



UNIVERSIDADE DO ESTADO DA BAHIA – UNEB – *CAMPUS 1*
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA TERRA – DCET
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA APLICADA – PGQA



LUIZ AUGUSTO FIGUEIREDO RIBEIRO

**AVALIAÇÃO METABOLÔMICA E DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE,
CITOTÓXICA E ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS DA RESINA DE *Vellozia*
pyrantha A. A. Conceição**

SALVADOR, BA

2020

LUIZ AUGUSTO FIGUEIREDO RIBEIRO

**AVALIAÇÃO METABOLÔMICA E DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE,
CITOTÓXICA E ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS DA RESINA DE *Vellozia*
pyrantha A. A. Conceição**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química Aplicada da Universidade do Estado da Bahia como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Ribeiro de Jesus

SALVADOR, BA

2020

LUIZ AUGUSTO FIGUEIREDO RIBEIRO

AVALIAÇÃO METABOLÔMICA E DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE,
CITOTÓXICA E ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS DA RESINA DE *Vellozia*
pyrantha A. A. Conceição

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química Aplicada da Universidade do Estado da Bahia como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Salvador, ____ de _____ de 2020

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Ribeiro de Jesus
Universidade Federal da Bahia

Profa. Dra. Lourdes Cardoso de Souza Neta
Universidade do Estado da Bahia

Profa. Dra. Regina Maria Geris dos Santos
Universidade Federal da Bahia

À minha maior guerreira, meu exemplo de força e
minha fonte de inspiração, Jaciara Weber (*in
memorian*),

“Será que as coisas seriam iguais

Se eu te visse no Paraíso?”

Tears in Heaven - Eric Clapton

AGRADECIMENTOS

À minha família e amigos do “VR2012”, pelo apoio incondicional recebido. Por todos os momentos de descontração, conquistas, alegrias, angústias, tristezas e por todos os encontros, que nem sempre permanecem harmoniosos.

Ao meu orientador, o Prof. Dr. Paulo Ribeiro, por todos os ensinamentos, paciência, compreensão e incentivo. Muito obrigado pela confiança e pela minha aceitação como orientando.

À Profa. Dr^a Lourdes Cardoso, por todos os valiosos ensinamentos durante a iniciação científica, por minha iniciação na pesquisa em produtos naturais e por todo conhecimento passado acerca das atividades biológicas.

Aos colegas do *Metabolomics Research Group* (MRG), por todo apoio, responsabilidade e compromisso demonstrados dos últimos dois anos. Em especial à lago Ferreira e aos ex membros e amigos Daniel Moura, Danilo Batista e Perla Machado pelo companheirismo e aprendizado compartilhados, que hoje ultrapassam a barreira profissional.

Aos amigos do grupo de pesquisa em produtos naturais da UNEB, por toda amizade ao longo dos últimos anos e toda a ajuda e colaboração na realização dos ensaios antimicrobianos. Sinto falta de todos e permaneço muito grato por todos os momentos vividos.

Ao Prof. Dr. Pio Colepicolo e demais colaboradores pela parceria do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Algas da Universidade de São Paulo (USP) para a realização dos experimentos de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas (CLAE-EM).

Ao Dr. Daniel Bezerra e demais colaboradores pela parceria com o Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) para a realização dos ensaios de atividade citotóxica.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada (PGQA) pela solicitude, apoio e auxílio na minha formação.

À FAPESB pela concessão da bolsa de mestrado e à CAPES e CNPq pelos auxílios financeiros para o desenvolvimento da pesquisa.

Por fim, à todos que direta- ou indiretamente me ajudaram a finalizar essa etapa e aos que estiveram ao meu lado durante toda essa caminhada.

“Não tenho nenhum talento especial. Apenas sou apaixonadamente curioso.”

- Albert Einstein

RESUMO

A *Vellozia pyrantha* A. A. Conceição, conhecida como Candombá, é uma planta endêmica dos campos rupestres do Parque Nacional da Chapada Diamantina conhecida por suas propriedades inflamáveis e a sua grande capacidade de florescimento após queimadas sendo influenciadora do ciclo de nutrientes do bioma. Apesar do uso tradicional e da importância da espécie, não há relatos sobre a sua composição química ou atividades biológicas. O objetivo deste trabalho é obter, através de uma abordagem metabolômica, o perfil metabólico e avaliar as atividades antioxidante, antimicrobiana e citotóxica da resina e frações de *V. pyrantha*. O fracionamento da resina foi feito por cromatografia em coluna com gradiente de polaridade (Hexano-Acetato de etila-Metanol) resultando na obtenção de oito frações. A atividade antioxidante foi determinada pelo método do sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) e os fenóis totais foram quantificados pelo método Folin-Ciocalteu. Os valores de IC₅₀ para a atividade antioxidante variou de 205,48 µg mL⁻¹ (fração 5) até 842,79 µg mL⁻¹ (fração 7). Os valores de fenólicos totais variaram de 14,09 mg EAG g⁻¹ (fração 8) até 154,26 mg EAG g⁻¹ (resina bruta). A atividade antimicrobiana foi avaliada frente a bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos através do método de microdiluição em caldo. Todas as amostras apresentaram atividade contra pelo menos um dos micro-organismos com valores de CIM e CMM entre 3,125 µg mL⁻¹ e 500 µg mL⁻¹. A citotoxicidade das amostras foi avaliada pelo método do *alamar blue* contra diferentes linhagens de células tumorais. Nos testes *in vitro* todas as amostras apresentaram resultados promissores (IC₅₀>30 µg mL⁻¹), variando entre 6,96 µg mL⁻¹ (fração 3 frente à B16F10) e 41,80 µg mL⁻¹ (fração 1 frente à HepG2). O perfil metabólico foi obtido por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM) e avaliado por análise estatística univariada e multivariada, permitindo a identificação de 28 metabólitos. Diterpenos e norditerpenos de esqueleto isopimarano e cleistanano são os compostos majoritários identificados em todas as frações, sendo os principais candidatos responsáveis pelas atividades biológicas obtidas.

Palavras-chave: Metabolômica. Bioprospecção. Produtos Naturais. *Vellozia pyrantha*.

ABSTRACT

Vellozia pyrantha A. A. Conceição, known as Candombá, is an endemic plant of rupestrian fields of the Chapada Diamantina National Park, known for its flammable properties and its great flowering capacity after burning events, influencing the biome's nutrient cycle. Despite the traditional use and the importance of the species, there are no reports about its chemical composition or biological activities. The objective of this work is to assess, through a metabolomic approach, the metabolic profile and the antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of the resin and fractions of *V. pyrantha*. The resin fractionation was done by column chromatography with a polarity gradient (Hexane-Ethyl acetate-Methanol) resulting in eight fractions. The antioxidant activity was determined by the free radical scavenging 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazil (DPPH) method and the total phenols were quantified by the Folin-Ciocalteu method. IC₅₀ values for antioxidant activity ranged from 205.48 µg mL⁻¹ (fraction 5) to 842.79 µg mL⁻¹ (fraction 7). The total phenolic values ranged from 14.09 mg EAG g⁻¹ (fraction 8) to 154.26 mg EAG g⁻¹ (resin). Antimicrobial activity was evaluated against Gram-positive, Gram-negative bacteria and fungi using the broth microdilution method. All samples showed activity against at least one of the microorganisms with MIC and CMM values between 3.125 µg mL⁻¹ and 500 µg mL⁻¹. The cytotoxicity of the samples was evaluated by the *alamar blue* method against different tumor cell lines. In the in vitro tests, all samples showed promising results (IC₅₀>30 µg mL⁻¹), ranging between 6.96 µg mL⁻¹ (fraction 3 against B16F10) and 41.80 µg mL⁻¹ (fraction 1 against HepG2). The metabolic profile was obtained by high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry (HPLC-MS) and evaluated by univariate and multivariate statistical analysis, allowing the identification of 28 metabolites. Diterpenes and norditerpenes of the isopimarane and cleistanthane skeleton are the major compounds identified in all fractions, being the main candidates responsible for the biological activities obtained.

Keywords: Metabolomics. Bioprospection. Natural Products. *Vellozia pyrantha*.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Produtos naturais ou sintéticos utilizados como droga.....	19
FIGURA 2 - Todas as drogas aprovadas entre 1981 e 2019	20
FIGURA 3 - Antibióticos utilizados em infecções microbianas	23
FIGURA 4 - Reação de redução do DPPH com um agente antioxidante (A-H)	27
FIGURA 5 - Produtos naturais isolados de planta e utilizados como anticâncer.....	31
FIGURA 6 - Reação de semissíntese do paclitaxel (Taxol)	32
FIGURA 7 - Reação de redução da resazurina em contato com a célula	33
FIGURA 8 - Distribuição dos biomas no Brasil.....	35
FIGURA 9 - Mapa de algumas zonas de transição e dos campos rupestres	38
FIGURA 10 - Distribuição geográfica da família Velloziaceae no Brasil	42
FIGURA 11 - Formação simplificada de IPP e DMAP em plantas	49
FIGURA 12 - Condensação do DMAP e IPP para formação dos terpenos.....	50
FIGURA 13 - Rota biossintética da via do chiquimato	84
FIGURA 14 - Esquema de formação sequencial dos derivados de flavonoides	85
FIGURA 15 - Biossíntese do fenilpiruvato e do 4-hidróxifenilpiruvato.....	102
FIGURA 16 - Formação dos ácidos fenólicos	103
FIGURA 17 - Biossíntese de estilbenos.....	104
FIGURA 18 - Espécimes de <i>V. pyrantha</i> fotografadas no Vale do Capão, PNCD ..	112
FIGURA 19 - Resina de <i>V. pyrantha</i>	113
FIGURA 20 - Fluxograma de fracionamento da VV-EB e obtenção das frações	114
FIGURA 21 - Curva analítica do ácido gálico.....	116
FIGURA 22 - Esquema representativo das placas de Elisa.....	118
FIGURA 23 - Atividade antioxidante das amostras de <i>V. pyrantha</i>	125
FIGURA 24 - Teor de fenólicos totais das amostras de <i>V. pyrantha</i>	126
FIGURA 25 - ANOVA dos compostos identificados por CLAE-EM	137
FIGURA 26 - Gráfico de PLS-DA das amostras de <i>V. pyrantha</i>	138
FIGURA 27 - Validação cruzada da PLS-DA das amostras.....	140
FIGURA 28 - Análise de agrupamento.....	141
FIGURA 29 - Gráfico de VIP scores das amostras e metabólitos de <i>V. pyrantha</i> ...	142
FIGURA 30 - Gráfico de <i>heatmap</i> das amostras de <i>V. pyrantha</i>	144

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Terpenóides isolados de espécies de <i>Vellozia</i>	52
TABELA 2 - Flavonoides isolados de espécies de <i>Vellozia</i>	87
TABELA 3 - Substâncias de classes minoritárias isoladas das espécies de <i>Vellozia</i>	106
TABELA 4 - Substâncias do gênero <i>Vellozia</i> que tiveram atividade biológica avaliada.....	108
TABELA 5 - Fracionamento da VV-EB por CCF.....	124
TABELA 6 - Resultados da atividade antioxidante e teor de fenólicos totais	124
TABELA 7 - Atividade antimicrobiana das amostras de <i>V. pyrantha</i>	128
TABELA 8 - Porcentagem de inibição de proliferação celular em concentração única das amostras de <i>V. pyrantha</i>	129
TABELA 9 - Valores de IC ₅₀ para atividade citotóxica das amostras de <i>V. pyrantha</i> contra diferentes linhagens de células tumorais e não tumorais (MRC-5)	130
TABELA 10 - Metabólitos identificados nas amostras da resina de <i>V. pyrantha</i> por CLAE-EM	134
TABELA 11 - Parâmetros da validação cruzada de amostras de <i>V. pyrantha</i>	140

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CBM	Concentração bactericida mínima
CFM	Concentração fungicida mínima
CG	Cromatografia gasosa
CIM	Concentração inibitória mínima
CL	Cromatografia líquida
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CV	<i>Cross Validation</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
EC	Eletroforese capilar
EM	Espectrometria de massas
ERRO	Espécies reativas do oxigênio
IC ₅₀	Metade da concentração inibitória máxima
OMS	Organização Mundial de Saúde
PLSA-DA	<i>Partial Least Squares-Discriminant Analysis</i>
PNCD	Parque Nacional da Chapada Diamantina
RMN	Ressonância magnética nuclear
UNEB	Universidade do Estado da Bahia
VIP	<i>Variable Importance Projection</i>
VV-EB	Resina bruta de <i>Vellozia pyrantha</i>
VV-Fr1-8	Frações 1 a 8 da resina bruta de <i>Vellozia pyrantha</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	PLANTAS MEDICINAIS	18
2.2	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	22
2.3	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	26
2.4	ATIVIDADE CITOTÓXICA	28
2.5	O BIOMA CERRADO	35
2.5.1	Campos rupestres	37
2.5.2	Parque Nacional da Chapada Diamantina	39
2.6	FAMÍLIA VELLOZIACEAE	40
2.6.1	Gênero <i>Vellozia</i>	44
2.6.2	Metabólitos isolados do gênero <i>Vellozia</i>	46
2.6.2.1	Terpenóides	47
2.6.2.2	Flavonoides	84
2.6.2.3	Demais classes	102
2.6.2.4	Atividade biológica das substâncias identificadas em <i>Vellozia</i>	108
2.6.3	<i>Vellozia pyrantha</i> A. A. Conceição	110
3	OBJETIVOS	112
3.1	OBJETIVO GERAL	112
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	113
4	MATERIAIS E MÉTODOS	113
4.1	MATERIAL VEGETAL	113
4.2	OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS	114
4.3	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	114
4.4	TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS	115
4.5	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	116
4.5.1	Preparo das amostras	116
4.5.2	Micro-organismos testados	117
4.5.3	Microdiluição em caldo	117
4.5.4	Concentração bactericida (CBM) e fungicida (CFM) mínima	119
4.6	ATIVIDADE CITOTÓXICA	119
4.6.1	Preparo das amostras	119
4.6.2	Células	120

4.6.3	Ensaio de citotoxicidade.....	120
4.7	PERFIL METABOLÔMICO	121
4.7.1	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (CLAE-EM).....	121
4.7.2	Processamento dos dados da CLAE-EM.....	122
4.7.3	Identificação dos metabólitos	122
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	123
4.8.1	Atividade antioxidante e teor de fenólicos totais	123
4.8.2	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (CLAE-EM).....	123
5	RESULTADOS	124
5.1	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS.....	124
5.2	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	126
5.3	ATIVIDADE CITOTÓXICA	129
5.4	PERFIL METABOLÔMICO	132
6	DISCUSSÃO	136
7	CONCLUSÃO.....	147
	REFERÊNCIAS.....	149
	APÊNDICE A – Curva de calibração do DPPH e consumo do ácido gálico	171
	APÊNDICE B – Consumo de DPPH das amostras de <i>V. pyrantha</i>	172
	APÊNDICE C – Massas de alta resolução dos compostos de <i>Vellozia</i>	173
	ANEXO A – Certidão de acesso ao patrimônio genético	175
	ANEXO B – Normalização dos dados de CLAE-EM	176
	ANEXO C – Resultados do <i>post hoc</i> utilizando LSD de Fisher	177
	ANEXO D – Valores de VIP scores dos metabólitos de <i>V. pyrantha</i>	178

1 INTRODUÇÃO

A biologia de sistemas é uma denominação dada para os estudos que utilizam conhecimentos multidisciplinares de maneira integrada para compreender sistemas biológicos complexos dentro de uma abordagem holística, que busca compreender o sistema como um todo (composição química, metabolismo e funções), avaliando suas inter-relações e visando, de uma maneira mais geral, a compreensão do funcionamento dos organismos (FUNARI; CASTRO-GAMBOA; CAVALHEIRO; BOLZANI, 2013).

A integração dos diferentes componentes de um sistema biológico foi determinante no surgimento de uma nova área da ciência, chamada de ciências “ômicas”, que passaram a ser conhecidas a partir do ano de 1990, com um projeto liderado pelo pesquisador Leroy Hood que visava o sequenciamento e a síntese do DNA humano. Relativamente recente, o termo se refere ao campo de estudo de diferentes ciências biológicas que terminam com a palavra ômica, como a genômica (do projeto citado anteriormente), a transcriptômica, a proteômica e a metabolômica (VAILATI-RIBONI; PALOMBO; LOOR, 2017).

O objetivo principal de cada uma das ômicas é a detecção geral de conjuntos de moléculas biológicas como genes (genômica), proteínas (proteômica), RNA (transcriptômica) e metabolitos (metabolômica) em amostras biológicas específicas incluindo a sua identificação, caracterização e quantificação. Por meio de uma aproximação de seus resultados, as ciências ômicas possuem a capacidade de analisar diferentes variações genéticas ou metabólicas e permitir o entendimento de sistemas biológicos complexos de maneira muito mais simples (FUNARI; CASTRO-GAMBOA; CAVALHEIRO; BOLZANI, 2013; VAILATI-RIBONI; PALOMBO; LOOR, 2017).

Dentre as ômicas citadas, pode-se destacar a metabolômica, definida por Fiehn (2001) como a análise abrangente e quantitativa do metaboloma (conjunto de todos os metabolitos de baixa massa molecular [até 1500 Da] presentes ou alterados) de um sistema biológico. As análises metabolômicas podem ser realizadas através de duas abordagens diferentes: a metabolômica alvo, que é a análise quantitativa de um ou mais metabolitos pré-selecionados e a metabolômica global, que é a análise

qualitativa do maior número de metabólitos possível. Além disso, existem as análises *footprint*, que direciona o estudo ao metaboloma extracelular e *fingerprint*, que direciona o estudo ao metaboloma intracelular (CANUTO; COSTA; CRUZ; SOUZA *et al.*, 2018).

Desde o seu surgimento, os estudos metabolômicos vêm sendo utilizados nas mais diversas áreas e tipos de estudo, como por exemplo na investigação de alterações metabólicas de um micro-organismo ou planta em resposta ao estresse induzido por agentes físicos, químicos ou biológicos na área ambiental ou de produtos naturais e na compreensão em nível molecular de diversas patologias diferentes na área de análises clínicas, nutrição ou toxicologia forense.

De um modo geral, todo estudo em metabolômica segue um fluxo de trabalho compreendendo sete etapas: 1) definição do problema biológico; 2) planejamento experimental; 3) preparo da amostra; 4) análise das amostras; 5) processamento dos dados obtidos; 6) identificação dos metabólitos e 7) interpretação biológica dos resultados. Na etapa do planejamento, a abordagem e tipo de análise irão definir todo o direcionamento do trabalho a ser realizado, como por exemplo a implicação de um protocolo específico de extração e preparo de amostras em análises metabolômicas alvo, uma vez que os metabólitos de interesse são pré-definidos.

A partir do protocolo, o estudo irá se basear em análises comparativas sobre perfis metabólicos de amostras individuais, podendo ser um conjunto de sinais cromatográficos ou espectroscópicos. Para a obtenção desses dados há a possibilidade do uso de diversas técnicas diferentes devido às diferentes propriedades físico-químicas apresentadas pelos metabólitos em sua matriz biológica (ZHANG; SUN; WANG; HAN *et al.*, 2012).

