



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



ANDERSON ANGEL VIEIRA PINHEIRO

**CONSTITUINTES QUÍMICOS DE *Vellozia plicata* MART.: CARACTERIZAÇÃO,
ESTUDOS *in silico* E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTI-HIV-1**

JOÃO PESSOA – PB

2020

ANDERSON ANGEL VIEIRA PINHEIRO

**CONSTITUINTES QUÍMICOS DE *Vellozia plicata* MART.: CARACTERIZAÇÃO,
ESTUDOS *in silico* E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTI-HIV-1**

Tese aprovada e apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, como requisito para obtenção do título de Doutor em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, na área de concentração: Farmacoquímica.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Marcelo Sobral da Silva

JOÃO PESSOA – PB

2020

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

P654c Pinheiro, Anderson Angel Vieira.

CONSTITUINTES QUÍMICOS DE *Vellozia plicata* MART.:
CARACTERIZAÇÃO, ESTUDOS *in silico* E AVALIAÇÃO DO
POTENCIAL ANTI-HIV-1 / Anderson Angel Vieira Pinheiro.

- João Pessoa, 2020.

290 f.

Orientação: Marcelo Sobral da Silva.

Tese (Doutorado) - UFPB/Ciências da Saúde.

1. *Vellozia plicata* Mart. 2.
3?-apigenin-8??-isocampferideo. 3. *in silico*. 4.
Atividade anti-HIV-1. 5. Velloziaceae. I. Silva,
Marcelo Sobral da. II. Título.

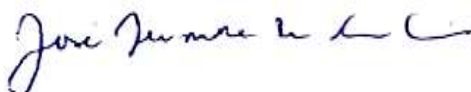
UFPB/BC

ANDERSON ANGEL VIEIRA PINHEIRO

**CONSTITUINTES QUÍMICOS DE *Vellozia plicata* MART.: CARACTERIZAÇÃO,
ESTUDOS *in silico* E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTI-HIV-1**

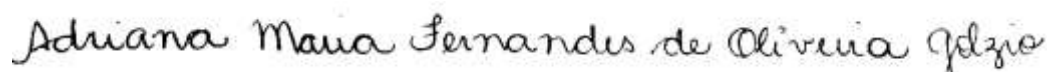
Tese aprovada em 27 de fevereiro de 2020.

Banca examinadora:



Prof. Dr. José Alixandre de Sousa Luis, UFCG

(Examinador externo à Instituição)



Prof. Dra. Adriana Maria Fernandes de Oliveira Golzio, UFPB

(Examinadora externa ao Programa)



Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho, UFPB

(Examinador interno)



Prof. Dr. Vicente Carlos de Oliveira Costa, UFPB

(Examinador interno)



Prof. Dr. Marcelo Sobral da Silva, UFPB

(Orientador)

JOÃO PESSOA – PB, 2020

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus** por se fazer presente em toda a minha caminhada, me guiar nos momentos escuros e ser sempre benevolente.

A minha avó (**Antonia Vieira**) e a minha Tia (**Tereza Vieira**) por me estimularem sempre ir à busca do conhecimento e por me formarem como pessoa honesta, paciente e resiliente.

A minha mãe, **Aurisvânia Maria**, por servir de exemplo, onde por maior que sejam as dificuldades impostas pela vida, nós podemos superá-las e vencer. Além disso, ensinar que a linguagem do olhar pode superar a distância e a saudade.

Aos irmãos **Ronaldo Segundo, Leandro Emanuel, Géssika Geanny** e Nilton Filho (*in memoriam*) pela confiança e carinho que sempre me foi ofertado.

A **Olivandro Duarte** pela motivação, confiança e companheirismo nos diversos momentos da vida.

Ao meu amigo **Jeferson Barbosa** pela família que formamos durante esta etapa de estudos como mestrandos e doutorandos, além das risadas e amizade solidificada.

Aos meus amigos **Triunfenses** e aos demais pelos estímulos e momentos únicos.

À **Joanda Paolla, Laiane Pereira** e **Sabrina Vieira** por partilharmos ideais próximos e construirmos o **Raiz de Sol**, projeto de extensão que ampliou nossas visões como estudantes/pesquisadores e pessoas.

Aos meus amigos e colegas que fiz na pós-graduação: **Alex Nóbrega, Ana Rita, Andrezza Barbosa, Arthur Gouveia, César Dantas, Daniele de Figuerêdo, Diégina Fernandes, Diego Igor, Edileuza Assis, George Dias, Gabriela Ribeiro, Jociano Lins, Jordana Silva, Juliana Medeiros, Kaio Aragão, Laisla Rangel, Lucas Abreu, Lucas Vitor, Madalena Teles, Márcio Cahino, Mayara Maia, Natália Ferreira, Natan Teles, Nikole Duran, Pedro Figueiredo, Ranna Beatris, Rawny Gouveia, Renata Barros, Rodrigo Silva, Roseane Ramos, Sallett Rocha, Thalysson Amorim, Thiago Brito e Yuri Mangueira.**

Aos funcionários **Glória, Raimundo Nonato, Evandro Ferreira, Marcelo, Socrates Golzio, Caroline Mangueira, Nilmar e Roseane e Lúcia**, por nos auxiliarem nos experimentos, secretariado e limpeza dos laboratórios.

Aos meus orientadores, **Prof. Dr. Marcelo Sobral da Silva** e o **Prof. Dr. Josean Fechine Tavares** pela confiança, paciência e disponibilidade ao me orientar nesse período e, parabenizar pela extrema dedicação para com a Universidade e a pesquisa nesse país.

Agradecimento especial à **Prof. Dra. Luciana Scotti** pela parceria estabelecida neste trabalho e também pelo exemplo que é para todos nós.

Aos **Professores do Ensino Fundamental, Ensino Médio, Graduação (UFCG), Mestrado e Doutorado** pelas suas contribuições à minha formação acadêmica, pós-gradual e pessoal, com os seus conhecimentos e experiências.

Aos órgãos financiadores desse estudo: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (**CAPES**) - Código Financeiro 001, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**CNPq**) e ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (**INCT**) – **RENNOFITO**, meu muito obrigado!

“Somente aquele que se dispõe a fazer as coisas pequeninas, que sabe e pode, virá saber e realizar grandes coisas.”

Emmanuel por Chico Xavier

RESUMO

PINHEIRO, Anderson Angel Vieira. **Constituintes químicos de *Vellozia plicata* Mart.: caracterização, estudos *in silico* e avaliação do potencial anti-HIV-1.** 290 p. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2020.

Os produtos naturais são empregados historicamente para o tratamento de diversas ameaças à saúde e são uma fonte em potencial para a obtenção de compostos bioativos. Nessa perspectiva, foi realizado um reestudo de *Vellozia plicata* Mart. com o objetivo de isolar compostos, quantificar um marcador químico, avaliar, por meio de estudos *in silico*, a probabilidade de atividade anti-HIV de compostos isolados, bem como prever seus riscos de citotoxicidade, taxa de absorção oral, intestinal e metabolização hepática. Além disso, investigou-se a viabilidade celular e atividade anti-HIV-1 de compostos e do extrato etanólico. Nesse estudo fitoquímico foram isolados treze compostos, dentre eles a amentoflavona (9), 3', 8''-biisocampferídeo (10) e a 3'-apigenin-8''-isocampferídeo (11), sendo este último relatado pela primeira vez na literatura. O composto (9) foi proposto como marcador químico da espécie, quantificado em 106,92 µg/mg de extrato bruto de *V. plicata*, com desvio padrão inferior a 5%, conforme preconizado pela Resolução 899/2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Os biflavonoides foram preditos usando o KNIME quanto a potencial probabilidade de atividade biológica (HIV-1), a taxa de absorção oral e aos parâmetros toxicológicos de mutagenicidade e carcinogenicidade. Eles apresentaram o percentual ABS superior ao controle (36,60%) e não foram observados riscos de toxicidade dentro dos parâmetros analisados pelo software OSIRIS. As análises preditivas de permeabilidade e absorção intestinal dos três biflavonoides isolados apresentaram probabilidade > 50%. Os compostos demonstraram bons resultados MolDock Score no *docking* molecular, ocorrendo melhor interação entre o composto (9) com a *protease*, e o (10) com a *integrase* e *transcriptase reversa*. Os três compostos tiveram suas estruturas preditas após metabolização hepática, indicando que a via metabólica no fígado para (9) se daria pela hidroxilação aromática das enzimas do citocromo P450, já nos compostos (10) e (11) ocorre uma maior expressão de alguns grupos aromáticos e alifáticos por *O*-desalquilação, hidroxilação e carboxilação. Os compostos gerados a partir da metabolização de (9), (10) e (11) foram preditos, utilizando o OSIRIS, quanto a capacidade de mutagenicidade e carcinogenicidade, entretanto, apenas o (9) apresentou um score de 29,95%, demonstrando alto risco de mutagenicidade. Dentre os compostos testados nos estudos biológicos, o extrato etanólico de *V. plicata* (71,19%) e a amentoflavona (70,98%) apresentaram melhor viabilidade celular frente as células JLTRF – R5 não infectadas. Na avaliação do potencial anti-HIV-1 não foi observado diferença significativa entre o controle positivo (DMSO 100%), os biflavonoides e o extrato etanólico. Nessa perspectiva, este reestudo demonstrou o potencial químico de *V. plicata* e demonstrou informações farmacocinéticas preditivas dos biflavonoides que poderão auxiliar no processo de investigação e/desenvolvimento de futuros fármacos. Além disso, evidenciou a necessidade de novas investigação por outras metodologias ou utilizando outros controles positivos para avaliar o potencial anti-HIV-1.

Palavras-chave: *Vellozia plicata* Mart.; 3'-apigenin-8''-isocampferídeo; *in silico*; Atividade anti-HIV-1; Velloziaceae.

ABSTRACT

PINHEIRO, Anderson Angel Vieira. **Chemical constituents of *Vellozia plicata* Mart.: characterization, *in silico* studies and evaluation of the anti-HIV-1 potential.** 290 p. Thesis (PhD in Natural and Synthetic Bioactive Products) – Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, 2020.

Natural products have historically been used to treat a variety of health threats and are a potential source for bioactive drugs. In this perspective, a re-study of *Vellozia plicata* Mart. was carried out with the objective of isolating compounds, quantifying a chemical marker, evaluating, through studies *in silico*, with probability of anti-HIV activity of compounds, as well as predicting their risks of cytotoxicity, oral, intestinal absorption rate and hepatic metabolism. In addition, it investigated the cell viability and anti-HIV-1 activity of compounds and ethanolic extract. In this phytochemical study there were three compound compounds, among them amentoflavone (9), 3',8"-biisocampferide (10) and 3'-apigenin-8' '-isocaempferide (11), the latter being listed for the first time in literature. Compound (9) was proposed as a chemical marker of the species, quantified in 106.92 µg/mg of crude extract of *V. plicata*, with a standard deviation of less than 5%, as recommended by Resolution 899/2003 of the National Health Surveillance Agency. Biflavonoids were predicted using KNIME for the potential probability of biological activity (HIV-1), an oral absorption index and the toxicological parameters of mutagenicity and carcinogenicity. They described the ABS percentage higher than the control (36.60%) and no toxicity risks were observed within the parameters analyzed by the OSIRIS software. Predictive estimates of intestinal permeability and absorption of the three biflavonoids are >50% probable. The compounds demonstrated good MolDock Score results in molecular docking, with a better interaction between compound (9) with a *protease* and (10) with an *integrase* and *reverse transcriptase*. The three compounds had their structures predicted after hepatic metabolism, which include metabolic pathway in the liver to (9), if aromatic hydroxylation of cytochrome P450 enzymes has already been performed (10) and (11) greater expression of some groups has occurred aromatic and aliphatic by *O*-desalination, hydroxylation and carboxylation. The compounds generated from the metabolization of (9), (10) and (11) were predicted, using OSIRIS, regarding the mutagenicity and carcinogenicity capacity, however, only (9) presented a score of 29.95%, demonstrating high risk of mutagenicity. Among the compounds tested in biological studies, ethanol extract of *V. plicata* (71.19%) and amentoflavone (70.98%) found better cell viability compared to uninfected JLTRF - R5 cells. In assessing the anti-HIV-1 potential, no significant difference was observed between the positive control (100% DMSO), biflavonoids and ethanolic extract. In this perspective, this study demonstrates the chemical potential of *V. plicata* and demonstrates predictive pharmacokinetic information for biflavonoids that may assist in the process of investigation and / or development of future drugs. In addition, it highlighted the need for further investigations using other methodologies or the use of other positive controls to assess the anti-HIV-1 potential.

Keywords: *Vellozia plicata* Mart.; 3'-apigenin-8"-isocaempferide; *in silico*; Anti-HIV-1 activity; Velloziaceae.

LISTA DE ABREVIATURAS

3TC: Lamivudina

ABC: Abacavir

AIDS: Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APT: Attached Proton Test

ARV: Antirretrovirais

ATV: Atazanavir

AZT: Zidovudina

CCAD: *Computacional Aided-Drug Design*

CCDA: Cromatografia em Camada Delgada Analítica

CCDP: Cromatografia em Camada Delgada Preparativa

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CLMP: Cromatografia Líquida de Média Pressão

DAD: Detector de Arranjo de Diodos

DDL: Didanosina

DMAPP: Dimetilalil Difosfato

DPPH: 2,2-difenil-1-picril-hidrazil.

DRV: Daruvanir

DTG: Dolutegravir

EEB: Extrato Etanólico Bruto

EFZ: Efavirenz

EM: Espectrometria de Massas

EMAR: Espectrometria de Massas de Alta Resolução

FPP: Farnesil Difosfato

FPV: Fosamprenavir

GFP: Proteína Verde Fluorescente

GGPP: Geranilgeranil Difosfato

HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana

HMBC: Heteronuclear Multiple Bond Correlation

HMQC: Heteronuclear Multiple Quantum Correlation

HSQC: Heteronuclear Single Quantum Correlation

Hz: Hertz

IES: Ionização de Eletrospray

IN: Integrase

IPeFarM: Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos

IPP: Isopentenil Difosfato

IV: Infravermelho

J: Constante de acoplamento

LMCA: Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análises

LPV: Lipinavir

MHz: Megahertz

NADPH: Fosfato de Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina

NFV: Etravirina

NVP: Nevirapina

PF: Ponto de Fusão

PR: Protease

QSAR: *Quantitative Structure–Activity Relationship*),

RAL: Raltegravir

RMN ¹³C: Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13

RMN ¹H: Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

RNA: Ácido Ribonucleico

ROS: Espécies de Oxigênio Radical

RTV: Ritonavir

SINAN: Sistema de Informação de Agravos de Notificação

SISGEN: Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional Associado

SQV: Saquinavir

SUS: Sistema Único de Saúde

SUS: Sistema Único de Saúde

TDF: Tenofovir

TPV: Tipranavir

Tr: Tempo de Retenção

TR: Transcriptase Reversa

UV: Ultravioleta

Vp: *Vellozia plicata*

δ: Deslocamento químico em ppm

LISTA DE EQUAÇÃO

Equação 01	Taxa de absorção oral	087
-------------------	-----------------------	-----

LISTA DE FIGURAS

Fig. 01	Mapa de distribuição geográfica da família Velloziaceae pelo mundo representado em amarelo	032
Fig. 02	Organização histórica do processo de classificação da família Velloziaceae	034
Fig. 03	Substâncias isolados da família Velloziaceae	044
Fig. 04	Distribuição geográfica do gênero <i>Vellozia</i> pelo mundo representado em amarelo	053
Fig. 05	Distribuição geográfica com ocorrências confirmadas de espécies do gênero <i>Vellozia</i> pelas regiões brasileiras	054
Fig. 06	Classes de compostos isolados até 2019 do gênero <i>Vellozia</i>	055
Fig. 07	Espécie <i>Vellozia plicata</i> Mart.	056
Fig. 08	Distribuição geográfica da espécie <i>Vellozia plicata</i> pelo mundo representado em amarelo	056
Fig. 09	Processo biossintético dos flavonoides	059
Fig. 10	Origem biossintética das diferentes classes de terpenos e seus precursores	061
Fig. 11	Biossíntese dos diterpenos clerodânicos	062
Fig. 12	Biossíntese de derivados clorogênicos	063
Fig. 13	Estrutura do vírus HIV	066
Fig. 14	Representação esquemática da classificação do HIV	067
Fig. 15	Processo resumido da replicação do HIV	068
Fig. 16	Esquema geral dos alvos de drogas no tratamento do HIV	074
Fig. 17	Exemplos de compostos naturais com potencial anti-HIV	075
Fig. 18	Obtenção do EEE e partição de <i>V. plicata</i>	079
Fig. 19	Processamento cromatográfico da fase acetato de <i>V. plicata</i> (frações Vp-A1 e Vp-A3)	080
Fig. 20	Processamento cromatográfico da fase acetato de <i>V. plicata</i> (fração Vp-A2)	081
Fig. 21	Processamento cromatográfico na fase clorofórmica	082
Fig. 22	Esquema da tabela confusão de um modelo de predição	086
Fig. 23	Cromatograma da fração Vp – A2a	092

Fig. 24	Cromatograma da fração Vp – A2b	093
Fig. 25	Cromatograma da fração 100% CHCl ₃	093
Fig. 26	Espectro de RMN ¹ H de Vp – 1 (δ, DMSO-d ₆ , 400 MHz)	097
Fig. 27	Espectro de RMN ¹³ C de Vp – 1 (δ, DMSO-d ₆ , 100 MHz)	098
Fig. 28	Composto Vp – 1	095
Fig. 29	Espectro de RMN ¹ H de Vp – 2 (δ, DMSO-d ₆ , 400 MHz)	102
Fig. 30	Espectro de RMN ¹³ C de Vp – 2 (δ, DMSO-d ₆ , 100 MHz)	103
Fig. 31	Mapas de contorno HMQC de Vp – 2 (δ, DMSO-d ₆ , 400 MHz)	104
Fig. 32	Composto Vp – 2	100
Fig. 33	Espectro de RMN ¹ H de Vp – 3 (δ, CD ₃ OD, 400 MHz)	108
Fig. 34	Espectro de RMN ¹³ C de Vp – 3 (δ, CD ₃ OD, 100 MHz)	109
Fig. 35	Composto Vp – 3 (ácido caféico)	106
Fig. 36	Espectro de RMN ¹ H de Vp – 4 (δ, CD ₃ OD, 400 MHz)	113
Fig. 37	Espectro de RMN ¹³ C de Vp – 4 (δ, CD ₃ OD, 100 MHz)	114
Fig. 38	Composto Vp – 4 (ácido gálico)	110
Fig. 39	Espectro de RMN ¹ H de Vp – 5 (δ, DMSO-d ₆ , 500 MHz)	120
Fig. 40	Espectro de RMN ¹³ C de Vp – 5 (δ, DMSO-d ₆ , 125 MHz)	121
Fig. 41	Primeira expansão do espectro de RMN ¹ H de Vp – 5 (δ, DMSO-d ₆ , 500 MHz)	122
Fig. 42	Primeira expansão do espectro de RMN ¹³ C de Vp – 5 (δ, DMSO-d ₆ , 125 MHz)	123
Fig. 43	Segunda expansão do espectro de RMN ¹³ C de Vp – 5 (δ, DMSO-d ₆ , 125 MHz)	124
Fig. 44	Terceira expansão do espectro de RMN ¹ H de Vp – 5 (δ, DMSO-d ₆ , 500 MHz)	125
Fig. 45	Mapas de contorno HSQC de Vp – 5 (δ, DMSO-d ₆ , 500 e 125 MHz)	126
Fig. 46	Primeira expansão dos mapas de contorno HSQC de Vp – 5 (δ, DMSO-d ₆ , 500 e 125 MHz)	127
Fig. 47	Segunda expansão dos mapas de contorno HSQC de Vp – 5 (δ, DMSO-d ₆ , 500 e 125 MHz)	128
Fig. 48	Mapas de contorno HMBC de Vp – 5 (δ, DMSO-d ₆ , 500 e 125 MHz)	129
Fig. 49	Primeira expansão dos mapas de contorno HMBC de Vp – 5 (δ, DMSO-d ₆ , 500 e 125 MHz)	130

Fig. 50	Espectro de Massas (IES – EM, modo negativo) de Vp – 5	131
Fig. 51	Espectro de Massas (IES – EM ² , modo negativo) de Vp – 5	131
Fig. 52	Espectro de Massas (IES – EM ³ , modo negativo) de Vp – 5	131
Fig. 53	Proposta de fragmentação de Vp – 5 (4,5-di- <i>O-E</i> -cafeoil-quínico, modo negativo)	132
Fig. 54	Composto Vp – 5 (ácido 4,5-di- <i>O-E</i> -cafeoil-quínico)	117
Fig. 55	Espectro de RMN ¹ H de Vp – 6 (δ, CD ₃ OD, 400 MHz)	139
Fig. 56	Espectro de Massas (IES-EM, modo negativo) de Vp – 6	140
Fig. 57	Espectro de Massas (IES-EM ² , modo negativo) de Vp – 6	140
Fig. 58	Espectro de Massas (IES-EM ³ , modo negativo) de Vp – 6	140
Fig. 59	Proposta de fragmentação de Vp – 6 (3,4-di- <i>O-E</i> -cafeoil-quínico, modo negativo)	141
Fig. 60	Primeira expansão do espectro de RMN ¹ H de Vp – 6 (δ, CD ₃ OD, 400 MHz)	142
Fig. 61	Segunda expansão do espectro de RMN ¹ H de Vp – 6 (δ, CD ₃ OD, 400 MHz)	143
Fig. 62	Terceira expansão do espectro de RMN ¹ H de Vp – 6 (δ, CD ₃ OD, 400 MHz)	144
Fig. 63	Quarta expansão do espectro de RMN ¹ H de Vp – 6 (δ, CD ₃ OD, 400 MHz)	145
Fig. 64	Espectro de RMN ¹³ C de Vp – 6 (δ, CD ₃ OD, 100 MHz)	146
Fig. 65	Primeira expansão do espectro de RMN ¹³ C de Vp – 6 (δ, CD ₃ OD, 100 MHz)	147
Fig. 66	Segunda expansão do espectro de RMN ¹³ C de Vp – 6 (δ, CD ₃ OD, 100 MHz)	148
Fig. 67	Composto Vp – 6 (ácido 3,4-di- <i>O-E</i> -cafeoil quínico)	136
Fig. 68	Espectro de RMN ¹ H de Vp – 7 (δ, CD ₃ OD, 500 MHz)	154
Fig. 69	Espectro de Massas (IES-EM, modo negativo) de Vp – 7	155
Fig. 70	Espectro de Massas (IES-EM ² , modo negativo) de Vp – 7	155
Fig. 71	Proposta de fragmentação de Vp – 7 (1,3-di- <i>O-E</i> -cafeoil-quínico, modo negativo)	156
Fig. 72	Primeira expansão do espectro de RMN ¹ H de Vp – 7 (δ, CD ₃ OD, 500 MHz)	157

Fig. 73	Segunda expansão do espectro de RMN ¹ H de Vp – 7 (δ, CD ₃ OD, 500 MHz)	158
Fig. 74	Terceira expansão do espectro de RMN ¹ H de Vp – 7 (δ, CD ₃ OD, 500 MHz)	159
Fig. 75	Espectro de RMN ¹³ C de Vp – 7 (δ, CD ₃ OD, 125 MHz)	160
Fig. 76	Primeira expansão do espectro de RMN ¹³ C de Vp – 7 (δ, CD ₃ OD, 125 MHz)	161
Fig. 77	Segunda expansão do espectro de RMN ¹³ C de Vp – 7 (δ, CD ₃ OD, 125 MHz)	162
Fig. 78	Terceira expansão do espectro de RMN ¹³ C de Vp – 7 (δ, CD ₃ OD, 125 MHz)	163
Fig. 79	Composto Vp – 7 (ácido 1,3-di- <i>O-E</i> -cafeoil quínico)	151
Fig. 80	Espectro de RMN ¹ H de Vp – 8 (δ, CD ₃ OD, 500 MHz)	168
Fig. 81	Espectro de Massas (IES-EM, modo negativo) de Vp – 8	169
Fig. 82	Espectro de Massas (IES-EM ² , modo negativo) de Vp – 8	169
Fig. 83	Proposta de fragmentação de Vp – 8 (5-di- <i>O-E</i> -cafeoil-quínico, modo negativo)	170
Fig. 84	Primeira expansão do espectro de RMN ¹ H de Vp – 8 (δ, CD ₃ OD, 500 MHz)	171
Fig. 85	Segunda expansão do espectro de RMN ¹ H de Vp – 8 (δ, CD ₃ OD, 500 MHz)	172
Fig. 86	Terceira expansão do espectro de RMN ¹ H de Vp – 8 (δ, CD ₃ OD, 500 MHz)	173
Fig. 87	Composto Vp – 8 (ácido 5- <i>O-E</i> -cafeoil quínico)	166
Fig. 88	Espectro de massas de alta resolução do composto Vp – 9	174
Fig. 89	Espectro de RMN ¹ H de Vp – 9 (δ, DMSO- _{d6} , 500 MHz)	180
Fig. 90	Primeira expansão do espectro de RMN ¹ H de Vp – 9 (δ, DMSO- _{d6} , 500 MHz)	181
Fig. 91	Segunda expansão do espectro de RMN ¹ H de Vp – 9 (δ, DMSO- _{d6} , 500 MHz)	182
Fig. 92	Terceira expansão do espectro de RMN ¹ H de Vp – 9 (δ, DMSO- _{d6} , 500 MHz)	183
Fig. 93	Espectro de RMN ¹³ C de Vp – 9 (δ, DMSO- _{d6} , 125 MHz)	284

Fig. 94	Primeira expansão do espectro de RMN ¹³ C de Vp – 9 (δ, DMSO-d ₆ , 125 MHz)	185
Fig. 95	Segunda expansão do espectro de RMN ¹³ C de Vp – 9 (δ, DMSO-d ₆ , 125 MHz)	186
Fig. 96	Mapas de contorno HMQC de Vp – 9 (δ, DMSO-d ₆ , 500 MHz e 125 MHz)	187
Fig. 97	Primeira expansão dos mapas de contorno HMQC de Vp – 9 (δ, DMSO-d ₆ , 500 MHz e 125 MHz)	188
Fig. 98	Mapas de contorno HMBC de Vp – 9 (δ, DMSO-d ₆ , 500 MHz e 125 MHz)	189
Fig. 99	Primeira expansão dos mapas de contorno HMBC de Vp – 9 (δ, DMSO-d ₆ , 500 MHz e 125 MHz)	190
Fig. 100	Segunda expansão dos mapas de contorno HMBC de Vp – 9 (δ, DMSO-d ₆ , 500 MHz e 125 MHz)	191
Fig. 101	Avaliação em escala de temperatura do efeito atropoisomérico de Vp – 9	192
Fig. 102	Composto Vp – 9 (amentoflavona)	176
Fig. 103	Espectro de massas de alta resolução do composto Vp – 10	193
Fig. 104	Espectro de RMN ¹ H de Vp – 10 (δ, DMSO-d ₆ , 400 MHz)	199
Fig. 105	Primeira expansão do espectro de RMN ¹ H de Vp – 10 (δ, DMSO-d ₆ , 400 MHz)	200
Fig. 106	Segunda expansão do espectro de RMN ¹ H de Vp – 10 (δ, DMSO-d ₆ , 400 MHz)	201
Fig. 107	Terceira expansão do espectro de RMN ¹ H de Vp – 10 (δ, DMSO-d ₆ , 400 MHz)	202
Fig. 108	Espectro de RMN ¹³ C de Vp – 10 (δ, DMSO-d ₆ , 100 MHz)	203
Fig. 109	Primeira expansão do espectro de RMN ¹³ C de Vp – 10 (δ, DMSO-d ₆ , 100 MHz)	204
Fig. 110	Segunda expansão do espectro de RMN ¹³ C de Vp – 10 (δ, DMSO-d ₆ , 100 MHz)	205
Fig. 111	Terceira expansão do espectro de RMN ¹³ C de Vp – 10 (δ, DMSO-d ₆ , 100 MHz)	206
Fig. 112	Composto Vp – 10 (3', 8''-biisocampferídeo)	195
Fig. 113	Espectro de IV de Vp – 11 (pastilhas de KBr)	207
Fig. 114	Espectro de massas de alta resolução do composto Vp – 11	207
Fig. 115	Espectro de RMN ¹ H de Vp – 11 (δ, DMSO-d ₆ , 400 MHz)	213

Fig. 116	Primeira expansão do espectro de RMN ¹ H de Vp – 11 (δ, DMSO-d ₆ , 400 MHz)	214
Fig. 117	Segunda expansão do espectro de RMN ¹ H de Vp – 11 (δ, DMSO-d ₆ , 400 MHz)	215
Fig. 118	Terceira expansão do espectro de RMN ¹ H de Vp – 11 (δ, DMSO-d ₆ , 400 MHz)	216
Fig. 119	Espectro de RMN ¹³ C de Vp – 11 (δ, DMSO-d ₆ , 100 MHz)	217
Fig. 120	Primeira expansão do espectro de RMN ¹³ C de Vp – 11 (δ, DMSO-d ₆ , 100 MHz)	218
Fig. 121	Segunda expansão do espectro de RMN ¹³ C de Vp – 11 (δ, DMSO-d ₆ , 100 MHz)	219
Fig. 122	Terceira expansão do espectro de RMN ¹³ C de Vp – 11 (δ, DMSO-d ₆ , 100 MHz)	220
Fig. 123	Mapas de contorno HMQC de Vp – 11 (δ, DMSO-d ₆ , 400 MHz e 100 MHz)	221
Fig. 124	Primeira expansão dos mapas de contorno HMQC de Vp – 11 (δ, DMSO-d ₆ , 400 MHz e 100 MHz)	222
Fig. 125	Mapas de contorno HMBC de Vp – 11 (δ, DMSO-d ₆ , 400 MHz e 100 MHz)	223
Fig. 126	Primeira expansão dos mapas de contorno HMBC de Vp – 11 (δ, DMSO-d ₆ , 400 MHz e 100 MHz)	224
Fig. 127	Composto Vp – 11 (3'-apigenin-8''-isocampferídeo)	209
Fig. 128	Espectro de RMN ¹³ C de Vp – 12 (δ, CDCl ₃ , 125 MHz)	230
Fig. 129	Primeira expansão do espectro de RMN ¹³ C de Vp – 12 (δ, CDCl ₃ , 125 MHz)	231
Fig. 130	Deslocamento químico do carbono de CH ₃ – 19 em configuração <i>cis</i> ou <i>trans</i>	226
Fig. 131	Espectro de RMN ¹ H de Vp – 12 (δ, CDCl ₃ , 500 MHz)	232
Fig. 132	Primeira expansão do espectro de RMN ¹ H de Vp – 12 (δ, CDCl ₃ , 500 MHz)	233
Fig. 133	Composto Vp – 12 (ácido cleroda-3,13-dien-15,16-olideo-18-oico)	227
Fig. 134	Espectro de massas de alta resolução do composto Vp – 13	234
Fig. 135	Espectro de RMN ¹³ C de Vp – 13 (δ, CDCl ₃ , 125 MHz)	239
Fig. 136	Primeira expansão do espectro de RMN ¹³ C de Vp – 13 (δ, CDCl ₃ , 125 MHz)	240

Fig. 137	Segunda expansão do espectro de RMN ¹³ C de Vp – 13 (δ, CDCl ₃ , 125 MHz)	241
Fig. 138	Espectro de RMN ¹ H de Vp – 13 (δ, CDCl ₃ , 500 MHz)	242
Fig. 139	Segunda expansão do espectro de RMN ¹ H de Vp – 13 (δ, CDCl ₃ , 500 MHz)	243
Fig. 140	Terceira expansão do espectro de RMN ¹ H de Vp – 13 (δ, CDCl ₃ , 500 MHz)	244
Fig. 141	Mapas de contorno HMQC de Vp – 13 (δ, DMSO- _{d6} , 500 MHz e 125 MHz)	245
Fig. 142	Primeira expansão dos mapas de contorno HMQC de Vp – 13 (δ, DMSO- _{d6} , 500 MHz e 125 MHz)	246
Fig. 143	Mapas de contorno HMBC de Vp – 13 (δ, DMSO- _{d6} , 500 MHz e 125 MHz)	247
Fig. 144	Primeira expansão dos mapas de contorno HMBC de Vp – 13 (δ, DMSO- _{d6} , 500 MHz e 125 MHz)	248
Fig. 145	Composto Vp – 13 (ácido clerodérmico)	236
Fig. 146	Grau de pureza do pico da amentoflavona em diferentes comprimentos de onda	249
Fig. 147	Método cromatográficos das concentrações de amentoflavona e do extrato de <i>V.plicata</i>	250
Fig. 148	Curva analítica do padrão amentoflavona (C18, λ=336 nm) nas concentrações de 30, 60, 90, 120 e 150 µg/mL	251
Fig. 149	Cromatograma do controle negativo (fase móvel – branco)	252
Fig. 150	Cromatograma do controle negativo (solvente extrator – etanol)	252
Fig. 151	Cromatograma do controle negativo (solvente extrator – metanol)	252
Fig. 152	Curva ROC do modelo criado (curva do grupo teste à direita e grupo de validação interna à esquerda).	253
Fig. 153	Gráficos comparativos entre as energias do MolDock Score para cada enzima selecionada envolvida no ciclo de replicação do HIV-1 (1= 11 , 2= 9 e 3= 10)	255
Fig. 154	Imagens geradas a partir das interações ligante-receptor do <i>docking</i> molecular usando a enzima <i>protease</i> (PDB ID 6DIF). a) o inibidor complexado com a proteína, b) o AZT usado como controle, c) darunavir, d) 9 , e) 10 e f) 11	258

Fig. 155	Imagens geradas a partir das interações ligante-receptor do <i>docking</i> molecular usando a enzima <i>integrase</i> (PDB ID 1QS4). a) o inibidor complexado com a proteína, b) o AZT usado como controle, c) darunavir, d) 9 , e) 10 e f) 11	260
Fig. 156	Imagens geradas a partir das interações ligante-receptor do <i>docking</i> molecular usando a enzima <i>transcriptase reversa</i> (PDB ID 3LP0). a) o inibidor complexado com a proteína, b) o AZT usado como controle, c) darunavir, d) 9 , e) 10 e f) 11	263
Fig. 157	Gráfico de viabilidade celular para as amostras testadas	267

LISTA DE QUADROS

Quadro 01	Compostos isolados da família Velloziaceae	035
Quadro 02	Medicamentos Antirretrovirais disponibilizados pelo SUS para o tratamento do HIV/AIDS	070
Quadro 03	Sistema de eluição das concentrações de 30, 60, 90, 120, 150 µg/mL e do extrato etanólico de <i>V.plicata</i> (Solvente A – H ₂ O acidificada com ácido fórmico 0,1% e solvente B – MeOH)	250

LISTA DE TABELAS

Tabela 01	Casos de HIV notificados no SINAN, segundo UF e região de residência por ano de diagnóstico. Brasil, 1980-2019	066
Tabela 02	Fármacos utilizados no tratamento do HIV e usados como controle nesse estudo	089
Tabela 03	Dados de RMN ¹ H e ¹³ C de Vp – 1 (δ, DMSO-d ₆ , 400MHz e 100 MHz) em comparações com a quercetina (δ, DMSO-d ₆ , 500 e 125 MHz)	196
Tabela 04	Dados de RMN ¹ H e ¹³ C de Vp – 2 (δ, DMSO-d ₆ , 400MHz e 100 MHz) em comparações com a luteolina (δ, DMSO-d ₆ , 500 e 125 MHz) (LIU et al., 2010)	101

Tabela 05	Dados de RMN ¹ H e ¹³ C de Vp – 3 (δ, CD ₃ OD, 400MHz e 100 MHz) em comparações com o ácido caféico (δ, CD ₃ OD, 500 e 125 MHz) (PINTO, 2015)	107
Tabela 06	Dados de RMN ¹ H e ¹³ C de Vp – 4 (δ, CD ₃ OD, 400MHz e 100 MHz) em comparações com o ácido gálico (δ, CD ₃ OD, 400 e 100 MHz) (MARQUI, 2011)	112
Tabela 07	Dados de RMN ¹ H e ¹³ C de Vp – 5 (δ, DMSO-d ₆ , 500MHz e 125 MHz) em comparações com o ácido 4,5-dicafeoil-quínico (δ, DMSO-d ₆ , 500 e 125 MHz) (NASSERI; EMAMI; MOJARRAB., 2019)	118
Tabela 08	Padrões de fragmentação (modo negativo) obtidos do composto Vp – 5 e comparados com o ácido 4,5-di- <i>O-E</i> -cafeoil-quínico (CLIFFORD et al., 2003)	133
Tabela 09	Padrões de fragmentação (modo negativo) obtidos do composto Vp – 6 e comparados com o Ácido 3,4-di- <i>O-E</i> -cafeoil-quínico (CLIFFORD et al., 2003)	135
Tabela 10	Dados de RMN ¹ H e ¹³ C de Vp – 6 (δ, CD ₃ OD, 400 MHz e 100 MHz) em comparações com o ácido 3,4-dicafeoil-quínico (δ, CD ₃ OD, 300 e 75 MHz) (JASINSKI, 2010)	137
Tabela 11	Padrões de fragmentação (modo negativo) obtidos do composto Vp – 7 e comparados com o ácido 1,3-di- <i>O-E</i> -cafeoil-quínico (WIANOWSKA; GIL, 2019)	149
Tabela 12	Dados de RMN ¹ H e ¹³ C de Vp – 7 (δ, CD ₃ OD, 500 MHz e 125 MHz) em comparações com o ácido 1,3-di- <i>O-E</i> -cafeoil-quínico (δ, CD ₃ OD, 600 e 150 MHz) (LIU et al., 2013)	152
Tabela 13	Padrões de fragmentação (modo negativo) obtidos do composto Vp – 8 e comparados com Ácido 5- <i>O-E</i> -cafeoil-quínico (CLIFFORD et al., 2003)	165
Tabela 14	Dados de RMN ¹ H de Vp – 8 (δ, CD ₃ OD, 500 MHz) em comparações com o ácido 5- <i>O-E</i> -cafeoil-quínico (δ, CD ₃ OD, 300 MHz) (BATISTA et al., 2014)	167
Tabela 15	Dados de RMN ¹ H e ¹³ C de Vp – 9 (δ, DMSO-d ₆ , 500MHz e 125 MHz) em comparação com a amentoflavona (δ, DMSO-d ₆ , 300 e 75 MHz) (DEVKOTA; MIYAZAKI; YAHARA, 2017)	178

Tabela 16	Dados de RMN ¹ H e ¹³ C de Vp – 10 (δ, DMSO-d ₆ , 400MHz e 100 MHz) em comparação Vp – 9 δ, DMSO-d ₆ , 500MHz e 150 MHz e com 3', 8''-biisocampferídeo (δ, CD ₃ OD, 500 e 125 MHz) (PINTO et al., 2010)	196
Tabela 17	Dados de RMN ¹ H e ¹³ C de Vp – 11 (δ, DMSO-d ₆ , 400MHz e 100 MHz) em comparação com a Vp – 9 (amentoflavona) (δ, DMSO-d ₆ , 500 e 125 MHz)	210
Tabela 18	Dados de RMN ¹ H e ¹³ C de Vp – 12 (δ, CDCl ₃ , 500 e 125 MHz) em comparações com o ácido clerodan-3,13-dien-15,16-olideo-8-óico (δ, CD ₃ OD, 500 e 125 MHz) (PINTO et al., 2010)	228
Tabela 19	Dados de RMN ¹ H, ¹³ C, HMQC e HMBC de Vp – 13 (δ, CDCl ₃ , 400MHz e 100 MHz) em comparação com o ¹ H (δ, CDCl ₃ , 500 MHz) do ácido patagônico (PINTO et al., 2010) e do ¹³ C (δ, CDCl ₃ , 125 MHz) do ácido clerodérmico (EFDI et al., 2007)	237
Tabela 20	Dados estatísticos do modelo de predição feito no KNIME	253
Tabela 21	Porcentagem de dados de restrição oral e citotoxicidade	254
Tabela 22	Dados de modelos de predição de permeabilidade e absorção intestinal	255
Tabela 23	Dados de energia total de ligação para as proteínas utilizadas para o acoplamento molecular	255
Tabela 24	Dados de <i>Score</i> e citotoxicidade <i>in silico</i> dos metabólitos hepáticos	266
Tabela 25	Valores percentuais com base nos dados obtidos por citometria de fluxo (infecção/inibição) e viabilidade celular (espectrofotometria)	268

SUMÁRIO

Resumo	
Abstract	
Lista de Abreviaturas	
Lista de Equação	
Lista de Figuras	
Lista de Quadros	
Lista de Tabelas	
1. INTRODUÇÃO	026
2. OBJETIVOS	029
2.1 Objetivo Geral	030
2.2 Objetivos Específicos	030
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	031
3.1 Considerações gerais sobre a família Velloziaceae J. Agardh	032
3.2 Considerações gerais sobre o gênero <i>Vellozia</i> Vand.	053
3.3 Considerações gerais sobre a espécie <i>Vellozia plicata</i> Mart.	055
3.4 Considerações gerais e processo biossintético de flavonoides/ biflavonoides	057
3.5 Considerações gerais e processo biossintético de diterpenos	060
3.6 Considerações gerais e processo biossintético de derivados clorogênicos	062
3.7 Considerações sobre estudos <i>in silico</i>	064
3.8 Infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana e o potencial de produtos naturais para o seu tratamento	065
4. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	076
4.1 Estudo fitoquímico	077
4.1.1 Procedimentos gerais	077
4.1.2 Material vegetal	079
4.1.3 Extração e isolamento	079
4.2 Desenvolvimento de metodologia analítica para o doseamento da amentoflavona no extrato etanólico bruto de <i>V. plicata</i> por CLAE	083
4.3 Ferramentas computacionais	083

4.3.1 Modelos de predição	083
4.3.2 Absorção por via oral	086
4.3.3 Predição dos riscos de citotoxicidade	087
4.3.4 Descritores moleculares	087
4.3.5 Estudo de metabólitos hepáticos	088
4.3.6 <i>Docking</i> molecular	089
4.4 Estudos biológicos e doseamento de fenólicos totais	089
4.4.1 Viabilidade celular e teste de nucleosídeos sintetizados para inibição da replicação do HIV	089
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	091
5.1 Estudo químico	092
5.1.1 Desenvolvimento de métodos cromatográficos por CLAE para isolamento de compostos	092
5.1.2 Identificação estrutural de V _p – 1 a V _p – 13	094
5.1.2.1 Identificação estrutural de V _p – 1	094
5.1.2.2 Identificação estrutural de V _p – 2	099
5.1.2.3 Identificação estrutural de V _p – 3	105
5.1.2.4 Identificação estrutural de V _p – 4	110
5.1.2.5 Identificação estrutural de V _p – 5	115
5.1.2.6 Identificação estrutural de V _p – 6	134
5.1.2.7 Identificação estrutural de V _p – 7	149
5.1.2.8 Identificação estrutural de V _p – 8	164
5.1.2.9 Identificação estrutural de V _p – 9	174
5.1.2.10 Identificação estrutural de V _p – 10	193
5.1.2.11 Identificação estrutural de V _p – 11	207
5.1.2.12 Identificação estrutural de V _p – 12	225
5.1.2.13 Identificação estrutural de V _p – 13	234
5.2 Determinação da concentração da amentoflavona no extrato etanólico de <i>V. plicata</i> por CLAE	249
5.2.1 Curva analítica e linearidade	249
5.2.2 Quantificação	251
5.3 Análises computacionais	253
5.4 Ensaios biológicos	267

5.4.1 Viabilidade celular e potencial anti-HIV-1	267
6. CONCLUSÕES	269
REFERÊNCIAS	271



1. INTRODUÇÃO

Os produtos naturais são empregados historicamente para o tratamento de diversas ameaças à saúde. Neste cenário, a utilização de plantas medicinais atua como um recurso importante para a recuperação, a cura e a prevenção de numerosas doenças, sendo frequentemente guiado pelo conjunto acumulado de conhecimentos, decorrente da relação direta entre os indivíduos, comunidades e o meio-ambiente (BROWN, 2016).

O uso popular mais antigo documentado de plantas, voltado à recuperação das pessoas, encontra-se registrado na Medicina Tradicional Chinesa. Este conjunto de práticas é executado por milhares de anos e continua fazendo parte dos atos diários de cuidados de muitas pessoas por todo o mundo (BOUFRIDI; QUINN, 2018).

Assim, a utilização das plantas como alvo para a descoberta e/ou obtenção de novas drogas, seja na sua forma inteira ou compostos isolados, é bastante enfatizado, baseando-se no seu uso em diferentes sistemas de medicina popular da antiguidade e atualmente (SIMÕES et al., 2007; TEWARI et al., 2017) e, em dados, observa-se que mais de 70% de um total de 1562 novos fármacos aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) (1981 – 2014) são de origens naturais (NEWMAN; CRAGG, 2016). As principais classes de metabólitos secundários obtidos de plantas são os flavonoides, alcaloides, esteroides, terpenos, saponinas, taninos, ácidos fenólicos, cumarinas, entre outras (NOVAES et al., 2013; AGATA et al., 2010; JEENU; BINDHU; ALEYKUTTY, 2013).

Posteriormente, após obtenção desses compostos isolados, eles seguiriam à um processo de descoberta de potencial biológico (HOQUE et al., 2017) onde poderiam atuar nas mais variadas atividades biológicas, como: anti-inflamatória, antioxidante, antimicrobiana, vasorrelaxante, leishmanicidas, atividades a nível de sistema nervoso central e imunológicas (HADAGALI; CHUA, 2014; TELES, et al., 2016) e, talvez, se candidatar ao desenvolvimento de um novo fármaco, que é um processo caracterizado por ser lento e dispendioso, até chegar ao mercado.

As metodologias de obtenção de novos compostos quando são associadas às técnicas *in silico*, propiciam uma redução de passos na pesquisa, direcionando o estudo e propiciando a redução de animais, custos e tempo de estudo (DAS, 2017).

Dentre as atividades farmacológicas que podem ser acompanhadas pelas técnicas computacionais, destaca-se as que tratam sobre as enzimas envolvidas no processo de replicação do Vírus da Imunodeficiência Adquirida (HIV). O HIV é um problema de saúde pública global, onde se busca novos agentes terapêuticos antirretrovirais que visem

diminuir/inibir a taxa de multiplicação do vírus no organismo humano, além de buscar baratear o tratamento e aumentar o arsenal de opções, diante do surgimento de resistência do vírus aos medicamentos (VANI et al., 2018; UNAIDS, 2019).

Dessa forma, a espécie em estudo, *Vellozia plicata* Mart., única espécie da família Velloziaceae identificada até o momento no estado da Paraíba, foi escolhida levando em consideração seu perfil etnobotânico e potencial fitoquímico (PINTO et al., 2010), na busca de novos compostos bioativos, sendo auxiliado por ferramentas computacionais para o direcionamento de ensaios biológicos *in vitro* para o HIV-1, uma vez que alguns compostos isolados anteriormente nesta espécie possuem atividade antiviral relatada na literatura.



2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Contribuir para o conhecimento fitoquímico por meio de um reestudo de *Vellozia plicata* Mart., realizar análises *in silico* de compostos isolados e ensaios biológicos.

2.2 Objetivos específicos

- Isolar, purificar e caracterizar estruturalmente constituintes químicos de *Vellozia plicata* Mart., por meio de métodos cromatográficos, espectroscópicos e espectrométricos;
- Propor marcador químico e realizar a quantificação deste marcador no extrato etanólico bruto de *Vellozia plicata*;
- Avaliar, por meio de estudos *in silico*, a atividade anti-HIV-1 de compostos isolados de *Vellozia plicata*, bem como, riscos de citotoxicidade, taxa de absorção oral e intestinal e biotransformação;
- Investigar a viabilidade celular e atividade anti-HIV-1 de alguns compostos isolados da espécie e do extrato etanólico.



3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Considerações gerais sobre a família Velloziaceae J. Agardh

Velloziaceae é uma família nativa e não endêmica do Brasil que compreende atualmente cinco gêneros (*Acanthochlamys*, *Barbacenia*, *Barbaceniopsis*, *Vellozia* e *Xerophyta*) e cerca de 274 espécies (MELLO-SILVA, 2015; MELLO-SILVA, 2018). Recebeu este nome em homenagem ao ilustre botânico Frei José Mariano da Conceição Vellozo e suas espécies possuem como características serem vivazes, habitando de preferência lugares áridos, pedregosos e elevados (PAULA-SOUZA; BRANDÃO, 2016).

A família é caracterizada por possuir plantas herbáceas com o caule coberto pelas bainhas foliares ou folhas marcescentes, onde as suas flores são chamativas, os estames e ovário ínfero, trilocular e com frutos capsulares (MELLO-SILVA et al. 2011).

A grande maioria das espécies distribuem-se na América neotropical (*Barbacenia*, *Barbaceniopsis* e *Vellozia*), outras ocorrem na África, Madagascar e na Península Arábica (*Xerophyta* e *Vellozia*) e uma na China (*Acanthochlamys*) (MELLO-SILVA et al. 2011) (Figura 01).

Figura 01. Mapa de distribuição geográfica da família Velloziaceae pelo mundo representado em amarelo



Fonte: <https://matadornetwork.com/travel-map/>

A família Velloziaceae possui um complexo histórico de classificação (Figura 02, página 34), onde os gêneros *Aylthonia*, *Acanthochlamys*, *Barbacenia*, *Barbaceniopsis*, *Burlemarxia*, *Nanuza*, *Pleurostima*, *Talbotia*, *Vellozia* e *Xerophyta*, em algum momento, foram

utilizados como nomenclaturas às espécies da família. Esse fato deu-se por existirem dois sistemas de classificação da família provocando algumas divergências na literatura quando não avaliadas.

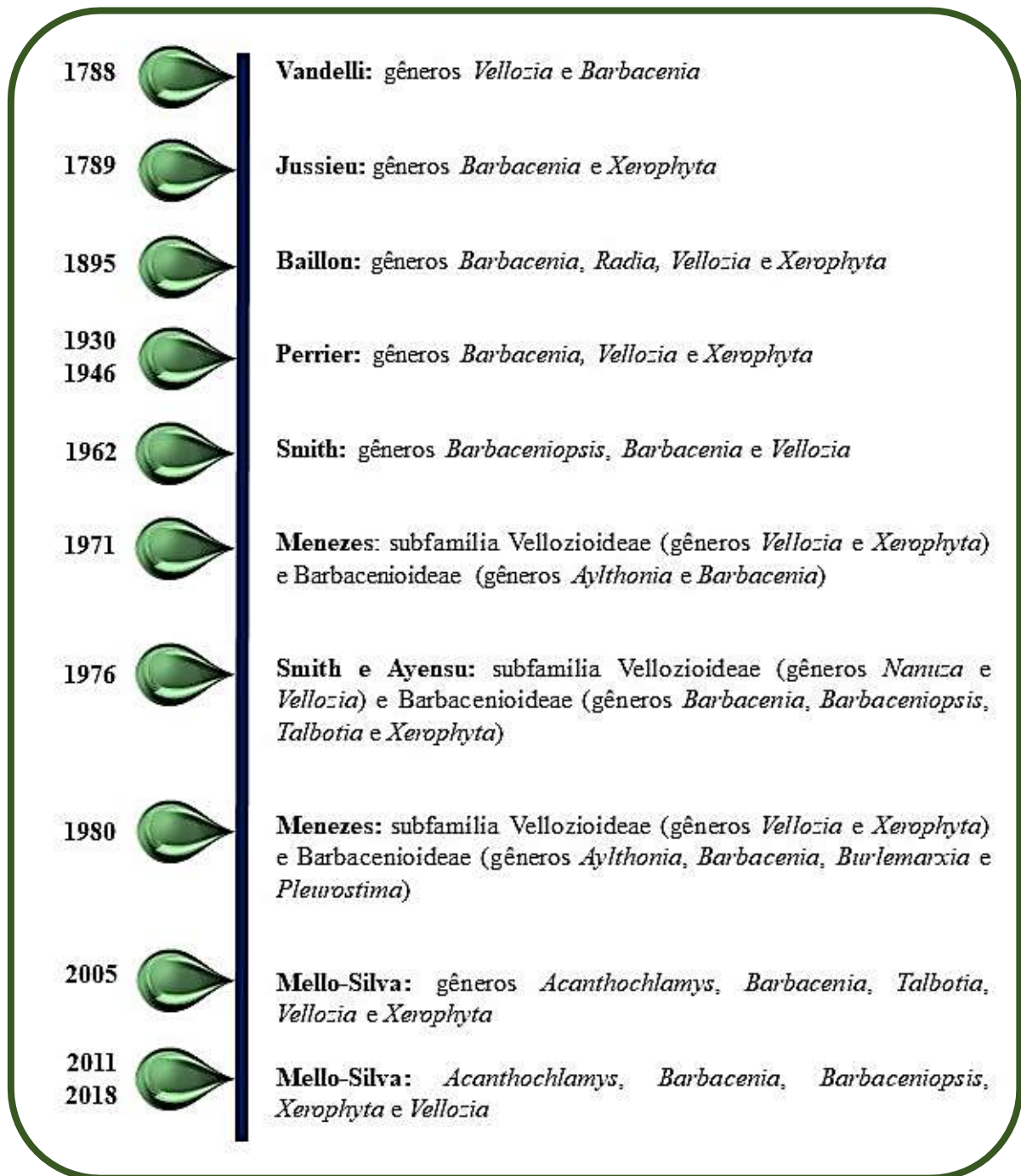
A classificação proposta por Menezes priorizou a presença ou ausência de corona e constituição das bainhas dos feixes das espécies. Já Smith e Ayensu deram prioridade à morfologia do estigma e filete e para posição dos apêndices florais em relação aos filetes das espécies (MELLO-SILVA, 2005).

Quanto ao uso etnofarmacológico, as partes aéreas de algumas espécies da família são utilizadas como anti-inflamatórias, antirreumáticas, tratamento de contusões e fraturas ósseas (uso tópico) (SOUZA; FELFIL, 2006; MESSIAS et al., 2015).

Em uma revisão bibliográfica das substâncias isoladas da família Velloziaceae, identificou-se uma grande quantidade de diterpenos isolados (109), seguido de flavonoides (21) e triterpenos (21). O Quadro 01 (página 35) apresenta os compostos isolados por espécie e na Figura 03 (página 44) observa-se a estrutura química de todas as substâncias encontradas.

E existem centenas de espécies da família Velloziaceae que não possuem nenhum estudo fitoquímico/farmacológico, demonstrando assim o potencial dessa família para posteriores investigações que venham contribuir como fonte e/ou obtenção de produtos aplicáveis à saúde.

Figura 02. Organização histórica do processo de classificação da família Velloziaceae



Fonte: Adaptação de MELLO-SILVA et al. 2011; MELLO-SILVA, 2015; MELLO-SILVA, 2018.

Quadro 01. Compostos isolados da família Velloziaceae

Nº	NOME DO COMPOSTO	ESPÉCIE (S)
FLAVONOIDES		
1	5,3',4' -Trihidroxi-3,6,7-trimetoxi-8-C-metilflavona	<i>Vellozia lilacina</i> L.B.Sm. & Ayensu (WILLIAMS et al., 1992) <i>Vellozia epidendroides</i> Mart. ex Schult. & Schult.f. (WILLIAMS et al., 1992)
2	5,4' -Dihidroxi-3,6,7,3' -tetrametoxi-8-C-metilflavona	<i>Vellozia lilacina</i> L.B.Sm. & Ayensu (WILLIAMS et al., 1992) <i>Vellozia epidendroides</i> Mart. ex Schult. & Schult.f. (WILLIAMS et al., 1992)
3	7-(3,4-Dihidroxifenil)-5-metilen-2-(prop-1-en-2-il)-3,5-dihidro-2H-furo[3,2-g]cromen-4,6-diol	<i>Vellozia streptophylla</i> L.B.Sm. (HARBORNE et al., 1992)
4	7-(3-hidroxi-4-metoxifenil)-5-metilen-2-(prop-1-en-2-il)-3,5-dihidro-2H-furo[3,2-g]cromen-4,6-diol	<i>Vellozia streptophylla</i> L.B.Sm. (HARBORNE et al., 1992)
5	Veloeriodictiol	<i>Vellozia glabra</i> J.C. Mikan (HARBORNE et al., 1993)
6	6,8-Diprenileriodictiol	<i>Vellozia nanuzae</i> L.B.Sm. & Ayensu (HARBORNE et al., 1993)
7	6-Prenilquercetin-3-metil-eter	<i>Vellozia nanuzae</i> L.B.Sm. & Ayensu (HARBORNE et al., 1993)
8	Veloquercetin-3,3' -dimetil-eter	<i>Vellozia lilacina</i> L.B.Sm. & Ayensu (WILLIAMS et al., 1993)
9	Veloquercetin-3,5,3' -trimetil-eter	<i>Vellozia lilacina</i> L.B.Sm. & Ayensu (WILLIAMS et al., 1993)
10	3',4',5,7-Tetrahidroxi-3,6-dimetoxi-8-metilflavona	<i>Vellozia candida</i> J.C. Mikan (BRANCO et al., 2002)
11	3',4',5-Trihidroxi-3,6,7-trimetoxi-8-metilflavona	<i>Vellozia candida</i> J.C. Mikan (BRANCO et al., 2002)
12	Liquiritigenina	<i>Acanthochlamys bracteata</i> P. C. Kao (BANG-JING et al., 2005)
13	Tilirosídeo	<i>Acanthochlamys bracteata</i> P. C. Kao (BANG-JING et al., 2005)
14	Isoramnetina 3-O-(3",6"-di-O-E-p-cumaroil)- β -D-glucopiranosídeo	<i>Acanthochlamys bracteata</i> P. C. Kao (BANG-JING et al., 2005)
15	Isoramnetina 3-O-(6"-di-O-E-p-cumaroil)- β -D-glucopiranosídeo	<i>Acanthochlamys bracteata</i> P. C. Kao (BANG-JING et al., 2005)
16	Canferol-3-O-(3",6"-di-O-E-p-cumaroil)- β -D-glucopiranosídeo	<i>Acanthochlamys bracteata</i> P. C. Kao (BANG-JING et al., 2005)
17	Aianina	<i>Acanthochlamys bracteata</i> P. C. Kao (BANG-JING et al., 2005)
18	Liquiritina	<i>Acanthochlamys bracteata</i> P. C. Kao (BANG-JING et al., 2005)
19	Luteolina	<i>Vellozia plicata</i> Mart. (PINTO et al., 2010)

20	3,5,7,3',4'-Pentahidroxi-6-prenilflavonol	<i>Vellozia subscabra</i> J.C. Mikan (SILVA et al., 2012)
21	3,5,7,3',4'-Pentahidroxi-8-metil-6-prenilflavonol	<i>Vellozia subscabra</i> J.C. Mikan (SILVA et al., 2012)
BIFLAVONOIDES		
22	Amentoflavona	<i>Vellozia plicata</i> Mart. (PINTO et al., 2010)
23	3',8''-Biisocaempferídeo	<i>Vellozia plicata</i> Mart. (PINTO et al., 2010)
CHALCONAS		
24	Isoliquiritigenin	<i>Acanthochlamys bracteata</i> P. C. Kao (BANG-JING et al., 2005)
DERIVADOS CLOROGÊNICOS		
25	3- <i>O</i> -Cafeoil quinato de metila	<i>Vellozia plicata</i> Mart. (PINTO et al., 2010)
26	3,5-Di- <i>O-E</i> -cafeoil quínico	<i>Vellozia plicata</i> Mart. (PINTO et al., 2010)
OUTROS FENÓLICOS		
27	Cafeato de etila	<i>Acanthochlamys bracteata</i> P. C. Kao (BANG-JING et al., 2005)
28	Demetil-coniferina	<i>Acanthochlamys bracteata</i> P. C. Kao (BANG-JING et al., 2005)
ÁCIDOS GRAXOS		
29	Ácido palmítico	<i>Acanthochlamys bracteata</i> P. C. Kao (BANG-JING et al., 2005)
30	Heptacosan-1-ol	<i>Acanthochlamys bracteata</i> P. C. Kao (BANG-JING et al., 2005)
31	Ácido tetracosanoico	<i>Acanthochlamys bracteata</i> P. C. Kao (BANG-JING et al., 2005)
ESTEROIDES/ ESTEROIDES GLICOSILADOS		
32	Estigmasterol	<i>Acanthochlamys bracteata</i> P. C. Kao (BANG-JING et al., 2005)
33	Estigmast-5,22-dien-3 β ,7 α -diol	<i>Acanthochlamys bracteata</i> P. C. Kao (BANG-JING et al., 2005)
34	Estigmasterol-3- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucopiranosídeo	<i>Acanthochlamys bracteata</i> P. C. Kao (BANG-JING et al., 2005)
TRITERPENOS		
35	3 β ,20-(<i>R</i>)-Dihidroxi-damar-24-eno	<i>Barbacenia brasiliensis</i> (BAKER et al., 1976)
36	20-(<i>R</i>)-Hidroxi-damar -24-en-3-ol	<i>Barbacenia brasiliensis</i> (BAKER et al., 1976)
37	Dipterocarpol	<i>Barbacenia flava</i> Mart. ex Schult. & Schult.f. (SILVA et al., 1980)
38	Ocotillo	<i>Barbacenia flava</i> Mart. ex Schult. & Schult.f. (SILVA et al., 1980)
39	20-(<i>R</i>)-Hidroxi-damar -24-en-3-o	<i>Barbacenia flava</i> Mart. ex Schult. & Schult.f. (SILVA et al., 1980)
40	(20- <i>R</i>)-Hidroxi-24-metilen-damar-3-eno	<i>Vellozia stipitata</i> L.B.Sm. & Ayensu (PINTO et al., 1980)
41	Ácido (<i>E</i>)-masticadienoico	<i>Vellozia glabra</i> J.C.Mikan (PINTO et al., 1981)
42	Damarenol I	<i>Vellozia glabra</i> J.C.Mikan (PINTO et al., 1981) <i>Barbacenia coccinea</i> Mart. ex Schult. & Schult.f. (PINTO et al., 1981)

43	Damarenol II	<i>Vellozia glabra</i> J.C.Mikan (PINTO et al., 1981) <i>Barbacenia coccinea</i> Mart. ex Schult. & Schult.f. (PINTO et al., 1981)
44	Damarenol III	<i>Vellozia glabra</i> J.C.Mikan (PINTO et al., 1981) <i>Barbacenia coccinea</i> Mart. ex Schult. & Schult.f. (PINTO et al., 1981)
45	Ketone	<i>Vellozia compacta</i> Mart. ex Schult. & Schult.f. (BARNES et al., 1984)
46	Taraxerona	<i>Vellozia piresiana</i> L.B.Sm. (PINTO et al., 1984)
47	20-Hidroxi-lupan-3-ona	<i>Vellozia nanuzae</i> L.B.Sm. & Ayensu (PINTO et al., 1988)
48	Lupeol	<i>Vellozia ornithophila</i> Mello-Silva (PINTO et al., 1990)
49	Lupenona	<i>Vellozia ornithophila</i> Mello-Silva (PINTO et al., 1990)
50	20-Hidroxi-lupan-3-ona	<i>Vellozia ornithophila</i> Mello-Silva (PINTO et al., 1990)
51	Ácido betulínico	<i>Vellozia ornithophila</i> Mello-Silva (PINTO et al., 1990)
52	Velozona	<i>Vellozia ornithophila</i> Mello-Silva (PINTO et al., 1990)
53	Ácido euscáfico	<i>Acanthochlamys bracteata</i> P. C. Kao (BANG-JING et al., 2005)
54	8-Feruloxil-octacosanoil 1-glicerídeo	<i>Acanthochlamys bracteata</i> P. C. Kao (BANG-JING et al., 2005)
55	Ácido acantoclamico	<i>Acanthochlamys bracteata</i> P. C. Kao (BANG-JING et al., 2005)
DITERPENOS		
56	Veadeirol	<i>Vellozia squamata</i> Pohl (PINCHIN et al., 1978)
57	Ácido veadeiróico	<i>Vellozia squamata</i> Pohl (PINCHIN et al., 1978)
58	Metil éster-veadeirônico	<i>Vellozia squamata</i> Pohl (PINCHIN et al., 1978)
59	Compactona	<i>Vellozia compacta</i> Mart. ex Schult. & Schult.f. (PINTO et al., 1979a) <i>Vellozia aloifolia</i> Mart. (GARCEZ et al., 1981) <i>Vellozia compacta</i> Mart. ex Schult. & Schult.f. (PINTO; BORGES, 1983) <i>Vellozia piresiana</i> L.B.Sm. (PINTO; PEIXOTO; FIORANI, 1994) <i>Vellozia patens</i> L.B.Sm. & Ayensu (PINTO et al., 1986b) <i>Vellozia aloifolia</i> Mart. (PINTO; QUEIROZ; GARCEZ, 1991)
60	3,4,5,10,11-Tetrahydro-3,8,8-trimetilfenantro[10,1-bc]piran-9(8H)-one	<i>Vellozia declinans</i> Goethart & Henrand (PINTO et al., 1979b)
61	3,4,5,10-en-11-Tetrahydro-3,8,8-trimetilfenantro[10,1-bc]piran-9(8H)-one	<i>Vellozia declinans</i> Goethart & Henrand (PINTO et al., 1979b)
62	3-Cetodamara-20,24-dieno	<i>Barbacenia brasiliensis</i> Willd. (BARREIRO et al., 1980)
63	3 β -Hidroxidamara-20,24-dieno	<i>Barbacenia brasiliensis</i> Willd. (BARREIRO et al., 1980)

64	20-Nor-4-metil-8,11,13-trien-3,16-dione	<i>Vellozia compacta</i> Mart. ex Schult. & Schult.f. (PINTO, 1980) <i>Vellozia ornithophila</i> Mello-Silva (PINTO; FURTADO; GONZAGA, 2010)
65	(4aR,7R,8aR)-7-Alil-4a-(hidroximetil)-1,1,7-trimetildodecahidrofenantren-8a(2H)-ol	<i>Vellozia aloifolia</i> Mart. (GARCEZ et al., 1981)
66	(4aR,7R,8aR)-7-Alil-8a-hidroxi-4a-(hidroximetil)-1,1,7-trimetildodecahidrofenantren-9(1H)-one	<i>Vellozia aloifolia</i> Mart. (GARCEZ et al., 1981)
67	(4aR,7R,8aR,13R)-7-Alil-1,1,7-trimetildecáhidro-2H,6H-8a,4a-(epoxietano)fenantren-13-ol	<i>Vellozia aloifolia</i> Mart. (GARCEZ et al., 1981)
68	(4aR,7R,8aR,13R)-7-Alil-1,1,7-trimetildecáhidro-2H,6H-8a,4a-(epoxietano)fenantren-9,13-diol	<i>Vellozia aloifolia</i> Mart. (GARCEZ et al., 1981)
69	12- β -Hidroxi-9,11- dehidro-caurano	<i>Vellozia caput-ardeae</i> L.B.Sm. & Ayensu (PINTO et al., 1981)
70	12-Oxo-9,11-dehidro-caurano	<i>Vellozia caput-ardeae</i> L.B.Sm. & Ayensu (PINTO et al., 1981)
71	Veloziolídeo	<i>Vellozia candida</i> J.C.Mikan (PINTO et al., 1982a) <i>Vellozia candida</i> J.C.Mikan (PINTO et al., 1983b)
72	Veloziolona	<i>Vellozia caput-ardeae</i> L.B.Sm. & Ayensu (PINTO et al., 1982b)
73	13-Hidroxi-15,16-bis-nor-isopimaran-20,8-olídeo	<i>Vellozia aloifolia</i> Mart. (PINTO et al., 1983a)
74	Epoxicorcovadina	<i>Vellozia candida</i> J.C.Mikan (PINTO et al., 1983b)
75	Epoxivelozina	<i>Vellozia candida</i> J.C.Mikan (PINTO et al., 1983b)
76	11,12-Dihidroveloziolona	<i>Vellozia caput-ardeae</i> L.B.Sm. & Ayensu (PINTO et al., 1983c)
77	<i>ent</i> -11- α -Hidroxicaur-16-eno	<i>Vellozia caput-ardeae</i> L.B.Sm. & Ayensu (PINTO et al., 1983d)
78	<i>ent</i> -9- β -Hidroxicaur-16-eno	<i>Vellozia caput-ardeae</i> L.B.Sm. & Ayensu (PINTO et al., 1983d)
79	<i>ent</i> -9- β ,11- α -Dihidroxi-caur-16-eno	<i>Vellozia caput-ardeae</i> L.B.Sm. & Ayensu (PINTO et al., 1983d)
80	Compactol	<i>Vellozia compacta</i> Mart. ex Schult. & Schult.f. (PINTO; BORGES, 1983) <i>Vellozia patens</i> L.B.Sm. & Ayensu (PINTO et al., 1986b)
81	Compactotriol	<i>Vellozia compacta</i> Mart. ex Schult. & Schult.f. (PINTO; BORGES, 1983)
82	12- β -Hidroxi-7-oxopimar-8(9),15-dieno	<i>Vellozia compacta</i> Mart. ex Schult. & Schult.f. (PINTO; BORGES, 1983) <i>Vellozia nanuzae</i> L.B.Sm. & Ayensu (PINTO; SILVA; VALENTE, 1988)

		<i>Vellozia ornithophila</i> Mello-Silva (PINTO; FURTADO; GONZAGA, 2010)
83	11- β -Hidroxi-7-oxopimar-8(9),15-dieno	<i>Vellozia compacta</i> Mart. ex Schult. & Schult.f. (PINTO; BORGES, 1983) <i>Vellozia ornithophila</i> Mello-Silva (PINTO; FURTADO; GONZAGA, 2010)
84	7,11-Dioxopimar-8(9),15-dieno	<i>Vellozia compacta</i> Mart. ex Schult. & Schult.f. (PINTO; BORGES, 1983) <i>Vellozia ornithophila</i> Mello-Silva (PINTO; FURTADO; GONZAGA, 2010)
85	12- β -Hidroxi-7,11-dioxopimar-8,(9),15-dieno	<i>Vellozia compacta</i> Mart. ex Schult. & Schult.f. (PINTO; BORGES, 1983) <i>Vellozia ornithophila</i> Mello-Silva (PINTO; FURTADO; GONZAGA, 2010)
86	3,4,5,10,11-Tetrahidro-3,8,8-trimetil-fenantro[10,1-bc]piran-9(8H)-ona	<i>Vellozia epidendroides</i> Mart. ex Schult. & Schult.f. (PINTO; GONZAGA; FIORANI, 1984) <i>Vellozia glabra</i> J.C.Mikan (PINTO; GONZAGA; FIORANI, 1984) <i>Vellozia ornithophila</i> Mello-Silva (PINTO; FURTADO; GONZAGA, 2010)
87	3,4,5,10-en-11-Tetrahidro-3,8,8-trimetil-fenantro[10,1-bc]piran-9(8H)-ona	<i>Vellozia epidendroides</i> Mart. ex Schult. & Schult.f. (PINTO; GONZAGA; FIORANI, 1984) <i>Vellozia glabra</i> J.C.Mikan (PINTO; GONZAGA; FIORANI, 1984) <i>Vellozia ornithophila</i> Mello-Silva (PINTO; FURTADO; GONZAGA, 2010)
88	3,4,5,10,11-Tetrahidro-3,8,8-trimetil-fenantro[10,1-bc]piran-9(8H)-o	<i>Vellozia epidendroides</i> Mart. ex Schult. & Schult.f. (PINTO; GONZAGA; FIORANI, 1984) <i>Vellozia glabra</i> J.C.Mikan (PINTO; GONZAGA; FIORANI, 1984) <i>Vellozia ornithophila</i> Mello-Silva (PINTO; FURTADO; GONZAGA, 2010)
89	8- β -Hidroxi-3-oxopimar-15-eno	<i>Vellozia piresiana</i> L.B.Sm. (PINTO; PEIXOTO; FIORANI, 1994)
90	7- β -8- β -Dihidroxi-3-oxopimar-15-eno	<i>Vellozia piresiana</i> L.B.Sm. (PINTO; PEIXOTO; FIORANI, 1994)
91	8,11,13-Clestanta-trien-3,7-diona	<i>Vellozia piresiana</i> L.B.Sm. (PINTO; PEIXOTO; FIORANI, 1994)

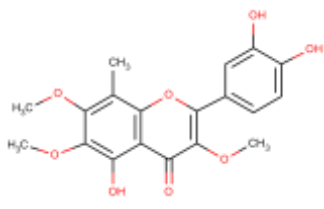
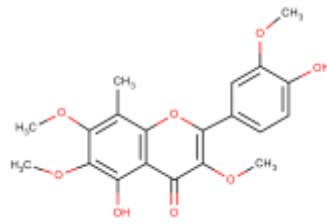
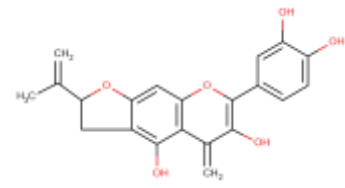
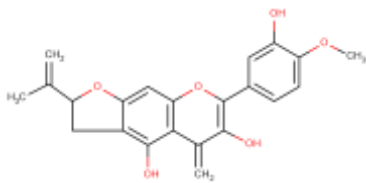
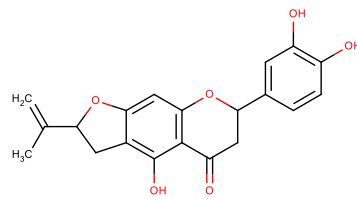
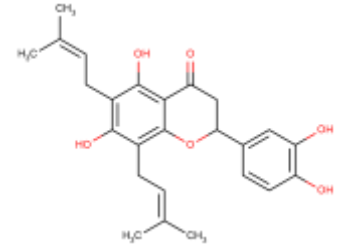
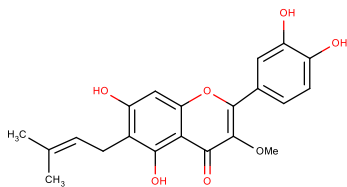
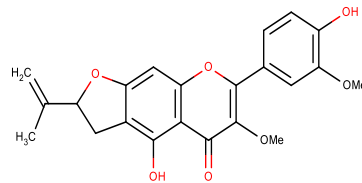
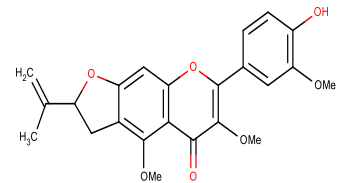
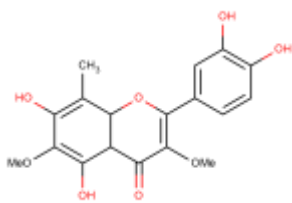
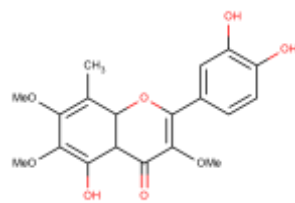
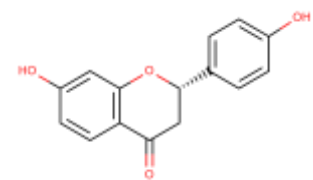
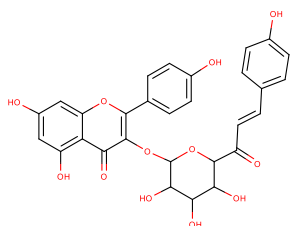
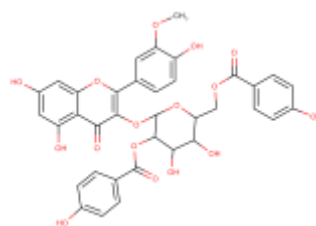
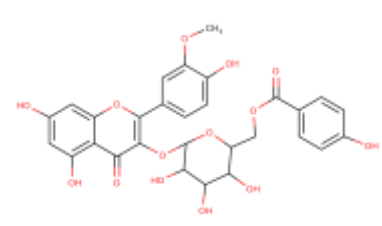
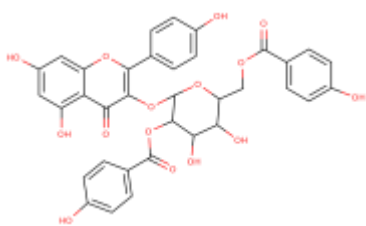
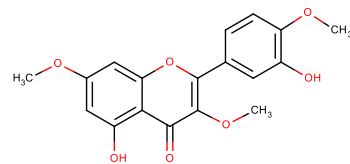
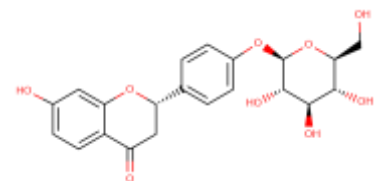
92	1,8,11,13-Cleistanta-tetraen-3,7-diona	<i>Vellozia piresiana</i> L.B.Sm. (PINTO; PEIXOTO; FIORANI, 1994)
93	8,11,13-Cleistanta-trien-3-ona	<i>Vellozia piresiana</i> L.B.Sm. (PINTO; PEIXOTO; FIORANI, 1994)
94	7- β -Hidroxil-8,11,13-cleistantatrien-3-ona	<i>Vellozia piresiana</i> L.B.Sm. (PINTO; PEIXOTO; FIORANI, 1994)
95	Ácido barbacênico	<i>Barbacenia flava</i> Mart. ex Schult. & Schult.f. (PINTO et al., 1985) <i>Barbacenia flava</i> Mart. ex Schult. & Schult.f. (PINTO; FRECHIANE; PEREIRA, 1988)
96	(4aR,7S,8aR,12S)-1,1,7-Trimetil-7-vinildecáhidro-2H,6H-8a,4a-(epoximetano)fenantren-12-ol	<i>Vellozia aloifolia</i> Mart. (PINTO et al., 1986a)
97	(4R,5S,10S)-Cleistanta-8,11,13-trien-19-ol	<i>Vellozia squamata</i> Pohl (PINTO et al., 1987)
98	Ácido (4R,5S,10S)-Cleistanta-8,11-13-trien-19-oico	<i>Vellozia squamata</i> Pohl (PINTO et al., 1987)
99	(4R,5S,10S)-Cleistanta-8,11-13-trien-19-al	<i>Vellozia squamata</i> Pohl (PINTO et al., 1987)
100	Ácido 3-Deoxibarbácenico	<i>Barbacenia flava</i> Mart. ex Schult. & Schult.f. (PINTO; FRECHIANE; PEREIRA, 1988)
102	Ácido 3-oxo-17-carboxi-3,18- <i>seco</i> -barbácenico	<i>Barbacenia flava</i> Mart. ex Schult. & Schult.f. (PINTO; FRECHIANE; PEREIRA, 1988)
102	Dihidroxi- γ -lactona	<i>Vellozia variabilis</i> Mart. ex Schult. & Schult.f. (PINTO et al., 1988a)
103	Ceto- γ -lactona	<i>Vellozia variabilis</i> Mart. ex Schult. & Schult.f. (PINTO et al., 1988a)
104	Hidroxi- γ -lactona	<i>Vellozia variabilis</i> Mart. ex Schult. & Schult.f. (PINTO et al., 1988a)
105	11-Hidroxi-cleistanta-8,11,13-trien-7-ona	<i>Vellozia nivea</i> L.B.Sm. & Ayensu (PINTO; MAÇAÍRA, 1988)
106	7,11-Diceto-14- α -hidroxi-cleistanta-8,12-dieno	<i>Vellozia nivea</i> L.B.Sm. & Ayensu (PINTO; MAÇAÍRA, 1988)
107	11- β -Hidroxi-20- <i>nor</i> -8(9),15-isopimaradien-7-one	<i>Vellozia pusilla</i> Pohl (PINTO et al., 1988b) <i>Vellozia nanuzae</i> L.B.Sm. & Ayensu (PINTO; SILVA; VALENTE, 1988)
108	20- <i>nor</i> -8(9),15-Isopimaradien-7,11-diona	<i>Vellozia pusilla</i> Pohl (PINTO et al., 1988b)
109	7,16-Epoxi-20- <i>nor</i> -5,7,9,11,13-cleistantapentaen-3-ona	<i>Vellozia nanuzae</i> L.B.Sm. & Ayensu (PINTO; SILVA; VALENTE, 1988)
110	7,16-Epoxi-20- <i>nor</i> -1,5,7,9,11,13-cleistantapentaen-3-ona	<i>Vellozia nanuzae</i> L.B.Sm. & Ayensu (PINTO; SILVA; VALENTE, 1988)
111	(5R,7S,10S)-7- α ,16,7- β -20-Diepoxicleistanta-1,8,11,13-tetraen-3-ona	<i>Vellozia nanuzae</i> L.B.Sm. & Ayensu (PINTO; SILVA; VALENTE, 1988) <i>Vellozia ornithophila</i> Mello-Silva (PINTO; FURTADO; GONZAGA, 2010)

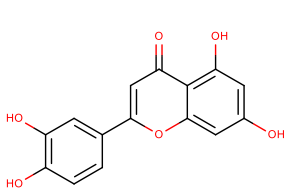
112	(5R,7S,10S)-7- α ,16,7- β -20-Diepoxycelestano-8,11,13-trien-3-ona	<i>Vellozia nanuzae</i> L.B.Sm. & Ayensu (PINTO; SILVA; VALENTE, 1988) <i>Vellozia ornithophila</i> Mello-Silva (PINTO; FURTADO; GONZAGA, 2010)
113	Nanuzona	<i>Vellozia nanuzae</i> L.B.Sm. & Ayensu (PINTO; SILVA; VALENTE, 1988)
114	11- β -Hidroxi-nanuzona	<i>Vellozia nanuzae</i> L.B.Sm. & Ayensu (PINTO; SILVA; VALENTE, 1988)
115	15-Isopimaren-8 β ,20-diol	<i>Vellozia aloifolia</i> Mart. (PINTO; QUEIROZ; GARCEZ, 1991)
116	8- β ,20-Dihidroxi-15-isopimaren-7-ona	<i>Vellozia aloifolia</i> Mart. (PINTO; QUEIROZ; GARCEZ, 1991)
117	8,20R-Epoxi-15-isopimaren-20R-ol	<i>Vellozia aloifolia</i> Mart. (PINTO; QUEIROZ; GARCEZ, 1991)
118	8,20R-Epoxi-15-isopimaren-7- β -20R-diol	<i>Vellozia aloifolia</i> Mart. (PINTO; QUEIROZ; GARCEZ, 1991)
119	8,20R-15,16-Diepoxi-20R-isopimaranol	<i>Vellozia aloifolia</i> Mart. (PINTO; QUEIROZ; GARCEZ, 1991)
120	16-Cloro-8,20R-epoxi-15,20-isopimaranediol	<i>Vellozia aloifolia</i> Mart. (PINTO; QUEIROZ; GARCEZ, 1991)
121	8,20-Epoxi-15,16- <i>bis-nor</i> -isopimaran-13,20R-diol	<i>Vellozia aloifolia</i> Mart. (PINTO; QUEIROZ; GARCEZ, 1991)
122	13-Hidroxi-15,16- <i>bis-nor</i> -isopimaran-20,8-olideo	<i>Vellozia aloifolia</i> Mart. (PINTO; QUEIROZ; GARCEZ, 1991)
123	20-Hidroxicelestano-8,11,13-trien-7-ona	<i>Vellozia declinans</i> Goethart & Henrand (PINTO; VALENTE; PIZZOLLATE, 1991)
124	20-Carboxaldeído-celestano-8,11,13-trien-7-ona	<i>Vellozia declinans</i> Goethart & Henrand (PINTO; VALENTE; PIZZOLLATE, 1991)
125	18-Acetoxi-15-isopimaren-7 β ,8-diol	<i>Vellozia patens</i> L.B.Sm. & Ayensu (PINTO; FIGUEIREDO; EPIFÂNIO, 1992)
126	Ácido 7- β ,8-dihidroxi-15-isopimaren-18-oico	<i>Vellozia patens</i> L.B.Sm. & Ayensu (PINTO; FIGUEIREDO; EPIFÂNIO, 1992)
127	8,18-Dihidroxi-15-isopimaren-7-ona	<i>Vellozia patens</i> L.B.Sm. & Ayensu (PINTO; FIGUEIREDO; EPIFÂNIO, 1992)
128	Ácido 8- β -hidroxi-7-oxo-15-isopimaren-18-oico	<i>Vellozia patens</i> L.B.Sm. & Ayensu (PINTO; FIGUEIREDO; EPIFÂNIO, 1992)
129	15-Isopimaren-7- β -8,14- β -triol	<i>Vellozia patens</i> L.B.Sm. & Ayensu (PINTO; FIGUEIREDO; EPIFÂNIO, 1992)
130	8,14- β -Dihidroxi-15-isopimaren-7-ona	<i>Vellozia patens</i> L.B.Sm. & Ayensu (PINTO; FIGUEIREDO; EPIFÂNIO, 1992)

131	Ácido 7- β ,8,14- β -trihidroxi-15-isopimare-18-oico	<i>Vellozia patens</i> L.B.Sm. & Ayensu (PINTO; FIGUEIREDO; EPIFÂNIO, 1992)
132	19-nor-8-Dihidroxi-15-isopimaren-7-ona	<i>Vellozia variabilis</i> Mart. ex Schult. & Schult.f. (PINTO et al., 1992)
133	19-nor-8,14 β -Dihidroxi-15-isopimaren-7-ona	<i>Vellozia variabilis</i> Mart. ex Schult. & Schult.f. (PINTO et al., 1992)
134	Ácido 7- β ,8- β ,13- α - trikidroxi-15,16- <i>bis-nor</i> -isopimar- 18-oico	<i>Vellozia variabilis</i> Mart. ex Schult. & Schult.f. (PINTO et al., 1993)
135	Ácido 2-oxo-5- α ,8- α -13,14,15,16-tetranorclerod-3-en-12-oico	<i>Vellozia aloifolia</i> Mart. (PINTO et al., 1994)
136	2-Oxo-5- α ,8- α -cleroda-3,13-dien-15,16-olideo	<i>Vellozia aloifolia</i> Mart. (PINTO et al., 1994)
137	Ácido dimetil-éster-8,11,13-cleistantatrien-17,19-dioico	<i>Vellozia squamata</i> Pohl (PINTO et al., 1995a)
138	Ácido dimetil-éster-8,11,13-cleistantatrien-7-one-17-oico	<i>Vellozia squamata</i> Pohl (PINTO et al., 1995a)
139	Ácido 8,11,13-cleistantantrien-7-one- 19-oico	<i>Vellozia squamata</i> Pohl (PINTO et al., 1995a)
140	Ácido 5(6)-tetra- <i>nor</i> -friedolabden-12-oic	<i>Vellozia squamata</i> Pohl (PINTO et al., 1995a)
141	5(6)-Tetra- <i>nor</i> -friedolabden-12-ol	<i>Vellozia squamata</i> Pohl (PINTO et al., 1995a)
142	Ácido 8(14)-totarane-13- β -ol-19-oico	<i>Vellozia squamata</i> Pohl (PINTO et al., 1995b)
143	19-Hidroxi-8(9),15-abieta-dieno	<i>Vellozia squamata</i> Pohl (PINTO et al., 1996a)
144	19-Hidroxi-8(9),13(16)-14 <i>S</i> ,17-ciclo-lab-dadieno	<i>Vellozia squamata</i> Pohl (PINTO et al., 1996a)
145	17-Hidroxi-8(9),15-isopimara-dieno	<i>Vellozia squamata</i> Pohl (PINTO et al., 1996a)
146	Ácido 13,14,15,16-tetra- <i>nor</i> -friedo-1-(10)-labden-12,19-dioico	<i>Vellozia stipitata</i> L.B.Sm. & Ayensu (PINTO et al., 1996b)
147	Candidalactona	<i>Vellozia candida</i> J.C. Mikan (VALENTE et al., 1997)
148	Candidalactona metil éster	<i>Vellozia candida</i> J.C. Mikan (VALENTE et al., 1997)
149	Candidenodiol	<i>Vellozia candida</i> J.C. Mikan (VALENTE et al., 1997)
150	Ácido metil éster 7-oxo-8,11,13-cleistantatrien-17-oico	<i>Vellozia squamata</i> Pohl (PINTO; ANTUNES, 1997)
151	Ácido metil éster 7-oxo-8,11,13-cleistantatrien-19-oico	<i>Vellozia squamata</i> Pohl (PINTO; ANTUNES, 1997)
152	8,11,13-Cleistantatrien-7-one-19,20b-olídeo	<i>Vellozia compacta</i> Mart. Ex Schult. & Schult F. (RIEHL; PINTO, 2000)
153	3-Geranyl-4-hidroxibenzoato	<i>Vellozia plicata</i> Mart. (RIEHL et al., 2000)
154	8(9),15-Isopimarandien-7-ona-20,12-carbolactona	<i>Vellozia pusilla</i> Pohl. (DANTAS; VALENTE; PINTO, 2003)
155	6- α -Hidroxianoneno	<i>Barbacenia macrantha</i> Lem. (PINTO; EPIFÂNIO; ZOCHER, 2004)
156	Ácido ailtonico	<i>Barbacenia macrantha</i> Lem. (PINTO; EPIFÂNIO; ZOCHER, 2004)

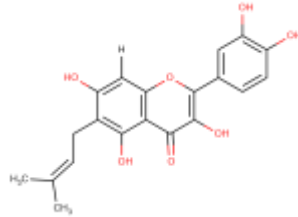
157	Metil xerofitolato A	<i>Vellozia plicata</i> Mart. (RIEHL; PINTO; FIGUEROA-VILLAR et al., 2006)
158	Ácido patagônico	<i>Vellozia plicata</i> Mart. (PINTO et al., 2010)
159	Ácido clerodano-15-metoxi-3,13-dien-15,16-olideo-8-oico	<i>Vellozia plicata</i> Mart. (PINTO et al., 2010)
160	(5 <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,13 <i>R</i>)-Halim-1,10-eno-15,16-diol	<i>Vellozia subscabra</i> J.C. Mikan (SILVA et al., 2015)
161	8(9),15-Isopimaradien-1,3,7,11-tetraona	<i>Vellozia gigantea</i> N.L.Menezes & Mello-Silva (FERREIRA et al., 2017)
162	7-Oxo-8,11,13-cleistantatrien-3-ol	<i>Vellozia gigantea</i> N.L.Menezes & Mello-Silva (FERREIRA et al., 2017)
163	3,20-Epoxi-7-oxo-8,11,13-cleistanta-trien-3-ol	<i>Vellozia gigantea</i> N.L.Menezes & Mello-Silva (FERREIRA et al., 2017)
164	20- <i>nor</i> -3,7-Dioxo-1,8,11,13-cleistanta-tetraen-10-ol	<i>Vellozia gigantea</i> N.L.Menezes & Mello-Silva (FERREIRA et al., 2017)

Fonte: Própria do autor.

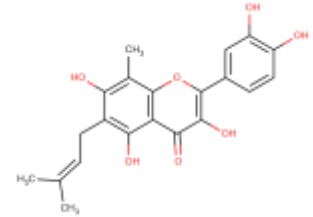
Figura 03. Substâncias isolados da família Velloziaceae**(1)****(2)****(3)****(4)****(5)****(6)****(7)****(8)****(9)****(10)****(11)****(12)****(13)****(14)****(15)****(16)****(17)****(18)**



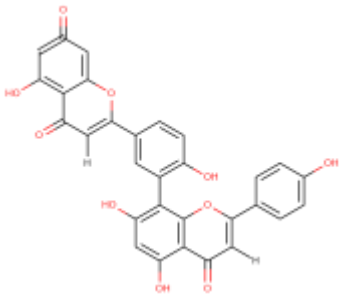
(19)



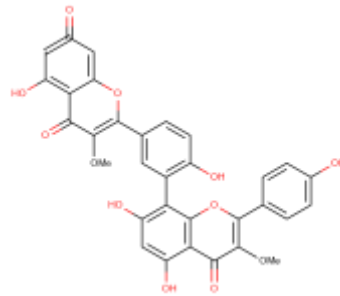
(20)



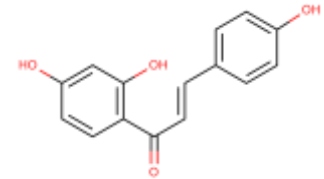
(21)



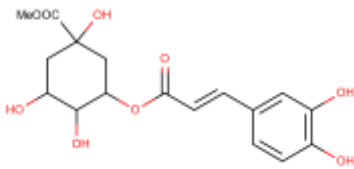
(22)



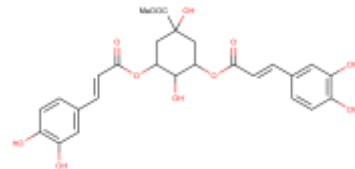
(23)



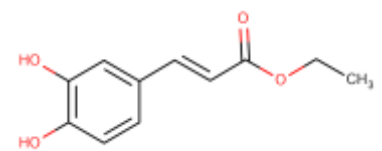
(24)



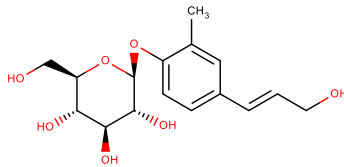
(25)



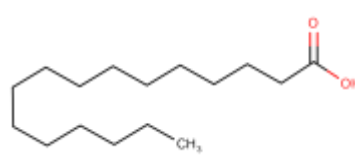
(26)



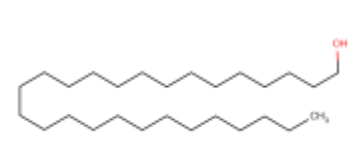
(27)



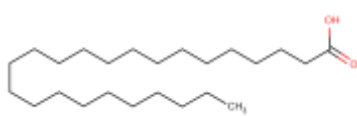
(28)



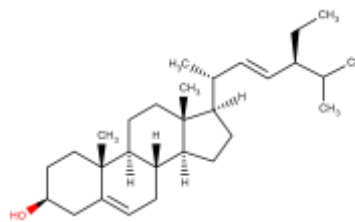
(29)



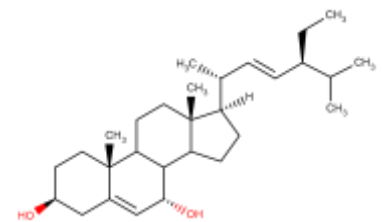
(30)



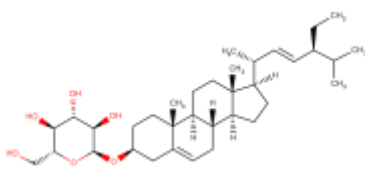
(31)



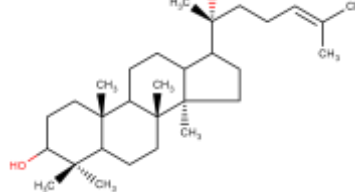
(32)



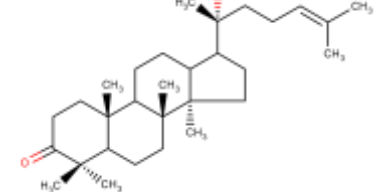
(33)



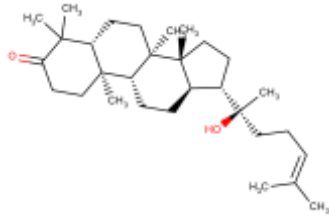
(34)



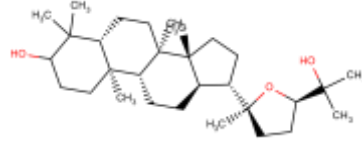
(35)



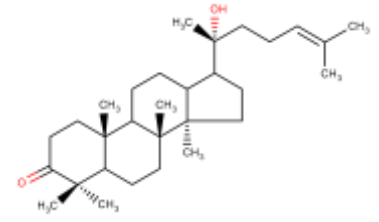
(36)



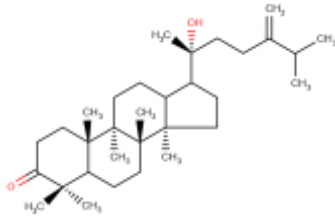
(37)



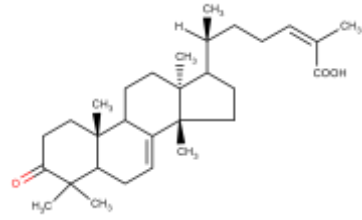
(38)



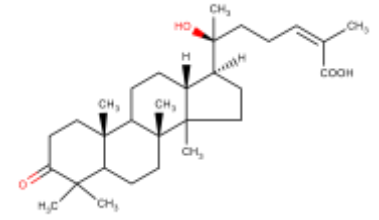
(39)



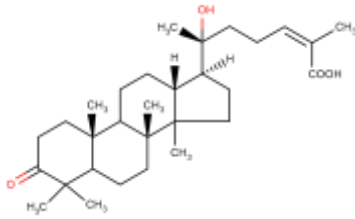
(40)



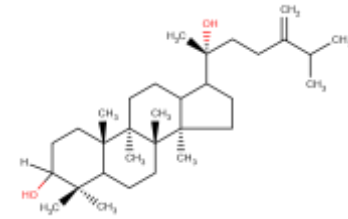
(41)



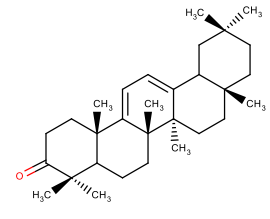
(42)



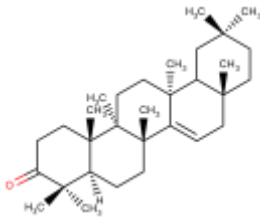
(43)



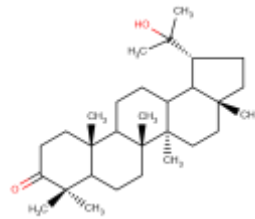
(44)



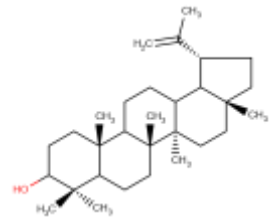
(45)



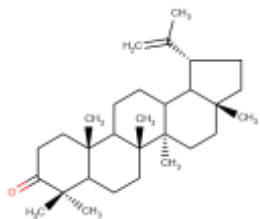
(46)



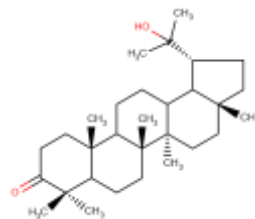
(47)



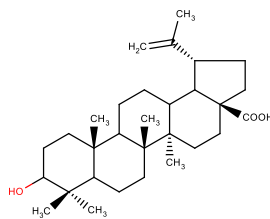
(48)



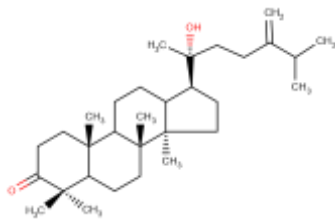
(49)



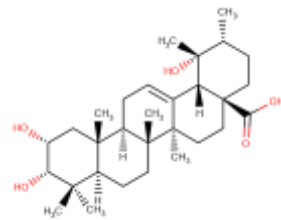
(50)



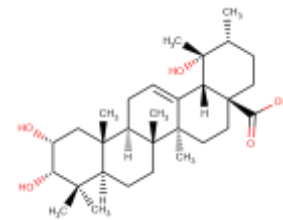
(51)



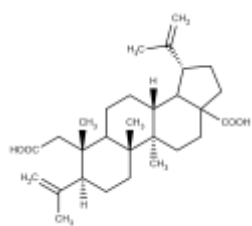
(52)



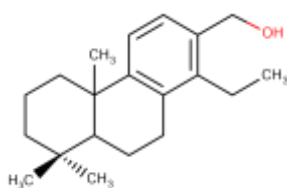
(52)



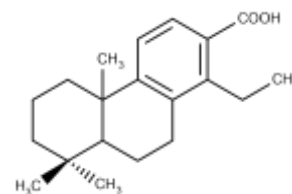
(54)



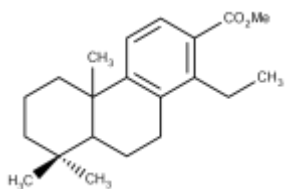
(55)



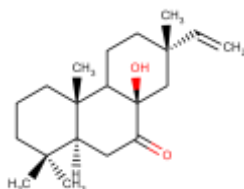
(56)



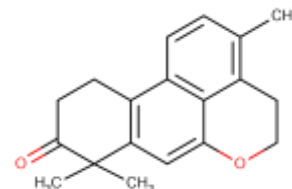
(57)



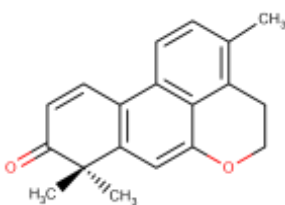
(58)



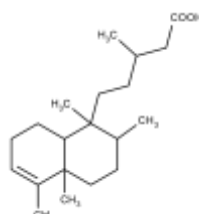
(59)



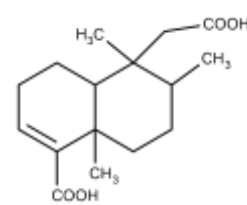
(60)



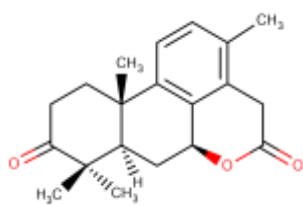
(61)



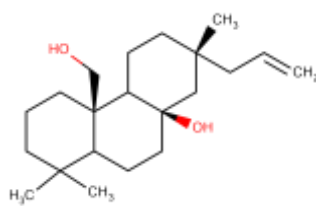
(62)



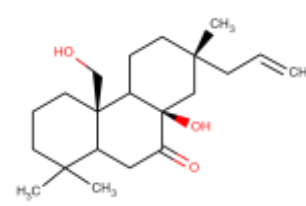
(63)



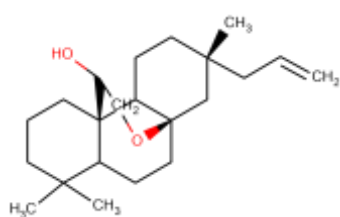
(64)



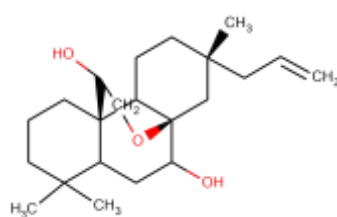
(65)



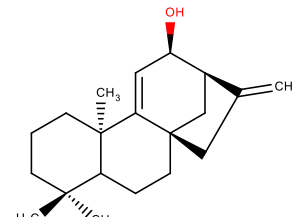
(66)



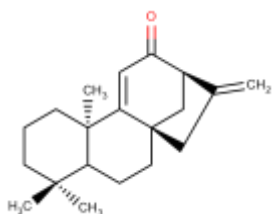
(67)



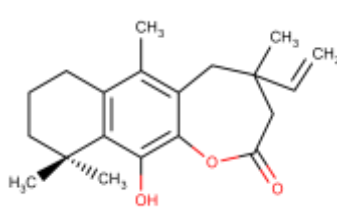
(68)



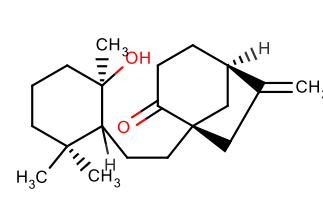
(69)



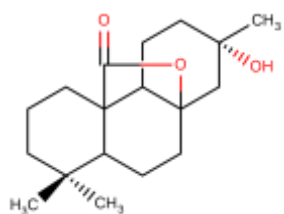
(70)



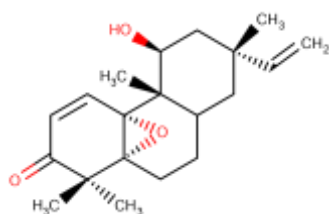
(71)



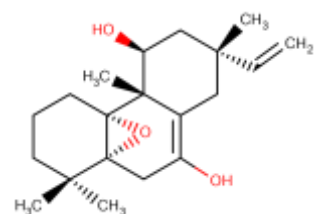
(72)



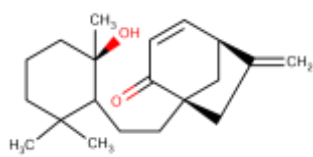
(73)



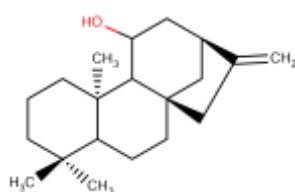
(74)



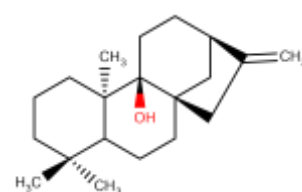
(75)



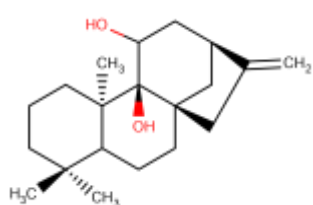
(76)



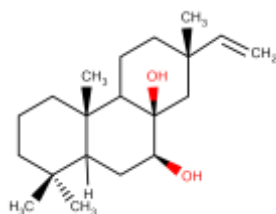
(77)



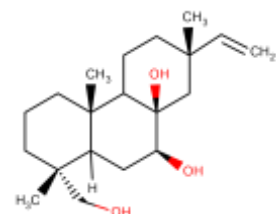
(78)



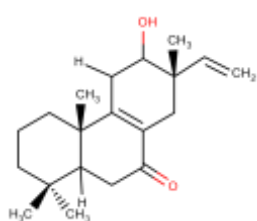
(79)



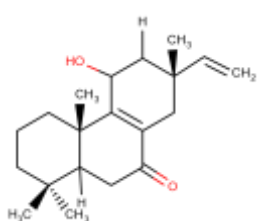
(80)



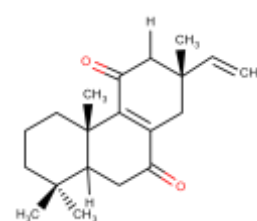
(81)



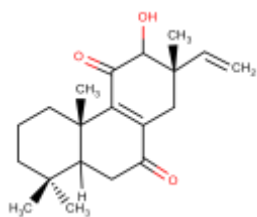
(82)



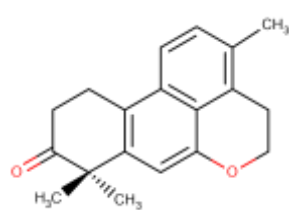
(83)



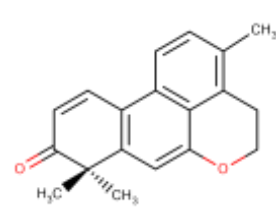
(84)



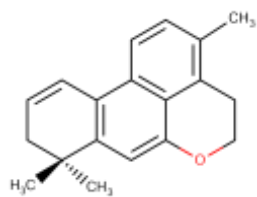
(85)



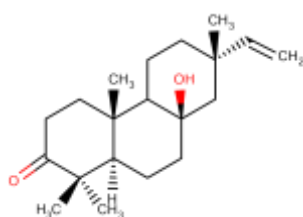
(86)



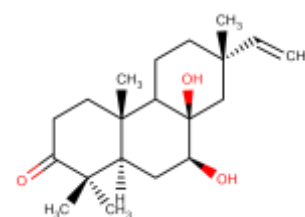
(87)



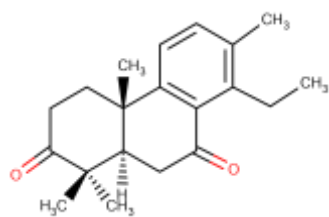
(88)



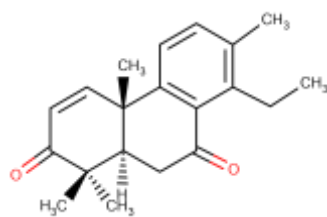
(89)



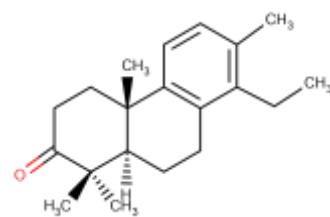
(90)



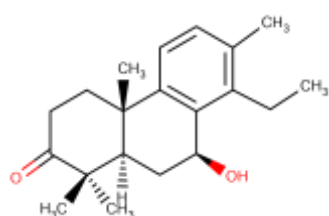
(91)



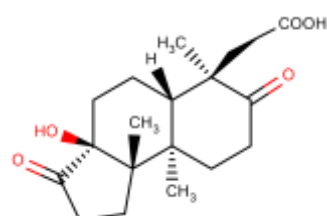
(92)



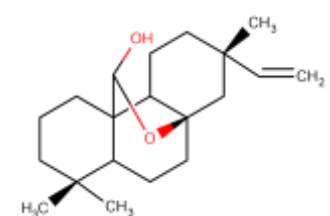
(93)



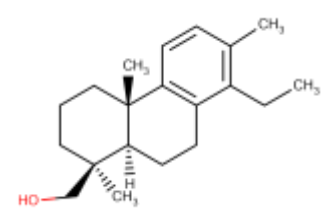
(94)



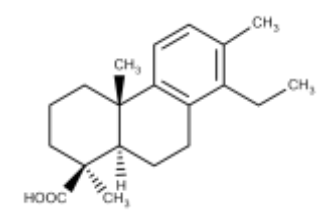
(95)



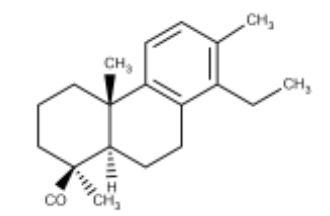
(96)



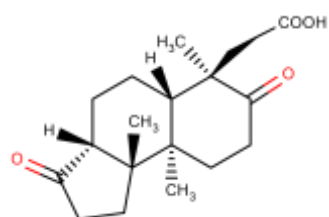
(97)



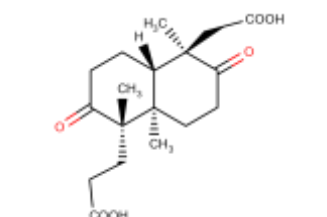
(98)



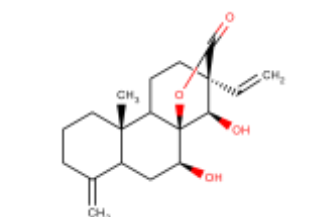
(99)



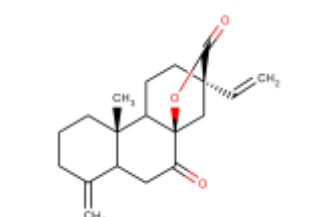
(100)



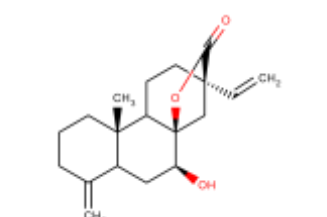
(101)



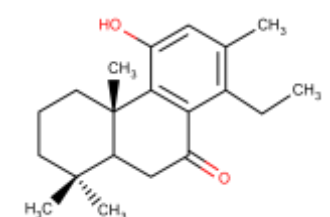
(102)



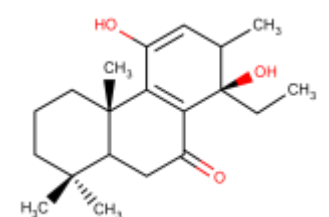
(103)



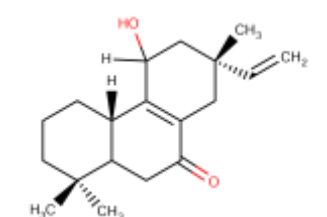
(104)



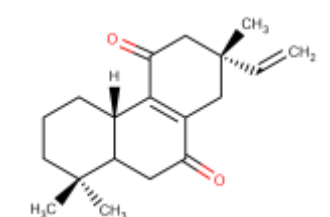
(105)



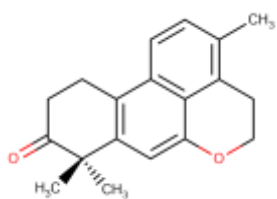
(106)



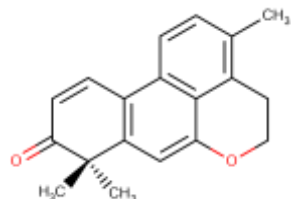
(107)



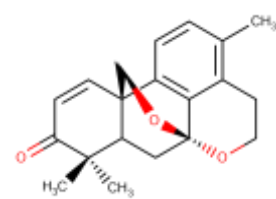
(108)



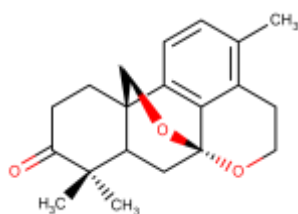
(109)



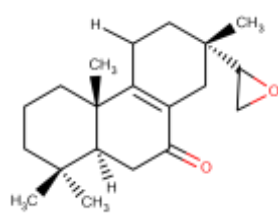
(110)



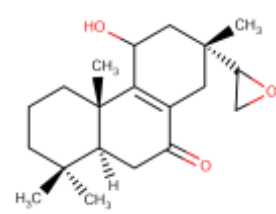
(111)



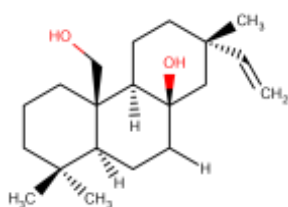
(112)



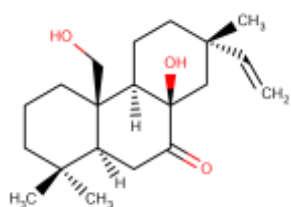
(113)



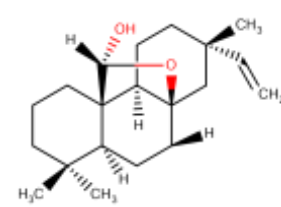
(114)



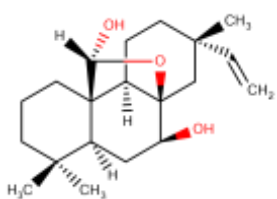
(115)



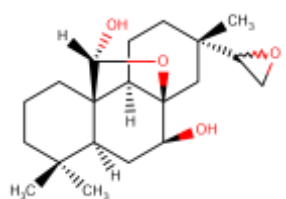
(116)



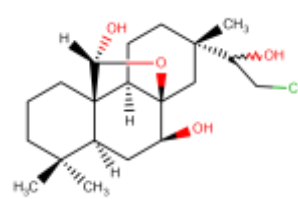
(117)



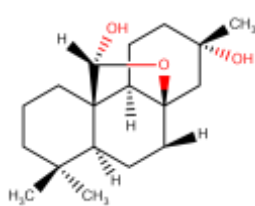
(118)



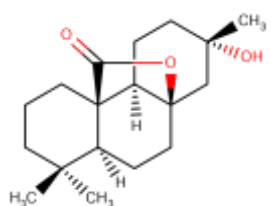
(119)



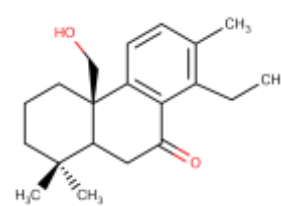
(120)



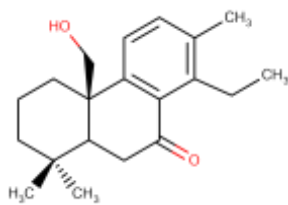
(121)



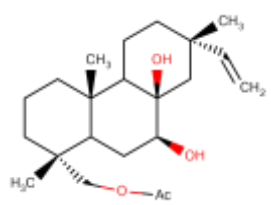
(122)



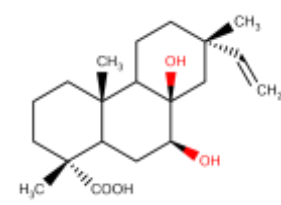
(123)



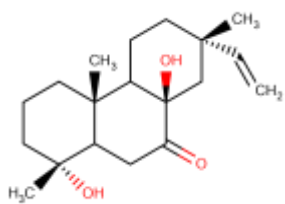
(124)



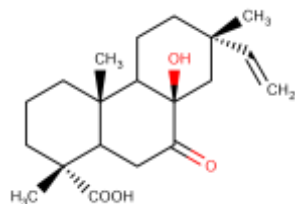
(125)



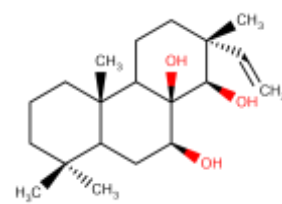
(126)



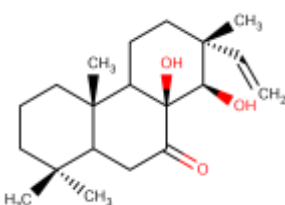
(127)



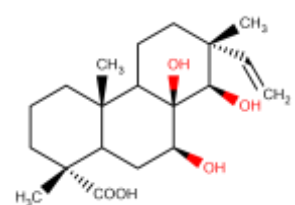
(128)



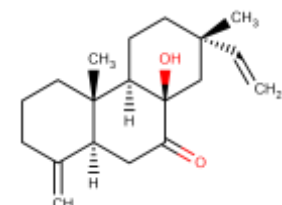
(129)



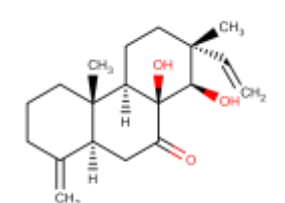
(130)



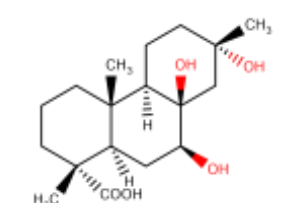
(131)



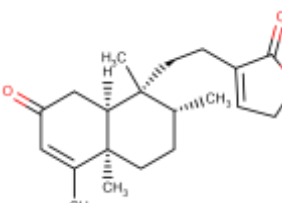
(132)



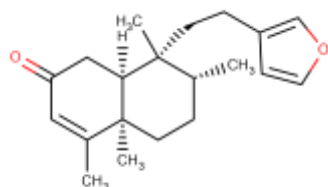
(133)



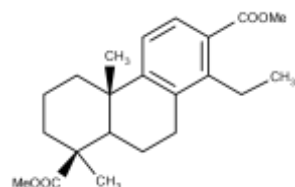
(134)



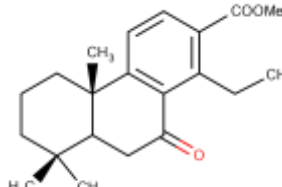
(135)



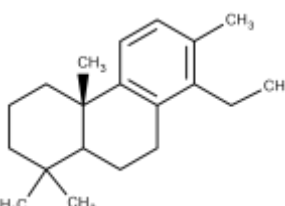
(136)



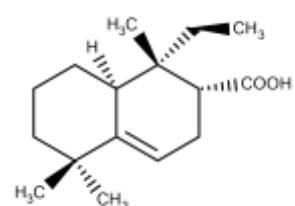
(137)



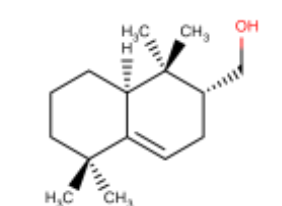
(138)



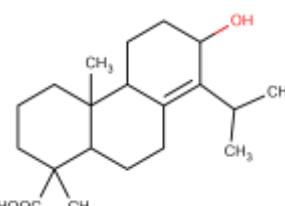
(139)



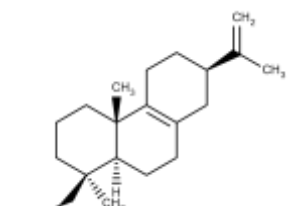
(140)



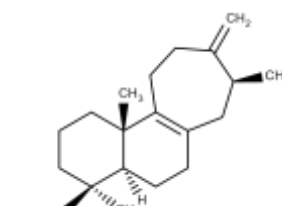
(141)



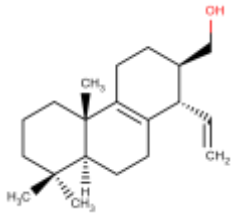
(142)



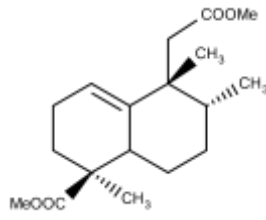
(143)



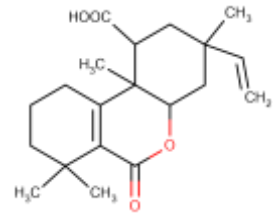
(144)



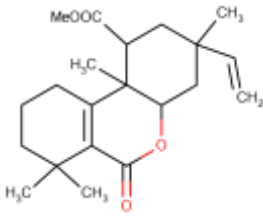
(145)



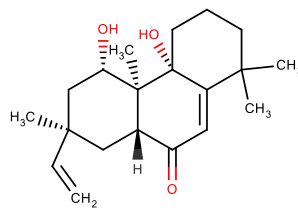
(146)



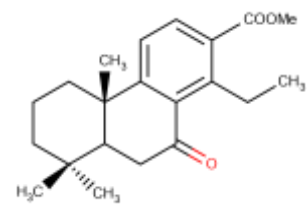
(147)



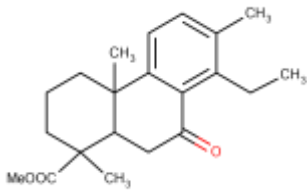
(148)



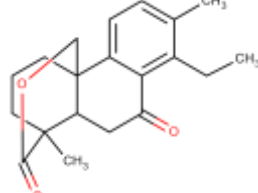
(149)



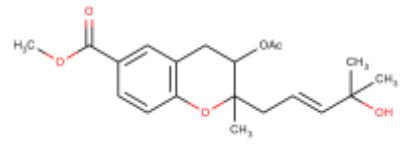
(150)



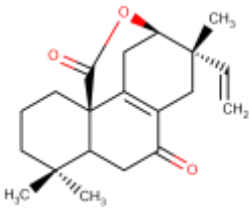
(151)



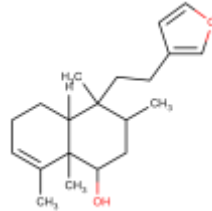
(152)



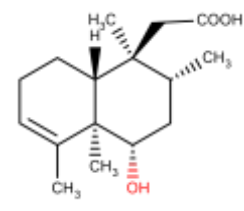
(153)



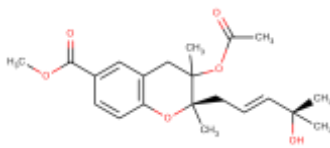
(154)



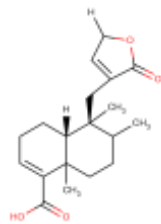
(155)



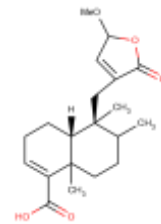
(156)



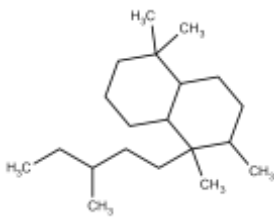
(157)



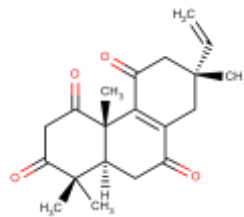
(158)



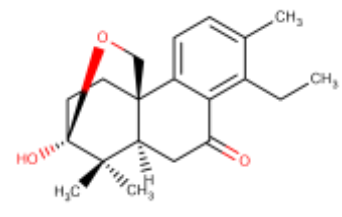
(159)



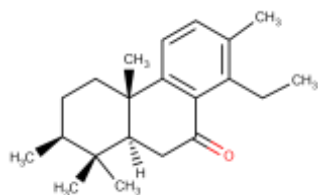
(160)



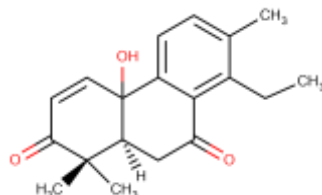
(161)



(162)



(163)



(164)

Fonte: Própria do autor.

