52	-	51,1	1,37 (<i>m</i>)	50,9	
13	37,99	2,53 (1H, <i>m</i>)	-	2H-12; 3H-26; 3H-27	38,35	-	38,9	2,75 (<i>m</i>)	38,3	
18	49,44	1,55 (<i>m</i>)	-	2H-22;	49,27	1,63	49,9	1,78 (<i>m</i>)	49,8	
19	47,05*	2,30 (1H, <i>dd</i>)	-	2H-29; 2H-22; H-18; 3H-30	46,88	2,5 (<i>m</i>)	47,9	3,54 (<i>m</i>)	48,1	
CH₂										
1	38,71	1,68 (<i>s</i>) 0,99 (<i>t</i>)	-	H-3; 3H-25	-	-	39,5	-	38,3	
2	29,73	1,55 (<i>m</i>) 1,09 (<i>dl</i>)	-	-	27,37	-	28,4	1,87 (<i>m</i>)	28,6	
6	18,06	1,55 (<i>m</i>)	-	-	18,29	1,52 1,36	18,9	1,37 (<i>m</i> , H-6 β) 1,56 (<i>m</i> , H-6 α)	19,5	
7	34,27	-	-	3H-26	32,15	-	35,0	1,37 (<i>m</i> , H-7 β) 1,41 (<i>m</i> , H-7 α)	33,3	
11	20,77	-	-	-	20,86	-	21,4	1,24 (<i>m</i> , 11- β)	22,0	
12	26,64	1,55 (<i>m</i>)	-	-	25,5	-	26,3	1,24 (<i>m</i> , 12- α) 1,94 (<i>m</i> , H-12 β)	26,8	
15	30,72	-	-	3H-27	-	-	30,4	1,24 (<i>m</i> , 15- α) 1,88 (<i>m</i> , H-15 β)	28,0	
16	33,06	2,22 (<i>m</i>) 1,28 (<i>s</i>)	-	H-18; 2H-22	34,34	-	33,0	1,54 (<i>m</i> , H-16 α) 2,62 (<i>m</i> , H-16 β)	35,5	
21	25,69	1,68 (<i>s</i>)	-	3H-30	29,70	1,24	31,4	1,54 (<i>m</i> , H-21 α)	31,6	
22	37,59	2,13 (<i>m</i>) 1,89 (<i>s</i>)	-	-	38,71	1,6	37,8	1,58 (<i>m</i> , H-22 α) 2,5 (<i>m</i> , H-22 β)	39,6	
29	108,10	4,68 (1H, <i>sl</i> , H-29b) 4,54 (1H, <i>sl</i> , 29a).	-	-	109,68	4,75 (<i>s</i>) 4,62 (<i>s</i>)	110,1	4,79 (<i>d</i> ; 2,4 Hz; H-29 β) 4,96 (<i>d</i> , 2,4 Hz, H-29 α).	110,1	4,58 (<i>dd</i> , <i>J</i> 3,6 e 1,8 Hz, H-29a) 4,70 (<i>dl</i> , H-29 b)
CH₃										
23	27,20	0,94 (3H, <i>s</i>)	-	H-3; 3H-24	28,03	0,98 (<i>s</i>)	28,8	1,25 (<i>s</i>)	28,0	0,74 (<i>s</i>)
24	14,70	0,74 (3H, <i>s</i>)	-	H-3; 3H-23	15,35	0,77 (<i>s</i>)	16,5	1,03 (<i>s</i>)	16,1	0,84 (<i>s</i>)
25	15,49	1,00 (3H, <i>s</i>)	-	-	17,55	-	16,6	0,83 (<i>s</i>)	16,7	0,94 (<i>s</i>)
26	15,36	0,85 (3H, <i>s</i>)	-	-	16,05	-	16,6	1,08 (<i>s</i>)	16,6	0,95 (<i>s</i>)
27	13,67	0,98 (3H, <i>s</i>)	-	-	14,69	0,98 (<i>s</i>)	15,1	1,09 (<i>s</i>)	15,0	0,99 (<i>s</i>)
28	-	-	-	H-18	16,13	0,84 (<i>s</i>)	-	-	18,4	1,00 (<i>s</i>)
30	18,28	1,68 (3H, <i>s</i>)	-	-	19,36	1,7 (<i>s</i>)	19,6	1,81 (<i>s</i>)	19,4	1,68 (<i>s</i>)

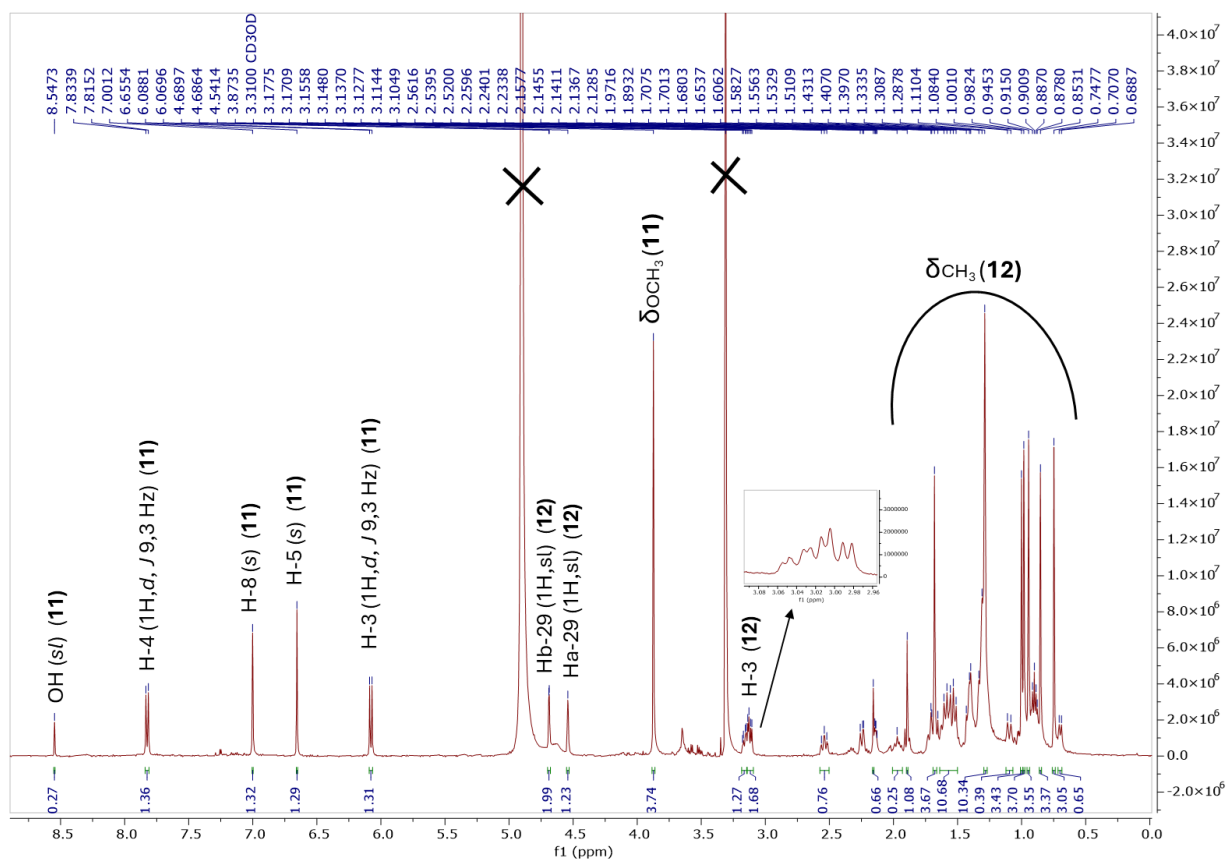


Figura 16 - Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) de **11** e **12** na região entre δ_{H} 0,0-9,0 ppm.

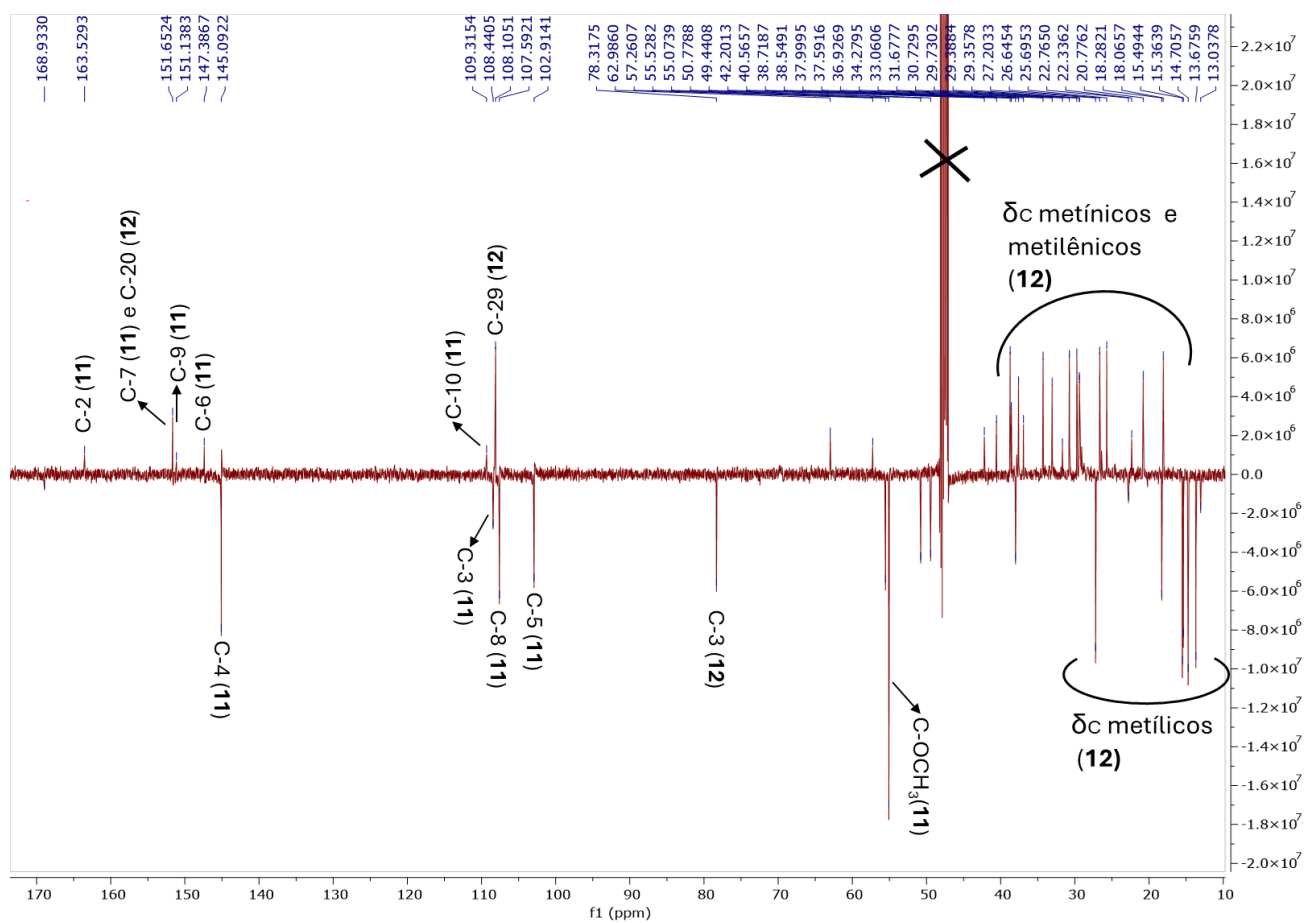


Figura 17 - Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) de **11** e **12**.

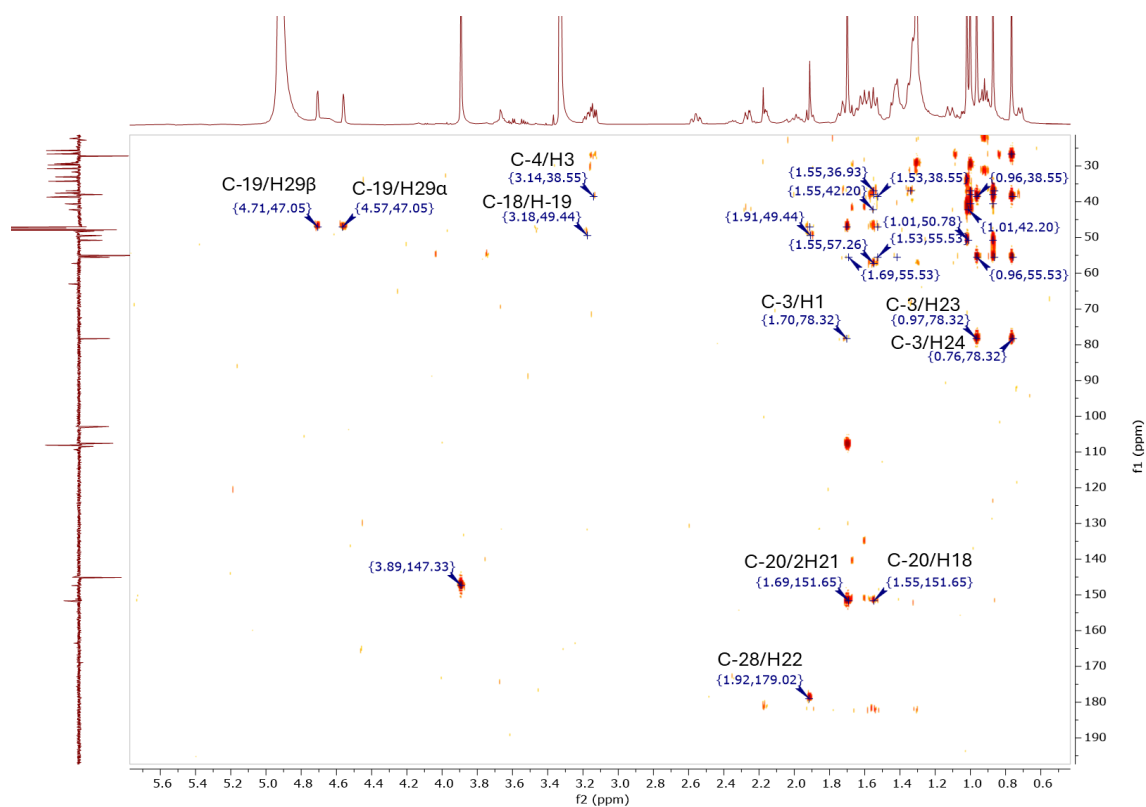


Figura 18 - Expansão do espectro de HMBC (500/125 MHz, CD₃OD) de **11** e **12** na região entre δ_H 0,6-5,60 ppm.

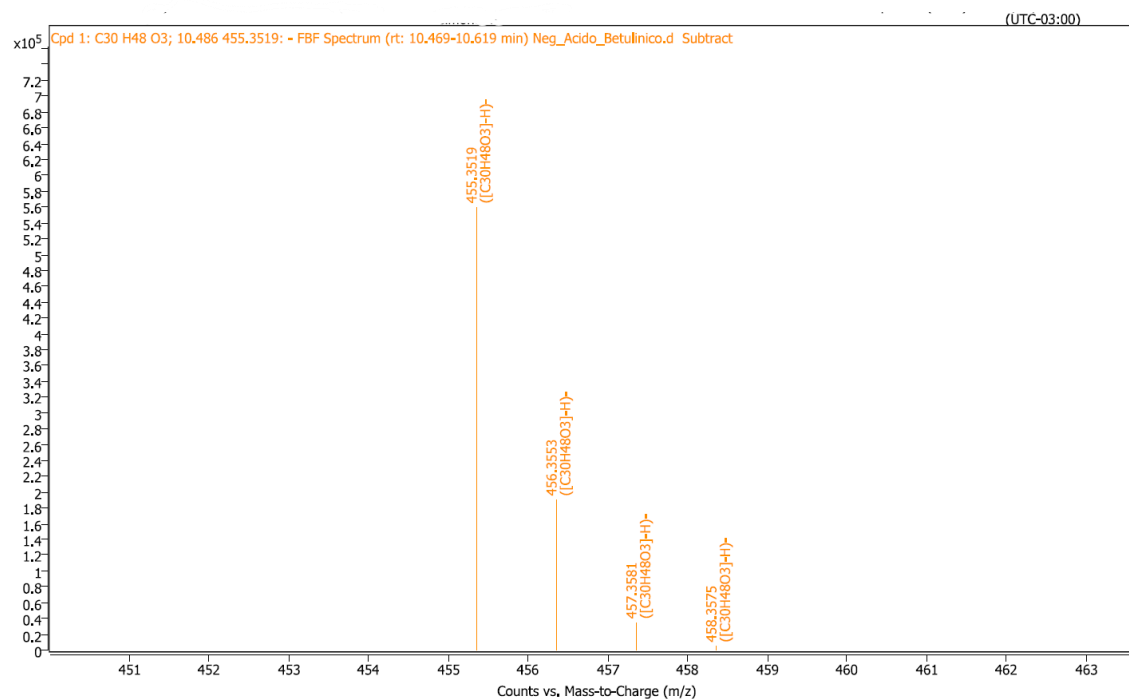


Figura 19 - Espectro HRESIMS em modo negativo do ácido betulínico (**12**), exibindo o pico $[M-H]^-$ em m/z 455,3519 [calculado 455.3525]

A análise por espectrometria de RMN de um precipitado branco amorfo [mancha 2 oriunda de GMDR-C2D (9-11), 8, 0 mg] revelou como outro triterpeno da série lupano para o composto **13** (Figura 20, pág. 57, e Figura 21, pág. 57, Tabela 3, pág. 52). No entanto, observou-se a presença de um composto majoritário não elucidado por essa técnica, bem como sinais-chaves que diferenciam o composto **13** do composto **12**. No espectro de ^1H (Figura 20, pág. 57), foram detectados sinais entre δ_{H} 0,5 a 5,0, coerente com o núcleo triterpênico de **13**. Observa-se ainda, o acúmulo de simpletos de metilas entre 0,75 e 1,75 ppm, com destaque para um sinal simpleto em δ_{H} 0,83 (s), sugerindo a presença de uma metila adicional em relação ao composto **12**, atribuído ao C-28 presente apenas em **13**. Outro sinal mais desblindado em δ_{H} 1,70 (H-30) indica a metila ligada ao carbono sp^2 , como observado anteriormente. O sinal do hidrogênio oximetínico (H-3), aparece como um duplo duplete minoritário em δ_{H} 3,21, e os hidrogênios metilênicos olefínicos terminais (H-29a e H-29b) são novamente observados como dois simpletos em δ_{H} 4,75 e 4,62 ppm.

No espectro de DEPTQ (Figura 21, pág. 57, Tabela 3) nota-se sinais de carbono atribuídos ao composto **13**, similares aos de **12**, incluindo δ_{C} 79,03 (CH-3), 49,27 (CH-18), 150,45 (C-20), 109,68 (CH₂-29). Entretanto, foram identificadas diferenças significativas, como o deslocamento químico de C-17 em 42,47 ppm, mais protegido em comparação ao núcleo do ácido betulinico, e a ausência do sinal do carbono carboxílico C-28. Foi observado um sinal de metila em δ_{C} 16,13, sugerindo a presença de um grupo metila nessa posição. Com base nesses dados bidimensionais e em comparação com a literatura, foi possível inferir que o composto **13** possa ser o lupeol, identificado como um dos componentes da fração analisada. Os demais sinais nos espectros ^1H e ^{13}C , que não foram atribuídos, pertencem ao componente não identificado. Os valores dos deslocamentos químicos dos carbonos de sistema aromático (C, CH) permite sugerir um sistema de estrutura de composto não fenólico. Certamente com estrutura de um alcalóide indólico (teste positivo com Dragendorff na fração) com padrão de substituição conduzindo a grupos singletos nessa região e dois grupos metilas ligados no sistema aromático, justificando os dois singletos perto de 2,0 ppm e um grupo hidroximetileno justificando o sinal de CH₂ (60,5 ppm). Ressalta-se que os dados de espectrometria de massas serão essenciais não apenas para corroborar a identificação do composto **13**, mas também para a caracterização dos demais constituintes dessa mistura.

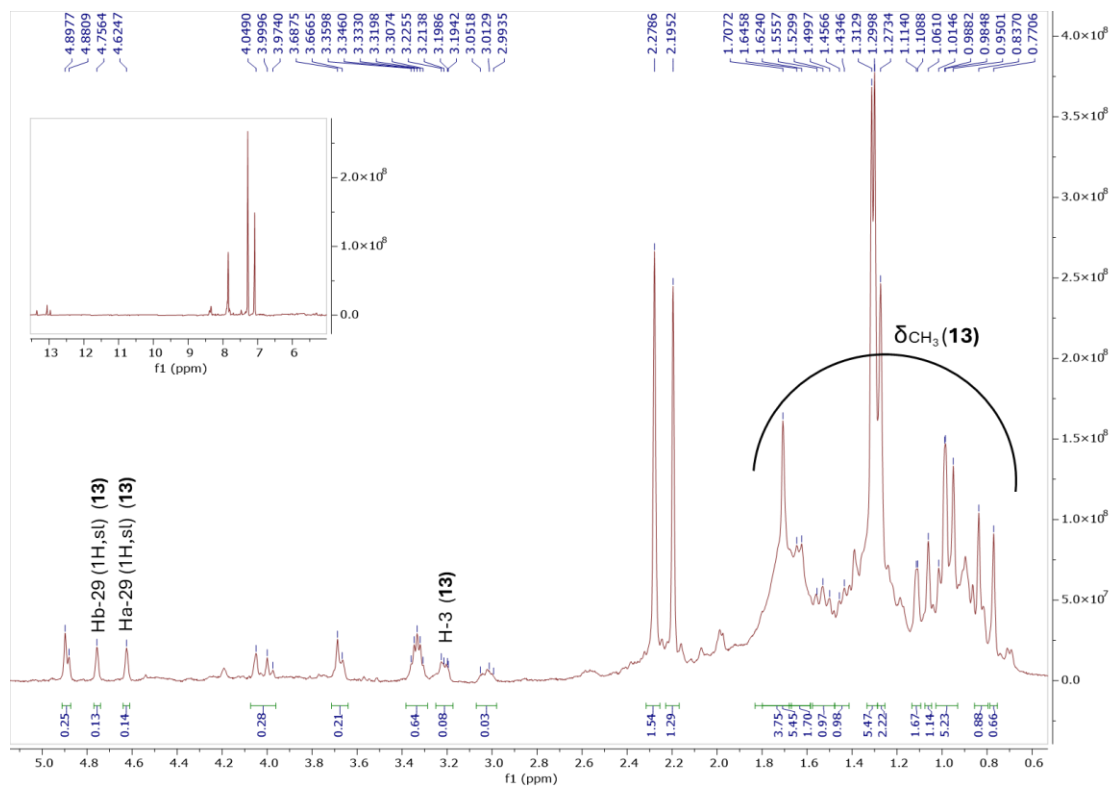


Figura 20 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **13**.

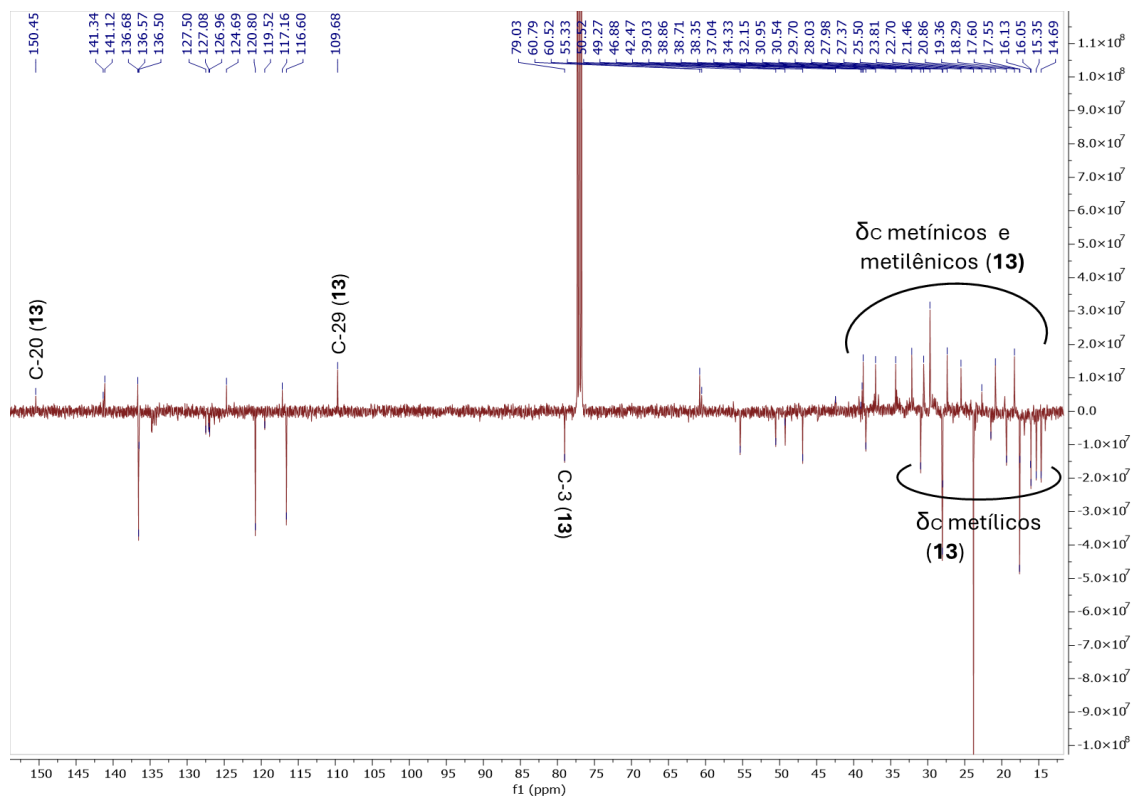


Figura 21 - Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de **13**.

2.3.1.5. Elucidação estrutural das misturas contendo novos triterpenos: **3** e **4**

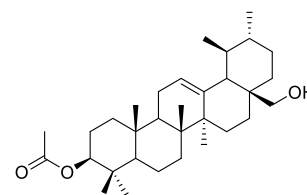
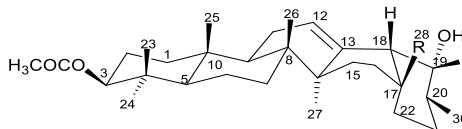
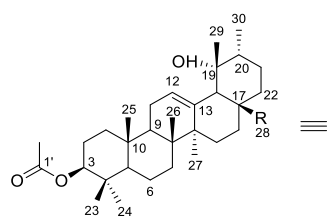
Na fração codificada como GMHR-C34 (30,4 mg), precipitado branco solúvel em CHCl_3 e CH_2Cl_2 , foi identificada como uma mistura de triterpeno pentacíclicos da classe dos ursanos (**3** e **4**) (Tabela 4, pág. 60).

A fórmula molecular do composto **3** ($\text{C}_{32}\text{H}_{50}\text{O}_5$) foi determinada com base no íon negativo de HRESIMS em m/z 513,3601 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (calculado 513,3584 $[\text{M}-\text{H}]^-$), 559,3618 ($\text{M}+\text{HCO}_2^-$), coerente a um núcleo triterpênico acetilado (Figura 27, pág. 64). A análise dos espectros de RMN do composto **3** revelou notáveis semelhanças com o núcleo triterpênico pentacíclico do composto **2**, porém apresentou informações fundamentais para classificá-lo na classe dos ursanos. O espectro de RMN ^{13}C -DEPTQ (Figura 23, pág. 62 e Figura 24, pág. 62) revelou 32 átomos de carbono (Tabela 4, pág. 60), incluindo oito metílicos (δ_{C} 28,04; 16,67; 15,32; 16,89; 24,49; 27,43; 16,15; 21,30), um acetil em δ_{C} 171,07 (C-1'), uma carboxila em δ_{C} 183,84 (C-28) e dois carbonos oxigenados em δ_{CH} 80,98 (CH-3) e δ_{C} 73,09 (C-19). A atribuição do esqueleto ursano foi sustentada pelo deslocamento dos carbonos olefínicos, com desproteção em C-12 (δ_{C} 129,31) e proteção em C-13 (δ_{C} 137,91), além de C-18 (δ_{C} 52,85) mais desprotegido em comparação ao núcleo oleanano, devido ao efeito β de desproteção do grupo metila e do OH em equatorial em C-19 e, também, a ausência de proteção em gama do grupo metila no C-20.

A análise do espectro de RMN ^1H (Figura 22, pág. 61) confirmou essa proposta, pois percebeu-se oito sinais simpletos de metilas (δ_{H} 0,89; 0,88; 0,96; 0,74; 1,27; 1,23; 0,97; 2,07), sinais em δ_{H} 5,36 (1H, *t*, H-12), um hidrogênio em carbono olefínico, e em δ_{H} 4,52 (1H, *dd*, H-3) de hidrogênio em carbono carbinólico desprotegido sustentando um grupo acetila. O sinal em δ_{H} 2,55 (1H, H-18), aliado às análises com $^n\text{J}_{\text{HC}}$ foi usado para confirmar a posição do OH. Esses dados, juntamente com a interpretação dos espectros de RMN 1D e 2D (Figura 25, pág. 63 e Figura 26, pág.63), os dados de EM e a comparação com a literatura (SONG *et al.*, 2013), permitiram identificar **3** como o ácido 3-O-acetil-19 α -hidroxiurs-12-en-28-oico (ácido 3 β -O-acetil-pomólico), já descrito na literatura (Tabela 4, pág. 60).

O composto **4** é o constituinte minoritário da fração GMHR-C34. A análise dos dados de RMN ^1H e ^{13}C , unidimensionais e bidimensionais (Figura 22-26), aliada à comparação com os dois triterpenos discutidos anteriormente, sugere que se trata de um novo triterpeno do tipo ursano, com semelhança estrutural ao composto **3**. Para a diferenciação e correta correlação

estrutural dos dois triterpenos em mistura, foram fundamentais as correlações observadas nos espectros bidimensionais de RMN. O experimento de HSQC (Figura 25, pág. 63 e Figura 26, pág.63) revelou uma correlação entre o multiplete δ_H 4,18 e um sinal característico de carbono oxigenado em δ_C 65,04 atribuído ao carbono metilênico carbinólico C-28, diferenciando-o do grupo carboxílico presente no ácido 3 β -O-acetil pomólico. Essas correlações (Tabela 4, pág. 60), associadas aos dados da literatura (MAHATO e KUNDU, 1994; SIDDIQUI *et al.*, 1986) e à espectrometria de massas, foram importantes para a proposta da estrutura da substância **4** como o 19,28-dihidroxi-3 β -O-acetil urs-12-eno (**4**). A fórmula molecular da substância **4** (C₃₂H₅₂O₄) foi determinada via HRESIMS, apresentando pico em m/z 499,3674 [M-H]⁻ (valor calculado 499,7560 [M-H]⁻) (Figura 28, pág. 64). Uma avaliação adicional com espectro de NOESY permitirá confirmar a estereoquímica relativa nas propostas de **3** e **4**.



R= COOH: Ácido 19-hidroxi-3 β -O-acetil pomólico (**3**)
R= CH₂OH: 19,28-dihidroxi-3 β -O-acetil urs-12-eno (**4**)

Ref [MAHATO e KUNDU,1994; Siddiqui *et al.*, 1986]

Tabela 4. Dados de RMN de ^{13}C (125 MHz, DEPTQ, CDCl_3) e ^1H (500 MHz, CDCl_3) das substâncias **3** e **4** em comparação com dados da literatura (SONG ., 2013; SIDDIQUI., 1986; MAHATO e KUNDU, 1994) [400 MHz e 100, CDCl_3].

	Substância 3				Substância 4		Literatura		
	HSQC		HMBC		HSQC		[3, ácido pomólico] * SONG ., 2013		[4, ref] * MAHATO e KUNDU,1994; SIDDIQUI, 1986
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
C									
4	37.68	-	3H-23; 3H-24	-	-	-	37.62	-	38.8
8	39.97	-	3H-26	3H-15; 3H-27	39.97	-	39.95	-	39.4
10	37.68	-	3H-25; H-3	2H-2	-	-	36.85	-	37.2
13	137.91	-	H-18	2H-11; 3H-27	137.91	-	137.95	-	138.0
14	39.97	-	3H-15; 2H-16	H-12; H-18; 3H-26	39.97	-	41.02	-	42.8
17	47.75	-	H-18; 2H-16; 2H-22	-	47.75	-	47.69	-	36.8
19	73.09	-	H-18; 3H-29	3H-30;	73.09	-	73.06	-	-
28	183.84	-	-	H-18; 2H-16; 2H-22	-	-	187.80	-	-
1'	171.07	-	3H-2'	H-3	171.07	-	-	-	-
CH									
3	80.98	4.52 (dd)	2H-2	3H-23; 3H-24	80.98	-	80.89	4.47 (1H, dd, J 6,4 e 9,2 Hz)	79.0
5	55.20	0.87 ou 0,88	-	3H-23; 3H-24; 3H-25	55.20	-	55.09	-	55.4
9	47.10	-	-	H-12; 3H-25; 3H-26	47.10	-	47.03	-	47.8
12	129.31	5.36 (s)	2H-11	H-18	129.31	-	129.20	5.35 (1H, s)	125.0
18	52.85	2.55 (1H, s)	-	H-12; 2H-22; 3H-29	52.85	-	52.76	2.50 (1H, s)	54.1
19	-	-	-	-	-	-	-	-	38.9
20	41.09	1.45	2H-21; 3H-30	H-18; 2H-22; 3H-29	41.09	-	40.96	-	39.4
CH₂									
1	38.09	1.63, 1.06	2H-2	H-3; 3H-25	38.09	-	37.97	-	38.8
2	23.53	1.64	H-3	-	23.53	-	23.61	-	27.3
6	18.29	1.55, 1.39	-	-	-	-	18.22	-	18.4
7	32.59	1.51, 1.30	-	3H-26	-	-	32.48	-	32.9
11	23.66	1.98	H-12	-	-	-	23.46	-	23.4
15	29.65	1.23	-	3H-27	-	-	28.23	-	29.2
16	25.34	2.54,1.63	-	H-18; 2H-22	-	-	25.27	-	25.27
21	28.18	1.73, 1.06	-	3H-30	-	-	25.95	-	30.7
22	37.68	1.82, 1.70	-	-	-	-	37.62	-	30.6
28	-	-	-	-	65.04	4.18 (m)	-	-	69.7
CH₃									
23	28.04	0.88 (3H, s)	-	H-3; 3H-24	28.04	0.88 (3H, s)	27.43	-	28.1
24	16.67	0.87 (3H, s)	-	H-3; 3H-23	16.67	0.87 (3H, s)	16.65	-	15.4
25	15.32	0.96 (3H, s)	-	-	15.32	0.96 (3H, s)	15.29	-	15.6
26	16.89	0.74 (3H, s)	-	-	16.89	0.74 (3H, s)	16.90	-	16.9
27	24.49	1.27 (s)	-	-	24.49	1.27 (s)	24.48	-	23.4
29	27.43	1.23 (3H, s)	-	H-18	27.43	1.23 (3H, s)	28.13	-	16.2
30	16.15	0.97 (s)	-	-	16.15	0.97 (s)	16.19	-	21.3
2'	21.30	2.07 (s)	-	-	21.30	2.07 (s)	21.35	-	-

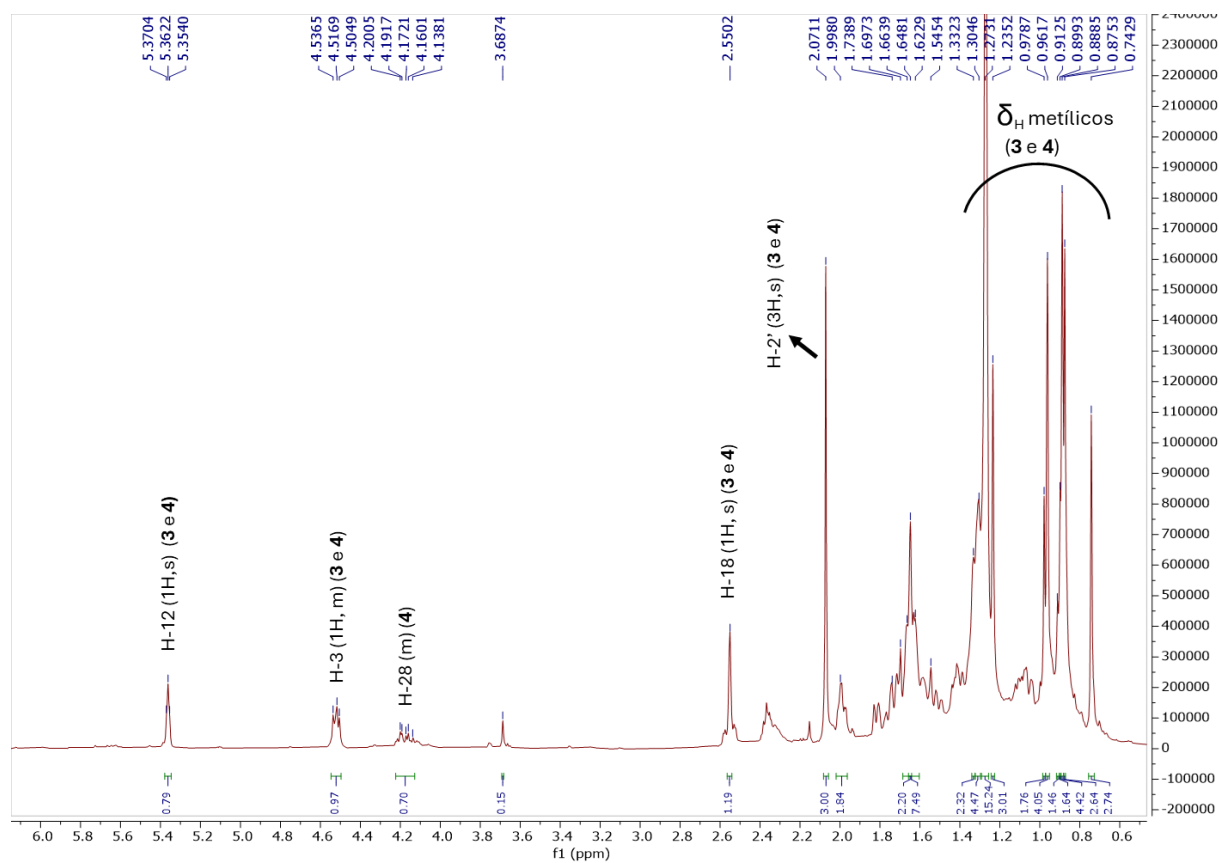


Figura 22 - Expansão do espectro de RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) de **3** e **4** na região entre δ_H 0,5-6,0 ppm.

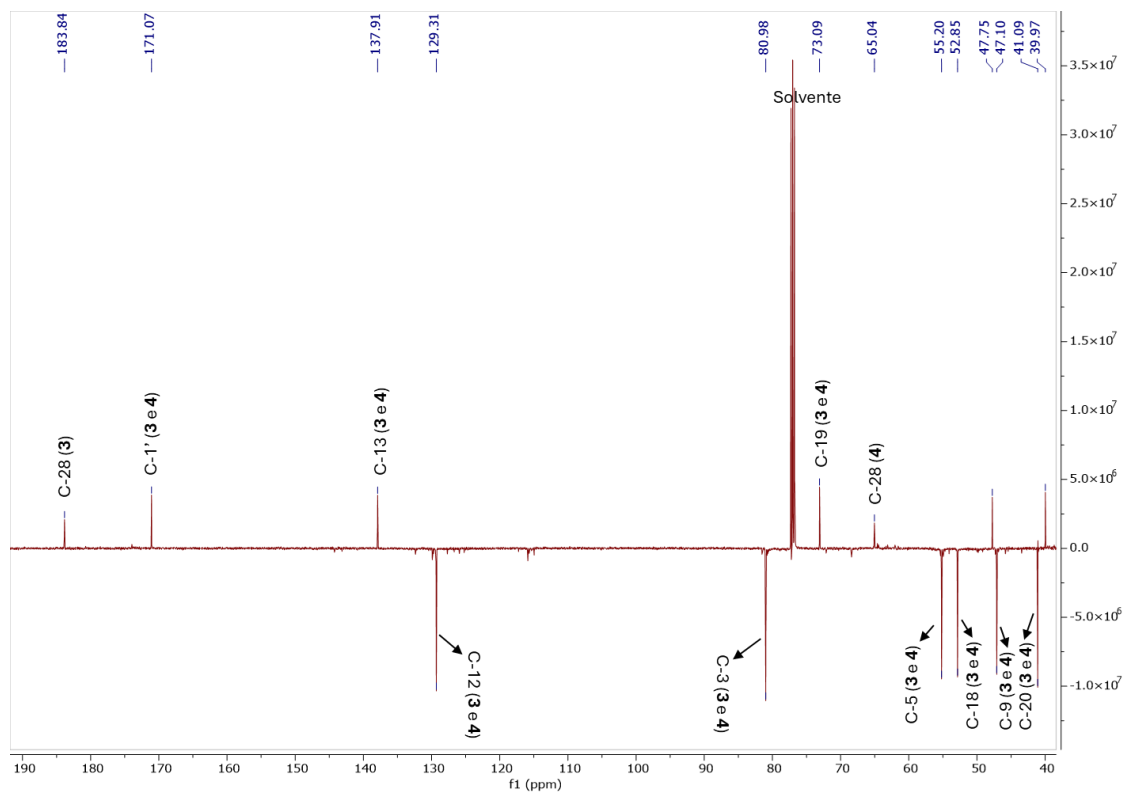


Figura 23 - Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de **3** e **4**, na região entre δ_{C} 40,00-190,00 ppm.

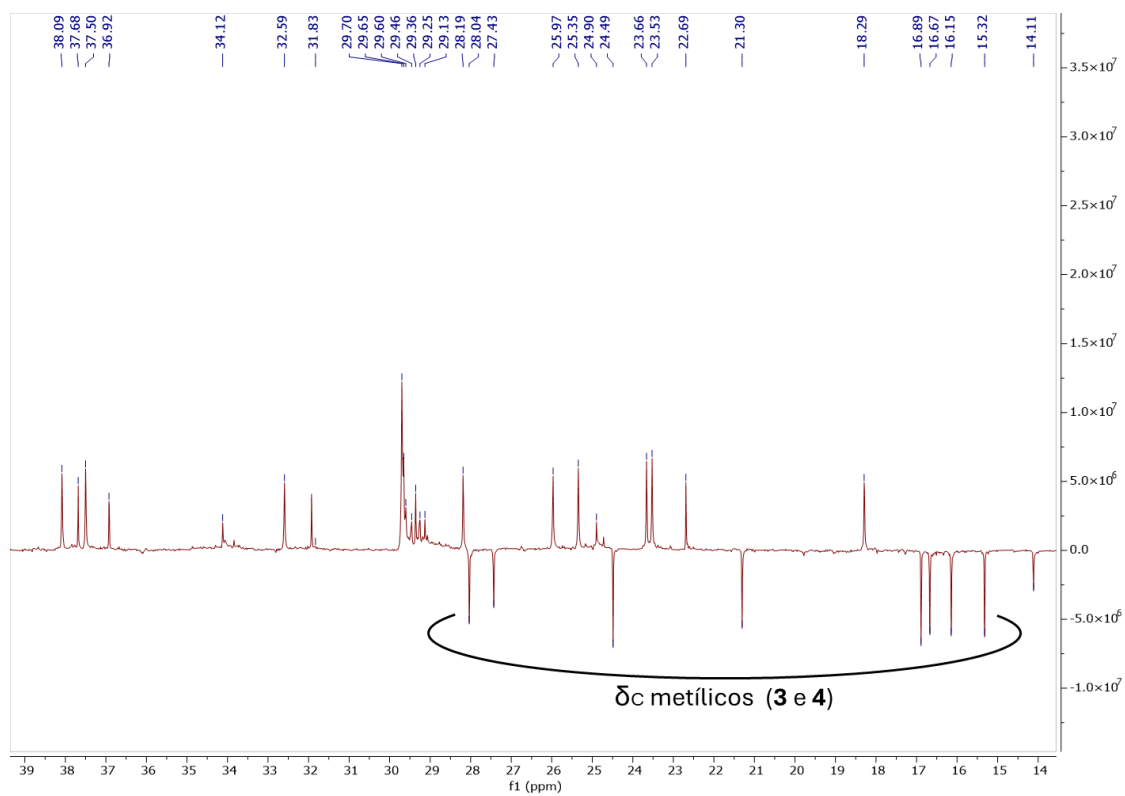


Figura 24 - Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de **3** e **4**, na região entre δ_{C} 14,00-39,00 ppm.

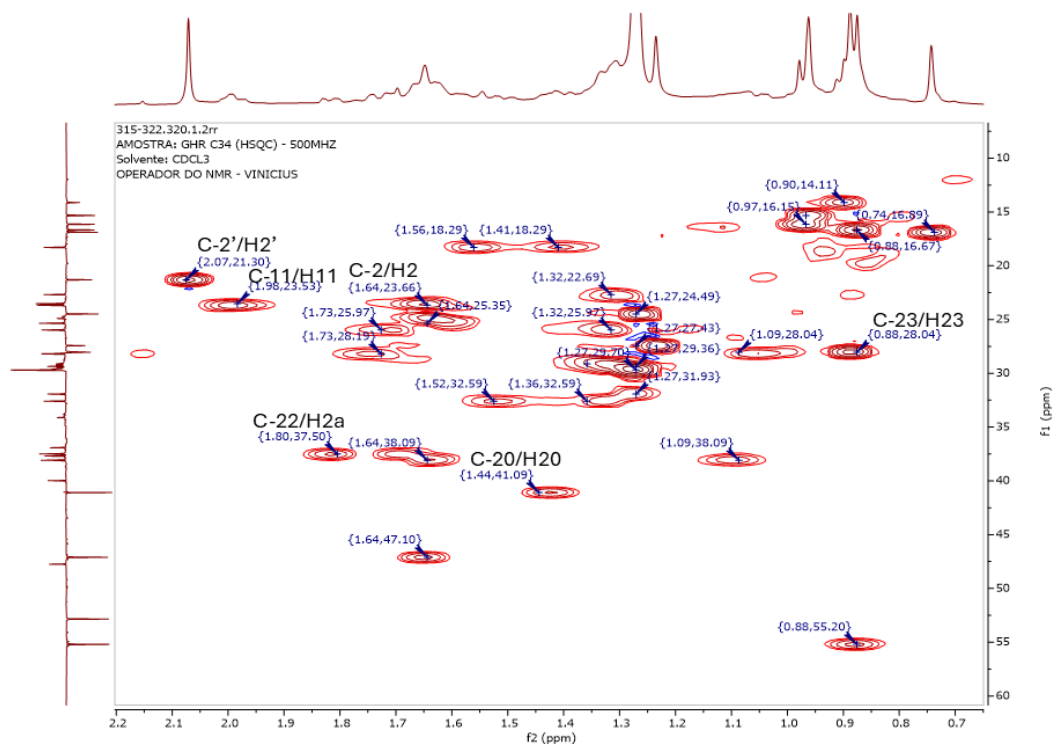


Figura 25 - Expansão do espectro de HSQC (500/125 MHz, CDCl₃) de **3** e **4**, na região entre δ_H 0,7 - 2,2 ppm.

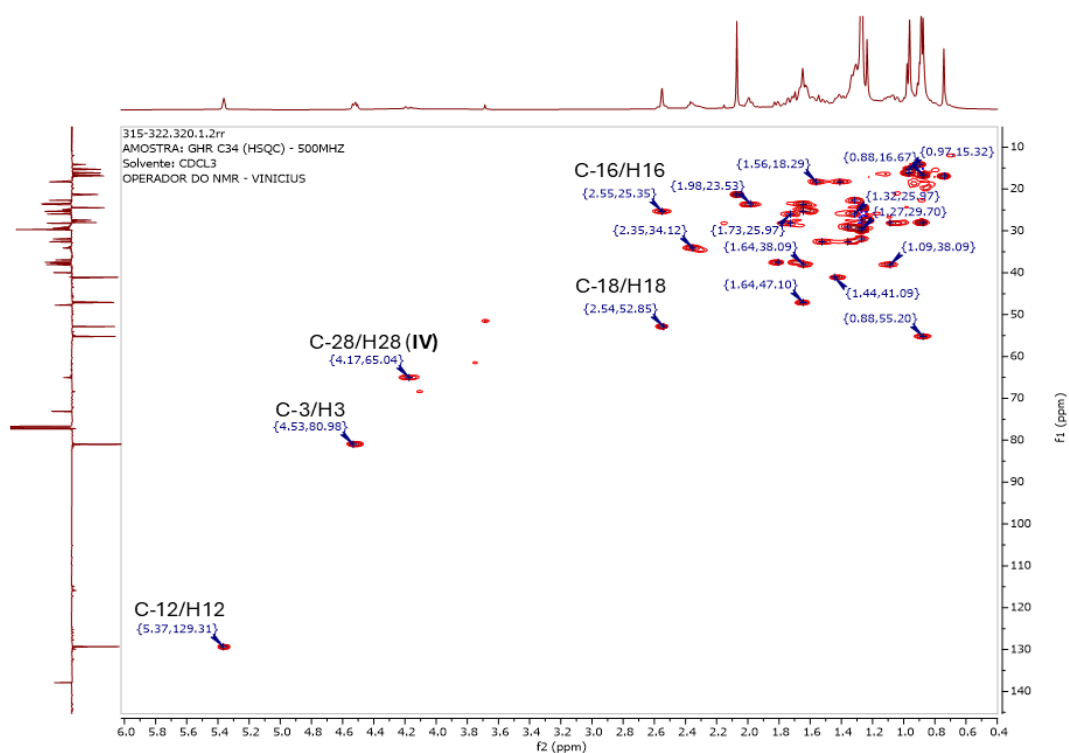


Figura 26 - Expansão do espectro de HSQC (500/125 MHz, CDCl₃) de **3** e **4**, na região entre δ_H 0,4 - 6,0 ppm.

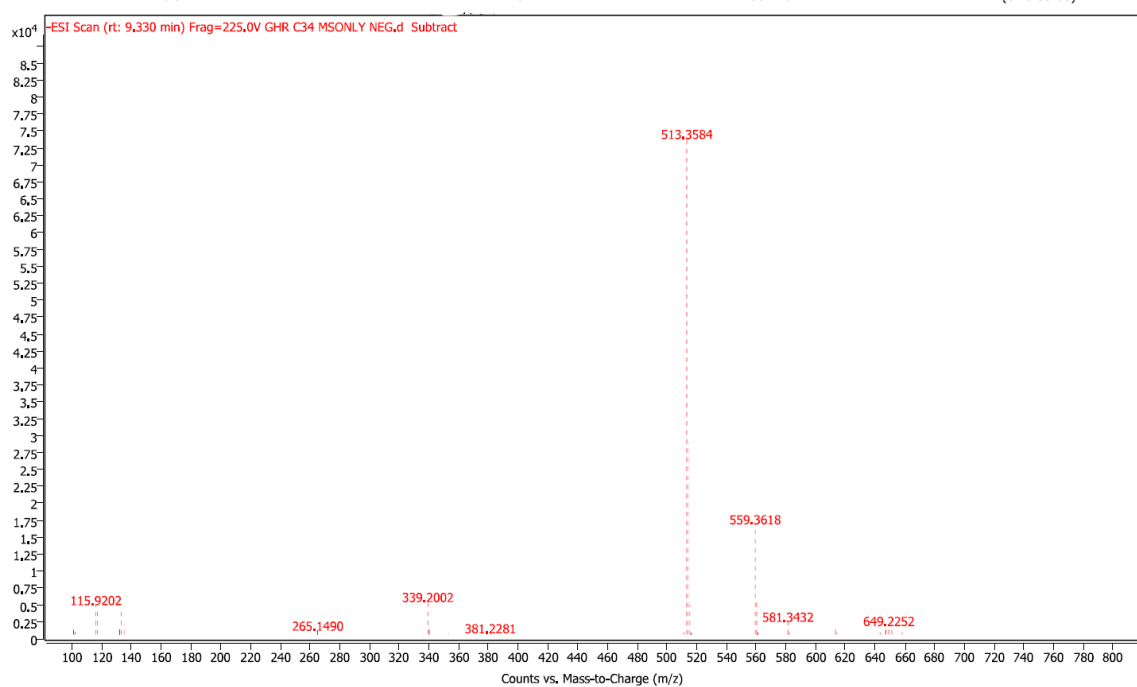


Figura 27 - Espectro MS do pico em 9,33 min obtido via HPLC-ESI(-)-QTOF do composto **3**.

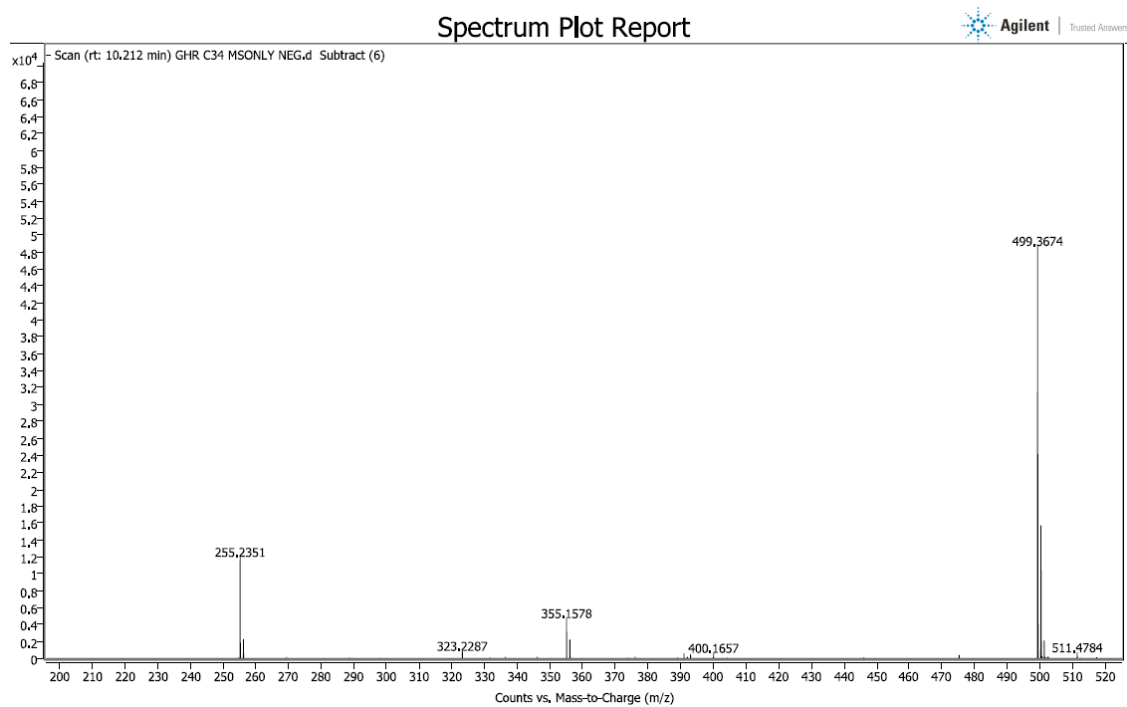


Figura 28 - Espectro MS do pico em 10,21 min obtido via HPLC-ESI(-)-QTOF do composto **4**.

2.3.1.6. Elucidação estrutural das misturas contendo novos triterpenos: **20** e **21**

A caracterização de GMDR-E7-6 (20 mg), um precipitado sólido marrom solúvel em MeOH, por RMN ^1H e ^{13}C (Tabela 5, pág. 68) revelou sinais compatíveis com uma mistura de triterpenos pentacíclicos, identificados como **20** e **21**. O espectro de RMN ^1H (Figura 29, pág. 69 e Figura 30, pág. 69) apresentou múltiplos sinais simpletos entre 0,80-1,23 ppm, atribuídos aos hidrogênios metílicos dos núcleos triterpênicos. Esses sinais correlacionam-se com carbonos metílicos no intervalo de 15,34-32,45 ppm no espectro de RMN ^{13}C , DEPTQ (Figura 31, pág. 70 e Figura 32, pág. 70). Adicionalmente, foi observado um multipletto em 5,28 ppm, integrando para dois hidrogênios, cuja correlação no experimento HSQC (Figura 33, pág. 71 e Figura 34, pág. 71) revelou associação com os sinais em δ_{C} 122,04 e 125,06, característico de sistemas olefínicos presentes em ambos os constituintes da mistura. Apesar de se apresentar como multipletto, a multiplicidade esperada para H-12 seriam tripletos, típicos dessa posição nos esqueletos triterpênicos. Com base em discussões anteriores, sobre essa classe de metabólitos, o sinal correlacionado a δ_{C} 122,04 foi atribuído ao C-12 mais blindado do núcleo oleanano (**20**), enquanto o sinal em δ_{C} 125,06 ao C-12, mais desblindado, corresponde ao C-12 do núcleo ursano (**21**). Outros carbonos que compõem esse sistema olefínico também foram evidenciados nos experimentos de HMBC (Figura 40, pág. 74 e Figura 41, pág. 75), com os sinais em δ_{C} 145,10 atribuídos ao C-13 do composto **20** e δ_{C} 138,13 ao C-13 do composto **21**.

A multiplicidade do sinal em δ_{H} 2,86 (m, H-18) tal qual corrobora a presença de mistura, possivelmente decorrente da sobreposição de sinais. Diferentemente do multipletto observado no RMN ^1H para essa fração, sabe-se que para triterpenos desses tipos, esse hidrogênio se apresenta como um dupletto para derivados ursanos e duplo dupletos nos oleananos, o que reforça a interpretação proposta. Destacam-se ainda as correlações $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ 3,90/65,79; 3,62/77,30, 3,62/77,35, que, com base no espectro DEPTQ e nos valores de deslocamento químico, foram atribuídos aos carbonos C-2 e C-3 (anel $2\alpha,3\beta,23$ -triidroxí) de ambos os compostos (Tabela 5, pág. 68). Os valores de deslocamentos em δ_{C} 65,79 (C-2, **20**), e δ_{C} 77,35 (C-3, **20**) justificam-se pela desblindagem causada pela hidroxila em C-2, que desprotege os carbonos α e β desse núcleo. Já o sinal em δ_{C} 77,30 foi atribuído ao C-3 de **21**.

A presença de um carbono metilenocarbinólico foi evidenciada pelo sinal em δ_{C} 69,92 no espectro de ^{13}C , correlacionando-se com os hidrogênios em δ_{H} 3,42 (s) e 3,54 (m), conforme identificado no experimento HSQC. Essa correlação é consistente com a presença de um grupo $-\text{CH}_2\text{OH}$ na posição 23 de ambos os constituintes da mistura. No espectro DEPTQ,

observou-se um sinal em δ_C 103,82 (C-30), acoplado a dois simpletos em δ_H 4,65 e 4,70 (2H-30), compatível com o grupo vinilidina presente exclusivamente na substância **21**. A multiplicidade do sinal em δ_H 2,86 (m, H-18) justifica a presença de mistura.

A Figura 35, pág. 72 apresenta as principais correlações observadas nas análises de COSY e HMBC. A análise detalhada dos espectros de HSQC, COSY, NOESY e HMBC (Figuras 33-41, Tabela 5, pág. 68), aliada aos dados da literatura (GOMES CASTRO *et al.*, 2021), confirmou a identificação do composto **20** como 2 α ,3 β ,23-triidroxi-olean-12-eno (THO). A estrutura proposta foi confirmada pela espectrometria de massas de alta resolução (HRESIMS), que exibiu um aduto de sódio em m/z 481,3649 $[M+Na]^+$ (calculado 481,717 $[M+Na]^+$), consistente com a fórmula molecular $C_{30}H_{50}O_3$. Esse triterpeno já foi previamente isolado de *Croton heterodoxus* Baill., *Actinidia macrosperma* e de *Commiphora merkeri* (GOMES CASTRO *et al.*, 2021; DING *et al.*, 2007; FOURIE e SNYCKERS, 1989).

A análise bidimensional permitiu a correta atribuição das posições dos grupos no composto **21**, cujos dados anteriormente analisados confirmam tratar-se de um derivado do núcleo ursano, com substituintes nas posições 2 α ,3 β ,23-triidroxi (Tabela 2, pág. 46). No HSQC (Figura 33, pág. 71 e Figura 34, pág. 71), foram observadas correlações: δ_C/δ_H 40,92/1,32(m), 1,6(m) (C-1); 65,79/3,90(m) (C-2); 77,30/3,62(s) (C-3); 17,58/1,40 (m) (C-6); 23,03/1,97(m) (C-11); 125,60/5,29(m) (C-12); 41,34/2,86(m) (C-18); 31,92/2,24(m) (C-22); 69,92/3,42(s), 3,54(m) (C-23); 16,19/0,80(s) (C-24); 17,35/1,19 (s) (C-25); 22,58/1,22 (s) (C-27); 15,84/1,04(s) (C-28) 103,83/4,65(s), 4,70(s) (C-30). No mapa de contorno HMBC (Figura 40, pág. 74 e Figura 41, pág. 75), foi possível observar os acoplamentos heteronucleares (Figura 35, pág. 72) dos prótons 2H-1 (δ_H 1,32 e 1,6) com C-25 (δ_C 17,35, $^3J_{HC}$); 2H-23 (δ_H 3,42 e 3,54) com C-3 (δ_C 77,30, $^3J_{HC}$); 3H-24 (δ_H 0,80) com C-3 (δ_C 77,30, $^3J_{HC}$), C-4 (δ_C 41,10, $^2J_{HC}$) e C-23 (δ_C 69,92, $^3J_{HC}$); 3H-25 (δ_H 1,19) com C-1 (δ_C 40,92, $^3J_{HC}$) e C-5 (δ_C 55,69, $^2J_{HC}$), indicando a presença de um anel 2 α ,3 β ,23-triidroxi de **21**. A correlação 1H - 1H -COSY (Figura 35, pág. 72) de H-11 (δ_H 1,97) com H-12 (δ_H 5,29) confirmou a presença de um anel com o sistema de hidrogênio olefínico em C-12 [δ_H 5,29(m), δ_C 125,60] para a classe proposta com o carbono quaternário 138,23 (C13), sinal ausente no RMN ^{13}C , porém perceptível no HMBC que correlaciona-se com o hidrogênio metílico δ_H 1,22 (3H-27). Outra importante correlação que une esse anel ao núcleo ursano foi observada no 1H - 1H -NOESY de **21**, NOE foi observado H-12 (δ_H 1,97) com H-18 (δ_H 2,86). Para o anel ursano com uma vinilidina, o HMBC mostrou outras importantes correlações: 3H-28 (δ_H 1,04) com C-18 (δ_C 41,34, $^3J_{HC}$), 3H-27 (δ_H 1,22) com C-13 (δ_C 138,13, $^3J_{HC}$). Esses dados, comparados aos dados da literatura (GOMES

CASTRO *et al.*, 2021; TRANG *et al.*, 2024; KAKUNO *et al.*, 1992, MAHATO & KUNDU, 1994; LAHLOU *et al.*, 2001) foram coerentes a um triterpeno pentacíclico da classe ursano que teve sua fórmula molecular definida como $C_{30}H_{48}O_3$, a partir dos dados de HRESIMS, em modo negativo, que apresentou um pico em m/z 455,3527 $[M-H]^-$ (calculado 455,703 $[M-H]^-$) e foi identificado como 2 α ,3 β ,23-triidroxi-ursa-20-eno (**21**), não descrito na literatura.

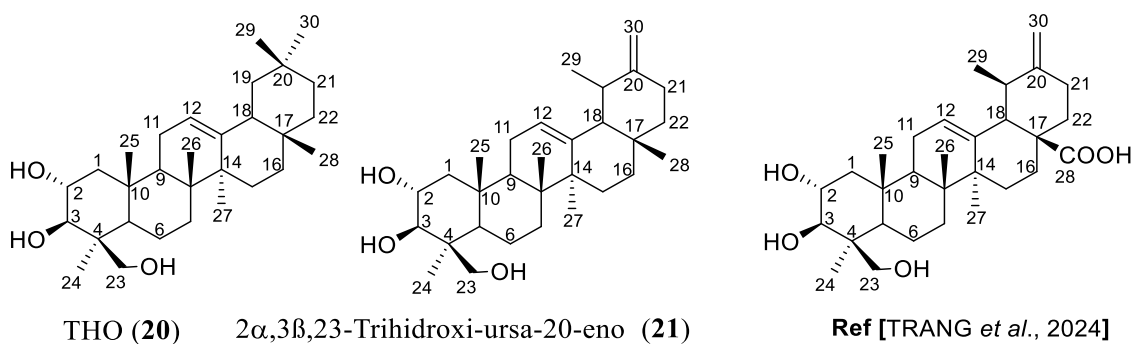


Tabela 5 Dados de RMN de ¹³C (125 MHz, DEPTQ, CDCl₃) e ¹H (500 MHz, CDCl₃) das substâncias **20** e **21** em comparação com dados da literatura (GOMES CASTRO *et al.*, 2021; * TRANG *et al.*, 2024) [CDCl₃,]*[600 MHz e 150 MHz, CD₃OD].

	Substância 20				Substância 21				Literatura			
	HSQC		HMBC		HSQC		HMBC		[20, THO]		[21, ácido actinídico]	
	δ _C	δ _H	² J _{CH}	³ J _{CH}	δ _C	δ _H	² J _{CH}	³ J _{CH}	GOMES CASTRO <i>et al.</i> , 2021		*TRANG <i>et al.</i> , 2024	
C									δ _C	δ _H	δ _C	d _H
4	41,10	-	3H-24	-	41,10	-	3H-24	-	43,2	-	44,1	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-	39,8	-	40,8	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	38,1	-	39,0	-
13	145,10*	-	-	3H-27	138,13*	-	-	H-27	145,2	-	139,6	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-	41,7	-	43,5	-
17	-	-	-	-	-	-	-	-	32,4	-	49,2	-
20	31,9	-	-	-	153,29*	-	-	3H-28	31,1	-	154,5	-
28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	181,0	-
CH												
2	65,79	3,90 (m)	-	-	65,79	3,90 (m)	-	-	69,1	3,90 (m)	69,7	3,72 – 3,73 (m)
3	77,35	3,62 (sl)	-	3H-24	77,30	3,62(s)	-	2H-23	85,4	3,20 (d, J 8,99 Hz)	78,2	3,39 (d, J 9,6 Hz)
5	55,69	-	-	3H-25	55,69	-	-	-	55,8	0,96 (m)	48,2	1,32 – 1,33 (m)
9	-	-	-	-	-	-	-	-	47,7	-	48,8	1,70 – 1,71 (m)
12	122,05	5,28 (m)	-	-	125,60	5,29 (m)	-	-	121,3	5,19 (dd, J 3,95 e 3,13 Hz)	127,0	5,29 (t, 3 Hz)
18	41,36	2,86 (m)	-	-	41,34	2,86 (m)	-	3H-28	47,1	1,94 (m)	56,6	2,29 (d, 14,4 Hz)
19	45,87	1,7 (m); 1,15 (s)	-	-	55,19	2,30	-	3H-29	-	-	38,5	1,03 (d, 7,2 Hz)
41,99					41,99	2,85 (m)	-	3H-29	-	-	38,5	1,03 (d, 7,2 Hz)
CH ₂												
1	40,92	1,32 (m); 1,6 (m)	-	3H-25	40,92	1,32 (m); 1,6 (m)	-	3H-25	46,4	0,94 (m); 2,05 (m)	48,0	0,92 – 0,93 (m)
6	17,58	1,40 (m)	-	3H- 26	17,58	1,40 (m)	-	3H- 26	18,4	1,62 (m)	19,1	1,41 – 1,42 (m)
7	-	-	-	-	-	-	-	-	32,7	1,40 (m); 0,87 (m)	33,3	2,23 – 2,24 (m)
11	23,18	1,97 (m)	-	-	23,03	1,97 (m)	-	3H-26	23,8	1,92 (m)	24,5	2,0 – 2,01 (m)
15	27,38	1,7 (m)	-	3H-27	-	-	-	-	26,0	1,25 (m)	29,2	1,17 – 1,18 (m)
16	-	-	-	-	-	-	-	-	26,8	0,80 (m)	25,3	1,97 – 1,98 (m)
19	45,87	1,70 (m); 1,15 (s)	-	3H-29; 3H-30	-	-	-	-	46,7	1,66 (m); 1,11(m)	-	2,25 – 2,26 (m)
21	33,50	1,4 (m); 1,22(s)	-	3H-29; 3H-30	-	-	-	-	34,7	1,22 (m)	33,6	1,35 – 1,36 (m)
22	-	-	-	-	31,92	2,24 (m)	-	3H-28	37,1	1,23 (m); 1,40 (m)	40,4	1,68 – 1,69 (m)
23	69,92	3,54 (m); 3,42(s)	-	3H-24	69,92	3,54 (m); 3,42(s)	-	3H-24	65,6	4,10 (d, J 11,33 Hz); 3,40 (d, J 11,33 Hz);	66,4	1,64 – 1,65 (m)
30	-	-	-	-	103,83	4,70 (s), 4,65(s)	-	-	-	-	105,3	1,86 – 1,87 (m)
CH ₃												
24	22,6	1,15 (s)	-	-	16,3	0,8 (s)	H-4	-	22,9	1,30 (s)	13,9	3,29 (d, 9,6 Hz)
25	17,35	1,09 (s)	-	-	17,4	1,09 (s)	-	-	17,4	0,97 (s)	17,7	3,53 (d, 9,6 Hz)
26	16,4	0,87(s)	-	-	16,4	0,87(s)	-	-	16,7	0,94 (s)	17,8	0,73 (s)
27	25,11	1,21 (s)	-	-	25,1	1,22 (s)	-	-	26,0	1,13 (s)	24,1	0,88 (s)
28	27,8	1,04 (s)	-	-	-	-	-	-	28,4	0,83 (s)	-	1,21 (s)
29	32,16	0,93 (s)	-	3H-30	15,8	1,04	-	-	33,3	0,88 (s)	16,8	-
30	22,58	0,97 (s)	-	3H-29	-	-	-	-	23,6	0,87 (s)	-	-

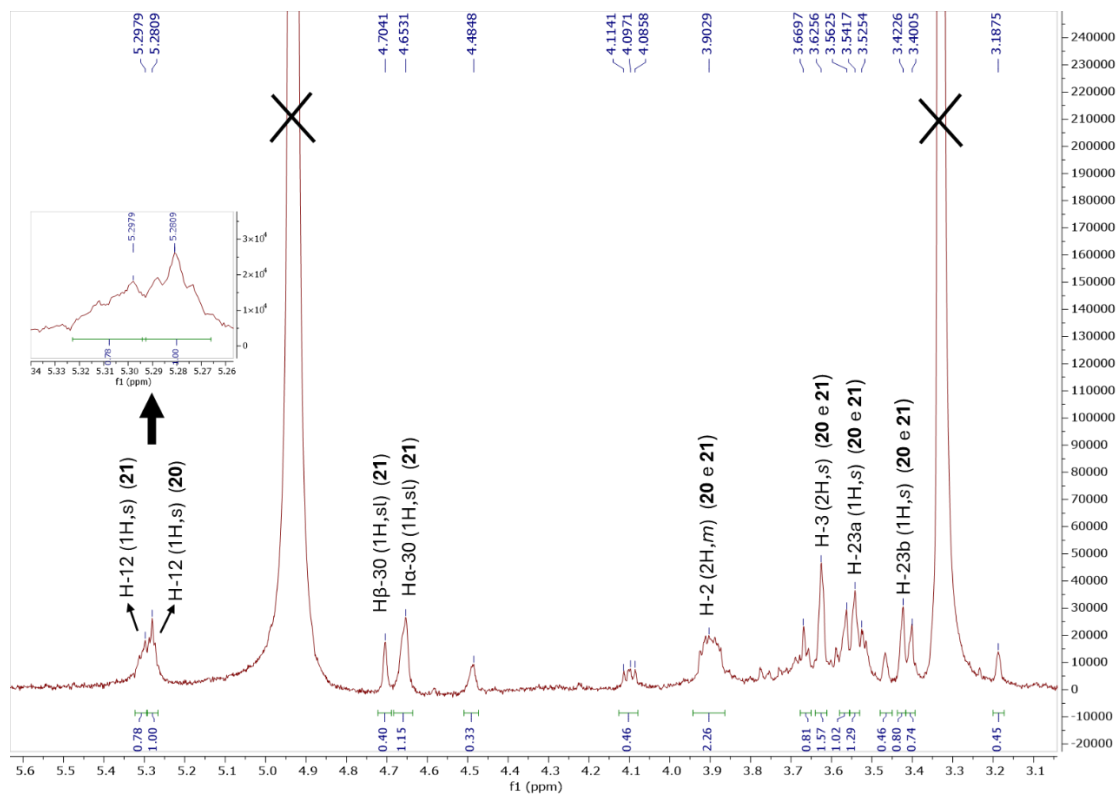


Figura 29 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) de **20** e **21** na região entre δ_{H} 3,1-5,6 ppm.

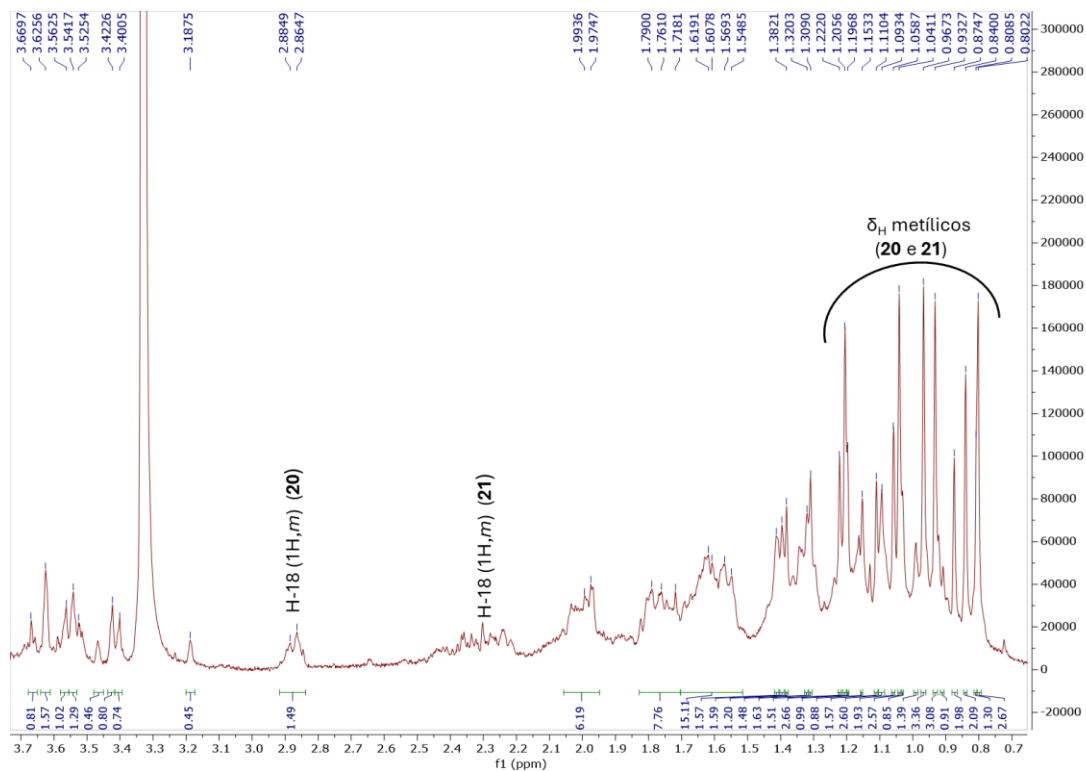


Figura 30 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) de **20** e **21** na região entre δ_{H} 0,7-3,72 ppm.

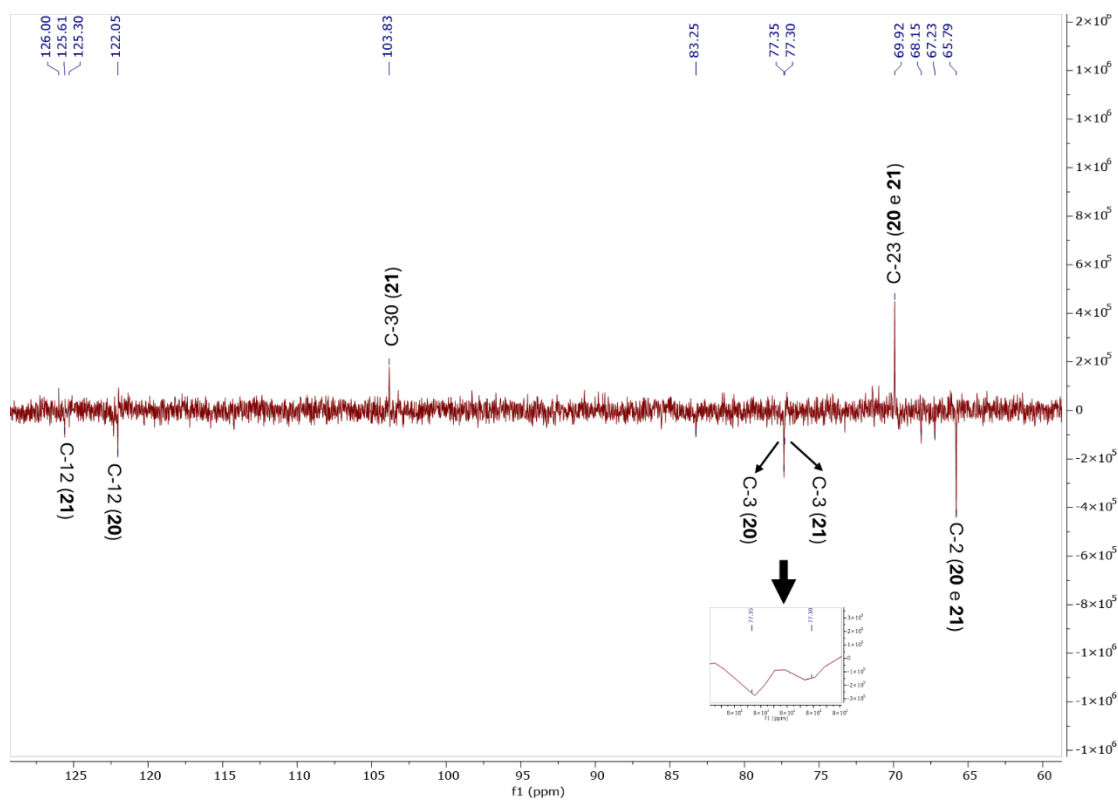


Figura 31- Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) de **20** e **21** na região entre δ_{C} 60,0-127,0 ppm.

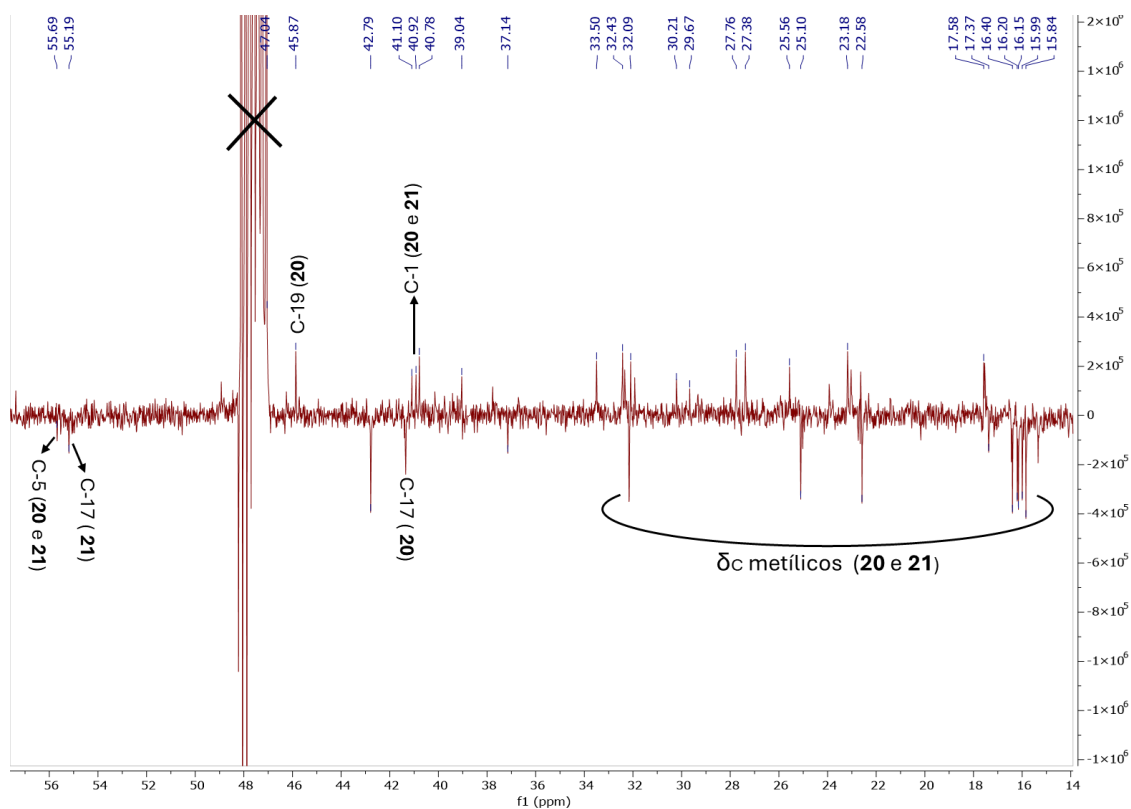


Figura 32- Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) de **20** e **21** na região entre δ_{C} 14,0-58,0 ppm.

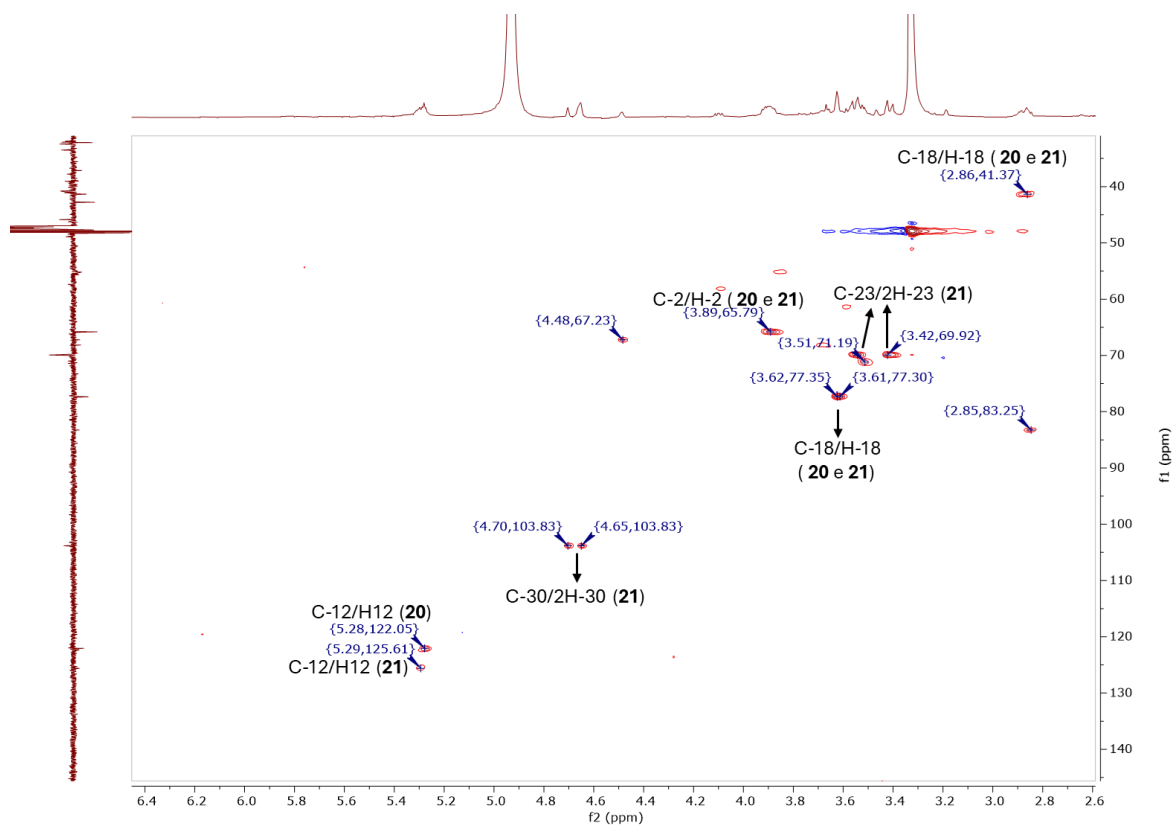


Figura 33- Espectro de HSQC (500/125 MHz, CD₃OD) de **20** e **21** na região entre δ_H 2,6-6,4 ppm.

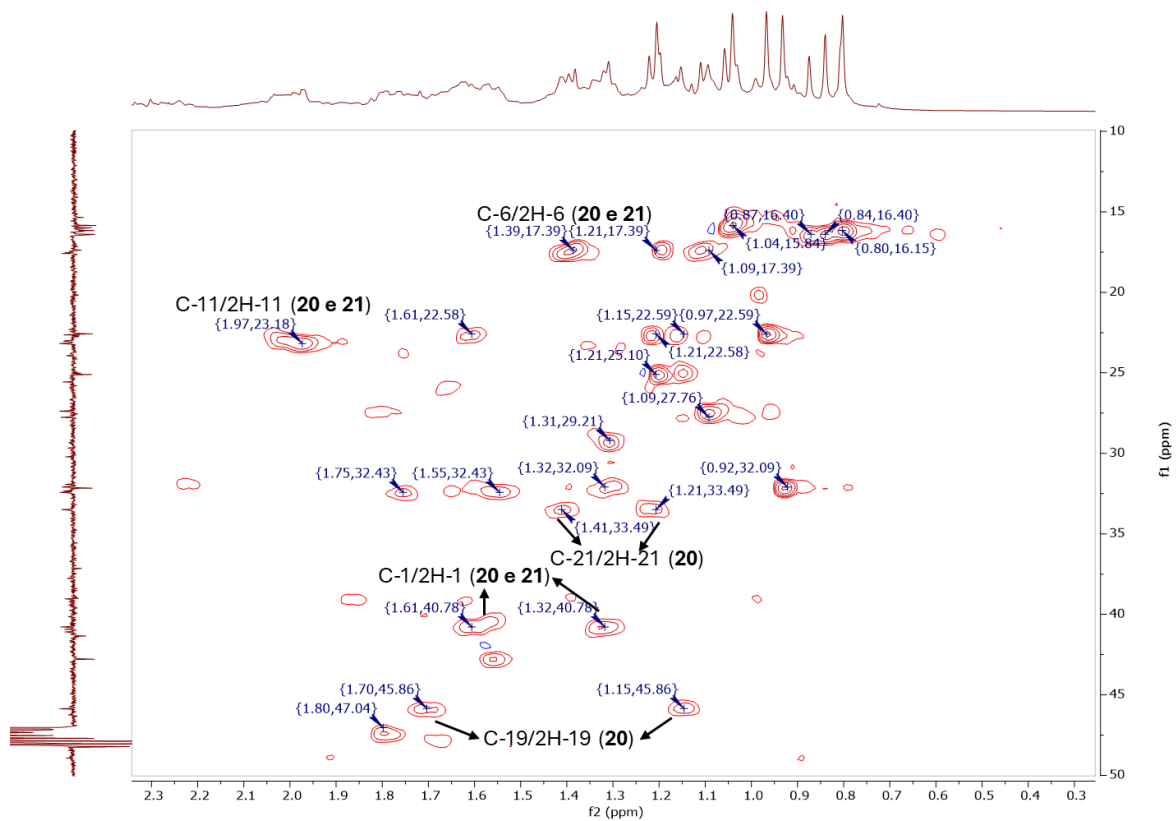


Figura 34 - Espectro de HSQC (500/125 MHz, CD₃OD) de **20** e **21** na região entre δ_H 0,3-2,3 ppm.

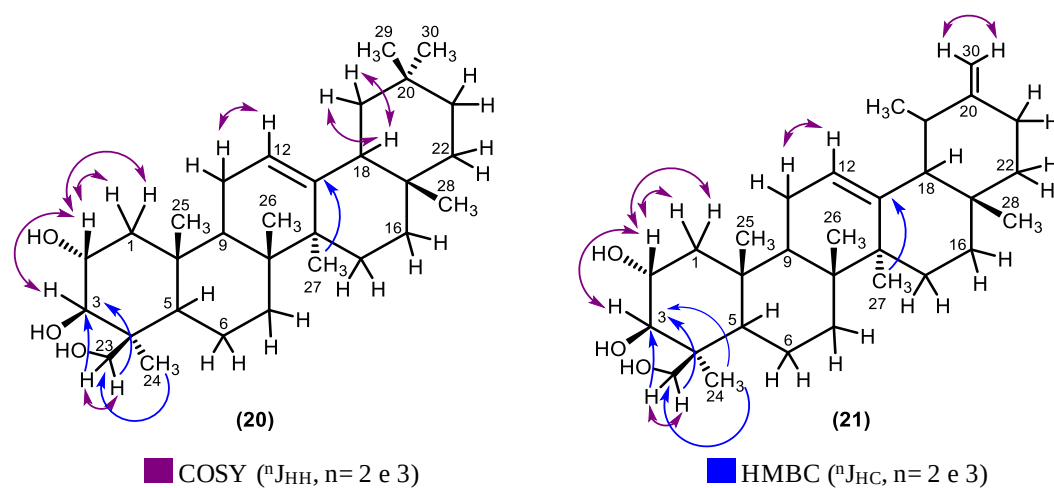


Figura 35 - Principais correlações observadas nos espectros bidimensionais de COSY e HMBC de **20** e **21**.

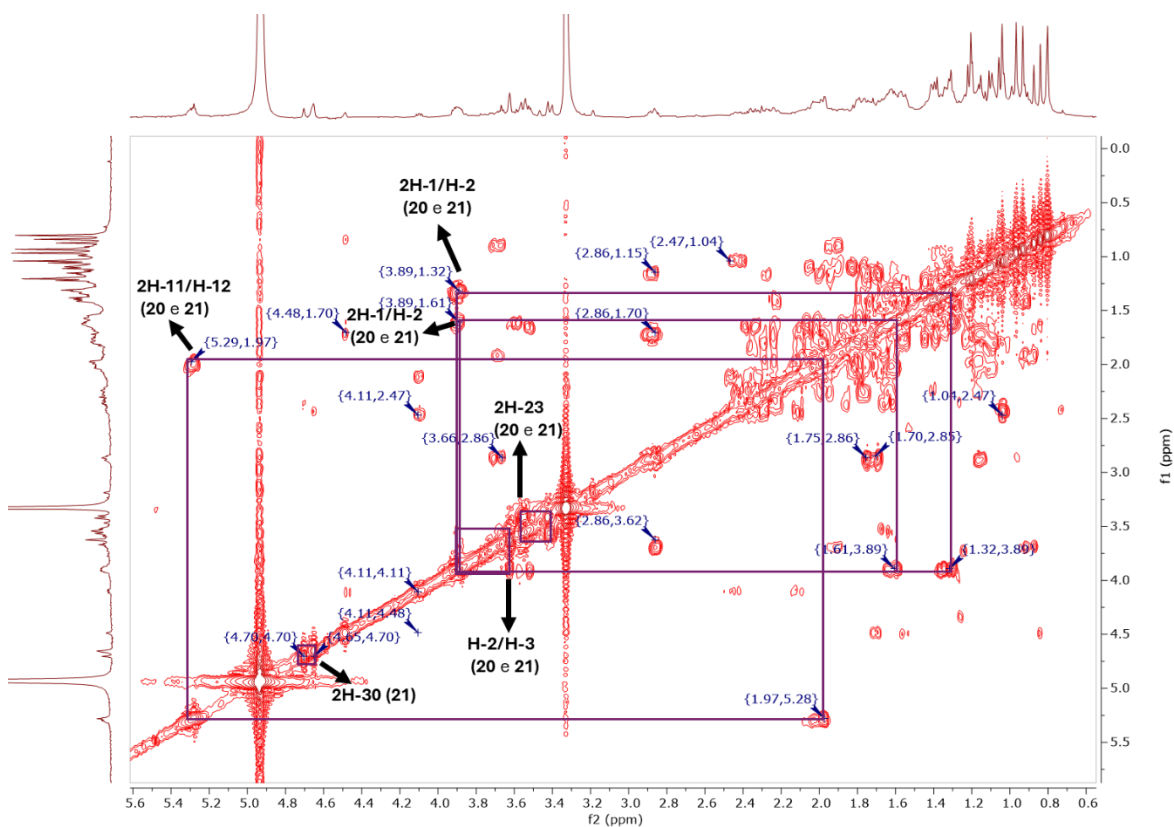


Figura 36 - Espectro de COSY (500, CD₃OD) de **20** e **21** na região entre δ_H 0,0-5,6 ppm.

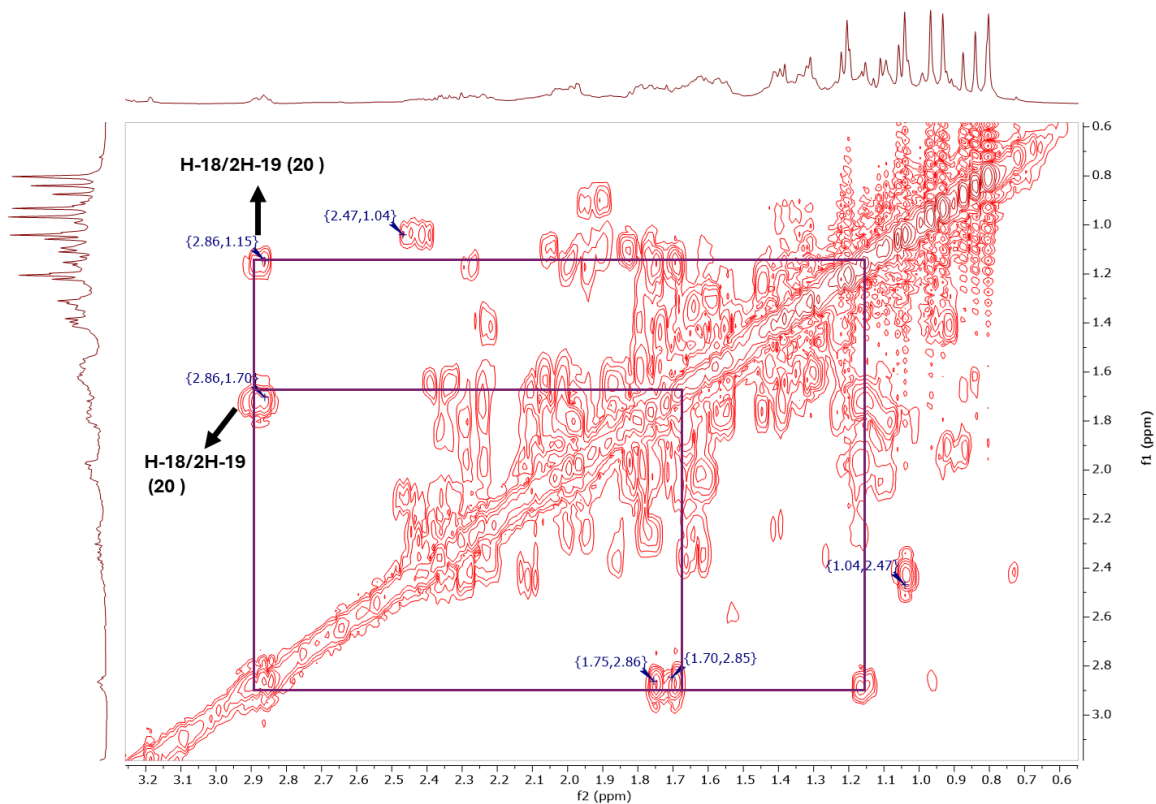


Figura 37 - Expansão de espectro de COSY (500, CD₃OD) de **20** e **21** na região entre δ_H 0,6-3,2 ppm.

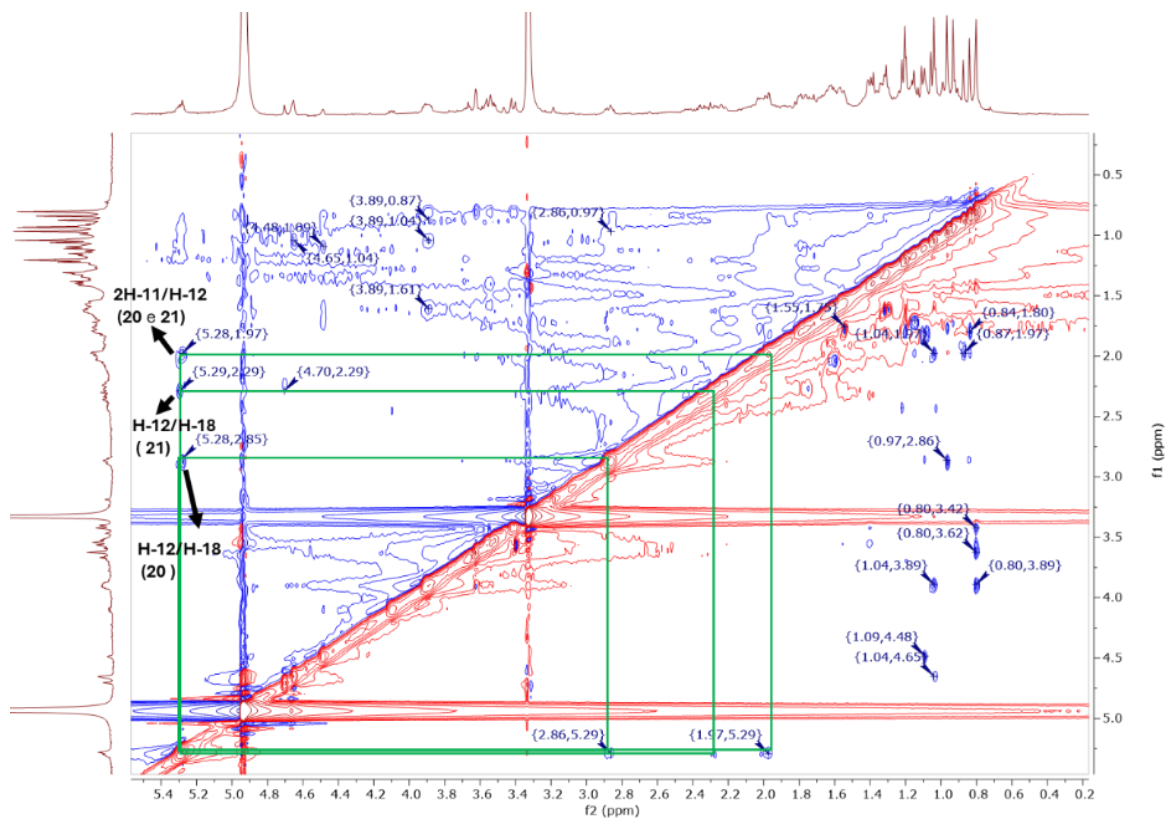


Figura 38 - Espectro de NOESY (500, CD₃OD) de **20** e **21** na região entre δ_H 0,2-5,7 ppm.

