



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

LAVOSYER DA SILVA MENDONÇA

***Athenaea velutina*: ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE LACTONAS
ESTEROIDAIIS POLIOXIGENADAS (VITANOLÍDEOS)**

FORTALEZA

2024

LAVOSYER DA SILVA MENDONÇA

Athenaea velutina: ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE LACTONAS
ESTEROIDAIIS POLIOXIGENADAS (VITANOLÍDEOS)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química.
Área de concentração: Química Orgânica.

Orientador: Professora Doutora Otília
Deusdênia Loiola Pessoa

Coorientador: Professor Doutor Francisco das
Chagas Lima Pinto

FORTALEZA

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- M495a Mendonça, Lavosyer da Silva.
Athenaea velutina: isolamento e caracterização de lactonas esteroidais polioxigenadas (vitanolídeos) / Lavosyer da Silva Mendonça. – 2024.
84 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências,
Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2024.
Orientação: Prof. Dr. Oflia Deusdênia Loiola Pessoa.
Coorientação: Prof. Dr. Francisco das chagas Lima Pinto.
1. Athenaea velutina. 2. Solanaceae. 3. Vitanolídeos. 4. Vitanolídeos glicosilados. 5.
atividade antiinflamatória. I. Título.

LAVOSYER DA SILVA MENDONÇA

Athenaea velutina: ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE LACTONAS
ESTEROIDAIIS POLIOXIGENADAS (VITANOLÍDEOS)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química.
Área de concentração: Química Orgânica.

Aprovação em: 29/08/2024

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Otília Deusdênia Loiola Pessoa (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Gilvandete Maria Pinheiro Santiago
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Lorena Mara Alexandre e Silva
Embrapa Agroindústria Tropical (Embrapa)

Todas as preces de agradecimento a Deus não são suficientes para expressar o sentimento de humildade e luz que carrego em meu coração. Senhor, agradeço as suas bênçãos e oro para que continue guiando os meus passos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, porque sem ele nada seria possível, por todas as oportunidades concedidas a mim, pela força e tranquilidade nos momentos de fraqueza e dificuldades.

Aos meus pais Murilo e Deise e irmã Karoene pelo amor, carinho e atenção e apoio que sempre me deram e por me acompanharem durante minha vida, nunca deixando faltar nada nessa vida alegre.

A minha orientadora Dra. Otília Deusdenia, pela manifestação de incondicional apoio e disponibilidade sempre, por ter lido diversas vezes os mesmos textos e sempre ter algo a acrescentar e melhorar.

A equipe do Laboratório de Análises Fitoquímicas de Plantas Medicinais (LAFIPLAM – UFC) sempre ajudando uns aos outros, se empenhando para um ambiente melhor e se dedicando à pesquisa, Horlando, Patrícia, Joana, Carol, Giovanni e Hieldo, um agradecimento especial ao Dr. Fco. das Chagas (Chaguinha) e Dra. Amanda Kesya, pois, foram determinantes em todo esse trabalho, sem o apoio deles, não haveria o conhecimento que tenho hoje em relação à pesquisa.

Ao Programa da Pós-Graduação, professores e aos seus funcionários, principalmente à Célia e à Lana, pelo apoio e amizade

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- Brasil (CAPES) - Código de financiamento 001 e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

“Não é a terra que é frágil. Nós é que somos frágeis. A natureza tem resistido a catástrofes muito piores do que as que produzimos. Nada do que fazemos destruirá a natureza. Mas podemos facilmente nos destruir” **James Lovelock.**

RESUMO

Os vitanolídeos constituem uma classe de metabólitos secundários isolados principalmente em plantas da família Solanaceae, restrita à subfamília solanoideae. Essa classe de compostos possuem estrutura derivada do esqueleto ergostano dando origem a δ - ou γ -lactonas esteroidais (C28). Os vitanolídeos apresentam grande interesse farmacológico e são considerados compostos promissores à candidados a fármacos como a vitaferina A. Dessa forma, este trabalho visa dar continuidade ao estudo dos extratos das folhas de *Athenaea velutina* (Solanaceae) focando na investigação química do extrato etanólico (AVFE). O fracionamento cromatográfico de AVFE resultou no isolamento de seis compostos. A análise dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (1D e 2D) permitiu a elucidação estrutural de três novos vitanolídeos: 3-O-[α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-glicopiranosil]-tuboanosídeo A (AV20), 3-O-[α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-glicopiranosil]-1-acetil-5,24-dienolídeo (AV21) e 16-hidroxipubesenolídeo (AV24), bem como outros três já descritos na literatura: pubesenolídeo (AV22), (20S,22R)-3 α ,6 α -epoxi-4 β ,5 β ,27-trihidroxi-1-oxivita-24-enolídeo (AV23) e 6 α -cloro-4 β ,5 β ,27 α -trihidroxi-1-oxo-22R-vita-2,24-dienolídeo (AV19). Uma triagem anti-inflamatória foi realizada utilizando os dois compostos majoritários isolados, através da análise de seus efeitos na viabilidade de células RAW 264.7 e sua capacidade de inibir a produção celular de óxido nítrico (ON). Enquanto, o composto AV20 exibiu atividade pró-inflamatória ao aumentar a produção de nitrito em macrófagos estimulados por LPS, o composto AV21 demonstrou ação anti-inflamatória ao reduzir esses níveis.

Palavras-chave: *Athenaea velutina*; solanaceae; vitanolídeos; vitajardins; vitanolídeos glicosilados; atividade anti-inflamatória.

ABSTRACT

Withanolides are a class of secondary metabolites particularly found in plants from the Solanaceae family, restricted to the Solanoideae subfamily. This compound's class has a structure derived from the ergostane framework which can provide steroidal δ - or γ -lactones. Withanolides have shown a high pharmacological interest and are considered promising molecules as drug candidates as the withaferin A. Therefore, this work aims to continue the study of extracts from the leaves of *Athenaea velutina* (Solanaceae) focusing on the chemical investigation of the ethanol extract (AVFE). chromatographic fractionation of AVFE resulted in the isolation of six compounds. An analysis of ^1H and ^{13}C NMR (1D and 2D) spectra allowed the structure elucidation of the new withanolides: 3-*O*-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyl]-tuboanoside A (AV20), 3-*O*-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyl]-1-acetyl-5,24-dienolide (AV21) and 16-hydroxypubesenolide (AV24) as well as the known withanolides pubesenolide (AV22), (20*S*,22*R*)-3 α ,6 α -epoxy-4 β ,5 β ,27-trihydroxy-1-oxo-22*R*-vita-2,24-dienolide (AV23) and 6 α -chloro-4 β ,5 β ,27 α -trihydroxy -1-oxo-22*R*-vita-2,24-dienolide (AV19). An anti-inflammatory screening was conducted using the two major withanolides, analyzing their effects on the viability of RAW 264.7 cells and their ability to inhibit cellular nitric oxide (NO) production. While withanolide AV20 exhibited pro-inflammatory activity by increasing nitrite production in LPS-stimulated macrophages, AV21 showed anti-inflammatory action by reducing these levels.

Keywords: *Athenaea velutina*; Solanaceae; withanolides; withajardins; withanolides glycosides; anti-inflammatory activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fotografia de <i>Athenaea velutina</i> (Sendtn) com destaque para inflorescências.....	17
Figura 2 - Estrutura dos vitanolídeos isolados previamente das folhas de <i>A. velutina</i>	18
Figura 3 - Estruturas dos vitanolídeos δ (a) e γ (b) lactonas	19
Figura 4 - Principais estruturas de vitanolídeos sem modificações no esqueleto básico	24
Figura 5 - Estrutura básica de fisalinas.....	25
Figura 6 - Estrutura básica de vitafisalinas.....	25
Figura 7 - Proposta da estrutura a partir da proposta da rota biosintética	26
Figura 8 - Estrutura básica de vitajardin.....	26
Figura 9 - Estrutura básica de acnistina.....	27
Figura 10 - Estrutura básica de vitametelin	27
Figura 11 - Exemplos de diferentes estruturas de vitanolídeos do tipo δ -lactona ou δ -lactol.	28
Figura 12 - Perfil teórico do espectro de CD para vitanolídeos 22R e 22S e dado experimental.	29
Figura 13 - Proposta biosintética para a formação de diferentes vitanolídeos.	32
Figura 14 - Fluxograma do fracionamento cromatográfico utilizando partição líquido-líquido do extrato etanólico AVFE.	36
Figura 15 - Cromatoplaças reveladas utilizando amostras de <i>A. velutina</i> , A revelador: sulfato de cério, B revelador: vanilina.....	37
Figura 16 - Cromatograma da fração AOB obtido por CLAE, no comprimento de onda na faixa de 210-400 nm.	40
Figura 17 - Cromatograma da fração AND obtido por CLAE, no comprimento de onda na faixa de 210-400 nm.....	41
Figura 18 - Fluxograma geral de isolamento dos compostos.	43
Figura 19 - Estrutura de AV19	46
Figura 20 - Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz) de AV19 , em CDCl_3	47
Figura 21 - Espectro de RMN de ^{13}C -DEPT 135° (125 MHz) de AV19 , em CDCl_3	48
Figura 22 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz) de AV19 , em CDCl_3	48
Figura 23 - Espectro de correlação quântica única heteronuclear (HSQC) de AV19 , em CDCl_3	49
Figura 24 - Principais correlações observadas nos espectros HMBC e COSY do composto AV20	50
Figura 25 - Estrutura de AV20 e do tuboanosídeo A.....	51

Figura 26 - Espectro de absorção na região do infravermelho de AV20	53
Figura 27 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz) de AV20 , em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$	54
Figura 28 - Espectro de correlação quântica única heteronuclear (HSQC) de AV20 , em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$	54
Figura 29 - Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz) de AV20 , em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$	55
Figura 30 - Espectro de correlação quântica múltipla heteronuclear (HSQC) de AV20 , em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$	55
Figura 31 - Espectro bidimensional de correlação de deslocamentos homonuclear (^1H , ^1H) (COSY) (500 MHz) de AV20 , em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$	56
Figura 32 - Espectro bidimensional de correlação dipolar (^1H , ^1H) (NOESY) (500 MHz) AV20 , em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$	56
Figura 33 - Principais correlações observadas nos espectros HMBC e COSY do vitanolídeo AV21	57
Figura 34 - Estrutura de AV21	58
Figura 35 - Espectro de absorção na região do infravermelho de AV21	60
Figura 36 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz) de AV21 , em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$	60
Figura 37 - Espectro de correlação quântica única heteronuclear (HSQC) de AV21 , em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$	61
Figura 38 - Espectro bidimensional de correlação de deslocamentos homonuclear (^1H , ^1H) (COSY) (500 MHz) de AV21 , em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$	61
Figura 39 - Espectro de correlação quântica múltipla heteronuclear (HSQC) de AV21 em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$	62
Figura 40 - Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz) de AV21 , em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$	62
Figura 41 - Espectro de RMN de ^{13}C -DEPT (125 MHz) de AV21 , em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$	63
Figura 42 - Espectro bidimensional de correlação dipolar (^1H , ^1H) (NOESY) (500 MHz) de AV21 , em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$	63
Figura 43 - Estrutura de AV22	64
Figura 44 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz) de AV22 , em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$	66
Figura 45 - Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz) de AV22 , em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$	66
Figura 46 - Estrutura do AV23	67
Figura 47 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz) de AV23 , em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$	69
Figura 48 - Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz) de AV23 , em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$	69
Figura 49 - Espectro de RMN de ^{13}C -APT (125 MHz) de AV23 , em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$	70
Figura 50 - Principais correlações observadas no espectro HMBC de AV24	71

Figura 51 - Estrutura do vitanolídeo AV24	71
Figura 52 - Espectro de RMN de ^1H (600 MHz) de AV24, em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$	72
Figura 53 - Espectro de RMN de ^{13}C (150 MHz) de AV24 , em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$	73
Figura 54 - Espectro de correlação quântica múltipla heteronuclear (HSQC) de AV24 em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$	73
Figura 55 - Espectro bidimensional de correlação dipolar (^1H , ^1H) (NOESY) (600 MHz) de AV24 , em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$	74
Figura 56 - Comparação no teste de viabilidade das células RAW264.7	75
Figura 57 - Comparação no controle de produção de nitrito para AV20 e AV21.	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Ocorrência de vitanolídeos em produtos naturais.....	21
Tabela 2 - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração AVFED.....	36
Tabela 3 - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração AVFEDF 37	37
Tabela 4 - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração AVFEDFB.....	38
Tabela 5 - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração AVFEDFBE	38
Tabela 6 - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração AVFEAE	39
Tabela 7 - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração AVFEAO.....	39
Tabela 8 - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração AVFEAN.....	40
Tabela 9 - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração AVFEAI	41
Tabela 10 - Análise comparativa dos valores de deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C e ^1H do composto AV19 e da 6-cloro-vitaferina A (NITTALA et al., 1981). ...	46
Tabela 11 - Análise comparativa dos valores de deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C e ^1H do composto AV20 e do tuboanosideo A (KIYOTA et al., 2008).	52
Tabela 12 - Análise comparativa dos deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C e ^1H de AV21 (piridina- d_5).	59
Tabela 13 - Análise comparativa dos valores de deslocamento químico de RMN de ^{13}C e ^1H de AV22 e RMN de ^{13}C para o composto pubesenolideo (SAHAI, 1985)...	65
Tabela 14 - Análise comparativa dos deslocamentos químico de RMN de ^{13}C e ^1H de AV23 com os dados na literatura para (20 <i>S</i> ,22 <i>R</i>)-3 α ,6 α -epoxi-4 β ,5 β ,27- trihidroxi-1-oxivita-24-enolídeo (ZHAO et al, 2002).	68
Tabela 15 - Análise comparativa dos valores de deslocamento químico de RMN de ^{13}C e ^1H de AV24 e RMN de ^{13}C do pubesenolideo.	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOEt	Acetato de etila
APT	<i>Attached Proton Test</i>
BB	<i>Broad Band</i>
CCD	Cromatografia em camada delgada
CENAUREM	Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
DEPT	<i>Distortionless Enhanced Polarization Transfer</i>
ECD	Espectro de dicroísmo circular
HRESIMS	<i>High Resolution Electrospray Ionization Mass Spectrometer</i>
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantun Coherence</i>
Hz	<i>Hertz</i>
IV	Infravermelho
MeOH	Metanol
OAc	Acetoxi
Ortep	<i>Oak Ridge Thermal-Ellipsoid Plot Program</i>
RMN ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
RMN ¹ H	Ressonância magnética nuclear de prótio
UFC	Universidade Federal do Ceará
UV	Ultravioleta

LISTA DE SÍMBOLOS

J	Constante de acoplamiento
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
δ	Delta
Δ	Delta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	Objetivos	17
<i>1.1.1</i>	<i>Objetivo geral</i>	17
<i>1.1.2</i>	<i>Objetivos específicos</i>	17
2	ASPECTOS GERAIS SOBRE VITANOLÍDEOS	19
2.1	Ocorrência de vitanolídeos em plantas e corais	20
<i>2.1.1</i>	<i>A família Solanaceae e a tribo Physaleae</i>	20
2.2	Classificação dos vitanolídeos	24
<i>2.2.1</i>	<i>Aspectos estereoquímicos</i>	29
<i>2.2.2</i>	<i>Proposta biossintética</i>	30
3	METODOLOGIA	33
3.1	Materiais e métodos	33
<i>3.1.1</i>	<i>Métodos cromatográficos</i>	33
<i>3.1.1.1</i>	<i>Cromatografia de adsorção em gel sílica</i>	33
<i>3.1.1.2</i>	<i>Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)</i>	33
<i>3.1.1.3</i>	<i>Cromatografia por exclusão molecular em Sephadex LH-20</i>	34
<i>3.1.2</i>	<i>Métodos espectroscópicos</i>	34
<i>3.1.2.1</i>	<i>Espectroscopia na região do infravermelho (IV)</i>	34
<i>3.1.2.2</i>	<i>Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)</i>	34
<i>3.1.2.3</i>	<i>Espectrometria de massas de alta resolução (EMAR)</i>	35
3.2	Parte experimental	35
3.3	Coleta do material botânico	35
3.4	Obtenção dos extratos das folhas de A. velutina: AVFH/A e AVFE	35
3.5	Partição líquido-líquido do extrato etanólico AVFE	35
3.6	Fracionamento Cromatográfico de AVFE-D	36
3.7	Fracionamento Cromatográfico de AVFE-DF	37
3.8	Fracionamento Cromatográfico de AVFE-DFB	38
3.9	Fracionamento Cromatográfico de AVFE-DFBE	38
3.10	Fracionamento Cromatográfico de AVFE-A	39
3.11	Fracionamento Cromatográfico de AVFE-AO	39
3.12	Fracionamento Cromatográfico de AVFE-AN	40
3.13	Fracionamento Cromatográfico de AVFE-AI	41

3.14	Ensaio farmacológico.....	44
3.15	Análise estatística.....	45
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	45
4.1	Determinação estrutural	45
4.1.1	<i>Determinação estrutural do composto AV19</i>	45
4.1.2	<i>Determinação estrutural do composto AV20</i>	49
4.1.3	<i>Determinação estrutural de AV21</i>	57
4.1.4	<i>Determinação estrutural de AV22</i>	64
4.1.5	<i>Determinação estrutural de AV23</i>	67
4.1.6	<i>Determinação estrutural de AV24</i>	70
4.2	Atividade Anti-inflamatória	74
5	CONCLUSÃO	76
	REFERENCIAS	77

1 INTRODUÇÃO

Diversas plantas da família solanaceae são reconhecidas por produzirem metabólitos secundários com propriedades farmacológicas, entre as quais destacam-se: atividade citotóxica (GU et al., 2018), anti-inflamatória (DENG et al., 2023) antipirética (HASSAN et al., 2021), antioxidante, hepatoprotetora, cardioprotetora, antiulcerogênica (JAN et al., 2024).

Inúmeras classes de compostos têm sido isoladas de plantas dessa grande família como: flavonoides (KUMAR et al., 2021), alcalóides esteroidais (GU et al., 2018), saponinas (ZHOU et al., 2006), amidas (capsaicinoides) (BATIHA et al., 2020) e vitanolídeos (ROCHA et al., 2022). Vale destacar que a última dessas classes é de grande interesse científico, devido às suas inúmeras atividades biológicas, particularmente neuroprotetora (GIRME et al., 2020), antioxidante (HA et al., 2002), anti-inflamatória (ROCHA et al., 2022), antimicrobiana, citotóxica, inseticida (BHADANI et al., 2021) e anticancerígena (HAHM et al., 2020).

A diversidade de compostos aliada ao seu potencial farmacológico tem motivado o estudo de plantas produtoras dessa classe de compostos, presentes na flora cearense, como por exemplo as plantas do gênero *Acnistus*, *Athenaea* e *Physalis* (MISICO et al., 2011).

Athenaea é um pequeno gênero sul-americano, com espécies endêmicas da Mata Atlântica, com distribuição geográfica nos estados da Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Santa Catarina, além de espécie nativa da Argentina, Bolívia, Paraguai e Peru. O gênero contempla 14 espécies, *A. altoserranae* I.M.C. Rodrigues & Stehmann, *A. angustifolia* (Alm.-Lafetá) I.M.C. Rodrigues & Stehmann, *A. anonacea* Sendtn., *A. brasiliiana* Hunz., *A. cuspidata* Witasek, *A. fasciculata* (Vell.) I.M.C. Rodrigues & Stehmann, *A. hunzikeriana* I.M.C. Rodrigues & Stehmann, *A. martiana* Sendtn., *A. picta* (Mart.) Sendtn., *A. pogogena* (Moric.) Sendtn., *A. sellowiana* (Sendtn.) I.M. Rodrigues & Stehmann, *A. tomentosa* (Sendtn.) I.M.C Rodrigues & Stehmann *A. velutina* (Sendtn.) D’Arcy e *A. wettsteiniana* (Witasek) I.M.C. Rodrigues & Stehmann (ROCHA et al., 2022).

Apesar do gênero *Athenaea* apresentar uma larga distribuição geográfica nos estados brasileiros, o Ceará contempla apenas a espécie *A. velutina* (FIGURA 1), popularmente conhecida como “baga-de-morcego”, “fruta-de-morcego” ou “jurubeba-de-morcego”, um arbusto ou arvoreta que frutifica no verão, estação com maior concentração de chuva do estado (ROCHA, 2023).

Figura 1- Fotografia de *Athenaea velutina* (Sendtn) com destaque para inflorescências



Fonte: Marinês Eiterer e Mauricio Mercadante

Os primeiros estudos fitoquímicos com *A. velutina* foram descritos por Almeida e colaboradores (2020), que avaliaram a atividade citotóxica e antimetastática do extrato etanólico das folhas de *A. velutina*. Deste estudo, resultou na publicação de outros três artigos, incluindo um, com o isolamento de três vitanolídeos (ALMEIDA et al., 2020; ALMEIDA et al., 2022; ALMEIDA-LAFETÁ et al., 2010).

Outro estudo com a planta foi iniciado em 2019 com o projeto de doutorado da Dra. Amanda K. D. Rocha, que resultou no isolamento de dezoito vitanolídeos, a partir do extrato hexano/acetato de etila 1:1 das folhas de *A. velutina* (FIGURA 2).

Dessa forma, este trabalho tem como objetivo dar continuidade aos estudos, de frações de maior polaridade, obtidos do extrato etanólico, concentrando-se no isolamento, caracterização e avaliação da atividade anti-inflamatória de vitanolídeos polares, bem como os vitanolídeos glicosilados.

1.1 Objetivos

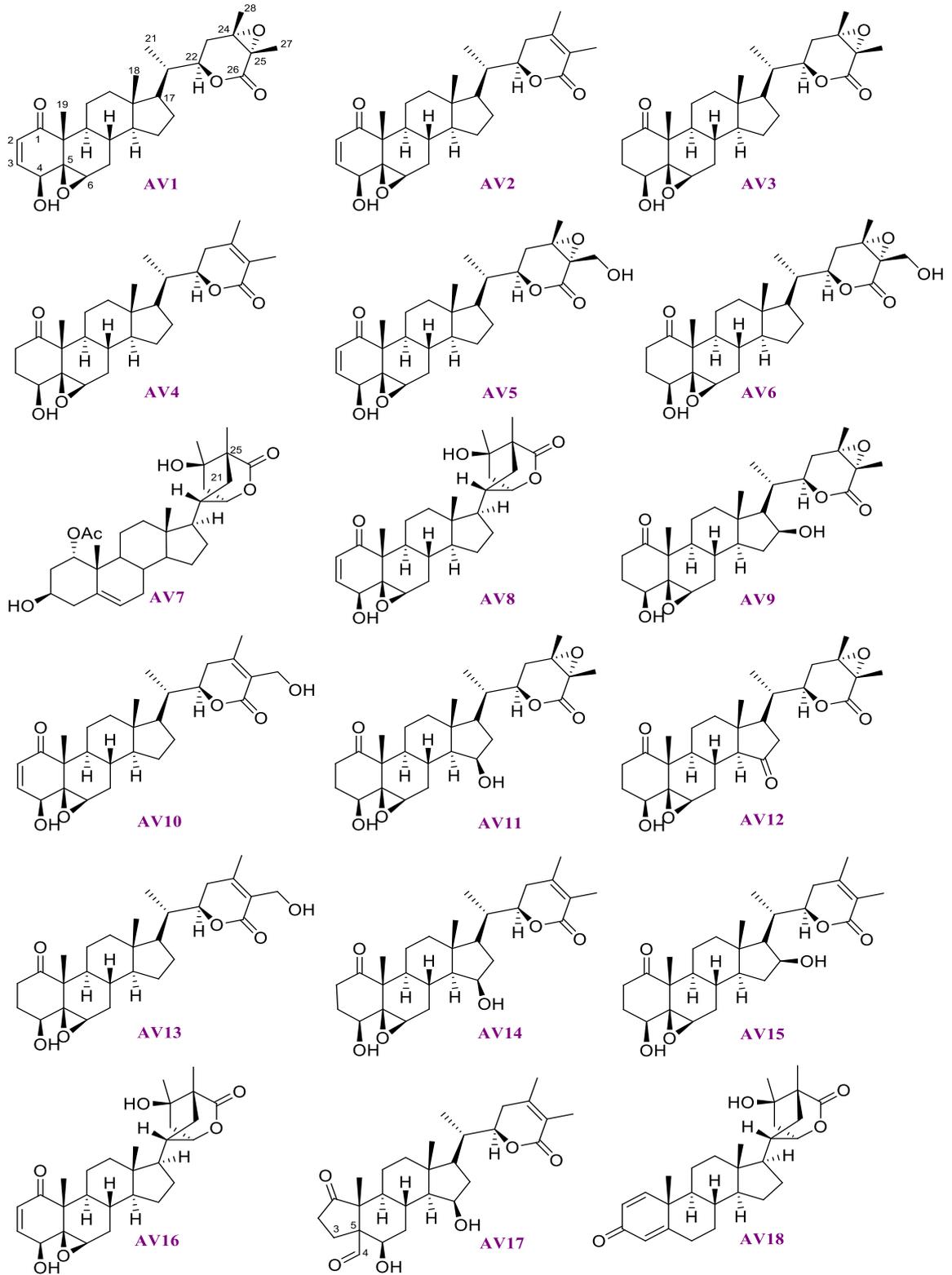
1.1.1 Objetivo geral

Investigar o extrato etanólico das folhas de *A. velutina* com vistas ao isolamento de seus metabólitos secundários e avaliar possíveis atividade anti-inflamatória.

1.1.2 Objetivos específicos

- ✓ Isolar novos compostos, incluindo os vitanolídeos poli-oxigenados (glicolisilados);
- ✓ Caracterizar de forma inequívoca as estruturas químicas dos compostos isolados;
- ✓ Avaliar a atividade anti-inflamatória dos compostos majoritários.

Figura 2- Estrutura dos vitanolídeos isolados previamente das folhas de *A. velutina*

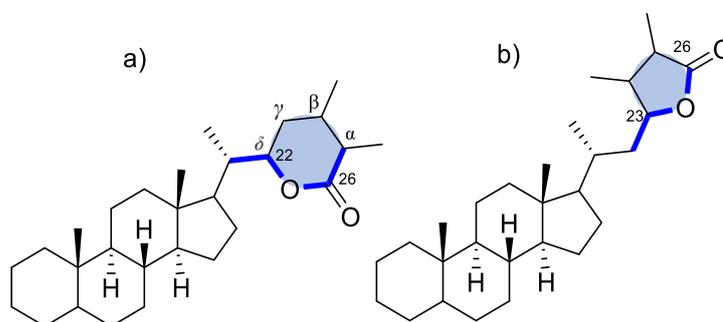


Fonte: ROCHA, 2023

2 ASPECTOS GERAIS SOBRE VITANOLÍDEOS

Os vitanolídeos pertencem a um grupo de metabolitos secundários produzidos principalmente por plantas, com estrutura baseada no esqueleto ergostano C_{28} , no qual os carbonos C-22 e C-26 são oxidados para formar uma δ -lactona ou δ -lactol, e menos comum a oxidação dos carbonos C-23 e C-26 para formar uma γ -lactona ou γ -lactol (LLANOS et al., 2017) como ilustrado na FIGURA 3.

Figura 3- Estruturas dos vitanolídeos δ (a) e γ (b) lactonas



Para este grupo de lactonas esteroidais existem diferentes tipos de estruturas, uma vez que, são compostos ricos em funções oxigenadas e que devido a um processo enzimático oriundo da planta, é capaz de oxidar vários átomos de carbono do núcleo esteroidal e cadeia lateral com exceção de C-10. O elevado grau de oxigenação que produz inúmeras modificações no esqueleto como a formação de epóxidos, hidroxilas e carbonilas (XU et al., 2016), como a presença dessas funções, permite a formação de novas ligações e aromatização.

Além disso, esses compostos são predominantemente apresentados na forma de agliconas, embora existam em sua forma glicosilada, apresentado uma ou mais unidades de açúcares ligadas ao carbono C-3 ou menos comum em C-27 (HUANG et al., 2020).

Vale destacar o valor medicinal e potencial etnofarmacológico de *Whitania somnifera* (Solanaceae). Em 1965 as pesquisas de Lavie, Glotter e Shvo resultaram no isolamento e caracterização do primeiro vitanolídeo, o qual foi denominado de vitaferina A, em alusão ao gênero. Ao longo dos anos a vitaferina A foi objeto de uma variedade de estudos químicos e farmacológicos, sendo atualmente considerada uma molécula altamente promissora na área oncológica (DOM; BERGHE; OSTADE, 2020).

Os vitanolídeos são isolados principalmente de plantas dos gêneros pertencentes à família Solanaceae e têm despertado grande interesse farmacológico, principalmente por sua diversidade estrutural (SINGH et al., 2022).

2.1 Ocorrência de vitanolídeos em plantas e corais

Apesar dos vitanolídeos serem isolados em sua grande maioria de plantas da família Solanaceae, há ocorrência de espécies vegetais de outras famílias, como: *Dioscorea japonica*, *Tacca plantaginea*, *T. integrifolia*, *T. subflabellata*, *T. chantrieri*, *T. paxiana* (Dioscoreaceae/Taccaceae), *Ajuga bracteosa*, *A. parviflora* (Lamiaceae/Labiatae), *Cassia siamea* (Leguminosae), *Eucalyptus globulus* (Myrtaceae) e curiosamente, de fontes marinhas como *Sinularia brassica*, *Paraminabea acronocephala* (Alcyoniidae/Coelenterata) *Talaromyces stollii* (Trichocomaceae) (YANG et al., 2016; WHITE et al., 2016; SINGH et al., 2022; ZHANG et al., 2023) (TABELA 1).

2.1.1 A família Solanaceae e a tribo Physaleae

A família Solanaceae, inserida na ordem Solanales, pertence ao grupo das plantas mais diversificadas entre as angiospermas eudicotiledôneas e apresenta aproximadamente 150 gêneros e cerca de 3.000 espécies, podendo ser encontradas em várias regiões do mundo, sendo a América do Sul considerada o maior centro de diversidade da família. O Brasil contempla 20% desses gêneros e cerca de 15% das espécies (BRANDÃO FILHO et al., 2018).

A família Solanaceae apresenta grande complexidade taxonomica, sendo dividida em subfamílias, tribos e subtribos. O sistema de classificação mais recente considera nove subfamílias. A tribo Physaleae é a maior da subfamília Solanoideae e concentra o maior número de plantas produtoras de vitanolídeos, como os gêneros *Athenaea*, *Deprea*, *Larnax*, *Tubocapsicum*, *Withania* (subtribo Whitaninae), *Acnistus*, *Dunalia*, *Eriolarynx*, *Iochroma*, *Saracha*, *Vassobia* (Subtribo Iochrominae), *Brachistus*, *Physalis*, *Witheringia* (Subtribo Physalinae) e *Salpichroa* (Subtribo Salpichroinae). Além dos gêneros mencionados, os vitanolídeos podem ser encontrados em plantas de outras tribos de Solanoideae, como em *Datura* (Datureae), *Hyoscyamus* (Hyoscyameae), *Jaborosa* (Jaboroseae), *Lycium* (Lycieae), *Mandragora* (Mandragoreae), *Exodeconus*, *Nicandra* (Nicandreae), *Discopodiun* e *Solanum* (Solanaceae) (YANG et al., 2016; WHITE et al., 2016).

Os vitanolídeos também já foram relatados para os gêneros *Browallia*, *Petunia* e *Trechonaetes* (ZHANG et al., 2012), apesar de não fazerem parte dessa subfamília Solanoideae.

Baseado nessas informações, podemos afirmar que a ocorrência de vitanolídeos em Solanaceae é quase que restrita a plantas da subfamília Solanoideae, com maior representatividade da tribo Physaleae, sendo a *Withania somnifera* (L.) Dunal a de maior relevância.

Para melhor ilustra a distribuição dessa classe de composto, foi construída a tabela a seguir.

Tabela 1- Ocorrência de vitanolídeos (plantas e marinhos).