3.2 Considerações gerais sobre o gênero *Vellozia* Vand.

O gênero *Vellozia* é nativo e não endêmico do Brasil, compreendendo atualmente 121 espécies, onde estas se apresentam na forma de arbustos, ervas ou subarbustos (FLORA DO BRASIL, 2019). Há relatos de sua identificação no Brasil, Bolívia, Colômbia, Panamá, México, países da África do Sul, Madagascar e Arábia (Figura 04) (MELLO-SILVA et al. 2011).

Figura 04. Distribuição geográfica do gênero *Vellozia* pelo mundo representado em amarelo



Fonte: DISCOVERLIFE, 2019.

No Brasil, a maioria das espécies do gênero ocorrem no Planalto Central, com muitos representantes concentrados na Cadeia do Espinhaço em Minas Gerais. Outras, em menor número, possuem ocorrência confirmada no Amazonas, Pará, Roraima, Tocantins, Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Sergipe, Goiás, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo e Distrito Federal (MELLO-

SILVA, 2005; FLORA DO BRASIL, 2019). Nota-se a presença das espécies desse gênero em todas as regiões brasileiras, excetuando-se a região Sul (Figura 05).

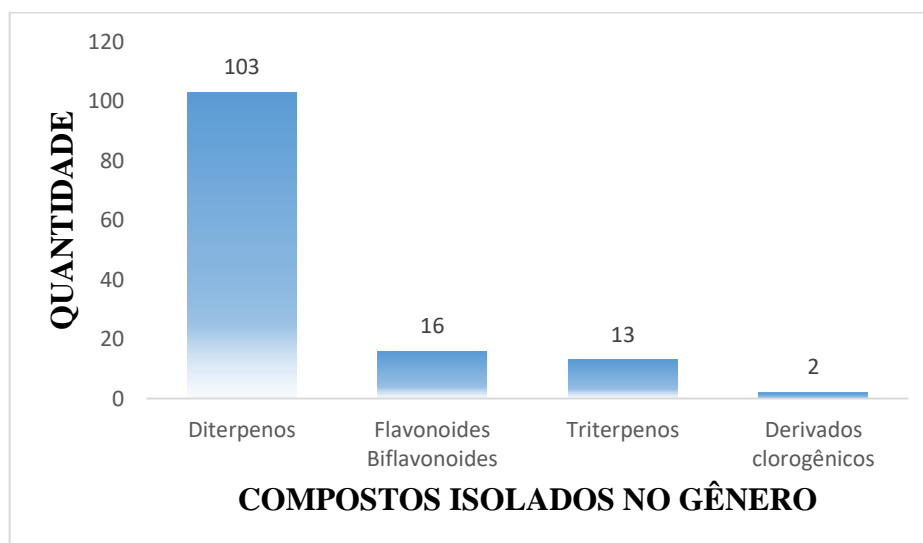
Vellozia é o gênero da família Velloziaceae que possui o maior número de estudos fitoquímicos, e em sua maioria, realizada por grupos de pesquisa do nosso país. Em um levantamento bibliográfico sobre todas as substâncias isoladas no gênero, observou-se uma predominância no isolamento de diterpenos, seguido de flavonoides, triterpenos e derivados clorogênicos, no entanto, há restritos estudos farmacológicos (Figura 06, página 55).

Figura 05. Distribuição geográfica com ocorrências confirmadas de espécies do gênero *Vellozia* pelas por estados das regiões brasileiras



Fonte: Adaptação de MELLO-SILVA, 2015.

Figura 06. Classes de compostos isolados até 2019 do gênero *Vellozia*



Fonte: Própria do autor.

A maioria das espécies desse gênero apresentam aspectos físicos semelhantes (tamanho, forma da folha, flor, etc.) e são chamadas popularmente como canela-de-ema e algumas espécies utilizadas como anti-inflamatórias e tratamento da dor e infecções (MESSIAS et al., 2015). Dessa forma, alerta-se para o cuidado quanto à utilização das espécies para que sejam utilizadas corretamente evitando agravos à saúde.

3.3 Considerações gerais sobre a espécie *Vellozia plicata* Mart.

A espécie *Vellozia plicata*, conhecida popularmente como canelinha ou canela-de-ema (Figura 07, página 56) é nativa e endêmica do Brasil (Figura 08, página 56). Esta espécie encontra-se distribuída no Nordeste (Bahia, Paraíba, Pernambuco e Piauí) e Sudeste (Minas Gerais, Espírito Santo e Rio de Janeiro) do país, sendo que o infuso de suas partes aéreas é utilizado na medicina popular como anti-inflamatória e tônica (AGRA et al., 2008; MELLO-SILVA, 2015), além do que alguns constituintes isolados desta espécie possuem estudos que tratam do potencial-anti-HIV-1 (MEHLA; BIVALKAR-MEHLA; CHAUHAN, 2011).

Figura 07. Espécie *Vellozia plicata* Mart.



Fonte: TAVARES, J.F., 2017.

Figura 08. Distribuição geográfica da espécie *Vellozia plicata* pelo mundo representado em amarelo



Fonte: DISCOVERLIFE, 2019.

Assim, como observado nos gêneros da família Velloziaceae, a espécie *Vellozia plicata* também apresentou diversas classificações com o passar dos anos, sendo considerados sinônimos os heterotípicos: *Nanuza almeidae*, *Nanuza luetzelburgii*, *Vellozia triquetra*, *Xerophyta triquetra*, *Nanuza plicata* e *Xerophyta plicata* (MELLO-SILVA, 2015).

Até o ano de 2019, nove substâncias foram isoladas de *Vellozia plicata* (Figura 03, página 44):

- WILLIAMS et al., 1987: amentoflavona (**22**);
- RIEHL, 2000: ácido xeroftólico (**153**);
- RIEHL, 2006: xeroftalato A (**157**);
- PINTO et al., 2010: amentoflavona (**22**), 3',8''-biisocampferídeo (**23**), luteolina (**19**), 3-*O*-cafeoil quinato de metila (**25**), ácido 3,5-di-*O-E*-cafeoil quínico (**26**), ácido patagônico (**158**) e ácido clerodano-15-metoxi-3,13-dien-15,16-olideo-8-oico (**159**).

3.4 Considerações gerais e processo biossintético de flavonoides/biflavonoides

Os flavonoides pertencem a uma grande família de compostos fenólicos, também conhecidos como polifenóis. Levando em consideração o processo evolutivo das plantas, destaca-se que os compostos fenólicos possuíram um papel fundamental para a adaptação à vida das espécies no planeta (HICHRI et al., 2011).

Muitas plantas terrestres contêm flavonoides e estão presentes em todos os órgãos da planta, variando a sua concentração, a depender da sua necessidade. Ultimamente, estes são conhecidos pelos efeitos propostos à saúde, sendo abundantes comercialmente em frutas e chás (PRASAD et al., 2010).

Quando biossintetizados pelas plantas, os flavonoides possuem uma grande variedade de funções, dentre elas: pigmentação das flores, processo de desenvolvimento, polinização e, principalmente, proteção contra radiação ultravioleta e patógenos (GROENENBOOM et al., 2013).

Diversas atividades biológicas desses metabólitos secundários foram verificadas em humanos, tendo destaque: atividade antioxidante, anti-inflamatória, antidiabética,

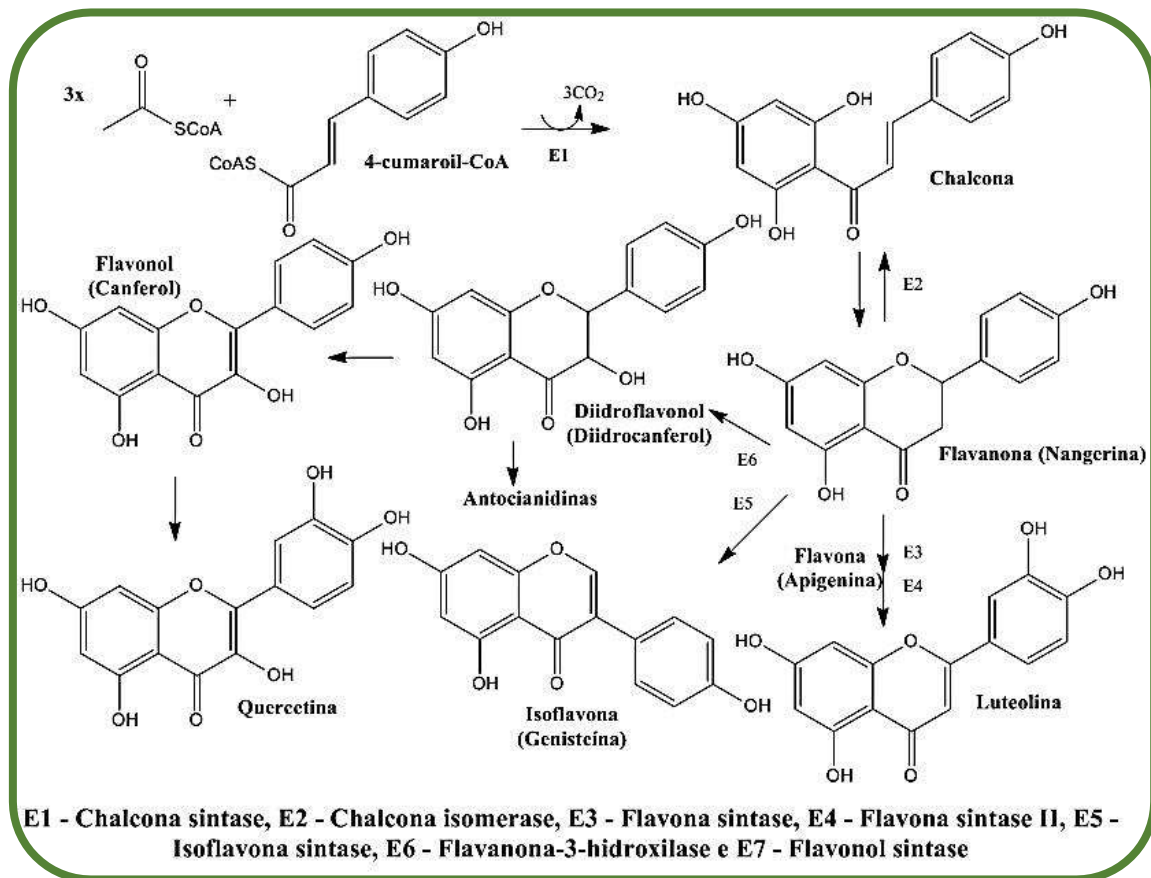
antimicrobiana, neuroprotetora, pró-apoptóticas, antiproliferativa, entre outras (NORDEEN et al., 2013; BALDISSEROTTO et al., 2015).

Quimicamente, os flavonoides englobam uma média de 10000 moléculas identificadas, consistindo em dois anéis aromáticos com seis átomos de carbono cada (anel A e B), conectados por um heterociclo com três átomos de carbono (anel C) (VANHOLME et al., 2010; POLLASTRI; TATTINI, 2011).

A classificação dos flavonoides baseia-se no nível de oxidação do heterociclo C, na presença de substituições de hidroxilas e metilas nos anéis A e B, como também, em modificações suplementares, tais como: glicosilação (glicose, ramnose, galactose, arabinose e, em menor grau, dissacarídeos), acilação (ácidos cumárico e cafeico) e a polimerização (ARON; KENNEDY, 2008; HICHRI et al., 2011).

A biossíntese dos flavonoides (Figura 09, página 59) apresenta uma rota mista: a via do acetato e a do ácido chiquímico. A rota do acetato permite a formação do anel A do núcleo flavonoídico ao passo que, a rota do ácido chiquímico, fornece a fenilalanina e o ácido cinâmico para formar o anel B e uma ponte com três átomos de carbono para se unir ao anel A, formando o anel C. A chalcona pré-gerada como o primeiro flavonoide da via (MARQUES, 2008; DEWICK, 2009).

Figura 09. Processo biossintético dos flavonoides



Fonte: DEWICK, 2009; PINHEIRO, 2016.

3.5 Considerações gerais e processo biossintético de diterpenos

Os terpenos (terpenoides) abrangem um amplo e mais diversificado grupo de metabólitos secundários, derivados do isopreno (C_5) e classificados em monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, sesterpenos, triterpenos e tetraterpenos (DEWICK, 2009). Esses compostos são considerados vitais para a maioria dos organismos, exercendo um controle metabólico e atuando em resposta à herbívoros, fatores de estresse e para atrair agentes polinizadores (ZWENGER; BASU, 2008).

No processo biossintético, como mencionado acima, os terpenos provêm de unidades de isopreno (C_5), que por sua vez, originaram-se da condensação de isopentenil difosfato (IPP) (citoplasma) e do dimetilalil difosfato (DMAPP) (cloroplastos). Estes podem ser originados por duas vias: a do ácido mevalônico (três moléculas de acetilCoA) e a via do fosfato desoxixululose (tiamina difosfato e ácido pirúvico) ((Figura 10, página 61) (BARBOSA; VEJA, 2017).

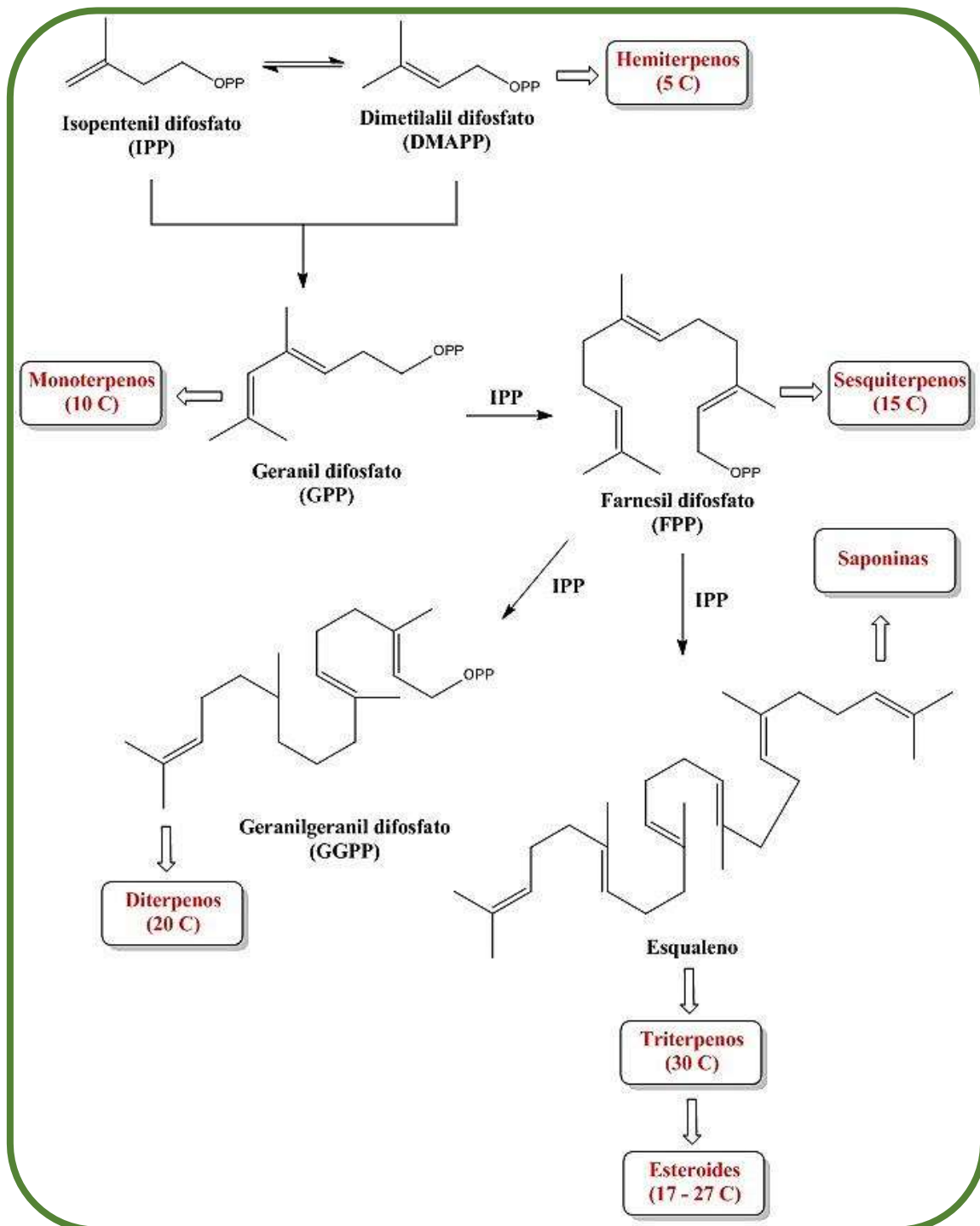
A reação cabeça-calda das unidades isoprênicas formam o geranyl difosfato (GPP) que é o precursor dos monoterpenos (C_{10}). Ligações entre o IPP e o precursor GPP permitem a formação do farnesil difosfato (FPP), precursor dos sesquiterpenos (C_{15}) e diterpenos (C_{20}). O FPP, por ligação cabeça-cabeça, dá origem ao squaleno que é precursor dos esteroides (C_{27}) e dos triterpenos (C_{30}) (Figura 10, página 61) (SIMÕES et al., 2017).

Nesse contexto, os diterpenos, gerados a partir de reações de ciclização do geranylgeranyl difosfato (GGPP), mediada pelas variadas formas da enzima diterpenos sintase (diTPS) para a formação de carbocátions e seguida de rearranjos moleculares, podem levar à formação dos mais variados núcleos diterpênicos (BARBOSA; VEJA, 2017).

De acordo com Zerbe e Bohlmann (2015) e Castro (2016), em uma dessas rotas biossintéticas, uma variação da enzima diTPS da classe II, converte o GGPP em precursor cíclico chamado labdadienil que, por sua vez, dá origem aos diterpenos clerodanos (Figura 11, página 62).

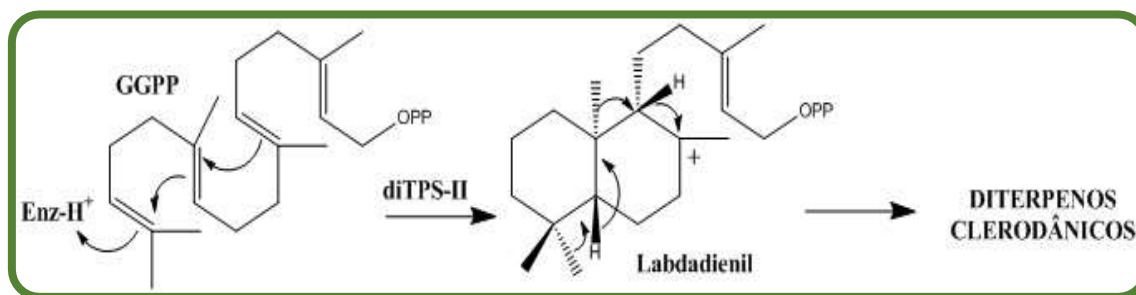
Quanto ao potencial farmacológico dos diterpenos, observa-se que eles possuem atividades biológicas diversificadas e promissoras, destacando-se: antitumoral, antimicrobiana, hipotensora, diurética, analgésicas, antitrombótica, entre outras (BARBOSA; VEJA, 2017).

Figura 10. Origem biossintética das diferentes classes de terpenos e seus precursores



Fonte: Adaptação de BARBOSA; VEJA, 2017.

Figura 11. Biossíntese dos diterpenos clerodânicos



Fonte: CASTRO, 2016.

3.6 Considerações gerais e processo biossintético de derivados clorogênicos

Os derivados clorogênicos são compostos fenólicos com função ácida formada pela esterificação de um ou mais derivados do ácido *trans*-cinâmico com o ácido quínico (MARIA; MOREIRA, 2004).

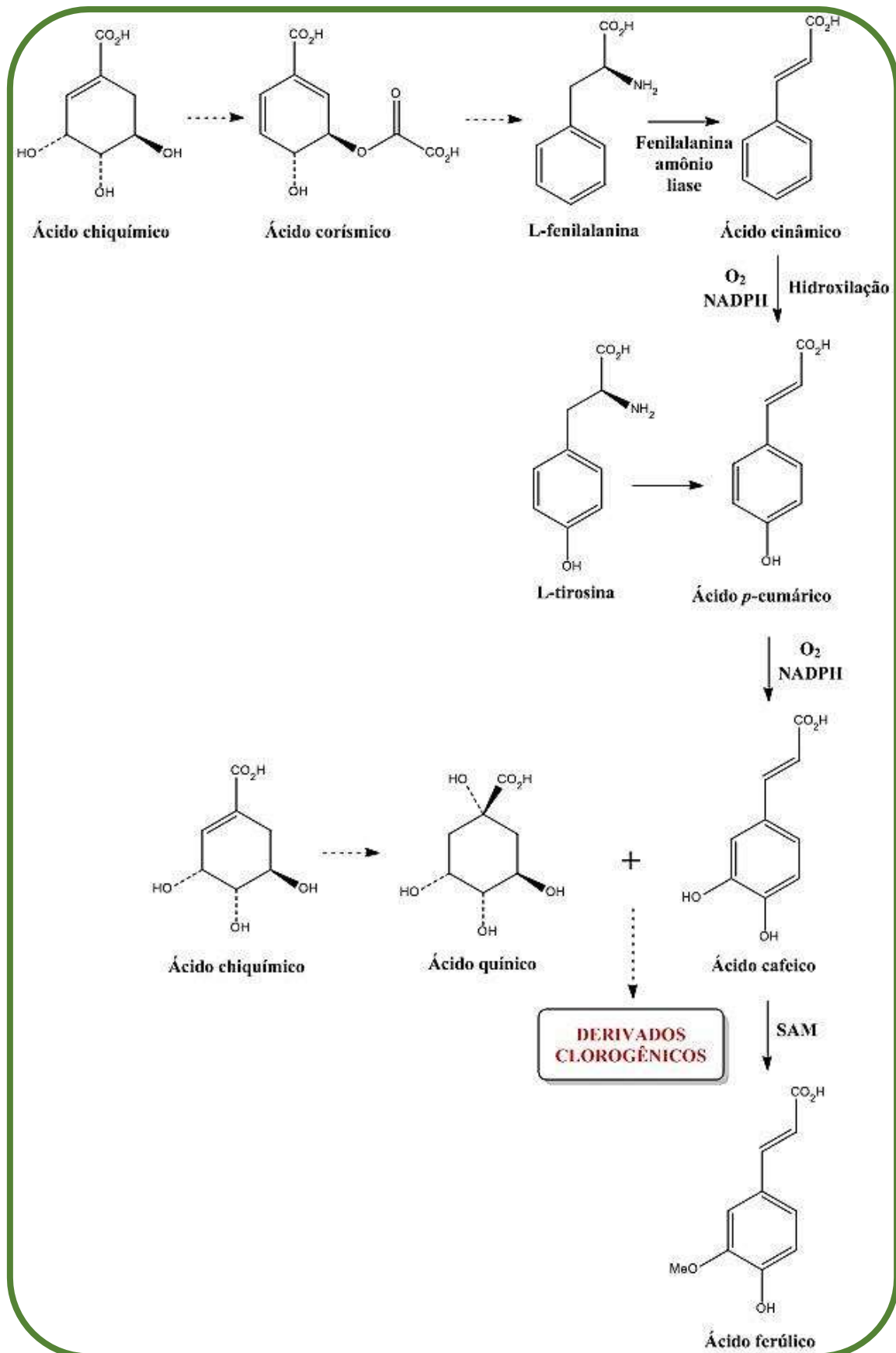
Os clorogênicos possuem origem pela via do ácido chiquímico, que gera aminoácidos aromáticos (*L*-fenilalanina e *L*-tirosina) essenciais para a formação desses metabólitos secundários (Figura 12, página 63) (DEWICK, 2009).

Segundo Maria e Moreira (2004), os derivados clorogênicos podem ser subdivididos pela identidade do derivado do ácido cinâmico, número e posição dos resíduos acila. Quanto à identidade, podemos observar:

- Éster do ácido cafeico com o ácido quínico (ácido cafeoilquínico);
- Éster de dois, três ou quatro resíduos do ácido cafeico com um ácido quínico (ácido di, tri ou tetracafeoilquínico);
- Éster do ácido ferúlico com o ácido quínico (ácido feruloilquínico).

Nos últimos anos, os derivados clorogênicos ganharam atenção substancial devido aos seus vários efeitos biológicos e terapêuticos, como: atividade antioxidante, antibacteriana, hepatoprotetora, cardioprotetora, anti-inflamatória, antipirética, neuroprotetora, antiobesidade, antiviral, anti-hipertensiva e agentes estimuladores do sistema nervoso central. Além disso, verificou-se que podem modular o metabolismo lipídico e glicêmico em distúrbios metabólicos (NAVEED et al., 2018).

Figura 12. Biossíntese de derivados clorogênicos



Fonte: Adaptação de DEWICK, 2009.

3.7 Considerações sobre estudos *in silico*

A utilização de metodologias que auxiliem no desenvolvimento de drogas com o uso de ferramentas computacionais teóricas (técnicas *in silico*) tem aumentado nos últimos anos, pois atua numa estratégia que busca otimizar os longos passos presentes na cadeia de desenvolvimento de fármacos, além dos custos e tempo investidos (HOQUE et al., 2017).

O design de fármacos assistido por computador (CADD – *Computational Aided-Drug Design*) é uma das estratégias mais aplicadas no entendimento entre propriedades físico-químicas e biológicas ou toxicológicas dos compostos (GOLBRAIKH; TROPSHA, 2018). Outro método utilizado nos estudos de CADD são os de modelagem molecular, que buscam compreender as complexidades da proteína-alvo e suas interações com os inibidores, ajudando a projetar compostos com atividade aprimorada (FERREIRA et al., 2015).

Assim, segundo Abdomaleki, Ghasemi e Ghasemi (2017), os métodos de CADD podem ser classificados em dois grupos: CADD baseados na estrutura do ligante e CADD baseados na estrutura do receptor. Os que se baseiam na estrutura do ligante buscam estabelecer relações quantitativas entre a estrutura química e atividade biológica (QSAR – *Quantitative Structure-Activity Relationship*), correlacionando as estruturas dos compostos e suas propriedades moleculares, comumente chamada de descritores moleculares, com a atividade biológica de interesse (ABDOMALEKI; GHASEMI; GHASEMI, 2017).

Dessa forma, o QSAR objetiva realizar uma previsão acurada de resultados de testes biológicos usando uma abordagem matemática, automatizada e computacional, observando quais mudanças da estrutura do composto podem resultar na mudança da atividade biológica (ALVES et al., 2018). Para tanto, diversos parâmetros físico-químicos determinados por métodos computacionais podem ser adotados, tais como: hidrofobicidade, topologia e propriedades eletrônicas moleculares (THOMAS, 2011).

A união do composto ligante ao receptor é fundamental para as reações enzimáticas e, portanto, realizar posteriormente sua inibição. Assim, se faz necessário um estudo detalhado das interações entre os compostos e as proteínas-alvo (RUICK, 2016). Nesse contexto, a segunda classe de técnicas de CADD contempla modelos baseados na estrutura do receptor que buscam informações do alvo proteico que possui uma elucidação estrutural caracterizada, a fim de identificar o melhor encaixe no sítio ativo da proteína, num procedimento comumente conhecido como *docking* molecular (ABDOMALEKI; GHASEMI; GHASEMI, 2017).

Para que ocorra o reconhecimento molecular, diversos fatores estão envolvidos, destacando-se: flexibilidade do receptor e do ligante, interações entálpicas e entrópicas, interações com moléculas de água, entre outras. Porém, devido essa complexidade no *docking* molecular proteína-ligante, algumas simplificações são feitas, desde que a especificidade e afinidade na predição sejam mantidas (DU, 2016). Após os resultados obtidos, as estruturas que apresentarem melhor interação podem ser selecionadas e encaminhadas para realização de testes biológicos.

3.8 Infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana e o potencial de produtos naturais para o seu tratamento

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) é um problema de saúde pública global há muitos anos e, até o final de 2018, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), havia 37,9 milhões de pessoas vivendo infectadas no planeta com o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), das quais 1,7 milhões são crianças menores de 15 anos e 36,2 milhões são adultos (UNAIDS, 2019).

No Brasil, de 1980 a junho de 2019 foram notificados 966.058 (Tabela 01, página 66) casos de AIDS, registrando uma média anual de 39 mil casos nos últimos cinco anos. Destaca-se que desde 2013 o número de casos vem diminuindo, registrando 37.161 casos em 2018. Levando em consideração todos os anos de notificação, as regiões Sudeste e Sul concentram o maior número de casos, sendo 51,3% e 19,9%, respectivamente (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2019).

Ainda, de acordo com o Boletim Epidemiológico (2019), observou-se que o estado da Paraíba notificou 221 novos casos no ano de 2019, totalizando 9193 infectados desde a década de 80 até o ano atual (Tabela 01, página 66).

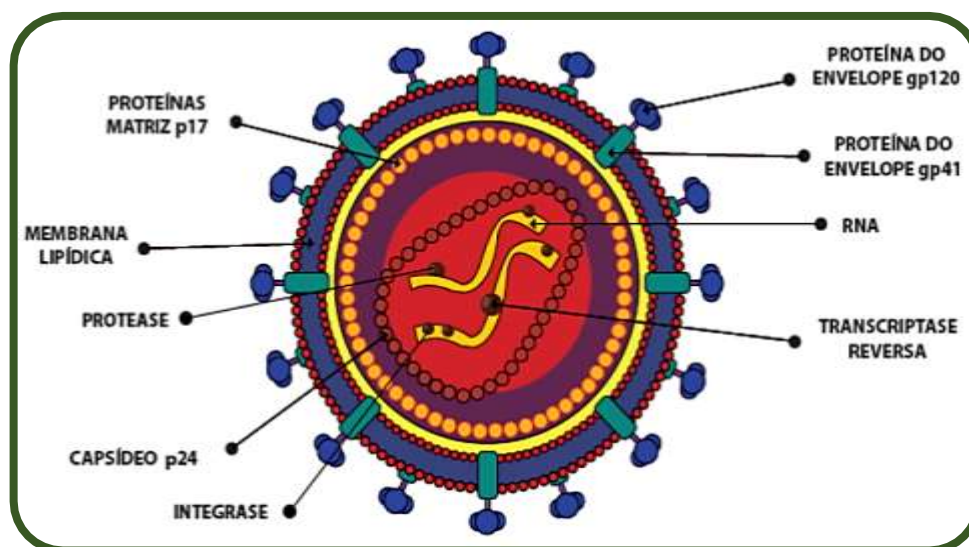
Tabela 01. Casos de HIV notificados no SINAN, segundo UF e região de residência por ano de diagnóstico. Brasil, 1980-2019

Regiões	1980 – 2016	2017	2018	2019	Total 1980 – 2019
Brasil	874.975	37.999	37.161	15.923	966.058
Norte	52.654	4.187	4.567	2.119	63.527
Nordeste	133.434	8.988	8.988	3.781	155.191
Paraíba	7.920	522	490	221	9.193
Sudeste	460.756	14.834	14.040	5.733	495.363
Sul	175.742	7.162	6.782	2.926	192.612
Centro-Oeste	52.389	2828	2784	1.364	59.365

Fonte: Adaptação do Boletim Epidemiológico, 2019.

O HIV é um vírus do gênero *Lentivirus* (Retroviridae) de fita simples constituído de ácido ribonucleico (RNA) que pode ser dividido em dois tipos: HIV tipo 1 (HIV-1) e HIV tipo 2 (HIV-2) (TELELAB, 2014). A estrutura e composição do vírus estão demonstradas na Figura 13.

Figura 13. Estrutura do vírus HIV

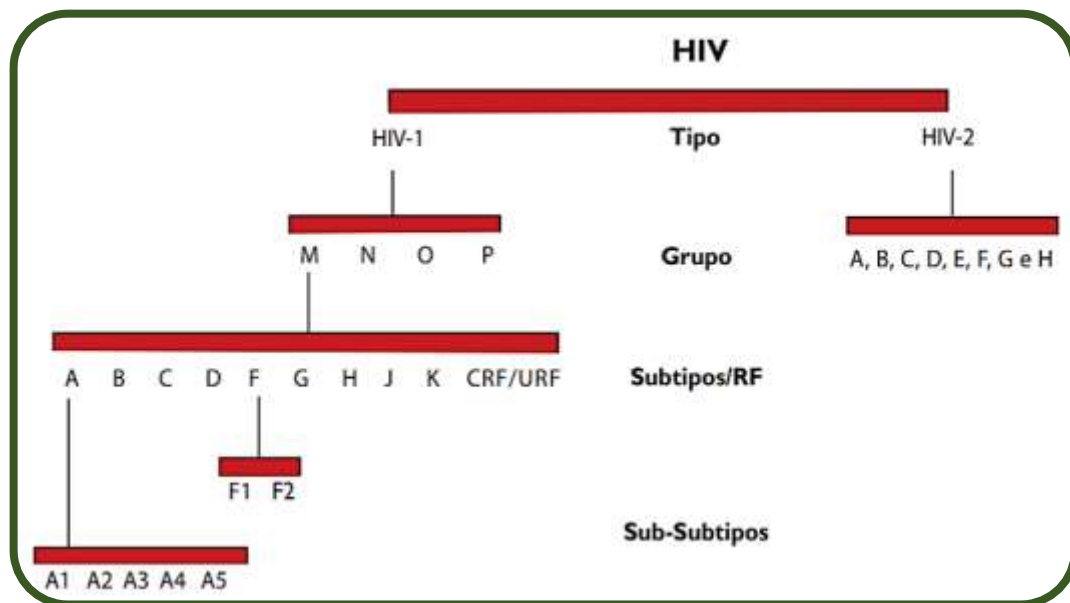


Fonte: TELELAB, 2014

Segundo Brasil (2013a), a classificação do HIV é feita por análise filogenética de sequências nucleotídicas dos vírus. O HIV-1 é subdividido em 4 grupos (M – do inglês, *major* ou majoritário, N – do inglês, *new* ou novo, O – do inglês, *outlier* e P) e o HIV-2 em 8 grupos

(A, B, C, D, E, F, G e H). Há situações que o indivíduo é portador de uma infecção mista, composta por dois ou mais vírus de linhagens (subtipos) diferentes, podendo ocorrer a transferência de material entre eles, gerando formas recombinantes (RF, do inglês *recombinant forms*) (Figura 14).

Figura 14. Representação esquemática da classificação do HIV



Fonte: BRASIL, 2013a.

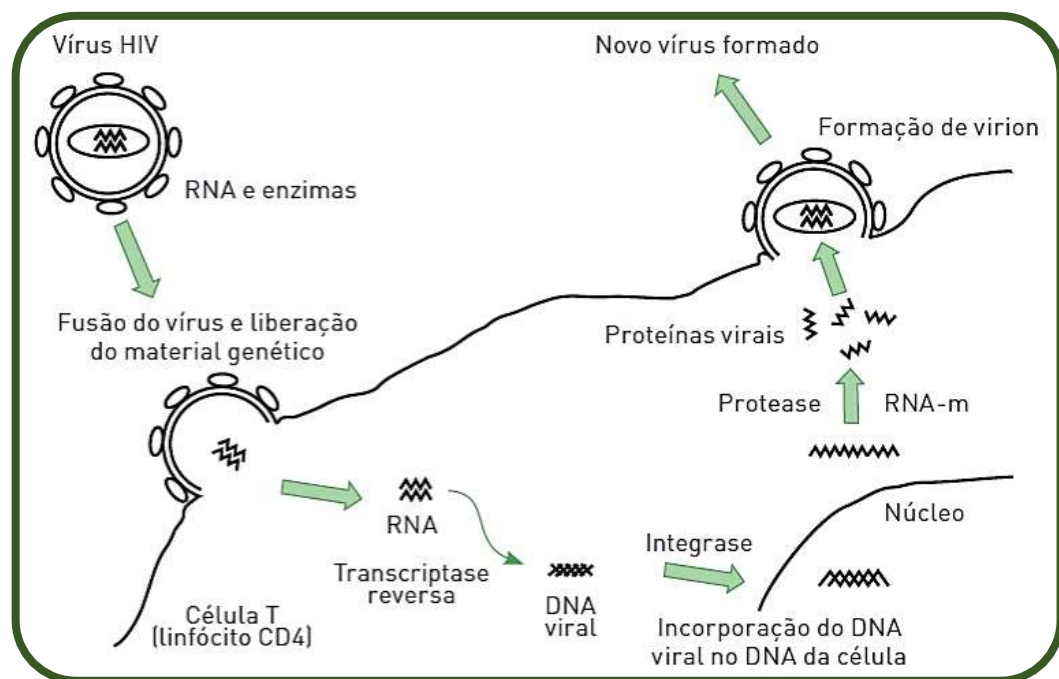
Quanto às suas origens não há um pleno consenso, porém, as afirmações mais robustas defendem que o vírus surgiu na África Central. Acredita-se que o precursor simiano do vírus da AIDS tenha surgido em chimpanzés/gorilas que comeram a carne de espécies de macacos (*mangabey* de topete vermelho e o *guenon* de bigode) infectados pelo Vírus da Imunodeficiência Símia (SIV). A transmissão para o homem deu-se pelo contato íntimo desses animais com os africanos na forma de alimentos (ingestão da carne de macaco malcozida, contendo tecidos e fluidos (sangue e secreções), mordidas e/ou arranhaduras (SHARP; HAHN, 2008; PINTO et al., 2007).

As transmissões do HIV aos seres humanos ocorreram repetidamente ao longo dos anos, porém, as mudanças econômicas, sociais e comportamentais particulares que ocorreram na metade do século 20 propiciaram que o vírus se tornasse bem estabelecido nos organismos dos seres humanos e se expandissem, atingindo proporções pandêmicas (JAWETZ; MELNICK; ADELBERGS, 2019).

A maioria das infecções pelo HIV-1 ocorrem através das mucosas do trato genital ou retal durante a relação sexual. O vírus atravessa a barreira da mucosa e busca infectar linfócitos T CD4⁺, além de macrófagos e células dendríticas. Após isso, em um período de aproximadamente 10 dias (fase eclipse, do inglês *eclipse phase*), o RNA viral não é detectado no plasma (BRASIL, 2013a).

Cunico, Gomes e Vellasco Júnior (2008) demonstraram o ciclo de vida de replicação viral do HIV, onde o processo de entrada do vírus HIV se dá pela afinidade da glicoproteína gp120 (superfície) com os receptores do hospedeiro (CD4), englobando correceptores CCR5 ou CXCR4 e propiciando mudanças conformacionais na membrana e posterior difusão. Dessa forma, a glicoproteína trimérica gp41 medeia a fusão das membranas viral e celular, onde há injeção do capsídeo do HIV à célula e ocorre liberação do RNA e de enzimas necessárias para a replicação viral. A enzima *transcriptase reversa* conduz a transcrição reversa do RNA genômico, culminando na formação de DNA viral que é transportado ao núcleo da célula do hospedeiro e integrado ao DNA por ação da enzima *integrase*. A transcrição do DNA em RNA mensageiro é traduzido em proteínas. A enzima *protease* cliva as poliproteínas virais geradas em proteínas individuais maduras. Assim, o RNA e as proteínas virais agrupam-se na superfície celular como um novo vírion e são liberados para infectar outras células (Figura 15).

Figura 15. Processo resumido da replicação do HIV



Fonte: CUNICO; GOMES; VELLASCO JÚNIOR, 2008.

A infecção pelo vírus do HIV cursa com um amplo espectro de apresentações clínicas, desde a fase aguda até a fase crônica da doença. Estima-se que o tempo médio entre o contágio e o aparecimento da doença em indivíduos não tratados esteja em torno de dez anos (BRASIL, 2013b).

Conforme Brasil (2017), as manifestações clínicas do HIV podem ser divididas em três fases:

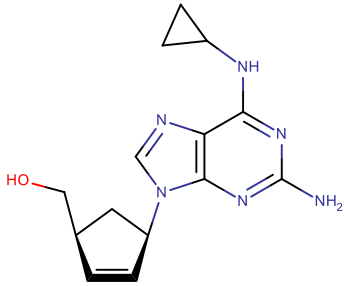
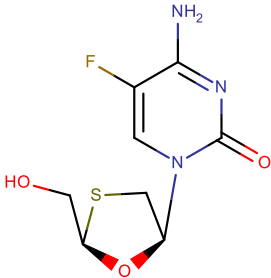
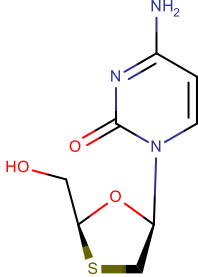
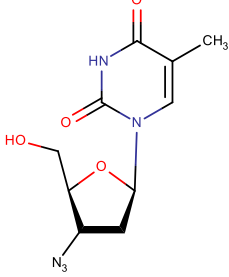
- **Infecção na fase aguda (0 a 4 semanas):** caracterizando-se pelo tempo entre a infecção e o surgimento dos primeiros sinais e sintomas da doença, apresentando febre, suor, cefaleia, cansaço, faringite, exantemas, gânglios linfáticos aumentados e coceira.
- **Fase assintomática ou de latência clínica:** surge após a fase aguda, onde geralmente não apresenta sinais e sintomas, apesar do vírus estar se multiplicando no organismo, durando em média de oito a dez anos.
- **AIDS:** os sinais e sintomas de doenças são secundários ao enfraquecimento do sistema imunológico, variando de acordo com o agente causador da infecção oportunista e podem incluir fadiga, perda de peso, suor noturno, falta de apetite, diarreia, alopecia, entre outros.

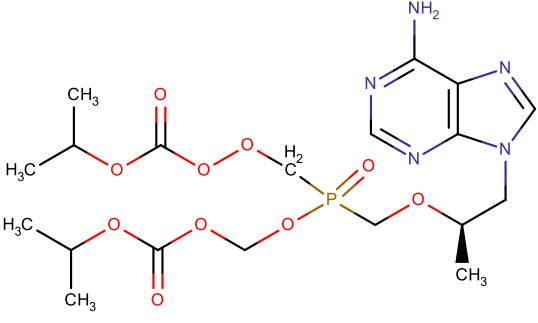
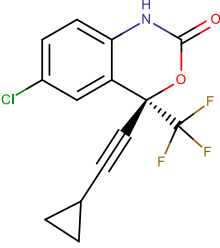
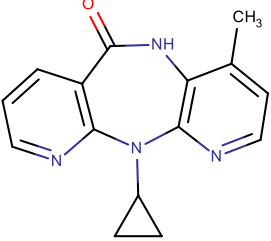
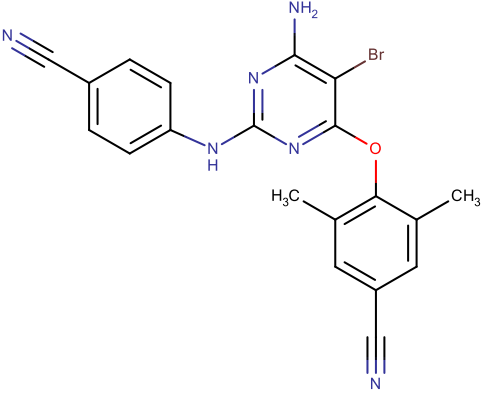
Os primeiros medicamentos antirretrovirais (ARV) surgiram na década de 1980, inibindo a multiplicação do HIV e evitando o enfraquecimento do sistema imunológico. Novos ARVs foram desenvolvidos e transformaram uma infecção quase sempre fatal em uma condição crônica controlável e se tornaram fundamentais para garantir o controle da doença e prevenir a evolução para a AIDS (BRASIL, 2018).

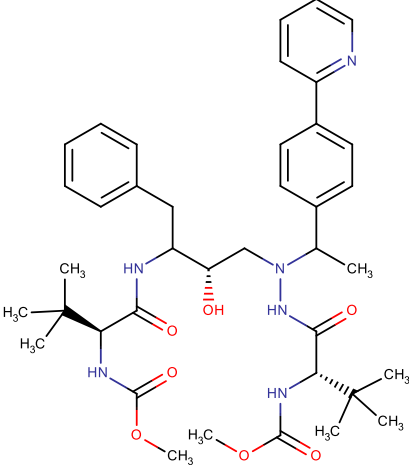
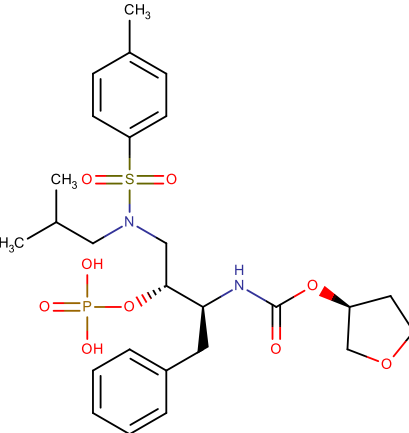
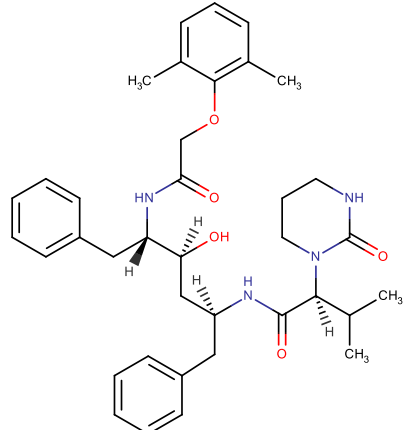
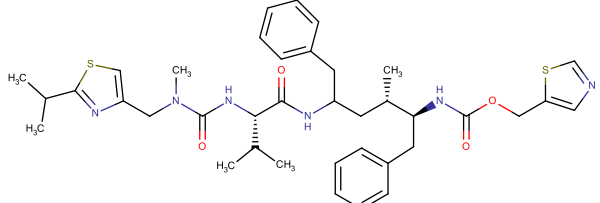
Estima-se que até o fim de 2019, cerca de 24,5 milhões de pessoas que viviam com o HIV possuíam acesso à terapia antirretroviral pelo mundo (UNAIDS, 2019).

Destaca-se que no Brasil ocorre a dispensação gratuita pelo Sistema Único de Saúde (SUS), desde 1996, na forma de componente estratégico, a terapia antirretroviral. Atualmente, existem 18 medicamentos incluídos na lista, acrescido de associações químicas (Quadro 02, página 70). Os alvos das drogas antirretrovirais atuais estão representados no Quadro 02 (página 70) e na Figura 16 (página 74).

Quadro 02. Medicamentos Antirretrovirais disponibilizados pelo SUS para o tratamento do HIV/AIDS

Nº	Estrutura química	Medicamento Antirretrovira I	Posologia
ITRN - Inibidores da Transcriptase Análogo do Nucleosídeo			
01		Abacavir	300 mg e solução oral
02		Entricitabina	200 mg
03		Lamivudina	150 mg e solução oral
04		Zidovudina	100 mg, xarope e injetável

05	 <p>The structure shows a central phosphorus atom (P) double-bonded to an oxygen atom (O) and single-bonded to three other oxygen atoms. One of these single-bonded oxygens is part of a propanoate ester group (CH₃-CH(CH₃)-O-C(=O)-O-). Another single-bonded oxygen is part of a 2-amino-6-aminopurine-9-ylmethyl ether group (-O-CH₂-NH₂ attached to a purine ring). The third single-bonded oxygen is part of a (1S)-propan-1-ylmethyl ether group (-O-CH₂-CH(CH₃)-CH₃).</p>	Tenofovir	300 mg
ITRNt – Inibidores da Transcriptase Reversa Não Análogo de Nucleosídeo			
06	 <p>The structure features a central carbon atom bonded to a chlorine atom (Cl), a cyclopropylmethyl group, a trifluoromethyl group (-CF₃), and a 2-(4-chlorophenyl)acetamide group (-NH-C(=O)-CH₂-C₆H₄-Cl).</p>	Efavirens	200 mg, 600 mg e solução oral
07	 <p>The structure consists of a central nitrogen atom bonded to a cyclopropylmethyl group, a 2-pyridinyl group, and a 2-(1-methyl-1H-pyridin-2-yl)acetamide group (-NH-C(=O)-CH₂-N(CH₃)-C₅H₄N).</p>	Nevirapina	200 mg e suspensão oral
08	 <p>The structure features a central pyrimidine ring with an amino group (-NH₂) at position 2, a bromine atom (Br) at position 4, and a 4-cyano-2,6-dimethylphenoxy group (-O-C₆H₃(CH₃)₂-C≡N) at position 6. The pyrimidine ring is also bonded to a 4-cyanophenylamino group (-NH-C₆H₄-C≡N) at position 5.</p>	Etravirina	100 mg e 200 mg
IP – Inibidores de Protease			

09	 <p>The chemical structure of Atazanavir is a complex molecule featuring a central piperazine ring. It is substituted with a 4-pyridinylphenyl group, a benzyl group, a 2-methylbutanamide group, and a 2-methylbutanamide group with a methyl ester. A hydroxyl group is attached to the piperazine ring.</p>	Atazanavir	200 mg e 300 mg
10	 <p>The chemical structure of Fosamprenavir consists of a piperazine ring substituted with a 4-methylphenylsulfonamide group, a benzyl group, and a 2-methylbutanamide group. The piperazine ring is also linked to a phosphonic acid group and a tetrahydrofuran ring.</p>	Fosamprenavir	Suspensão oral
11	 <p>The chemical structure of Lopinavir features a piperazine ring substituted with a 3,5-dimethylbenzyloxy group, a benzyl group, and a 2-methylbutanamide group. The piperazine ring is also linked to a hydroxyl group and a 2-methylbutanamide group.</p>	Lopinavir	Solução oral
12	 <p>The chemical structure of Ritonavir is a complex molecule featuring a piperazine ring substituted with a 4-(2-methylbutyl)phenyl group, a benzyl group, and a 2-methylbutanamide group. The piperazine ring is also linked to a 2-methylbutanamide group and a 2-methylbutanamide group.</p>	Ritonavir	100 mg e solução oral

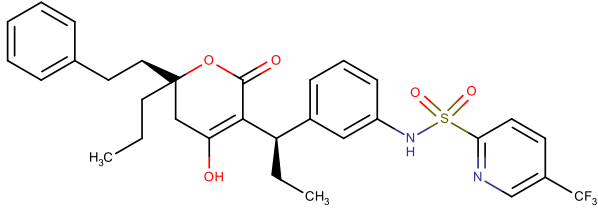
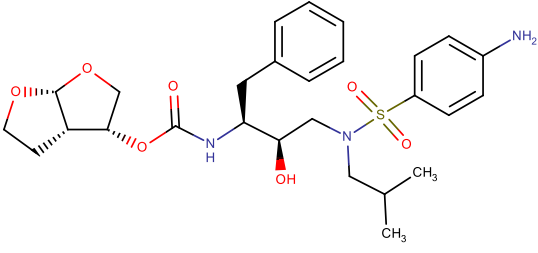
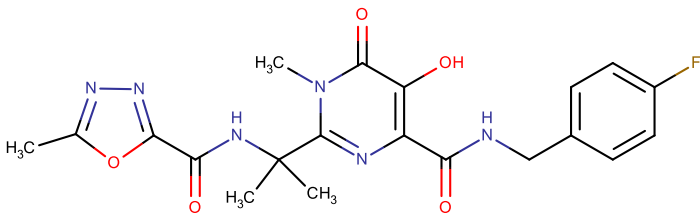
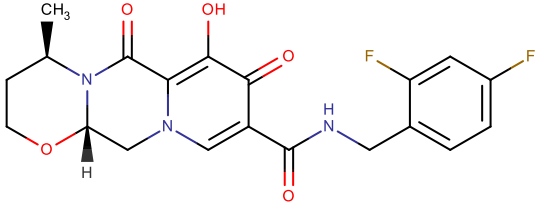
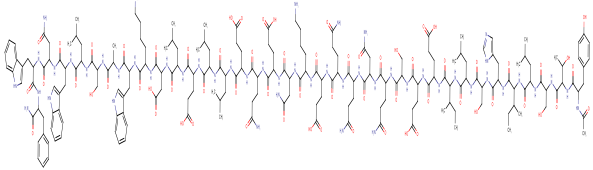
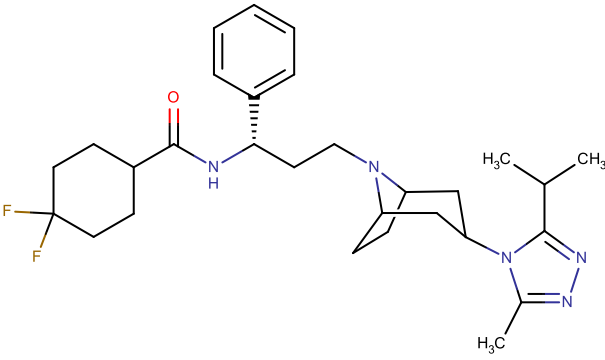
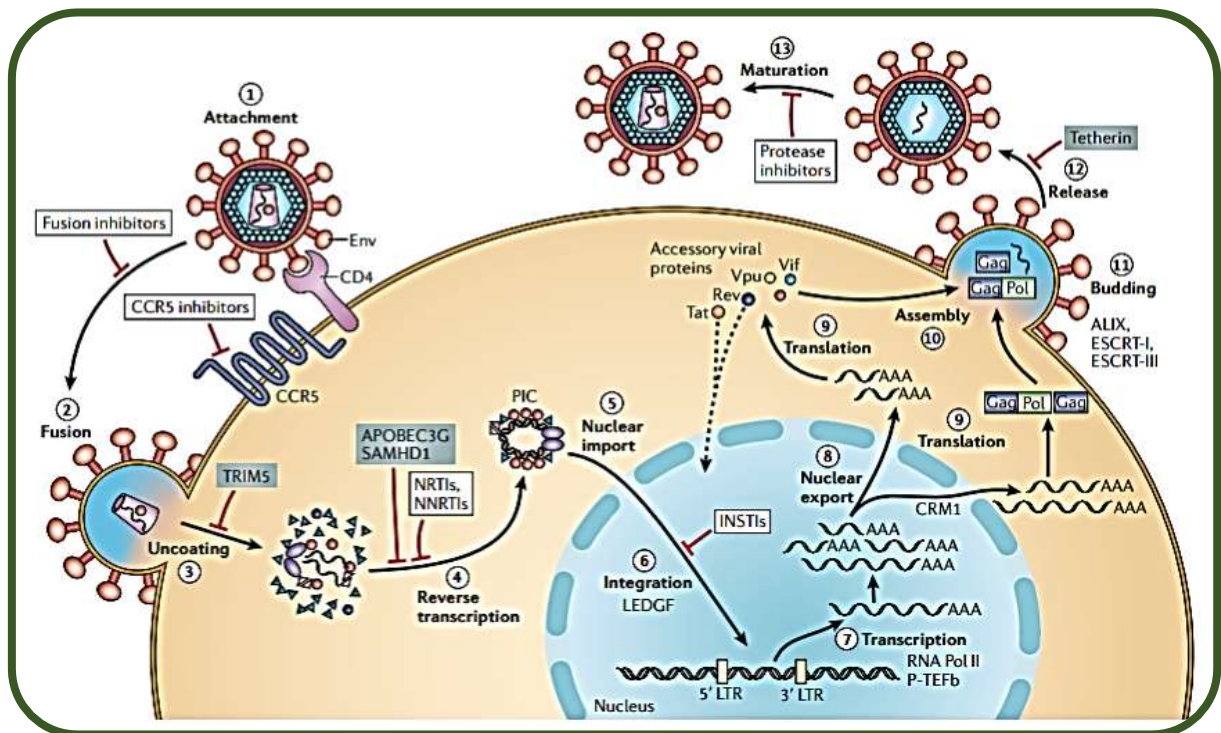
13		Tipranavir	250 mg e solução oral
14		Darunavir	75 mg, 150 mg e 600 mg
INI – Inibidores de Integrase			
15		Raltegravir	100 mg e 400 mg
16		Dolutegravir	50 mg
Inibidor de Entrada – Inibidor de Fusão			
17		Enfuvirtida	90 mg
Inibidor de Entrada – Inibidor de Correceptor (CCR5)			
18		Maraviroque	150 mg

Figura 16. Esquema geral dos alvos de drogas no tratamento do HIV



Fonte: ENGELMAN; CHEREPANOV, 2012.

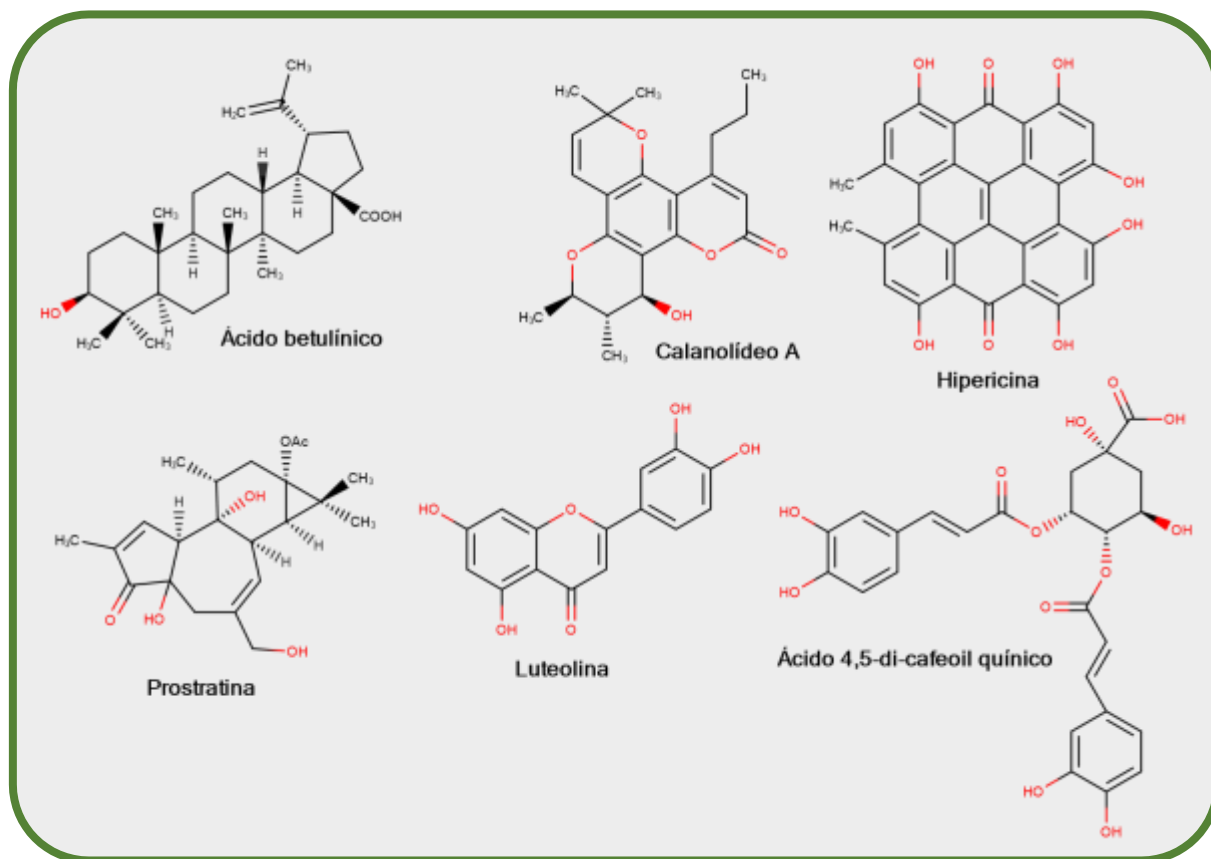
Os medicamentos para o tratamento do HIV/AIDS no Brasil fazem parte do elenco de componentes estratégicos da assistência farmacêutica e, conforme BRASIL (2018), o protocolo inicial da terapia antirretroviral recomendado pelo Ministério da Saúde deve associar dois ITRN/ITRNT (lamivudina e tenofovir) associado ao INI (dolutegravir), onde exceções ao esquema devem ser levadas em consideração nos casos de coinfeção tuberculose-HIV, mulheres vivendo com HIV e com possibilidade engravidar e gestante.

Apesar da eficiência farmacoterapêutica que os medicamentos antirretrovirais possuem, observa-se em muitos casos uma falência terapêutica decorrente da alta mutagenicidade do vírus, exposição do paciente a um período prologado a estes fármacos, além de muitos efeitos colaterais e/ou adversos que acabam reduzindo a adesão e continuidade ao tratamento (FERREIRA; RIFFEL; SANT'ANA, 2010; KUDALKAR et al., 2019).

Assim, se faz necessário buscar novos compostos que possam atuar em algum dos pontos do processo de replicação viral e que sejam candidatos à substituição ou combinação com os medicamentos atualmente disponibilizados (YOSHINAGA et al., 2019).

Alguns grupos de pesquisas pelo mundo vêm evidenciando compostos oriundos de espécies vegetais (produtos naturais) com potencial atividade antirretroviral para o HIV (Figura 17), o que estimula novas pesquisas a serem direcionadas à esta linha de pesquisa.

Figura 17. Exemplos de compostos naturais com potencial anti-HIV



Fonte: FERREIRA; RIFFEL; SANT'ANA, 2010; MEHLA; BIVALKAR-MEHLA; CHAUHAN, 2011 e TAMAYOSE et al., 2019.



4. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

4.1 Estudo fitoquímico

4.1.1 Procedimentos gerais

Para o isolamento e análise dos compostos foram utilizados Sephadex LH-20 (Merck, Kenilworth, NJ, EUA), sílica gel (tamanho da partícula de 40 – 63 μm (230 – 400 mesh) da Silicycle[®]), cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) (uma placa de alumínio com tamanho de sílica gel de 250 μm e fluorescência em UV₂₅₄ da Whatman[®]), Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP), Cromatografia Líquida de Média Pressão (CLMP) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) analítica, semipreparativa e preparativa.

As análises por CLAE analítica se deram com a utilização de um equipamento da Shimadzu Prominence equipado com uma bomba de solvente binária LC-20AT, um autoinjeter SIL-20A, um sistema de degaseificação DGU-20A, um Detector de Arranjo de Diodos (DAD) SPD-M20A e um controlador de sistema CBM-20A. A pré- coluna utilizada foi uma SecurityGuard Gemini[®] C-18 (4 mm x 3.0 mm preenchida com partículas de 5 μm) e uma coluna analítica da Phenomenex Gemini[®] C-18 (150 mm x 4.6 mm preenchida com partículas de 5 μm).

Para CLAE semipreparativa, foi utilizado um sistema da série SHIMADZU 10AVP com um detector SPD-M10AVP, duas bombas LC-6AD e um injetor Rheodyne com uma interface SCL-10AVP. Foi utilizada uma coluna Shimadzu Shim-Pack C-18 (250 mm x 10 mm e tamanho de partícula de 5 μm).

As análises por CLAE preparativa foram realizadas utilizando um equipamento Shimadzu equipado com uma bomba binária de solvente LC-6AD, um injetor manual Rheodyne, um DAD SPD-M10A e um controlador de sistema SCL-10A. A coluna utilizada foi um ACE C-18 (250 mm x 21,2 mm e tamanho de partícula de 5 μm). Os solventes orgânicos utilizados foram metanol ou acetonitrila, grau CLAE (TEDIA[®], Brasil) e água ultrapura obtida com o sistema de purificação Milli-Q (Millipore[®]/ Tedia[®], Brasil).

Os dados espectrais de infravermelho (IV) (4000 a 400 cm^{-1}) foram obtidos com um Perkin-Elmer FT-IR-1750 (São Paulo, SP, Brasil) usando amostra de 1,0 mg em pastilhas de KBr medidas em cm^{-1} .

As análises por espectrometria de massas tandem com ionização por eletrospray (IES – EMⁿ) foram realizadas por meio de injeção direta de 1 mg da amostra, após solubilizada em

MeOH ou acetonitrila e filtradas em filtro PVDF de 0,45 μm , em um cromatógrafo da marca Shimadzu, utilizando uma coluna analítica C-18 (Kromasil - 250 mm x 4,6 mm x 5 μm), acoplado espectrômetro de massas da marca Bruker (Ion-Trap AmazonX), IES e analisador do tipo Ion Trap (IT), situado no Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análises (LMCA) do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPEFarM) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

Para obtenção dos espectros de massas de alta resolução (EMAR) das substâncias, foi utilizado espectrômetros de massas da marca Bruker, modelo microTOF II, pela técnica IES, modo negativo, utilizando os seguintes parâmetros de análise: capilar 4,0 kV, offset da placa final 500 V, nebulizador 5.8 psi, gás seco (N_2) com fluxo de 4 mL/min e temperatura de 180 $^\circ\text{C}$. As amostras foram analisadas por injeção direta, assim, pesou-se 1 mg de cada uma e solubilizou-se em 1000 μL de metanol (grau HPLC) (solução A). Posteriormente, retirou-se 200 μL da solução A e adicionou-se 800 μL de metanol (solução B). A solução C foi preparada com 2 μL da solução B e mais 490 μL de metanol e 450 μL de água mili-Q.

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C , uni e bidimensionais, foram obtidos nos espectrômetros das marcas BRUKER AVANCE III HD, operando a 400 MHz para hidrogênio (RMN de ^1H) e 100 MHz para carbono-13 (RMN de ^{13}C) e VARIAN operando a 500 MHz para RMN de ^1H e 125 MHz para RMN de ^{13}C . As amostras para análise foram preparadas dissolvendo-se as mesmas em solventes deuterados. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em Hz, as multiplicidades no espectro de RMN de ^1H foram indicadas segundo as convenções: *s* (singlete), *d* (dubleto), *dd* (duplo dubleto), *t* (tripleto) e *m* (multiplete). Os espectros de RMN de ^{13}C unidimensionais foram obtidos utilizando-se a técnica de APT (do inglês: "*Attached Proton Test*") e/ou BB (do inglês: "*BroadBand*"). Os espectros bidimensionais utilizados foram: HSQC (do inglês: "*Heteronuclear Single Quantum Coherence*"), HMQC (do inglês: "*Heteronuclear Multiple Quantum Coherence*") e HMBC (do inglês: "*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*").

4.1.2 Material vegetal

A espécie (planta inteira) foi coletada em junho de 2017 na cidade de Serra Branca, Paraíba, Brasil (07°29'1"S/36°39'51"W). O material botânico foi identificado como *Vellozia plicata* Mart. pela Profa. Dra. Maria de Fátima Agra e uma exsicata foi elaborada e depositada no Herbário Lauro Pires Xavier da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), sob a identificação AGRA 5730.

O estudo está registrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN) sob o número A130780.

4.1.3 Extração e isolamento

O material vegetal (2500,0 g) foi seco em estufa com ar circular (40°C), pulverizado em moinho mecânico (432,0 g de pó) e extraído à temperatura ambiente com etanol 95% (3 x 4 L) e concentrado sobre pressão reduzida em rotaevaporador, produzindo 80 g (18,5%) (Figura 18)

Figura 18. Obtenção do EEB e partição de *V. plicata*

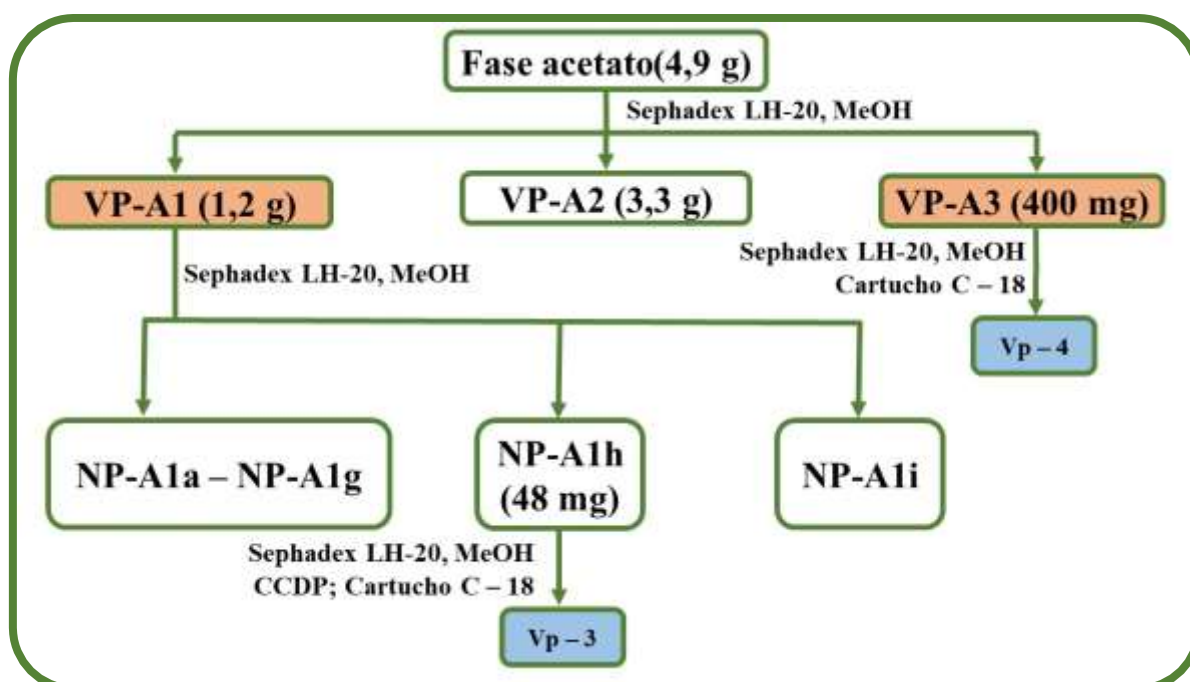


Fonte: Própria do autor.

Uma alíquota de 70 g do extrato etanólico bruto (EEB) foi desengordurado com hexano (4 x 0,5L), sendo o solvente adicionado ao extrato e agitado com agitador magnético por 20 minutos cada, gerando uma porção solúvel de 13,4 g. Posteriormente, a porção não solúvel em hexano foi solubilizada em MeOH:H₂O (7:3) e submetida a uma partição líquido-líquido com solventes em ordem crescente de polaridade: Hexano (1,5 g), Clorofórmio (16,3 g), Acetato (6,9 g) e n-butanol (18,2 g).

Cerca de 4,9 g da fase acetato foi aplicada em uma coluna de permeação em gel (Sephadex[®] LH-20) e eluída com MeOH, sendo coletadas três frações (VP-A1 – VP-A3). A fração VP-A1 (1,2 g) foi aplicada em uma coluna com Sephadex[®] LH-20 e eluída com MeOH, sendo coletadas nove frações (VP-A1a – VP-A1i). A subfração VP-A1h, posteriormente, foi submetida a uma cromatografia em camada delgada preparativa e purificada em cartucho de C – 18, levando ao isolamento de **Vp – 3** (Figura 19).

Figura 19. Processamento cromatográfico da fase acetato de *V. plicata* (frações Vp-A1 e Vp-A3)



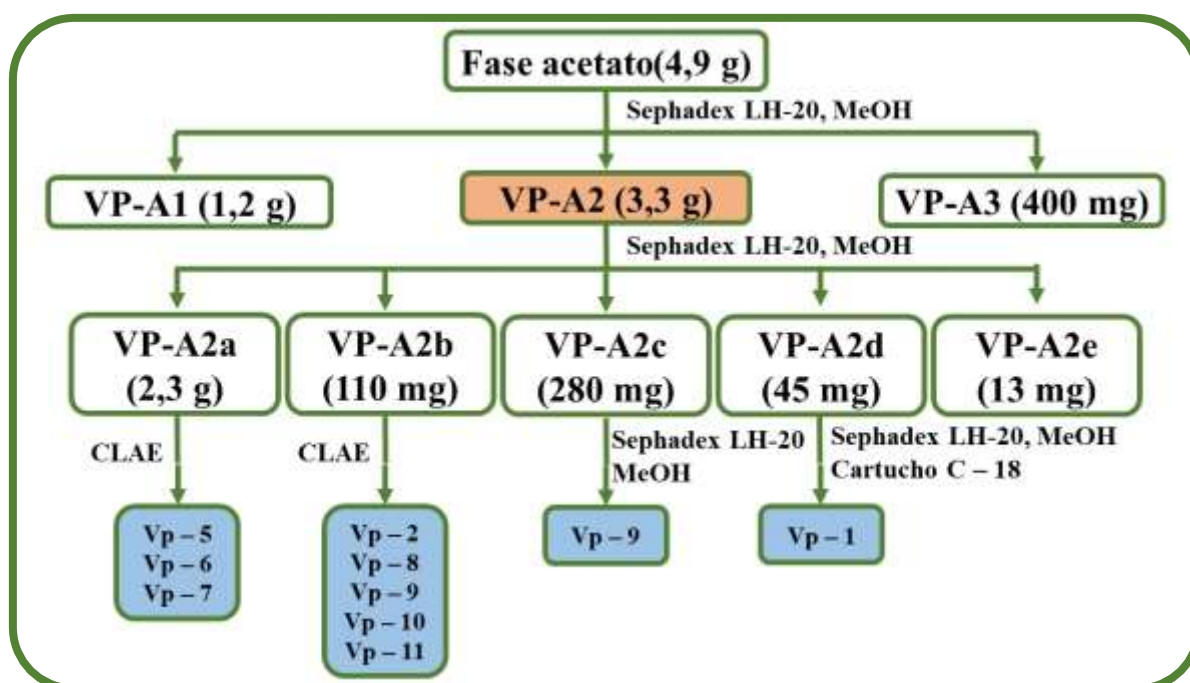
Fonte: Própria do autor.

A fração VP-A2 (Figura 20, página 81) foi submetida a uma coluna com Sephadex[®] LH-20 e eluída com MeOH, onde foram coletadas cinco frações (VP-A2a – VP-A2e). A subfração VP-A2a (2,3 g) teve um método desenvolvimento em HPLC analítico e reproduzido para isolamento em HPLC preparativo, sendo coletados 3 picos (**Vp – 5**, **Vp – 6** e **Vp – 7**)

(Método: fase móvel A: H₂O acidificada (ácido fórmico 0,1%); fase móvel B: MeOH, gradiente de eluição: 0 a 20 min (27% a 30% B), 20 a 30 min (30% a 38% B), 30 a 50 min (38% B), 50 a 70 min (42% B), 70 a 85 min (42% a 100% B) e 85 a 105 min (100% B)).

A subfração NP-A2b (110,0 mg) também teve um método desenvolvido em HPLC analítico e reproduzido para isolamento em HPLC semipreparativo e coletados 5 picos (**Vp – 2**, **Vp – 8**, **Vp – 9**, **Vp – 10** e **Vp – 11**). Método: fase móvel A: H₂O acidificada (ácido fórmico 0,1%); fase móvel B: MeOH, gradiente de eluição: 0 a 60 min (40% a 75% B); 60 a 70 min (75% a 100% B); 70 a 90 min (100% B)).

Figura 20. Processamento cromatográfico da fase acetato de *V. plicata* (fração Vp-A2)



Fonte: Própria do autor.

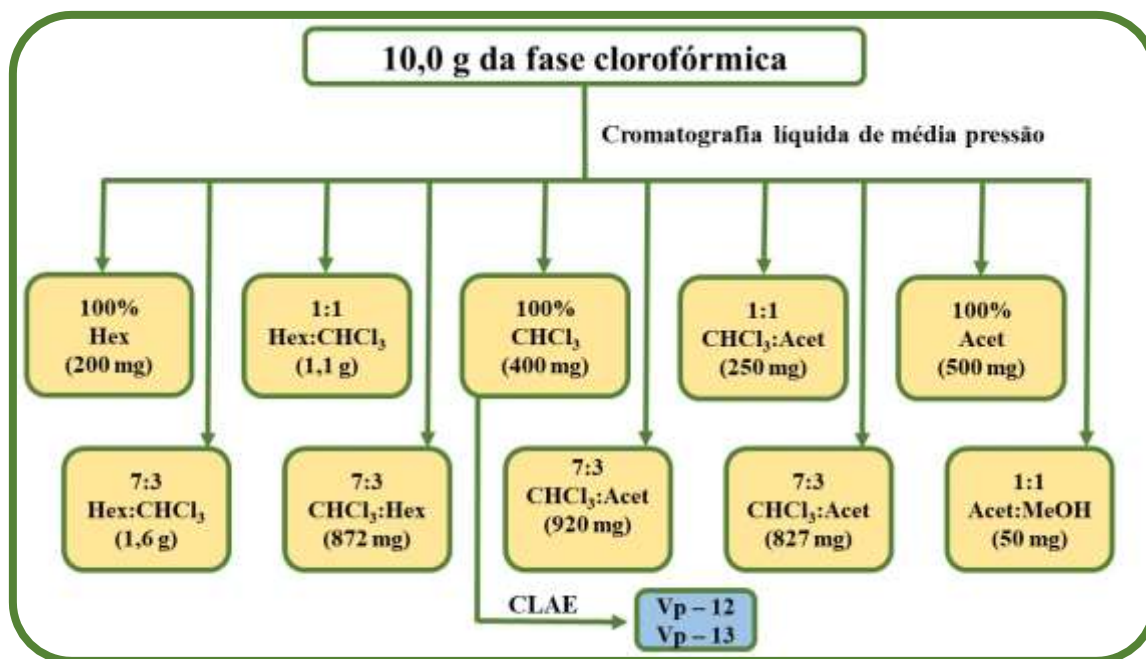
A subfração VP-A2c (280,0 mg) foi eluída em Sephadex[®] LH-20 com MeOH, levando ao reisolamento de **Vp – 9**. A subfração VP-A2d (45,0 mg) também foi eluída em Sephadex[®] LH-20 com MeOH e purificada em cartucho de C – 18, obtendo **Vp – 1**.

A subfração VP-A2d (45,0 mg) foi eluída novamente com MeOH em três colunas posteriores com Sephadex[®] LH-20, levando ao isolamento de **Vp – 6**. A fração VP-A3 (400,0 mg) foi eluída com MEOH, levando ao isolamento de **Vp – 7**.

A fração VP-A3 (400 mg) foi aplicada em uma coluna contendo Sephadex[®] LH-20 e eluída com MeOH e purificada em cartucho de C – 18, obtendo **Vp – 4** (Figura 20, página 81).

Uma alíquota de 10,0 g da fase clorofórmica foi aplicada em uma coluna com sílica gel 60 Merck e submetida a uma cromatografia líquida de média pressão. Foram coletados 5 tubos de 50 mL para cada polaridade adotada (100% Hexano, 7:3 (hexano:CHCl₃), 1:1 (hexano:CHCl₃), 7:3 (CHCl₃:hexano), 100% (CHCl₃), 7:3 (CHCl₃:acetato), 1:1 (CHCl₃:acetato), 7:3 (CHCl₃:acetato), 100% (acetato) e 1:1 (acetato:MeOH) (Figura 21).

Figura 21. Processamento cromatográfico na fase clorofórmica



Fonte: Própria do autor.

A fração 100% (CHCl₃, 400 mg) teve um método desenvolvido em HPLC analítico e reproduzido para isolamento em CLAE preparativa, sendo coletados 2 picos (**Vp – 12** e **Vp – 13**) (Método: fase móvel A: H₂O; fase móvel B: acetonitrila, gradiente de eluição: 0 a 15 min (30% a 55% B), 15 a 20 min (55% a 60% B), 20 a 30 min (isocrático de 60% B), 30 a 40 min (60% a 68% B), 40 a 50 min (isocrático de 68% B), 50 a 60 min (68% a 78% B), 60 a 80 min (78% a 100% B).

As substâncias isoladas foram identificadas por meio da utilização de RMN ¹H e ¹³C uni e bidimensionais, UV, CLAE-EMⁿ e/ou EMAR.

4.2 Desenvolvimento de metodologia analítica para o doseamento da amentoflavona no extrato etanólico bruto de *V. plicata* por CLAE

A condição cromatográfica utilizada para a construção da curva analítica se deu com o emprego dos solventes MeOH (B) e água ultrapura acidificada com ácido fórmico 0,1% (A). Para as análises em CLAE – DAD foi utilizado um equipamento (Shimadzu Prominence, Japão) com bomba de solvente binária LC-20AT, auto injetor SIL-20A, sistema de desgaseificação DGU-20A, detector DAD SPD-M20A e controlador de sistema CBM-20. O forno de coluna foi desativado e as análises foram realizadas à temperatura ambiente, com fluxo de 1,0 mL/min, uma coluna analítica de fase reversa C – 18 (Phenomenex Gemini® - 150 mm × 4.6 mm diâmetro interno, preenchida com partículas de 5 µm) e um volume de injeção de 20 µL. O comprimento de onda que melhor avaliou a absorção da amentoflavona e escolhido para a análise foi o de 336 nm.

Para a construção da curva analítica, soluções de amentoflavona (isolada de *V. plicata* nesse estudo) em cinco concentrações (30, 60, 90, 120, 150 µg/mL) foram preparadas e injetadas no cromatógrafo em triplicata.

A linearidade do método foi realizada a partir de dados apresentados na curva analítica e avaliada pela análise do coeficiente de determinação da curva de calibração (r^2).

Os dados obtidos foram considerados satisfatórios caso apresentassem um desvio padrão relativo inferior à 5%, conforme preconiza a Resolução (RE) 899/2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2003).

4.3 Ferramentas computacionais

Esta etapa se deu em parceria com a Laboratório de Quimioinformática da UFPB, sob a orientação da Profa. Dra. Luciana Scotti e colaboradores.

4.3.1 Modelos de predição

A princípio foi construído um conjunto de dados para esta pesquisa a partir das moléculas disponibilizadas gratuitamente no banco de dados das estruturas químicas ChEMBL

(<https://www.ebi.ac.uk/chembl>) (VIIRA; GARCÍA-SOSA; MARAN, 2017; MENDEZ et al., 2018; ZHU et al., 2017), sendo usado a palavra-chave “*Human Immunodeficiency Virus 1*” como alvo e, “*single protein*”, como tipo de alvo. Foram consideradas moléculas que apresentaram IC₅₀ (nM) como resposta a ação inibitória para protease (ID: CHEMBL243), integrase (ID: CHEMBL3471) e transcriptase reversa (ID: CHEMBL247). Estes conjuntos de dados foram agrupados em uma única planilha utilizando o Microsoft Office Excel 365, apresentando 4.573 bioativos anti-HIV registrados na literatura (disponíveis do ChEMBL).

As 4.573 estruturas 3D dos bioativos obtidos no banco de dados ChEMBL (<https://www.ebi.ac.uk/chembl>) foram identificados a partir de seus respectivos códigos SMILES, através do software Standardizer 18.21.0 da ChemAxon© (BERTO PEREIRA et al., 2018), agrupadas em um arquivo SDF contendo os dados e coordenadas espaciais de cada estrutura.

A predição da atividade biológica foi feita através de um modelo usando o software estatístico KNIME Analytics Platforms 3.6 (VARSOU et al., 2018; KAUSAR; FALCÃO, 2018; SIZOCHENKO et al., 2017; LEONIS et al., 2017). Com ele, é possível elaborar um mapa auto-organizável (CAVALCANTI, 2018), integrando diversos nós de dados que juntos formam o modelo de predição. O fluxo de trabalho usados nesta pesquisa pode ser encontrado online (<https://doi.org/10.6084/m9.figshare.7588595>).

Este modelo consiste na aplicabilidade de inteligência artificial por meio do aprendizado de máquina, no qual o modelo ensina a máquina a classificar cada estrutura cuja atividade deseja-se prever, com base em suas características estruturais. Esta comparação na busca de similaridades é feita com base nas moléculas classificadas como ativas no momento da construção do modelo (ALVES et al., 2018; MARTINS, 2017; SANTOS, 2017; SILVA, 2017). Uma vez a máquina sabendo as características das moléculas ativas e inativas, por comparação, ela pode classificar moléculas cuja predição de uma determinada atividade biológica não tenha sido relatada na literatura (SILVA, 2017; Piccirillo; AMARAL, 2018; PANIAGO, 2018; CAIRES, 2017).

Nesta pesquisa foi usado como algoritmo de classificação integrado com o aprendizado de máquina o *Random Forest* que consiste em um conjunto de árvores de decisões que analisam moléculas randomicamente, sendo possível classificar cada molécula através de uma análise de consenso entre as diversas árvores de decisão (FASHOTO ET AL., 2018; TANEJA, 2018; KANZABI ET AL., 2018; BJIJ; HDOUFANE; CHERQAOU, 2017). Para isso, o banco

contendo os bioativos usados para construir o modelo foram particionados em treino (80%) e teste (20%) (FORTI, 2018; VAZ, 2017), no qual a classificação final é dada pela maioria de ocorrência de uma classificação em cada molécula.

Após particionar o banco de dados (neste caso retirados do ChEMBL), a máquina começou a aprender a classificar cada estrutura através da similaridade com as estruturas inicialmente admitidas como ativas (JESUS, 2017; ALMEIDA, 2018; GOMES, 2017), onde quanto mais similar com moléculas ativas e dentro do domínio de aplicabilidade, maior a probabilidade da estrutura que está tendo a atividade ou propriedade predita ser também ativa (MARTINS, 2017; LINS, 2018; PEREIRA, 2017).

A similaridade é analisada com base nos descritores moleculares (ALVES et al., 2018; SANTOS, 2017; SAKATA, 2018), onde os descritores das moléculas do modelo são comparados com os das moléculas cuja atividade é desconhecida. Dividindo-se a tabela das moléculas usadas na construção do modelo, com base no seguinte critério: divide-se o conjunto das moléculas usadas para a construção do modelo ao meio, as moléculas com pIC_{50} ($-\log(IC_{50})$) mais altos são atribuídas a atividade “A” (ativas) e as demais como “I” (inativas), assim a máquina é capaz de classificar qualquer outra estrutura que esteja dentro do domínio de aplicabilidade do modelo.

Estatisticamente, para a predição ser aceitável, a molécula cuja predição está sendo feita deve estar inserida no domínio de aplicabilidade. Esse domínio garante que as características das moléculas testadas sejam conhecidas pelo modelo criado. Assim, como o modelo toma como base a comparação por similaridade, o domínio de aplicabilidade garante que a molécula cuja predição está sendo feita apresente características estruturais representadas no espaço químico das moléculas usadas na construção do modelo, pois quando as moléculas testadas e as moléculas do modelo estão no mesmo espaço químico, aumenta-se a confiabilidade da predição (ALVES et al., 2017; RIBEIRO, 2017; ALVES, 2017). Quanto maior a porcentagem da aplicabilidade, mais confiável é a predição para a molécula analisada.

Para a predição da atividade foi utilizado o *Weka Predictor 3.7* (HOGAN et al., 2017; ROSA et al., 2018; HALDER, 2018) para realizar a classificação das moléculas cuja atividade anti-HIV não era conhecida. Agregando-se o aprendizado de máquina do RF e a classificação da WPRED, o mapa auto organizável criado na *workflows* do KNIME vem ganhando as atenções de muitos pesquisadores na área de quimioinformática (ROSA et al., 2018; HALDER, 2018; IDOWU et al., 2018) pela sua eficiência na predição e facilidade de configuração.

A tabela de confusão informa os valores de verdadeiro positivo, verdadeiro negativo, falso positivo e falso negativo (Figura 22). Para avaliar a confiabilidade do modelo foram considerados, com base na tabela de confusão gerada pelo modelo, a acurácia acima de 75% e o coeficiente de correlação de Matthews acima de 60%. Estes são parâmetros estatísticos que garantem a qualidade das predições realizadas. Outros parâmetros que também foram analisados na discussão dos dados e da eficiência preditiva do modelo, foram: as curvas ROC do teste e da validação interna e o domínio de aplicabilidade.

Figura 22. Esquema da tabela confusão de um modelo de predição

	Verdadeiro	Falso
Positivo	VP	FP
Negativo	VN	FN

Fonte: Própria do autor.

Além da atividade biológica tomando como base o IC_{50} de moléculas com atividade anti-HIV conhecidas, ainda foram criados modelos para a predição da absorção intestinal com planilhas fornecidas pelo admetSAR @ LMMD (<http://lmmd.ecust.edu.cn/admetSar1/download>) gentilmente fornecidas pelo pesquisador Dr. Feixiong Cheng. Nas três predições realizadas nesta pesquisa foram usados o mesmo fluxo de trabalho, variando apenas as tabelas para a construção dos modelos.

4.3.2 Absorção por via oral

Tendo em vista que a maioria dos medicamentos utilizados para o tratamento do HIV se apresentam na forma farmacêutica comprimido e/ou cápsula e, conseqüentemente, são administrados por via oral pelos pacientes, buscou-se avaliar a taxa de absorção oral de **Vp – 9**, **Vp – 10** e **Vp – 11** (biflavonoides) baseados em sua área de superfície topológica total (TPSA) como parâmetro de exclusão (HARIKA; KUMAR; REDDY, 2017; TOEPAK; TAMBUNAN, 2017; SHIRI, PIRHADI; RAHMANI, 2018), através da Equação 01 (página 87).

Equação 01. Taxa de absorção oral

$$\% \text{ ABS} = 109 - (\text{TPSA} \times 0.345)$$

Ao utilizar a taxa de absorção como parâmetro de exclusão na triagem virtual, apenas são considerados as moléculas que apresentam % ABS (porcentagem de absorção) igual ou superior a menor taxa dentre os fármacos já utilizados no tratamento do HIV e utilizados como controles nesse estudo (ritonavir com 39,22%).

4.3.3 Predição dos riscos de citotoxicidade

As moléculas foram importadas para o software gratuito OSIRIS DataWarrior 5.0 (<http://www.openmolecules.org/datawarrior>) (SOUSA, 2017; MIZERA et al., 2017; LUIS, 2017). Neste programa os riscos de toxidade são preditos pela comparação entre um banco de dados interno, no qual o programa busca fragmentos conhecidos nas moléculas analisadas. Esses fragmentos, quando encontrados, geram um alerta de citotoxicidade em dois parâmetros: mutagenicidade e carcinogenicidade. A citotoxicidade total foi atribuído o valor “Não” quando uma molécula não apresenta alertas para nenhum dos dois parâmetros analisado pelo OSIRIS.

Nesse estudo, o uso dos riscos de citotoxicidade como parâmetro de seleção de moléculas foi adotado para **Vp – 9**, **Vp – 10** e **Vp – 11**, onde só seria tolerado a permanência dessas moléculas no estudo caso apresentassem no máximo um valor “Sim” com baixa porcentagem.

4.3.4 Descritores moleculares

Os Descritores moleculares correspondem as características estruturais de cada molécula, e podem ser divididos em 5 tipos: descritores híbridos, descritores constitucionais, descritores topológicos, descritores eletrônicos e descritores geométricos. Cada tipo com seus descritores moleculares, e cada um com seu significado particular.

Os descritores são calculados a partir da importação do arquivo de entrada, que geralmente é um arquivo SDF contendo todas as estruturas químicas a serem analisadas, onde então o cálculo dos descritores é iniciado. Existem muitos programas para geração de descritores moleculares, dos mais simples aos mais complexos, como exemplo o aplicativo gratuito em Java CDK Descriptor Calculator 4.8

(<http://www.rguha.net/code/java/cdkdesc.html>) (BERTO PEREIRA, 2018; SAKAGAMI, 2017; SPECK-PLANCHE, 2017) e o software não livre Volsurf+ (MOREIRA, 2014; VARALLO, 2010; CRUCIANI et al., 2005).

Como os descritores são imprescindíveis para a construção de um modelo de predição e que cada software pode calcular alguns descritores diferentes uns dos outros, foram realizados dois modelos preditivos, um com base nos descritores calculados pelo CDK e outro com os descritores calculados pelo Volsurf+. Assim, foi possível obter uma predição por consenso, ao cruzar as duas predições, cujo método ganha maior confiança e dá maior robustez a metodologia (CECE-ESENCAN et al., 2016; AHLQVIST et al., 2015).

4.3.5 Estudos de metabólitos hepáticos

Para realizar um estudo metabólico através de métodos computacionais, nesta pesquisa, foi utilizado o software não livre METASITE 6.0 da Molecular Discovery e os compostos **Vp – 9**, **Vp – 10** e **Vp – 11**. Ele prediz as possíveis transformações sofridas por um conjunto de moléculas em um ou mais citocromos do fígado e outros órgãos (RADCHENKO et al., 2017; WILSON; NICHOLSON, 2017; QUINN et al. 2017).

Uma vez estimados pelo software, as estruturas químicas 3D dos metabólitos provenientes do metabolismo no fígado, cérebro e/ou pele, nesta pesquisa foi considerada apenas as transformações no fígado e os seus metabólitos gerados foram submetidos a um modelo de predição de atividade biológica e os riscos de citotoxicidade, comparados com as suas respectivas abundâncias metabólicas (QUINN et al. 2017).

Cada metabólito secundário teve seus riscos de citotoxicidade preditos, através do OSIRIS, pois os bioativos que apresentavam parâmetros citotóxicos como alta mutagenicidade e/ou alta carcinogenicidade em seus metabólitos com abundância acima de 75% era desconsiderado para a seleção dos análogos de nucleosídeos de melhor perfil. Compreende-se para esta pesquisa que um candidato a fármaco deve apresentar baixa ou nula citotoxicidade, bem como, seus metabólitos gerados em maior abundância.

4.3.6 Docking molecular

As estruturas químicas de 18 fármacos que são amplamente utilizados no tratamento do HIV foram utilizadas neste estudo como controles (Tabela 02).

Tabela 02. Fármacos utilizados no tratamento do HIV e usados como controle nesse estudo

ID	Inibição	Nome	Sigla	%ABS	MUT	CAR	TOX
01	PR	Ritonavir	RTV	39.22	Não	Não	Não
02	PR	Fosamprenavir	FPV	41.41	Não	Não	Não
03	PR	Atazanavir	ATV	49.93	Não	Não	Não
04	PR	Saquinavir	SQV	51.47	Não	Não	Não
05	IN	Raltegravir	RAL	57.24	Não	Não	Não
06	PR	Darunavir	DRV	57.66	Não	Não	Não
07	TR	Tenofovir	TDF	58.56	Não	Não	Não
08	PR	Nelfinavir	NFV	65.12	Não	Não	Não
09	TR	Etravirina	ETR	67.38	Não	Não	Não
10	PR	Lopinavir	LPV	67.60	Não	Não	Sim
11	PR	Tipranavir	TPV	69.68	Não	Não	Não
12	TR	Lamivudina	3TC	69.86	Não	Não	Sim
13	TR	Zidovudina	AZT	72.83	Sim	Sim	Sim
14	TR	Abacavir	ABC	73.85	Não	Não	Não
15	IN	Dolutegravir	DTG	74.78	Não	Não	Não
16	TR	Didanosina	DDL	78.38	Não	Não	Não
17	TR	Nevirapina	NVP	88.95	Não	Não	Não
18	TR	Efavirenz	EFZ	95.78	Não	Sim	Sim

Fonte: Própria do autor.