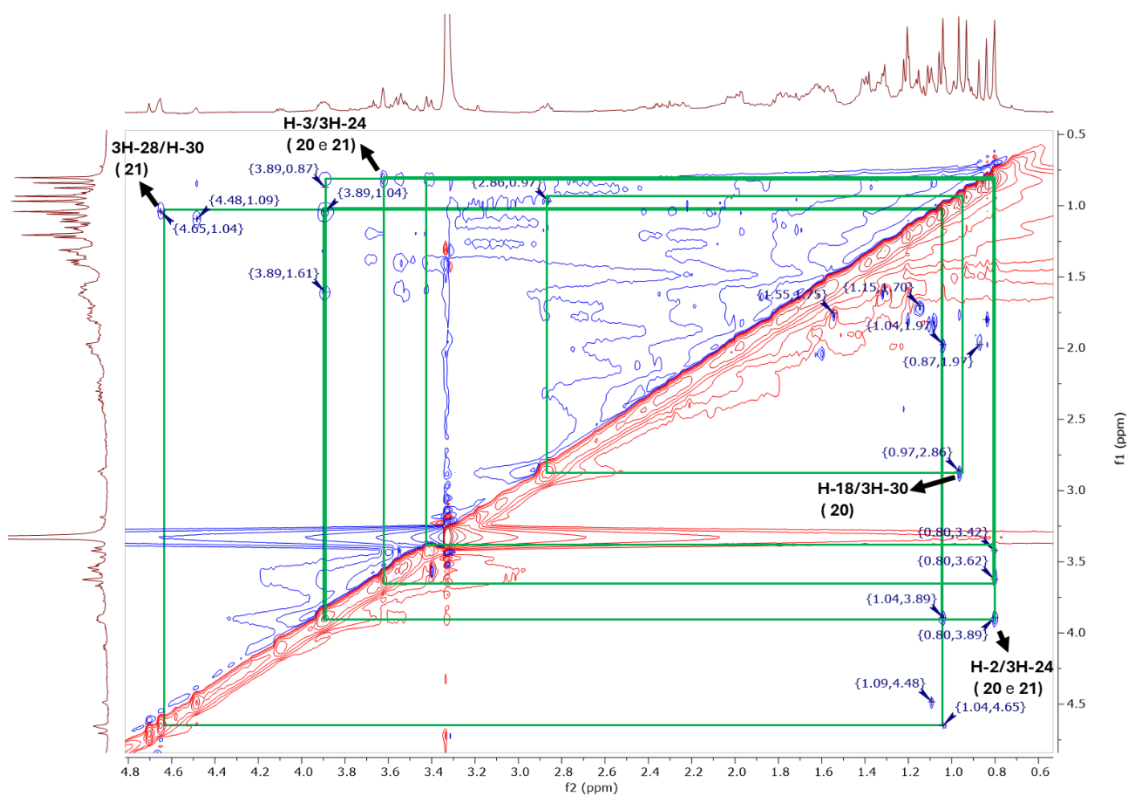


Figura 39 - Espectro de NOESY (500, CD₃OD) de 20 e 21 na região entre δ_H 0,5-4,8 ppm.

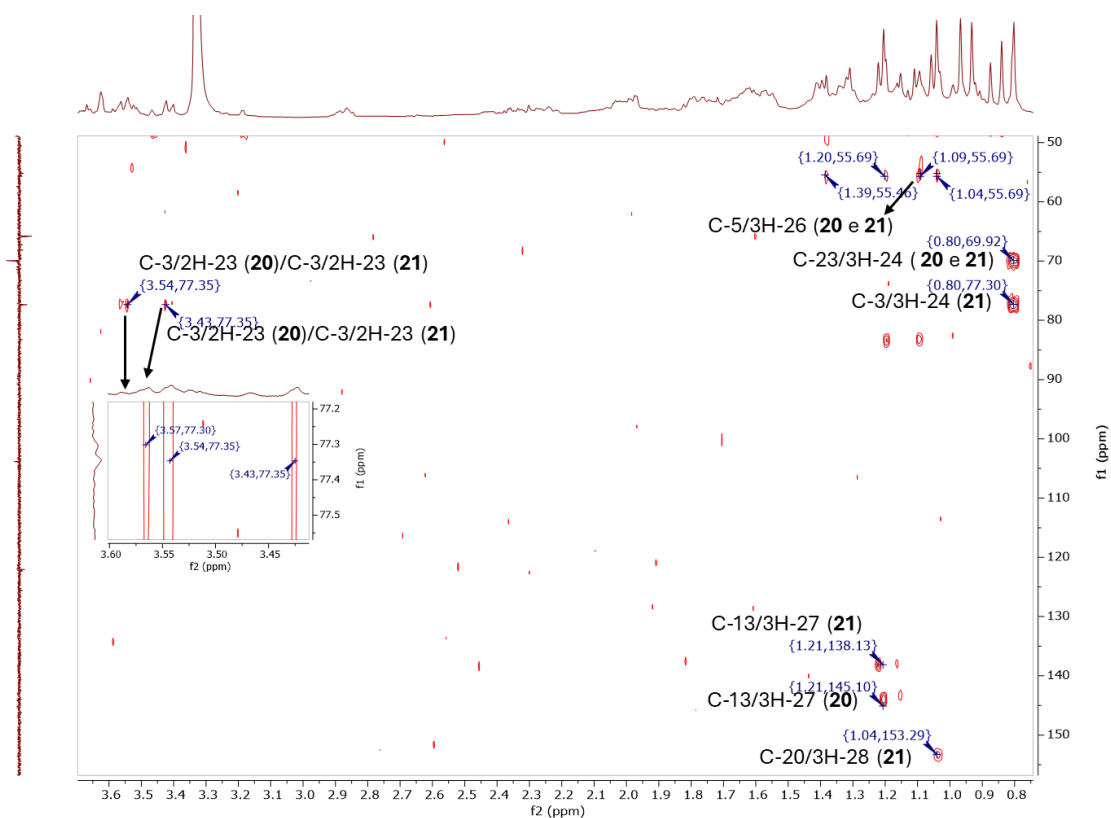


Figura 40 - Espectro de HMBC (500/125 MHz, CD₃OD) de 20 e 21 na região entre δ_H 0,7-3,7 ppm.

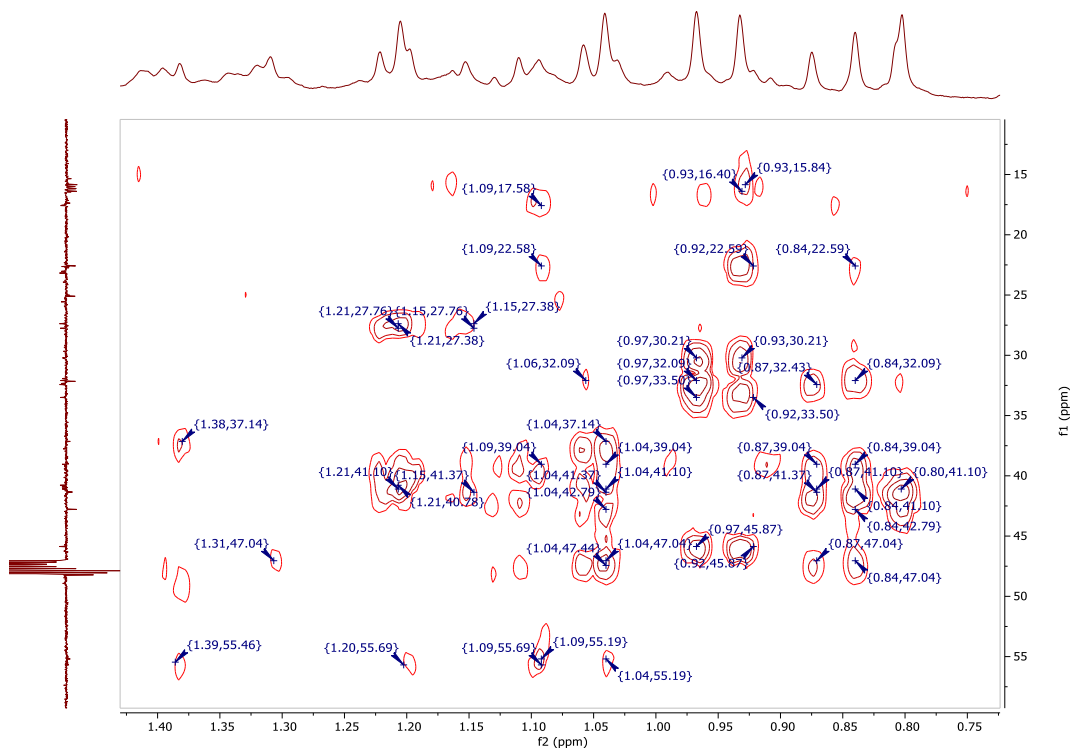


Figura 41 - Espectro de HMBC (500/125 MHz, CD₃OD) de **20** e **21** na região entre δ_H 0,7-1,43 ppm.

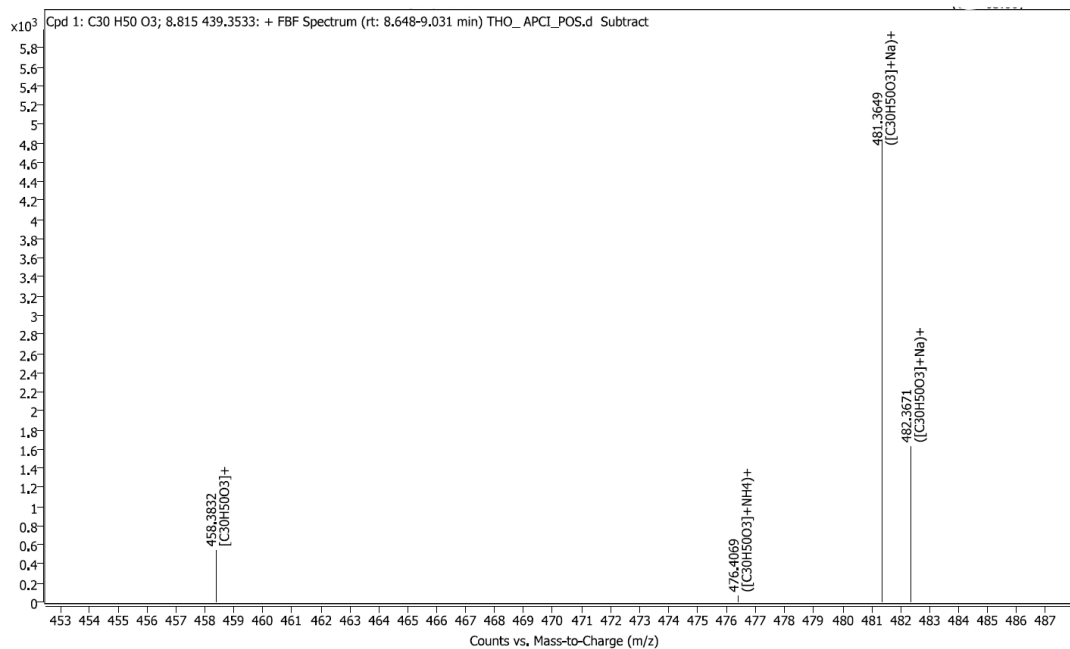


Figura 42 - Espectro HRESIMS em modo positivo do THO (**20**), exibindo o pico $[M+Na]^+$ em m/z 481,3649.

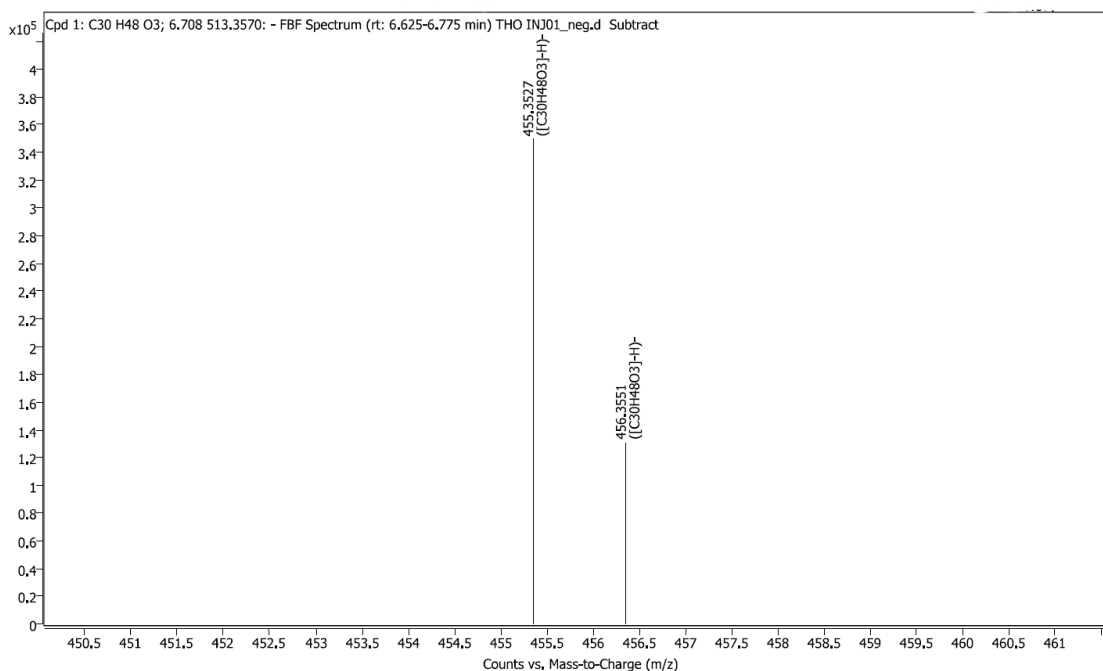


Figura 43 - Espectro HRESIMS em modo negativo de **21**, exibindo o pico $[M-H]^-$ em m/z 455,3527.

2.3.1.7. Elucidação estrutural dos esteroides: **5**, **6**, **7**, **15** e **16**

Ao submeter a fração GMHR-F1(13-15), às análises de RMN unidimensionais de 1H e ^{13}C (Figura 44, pág. 77), conclui-se que ela corresponde a uma mistura dos constituintes **5** e **6**, triterpenos tetracíclico da classe dos fitoesteróis, muito comuns em plantas. Seus espectros apresentaram notável similaridade com os obtidos para a fração GMDR-E10 (substâncias **15** e **16**, [pág. 76](#)), cujos dados são compatíveis com glicosídeos esteroidais.

No espectro de RMN de 1H , observa-se um conjunto de simpletos na região entre δ_H em 0,50 e 0,98, evidenciando a presença de hidrogênios metílicos, característicos do esqueleto ciclopentanoperidrofenantrenico (sistema de anéis condensados e uma cadeia lateral ligada ao C-17) que define as substâncias **5**, **6**, **15** e **16** (Tabela 6, pág. 80). Esses sinais correlacionam-se com os sinais observados no espectro DEPT-Q, no qual os deslocamentos químicos dos carbonos metílicos aparecem predominantemente na faixa de 11,5 a 20,00 ppm.

A insaturação entre C-5 e C-6 nos quatro isolados foi justificada por sinais de ^{13}C em δ 140,77 e 121,51 ppm (C-5/6 de **5** e **6**), e 140,68 e 121,78 ppm (C-5/6 de **15** e **16**). No espectro de 1H , dois simpletos largos, com integração para dois hidrogênios cada, em δ_H 5,27 (2H, sl) e 5,41(2H, sl), confirmam os hidrogênios metínicos sp^2 H-6 dos isolados.

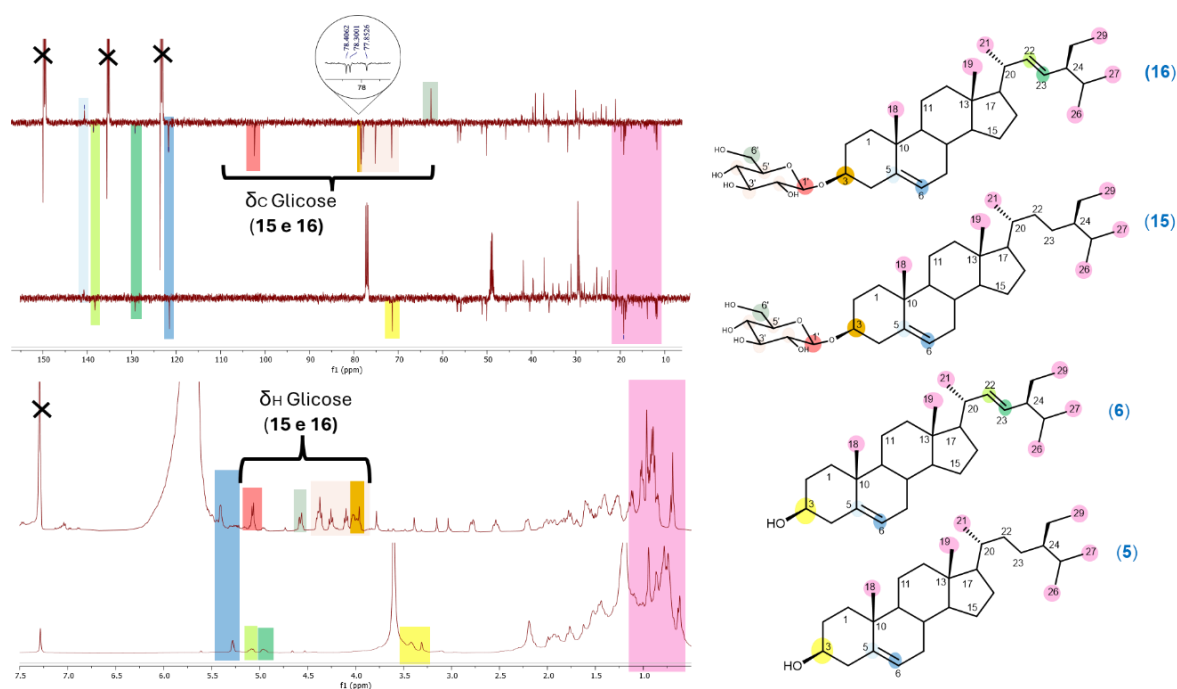


Figura 44 - Comparação dos espectros de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) dos compostos **5**, **6** (em CDCl_3) e **15** e **16** (em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$).

A análise espectroscópica por RMN foi fundamental para diferenciação estrutural dos núcleos esteroidais das substâncias isoladas. A interpretação conjunta dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , permitiu distinguir características estruturais sutis entre os esteroides. A exemplo, possibilitou deduzir a ocorrência de uma ligação dupla na cadeia lateral entre os carbonos C-22 e C-23, observadas apenas nos isolados **6** e **16**, e ausente em **5** e **15**. No espectro DEPTQ, essa hipótese é sustentada pela existência de dois carbonos metínicos com deslocamentos químicos em δ_{C} 138,26 e 129,18 (**6**) e 138,62 e 129,23 (**16**), sugerindo a presença de um sistema sp^2 nessa posição da molécula.

Outro critério de diferenciação foi o substituinte hidroxila em C-3: em **5** e **6**, o multipletto em δ_{H} 3,40 e δ_{C} 71,32 indicam o hidrogênio oximetínico H-3 do núcleo ciclopentanoperidrofenantênico; em **15** e **16**, os sinais referentes a esses átomos se deslocam para δ_{H} 4,00 (2H, m) e δ_{C} 78,40, indicando uma possível glicosilação nessa posição que foi deduzida devidos aos dados adicionais nos espectros. Por fim, o padrão de sinais em δ_{H} 3,50-4,70 ppm, combinado com um sinal de carbono anomérico em δ_{C} 102,35/ δ_{H} 5,07 (2H, d, J 7,9 Hz), carbonos metínicos oxigenados em δ_{C} 75,13 (C-2'); 77,85 (C-3'); 71,45 (C-4'); 78,30 (C-5') e o carbono oximetilênico em δ_{C} 62,61 (C-6'), reforçam a presença de uma unidade de β -glicose ligada à posição C-3 do núcleo esteroideal ciclopentanoperidrofenantênico em **15** e **16**.

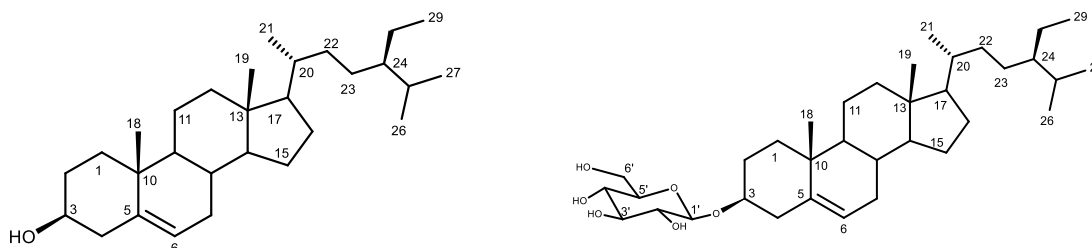
O experimento HSQC (Tabela 6, pág. 80) para **15** e **16** possibilitou a atribuição inequívoca dos sinais de carbono e hidrogênio dessas substâncias, conforme apresentados na Tabela 6, pág. 80, que também inclui os dados unidimensionais de **5** e **6**. A comparação desses dados com a literatura (PESHIN e KAR, 2017; GIPREEL *et al.*, 2021) levou à identificação de **5** e **6** como uma mistura de β -sitosterol e estigmasterol, e **15** e **16** como seus glicosídeos correspondentes. As semelhanças físico-químicas dessas misturas de fitoesteróis explicam a dificuldade de separação cromatográfica.

No caso do composto (**7**) não foi possível elucidar sua estrutura por RMN, pois seu núcleo esteroidal, mantém semelhança às de outros esteroides em mistura, dificultando a diferenciação com base nos dados disponíveis na literatura usada para justificar a proposta conforme descrito a seguir. Para esse caso, e para confirmação estrutural e identificação dos metabólitos elucidados via RMN, recorreu-se a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) e a espectrometria de massas por cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas com analisador quadrupolo-tempo de voo (LC-QTOF-MS), no modo negativo.

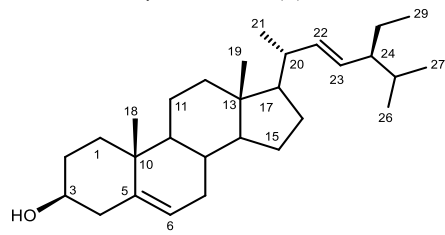
No CG-MS da mistura GMHR-F 1-11(Figura 45, pág. 81), um pico majoritário em t_R 34,8 min e outros dois minoritários em t_R 35,6 e 34,5 min associam-se a íons moleculares m/z 412, 400 e 414.

No espectro de massas por impacto de elétrons do composto **6** (Figura 46, pág. 82), o íon molecular em m/z 412 coincide com $C_{29}H_{48}O$ correspondente ao estigmasterol. O íon em m/z 414, corresponde a $C_{29}H_{50}O$ (β -sitosterol, **5**). No espectro do composto **7**, o íon molecular em m/z 400 ($C_{28}H_{48}O$) foi atribuído ao campesterol.

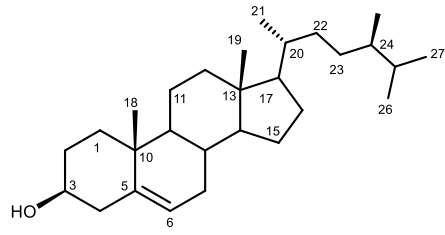
As fórmulas moleculares de **15** ($C_{35}H_{60}O_6$, 576 g.mol⁻¹) e **16** ($C_{35}H_{58}O_6$, 574 g.mol⁻¹) foram confirmadas com de HRESIMS em modo negativo (Figura 47, pág. 83 e Figura 48, pág. 83). O cromatograma de LC-QTOF-MS mostrou pico majoritário em t_R 12,19 min com íon m/z 621,4354 $[M+HCOO]^-$ (**15**) e pico minoritário em t_R 11,62 min com m/z 619,4190 $[M+HCOO]^-$ (**16**), corroborando a elucidação dos glicosídeos esteroidais.



β-sitosterol (5)

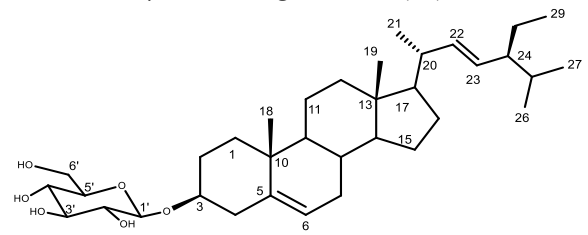


Estigmasterol (6)



Campesterol (7)

β-sitosterol glicosilado (15)



Estigmasterol glicosilado (16)

Tabela 6: Dados de RMN de ^{13}C (125 MHz, DEPTQ, CDCl_3 e $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) e ^1H (500 MHz, CDCl_3 e $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) das substâncias **5**, **6**, **15** e **16** em comparação com dados da literatura (* PESHIN e KAR, 2017; **GIPREEL *et al.*, 2021) [*400 e 100 MHz, CDCl_3 ; **500 e 125 MHz].

	2021) [400 e 100 MHz, CDCl ₃ , 300 e 125 MHz].											
	Substância 5		Substância 6		Substância 15		Substância 16		Literatura			
									[β-sitosterol glicosídeo] *PESHIN e KAR, 2017		[estigmasterol glicosídeo] **GIPREEL <i>et al.</i> , 2021	
					δ _C	δ _H	δ _C	δ _H	δ _C	δ _H	δ _C	δ _H
C												-
5	140,77	-	140,77	-	140,68	-	140,68	-	140,41	-	140,92	-
10	-	-	-	-	36,71	-	36,71	-	36,18	-	36,94	-
13	-	-	-	-	42,26	-	42,26	-	41,82	-	42,21	-
CH												
3	71,32	3,40 (m)	71,32	3,31 (sl)	78,40	4,00 (m)	78,40	4,00 (m)	76,85	3,97 (m)	70,53	3,42 (dd, J8,4 Hz)
6	121,51	5,27 (2H, s)	121,51	5,27 (2H, s)	121,78	5,41 (2H, sl)	121,78	5,41 (2H, sl)	121,20	5,35 (t, J3,6 Hz)	121,65	5,32 (br, d, J4,5 Hz)
8	-	-	-	-	31,04	1,40 (sl)	31,91	1,96 (m)	31,26	1,36 (m)	31,88	1,55 (1H, s)
9	-	-	-	-	50,21	0,93 (m)	51,23	1,58 (m)	49,55	0,85 (m)	50,10	0,99 (1H, s)
14	-	-	-	-	56,10	1,28 (m)	56,10	1,01 (m)	56,71	0,95 (m)	40,47	1,04 (1H, m)
17	-	-	-	-	55,16	-	55,82	-	55,38	1,20 (m)	55,81	1,14 (1H, m)
20	-	-	-	-	31,91	-	36,18	1,41 (m)	35,45	1,40 (m)	24,36	2,02 (1H, m)
22	-	-	138,26	5,08 (m)	-	-	138,62	-	-	-	129,30	5,18 (dd, J8,4 e 15,0 Hz)
23	-	-	129,18	4,96 (m)	-	-	129,23	-	-	-	121,58	5,04 (dd, J8,4 e 8,1 Hz)
24	-	-	-	-	45,88	1,01 (s)	40,59	-	45,09	0,94 (m)	31,85	1,84 (2H, s)
25	-	-	-	-	29,22	1,71 (s)	-	-	28,64	1,68 (m)	37,31	1,63 (1H, m)
1'	-	-	-	-	102,35	5,07 (2H, d, J7,9 Hz)	102,35	5,07 (2H, d, J7,9 Hz)	100,73	4,20 (d, J7,9 Hz)	98,28	4,23 (d, J7,8 Hz)
2'	-	-	-	-	75,13	4,10 (2H, t, J8,4 Hz)	75,13	4,10 (2H, t, J8,4 Hz)	73,42	2,89 (dt, J4,5 e 8,0 Hz)	70,53	3,37 (1H, m)
3'	-	-	-	-	77,85	4,38 (2H, m)	77,85	4,38 (2H, m)	76,86	3,27 (dt, J4,5 e 8,0 Hz)	77,23	3,14 (1H, m)
4'	-	-	-	-	71,45	4,25 (2H, t, 9,1 Hz)	71,45	4,25 (2H, t, 9,1 Hz)	70,04	3,00 (dt, J4,5 e 8,0 Hz)	73,99	3,06 (1H, m)
5'	-	-	-	-	78,30	4,00 (m)	78,30	4,00 (m)	76,72	3,06 (dt, J4,5 e 8,0 Hz)	73,08	3,04 (1H, m)
CH ₂												
1	-	-	-	-	39,82	1,11 (m) 1,95 (m)	39,11	2,55 (H, t, J10,7 Hz) 2,78 (2H, dd, J14,2 e 4,4 Hz)	36,79	1,0 (m) 1,40 (m)	38,79	1,76 (2H, m)
2	-	-	-	-	32,01	1,41 (m) 1,58 (m)	32,01	1,41 (m) 1,58 (m)	29,23	1,58 (m) 1,26 (m)	33,82	1,50 (2H, m)
4	-	-	-	-	39,11	2,55 (H, t, J10,7 Hz) 2,78 (2H, dd, J14,2 e 4,4 Hz)	39,11	2,55 (H, t, J10,7 Hz) 2,78 (2H, dd, J14,2 e 4,4 Hz)	39,28	2,26 (dt, J4,6 e 8,10 Hz)	36,76	1,80 (br, 2H, d, J10,2 Hz)
7	-	-	-	-	32,01	1,30 (m) 1,77 (m)	-	-	31,38	1,73 (dd, J2,57 e 16,0 Hz)	29,73	1,46 (2H, m)
11	-	-	-	-	30,01	1,77 (m) 2,22 (d)	-	-	20,56	1,0 (m) 1,42 (m) 1,42 (m)	36,69	1,39 (2H, m)
12	-	-	-	-	37,33	1,01 (m) 1,73 (m)	-	-	38,26	1,52 (dd, J4,3 e 12,37 Hz) 1,20 (m)	22,58	1,93 (1H, m)
15	-	-	-	-	-	-	-	-	23,83	1,05 (m) 1,57 (m)	56,74	1,79 (2H, m)
16	-	-	-	-	-	-	-	-	27,76	1,25 (m) 1,85 (m)	12,31	1,81 (2H, m)
22	-	-	-	-	34,04	1,11 (m) 1,28 (m)	-	-	33,29	1,20 (m)	-	-
23	-	-	-	-	-	-	-	-	25,36	1,25 (m)	-	-
28	-	-	-	-	-	-	-	-	22,06	1,30 (m)	25,36	1,44 (2H, s)
6'	-	-	-	-	62,61	4,57 (1H, d, J10,4 Hz) 4,38 (m)	62,61	4,57 (1H, d, J10,4 Hz) 4,38 (m)	62,82	4,55 (dd, J2,5 e 11,77 Hz)	61,53	3,66 (1H, m)
CH ₃												
18	11,73	0,61 (s)	11,83	0,63 (s)	11,94	0,69 (3H, s)	-	-	11,64	0,70 (s)	12,06	0,96 (3H, s)
19	18,87	0,78 (s)	18,69	0,78 (s)	18,87	0,89 (s)	19,00	0,89 (s)	19,07	0,94 (s)	19,57	0,91 (3H, s)
21	19,24	0,94 (s)	19,24	0,86 (s)	19,27	0,96 (3H, sl)	21,31	0,93 (m)	18,58	0,95 (d, J6,5 Hz)	21,30	0,91 (3H, d, J7,2 Hz)
26	19,65	0,81 (s)	-	-	19,83	0,91 (s)	-	-	19,69	0,87 (d, J7,0 Hz)	21,42	0,82 (d, J6,3 Hz)
27	18,88	0,81 (s)	-	-	19,08	0,92 (s)	-	-	18,89	0,88 (d, J7,0 Hz)	28,99	0,79 (d, J6,9 Hz)
29	12,09	0,74 (s)	11,92	-	12,01	0,88 (s)	-	-	11,75	0,97 (t, J7,5 Hz)	20,18	0,94 (d, J8,1 Hz)

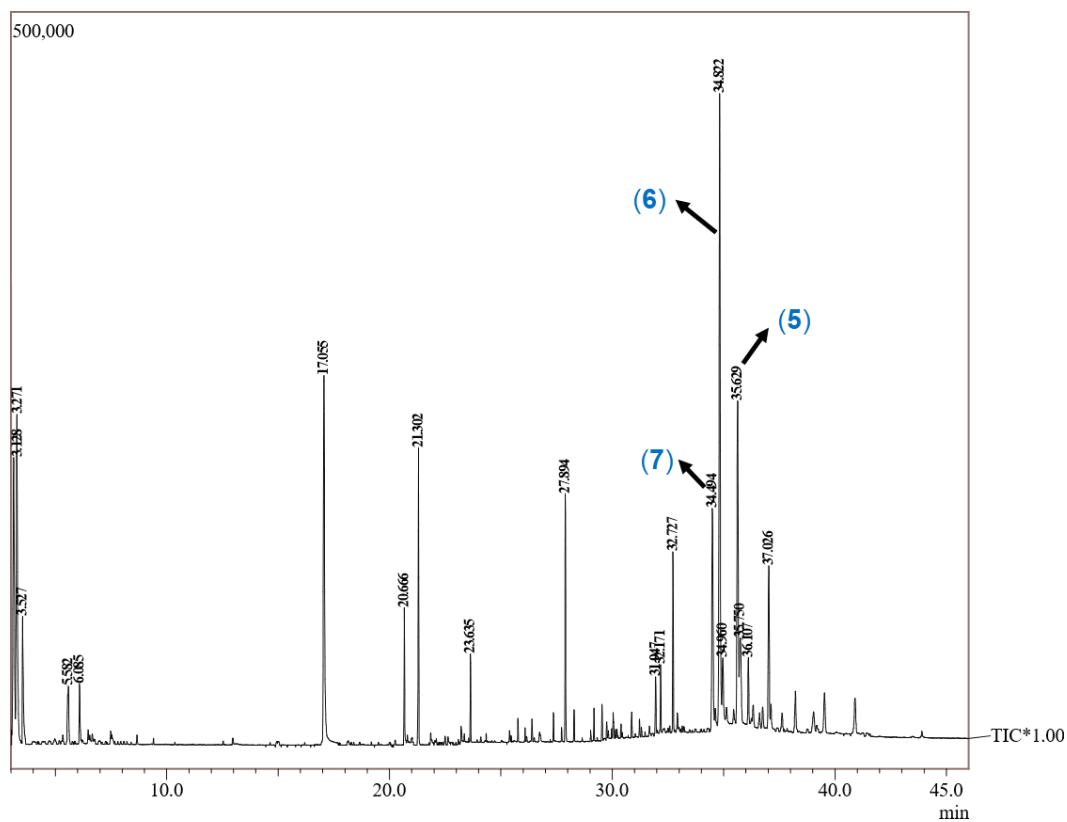
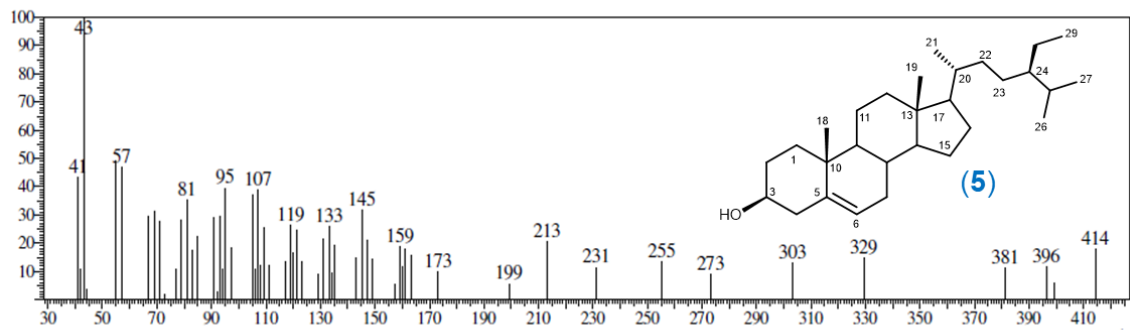
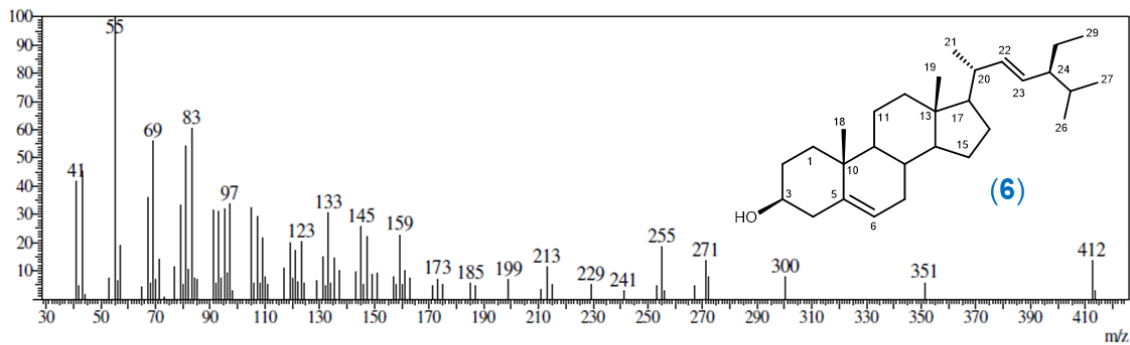


Figura 45 - Cromatograma a gás da fração GMHR-F1(13-15), mistura contendo 5, 6 e 7.

Line#:17 R.Time:35.6(Scan#:3916)



Line#:15 R.Time:34.8(Scan#:3820)



Line#:14 R.Time:34.5(Scan#:3780)

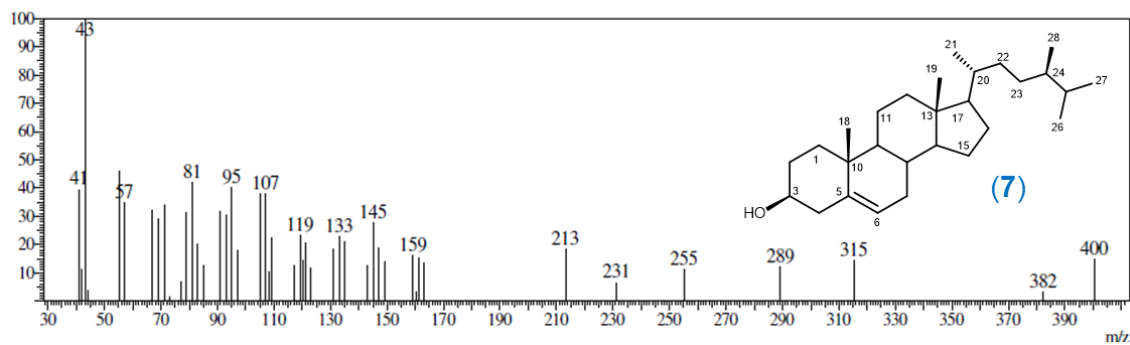


Figura 46 - Espectro de massas por I.E. (70 eV) de 5,6 e 7.

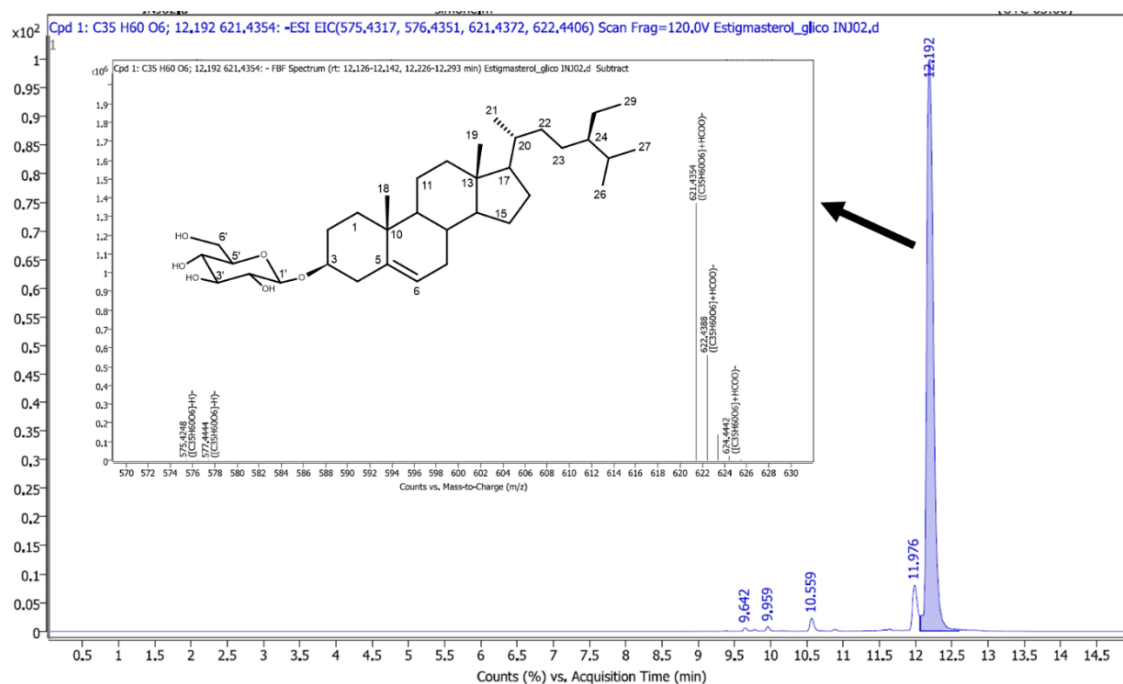


Figura 47 - Espectro HRESIMS em modo negativo de **15**, exibindo o pico $[M+HCOO]^-$ em m/z 621,4354.

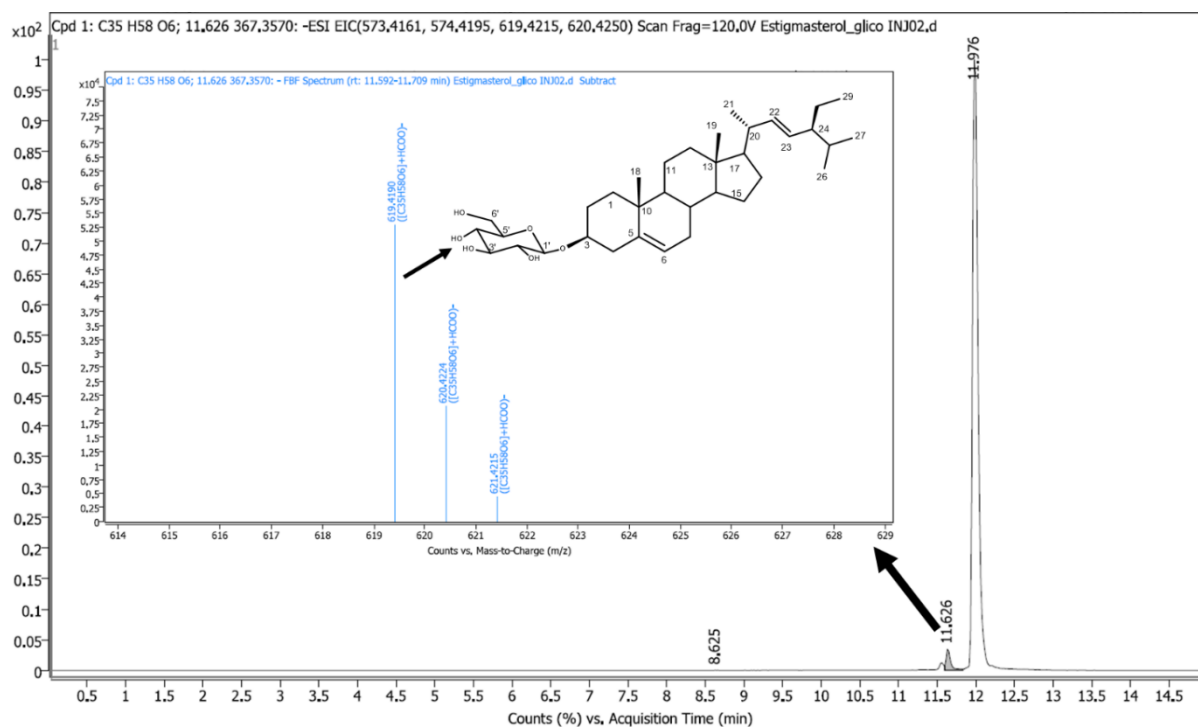


Figura 48 - Espectro HRESIMS em modo negativo de **16**, exibindo o pico $[M+HCOO]^-$ em m/z 619,4191.

2.3.1.8. Elucidação estrutural do ácido graxo (éster metílico de ácido palmítico): **1**

A análise por CG-EM da fração oleosa amarelada (GMHR-10, 27,10 mg) indicou a presença de uma mistura de cinco componentes, sendo quatro minoritários e um majoritário, com tempos de retenção entre 3,71 e 25,58 min. O cromatograma mostrou um pico de alta intensidade em tR 18,98 min, cujo íon molecular $[M]^+$ apresentou m/z 270, consistente com a fórmula $C_{17}H_{34}O_2$ do éster metílico de ácido palmítico (**1**) (Figura 49, pág. 85).

Uma vez determinada a fórmula molecular, a espectroscopia de RMN mostrou-se essencial, pois forneceu informações detalhadas sobre os ambientes químicos dos átomos que definem o esqueleto estrutural dos constituintes da amostra. No espectro de RMN de 1H (Tabela 7, pág. 85, Figura 50, pág. 86) foram observados sinais na região de 0,75 a 3,80 ppm, típicos de hidrogênios alifáticos de ácido graxo, com metilênicos α adjacentes à carbonila em δ_H 2,26 (2H, *t*, *J* 7,5 Hz, H-2) e metilênicos β em δ_H 1,57 (2H, *sl*, H-3). Evidenciou-se um simpleto intenso em δ_H 1,21 (*s*, H-4 a H-15), atribuído aos demais hidrogênios metilênicos da cadeia, bem como um tripleto em δ_H 0,83 (3H, *t*, *J* 6,6 e 6,8 Hz) correspondente ao grupo metílico terminal. A presença dos hidrogênios oximetílicos (H-1') do éster foi justificada pelo simpleto em δ_H 3,62 (3H), compatível com o metil do éster. O espectro de DEPTQ (Figura 51, pág. 86) permitiu identificar o carbono metoxílico do éster (C-1') em 51,46 ppm e o carbono metílico terminal (C-16) em 14,14 ppm, além de carbonos metilênicos sinais negativos entre 22,0 e 35,00 ppm, com os maiores deslocamentos químicos observados para os carbonos vizinhos à carbonila, C-2 (δ_C 34,13) e C-3 (δ_C 24,97). Embora o sinal do carbono carbonílico do éster não tenha sido detectado no espectro de ^{13}C , a proposta estrutural de um metil éster de ácido hexadecanóico (éster metílico de ácido palmítico) é corroborada pelas possibilidades de fragmentações observadas no espectro de CG-MS. No espectro de massas (Figura 49, pág. 85), além do pico correspondente ao íon molecular $[M]^+$ m/z 270, valores em m/z 239 (perda de OCH_3), 227 ($M - 43$)⁺, 213 ($M - 57$)⁺, 199 ($M - 71$)⁺, 185 ($M - 85$)⁺, 171 ($M - 99$)⁺, 143 ($C_6H_{12}CO_2CH_3$)⁺, 101 ($CH_2CH_2CH_2CO_2CH_3$)⁺. Esses padrões de fragmentação são consistentes com a quebra esperada para um éster metílico alifático proposto para a substância **1**.

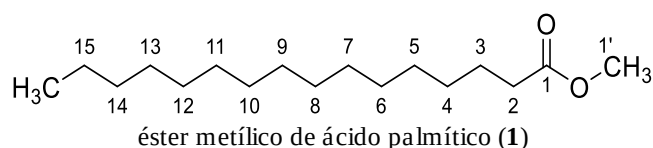


Tabela 7 Dados de RMN de ^{13}C (125 MHz, DEPTQ, CDCl_3) e ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância **1** em comparação com dados da literatura (SILVA *et al.*, 2022) [CDCl_3 , 500 MHz; CDCl_3 , 125 MHz]

Substância 1			Literatura SILVA <i>et al.</i> , 2022	
C (posição)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	δ_{C}	δ_{H}
1	-	-	174,41	-
2	34,14	2,26 (2H, t, J 7,5 Hz)	33,87	2,34 (dt, J 6,5; 7,5; 8,0 Hz)
3	24,98	1,57 (2H, s)	24,70	1,65 (q, J 7,0; 7,5 Hz)
4-15	22,70-31,95	1,21 (s)	-	1,28 (s)
16	14,14	0,83 (3H, t, J 6,6; 6,8 Hz)	14,10	0,90 (t, J 7,0 Hz)
1' (OCH ₃)	51,46	3,62 (3H, s)	51,37	3,69 (s)

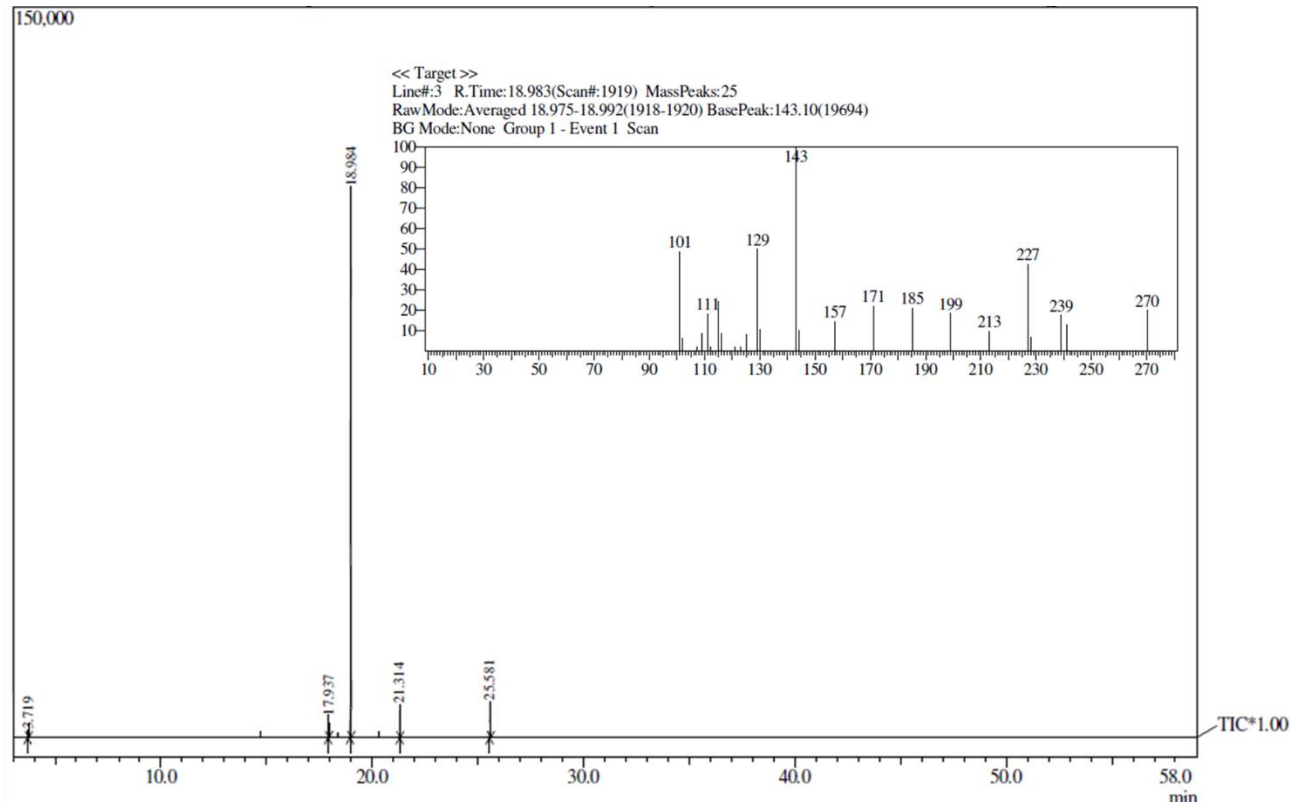


Figura 49 - Cromatograma gás e espectro de massas por I.E. (70 eV) de **1**.

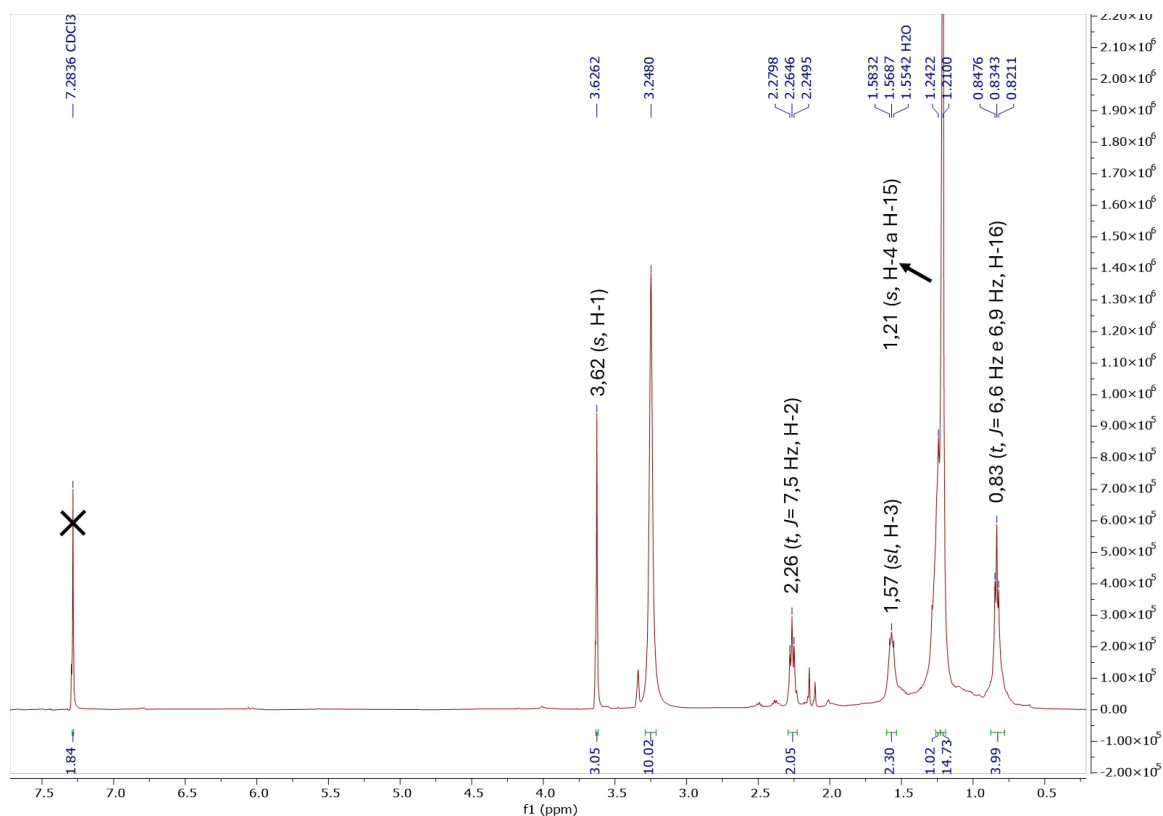


Figura 50 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **1**.

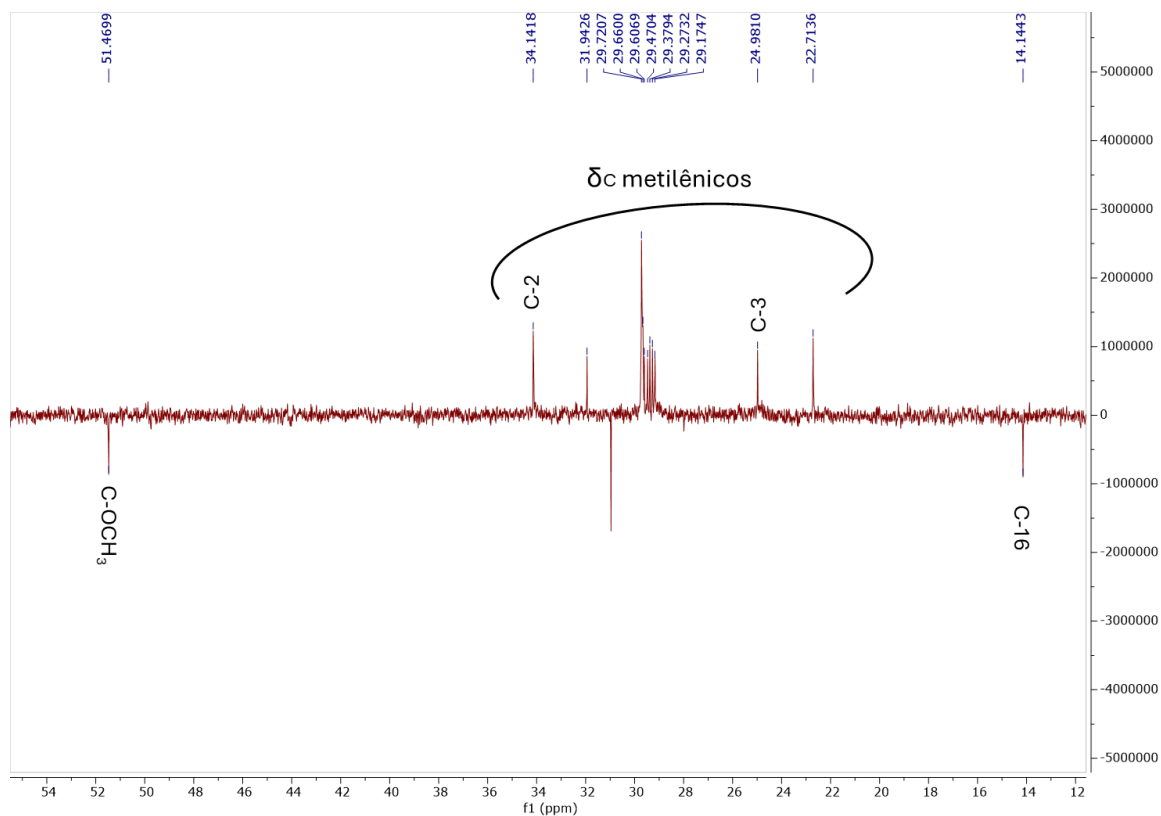


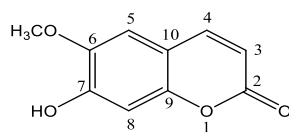
Figura 51 - Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de **1**.

2.3.1.9. *Elucidação estrutural dos compostos fenólicos isolados*

2.3.1.9.1. *Elucidação estrutural da cumarina: 11*

O precipitado branco amorfo (8,5 mg), constituído por uma mistura do ácido betulínico (substância **13**, pág. 51) e de um metabólito fenólico, exibiu fluorescência azul intensa em CCDA sob luz ultravioleta (365 nm), característica de cumarinas. A análise unidimensional por RMN, considerando apenas os sinais relacionados ao sistema aromático, ignorando os demais do triterpeno na mistura (assinalados como AB nos espectros), permitiu observar que tratava-se de um composto com sistema aromático com possibilidade de uma cumarina, coerente com a fórmula molecular $C_{10}H_8O_4$, determinada por espectrometria HRESIMS que apresentou o íon molecular em m/z 193,0493 $[M+H]^+$ e fragmentos compatíveis previstos na biblioteca (Figura 55, pág. 91).

A caracterização do esqueleto cumarínico baseou-se na comparação dos dados de RMN com a literatura (CARVALHO *et al.*, 2006; JEREZANO *et al.*, 2011). No espectro de RMN 1H (Figura 52, pág. 89), cinco sinais em campo baixo (δ_H 5,9-8,5), além de um simpleto em 3,87 ppm, foram atribuídos à substância **11**. Dois dupletos em δ_H 7,82 (1H, *d*, *J* 9,3 Hz) e 6,08 (1H, *d*, *J* 9,3 Hz) confirmaram a dupla α,β -insaturada (H-4 e H-3), cujo valores de constante de acoplamento 9,3 Hz é típica de átomos de hidrogênios vicinais em configuração *cis*. Além disso, são observados dois simpletos em δ_H 6,65 (1H, *s*) e 7,00 (1H, *s*), atribuídos aos hidrogênios H-5 e H-8, no anel aromático tetrassubstituído, cujos substituintes são um OH em 8,54 ppm (*sl*) e uma metoxila em δ_H 3,87 (3H, *s*) nas posições 6 e 7. O espectro de RMN ^{13}C (Figura 53, pág. 90) confirmou o esqueleto básico C6.C3 da cumarina, destacando-se o carbono carboxílico em δ_C 163,52 (C-2) e os carbonos sp^2 , em δ_C 108,44 (C-3) e 145,09 (C-4), compatíveis com a lactona α,β -insaturada. Os carbonos metínicos aparecem em δ_C 102,91 (C-5) e 107,59 (C-8). Outros sinais atribuídos a carbonos quaternários do anel aromático, não visíveis diretamente em ^{13}C , foram identificados no HMBC em δ_C 147,33 (C-6), 152,65 (C-7), 151,14 (C-9) e 109,31 (C-10) (Figura 54, pág. 90). O sinal em δ_C 55,07 foi associado ao grupo metoxila. Esses dados permitiram inferir a estrutura de **11** como 7-hidroxi-6-metoxi-2H-1-benzopiran-2-ona, também denominada escopoletina, já descrita em *G. thalictroides* (GARCEZ *et al.*, 2016).



Escopoletina (**11**)

Tabela 8 Dados de RMN de ^{13}C (125 MHz, DEPTQ, CD_3OD) e ^1H (500 MHz, CD_3OD) da substância **11** em comparação com dados da literatura (*CARVALHO *et al.*, 2006; **JEREZANO *et al.*, 2011) [CD_3OD , 200 MHz; $\text{DMSO}-d_6$, 125 MHz]

	Substância 11		Literatura	
	δ_{C}	δ_{H}	[11] *CARVALHO <i>et al.</i> , 2006; **JEREZANO <i>et al.</i> , 2011)	
			* δ_{C}	** δ_{H}
C				
2	163,52	-	161,5	-
6	*147,33	-	144,0	-
7	*151,65	-	150,3	-
9	*151,14	-	149,7	-
10	*109,31	-	111,5	-
CH				
3	108,44	6,08 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> 9,3 Hz)	113,4	6,20 (<i>d</i> , <i>J</i> 9,4 Hz)
4	145,09	7,82 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> 9,3 Hz)	143,3	7,80 (<i>d</i> , <i>J</i> 9,4 Hz)
5	102,91	6,65 (1H, <i>s</i>)	107,5	6,75 (<i>s</i>)
8	107,59	7,00 (1H, <i>s</i>)	103,2	7,09 (<i>s</i>)
OCH₃	55,07	3,87 (3H, <i>s</i>)	56,4	3,89 (3H, <i>s</i>)
OH	-	8,54 (<i>sl</i>)	-	8,5 (<i>sl</i>)

*Sinais próximos dos sinais do lupeol.

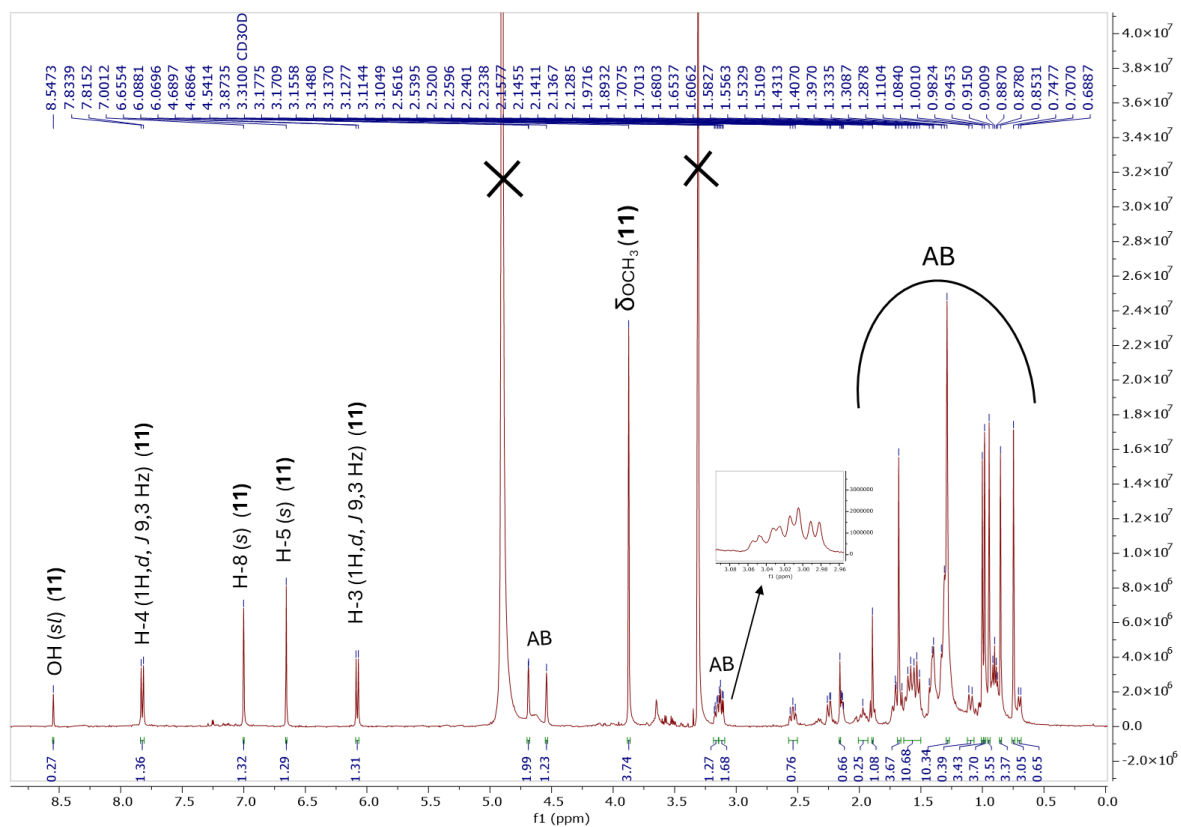


Figura 52 - Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) do espectro contendo de **11** e o **12** (ácido betulínico, AB).

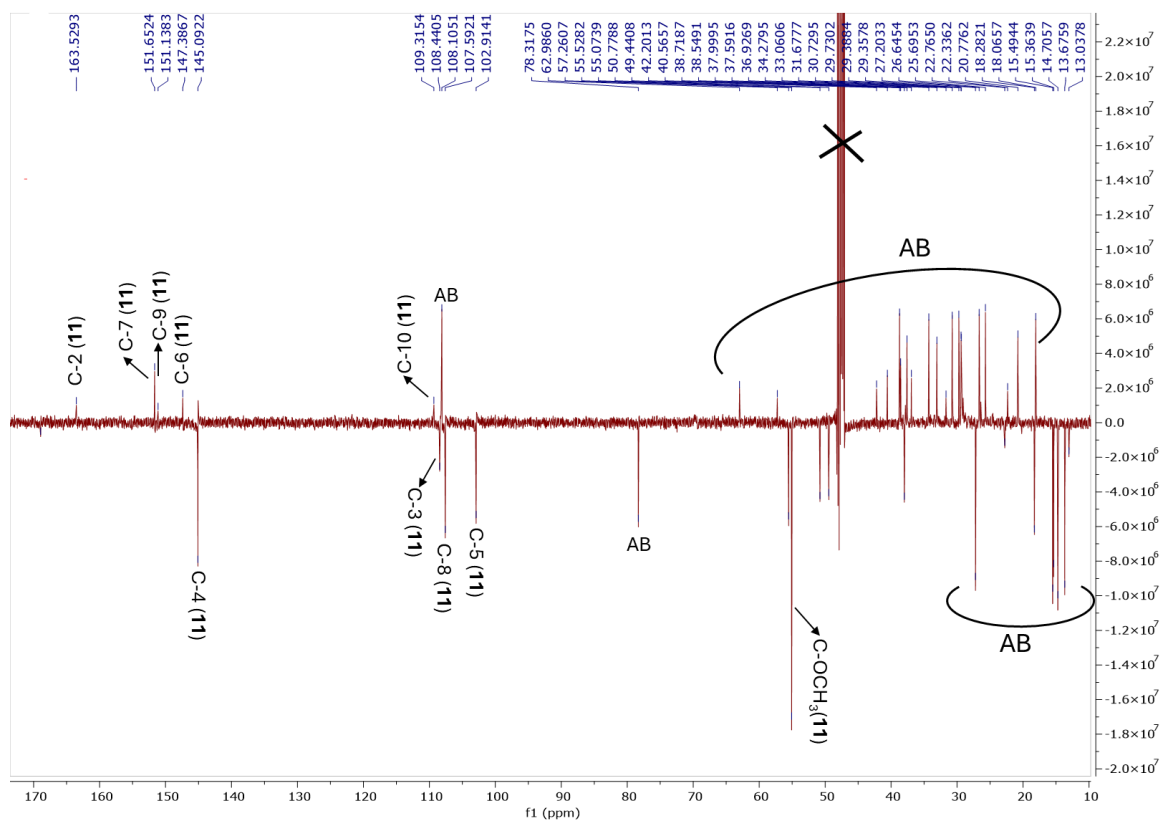


Figura 53 - Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) de **11**. AB=ácido betulínico (12, pág. 51)

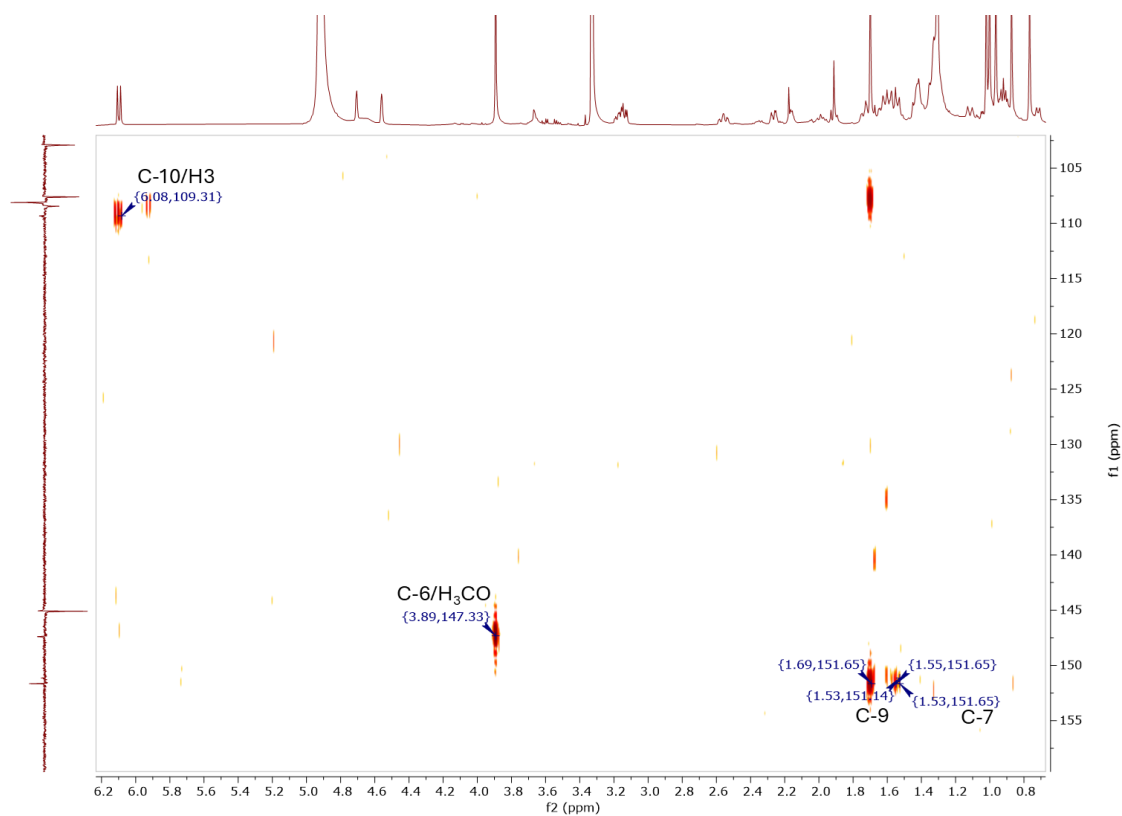


Figura 54 - Espectro de HMBC (500/125 MHz, CD_3OD) de **11** na região entre δ_{H} 0,8-6,2. *.C-10, C-9 e C-7 estão próximos do sinal do lupeol, por isso o $^nJ_{\text{CH}}$ com a metila.

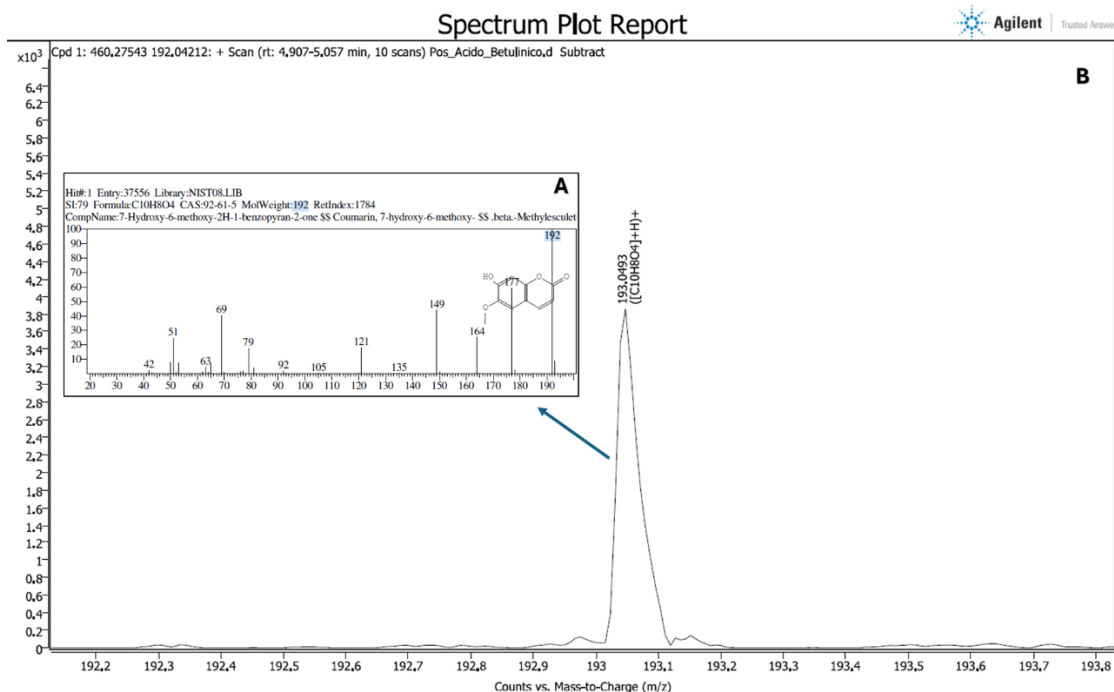


Figura 55 - A) Espectro de massas obtido por impacto eletrônico (EI) do composto **11**, coincidente com o registrado na biblioteca NIST; B) Espectro de massas de alta resolução por ionização por electrospray (HRESIMS) em modo positivo do composto **11**, exibindo o pico $[M+H]^+$ em m/z 193,0493.

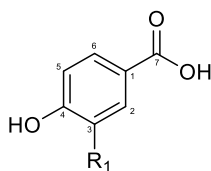
2.3.1.9.2. Elucidação estrutural dos derivados do ácido benzoico: **17** e **18**

As substâncias **17** e **18** foram identificados como uma mistura de dois derivados do ácido benzoico presentes na fração GMD-E4B(6-7)-16 (10,6 mg), obtido na forma de um sólido amorfo marrom (10,6 mg). A identificação desses compostos foi realizada por meio de técnicas espectroscópicas, incluindo RMN ¹H, DEPTQ, HSQC e HMBC.

O espectro de RMN ¹H (Figura 56, pág. 93) da mistura apresentou cinco sinais de prótons na em sistemas aromáticos. Dentre esses sinais, destacam-se dois dupletos em δ_H 6,74 (1H, *d*, *J* 8,6 Hz, H-3/5) e 7,83 (1H, *d*, *J* 8,6 Hz, H-2/6), cuja constante de acoplamento de (8,6 Hz) sugere a presença do sistema AA'BB'. Esse padrão é característico de um anel benzênico dissustituído e foi atribuído a substância **17**. O composto **18** foi proposto a partir da correlação dos sinais duplo duplete em δ_H 7,49 (*dd*, *J* 1,8 e 8,2 Hz) e o duplete em δ_H 7,58 (*d*, *J* 1,8 Hz) que foram atribuídos aos hidrogênios H-6 e H-2, respectivamente. Um sinal sobreposto em δ_H 6,76 (*dl*, 8,2 Hz) pode ser atribuído ao H-5 e propondo-se o sistema ABC no anel aromático. O simpleto minoritário em 8,5 ppm confirmou a existência de uma hidroxila fenólica comum em

ambas as moléculas, enquanto um simpleto adicional em δ_H 3,88 indicou a presença da metoxila (3-OCH₃). O espectro DEPTQ (Figura 57, pág. 94) possui sinais de carbonos que estão de acordo com o composto **17**, confirmando o sistema AA'BB' pelos sinais em δ_C 130,93 (C-2/6) e 113,87 (C-3/5). Para o composto **18**, os deslocamentos químicos em δ_C 122,84, 113,78 e 112,62 são compatíveis com os carbonos metínicos do sistema aromático C-6, C5 e C-2, respectivamente. Além disso, o sinal em 174,16 ppm foi atribuído ao carbono carboxílico (C-7) e o de δ_C 146,74 ao carbono quaternário (C-4). O sinal em 54,89 ppm confirmou a presença do grupo metoxila.

A análise do mapa de contorno de HSQC e HMBC (Figura 58, pág. 94 e Figura 59, pág. 95) demonstrou correlações essenciais entre hidrogênios e carbonos diretamente ligados e vizinhos a uma distância de até três ligações. Estas correlações permitiram confirmar a estrutura desses derivados de ácido benzoico. No HMBC (Figura 59, pág. 95), a correlação 2J entre o δ_C 128,0 e H-2 (δ_H 7,58) e 3J com H-5 (δ_H 6,76), permitiu atribuir esse valor ao C-1 de **18**. Correlações entre os pares de hidrogênios H-2/H-6 e H-3/H-5 com um carbono em 159, sugeriram a atribuição desse valor ao carbono fenólico C-4 de **17**. A presença de um sinal em δ_C 174,16 foi a informação inicial da carboxila nesses compostos (C-7, COOH). Os dados dos espectros bidimensionais confirmam essa proposta considerando as correlações desse sinal com H-2/H-6 de **17** e H-2/H-6 de **18**. Com base nessas análises e comparação com dados da literatura (MAIA, 2011; ZHANG *et al*, 2009) (Tabela 9, pág. 93), concluiu-se a proposta de ambos compostos **17** é o ácido p-hidroxibenzóico e **18** o ácido 3-metoxi-4-hidroxibenzoico (ácido vanílico).



R₁ = H, Ácido *p*-hidroxibenzóico (**17**)

R₁ = OCH₃ Ácido vanílico (**18**)

Tabela 9. Dados de RMN de ^{13}C (125 MHz, DEPTQ, CD_3OD) e ^1H (500 MHz, CD_3OD) da substância **17** e **18** em comparação com dados da literatura [Maia, 2011(500 e 125MHz); Zhang ., 2009 (400 MHz e 100, CD_3OD)].

	Substância 17				Substância 18				Literatura			
	HSQC		HMBC		HSQC		HMBC		[ácido phidoxibenzóico] Maia, 2011		[ácido vanílico] Zhang <i>et al.</i> 2009	
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
C												
1	-	-	-	-	128,0	-	H-2	H-5	122,84	-	121,7	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	147,3	-
4	159,00	-	H-3;H-5	H-2;H-6	146,74	-	H-5	3H-OCH ₃	163,3	-	151,3	-
7	174,16	-	-	H-2;H-6	-	-	174,16	H-2;H-6	170,1	-	168,6	-
CH												
2	130,8	7,83(2H,d,J8,6 Hz)	-	H-6	112,62	7,58(d,J1,8Hz)	-	H-6	133,0	7,86(d,J8,5Hz)	114,4	7,43(d,J1,8 Hz)
3	113,87	6,74(2H,d,J8,6 Hz)	-	-	-	-	-	-	116,0	6,80(d,J8,5Hz)	-	-
5	113,87	6,74(2H,d,J8,6 Hz)	-	-	113,78	6,76(d,J8,2Hz)	-	-	-	-	-	-
6	130,8	7,83(2H,d,J8,6 Hz)	-	-	122,84	7,49(dd,J1,8e8,2 Hz)	-	-	-	-	-	-

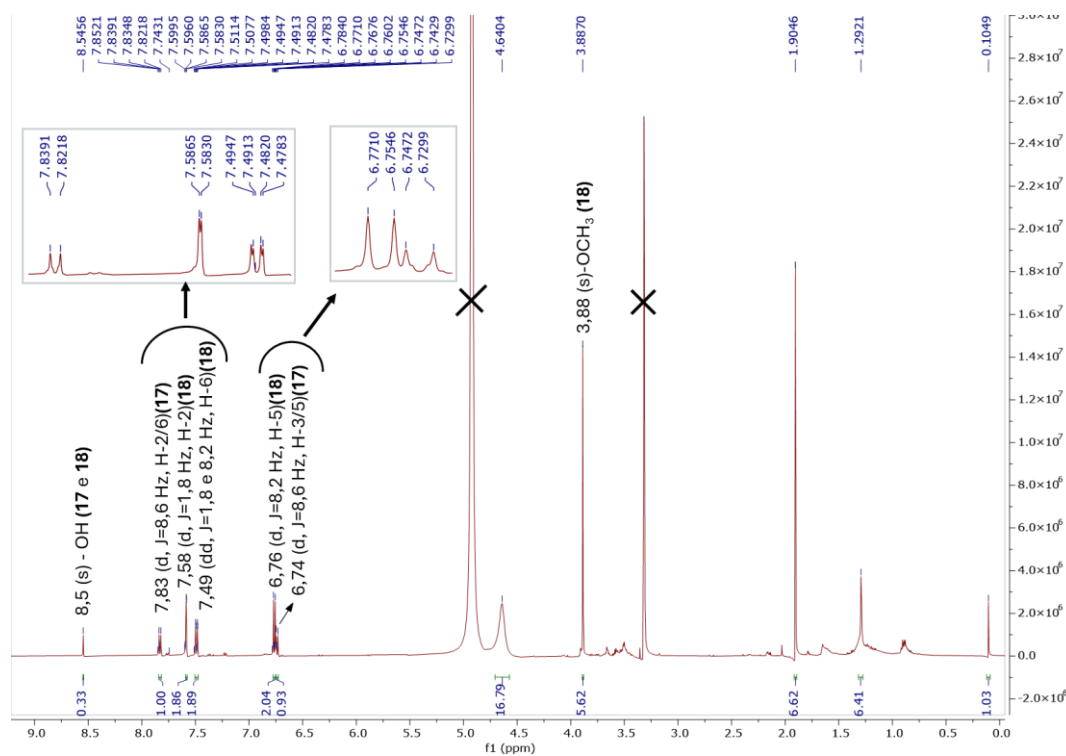


Figura 56 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) de **17** e **18**.

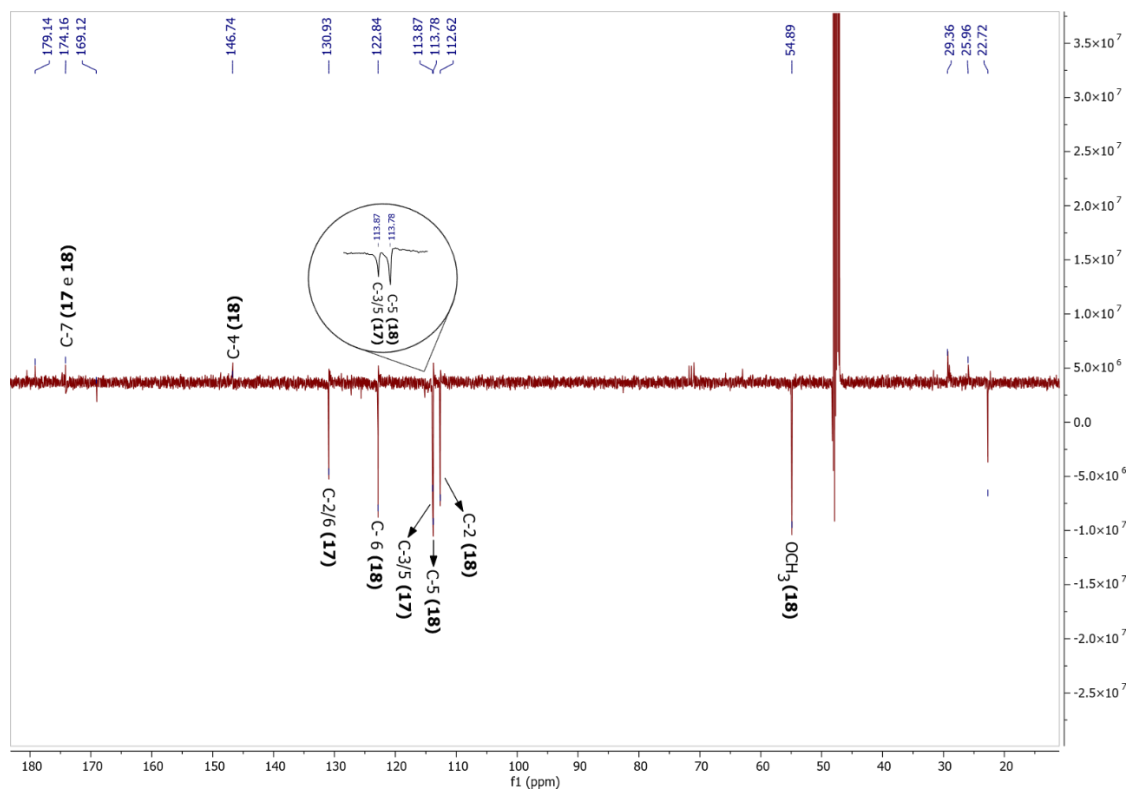


Figura 57- Espectro de RMN de ^{13}C 125 MHz, CD_3OD) de 17 e 18.

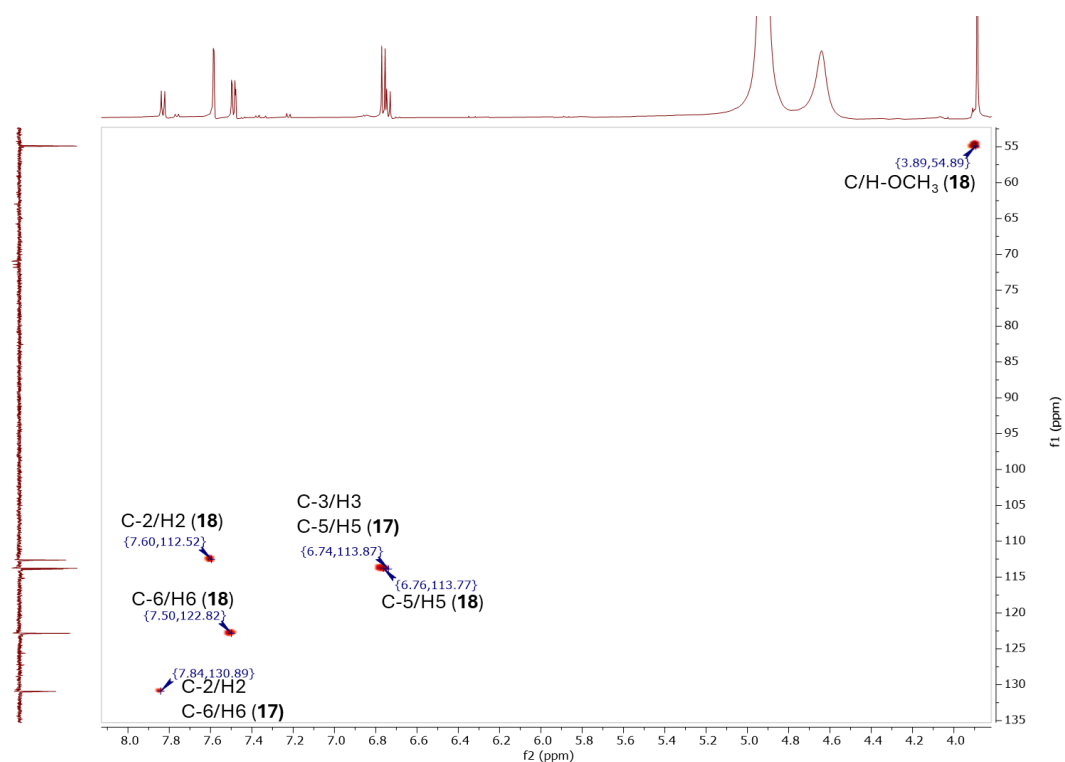


Figura 58- Espectro de HSQC (500/125 MHz, CD_3OD) de 17 e 18.

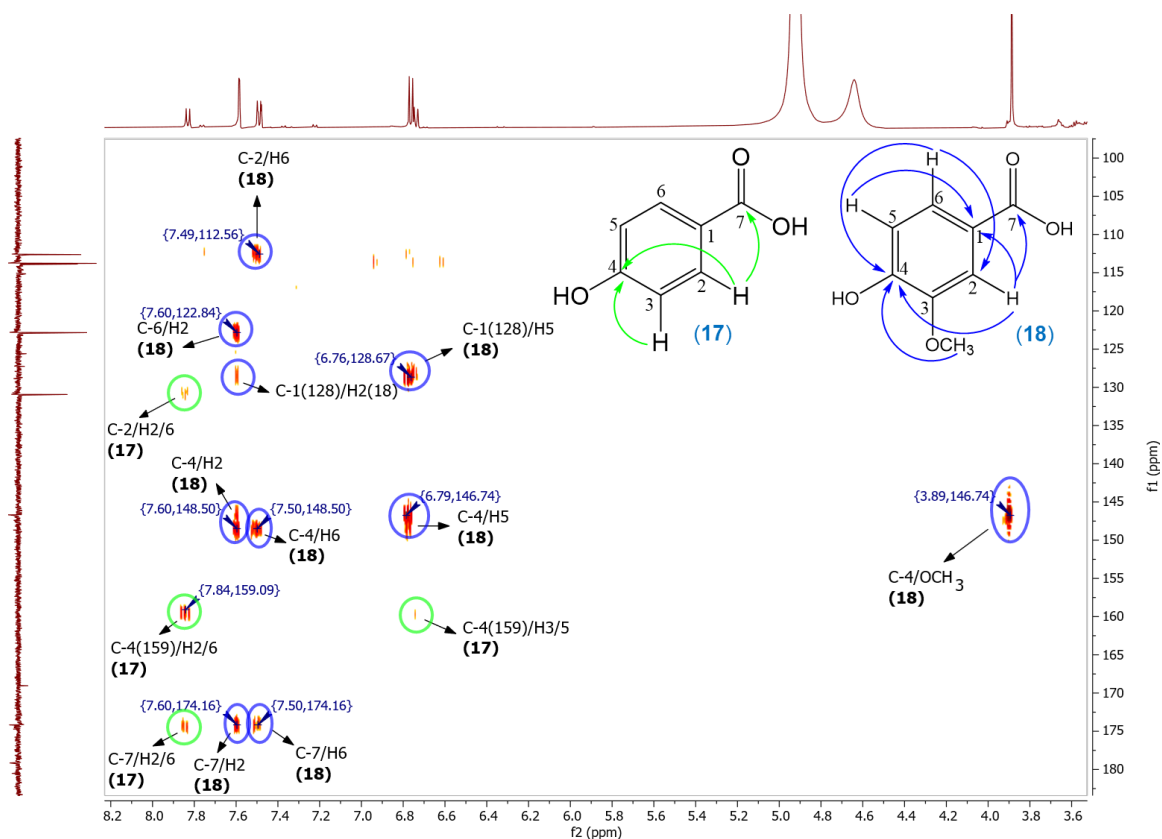


Figura 59 - Expansão do espectro de HMBC (500/125 MHz, CD₃OD) de **17** e **18**, na região entre 3,5-8,2.

2.3.1.9.3. Elucidação estrutural do derivado análogo de uma *trans*-chalcona *trans*: **14**

O precipitado amorfo de coloração amarela (GMDR-D5, 12 mg), que apresentou fluorescência amarelada quando solubilizado em solventes orgânicos, foi identificado como o composto **14**. A elucidação estrutural, proposta como um análogo *trans*-chalcona, baseou-se em análises uni e bidimensional de RMN de hidrogênio e carbono, em comparação com dados da literatura (VAN DER WESTHUIZEN *et al.*, 1980) e simulações realizadas no ChemDraw. É importante salientar que, embora tais autores não tenham isolado o mesmo composto, seu trabalho demonstrou que, em meio aprótico, a fotoconversão da 2benzil-2-hidroxibenzo[b]furano3(2H)-ona promove a transformação de grupos metoxi em grupos hidroximetila, descrevendo dados espectrais de um intermediário com núcleo estrutural similar ao isolado neste estudo. Esses resultados reforçam a proposta de que o precipitado corresponde a um análogo de *trans*-chalcona (**14**).

Na análise do espectro de RMN de ^1H (Figura 60, pág. 99), notou-se seis sinais atribuídos ao composto, além de sinais residuais provenientes de impurezas graxas. Entre os sinais característicos de chalconas, identificou-se um triplo duplete com integração para três hidrogênios, em δ_{H} 7,83 (3H, *td*, J 7,2 e 1,4 Hz), cujas integrações e constantes de acoplamento (J orto $\approx$ 7,2 Hz; J meta $\approx$ 1,4 Hz) são compatíveis com H-3', H-4' e H-5'. Adicionalmente, um multiplete (*m*) em δ_{H} 8,32 (2H, H-2' e 6') é consistente com um anel fenil monossustituído (anel C do agrupamento AB da lactona). Ressalta-se que efeitos anisotrópicos do sistema conjugado *cis* podem interferir no campo magnético local desse anel aromático, modificando os ambientes químicos dos hidrogênios e dificultando a determinação precisa da multiplicidade dos sinais. Diante do exposto, estudos de modelagem molecular poderão contribuir para o esclarecimento desses efeitos.

Também foram identificados um simpleto em δ_{H} 13,2 (1H), atribuído as hidroxilas (2-OH e 4-OH), e um simpleto em δ_{H} 7,48 (1H), indicativo de um hidrogênio de sistema aromático isolado (atribuído ao H-5 do anel A). Além disso, um sinal em δ_{H} 4,0 (3H, *s*) foi atribuído ao hidrogênio do grupo metoxila na posição 3, enquanto outro simpleto em δ_{H} 4,9 (2H, *s*) correspondeu aos hidrogênios oximetilênicos 2H-7.

Embora a análise de RMN de ^{13}C (Figura 61, pág. 99) tenha revelado sinais referentes ao carbono carbonílico em δ_{C} 188,3 (C-10), o carbono da metoxila em δ_{C} 61,8 (3-OCH₃) e ao carbono dos hidrogênios oximetilênicos em δ_{C} 60,8 (C-7), essa técnica mostrou-se limitada para atribuições completas de todos os carbonos da substância. Contudo, os dados de correlação obtidos no espectro HMBC (Figura 63, pág. 100) foram cruciais para complementar as informações e permitir as atribuições propostas. As correlações relevantes destacaram carbonos ausentes no espectro DEPTQ, como $\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$ 160/13,2 (C-2/HO-2), 152/7,48 e 4,0 (C-3/H-5 e 3-OCH₃), 147/4,9 e 13,21 (C-6/2H-7 e OH-2), 114,8/7,48 e 13,21 (C-1/H-5 e HO-2), além de 124/4,9 e 13,2 (C-5/2H-7 e OH-4). Também se destacaram as correlações do anel fenil monossustituído da lactona: 126/7,8 (C-2', 6'/H-3',4',5'), 127/7,8 (C-2', 6'/H-3',4',5'), 134/7,8 e 8,3 (C-3',4',5'/H-3',4',5' e 2' e 6'), que permitiram consolidar as atribuições estruturais.

Embora não tenha sido possível atribuir todos os sinais de carbono, devido à ausência de alguns no DEPTQ, a interpretação conjunta dos dados espectroscópicos indica que o composto **14** corresponde à 9-(*O*-metileno-6)-2,4-diidroxi, 3'-metoxi chalcona, cujos dados, incluindo o HSQC (Figura 62, pág. 100), encontram-se na Tabela 10, pág. 98.

O composto 9-(*O*-metileno-6)-2,4-diidroxi, 3'-metoxi chalcona (**14**), com fórmula molecular $C_{17}H_{14}O_6$ ($M = 314,08$ Da), foi analisado por cromatografia líquida de baixa resolução acoplada à espectrometria de massas em modo positivo (HPLC/ESI/MS). No tempo de retenção de 4,295 min, observou-se um íon em m/z 365, atribuído ao aduto com solventes e protonado $[M + H_2O + CH_3OH]^+$ (Esquema 7, pág. 100). Esse esquema mostra propostas de fragmentações que justificam os picos detectados no espectro de massas obtido com sistema de IES em modo positivo.

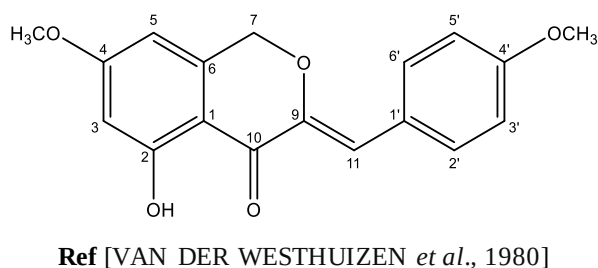
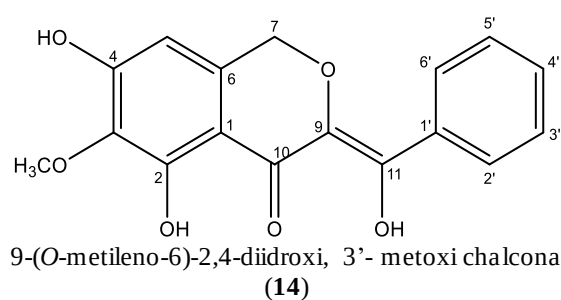


Tabela 10 Dados de RMN de ^{13}C (125 MHz, DEPTQ, CDCl_3) e ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância **14** em comparação com dados da literatura (VAN DER WESTHUIZEN *et al.*, 1980, Simulador Chemdraw) [80 MHz, acetona- d_6]

	Substância 14				Literatura		Simulador Chemdraw	
	HSQC		HMBC		VAN DER WESTHUIZEN <i>et al.</i> , 1980		Solvente DMSO 300 MHz)	
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	δ_{H}		δ_{C}	δ_{H}
C								-
1	114,8*	-	OH-2	H-5; OH-2	-	-	112	-
2	160,2*	-	OH-2	-	-	-	152	-
3	152*	-	-	H-5	-	-	136	-
4	160,2*	-	H-5	-	-	-	156	-
6	147,5*	-	2H-7	-	-	-	134	-
9	Nd	-	-	-	-	-	129	-
10	188,3	-	-	-	-	-	178	-
11	Nd	-	-	-	-	-	135	-
1'	Nd	-	-	-	-	-	130	-
CH								
3	-	-	-	-	-	6,28 (<i>d</i> , <i>J</i> 2,0 Hz)	-	-
5	124,0	7,48 (1H, <i>s</i>)	OH-4	2H-7	-	6,13 (<i>m</i>)	107	6,6
11	-	-	-	-	-	6,9 (<i>s</i>)	-	-
2'	127,4 / 126,5	8,32 (2H, <i>m</i>)	H-3', 5'	H-4'	-	7,7 (2H, <i>d</i> , <i>J</i> 8,5 Hz)	128	7,8
3'	134,8 / 133,8	7,83 (3H, <i>td</i> , <i>J</i> 7,2 e 1,4 Hz)	H-2'; H-4'	H-5'	H-4'	6,8 (2H, <i>d</i> , <i>J</i> 8,5 Hz)	129	7,5
4'	134,8 / 133,8	7,83 (3H, <i>td</i> , <i>J</i> 7,2 e 1,4 Hz)	H-3', 5'	H-2', 6'	-	-	128	7,4
5'	134,8 / 133,8	7,83 (2H, <i>td</i> , <i>J</i> 7,2 e 1,4 Hz)	H-6'; H-4'	H-3'	-	6,8 (<i>d</i> , <i>J</i> 8,5 Hz)	129	7,5
6'	127,4 / 126,5	8,32 (2H, <i>m</i>)	H-3', 5'	H-4'	-	7,7 (2H, <i>d</i> , <i>J</i> 8,5 Hz)	128	7,8
2-OH	-	13,21 (1H, <i>s</i>)	-	-	-	10,0 (<i>s</i>)	-	20,0
4-OH								
7-CH ₂	60,80	4,9 (2H, <i>s</i>)	-	-	-	5,05 (<i>br s</i>)	71	5,22
3-OCH ₃	61,8	4,00 (3H, <i>s</i>)	-	-	-	-	61	3,71
4-OCH ₃	-	-	-	-	-	3,8 (3H, <i>s</i>)	-	-
6'-OCH ₃	-	-	-	-	-	4,00 (3H, <i>s</i>)	--	-

* Os valores representam dados aproximados deduzidos através do HMBC

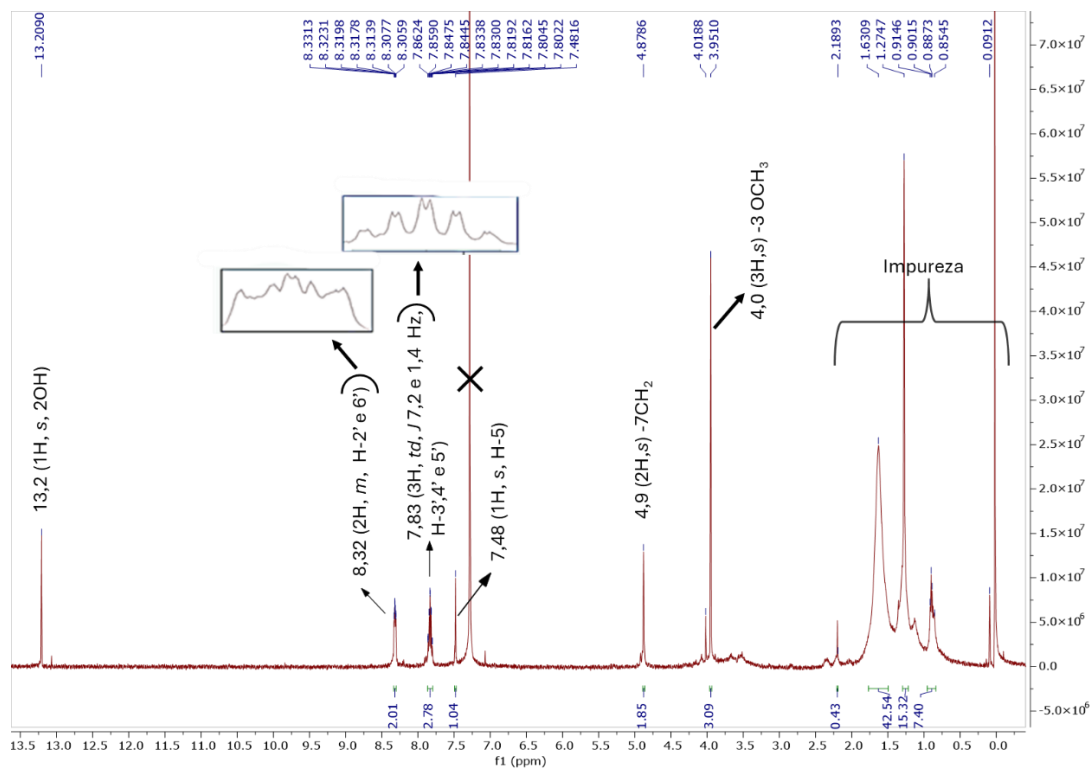


Figura 60 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **14**.