Sabendo que nessas matrizes há a presença de um grande número de metabólitos diferentes, o uso de instrumentos e técnicas analíticas de alto desempenho faz-se necessário e por conta disso, a metabolômica é considerada uma das mais avançadas abordagens para o mapeamento químico de um organismo vivo. De acordo com Canuto *et al.* (2016), as primeiras aplicações em metabolômica datam da década de 80 e utilizam a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) e a ressonância magnética nuclear (RMN). Dentre as disponíveis, o uso da espectrometria de massas (EM) acoplada com técnicas de separação

(cromatografia líquida [CL], gasosa [CG] ou eletroforese capilar [EC]) é o modo de detecção mais rápido para a metabolômica, visto que essas técnicas proporcionam análises rápidas, sensíveis e seletivas. Além disso, a cromatografia líquida torna-se bastante utilizada por se adaptar com a maior quantidade de substâncias diferentes e por ser um instrumento de fácil manuseio e automatização, tendo boa resolução, reprodutibilidade e seletividade (KUEHNBAUM; BRITZ-MCKIBBIN, 2013; ZHANG; SUN; WANG; HAN *et al.*, 2012).

Com resultados cada vez mais promissores, surgiram nos últimos anos diversos estudos metabolômicos correlacionando aspectos metabólicos com as atividades biológicas, como o de Guan *et al.* (2018), que avaliou o efeito preventivo em ratos do uso de um medicamento a base de plantas da medicina tradicional chinesa para problemas gastrointestinais utilizando RMN de hidrogênio. Em outro estudo, o efeito mio-relaxante nas vias aéreas e o efeito cardioprotetor de diferentes metabólitos identificados em plantas da família Menispermaceae foram estudados utilizando RMN de hidrogênio em conjunto com análise multivariada investigando a variação na composição química e nas atividades biológicas dessas plantas (ALVES; SCOTTI; SCOTTI; DOS SANTOS *et al.*, 2017).

Os estudos desse tipo mostram que a metabolômica torna interessante a bioprospecção de plantas medicinais por meio da RMN ou da EM (HEYMAN; MEYER, 2012; JORGE; MATA; ANTÓNIO, 2016) associadas com técnicas cromatográficas para o isolamento de suas substâncias bioativas. Dentro desse contexto, o objetivo desse trabalho é a realização do estudo metabolômico da resina de *Vellozia pyrantha*, uma planta típica do cerrado brasileiro, bem como as correlações entre o seu perfil metabólico e as suas atividades biológicas.

Vale ressaltar que o estudo dessa espécie é um trabalho inédito, não existindo na literatura nenhum estudo fitoquímico, antimicrobiano, antioxidante, antitumoral ou metabolômico acerca da espécie em questão.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PLANTAS MEDICINAIS

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), planta medicinal é “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semissintéticos” (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1998). Estudos indicam que no decorrer da história da humanidade, as plantas medicinais foram bastante utilizadas na medicina tradicional por meio de chás, extratos ou tinturas como tratamento terapêutico de muitas comunidades, principalmente as menos favorecidas, uma vez que o tratamento é dificultado por obstáculos como o próprio acesso aos centros hospitalares ou a obtenção dos exames e medicamentos. Dessa forma, a fácil obtenção e a tradicionalidade do uso de plantas medicinais acaba tornando o conhecimento acerca dos produtos naturais muitas vezes o único recurso medicinal no tratamento de enfermidades (MACIEL; PINTO; VEIGA JUNIOR; GRYNBERG *et al.*, 2002; VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

No início da década de 90, estimava-se que cerca de 65-80% da população dos países em desenvolvimento dependiam dessas plantas como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde (AKERELE, 1993). Para prevenir, curar ou minimizar os sintomas de doenças, surge o estímulo ao uso dos fitoterápicos, que tem como principais fornecedores de matéria-prima as plantas medicinais, sendo definidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) como “todo medicamento tecnicamente obtido e elaborado, empregando-se, exclusivamente, matérias-primas vegetais com finalidade profilática, curativa ou para fins de diagnóstico, com benefício para o usuário” (BRASIL, 1995).

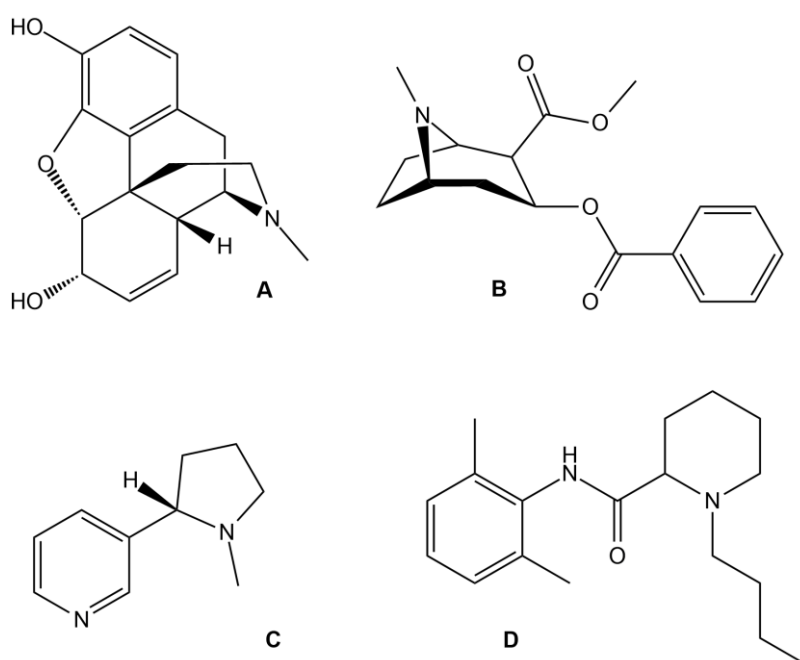
Ainda hoje, as plantas medicinais tem seu acesso simplificado por serem encontradas facilmente em feiras livres, quintais residenciais e mercados populares, seja no interior ou em grandes cidades. Por conta disso, os medicamentos fitoterápicos acabam possuindo um custo mais acessível para a população e para os serviços públicos de saúde quando comparados aos obtidos na indústria farmacêutica

por meio da síntese química, que envolvem tecnologia e patentes tecnológicas em sua produção (MACIEL; PINTO; VEIGA JUNIOR; GRYNBERG *et al.*, 2002; TOLEDO; HIRATA; BUFFON; MIGUEL *et al.*, 2003).

Para Maciel *et al.* (2002), o conhecimento acerca das plantas medicinais é divulgado pelo conhecimento popular e se torna uma fonte importante da busca de substâncias com atividade biológica, uma vez que seus extratos representam uma rica fonte de antioxidantes (CHIRAG J; TYAGI; HALLIGUDI; YADAV *et al.*, 2013), antifúngicos e antibacterianos (RIOS; RECIO, 2005), despertando o interesse de pesquisadores em estudos envolvendo áreas multidisciplinares, dando caráter científico e enriquecendo os conhecimentos acerca da flora mundial.

Por conta da diversidade, complexidade e especificidade de suas moléculas, as substâncias de origem natural despertam a atenção dos químicos de produtos naturais e da indústria farmacêutica, sendo utilizados na geração de fármacos, alimentos, fragrâncias, cosméticos, agroquímicos e diversos outros produtos (CRAGG; NEWMAN, 2013; MISHRA; TIWARI, 2011). De acordo com Harvey (2008), mais de 80% das drogas é um produto natural, como a morfina (A), cocaína (B) e nicotina (C) ou um composto sintético baseado num produto natural, como a bupivacaína (D), apresentados na figura 1.

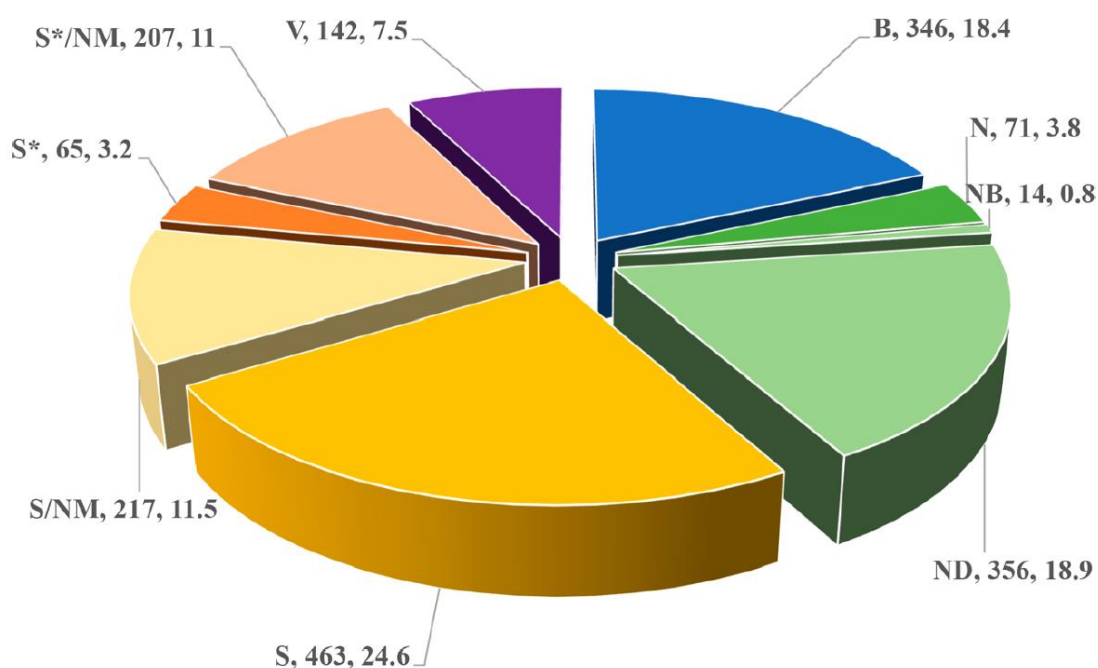
FIGURA 1 - Produtos naturais ou sintéticos utilizados como droga



Fonte: Produzidas pelo autor.

Esses dados corroboram com um estudo recente feito por Newman e Cragg (2020), que identificou que entre os anos de 1981 e 2019 houve a aprovação de 1881 drogas no total, com uma parcela significativa de produtos naturais inalterados, derivados de produtos naturais, “drogas botânicas” (produtos naturais em mistura definida) ou drogas sintéticas baseadas em produtos naturais conforme os dados apresentados na figura 2. Entre os anos de 2005 e 2010, um total de 19 drogas baseadas em produtos naturais de origens diversas tiveram aprovação para comércio em todo o mundo. Dessas, 5 apresentavam ação contra o câncer e 6 possuíam atividade antimicrobiana (MISHRA; TIWARI, 2011). Em 2008, mais de 100 novos compostos derivados de produtos naturais se encontravam em fase de testes clínicos, principalmente na área do tratamento do câncer e de doenças infecciosas (HARVEY, 2008).

FIGURA 2 - Todas as drogas aprovadas entre 1981 e 2019



B – Macromolécula biológica; **N** – Produto natural inalterado; **NB** – Droga botânica; **ND** – Derivado de produto natural; **S** – Droga sintética; **NM** – Imitação de um produto natural; **S*** – Droga sintética (farmacóforo); **V** – Vacina.

Fonte: Adaptado de Newman e Cragg (2020).

Dentro desse contexto, os estudos na área de química de produtos naturais ajudam na bioprospecção de plantas medicinais, que tem o objetivo de extrair valor econômico da biodiversidade através da busca de possíveis substâncias que possuam potencial econômico e de desenvolvimento de produtos.

A primeira e mais importante etapa na bioprospecção é a escolha da espécie vegetal, que pode ser feita por diversas maneiras das quais três se destacam: 1) abordagem randômica, na qual a espécie é escolhida de maneira aleatória, sem nenhum critério e considerando apenas a disponibilidade; 2) abordagem quimiotaxonômica, onde a espécie é escolhida mediante a presença de alguma classe específica de substâncias e 3) abordagem etnobotânica e etnofarmacológica, onde a espécie é selecionada de acordo com o uso terapêutico evidenciado por determinados grupos étnicos (MACIEL; PINTO; VEIGA JUNIOR; GRYNBERG *et al.*, 2002). Apesar disso, estima-se que de mais de 300 mil espécies vegetais, apenas 6% têm sido estudadas farmacologicamente e 15% fitoquimicamente (CRAGG; NEWMAN, 2013).

Dentre as abordagens citadas, a etnofarmacológica têm apresentado resultados mais promissores na descoberta de novas substâncias bioativas principalmente pelo fato de partir de espécies com atividades biológicas já evidenciadas pela medicina tradicional (ARAÚJO; ALENCAR; AMORIM; ALBUQUERQUE, 2008; RIBEIRO; OLIVEIRA; MACÊDO; MENEZES *et al.*, 2014).

No Brasil, a etnofarmacologia e a etnobotânica sofreram grande influência de três grandes grupos étnicos: as tribos indígenas, as tribos africanas e os europeus (representados pelos portugueses). Ambas deixaram marcas nas diferentes áreas da cultura brasileira, tanto no caráter material quanto no caráter espiritual, constituindo as bases de toda a medicina tradicional brasileira. As tribos indígenas utilizavam as plantas dentro de uma visão mística, onde a utilização de plantas com efeito psicotrópico era feita pelos pajés e as visões revelavam a erva certa para a cura dos enfermos. A influência africana advém do período da escravidão, quando os africanos trouxeram o conhecimento da medicina tradicional africana ao Brasil junto com diversas plantas diferentes por meio dos navios negreiros. Para eles, era papel do curandeiro livrar as pessoas do “espírito mau” (a forma que eles enxergavam as doenças). Por fim, a influência europeia se deu com a chegada dos padres jesuítas, que utilizavam as plantas medicinais na formulação de receitas para venda em suas “boticas”, localizadas nos colégios jesuítas e que hoje evoluíram para as farmácias (RAVAGNANI, 1981; SANTOS, 2009).

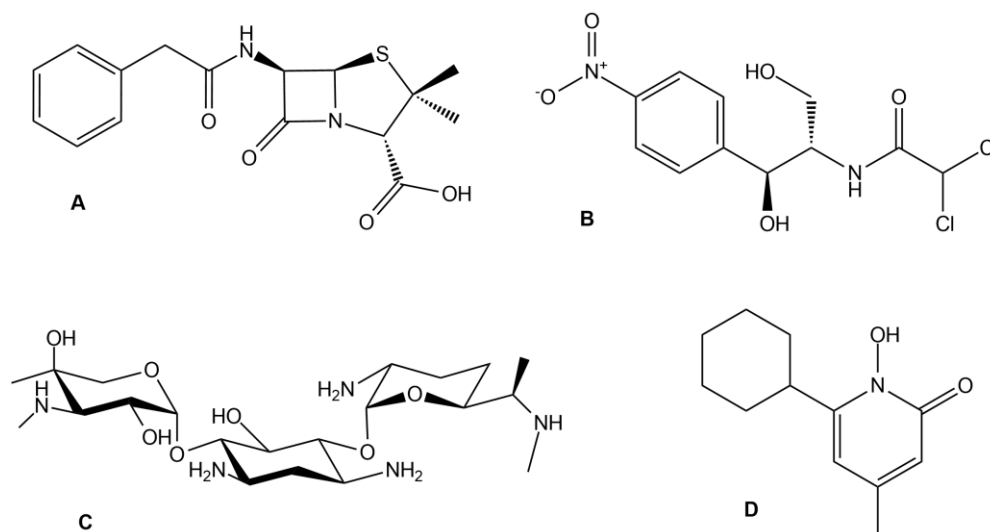
De um modo geral, grande parte dos estudos fitoquímicos de plantas medicinais engloba a realização de pelo menos um ensaio biológico, dos quais três possuem maior destaque: atividade antimicrobiana (para tratamento de infecções

causadas por micro-organismos), atividade antioxidante (para retardar reações de oxidação no organismo e prevenir o estresse oxidativo) e atividade citotóxica (para investigação da toxicidade dos compostos em culturas celulares).

2.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A busca de substâncias químicas com atividade antimicrobiana passou a se destacar na segunda metade do século XIX, quando as infecções microbianas assumiram um papel marcante por conta da descoberta de micro-organismos responsáveis por doenças como a tuberculose, cólera e febre tifoide (PATRICK, 2013a). A partir dessa época, vários estudos surgem no intuito da descoberta de antibióticos, definidos por Walsh (2003a) como “compostos, de origem natural ou sintética, capazes de inibir o crescimento ou causar a morte de bactérias e/ou fungos”. Esses compostos podem ser classificados em antibacterianos, quando voltados ao tratamento de bactérias ou antifúngicos, quando voltados ao tratamento de fungos. Da mesma forma, o antibiótico pode ser classificado como microbiostático (bacteriostático ou fungistático) quando causa inibição do crescimento ou microbicida (bactericida ou fungicida) quando causa a morte.

Um dos maiores marcos na história da busca de antibióticos foi a descoberta da penicilina G (A, figura 3), ou benzilpenicilina, por Fleming em 1928, uma vez que o composto possuía atividade superior à de todos os compostos existentes na época. Fleming, porém, não conseguia purificar o composto, que foi isolado em água, mas se destruía toda vez que tentava-se purificar. Foi em 1940, após o surgimento de novas técnicas experimentais como a cromatografia, que a penicilina foi purificada e passou a servir de antibiótico. Apesar disso, a descoberta da penicilina foi a maior motivação para maiores investimentos na bioprospecção de produtos naturais (micro-organismos e plantas), causando a descoberta de diversos antibióticos e fazendo com que doenças como a pneumonia, sífilis e tuberculose deixassem de ser fatais (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010; PATRICK, 2013a; c). Hoje, além da benzilpenicilina, existem diversos antibióticos, como o cloranfenicol (B), garamicina (C) e o loprox (D), apresentados na figura 3.

FIGURA 3 - Antibióticos utilizados em infecções microbianas

Fonte: Produzidas pelo autor.

A busca por novos antibióticos em plantas medicinais teve um grande destaque no campo da etnofarmacologia durante as últimas décadas, tendo o número de publicações acerca da atividade antimicrobiana de plantas medicinais crescido de 115 para 307 nos períodos de 1966-1994 e 1995-2004 (RIOS; RECIO, 2005). Uma das justificativas para isso, além da descoberta da penicilina, é a evidência de que as intervenções humanas, associado com o potencial de mudanças estruturais em sua genética contribuiu na geração de micro-organismos mais patogênicos e/ou com resistência aos antibióticos utilizados. Essas intervenções ocorrem através do uso indevido dos antibióticos na criação de animais ou na agricultura, além do uso indiscriminado de antibióticos ou de prescrições médicas dos mesmos, que acabam contribuindo na seleção natural dos mais resistentes (BYARUGABA, 2004; TAYLOR; STAPLETON; LUZIO, 2002; WALSH, 2003b).

A resistência dos micro-organismos é uma consequência natural de suas habilidades em se adaptar ao meio em que vive, ocorrendo de diferentes maneiras mas sempre envolvendo uma mudança genética, podendo ser resultado de uma mutação ou da simples transferência de informações genéticas de uma célula para outra (PATRICK, 2013a). Isso, somado com o fato de que as grandes cidades hoje em dia possuem milhões de pessoas que, muitas vezes, não vivem com a higiene e as condições sanitárias adequadas, gera um problema não só de saúde, mas também de economia pública já que de acordo com Taylor *et al.* (2002), no ano da publicação, o Reino Unido (por exemplo) gastou aproximadamente 1 bilhão de euros e sofria com

5000 mortes anualmente em decorrência de doenças infecciosas. Em 2004, o custo para se trazer um novo antibiótico ao mercado era estimado em pelo menos 300 milhões de dólares (BYARUGABA, 2004).

Nesse ponto, a descoberta de novos antibióticos passa a ser de extrema importância seja em busca da diminuição dos gastos, do aumento da eficácia dos antibióticos ou da diminuição da mortalidade. Para auxiliar a descoberta de novas substâncias bem como auxiliar na seleção do tratamento vide o número crescente de antibióticos disponíveis, aumentou-se o interesse nos métodos laboratoriais padronizados pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* – CLSI (Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais). Esses testes são indicados quando se acredita que o micro-organismo causativo pertence a uma espécie capaz de apresentar resistência aos agentes geralmente utilizados, podendo ser utilizados também na avaliação do potencial antibiótico de novas substâncias (CLSI, 2018a; b).