4.4 Estudos biológicos e doseamento de fenólicos totais

4.4.1 Viabilidade celular e teste de nucleosídeos sintetizados para inibição da replicação do HIV

O delineamento experimental seguiu o fluxo de trabalho adotado pelo Laboratório de Biologia Celular do Sistema Imune do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, sob a orientação da Profa. Dra. Bruna Cunha de Alencar Bargieri, envolvendo a cultura de células JLTRF – R5 (Jurkat LTR-GFP, CCR5⁺, CXCR4⁺) e infecção pelo vírus HIV-

1 (cepa NL4-3). Foram testados 5 mg do extrato etanólico bruto de *V. plicata* e dos três biflavonoides isolados (**Vp – 9** (representado pelo **número 3**), **Vp – 10** (representado pelo **número 2**) e **Vp – 11** (representado pelo **número 1**)).

No **dia 0**, cerca de 80.000 células foram plaqueadas (placas de 96 poços com fundo U), em duplicata, em 200 µL de RPMI-1640 contendo 10% de soro bovino fetal (SBF). A diluição dos compostos se deu a partir de uma solução-estoque de 50 mM em DMSO que foram diluídos para 1 mM em meio RPMI com 10% SBF. O controle positivo se deu com células tratadas apenas com o veículo DMSO (100%). A droga padrão utilizada foi o AZT na concentração de 25 µM e as células para avaliação da atividade anti-HIV-1 foram infectadas com NL4-3 (Multiplicidade específica de infecção (M.O.I) = 0,5).

Já no **dia 1**, as células plaqueadas foram lavadas três vezes com 200 µL de tampão fosfato-salino (PBS), ressuspensas em 200 µL de RPMI e tratadas novamente com o AZT (25 µM) e as amostras em teste.

No **dia 2**, após 48 horas, o sobrenadante (100 µL) foi coletado e estocado à – 80 °C para posterior análise. Para isso, foi utilizado 20 µL de resazurina (reagente Alamar Blue[®]), incubado nos poços durante 4 horas (37 °C). Após esse período, a absorbância foi observada em 570 nm em um espectrofotômetro para avaliação da viabilidade celular.

A resazurina, de cor azul e não fluorescente, é reduzida a resofurin, de cor rosa e fluorescente, e não precipita após ser reduzida; porém, o mecanismo pelo qual este processo ocorre ainda não está bem esclarecido, o qual pode ocorrer por reações enzimáticas ou químicas em células viáveis (ROLON et al., 2006; BENERE et al., 2007).

Ainda, as células infectadas foram fixadas e lidas em citômetro de fluxo para análise da infecção celular por meio da proteína verde fluorescente (GFP), onde GFP⁺ = HIV⁺.

Para expressão dos resultados, foram utilizados: controle negativo: célula não infectada (NI); controle positivo: DMSO; droga padrão: AZT.



5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

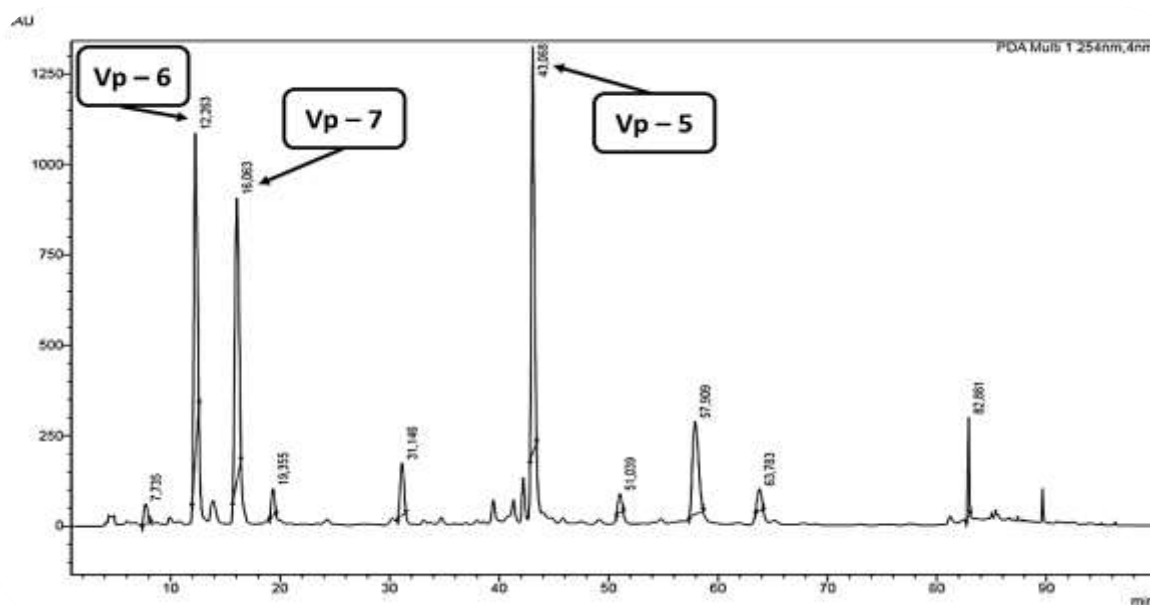
5.1 Estudo Químico

5.1.1 Desenvolvimento de métodos cromatográficos por CLAE para isolamento de compostos

Visando obter um maior número de compostos e com maior grau de pureza, três frações (Vp – A2a, Vp – A2b e 100% CHCl₃) tiveram seus métodos cromatográficos desenvolvidos. Um método exploratório foi adotado para análise inicial de cada fração, utilizando o solvente que melhor se adequou para uma separação eficiente dos picos (MeOH ou acetonitrila). Posteriormente, após vários métodos desenvolvidos, obteve-se um cromatograma considerado ideal para que fosse realizado o isolamento por CLAE semipreparativa ou preparativa.

O método da fração Vp – A2a (oriunda da fase acetato de etila) foi realizado utilizando o comprimento de onda 254 nm (PDA Multi 1), gerando o cromatograma apresentado na Figura 23 (página 92), levando ao isolamento de Vp – 5, Vp – 6 e Vp – 7.

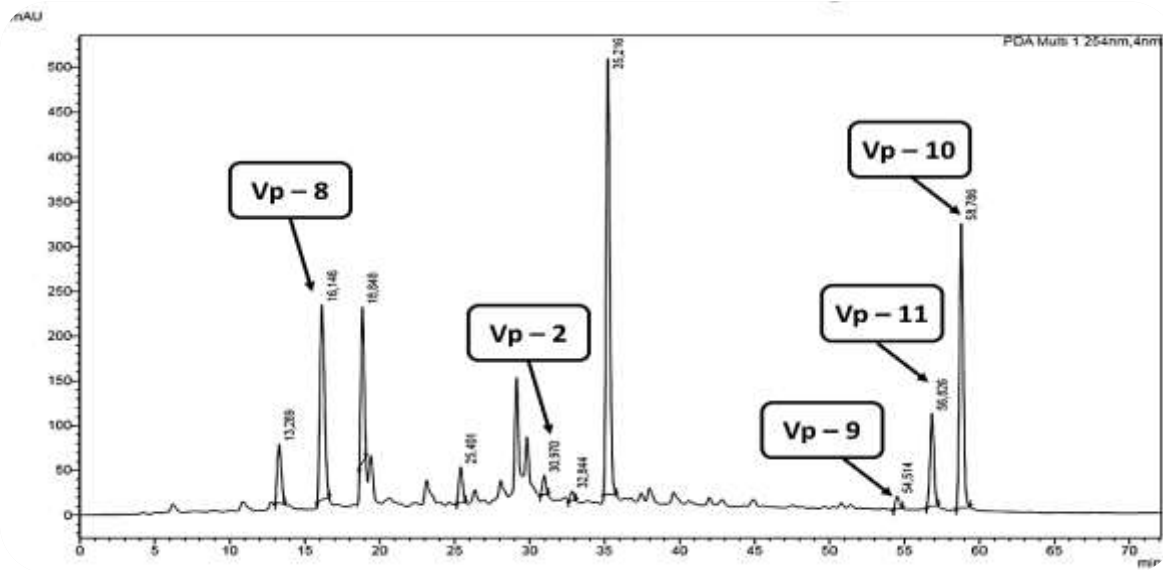
Figura 23. Cromatograma da fração Vp – A2a



Fonte: Própria do autor.

A fração Vp – A2b, também oriunda da fase acetato de etila, teve um método desenvolvido utilizando o comprimento de onda 254 nm (PDA Multi 1), sendo obtido o cromatograma observado na Figura 24 (página 93), permitindo o isolamento de Vp – 2, Vp – 8, Vp – 9, Vp – 10 e Vp – 11.

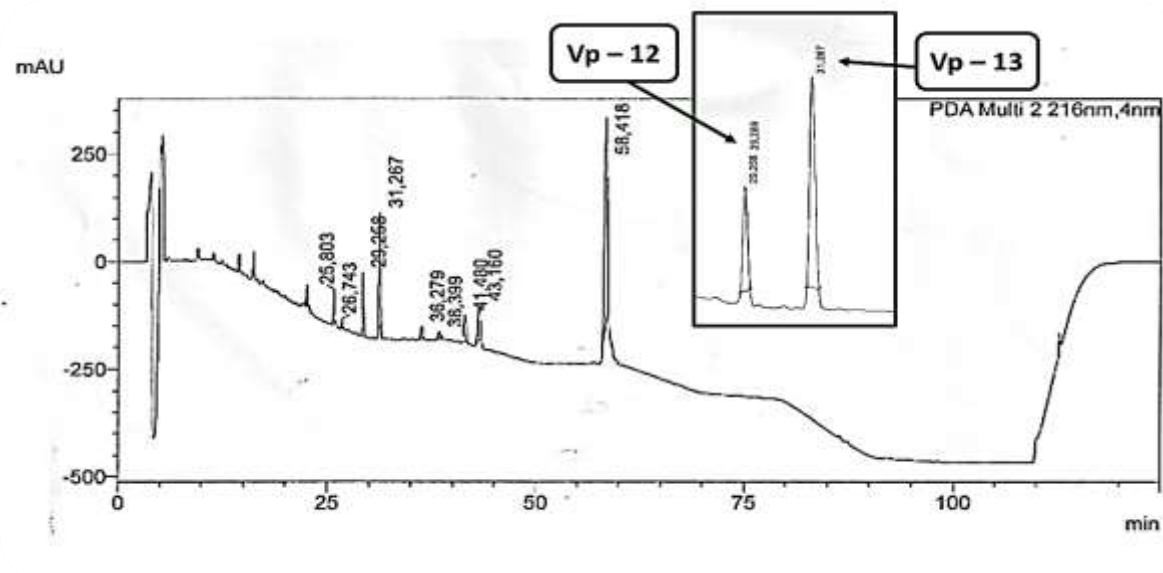
Figura 24. Cromatograma da fração Vp – A2b



Fonte: Própria do autor.

Já para a fração 100% CHCl_3 (fase clorofórmica) foi utilizado o comprimento de onda 216 nm (PDA Multi 1), gerando o cromatograma observado na Figura 25, permitindo o isolamento de Vp - 12 e Vp - 13.

Figura 25. Cromatograma da fração 100% CHCl_3



Fonte: Própria do autor.

5.1.2 Identificação estrutural de Vp – 1 a Vp – 13

5.1.2.1 Identificação estrutural de Vp – 1

O composto identificado como Vp – 1 (6,1 mg) se apresentou na forma de um pó amorfo amarelo. O seu espectro de RMN ^1H (Figura 26, página 97) mostrou absorções entre δ_{H} 6,15 a 7,66, característicos de hidrogênios aromáticos (GOMES et al., 2011). Estas absorções, aliadas aos relatos de isolamento de flavonoides na família e na espécie em questão (PINTO et al., 2010), levaram a inferir a presença deste núcleo.

Esta proposta foi fortalecida pela observação de um duplo dubleto em δ_{H} 7,53 (1H) acoplando *orto* ($J=8,4$ Hz) com um dubleto em δ_{H} 6,88 (1H) e *meta* ($J=2,4$) com outro dubleto em δ_{H} 7,66 (1H), propondo um sistema aromático do tipo ABX no anel B de flavonoides (ALBUQUERQUE et al., 2014) (Tabela 03, página 96). Ainda, no espectro de RMN ^1H , foi possível observar dois outros dubletos em δ_{H} 6,15 e 6,37 (Figura 26, página 97) acoplando *meta* com $J=2,0$ Hz, ambos integrando para 1H cada, indicando que o anel A da molécula flavanoídica encontrava-se com substituições nas posições 5 e 7 (CHAVES et al., 2013) (Tabela 03, página 96).

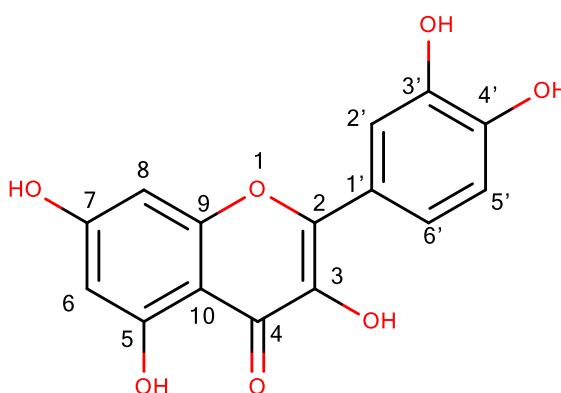
Notou-se a ausência de um singlete em $\delta_{\text{H}} \sim 6,65$ (1H) que geralmente é atribuído ao hidrogênio H – 3 de flavonas (CHAVES et al., 2013) (Figura 26, página 97). Desta forma, levou a sugerir que esta posição estaria substituída. No espectro de RMN ^1H não foi verificado absorções de hidrogênios de grupos metoxílicos e carbinólicos, o que indica que todos os substituintes nos anéis A, B e C tratam-se de hidroxilas. Assim, essas análises e os dados de RMN ^1H (Tabela 03, página 96) levaram a sugerir que Vp – 1 poderia se tratar da quercetina, um flavonol 3,5,7,3',4' pentahidroxilado.

O espectro de RMN ^{13}C de Vp – 1, utilizando a técnica BB, fortaleceu a proposta anterior ao apresentar 15 sinais de carbonos (Figura 27, página 98) (Tabela 03, página 100), entre eles uma absorção em δ_{C} 175,7 condizente com uma carbonila de cetona conjugada na posição C – 4 (CHAVES et al., 2013) do núcleo da quercetina, em conjunto com 14 sinais para carbonos aromáticos, sendo 9 carbonos não hidrogenados (δ_{C} 146,6, 135,6, 160,6, 164,6, 156,2, 102,7, 121,9, 145,1 e 147,7) (Figura 27, página 98) e 5 carbonos monohidrogenados (δ_{C} 98,3, 93,4, 115,6, 114,9 e 119,9) (Figura 27, página 98).

A proposta da existência do sistema ABX foi ratificada pelos sinais em δ_C 115,6, 114,9 e 119,9 (Figura 27, página 98) condizentes com os carbonos monohidrogenados C – 2', C – 5' e C – 6', respectivamente (ALBUQUERQUE et al., 2014).

Após comparações realizadas com os dados de RMN 1H e ^{13}C – BB de Vp – 1 com modelos da literatura (Tabela 03, página 96), pode-se afirmar que o composto se trata da 3,5,7,3',4' pentahidroxiavona (quercetina), isolada pela primeira vez na família Velloziaceae (Figura 28).

Figura 28. Composto Vp – 1

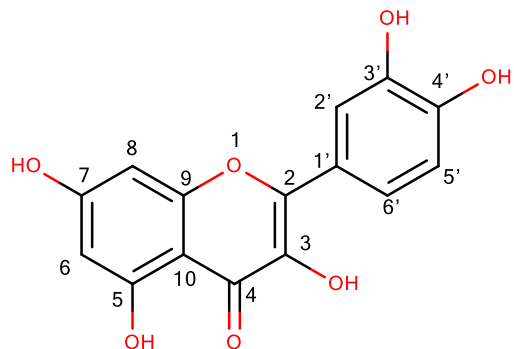


Fonte: Própria do autor.

Este composto bioativo é uma molécula versátil por apresentar diversas propriedades farmacológicas, incluindo atividade antiviral, antioxidante, anticâncer, neurológica, antimicrobiana, cardiovascular, agente antiobesidade, protetora do sistema reprodutor, hepatoprotetor e anti-inflamatório (MAALIK et al., 2014).

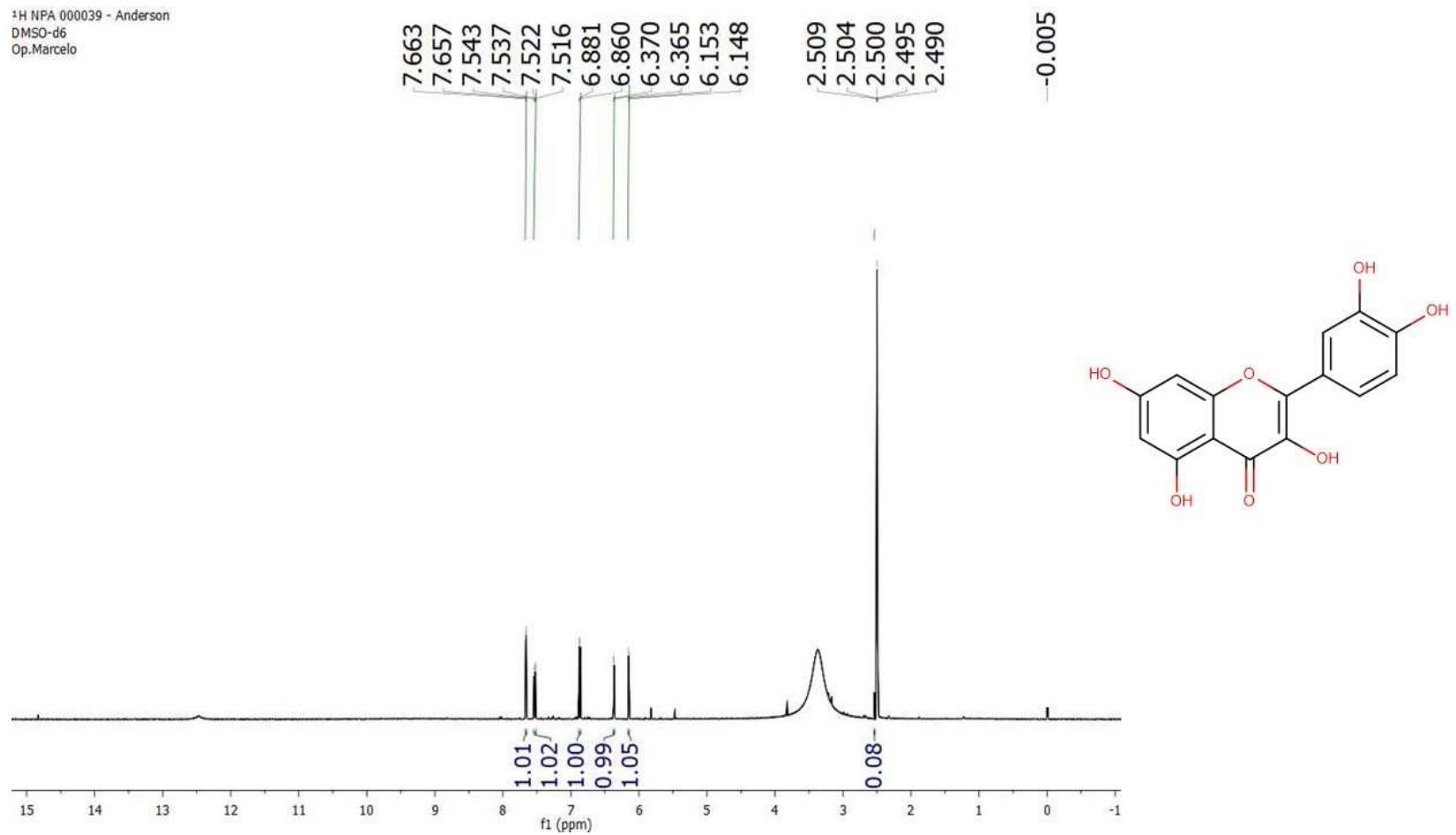
Tabela 03. Dados de RMN ^1H e ^{13}C de Vp – 1 (δ , DMSO- d_6 , 400MHz e 100 MHz) em comparações com a quercetina (δ , DMSO- d_6 , 500 e 125 MHz) (LIU et al., 2010)

	Vp – 1		Quercetina	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1	-	-	-	-
2	-	146,6	-	147,9
3	-	135,6	-	135,9
4	-	175,7	-	176,0
5	-	160,6	-	160,9
6	6,15 (d, $J=2,0$ Hz, 1H)	98,3	6,17 (d, $J=2,0$ Hz, 1H)	98,4
7	-	164,6	-	164,1
8	6,37 (d, $J=2,0$ Hz, 1H)	93,4	6,39 (d, $J=2,0$ Hz, 1H)	93,5
9	-	156,2	-	156,3
10	-	102,7	-	103,2
1'	-	121,9	-	122,1
2'	7,66 (d, $J=2,4$ Hz, 1H)	115,6	7,66 (d, $J=2,0$ Hz, 1H)	115,2
3'	-	145,1	-	145,2
4'	-	147,7	-	147,0
5'	6,86 (d, $J=8,4$ Hz, 1H)	114,9	6,87 (d, $J=8,5$ Hz, 1H)	115,4
6'	7,53 (dd, $J=8,4$ e 2,4 Hz, 1H)	119,9	7,53 (dd, $J=8,0$ e 2,0 Hz, 1H)	120,2



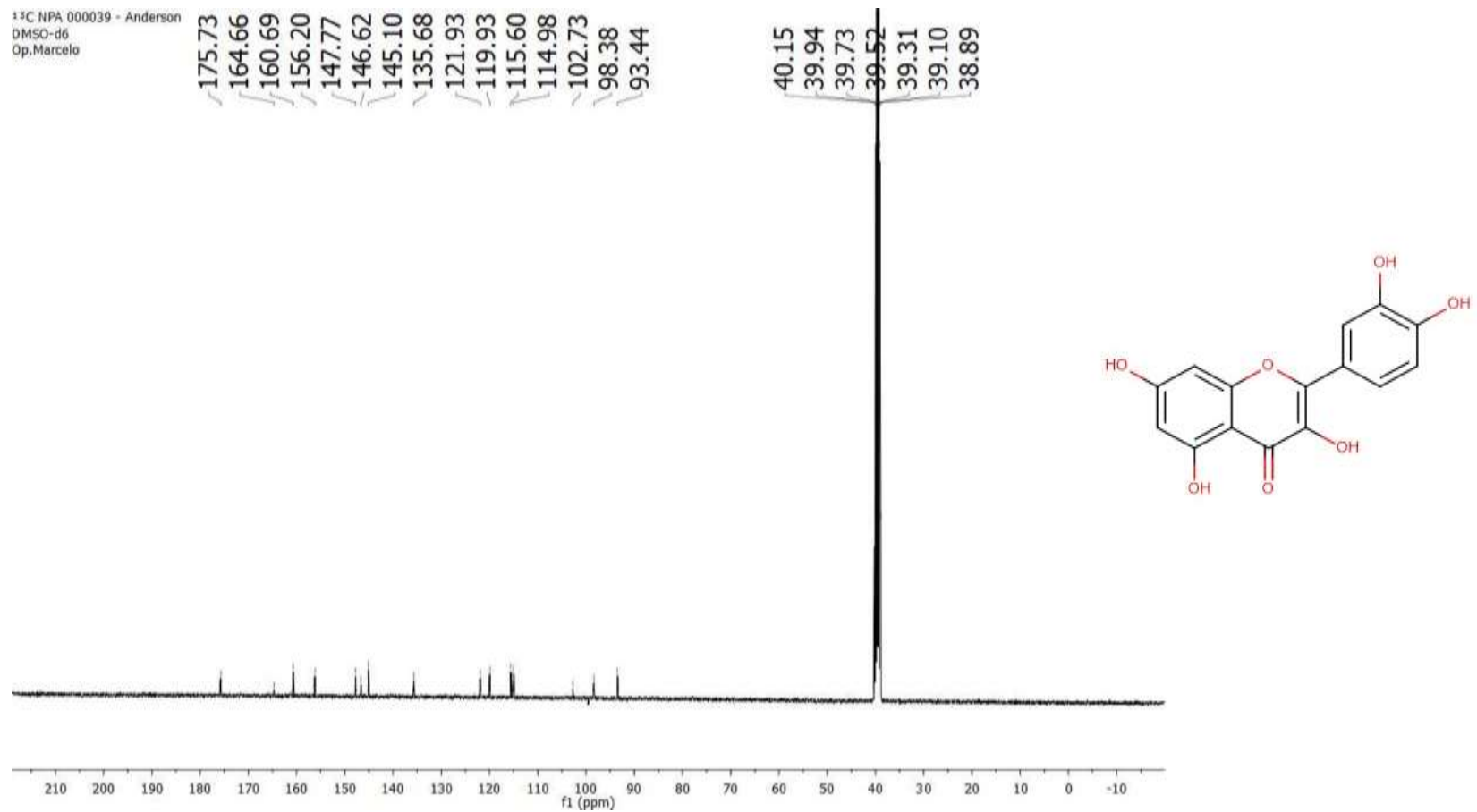
Fonte: Própria do autor.

Figura 26. Espectro de RMN ^1H de Vp – 1 (δ , DMSO- d_6 , 400 MHz)



Fonte: Própria do autor.

Figura 27. Espectro de RMN ^{13}C de Vp – 1 (δ , DMSO- d_6 , 100 MHz)



Fonte: Própria do autor.

5.1.2.2 Identificação estrutural de Vp – 2

A substância identificada como Vp – 2 (8,0 mg), isolada em um $T_R = 30,9$ min, apresentou-se na forma de um sólido amorfo amarelo com absorções no espectro de UV-Visível em 197 e 334 nm.

Absorções entre δ_H 6,18 a 7,42 presentes em seu espectro de RMN 1H (Figura 29, página 102), aliados a relatos de flavonoides isolados na espécie, além de comparações com os espectros de Vp – 1, permitiram inferir que a substância em questão poderia apresentar núcleo flavonoídico.

A proposta foi fortalecida pela presença de um duplo dubleto em δ_H 7,39 (1H) acoplando *orto* ($J=8,4$ Hz) com um dubleto em δ_H 6,89 (1H) e *meta* ($J=2,4$ Hz) com outro dubleto em δ_H 7,42 (1H) (Figura 29, página 102). Assim como em Vp – 1, observou-se a presença de um sistema aromático do tipo ABX no anel B de flavonoíde (ALBUQUERQUE et al., 2014) em Vp – 2 (Tabela 04, página 101).

Dois dubletos em δ_H 6,18 e 6,43 (Figura 29, página 111) acoplando *meta* com $J=2,0$ Hz, ambos integrando para 1H cada também foram observados, indicando substituições nas posições 5 e 7 do anel A do flavonoide (CHAVES et al., 2013) (Tabela 04, página 110).

Uma absorção em δ_H 7,42 (1H) foi observada no espectro de RMN 1H (Figura 29, página 102), característico de hidroxila quelada na posição 5 do anel A (TELES et al., 2015).

Ainda, diferentemente de Vp – 1, notou-se a presença de um singlete em δ_H 6,65 (1H), característico de hidrogênio da posição 3 do anel C de flavona (GOMES et al., 2013). Assim, essas análises e os dados de RMN 1H (Tabela 04, página 101) levaram a sugerir que Vp – 2 poderia se tratar da luteolina, uma flavona 5,7,3',4' tetrahidroxilada.

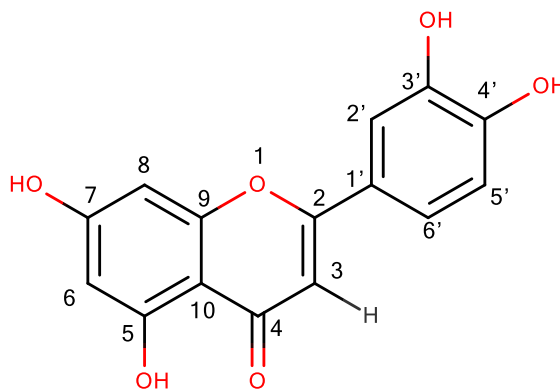
O espectro de RMN ^{13}C – APT de Vp – 2, utilizando a técnica APT, ratificou a proposta anterior ao apresentar 15 absorções para átomos de carbono (Figura 30, página 103) (Tabela 04, página 101). Um sinal característico de carbonila de cetona conjugada (C – 4) (CHAVES et al., 2013) foi observado em δ_C 181,6 (Figura 30, página 103). Outras 14 absorções foram observadas, sendo 5 atribuídas a 6 carbonos monohidrogenados (δ_C 101,8, 98,9, 93,9, 113,2, 116,0 e 119,0) e 8 para carbonos não hidrogenados (163,9, 161,5, 164,4, 157,3, 103,6, 121,4, 145,8 e 149,8) (Figura 30, página 103).

Os sinais em δ_C 113,2, 116,0 e 119,0 (Figura 30, página 103) evidenciaram a presença de um sistema ABX, condizentes com os carbonos monohidrogenados C – 2', C – 5' e C – 6', respectivamente (ALBUQUERQUE et al., 2014).

O mapa de contorno HMQC de Vp – 2 (Figura 31, página 104) permitiu confirmar a atribuição dos hidrogênios aos seus respectivos carbonos (Tabela 04, página 101).

Os dados obtidos foram comparados com dados de RMN ^1H e ^{13}C – APT com modelos da literatura (Tabela 04, página 101), sendo possível afirmar que o composto se trata da 2-(3,4-dihidroxifenil)-5,7-dihidroxicromen-4-ona (luteolina), isolada pela segunda vez na espécie (Figura 32).

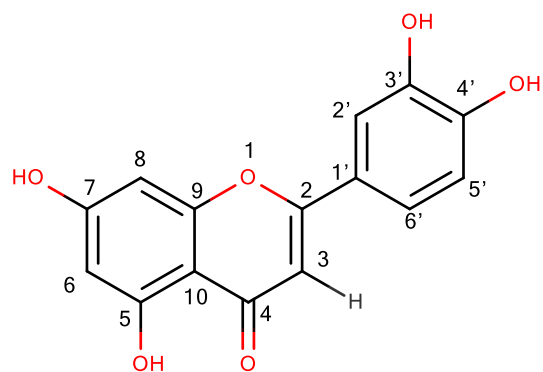
Figura 32. Composto Vp – 2



Fonte: Própria do autor.

A luteolina é um composto com diversas atividades farmacológicas evidenciadas, como: antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, potencial para o tratamento do câncer, diabetes, doenças neurodegenerativas (LÓPEZ-LÁZARO, 2009), cardioprotetora (LUO; SHANG, LI, 2017) e anti-HIV (MEHLA; BIVARLKAR_MEHLA; CHAUHAN, 2011).

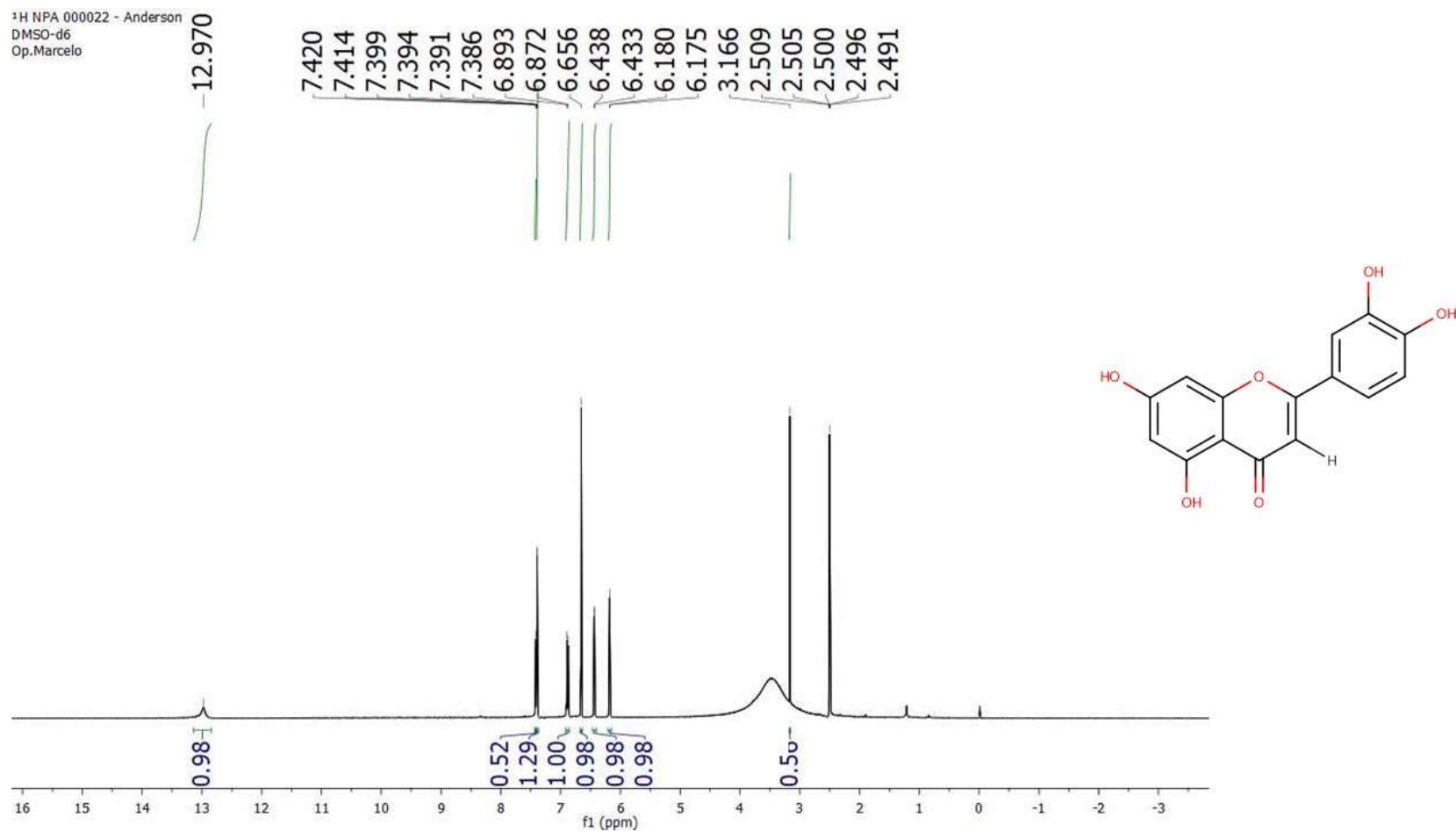
Tabela 04. Dados de RMN ^1H e ^{13}C de Vp – 2 (δ , DMSO- d_6 , 400MHz e 100 MHz) em comparações com a luteolina (δ , DMSO- d_6 , 500 e 125 MHz) (LIU et al., 2010)



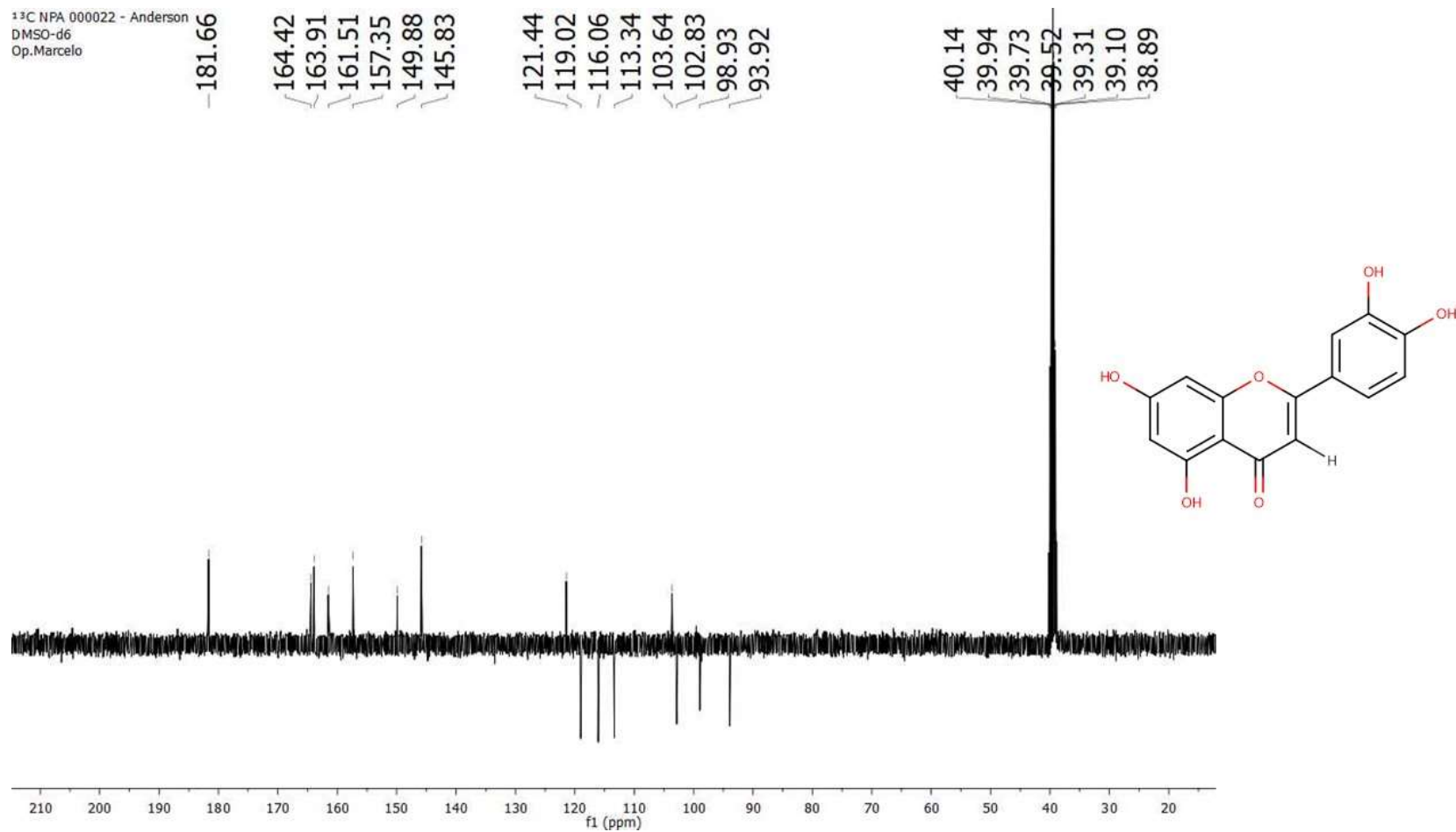
	Vp – 2		Luteolina	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1	-	-	-	-
2	-	164,4	-	167,6
3	6,65 (s)	101,8	6,76	101,8
4	-	181,6	-	181,0
5	-	161,5	-	161,3
6	6,18 (d, $J=2,0$ Hz, 1H)	98,9	6,29 (d, $J=2,0$ Hz, 1H)	99,6
7	-	163,9	-	163,6
8	6,43 (d, $J=2,0$ Hz, 1H)	93,9	6,47 (d, $J=2,0$ Hz, 1H)	94,8
9	-	157,3	-	157,5
10	-	103,6	-	102,3
1'	-	121,4	-	119,8
2'	7,42 (d, $J=2,4$ Hz, 1H)	113,2	7,75 (d, $J=2,2$ Hz, 1H)	112,2
3'	-	145,8	-	146,4
4'	-	149,8	-	152,0
5'	6,89 (d, $J=8,4$ Hz, 1H)	116,0	6,90 (d, $J=8,5$ Hz, 1H)	115,8
6'	7,39 (dd, $J=8,4$ e 2,4 Hz, 1H)	119,0	7,61 (dd, $J=8,5$ e 2,2 Hz, 1H)	118,9
OH-5	12,97 (s)	-	12,93 (s)	-

Fonte: Própria do autor.

Figura 29. Espectro de RMN ^1H de Vp – 2 (δ , DMSO- d_6 , 400 MHz)

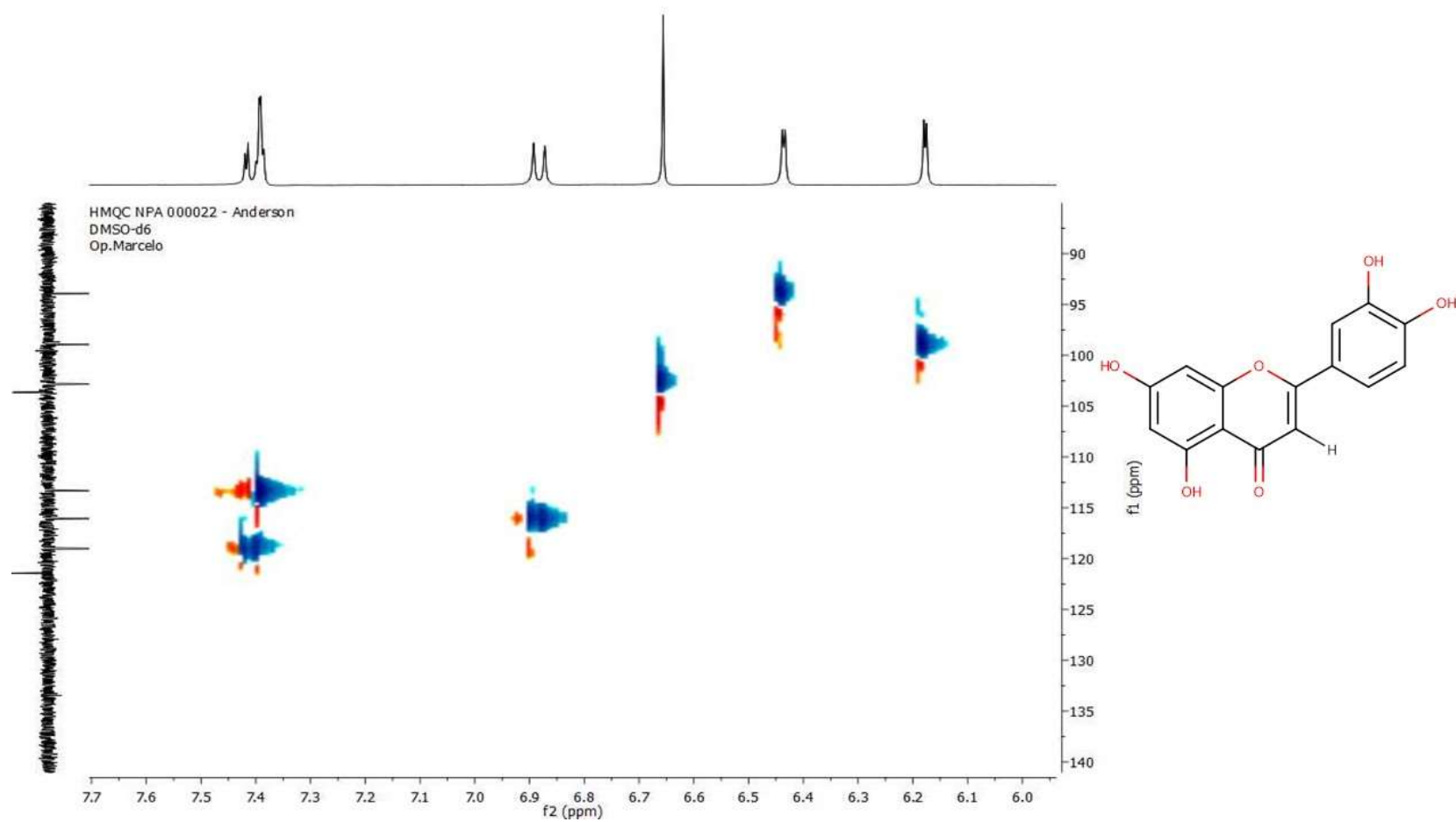


Fonte: Própria do autor.

Figura 30. Espectro de RMN ^{13}C de Vp – 2 (δ , DMSO- d_6 , 100 MHz)

Fonte: Própria do autor.

Figura 31. Mapas de contorno HMQC de Vp – 2 (δ , DMSO- d_6 , 400 MHz)



Fonte: Própria do autor.

5.1.2.3 Identificação estrutural de Vp – 3

A substância identificada como Vp – 3 (8,3 mg) foi isolada na forma de um sólido amarelo por cromatografia clássica (CCDP) e purificada em cartucho com C-18.

O espectro de RMN ^1H (Figura 33, página 108) de Vp – 3 revelou sinais entre δ_{H} 6,78 a 7,54 ppm, característicos de hidrogênios aromáticos e/ou olefínicos (PINTO, 2015). Estas absorções, associadas aos relatos de isolamento de ácidos fenólicos na família Velloziaceae (BANG-JING et al., 2005), levaram a sugerir que a substância poderia se tratar desta classe de metabólito secundário.

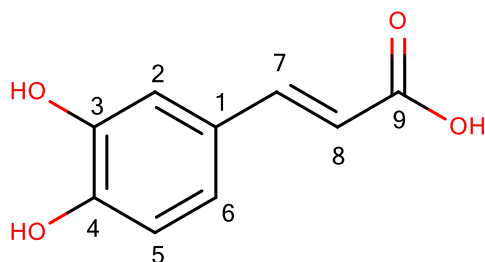
Assim, a proposta foi fortalecida pela presença de um par de dubletos em δ_{H} 7,54 ($J=16,0$ Hz, 1H) e δ_{H} 6,23 ($J=16,0$ Hz, 1H) (Figura 33, página 108), típicos de sistema *trans*-alceno de derivados aromáticos $\text{C}_6 - \text{C}_3$ (REGASINI et al., 2008), atribuídos aos hidrogênios 7 e 8, respectivamente.

Os demais valores observados no espectro de RMN ^1H foram um duplo dubleto em δ_{H} 6,94 (1H) acoplado *orto* ($J=8,0$ Hz) com um dubleto em δ_{H} 6,78 (1H) e *meta* ($J=2,4$ Hz) com um dubleto em δ_{H} 7,03 (1H), atribuídos aos hidrogênios 6, 5 e 2, respectivamente (Figura 33, página 108). Desta forma, estes dados levaram a sugerir a presença de um anel aromático 1,3,4-trissubstituído (derivado do ácido cinâmico) (REGASINI et al., 2008).

O espectro de RMN ^{13}C de Vp – 3, utilizando a técnica BB (Figura 34, página 109), fortaleceu a proposta anterior, apresentando uma absorção de carbono acílico (δ_{C} 171,0) e de carbonos metínicos aromáticos e/ou olefínicos em δ_{C} 127,7 (C – 1), 115,0 (C – 2), 146,7 (C – 3), 149,4 (C – 4), 116,4 (C – 5), 122,8 (C – 6), 147,0 (C – 7) e 115,5 (C – 8) (Figura 34, página 109).

Os dados obtidos foram comparados com dados de RMN ^1H e ^{13}C da literatura (Tabela 05, página 107), sendo possível afirmar que Vp – 3 se tratava do ácido *trans*-3,4-dihidroxicinâmico (ácido caféico), isolado pela primeira vez na família Velloziaceae (Figura 35, página 106).

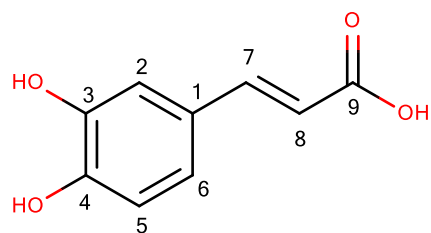
Figura 35. Composto Vp – 3 (ácido caféico)



Fonte: Própria do autor.

O ácido caféico é um composto bioativo com experimentos *in vitro* e *in vivo* realizados e inúmeros efeitos fisiológicos comprovados, como: antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatório, antiaterosclerótica, antidiabética, cardioprotetora, hepatoprotetora, auxilia no tratamento do câncer e atividade antihepatocarcinoma (ESPÍNDOLA et al., 2019).

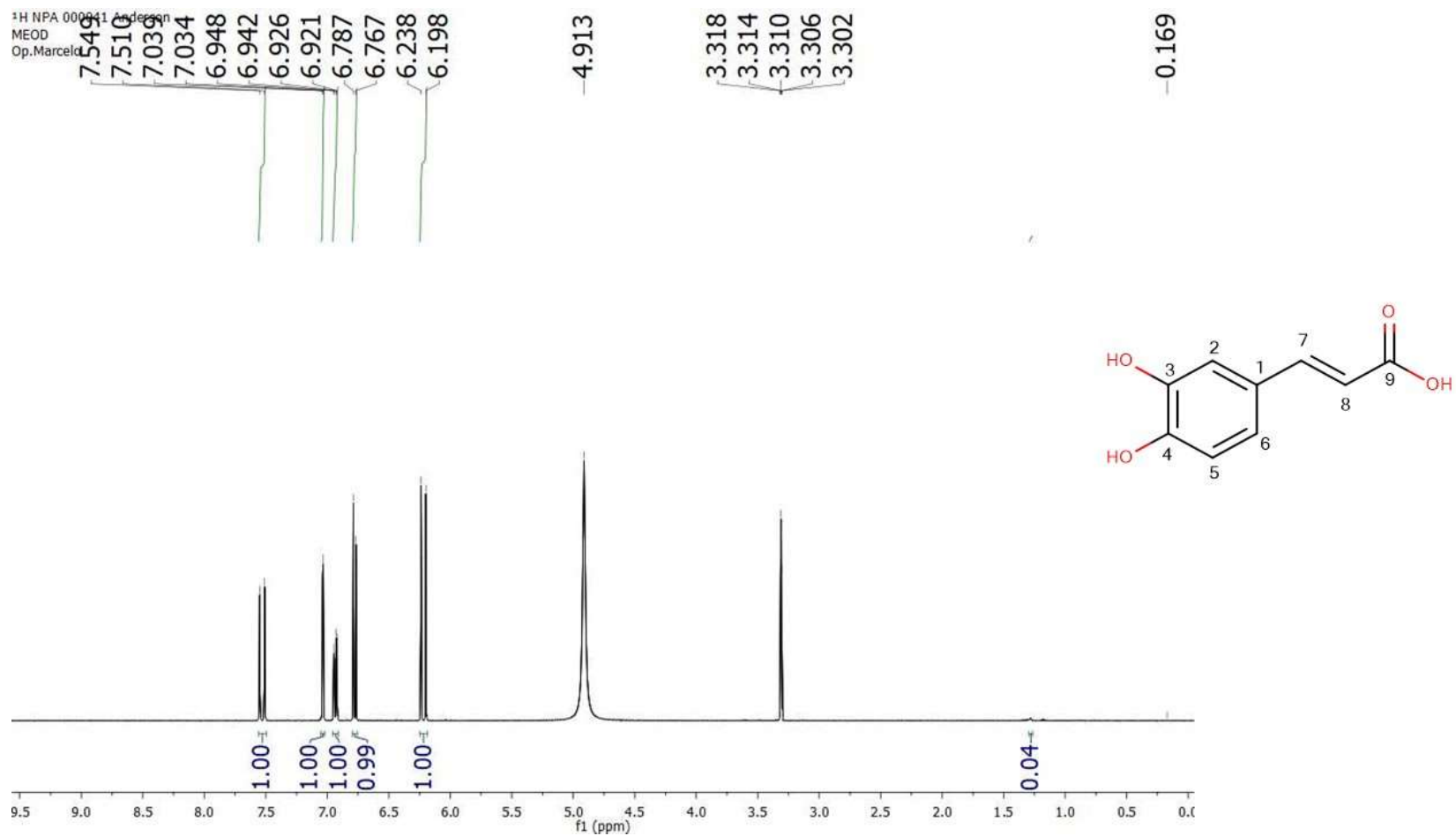
Tabela 05. Dados de RMN ^1H e ^{13}C de Vp – 3 (δ , CD_3OD , 400MHz e 100 MHz) em comparações com o ácido caféico (δ , CD_3OD , 500 e 125 MHz) (PINTO, 2015)



	Vp – 3		Ácido caféico	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1	-	127,7	-	127,8
2	7,03 (d, $J=2,4$ Hz, 1H)	115,0	7,03 (d, $J=2,0$ Hz, 1H)	115,1
3	-	146,7	-	146,8
4	-	149,4	-	149,4
5	6,78 (d, $J=8,0$ Hz, 1H)	116,4	6,77 (d, $J=8,5$ Hz, 1H)	116,1
6	6,94 (dd, $J=2,4$; 8,0 Hz, 1H)	122,8	6,92 (dd, $J=2,0$; 8,0 Hz, 1H)	122,8
7	7,54 (d, $J=16,0$ Hz, 1H)	147,0	7,52 (d, $J=15,5$ Hz, 1H)	147,0
8	6,23 (d, $J=16,0$ Hz, 1H)	115,5	6,21 (d, $J=16,0$ Hz, 1H)	115,4
9	-	171,0	-	171,1

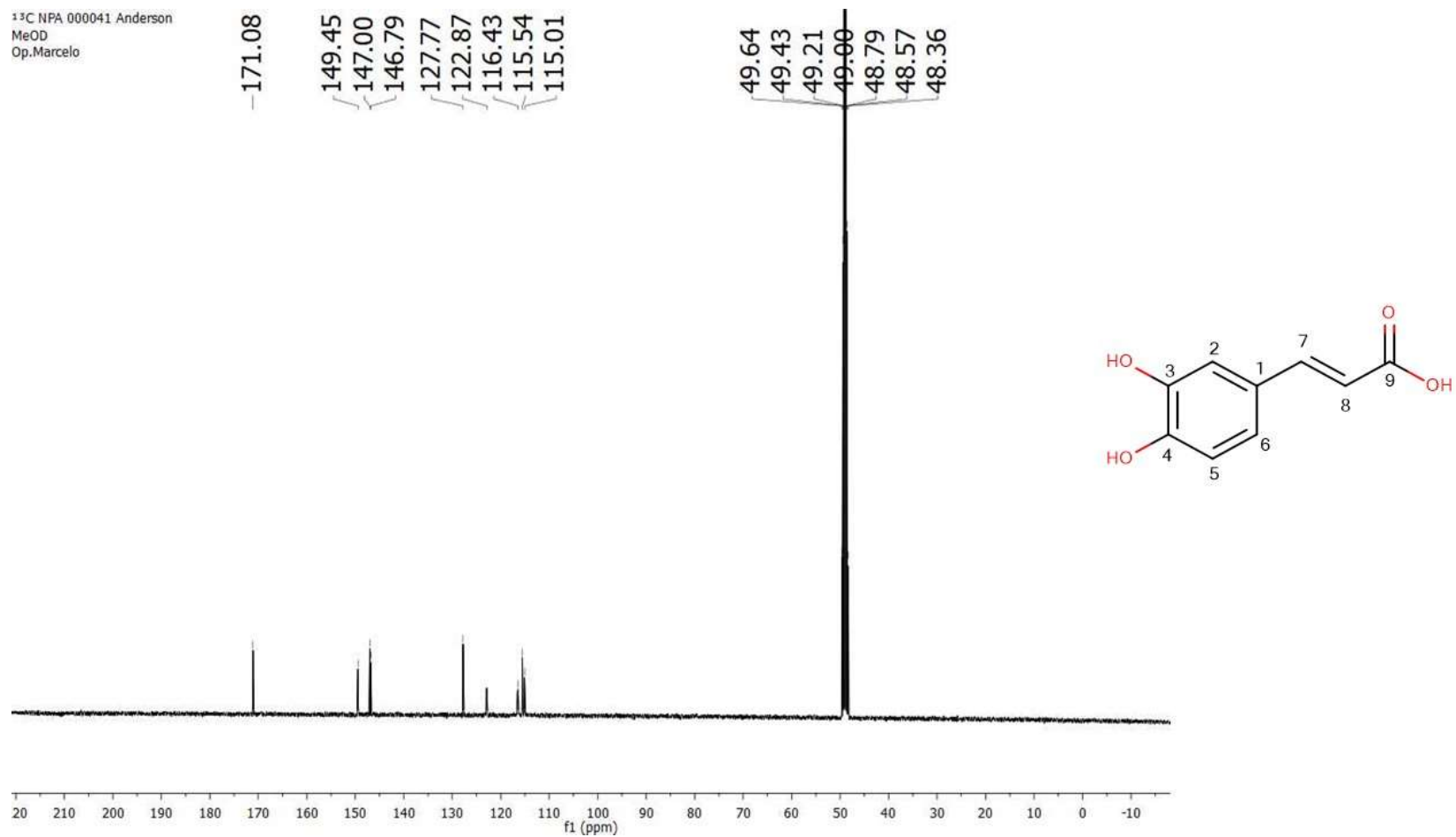
Fonte: Própria do autor.

Figura 33. Espectro de RMN ^1H de Vp – 3 (δ , CD_3OD , 400 MHz)



Fonte: Própria do autor.

Figura 34. Espectro de RMN ^{13}C de Vp – 3 (δ , CD_3OD , 100 MHz)



Fonte: Própria do autor.

5.1.2.4 Identificação estrutural de Vp – 4

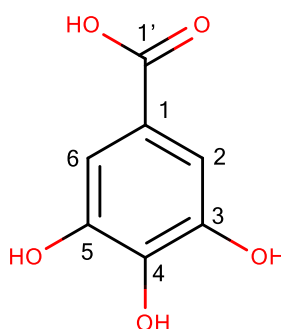
O composto codificado como Vp – 4 (6,0 mg) foi isolado na forma de um sólido branco amorfo por cromatografia clássica e purificado em cartucho com C – 18.

O espectro de RMN ^1H (Figura 36, página 113) apresentou absorção para um único singlete na região de aromáticos em δ_{H} 7,06, sugerindo que a substância poderia se tratar do ácido gálico devido o valor característico dos dois hidrogênios ligados a carbonos aromáticos (s, H-2 e ao H-6) (Tabela 06, página 112) (MOURA; VILEGAS; SANTOS, 2011; ALVES, 2007; WYREPKOWSKI, 2014).

O espectro de RMN ^{13}C , utilizando a técnica de BB (Figura 37, página 114), indicou a presença de 5 sinais, entre eles, o sinal em δ_{C} 170,4 de carbono não hydrogenado, referente à carbonila ou ácido conjugado. Os sinais em δ_{C} 146,6 e 110,3 estavam apresentando intensidade característica para dois carbonos cada, sendo atribuídos aos C – 3/ C – 5 e C – 2 e C – 6, respectivamente. Os sinais em δ_{C} 121,9 e 139,5 foram atribuídos aos carbonos C – 1 e c – 4, respectivamente (ALVES, 2007; WYREPKOWSKI, 2014).

Os dados obtidos foram comparados com dados de RMN ^1H e ^{13}C da literatura (Tabela 06, página 112) e suficientes para afirmar que o composto Vp – 4 se trata do ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico (ácido gálico), isolado pela primeira vez na família Velloziaceae (Figura 38, página 127).

Figura 38. Composto Vp – 4 (ácido gálico)

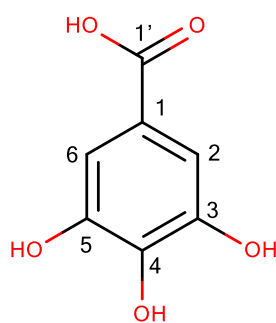


Fonte: Própria do autor.

O ácido gálico é um composto com diversas atividades farmacológicas testadas, sendo evidenciado seu potencial antimicrobiano, antiviral, anti-inflamatório, tratamento da úlcera

gástrica, obesidade, diabetes, dislipidemias, antioxidante e no tratamento do câncer (KAHKESHANI et al., 2019).

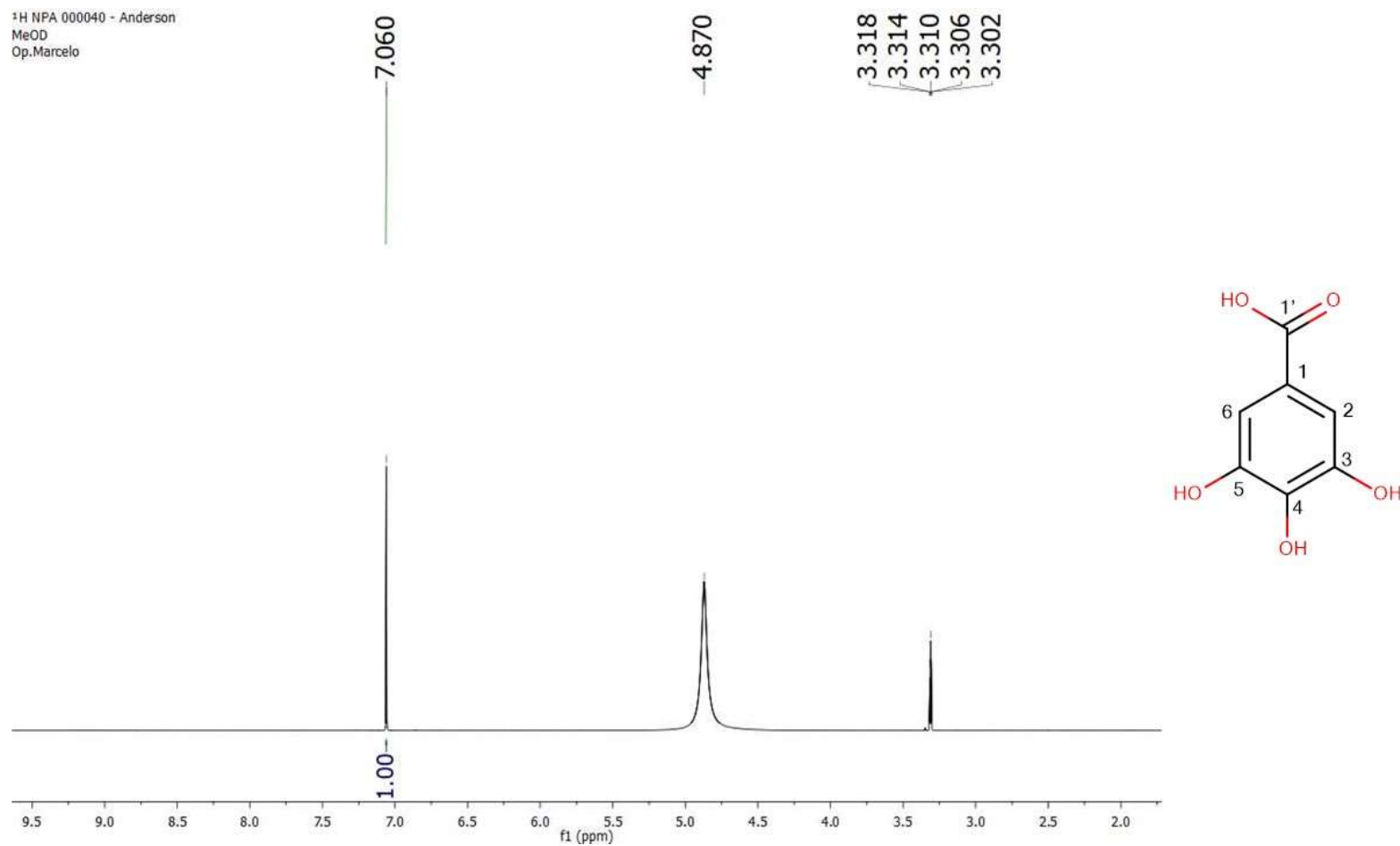
Tabela 06. Dados de RMN ^1H e ^{13}C de Vp – 4 (δ , CD_3OD , 400MHz e 100 MHz) em comparações com o ácido gálico (δ , CD_3OD , 400 e 100 MHz) (MARQUI, 2011)



	Vp – 4		Ácido cafeico	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1	-	121,9	-	122,1
2	7,06 (s)	110,3	7,10 (s)	110,4
3	-	146,3	-	146,3
4	-	139,5	-	139,5
5	-	146,3	-	146,3
6	7,06 (s)	110,3	7,10 (s)	110,4
1'	-	170,4	-	170,6

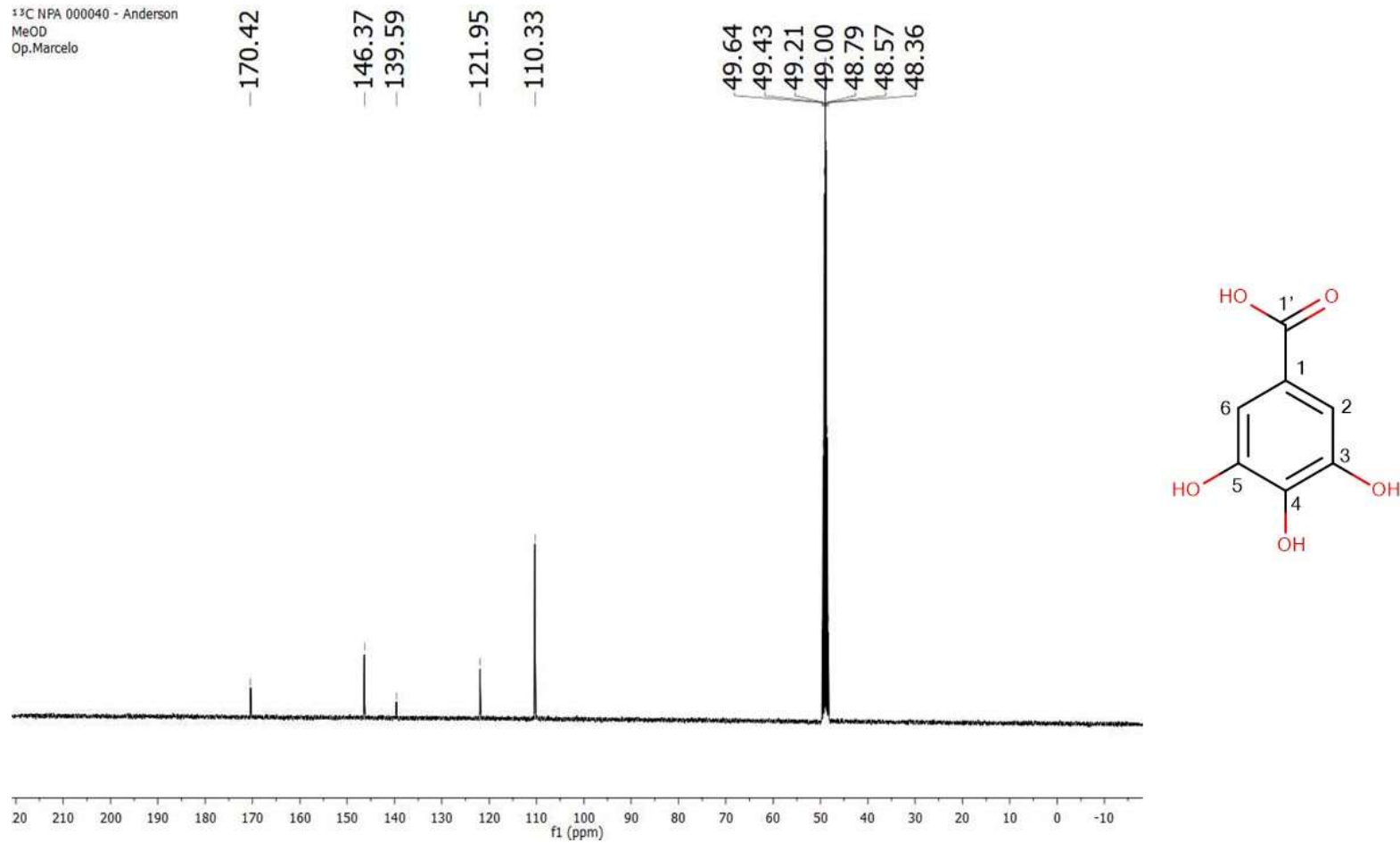
Fonte: Própria do autor.

Figura 36. Espectro de RMN ^1H de Vp – 4 (δ , CD_3OD , 400 MHz)



Fonte: Própria do autor.

Figura 37. Espectro de RMN ^{13}C de Vp – 4 (δ , CD_3OD , 100 MHz)



Fonte: Própria do autor.

5.1.2.5 Identificação estrutural de Vp – 5

O composto identificado como Vp – 5 (4,7 mg) foi isolado em um $T_R=43,0$ min, se apresentando na forma de um sólido amorfo e exibindo absorções no espectro de UV-Visível λ/nm 195, 219, 242 e 328.

Observou-se, no espectro de RMN 1H (Figura 39, página 120), sinais entre δ_H 6,13, 7,49, δ_H 5,43 e 4,96 característicos de prótons em sistemas aromáticos e/ou olefínicos. No espectro de RMN ^{13}C , utilizando a técnica de BB (Figura 40, página 121) registrou-se a presença de 22 sinais correspondentes a 25 átomos de carbonos, sendo 10 atribuídos a carbonos não hidrogenados, 13 a carbonos metínicos e 2 a carbonos metilênicos.

O espectro de RMN 1H (Figura 41, página 122) mostrou a presença de quatro dubletos em δ_H 6,16 (1H), 6,24 (1H), 7,44 (1H) e 7,49 (1H), respectivamente, característicos de prótons α e β à carbonilas, em uma configuração *trans* ($J=16,0$ Hz). Outras absorções foram observadas em δ_H 7,02 (sl, 2H), 6,97 (ddl, $J=8,0$; 1,5 Hz, 2H), 6,75 (d, $J=3,5$ Hz, 1H) e 6,73 (d, $J=3,5$ Hz, 1H), indicativos de dois sistemas ABX, 1,3,4 trissubstituídos. Corroborando com essa proposta, visualizou-se sinais no espectro de RMN ^{13}C (Figuras 42 e 43, páginas 123 e 124) em δ_C 125,8, 115,2, 148,9, 145,9, 116,2, 121,8, 146,0, 114,1, 114,2, 166,1 e 166,4, sugerindo a presença de duas unidades cafeóilas na estrutura (NASSERI; EMAMI; MOJARRAB, 2019) (Tabela 07, página 118).

Adicionalmente, o espectro de RMN 1H (Figura 44, página 125) mostrou dois multipletos em δ_H 2,15 – 2,09 (1H) e 1,87 – 1,84 (1H) que, segundo os mapas de contorno de HSQC (Figura 45, página 126), exibiram uma correlação com δ_C 38,5 (C – 2). Assim como também, foi observado um singlete largo em δ_H 2,00 (2H) correlacionando com o carbono em δ_C 38,0 (C – 6). Os deslocamentos químicos em δ_H 4,17 (sl, 1H), 4,96 (dd, $J=8,5$; 2,5 1,5, 1H) e 5,43 (sl, 1H), juntamente com as correlações observadas por HSQC (Figura 46, página 127) com os carbonos em δ_C 68,2 (C – 3), 74,5 (C – 4) e 67,5 (C – 5), respectivamente, indicaram que estão ligados à carbonos oxigenados. Associado a isso, a presença de 74,6 (C – 1) e da carbonila de ácido em 175,7 (C – 7) (Figura 47, página 128), infere na existência do ácido quínico na estrutura em questão (NASSERI; EMAMI; MOJARRAB, 2019).

A desproteção observada nos hidrogênios ligados a C – 4 e C – 5, aliadas aos mapas de contorno HMBC (Figura 48, página 129), evidenciaram as correlações existentes entre H –

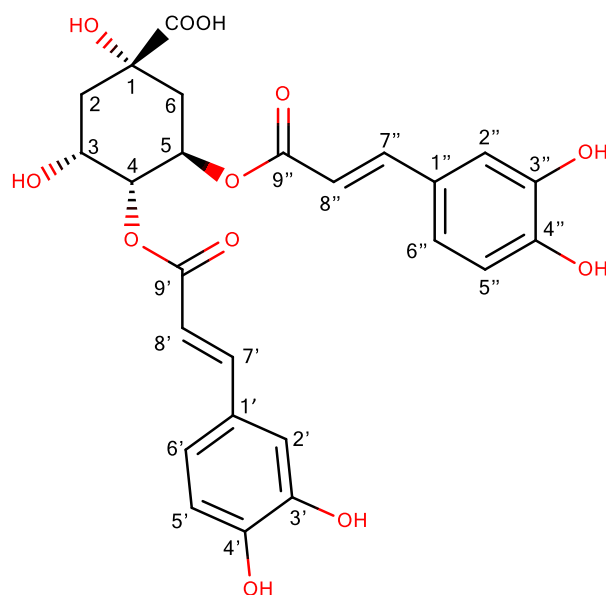
4 a 2J com C – 3/C – 5, a 3J com os C – 9' e a 4J 9''. Também se verificou correlações entre H – 5 2J com C – 4/C – 6, a 3J com o C – 9'' e a 4J 9' (Figura 49, página 130) (Tabela 07, página 118). Dessa forma, confirmou-se a inserção dos grupos cafeoíla nas posições 4 e 5 do ácido quínico, demonstrando que VP – 5 tratava-se de um ácido clorogênico.

Os derivados clorogênicos podem se apresentar em diversas formas isoméricas, sendo necessário definir a ligação da unidade cafeoíla com o ácido quínico. Nesse contexto, a espectrometria de massas vem sendo amplamente utilizada como ferramenta eficaz que, por meio do padrão de fragmentação e intensidade dos íons produtos em EM² e/ou EM³, contribuem para a diferenciação de isômeros de posição (CLIFFORD et al., 2003; CARVALHO, 2016).

Mediante o exposto, Vp – 5 foi analisado por IES – EM³, apresentando o pico base m/z 515 [M – H]⁻ (Figura 50, página 131), gerando em EM² o íon produto m/z 353 (100%) [M – H – 163]⁻ (Figura 51, página 131), indicando a perda de uma unidade cafeoíla. No espectro EM³ [515 → 353] (Figura 52, página 131), foram observados os íons produtos: m/z 173 (100%) [M – H – 180]⁻, inferindo a saída de cafeoíla + H₂O; m/z 179 (78,85%) [M – H – 174]⁻, indicando a perda de ácido quínico + H₂O; m/z 191 (30,16%) [M – H – 162]⁻, atribuído a saída da outra unidade de cafeoíla; e m/z 135 (9,11%) [M – H – 218]⁻, correspondente a perda de H₂O + ácido quínico + COO⁻. Tendo como base os estudos de Clifford e colaboradores, também foi possível identificar a substância como a 4,5-dicafeoil-quínico (Figura 53, página 132) (CLIFFORD et al., 2003; CLIFFORD et al., 2007; CARVALHO, 2016). Os dados obtidos foram compilados na Tabela 08 (página 133) e comparados com padrões de fragmentação da literatura.

Assim, de acordo com os dados de RMN ¹H, ¹³C e bidimensionais, IES-EM de Vp – 5 foi possível identificar o composto como um derivado clorogênico, o ácido 4,5-di-*O-E*-cafeoil-quínico (Figura 54, página 117), isolado pela primeira vez na família Velloziaceae.

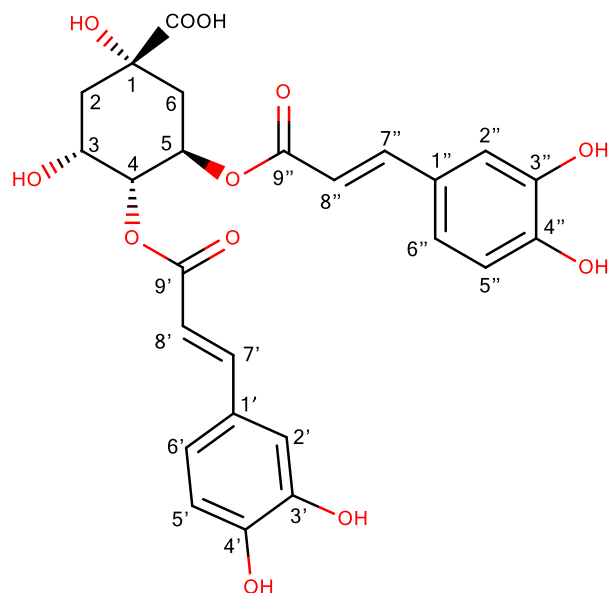
Figura 54. Composto Vp – 5 (ácido 4,5-di-*O-E*-cafeoil-quínico)



Fonte: Própria do autor.

O ácido 4,5-di-*O-E*-cafeoil-quínico é um derivado clorogênico com diversas atividades biológicas comprovadas, como: antioxidante, DNA- protetiva (JIAN-GUO; QING-PING; YU, 2012), antitussígeno, expectorante (QI-ZHEN et al., 2015), anti-inflamatória (KIM et al., 2017) e anti-HIV (TAMAYOSE et al., 2019).

Tabela 07. Dados de RMN ^1H e ^{13}C de Vp – 5 (δ , $\text{DMSO-}d_6$, 500MHz e 125 MHz) em comparações com o ácido 4,5-dicafeoil-quínico (δ , $\text{DMSO-}d_6$, 500 e 125 MHz) (NASSERI; EMAMI; MOJARRAB., 2019)

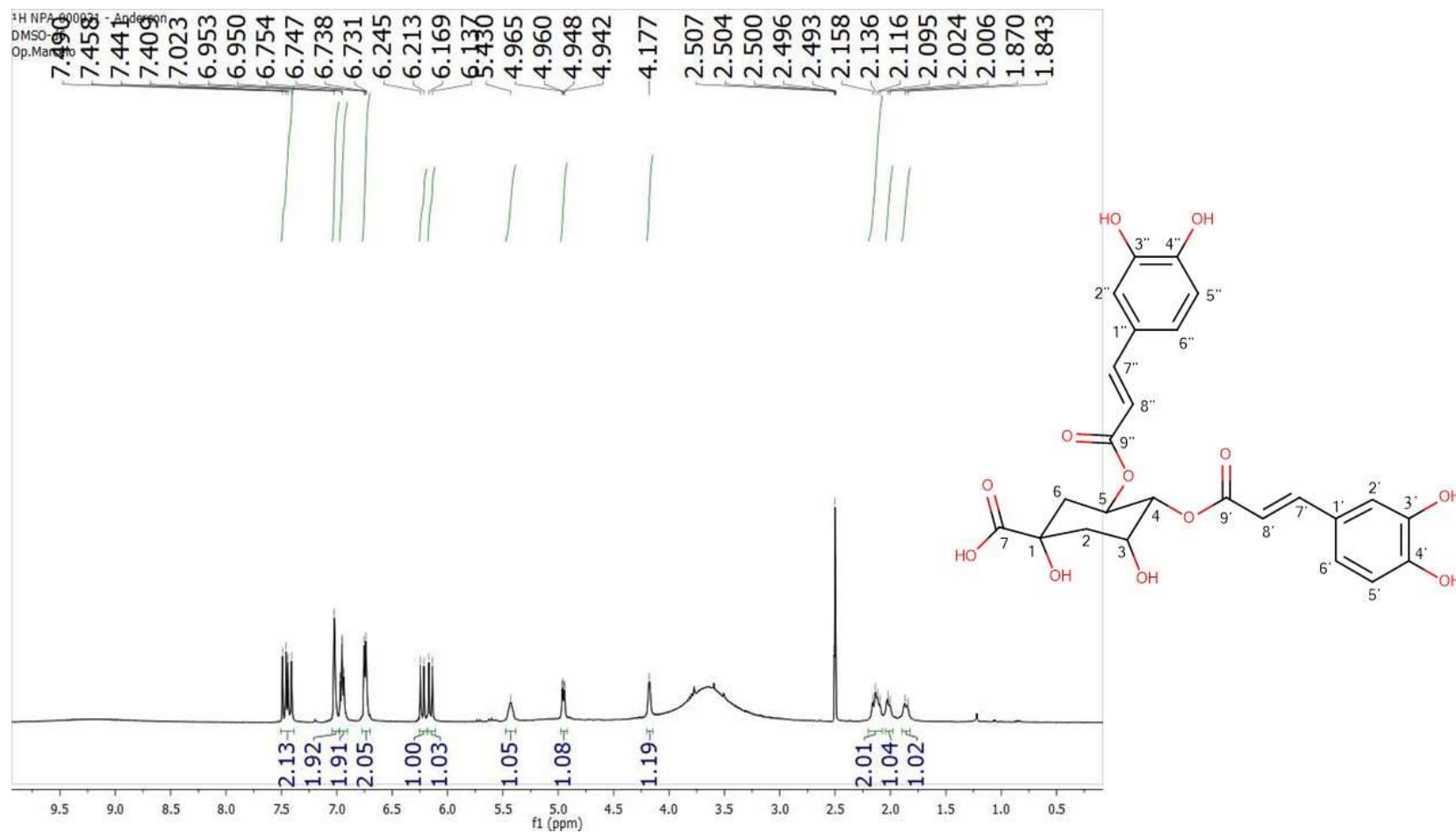


	Vp – 5			Ácido 4,5-di- <i>O-E</i> -cafeoil-quínico	
	δ_{H}	δ_{C}	HMBC	δ_{H}	δ_{C}
1	-	74,6	-	-	73,6
2	2,15 – 2,09 (m, 1H) 1,87 – 1,84 (m, 1H)	38,5	C – 1, C – 4 e C – 6	2,00 – 2,20 (m, 4H)	37,5
3	4,17 (sl, 1H)	68,2	-	4,27 (m, 1H)	66,3
4	4,96 (ddd, $J=8,5;2,5$ 1,5, 1H)	74,5	C – 3, C – 5 e C – 9'	5,04 (m, 1H)	73,3
5	5,43 (sl, 1H)	67,5	C – 4, C – 6 e C – 9'/9''	5,48 (m, 1H)	67,7
6	2,00 (sl, 2H)	38,0	C – 1, C – 2, C – 5 e C – 7	2,00 – 2,20 (m, 4H)	37,1
7	-	175,7	-	-	174,8
1'	-	125,8	-	-	125,5
2'	7,02 (sl, 1H)	115,2	C – 1', C – 3' e C – 4'	7,06 (sl, 1H)	114,9
3'	-	145,9	-	-	145,6
4'	-	148,9	-	-	148,5
5'	6,73 (d, $J=3,5$, 1H)	116,2	C – 1', C – 3', C – 4' e C – 6'	6,78 (d, $J=7,5$, 1H)	115,9
6'	6,95 (dd, $J=8,0; 1,5$, 2H)	121,8	C – 2', C – 4' e C – 5'	6,95 (2H, m, H-6' and H-6'')	121,5

7'	7,44 (d, $J=16,0$, 1H)	146,0	C – 1', C – 2', C – 6', C – 8' e C – 9'	7,47 (d, $J=16,0$, 1H)	145,6
8'	6,24 (d, $J=16,0$, 1H)	114,2	C – 1' e C – 9'	6,26 (d, $J=16,0$, 1H)	113,6
9'	-	166,1	-	-	165,6
1''	-	125,8	-	-	125,5
2''	7,02 (sl, 1H)	115,2	C – 1'', C – 3'', C – 4'' e C – 5''	7,06 (sl, 1H)	114,9
3''	-	145,9	-	-	145,6
4''	-	148,9	-	-	148,5
5''	6,75 (d, $J=3,5$, 1H)	116,2	C – 1'', C – 3'', C – 4'' e C – 6''	6,78 (d, $J=7,5$, 1H)	115,9
6''	6,95 (dd, $J=8,0$; 1,5, 2H)	121,8	C – 2'', C – 4'' e C – 5''	6,95 (2H, m, H-6' and H- 6'')	121,5
7''	7,49 (d, $J=16,0$, 1H)	146,0	C – 1'', C – 2'', C – 6'', C – 8'' e C – 9''	7,53 (d, $J=16,0$, 1H)	145,6
8''	6,16 (d, $J=16,0$, 1H)	114,1	C – 1'' e C – 9''	6,18 (d, $J=16,0$, 1H)	113,9
9''	-	166,1	-	-	166,1

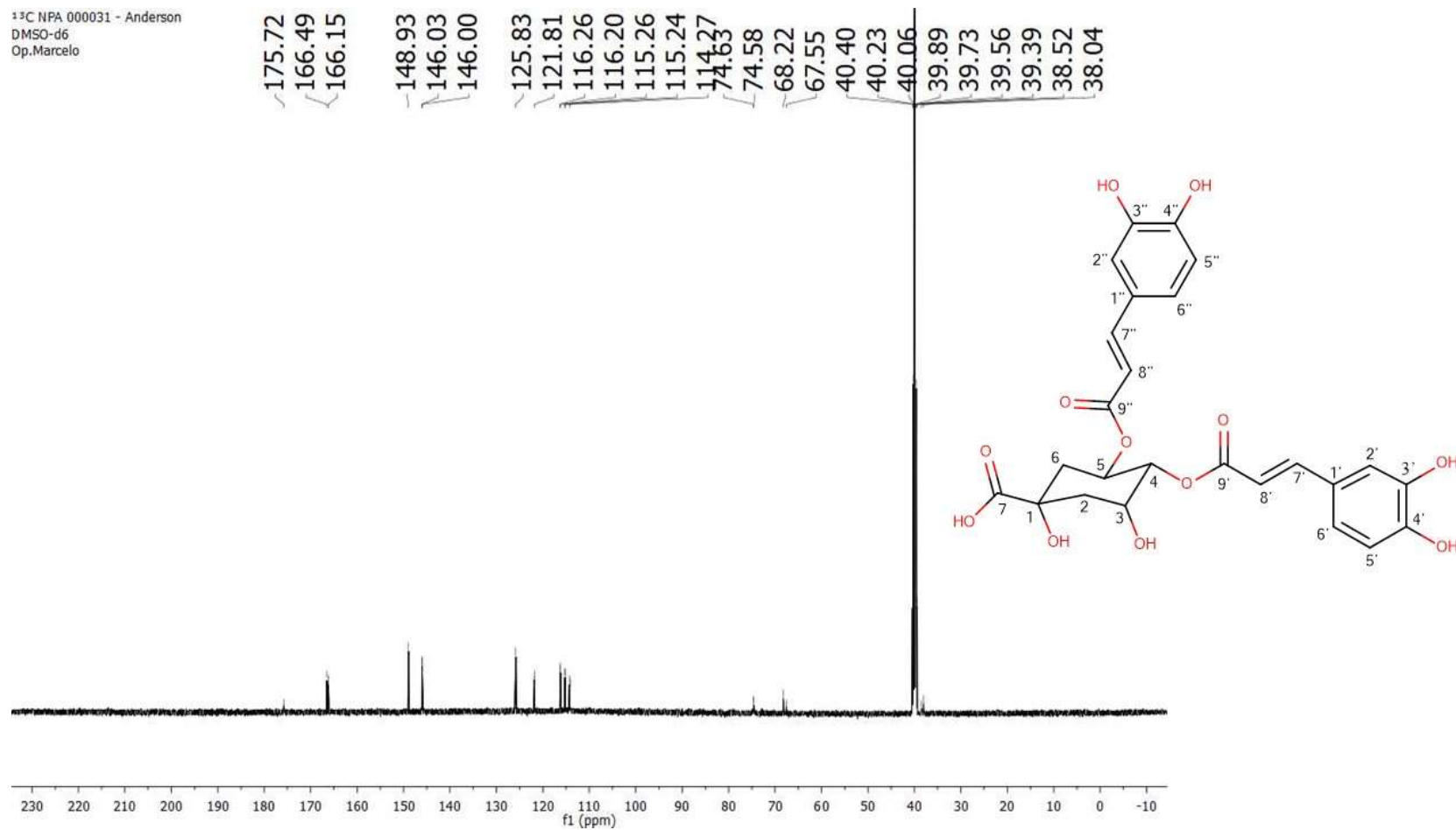
Fonte: Própria do autor.

Figura 39. Espectro de RMN ^1H de Vp – 5 (δ , DMSO- d_6 , 500 MHz)

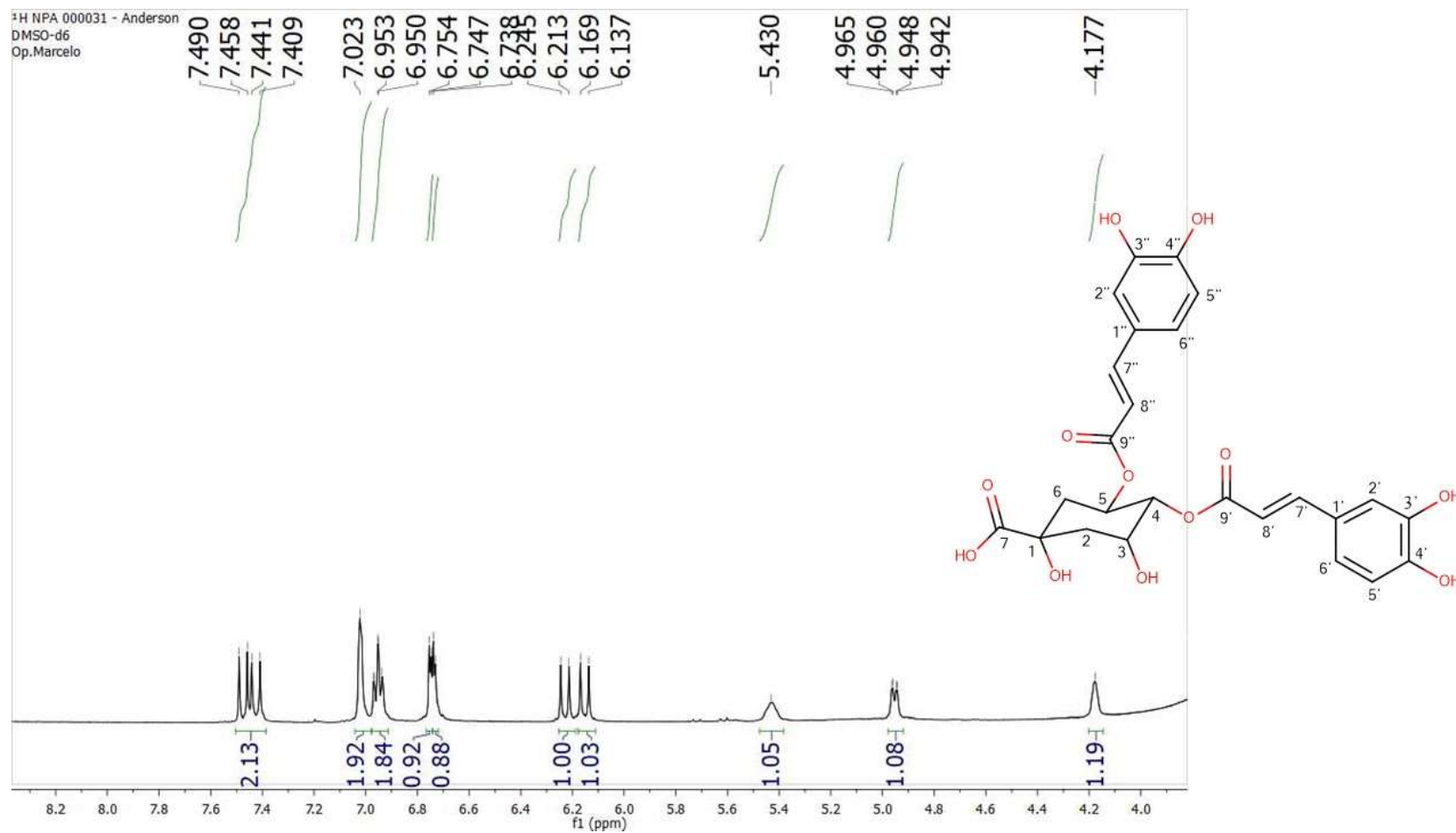


Fonte: Própria do autor.

Figura 40. Espectro de RMN ^{13}C de Vp – 5 (δ , DMSO- d_6 , 125 MHz)

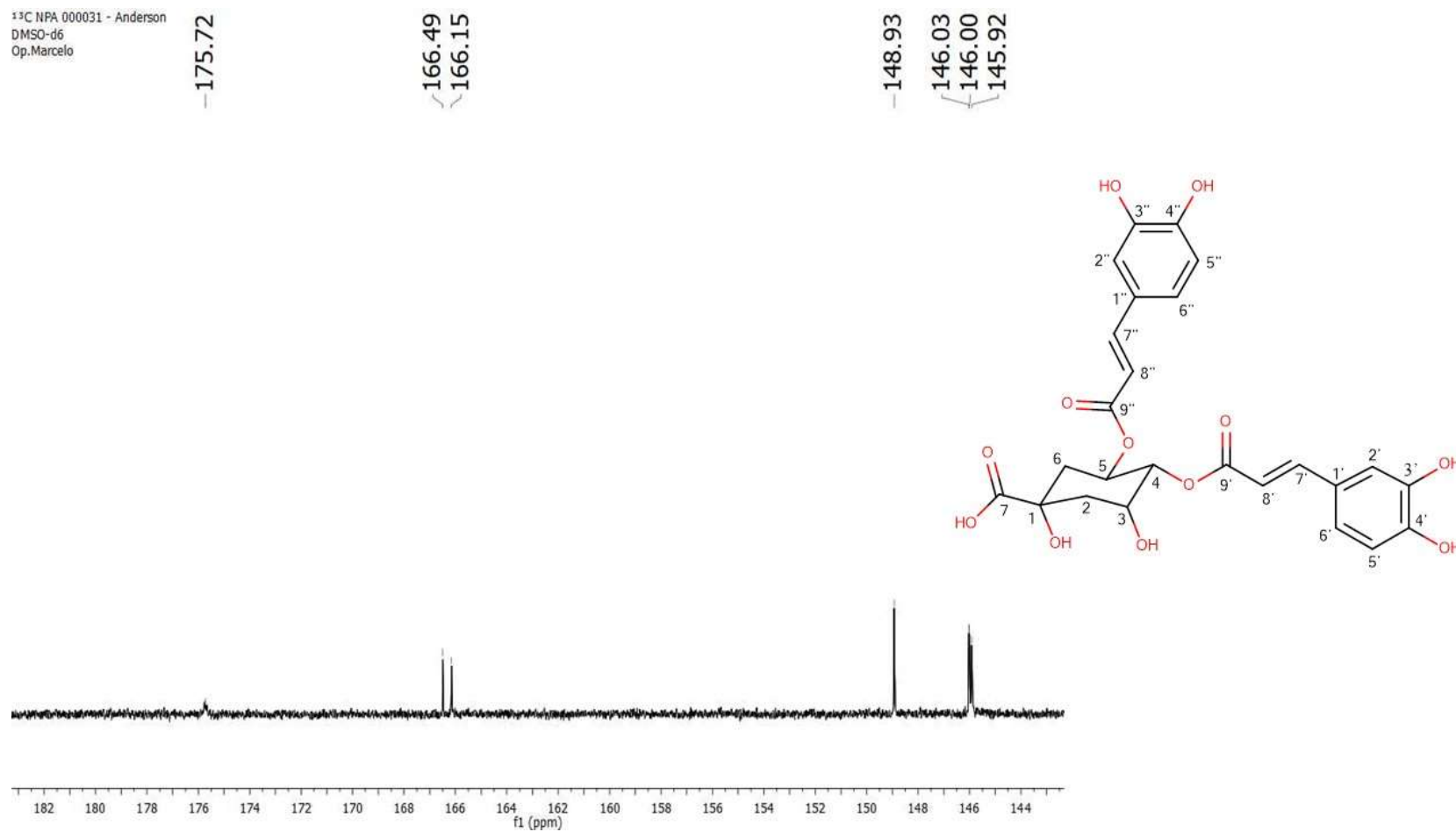


Fonte: Própria do autor.

Figura 41. Primeira expansão do espectro de RMN ^1H de Vp – 5 (δ , DMSO- d_6 , 500 MHz)

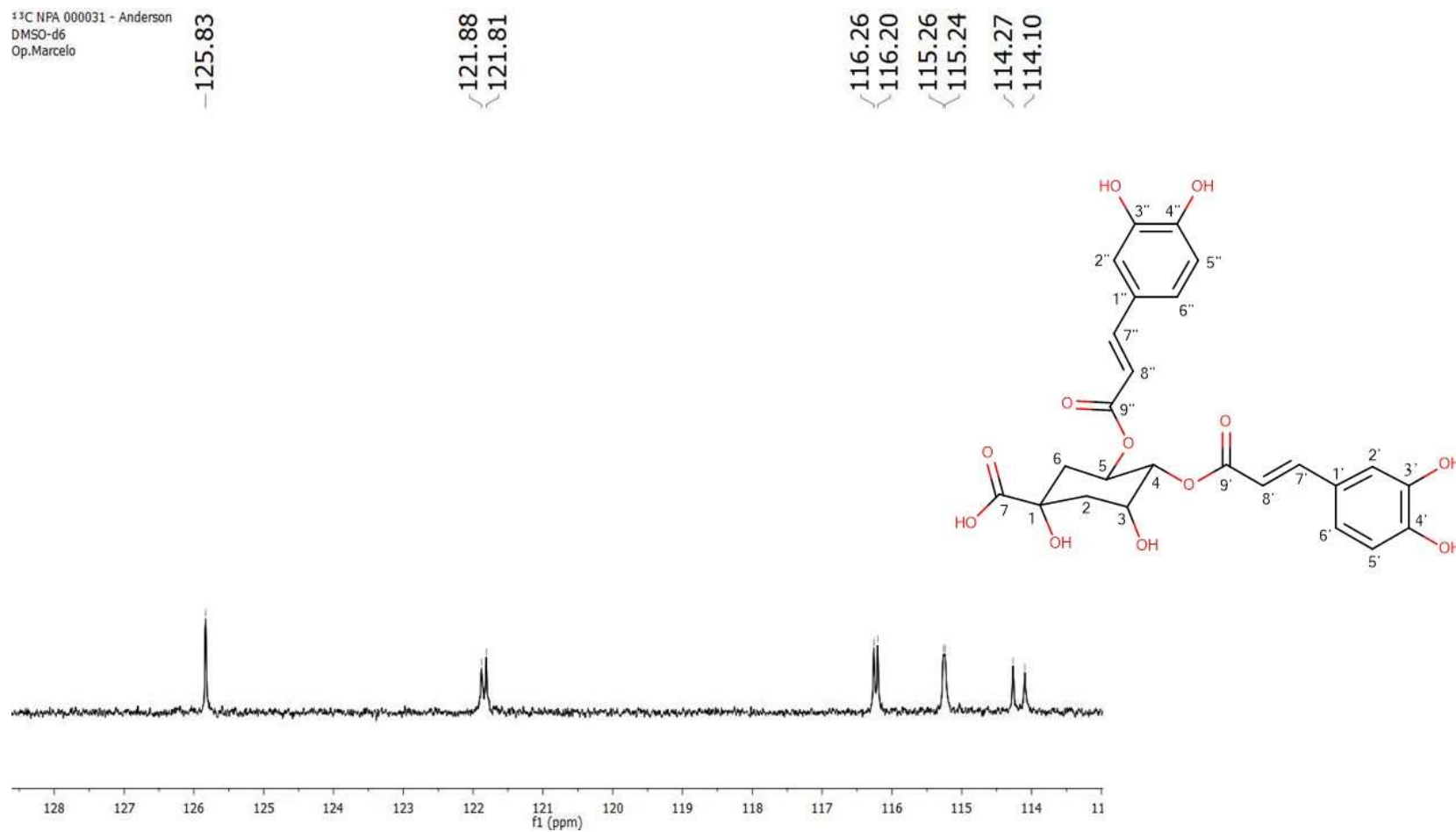
Fonte: Própria do autor.

Figura 42. Segunda expansão do espectro de RMN ^{13}C de Vp – 5 (δ , DMSO- d_6 , 125 MHz)



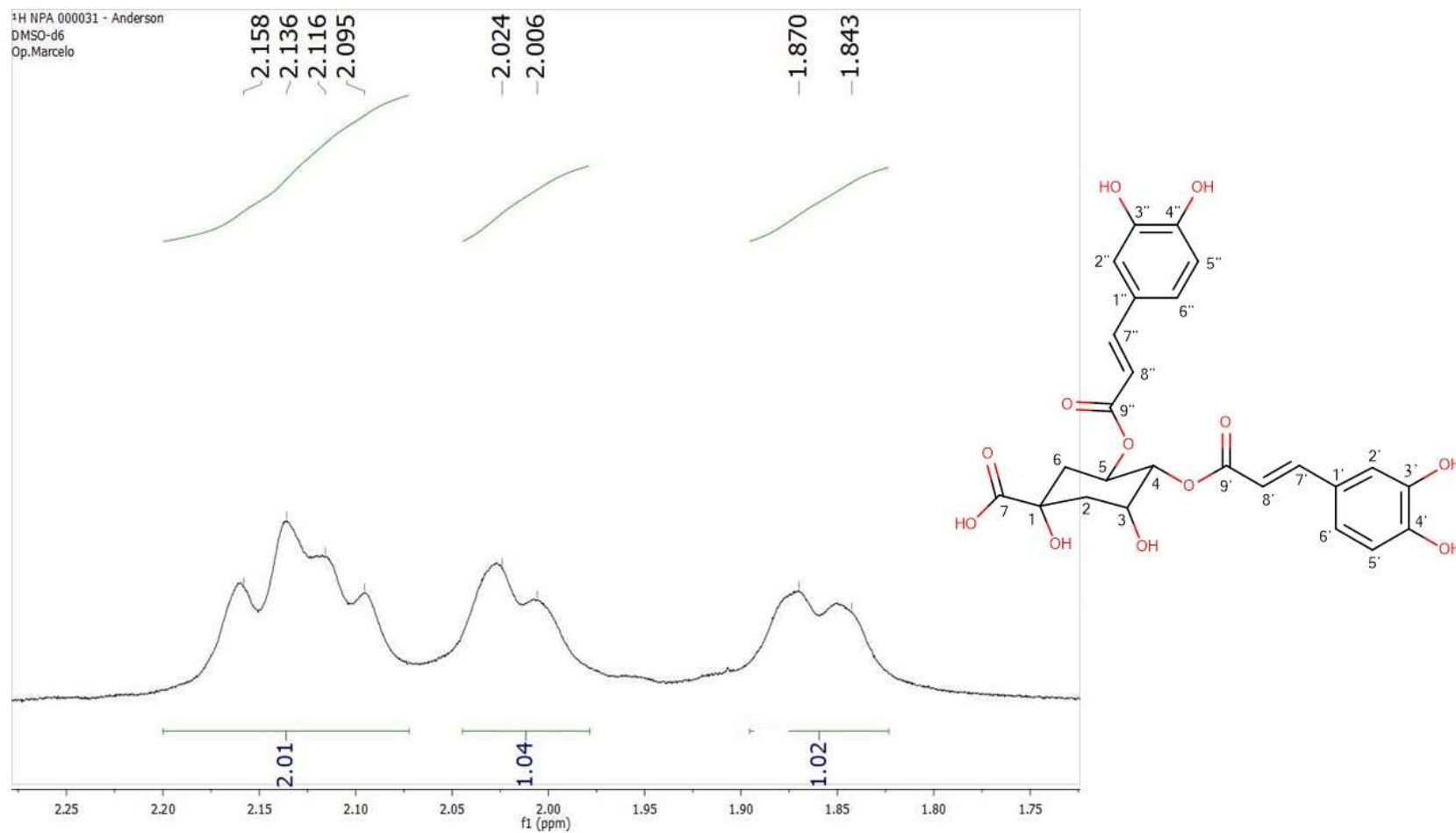
Fonte: Própria do autor.

Figura 43. Terceira expansão do espectro de RMN ^{13}C de Vp – 5 (δ , DMSO- d_6 , 125 MHz)



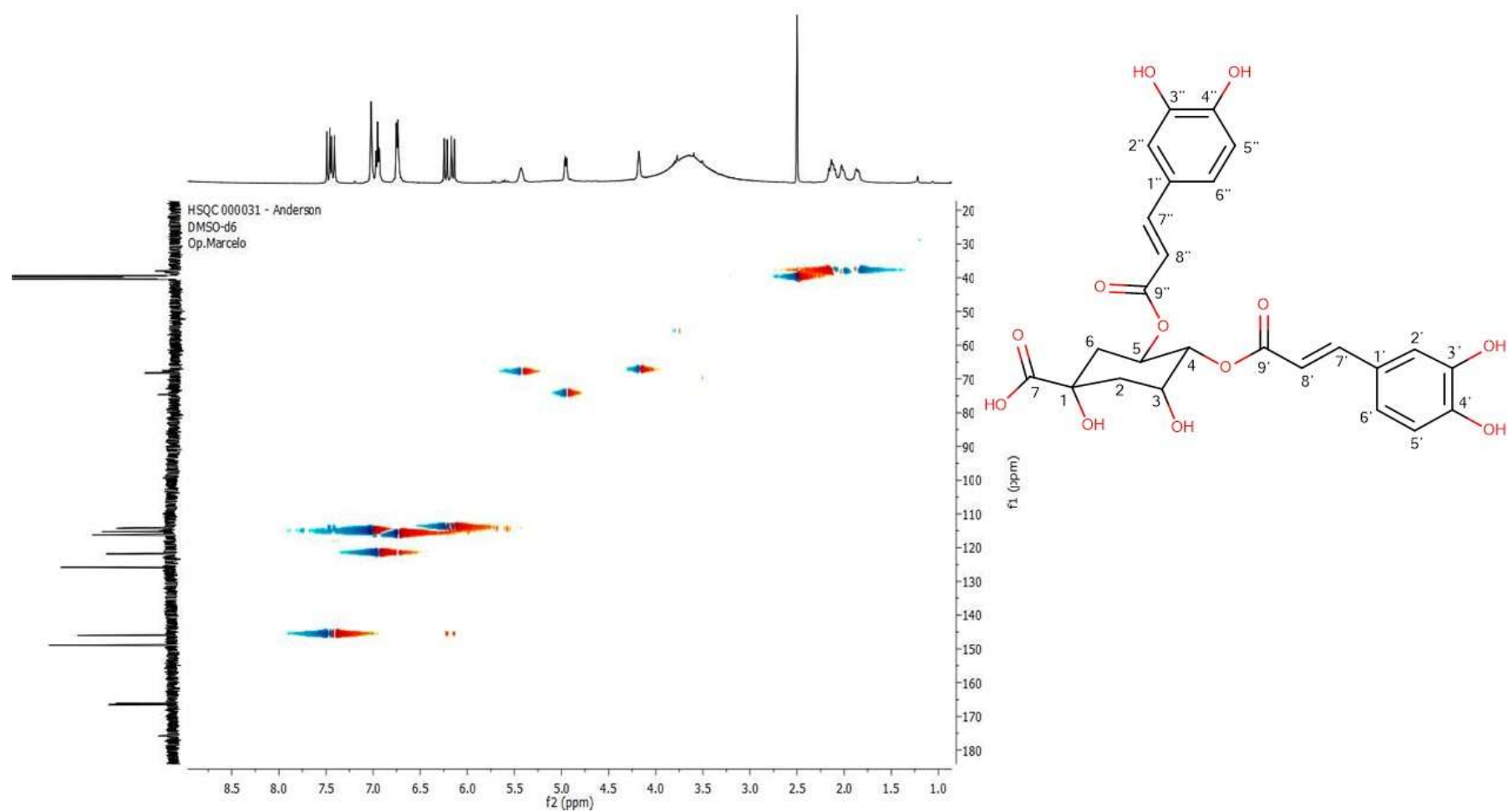
Fonte: Própria do autor.