Família Solanaceae			
Gênero	Espécies	Referências	
<i>Athenaea</i>	<i>A. fasciculata</i> (Vell.) Rodrigues & Stehmann	(SILVA et al., 2023)	
<i>Aureliana</i>	<i>A. martiana</i> (Sendtn.) Rodrigues & Stehmann	(SILVA et al., 2018)	
	<i>A. velutina</i> (Sendt) D'Arcy	(ROCHA et al., 2022)	
	<i>A. arborescens</i> (L.) Schltdl.	(MISICO et al., 2011)	
<i>Acnistus</i>	<i>A. australis</i> var. <i>grandiflorus</i> Griseb.	(CONTA et al., 1971)	
	<i>A. breviflorus</i> Sendtn	(NITTALA et al., 1981)	
	<i>A. ramiflorus</i> Miers	(USUBILLAGA et al., 1992)	
	<i>A. stramoniiifolius</i> (Kunth) miers	(MISICO et al., 2011)	
<i>Brachistus</i>	<i>B. hunzikeri</i> (D'Arcy) Sousa-Penã	(MISICO et al., 2011)	
	<i>B. viscosa</i> Kunth	(ZHANG et al., 2012)	
<i>Browallia</i>	<i>D. ferox</i> L.	(MISICO et al., 2011)	
<i>Datura</i>	<i>D. inoxia</i> Mill.	(MISICO et al., 2011)	
	<i>D. metel</i> L.	(MISICO et al., 2011)	
	<i>D. metel</i> var. <i>fastuosa</i> (L.) Saff.	(MISICO et al., 2011)	
	<i>D. wrightii</i> Regel	(SINGH et al., 2022)	
	<i>D. quercifolia</i> Kunth	(MISICO et al., 2011)	
	<i>D. stramonium</i> L.	(MISICO et al., 2011)	
	<i>D. tatula</i> L.	(MANICKAM et al., 1996)	
	<i>D. ceratocaula</i> Jacq.	(GONZALEZ et al., 2023)	
	<i>D. discolor</i> Bernh.	(GONZALEZ et al., 2023)	
	<i>D. tatura</i> L.	(VERAS et al., 2010)	
	<i>Deprea</i>	<i>D. orinocensis</i> (Kunth) Raf.	(MISICO et al., 2011)
		<i>D. subtriflora</i> (Ruiz & Pav.) D' Arcy	(SINGH et al., 2022)
		<i>D. bitteriana</i> (Werderm.) N.W. Sawyer & Benítez	(CASTRO et al., 2019)
		<i>D. cuyacensis</i> S.Leiva & Lezama	(CASTRO et al., 2019)
<i>D. zamorae</i> Barboza & S.Leiva		(CASTRO et al., 2019)	
<i>Discopodium</i>	<i>D. procumbens</i>	(ECHEVERRI et al., 1988)	
<i>Discopodium</i>	<i>D. penninervium</i> Hochst.	(MISICO et al., 2011)	
	<i>D. brachyacantha</i> Miers	(MISICO et al., 2011)	
<i>Dunalia</i>	<i>D. solanacea</i> Kunth	(MISICO et al., 2011)	
	<i>D. arborescens</i> (L.) Sleumer	(ZHANG et al., 2012)	
	<i>D. australis</i> (Griseb.) Sleumer	(ZHANG et al., 2012)	
	<i>D. tubulosa</i> (Benth.) J.F.Macbr.	(ZHANG et al., 2012)	
	<i>E. lorentzii</i> (Dammer) Hunz.	(MISICO et al., 2011)	
<i>Eriolarynx</i>	<i>E. iochromoides</i> (Hunz.) Hunz.	(SINGH et al., 2022)	

Continuação Tabela-1

<i>Exodeconus</i>	<i>E. maritimus</i> (Benth.) D'Arcy	(MISICO et al., 2011)
	<i>E. pusillus</i> (Bitter) Axelius	(NICOLAS et al., 2020)
	<i>E. prostratus</i> (Dombey ex L'Hér.) Raf.	(NICOLAS et al., 2020)
	<i>E. integrifolius</i> (Phil.) Axelius	(NICOLAS et al., 2020)
	<i>E. flavus</i> (I.M.Johnst.) Axelius & D'Arcy	(NICOLAS et al., 2020)
	<i>Exodeconus</i> sp	(NICOLAS et al., 2020)
<i>Hyoscyamus</i>	<i>H. niger</i> L.	(MISICO et al., 2011)
	<i>H. muticus</i> L.	(ZHANG et al., 2012)
<i>Iochroma</i>	<i>I. australe</i> Griseb.	(MISICO et al., 2011)
	<i>I. coccineum</i> Scheid.	(MISICO et al., 2011)
	<i>I. fuchsoides</i> Miers	(MISICO et al., 2011)
	<i>I. gesneroides</i> Miers	(MISICO et al., 2011)
<i>Jaborosa</i>	<i>J. araucana</i> Phil.	(MISICO et al., 2011)
	<i>J. bergii</i> Hieron.	(MISICO et al., 2011)
	<i>J. caulescens</i> var. <i>bipinnatifida</i> (Dunal) Reiche	(MISICO et al., 2011)
	<i>J. caulescens</i> Gillies & Hook. var. <i>caulescens</i>	(MISICO et al., 2011)
	<i>J. integrifolia</i> Lam.	(MISICO et al., 2011)
	<i>J. kurtzii</i> Hunz. & Barboza	(MISICO et al., 2011)
	<i>J. laciniata</i> (Miers) Hunz. & Barboza	(MISICO et al., 2011)
	<i>J. lanigera</i> (Phil.) Hunz. & Barboza	(MISICO et al., 2011)
	<i>J. leucotricha</i> (Speg.) Hunz.	(MISICO et al., 2011)
	<i>J. magellanica</i> (Griseb.) Dusén	(MISICO et al., 2011)
	<i>J. odonelliana</i> Hunz.	(MISICO et al., 2011)
	<i>J. rotacea</i> (Lillo) Hunz. & Barboza	(MISICO et al., 2011)
	<i>J. runcinate</i> Lam.	(MISICO et al., 2011)
	<i>J. sativa</i> (Miers) Hunz. & Barboza	(MISICO et al., 2011)
	<i>J. parviflora</i> (Phil.) Hunz. & Barboza	(CHEN et al., 2011)
	<i>J. cabreræ</i> Barboza	(GARCIA et al., 2012)
<i>J. reflexa</i> Phil.	(GARCIA et al., 2012)	
<i>Larnax</i>	<i>L. glabra</i> (Standl.) Sawyer	(MISICO et al., 2011)
	<i>L. subtriflora</i> (Ruiz & Pav.) Miers	(MISICO et al., 2011)
<i>Lycium</i>	<i>L. chinense</i> Mill.	(MISICO et al., 2011)
	<i>L. barbarum</i> L.	(MISICO et al., 2011)
	<i>L. halimifolium</i> Mill.	(ZHANG et al., 2012)
<i>Mandragora</i>	<i>M. officinarum</i> L.	(SULEIMAN et al., 2010)
	<i>Mandragora</i> spp	(MONADI et al., 2021)
<i>Margaranthus</i>	<i>M. solanaceous</i> Schltld.	(MISICO et al., 2011)
<i>Nicandra</i>	<i>N. physalodes</i> (L.) Gaertn.	(MISICO et al., 2011)
	<i>N. physaloides</i> (L.) Gaertn. vax. <i>Albiflora</i>	(ASCHER et al. 1981)
	<i>N. john-tyleriana</i> S. Leiva, Pereyra	(SINGH et al., 2022)
	<i>N. yacheriana</i> S. Leiva	(SINGH et al., 2022)
<i>Physalis</i>	<i>P. alkenkegi</i> L.	(MISICO et al., 2011)
	<i>P. alkenkegi</i> var. <i>franchetii</i> (Mast.) Makinoc	(MISICO et al., 2011)
	<i>P. angulata</i> L.	(MISICO et al., 2011)
	<i>P. angulate</i> L.	(SINGH et al., 2022)
	<i>P. chenopodifolia</i> Lam.	(MISICO et al., 2011)
	<i>P. cinerascens</i> (Dunal) Hitchc.	(MISICO et al., 2011)
	<i>P. coztomatl</i> Dunal	(MISICO et al., 2011)
	<i>P. divaricata</i> D. Donc	(MISICO et al., 2011)
	<i>P. crassifolia</i> Benth.	(SINGH et al., 2022)
	<i>P. lanceifolia</i> Nees	(MISICO et al., 2011)
	<i>P. longifolia</i> Nutt.	(SINGH et al., 2022)
	<i>P. minima</i> L.	(MISICO et al., 2011)
	<i>P. neomexicana</i> Rydb.	(SINGH et al., 2022)
	<i>P. peruviana</i> L.	(MISICO et al., 2011)
	<i>P. philadelphica</i> Lam.	(MISICO et al., 2011)
	<i>P. pruinosa</i> L.	(MISICO et al., 2011)

Continuação Tabela-1		
<i>Physalis</i>	<i>P. pubescens</i> L.	(MISICO et al., 2011)
	<i>P. virginiana</i> Mill.	(MISICO et al., 2011)
	<i>P. viscosa</i> L.	(MISICO et al., 2011)
<i>Petunia</i>	<i>P. hybrida</i> (Hook.) Regel	(ELLIGER et al. 1989)
<i>Salpichroa</i>	<i>S. origanifolia</i> (Lam.) Thell.	(MISICO et al., 2011)
	<i>S. scandens</i> Dammer	(NICOLAS et al. 2020)
	<i>S. tristis</i> var. <i>lehmannii</i> (Dammer) Keel	(NICOTRA et al. 2013)
<i>Saracha</i>	<i>S. viscosa</i> Link ex D.Don	(VERAS et al., 2010)
<i>Solanum</i>	<i>S. ciliatum</i> Lam.	(MISICO et al., 2011)
	<i>S. sisymbriifolium</i> Lam.	(MISICO et al., 2011)
	<i>S. capsicoide</i> Mart.	(SINGH et al., 2022)
	<i>S. nigrum</i> L.	(PREET et al. 2019)
<i>Tubocapsicum</i>	<i>T. anomalum</i> (Franch. & Sav.) Makino	(MISICO et al., 2011)
<i>Trechonaetes</i>	<i>T. laciniata</i> Miers	(LAVIE et al. 1987)
<i>Vassobia</i>	<i>T. breviflora</i> (Sendtn.) Hunz.	(MISICO et al., 2011)
	<i>T. lorentzii</i> (Dammer) Hunz.	(MISICO et al., 2000)
<i>Withania</i>	<i>W. adpressa</i> Cors.	(MISICO et al., 2011)
	<i>W. aristata</i> (Aiton) Pauq.	(MISICO et al., 2011)
	<i>W. coagulance</i> Dun.	(VERAS et al., 2010)
	<i>W. coagulans</i> (Stocks) Dunal	(MISICO et al., 2011)
	<i>W. frutescens</i> (L.) Pauq	(MISICO et al., 2011)
	<i>W. obtusifolia</i> V. Tackh	(MISICO et al., 2011)
	<i>W. somnifera</i> (L.) Dunal	(MISICO et al., 2011)
	<i>W. hunzikeri</i>	(VERAS et al., 2010)
	<i>W. qaraitica</i> A.G.Mill. & Biagi	(ALMAQBALI et al. 2023)
	<i>Witheringia</i>	<i>W. coccoloboides</i> (Dammer) Hunz.
<i>W. solanacea</i> L'Her.		(MISICO et al., 2011)
<i>W. hunzikeri</i> D'Arcy		(VERAS et al., 2010)
Família Dioscoreaceae		
<i>Tacca</i>	<i>T. chantrieri</i> Andre	(MISICO et al., 2011)
	<i>T. paxiana</i> H. Limpr.	(MISICO et al., 2011)
	<i>T. plantaginea</i> (Hance) Drenth	(MISICO et al., 2011)
	<i>T. subflabellata</i> P.P. Ling & C.T. Ting	(MISICO et al., 2011)
	<i>T. integrifolia</i> Ker Gawl.	(ZHANG et al., 2012)
<i>Dioscorea</i>	<i>Tacca</i> sp	(PENG et al. 2013)
	<i>D. japônica</i> Thunb.	(SINGH et al., 2022)
	<i>D. panthaica</i> Prain & Burkill	(SHAN et al. 2013)
Família Leguminosae		
<i>Senna</i>	<i>S. siamea</i> (Lam.) Irwin & Barneby	(MISICO et al., 2011)
Família Myrtaceae		
<i>Eucalyptus</i>	<i>G. globulus</i> Labill.	(MISICO et al., 2011)
Família Lamiaceae		
<i>Ajuga</i>	<i>A. parviflora</i> Benth.	(MISICO et al., 2011)
	<i>A. reptans</i> L.	(RAHIMINIYA et al., 2022)
	<i>A. bracteosa</i> Wall. ex Benth	(MISICO et al., 2011)
	<i>A. chamaecistus</i> ssp. <i>tomentella</i> (Boiss.) Rech. f.	(RAHIMINIYA et al., 2022)
Família Coralliidae		
<i>Paraminabea</i>	<i>P. acronocephala</i> (coral mole) (Williams, 1992)	(SINGH et al., 2022)
<i>Minabea</i>	<i>Minabea</i> sp (coral mole)	(KSEBATI et al. 1987)
Família Sinulariidae		
<i>Sinularia</i>	<i>S. brassica</i> (coral mole) May, 1898	(SINGH et al., 2022)

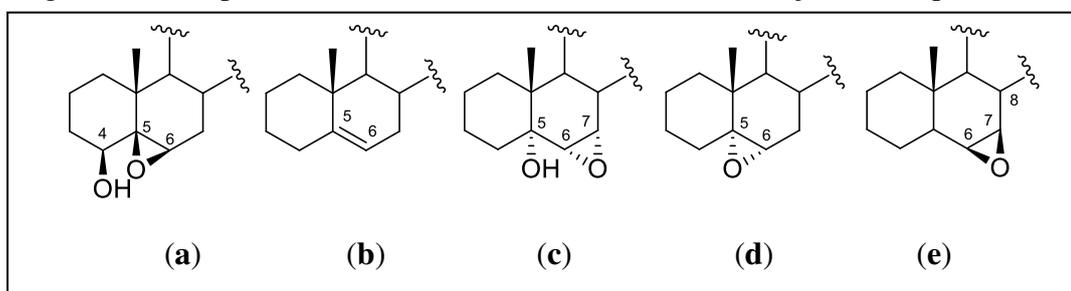
Fonte: Próprio autor

2.2 Classificação dos vitanolídeos

A estrutura do esqueleto ergostano C_{28} nos vitanolídeos pode ser apresentada de duas formas distintas, como uma δ -lactona ou δ -lactol e menos comum como uma γ -lactona ou γ -lactol. Como mencionado, a maioria deles apresenta o esqueleto do tipo δ -lactona, que pode ser classificado em dois subgrupos, com ou sem modificações no esqueleto básico. Interessantemente, o subgrupo sem modificação no esqueleto, aquele semelhante ao esqueleto da vitaferina A, é o mais abundante, sendo considerado um possível precursor dos outros vitanolídeos (CHEN; HE; QIU, 2011).

O esqueleto sem modificação apresenta várias possibilidades para qualquer tipo de vitanolídeo (FIGURA 4) e incluem: $5\beta,6\beta$ -epóxidos (**a**) são os mais comuns, e normalmente trazem um grupo hidroxila em C-4 com orientação β ; 5-eno (**b**), os que também são biossintetizados em número considerável; $6\alpha,7\alpha$ -epóxidos (**c**), que geralmente contém um grupo hidroxila em C-5 com configuração *alfa*. Os vitanolídeos $5\alpha,6\alpha$ -epóxidos (**d**) ocorrem em menor frequência, enquanto os $6\beta,7\beta$ -epóxidos (**e**) são bastante incomuns (CHEN; HE; QIU, 2011).

Figura 4- Principais estruturas de vitanolídeos sem modificações no esqueleto básico



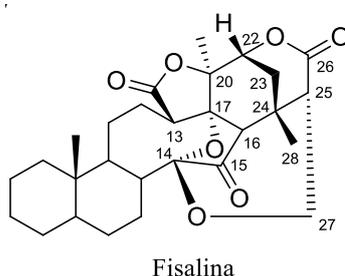
Fonte: ROCHA, 2023

O esqueleto com modificação na estrutura dos vitanolídeos apresenta diversas características e semelhança entre suas estruturas bases, com modificações principalmente no núcleo esteroide (C-14 a C-18) bem como na cadeia lateral (C-20, C-21, C-26 e C-27) (XU et al., 2016). Como resultado, os compostos são classificados como: fisalina, vitafisalina, neofisalina, vitajardin, acnistina, vitametelin, vitanolídeo do tipo norbornano, sativolídeo, δ -lactona espiranoide, δ -lactona subtriflora, δ -lactona taccalonolídeo, 14α , 20α -epóxido, anel A aromático e anel D aromático, representados na Figura 5 (ROCHA, 2023).

Dentre essas subclasses, algumas merecem destaque pelo maior número de substâncias isoladas e publicações, como exemplo, destaca-se as fisalinas são uma subclasse

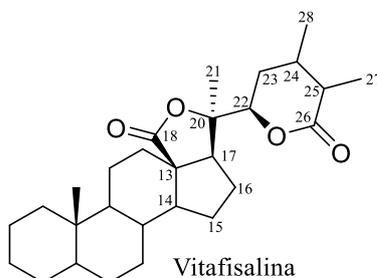
de vitanolídeos altamente oxigenados, comumente conhecidas pelo nome de esteróides 16,24-ciclo-13,14-seco, na qual a quebra da ligação C-13 e C-14 produz um anel de oito ou nove membros e a carbociclização de C-16 e C-24 gera um novo anel de seis membros, enquanto isso, a oxidação do grupo C-18 forma uma 18,20-lactona e a oxidação de C-14 e C-17 leva a formação de um epóxido, assim como em C-14 e C-27 (WU et al., 2021). As fisalinas são os constituintes mais abundantes no gênero *Physalis*, porém já foram encontradas em plantas dos gêneros *Margaranthus*, *Witheringia* e *Brachistus* (MISICO et al., 2011).

Figura 5-Estrutura básica de fisalinas



As vitafisalinas são consideradas como produto intermediário na produção de fisalinas, com exceção da vitafisalina C. As demais apresentam o esqueleto carbocíclico intacto do ergostano e se assemelham estruturalmente às fisalinas, pela presença de uma γ -lactona ou lactol fundido ao anel D do núcleo esteroidal (VERAS et al., 2010). As vitafisalinas compreendem um grupo que apresenta um epóxido entre C-18 e C-20, e pode resultar um lactol ou lactona. Os hemicetais em C-18 são altamente reativos com álcoois simples e geralmente os metil cetais são formados quando o metanol é usado para extração ou purificação (MISICO et al., 2011).

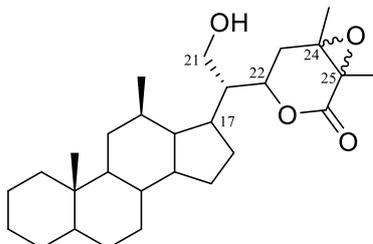
Figura 6- Estrutura básica de vitafisalinas



Os vitajardins, as acnistinas e os vitametilins são caracterizados por apresentarem uma cadeia lateral bicíclica em C-17. Tentando entender o processo de ciclização dos

vitanolides para vitajardins, acnistinas e vitametilins, pode-se inferir que essas subclasses de vitanolídeos poderiam ser facilmente formado a partir dos 21-hidroxi-24,25-epoxivitanolídeo na qual foi sugerida uma hipotética via biossintética (ROCHA et al., 2022).

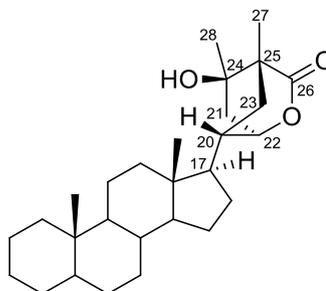
Figura 7- Proposta da estrutura a partir da proposta da rota biosintética



21-hidroxi-24,25-epoxivitanolídeo

Os vitajardins são representados por um anel homocíclico de seis membros e um anel δ -lactona, na qual C-21 está diretamente ligado a C-25 formando um sistema de anel [2,2,2] biciclo com a δ -lactona. Essa subclasse de compostos é majoritária nos gêneros *Deprea* (LUIS; ECHEVERRI; GONZÁLEZ, 1994; ECHEVERRI et al., 1988; WANG et al., 2018), *Tubocapsicum* (KIYOTA et al., 2008), *Nicandra* (GUTIERREZ et al., 2015), e recentemente, foi descrito em *Athenaea* (ROCHA et al., 2022).

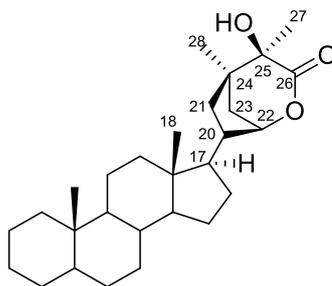
Figura 8-Estrutura básica de vitajardin



Vitajardin

As acnistinas são representados por um anel homocíclico de cinco membros e um anel δ -lactona, na qual C-21 está diretamente ligado a C-24. Essa subclasse é predominante nas plantas dos gêneros: *Acnistus*, *Tubocapsicum*, *Nicandra*, *Withania*, *Physalis* e *Dunalia*.

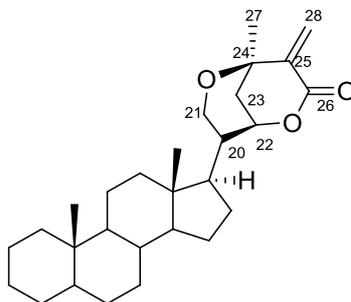
Figura 9-Estrutura básica de acnistina



Acnistina

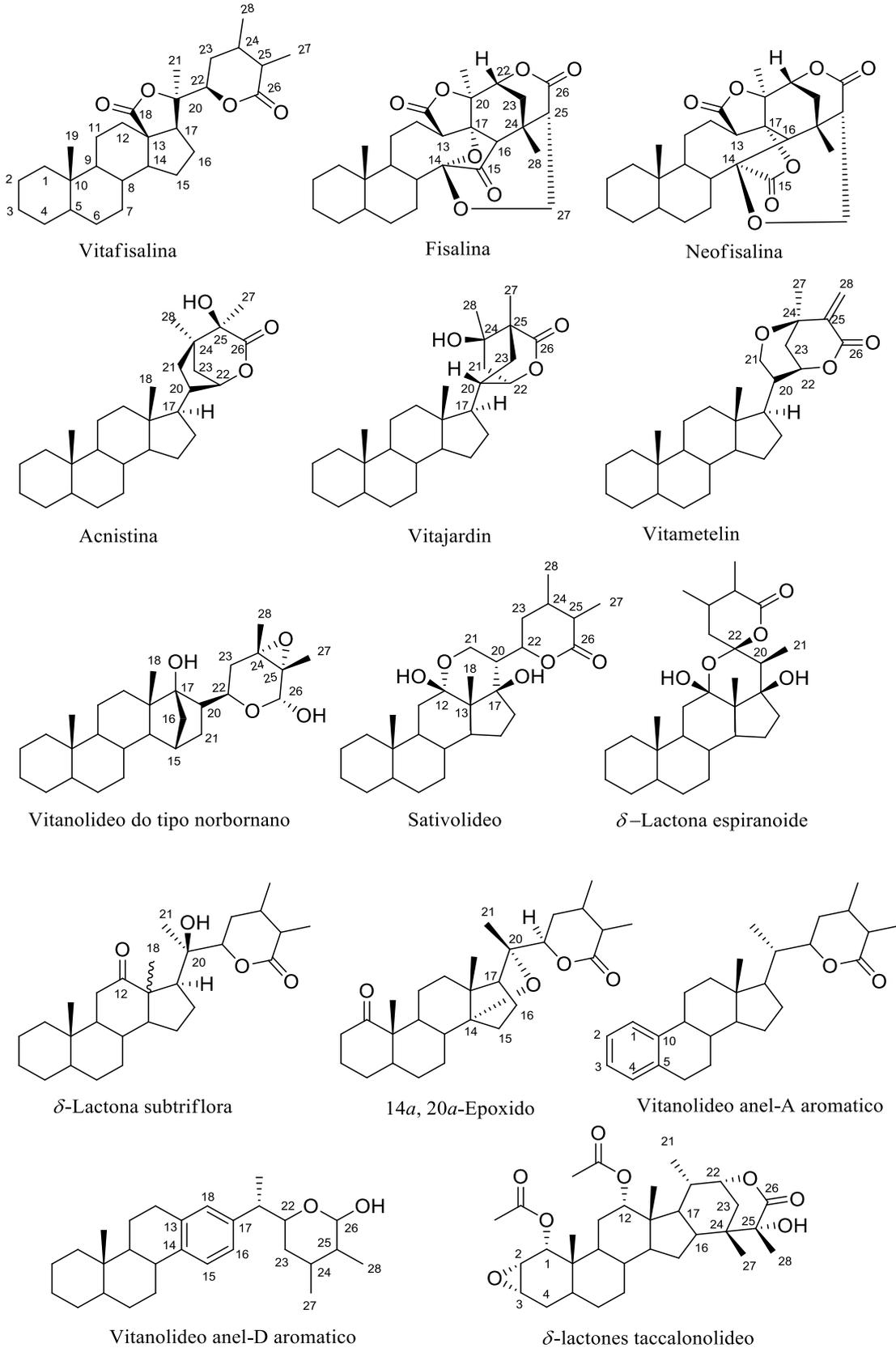
Os vitametelins fazem parte da subclasse de vitanolídeos que possuem uma cadeia lateral bicíclica em C-17, na qual HO-21 se liga a C-24 formando um anel heterocíclico de seis membros e um anel δ -lactona com grupo vinila em C-25/C-27 (OSHIMA et al., 1987). Esses compostos, incluindo a vitametelina, são encontrados principalmente no gênero *Datura* (CHEN; HE; QIU, 2011).

Figura 10-Estrutura básica de vitametelin



Vitametelin

Figura 11- Exemplos de diferentes estruturas de vitanolídeos do tipo δ -lactona ou δ -lactol.



Fonte: ROCHA, 2023

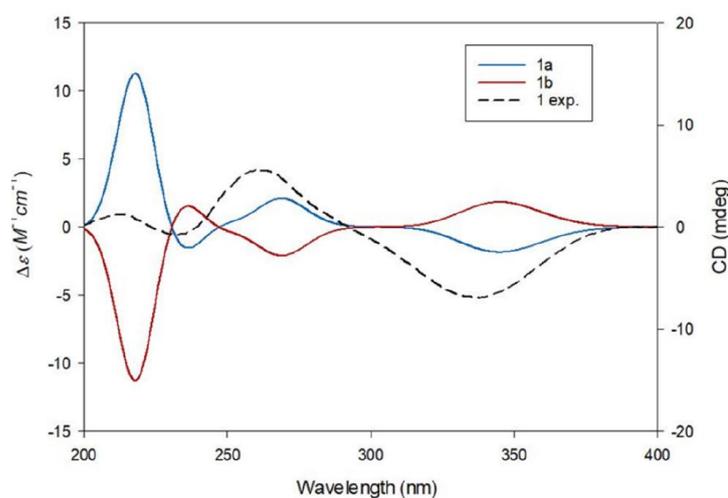
2.2.1 Aspectos estereoquímicos

Para a determinação da estrutura absoluta dos vitanolídeos, a cristalografia de raios X é um excelente método, na qual é obtido um cristal único da substância e através da medida da difração dos raios X, é atribuída a orientação dos grupos no cristal. No entanto, não é trivial a obtenção dos cristais, sendo necessária abordagens de outros métodos para a determinação da configuração absoluta (YANG et al., 2016).

Os vitanolídeos apresentam algumas características comuns em sua estereoquímica, a exemplo do C-22, que corresponde à configuração absoluta 22*R*. A estereoquímica em C-22 pode ser medida pelos valores de absorbância obtidos pelo espectro de dicroísmo circular (ECD) através da dedução da configuração *R* ou *S* pelo efeito *cotton* positivo ou negativo em 248 a 253 nm. O efeito *cotton* positivo aponta para a configuração 22*R* baseada na transição $n \rightarrow \pi^*$, que é atribuído para uma δ -lactona α, β -insaturada. (YANG et al., 2016). A excessão foi verificada em daturacina, isolada de *Datura innoxia* e constituindo o primeiro vitanolídeo com configuração absoluta 22*S*, configuração baseada no efeito *cotton* negativo em 249,4 nm (SIDDIQUI et al., 2005).

Além disso, outra característica dos vitanolídeos é a fusão *trans* dos anéis A/B, verificada pelo efeito *cotton* negativo em torno de 340 nm obtido pelo espectro de CD (LEE et al., 2021) (FIGURA 6).

Figura 12- Perfil teórico do espectro de CD para vitanolídeos 22*R* e 22*S* e dado experimental.



Fonte: Adaptado de LEE et al., 2021

Diversos estudos sobre a biossíntese de vitanolídeos sugerem o intermediário 24-metilenocolesterol como o precursor responsável pela rota biossintética (CHAURASIYA et al., 2012; YANG et al., 2016; WORLAND et al., 2020). Visto isso, os vitanolídeos

apresentam alguns centros estereogênicos padrões do seu precursor, como a β -orientação das metilas em C-10 e C-13 e a orientação alfa de CH₃ em C-20.

Com relação aos vitanolídeos glicosilados, estes são majoritariamente representados em C-3 por uma β -D-glicose, como evidenciado pela constante de acoplamento de H-1-glic, $J=6-9$ Hz (d). Outros grupos como a acetila poderão aparecer em C-1, e apresentarão deslocamento químico entre δ_C 74,6 a 75,4 ppm para α -OAc. Já a oxidação de C-16 apresentará deslocamento químico entre δ_C 78,8 a 81,7 para o grupo α -OH e δ_C 72,9 para uma β -OH (YANG et al., 2016).

2.2.2 Proposta biossintética

Estudos mostram que os precursores isoprenóides usados na biossíntese dos vitanolídeos são sintetizados através das vias do mevalonato (MVA) no citosol e non-mevalonato (MEP) no plastídio (SANGWAN et al., 2008; CHAURASIYA et al., 2012). Depois de uma série de reações, os isoprenóides geram o esqualeno, que passa por um processo de ciclização para produzir o cicloartenol (AKHTAR et al., 2013; GUPTA et al., 2013), sendo ao final da biossíntese, o 24-metilenocolesterol o principal intermediário na biossíntese dos vitanolídeos (CHAURASIYA et al., 2012; WORLAND et al., 2020). A diversidade de estruturas para esses compostos é devida as funções hidroxila, epóxido e carbonilas de cetona e éster (GUPTA et al. 2013).