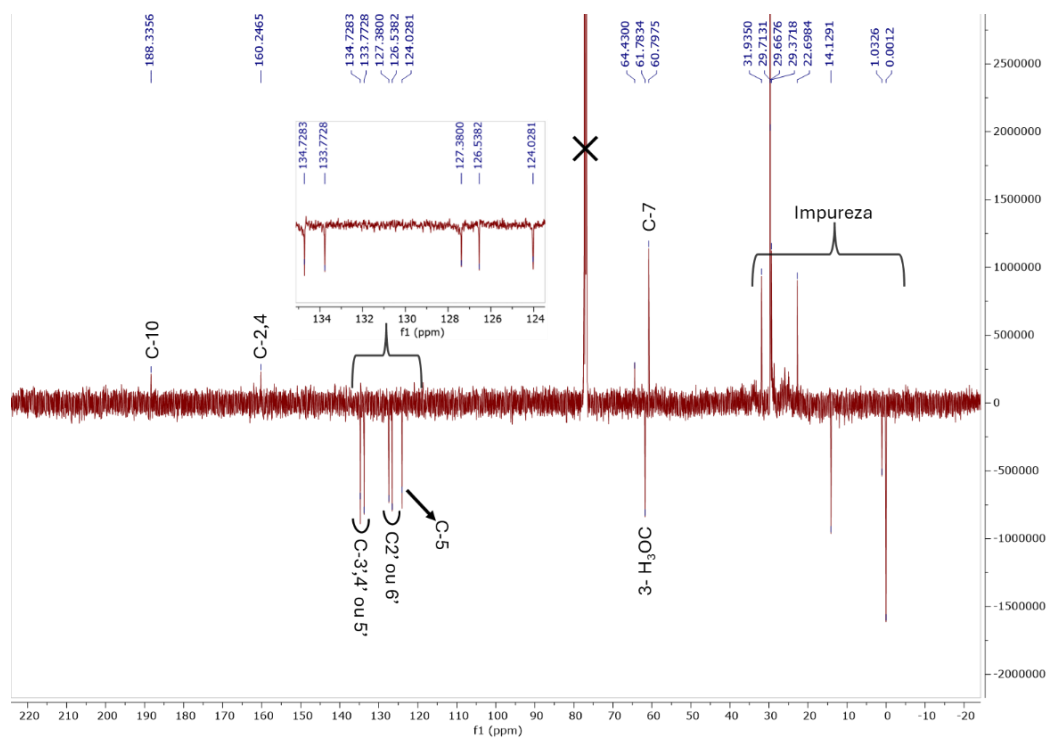


Figura 61 - Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de **14**.

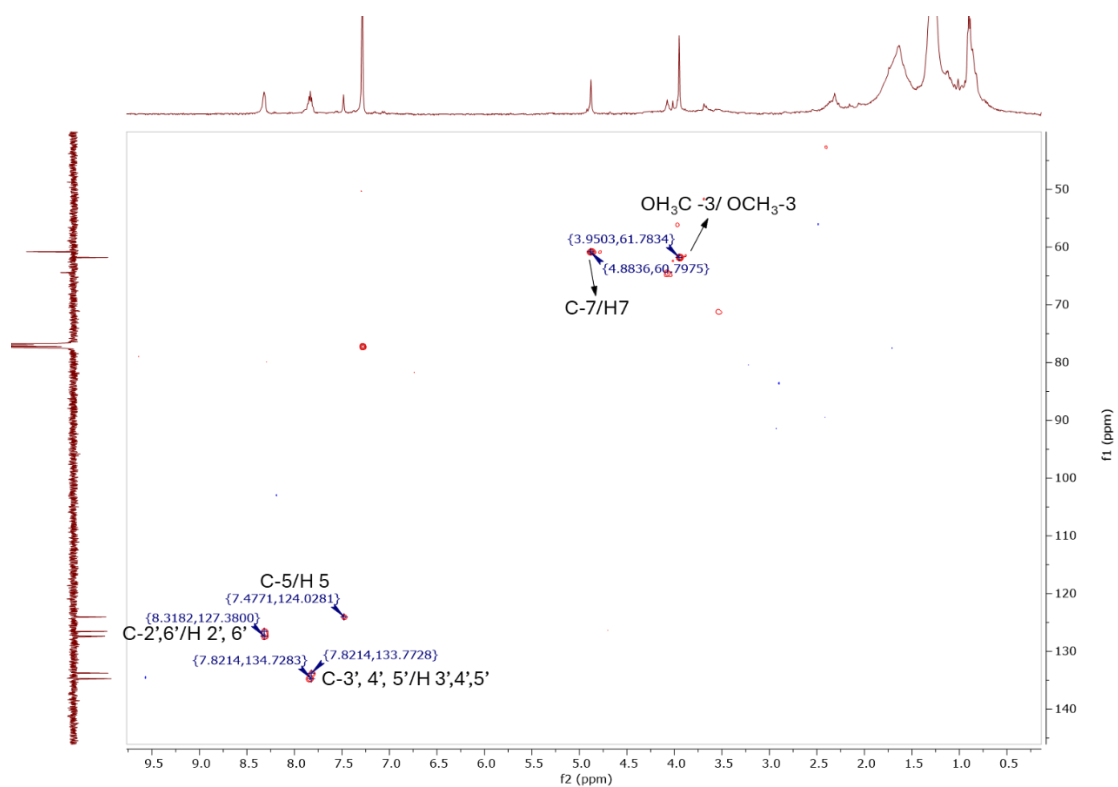


Figura 62 - Espectro de HSQC (500/125 MHz, CDCl₃ de **14**.

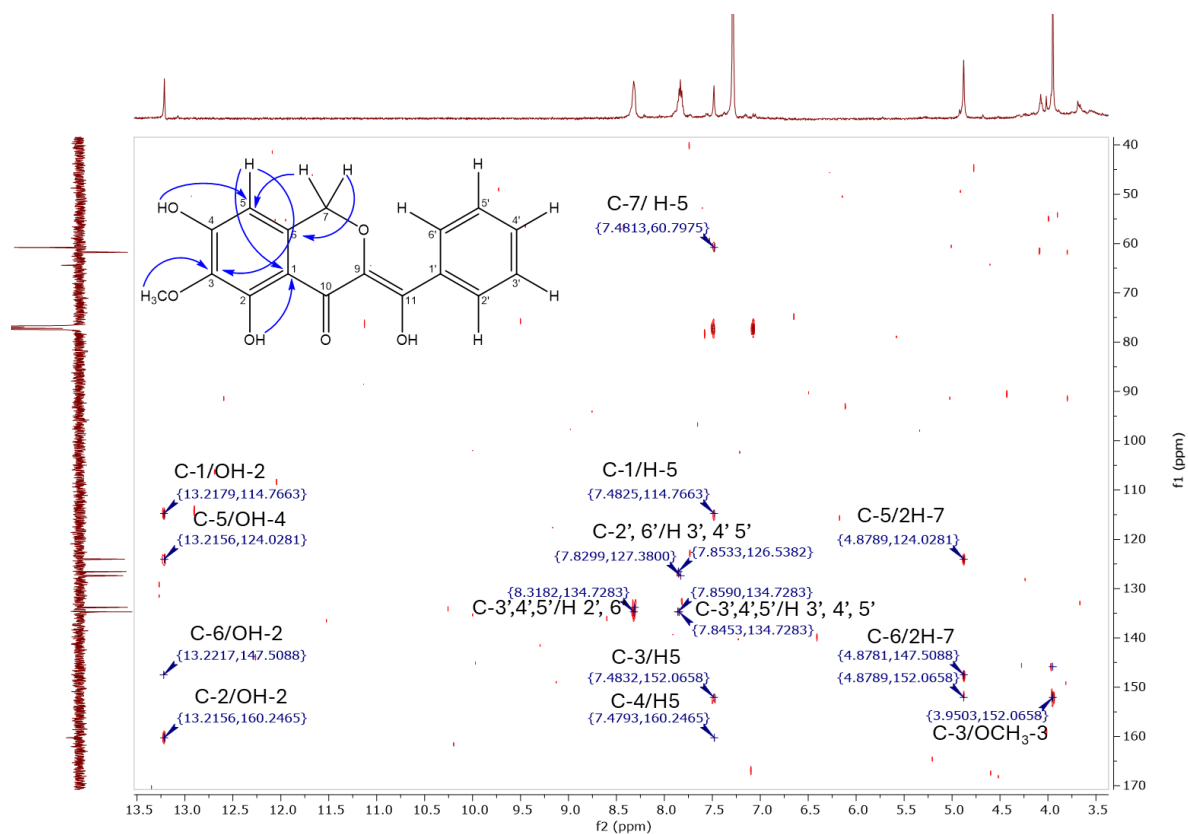


Figura 63 - Expansão do espectro de HMBC (500/125 MHz, CD₃OD) de **14**, na região entre 3,5-14,0.

Line#:1 R.Time:---(Scan#:---)
 MassPeaks:135
 Spectrum Mode:Averaged 4,267-4,300(257-259) Base Peak:365(3595469)
 BG Mode:Calc Segment 1 - Event 1

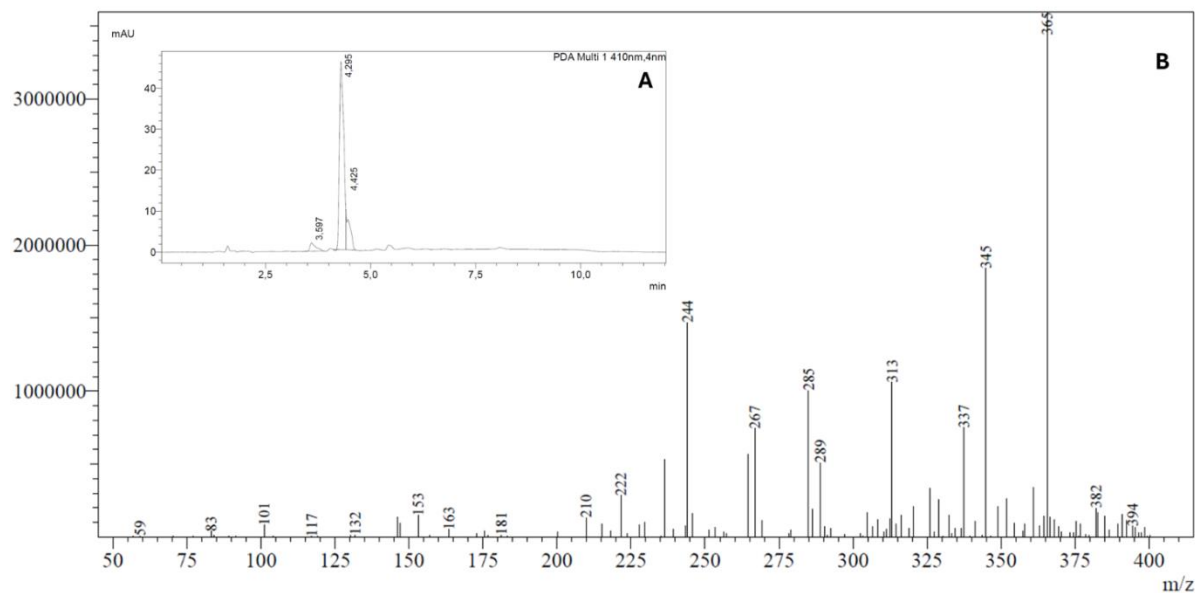
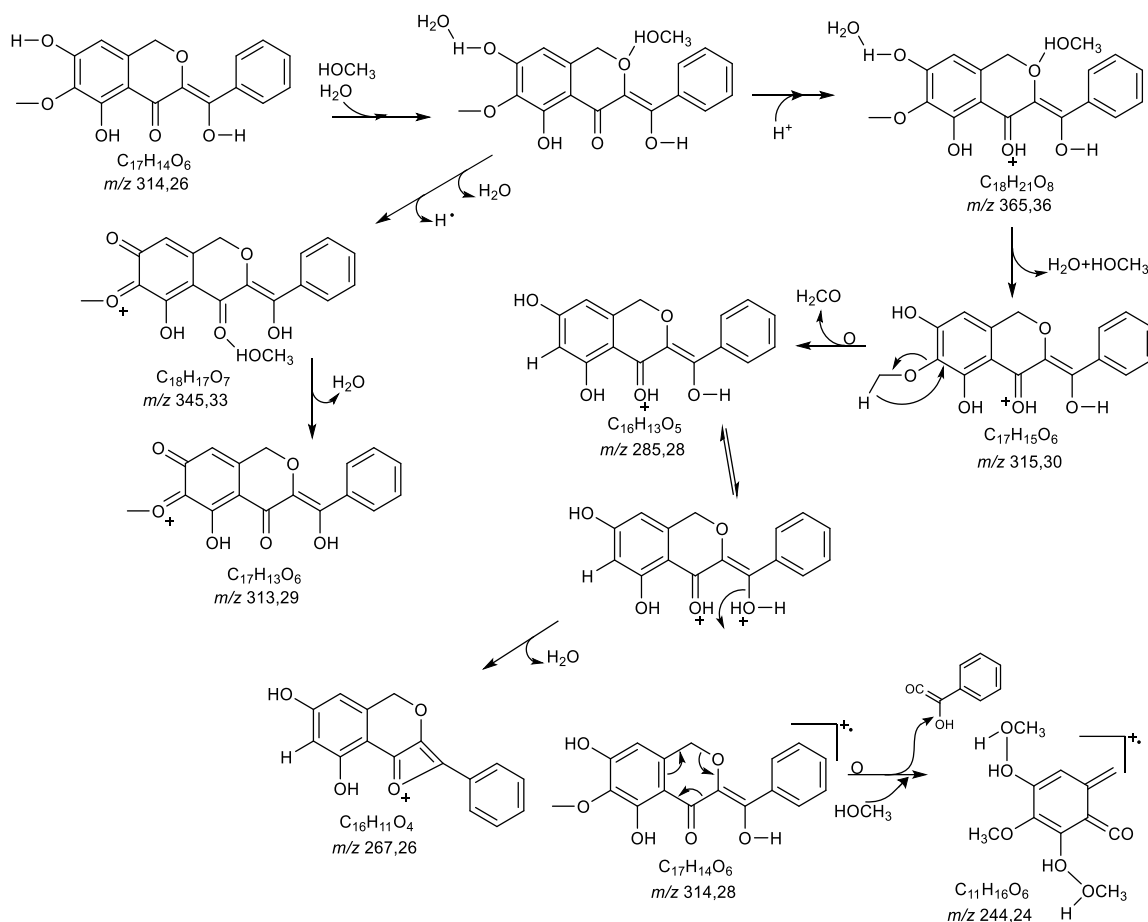


Figura 64 - A) Cromatograma PDA (410 nm) e B) espectro de massas (HPLC/ESI/MS) de baixa resolução do composto **14**.



Esquema 7 - Propostas de fragmentações incluindo adutos com os solventes utilizados que justificam os picos detectados no espectro de massas da substância **14** com IES em modo positivo.

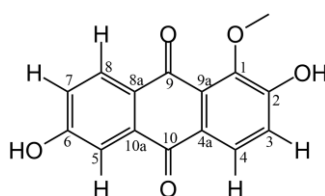
2.3.1.9.4. Elucidação estrutural da antraquinona: **19**

A substância **19** (20,0 mg), um sólido vermelho-tijolo [mancha 1 oriunda de GMDR-E4D (11-15), 20,0 mg], foi caracterizado como uma antraquinona do grupo das umbellatas após análise de RMN de 1H e ^{13}C (Tabela 11, pág. 104). Análise de RMN de 1H (Figura 65, pág. 104) revelou quatro sinais na região de hidrogênios em anéis aromáticos, sendo dois dupletos: δ_H 6,89 (*d*, *J* 8,8 Hz, H-7) e δ_H 6,93 (*d*, *J* 8,6 Hz, H-3). Os valores da constante de acoplamento sugerem que ambos acoplam em *orto* com os hidrogênios representados pelos sinais em δ_H 7,91 (1H, *d*, *J* 8,5 Hz, H-8) e o sinal em δ_H 7,85 (1H, *d*, *J* 8,6 Hz, H-4) e o sinal em δ_H 7,32 (1H, *d*, *J* 1,8 Hz, H-5). A correlação de acoplamento, percebida com os sinais do 1H - 1H -COSY (Figura 67, pág. 105), permitiu propor dois sistemas de prótons, um sistema AB em um anel e um sistema ABC no outro anel. Além disso, é possível observar um simpleto intenso em δ_H 3,86 atribuído a um grupo metoxila (OCH_3), cujo valor do deslocamento químico do carbono

justifica estar entre a carbonila e grupo hidroxila deslocando-o para uma região de desproteção e aumentando o deslocamento químico (δ_C 59,38). Justificando assim a proposta do sistema dissustituído conduzindo a formação do sistema AB de prótons. O simpleto em 8,59 ppm, característico de hidroxila não quelada. No espectro de DEPTQ (Figura 66, pág. 105) não foram evidentes todos os sinais que compõe o núcleo da antraquinona. No entanto, foram identificados os carbonos hidrogenados em δ_C 123,24 (C-3), 125,75 (C-4), 114,18 (C-5), 122,31 (C-7), 128,75 (C-8), um quaternário em δ_C 137,37 (C-10a), além do carbono oximetílico em 59,38 ppm.

As atribuições dos deslocamentos químicos dos carbonos hidrogenados foram confirmadas pela análise do espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear 1H - 1H -COSY e HSQC, mostrando os seguintes acoplamentos entre hidrogênios e seus respectivos carbonos ($^1J_{HC}$): 3,86/59,3 (C-OCH₃); 6,93/123,24 (C-3); 7,85/125,75 (C-4); 7,32/114,18 (C-5); 6,89/122,24 (C-7) e 7,91/128,75 (C-8). As atribuições aos demais carbonos da estrutura foram confirmadas mediante o espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear a longa distância, HMBC (Figura 68, pág. 106), o qual mostrou os seguintes acoplamentos ($^nJ_{HC}$): O hidrogênio em δ_H 7,91 (H-8) com os carbonos em δ_C 181 (C-9), 167 (C-6) e 137 (C-10a); 7,85 (H-4) com os carbonos δ_C 181 (C-10), 164 (C-2) e 126 (C-9a), e os dois hidrogênios em δ_H 6,93 (H-3) e 3,86 (OCH₃) com o carbono δ_C 150 (C-1).

Além dessas análises registrou-se o espectro e massas (HPLC-ESI(-)-QTOF), no modo negativo, dessa substância registrando um pico majoritário em tR 9,36 minutos (Figura 69, pág. 106), com m/z 269,0456 compatível com o íon $[M-H]^-$ coerente com a fórmula molecular C₁₅H₁₀O₅ da antraquinona proposta com massa molar 270 g.mol⁻¹. Essas observações, aliadas a dados da literatura (LI *et al*, 2019), possibilitou identificar a substância **19** como sendo a 2,6-dihidroxí-1-metoxiantraquinona (umbellata H).



Umbellata H (**19**)

Tabela 11 Dados de RMN de ^{13}C (125 MHz, DEPTQ, CD_3OD) e ^1H (500 MHz, CD_3OD) da substância **19** em comparação com dados da literatura (Li., 2019) [400 MHz e 150, DMSO-d_6]

	Substância 19					Literatura	
	δ_{C}	HSQC	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	HMBC $^3J_{\text{CH}}$	Li., 2019	δ_{H}
C							
1	150*	-	-	3H-OCH ₃	H-3	147,7	-
2	164*	-	-	-	H-4	158,7	-
4a	121*	-	-	-	-	125,0	-
6	167*	-	-	-	H-8	162,5	-
8a	126*	-	-	-	-	126,7	-
9	181*	-	-	-	H-8	181,2	-
9a	126*	-	-	-	H-4	126,6	-
10	181*	-	-	-	H-4	181,4	-
10a	137,37	-	-	-	H-8	134,7	-
CH							
3	123,24	6,93 (1H, d, J 8,6 Hz)	-	-	-	120,9	7,23 (d, J 8,4 Hz)
4	125,75	7,85 (1H, d, J 8,6 Hz)	-	-	-	125,0	7,88 (d, J 8,4 Hz)
5	114,18	7,32 (1H, d, J 1,8 Hz)	-	-	-	111,4	7,41 (d, J 2,4 Hz)
7	122,24	6,89 (1H, d, J 8,8 Hz)	-	-	-	121,1	7,18 (dd, J 8,8 e 2,4)
8	128,75	7,91 (1H, d, J 8,5 Hz)	-	-	-	129,6	8,02 (d, J 8,8 Hz)
OH	-	8,59 (s)	-	-	-	-	-
OCH₃	59,38	3,86 (3H, s)	-	-	-	-	-

* Os valores representam dados aproximados deduzidos através do HMBC

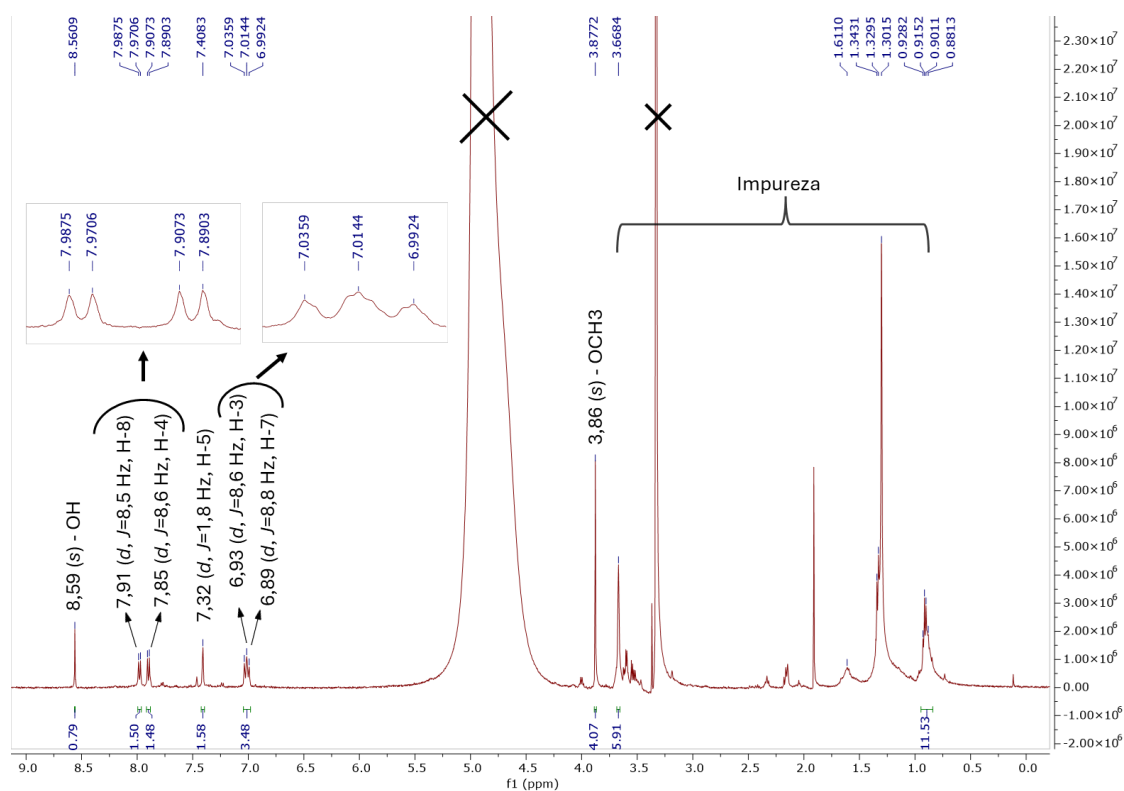


Figura 65 - Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) de **19**.

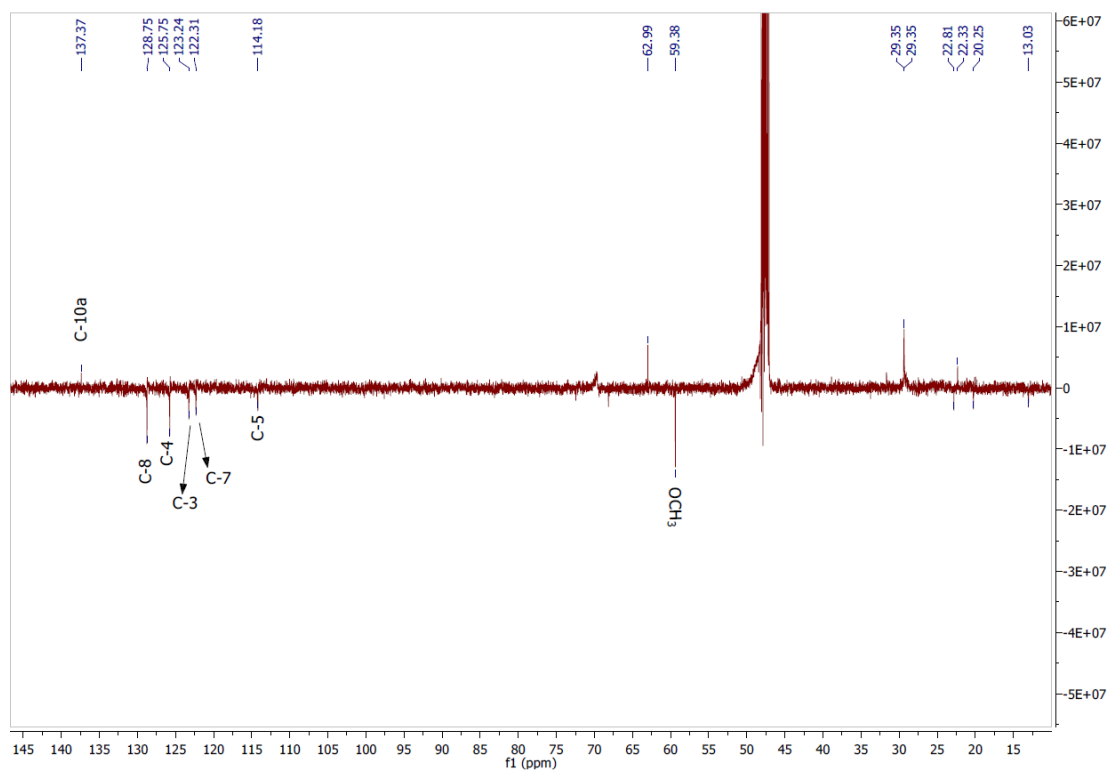


Figura 66 - Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) de **19**, na região entre δ_{C} 15,00-145,00.

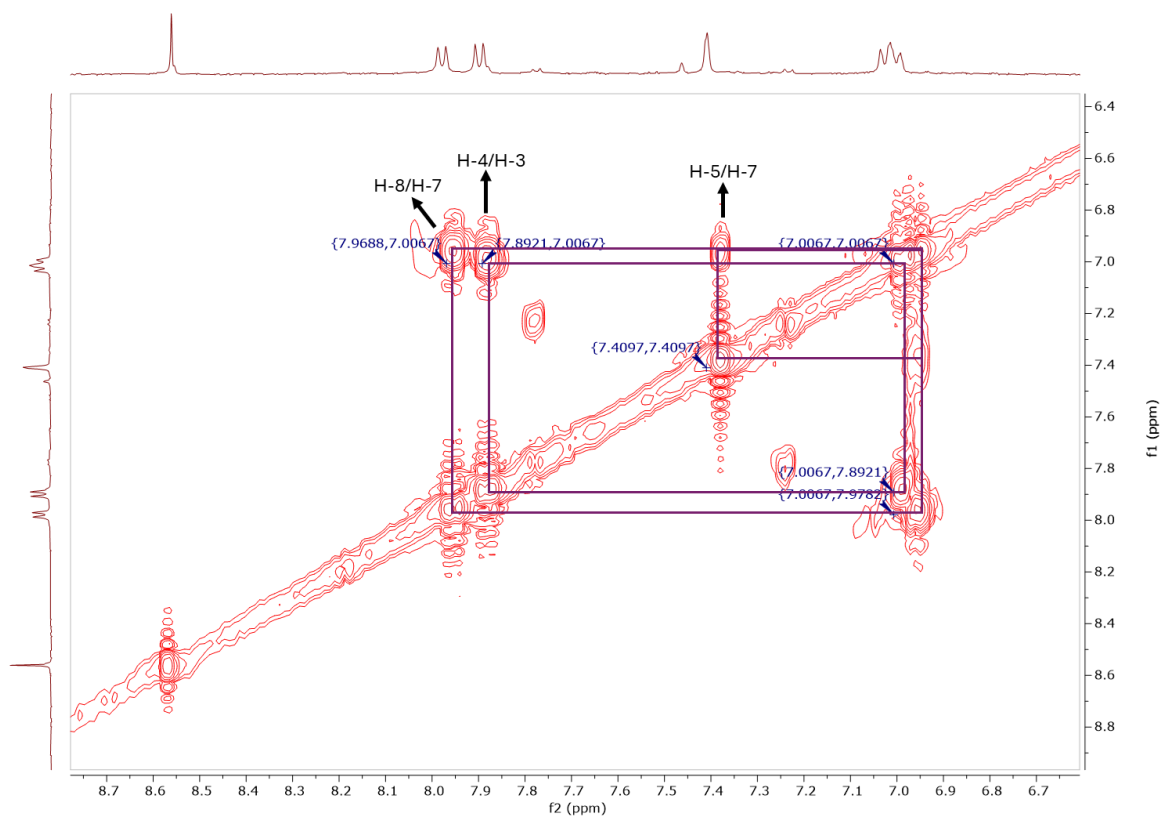


Figura 67 - Expansão do espectro de COSY (500 MHz, DEPTQ, CD_3OD) de **19**, na região entre δ_{H} 6,7 - 8,7.

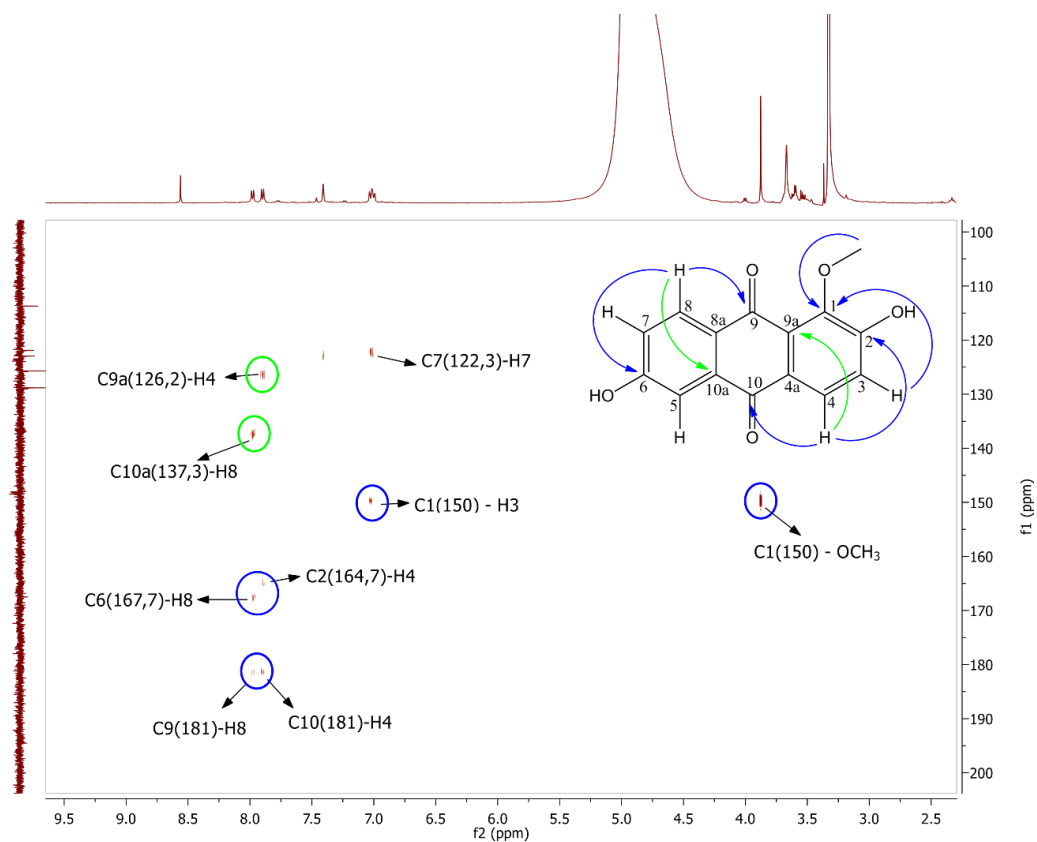


Figura 68 - Expansão do espectro de HMBC (500/125 MHz, CD₃OD) de **19**, na região entre 2,5-9,5.

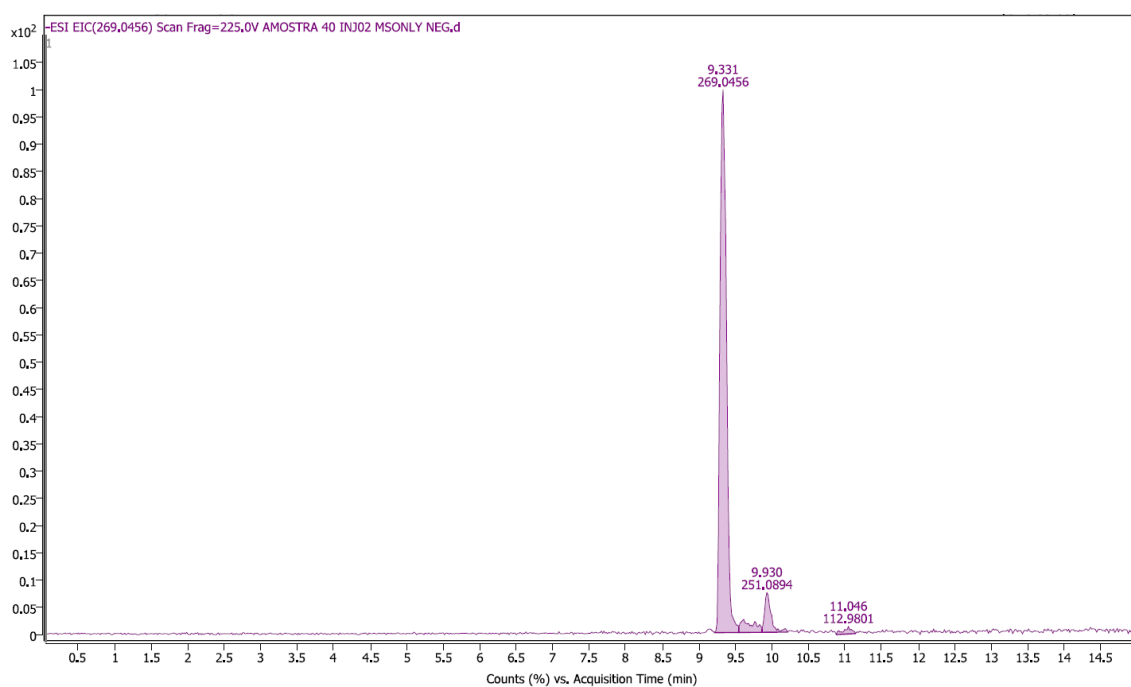


Figura 69 - Espectro HRESIMS em modo positivo de **19**, exibindo o pico [M-H]⁺ em m/z 269,0456.

2.3.2. Explorando o potencial biológico de extratos, frações e isolados de *Galianthe matogrossiana*

2.3.2.1. Experimentos envolvendo extratos e frações: Atividades antinociceptiva e anti-inflamatória dos extratos metanólico das raízes e de partes aéreas de *Galianthe matogrossiana*

A busca por alternativas farmacológicas para o controle da dor é fundamental, posto que muitas condições dolorosas permanecem de difícil tratamento e nem sempre há acesso a terapias eficazes. Um resumo apresentado no 32º Seminário de Iniciação Científica da UDESC (Santa Catarina, 2022) indicou que *Galianthe palustris* exibe efeito antinociceptivos ao modular componentes inflamatórios da dor, justificando seu uso popular em picadas de escorpião (REICHARDT *et al.*, 2022). Esse achado ressalta o potencial do gênero *Galianthe* como fonte de novas investigações sobre mecanismos de ação em dor e inflamação. Considerando ainda o potencial terapêutico demonstrado em espécies do gênero e família, como os terpenos com atividades antinociceptivas e anti-inflamatórias (DALLA VECHIA *et al.*, 2009), investigou-se a ação antinociceptiva dos extratos metanólicos brutos e suas frações (hexânica, diclorometânica, acetato de etila e resíduo hidroalcoólico) das raízes (EBMeOHR; GMHR, GMDR, GMAR, GMRHR) e partes aéreas (EBMeOHPA; GMHPA, GMDPA, GMAPA, GMRHPA) de *G. matogrossiana*.

A avaliação *in vivo* foi conduzida pela graduanda em Medicina Veterinária Isabela M. da Costa, no Departamento de Ciências Fisiológicas da UFRRJ, no Laboratório de Farmacologia da Inflamação e Nocicepção, sob supervisão do Prof. Bruno G. Marinho. Camundongos machos da linhagem Swiss (25 ± 5 g), obtidos do Biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas/ICBS/UFRRJ, foram distribuídos em quatorze grupos ($n = 6$): controle (salina), veículo (salina + 0,5 % DMSO, v/v), morfina (3 mg.kg^{-1}), ácido acetilsalicílico (100 mg.kg^{-1}), EBMeOHR e EBMeOHPA e cada fração vegetal. As amostras foram administradas por via oral (dose de 100 mg.kg^{-1} , na concentração de 50 mg.mL^{-1}). Controles positivos (morfina e ácido acetilsalicílico), veículos e grupos em branco foram aplicados em todos os ensaios. Os dados de viabilidade e nocicepção foram analisados por ANOVA, seguida de teste de Bonferroni, adotando $p < 0,05$ como nível de significância.

Para os ensaios antinociceptivos, utilizaram-se três modelos: contorções abdominais induzidas por ácido acético, teste de formalina e campo aberto. O modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético é utilizado para triagem da atividade antinociceptiva. Neste modelo as contorções manifestam-se como contrações da musculatura abdominal, seguidas de torção do tronco e extensão de um ou ambos os membros posteriores, em resposta à mediadores inflamatórios liberados a partir da indução de peritonite (OLIVEIRA *et al.*, 2005).

No modelo de contorção abdominal induzido por ácido acético em camundongos, a administração intraperitoneal de 0,8 % (v/v) de ácido acético em solução salina é feita uma hora após os animais receberem oralmente as amostras em avaliação. Após a injeção do ácido, contabilizou-se o número total de contorções, no intervalo de 30 min para quantificar a eficácia das amostras na redução desse comportamento (Figura 70, pág. 108).

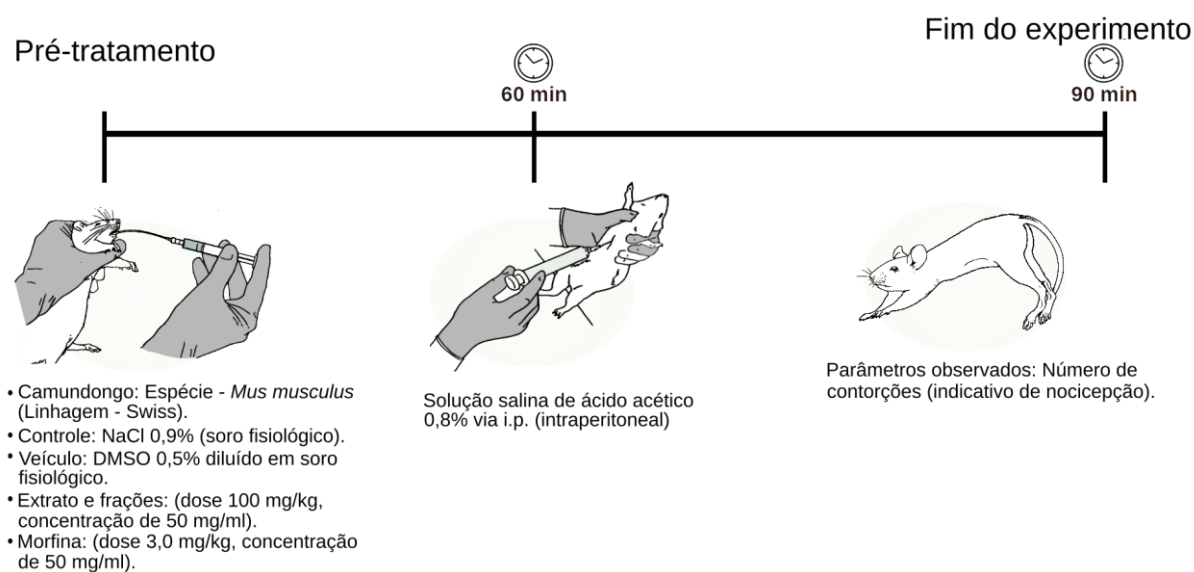


Figura 70 - Diagrama demonstrando o experimento de contorções abdominais induzidas por ácido acético.

No teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético das raízes, foram observadas reduções no número de contorções de 66,9%, 84,6%, 86,4%, 89,8% e 96,1% nos grupos tratados com morfina, EBMeOHR, GMRHR e as frações GMAR e GMDR, respectivamente. A fração hexânica das raízes, por sua vez, não apresentou atividade antinociceptiva. Destaca-se que a fração diclorometano (GMDR) mostrou uma atividade promissora, sugerindo presença de compostos bioativos mais potentes nessas frações. Nas partes aéreas da planta, as reduções no número de contorções foram de 66,9%, 96,7%, 94,1%,

82,5%, 80,2% e 97,1% nos grupos tratados com morfina, EBMeOHR, GMRHR e as frações GMAPA, GMHPA e GMDPA, respectivamente. Sobressai a fração GMDPA, que apresentou o melhor resultado na dose de 100 mg.kg⁻¹, seguida pelas frações hexano e acetato de etila, o que sugere que a atividade antinociceptiva não está restrita às raízes, ampliando o potencial farmacológico da planta.

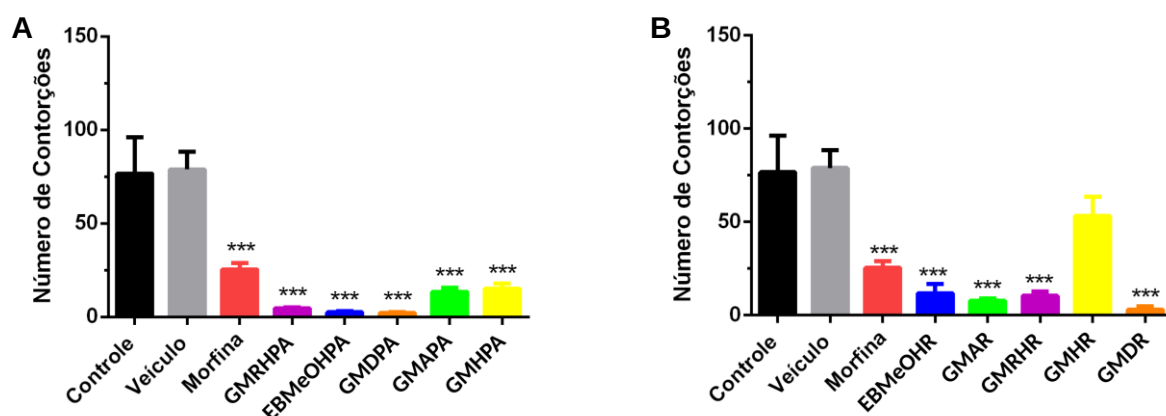


Gráfico 2 - Efeito antinociceptivo dos extratos e frações de partes aéreas (A) e raízes (B) de *G. matogrossiana* no modelo de contorções abdominais induzidos por ácido acético. Os animais foram tratados por via oral com os extratos e frações na dose de 100 mg.kg⁻¹, além de solução salina, veículo e morfina (3 mg.kg⁻¹). Os resultados são expressos como média ± E.P.M. (n = 6) do número de contorções. A significância estatística (*p < 0,05 e ***p < 0,001) foi calculada entre o grupo controle e os grupos tratados com morfina, veículo, extratos e frações de partes aéreas e raízes de *G. matogrossiana*, por One Way ANOVA acompanhado pelo teste de Bonferroni.

O teste da formalina é amplamente utilizado para avaliar a eficácia de substâncias com potencial efeito antinociceptivo, por permitir a distinção entre dor neurogênica e inflamatória (HUNSKAAR e HOLE, 1987). Neste protocolo (Figura 71, pág. 110), sessenta minutos após a administração oral dos tratamentos (salina, veículo, morfina na dose de 3 mg.kg⁻¹, ácido acetilsalicílico na dose de 100 mg.kg⁻¹ ou amostras testadas na dose de 100 mg.Kg⁻¹ na concentração de 50 mg.mL⁻¹), é realizada a injeção de 0,02mL de uma solução de formalina a 2,5% na pata traseira direita dos animais. Após a injeção, os camundongos são colocados individualmente em caixas de vidro com paredes espelhadas, o que permite melhor visualização e registro dos comportamentos nociceptivos. A resposta à formalina é caracterizada por dois períodos distintos. A primeira fase, chamada neurogênica, ocorre entre 0 e 5 minutos após a injeção e é atribuída à ativação direta dos nociceptores pela formalina e por mediadores inflamatórios pré-formados. A segunda fase, denominada inflamatória, acontece entre 15 e 30 minutos após a injeção e resulta da liberação de mediadores inflamatórios pós-formados, como prostaglandinas, histamina, serotonina e bradicinina, os quais atuam sobre terminações

nervosas livres, além de envolver mecanismos centrais de sensibilização da medula espinhal (HUNSKAAR e HOLE, 1987). O tempo que cada animal permanece lambendo, sacudindo ou mordendo a pata injetada é medido em segundos durante cada uma dessas fases e serve como indicador da intensidade da dor. Este modelo experimental é amplamente utilizado na investigação do potencial analgésico de substâncias naturais e sintéticas por abranger mecanismos periféricos e centrais de dor, sendo considerado robusto e informativo (MUNGUIA, Q.F.B., 2007).

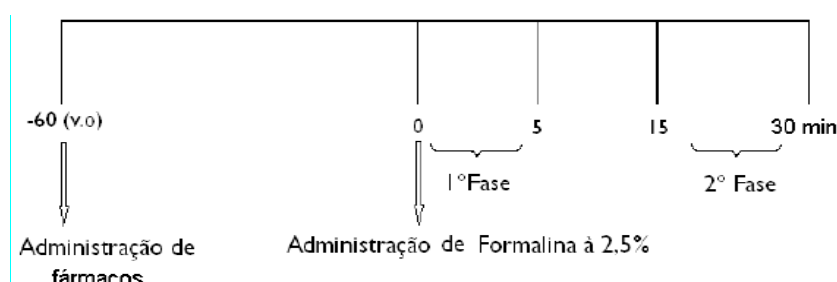


Figura 71 - Protocolo experimental do Modelo da Formalina. Fonte: OLIVEIRA, 2016.

No teste de formalina, ambas as frações provenientes das raízes de *Galianthe matogrossiana* reduziram o tempo de lambedura em aproximadamente 53-54% na fase neurogênica e entre 41-55% na fase inflamatória, valores próximos aos observados nos grupos tratados com morfina (55,8% na fase neurogênica e 51,2% na fase inflamatória) e ácido acetilsalicílico (54,6% na fase inflamatória), **Erro! Fonte de referência não encontrada.** A e B , pág **Erro! Indicador não definido..**

Na primeira fase do teste de formalina com preparados da raiz, da espécie a redução do tempo de lambedura foi de 55,8%, 53,8%, 46,8%, 58,5% e 45,7% nos grupos tratados com morfina, EBMeOHR, GMRHR, GMAR e GMDR, respectivamente. Para as partes aéreas da planta, a redução observada foi de 55,8%, 53,9%, 49,8% e 54,5% nos grupos morfina, EBMeOLHPA, GMRHPA e GMDPA, respectivamente.

Na segunda fase do teste, os extratos da raiz promoveram reduções no tempo de lambedura de 51,2%, 54,6%, 41,8%, 30,2%, 45,6% e 48,5%, respectivamente para os grupos tratados com morfina, ácido acetilsalicílico, EBMeOHR, GMRHR, GMAR e GMDR. Nas partes aéreas, a redução foi de 51,2%, 54,6%, 36,0%, 44,5%, 43,4%, 39,3% e 49,0% nos grupos tratados com morfina, ácido acetilsalicílico, EBMeOLHPA, GMRHPA, GMAPA, GMAHPA e GMDPA, respectivamente.

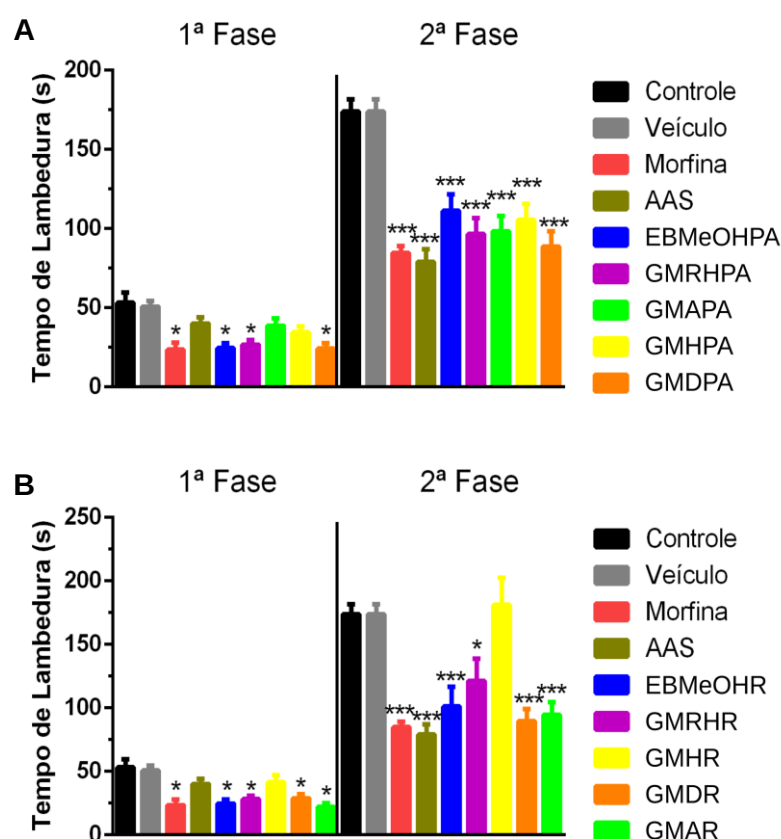


Gráfico 3 - Efeito antinociceptivo dos extratos e frações de partes aéreas (A) e raízes (B) de *G. matogrossiana* no modelo de formalina. Os animais foram tratados por via oral com solução salina, veículo, morfina (3 mg.kg⁻¹), ácido acetilsalicílico (AAS - 100 mg.kg⁻¹) e extratos e frações de partes aéreas e raízes na dose de 100 mg.kg⁻¹. Os resultados são expressos como média ± E.P.M. (n = 6) do tempo de lambedura. A significância estatística (*p < 0,001) foi calculada entre o grupo controle e os grupos tratados com veículo, morfina, ácido acetilsalicílico, extratos e frações de partes aéreas e raízes de *G. matogrossiana*, por One-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni.

O teste de campo aberto é amplamente utilizado para avaliar alterações comportamentais e motoras, baseado no comportamento espontâneo dos animais, bem como para inferir efeitos ansiolíticos ou sedativos de substâncias testadas (COELHO, 2010 apud OLIVEIRA, A.M., 2019). Em seu procedimento clássico, os animais recebem treinamento prévio na arena para minimizar o estresse da novidade (LAPA *et al.*, 2003 apud OLIVEIRA, 2019). No presente estudo, cinco dias antes do início dos experimentos, todos os camundongos foram habituados ao campo aberto, uma placa de acrílico dividido em quadrados de 5 × 5 cm e cercado por paredes transparentes de 30 cm de altura. Sessenta minutos após a administração oral dos tratamentos, que incluíram salina, diazepam na dose de 3 mg.kg⁻¹ e amostras na dose de 100 mg.kg⁻¹, cada animal foi colocado individualmente na arena e avaliado quanto à

movimentação espontânea, registrada pelo número de cruzamentos com as quatro patas entre as divisões de campo (CARLINI *et al.*, 1986).

A atividade espontânea foi registrada pelo número de quadrados atravessados em um período de cinco minutos, conforme descrito por Barros *et al.* (1991) (Figura 72, pág. 112). Substâncias estimulantes do sistema nervoso central aumentam o deslocamento, enquanto agentes depressores reduzem a mobilidade (COELHO, 2010 apud OLIVEIRA, 2019). A tendência do camundongo de explorar um ambiente novo torna este modelo útil para detectar alterações na locomoção e no estado emocional provocadas pelos preparados vegetais testados.



Figura 72 - Protocolo experimental do modelo de campo aberto. Fonte: OLIVEIRA, 2016.

Em síntese, os extratos metanólico e o resíduo hidrometanólico obtidos das raízes e partes aéreas (EBMeOHR, EBMeOHPA, GMRHR e GMRHPA) de *G. matogrossiana* apresentaram atividade antinociceptiva expressiva em todos os modelos comportamentais empregados, sem comprometer a motricidade espontânea no teste de campo aberto (Gráfico 4A e 1B, pág.112). Nesse ensaio, apenas o controle positivo diazepam reduziu a atividade motora em 50,7 %.

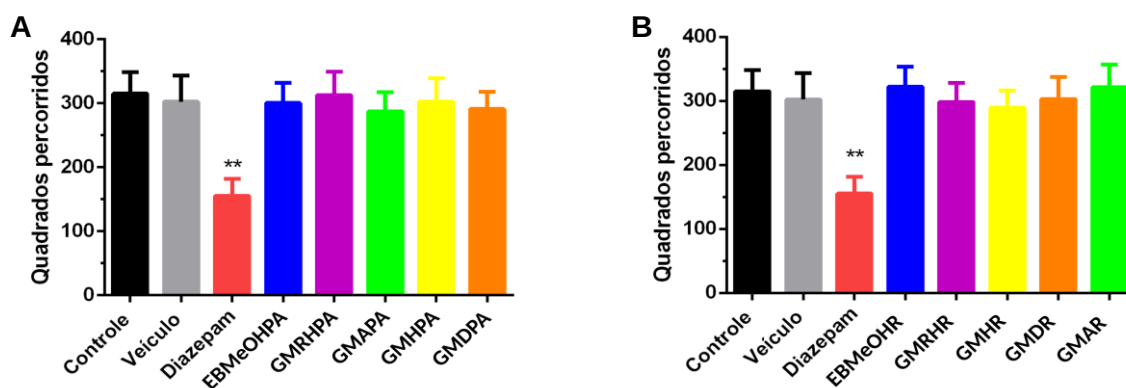


Gráfico 4 - Efeito dos extratos e frações de partes aéreas (A) e raízes (B) de *G. matogrossiana* no modelo de campo aberto. Os animais foram tratados por via oral com solução salina, veículo, diazepam (3 mg.kg⁻¹), extratos e frações de partes aéreas e raízes na dose de 100 mg.kg⁻¹. Os resultados são expressos como média ± E.P.M. (n = 6) do número de quadrados percorridos. A significância estatística (**p < 0,01) foi calculada entre o grupo controle

e os grupos tratados com veículo, diazepam, extratos e frações de partes aéreas e raízes de *G. matogrossiana*, por One-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni.

Em síntese, os resultados demonstram que todos os extratos e frações de *Galianthe matogrossiana*, com exceção da fração hexano das raízes, apresentaram efeito antinociceptivo. Destaca-se que apenas as frações de acetato de etila e hexano das partes aéreas exibiram atividade significativa na modulação da dor, enquanto as demais atuaram predominantemente no alívio da dor neurogênica. Esses dados indicam que os compostos ativos podem modular mecanismos neurais da dor, incluindo possíveis ações periféricas, espinais ou supraespinais, sendo necessários estudos adicionais para esclarecer os locais e vias específicas de atuação. Essas descobertas reforçam o potencial da planta como fonte promissora de agentes naturais e ressaltam a importância de estudos fitoquímicos pautados no isolamento e caracterização dos princípios envolvidos, bem como seus mecanismos de ação.

2.3.2.2. Experimentos envolvendo extratos e frações: Atividade antioxidante do extrato e frações das raízes de *Galianthe matogrossiana* em modelo com *Saccharomyces cerevisiae*

A crescente demanda por novos compostos bioativos ressalta a importância de investigar espécies de plantas pouco estudadas, como *Galianthe matogrossiana* E.L. Cabral, endêmica do Cerrado brasileiro. Nesse estudo, realizou-se o rastreamento dos ensaios antioxidantes utilizando o extrato bruto e frações das raízes (para esses ensaios adotaram-se as siglas: extrato bruto (EBMeOHR) e suas frações acetato de etila (GMAR), diclorometano (GMDR), hexano (GMHR) e resíduo hidrometanólico (GMRHR)), que fornecem informações preliminares essenciais para a selecionar candidatos a estudos farmacológicos mais avançados, uma vez que o estresse oxidativo está envolvido na fisiopatologia de diversas doenças humanas (FADEL *et al.*, 2019; OLDONI *et al.*, 2025). Utilizou-se *Saccharomyces cerevisiae* como modelo eucariótico por sua facilidade de manipulação genética, ciclo de vida curto e conservação de vias celulares presentes em organismos superiores (SUBHASWARAJ *et al.*, 2017; SUDHARSHAN *et al.*, 2022). Empregou-se a cepa selvagem BY4741 e a mutante *Δyap1*, deficiente em fator de transcrição para genes antioxidantes, para avaliar o potencial antioxidante das amostras. A citotoxicidade do EBMeOHR foi determinada por curvas de crescimento celular, e a atividade antioxidante desta e demais frações foram avaliadas pelo ensaio de oxidação intracelular com diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA).

A descrição detalhada dos procedimentos encontra-se no manuscrito (Anexo 2) recentemente submetido ao periódico *Planta Médica*; em linhas gerais, os tópicos abordados incluem cepas de levedura e meio de cultura, cultivo de *Saccharomyces cerevisiae*, preparação do inóculo e solubilização dos extratos, avaliação do crescimento celular na presença do extrato de *G. matogrossiana* e ensaio de oxidação intracelular utilizando H₂DCFDA.

Como resumo dos dados que sustentam estes ensaios, cujo detalhamento encontra-se no manuscrito submetido, o extrato bruto das raízes de *G. matogrossiana* (EBMeOHR) não exibiu citotoxicidade em *S. cerevisiae* (BY4741) após 24 h, com densidades celulares de 4,34, 4,64 e 4,87 mg·mL⁻¹ para o controle e para as células incubadas com 17,5 e 35,0 µg·mL⁻¹, respectivamente, indicando que até o dobro de concentração não inibiu a proliferação (Gráfico 5, pág 114).

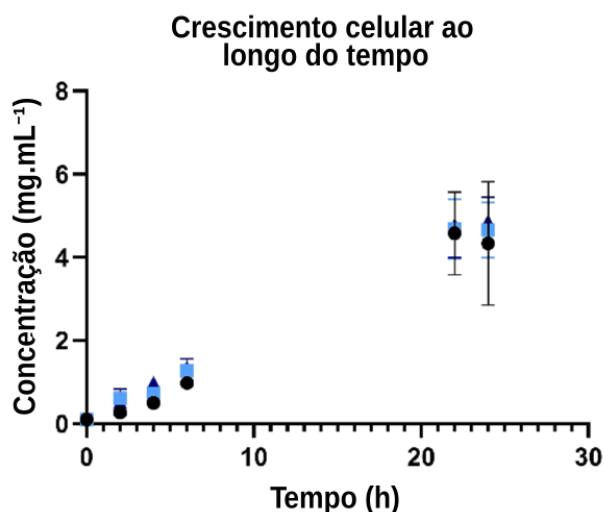


Gráfico 5 - Curva de crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* (cepa BY4741) ao longo de 24 horas na presença do extrato bruto das raízes de *Galianthe matogrossiana* nas concentrações de 17,5 µg·mL⁻¹ e 35 µg·mL⁻¹. As culturas foram incubadas a 28 °C sob agitação (160 rpm), com leituras da densidade óptica a 570 nm realizadas nos tempos de 0, 2, 4, 6, 22 e 24 horas. Os valores estão expressos como média ± desvio padrão de três experimentos independentes (n = 3).

A capacidade antioxidante de EBMeOHR e de suas frações foi avaliada pela inibição da oxidação intracelular induzida por H₂O₂. No ensaio com DCFHDA, as frações apolares GMHR (hexano) e GMDR (diclorometano) exibiram os maiores efeitos com taxas de inibição de 7,27 e 4,56 µg⁻¹ na cepa selvagem (BY4741) (Gráfico 6A, pág. 115) e de 10,2 e 5,27 µg⁻¹ no mutante *Δyap1* (Gráfico 6B, pág. 115). A fração GMAR (acetato de etila) também foi ativa (1,33 µg⁻¹ em BY4741 e 2,09 µg⁻¹ em *Δyap1*), enquanto EBMeOHR e GMRHR exibiram menores atividades em ambas as cepas testadas.

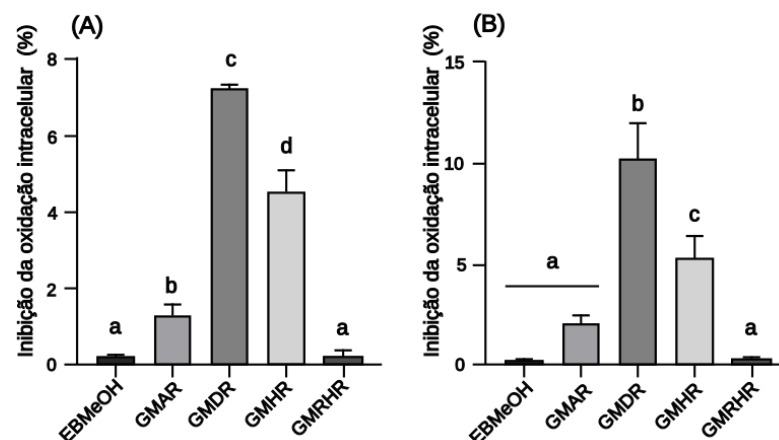


Gráfico 6 - Inibição da oxidação intracelular por frações do extrato bruto e subfrações das raízes de *Galianthe matogrossiana* nas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 (A) e *Δyap1* (B). As células foram expostas às amostras vegetais por 2 horas, seguidas de tratamento com peróxido de hidrogênio (2,0 mM) e marcação com H₂DCFDA (20 μM). A fluorescência foi medida (excitação 488 nm, emissão 520 nm), e os resultados expressos como taxa de inibição da oxidação intracelular por micrograma de extrato testado (μg⁻¹). Valores representados como média ± desvio padrão de três experimentos independentes (n = 3).

Esses resultados são sustentados pelo estudo fitoquímico de GMHR e GMDR, matrizes vegetais ricas em triterpenos pentacíclicos das classes lupano, oleanano e ursano, os quais podem ter contribuído para os melhores resultados na avaliação antioxidante (TAN *et al.*, 2015). A presença de grupos hidroxila em seus núcleos estruturais favorece a doação de elétrons ou hidrogênio, neutralizando os radicais livres e prevenindo danos celulares significativos, o que contribui para a desintoxicação do organismo (ROHMAN *et al.*, 2006). Destacam-se ainda o ácido betulinico (**12**) e compostos fenólicos como ácido p-hidroxibenzoico (**17**), ácido vanílico (**18**) e a cumarina escopoletina (**11**), cujas atividades antioxidantes por doação de hidrogênio e pela capacidade de quelar metais são bem documentadas (STUTZ *et al.*, 2024; SHAHARYAR *et al.*, 2025 ; SHAHIDI *et al.*, 2012; SOHAG *et al.*, 2022; FABIO *et al.*, 2014; TAN *et al.*, 2015; KOSTOVA *et al.*, 2011; RAZAVI *et al.*, 2008; VELIKA e KRON, 2012). A sinergia entre esses metabólitos, especialmente nas frações apolares GMHR e GMDR (mais puras que o extrato bruto e o resíduo hidrometanólico), explica a forte redução do estresse oxidativo observada em ambas as cepas de levedura, confirmando o potencial dessas frações como fontes promissoras de agentes antioxidantes.

2.3.2.3. Experimentos isolados: Avaliação do ácido oleanólico acetilado isolado de *Galianthe matogrossiana* com potencial atividade contra amastigotas de *Trypanosoma cruzi*

A classe dos triterpenos pentacíclicos, notadamente o ácido oleanólico (AO) e seu isômero, destaca-se como uma subclasse de terpenos amplamente biossintetizada no reino vegetal, caracterizada por sua diversidade de moléculas biologicamente ativas (SILVA *et al.*, 2020). O AO é frequentemente encontrado em plantas utilizadas na medicina tradicional e tem sido objeto de numerosos estudos científicos, revelando uma ampla gama de atividades terapêuticas, incluindo propriedades antidiabéticas, antioxidantes, antivirais, hepatoprotetoras, anti-inflamatórias, antimicrobianas, antiproliferativas e anticancerígenas (RASHEED *et al.*, 2023). A substituição do grupo hidroxila do AO por um grupo lipofílico acetil (AOA) altera as propriedades físicas e biológicas do composto original, aumentando sua ação contra *Plasmodium falciparum* no derivado AOA em comparação ao AO (CI₅₀ AOA = 4,3 µg/mL; CI₅₀ AO = 27,4 µg/mL), sugerindo uma potente atividade antimalárica e demonstrando que essa molécula é uma importante fonte para a exploração de outras atividades biológicas (FADIPE *et al.*, 2020).

Em um cenário em que a Doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) representa um sério desafio de saúde pública na América Latina, o tratamento com benzonidazol, embora seja a única opção disponível, é limitado por sua baixa eficácia e alta toxicidade. Nesse contexto, o AOA surge como uma opção terapêutica promissora, uma vez que estudos com seus análogos, os ácidos ursólico e oleanólico, demonstraram notável atividade antiparasitária contra as formas tripomastigotas de *T. cruzi*, atribuindo-se a essa molécula um potencial significativo como agente terapêutico contra a Doença de Chagas (FERREIRA *et al.*, 2013).

Neste tópico, são apresentados os resultados dos ensaios realizados com o ácido 3β-O-acetil-oleanólico (AOA, 2), isolado de *G. matogrossiana*, contra a forma intracelular do parasita, os amastigotas, considerados alvos preferenciais em estudos de descoberta de fármacos. A avaliação da atividade anti-*Trypanosoma cruzi* do composto foi conduzida pelo doutorando Afonso Santine M. M. Velez no Instituto de Medicina Veterinária – UFRRJ, no Laboratório de Imunologia e Virologia Veterinária, sob supervisão da Prof^a Débora Decoté-Ricardo de Lima e orientação de Marco Edilson F. de Lima.

Seguindo um protocolo detalhado (Anexo 3) e resumido no esquema da figura 73, células LLC-MK2 foram cultivadas em DMEM + 2 % SFB, infectadas com tripomastigotas transfectados para expressão de β -galactosidase e, após estabelecimento da infecção, tratadas com diluições seriadas do AOA. A atividade tripanocida foi quantificada pelo ensaio colorimétrico com o substrato CPRG (vermelho de clorofenol- β -D-galactopiranosídeo) cuja clivagem pela β -galactosidase libera produto vermelho medido a 570 nm, caso tenha parasito no meio. Paralelamente, a citotoxicidade sobre as células hospedeiras foi avaliada pelo ensaio de redução de MTT em formazana e leitura a 570 nm, cuja maior intensidade da coloração roxa, indica maior número de células viáveis. Controles de veículo (0,3 % DMSO), branco (sem parasitos) e benzonidazol como padrão positivo foram incluídos.

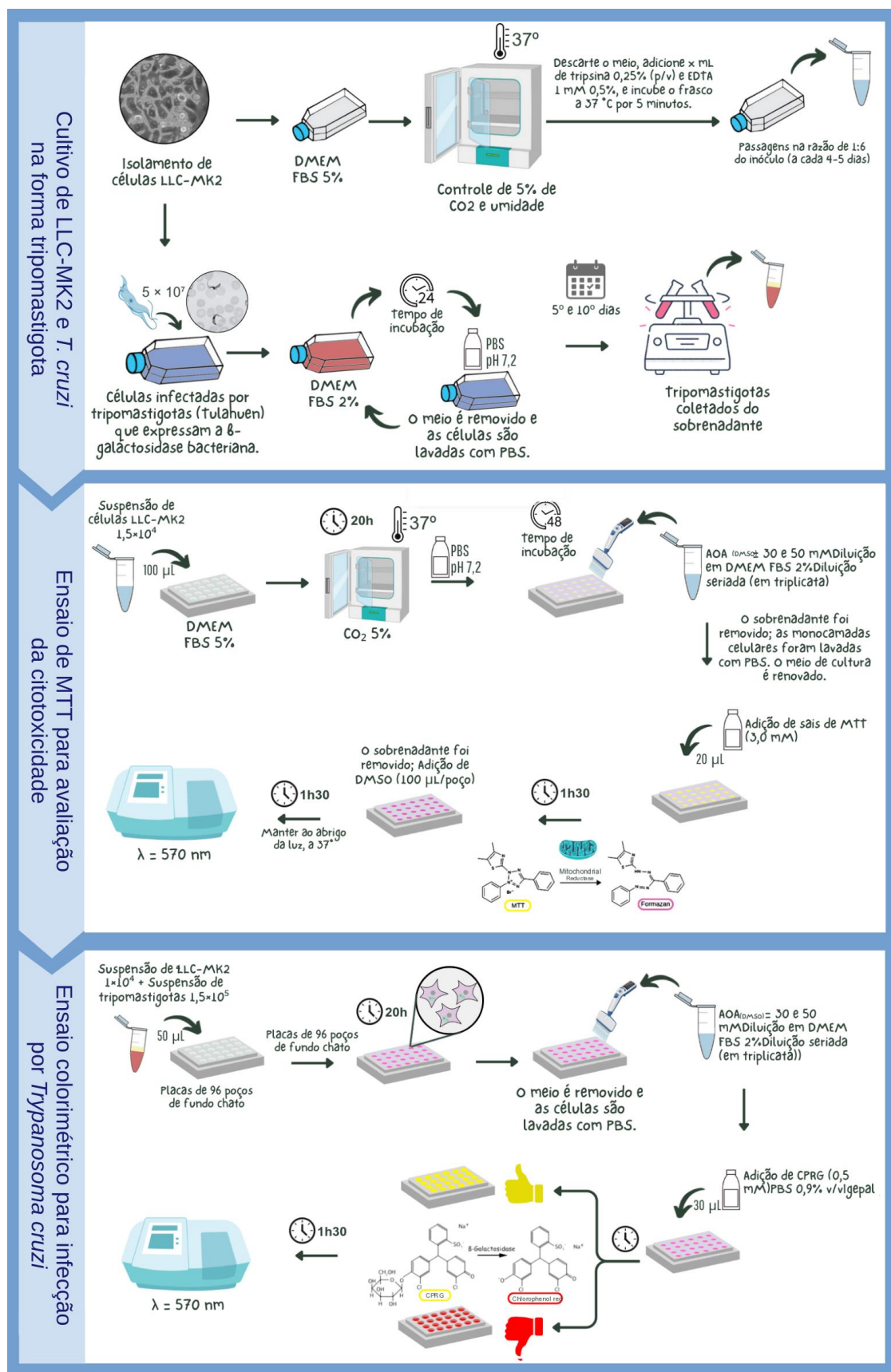


Figura 73 - Esquema do cultivo de células e parasitas e da metodologia dos ensaios biológicos com amastigotas de *T. cruzi*. (Fonte própria).

O ácido 3 β -O-acetil-oleanólico (AOA) de *Galianthe matogrossiana* exibiu atividade antiparasitária promissora contra amastigotas de *T. cruzi* (cepa Tulahuen C2C4LacZ) (Gráfico 7B, pág. 119). Após 120 horas de tratamento, verificou-se inibição do crescimento dos amastigotas, com concentração inibitória de 50% (CI₅₀) igual a 11,06 μ M. Paralelamente, o composto apresentou citotoxicidade razoável em células LLCMK2, com CI₅₀ de 34,46 μ M (Gráfico 7A, pág. 119), resultando em índice de seletividade (IS) de 3,11. Esses dados indicam que o AOA age de forma mais tóxica ao parasito do que às células hospedeiras, destacando seu perfil tripanocida promissor para a forma intracelular clinicamente relevante de *T. cruzi*.

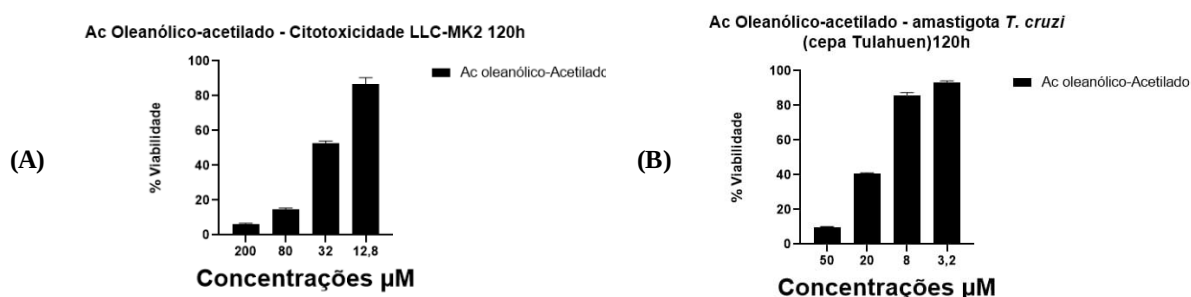


Gráfico 7 - Efeito citotóxico do ácido oleanólico acetilado em: (A) células LLC-MK2 e (B) formas amastigotas de *T. cruzi* (cepa Tulahuen C2C4 LacZ).

Em resumo, os resultados obtidos são de relevância significativa, pois preenchem uma lacuna no conhecimento existente sobre a atividade antiparasitária desse composto. Nossas constatações demonstram que o AOA, um produto natural não modificado, exibiu notável atividade tripanocida contra amastigotas, a forma intracelular replicativa clinicamente relevante no ciclo de *T. cruzi*, com um CI₅₀ bastante expressivo para um metabólito natural. Sua seletividade favorável sugere potencial terapêutico e justifica estudos adicionais, incluindo a avaliação de misturas de derivados triterpênicos e dos compostos puros obtidos neste estudo (como combinações de ácido oleanólico e ursólico em suas formas livres e acetiladas), não finalizados até a apresentação desta tese.

Entretanto, a razão entre atividade antiparasitária e citotoxicidade (IS = 3,11), embora encorajadora, evidencia a necessidade de avanços em duas frentes. Primeiramente, investigações adicionais sobre o mecanismo de ação devem ser conduzidas, uma vez que o presente ensaio não permite identificar se o AOA atua seletivamente sobre alvos do parasito ou se o efeito observado decorre de mecanismos gerais de toxicidade celular. Nesse sentido,

abordagens baseadas em ensaios enzimáticos, análises moleculares e estudos *in silico* podem fornecer informações cruciais sobre os alvos envolvidos, tanto no parasito quanto na célula hospedeira.

Além disso, como perspectiva futura, a aplicação de modelagem molecular poderá apoiar o planejamento de modificações estruturais em derivados do AOA, com vistas a reduzir a citotoxicidade e, simultaneamente, potencializar sua atividade tripanocida. Essas abordagens, associadas à avaliação de combinações de triterpenos, poderão ampliar as possibilidades terapêuticas e contribuir para o desenvolvimento de novos candidatos a fármacos antichagásicos a partir de metabólitos da espécie em estudo.

Os resultados aqui apresentados são robustos e suficientes para publicação em periódico científico voltado à descoberta de novos agentes antichagásicos baseados em metabólitos de *G. matogrossiana*.

2.3.2.4. Seleção de potenciais agentes anticâncer: Abordagem *In Silico* de docking molecular com triterpenos de *G. matogrossiana* contra a Aurora Quinase B

Os triterpenos obtidos das frações hexânica e diclorometano das raízes de *G. matogrossiana* são reconhecidos por sua importância em pesquisas farmacológicas. Neste estudo, o isolamento e a elucidação estrutural desses triterpenos foram cruciais, pois forneceram as estruturas moleculares para a triagem baseada em modelagem computacional, especificamente focada na sua atividade antitumoral. Essa abordagem é atual e permite identificar interações moleculares específicas, considerando o vasto potencial anticâncer já descrito para esses compostos (SHAHARYAR *et al.*, 2025; PISHA *et al.*, 1995; FURTADO *et al.*, 2017; JOSHI, 2023). Neste trabalho o foco foi analisar dados teóricos para prever a atividade antitumoral de quatro triterpenos isolados: ácido ursólico (**8, AU**), ácido oleanólico livre (**9, AO**), ácido oleanólico acetilado (**2, AOA**) e ácido 3 β -O-acetil-pomólico (**3, APA**). Para isso, aplicou-se uma abordagem de *docking* molecular visando selecionar potenciais compostos medicamentosos entre esses triterpenos, com foco na inibição da Aurora quinase B. Esta quinase é um alvo promissor para o desenvolvimento de fármacos em terapias anticâncer.

Para a seleção do tipo de câncer a ser investigado, realizou-se uma triagem *in silico* utilizando a ferramenta *online* gratuita CLC-Pred 2.0. O CLC-Pred é um *software* capaz de prever os efeitos citotóxicos de compostos químicos em linhagens celulares cancerígenas ou não tumorais (LAGUNIN *et al.*, 2018). Com base na similaridade entre as estruturas

moleculares analisadas e compostos com atividade biológica conhecida, o programa calcula a probabilidade de uma molécula ser ativa (Pa) ou inativa (Pi). Nesse contexto, as estruturas químicas dos triterpenos foram representadas no formato SMILES (*Simplified Molecular-input Line-entry System*) para avaliar o potencial de toxicidade *in silico* e determinar as principais linhagens celulares previstas para os triterpenos. A Figura 74, pág. 121, apresenta todos os SMILES utilizados neste estudo.

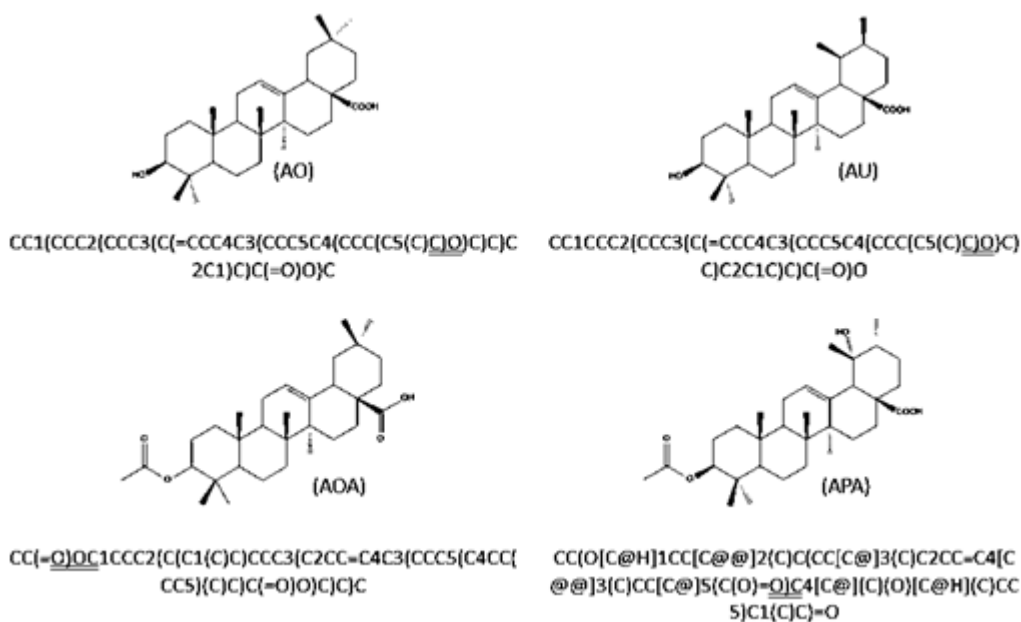


Figura 74 - Estrutura molecular dos triterpenos testados e seus SMILES.

A análise preditiva realizada com a ferramenta CLC-Pred forneceu *insights* sobre o espectro de ação antitumoral dos triterpenos investigados. O Gráfico 8 ilustra o número total de linhagens celulares de câncer que poderiam ser alvo para cada composto. Observou-se que todos os triterpenos apresentaram um amplo espectro de potencial atividade, com uma variação de 47 a 61 linhagens cancerígenas previstas. Os esqueletos oleananos demonstraram maior abrangência, destacando-se como alvos promissores.

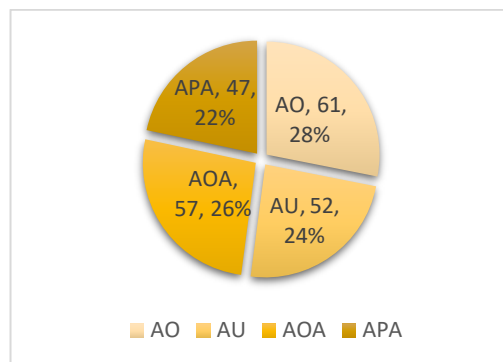


Gráfico 8 - Resultados da predição com o número total de linhagens celulares de câncer a partir da análise empregando CLC-Pred. Valores de Pa > Pi.

Para que a predição fosse considerada relevante, adotou-se o critério de probabilidade de atividade (Pa) superior a 0,5. Sob essas condições, todos os triterpenos exibiram similaridades promissoras com duas linhagens cancerígenas principais: carcinoma gástrico e carcinoma indiferenciado (anaplásico) da glândula tireoide. Os triterpenos ácido oleanólico (AO) e ácido 3 β -O-acetil-pomólico (APA) destacaram-se por apresentarem os valores de Pa mais elevados. Os resultados detalhados dessa análise para diferentes linhagens celulares e seus respectivos valores de Pa encontram-se na Tabela 12, pág. 122.

Tabela 12 Análise *in silico* de atividade antitumoral obtida com o CLC-Pred (Way2Drug ©).

Triterpeno	Pa	Linhagem cancerígena como alvo potencial	Triterpeno	Pa	Linhagem cancerígena como alvo potencial
AO	0.592	MKN-7 Carcinoma gástrico	AOA	0.587	8505C Carcinoma indiferenciado (anaplásico) da glândula tireoide
	0.556	8505C Carcinoma indiferenciado (anaplásico) da glândula tireoide		0.511	MKN-7 Carcinoma gástrico
	0.497	HL-60 Leucemia promieloblástica		0.476	FaDu Carcinoma escamoso hipofaríngeo
	0.446	H9 Linfoma T		0.482	HL-60 Leucemia promieloblástica
	0.442	NCI-H322M Carcinoma de células não pequenas do pulmão		0.448	H9 Linfoma T
	0.417	SK-MEL-2 Melanoma		0.395	DLD-1 Adenocarcinoma de cólon
	0.425	UACC-257 Melanoma		0.455	A549 Carcinoma pulmonar
	0.420	OVCAR-4 Adenocarcinoma ovariano		0.386	SW480 Adenocarcinoma de cólon
	0.405	UO-31 Carcinoma renal		0.438	SK-MEL-1 Melanoma metastático
AU	0.409	OVCAR-5 Adenocarcinoma ovariano		0.411	UACC-257 Melanoma
	0.512	MKN-7 Carcinoma gástrico	APA	0.613	8505C Carcinoma indiferenciado (anaplásico) da glândula tireoide
	0.478	Bcap37 Adenocarcinoma de mama		0.490	HepG2 Hepatoblastoma
	0.466	8505C Carcinoma indiferenciado (anaplásico) da glândula tireoide		0.504	NCI-H838 Câncer de pulmão de células não pequenas, estágio 3
	0.432	PANC-1 Carcinoma pancreático		0.444	DLD-1 Adenocarcinoma de cólon
	0.452	HL-60 Leucemia promieloblástica		0.418	MKN-7 Carcinoma gástrico
	0.431	EKVX Carcinoma de células não pequenas do pulmão		0.404	H9 Linfoma T
	0.412	H9 Linfoma T		0.436	SK-MEL-1 Melanoma metastático
	0.403	SK-MEL-2 Melanoma		0.369	A2780 Carcinoma ovariano
	0.371	RXF 393 Carcinoma renal		0.414	A549 Carcinoma pulmonar
	0.334	DLD-1 Adenocarcinoma de cólon		0.287	SW480 Adenocarcinoma de cólon

Adicionalmente, utilizando o programa CLC-Pred, realizou-se uma análise da citotoxicidade das estruturas moleculares dos triterpenos em relação a células não tumorais. No

entanto, os resultados obtidos foram inconclusivos e, portanto, não serão abordados neste estudo.

As conclusões da predição foram determinantes para a escolha do carcinoma anaplásico da tireoide como o principal foco deste estudo de *docking* molecular. Assim, torna-se essencial compreender a biologia dessa anaplasia para identificar o alvo proteico e os potenciais inibidores necessários para as simulações de acoplamento molecular.

O carcinoma anaplásico da tireoide (CAT) é uma neoplasia rara e extremamente agressiva, representando cerca de 1% de todos os cânceres de tireoide. Caracteriza-se por uma mutação no gene p53, um supressor tumoral crucial na regulação do ciclo celular. Essa mutação resulta em um crescimento descontrolado de células cancerosas. Geralmente diagnosticado em mulheres mais velhas, o CAT apresenta uma sobrevida média de aproximadamente 6 meses após o diagnóstico (CARVALHO e GRAF, 2005; SHERMAN, S.I., 2000). A agressividade associada à baixa incidência dessa neoplasia dificulta a realização de estudos para definir a melhor estratégia terapêutica.

Um importante desregulador do gene p53 no CAT é a superexpressão da proteína Aurora B quinase. Esta proteína provoca a fosforilação do p53, ativando a proteína Mdm2, que, por sua vez, promove a degradação do p53 (SOARES *et al.*, 1994; GULLY *et al.*, 2012). Esse processo impede a ativação do p53 e a resposta celular ao dano no DNA (Figura 75, pág. 124) (GULLY *et al.*, 2012). Consequentemente, a Aurora B quinase emerge como um alvo principal para o tratamento do carcinoma indiferenciado da tireoide.

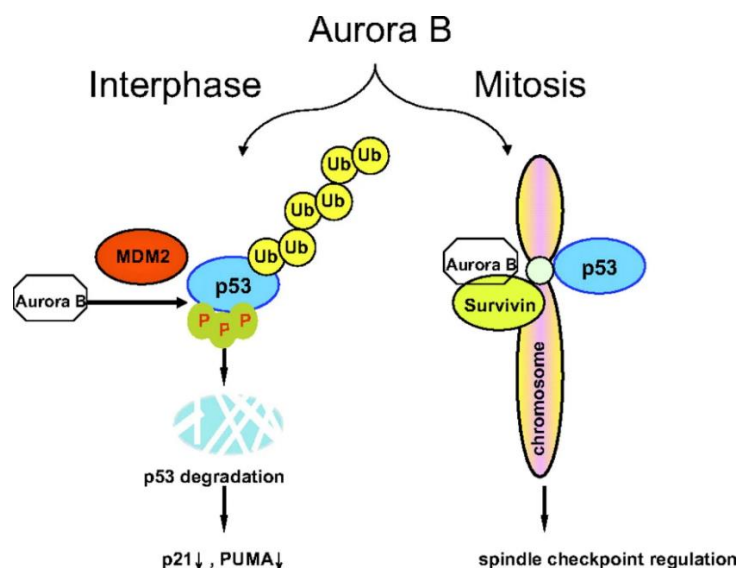


Figura 75 : Consequências funcionais da interação entre p53 e Aurora B. Fonte: GULLY *et al.*, 2012

Atualmente, diversos estudos focam em inibidores da Aurora B quinase, com destaque para o VX-680, que se confirma como um inibidor potente e seletivo. Este composto tem demonstrado eficácia notável na indução de apoptose em várias linhagens celulares neoplásicas (HARRINGTON *et al.*, 2004). Com base nessa contextualização, defini a proteína Aurora B quinase e o VX-680 como o ligante para a realização do *docking* molecular.

Para elucidar seu mecanismo inibitório, é fundamental compreender as interações-chave que ocorrem entre o VX-680 e os resíduos de aminoácidos críticos no sítio de ligação da Aurora B quinase. Pesquisas indicam que a bolsa de ligação da quinase é formada pelos resíduos Leu83, Phe88, Val91, Ala157 e Leu207. A conformação de ligação do VX-680 com a Aurora B, ilustrada na Figura 76, pág. 125, revela que o grupo amino da Ala157 estabelece duas ligações de hidrogênio com a pirazolidina e o nitrogênio ligante do VX-680, a distâncias de 1,92 Å e 2,39 Å, respectivamente. Adicionalmente, Leu83, Val91 e Phe88 participam de interações hidrofóbicas, enquanto Phe88 forma uma interação pi-pi com o anel de benzeno do VX-680 (ASHRAF *et al.*, 2021).

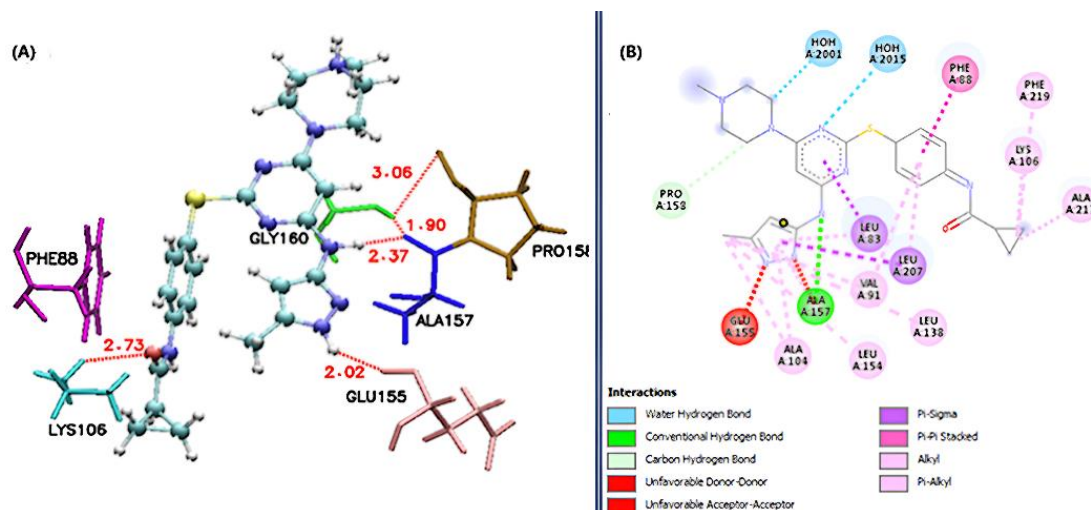


Figura 76 - Ancoragem de compostos no sítio de ligação da Aurora quinase B. **(A)** Composto VX-680 (ASHRAF, *et al.*, 2021) e **(B)** Simulado no software Discovery Studio visualizer, v 24.1

2.3.2.5. Metodologia: Redocking e Docking Molecular

Para realizar o *redocking* e o *docking* molecular, empregaram-se as ferramentas AutoDockTools 1.5.7, AutoDock 4.2.6, Discovery Studio Visualizer v24.1 e a base de dados RCSB Protein Data Bank. A estrutura tridimensional da proteína-alvo (PDB ID 4AF3) foi obtida no RCSB Protein Data Bank e importada para o AutoDockTools, onde se removeu toda molécula de água e se excluiu o ligante co-cristalizado VX6 (Figura 77). Em seguida, adicionou-se hidrogênios polares à proteína e calculou-se as cargas de Kollman, salvando-se o resultado em formato *.pdbqt para as etapas seguintes.



4AF3

Human Aurora B Kinase in complex with INCENP and VX-680

PDB DOI: <https://doi.org/10.2210/pdb4AF3/pdb>

Classification: **TRANSFERASE/INHIBITOR**

Organism(s): Homo sapiens

Expression System: Escherichia coli BL21(DE3)

Mutation(s): Yes

Deposited: 2012-01-16 Released: 2012-04-11

Deposition Author(s): Elkins, J.M., Vollmar, M., Wang, J., Picaud, S., Arrowsmith, C.H., Edwards, A., Bountra, C., von Delft, F., Knapp, S.

Ligands 1 Unique			
ID	Chains	Name / Formula / InChI Key	2D Diagram
VX6 Query on VX6	C [auth A]	CYCLOPROPANECARBOXYLIC ACID {4-[4-(4-METHYL-PIPERAZIN-1-YL)-6-(5-METHYL-2H-PYRAZOL-3-YLAMINO)-PYRIMIDIN-2-YLSULFANYL]-PHENYL}-AMIDE C ₂₃ H ₂₈ N ₈ O S GCIKSSRWRFVXBI- UHFFFAOYSA-N	
Download Ideal Coordinates CCD File Download Instance Coordinates			

Figura 77 - Proteína-alvo de interesse 4AF3 obtida no site RCSB Protein Data Bank.

Paralelamente, o ligante VX6 foi construído e otimizado no Avogadro, acrescentando-se hidrogênios e buscando a conformação de menor energia (Figura 78, pág. 127).

Para o ligante, também no AutoDockTools, suas ligações foram fixadas como não-rotacionáveis, e o arquivo foi salvo no formato *.pdbqt (Figura 79b, pág. 127). Subsequentemente, delineou-se a grid-box, uma caixa que delimita o sítio ativo para o encaixe do ligante (Figura 79c, pág. 127). As dimensões da caixa foram definidas em 70 Å (x), 42 Å (y) e 50 Å (z), com coordenadas de centro em x=26,295, y=-23,048 e z=-10,442. Este arquivo foi salvo no formato *.gpf.

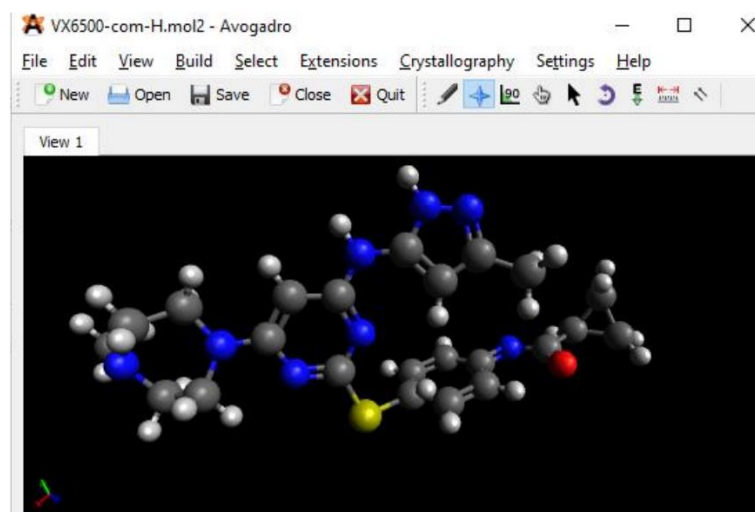


Figura 78 - Software Avogadro utilizado para desenho e obtenção da conformação de menor energia do ligante.

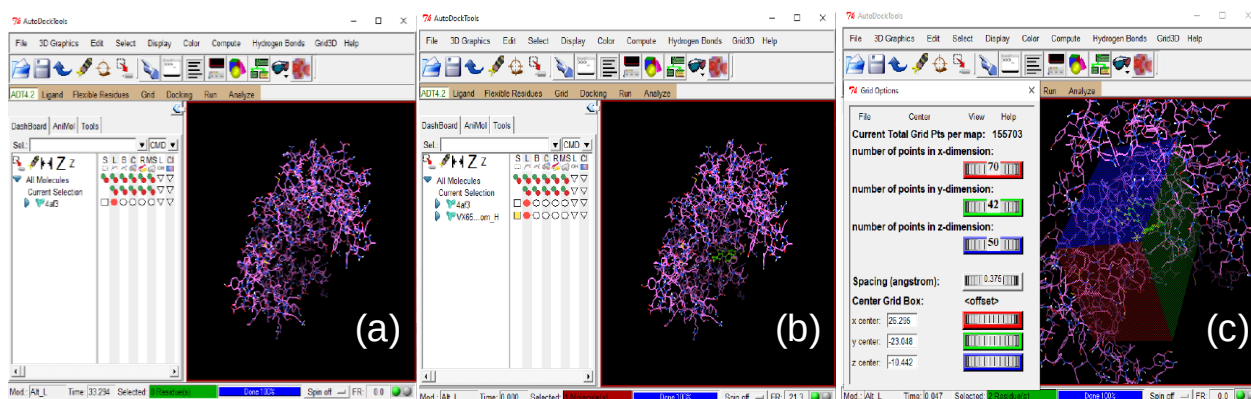


Figura 79 - Software AutoDockTools; a – tratamento da proteína; b – fixação das ligações para não-rotacionáveis; c – criação da grid-box do sítio ativo.

Na configuração dos parâmetros de *docking*, a macromolécula e o ligante previamente tratados foram especificados. Optou-se pelo algoritmo de busca "Lamarckian GA 4.2" (do tipo "Genetic Algorithm"). Essas configurações foram registradas em um arquivo *.dpf.