Figura 44. Terceira expansão do espectro de RMN ^1H de Vp – 5 (δ , DMSO- d_6 , 500 MHz)



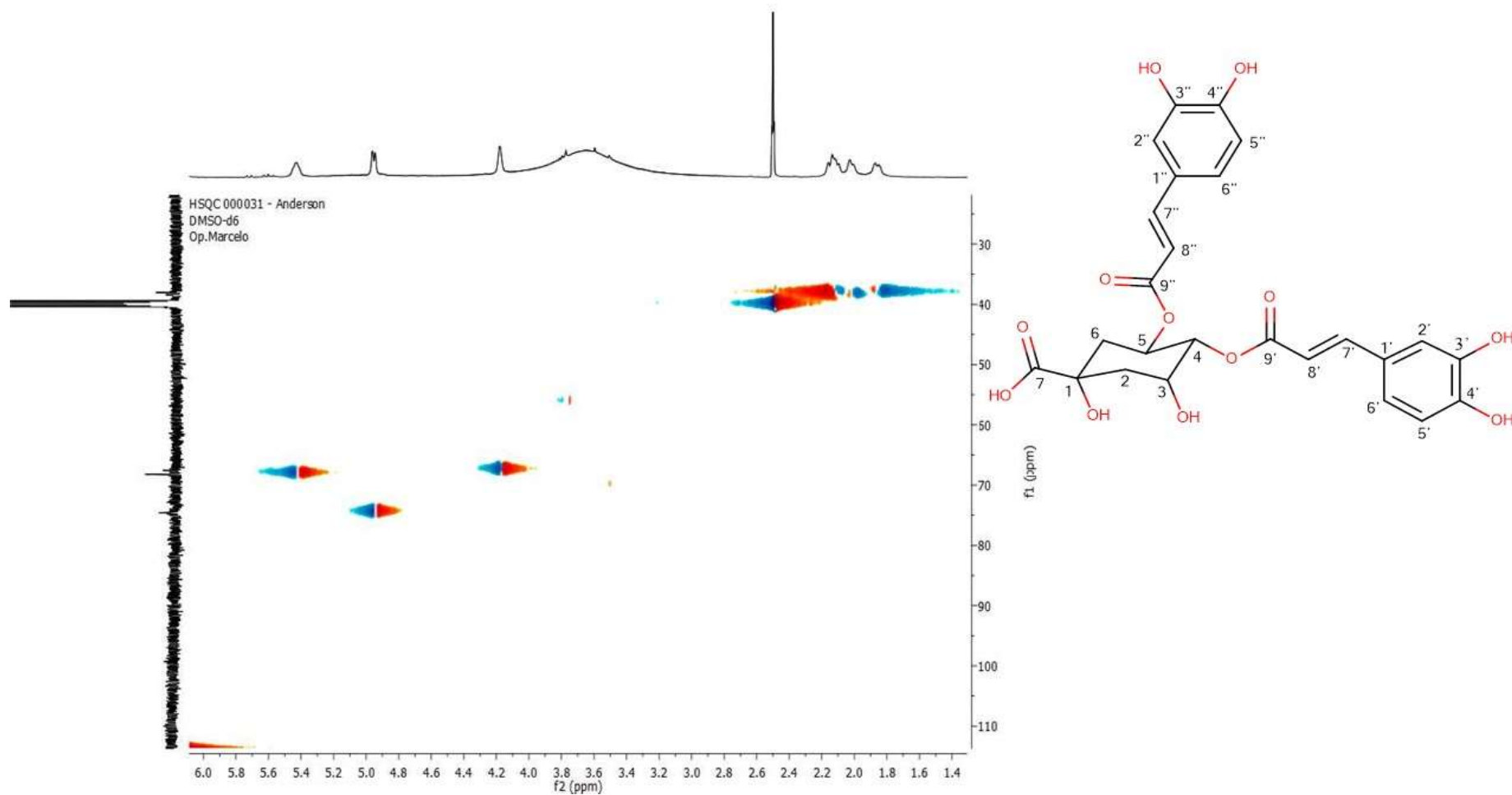
Fonte: Própria do autor.

Figura 45. Mapas de contorno HSQC de Vp – 5 (δ , DMSO- d_6 , 500 e 125 MHz)



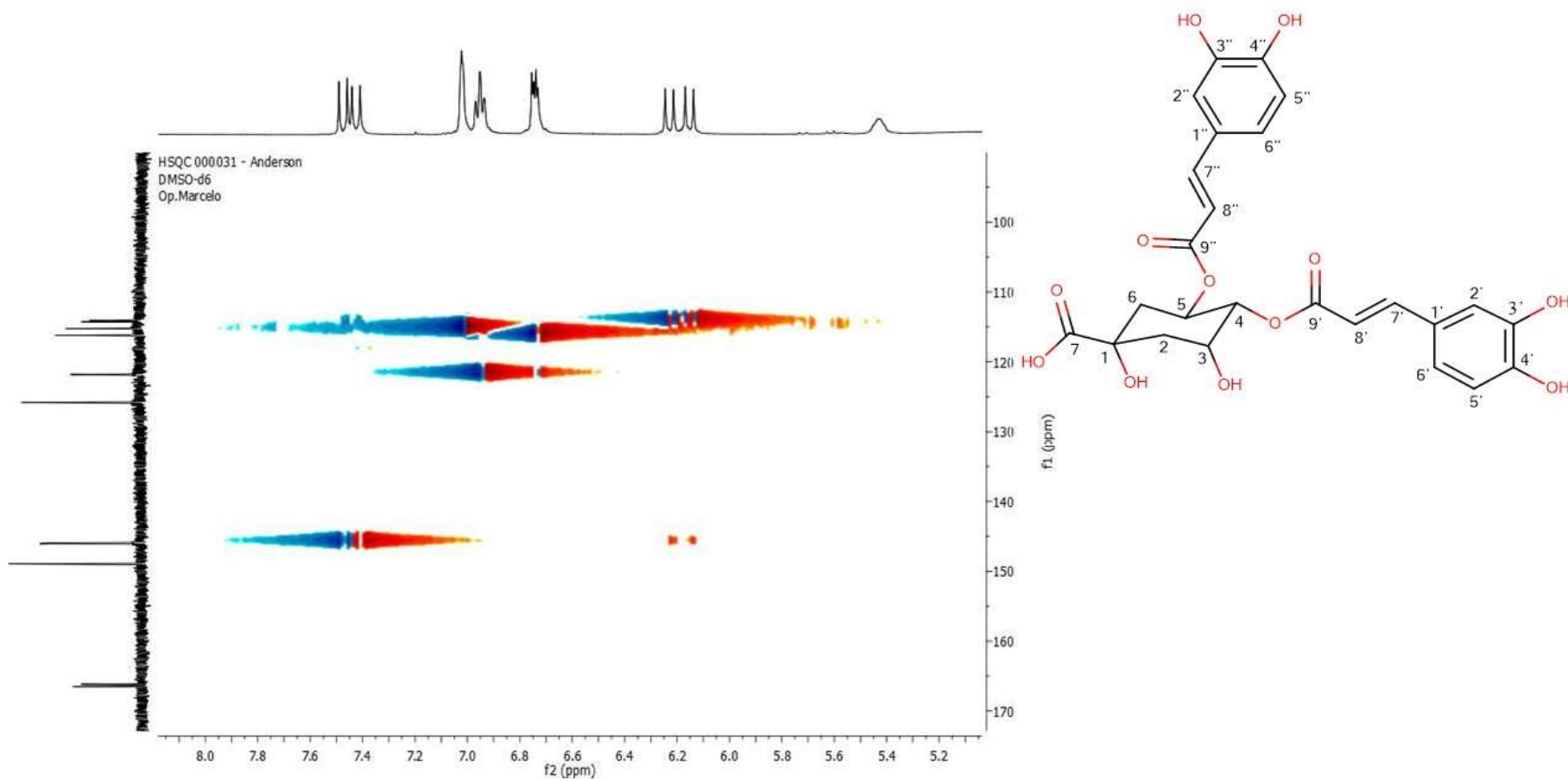
Fonte: Própria do autor.

Figura 46. Primeira expansão dos mapas de contorno HSQC de Vp – 5 (δ , DMSO- d_6 , 500 e 125 MHz)



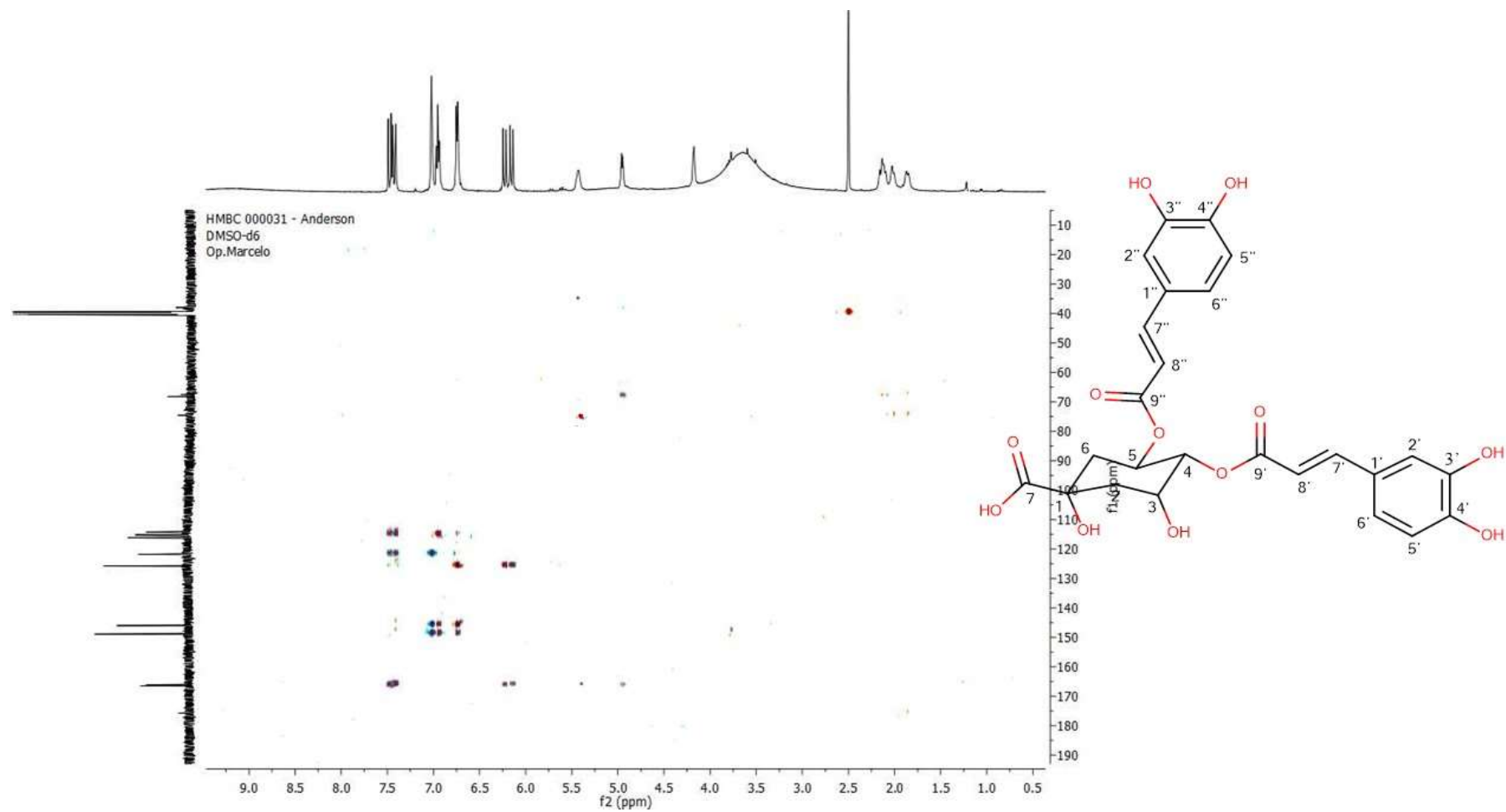
Fonte: Própria do autor.

Figura 47. Segunda expansão dos mapas de contorno HSQC de Vp – 5 (δ , DMSO- d_6 , 500 e 125 MHz)



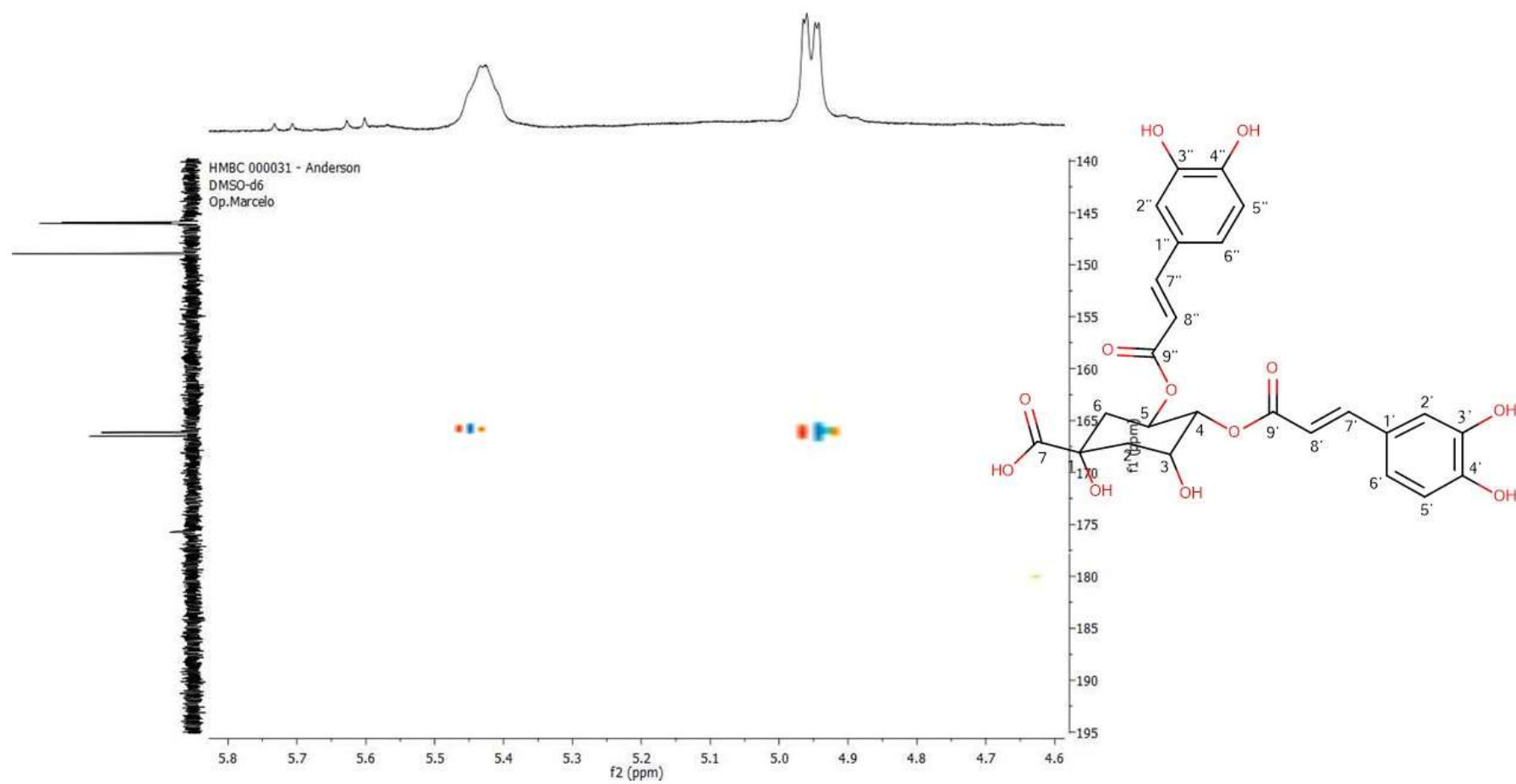
Fonte: Própria do autor.

Figura 48. Mapas de contorno HMBC de Vp – 5 (δ , DMSO- d_6 , 500 e 125 MHz)



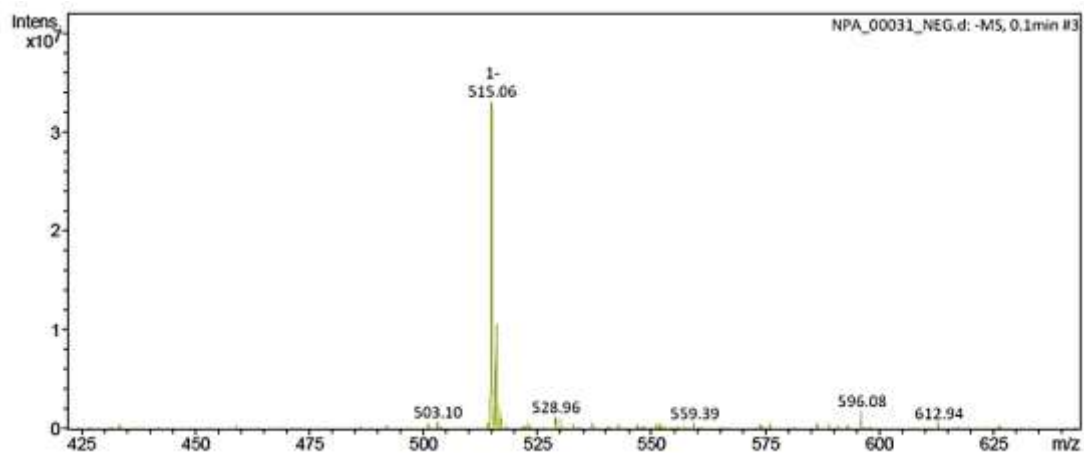
Fonte: Própria do autor.

Figura 49. Primeira expansão dos mapas de contorno HMBC de Vp – 5 (δ , DMSO- d_6 , 500 e 125 MHz)



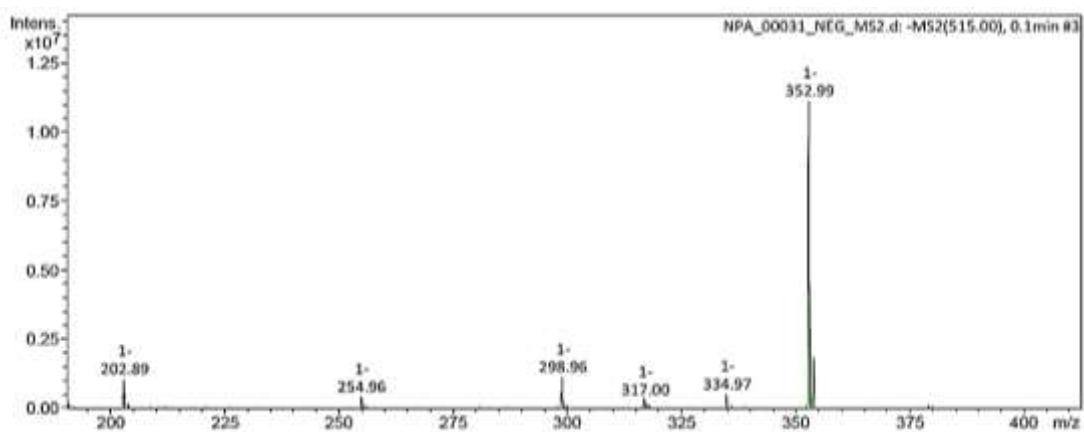
Fonte: Própria do autor.

Figura 50. Espectro de Massas (IES – EM, modo negativo) de Vp – 5



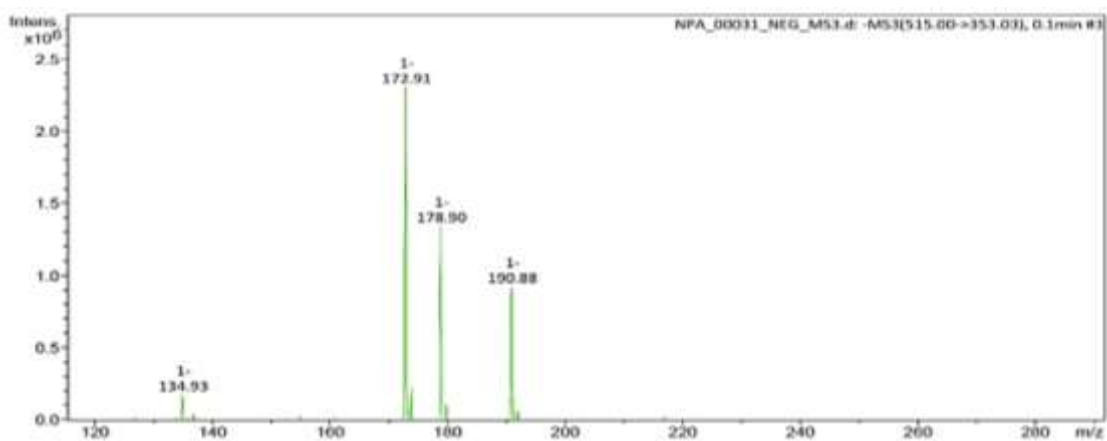
Fonte: Própria do autor.

Figura 51. Espectro de Massas (IES – EM², modo negativo) de Vp – 5



Fonte: Própria do autor.

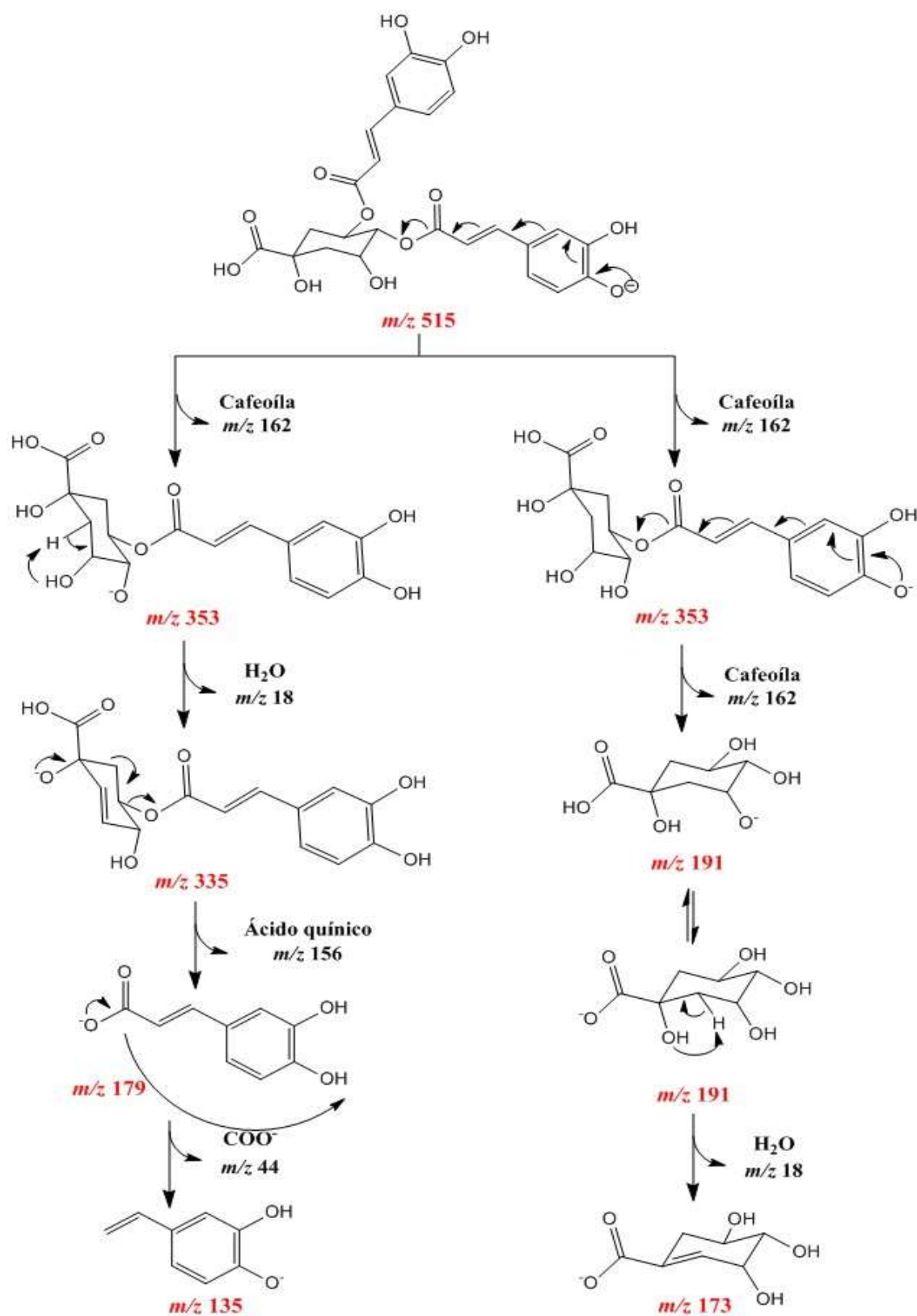
Figura 52. Espectro de Massas (IES – EM³, modo negativo) de Vp – 5



Fonte:

Própria do autor.

Figura 53. Proposta de fragmentação de Vp – 5 (4,5-di-*O-E*-cafeoil-quínico, modo negativo)



Fonte: Própria do autor.

Tabela 08. Padrões de fragmentação (modo negativo) obtidos do composto Vp – 5 e comparados com o ácido 4,5-di-*O-E*-cafeoil-quinico (CLIFFORD et al., 2003)

Composto	IES – EM ³		
	EM	EM ²	EM ³
	<i>m/z</i> (intensidade)	<i>m/z</i> (intensidade)	<i>m/z</i> (intensidade)
Vp – 5			173 (100%)
			179 (78,85%)
	515 (100%)	353 (100%)	191(30,16%)
			135 (9,11%)
Ácido 4,5-di- <i>O-E</i> -cafeoil- quinico			173,6 (100%)
			179,4 (80%)
	515 (100%)	353 (100%)	191,6 (27%)
			135,8 (11%)

Fonte: CLIFFORD et al., 2003.

5.1.2.6 Identificação estrutural de Vp – 6

O composto identificado como Vp – 6 (5,1 mg) foi isolado em um $T_R=12,2$ min, se apresentando na forma de um sólido amorfo e absorções no espectro de UV-Visível λ/nm 197 e 314.

No espectro de RMN 1H (Figura 55, página 139) foi observado sinais entre δ_H 7,64 a 6,20, δ_H 5,41 a 5,29 e δ_H 3,99 a 2,21, que assim como Vp – 5, são característicos de prótons em sistemas aromáticos e/ou olefínicos, sugerindo que a substância também poderia se tratar de um derivado clorogênico (PINTO et al., 2010). Dessa forma, a substância também foi analisada por IES – EM³ para auxiliar na identificação e atribuição correta dos dados de RMN.

Os espectros de massas de baixa resolução de Vp – 6 foram registrados no modo de ionização negativo, apresentando o pico base m/z 515 $[M - H]^-$ (Figura 56, página 140) e compatíveis com a presença de derivados dicafeoilquínicos. Em EM² (Figura 57, página 140), o íon m/z 515 gerou três íons produtos m/z 353 (100%) $[M - H - 163]$, indicando a perda de uma unidade de cafeoíla; m/z 335 (15%) $[M - H - 180]^-$, inferindo a saída de cafeoíla + H₂O; m/z 173 (4%) $[M - H - 342]^-$, correspondente a perda de cafeoíla + H₂O (CLIFFORD et al., 2003).

No espectro EM³ (Figura 58, página 140) $[515 \rightarrow 353]$ foram observados os íons produtos: m/z 173 (100%) $[M - H - 180]^-$, indicando a saída de cafeoíla + H₂O; m/z 179 (73%) $[M - H - 174]^-$, inferindo a perda de ácido quínico + H₂O; m/z 191 (60%) $[M - H - 162]^-$, atribuído a saída da outra unidade de cafeoíla; e m/z 135 (9%) $[M - H - 218]$, correspondente a perda de H₂O + ácido quínico + COO⁻ (CLIFFORD et al., 2003) (Figura 59, página 141).

Quando a intensidade de m/z 191 (EM³) for maior que 60%, a substância é identificada como ácido 3,4-dicafeoil quínico (CLIFFORD et al., 2003; CLIFFORD et al., 2007; CARVALHO, 2016). Assim, os dados obtidos foram compilados na Tabela 09 (página 135) e comparados com padrões de fragmentação da literatura (Figura 73, página 158).

Tabela 09. Padrões de fragmentação (modo negativo) obtidos do composto Vp – 6 e comparados com o Ácido 3,4-di-*O-E*-cafeoil-quinico (CLIFFORD et al., 2003)

Composto	IES – EM ³		
	EM	EM ²	EM ³
	<i>m/z</i> (intensidade)	<i>m/z</i> (intensidade)	<i>m/z</i> (intensidade)
Vp – 6	515,06 (100%)	[515,06]	[515 → 353]
		353 (100%)	173 (100%)
		335 (15%)	179 (73%)
		173 (4%)	191 (60%)
			135 (9%)
Ácido 3,4-di-		353,5 (100%)	173,5 (100%)
<i>O-E</i> -cafeoil-	515,7 (100%)	335,6 (16%)	179,5 (91%)
quinico		173,7 (18%)	191,7 (53%)
			135,6 (14%)

Fonte: CLIFFORD et al., 2003

No espectro de RMN ¹H foi observado a presença de quatro dubletos em δ_H 6,24 (1H), 6,36 (1H), 7,57 (1H) e 7,64 (1H) característicos de prótons α e β à carbonilas, em uma configuração *trans* ($J=16,0$ Hz). Outras absorções foram observadas em δ_H 7,06 (d, $J=2,0$ Hz, 2H), 6,98 (tl, $J=2,4$, 1H), 6,96 (tl, $J=1,6$, 1H), 6,80 (d, $J=3,6$, 1H) e 6,78 (d, $J=3,6$, 1H), corroborando com a presença de dois anéis aromáticos 1,3,4 trissubstituídos (Figuras 60 e 61, páginas 142 e 143).

O espectro de RMN ¹H ainda mostrou um multipletto em δ_H 2,36 – 2,28 (2H), atribuído aos hidrogênios de um carbono sp³ do ácido quinico. Dois multipletto em δ_H 5,41 e 5,28, integrando para 1H cada, foram atribuídos aos dois prótons oximetínicos, indicando que as unidades de cafeoila estavam esterificando o ácido quinico nas posições 3 e 4, respectivamente (Figura 62, página 144) (JASINSKI, 2010). A presença do multipletto entre δ_H 2,16 – 2,21 foi atribuído ao H – 6 (Figura 63, página 145).

O espectro de RMN ¹³C, utilizando a técnica de BB (Figura 64, página 146) mostrou a presença de 23 sinais correspondentes a 25 átomos de carbonos, sendo 10 atribuídos aos carbonos não hidrogenados, 13 aos carbonos metínicos e 2 sinais aos carbonos metilênicos.

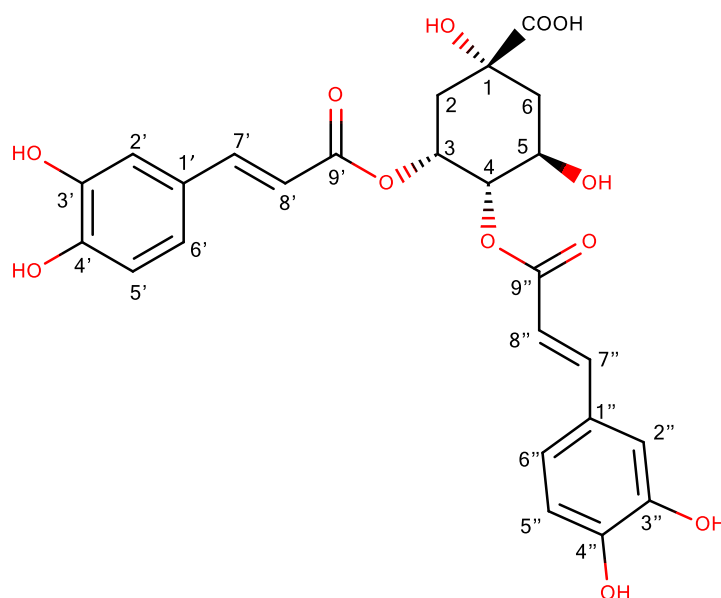
Os deslocamentos em δ_C 74,6 (C – 1), 41,2 (C – 2), 71,9 (C – 3), 72,2 (C – 4), 69,5 (C – 5), 35,6 (C – 6) e 175,6 (C – 7) (Figuras 65 e 66, páginas 147 e 148) demonstraram a presença

de uma unidade de ácido quínico, sendo o valor da última absorção característico de carbonila (JASINSKI, 2010).

Já os sinais em δ_C 127,5, 127,8, 115,1, 115,4, 146,8, 148,5, 149,7, 116,4, 116,7, 123,0, 147,1, 147,4, 114,8, 115,1, 168,7 e 167,9 (Figuras 79 e 80, páginas 164 e 165) indicaram a presença de duas unidades cafeólicas na estrutura (JASINSKI, 2010) (Tabela 10, página 137).

Os dados de RMN 1H e ^{13}C , além dos obtidos por IES – EM³ foram comparados com modelos da literatura (Tabelas 09 e 10, páginas 152 e 154, respectivamente), identificando o composto Vp – 6 como o ácido 3,4-di-*O-E*-cafeoil quínico, isolado pela primeira vez na família Velloziaceae (Figura 67).

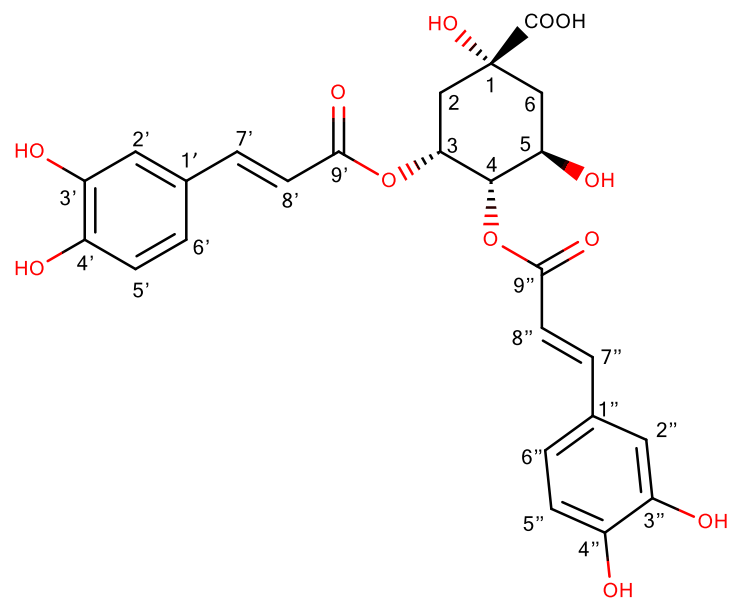
Figura 67. Composto Vp – 6 (ácido 3,4-di-*O-E*-cafeoil quínico)



Fonte: Própria do autor.

O ácido 3,4-di-*O-E*-cafeoil quínico é um composto bioativo com atividade anti-inflamatória (ABDEL MOTAAL et al., 2016), antitussígeno, expectorante (QI-ZHEN et al., 2015), atividade antioxidante, DNA-protetiva (JIAN-GUO; QING-PING; YU, 2012) e anti-influenza A (TEKEMURA et al., 2012) comprovada.

Tabela 10. Dados de RMN ^1H e ^{13}C de Vp – 6 (δ , CD_3OD , 400 MHz e 100 MHz) em comparações com o ácido 3,4-dicafeoil-quínico (δ , CD_3OD , 300 e 75 MHz) (JASINSKI, 2010)

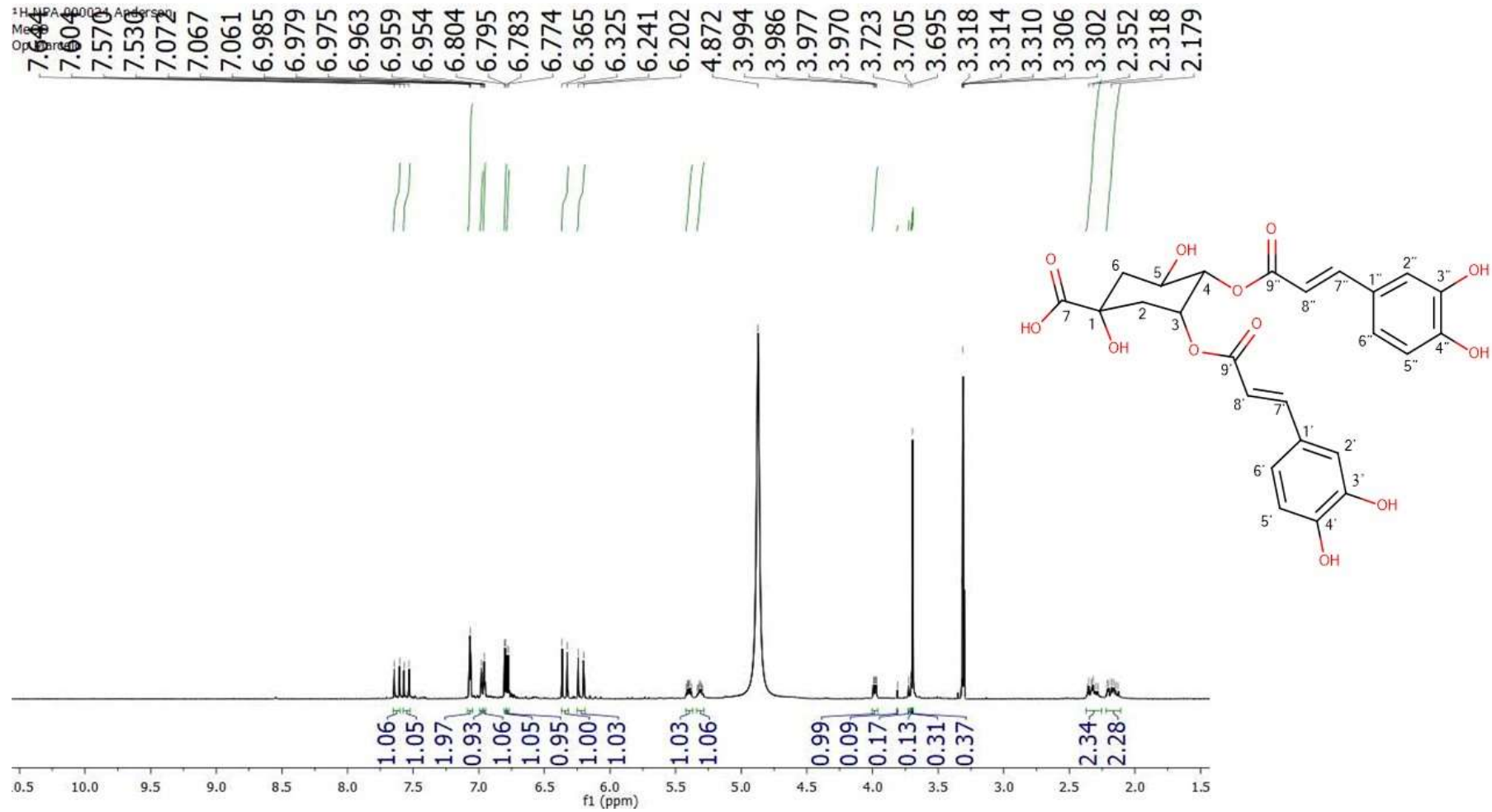


	Vp – 6		Ácido 3,4-di- <i>O-E</i> -cafeoil-quínico	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1	-	74,6	-	76,8
2	2,36 – 2,28 (m, 2H)	41,20	2,21 (m)	40,5
3	5,41 (m, 1H)	71,9	5,70 (m)	69,3
4	5,28 (m, 1H)	72,2	5,13 (dd, $J=8,4; 3,0$ Hz)	74,8
5	3,99 (dd, $J=6,8; 3,2$ Hz, 1H)	69,5	4,40 (m)	70,4
6	2,16 – 2,21 (m, 2H)	35,6	2,14 – 2,29 (m)	38,0
7	-	175,6	-	179,3
1'	-	127,5	-	127,7
2'	7,06 (d, $J=2,0$ Hz, 2H)	115,1	6,95 (sl)	115,3
3'	-	146,8	-	146,7
4'	-	149,7	-	149,6
5'	6,80 (d, $J=3,6$, 1H)	116,7	6,95 (sl)	116,6
6'	6,98 (tl, $J=2,4$, 1H)	123,0	6,86 (d, $J=3,0$ Hz)	123,2

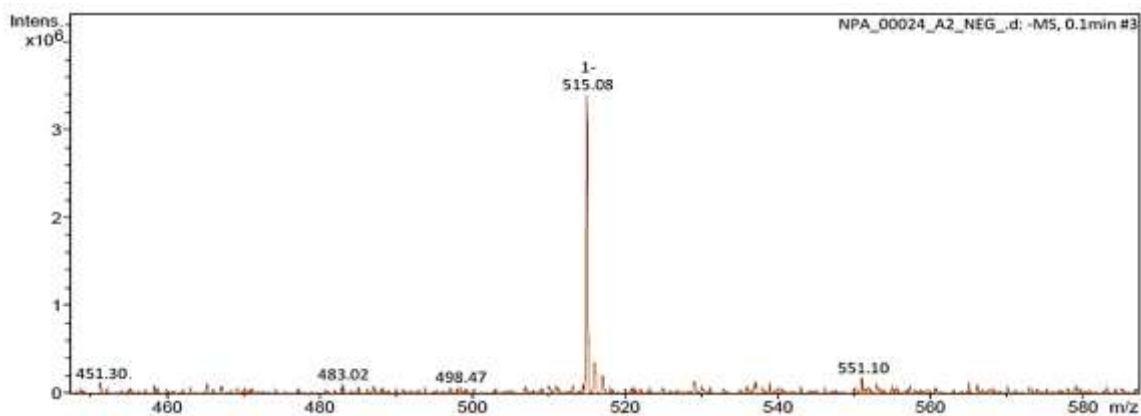
7'	7,64 (d, $J=16,0$, 1H)	147,4	7,47 (d, $J=15,5$ Hz, 1H)	147,4
8'	6,36 (d, $J=16,0$, 1H)	115,1	6,71 (d, $J=9,0$ Hz)	114,9
9'	-	168,7	-	168,6
1''	-	127,8	-	127,8
2''	7,06 (d, $J=2,4$, 2H)	115,4	6,99 (sl, 1H)	115,3
3''	-	146,8	-	146,7
4''	-	149,5	-	149,6
5''	6,78 (d, $J=3,6$, 1H)	116,4	6,77 (d, $J=9,0$ Hz)	116,6
6''	6,96 (tl, $J=1,6$, 1H)	123,0	6,88 (d, $J=3,0$ Hz)	123,2
7''	7,57 (d, $J=16,0$, 1H)	147,1	7,57 (d, $J=16,0$ Hz, 1H)	147,7
8''	6,24 (d, $J=16,0$, 1H)	114,8	6,27 (m)	114,9
9''	-	167,9	-	168,7

Fonte: Própria do autor.

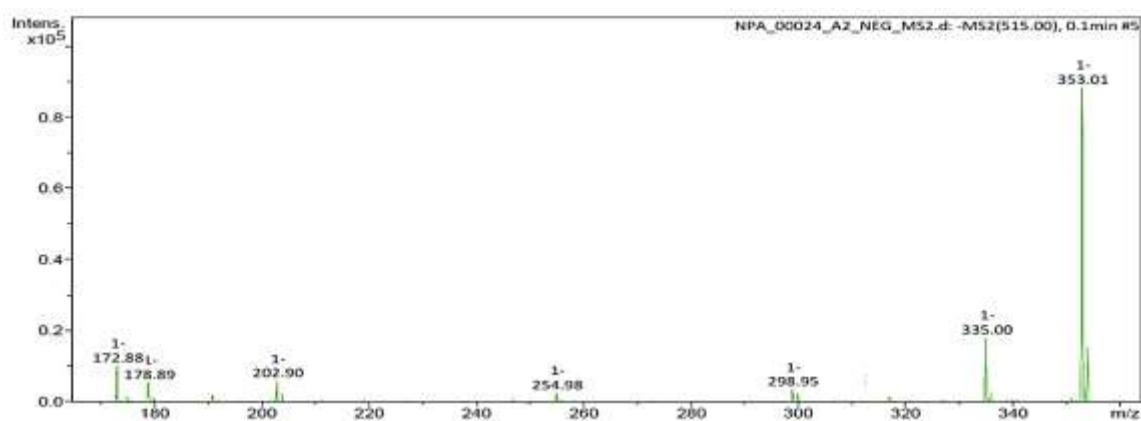
Figura 55. Espectro de RMN ^1H de Vp – 6 (δ , CD_3OD , 400 MHz)



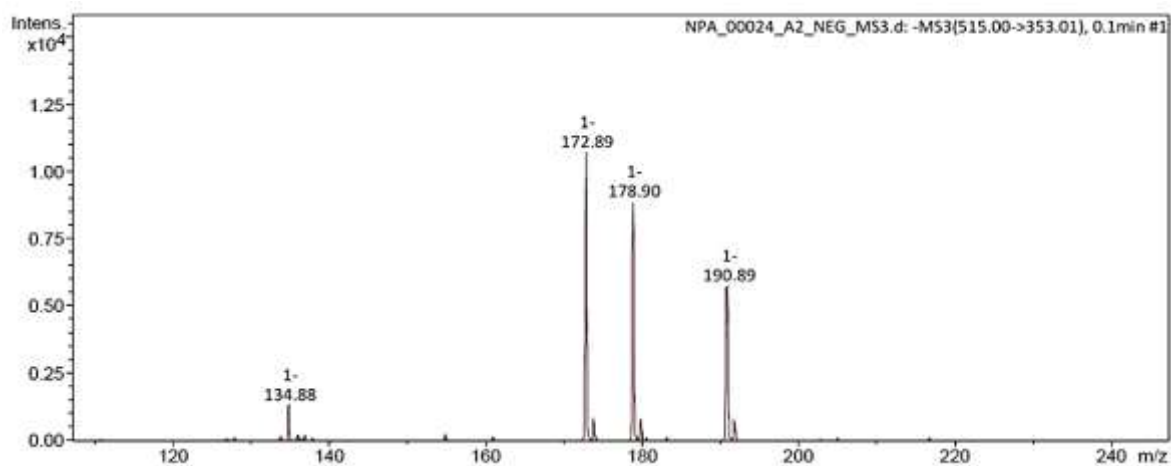
Fonte: Própria do autor.

Figura 56. Espectro de Massas (IES-EM, modo negativo) de Vp – 6

Fonte: Própria do autor.

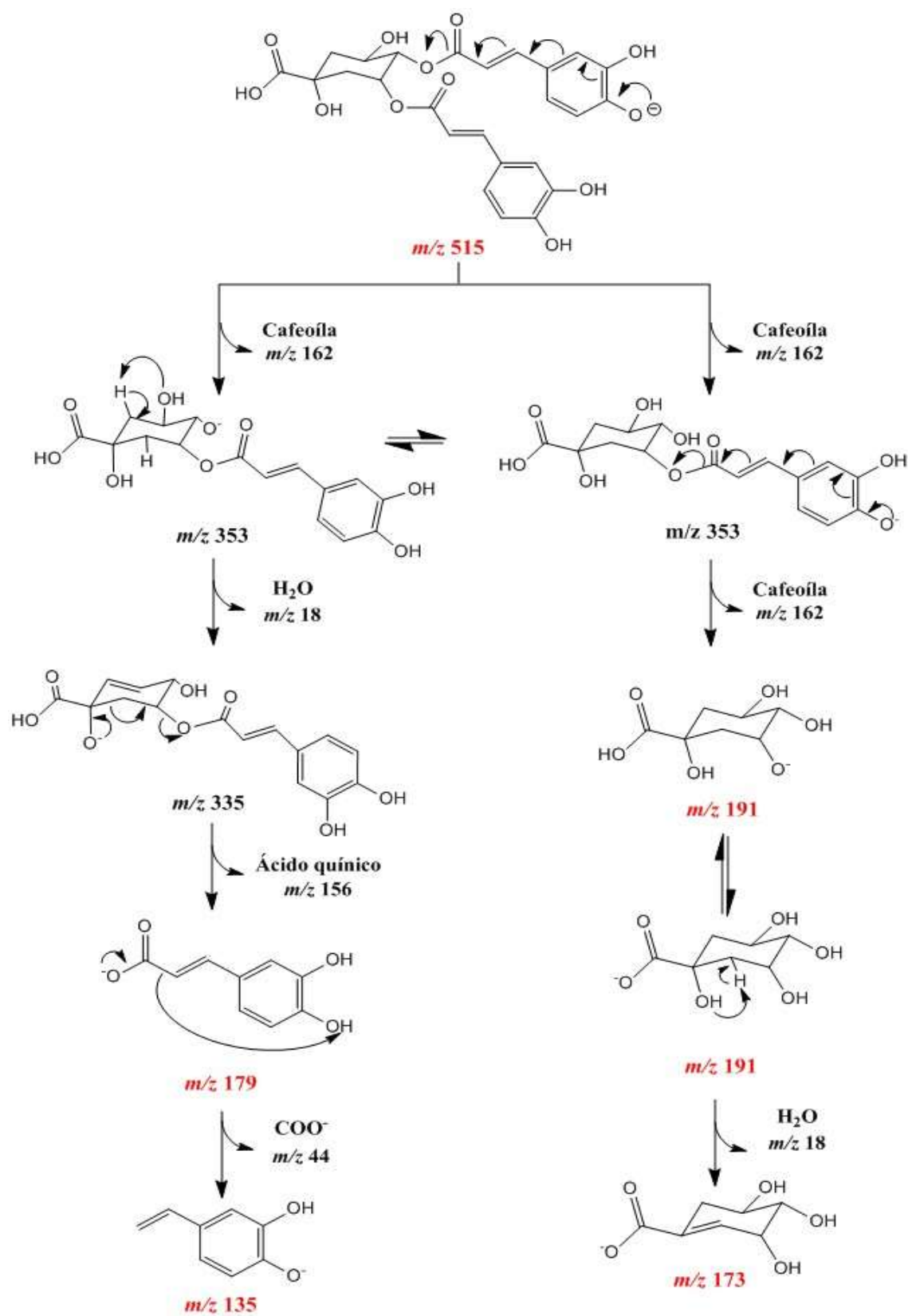
Figura 57. Espectro de Massas (IES-EM², modo negativo) de Vp – 6

Fonte: Própria do autor.

Figura 58. Espectro de Massas (IES-EM³, modo negativo) de Vp – 6

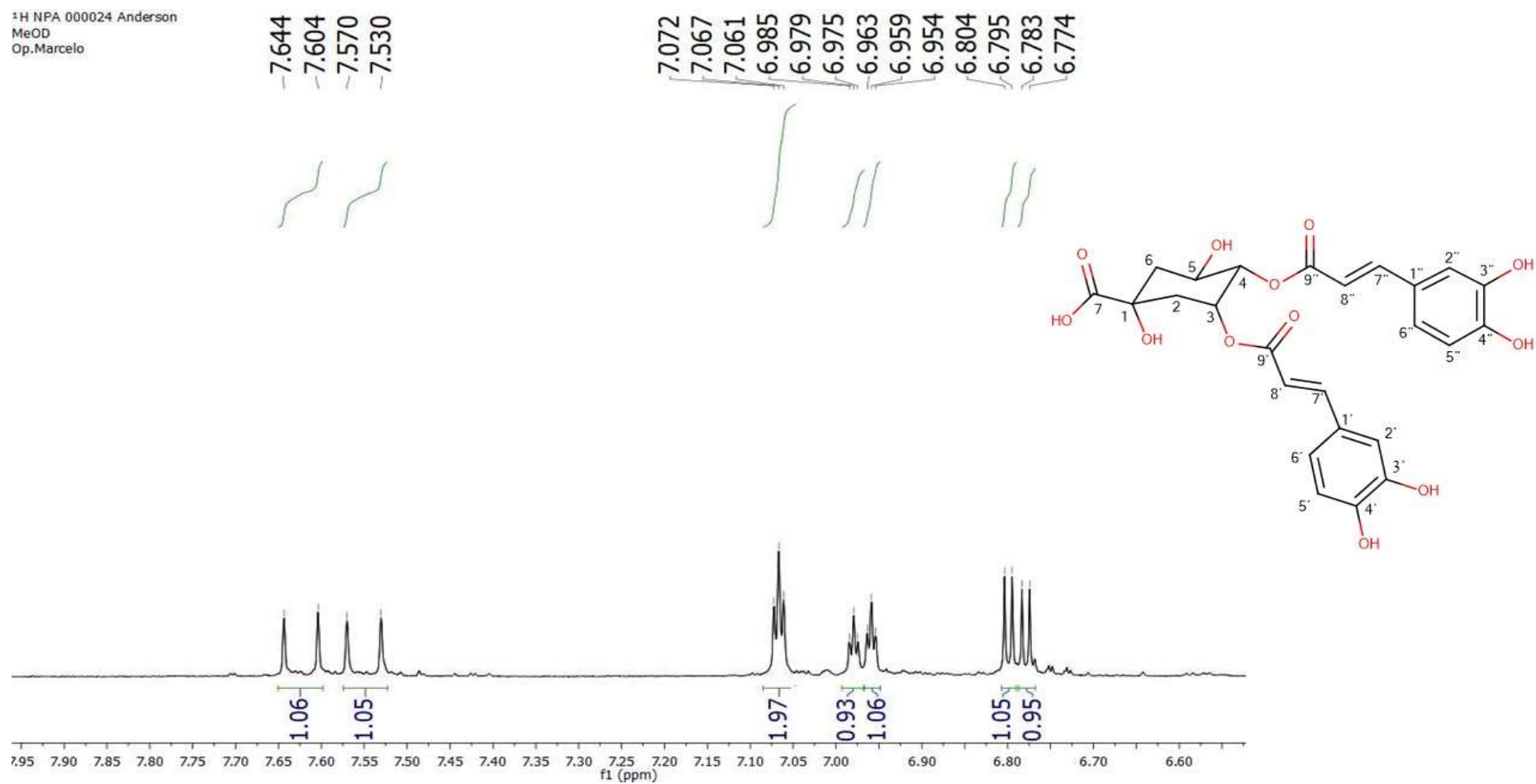
Fonte: Própria do autor.

Figura 59. Proposta de fragmentação de Vp – 6 (3,4-di-*O-E*-cafeoil-quínico, modo negativo)



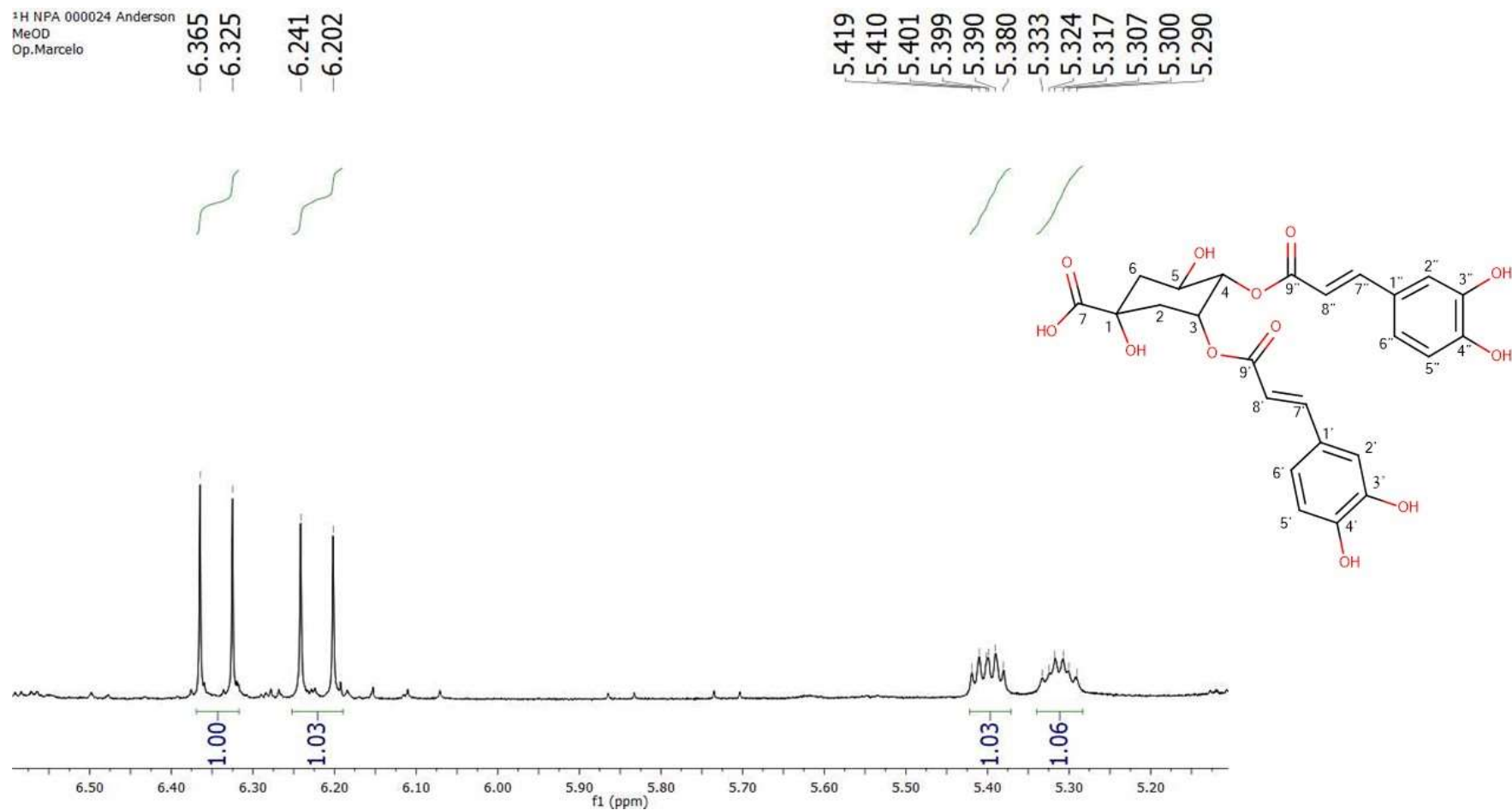
Fonte: Adaptação de CLINFFORD et al., 2003.

Figura 60. Primeira expansão do espectro de RMN ^1H de Vp – 6 (δ , CD_3OD , 400 MHz)



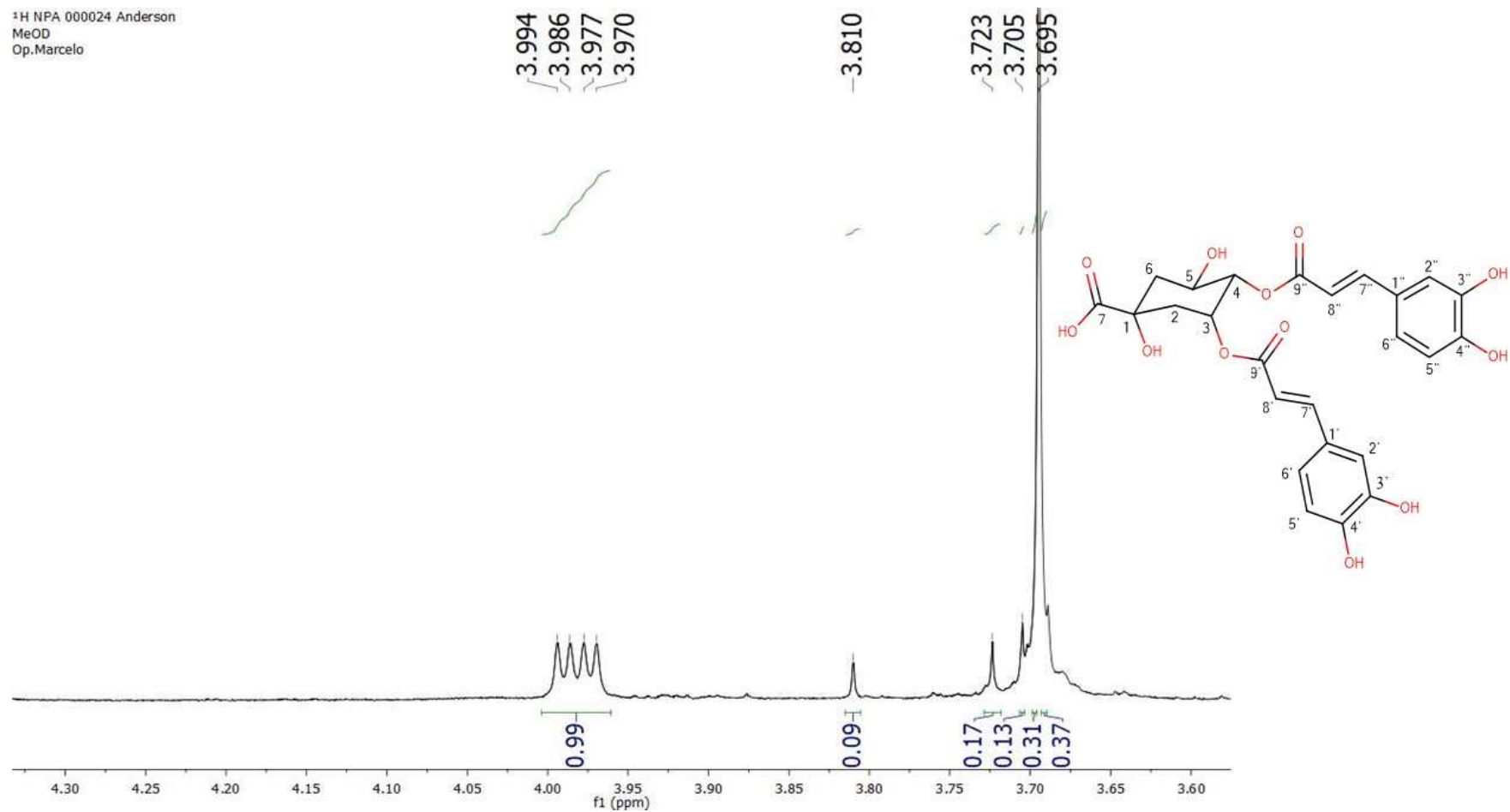
Fonte: Própria do autor.

Figura 61. Segunda expansão do espectro de RMN ^1H de Vp – 6 (δ , CD_3OD , 400 MHz)



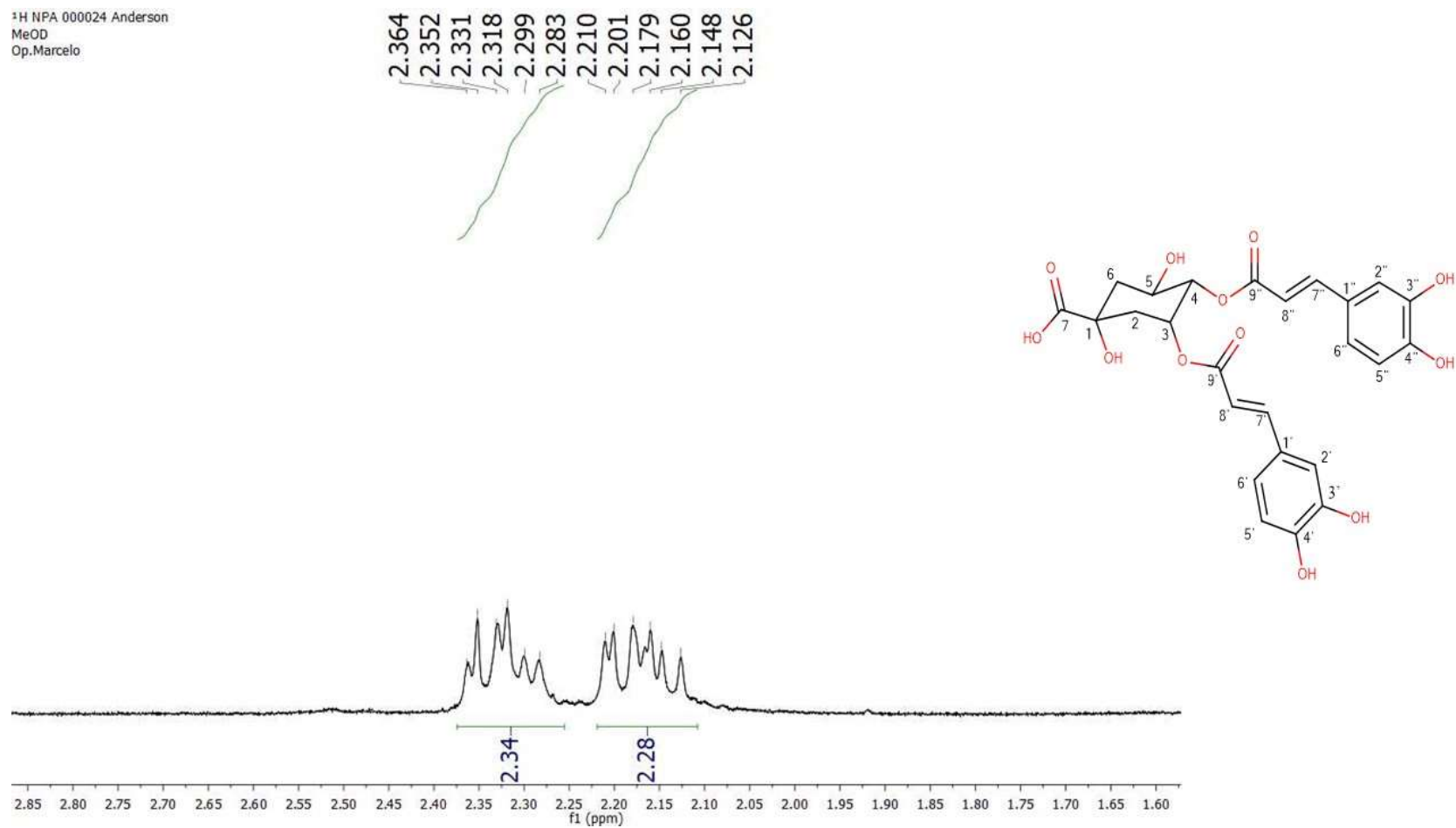
Fonte: Própria do autor.

Figura 62. Terceira expansão do espectro de RMN ^1H de Vp-6 (δ , CD_3OD , 400 MHz)



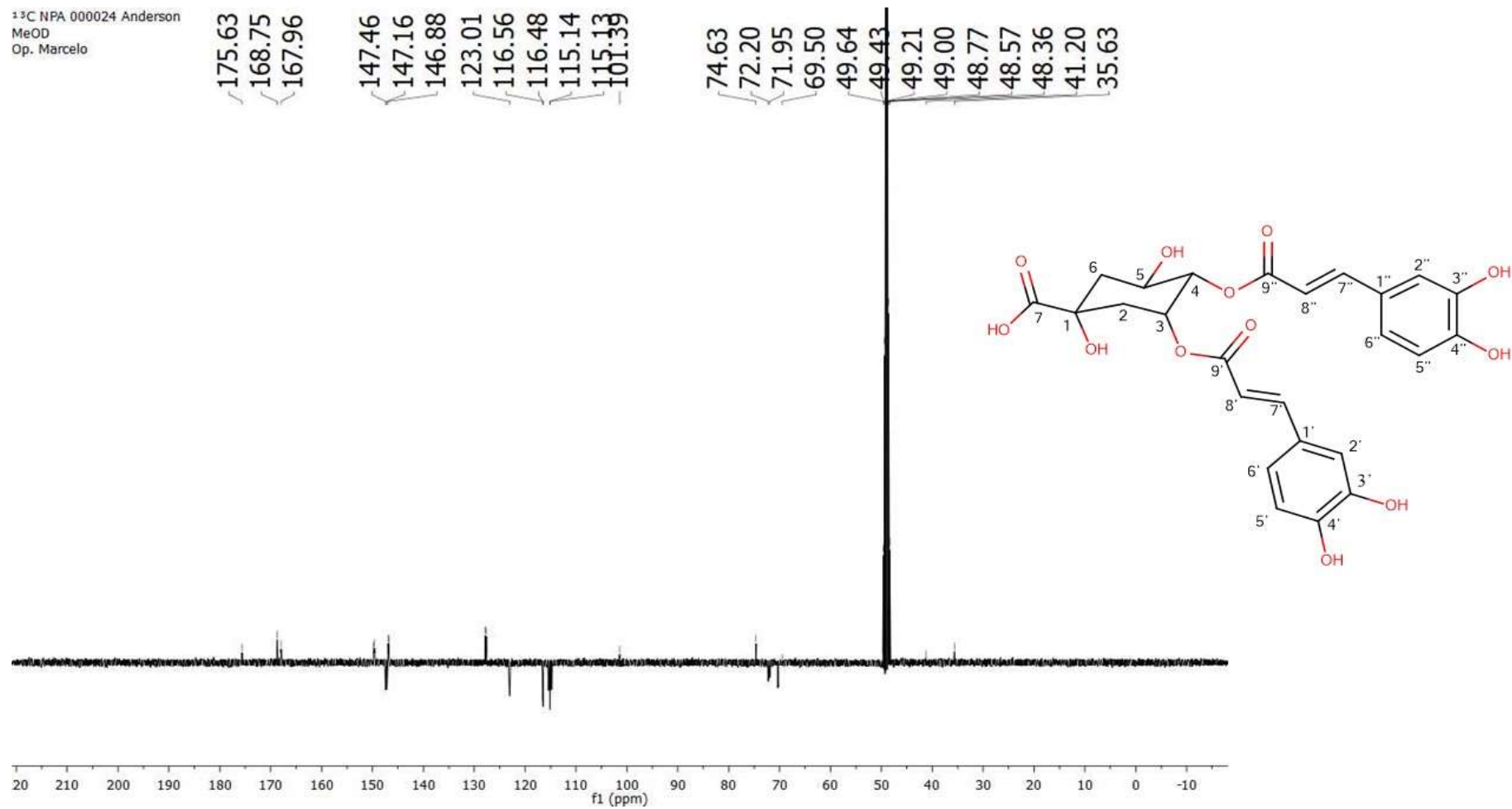
Fonte: Própria do autor.

Figura 63. Quarta expansão do espectro de RMN ^1H de Vp – 6 (δ , CD_3OD , 400 MHz)



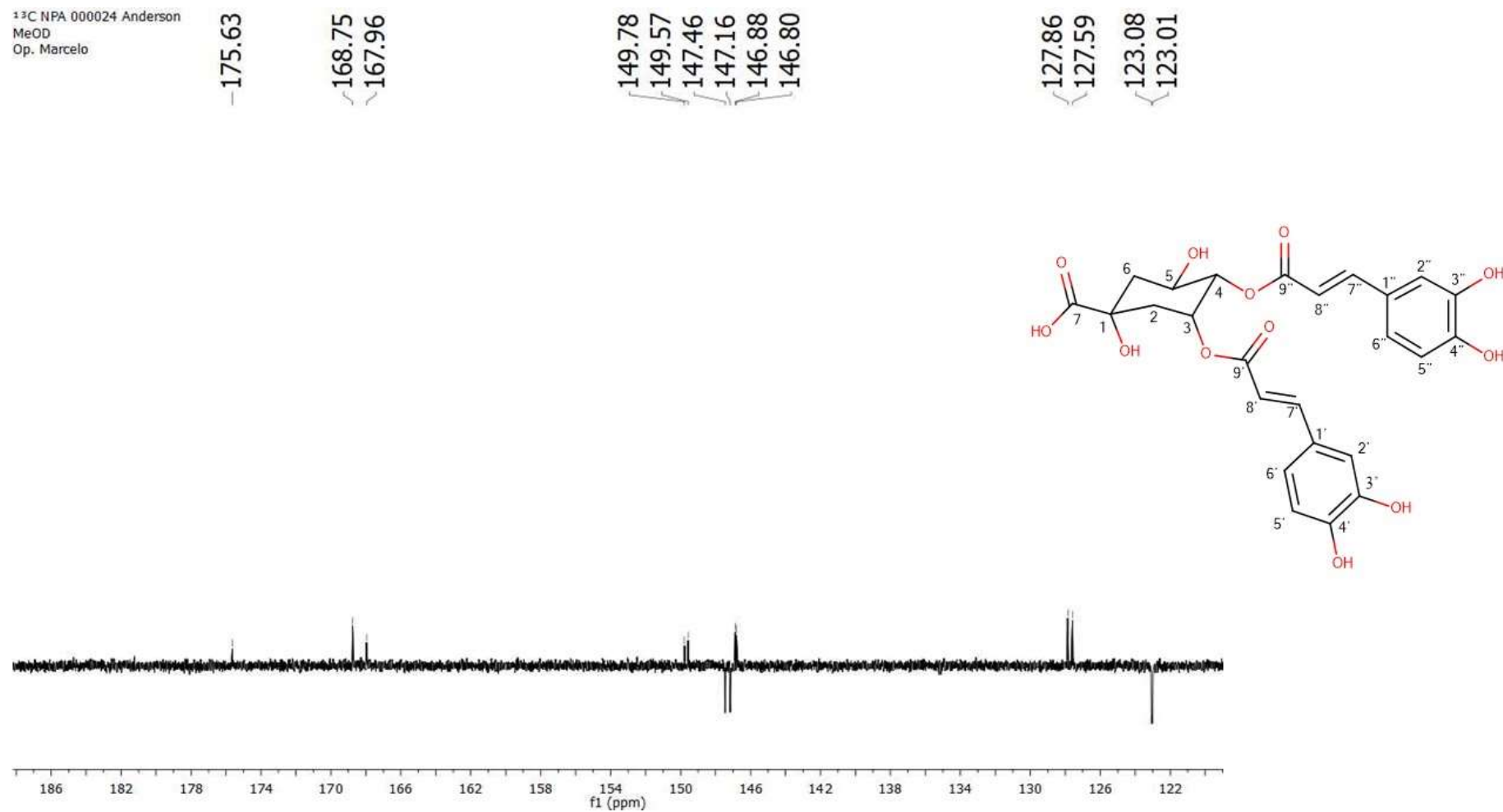
Fonte: Própria do autor.

Figura 64. Espectro de RMN ^{13}C de Vp – 6 (δ , CD_3OD , 100 MHz)



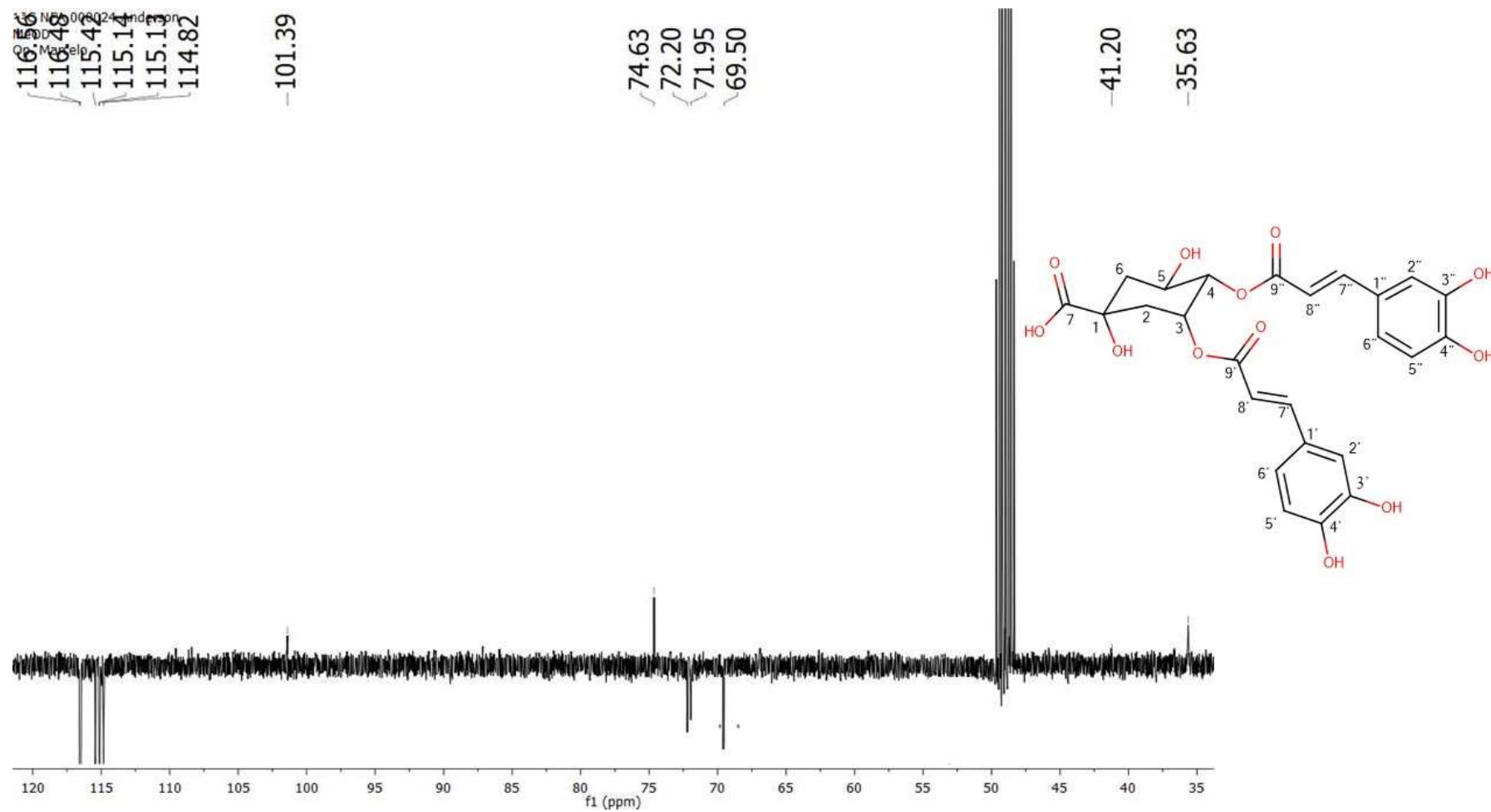
Fonte: Própria do autor.

Figura 65. Primeira expansão do espectro de RMN ^{13}C de Vp – 6 (δ , CD_3OD , 100 MHz)



Fonte: Própria do autor.

Figura 66. Segunda expansão do espectro de RMN ^{13}C de Vp – 6 (δ , CD_3OD , 100 MHz)



Fonte: Própria do autor.

5.1.2.7 Identificação estrutural de Vp – 7

O composto nomeado como Vp – 7 (4,2 mg), isolado em um $T_R=16,0$ min, apresentou-se na forma de um sólido amorfo e absorções no espectro de UV-Visível λ/nm em 199, 212, 237 e 321.

Semelhante a Vp – 5 e Vp – 6, o seu espectro de RMN 1H (Figura 68, página 154) também apresentou absorções características de prótons em sistemas aromáticos e/ou olefínicos entre δ_H 7,50 a 6,10, δ_H 5,38, a 4,19 e δ_H 3,64 a 1,82, sugerindo que a substância também se tratava de um derivado clorogênico (LIU et al., 2013). Para identificar e atribuir corretamente os dados de RMN, o composto Vp – 7 foi analisado por IES – EM³.

Os espectros de massas de baixa resolução de Vp – 7 também foram registrados no modo de ionização negativo, apresentando o pico base m/z 515 $[M - H]^-$ (Figura 69, página 155) e compatíveis com a presença de derivados dicafeoilquínicos. Em EM² (Figura 70, página 155), o padrão de fragmentação se apresentou diferente de VP – 5 e Vp – 6, gerando três íons produtos: m/z 353 (100%) $[M - H - 162]^-$, indicando a perda de uma unidade de cafeoila; m/z 335 (31%) $[M - H - 180]^-$, inferindo a saída de cafeoila + H₂O; m/z 179 (4%) $[M - H - 342]^-$, correspondente a perda de cafeoila + H₂O + ácido quínico (CLIFFORD et al., 2003; WIANOWSKA; GIL, 2019). Os dados obtidos foram compilados na Tabela 11 e comparados com padrões de fragmentação da literatura (Figura 71, página 156), identificando a substância como ácido 1,3-*O*-dicafeoil quínico (WIANOWSKA; GIL, 2019).

Tabela 11. Padrões de fragmentação (modo negativo) obtidos do composto Vp – 7 e comparados com o ácido 1,3-di-*O-E*-cafeoil-quínico (WIANOWSKA; GIL, 2019)

Compostos	IES – EM ²	
	EM	EM ²
	<i>m/z</i> (intensidade)	<i>m/z</i> (intensidade)
Vp – 7		[515]
		353 (100%)
	515 (100%)	335 (31%)
		191 (6%)
		179 (53%)

Ácido 1,3-di-		353 (100%)
O-E-cafeoil-	515,7 (100%)	335 (>30%)
quínico		191 (<10%)
		179 (> 50%)

Fonte: Própria do autor.

No espectro de RMN ^1H foi observado a presença de quatro dubletos em δ_{H} 6,14 (1H), 6,22 (1H), 7,49 (1H) e 7,52 (1H) característicos de prótons α e β à carbonilas, em uma configuração *trans* ($J=16,0$ Hz) (Figura 72, página 157). Outras absorções foram observadas em δ_{H} 6,22 (d, $J=2,0$ Hz, 1H), 6,93 (d, $J=2,0$ Hz, 1H), 6,52 (d, $J=8,5$, 1H), 6,67 (dl, $J=8,0$, 1H), 6,63 (dd, $J=8,5$; 2,0, 1H) e 6,76 (dd, $J=8,5$; 2,0, 1H), corroboram com a presença de dois anéis aromáticos 1,3,4 trissubstituídos (Figuras 72 e 73, páginas 157 e 158) (LIU et al., 2013)

O espectro de RMN ^1H ainda mostrou um duplo dubleto em δ_{H} 2,34 ($J=16,0$; 3,0 Hz, H-2a) e um duplo tripleto δ_{H} 2,93 ($J=16,0$; 3,0 Hz, H-2b) (Figura 74, página 159) atribuídos aos hidrogênios do carbono sp^3 do ácido quínico (LIU et al., 2013).

A presença de apenas um duplo dubleto sofrendo desproteção em δ_{H} 5,41, integrando para 1 H, atribuído ao próton oximetínico, indica que as duas unidades de cafeoíla estavam esterificando o ácido quínico nas posições 3 e 1 (Figura 73, página 175) (LIU et al., 2013). A presença de um duplo dubleto em δ_{H} 1,90 ($J=14,0$; 11,5 Hz, 1H, H-6a) e um duplo tripleto em δ_{H} 2,54 ($J=14,0$; 3,5 Hz, 1H, H-6b) foram atribuídos aos hidrogênios H – 6 (Figura 88, página 176).

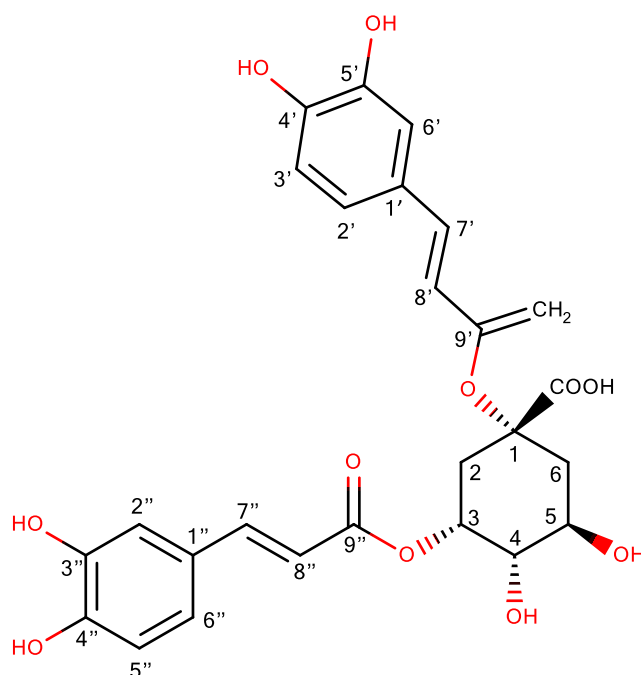
O espectro de RMN ^{13}C , utilizando a técnica de BB (Figura 75, página 160) mostrou a presença de 25 absorções para átomos de carbonos, sendo 10 atribuídos a carbonos não hidrogenados, 13 a carbonos metínicos e 2 a carbonos metilênicos.

Os deslocamentos em δ_{C} 81,3 (C – 1), 32,9 (C – 2), 72,9 (C – 3), 75,2 (C – 4), 67,9 (C – 5), 41,2 (C – 6) e 174,9 (C – 7) (Figuras 76 e 77, páginas 161 e 162) demonstraram a presença de uma unidade de ácido quínico, sendo o valor da última absorção característico de carbonila (LIU et al., 2013) (Tabela 12, página 152).

Já os sinais em δ_{C} 127,4, 115,2, 146,4, 146,7, 149,2, 149,2, 116,0, 116,5, 122,0, 122,9, 147,1, 147,5, 115,3, 115,4, 167,8 e 168,8 (Figuras 77 e 78, páginas 162 e 163) indicaram a presença de duas unidades cafeoílas na estrutura (JASINSKI, 2010).

Os dados de RMN ^1H e ^{13}C , além dos obtidos por LC – MS/MS foram comparados com modelos da literatura (Tabelas 11 e 12, páginas 166 e 169, respectivamente), identificando o composto Vp – 7 como o ácido 1,3-di-*O-E*-cafeoil quínico (cinarina), isolado pela primeira vez na família Velloziaceae (Figura 79).

Figura 79. Composto Vp – 7 (ácido 1,3-di-*O-E*-cafeoil quínico)

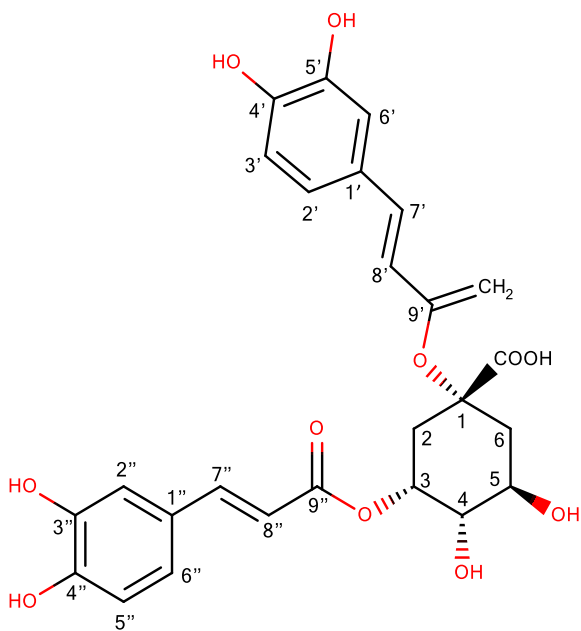


Fonte: Própria do autor.

Há relatos na literatura que em testes realizados tanto em animais quanto em humanos que o ácido 1,3-di-*O-E*-cafeoil quínico possui atividade hipolipêmica, colerética, colagoga, hepatoprotetora e antioxidante, sendo um composto encontrado na *Cynara scolymus* L. (alcachofra) (NOLDIN et al., 2003).

Tabela 12. Dados de RMN ^1H e ^{13}C de Vp – 7 (δ , CD_3OD , 500 MHz e 125 MHz) em comparações com o ácido 1,3-di-*O-E*-cafeoil-quínico (δ , CD_3OD , 600 e 150 MHz) (LIU et al., 2013)

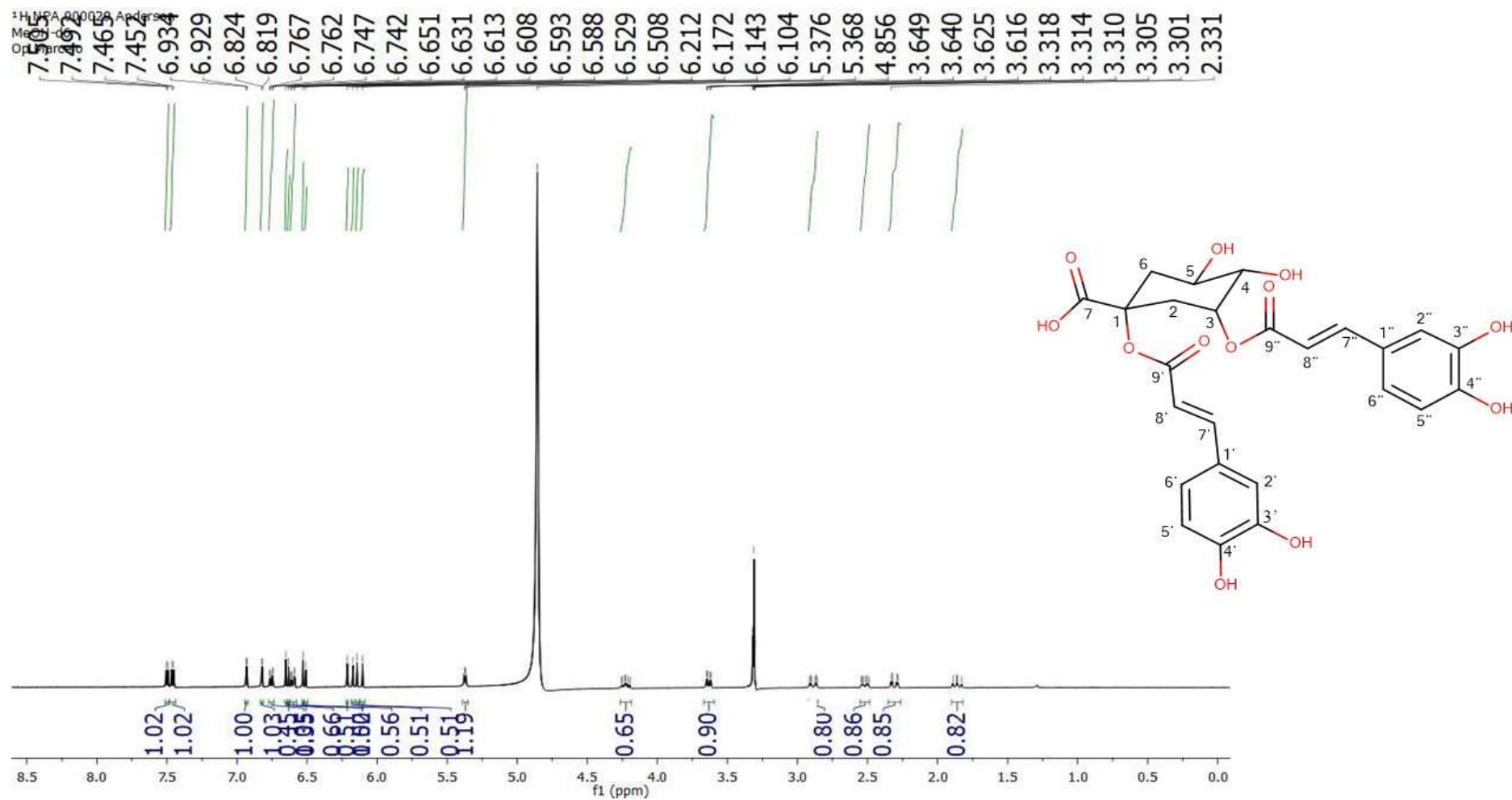
	Vp – 7		Ácido 1,3-di- <i>O-E</i> -cafeoil quínico	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1	-	81,3	-	80,6
2	2,34 (dd, $J=16,0;3,0$ Hz) 1H – H2a 2,91 (dt, $J=16,0$ e $3,0$ Hz) 1H – H2b	32,9	2,36 (dd, $J=15,6;$ 3,2 Hz) 1H – H2a 2,92 (dt, $J=15,6;$ 3,2 Hz) 1H – H2b	33,2
3	5,38 (dd, $J=7,0;3,5$ Hz) 1H	72,9	5,42 (q, $J=3,2$ Hz) 1H	73,2
4	3,64 (dd, $J=9,5;$ 3,5 Hz) 1H	75,2	3,94 (dd, $J=9,5;$ 3,0 Hz) 1H	75,6
5	4,25 (ddd, $J=14,0;$ 10,0;5,0 Hz) 1H	67,9	4,34 (ddd, $J=10,8;$ 9,6; 3,2 Hz) 1H	68,2
6	1,90 (dd, $J=14,0;11,5$ Hz) 1H – H6a 2,54 (dt, $J=14,0;$ 3,5 Hz) 1H – H6b	41,2	2,08 (dd, $J=13,2;$ 10,8 Hz) 1H – H6a 2,48 (dt, $J=13,2;$ 3,2 Hz) 1H – H6b	41,2
7	-	174,9	-	176,2
1'	-	127,4	-	127,4
2'	6,82 (d, $J=2,0$ Hz) 1H	115,2	7,02 (d, $J=1,8$ Hz) 1H	115,0
3'	-	146,4	-	146,6
4'	-	149,2	-	149,5



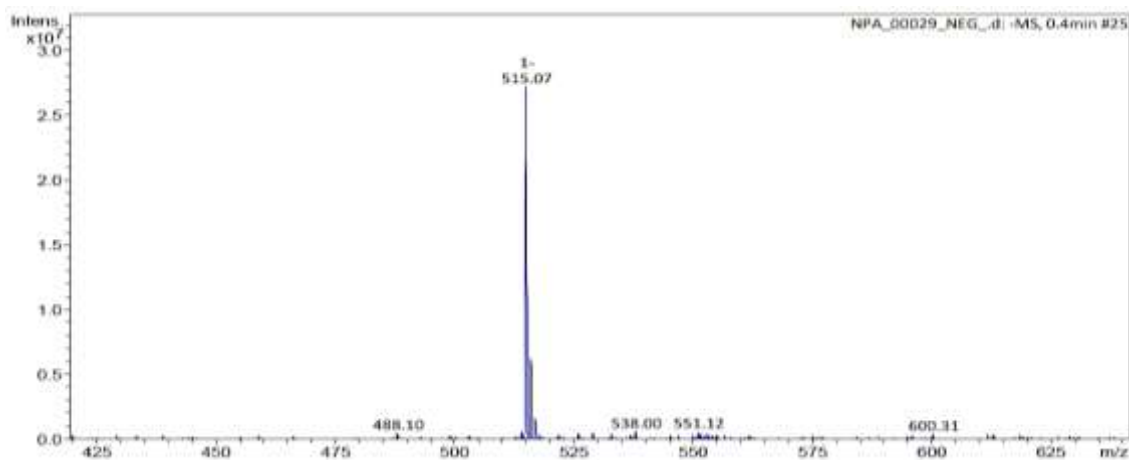
5'	6,52 (d, $J=8,5$ Hz) 1H	116,0	-	116,0
6'	6,61 (dd, $J=8,5; 2,0$ Hz) 1H	122,0	6,79 (dd, $J=7,8;$ 1,8 Hz) 1H	122,8
7'	7,49 (d, $J=16,0$ Hz) 1H	147,1	7,56 (d, $J=15,6$ Hz) 1H	147,5
8'	6,22 (d, $J=16,0$) 1H	115,3	6,24 (d, $J=15,6$ Hz) 1H	115,5
9'	-	167,8	-	167,6
1''	-	127,4	-	127,5
2''	6,93 (d, $J=2,0$ Hz) 1H	115,2	7,05 (d, $J=1,8$ Hz) 1H	115,6
3''	-	146,7	-	146,8
4''	-	149,6	-	149,8
5''	6,65 (dl, $J=8,0$ Hz) 1H	116,5	6,86 (d, $J=7,8$ Hz) 1H	116,5
6''	6,76 (dd, $J=8,5; 2,0$ Hz) 1H	122,9	6,97 (dd, $J=7,8$ and 1.8 Hz) 1H	123,0
7''	7,52 (d, $J=16,0$ Hz) 1H	147,5	7,62 (d, $J=15,6$ Hz) 1H	147,8
8''	6,14 (d, $J=15,5$) 1H	115,4	6,36 (d, $J=15,6$ Hz) 1H	115,6
9''	-	168,8	-	168,6

Fonte: Própria do autor.

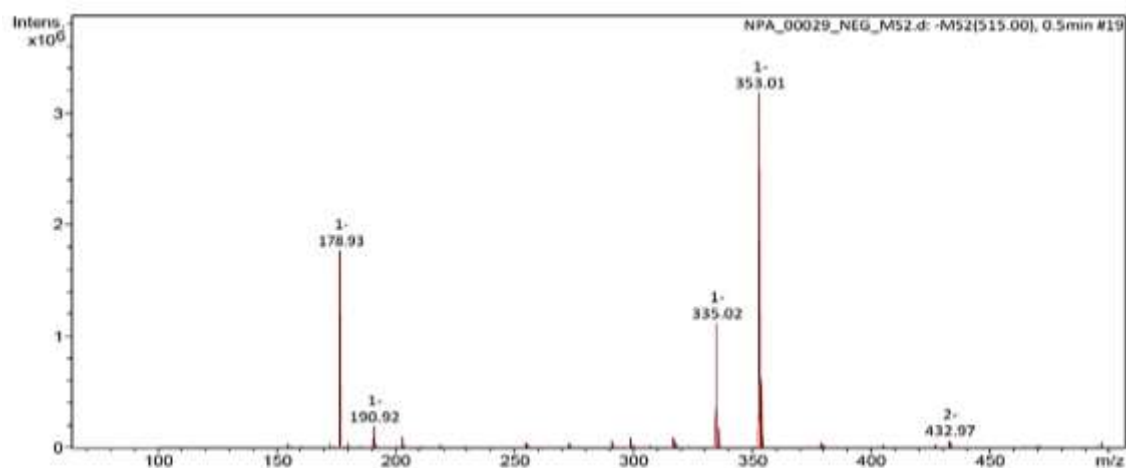
Figura 68. Espectro de RMN ^1H de Vp – 7 (δ , CD_3OD , 500 MHz)



Fonte: Própria do autor.

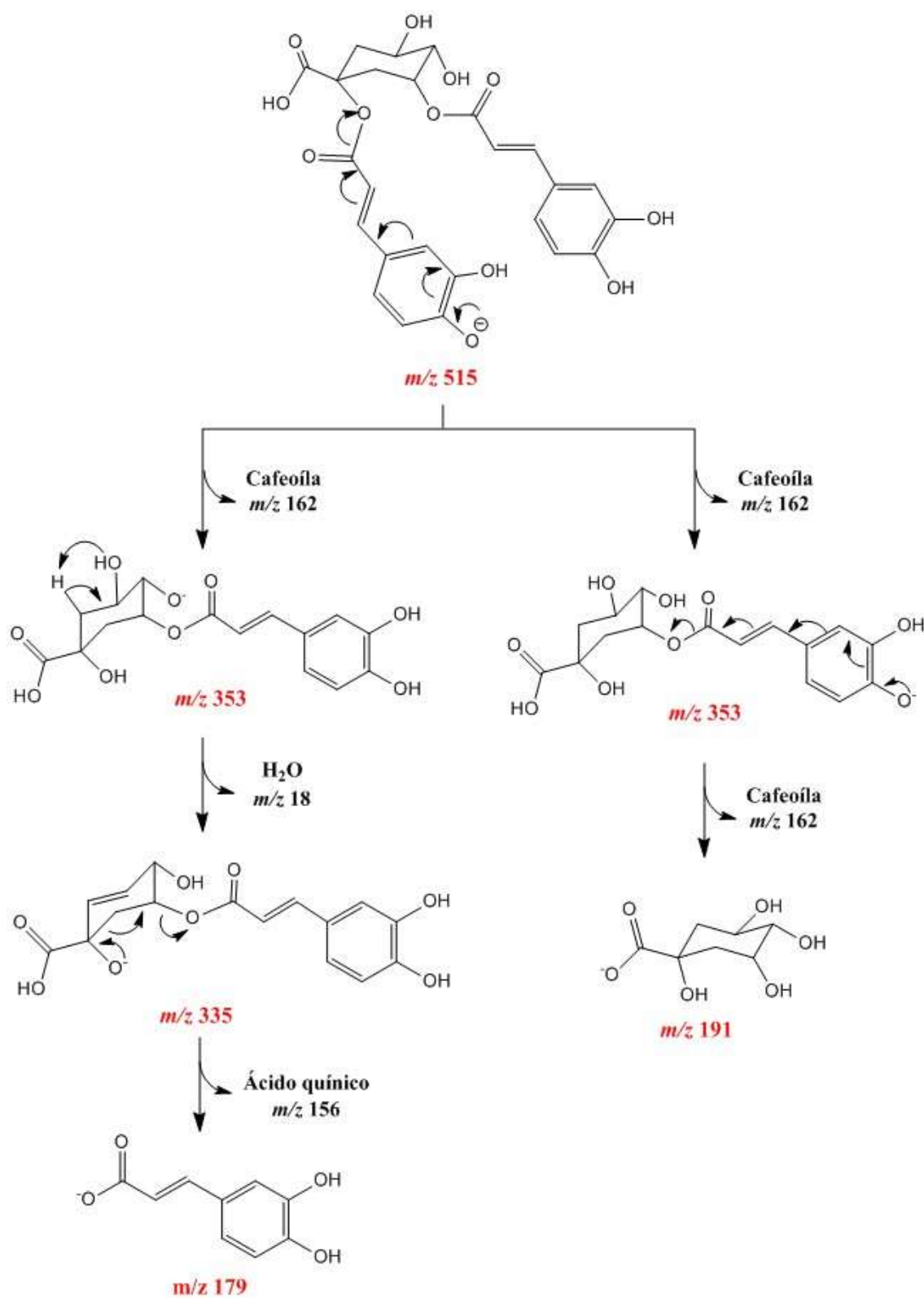
Figura 69. Espectro de Massas (IES-EM, modo negativo) de Vp – 7

Fonte: Própria do autor.

Figura 70. Espectro de Massas (IES-EM², modo negativo) de Vp – 7

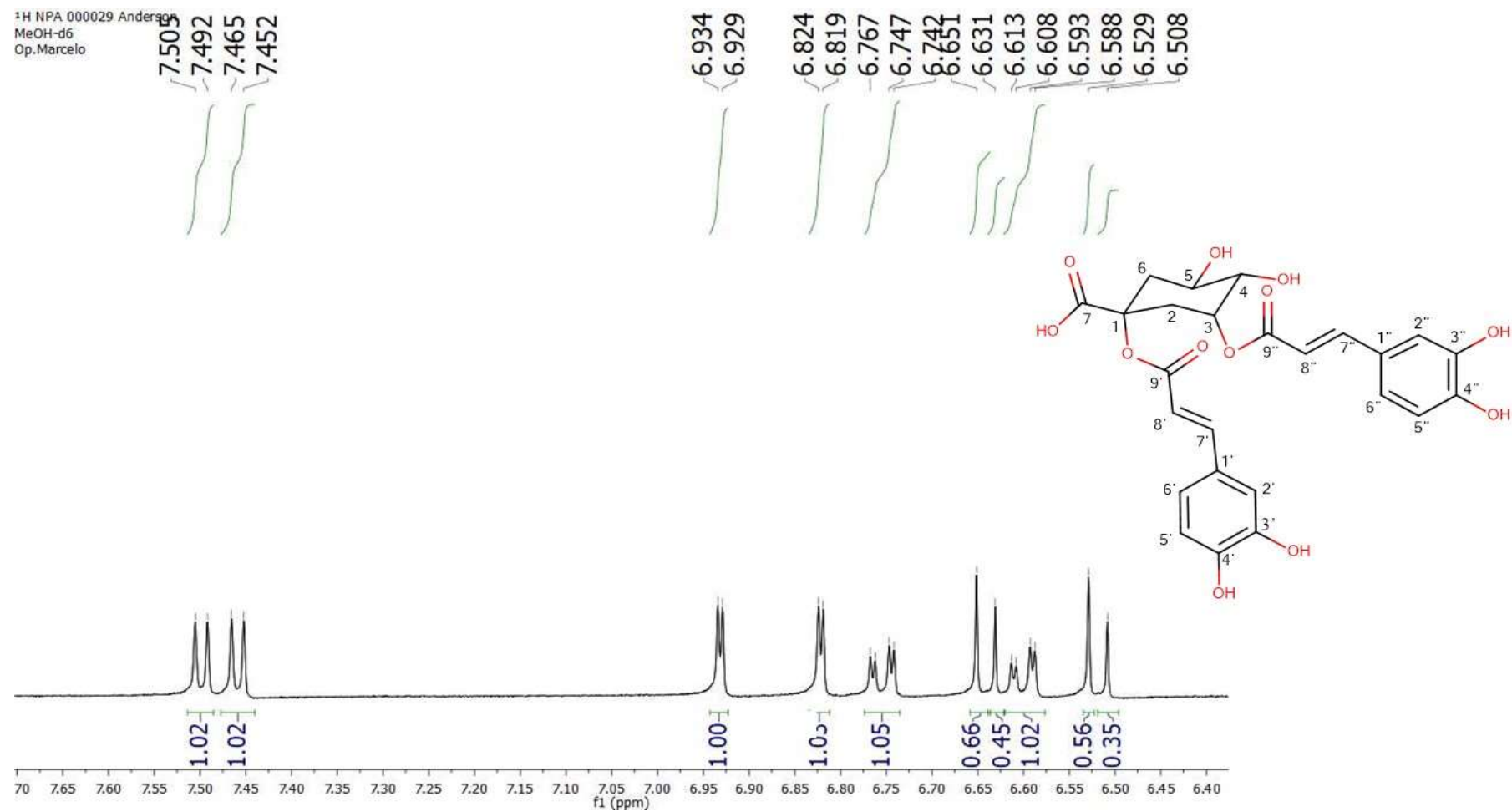
Fonte: Própria do autor.

Figura 71. Proposta de fragmentação de Vp – 7 (1,3-di-*O-E*-cafeoil-quinico, modo negativo)



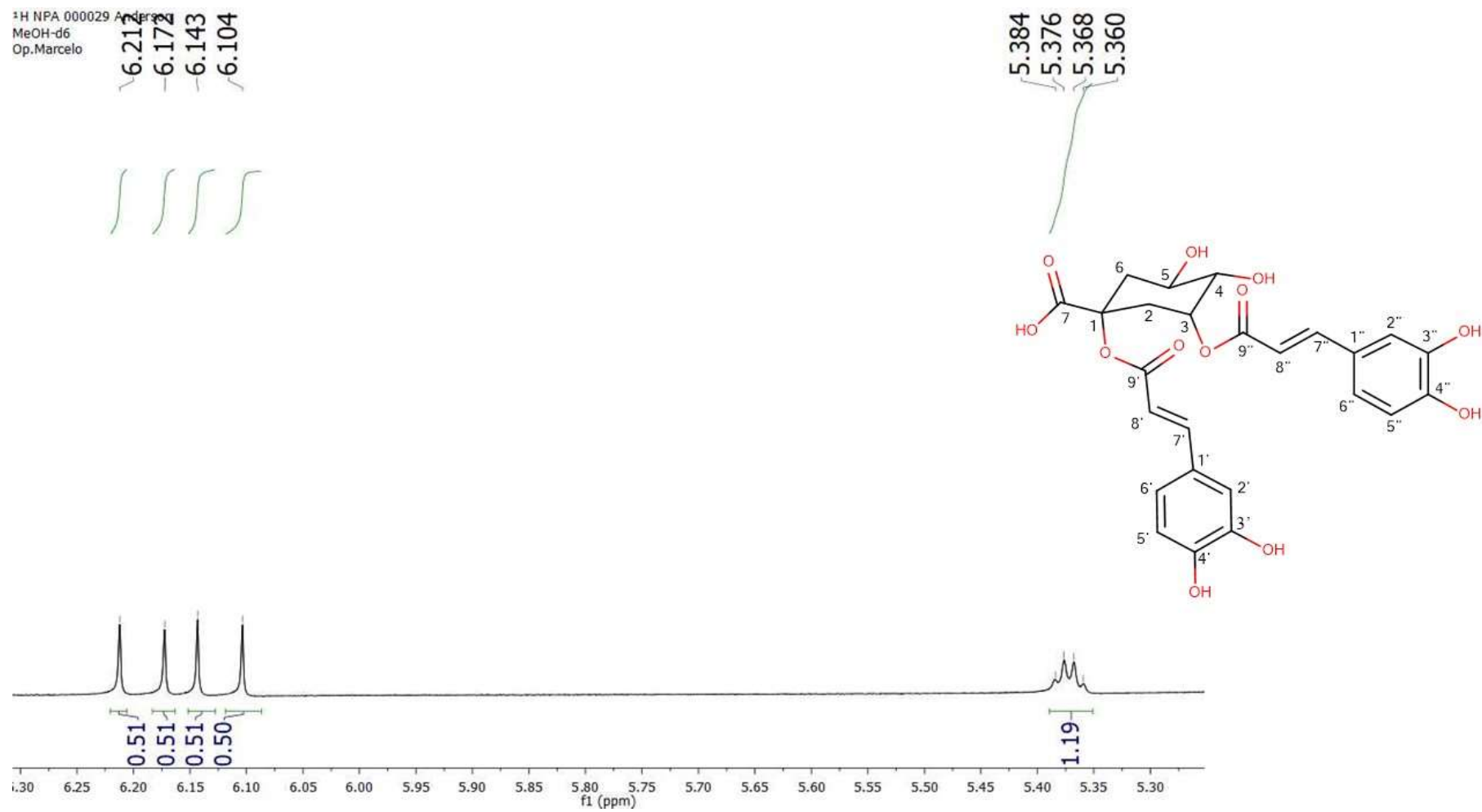
Fonte: Adaptação de CLINFFORD et al., 2003.