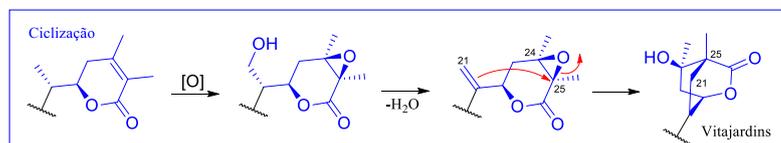
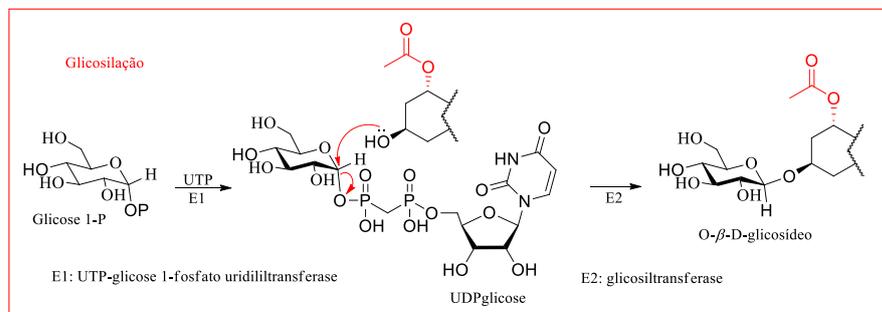
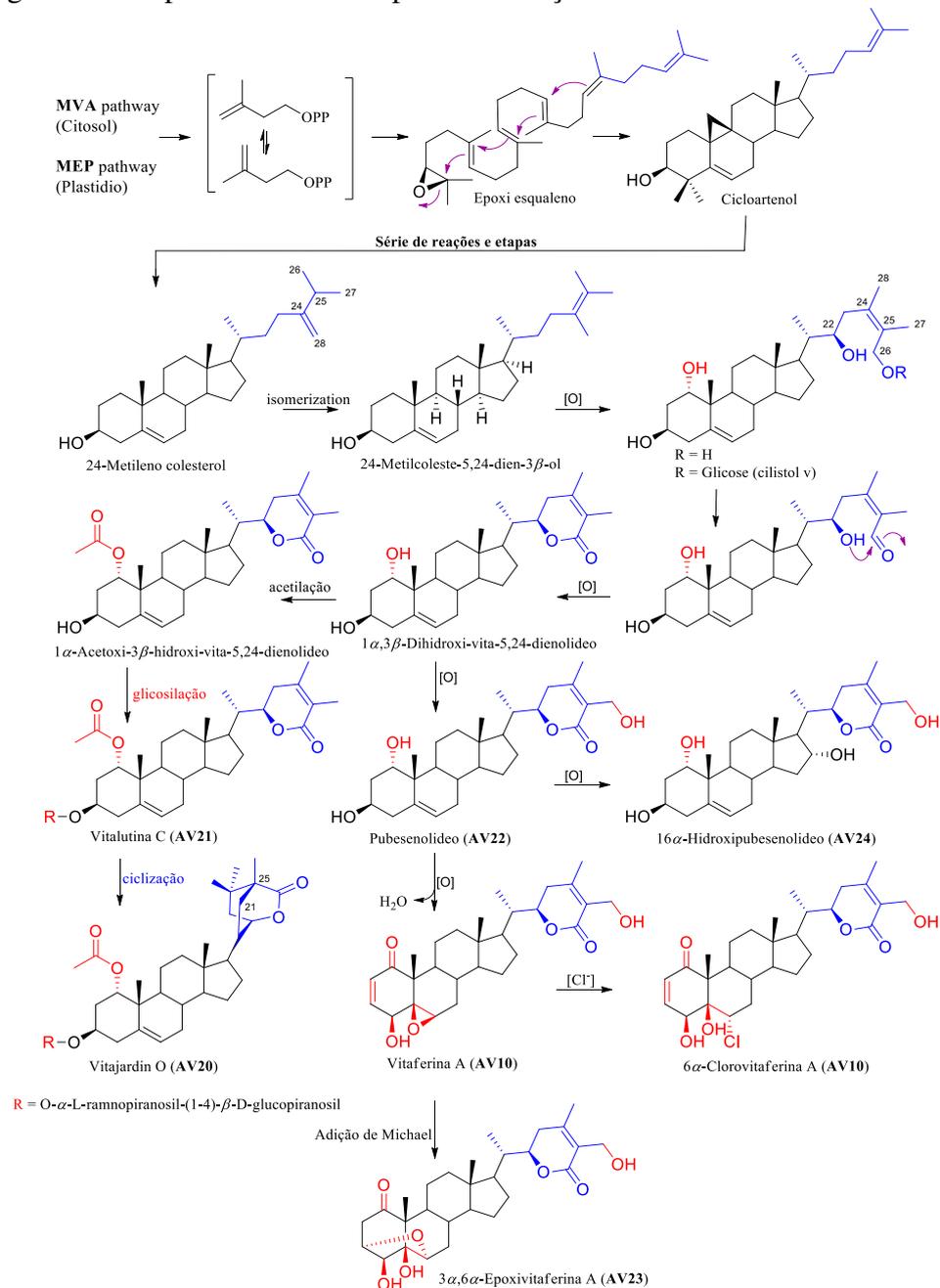
A etapa de glicosilação dos esteroides, observada nos compostos **AV20** e **AV21**, é descrita por CHAURASIYA e colaboradores (2012), na qual o grupo hidroxila em C-3 é preferencial pelos genes da esterol-glicosiltransferase (SGTs) para catálise enzimática. Adicionalmente, outro gene, WsSGTL1 (espécie de transportador de monossacarídeos), é específico para a orientação 3β -hidroxi com especificidade catalítica para os vitanolídeos glicosilados (SAEMA et al., 2016).

Esta classe de compostos é reconhecida por suas propriedades farmacológicas e biológicas, no entanto, pouco é relatado sobre sua biossíntese (YANG et al., 2016). Como base nas propostas abordadas na literatura e em intermediários isolados (CHAURASIYA et al., 2012; WORLAND et al., 2020), foi proposto uma via de formação dos vitanolídeos a partir do 24-metilenocolesterol, uma vez que a biossíntese até este intermediário é bem conhecida (FIGURA 49).

No processo de ciclização dos vitanolídeos para vitajadins, Rocha e colaboradores (2022), observaram que os vitajadins poderiam ser formados a partir de 24,25-

epóxivitanolídeos, com configuração $24\beta,25\beta$ -epóxi ($24R$ e $25R$), uma vez que todos os vitajardins já isolados possuíam configuração R . Dessa forma foi sugerida uma via biossintética hipotética para a formação do [2,2,2] biciclo δ -lactona a partir do esqueleto básico de vitanolídeos do tipo δ -lactona (ROCHA et al., 2022), como ilustrado a seguir.

Figura 13- Proposta biosintética para a formação de diferentes vitanolídeos.



3 METODOLOGIA

3.1 Materiais e métodos

3.1.1 Métodos cromatográficos

3.1.1.1 Cromatografia de adsorção em gel sílica

As separações cromatográficas foram realizadas por cromatografia de adsorção em coluna sobre sílica gel 60 com granulometria entre 0,063 e 0,200 mm da Merck. O comprimento e o diâmetro das colunas de vidro variaram de acordo com as quantidades de adsorbato e de gel de sílica empregados. As cromatografias em camada delgada (CCD) foram efetuadas em placas de alumínio pré-revestidas com 200 µm de espessura de sílica gel F-254 (Silicycle). Os eluentes utilizados nos procedimentos cromatográficos foram: diclorometano, clorofórmio, acetato de etila, acetona e metanol, isoladamente ou em misturas binárias com proporções crescentes de polaridade ou não (isocrático) para a fase normal. A revelação das substâncias nas cromatoplasmas analíticas foi realizada por exposição à radiação ultravioleta (UV) no equipamento Boitton modelo BOIT-LUB 01 em dois comprimentos de onda (254 e 365 nm) e por mergulho em solução de sulfato de cério [Ce(SO₄)] ou solução de vanilina (C₈H₈O₃) seguido de aquecimento por soprador térmico da marca Vonder (STV-200) a 100 °C por aproximadamente 1 minutos.

3.1.1.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

O material foi analisado em cromatógrafo SHIMADZU, modelo UFLC, equipado com detector UV Vis com arranjo de diodos (SPD M20A) e sistema de bombas ternário modelo (LC 20AT). Utilizou-se colunas de fase reversa constituídas de gel de sílica substituída por cadeias orgânicas alifáticas de dezoito carbonos (C18) da marca Phenomenex® (analítica: 250 x 4,6 mm, 5 µm; semi-preparativa: 250 x 10 mm, 5 µm) mantida em forno termostático a 35 °C. Os solventes utilizados foram H₂O deionizada obtida de um destilador da marca millipore (levemente acidificada com ácido trifluoracético TFA a 0,1%) e metanol grau HPLC (BIOGRADE®), adequadamente filtrado em membrana de nylon com poros de 0,45 µm (Millipore). As amostras foram dissolvidas em metanol e filtradas em membranas de PTFE (politetrafluoretileno) com poros de 0,45 µm (Whatman) e usando como metodologia padrão, foram utilizadas a concentração de 20 mg/ml e injetadas com de volume 200 µL para as amostras analisadas.

3.1.1.3 Cromatografia por exclusão molecular em Sephadex LH-20

A cromatografia por exclusão molecular foi efetuada utilizando como fase estacionária a resina de gel de dextrana *Sephadex LH-20* (GE Healthcare) e como fase móvel MeOH e CH₂Cl₂ de qualidade P.A. – A.C.S. (Labsynth).

3.1.2 Métodos espectroscópicos

3.1.2.1 Espectroscopia na região do infravermelho (IV)

Os espectros de absorção na região do infravermelho (IV) foram obtidos em espectrômetro Shimadzu IR-tracer-100, com transformada de Fourier. As amostras foram analisadas em pastilhas de KBr. Os dados por transmitância foram obtidos com 64 scans e resolução de 4 cm⁻¹.

3.1.2.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de prótons (RMN ¹H) e de carbono-13 (RMN de ¹³C) uni e bidimensionais, foram obtidos em dois espectrômetros Agilent modelos DD2, operando na frequência do hidrogênio a 599,58 MHz e frequência do carbono a 149,89 MHz, pertencente a EMBRAPA agroindústria tropical e um espectrômetro Bruker, modelo AVANCE DRX-500, operando na frequência do hidrogênio a 500,13 MHz e na frequência do carbono a 125,75 MHz, pertencentes ao Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN), da Universidade Federal do Ceará. Os solventes deuterados utilizados na dissolução das amostras para obtenção dos espectros são comercializados pela Cambridge Isotope Laboratories Inc. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm). Nos espectros de RMN de ¹H e ¹³C as moléculas residuais não deuteradas dos solventes utilizados apresentaram sinais em δ_H 8,74, 7,58 e 7,22 e δ_C 150,3, 136,9 e 123,9 para piridina. A multiplicidade dos sinais de hidrogênio nos espectros de RMN de ¹H foi indicada segundo a convenção: s (simpleto), sl (simpleto largo) d (duplete), dd (duplete de duplete), t (triplete), tt (triplete de triplete), m (multiplete).

O padrão de hidrogenação dos carbonos foi determinado através da utilização da técnica BB, DEPT 135°, APT e HSQC. E segundo convenção: carbono não-hidrogenado (C), carbono metínico (CH), carbono metilênico (CH₂) e carbono metílico (CH₃).

3.1.2.3 *Espectrometria de massas de alta resolução (EMAR)*

Para obtenção dos espectros de massas das substâncias foram utilizados espectrômetros de massas de alta e baixa resolução da marca Bruker, modelo microTOF II e Ion-Trap AmazonX, respectivamente, pela técnica de Ionização por Eletrospray no modo positivo.

3.2 Parte experimental

3.3 Coleta do material botânico

As folhas de *A. velutina* foram coletadas em Pico Alto, no município de Guaramiranga/Ceará, Brasil, em 14 de janeiro de 2019 (S 04° 12.590', W 38° 58.244').

O material vegetal de *A. velutina* foi identificado pela botânica profa. Dr^a Valéria Sampaio, do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará. A excisata preparada foi depositada no Herbário Prisco Bezerra (EAC) /UFC, com o número de inscrição EAC45010. Amostra cadastrada no SisGen com número A5C2E09.

3.4 *Obtenção dos extratos das folhas de A. velutina: AVFH/A e AVFE*

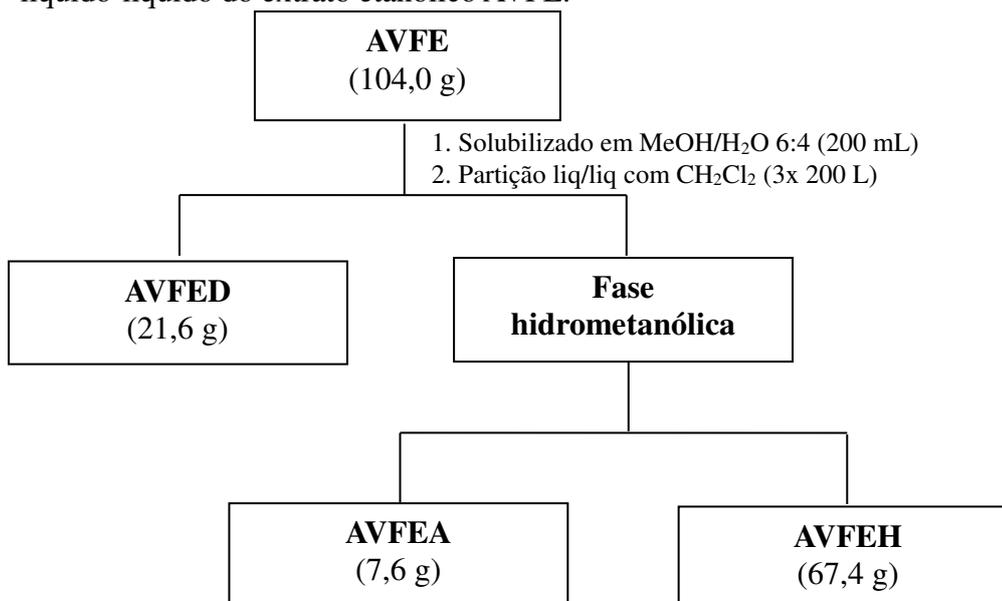
As folhas secas e pulverizadas de *A. velutina* (2,0 kg) foram depositadas em frascos de vidro para extração a frio com hexano/acetato de etila 1: 1 (10 L) à temperatura ambiente. Após 24 horas, o solvente foi evaporado sob pressão reduzida em evaporador rotativo, para a obtenção do extrato denominado AVFH/A. O mesmo procedimento de extração com solvente foi submetido com a torta mais duas vezes de 24 horas. Foi obtido nas três extrações um total de 95,0 g de AVFH/A, com rendimento de 4,7%. Uma segunda extração foi realizada com 10 L de etanol por 24 horas. Da mesma forma que da extração anterior, o solvente foi evaporado e a torta submetida à outra extração com etanol por 24 horas, obtendo um total de 104,0 g de extrato etanólico codificado AVFE.

3.5 *Partição líquido-líquido do extrato etanólico AVFE*

O extrato AVFE, 104,0 g, foi solubilizado em 200 mL de MeOH/H₂O 6:4, permaneceu em descanso por 24 horas e posteriormente submetido à partição líquido-líquido com 600 mL de diclorometano (3 x 200 mL), resultando em uma massa de 21,61 g de AVFED, com rendimento de 20,7%. Em seguida a fase hidrometanólica utilizando 600 mL de acetato de etila (3 x 200 mL), fornecendo uma massa de 7,69 g de AVFEA com rendimento de 7,4%, a fase hidroalcoólica (AVFEH) após evaporação total forneceu uma massa de 67,44 g.

As fases orgânicas, diclorometano e acetato de etila foram secas com sulfato de sódio anidro e evaporadas sob pressão reduzida em evaporador rotativo. A FIGURA 7 mostra um fluxograma simplificado ilustrando todo o processo de partição líquido-líquido do extrato etanólico AVFE.

Figura 14- Fluxograma do fracionamento cromatográfico utilizando partição líquido-líquido do extrato etanólico AVFE.



Legenda:

AVFE: Extrato etanólico de *Athenaea velutina*

AVFED: Fração diclorometano de AVFE

AVFEA: Fração acetato de etila de AVFE

AVFEH: Fração hidrometanólica de AVFE

3.6 Fracionamento Cromatográfico de AVFE-D

A fração diclorometano, AVFED (21,6 g), foi adsorvida em 100 g de gel de sílica e fracionada em coluna cromatográfica de vidro ($\varnothing_{int} = 5,8$ cm) com 70 g de sílica gel utilizando um sistema gradiente de eluição Hex/AcOEt 20% a Hex/AcOEt 80%, AcOEt 100% e $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 50%, resultando em 76 frações, que após análise comparativa em CCD, foram reunidas de acordo com a similaridade de seus spots e cujo resultado pode ser observado na Tabela 2.

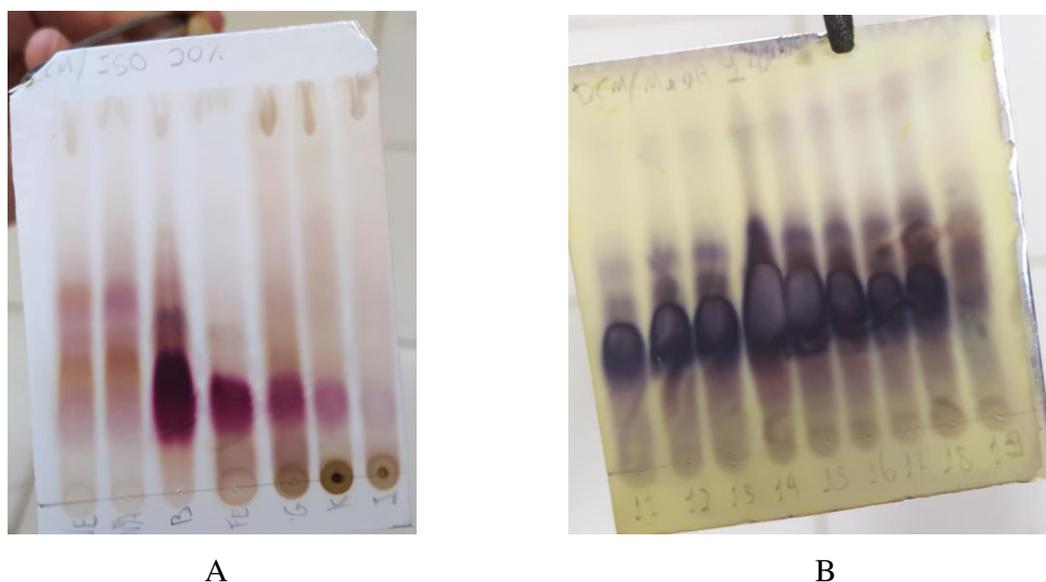
Tabela 2- Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração AVFE-D

Frações	Massa (mg)
DA (1-3)	658,3
DB (4-14)	3924,2
DC (15-23)	1503,7

Continuação tabela 2	
DD (24-32)	1910,0
DE (33-49)	2892,3
DF (50-72)	2638,5
DG (73-76)	5870,0
Massa total: 19,4 g	
Rendimento: 90%	

A escolha das frações para serem analisadas e trabalhadas se basearam na experiência e conhecimentos adquiridos pelo grupo trabalhando com a classe de vitanolídeos. Para a revelação destes compostos podem ser utilizados, em cromatoplas, alguns reveladores, mas a vanilina (FIGURA 15 A) e o sulfato de cério (FIGURA 15 B) foram os que melhor representaram estes compostos.

Figura 15- Cromatoplas reveladas utilizando vanilina (A) e sulfato de cério (B).



3.7 Fracionamento Cromatográfico de AVFE-DF

A fração DF (2,6 g) foi adsorvida em 6,5 g de gel de sílica e acondicionada em uma coluna cromatográfica ($\varnothing_{int} = 5,8$ cm), com 105 g de sílica, submetida ao sistema gradiente de eluição com CH_2Cl_2 /isoprano 5%, CH_2Cl_2 /isoprano 10% e CH_2Cl_2 /MeOH 50%, obtendo 26 subfrações reunidas após análise comparativa em cromatoplas de sílica gel (TABELA 3).

Tabela 3- Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração AVFE-DF

Subfração	Massa (mg)
DFA (1-2)	34,0
DFB (3-4)	231,1
DFC (5-11)	667,9
DFD (12-14)	125,1

Continuação tabela 5	
DFE (15-22)	373,9
DFE (23-24)	153,9
Massa total: 1,60g	
Rendimento: 61 %	

3.8 Fracionamento Cromatográfico de AVFE-DFB

A subfração DFB (231,1 mg) foi adsorvida em 0,5 g de gel de sílica, acondicionada em uma coluna cromatográfica (\varnothing_{int} = 2,8 cm) contendo 60 g dessa sílica e eluída com sistema isocrático de CH_2Cl_2 /acetona 10%, obtendo 40 subfrações, reunidas após análise comparativa por CCD (TABELA 4).

Tabela 4- Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração AVFE-DFB

Subfração	Massa (mg)
DFBA (1-6)	13,0
DFBB (7-8)	9,0
DFBC (9-11)	12,9
DFBD (12-17)	31,0
DFBE (18-35)	83,1
DFBF (36-40)	31,0
Massa total: 180,3 mg	
Rendimento: 78%	

3.9 Fracionamento Cromatográfico de AVFE-DFBE

A subfração DFBE (83,1 mg) foi adsorvida em 200 mg de gel de sílica e submetida ao fracionamento cromatográfico em coluna (\varnothing_{int} = 1,4 cm) contendo 10 g de gel de sílica, eluída com Hex/ CH_2Cl_2 /Acetona 1:1:1, fornecendo 12 subfrações, as quais foram reunidas após análise comparativa em cromatoplacas (TABELA 5).

Tabela 5- Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração AVFE-DFBE

Subfração	Massa (mg)
DFBE A (1-3)	5,67
DFBEB (4-5)	10,5
DFBEC (6)	11,6
DFBED (7-8)	18,6
DFBEE (9)	15,5
DFBEF (10-12)	8,91
Massa total: 70,8 mg	
Rendimento: 85%	

Isolamento do composto designado de AV19

A subfração E (15,5 mg) obtida da subfração AVFE-DFBE, após análise em CCD, mostrou uma mancha forte majoritária, dando origem ao composto AV19.

3.10 Fracionamento Cromatográfico de AVFE-A

A fração AVFEA (7,69 g), foi adsorvida em 14,5 g de gel de sílica e submetida a fracionamento em coluna cromatográfica de vidro (\varnothing_{int} = 5,8 cm) sobre 95,7 g gel de sílica utilizando sistema gradiente de eluição com CH_2Cl_2 , $CH_2Cl_2/MeOH$ 10%, $CH_2Cl_2/MeOH$ 20%, $CH_2Cl_2/MeOH$ 1:1 e finalizando com MeOH. Foram obtidas 44 subfrações de 10 mL, que foram reunidas após análise comparativa em CCD (TABELA 6).

Tabela 6- Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração AVFE-A

Subfração	Massa (mg)
AA (2-3)	27,8
AB (4-6)	73,4
AC (7-10)	200,9
AD (11-12)	82,8
AE (13)	72,0
AG (14-15)	114,2
AH (16-21)	227,9
AI (22-26)	164,4
AJ (27-29)	95,3
AK (30-33)	477,6
AL (34-35)	236,6
AM (36-37)	246,5
AN (38-39)	1.060,0
AO (40)	1.259,8
AP (41)	1.546,4
AQ (42)	493,6
AR (43)	72,2
AS (44)	67,3
Massa total: 6,5g	
Rendimento: 82%	

3.11 Fracionamento Cromatográfico de AVFE-AO

A fração AO (1,2 g) foi dissolvida com $CHCl_3/MeOH$ 1:1 e acondicionada em uma coluna cromatográfica (\varnothing_{int} = 3 cm) com altura de 48 cm de *Sephadex* LH-20. A eluição com $CHCl_3/MeOH$ 60% seguido de MeOH, resultou em 51 subfrações (4 mL cada) que foram monitoradas por CCD e reunidas conforme similaridade (TABELA 7).

Tabela 7- Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração AVFE-AO

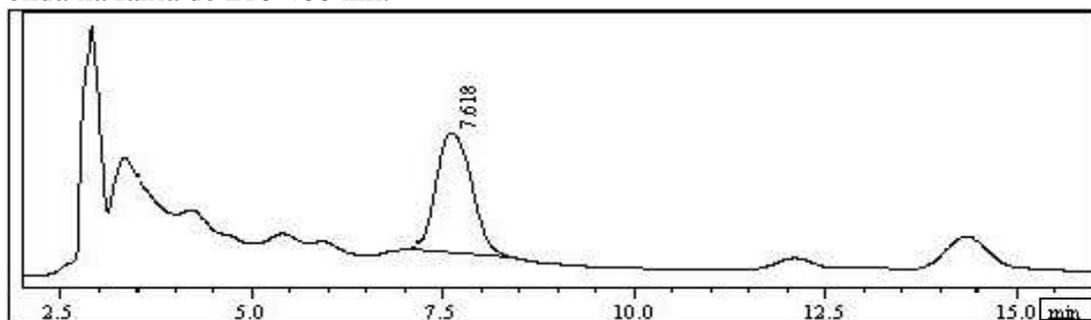
Fração	Massa (mg)
AOA (4-14)	100,5
AOB (15-17)	195,8
AOC (18-23)	383,1
AOD (24-26)	89,8
AOE (27)	34,0
AOF (28-29)	28,0
AOG (30-36)	55,9
AOH (37-51)	23,1
Massa total: 930mg	
Rendimento: 77,5 %	

Isolamento do composto designado de AV20

A subfração AOB (195,8 mg) foi fracionada por CLAE, com injeção de 200 μ L da amostra dissolvida em 5 mL de MeOH. A separação foi realizada em coluna semi-preparativa de C-18, usando como fase móvel H₂O (0,1%TFA)/MeOH 65% em sistema isocrático, com um fluxo de 4,0 mL/min.

O pico com tempo de retenção de 7.6 min, forneceu 86,7 mg de um puro composto denominado AV20 (FIGURA 8).

Figura 16- Cromatograma da fração AOB obtido por CLAE, no comprimento de onda na faixa de 210-400 nm.



Fonte: Próprio autor

3.12 Fracionamento Cromatográfico de AVFE-AN

A fração AN (1,1 g), eluída com CH₂Cl₂/MeOH 1:1, foi adsorvida em 2,5 g de gel de sílica e acondicionada em uma coluna cromatográfica (\varnothing int= 3,5 cm) contendo 80 g de gel de sílica. Usando um sistema gradiente de eluição com CHCl₃/MeOH 10%, CHCl₃/MeOH 15%, CHCl₃/MeOH 50% e MeOH, foram obtidas 68 frações de aproximadamente 9 mL cada, reunidas após análise comparativa em CCD (TABELA 8).

Tabela 8- Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração AVFE-AN

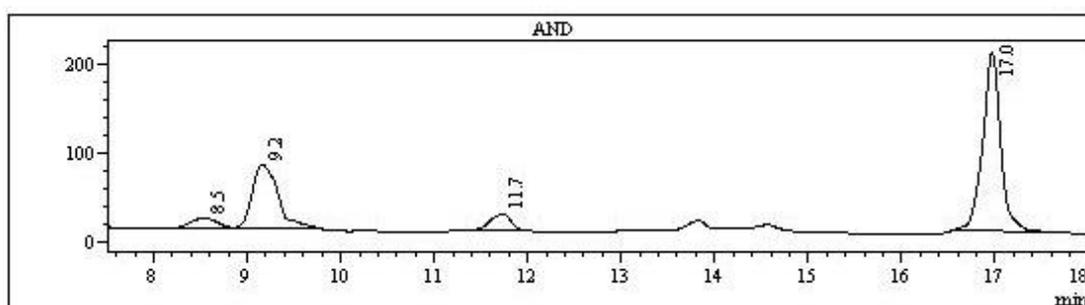
Subfração	Massa (mg)
ANA (1-24)	45,0
ANB (25,26)	50,9
ANC (27-29)	155,6
AND (30-34)	157,2
ANE (35-36)	30,0
ANF (37-47)	244,7
ANG (48-49)	22,7
ANH (50-54)	23,4
ANI (55-59)	24,2
ANJ (60-63)	66,7
ANK (64-65)	91,6
ANL (66-68)	33,6
Massa total: 945,4 mg	
Rendimento: 85,9%	

Isolamento do composto designado de AV21 e AV24

A subfração AND (155,6 mg) foi submetida a fracionamento cromatográfico CLAE com injeção de 200 µL da amostra dissolvida em 3 mL de MeOH. A separação foi realizada em coluna semi-preparativa C-18, sistema gradiente e fluxo de 4,0 mL/min com fase móvel H₂O (0,1% TFA) /MeOH 50% a MeOH 100%, por um período de 20 minutos.

Foram coletados dois picos, correspondentes aos compostos AV24 (0,8 mg, T_R= 11,7 min) e AV21 (18,8 mg, T_R= 17,0 min), conforme o cromatograma na Figura 9.

Figura 17– Cromatograma da fração AND obtido por CLAE, no comprimento de onda na faixa de 210-400 nm



Fonte: Próprio autor

3.13 Fracionamento Cromatográfico de AVFEAI

A fração AI (164,4 mg), dissolvida com CHCl₃/MeOH 1:1, foi acondicionada em uma coluna cromatográfica (Øint= 2 cm) com altura de 26,5 cm de *Sephadex*-LH20. Foi utilizado um sistema isocrático de eluição com CHCl₃/MeOH 60%, resultando em 40 frações de 4 mL cada, reunidas após análise comparativa das frações, CCD (TABELA 9).

Tabela 9- Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração AVFE-AI

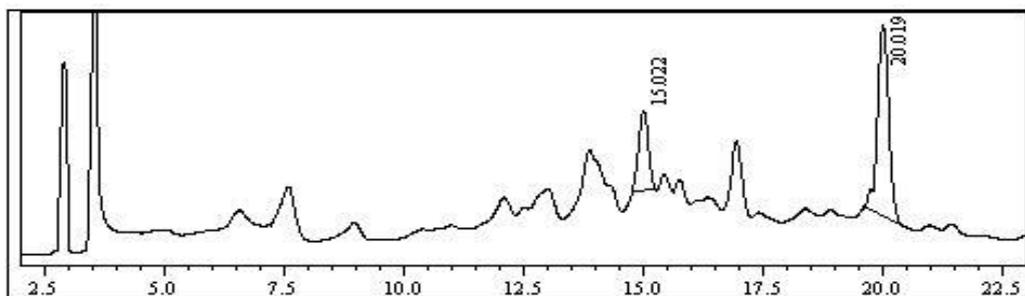
Subfração	Massa (mg)
AIA (14-17)	55,8
AIB (18)	16,3
AIC (19-21)	34,7
AID (22-26)	16,7
AIE (27-29)	3,4
AIF (30-31)	2,7
AIG (4-13)	25,7
AIH (30-40)	4,2
Massa total: 159,5g	
Rendimento: 97%	

Isolamento dos compostos designados AV22 e AV23

A subfração AIA (55,8 mg) foi fracionada por CLAE com injeção de 200 μ L da amostra dissolvida em 2 mL de MeOH. A separação foi realizada em coluna semi-preparativa C-18, com um fluxo de 3,0 mL/min usando como fase móvel um gradiente de H₂O (0,1%TFA)/MeOH 25% - H₂O (0,1%TFA)/MeOH 45% por 5 minutos, em seguida H₂O (0,1%TFA)/MeOH 45% - H₂O (0,1%TFA)/MeOH 90% por 15 minutos e finalizando por H₂O(0,1%TFA)/ MeOH 90% por 10 minutos.

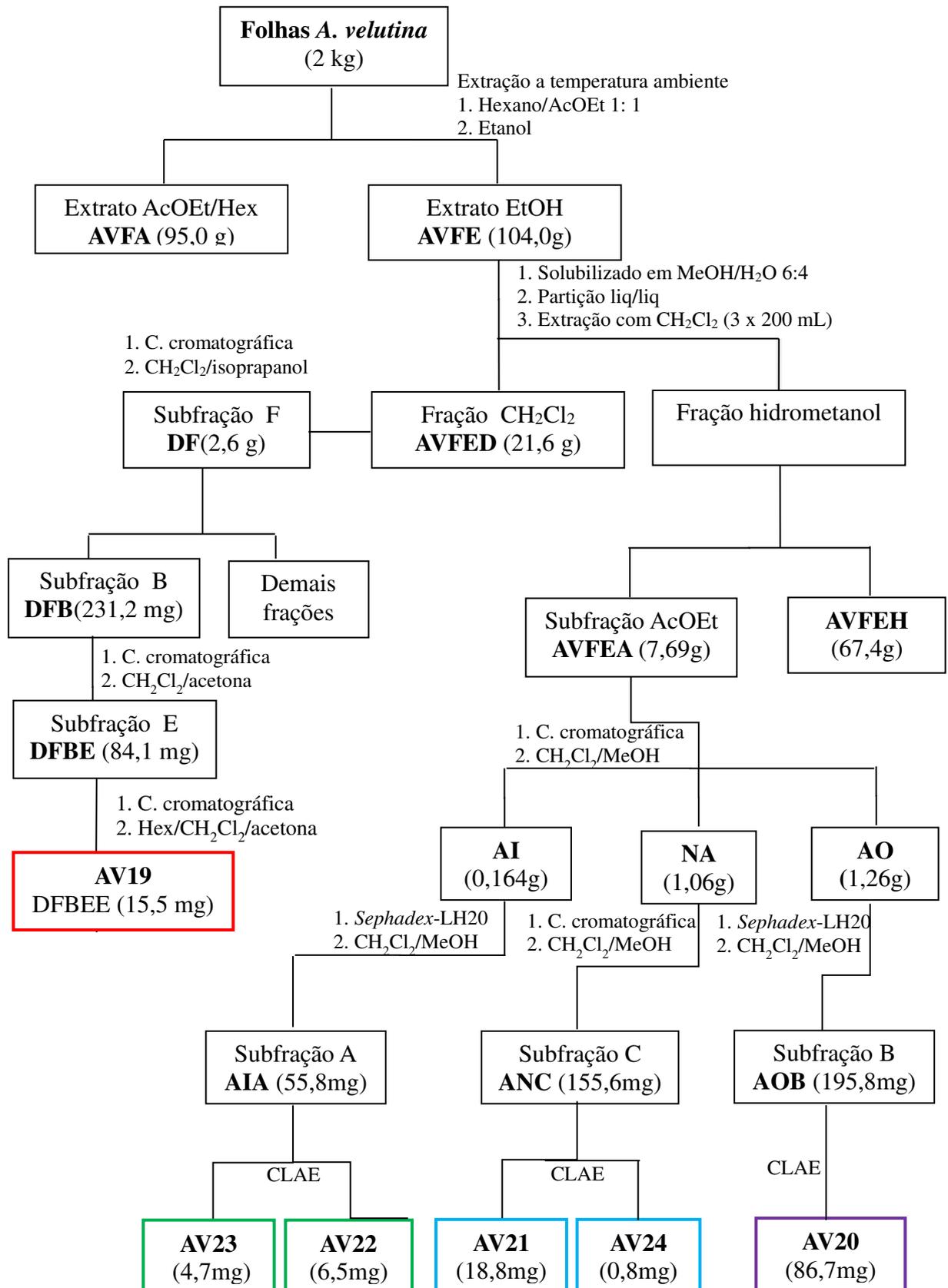
Como pode ser observado no cromatograma da Figura 7, a subfração AIA forneceu os compostos **AV23** (4,7 mg, T_R= 15,02 min) e **AV22** (6,5 mg T_R= 20,01 min).