De uma maneira geral, existem três tipos de métodos diferentes para a avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana: os métodos de difusão, de cromatografia/bioautografia e de diluição. Destes, os métodos de diluição (em ágar, macrodiluição e microdiluição) são os mais apropriados para obtenção dos valores de concentração inibitória mínima (CIM), classificada como a concentração mínima da substância necessária para inibir ou matar o micro-organismo testado. De um modo geral, esses ensaios envolvem o preenchimento de tubos de ensaio (macrodiluição) ou microplacas de 96 poços (microdiluição) com meios de cultura seguido da adição do agente microbiano em diferentes concentrações e da inoculação com a bactéria ou fungo a ser testado. Além do valor da CIM, os testes de diluição conseguem fornecer informações acerca do tipo de atividade (microbicida ou microbiostática) com a concentração bactericida mínima (CBM) e concentração fungicida mínima (CFM), obtidas a partir da incubação de uma nova cultura feita com a transferência de um pequeno volume das amostras de CIM para placas não inoculadas (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016).

Com relação aos fungos e bactérias utilizados nos testes de susceptibilidade, existem alguns que apresentam grande importância clínica devido a sua patogenicidade e, conseqüentemente, tornam-se os mais utilizados.

Cerca de 40% da população mundial é afetada por doenças de pele provenientes de fungos. Em 70-90% dos casos, essas doenças são causadas por fungos do gênero *Candida*. Desses, 40-60% dos casos de mortalidade são causados pela *C. albicans* e pela *C. glabrata* através da candidíase, que causa infecções vaginais superficiais e atinge a pele e as mucosas orais. Em pacientes com sistema imunológico comprometido, o micro-organismo responsável pode chegar a invadir a corrente sanguínea e atingir outros tipos de tecido (DADAR; TIWARI; KARTHIK; CHAKRABORTY *et al.*, 2018; GUPTA; MEENA; KUMAR, 2020).

As infecções bacterianas também são fontes de estudo e causam preocupação. Bactérias Gram-positivas do gênero *Staphylococcus* são consideradas responsáveis por infecções nos ossos e articulações (*S. aureus*) e por infecções em pacientes que recebem implantes (*S. aureus* e *S. epidermidis*), além de infecções mais comuns, como a conjuntivite, que pode ser causada por diversas espécies, mas é causada também por *S. aureus* e *S. epidermidis* (ALDER; LEE; MUNGER; KWON *et al.*, 2020; MOHAMED; ELMOHAMADY; ABDELRAHMAN; AMER *et al.*, 2020; OLIVEIRA; SILVA; SILVA; SILVA *et al.*, 2018). Outro gênero de bactérias Gram-positivas bastante utilizado nos estudos antimicrobianos é o *Bacillus*, conhecido por espécies envolvidas na deterioração de alimentos, podendo causar intoxicação alimentar (*B. cereus* e *B. subtilis*) e doenças diarreicas de origem alimentar causadas pelo *B. cereus* (FERNÁNDEZ-NO; BÖHME; DÍAZ-BAO; CEPEDA *et al.*, 2013).

Algumas bactérias são classificadas como Gram-negativas por conta de sua composição celular. Elas possuem uma membrana exterior formada por um material complexo que age como uma endotoxina e garante ao micro-organismo uma maior virulência e menor vulnerabilidade a parte dos antibióticos disponíveis. As bactérias do gênero *Salmonella* estão envolvidas com a febre tifoide e são responsáveis por infecções alimentares e doenças diarreicas, além da infecção generalizada em animais, causada pela *S. choleraesuis* (BESSER, 2018; PATRICK, 2013a). As infecções hospitalares são causadas na maior parte dos casos por micro-organismos oportunistas, que se aproveitam do sistema imunológico debilitado dos pacientes. A *Escherichia coli* é um exemplo desses casos, pois está presente na microbiota intestinal, mas consegue agir em situações pós-cirúrgicas, por exemplo, e pode causar, além de diarreia, infecções intestinais, urinárias e em feridas (ABDELHALIM; UZEL; ÜNAL, 2020; PATRICK, 2013a). Outra bactéria oportunista é a *Pseudomonas*

aeruginosa, que sobrevive sob controle do sistema imunológico humano, mas é causadora da pneumonia hospitalar e de outras infecções respiratórias, sendo conhecida por apresentar múltiplas resistências e elevados índices de mortalidade além da possibilidade de provocar complicações em pacientes que passam por transplantes de órgãos (AMARAL; CORTÊS; PIRES, 2009; PATRICK, 2013a; WOJARSKI; OCHMAN; MEDRALA; KULACZKOWSKA *et al.*, 2018).

2.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Os radicais livres são espécies químicas que possuem um número ímpar de elétrons em sua última camada, ou seja, são moléculas que possuem um ou mais elétrons desemparelhados por conta de reações de óxido-redução. O metabolismo celular possui uma série de reações dependentes do oxigênio, como a oxidação de compostos orgânicos ou as reações de produção de energia e uma pequena parcela desse oxigênio consumido passa por reações de redução que produzem as espécies reativas do oxigênio (ERO), uma grande variedade de radicais livres patogênicos (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; SILVA; GONÇALVES, 2010).

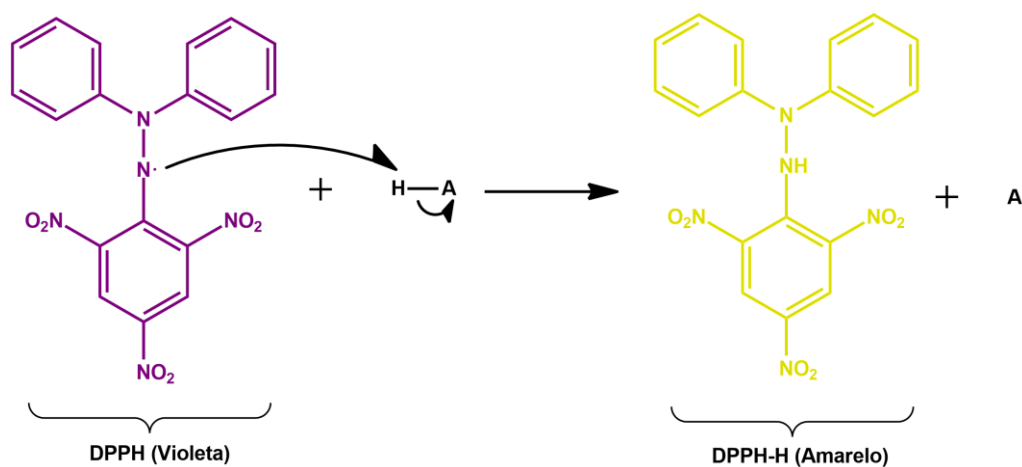
Por conta dos elétrons desemparelhados, as ERO são espécies instáveis e altamente reativas, possuindo a capacidade de capturar elétrons em outras moléculas e gerar reações em cadeia, criando radicais livres mais tóxicos e/ou reativos. De acordo com Manna e Jain (2015), as ERO são compostos altamente letais que causam extensos danos às proteínas, ao DNA e aos lipídios e, por conta disso, afetam o funcionamento normal das células. Mandel e Youdim (2004) afirmam que o dano causado pelas ERO, em conjunto com outros radicais livres está ligado diretamente ao câncer e à um grande número de doenças crônicas, como doenças cardiovasculares e neurodegenerativas. Além disso, os radicais livres e as ERO estão envolvidos também em processos inflamatórios, envelhecimento e patologias como diabetes, hipertensão e Mal de Alzheimer (OLIVEIRA; VALENTIM; GOULART; SILVA *et al.*, 2009).

Entretanto, as ERA são constantemente inativadas por meio de diferentes mecanismos antioxidantes e para que isso ocorra, o corpo humano está sempre tentando buscar o equilíbrio entre radicais livres e os compostos antioxidantes.

Quando há a maior concentração de radicais livres em comparação ao dos antioxidantes, ocorre o estresse oxidativo (MANNA; JAIN, 2015; SILVA; GONÇALVES, 2010). Com o intuito de diminuir os danos gerados pelo estresse oxidativo e inibir a propagação dos efeitos das ERO surgem as pesquisas envolvendo a busca de compostos que consigam estabilizar o metabolismo, chamados de antioxidantes e muito encontrados em espécies vegetais (CHIRAG J; TYAGI; HALLIGUDI; YADAV *et al.*, 2013).

A avaliação da atividade antioxidante de uma planta pode ser feita por diferentes métodos, destacando-se a metodologia do sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH). O DPPH é um radical livre obtido diretamente da dissolução do reagente em meio orgânico, sendo barato, estável e colorido, características que permitem o seu uso em ensaios de atividade antioxidante por métodos colorimétricos. O ensaio consiste na adição do agente antioxidante numa solução do radical DPPH seguido da leitura dos resultados por meio de um espectrofotômetro. O radical, que possui coloração violeta, ao reagir com potenciais agentes antioxidantes, é reduzido para 2,2-difenil-1-picril-hidrazina (DPPH-H) conforme reação apresentada na figura 4. O DPPH-H é de cor amarela, o que acaba resultando numa alteração da absorção observada por meio da espectrofotometria e permite a determinação da quantidade de radical remanescente no sistema após a reação (CHEN; LIANG; HAN, 2020; MENG; ZHANG; ZHANG; WANG *et al.*, 2017).

FIGURA 4 - Reação de redução do DPPH com um agente antioxidante (A-H)



Fonte: Produzida pelo autor.

A ação antioxidante de um composto pode ocorrer de várias maneiras diferentes como através da estabilização dos radicais livres por ressonância, a eliminação de radicais livres pela doação de hidrogênio a partir de compostos fenólicos, a quelação de um composto contendo um íon metálico ou a inibição de uma enzima (NIMSE; PAL, 2015). A atividade dos compostos fenólicos advém de suas propriedades redutoras, uma vez que se tratam de substâncias que contem um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxila (OH). De acordo com Oliveira *et al.* (2009), os flavonoides, ácidos fenólicos e taninos estão entre os compostos fenólicos antioxidantes mais comuns na natureza.

Para a quantificação desses compostos fenólicos, pode-se utilizar o método de Folin-Ciocalteu que se baseia também na espectrofotometria. O reagente em questão consiste numa mistura de ácidos de molibdênio e tungstênio em estado de oxidação +6. Na presença de agentes redutores (os compostos fenólicos, por exemplo), os metais sofrem alteração em seu estado de oxidação, mudando de cor e permitindo que se consiga medir a variação da coloração e assim quantificar os agentes redutores totais daquelas amostras. O ensaio é semelhante ao de atividade antioxidante, onde se adicionam volumes do agente redutor em contato com o reagente, seguido da leitura em espectrofotômetro. Vale ressaltar que o método quantifica as substâncias redutoras totais, não necessariamente apenas fenólicas. Dessa forma, substâncias como os terpenos também podem alterar os valores de concentração (BOX, 1983; KAMBOJ; RANA; KAUR; JAIN, 2015).

2.4 ATIVIDADE CITOTÓXICA

O crescimento descontrolado, excessivo e persistente das células é chamado de neoplasia, podendo ser benigna ou maligna, dependendo das condições. A neoplasia benigna possui um crescimento de forma organizada e expansivo enquanto a neoplasia maligna possuem mais autonomia, sendo capazes de invadir tecidos vizinhos e provocas as metástases (migração das células do tumor para outros locais por meio da corrente sanguínea), podendo resistir aos tratamentos e causar a morte do hospedeiro, sendo chamada de câncer (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2011). De um modo geral, o processo de formação de um tumor é lento, podendo

levar vários anos para que a proliferação inicial da célula se torne um tumor de tamanho considerável e perceptível. O processo é composto de três estágios: iniciação, promoção e progressão (BRASIL, 2013). O primeiro estágio é caracterizado pela ocorrência da ação cancerígena nos genes, o segundo marca a atuação dos agentes nas células alteradas e o último pela multiplicação descontrolada e irreversível da célula, formando os tumores.

Ainda hoje, o câncer continua sendo uma das maiores doenças causadoras de morte em todo o mundo, ocupando o segundo lugar. De 1990 até 2005, a incidência mundial de câncer aumentou em 19%, estimando-se em mais de 7 milhões o número de pessoas vitimadas anualmente (NEWBY; HOWARD, 2005). Só no ano de 2018, a OMS registrou 559.371 casos e 243.588 mortes por câncer no Brasil, sendo o câncer de mama (15.3%) e de próstata (15.2%) os dois tipos mais comuns em incidência e o câncer de pulmão (13.1%) e o colorretal (10.1%) como os dois que mais causam a morte (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020). Em 2019, segundo a *International Agency for Research on Cancer – IARC* (Agência Internacional para Pesquisa em Câncer), a estimativa era de que o câncer acumulava 18 milhões de novos casos e 10 milhões de mortes todos os anos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019).

Cerca de um terço das mortes por câncer são causadas por cinco comportamentos principais: alto índice de massa corporal, baixo consumo de frutas e vegetais, falta de atividade física, uso de tabaco e o uso de álcool (GBD 2015 Risk Factors Collaborators, 2016). Desses, 30% dos casos estão relacionados com o fumo e outros 30% estão relacionados à dieta, sendo os dois motivos mais mortais nos casos de câncer (PATRICK, 2013b).

A dificuldade em encontrar a cura do câncer advém da heterogeneidade e especificidade e cada tumor nas diferentes partes do corpo, além da resistência adquirida aos medicamentos após o uso prolongado (HOUSMAN; BYLER; HEERBOTH; LAPINSKA *et al.*, 2014). Por conta desses fatores, os impactos econômicos do câncer também acabam se tornando significativos. O custo total dos tratamentos no ano de 2010, por exemplo, foi de aproximadamente 1.16 trilhões de dólares (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014).

Ao longo dos anos, surgiram os tratamentos terapêuticos da quimioterapia, radioterapia e os procedimentos cirúrgicos para a retirada de tumores com o intuito de

reduzir os impactos da doença. Nos últimos anos, a quimioterapia conseguiu diversos êxitos na cura de algumas formas de câncer, como a leucemia aguda infantil, mas a melhora no tratamento de outros tumores mais frequentes em adultos, como pulmão, mama, cólon e pâncreas, não obteve grandes avanços (COSTA-LOTUFO; MONTENEGRO; ALVES; MADEIRA *et al.*, 2010).

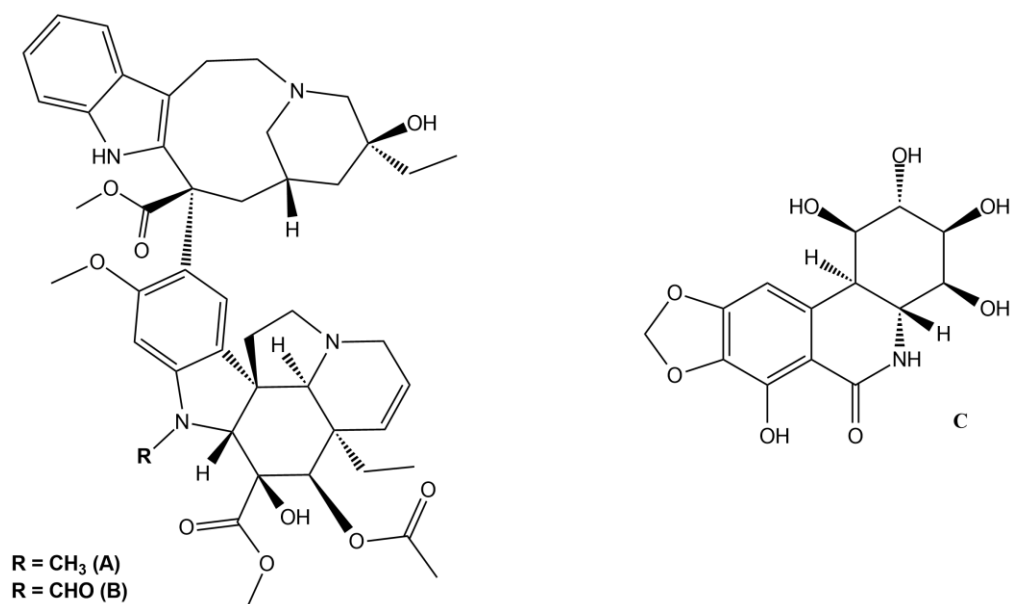
Além disso, o fato dos fármacos mais utilizados na quimioterapia apresentarem grandes efeitos colaterais, como anemia e enfraquecimento do sistema imunológico, associado também com o alto índice de casos e de mortalidade, faz com que a necessidade de identificar, avaliar e desenvolver novos fármacos mais baratos e mais eficientes seja bem evidente (KLEIN-JÚNIOR; CORRÊA; HEYDEN; FILHO, 2019).

Dentro desse contexto, de acordo com Costa-Lotufo *et al* (2010), “existe um potencial extraordinário para a descoberta de novos fármacos anticâncer de ocorrência natural em função da existência de um grande número de espécies disponíveis para investigação”. O mesmo autor estima que apenas 2% das plantas superiores foram analisadas para detecção de constituintes com atividade antineoplásica.

Até determinado momento, o desenvolvimento de um produto natural era impedido pela disponibilidade limitada (alguns eram isolados em quantidades muito baixas) e complexidade estrutural de suas moléculas. Porém os avanços em engenharia molecular em conjunto com as descobertas acerca dos caminhos biossintéticos das substâncias ao longo dos anos permitiram a produção em larga escala de produtos naturais (CRAGG; GROTHAUS; NEWMAN, 2009).

A pesquisa de produtos naturais na área do câncer cresceu então, significativamente, no século XX, dando origem a cerca de 60% dos fármacos introduzidos no mercado, como a vimblastina (A) e a vincristina (B), isoladas da *Catharanthus roseus*, a pancratistatina (C), isolada da *Pancreaticum littoralis* e o paclitaxel, isolado primeiramente da *Taxus brevifolia*, apresentados na figura 5 e tendo o seu isolamento feito através de plantas (COSTA-LOTUFO; MONTENEGRO; ALVES; MADEIRA *et al.*, 2010).

FIGURA 5 - Produtos naturais isolados de planta e utilizados como anticâncer

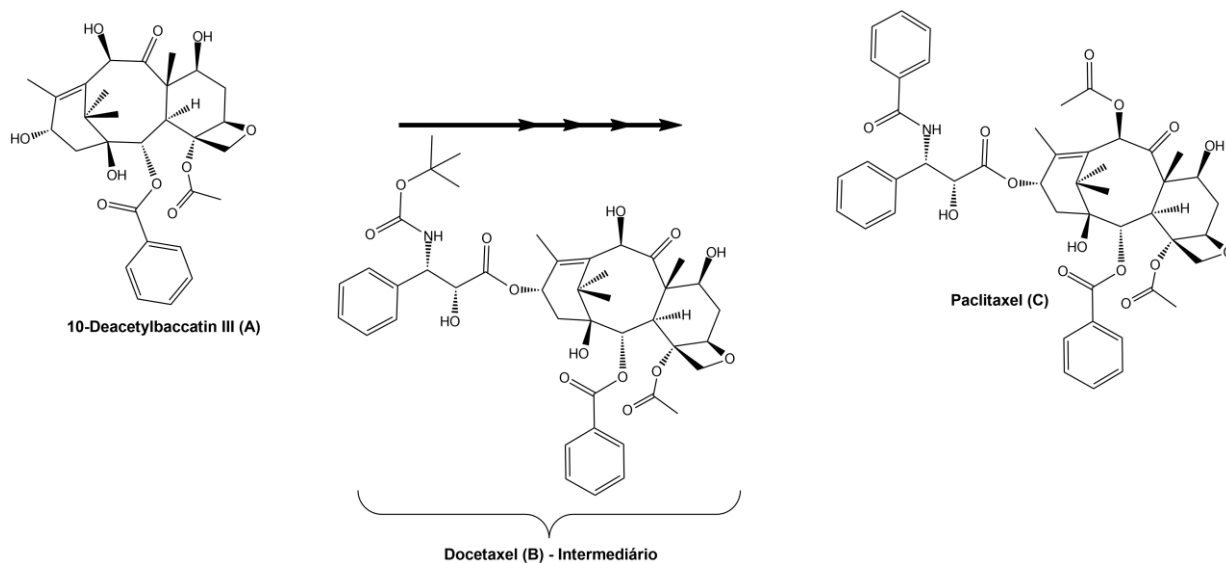


Fonte: Produzidas pelo autor.