Figura 72. Primeira expansão do espectro de RMN ^1H de Vp – 7 (δ , CD_3OD , 500 MHz)



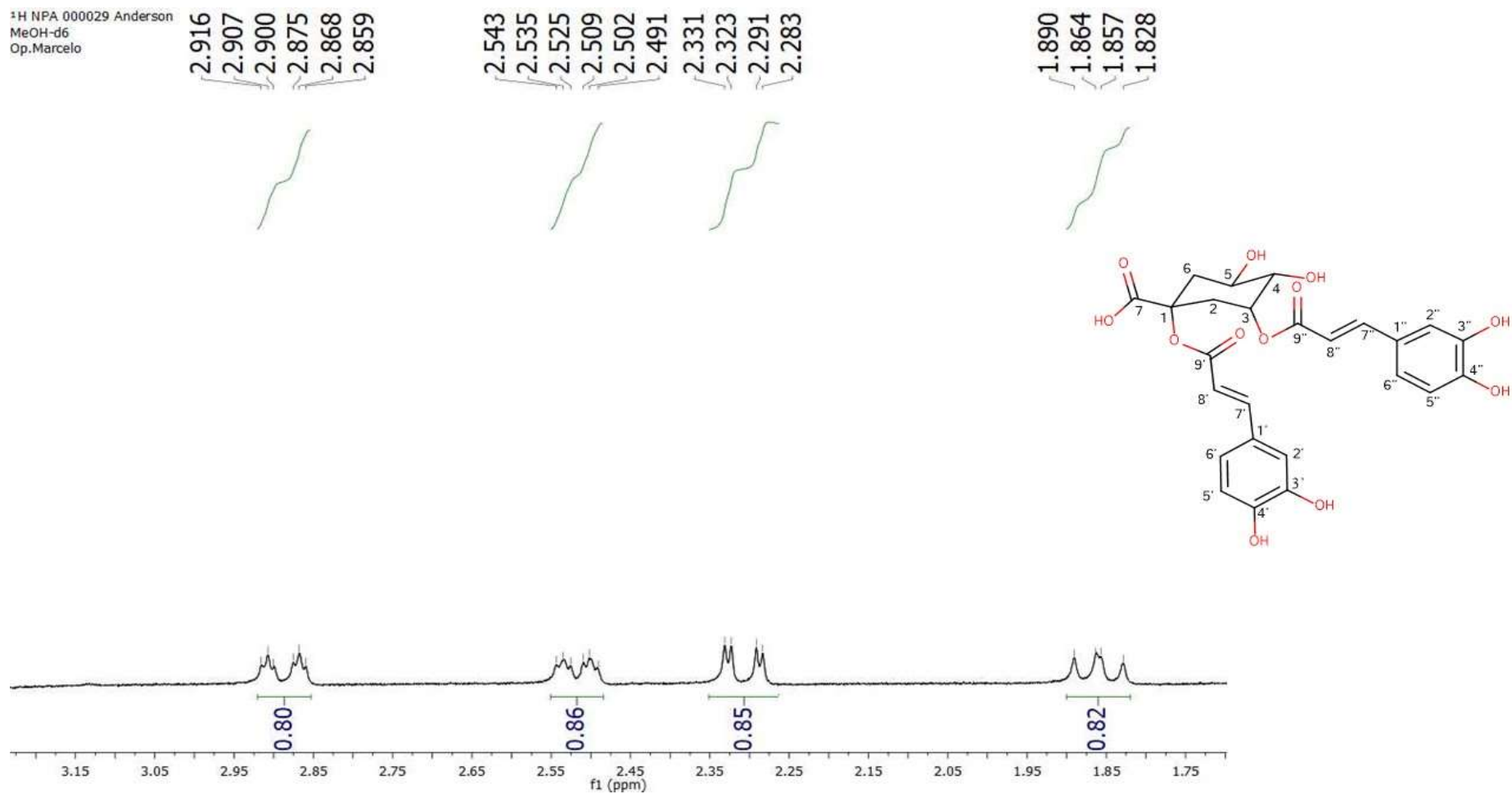
Fonte: Própria do autor.

Figura 73. Segunda expansão do espectro de RMN ^1H de Vp – 7 (δ , CD_3OD , 500 MHz)



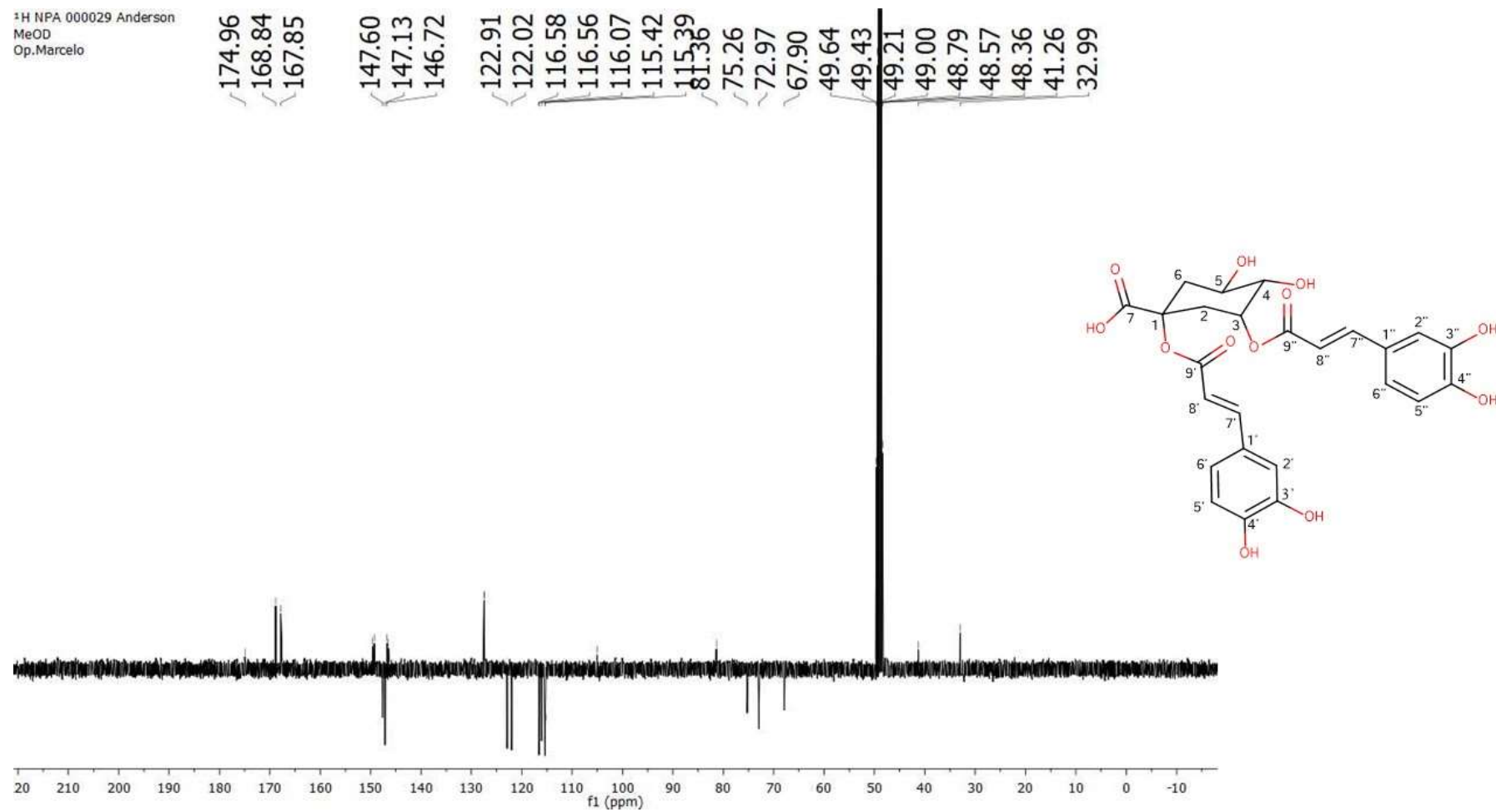
Fonte: Própria do autor.

Figura 74. Terceira expansão do espectro de RMN ^1H de Vp-7 (δ , CD_3OD , 500 MHz)



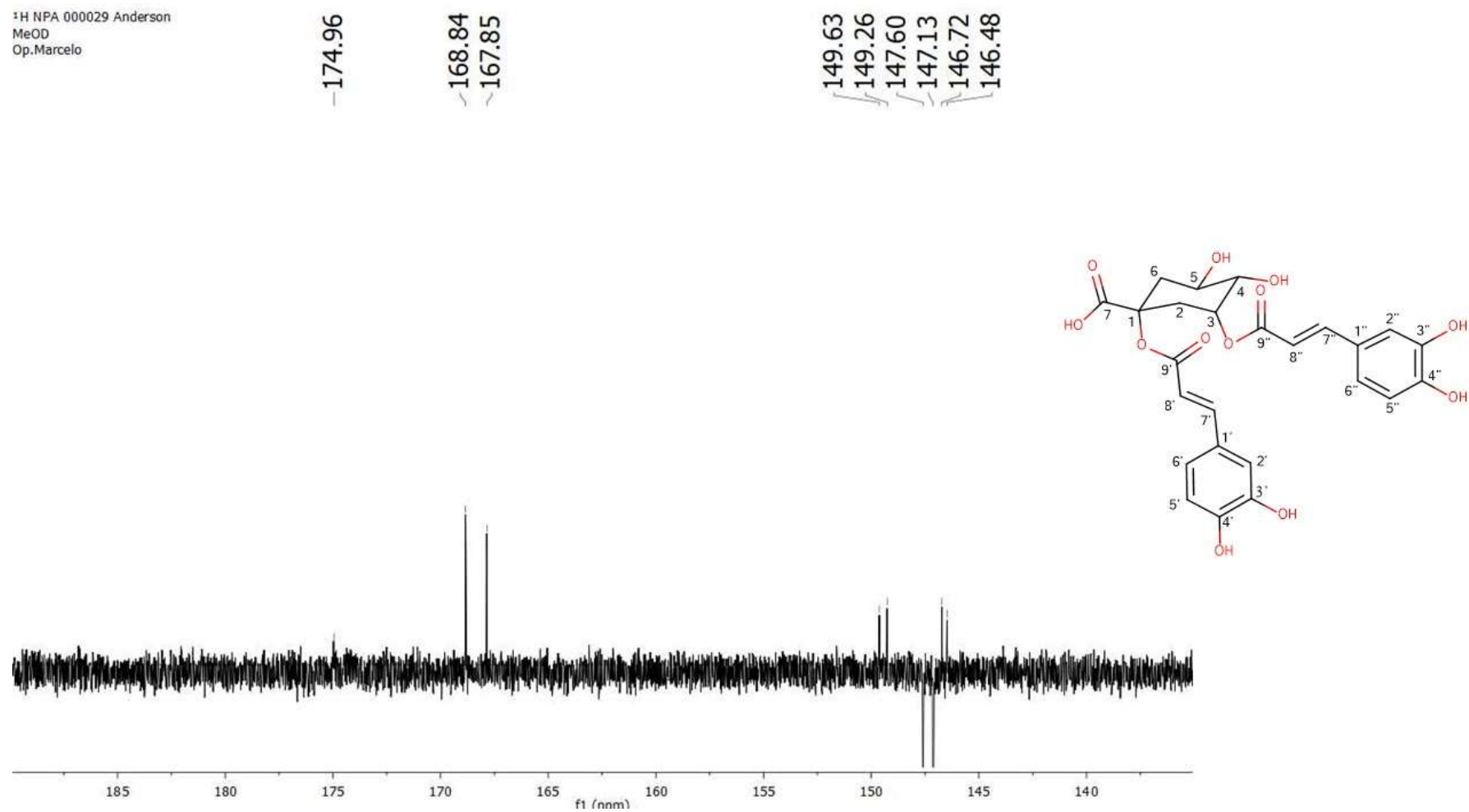
Fonte: Própria do autor.

Figura 75. Espectro de RMN ^{13}C de Vp – 7 (δ , CD_3OD , 125 MHz)



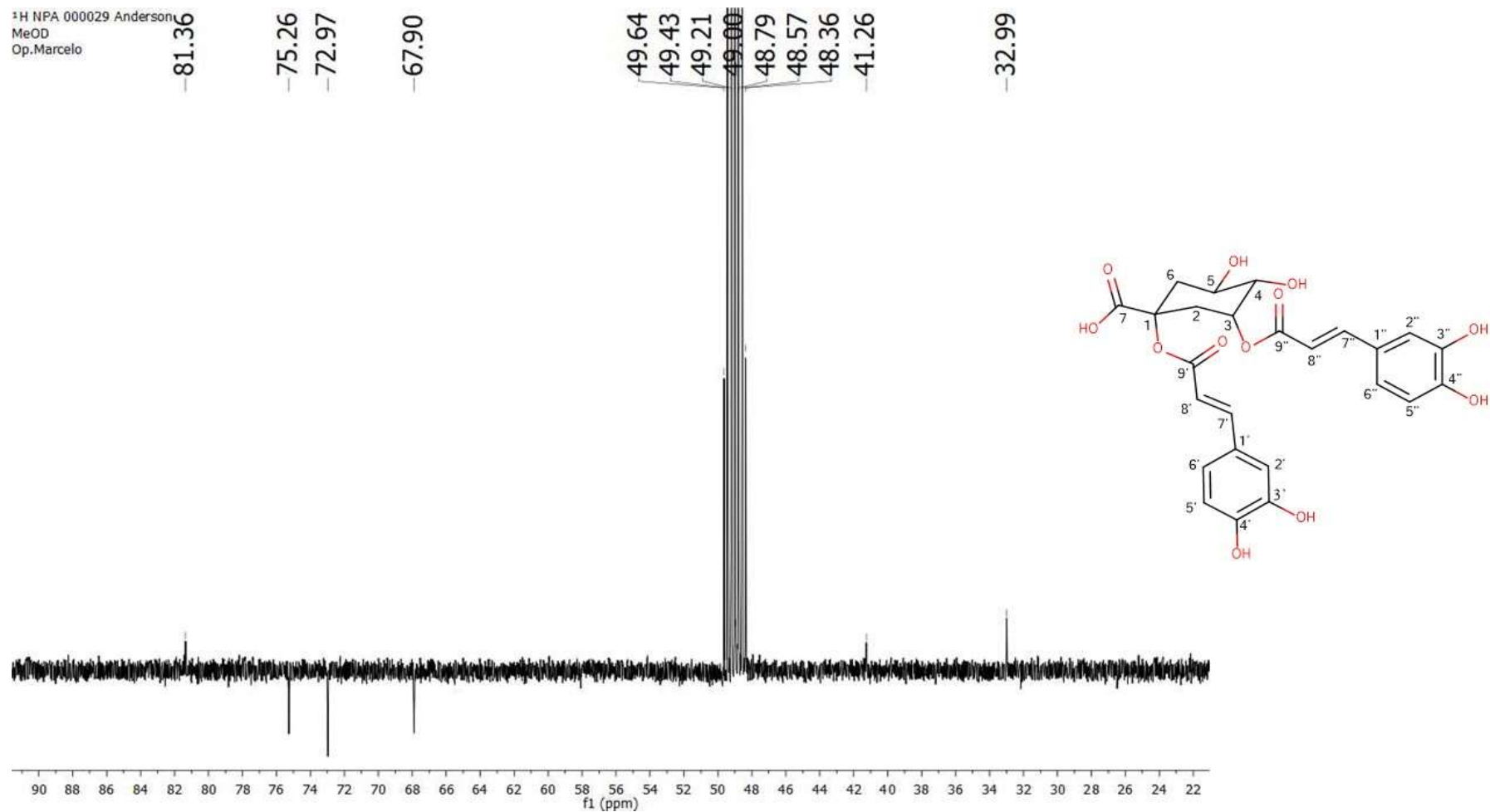
Fonte: Própria do autor.

Figura 76. Primeira expansão do espectro de RMN ^{13}C de Vp – 7 (δ , CD_3OD , 125 MHz)



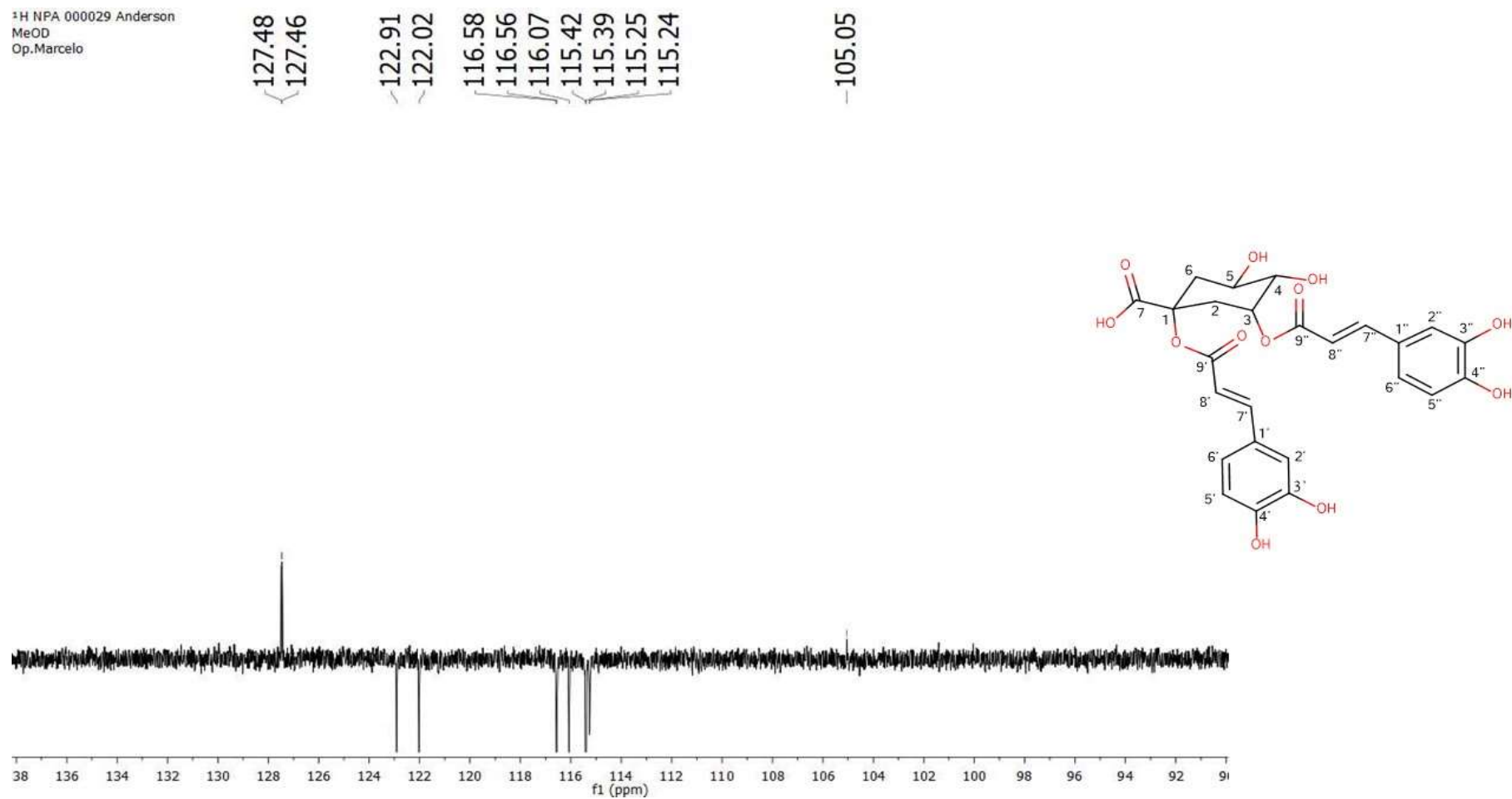
Fonte: Própria do autor.

Figura 77. Segunda expansão do espectro de RMN ^{13}C de Vp – 7 (δ , CD_3OD , 125 MHz)



Fonte: Própria do autor.

Figura 78. Terceira expansão do espectro de RMN ^{13}C de Vp – 7 (δ , CD_3OD , 125 MHz)



Fonte: Própria do autor.

5.1.2.8 Identificação estrutural de Vp – 8

O composto identificado como Vp – 8 (5,5 mg), isolado da fase acetato de etila em um $T_R=16,1$ min, mostrou-se na forma de um sólido amorfo com absorções no espectro de UV-Visível λ/nm 204, 220 e 321.

Assim como nos espectros de RMN 1H de Vp – 5, 6 e 7, o composto Vp – 8 (Figura 80, página 168) exibiu sinais característicos de prótons em sistemas aromáticos e/ou olefínicos entre δ_H 7,57 a 6,24, δ_H 5,34, a 4,18 a 3,30 e δ_H 2,25 a 2,05, sugerindo que o composto poderia se tratar de um derivado clorogênico (BATISTA et al., 2014). Como realizado com os derivados clorogênicos anteriores, Vp – 8 foi analisado por IES – EM² para correta identificação e atribuição dos dados de RMN.

Os espectros de massas de baixa resolução de Vp – 8 foram registrados no modo de ionização negativo, apresentando um pico base m/z 353 (100%) (Figura 81, página 169) e compatíveis com a presença de derivado cafeoilquínico.

Em EM² (Figura 82, página 169), os íons produtos formados foram: m/z 190 (100%) $[M - H - 162]^-$, indicando a perda da unidade cafeoila; m/z 179 (5%) $[M - H - 174]^-$, inferindo a saída de $H_2O +$ ácido quínico; m/z 173 (2%) $[M - H - 180]^-$, correspondente a perda de $H_2O +$ ácido quínico + COO^- (CLIFFORD et al., 2003).

A diferença da unidade cafeoila na posição 3 ou 5 na estrutura do clorogênico pode ser identificada pela intensidade (%) de formação do pico em m/z 179. A posição 5 detém uma fraca intensidade de ~5%. Já a posição 3 possui uma intensidade média de (~50%) (CLIFFORD et al., 2003). Assim, os dados obtidos de massas foram compilados na Tabela 13 (página 165) e comparados com padrões de fragmentação da literatura (Figura 83, página 170), identificando a substância como ácido 5-*O-E*-cafeoil quínico (CLIFFORD et al., 2003).

Observou-se no espectro de RMN 1H dois dubletos em δ_H 7,57 (1H) e 6,27 (1H) característicos de prótons α e β à carbonila, em configuração *trans* ($J=16,0$ Hz) (Figura 84, página 171). Outros sinais observados em δ_H 7,05 (sl, 1H), 6,79 (d, $J=8,0$ Hz, 1H) e 6,95 (dl, $J=8,5$, 1H) corroboram a presença de um anel aromático 1,3,4 trissubstituído (Figura 84, página 171) (BATISTA et al., 2014)

Tabela 13. Padrões de fragmentação (modo negativo) obtidos do composto Vp – 8 e comparados com Ácido 5-*O-E*-cafeoil-quínico (CLIFFORD et al., 2003)

Compostos	IES – EM ²	
	EM	EM ²
	<i>m/z</i> (intensidade)	<i>m/z</i> (intensidade)
Vp – 8		[353]
	353 (100%)	191 (100%)
		179 (5%)
		173 (2%)
Ácido 5- <i>O-E</i> -cafeoil-quínico	353 (100%)	191 (100%)
		179 (4%)

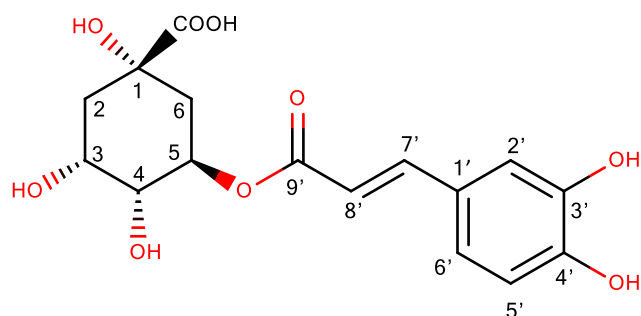
Fonte: CLIFFORD et al., 2003.

Ainda, no espectro de RMN ¹H, observou-se a presença de dois dubletos largos em δ_H 2,18 ($J=13,0$ Hz, 1H) e em δ_H 2,25 ($J=12,5$ Hz, 1H) e um tripleto largo em δ_H 2,09 ($J=10,5$ Hz, 2H) que foram atribuídos aos hidrogênios do carbono sp³ do ácido quínico (Figura 85, página 172) (BATISTA et al., 2014). A presença de apenas um duplo duplodoubleto sofrendo desproteção em δ_H 5,36 ($J=4,0, 9,0$ e $17,5$ Hz, 1H) foi atribuído ao próton oximetínico, indicando que a unidade de cafeoila estava esterificando o ácido quínico na posição 5 (Figura 86, página 173) (BATISTA et al., 2014).

A presença de um dubleto largo em δ_H 4,18 ($J=3,0$ Hz, 1H) e de um duplo dubleto em δ_H 3,74 ($J=2,0; 8,5$ Hz, 1H) foram atribuídos aos hidrogênios H – 3 e H – 4, respectivamente (Figura 86, página 173).

Os dados de RMN ¹H e IES – EM² foram comparados com modelos da literatura (Tabelas 13 e 14, páginas 165 e 167, respectivamente), identificando o composto Vp – 8 como o ácido 5-*O-E*-cafeoil quínico, isolado pela primeira vez na família Velloziaceae (Figura 87, página 166).

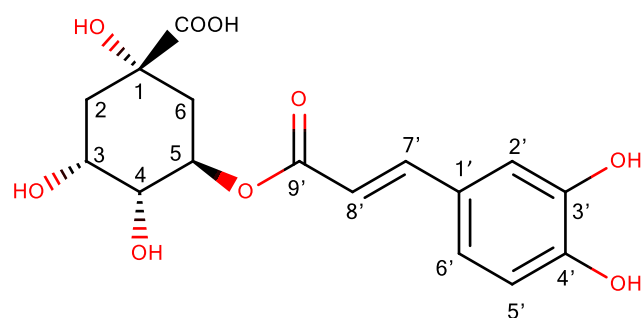
Figura 87. Composto Vp – 8 (ácido 5-*O-E*-cafeoil quínico)



Fonte: Própria do autor.

O ácido 5-*O-E*-cafeoil quínico é uma substância dotada de potencial antioxidante, efeito antiproliferativo frente ao adenocarcinoma de cólon humano (MURAD, 2013), possui potencial aplicação no tratamento de envenenamento por serpentes (TOYAMA et al., 2014) e atuou inibição o crescimento celular na linhagem de câncer de mama MCF7 e MDA-MB-231 (BENDER et al., 2018).

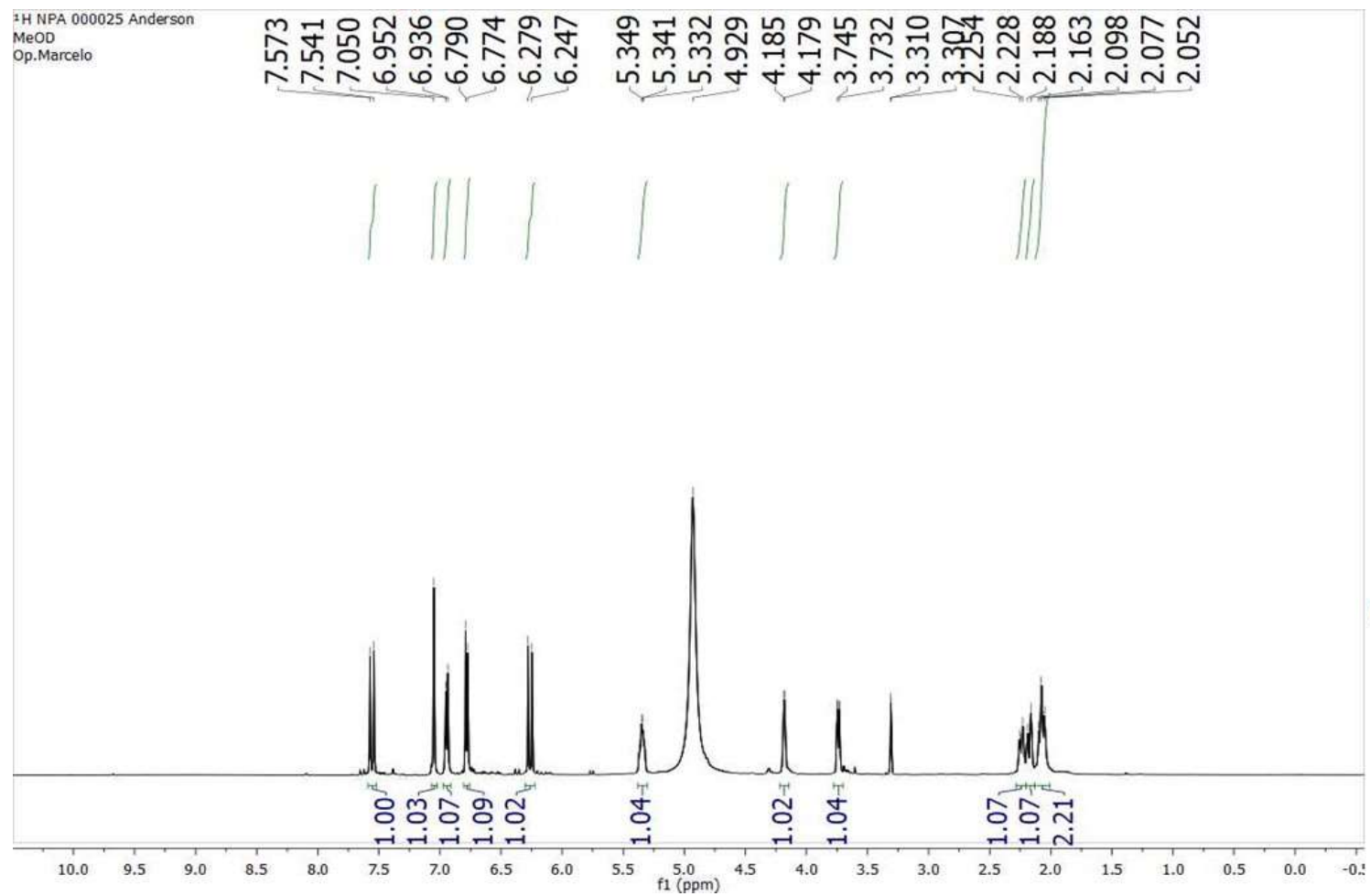
Tabela 14. Dados de RMN ^1H de Vp – 8 (δ , CD_3OD , 500 MHz) em comparações com o ácido 5-*O-E*-cafeoil-quinico (δ , CD_3OD , 300 MHz) (BATISTA et al., 2014)



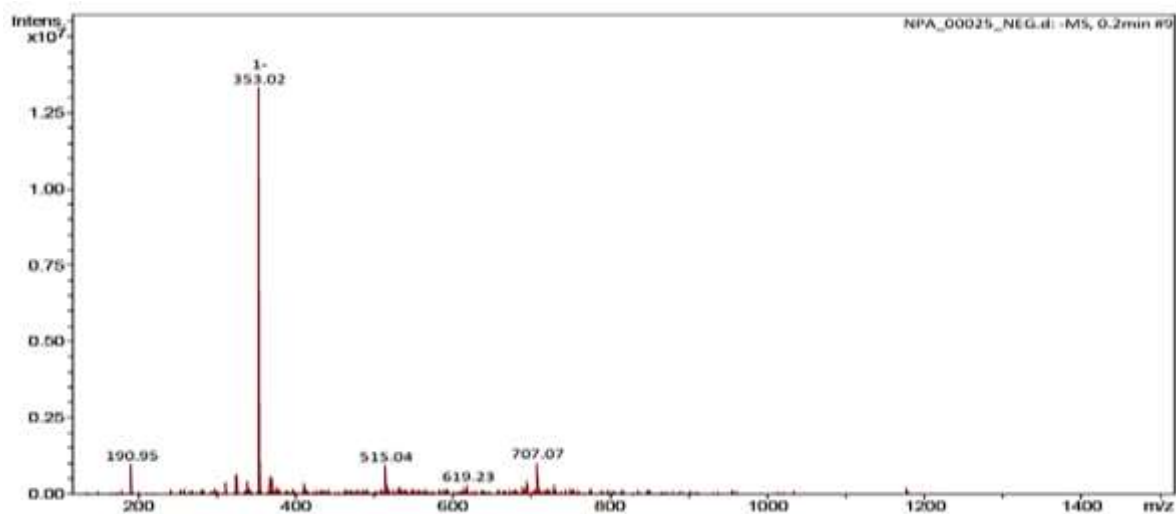
	Vp – 8	Ácido 5- <i>O-E</i> -cafeoil-quinico
	δ_{H}	δ_{H}
1	-	-
2	2,18 (dl, $J=13,0$ Hz, 1H) 2,25 (dl, $J=12,5$ Hz, 1H)	1,98 – 2,24 (m, 1H)
3	4,18 (dl, $J=3,0$ Hz, 1H)	4,16 (dl, $J=3,0$ Hz, 1H)
4	3,74 (dd, $J=2,0$ e 8,5 Hz, 1H)	3,70 (dd, $J=10,0$ e 3,0 Hz, 1H)
5	5,36 (ddd, $J=4,0, 9,0$ e 17,5 Hz, 1H)	5,35 (ddd, $J=10,0, 10,0$ e 4,2 Hz, 1H)
6	2,09 (tl, $J=10,5$ Hz, 2H)	1,98 – 2,24 (m, 1H)
7	-	-
1'	-	-
2'	7,05 (sl, 1H)	7,03 (d, $J=1,8$ Hz, 1H)
3'	-	-
4'	-	-
5'	6,79 (d, $J=8,0$ Hz, 1H)	6,78 (d, $J=8,1$ Hz, 1H)
6'	6,95 (dl, $J=8,0$ Hz, 1H)	6,93 (dd, $J=1,8$ e 8,0 Hz, 1H)
7'	7,57 (d, $J=16,0$ Hz, 1H)	7,58 (d, $J=15,9$ Hz, 1H)
8'	6,27 (d, $J=16,0$ Hz, 1H)	6,28 (d, $J=15,9$ Hz, 1H)
9'	-	-

Fonte: Própria do autor.

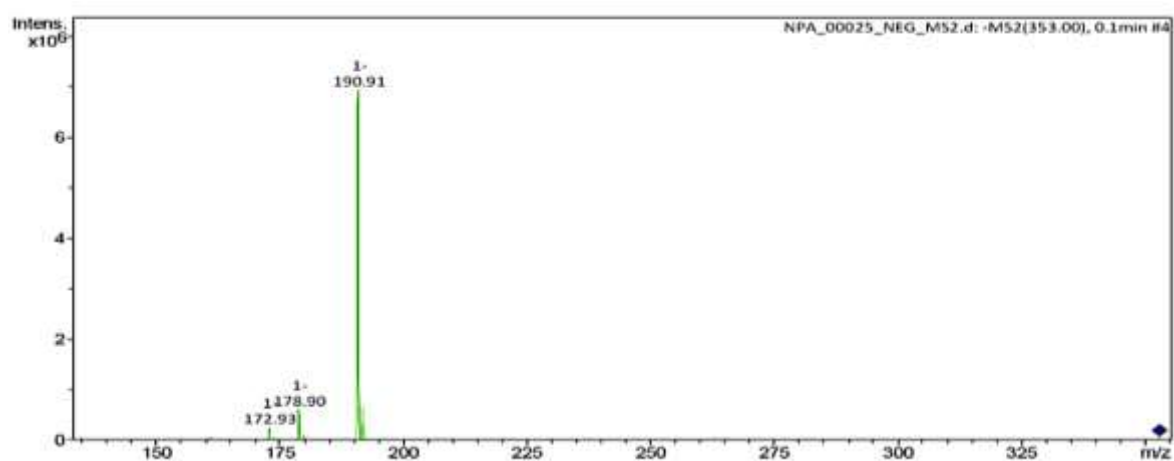
Figura 80. Espectro de RMN ^1H de Vp – 8 (δ , CD_3OD , 500 MHz)



Fonte: Própria do autor.

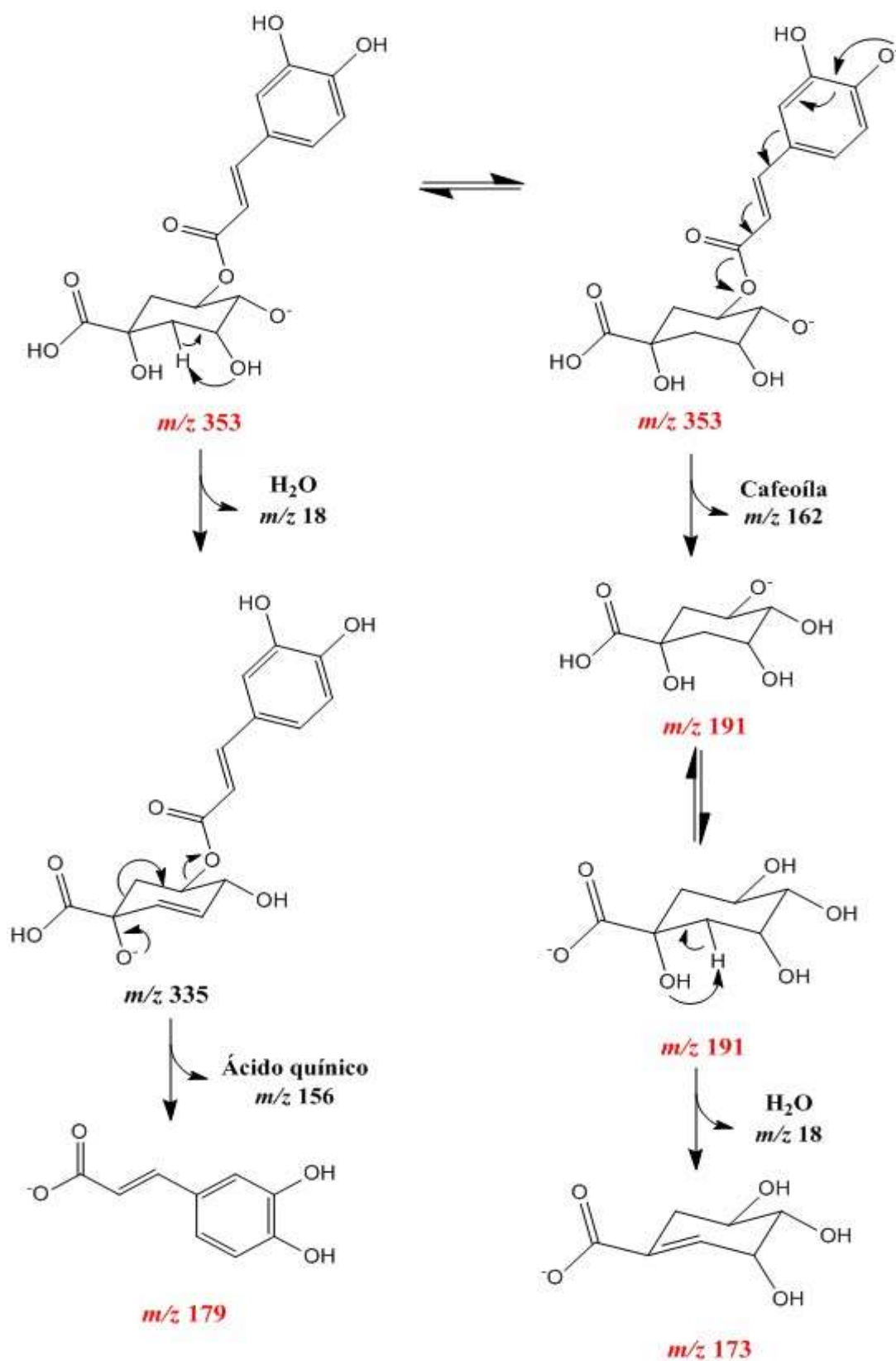
Figura 81. Espectro de Massas (IES-EM, modo negativo) de Vp – 8

Fonte: Própria do autor.

Figura 82. Espectro de Massas (IES-EM², modo negativo) de Vp – 8

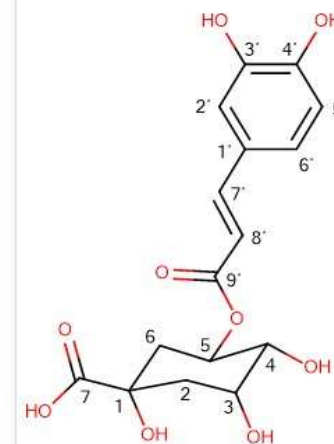
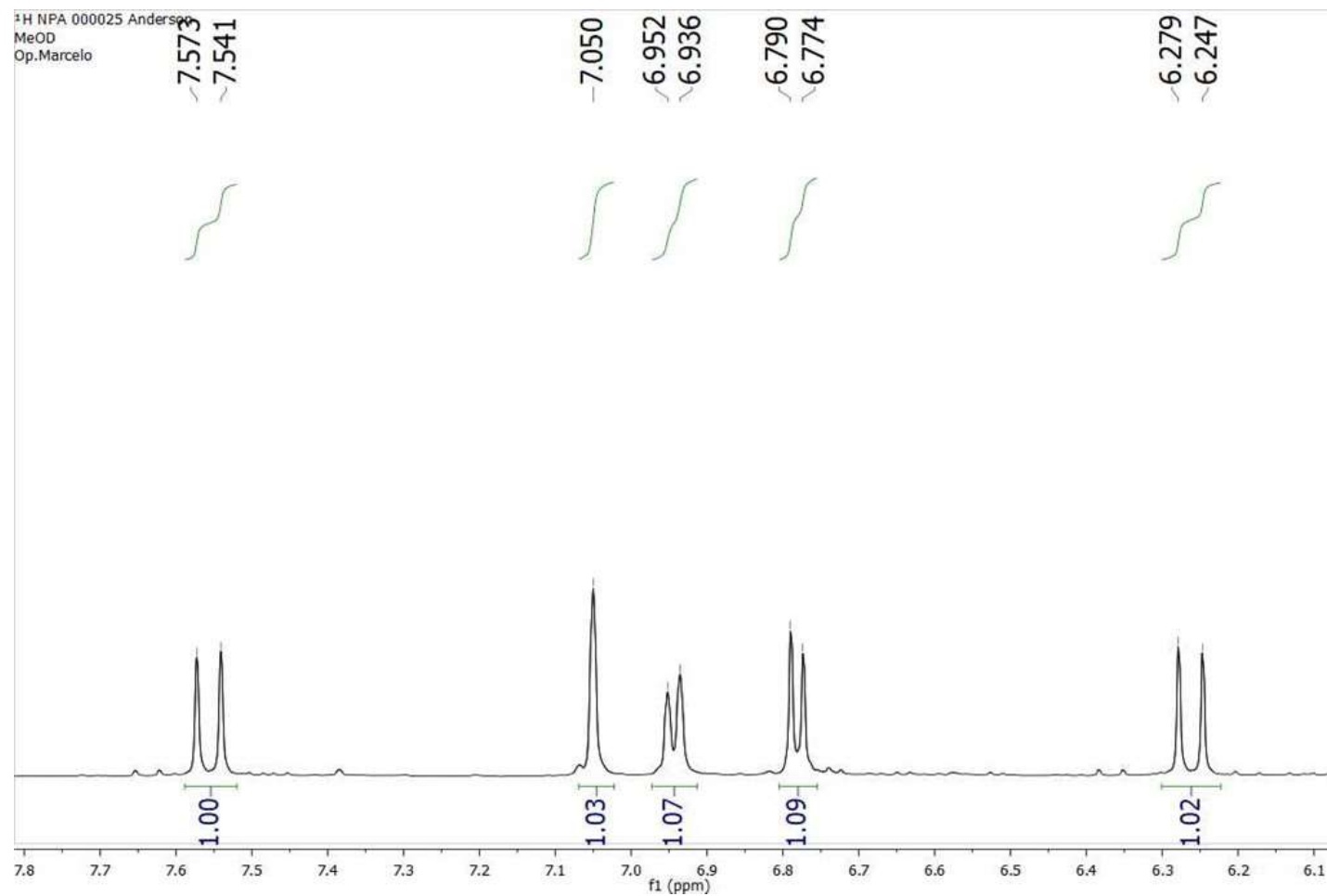
Fonte: Própria do autor.

Figura 83. Proposta de fragmentação de Vp – 8 (5-di-*O-E*-cafeoil-quinico, modo negativo)



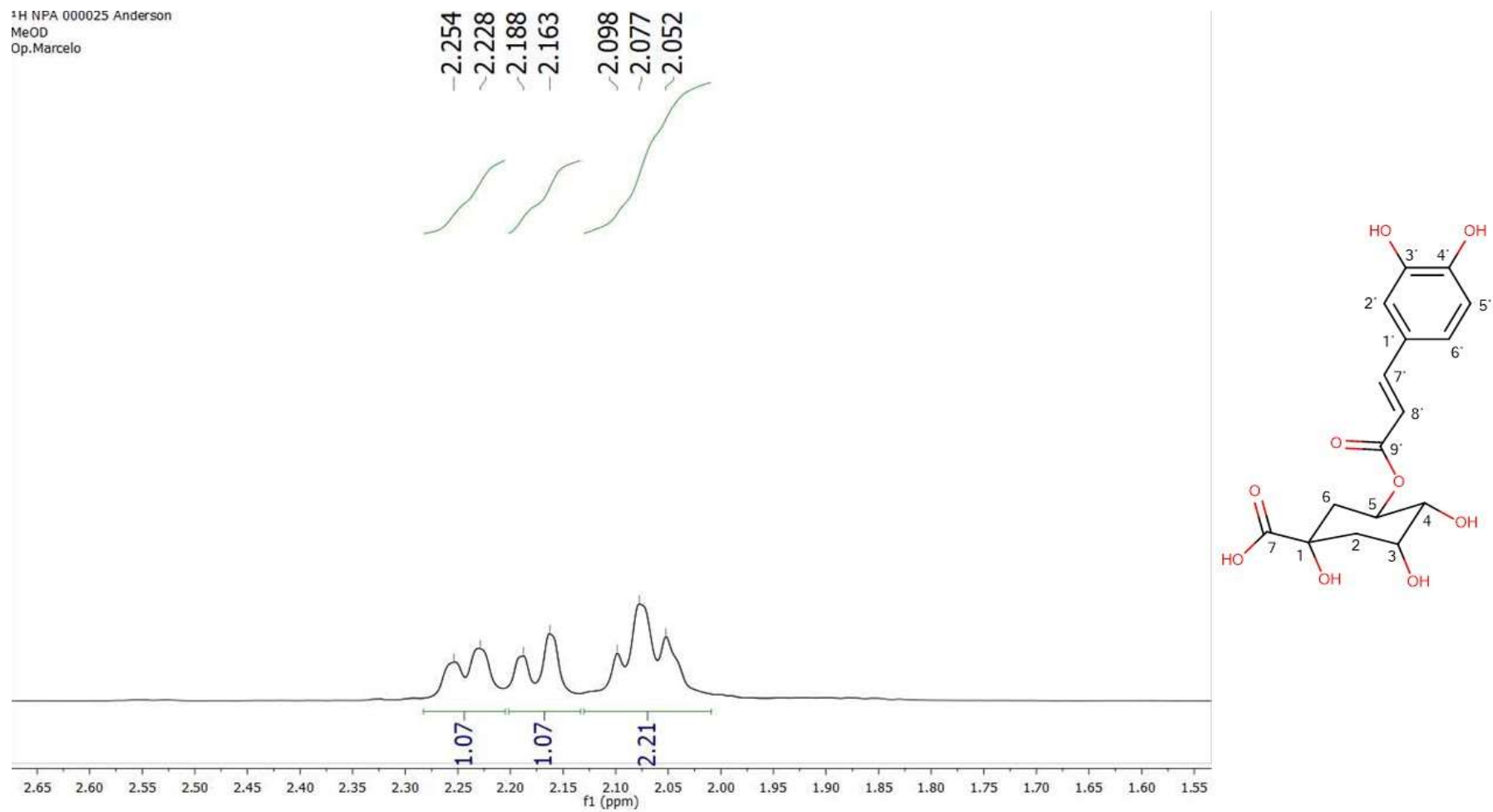
Fonte: Adaptação de CLINFFORD et al., 2003

Figura 84. Primeira expansão do espectro de RMN ^1H de Vp-8 (δ , CD_3OD , 500 MHz)



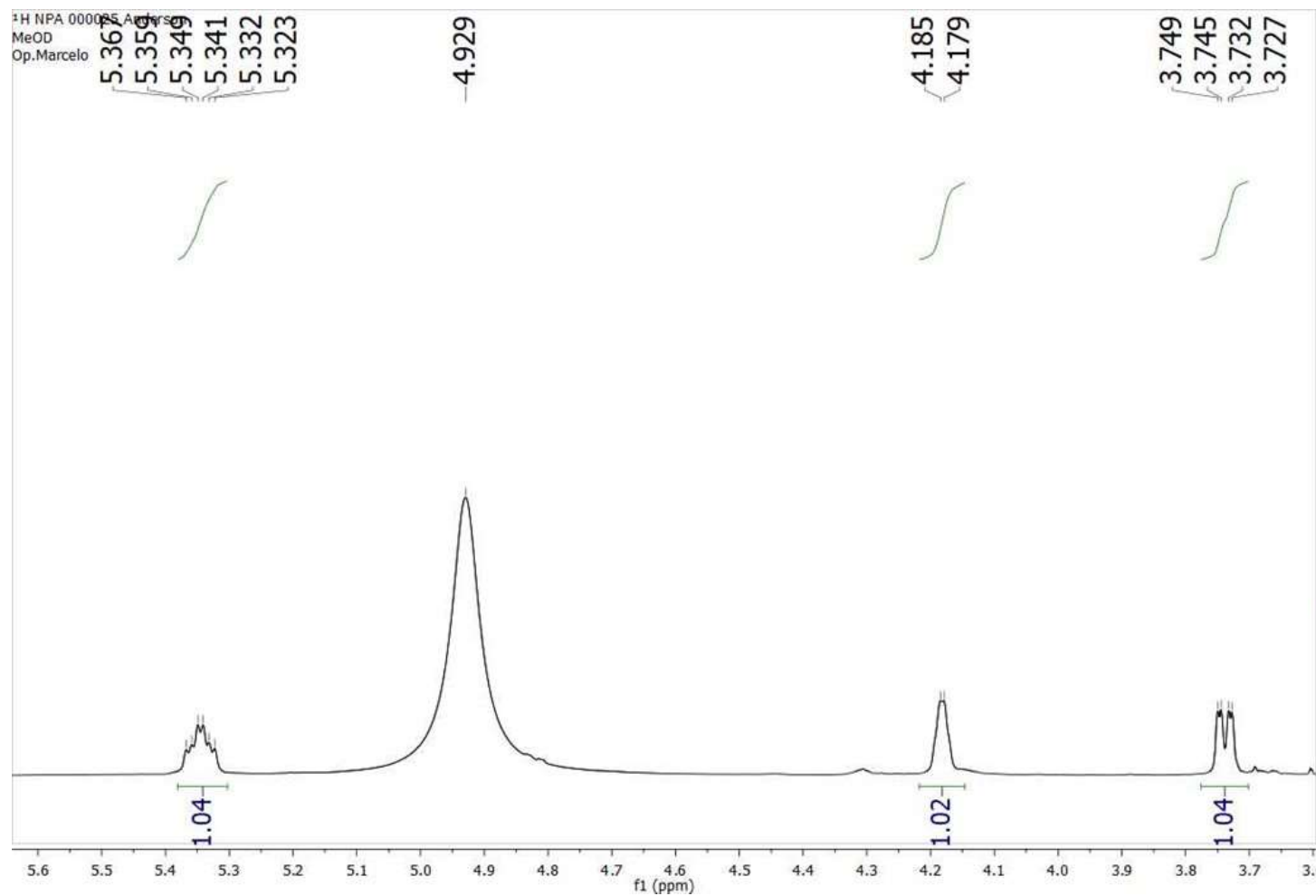
Fonte: Própria do autor.

Figura 85. Segunda expansão do espectro de RMN ^1H de Vp – 8 (δ , CD_3OD , 500 MHz)



Fonte: Própria do autor.

Figura 86. Terceira expansão do espectro de RMN ^1H de Vp – 8 (δ , CD_3OD , 500 MHz)



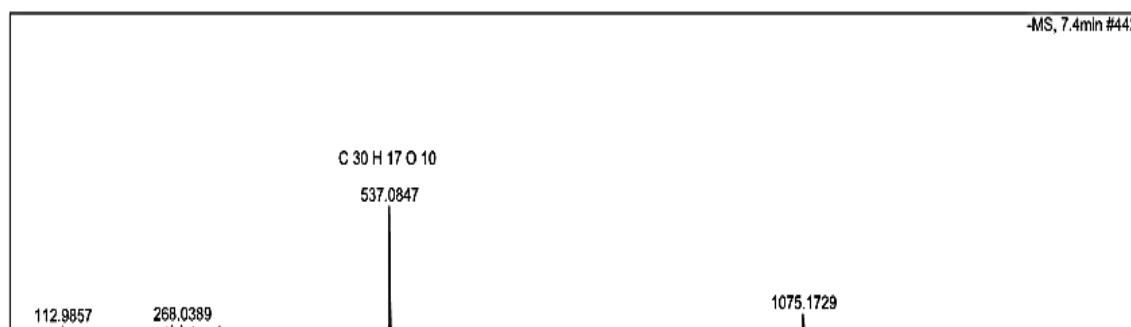
Fonte: Própria do autor.

5.1.2.9 Identificação estrutural de Vp – 9

O composto Vp – 9 (28,2 mg) foi isolado a partir da fase acetato de etila na forma de um sólido amorfo amarelo, tanto por cromatografia clássica (22,2 mg) como por CLAE (6,0 mg), em um $T_R=54,5$ min e apresentando absorções no espectro de UV-Visível λ/nm 198, 268 e 334.

O EMAR do composto Vp – 9 apresentou um íon da molécula desprotonada em m/z 537,0847 Da $[M - H]^-$ (Figura 88), compatível com a fórmula molecular $C_{30}H_{17}O_{10}$ (erro de 3,7 ppm, valor calculado 537,0827 Da).

Figura 88. Espectro de massas de alta resolução do composto Vp – 9



Fonte: Própria do autor.

O espectro de RMN 1H (Figura 89, página 180), obtido em $DMSO-d_6$, exibiu absorções entre δ_H 6,05 a 8,24, característicos de hidrogênios aromáticos (GOMES et al., 2011). O valor dessas absorções, juntamente com o seu aspecto físico e o relato de isolamento de biflavonoides nesta espécie, sugeriu que VP – 9 poderia pertencer a esta classe de metabólito secundário (PINTO et al., 2010). A presença de dois singletos de hidroxilas queladas em δ_H 13,04 e 13,17 reforçaram essa proposta (Figura 90, página 181).

Dois dubletos foram observados em δ_H 6,15 (d, $J=2,0$ Hz, 1H) e 6,30 (d, $J=2,0$ Hz, 1H) (Figura 91, página 182), ambos com acoplamento *meta*, correspondentes aos hidrogênios H-6 and H-8, respectivamente, indicando que o anel A I do flavonoide encontrava-se substituído nas posições 5 e 7. Observou-se ainda um duplo dubleto em δ_H 8,01 (dd, $J=8,5$; 2,5 Hz, 1H, H-6'), acoplando *orto* com um dubleto em δ_H 6,92 (d, $J=9,0$ Hz, 1H, H-5') e *meta* com um dubleto em δ_H 8,24 (d, $J=2,5$ Hz, 1H, H-2') (Figuras 91 e 92, páginas 182 e 183), condizentes

com os hidrogênios H-6', H-5' e H-2', respectivamente, do anel B I de um flavonoide com sistema ABX.

Ainda no espectro de RMN ^1H observou-se um singlete em δ_{H} 6.05 que foi atribuído ao H-6'' do anel A II, reforçando a possibilidade de união C-3' e C-8''. A presença de dois dubletos em δ_{H} 7,66 (d, $J=8,5$ Hz, 2H) e 6,57 (d, $J=9,0$ Hz, 2H) (Figuras 91 e 92, páginas 182 e 183), acoplando *orto* e integrando para 2H cada, estão condizentes com H-2'''/H-6''' e H-3'''/H-5''', respectivamente, do anel B II de um flavonoide com sistema AA' BB'.

A presença de dois singletos em δ_{H} 6,76 e 6,68 foram atribuídos às posições H – 3 e H – 3'' dos anéis C I e C II, respectivamente, do composto (Figura 91, página 182).

No espectro de RMN ^{13}C (Figura 93, página 184), utilizando a técnica de APT, foi possível identificar 27 sinais equivalentes à 30 átomos de carbono, sendo 17 sinais correspondentes à 18 carbonos não hidrogenados e 10 sinais referentes à 12 carbonos metínicos.

Sinais em δ_{C} 123,1 e 106,7 (Figura 94, página 185) comparados com dados da literatura (DEVKOTA; MIYAZAKI; YAHARA, 2017), indicaram que a substância se tratava de um biflavonoide com a união de C-3' (anel B I) com C-8'' (anel A II).

A ausência de sinal em δ_{C} ~93,8, juntamente com os sinais em δ_{C} 160,5 (C-5''), 164,0 (C-7'') e 106,7 (C-8'') (Figuras 95 e 94, páginas 186 e 185), sugeriram que o anel A II é pentassubstituído. A proposta da existência do sistema AA'BB' foi fortalecida pela presença e amplitude dos sinais δ_{C} 128,1 e 115,5 (Figura 94, página 185), referentes aos carbonos C-2'''/C-6''' e C-3'''/C-5''', respectivamente.

As absorções em δ_{C} 131,4, 119,1 e 126,6 (Figura 94, página 185) evidenciaram a presença de um sistema ABX, condizentes com os carbonos monohidrogenados C – 2', C – 5' e C – 6' do anel B I, respectivamente.

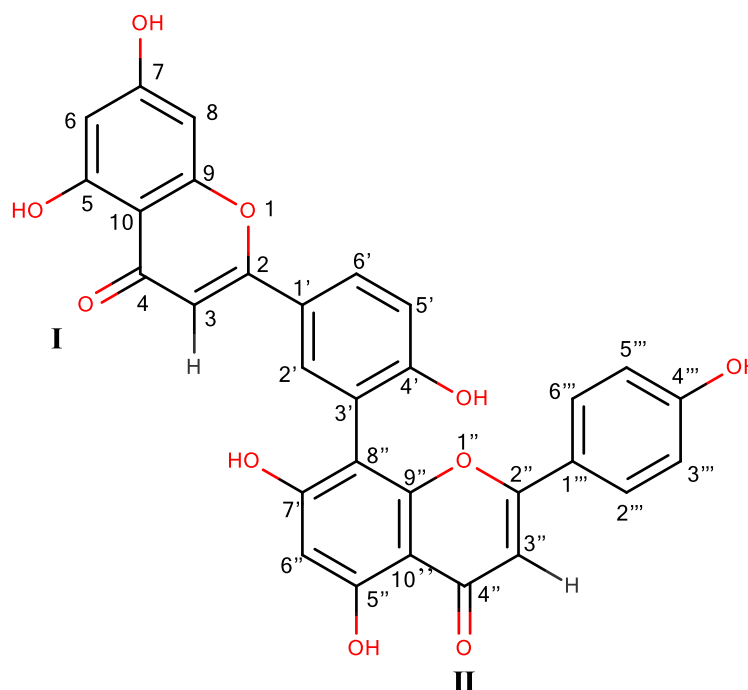
A presença dos sinais de carbonos metínicos em δ_{C} 102,0 (C – 3) e 102,4 (C – 3'') (Figura 94, página 185), bem como os observados em δ_{C} 181,6 (C – 4) e 181,6 (C – 4'') (Figura 95, página 186), sugerem que o composto possui núcleos do tipo flavona e se tratava da amentoflavona.

Os mapas de contorno HMQC de Vp – 9 (Figura 96, página 187) e sua expansão (Figuras 97, página 188) permitiram confirmar a atribuição dos hidrogênios aos seus respectivos carbonos (Tabela 15, página 178).

Os mapas de contorno HMBC de Vp – 9 (Figura 98, página 189) e suas expansões (Figuras 99 e 100, páginas 190 e 191) confirmaram a união C-3' (anel B I) com C-8'' (anel A II) ao exibir correlações do hidrogênio metínico H – 2' a 3J com C – 2, C – 6' e C – 8'' (Tabela 15, página 178).

Assim, os dados obtidos (RMN ^1H , ^{13}C , HMQC e HMBC e EMAR foram comparados com dados de RMN ^1H e ^{13}C com modelos da literatura (Tabela 15, página 178), onde é possível afirmar que o composto se trata da amentoflavona (Figura 102), reisolada pela segunda vez na espécie (WILLIAMNS et al., 1987; PINTO et al., 2010).

Figura 102. Composto Vp – 9 (amentoflavona)



Fonte: Própria do autor.

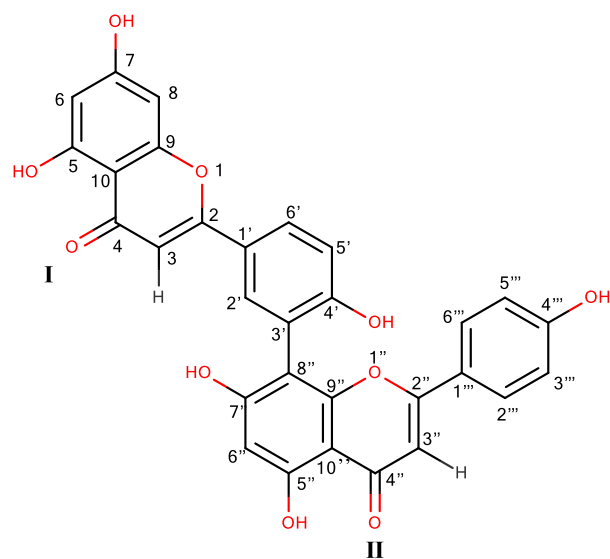
A complexidade dos espectros de um composto biflavonoídico, em que se observa duplicação e pareamento de muitos sinais, é explicada pelo atropoisomerismo. Porém, esse fenômeno, oriundo da palavra grega *atropos* (sem rotação), é atribuído a um estereoisomerismo característico de sistemas onde a rotação livre em torno de uma ligação simples é impedida, gerando uma barreira energética elevada, de modo a permitir o isolamento ou simplesmente a detecção dos diferentes rotâmeros, chamados atropoisômeros e é mais comum cujas unidades estão interligadas através dos carbonos C – 3 → C – 8'' (FRAGA et al., 2007; FERNANDES, 2010).

Porém, no espectro de RMN ^1H (δ , DMSO- d_6 , 500MHz), quando realizado com a quantidade de 8,0 mg de Vp – 9 à uma temperatura de 25°C, observou-se a duplicação dos picos referentes as hidroxilas queladas. Então, sob aquecimento, buscou-se fornecer calor para evitar a alta energia de rotação que pode duplicar sinais espectrais.

Com um aumento das faixas de temperatura (25°C, 40°C, 50°C e 80°C), observou-se aproximação dos sinais duplicados, coalescência (pico único) e obtenção de um sinal simples com absorção correspondente a frequência central à duas existentes anteriormente (Figura 101, página 192).

A amentoflavona (Vp – 9) é descrita na literatura com diversas potencialidades biológicas, destacando-se: antimicrobiano, antifúngico, analgésico, antimalárico, antiparkinsoniano, hepatoprotetor (BAIS; PRASHAR, 2015), antioxidante, anti-inflamatória e antidiabética (YU et al., 2017). Ainda, foi relatado que a amentoflavona protege o pulmão do estresse oxidativo em ratos (ZONG; ZHANG, 2017).

Tabela 15. Dados de RMN ^1H e ^{13}C de Vp – 9 (δ , DMSO- d_6 , 500MHz e 125 MHz) em comparação com a amentoflavona (δ , DMSO- d_6 , 300 e 75 MHz) (DEVKOTA; MIYAZAKI; YAHARA, 2017)

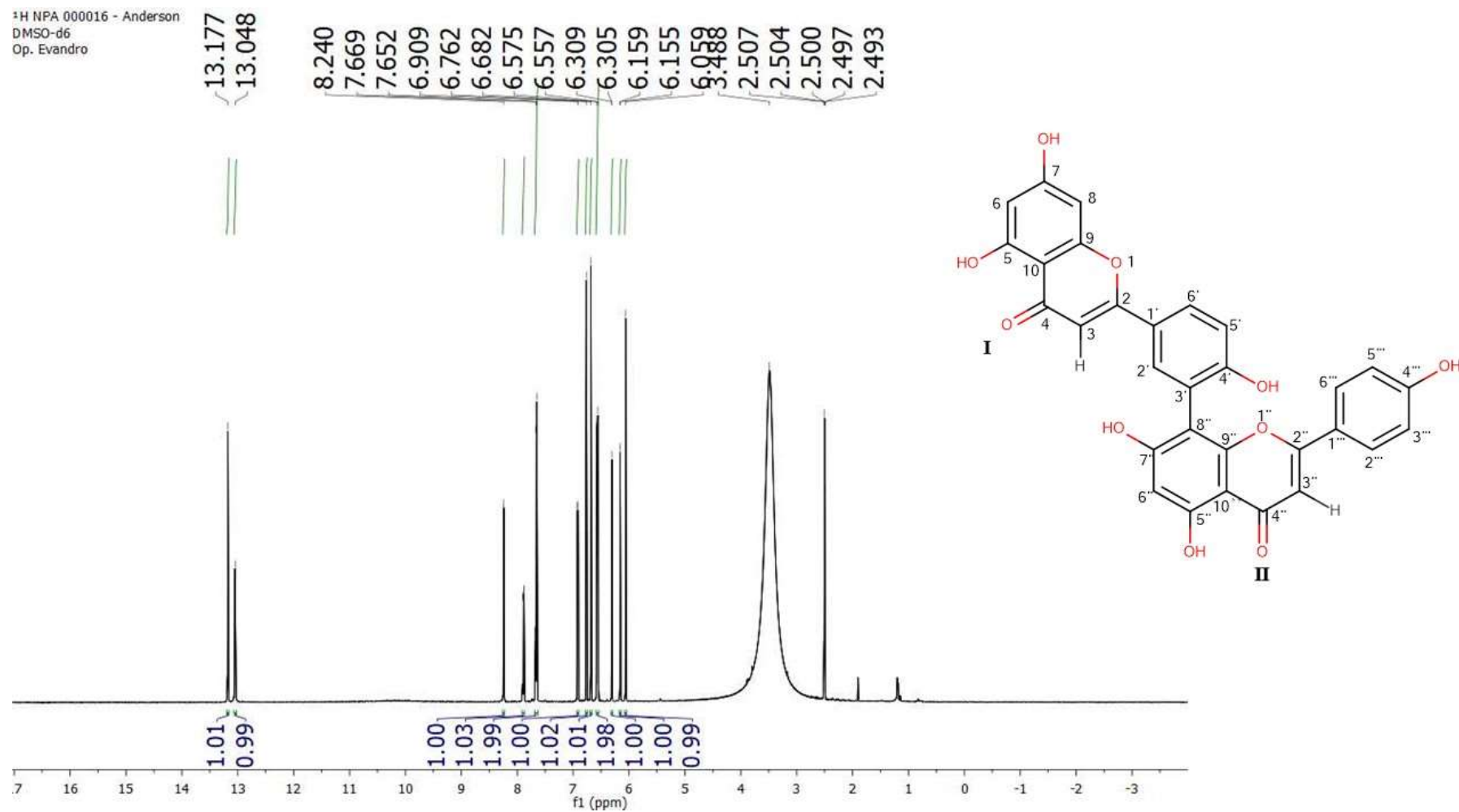


	Vp – 9			Amentoflavona	
	δ_{H}	δ_{C}	HMBC	δ_{H}	δ_{C}
2	-	164,5	-	-	163,9
3	6,76 (s, 1H)	102,0	C – 2, C – 4, C – 10 e C – 1'	6,82 (s, 1H)	102,5
4	-	181,6	-	-	181,6
5	-	162,9	-	-	161,3
6	6,15 (d, $J=2,0$, 1H)	98,8	C – 5, C – 7, C – 8 e C – 10	6,18 (d, $J=2,1$, 1H)	98,8
7	-	164,1	-	-	163,5
8	6,30 (d, $J=2,0$, 1H)	94,0	C – 6, C – 7, C – 9 e C – 10	6,44 (d, $J=2,1$, 1H)	93,8
9	-	157,3	-	-	157,2
10	-	103,6	-	-	103,9
1'	-	118,1	-	-	120,2
2'	8,24 (d, $J=2,5$, 1H)	131,4	C – 2, C – 6'e C – 8''	8,02 (d, $J=2,4$, 1H)	129,6
3'	-	123,1	-	-	121,2
4'	-	161,4	-	-	159,5
5'	6,92 (d, $J=9,0$, 1H)	119,1	C – 2, C – 4'e C – 6'	7,12 (d, $J=8,5$, 1H)	116,1
6'	7,90 (dd, $J=2,5$; 8,5, 1H)	126,6	C – 2 e C – 2'	7,99 (dd, $J=2,4$;8,5 1H)	128,2
2''	-	164,5	-	-	163,7
3''	6,68 (s, 1H)	102,4	C – 2'', C – 4'', C – 10'' e C – 1'''	6,77 (s, 1H)	102,4
4''	-	181,6	-	-	182,0

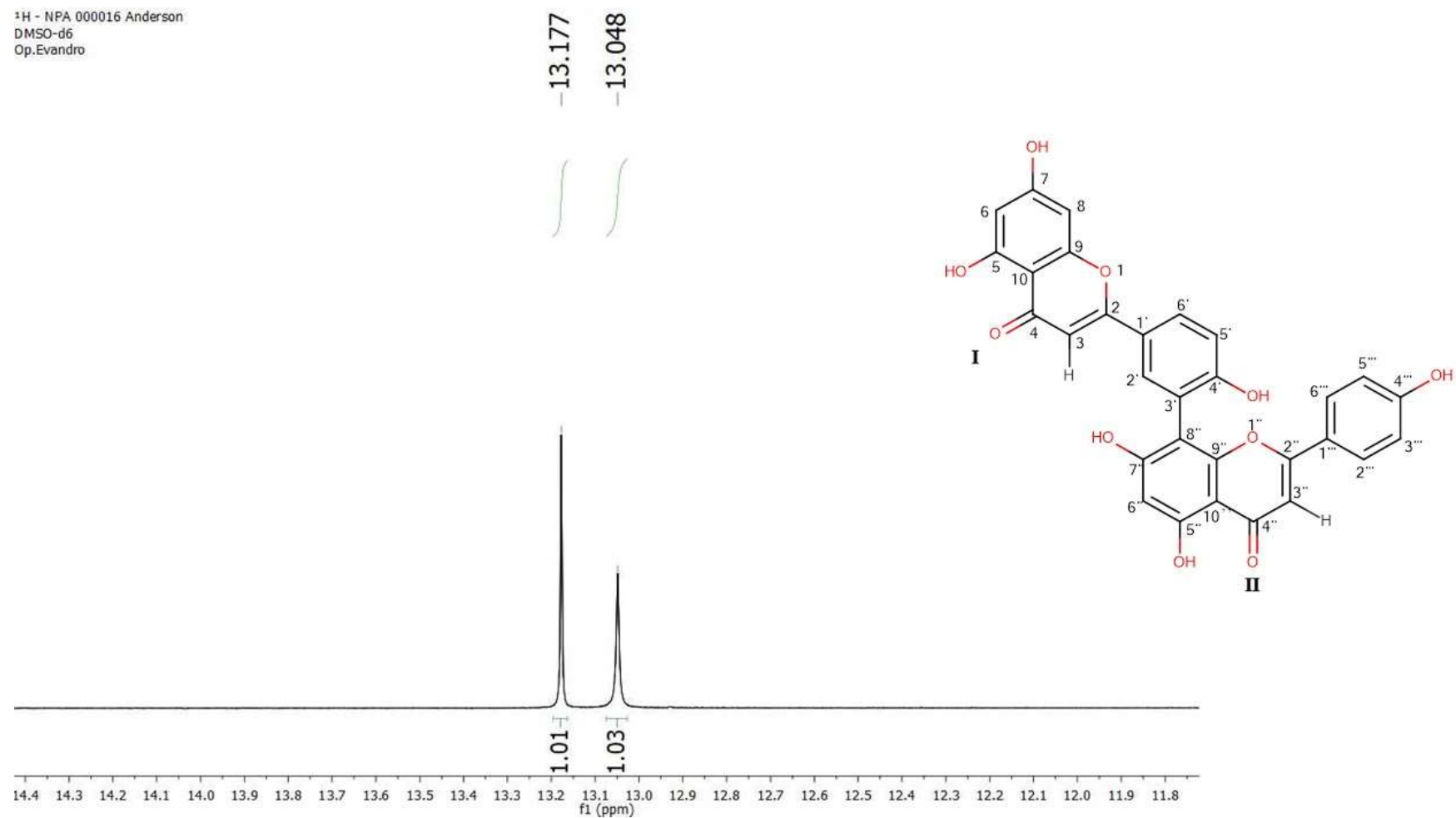
5''	-	160,5	-	-	160,4
6''	6,05 (s, 1H)	101,4	C – 5'', C – 8'' e C – 10''	6,16 (s, 1H)	98,7
7''	-	164,0	-	-	161,4
8''	-	106,7	-	-	103,9
9''	-	154,7	-	-	154,6
10''	-	101,9	-	-	103,9
1'''	-	121,7	-	-	121,2
2'''	7,66 (d, J=8,5, 1H)	128,1	C – 2''' e C – 4'''	7,58 (d, J=8,8, 1H)	128,0
3'''	6,57 (d, J=9,0, 1H)	115,5	C – 1''' e C – 4'''	6,70 (d, J=8,8, 1H)	115,7
4'''	-	160,6	-	-	160,4
5'''	6,57 (d, J=9,0, 1)H	115,5	C – 1''' e C – 4'''	6,70 (d, J=8,8, 1H)	115,7
6'''	7,66 (d, J=8,5, 1H)	128,1	C – 2''' e C – 4'''	7,58 (d, J=8,8, 1H)	128,0
5-OH	13,04	-	-	-	-
5-OH''	13,17	-	-	-	-

Fonte: Própria do autor.

Figura 89. Espectro de RMN ^1H de Vp – 9 (δ , DMSO- d_6 , 500 MHz)

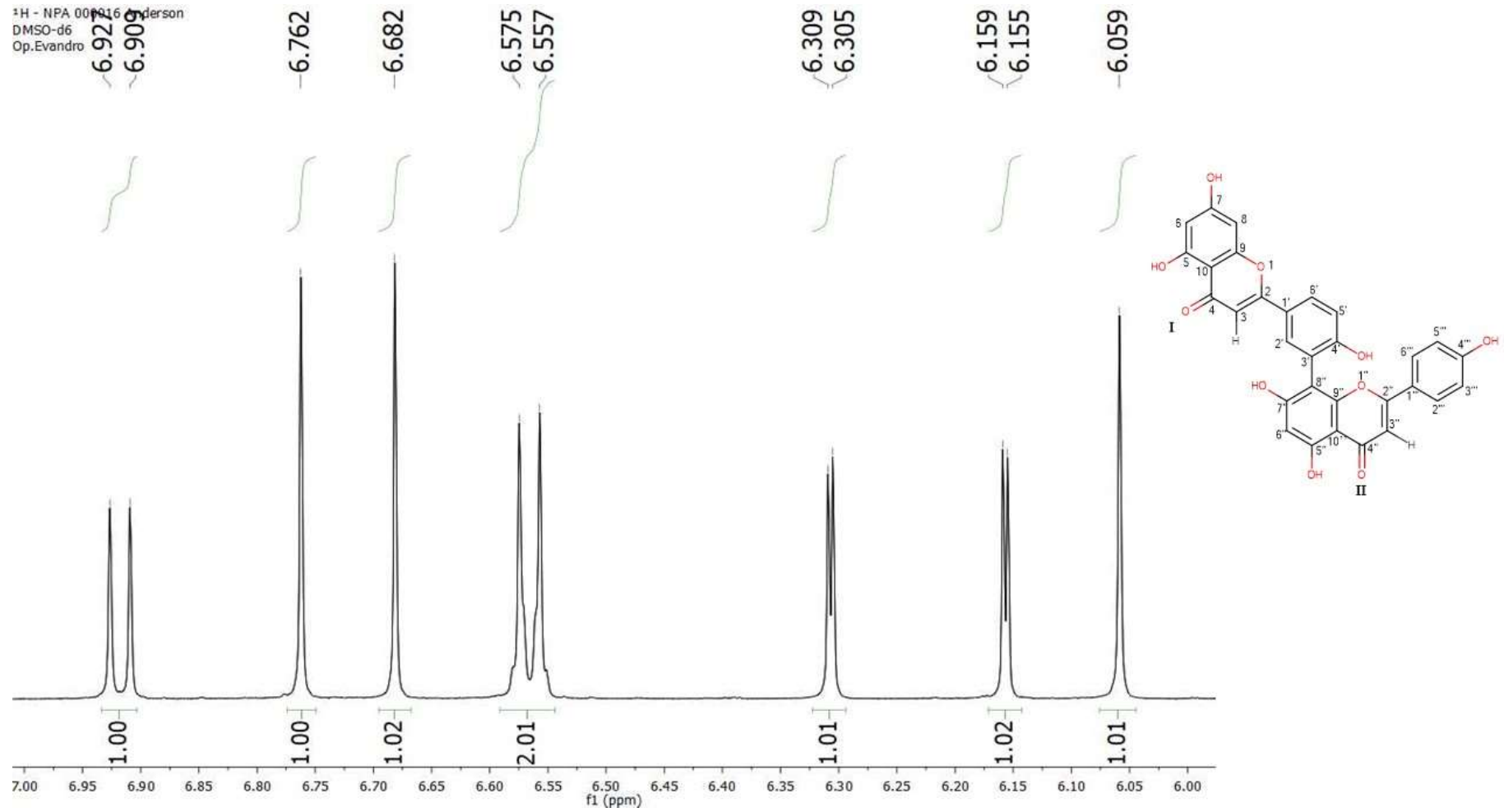


Fonte: Própria do autor.

Figura 90. Primeira expansão do espectro de RMN ^1H de Vp – 9 (δ , DMSO- d_6 , 500 MHz)

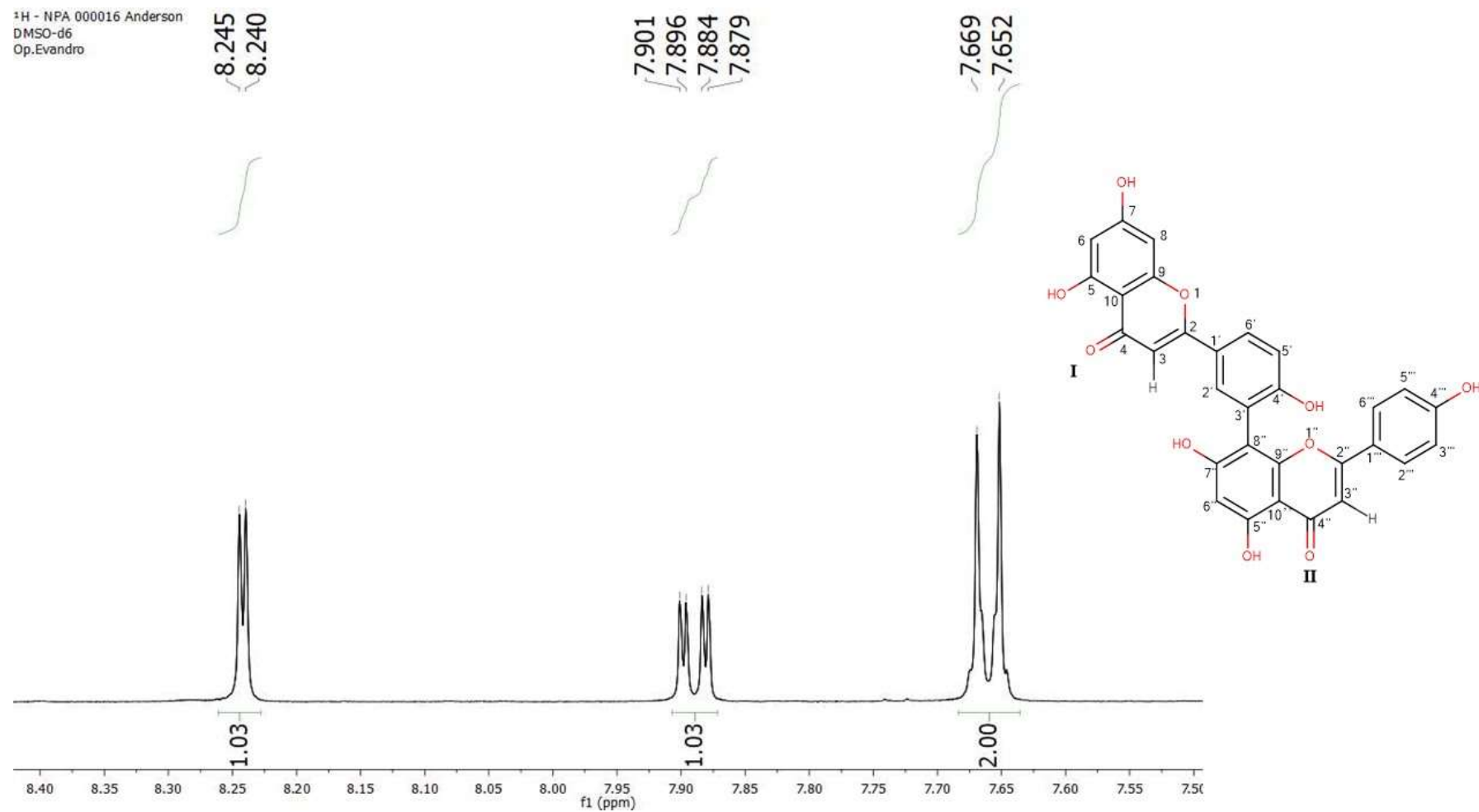
Fonte: Própria do autor.

Figura 91. Segunda expansão do espectro de RMN ^1H de Vp – 9 (δ , DMSO- d_6 , 500 MHz)



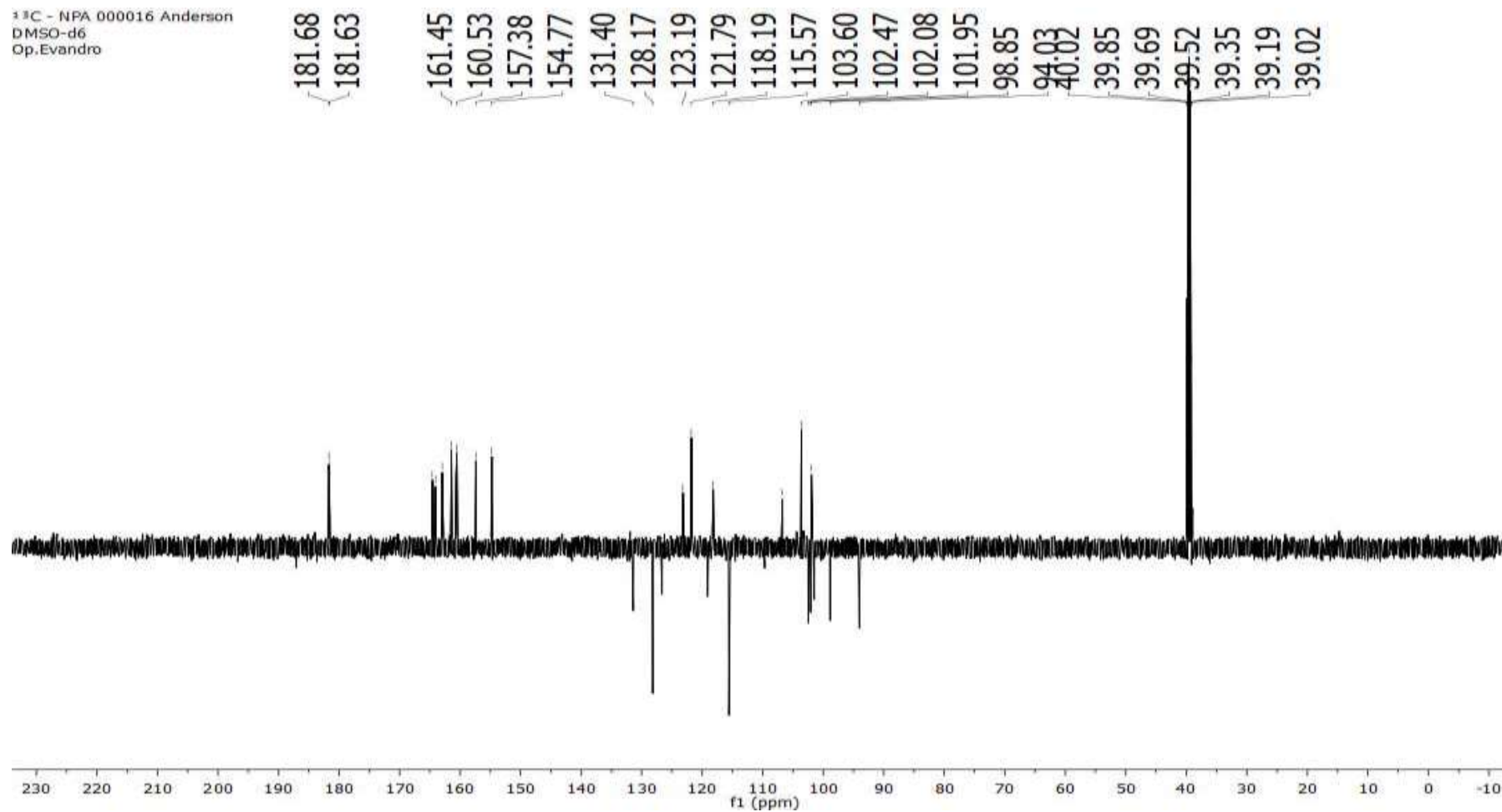
Fonte: Própria do autor.

Figura 92. Terceira expansão do espectro de RMN ^1H de Vp-9 (δ , DMSO-d_6 , 500 MHz)



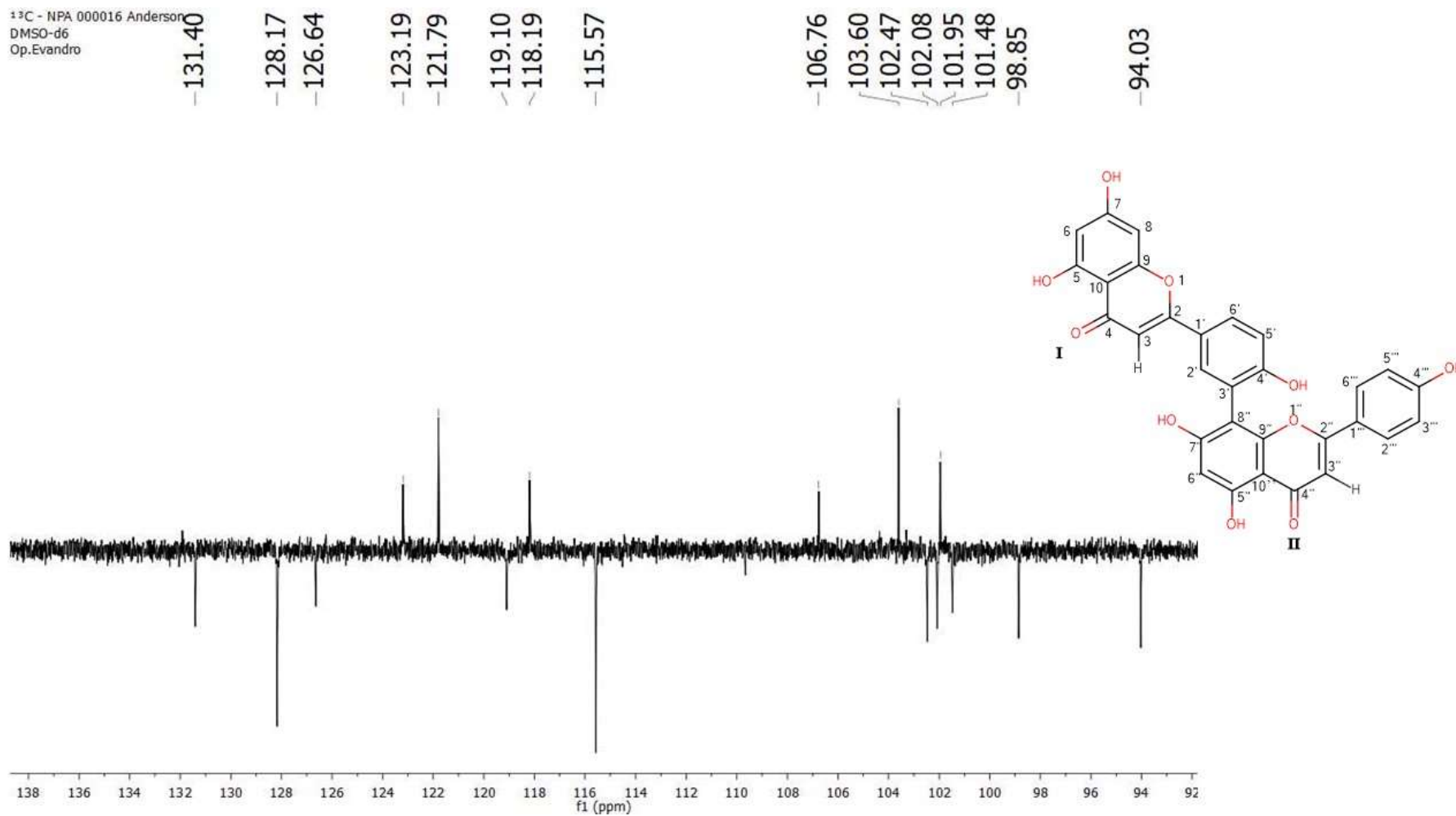
Fonte: Própria do autor.

Figura 93. Espectro de RMN ^{13}C de Vp – 9 (δ , DMSO- d_6 , 125 MHz)



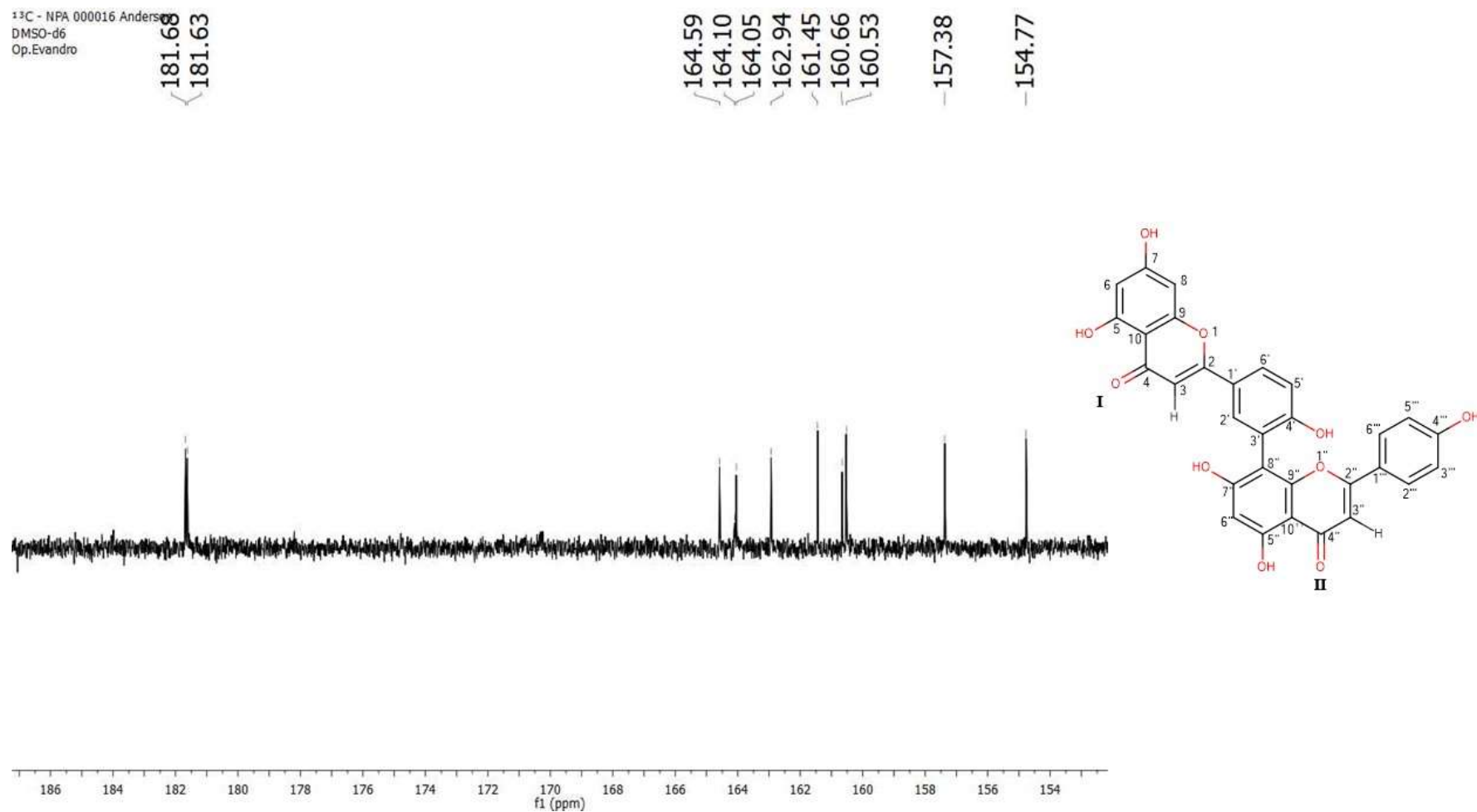
Fonte: Própria do autor.

Figura 94. Primeira expansão do espectro de RMN ^{13}C de Vp – 9 (δ , DMSO- d_6 , 125 MHz)



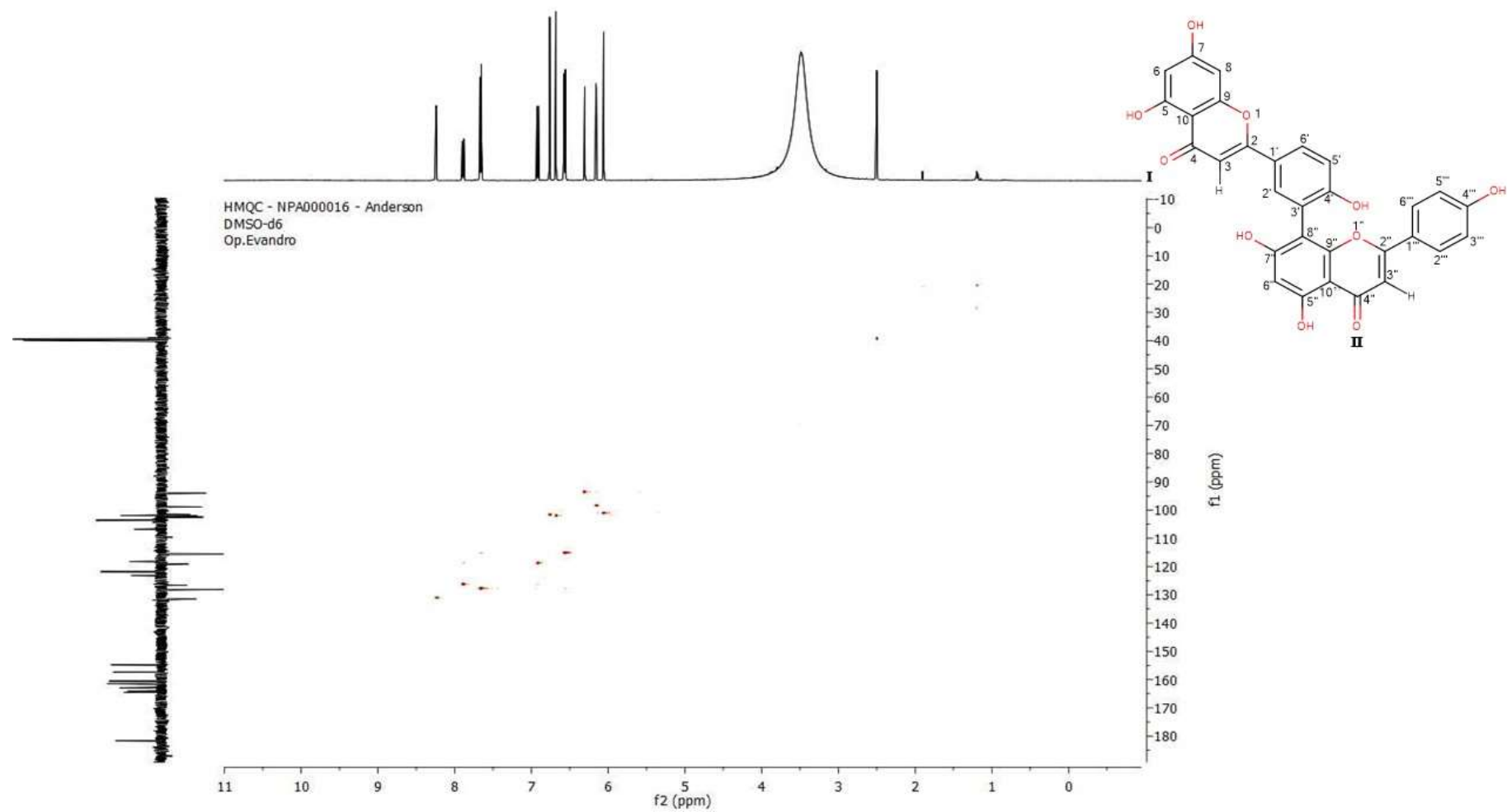
Fonte: Própria do autor.

Figura 95. Segunda expansão do espectro de RMN ^{13}C de Vp – 9 (δ , DMSO- d_6 , 125 MHz)



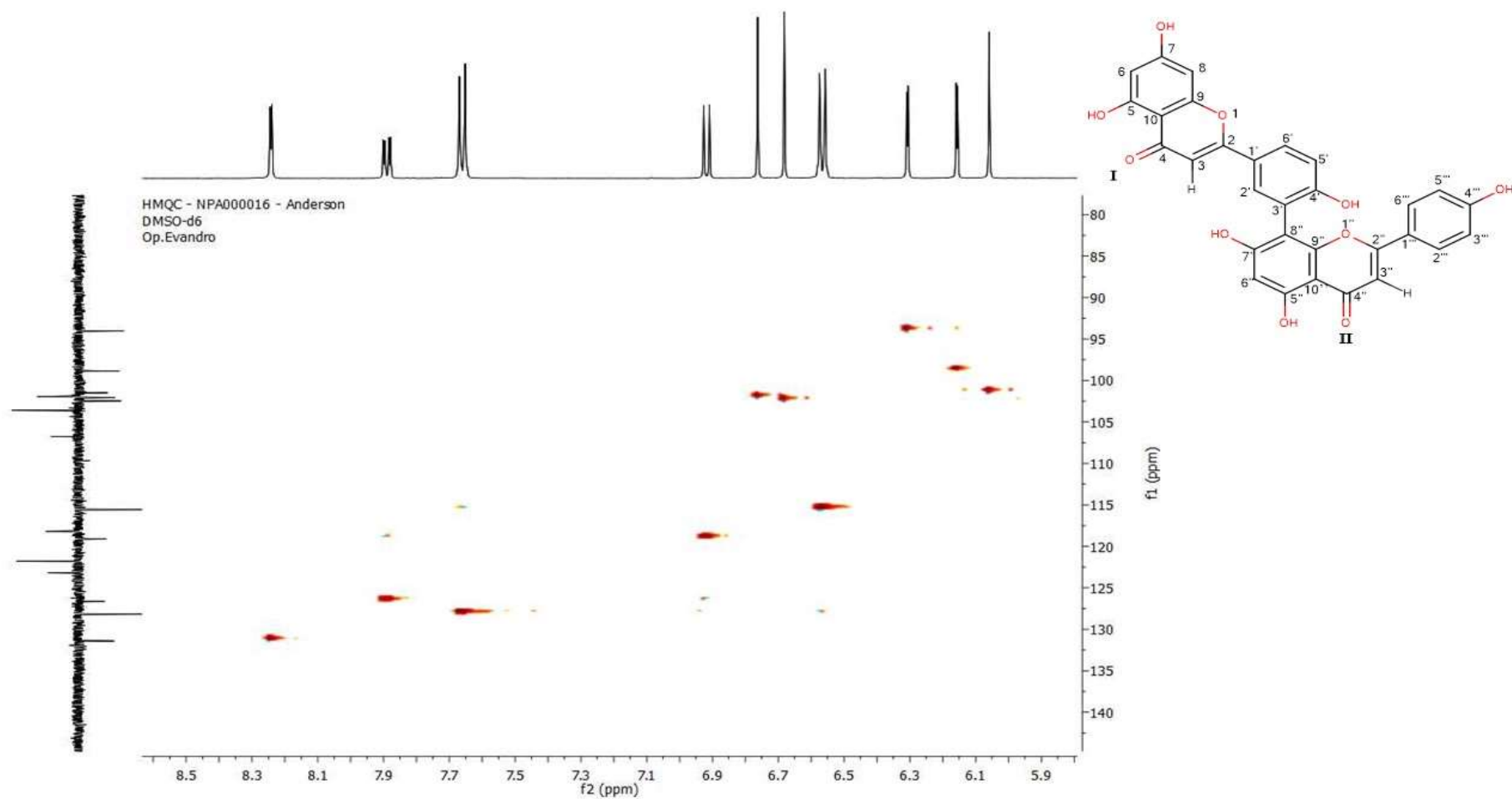
Fonte: Própria do autor.

Figura 96. Mapas de contorno HMQC de Vp – 9 (δ , DMSO- d_6 , 500 MHz e 125 MHz)



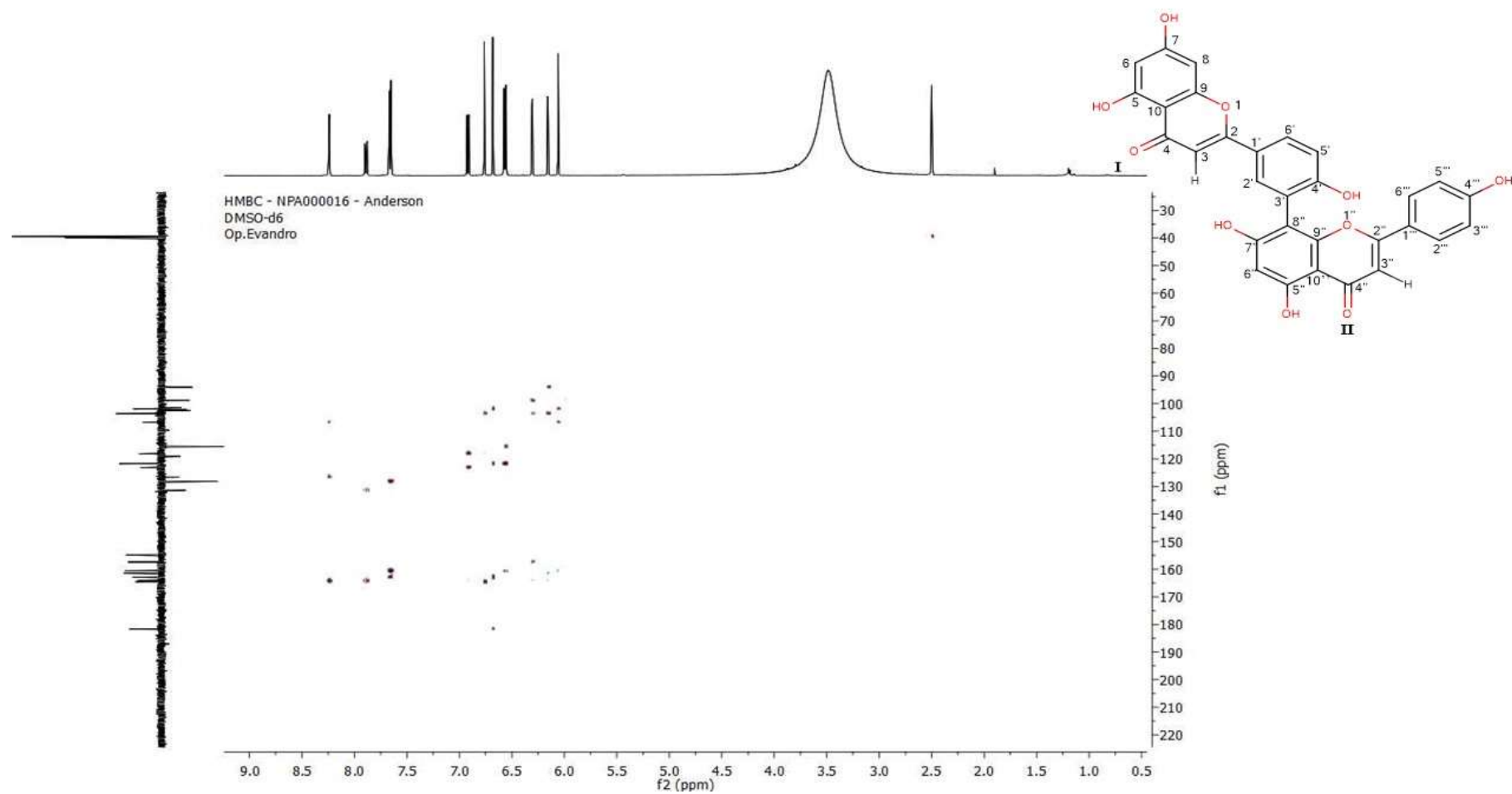
Fonte: Própria do autor.

Figura 97. Primeira expansão dos mapas de contorno HMQC de Vp-9 (δ , DMSO- d_6 , 500 MHz e 125 MHz)



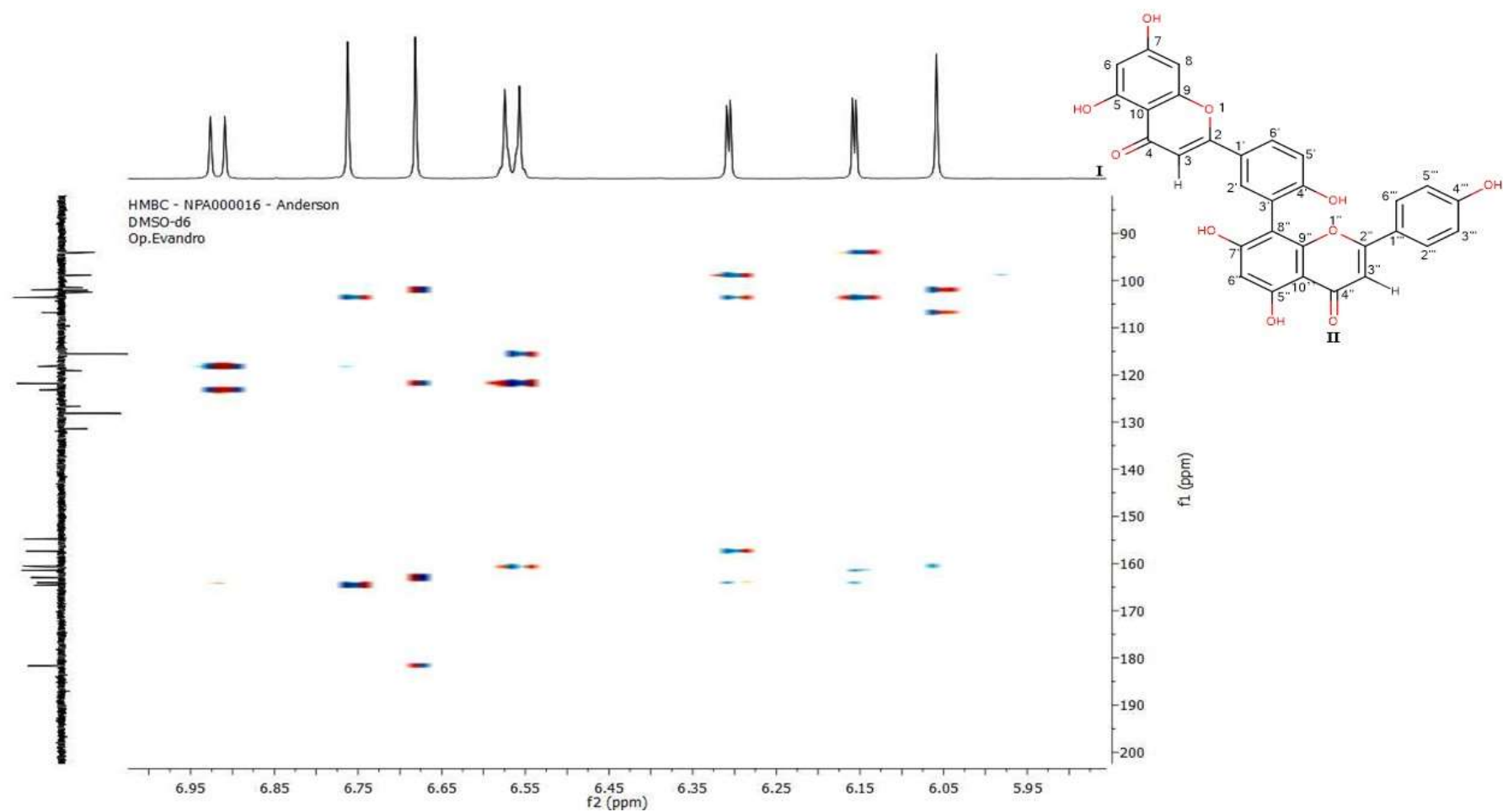
Fonte: Própria do autor.