Figura 7– Cromatograma da fração AIA obtido por CLAE, no comprimento de onda na faixa de 210-400 nm



Fonte: Próprio autor

Figura 18- Fluxograma geral de isolamento dos compostos.



Fonte: Próprio autor

3.14 Ensaio farmacológico

A linhagem de células de macrófagos RAW264.7 é comumente usada para triagens *in vitro* de imunomoduladores. Compostos que reduzem a expressão de citocinas pró-inflamatórias ou a produção de óxido nítrico (NO) em células RAW264.7 estimuladas com lipopolissacarídeos (LPS) são candidatos promissores para investigação posterior quanto ao seu potencial anti-inflamatório

Os vitanolídeos glicosílicos **AV20** e **AV21** foram avaliados quanto à sua citotoxicidade e capacidade de reduzir a produção de nitrito em células de macrófagos RAW 264.7. Para o ensaio de viabilidade celular, células RAW 264.7 (ATCC® TIB-71™) foram cultivadas em um meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) contendo 10% de soro bovino fetal, 100 unidades/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina a 37 °C em uma atmosfera contendo 5% de CO₂. As células foram semeadas em uma placa de 96 poços a uma densidade de 3x10⁵ células por poço e incubadas a 37 °C por 24 h. Os compostos **AV20** e **AV21** (0,78 – 400 µM) dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) foram adicionados à placa de células por mais 24h. Depois, 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazólio brometo (MTT, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA; 1 mg/mL) foi adicionado a cada poço e incubado por 4 h a 37 °C. A absorbância foi medida a 570 nm usando um leitor de microplacas (Asys UVM 340, Biochrom, EUA) (GRIESS, 1859) Três experimentos independentes foram realizados em triplicata.

Para avaliar a atividade anti-inflamatória, as concentrações de nitrito no meio foram medidas em células RAW 264.7 estimuladas por LPS. As células foram semeadas em uma placa de 96 poços a uma densidade de 3x10⁵ células por poço e incubadas a 37 °C por 24 h. As células foram então tratadas com os compostos **AV20** e **AV21** (50 – 200 µM) por 1 h, seguido de estimulação com LPS (1 µg/mL) a 37 °C por 24 h. Dexametasona (10 µM) foi usada como controle positivo. Um total de 100 µL de meio de cultura de cada amostra foi misturado com um volume igual de reagente de Griess (1% sulfanilamida, 0,1% N-[1-naftil]-etilenodiamina dicloridrato, 5% ácido fosfórico) e incubado a 37 °C por 10 min. A absorbância foi medida a 540 nm usando um leitor de microplacas (MOSMANN, 1983). As absorbâncias obtidas foram interpoladas para a curva padrão de nitrito de sódio. Os resultados foram expressos como µM de nitrito por µg de proteína (µM/µg de proteína). O conteúdo de proteína nas amostras foi determinado usando o método descrito em 1951 por Lowry et al. Três experimentos independentes foram realizados em triplicado.

3.15 Análise estatística

Os resultados para os ensaios farmacológicos foram apresentados como média \pm desvio padrão (DP) de três experimentos independentes. A análise estatística foi realizada usando o GraphPad Prism versão 5.01 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA). As diferenças entre os grupos foram analisadas por análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida pelo teste de comparação múltipla de Tukey.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Determinação estrutural

Das folhas de *A. velutina*, foram isolados seis metabólitos secundários **AV19-AV24** cujos três são foram inéditos, os dados de RMN de ^1H , ^{13}C é bidimensionais indicaram ser vitanolídeos, conforme trabalhos prévios (ROCHA, 2023). A interpretação dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C resultou na identificação de três novos compostos **AV20**, **AV21** e **AV24**, cujas determinações estruturais serão apresentadas a seguir. Os compostos **AV19**, **AV22** e **AV23** são conhecidos e suas estruturas estão bem documentadas na literatura.

4.1.1 Determinação estrutural do composto AV19

A estrutura de **AV19**, item 3.9 pag. 26, foi determinada com base na análise dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , uni e bidimensionais e dados da literatura.

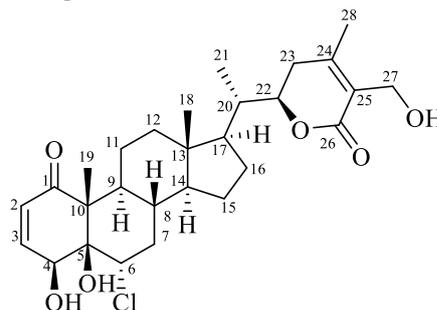
O espectro de RMN ^{13}C (FIGURA 12) apresentou 28 sinais espectrais, corroborando com o esperado para a estrutura de um vitanolídeo. A análise comparativa dos espectros de RMN ^{13}C e DEPT 135° (FIGURA 13) permitiu identificar sete carbonos não hidrogenados, incluindo duas carbonilas em δ_{C} 200,0 (C-1) e 166,9 (C-26), sendo a última, característica de uma δ -lactona α,β -insaturada, típica destes compostos. Foram identificados oito carbonos metínicos, entre eles, três carbonos ligados a átomos eletronegativos em δ_{C} 66,4 (C-4), 66,9 (C-6) e 78,9 (C-22), além de sinais para oito carbonos metilênicos em δ_{C} 39,7 (C-7), 23,0 (C-11), 39,4 (C-12), 24,2 (C-15), 27,5 (C-16), 30,3 (C-23), incluindo um oxigenado em 57,6 (C-27) e quatro carbonos metílicos em δ_{C} 12,1 (C-18), 10,1 (C-19), 13,6 (C-21) e 20,1 (C-28).

A análise do espectro de RMN ^1H (FIGURA 14) mostrou sinais correspondentes a dois hidrogênios olefínicos em δ_{H} 6,00 (H-2) e 6,47 (H-3), bem como para átomos de

hidrogênio ligados a carbonos oxigenados em δ_H 5,02 (H-4), 4,37 (H-22) e 4,35 (H₂-27). Apresentou ainda, sinais correspondentes a quatro grupos metilas em δ_H 0,68 (H₃-18), 1,25 (H₃-19), 2,02 (H₃-28), incluindo uma metila dubleto em δ_H 0,96 (H₃-21). Conforme o espectro HSQC (FIGURA 15) foi possível correlacionar, além dos sinais mencionados, uma série de sinais para hidrogênios metínicos e metilênicos com seu respectivo sinal de carbono, como pode ser observado na Tabela 10.

A análise comparativa dos dados de RMN de **AV19** com os do composto vitaferina A mostrou que estes possuem estrutura semelhantes (ROCHA, 2023), porém, numa busca mais profunda na literatura, chegou-se a estrutura da 6-cloro-vitaferina A (NITTALA et al., 1981) cujos dados de RMN de ¹³C então apresentados na Tabela 10. Revelaram de que se tratava a mesma estrutura. Vale destacar que um vitanolídeo com estrutura semelhante a este, inclusive clorado em C-6, foi previamente isolado de *Acnistus arborences* (ALVES et al., 2023).

Figura 19- Estrutura de **AV19**



6-Cloro-vitaferina A

Tabela 10- Análise comparativa dos valores de deslocamentos químicos de RMN de ¹³C e ¹H do composto **AV19** e da 6-cloro-vitaferina A (NITTALA et al., 1981).

		AV19 (CDCl ₃)		6-cloro-vitaferina A (CDCl ₃)
		δ_C	δ_H multiplicidade (J / Hz)	δ_C
1	C	200,0	-	200,2
2	CH	128,0	6,00 dd (10,3; 1,4)	127,6
3	CH	143,0	6,47 dd (10,3; 2,1)	143,0
4	CH	66,4	5,02 s	66,6
5	C	78,4	-	78,6
6	CH	66,9	4,42 m	66,0
7	CH ₂	39,7	2,29 m / 1,65 m	39,0
8	CH ₂	35,4	1,63 m	35,0
9	CH	46,2	1,30 m	45,8
10	C	57,5	-	55,3
11	CH ₂	23,0	1,34 m / 0,91 m	22,7
12	CH ₂	39,4	1,90 m / 1,06 m	39,3
13	C	43,5	-	43,1
14	CH	55,7	1,07 m	57,2
15	CH ₂	24,2	1,64 m / 1,19 m	23,9
16	CH ₂	27,5	1,69 m / 1,38 m	27,2
17	CH	52,2	1,10 m	57,3

Continuação tabela 10				
18	CH ₃	12,1	0,68 s	11,8
19	CH ₃	10,1	1,25 s	9,9
20	CH	39,0	1,97 m	38,7
21	CH ₃	13,6	0,96 d (6,6)	13,3
22	CH	78,9	4,37 m	78,2
23	CH ₂	30,3	2,46 t / 1,94 m	29,8
24	C	152,7	-	152,9
25	C	126,2	-	125,7
26	C	166,9	-	166,9
27	CH ₂	57,6	4,35 m	57,3
28	CH ₃	20,1	2,02 s	20,0

Fonte: Próprio autor

Figura 20- Espectro de RMN de ¹³C (125 MHz) de AV19, em CDCl₃.

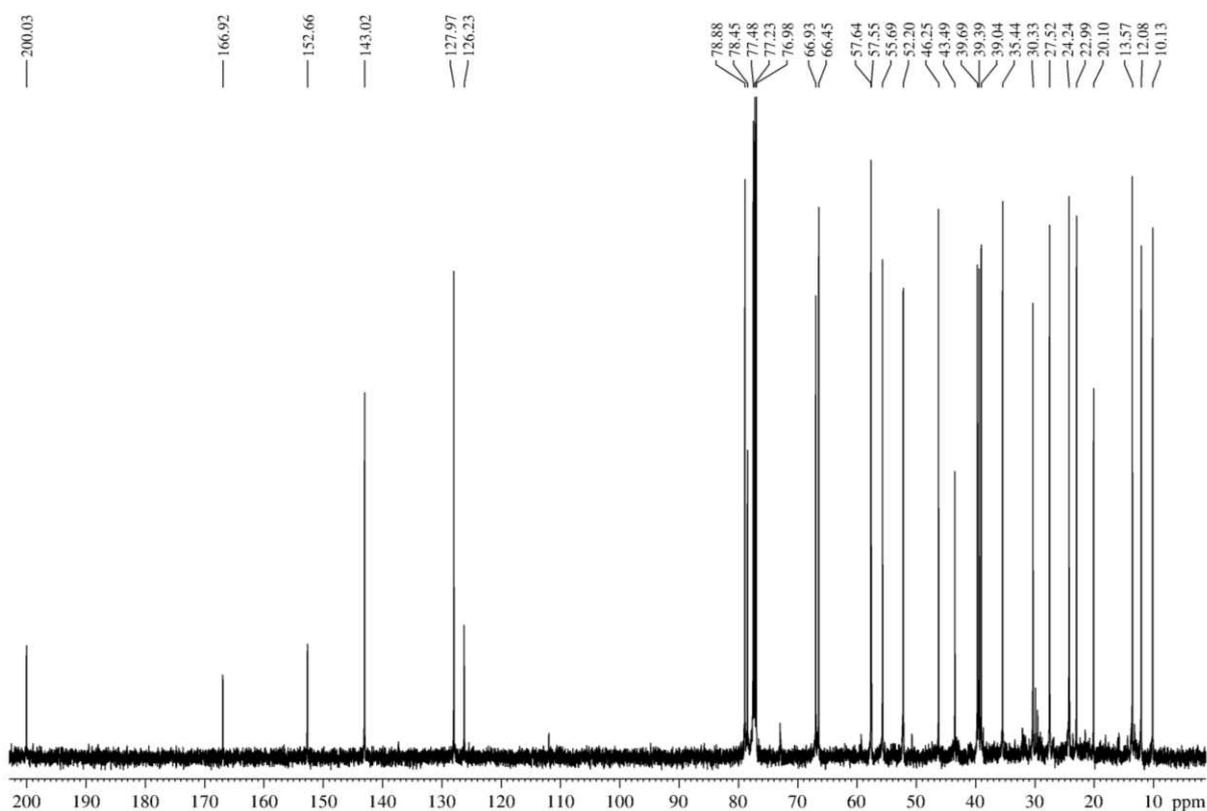


Figura 21- Espectro de RMN de ^{13}C -DEPT 135° (125 MHz) de AV19, em CDCl_3 .

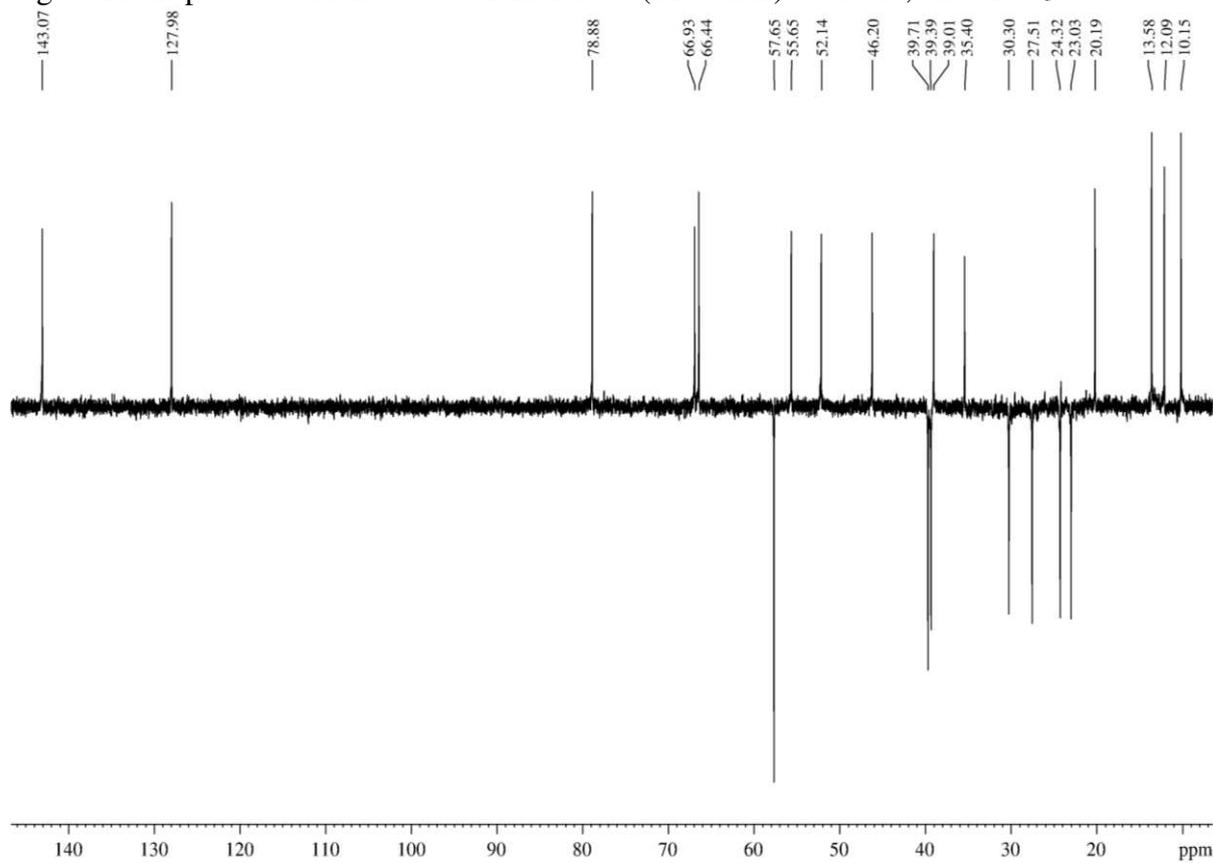


Figura 22- Espectro de RMN de ^1H (500 MHz) de AV19, em CDCl_3 .

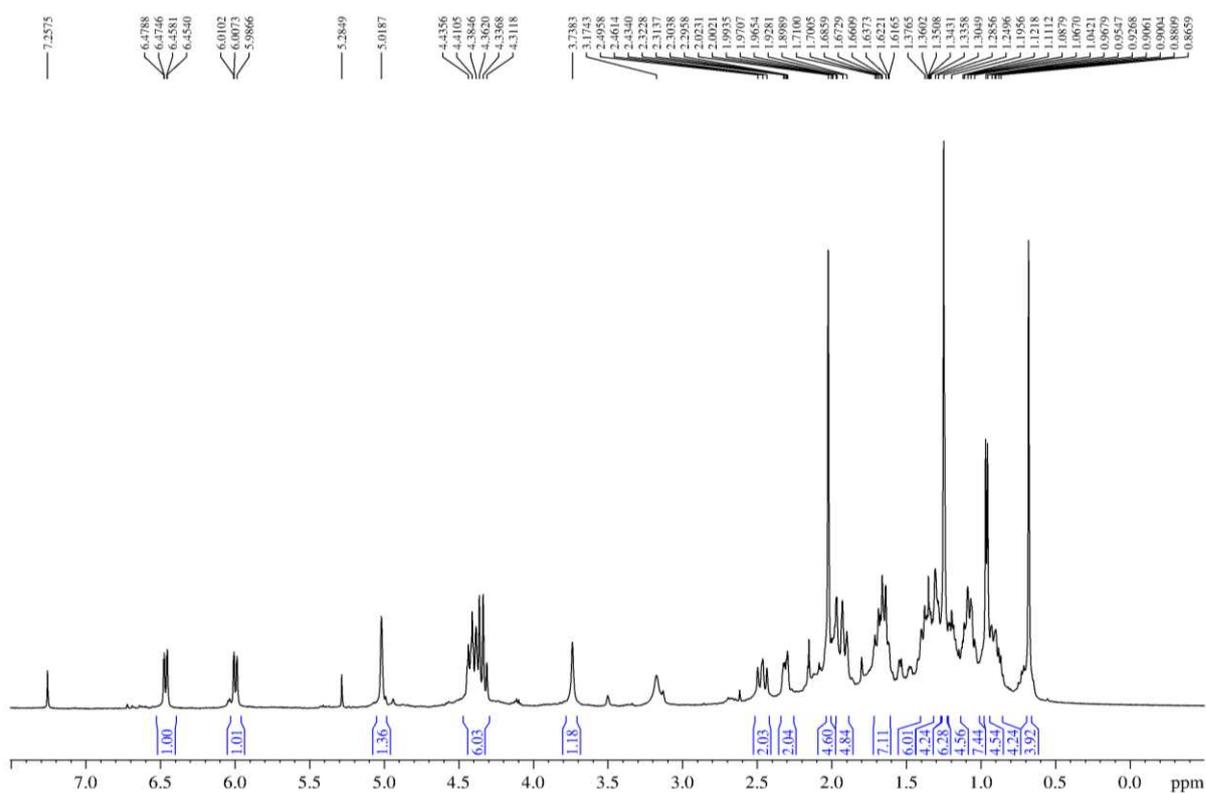
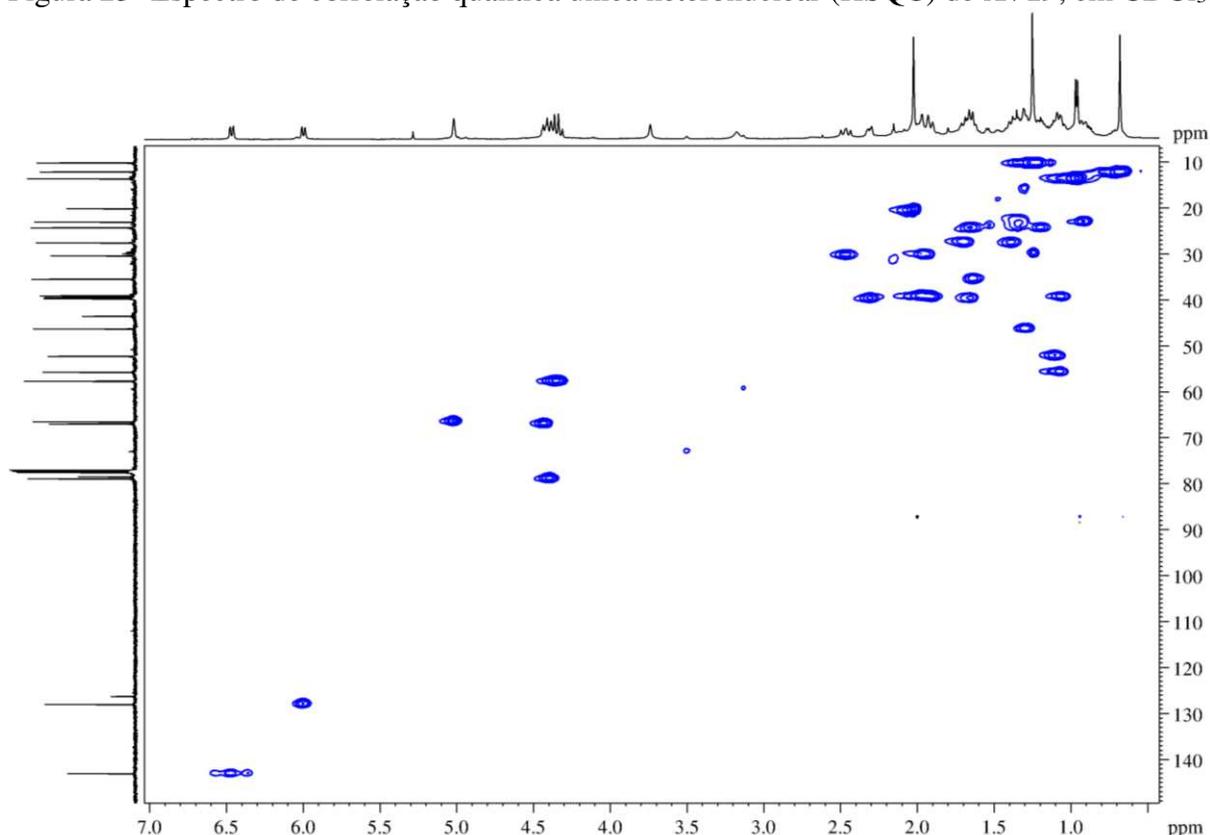


Figura 23- Espectro de correlação quântica única heteronuclear (HSQC) de AV19, em CDCl₃.



4.1.2 Determinação estrutural do composto AV20

O composto codificado de AV20, proveniente da fração AVFEAOB (item 3.11, p. 27), foi obtido como sólido amorfo, PF: 199,0 °C com rotação óptica de $[\alpha]_D^{25} = + 62$ e EMAR m/z 809,4290 $[M+H]^+$ (massa calculada para C₄₂H₆₅O₁₅: 809,4318).

O espectro de absorção na região do Infravermelho (FIGURA 18) exibiu uma banda larga em 3435 cm⁻¹ característica da deformação axial da ligação O-H, bandas em 1732 e 1684 cm⁻¹ referentes às ligações C=O de ésteres, bem como em 1551 e 1458 cm⁻¹ correspondentes a deformação angular da ligação C=C de olefinas (PAVIA, 2015).

O espectro de RMN de ¹H (FIGURA 19) mostrou um sinal de hidrogênio ligado a carbono *sp*² em δ_H 5,50 (H-6), sinais para hidrogênios ligados a carbonos oxigenados na faixa de δ_H 5,86 a 3,69 os quais foram correlacionados aos seus respectivos carbonos com base na análise do espectro HSQC (FIGURA 20), inclusive permitiu inferir a presença de duas unidades de açúcar.

Os espectros de RMN de ¹³C (FIGURA 21) junto ao espectro HSQC mostraram sinais para 41 átomos de carbono, compatíveis com a estrutura de um vitanolídeo glicosilado. Os deslocamentos químicos em δ_C 178,6 (C-26) e 170,5 (OAc-1) são compatíveis com

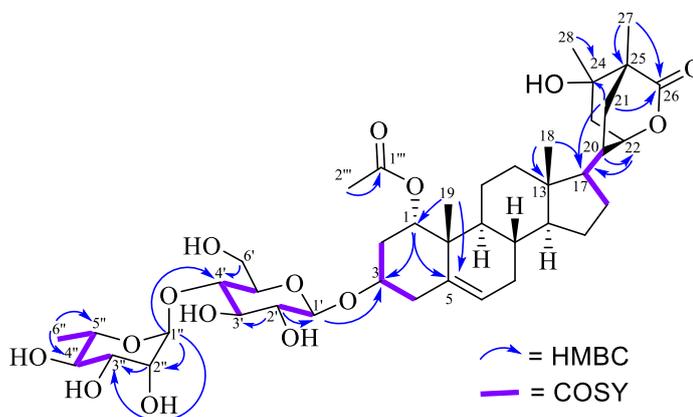
carbonilas de uma δ -lactona e de grupo acetoxila, respectivamente, enquanto os sinais em δ_C 124,8 (C-6) e δ_C/δ_H 137,8/5,50 (C-5), indicaram uma ligação dupla trissubstituída. Uma análise detalhada dos espectros de RMN 1D e 2D indicaram um vitanolídeo do tipo vitajardin (KIYOTA *et al.*, 2008), confirmado pelas correlações exibidas no espectro de HMBC (FIGURA 22). As correlações dos hidrogênios metilênicos em δ_H 2,45/1,60 (H₂-21) com δ_C 178,2 (C-26), 71,3 (C-24) e 53,0 (C-17), bem como dos grupos metilas em δ_H 1,50 (H₃-27) e 1,45 (H₃-28) com os carbonos δ_C 178,2 (C-26) e 71,3 (C-24) respectivamente, confirmaram o sistema [2,2,2-biciclo] com uma δ -lactona, característico de vitajardins (ROCHA, 2022).

O espectro HMBC mostrou correlações dos hidrogênios metílicos em δ_H 0,91 (H₃-19) com δ_C 41,2 (C-10), 75,4 (C-1) e 137,8 (C-5), sugerindo a posição do grupo acetoxila em C-1.

Os sinais correspondentes aos carbonos anoméricos em δ_C/δ_H 102,4/4,96 (C-1') e 102,9/5,86 (C-1''), determinados através do espectro HSQC, aliados àqueles em δ_C/δ_H 61,7/4,20; 4,06 (C-6') e 18,8/1,70 (C-6'') indicaram as unidades de açúcares glicose (Gli) e ramnose (Ram), respectivamente, corroborando com o espectro de COSY (FIGURA 23), que mostrou acoplamento para uma sequência de hidrogênios ligados a carbono oxigenados evidenciando os açúcares mencionados.

Com base no espectro HMBC, a unidade ramnose foi ligada ao carbono em δ_C 78,5 (C-4') através das correlações do hidrogênio em δ_H 4,33 (H-4') com ambos carbonos, oximetilênico (C-6') da glicose e anomérico da ramnose (C-1''). O dissacarídeo (Gli-Ram) foi ligada ao carbono oximetínico em δ_C 73,2 (C-3), pela correlação observada do hidrogênio ligado ao carbono anomérico da glicose em δ_H 4,96 (H-1') com esse carbono (FIGURA 16).

Figura 24- Principais correlações observadas nos espectros HMBC e COSY do composto **AV20**.



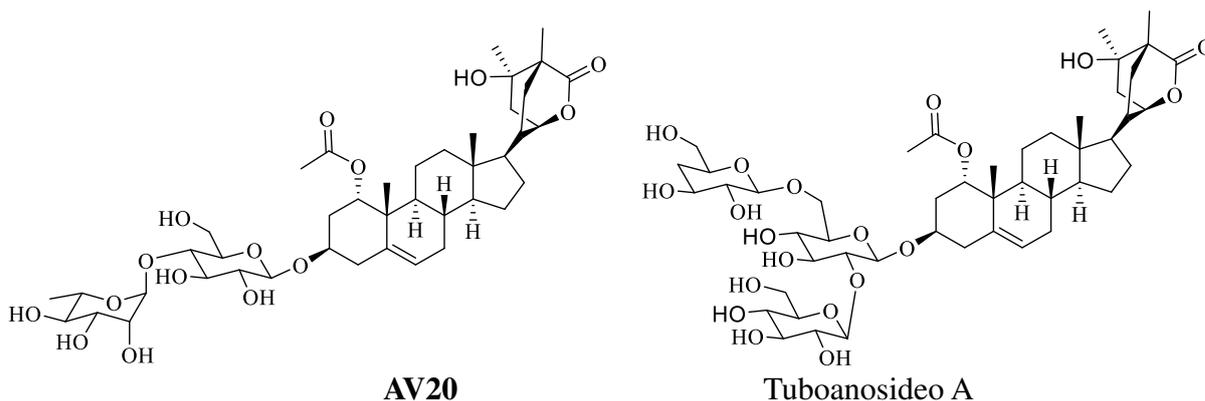
A estereoquímica relativa do composto **AV20** foi estabelecida pela análise do espectro NOESY (FIGURA 24) através das correlações entre os hidrogênios do grupo metila δ_H 0,91 (H₃-19) com 5,18 (H-1) indicando a α -orientação do grupo acetoxila, enquanto a β -orientação da lactona bicíclica em C-17 (δ_C 53,0) foi determinada com base na interação dipolar entre os hidrogênios metínicos em δ_H 1,46 (H-17) e 0,70 (H-14), bem como dos hidrogênios ligados a carbono metílico em δ_H 0,54 (H₃-18) com 2,01 (H-20).

Baseado nos valores dos deslocamentos químicos obtidos pelos espectros RMN de ¹H e ¹³C (TABELA 11) o composto codificado de **AV20** foi identificado como um vitajardin glicosilado, cujos deslocamentos químicos foram semelhantes a aqueles do composto glicosilado tuboanosideo A, um vitajardin, previamente isolado de *Tubocapsicum anomalum* (Solanaceae) (KIYOTA et al., 2008).

Vale ressaltar que os vitajardins foram encontrados apenas nos gêneros *Deprea* (ECHEVERRI et al., 1988; ECHEVERRI et al., 1989), *Nicandra* (NICOLÁS et al., 2015), *Tubocapsicum* (KIYOTA et al., 2008; WANG et al., 2018) e recentemente em *Athenaea* (ROCHA et al., 2022).

Como pode ser observado na Figura 17 a diferença entre **AV20** e o tuboanosideo A está em sua cadeia glicosilada, portanto, há modificações nos deslocamentos químicos de seus carbonos, conforme mostrado na Tabela 11.

Figura 25- Estrutura de **AV20** e do tuboanosideo A



As principais diferenças nos deslocamentos estão relacionadas aos carbonos oxigenados da glicose em δ_C 61,7 (C-6'), 78,5 (C-4') e 75,8, (C-2'), enquanto para o tuboanosideo A é δ_C 69,9 (C-6'), 71,3 (C-4') e 84,6 (C-2'). A diferença de deslocamento químico para C-2' ($\delta\Delta$ -8,8) é justificada pela presença de uma hidroxila em vez de uma unidade glicosídica que contribui para a desproteção desse carbono no tuboanosideo A. Da

mesma forma, C-4' é mais desprotegido ($\delta\Delta +7,2$ ppm), enquanto C-6' encontra-se em campo de maior proteção ($\delta\Delta -8,2$). A desproteção é observada nos carbonos ligados à unidade de açúcar, em substituição a hidroxila, devido à influência do campo eletromagnético.

Dessa forma, **AV20** está sendo descrito pela primeira vez neste trabalho e sua estrutura foi definida como 3-O-[α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopiranosil] tuboanosigenin, mas, em concordância com denominações atribuídas para estes compostos, ampliando o leque de vitajardins já registrados (ROCHA, 2023).

Tabela 11- Análise comparativa dos valores de deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C e ^1H do composto **AV20** e do tuboanosídeo A (KIYOTA et al., 2008).