A execução dos cálculos de docking foi realizada via linha de comando do Windows (Figura 80, pág. 128), utilizando os seguintes comandos

```
autogrid4.exe -p 1.gpf -l 1.glg
autodock4.exe -p 2.dpf -l 2.dlg
```

```

C:\Users\andre\Documents\docking>autogrid4.exe -p 1.gpf -l 1.glg
C:\Users\andre\Documents\docking>autodock4.exe -p 2.dpf -l 2.dlg

```

Figura 80 - Janela do terminal onde foram executados os cálculos de docagem.

Os resultados foram analisados no arquivo de saída (2.dlg), em especial a tabela “Clustering Histogram”, que orientou a escolha da conformação de melhor afinidade (Figura 81, pág. 128). De volta ao AutoDockTools, o arquivo de saída foi aberto e a conformação de melhor energia de ligação foi selecionada. O complexo resultante foi salvo no formato *.pdb para visualização e análise detalhada no Discovery Studio Visualizer (Figura 82, pág. 129). A validação do protocolo de redocking foi realizada por meio do cálculo do RMSD (Root Mean Square Deviation) entre o ligante co-cristalizado original e o ligante *redocked*. Obteve-se um valor de RMSD de 0.9706 Å, o que é considerado validado (<2 Å) para o protocolo de docking (Figura 82, pág. 129).

CLUSTERING HISTOGRAM											
Clus- ter Rank	Lowest Binding Energy	Run	Mean Binding Energy	Num in Clus	Histogram						
					5	10	15	20	25	30	35
1	+3.24e+006	5	+3.24e+006	4	####						
2	+3.24e+006	8	+3.24e+006	1	#						
3	+3.24e+006	10	+3.24e+006	5	#####						

RMSD TABLE						
Rank	Sub- Rank	Run	Binding Energy	Cluster RMSD	Reference RMSD	Grep Pattern
1	1	5	+3.24e+006	0.00	40.12	RANKING
1	2	6	+3.24e+006	0.01	40.11	RANKING
1	3	3	+3.24e+006	0.05	40.10	RANKING
1	4	2	+3.24e+006	0.37	40.03	RANKING
2	1	8	+3.24e+006	0.00	46.30	RANKING
3	1	10	+3.24e+006	0.00	42.65	RANKING
3	2	4	+3.24e+006	0.05	42.65	RANKING
3	3	9	+3.24e+006	0.02	42.65	RANKING
3	4	7	+3.24e+006	0.09	42.65	RANKING
3	5	1	+3.24e+006	0.09	42.65	RANKING

Figura 81 - Arquivo de saída do cálculo de docagem contendo as tabelas do ranking e o RMSD.

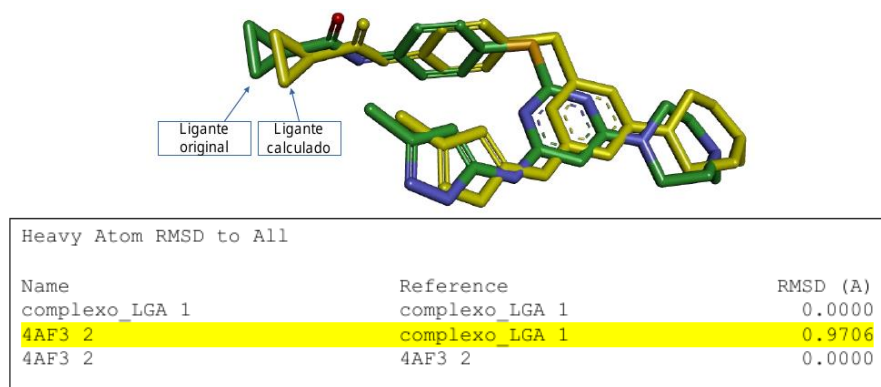


Figura 82 - Análise dos resultados utilizando o software Discovery Studio.

Em suma, esses passos representam uma jornada metodológica sistemática, desde a seleção da proteína-alvo até a análise final dos complexos moleculares gerados. Esta abordagem combinou o uso eficiente de *softwares* especializados com procedimentos cuidadosamente ajustados, visando estabelecer um protocolo de *docking* validado para futuras investigações.

Após a conclusão dos cálculos de redocking realizados com o AutoDockTools, os resultados apresentados na Figura 81 forneceram as energias de ligação entre o ligante e a proteína-alvo, informação fundamental para avaliar tanto a afinidade do ligante quanto a estabilidade das interações formadas. O *software* classificou e ordenou as poses mais promissoras, revelando energias idênticas, em concordância com o método rígido empregado, que não introduz variações energéticas significativas. Entretanto, a observação de uma energia positiva sinaliza possível irregularidade no redocking, visto que valores mais negativos indicam estados de maior estabilidade e interações mais favoráveis.

A análise do RMSD, também apresentada na Figura 81, indicou valores iguais para todas as poses, mas ao sobrepor o ligante co-cristalizado e o ligante re-dockado no Discovery Studio Visualizer (Figura 82), verificou-se excelente alinhamento estrutural. Esse parâmetro expressa a média quadrática das diferenças posicionais entre os átomos das duas conformações; valores inferiores a 2 Å, como o RMSD de 0,9706 Å observado, confirmam a fidelidade do protocolo e a validação do método empregado.

Na visualização das interações específicas no sítio ativo (Figura 83), identificaram-se tanto interações desfavoráveis quanto ligações cruciais para a inibição da Aurora Quinase B: destaca-se a interação π - π entre Phe88 e o anel benzênico de VX-680, a

ligação ao nitrogênio do núcleo pirazolidina de Ala157 e interações hidrofóbicas com Val91 e Leu83. Estas interações são relevantes para a inibição eficaz da Aurora B quinase.

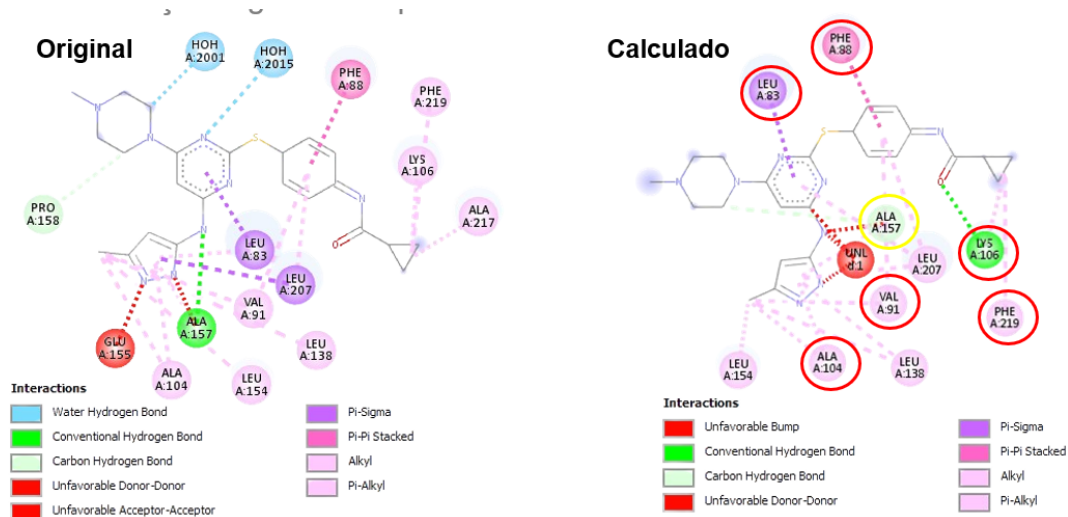


Figura 83 - Ancoragem de compostos no sítio de ligação da Aurora quinase B em sua forma original e calculada.

Os resultados obtidos após os cálculos de *redocking* validaram o método, justificando a continuidade do *docking* com os triterpenos. No entanto, ao final dos cálculos, observou-se que os triterpenos não foram acoplados ao sítio de ligação da proteína. Essa observação pode ser atribuída à estrutura complexa e à rigidez intrínseca desses triterpenos, ou até mesmo ao seu maior volume, o que pode impedir um encaixe adequado no sítio ativo da proteína.

Complementarmente aos resultados obtidos com o protocolo desenvolvido neste estudo, dados fornecidos por um colaborador da pós-graduação, o mestre Jorge Lucas F. Lacerda, apresentou resultados distintos para o mesmo *docking* utilizando outra ferramenta, o *software* Gold (ver Figura 84, pág. 131). Nessa abordagem alternativa, além da ancoragem, os triterpenos testados exibiram valores elevados de *Score*, indicando um potencial para exercer alguma ação inibitória na quinase testada. No entanto, é imperativo ressaltar que estudos adicionais são necessários para a realização de predições mais precisas e para a validação experimental desses achados.

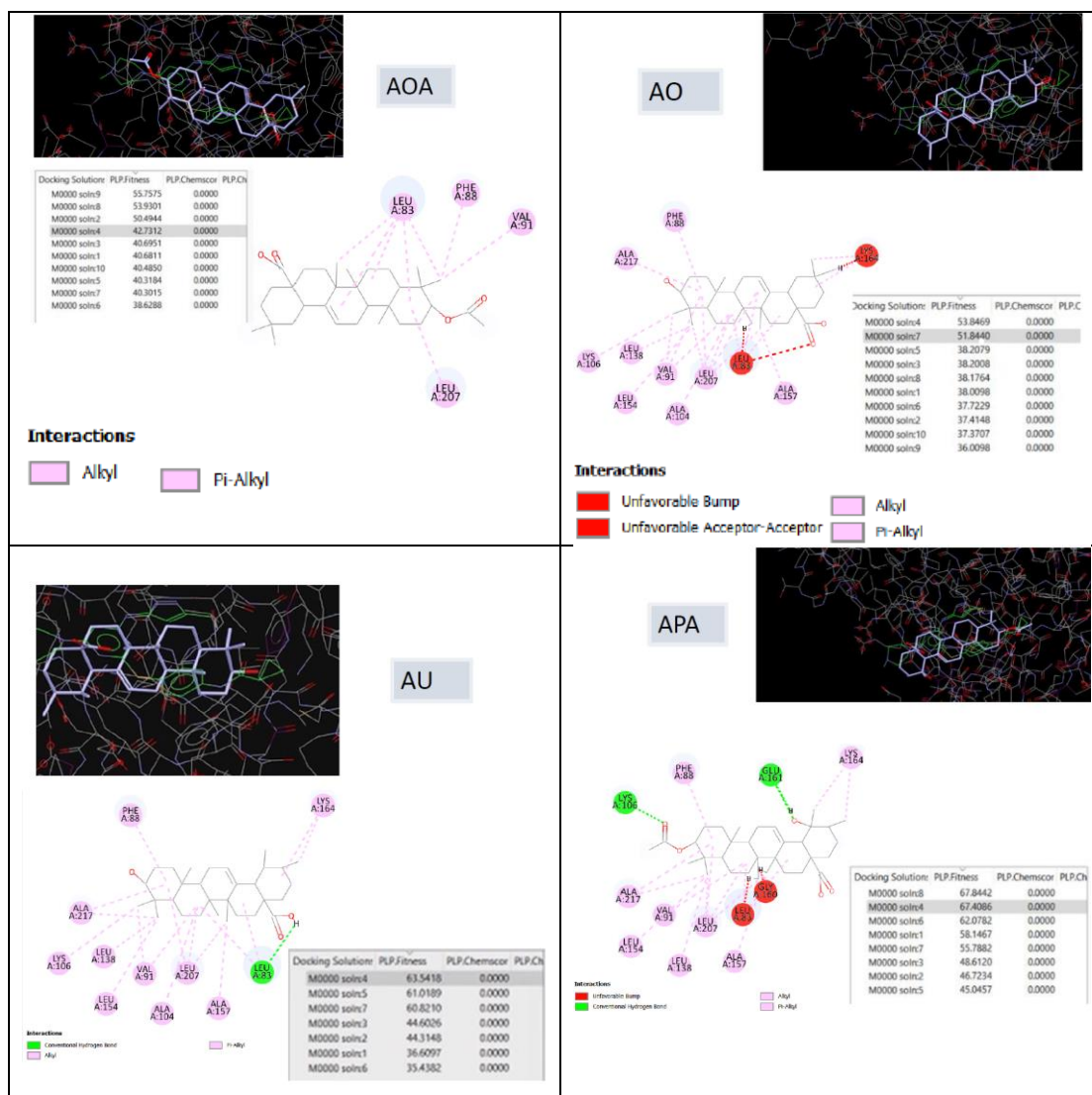


Figura 84 - Dados de Score obtidos para os triterpenos testados utilizando o GOLD com interações com a proteína alvo. Resultados de *docking* molecular obtidos para os triterpenos 3-O-acetil-oleanólico (AOA), ácido oleanólico (AO), ácido ursólico (AU) e ácido 3-O-acetil-ursólico (APA) utilizando o software GOLD, destacando os valores de score e as principais interações estabelecidas com a proteína -alvo.

Conclui-se que apesar de o protocolo de *redocking* ter demonstrado bons resultados, a realização do *docking* com a proteína Aurora B quinase e os triterpenos utilizando o AutoDockTools não foi bem-sucedida neste estudo. Contudo, dados preliminares obtidos por ancoragem com o *software* Gold indicam a relevância de prosseguir com esta investigação, reforçando a necessidade de aprofundar o domínio técnico no AutoDockTools. Os resultados aqui apresentados, embora iniciais e derivados de uma abordagem simplificada, evidencia a necessidade de estender o estudo a outros terpenoides (incluindo os inéditos), a investigação com diferentes proteínas-alvo e ligantes, e a validação em testes antitumorais *in vitro* e *in vivo*, de modo a validar e ampliar as observações aqui relatadas. A elaboração desta narrativa e o

compartilhamento dos dados tornam-se fundamentais, pois abrem novas possibilidades para investigações subsequentes nesse contexto. Trata-se de contribuição significativa não apenas para os grupos de pesquisa vinculados ao programa de pós-graduação em química medicinal e modelagem molecular, como também para outras instituições que empregam abordagens similares, ampliando o impacto e o alcance desta linha de pesquisa. Nesse cenário, revela-se imprescindível divulgar estas descobertas, aproveitando os resultados já obtidos para impulsionar e expandir estudos futuros.

2.4. CONCLUSÕES

A investigação fitoquímica de *G. matogrossiana* culminou no isolamento e identificação de 21 substâncias a partir de extratos de raízes e partes aéreas. A caracterização estrutural, validada por uma série de técnicas espectroscópicas e espectrométricas, revelou a presença de diversos metabólitos, incluindo ácidos graxos, antraquinonas, derivados de chalcona e cumarina, derivados do ácido benzoico, esteroides e, notavelmente, dez triterpenos predominantemente das séries ursano e oleanano, cuja lipossolubilidade confere um perfil farmacocinético e bioativo de particular interesse.

A avaliação biológica integrada demonstrou o potencial multifuncional de extratos, frações e compostos isolados de ambas as partes da planta testada. Extratos e frações de ambas as partes da planta de *G. matogrossiana* exibiram atividade antinociceptiva, com exceção da fração hexano das raízes, atuando principalmente na dor neurogênica sem afetar a motricidade. As frações de acetato de etila e hexano das partes aéreas mostraram efeito modulatório adicional, sugerindo ação em múltiplos níveis do sistema nervoso. Esses resultados indicam um mecanismo de ação neural, necessitando estudos adicionais para elucidar as vias específicas envolvidas. Ensaio com *Saccharomyces cerevisiae* confirmaram o potencial antioxidante das frações apolares (hexano, diclorometano) das raízes. As atividades foram avaliadas em duas linhagens de *S. cerevisiae* (BY4741 e $\Delta yap1$) e demonstraram que o efeito antioxidante é independente da via de sinalização mediada por Yap1p. Os resultados sugerem que a atividade está associada à presença de triterpenos pentacíclicos (lupano, oleanano, ursano) e compostos fenólicos. O ácido 3 β -O-acetil-oleanólico (AOA), isolado neste estudo, demonstrou potente atividade tripanocida contra amastigotas de *Trypanosoma cruzi*, destacando-se como um

candidato promissor devido ao seu promissor índice de seletividade em relação às células hospedeiras.

A investigação *in silico* indicou potencial anticâncer contra linhagens como o carcinoma anaplásico da tireoide. Dados complementares com o *software* Gold sugerem um potencial inibitório, mesmo que experimentos iniciais de docking com AutoDockTools na Aurora B quinase não tenham sido conclusivos.

Em síntese, os resultados desta tese consolidam *G. matogrossiana* como uma fonte valiosa de metabólitos especiais com uma gama de atividades biológicas comprovadas na literatura, fornecendo uma base robusta para a prospecção de novos candidatos a fármacos. Nesse contexto, a abordagem empregada ressalta o papel da fitoquímica clássica no cenário da ciência moderna. Ainda que surjam críticas sobre sua aplicação, este trabalho demonstra que ela é o caminho indispensável para gerar informações primárias, especialmente em casos como o presente, onde a eficácia da desreplicação é comprometida pela escassez de dados químicos para o gênero *Galianthe* e, simultaneamente, pela alta complexidade metabólica da sua família (Rubiaceae). Ao prover dados estruturais validados, esta abordagem supre uma lacuna crítica de conhecimento, viabilizando o uso de ferramentas avançadas como MS-DIAL e GNPS, que dependem de informações robustas da literatura. Valida-se, portanto, a interconexão entre as abordagens fitoquímica, biológica e computacional. Com base neste panorama, as perspectivas futuras apontam para o aprofundamento da investigação das frações polares, o isolamento biomonitorado dos princípios ativos responsáveis pelas atividades observadas, e a crucial validação experimental dos achados *in silico*. A continuidade dessas investigações é fundamental para explorar integralmente o vasto potencial farmacológico desta espécie endêmica.

3. CAPÍTULO II

Potencial Glicoxidativo de *Crateva tapia*: Avaliação *In Vitro* e Caracterização Fitoquímica

3.1. INTRODUÇÃO/ JUSTIFICATIVA

Retomando a relevância da biodiversidade brasileira, com seus distintos *hotspots* biogeográficos, ressalta-se o imenso potencial desse patrimônio natural para a química de produtos naturais, já que oferece uma variedade de espécies ainda pouco exploradas quanto ao seu potencial biológico e à caracterização de sua composição química (FELISBERTO et al., 2022). Dando continuidade a essa perspectiva e expandindo nossa investigação para além dos limites do Cerrado, em que abordei o estudo de uma espécie nativa (Capítulo I), este capítulo volta-se para uma representante do Pantanal, um bioma igualmente vital e sob crescente ameaça.

Atualmente, uma mudança negativa nesse panorama tem gerado grande preocupação em toda a comunidade científica. Essa vasta riqueza natural enfrenta ameaças crescentes, especialmente devido a queimadas que destroem habitats essenciais. Dados recentes do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE, 2024) revelam uma situação alarmante: no primeiro semestre de 2024, foram detectados 3.262 focos de queimadas no Pantanal, um aumento de mais de 22 vezes em relação ao mesmo período do ano anterior e o maior registro desde 1988. Embora quase todos os biomas brasileiros tenham sofrido aumento nas queimadas em comparação a 2023, a preservação do Pantanal é urgente, pois a perda de espécies compromete não apenas o equilíbrio dos ecossistemas, mas também potenciais linhas de pesquisa e descobertas de novos compostos farmacologicamente relevantes.

Entre as diversas espécies presentes no Pantanal, destaca-se *Crateva tapia* L., cuja distribuição inclui também Cerrado e Mata Atlântica (SANTOS et al., 2012; ATANU et al., 2014; SOUSA, 2019). Apesar de seu uso tradicional como planta medicinal e de relatos sobre sua atividade antidiabética, há carência de dados sobre os metabólitos isolados e as correlações

entre sua estrutura química e atividades biológicas, o que motivou a investigação fitoquímica desta espécie, coletada no bioma pantaneiro (SHARMA *et al.*, 2013, 2016).

O estudo fitoquímico apresentado nesse capítulo seguirá em andamento como projeto de Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) do bolsista voluntário de iniciação científica Luan C. Alves, integrante do Grupo de Pesquisa em Química de Produtos Naturais da UFRRJ.

Além de expandir o conhecimento sobre os metabólitos especiais desta planta, o presente estudo propõe avaliar seu potencial de inibir, *in vitro*, a formação de produtos avançados de glicação (AGEs), utilizando extratos hidroalcoólicos das folhas e entrecascas do caule, visando aplicações na prevenção de complicações do diabetes. Para tanto, serão quantificados os níveis de AGEs fluorescentes gerados em reações de glicação, permitindo estimar a capacidade de prevenção de complicações associadas ao diabetes. Espera-se, com esta investigação, não apenas ampliar o conhecimento sobre os constituintes químicos de *C. tapia* e validar sua atividade antidiabética, mas também fornecer subsídios para a conservação do Pantanal, demonstrando a importância de preservar a diversidade biológica como fonte de novas moléculas bioativas e contribuindo para avanços em diversas áreas do conhecimento. Nesse contexto, destaca-se o desejo de promover meios de registro na literatura de estudos dessa planta existente no nosso Pantanal!

3.1.1. Revisão e Perspectivas para *Crateva tapia* L.

Crateva tapia L. (Capparaceae), equivocadamente denominada como *Crataeva tapia* (SANTOS, 2012; PATIL *et al.*, 2010), pertencente à família Capparaceae. O gênero *Crateva* possui nove espécies distribuídas em regiões tropicais e subtropicais ao redor do mundo (COSTA e SILVA, 2002). No Brasil, *C. tapia* é o único representante do gênero com diversos relatos de uso popular. Caracteriza-se como uma árvore de 4 e 8 metros de altura (Figura 85, pág. 136) com amplamente distribuída no território nacional, ocorrendo nos biomas Mata Atlântica, Pantanal e Caatinga, além de outras áreas da América tropical e na Índia (SANTOS *et al.*, 2012; ATANU *et al.*, 2014; SOUSA, 2019). Conhecida popularmente como trapiá, cabaceira, varuna e catoré, essa espécie é facilmente reconhecida pelas folhas compostas trifolioladas, sendo a única Capparaceae no Brasil com essa característica (GALINDO *et al.*, 2012; PEREIRA JUNIOR, 2005; SOARES NETO e JARDIM, 2015). Seus frutos globosos medem cerca de 4 cm de diam, são lisos, glabos e ficam laranja ou amarelados ao amadurecer

(Figura 85, pág. 136) A frutificação ocorre de janeiro a fevereiro, e a floração é observada em janeiro, fevereiro e outubro (SOARES NETO e JARDIM, 2015; GALINDO *et al*, 2012).

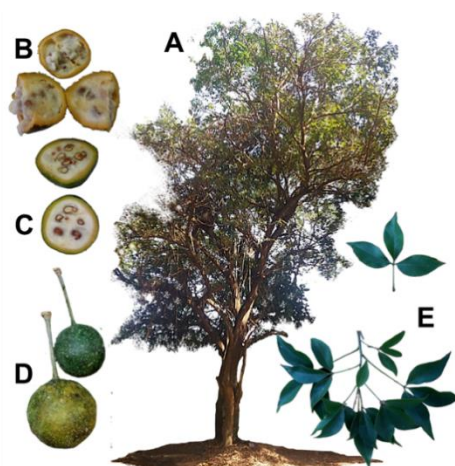


Figura 85 *Crateva tapia*. **A** – Árvore; **B** – Polpa madura; **C** – Polpa verde; **D** – Frutos; **E** – Folhas: Fonte: GONÇALVES, M.R.S.

Considerando *C. tapia* como alvo de investigação fitoquímica, uma revisão bibliográfica demonstra o imenso potencial econômico e medicinal dessa espécie, fornecendo uma base sólida para o estudo fitoquímico das cascas do caule que atualmente está em andamento. A pesquisa bibliográfica focou nas propriedades terapêuticas e o perfil químico de trapiá, além de explorar seus potenciais aplicações na medicina moderna (Tabela 13, pág. 138). Para conduzir essa investigação, foram utilizadas bases de dados científicas como Google Acadêmico, Scielo e Periódicos Capes, com as palavras-chaves, “*Crateva tapia*” e “*Crataeva tapia*”. A análise dos dados obtidos na revisão bibliográfica revela que *C. tapia* tem sido alvo de investigações de 2004 a 2023, majoritariamente descritas em artigos científicos (Gráfico 9, pág. 137). A espécie possui grande relevância econômica e sociocultural, com importantes aplicações medicinais (Tabela 13, pág. 138) relatadas para todas as suas partes, sendo as entrecascas e as folhas as mais exploradas (Gráfico 10, pág. 137).

Publicações por ano para pesquisa de *Crateva tapia*

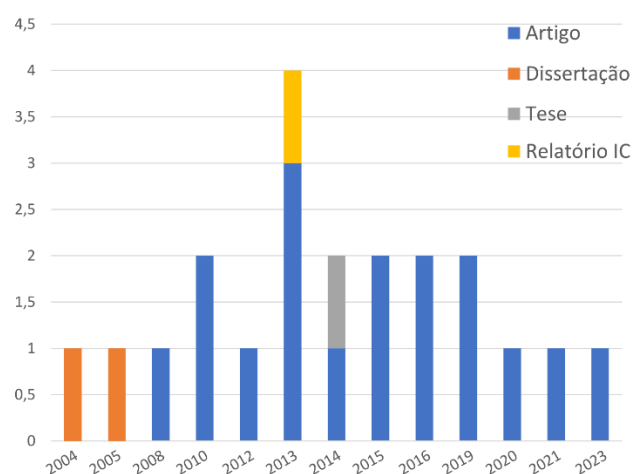


Gráfico 9 - Trabalhos acadêmicos e artigos disponíveis, com e seus respectivos anos, nos bancos de dados consultados sobre *C. tapia*¹. **Autoria:** Gráfico elaborado pela autora (2025) com base na literatura ¹.

Partes estudadas de *Crateva tapia*

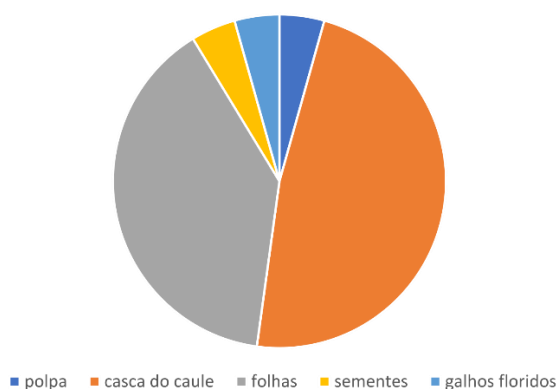


Gráfico 10 - Partes de *C. tapia* estudadas¹. **Autoria:** Gráfico elaborada pela autora (2025) com base na literatura ¹.

Além disso, a planta tem sido amplamente investigada na Índia. No Brasil, as universidades do Nordeste são as que mais contribuem para o estudo dessa espécie. Há muitos registros de usos populares e atividades biológicas comprovadas, conforme descrito na tabela:

¹ Araújo (2004, 2008, 2011); Arruda et al. (2021); Bonturi et al. (2019); Cabral et al. (2015); Ferreira et al. (2013); Galindo et al. (2012); Lakshmi e Chauhan (1975); Magalhães et al. (2023); Nascimento et al. (2008); Neto e Guarim (2010); Nunes et al. (2015); Patil (2014); Patil et al. (2010); Pereira Junior (2005); Santos et al. (2012); Santos et al. (2020); Sharma et al. (2013); Sharma et al. (2016a, 2016b); Silva (2014); Sousa (2019); Xavier et al. (2019).

Tabela 13 Resumo das informações econômicas, socioculturais e medicinais atribuídas a *C. tapia*¹. Autoria: Tabela elaborada pela autora (2025) com base na literatura ¹.

Importância Econômica	Uso na Medicina Popular	Atividades Farmacológicas
• Forrageira: Utilizada na alimentação do gado e como isca de pesca no Pantanal. • Construção Civil: Madeira empregada em forros, caixotarias e confecção de canoas. • Alimentos: Frutos consumidos in natura, usados em refrescos e bebidas viníficas; alimentam peixes e animais silvestres. • Ornamentação: Arborização paisagística e recomposição de áreas degradadas. • Valor Medicinal: Frutos, folhas e cascas com ampla aplicação medicinal. • Potencial Alelopático: Folhas atuando como herbicida natural em práticas agrícolas e ambientais. • Aplicações Farmacêuticas: Lignina isolada com propriedades antioxidantes, utilizada em filtros solares e cosméticos. • Ação Inseticida Biodegradável: Proteínas específicas no combate a cupins (<i>Nasutitermes corniger</i>). • Outras Propriedades: Ação antinociceptiva, anti-inflamatória, antitumoral e no controle de diabetes.	• Amargo-tônica e Febrífuga: Cascas utilizadas por índios da Amazônia Ocidental. Frutos usados como febrífugo no Nordeste. • Estomáquico: Chás de folhas usados por índios da Amazônia Ocidental. • Dores Reumáticas: Seiva da planta utilizada por índios da Amazônia Ocidental. Suco da planta usado na região do Konkan. • Distúrbios Urinários: Amplamente usada na medicina Ayurveda para tratar distúrbios urinários e inflamatórios. Pó da planta melhora o tônus da bexiga urinária, útil no controle de infecções do trato urinário. • Afecções Calcúlosas: Cascas utilizadas para distúrbios urinários, incluindo urolitíase e hipertrofia prostática. • Inchaço Gotoso: Folhas utilizadas no Ceilão para tratar inchaços. • Inchaço dos Pés: Folhas usadas em Bombaim para aliviar a sensação de queimação nos pés. • Necroses ósseas do Nariz: Folhas fumadas para tratar infecções nos ossos do nariz. • Antiperiódicas: Folhas utilizadas para tratar febres. • Frutos como Tônico : Frutos usados como tônico no Nordeste. • Picadas de Cobra: Entrecasca esverdeada com sal e água usada em sucos ou emplastos. • Emplastos: Aplicados em panarícios e unheiros. • Hipoglicemiante: Cascas do caule com propriedades úteis na redução da glicose no sangue. • Infecções Respiratórias: Frutos usados no tratamento de infecções respiratórias. • Uso Geral em Doenças Musculares: Frutos e cascas usados para doenças do sistema músculo-esquelético. • Propriedades Variadas: Rubefacientes, laxantes e antilíticos e irritação gástrica.	• Potencial Antioxidante (extrato das folhas e casca) • Atividade Anti-inflamatória (cascas, raiz e folhas) • Propriedades Diuréticas (tratamento de distúrbios urinários como urolitíase e infecções) • Ação Litontrópica (prevenção de cálculos renais, cascas e raiz) • Propriedades Hepatoprotetoras e Cardioprotetoras (folhas e casca do caule) • Propriedades Antimicrobianas (contra cepas resistentes de <i>Escherichia coli</i>, <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>) • Propriedade Antidiabética e Anti-artrítica (extratos das cascas e folhas) • Atividade Antifertilidade e Antimicótica (cascas e raiz) • Atividade Antidiarreica (folhas e casca) • Ação Cicatrizante de Feridas (folhas e casca do caule) • Propriedade Anti-helmíntica (tratamento de infecções parasitárias) • Atividade Moduladora da Resistência Bacteriana (extrato hidroalcoólico bruto)

A cabaceira destaca-se por sua grande relevância econômica e medicinal, especialmente nos biomas Pantanal e Caatinga de Sergipe. Sua madeira é utilizada na construção civil, em forros e caixotarias, além de servir na confecção de canoas (DE ARAUJO *et al.*, 2011). Os frutos são consumidos *in natura*, usados em refrescos e bebidas fermentadas, e alimentam peixes e animais silvestres (DE ARAÚJO, 2008; CABRAL *et al.*, 2015). A planta é valorizada na ornamentação e recomposição de áreas degradadas, sendo usada como forragem para gado e como isca de pesca (LORENZI, 2002; GUARIM NETO *et al.*, 2010).

Tradicionalmente, a planta é usada na medicina popular para tratar distúrbios urinários, reumatismo, infecções respiratórias e doenças músculo-esqueléticas (PATIL *et al.*, 2010; MAGALHÃES *et al.*, 2023). A entrecasca é aplicada em sucos ou emplastos para tratar picadas de cobra, enquanto suas propriedades hipoglicemiantes e antinociceptivas são amplamente reconhecidas (ALBUQUERQUE,1989; MORS *et al.*, 2000; NASCIMENTO *et al.*, 2008;

MAGALHÃES *et al.*, 2023). O potencial terapêutico dessa planta é vasto e subaproveitado em um contexto global.

Quimicamente, essa planta é uma rica fonte de moléculas bioativas, incluindo alcaloides (com atividades analgésicas, anti-inflamatórias e antimicrobianas), flavonoides (antioxidantes e anti-inflamatórios), taninos (adstringentes e antimicrobianos), triterpenoides (anti-inflamatórios e hepatoprotetores) e saponinas (imunomoduladoras e antimicrobianas) (SILVA, 2014; XAVIER *et al.*, 2019; SHARMA *et al.*, 2013). É fundamental destacar alguns dos isolados de diferentes partes de *C. tapia*, como folhas, raízes, frutos e entrecasas, que representam as diversas classes de compostos presentes na planta (Figura 86, pág.139). No entanto, muitos estudos referenciam esses isolados utilizando termos como *C. nurvala*, *C. religiosa*, e *C. benthamii* como sinônimos de *C. tapia*. Essa confusão ressalta a necessidade premente de uma distinção química clara para a espécie e o gênero em estudo (SHARMA *et al.*, 2013; PATIL *et al.*, 2010; 2014).

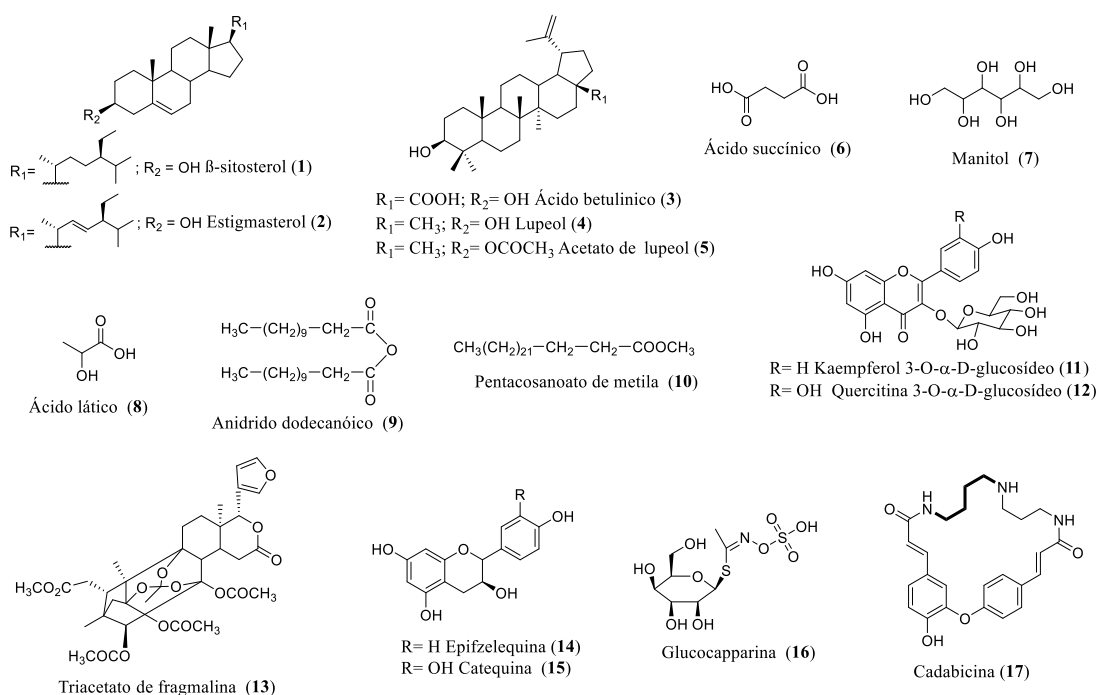


Figura 86 - Substâncias isoladas de frutos, raízes, entrecasas e folhas de *C. tapia*.

Além dos metabólitos já descritos, a literatura aponta outros isolados dessa espécie, distribuídos por suas diferentes partes. Do fruto, foram identificados pentadecano, octanamida, 12-tricosanona (GAGANDEEP *et al.*, 2009) e tricontato. A entrecasca do caule revelou friedelina, álcool cerílico, acetato de espinasterol, taxasterol, 3-epilupeol, diacetato de

cadabicina e epicatequina-5-glicosídeo. As folhas contêm rutina e varunol. Já das cascas da raiz, foram isolados rutina, 3-epilupeol, acetato de α -spinasterol e varunol. Especificamente do caule, foi encontrado ácido láctico (TOLSARWAD *et al.*, 2020), além da proteína CrataBL (BONTURI *et al.*, 2019; PEREIRA JUNIOR, 2005; SHARMA *et al.*, 2013; PATIL *et al.*, 2014). Relatos mais antigos também mencionam aminoácidos como cisteico, cloridrato de lisina, cloridrato de arginina, hidroxiprolina, ácido glutâmico e ácido α -amino caprílico (LAKSHMI e CHAUHAN, 1975), e açúcares como glicose, galactose e maltose. As flores também contribuem para o perfil químico, com a identificação de heneicosano, 1-octadecanol, pentanoato de metila, 1-eicosanol e 9-heptadecanona (GAGANDEEP *et al.*, 2005).

Farmacologicamente, *C. tapia* demonstra diversas atividades biológicas, como antioxidantes, anti-inflamatórias, antidiabéticas, antimicrobianas, antimicótico, antifertilidade, anti-helmíntico, cardioprotetora, entre outras (SHARMA, 2016). Embora um estudo tenha mostrado atividade antimicrobiana no extrato hidroalcoólico da casca de *C. tapia*, outro não apresentou essa mesma atividade e3-om níveis significativos, o que pode ser atribuído a variações nas condições ambientais onde as amostras foram coletadas ou a variação na síntese de metabólitos especiais do genótipo coletado (CABRAL *et al.*, 2015; PATIL *et al.*, 2014). Isso ressalta a importância de estudar plantas coletadas no Pantanal, pois tais estudos possibilitam novas descobertas sobre a composição química, auxiliam na confirmação da identificação da espécie e no estudo sobre biogênese de diferentes genótipos vegetais.

Adicionalmente, muitas das informações mencionadas acima sobre *C. tapia* referem-se a *C. nurvala*, que é considerada sinônimo da referida espécie em alguns trabalhos científicos consultados, incluindo os grupos de pesquisa indianos. Contudo, os frutos dessas espécies apresentam características distintas, como a cor da casca, que pode ser carmesim em *C. nurvala* (PATIL *et al.*, 2014). Essa distinção motiva a realização de novos estudos, como o presente, que visam contribuir com informações para a quimiotaxonomia e fornecer novos dados sobre os metabólitos especiais isolados da planta coletada no Pantanal Matogrossense.

Levantamentos de novos dados sobre a composição química e as propriedades biológicas da espécie coletada em nossos biomas tornam-se extremamente relevantes, pois contribuem com informações inéditas de caracterização e quimiotaxonomia da espécie no contexto nacional. Além disso, permitem que a química interaja interdisciplinarmente com áreas como bioquímica, genética, ecologia e farmacologia, visando o isolamento ou a identificação de metabólitos que contribuam para pesquisas nessas diferentes áreas de

conhecimento, bem como para a busca de novos fármacos capazes de solucionar problemas de saúde humana (FERNANDES, 2008; VIEGAS Jr. *et al.*, 2006).

3.1.1.1. Glicação e AGEs: Implicações para o Controle do Diabetes

O diabetes mellitus (DM) é uma doença crônica que ocupa a nona posição entre as causas de maior perda de anos de vida saudável, afetando cerca de 3 % da população mundial, percentual que tende a crescer até 2030 devido ao envelhecimento populacional (GBD 2013 Mortality and Causes of Death Collaborators, 2015; GUARIGUATA *et al.*, 2014). Em 2022, estimou-se que 828 milhões de adultos (≥ 18 anos) foram diagnosticados com DM, um aumento expressivo de 630 milhões em comparação a 1990, com prevalência crescente 131 países para mulheres e 155 para homens (GUARIGUATA *et al.*, 2014; ZHOU *et al.*, 2024 ou NCD Risk Factor Collaboration, 2024). No Brasil, esse cenário é igualmente preocupante, sendo agravado pelo rápido envelhecimento da população. Dados da Pesquisa Nacional de Saúde (PNS, 2013) indicam uma prevalência autorreferida de 6,2 %, evidenciando o impacto do DM como um grave problema de saúde pública (PNS, 2013).

Entre as principais complicações do diabetes mellitus destacam-se neuropatia, retinopatia (que pode evoluir para cegueira), pé diabético, amputações, nefropatia e cardiopatia, todas associadas a múltiplos fatores metabólicos, incluindo hiperglicemia, hiperlipidemia, aumento do estresse oxidativo e elevação da glicação proteica (COSTA *et al.*, 2017; GIACCO e BROWNLEE, 2010). No contexto desses distúrbios, a glicação é definida como uma reação não enzimática, conhecida como reação de Maillard, que ocorre tanto em ambientes biológicos quanto em alimentos (BARBOSA *et al.*, 2016). Nessa reação, açúcares redutores (glicose e frutose, ribose) reagem com grupos nucleofílicos das biomoléculas, como aminoácidos constituintes de proteínas, lipídios ou ácidos nucleicos (ZHANG *et al.*, 2008).

A sequência de reações de glicação é complexa. Na fase inicial da reação de Maillard, formam-se bases de Schiff instáveis, como produto da condensação reversível entre a carbonila de um açúcar redutor e grupos amino de proteínas, ácidos nucleicos ou fosfolipídios (YEH *et al.*, 2017). Essas bases, ao se rearranjarem, dão origem a produtos de Amadori (cetoaminas) mais estáveis, como a hemoglobina glicosilada e a frutossamina, que se acumulam em dias e são quase irreversíveis *in vivo* (WAUTIER *et al.*, 1994; SINGH *et al.*, 2001). As bases de Schiff

também são propensas à oxidação, gerando radicais livres e intermediários carbonílicos reativos (BONNEFONT-ROUSSELOT, D., 2002).

A hiperglicemia e o estresse oxidativo agravam significativamente essa sequência de reações, levando à formação dos Produtos Finais de Glicação Avançada (AGEs, Advanced Glycation End-products) (NOWOTNY *et al.*, 2015). Os AGEs são derivados fluorescentes irreversíveis, um grupo heterogêneo de compostos formados a partir de interações aminocarbonilo de natureza não enzimática (YAMAGISHI *et al.*, 1998; VEIRALIAH, A., 2005). Eles são considerados um dos principais mecanismos responsáveis pela progressão da doença diabética e suas lesões vasculares (GOH e COOPER, 2008).

Rotas alternativas, como a via do estresse carbonílico, envolvem a oxidação de lipídeos ou açúcares, gerando compostos dicarbonílicos intermediários altamente reativos, como metilglioxal e glioxal (Figura 87, pág. 143) (SINGH *et al.*, 2001; TWARDA-CLAPA *et al.*, 2022). Esses compostos, muito mais reativos que a glicose, interagem rapidamente com aminoácidos para formar AGEs, sendo os principais intermediários na sua formação tanto *in vivo* quanto nos alimentos (KALAPOUS, 1999; URIBARR *et al.*, 2010). Na fase avançada da reação de Maillard, esses compostos dicarbonílicos formam isômeros com resíduos de arginina e lisina de proteínas, consolidando os AGEs, que são caracterizados por sua estabilidade térmica e são classificados em grupos, como os AGEs reticulantes fluorescentes (YEH *et al.*, 2017).

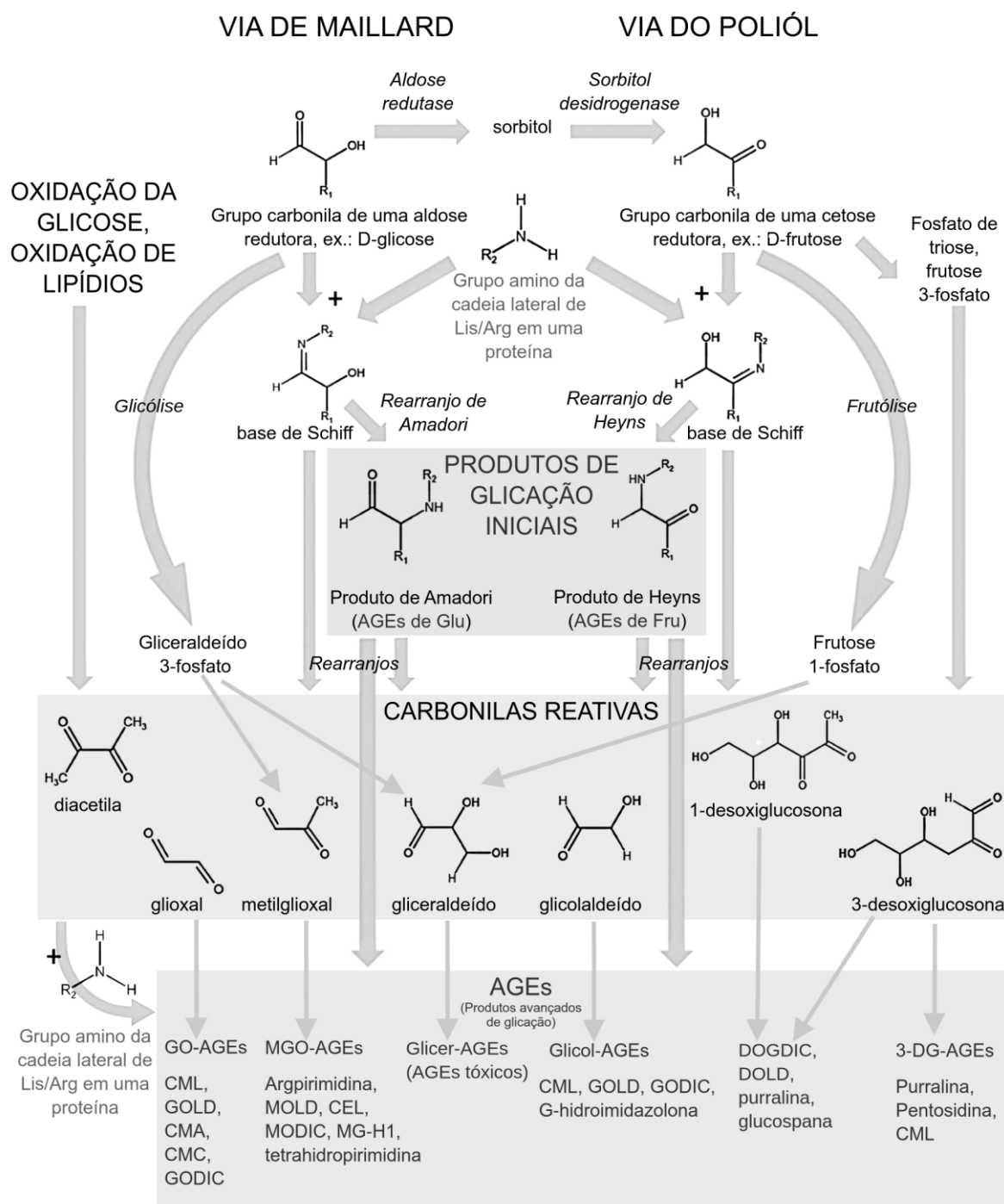


Figura 87 - Esquema de formação de AGEs. Abreviações: derivados de glicose (Glu-AGEs), derivados de frutose (Fru-AGE), derivados de glicoxal (GO-AGEs), derivados de metilglicoxal (MGO-AGEs), derivados de gliceraldeído (Glycer-AGEs), derivados de glicolaldeído (Glycol-AGEs) e derivados de 3-desoxiglucosona (3-DG-AGEs). Fonte: TWARDA-CLAPA *et al.*, 2022. (Adaptada).

Os AGEs danificam o organismo por três vias: 1) modificação de estruturas intracelulares (incluindo proteínas de transcrição gênica); 2) interação com proteínas da matriz extracelular, alterando a sinalização e gerando disfunção; e 3) modificação de proteínas ou

lipídios sanguíneos, por meio de ligações cruzadas, o que compromete propriedades químicas e morfofuncionais das biomoléculas (GOH e COOPER, 2008; LEWIS *et al.*, 2017). Uma vez glicosados, esses componentes circulantes ligam-se a receptores específicos, promovendo a produção de citocinas inflamatórias e fatores de crescimento que contribuem para a patologia vascular do diabetes (BIERHAUS *et al.*, 1998). A dieta é a principal fonte exógena de AGEs, que se somam aos AGEs endógenos, potencializando as complicações da doença (PEPPA *et al.*, 2003; LESLIE *et al.*, 2003). A formação de AGEs também desempenha papel relevante no envelhecimento, pois a ligação cruzada entre AGEs e proteínas de meia-vida longa, como o colágeno tipo I, aumenta a área da matriz extracelular e eleva a rigidez vascular (FORBES *et al.*, 2005).

Nesta conjuntura, a investigação de substâncias com atividade antiglicante surge como estratégia promissora para retardar o envelhecimento e prevenir o desenvolvimento de doenças crônicas associadas ao acúmulo de AGEs. A inibição da formação desses produtos baseia-se principalmente na ação antioxidante, capaz de neutralizar radicais livres e intermediários carbonílicos e dicarbonílicos gerados nas fases iniciais da reação de Maillard, bem como na atuação de compostos que bloqueiam a condensação de açúcares redutores com grupos amino. Ao atuar em diferentes etapas da via de glicação, esses agentes podem reduzir tanto a síntese quanto os efeitos deletérios dos AGEs, oferecendo uma abordagem terapêutica com potencial de melhorar a saúde vascular e prolongar a longevidade humana.

Diante da realidade apresentada, a química de produtos naturais mostra-se essencial ao esclarecer, por meio de investigações fitoquímicas, as correlações químico-biológicas de plantas populares e estimula pesquisas voltadas ao aprimoramento da detecção, prevenção e tratamento das complicações patológicas do diabetes mellitus. Embora existam diversos agentes farmacológicos, as plantas medicinais são amplamente empregadas como terapia complementar, sobretudo para amenizar os efeitos prejudiciais dos AGEs (OTA e ULRIH, 2017). Espécies como graviola (*Annona muricata*), chá-verde (*Camellia sinensis*), jambolão (*Syzygium cumini*), pata-de-vaca (*Bauhinia forficata*) e gengibre (*Zingiber officinale*) destacam-se por fornecer extratos ricos em compostos capazes de inibir a glicação proteica e reduzir o estresse oxidativo, comprovando a ação biológica destes fitoterápicos e fomentando a necessidade urgente de suas padronizações (FLORENCE *et al.*, 2014; TANG *et al.*, 2013; TROJAN-RODRIGUES *et al.*, 2012; BOLSON *et al.*, 2015; DAILY *et al.*, 2015). Sabe-se que plantas que unem propriedades antiglicantes e antioxidantes podem exercer ação sinérgica na inibição da glicação, fornecendo compostos que neutralizam o estresse oxidativo e impedem a

modificação protéica, bem como inibem enzimas digestivas, fatores que em conjunto podem contribuir para a redução da hiperglicemia e da hiperlipidemia pós-prandial (AHMAD e AHMED 2006; MARINHO *et al.*, 2016; TORRES *et al.*, 2018).

Em modelos animais, a restrição de AGEs na dieta e o uso de extratos vegetais melhoram a sensibilidade à insulina, elevaram os níveis de HDL-colesterol e favorecem a cicatrização de feridas, além de prevenirem aterosclerose e restenose pós-angioplastia (HOFMANN *et al.*, 2002; LIN *et al.*, 2002; PEPPA *et al.*, 2003). Estudos clínicos também relataram benefícios em pacientes diabéticos submetidos a preparações vegetais com atividade antiglicante e antioxidante e confirmaram que taninos do chá-verde são potentes inibidores da formação de AGEs (AHMAD e AHMED, 2006; NAKAGAWA *et al.*, 2002).

No estudo de Nakagawa *et al.* (2002), o tanino isolado demonstrou maior eficiência na inibição da formação de AGEs do que o extrato bruto. Muitos extratos vegetais, de plantas, frutas e verduras, com atividade antidiabética contêm bioativos que atuam nesse processo. A análise fitoquímica desses extratos revelou terpenoides como lupeol e ácido ursólico, flavonoides como quercetina e polifenóis como ácido gálico, além de vitaminas, todos capazes de modular a glicemia e prevenir a formação de AGEs (MARINHO *et al.*, 2016; TORRES *et al.*, 2018). Ainda não se compreende completamente o mecanismo de inibição exercido pelos triterpenos, mas sabe-se que o ácido ursólico, o ácido oleanólico e o lupeol reagem preferencialmente com açúcares, bloqueando a reação de glicação, sendo os ácidos carboxílicos os mais ativos.

Considerando a contextualização abordada, este trabalho integra o estudo fitoquímico e biológico de extratos brutos metanólicos de folhas e entrecasas de *Crataeva tapia*, com foco na inibição da glicação proteica e no potencial antioxidante. No extrato da entrecasca, busca-se quantificar a redução de AGEs fluorescentes, oxidação de tirosina e triptofano, carbonilação proteica e ligações cruzadas em um modelo *in vitro* de glicação. Já no extrato das folhas, avalia-se a inibição das modificações proteicas induzidas por metilglioxal, sendo realizados os mesmos testes, exceto a análise de carbonilação proteica e de ligações cruzadas. Ao aprofundar o estudo fitoquímico dessas matrizes, pretende-se oferecer novas perspectivas terapêuticas para as complicações do diabetes, ampliando o conhecimento sobre metabólitos antiglicantes e antioxidantes capazes de contribuir para a saúde e o bem-estar metabólico.

3.2. MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1. Reagentes e equipamentos

O material vegetal foi moído em moinho de facas da marca Marconi, modelo MA 580/E. Para a separação das substâncias foram utilizadas colunas em vidro de vários tamanhos e diâmetros, empacotadas com gel de sílica 60 (70-230 mesh), das marcas Macherey-Nagel e Carvalhaes, eluídas a pressão atmosférica.

Nas análises comparativas das frações por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) foram utilizadas cromatoplas de alumínio 20x20 cm revestidas com sílica gel 60 F254 da Merck e Silicycle. As placas foram padronizadas em tamanho 5x7cm, com plotagem das amostras a 0,5cm da base. Os solventes utilizados para extração, fracionamento, purificação e eluições em CCDA, foram de grau P.A das marcas Vetec, ACMA labs, Anidrol e Neon.

As revelações das substâncias foram efetuadas mediante radiação UV no comprimento de onda 254 e 365 nm, bem como vanilina sulfúrica e anisaldeído sulfúrico.

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e de ^{13}C , foram obtidos em espectrômetros Bruker DRX-500 (500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C), utilizando o tetrametilsilano (TMS) como padrão interno. Os solventes deuterados utilizados foram clorofórmio (CDCl_3) e piridina- d_5 das marcas Cambridge Isotope Laboratories (CIL), Deutero e Merck. Os deslocamentos químicos (δ) são indicados em parte por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz). Equipamento pertencente à CAM/UFRRJ.

Nos testes biológicos, diferentes equipamentos foram utilizados de acordo com cada metodologia aplicada. O leitor de placas BioTek® Synergy H1 foi empregado nas análises de solubilidade dos extratos, bem como na quantificação da formação de produtos de glicação avançada (AGEs) fluorescentes e na detecção de marcadores de oxidação de resíduos de tirosina e triptofano. Para a determinação dos níveis de proteínas carboniladas, foi utilizado o espectrofotômetro Jasco® V-630, por meio de leituras de absorbância. Já a avaliação da formação de ligações cruzadas entre proteínas foi realizada por eletroforese em gel SDS-PAGE a 12%, permitindo a separação das proteínas sob condições desnaturantes, seguida de coloração com Coomassie blue e posterior análise densitométrica por meio de imagens processadas no software ImageJ®. Os dados obtidos a partir desses ensaios foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) e submetidos à análise estatística no software GraphPad Prism 9

(Versão 9.0.0, GraphPad Software, Inc, EUA). As discrepâncias entre os grupos foram avaliadas por análise de variância One-Way (ANOVA), seguida do teste de comparação de Newman-Keuls utilizado para avaliar as diferenças entre os grupos. O critério de significância estabelecido foi de $p < 0,05$, indicando diferenças estatisticamente significantes entre os blocos comparados.

3.2.2. **Material vegetal**

As folhas (3,00 Kg) e as cascas do caule (2,9 Kg) de *C. tapia* foram coletadas no bairro São Gonçalo Beira Rio, Cuiabá (MT); as amostras testemunho foram depositadas no herbário da UFMT (nº 44515) e no herbário CGMS-UFMS (nº 80838), e registradas no SisGen (código A8B1B1E). A área de coleta situa-se em zona urbana, à margem do rio Cuiabá (Coord. Geog.: 15°38'55.080"S 56°4'7.716" W) frequentemente visitada por pescadores.

As entrecascas foram coletadas em 08 de julho de 2021, durante a estação seca, de uma árvore de aproximadamente 7 m de altura, sem flores ou frutos e com pouca folhagem, em solo ressecado. Já as folhas foram obtidas em 19 de janeiro de 2022, no período chuvoso, quando as águas do rio transbordavam e atingiam as raízes da planta. A árvore apresentava folhagem verde vívida e frutos para confirmação taxonômica: baga globosas, verdes, de 6-8 cm de diâmetro, que atraíam pássaros. Alguns frutos maduros, caídos ao solo, exibiam coloração levemente amarelada, textura macia e polpa branca envolvendo as sementes, além de pequenas manchas escuras nas cascas.

3.2.3. **Preparo dos extratos bruto metanólico de folhas (EBMF) e entrecascas (EBME) de *C. tapia***

As partes aéreas e as entrecascas da planta foram secas, pulverizadas e extraídas a frio com metanol (9 L para as folhas e 7 L para as entrecascas) em cinco ciclos de cinco dias cada. Os extratos obtidos foram filtrados e concentrados em evaporador rotatório a 40 °C sob pressão reduzida até exaustão do material, resultando em 370 g de extrato bruto de folhas (EBMF) e 261 g de extrato bruto de entrecascas (EBME). Em seguida, 300 g de EBMF foram suspensos

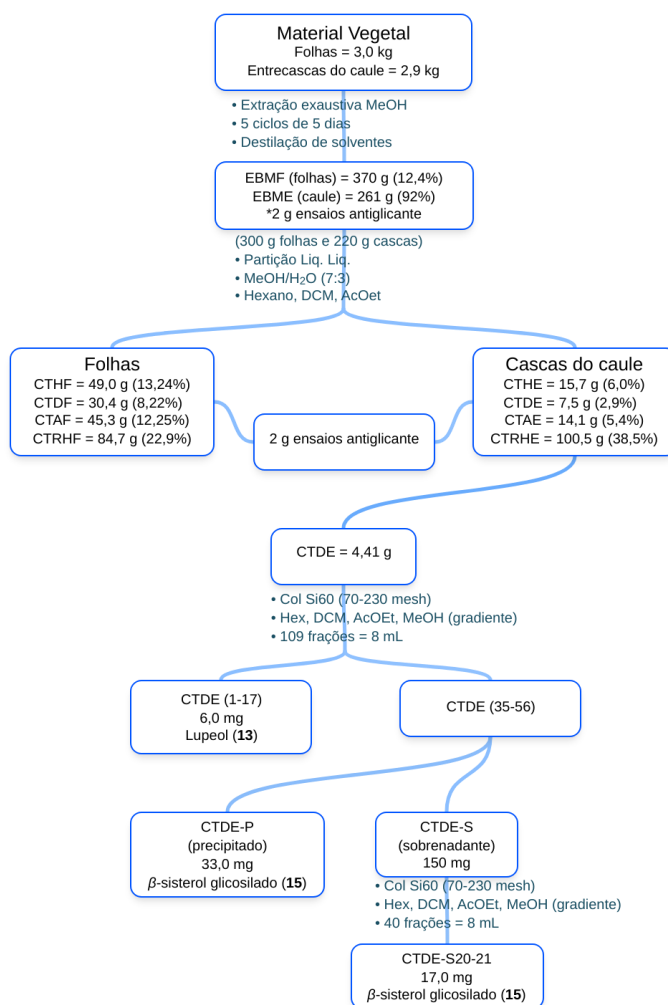
em 600mL de mistura metanol/água (7:3) e submetidos à partição líquido-líquido com hexano, diclorometano e acetato de etila, cada solvente em três porções de 700 mL), o que gerou as subfrações das folhas: hexânica (CTHF, 49 g), diclorometano (CTDF, 30,4 g), acetato de etila (CTAF, 45,32 g) e resíduo hidrometanólico (CTRHF, 84,7 g). Utilizou-se o mesmo procedimento para 220 g de EBME, suspensos em 500 mL de metanol/água (7:3), obtendo-se as subfrações hexânica (CTHE, 15,7 g), diclorometano (CTDE, 7,5 g), acetato de etila (CTAE, 14,1 g) e o resíduo hidrometanólico (CTRHE, 100,5 g). Aproximadamente 2 g de cada extratos e subfração, foram reservados para avaliação da atividade antiglicante. O **Erro! Fonte de referência não encontrada.** (pag. 152) ilustra todas as etapas de preparação do extrato bruto e de suas subfrações.

3.2.4. **Estudo fitoquímico das subfrações hexânica (CTHF) e diclorometano das folhas (CTDF) e entrecascas (CTDE)**

Iniciou-se o fracionamento de CTHF e CTDF, frações apolares das folhas, por cromatografia em coluna utilizando sílica gel 60 (mesh), eluída em gradiente de polaridade com hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol. Contudo, as frações apresentaram elevado teor de clorofila, além de perfil cromatográfico muito complexo em camada delgada analítica (CCDA) e massa insuficiente para o isolamento de constituintes. Em razão disso, o estudo fitoquímico dessas frações foi interrompido, prosseguindo-se apenas com a investigação da atividade biológica proposta, bem como com análise fitoquímica da fração das entrecascas.

A investigação fitoquímica de CTDE teve início com o fracionamento de 4,41 g em coluna cromatográfica clássica (CC) usando sílica gel 60 (mesh) e o mesmo gradiente de solventes (hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol) ver esquema 8. Foram coletadas 109 frações de 8 mL, analisadas por CCDA. As frações 1-17 (CTDE, 6,0 mg) forneceram o composto **13** (pág. 40), um precipitado branco amorfo solúvel em clorofórmio, anteriormente isolado em *Galianthe matogrossiana*. Nas frações 35-56, observou-se um precipitado branco amorfo solúvel em piridina, separado do sobrenadante e isolado como composto **15** (CTDE-P, 33,0 mg, descrito no Capítulo I, pág. 5). O sobrenadante (CTDE-S, 150,0 mg) foi purificado com o mesmo sistema de fase móvel, gerando 40 frações de aproximadamente 8 mL; nas frações 20-21 (CTDE-S20-21), repete-se o isolamento do composto **15** (17,0 mg), já descrito

em *G. matogrossiana* (Capítulo I). Até a defesa desta tese, não haviam sido concluídos os fracionamentos cromatográficos dessa fração, nem a exploração das demais frações polares de ambas as partes da planta.



Esquema 8 - Preparo de extratos brutos de *Cratogeomys matogrossiana* (Folhas e Cascas do Caule) e Fracionamento do CTDE.

3.2.5. Metodologia de avaliação da atividade antiglicante das folhas e entrecascas

Sob a supervisão da Prof. Dr^a Amanda Martins Baviera (UNESP, Araraquara-SP), os bolsistas de iniciação Amanda Brandão da Silva e Sergio Massambani Rodrigues realizaram os ensaios *in vitro* de antiglicação dos extratos brutos metanólicos das folhas (EBMF) e das entrecascas (EBME) de *Cratogeomys matogrossiana*. Demais frações não foram testadas, uma vez que a

triagem inicial, como teste de solubilidade não foram promissores para prosseguir com os ensaios.

As etapas incluíram o preparo e teste de solubilidade dos extratos; a incubação de BSA com metilglioxal na presença ou ausência de aminoguanidina e dos extratos testados; a quantificação de AGEs fluorescentes; a determinação de marcadores de oxidação de resíduos de tirosina e triptofano; e especificamente para o extrato da entrecasca, a avaliação de proteínas carboniladas e a análise de *cross-linking* proteico, todas realizadas conforme protocolos previamente estabelecidos.

3.2.6. **Teste de solubilidade dos extratos**

Preparou-se uma solução-estoque de cada extrato em DMSO a 300 µg/mL, seguida de diluições para 300; 250; 200; 150; 125; 100; 75; 62,5 e 50 µg/mL. Para cada concentração, ajustou-se o volume a 300 µL, agitou-se manualmente por 30 s e repousou-se 5 min. As soluções foram lidas em espectrofotômetro de placas (BioTek® Synergy H1), com varredura de 300-500 nm em intervalos de 10 nm, para verificar a clareza das soluções e identificar possível interferência espectral.

3.2.7. **Determinação da capacidade de inibição da glicação proteica *in vitro* dos extratos**

O ensaio de inibição da glicação proteica *in vitro* seguiu MOTTA et al. (2020) e empregou um sistema-modelo que simula, em condições de hiperglicemia, a modificação da albumina sérica bovina (BSA, 10 mg.mL⁻¹) pelo metilglioxal (MG, 2 mM). Para cada ensaio, montaram-se reações em tubos criogênicos de 1,8 mL contendo BSA e MG dissolvidos em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4) com 0,02% de azida sódica, incubadas a 37 °C (estufa incubadora de CO₂, P Selecta®) por 8 dias, na presença ou ausência de aminoguanidina (AG, 1 mM; controle anti-AGE) e dos extratos de *C. tapia* (EBMF, EBME) em 62,5, 125 e 250 µg/mL. Em 0, 1, 2, 4 e 8 dias, retiraram-se alíquotas para quantificação de AGEs

fluorescentes e de produtos de oxidação de resíduos de triptofano e tirosina. Como branco, substituiu-se o MG por tampão fosfato e o extrato por DMSO.

Após 8 dias de incubação, as alíquotas do EBME foram usadas para quantificar proteínas carboniladas e a formação de ligações cruzadas (MOTTA *et al.*, 2020; DOS SANTOS *et al.*, 2020).

3.2.8. **Determinação de AGEs fluorescentes e marcadores de oxidação de resíduos de aminoácidos dos extratos**

A intensidade de fluorescência de AGEs, foi mensurada utilizando-se um espectrofluorímetro de placas com excitação a 355nm e emissão a 430nm ((BioTek® Synergy H1) (SÉRO *et al.*, 2013). A capacidade anti-AGE dos testados de *C. tapia* (EBMF e EBME) foi avaliado comparando a fluorescência média dos AGEs gerados na incubação de BSA + extratos com a fluorescência média dos AGEs gerados na incubação de BSA + MG + extratos, em todas as concentrações testadas (62,5; 125 e 250 µg/mL). Os valores de AGEs foram obtidos através da diferença da fluorescência dos AGEs das soluções de AG ou extraídos incubadas em tampão, e a fluorescência dos AGEs das soluções de AG ou extratos incubadas com BSA + MG. Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias de fluorescência (MEEPROM *et al.*, 2013; MOTTA *et al.*, 2020; DOS SANTOS *et al.*, 2020). Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias de fluorescência e apresentados graficamente em função da concentração do extrato, permitindo calcular a percentagem de inibição da formação de AGEs em comparação ao controle sem inibidor (AG).

Tal como os AGE fluorescentes, os produtos da oxidação de resíduos de aminoácidos foram monitorados espectrofluorimetricamente, em seus respectivos comprimentos de onda de excitação/emissão: ditirosina (330/415 nm) como marcador de oxidação dos resíduos de tirosina; N'-formilquinurenina (325/434 nm) e quinurenina (365/480 nm), como marcadores da oxidação dos resíduos de triptofano (SADOWSKA-BARTOSZ *et al.*, 2014). Para tanto, os valores de ditirosina, N'-formilquinurenina e quinurenina foram obtidos através da subtração aritmética da fluorescência dessas substâncias das soluções de AG ou extraídos incubadas em tampão menos a fluorescência das substâncias das soluções de AG ou extratos incubados com

BSA + MG. Os resultados foram apresentados em unidades arbitrárias de fluorescência (FRANCO, 2018).

3.2.9. Quantificação de proteínas carboniladas do EBME

Proteínas carboniladas são amplamente utilizadas como biomarcadores de dano oxidativo, pois o estresse carbonílico decorrente do acúmulo de precursores reativos de AGE, produtos de glicoxidação e de lipoxidação intensifica a modificação química de proteínas em diabetes e em outras doenças associadas (BAYNES e THORPE, 1999).

Os níveis de grupos carbonila foram determinados mediante a reação com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) formando 100 μL de cada amostra de incubação foram divididos em dois microtubos: amostra (A) e controle (C). No tubo A, adicionou-se 400 μL de DNPH (10 mM em HCl 2,5 M), para reagir com os grupos carbonila; no tubo C, 400 μL de HCl 2,5 M. Ambos foram incubados por 1 hora, na ausência de luz, seguido de adição de 500 μL de ácido tricloroacético (TCA, 10%) para precipitar as proteínas. Após homogeneização, os microtubos permaneceram 5 minutos no gelo e foram centrifugados a 10000 x g por 10 minutos a 4°C.

Os líquidos sobrenadantes foram descartados, e os pellets foram lavados duas vezes com 1 mL de uma solução de acetato de etila: etanol (1:1), com agitação seguida de centrifugação a 10 000 $\times g$ por 5 min a 4 °C. Os sólidos foram ressuspensos em 1 mL de ureia (6 M). A absorbância dos sobrenadantes foi medida em espectrofotômetro (Jasco, modelo V630). Finalmente, a diferença de absorbância entre as amostras (A) e (C), permitiu calcular a concentração de grupos carbonila, usando o coeficiente de extinção molar do DNPH ($\epsilon = 22.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (MEEPROM *et al.*, 2013).

3.2.10. Inibição do *Cross-Linking* Proteico pelo extrato da entrecasca de *Crateva tapia*

A formação de ligações cruzadas entre moléculas de albumina catalisada pelo metilglioxal reflete a fase tardia e irreversível da glicação proteica, na qual produtos reativos e

espécies de oxigênio promovem ligações covalentes que estabilizam agregados protéicos (gerando modificações na sua estrutura tridimensional), contribuindo para o estresse glicooxidativo e as complicações vasculares do diabetes (ZIEMAN e KASS, 2004; NOWOTNY, 2015). Ao quantificar a redução na intensidade das bandas de alto peso molecular em SDS-PAGE (Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio), avalia-se diretamente a capacidade do EBME de *C. tapia* de inibir tanto a formação de AGEs quanto a consequente polimerização proteica. Quanto maior a diminuição dessas bandas em relação ao controle (BSA + MG), maior o potencial antiglicante do extrato, evidenciando sua eficiência em bloquear as reações químicas responsáveis pelo dano tecidual em condições de hiperglicemia.

Para realizar o ensaio, alíquotas de 3 µL das incubações de BSA + metilglioxal, com ou sem o extrato da planta, foram adicionadas a 9 µL de tampão desnaturante (62,5 mM de Tris-HCl (cloridrato de tris[hidroximetil]aminometano, pH 6,8), 10% de glicerol, 2% de SDS (dodecil sulfato de sódio), 100 mM de ditiotreitol e 0,1% de azul de bromofenol), garantindo desnaturação completa da proteína. Desse total, 1,5 µL (3,75 µg de proteína) foi carregado em gel de poliacrilamida a 12% para eletroforese SDS-PAGE, conduzida a 120 V por 1 h 30 min em tampão de corrida composto por 25 mM de Tris (pH 8,3), 192 mM de glicerol e 0,1% de SDS.

Após a separação, os géis foram corados com Coomassie blue (10% metanol, 10% ácido acético glacial) por 30 min e submetidos a três lavagens em solução descorante (10% metanol, 10% ácido acético) durante 15, 10 e 5 min, seguidas de 48 h em *overnight* para intensificar o contraste das bandas (FRANCO, 2018). A análise densitométrica, realizada no software ImageJ®, converteu cada banda de alto peso molecular em picos e calculou suas áreas. A comparação dessas áreas com o controle (BSA + MG sem extrato) permitiu determinar a porcentagem de inibição do *cross-linking* proteico pelo extrato de entrecasca de *C. tapia*.

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1. Atividade antiglicação *in vitro* de extratos das folhas (EBMF) de *C. tapia*

3.3.1.1. Teste de solubilidade de EBMF

Os extratos apresentaram boa solubilidade em DMSO, evidenciada por valores consistentes de absorbância ao longo das leituras, o que indica dispersão adequada dos extratos nas soluções analisadas, condição essencial para execução dos testes *in vitro*. Entretanto, em algumas concentrações, os valores de absorbâncias ultrapassaram o limite linear estabelecido pela Lei de Lambert-Beer, conforme demonstrado no Gráfico 11 (pág. 154). As absorbâncias mais elevadas foram observadas entre 300 e 340 nm, especialmente nas concentrações de 300, 250 e 200 µg/mL, com valores que ultrapassam 1,0, chegando a quase 2,0 na concentração máxima. Esse comportamento indica que acima de determinado ponto, a relação entre concentração e absorbância deixa de ser proporcional, comprometendo a linearidade da resposta óptica. Tal condição pode gerar distorções em ensaios espectrofotométricos e espectrofluorimétricos, interferindo na precisão das medições e na confiabilidade dos dados obtidos.

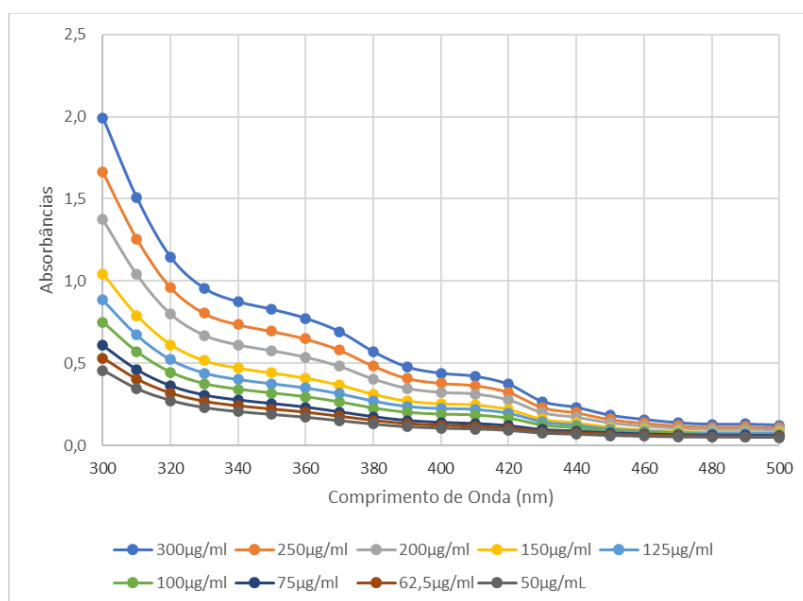


Gráfico 11 - Espectro de absorbância do extrato metanólico de folhas de *C. tapia* em concentrações de 50 a 300 µg/mL. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro de placas BioTek®, contemplando comprimentos de onda de 300 a 500 nm com intervalos de 10 nm. Fonte: Brandão da Silva, 2023.

A queda acentuada nas curvas após 340–360 nm sugere menor interferência óptica em comprimentos de onda acima de 400 nm. Uma possível explicação para os altos níveis de absorbância é a presença de alcaloides nas folhas da planta, cuja estrutura química complexa permite ampla absorção de luz, especialmente nas faixas próximas aos 260–400 nm (PATIL *et al.*, 2010; VIOLANTE *et al.*, 2009). Essa região coincide com os comprimentos de onda utilizados na detecção de produtos da glicação e de marcadores oxidativos, com AGEs fluorescentes e ditirosina, o que pode gerar sobreposição espectral e mascarar os resultados dos testes.

Embora a literatura recomende, em alguns casos, o uso de 420 nm como alternativa para reduzir tais interferências, essa faixa se sobrepõe a regiões críticas de emissão de diversos marcadores utilizados neste estudo, impossibilitando prosseguir com essa recomendação (GRAEL *et al.*, 2015). Por outro lado, as concentrações de 62,5, 125 e 250 µg/mL selecionadas para os ensaios biológicos demonstram perfis intermediários: apresentam boa solubilidade e valores de absorbância aceitáveis, abaixo do limite crítico para obtenção de fluorescência confiável, garantindo maior robustez nos experimentos subsequentes.

3.3.1.2. Determinação da formação de AGEs fluorescentes

Neste ensaio, utilizou-se a aminoguanidina como composto protótipo de atividade antiglicação em um sistema-modelo de glicação proteica *in vitro*. A albumina sérica bovina (BSA) foi incubada com ou sem metilglioxal (MG) por oito dias, e a formação de AGEs fluorescentes foi monitorada em espectrofluorímetro de placas (excitação/emissão 355/430 nm). Os resultados estão representados nas figuras 88 e 89.

Na ausência de MG, as amostras contendo apenas BSA + EBMF (extrato folhas de *C. tapia*) exibiram fluorescências quase nulas, semelhante ao controle de BSA puro (Figura 88, pág 156). Esse perfil confirma que o extrato não induz reação com BSA para gerar AGEs ou intermediários glicativos (como produtos de Amadori, ou outros compostos dicarboxílicos), e, portanto, não promove modificações glico-oxidativas em proteínas na ausência de MG. Dessa forma, a formação de AGEs depende exclusivamente da adição de metilglioxal.

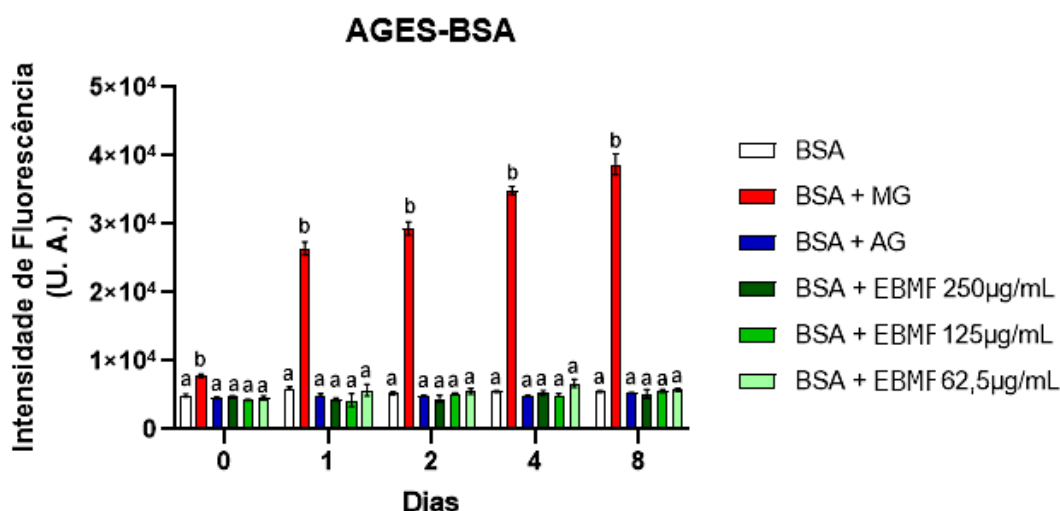


Figura 88 - Níveis de AGEs fluorescentes em incubações contendo BSA (na ausência de metilglioxal) e extrato metanólico de folhas de *C. tapia* (EBMF). A fluorescência dos AGEs foi determinada nos dias 0, 1, 2, 4 e 8 de incubação. Os grupos experimentais incluem: grupo controle positivo (BSA + MG), grupos controles negativos (BSA e BSA + AG) e os grupos com diferentes concentrações de EBMF (62,5, 125 e 250 µg/mL). Os resultados são expressos como média ± desvio padrão de experimentos independentes realizados em triplicata (n = 3). A análise estatística foi realizada por ANOVA one-way, seguida pelo teste de Newman-Keuls ($p < 0,05$). Barras compartilhando a mesma letra não diferem significativamente entre si. Fonte: Brandão da Silva, 2023.

Quando MG foi adicionado (Figura 89, pág.157), o controle BSA + MG apresentou rápido aumento da fluorescência de AGEs em comparação com a BSA isolada, enquanto o tratamento com aminoguanidina manteve os níveis de fluorescência próximo ao mínimo, validando seu efeito antiglicante. A inclusão de EBMF reduziu imediatamente a formação de AGEs já no primeiro dia. As reduções foram de 28,6 % de inibição com 62,5 µg/mL, 9,4 % com 125 µg/mL e 5,0 % com 250 µg/mL, em relação ao controle BSA + MG. Essa proteção decaiu levemente ao longo do tempo (27,5% no segundo dia, 22,7% no quarto e para 18,5% no oitavo), mas manteve atividade antiglicação significativa, sobretudo na fase inicial. A concentração de 250 µg/mL de EBMF apresentou maior proteção entre as doses testadas, embora inferior à da aminoguanidina, mas não tão significativa quando comparada ao grupo BSA + MG + AG, que apresentou uma diferença de 72,2%.

Em resumo, os dados sugerem que EBMF não induz a formação de AGEs na ausência de MG, mas exerce inibição parcial da glicação quando MG está presente. Esse perfil reforça o potencial do extrato metanólico das folhas como inibidor complementar das etapas iniciais da glicação proteica, sugerindo sua aplicação como estratégia promissora para controlar a geração de AGEs em condições de hiperglicemia.

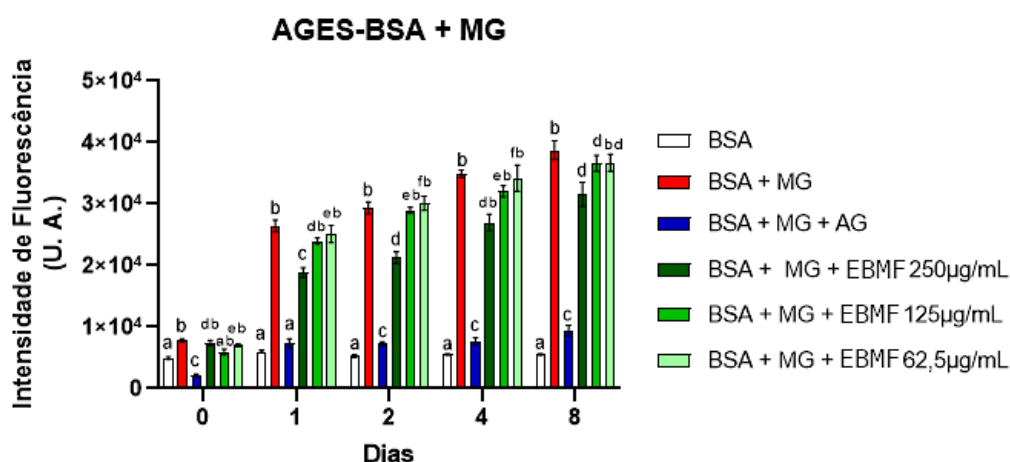


Figura 89 - Níveis de AGEs fluorescentes em incubações contendo BSA + metilglioxal (MG) e extrato metanólico de folhas de *C. tapia* (EBMF). A fluorescência dos AGEs foi determinada nos dias 0, 1, 2, 4 e 8 de incubação. Os grupos experimentais incluem: grupos controles positivos (BSA + MG e BSA + MG + AG), grupo controle negativo (BSA), e os grupos com diferentes concentrações de EBMF (62,5, 125 e 250 µg/mL). Os resultados são expressos como média ± desvio padrão de experimentos independentes realizados em triplicata (n = 3). A análise estatística foi realizada por ANOVA one-way, seguida pelo teste de Newman-Keuls ($p < 0,05$). Barras compartilhando a mesma letra não diferem significativamente entre si. Fonte: Brandão da Silva, 2023.

3.3.1.3. Determinação da formação de marcadores de oxidação de resíduos de aminoácidos de EBMF

Em pacientes diabéticos, o aumento da glicemia favorece a geração de espécies reativas de carbonila, o que acelera a oxidação de resíduos de aminoácidos em proteínas. Dentre esses marcadores oxidativos, destacam-se a N'-formilquinurenina e a quinurenina (produtos da oxidação do triptofano) e a ditirosina (derivado da tirosina), associados à disfunção proteica e à gênese de complicações crônicas (SADOWSKA-BARTOSZ *et al.*, 2014). Considerando esse quadro, avaliou-se a capacidade do EBMF em modular a formação dos marcadores oxidativos em sistema modelo de albumina bovina incubada com metilglioxal (MG). Nesse ensaio, a formação de N'-formilquinurenina foi quantificada por fluorescência ao longo de oito dias de incubação da BSA na presença de metilglioxal (MG), como apresentado na Figura 90, pág. 158. O tratamento com MG promoveu um aumento progressivo da fluorescência, refletindo a intensificação da oxidação de resíduos de triptofano. A inclusão da aminoguanidina (AG), utilizada como controle positivo, resultou na inibição significativa da formação de N'-formilquinurenina em todos os tempos avaliados, confirmando sua eficácia como agente antioxidante e antiglicante nesse modelo. Em contraste, as incubações contendo BSA, MG e EBMF revelaram um padrão distinto. A partir do segundo dia, todos os grupos tratados com

EBMF apresentaram aumento de fluorescência em relação ao grupo BSA + MG (de até 14,6%), indicando intensificação do dano oxidativo. Esse efeito foi mais intenso na concentração de 125 µg/mL, que alcançou os maiores níveis de fluorescência entre todos os avaliados, inclusive superiores aos do grupo BSA + MG, alcançando 39,0% (maior agressão) no oitavo dia de incubação. As concentrações de 62,5 µg/mL e 250 µg/mL demonstraram respectivamente, menor e intermediária “agressividade” na formação de N’-formilquinurenina, sendo que 250 µg/mL se aproximou mais do perfil observado em BSA + MG. Esses dados podem indicar a presença de compostos com possível ação pró-oxidante ou ainda a incapacidade dessa matriz fitoquímica, nessa concentração específica, de neutralizar as espécies reativas geradas pelo MG.

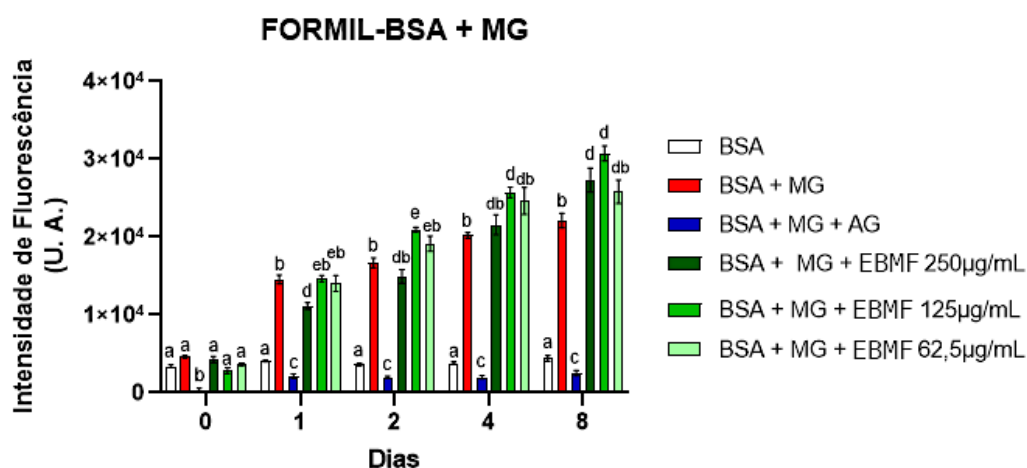


Figura 90 - Níveis de N’-formilquinurenina em incubações contendo BSA + metilglioxal (MG) e extrato metanólico de folhas de *C. tapia* (EBMF). A fluorescência de N’-formilquinurenina foi determinada nos dias 0, 1, 2, 4 e 8 de incubação. Os grupos experimentais incluem: grupos controles positivos (BSA + MG e BSA + MG + AG), grupo controle negativo (BSA), e os grupos com diferentes concentrações de EBMF (62,5, 125 e 250 µg/mL). Os resultados são expressos como média ± desvio padrão de experimentos independentes realizados em triplicata (n = 3). A análise estatística foi realizada por ANOVA one-way, seguida pelo teste de Newman-Keuls (p < 0,05). Barras compartilhando a mesma letra não diferem significativamente entre si. Fonte: Brandão da Silva, 2023.

O experimento evidenciou diferenças significativas na formação de N’-formilquinurenina (Figura 90) e de quinurenina (Figura 91, pág. 158) em diferentes condições experimentais. Notadamente, os dados da figura 91 mostram que, após oito dias de incubação no grupo BSA + MG, observou-se um aumento gradual e significativo na intensidade de fluorescência de formação de quinurenina a partir do segundo dia, atingindo valores máximos ao final do experimento, o que reflete a oxidação progressiva do resíduo de triptofano. Nas amostras tratadas com EBMF (62,5; 125 e 250 µg/mL), a formação de quinurenina permaneceu comparável ao grupo BSA + MG, mas com redução do dano oxidativo proporcional à

concentração do extrato. Especificamente, a dose mais alta (250 µg/mL) de EBMF diminuiu a fluorescência em 17,3 % no quarto dia e em 19,8 % no oitavo dia, indicando capacidade de atenuar progressivamente a geração de quinurenina ao longo do tempo no sistema BSA + MG. A concentração intermediária (125 µg/mL) também reduziu significativamente a fluorescência a partir do quarto dia, embora em magnitude inferior à de 250 µg/mL, enquanto 62,5 µg/mL apresentou apenas leve redução nos dias iniciais, sem atingir os níveis do controle de BSA puro.

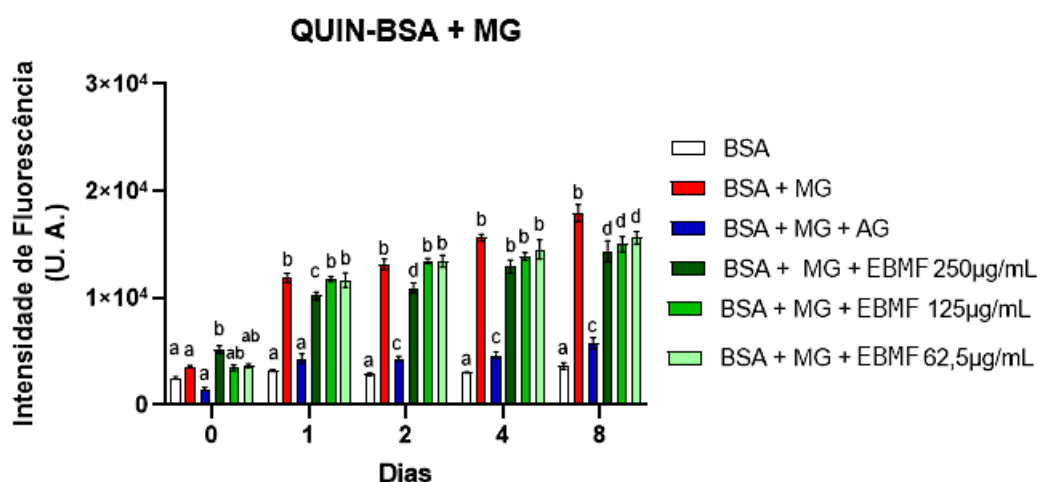


Figura 91 - Níveis de quinurenina em incubações contendo BSA + metilglioxal (MG) e extrato metanólico de folhas de *C. tapia* (EBMF). A fluorescência de quinurenina foi determinada nos dias 0, 1, 2, 4 e 8 de incubação. Os grupos experimentais incluem: grupos controles positivos (BSA + MG e BSA + MG + AG), grupo controle negativo (BSA), e os grupos com diferentes concentrações de EBMF (62,5, 125 e 250 µg/mL). Os resultados são expressos como média ± desvio padrão de experimentos independentes realizados em triplicata (n = 3). A análise estatística foi realizada por ANOVA one-way, seguida pelo teste de Newman-Keuls ($p < 0,05$). Barras compartilhando a mesma letra não diferem significativamente entre si. Fonte: Brandão da Silva, 2023.

No experimento cujos dados estão representados na Figura 92 (pág. 160), avaliou-se a formação de ditirosina ao longo de oito dias de incubação de BSA com metilglioxal (MG). Esse marcador oxidativo é gerado a partir de uma ligação cruzada covalente entre dois resíduos de tirosina por acoplamento orto-orto (MAINA *et al.*, 2023). No grupo BSA + MG, observou-se aumento contínuo e acentuado da fluorescência a partir do segundo dia, atingindo os maiores valores no oitavo dia, o que indica intensa dimerização de tirosina. A aminoguanidina, empregada como controle positivo, suprimiu quase completamente a formação de ditirosina em todos os tempos testados, confirmando sua potente atividade antiglicante e antioxidante.

Nas incubações com BSA + MG + EBMF, observou-se aumento da agressão em comparação ao grupo BSA + MG, que se intensificou com o avanço do tempo, apresentando perfil similar ao observado para o marcador N'-formilquinurenina. Na concentração de 250 µg/mL, a elevação da fluorescência foi de 5,6 % imediatamente no segundo dia e manteve-se significativa até o final do experimento. Em 125 µg/mL, o extrato promoveu o maior aumento relativo, com 71,9 % de incremento da fluorescência no oitavo dia, indicando que essa dose maximiza a formação de ditirosina. A menor concentração (62,5 µg/mL) exibiu padrão intermediário de aumento da fluorescência, inferior ao observado em 125 µg/mL.

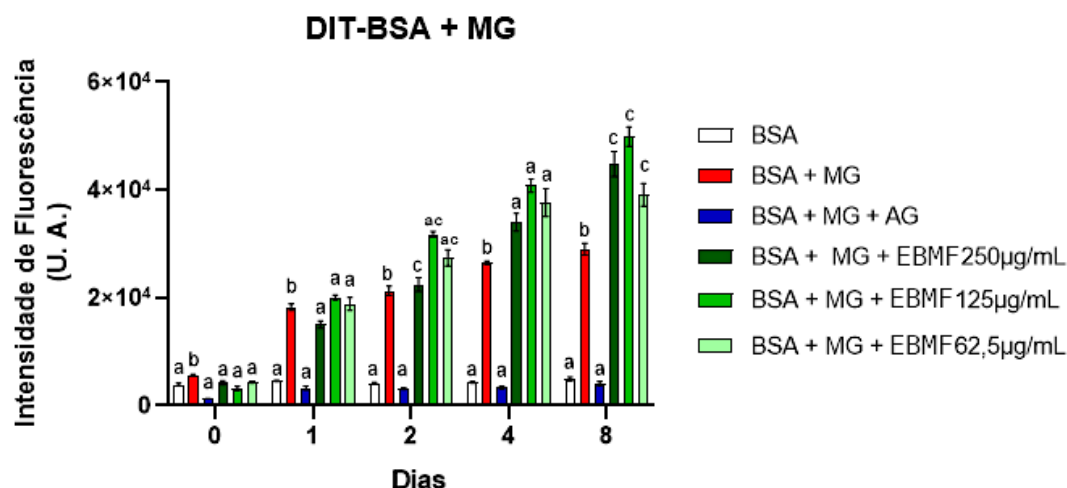


Figura 92 -- Níveis de ditirosina em incubações contendo BSA + metilglioxal (MG) e extrato metanólico de folhas de *C. tapia* (EBMF). A fluorescência de ditirosina foi determinada nos dias 0, 1, 2, 4 e 8 de incubação. Os grupos experimentais incluem: grupos controles positivos (BSA + MG e BSA + MG + AG), grupo controle negativo (BSA), e os grupos com diferentes concentrações de EBMF (62,5, 125 e 250 µg/mL). Os resultados são expressos como média ± desvio padrão de experimentos independentes realizados em triplicata (n = 3). A análise estatística foi realizada por ANOVA one-way, seguida pelo teste de Newman-Keuls ($p < 0,05$). Barras compartilhando a mesma letra não diferem significativamente entre si. Fonte: Brandão da Silva, 2023.

Em síntese, a incubação de BSA com metilglioxal resultou em aumento progressivo de todos os marcadores de oxidação avaliados (N'-formilquinurenina, quinurenina e ditirosina), enquanto a aminoguanidina suprimiu consistentemente sua formação. O extrato metanólico das folhas de *Crateva tapia* apresentou efeito complexo, atenuando parcialmente a formação de produtos derivados do triptofano e a dimerização oxidativa de resíduos de tirosina. Esses resultados sugerem que o tratamento com EBMF pode influenciar a formação de marcadores de oxidação de resíduos de aminoácidos, seja promovendo maior agressão ou conferindo proteção. No entanto, não é possível, neste momento, afirmar com certeza o potencial relativo

deste extrato na modulação do estresse oxidativo associado ao diabetes, o que reforça a necessidade de investigações complementares para a identificação dos compostos majoritários presentes no extrato das folhas e a elucidação dos mecanismos moleculares que possam explicar seu perfil de ação.

3.3.2. **Efeitos Glicooxidativos do extrato das entrecascas (EMBE) de *C. tapia* em Sistema Modelo de Glicação Proteica**

3.3.2.1. *Determinação da formação de AGEs fluorescentes*

Conforme reportado anteriormente, a avaliação da formação de AGEs em um sistema-modelo *in vitro* de glicação proteica demonstrou que a incubação de BSA com MG intensificou significativamente a geração desse dicarboxílico em comparação à BSA isolada. Na Figura 93, pág. 162, constata-se todas as amostras testadas com MG (BSA + MG, BSA + MG + AG, BSA + MG + EBME em 62,5, 125 e 250 µg/mL) exibiram aumento progressivo e significativo da fluorescência ao longo de oito dias. O controle positivo (AG) suprimiu quase por completo essa formação, mantendo as leituras de fluorescência próximas aos níveis basais, em concordância com seu mecanismo de sequestro de intermediários dicarbonílicos. Em contrapartida, nenhuma das concentrações de EBME (62,5, 125 e 250 µg/mL) inibiu a formação de AGEs; ao contrário, todas apresentaram intensidades de fluorescência iguais ou até superiores às do grupo BSA + MG, particularmente a 250 µg/mL, que mostrou os maiores valores ao longo de todo o período e nas concentrações testadas, sugerindo uma interferência negativa do extrato metanólico de entrecasca na contenção da glicação proteica *in vitro*.

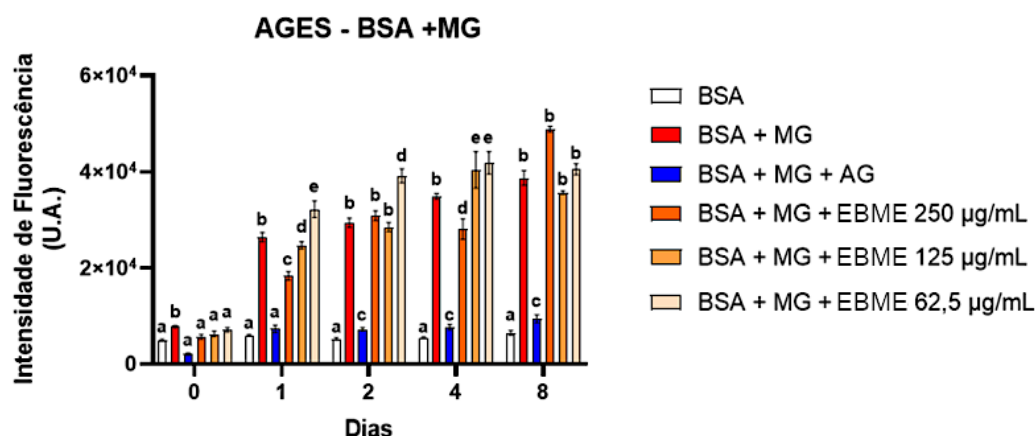


Figura 93 - Níveis de AGEs fluorescentes em incubações contendo BSA + metilglioxal (MG) e extrato metanólico de entrecasas de *C. tapia* (EBME). A fluorescência dos AGEs foi determinada nos dias 0, 1, 2, 4 e 8 de incubação. Os grupos experimentais incluem: grupos controles positivos (BSA + MG e BSA + MG + AG), grupo controle negativo (BSA), e os grupos com diferentes concentrações de EBME (62,5, 125 e 250 µg/mL). Os resultados são expressos como média ± desvio padrão de experimentos independentes realizados em triplicata (n = 3). A análise estatística foi realizada por ANOVA one-way, seguida pelo teste de Newman-Keuls ($p < 0,05$). Barras compartilhando a mesma letra não diferem significativamente entre si. Fonte: RODRIGUES, 2024.