Figura 98. Mapas de contorno HMBC de Vp – 9 (δ , DMSO- d_6 , 500 MHz e 125 MHz)



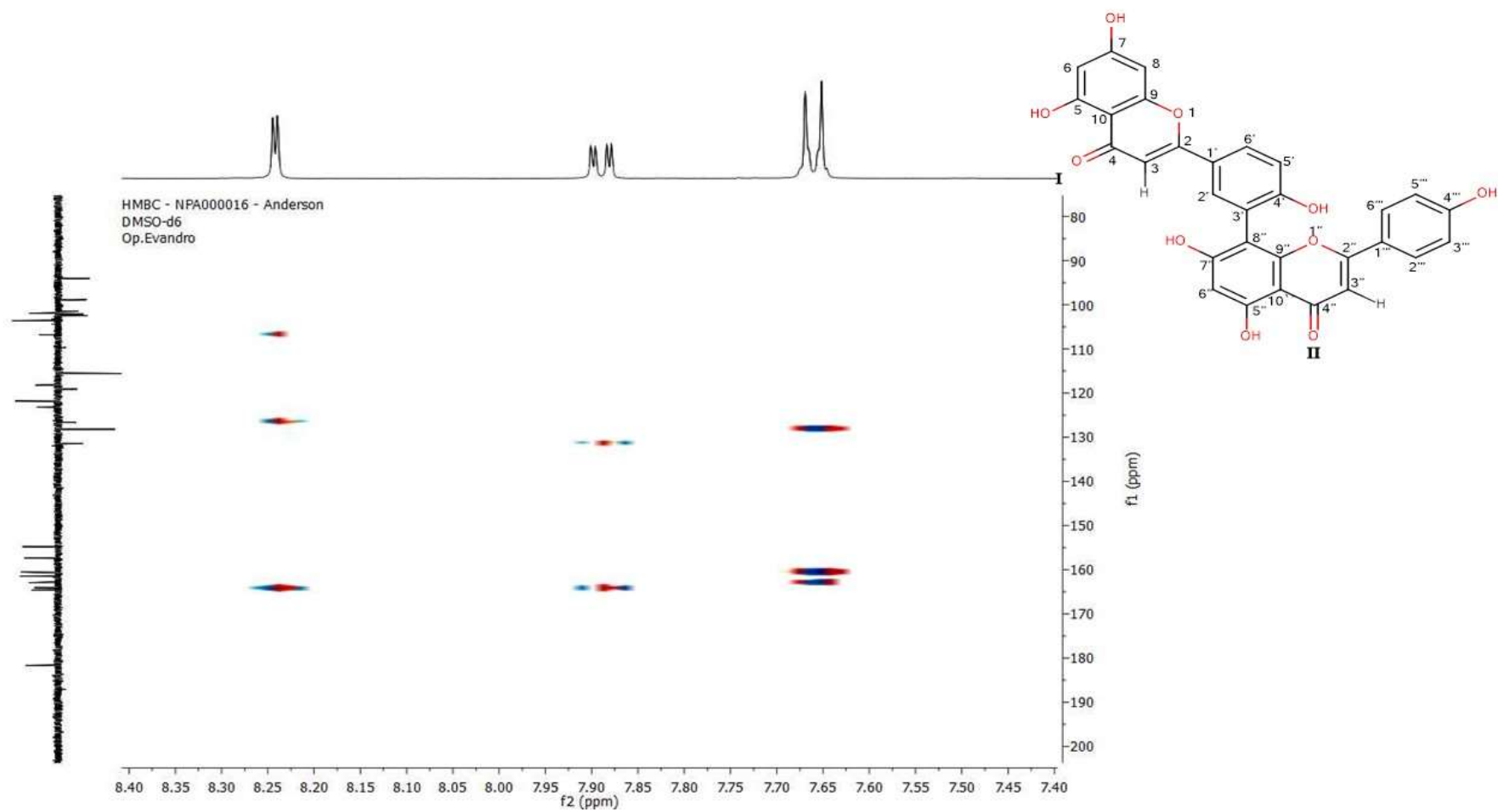
Fonte: Própria do autor.

Figura 99. Primeira expansão dos mapas de contorno HMBC de Vp – 9 (δ , DMSO- d_6 , 500 MHz e 125 MHz)



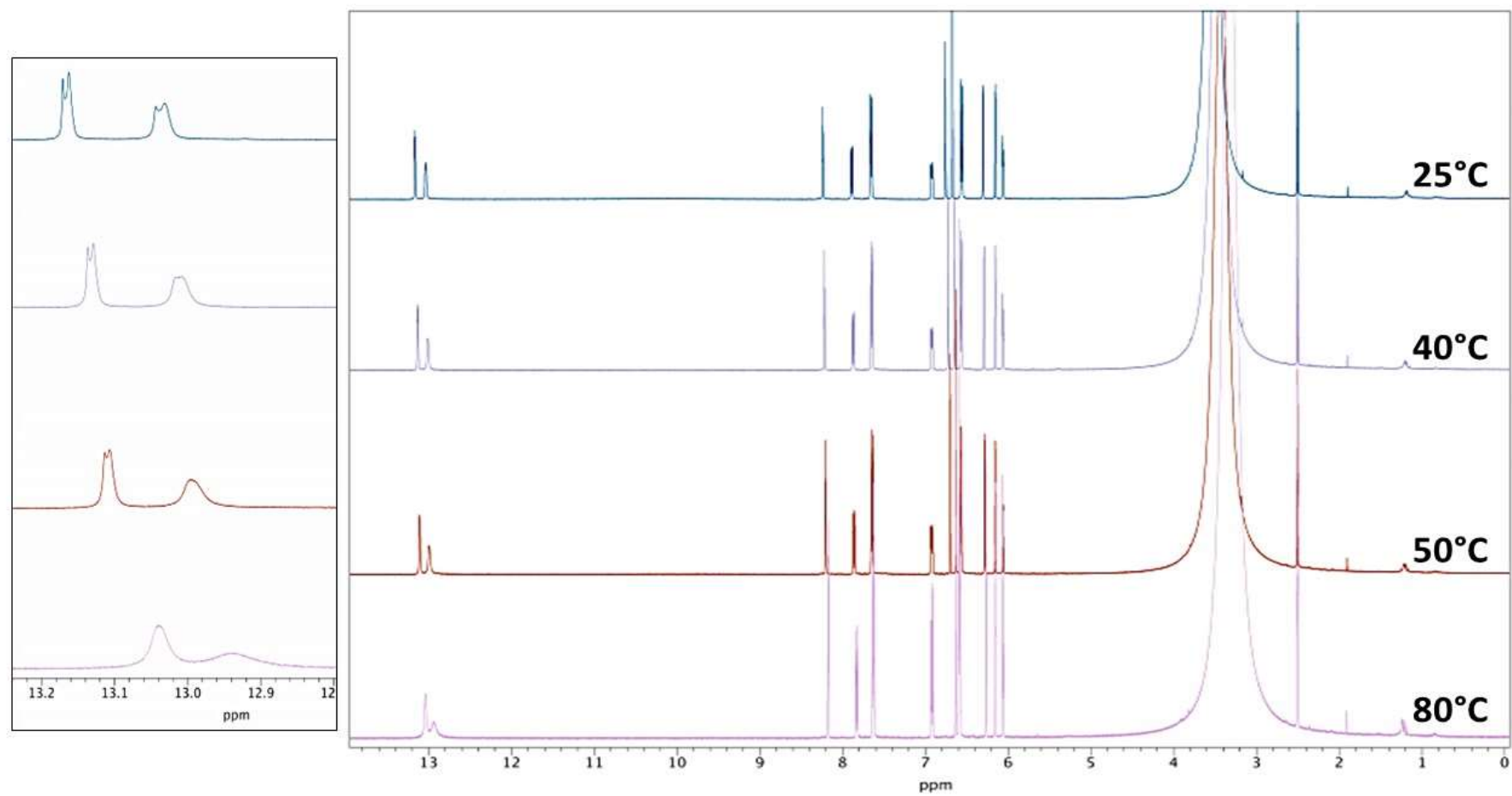
Fonte: Própria do autor.

Figura 100. Segunda expansão dos mapas de contorno HMBC de Vp – 9 (δ , DMSO- d_6 , 500 MHz e 125 MHz)



Fonte: Própria do autor.

Figura 101. Avaliação em escala de temperatura do efeito atropoisomérico de Vp – 9



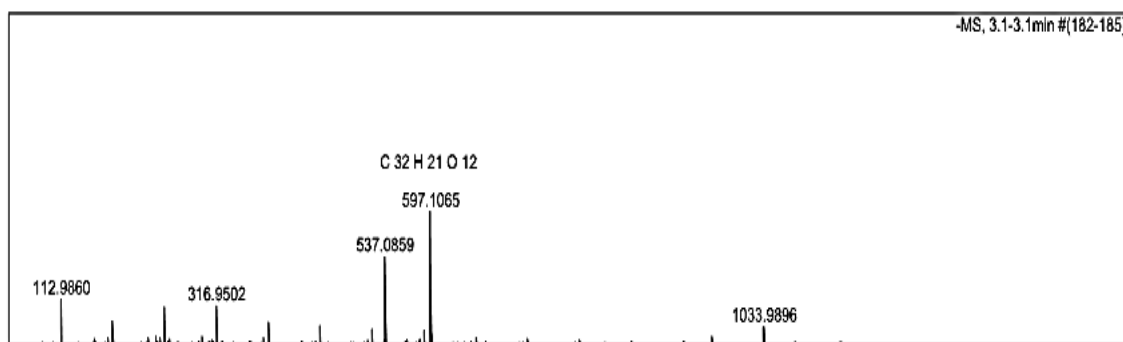
Fonte: Própria do autor.

5.1.2.10 Identificação estrutural de Vp – 10

O composto Vp – 10 (8,5 mg) foi isolado a partir da fase acetato de etila na forma de um sólido amorfo amarelo por CLAE em $T_R=58,7$ min e apresentou absorções no espectro de UV-Visível λ/nm 268 e 353.

O EMAR do composto Vp – 9 apresentou um íon da molécula desprotonada em m/z 597,1065 Da $[M - H]^-$ (Figura 103), compatível com a fórmula molecular $C_{32}H_{21}O_{12}$ (erro de 4,5 ppm, valor calculado 537,1038 Da).

Figura 103. Espectro de massas de alta resolução do composto Vp – 10



Fonte: Própria do autor.

O espectro de RMN 1H (Figura 104, página 199), obtido em $DMSO-d_6$, apresentou absorções entre δ_H 6,18 a 8,09, característicos de hidrogênios aromáticos (GOMES et al., 2011), além de dois sinais em δ_H 3,7 (região de hidrogênios de metoxilas). O valor dessas absorções, juntamente com o seu aspecto físico e o relato de isolamento de biflavonoides nesta espécie, sugeriu que VP – 9 poderia pertencer a esta classe de metabólito secundário (PINTO et al., 2010). A presença de dois singletos de hidroxilas queladas em δ_H 12,72 e 12,86 reforçaram essa proposta (Figura 105, página 200).

Assim como em Vp – 9, foram observadas absorções em δ_H 6,18 (d, $J=2,0$ Hz, 1H) e 6,34 (d, $J=1,6$ Hz, 1H) (Figura 106, página 201), ambos com acoplamento *meta*, correspondentes aos hidrogênios H-6 e H-8, respectivamente, indicando que o anel A I do flavonoide encontrava-se substituído nas posições 5 e 7. Observou-se ainda um duplo dubleto em δ_H 7,99 (dd, $J=2,4$; 8,4, 1H), acoplado *orto* com um dubleto em δ_H 7,03 (d, $J=8,8$, 1H) e *meta* com um dubleto em δ_H 8,09 (d, $J=2,0$, 1H) (Figura 106, página 201), condizentes com os

hidrogênios H-6', H-5' e H-2', respectivamente, do anel B I de um flavonoide com sistema ABX.

Ainda no espectro de RMN ^1H observou-se um singlete em δ_{H} 6,22 que foi atribuído ao H-6'' do anel A II, reforçando a possibilidade de união C-3' e C-8''. A presença de dois dubletos em δ_{H} 7,70 (d, $J=8,8$, 2H) e 6,64 (d, $J=8,8$, 2H) (Figura 106, página 201), acoplado *orto* e integrando para 2H cada, estão condizentes com H-2'''/H-6''' e H-3'''/H-5''', respectivamente, do anel B II de um flavonoide com sistema AA' BB'.

A ausência de dois singletos em δ_{H} 6,76 e 6,68 como observados em Vp – 9 e a presença de dois singletos em δ_{H} 3,79 e 3,75 (Figura 107, página 202), integrando para 3H cada, levaram a sugerir que as posições H – 3 e H – 3'' dos anéis C I e C II estariam substituídas por – OCH₃, como observado no biflavonoide 3', 8''-biisocampferídeo (PINTO et al., 2010).

No espectro de RMN ^{13}C (Figura 108, página 203), utilizando a técnica de APT, foi possível identificar 24 sinais equivalentes à 32 átomos de carbono, sendo 15 sinais correspondentes à 20 carbonos não hidrogenados, 8 sinais equivalentes à 10 carbonos metínicos e 1 absorção equivalente a 2 carbonos oximetílicos.

Os sinais observados em δ_{C} 119,0 e 103,1 (Figura 109, página 204) evidenciaram que a substância se tratava de um biflavonoide com a união de C-3' (anel B I) com C-8'' (anel A II).

A sugestão do anel A II pentassubstituído foi fortalecida pela presença dos sinais δ_{C} 156,4 (C-5''), 164,2 (C-7'') e 103,1 (C-8'') (Figura 110, página 205) e ausência de um sinal em $\sim 93,8$. A proposta da existência do sistema AA'BB' foi sugerida mediante análise da amplitude dos sinais δ_{C} 129,8 e 115,3 (Figura 109, página 204), referentes aos carbonos C-2'''/C-6''' e C-3'''/C-5''', respectivamente.

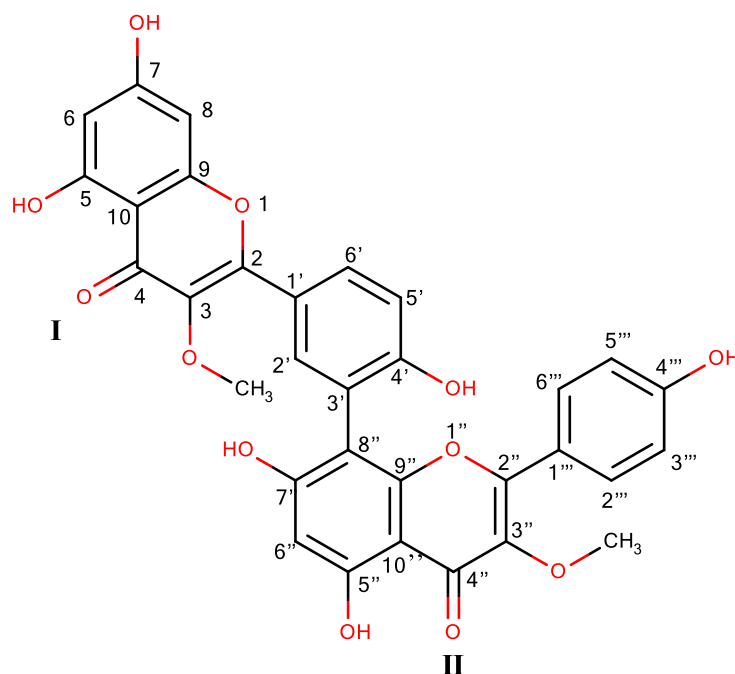
As absorções em δ_{C} 132,9, 117,3 e 128,9 (Figura 109, página 204) evidenciaram a presença de um sistema ABX, condizentes com os carbonos monohidrogenados C – 2', C – 5' e C – 6' do anel B I, respectivamente.

A ausência dos sinais de carbonos metínicos como observados em Vp – 9 (δ_{C} 102,0 (C – 3) e 102,4 (C – 3'')) e a presença em Vp – 10 de um deslocamento químico com intensidade para dois carbonos oximetílicos em δ_{C} 59,7, sugeriram a inserção desses grupos em C – 3 e C – 3'', respectivamente (Figura 111, página 206) (PINTO et al., 2010).

Dessa forma, os dados obtidos (RMN ^1H , ^{13}C e EMAR) foram comparados com dados de RMN ^1H e ^{13}C da literatura (Tabela 16, página 196), sendo possível afirmar que o composto

se trata do biflavonoide 3', 8''-biisocampferídeo (Figura 112), isolado pela segunda vez na espécie (PINTO et al., 2010).

Figura 112. Composto Vp – 10 (3', 8''-biisocampferídeo)



Fonte: Própria do autor.

O 3', 8''-biisocampferídeo foi um composto isolado pela primeira vez na literatura em 2010 e avaliado a sua citotoxicidade em células de glioblastoma humano (GL-15), apresentando uma concentração efetiva inferior ao temozolomida que é um agente aprovado para o tratamento de doenças malignas de alto grau de gliomas há mais de 30 anos (PINTO et al., 2010).

Tabela 16. Dados de RMN ^1H e ^{13}C de Vp – 10 (δ , DMSO- d_6 , 400MHz e 100 MHz) em comparação Vp – 9 (amentoflavona) δ , DMSO- d_6 , 500MHz e 150 MHz e com 3', 8''-biisocampferídeo (δ , CD_3OD , 500 e 125 MHz) (PINTO et al., 2010)

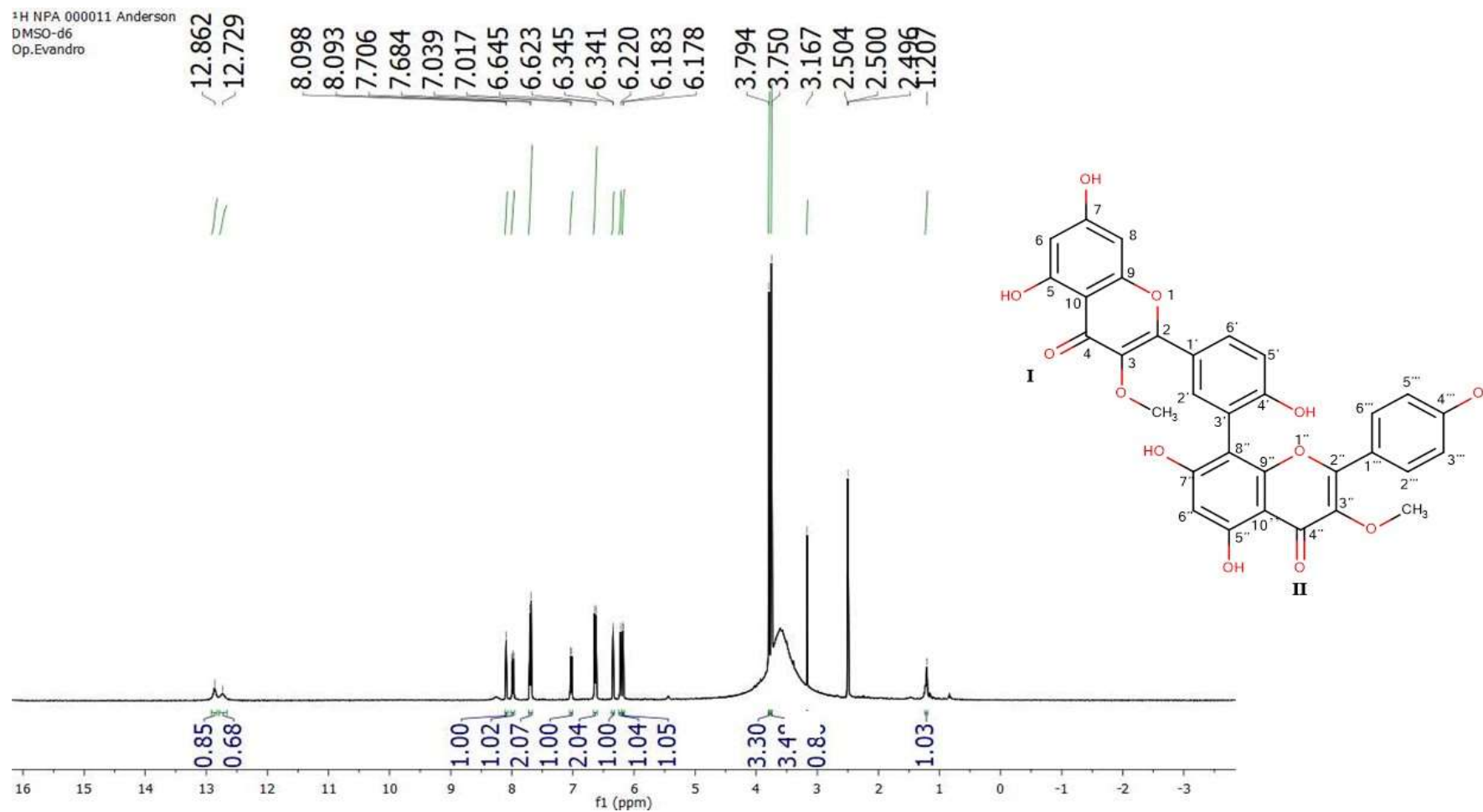
		Amentoflavona		3', 8''-biisocampferídeo		
Vp – 10		Vp – 9 (Amentoflavona)		3', 8''-biisocampferídeo		
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
2	-	161,2	-	164,5	-	158,1
3	-	137,4	6,76 (s, 1H)	102,0	-	139,4
4	-	177,8	-	181,6	-	180,0
5	-	156,4	-	162,9	-	162,9
6	6,18 (d, $J=2,0$, 1H)	98,6	6,15 (d, $J=2,0$, 1H)	98,8	6,14 (d, $J=2,0$)	99,8
7	-	164,2	-	164,1	-	166,2

8	6,34 (d, $J=1,6$, 1H)	93,8	6,30 (d, $J=2,0$, 1H)	94,0	6,19 (d, $J=2,0$ Hz)	94,8
9	-	156,0	-	157,3	-	158,4
10	-	104,1	-	103,6	-	105,7
1'	-	120,9	-	118,1	-	122,7
2'	8,09 (d, $J=2,0$, 1H)	132,9	8,24 (d, $J=2,5$, 1H)	131,4	8,16 (d, $J=2,0$ Hz)	124,6
3'	-	119,0	-	123,1	-	121,9
4'	-	160,2	-	161,4	-	161,1
5'	7,03 (d, $J=8,8$, 1H)	117,3	6,92 (d, $J=9,0$, 1H)	119,1	7,08 (d, $J=9,0$ Hz)	118,4
6'	7,99 (dd, $J=2,4$; 8,4, 1H)	128,9	7,90 (dd, $J=2,5$; 8,5, 1H)	126,6	8,08 (dd, $J=2,0$; 9,0 Hz)	130,4
2''	-	154,8	-	164,5	-	157,2
3''	6,68 (s, 1H)	137,3	6,68 (s, 1H)	102,4	-	139,3
4''	-	177,8	-	181,6	-	179,9
5''	-	156,4	-	160,5	-	162,1
6''	6,22 (s, 1H)	100,1	6,05 (s, 1H)	101,4	6,31 (s)	101,4
7''	-	164,2	-	164,0	-	167,5
8''	-	103,1	-	106,7	-	106,8
9''	-	153,7	-	154,7	-	155,6
10''	-	104,1	-	101,9	-	105,2
1'''	-	120,9	-	121,7	-	122,6
2'''	7,70 (d, $J=8,8$, 2H)	129,8	7,66 (d, $J=8,5$, 1H)	128,1	7,78 (d, $J=8,0$ Hz)	131,3
3'''	6,64 (d, $J=8,8$, 2H)	115,3	6,57 (d, $J=9,0$, 1H)	115,5	6,64 (d, $J=8,0$ Hz)	116,3
4'''	-	159,8	-	160,6	-	161,4
5'''	6,64 (d, $J=9,0$, 2H)	115,3	6,57 (d, $J=9,0$, 1H)	115,5	6,65 (d, $J=8,0$ Hz)	116,3

6'''	7,70 (d, $J=8,5$, 2H)	129,8	7,66 (d, $J=8,5$, 1H)	128,1	7,78 (d, $J=8,0$ Hz)	131,3
3'-OCH₃	3,79 (s, 3H)	59,7	-	-	3,73 (s)	60,5
3''-OCH₃	3,75 (s, 3H)	59,7	-	-	3,78 (s)	60,6
5-OH	12,72	-	13,04	-	12,74	-
5-OH''	12,86	-	13,17	-	12,86	-

Fonte: Própria do autor.

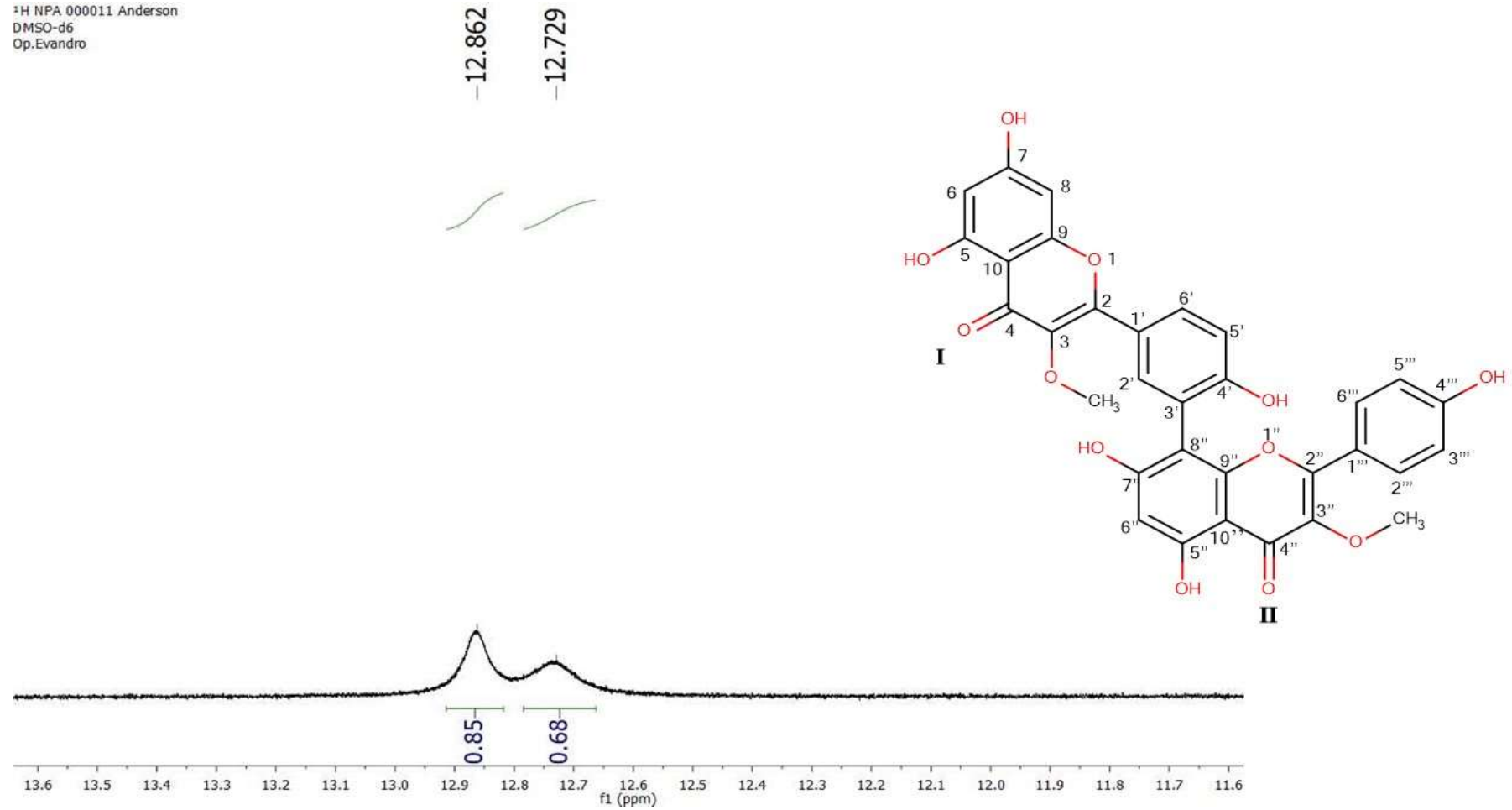
Figura 104. Espectro de RMN ^1H de Vp – 10 (δ , DMSO- d_6 , 400 MHz)



Fonte: Própria do autor.

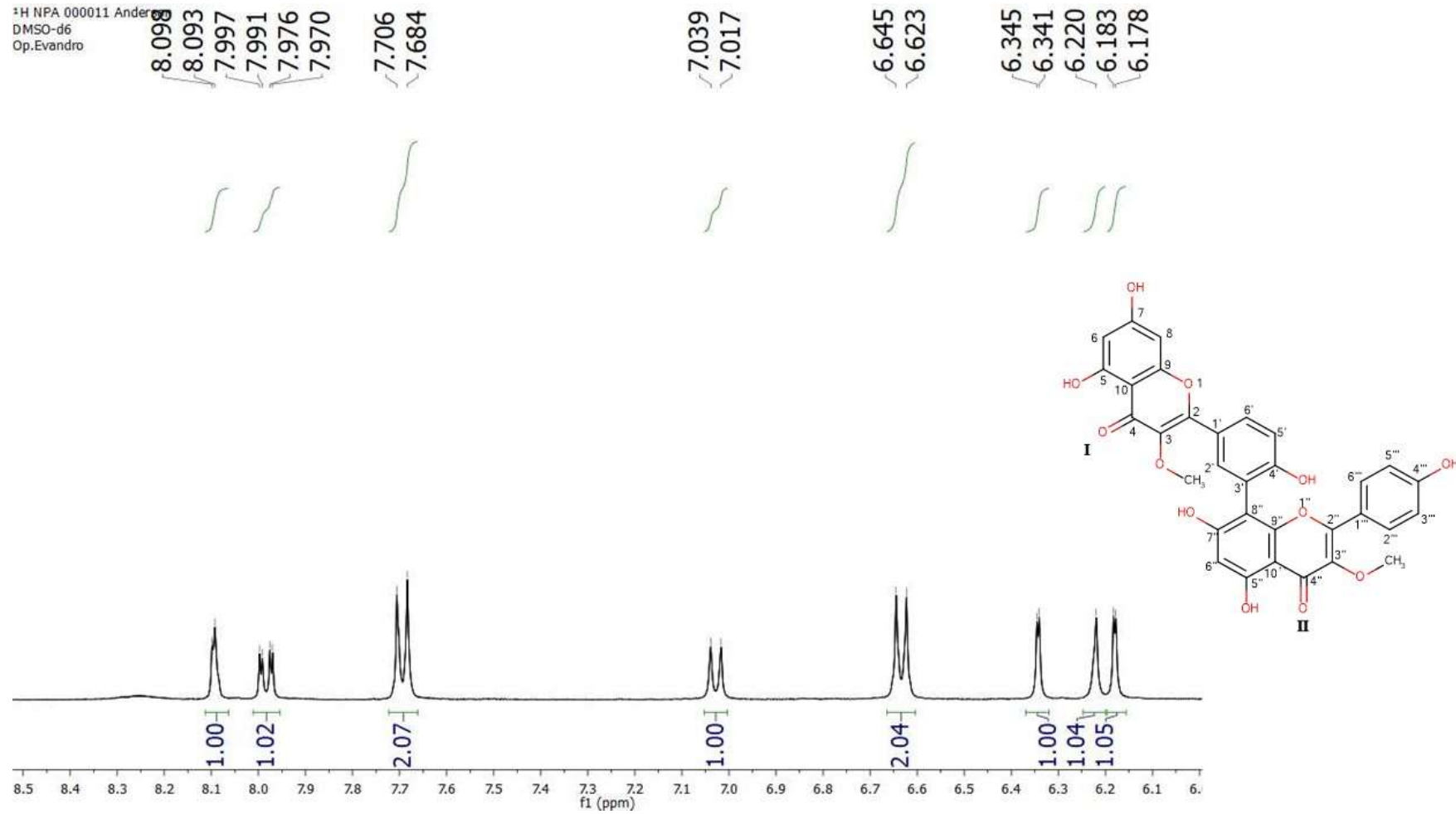
Figura 105. Primeira expansão do espectro de RMN ^1H de Vp – 10 (δ , DMSO- d_6 , 400 MHz)

^1H NPA 000011 Anderson
DMSO- d_6
Op.Evandro



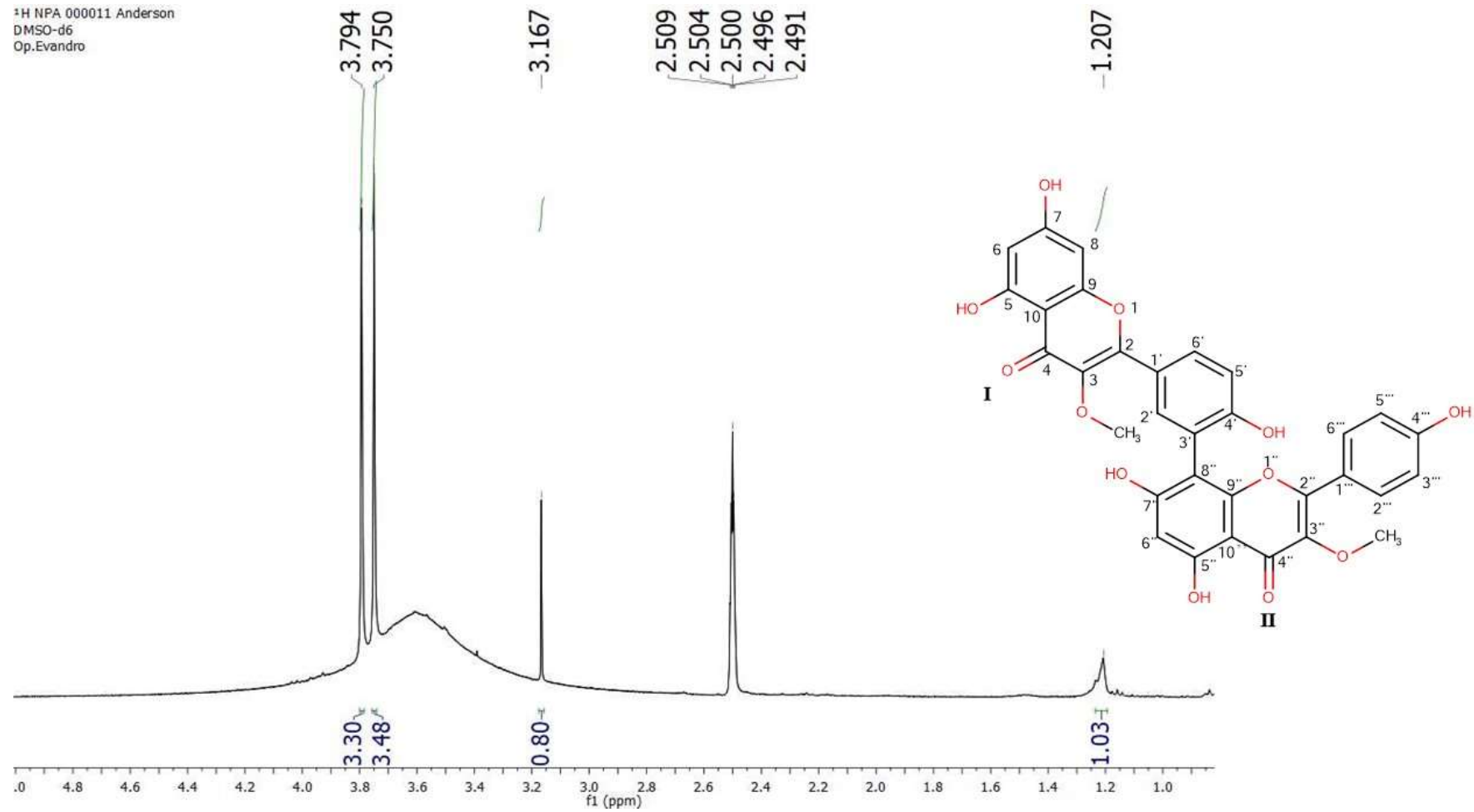
Fonte: Própria do autor.

Figura 106. Segunda expansão do espectro de RMN ^1H de Vp – 10 (δ , DMSO- d_6 , 400 MHz)



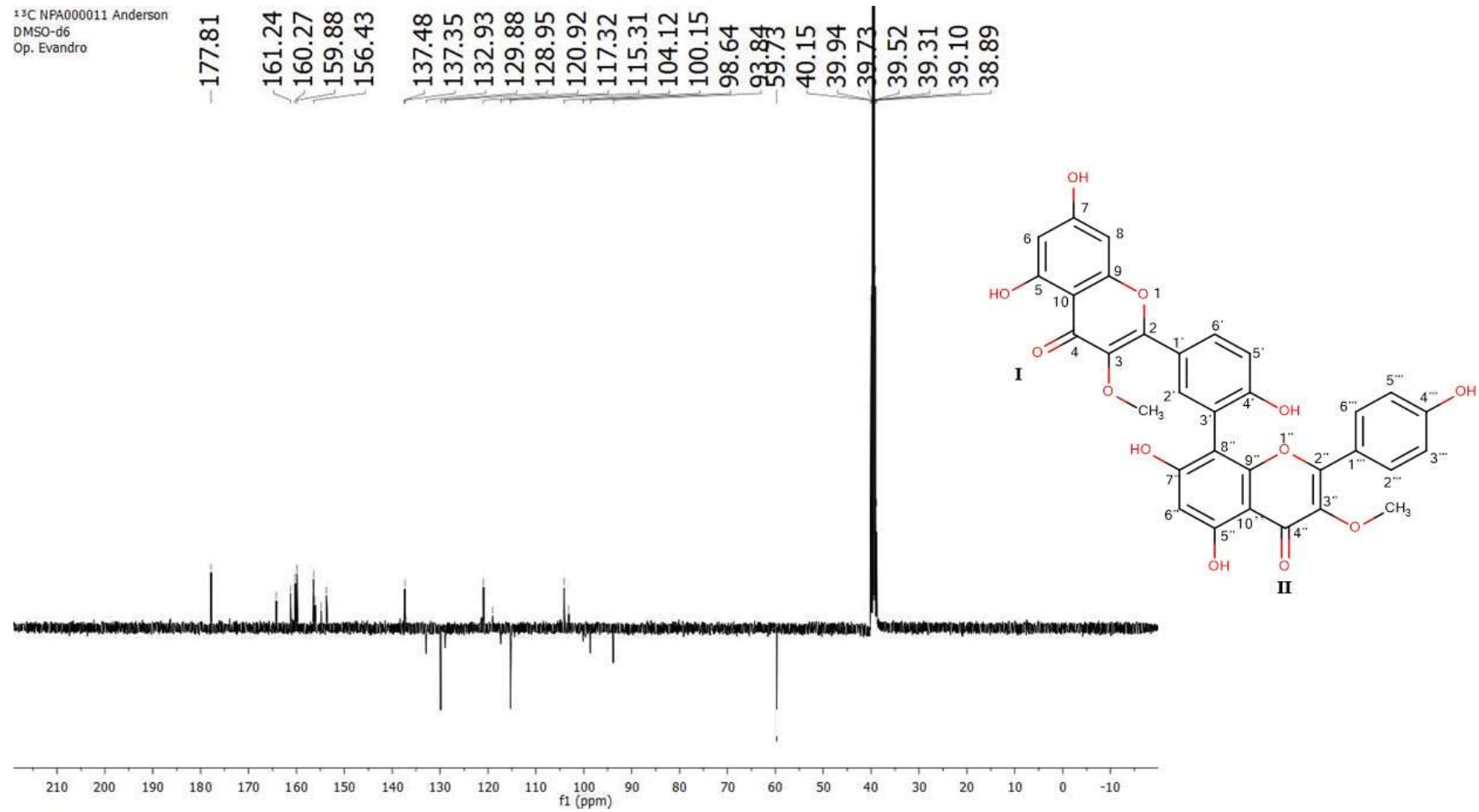
Fonte: Própria do autor.

Figura 107. Terceira expansão do espectro de RMN ^1H de Vp – 10 (δ , DMSO-d_6 , 400 MHz)



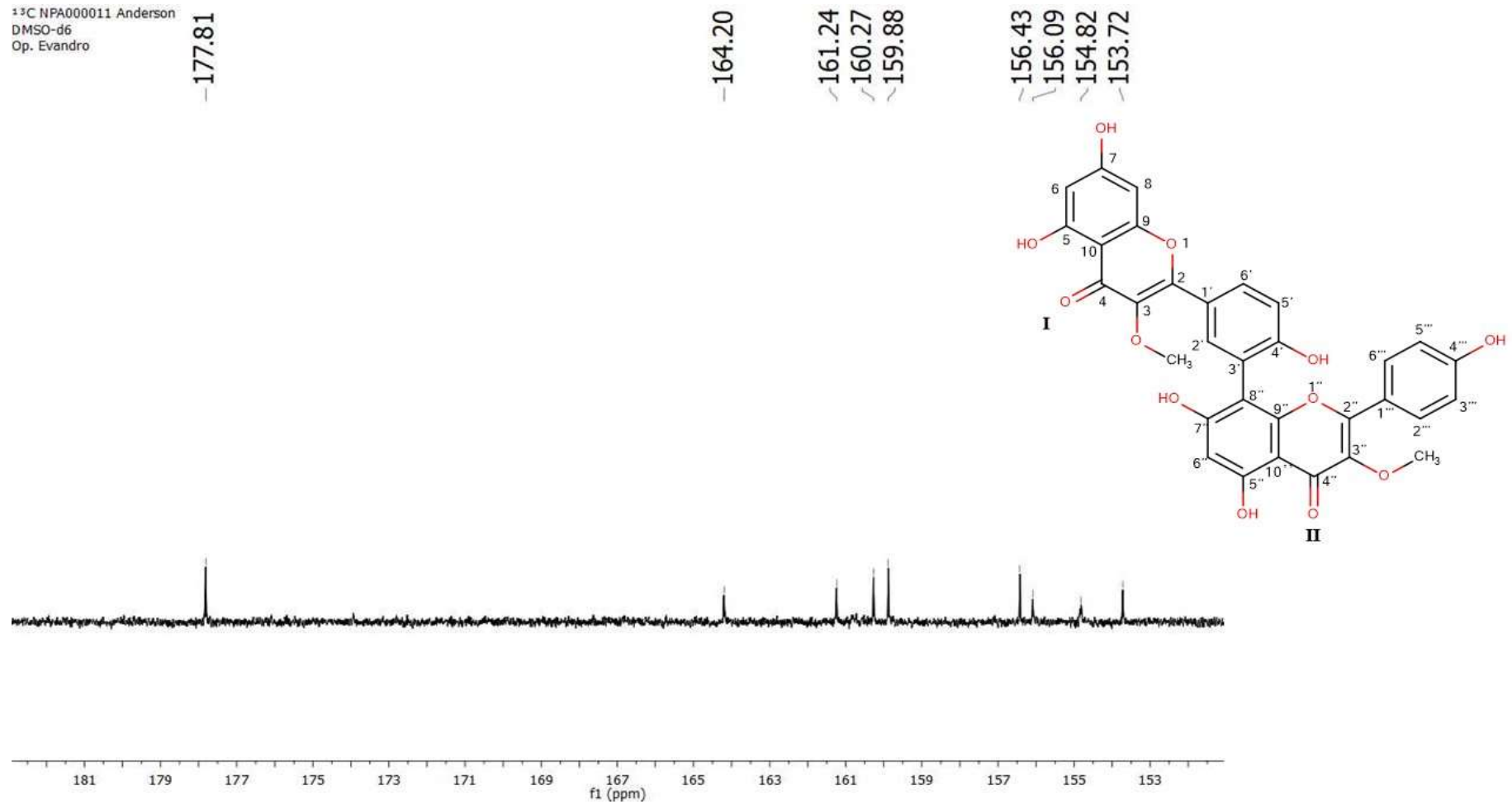
Fonte: Própria do autor.

Figura 108. Espectro de RMN ^{13}C de Vp – 10 (δ , DMSO- d_6 , 100 MHz)



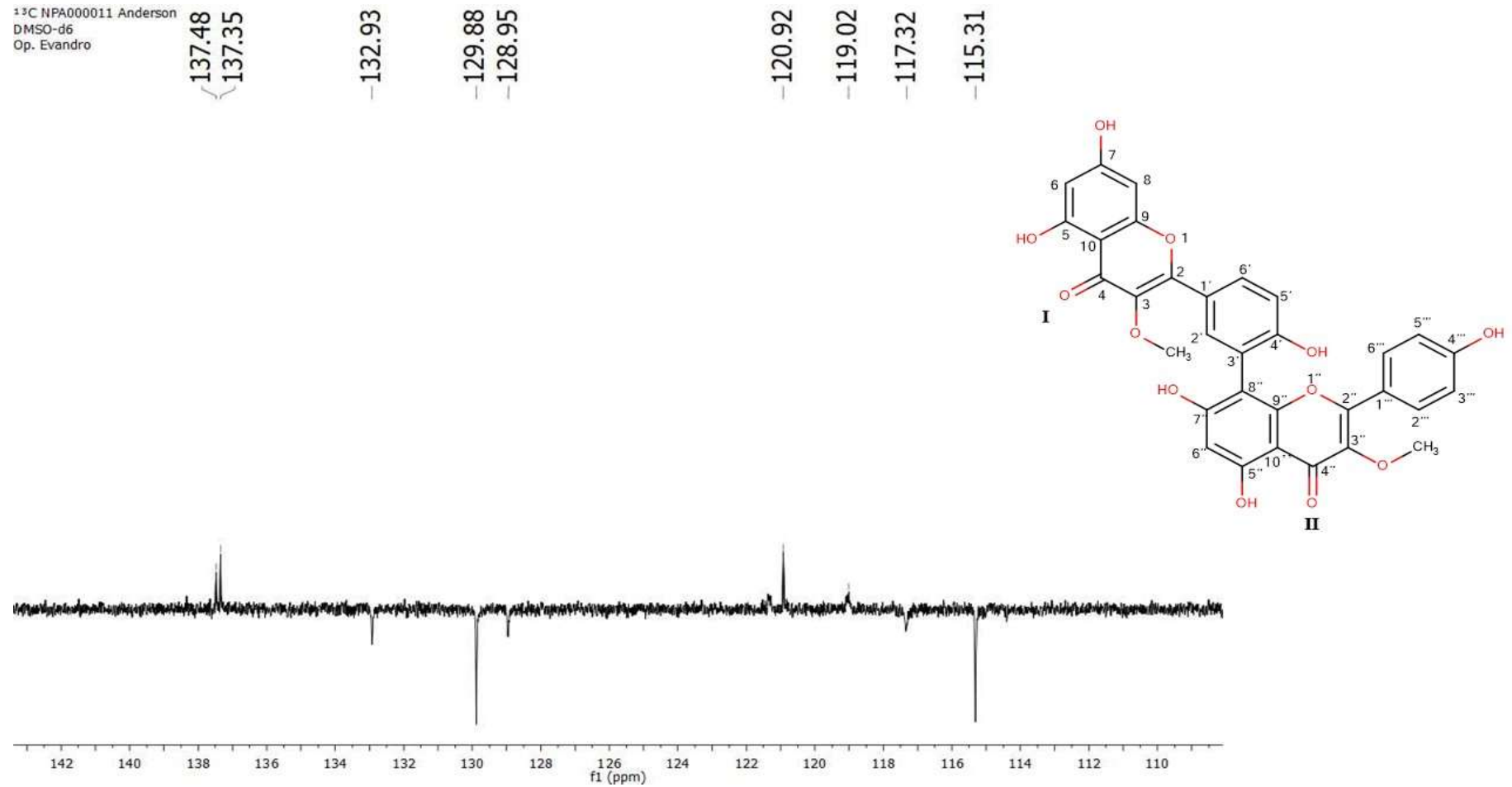
Fonte: Própria do autor.

Figura 109. Primeira expansão do espectro de RMN ^{13}C de Vp – 10 (δ , DMSO- d_6 , 100 MHz)



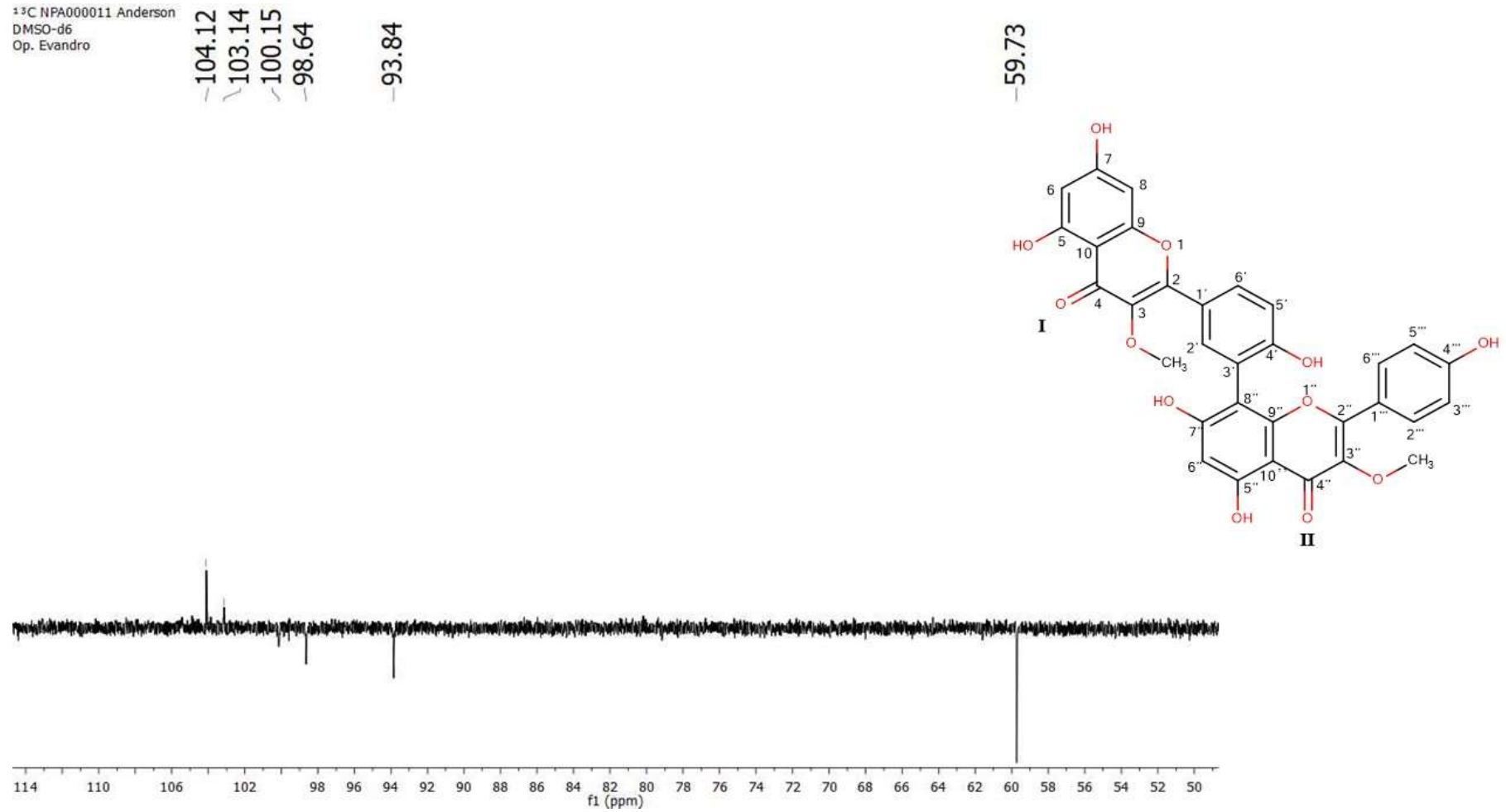
Fonte: Própria do autor.

Figura 110. Segunda expansão do espectro de RMN ^{13}C de Vp – 10 (δ , DMSO- d_6 , 100 MHz)



Fonte: Própria do autor.

Figura 111. Terceira expansão do espectro de RMN ^{13}C de Vp – 10 (δ , DMSO- d_6 , 100 MHz)



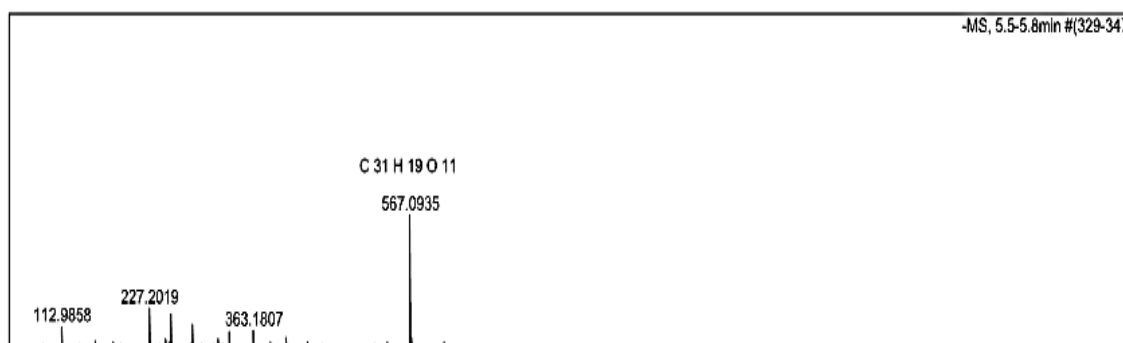
Fonte: Própria do autor.

5.1.2.11 Identificação estrutural de Vp – 11

O composto Vp – 11 (7,2 mg) foi isolado a partir da fase acetato de etila na forma de um sólido amorfo amarelo por CLAE em um $T_R=56,8$ min e apresentando absorções no espectro de UV-Visível λ/nm 198, 268 e 344 e P.F. 338 – 340 °C. Seu espectro de IR registrou bandas em 3448 cm^{-1} , característico de deformação axial de hidroxilas (O – H) e em 1640 cm^{-1} , típicos de estiramento de carbonila (C = O) (Figura 113).

O EMAR do composto Vp – 11 apresentou um íon da molécula desprotonada em m/z 567,0935 Da $[M - H]^-$ (Figura 114), compatível com a fórmula molecular $C_{31}H_{19}O_{11}$ (erro de 0,4 ppm, valor calculado 537,1038 Da).

Figura 114. Espectro de massas de alta resolução do composto Vp – 11



Fonte: Própria do autor.

O espectro de RMN 1H (Figura 115, página 213), obtido em $DMSO-d_6$, apresentou absorções entre δ_H 6,17 a 8,09, característicos de hidrogênios aromáticos (GOMES et al., 2011) e um sinal em δ_H 3,7 (região de hidrogênio de metoxila). O valor dessas absorções, juntamente com o seu aspecto físico e o relato de isolamento de biflavonoides nesta espécie, sugeriu que VP – 11 poderia pertencer a esta classe de metabólito secundário (PINTO et al., 2010).

A presença de dois singletos foi observada em δ_H 12,72 e 13,12 (Figura 230, página 210), sendo característicos de hidroxilas queladas e, de dois dubletos em δ_H 6,17 (d, $J = 2,0$ Hz, H-6) e 6,30 (d, $J = 2,0$ Hz, H-8) (Figura 116, página 214) indicando que o anel A I de um flavonoide estava substituído nas posições 5 e 7. Um duplo dubleto em δ_H 8,01 (dd, $J = 8,8; 2,4$ Hz, H-6') acoplado *orto* com um dubleto em δ_H 7,07 (d, $J = 8,8$ Hz, H-5') e *meta* com δ_H 8,07 (H-2', d, $J = 2,4$ Hz, 1H, H-2') (Figura 117, página 215) indicaram um sistema ABX do anel B I do flavonoide (FERNANDES et al., 2018).

Ainda no espectro de RMN ^1H foi observado um singlete em δ_{H} 6,23 (s, H-6''), compatível com a união C-3' e C-8'' e dois dubletos em δ_{H} 7,62 (d, $J = 8,8$ Hz, H-2'''/H-6''') e 6,66 (d, $J = 8,8$ Hz, H-3'''/H-5'''), sugerindo a existência de um sistema AA'BB' do anel B II (Figuras 130 e 131, páginas 231 e 232). Um singlete em δ_{H} 3.75 (Figura 118, página 216) foi atribuído a hidrogênios metoxílicos na posição C-3'' do anel C II.

O espectro de RMN ^{13}C (Figura 119, página 217) e suas expansões (Figuras 120, 121 e 122, páginas 218-220), utilizando a técnica APT, revelaram absorções que alinhadas aos mapas de contorno HMQC (Figuras 123 e 124, páginas 221 e 222) e HMBC (Figuras 125 e 126, páginas 223 e 224), permitiram a identificação e confirmação dos substituintes de Vp – 11.

Assim, no espectro de RMN ^{13}C (Figura 119, página 217) foram observados 27 sinais equivalentes a 31 sinais de carbonos, sendo: 17 absorções equivalentes a 19 carbonos não hidrogenados, 9 sinais equivalentes a 11 carbonos metínicos e 1 sinal equivalente a um carbono oximetílico.

Os sinais observados em δ_{C} 121,1 e 105,4 (Figura 121, página 219) confirmaram a união de C – 3' com C – 8'' do biflavonoide (PINTO et al., 2010).

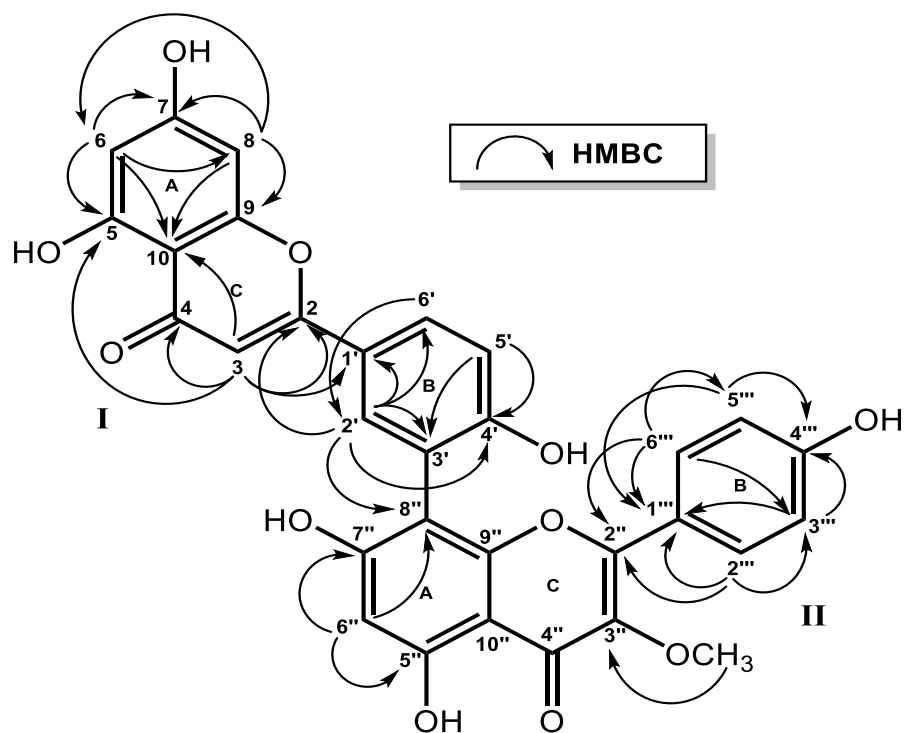
Além disso, ao contrário de Vp – 10, apenas uma correlação foi observada no mapa de contorno HMQC em 6,73 (H – 3)/ δ_{C} 102,5 (C – 3) (Figura 124, página 222), demonstrando a ausência de um metoxila em C – 3 do anel A I.

No espectro HMBC (Figura 125, página 223), as correlações de δ_{H} 6,73 (H – 3) com δ_{C} 163,2 (C – 2) e 181,8 (C – 4), δ_{C} 102,7 (C – 10) e 119,1 (C – 1') e de δ_{H} 8,07 (H – 2') com δ_{C} 163,2 (C – 2), 121,1 (C – 3'), 161,2 (C – 4'), 129,0 (C – 6') e δ_{C} 105,4 (C – 8''), confirmaram a substituição no anel B I.

Também, os mapas de contorno HMBC evidenciaram correlações de δ_{H} 6,23 (H – 6'') com δ_{C} 160,5 (C – 5''), δ_{C} 164,1 (C – 7'') e δ_{C} 105,4 (C – 8''), além de δ_{H} 7,62 (H – 2''') e 6,66 (H – 3''') com 128,1 (C – 6''') e 115,6 (H – 5''') (Figura 126, página 224), confirmando a inserção do grupo metoxi em C – 3'' do anel C II do biflavonoide.

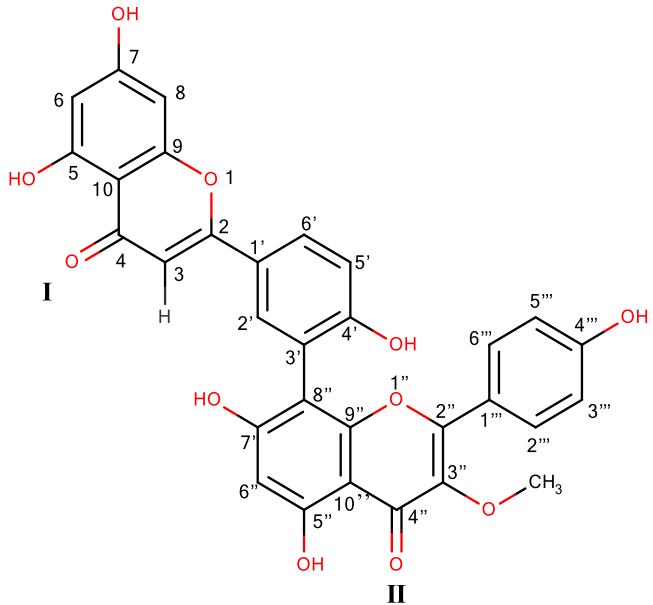
Assim, os dados obtidos (RMN ^1H , ^{13}C , HMQC, HMBC e EMAR) foram comparados com Vp – 9, Vp – 10 e dados da literatura (PINTO et al., 2010) e expressos na Tabela 17 (página 210), permitindo identificar Vp – 11 como 3'-apigenin-8''-isocampferídeo (Figura 127, página 209), novo biflavonoide relatado pela primeira vez na literatura.

Figura 127. Composto Vp – 11 (3'-apigenin-8''-isocampferídeo)



Fonte: Própria do autor.

Tabela 17. Dados de RMN ^1H e ^{13}C de Vp – 11 (δ , DMSO- d_6 , 400MHz e 100 MHz) em comparação com a Vp – 9 (amentoflavona) (δ , DMSO- d_6 , 500 e 125 MHz)

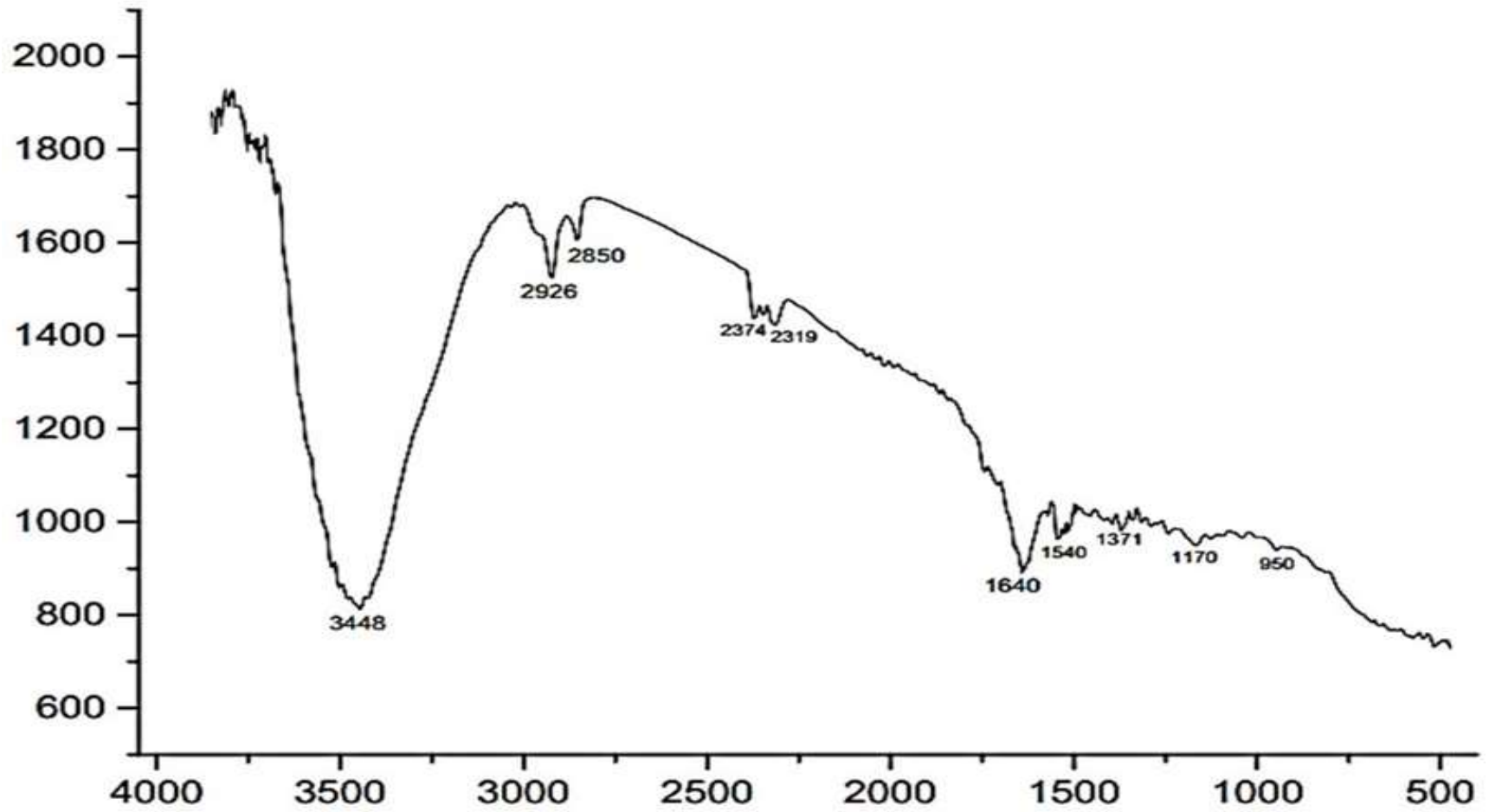


	Vp – 11			Vp – 9 (amentoflavona)	
	δ_{H}	δ_{C}	HMBC	δ_{H}	δ_{C}
2	-	163,2	-	-	164,5
3	6,73 (sl, 1H)	102,5	C-2, C-4, C-5, C-10 e C-1'	6,76 (s, 1H)	102,0
4	-	181,8	-	-	181,6
5	-	160,5	-	-	162,9
6	6,17 (d, $J=2,0$ Hz, 1H)	98,6	C-5, C-7, C-8 e C-10	6,15 (d, $J=2,0$, 1H)	98,8
7	-	164,1	-	-	164,1
8	6,30 (d, $J=2,0$ Hz, 1H)	93,8	C-6, C-7, C-9 e C-10	6,30 (d, $J=2,0$, 1H)	94,0
9	-	156,4	-	-	157,3
10	-	102,7	-	-	103,6
1'	-	119,1	-	-	118,1
2'	8,07 (d, $J=2,4$ Hz, 1H)	132,9	C-2, C-1', C-3', C-4', C-6' e C-8''	8,24 (d, $J=2,5$, 1H)	131,4
3'	-	121,1	-	-	123,1
4'	-	161,2	-	-	161,4
5'	7,07 (d, $J=8,8$ Hz, 1H)	117,2	C-4' e C-3'	6,92 (d, $J=9,0$, 1H)	119,1
6'	8,01 (dd, $J=8,8$; 2,4 Hz, 1H)	129,0	C-2'	7,90 (dd, $J=2,5$; 8,5, 1H)	126,6
2''	-	156,1	-	-	164,5
3''	-	137,5	-	-	102,4
4''	-	177,8	-	-	181,6

5''	-	160,5	-	-	160,5
6''	6,23 (s, 1H)	100,0	C-5'', C-7'' e C-8''	6,05 (s, 1H)	101,4
7''	-	164,1	-	-	164,0
8''	-	105,4	-	-	106,7
9''	-	154,5	-	-	154,7
10''	-	104,1	-	-	101,9
1'''	-	121,5	-	-	121,7
2'''	7,62 (d, $J=8,8$ Hz, 2H)	128,1	C-1''', C-3''', C-4''' e C-2''	7,66 (d, $J=8,5$, 1H)	128,1
3'''	6,66 (d, $J=9,2$ Hz, 2H)	115,6	C-1''' e C-4'''	6,57 (d, $J=9,0$, 1H)	115,5
4'''	-	160,8	-	-	160,6
5'''	6,66 (d, $J=9,2$ Hz, 2H)	115,6	C-1''' e C-4'''	6,57 (d, $J=9,0$, 1)H	115,5
6'''	7,62 (d, $J=8,8$ Hz, 2H)	128,1	C-1''' e C-3'''	7,66 (d, $J=8,5$, 1H)	128,1
3'-OCH ₃	-	-	-	-	-
3''-OCH ₃	3,75 (s, 3H)	59,7	C-3''	-	-
5-OH	12,7	-	-	13,04	-
5-OH''	13,1	-	-	13,17	-

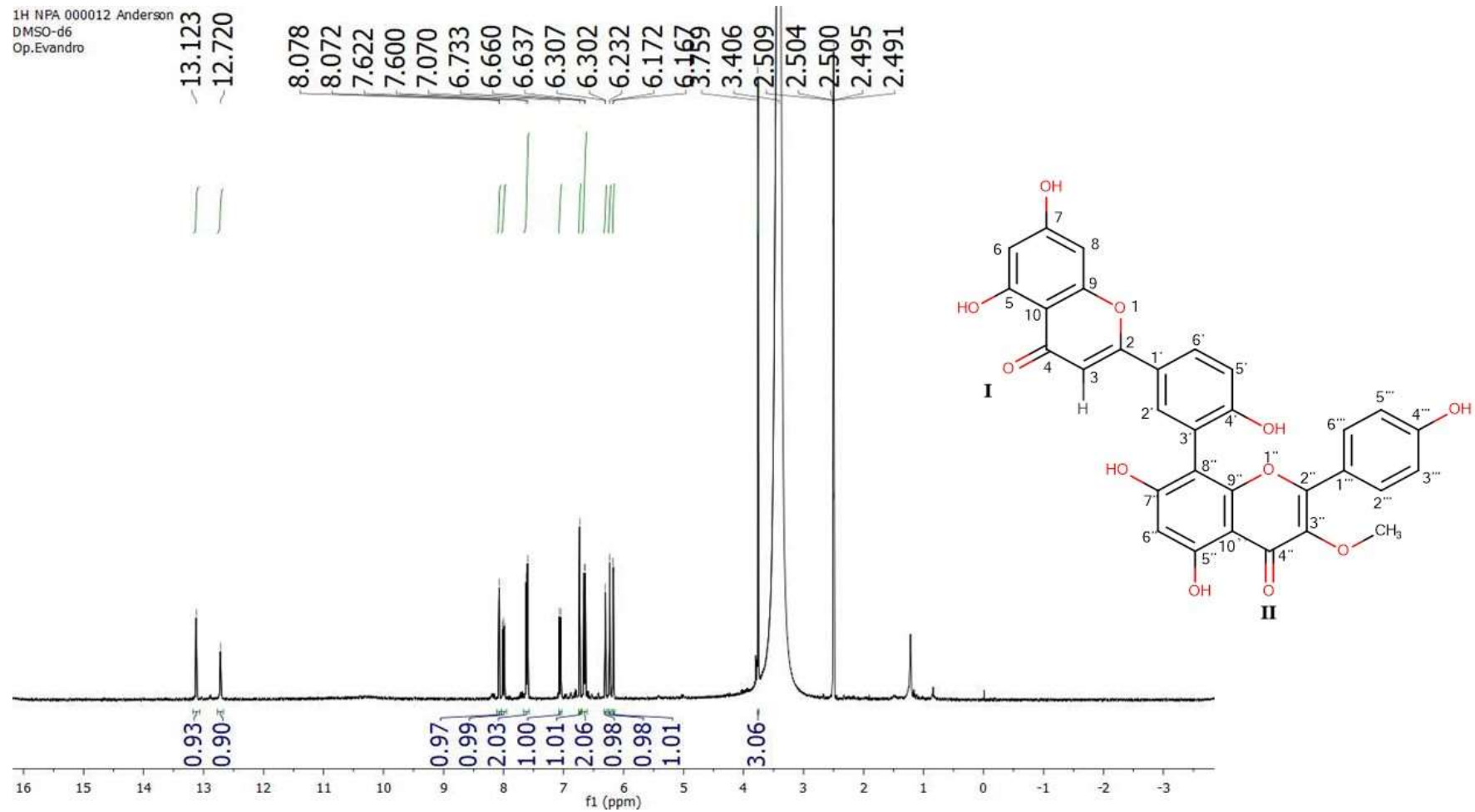
Fonte: Própria do autor.

Figura 112. Espectro de IV de Vp – 11 (pastilhas de KBr)



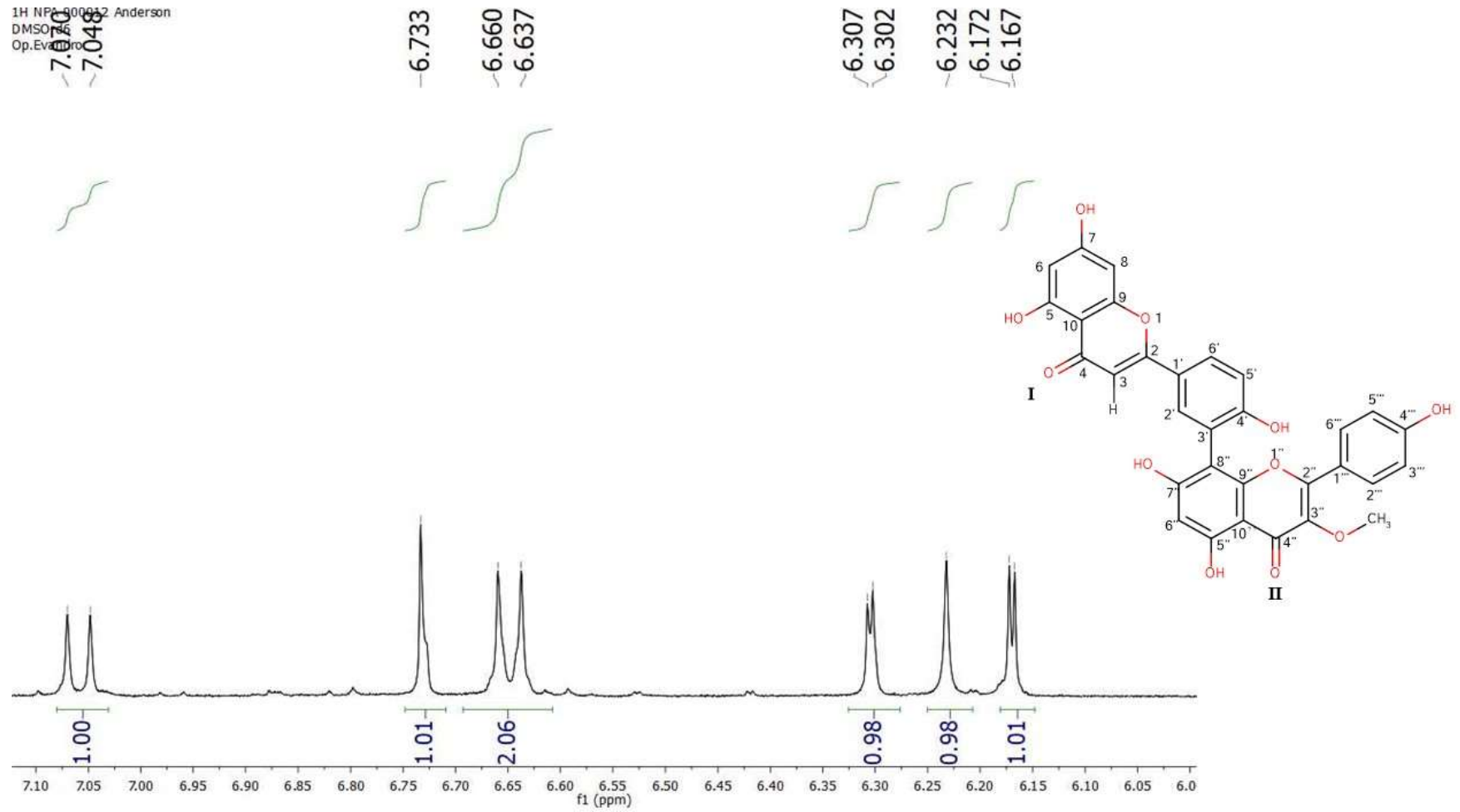
Fonte: Própria do autor.

Figura 115. Espectro de RMN ^1H de Vp – 11 (δ , DMSO- d_6 , 400 MHz)



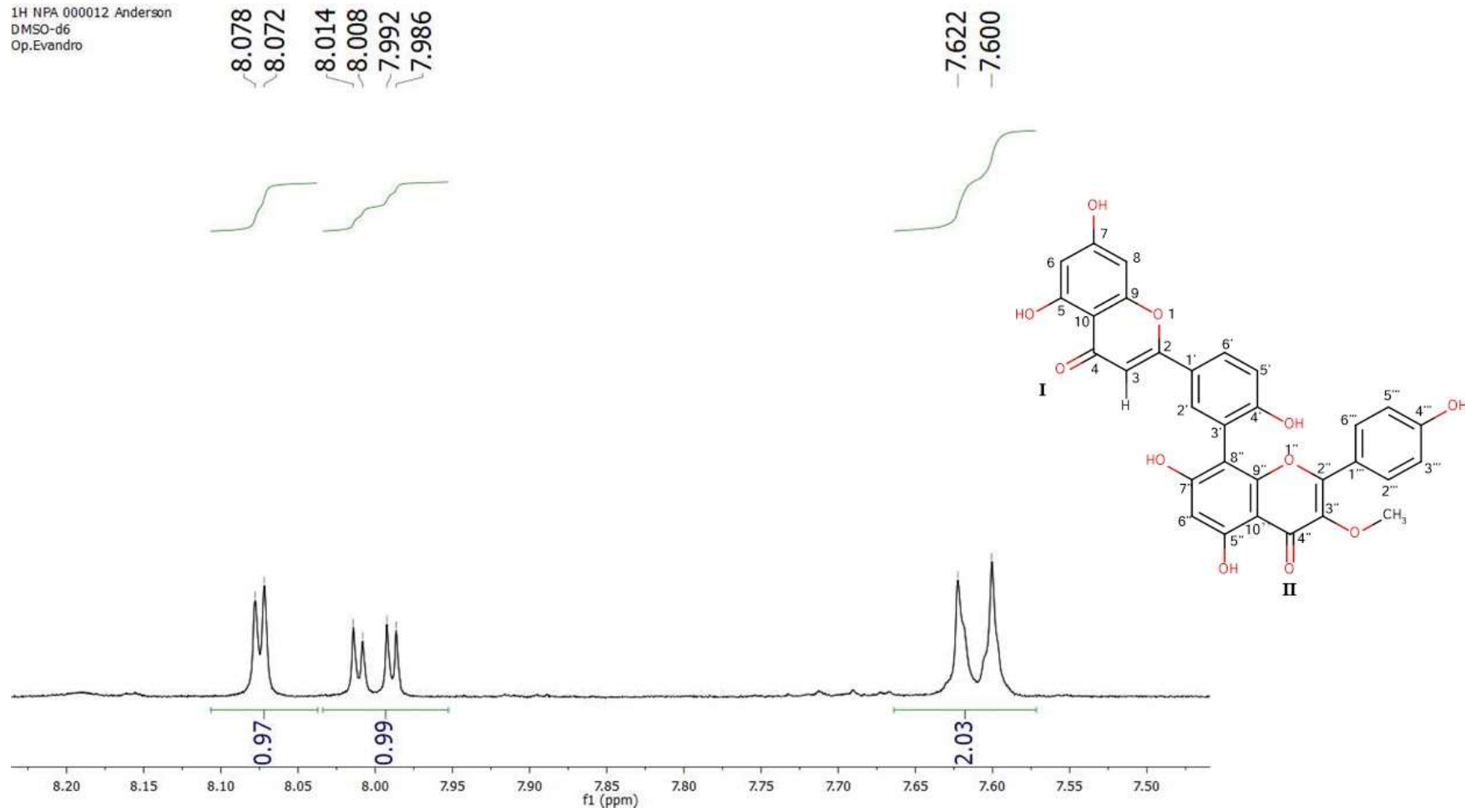
Fonte: Própria do autor.

Figura 116. Primeira expansão do espectro de RMN ^1H de Vp – 11 (δ , DMSO- d_6 , 400 MHz)



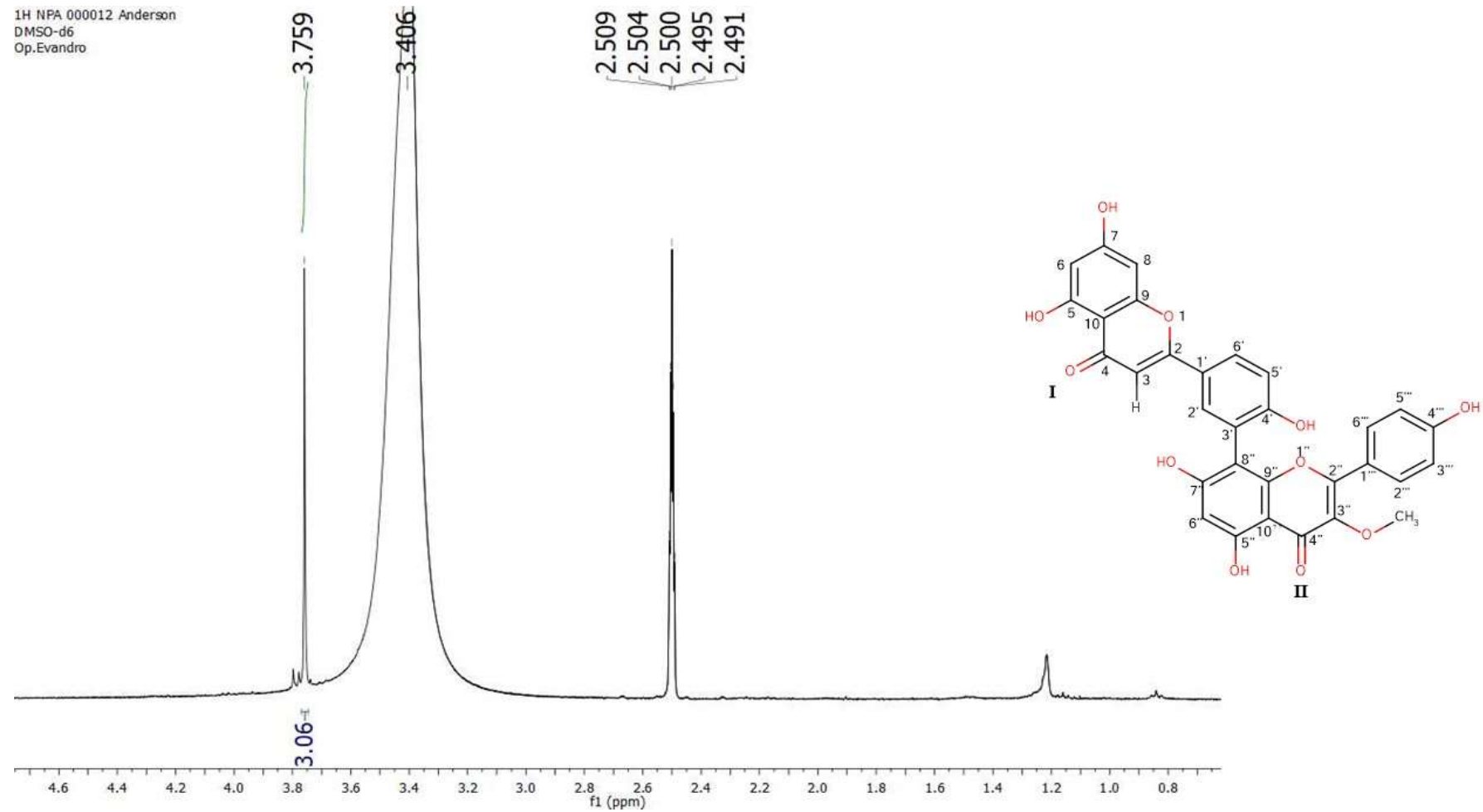
Fonte: Própria do autor.

Figura 117. Segunda expansão do espectro de RMN ^1H de Vp – 11 (δ , DMSO- d_6 , 400 MHz)



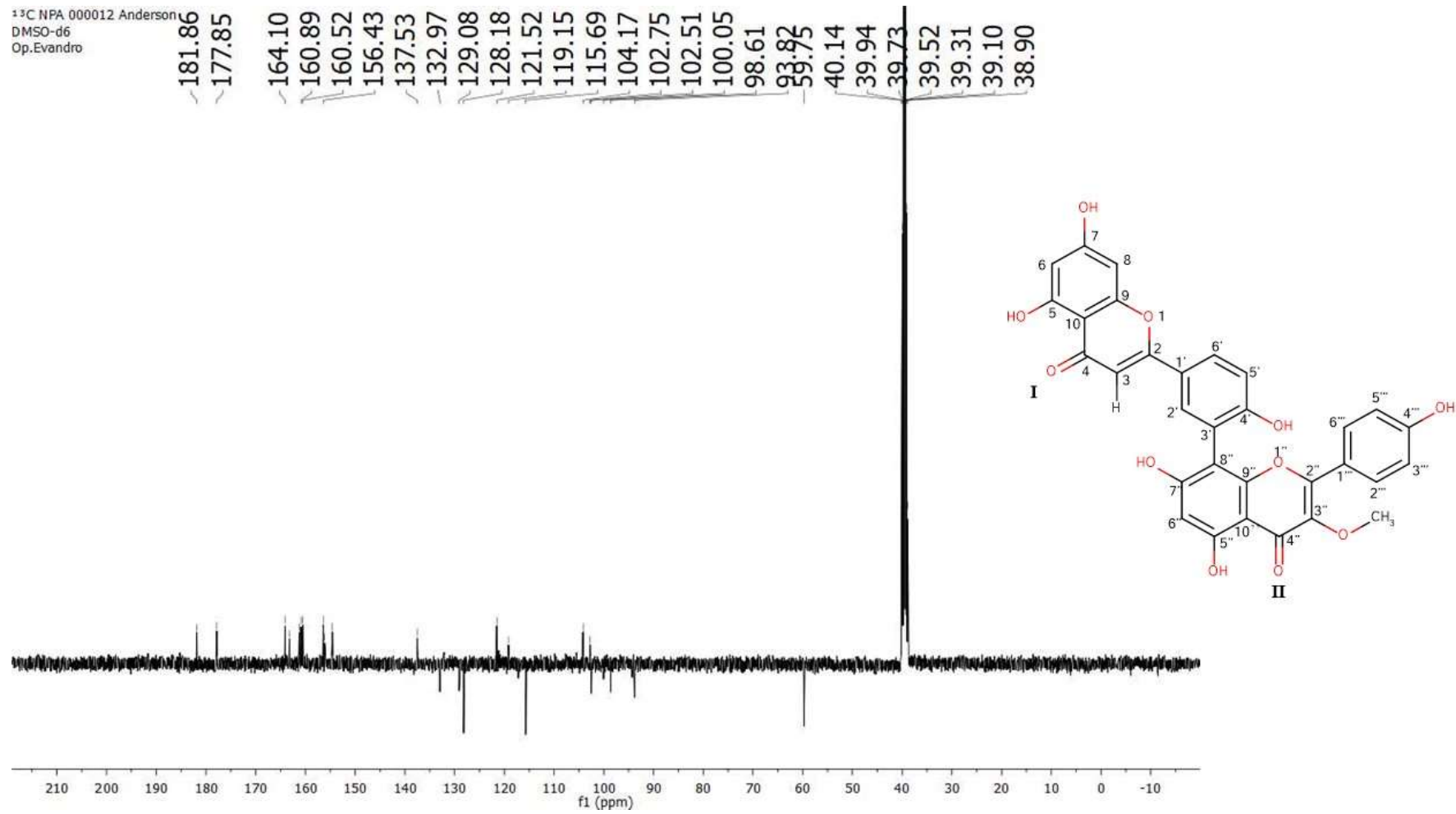
Fonte: Própria do autor.

Figura 118. Terceira expansão do espectro de RMN ^1H de Vp – 11 (δ , DMSO-d_6 , 400 MHz)



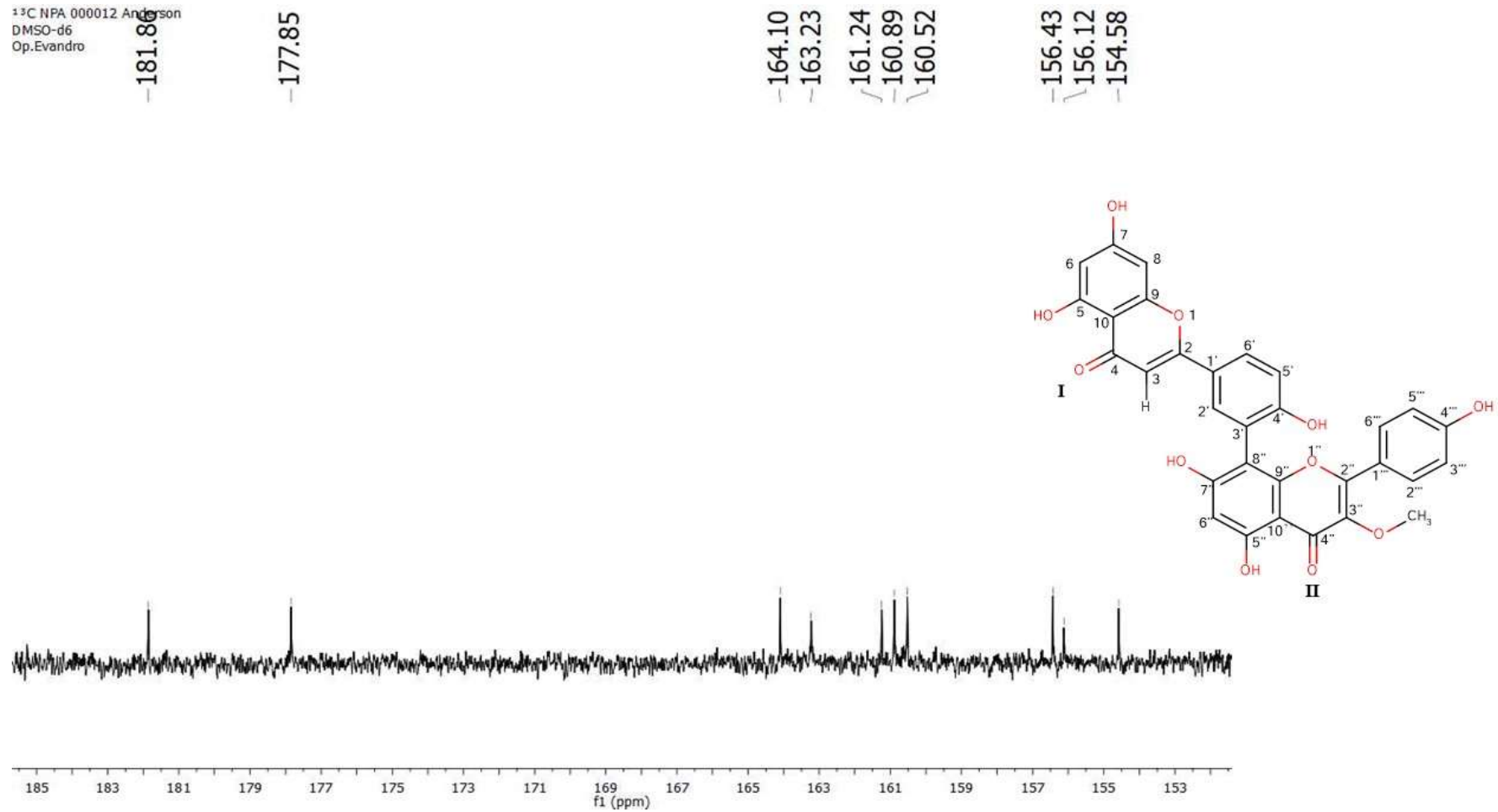
Fonte: Própria do autor.

Figura 119. Espectro de RMN ^{13}C de Vp – 11 (δ , DMSO- d_6 , 100 MHz)



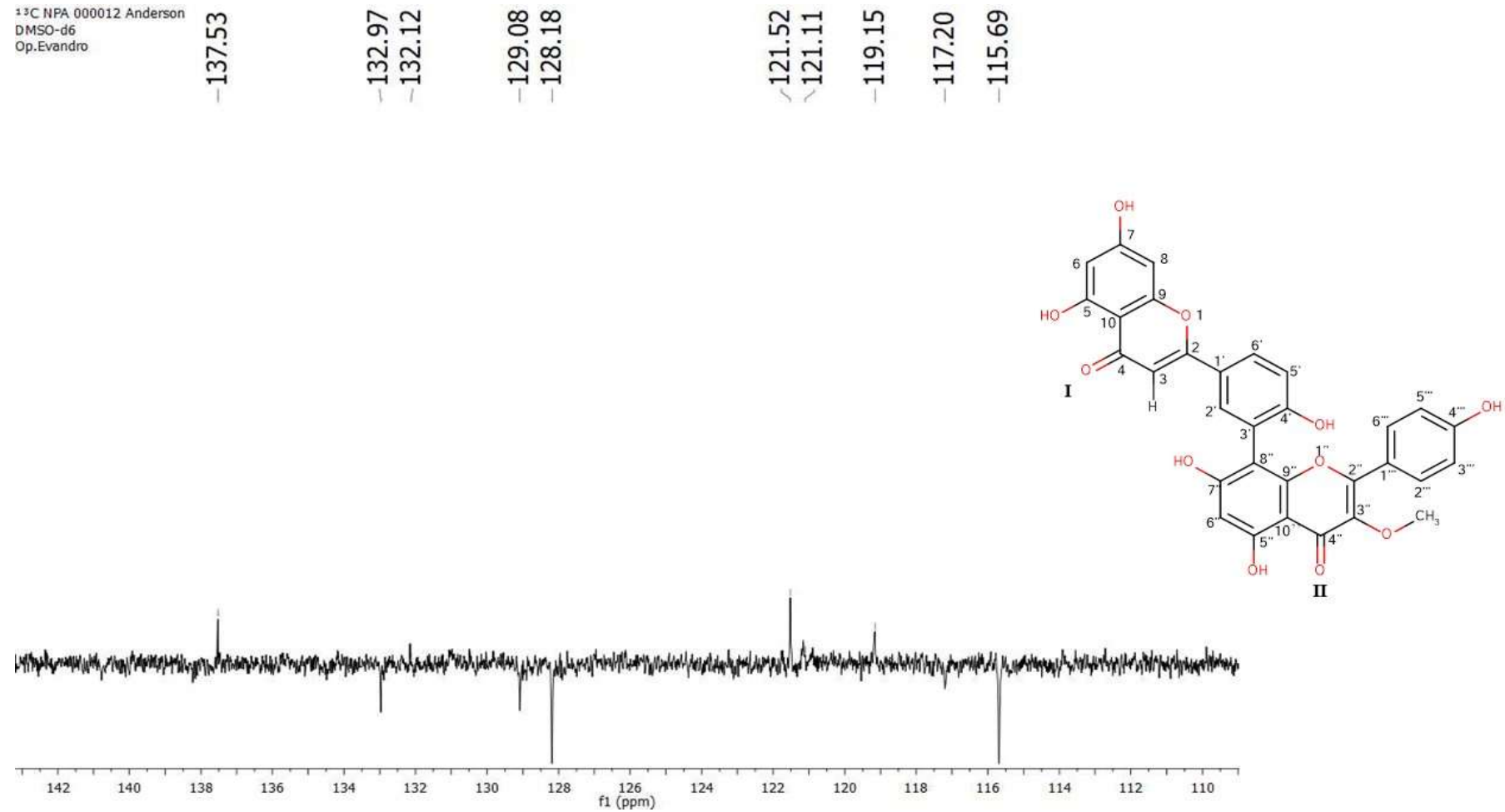
Fonte: Própria do autor.

Figura 120. Primeira expansão do espectro de RMN ^{13}C de Vp – 11 (δ , DMSO- d_6 , 100 MHz)



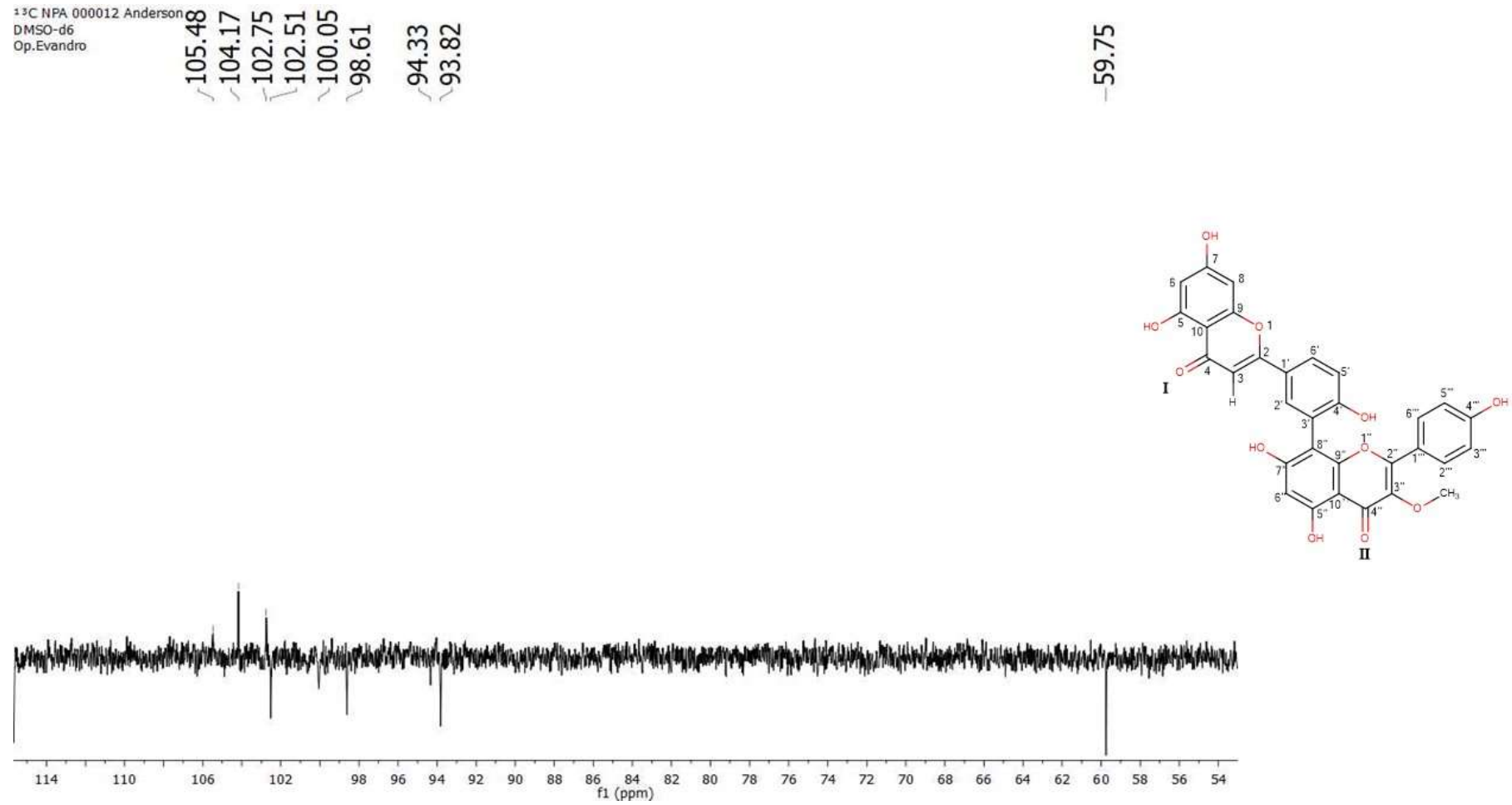
Fonte: Própria do autor.

Figura 121. Segunda expansão do espectro de RMN ^{13}C de Vp – 11 (δ , DMSO- d_6 , 100 MHz)



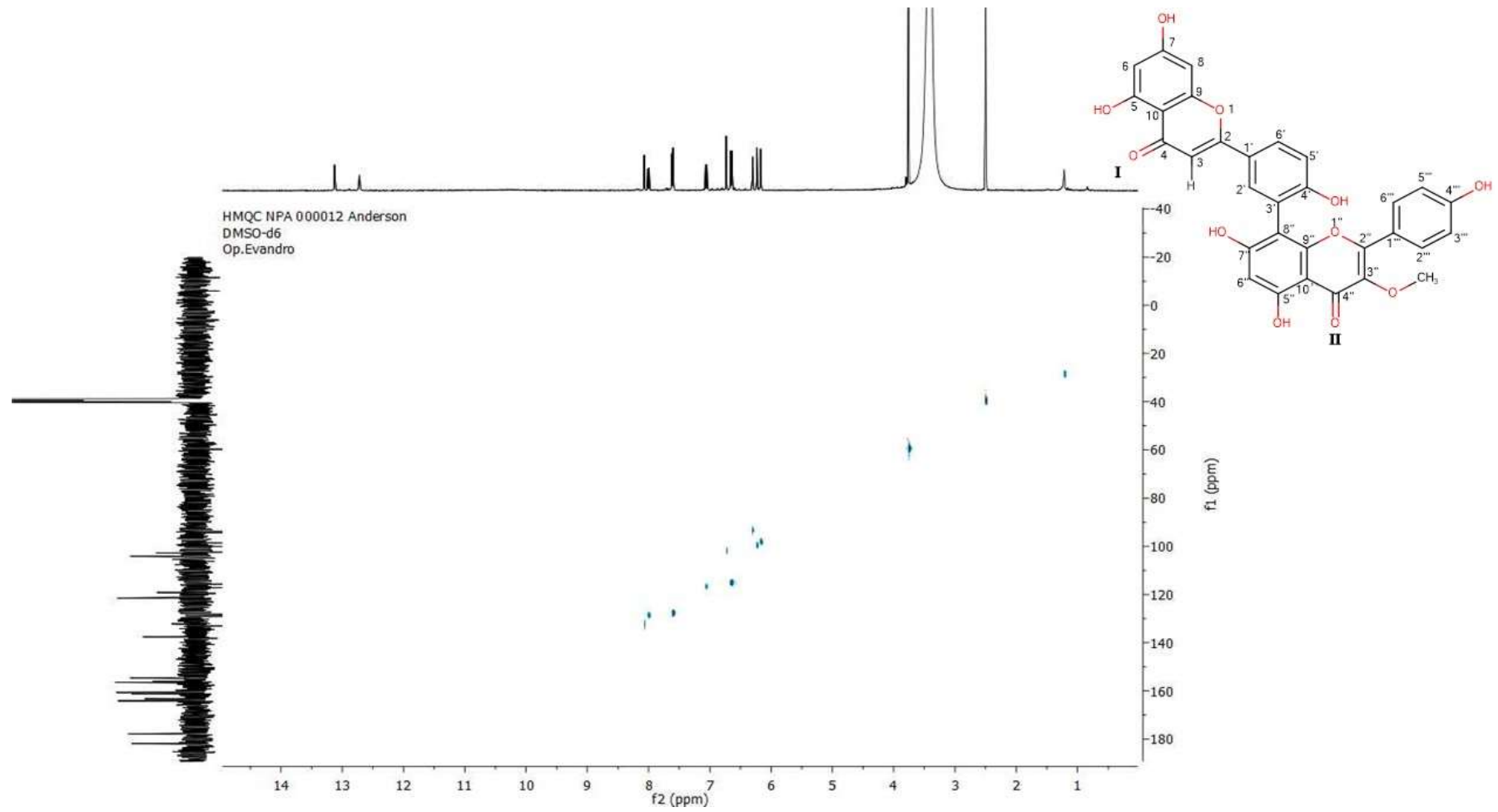
Fonte: Própria do autor.

Figura 122. Terceira expansão do espectro de RMN ^{13}C de Vp – 11 (δ , DMSO- d_6 , 100 MHz)



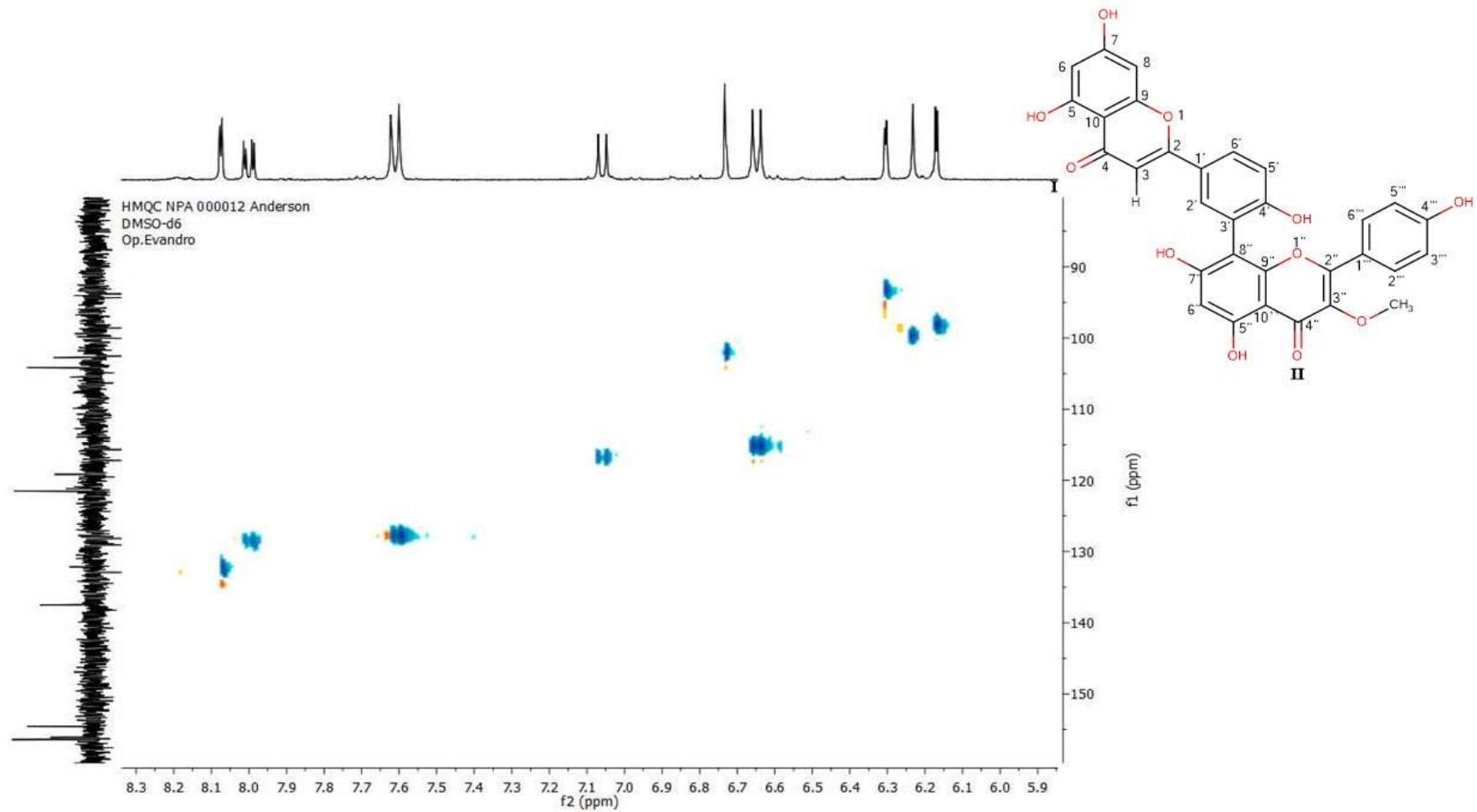
Fonte: Própria do autor.