		AV20 (Py-d ₅)		Tubeanosídeo A (Py-d ₅)
		δ_{C}	δ_{H} multiplicidade (J / Hz)	δ_{C}
1	CH	75,4	5,18 sl	75,3
2	CH ₂	34,6	2,4, d (13,1) / 1,92 m	34,4
3	CH	73,2	4,39 m	74,4
4	CH ₂	38,7	2,84 dd (13,4; 3,2) / 2,54 t (11,6)	38,3
5	C	137,8	-	137,8
6	CH	124,8	5,50 d (4,5)	124,2
7	CH ₂	32,2	1,81 d (17,0) / 1,30 m	32,0
8	CH	32,2	1,49 m	32,0
9	CH	42,6	1,37 m	42,4
10	C	41,2	-	41,0
11	CH ₂	20,8	1,37 m / 1,34 m	20,6
12	CH ₂	39,7	2,24 d (14,4) / 2,13 dd (14,4; 3,5)	39,5
13	C	43,2	-	43,0
14	CH	55,7	0,70 m	55,5
15	CH ₂	27,0	1,70 m / 1,44 m	24,6
16	CH ₂	24,8	1,40 m / 0,97 dd (12,4; 4,0)	26,8
17	CH	53,0	1,46 m	25,7
18	CH ₃	13,2	0,54 s	12,9
19	CH ₃	19,7	0,91 s	19,6
20	CH	40,0	2,01 m	39,8
21	CH ₂	31,9	2,45 m / 1,60 dd (10,6; 10,6)	31,7
22	CH	78,1	4,50 sl	77,8
23	CH ₂	39,6	1,73 dl (12,0) / 1,11 m	39,4
24	C	71,3	-	71,0
25	C	48,4	-	48,2
26	C	178,2	-	177,8
27	CH ₃	15,5	1,50 s	15,2
28	CH ₃	29,3	1,45 s	29,0
OAc	C	170,5	-	170,5
	CH ₃	21,2	1,90 s	21,1
Ram				
1''	CH	102,9	5,86 sl	
2''	CH	72,8	4,66 sl	
3''	CH	73,1	4,57 dd (9,2; 3,2)	
4''	CH	74,3	4,32 t (9,4)	
5''	CH	70,6	5,00 m	
6''	CH ₃	18,8	1,70 d (6,1)	
Gli				
1'	CH	102,4	4,96 d (7,8)	101,1
2'	CH	75,8	3,96 t (8,5)	84,6
3'	CH	77,4	3,69 d (9,2)	77,6
4'	CH	78,5	4,43 t (9,2)	71,3

Continuação tabela 11				
5'	CH	76,9	4,22 m	76,9
6'	CH ₂	61,7	4,20 d (9,4) / 4,06 dd (12,1; 3,2)	69,9
1''	CH			106,7
2''	CH			76,8
3''	CH			78,1
4''	CH			71,7
5''	CH			78,7
6''	CH ₂			63,0
1'''	CH			105,4
2'''	CH			75,2
3'''	CH			78,7
4'''	CH			71,8
5'''	CH			78,4
6'''	CH ₂			62,8

Figura 26- Espectro de absorção na região do infravermelho de **AV20**.

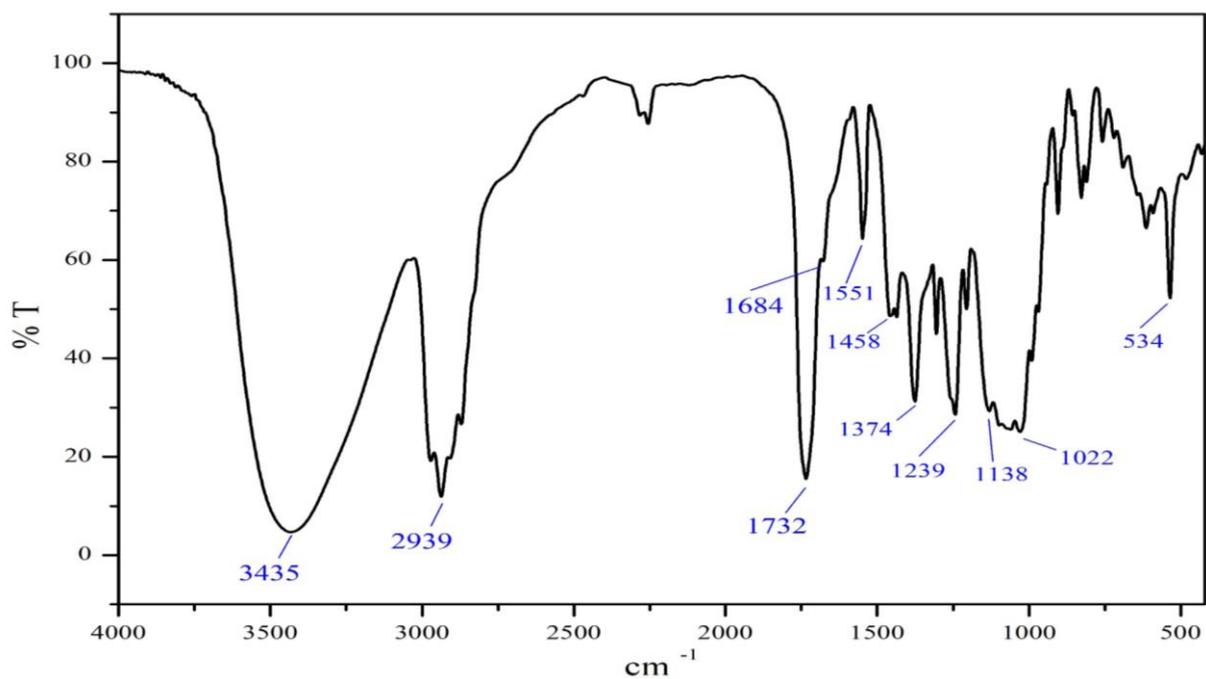


Figura 27- Espectro de RMN de ^1H (500 MHz) de AV20, em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$.

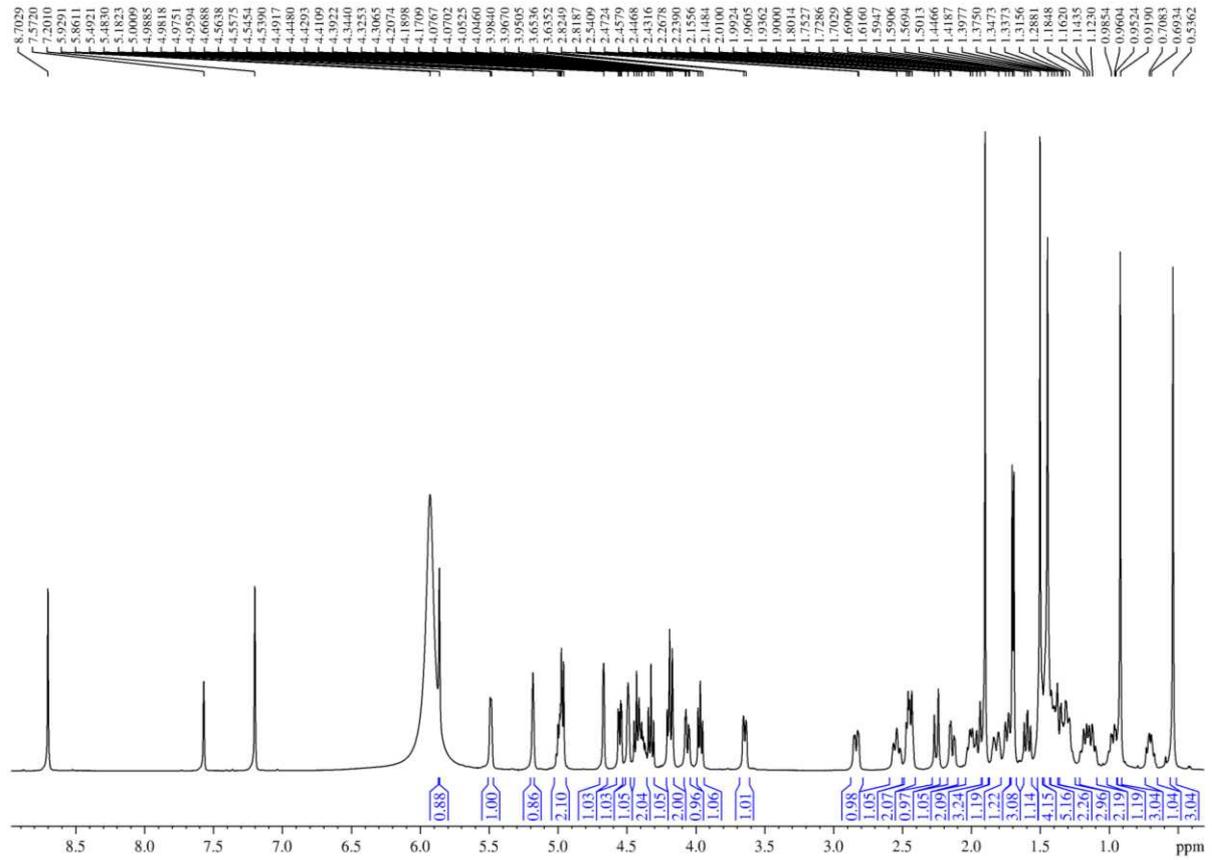


Figura 28- Espectro de correlação quântica única heteronuclear (HSQC) de AV20, em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$.

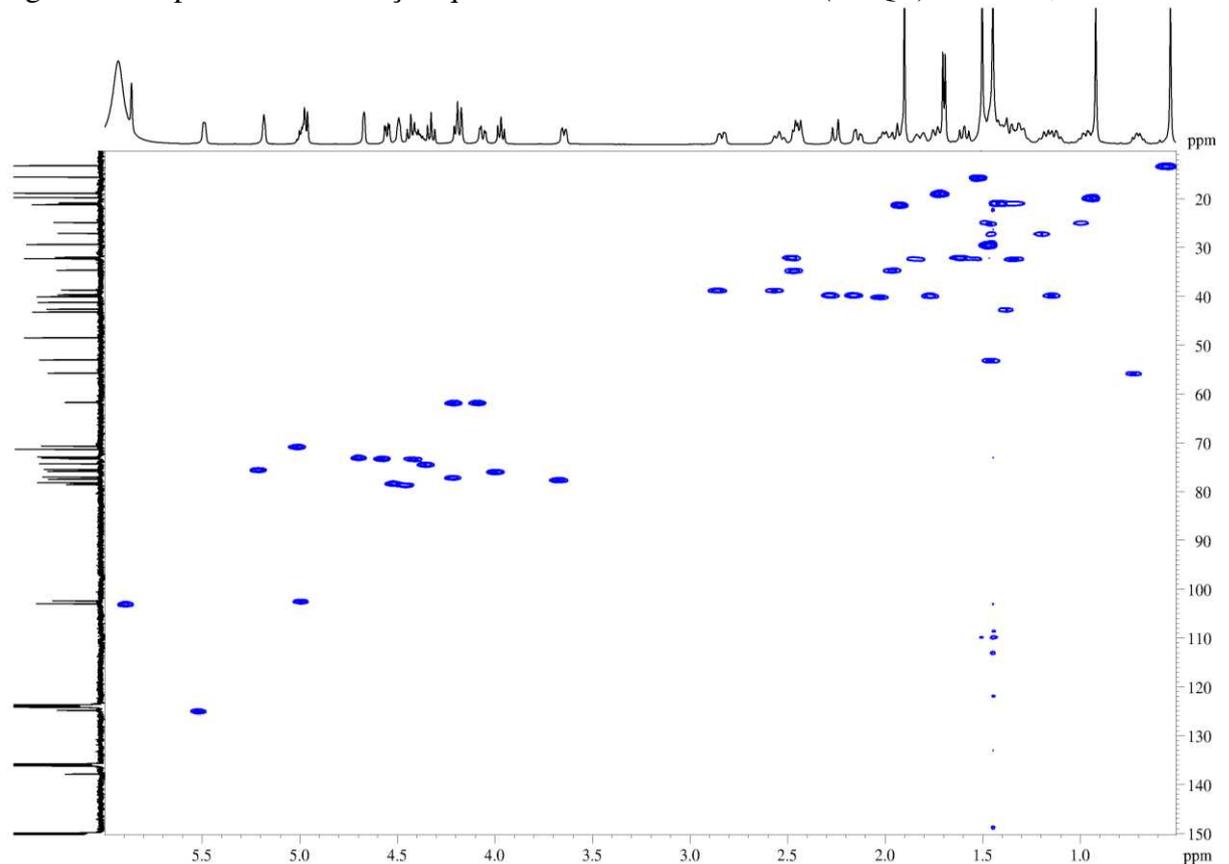


Figura 29- Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz) de AV20, em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$.

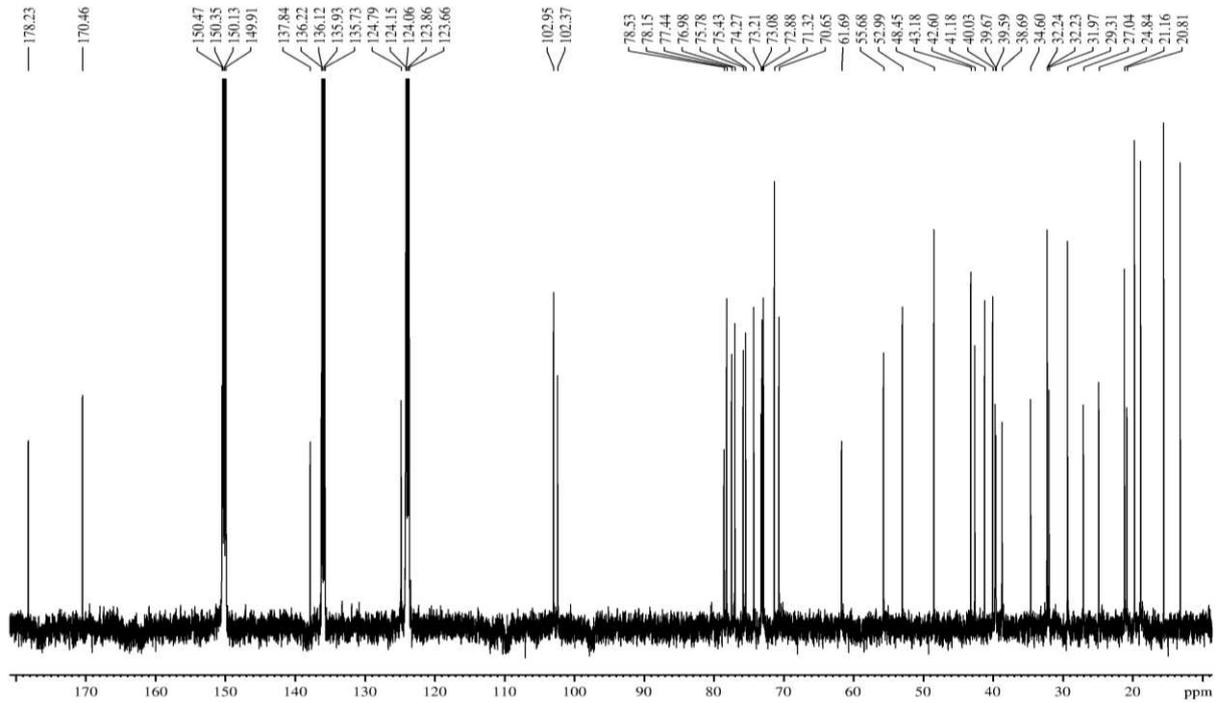


Figura 30- Espectro de correlação quântica múltipla heteronuclear (HSQC) de AV20, em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$.

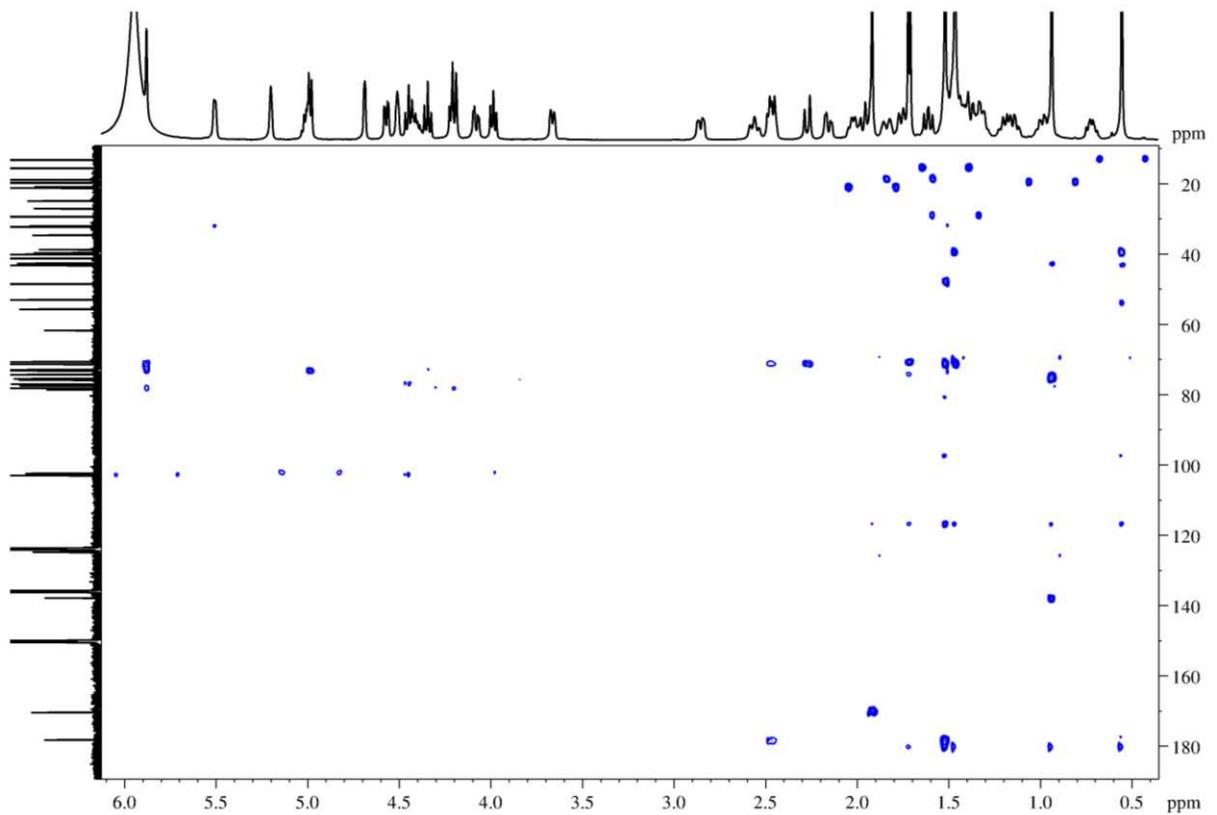


Figura 31- Espectro bidimensional de correlação de deslocamentos homonuclear (^1H , ^1H) (COSY) (500 MHz) de AV20, em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$.

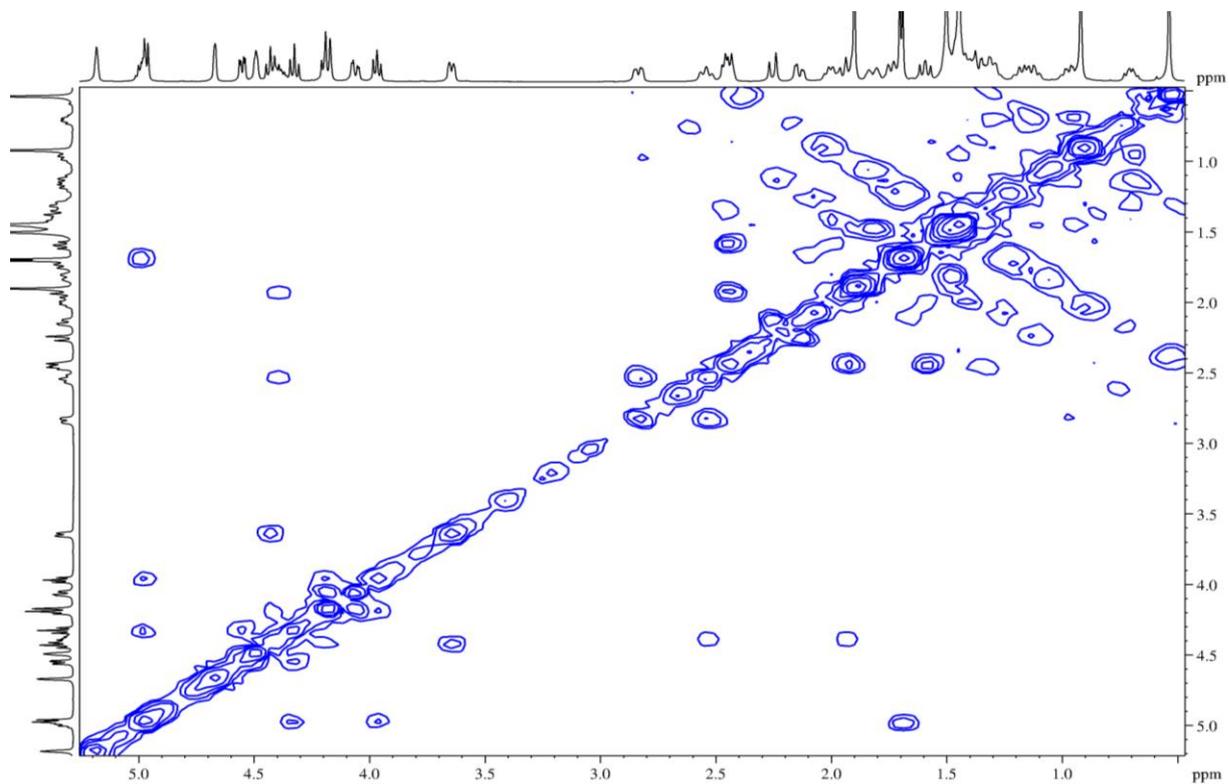
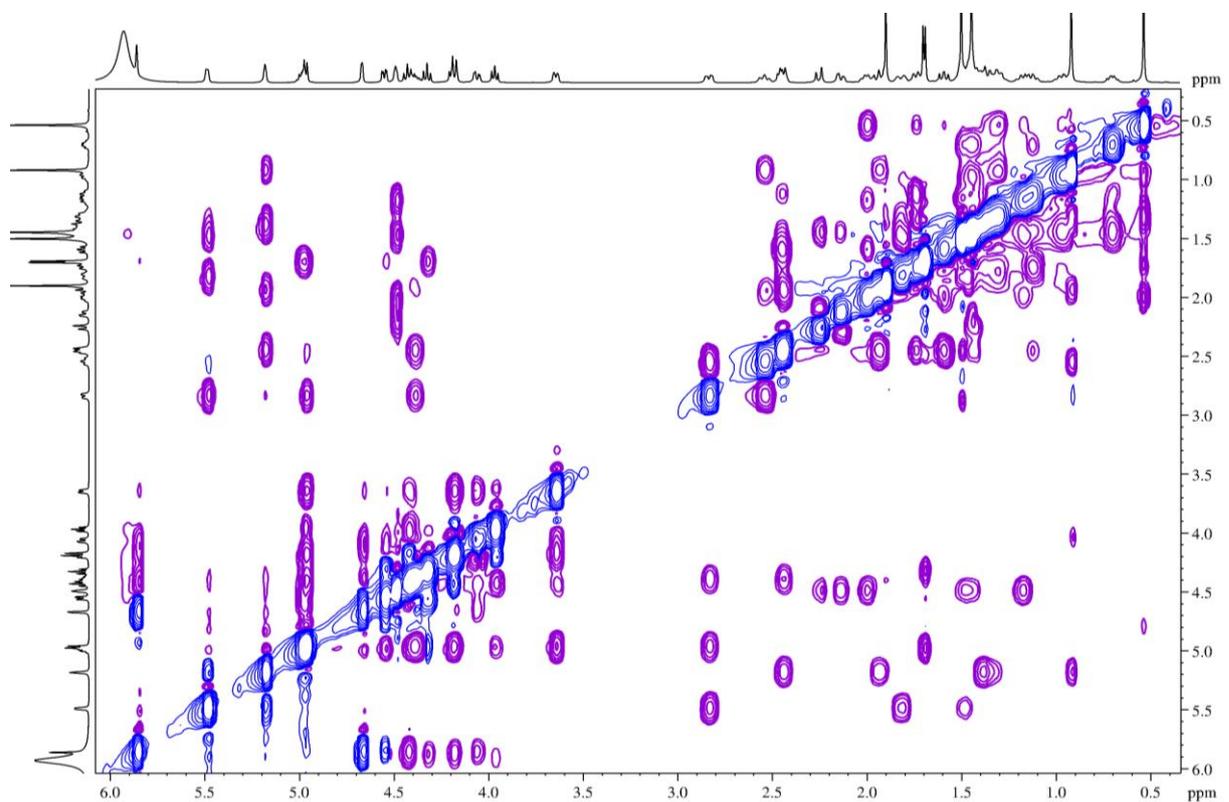


Figura 32- Espectro bidimensional de correlação dipolar (^1H , ^1H) (NOESY) (500 MHz) de AV20, em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$.



4.1.3 Determinação estrutural de AV21

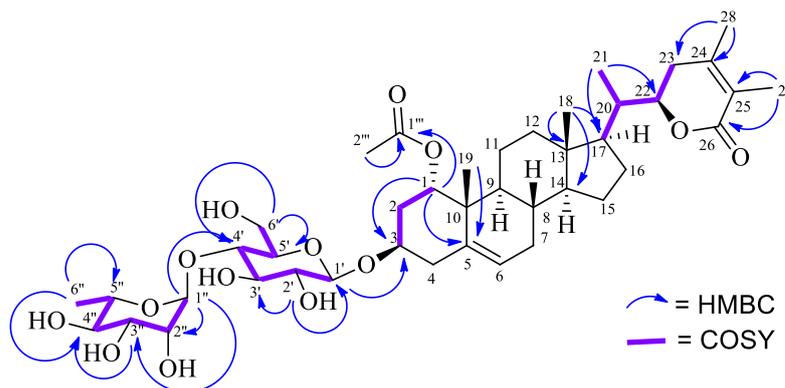
O composto codificado de **AV21**, proveniente da fração AVFEANC (item 3.12, pag. 28), foi obtido como sólido amorfo, PF: 172,3 °C e rotação óptica de $[\alpha]_D^{25} = + 69$ e EMAR m/z 810,4598 $[M+H_2O]^+$ (massa calculada para $C_{42}H_{66}O_{15}$: 810,4402).

O espectro de absorção na região do Infravermelho (FIGURA 27) exibiu uma banda larga em 3421 cm^{-1} referente ao grupo hidroxila (O-H), bandas em 1730 e 1711 cm^{-1} referentes às ligações C=O de ésteres (PAVIA, 2015).

Os espectros de RMN de ^1H (FIGURA 28) e HSQC (FIGURA 29) para este composto apresentaram sinais semelhantes àqueles observados para o composto **AV20**, como a presença do grupo acetoxila, representado pelos deslocamentos químicos em δ_C/δ_H 170,6 e 21,4/1,98 (OAc) e carbonos olefínicos em δ_C/δ_H 138,1 (C-5) e 124,9/5,56 (C-6), correspondentes a ligação dupla trissubstituída em C-5/C-6. Igualmente, os monômeros de açúcares, glicose (δ_C/δ_H 102,4/4,97, C-1') e ramnose (δ_C/δ_H 103,2/5,90, C-1''), cuja sequência de ligações Glc-1'→Glc-6' e Ram-1''→Ram-6'', foi determinada com pelas correlações observadas no espectro de COSY (FIGURA 30). Adicionalmente, o espectro de HMBC (FIGURA 31) confirmou a posição das ligações Ram-1''→Gli-4' e Gli-1'→C-3, através das correlações de δ_H 5,90 (H-1'') com δ_C 78,8 (C-4') e δ_H 5,02 (H-1') com δ_C 73,5 (C-3), respectivamente.

Diferentemente de **AV20**, que apresentou uma cadeia lateral [2,2,2-biciclo] contendo uma δ -lactona, os espectros de RMN de ^{13}C (FIGURA 32) e DEPT 135° (FIGURA 33) de **AV21**, exibiram sinais para dois carbonos sp^2 não hidrogenados em δ_C 122,4 (C-24) e 150,3 (C-25), que aliado ao sinal de carbono em δ_C 167,2 (C-26) foi consistente com uma δ -lactona α,β -insaturada, comum em vitanolídeos. Outra evidência foi a correlação da metila dubleto em δ_H 0,98 (H-21) com os carbonos em δ_C 78,7 (C-22) e 52,5 (C-17) como pode ser observado na Figura 25.

Figura 33- Principais correlações observadas nos espectros HMBC e COSY do vitanolídeo **AV21**



A estereoquímica relativa de **AV21** foi determinada pelo espectro NOESY (FIGURA 34) e comparação dos valores de deslocamentos químicos deste com aqueles descritos para **AV20**. Vale mencionar que a α -orientação do grupo metila (C-21) ligada ao C-20 foi confirmada pelas correlações de δ_H 0,58 (H-18), β orientado, com 1,93 (H-20).

Após um levantamento bibliográfico em diferentes bases de dados (SciFinder, National Center for Biotechnology Information, Web of Science e Scopus), o composto **AV21** se trata de um vitanolídeo glicosilado inédito, cuja estrutura foi estabelecida como 1-acetoxy-3-O-[α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopiranosil]-27-dehidroxipubesenolideo. Vale destacar que vitanolídeos glicosilados apresentam propriedades farmacológicas como atividades anticancerígena (MA et al., 2006), neuro-protetora (GIRME et al., 2020), antioxidante e anti-inflamatória (HA et al., 2002).

Figura 34- Estrutura de **AV21**

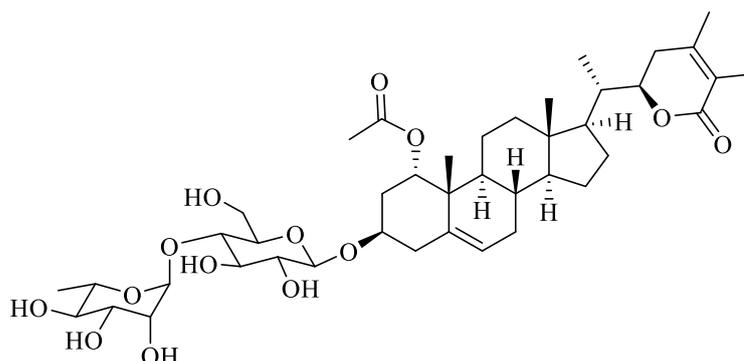


Tabela 12- Deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C e ^1H de AV21 (piridina- d_5).

AV21			
		δ_{C}	δ_{H} multip. (J / Hz)
1	CH	75,7	5,28 sl
2	CH ₂	34,9	2,49 dd (13,4; 2,9)/ 2,02 m
3	CH	73,5	4,46 m
4	CH ₂	38,9	2,89 dd (13,4; 2,9)/ 2,60 t (11,5)
5	C	138,1	-
6	CH	124,9	5,56 sl
7	CH ₂	32,4	1,58 m/ 1,38 m
8	CH	32,4	1,95 m
9	CH	43,1	1,44 m
10	C	41,4	-
11	CH ₂	21,3	1,50 m / 1,34 m
12	CH ₂	40,2	1,83 m/ 1,03 m
13	C	43,3	-
14	CH	56,8	0,84 m
15	CH ₂	27,8	1,58 m / 1,22 d (11,6)
16	CH ₂	24,9	1,48 m / 1,03 m
17	CH	52,5	0,95 m
18	CH ₃	12,2	0,58 s
19	CH ₃	19,9	0,98 s
20	CH	39,7	1,93 m
21	CH ₃	14,0	0,98 m
22	CH	78,8	4,37 m
23	CH ₂	30,1	2,34 m/ 1,99 m
24	C	150,3	-
25	C	122,4	-
26	C	167,2	-
27	CH ₃	13,2	1,98 s
28	CH ₃	20,7	1,86 s
AcO	C	170,6	-
	CH ₃	21,4	1,98 s
Glc			
1'	CH	102,7	5,02 d (7,5)
2'	CH	76,0	4,03 t (8,3)
3'	CH	77,7	3,69 dl (9,1)
4'	CH	78,8	4,45 d (9,1)
5'	CH	77,2	4,22 m
6'	CH ₂	61,9	4,23 m/ 4,11 dd (12,0; 3,3)
Rha			
1''	CH	103,2	5,90 sl
2''	CH	73,1	4,71 sl
3''	CH	73,3	4,60 dd (9,0; 3,2)
4''	CH	74,5	4,37 m
5''	CH	70,9	5,0 m
6''	CH ₃	19,0	1,73 d (6,1)

Fonte: Próprio autor

Figura 35- Espectro de absorção na região do infravermelho de AV21.