3.3.3. Determinação da formação de marcadores de oxidação de resíduos de aminoácidos de EBME

Para investigar o impacto da glicação proteica na promoção de danos oxidativos, monitorou-se a geração dos três biomarcadores: N'-formilquinurenina (Figura 94), quinurenina (Figura 95) e ditirosina (Figura 96), em incubações de BSA com MG ao longo de oito dias. Conforme esperado, a aminoguanidina inibiu eficientemente a formação de todos esses produtos, confirmando sua ação antiglicante. No entanto, os dados demonstram um aumento significativo na fluorescência de ditirosina, N'-formilquinurenina e quinurenina nos grupos que continham BSA + MG + EBME nas concentrações 62,5, 125 e 250 µg/mL.

A oxidação do triptofano, avaliada pela formação de N' formilquinurenina (Figura 94, pág.161) e quinurenina (Figura 95, pág. 162), exibiu padrões dependentes da concentração e tempo. Enquanto no sistema modelo, BSA + MG apresentou aumento progressivo da fluorescência, refletindo oxidação contínua do triptofano, o EBME nas três concentrações testadas intensificou ainda mais a geração desses dois biomarcadores. Esse efeito foi particularmente evidente em 250 µg/mL nas fases tardias do experimento. A menor concentração (62,5 µg/mL) de EBME manteve níveis elevados de fluorescência do primeiro ao quarto dia, sem reduzir significativamente a oxidação em relação a BSA + MG. Em vez de

minimizar o processo, o extrato intensificou a oxidação do triptofano em todas as concentrações testadas.

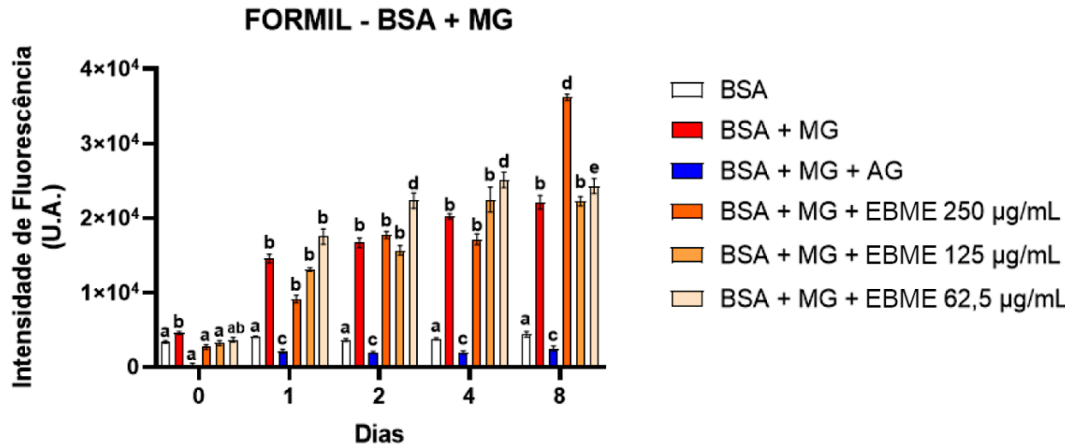


Figura 94 - Níveis de N'-formilquinurenina em incubações contendo BSA + metilglioxal (MG) e extrato metanólico de entrecascas de *C. tapia* (EBME). A fluorescência de N'-formilquinurenina foi determinada nos dias 0, 1, 2, 4 e 8 de incubação. Os grupos experimentais incluem: grupos controles positivos (BSA + MG e BSA + MG + AG), grupo controle negativo (BSA), e os grupos com diferentes concentrações de EBME (62,5, 125 e 250 µg/mL). Os resultados são expressos como média ± desvio padrão de experimentos independentes realizados em triplicata (n = 3). A análise estatística foi realizada por ANOVA one-way, seguida pelo teste de Newman-Keuls ($p < 0,05$). Barras compartilhando a mesma letra não diferem significativamente entre si. Fonte: RODRIGUES, 2024.

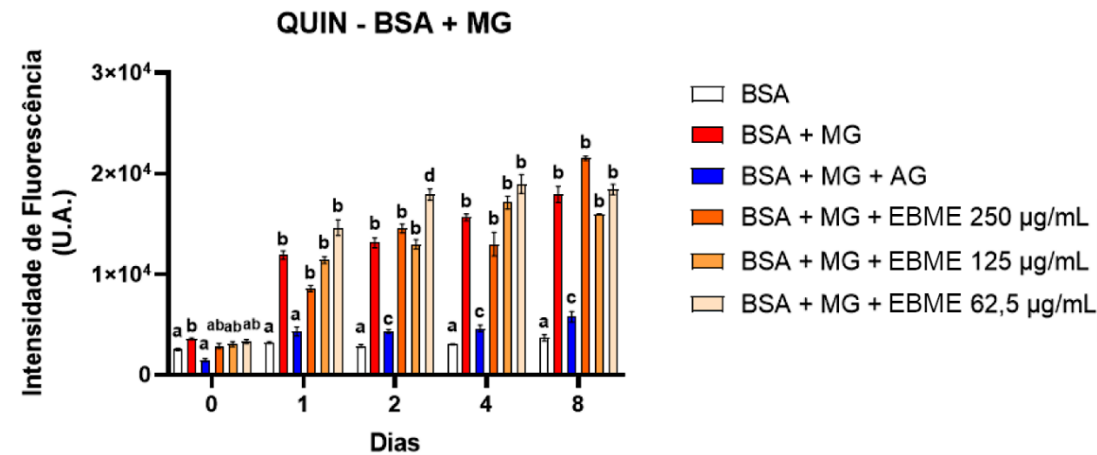


Figura 95 - Níveis de quinurenina em incubações contendo BSA + metilglioxal (MG) e extrato metanólico de entrecascas de *C. tapia* (EBME). A fluorescência de quinurenina foi determinada nos dias 0, 1, 2, 4 e 8 de incubação. Os grupos experimentais incluem: grupos controles positivos (BSA + MG e BSA + MG + AG), grupo controle negativo (BSA), e os grupos com diferentes concentrações de EBME (62,5, 125 e 250 µg/mL). Os resultados são expressos como média ± desvio padrão de experimentos independentes realizados em triplicata (n = 3). A análise estatística foi realizada por ANOVA one-way, seguida pelo teste de Newman-Keuls ($p < 0,05$). Barras compartilhando a mesma letra não diferem significativamente entre si. Fonte: RODRIGUES, 2024.

Nos tratamentos com o EBME, verificou-se que a dimerização oxidativa de resíduos de tirosina, indicada pela ditirosina, também foi intensificada pela incubação com MG e inibida

pela AG (Figura 96, pág. 162). A concentração de 62,5 µg/mL causou leve aumento da fluorescência nos primeiros dias, mas manteve-se estável a partir do quarto dia, porém em níveis acima do controle negativo. A 125 µg/mL, a fluorescência elevou seus níveis no oitavo dia, enquanto a 250 µg/mL teve um aumento discreto no segundo dia e manteve-se acima do controle até o fim do experimento. Esse comportamento específico para os resíduos de tirosina sugere que determinados metabólitos do extrato podem catalisar reações de acoplamento entre os monômeros de tirosinas.

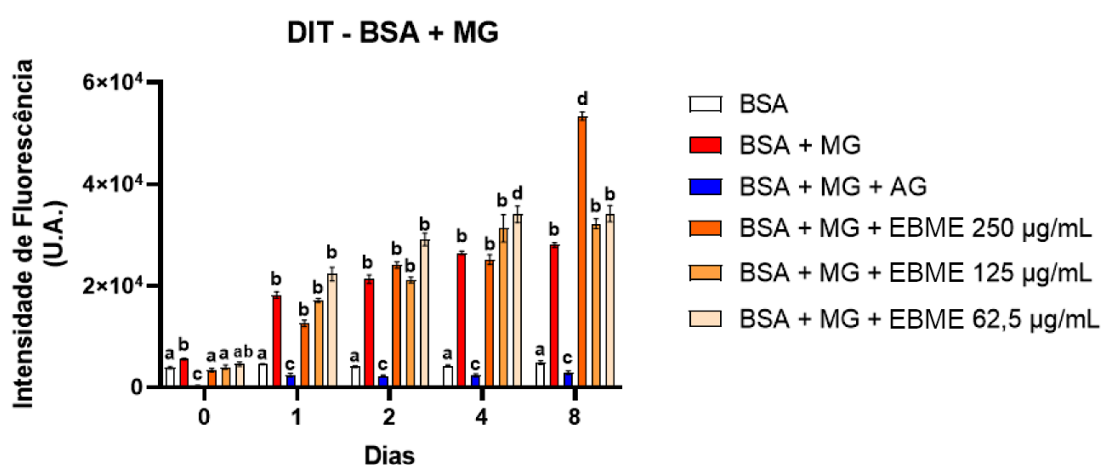


Figura 96 - Níveis de ditirosina em incubações contendo BSA + metilglioxal (MG) e extrato metanólico de entrecasas de *C. tapia* (EBME). A fluorescência de ditirosina foi determinada nos dias 0, 1, 2, 4 e 8 de incubação. Os grupos experimentais incluem: grupos controles positivos (BSA + MG e BSA + MG + AG), grupo controle negativo (BSA), e os grupos com diferentes concentrações de EBME (62,5, 125 e 250 µg/mL). Os resultados são expressos como média ± desvio padrão de experimentos independentes realizados em triplicata (n = 3). A análise estatística foi realizada por ANOVA one-way, seguida pelo teste de Newman-Keuls (p < 0,05). Barras compartilhando a mesma letra não diferem significativamente entre si. Fonte: RODRIGUES, 2024.

Nesses experimentos, o perfil pró-oxidante observado para esses marcadores sugere uma interação complexa do EBME com o sistema, na qual o extrato, em vez de atenuar, exacerba a oxidação de resíduos de triptofano e tirosina sob as condições *in vitro* e ao longo do tempo de incubação.

3.3.4. Efeitos do Extrato de Entrecasca de *Crataeva tapia* na Carbonilação Proteica e Inibição do Cross-Linking em Modelo de Glicoxidação *In Vitro*

Para averiguar se a formação de marcadores de oxidação de aminoácidos refletia alterações químicas mais amplas na proteína, quantificou-se a presença de proteínas carboniladas (PCO) nos dias 0 e 8 de incubação (Figura 97, pág. 163). Observou-se que a incubação de BSA com MG elevou significativamente os níveis de PCO. Contudo, tanto a AG quanto todas as concentrações de EBME foram capazes de potencializar os danos oxidativos induzidos pelo metilglioxal. Os níveis de PCO mantiveram-se abaixo do controle negativo em todos os dias analisados, indicando um discreto efeito protetor contra a introdução de grupos carbonila. Nota-se que o EBME, especificamente nas maiores concentrações (125 e 250 µg/mL), demonstrou uma capacidade mais expressiva de impedir a introdução de grupos carbonila na estrutura da BSA do que a AG (Figura 97, pág. 165).

Essa maior proteção oferecida pelo extrato, particularmente em suas concentrações mais elevadas, sugere que determinados metabólitos presentes no EBME podem se ligar a resíduos suscetíveis à carbonilação, protegendo-os de reações de oxidação de suas cadeias laterais.

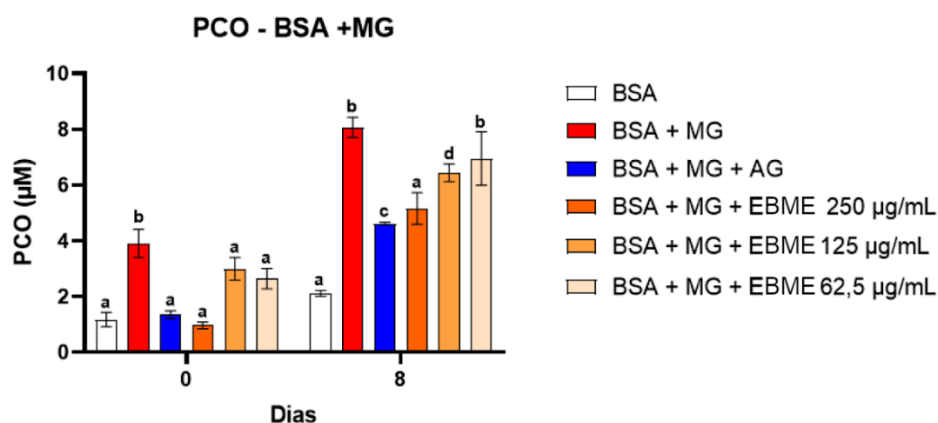


Figura 97 - Níveis de proteínas carboniladas (PCO) em incubações contendo BSA + metilglioxal (MG) e extrato metanólico de entrecascas de *C. tapia* (EBME). A fluorescência de ditirosina foi determinada nos dias 0, 1, 2, 4 e 8 de incubação. Os grupos experimentais incluem: grupos controles positivos (BSA + MG e BSA + MG + AG), grupo controle negativo (BSA), e os grupos com diferentes concentrações de EBME (62,5, 125 e 250 µg/mL). Os resultados são expressos como média ± desvio padrão de experimentos independentes realizados em triplicata (n = 3). A análise estatística foi realizada por ANOVA one-way, seguida pelo teste de Newman-Keuls ($p < 0,05$). Barras compartilhando a mesma letra não diferem significativamente entre si. Fonte: RODRIGUES, 2024.

Como última etapa dos testes, caracterizou-se a fase avançada da glicação proteica, na qual ocorrem ligações cruzadas (*cross-linking*) intra e intermoleculares, sobretudo entre resíduos de lisina e arginina. Para quantificar esse processo, avaliou-se o grau de *cross-linking*

proteico em amostras de BSA incubadas por oito dias, por meio de SDS-PAGE e análise densitométrica (Figura 98, pág. 167 e Tabela 14, pág. 167). A eletroforese evidenciou a formação de adutos covalentes de alto peso molecular, visíveis como uma “sombra” acima da banda monomérica de BSA (66 kDa) em todas as pistas contendo metilglioxal (linhas 2, 4, 6, 8 e 10). Essa “sombra” difusa confirma a ocorrência de *cross-linking* proteico, uma vez que os oligômeros de BSA ficam retidos em posições superiores no gel.

Embora o EBME tenha reduzido moderadamente a carbonilação proteica, principalmente em 250 µg/mL, aproximando os níveis de PCO aos observados com a aminoguanidina, o extrato não impediu a formação de ligações cruzadas. A análise densitométrica mostrou que, em comparação à BSA + MG (100 %), as intensidades das bandas de alto peso molecular permaneceram acima de 80 % em todas as concentrações de EBME, e chegaram a aumentar em 5 % (125 µg/mL) e 17 % (62,5 µg/mL), valores que indicam formação ainda mais intensa de *cross-linking* em relação ao controle puro.

Esses resultados demonstram que, diferentemente da aminoguanidina, o EBME não inibe o *cross-linking* induzido por metilglioxal e pode até potencializá-lo em concentrações intermediárias e baixas. Essa ação seletiva, que protege as etapas iniciais de oxidação e carbonilação, mas não avança ao bloqueio das ligações cruzadas, sugere a presença de compostos cujo efeito varia conforme a fase do processo glicooxidativo. A divergência no perfil de atividade antiglicação e antioxidante reforça a necessidade de estudos detalhados para caracterizar os componentes físico-químicos do extrato de entrecasca de *Crateva tapia*, assim como de isolar e identificar os metabólitos responsáveis por essas respostas.

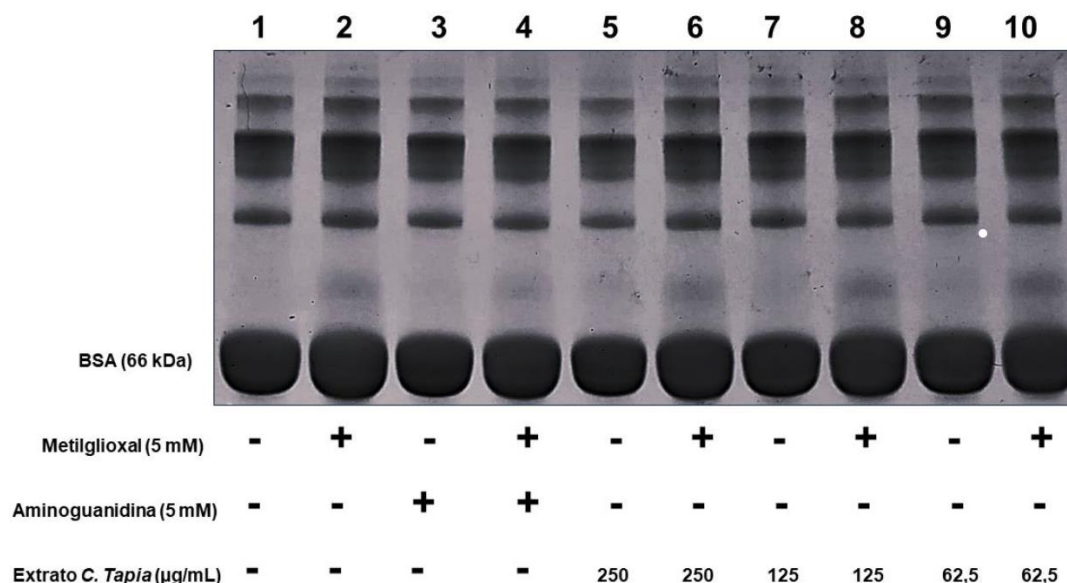


Figura 98 - Cross-link proteico em incubações contendo BSA + metilglioxal (MG) e extrato metanólico de entrecascas de *C. tapia* (EBME). Linhas: (1) BSA; (2) BSA + MG; (3) BSA + AG; (4) BSA + MG + AG; (5) BSA + EBME 250 µg/mL; (6) BSA + MG + EBME 250 µg/mL; (7) BSA + EBME 125 µg/mL; (8) BSA + MG + EBME 125 µg/mL; (9) BSA + EBME 62,5 µg/mL; (10) BSA + MG + EBME 62,5 µg/mL. Fonte: RODRIGUES, 2024

Tabela 14 Análise densitométrica das bandas referentes ao *cross-linking* proteicos presentes no gel contendo as amostras após 8 dias de incubação. Fonte: Rodrigues, 2024

Condição/linha correspondente no gel	Intensidade da tonalidade de cinza
BSA + MG	26.461.081 (100,00%)
BSA + MG + AG	17.019.535 (36,00%)
BSA + MG + EBME 250 µg/mL	25.917.031 (2,10%)
BSA + MG + EBME 125 µg/mL	27.810.263 (-5%)
BSA + MG + EBME 62,5 µg/mL	31.007.288 (-17%)

A condição BSA + MG foi considerada como 100% e as demais condições foram comparadas com ela.

Apesar dos dados da triagem antiglicação do extrato bruto metanólico (EBME) não terem apresentado um potencial promissor para todas as etapas da glicação, a hipótese de investigar essa atividade em frações purificadas ou isolados não pode ser descartada, dada a relevância popular e o histórico de uso da planta. Além disso, estudos prévios com *C. nurvala*, uma espécie relacionada, demonstraram atividade antidiabética do extrato da casca do caule em modelos de diabetes induzido por aloxana em ratos, substância conhecida por destruir células β pancreáticas (SIKARWAR & PATIL, 2010). Essa evidência, bem como a observação de que a atividade se estende a diferentes partes da planta (folhas e cascas do caule), justifica a continuidade da pesquisa.

A família Capparaceae, à qual pertence a espécie em estudo (*Crateva tapia*), engloba diversas espécies com reconhecido potencial antiglicação. Exemplos incluem a *Cadaba rotundifolia*, que demonstrou alta capacidade inibitória na formação de AGEs *in vitro* em um sistema-modelo de incubação com albumina sérica, atribuída a flavonoides glicosídeos (ABDULAZIZ AL-HAMOUD *et al.*, 2019), e a *Capparis spinosa* L., com potencial antiglicação *in vivo* com modelos animais e em ensaios clínicos em humanos para o controle da glicose (VAHID *et al.*, 2017). É importante notar que esses estudos frequentemente utilizam folhas, sementes, frutos e flores, partes da planta conhecidas por sua maior concentração de flavonoides (SHEN *et al.*, 2022; TORRES *et al.*, 2018), compostos com alto potencial antioxidante e antiglicação. Este fato pode estar diretamente relacionado aos resultados obtidos com o EBME. Como o extrato foi preparado a partir da entrecasca do caule, que hipoteticamente pode conter uma quantidade inferior de flavonoides, essa menor concentração de compostos bioativos poderia justificar a proteção menos pronunciada do extrato em algumas etapas da atividade antiglicação.

A divergência no perfil de atividade antiglicação e antioxidante do EBME reforça a necessidade de estudos detalhados para caracterizar os componentes físico-químicos do extrato da entrecasca de *Crataeva tapia*, assim como para isolar e identificar os metabólitos responsáveis por essas respostas divergentes. Além disso, a condução de experimentos complementares é fundamental para confirmar e detalhar seu potencial antioxidante em diferentes contextos.

3.3.5. Elucidação estrutural dos isolados de CTDE

A investigação fitoquímica da fração diclorometano das entrecascas de *C. tapia* (CTDE), conduzida até o momento, permitiu o isolamento de dois metabólitos de relevância estrutural e potencial biológico: um triterpeno (designado composto **13**) e um sitosterol glicosilado (composto **15**). A identificação e elucidação estrutural desses compostos foram realizadas por espectroscopia de RMN unidimensional de ^1H e ^{13}C , seguida de comparação com dados descritos na literatura.

Em relação ao composto **13**, anteriormente elucidado (Capítulo I) apenas em mistura, sua obtenção isolada a partir de *C. tapia* constitui um avanço significativo para a elucidação

estrutural dessa série de triterpenos e para a caracterização fitoquímica da espécie. A análise do espectro de RMN de ^{13}C , experimento DEPTQ (Figura 99, pág. 169), revelou sinais similares com um esqueleto lupano, corroborando com os dados relatados por CANTANHEDE *et al.* (2017). Destacam-se entre os deslocamentos químicos, δ_{C} 79,02 (C-3), 151,03 (C-20), 109,35 (C-29), atribuídos à hidroxila e à unidade isopropenila terminal ligada no anel ciclopentano. Além disso, notou-se sete sinais de carbonos metílicos do núcleo lupano, dez carbonos metilênicos e cinco sinais de carbonos metínicos.

Os dados observados no espectro de RMN de ^1H (Figura 100, pág. 170) também corroborou o núcleo lupano do composto **13**. Identificou-se sete simpletos de metilas entre 0,65 e 1,75 ppm; o sinal do hidrogênio oximetínico (H-3), um duplo duplete em δ_{H} 3,21; e os hidrogênios olefínicos terminais (H-29 α e H-29 β), observados como simpletos em δ_{H} 4,71 e 4,58.

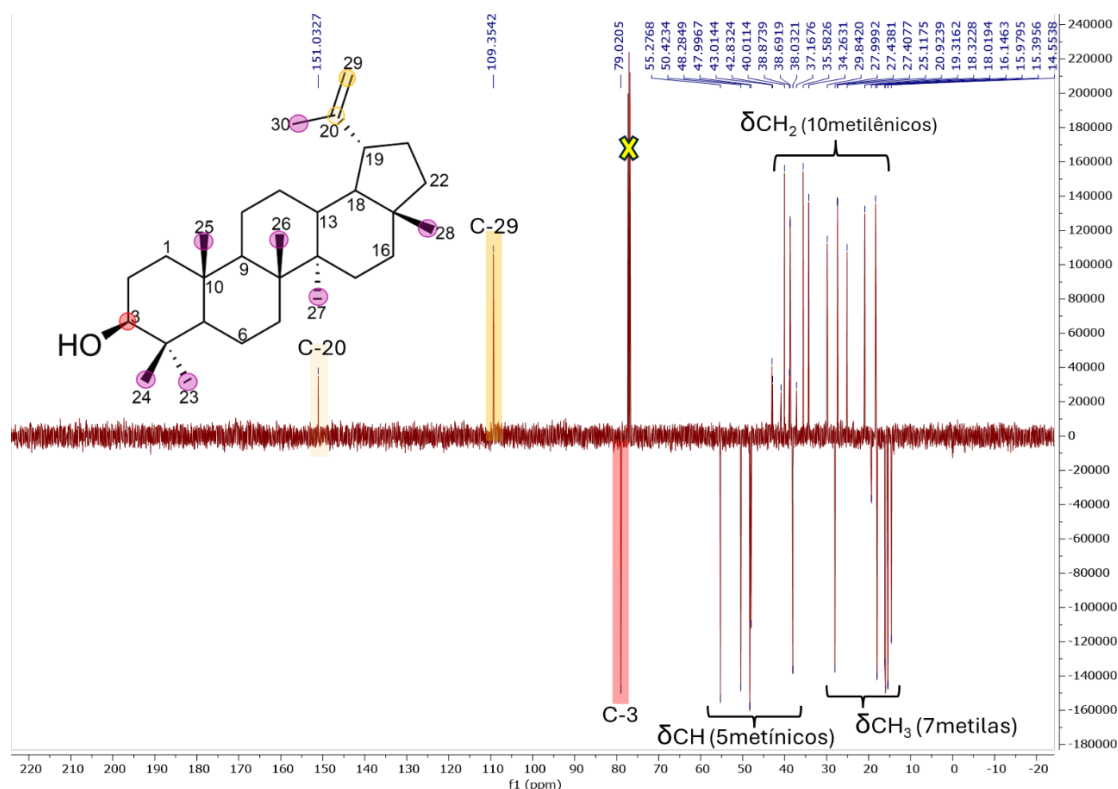


Figura 99 - Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de **13** isolado em *C. tapia*.

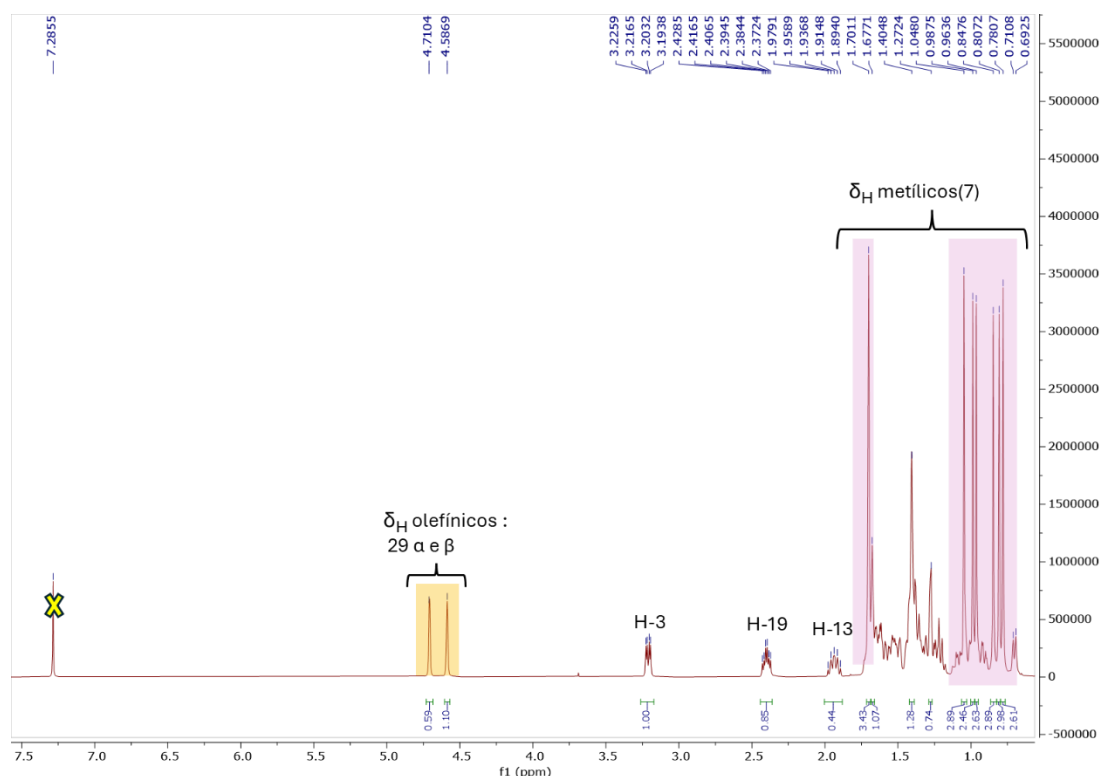


Figura 100 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **13** isolado em *C. tapia*.

Enquanto para o composto **15**, no espectro de RMN de ^1H (Figura 102, pág. 172), observa-se um conjunto de simpletos entre δ_{H} em 0,50 e 0,98, correspondentes aos hidrogênios metílicos do esqueleto ciclopentanoperidrofenantrenico. Esses sinais somam-se a seis outros simpletos de metilas localizados entre 10,0 e 20,0 ppm. No experimento DEPTQ (Figura 101, pág. 171), os sinais em δ_{C} 140,66 e 121,72 indicam a presença da insaturação entre C-5 e C-6. Essa insaturação também é evidenciada no espectro de ^1H , onde um simpleto largo em δ_{H} 5,32 (1H, sl) confirmam o hidrogênio metínico sp^2 em C-6, em concordância com Peshin e Kar (2017). A interpretação conjunta dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C permitiu distinguir o composto **15** dos demais isolados de *Galianthe matogrossiana*. Em especial, observou-se ausência de sinais indicativos de dupla ligação na cadeia lateral entre C-22 e C-23, coerente com o esqueleto do β -sitosterol. No espectro DEPT-Q, essa ausência se confirma pela falta de dois carbonos metínicos sp^2 na faixa de 129 -138 ppm. Além disso, o deslocamento de δ_{C} 78,39 atribuído a C-3 sugere a presença de um substituinte glicosil, hipótese sustentada pelo sinal de carbono anomérico em 102,33 (C-1').

Adicionalmente, o padrão de sinais em δ_{H} 3,50-4,60 ppm, associado ao sinal de sistema anomérico em δ_{C} 102,33/ δ_{H} 5,06, e aos carbonos oxigenados em δ_{C} 75,13 (C-2'); 77,86 (C-3');

71,44 (C-4'); 78,30 (C-5') e o carbono oximetilênico em δ_C 62,59 (C-6'), reforçam a presença de uma unidade de β -D-glucopiranoose ligada em C-3 do núcleo esteroidal. Dessa forma, o composto **15** foi caracterizado como 3-O- β -D-glucopiranosilsterol.

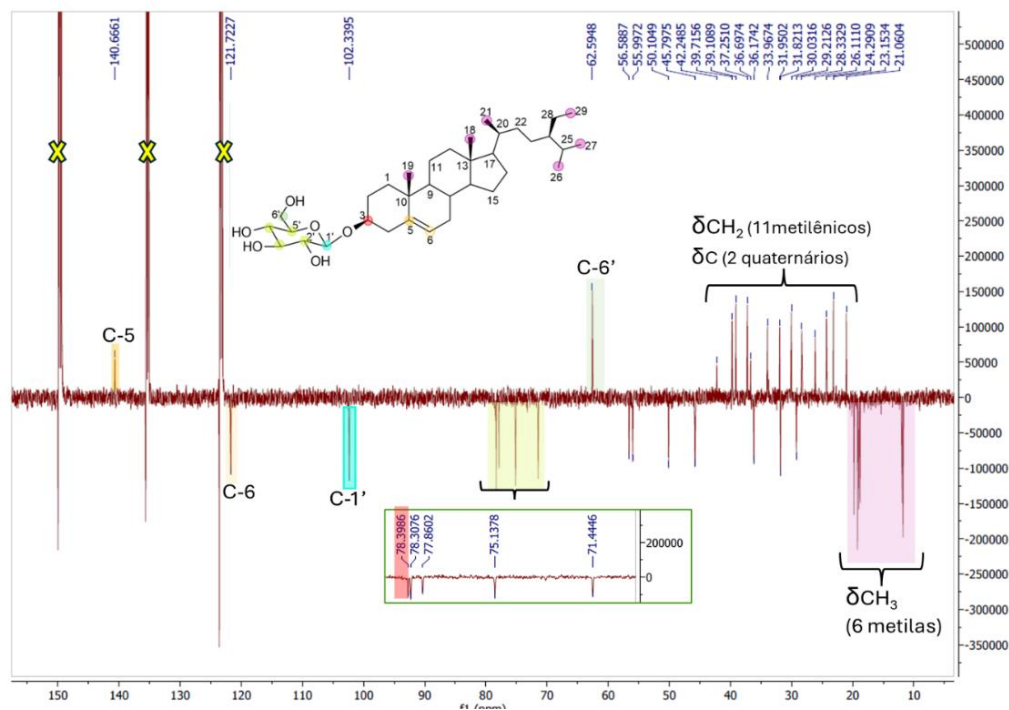


Figura 101 - Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de **15** isolado em *C. tapia*.

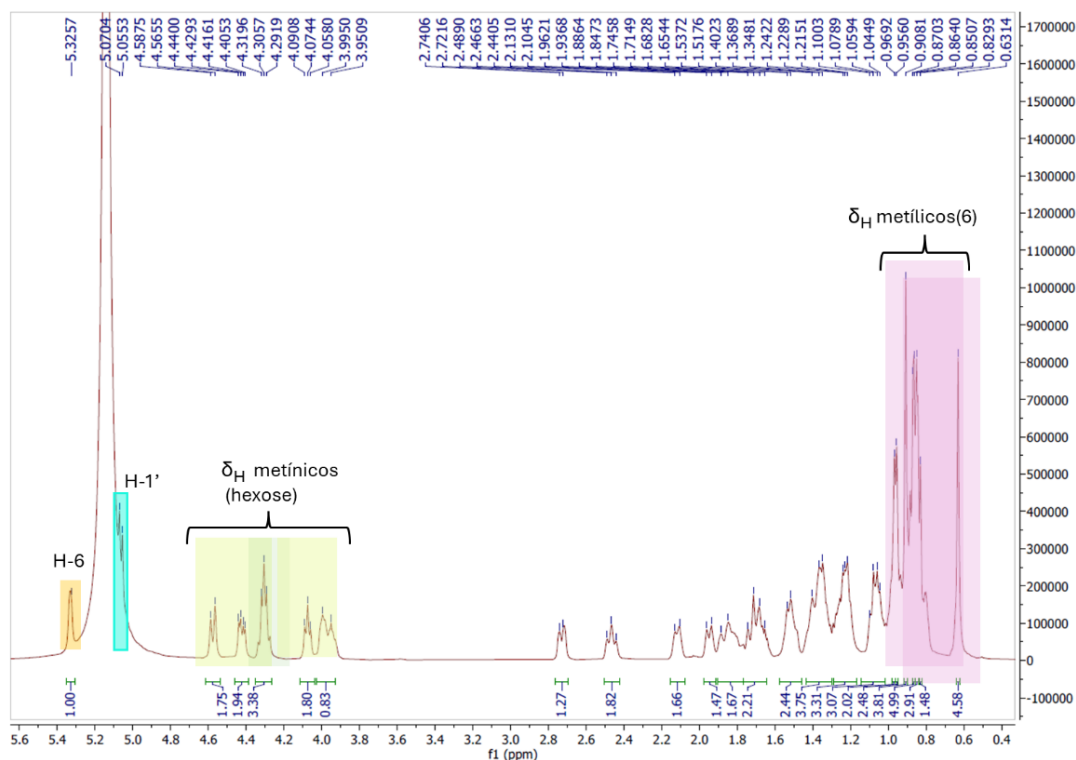


Figura 102 - Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de **15** isolado em *C. tapia*.

Este estudo, embora em estágio inicial, contribui para a compreensão dos metabólitos que compõem a espécie *Crataeva tapia* coletada no bioma Pantanal. Pela primeira vez na espécie, o fitoesteroide 3-O- β -D-glucopiranosilsterol (**15**) foi relatado, embora sua forma não glicosilada já tivesse sido descrita anteriormente. Adicionalmente, o lupeol (**13**), um triterpeno, foi novamente isolado na espécie.

Apesar de a investigação antiglicante com o extrato bruto das entrecascas não ter apontado um resultado promissor em consonância com a narrativa popular de efeito antidiabético, é crucial notar que ambos os metabólitos isolados (**13** e **15** possuem atividade comprovada na modulação da glicemia e na prevenção da formação de AGEs (MARINHO *et al.*, 2016; TORRES *et al.*, 2018; AFIFI *et al.*, 2022).

O β -sitosterol livre, sem glicosilação, tem demonstrado potente atividade antidiabética em diversos modelos experimentais. Em ensaios *in vitro*, mostrou capacidade antiglicante ao inibir a formação de produtos de glicação avançada em sistema BSA-frutose (SHENG *et al.*, 2016). Em modelos de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina e dieta rica em gordura, a administração diária de β -sitosterol reduziu significativamente os níveis de glicose plasmática, hemoglobina glicada e óxido nítrico, ao mesmo tempo em que elevou a secreção de

insulina pelas células β do pâncreas (FRANCIS *et al.*, 2002; GUPTA *et al.*, 2011). Além disso, reforçou duas vias-chave da sensibilidade à insulina: aumentou os níveis de PPAR γ (um fator que melhora o armazenamento de gordura e a resposta das células à insulina) e a quantidade de GLUT4 (o transportador responsável por levar glicose do sangue para dentro das células) em tecidos sensíveis à insulina (PONNULAKSHMI *et al.*, 2019). Juntos, esses efeitos promovem maior captação de glicose e maior eficácia da insulina nos tecidos-alvo. O β -sitosterol também reverte marcadores de resistência à insulina ao reduzir a fosforilação de serina em IRS-1 e aumentar as fosforilações de IRS-1 (Tyr632), Akt (Ser473/Thr308) e AS160 (Thr642) no tecido adiposo de ratos diabéticos (BABU *et al.*, 2020), além de reduzir a resistência à insulina ao aumentar a fosforilação de IRS-1 e Akt e inibir as vias inflamatórias IKK β /NF- κ B e JNK no tecido adiposo (ZHANG *et al.*, 2022).

A incorporação em nanosistemas do glicosídeo β -sitosterol (composto **15**), conforme demonstrado pela sua capacidade de potencializar a resistência à insulina, estresse oxidativo e disfunção de células β , expande ainda mais seu potencial terapêutico (AFIFI *et al.*, 2022). Dessa forma, o β -sitosterol, tanto em sua forma livre quanto conjugada, merece investigação contínua para elucidar seus mecanismos que maximizam seus benefícios no manejo do diabetes e de suas complicações.

Portanto, uma possibilidade de obter matrizes promissoras no teste antiglicante é a investigação de amostras mais purificadas do que o extrato bruto. Um estudo bioguiado com frações menos complexas pode permitir a identificação de um maior potencial bioativo desses metabólitos ativos nessa atividade.

3.4. CONCLUSÕES

Neste estudo, a investigação do extrato de *Crataeva tapia* em um sistema-modelo de glicação proteica *in vitro* revelou que, embora o extrato das folhas (EBMF) e o extrato da entrecasca do caule (EBME) não tenham demonstrado um potencial anti-AGE abrangente, eles exibiram atividades seletivas. O EBMF reduziu significativamente a formação de AGEs em concentrações específicas, enquanto o EBME apresentou um discreto, mas importante, potencial antioxidante ao impedir a introdução de grupamentos carbonila em proteínas. É

notável, porém, que o EBME também se associou a um aumento em outros marcadores de oxidação de aminoácidos, como ditirosina e quinurenina, sugerindo complexas interações dos seus compostos na presença de metilglioxal.

O estudo fitoquímico da espécie resultou no reisolamento do Lupeol (**13**) e, pela primeira vez em *Crataeva tapia*, na identificação do 3-O- β -D-glucopiranosilsterol (**15**). Apesar da atividade antiglicante do extrato bruto não ter sido amplamente promissora, esses metabólitos isolados (**13** e **15**) possuem reconhecida atividade na modulação da glicemia e na prevenção de AGEs. O β -sitosterol (forma livre e glicosilada) e o Lupeol são amplamente documentados por seus efeitos antidiabéticos, incluindo a melhoria da sensibilidade à insulina e a redução de marcadores de estresse oxidativo e inflamação.

Portanto, os resultados desse capítulo fornecem uma base inicial indispensável, não apenas para a compreensão dos constituintes químicos de *Crataeva tapia* no bioma Pantanal, mas também para direcionar investigações futuras. A prospecção de terapias para o enfrentamento do estresse glicoxidativo e suas complicações associadas ao diabetes pode se beneficiar de estudos bioguiados com frações mais purificadas da planta, visando identificar e otimizar a atividade dos metabólitos isolados.

4. CAPÍTULO III

Contribuição na elucidação estrutural do novo alcaloide isolado de *Justicia wasshauseniana* Profice (Acanthaceae)

Dicroísmo Circular e Cálculos Teóricos na Elucidação Estrutural Incluindo Estereoquímica Absoluta. “O Estudo do Alcaloide Brazoide E de *Justicia wasshauseniana*”

4.1. INTRODUÇÃO/ JUSTIFICATIVA

Neste capítulo, amplia-se o direcionamento iniciado no Capítulo I, que tratou do perfil fitoquímico de *Galianthe matogrossiana* apresentando a determinação de estruturas moleculares de diferentes classes de metabólitos. Embora ferramentas como dicroísmo circular e cálculos computacionais tenham papel fundamental na elucidação estrutural de metabólitos vegetais, elas não foram diretamente aplicadas ao estudo fitoquímico de *G. matogrossiana*, que foi o principal objeto desta tese (Capítulo I). No entanto, considerando que a compreensão das teorias envolvidas e a incorporação dessas metodologias, especialmente do dicroísmo circular, que são de grande relevância para a formação de pesquisadores em química de produtos naturais e áreas correlatas elaborou-se esse capítulo nessa tese. Com isso mostrar discussões adicionais sobre determinação estrutural de substâncias orgânicas chegando à completa elucidação das mesmas, incluindo a estereoquímica absoluta. E como exemplo descreve-se a elucidação estrutural de um novo alcaloide, Brazoide E, isolado de *Justicia wasshauseniana*, tópico não discutido no trabalho original do estudo dessa planta. Para isso apresenta-se a aplicação de técnicas utilizando dados experimentais e cálculos computacionais para definição da estereoquímica absoluta dessa substância. Incluindo, entretanto, conceitos de quiralidade óptica e polarização de luz por meio da espectroscopia de dicroísmo circular (DC) aliado a cálculos teóricos de química quântica (TD-DFT).

Nesse contexto apresenta-se uma breve descrição da pesquisa realizada em 2016 no Laboratório de Química de Produtos Naturais (LQPN) da UFRRJ, que envolveu o estudo fitoquímico de *J. wasshauseniana* (Acanthaceae) e a avaliação de suas atividades biológicas (FERNANDES, R. D., 2016). Nos ensaios antioxidantes com DPPH, o extrato metanólico do caule da planta mostrou maior atividade que o das folhas. O extrato das folhas também

apresentou efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório em modelos farmacológicos. Quanto à composição química da espécie, Fernandes (2016) descreve o isolamento e identificação em extratos de folhas e caule da planta, um triglicerídeo com a unidade acila insaturada, um ácido carboxílico insaturado, a mistura de esteróides, β -sitosterol, estigmasterol e campesterol, os glicosídeos, 3-O- β -D-glicopiranosilsitosterol e 3-O- β -D-glicopiranosilestigmasterol, a sacarose (α -D-glicopiranosil- β -D-frutofuranosídeo) e dois alcalóides inéditos, ácido-(N-fenil-o-metileno-O-5)3-hidroxi-5-carboxi- γ -lactama e N(fenil-o-metileno-O-8)-10-hidroxi-8-carbonil-(2',3'-dihidroxipropanoato)- γ -lactona. A identificação desses metabólitos, baseou-se em análise de IV, RMN 1D/2D, espectrometria de massas e dicroísmo circular (DC), além da preparação de derivados acetilados em alguns casos, constituindo uma das contribuições relevantes dessa pesquisa para a discussão dos desafios relacionados à determinação estrutural de metabólitos naturais (FERNANDES, 2016). O fato desses dados não terem sido publicados e a estereoquímica do alcalóide não ter sido definida motivou o envolvimento nesse trabalho fazendo as discussões de estereoquímica absoluta e escrita do trabalho e publicação dos resultados.

Assim fizeram-se cálculos teóricos baseados na Teoria do Funcional da Densidade Dependente do Tempo (TD-DFT) que forneceram dados complementares à análise por dicroísmo circular, permitindo definir a estereoquímica absoluta do alcaloide e propor uma estrutura mais conclusiva e informativa [ácido (8S,10S)N-(fenil-o-metileno-O-8)-10-hidróxi-8-carboxílico- γ -lactama]. Resultando no artigo “Brazoide E, a New Alkaloid and Other Compounds from *Justicia wasshauseniana* (Acanthaceae)”, publicado no Journal of the Brazilian Chemical Society (FERNANDES *et al.*, 2025). Que enfatiza os dados revisados para o alcaloide denominado Brazoide E. O nome desse composto surgiu devido a semelhança estrutural com a série de alcaloides (Brazoides A–D) contendo a unidade N-(o-metileno-fenil)-amida, descritos anteriormente como constituintes de *Justicia gendarussa*, como homenagem dos autores ao Professor Dr. Raimundo Braz-Filho (SOUZA *et al.*, 2016). Essas informações não foram apresentadas no trabalho inicial (FERNANDES, 2016).

Assim, este capítulo retoma parte da investigação conduzida com *J. wasshauseniana*, a fim de apresentar dados atualizados sobre a configuração absoluta desse alcaloide, complementando sua elucidação estrutural com base em abordagens computacionais. Para isso este capítulo apresenta, de forma resumida, os fundamentos teóricos da quiralidade e do dicroísmo circular, essenciais para a compreensão das análises realizadas. Posteriormente, será detalhada a elucidação estrutural do alcaloide Brazoide E.

4.2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

4.2.1. Quiralidade, Luz Polarizada e Introdução ao Estudo de Caso

O dicroísmo circular (DC) é uma técnica espectroscópica de absorção que utiliza luz polarizada circularmente para investigar aspectos estruturais de substâncias quirais e opticamente ativas (BEROVA *et al.*, 2000). Apesar de parecer inicialmente complexa, a compreensão dessa técnica envolve o entendimento prévio de conceitos fundamentais, como as propriedades quirópticas e sua interação com a luz. Esses conceitos serão abordados a seguir, por meio da análise de um estudo de caso publicado por CHAMPAKAM *et al.*, em 2024.

4.2.1.1. Quiralidade Molecular e Propriedades Ópticas

A quiralidade é um fenômeno intrinsecamente conectada a atividade ótica especialmente à polarização, haja visto que formas de forças ópticas podem emergir quando um sistema quiral é imerso em um campo de luz quiral. Essas novas forças envolvem não apenas a quiralidade do sistema sobre o qual exercem sua ação mecânica, mas também a própria quiralidade do campo óptico que as gera. Como tal, elas têm propriedades fascinantes, sendo a crucial a enantiosseletividade (GENET, 2022).

Quando a imagem especular (espelhada) de uma molécula não é sobreponível à original, formam-se pares de enantiômeros (Figura 103B e Figura 103C, pág. 178) (ROOS e ROOS, 2015). Enantiômeros possuem propriedades físicas e espectroscópicas idênticas em ambientes aquirais, o que dificulta sua diferenciação por métodos espectroscópicos convencionais (CAREY e SUNDBERG, 2007; ROOS e ROOS, 2015).

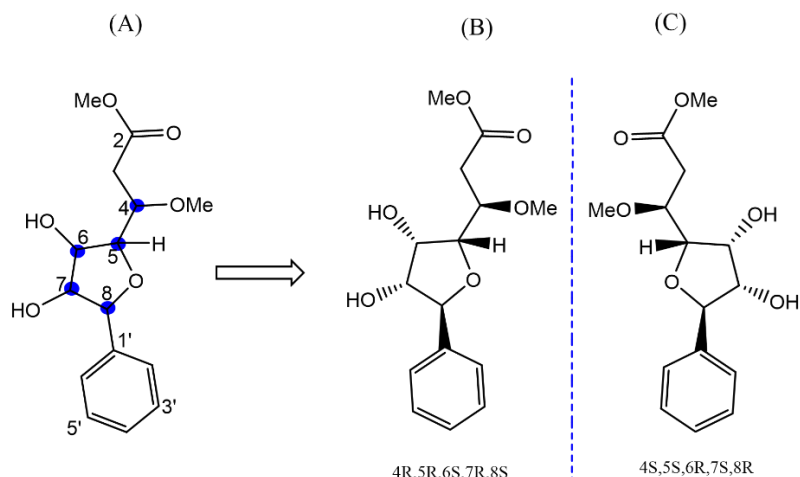


Figura 103 - Representação de um derivado de estilactona. (A) Molécula com centros estereogênicos destacados em azul, sem definição de configuração absoluta. (B) e (C) Par de enantiômeros da molécula (A).

Em compostos quirais, como o derivado de estilactona investigado por CHAMPAKAM *et al.* (2024), cinco centros estereogênicos (carbonos assimétricos, tetraédricos com quatro substituintes diferentes) conferem quiralidade à molécula (Figura 103A, pág. 178). Com cinco centros estereogênicos, a molécula do estudo de casos pode teoricamente existir em até 32 estereoisômeros. Embora técnicas bidimensionais de RMN, especialmente ^1H - ^1H -NOESY, possam auxiliar na determinação da configuração relativa, a definição de qual molécula compõe o óleo analisado torna-se um desafio, uma vez que exige outros instrumentos para prever a configuração absoluta (isto é, o arranjo tridimensional da molécula), tarefa para a qual o DC e cálculos teóricos se mostram fundamentais (CHAMPAKAM *et al.*, 2024).

Essa determinação é crucial, pois enantiômeros frequentemente exibem atividades biológicas distintas, em razão do reconhecimento estereoseletivo por alvos biológicos quirais, como enzimas e receptores (VOET e VOET, 2011). Um enantiômero pode ser terapeuticamente ativo, enquanto o outro pode ser inativo ou até mesmo tóxico (SHEN *et al.*, 2013).

A distinção entre enantiômeros reside fundamentalmente na forma como cada um interage com a luz polarizada, especialmente por meio de seus centros estereogênicos, manifestação direta de suas propriedades quirópticas. Moléculas quirais têm a capacidade de rotacionar o plano da luz polarizada, fenômeno conhecido como atividade óptica: se a rotação ocorrer no sentido horário, a substância é denominada dextrógira (+); se no sentido anti-horário, levógira (-). Misturas racêmicas, compostos meso e sistemas pró-quirais, apresentam mecanismos que anulam a atividade óptica (MORRISON e BOYD, 1987).

Essa relação entre a quiralidade molecular e a luz polarizada constitui a base para técnicas como o dicroísmo circular, ferramenta poderosa na determinação da configuração absoluta de moléculas quirais.

4.2.1.2. Natureza da Luz e Polarização

A compreensão da luz como onda eletromagnética foi consolidada no final do século XIX pelas equações de James Clerk Maxwell, que previram teoricamente a propagação, no vácuo e à velocidade da luz, de campos elétricos e magnéticos oscilantes, perpendiculares entre si e à direção de propagação. Pouco tempo depois, Heinrich Hertz confirmou essa previsão experimentalmente (Figura 104, pág. 177) (HALLIDAY *et al.*, 2023; VICENTE e SILVA, 2024). Nas espectroscopias ópticas, como o DC, a interação da radiação com a matéria é predominantemente atribuída à componente do campo elétrico, pois este é o principal responsável por induzir transições eletrônicas nos cromóforos (ELIEL e WILEN, 1994).

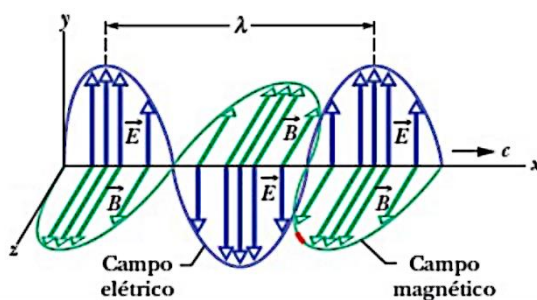


Figura 104 - Figura esquemática de uma onda eletromagnética, em que λ indica um comprimento de onda.
Fonte: HALLIDAY *et al.*, 2023 (adaptada).

A luz emitida por fontes comuns é geralmente policromática (contém múltiplos comprimentos de onda) e não polarizada. Quando esse feixe incide sobre uma substância, diferentes grupos funcionais podem absorver seletivamente certos comprimentos de onda, promovendo transições eletrônicas. Esse é o princípio da espectroscopia UV-Vis, que produz um espectro de absorção em função do comprimento de onda (PRATIWI e NANDIYANTO, 2022; GENET, 2022). Contudo, para investigar propriedades mais sutis, como a quiralidade molecular, faz-se necessária a polarização da luz.

A oscilação do campo elétrico da luz pode ser restringida a um único plano através de um filtro polarizador, resultando na chamada luz linearmente polarizada (ou plano-polarizada). Nesta forma de luz, a direção de oscilação do campo elétrico permanece constante ao longo do

tempo, enquanto sua magnitude também varia ao longo do tempo (Figura 105, pág.180) (SILVA e LAIA, 2023). Além dessa forma, a luz também pode ser circularmente polarizada, um conceito crucial para o dicroísmo circular, elucidado por Augustin-Jean Fresnel. Na luz circularmente polarizada, o vetor do campo elétrico mantém uma magnitude constante, mas sua direção gira continuamente ao redor do eixo de propagação, completando uma rotação a cada comprimento de onda (VICENTE e SILVA, 2024). Este tipo de polarização é gerado pela sobreposição de duas ondas linearmente polarizadas de mesma amplitude, vibrando em planos perpendiculares entre si e com uma diferença de fase de $\pm 90^\circ$ (ou $\pm \lambda/4$) (MATOS e LIMA, 2022; BUSCH e BUSCH, 2018). Dependendo do sentido de rotação do vetor elétrico (observado no sentido contrário ao da propagação), a luz é classificada como: circularmente polarizada à esquerda (LCE), se o vetor gira no sentido anti-horário; ou circularmente polarizada à direita (LCD), se o vetor gira no sentido horário (GENET, 2022).

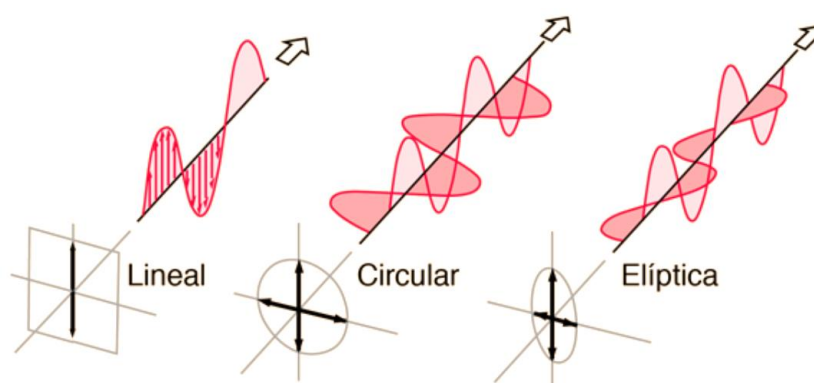


Figura 105 - Classificação da polarização.

Substâncias quirais, como os enantiômeros, interagem diferencialmente com a luz LCE e LCD, gerando dois fenômenos principais. No primeiro, conhecido como birrefringência circular, moléculas quirais exibem índices de refração diferentes para a LCE (n_e) e a LCD (n_d). Consequentemente, as componentes LCE e LCD da luz plano-polarizada propagam-se com velocidades distintas através do meio quiral, resultando na rotação do plano de polarização. A magnitude dessa rotação óptica (α) é descrita pela equação de Fresnel $\alpha = (\pi/\lambda) \cdot (n_e - n_d) \cdot L$, onde λ é o comprimento de onda no vácuo, L é o caminho óptico e $(n_e - n_d)$ é a diferença entre os índices de refração para cada polarização (ELIEL e WILEN, 1994). Se $n_e \neq n_d$, a substância é opticamente ativa.

$$\alpha = \frac{\pi}{\lambda} (n_d - n_e)$$

Figura 106 - Equação de Fresnel

No segundo fenômeno, o dicroísmo circular (DC), se a substância opticamente ativa, contém grupos cromóforos (C=C, C=O, N=N ou N=O) capazes de absorver luz na região UV-vis, cada componente LCE e LCP pode ser absorvida de modo desigual, gerando luz elipticamente polarizada na saída da amostra, e assim faz-se a medida dessa diferença de absorção. Sendo então, o DC é quantificado como a diferença entre os coeficientes de absorção molar da luz polarizada à esquerda e à direita ($\Delta\epsilon = \epsilon_e - \epsilon_d$), (Figura 107, pág.181) conhecida como absorção dicroica diferencial. Em termos de absorbância seria, $\Delta A = A_e - A_d$ no mesmo comprimento de onda (Figura 108, pág. 181) (ZHANG *et al.*, 2004).

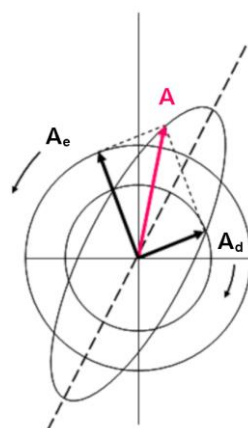


Figura 107 - Absorção diferente dos componentes polarizados esquerdo e direito leva à elipticidade (CD).
Fonte: RUPP, 2008 (adaptado).

$\Delta A = A_e - A_d$	$A = \text{absorvância}$
$\Delta\epsilon = \epsilon_e - \epsilon_d = \frac{\Delta A}{c l}$	$\epsilon = \text{Absortividade molar;}$
	$c = \text{concentração molar da amostra (mol.L}^{-1}\text{)}$
	$l = \text{comprimento do caminho ótico da cela (cm)}$

Figura 108 - Diferença de absorção da luz circularmente polarizada – Dicroísmo Circular.

No estudo de CHAMPAKAM *et al* (2024), a espectroscopia de dicroísmo circular (DC) foi aplicada a um derivado de estilactona contendo cinco centros estereogênicos, com destaque para os carbonos assimétricos C-4 e C-8, próximo a um cromóforo. Esse carbono representa o ponto-chave para a identificação por DC, servindo como referência para a definição estereoquímica dos demais centros estereogênicos do composto. restringiram as

possibilidades estruturais aos enantiômeros com configurações 4R,5R,6S,7R,8S ou 4S,5S,6R,7S,8R. A obtenção do espectro de DC permitiu a observação de bandas características na região do UV, associadas às transições $\pi-\pi^*$ e $n-\pi^*$, que são influenciadas pela disposição espacial dos centros estereogênicos. Essas assinaturas espectrais foram então comparadas com curvas teóricas obtidas por DFT/TD-DFT, possibilitando a atribuição da configuração absoluta de cada centro estereogênico, conforme será discutido na próxima seção/tópico. Antes da existência desses programas de simulação de espectros utilizavam-se, para o caso do DC, sistemas de projeções tridimensionais fazendo correlações com os centros assimétricos vizinhos ao cromóforo para direcionar as correlações de sinais, tendo, inclusive, parâmetros para cálculos de valores de contribuições ao EC, como por exemplo octante para carbonilas, quadrante para aromáticos, etc. (CRABBÉ, 1974). Com o sistema de simulações teóricas ficaram mais fáceis essas conclusões.

4.2.1.3. *Dicroísmo Circular: Significado, Interpretação de Gráficos, Cálculos Teóricos e Fechamento do Estudo de Caso*

O dicroísmo, fenômeno óptico observado por Jean-Baptiste Biot em 1815 ao estudar a turmalina, refere-se à capacidade de certos materiais absorverem luz com polarizações distintas de maneira desigual (BUSCH e BUSCH, 2018). O termo tem origem no grego *dikhroós* (“duas cores”) e, originalmente, designava dispositivos que dividiam feixes de luz em comprimentos de onda diferentes. Mais tarde, Aimé Cotton demonstrou esse efeito em soluções de sais de cobre e cromo, identificando-o em substâncias opticamente ativas (BEROVA *et al.*, 2000). Com os avanços instrumentais e teóricos, a espectroscopia de DC consolidou-se como ferramenta amplamente empregada em bioquímica, química farmacêutica e produtos naturais, sobretudo para investigar a estereoquímica de metabólitos secundários vegetais (MILES *et al.*, 2021).

Conforme brevemente apresentado em seções anteriores, a espectroscopia de DC é um método espectroscópico óptico que se baseia na absorção diferencial de luz polarizada circularmente à esquerda e à direita por cromóforos em moléculas quirais. Em comparação com técnicas como cristalografia de raios X e RMN, o DC demanda quantidades mínimas de amostra e pode ser realizado em condições mais próximas das biológicas (MILES *et al.*, 2021). Isso torna o DC especialmente adequado para elucidar conformações e atribuir configurações absolutas em compostos naturais.

No contexto químico, o DC fornece assinaturas qualitativas, como a presença de bandas positivas ou negativas em comprimentos de onda específicos, e quantitativas ($\Delta\epsilon$ ou ΔA) que podem ser correlacionadas a modelos teóricos de transições eletrônicas. No espectro de DC, plotamos $\Delta\epsilon = \epsilon_e - \epsilon_d$ em função do comprimento de onda (λ). O resultado são picos positivos ($\Delta\epsilon > 0$) ou negativos ($\Delta\epsilon < 0$), conhecidos como efeitos Cotton (Figura 109, pág.183) (BEROVA *et al.*, 2000; LORIN, 2007). Esses sinais dependem diretamente da geometria dos centros quirais vinculados a cromóforos e, por isso, um enantiômero exibirá no DC um espectro “espelho” do seu par, com mesma intensidade em $\Delta\epsilon$, porém com sinais invertidos. Se o isômero R (do latim *rectus*, direito) absorver mais LCE que LCD em determinado λ , o isômero S (do latim *sinistre*, esquerdo) absorverá mais LCD que LCE nesse mesmo ponto; essa distinção é refletida nos pontos de máxima e mínima do espectro no ultravioleta (ROGERS *et al.*, 2019).

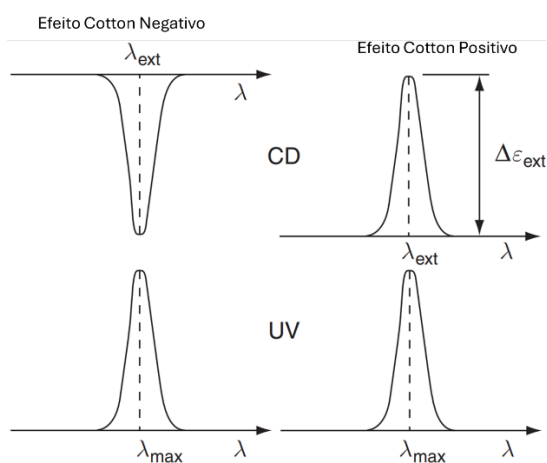


Figura 109 - Padrão geral dos espectros de CD e UV. Fonte: BEROVA *et al.*, 2010 (adaptada).

Na seção de estudo de caso, destaca-se uma estilactona cuja configuração absoluta foi proposta como 4R,5R,6S,7R,8S. A Figura 110, pág. 184, apresenta os espectros de dicroísmo circular eletrônico (ECD) desse composto: a curva verde corresponde ao sinal experimental e as curvas vermelhas são resultados de cálculos teóricos (por exemplo, TD-DFT). A linha contínua representa o enantiômero 4R,5R,6S,7R,8S; a tracejada, seu espelho 4S,5S,6R,7S,8R. Observa-se que ambas seguem o mesmo padrão: pico positivo em $\Delta\epsilon$ por volta de 210 nm (efeito Cotton positivo) e pico negativo próximo a 235 nm (efeito Cotton negativo). A excelente concordância entre os dados experimentais e o espectro calculado para o isômero 4R,5R,6S,7R,8S confirma sua configuração absoluta.

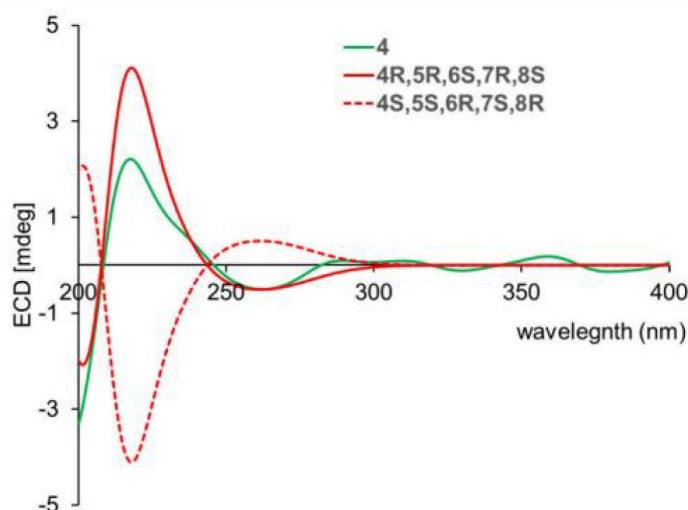


Figura 110 - Espectros de ECD experimentais e calculados do composto estirilactona (4R,5R,6S,7R,8S).

Esse estudo de caso evidencia a relevância do dicroísmo circular na determinação de configurações absolutas em moléculas quirais de produtos naturais. A combinação entre experimentação e simulação teórica revela-se robusta, mesmo quando a cristalinidade para difração de raios X não está disponível.

4.2.2. ESTUDO DE CASO – O ALCALOIDE “BRAZOIDE E” DE *Justicia wasshauseniana*

4.2.2.1. Descrições retiradas do trabalho de R. D Fernandes (2016) acrescidas de informações atualizados

Justicia L. é o maior gênero da família Acanthaceae, com aproximadamente 600 espécies distribuídas globalmente, desde regiões tropicais até regiões temperadas da América do Norte (CORRÊA e ALCÂNTARA *et al.*, 2012; WASSHAUSEN, 2002; BRAZ, 2015). Uma revisão recente sobre a família traz muitas informações sobre as propriedades química e medicinais da mesma (BRAZ *et al.*, 2024, <https://doi.org/10.1016/j.jep.2024.117980>). A espécie endêmica do Brasil, *Justicia wasshauseniana* Profice, é encontrada na Mata Atlântica nos estados do Rio de Janeiro, Espírito Santo e Bahia. As espécies do gênero *Justicia* compartilham alta similaridade morfológica, nomes comuns e uma variedade de indicações médicas, incluindo atividades antioxidante, antiartrítica, antiinflamatória, analgésica, anticancerígena, hepatoprotetora e larvicida (BRAZ-FILHO, 2015; CHAGAS e COSTA-LIMA, 2024;

CORRÊA e ALCÂNTARA *et al.*, 2012). Essas propriedades medicinais têm sido tradicionalmente exploradas na medicina popular, especialmente no caso de *J. gendarussa*, conhecida como “anador” e usada para tratar uma ampla gama de condições de saúde, desde febre até doenças oculares (SONAL e MAITREYI, 2011). Estudos fitoquímicos anteriores com *J. gendarussa* relataram a presença de triterpenoides, esteroides, flavonoides e alcaloides. Em relação a estes últimos, quatro novas moléculas, denominadas brazoides A-D, foram isoladas do extrato das folhas desta espécie (SONAL e MAITREYI, 2011; SOUZA *et al.*, 2016). Considerando a relevância deste gênero em termos de uso popular e o pouco conhecimento sobre sua composição química, o estudo de suas espécies torna-se relevante. Assim, este trabalho descreve o primeiro estudo fitoquímico de *Justicia wasshauseniana* sobre o isolamento e a elucidação estrutural do novo alcalóide denominado brazoide E (6), além da identificação de cinco esteróides, incluindo dois glicosilatos, e sacarose. Métodos físicos de análise orgânica foram utilizados para definir e identificar as estruturas dos compostos isolados. Cálculos teóricos baseados na teoria do funcional da densidade, adotando os funcionais M06-2X e wB97X-D e a base aug-cc-pVDZ, também foram realizados (KOMJÁTI *et al.*, 2016). Trabalhos publicados recentemente corroboram para a escolha deste nível de teoria para a predição de espectros UV-Vis e espectroscopia de dicroísmo circular (DC) (WANG *et al.*, 2014). Neste contexto, descrevemos o estudo fitoquímico de *J. wasshauseniana* incluindo considerações sobre a estereoquímica do novo alcaloide identificado neste trabalho.

4.3. MATERIAIS E MÉTODOS

É importante ressaltar que os dados apresentados nesta seção metodológica correspondem ao recorte da tese de doutorado de Renata D. Fernandes, desenvolvido no âmbito de uma pesquisa colaborativa entre diferentes grupos de pesquisa, cujos resultados culminaram na publicação de um artigo científico. Destaca-se que as etapas de experimentação química, isolamento e derivatização dos metabólitos naturais descritos não foram realizadas por mim. Essas atividades foram conduzidas por Renata D. Fernandes e Luciano R. Suzart, do Laboratório de Química de Produtos Naturais (LQPN/UFRRJ), sob a orientação dos professores Raimundo Braz-Filho e Mário G. de Carvalho, que também participaram da caracterização e elucidação estrutural dos compostos, além da redação e revisão do manuscrito.

A identificação botânica foi realizada por Denise M. Braz, do Departamento de Botânica do ICBS/UFRRJ. As análises de espectrometria de massas de alta resolução (HRESIMS) foram conduzidas pelo Dr. Ari Miranda da Silva (UFRJ/IPPEN – Central Analítica) e por Carolina Passos Cunha (Embrapa Agroindústria de Alimentos, Laboratório de Cromatografia Líquida – Guaratiba, RJ). Os ensaios de dicroísmo circular foram realizados pelo Prof. Darí Cesarin-Sobrinho (UFRRJ). As análises e simulações computacionais, que auxiliaram na definição da estereoquímica absoluta dos alcaloides, foram conduzidas por Tatiane Nicola Tejero e Glauco Favilla Bauerfeldt, do Laboratório de Cinética Química (LCQ/UFRRJ). Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C foram obtidos com o suporte da Central Analítica Multiusuário (CAM) da UFRRJ, atualmente supervisionada pela professora Rosane Nora Castro.

Minha contribuição concentrou-se na participação das discussões relativas à estereoquímica do alcaloide proposto, bem como na elaboração textual e editoração do manuscrito.

Na sequência, descreve-se o passo a passo metodológico referente a esse recorte, com base nos dados fornecidos por esses diferentes grupos, respeitando a autoria das atividades e contribuindo para uma apresentação integrada dos procedimentos empregados na atual elucidação estrutural do composto isolado.

4.3.1. Reagentes e equipamentos

As folhas e caules foram moídos em um moinho de facas Maqtron B-611. Os solventes orgânicos dos extratos foram removidos usando um evaporador rotativo Fisatom 550 (São Paulo-SP, Brasil) a 40 °C sob pressão reduzida (300 mbar). Espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) 1D e 2D de ^1H e ^{13}C foram obtidos usando um espectrômetro Bruker Avance II 400 MHz (Bruker, Rheinstetten, Alemanha) equipado com uma sonda BB ^1H (400 MHz) e um espectrômetro Bruker Avance III 500 MHz (Bruker, Rheinstetten, Alemanha) equipado com uma sonda BBO 500 MHz S2 5 mm z-gradient PLUS SP (500 MHz). Clorofórmio deuterado (CDCl_3), metanol (CD_3OD) e dimetilsulfóxido (D_3CSOCD_3) foram usados para os experimentos de RMN. Os espectros de massa de alta resolução (HRESIMS) foram obtidos com um espectrômetro MICROTOF-Bruker Daltonics (Billerica, EUA) equipado com uma

fonte de ionização por eletrospray. Os espectros de massa de baixa resolução (EIMS) foram obtidos por ionização por impacto de elétron (70 eV) em um cromatógrafo gasoso com espectrometria de massas (GC-MS) Shimadzu GCMS-QP2010 Plus (Mundelein, EUA). Os espectros de infravermelho foram obtidos com pastilha de KBr em um espectrômetro Bruker VERTEX-70 (Billerica, EUA) com transformada de Fourier. A curva CD foi registrada com um espectrômetro JASCO J-805 (São Paulo-SP, Brasil). Cálculos teóricos foram conduzidos com o *software* ORCA (versão 4.1.1) para investigar as propriedades espectroscópicas dos estereoisômeros do composto 6 (Neese, 2019). Os cálculos da teoria do funcional da densidade (DFT) adotaram os funcionais M06-2X e wB97X-D e a base aug-cc-pVDZ. Cálculos de geometria e otimização de frequência vibracional para os mínimos globais de cada isômero foram realizados no nível wB97X-D/def2-TZVP. Em todos os cálculos, os efeitos do solvente metanol foram considerados com o modelo de contínuo polarizável CPCM (modelo de contínuo polarizável tipo condutor). As diferenças de energia (ΔE^0) relatadas no presente estudo incluíram correções de energia vibracional do ponto zero (SAMMARITANO *et al.*, 2020; TEJERO e BAUERFELDT, 2020). Cálculos dos estados eletrônicos excitados verticalmente foram realizados no nível TD-DFT, wB97X-D/def2-TZVP para as conformações de menor energia dos isômeros do novo alcaloide. No total, 25 raízes foram solicitadas para obtenção da estrutura fina dos espectros UV-Vis e DC incluindo os efeitos do solvente com o método CPCM (KOMJÁTI *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2014).

4.3.2. Material vegetal

Folhas e caules da espécie *J. wasshauseniana* Profice foram coletados no Parque Natural Municipal do Curió, Município de Paracambi, estado do Rio de Janeiro, Brasil (localização geográfica: 22°34'41.0"S e 43°42'34.0"W), em setembro de 2009. A espécie foi identificada pela Profa. Denise Monte Braz e um espécime testemunho foi depositado no Herbário do Departamento de Botânica da UFRRJ, D. M. Braz 274 (RBR). A autorização para acesso à espécie através do número ACD32AD foi concedida pelo Sistema Brasileiro de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen). Após quinze dias de secagem à temperatura ambiente e posterior moagem em moinho de facas, foram obtidos 453,4 g de caules e 657,4 g de folhas.

4.3.2.1. Procedimentos interpretados do trabalho de R.D. Fernandes (2016)

Caules (453 g) e folhas (657 g) de *J. wasshauseniana* foram extraídos separadamente por maceração contínua à temperatura ambiente com CH₂Cl₂ (5 L) e MeOH (4 L) durante 72 h. Os solventes foram removidos em rotavapor a 40 °C sob pressão reduzida, resultando nos seguintes extratos brutos: JwCD (diclorometano do caule, 2,4 g); JwFD (diclorometano das folhas, 20,6 g); JwCM (metanólico do caule, 44,8 g) e JwFM (metanólico das folhas, 55,1 g). A massa do extrato JwFM foi obtida após filtração para remoção de um precipitado, identificado como KCl.

O extrato de JwCD (2,2 g) foi submetido a cromatográfica em coluna aberta com uma fase estacionária de sílica gel (230-400 mesh) e eluído com uma mistura de CH₂Cl₂/MeOH em gradiente de polaridade crescente, o que resultou em 58 frações (JwCD-1 a JwCD-58). Um precipitado branco foi obtido a partir da subfração JwCD-20-31 (33,0 mg) solúvel em dimetilsulfóxido (DMSO). Após adição de acetona e filtração, obteve-se o material final (30,0 mg, p.f. 290-292 °C) caracterizado como uma mistura de 3-O-β-D-glicopiranosilsterol (**4**) e 3-O-β-D-glicopiranosilstigmasterol (**5**).

O extrato JwCM (26,3 g) foi solubilizado em MeOH/H₂O (8:2) e extraído com CHCl₃. O material obtido (JwSCMC, 1,03 g) foi fracionado por cromatografia em coluna aberta de sílica gel, eluída com CH₂Cl₂/MeOH em gradiente crescente de polaridade, originando 26 frações (JwSMC-1 a JwSMC-26). As frações JwCMC-6 a JwCMC-10 apresentaram um material sólido (30,0 mg), identificado como uma mistura de saponinas esteroidais mencionadas anteriormente.

20,6 g de JwFD foram submetidos à filtração seletiva em funil de separação com sílica gel (230-400 mesh) como meio filtrante e eluída com hexano, CH₂Cl₂, acetato de etila e metanol. A fração CH₂Cl₂ (JwFD-D) foi cromatografada em sílica gel e eluída com uma mistura binária dos solventes CH₂Cl₂/MeOH em gradiente de polaridade crescente. Desta coluna, 121 subfrações (JwFM-D-1-121) foram coletadas e analisadas por cromatografia analítica em camada delgada (CCD) e agrupadas de acordo com seu perfil cromatográfico. Um precipitado branco observado nas subfrações JwFM-D-11-19 e JwFM-D-20-30 foi identificado como uma mistura de esteroides (**1**, **2**, **3**, 65 mg). Na fração eluída com acetato de etila (JwFDAc), um precipitado solúvel em DMSO foi formado, sendo caracterizado como uma mistura dos glicosídeos **4** e **5**.

O extrato JwFM (36,2 g) foi suspenso em água e sequencialmente particionado com clorofórmio, acetato de etila e n-butanol. A fração butanólica (JwFM-B, 3,1 g) foi cromatografada em sílica gel e eluída com misturas de hexano/acetato de etila/metanol em gradientes de polaridade crescente (90:10:0 a 0:10:90), originando 29 subfrações (JwFM-B-1-29), analisadas por TLC e reunidas conforme o perfil cromatográfico. As subfrações JwFM-B-1-2 (456,0 mg) e JwFM-B-3-7 (357,0 mg) foram recromatografadas separadamente em coluna Sephadex LH-20, eluída com metanol. A purificação de JwFM-B-1-2 resultou em 20 frações, das quais as subfrações agrupadas 2-4 foram analisadas e identificadas como brazoide E (**6**, 80,0 mg). Parte desse material (20,0 mg) foi submetida à reação de acetilação com anidrido acético e piridina, produzindo 20,0 mg do derivado acetilado **6a** (Figura 111, pág. 190), após reação com anidrido acético e piridina. A análise das frações 6-8 desta última filtração levou à identificação de sacarose (**7**).

4.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A investigação fitoquímica dos extratos de folhas (JwF) e caule (JwC) de *Justicia wasshauseniana* levou ao isolamento de cinco esteroides e um carboidrato já descritos na literatura e um novo alcaloide (**6**, Figura 111, pág. 190). As saponinas esteroidais 3-O- β -D-glicopiranosilsterol (**4**) e 3-O- β -D-glicopiranosilstigmasterol (**5**), e sacarose (**7**), foram identificadas pela análise dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C e comparação com dados descritos na literatura (VELÂNDIA, *et al.*, 2002). A mistura de sitosterol (**1**), estigmasterol (**2**) e campesterol (**3**) foi identificada por meio do mesmo procedimento, incluindo análise adicional por CG-MS e comparação com os espectros de massa disponíveis na base de dados do equipamento (NIST08) (JAIN e BARI, 2010). A identificação do novo alcaloide, Brazoide E (**6**), foi realizada com o auxílio de métodos físicos de análise estrutural, aplicando também ao respectivo derivado acetilado (**6a**), conforme descrito a seguir.

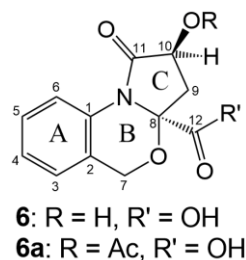
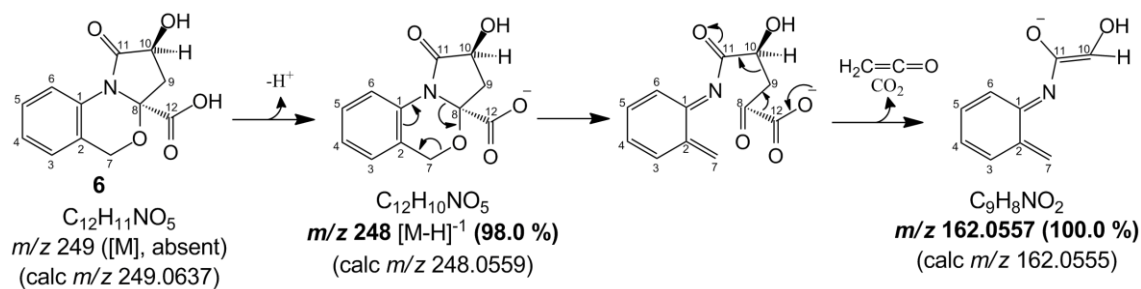


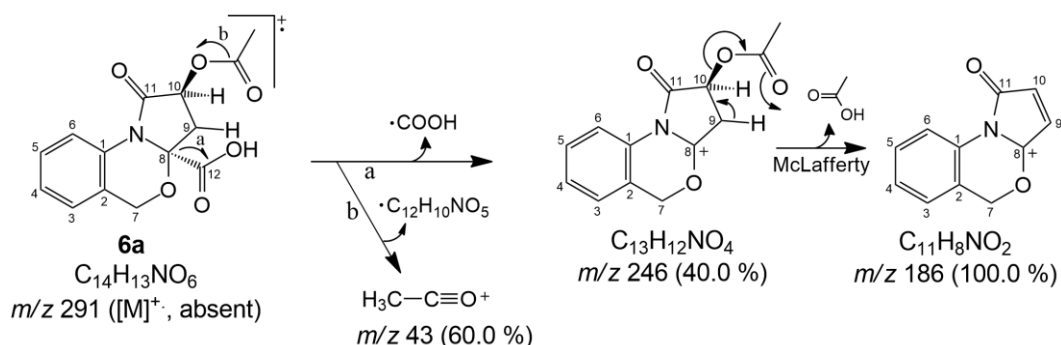
Figura 111 - Estrutura de **6** e seu derivado acetilado (**6a**).

O composto **6** foi isolado como um sólido amorfo marrom, solúvel em metanol. O realce sem distorção de ^{13}C por transferência de polarização, incluindo a detecção de núcleos quaternários no espectro de RMN (DEPTQ), revelou a presença de 12 átomos de carbono (Tabela 15), sendo cinco metinos (δ_{C} 118,7; 126,3; 124,2; 124,0 e 68,2), cinco carbonos quaternários [$(\delta_{\text{C}}$ 123,9; 132,9, (C=C); 172,6 e 174,7 (dois carbonos carbonílicos); e 88,7 (carbono sp^3 não hidrogenado conectado a átomos de oxigênio e nitrogênio)] e dois metilenos, dos quais um é oxigenado [δ_{C} 64,1(CH_2O) e 40,3(CH_2)].

Foi confirmado por espectroscopia de RMN de ^1H que o composto **6** possui quatro hidrogênios em um anel aromático em δ_{H} 7,11 (m, 2H), 7,26 (t, J 8,2 Hz) e 8,35 (d, J 8,2 Hz). As correlações observadas na espectroscopia correlacionada ^1H - ^1H (COSY) entre H-6 (δ_{H} 8,35) e H-5 (δ_{H} 7,26), bem como entre H-4 (δ_{H} 7,11) e H-5, e H-3 (δ_{H} 7,11), confirmaram a presença de um anel aromático 1,2-dissubstituído. Esses dados permitem propor o conjunto de átomos: $\text{C}_2(\text{C}=\text{O})_2(\text{N}-\text{C}-\text{O})(\text{CH})_4(\text{OCH})(\text{CH}_2)_2$, correspondente à fórmula parcial $\text{C}_{12}\text{H}_9\text{NO}_4$, que difere em dois átomos de hidrogênio e um de oxigênio da fórmula molecular $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{NO}_5$ que foi deduzida por HRESIMS em modo negativo (m/z 248,0560 [$\text{M} - \text{H}$] $^-$) (Esquema 9, pág. 189). Essa diferença foi justificada pela presença de um grupo hidroxila, confirmado pela reação de acetilação que levou à formação do derivado **6a** (Figura 111, pág. 190), e pela presença de um grupo carboxila (Esquema 10, pág. 189).



Esquema 9 - Fragmentação proposta para justificar os principais picos observados no espectro de massas de alta resolução (HRESIMS, modo positivo) da substância **6**.



Esquema 10 - Fragmentação proposta para explicar os principais picos observados no espectro de massas de baixa resolução (EIMS) do derivado acetilado (**6a**) da substância **6**.

Os sinais atribuídos a um sistema AB oxigenado (CH_2O), com constante de acoplamento geminal de 15,6 Hz corresponderam a H-7a (δ_H 5,26) e H-7b (δ_H 4,87). O sistema $OCH-CH_2-$ (do tipo ABX) exibiu sinais em δ_H 4,57 (dd, J 9,6 e 8,3 Hz, H-10) e dois duplos dupletos em δ_H 2,89 (dd, J 12,5 e 8,3 Hz, H-9a) e δ_H 2,07 (dd, J 12,5 e 9,6 Hz, H-9b), cujas correlações foram confirmadas por espectroscopia $^1H-^1H$ COSY (Figura 112, pág. 193)

O mapa de contorno obtido por espectroscopia heteronuclear de $^1J_{HC}$ (HSQC) revelou as seguintes correlações (Tabela 15): δ_C/δ_H 118,7/8,35 (d, J 8,2 Hz), C-6; 126,8/7,26 (t, J 8,2 Hz), C-5; 124,2/7,11 (m, 2H), C-3 e C-4; 68,2/4,57 (dd, J 9,6 e 8,3 Hz), C-10; 64,1/5,26, 4,87 (d, J 15,6 e 16,6 Hz), C-7; 40,3/2,89 (dd, J 12,5 e 8,3 Hz) e 2,07 (dd, J 12,5 e 9,6 Hz), C-9 (Tabela 15). Adicionalmente, no mapa de correlação heteronuclear por múltiplos acoplamentos (HMBC), foram observadas correlações entre os hidrogênios H-7 (δ_H 4,87 e 5,26) e os carbonos C-2 (δ_C 124,2; $^2J_{HC}$), C-3 (δ_C 124,2; $^3J_{HC}$) e C-8 (δ_C 88,7; $^3J_{HC}$), indicando ligação direta de C-7 com o anel aromático e ao oxigênio ligado a C-8. Os hidrogênios H-9 (δ_H 2,07 e 2,89) mostraram correlações com C-8 (δ_C 88,7; $^2J_{HC}$) e com o carbono carboxílico C-12 (δ_C 172,6; $^3J_{HC}$), e do H-10 (δ_H 4,57) com C-9 (δ_C 40,3; $^2J_{HC}$) e com C-11 (δ_C 174,7; $^3J_{HC}$).

A comparação com dados da literatura do composto sintético 7-oxa-2-azatriciclo[7.4.0.0^{2,6}] trideca-1(9),10,12-trien-3-ona (JHA e NAIDU, 2013; ZHOU *et al.*, 2010), assim como os acoplamentos adicionais observados por HMBC (ver Informações Suplementares), encontram-se resumidos na Figura 112, pág. 193. Essas interpretações permitiram a atribuição inequívocas dos deslocamentos químicos (δ_C e δ_H) do composto **6**, corroboradas pelos dados de RMN de 1H e ^{13}C (1D e 2D) obtidos para o derivado acetilado **6a**, confirmando a presença e posição do grupo hidroxila.

Assim, a estrutura do novo alcalóide isolado de *J. wasshauseniana* foi determinada como a do composto **6** (Figura 111, pág.190). A aplicação das técnicas 1D e 2D de RMN de 1H e ^{13}C (Tabela 15 e Figura 112, pág. 193) permitiu confirmar a estrutura e definir as atribuições dos deslocamentos químicos para **6** e seu derivado acetilado **6a** (Tabela 15). Esta estrutura de **6** é similar aos alcaloides denominados brazoides C e D, previamente isolados de *J. gendarussa* (SOUZA *et al.*, 2016), os quais contêm a unidade: N-(o-O-metileno)-fenilamida, sendo este novo composto nomeado como Brazoide E.

Tabela 15 Dados de RMN de ^{13}C (125 MHz, DEPTQ, CD₃OD) e 1H (500 MHz, CD₃OD) obtidos para o composto **6** e seu derivado acetilado **6a** (CDCl₃).

Posição	6		6^a	
	d_C	d_H (mult., J in Hz)	d_C	d_H (mult., J in Hz)
1	132.9	-	131.8	-
2	123.9	-	122.6	-
3	124.2	7.11 (m)	124.4	7.06 (d, 8.2)
4	124.2	7.11 (m)	125.2	7.16 (t, 8.2)
5	126.8	7.26 (t, 8.2)	127.8	7.28 (t, 8.2)
6	118.7	8.35 (d, 8.2)	119.5	8.35 (d, 8.2)
7	64.1	5.26 (d, 15.6, H-7a) 4.87 (d, 15.6, H-7b)	64.8	5.28 (d, 15.6) 4.95 (d, 15.6)
8	88.7	-	87.0	-
9	40.3	2.89 (dd, 12.5, 8.3, H-9a) 2.07 (dd, 12.5, 9.6, H-9b)	37.8	3.12 (dd, 13.3, 8.5) 2.29 (dd, 13.3, 9.4)
10	68.2	4.57 (dd, 9.6, 8.3)	68.5	5.63 (t, 8.4)
11	174.7	-	167.3	-
12	172.6	-	171.8	-
2'	-	-	-	-
3'	-	-	-	-
H ₃ CCO ₂ -10	-	-	170.3	-
H ₃ CCO-10	-	-	20.7	2.19 (s)

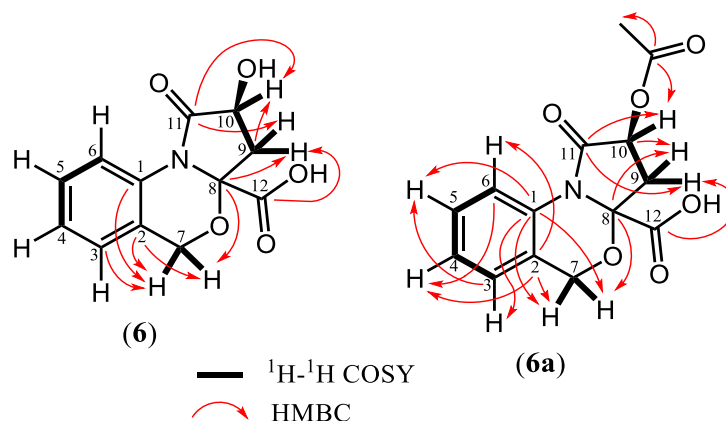
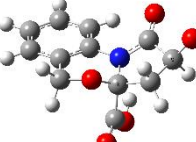
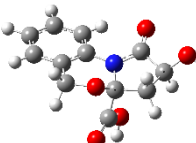
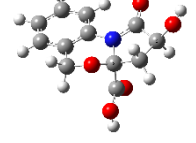


Figura 112 - Correlações selecionadas de HMBC e $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY para o composto **6** e seu derivado acetilado (**6a**).

A estrutura proposta para o braçoide E (**6**) permite sugerir os estereoisômeros (8R,10R) e (8S,10S), além de algumas possibilidades conformacionais. A análise conformacional revelou um conjunto de cinco conformações para o composto **6**, separadas por no máximo $3,15 \text{ kcal mol}^{-1}$ no nível M06-2x/aug-cc-pVDZ (ou $2,26 \text{ kcal mol}^{-1}$ no nível wB97X-D level/aug-cc-pVDZ). Todas as conformações provêm de rotações dos grupos hidroxila ligados aos carbonos C-10 e C-12. A conformação de menor energia se justifica pela interação entre o hidrogênio do grupo OH ligado ao carbono 10 e o oxigênio da carboxila (C-11). A distância OH–O nessa interação é de $2,57 \text{ \AA}$, e resulta na formação de um pseudoanel de cinco membros. Observa-se excelente concordância entre os resultados obtidos com os dois funcionais utilizados. Espera-se o mesmo espectro de conformações para os isômeros (8R,10R) e (8S,10S), uma vez que são imagens especulares. A Tabela 16 apresenta as geometrias de menor energia que compõem o espectro conformacional do isômero (8S,10S) do composto **6**, bem como os valores de energia eletrônica, energia vibracional de ponto zero e energia relativa obtidos nos níveis CPCM(metanol)/M06-2X/aug-cc-pVDZ e CPCM(metanol)/wB97X-D/aug-cc-pVDZ, respectivamente.

Tabela 16 Pontos estacionários obtidos nos níveis CPCM(metanol)/X/aug-cc-pVDZ, com X = M06-2X e wB97X-D, como possíveis conformações do isômero (8S,10S) do composto **6**.

Geometry	Functional	Energy (hartree)	Vibrational Energy from Point Zero (hartree)	DE ⁰ (kcal/mol)
	M06-2X wB97X-D	-894.626017	0.224081	0.18
		-894.654656	0.223895	0.13
	M06-2X wB97X-D	-894.6216452	0.224435	3.15
		-894.6513457	0.223982	2.26
	M06-2X wB97X-D	-894.624060	0.223842	1.26
		-894.652797	0.224121	1.46
	M06-2X wB97X-D	-894.624716	0.224096	1.01
		-894.653566	0.224409	1.13
	M06-2X wB97X-D	-894.626150	0.223920	0.00
		-894.654877	0.223912	

A configuração absoluta do alcaloide foi determinada com o auxílio da análise de DC, (300 μ L, MeOH) [θ]₂₅₀ = -33.000 e [θ]₂₂₀ = +62.700), conforme apresentado na Figura 113a (Pág. 195). Para definir qual estereoisômero corresponde a esse efeito Cotton (EC), foram realizados cálculos teóricos para simular os espectros de dicroísmo circular dos isômeros (8R,10R) e (8S,10S), apresentados na Figura 113b, pág. 195. Nesta figura, as linhas vermelhas delimitam a região experimentalmente observada no espectro teórico. Como esperado, os perfis observados no espectro de DC seguem os máximos de absorção do espectro de UV. O espectro do isômero (8S,10S) apresenta concordância com o espectro experimental obtido para o composto **6** (Figura 113a, pág. 195): a partir de 190 nm, observa-se um aumento de intensidade, formando uma banda de sinal positivo com pico em 196 nm; o segundo pico apresenta sinal negativo, com máximo em 225 nm. Já o espectro teórico obtido para o isômero (8R,10R) exibe um perfil invertido, com pico de sinal negativo em 196 nm e pico de sinal positivo em 225 nm.

O espectro previsto no nível CPCM (metanol)/TDDFT-wB97X-D/def2-PVTZ (Figura 113b, pág. 195) apresenta boa correspondência, em termos de perfil e intensidade dos picos,

com o espectro experimental no intervalo de 200 a 350 nm (Figura 113a, pág. 195). No entanto, são esperadas diferenças nos valores de comprimento de onda referentes aos máximos de absorção entre os espectros UV experimental e teórico. Ainda assim, foi observada uma diferença de apenas 25 nm entre os máximos de absorção teóricos e experimentais, com os resultados teóricos deslocados para comprimentos de onda menores. Dessa forma, os cálculos teóricos corroboram a interpretação dos espectros experimentais de dicroísmo circular com base em regras empíricas de projeção, confirmando a estereoquímica (8S,10S) para o composto **6**.

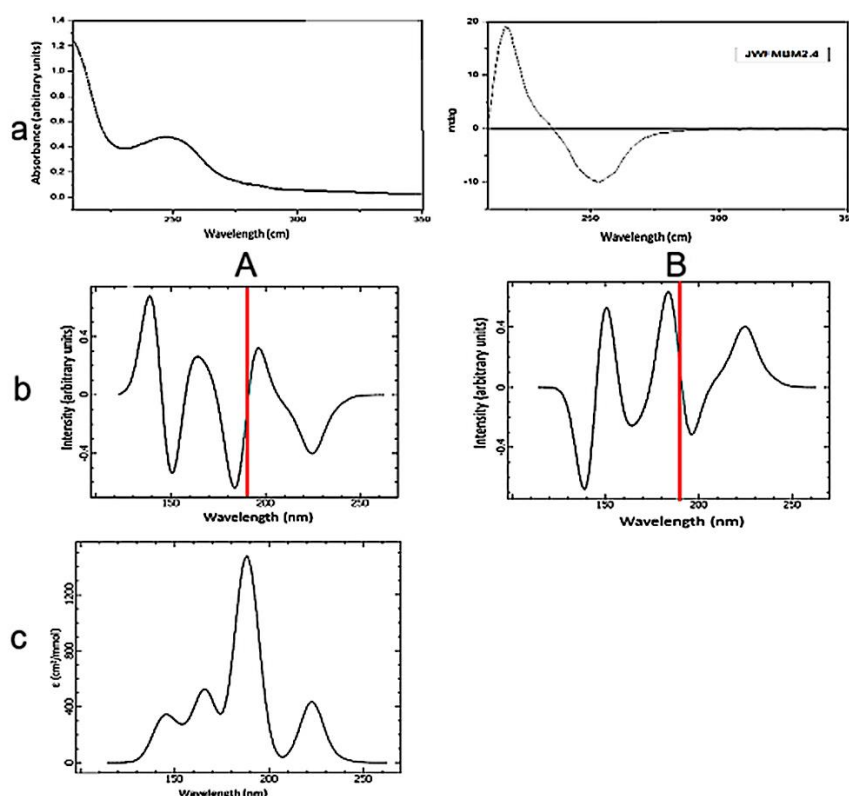


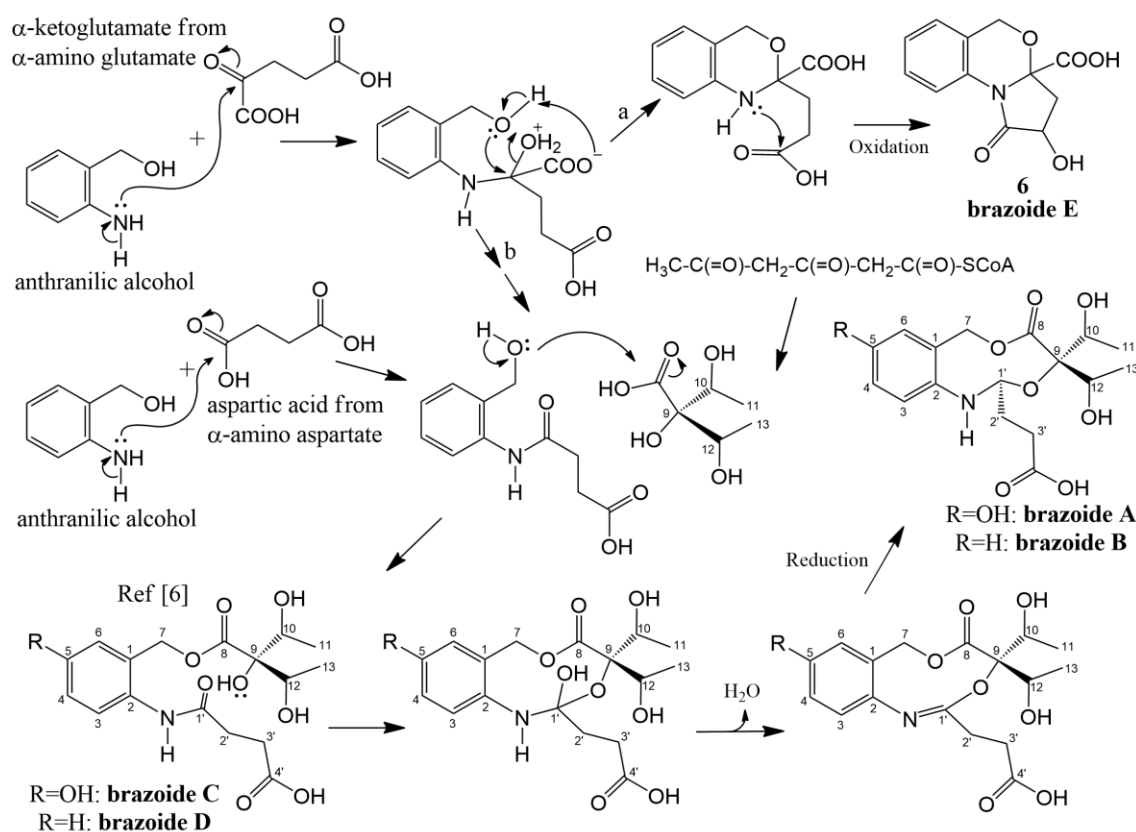
Figura 113 - Representação das espectroscopias experimental e teórica de **6**; (a) espectros experimentais de UV (A) e DC (B) do composto **6** em metanol; (b) espectros de DC simulados para CPCM/TDDFT os isômeros de **6** do nível CPCM/TDDFT wB97X-D/ def2- PVTZ: (A) (8S,10S); (B) (8R,10R); (c) espectro UV teórico de **6**, obtido no nível CPCM/TDDFT wB97X- D/def2-PVTZ.