O paclitaxel (C, figura 6), de nome comercial Taxol, é isolado do teixo (*Taxus* spp.) e é um dos agentes anticâncer mais importantes da história. O composto foi isolado e identificado em 1971, sendo aprovado para o tratamento clínico do câncer de mama e de ovário em 1992. No entanto, a quantidade necessária de paclitaxel para tratar apenas um paciente equivalia à casca completa de dois espécimes de teixo, o que tornava a produção do fármaco inviável (KUSARI; SINGH; JAYABASKARAN, 2014).

Em 1994, a síntese completa do paclitaxel foi feita em laboratório, mas se tornava impraticável em longa escala devido ao baixo rendimento e o envolvimento de 30 etapas na reação. Eventualmente, descobriu-se a existência do “10-deacetylbaccatin III” (A, figura 6), um composto produzido pela mesma espécie e que serviria de base para a produção do paclitaxel por reações de semissíntese utilizando apenas quatro etapas. Essa reação ajudou na descoberta do docetaxel (B, figura 6), um composto intermediário bioativo aprovado em 1996 para o uso clínico contra o câncer de mama, além da criação do termo “taxóides”, usado para classificar o paclitaxel e todos os seus derivados (KUSARI; SINGH; JAYABASKARAN, 2014; PATRICK, 2013b).

FIGURA 6 - Reação de semissíntese do paclitaxel (Taxol)



Fonte: Produzida pelo autor, adaptado de (PATRICK, 2013b).

Apesar do constante crescimento na produção de drogas a partir de produtos naturais, é importante pensar sobre a sua toxicidade para o organismo humano, uma vez que o consumo dessas substâncias pode levar a alterações no crescimento e morfologia celular ou até mesmo a morte das células. Por conta disso, é necessário que haja toxicidade mínima ou nenhuma (MCGAW; ELGORASHI; ELOFF, 2014).

Para que isso seja possível, é preciso que se façam testes de viabilidade celular e citotoxicidade, avaliando as características do produto para que, caso seja necessário, se estabeleçam condições seguras antes que o mesmo chegue na etapa de comercialização e consumo. Dentro desse contexto, os ensaios *in vitro* são amplamente utilizados na indústria para que sejam testados os novos fármacos através de técnicas automatizadas que permitem a análise de um grande número de compostos de forma rápida, de baixo custo e sem a necessidade do uso de animais (ASLANTÜRK, 2018; COSTA-LOTUFO; MONTENEGRO; ALVES; MADEIRA *et al.*, 2010).

Em contrapartida, o ataque de substâncias naturais à alguns tipos de célula, a exemplo das células cancerígenas, pode ser favorável ao organismo, uma vez que se livrar dessas células é uma atitude benéfica. Dessa forma, existem duas metodologias bastante utilizadas nas pesquisas, os testes *in vitro* e os testes *in vivo*. Os ensaios *in vitro* adquirem um papel importante em pesquisas oncológicas durante o desenvolvimento de qualquer tipo de droga, para avaliar a toxicidade do composto e

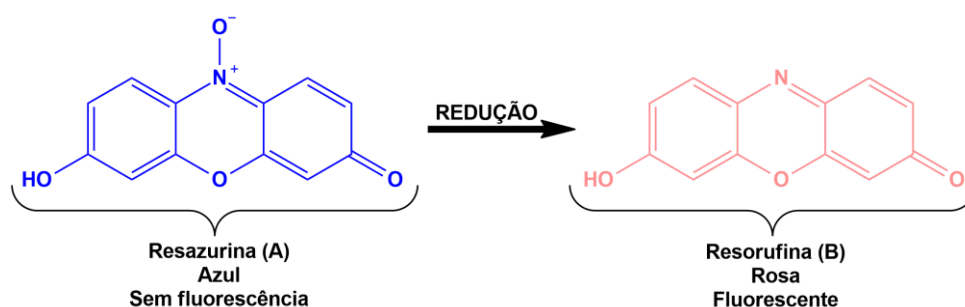
a sua porcentagem de inibição no crescimento de células tumorais ao mesmo tempo, pesquisando moléculas com potencial de matar células neoplásicas em cultura mantendo uma correlação entre a concentração da substância e a resposta seletiva para algum tipo de célula tumoral (ASLANTÜRK, 2018; CHABNER; ROBERTS JR, 2005).

De acordo com Aslantürk (2018), os métodos utilizados para a avaliação da citotoxicidade de um composto podem ser classificados em colorimétricos, fluorométricos, luminométricos ou de exclusão de cor de acordo com a resposta obtida do ensaio (mudança de cor, fluorescência ou luminescência).

Os métodos colorimétricos, como o método do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio), são muito utilizados nos estudos de citotoxicidade. Apesar disso, os métodos fluorométricos possuem várias vantagens em comparação com os demais, como a maior sensibilidade que o método do MTT e os métodos colorimétricos no geral.

O *alamar blue*, identificado como resazurina, é um indicador fluorescente e colorimétrico com propriedades oxirredutoras, permitindo a detecção da viabilidade celular por duas formas diferentes (espectrofotometria e fluorometria). Assim como o MTT, a resazurina (A, figura 7) é reduzida para resorufina (B, figura 7) ao entrar em contato com a cultura celular. Sua forma oxidada apresenta coloração azul sem fluorescência e a sua forma reduzida (resorufina) possui coloração rosa e é fluorescente, refletindo assim a proliferação celular, uma vez que a resazurina é reduzida pela mitocôndria celular e a mudança de cor vai indicar a existência ou não de células viáveis (AHMED; GOGAL; WALSH, 1994; ASLANTÜRK, 2018; O'BRIEN; WILSON; ORTON; POGNAN, 2000).

FIGURA 7 - Reação de redução da resazurina em contato com a célula



Fonte: Produzida pelo autor.

O sucesso dos ensaios citotóxicos e antitumorais acontece em grande parte pelo avanço e desenvolvimento das técnicas de cultura celular, que permitiram o desenvolvimento dos métodos *in vitro* com diversas linhagens celulares advindas de tumores humanos para utilização como modelo experimental. Essas células, chamadas de linhagem celular contínua, são muito utilizadas nas pesquisas por terem alta proliferação, a capacidade de serem mantidas em cultura por um grande período de tempo e, principalmente, por ainda possuírem grande parte das características do tecido original. A partir do surgimento das Comissões de Ética de Uso de Animais em Pesquisa (CEUA), o uso da cultura de células passou a ser o principal modelo para a substituição dos animais em experimentos (os ensaios *in vivo*), tendo como principais vantagens o controle do ambiente, homogeneidade da amostra e a economia, além de oferecer resultados com mais rapidez e eficiência. (ALVES; GUIMARÃES, 2010).

Os tipos de câncer são classificados de acordo com o tecido do qual o tumor é derivado. O carcinoma é o tipo de câncer mais comum que se desenvolve a partir de células epiteliais, que cobrem toda a pele humana e a superfície da maioria dos órgãos. Apesar de mesma origem, cada carcinoma possui diferentes especificidades por conta da sua localização e da composição e função das células originais. O câncer de mama é o tipo de carcinoma mais incidente entre a população feminina, considerada como uma doença geneticamente complexa caracterizada por vários fatores, como o acúmulo de diversas alterações genéticas e epigenéticas, expressão de marcadores tumorais e alterações em reguladores chaves do ciclo celular (ZANETTI; OLIVEIRA; RIBEIRO-SILVA, 2011). Utilizando células da linhagem MCF7 de carcinoma de mama, Adebayo *et al* (2020), comprovou que extratos da semente de *Moringa oleífera* induzem apoptose nas células tumorais. No Brasil, o câncer de mama, junto com o câncer do colo do útero apresentam altas taxas de incidência e mortalidade, tendo motivado a criação de uma cartilha de implantação de estratégias efetivas de controle dessas patologias (BRASIL, 2013; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020).

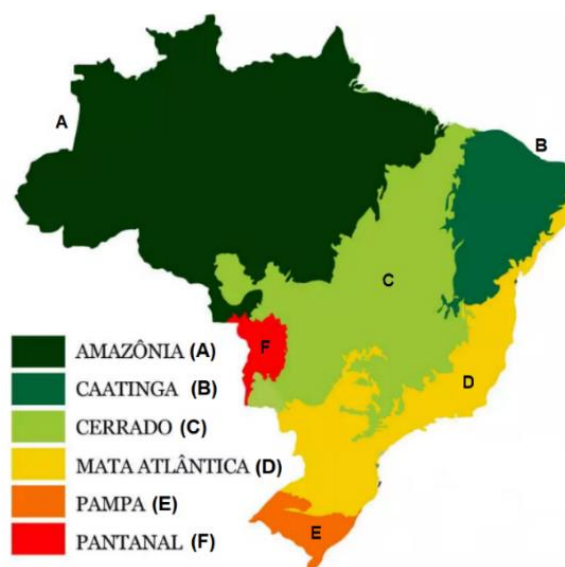
Outro tipo de câncer é o melanoma, câncer de pele que se origina nos melanócitos e é caracterizado por sua agressividade e natureza altamente metastática, apresentando um prognóstico com um tempo de vida média de 5 a 10 meses dependendo do estágio da doença. Em busca do entendimento mais avançado da patologia, surgiram estudos de cultura celular utilizando células de camundongos

(SALEH, 2018). As células de melanoma murino da linhagem B16F10, por exemplo, foram utilizados por Chaikul *et al* (2020) para avaliar os efeitos antitumorais de *Camellia sinensis*.

2.5 O BIOMA CERRADO

O Brasil é um país com diversas zonas climáticas distribuídas ao longo de uma área total de 8,5 milhões de km². As diferenças climáticas contribuem para a existência de seis zonas biogeográficas distintas chamadas de biomas (figura 8). Dentro desses biomas, estima-se a existência de um total de 60 mil espécies vegetais, tornando o Brasil um dos países com maior biodiversidade no mundo, sendo conhecido por sua vasta diversidade de flora e fauna e tendo cerca de 20% do número total de espécies do planeta. Apesar disso, a composição total da biodiversidade não é conhecida e devido à sua complexidade, talvez nunca seja totalmente desvendada (ELISABETSKY; COSTA-CAMPOS, 1996; KATO, 2001).

FIGURA 8 - Distribuição dos biomas no Brasil



Fonte: Adaptada de Educa+ Brasil (www.educamaisbrasil.com.br).

O Cerrado é o segundo maior bioma do Brasil e da América do Sul, ocupando cerca de 24% do território brasileiro e contribuindo com 14% da produção hídrica superficial brasileira, que é essencial para a região nordeste por ser frequentemente atingida por períodos de seca. Devido à sua localização geográfica e características

ecológicas, o Cerrado desempenha um papel fundamental para a sociedade brasileira, para a biodiversidade (concentrando 30% de todas as espécies do país, com 32% delas endêmicas) e para a manutenção dos recursos naturais (especialmente os hídricos), além de ser importante para a produção agrícola. Em 1998, existiam 6429 espécies catalogadas no Cerrado. Em 2019, estimava-se mais de 12 mil espécies, contendo 4400 endêmicas, ou seja, espécies que pertencem a esse espaço por se adaptar às condições do local e não serem encontradas em nenhum outro lugar do mundo (BRASIL, 2005; WWF-BRASIL, 2019).

De acordo com Silva e Bates (2002), o endemismo do Cerrado vai além da flora, com valores estimados de 30% para anfíbios, 20% para répteis, 12% para mamíferos e 1,4% para aves. Apesar disso, os mesmos autores consideram que a sua biogeografia permanece sem ser muito conhecida. De acordo com estimativas recentes do Ministério do Meio Ambiente (MMA), o Cerrado também é o refúgio de 13% das borboletas, 35% das abelhas e 23% dos cupins de toda a região dos trópicos (BRASIL, 2020).

Além dos aspectos ambientais, o Cerrado possui grande importância social. Muitas populações sobrevivem de seus recursos naturais, como as etnias indígenas, quilombolas e ribeirinhos, que fazem parte do patrimônio histórico e cultural brasileiro e detêm um grande conhecimento tradicional da biodiversidade. Mais de 220 espécies do Cerrado tem uso medicinal e mais de 416 podem ser usadas de outras formas, como na recuperação de solos degradados ou na proteção contra a erosão (BRASIL, 2005; 2020). De acordo com o Instituto Sociedade, População e Natureza (ISPN), “a rica biodiversidade do Cerrado oferece raízes, cascas, resinas, óleos, folhas, argilas, água e outros diversos recursos naturais que são primorosamente manejados por suas populações para a prática da medicina popular”.

O bioma possui 11 tipos principais de vegetação, mas basicamente as espécies podem ser divididas em lenhosas, caracterizadas por árvores com até 20 metros de altura, troncos grossos e tortuosos e raízes que podem chegar a 15 metros de profundidade, e herbáceas, que compreende as ervas de pequeno porte com raízes de até 30 centímetros. As raízes longas das espécies lenhosas servem para garantir que a planta encontre água e se mantenha nos períodos de seca. Já para as espécies herbáceas, a falta de profundidade faz com que seus ramos sequem durante os períodos de seca e por conta disso as queimadas sejam facilitadas pelo acúmulo de

biomassa seca, temperaturas elevadas, tempo seco e baixa umidade relativa do ar (BRASIL, 2005; FRANCISCO, 2020; SOUSA, 2020).

No entanto, as queimadas podem acabar sendo benéficas no bioma em alguns casos por contribuir na floração e frutificação de algumas espécies bem como com a germinação das sementes, que necessitam de um choque térmico para que a dormência vegetativa seja quebrada por meio da criação de fissuras em suas cascas que permitem a entrada de água e iniciam o processo de germinação. Nesses casos, diz-se que as queimadas são influenciadoras do ciclo natural de nutrientes do solo para algumas espécies (MUNHOZ; FELFILI, 2007; NEVES; CONCEIÇÃO, 2010; ZAIDAN; CARREIRA, 2008).

Além das queimadas, há a exploração totalmente predatória do material lenhoso para fabricação de carvão e o constante desmatamento por conta da pecuária extensiva e a expansão da agricultura mecanizada, que fez com que nos últimos anos cada vez mais parte da paisagem natural do bioma fosse transformada em culturas de soja, milho e algodão além de pastagens para gado. De acordo com os dados divulgados pelo Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE), a perda da vegetação acontece num ritmo alarmante com média de 1 milhão de hectares perdidos por ano desde 2009. Dessa forma, os danos causados pelas queimadas e pelo desmatamento atingem não só a fauna e flora do bioma como também trazer danos consideráveis para o ecossistema (como no ciclo de nutrientes e no fluxo das águas) e comprometer a vida e sustentabilidade da população moradora da região (BRASIL, 2005; 2020; FRANCISCO, 2020; WWF-BRASIL, 2019).

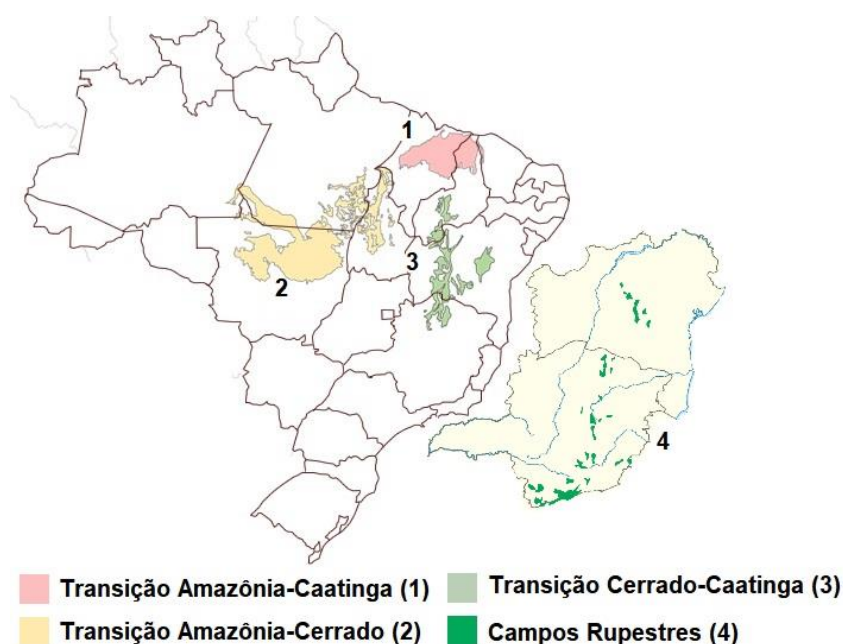
2.5.1 Campos rupestres

O Cerrado está presente em 11 estados brasileiros (Bahia, Goiás, Tocantins, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Maranhão, Piauí, Rondônia, Paraná e São Paulo) e se estende pela região central do país, conectando-se a outros biomas importantes (ao norte com a Amazônia, ao nordeste com a Caatinga, ao sudeste com a Mata Atlântica e ao sudoeste com o Pantanal). Essas zonas de transição entre os biomas são particularmente importantes ao Cerrado por ser o único bioma a ter tantos contatos diferentes, tendo grandes variações de clima e altitude e, conseqüentemente,

de vegetação. Dos ambientes gerados nas zonas de transição, destacam-se os contrastantes entre o Cerrado e a Caatinga (3, figura 9), que possui uma vegetação mais rica que a da Caatinga e clima mais seco que o do Cerrado, com solo ressecado e maiores períodos sem chuva (BRASIL, 2005; RIBEIRO; WALTER, 2008).

Parte dessa transição é a vegetação dos campos rupestres (4, figura 9), que inclui a região de transição entre o Cerrado, a Caatinga e a Mata Atlântica e é bastante comum na Chapada Diamantina, sendo detentora de grande parte do endemismo e das plantas raras do Cerrado por conta de suas particularidades ambientais (como o clima e o solo). A flora típica dos campos rupestres está relacionada com as características peculiares dessa região, com a grande quantidade de rochas expostas, longos períodos sem água e baixa capacidade de armazenamento de água no solo (CONCEIÇÃO, 2006).

FIGURA 9 - Mapa de algumas zonas de transição e dos campos rupestres



Fonte: Adaptado de WWF-Brasil (www.wwf.org.br) e Embrapa (www.embrapa.br).

O campo rupestre é um ecossistema predominantemente herbáceo-arbustivo (ervas, arbustos e gramíneas), com a presença de poucas árvores pouco desenvolvidas de até 2 metros de altura. A vegetação é encontrada em afloramentos rochosos no topo de serras e chapadas com altitudes superiores a 900 metros, em áreas de ventos constantes, dias quentes e noites frias. O solo desse tipo de vegetação é caracterizado pela acidez, pobreza de nutrientes e a baixa capacidade

de armazenamento de água, porém algumas espécies podem crescer diretamente sobre as rochas, sem que haja solo (NEVES; CONCEIÇÃO, 2010; RIBEIRO; WALTER, 2008; SCHAEFER; CÂNDIDO; CORRÊA; NUNES *et al.*, 2016).

Apesar das condições severas de clima e solo, a vegetação do campo rupestre é rica em espécies ameaçadas e endêmicas. Em 2015, um estudo feito por Zappi *et al* (2015) reconheceu a presença de um total de 4928 espécies de angiospermas nos campos rupestres, 40,5% (1994) dessas espécies são restritas à esse tipo de vegetação enquanto 39,6% (1951) são endêmicas dos campos rupestres.