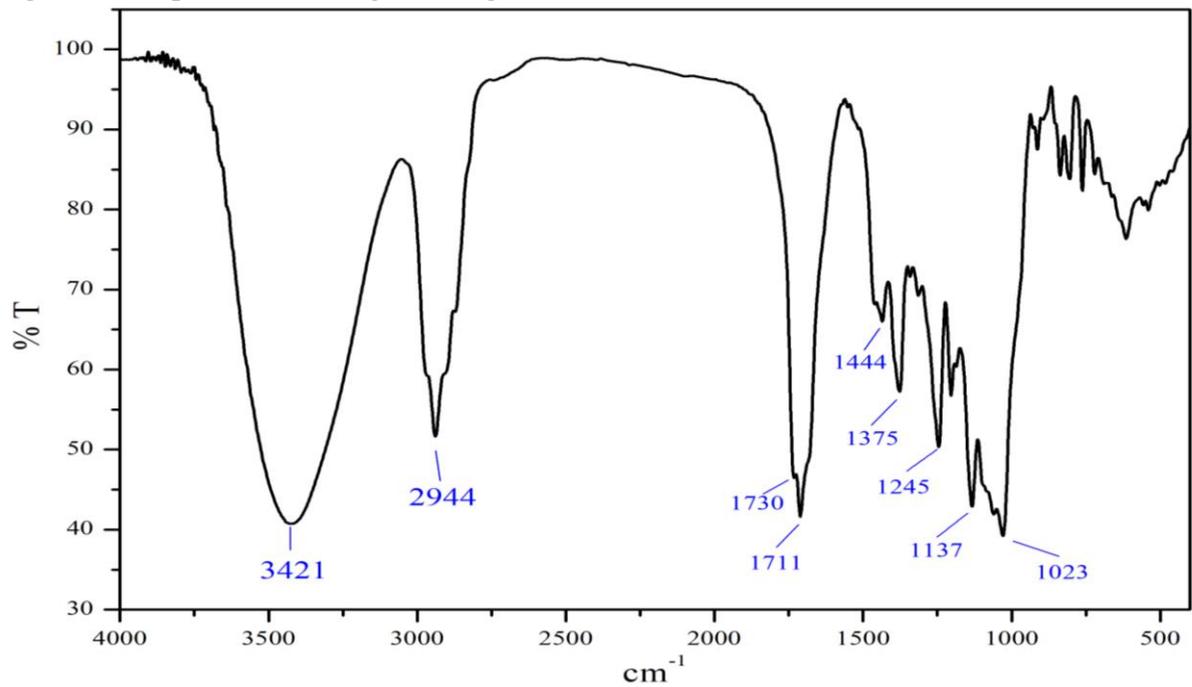


Figura 36- Espectro de RMN de ^1H (500 MHz) de AV21, em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$.

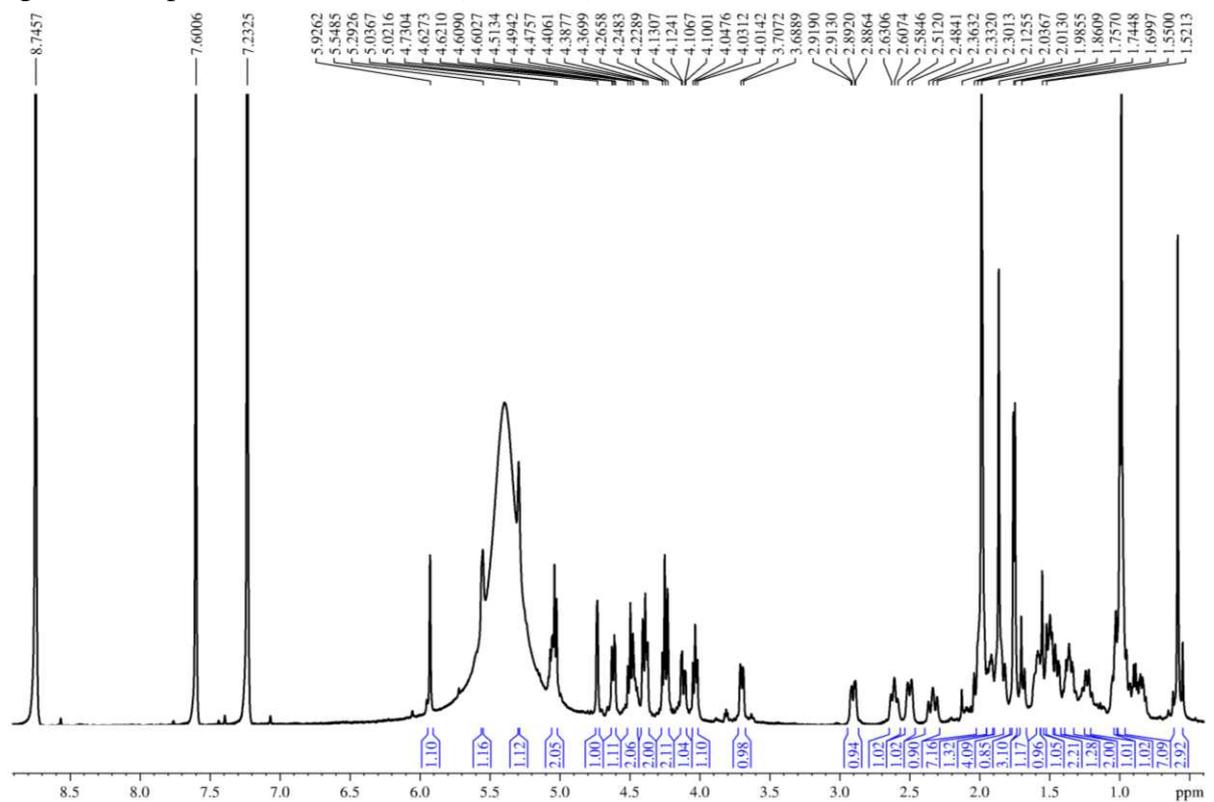


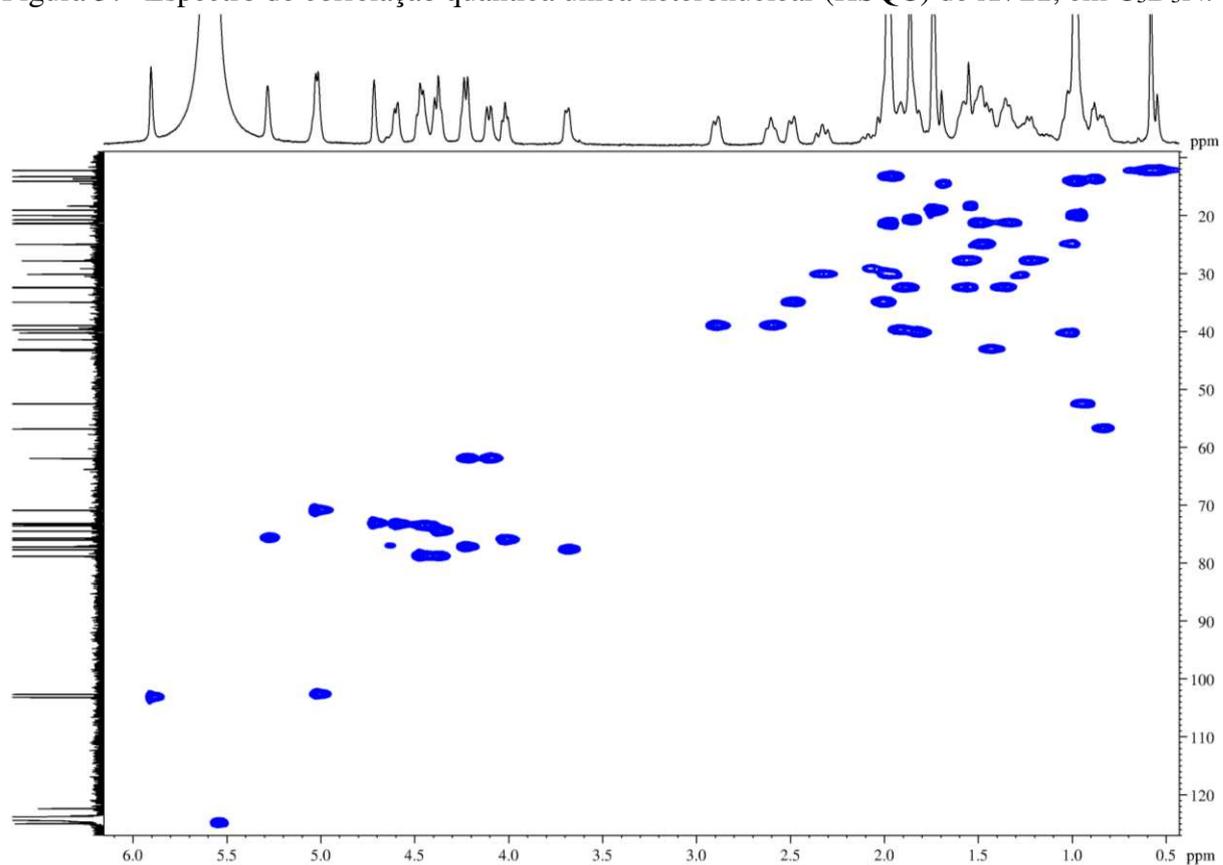
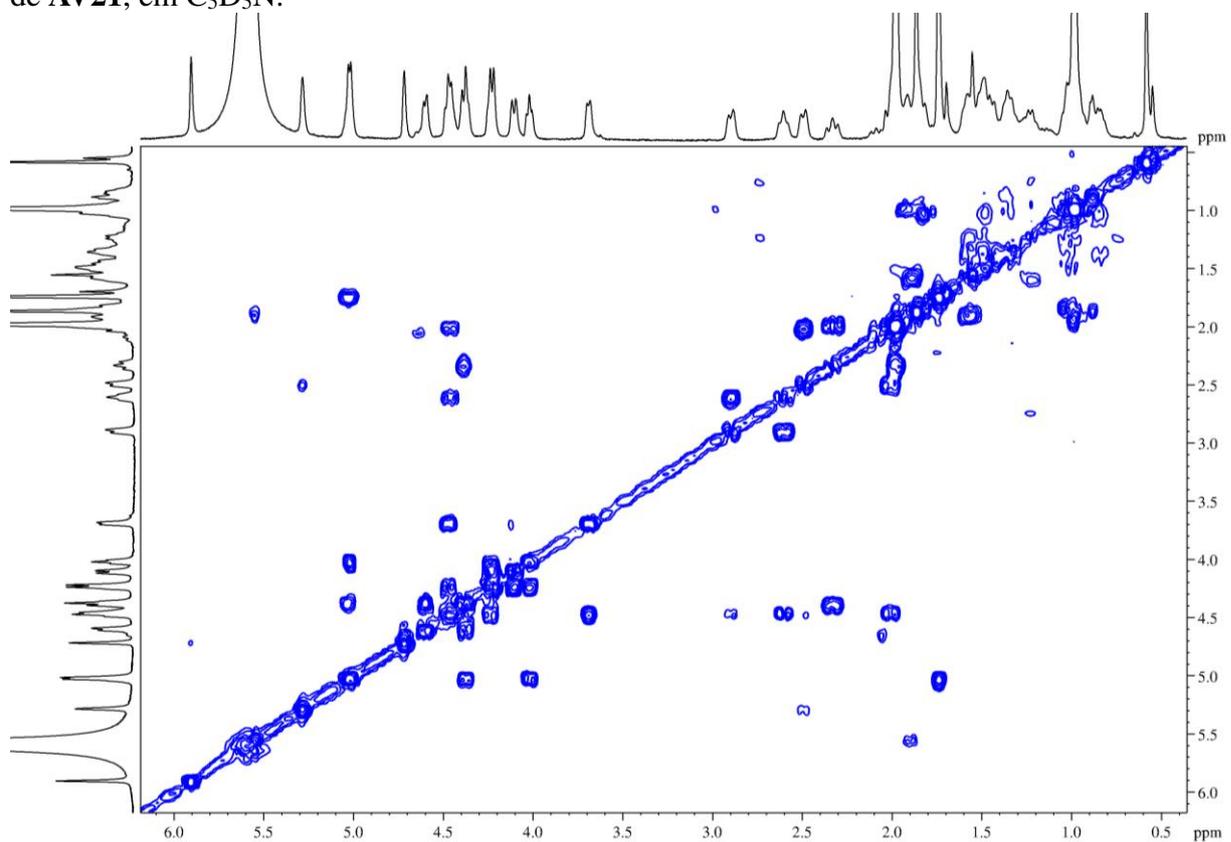
Figura 37- Espectro de correlação quântica única heteronuclear (HSQC) de AV21, em C₅D₅N.Figura 38- Espectro bidimensional de correlação homonuclear (¹H, ¹H) (COSY) (500 MHz) de AV21, em C₅D₅N.

Figura 391- Espectro de correlação quântica múltipla heteronuclear (HSQC) de AV21, em C_5D_5N .

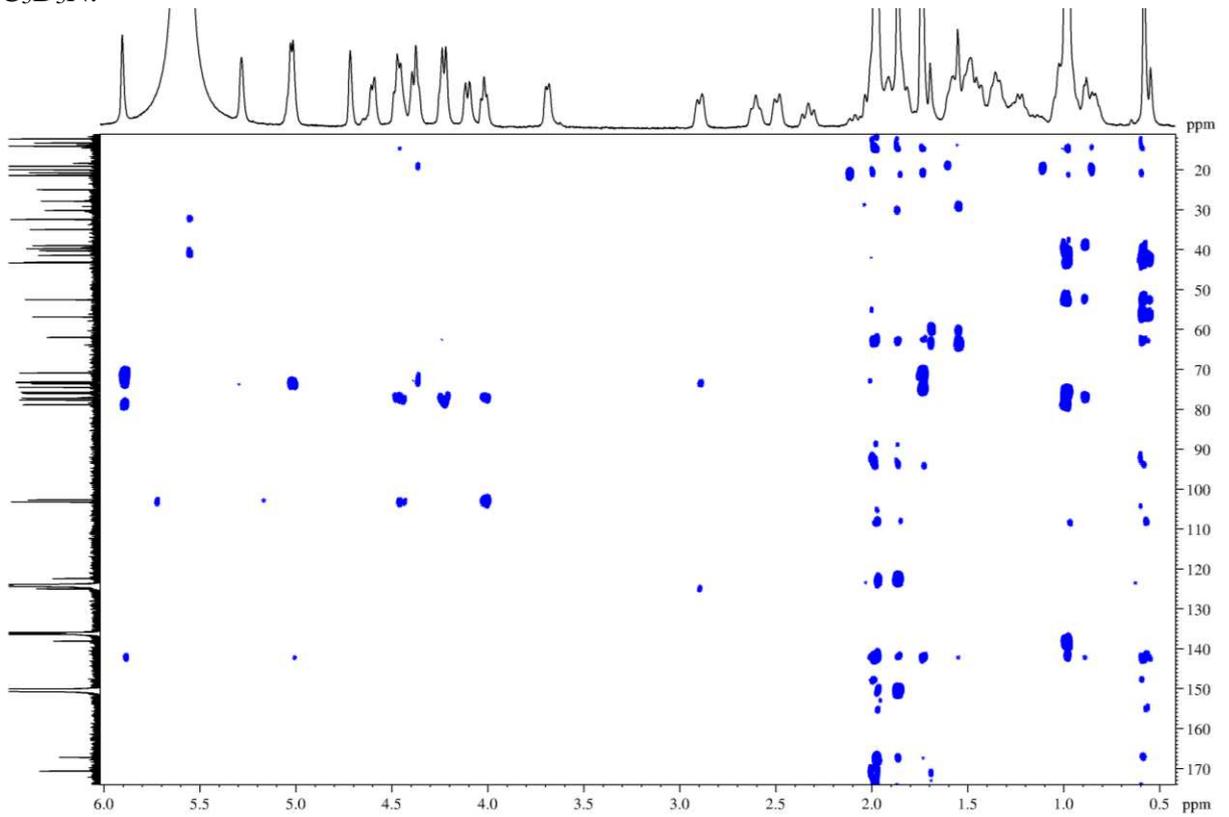


Figura 40- Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz) de AV21, em C_5D_5N .

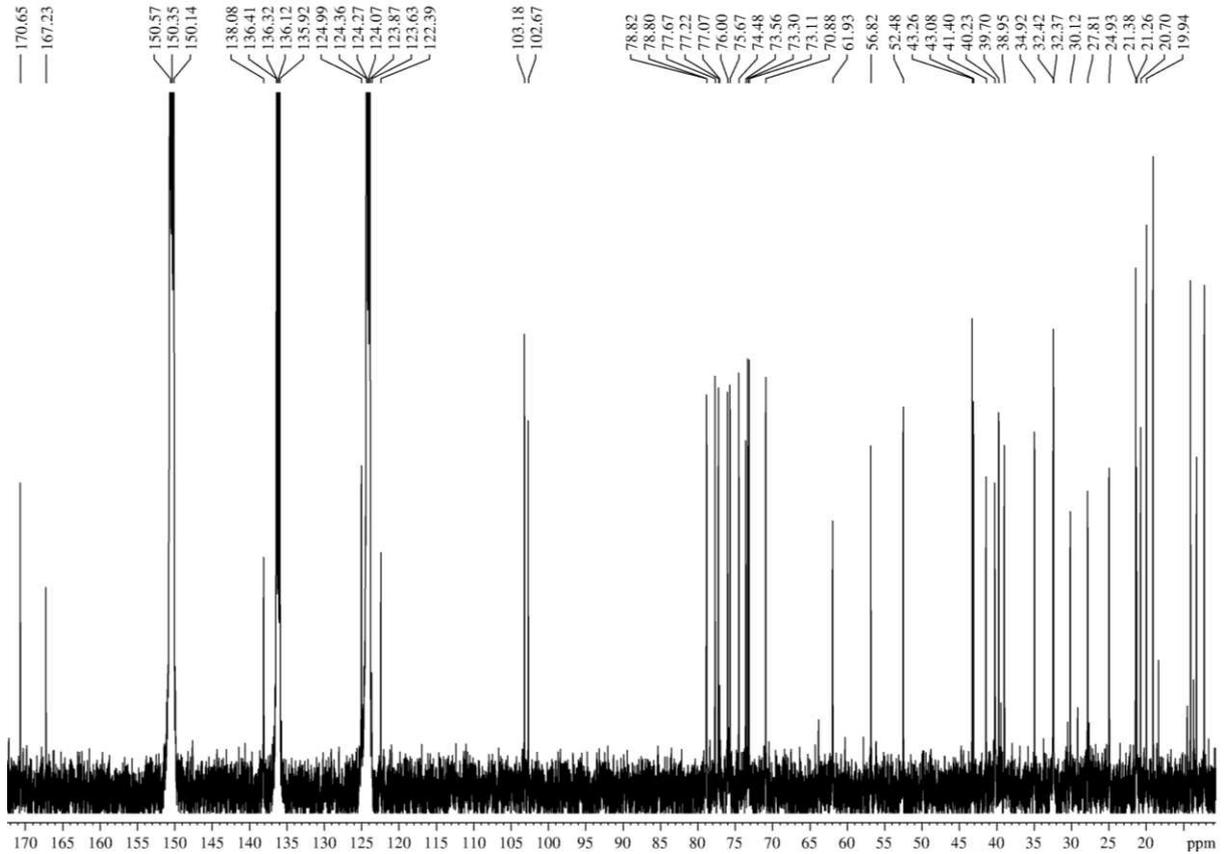


Figura 41- Espectro de RMN de ^{13}C -DEPT (125 MHz) de AV21, em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$.

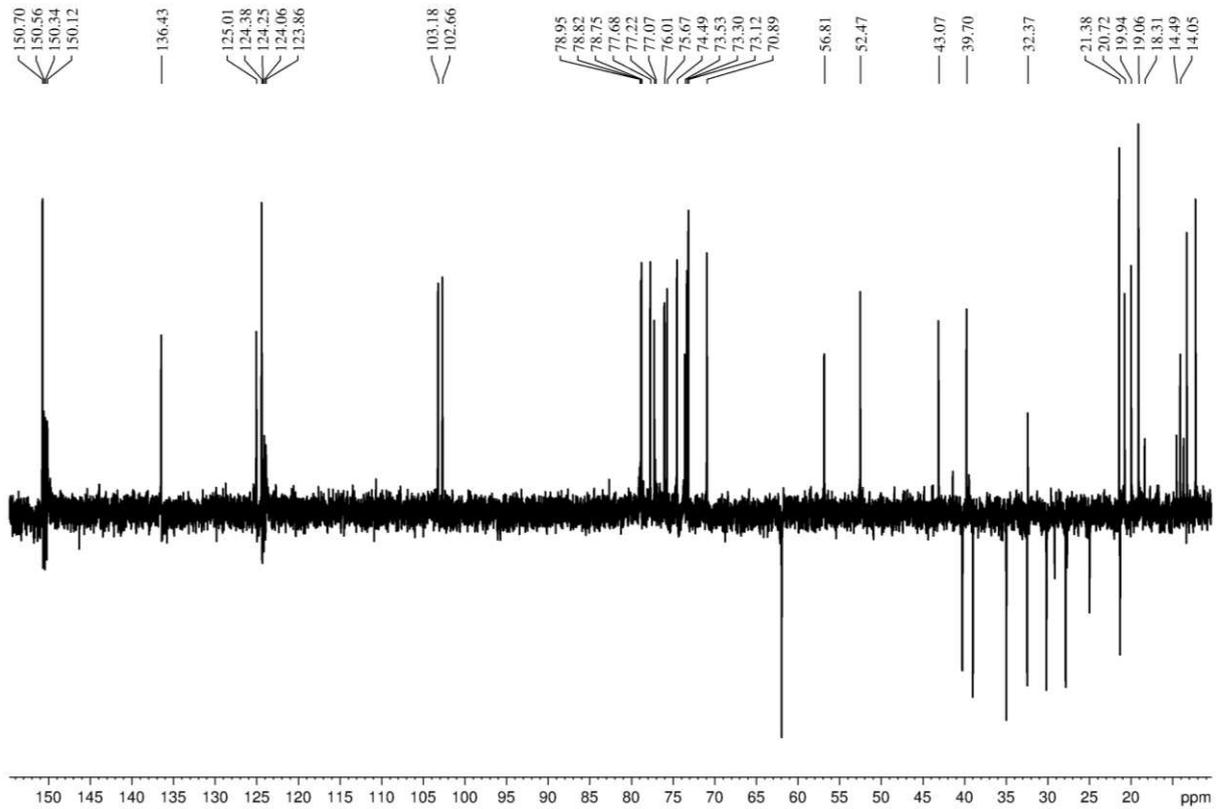
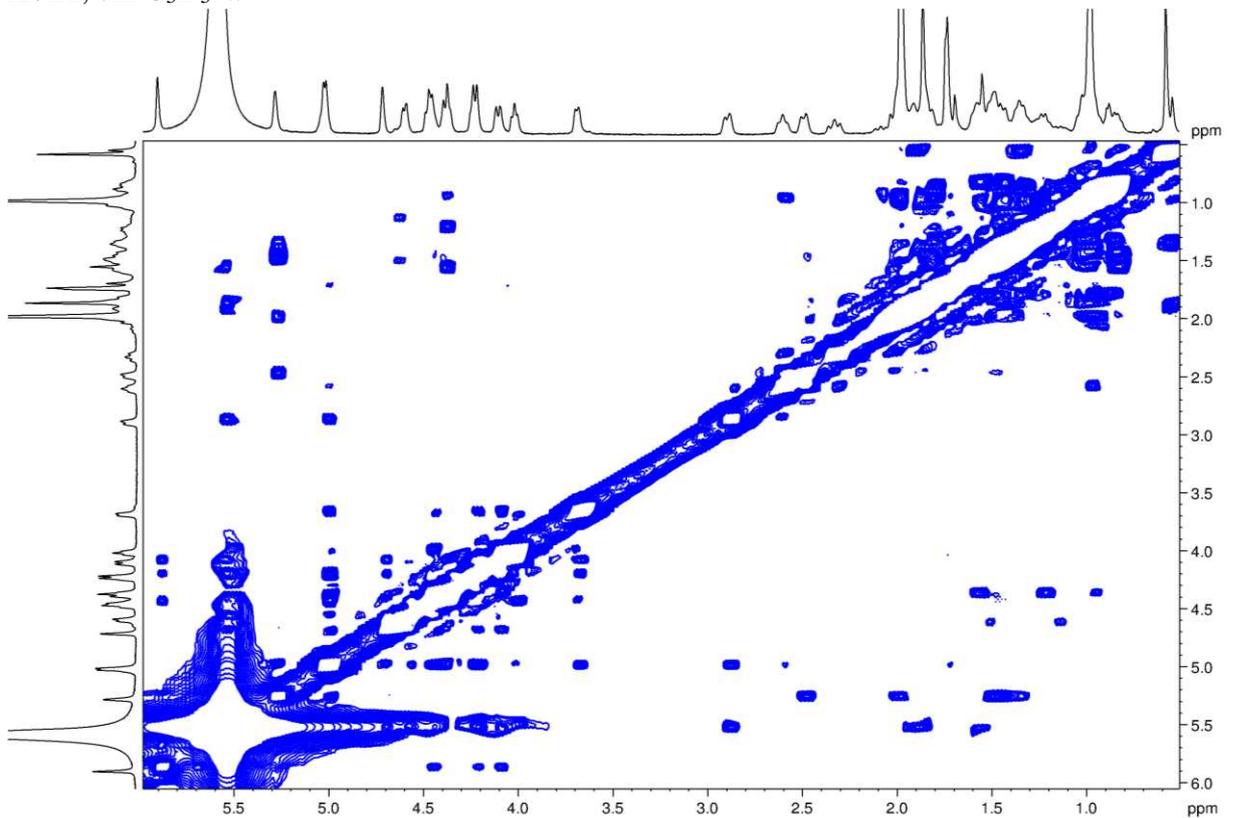


Figura 42- Espectro bidimensional de correlação dipolar (^1H , ^1H) (NOESY) (500 MHz) de AV21, em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$.



4.1.4 Determinação estrutural de AV22

A estrutura do composto **AV22** (item 3.13, pag. 29) foi identificada com base na análise dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (FIGURAS 36 e 37) e comparação com dados descritos na literatura (SAHAI et al., 1985; YANG et al., 2016).

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C de **AV22** mostraram quatro sinais para grupos metilas em $\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$ 12,1/0,65 (C-18), 20,2/1,15 (C-19), 20,4/2,16 (C-28), incluindo uma metila dubleto em $\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$ 13,9/0,98 (C-21), um carbono oximetilênico em δ_{C} 56,8 (C-27) e sinais em δ_{C} 166,8 (C-26), 154,3 (C-24) e 127,7 (C-25), indicando uma δ -lactona α,β -insaturada, assim como no composto **AV19**. Os deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C de **AV22** são compatíveis com a de uma estrutura semelhante a **AV19**, com exceção dos sinais referentes aos anéis A e B, no entanto mostraram próximos aos deslocamentos químicos do composto **AV21**. Assim como em **AV21** e **AV22** apresentou sinais para dois carbonos oximetínicos em $\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$ 73,0/4,16 (C-1) e 66,4 (C-3) e dois carbonos sp^2 correspondentes a ligação dupla trissubstituída $\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$ 140,6 (C-5) e 123,8/5,66 (C-6). A diferença de **AV22** em relação ao composto mencionado, foi a presença de grupos hidroxilados em C-1 e C-3 em substituição a unidade dissacarídeo em C-3 e grupo acetoxila em C-1 (FIGURA 35)

Com base nos dados de RMN de ^1H e ^{13}C (TABELA 13), este composto tem estrutura idêntica ao composto pubesenolideo, previamente isolado de *Physalis pubescens* (SAHAI, 1985). Para este composto foram descritas as atividades antimicrobiana, citotóxica e inseticida (BHADANI et al., 2021).

Figura 43- Estrutura de **AV22**

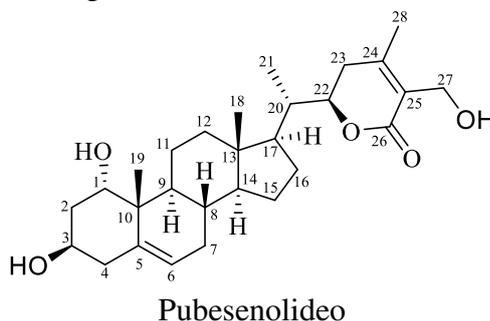


Tabela 13- Análise comparativa dos valores de deslocamento químico de RMN de ^{13}C e ^1H de **AV22** em para o composto pubesenolideo (SAHAI, 1985).

		AV22 (Py- <i>d</i> ₅)		Pubesenolideo (CDCl ₃)
		δ_{C}	δ_{H} multiplicidade (J/Hz)	δ_{C}
1	CH	73,0	4,16 m	72,8
2	CH ₂	40,7	2,63 tt (13,12, 3,60) / 2,19 m	38,3
3	CH	66,4	4,76 m	66,1
4	CH ₂	43,7	2,81 dl (6,86)	41,4
5	C	140,6	-	137,8
6	CH	123,8	5,66 m	125,6
7	CH ₂	32,7	2,00 m / 1,72 m	31,9
8	CH	32,6	1,54 m	31,4
9	CH	42,1	2,24 m	41,5
10	C	42,5	-	41,5
11	CH ₂	20,9	1,80 m	22,4
12	CH ₂	40,1	1,11 m	39,6
13	C	43,7	-	42,8
14	CH	56,5	0,90 m	56,3
15	CH ₂	24,9	1,48 m / 1,15 m	24,5
16	CH ₂	27,6	1,51 m / 1,04 m	27,4
17	CH	52,5	1,02 m	52,0
18	CH ₃	12,1	0,65 s	11,8
19	CH ₃	20,2	1,15 s	15,5
20	CH	39,5	1,95 m	38,8
21	CH ₃	13,9	0,98 m	13,5
22	CH	78,8	4,40 tt (13,2, 3,2)	78,7
23	CH ₂	30,2	2,35 d (3,0) / 2,04 d (3,0)	29,8
24	C	154,3	-	154,0
25	C	127,7	-	124,9
26	C	166,8	-	167,2
27	CH ₂	56,8	4,88 d (11,6) / 4,77 d (11,6)	56,9
28	CH ₃	20,4	2,16 s	20,2

Fonte: Próprio autor.

Figura 44- Espectro de RMN de ^1H (500 MHz) de AV22, em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$.