O espectro UV teórico do composto **6** é apresentado na Figura 113c, pág. 195. As larguras de banda foram ampliadas para permitir melhor comparação com o espectro experimental. Nessa resolução, são observados quatro picos, com máximos em 145, 165, 189 e 223 nm. O pico em 189 nm compreende três excitações eletrônicas: 189 nm e 185 nm, correspondentes à excitação $n \rightarrow \pi^*$ (HOMO-1 $\rightarrow$ LUMO+1 e HOMO-1 $\rightarrow$ LUMO, respectivamente), e 191 nm, o pico de menor intensidade, atribuído à excitação $\pi \rightarrow \pi^*$ (HOMO $\rightarrow$ LUMO+2).

O pico em 223 nm abrange duas excitações eletrônicas de característica predominantemente $\pi \rightarrow \pi^*$ em 236 nm (HOMO $\rightarrow$ LUMO+1) e 222 nm (HOMO $\rightarrow$ LUMO), além de duas excitações eletrônicas de caráter $n \rightarrow \pi^*$ em 224 nm (HOMO-2 $\rightarrow$ LUMO) e 214 nm (HOMO-3 $\rightarrow$ LUMO+2).

Os orbitais de fronteira relacionados a essas transições eletrônicas estão apresentados na seção de Informações Suplementares, sendo o orbital molecular mais ocupado (HOMO) o orbital 64 e o menos ocupado (LUMO) o orbital 65. Os orbitais HOMO-3, HOMO-2 e HOMO-1 correspondem aos orbitais 61, 62 e 63, respectivamente, enquanto LUMO+1 e LUMO+2 são os orbitais 66 e 67.

Por fim, uma proposta biossintética para o novo alcaloide e para os demais brazoides conhecidos foi resumida no Esquema 11.



Esquema 11 - Proposta de rota biossintética para a produção biológica dos Brazoides A, B, C, D (SOUZA *et al.*, 2016).

4.5. CONCLUSÕES

O presente capítulo apresentou informações inéditas oriundas do primeiro estudo químico da espécie *Justicia wasshauseniana* Profice (Acanthaceae), que resultou no isolamento e na determinação estrutural de um novo alcaloide: (8S,10S)-N-(fenilometileno-O-8)-10-hidroxiácido carboxílico-8 γ -lactama (**6**), denominado Brazoide E. A elucidação da configuração absoluta deste composto foi possível através da aplicação integrada da espectroscopia de dicroísmo circular experimental com cálculos teóricos de TD-DFT. Esta abordagem reforça a importância da aplicação de métodos computacionais como complemento à arte da elucidação estrutural de produtos naturais quirais.

Adicionalmente ao Brazoide E, foram também identificados na espécie *J. wasshauseniana* outros metabólitos, como as saponinas esteroidais 3-O- β -D-glicopiranosilsterol (**4**) e a 3-O- β -D-glicopiranosilestigmasterol (**5**), em diferentes extratos da planta. Além disso, foram detectadas uma mistura de esteroides e o dissacarídeo sacarose.

Os resultados deste estudo contribuem significativamente para a ampliação do conhecimento sobre a composição química de espécies do gênero *Justicia*, amplamente conhecidas por seus usos populares e por apresentarem diversas atividades farmacológicas. Ainda, a discussão detalhada dos fundamentos e da aplicação do dicroísmo circular e dos cálculos teóricos neste capítulo serve para ilustrar o potencial dessas ferramentas na moderna química de produtos naturais, sendo de grande valia para a formação de pesquisadores na área.

5. REFERÊNCIAS

- ABDULAZIZ AL-HAMOUD, G. *et al.* Four New Flavonoids Isolated from the Aerial Parts of *Cadaba rotundifolia* Forssk. (Qadab). **Molecules**, v. 24, n. 11, p. 2167, 2019. DOI: 10.3390/molecules24112167.
- AFIFI, S. M. *et al.* β -Sitosterol Glucoside-Loaded Nanosystem Ameliorates Insulin Resistance and Oxidative Stress in *Streptozotocin*-Induced Diabetic Rats. **Antioxidants**, v. 11, n. 5, p. 1023, 2022. DOI: 10.3390/antiox11051023.
- AGRA, L. C.; FERRO, J. N. S.; BARBOSA, F. T.; *et al.* Triterpenes with healing activity: A systematic review. **Journal of Dermatological Treatment**, v. 26, n. 5, p. 465–470, 20 abr. 2015. DOI: 10.3109/09546634.2015.1021663.
- AHMAD, M. S.; AHMED, N. Antiglycation properties of aged garlic extract: possible role in prevention of diabetic complications. **Journal of Nutrition**, v. 136, n. 3 Suppl, p. 796S–799S, 2006. DOI: 10.1093/jn/136.3.796S.
- ALBUQUERQUE, J. M. de. **Plantas medicinais de uso popular**. Brasília: ABEAS/MEC, 1989. 96 p.
- ARRUDA, M.D.M. *et al.* Characterization of a lignin from *Crataeva tapia* leaves and potential applications in medicinal and cosmetic formulations. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 180, p. 286–298, 2021.
- ASHRAF, S.; RANAGHAN, K. E.; WOODS, C. J.; MULHOLLAND, A. J.; UL-HAQ, Z. Exploration of the structural requirements of Aurora Kinase B inhibitors by a combined QSAR, modelling and molecular simulation approach. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, 2021. DOI: 10.1038/s41598-021-97368-3.
- ASSISJUNIOR, L. R. de; GARCEZ, F. R.; GARCEZ, W. S.; GUTERRES, Z. da R. Pregnanos e Outros Constituintes Das Raízes de *Macrosiphonia Petraea* (A. St.-Hil.) Kuntze (Apocynaceae). **Química Nova**, v. 36, n. 4, p. 519–523, 2013. DOI: 10.1590/s0100-40422013000400006.
- ATANU, B.; SHASTRY, C. S.; SANTANU, S. Isolation, purification, and structural elucidation of N-acetyl-5-methoxy-tryptamine (melatonin) from *Crataeva nurvala* Buch-Ham stem bark. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 7, n. 3, p. 86–98, 2014.
- BABU, S. *et al.* Beta-sitosterol attenuates insulin resistance in adipose tissue via IRS-1/Akt mediated insulin signaling in high fat diet and sucrose induced type-2 diabetic rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 873, art. 173004, 2020. DOI: 10.1016/j.ejphar.2020.173004.
- BARBOSA, E. de C. **Avaliação da atividade antiviral de extratos brutos e substâncias, obtidos de plantas e de fungos, contra os vírus Dengue, Zika e Chikungunya**. 2019. 218 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, 2019.
- BARBOSA, J. H. P. *et al.* A determinação dos produtos avançados de glicação (AGES) e de lipoxidação (ALES) em alimentos e em sistemas biológicos: avanços, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 39, p. 608–626, 2016. DOI: 10.21577/0100-4042201600060.
- BAYNES, J. W.; THORPE, S. R. Role of oxidative stress in diabetic complications: A new perspective on an old paradigm. **Diabetes**, v. 48, n. 1, p. 1–9, 1999. DOI: 10.2337/diabetes.48.1.1.

- BEROVA, N.; ELLESTAD, G. A.; HARADA, N. Characterization by circular dichroism spectroscopy. In: MANDER, L.; LIU, H.-W. (eds.). *Comprehensive Natural Products II: Chemistry and Biology*, vol. 9, p. 91–147. Oxford: Elsevier, 2010. DOI: 10.1016/B978-008045382-8.00188-X.
- BEROVA, N.; NAKANISHI, K.; WOODY, R. W. *Circular dichroism: principles and applications*. 2. ed. New York: John Wiley & Sons, 2000. 877 p.
- BEZERRA, M. B. S.; CASTRO, V.; BOTREL, R. T. Arborização da avenida Jerônimo Rosado no município de Baraúna - RN, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Arborização Urbana**, v. 12, n. 1, p. 122–131, 2017.
- BIERHAUS, A. *et al.* AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept. **Cardiovascular Research**, v. 37, n. 3, p. 586-600, 1998.
- BOLSON, M. *et al.* Ethno-medicinal study of plants used for treatment of human ailments, with residents of the surrounding region of forest fragments of Paraná, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 161, p. 1–10, 2015. DOI: 10.1016/j.jep.2014.11.045.
- BONNEFONT-ROUSSELOT, D. Glucose and reactive oxygen species. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 5, p. 561–568, 2002. DOI: 10.1097/00075197-200211000-00009.
- BONTURI, C. R. *et al.* A Bifunctional Molecule with Lectin and Protease Inhibitor Activities Isolated from *Crataeva tapia* Bark Significantly Affects Cocultures of Mesenchymal Stem Cells and Glioblastoma Cells. **Molecules**, v. 24, n. 11, p. 2109, 2019. DOI: 10.3390/molecules24112109.
- BRANDÃO DA SILVA, A. **Avaliação do potencial antiglicação in vitro de extrato e frações das folhas de trapia (Crataeva tapia L.)**. 2023. Relatório de Bolsa de Iniciação Científica – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2023.
- BRAZ, Denise Monte; AZEVEDO, Igor Henrique Freitas. Acanthaceae da Marambaia, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Hoehnea*, v. 43, n. 3, p. 497-516, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1590/2236-8906-12/2016>
- BRAZ, D. M.; TOZIN, L. R. dos S.; GEVÚ, K. V.; LIMA, H. R. P.; SANTOS, V. dos; OLIVEIRA, R. A. M. de; SANTOS, V. O. dos; SANTOS, F. R. dos; CASTRO, R. N.; CARVALHO, M. G.; BRAZ-FILHO, R. Folk medicine, biological activity, and chemical profiles of Brazilian acanthaceae (Lamiales) - A review. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 329, p. 117980, 2024. DOI: doi.org/10.1016/j.jep.2024.117980
- BRAZ, Denise Monte. *Justicia paracambi*, a new Brazilian species of Acanthaceae. **Phytotaxa**, v. 236, n. 2, p. 184-190, 2015. DOI: doi.org/10.11646/phytotaxa.236.2.7
- BRAZ-FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 229–239, 2010. DOI: 10.1590/S0100-40422010000100040.
- BREMER, B.; ERIKSSON, T. Time tree of Rubiaceae: Phylogeny and dating the Family, subfamilies, and tribes. **International Journal of Plant Sciences**, v. 170, p. 766–793, 2009.
- BU, Q.; GE, Z.-Y.; LIANG, L.-F. Chemical and biological investigation on the potential ornamental plant *Ophiorrhiza chinensis*. **Agronomy**, v. 14, n. 8, p. 1872, 2024. DOI: 10.3390/agronomy14081872.

- BUSCH, K. W.; BUSCH, M. A. Light polarization and signal processing in chiroptical instrumentation. In: POLAVARAPU, P. L. (ed.). **Chiral Analysis**, 2. ed., cap. 3, p. 73–151. Amsterdam: Elsevier, 2018. ISBN: 978-0-444-64027-7. DOI: 10.1016/B978-0-444-64027-7.00003-3.
- CABRAL, E. L. dos especies nuevas de *Galianthe* (rubiaceae) para brasil. **Bonplandia**, v. 13, p. 15–19, 2004.
- CABRAL, E. L. Revision Sinóptica de *Galianthe* Subgen. *Galianthe* (Rubiaceae: Spermacoceae), con una sección nueva. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 96, p. 27–60, 2009.
- CANTANHEDE-FILHO, A. J.; SANTOS, L. S.; GUILHON, G. M. S. P.; ZOGHBI, M. das G. B.; PORTS, P. S.; RODRIGUES, I. C. S. Triterpenoides, fenólicos e efeito fitotóxico das folhas de *Eugenia flavescens* DC (Myrtaceae). **Química Nova**, v. 40, n. 3, p. 252–259, 2017. DOI: 10.21577/0100-4042.20160190.
- CAREY, F. A.; SUNDBERG, R. J. Advanced Organic Chemistry: Part A: Structure and Mechanisms. New York: Springer Science & Business Media, 2007. p. 122–128.
- CARVALHO, G. A. de; GRAF, H. Carcinoma indiferenciado de tireoide. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 49, n. 5, p. 719–724, 2005. DOI: 10.1590/S0004-27302005000500012.
- CARVALHO, M. G. de; ALVES, C. C. F.; WERLE, A. A.; BRAZ-FILHO, R. Metabólitos especiais isolados de *Laseguea erecta* (Apocynaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 4, p. 497–500, 2006. DOI: 10.1590/S0102-695X2006000400010.
- CECATTO, A.; FORMAGIO, A.; BUZANELLO-MARTINS, C.; FORTUNA, C.; CABRAL, M.; DA COSTA, W.; BALDOQUI, D.; SARRAGIOTTO, M. CHEMICAL AND DEREPICATION STUDIES OF *Palicourea tomentosa* (Aubl.) Borhidi AND THEIR ANTIMICROBIAL AND ANTICHOLINESTERASE ACTIVITIES. **Química Nova**, 2025. DOI: 10.21577/0100-4042.20250007.
- CHAGAS, E. C. O.; COSTA-LIMA, J. L. *Flora e Funga do Brasil*, Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB106949>. Acesso em: jul. 2024.
- CHAMPAKAM, S.; PATRICK, B. O.; INJAN, N.; NOKBIN, S.; CHEENPRACHA, S.; LOH, Z. H.; MANEERAT, T.; WINYAYONG, P.; PROMNART, P.; MAH, S. H.; ANDERSEN, R. J.; LAPHOOKHIEO, S. Alkaloids and styryl lactones from *Goniothalamus tortilipetalus* and their biological activities. **Journal of Natural Products**, 2024. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.4c00933.
- CHANIAD, P.; PHUWAJAROANPONG, A.; TECHARANG, T.; VIRIYAVEJAKUL, P.; CHUKAEW, A.; PUNSAWAD, C. Antiplasmodial activity and cytotoxicity of plant extracts from the Asteraceae and Rubiaceae families. **Heliyon**, v. 8, n. 1, 2022. DOI: 10.1016/j.heliyon.2022.e08848.
- CHEN, X.; GUAN, J.; ZHANG, C.; LI, S.; ZANG, Y.; CHEN, J.; JIN, H.; LAI, F.; ZHANG, D. Previously Undescribed Tetrahydroanthraquinones from *Prismatomeris Tetrandra* (Roxb.) K. Schum with Antitumor Cell Proliferation Activities. **Phytochemistry**, v. 220, p. 113995, 2024. DOI: 10.1016/j.phytochem.2024.113995.
- CHEN, Y.-F.; GONG, W.; ZHAO, Q.-J.; LIU, C. Antinociceptive Iridoid Glycosides from the Aerial Parts of *Paederia Foetida*. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 26, n. 7, p. 788–794, 2024. DOI: 10.1080/10286020.2024.2326565.

- CHENG, A.-X.; LOU, Y.-G.; MAO, Y.-B.; LU, S.; WANG, L.-J.; CHEN, X.-Y. Plant terpenoids: biosynthesis and ecological functions. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 49, p. 179–186, 2007.
- CHENG, L.; JI, T.; ZHANG, M.; *et al.* Recent advances in squalene: Biological activities, sources, extraction, and delivery systems. **Trends in Food Science & Technology**, v. 146, p. 104392, abr. 2024. DOI: 10.1016/j.tifs.2024.104392.
- CIRILO DA SILVA, J. H.; NUNES VICTOR, A. R.; DE SOUZA MENDES, R. M.; EDSON-CHAVES, B. Arborização e paisagismo das praças públicas e parques de duas cidades do Vale do Jaguaribe, Ceará, Brasil. **Revista Brasileira de Geografia Física**, v. 17, n. 4, p. 2711–2735, 2024. DOI: 10.26848/rbgf.v17.4.p2711-2735.
- CLAUDE, J. P.; JOSEPH, P.; ABATI, Y.; *et al.* Considerations on the ecology of Rubiaceae in Martinique (Lesser Antilles). **Ecology, Environment and Conservation**, v. 29, n. 3, p. 1001–1023, 2023. DOI: 10.53550/eec.2023.v29i03.001.
- CLAUDE, J.-P.; RANGUIN, N.; ABATI, Y.; JOSEPH, P. Ornamentals of Rubiaceae Family: current status and potency evaluation of its phytocoenosis for dooryard gardening in Martinique. **Ornamental Horticulture**, v. 30, 2024.
- CONSERVA, L. M.; FERREIRA, J. J. *Borreria* and *Spermacoce* species (Rubiaceae): A review of their ethnomedicinal properties, chemical constituents, and biological activities. **Pharmacognosy Reviews**, v. 6, p. 46–55, 2012. DOI: 10.4103/0973-7847.95866.
- CORRÊA, G. M.; ALCÂNTARA, A. F. C. **J. Braz. Pharmacogn.**, v. 22, p. 220, 2012.
- COSTA E SILVA, M. B. *et al.* Capparaceae. In: WANDERLEY, M. G. L. *et al.* (eds.). **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo**. São Paulo: Instituto de Botânica, 2002. v. 2, p. 71–78.
- COSTA, A. F. *et al.* Carga do diabetes mellitus tipo 2 no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 33, e00197915, 2017.
- COSTA, H. N. R. da; SANTOS, M. C. dos; ALCÂNTARA, A. F. de C.; SILVA, M. C.; FRANÇA, R. C.; PILÓ-VELOSO, D. Constituintes Químicos e Atividade Antiedematogênica de *Peltodon Radicans* (Lamiaceae). **Química Nova**, v. 31, n. 4, p. 744–750, 2008. DOI: 10.1590/s0100-40422008000400006.
- CRABBÉ, P. *Actividad óptica, dispersión rotatoria óptica y dicroísmo circular en Química Orgánica*. Ed. Eva V. Chesnear, 1974. 65 p.
- DA SILVA FERREIRA, Rodrigo *et al.* Crystal structure of *Crataeva tapia* bark protein (CrataBL) and its effect in human prostate cancer cell lines. **PLoS One**, v. 8, n. 6, p. e64426, 2013.
- DAILY, J. W. *et al.* Efficacy of ginger for treating Type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. **Journal of Ethnic Foods**, v. 2, n. 1, p. 36–43, 2015. DOI: 10.1016/j.jef.2015.02.007.
- DALLA VECHIA, L.; *et al.* Derivados oleananos e ursanos e sua importância na descoberta de novos fármacos com atividade antitumoral, anti-inflamatória e antioxidante. **Química Nova**, v. 32, n. 5, p. 1245–1252, 2009.
- DHAKAD, Prashant Kumar; SHARMA, Pramod Kumar; KUMAR, Sokindra. A review on ethnobiological & medicinal potential of Capparaceae family plant: *Capparis decidua* (Forssk.) Edgew. **Advances in Pharmacology and Pharmacy**, v. 4, n. 3, p. 27–39, 2016. DOI: <https://doi.org/10.13189/app.2016.040302>.

DE ARAÚJO, R. M. S. **Purificação, imobilização e avaliação de propriedades biológicas da lectina da entrecasca de *Crataeva tapia***. 2008. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2008.

DE ARAÚJO, R. M. S.; PAIVA, P. M. G. **Isolamento, caracterização parcial e imobilização em Sepharose CL-4B da Lectina de entrecasca de *Crataeva tapia* L.** 2004. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2004.

DE ARAÚJO, R.M.S. *et al.* *Crataeva tapia* bark lectin is an affinity adsorbent and insecticidal agent. **Plant Science**, v. 183, p. 20–26, 2011.

DE FREITAS, C.; KATO, L.; DE OLIVEIRA, C.; QUEIROZ, L., jr.; SANTANA, M.; SCHUQUEL, I.; DELPRETE, P.; DA SILVA, R.; QUINTINO, G.; DA SILVA NETO, B.; SOARES, C.; PEREIRA, M. β -Carboline Alkaloids from *Galianthe Ramosa* Inhibit Malate Synthase from *Paracoccidioides* Spp. **Planta Medica**, v. 80, n. 18, p. 1746–1752, 2014. DOI: 10.1055/s-0034-1383305.

DE V CABRAL, D.L. *et al.* Modulatory activity and chemical profile of a hydroalcoholic extract of *Crataeva tapia* L. **African Journal of Microbiology Research**, v. 9, n. 5, p. 326–331, 2015.

DELPRETE, P. G.; CORTÉS-B, R. A synopsis of the Rubiaceae of the States of Mato Grosso And. **Revista de Biologia Neotropical**, v. 3, n. 1, 2007. DOI: 10.5216/rbn.v3i1.2813.

DELPRETE, P. G.; JARDIM, J. G. Systematics, taxonomy and floristics of Brazilian Rubiaceae: An overview about the current status and future challenges. **Rodriguésia**, v. 63, n. 1, p. 101–128, 2012. DOI: 10.1590/s2175-78602012000100009.

DENARDIN *et al.* Potencial alelopático de extratos de *Borreria palustris*. **Anais do VI Congresso Latino-americano de Agroecologia**, v. 13, 2018.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**. 3. ed. New York: John Wiley & Sons, 2009. DOI: 10.1002/9780470742761.

DING, L. L.; WANG, S. C.; WANG, Z. T. [Studies on chemical constituents from root of *Actinidia macrosperma*]. **Zhongguo Zhongyao Zazhi**, v. 32, p. 1893–1895, 2007.

DODDRELL, D. M.; KHONG, P. W.; LEWIS, K. G. The stereochemical dependence of ^{13}C chemical shifts in olean-12-enes and urs-12-enes as an aid to structural assignment. **Tetrahedron Letters**, v. 15, n. 27, p. 2381–2384, 1974. DOI: 10.1016/s0040-4039(01)92261-0.

DONFACK NANFACK, A. R.; NONO, H. W.; LATEEF, M.; AWOUAFACK, M. D.; NGOUELA, S. A.; ALI, M. S.; TENE, M. Diverse Bioactive Secondary Metabolites from *Phylloentas Schimperii* (Hochst.) Y.D. Zhou & Q.F. Wang with Chemophenetic Significance. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 114, p. 104828, 2024. DOI: 10.1016/j.bse.2024.104828.

DOS SANTOS, C. H. C. *et al.* New compounds of *Siolmatra brasiliensis* and inhibition of in vitro protein glycation damage. **Fitoterapia**, v. 133, p. 109–119, 2020.

DU, X.; LITIFU, D.; YUAN, W.; CHEN, Z.; CHEN, Z.; ZHANG, R.; ZUO, J.; LIN, Z.; ZHAO, W. N-Containing Triterpenoid Saponins from *Mussaenda Densiflora* and Identification of Heinsiagenin A as a Potent Immunosuppressant. **Bioorganic Chemistry**, v. 147, p. 107351, 2024. DOI: 10.1016/j.bioorg.2024.107351.

DUBEY, K.; PRAKASH, S. Economic importance of Angiosperm. In: **Economic Importance of Different Classes of Plants**, 2021.

ELIEL, E. L.; WILEN, S. H. *Stereochemistry of organic compounds*. 2. ed. New York: John Wiley & Sons, 1994.

ENQUIST, B. J.; FENG, X.; BOYLE, B.; *et al.* The commonness of rarity: Global and future distribution of rarity across land plants. **Science Advances**, v. 5, art. eaaz0414, 2019. DOI: 10.1126/sciadv.aaz0414.

FABIO, G. D.; ROMANUCCI, V.; DE MARCO, A.; ZARRELLI, A. Triterpenoids from *Gymnema sylvestre* and their pharmacological activities. **Molecules**, v. 19, p. 10956–10981, 2014.

FADEL, H.; BOUCHAL, B.; KHALLOUKI, F.; AMECHROUQ, A.; EL HAJJAJI, S. Antioxidant and Leishmanicidal Evaluation of *Pulicaria inuloides* Root Extracts: A Bioguided Fractionation. **Pathogens**, v. 8, p. 201, 2019. DOI: 10.3390/pathogens8040201.

FADIPE, V. *et al.* Antimycobacterial, antiplasmodial studies and cytotoxicity of oleanolic acid and its derivative from *Syzygium aromaticum* Linn (Myrtaceae). **Journal Biomedical and Biopharmaceutical Research**, v. 17, p. 1–12, 2020.

FARIAS, F.M. **Psychotria myriantha müll arg. (rubiaceae): Caracterização dos alcalóides e avaliação das atividades antiqumiotóxica e sobre o sistema nervoso central**. Ph.D. Thesis, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil, 2006.

FARZAN, M.; FARZAN, M.; SHAHRANI, M.; *et al.* Neuroprotective properties of Betulin, Betulinic acid, and Ursolic acid as triterpenoids derivatives: a comprehensive review of mechanistic studies. **Nutritional Neuroscience**, v. 27, n. 3, p. 223–240, 23 fev. 2023. DOI: 10.1080/1028415X.2023.2180865.

FAUSTINO, C.; DUARTE, N.; PINHEIRO, L. Triterpenes Drug Delivery Systems, a Modern Approach for Arthritis Targeted Therapy. **Pharmaceuticals**, v. 17, n. 1, p. 54, 28 dez. 2023. DOI: 10.3390/ph17010054.

FELISBERTO, J. S.; RAMOS, U. J.; MOREIRA, D. L. **A biodiversidade como ferramenta para o melhoramento da saúde humana**. 1. ed. Curitiba: Appris, 2022.

FERNANDES, L. M.; GARCEZ, W. S.; MANTOVANI, M. S.; FIGUEIREDO, P. O.; FERNANDES, C. A.; GARCEZ, F. R.; GUTERRES, Z. R. Assessment of the in vitro and in vivo genotoxicity of extracts and indole monoterpene alkaloid from the roots of *Galianthe thalictroides* (Rubiaceae). **Food and Chemical Toxicology**, v. 59, p. 405–411, 2013. DOI: 10.1016/j.fct.2013.05.052.

FERNANDES, R. D. Estudo fitoquímico de *Justicia wasshauseniana* (Acanthaceae), *Tetrapteryx acutifolia* e *Lophanthera lactescens* (Malpighiaceae) e atividades biológicas. 2016. Tese (Doutorado em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2016. Disponível em: <https://tede.ufrjr.br/jspui/handle/jspui/2021>.

FERNANDES, R. D. **Estudo químico e atividade biológica de *Ouratea hexasperma* var. *planchonii* Engl. (Ochnaceae)**. 2008. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

FERNANDES, R. D.; BRAZ FILHO, R.; CARVALHO, M. G. de; BRAZ, D. M.; SUZART, L. R.; TEJERO, T. N.; BAUERFELDT, G. F.; GONÇALVES, M. R. S. Brazoide E, a new alkaloid and other compounds from *Justicia wasshauseniana* (Acanthaceae). **Journal of the**

Brazilian Chemical Society, v. 36, n. 3, art. e20240166, 2025. DOI: 10.21577/0103-5053.20240166.

FERREIRA, D. D. S.; ESPERANDIM, V. R.; MARÇAL, M. G.; NERES, N. B. D. R.; CUNHA, N. L.; ANDRADE E SILVA, M. L.; CUNHA, W. R. Natural products and Chagas' disease: The action of triterpenes acids isolated from *Miconia* species. **Universitas Scientiarum**, v. 18, n. 3, 2013. DOI: 10.11144/javeriana.sc18-2.npcd.

FIGUEIREDO, P. O.; GARCEZ, F. R.; MATOS, M. de F.; PERDOMO, R. T.; QUEIROZ, L. M.; POTT, A.; GARCEZ, A. J.; GARCEZ, W. S. A new cytotoxic β -carboline alkaloid from *Galianthe thalictroides*. **Planta Medica**, v. 77, n. 16, p. 1852–1854, 2011. DOI: 10.1055/s-0030-1271154.

FIGUEIREDO, P. O.; MATOS, M. de F.; PERDOMO, R. T.; KATO, W. H. Jr.; BARROS, M. V.; GARCEZ, F. R.; GARCEZ, W. S. Rubiaceae-Type Cyclopeptides from *Galianthe thalictroides*. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 4, p. 1165–1169, 2015.

FIGUEIREDO, P. O.; PERDOMO, R. T.; GARCEZ, F. R.; *et al.* Further constituents of *Galianthe thalictroides* (Rubiaceae) and inhibition of DNA topoisomerases I and II α by its cytotoxic β -carboline alkaloids. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, n. 5, p. 1358–1361, 2014.

FLORA DO BRASIL. Rubiaceae in Flora e Funga do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em: <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB210>. Acesso em: 15 mar. 2025.

FLORENCE, N. T. *et al.* Antidiabetic and antioxidant effects of *Annona muricata* (Annonaceae) aqueous extract on streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 151, n. 2, p. 784–790, 2014. DOI: 10.1016/j.jep.2013.09.021.

FLORENTÍN, J. E.; SALAS, R. M.; JARVIE, S.; SVENNING, J.-C.; GOMEZ, J. M. D. Areas of endemism and conservation status of *Galianthe* species (Spermacoceae, Rubiaceae) in the Neotropics. **Systematics and Biodiversity**, v. 20, n. 1, p. 1–20, 7 fev. 2022. DOI: 10.1080/14772000.2021.1986567.

FORBES, J. M.; SOLDATOS, G.; THOMAS, M. C. Below the radar: advanced glycation end products that detour “around the side”. Is HbA1c not an accurate enough predictor of long term progression and glycaemic control in diabetes? **Clinical Biochemist Reviews**, v. 26, n. 4, p. 123-134, 2005.

FOURIE, T. G.; SNYCKERS, F. O. A pentacyclic triterpene with anti-inflammatory and analgesic activity from the roots of *Commiphora merkeri*. **Journal of Natural Products**, v. 52, p. 1129–1131, 1989. DOI: 10.1021/np50066a040.

FRANCIS, G.; KEREM, Z.; MAKKAR, H. P.; BECKER, K. The biological action of saponins in animal systems: A review. **British Journal of Nutrition**, v. 88, p. 587–605, 2002. DOI: 10.1079/BJN2002713.

FRANCO, P. A. **Avaliação temporal da formação de produtos de glico-oxidação em sistema modelo in vitro de glicação proteica e prevenção por compostos fenólicos**. 2018. 56 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia-Bioquímica) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho”, São Paulo, 2018.

FRÉDÉRICH, M.; BENTIRES-ALJ, M.; TITS, M.; ANGENOT, L.; GREIMERS, R.; GIELEN, J.; BOURS, V.; MERVILLE, M. P. Isostrychnopentamine, na indolomonoterpenic alkaloid from *strychnos usambarensis*, induces cell cycle arrest and apoptosis in human colon cancer cells. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 304, p. 1103–1110, 2003.

FUKAYA, M.; RYU, K.; ITO, T. Isolation and Identification of Three New Iridoid Glucosides from the Aerial Parts of *Paederia Scandens*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 73, n. 3, p. 156–161, 2025. DOI: 10.1248/cpb.c24-00777.

FURTADO, N. A. J. C.; PIRSON, L.; EDELBERG, H.; MIRANDA, L. M.; LOIRA-PASTORIZA, C.; PREAT, V.; LARONDELLE, Y.; ANDRÉ, C. M. Pentacyclic Triterpene Bioavailability: An Overview of In Vitro and In Vivo Studies. **Molecules**, v. 22, art. 400, 2017. DOI: 10.3390/molecules22040400.

GAGANDEEP; MEERA; KALIDHAR, S. B. Chemical constituents of flowers of *Crataeva nurvala* (Buch-Ham). **National Journal of Plant Improvement**, v. 7, p. 95–96, 2005.

GAGANDEEP; MEERA; KALIDHAR, S. B. Chemical investigation of *Crataeva nurvala* Buch.-Ham. fruits. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 71, p. 129–130, 2009.

GALINDO, E. A. *et al.* Germinação e vigor de sementes de *Crataeva tapia* L. em diferentes temperaturas e regimes de luz. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, n. 1, p. 138–145, jan. 2012.

GALOTTA, A. L. Q. DE A.; BOAVENTURA, M. A. D. Constituintes químicos da raiz e do talo da folha do açaí (*Euterpe precatoria* Mart., Arecaceae). **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 610–613, 2005.

GARCEZ, F. R.; GARCEZ, W. S.; YOSHIDA, N. C.; FIGUEIREDO, P. O. A diversidade dos constituintes químicos da flora de Mato Grosso do Sul e sua relevância como fonte de substâncias bioativas. **Revista Virtual de Química**, v. 8, p. 97–129, 2016. DOI:10.5935/1984-6835.20160008.

GBD 2013 MORTALITY AND CAUSES OF DEATH COLLABORATORS. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. **The Lancet**, v. 385, p. 117-71, 2015.

GENET, C. Chiral light–chiral matter interactions: an optical force perspective. **ACS Photonics**, v. 9, n. 2, p. 319–332, 2022. DOI: 10.1021/acsphotonics.1c01130.

GIACCO, F.; BROWNLEE, M. Oxidative stress and diabetic complications. **Circulation Research**, v. 107, n. 9, p. 1058-1070, 2010. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.110.223545.

GIPREEL, N. T. Isolation, Purification and Elucidation of Stigmasterol and β -Sitosterol Glucosides from the Stems of *Solenostemma Argel* Grown in Sudan and Their Application as Insecticides. **Indian Journal of Pure & Applied Biosciences**, v. 9, n. 3, p. 27–31, 2021. DOI: 10.18782/2582-2845.8686.

GOH, S.-Y.; COOPER, M. E. The role of advanced glycation end products in progression and complications of diabetes. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 93, n. 4, p. 1143–1152, 2008. DOI: 10.1210/jc.2007-1817.

GOMES CASTRO, A. J.; CAZAROLLI, L. H.; SILVA FREDERICO, M. J.; DAMBRÓS, B. F.; DE CARVALHO, F. K.; DE MEDEIROS PINTO, V. A.; DA FONTE RAMOS, C.; FILIPPIN MONTEIRO, F. B.; PIZZOLATTI, M. G.; MENA BARRETO SILVA, F. R. Biological activity of $2\alpha,3\beta,23$ -trihydroxyolean-12-ene on glucose homeostasis. **European Journal of Pharmacology**, v. 907, p. 174250, 2021. DOI: 10.1016/j.ejphar.2021.174250.

GONZÁLEZ-CASTELAZO, F.; SORIA-JASSO, L. E.; TORREVILLALVAZO, I.; CARIÑO-CORTES, R.; MUÑOZ-PEREZ, V. M.; ORTIZ, M. I.; FERNANDEZ-MARTINEZ, E. Plants of the Rubiaceae family with effect on metabolic syndrome: constituents, pharmacology, and molecular targets. **Plants**, v. 12, n. 20, p. 3583, 2023. DOI: 10.3390/plants12203583.

GRAEL, C. F. F. *et al.* Avaliação do potencial antioxidante e do perfil fitoquímico de plantas medicinais do cerrado. **Scientia Plena**, v. 8, n. 4(a), art. 047201, 2012.

GUARIGUATA, L. *et al.* Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 103, p. 137-49, 2014.

GUDOITYTE, E.; ARANDARCIKAITE, O.; MAZEIKIENE, I.; BENDOKAS, V.; LIObIKAS, J. Ursolic and oleanolic acids: plant metabolites with neuroprotective potential. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, art. 4599, 2021. DOI: 10.3390/ijms22094599.

GULLY, C. P.; VELAZQUEZ-TORRES, G.; SHIN, J.-H.; FUENTES-MATTEI, E.; WANG, E.; CARLOCK, C.; CHEN, J.; ROTHENBERG, D.; ADAMS, H. P.; CHOI, H. H.; GUMA, S.; PHAN, L.; CHOU, P.-C.; SU, C.-H.; ZHANG, F.; CHEN, J.-S.; YANG, T.-Y.; YEUNG, S.-C. J.; LEE, M.-H. Aurora B kinase phosphorylates and instigates degradation of p53. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 24, 2012. DOI: 10.1073/pnas.1110287109.

GUO, H.; CHEN, T.; ZHU, H.; *et al.* Engineering amino acid residues of pentacyclic triterpene synthases for improving the activity. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 108, n. 1, 7 fev. 2024. DOI: 10.1007/s00253-024-13030-8.

GUPTA, R. *et al.* Antidiabetic and antioxidant potential of β -sitosterol in *streptozotocin*-induced experimental hyperglycemia. **Journal of Diabetes**, v. 3, n. 1, p. 29–37, 2011. DOI: 10.1111/j.1753-0407.2010.00107.x.

HALLIDAY, D.; RESNICK, R.; WALKER, J. W. *Fundamentos de Física – Ótica e Física Moderna*, v. 4. Rio de Janeiro: LTC, 2023.

HARBORNE, J. B. **Phytochemical Methods: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis**. 3. ed. London: Chapman & Hall, 1998.

HARRINGTON, E. A.; BEBBINGTON, D.; MOORE, J.; RASMUSSEN, R. K.; AJOSE-ADEOGUN, A. O.; NAKAYAMA, T.; GRAHAM, J. A.; DEMUR, C.; HERCEND, T.; DIU-HERCEND, A.; SU, M.; GOLEC, J. M. C.; MILLER, K. M. VX-680, a potent and selective small-molecule inhibitor of the *Aurora kinases*, suppresses tumor growth in vivo. **Nature Medicine**, v. 10, n. 3, p. 262–267, 2004. DOI: 10.1038/nm1003.

HILL, R. A.; CONNOLLY, J. D. Triterpenoids. **Natural Product Reports**, v. 35, p. 1294–1329, 2018. DOI: 10.1039/c8np00029h.

HILL, R. A.; CONNOLLY, J. D. Triterpenoids. **Natural Product Reports**, v. 37, p. 962–998, 2020. DOI: 10.1039/c9np00067d.

HOANG, V. D.; HUNG, N. K.; DUONG, P. Q.; TAN, C. V.; MINH, T. T. M.; MEU, N. T. T. Constituintes químicos do extrato de diclorometano das folhas de *Gardenia angkorensis*, seus citotóxicos e α -atividades de inibição da glicosidase. **Tropical Journal of Natural Product Research**, v. 8, n. 2, p. 6267–6271, fev. 2024. ISSN 2616-0684 (impresso); ISSN 2616-0692 (eletrônico).

HOFMANN, S. M. *et al.* Improved insulin sensitivity is associated with restricted intake of dietary glycoxidation products in the db/db mouse. **Diabetes**, v. 51, n. 7, p. 2082–2089, 2002. DOI: 10.2337/diabetes.51.7.2082.

HU, J.; YANG, G.-R.; JI, R.; LV, T.; LI, Q.; WANG, R. Cytotoxic Iridoid Glycosides from the Leaves of *Paederia Scandens*. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 26, n. 10, p. 1139–1146, 2024. DOI: 10.1080/10286020.2024.2358820.

HUANG, A. C.; JIANG, T.; LIU, Y. X.; BAI, Y.; BAI, Y. C.; QU, B.; GOOSSENS, A.; NUTZMANN, H. W.; BAI, Y.; OSBOURN, A. A specialized metabolic network selectively modulates *Arabidopsis* root microbiota. **Science**, v. 364, art. eaau6389, 2019. DOI: 10.1126/science.aau6389.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, v. 30, p. 103–114, 1987.

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS (INPE). Monitoramento dos focos ativos no país: comparação do total de focos ativos pelo satélite de referência em cada mês, no período de 1998 até 23/07/2024. Disponível em: <https://queimadas.dgi.inpe.br/queimadas/>. Acesso em: 30 ago. 2024.

JAAFAR, A.; ZULKIPLI, M. A.; HATTA, F. H. M.; JAHIDIN, A. H.; NASIR, N. A. A.; HASAN, M. H. Therapeutic potentials of iridoids derived from Rubiaceae against *in vitro* and *in vivo* inflammation: A scoping review. **Saudi Pharmaceutical Journal**, p. 101876, 2023. DOI: 10.1016/j.jsps.2023.101876.

JAIN, P. S.; BARI, S. B. Isolation of Lupeol, Stigmasterol and Campesterol from Petroleum Ether Extract of Woody Stem of *Wrightia tinctoria*. **Asian Journal of Plant Sciences**, v. 9, n. 4, p. 163–167, 2010. DOI: 10.3923/ajps.2010.163.167.

JEREZANO, A.; JIMENEZ, F.; CRUZ, M. C.; MONTIEL, L. E.; DELGADO, F.; TAMARIZ, J. New approach for the construction of the coumarin frame and application in the total synthesis of natural products. **Helvetica Chimica Acta**, v. 94, p. 185–198, 2011.

JHA, A.; NAIDU, A. B.; ABDELKHALIK, A. M. A new route to aza-sugars via a stereoselective multicomponent reaction. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 11, n. 44, p. 7559–7566, 2013. DOI: 10.1039/c3ob41706a.

JIANG, Y.; CHEN, L.; ZENG, J.; WANG, Y.; CHEN, Y.; CHEN, S.; XU, J.; HE, X. Anti-Inflammatory Monoterpenes from *Morinda* (*Morinda Officinalis* How.). **Phytochemistry**, v. 220, p. 114034, 2024. DOI: 10.1016/j.phytochem.2024.114034.

JOSEPH, P.; CLAUDE, J. P.; ABATI, Y. «Some considerations on the medicinal botany of the lesser Antilles: The case of Martinique». University of the French West Indies, UMR Espace Dev - Bioreca. **Journal of Medicinal Plants Studies**, v. 12, n. 4, part A, 2024. DOI: 10.22271/plants.2024.v12.i4a.1692.

JOSHI, R. K. Bioactive Usual and Unusual Triterpenoids Derived from Natural Sources Used in Traditional Medicine. **Chemistry & Biodiversity**, v. 20, n. 2, 24 jan. 2023. DOI: 10.1002/cbdv.202200853.

KAGISHA, V.; MARINI DJANG'EING'A, R.; MUGANGA, R.; BONNET, O.; TCHINDA, A. T.; JANSEN, O.; FREDERICH, M. *Pentas longiflora* Oliv. (Rubiaceae), a plant used in the treatment of *Pityriasis Versicolor* in Rwanda: Chemical composition and standardization of leaves and roots. **Fitoterapia**, v. 153, p. 104974, 2021. DOI: 10.1016/j.fitote.2021.104974.

KALAPOPOS, M. P. Methylglyoxal in living organisms: chemistry, biochemistry, toxicology and biological implications. **Toxicology Letters**, v. 110, p. 145–175, 1999.

KAROU, S. D.; TCHACONDO, T.; ILBOUDO, D. P.; SIMPORE, J. Sub-Saharan Rubiaceae: A Review of their traditional uses, phytochemistry and biological activities. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 14, p. 149–169, 2011.

- KHAN, Z. A. *et al.* Multifunctional roles and pharmacological potential of β -sitosterol: Emerging evidence toward clinical applications. **Chemico-Biological Interactions**, v. 365, p. 110117, 2022.
- KOMJÁTI, B.; URAI, A.; HOSZTAFI, S.; KÖKÖSI, J.; KÓVÁTS, B.; NAGY, J.; HORVÁTH, P. Spectroscopic and computational studies on chiral interactions of amino acids. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 155, p. 95–102, 2016. DOI: 10.1016/j.saa.2015.10.030.
- KOSTOVA, I.; BHATIA, S.; GRIGOROV, P.; BALKANSKY, S.; PARMAR, V. S.; PRASAD, A. K.; SASO, L. Coumarins as Antioxidants. **Current Medicinal Chemistry**, v. 18, p. 3929–3951, 2011.
- LAGUNIN, A. A.; DUBOVSKAJA, V. I.; RUDIK, A. V.; POGODIN, P. V.; DRUZHILOVSKIY, D. S.; GLORIOZOVA, T. A.; FILIMONOV, D. A.; SASTRY, N. G.; POROIKOV, V. V. CLC-Pred: A freely available web-service for *in silico* prediction of human cell line cytotoxicity for drug-like compounds. **PLoS ONE**, v. 13, p. e0191838, 2018. DOI: 10.1371/journal.pone.0191838.
- LAHLOU, E. H.; HIRAI, N.; KAMO, T.; TSUDA, M.; OHIGASHI, H. Actinidic acid, a new triterpene phytoalexin from unripe kiwi fruit. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 65, n. 2, p. 480–483, fev. 2001. DOI: 10.1271/bbb.65.480.
- LAKSHMI, M.; CHAUHAN, J. Triterpenoids and related compounds from *Crataeva nurvala*. **Planta Medica**, v. 27, n. 03, p. 254–256, 1975.
- LEMOIGNE, N.; MAITI, D.; BHATTACHARJEE, B.; KUMAR SINGHA, A.; GHOSH, R.; DE, C. Antimicrobial, antioxidant and anti α -glucosidase activities of the leaf extract from *Mussaenda roxburghii* Hook. f. (Rubiaceae). **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 2, p. 3216–3228, 2015.
- LESLIE, R. D. *et al.* Level of an advanced glycated end product is genetically determined: a study of normal twins. **Diabetes**, v. 52, n. 9, p. 2441–2444, 2003. DOI: 10.2337/diabetes.52.9.2441.
- LEWIS, J. B. *et al.* Inhibition of the receptor for advanced glycation end-products (RAGE) protects from secondhand smoke (SHS)-induced intrauterine growth restriction IUGR in mice. **Cell and Tissue Research**, v. 370, n. 3, p. 513–521, 2017. DOI: 10.1007/s00441-017-2691-z.
- LI, C.; SU, X.; LI, F.; FU, J.; WANG, H.; LI, B.; CHEN, R.; KANG, J. Cytotoxic quinones from the aerial parts of *Morinda umbellata* L. **Phytochemistry**, v. 167, p. 112096, nov. 2019.
- LI, Y.; WANG, T.; WANG, H.; WANG, Q.; CAI, C.-H.; ZHU, G.-P.; MEI, W.-L.; XU, F.-Q.; DAI, H.-F.; HUANG, S.-Z. Naucloffines A and B, Two Novel Monoterpenoid Indole Alkaloids from the Li Folk Herb *Nauclea Officinalis* with Anti-Allergic Inflammatory Effects on RBL-2H3 Cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 344, p. 119533, 2025. DOI: 10.1016/j.jep.2025.119533.
- LIN, R. Y. *et al.* Lowering of dietary advanced glycation endproducts reduces neointimal formation after arterial injury in genetically hypercholesterolemic mice. **Atherosclerosis**, v. 163, n. 2, p. 303–311, 2002. DOI: 10.1016/S0021-9150(02)00008-4.
- LIU, G.; QIN, P.; CHENG, X.; *et al.* Ursolic acid: biological functions and application in animal husbandry. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 10, art. 125124, 25 out. 2023. DOI: 10.3389/fvets.2023.125124.

- LIU, J.; YIN, X.; KOU, C.; *et al.* Classification, biosynthesis, and biological functions of triterpene esters in plants. **Plant Communications**, v. 5, n. 4, p. 100845, abr. 2024. DOI: 10.1016/j.xplc.2024.100845.
- LIU, Z.; SHANG, Q.; CHENG, J.; *et al.* Mechanistic study of a triterpenoid-enriched fraction derived from *Cynomorium songaricum* against NAFLD: An integrative elucidation. **Phytomedicine**, v. 142, p. 156782, jul. 2025. DOI: 10.1016/j.phymed.2025.156782.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002.
- LORENZI, H.; SOUZA, H. M. **Plantas Ornamentais no Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras**. Instituto Plantarum, Nova Odessa, São Paulo, Brasil, 1999. p. 955.
- LORIN, M.; DELÉPÉE, R.; RIBET, J.-P.; MORIN, P. Validation of a method using an achiral liquid chromatography sorbent and a circular dichroism detector. **Journal of Chromatography A**, v. 1141, n. 2, p. 244–250, 2007. DOI: 10.1016/j.chroma.2006.12.036.
- MAFFEI, M. E.; GERTSCH, J.; APPENDINO, G. Plant volatiles: production, function and pharmacology. **Natural Product Reports**, v. 28, p. 1359–1380, 2011. DOI: 10.1039/c1np00029h.
- MAGALHÃES, C. DOS S. *et al.* Morphoanatomy, Histochemistry, and Phytochemistry of Stem and Leaves of *Crateva tapia* L. **Microscopy and Microanalysis**, v. 29, n. 2, p. 795–801, 2023.
- MAHATO, S. B.; KUNDU, A. P. ¹³C NMR Spectra of pentacyclic triterpenoids—a compilation and some salient features. **Phytochemistry**, v. 37, n. 6, p. 1517–1575, dez. 1994.
- MAHATO, S. B.; SEN, S. Advances in triterpenoid research, 1990–1994. **Phytochemistry**, v. 44, n. 7, p. 1185–1236, 1997. DOI: 10.1016/s0031-9422(96)00639-5.
- MAIA, G. L. A. **CONTRIBUIÇÃO AO CONHECIMENTO QUÍMICO DE ESPÉCIES DA FAMÍLIA ASTERACEA (*Verbesina macrophylla* (Cass.) S. F. BLAKE e *Praxelis clematidea* R. M. King & Robinson)**. Tese de doutorado. Universidade Federal da Paraíba, 2011.
- MAINA, M. B.; AL-HILALY, Y. K.; SERPELL, L. C. Dityrosine *cross-linking* and its potential roles in Alzheimer’s disease. **Frontiers in Neuroscience**, v. 17, art. 1132670, 2023. DOI: 10.3389/fnins.2023.1132670.
- MARIA, T. R. B. C.; BIONDI, D.; BEHLING, A.; SOUSA, N. J. Influência da poda nos defeitos estruturais de *Ficus benjamina* na Floresta Urbana de Itanhaém – São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Arborização Urbana**, v. 16, n. 2, p. 1–19, 2021. DOI: 10.5380/revsbau.v16i2.80863.
- MARINHO, J. B. M. *et al.* Uso da moringa na alimentação animal e humana: revisão. **Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 10, n. 8, p. 580–635, 2016.
- MARTÍNEZ CROVETTO, R. Las plantas utilizadas em medicina popular en el noroeste de Corrientes (República Argentina). **Miscelánea Fundación Miguel Lillo**, v. 69, p. 1–139, 1981.
- MARTINS, D.; NUNEZ, C. Secondary metabolites from rubiaceae species. **Molecules**, v. 20, n. 7, p. 13422–13495, 2015. DOI: 10.3390/molecules200713422.
- MATEFO, I. O. T.; JUMETA, K. J. D.; TCHEGNITEGNI, B. T.; EFANGE, N. M.; AYONG, L.; FONGANG, Y. S. F.; BANKEU, J. J. K.; CHOUNA, J. R.; SEWALD, N.; LENTA, B. N.

- Homoflavonoids and Other Constituents from *Brenania Brieyi* De Wild (Rubiaceae) with Their Bioactivities. **Phytochemistry Letters**, v. 66, p. 1–8, 2025. DOI: 10.1016/j.phytol.2025.01.1000.
- MATOS, B. C. da S.; LIMA, M. C. de. Efeito Faraday: entre a atividade óptica natural e a teoria dos elétrons. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 44, 2022. DOI: 10.1590/1806-9126-rbef-2021-0395.
- MEEPROM, A. *et al.* Isoferulic acid, a new anti-glycation agent, inhibits fructose- and glucose-mediated protein glycation in vitro. **Molecules**, v. 18, n. 6, p. 6439–6454, 2013. DOI: 10.3390/molecules18066439.
- MENTZ, L. A.; LUTZEMBERGER, L. C.; SCHENKEL, E. P. Da flora medicinal do Rio Grande do Sul: notas sobre a obra de D’Avila (1910). **Caderno de Farmácia**, v. 13, n. 1, p. 25–48, 1997.
- MILES, A. J.; JANES, R. W.; WALLACE, B. A. Tools and methods for circular dichroism spectroscopy of proteins: a tutorial review. **Chemical Society Reviews**, v. 50, n. 15, p. 8400–8413, 2021. DOI: 10.1039/d0cs00558d.
- MORRISON, R. T.; BOYD, R. N. *Química orgánica*. 4. ed. trad. da 4. ed. estadounidense. Madrid: Addison-Wesley Iberoamericana, 1987. Obra original publicada por Allyn and Bacon, Inc., Boston, EUA, 1983, p. 127.
- MORS, W. B.; RIZZINI, C. T.; PEREIRA, N. A. **Medicinal plants of Brazil**. Algonac, MI: Reference Publications, Inc., 2000.
- MOTTA, B. P. *et al.* In vitro inhibition of protein glycation and advanced glycation end products formation by hydroethanolic extract and two fractions of *Simaba trichilioides* roots. **Natural Product Research**, p. 1–5, 2020. DOI: 10.1080/14786419.2020.1843054.
- MOURA, V. M.; SANTOS, A. R.; NURNBERG, V.; SOUZA, M. C.; SANTIN, S. M. O. Iridoid glycosides from *Galianthe brasiliensis*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 33, p. 451–453, 2005.
- MOURA, V. M.; SANTOS, D. P.; SANTINI, S. M. O. Constituintes químicos de *Galianthe brasiliensis* (Rubiaceae). **Química Nova**, v. 29, n. 3, p. 452–455, 2006.
- MUNGUÍA, Q. F. B. **Mecanismos opioides que participan a nivel supraespinal el la potenciación del efecto antinociceptivo de la combinación tramadol + cafeína em el modelo de la formalina**. 2007. 79 p. Dissertação (Mestrado) – Universidad de Colima, Facultad de Medicina, Colima, 2007.
- NAKAGAWA, T. *et al.* Protective activity of green tea against free radical- and glucose-mediated protein damage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 8, p. 2418–2422, 3 mar. 2002. DOI: 10.1021/jf011339n.
- NASCIMENTO, C.O. *et al.* Optimized extraction of a lectin from *Crataeva tapia* bark using AOT in isooctane reversed micelles. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 7, p. 779–782, 2008.
- NEESE, F. ORCA quantum chemistry program, version 4.1.1; Max Planck Institute for Coal Research: Mülheim an der Ruhr, Germany, 2019.
- NETO, G. G.; GUARIM, M. *et al.* Etnobotânica no Pantanal: o saber botânico tradicional pantaneiro. **Flovet**, v. 2, n. 1, p. 1–68, 2010.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 3, p. 770–803, 2020. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.9b01285.

NISTOR, M.; RUGINA, D.; DIACONEASA, Z.; *et al.* Pentacyclic Triterpenoid Phytochemicals with Anticancer Activity: Updated Studies on Mechanisms and Targeted Delivery. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 16, p. 12923, 18 ago. 2023. DOI: 10.3390/ijms241612923.

NKOUAYEB NANGMOU, B. M.; MAZA DJOMKAM, H. L.; BELLIER TABEKOUENG, G.; TÉKAPI TSOPGNI, W. D.; MBAHBOU BITCHAGNO, G. T.; MBOCK, M. A.; KAMKUMO, R. G.; FRESE, M.; NDJAKOU LENTA, B.; NGOUELA, S. A.; SEWALD, N.; BLAISE AZEBAZE, A. G. Bioguided Fractionation and Isolation of an Antiplasmodial Saponin from the Roots of *Nauclea xanthoxylon* (A.Chev.) Aubrév. (Rubiaceae). **Chemistry & Biodiversity**, v. 20, n. 4, 22 mar. 2023.

NOWOTNY, K. Advanced glycation end products and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus. **Biomolecules**, v. 5, n. 1, p. 194–222, 2015. DOI: 10.3390/biom5010194.

NUNES, N.N.S. *et al.* Potential of the Lectin/Inhibitor Isolated from *Crataeva tapia* Bark (CrataBL) for Controlling *Callosobruchus maculatus* Larva Development. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 48, p. 10431–10436, 2015.

OLDONI, T. L. C.; MERLIN, N.; KARLING, M.; CARVALHO, T.; COELHO, M. D. G.; LIMA, V. R.; SCHNEIDER, T.; SILVA, S. Antihyperglycemic activity and bioguided isolation of phenolic compounds with antioxidant and cytotoxic properties from *Syzygium malaccense* leaves. **Fitoterapia**, v. 181, p. 106357, 2025. DOI: 10.1016/j.fitote.2024.106357.

OLIVEIRA, A. M. de. **Avaliação da toxicidade aguda e subaguda e efeitos antinociceptivo, antipirético e anti-obesidade de extrato do caule de *Pilosocereus gounellei***. 2019. Tese (Doutorado em Bioquímica e Fisiologia) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2019.

OLIVEIRA, P. de A. **Avaliação do potencial anti-nociceptivo e antiinflamatório do ácido pipérico**. 2016. 68 f. Dissertação (Mestrado Multicêntrico em Ciências Fisiológicas) – Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

OLIVEIRA, R. B.; *et al.* Avaliação das atividades antiinflamatória e analgésica de extrato de *Synadenium umbellatum*. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 2, n. 2, p. 137–139, 2005.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Medicina Tradicional. Ficha informativa, 134, 2003-2005, 2008. Disponível em: <www.who.int/medicentre/factsheets/fs134/en>. Acesso em: 25 nov. 2024.

OTA, A.; ULRICH, N. P. An overview of herbal products and secondary metabolites used for management of type two diabetes. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, art. 436, 2017. DOI: 10.3389/fphar.2017.00436.

PAIVA, A. M. de; GERMANO FILHO, P.; PEREIRA-MOURA, M. V. L. Rubiaceae ornamentais do Campus da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, R.J. **Floresta e Ambiente**, v. 16, n. 1, p. 39–46, 2009. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/floram/a/sg9dptyLDRCjZRC6x4bKRQN/>.

PATIL, A. *et al.* Pharmacognostic standardization and HPTLC fingerprint of *Crataeva tapia* L. seeds. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, p. 987–999, 2014.

PATIL, A. G. *et al.* Pharmacognostical standardization and HPTLC fingerprint of *Crataeva tapia* Linn. ssp. odora (Jacob.) Almeida leaves. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 1, n. 2, p. 01–08, 2010.

PATIL, U. H.; GAIKWAD, D. K. Differential bactericidal potential and phytochemical evaluation of *Crataeva religiosa* stem bark. **IJPRD**, v. 2, n. 11, p. 82–88, jan. 2012.

PEPPA, M. *et al.* Adverse effects of dietary glycotoxins on wound healing in genetically diabetic mice. **Diabetes**, v. 52, n. 11, p. 2805–2813, 1 nov. 2003. DOI: 10.2337/diabetes.52.11.2805.

PEPPA, M.; URIBARRI, J.; VLASSARA, H. Glucose, advanced glycation end products, and diabetes complications: what is new and what works. **Clinical Diabetes**, v. 21, n. 4, p. 186–187, 2003.

PEREIRA JUNIOR, R. C. **Estudo fitoquímico e avaliação da potencialidade farmacológica de extratos de *Crataeva benthamii* (Capparaceae)**. 2005. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2005.

PESHIN, T.; KAR, H. Isolation and Characterization of β -Sitosterol-3-O- β -D-Glucoside from the Extract of the Flowers of *Viola Odorata*. **British Journal of Pharmaceutical Research**, v. 16, n. 4, p. 1–8, 2017. DOI: 10.9734/bjpr/2017/33160.

PHAM, N. K. T.; NGUYEN, T. D. H.; NGUYEN, T. M. C.; NGUYEN, G. D.; HUYNH, C. D.; VO, T. N.; NGUYEN, T. Q. T.; DUONG, T. H.; DANG, V. S.; HUYNH, B. L. C.; TRAN, T. N. M.; NGUYEN, T. P. Lasibidoupins A and B, two new compounds from the stems of *Lasianthus bidoupensis* V.S. Dang & Naiki. **Natural Product Research**, v. 37, n. 3, p. 455–461, 20 set. 2021.

PHILIPPE, G.; DEMOL, P.; ANGENOT, L.; TITS, M.; FRÉDÉRICH, M. *In vivo* antimalarial activity of isosungucine, an indolomonoterpenic alkaloid from *Strychnos icaja*. **Planta Medica**, v. 73, p. 478–479, 2007.

PHILIPPE, G.; NGUYEN, L.; ANGENOT, L.; FRÉDÉRICH, M.; MOONEN, G.; TITS, M.; RIGO, J. M. Study of the interaction of antiplasmodial strychnine derivatives with the glycine receptor. **European Journal of Pharmacology**, v. 530, p. 15–22, 2006.

PHILLIPS, D. R.; RASBERY, J. M.; BARTEL, B.; MATSUDA, S. P. Biosynthetic diversity in plant triterpene cyclization. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 9, p. 305–314, 2006.

PISHA, E.; CHAI, H.; LEE, I. S.; CHAGWEDERA, T. E.; FARNSWORTH, N. R.; CORDELL, A. C.; BEECHER, C. W. W.; FONG, H. H. S.; KINGHORN, A. D.; BROWN, D. M.; *et al.* Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis. **Nature Medicine**, v. 1, p. 1046–1051, 1995. DOI: 10.1038/nm1095-1046.

PONNULAKSHMI, R. *et al.* *In silico* and *in vivo* analysis to identify the antidiabetic activity of beta-sitosterol in adipose tissue of high fat diet and sucrose induced type-2 diabetic experimental rats. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 29, n. 3, p. 276–290, 2019. DOI: 10.1080/15376516.2019.1624822.

PRATIWI, R. A.; NANDIYANTO, A. B. D. How to read and interpret UV-VIS spectrophotometric results in determining the structure of chemical compounds. **Indonesian Journal of Educational Research and Technology**, v. 2, n. 1, p. 1–20, 2022. DOI: 10.17509/ijert.v2i1.35171.

- PUTRI, D. M.; JUNAEDI, D. I.; HENDRIAN, R. Ornamental plant's potentials of Indonesian native Rubiaceae collected in Cibodas Botanical Garden. **International Journal of Agriculture System**, v. 9, n. 1, p. 1–9, 2021. DOI: 10.20956/ijas.v9i1.2718.
- RASHEED, H. M.; *et al.* Isolation of oleanolic acid from *Lavandula stoechas* and its potent anticancer properties against MCF-7 cancer cells via induced apoptosis. **Journal of King Saud University – Science**, v. 35, n. 2, p. 102454, 2023.
- RAZAFIMANDIMBISON, S. G.; RYDIN, C. Phylogeny and classification of the coffee family (Rubiaceae, Gentianales): Overview and outlook. **Taxon**, v. 73, n. 3, p. 673–717, 2024. DOI: 10.1002/tax.13167.
- RAZAVI, S. M.; NAZEMIYEH, H.; HAJIBOLAND, R.; KUMARASAMY, Y.; DELAZAR, A.; NAHAR, L.; SARKER, S. D. Cumarinas das partes aéreas de *Prangos uloptera* (Apiáceas). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 1–5, 2008.
- REICHARDT, L.; BORTOLUZZI, R.; BASTOS-PEREIRA, A. L. Atividade antinociceptiva da *Galianthe palustris*. **Resumo apresentado no 32º Seminário de Iniciação Científica da UDESC**, Florianópolis, SC, 2022.
- ROBERTS, S. C. Production and engineering of terpenoids in plant cell culture. **Nature Chemical Biology**, v. 3, n. 7, p. 387–395, 2007. DOI: 10.1038/nchembio0707-387.
- RODRIGUES, F. C.; MORAIS-BRAGA, M. F. B.; ALMEIDA-BEZERRA, J. W.; *et al.* Chemical composition and antimicrobial activity of *Cordia myrciifolia* leaves against pathogenic bacteria and fungi: Drug potentiation ability and inhibition of virulence. **Fitoterapia**, v. 176, p. 106027, jul. 2024. DOI: 10.1016/j.fitote.2024.106027.
- RODRIGUES, S. M. **Avaliação do potencial antioxidante e antiglicação *in vitro* de extrato da entrecasca do caule de *Crataeva tapia* L.** Araraquara: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2024.
- ROGERS, D. M.; JASIM, S. B.; DYER, N. T.; AUVRAY, F.; RÉFRÉGIERS, M.; HIRST, J. D. Electronic circular dichroism spectroscopy of proteins. **Chem**, v. 5, n. 11, p. 2751–2774, 2019. DOI: 10.1016/j.chempr.2019.07.008.
- ROHMAN, A.; SUGENG, R.; DIAH, U. Antioxidant activity, total phenolics and flavonoid contents of ethyl acetate extract and its fractions. **Indonesian Journal of Pharmacy**, v. 17, p. 136–142, 2006.
- ROOS, G.; ROOS, C. *Isomers and stereochemistry*. In: *Organic Chemistry Concepts*; Elsevier, 2015; p. 43–54.
- ROY, D.; BRAR, S.; BHATIA, R.; RANGRA, N. K. An insight into the ethnopharmacological importance of Indian subcontinent medicinal plant species of Rubiaceae family. **ADV TRADIT MED (ADTM)**, 2023. DOI: 10.1007/s13596-023-00714-1.
- RUPP, B. CD spectropolarimetry (circular dichroism) para cromóforos. 2008. Disponível em: https://hackert.cm.utexas.edu/courses/ch370/old2008/CD/CD_Rupp.htm. Acesso em: 15 mar. 2025.
- RUSHDAN, N. A. N. A.; AB GHANI, N.; RASOL, N. E. Review on anthraquinones isolated from Rubiaceae family. **Journal of Science and Mathematics Letters**, v. 11, p. 163–174, 2023. DOI: 10.37134/jsml.vol11.sp.18.2023.
- SADOWSKA-BARTOSZ, I.; GALINIAK, S.; BARTOSZ, G. Kinetics of glycoxidation of bovine serum albumin by methylglyoxal and glyoxal and its prevention by various compounds. **Molecules**, v. 19, n. 4, p. 4880–4896, 2014. DOI: 10.3390/molecules19044880.

- SALAS, R. M.; CABRAL, E. L.; FLORENTÍN, J. E.; FADER, A. A. C.; SOUZA, E. B.; NEPOMUCENO, F. A. A.; CARMO, J. A. M.; MIGUEL, L. M.; NUÑEZ FLORENTÍN, M.; NICORA CHEQUIN, R.; SOBRADO, S. V. *Galianthe* in Flora e Funga do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, 2020. Disponível em: <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB38843>. Acesso em: 22 jun. 2024.
- SAMMARITANO, M. A.; VERA, M. G.; COMETTO, P. M.; TEJERO, T. N.; BAUERFELDT, G. F.; MELLOUKI, A. Insights into the chiroptical properties of nicotine and its derivatives: A joint experimental and theoretical study. **Chemical Physics Letters**, v. 755, art. 137757, 2020. DOI: 10.1016/j.cplett.2020.137757.
- SANTIVÁÑEZ, J. C. M.; FIGUEIREDO ANGOLINI, C. F. The genus *Palicourea* Aubl. (Rubiaceae): source of bioactive compounds. **Natural Product Research**, p. 1–15, fev. 2025. DOI: 10.1080/14786419.2024.2449510.
- SANTOS, E. F. dos *et al.* Quantificação de compostos bioativos e potencial antioxidante total de fruteiras nativas de Alagoas. **Revista Ouricuri**, v. 10, n. 2, 2020.
- SANTOS, T. C. *et al.* Frutos da Caatinga de Sergipe utilizados na alimentação humana. **Scientia Plena**, v. 8, n. 4(a), 2012.
- SEEBACHER, W.; SIMIC, N.; WEIS, R.; SAF, R.; KUNERT, O. Complete Assignments of ¹H and ¹³C NMR Resonances of Oleanolic Acid, 18 α -oleanolic Acid, Ursolic Acid and Their 11-oxo Derivatives. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 41, n. 8, p. 636–638, 2003. DOI: 10.1002/mrc.1214.
- SÉRO, L. *et al.* Tuning a 96-well microtiter plate fluorescence-based assay to identify AGE inhibitors in crude plant extracts. **Molecules**, v. 18, p. 14320–14339, 2013. DOI: 10.3390/molecules181214320.
- SHAHARYAR, M. A.; BANERJEE, T.; SENGUPTA, M.; *et al.* Monotherapy or Combination Therapy of Oleanolic Acid? From Therapeutic Significance and Drug Delivery to Clinical Studies: A Comprehensive Review. **Planta Medica**, v. 91, n. 06/07, p. 306–319, 7 jan. 2025. DOI: 10.1055/a-2510-9958.
- SHAHIDI, F.; ZHONG, Y.; CHANDRASEKARA, A. Antioxidants and human health. In: YU, L. L.; TSAO, R.; SHAHIDI, F. (eds.). **Cereals and pulses: nutraceutical properties and health benefits**. Chichester: John Wiley & Sons, 2012. p. 273–308.
- SHARMA, P. *et al.* *Crataeva tapia* Linn. – An important medicinal plant: a review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacological properties. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 2, n. 6, p. 582–589, 2013.
- SHARMA, P. *et al.* Method development and validation for quantification of lupeol from bark of *Crataeva tapia* L. using HPTLC. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, p. 217-219, 2016.
- SHARMA, P. *et al.* Quantification of β -sitosterol from field-grown plants and callus of *Crataeva tapia* L. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 7, p. 1556–1563, 2016.
- SHEN, N. *et al.* Plant flavonoids: classification, distribution, biosynthesis, and antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 383, art. 132531, 2022. DOI: 10.1016/j.foodchem.2022.132531.
- SHEN, Q.; WANG, L.; ZHOU, H.; JIANG, H.; YU, L.; ZENG, S. Stereoselective binding of chiral drugs to plasma proteins. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 34, p. 998–1006, 2013.

- SHENG, Z. *et al.* Phytosterols in banana (*Musa* spp.) flower inhibit α -glucosidase and α -amylase hydrolyses and glycation reaction. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 52, n. 1, p. 171–179, 2016. DOI: 10.1111/ijfs.13263.
- SHERMAN, S. I. Anaplastic carcinoma. In: WARTOFISKY, L. (ed.). **Thyroid cancer – A comprehensive guide to clinical management**. New York: Springer, 2000. p. 319–325.
- SHI, B.-B.; XU, F.; ZHANG, G.-R.; HE, Y.; LIU, Q.; FENG, M.-L.; LI, Z.-H.; LIU, J.-K. Glucoconjugated Monoterpene Indole Alkaloids with Xanthine Oxidase Inhibitory Activity from *Ophiorrhiza Japonica*. **Phytochemistry**, v. 224, p. 114169, 2024. DOI: 10.1016/j.phytochem.2024.114169.
- SIDDIQUI, S.; HAFEEZ, F.; BEGUM, S.; SIDDIQUI, B. S. Kaneric acid, a new triterpene from the leaves of *Nerium oleander*. **Journal of Natural Products**, v. 49, n. 6, p. 1086–1090, nov. 1986. DOI: 10.1021/np50047a032.
- SIKARWAR, M. S.; PATIL, M. B. Antidiabetic activity of *Crataeva nurvala* stem bark extracts in alloxan-induced diabetic rats. **Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences**, v. 2, n. 1, p. 18–22, 2010. DOI: 10.4103/0975-7406.67003.
- SILVA SANTOS, M. F.; LAIA, A. S. Abordagem quantitativa da polarização da luz: explorando a lei de Malus com o aplicativo PhyPhox. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 45, 2023. DOI: 10.1590/1806-9126-rbef-2022-0320.
- SILVA, D. F.; SILVA, C. A. P.; OLIVEIRA, L. A. R.; SILVA, V. A.; QUEIROZ, C. A.; BRANDÃO, H. N. Isolamento e identificação de metabólitos secundários de *Polygala boliviensis* A.W. Benn (Polygalaceae). **Revista RG News**, v. 8, n. 2, p. 102–109, 2022.
- SILVA, F. C. O.; *et al.* Bioatividades de triterpenos isolados de plantas: Uma breve revisão. **Revista Virtual de Química**, v. 12, p. 234–247, 2020.
- SILVA, P. C. da. **Perfil fitoquímico de extrato bruto etanólico de Crataeva tapia L. (Capparidaceae)**. 2014. Relatório Final de Iniciação Científica, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2014.
- SIMPSON, M. G. Diversity and Classification of Flowering Plants: Eudicots. In: **Plant Systematics**. Elsevier, 2010, p. 392–400. DOI: 10.1016/b978-0-12-374380-0.50008-7.
- SINGH, R. *et al.* Advanced glycation end-products: a review. **Diabetologia**, v. 44, n. 2, p. 129–146, 2001. DOI: 10.1007/s001250051591.
- SOARES NETO, R. L.; JARDIM, J. G. Capparaceae no Rio Grande do Norte, Brasil. **Rodriguésia**, v. 66, n. 3, p. 847–857, 2015. DOI: 10.1590/2175-7860201566036.
- Soares Neto RL & Luber J (2020) Capparaceae em BFG - The Brazil Flora Group (2018) Flora Brasileira 2020: inovação e colaboração para atingir a Meta 1 da Estratégia Global para a Conservação de Plantas (GSPC). *Rodriguésia* 69: 1513-1527
- SOARES, P.; CAMESELLE-TEIJEIRO, J.; SOBRINHO-SIMÕES, M. Immunohistochemical detection of p53 in differentiated, poorly differentiated and undifferentiated carcinoma of the thyroid. **Histopathology**, v. 24, p. 205–210, 1994.
- SOHAG, A. A. M.; HOSSAIN, M. T.; RAHAMAN, M. A.; RAHMAN, P.; HASAN, M. S.; DAS, R. C.; KHAN, M. K.; SIKDER, M. H.; ALAM, M.; UDDIN, M. J.; *et al.* Molecular pharmacology and therapeutic advances of the pentacyclic triterpene Lupeol. **Phytomedicine**, v. 99, p. 154012, 2022.

SONAL, P.; MAITREYI, Z. Asian Journal of Traditional Medicine, v. 6, p. 61, 2011. Acesso em: jul. 2024.

SONG, N.-Y.; CHO, J.-G.; IM, D.; LEE, D.-Y.; WU, Q.; SEO, W.-D.; KANG, H. C.; LEE, Y.-H.; BAEK, N.-I. Triterpenoids from *Fragaria ananassa* calyx and their inhibitory effects on melanogenesis in B16-F10 mouse melanoma cells. **Natural Product Research**, v. 27, n. 23, p. 2219–2223, dez. 2013. DOI: 10.1080/14786419.2013.829716.

SOUSA, L. D. N. de. **Importância do trapiá (*Crataeva tapia*) como fonte de alimento para abelhas africanizadas e nativas**. 2019. 27 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Zootecnia) – Departamento de Zootecnia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2019.

SOUZA, L. G. S.; ALMEIDA, M. C. S.; LEMOS, T. L. G.; RIBEIRO, P. R. V.; CANUTO, K. M.; BRAZ-FILHO, R.; DEL CISTIA, C. N.; SANT'ANNA, C. M. R.; BARRETO, F. S.; DE MORAES, M. O. Brazoides A-D, New Alkaloids from *Justicia gendarussa* Burm. F. Species. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 7, p. 1281–1287, 2017. DOI: 10.21577/0103-5053.20160291.

STUTZ, C.; FONTÃO, A. P. G. A.; SILVA, G. W. de S.; *et al.* Betulinic Acid Acts in Synergism with Imatinib Mesylate, Triggering Apoptosis in MDR Leukemia Cells. **Planta Medica**, v. 91, n. 01/02, p. 19–28, 12 out. 2024. DOI: 10.1055/a-2440-4847.

SUBHASWARAJ, P.; SOWMYA, M.; BHAVANA, V.; DYAVAIAH, M. Determination of antioxidant activity of *Hibiscus sabdariffa* and *Croton caudatus* in *Saccharomyces cerevisiae* model system. **Journal of Food Science and Technology**, v. 54, p. 2728–2736, 2017.

SUDHARSHAN, S. J.; KRISHNA NARAYANAN, A.; PRINCILLY, J.; DYAVAIAH, M.; NAGEGOWDA, D. A. Betulinic acid mitigates oxidative stress-mediated apoptosis and enhances longevity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* model. **Free Radical Research**, v. 56, p. 699–712, 2022.

TAN, Y. S.; BASKARAN, A.; NALLATHAMBY, N.; CHUA, K. H.; KUPPUSAMY, U. R.; SABARATNAM, V. Influence of customized cooking methods on the phenolic contents and antioxidant activities of selected species of oyster mushrooms (*Pleurotus* spp.). **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, p. 3058–3064, 2015.

TANG, W. *et al.* Anti-diabetic activity of chemically profiled green tea and black tea extracts in a type 2 diabetes mice model via different mechanisms. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 4, p. 1784–1793, 2013. DOI: 10.1016/j.jff.2013.08.007.

TEJERO, T. N.; BAUERFELDT, G. F. Conformational and chiroptical properties of the alkaloid (R)-(+)-vasicinol. **Arkivoc**, v. 2020, part ii, p. 20–30, 2020. DOI: 10.24820/ark.5550190.p011.233.

THIMMAPPA, R.; GEISLER, K.; LOUVEAU, T.; O'MAILLE, P.; OSBOURN, A. Biossíntese de triterpenos em plantas. **Annual Review of Plant Biology**, v. 65, p. 225–257, 2014. DOI: 10.1146/annurev-arplant-050312-120229.

TOLSARWAD, G. S.; MAHESH, M. B.; SHRIKRUSHNA, A. S. Potential pharmacognostic interventions of *Crataeva nurvala*: A pharmacological view. **Innovations in Pharmacy and Pharmacotherapy**, v. 8, n. 3, p. 66–73, 2020.

TORRES, N. M. P. O. *et al.* A química dos produtos finais de glicação avançada. **Revista Virtual de Química**, v. 10, n. 2, p. 375–392, 2018.

- TRANG, D. T.; TAI, B. H.; HOANG, N. H.; CUC, N. T.; BANG, N. A.; DUNG, D. T.; YEN, D. T. H.; HUONG, P. T. T.; DUNG, N. V.; HANG, D. T. T.; YEN, P. H.; KIEM, P. V. Undescribed Triterpenes from the Leaves of *Syzygium Myrsinifolium* with Their α -Glucosidase and α -Amylase Inhibition Activity. **Chemistry & Biodiversity**, v. 21, n. 3, 2024. DOI: 10.1002/cbdv.202400124.
- TROJAN-RODRIGUES, M. *et al.* Plants used as antidiabetics in popular medicine in Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, n. 1, p. 155–163, 2012. DOI: 10.1016/j.jep.2011.10.034.
- TWARDA-CLAPA, A. *et al.* Advanced glycation end-products (AGEs): formation, chemistry, classification, receptors, and diseases related to AGEs. **Cells**, v. 11, n. 8, art. 1312, 2022. DOI: 10.3390/cells11081312.
- URIBARRI, J. *et al.* Advanced glycation end products in foods and a practical guide to their reduction in the diet. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 110, n. 6, p. 911–916.e12, 2010. DOI: 10.1016/j.jada.2010.03.018.
- VAHID, H.; RAKHSHANDEH, H.; GHORBANI, A. Antidiabetic properties of *Capparis spinosa* L. and its components. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 92, p. 293–302, 2017. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.05.006.
- VAN DER WESTHUIZEN, J. H.; FERREIRA, D.; ROUX, D. G. A novel photochemical structural inversion: The first methoxy–hydroxymethyl isomerization. **J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1**, p. 1540–1543, 1980. DOI: 10.1039/p19800001540.
- VARGAS, I. B.; MARTINS, L. F. da S. REVISÃO DA OCORRÊNCIA DE GÊNEROS E ESPÉCIES DA FAMÍLIA RUBIACEAE JUSS., NO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 8, p. 63632–63646, 2020. DOI: 10.34117/bjdv6n8-699.
- VEIRAIAH, A. Hyperglycemia, lipoprotein glycation, and vascular disease. **Angiology**, v. 56, n. 4, p. 431–438, 2005. DOI: 10.1177/000331970505600411.
- VELÂNDIA, J. R.; DE CARVALHO, M. G.; BRAZ-FILHO, R.; WERLE, A. A. Triterpenoids from the stem of *Swartzia polyphylla*. **Phytochemical Analysis**, v. 13, n. 5, p. 283–288, 2002. DOI: 10.1002/pca.620.
- VELIKA, B.; KRON, I. Antioxidant Properties of Benzoic Acid Derivatives against Superoxide Radical. **Free Radicals and Antioxidants**, v. 2, p. 62–67, 2012.
- VICENTE, I. D.; DA SILVA, S. L. L. A natureza quântica da luz e a Lei de Snell-Descartes. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 46, 2024. DOI: 10.1590/1806-9126-rbef-2023-0368.
- VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. da S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326–337, 2006.
- VIOLANTE, I. M. P. *et al.* Avaliação *in vitro* da atividade fotoprotetora de extratos vegetais do cerrado de Mato Grosso. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 452–457, 2009. DOI: 10.1590/S0102-695X2009000300015.
- VOET, D.; VOET, J. G. *Biochemistry*. 4. ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2011. p. 315–318.
- WANG, C.; WEI, Q.-H.; XIN, Z.-Q.; TIAN, L.-L.; ZHANG, J.-S.; ZHANG, H. Methyl 2-naphthoates with anti-inflammatory activity from *Morinda officinalis*. **Fitoterapia**, v. 164, p. 105354, 2023. DOI: 10.1016/j.fitote.2022.105354.

- WANG, Y.; LIU, H.; HOU, L.; LIAO, J.; ZHANG, P.; ZHANG, H.; WANG, G.; SUN, L. Two New Indole Alkaloids from *Nauclea Officinalis* and Their Evaluation for Cytotoxic Activities. **Natural Product Research**, v. 38, n. 4, p. 607–613, 2023. DOI: 10.1080/14786419.2023.2189707.
- WANG, Z.-Q.; HUANG, C.; HUANG, J.; HAN, H.-Y.; LI, G.-Y.; WANG, J.-H.; SUN, T.-M. Highly efficient recyclable Cu(II)- β -cyclodextrin catalyst for the asymmetric Henry reaction in water. **RSC Advances**, v. 4, n. 28, p. 14373–14379, 2014. DOI: 10.1039/C4RA01049G.
- WASSHAUSEN, D. C. *Brittonia*, v. 54, p. 286, 2002.
- WAUTIER, J. *et al.* Advanced glycation end products (AGEs) on the surface of diabetic erythrocytes bind to the vessel wall via a specific receptor inducing oxidant stress in the vasculature: a link between surface-associated AGEs and diabetic complications. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 16, p. 7742–7746, 1994. DOI: 10.1073/pnas.91.16.7742.
- WOŹNIAK, Ł.; SKĄPSKA, S.; MARSZAŁEK, K. Ursolic Acid--A Pentacyclic Triterpenoid with a Wide Spectrum of Pharmacological Activities. **Molecules**, v. 20, n. 11, p. 20614–20641, 2015. DOI: 10.3390/molecules201119721.
- WU, R.; ZHANG, Z.; QIN, J.; WU, Y.; YANG, F.; LI, J.; YAO, H.; LI, Y. Chemical Constituents from *Galium Aparine* and Their Chemotaxonomic Significance. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 119, p. 104943, 2025. DOI: 10.1016/j.bse.2024.104943.
- XAVIER, M.E.V. *et al.* Potencial antioxidante e alelopático de *Crataeva tapia* L. **Diversitas Journal**, v. 4, n. 1, p. 306, 2019.
- XU, R.; FAZIO, G. C.; MATSUDA, S. P. T. On the origins of triterpenoid skeletal diversity. **Phytochemistry**, v. 65, p. 261–291, 2004. DOI: 10.1016/j.phytochem.2003.11.014.
- YAMAGISHI, S. *et al.* Advanced glycation endproducts inhibit prostacyclin production and induce plasminogen activator inhibitor-1 in human microvascular endothelial cells. **Diabetologia**, v. 41, n. 12, p. 1435–1441, 23 nov. 1998. DOI: 10.1007/s001250051089.
- YEH, W.-J. *et al.* Polyphenols with antiglycation activity and mechanisms of action: a review of recent findings. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 25, n. 1, p. 84–92, jan. 2017. DOI: 10.1016/j.jfda.2016.10.017.
- ZHANG, B.; YANG, S. L.; LI, X.; ZHANG, Q. R.; TIAN, M. Y.; WANG, X. L.; WANG, S. J. Structures and neuroprotective activities of triterpenoids from *Cynomorium coccineum* subsp. *songaricum* (Rupr.) J. Leonard. **Phytochemistry**, v. 198, p. 113155, 2022. DOI: 10.1016/j.phytochem.2022.113155.
- ZHANG, H.; FANG, W.-T.; LI, Y.; KONG, Q.-H.; FANG, C.-W.; LUO, H.; LIU, S.-J. Chemical Constituents from the Aerial Parts of *Rubia Cordifolia* L. with Their NO Inhibitory Activity. **Natural Product Research**, v. 38, n. 5, p. 711–718, 2024. DOI: 10.1080/14786419.2023.2192491.
- ZHANG, Q. *et al.* A perspective on the Maillard reaction and the analysis of protein glycation by mass spectrometry: probing the pathogenesis of chronic disease. **Journal of Proteome Research**, v. 8, p. 754–769, 2009. DOI: 10.1021/pr800857r.
- ZHANG, Q. *et al.* Anti-obesity effect of escin: A study on high-fat diet-induced obese mice. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 26, p. 7797–7812, 2022.

ZHANG, Y.; WATTS, W.; NOGLE, L.; McCONNELL, O. Rapid method development for chiral separation in drug discovery using multi-column parallel screening and circular dichroism signal pooling. **Journal of Chromatography A**, v. 1049, n. 1–2, p. 75–84, 2004.

ZHANG, Z.; *et al.* Antioxidant phenolic compounds from walnut kernels (*Juglans regia* L.). **Food Chemistry**, v. 113, p. 160–165, 2009.

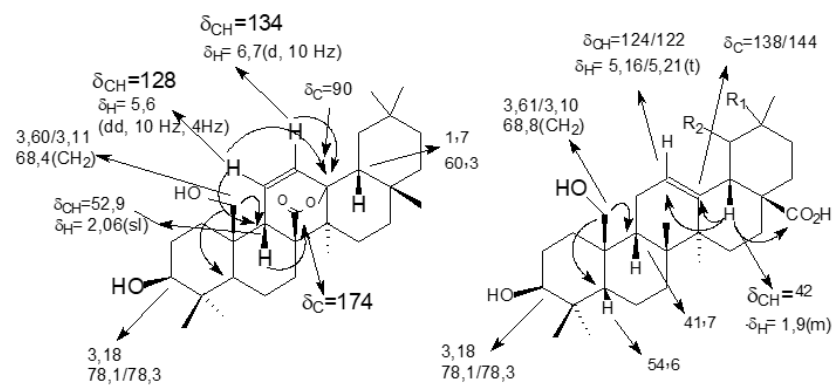
ZHOU, B. *et al.* Worldwide trends in diabetes prevalence and treatment from 1990 to 2022: a pooled analysis of 1108 population-representative studies with 141 million participants. **The Lancet**, v. 404, n. 10467, p. 2077–2093, nov. 2024. DOI: 10.1016/s0140-6736(24)02317-1.

ZIEMAN, S. J.; KASS, D. A. Advanced glycation end product *cross linking* in the cardiovascular system. **Cardiovascular Research**, v. 64, p. 459–470, 2004.

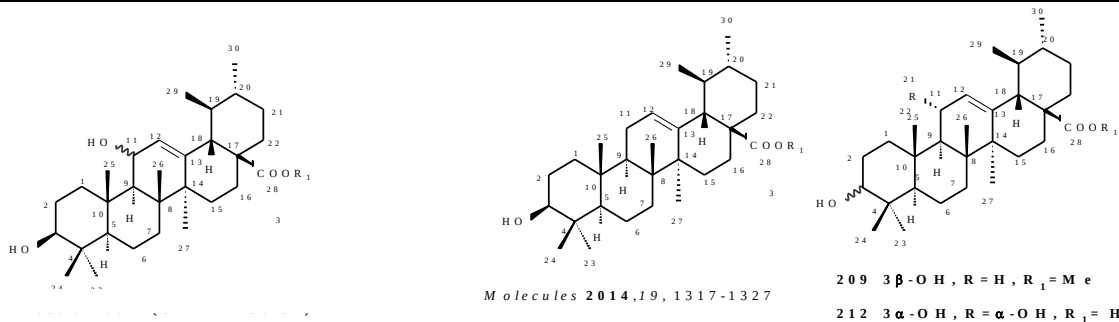
6. ANEXO 1

Proposta de elucidação de outros triterpenos não discutidos no capítulo 1

Frações 5-6, originadas do fracionamento em Sephadex-LH20 de GMDPA-E11B



Frações 4-5 (da purificação em silica gel 60) flash de GMDPA-K1A



7. ANEXO 2

Manuscrito submetido à Planta Medica (2025)

Antioxidant potential of triterpenoids in synergy with phenolics in extracts of *Galianthe matogrossiana* E.L. Cabral

Mariele R.S. Gonçalves¹, Mariana de C.C. Pinto¹, Danniel C.N. Grillo², Rodrigo P. Osório², Cristiano J. Riger², Mário G. de Carvalho¹, Raimundo Braz-Filho¹, Tereza A. Ribeiro³

Affiliation

¹ Laboratório de Química de Produtos Naturais (LQPN), Instituto de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica, RJ, Brazil.

² Laboratório de Estresse Oxidativo em Microrganismos (LEOM), Instituto de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica, RJ, Brazil.

³ Laboratório de Pesquisa em Química de Produtos Naturais (LPQPN), Instituto de Química, Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), Cuiabá, MT, Brazil.

Corresponding Author

Mariele Rondon Santos Gonçalves

Programa de Pós-Graduação em Química

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Instituto de Química

BR. 465 Km 07

23.897-000-Seropédica-RJ

Phone: +55 (21) 26822807

mariele.rondon@gmail.com

Abstract

Galianthe matogrossiana E.L. Cabral (Rubiaceae) is a species with no previous records of popular use or phytochemical or pharmacological data, despite belonging to a genus rich in bioactive metabolites. The methanolic extract of roots (EBMeOHR), and the fractions GMHR (hexane), GMDR (dichloromethane), GMAR (ethyl acetate) and GMRHR (hydromethanolic residue), obtained through partition with solvents were used in phytochemical studies and biological activities. Cytotoxicity of EBMeOHR was analyzed using cell growth curves, while the antioxidant activities of the extract and the four subfractions were assessed using the intracellular oxidation assay with dichlorofluorescein 2,7-diacetate (DCFH-DA). We used eukaryotic cells of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, with a control strain (BY4741) and a strain deficient in a transcription factor for several antioxidant genes (*Δyap1*). The extract showed no toxicity after 24 h, and the subfractions significantly reduced the levels of oxidant species, mainly GMHR and GMDR. Phytochemical investigation of GMHR and GMDR using classical chromatographic procedures associated with NMR, GC-MS and LC-QTOF-MS analyses allowed the identification of a new triterpene, 19,28-dihydroxy-3-O-acetyl-urs-12-ene, along with the known compounds 3 β -O-acetyl-pomolic acid, oleanolic acid, ursolic acid, sitosterol, stigmasterol, and campesterol in GMHR. From the GMDR fraction, a new triterpene, 2 α ,3 β ,23-trihydroxy-olean-12-ene was isolated, along with 2 α ,3 β ,23-trihydroxy-ursa-20-ene, 3 β -O-acetyl-ursolic acid, scopoletin, betulinic acid, lupeol, steroidal glycosides, *p*-hydroxybenzoic acid, vanillic acid and 2,6-dihydroxy-1-methoxyanthraquinone. These results show that the studied fractions are rich sources of pentacyclic triterpenoids. These results indicate that the identified triterpenoids and phenolic compounds are major contributors to the antioxidant activity observed in the extracts, acting through the reduction of intracellular oxidation.

Keywords: *Galianthe matogrossiana*, Rubiaceae, *Saccharomyces cerevisiae*, antioxidant activity, pentacyclic triterpenes, phenolic compounds.

Introduction

The growing demand for novel bioactive compounds reinforces the importance of investigating understudied plant species, particularly those from regions with high biodiversity such as Brazil, which constitutes a valuable reservoir of chemical diversity with promising applications for drug discovery [1]. Phytochemical investigations of native species not only contribute to medicinal chemistry, but also enrich metabolomic databases, including molecular networking platforms that facilitate the sharing and interpretation of spectral data.

Among Brazilian biomes, the Cerrado is the second largest, surpassed only by the Amazon, and is recognized as one of the world's most important biodiversity *hotspots* [2]. It has a high degree of plant endemism, as well as species richness comparable to that of tropical forest ecosystems [3]. However, this biodiversity is increasingly threatened. Indeed, the Cerrado is one of the most vulnerable ecosystems on the planet [2]. Within this biome, the Neotropical genus *Galianthe* Griseb. (Rubiaceae, Spermacoceae) has been recognized as monophyletic, with well-established morphological and molecular boundaries [4]. Of the 39 species recorded in Brazil, most of which are herbaceous, the greatest diversity occurs in the Midwest and Southeast regions [5,6]. Several of these species are used in folk medicine to treat cancer, flu, pneumonia and various infections [7, 8]. In particular, some have demonstrated antiproliferative activity against several human tumor cell lines [9].

Despite their ethnopharmacological relevance, the chemical composition and biological properties of many *Galianthe* species remain underexplored, especially regarding *Galianthe matogrossiana* E.L. Cabral (Rubiaceae). To date, there are no records of ethnobotanical use or phytochemical investigation of this species. Recent contributions from Flora of Brazil identify this species as endemic to Brazil, with its distribution restricted to the Cerrado of Mato Grosso do Sul State, where its flowering has been observed in April [10, 11]. This study reports for the first time the occurrence of the species in the state of Mato Grosso, thereby expanding its known geographic range.

Given the complete lack of phytochemical and pharmacological data for *Galianthe matogrossiana*, our initial approach to unveil its potential involved bioassay-guided screening of its crude extracts and fractions [12]. In this context, antioxidant assays provide essential preliminary information to select candidates for more advanced pharmacological studies. The ability to modulate the intracellular redox environment is of significant therapeutic interest, particularly considering that oxidative stress plays a central role in the pathophysiology of numerous human diseases [13, 14].

The yeast *Saccharomyces cerevisiae* has emerged as a valuable model for assessing antioxidant activity due to its ease of genetic manipulation, short life cycle, and the conservation of cellular pathways shared with higher eukaryotes [15, 16]. Its use enables the investigation of oxidative stress regulation mechanisms in living cells and serves as a relevant platform for inferring potential effects in more complex biological systems.

In this study, we report the chemical composition, cytotoxic activity, and antioxidant potential of the crude extract and fractions obtained from the roots of *G. matogrossiana*. The activities were evaluated in two *S. cerevisiae* strains (BY4741 and *Δyap1*), and the phytochemical study revealed this plant is a rich source of triterpenes, a class of metabolites recognized for having multiple biological properties [17].

Results and Discussion

Phytochemical investigation of the roots of *G. matogrossiana* revealed a promising source of specialized metabolites, notably rich in pentacyclic triterpenes. Chromatographic fractionation of the apolar fractions, hexane (GMHR) and dichloromethane (GMDR), led to the identification of **19** compounds (Fig. 1). The following triterpenes were isolated: 3 β -O-acetyl-oleanolic acid (**1**), 3 β -O-acetyl-pomolic acid (**2**), ursolic acid (**7**), oleanolic acid (**8**), 3 β -O-acetyl-ursolic acid (**9**), betulinic acid (**11**), lupeol (**12**), and 2 α ,3 β ,23-trihydroxy-olean-12-ene (THO, **18**). Additionally, the steroids β -sitosterol (**4**), stigmasterol (**5**), and campesterol (**6**); the coumarin scopoletin (**10**); the glycosides 3-O- β -D glucopyranosylsitosterol (**13**) and 3-O- β -D-glucopyranosylstigmasterol (**14**); the phenolic acids *p*-hydroxybenzoic (**15**) and vanillic (**16**); and the anthraquinone 2,6-dihydroxy-1-methoxyanthraquinone (**17**) were identified. Notably, two previously unreported triterpenes were isolated and characterized in mixtures: 19,28-dihydroxy-3-O-acetyl-urs-12-ene (**3**), in a mixture with compound **2**, and 2 α ,3 β ,23-trihydroxy-urs-20-ene (**19**), in a mixture with compound **18**.

The structural identification of the previously reported compounds was performed by analysis of their ^1H and ^{13}C NMR spectra and by comparison with spectral data available in the literature (Supporting Information). In the case of compound **6**, its structure could not be fully elucidated by NMR due to the structural similarity of its steroidal nucleus to other steroids present in the mixture, hindering its differentiation based on available literature data. This limitation justified the complementary analytical approach described below. In this context, gas

chromatography–mass spectrometry (GC-MS), particularly for compound **6**, and liquid chromatography–quadrupole time-of-flight mass spectrometry (LC-QTOF-MS), in both positive and negative ion modes, were employed for structural confirmation and metabolite identification.

The structural elucidation of the new substances was achieved through detailed spectroscopic analyses. The mixture from fraction GMHR-C34, a white precipitate soluble in dichloromethane (30.40 mg), contained 3 β -O-acetyl-pomolic acid (**2**) and the new triterpene **3**. The molecular formula of **2** (C₃₂H₅₀O₅) was determined from the negative HRESIMS ion at *m/z* 513.3601 [M–H][–] (calc. 513.7390 [M–H][–]) (Figs. 1S and 2S, Supporting Information), which is compatible with an acetylated ursane-type triterpenoid. The ¹³C-DEPTQ NMR (Fig. 6S, Supporting Information) spectrum displayed 32 carbon signals (Table 1), with eight methyl carbons (δ_C 28.03, 16.67, 15.32, 16.88, 24.48, 27.42, 16.14, 21.30), an acetyl carbonyl at δ_C 171.07 (C-1'), a carboxyl carbon at δ_C 183.84 (C-28), and two oxygenated carbons at δ_{CH} 80.84 (CH-3) and δ_C 73.08 (C-19). Assignment of an ursane skeleton was supported by the chemical shifts of olefinic carbons: C-12 at δ_C 129.30 and C-13 at δ_C 137.91, as well as C-18 at δ_C 52.85 (which was more deshielded compared to an oleanane core, consistent with the β -deshielding effect of the equatorial methyl at C-19. The ¹H NMR spectrum (Fig. 5S, Supporting Information) confirmed this proposal, showing eight methyl singlets (δ_H 0.88, 0.87, 0.96, 0.74, 1.27, 1.23, 0.97 and 2.07), an olefinic proton at δ_H 5.36 (1H, t, H-12), and a proton δ_H 4.52 (1H, dd, H-3), in a carbon connected to an acetyl group. The signal at δ_H 2.55 (1H, H-18), together with ¹J_{HC} coupling analyses, was used to confirm the OH position. These data allowed us to propose for compound **2** the structure of 3-O-acetyl-19 α -hydroxyurs-12-en-28-oic acid (3-O-acetyl-pomolic acid) (Fig. 1). Detailed comparison of 1D and 2D NMR spectra (Figs. 7S, 8S and 9S, Supporting Information,) with literature data [18] enabled the complete assignment of all resonances of **2** as previously reported (Table 1).

The molecular formula of compound **3** (C₃₂H₅₂O₄) was determined by HRESIMS at *m/z* 499.3590 [M–H][–] (499.7560 [M–H][–]) (Figs. 3S and 4S, Supporting Information). Analysis of ¹H and ¹³C NMR data, including one- and two-dimensional experiments (Figs. 5S–9S, Supporting Information; Table 1), along with comparison to literature data [19, 20], confirmed the structure of this second triterpenoid component, which is structurally related to compound **2**. Two-dimensional NMR correlations were used to distinguish the structures of the compounds in the mixture. The HSQC spectrum (Fig. 8S, Supporting Information) revealed a correlation between a multiplet at δ_H 4.18 and a low-intensity oxygenated carbon at δ_C 65.04, attributed to a carbinolic methylene carbon (C-28) instead of a carboxylic group. Therefore, the combined interpretation of ¹Hx¹H-COSY, HSQC, and HMBC correlations, along with mass spectrometry data, were sufficient to define the structure of compound **3** as the triterpenoid, 19,28-dihydroxy-3-O-acetyl-urs-12-ene (Fig. 1).