De acordo com Vasconcelos (2011), a vegetação varia em função do relevo, microclima, profundidade do solo e natureza do substrato, o que dá um caráter de mosaico aos campos rupestres. Por conta disso, existe uma “grande variação de fisionomias, desde áreas cobertas por gramíneas e outras ervas, a habitats com adensamento de arbustos e pequenas árvores, com ou sem afloramentos rochosos”, separados por poucos metros ou, em alguns casos, poucos centímetros (CONCEIÇÃO; GIULIETTI, 2002; CONCEIÇÃO; PIRANI, 2005).

Apesar disso, também são comuns os agrupamentos de indivíduos de uma mesma espécie condicionados, entre outros fatores, pela umidade disponível no ar ou solo. Esses agrupamentos ocorrem com espécies frequentes de famílias e gêneros dominantes, como Bromeliaceae (*Dyckia*, *Tillandsia*), Leguminosae (*Calliandra*, *Chamaecrista*, *Galactia*, *Mimosa*), Myrtaceae (*Myrcia*), Velloziaceae (*Vellozia*) e outras (RIBEIRO; WALTER, 2008).

De acordo com Harley (1995), pode-se considerar o gênero *Vellozia* como um bom indicador da ocorrência dos campos rupestres pois, apesar de algumas espécies desse gênero estarem presentes em outras formações campestres, grande parte é endêmica do campo rupestre.

2.5.2 Parque Nacional da Chapada Diamantina

A Chapada Diamantina é uma região de serras de 50.610 km² localizada no centro do estado da Bahia e registrando altitudes entre 200 a 1800 metros, com alguns picos isolados, como o Pico do Barbado (2033 m). Nas regiões acima de 1000 m de

altitude, predominam os campos rupestres e os afloramentos de rocha (MMA, 2005). De acordo com o Ministério do Meio Ambiente – MMA (2002), “a Chapada Diamantina é uma região extremamente desconhecida e prioritária para investigação científica”.

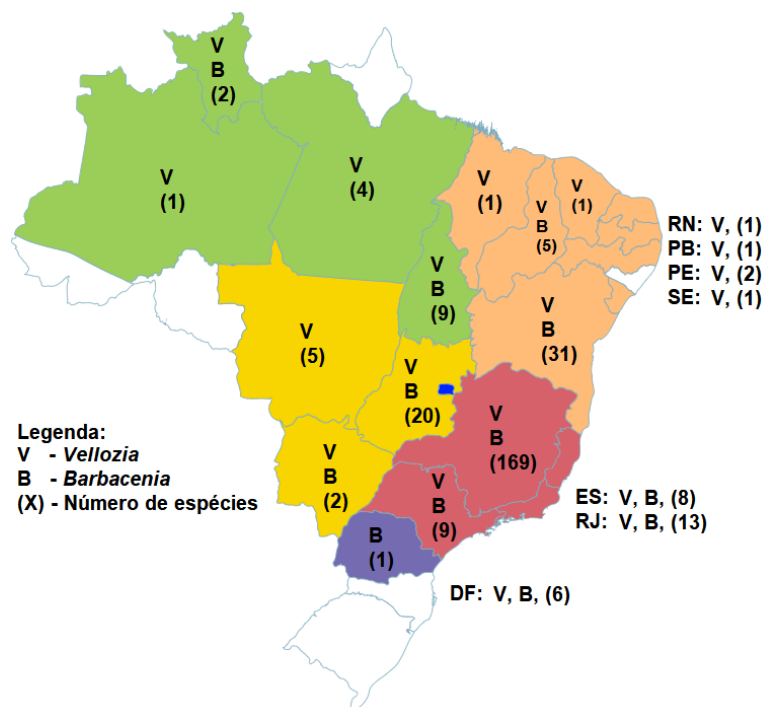
O Parque Nacional da Chapada Diamantina (PNCD) foi criado em 17 de setembro de 1985 através do decreto federal nº 91.655 com o objetivo principal de preservar o ecossistema natural de grande importância ecológica. Além disso, o PNCD possibilita a realização de pesquisas científicas e promove a educação ambiental, lazer ao ar livre e ecoturismo (MMA; ICMBIO, 2012). Atualmente é administrado pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) e possui uma área de 152 mil hectares, localizado entre as coordenadas 41°25'-41°35'O e 12°25'-13°20'S e protegendo uma parcela da Serra do Sincorá, que é parte da Serra do Espinhaço, cadeia montanhosa que se estende de Minas Gerais à Bahia (ICMBIO, 2020a; b). No Parque, é encontrada uma alta taxa de endemismos, dentre as maiores taxas da flora brasileira e distribuídos em diversos grupos de plantas, especialmente em famílias de monocotiledôneas como a Velloziaceae, com mais da metade de suas espécies restritas aos campos rupestres (MMA, 2005).

2.6 FAMÍLIA VELLOZIACEAE

A família Velloziaceae é uma família de angiospermas monocotiledôneas pertencente à ordem das Pandanales que possui 5 gêneros e 306 espécies (CHRISTENHUSZ; BYNG, 2016). Até algum tempo atrás, a família possuía de 240 a 270 espécies reconhecidas, divididas em duas subfamílias Vellozioideae e Barbacenioidae e seis gêneros. A subfamília Vellozioideae compreendia os gêneros *Vellozia* e *Nanuzia* enquanto a subfamília Barbacenioidae compreendia os gêneros *Talbotia*, *Xerophyta*, *Barbaceniopsis* e *Barbacenia* (LOUSADA; BORBA; RIBEIRO; RIBEIRO *et al.*, 2011; SMITH; AYENSU, 1974; 1976). Atualmente, a família é dividida por Mello-Silva *et al* (2011) e Mello-Silva & Montserrat (2015) nos gêneros *Acanthochlamys* (gênero monoespecífico que pertencia anteriormente à família Amaryllidaceae), *Xerophyta* (englobando o gênero *Talbotia*), *Barbacenia* (englobando os gêneros *Aylthonia*, *Burlemarxia* e *Pleurostima*), *Barbaceniopsis* e *Vellozia* (que engloba o gênero *Nanuzia*).

As plantas da família Velloziaceae são predominantemente neotropicais, sendo nativas, em sua maior parte, da América do Sul. Os gêneros *Vellozia* e *Barbacenia* são os maiores da família, incluindo cerca de 100 espécies cada e sendo encontrados exclusivamente na América do Sul, com exceção da espécie *Vellozia tubiflora*, que se estende até a América Central, encontrada no Panamá. O gênero *Xerophyta* compreende cerca de 30 espécies encontradas na África e em Madagascar, *Barbaceniopsis* é um gênero andino de quatro espécies e o gênero *Acanthochlamys* tem a sua única espécie encontrada apenas na China (MELLO-SILVA; MONTSERRAT, 2015; MELLO-SILVA; SANTOS; SALATINO; MOTTA *et al.*, 2011). De acordo com o Projeto Flora do Brasil 2020, criado e administrado pelo Jardim Botânico do Rio de Janeiro, o Brasil apresenta apenas os gêneros *Vellozia* e *Barbacenia*, possuindo 224 espécies no total (102 espécies do *Barbacenia* e 122 do *Vellozia*), sendo 221 (101 do *Barbacenia* e 120 do *Vellozia*) delas endêmicas do país. As espécies estão distribuídas nas regiões Norte (Amazonas, Pará, Roraima e Tocantins), Nordeste (Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte e Sergipe), Centro-Oeste (Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso do Sul e Mato Grosso), Sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo) e Sul (Paraná). Por conta dessa ampla distribuição, as espécies estão em quase todos os tipos de vegetação do Brasil (Flora do Brasil 2020, 2020).

A distribuição geográfica, o número de espécies e os gêneros encontrados em cada um dos estados brasileiros estão apresentados na figura 10, evidenciando a concentração de uma maior diversidade de espécies nos estados de Minas Gerais e Bahia, distribuídas em sua maioria na região da Serra do Cipó (MG) e da Chapada Diamantina (BA).

FIGURA 10 - Distribuição geográfica da família Velloziaceae no Brasil

Fonte: Adaptado de Projeto Flora do Brasil 2020 (www.floradobrasil.jbrj.gov.br).

De modo geral, as espécies da família Velloziaceae são plantas arbustivas, robustas, de caule fibroso com tamanho variável, podendo atingir entre poucos centímetros (como a *Acanthochlamys bracteata* e a *Vellozia mínima*) e seis metros de altura (*Vellozia gigantea*). No entanto, a maior parte das espécies se concentra na faixa de 0,3 a 2 metros. Essas plantas são conhecidas por possuir diversas características adaptativas como a resistência ao fogo, a quiescência (baixa atividade metabólica caracterizada pelo baixo teor de água nos tecidos), folhas que regulam a transpiração para diminuir a taxa de água perdida, caule coberto por bainhas que possuem alta capacidade de armazenamento de água e raízes com a capacidade de rápida absorção de água. Outra característica de suas espécies é a esclerofilia (adaptação a longos períodos de seca e de calor), uma vez que foram adaptadas a grandes variações climáticas, sendo submetidas à intensa radiação solar ou violentas tempestades durante o dia e baixas temperaturas e a cobertura de nuvens densas pela noite. Além disso, são ervas e arbustos perenes, ou seja, suas folhas não caem e o seu ciclo de vida é bastante longo (AYENSU, 1973; MELLO-SILVA; MONTSERRAT, 2015; MENEZES; MELLO-SILVA; MAYO, 1993; QUINTÃO; TAVARES; VIEIRA-FILHO; SOUZA *et al.*, 2013; SMITH; AYENSU, 1974; 1976).

Como grande parte das espécies são encontradas nos campos rupestres ou vegetações semelhantes, acabam passando por longos períodos de seca além de grandes períodos de queimadas, o que exige a criação de reservas de carboidratos em seus órgãos de armazenamento para que seja possível a regeneração e a rebrota dessas plantas (OLIVEIRA; ABRAHÃO; PEREIRA; TEODORO *et al.*, 2016; SILVEIRA; NEGREIROS; BARBOSA; BUISSON *et al.*, 2016). Um estudo realizado por Joaquim *et al* (2018) com diferentes espécies da família Velloziaceae resultou na identificação e quantificação de açúcares solúveis, frutose e açúcares redutores.

Apesar da presença desses açúcares, a classe de substâncias mais representativa é a dos diterpenos. Até 2010, das 32 espécies estudadas, foram identificados diterpenos de esqueleto clerodano, ent-kaurano, totarano, isopimarano e cleistantano, destacando-se os dois últimos (PINTO; EPIFANIO; CAMARGO, 1993; PINTO; PATITUCCI; ZOCHER; KELECOM, 1985; SILVA; CASTRO-GAMBOA; BOLZANI, 2010). A maior presença e a ocorrência conjunta de derivados diterpenos de esqueleto isopimarano e cleistantano faz sentido biossintético, uma vez que estudos indicam que o isopimarano seja o esqueleto precursor dos cleistantanos (PINTO; PATITUCCI; SILVA; QUEIROZ *et al.*, 1983).

Algumas classes são utilizadas como marcadores taxonômicos na família Velloziaceae. O padrão e as diferenças nos alcanos presentes da superfície das folhas, por exemplo, foram estudados por Salatino *et al* (1991; 2000; 1989) e demonstrou-se que a subfamília Vellozoideae apresenta a predominância de alcanos C27, C29 ou C31 enquanto na subfamília Barbacenioideae destacam-se os alcanos C33 ou C35.

Outro marcador utilizado na diferenciação dos gêneros são os flavonoides (em sua maioria flavonas e flavonols glicosilados), que, de acordo com Williams e colaboradores (1994; 1991), apresentam-se de forma diferente nos diferentes gêneros ou subfamílias. A combinação da luteolina com flavona C-glicosiladas, por exemplo, é característica da subfamília Vellozoideae, enquanto flavonoides específicos, como a isorhamnetina são indicativos de espécies do gênero *Barbacenia*, *Vellozia* e *Xerophyta* (apenas algumas espécies de Madagascar).

Na literatura, existem poucos estudos acerca do uso tradicional das plantas da família Velloziaceae. Ayensu (1973), por exemplo, reporta que a resina de algumas

espécies do gênero *Vellozia* é utilizada na cobertura de feridas na pele para auxiliar no tratamento e cicatrização e a suspeita da presença de uma substância bioativa numa espécie africana (gênero *Xerophyta*) com potencial atividade anticâncer. Outros exemplos são o consumo, feito por algumas tribos africanas, de raízes secas de determinadas espécies através do fumo para o tratamento do asma (WATT; BREYER, 1962).

2.6.1 Gênero *Vellozia*

O gênero *Vellozia* é o maior da família Velloziaceae, compreendendo cerca de 127 espécies diferentes de acordo com a *World Flora Online* (WFO), enciclopédia online de todas as espécies de plantas do mundo, criada e administrada pelo Jardim Botânico de Missouri e pelo Jardim Botânico Real de Kew sendo um projeto da Convenção sobre Diversidade Biológica das Nações Unidas (WFO, 2020).

No Brasil há a presença de 122 de suas espécies, sendo 120 endêmicas, distribuídas pelos estados de Roraima (1 espécie), Pará (4 espécies), Tocantins (6 espécies), Amazonas (1 espécie), Bahia (23 espécies), Ceará (1 espécie), Maranhão (1 espécie), Paraíba (1 espécie), Pernambuco (2 espécies), Piauí (4 espécies), Rio Grande do Norte (1 espécie), Sergipe (1 espécie), Distrito Federal (5 espécies), Goiás (14 espécies), Mato Grosso do Sul (1 espécie), Mato Grosso (5 espécies), Espírito Santo (5 espécies), Minas Gerais (95 espécies), Rio de Janeiro (4 espécies) e São Paulo (5 espécies) estando presentes em quase todas as regiões do Brasil, com exceção do Sul (Flora do Brasil 2020, 2020).

De acordo com Martins e Paiva (2016), por mais de trezentos anos, as plantas do gênero *Vellozia* são conhecidas apenas por “pegarem fogo” por conta dos primeiros exploradores que o Brasil teve, que utilizavam o caule dessas plantas como tochas por conta de sua resina, que é inflamável. Essas resinas são compostas pela mistura de metabólitos secundários voláteis e não voláteis das classes dos terpenóides e/ou compostos fenólicos, sendo secretadas por glândulas especializadas e tendo a principal função de mediar as interações da planta com o ambiente, podendo ter valor comercial ou não (FAHN, 2002; LANGENHEIM, 2003).

A atividade biológica de algumas espécies é retratada em algumas publicações. Os extratos metanólicos das raízes, caule e bainhas das folhas de *V. pusilla* foram estudados por Dantas *et al* (2005) e apresentaram atividade antitumoral. Extratos hidroalcóolicos de *V. flavicans* apresentam atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* e antivenenosa contra veneno de *Bothrops jararacussu* (TRIBUIANI; DA SILVA; FERRAZ; SILVA *et al.*, 2014). Em outro trabalho, Morales *et al* (2014) identificou tocotrienols com atividade antioxidante das folhas de *V. gigantea*.

O uso tradicional também é apresentado na literatura. De acordo com Brandão *et al* (2012), a *V. squamata*, de nome popular “canela de ema” é utilizada na produção de travesseiros, colchões, cestos e colheres. Além disso, a infusão das folhas da canela de ema é também utilizada como anti-inflamatório e seus extratos hidroalcóolicos do caule e folha tiveram a atividade antioxidante comprovada por Quintão *et al* (2013), com intuito de avaliar a aplicação farmacêutica e cosmética da espécie. Com o mesmo nome popular, Fagg *et al* (2015) e Chaves *et al* (2015) falam sobre o uso do caule resinoso da espécie *Vellozia* spp. como combustível.

Vale ressaltar que maior parte desses trabalhos apenas avalia a atividade biológica dos extratos sem o isolamento, identificação ou relação com as possíveis substâncias bioativas. Para a parte fitoquímica, alguns desses trabalhos fazem testes de *screening*, que servem para auxiliar na identificação das classes de substâncias presentes nas amostras testadas.

Apesar disso, na literatura, existem alguns estudos fitoquímicos de diversas espécies desse gênero, que resultaram no isolamento e identificação de diferentes classes de metabólitos secundários, como alcanos (SALATINO; SALATINO; MELLO-SILVA; DUERHOLT-OLIVEIRA, 1991; SALATINO; SALATINO; MENEZES; MELLO-SILVA, 1989), terpenos (PINTO; GONZAGA; FIORANI, 1984; PINTO; PINCHIN; PRADO, 1983; PINTO; SCOFIELD; BRAZ-FILHO, 1983), tocotrienols (MORALES; GARCIA; SIQUEIRA-SILVA; SILVA *et al.*, 2014) e flavonoides (HARBORNE; GREENHAM; WILLIAMS; EAGLES *et al.*, 1993; WILLIAMS; GREENHAM; HARBORNE; EAGLES *et al.*, 1992; WILLIAMS; HARBORNE; GREENHAM; EAGLES *et al.*, 1993)

2.6.2 Metabólitos isolados do gênero *Vellozia*

As substâncias que não estão envolvidos nas funções vitais de uma planta como crescimento ou reprodução são chamadas de metabólitos secundários, que se envolvem diretamente no metabolismo secundário e tem a função principal de adaptar as plantas aos seus ambientes, sendo responsáveis pela interação da planta com diferentes ecossistemas e essenciais em seu desenvolvimento, regulação, equilíbrio e defesa (HARBORNE, 1988; HICKS, 1966). Essas substâncias são classificadas de acordo com a sua origem biossintética, mas podem ser divididos de uma forma mais simples em três grandes grupos: compostos fenólicos, terpenóides e compostos nitrogenados (AGOSTINI-COSTA; VIEIRA; BIZZO; SILVEIRA *et al.*, 2012).

Os compostos fenólicos são encontrados, em grande parte das vezes, através da classe dos flavonoides, que apresentam diversas funções. Atuam na proteção vegetal contra a incidência de radiação ultravioleta além da proteção contra insetos, fungos, vírus e bactérias. Além disso, possuem potencial atividade antioxidante, antimicrobiana, antidiarreica e são bons inibidores enzimáticos (BARRON; IBRAHIM, 1996; HARBORNE; MABRY, 1987; TIWARI; KUMAR; KAUR; KAUR *et al.*, 2011). O grupo dos terpenóides engloba uma grande quantidade de substâncias voláteis, utilizadas pelas plantas para atrair ou afastar animais e por conta disso podem possuir efeito repelente, além de atividade analgésica, antioxidante, antimicrobiana e antidiarreica. Os alcaloides são as substâncias mais representativas dos compostos nitrogenados, apresentando atividade antitumoral, antimicrobiana, antidiarreica e propriedades alucinógenas, gerando desvios de consciência e tornando-se drogas de abuso (SEIGLER, 1998; TIWARI; KUMAR; KAUR; KAUR *et al.*, 2011).

No levantamento realizado das substâncias isoladas do gênero *Vellozia*, foram encontradas 193 substâncias, divididas principalmente entre terpenóides (diterpenos, triterpenos e esteróides) e flavonoides (simples, C- e O-metilados, C- e O- prenilados e glicosilados), mas com a presença também de um ácido fenólico, um álcool, dois estilbenos e alguns alcanos e ácidos graxos.

Os diterpenos isopimaranos e cleistantanos são bastante predominantes no gênero, tornando-se as substâncias mais identificadas e possuindo algumas características interessantes. A primeira delas é o alto nível de oxidação de algumas

substâncias, que ocorre por conta do forte metabolismo oxidativo das espécies da família Velloziaceae (PINTO; ANTUNES; REZENDE; CORREIA, 1995; 1997). Além disso, os esqueletos cleistantanos são bastante incomuns na natureza e todos os isolados da família Velloziaceae são diferentes dos demais por possuir configuração (5S,10S), ao contrário da configuração (5R,10R), que é mais comum nas demais famílias (PINTO; MAÇAIRA, 1988; PINTO; PATITUCCI; SILVA; QUEIROZ *et al.*, 1983).