Figura 123. Mapas de contorno HMQC de Vp – 11 (δ , DMSO- d_6 , 400 MHz e 100 MHz)



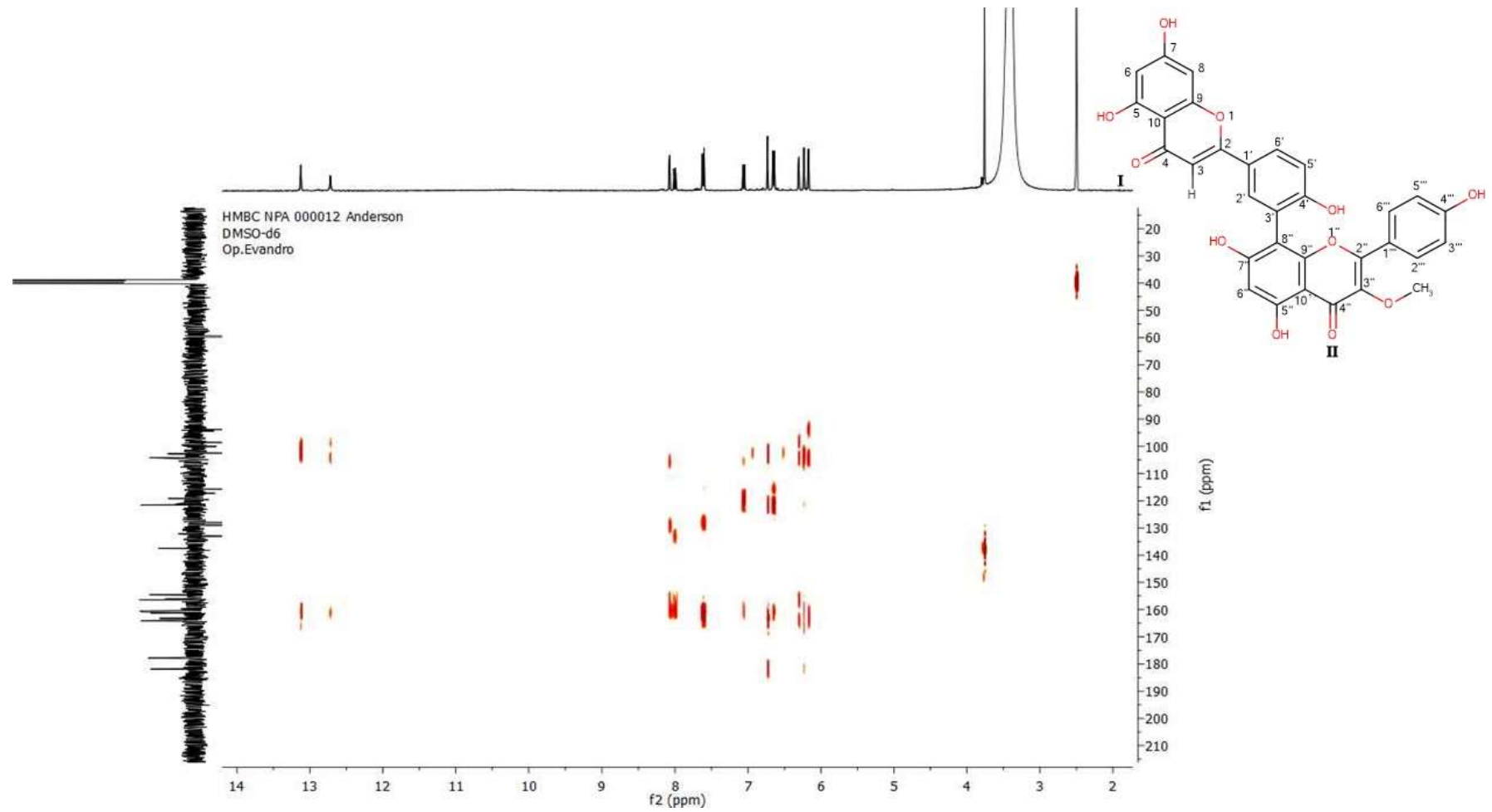
Fonte: Própria do autor.

Figura 124. Primeira expansão dos mapas de contorno HMQC de Vp – 11 (δ , DMSO- d_6 , 400 MHz e 100 MHz)



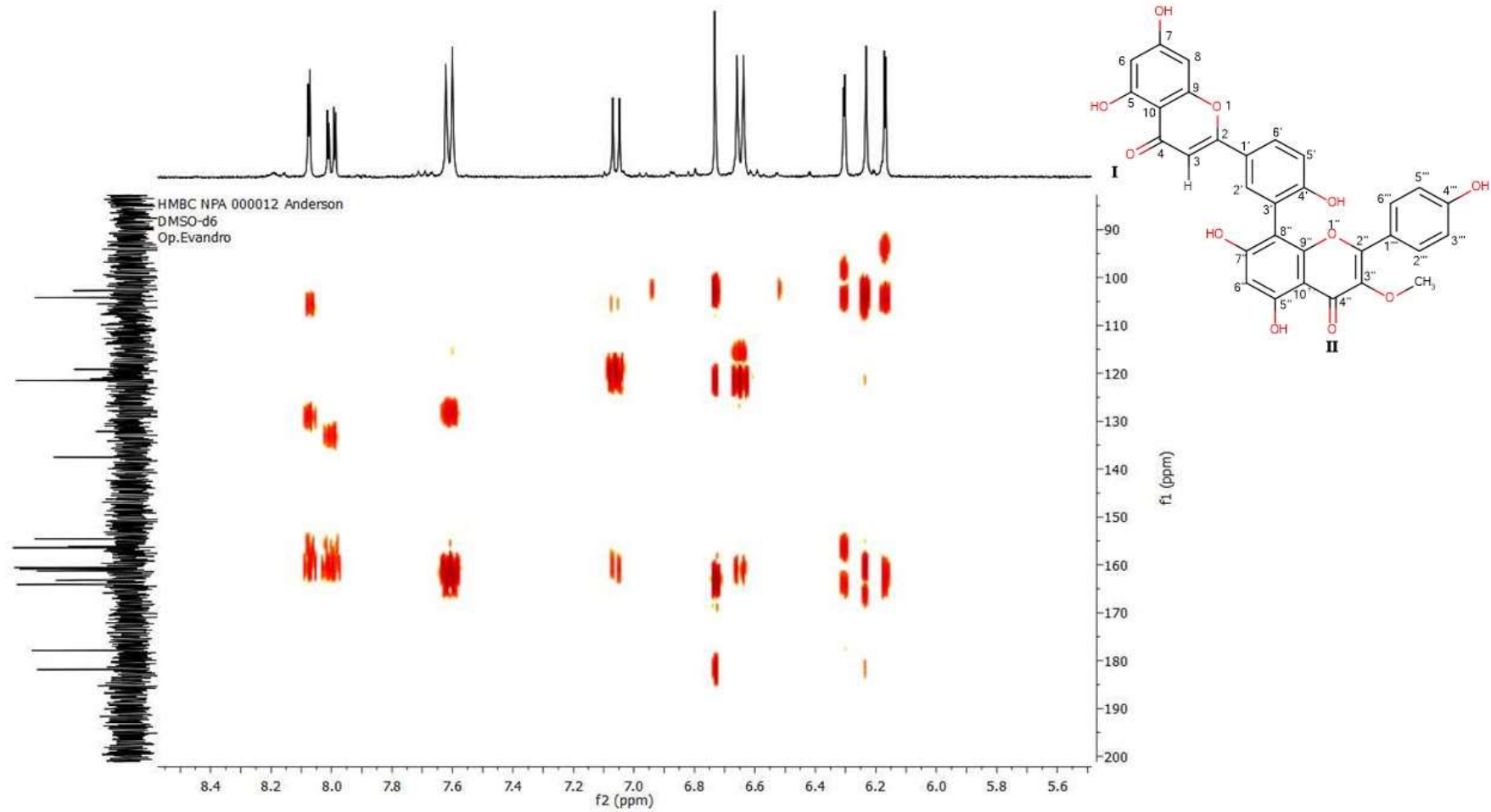
Fonte: Própria do autor.

Figura 125. Mapas de contorno HMBC de Vp – 11 (δ , DMSO- d_6 , 400 MHz e 100 MHz)



Fonte: Própria do autor.

Figura 126. Primeira expansão dos mapas de contorno HMBC de Vp – 11 (δ , DMSO- d_6 , 400 MHz e 100 MHz)



Fonte: Própria do autor.

5.1.2.12 Identificação estrutural de Vp – 12

O composto Vp – 12 (8,0 mg) foi isolado a partir da fase clorofórmica na forma de um sólido amorfo por CLAE em um $T_R=29,2$ min e apresentando absorções no espectro de UV-Visível λ/nm 221.

No espectro de RMN ^{13}C (Figura 128, página 230) de Vp – 12, utilizando a técnica APT e obtido em $CDCl_3$, observou-se a presença de 20 sinais, levando a sugerir que a substância poderia se tratar de um diterpeno (PINTO et al., 2010). Destes, 6 foram atribuídos a carbonos não hidrogenados, 4 carbonos metínicos, 7 carbonos metilênicos e 3 carbonos metílicos.

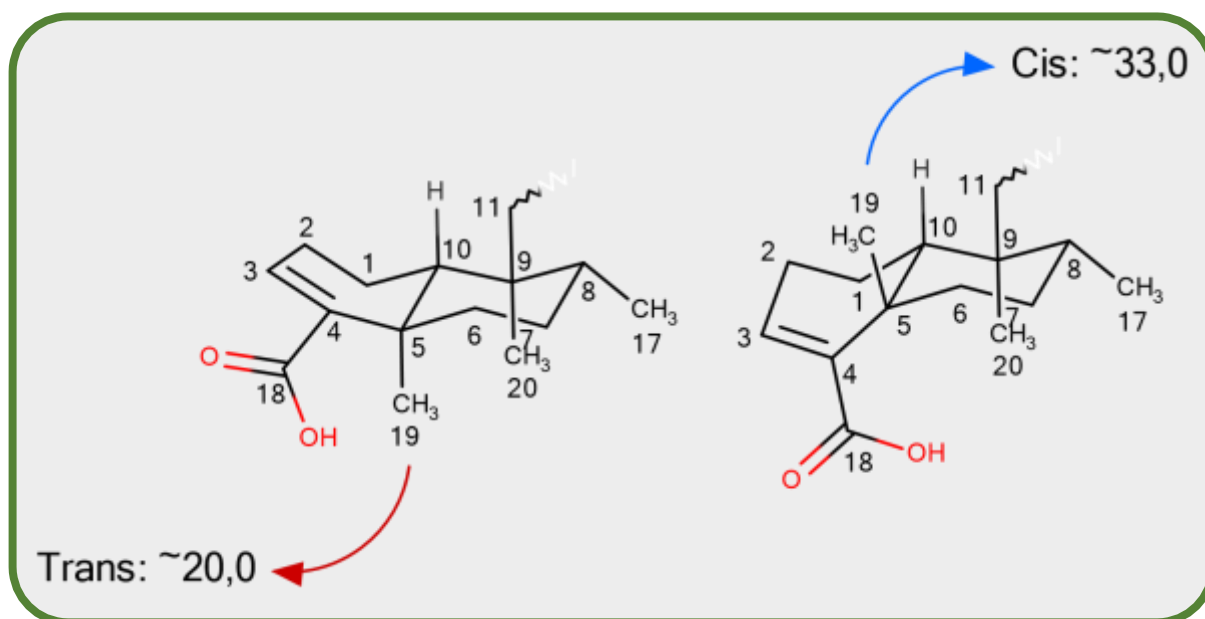
Os sinais observados em δ_C 37,7 (C – 5), 36,4 (C – 8), 38,9 (C – 9) e 46,8 (C – 10) foram compatíveis com esqueleto carbônico de diterpenos do tipo clerodano (Figura 129, página 231) (SANTOS et al., 2007). Além disso, pôde-se evidenciar absorções em δ_C 135,1 (C – 13), 143,6 (C – 14), 70,2 (C – 15) e 174,4 (C – 16), características de um anel γ -lactônico α,β insaturado (Figura 128, página 230) (MEDEIROS, 2012).

Com os dados obtidos por RMN ^{13}C foi possível realizar a determinação da estereoquímica dos centros quirais C – 5, C – 8, C – 9 e C – 10 a partir dos valores dos seus deslocamentos químicos.

A configuração da fusão dos anéis A/B na decalina pode ser *cis* ou *trans*, sendo o valor do deslocamento químico de $CH_3 - 19$ utilizado para diferenciá-los. Dessa forma, na fusão *cis*, o δ_C $CH_3 - 19$ é $\sim 33,0$ e, na configuração *trans*, é $\sim 20,0$ (SANTOS et al., 2007) (Figura 130, página 226). Assim, no espectro de RMN ^{13}C (Figura 129, página 231), observou-se um sinal em δ_C 20,6 atribuído ao $CH_3 - 19$ e condizente com a fusão dos anéis A/B em configuração *trans*-decalina.

Outro aspecto importante é a possibilidade de diferenciar também pelos valores de deslocamentos químicos o $CH_3 - 17$ e o $CH_3 - 20$, pois estes podem estar *cis* ou *trans* entre si. Assim, em diterpenos clerodanos, quando as metilas $CH_3 - 17$ e o $CH_3 - 20$ estão em configuração *cis*, o deslocamento químico do $CH_3 - 20$ é $\sim 18,0$. Já se o deslocamento for $\sim 26,0$, a configuração é *trans* (SANTOS et al., 2007). O sinal observado no espectro de RMN ^{13}C (Figura 129, página 231) em δ_C 18,3 foi condizente com uma configuração *cis* entre $CH_3 - 17$ e o $CH_3 - 20$.

Figura 130. Deslocamento químico do carbono de CH₃ – 19 em configuração *cis* ou *trans*



Fonte: Adaptação de SANTOS et al., 2007.

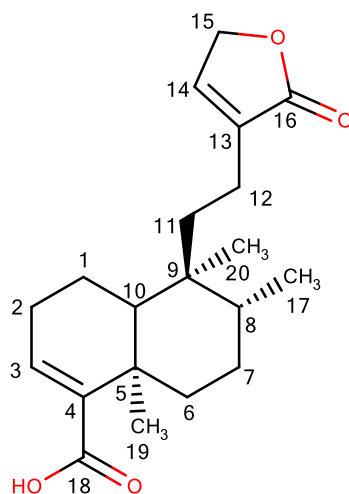
Adicionalmente, seu espectro de RMN ¹H (Figura 131, página 232) exibiu dois sinais em δ_H 7,09 (t, $J=3,0$, 1H, H – 14) e 6,85 (tl, $J=3,0$, 1H, H – 3), típicos de prótons olefínicos conjugados com carbonila.

Ainda, observou-se três sinais referentes as metilas em δ_H 0,82 (m, 3H, C – 17), 1,24 (sl, 3H, C – 19) e 0,76 (s, 3H, C – 20) (Figura 132, página 233), corroborando com esqueleto do tipo clerodano. A desproteção observada em CH₃ – 20 é compatível com diterpenos clerodanos da série *ent*, pois quando é da série *normal*, esse valor sofre proteção e absorve em ~0,57.

Um dubleto em δ_H 4,76 (d, $J=2,0$, 2H) (Figura 131, página 232) que é característico de prótons oximetilênicos do anel lactônico e foi atribuído ao H – 15. Múltiplos sinais presentes entre δ_H 1,12 e 2,45 foram atribuídos aos demais hidrogênios alifáticos de Vp – 12.

Assim, os dados obtidos de RMN ¹H e ¹³C de Vp – 12 foram comparados com dados da literatura (PINTO et al., 2010) (Tabela 18, página 228), permitindo identificar o composto como ácido cleroda-3,13-dien-15,16-olideo-18-oico (ácido patagônico) (Figura 133, página 227) e isolado pela segunda vez nesta espécie.

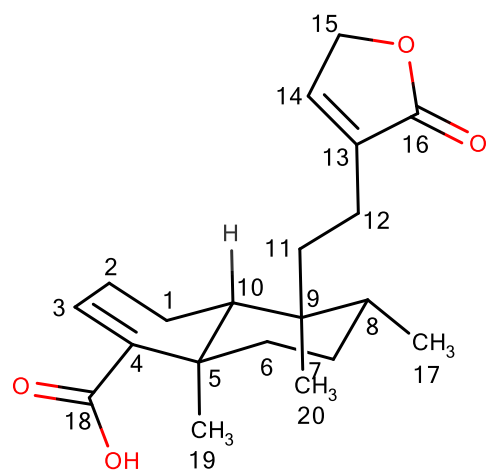
Figura 133. Composto Vp – 12 (ácido cleroda-3,13-dien-15,16-olideo-18-oico)



Fonte: Própria do autor.

O ácido patagônico foi investigado quanto a sua citotoxicidade *in vitro* frente a quatro linhagens celulares de tumor: melanoma maligno (SK-MEL), células de carcinoma epidérmico oral (KB), carcinoma ductal *in situ* da mama (BT549) e carcinoma de ovário (SK-OV3), porém, na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$, não apresentou citotoxicidade (WANG et al., 2009).

Tabela 18. Dados de RMN ^1H e ^{13}C de Vp – 12 (δ , CDCl_3 , 500 e 125 MHz) em comparações com o ácido clerodan-3,13-dien-15,16-olideo-8-óico (δ , CD_3OD , 500 e 125 MHz) (PINTO et al., 2010)

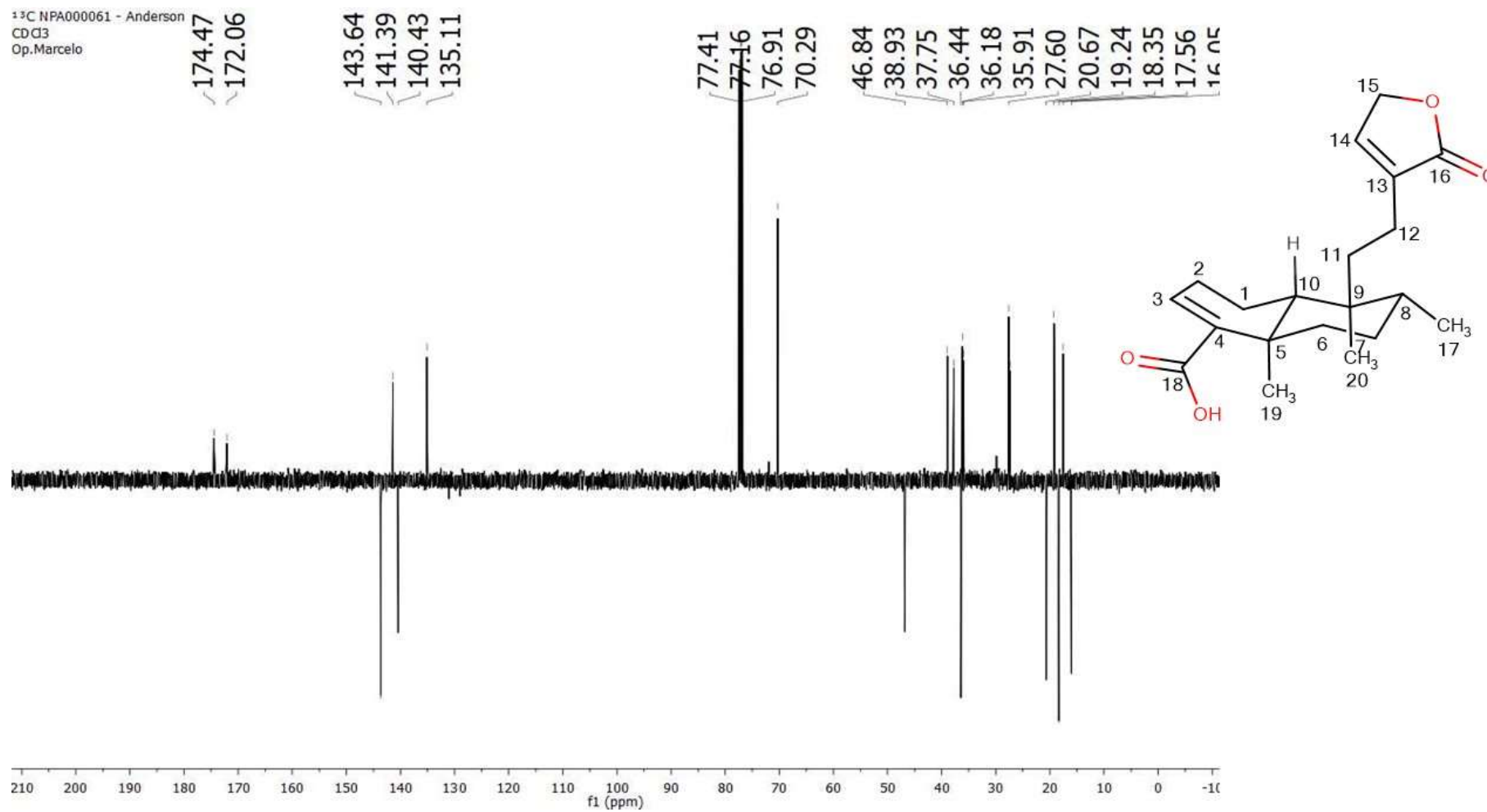


	Vp – 12		Ácido clerodan-3,13-dien-15,16-olideo-8-óico	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1	1,71 (m)	17,5	1,70 (m)	17,4
2	1,42 (m)	27,3	1,45 (m)	27,2
3	6,85 (tl, $J=3,0$, 1H)	140,4	6,81 (sl)	140,1
4	-	141,3	-	141,1
5	-	37,7	-	37,4
6	1,42 e 2,45 (m, 2H)	36,1	1,43 e 2,40 (m)	36,0
7	2,23-2,32 (m, 2H)	27,6	2,25 (m)	27,2
8	1,52 (m, 1H)	36,4	1,50 (m)	36,3
9	-	38,9	-	38,7
10	1,37 (m, 1H)	46,8	1,35 (m)	46,7
11	1,12 e 2,45 (2H)	35,9	1,19 e 2,40 (m)	35,7
12	2,17-2,21 (m, 1H)	19,2	2,05 e 2,20 (m)	19,0
13	-	135,1	-	135,0
14	7,09 (t, $J=3,0$, 1H)	143,6	7,06 (sl)	143,4
15	4,76 (d, $J=2,0$, 2H)	70,2	4,79 (s)	70,1
16	-	174,4	-	174,3
17	0,82 (m, 3H)	16,0	0,85 (m)	15,8
18	-	172,0	-	174,3

19	1,24 (sl, 3H)	20,6	1,27 (s)	20,5
20	0,76 (s, 3H)	18,3	0,75 (s)	18,1

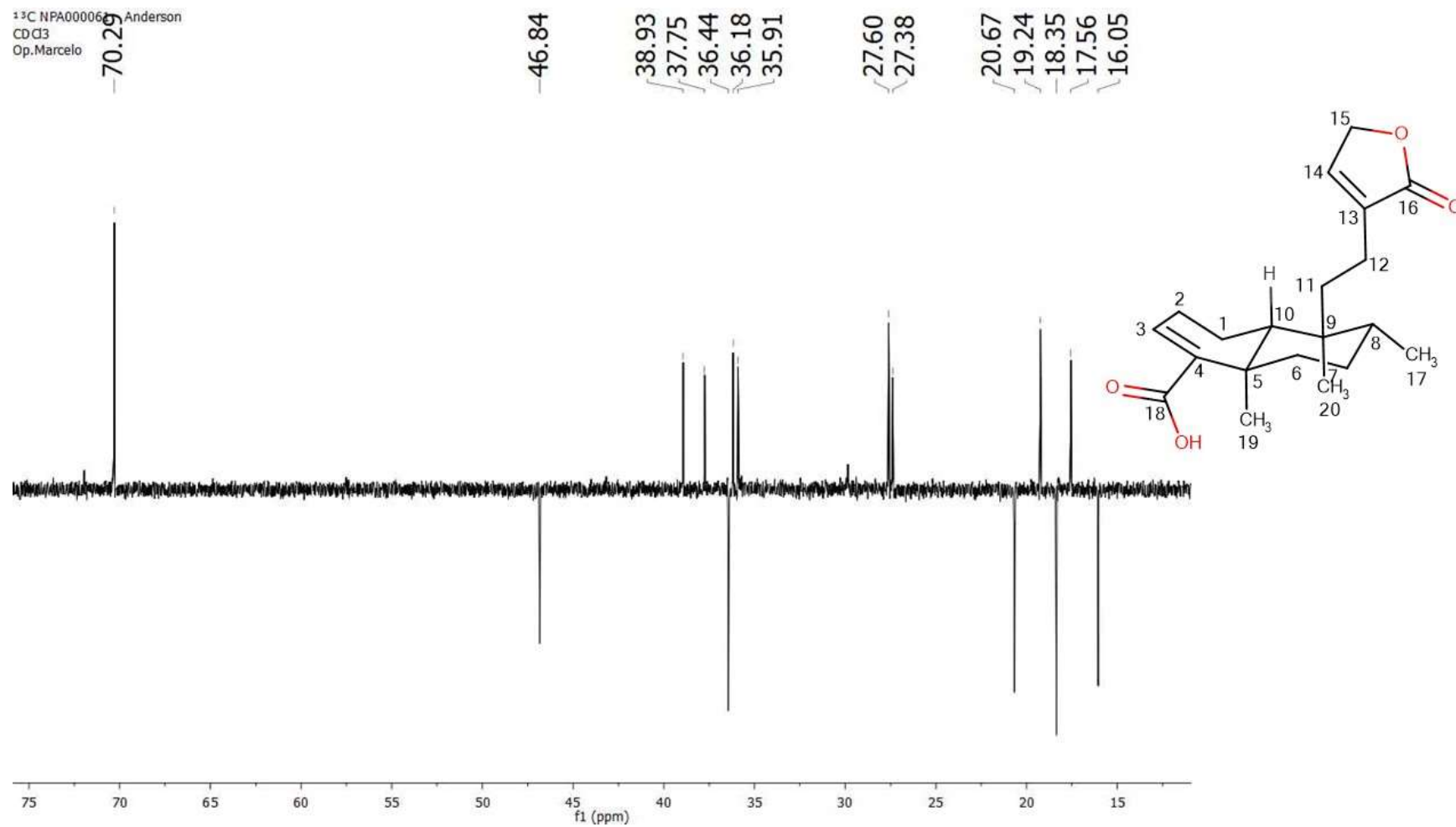
Fonte: Própria do autor.

Figura 128. Espectro de RMN ^{13}C de Vp – 12 (δ , CDCl_3 , 125 MHz)



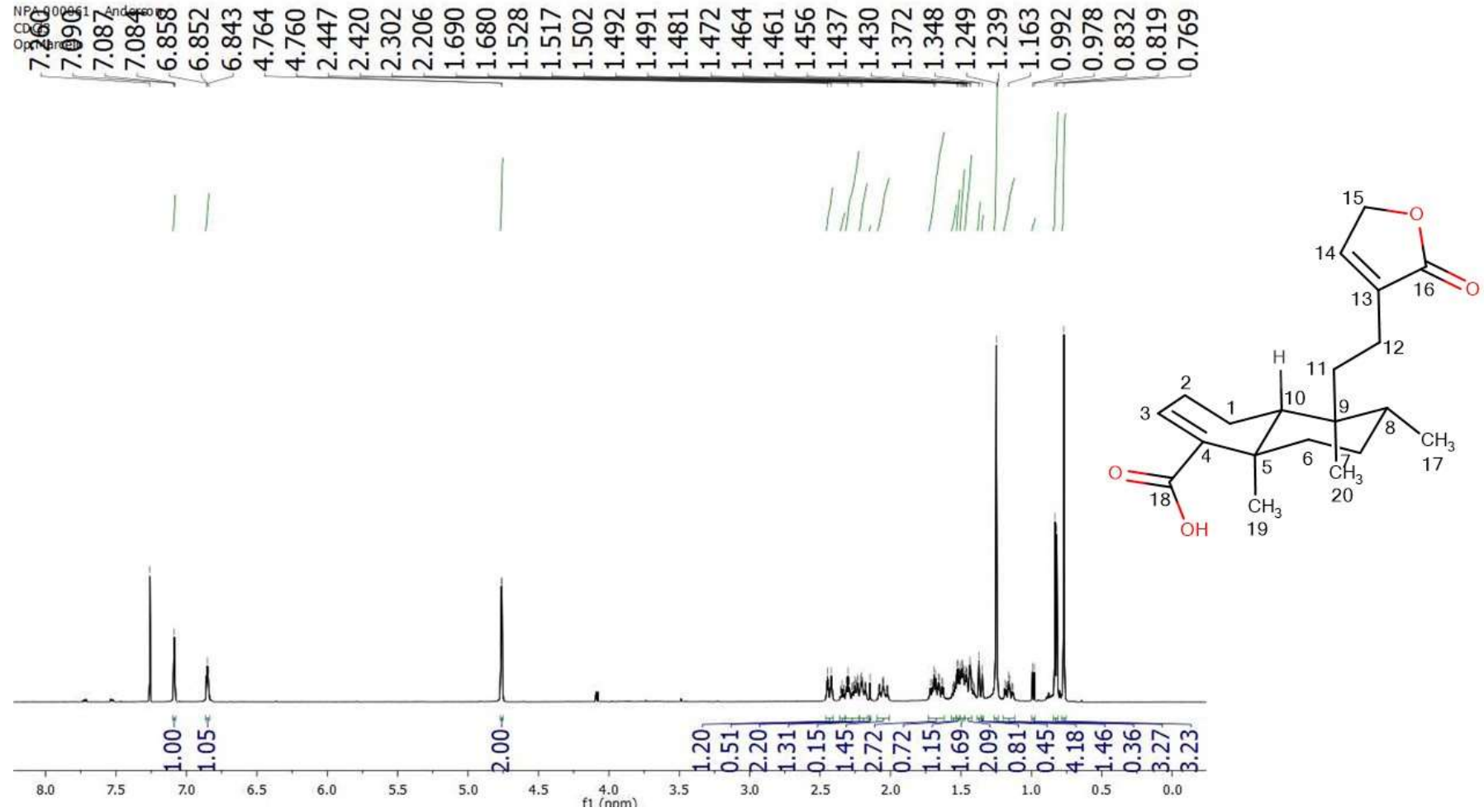
Fonte: Própria do autor.

Figura 129. Primeira expansão do espectro de RMN ^{13}C de Vp – 12 (δ , CDCl_3 , 125 MHz)



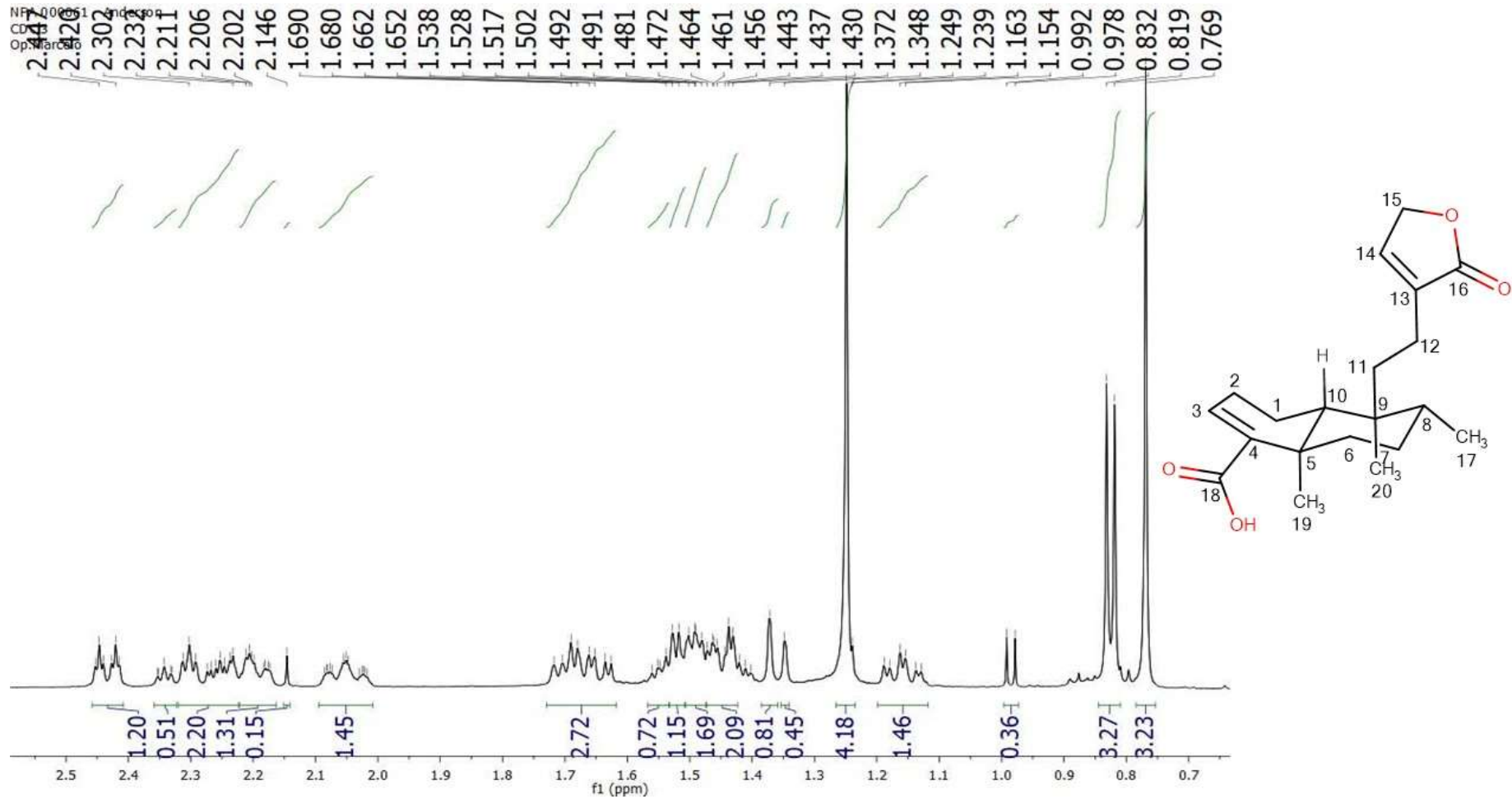
Fonte: Própria do autor.

Figura 131. Espectro de RMN ^1H de Vp – 12 (δ , CDCl_3 , 500 MHz)



Fonte: Própria do autor.

Figura 132. Primeira expansão do espectro de RMN ^1H de Vp – 12 (δ , CDCl_3 , 500 MHz)



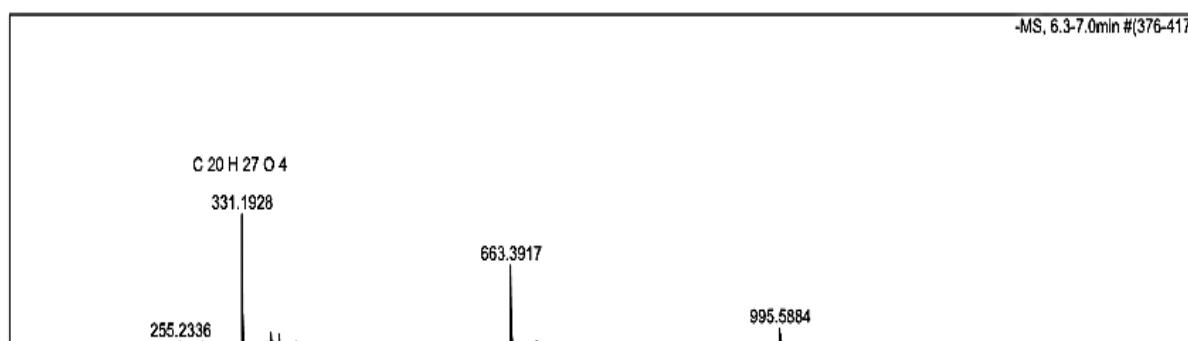
Fonte: Própria do autor.

5.1.2.13 Identificação estrutural de Vp – 13

O composto Vp – 13 (5,0 mg) foi isolado a partir da fase clorofórmica na forma de um sólido amorfo por CLAE em um $T_R=31,2$ min e apresentando absorções no espectro de UV-Visível λ/nm 222.

O EMAR do composto Vp – 13 apresentou um íon da molécula desprotonada em m/z 331,1928 Da $[M - H]^-$ (Figura 134), compatível com a fórmula molecular $C_{20}H_{27}O_4$ (erro de 3,9 ppm, valor calculado 331,1928 Da).

Figura 134. Espectro de massas de alta resolução do composto Vp – 13



Fonte: Própria do autor.

No espectro de RMN ^{13}C (Figura 135, página 239) de Vp – 13, utilizando a técnica *broadband* e obtido em $CDCl_3$, observou-se a presença de 19 sinais equivalentes a 20 carbonos, levando a sugerir que o composto poderia se tratar da classe dos diterpenos (PINTO et al., 2010). Destes, 6 foram atribuídos a carbonos não hidrogenados, 4 aos carbonos metínicos, 7 a carbonos metilênicos e 3 aos carbonos metílicos.

Assim como observado em Vp – 12, os sinais em δ_C 37,7 (C – 5), 36,4 (C – 8), 38,9 (C – 9) e 46,8 (C – 10) (Figura 136, página 240) foram compatíveis com esqueleto carbônico de diterpenos do tipo clerodano (SANTOS et al., 2007). Porém, os valores dos deslocamentos químicos de um anel γ -lactônico α,β insaturado estavam invertidos, onde C – 13 e C – 15 estavam desblindados e C – 14 e C – 16 mais blindados. Dessa forma, através dos espectros bidimensionais foi possível atribuir para os carbonos os sinais δ_C 174,1 (C – 13), 115,3 (C – 14), 170,9 (C – 15) e 73,2 (C – 16) (Figura 137, página 241), evidenciado que a substância se tratava do ácido clerodérmico.

A determinação da estereoquímica dos centros quirais C – 5, C – 8, C – 9 e C – 10 também foram compatíveis com Vp – 12, onde, no espectro de RMN ^{13}C (Figura 136, página 240), observou-se uma absorção em δ_{C} 20,6 atribuído ao CH_3 – 19 condizente com a fusão dos anéis A/B em configuração *trans*-decalina. O deslocamento químico em δ_{C} 18,3 (Figura 136, página 240) também foi condizente com uma configuração *cis* entre CH_3 – 17 e o CH_3 – 20.

No espectro de RMN ^1H foi possível observar dois sinais em δ_{H} 6,80 (sl, 1H, H – 14) e 5,84 (sl, 1H, H – 3) (Figura 138, página 242), característicos de prótons olefínicos conjugados com carbonila.

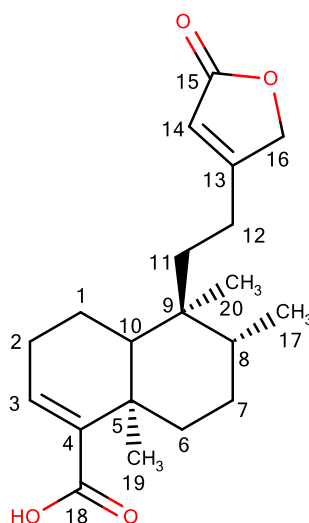
Observou-se ainda três sinais, assim como em Vp – 12, referentes as metilas em δ_{H} 0,81 (sl, 3H, C – 17), 1,25 (s, 3H, C – 19) e 0,80 (s, 3H, C – 20) (Figura 139, página 243), corroborando com esqueleto do tipo clerodano. A desproteção observada em CH_3 – 20 é compatível com diterpenos clerodanos da série *ent*, pois quando é da série *normal*, esse valor sofre proteção e absorve em $\sim 0,57$.

Um dubleto em δ_{H} 4,73 (d, $J=1,0$, 2H) (Figura 140, página 244) que é característico de prótons oximetilênicos do anel lactônico e foi atribuído ao H – 16. Múltiplos sinais presentes entre δ_{H} 1,16 e 2,36 foram atribuídos aos demais hidrogênios alifáticos de Vp – 12.

Os mapas de contorno HMQC (Figura 141, página 245) e sua expansão (Figura 142, página 246) permitiram evidenciar as correlações diretas entre H – 14 e H – 16 com os seus respectivos carbonos. Ainda, nos mapas de contorno HMBC (Figura 143, página 247) e sua expansão (Figura 144, página 248), observou-se as correlações de δ_{H} 5,84 (H – 14) com δ_{C} 174,1 (C – 13), 170,9 (C – 15) e 73,2 (C – 16) e de δ_{H} 4,73 (H – 16) com δ_{C} 174,1 (C – 13), 115,3 (C – 14) e 170,9 (C – 15). Dessa forma, confirmando a mudança da carbonila no anel γ -lactônico α,β insaturado em Vp – 13.

Assim, os dados obtidos (RMN ^1H , ^{13}C , HMQC, HMBC e EMAR) foram comparados com Vp – 12 e com dados da literatura (EFDI et al., 2007; PINTO et al., 2010) que foram expressos na Tabela 19 (página 237) permitindo identificar Vp – 13 como ácido clerodérmico (Figura 145, página 236), um diterpenos clerodano isolado pela primeira vez na família.

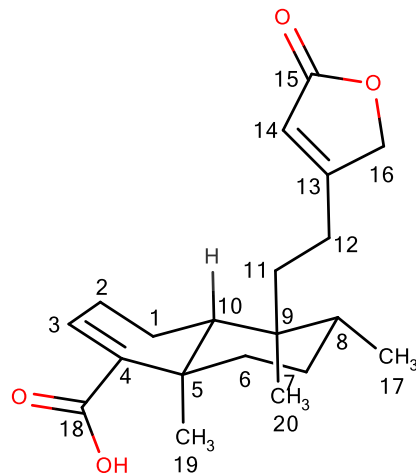
Figura 145. Composto Vp – 13 (ácido clerodérmico)



Fonte: Própria do autor.

Um estudo realizado com diterpenos isolados de *Enicosanthum membranifolium* (Annonaceae) evidenciou que o ácido clerodérmico é um potente indutor a apoptose de células HL60 de leucemia humana e com mérito potencial para a concepção de futuros novos agentes semissintéticos anticâncer (EFDI et al., 2007).

Tabela 19. Dados de RMN ^1H , ^{13}C , HMQC e HMBC de Vp-13 (δ , CDCl_3 , 400MHz e 100 MHz) em comparação com o ^1H (δ , CDCl_3 , 500 MHz) do ácido patagônico (PINTO et al., 2010) e do ^{13}C (δ , CDCl_3 , 125 MHz) do ácido clerodérmico (EFDI et al., 2007)

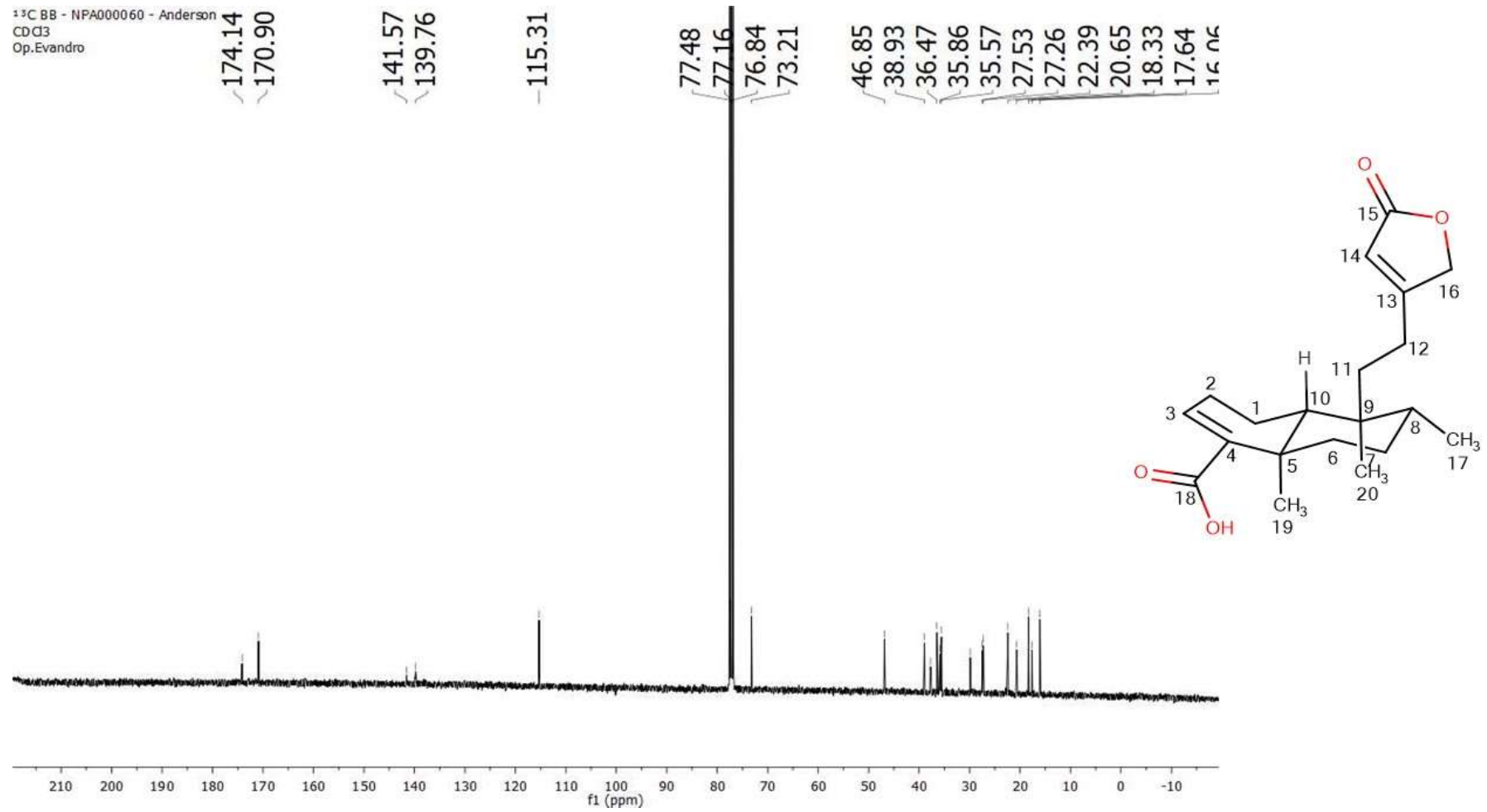


	Vp-13 (HMQC)			Ácido clerodérmico	
	δ_{H}	δ_{C}	HMBC	δ_{H}	δ_{C}
1	1,70 (m, 2H)	17,6	C-2, C-6 e C-9	1,70 (m)	17,43
2	1,54 – 1,60 (m, 2H)	22,1	C-1, C-4 e C-18	1,45 (m)	22,20
3	6,80 (sl, 1H)	139,7	-	6,81 (sl)	139,84
4	-	141,5	-	-	141,37
5	-	37,7	-	-	38,74
6	1,13 – 1,16 (m, 1H) 1,64 – 1,71 (m, 1H)	35,8	C-5, C-7, C-8, C-9 e C-20	1,43 e 2,40 (m)	35,67
7	1,42 – 1,48 (m, 3H)	27,2	C-5, C-8, C-9, C-19 e C-20	2,25 (m)	27,06
8	1,42 – 1,48 (m, 3H)	36,4	C-5, C-7, C-9, C-12 e C-20	1,50 (m)	36,27
9	-	38,9	-	-	37,53
10	1,29 (sl, 1H)	46,8	C-5	1,35 (m)	46,66
11	1,56 – 1,59 (m, 2H)	35,5	C-8, C-9 e C-12	1,19 e 2,40 (m)	35,37
12	2,17 – 2,36 (m, 2H)	27,7	C-11, C-14, C-15 e C-16	2,05 e 2,20 (m)	27,36
13	-	174,1	-	-	173,98
14	7,26 (sl, 1H)	115,3	C-13, C-15 e C-16	7,06 (sl)	115,08
15	-	170,9	-	-	170,78
16	4,73 (d, $J=1,0$, 2H)	73,2	C-13, C-14 e C-15	4,79 (sl)	73,04
17	0,81 (sl, 3H)	16,0	C-7, C-8 e C-9	0,85 (m)	15,86

	18	-	170,9	-	-	172,26
	19	1,25 (s, 3H)	20,6	C - 4, C - 5 e C - 10	1,27 (s)	20,44
	20	0,80 (s, 3H)	18,3	C - 7, C - 8, C - 9 e C - 10	0,75 (s)	18,14

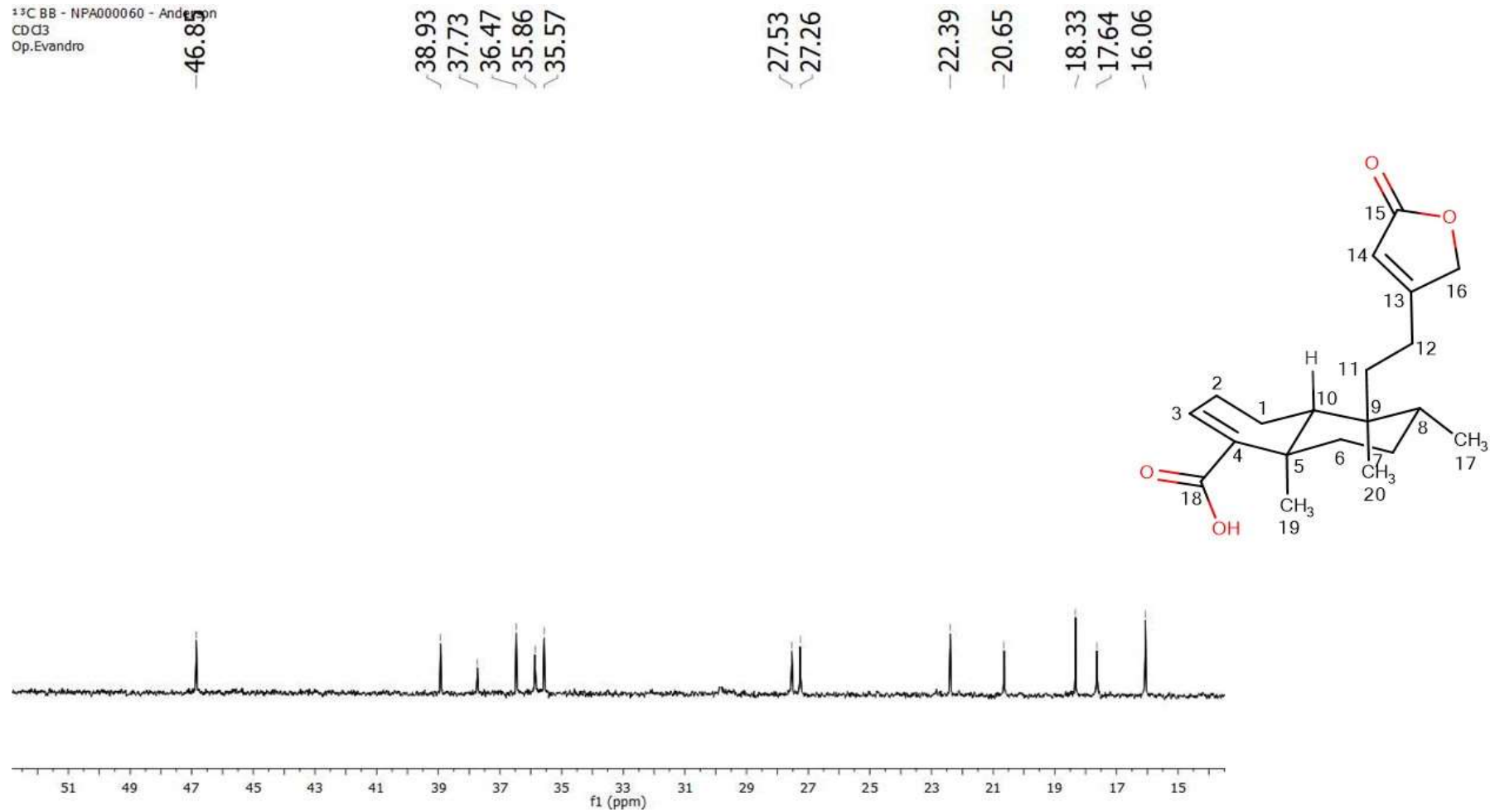
Fonte: Própria do autor.

Figura 135. Espectro de RMN ^{13}C de Vp – 13 (δ , CDCl_3 , 125 MHz)



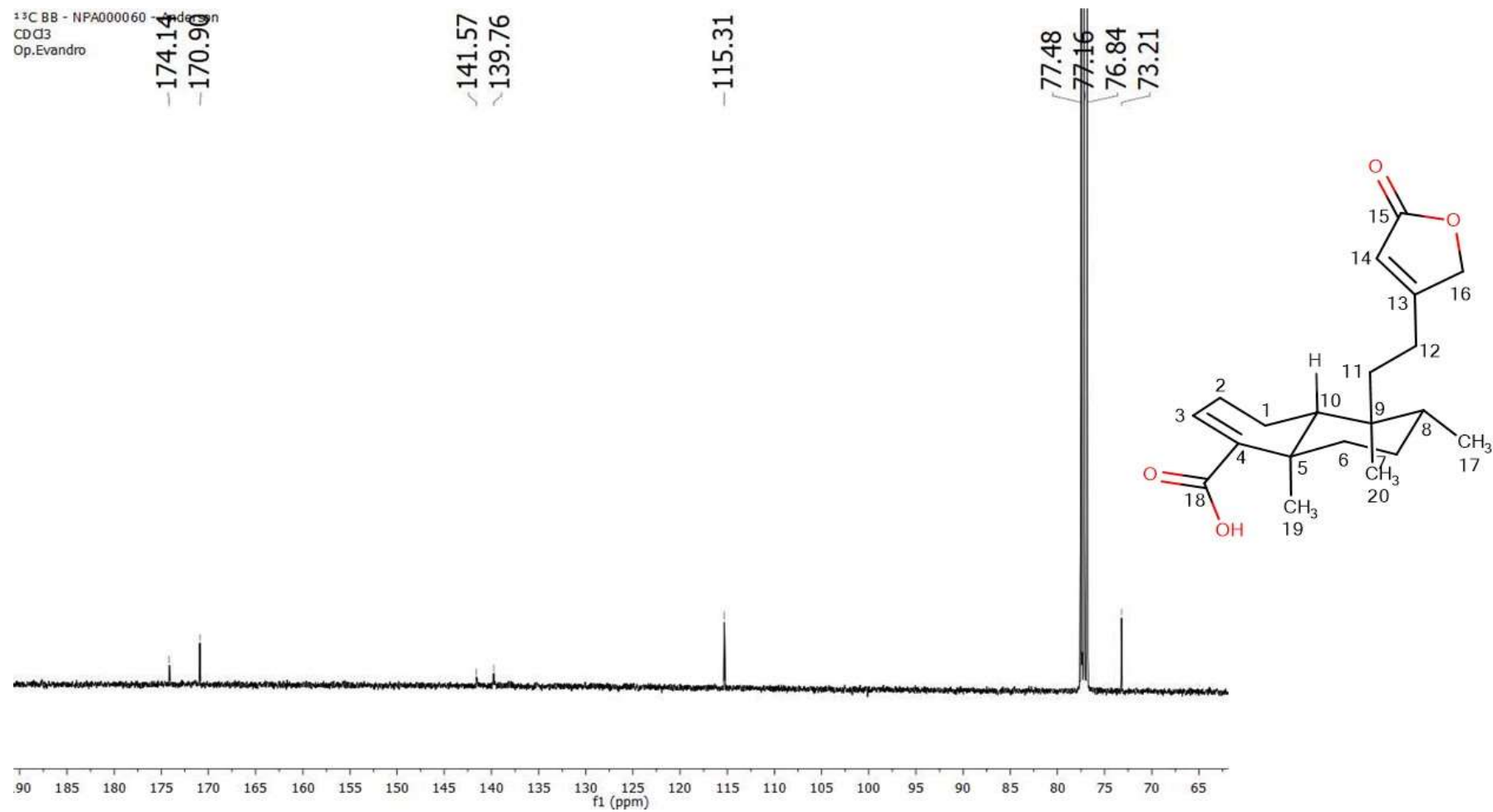
Fonte: Própria do autor.

Figura 136. Primeira expansão do espectro de RMN ^{13}C de Vp – 13 (δ , CDCl_3 , 125 MHz)



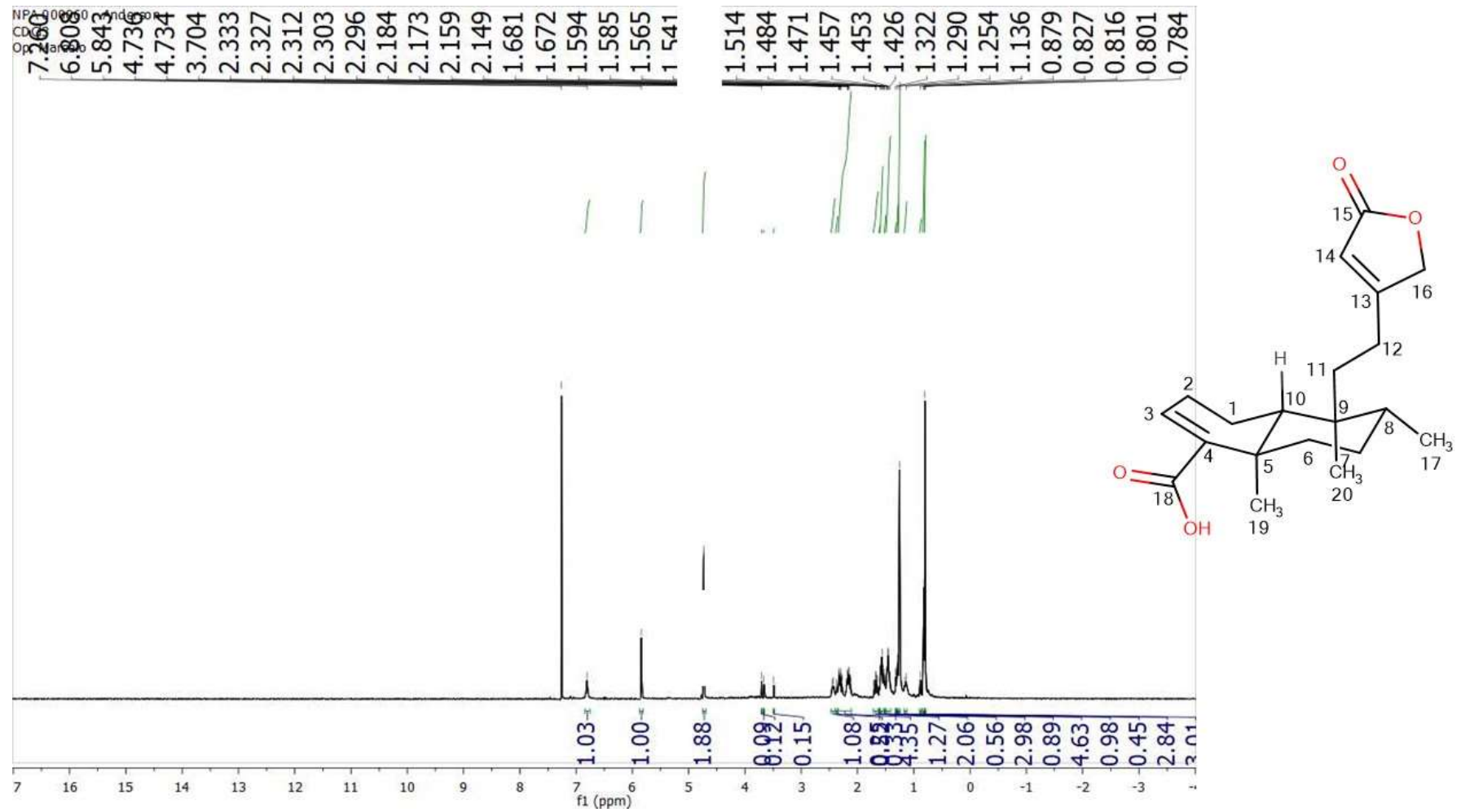
Fonte: Própria do autor.

Figura 137. Segunda expansão do espectro de RMN ^{13}C de Vp – 13 (δ , CDCl_3 , 125 MHz)



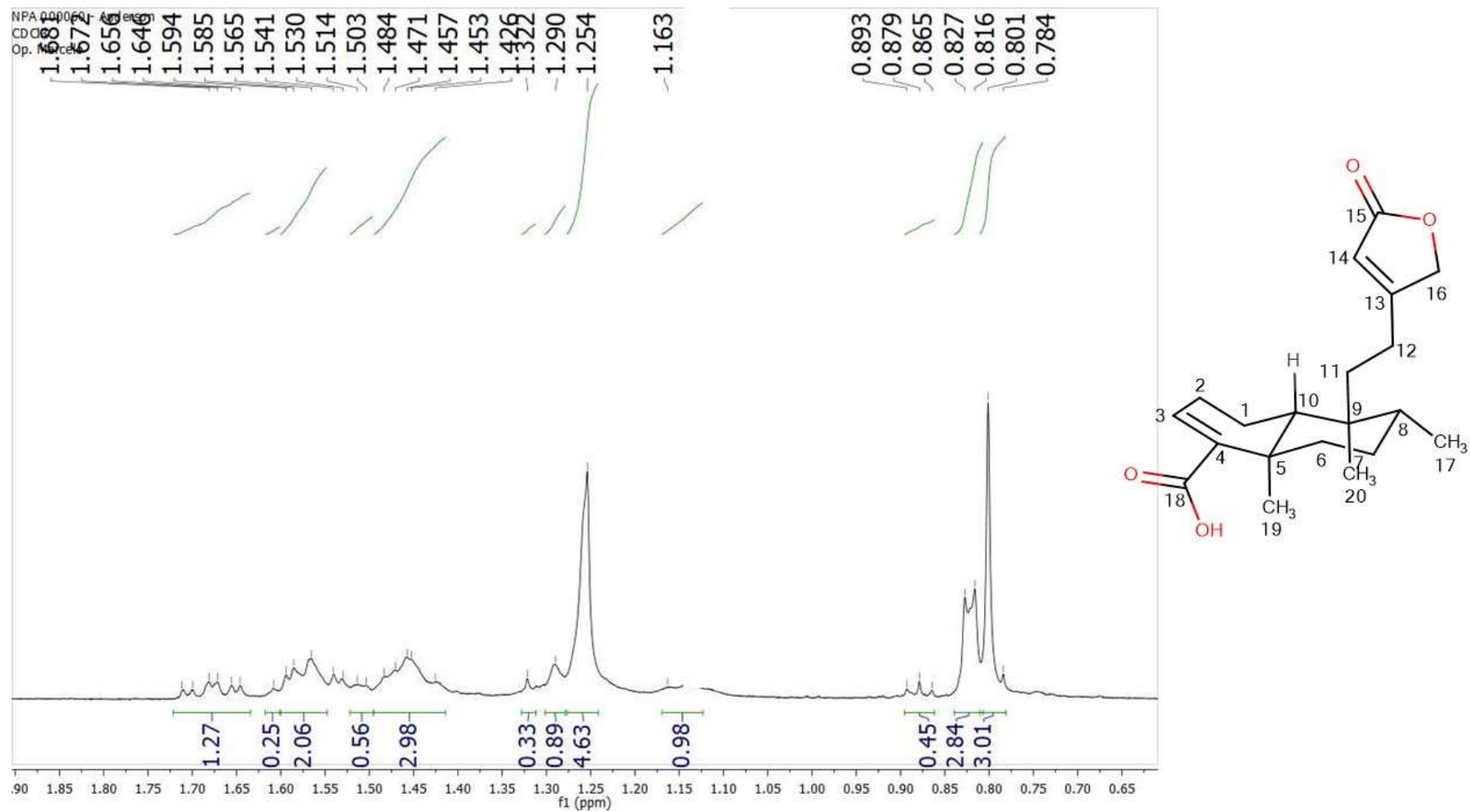
Fonte: Própria do autor.

Figura 138. Espectro de RMN ^1H de Vp – 13 (δ , CDCl_3 , 500 MHz)



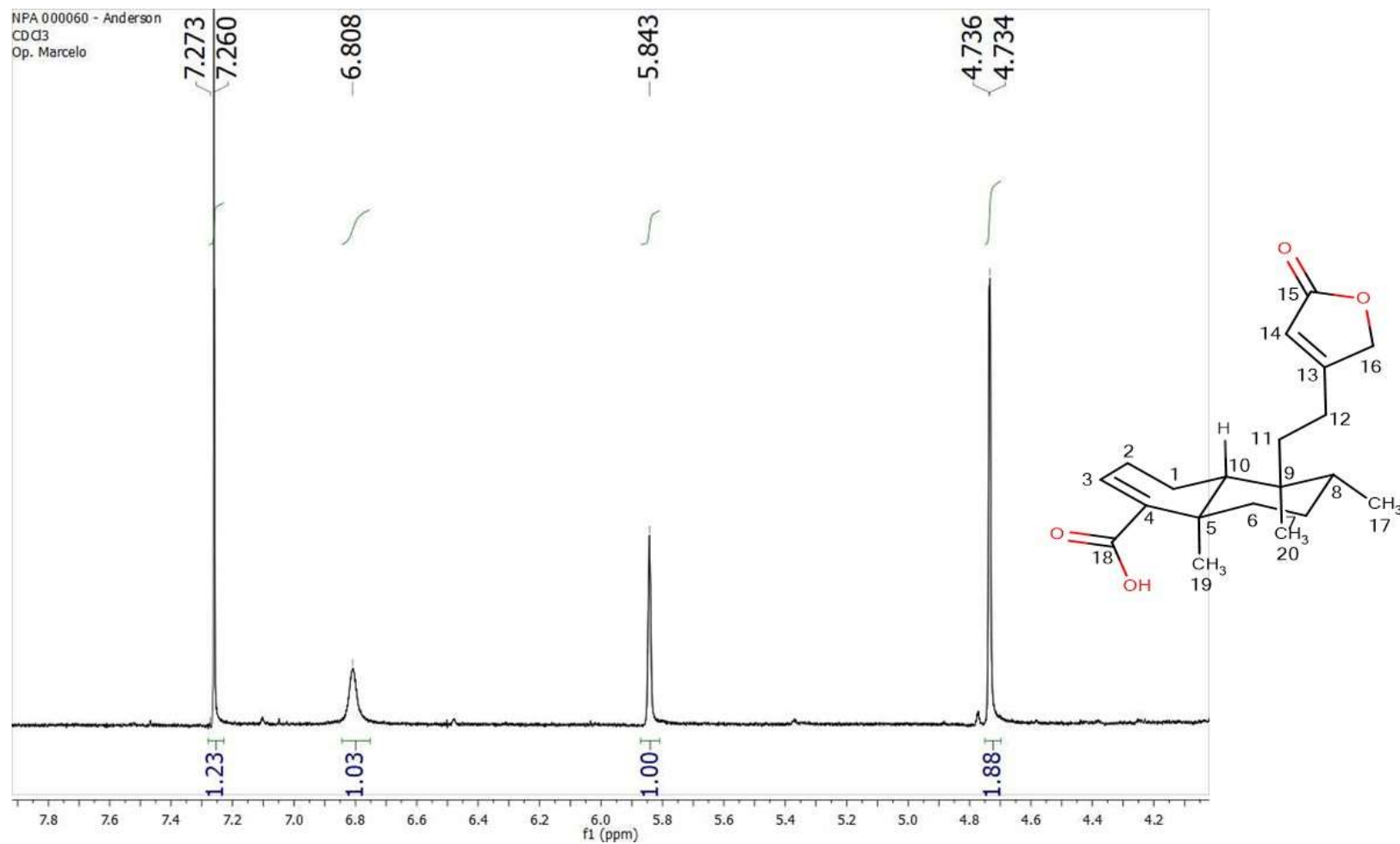
Fonte: Própria do autor.

Figura 139. Primeira expansão do espectro de RMN ^1H de Vp – 13 (δ , CDCl_3 , 500 MHz)



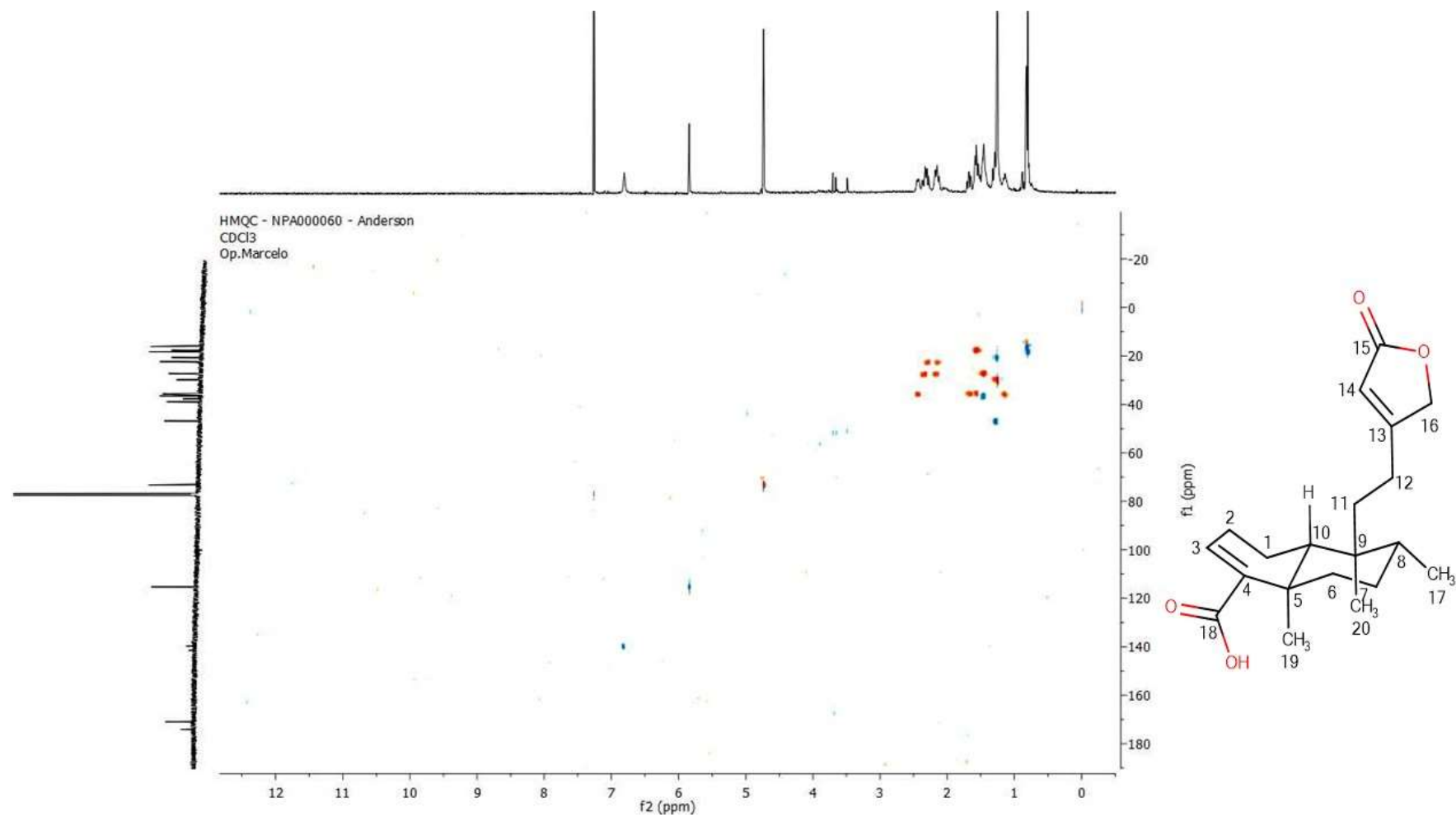
Fonte: Própria do autor.

Figura 140. Segunda expansão do espectro de RMN ^1H de Vp – 13 (δ , CDCl_3 , 500 MHz)



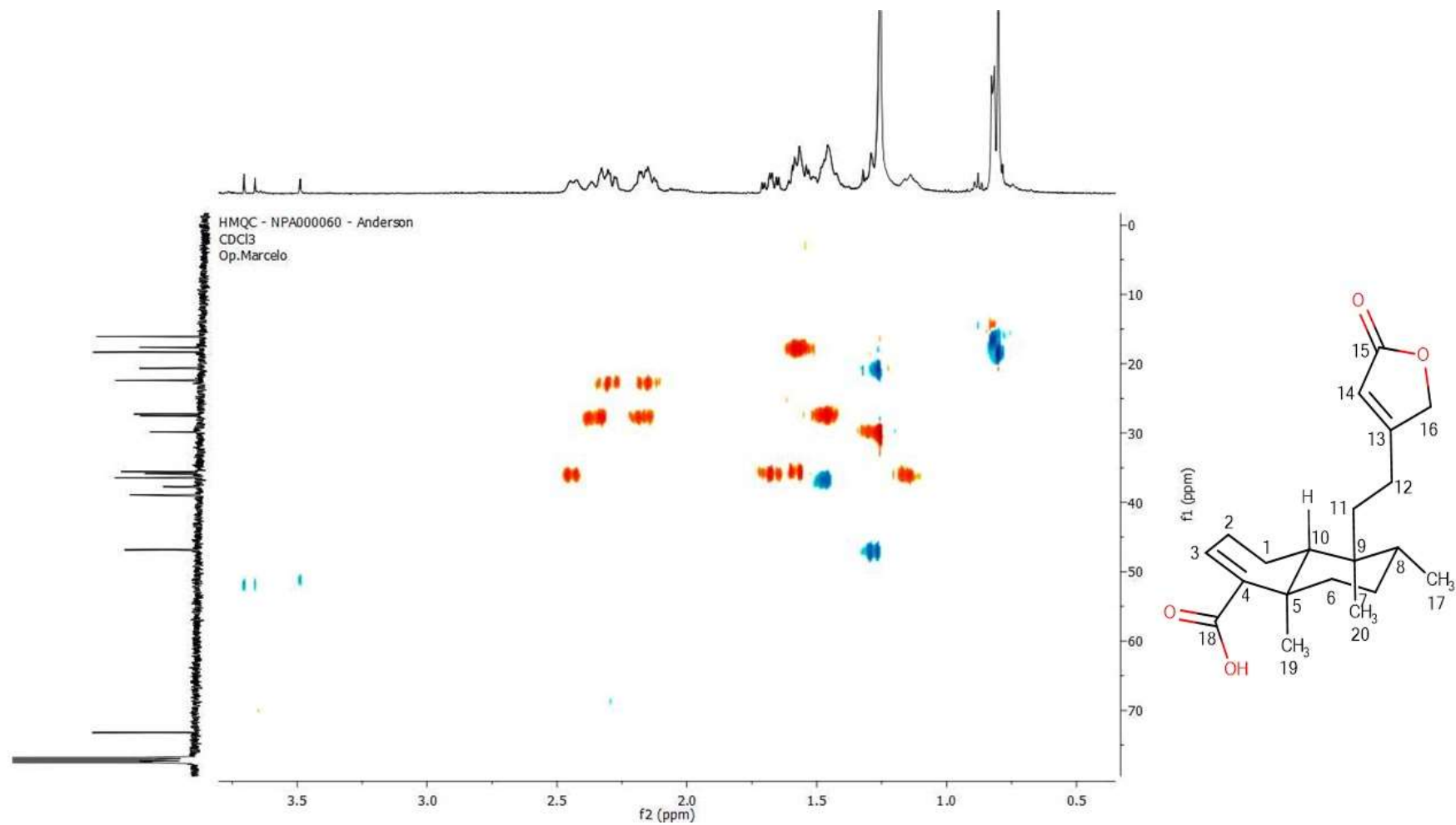
Fonte: Própria do autor.

Figura 141. Mapas de contorno HMQC de Vp – 13 (δ , DMSO- d_6 , 500 MHz e 125 MHz)



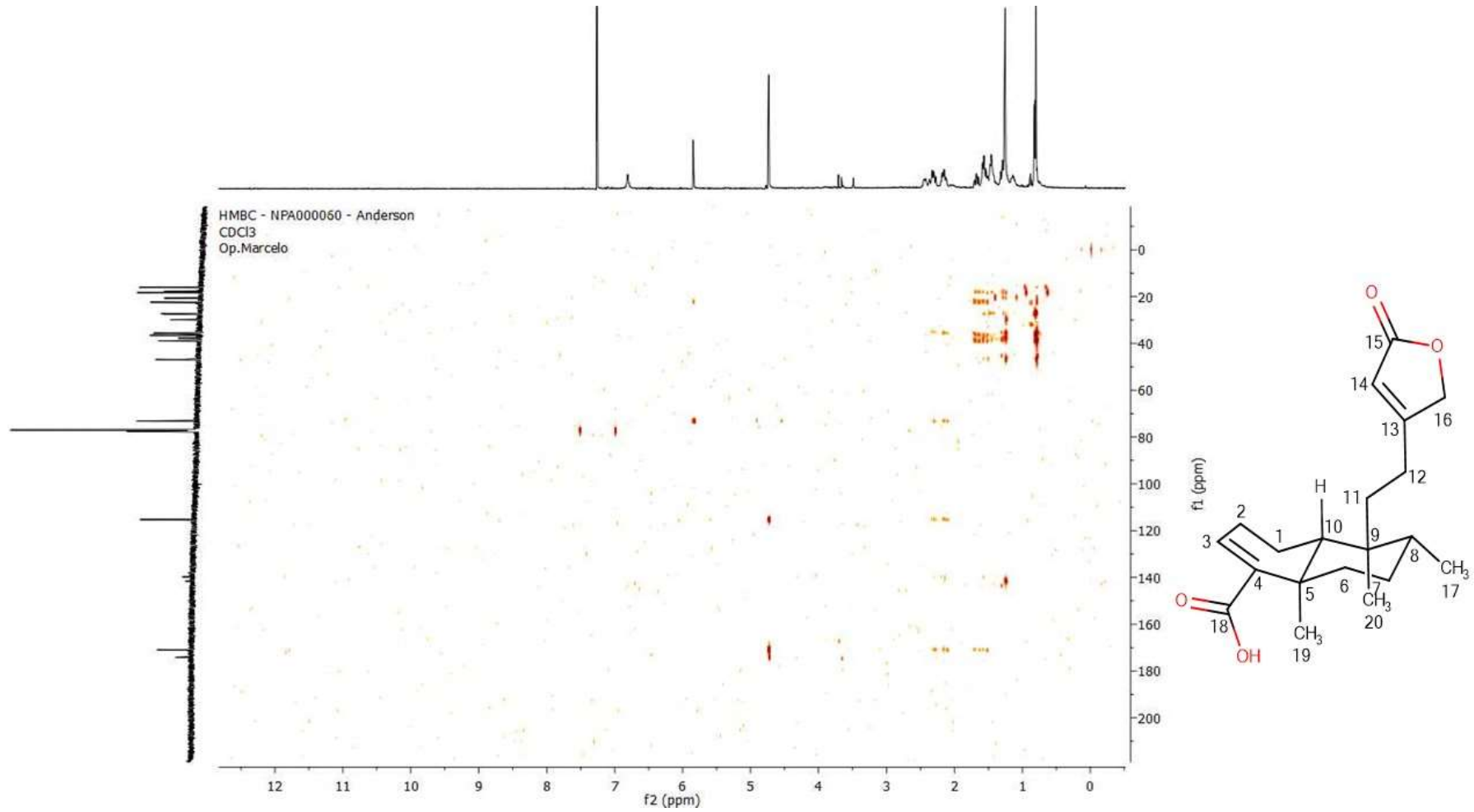
Fonte: Própria do autor.

Figura 142. Primeira expansão dos mapas de contorno HMQC de Vp – 13 (δ , DMSO- d_6 , 500 MHz e 125 MHz)



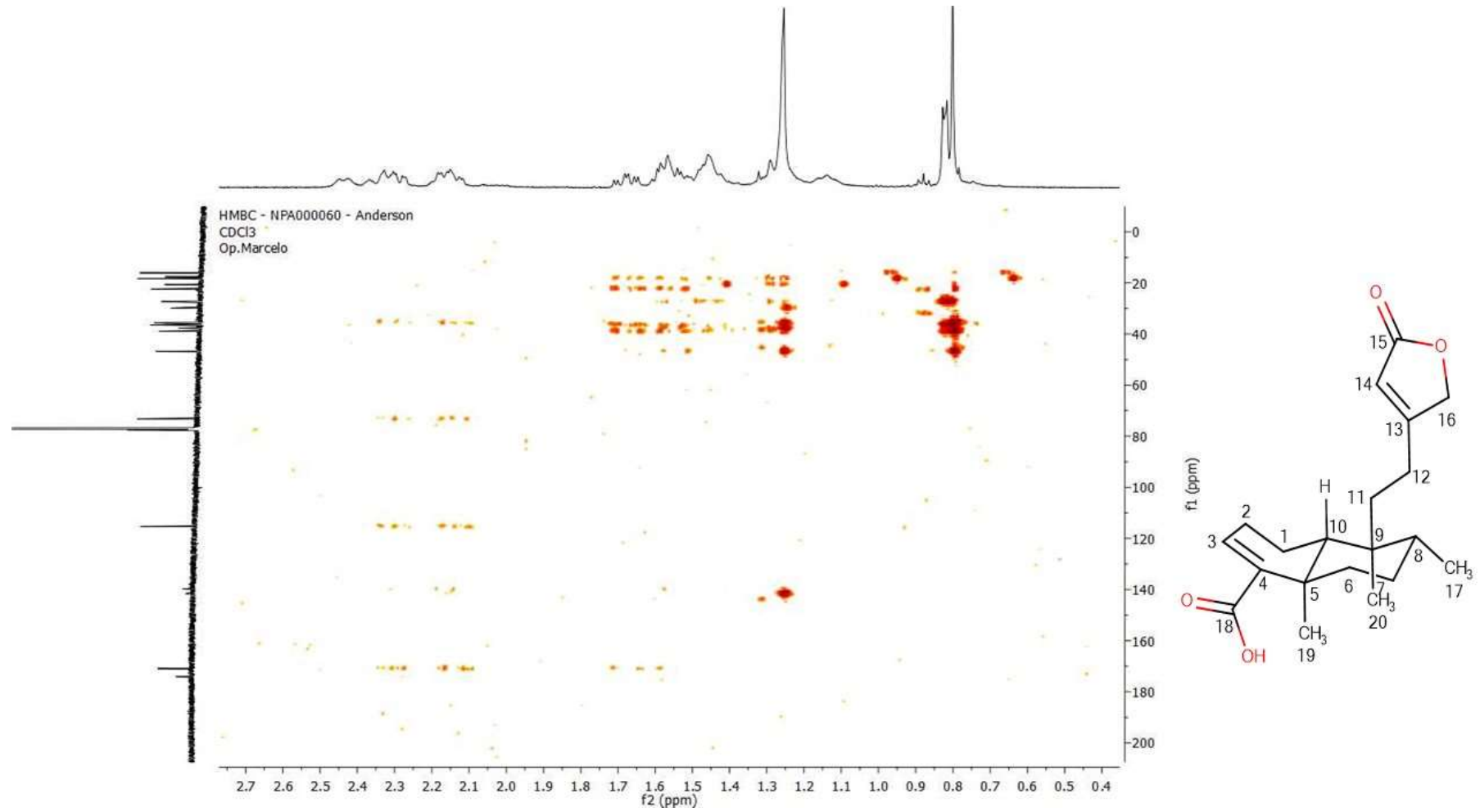
Fonte: Própria do autor.

Figura 143. Mapas de contorno HMBC de Vp – 13 (δ , DMSO- d_6 , 500 MHz e 125 MHz)



Fonte: Própria do autor.

Figura 144. Primeira expansão dos mapas de contorno HMBC de Vp – 13 (δ , DMSO- d_6 , 500 MHz e 125 MHz)



Fonte: Própria do autor.

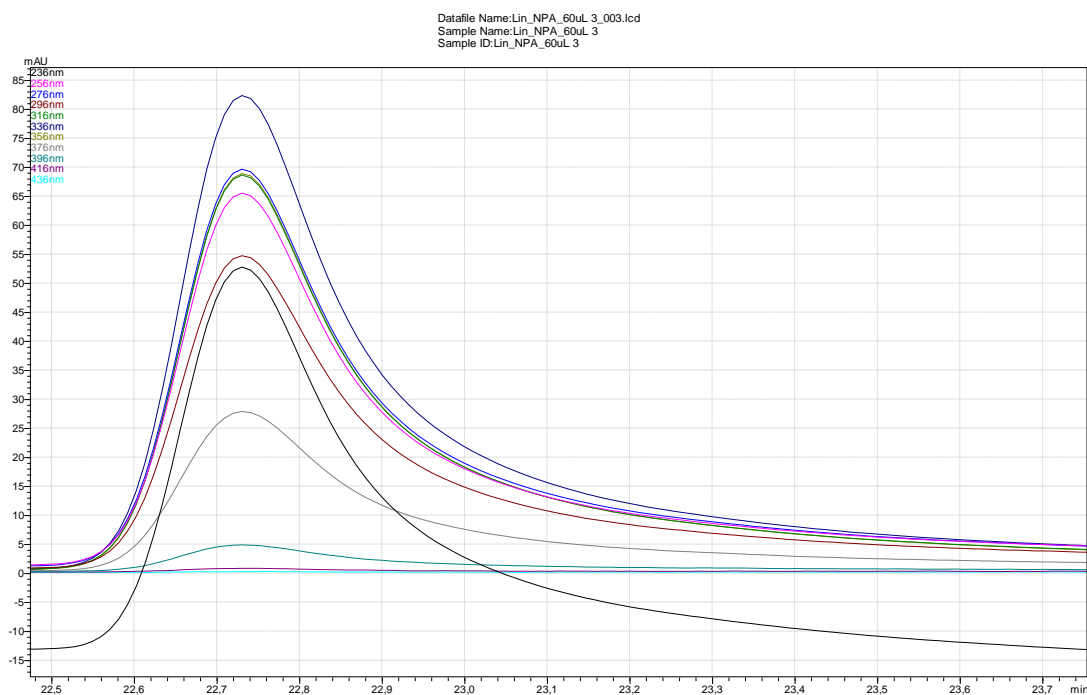
5.2 Determinação da concentração da amentoflavona no extrato etanólico de *V. plicata* por CLAE

Tendo em vista o isolamento de Vp – 10 (amentoflavona) em alta concentração a partir do extrato etanólico, mesmo utilizando métodos cromatográficos clássicos e o potencial emprego de *V. plicata* como fonte natural deste composto, a concentração da amentoflavona foi determinada por métodos analíticos quantitativos.

5.2.1 Curva analítica e linearidade

A amentoflavona, utilizada como padrão, foi isolada neste estudo com um grau de pureza > 95% (Figura 146) quando analisada por CLAE-DAD e RMN ¹H (Figura 89, página 180). O marcador foi utilizado para a construção da curva analítica com as concentrações 30, 60, 90, 120 e 150 µg/mL.

Figura 146. Grau de pureza do pico da amentoflavona em diferentes comprimentos de onda



Fonte: Própria do autor.

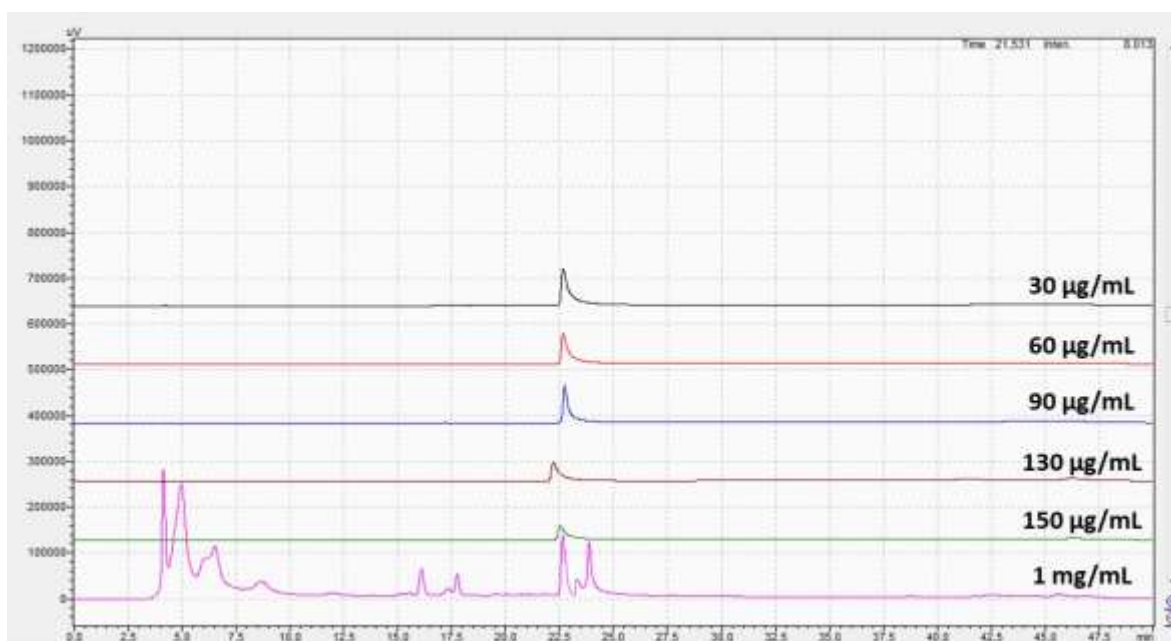
O desenvolvimento do método cromatográfico (Quadro 03) para as análises da concentração da amentoflavona no extrato compreendeu a utilização das variáveis: tipos de solventes orgânicos e a utilização ou não de ácido. Assim, observou-se que a utilização de MeOH como solvente orgânico e adição de 0,1% de ácido fórmico levou a uma boa resolução do pico do cromatograma e em um menor tempo de análise (Figura 147).

Quadro 03 – Sistema de eluição das concentrações de 30, 60, 90, 120, 150 $\mu\text{g/mL}$ e do extrato etanólico de *V.plicata* (Solvente A – H_2O acidificada com ácido fórmico 0,1% e solvente B – MeOH)

Tempo	% de B (Metanol)
0,01	50
10,00	70
15,00	80
20,00	92
28,00	92
32,00	100

Fonte: Própria do autor.

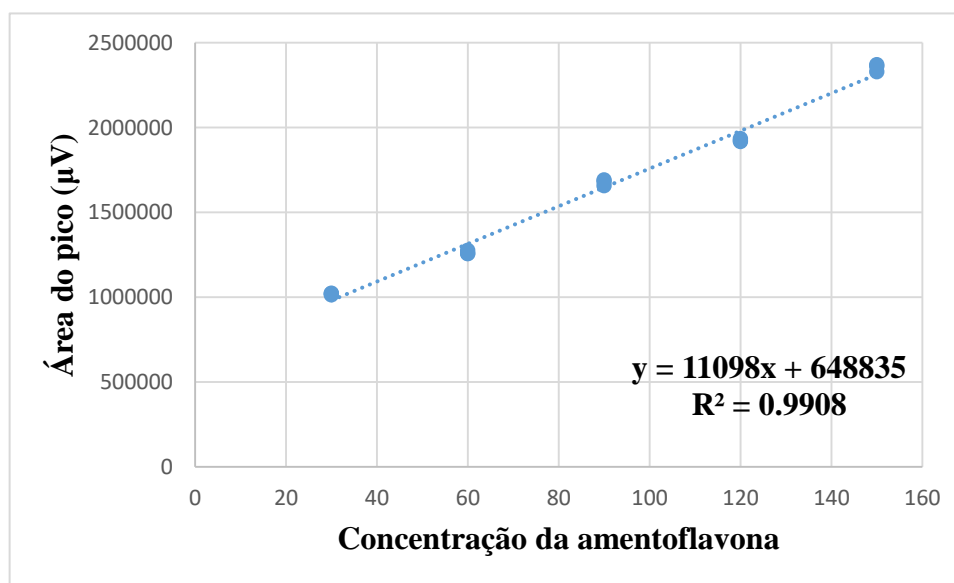
Figura 147. Método cromatográficos das concentrações de amentoflavona e do extrato de *V.plicata*



Fonte: Própria do autor.

As amostras das diferentes concentrações foram analisadas por CLAE-DAD em injeções em triplicata no cromatógrafo e os valores das áreas dos picos cromatográficos (y) foram plotados em relação à concentração (x, µg/mL) utilizando regressão linear obtendo-se a equação da reta ($y = 11098x + 648835$) (Figura 148). A análise de variância da regressão levou à determinação da existência de um coeficiente angular significativo e à validade da reta de regressão ($r^2=0,9908$).

Figura 148. Curva analítica do padrão amentoflavona (C18, $\lambda=336$ nm) nas concentrações de 30, 60, 90, 120 e 150 µg/mL



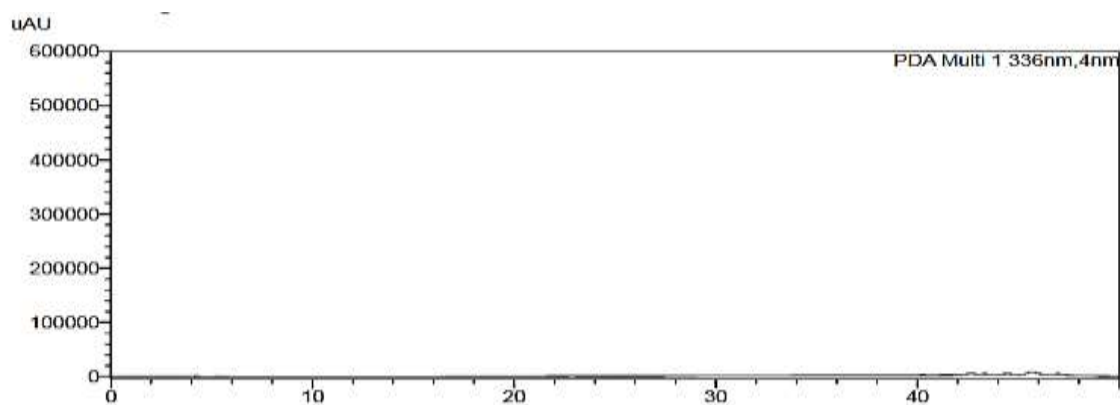
Fonte: Própria do autor.

5.2.2 Quantificação

O método analítico desenvolvido foi utilizado para quantificar a amentoflavona no extrato etanólico bruto de *V. plicata*. Assim, o pico referente a amentoflavona ($T_R=22,6$ min) foi identificado e a média correspondente a essa banda cromatográfica foi de 106,92 µg/mg de extrato bruto de *V. plicata*. Em adição foi possível observar que o desvio padrão relativo (DPR) obtido foi inferior a 5% conforme preconizado pela RE 899/2003, considerando-se válidos os valores obtidos (BRASIL, 2003).

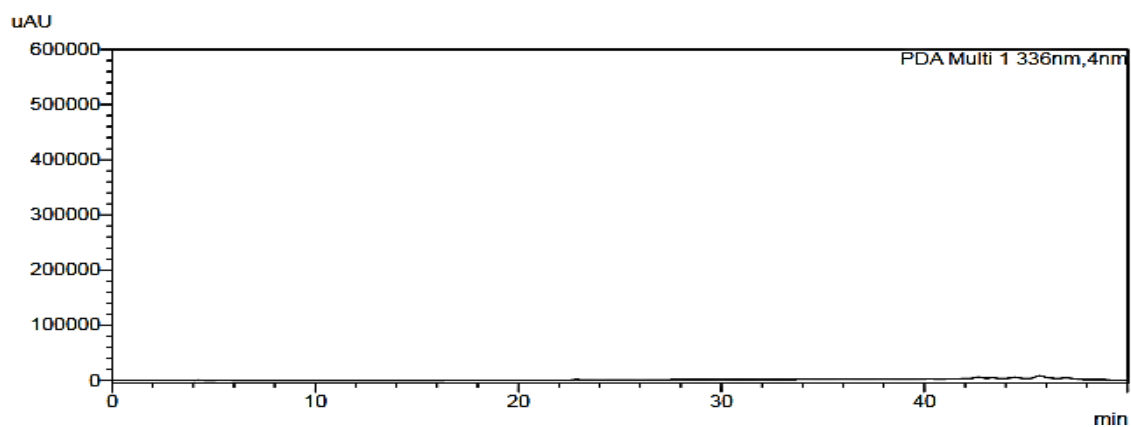
Para avaliar a especificidade do método para a quantificação da amentoflavona, foram analisados os controles negativos em triplicata separadamente (fase móvel – branco, solvente extrator – etanol e solução diluente – metanol) (Figuras 149, 150 e 151, página 252) para confirmar que não existia picos coeluinto no T_R do marcador em análise.

Figura 149. Cromatograma do controle negativo (fase móvel – branco)



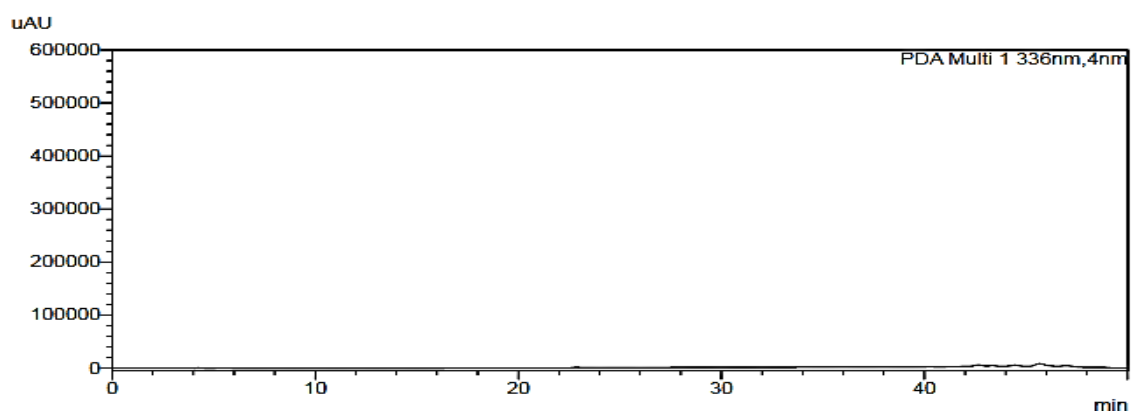
Fonte: Própria do autor.

Figura 150. Cromatograma do controle negativo (solvente extrator – etanol)



Fonte: Própria do autor.

Figura 151. Cromatograma do controle negativo (solvente extrator – metanol)

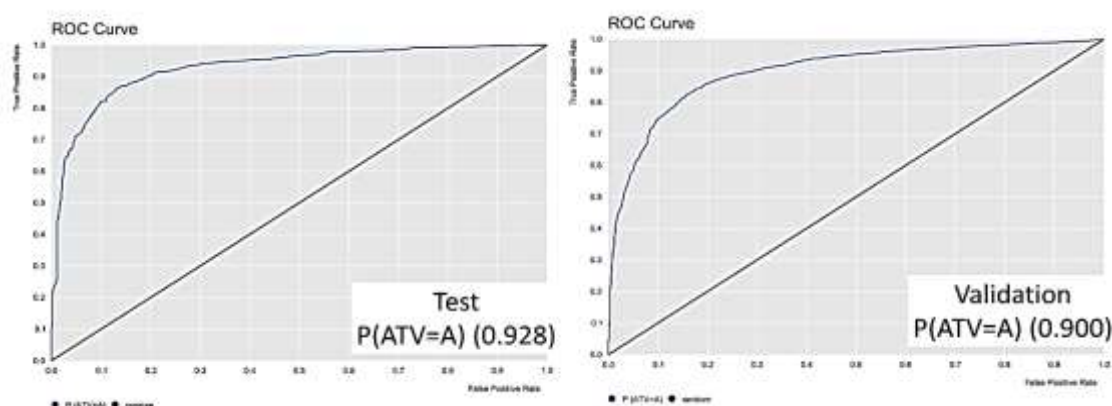


Fonte: Própria do autor.

5.3 Análises computacionais

Inicialmente, os compostos isolados (1 – 11) foram submetidos a um modelo de predição de atividade biológica desenvolvido no KNIME, onde os compostos 2, 5, 9, 10 e 11 foram aprovados, ou seja, apresentaram valores maiores que 50%. Os dados estatísticos gerados pelo próprio modelo comprovaram a sua capacidade preditiva, onde o primeiro parâmetro considerado foi a curva ROC (do inglês *receiver operator characteristic*) que para o grupo teste foi de 0,928 e para a validação interna foi de 0,900 (Figura 152). Além dessas curvas, o modelo pode ser avaliado analisando-se outros parâmetros como a acurácia, o coeficiente de Matthews (MCC), especificidade, precisão e sensibilidade, conforme mostrado na Tabela 20.

Figura 152. Curva ROC do modelo criado (curva do grupo teste à direita e grupo de validação interna à esquerda).



Fonte: Própria do autor.

Tabela 20. Dados estatísticos do modelo de predição feito no KNIME

Dados	Teste	Validação cruzada
Verdadeiro Positivo (VP)	706	2083
Falso Positivo (FP)	93	362
Verdadeiro Negativo (VN)	517	1468
Falso Negativo (FN)	103	342
Predição	0,88	0,85
Sensibilidade	0,87	0,86
Especificidade	0,85	0,80
MCC	0,72	0,66
Acurácia	0,86	0,83

Fonte: Própria do autor.

Na literatura observou-se que há estudos completos que avaliam o potencial anti-HIV-1 dos compostos **2** e **5** (MEHLA; BIVARLKAR_MEHLA; CHAUHAN, 2011; TAMAYOSE et al., 2019). Desta forma, apenas os compostos **9**, **10** e **11** (biflavonoides) seguiram as etapas posteriores deste estudo, que também apresentaram probabilidade de atividade acima de 50%.

Além da predição de atividade, foram preditos os riscos de toxicidade através do OSIRIS, levando em consideração dois parâmetros toxicológicos importantes: mutagenicidade (MUT) e carcinogenicidade (CAR). De acordo com os dados obtidos (Tabela 21), os três biflavonoides (**9**, **10** e **11**) não apresentaram riscos de toxicidade alarmantes dentro dos parâmetros analisados pelo software.

Tabela 21. Porcentagem de dados de restrição oral e citotoxicidade

Composto	FM	Massa	% ABS	Toxicidade	
				MUT	CAR
9	C ₃₀ H ₁₈ O ₁₀	538.45	48.98	Não	Não
10	C ₃₂ H ₂₂ O ₁₂	598.53	48.98	Não	Não
11	C ₃₁ H ₂₀ O ₁₁	568.55	52.16	Não	Não

Fonte: Própria do autor.

O OSIRIS também calculou a área de superfície topológica total dos compostos. Assim, tornando possível calcular a taxa de absorção oral de qualquer candidato à bioativo (HARIKA; KUMAR; REDDY, 2017; TOEPAK; TAMBUNAN, 2017; SHIRI, PIRHADI; RAHMANI, 2018). Esta pesquisa utilizou o medicamento comercial ritonavir, que apresenta uma % ABS igual a 36,60%, como valor mínimo para o composto não fosse excluído. De acordo com a Tabela 20 (página 272), os compostos **9**, **10** e **11** apresentaram uma taxa de absorção acima do valor de referência mínimo, indicando a possibilidade de que esses bioativos possam ser administrados via oral.

Outras análises realizadas foram as predições de permeabilidade e absorção intestinal. Para isso, usou-se como modelo preditivo semelhante ao usado para a predição de atividade biológica, cujos resultados já foram discutidos anteriormente. Ao analisar primeiramente a permeabilidade intestinal foi possível dizer que os compostos isolados (**9**, **10** e **11**) apresentam possibilidade positiva. O mesmo resultado foi obtido quando com três biflavonoides foram submetidos a predição da capacidade de absorção pelo intestino. Esses dados, juntamente com os dados estatísticos do modelo estão demonstrados na Tabela 22, comprovando a aceitabilidade dos modelos.

Tabela 22. Dados de modelos de predição de permeabilidade e absorção intestinal

Dados	Permeabilidade intestinal		Absorção intestinal	
	Teste	Validação cruzada	Teste	Validação cruzada
VP	706	2083	706	2083
FP	93	362	93	362
VN	517	1468	517	1468
FN	103	342	103	342
Precisão	0.88	0.85	0.88	0.85
Sensitividade	0.87	0.86	0.87	0.86
Especificidade	0.85	0.80	0.85	0.80
MCC	0.72	0.66	0.72	0.66
Acurácia	0.86	0.83	0.86	0.83

Fonte: Própria do autor.

Os biflavonoides também foram submetidos ao Docking molecular através do software MVD para conhecermos as energias de interação ligante-receptor e quais são esses sítios de interação entre as proteínas protease (PR, PDB ID 6DIF), a integrase (IN, PDB ID 1QS4) e transcriptase reversa (RT, PDB ID 3LP0), juntamente com dezoito fármacos usados como controles e os inibidores complexados juntos a cada proteína para a discussão dessas interações.

A Tabela 23 demonstrou que os três compostos testados apresentaram bons resultados MolDock Score no docking molecular. Para cada proteína usada foi possível perceber que alguns compostos apresentaram resultados melhores que muitos controles. Essa comparação fica mais fácil de visualizar através da interpretação da Figura 153 (página 255).

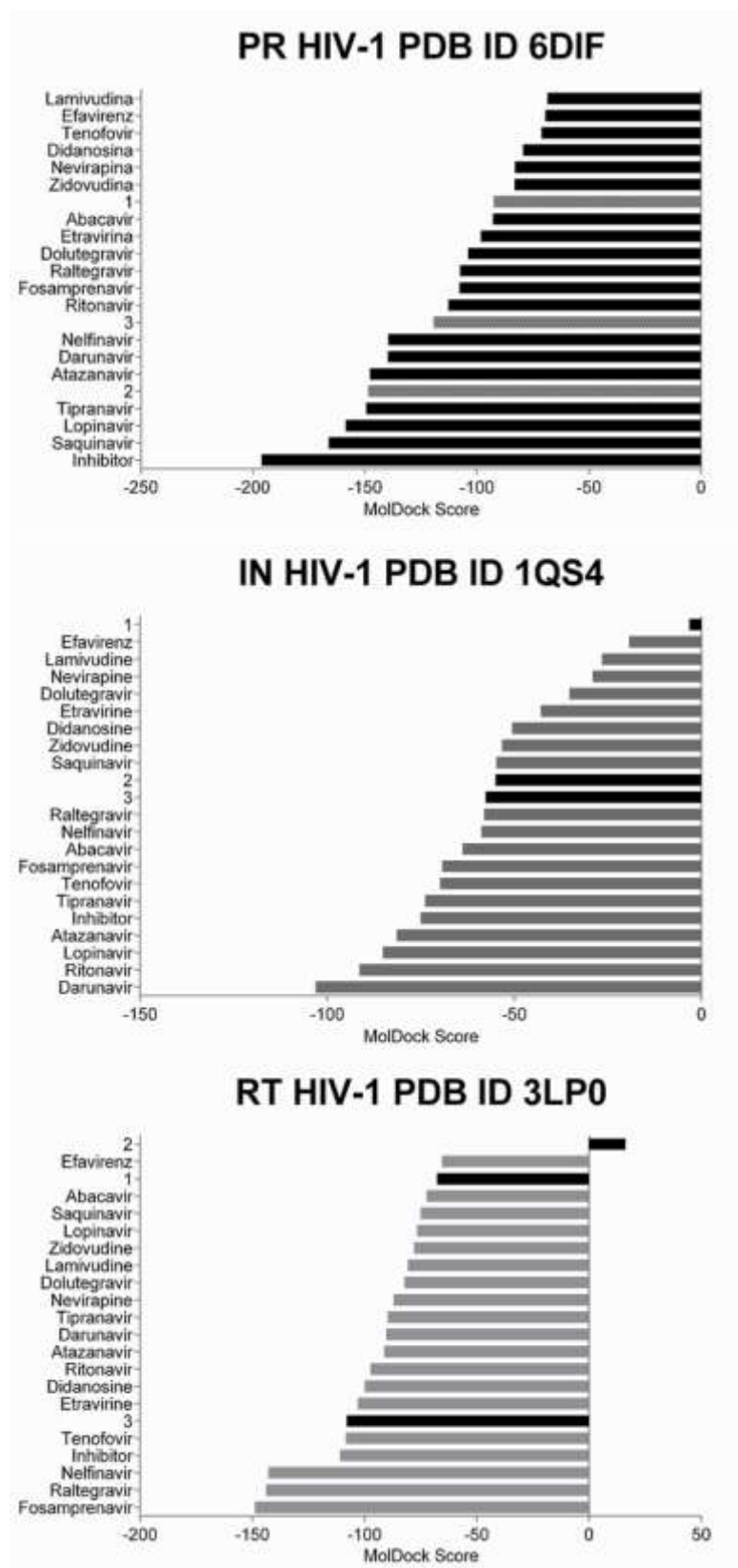
Tabela 23. Dados de energia total de ligação para as proteínas utilizadas para o acoplamento molecular

Nomes	Tipo	PR	IN	RT
		[kcal.mol⁻¹]		
Inibidor	Inibidor	-196.0680	-74.9387	-110.8010
9		-148.5010	-54.9542	16.2423
10	Amostras	-92.4785	-57.6865	-108.0300
11		-119.2970	-3.1652	-67.7427
Abacavir		-92.8272	-63.8193	-72.2493
Atazanavir		-147.7670	-81.3486	-91.2420
Darunavir	Controles	-139.8320	-102.9980	-90.2859
Didanosine		-79.4684	-50.5311	-99.9057
Dolutegravir		-103.8840	-35.1842	-82.2243
Efavirenz		-69.4114	-19.2434	-65.4364

Etravirine	-98.3168	-42.8782	-102.8940
Fosamprenavir	-107.7580	-69.1718	-148.8650
Lamivudine	-68.4426	-26.4748	-80.6608
Lopinavir	-158.5830	-85.1169	-76.4883
Nelfinavir	-139.5340	-58.7402	-142.7410
Nevirapine	-83.0143	-29.0113	-87.0306
Raltegravir	-107.5950	-58.0178	-143.7700
Ritonavir	-112.7040	-91.3027	-97.2929
Saquinavir	-166.2150	-54.7717	-74.8533
Tenofovir	-71.1458	-69.7402	-108.2260
Tipranavir	-149.4440	-73.7654	-89.7274
Zidovudine	-83.2664	-53.2381	-77.9754

Fonte: Própria do autor.