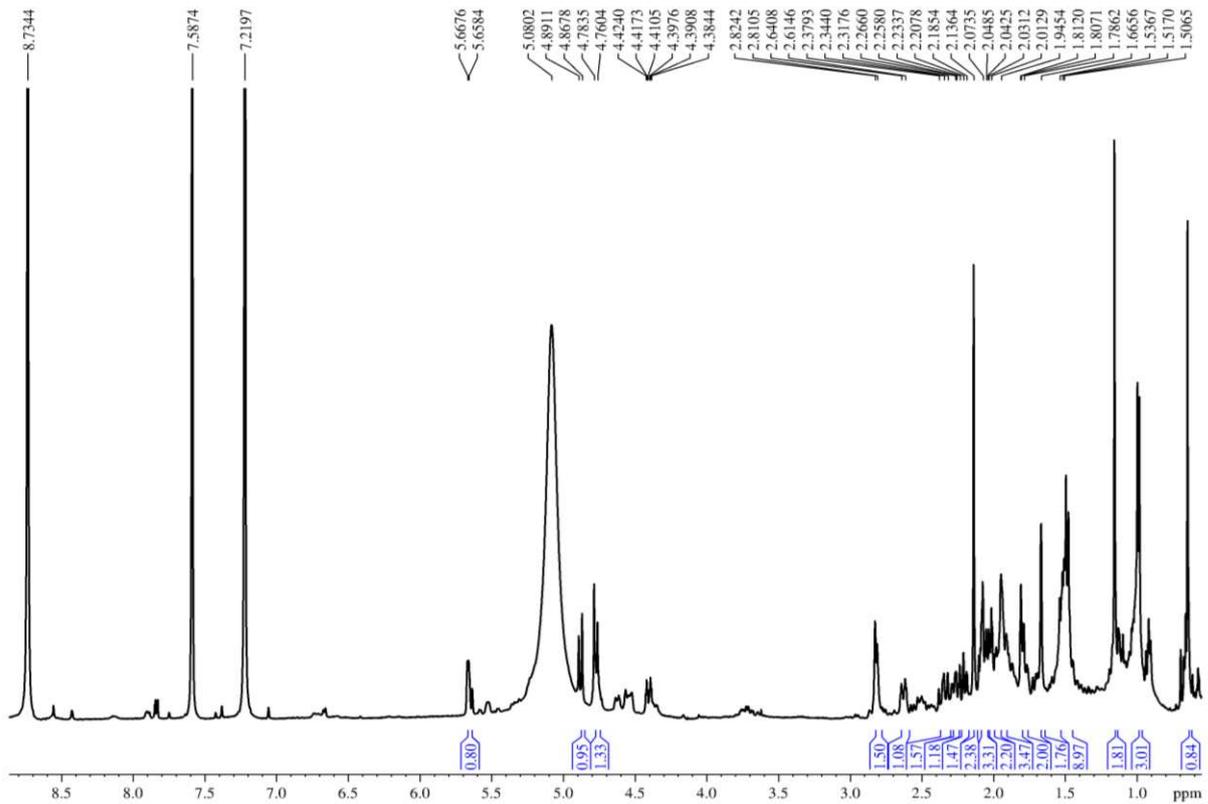
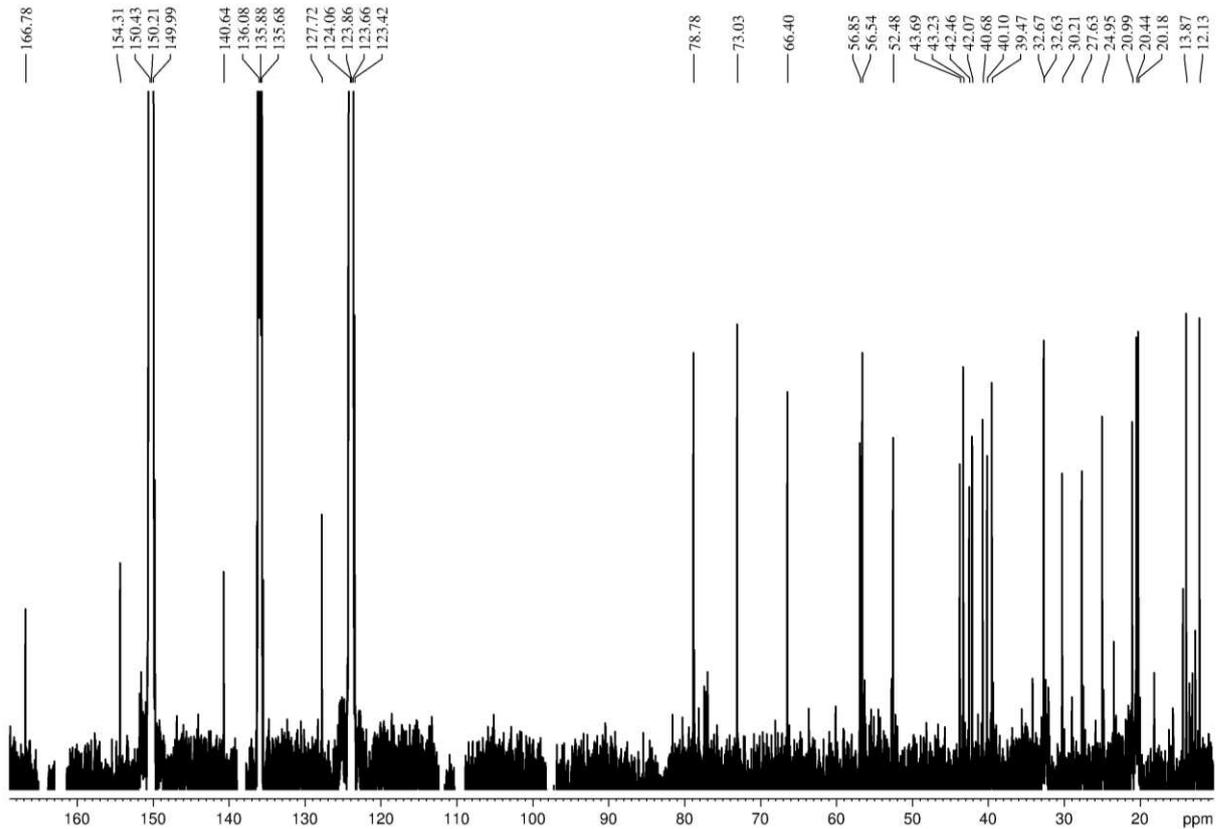


Figura 45- Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz) de AV22, em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$.



4.1.5 Determinação estrutural de AV23

A estrutura de **AV23** (item 3.13, pag. 29) foi determinada com base na análise dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (FIGURAS 39 e 40) e comparação com dados de compostos previamente relatados com a literatura (ZHANG et al, 2012).

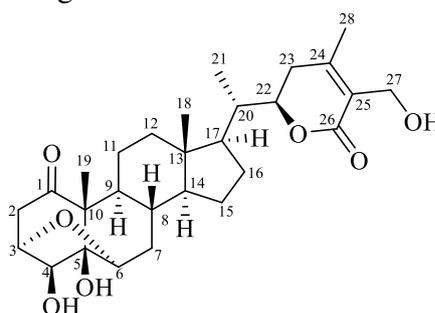
Como observado na determinação do composto **AV19**, os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **AV23** apresentam sinais em δ_{C} 210,4 (C-1), característico de carbonila de cetona, δ_{C} 166,9 (C-26), 154,7 (C-24) e 127,8 (C-25), para uma δ -lactona α,β -insaturada, em δ_{C} 56,8 (C-27), referente ao carbono oximetilênico, além de quatro sinais para grupos metilas em $\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$ 12,1/0,58 (C-18), 16,6/1,89 (C-19), 20,4/2,14 (C-28), incluindo a metila dubleto em $\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$ 13,9/0,97 (C-21).

A diferença foi inferida aos anéis A e B, na qual foi observado sinais para três carbonos oximetínicos em $\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$ 74,7/4,58 (C-3), 78,8/4,38 (C-4) e 78,0/4,57 (C-6), um sinal para carbono não hidrogenado oxigenado em δ_{C} 77,3 (C-5) e um carbono metilênico em $\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$ 42,9/2,95, em acordo com o espectro APT (FIGURA 41).

Os sistemas Δ^2 -1-ceto e 4β -hidroxi- $5\beta,6\beta$ -epoxi são comuns em vitanolídeos, no entanto, o carbono β à carbonila (C-3) pode sofrer adição de Michael, e embora raro, é formado um anel de cinco membros pela adição intramolecular e abertura do epóxido em C-5/C-6, formando um novo epóxido em C-3/C-6 α -orientado (DINAN et al, 2001).

Com base na estrutura proposta para **AV23** e no levantamento bibliográfico, esse composto se trata do (20*S*,22*R*)- $3\alpha,6\alpha$ -epoxi- $4\beta,5\beta,27$ -trihidroxi-1-oxivita-24-enólídeo, previamente isolado das folhas de *Withania somnifera* (ZHAO et al, 2002), cujo dados de RMN de ^{13}C estão descritos na Tabela 14. Adicionalmente, esse composto apresentou atividade significativa no crescimento de neuritos, fornecendo novas estratégias para o desenvolvimento de medicamentos que previnem, tratam e curam de doenças neurodegenerativas como Alzheimer e Parkinson (ZHAO et al, 2002; VERMA; PATEL; CHANDRA, 2021).

Figura 46- Estrutura do **AV23**



(20*S*,22*R*)- $3\alpha,6\alpha$ -Epoxi- $4\beta,5\beta,27$ -trihidroxi-1-oxivita-24-enólídeo

Tabela 14- Análise comparativa dos deslocamentos químico de RMN de ^{13}C e ^1H de **AV23** com os do vitanolídeo (20*S*,22*R*)-3 α ,6 α -epoxi-4 β ,5 β ,27-trihidroxi-1-oxivita-24-enolídeo (ZHAO et al, 2002).

		AV23 (Py- <i>d</i> ₅)		(20 <i>S</i> ,22 <i>R</i>)-3 α ,6 α -Epoxi-4 β ,5 β ,27-trihidroxi-1-oxivita-24-enolídeo (Py- <i>d</i> ₅)	
		δ_{C}	δ_{H} multiplicidade (J/Hz)		δ_{C}
1	CH	210,4	-		210,1
2	CH ₂	42,9	2,95 dd (10,7, 3,0)		42,5
3	CH	74,7	4,58 m		74,2
4	CH	78,8	4,38 m		77,9
5	C	77,3	-		76,9
6	CH	78,0	4,57 m		77,6
7	CH ₂	33,3	2,25 m / 1,44 m		32,9
8	CH	31,8	1,96 m		31,3
9	CH	41,7	1,85 m		41,1
10	C	55,7	-		55,3
11	CH ₂	21,9	1,81 m / 1,03 m		21,5
12	CH ₂	40,0	1,0 m		39,6
13	C	43,1	-		42,7
14	CH	58,4	0,89 m		58,0
15	CH ₂	24,7	1,52 m		24,3
16	CH ₂	27,7	1,49 m / 1,11 m		27,3
17	CH	52,1	0,99 m		51,7
18	CH ₃	12,1	0,58 s		11,6
19	CH ₃	16,6	1,89 s		16,0
20	CH	39,4	1,89 s		39,0
21	CH ₃	13,9	0,97 d (6,4)		13,4
22	CH	78,4	4,90 d (6,4)		78,4
23	CH ₂	30,3	2,35 m / 2,03 m		29,9
24	C	154,7	-		154,1
25	C	127,8	-		127,2
26	C	166,9	-		166,4
27	CH ₂	56,5	4,87 d (11,7) / 4,76 d (11,7)		56,1
28	CH ₃	20,4	2,14 s		20,0

Figura 47- Espectro de RMN de ^1H (500 MHz) de AV23, em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$.

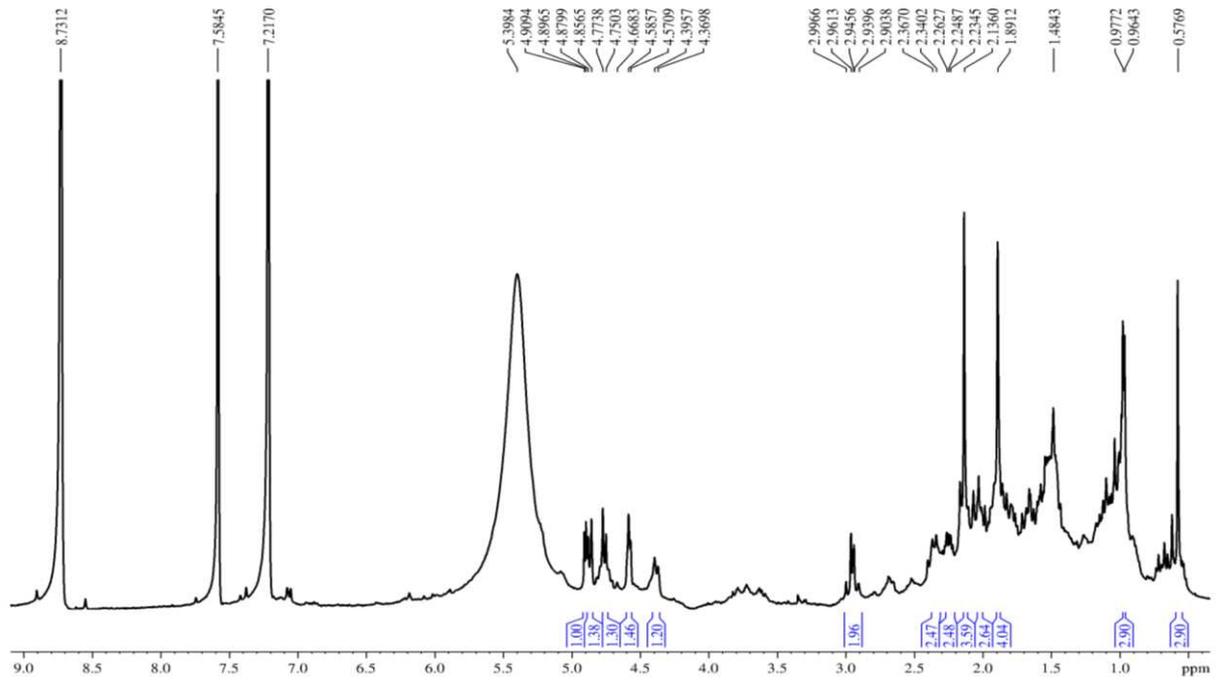


Figura 48- Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz) de AV23, em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$.

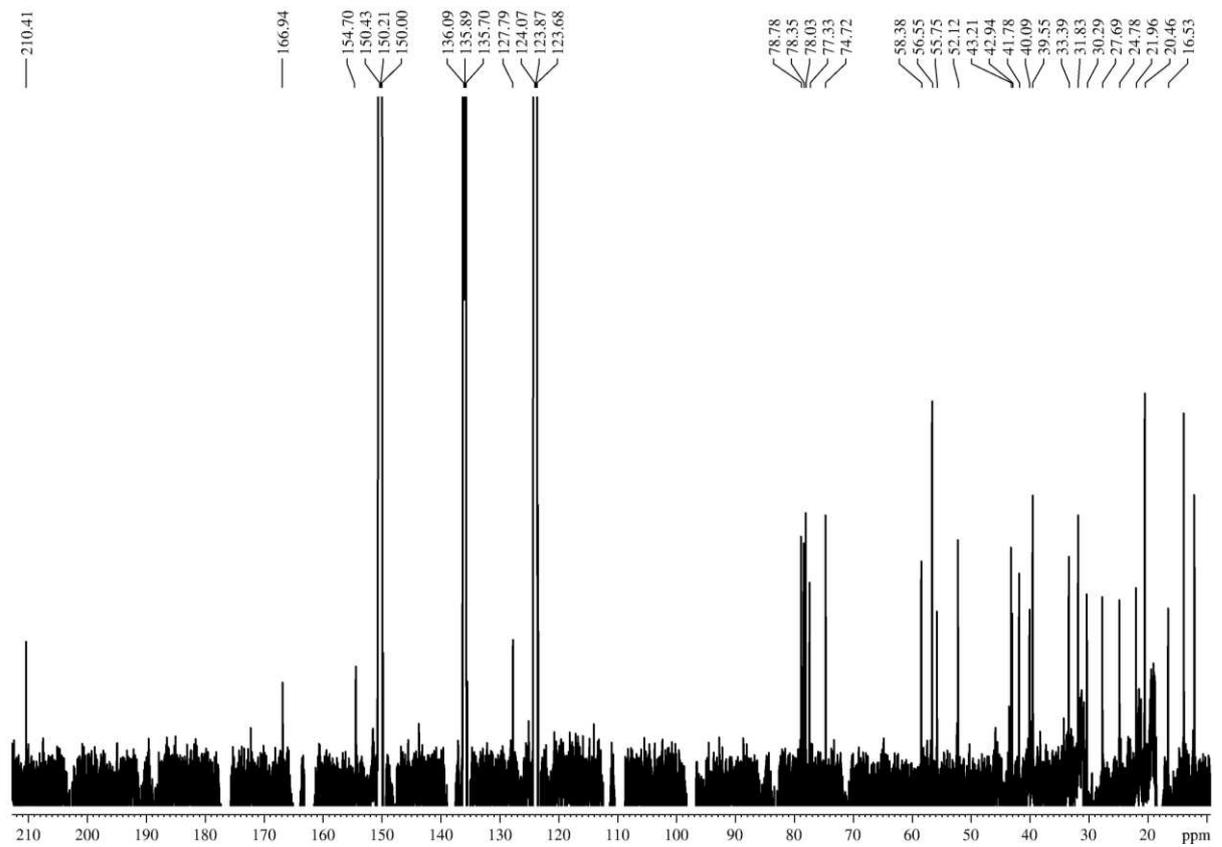
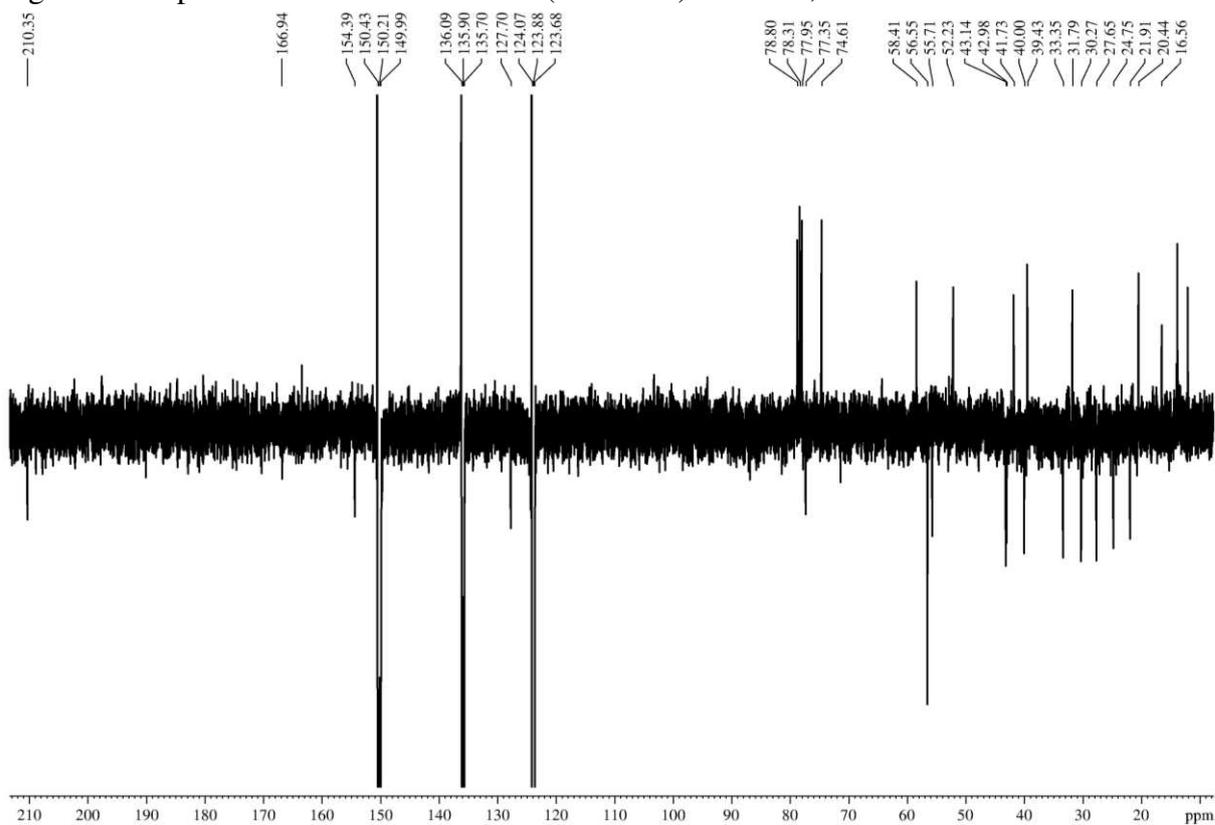


Figura 49- Espectro de RMN de ^{13}C -APT (125 MHz) de **AV23**, em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$.



4.1.6 Determinação estrutural de AV24

A estrutura do composto **AV24** (item 3.12, pag. 28) foi caracterizada com base nas análises dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C (FIGURAS 44 e 45), bem como na comparação com os dados de RMN descritos na literatura para compostos semelhantes obtendo o espectro de massas de EMAR m/z 475,3030 $[\text{M}+\text{H}]^+$ com massa calculada para $\text{C}_{28}\text{H}_{43}\text{O}_6$: 475,3054.

Os dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **AV24**, mostraram-se semelhantes àqueles descritos para o composto **AV22**, conhecido na literatura como pubesenolideo (SAHAI et al., 1985; YANG et al., 2016).

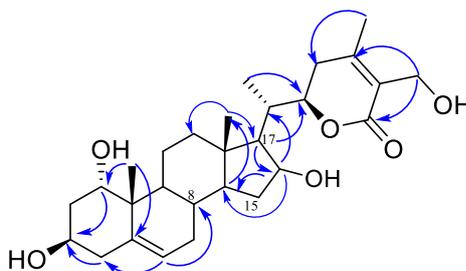
Conforme apresentado na Tabela 15, as diferenças entre o pubesenolideo (**AV22**) e **AV24** estão relacionadas às variações nos deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C nos quatro carbonos do anel D (C-14 a C-17). O valor do deslocamento químico em δ_{C} 76,1 denota a presença de um carbono hidroxilado em um destes carbonos.

As correlações no espectro HMBC (FIGURA 46) de δ_{H} 4,17 (H-16) com o carbono em δ_{C} 54,6 (C-14) são consistentes com a presença de um grupo hidroxila em C-16, o que justifica a desproteção de C-15 ($\Delta\delta_{\text{C}}$ +14,1) e C-17 ($\Delta\delta_{\text{C}}$ +10,3) pelo efeito β e a proteção de C-14 ($\Delta\delta_{\text{C}}$ -1,7) pelo efeito γ .

Uma evidência quanto á orientação do grupo OH-16, refere-se ao valor do deslocamento químico do carbono em δ_C 71,2 para a β -orientação (WIJERATNE et al., 2018) e δ_C 76,5 para a α -orientação (NICOLÁS et al., 2015). Com base nessas informações a hidroxila em C-16 encontra-se α -orientada. Outra evidência da α -orientação da hidroxila em C-16 é a blindagem de C-20 pelo efeito γ -gauche, que para a orientação α é $\Delta\delta_C \sim -1$ e para a orientação β é $\Delta\delta_C -5,2$ (WIJERATNE et al., 2018; NICOLÁS et al., 2015), para o composto **AV24** foi de $\Delta\delta_C -0,6$.

A estereoquímica relativa de **AV24** foi determinada com base na análise do espectro NOESY (FIGURA 47), o qual mostrou correlação de δ_H 1,14 (H₃-19) com δ_H 4,14 (H-1), indicando a α -orientação do grupo hidroxila em C-1.

Figura 50- Principais correlações observadas no espectro HMBC de **AV24**



Apoiado nas análises dos espectros de RMN e comparação com os dados espectrais do composto pubesenolideo (**AV22**), conclui-se que **AV24** se trata do 16 α -hidroxipubesenolideo, um composto cuja estrutura está sendo descrita pela primeira vez.

Figura 51- Estrutura do vitanolídeo **AV24**

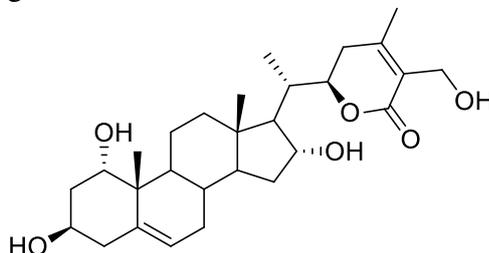


Tabela 15- Análise comparativa dos valores de deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C e ^1H de AV24 e do vitanolídeo pubesenolideo (SAHAI, 1985).

		AV24 (Py- d_5)		Pubesenolideo (CDCl $_3$)
		δ_{C}	δ_{H} multiplicidade (J/Hz)	δ_{C}
1	CH	72,9	4,14 m	72,8
2	CH $_2$	40,6	2,62 / 2,19	38,3
3	CH	66,4	4,73	66,1
4	CH $_2$	43,6	2,78 d (2,79)	41,4
5	C	140,6	-	137,8
6	CH	123,5	5,60 d (5,61)	125,6
7	CH $_2$	32,7	1,97 / 1,72	31,9
8	CH	32,1	1,54	31,4
9	CH	42,0	2,30	41,5
10	C	42,5	-	41,5
11	CH $_2$	20,7	1,77 / 1,47	22,4
12	CH $_2$	40,3	1,93 / 1,30	39,6
13	C	44,4	-	42,8
14	CH	54,6	1,64	56,3
15	CH $_2$	38,2	2,19	24,5
16	CH	76,1	4,17 m	27,4
17	CH	62,3	1,36	52,0
18	CH $_3$	13,6	0,72	11,8
19	CH $_3$	20,2	1,14	15,5
20	CH	38,6	1,84 / 1,71	38,8
21	CH $_3$	14,2	1,04	13,5
22	CH	79,5	5,10 m	78,7
23	CH $_2$	30,6	2,68 dd (2,70/ 12,0) 2,37 m	29,8
24	C	155,1	-	154,0
25	C	127,5	-	124,9
26	C	167,2	-	167,2
27	CH $_2$	56,5	4,80 d (4,76) 4,72 d (4,76)	56,9
28	CH $_3$	20,4	2,00	20,2

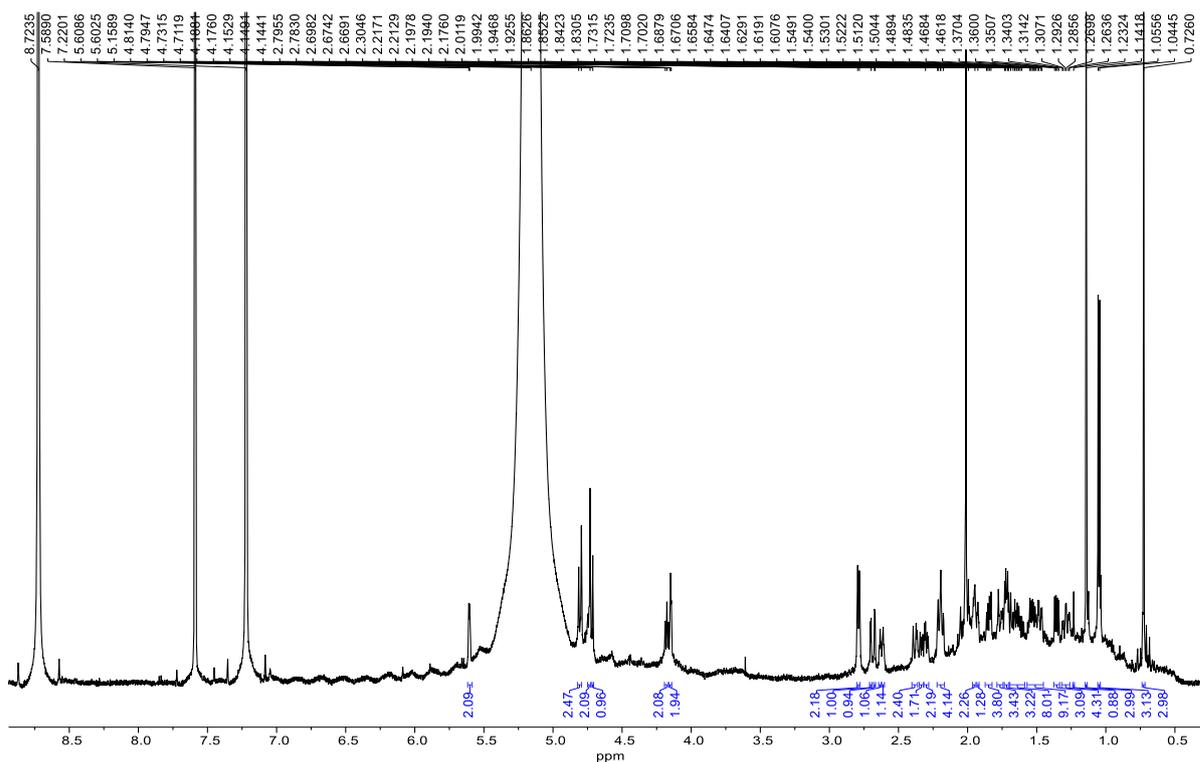
Figura 52- Espectro de RMN de ^1H (600 MHz) de AV24, em C $_5\text{D}_5\text{N}$.

Figura 53- Espectro de RMN de ^{13}C (150 MHz) de **AV24**, em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$.

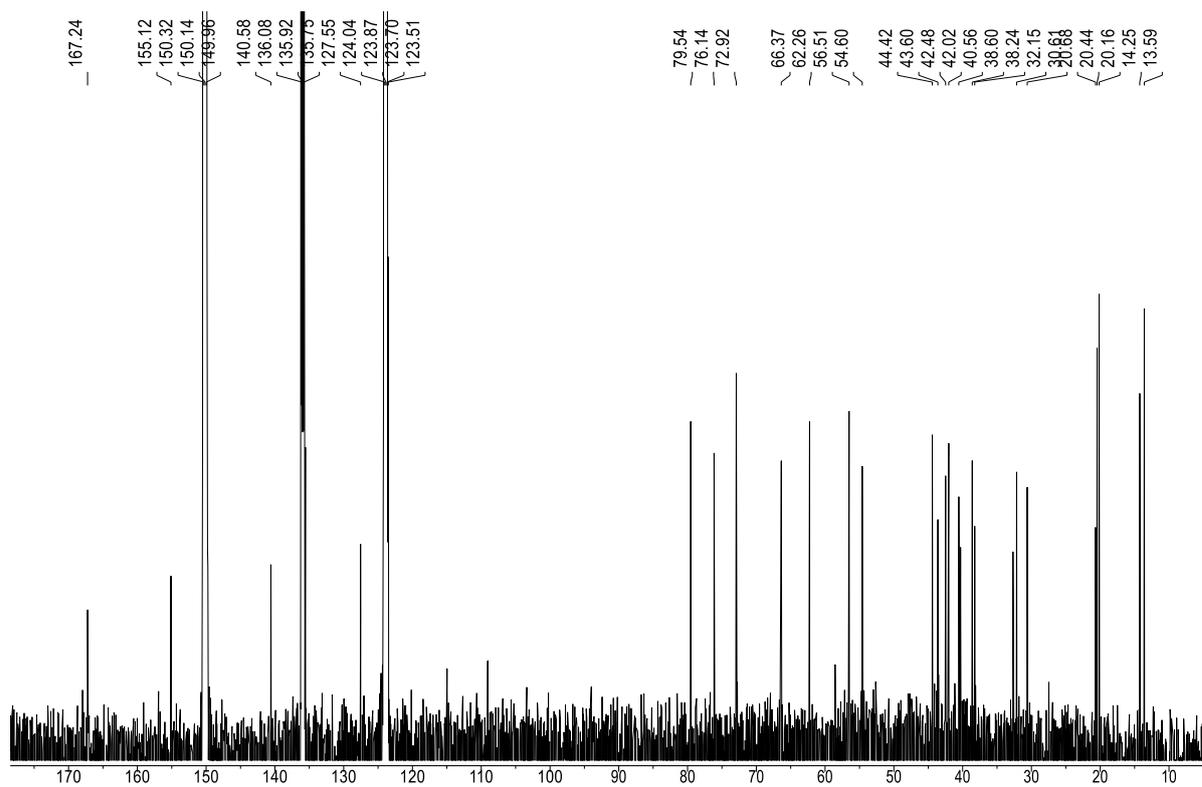


Figura 54- Espectro de correlação quântica múltipla heteronuclear (HSQC) de **AV24**, em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$.