Outra característica incomum de algumas substâncias encontradas no gênero *Vellozia* são os diterpenos com hidroxila em C-14, geralmente não encontrados na natureza (PINTO; FIGUEIREDO; EPIFANIO, 1992). Em 1997, foram isolados da *Vellozia magdalenae* dois terpenos muito raros. O primeiro, ácido magdalênico (substância 98, tabela 1), é um diterpeno de esqueleto eunicelano, que é característico de animais vertebrados marinhos e o segundo, ácido bismagdalênico (substância 99, tabela 1) é um bis-diterpeno formado da condensação de um diterpeno lábdano com um diterpeno eunicelano (PINTO; PIZZOLATTI; EPIFANIO; FRANKMÖLLE *et al.*, 1997).

2.6.2.1 Terpenóides

Os terpenóides constituem uma vasta família de produtos naturais com estruturas formadas por várias unidades de isopreno (2-metilbutadieno). Apesar disso, as unidades de isopreno não estão envolvidas diretamente na biossíntese desses compostos, que começa a partir de duas unidades de isômeros C₅, o 3-isopentenil pirofosfato (IPP) e o 3,3'-dimetilalil pirofosfato (DMAP) por meio de duas vias metabólicas independentes: a via do mevalonato (MVA) e a via do 2-C-metil-D-eritrol-4-fosfato (MEP), dependendo do compartimento celular utilizado, uma vez que as vias acontecem em locais diferentes das plantas, tendo a MVA no citosol e a MEP nos plastídios (ABREU; HEGGIE, 2007; DEWICK, 2002; HILLMAN; READNOUR; SOLOMON, 2017).

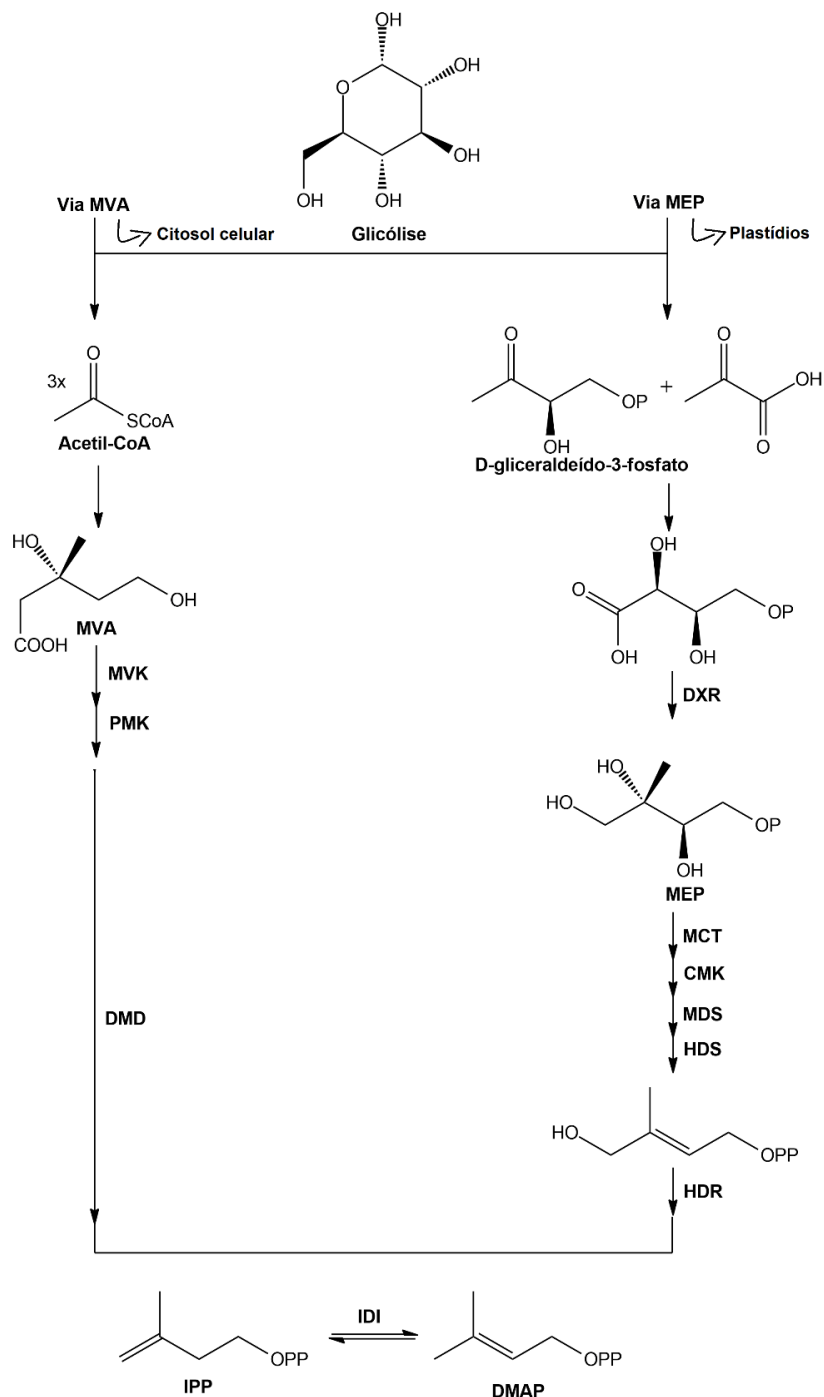
Ambas as vias partem da glicólise e tem a conversão de IPP em DMAP mediante a ação da enzima *isopentenil difosfato isomerase* (IDI). Essa isomerase age pela remoção de um próton em C-2.

Na via do mevalonato, três moléculas de acetil-CoA são condensadas por reações de Claisen, aldol e hidrólise, seguidas de uma redução enzimática para a formação do MVA. A transformação dele em IPP envolve a fosforilação sucessiva dos grupos hidroxila, seguidas da descarboxilação e eliminação do grupo pirofosfato (ABREU; HEGGIE, 2007).

Na via do 2-C-metil-D-eritrol-4-fosfato, ocorre uma reação entre uma molécula de D-gliceraldeído com uma molécula de ácido pirúvico, levando à formação do intermediário 1-dexi-D-xilulose-5-fosfato, que pela ação da enzima *1-desoxi-D-xilulose 5-fosfato redutoisomerase* (DXR) forma o MEP. Nas etapas seguintes, o MEP é convertido a IPP mediante a ação de diferentes enzimas.

A formação de IPP e DMAP por ambas as vias é representada na figura 11:

FIGURA 11 - Formação simplificada de IPP e DMAP em plantas

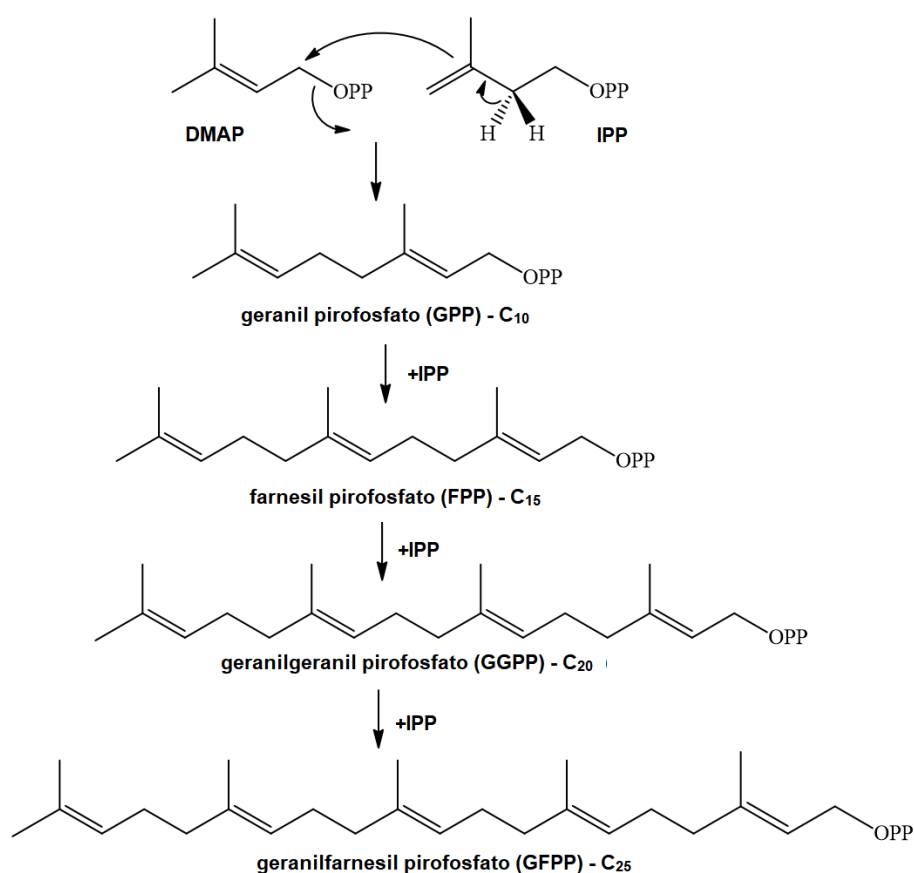


Enzimas: **MVK** - mevalonato quinase; **PMK** - fofomevalonato quinase; **DMD** - mevalonato-5 fosfato descarboxilase; **DXR** - 1-desoxi-D-xilulose 5-fosfato redutoisomerase; **MCT** - 2C-metil-D-eritritol 4-fosfato citidil transferase; **CMK** - 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol cinase; **MDS** - 2C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfato sintase; **HDS** - 1-hidroxi-2-metil-2-(E)-butenil-4-difosfato-sintase; **HDR** - 1-hidroxi-2-metil-2-(E)-butenil-4-difosfato-redutase; **IDI** - isopentenil difosfato isomerase.

Fonte: Produzida pelo autor, adaptado de (ABREU; HEGGIE, 2007).

A formação dos diferentes terpenos é feita pela condensação “cabeça-cauda” das unidades de DMAP e IPP, catalisada por enzimas *prenil-transferase*. A condensação simples de uma unidade de DMAP com uma unidade de IPP forma a cadeia de geranyl pirofosfato, precursora dos monoterpênos. A partir de novas condensações a partir dessa cadeia de C₁₀ são formadas as novas classes de terpenos, como os sesquiterpenos (precursor farnesil pirofosfato, C₁₅), diterpenos (precursor geranylgeranyl pirofosfato, C₂₀) e triterpenos (C₃₀). As condensações estão exemplificadas na figura 12.

FIGURA 12 - Condensação do DMAP e IPP para formação dos terpenos



Fonte: Produzida pelo autor, adaptado de (ABREU; HEGGIE, 2007).

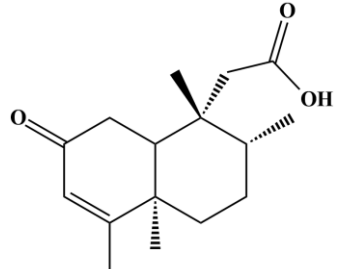
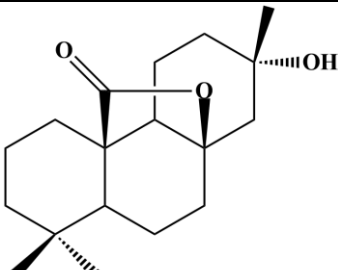
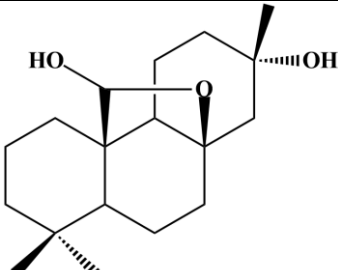
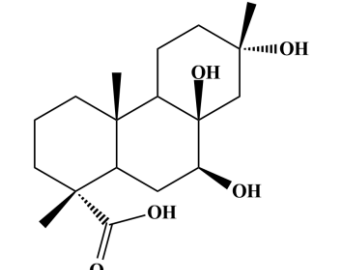
No levantamento bibliográfico foram identificados 123 terpenóides, divididos em: 4 tetranorditerpenos, 3 bisnorditerpenos, 11 norditerpenos, 80 diterpenos, 1 bisditerpeno, 21 triterpenos e 3 esteróides. Em relação aos esqueletos, os diterpenos se dividem em 3 friedolabdanos, 3 clerodanos, 39 isopimaranos, 33 cleistantanos, 1 9,11 seco-rosano, 1 6,7 seco-rosano, 2 seco-ent-kauranos, 3 rosanos, 5 ent-kauranos, 3 labdanos, 1 halimano, 1 abietano, 1 estrobano, 1 totarano e 1 eunicelano. O

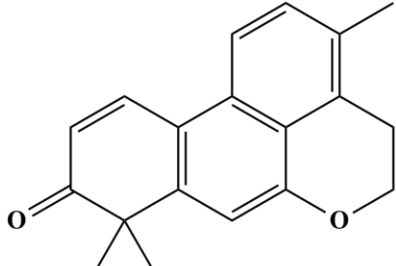
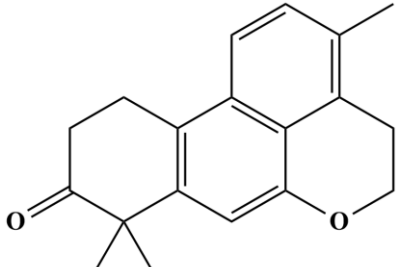
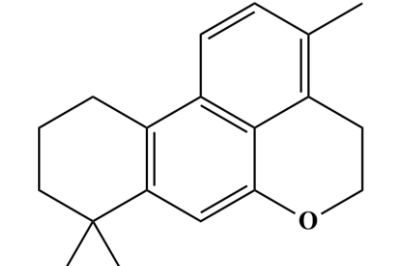
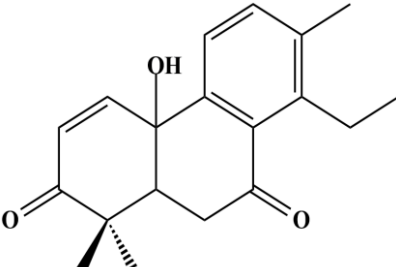
bisditerpeno é eunicelano-labdano. Os triterpenos estão em 7 oleananos, 6 lupanos, 2 glutinanos, 2 taraxeranos, 1 ursano, 1 friedelano, 1 cicloartano e 1 damarano e os esteróides se dividem em 1 ergostano e 2 estigmastanos.

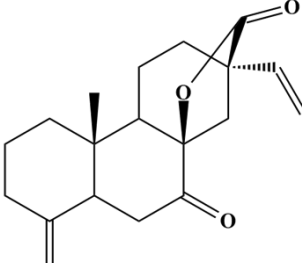
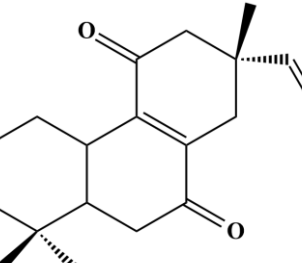
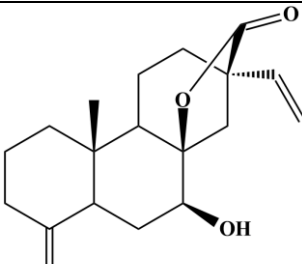
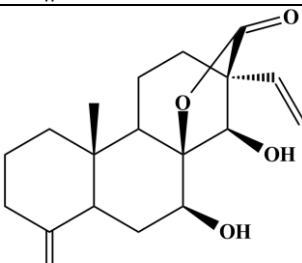
Todo o levantamento feito está apresentado na tabela 1, com a classe, estrutura, fórmula molecular, parte da planta, solvente, espécie e referência utilizada.

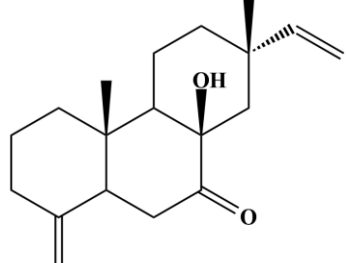
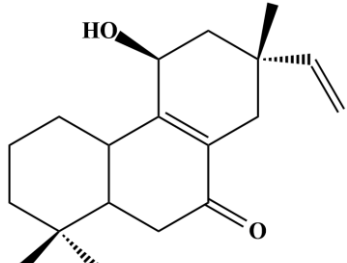
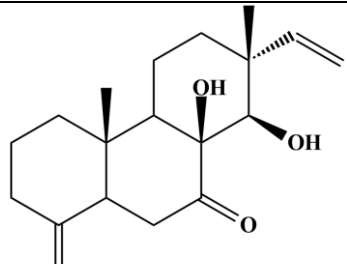
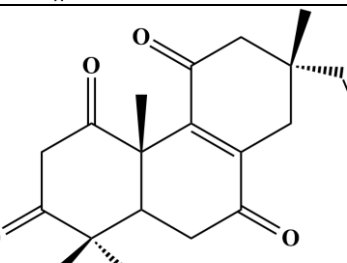
TABELA 1 - Terpenóides isolados de espécies de *Vellozia*

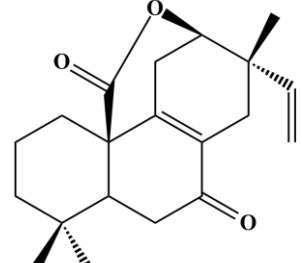
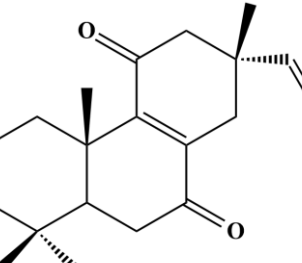
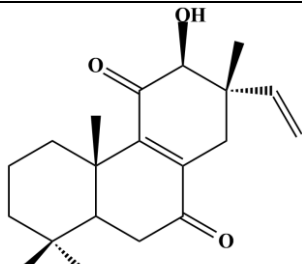
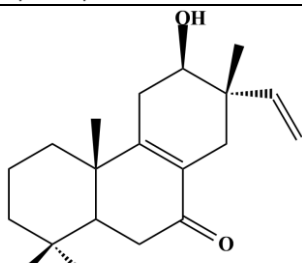
Número	Classe	Composto	Estrutura	Fórmula	Parte, solvente e espécie	Referência
1	Tetranorditerpeno (friedolabdano)	13,14,15,16-tetranor-friedolabd-1(10)-en-12,19-dioic acid		C ₁₆ H ₂₄ O ₄	Planta completa, metanol, <i>V. stipitata</i>	(PINTO; ANTUNES; PIZZOLATTI; RUMJANEK, 1996)
2	Tetranorditerpeno (friedolabdano)	13,14,15,16-tetranor-friedolabd-5(6)-en-12-oic acid		C ₁₆ H ₂₆ O ₂	Caule, hexano, <i>V. flavicans</i>	(PINTO; ANTUNES; REZENDE; CORREIA, 1995)
3	Tetranorditerpeno (friedolabdano)	13,14,15,16-tetranor-friedolabd-5(6)-en-12-ol		C ₁₆ H ₂₈ O	Caule, hexano, <i>V. flavicans</i>	(PINTO; ANTUNES; REZENDE; CORREIA, 1995)