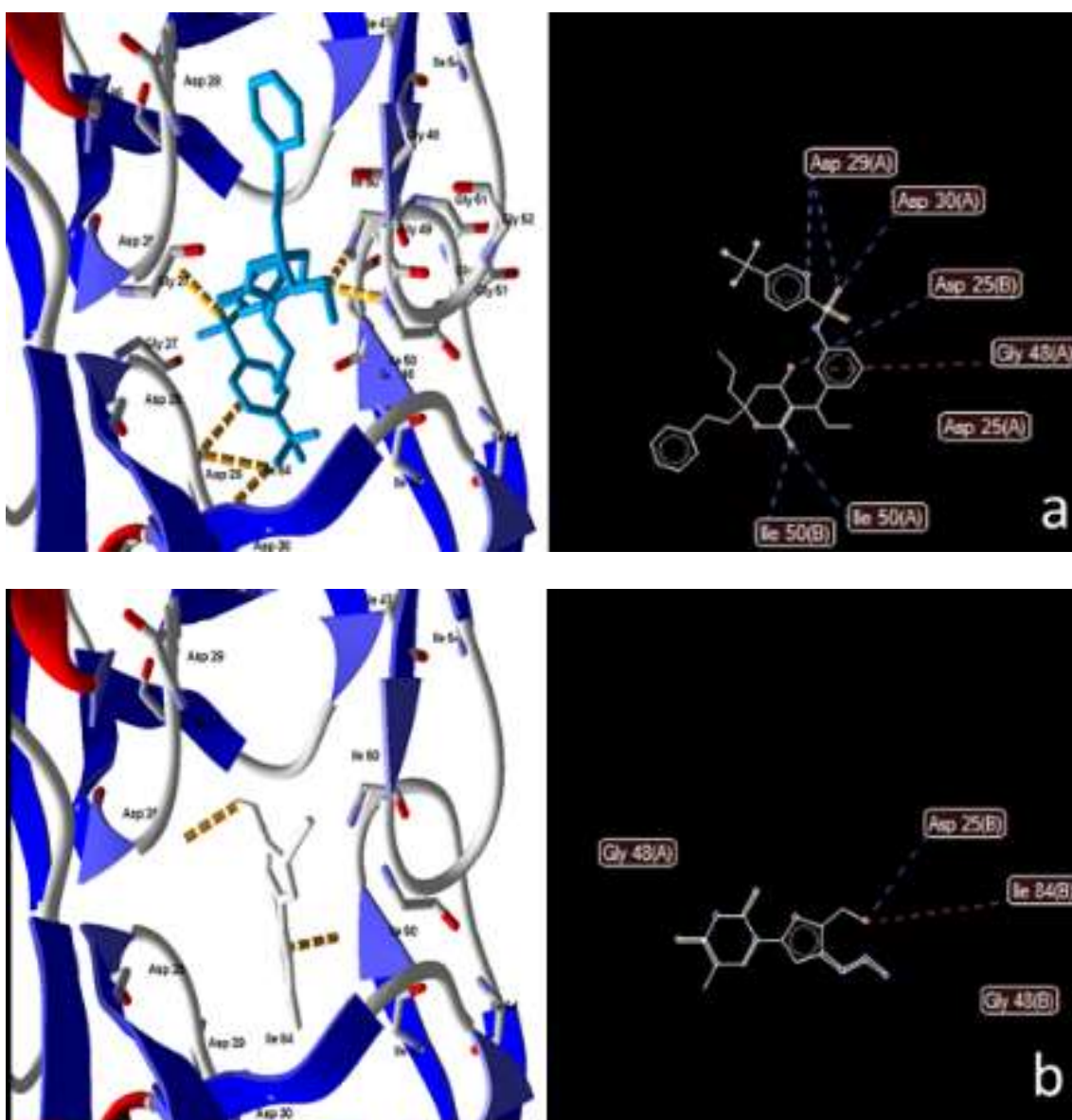
Figura 153. Gráficos comparativos entre as energias do MolDock Score para cada enzima selecionada envolvida no ciclo de replicação do HIV-1 (1=**11**, 2=**9** e 3=**10**)

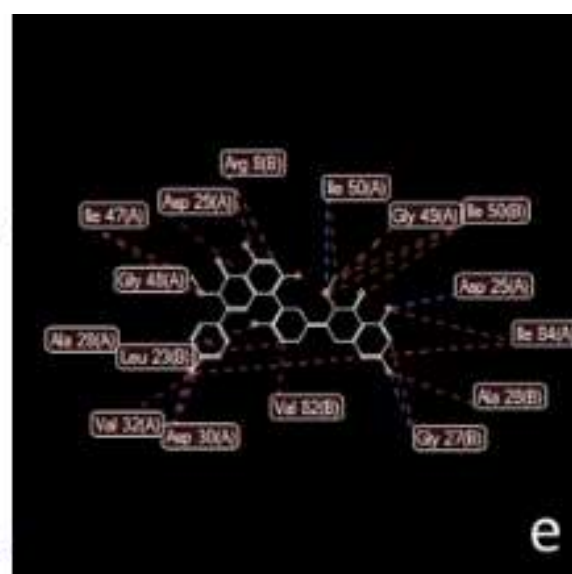
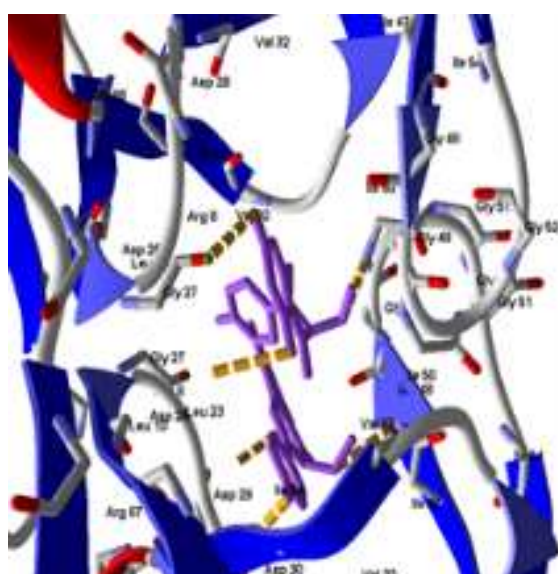
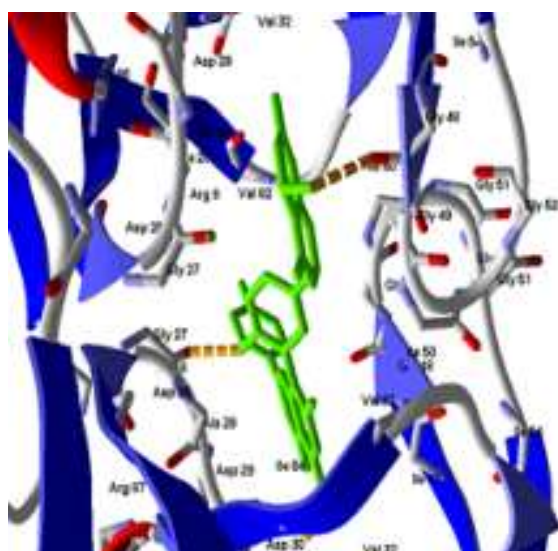
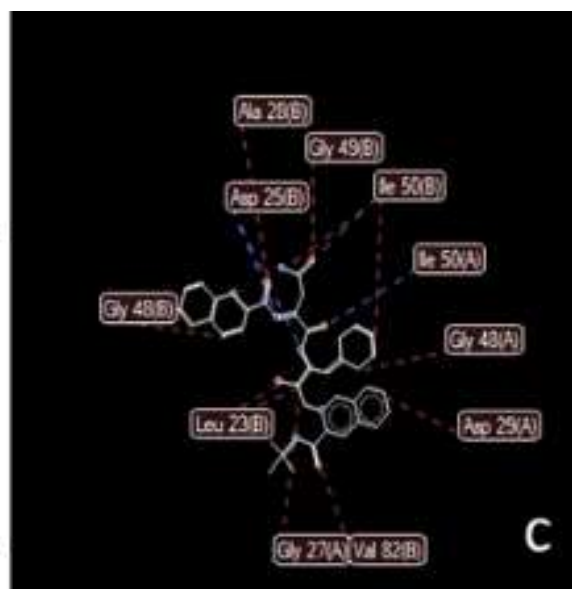
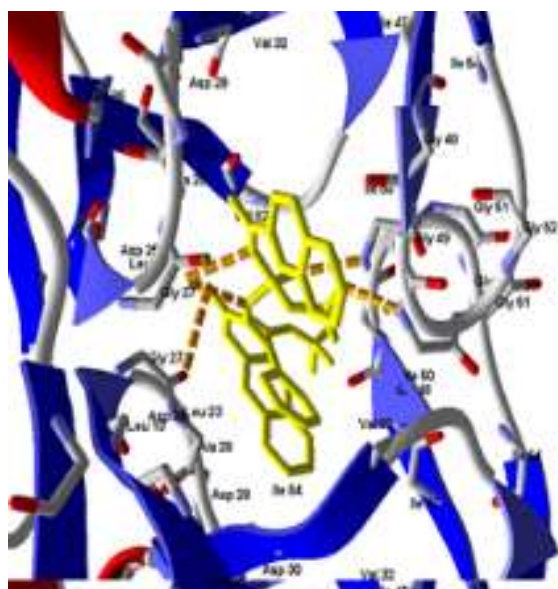


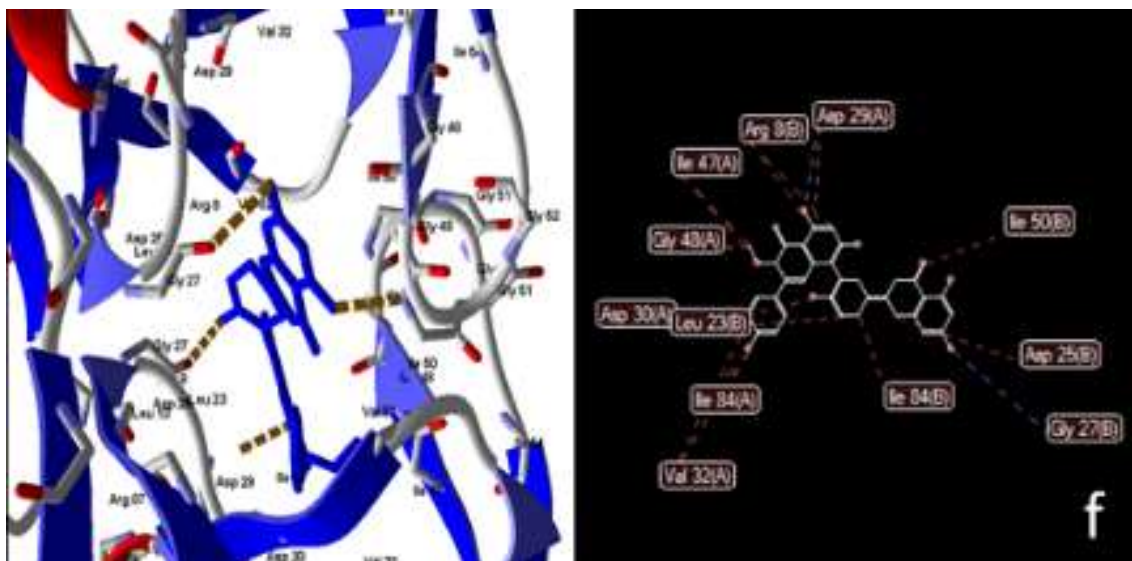
Fonte: Própria do autor.

Ao analisar os dados obtidos no *docking* para protease (Figura 154), a **10** (-92.4785 kcal.mol⁻¹) apresentou interação superior a 12 dos controles, inclusive com melhor resultado de energia de interação total que todos os inibidores de protease testados: atazanavir, saquinavir, fosamprenavir, nelfinavir, tipranavir (inibidor), ritonavir, lopinavir and darunavir.

Figura 154. Imagens geradas a partir das interações ligante-receptor do *docking* molecular usando a enzima *protease* (PDB ID 6DIF). a) o inibidor complexado com a proteína, b) o AZT usado como controle, c) darunavir, d) **9**, e) **10** e f) **11**



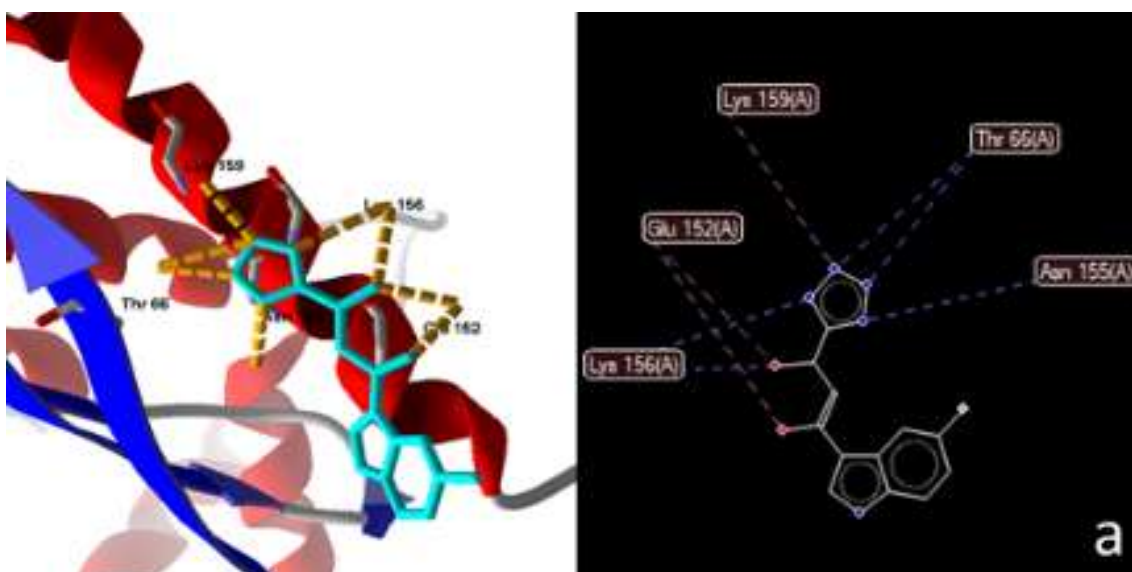


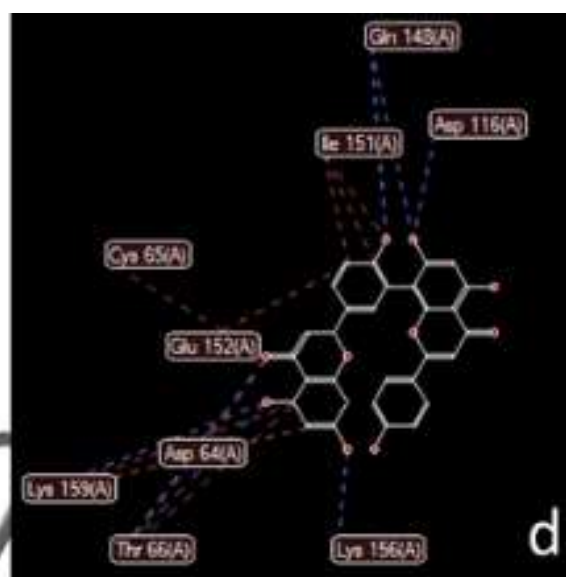
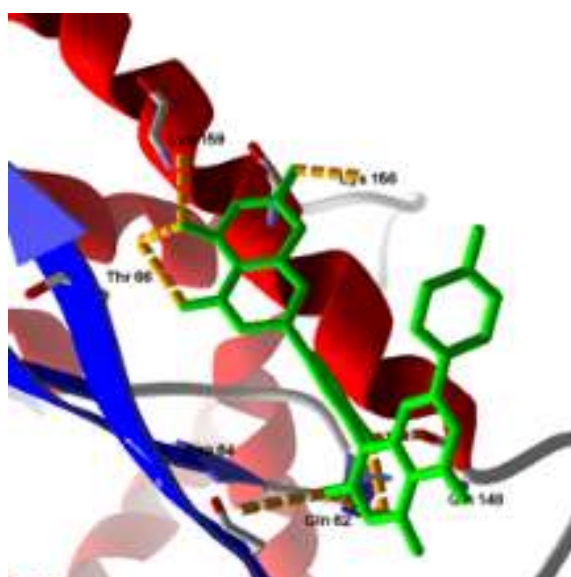
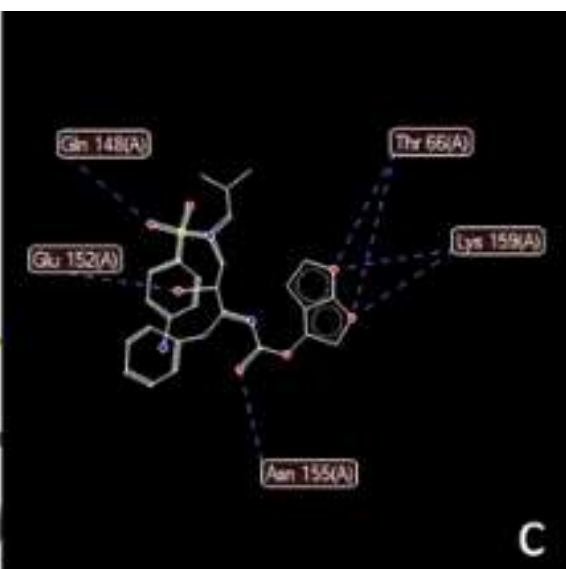
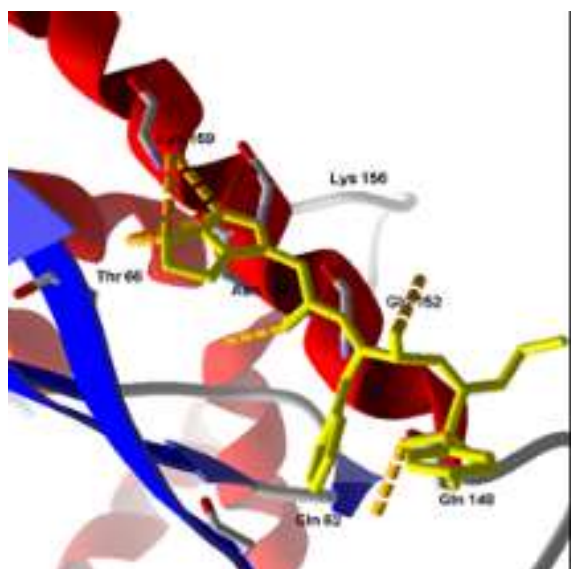
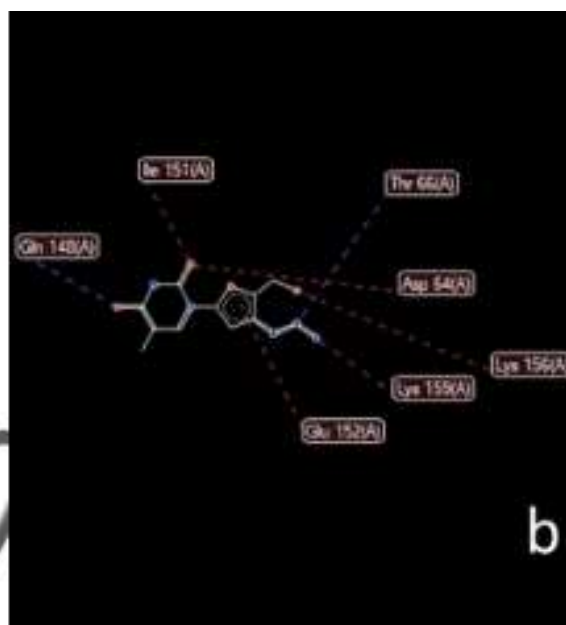
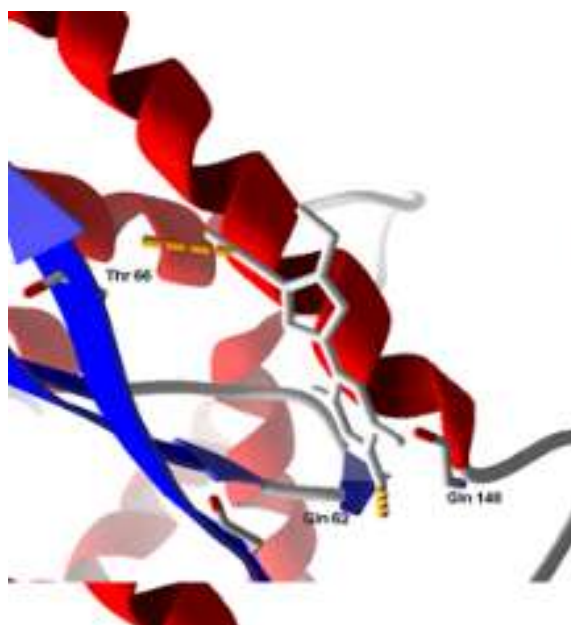


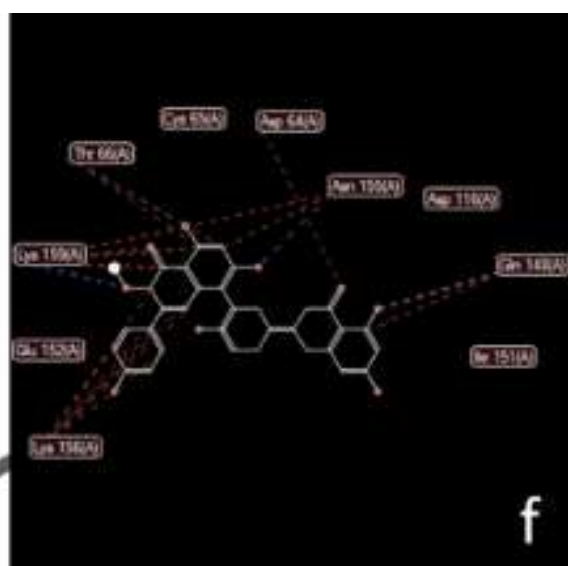
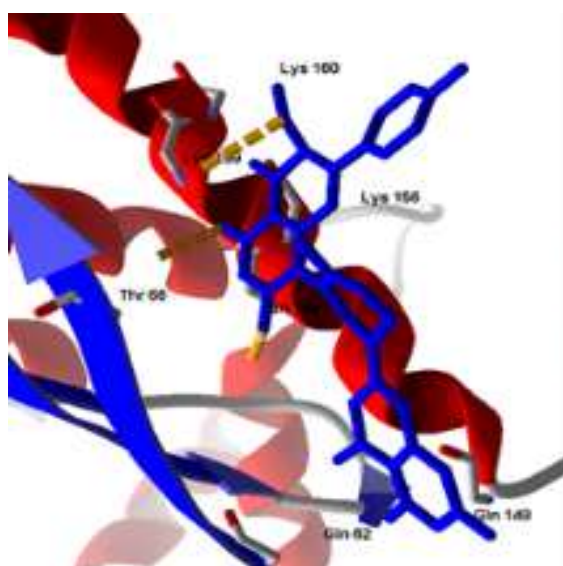
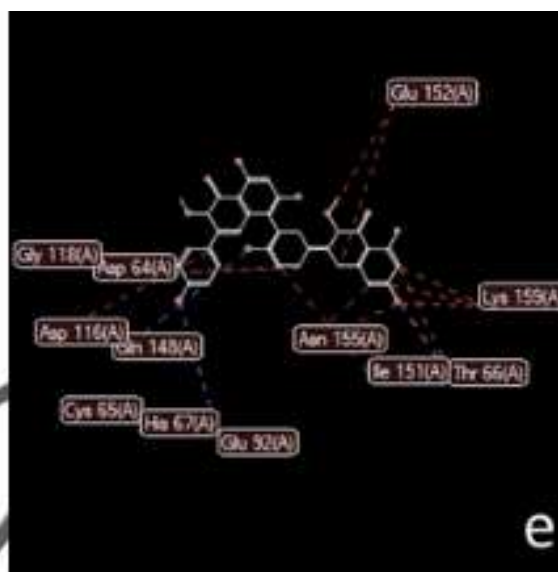
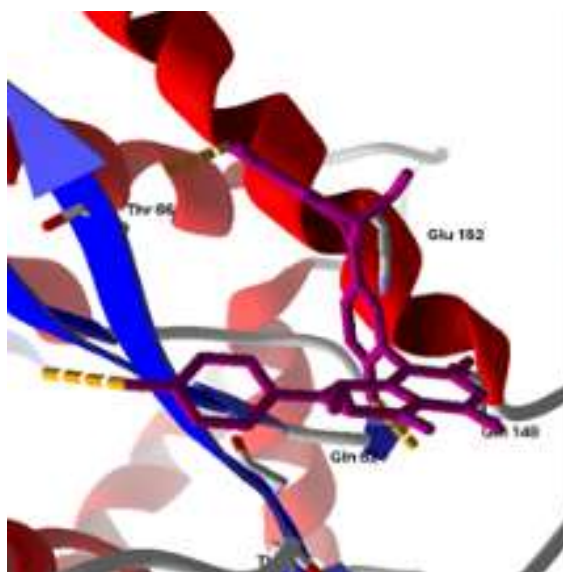
Fonte: Própria do autor.

Para a integrase, os resultados (Figura 155) mostraram que a 10 e a 9 ($-57.6865 \text{ kcal.mol}^{-1}$ and $-54.9542 \text{ kcal.mol}^{-1}$, respectivamente) apresentaram interações semelhantes com o sítio ativo do receptor de IN escolhido. Já para RT, a 9 ($16.2423 \text{ kcal.mol}^{-1}$) não apresentou bom resultado de energia ligante-receptor, porém, destaca-se ainda a necessidade de testes biológicos específicos frente a essa enzima que são indispensáveis antes dessa conclusão (Figura 156, página 263).

Figura 155. Imagens geradas a partir das interações ligante-receptor do *docking* molecular usando a enzima *integrase* (PDB ID 1QS4). a) o inibidor complexado com a proteína, b) o AZT usado como controle, c) darunavir, d) 9, e) 10 e f) 11

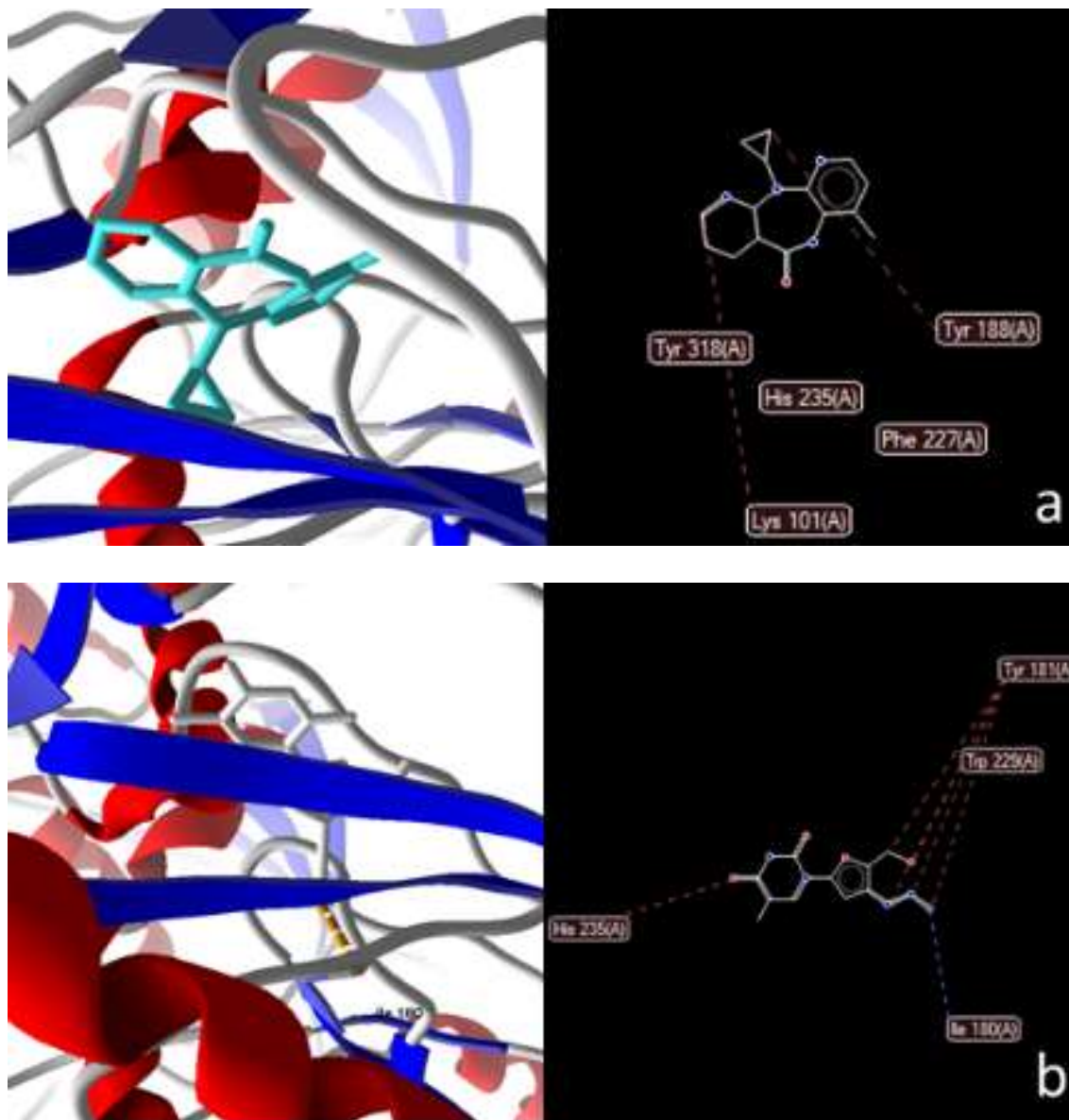


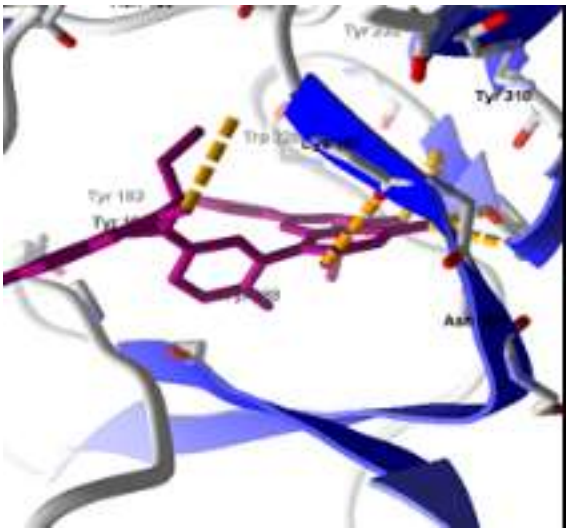
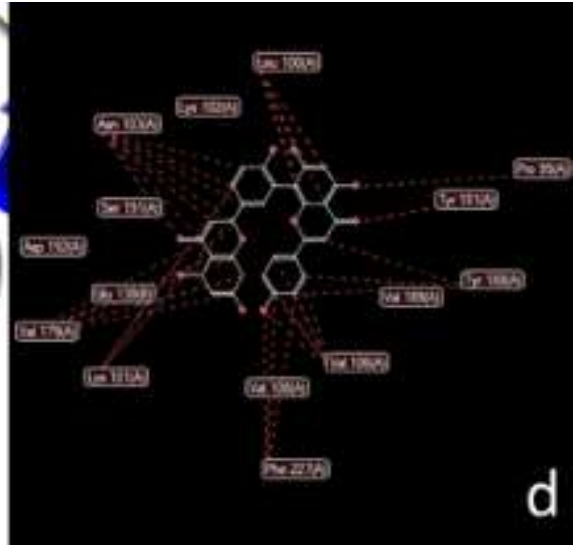
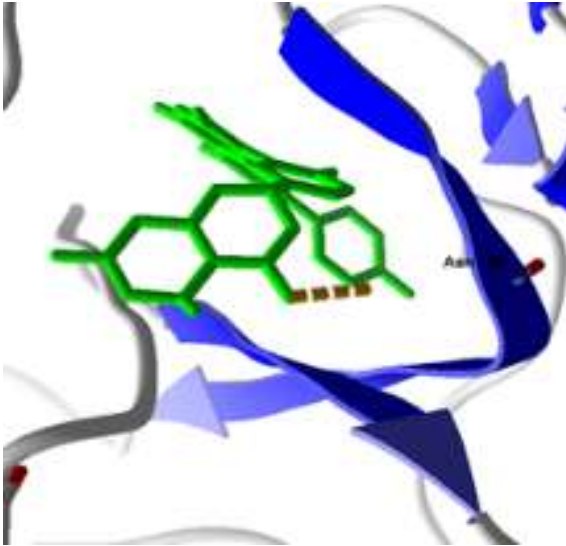
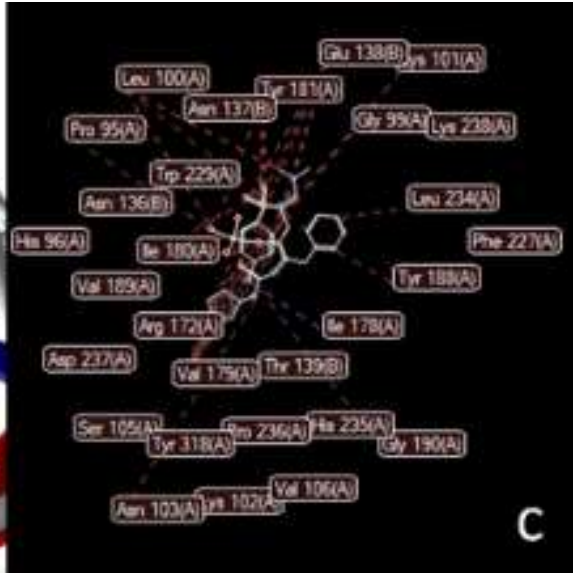
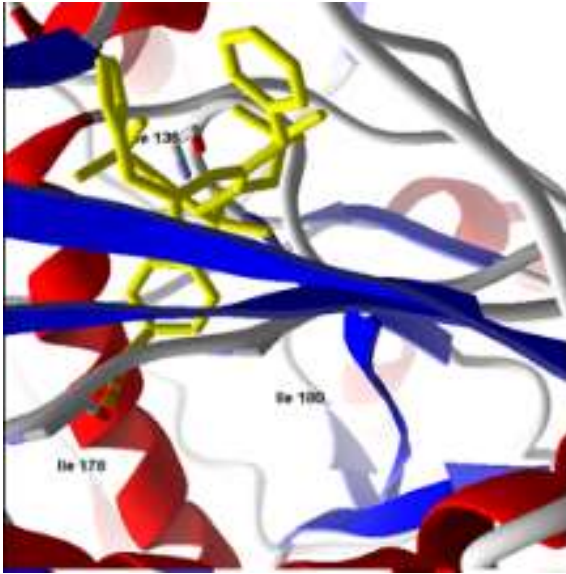


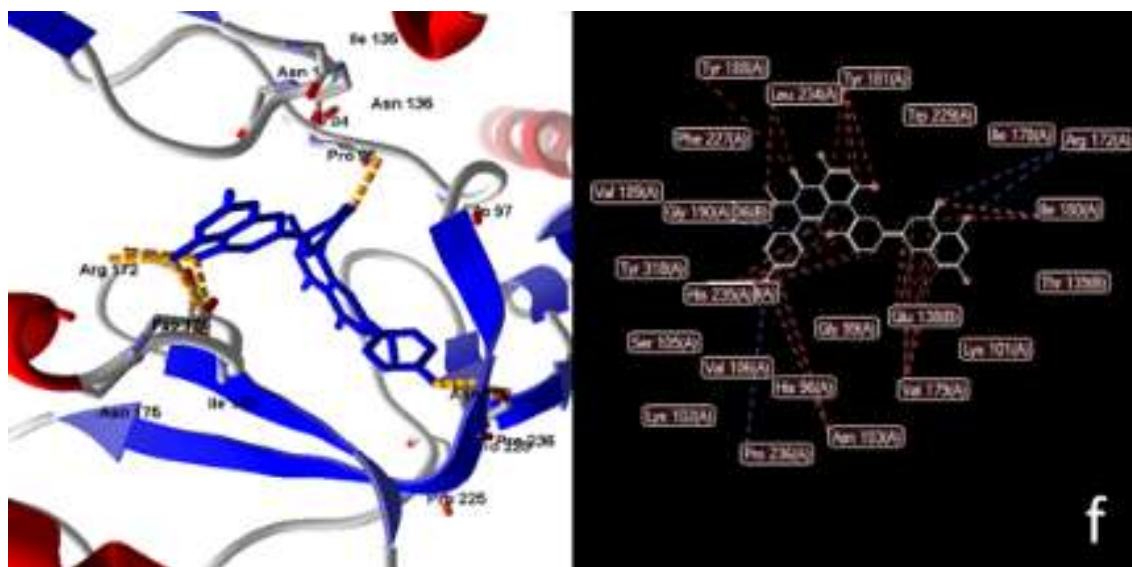


Fonte: Própria do autor.

Figura 156. Imagens geradas a partir das interações ligante-receptor do *docking* molecular usando a enzima *transcriptase reversa* (PDB ID 3LP0). a) o inibidor complexoado com a proteína, b) o AZT usado como controle, c) darunavir, d) **9**, e) **10** e f) **11**







Fonte: Própria do autor.

Por fim, para encerrar as discussões sobre as ferramentas computacionais empregadas na análise *in silico* nesta pesquisa, os biflavonoides foram importados para o software METASITE, onde as estruturas após metabolização hepática foram preditas, além de ranqueá-las com estimativas de formação. De acordo com os dados obtidos nessa análise, a via metabólica no fígado corresponde principalmente pela hidroxilação aromática pelas enzimas do citocromo P450 para a **9**. Para o composto isolado **10** apresentou maior expressão para a via metabólica que leva a *O*-desalquilação, hidroxilação e a carboxilação de alguns grupos aromáticos e alifáticos em sua estrutura, assim como o **11** (Tabela 24, página 266).

Além de conhecer e discutir as principais vias metabólicas para os três compostos isolados, os metabólitos hepáticos foram exportados através de um único arquivo SDF, onde estes metabólitos gerados foram submetidos a predição dos riscos de toxicidade, quanto a MUT e CAR (Tabela 24, página 266).

A **9** apresentou 10 metabólitos secundários principais, onde o metabólito 5 apresentou ranking de 100% no processo de metabolismo hepático, seguindo do metabólito 10 com 49.17%, os metabólitos 11, 6 e 7 apresentaram score entre 20% e 30%. A **10** apresentou 16 metabólitos de acordo com a simulação de metabolismo no fígado, O metabólito 24 apresentou score de 100% no processo de metabolismo, os metabólitos 14, 23, 24 e 26 apresentaram score entre 31% e 39%, além dos metabólitos 15 e 27 com ranking de 24.88%. Já a **11** apresentou o metabólito 40 com score de 100%, seguidos dos metabólitos 30, 31, 33, 39, 41 e 42 com *score* entre 20% e 48% (Tabela 24, página 266).

Tabela 24. Dados de *Score* e citotoxicidade *in silico* dos metabólitos hepáticos

Compostos	Metabólitos ID	Reação	Score	MUT	CAR
9	Metabólito 05	Hidroxilação alifática	100.00	Não	Não
	Metabólito 06	Hidroxilação aromática	25.04	Não	Não
	Metabólito 07	Hidroxilação aromática	20.15	Não	Não
	Metabólito 10	Hidroxilação aromática	49.17	Não	Não
	Metabólito 11	Hidroxilação aromática	29.95	Alto	Não
10	Metabólito 14	Hidroxilação alifática	36.48	Não	Não
	Metabólito 15	Hidroxilação alifática	24.88	Não	Não
	Metabólito 23	Hidroxilação aromática	31.42	Não	Não
	Metabólito 24	<i>O</i> -Desalquilação	100.00	Não	Não
	Metabólito 25	<i>O</i> -Desalquilação	38.80	Não	Não
	Metabólito 26	Hidroxilação alifática	36.48	Não	Não
11	Metabólito 27	Hidroxilação alifática	24.88	Não	Não
	Metabólito 30	Hidroxilação alifática	47.38	Não	Não
	Metabólito 31	Hidroxilação alifática	28.52	Não	Não
	Metabólito 33	Hidroxilação aromática	20.17	Não	Não
	Metabólito 39	Hidroxilação aromática	29.38	Não	Não
	Metabólito 40	<i>O</i> -Desalquilação	100.00	Não	Não
	Metabólito 41	Hidroxilação alifática	47.38	Não	Não
Metabólito 42	Hidroxilação alifática	28.52	Não	Não	

Fonte: Própria do autor.

Para a proposição de um bioativo é importante conhecermos seus metabólitos e vias metabólicas principais, contudo, os compostos quando metabolizados pelo fígado sofrem modificações estruturais, podendo gerar compostos nocivos ao organismo (ALMAZROO; MIAH; VENKATARAMANAN, 2017). Assim, este deve ser também um fator importante a ser avaliado quando se propõe novos compostos bioativos a serem candidatos à fármacos. Ainda, de acordo com a Tabela 24 (página 279), observou-se que o composto 9 apresentou um score de 29,95% de alto risco de mutagenicidade, segundo a predição realizada no OSIRIS.

Através dos dados referentes a análise computacional do processo de metabolismo no fígado, as moléculas não apresentaram inviabilidade metabólica, sendo possível seguir com a última etapa dessa pesquisa que consiste nos ensaios biológicos de viabilidade celular e efeito anti-HIV-1 dos compostos **9**, **10** e **11**.

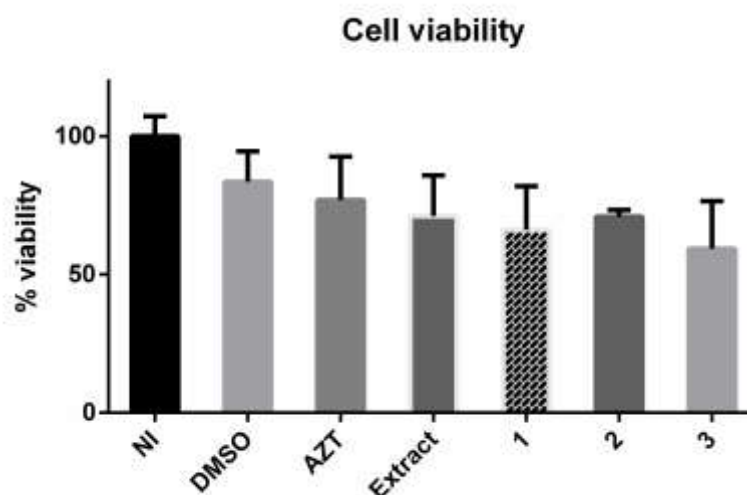
5.4 Ensaios biológicos

5.4.1 Viabilidade celular e atividade anti-HIV-1

Os dados que foram obtidos por espectrofotometria demonstraram que a quantidade de células JLTRF – R5 não infectadas (normais) não sofreram reduções consideráveis após adição dos três compostos e do extrato etanólico, quando comparados com o AZT e, assim, validando o modelo predito pelo OSIRIS.

A droga padrão (AZT) apresentou uma viabilidade de 76,99% (toxicidade de 23,01%), **Vp – 9 (=2)** com uma viabilidade de 70,98% e toxicidade igual a 29,02%, **Vp – 10 (=3)** demonstrou viabilidade de 59,35% e toxicidade de 40,65% e **Vp – 11 (=1)** uma viabilidade de 66,17% e a toxicidade foi de 33,83%. O **extrato etanólico de *V.plicata* (=extract)** também foi testado, apresentando a melhor viabilidade e menor toxicidade entre as amostras analisadas (71,19% e 28,81%, respectivamente) (Figura 157).

Figura 157. Viabilidade celular para as amostras testadas



Fonte: Própria do autor.

Dessa forma, os ensaios baseados em determinar a viabilidade celular são frequentemente utilizados para rastrear coleções de compostos para determinar se as moléculas em teste têm efeitos na proliferação celular ou mostram efeitos citotóxicos diretos que eventualmente levam à morte celular (TERRY et al., 2016).

Além dos ensaios de viabilidade celular, também buscou-se avaliar o efeito anti-HIV-1 dos três biflavonoides e do extrato etanólico de *V.plicata*. Os valores expressos na Tabela 25 mostram o percentual de infecção restante no experimento após 48 horas de adição das drogas no meio de cultura contendo células Jurkat infectadas.

Tabela 25. Valores percentuais com base nos dados obtidos por citometria de fluxo (infecção/inibição) e viabilidade celular (espectrofotometria)

Teste	%			
	Infecção	Inibição	Viabilidade	Toxicidade
NI	1,04	98,96	100,00	0,00
DMSO	48,60	51,40	83,54	16,46
AZT	37,40	62,60	76,99	23,01
Extrato	48,10	51,90	71,19	28,81
9	47,25	52,75	70,98	29,02
10	48,65	51,35	59,35	29,02
11	48,70	51,30	66,17	33,83

Fonte: Própria do autor.

A Tabela 25 expressou que não há diferença entre o controle positivo (DMSO) e os compostos testados. Dessa forma, não foi observado, na metodologia utilizada, inibição viral do HIV-1 nas células testadas pelos biflavonoides e extrato etanólico.

Nesse estudo, o modelo computacional foi construído avaliando a atividade direta das substâncias na inibição de enzimas envolvidas no processo de infecção pelo HIV-1. Assim, várias variáveis não previstas no modelo podem influenciar a avaliação da atividade farmacológica (*in vitro*), como: a metodologia empregada, o perfil de solubilidade dos compostos, a escala de concentração dos compostos, bem como, parâmetros físico-químicos (BURTON et al., 1996; AVDEEF, 2001).

Observou-se no teste *in vitro* realizado nesse estudo que o DMSO não foi o solubilizante de amostras mais adequado. Desta forma, destacamos a necessidade de realizar a repetição do estudo anti-HIV-1 *in vitro* com otimização da metodologia testada (substituição do DMSO por outro solvente) ou adoção de outros mecanismos de testes farmacológicos.



6. CONCLUSÕES

O reestudo fitoquímico de *V. plicata* Mart. levou ao isolamento e caracterização estrutural de treze substâncias. Dessas, nove foram isoladas pela primeira vez na família e o biflavonoide 3'-apigenin-8''-isocampferídeo foi relatado pela primeira vez na literatura. A quantificação da amentoflavona no extrato etanólico bruto da espécie por meio do desenvolvimento de um método analítico permitiu identificar uma média correspondente de 106,91 µg/mg de amentoflavona no extrato, com desvio padrão relativo inferior a 5%, conforme preconiza a resolução 899/2003. O modelo de predição de atividade biológica para o HIV-1 aprovou Vp – 2, Vp – 5, Vp – 9, Vp – 10 e Vp – 11 como potenciais compostos ativos. Outros testes preditivos buscando informações farmacocinéticas dos biflavonoides (Vp – 9 a Vp – 11) demonstraram que não apresentaram riscos de toxicidade quanto à mutagenicidade e carcinogenicidade. O cálculo do percentual de absorção oral demonstrou que os compostos Vp – 9, Vp – 10 e Vp – 11 apresentaram uma taxa de absorção de 48,98%, 48,98% e 52,16%, respectivamente, sendo maiores que o controle (ritonavir = 36,60%). Os três biflavonoides também apresentaram possibilidade positiva quando avaliados nos modelos preditivos de permeabilidade e capacidade de absorção intestinal. O *Docking* molecular (software MVD) observou-se que para a enzima *protease*, o Vp – 10 (-92.4785 kcal.mol⁻¹) apresentou interação superior a 14 dos controles utilizados. Para a enzima *integrase*, o Vp – 10 e Vp – 11 (-57.6865 kcal.mol⁻¹ e -54.9542 kcal.mol⁻¹, respectivamente) apresentaram interações semelhantes com o sítio ativo do receptor escolhido, e para a *transcriptase reversa*, o Vp – 10 (-108.0300) apresentou melhor interação. A predição das estruturas dos biflavonoides após metabolização hepática com estimativas de formação de mutagenicidade e carcinogenicidade identificou que Vp – 10 apresentou um *score* de 29,95% de alto risco de mutagenicidade. As investigações *in vitro* demonstraram que dentre os compostos testados, o extrato etanólico de *V. plicata* M. (71,19%) e a amentoflavona (70,98%) apresentaram melhor viabilidade celular frente as células JLTRF – R5 não infectadas. Porém, ao avaliar o potencial anti-HIV-1, não foi observado diferença significativa entre o controle positivo, os biflavonoides e o extrato etanólico. Dessa forma, como o DMSO na concentração de 100% apresentou efeito de inibição, reforça-se a necessidade de repetição do teste empregado uma menor concentração ou outro controle positivo.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

ABDEL MOTAAL, A.; EZZAT, S.M.; TADROS, M.G.; EL-ASKARY, H.I. In vivo anti-inflammatory activity of caffeoylquinic acid derivatives from *Solidago virgaurea* in rats. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 12, p. 2864-2870, 2016.

ABDOLMALEKI, A.; GHASEMI, J.; GHASEMI, F. Computer aided drug design for multi-target drug design: SAR/QSAR, Molecular Docking and Pharmacophore Methods. **Current Drug Targets**, v. 18, n. 5, p. 556-575, 2017.

AGATA, K.; KUSIAK, J.; STEPIÉN, B.; BERGIER, K.; KUZNIAK, E. Bioactive secondary metabolites produced by plants of the genus [i]Physalis[/i]. **Directory of Open Access Journals**, v. 64, p. 665-673, 2010.

AGRA, M.F.; SILVA, K.N.; BASÍLIO, J.L.D. FREITAS, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 472-508, 2008.

AHLQVIST, M.; LEANDERSSON, C.; HAYES, M.A.; ZAMORA, I.; THOMPSON, R.A. Software-aided structural elucidation in drug discovery. **Rapid Communication in Mass Spectrometry**, v. 29, n. 21, p. 2083-9, 2015.

AHSAN, M.J.; AMIR, M.; BAKHT, M.A.; GOVINDASAMY, J. HASAN, M.Z. Synthesis and antimicrobial activity of N1-(3-chloro-4-fluorophenyl)-N4-substituted semicarbazone derivatives. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 9, p. 861-866, 2016.

ALAM, M.N.; BRISTI, N.J.; RAFIQUZZAMAN, M. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidante activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21, n. 2, p. 143-152, 2013.

ALBUQUERQUE, C.H.; TAVARES, J.F.; OLIVEIRA, S.L.; SILVA, T.S.; GONÇALVES, G.S.; COSTA, V.C.O.; AGRA, M.F.; PESSÔA, H.L.F.; SILVA, M.F. Flavonoides glicosilados de *Erythroxylum pulchrum* A. St.-Hil. (Erythroxylaceae). **Química Nova**, v. 37, n. 4, p. 663-666, 2014.

ALMAZROO, O.A.; MIAH, M.K.; VENKATARAMANAN, R. Drug Metabolism in the Liver. **Clin. Liver. Dis.**, v. 21, n. 1, p. 1-20, 2017.

ALMEIDA, R.O. **Predição de rotas metabólicas de enzimas utilizando aprendizado de máquina**. 2018. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, 2018.

ALVES, A.B.; VEIGA, J.R. V.F.; PINTO, A.C. Constituintes Químicos de *Burlemarxia rodriguesii* Menezes & Semir (Velloziaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Maringá-PR, v. 12, p. 78-79, 2002.

ALVES, C.Q. **Flavonoides antioxidantes e derivados de ácido gálico isolados de *Cenostigma gardnerianum* Tul. (Leguminosae)**. 2007. Dissertação (Pós-Graduação em Química) – Universidade federal da Bahia, Salvador, 2007.

ALVES, V.; BRAGA, R.C.; MURATOV, E.N.; ANDRADE, C.H. Químioinformática: uma introdução. **Química Nova**, v. 41, n. 3, p. 284-291, 2017.

ALVES, V.M. **Estratégias computacionais como métodos alternativos para avaliação da sensibilização cutânea**. 2017. 114f. Tese (Doutorado em Inovação Farmacêutica em Rede) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2017.

ARON, P.M.; KENNEDY, J.A. Flavan-3-ols: nature, occurrence and biological activity. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 52, p. 79-104, 2008.

AVDEEF, A. Physicochemical profiling (solubility, permeability and charge state). **Current Topics of Medicinal Chemistry**, v. 1, n. 4, p. 277-351, 2001.

BAIS, S.; PRASHAR, Y. Identification and characterization of amentoflavone from six species of Juniperus against H₂O₂ induced oxidative damage in human erythrocytes and leucocytes. **Reserach Jornal of Phytochemistry**, v. 9, p. 41-55, 2015.

BAKER, P.M.; BARREIRO, E.J.L.; BENJAMIN, G. Tetracyclic triterpenes of *Barbacenia bicolor*. **Phytochemistry**, v. 15, p. 5, p. 785-787, 1976.

BALDISSEROTTO, A.; VERTUANI, S.; BINO, A.; DE LUCIA, D.; LAMPRONTI, I.; MILANI, R.; GAMBARI, R.; MANFREDINI, S. Design, synthesis and biological activity of a novel Rutin analogue with improved lipid soluble properties. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 1, p. 264-271, 2015.

BANG-JING, L.; GAO, B.; PENG, S.; LIAO, X.; DING, L. Chemical Constituents of *Acanthochlamys bracteata*. **Chinese Journal of Chemistry**, v. 23, p. 933-936, 2005.

BARBOSA, L.T.C.; VEGA, M.R.G. Diterpenos do gênero Xylopi. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 4, p. 1712-1733, 2017.

BARNES, R. A.; PEREIRA, A. L., SCOFIELD, T.C.V.; BRAZ-FILHO, R.; PINTO, A.C. A new triterpene from *Vellozia compacta*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 32, p. 3674-3677, 1984.

BARREIRO, E. J. PEREIRA, A.L.; GOMES, L.N.L. Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance of Pyrrolizidines Alkaloids. **Journal of Chemical Research. Synopses**, p. 330-331, 1980.

BATISTA, J.C.; SANTIN, S.M. O.; SCHUQUEL, A.; ARRUDA, L.L.M.; BERSANI-AMADO, C.A.; OLIVEIRA, C.M.; KATO, L.; FERREITA, H.D.; SILVA, C.C. Constituintes químicos e avaliação das atividades antioxidante e anti-inflamatória das raízes de *Sabicea brasiliensis* Wernh (Rubiaceae). **Química Nova**, v. 37, n. 4, p. 638-642, 2014.

BEKHIT, A.; CHENG, V.J.; MCCONNELL, M.; ZHAO, J.H.; SEDCOLE, R.; HARRISON, R. Antioxidant activities, sensory and anti-influenza activity of grape skin tea infusion. **Food Chemistry**, v. 129, n. 3, p. 837-845, 2011.

BENDER, O.; LLORENT-MARTÍNEZ, E.J.; ZENGİN, G.; MOLLIKA, A.; CEYLAN, R.; MOLINA-GARCIA, L.; CÓRDOVA, M.L.F.; ATALAY, A. Integration of in vitro and in silico perspectives to explain chemical characterization, biological potential and anticancer effects of *Hypericum salsugineum*: A pharmacologically active source for functional drug formulations. **PlosOne**, p. 1-21, 2018.

BENERE, E.; LUZ, R.A.; VERMEERSCH, M.; COS, P. MAES, L. A new quantitative in vitro microculture method for *Giardia duodenalis* trophozoites. **Journal of Microbiological Methods**, v.71, n.2, p.101-106, 2007.

BJIJ, I.; HDOUFANE, I.; CHERQAOU, D. Artificial neural networks, support vector machines and decision trees for anti hIV activity prediction of organic compounds. In: **III International Summer School-Conference on Chemoinformatics**, Kazan, July 5-7 de julho, 2017.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO. **HIV/AIDS 2019**. Brasília-DF, 2019.

BOUFRIDI, A.; QUINN, R.J. Harnessing the properties of Natural products. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v.6, n.58, p.451-470, 2018.

BRANCO, A.; PEREIRA, A.S.; CARDOSO, J.N.; NETO, F.R.A.; PINTO, A.C.; BRAZ-FILHO, R. Further lipophilic flavonols in *Vellozia graminifolia* (**Velloziaceae**) by high temperature gas chromatography: quick spotting of new compounds *Phytochemical Analysis* Inglaterra. **Phytochemical Analysis**, Grã-Bretanha, v. 12, n. 4, p. 266-270, 2000.

BRASIL. ANVISA. Resolução-RE nº 899, de 29 de maio de 2003. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=15132&word>> Acesso em 22 dez. 2019.

BRASIL. **Manual técnico para o diagnóstico da infecção pelo HIV**. Brasília-DF, 2013a.

BRASIL. **Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para manejo da infecção pelo HIV em adultos**. Brasília-DF, 2013b.

BRASIL. **Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para manejo da infecção pelo HIV em adultos**. Brasília – DF, 2018. 416p.

BROWN, K. The use of medicinal plants in Rio de Janeiro's urban periphery: an analysis of communities' engagements with polices. **Journal of Ethnobiology**, v.36, n.4, p.861-880, 2016.

BURTON, P.S.; CONRADI, R.A.; HO, N.F.; HILGERS, A.R.; BORCHARDT, R.T. How structural features influence the biomembrane permeability of peptides. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 85, n. 12, p. 1336-1340, 1996.

CAIRES, F. R. **Estudos e desenvolvimento de métodos baseados em harmônicos esféricos para análise de similaridade estrutural entre ligantes**. 2016. 130f. Dissertação (Mestrado em Física Biomolecular) - Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.

CAMPOS, M. G.; WEBBY, R.F.; MARKHAM, K.R.; MITCHELL, K.A.; CUNHA A.P. Age-induced diminution of free radical scavenging capacity in bee pollens and the contribution of constituent flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 742- 745, 2003.

CARVALHO, T.C.L. **Estudo fitoquímico e de bioatividade de *Calea pinnatifida* (R. Br.) Less. E *Calea uniflora* Less. (Asteraceae).** 2016. Tese (Pós-Graduação em Farmácia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

CASTRO, R.C. **Caracterização por espectrometria de massas e investigação das atividades anti-inflamatória e gastroprotetora do extrato etanólico e diterpenos clerodânicos de folhas de *Casearia sylvestris* Swartz.** 2016. Tese (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual de São Paulo, 2016.

CAVALCANTI, É.B.V.S. **Estudos quimiotaxonômicos e triagem virtual de flavonoides isolados da família asteraceae com potencial atividade leishmanicida.** 2018. 298f. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2018.

CECE-ESENCAN, E. N.; ZAMORA, I.; BRINK, A.; TEPPNER, M.; FONTAINE, F.; GALLOFRÉ, G. P.; PÄHLER, A. Software-aided cytochrome P450 reaction phenotyping and kinetic analysis in early drug discovery. **Rapid Communication in Mass Spectrometry**, v. 30, n. 2, p. 301–10, 2016.

CHAVES, O.S.; GOMES, R.A.; TOMAZ, A.C.; FERNANDES, M.G.; DAS GRAÇAS MENDES, L.J.; DE FÁTIMA, A.M, BRAGA, V.A.; DE FÁTIMA VANDERLEI DE SOUZA, M. Secondary metabolites from *Sida rhombifolia* L. (Malvaceae) and the vasorelaxant activity of cryptolepinone. **Molecules**, v. 18, n. 3, p. 2769-2777, 2013.

CRUCIANI, G.; CAROSATI, E.; BOECK, B.; ETHIRAJULU, K.; MACKIE, C.; HOWE, T.; VIANELLO, R. MetaSite: understanding metabolism in human cytochromes from the perspective of the chemist. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, n. 22, p. 6970–9, 2005.

CUNICO, W.; GOMES, C.R.B.; VELLASCO JÚNIOR, W.T. HIV – Recentes avanços na pesquisa de fármacos. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 2111-2117, 2008.

DANTAS, A.L.A.; VALENTE, L.M.M.; PINTO, A.C. A new isopimarane diterpenoid from *Vellozia pusilla* pohl (velloziaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 14, n. 1, p. 126-128, Jan. 2003.

DAS, P.S.; SAHA, P.A. A review on computer aided drug design in drug Discovery. **World Journal os Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. 7, p. 279-291, 2017.

DEVKOTA, H.P.; MIYAZAKI, S.; YAHARA, S. Amentoflavone and Kaempferol Glycosides from the Aerial Parts of *Cissampelos parreira*. **Nepal Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 1, p. 1-4, 2017.

DEWICK, P.M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach.** 3 ed. Ottawa: J.Wiley, 2009.

DU, X.; LI, Y.; XIA, Y.L.; AI, S.M.; LIANG, J.; SANG, P; JI, X.L.; LIU, S.Q. Insights into Protein-Ligand Interactions: Mechanisms, Models, and Methods. **International Journal of Molecular Science**, v. 17, n. 2, p. 144, 2016.

EFDI, M.; ITOH, T.; AKAO, Y.; NOZAWA, Y.; ISHIHARA, H. The isolation of secondary metabolites and in vitro potent anti-cancer activity of clerodermic acid from *Enicosanthum membranifolium*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 3667-3671, 2007.

ENGELMAN, A.; CHEREPANOV, P. The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, p. 279-290, 2012.

ESPÍNDOLA, K.M.M.; FERREIRA, R. G.; NARVAEZ, L.E.M.; ROSARIO, A. C. R. S.; SILVA, A.H.M.; SILVA, A.G.B.; VIEIRA, A.P.O.; MONTEIRO, M.C. Chemical and pharmacological aspects of caffeic acid and its activity in hepatocarcinoma. **Frontiers in Oncology**, v. 9, p. 541, 2019.

FASHOTO, S.G.; METFULA, A.S.; MATSEBULA, B.B.; FASHOTO, B. Y. Multi-Target Regression Prediction on Cervical Cancer for **Evaluation of Predictive Performance Measures**. **Asian Journal of Information Technology**, v. 17, n. 2, p. 160–166, 2018.

FERNANDES, D. A.; BARROS, R.P.C.; TELES, Y.C.F.; OLIVEIRA, L.H.G.; LIMA, J.B.; SCOTTI, M.T.; NUNES, F.C.; CONCEIÇÃO, A.S.; VANDERLEI DE SOUZA, M.F. Larvicidal Compounds Extracted from *Helicteres velutina* K. Schum (Sterculiaceae) Evaluated against *Aedes aegypti* L. **Molecules**, v. 24, n. 12, p. 2-16, 2019.

FERNANDES, D.C. Estudo químico e atividade biológica de *Garcinia xanthochymus* (Clusiaceae). 2010. 264 f. Tese (Mestrado em Química) – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, São Paulo, 2010.

FERNANDEZ-MARIN, M.I.; MATEOS, R.; GARCIA-PARRILLA, M.C.; PUERTAS, B.; CANTOS-VILLAR, E. Bioactive compounds in wine: resveratrol, hydroxytyrosol and melatonin: a review. **Food Chemistry**, v. 130, n. 4, p. 797-813, 2012.

FERREIRA, L.G.; SANTOS, R.N.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A.D. Molecular docking and structure-based drug design strategies. **Molecules**, v. 20, n. 7, p. 13384-13421, 2015.

FERREIRA, M. C.; CANTRELL, C.L.; WEDGE, D.E.; GONÇALVES, V.N.; JACOB, M.R.; KHAN, A.; ROSA, C.A.; ROSA, L.H.. Antimycobacterial and antimalarial activities of endophytic fungi associated with the ancient and narrowly endemic neotropical plant *Vellozia gigantea* from Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 10, p. 692-697, 2017.

FERREIRA, M.C.; CANTRELL, C.L.; DUKE, S.O.; ALI, A.; ROSA, L.H. New Pesticidal Diterpenoids from *Vellozia gigantea* (Velloziaceae), an Endemic Neotropical Plant Living in the Endangered Brazilian Biome Rupestrian Grasslands. **Molecules**, v. 22, p. 175, 2017.

FERREIRA, R. C. S.; RIFFEL, A.; SANT'ANA, A. E. G. HIV: mecanismo de replicação, alvos farmacológicos e inibição por produtos derivados de plantas. **Química Nova**, v. 33, n. 8, p. 1743-1755, 2010.

FINCHIN, R.; MAYER, L. M.U.; PINTO, A.C. Veadeirol and veadeiroic acid, two novel diterpenes from *Vellozia flavicans*. **Phytochemistry**, v. 17, p. 1671-1672, 1978.

FLORA DO BRASIL. **Velloziaceae in Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB15114>>. Acesso em: 26 Nov. 2019.

FORTI, M. **Técnicas de machine learning aplicadas na recuperação de crédito do mercado brasileiro**. 2018. 74f. Dissertação (Mestrado em Economia) - Escola de Economia de São Paulo, São Paulo, 2018.

FRAGA, C.A.M.; PINHEIRO, A.C.; SODERO, A.C.R.; CUNHA, A.S.; PADILHA, M.C.; SOUSA, P.M.; FONTES, S.P.; VELOSO, M.P.; FRAGA, C.A.M. Atropoisomerismo: o efeito da quiralidade axial em substâncias bioativas. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 125-135, 2007.

GARCEZ, F.R.; GARCEZ, W.S.; HAMERSKI, L.; MIGUITA, C.H. Fenilpropanóides e outros constituintes bioativos de *Nectandra megapotamica*. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 407-411, 2009.

GARCEZ, W. S.; QUEIROZ, P. P. S.; PINTO, A. C. Chemical Constituents of *Vellozia bicolor*. **Ciência e Cultura - São Paulo**, v. 33, p. 107-108, 1981.

GOLBRAIKH, A.; TROPSHA, A. Beware of q2! **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 20, n. 4, p. 269-276, 2002.

GOMES, M. N. **Planejamento, síntese guiada por QSAR, avaliação biológica e modelagem molecular de chalconas com atividade antituberculose**. 2017. 230 f. Tese (Doutorado em Inovação Farmacêutica em Rede) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2017.

GONZALEZ, M.M.; CABRERIZO, F.M.; BAIKER, A.; ERRA-BALSELLS, R.; OSTERMAN, A.; NITSCHKO, H.; VIZOSO-PINTO, M.G. β -Carboline derivatives as novel antivirals for herpes simplex virus. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 52, n. 4, p. 459-468, 2018.

GROENENBOM, M.; GOMEZ-ROLDAN, V.; STIGTER, H.; ASTOLA, L.; DAELEN, R.; BEEKWILDER, J.; BOVY, A.; HALL, R.; MOLENAAR, J. The flavonoid pathway in tomato seedling: transcript abundance and the modeling of metabolite dynamics. **Plos One**, v. 8, n. 7, p. 1-11, 2013.

GULCIN, I.; KÜFREVIÖGLU, O.I.; OKTAY, M.; BÜYÜKOKUROĞLU, M.E. Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (*Urtica dioica* L.). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 90, p. 205-215, 2004.

HADAGALI, M.D.; CHUA, L.S. The anti-inflammatory and wound healing properties of honey. **European Food Research and Technology**, v. 239, n.6, p.1003-1014, 2014.

HALDER, A. K. Finding the structural requirements of diverse HIV-1 protease inhibitors using multiple QSAR modelling for lead identification. **SAR and QSAR in Environmental Research**, v. 29, n. 11, p.911-933, 2018.

- HARBORNE, J. B.; BAXTER, H. The handbook of natural flavonoids. Vol 2. 3- Flavone O-glycosides. New York: John Wiley and son, 1999. 1800p.
- HARBORNE, J.B.; GREENHAM, J.; WILLIAMS, C.; EAGLES, J.; MARKHAM, K. R. Six dihydrofuranoflavonols from the leaf surface of *Vellozia*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 1, p. 305-308, 1992.
- HARBORNE, J.B.; GREENHAM, J.; WILLIAMS, C.; EAGLES, J.; MARKHAM, K. R. Ten isoprenylated and C-methylated flavonoids from the leaves of three *Vellozia* species. **Phytochemistry**, v. 34, p. 219-226, 1993
- HARBORNE, J.B.; GREENHAM, J.; WILLIAMS, C.; EAGLES, J.; MARKHAM, K. R. Variations in the lipophilic and vacuolar flavonoids of the genus *Vellozia*. **Phytochemistry**, v. 35, n. 6, p. 1475-1480, 1994.
- HARIKA, M. S.; KUMAR, T. R.; REDDY, L. S. S. Docking studies of benzimidazole derivatives using hex 8.0. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 8, n. 4, p. 1677, 2017.
- HICHRI, I.; BARRIEU, F.; BOGS, J.; KAPPEL, C.; DELROT, S.; LAUVERGEAT, V. Recent advances in the transcriptional regulation of the flavonoid biosynthetic pathway. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 8, p. 2465-2483, 2011.
- HOGAN, D.; GEYER, C.R.; MARUTHACHALAM, B.V.; KUSALIK, A. WeSeqMiner: A Weka package for building machine-learning models for sequence data. **bioRxiv 217802**, 20 de novembro, p. 1-4, 2017.
- HOQUE, I.; CHATTERJEE, A.; BHATTAACHARYA, S.; BISWAS, R. An approach of Computer-Aided Drug Design (CADD) tools for in silico pharmaceutical drug design and development. **International Journal of Advanced Research in Biological Sciences**, v. 4, n. 2, p. 60-71, 2017.
- IDOWU, P.A.; ALADEKOMO, T.A.; AGBELUSI, O.; AKANBI, C.O. Prediction of pediatric HIV/Aids survival in Nigeria using naïve Bayes' approach. **Journal of Computer Science Its Application**, v. 25, n. 1, p. 1–15, 2018.
- JASINSKI, V.C.G. Óleos essenciais e compostos fenólicos de espécimes masculinos e femininos de *baccharis uncinella* dc. **Dissertação (Pós-Graduação em Química Aplicada)** – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2010.
- JAWETZ; MELNICK; ADELBERGS. **Medical Microbiology**. 28 ed. McGraw-Hill Education/Medical, 2019, p. 880.
- JEENU, J.; BINDHU, A.; ALEYKUTTY, N. In vitro and in vivo antiinflammatory activity of *Clerodendrum paniculatum* linn. Leaves. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.75, n.3, p.376, 2013.
- JESUS, É. M. **Adaptação e avaliação de triagem virtual em arquiteturas paralelas híbridas**. 2017, 42f. Dissertação (Mestrado em Ciência da Computação) – Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2016.

JIAN-GUO, X.; QING-PING, H.; YU, L. Antioxidant and DNA-Protective Activities of Chlorogenic Acid Isomers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 46, p. 11625-11630, 2012.

KAHKESHANI, N.; FARZAEI, F.; FOTOUHI, M.; ALAVI, S.S.; HAHRAMSOLTANI, R.; NASERI, R.; MOMTAZ, S.; ABBASABADI, Z.; RAHIMI, R.; FARZAEI, M.H.; BISHAYEE, A. Pharmacological effects of gallic acid in health and diseases: A mechanistic review. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 22, n. 3, p. 225-237, 2019.

KANZAKI, L. I. B. HTLV-1: A real pathogen or a runaway guest of a diseased cell? **Journal of Biosciences**, p. 1–11, 2018.

KAUSAR, S.; FALCAO, A. O. An automated framework for QSAR model building. **Journal of Cheminformatics**, v. 10, n. 1, p.1, 2018.

KIM, Y.; KIM, J. T.; PARK, J.; SON, H.J.; KIM, E.Y.; LEE, Y.J.; RHYU, M.R. Di-O-Caffeoylquinic Acid from *Ligularia fischeri* Suppresses Inflammatory Responses Through TRPV1 Activation. **Phytotherapy Research**, v. 31, n. 10, p. 1564-1570, 2017.

KUDALKAR, S.N.; ULLAH, I.; BERTOLETTI, N.; MANDL, H.K.; CISNEROS, J.A.; BELOOR, J.; CHAN, A.H.; QUIJANO, E.; SALTZMAN, W.M.; JORGENSEN, W.L.; KUMAR, P.; ANDERSON, K.S. Structural and pharmacological evaluation of a novel non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor as a promising long acting nanoformulation for treating HIV. **Antiviral Research**, v. 167, p. 110-116, 2019.

LEONIS, G.; MELAGRAKI, G.; AFANTITIS, A. Open Source Chemoinformatics Software including KNIME Analytics. In: LESZCZYNSKI, J. et al. (eds). **Handbook of Computational Chemistry**. Springer, 2017. p. 2201–30.

LINS, A. J. C. C. **Aplicação de aprendizagem de máquina no diagnóstico de declínio cognitivo e demência de Alzheimer baseado em testes cognitivos e marcadores genéticos**. 2018. 146 f. Tese (Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (Renorbio)) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2018.

LIU, H.; MOU, Y.; ZHAO, J.; WANG, J.; ZHOU, L.; WANG, M.; WANG, D.; HAN, J.; YU, Z.; YANG, F. Flavonoids from *Halostachys caspica* and Their Antimicrobial and Antioxidant Activities, **Molecules**, v. 10, p. 7933-7945, 2010.

LIU, H.; ZHANG, X.; WU, C.; WU, H.; GUO, P.; XU, X. Anti-hyperlipidemic caffeoylquinic acids from the fruits of *Pandanus tectorius* Soland. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 3, v. 8, p. 16-19, 2013.

LÓPEZ-LÁZARO, M. Distribution and Biological Activities of the Flavonoid Luteolin. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 9, p. 31-59, 2009.

LUIS, J. A. Virtual screening of a cyclics imides to evaluate potential new multi-target agents against species of Leishmania. **MOL2NET**, v. 2, n. 14, p.1-5, 2017.

LUO, Y.; SHANG, P.; LI, D. Luteolin: a flavonoid that has multiple cardio-protective effects and its molecular mechanisms. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, p. 692, 2017.

MAALIK, A.; KHAN, F.A.; MUMTAZ, A.; MEHMOOD, A.; AZHAR, S.; ATIF, M.; KARIM, S.; ALTAF, Y.; TARIQ, I. Pharmacological applications of Iuercetin and its derivatives: A short review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 13, n. 9, p. 1561-1566, 2014.

MARIA, C.A.B.; MOREIRA, R.F.A. Métodos para análise de ácido clorogênicos. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 586-592, 2004.

MARQUES, O.C.P. Desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas orais de *Uncaria tomentosa* com atividade antioxidante. 2008. 210 f. **Dissertação (Pós-Graduação em Farmácia)** – Universidade de Coimbra, Coimbra, 2008.

MARQUI, S.R. Bioprospecção em espécies de Fabaceae: agentes quimiopreventivos e substâncias de interesse agroquímico. 2011. **Tese (Instituto de Química)** – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2011.

MARTINS, E. J. V. **Data Mining em aplicações de Desenho racional de Fármacos**. 2017. 65f. Dissertação (Mestrado Integrado em Engenharia Informática e Computação) - Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, Portugal, 2017.

MEDEIROS, V.M. **Estudo fitoquímico de *Croton grewoides* Baill e revisão da ocorrência das principais classes de metabólitos do gênero *Croton***. 2012. Tese (Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Universidade Federal da Paraíba. 2012.

MEHLA, R.; BIVALKAR-MEHLA, S.; CHAUHAN, A. A flavonoid, luteolina, cripples HIV-1 by abrogation of Tat function. **Plos One**, v. 6, n. 11, p. 27915, 2011.

MELLO-SILVA, R. Aspectos taxonômicos, biogeográficos, morfológicos e biológicos das Velloziaceae de grão-mogol, Minas Gerais, Brasil. **Boletim de Botânica**, v. 14, p. 49-79, 1995.

MELLO-SILVA, R. Flora das cangas da Serra dos Carajás, Pará, Brasil: Velloziaceae. **Rodriguésia**, v. 69, n. 1, p. 259-262, 2018.

MELLO-SILVA, R. Morphological analysis, phylogenies and classification in Velloziaceae. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 148, p. 157-173, 2005.

MELLO-SILVA, R. Velloziaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015.

Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB245>>. Acesso em 17 nov. 2019.

MELLO-SILVA, R.; SANTOS, D.Y.A.C.; SALATINO, M.L.F.; MOTTA, L.B.; CATTAL, M.B.; SASAKI, D.; LOVO, J.; PITA, P.B.; ROCINI, C.; RODRIGUES, C.D.N.; ZARREI, M.; CHASE, M.W. Five vicarious genera from Gondwana: the

Velloziaceae as shown by molecules and morphology. **Annals of Botany**, v. 108, p. 87–102, 2011.

MENDEZ, D.; GAULTON, A.; BENTO, A.P.; CHAMBERS, J.; DE VEIJ, M.; FÉLIX, E.; MAGARIÑOS, M.P.; MOSQUERA, J.F.; MUTOWO, P.; NOWOTKA, M.; GORDILLO-MARAÑÓN, M.; HUNTER, F.; JUNCO, L.; MUGUMBATE, G.; RODRIGUEZ-LOPEZ, M.; ATKINSON, F.; BOSCH, N.; RADOUX, C. J.; SEGURA-CABRERA, A.; HERSEY, A.; LEACH, A.R. ChEMBL: towards direct deposition of bioassay data. **Nucleic Acids Research**, v. 1, 2018.

MESSIAS, M.C.T.B.; MENEGATTO, M.F.; PRADO, A.C.C.; SANTOS B.R.; GUIMARÃES, M.F.M. Uso popular de plantas medicinais e perfil socioeconômico dos usuários: um estudo em área urbana em Ouro Preto, MG, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 1, p. 76-104, 2015.

MIZERA, M.; KRAUSE, A.; ZALEWSKI, P.; SKIBIŃSKI, R.; CIELECKA-PIONTEK, J. Quantitative structure-retention relationship model for the determination of naratriptan hydrochloride and its impurities based on artificial neural networks coupled with genetic algorithm. **TALANTA**, v. 164, p. 164–74, 2017.

MOLFETTA, F.A.; HONÓRIO, K.M.; ALVES, C.N.; SILVA, A.B.F. A study on the anti-HIV activity of biflavonoid compounds by using quantum chemical and chemometric methods **Journal of Molecular Structure**, v. 674, v. 1-3, p. 191-197, 2004.

MOREIRA, R. F. **Determinação do perfil farmacocinético de medicamentos contendo fármacos de ação central**. 2014. 161f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2014.

MOURA, A.C.S.; VILEGAS, W.; SANTOS, L.C. Identificação de alguns constituintes químicos de *Indigofera hirsuta* LINN. (Fabaceae) por CLAE-IES-EM (TOF) e avaliação da atividade antirradicalar. **Química Nova**, v. 34, n. 7, p. 1136-1140, 2011.

MURAD, L.D. Efeitos dos ácidos cafeico e 5-cafeoilquínico sobre o crescimento e captação celular em células de adenocarcinoma de cólon humano. 2013. **Dissertação (Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição)** – Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, 2013.

NASSERI, S.; EMAMI, S.A.; MOJARRAB, M. Dicaffeoylquinic Acids from the Aerial Parts of *Artemisia ciniformis* Krasch. & Popov ex Poljakov. **Pharmaceutical Sciences**, v. 25, n. 2, p. 171-175, 2019.

NAVEED, M.; HEJAZI, V.; ABBAS, M.; KAMBOH, A.A.; KHAN, G.J.; SHUMZAID, M.; AHMAD, F.; BABAZADEH, D.; FANGFANG, X.; MODARRESI-GHAZANI, F.; WENHUA, L.; XIAOHUI, Z. Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 97, p. 67-74, 2018.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as source of new drugs from 1981 to 2014. **Journal Natural Product**, v. 79, p. 629-661, 2016.

NOLDIN, V.F.; FILHO, V.C.; MONACHE, F.D.; BENASSI, J.C.; CHRISTMANN, I. L.; PEDROSA, R.C.; YUNES, R.A. Composição química e atividades biológicas das folhas de *Cynara scolymus* L. (Alcachofra) cultivada no Brasil. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 331-334, 2003.

NORDEEN, S.K.; BONA, B.J.; JONES, D.N.; LAMBERT, J.R.; JACKSON, T.A. Endocrine Disrupting Activities of the Flavonoid Nutraceuticals Luteolin and Quercetin. **Hormones and Cancer**, v. 3, p. 293-300, 2013.

NOVAES, P.; MOLINILLO, J.M.G.; VARELA, R.M.; MACÍAS, F.A. Ecological phytochemistry of Cerrado (Brazilian savanna) plants. **Phytochemistry Reviews**, v.12, n.4, p.839-855, 2013.

PANIAGO, I. F. **Prospecção virtual de potenciais inibidores da proteína transportadora de serotonina sódio-dependente humana (SERT)**. 2018. 44f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biotecnologia) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2018.

PATIN, A.; KANAZAWA, A.; PHILOUZE, C.; GREENE, A.E.; MURI, E.; BARREIRO, E.; COSTA, P.C.C. Highly Stereocontrolled Synthesis of Natural Barbacenic Acid, Novel Bisditerpene from *Barbacenia flava*. **Journal of Organic Chemistry**, v. 68, n. 10, p. 3831-3837, 2003.

PAULA-SOUZA, J.; BRANDÃO, M.G.L. **História das plantas medicinais e úteis do Brasil**. Fino Traço, 1ed, Belo Horizonte – MG, 2016, p.904.

PEREIRA, G.B.; SZWARC, B.; MONDRAGÃO, M.A.; LIMA, P.A.; PEREIRA, F.; A Ligand-Based Approach to the Discovery of Lead-Like Potassium Channel KV 1.3 Inhibitors. **Chemistry Select**, v. 3, n. 5, p. 1352-1364, 2018.

PEREIRA, J.C. **Melhoramento de docking-based virtual screening usando abordagem de deep learning**. 2017. 168 f. Tese (Doutorado em Biologia Computacional e Sistemas) -Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2017.
PICCIRILLO, E.; AMARAL, A.T. Virtual screening of bioactive compounds: concepts and applications. **Química Nova**, v. 41, n. 6, p. 662-677, 2018.

PINHEIRO, A.A.V. Contribuição para o conhecimento fitoquímico de *Sida rhombifolia* L. (Malvaceae) e avaliação da atividade antimicrobiana do seu óleo essencial.2016. **Dissertação (Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos)** – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2016.

PINTO, A. C. Um novo diterpeno de *Vellozia compacta*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 52, p. 473-475, 1980.

PINTO, A. C.; BORGES, C. Six diterpenes from *Vellozia compacta*. **Phytochemistry**, v. 22, p. 2011-2015, 1983.

PINTO, A.C. GARCEZ, W.S.; QUEIROZ, P.P.S.; PEREIRA, A.L. ¹³C of isopimarane diterpenes. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 58, p. 41-45, 1986.

PINTO, A.C.; ANTUNES, O.A.C.; REZENDE, C.M.; CORREIA, C.R.D. Isolation and identification of the acidic constituents of *Vellozia flavicans*. **Phytochemical Analysis**, Inglaterra, v. 8, p. 14-17, 1997.

PINTO, A.C.; ANTUNES, O.A.C.; REZENDE, C.M.; CORREIA, C.R.D. Minor cleisthantane and tetranorfriedolabdane from *Vellozia flavicans*. **Phytochemistry**, v. 38, p. 1269-1271, 1995.

PINTO, A.C.; BAKER, P.M.; GILBERT, B.; PINCHIN, R.; REIS, F.M.A.; WAINERAICH, M.S.; ZOCHER, D.H.T. Vellozone, a tetracyclic triterpene from *Vellozia stipitata*. **Phytochemistry**, v. 19, p. 2486-2487, 1980.

PINTO, A.C.; BAKER, P.M.; GILBERT, B.; PINCHIN, R.; REIS, F.M.A.; WAINERAICH, M.S.; ZOCHER, D.H.T. A tetranorfriedolabdane diterpene from *Vellozia stipitata*. **Phytochemistry**, v. 42, n. 3, p. 771-774, 1996.

PINTO, A.C.; BRITO, L.C.; ZUKERMANSCHPECTOR, J.; EPIFANIO, R.A. A bis-nor-diterpene from *Vellozia variabilis*. **Phytochemistry**, v. 33, p. 1269-1271, 1993.

PINTO, A.C.; DOCARMO, F.M.; PEREIRA, A. Bisnorditerpenes with a barbacenane skeleton from *Barbacenia flava*. **Phytochemistry**, v. 27, p. 3917-3918, 1988.

PINTO, A.C.; EPIFANIO, R.A.; PIZZOLATTI, M.G. Diterpenoids from *Vellozia declinans*. **Phytochemistry**, v. 31, p. 4241-4243, 1992.

PINTO, A.C.; EPIFANIO, R.A.; PIZZOLATTI, M.G.; REZENDE, C.M.; SILVA, B.R. Two norditerpenes with an isopimarane skeleton from *Vellozia varoabilis*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 5, p. 1679-1680, 1992.

PINTO, A.C.; FIGUEIREDO, M.R.; BRITO, L.C.; PEREIRA, A.L. ¹³C NMR of isopimarane diterpenes. Part 4. Diterpenes from *Vellozia patens*. **Química Nova**, v. 9, p. 222-223, 1986.

PINTO, A.C.; FIGUEIREDO, M.R.; EPIFANIO, R.A. Diterpenes from *Vellozia patens*. **Phytochemistry**, v. 31, p. 1681-1686, 1992.

PINTO, A.C.; FRECHIANI, M.C.; TINANT, B.; DECLERCQ, J.; MEERSSCHE, M. V. Barbacenic acid, a bisnorditerpene with a novel skeleton from *Barbacenia flava*. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, p. 446-447, 1985.

PINTO, A.C.; FURTADO, V.L.R.; PEREIRA, A.L. Terpenoids constituents from *Vellozia epidendroides*. **Química Nova**, v. 13, p. 64-65, 1990.

PINTO, A.C.; GARCEZ, W.S.; HULL, W.E.; NESMELYI, A.; LUKACS, G. The 2-dimensional inadequate N. M. R. Experiment for carbon connectivity pattern determination of a new bis-nor-diterpene. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, p. 464-465, 1983.

PINTO, A.C.; GARCEZ, W.S.; QUEIROZ, P.P.S.; FIORANI, N.G. Tetranorclerodane diterpenes from *Vellozia bicolor*. **Phytomedicine**, Inglaterra, v. 37, p. 1115-1117, 1994.

- PINTO, A.C.; GONCALVES, M.L.A.; BRAZFILHO, R.; NESMELYI, A.; LUKACS, G. Natural abundance ^{13}C ^{13}C coupling constants observed via double quantum coherence: structural elucidation of Velloziolide, a diterpene of new skeleton. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, p. 293-295, 1982.
- PINTO, A.C.; GONZAGA, L.; FIORANI, N.G. A naphthalenic norditerpene from Velloziaceae. **Phytochemistry**, v. 23, p. 918-919, 1984.
- PINTO, A.C.; GONZAGA, L.; ZOCHER, D.H.T. Triterpenes from *Vellozia glabra* and *Barbacenia conicostigma*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 53, p. 69-72, 1981.
- PINTO, A.C.; MACAIRA, A. Two diterpenes with a cleistanthane skeleton from *Vellozia nivea*. **Phytochemistry**, v. 27, p. 3973-3974, 1988.
- PINTO, A.C.; PEIXOTO, E.M.; FIORANI, N.G. Diterpenes with pimarane and cleistanthane skeletons from *Vellozia piresiana*. **Phytochemistry**, v. 23, p. 1293-1296, 1984.
- PINTO, A.C.; PEREIRA, A.L.; COMASSETO, J.V. 11,12-dehydrovelloziolone, a minor constituent of *Vellozia caput-ardeae*. **Química Nova**, v. 6, p. 71-72, 1983.
- PINTO, A.C.; PINCHIN, R.; DOPRADO, S. Three ent-kaurene diterpenes from *Vellozia caput-ardeae*. **Phytochemistry**, v. 22, p. 2017-2019, 1983.
- PINTO, A.C.; PINCHIN, R.; ZOCHER, D.H.T.; LOPES, C.C. Two naphthalenic norditerpenes from *Velloziaceae*. **Tetrahedron Letters**, n. 5, p. 405-406, 1979.
- PINTO, A.C.; PINHEIRO, P.N.C.; VIEIRA, N.F.C.; ALVES, M.D. Compreensão da pandemia da AIDS nos últimos 25 anos. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v.19, n.1, p.45-50, 2007.
- PINTO, A.C.; PRADO, S.K.; PINCHIN, R. Two kaurenes from *Vellozia caput-ardeae*. **Phytochemistry**, v. 20, p. 520-521, 1981.
- PINTO, A.C.; QUEIROZ, P.P.S.; GARCEZ, W.S. Diterpenes from *Vellozia bicolor*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 2, p. 25-30, 1991.
- PINTO, A.C.; REZENDE, C.M.; ANTUNES, O.A.C.; CORREIA, C.R.D. Three isomeric diterpenes from *Vellozia flavicans*. **Phytochemistry**, Inglaterra, v. 42, p. 767-769, 1996.
- PINTO, A.C.; RIBEIRO, N.M.; BRITO, L.C.; TINANT, B.; DECLERCQ, J. Three new norditerpenes with an isopimarane skeleton from *Vellozia variabilis*. **Bulletin des Sociétés Chimiques Belges**, v. 97, p. 1067-1074, 1988.
- PINTO, A.C.; SCOFIELD, T.C.V.; BRAZFILHO, R. Two new diterpenes with a rosane skeleton from Velloziaceae. **Tetrahedron Letters**, v. 24, p. 5043-5046, 1983.
- PINTO, A.C.; SILVA, A.J.R.; MAYER, L.M.U.; BRAZFILHO, R. Compactone, a new diterpenoid from *Vellozia compacta*. **Phytochemistry**, v. 18, p. 2036-2037, 1979.

- PINTO, A.C.; SILVA, R.; VALENTE, L. Diterpenes from *Vellozia nanuzae*. **Phytochemistry**, v. 27, p. 3909-3911, 1988.
- PINTO, A.C.; VALENTE, L.; DASILVA, R. Norditerpenoids from *Vellozia pusilla*. **Phytochemistry**, v. 27, p. 3913-3915, 1988.
- PINTO, A.C.; VESSECCHI, R.; SILVA, C. G.; AMORIM, A. C. L.; JÚNIOR, H.M.S.; RESENDE, M.J.C.; GATES, P.J; RESENDE, C.M.; LOPES, N.P. Electrospray ionization tandem mass spectrometry analysis of isopimarane diterpenes from Velloziaceae. **Rapid Communication Mass Spectrometry**, v. 30, p. 61–68, 2016.
- PINTO, A.C.; ZOCHER, D.; QUEIROZ, P.; KELECOM, A. Diterpenoids from *Vellozia flavicans*. **Phytochemistry**, v. 26, p. 2409-2411, 1987.
- PINTO, A.C.; ZOCHER, D.H.T.; REZENDE, C.M.; GOTTLIEB, H.E. A New Diterpene with a Totarane Skeleton from *Vellozia flavicans*. **Natural Product Letters**, v. 6, n. 3, p. 209-213, 1995.
- PINTO, A.C.; EPIFANIO, R.A.; ZOCHER, D.H.T. Aylthonic acid, a new tetranorneoclerodane from *Aylthonia macrantha* (Velloziaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 32, n.6, p. 597-601, 2004.
- PINTO, A.C; PRADO, S.K.; BRAZFILHO, R.; HULL, W.E.; NESMELYI, A.; LUKACS, G. Natural abundance ¹³C - ¹³C coupling constants observed via double quantum coherence. Structural elucidation by the one- and the two-dimensional NMR experiments of velloziolone, a new seco-diterpene. **Tetrahedron Letters**, v. 23, p. 5267-5270, 1982.
- PINTO, L.S. Fenilpropanoides de *Paspalum atratum*. 2015. 84 f. **Dissertação (Instituto de Química)** – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2015.
- PINTO, M.E.F.; SILVA, M.S.; SCHINDLER, E.; BARBOSA-FILHO, J.M.; EL-BACHÁ, R.S.; CASTELLO-BRANCO, M.V.S.; AGRA, M.F.; TAVARES, J.F. 3',8"-biisokaempferide, a cytotoxic biflavonoid and other chemical constituents of *Nanuzia plicata* (Velloziaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 21, n. 10, p. 1819-1824, 2010.
- POLLASTRI, S.; TATTINI, M. Flavonols: old compounds for old roles. **Annals of Botanic**, v.108, n.7, p.1225-1233, 2011.
- PRASAD, S.; PHROMNOI, K.; YADAV, V.R.; CHATURVEDI, M.M.; AGGARWAL, B.B. Targeting inflammatory pathways by flavonoids for prevention and treatment of cancer. **Planta Medica**, v. 76, p. 1044-1063, 2010.
- QI-ZHEN, W.; ZHAO, D.X.; XIANG, J.; ZHANG, M.; ZHANG, C.F.; XU, X.H. Antitussive, expectorant, and anti-inflammatory activities of four caffeoylquinic acids isolated from *Tussilago farfara*. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 7, p. 1117-1124, 2015.

QUINN, R.A.; NOTHIAS, L.F.; VINING, O.; MEEHAN, M.; ESQUENAZI, E.; DORRESTEIN, P.C. Molecular networking as a drug discovery, drug metabolism, and precision medicine strategy. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 38, n. 2, p. 143–54, 2017.

RADCHENKO, T.; BRINK, A.; SIEGRIST, Y.; KOCHANSKY, C.; BATEMAN, A.; FONTAINE, F.; MORETONI, L.; ZAMORA, I. Software-aided approach to investigate peptide structure and metabolic susceptibility of amide bonds in peptide drugs based on high resolution mass spectrometry. **PLoS One**, v. 12, n. 11, p. e0186461, 2017.

REGANISI, L.O.; FERNANDES, D.C.; GAMBOIA-CASTRO, I.; SILVA, D.H.S.; FURLANA, S.; BOLZANI, V.S.; BARREIRO, E.J.; CARDOSO-LOPES, E.M.; YOUNG, M.C.M.; TORRES, L.B.; VELLOSA, J.C.R.; OLIVEIRA, O.M.M. Constituintes químicos das flores de *Pterogyne nitens* (caesalpinioideae). **Química Nova**, v. 31, n. 4, p. 802-806, 2008.

RIBEIRO, T.P.P. **Estudo teórico (modelagem molecular e QSAR) de compostos quinolínicos com atividade herbicida**. 2017. 88f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, 2017.

RIEHL, C.A. S.; PINTO, A.C.A cleistanthane diterpene lactone from *Vellozia compacta*. **Phytochemistry**, Gra-Bretanha, v. 53, p. 917-919, 2000.

RIEHL, C.A.S.; PINTO, A.C.; FIGUEROA-VILAR, J.D. Isolation and structural determination of xerophytolic acid, a novel 3-geranyl-4hydroxybenzoate derivative from *Xerophyta plicata*. **Spectroscopy Letters**, Estados Unidos, v. 33, n. 5, p. 643-651, 2000.

RIEHL, C.A.S.; PINTO, A.C.; FIGUEROA-VILLAR, J.D. Isolation and structural determination of xerophytolic acid A, a 3-geranyl-4-hydroxybenzoate derivative from *Xerophyta plicata* , **Natural Product Research**, v. 20, n.13, p. 1225-1230, 2006.

ROLON, M.; VEGA, C.; ESCARIO, J.A.; GÓMEZ-BARRIO, A. Development of resazurin microtiter assay for drug sensibility testing of *Trypanossoma cruzi* epimastigotes. **Parasitology Research**, v. 99, n. 2, p. 103-107, 2006.

ROSA, R.S.; SILVA, A.Y.B.; GUIMARÃES, K.S. Features in HIV genotypes associated with failure in the computational prediction of patients' response to antiretroviral treatment. **Journal of Environmental Analytical Program**, v. 3, n. 3, p. 319–29, 2018.

SAKAGAMI, H.; MASUDA, Y.; TOMOMURA, M.; YOKOSE, S.; UESAWA, Y.; IKEZOE, N.; ASAHARA, D.; TAKAO, K.; KANAMOTO, T.; TERAKUBO, S.; KAGAYA, H.; NAKASHIMA, H.; SUGITA, Y. Quantitative structure–cytotoxicity relationship of newly synthesized piperic acid esters. **Anticancer Research**, v. 37, n. 11, p. 6161–6168, 2017.

SAKATA, R. P. **Docking molecular, síntese e estudo biológico de potenciais inibidores da beta-secretase (BACE-1) e da acetilcolinesterase (AChE)**. 2018. 182f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2018.

SANTOS, A. D. **Ranking ligands in structure-based virtual screening using siamese neural networks**. 2017. 30f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Computação) - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2017.

SANTOS, A.G.; PEREZ, C.C.; TININIS, A.G.; BOLZANI, V.S.; CAVALHEIRO, A.J. Clerodane diterpenes from leaves of *Casearia sylvestris* Swart. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1100-1103, 2007.

SANTOS, M.L.A. **Estudos químicos-computacionais, farmacocinéticos e toxicológicos in silico de derivados azaindóis do ácido hidroxâmico, inibidores da enzima integrase do HIV-1**. 2014. 115f. Dissertação (Mestrado em Ciências Aplicadas e Produtos para Saúde) – Universidade Federal Fluminense, 2014.

SHARP, P.; HAHN, S.P. Prehistory of HIV-1. **Nature**, v. 455, p.605-606, 2008.

SHIRI, F.; PIRHADI, S.; RAHMANI, A. Identification of new potential HIV-1 reverse transcriptase inhibitors by QSAR modeling and structure-based virtual screening. **Journal of Receptors and Signal Transduction**, v. 38, n. 1, p. 37–47, 2018.

SILVA, C.G.; CARVALHO, C.D.F.; HAMERSKI, L.; CASTRO, F.A.V.; KAISER, C.R.; ELEUTHERIO, E.C.A.; REZENDE, C.M. Protective effects of flavonoids and extract from *Vellozia kolbekii* Alves against oxidative stress induced by hydrogen peroxide in yeast. **Journal of Natural Medicines**, v. 66, p. 367–372, 2012.

SILVA, C.G.; SANTOS JUNIOR, H.M.; BARBOSA, J.P.; COSTA, G.L.; RODRIGUES, F.A.R.; OLIVEIRA, D.F.; MORAES, M.O.; COSTA-LOTUFO, L.V.; ALVES, R.J.V.; ELEUTHERIO, E.C.A.; PESSOA, C.O. Structure Elucidation, Antimicrobial and Cytotoxic Activities of a Halimane Isolated from *Vellozia kolbekii* Alves (Velloziaceae). **Chemistry & Biodiversity**, v. 12, n. 12, 1891-1901, 2015.

SILVA, H. **Triagem virtual de compostos provenientes de plantas da biodiversidade brasileira, com potencial atividade inibitória das enzimas alfa-amilase, alfa-glicosidase humanas**. 2017. 33f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biotecnologia) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2017.

SILVA, P.K.; PINCHIN, R.; PINTO, A. C. Phytochemical Studies on Brazilian Velloziaceae. II Triterpenes from *Barbacenia flava*. **Ciência e Cultura. Suplemento**, v. 32, p. 120-121, 1980.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. 1 ed. Editora Artmed, São Paulo – SP, 2017, p.914.

SIZOCHENKO, N.; LESZCZYNSKA, D.; LESZCZYNSKI, J. Modeling of Interactions between the Zebrafish Hatching Enzyme ZHE1 and A Series of Metal Oxide Nanoparticles: Nano-QSAR and Causal Analysis of Inactivation Mechanisms. **Nanomaterials**, v. 7, n. 10, p. 330, 2017.

SOUSA, J. M. A. Descriptors Generation Using the CDK Toolkit and Web Services. **Tutorials in Chemoinformatics**, p. 127–34, 2017.

SOUZA, C.D.; FELFILL, J.M. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, GO, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, n. 1, p. 135-142, 2006.

SPECK-PLANCHE, A. **Multi-scale Approaches in Drug Discovery: From Empirical Knowledge to in Silico Experiments and Back**. 1 ed. Elsevier, 2017, 238p.

TAMAYOSE, C.I.; TORRES, P.B.; ROQUE, N.; FERREIRA, M.J.P. HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activity of flavones and chlorogenic acid derivatives from *Moquiniastrum floribundum* (Asteraceae). **South African Journal of Botany**, v. 123, p. 142-146, 2019.

TANEJA, V. **Methods and materials for assessing and treating arthritis**, 2018. Disponível em: <<https://patents.google.com/patent/EP3255994A1/en>>

TEKEMURA, T.; URUSHISAKI, T.; FUKUOKA, M.; HOSOKAWA-MUTO, J.; HATA, T.; OKUDA, Y.; HORI, S.; TAZAWA, S.; ARAKI, Y.; KUWATA, K. 3,4-Dicaffeoylquinic Acid, a Major Constituent of Brazilian Propolis, Increases TRAIL Expression and Extends the Lifetimes of Mice Infected with the Influenza A Virus. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p.1-7, 2012.

TELELAB. **Diagnóstico do HIV**. UFSC, Florianópolis-SC, 2014.

TELES, F.; SILVA, T.M.; CRUZ JÚNIOR, F.P.; HONORATO, V.H.; COSTA, H.O.; BARBOSA, A.P.F.; OLIVEIRA, S.G.; PORFÍSIO, Z.; LIBÓRIO, A.B.; BORGES, R.L.; FANELLI, C. Brazilian red propolis attenuates hypertension and renal damage in 5/6 renal ablation model. **Journal Homepage**, v.10, n.1, p.1-15, 2016.

TELES, Y.C.F.; HORTA, C.C.; AGRA, M.D.E.F.; SIHERI, W.; BOYD, M.; IGOLI, J.O.; GRAY, A.I.; DE SOUZA, M.D.F. New sulphated flavonoids from *Wissadula periplocifolia* (L.) C. Presl (Malvaceae). **Molecules**, v. 20, p. 20161-20172, 2015.

TERRY, L.R.; MORAVEC, R.A.; NILES, A.L.; DUELLMAN, S.; BENINK, H.A.; WORZELLA, T.J. **Cell Viability Assays: Assay Guidance Manual**. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2016.

TEWARI, D.; MOCAN, A.; PARVANOV, E.D.; SAH, A.N.; NABAVI, S.M.; HUMINIECKI, L.; MA, Z.F.; LEE, Y.Y.; HORBANCZUK, J.O.; ATANASOV, A.G. Ethnopharmacological Approaches for Therapy of Jaundice: Part I. **Frontiers in Pharmacology**, v.8, p.1-18, 2017.

THOMAS, G. Medicinal chemistry: an introduction. John Wiley & Sons, 2011.

TOEPAK, E.P.; TAMBUNAN, U.S.F. In silico design of fragment-based drug targeting host processing α -glucosidase i for dengue fever. In: **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**. IOP Publishing, p. 12017, 2017.

TOYAMA, D.O.; FERREIRA, M.J.P.; ROMOFF, P.; FÁVERO, O.A.; GAETA, H.H.; TOYAMA, M.H. Effect of Chlorogenic Acid (5-Caffeoylquinic Acid) Isolated from *Baccharis oxyodonta* on the Structure and Pharmacological Activities of Secretory

Phospholipase A2 from *Crotalus durissus terrificus*. **BioMed Research International**, p. 1-10, 2014.

TUNCBILEK, M.; KUCUKDURLU, A.; GUVEN, E.B.; ALTIPARMAK, D.; CETIN-ATLAY, R. Synthesis of novel 6-substituted amino-9-(β -D-ribofuranosyl) purine analogs and their bioactivities on human epithelial cancer cells. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 28, n. 3, p. 235–239, 2018.

TUNCBILEK, M.; KUCUKDURLU, A.; GUVEN, E.B.; ALTIPARMAK, D.; CETIN-ATLAY, R. Synthesis of novel 6-substituted amino-9-(β -D-ribofuranosyl) purine analogs and their bioactivities on human epithelial cancer cells. **Bioorganic Medicinal Chemistry Letters**, v. 28, n. 3, p. 235-239, 2018.

UNAIDS data 2019. Disponível em: https://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/2019-global-AIDS-update_en.pdf. Acesso em 21 de Maio, 2019.

VALENTE, L.M.M.; GUNATILAKA, A.A.L.; KINGSTON, D.G.; PATITUCI, M.L.; PINTO, A.C. A Bioactive *seco*-Rosane Diterpenoid from *Vellozia candida*. **Journal of Natural Products**, v. 60, n. 5, p. 478-481, 1997.

VANHOLME, R.; DEMEDTS, B.; MORREEL, K.; RALPH, J.; BOERJAN, W. Lignin biosynthesis and structure. **Plant Physiology**, v. 153, p. 895-905, 2010.

VANI, V.; KEERTHIKA, V.; LAHIRI, M.; SARKAR, M. *In silico* analysis of natural antiviral compounds against HIV. **European Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences**, v. 5, n. 2, p. 804-810, 2018.

VARALLO, F.R. **Internações hospitalares por Reações Adversas a Medicamentos (RAM) em um hospital de ensino**. 2010. 96f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.

VARSOU, D.D.; NIKOLAKOPOULOS, S.; TSOUMANIS, A.; MELAGRAKI, G.; AFANTITIS, A. Enalos+ KNIME Nodes: New Cheminformatics Tools for Drug Discovery. **Rational Drug Design**, p. 113–138, 2018.

VAZ, T. A. **Modelo de dados para treinamento de inteligência artificial na pesquisa em saúde: um estudo prático sobre infecções hospitalares**. 2017. 103f. Dissertação (Mestrado em Pesquisa Clínica) – Universidade federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2017.

VIIRA, B.; GARCÍA-SOSA, A.T.; MARAN, U. Chemical structure and correlation analysis of HIV-1 NNRT and NRT inhibitors and database-curated, published inhibition constants with chemical structure in diverse datasets. **Journal of Molecular Graphics Modelling**, v. 76, n. 205-223, 2017.

WANG, W.; ZHAO, J.; WANG, Y.H.; SMILIE, T.A.; LI, X.C.; KHAN, I.K. Diterpenoids from *Casearia sylvestris*. **Planta Medica**, v. 75, n. 13, p. 1436-1441, 2009.

WIANOWSKA, D.; GIL, M. Recent advances in extraction and analysis procedures of natural chlorogenic acids. **Phytochemical Review**, v. 18, p. 273-302, 2019.

WILLIAMS, C.A.; GREENHAM, J.; HARBORNE, J.; EAGLES, J.; MARKHAM, K.R. Occurrence of c-methylflavonols in leaves of *Vellozia*, **Phytochemistry**, v. 31, n. 2, p. 555-557, 1992.

WILLIAMS, C.A.; HARBORNE, J.B.; GREENHAM, J.; EAGLES, J.; MARKHAM, K.R.; Six further lipophilic flavonols from the leaf of *Vellozia stipitata*. **Phytochemistry**, v. 32, n. 3, p. 731-735, 1993.

WILLIAMS, C.A.; HARBORNE, J.B.; TOMAS-BARBERAN, F.A. Biflavonoids in the primitive monocots *Isophysis tasmanica* and *Xerophyta plicata*. **Phytochemistry**, v. 26, n. 9, p. 2553-2555, 1987.

WILSON, I. D.; NICHOLSON, J. K. Gut microbiome interactions with drug metabolism, efficacy, and toxicity. **Translation Research**, v. 179, n. 204–22, 2017.

WYREPKOWSKI, C. C. **Estudo Químico e Atividades Mutagênica e Antirradicalar de *Caesalpinia ferrea***. 2014. Tese (Pós-Graduação em Química) – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2014.

YOSHINAGA, T.; MIKI, S.; KAWAUCHI-MIKI, S.; SEKI, T.; FUJIWARA, T. Barrier to Resistance of Dolutegravir in Two-Drug Combinations. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 63, n. 3, p. 2104-2118, 2019.

YU, S.; YAN, H.; ZHANG, L.; SHAN, M.; CHEN, P.; DING, A.; LI, S.F.Y. A review on the phytochemistry, pharmacology, and pharmacokinetics of amentoflavone, a naturally occurring biflavonoid. **Molecules**, v. 22, n. 2, p. 299, 2017.

ZERBE, P.; BOHLMANN, J. Plant diterpene synthases: exploring modularity and metabolic diversity for bioengineering. **Trends in Biotechnology**, v. 33, n. 7, 2015.

ZHOU, J.M.; IBRAHIM, R. K. Tricin-a potential multifunctional nutraceutical. **Phytochemistry Reviews**, v. 9, p. 413–424, 2010.

ZONG, Y.; ZHANG, H. Amentoflavone prevents sepsis-associated acute lung injury through Nrf2-GCLC-mediated upregulation of glutathione. **Acta Biochemical Polonica**, v. 64, n. 1, p. 93–98, 2017.

ZWENGER, S.; BASU, C. Plant terpenoids: application and future potentials. **Biotechnology and Molecular Biology Reviews**, v. 3, n. 1, p. 1-7, 2008.