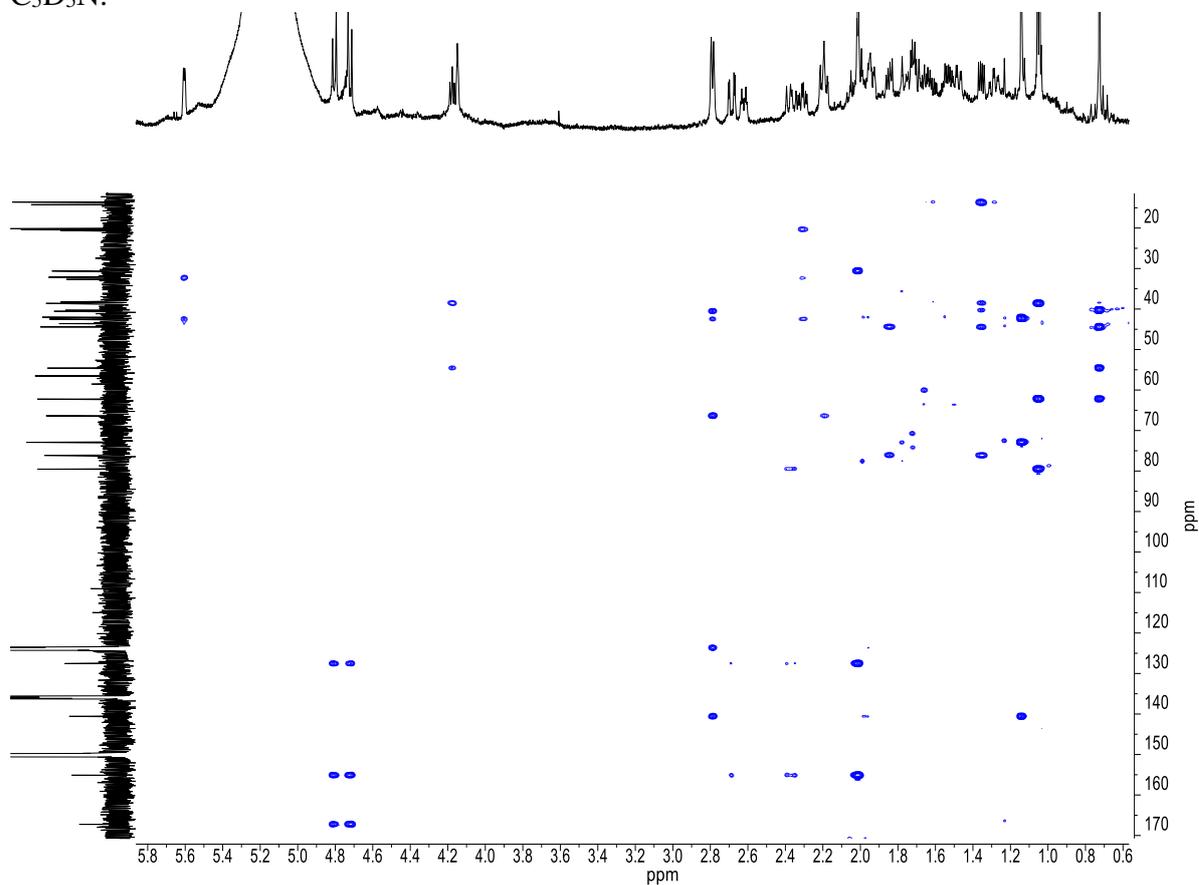
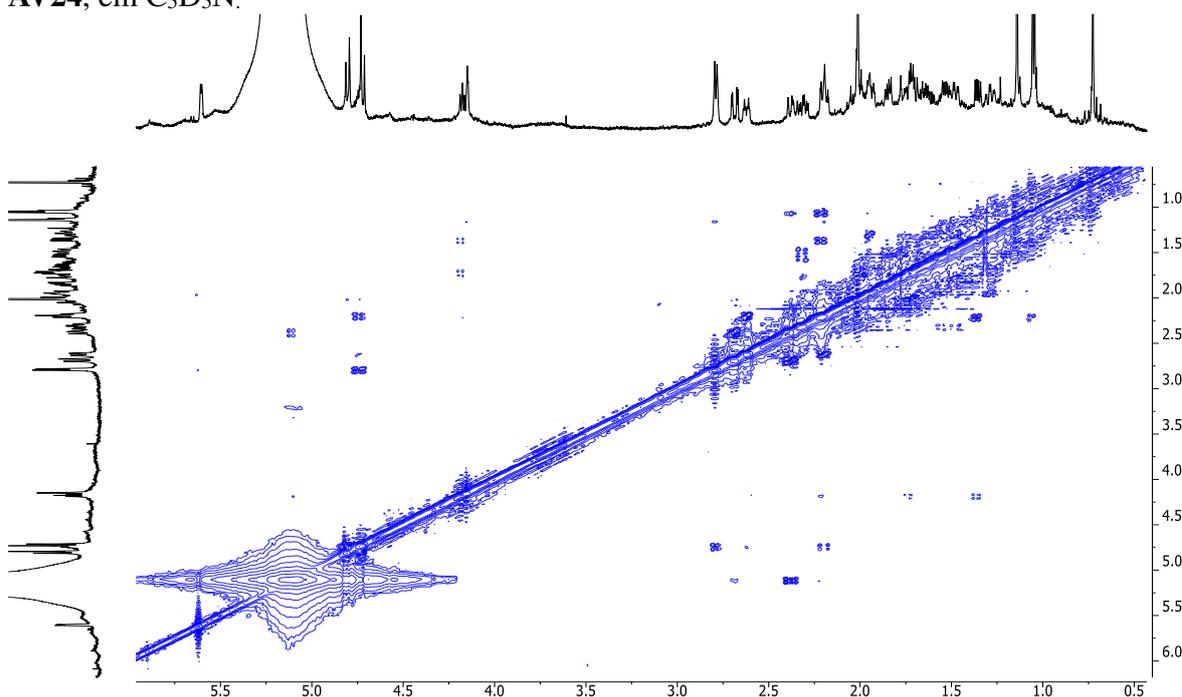


Figura 55- Espectro bidimensional de correlação dipolar (^1H , ^1H) (NOESY) (600 MHz) de AV24, em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$.

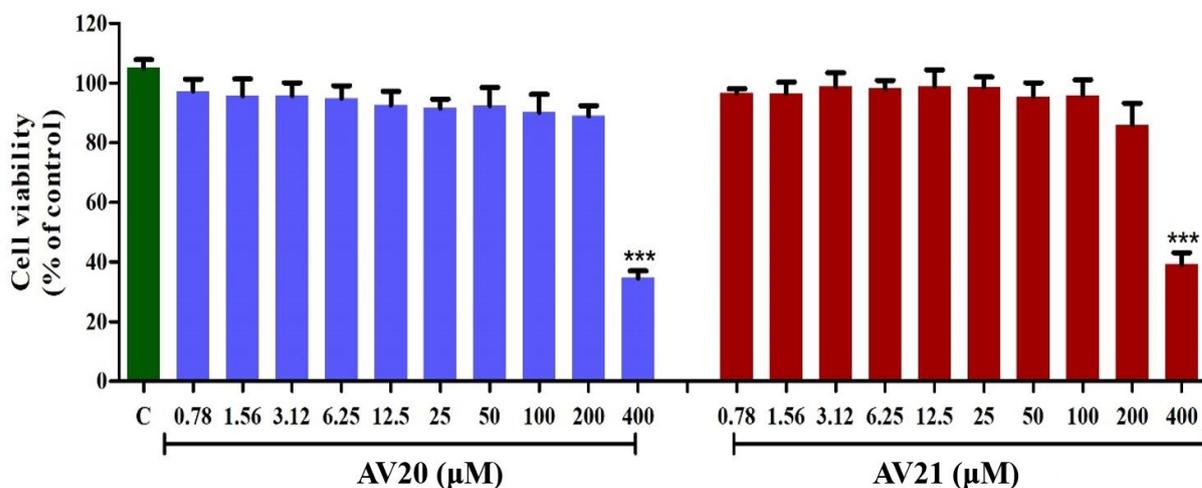


4.2 Atividade Anti-inflamatória

Estudos de relação estruturas e atividades demonstram que certos critérios estruturais são necessários para que um vitanolídeo exiba atividade citotóxica relevante como a combinação da ciclohexanona α,β -conjugada contendo um grupo hidroxila em C-4 e um epóxido em C-5/C-6 (BATISTA, et al., 2016; LEM, et al., 2022; YANG, et al., 2016). Deste modo, a ausência dessas funcionalidades nos levou a testar a atividade anti-inflamatória dos vitanolídeos glicosilados AV20 e AV21 que foram os principais compostos isolados neste estudo.

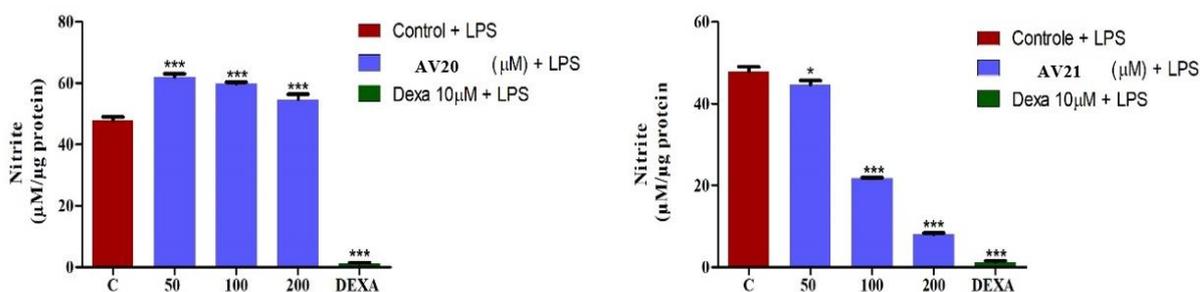
Os vitanolídeos glicosilados AV20 e AV21, em concentrações variando de 0,78 a 200 μM , não reduziram a viabilidade das células Raw 264,7. Curiosamente, o composto AV20 aumentou a produção de nitrito em 29,5%, 24,6% e 14,3% em concentrações de 50, 100 e 200 μM , respectivamente, em células RAW 264.7 estimuladas por LPS. Em contraste, o composto AV21 exibiu uma redução dependente da dose na produção de nitrito, diminuindo-a em 6,8%, 54,7% e 83,4% nas mesmas concentrações, demonstrando atividade anti-inflamatória. A diferença na atividade biológica desses vitanolídeos pode ser parcialmente atribuída a variações em suas estruturas químicas; no entanto, estudos mais aprofundados são necessários para confirmar essa hipótese.

Figura 56- Efeitos dos compostos AV20 e AV21 na viabilidade de células de macrófagos RAW264.7.



Os dados foram expressos como média \pm DP e representaram a porcentagem de viabilidade celular em relação ao controle (C) (ANOVA, seguido pelo teste de Tukey). Controle (0,5% DMSO em DMEM). * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$ vs. grupo controle

Figura 57- Efeitos dos compostos AV20 e AV21 nos níveis de nitrito em células RAW264.7 estimuladas por LPS.



Os valores representam a média \pm DP dos níveis de nitrito em células RAW264.7 tratadas com os compostos 1 e 2 (50, 100 e 200 µM) e estimuladas com LPS (1 µg/mL). Controle (C, 0,5% DMSO em DMEM). Dexametasona (Dexa, 10 µM/mL). * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$ vs. grupo controle.

5 CONCLUSÃO

Athenaea velutina faz parte de um pequeno gênero da família Solanaceae ainda pouco investigado do ponto de vista químico. Na verdade, *A. velutina* já foi objeto de estudo de uma tese de doutorado (Almeida et al., 2020; Dantas Rocha et al., 2022). Neste estudo prévio, foi investigado o extrato hexano/acetato de etila 1:1 das folhas de exemplares da espécie mencionada o qual resultou no isolamento de série de vitanolídeos (FIGURA 2. pag. 11), incluindo vitajardins.

No presente estudo, no qual foi investigado o extrato etanólico, foram isolados vitanolídeos polioxigenados, incluindo três deles ainda não registrados na literatura. Entre os novos compostos, dois foram vitanolídeos glicosilados, os quais foram os isolados em maiores quantidades. Com isto, conclui que *A. velutina* é uma fonte importante desta grande classe, haja vista que no total foram isoladas **24** vitanolídeos, abrangendo tanto compostos de baixa polaridade como de alta polaridade.

Vale destacar que a opção por solventes não nucleofílicos foi fundamental para evitar a formação de artefatos, pois, devido o alto grau de funções oxigenadas com centros eletrofílicos, os vitanolídeos são altamente reativos.

Como resultado da experiência do grupo no isolamento destes compostos, sabe-se de antemão, os critérios estruturais para a atividade citotóxica, uma das atividades mais investigadas para estes compostos como mencionado o 4β -OH, Δ^2 , 1-oxo em seu anel A, $5\beta,6\beta$ -epoxi no anel B, e a δ -lactona em sua cadeia lateral. Como os vitanolídeos glicosilados além de serem inéditos não apresentavam as características essenciais para conferir alta toxicidade, optou-se por avaliar a atividade anti-inflamatória. Os resultados foram interessantes, haja vista que apenas um dos compostos (**AV21**) exibiu atividade anti-inflamatória, enquanto o vitajardín (**AV20**) mostrou indícios de ser pro-inflamatório. Outro ponto que merece destaque, ao comparar **AV22** com seu análogo não glicosilados **AV7**, este mostrou efeito anti-inflamatório.

Estudos em colaboração, onde está sendo dado continuidade aos estudos de inflamação, bem como outros tipos de atividades para os compostos isolados de *A. velutina*, estão em curso.

REFERENCIAS

- AKHTAR, N. *et al.* Cloning and functional characterization of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene from *Withania somnifera*: an important medicinal plant. **Protoplasma**, v. 250, p. 613–622. 2013. <https://doi.org/10.1007/s00709-012-0450-2>
- ALMAQBALI, R. K. *et al.* Antidepressant-like activity of methanolic extract of *withania qaraitica* in mice. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 15, n. 2, p. 25-30, 2023. <https://doi.org/10.22159/ijpps.2023v15i2.46788>
- ALMEIDA, A. A. *et al.* Screening of plants from the Brazilian atlantic forest led to the identification of *Athenaea velutina* (Solanaceae) as a novel source of antimetastatic agents. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 101, n. 3-4, p. 1–16, 2020. <https://doi.org/10.1111/iep.12351>
- ALMEIDA, A. A. *et al.* Withalutin, a new cytotoxic withanolide from *Athenaea velutina* (Sendtn.) D'Arcy, **Natural Product Research**, v. 36, n. 24, p. 1-16, 2022. <https://doi.org/10.1080/14786419.2022.2039135>
- ALMEIDA-LAFETÁ, R. C. *et al.* Withanolides from *Aureliana fasciculata* var. *fasciculata*. **Helvetica Chimica Acta**, v. 93, n. 12, p. 2478–2487, 2010. <https://doi.org/10.1002/hlca.201000126>
- ALVES, P. A. *et al.* Withanolides of *Athenaea velutina* with potential inhibitory properties against SARS coronavirus main protease (mpro): molecular modeling studies. **Journal of Biomolecular Structure & Dynamics**, v. 41, n. 21, p. 12267–12275, 2023. <https://doi.org/10.1080/07391102.2023.2167863>
- ASCHER, K. R. S. *et al.* Withanolides and related ergostane-type steroids as antifeedants for larvae of *Epilachna varivestis* (Coleoptera: Chrysomelidae). **Phytoparasitica**, v. 9, p. 197–205, 1981. <https://doi.org/10.1007/BF03158579>
- BATISTA, P.H. *et al.* Withanolides from leaves of cultivated *Acnistus arborescens*. **Phytochemistry**, v. 130 p. 321–327, (2016). <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2016.07.003>
- BRANDÃO FILHO, J.U.T. *et al.* Solanáceas. In: BRANDÃO FILHO, J.U.T., *et al.*, comps. **Hortaliças-fruto** [online]. Maringá: EDUEM, p. 37-70, 2018. ISBN: 978-65-86383-01-0. <https://doi.org/10.7476/9786586383010.0004>.
- BATIHA, G. E., *et al.* Biological properties, bioactive constituents, and pharmacokinetics of some *capsicum* spp. and capsaicinoids. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21 n. 15 p. 5179, 2020. <https://doi.org/10.3390/ijms21155179>
- BHADANI, R. V. *et al.* Metabolomics of extracellular compounds and parasitic enzymes of *Beauveria bassiana* associated with biological control of whiteflies (*Bemisia tabaci*). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 176, n. 104877, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2021.104877>

- CARDONA, D. *et al.* Leishmanicidal activity of withajardins and acnistins. An experimental and computational study. **Tetrahedron**, v. 62, p. 6822-6829, 2006
<https://doi.org/10.1016/j.tet.2006.04.101>
- CASTRO, S. J. *et al.* Selective antiproliferative withanolides from species in the genera *Eriolarynx* and *Deprea*. **Journal of Natural Products**, v. 82, n. 5, p. 1338–1344. 2019.
<https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b00117>
- CHAURASIYA, N. D. *et al.* Withanolide biosynthesis recruits both mevalonate and DOXP pathways of isoprenogenesis in ashwagandha *Withania somnifera* L. (Dunal). **Plant Cell Reports**, v. 31, p. 1889–1897, 2012. <https://doi.org/10.1007/s00299-012-1302-4>
- CHEN, L-X.; HE, H.; QIU, F. Natural withanolides: an overview. **Natural Product Reports**, v. 28, n. 4, p. 705–740, 2011. <https://doi.org/10.1039/c0np00045k>
- CONTA, A. G.; ALBONICO, S. M.; JULIANI, H. R. Isolation of withaferine from some Argentinian species of *Acnistus* and *Dunalia*. **Anales de la Asociacion Quimica Argentina**, v. 59, n. 5, p. 373-375, 1971.
- DENG, J. *et al.* Anti-inflammatory steroids from the stems of *Solanum nigrum* L. **Phytochemistry**, v. 210, n. 113667, 2023.
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2023.113667>
- DINAN, L. *et al.* Assessment of natural products in the *Drosophila melanogaster* B_{II} cell bioassay for ecdysteroid agonist and antagonist activities. **Cellular and Molecular Life Sciences**. v. 58, p. 321-342, 2001. <https://doi.org/10.1007/PL00000859>
- DOM, M.; BERGHE, W. V.; OSTADE, X. V. Broad-spectrum antitumor properties of withaferin A: a proteomic perspective. **RSC Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 30–50, 2020.
<https://doi.org/10.1039/c9md00296k>
- ECHEVERRI, F. *et al.* Structure of withajardin B. **Spectroscopy**, v. 7, p. 345-51, 1989
- ECHEVERRI, F. *et al.* Withajardines: structure and activity. **Revista Boliviana de Química**. v. 10, p. 21-3, 1991.
- ECHEVERRI, F. *et al.* Withajardin: a new type of withanolides. **Spectroscopy**, v. 6, n. 3-4, p. 137-46, 1988.
- ELLIGER, C. A. *et al.* Petuniasterone N, an unusual ergostanoid from *Petunia* species. **Journal of Natural Products**, v. 52, n. 3, p. 576-580, 1989.
<https://doi.org/10.1021/np50063a017>
- GARCÍA, M. E. *et al.* Antiproliferative activity of withanolide derivatives from *Jaborosa cabreræ* and *Jaborosa reflexa*. Chemotaxonomic considerations. **Phytochemistry**, v. 76, p. 150-157, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.12.018>
- GIRME, A. *et al.* Investigating 11 withanosides and withanolides by UHPLC-PDA and mass fragmentation studies from Ashwagandha (*Withania somnifera*). **ACS Omega**, v. 5, n. 43, p. 27933–27943, 2020. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c03266>

GONZÁLEZ, U., *et al.* Withanolides from *Datura ceratocaula* and *Datura discolor* and their acetylcholinesterase inhibitory activity. **Fitoterapia**, v. 170, n. 105655, 2023.
<https://doi.org/10.1016/j.fitote.2023.105655>

GRIESS, J.P. V. On new nitrogenous derivatives of the phenyl-and benzoyl-series. **Proceedings of Royal Society of London**, v. 9 p. 594–597, 1859.
<https://doi.org/10.1098/rspl.1857.0113>

GU, X. Y. *et al.* Bioactive steroidal alkaloids from the fruits of *Solanum nigrum*. **Phytochemistry**, v. 147, p. 125–131, 2018.
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2017.12.020>

GUPTA, P. *et al.* De novo assembly, functional annotation and comparative analysis of *Withania somnifera* leaf and root transcriptomes to identify putative genes involved in the withanolides biosynthesis. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, e62714, 2013.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062714>

GUTIÉRREZ N. F. *et al.* Withanolides with antibacterial activity from *Nicandra john-tyleriana*. **Journal of natural products**, v. 78 n. 2, p. 250–257, (2015).
<https://doi.org/10.1021/np500824f>

HA, J. W. *et al.* Structural characterization of withanolide glycosides from the roots of *Withania somnifera* and their potential biological activities. **Plants**, v. 11 n. 6 p. 767, 2022.
<https://doi.org/10.3390/plants11060767>

HABTEMARIAM S. Cytotoxicity and immunosuppressive activity of withanolides from *Discopodium penninervium*. **Planta Medica**, v. 63, n. 1, p. 15–17, 1997.
<https://doi.org/10.1055/s-2006-957594>

HAHM, E. R. *et al.* A comprehensive review and perspective on anticancer mechanisms of Withaferin a in breast cancer. **Cancer Prevention Research**, v. 13 n. 9 p. 721–734, 2020.
<https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-20-0259>

HASSAN, S. H. *et al.* Alpha Solanine: A novel natural bioactive molecule with anticancer effects in multiple human malignancies. **Nutrition and Cancer**, v. 73, n. 9, p. 1541–1552, 2021. <https://doi.org/10.1080/01635581.2020.1803932>

HUANG, M. *et al.* Withanolides from the genus *Physalis*: a review on their phytochemical and pharmacological aspects. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 72, n. 5, p. 649–669, 2020. <https://doi.org/10.1111/jphp.13209>

JAN, S. *et al.* Unleashed Treasures of Solanaceae: mechanistic insights into phytochemicals with therapeutic potential for combatting human diseases. **Plants**, v. 13, n. 5, p. 724, 2024.
<https://doi.org/10.3390/plants13050724>

KIYOTA, N. *et al.* New C28 Steroidal glycosides from *Tubocapsicum anomalum*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 56, n. 7, p. 1038–1040, 2008.
<https://doi.org/10.1248/cpb.56.1038>

KSEBATI, MO. B.; SCHMITZ, F. J. Minabeolides: a group of withanolides from a soft coral, *Minabea* sp. **Journal of Organic Chemistry**, v. 53, n. 17, p. 3926-3929, 1988. <https://doi.org/10.1021/jo00252a008>

KUMAR, S.; BOUIC, P. J.; ROSENKRANZ, B. Investigation of CYP2B6, 3A4 and β -esterase interactions of *Withania somnifera* (L.) dunal in human liver microsomes and HepG2 cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 270, n. 113766, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113766>

LAVIE, D. *et al.* Trechonolide A, a new withanolide type from *Trechonaetes laciniata*. **Phytochemistry**, v. 26, n. 6, 1987. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)82290-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)82290-6)

LEE, B. S. *et al.* Withasomniferol D, a new anti-adipogenic withanolide from the roots of Ashwagandha (*Withania somnifera*). **Pharmaceuticals**, v. 14, n. 10, 1017, 2021. <https://doi.org/10.3390/ph14101017>

LEM, F.F. *et al.* Withanolides, the hidden gem in *Physalis minima*: A mini review on their anti-inflammatory, anti-neuroinflammatory and anti-cancer effects. **Food Chemistry**, v. 377, n. 132002, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.132002>

LLANOS, G. G. *et al.* Structure-based design, synthesis, and biological evaluation of withaferin A-analogues as potent apoptotic inducers. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 140, p. 52–64, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.09.004>

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil Nativas e Exóticas**. São Paulo: Instituto plantarum de estudos da flora Ltda, 2ª Ed., 544 p. 2008.

LOWRY, O. H. *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193 p. 265–275, 1951.

LUIS, J. G.; ECHEVERRI, F.; GONZÁLEZ, A. G. Acnistins C and D, withanolides from *Dunalia solanácea*. **Phytochemistry**, v. 36, n. 5, p. 1297-1301, 1994. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)89655-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)89655-7)

MA, L. *et al.* Daturametelins H, I, and J: three new withanolide glycosides from *Datura metel* L. **Chemistry & biodiversity**, v. 3 n. 2 p. 180–186, 2006. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200690021>

MANICKAM, M.; RAY, A. B. Withasteroids. 29. Structure of withatatulins E, a minor withanolide of *Datura tatula*. **Indian Journal of Chemistry**, v. 35B n. 12, p. 1311-1313, 1996.

MISICO, R. I. *et al.* Withanolides and related steroids. **Progress in the Chemistry of Organic Natural Products**, v. 94, p. 128–229, 2011. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-0748-5_3

MONADI, T. *et al.* A Comprehensive review on the ethnopharmacology, phytochemistry, pharmacology, and toxicology of the *Mandragora* genus; from folk medicine to modern medicine. **Current Pharmaceutical Design**, v. 27, n. 34, p. 3609–3637, 2021. <https://doi.org/10.2174/1381612827666210203143445>

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, **Journal of immunological methods**, v. 65 n. 1-2 p. 55–63, 1983. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)

NICOLÁS, F. G. *et al.* Withanolides from the genus *Exodeconus* (Solanaceae). Chemotaxonomical considerations. **Steroids**, v. 162, n. 108700, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2020.108700>

NICOLÁS, F. G. *et al.* Withanolides with antibacterial activity from *Nicandra john-tyleriana*. **Journal of Natural Products**, v. 78 n. 2 p. 250–257, 2015. <https://doi.org/10.1021/np500824f>

NICOTRA, V. E. *et al.* Withanolides with phytotoxic activity from two species of the genus *Salpichroa*: *S. organifolia* and *S. tristis* var. *lehmannii*. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 12, p. 2219–2225, 2013. <https://doi.org/10.1021/np400559p>

NITTALA, S. S.; LAVIE, D. Withanolides of *Acnistus breviflorus*, **Phytochemistry**, v. 20, n. 12, p. 2735-2739, 1981. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(81\)85277-6](https://doi.org/10.1016/0031-9422(81)85277-6)

OSHIMA, Y. *et al.* Withametelin, a hexacyclic withanolide of *Datura metel*. **Tetrahedron Letters**, v. 28, n. 18, p. 2025-2027, 1987. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)96036-2](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)96036-2)

PAVIA, D. L. *et al.* **Introduction to Spectroscopy**. 5. ed. Stamford: Cengage Learning, p. 745 2015.

PENG, J. *et al.* Structure–Activity relationships of retro-dihydrochalcones isolated from *Tacca* sp. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 12, p. 2189-2194, 2013. <https://doi.org/10.1021/np4005085>

PREET, R. *et al.* Simultaneous High-Performance Thin-Layer Chromatographic Quantification of Withaferin A and Withanolide A in *Solanum nigrum* L. “Black Nightshade”. **Journal Planar Chromatography**, v. 32, p. 339–342, 2019. <https://doi.org/10.1556/1006.2019.32.4.10>

RAHIMINIYA, A. *et al.* Medicinal Importance of *Ajuga* Species in Iran: Ethnobotanical and Traditional Applications, Phytochemical, and Pharmacological Studies. **Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products**, v. 17, n.3, e119209, 2022. <https://doi.org/10.5812/jjnpp.109209>

ROCHA, K. A. D. *et al.* Anti-inflammatory withajardins from the leaves of *Athenaea velutina*. **Phytochemistry**, v. 203 n. 113338, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2022.113338>

ROCHA, Késya Amanda Dantas, **vitanolídeos antiproliferativos e anti-inflamatórios isolados das folhas de *Athenaea velutina* (sendtn.) d’arcy – solanaceae**. Tese (Doutorado em química) - Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará-Fortaleza, 2023

RODRIGUES, I. M. C.; KNAPP, S.; STEHMANN, J. R. Two new species of *Athenaea* Sendtn. (Solanaceae) from the Atlantic forests of south-eastern Brazil. **PhytoKeys**, v. 178, p. 1–15, 2021. <https://doi.org/10.3897/phytokeys.178.64609>

SAEMA, S. *et al.* RNAi-mediated gene silencing of *WsSGTL1* in *W.somnifera* affects growth and glycosylation pattern. **Plant Signaling & Behavior**, v. 10, n. 12, 2016.
<https://doi.org/10.1080/15592324.2015.1078064>

SAHAI, M. Pubesenolide, a new withanolide from *Physalis pubescens*. **Journal of Natural Products**, v. 48, n. 3, p. 474-476, 1985. <https://doi.org/10.1021/np50039a021>

SAMPAIO, V. S. *et al.* Flora of Ceará, Brazil: *Solanum* (Solanaceae). **Rodriguésia**, v. 70, e02512017, 2019. <http://dx.doi.org/10.1590/2175-7860201970029>

SANGWAN, R. S. *et al.* Withanolide A is inherently de novo synthesized with in roots in Ashwagandha (*Withania somnifera*). **Physiologia Plantarum**, v. 133, n. 2, p. 278–287, 2008.
<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2008.01076.x>

SHAN, X. *et al.* A Novel withanolide glucoside from the rhizomes of *Dioscorea panthaica*. **Chinese Journal of Organic Chemistry**, v. 33, n. 6, p. 1349-1351, 2013.
<https://doi.org/10.6023/cjoc201301083>

SIDDIQUI, B. S. *et al.* Daturacin, a new withanolide from *Datura innoxia*. **Natural Product Research**. v. 19, n. 6, p. 619–623, 2005.
<https://doi.org/10.1080/14786410512331330620>

SILVA, E. L. *et al.* Athenolide A, a new steroidal lactone from the leaves of *Athenaea martiana* (Solanaceae) determined by means of HPLC-HR-MS-SPE-NMR Analysis. **Chemistry & biodiversity**, v. 15 n. 1, 2018.
<https://doi.org/10.1002/cbdv.201700455>

SILVA, G. W. S. *et al.* Aurelianolides from *Aureliana fasciculata* var. *fasciculata* trigger apoptosis with caspase activation in human leukemia cells. **Anticancer Research**, v. 43, n. 3, p. 1245–1253, (2023). <https://doi.org/10.21873/anticanres.16271>

SINGH, A. *et al.* Recent advances in the chemistry and therapeutic evaluation of naturally occurring and synthetic withanolides. **Molecules**, v. 27, n. 3 p. 886, 2022.
<https://doi.org/10.3390/molecules27030886>

SULEIMAN, R. K.; ZARGA, M. A.; SABRI, S. S. New withanolides from *Mandragora officinarum*: First report of withanolides from the Genus *Mandragora*. **Fitoterapia**, v. 81, n. 7, 864-868, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2010.05.013>

USUBILLAGA, A. *et al.* Steroidal lactones of *Acnistus ramiflorum* Miers. Isolation and properties of acnistins A and E. **Anales de Química**, v. 88, n. 7-8, p. 707-717, 1992.

VERAS, M. L. *et al.* Recent insights on the chemistry and pharmacology of withasteroids. *In*: GUPTA, V. K., *et al.* **Comprehensive Bioactive Natural Products**, v. 6, Studium Press LLC, U.S.A., ISBN 978-1933699561, 2010.

VERMA, S.; PATEL, C. N.; CHANDRA, M. Identification of novel inhibitors of SARS-CoV-2 main protease (M^{Pro}) from *Withania sp.* by molecular docking and molecular dynamics simulation. **Journal of Computational Chemistry**, v. 42 n. 26 p. 1861, 2021. <https://doi.org/10.1002/jcc.26717>

WANG, S-B. *et al.* Cytotoxic withanolides from the aerial parts of *Tubocapsicum anomalum*, **Bioorganic Chemistry**, v. 81, p. 396-404, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2018.08.034>

WHITE, P.T. *et al.* Natural withanolides in the treatment of chronic diseases in: S.C. Gupta, S. Prasad, B.B. Aggarwal (Eds.), *Anti-inflammatory nutraceuticals and chronic diseases, advances in experimental medicine and biology*. Springer, Berlin, v. 928 p. 329-373, 2016. https://doi.org/10.1007/978-3-319-41334-1_14

WIJERATNE, E. M. K. *et al.* Withaferin A and withanolide D analogues with dual heat-shock-inducing and cytotoxic activities: semisynthesis and biological evaluation. **Journal of Natural Products**. v. 81, p. 825–837, 2018. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.7b00918>

WORLAND, A.M. *et al.* Biosynthesis of terpene compounds using the non-model yeast *Yarrowia lipolytica*: grand challenges and a few perspectives. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 64, p. 134–140, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2020.02.020>.

WU, J. *et al.* Naturally occurring physalins from the genus *Physalis*: A review. **Phytochemistry**, v. 191, e. 112925, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2021.112925>

XU, Y-M. *et al.* 17 β -Hydroxy-18-acetoxywithanolides from aeroponically grown *Physalis crassifolia* and their potent and selective cytotoxicity for prostate cancer Cells. **Journal of Natural Products**, v. 79, p. 821–830, 2016. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00911>

YANG, B-Y., *et al.* Phytochemistry and biosynthesis of δ -lactone withanolides. **Phytochemistry Reviews**, v. 15 p. 771–797, 2016. <https://doi.org/10.1007/s11101-015-9420-6>

ZAMBERLAN, Priscilla Mena. **Estudos filogenéticos e filogeográficos nos gêneros *Athenaea sendtn.* e *Aureliana sendtn.* (solanaceae)**. 2012. Tese (Doutorado em Ciências) - Centro de Ciências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

ZHANG, H. *et al.* Antiproliferative withanolides from the Solanaceae: A structure–activity study. **Pure and Applied Chemistry**, v. 84, n. 6, p. 1353–1367, 2012. <https://doi.org/10.1351/PAC-CON-11-10-08>

ZHANG, J. F. *et al.* Withanolides from *Physalis angulata* var. *villosa* and the relative configurational revision of some known analogs. **Journal of Natural Products**, v. 87, n. 1, p. 38–49, 2024. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.3c00725>

ZHANG, Y-H. *et al.* Talasteroid, a new withanolide from the marine-derived fungus *Talaromyces stollii*. **Natural Product Research**, v. 37, n. 19, p. 3283–3289, 2023. <https://doi.org/10.1080/14786419.2022.2070747>

ZHAO, Jing. *et al.* Withanolide Derivatives from the Roots of *Withania somnifera* and Their Neurite Outgrowth Activities. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 50 n. 6 p.760—765, 2002. <https://doi.org/10.1248/cpb.50.760>

ZHOU, X. *et al.* Steroidal saponins from *Solanum nigrum*. **Journal of Natural Products**, v. 69 n. 8 p. 1158–1163, 2006. <https://doi.org/10.1021/np060091z>