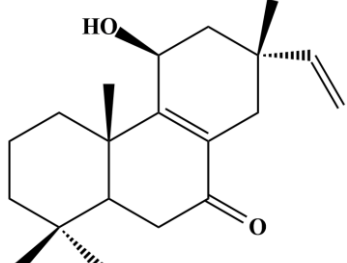
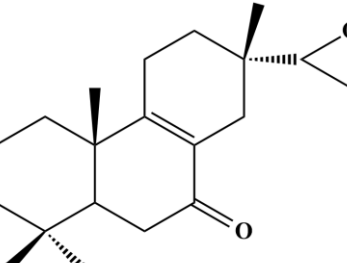
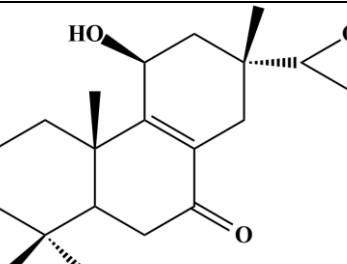
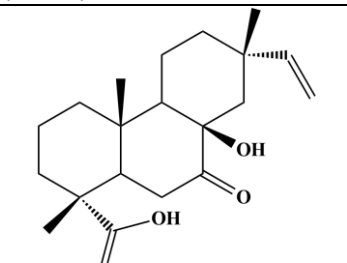
4	Tetranorditerpeno (clerodano)	2-oxo-13,14,15,16-tetranor-clerod-3-en-12-oic acid		C ₁₆ H ₂₄ O ₃	Planta completa, acetato de etila, <i>V. bicolor</i>	(PINTO; GARCEZ; QUEIROZ; FIORANI, 1994)
5	Bisnorditerpeno (isopimarano)	13-hydroxy-15,16-bis-nor-isopimarane-8,20-olide		C ₁₈ H ₂₈ O ₃	Caule e bainhas, acetato de etila, <i>V. bicolor</i>	(PINTO; GARCEZ; HULL; NESZMELYI <i>et al.</i> , 1983); (PINTO; QUEIROZ; GARCEZ, 1991)
6	Bisnorditerpeno (isopimarano)	(20R)-8,20-epoxy-15,16-bis-nor-isopimarane-13,20-diol		C ₁₈ H ₃₀ O ₃	Caule e bainhas, acetato de etila, <i>V. bicolor</i>	(PINTO; QUEIROZ; GARCEZ, 1991)
7	Bisnorditerpeno (isopimarano)	7β,8β,13α-trihydroxy-15,16-bis-nor-isopimar-18-oic acid		C ₁₈ H ₃₀ O ₅	Planta completa, acetato de etila, <i>V. variabilis</i>	(PINTO; BRITO; ZUKERMAN- SCHPHECTOR; EPIFANIO, 1993)

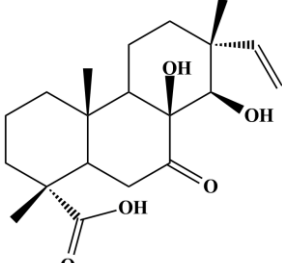
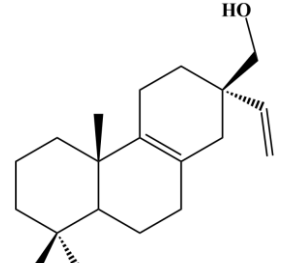
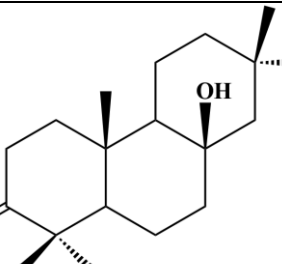
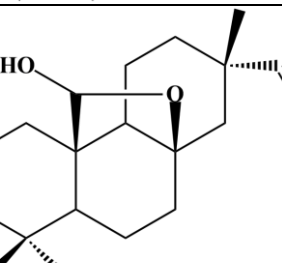
8	Norditerpeno (cleistantano)	7,16-epoxy-20-norcleistantha-1,5(10),6,8,11,13-hexaen-3-one		C ₁₉ H ₁₈ O ₂	Planta completa, etanol, <i>V. compacta</i> ; Planta completa, acetato de etila, <i>V. nanuzae</i> ; Planta completa, hexano, <i>V. declinans</i> , <i>V. pusilla</i> , <i>V. epidendroides</i> ; Planta completa, clorofórmio, <i>V. epidendroides</i>	(PINTO; PINCHIN; ZOCHER; LOPES, 1979); (RIEHL; PINTO, 2000); (PINTO; SILVA; VALENTE, 1988); (PINTO; VALENTE; SILVA, 1988); (PINTO; FURTADO; GONZAGA, 1990)
9	Norditerpeno (cleistantano)	7,16-epoxy-20-norcleistantha-5(10),6,8,11,13-pentaen-3-one		C ₁₉ H ₂₀ O ₂	Planta completa, acetato de etila, <i>V. nanuzae</i> ; Planta completa, hexano, <i>V. stipitata</i> , <i>V. declinans</i> , <i>V. pusilla</i> , <i>V. epidendroides</i> ; Planta completa, clorofórmio, <i>V. epidendroides</i>	(PINTO; PINCHIN; ZOCHER; LOPES, 1979); (PINTO; SILVA; VALENTE, 1988); (PINTO; VALENTE; SILVA, 1988); (PINTO; FURTADO; GONZAGA, 1990)
10	Norditerpeno (cleistantano)	7,16-epoxy-20-norcleistantha-5(10),6,8,11,13-pentaene		C ₁₉ H ₂₂ O	Planta completa, hexano, <i>V. declinans</i> , <i>V. epidendroides</i> , <i>V. phalocarpa</i> ; Planta completa, clorofórmio, <i>V. epidendroides</i>	(PINTO; GONZAGA; FIORANI, 1984); (PINTO; FURTADO; GONZAGA, 1990); (PINTO; EPIFANIO; PIZZOLATTI, 1992)
11	Norditerpeno (cleistantano)	10-hydroxy-20-norcleistantha-1,8,11,13-tetraen-3,7-dione		C ₁₉ H ₂₂ O ₃	Raíces, diclorometano, <i>V. gigantea</i>	(FERREIRA; CANTRELL; DUKE; ALI <i>et al.</i> , 2017)

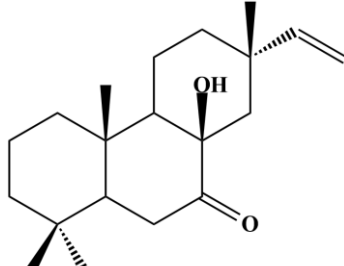
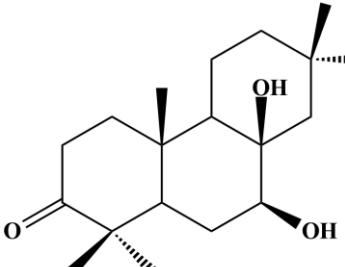
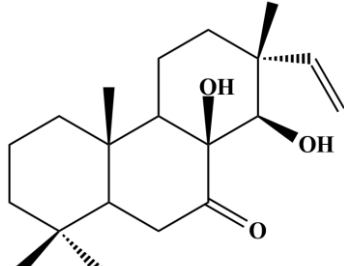
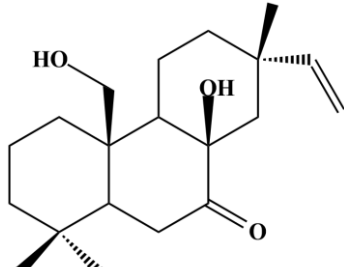
12	Norditerpeno (isopimarano)	7-oxo-18-nor- isopimar-4(19),15- dien-8,17-olide		C ₁₉ H ₂₄ O ₃	Planta completa, acetato de etila, <i>V. variabilis</i>	(PINTO; RIBEIRO; BRITO; TINANT <i>et al.</i> , 1988)
13	Norditerpeno (isopimarano)	20-nor-isopimara- 8(9),15-dien-7,11- dione		C ₁₉ H ₂₆ O ₂	Planta completa, hexano, <i>V.</i> <i>pusilla</i>	(PINTO; VALENTE; SILVA, 1988)
14	Norditerpeno (isopimarano)	7-hydroxy-18-nor- isopimara-4(19),15- dien-8,17-olide		C ₁₉ H ₂₆ O ₃	Planta completa, acetato de etila, <i>V. variabilis</i>	(PINTO; RIBEIRO; BRITO; TINANT <i>et al.</i> , 1988)
15	Norditerpeno (isopimarano)	7,14-dihydroxy-18- nor-isopimara- 4(19),15-dien-8,17- olide		C ₁₉ H ₂₆ O ₄	Planta completa, acetato de etila, <i>V. variabilis</i>	(PINTO; RIBEIRO; BRITO; TINANT <i>et al.</i> , 1988)

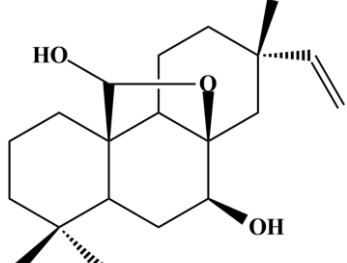
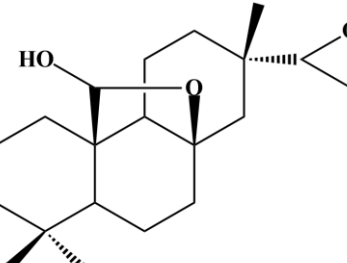
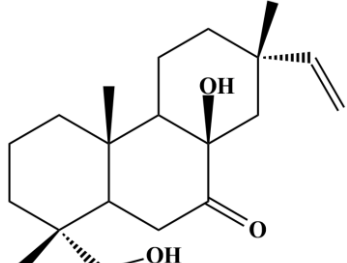
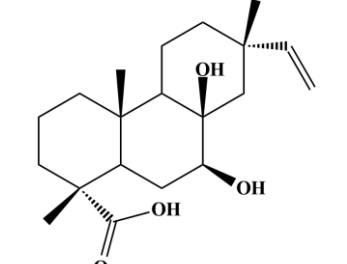
16	Norditerpeno (isopimarano)	8-hydroxy-18-nor-isopimara-4(19),15-dien-7-one (norcompactone)		C ₁₉ H ₂₈ O ₂	Planta completa, hexano, <i>V. variabilis</i>	(PINTO; EPIFANIO; PIZZOLATTI; REZENDE <i>et al.</i> , 1992)
17	Norditerpeno (isopimarano)	11β-hydroxy-20-nor-isopimara-8(9),15-dien-7-one		C ₁₉ H ₂₈ O ₂	Planta completa, acetato de etila, <i>V. nanuzae</i> ; Planta completa, hexano, <i>V. pusilla</i>	(PINTO; SILVA; VALENTE, 1988); (PINTO; VALENTE; SILVA, 1988)
18	Norditerpeno (isopimarano)	8,14-dihydroxy-18-nor-isopimara-4(19),15-dien-7-one		C ₁₉ H ₂₈ O ₃	Planta completa, hexano, <i>V. variabilis</i>	(PINTO; EPIFANIO; PIZZOLATTI; REZENDE <i>et al.</i> , 1992)
19	Diterpeno (isopimarano)	Isopimara-8(9),15-dien-1,3,7,11-tetraone		C ₂₀ H ₂₄ O ₄	Raíces, diclorometano, <i>V. gigantea</i>	(FERREIRA; CANTRELL; DUKE; ALI <i>et al.</i> , 2017)

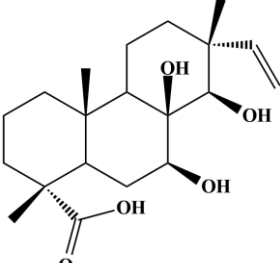
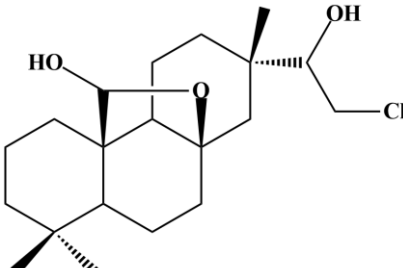
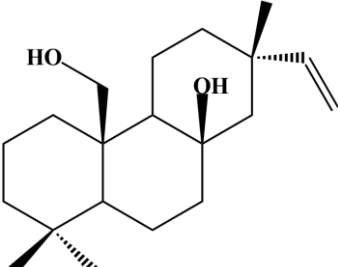
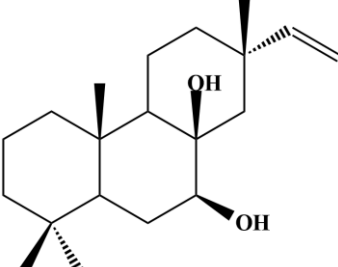
20	Diterpeno (isopimarano)	7-oxo-isopimara-8(9),15-dien-12,20-olide		C ₂₀ H ₂₆ O ₃	Planta completa, hexano, <i>V. pusilla</i>	(DANTAS; VALENTE; PINTO, 2003)
21	Diterpeno (isopimarano)	Isopimara-8(9),15-dien-7,11-dione		C ₂₀ H ₂₈ O ₂	Planta completa, etanol, <i>V. compacta</i> ; Planta completa, clorofórmio, <i>V. epidendroides</i> ; Planta completa, hexano, <i>V. compacta</i> , <i>V. epidendroides</i>	(RIEHL; PINTO, 2000); (PINTO; BORGES, 1983); (PINTO; FURTADO; GONZAGA, 1990)
22	Diterpeno (isopimarano)	12β-hydroxy-isopimara-8(9),15-dien-7,11-dione		C ₂₀ H ₂₈ O ₃	Planta completa, hexano, <i>V. compacta</i> , <i>V. epidendroides</i> ; Planta completa, clorofórmio, <i>V. epidendroides</i>	(PINTO; BORGES, 1983); (PINTO; FURTADO; GONZAGA, 1990)
23	Diterpeno (isopimarano)	12β-hydroxy-isopimara-8(9),15-dien-7-one		C ₂₀ H ₃₀ O ₂	Planta completa, etanol, <i>V. compacta</i> ; Planta completa, clorofórmio, <i>V. epidendroides</i> ; Planta completa, acetato de etila, <i>V. nanuzae</i> ; Planta completa, hexano, <i>V. compacta</i> , <i>V. epidendroides</i> ; <i>V. pusilla</i>	(RIEHL; PINTO, 2000); (PINTO; BORGES, 1983); (PINTO; FURTADO; GONZAGA, 1990); (PINTO; SILVA; VALENTE, 1988); (PINTO; VALENTE; SILVA, 1988)

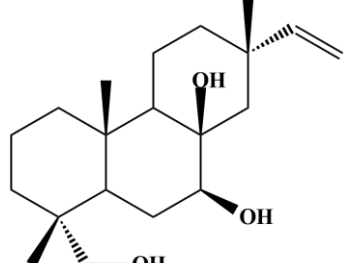
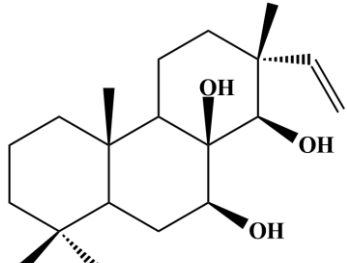
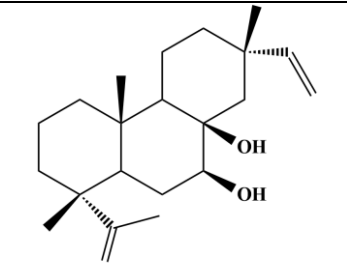
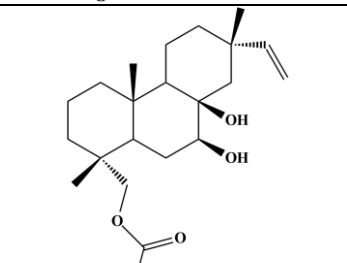
24	Diterpeno (isopimarano)	11 β -hydroxy-isopimara-8(9),15-dien-7-one		C ₂₀ H ₃₀ O ₂	Planta completa, clorofórmio, <i>V. epidendroides</i> ; Planta completa, hexano, <i>V. compacta</i> , <i>V. epidendroides</i>	(PINTO; BORGES, 1983); (PINTO; FURTADO; GONZAGA, 1990)
25	Diterpeno (isopimarano)	15,16-epoxy-isopimar-8(9)-en-7-one (nanuzone)		C ₂₀ H ₃₀ O ₂	Planta completa, hexano, <i>V. nanuzae</i> ; Planta completa, acetato de etila, <i>V. nanuzae</i>	(PINTO; SILVA; VALENTE, 1988)
26	Diterpeno (isopimarano)	15,16-epoxy-11 β -hydroxy-isopimar-8(9)-en-7-one (11 β -hydroxy-nanuzone)		C ₂₀ H ₃₀ O ₃	Planta completa, hexano, <i>V. nanuzae</i> ; Planta completa, acetato de etila, <i>V. nanuzae</i>	(PINTO; SILVA; VALENTE, 1988)
27	Diterpeno (isopimarano)	8 β -hydroxy-7-oxo-isopimar-15-en-18-oic acid		C ₂₀ H ₃₀ O ₄	Planta completa, acetato de etila, <i>V. patens</i> ; Planta completa, hexano, <i>V. variabilis</i>	(PINTO; FIGUEIREDO; BRITO; PEREIRA, 1986); (PINTO; FIGUEIREDO; EPIFANIO, 1992); (PINTO; EPIFANIO; PIZZOLATTI; REZENDE <i>et al.</i> , 1992)

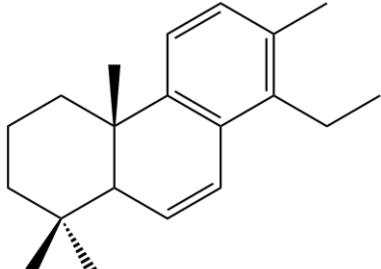
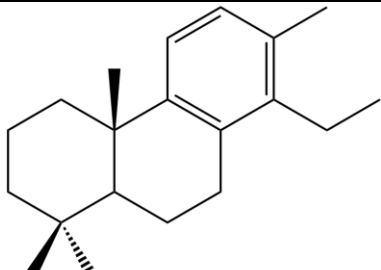
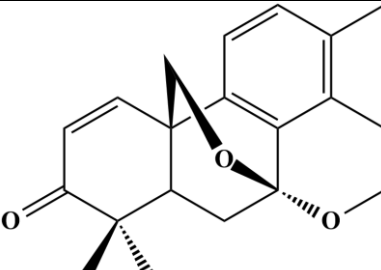
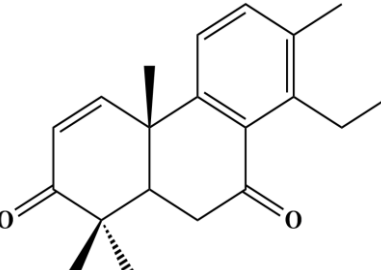
28	Diterpeno (isopimarano)	8,14β-dihydroxy-7-oxo-isopimar-15-en-18-oic acid		C ₂₀ H ₃₀ O ₅	Planta completa, acetato de etila, <i>V. patens</i> ; Planta completa, hexano, <i>V. variabilis</i>	(PINTO; FIGUEIREDO; EPIFANIO, 1992); (PINTO; EPIFANIO; PIZZOLATTI; REZENDE <i>et al.</i> , 1992)
29	Diterpeno (isopimarano)	17-hydroxy- isopimara-8(9),15- diene		C ₂₀ H ₃₂ O	Planta completa, hexano, <i>V.</i> <i>flavicans</i>	(PINTO; REZENDE; ANTUNES; CORREIA, 1996)
30	Diterpeno (isopimarano)	8β-hydroxy- isopimar-15-en-3- one		C ₂₀ H ₃₂ O ₂	Planta completa, hexano, <i>V.</i> <i>piresiana</i>	(PINTO; PEIXOTO; FIORANI, 1984)
31	Diterpeno (isopimarano)	(20R)-8,20-epoxy- isopimar-15-en-20- ol		C ₂₀ H ₃₂ O ₂	Caule e bainhas, acetato de etila, <i>V. bicolor</i>	(PINTO; QUEIROZ; GARCEZ, 1991)