The brown methanol-soluble precipitate GMDR-E7-6 (20 mg) was characterized by ¹H and ¹³C NMR (Table 2), which revealed a mixture of pentacyclic triterpenes later assigned to compounds **18** and **19**. In the ¹H NMR experiments (Fig. 14S, Supporting Information; Table 2), multiple singlets between δ_H 0.80 and 1.23 ppm corresponding in DEPTQ (Fig. 15S, Supporting Information; Table 2), as well as to methyl carbons at δ_C 15.34 to 32.45 ppm attested to the presence of several triterpenoid methyl groups. A multiplet at δ_H 5.28 exhibited HSQC (Fig. 18S, Supporting Information), along with correlations at δ_C 122.04 and 125.06 ppm characteristic of olefinic carbons in both components. Further HSQC cross-peaks between δ_H 3.90 and δ_C 65.79, and between δ_H 3.62 and δ_C 77.30 and 77.35 ppm indicated hydroxylated methine centers. The correlations of hydrogen signals at δ_H 3.42 (s) and 3.54 (m) with an oxygenated carbon at δ_C 69.92 confirmed the presence of a carbinolic methylene, and a DEPTQ

resonance at δ_C 103.82 coupled to two singlets at δ_H 4.65 and 4.70 ppm, revealed a vinylidene group. Detailed HSQC, COSY, NOESY and HMBC (Figs.16S-19S, Supporting Information) analyses together with comparison to literature data (Table 2) [21], allowed the assignment of the signal at δ_C 77.35 to the triterpenoid 2 α ,3 β ,23-trihydroxy-olean-12-ene (THO, compound **18**), whose $C_{30}H_{50}O_3$ formula was confirmed by HRESIMS (Figs. 10S and 11S, Supporting Information), displaying an $[M + Na]^+$ adduct at m/z 481.3650 (calculated 481.7170). The multiplicity of the signals at δ_H 2.86 (m, H-18) supports the presence of a mixture. Two-dimensional analysis enabled the correct assignment of substituent positions in compound **19** (Table 2). In the HSQC (Fig.18S, Supporting Information), spectrum cross peaks were observed at δ_C/δ_H 40.92/1.32 (m) and 1.60 (m) for C-1; 65.79/3.90 (m) for C-2; 77.30/3.62 (s) for C-3; 17.58/1.40 (m) for C-6; 23.03/1.97 (m) for C-11; 125.60/5.29 (m) for C-12; 41.34/2.86 (m) for C-18; 31.92/2.24 (m) for C-22; 69.92/3.42 (s) and 3.54 (m) for C-23; 16.19/0.80 (s) for C-24; 17.35/1.19 (s) for C-25; 22.58/1.22 (s) for C-27; 15.84/1.04 (s) for C-28; and 103.83/4.65 (s) and 4.70 (s) for C-30. In the HMBC (Fig.19S, Supporting Information), contour map key heteronuclear correlations included the 2H-1 protons (δ_H 1.32 and 1.60) with C-25 (δ_C 17.35, $^3J_{HC}$); 2H-23 protons (δ_H 3.42 and 3.54) with C-3 (δ_C 77.30, $^3J_{HC}$); 3H-24 (δ_H 0.80) with C3 (δ_C 77.30, $^3J_{HC}$), C-4 (δ_C 41.10, $^2J_{HC}$) and C-23 (δ_C 69.92, $^3J_{HC}$); 3H-25 (δ_H 1.19) with C-1 (δ_C 40.92, $^3J_{HC}$) and C-5 (δ_C 55.69, $^2J_{HC}$), confirming a 2 α ,3 β ,23-trihydroxy in **19**. The 1H - 1H COSY correlation between H-11 (δ_H 1.97) and H-12 (δ_H 5.29) corroborated the presence of an olefinic hydrogen system at C-12 (δ_C 125.60) while a quaternary carbon at δ_C 138.23 C-13 (absent in the ^{13}C spectrum), was observed in the HMBC correlation with the methyl hydrogen at δ_H 1.22 (3H-27). The NOESY interaction between H-12 and H-18 was used to confirm the position of a double bond in **19** (Fig.17S, Supporting Information). Through additional analysis by HMBC, correlations were observed of $^nJ_{CH}$ interaction between 3H-28 (δ_H 1.04) and C-18 (δ_C 41.34, $^3J_{HC}$) as well as C-20 (δ_C 153.34, $^4J_{HC}$). These data compared with literature reports [22] were consistent with a ursane triterpene, whose molecular formula was determined as $C_{30}H_{48}O_3$ from negative-mode HRESIMS (Figs. 12S and 13S, Supporting Information), which showed a peak at m/z 455.3527 $[M-H]^-$ (calculated 455.7030 $[M-H]^-$), and was identified as 2 α ,3 β ,23-trihydroxy-ursa-20-ene (**19**, Fig. 1), not previously described in the literature”.

Motivated by this rich phytochemical profile, we evaluated the crude root extract of *G. matogrossiana* and its fractions for their biological potential. First, we investigated the cytotoxicity of the crude root extract of *G. matogrossiana* by a cell growth curve assay in *Saccharomyces cerevisiae* (strain BY4741), a widely used method that involves monitoring cell proliferation rates and observing the substance's effect on the increase in cell number.

After 24 hours of exposure, no significant reduction in cell growth rate was observed for the crude extract at concentrations of 17.5 $\mu g.mL^{-1}$ and 35.0 $\mu g.mL^{-1}$ (Fig. 2). The values for each curve after 24 hours of growth were 4.34, 4.64, and 4.87 $mg.mL^{-1}$ for the control and cells incubated with 17.5 and 35.0 $\mu g.mL^{-1}$, respectively. These results indicated that even doubling the extract concentration did not inhibit the proliferation of *S. cerevisiae* cells. This lack of a toxic effect is consistent with the composition of plant extracts, which are frequently rich in flavonoids, flavones, carotenoids, triterpenoids, sesquiterpenes, polyphenols, glycosides and saponins, all of which are classes of metabolites associated with diverse biochemical activities, including modulation of oxidative stress response and autophagic pathways in yeast [23]. Thus, the absence of cytotoxicity at moderate concentrations reinforced the feasibility of continuing biological studies of *G. matogrossiana*. The results indicated that its constituents did not compromise cell survival within the tested concentration ranges, which is fundamental for future investigations.

Antioxidant capacity of the methanolic extract and fractions from *G. matogrossiana* roots was evaluated based on the inhibition of H₂O₂-induced intracellular oxidation. Exposure to this reagent resulted in a marked increase in intracellular oxidation levels (Fig. 3). The crude extract and its fractions were evaluated for antioxidant protection using the DCF assay. In this assay, the fractions showed statistically significant antioxidant capacity. The percentages of intracellular oxidation reduction compared to cells exposed only to H₂O₂ were normalized using the respective fraction masses. The results are expressed as the intracellular oxidation inhibition rate. In the wild-type strain (BY4741), GMHR, GMDR, and GMAR fractions exhibited the most pronounced antioxidant effects, with inhibition rates of 1.33, 7.27, and 4.56 μg^{-1} of plant material, respectively. The crude extract (EBMeOHR) and the GMRHR fraction also demonstrated antioxidant activity, although to a lesser extent, with respective rates of 0.24 and 0.26 μg^{-1} (Fig. 3A).

Comparable results were obtained with the *Yap1* mutant strain. The GMDR and GMHR fractions again showed the highest antioxidant activity, with rates of 10.2 and 5.27 μg^{-1} , respectively. The crude extract, GMAR fraction, and GMRHR residue exhibited rates of 0.34, 2.09, and 0.41 μg^{-1} , respectively (Fig. 3B). These findings indicate that the antioxidant activity of the fractions is consistent across both strains tested, particularly highlighting the efficacy of the nonpolar fractions.

Eukaryotic cells possess endogenous antioxidant mechanisms to neutralize reactive oxygen species (ROS) and maintain redox homeostasis. However, an imbalance in this system can trigger apoptotic pathways. H₂O₂ is a reactive species generated as a byproduct of several enzymatic reactions, and at high concentrations it can impair biomolecular function, promote enzyme inactivation, and induce oxidative stress [24]. As expected, exposure to hydrogen peroxide led to increased intracellular levels of oxidant species in *Saccharomyces cerevisiae*. Previous studies have reported similar effects, including elevated protein carbonylation and decreased activity of key antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD) and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [25].

The similarity of antioxidant responses observed in the BY4741 and *Yap1* strains suggests that the mechanisms of action of the fractions are, at least in part, independent of the pathway regulated by the transcription factor *Yap1p*. This factor functions in the cellular response to H₂O₂ by promoting the expression of antioxidant genes such as *SOD1*, *SOD2*, *GSH1*, *GSH2*, and *CTT1* [26]. This is further supported by the fact that the antioxidant effect was similar across all tested fractions in both the wild-type and *Yap1* mutant strains.

Our results provide novel evidence for the antioxidant activity of nonpolar fractions from *G. matogrossiana* roots, thereby expanding current knowledge of the *Galianthe* genus (Rubiaceae) as a potential source of antioxidant compounds. These effects were especially pronounced in fractions rich in triterpenoids, a class of natural products widely recognized for their biological relevance [27, 28]. Such antioxidants play an essential role in promoting health and are associated with the prevention of chronic and degenerative diseases [29].

Phytochemical investigation revealed that the nonpolar fractions (GMHR and GMDR) are potent sources of pentacyclic triterpenes belonging to the lupane, oleanane, and ursane classes. These compounds likely contributed to the superior antioxidant activity observed. Their relevance stems from their important roles in the modulation of chronic disorders, including neurodegenerative diseases such as Alzheimer's, Huntington's, and Parkinson's [30], as well as their broad spectrum of bioactivities, including antibacterial, anti-inflammatory, and antitumor properties [27,28]. In addition, these triterpenes are known to modulate incretin activity [31] and exhibit notable antioxidant potential [32].

The presence of hydroxyl groups in their molecular structures enables the donation of electrons or hydrogen atoms, effectively neutralizing free radicals and preventing cellular damage, thereby supporting detoxification processes in the body [33]. Notably, betulinic acid (**11**), one of the triterpenes isolated in this study, has long been used in traditional medicine. It has demonstrated antioxidant activity by enhancing the function of key antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), and glutathione reductase (GRd) in the liver of mice, contributing to the neutralization of free radicals and protection against oxidative damage. It also reduces the levels of malondialdehyde (MDA), a major product of lipid peroxidation [34, 35]. In *S. cerevisiae*, betulinic acid has been shown to modulate the expression of genes such as *SOD1*, *SOD2*, *PEP4*, and *FIS1*, explaining its potential to protect cells from oxidative stress and delay aging [16].

In addition to triterpenes, phenolic compounds present in the GMDR fraction, such as scopoletin (**10**), p-hydroxybenzoic acid (**15**), vanillic acid (**16**), and 2,6-dihydroxy-1-methoxyanthraquinone (**17**), also play an important role in the observed antioxidant activity. These compounds act by neutralizing superoxide radicals ($O_2^{\cdot-}$) and reducing oxidative stress in organic matter, a function attributed to the presence of an aromatic ring bearing hydroxyl groups [36, 37]. Structural factors such as the number and position of hydrogen-donating hydroxyl groups on the aromatic ring, as well as steric effects, can enhance or diminish the antioxidant potential of phenolic molecules. Hydroxycoumarins, in turn, are recognized for their metal-chelating capacity and free radical scavenging ability, in addition to exhibiting anti-inflammatory and antioxidant properties [38, 39]. A quantitative DPPH assay, which tested the monohydroxylated coumarin scopoletin and four non-hydroxylated coumarins, revealed that scopoletin was the most active, demonstrating significant antioxidant activity [39]. Benzoic acid and its derivatives have also shown promise as antioxidant agents [40]. Previous studies have demonstrated that this activity is enhanced in monohydroxybenzoic derivatives with hydroxyl groups in the *ortho* or *para* positions relative to the carboxyl group [40]. Moreover, the presence of an ester moiety in benzoic acid derivatives tends to reduce antioxidant activity, as evidenced by comparisons between p-hydroxybenzoic acid and its esters, with the former exhibiting the highest antioxidant potential among the most promising fractions tested [40].

The antioxidant activity observed in the GMHR fraction may be attributed to the presence of hydroxylated triterpenes that act as hydrogen donors. In contrast, the enhanced antioxidant effect in the GMDR fraction can be explained by the presence of coumarins (**10**) and phenolic compounds, which likely contribute more significantly to its activity than in the GMHR fraction. In summary, the nonpolar fractions from the roots of *G. matogrossiana* exhibit promising antioxidant potential, likely resulting from the synergistic effects between triterpenoids and phenolic compounds. These findings underscore the potential of the *Galianthe* genus as a valuable source of bioactive molecules, suggesting possible applications in both the food and pharmaceutical industries. Further studies should explore additional fractions and include biological evaluation of isolated compounds to identify novel active constituents and provide deeper insights into the therapeutic potential of natural products. Taken together, the nonpolar fractions from the roots of *Galianthe matogrossiana* exhibited promising antioxidant potential, likely resulting from the synergistic effects between triterpenoids and phenolic compounds. These findings underscore the potential of the *Galianthe* genus as a valuable source of bioactive molecules, suggesting possible applications in both the food and pharmaceutical industries. Further studies should explore additional fractions and include biological evaluation of isolated compounds to identify novel active constituents and provide deeper insights into the therapeutic potential of natural products.

In summary, the roots of *Galianthe matogrossiana* represent a rich source of special metabolites, predominantly pentacyclic triterpenes, including two previously undescribed compounds whose structures were fully elucidated. Biological assays revealed that although the crude extract showed no cytotoxicity in *Saccharomyces cerevisiae* at the tested concentrations, its nonpolar fractions exhibited notable and promising antioxidant activity, which appeared to be independent of the Yap1p mediated signaling pathway. The consistent correlation between the presence of triterpenes and other bioactive constituents, such as phenolic acids and coumarins, in the most active fractions suggests that these classes of compounds are mainly responsible for the observed protective effects. These findings expand current knowledge of the chemical composition and biological potential of the genus *Galianthe*, and highlight *G. matogrossiana* as a promising natural source for the development of new antioxidant and therapeutic agents, with potential applications in human health and oxidative stress-related conditions.

Material and Methods

General experimental procedures

The roots were ground in a knife mill (MA 580/E; Marconi). Organic solvents from the extract were removed under reduced pressure (0.3 bar; 3×10^4 Pa) at 40 °C using a rotary evaporator (Fisatom 550). Column chromatography separations were carried out using silica gel 60 (70–230 mesh; Macherey-Nagel) and Sephadex LH-20 (Sigma-Aldrich). Preparative thin-layer chromatography (PTLC) was conducted on glass plates (20 × 20 cm, 500 µm thickness) coated with silica gel 60 PF₂₅₄ (Silicycle). Analytical thin-layer chromatography (TLC) was performed on silica gel F₂₅₄ plates (Silicycle); spots were visualized under UV light (254 and 365 nm) and developed with vanillin sulfuric acid or anisaldehyde sulfuric acid spray reagents. All solvents used in extraction, fractionation, purification, and reaction processes were of analytical grade (ACMA Labs; Anidrol; Neon).

Infrared spectra were recorded with a VERTEX 70 spectrometer (Bruker) with an attenuated total reflectance (ATR) accessory. One- and two-dimensional NMR spectra (¹H and ¹³C) were acquired with an Avance II (400 MHz, BB-probe) and Avance III (500 MHz, BBO-probe, z-gradient) spectrometers (Bruker; Rheinstetten, Germany). The deuterated solvents were CDCl₃, MeOD, pyridine-d₅, and DMSO-d₆. High-resolution mass spectra (HRESIMS) were obtained with an LC/Q-TOF 6530 spectrometer (Agilent) equipped with ESI and APCI sources. Low-resolution mass spectra (EIMS) were recorded by electron impact (70 eV) with a GC-MS QP2010 Plus (Shimadzu).

Plant material

The roots of *G. matogrossiana* were collected in July 2021 at Mirante do Geodésico, Chapada dos Guimarães, Mato Grosso, Brazil (15°28'42.0"S, 55°41'05.4"W) by Mariele Rondon Santos Gonçalves. Botanical identification was performed by Vali Joana Pott (CGMS Herbarium, Federal University of Mato Grosso do Sul, UFMS) and confirmed by Dr. Elza L. Cabral (Instituto de Botánica del Nordeste, UNNE, Argentina). A voucher specimen (CGMS 79574) was deposited at the CGMS Herbarium (UFMS). Access to genetic material was registered in the Brazilian National System for the Management of Genetic Heritage and Associated Traditional Knowledge (SisGen) under number A129410. Dried roots were used for extraction.

Extraction and isolation

The dried roots of *G. matogrossiana*, with a total weight of 1.16 kg, were submitted to extraction by cold maceration in methanol at 30 °C. The process consisted of seven successive five-day cycles, each using approximately 5 L of methanol. After each cycle, the suspension was filtered, and the filtrate was concentrated under reduced pressure at 40 °C, affording 140 g of crude extract (EBMeOHR). A portion of this extract (127.4 g) was suspended in a methanol–water solution (MeOH:H₂O, 7:3) and successively partitioned with *n*-hexane (250 mL × 3), dichloromethane (250 mL × 3), and ethyl acetate (250 mL × 3). This yielded four fractions: *n*-hexane (GMHR; 6.54 g), dichloromethane (GMDR; 3.72 g), ethyl acetate (GMAR; 15.10 g), and the remaining hydro-methanolic fraction (GMRHR; 100.40 g). Small aliquots of the crude extract and each fraction were stored at 4 °C for subsequent *in vivo* assays using *Saccharomyces cerevisiae* cells. These samples were evaluated for cytotoxic and antioxidant activities in this eukaryotic model.

The *n*-hexane fraction (GMHR; 5.87 g) was fractionated by open column chromatography on silica gel 60 (column dimensions: 73 cm length × 4.5 cm internal diameter) using a polarity gradient elution system (starting with *n*-hexane, followed by dichloromethane, ethyl acetate, and finally methanol). Approximately 150 fractions (200 mL each) were collected and combined into subfractions (GMHR-A to GMHR-M) based on TLC monitoring. Subfraction GMHR-C (fractions 32–41; 400 mg) was further fractionated under the same chromatographic conditions, yielding 50 fractions (~10 mL each), which were analyzed by TLC. Fraction GMHR-C16 (37.4 mg) afforded a white amorphous precipitate soluble in chloroform, identified as compound **1**. Another fraction with similar characteristics (GMHR-C34; 30.4 mg) was characterized as a mixture of compounds **2** and **3**.

With the same chromatographic conditions, the subsequent pooled fractions (42–53; 500 mg) were chromatographed on silica gel, yielding 76 fractions of 6 mL. After TLC-guided pooling, 37 mg was obtained (GMHR-F1; fractions 1–11). This fraction was purified by Sephadex LH-20 chromatography using methanol, yielding 19.7 mg of a steroidal mixture (compounds **4–6**) and ~18.7 mg of a white amorphous precipitate soluble in chloroform (GMHR-F26), identified as a mixture of triterpenes (compounds **7** and **8**). All fractions were reserved for structural elucidation.

The dichloromethane fraction (GMDR; 3.3 g) was subjected to open column chromatography on silica gel (column dimensions: 42 cm × 3.5 cm) using a gradient of *n*-hexane, dichloromethane, ethyl acetate, and methanol. A total of 54 fractions (250 mL each) were collected and combined into subfractions GMDR-A to GMDR-G based on TLC profiles. Among them, GMDR-C (fractions 16–23; 1.430 mg) and GMDR-E (fractions 27–42; 1.677 mg) were selected for further purification.

Subfraction GMDR-C was first subjected to Sephadex LH-20 column chromatography and eluted with methanol, affording GMDR-C2 (fractions 3–8; 153.8 mg), which was then chromatographed on silica gel using a dichloromethane/methanol gradient. Twenty-one fractions (15 mL each) were collected and pooled based on TLC. From this, GMDR-C2C (fractions 4–8; 26.7 mg) underwent a final purification by Sephadex LH-20 in methanol, yielding GMDR-C2CB (fractions 2–3; 19.7 mg), a white amorphous precipitate soluble in chloroform, composed of a triterpene mixture (compounds **1** and **9**). Fraction GMDR-C2D (fractions 9–11; 20.0 mg) was purified by preparative TLC (dichloromethane/ethyl acetate 9:1), affording two spots. The first (8.5 mg), exhibiting intense blue fluorescence under 365 nm UV light, was consistent with a coumarin (compound **10**) mixed with a triterpene (compound **11**).

The second spot (8.0 mg) was a white amorphous precipitate, identified as compound **12** along with a minor unidentified constituent.

Subfraction GMDR-E was fractionated using the same chromatographic system employed for GMDR, resulting in 137 fractions (8 mL each), pooled by TLC into 12 subfractions. Fraction GMDR-E10 (80.0 mg) precipitated as a white amorphous solid, soluble in pyridine, containing a mixture of glycosylated steroids (compounds **13** and **14**). Further pooled fractions led to the selection of GMDR-E4 (fractions 49–57; 84.3 mg) and GMDR-E7 (fractions 71–75; 27.0 mg) for subsequent purification steps.

GMDR-E4 was submitted to Sephadex LH-20 chromatography in methanol, generating 20 fractions (3 mL each), which were pooled into subfractions GMDR-E4A to E4E. Among them, GMDR-E4B (fractions 6–7; 13.1 mg) and GMDR-E4D (fractions 11–15; 2.1 mg) showed promising chromatographic profiles. GMDR-E4B was further chromatographed on silica gel using an *n*-hexane/methanol gradient, affording GMDR-E4B (6–7)-16 (10.6 mg), an amorphous brown precipitate containing benzoic acid derivatives (compounds **15** and **16**). GMDR-E4D was purified by preparative TLC (dichloromethane/ethyl acetate 9:1), yielding a brick-red precipitate (20.0 mg) identified as substance **17**.

Finally, fraction GMDR-E7 was subjected to Sephadex LH-20 chromatography in methanol, yielding 15 fractions (10 mL each). Fraction GMDR-E7-6 (20 mg) was a brown solid, soluble in methanol, composed of a triterpene mixture (compounds **18** and **19**).

Spectroscopic data of compounds 2,3,18 and 19

Compound 2: white amorphous powder; ^1H and ^{13}C NMR data, see Table 1; HRESIMS m/z : 513.3601 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (calcd. for $\text{C}_{32}\text{H}_{49}\text{O}_5$, 513.7390). The structure was elucidated as 3-*O*-acetyl-19 α -hydroxyurs-12-en-28-oic acid (3-*O*-acetyl-pomolic acid) based on detailed spectroscopic data including 1D and 2D NMR and comparison with literature values [18].

Compound 3: white amorphous powder; ^1H and ^{13}C NMR data, see Table 1; HRESIMS m/z : 499.3674 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (calc. for $\text{C}_{32}\text{H}_{51}\text{O}_4$, 499.7560); The structure was elucidated as 19,28-dihydroxy-3-*O*-acetyl-urs-12-ene based on comprehensive spectroscopic analyses, including 1D and 2D NMR (COSY, HSQC, HMBC) and comparison with literature data [19, 20].

Compound 18: brown amorphous powder; ^1H and ^{13}C NMR data, see Table 2; HRESIMS m/z : 481.3650 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calcd. for $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3\text{Na}$, 481.7170); The structure was elucidated as 2 α ,3 β ,23-trihydroxy-olean-12-ene (THO) based on comprehensive spectroscopic analyses, including DEPTQ, HSQC, COSY, NOESY, and HMBC, and comparison with literature data [21].

Compound 19: brown amorphous powder; ^1H and ^{13}C NMR data, see Table 2; HRESIMS m/z : 455.3527 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (calcd. for $\text{C}_{30}\text{H}_{47}\text{O}_3$, 455.7030); The structure was elucidated as 2 α ,3 β ,23-trihydroxy-ursa-20-ene based on detailed interpretation of HSQC, HMBC, COSY and NOESY spectra, and confirmed through comparison with literature data [22]. This compound has not been previously described in the literature.

Yeast strains, and culture media

For yeast assays, two culture media were used: liquid YPD (yeast extract 1%, peptone 2%, glucose 2%) (BD Difco, USA) and solid YPD (same composition plus agar 2%) (Kasvi, Brazil). *Saccharomyces cerevisiae* strains were *Δyap1* (Yap1 transcription factor deletion, geneticin 0.02% to maintain the marker; BY4741 background) and control strain BY4741 (Euroscarf, Frankfurt, Germany). Both were stored on solid YPD at 4 °C. Cytotoxicity assays were performed by monitoring growth curves (absorbance at 570 nm) (Biospectro, Brazil). Antioxidant activity was evaluated by intracellular oxidation using 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) (Sigma-Aldrich, Brazil).

Cultivation of Saccharomyces cerevisiae, inoculum preparation, and extract solubilization

For fresh subculturing, a loopful of culture was transferred to the surface of solid YPD medium (2%) in a tube and incubated at 28 °C for 24 hours in a refrigerated BOD incubator (Solab, Brazil). The inoculum was prepared by transferring a mass of cells from the fresh culture to an Erlenmeyer flask containing liquid YPD medium, ensuring that the cells were in the respiratory growth phase. The culture was incubated at 28 °C for 22 hours under shaking at 160 rpm in a shaker incubator (NovaTecnica, Brazil). Cell concentration was determined via spectrophotometry by measuring the absorbance of the cell suspension at 570 nm using a UV-Vis spectrophotometer (Biospectro®).

The crude extract from the roots of *G. matogrossiana*, as well as its fractions and the hydroalcoholic residue, were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) at 20%, while ensuring that the final DMSO concentration in contact with the cells remained below 3% [41].

Cell growth in the presence of G. matogrossiana extract

Growth curves were determined after incubating the cells with the extract. The experiment was initiated with a cell concentration of 0.1 mg.mL^{-1} and extract concentrations of $17.5 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ and $35 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$. As control, cultures without extract addition were prepared under the same experimental conditions. Cell density was measured at 0, 2, 4, 6, 22, and 24 hours to monitor cell growth at 570 nm.

Intracellular oxidation assay using DCFH-DA

Cell suspensions were incubated with the crude extract solution for 2 h at 28 °C. Following this incubation, aliquots corresponding to 3.0 mg of cell biomass were resuspended in 1.0 mL of 50 mM potassium phosphate buffer (pH 6.0). Initially, two control samples (with the same amount of cells) were processed without prior incubation with the extract. Other aliquots of the suspensions were pretreated with the crude extract or with the plant fractions, and then the fluorescent probe 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate was added to a final concentration of 20 μM . Samples were incubated in the dark for 15 minutes at 28 °C to allow uptake of the probe by the cells. Subsequently, a hydrogen peroxide solution was added to a final concentration of 2.0 mM. Samples were incubated for 1 h at 28 °C under shaking at 160 rpm in a shaker incubator. After incubation, samples were centrifuged at 6,000 rpm for 5 minutes at room temperature, and the fluorescence of the supernatants was measured with a microplate reader (HIDEX, Turku, Finland) with excitation at 488 nm and emission at 520 nm, as adapted from [15]. Results here are expressed as the level of intracellular oxidation

inhibition, calculated as the ratio between the percentage reduction in fluorescence and the mass of extract tested.

Supporting Information

Spectrometric and spectroscopic data of new compounds are available as Supporting Information.

Acknowledgments

We are grateful to the taxonomists Vali Joana Pott and Elsa Leonor Cabral for their prompt and valuable contribution to the taxonomic identification of *Galianthe matogrossiana*. We also acknowledge the support of the funding institutions CNPq, CAPES and FAPERJ.

Contributors' Statement

Mariele R.S. Gonçalves, Mariana de C.C. Pinto, and Tereza A. Ribeiro were responsible for conducting the chemical experiments and isolating the described compounds. Raimundo Braz Filho, Mário G. de Carvalho, and Mariele R.S. Gonçalves contributed to the interpretation, characterization, and structural elucidation of the molecules. Danniel C.N. Grillo, Rodrigo P. Osório, and Cristiano J. Riger were responsible for the planning and execution of the cytotoxic and antioxidant assays. All authors contributed to the interpretation of the correlations between chemical composition and biological activity, as well as to the writing, review, and editing of the manuscript. The manuscript was approved by all authors.

Conflicts of Interest

We declare no conflicts of interest.

References

- 1 Berlinck RGS, Borges WS, Scotti MT, Vieira PC. A Química de Produtos Naturais do Brasil no Século XXI. Quim Nova 2017; 40: 706–710
- 2 Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA). Dia Nacional do Cerrado é comemorado nesta segunda, 11 de setembro. Available at <https://www.gov.br/ibama/pt-br/assuntos/noticias/2023/dia-nacional-do-cerrado-e-comemorado-nesta-segunda-11-de-setembro>. Accessed March 2, 2025
- 3 Marinho-Filho JM, Machado RB, Henriques RPB. Evolução do conhecimento e da conservação do Cerrado brasileiro. In: Diniz IR, Marinho-Filho J, Machado RB, Cavalcanti RB, eds. Cerrado - conhecimento científico quantitativo como subsídio para ações de conservação. Brasília: Thesaurus; 2010: 13–32
- 4 Cabral EL. Revisión del género *Galianthe* Griseb. (Rubiaceae) Dissertation. Corrientes: Universidad Nacional del Nordeste; 2002
- 5 Cabral EL. Revision Sinóptica de *Galianthe* Subgen. *Galianthe* (Rubiaceae: Spermacoceae), con una sección nueva. Ann Missouri Bot Gard 2009; 96: 27–60

- 6 Delprete PG, Cortés-B R. A synopsis of the Rubiaceae of the States of Mato Grosso and Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev Biol Neotrop* 2007; 3. doi:10.5216/rbn.v3i1.2813
- 7 Figueiredo PO, Garcez FR, Matos MF, Perdomo RT, Queiroz LM, Pott A, Garcez AJ, Garcez WS. A new cytotoxic β -carboline alkaloid from *Galianthe thalictroides*. *Planta Med* 2011; 77: 1852–1854
- 8 Mentz LA, Lutzemberger LC, Schenkel EP. Da flora medicinal do Rio Grande do Sul: notas sobre a obra de D'Ávila (1910). *Cad Farm* 1997; 13: 25–48
- 9 Moura VM, Santos DP, Santini SMO. Constituintes químicos de *Galianthe brasiliensis* (Rubiaceae). *Quim Nova* 2006; 29: 452–455
- 10 Cabral EL. Dos especies nuevas de *Galianthe* (Rubiaceae) para Brasil. *Bonplandia* 2004; 13: 15–19
- 11 Salas RM, Cabral EL, Florentín JE, Fader AAC, Souza EB, Nepomuceno FAA, Carmo JAM, Miguel LM, Nuñez Florentín M, Nicora Chequin R, Sobrado SV. *Galianthe* in Flora e Funga do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Available at <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB38843>. Accessed March 2, 2025
- 12 Zeouk I, Abboussi O, Boualy B, El-Bassat A, Mahmoud AM, Bousta D. Isolation, identification, and activity evaluation of antioxidant components from *Inula viscosa*: A bioguided approach. *Bioorg Chem* 2022; 119: 105551
- 13 Fadel H, Bouchal B, Khallouki F, Amechrouq A, El Hajjaji S. Antioxidant and Leishmanicidal Evaluation of *Pulicaria inuloides* Root Extracts: A Bioguided Fractionation. *Pathogens* 2019; 8: 201
- 14 Oldoni TLC, Merlin N, Karling M, Carvalho T, Coelho MDG, Lima VR, Schneider T, Silva S. Antihyperglycemic activity and bioguided isolation of phenolic compounds with antioxidant and cytotoxic properties from *Syzygium malaccense* leaves. *Fitoterapia* 2025; 181: 106357
- 15 Subhaswaraj P, Sowmya M, Bhavana V, Dyavaiah M. Determination of antioxidant activity of *Hibiscus sabdariffa* and *Croton caudatus* in *Saccharomyces cerevisiae* model system. *J Food Sci Technol* 2017; 54: 2728–2736
- 16 Sudharshan SJ, Krishna Narayanan A, Princilly J, Dyavaiah M, Nagegowda DA. Betulinic acid mitigates oxidative stress-mediated apoptosis and enhances longevity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* model. *Free Radic Res* 2022; 56: 699–712
- 17 Santivañez JCM, Figueiredo Angolini CF. The Genus *Palicourea* Aubl (Rubiaceae): Source of Bioactive Compounds. *Nat Prod Res* 2025. doi:10.1080/14786419.2024.2449510
- 18 Song NY, Cho JG, Im D, Lee DY, Wu Q, Seo WD, Kang HC, Lee YH, Baek NI. Triterpenoids from *Fragaria ananassa* calyx and their inhibitory effects on melanogenesis in B16-F10 mouse melanoma cells. *Nat Prod Res* 2013; 27: 2219–2223
- 19 Mahato SB, Kundu AP. ¹³C NMR Spectra of pentacyclic triterpenoids—a compilation and some salient features. *Phytochemistry* 1994; 37: 1517–1575
- 20 Siddiqui S, Hafeez F, Begum S, Siddiqui BS. Kaneric Acid, a New Triterpene from the Leaves of *Nerium oleander*. *J Nat Prod* 1986; 49: 1086–1090
- 21 Gomes Castro AJ, Cazarolli LH, Silva Frederico MJ, Dambrós BF, de Carvalho FK, de Medeiros Pinto VA, da Fonte Ramos C, Filippin Monteiro FB, Pizzolatti MG, Mena Barreto

- Silva FR. Biological activity of 2 α ,3 β ,23-trihydroxyolean-12-ene on glucose homeostasis. *Eur J Pharmacol* 2021; 907:174250
- 22 Trang DT, Tai BH, Hoang NH, Cuc NT, Bang NA, Dung DT, Yen DTH, Huong PTT, Dung NV, Hang DTT, Yen PH, Kiem PV. Undescribed Triterpenes from the Leaves of *Syzygium Myrsinifolium* with Their α -Glucosidase and α -Amylase Inhibition Activity. *Chem Biodivers* 2024; 21. doi:10.1002/cbdv.202400124
- 23 Liu YY, Yang YN, Feng ZM, Jiang JS, Zhang PC. Eight new triterpenoid saponins with antioxidant activity from the roots of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. *Fitoterapia* 2019; 133:186–192
- 24 Zabeu AMC, Rossato R, Soares CP, Silva NS da. Estresse Oxidativo Em Células SH-SY5Y Diante Da Exposição Ao Peróxido de Hidrogênio. *Res Soc Dev* 2022; 11:e30811326474
- 25 Cuinica LG. Estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio e menadiona em células de *Saccharomyces cerevisiae* BY4741. *Rev Biocienc* 2019; 25
- 26 Zhang L, Onda K, Imai R, Fukuda R, Horiuchi H, Ohta A. Growth Temperature Downshift Induces Antioxidant Response in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 307:308–314
- 27 Stutz C, Fontão APGA, Silva GW de S e, Seito LN, Perdomo RT, Sampaio ALF. Betulinic Acid Acts in Synergism with Imatinib Mesylate, Triggering Apoptosis in MDR Leukemia Cells. *Planta Med* 2024; 91:19–28
- 28 Shaharyar MA, Banerjee T, Sengupta M, Bhowmik R, Sarkar A, Mandal P, Alzarea SI, Ghosh N, Akhtar J, Kazmi I, Karmakar S. Monotherapy or Combination Therapy of Oleanolic Acid? From Therapeutic Significance and Drug Delivery to Clinical Studies: A Comprehensive Review. *Planta Med* 2025; 91:306–319
- 29 Shahidi F, Zhong Y, Chandrasekara A. Antioxidants and human health. In: Yu LL, Tsao R, Shahidi F, eds. *Cereals and pulses: nutraceutical properties and health benefits*. Chichester: John Wiley & Sons; 2012: 273–308
- 30 Sohag AAM, Hossain MT, Rahaman MA, Rahman P, Hasan MS, Das RC, Khan MK, Sikder MH, Alam M, Uddin MJ, *et al.* Molecular pharmacology and therapeutic advances of the pentacyclic triterpene Lupeol. *Phytomedicine* 2022; 99:154012
- 31 Fabio GD, Romanucci V, De Marco A, Zarrelli A. Triterpenoids from *Gymnema sylvestre* and their pharmacological activities. *Molecules* 2014; 19:10956–10981
- 32 Tan YS, Baskaran A, Nallathamby N, Chua KH, Kuppusamy UR, Sabaratnam V. Influence of customized cooking methods on the phenolic contents and antioxidant activities of selected species of oyster mushrooms (*Pleurotus* spp.). *J Food Sci Technol* 2015; 52:3058–3064
- 33 Rohman A, Sugeng R, Diah U. Antioxidant activity, total phenolics and flavonoid contents of ethyl acetate extract and its fractions. *Indones J Pharm* 2006; 17:136–142
- 34 Ou Z, Zhao J, Zhu L, *et al.* Anti-inflammatory effect and potential mechanism of betulinic acid on κ -carrageenan-induced paw edema in mice. *Biomed Pharmacother* 2019; 118:109347
- 35 Tsai JC, Peng WH, Chiu TH, *et al.* Anti-inflammatory effects of *Scoparia dulcis* L. and betulinic acid. *Am J Chin Med* 2011; 39:943–956

- 36 Singh B, Singh JP, Kaur A, Singh N. Phenolic Composition, Antioxidant Potential and Health Benefits of Citrus Peel. *Food Res Int* 2020; 132:109114
- 37 Staszowska-Karkut M, Materska M. Phenolic Composition, Mineral Content, and Beneficial Bioactivities of Leaf Extracts from Black Currant (*Ribes Nigrum L.*), Raspberry (*Rubus Idaeus*), and Aronia (*Aronia Melanocarpa*). *Nutrients* 2020; 12:463
- 38 Kostova I, Bhatia S, Grigorov P, Balkansky S, Parmar VS, Prasad AK, Saso L. Coumarins as Antioxidants. *Curr Med Chem* 2011; 18:3929–3951
- 39 Razavi SM, Nazemiyeh H, Hajiboland R, Kumarasamy Y, Delazar A, Nahar L, Sarker SD. Cumarinas das partes aéreas de *Prangos uloptera* (Apiáceas). *Rev Bras Farmacogn* 2008; 18:1–5
- 40 Velika B, Kron I. Antioxidant Properties of Benzoic Acid Derivatives against Superoxide Radical. *Free Radic Antioxid* 2012; 2:62–67
- 41 Sadowska-Bartosz I, Pączka A, Mołoń M, Bartosz G. Dimethyl Sulfoxide Induces Oxidative Stress in the yeast *Saccharomyces Cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* 2013; 13:820–830

Legends for Figures

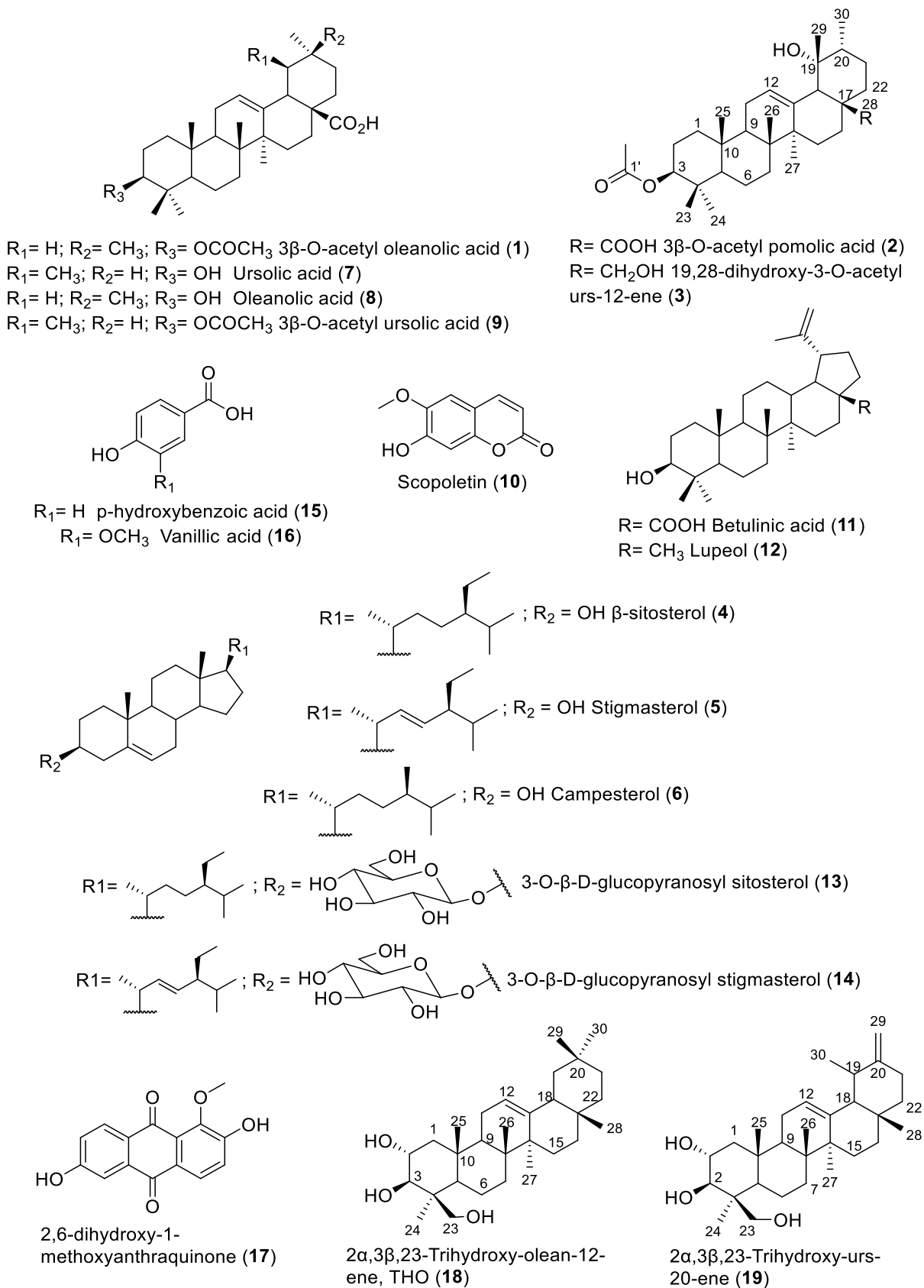


Fig. 1. Chemical structures of compounds 1–19 isolated from the roots of *G. matogrossiana*.

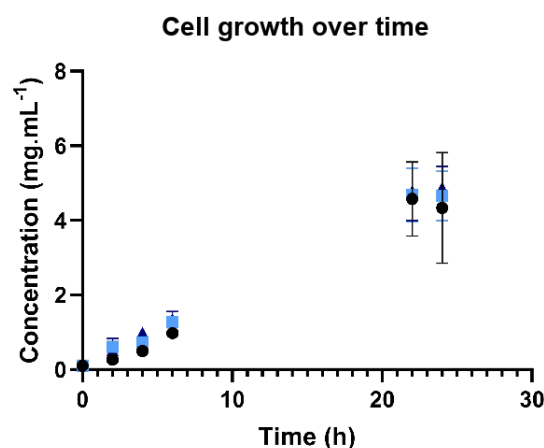


Fig. 2. Growth curve of *Saccharomyces cerevisiae* (strain BY4741) over 24 hours in the presence of crude root extract of *Galianthe matogrossiana*. Cultures were incubated (28 °C/160 rpm) and cell concentrations (mg.mL⁻¹) were determined at 0, 2, 4, 6, 22, and 24 hours. The three curves represent the assays without extracts (squares), with extract at 17.5 µg.mL⁻¹ (triangle), and with extract at 35.0 µg.mL⁻¹ (circle). Values are presented as mean ± standard deviation of three independent experiments (n = 3).

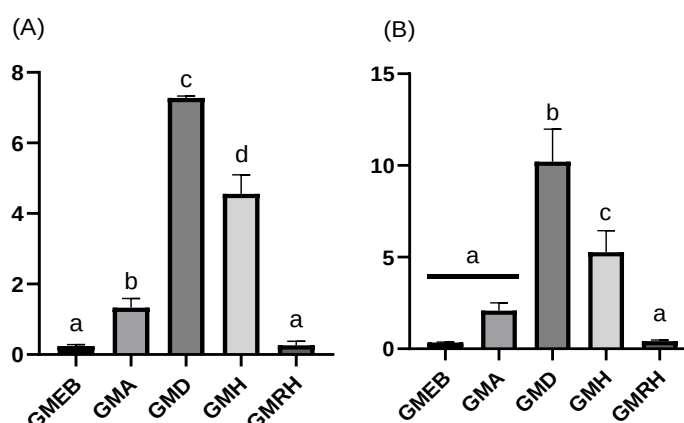


Fig. 3. Inhibition of intracellular oxidation in *Saccharomyces cerevisiae* strains BY4741 (A) and *Ayap1* (B) by the crude extract (EBMeOHR) and its fractions ethyl acetate (GMA), dichloromethane (GMD), hexane (GMH), and hydromethanolic residue (GMRH) from *G. matogrossiana* roots. Cells were exposed to the plant samples for 2 hours, followed by treatment with hydrogen peroxide (2.0 mM) and staining with H₂DCFDA (20 µM). Values are expressed as mean ± standard deviation of three independent experiments (n = 3). Different letters indicate statistically different results at < 0.05.

Table 1. ¹H NMR (500 MHz) and ¹³C NMR (125 MHz) data for compounds **2** and **3** in CDCl₃.

	Compound 2				Compound 3		Literature		
	HSQC		HMBC		HSQC		Ref. for compound 2 [18]		Ref. for compound 3 [19, 20]
	δ _C	δ _H	² J _{CH}	³ J _{CH}	δ _C	δ _H	δ _C	δ _H	δ _C
C									
4	37.68	-	3H-23; 3H-24	-	-	-	37.62	-	38.8
8	39.97	-	3H-26	3H-15; 3H-27	-	-	39.95	-	39.4
10	37.68	-	3H-25; H-3	2H-2	-	-	36.85	-	37.2
13	137.91	-	H-18	2H-11; 3H-27	-	-	137.95	-	138.0
14	39.97	-	3H-15; 2H-16	H-12; H-18; 3H-26	-	-	41.02	-	42.8
17	47.74	-	H-18; 2H-16; 2H-22	-	-	-	47.69	-	36.8
19	73.08	-	H-18; 3H-29	3H-30;	-	-	73.06	-	-
28	183.84	-	-	H-18; 2H-16; 2H-22	-	-	187.80	-	-
1'	171.07	-	3H-2'	H-3	-	-	-	-	-
CH									
3	80.97	4.52 (<i>dd</i>)	2H-2	3H-23; 3H-24	-	-	80.89	4.47 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> 6.4 e 9.2 Hz)	79.0
5	55.20	0.87 ou 0.88	-	3H-23; 3H-24; 3H-25	-	-	55.09	-	55.4
9	47.10	-	-	H-12; 3H-25; 3H-26	-	-	47.03	-	47.8
12	129.30	5.36 (<i>s</i>)	2H-11	H-18	-	-	129.20	5.35 (1H, <i>s</i>)	125.0
18	52.85	2.55 (1H, <i>s</i>)	-	H-12; 2H-22; 3H-29	-	-	52.76	2.50 (1H, <i>s</i>)	54.1
19	-	-	-	-	-	-	-	-	38.9
20	41.08	1.45	2H-21; 3H-30	H-18; 2H-22; 3H-29	-	-	40.96	-	39.4
CH₂									
1	38.08	1.63, 1.06	2H-2	H-3; 3H-25	-	-	37.97	-	38.8
2	23.52	1.64	H-3	-	-	-	23.61	-	27.3
6	18.28	1.55, 1.39	-	-	-	-	18.22	-	18.4
7	32.59	1.51, 1.30	-	3H-26	-	-	32.48	-	32.9
11	23.66	1.98	H-12	-	-	-	23.46	-	23.4
15	29.65	1.23	-	3H-27	-	-	28.23	-	29.2
16	25.34	2.54, 1.63	-	H-18; 2H-22	-	-	25.27	-	25.27
21	28.18	1.73, 1.06	-	3H-30	-	-	25.95	-	30.7
22	37.68	1.82, 1.70	-	-	-	-	37.62	-	30.6
28	-	-	-	-	65.04	4.18 (<i>m</i>)	-	-	69.7
CH₃									
23	28.03	0.88 (3H, <i>s</i>)	-	H-3; 3H-24	-	-	27.43	0.84 (3H, <i>s</i>)	28.1
24	16.67	0.87 (3H, <i>s</i>)	-	H-3; 3H-23	-	-	16.65	0.82 (3H, <i>s</i>)	15.4
25	15.32	0.96 (3H, <i>s</i>)	-	-	-	-	15.29	0.91 (3H, <i>s</i>)	15.6
26	16.88	0.74 (3H, <i>s</i>)	-	-	-	-	16.90	0.69 (3H, <i>s</i>)	16.9
27	24.48	1.27 (<i>s</i>)	-	-	-	-	24.48	1.21 (3H, <i>s</i>)	23.4
29	27.42	1.23 (3H, <i>s</i>)	-	H-18	-	-	28.13	1.18 (3H, <i>s</i>)	16.2
30	16.14	0.97 (<i>s</i>)	-	-	-	-	16.19	0.93 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> 7.6 Hz)	21.3
2'	21.30	2.07 (<i>s</i>)	-	-	-	-	21.35	2.02 (3H, <i>s</i>)	-

Chemical shifts (δ) are reported in ppm. Coupling constants (*J*) are given in Hz and are shown in parentheses. Assignments were confirmed by 1D and 2D NMR experiments (HSQC and HMBC). Data were compared with literature values [18-20], which were obtained in C₅D₅N, CD₃OD at 400 MHz (¹H) and 100 MHz (¹³C).

Table 2. ^1H NMR (500 MHz) and ^{13}C NMR (125 MHz) data for compounds **18** and **19** in CD_3OD .

	Compound 18				Compound 19				Literature			
	HSQC		HMBC		HSQC		HMBC		Ref. for compound 18 ^[21]		Ref. for compound 19 ^[22]	
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
C												
4	41.10	-	3H-24	-	41.10	-	3H-24	-	43.2	-	44.1	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-	39.8	-	40.8	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	38.1	-	39.0	-
13	145.10*	-	-	3H-27	138.13*	-	-	H-27	145.2	-	139.6	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-	41.7	-	43.5	-
17	-	-	-	-	-	-	-	-	32.4	-	49.2	-
20	31.9	-	-	-	153.29*	-	-	3H-28	31.1	-	154.5	-
28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	181.0	-
CH												
2	65.79	3.90 (m)	-	-	65.79	3.90 (m)	-	-	69.1	3.90 (m)	69.7	3.72 – 3.73 (m)
3	77.35	3.62 (sl)	-	3H-24	77.30	3.62(s)	-	2H-23/ 3H-24	85.4	3.20 (d. <i>J</i> 8.99 Hz)	78.2	3.39 (d. <i>J</i> 9.6 Hz)
5	55.69	-	-	3H-25	55.69	-	-	-	55.8	0.96 (m)	48.2	1.32 – 1.33 (m)
9	-	-	-	-	-	-	-	-	47.7	-	48.8	1.70 – 1.71 (m)
12	122.05	5.28 (m)	-	-	125.60	5.29 (m)	-	-	121.3	5.19 (dd. <i>J</i> 3.95 e 3.13 Hz)	127.0	5.29 (t. 3 Hz)
18	41.36	2.86 (m)	-	-	41.34	2.86 (m)	-	3H-28	47.1	1.94 (m)	56.6	2.29 (d. 14.4 Hz)
19	45.87	1.7 (m); 1.15 (s)	-	-	55.19 2.30 41.99	2.85 (m)	-	3H-29	-	-	38.5	1.03 (d. 7.2 Hz)
CH₂												
1	40.92	1.32 (m); 1.6 (m)	-	3H-25	40.92	1.32 (m); 1.6 (m)	-	3H-25	46.4	0.94 (m); 2.05 (m)	48.0	0.92 – 0.93 (m) 1.98 – 1.99 (m)
6	17.58	1.40 (m)	-	3H- 26	17.58	1.40 (m)	-	3H- 26	18.4	1.62 (m)	19.1	1.41 – 1.42 (m) 1.5 – 1.51 (m)
7	-	-	-	-	-	-	-	-	32.7	1.40 (m); 0.87 (m)	33.3	2.23 – 2.24 (m) 2.35 – 2.36 (m)
11	23.18	1.97 (m)	-	-	23.03	1.97 (m)	-	3H-26	23.8	1.92 (m)	24.5	2.0 – 2.01 (m)
15	27.38	1.7 (m)	-	3H-27	-	-	-	-	26.0	1.25 (m)	29.2	1.17 – 1.18 (m) 1.97 – 1.98 (m)
16	-	-	-	-	-	-	-	-	26.8	0.80 (m)	25.3	1.77 – 1.78 (m) 2.25 – 2.26 (m)
19	45.87	1.70 (m). 1.15 (s)	-	3H-29; 3H-30	-	-	-	-	46.7	1.66 (m); 1.11(m)	-	-
21	33.50	1.4 (m); 1.22(s)	-	3H-29; 3H-30	-	-	-	-	34.7	1.22 (m)	33.6	1.35 – 1.36 (m) 1.68 – 1.69 (m)
22	-	-	-	-	31.92	2.24 (m)	-	3H-28	37.1	1.23 (m); 1.40 (m)	40.4	1.64 – 1.65 (m) 1.86 – 1.87 (m)
23	69.92	3.54 (m); 3.42(s)	-	3H-24	69.92	3.54 (m); 3.42(s)	-	3H-24	65.6	4.10 (d. <i>J</i> 11.33 Hz); 3.40 (d. <i>J</i> 11.33 Hz);	66.4	3.29 (d. 9.6 Hz) 3.53 (d. 9.6 Hz)
30	-	-	-	-	103.83	4.70 (s). 4.65(s)	-	-	-	-	105.3	4.70 (s) 4.65 (s)
CH₃												
24	16.19	0.80 (s)	-	-	-	0.80 (s)	H-4	-	22.9	1.30 (s)	13.9	0.73 (s)
25	17.35	1.19 (s)	-	-	-	1.19 (s)	-	-	17.4	0.97 (s)	17.7	1.07 (s)
26	-	1.09 (s)	-	-	-	1.09(s)	-	-	16.7	0.94 (s)	17.8	0.88 (s)
27	25.11	1.20 (s)	-	-	22.58	1.22 (s)	-	-	26.0	1.13 (s)	24.1	1.21 (s)
28	15.84	1.04 (s)	-	-	15.84	1.04 (s)	-	-	28.4	0.83 (s)	-	-
29	32.16	0.93 (s)	-	3H-30	-	-	-	-	33.3	0.88 (s)	16.8	1.03 (d. 7.2 Hz)
30	22.58	0.96 (s)	-	3H-29	-	-	-	-	23.6	0.87 (s)	-	-

Data compared with literature values [21, 22], which were obtained in CD_3OD at 600 MHz (^1H) and 150 MHz (^{13}C).

8. ANEXO 3

Metodologia avaliação antichagásica

A avaliação da atividade anti-Trypanosoma cruzi das moléculas obtidas neste trabalho foi realizada pelo doutorando Afonso Santine M. M. Velez, no Instituto de Veterinária - UFRRJ, no Laboratório de Imunologia e Virologia Veterinária, sob a supervisão da Profa Débora Decoté-Ricardo de Lima.

Cultivo de LLC-MK2

As células LLC-MK2 (ATCC) são fibroblastos que apresentam morfologia epitelial e foram isoladas do rim de macacos rhesus (Macaca mulata). As células foram mantidas em meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) completo, suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB), em estufa a 37°C com controle de umidade e sob atmosfera a 5% de CO₂. O inóculo foi obtido pelo tratamento da monocamada de células com solução aquosa de 0,25% m/v de tripsina e 1 mM de ácido etileno-diamino acético (EDTA) por 5 min. Passagens na proporção de 1:6 do volume do inóculo foram realizadas a cada 4-5 dias.

Cultivo de *T. cruzi* na forma tripomastigota

Células LLC-MK2 com 50% de confluência em garrafas de cultura de 175 cm² de área de cultivo (T-175) foram infectadas com 5×10^7 formas tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa Tulahuen C2C4 LacZ, transfectada com plasmídeo de Escherichia coli para a expressão citoplasmática da enzima beta-galactosidase (β Gal). Foi utilizado meio DMEM com 2% SFB. Após 24h, o meio foi removido e a monocamada de células lavada com tampão fosfato-salino (pH 7,2) (PBS). Meio DMEM com 2% SFB foi adicionado à cultura e renovado a cada 2 dias. Formas tripomastigotas foram recolhidas do sobrenadante entre o 5º e 10º dias após a infecção, e separadas de células não aderidas por centrifugação diferencial.

Soluções estoques das misturas

As soluções estoques dos compostos utilizados nos ensaios biológicos, foram obtidos pela solubilização destes em dimetilsulfóxido (DMSO), na concentração de 30 e 50 mM. As concentrações utilizadas nos ensaios foram obtidas por meio da diluição seriada das soluções estoque preparadas para cada mistura. As diluições foram realizadas no próprio meio de cultura do experimento, de forma que a concentração máxima de DMSO presente nas culturas de células não ultrapassasse 0,3% v/v.

Atividade trypanocida contra *T. cruzi*

Em uma placa de 96 poços transparente, foi adicionada uma suspensão de 2×10^4 células LLC-MK2 (ATCC) em meio DMEM + 2% SFB. As células foram incubadas a 37°C (5% CO₂) por 3 h e em seguida lavadas com PBS para remoção de células não aderidas. Uma suspensão contendo $1,5 \times 10^5$ formas trypomastigotas de *T. cruzi* da cepa Tulahuen C2C4 LacZ, que expressa a enzima β -galactosidase, foi adicionada às células, seguindo-se incubação a 37°C (5% CO₂) por 20 h para estabelecimento da infecção. Os parasitos não internalizados foram removidos por três lavagens sucessivas com PBS, seguindo-se tratamento com diluições seriadas dos compostos **X** em triplicatas, pré-diluídos em DMEM + 2% SFB. Controles não tratado, veículo (0,3% v/v DMSO) e branco (sem adição de parasitos) foram incluídos no experimento. Benzonidazol foi utilizado em diluição seriada como controle positivo. Adicionaram-se então 30 μ L de solução 0,5 mM do substrato vermelho de clorofenol β -galactopiranosídeo (CPRG) em PBS com 0,9% v/v Igepal CA-630. Após incubação por 1,5 h a absorbância foi medida a $\lambda = 570$ nm com auxílio de um leitor de placas.

Citotoxicidade contra células LLC-MK2

Em uma placa de 96 poços transparente, foi adicionada uma suspensão de 2×10^4 células LLC-MK2 (ATCC) em meio DMEM + 2% SFB. As células foram incubadas a 37°C (5% CO₂) por 20 h e em seguida lavadas com PBS para remoção de células não aderidas. As células foram tratadas com diluições seriadas dos compostos **X** em triplicatas, pré-diluídos em DMEM + 2% SFB. Controles não tratado, veículo (0,3% v/v DMSO) e branco (sem adição de células) foram incluídos no experimento. Após incubação por 48 h o sobrenadante foi removido e a monocamada de células lavada com PBS, renovando-se o meio de cultura em seguida. Adicionaram-se então 20 μ L de solução 3,0 mM de sal de MTT, seguindo-se incubação por mais 1,5 h. O sobrenadante foi então removido e os cristais de formazana de MTT dissolvidos pela adição de 100 μ L/poço de DMSO. Após incubação por 1,5 h para dissolução dos cristais

de MTT ao abrigo da luz e 37°C, a absorbância foi medida a $\lambda = 570$ nm com auxílio de um leitor de placas.

Tratamento estatístico de dados

Os dados de absorbância foram convertidos em valores de viabilidade relativa à média do controle veículo, descontados da média do controle branco, conforme a fórmula abaixo:

$$V(\%) = \frac{Abs - M_B}{M_V - M_B}$$

$V(\%)$ = Viabilidade em %

Abs = Leitura de absorbância em determinado poço

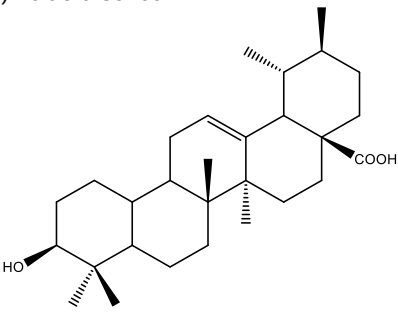
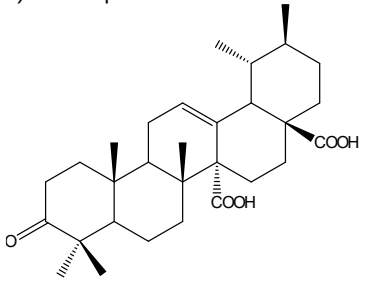
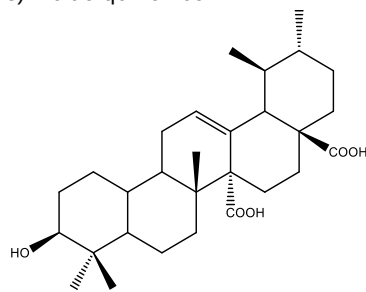
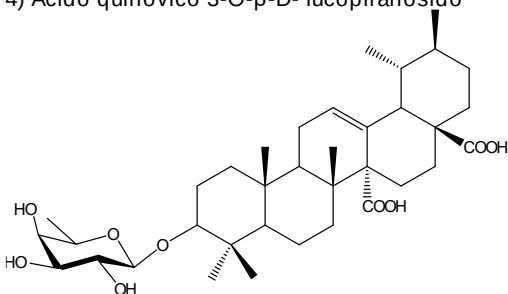
M_B = Média da absorbância da triplicata do **Controle Branco**

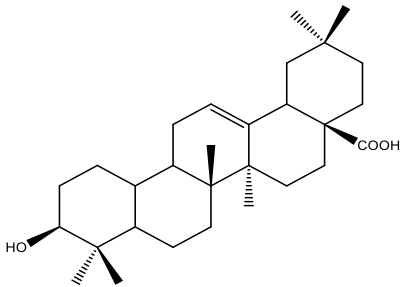
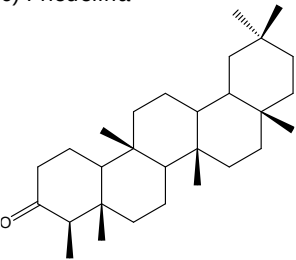
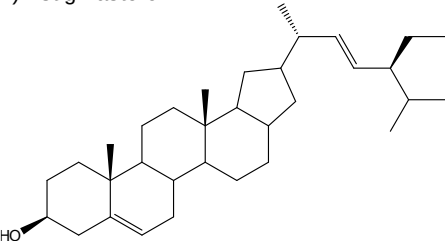
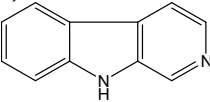
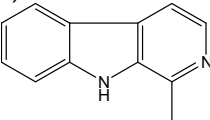
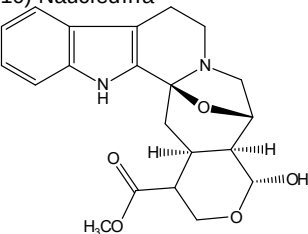
M_V = Média da absorbância da triplicata do **Controle Veículo**

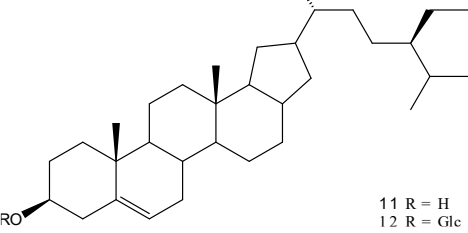
Os valores de percentuais foram inseridos no software GraphPad Prism 9, onde foram realizados os cálculos estatísticos e gerados os gráficos apresentados. Para os cálculos da concentração inibitória do crescimento em 50% (CI₅₀) foi utilizado o modelo padrão do software de regressão não linear de para valor de concentração de inibidor *versus* resposta normalizada com inclinação variável. Os resultados finais para os valores de CI₅₀ foram obtidos pela média de ao menos 3 experimentos independentes. Para os testes de significância estatística foi utilizada a análise de variância simples *one-way* ANOVA.

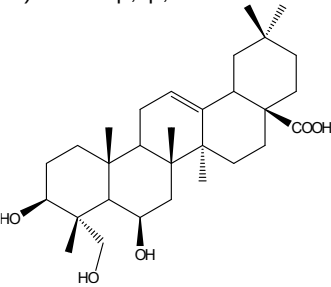
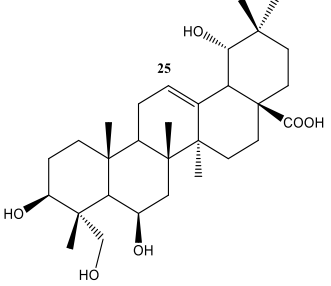
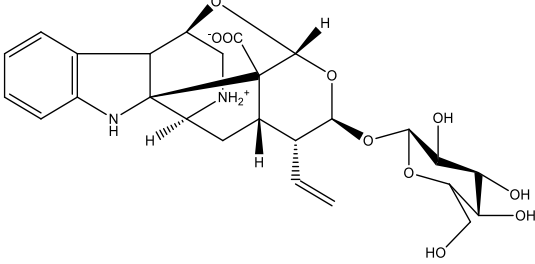
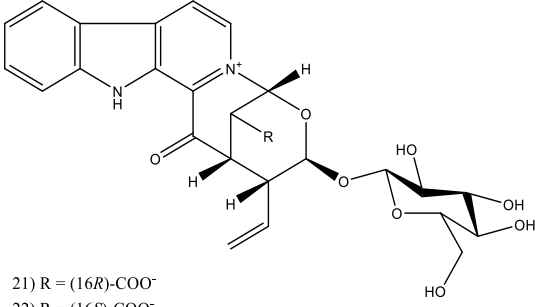
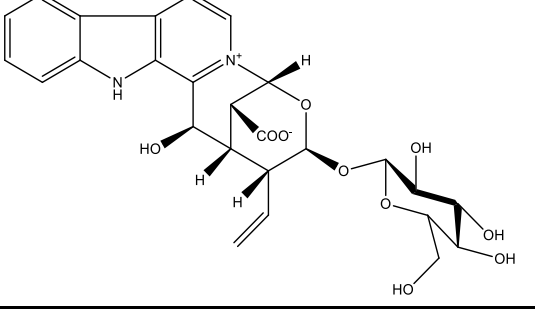
9. ANEXO 4

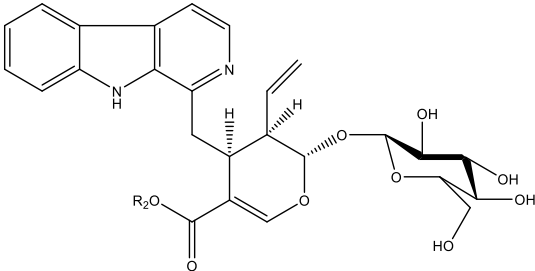
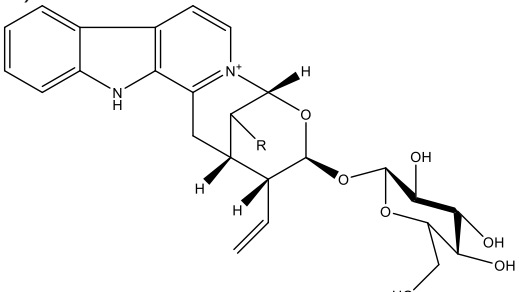
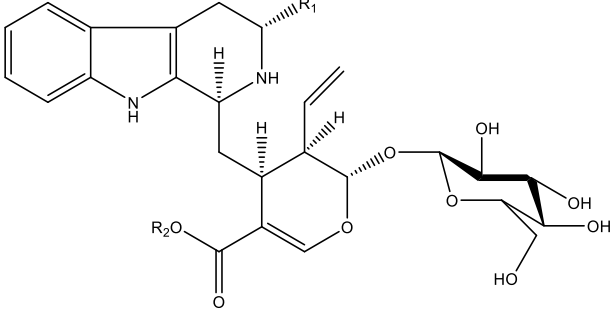
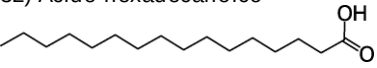
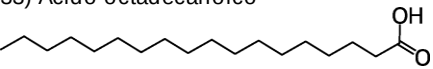
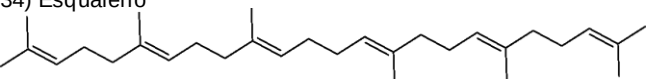
Dados revisão Rubiaceae

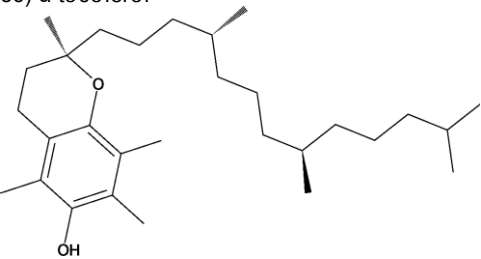
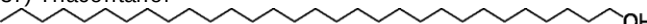
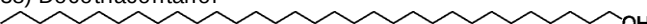
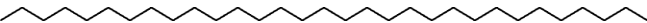
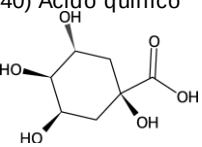
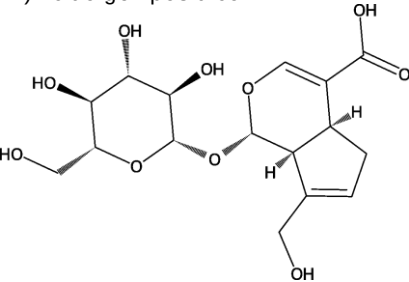
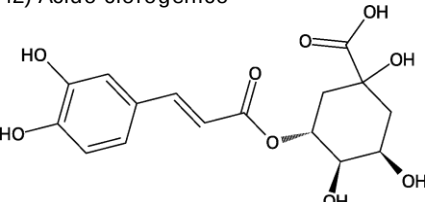
Classe	Substância	Espécie	Parte da planta	Atividade Biológica	Referência
Triterpeno	1) Ácido ursólico 	<i>Brenania brieyi</i>	Folhas		(Matefo <i>et al.</i> , 2025)
		<i>Nauclea xanthoxylon</i>	Raízes		(Nangmou <i>et al.</i> , 2023)
Triterpeno	2) Ácido quafrinólico 	<i>Nauclea xanthoxylon</i>	Raízes		(Nangmou <i>et al.</i> , 2023)
Triterpeno	3) Ácido quinóvico 	<i>Nauclea xanthoxylon</i>	Raízes		(Nangmou <i>et al.</i> , 2023)
		<i>Brenania brieyi</i>	Casca do caule		(Matefo <i>et al.</i> , 2025)
Triterpeno	4) Ácido quinóvico 3-O-β-D- fucopiranósido 	<i>Nauclea xanthoxylon</i>	Raízes		(Nangmou <i>et al.</i> , 2023)

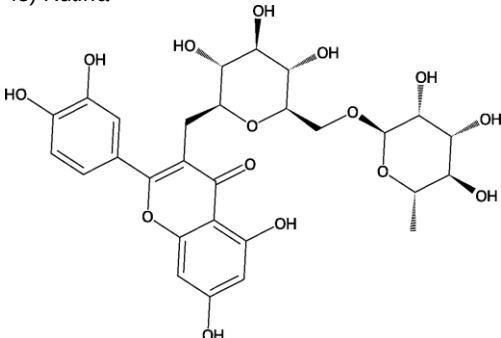
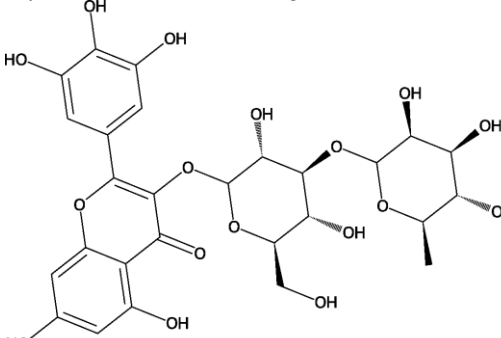
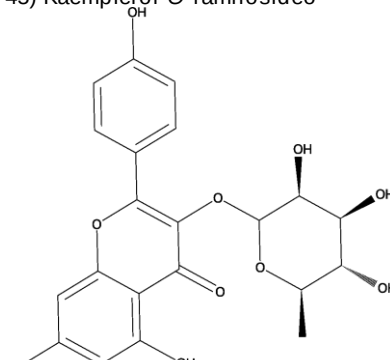
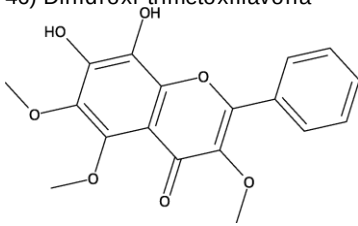
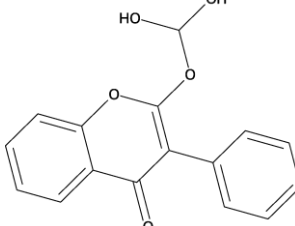
Classe	Substância	Espécie	Parte da planta	Atividade Biológica	Referência
Triterpeno	5) Ácido oleanólico 	<i>Brenania briei</i> <i>Randia dumetorum lamk</i>	Casca do caule Fruto	Antiplasmodial (<i>Plasmodium falciparum</i>)	(Matefo et al., 2025) (Narota et al., 2023)
Triterpeno	6) Friedelina 	<i>Nauclea xanthoxylon</i>	Raízes		(Nangmou et al., 2023)
Esteróide	7) Estigmasterol 	<i>Brenania briei</i>	Casca do caule		(Matefo et al., 2025)
Alcaloide indólico	8) Norharmano 	<i>Ochreinauclea maingayi</i>	Casca		(Osman et al., 2024)
Alcaloide indólico	9) Harmano 	<i>Ochreinauclea maingayi</i>	Casca		(Osman et al., 2024)
Alcaloide indólico	10) Naucedina 	<i>Ochreinauclea maingayi</i>	Casca		(Osman et al., 2024)

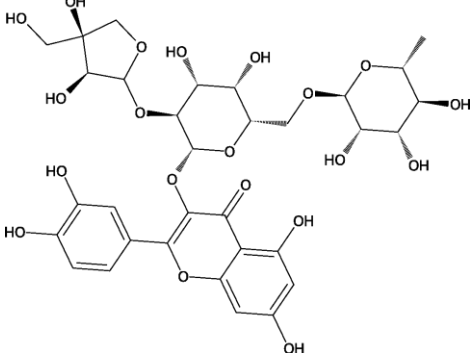
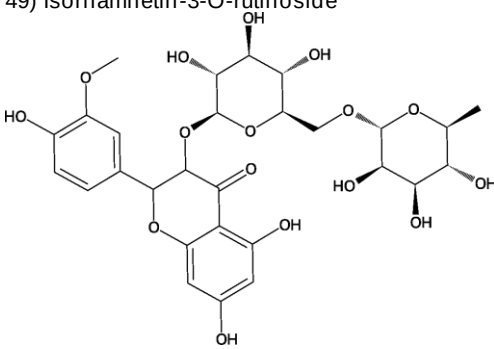
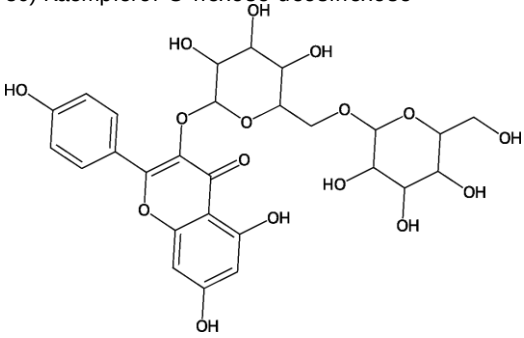
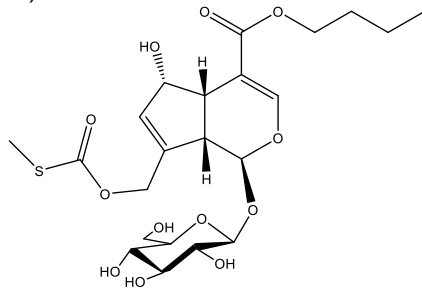
Classe	Substância	Espécie	Parte da planta	Atividade Biológica	Referência
Esteroides	11) β -sitosterol	<i>Brenania brieiyi</i>	Casca do caule		(Matefo <i>et al.</i> , 2025)
	12) β -sitosterol 3-O- β -D-glicopiranosídeo (daucosterol)	<i>Ophiorrhiza chinensis</i>	Plantas inteiras		(Bu <i>et al.</i> , 2024)
		<i>Phyllopentas schimperi</i>	Cascas do caule e Raízes		(Nanfack <i>et al.</i> , 2024)
Alcaloide indólico	13) Neonaucina	<i>Ochreinaucle a maingayi</i>	Casca		(Osman <i>et al.</i> , 2024)
Alcaloide indólico	14) 1,2,3,4-tetranorharmano-1-ona	<i>Ochreinaucle a maingayi</i>	Casca		(Osman <i>et al.</i> , 2024)
Alcaloide indólico	15) Naulafina	<i>Ochreinaucle a maingayi</i>	Casca		(Osman <i>et al.</i> , 2024)
Alcaloide indólico	16) Cadambina	<i>Ochreinaucle a maingayi</i>	Casca		(Osman <i>et al.</i> , 2024)
Alcaloide indólico	17) Dihidrodeglicocadambina 7	<i>Ochreinaucle a maingayi</i>	Casca		(Osman <i>et al.</i> , 2024)

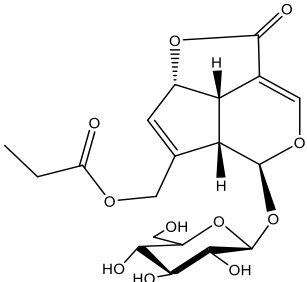
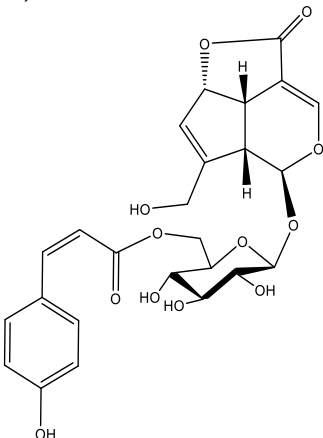
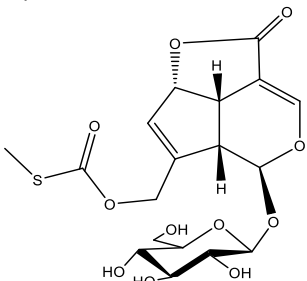
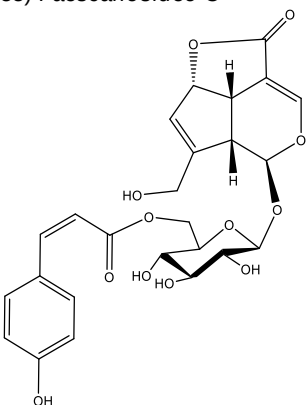
Classe	Substância	Espécie	Parte da planta	Atividade Biológica	Referência
Triterpeno	18) Ácido 3β,6β,23-triidrioleano-12-en-28-óico 	<i>Mussaenda recurvata</i> Nakai	Partes aéreas	moderada atividade anti-inflamatória	(Du <i>et al.</i> , 2024)
Triterpenos	19) Ácido 3β,6β,19α,23-tetrahidroxioleano-12-en-28-óico 	<i>Mussaenda recurvata</i> Nakai	Partes aéreas		(Du <i>et al.</i> , 2024)
Alcaloide	20) Ofiorglucidina A 	<i>Ophiorrhiza japonica</i>	Caule		(Shi <i>et al.</i> , 2024)
Alcaloide	21) Ofiorglucidina B 22) Ofiorglucidina C  21) R = (16<i>R</i>)-COO⁻ 22) R = (16<i>S</i>)-COO⁻	<i>Ophiorrhiza japonica</i>	Caule	Significativa atividade inibidora da enzima xantina oxidase.	(Shi <i>et al.</i> , 2024)
Alcaloide	23) Ofiorglucidina D 	<i>Ophiorrhiza japonica</i>	Caule		(Shi <i>et al.</i> , 2024)

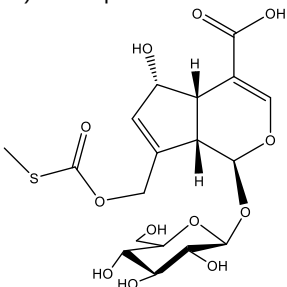
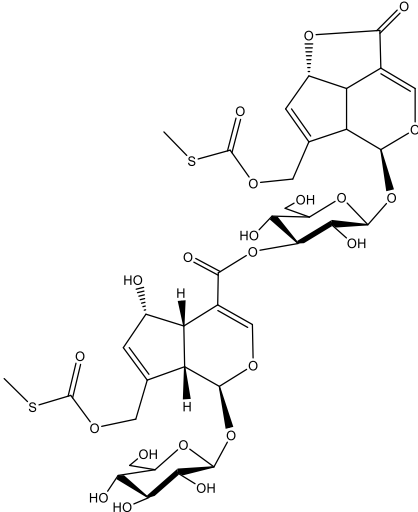
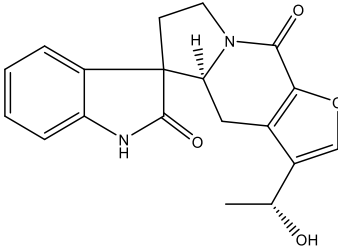
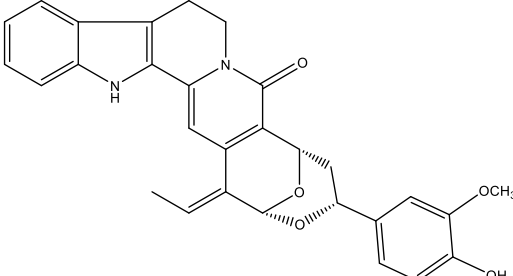
Classe	Substância	Espécie	Parte da planta	Atividade Biológica	Referência
Alcaloide	24) Ofiorglucidina E 25) Lialosídeo 26) Desoxicordifolina  24) $R_1 = H, R_2 = CH_2CH_3$ 25) $R_1 = H, R_2 = CH_3$ 26) $R_1 = COOH, R_2 = CH_3$	<i>Ophiorrhiza japonica</i>	Caule		(Shi <i>et al.</i> , 2024)
Alcaloide	27) Ofiorina B 28) Ofiorina A  27) $R = (16R)-COO^-$ 28) $R = (16S)-COO^-$	<i>Ophiorrhiza japonica</i>	Caule		(Shi <i>et al.</i> , 2024)
Alcaloide	29) ácido estrictosidínico 30) estritosidina 31) 5 α -carboxistrictosidina  29) $R_1 = H, R_2 = H$ 30) $R_1 = H, R_2 = CH_3$ 31) $R_1 = COOH, R_2 = CH_3$	<i>Ophiorrhiza japonica</i>	Caule		(Shi <i>et al.</i> , 2024)
Ácido graxo	32) Ácido hexadecanoico 	<i>Cordia myrciifolia</i>	Folhas		(Rodrigues <i>et al.</i> , 2024)
Ácido graxo	33) Ácido octadecanóico 	<i>Cordia myrciifolia</i>	Folhas		(Rodrigues <i>et al.</i> , 2024)
Flavonóide	34) Esqualeno 	<i>Cordia myrciifolia</i>	Folhas		(Rodrigues <i>et al.</i> , 2024)

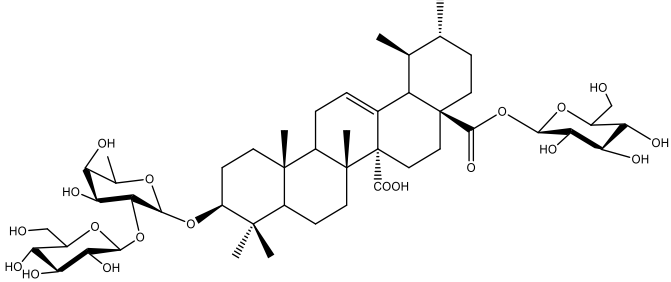
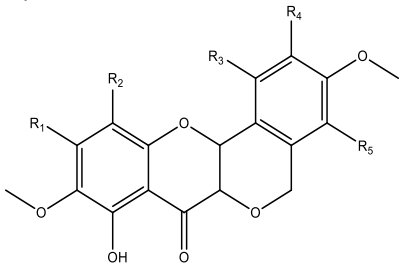
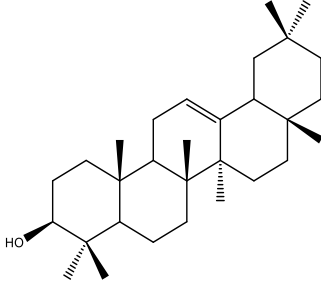
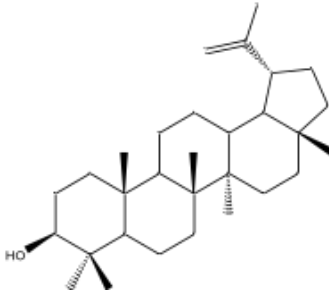
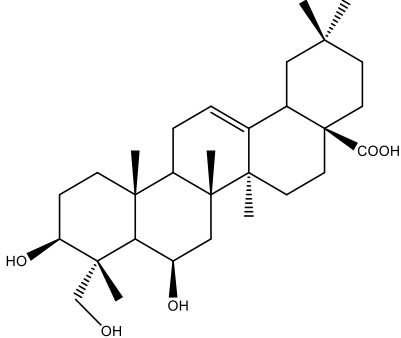
Classe	Substância	Espécie	Parte da planta	Atividade Biológica	Referência
Alcano	35) Nonacosano 	<i>Cordia myrciifolia</i>	Folhas		(Rodrigues et al., 2024)
Fenol Metilado	36) α -tocoferol 	<i>Cordia myrciifolia</i>	Folhas		(Rodrigues et al., 2024)
Ácido graxo	37) Triacontanol 	<i>Cordia myrciifolia</i>	Folhas		(Rodrigues et al., 2024)
Ácido graxo	38) Docotriacontanol 	<i>Cordia myrciifolia</i>	Folhas		(Rodrigues et al., 2024)
Alcano	39) Hentriacontana 	<i>Cordia myrciifolia</i>	Folhas		(Rodrigues et al., 2024)
Poliol	40) Ácido quinico 	<i>Cordia myrciifolia</i>	Folhas		(Rodrigues et al., 2024)
Iridoide glicosilado	41) Ácido geniposídico 	<i>Cordia myrciifolia</i>	Folhas		(Rodrigues et al., 2024)
fenilpropanoide	42) Ácido clorogênico 	<i>Cordia myrciifolia</i>	Folhas		(Rodrigues et al., 2024)

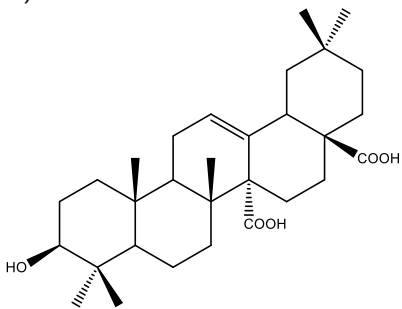
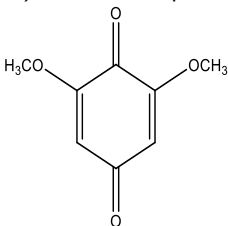
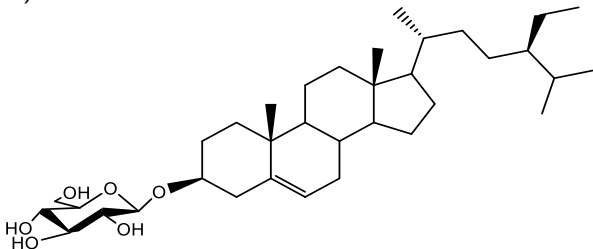
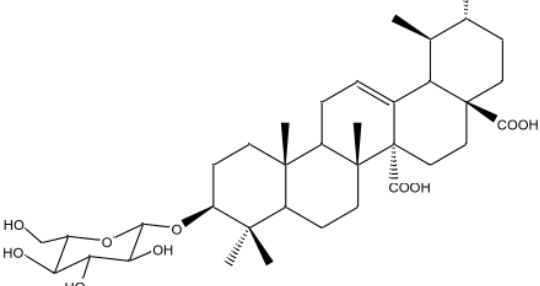
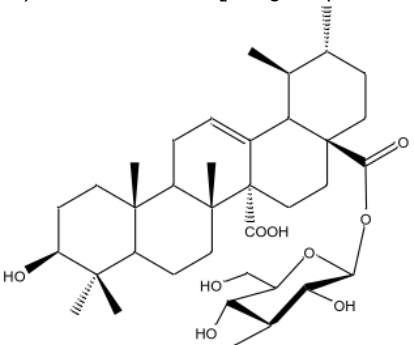
Classe	Substância	Espécie	Parte da planta	Atividade Biológica	Referência
Flavonoide	43) Rutina 	<i>Cordia myrciifolia</i>	Folhas		(Rodrigues <i>et al.</i> , 2024)
Flavonoide	44) Miricetina-3-O-ramnosilglucosídeo 	<i>Cordia myrciifolia</i>	Folhas		(Rodrigues <i>et al.</i> , 2024)
Flavonoide	45) Kaempferol-O-ramnosideo 	<i>Cordia myrciifolia</i>	Folhas		(Rodrigues <i>et al.</i> , 2024)
Flavonoide	46) Dihidroxi-trimetoxiflavona 	<i>Cordia myrciifolia</i>	Folhas		(Rodrigues <i>et al.</i> , 2024)
Flavonoide	47) Dihidroxi-metóxi-isoflavona 	<i>Cordia myrciifolia</i>	Folhas		(Rodrigues <i>et al.</i> , 2024)

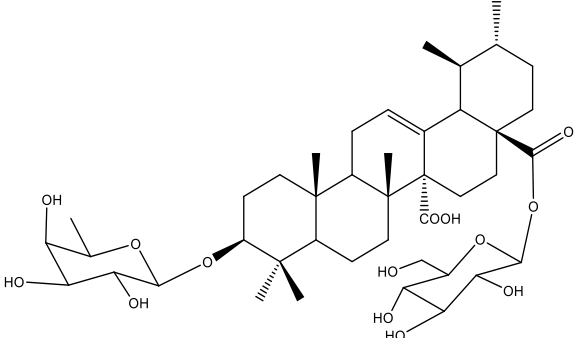
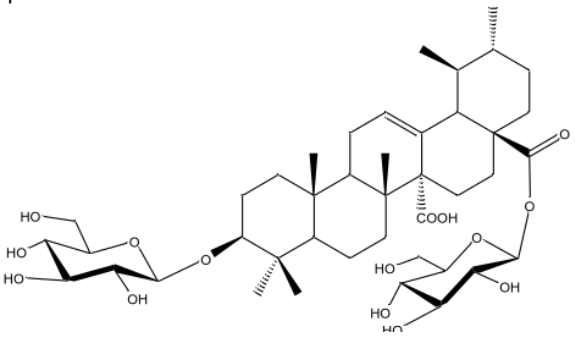
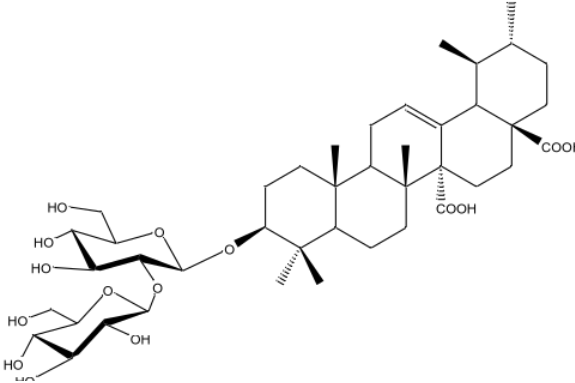
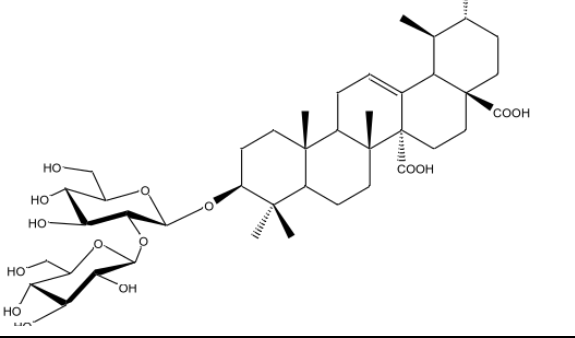
Classe	Substância	Espécie	Parte da planta	Atividade Biológica	Referência
Flavonoide	48) Quercetina-3-O-β-D-galactopiranosil-(1-2)-α-apiopiranosil- (1-6)-α-L-ramnopiranosídeo 	<i>Cordia myrciifolia</i>	Folhas		(Rodrigues <i>et al.</i> , 2024)
Flavonoide	49) Isorhamnetin-3-O-rutinoside 	<i>Cordia myrciifolia</i>	Folhas		(Rodrigues <i>et al.</i> , 2024)
Flavonoide	50) Kaempferol-O-hexose-deosihexose 	<i>Cordia myrciifolia</i>	Folhas		(Rodrigues <i>et al.</i> , 2024)
Iridóide Glicosilado	51) Paescanosídeo A 	<i>Paederia scandens</i>	partes aéreas		(Fukaya <i>et al.</i> , 2025)

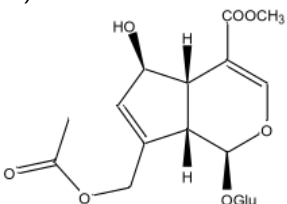
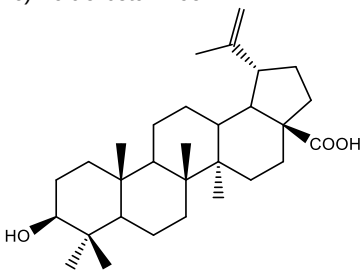
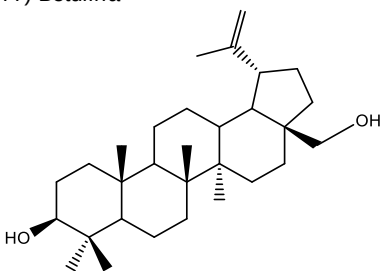
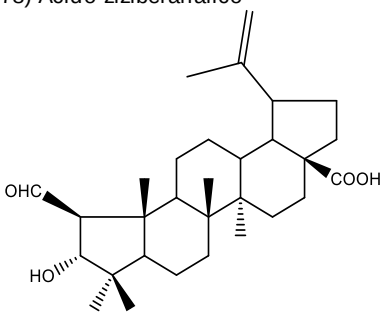
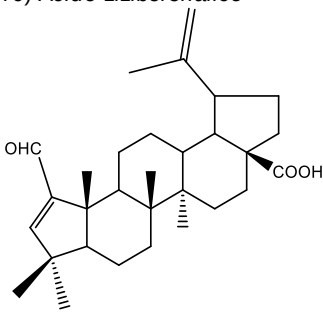
Classe	Substância	Espécie	Parte da planta	Atividade Biológica	Referência
Iridóide Glicosilado	52) Paescanosídeo B 	<i>Paederia scandens</i>	partes aéreas		(Fukaya <i>et al.</i> , 2025)
Iridóide Glicosilado	53) Paescanosídeo C 	<i>Paederia scandens</i>	partes aéreas		(Fukaya <i>et al.</i> , 2025)
Iridóide Glicosilado	54) Pederosídeo 	<i>Paederia scandens</i>	partes aéreas	anticancerígeno	(Fukaya <i>et al.</i> , 2025)
Iridóide Glicosilado	55) Paescanosídeo C 	<i>Paederia scandens</i>	partes aéreas		(Fukaya <i>et al.</i> , 2025)

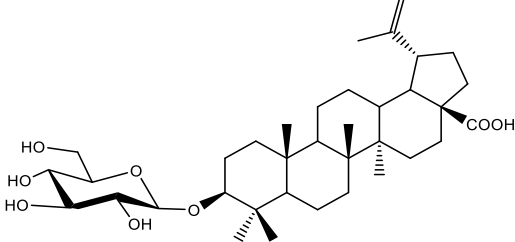
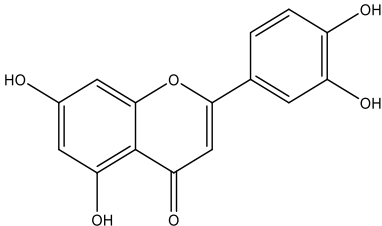
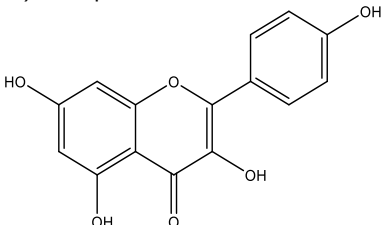
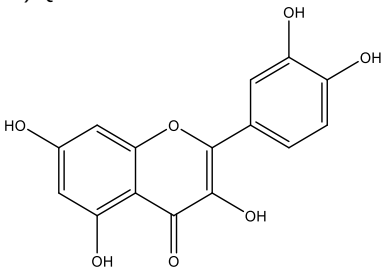
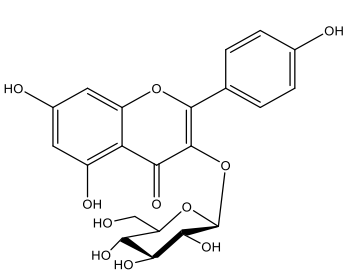
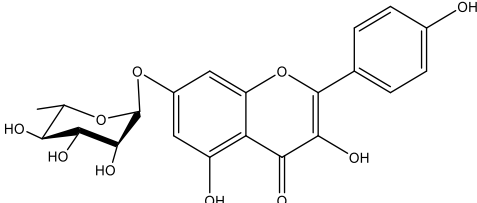
Classe	Substância	Espécie	Parte da planta	Atividade Biológica	Referência
Iridóide Glicosilado	56) Ácido pediosídico 	<i>Paederia scandens</i>	partes aéreas		(Fukaya <i>et al.</i> , 2025)
Iridóide Glicosilado	57) Saprosmosídeo D 	<i>Paederia scandens</i>	partes aéreas		(Fukaya <i>et al.</i> , 2025)
Alcaloide	58) Naucloficina A 	<i>Nauclea officinalis</i>	madeira		(Li <i>et al.</i> , 2025)
Alcaloide	59) Naucloficina B 	<i>Nauclea officinalis</i>	madeira	antiinflamatória	(Li <i>et al.</i> , 2025)

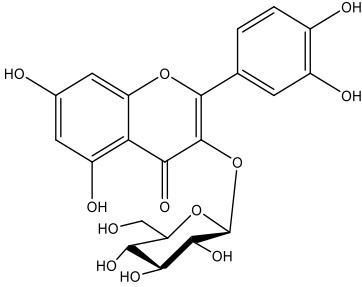
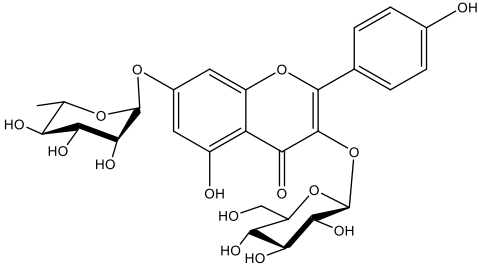
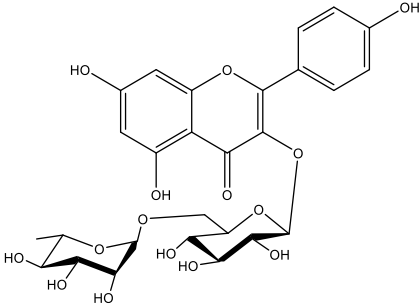
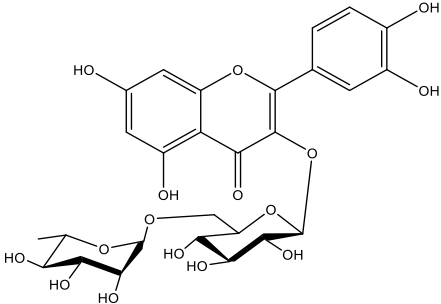
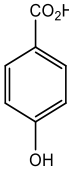
Classe	Substância	Espécie	Parte da planta	Atividade Biológica	Referência
Saponina	60) Brenaniosídeo 	<i>Brenania briei</i>	Casca do caule e folhas		(Matefo et al., 2025)
Flavonoide	61) Brenaniol A 62) Brenaniol B  61) R₁=R₂=OCH₃; R₃=R₄=H; R₅=OH 62) R₁=R₃=OH; R₂=H; R₄=R₅=OCH₃	<i>Brenania briei</i>	Casca do caule e folhas	Antibacteriana (brenaniol A)	(Matefo et al., 2025)
Triterpeno	63) β-amirina 	<i>Brenania briei</i>	Casca do caule e folhas		(Matefo et al., 2025)
Triterpeno	64) Lupeol 	<i>Brenania briei</i>	Casca do caule e folhas	Antiplasmodial (<i>Plasmodium falciparum</i>)	(Matefo et al., 2025)
Triterpeno	65) Uncargenina C 	<i>Brenania briei</i>	Casca do caule e folhas		(Matefo et al., 2025)

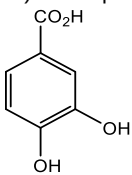
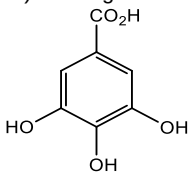
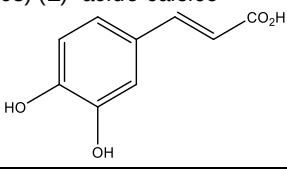
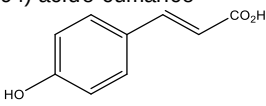
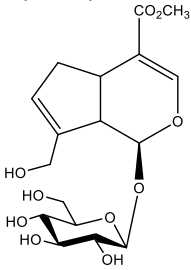
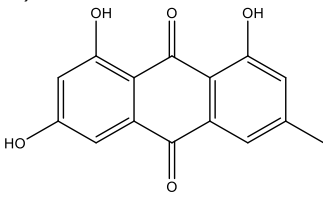
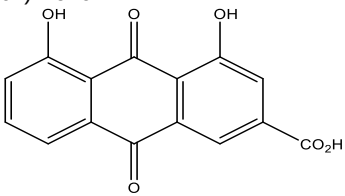
Classe	Substância	Espécie	Parte da planta	Atividade Biológica	Referência
Triterpeno	66) Ácido cincólico 	<i>Brenania brieyi</i>	Casca do caule e folhas		(Matefo et al., 2025)
Benzoquinona	67) 2,6-dimetoxiquinona 	<i>Brenania brieyi</i>	Casca do caule e folhas		(Matefo et al., 2025)
Saponina	68) Daucosterol 	<i>Brenania brieyi</i>	Casca do caule e folhas		(Matefo et al., 2025)
Saponina	69) Ácido quinóico 3-O-β-D-glucopiranosídeo 	<i>Brenania brieyi</i>	Casca do caule e folhas		(Matefo et al., 2025)
Saponina	70) Ácido éster 28-O-[β-D-glucopiranosil] quinóico 	<i>Brenania brieyi</i>	Casca do caule e folhas		(Matefo et al., 2025)

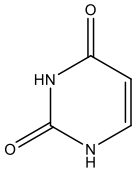
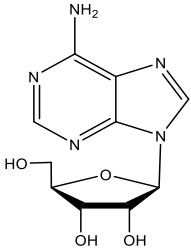
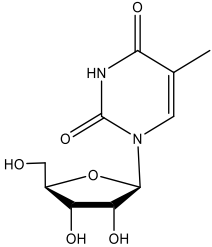
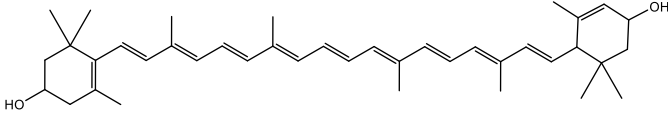
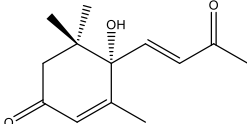
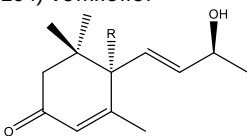
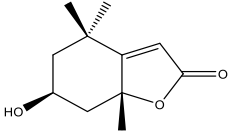
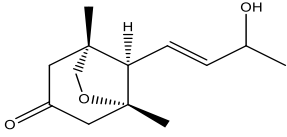
Classe	Substância	Espécie	Parte da planta	Atividade Biológica	Referência
Saponina	71) Ácido 3-O-[β-D-fucopiranosídeo] e éster 28-O-[β-D-glucopiranosil] e quinóvico. 	<i>Brenania briei</i>	Casca do caule e folhas		(Matefo et al., 2025)
Saponina	72) Ácido 3-O-[β-D-glucopiranosídeo] e éster 28-O-[β-D-glucopiranosil] quinóvico 	<i>Brenania briei</i>	Casca do caule e folhas		(Matefo et al., 2025)
Saponina	73) Ácido 3-O-[β-D-glucopiranosil-(1→2)-β-D-quinovpiranosil] quinóvico quinovic acid 3-O-[β-D-glucopyranosyl-(1→2)-β-D-quinovopyranosyl] 	<i>Brenania briei</i>	Casca do caule e folhas		(Matefo et al., 2025)
Saponina	74) Ácido quinóvico 3-O-[β-D-glucopiranosil-(1→2)-β-D-glucopiranosil] 3-O-[β-D-glucopyranosyl-(1→2)-β-D-glucopyranosyl] quinovic acid 	<i>Brenania briei</i>	Casca do caule e folhas		(Matefo et al., 2025)

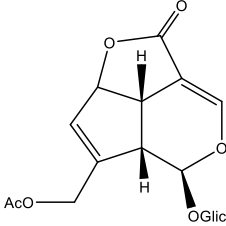
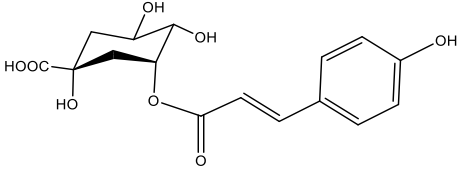
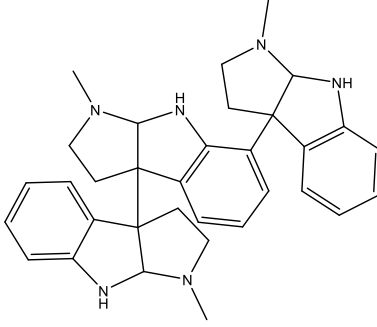
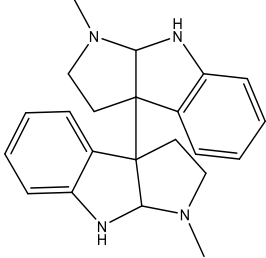
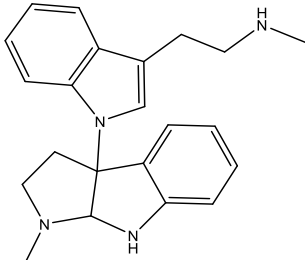
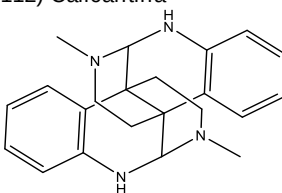
Classe	Substância	Espécie	Parte da planta	Atividade Biológica	Referência
Iridoide	75) Diacetildafilosídeo 	<i>Brenania brieyi</i>	Folhas		(Matefo et al., 2025)
Triterpeno	76) Ácido betulínico 	<i>Brenania brieyi</i>	Folhas	Antiplasmódico (<i>Plasmodium falciparum</i>)	(Matefo et al., 2025)
Triterpeno	77) Betulina 	<i>Brenania brieyi</i>	Folhas	Antiplasmódico (<i>Plasmodium falciparum</i>)	(Matefo et al., 2025)
Triterpeno	78) Ácido ziziberanalico 	<i>Brenania brieyi</i>	Folhas	Antibacteriana	(Matefo et al., 2025)
Triterpeno	79) Ácido ziziberenalico 	<i>Brenania brieyi</i>	Folhas		(Matefo et al., 2025)

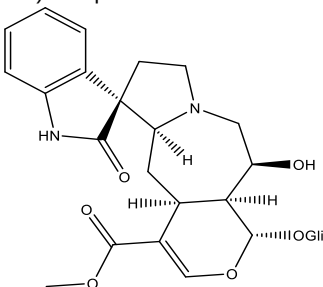
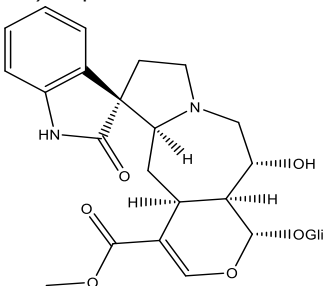
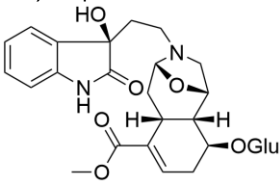
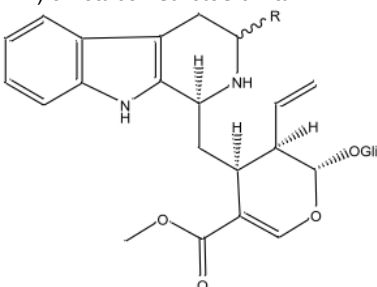
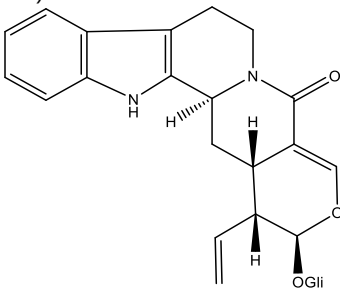
Classe	Substância	Espécie	Parte da planta	Atividade Biológica	Referência
Saponina	80) Ácido 3-O-β-D-glucopiranosil betulinico 	<i>Brenania briei</i>	Folhas		(Matefo <i>et al.</i> , 2025)
Flavonoide	81) Luteolina 	<i>Galium aparine</i> <i>Rubia cordifolia</i> (Partes aéreas)	Plantas inteiras	Atividade inibitória de NO (indicador de atividade anti-inflamatória)	(Wuun <i>et al.</i> , 2025)
Flavonoide	82) Kaempferol 	<i>Galium aparine</i> <i>Rubia cordifolia</i>	Plantas inteiras Partes aéreas	Atividade inibitória de NO (indicador de atividade anti-inflamatória)	(Wuun <i>et al.</i> , 2025) (Zhang <i>et al.</i> , 2024)
Flavonoide	83) Quercetina 	<i>Galium aparine</i> <i>Rubia cordifolia</i>	Plantas inteiras Partes aéreas	Atividade inibitória de NO (indicador de atividade anti-inflamatória)	(Wuun <i>et al.</i> , 2025) (Zhang <i>et al.</i> , 2024)
Flavonoide	84) Astragalina 	<i>Galium aparine</i>	Plantas inteiras		(Wuun <i>et al.</i> , 2025)
Flavonoide	85) kaempferol-7-O-α-L-rhamnopiranosídeo 	<i>Galium aparine</i>	Plantas inteiras		(Wuun <i>et al.</i> , 2025)

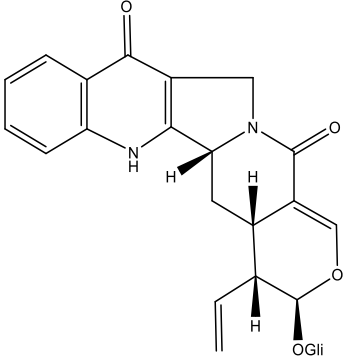
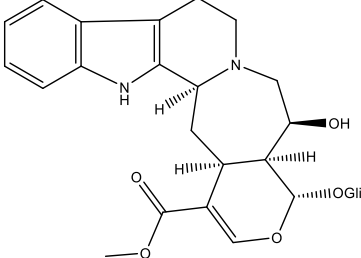
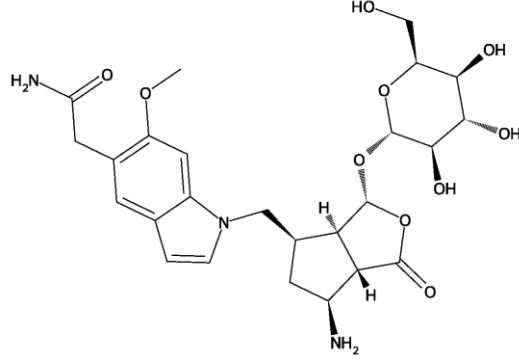
Classe	Substância	Espécie	Parte da planta	Atividade Biológica	Referência
Flavonoide	86) quercetin-3-O-β-D-glucopiranosídeo 	<i>Galium aparine</i>	Plantas inteiras		(Wuun <i>et al.</i> , 2025)
Flavonoide	87) kaempferol-3-O-β-D-glucopiranosil-7-O-α-L-rhamnopiranosídeo 	<i>Galium aparine</i>	Plantas inteiras		(Wuun <i>et al.</i> , 2025)
Flavonoide	88) Nicotiflorina 	<i>Galium aparine</i>	Plantas inteiras		(Wuun <i>et al.</i> , 2025)
Flavonoide	89) Quercetina 	<i>Galium aparine</i>	Plantas inteiras		(Wuun <i>et al.</i> , 2025)
Derivado fenólico	90) <i>p</i> -ácido hidroxibenzoico 	<i>Galium aparine</i>	Plantas inteiras		(Wuun <i>et al.</i> , 2025)
		<i>Rubia cordifolia</i> L.	Partes aéreas		(Zhang <i>et al.</i> , 2024)

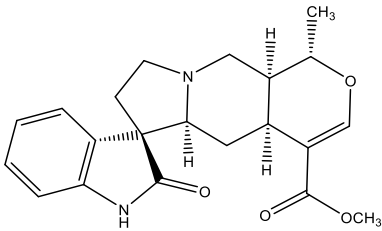
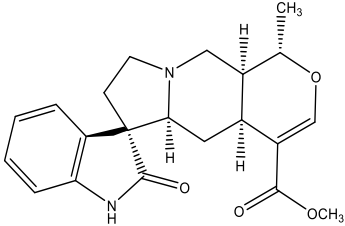
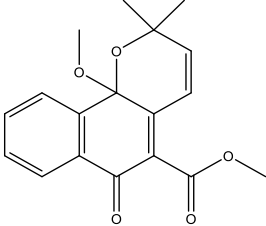
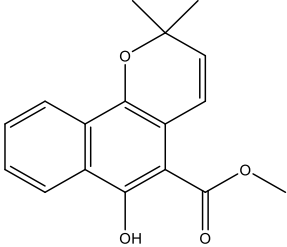
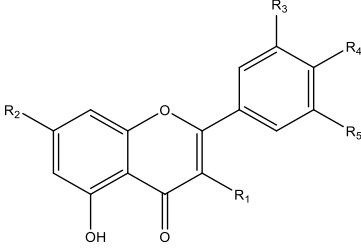
Classe	Substância	Espécie	Parte da planta	Atividade Biológica	Referência
Derivado fenólico	91) ácido protocatecuico 	<i>Galium aparine</i>	Plantas inteiras		(Wuun <i>et al.</i> , 2025)
		<i>Rubia cordifolia L.</i>	Partes aéreas		(Zhang <i>et al.</i> , 2024)
Derivado fenólico	92) ácido gálico 	<i>Galium aparine</i>	Plantas inteiras		(Wuun <i>et al.</i> , 2025)
Derivado fenólico	93) (E) -ácido cafeico 	<i>Galium aparine</i>	Plantas inteiras		(Wuun <i>et al.</i> , 2025)
		<i>Rubia cordifolia L.</i>	Partes aéreas		(Zhang <i>et al.</i> , 2024)
Derivado fenólico	94) ácido cumárico 	<i>Galium aparine</i>	Plantas inteiras		(Wuun <i>et al.</i> , 2025)
Iridóide	95) Geniposídeo 	<i>Galium aparine</i>	Plantas inteiras		(Wuun <i>et al.</i> , 2025)
Antraquinona	96) Emodina 	<i>Galium aparine</i>	Plantas inteiras		(Wuun <i>et al.</i> , 2025)
Antraquinona	97) Reno 	<i>Galium aparine</i>	Plantas inteiras		(Wuun <i>et al.</i> , 2025)

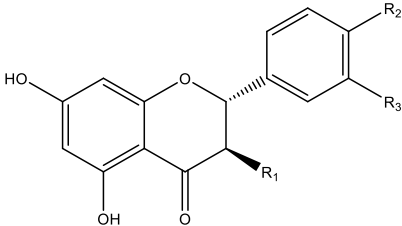
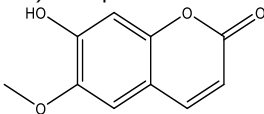
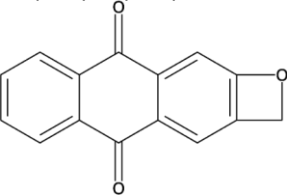
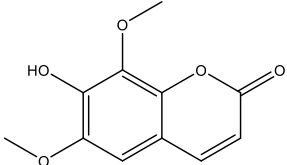
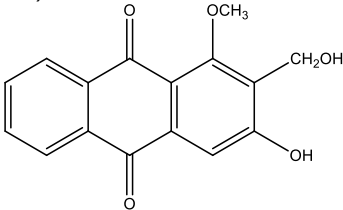
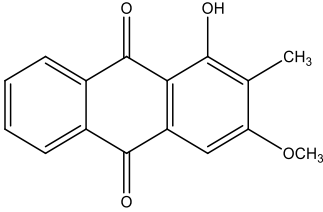
Classe	Substância	Espécie	Parte da planta	Atividade Biológica	Referência
Nucleosídeo	98) Uracila 	<i>Galium aparine</i>	Plantas inteiras		(Wuun <i>et al.</i> , 2025)
Nucleosídeo	99) Adenosina 	<i>Galium aparine</i>	Plantas inteiras		(Wuun <i>et al.</i> , 2025)
Nucleosídeo	100) Timina 	<i>Galium aparine</i>	Plantas inteiras		(Wuun <i>et al.</i> , 2025)
Carotenoide	101) Luteína 	<i>Palicourea tomentosa</i>	Folhas		(Cecatto <i>et al.</i> , 2025)
Megastigmano	102) dehidrovomifoliol 	<i>Palicourea tomentosa</i>	Folhas		(Cecatto <i>et al.</i> , 2025)
Megastigmano	103) megastigma-4,7- dien-3-ona 104) vomifoliol  103) R = H 104) R = OH	<i>Palicourea tomentosa</i>	Folhas		(Cecatto <i>et al.</i> , 2025)
Megastigmano	105) Loliolida 	<i>Palicourea tomentosa</i>	Folhas		(Cecatto <i>et al.</i> , 2025)
Megastigmano	106) 5,13-epóxi-9-hidroxi-megastigma-7-en,3-ona 	<i>Palicourea tomentosa</i>	Folhas		(Cecatto <i>et al.</i> , 2025)

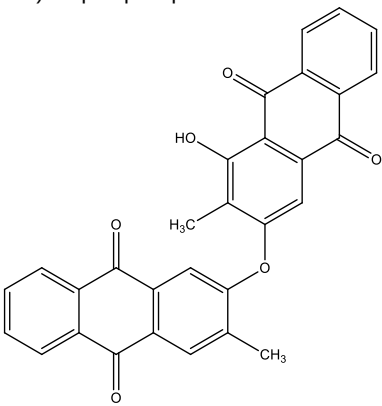
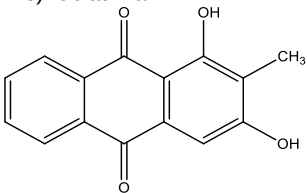
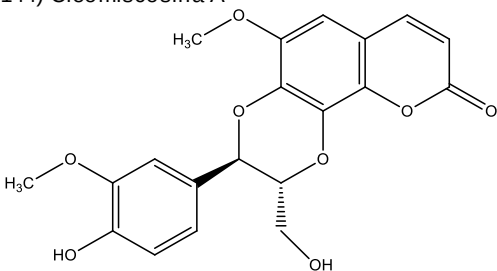
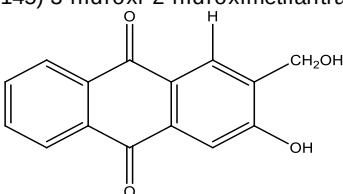
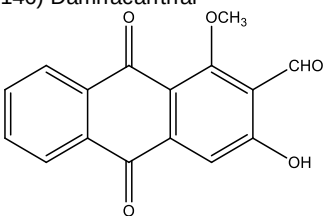
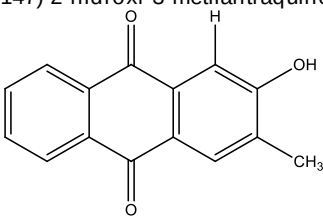
Classe	Substância	Espécie	Parte da planta	Atividade Biológica	Referência
Iridoide	107) Asperulosídeo 	<i>Palicourea tomentosa</i>	Folhas		(Cecatto <i>et al.</i> , 2025)
Ácido clorogênico	108) 3-O- <i>p</i> -ácido cumaroilquínico 	<i>Palicourea tomentosa</i>	Folhas		(Cecatto <i>et al.</i> , 2025)
Alcaloide pirrolizidinoindolínico	109) Hodgkinsina 	<i>Palicourea tomentosa</i>	Folhas		(Cecatto <i>et al.</i> , 2025)
Alcaloide pirrolizidinoindolínico	110) Quimonantina 	<i>Palicourea tomentosa</i>	Folhas		(Cecatto <i>et al.</i> , 2025)
Alcaloide pirrolizidinoindolínico	111) Psicotriasina 	<i>Palicourea tomentosa</i>	Folhas		(Cecatto <i>et al.</i> , 2025)
Alcaloide pirrolizidinoindolínico	112) Calicantina 	<i>Palicourea tomentosa</i>	Folhas		(Cecatto <i>et al.</i> , 2025)

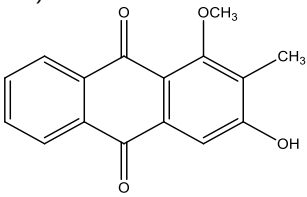
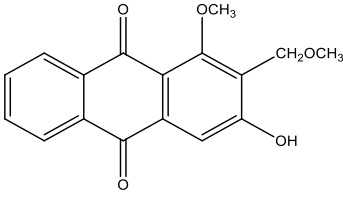
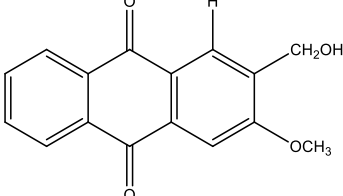
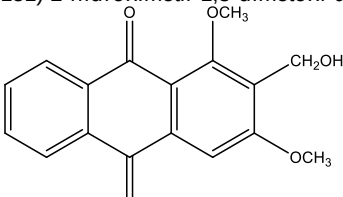
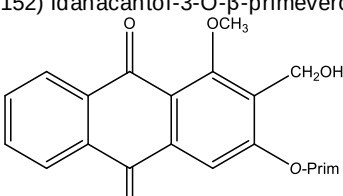
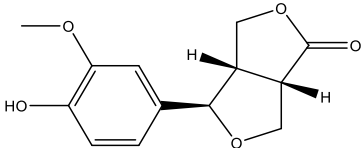
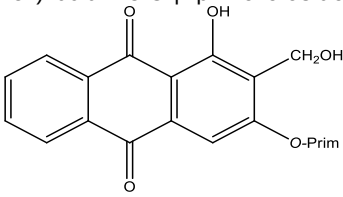
Classe	Substância	Espécie	Parte da planta	Atividade Biológica	Referência
Glicoalcalóide indólico	113) 19-epi-rincofilósido A 	<i>Uncaria rhynchophylla</i>	Ramos	Atividade imunossupressora	(Rao <i>et al.</i> , 2025)
Glicoalcalóide indólico	114) 7-epi-rincofilósido A 	<i>Uncaria rhynchophylla</i>	Ramos		(Rao <i>et al.</i> , 2025)
Alcaloide	115) 7-epi-antocefalusina A 	<i>Uncaria rhynchophylla</i>	Ramos	Atividade imunossupressora	(Rao <i>et al.</i> , 2025)
Alcaloide	116) hirsutaside A 117) 5α-carboxistrictosidina  116) R = β-COOEt 117) R = α-COOH	<i>Uncaria rhynchophylla</i>	Ramos		(Rao <i>et al.</i> , 2025)
Alcaloide	118) Estritosamida 	<i>Uncaria rhynchophylla</i>	Ramos		(Rao <i>et al.</i> , 2025)

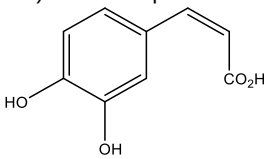
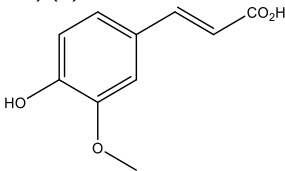
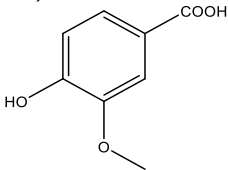
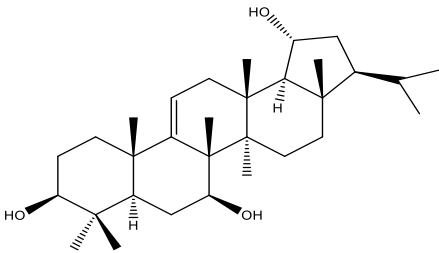
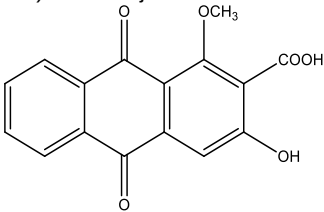
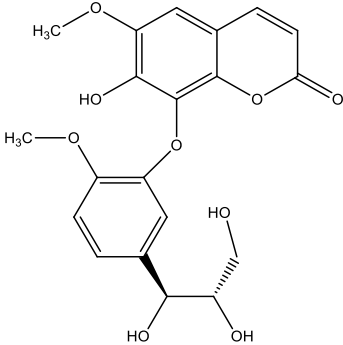
Classe	Substância	Espécie	Parte da planta	Atividade Biológica	Referência
Alcaloide	119) (3R)-pumilosídeo 	<i>Uncaria rhynchophylla</i>	Ramos		(Rao <i>et al.</i> , 2025)
Alcaloide	120) 3β-isodihidrocadambina 121) Rincofilósido I 120) R = 3β-H 121) R = 3α-H	<i>Uncaria rhynchophylla</i>	Ramos		(Rao <i>et al.</i> , 2025)
Alcaloide	122) 3α-di-hidrocadambina 	<i>Uncaria rhynchophylla</i>	Ramos		(Rao <i>et al.</i> , 2025)
Alcaloide	123) Ofiorina D 	<i>Uncaria rhynchophylla</i>	Ramos		(Rao <i>et al.</i> , 2025)

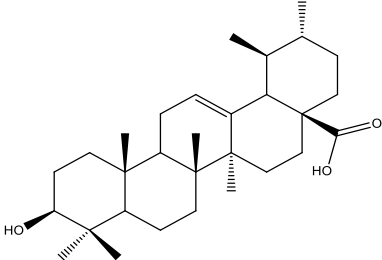
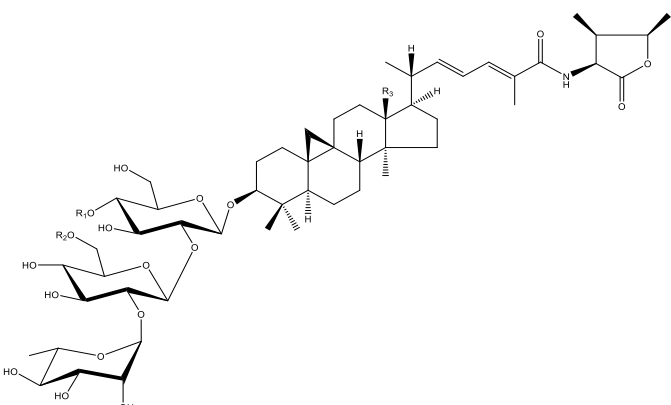
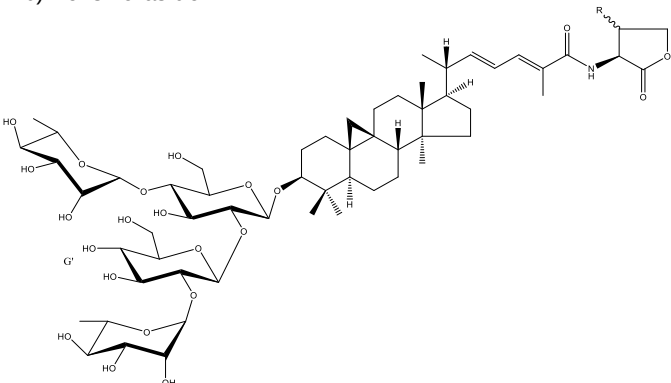
Classe	Substância	Espécie	Parte da planta	Atividade Biológica	Referência
Alcaloide	124) Pteropodina 	<i>Uncaria longiflora</i>	Hastes		(Sulaiman <i>et al.</i> , 2025)
Alcaloide	125) Isopteropodina 	<i>Uncaria longiflora</i>	Hastes		(Sulaiman <i>et al.</i> , 2025)
Derivado de naftoquinona	126) 4-metoxi-oxomolugina 	<i>Rubia cordifolia</i> L.	Partes aéreas		(Zhang <i>et al.</i> , 2024)
Derivado de naftoquinona	127) Mollugin 	<i>Rubia cordifolia</i> L.	Partes aéreas	Atividade inibitória de NO (indicador de atividade anti-inflamatória.)	(Zhang <i>et al.</i> , 2024)
Flavonoides	 128) R₁= H; R₂=OH; R₃=H; R₄= OH; R₅= H (apigenina) 129) R₁= H; R₂=OH; R₃=H; R₄= OH; R₅= OH (luteolina) 130) R₁= OH; R₂=OH; R₃=H; R₄= OH; R₅= OCH₃ (isorhamnetina) 131) R₁= OGlic; R₂=OH; R₃=H; R₄= OH; R₅= H (kaempferol-3-O-β-D-glucopiranosídeo) 132) R₁= OGlic; R₂=OH; R₃=H; R₄= OH; R₅= OH (quercetina-3-O-β-D-glucopiranosídeo) 133) R₁= OGlic; R₂=OH; R₃=H; R₄= OH; R₅= OCH₃ (isorhamnetina-3-O-β-D-glicosídeo)	<i>Rubia cordifolia</i> L.	Partes aéreas	Atividade inibitória de NO (indicador de atividade anti-inflamatória.)	(Zhang <i>et al.</i> , 2024)

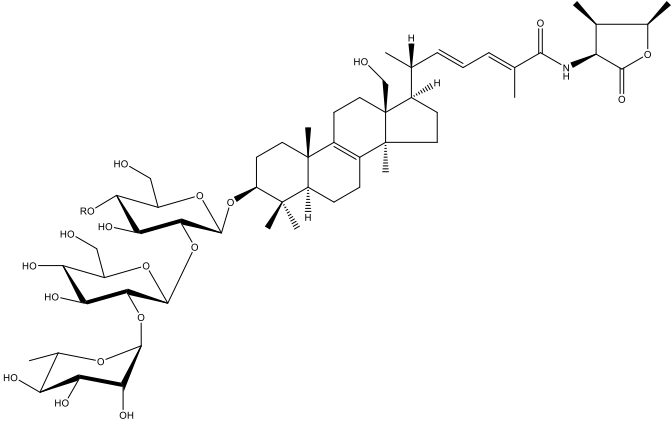
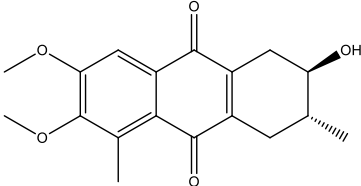
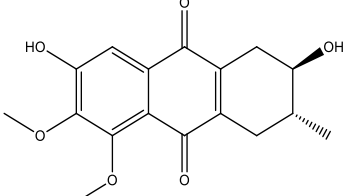
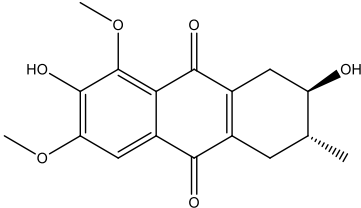
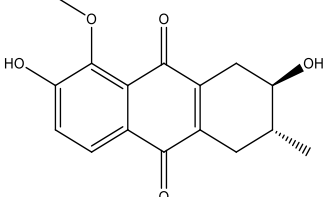
Classe	Substância	Espécie	Parte da planta	Atividade Biológica	Referência
Flavonoides	 134) R₁= H; R₂= OH; R₃=H (naringenina) 135) R₁= OH; R₂=OH; R₃=OH (taxifolina) 136) R₁= OH; R₂=OCH₃; R₃=OH (di-hidroquercetina-4'-éter metílico)	<i>Rubia cordifolia</i> L.	Partes aéreas		(Zhang <i>et al.</i> , 2024)
Cumarina	137) Escopoletina 	<i>Rubia cordifolia</i> L.	Partes aéreas		(Zhang <i>et al.</i> , 2024)
Antraquinona	138) esquimperiquinona C 	<i>Phylloentas schimperi</i>	Cascas do caule e das raízes		(Nanfack <i>et al.</i> , 2024)
Cumarina	139) Isofraxidina 	<i>Rubia cordifolia</i> L.	partes aéreas		(Zhang <i>et al.</i> , 2024)
Antraquinona	140) Damnacanthol 	<i>Phylloentas schimperi</i>	Cascas do caule e das raízes	Apresentou potente atividade inibitória da urease	(Nanfack <i>et al.</i> , 2024)
Antraquinona	141) 1-hidroxi-3-metoxi-2-metilantraquinona 	<i>Phylloentas schimperi</i>	Cascas do caule e das raízes	Apresentou potente atividade inibitória da urease	(Nanfack <i>et al.</i> , 2024)

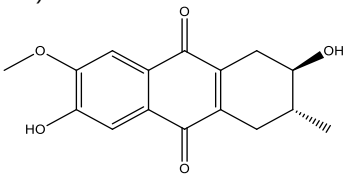
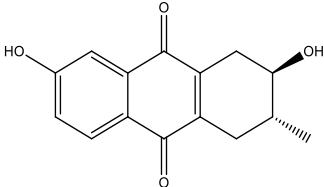
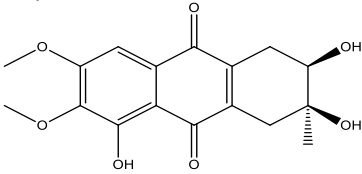
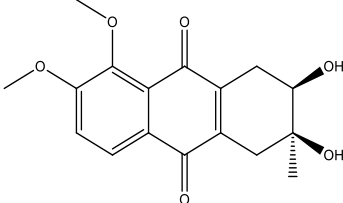
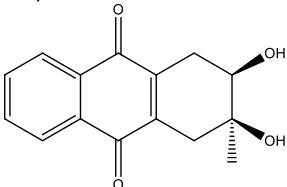
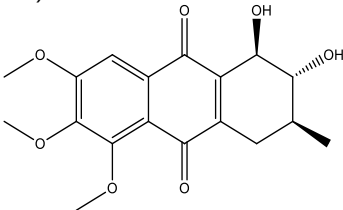
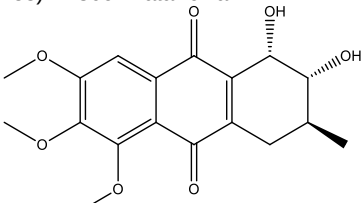
Classe	Substância	Espécie	Parte da planta	Atividade Biológica	Referência
Antraquinona	142) esquimperiquinona A 	<i>Phyllopentas schimperi</i>	Cascas do caule e das raízes	Atividade antioxidante e inibidora de enzimas (lipoxigenas e, urease).	(Nanfack <i>et al.</i> , 2024)
Antraquinona	143) rubiadina 	<i>Phyllopentas schimperi</i>	Cascas do caule e das raízes	Atividade antioxidante e inibidora de enzimas (lipoxigenas e, urease).	(Nanfack <i>et al.</i> , 2024)
cumarinolignana	144) Cleomiscosina A 	<i>Phyllopentas schimperi</i>	Cascas do caule e das raízes	exibiu atividade antioxidante e inibidora da lipoxigenase significativas	(Nanfack <i>et al.</i> , 2024)
Antraquinona	145) 3-hidroxi-2-hidroxi metil-antraquinona 	<i>Phyllopentas schimperi</i>	Cascas do caule e das raízes	apresentou potente atividade inibitória da urease	(Nanfack <i>et al.</i> , 2024)
Antraquinona	146) Damnacanthal 	<i>Phyllopentas schimperi</i>	Cascas do caule e das raízes	Apresentou as melhores atividades inibitórias da urease em comparação com a tiourea.	(Nanfack <i>et al.</i> , 2024)
Antraquinona	147) 2-hidroxi-3-metil-antraquinona 	<i>Phyllopentas schimperi</i>	Cascas do caule e das raízes	Apresentou as melhores atividades inibitórias da urease em comparação com a tiourea.	(Nanfack <i>et al.</i> , 2024)

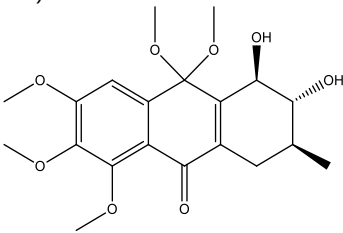
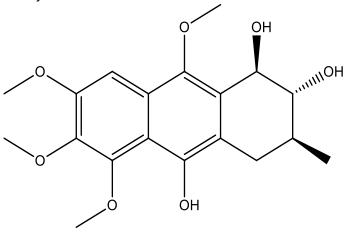
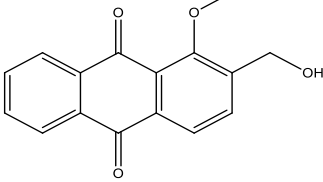
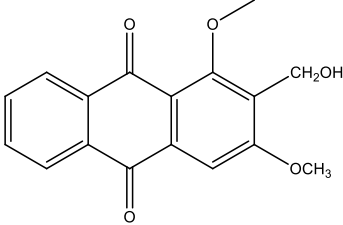
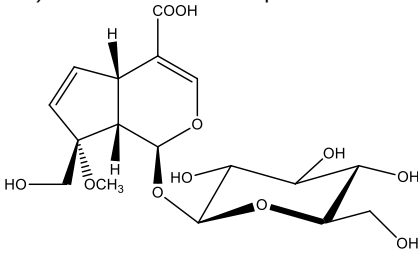
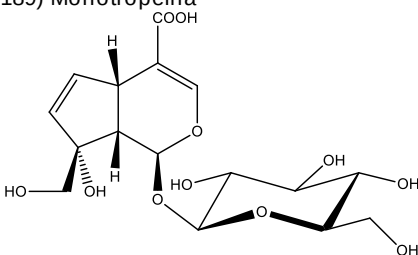
Classe	Substância	Espécie	Parte da planta	Atividade Biológica	Referência
Antraquinona	148) rubiadina-1-metiléter 	<i>Phylloentas schimperi</i>	Cascas do caule e das raízes	Apresentou as melhores atividades inibitórias da urease em comparação com a tiourea.	(Nanfack <i>et al.</i> , 2024)
Antraquinona	149) 3-hidroxi-1-metoxi-2-metoximetilantraquinona 	<i>Phylloentas schimperi</i>	Cascas do caule e das raízes		(Nanfack <i>et al.</i> , 2024)
Antraquinona	150) 2-hidroximetil-3-metoxiantraquinona 	<i>Phylloentas schimperi</i>	Cascas do caule e das raízes	Apresentou potente atividade inibitória da urease	(Nanfack <i>et al.</i> , 2024)
Antraquinona	151) 2-hidroximetil-1,3-dimetoxi-antraquinona 	<i>Phylloentas schimperi</i>	Cascas do caule e das raízes		(Nanfack <i>et al.</i> , 2024)
Antraquinona	152) Idanacantol-3-O-β-primeverosídeo 	<i>Phylloentas schimperi</i>	Cascas do caule e das raízes		(Nanfack <i>et al.</i> , 2024)
Lignana	153) Salicofoliol 	<i>Rubia cordifolia L</i>	Partes aéreas		(Zhang <i>et al.</i> , 2024)
Antraquinona	154) lucidin-3-O-β-primeverosídeo 	<i>Phylloentas schimperi</i>	Cascas do caule e das raízes		(Nanfack <i>et al.</i> , 2024)

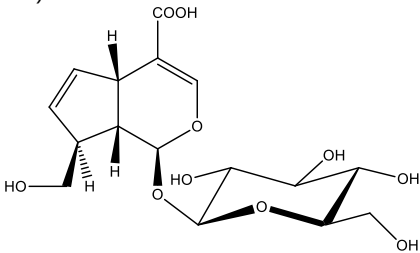
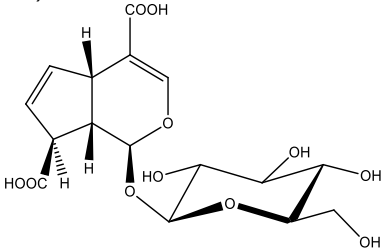
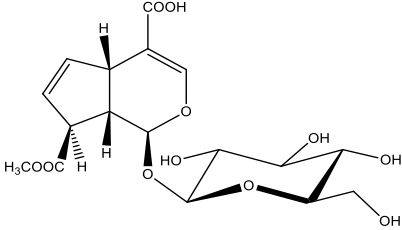
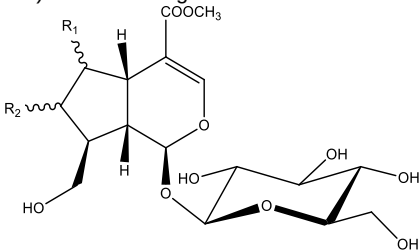
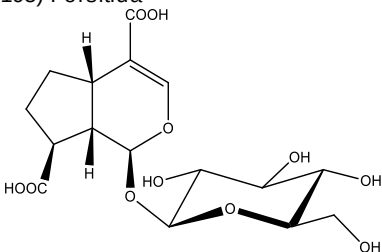
Classe	Substância	Espécie	Parte da planta	Atividade Biológica	Referência
Ácido orgânico	155) ácido cis-p-hidroxicinâmico 	<i>Rubia cordifolia</i> L	Partes aéreas		(Zhang <i>et al.</i> , 2024)
Derivado fenólico	156) (E)-ácido ferúlico 	<i>Rubia cordifolia</i> L	Partes aéreas		(Zhang <i>et al.</i> , 2024)
Derivado fenólico	157) ácido vanílico 	<i>Rubia cordifolia</i> L	Partes aéreas		(Zhang <i>et al.</i> , 2024)
Triterpeno pentacíclico	158) Rubiarbonol B 	<i>Rubia cordifolia</i> L	Partes aéreas		(Zhang <i>et al.</i> , 2024)
Antraquinona	159) Éter munjistin-1-O-metílico 	<i>Phylloentas schimperi</i>	Cascas do caule e raízes		(Zhang <i>et al.</i> , 2024)
Cumarinol	160) 8-(7',8',9'-propanotriol-4'-metoxi-3'-O-fenilpropanoide)-7-hidroxi-6-metoxicumarina 	<i>Phylloentas schimperi</i> .	Cascas do caule e raízes		(Zhang <i>et al.</i> , 2024)

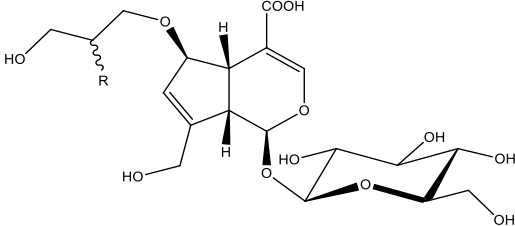
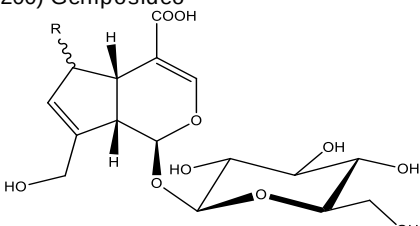
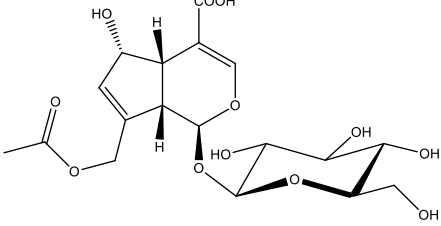
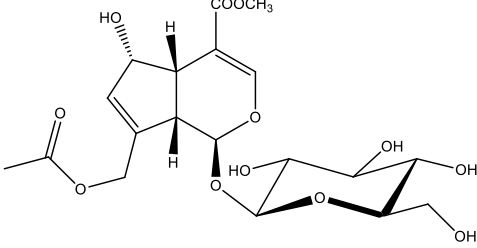
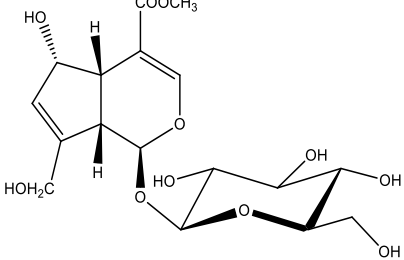
Classe	Substância	Espécie	Parte da planta	Atividade Biológica	Referência
Triterpenoide	161) Ácido 3β-hidroxiurs-12-en-28-óico 	<i>Phylloentas schimperi</i>	Cascas do caule e raízes		(Zhang <i>et al.</i> , 2024)
Saponinas triterpenoides	162) Densifloraside A 163) Densifloraside B 164) heinsiagenin A [3-O- O-[α-L- rhamnopyranosyl-(1 → 2)-β-D- glucopyranosyl-(1 → 2)]-β-D- glucopyranosyl] 165) mussaendosídeo O 166) mussaendosídeo H 167) mussaendosídeo G 168) mussaendosídeo U  162) R₁=α-L-Rha (R), R₂=β-D-Xyl-(1 → 2)-β-D-Glc, R₃= CH₃ 163) R₁=α-L-Rha (R), R₂=β-D-Glc, R₃= CH₂OH 164) R₁= H, R₂= H, R₃= CH₃ 165) R₁=α-L-Rha, R₂= H, R₃= CH₃ 166) R₁=α-L-Rha, R₂= H, R₃= CH₂OH 167) R₁=α-L-Rha, R₂=β-D-Glc, R₃= CH₃ 168) R₁=α-L-Rha, R₂=β-D-Glc-(1 → 2)-β-D-Glc, R₃= CH₃	<i>Mussaenda densiflora</i>	Partes aéreas	Potencial atividade anti-inflamatória e imunossupressora.	(Du <i>et al.</i> , 2024)
Saponinas triterpenoides	169) Densifloraside C 170) Densifloraside D  169) R= α-CH₃ 170) R= β-CH₃	<i>Mussaenda densiflora</i>	Partes aéreas		(Du <i>et al.</i> , 2024)

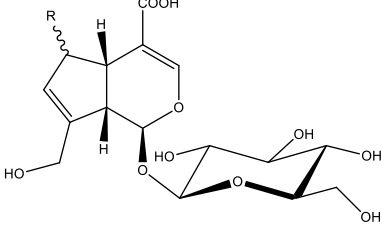
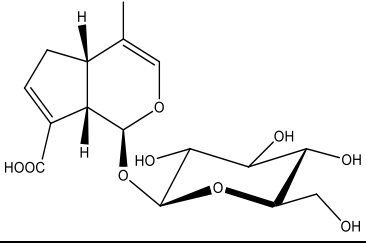
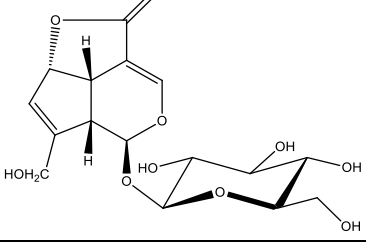
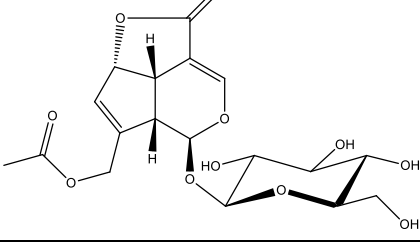
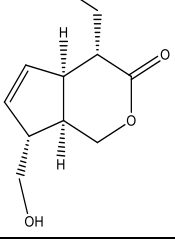
Classe	Substância	Espécie	Parte da planta	Atividade Biológica	Referência
Saponinas triterpenoides	171) Densifloraside E 172) 6 – N-(2S,3R,4R-3-methyl-4-penta nolid-2-yl)-18-hydroxylanosta-8(9),22E,24E-trien-27-amide-3-O-[α-L-rhamnopyranosyl-(1 → 2)-β-D-glucopyranosyl-(1 → 2)]-β-D- glucopyranosyl-(1 → 4)-β O- [L D- glucopyranoside  171) R=α-L-Rha (R) 172) R= β-D-Glc	<i>Mussaenda densiflora</i>	Partes aéreas		(Du <i>et al.</i> , 2024)
Tetrahidroantraquinona	173) Prisconnatanona J 	<i>Prismatomeris tetrandra</i>	Raízes	Atividade seletiva e potente contra câncer gástrico.	(Chen <i>et al.</i> , 2024)
Tetrahidroantraquinona	174) Prisconnatanona K 	<i>Prismatomeris tetrandra</i>	Raízes		(Chen <i>et al.</i> , 2024)
Tetrahidroantraquinona	175) Prisconnatanona L 	<i>Prismatomeris tetrandra</i>	Raízes		(Chen <i>et al.</i> , 2024)
Tetrahidroantraquinona	176) Prisconnatanona M 	<i>Prismatomeris tetrandra</i>	Raízes		(Chen <i>et al.</i> , 2024)

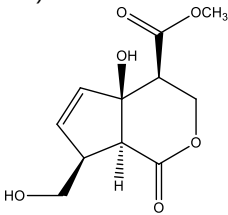
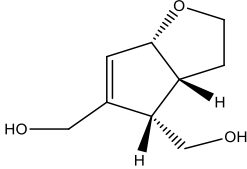
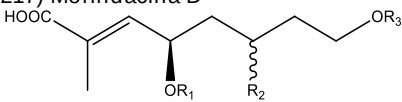
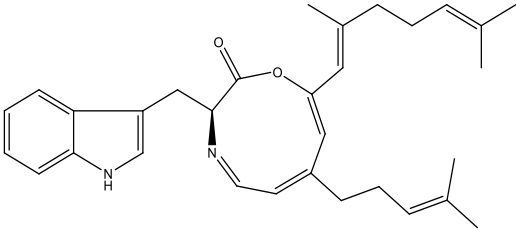
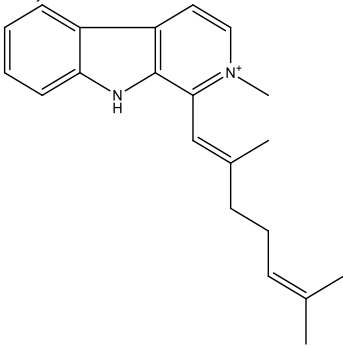
Classe	Substância	Espécie	Parte da planta	Atividade Biológica	Referência
Tetrahidroantraquinona	177) Prisconnatanona N 	<i>Prismatomeris tetrandra</i>	Raízes		(Chen <i>et al.</i> , 2024)
Tetrahidroantraquinona	178) Prisconnatanona O 	<i>Prismatomeris tetrandra</i>	Raízes		(Chen <i>et al.</i> , 2024)
Tetrahidroantraquinona	179) Prisconnatanona P 	<i>Prismatomeris tetrandra</i>	Raízes		(Chen <i>et al.</i> , 2024)
Tetrahidroantraquinona	180) Prisconnatanona Q 	<i>Prismatomeris tetrandra</i>	Raízes		(Chen <i>et al.</i> , 2024)
Tetrahidroantraquinona	181) Prisconnatanona R 	<i>Prismatomeris tetrandra</i>	Raízes		(Chen <i>et al.</i> , 2024)
Tetrahidroantraquinona	182) Prisconnatanona S 	<i>Prismatomeris tetrandra</i>	Raízes		(Chen <i>et al.</i> , 2024)
Tetrahidroantraquinona	183) Prisconnatanona T 	<i>Prismatomeris tetrandra</i>	Raízes		(Chen <i>et al.</i> , 2024)

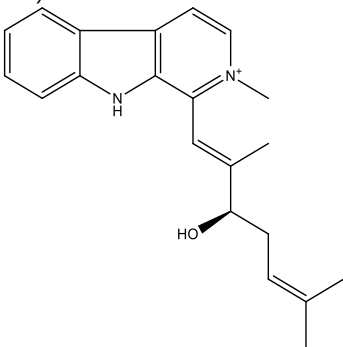
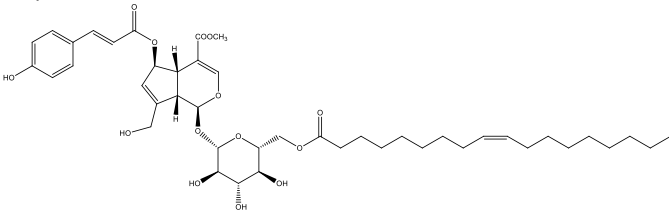
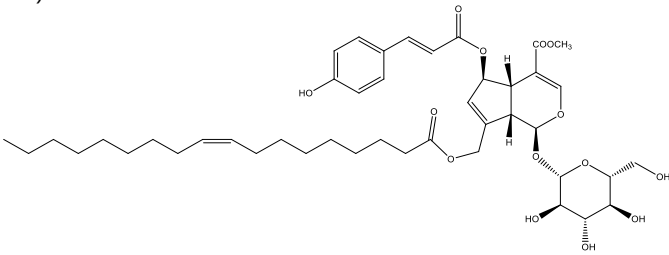
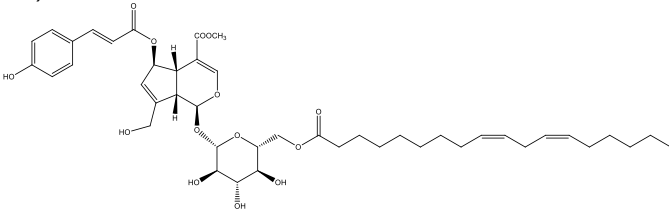
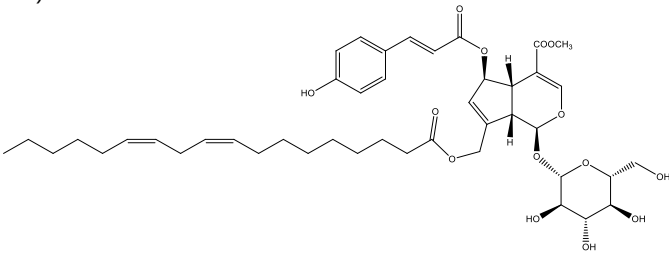
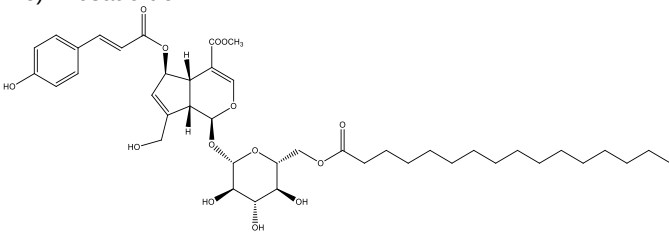
Classe	Substância	Espécie	Parte da planta	Atividade Biológica	Referência
Tetrahidroantraquinona	184) Prisconnatanona U 	<i>Prismatomeris tetrandra</i>	Raízes		(Chen <i>et al.</i> , 2024)
Tetrahidroantraquinona	185) Prisconnatanona V 	<i>Prismatomeris tetrandra</i>	Raízes		(Chen <i>et al.</i> , 2024)
Antraquinona	186) 2-(Hidroximetil)-1-metoxi-9,10-antracenodiona 	<i>Prismatomeris tetrandra</i>	Raízes		(Chen <i>et al.</i> , 2024)
Antraquinona	187) 2-(hidroximetil)-1,3-dimetoxi-9,10-antracenodiona 	<i>Prismatomeris tetrandra</i>	Raízes		(Chen <i>et al.</i> , 2024)
Iridoide	188) 8-metoxi-11-dimetil apodantosídeo 	<i>Morinda officinalis How</i>	Raízes		(Jiang <i>et al.</i> , 2024)
Iridoide	189) Monotropeína 	<i>Morinda officinalis How</i>	Raízes		(Jiang <i>et al.</i> , 2024)

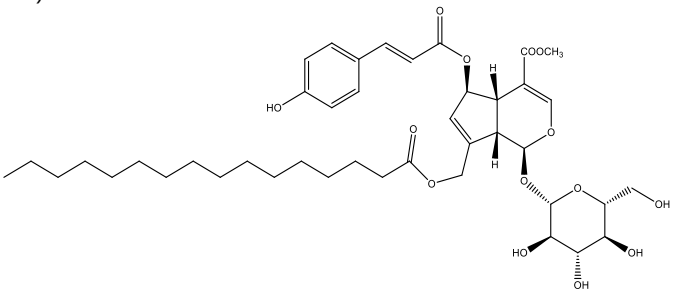
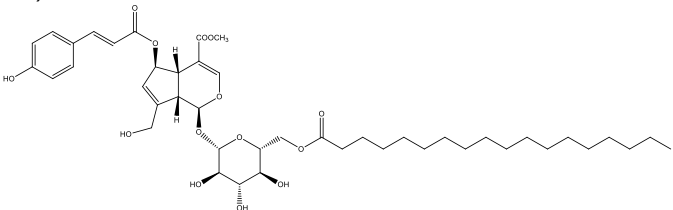
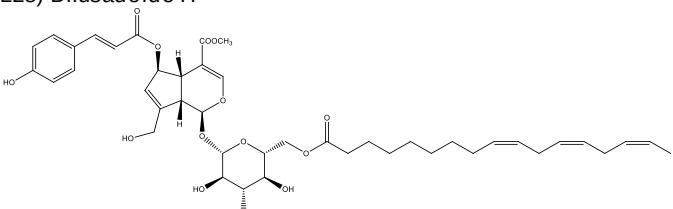
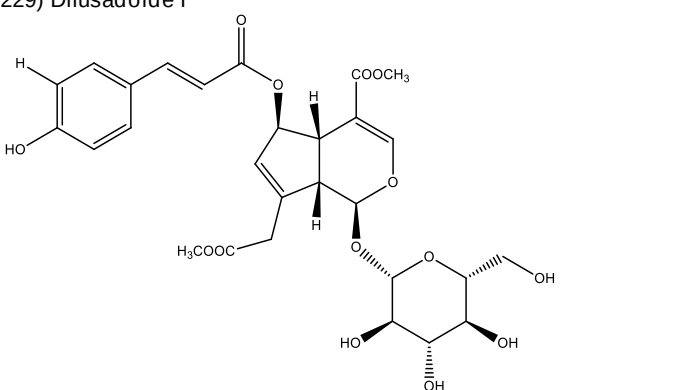
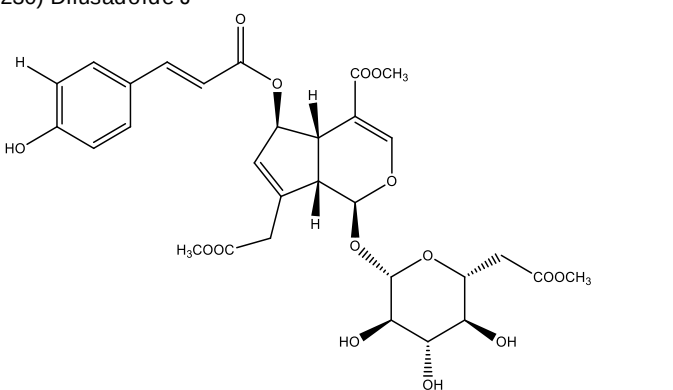
Classe	Substância	Espécie	Parte da planta	Atividade Biológica	Referência
Iridoide	190) Morindalina A 	<i>Morinda officinalis</i> How	Raizes		(Jiang et al., 2024)
Iridoide	191) Morindalina B 	<i>Morinda officinalis</i> How	Raizes		(Jiang et al., 2024)
Iridoide	192) Morindaparvin Q 	<i>Morinda officinalis</i> How	Raizes		(Jiang et al., 2024)
Iridoide	193) (6S,7S)-6,7-di-hidroxi adoxósido. 194) 10-hidroxiloganina  193) R ₁ = β-OH, R ₂ = α-OH 194) R ₁ = H, R ₂ = β-OH	<i>Morinda officinalis</i> How	Raizes		(Jiang et al., 2024)
Iridoide	195) Forsítida 	<i>Morinda officinalis</i> How	Raizes		(Jiang et al., 2024)

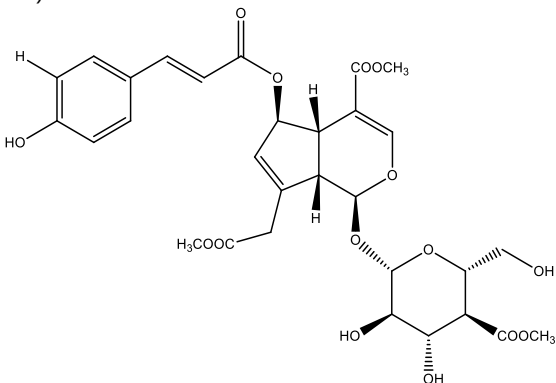
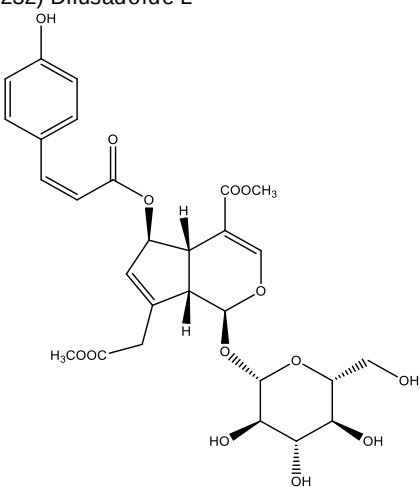
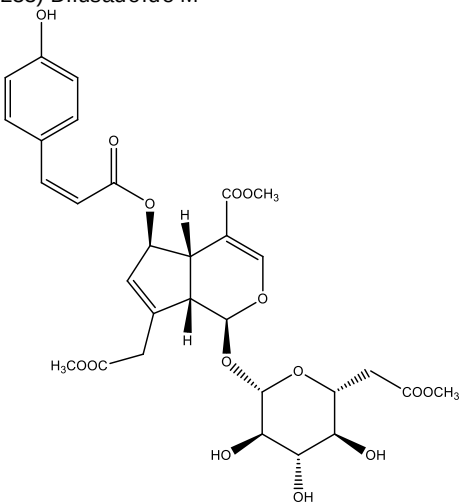
Classe	Substância	Espécie	Parte da planta	Atividade Biológica	Referência
Iridoide	196) Ácido 6R-6-((R)-2", 3"-di-hidroxipropoxi) geniposídico 197) Ácido 6R-6-((S)-2", 3"-di-hidroxipropoxi) geniposídico  196) R= β-OH 197) R= α-OH	<i>Morinda officinalis</i> How	Raizes		(Jiang et al., 2024)
	198) Ácido (6R)-6-etoxi geniposídico 199) Ácido desacetilasperulosídicoéter-6-etílico 200) Geniposídeo  198) R= β-OCH₂CH₃ 199) R= α-OCH₂CH₃ 200) R= H	<i>Morinda officinalis</i> How	Raizes	Compostos 11 e 12 – atividade anti-inflamatório	(Jiang et al., 2024)
Iridoide	201) ácido asperulosídico 	<i>Morinda officinalis</i> How	Raizes		(Jiang et al., 2024)
Iridoide	202) ácido metil asperulosídico 	<i>Morinda officinalis</i> How	Raizes		(Jiang et al., 2024)
Iridoide	203) Éster metílico do ácido desacetilasperulosídico 	<i>Morinda officinalis</i> How	Raizes		(Jiang et al., 2024)

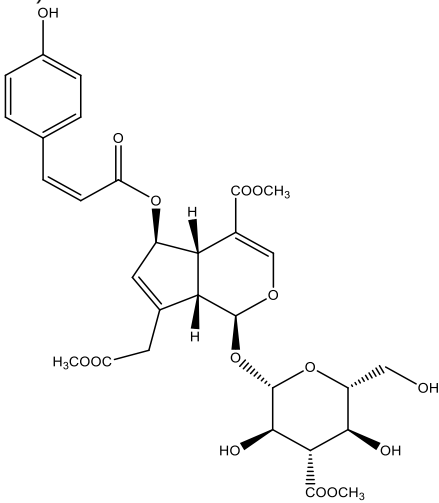
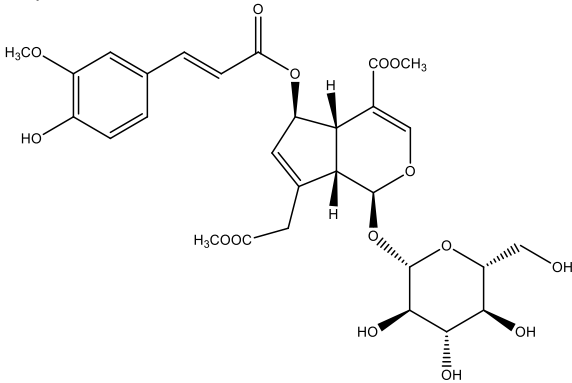
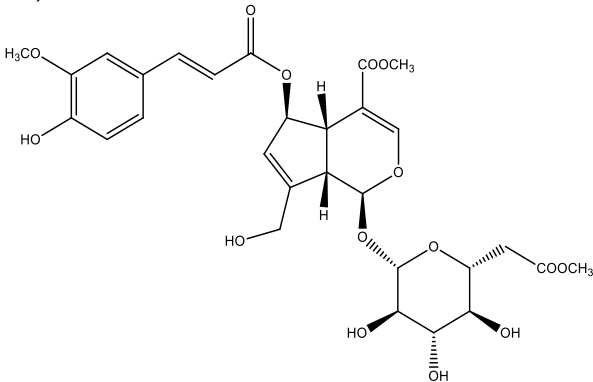
Classe	Substância	Espécie	Parte da planta	Atividade Biológica	Referência
Iridoide	204) ácido desacetilasperulosídico 205) Escandosídeo 206) Ácido-6 α - metoxigeniposídico 207) Ácido- 9- <i>epi</i> -6 α -metoxigeniposídico 208) Rodolatusídeo A  204) R= α -OH 205) R= β -OH 206) R= α -OCH ₃ 207) R= β -OCH ₃ 208) R= α - <i>n</i> -butil	<i>Morinda officinalis</i> How	Raizes	Composto 20 -atividade anti-inflamatório	(Jiang et al., 2024)
Iridoide	209) Ixosídeo 	<i>Morinda officinalis</i> How	Raizes		(Jiang et al., 2024)
Iridoide	210) Desacetilasperulosídeo 	<i>Morinda officinalis</i> How	Raizes		(Jiang et al., 2024)
Iridoide	211) Asperulósido 	<i>Morinda officinalis</i> How	Raizes		(Jiang et al., 2024)
Iridoide	212) Morindacina A 	<i>Morinda officinalis</i> How	Raizes		(Jiang et al., 2024)

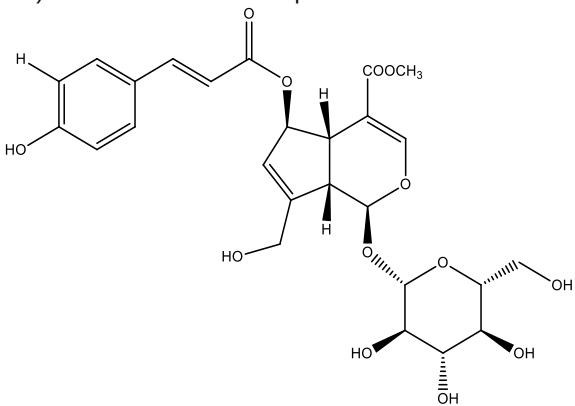
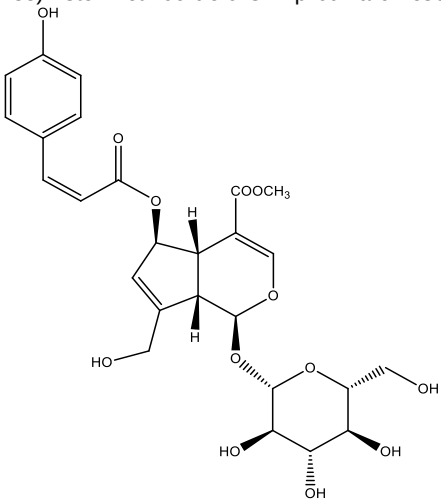
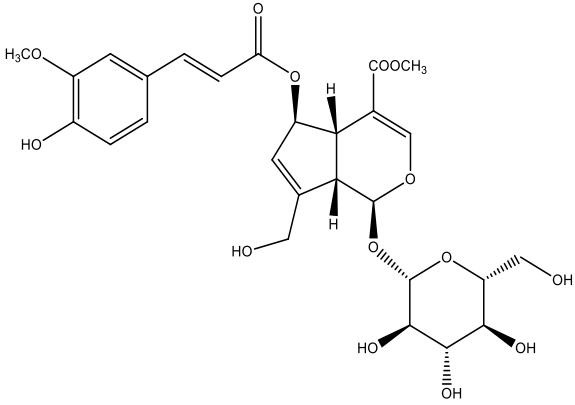
Classe	Substância	Espécie	Parte da planta	Atividade Biológica	Referência
Iridoide	213) Oficialosídeo A 	<i>Morinda officinalis</i> How	Raizes		(Jiang et al., 2024)
Iridoide	214) Ningpogenina 	<i>Morinda officinalis</i> How	Raizes		(Jiang et al., 2024)
monoterpenoides acíclicos	215) Morindacina B 216) Morindacina C 217) Morindacina D  215) R ₁ = H, R ₂ = β-CH ₃ , R ₃ = β-D-glc 216) R ₁ = β-D-glc, R ₂ = α-CH ₃ , R ₃ = H 217) R ₁ = H, R ₂ = α-CH ₃ , R ₃ = H	<i>Morinda officinalis</i> How	Raizes		(Jiang et al., 2024)
Alcaloide indólico	218)Hedscandines A 	<i>Hedyotis scandens</i> Roxb	Plantas inteiras secas	Atividade bactericida contra MRSA	(Wang et al., 2024)
Alcaloide indólico	219) Hedscandines B 	<i>Hedyotis scandens</i> Roxb	Plantas inteiras secas		(Wang et al., 2024)

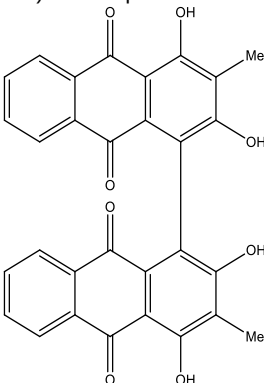
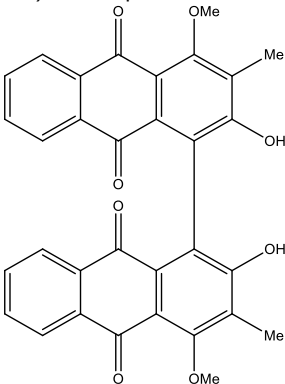
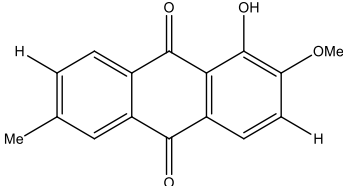
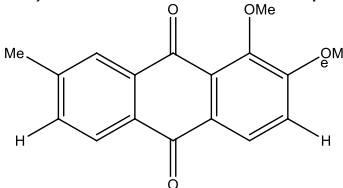
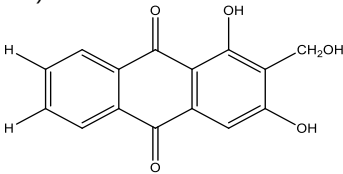
Classe	Substância	Espécie	Parte da planta	Atividade Biológica	Referência
Alcaloide indólico	220) Hedscandines C 	<i>Hedyotis scandens Roxb</i>	Plantas inteiras secas		(Wang <i>et al.</i> , 2024)
Iridoide	221) Difusadoide A 	<i>Hedyotis diffusa</i>	Grama inteira		(Qin <i>et al.</i> , 2024)
Iridoide	222) Difusadoide B 	<i>Hedyotis diffusa</i>	Grama inteira	Atividade antiinflamatória	(Qin <i>et al.</i> , 2024)
Iridoide	223) Difusadoide C 	<i>Hedyotis diffusa</i>	Grama inteira		(Qin <i>et al.</i> , 2024)
Iridoide	224) Difusadoide D 	<i>Hedyotis diffusa</i>	Grama inteira	Atividade anti-inflamatória	(Qin <i>et al.</i> , 2024)
Iridoide	225) Difusadoide E 	<i>Hedyotis diffusa</i>	Grama inteira		(Qin <i>et al.</i> , 2024)

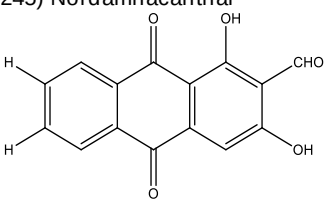
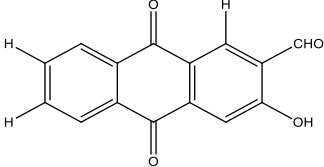
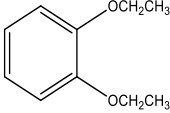
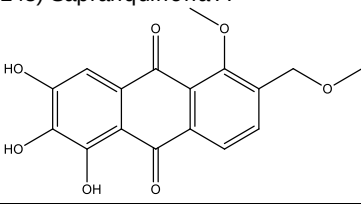
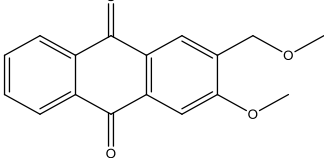
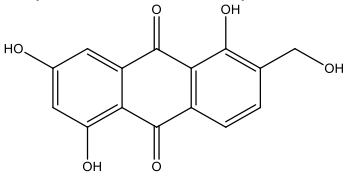
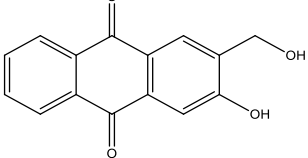
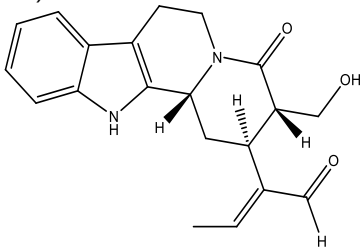
Classe	Substância	Espécie	Parte da planta	Atividade Biológica	Referência
Iridoide	226) Difusadoide F 	<i>Hedyotis diffusa</i>	Grama inteira	Atividade anti-inflamatória	(Qin <i>et al.</i> , 2024)
Iridoide	227) Difusadoide G 	<i>Hedyotis diffusa</i>	Grama inteira		(Qin <i>et al.</i> , 2024)
Iridoide	228) Difusadoide H 	<i>Hedyotis diffusa</i>	Grama inteira		(Qin <i>et al.</i> , 2024)
Iridoide	229) Difusadoide I 	<i>Hedyotis diffusa</i>	Grama inteira		(Qin <i>et al.</i> , 2024)
Iridoide	230) Difusadoide J 	<i>Hedyotis diffusa</i>	Grama inteira		(Qin <i>et al.</i> , 2024)

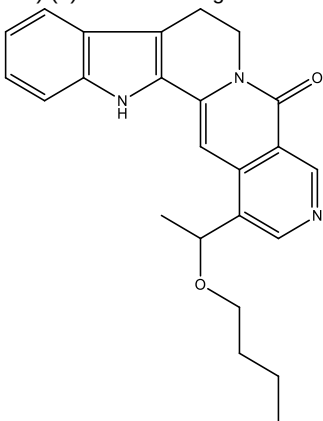
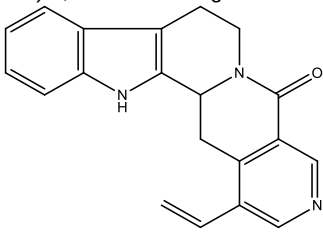
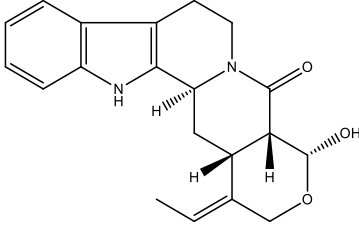
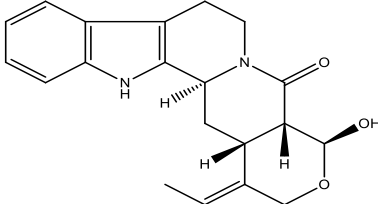
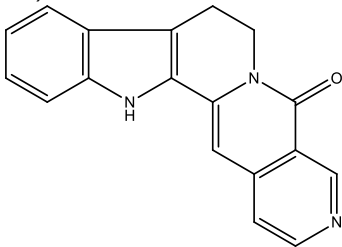
Classe	Substância	Espécie	Parte da planta	Atividade Biológica	Referência
Iridoide	231) Difusadoide K 	<i>Hedyotis diffusa</i>	Grama inteira		(Qin <i>et al.</i> , 2024)
Iridoide	232) Difusadoide L 	<i>Hedyotis diffusa</i>	Grama inteira		(Qin <i>et al.</i> , 2024)
Iridoide	233) Difusadoide M 	<i>Hedyotis diffusa</i>	Grama inteira		(Qin <i>et al.</i> , 2024)

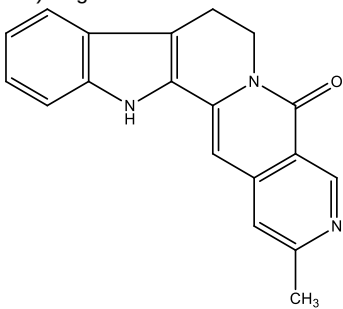
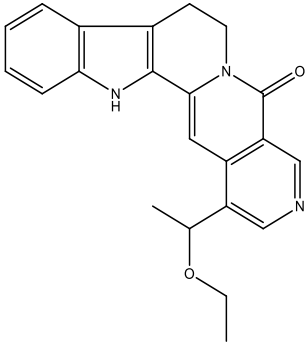
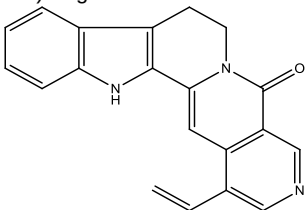
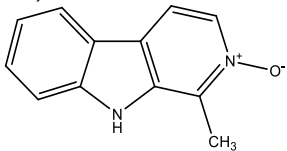
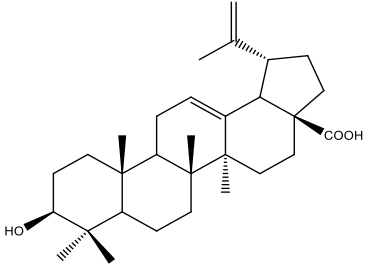
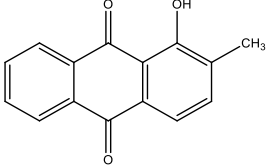
Classe	Substância	Espécie	Parte da planta	Atividade Biológica	Referência
Iridoide	234) Difusadoide N 	<i>Hedyotis diffusa</i>	Grama inteira		(Qin <i>et al.</i> , 2024)
Iridoide	235) Difusadoide O 	<i>Hedyotis diffusa</i>	Grama inteira		(Qin <i>et al.</i> , 2024)
Iridoide	236) Difusadoide P 	<i>Hedyotis diffusa</i>	Grama inteira		(Qin <i>et al.</i> , 2024)

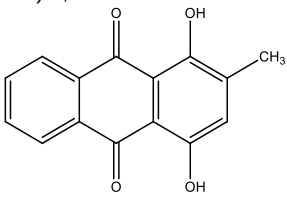
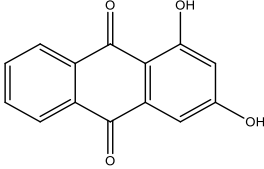
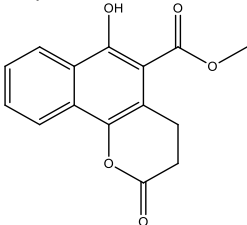
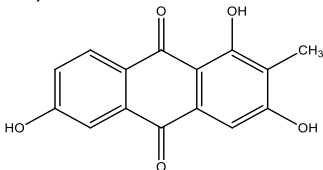
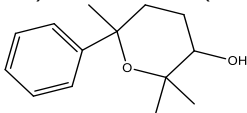
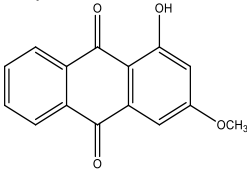
Classe	Substância	Espécie	Parte da planta	Atividade Biológica	Referência
Iridoide	237) Éster metílico de 6-O-E-p-cumaroil escandosídeo 	<i>Hedyotis diffusa</i>	Grama inteira		(Qin <i>et al.</i> , 2024)
Iridoide	238) Éster metílico de 6-O-Z-p-cumaroil escandosídeo 	<i>Hedyotis diffusa</i>	Grama inteira		(Qin <i>et al.</i> , 2024)
Iridoide	239) Éster metílico de 6-O-feruloilescandosídeo 	<i>Hedyotis diffusa</i>	Grama inteira		(Qin <i>et al.</i> , 2024)

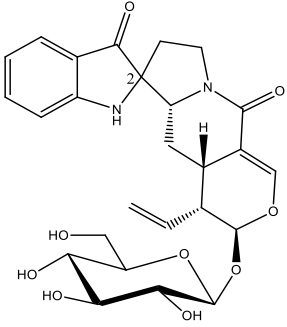
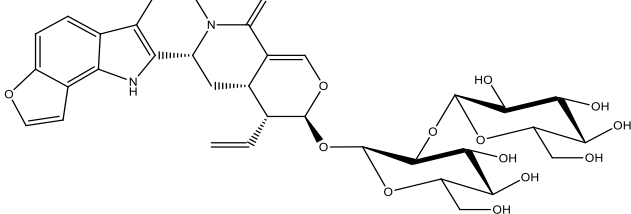
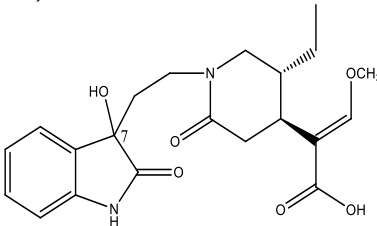
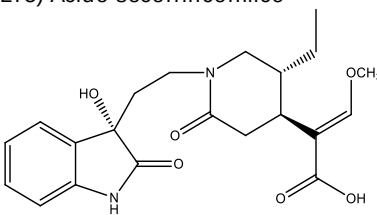
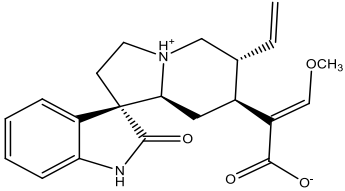
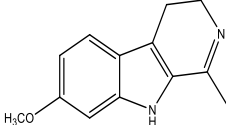
Classe	Substância	Espécie	Parte da planta	Atividade Biológica	Referência
Bisantraquinona	240) Glabraquinona A 	<i>Prismatomeris glabra</i>	raízes	Atividade moderada contra células de neuroblastoma.	(Primus et al., 2024)
Bisantraquinona	241) Glabraquinona B 	<i>Prismatomeris glabra</i>	raízes		(Primus et al., 2024)
Antraquinona	242) 1-hidroxi-2-metoxi-6-metil-antraquinona 	<i>Prismatomeris glabra</i>	raízes		(Primus et al., 2024)
Antraquinona	243) 1,2-dimetoxi-7-metil-antraquinona 	<i>Prismatomeris glabra</i>	raízes	Atividade moderada contra células de neuroblastoma.	(Primus et al., 2024)
Antraquinona	244) Lucidina 	<i>Prismatomeris glabra</i>	raízes		(Primus et al., 2024)

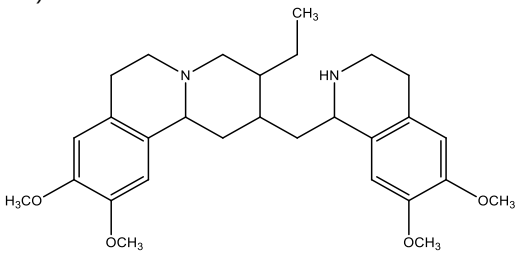
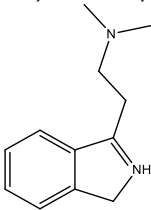
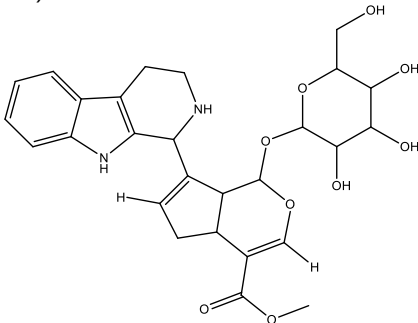
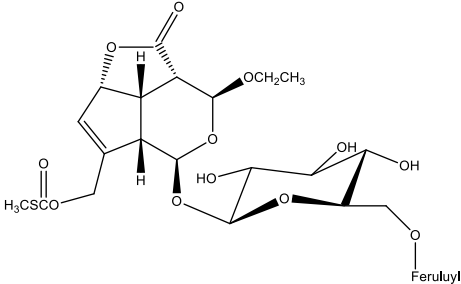
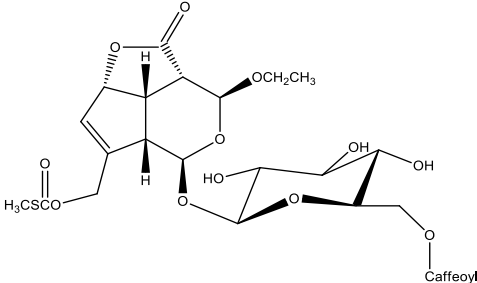
Classe	Substância	Espécie	Parte da planta	Atividade Biológica	Referência
Antraquinona	245) Nordamnacanthal 	<i>Prismatomeris glabra</i>	raízes		(Primus et al., 2024)
Antraquinona	246) 2-carboxaldeído-3-hidroxiantraquinona 	<i>Prismatomeris glabra</i>	raízes		(Primus et al., 2024)
Antraquinona	247) catecol éter dietílico 	<i>Prismatomeris glabra</i>	raízes	Atividade moderada contra células de neuroblastoma.	(Primus et al., 2024)
Antraquinona	248) Sapanquinona A 	<i>Saprosma crassipes</i>	caules	Atividade antibacteriana de amplo espectro.	(Ji et al., 2024)
Antraquinona	249) Sapanquinona B 	<i>Saprosma crassipes</i>	caules		(Ji et al., 2024)
Antraquinona	250) 1,5,7-tri-hidroxi-2-(hidroximetil)-9,10-antracenodiona 	<i>Saprosma crassipes</i>	caules	Atividade antibacteriana de amplo espectro.	(Ji et al., 2024)
Antraquinona	251) 2-hidroxi-3-(hidroximetil)-9,10-antracenodiona 	<i>Saprosma crassipes</i>	caules		(Ji et al., 2024)
Alcaloide indólico	252) Naucleamida H 	<i>Nauclea officinalis</i>	ramos, casca	atividade inibitória contra o câncer de fígado humano (HepG-2)	(Wang et al., 2024)

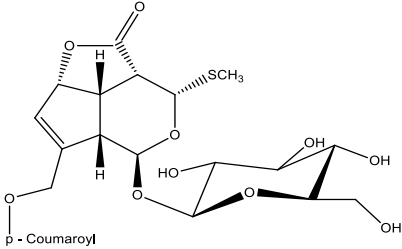
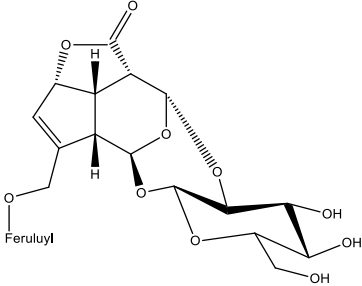
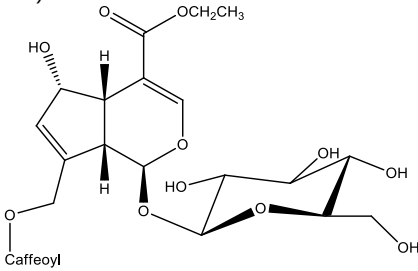
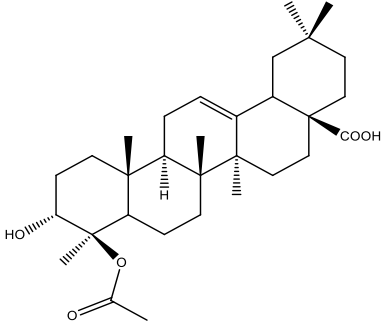
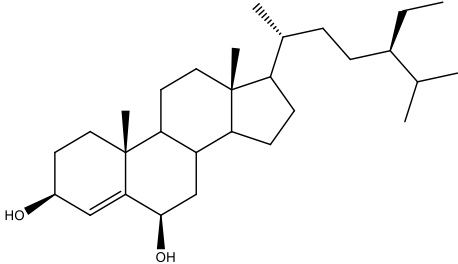
Classe	Substância	Espécie	Parte da planta	Atividade Biológica	Referência
Alcaloide indólico	253) (±)-19-O-butilangustolina 	<i>Nauclea officinalis</i>	ramos, casca	atividade inibitória contra o câncer de fígado humano (HepG-2)	(Wang <i>et al.</i> , 2024)
Alcaloide	254) 3,14-di-hidroangustina 	<i>Nauclea officinalis</i>	ramos, casca		(Wang <i>et al.</i> , 2024)
Alcaloide	255) (-)-naucleofficine D 	<i>Nauclea officinalis</i>			(Wang <i>et al.</i> , 2024)
Alcaloide	256) (+)-naucleofficine D 	<i>Nauclea officinalis</i>	ramos, casca		(Wang <i>et al.</i> , 2024)
Alcaloide	257) nauclefina 	<i>Nauclea officinalis</i>	ramos, casca	Atividade citotóxica forte contra câncer de fígado.	(Wang <i>et al.</i> , 2024)

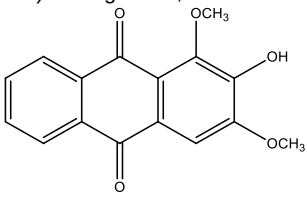
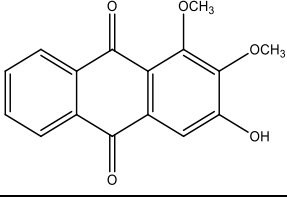
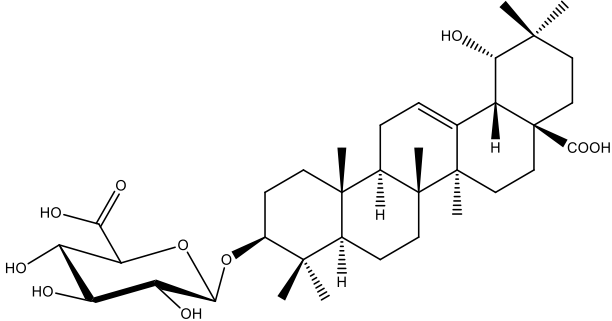
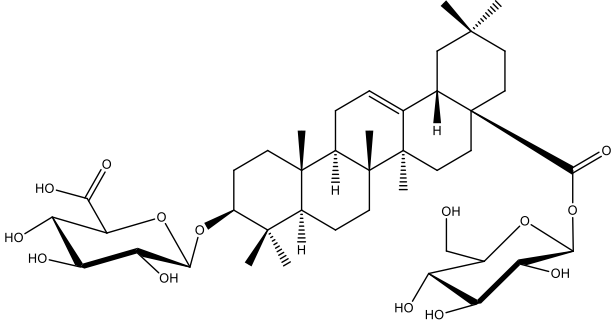
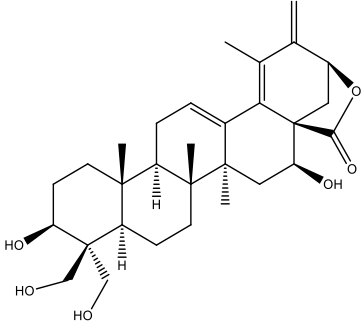
Classe	Substância	Espécie	Parte da planta	Atividade Biológica	Referência
Alcaloide	258) angustidina 	<i>Nauclea officinalis</i>	ramos, casca	-	(Wang <i>et al.</i> , 2024)
Alcaloide	259) 19-O-etilangustolina 	<i>Nauclea officinalis</i>	ramos, casca		(Wang <i>et al.</i> , 2024)
Alcaloide	260) angustina 	<i>Nauclea officinalis</i>	ramos, casca	-	(Wang <i>et al.</i> , 2024)
Alcaloide	261) 4-N-óxido-harmano 	<i>Psychotria Schlechtendaliana</i>	partes aéreas		(Corrêa <i>et al.</i> , 2024)
Triterpeno	262) ácido betulínico 	<i>Psychotria Schlechtendaliana</i>	partes aéreas		(Corrêa <i>et al.</i> , 2024)
Antraquinona	263) 1-hidroxi-2-metil-antraquinona 	<i>Rubia cordifolia</i>	grama inteira		(Wang <i>et al.</i> , 2024)

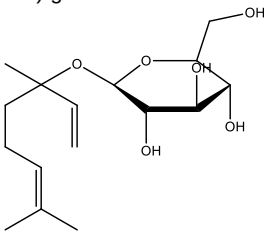
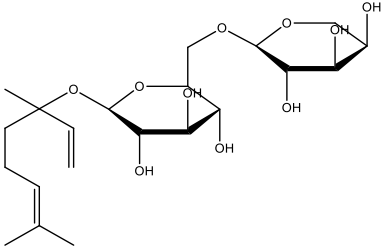
Classe	Substância	Espécie	Parte da planta	Atividade Biológica	Referência
Antraquinona	264) 1,4-dihidroxi-2-metilantraquinona 	<i>Rubia cordifolia</i>	grama inteira		(Wang <i>et al.</i> , 2024)
Antraquinona	265) 1,3-dihidroxi-antraquinona 	<i>Rubia cordifolia</i>	grama inteira		(Wang <i>et al.</i> , 2024)
Antraquinona	266) rubilactona 	<i>Rubia cordifolia</i>	grama inteira		(Wang <i>et al.</i> , 2024)
Antraquinona	267) 1,3,6-trihidroxi-2-metilantraquinona 	<i>Rubia cordifolia</i>	grama inteira	Atividade antimicrobiana	(Wang <i>et al.</i> , 2024)
Terpenoide	268) 2,2,6-trimetil-6-(4-metilfenil)-tetra-hidropiran-3-ol 	<i>Rubia cordifolia</i>	grama inteira	Antifúngica, Antibacteriana, Atividade contra o Vírus do Mosaico do Tabaco (TMV)	(Wang <i>et al.</i> , 2024)
Antraquinona	269) 1-hidroxi-3-metoxiantraquinona 	<i>Rubia cordifolia</i>	grama inteira	Antifúngica, Antibacteriana, Atividade contra o Vírus do Mosaico do Tabaco (TMV)	(Wang <i>et al.</i> , 2024)

Classe	Substância	Espécie	Parte da planta	Atividade Biológica	Referência
alcaloides monoterpênicos	270) Uncarpseudoindosídeo A 271) Uncarpseudoindosídeo B  270) 2R 271) 2S	<i>Uncaria rhynchophylla</i>	caules	-	(Zhang <i>et al.</i> , 2024)
alcaloide monoterpênico furoindo	272) Furorincofilósido A 	<i>Uncaria rhynchophylla</i>	caules	-	(Zhang <i>et al.</i> , 2024)
alcaloides monoterpênicos	273) ácido secorrincohílico A 274) ácido secorrincohílico B  273) 7S 274) 7R	<i>Uncaria rhynchophylla</i>	caules		(Zhang <i>et al.</i> , 2024)
alcaloide monoterpênico	275) Ácido secorrincohílico 	<i>Uncaria rhynchophylla</i>	caules	-	(Zhang <i>et al.</i> , 2024)
alcaloide monoterpênico	276) Ácido 18-desidroisorrincofilico 	<i>Uncaria rhynchophylla</i>	caules	atividade anti-inflamatória	(Zhang <i>et al.</i> , 2024)
Alcaloide	277) Harmalina 	<i>Psychotria dalzellii</i>	folhas		(Talluri <i>et al.</i> , 2024)

Classe	Substância	Espécie	Parte da planta	Atividade Biológica	Referência
Alcaloide	278) Emetina 	<i>Psychotria dalzellii</i>	folhas		(Talluri <i>et al.</i> , 2024)
Alcaloide	279) Dimetiltryptamina 	<i>Psychotria dalzellii</i>	folhas		(Talluri <i>et al.</i> , 2024)
Alcaloide	280) Psicolatina 	<i>Psychotria dalzellii</i>	folhas		(Talluri <i>et al.</i> , 2024)
Iridoide glicosídeo	281) 6'-O-trans-feruloil-(4S,6R)-3,4-di-hidro-3β-etoxipederósídeo 	<i>Paederia foetida</i>	partes aéreas		(Chen <i>et al.</i> , 2024)
Iridoide glicosídeo	282) 6'-O-trans-cafeoil-(4S,6R)-3,4-di-hidro-2'-O-3α-pederósídeo 	<i>Paederia foetida</i>	partes aéreas	Atividade antinociceptiva.	(Chen <i>et al.</i> , 2024)

Classe	Substância	Espécie	Parte da planta	Atividade Biológica	Referência
Iridoide	283) 10-O-trans-p-cumaroil (4R,6R)-3,4-di-hidro-3 α -metiltiopederosídeo  p - Coumaroyl	<i>Paederia scandens</i>	folhas	Atividade citotóxica	(Hu <i>et al.</i> , 2024)
Iridoide	284) 10-O-trans-feruloil- (4S,6R)-3,4-di-hidro-2'-O-3 α -pederosídeo  Feruluyyl	<i>Paederia scandens</i>	folhas		(Hu <i>et al.</i> , 2024)
Iridoide	285) 10-O-trans-cafeoil éster etílico do ácido peditosídico  Caffeoyl	<i>Paederia scandens</i>	folhas		(Hu <i>et al.</i> , 2024)
triterpeno	286) 24-acetoxi-3 α -hidroxioleano-12-en-28-óico 	<i>Ophiorrhiza chinensis</i>	partes aéreas	Atividade inibitória moderada da enzima tirosinase.	(Bu <i>et al.</i> , 2024)
esteroide	287) estigmast-4-eno-3 β ,6 β -diol 	<i>Ophiorrhiza chinensis</i>	partes aéreas	Atividade inibitória moderada da enzima tirosinase.	(Bu <i>et al.</i> , 2024)

Classe	Substância	Espécie	Parte da planta	Atividade Biológica	Referência
antraquinona	288) Antragalol-1,3-dimetiléter 	<i>Ophiorrhiza chinensis</i>	partes aereas	Atividade inibitória moderada da enzima tirosinase.	(Bu <i>et al.</i> , 2024)
antraquinona	289) Antragalol-1,2-dimetiléter 	<i>Ophiorrhiza chinensis</i>	partes aereas	Atividade inibitória moderada da enzima tirosinase.	(Bu <i>et al.</i> , 2024)
triterpeno	290) Ácido 19α-hidroxioleanólico 3-O-β-D-glucuronopiranosídeo 	<i>Gardenia angkorensis</i>	folhas	apresentou inibição moderada contra α-glicosidase	(Hoang <i>et al.</i> , 2024)
saponina triterpênica	291) chikusetsusaponina IV 	<i>Gardenia angkorensis</i>	folhas		(Hoang <i>et al.</i> , 2024)
triterpeno	292) Ácido 3β,16β, 21β, 23,24-penta-hidroxi urs-12,18,20-trien-28-óico-γ-lactona 	<i>Gardenia angkorensis</i>	folhas	Atividade citotóxica fraca contra células cancerígenas	(Hoang <i>et al.</i> , 2024)

Classe	Substância	Espécie	Parte da planta	Atividade Biológica	Referência
glicosídeo monoterpênico	293) glicosídeo de linalol 	<i>Gardenia angkorensis</i>	folhas		(Hoang et al., 2024)
glicosídeo monoterpênico	294) linalil 6-O- α -L-arabinopiranosil- β -D-glucopiranosídeo 	<i>Gardenia angkorensis</i>	folhas	Exibiu fraca citotoxicidad e contra a linhagem celular KB e a linhagem celular Hep G2	(Hoang et al., 2024)