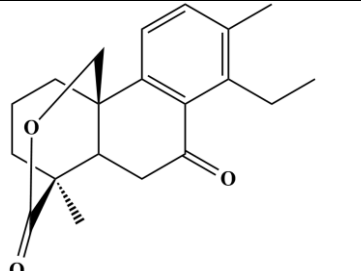
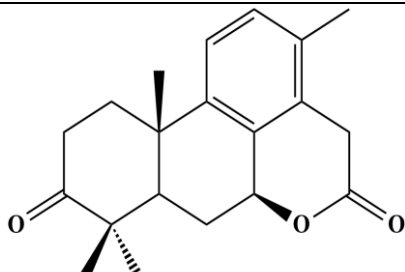
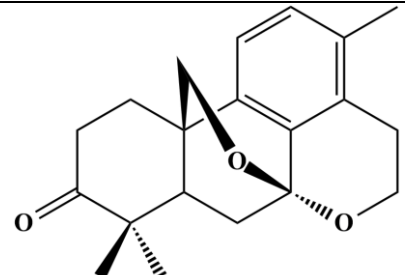
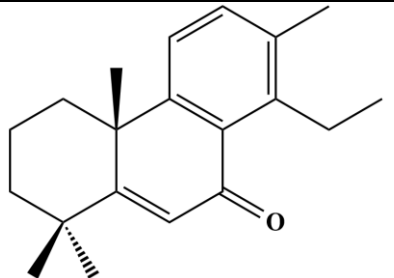
32	Diterpeno (isopimarano)	8-hydroxy-isopimar-15-en-7-one (compactone)		C ₂₀ H ₃₂ O ₂	Caule e bainhas, acetato de etila, <i>V. bicolor</i> ; Planta completa, metanol, <i>V. stipitata</i> ; Planta completa, hexano, <i>V. piresiana</i> , <i>V. compacta</i> , <i>V. variabilis</i>	(PINTO; SILVA; MAYER; BRAZ-FILHO, 1979); (PINTO; ANTUNES; PIZZOLATTI; RUMJANEK, 1996); (PINTO; BORGES, 1983); (PINTO; PEIXOTO; FIORANI, 1984); (PINTO; EPIFANIO; PIZZOLATTI; REZENDE <i>et al.</i> , 1992); (PINTO; QUEIROZ; GARCEZ, 1991)
33	Diterpeno (isopimarano)	7β,8β-dihydroxy-isopimar-15-en-3-one		C ₂₀ H ₃₂ O ₃	Planta completa, hexano, <i>V. piresiana</i>	(PINTO; PEIXOTO; FIORANI, 1984)
34	Diterpeno (isopimarano)	8,14-dihydroxy-isopimar-15-en-7-one		C ₂₀ H ₃₂ O ₃	Planta completa, hexano, <i>V. variabilis</i> ; Planta completa, acetato de etila, <i>V. patens</i>	(PINTO; FIGUEIREDO; BRITO; PEREIRA, 1986); (PINTO; FIGUEIREDO; EPIFANIO, 1992); (PINTO; EPIFANIO; PIZZOLATTI; REZENDE <i>et al.</i> , 1992)
35	Diterpeno (isopimarano)	8β,20-dihydroxy-isopimar-15-en-7-one		C ₂₀ H ₃₂ O ₃	Caule e bainhas, acetato de etila, <i>V. bicolor</i>	(PINTO; QUEIROZ; GARCEZ, 1991)

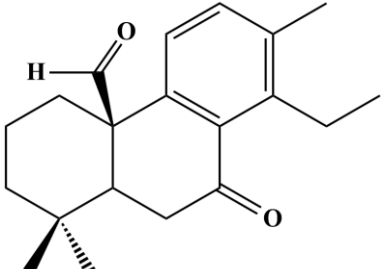
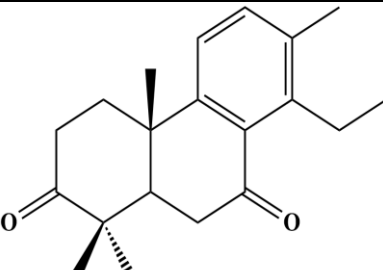
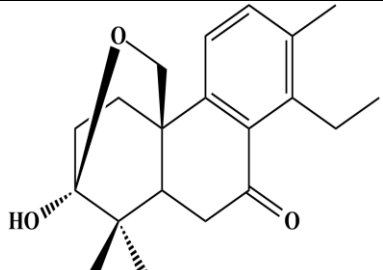
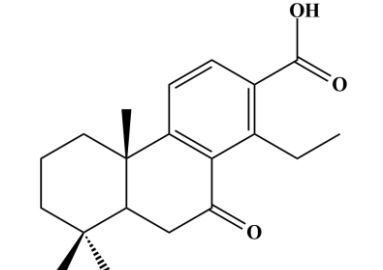
36	Diterpeno (isopimarano)	(20R)-8,20-epoxy- isopimar-15-en- 7 β ,20-diol		C ₂₀ H ₃₂ O ₃	Caule e bainhas, acetato de etila, <i>V. bicolor</i>	(PINTO; QUEIROZ; GARCEZ, 1991)
37	Diterpeno (isopimarano)	(20R)-8,20:15,16- diepoxy- isopimaran-20-ol		C ₂₀ H ₃₂ O ₃	Caule e bainhas, acetato de etila, <i>V. bicolor</i>	(PINTO; QUEIROZ; GARCEZ, 1991)
38	Diterpeno (isopimarano)	8,18-dihydroxy- isopimar-15-en-7- one		C ₂₀ H ₃₂ O ₃	Planta completa, acetato de etila, <i>V. patens</i>	(PINTO; FIGUEIREDO; EPIFANIO, 1992)
39	Diterpeno (isopimarano)	7 β ,8 β -dihydroxy- isopimar-15-en-18- oic acid		C ₂₀ H ₃₂ O ₄	Planta completa, acetato de etila, <i>V. patens</i>	(PINTO; FIGUEIREDO; BRITO; PEREIRA, 1986); (PINTO; FIGUEIREDO; EPIFANIO, 1992)

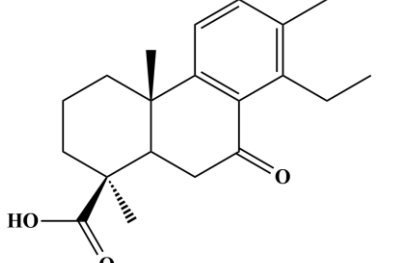
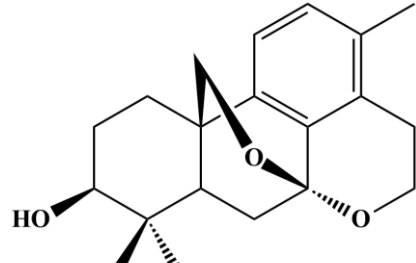
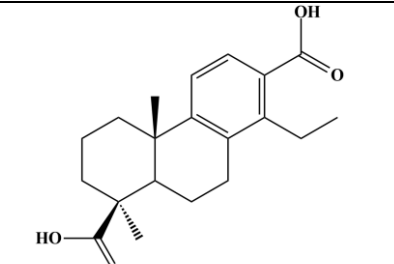
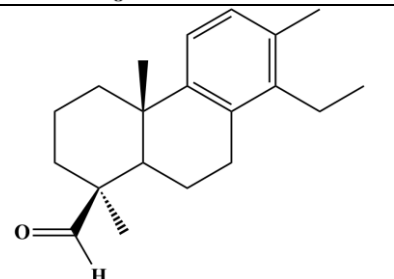
40	Diterpeno (isopimarano)	7,8,14-trihydroxy- isopimar-15-en-18- oic acid		C ₂₀ H ₃₂ O ₅	Planta completa, acetato de etila, <i>V. patens</i>	(PINTO; FIGUEIREDO; BRITO; PEREIRA, 1986); (PINTO; FIGUEIREDO; EPIFANIO, 1992)
41	Diterpeno (isopimarano)	(20R)-8,20-epoxy- 16-chloro- isopimarane-15,20- diol		C ₂₀ H ₃₃ O ₃ Cl	Caule e bainhas, acetato de etila, <i>V. bicolor</i>	(PINTO; QUEIROZ; GARCEZ, 1991)
42	Diterpeno (isopimarano)	Isopimar-15-en- 8β,20-diol		C ₂₀ H ₃₄ O ₂	Caule e bainhas, acetato de etila, <i>V. bicolor</i>	(PINTO; QUEIROZ; GARCEZ, 1991)
43	Diterpeno (isopimarano)	Isopimar-15-en-7,8- diol (compactol)		C ₂₀ H ₃₄ O ₂	Planta completa, hexano, <i>V.</i> <i>compacta</i> , <i>V. variabilis</i>	(PINTO; BORGES, 1983); (PINTO; EPIFANIO; PIZZOLATTI; REZENDE <i>et al.</i> , 1992)

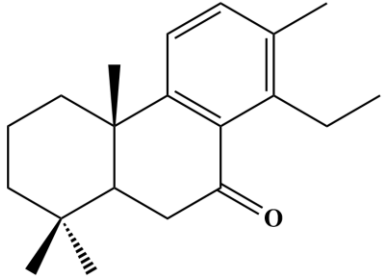
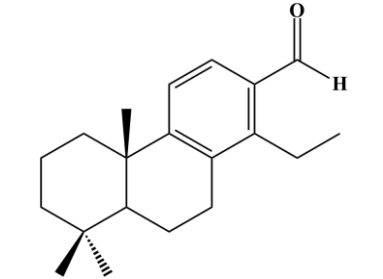
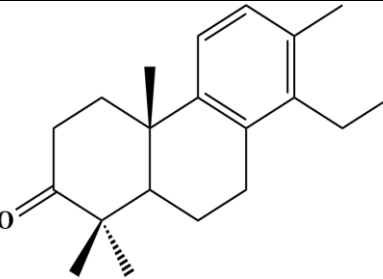
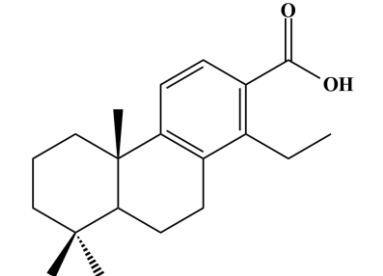
44	Diterpeno (isopimarano)	Isopimar-15-en-7,8,18-triol (compactotriol)		C ₂₀ H ₃₄ O ₃	Planta completa, hexano, <i>V. compacta</i> , <i>V. variabilis</i>	(PINTO; BORGES, 1983); (PINTO; EPIFANIO; PIZZOLATTI; REZENDE <i>et al.</i> , 1992)
45	Diterpeno (isopimarano)	Isopimar-15-en-7,8,14-triol		C ₂₀ H ₃₄ O ₃	Planta completa, hexano, <i>V. variabilis</i> ; Planta completa, acetato de etila, <i>V. patens</i>	(PINTO; EPIFANIO; PIZZOLATTI; REZENDE <i>et al.</i> , 1992); (PINTO; FIGUEIREDO; BRITO; PEREIRA, 1986); (PINTO; FIGUEIREDO; EPIFANIO, 1992)
46	Diterpeno (isopimarano)	18-acetyl-isopimar-15-en-7β,8β-diol		C ₂₁ H ₃₄ O ₃	Planta completa, etanol, <i>V. compacta</i>	(RIEHL; PINTO, 2000)
47	Diterpeno (isopimarano)	18-acetoxy-isopimar-15-en-7β,8β-diol		C ₂₂ H ₃₆ O ₄	Planta completa, acetato de etila, <i>V. patens</i>	(PINTO; FIGUEIREDO; BRITO; PEREIRA, 1986); (PINTO; FIGUEIREDO; EPIFANIO, 1992)

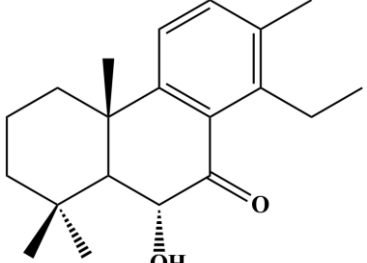
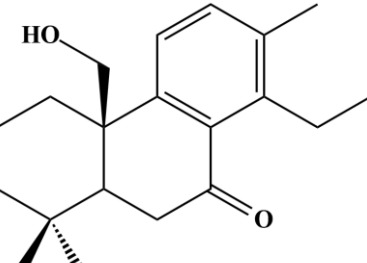
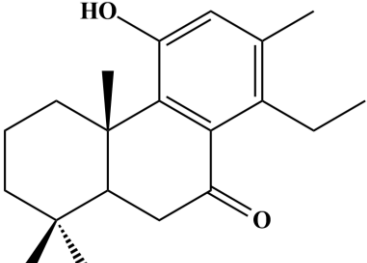
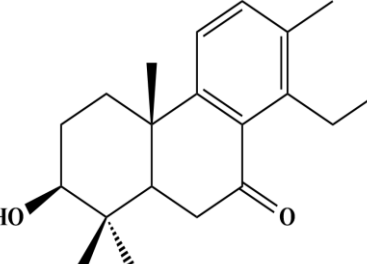
48	Diterpeno (cleistantano)	Cleistantha-6,8,11,13-tetraene		C ₂₀ H ₂₈	Planta completa, metanol, <i>V. stipitata</i> ; Planta completa, hexano, <i>V. declinans</i>	(PINTO; ANTUNES; PIZZOLATTI; RUMJANEK, 1996); (PINTO; EPIFANIO; PIZZOLATTI, 1992)
49	Diterpeno (cleistantano)	Cleistantha-8,11,13-triene		C ₂₀ H ₃₀	Caule, hexano, <i>V. flavicans</i> ; Planta completa, hexano, <i>V. declinans</i>	(PINTO; ANTUNES; REZENDE; CORREIA, 1995); (PINTO; EPIFANIO; PIZZOLATTI, 1992)
50	Diterpeno (cleistantano)	(5S,7S,10R)-7 α ,16:7 β ,20-diepoxy-cleistantha-1,8,11,13-tetraen-3-one		C ₂₀ H ₂₂ O ₃	Planta completa, etanol, <i>V. compacta</i> ; Planta completa, acetato de etila, <i>V. nanuzae</i> ; Planta completa, clorofórmio, <i>V. epidendroides</i> ; Planta completa, hexano, <i>V. pusilla</i> , <i>V. declinans</i> , <i>V. epidendroides</i>	(RIEHL; PINTO, 2000); (PINTO; SILVA; VALENTE, 1988); (PINTO; VALENTE; SILVA, 1988); (PINTO; FURTADO; GONZAGA, 1990); (PINTO; EPIFANIO; PIZZOLATTI, 1992)
51	Diterpeno (cleistantano)	Cleistantha-1,8,11,13-tetraen-3,7-dione		C ₂₀ H ₂₄ O ₂	Planta completa, hexano, <i>V. piresiana</i> , <i>V. aff. carunculares</i>	(PINTO; PEIXOTO; FIORANI, 1984); (SILVA; VALENTE; PATITUCCI; PINTO <i>et al.</i> , 2001)

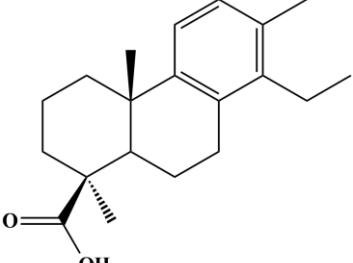
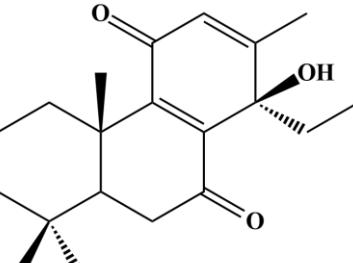
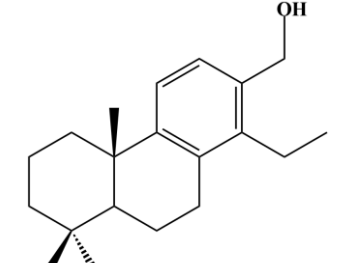
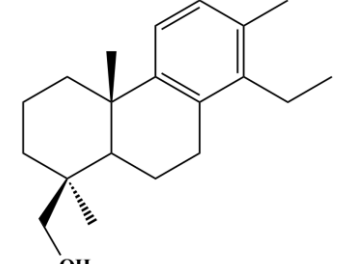
52	Diterpeno (cleistantano)	7-oxo-cleistantha-8,11,13-trien-19,20 β -olide		C ₂₀ H ₂₄ O ₃	Planta completa, etanol, <i>V. compacta</i>	(RIEHL; PINTO, 2000)
53	Diterpeno (cleistantano)	3-oxo-cleistantha-8,11,13-trien-7,16-olide		C ₂₀ H ₂₄ O ₃	Planta completa, hexano, <i>V. compacta</i> , <i>V. epidendroides</i> ; Planta completa, clorofórmio, <i>V. epidendroides</i>	(PINTO; BORGES, 1983); (PINTO; FURTADO; GONZAGA, 1990)
54	Diterpeno (cleistantano)	(5S,7S,10R)-7 α ,16:7 β ,20-diepoxy-cleistantha-8,11,13-trien-3-one		C ₂₀ H ₂₄ O ₃	Planta completa, hexano, <i>V. pusilla</i> , <i>V. declinans</i> , <i>V. epidendroides</i> ; Planta completa, clorofórmio, <i>V. epidendroides</i> ; Planta completa, acetato de etila, <i>V. nanuzae</i>	(PINTO; SILVA; VALENTE, 1988); (PINTO; VALENTE; SILVA, 1988); (PINTO; FURTADO; GONZAGA, 1990); (PINTO; EPIFANIO; PIZZOLATTI, 1992)
55	Diterpeno (cleistantano)	Cleistantha-5,8,11,13-tetraen-7-one		C ₂₀ H ₂₆ O	Planta completa, hexano, <i>V. aff. carunculares</i>	(SILVA; VALENTE; PATITUCCI; PINTO <i>et al.</i> , 2001)

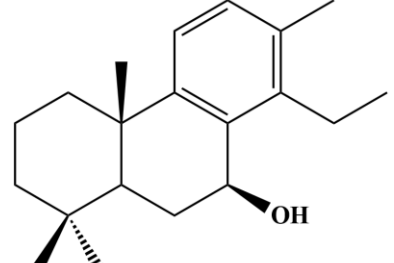
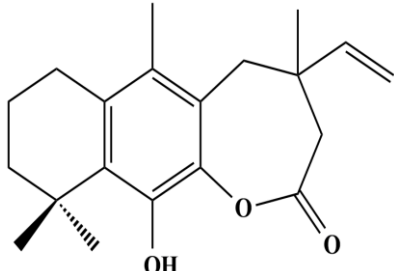
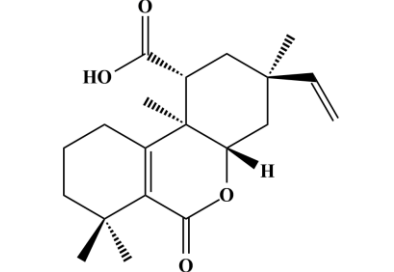
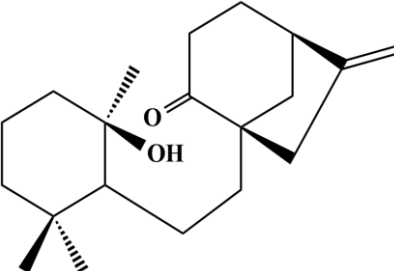
56	Diterpeno (cleistantano)	7-oxo-cleistantha-8,11,13-trien-20-al		C ₂₀ H ₂₆ O ₂	Planta completa, hexano, <i>V. declinans</i>	(PINTO; VALENTE; PIZZOLATTI, 1991)
57	Diterpeno (cleistantano)	Cleistantha-8,11,13-trien-3,7-dione		C ₂₀ H ₂₆ O ₂	Planta completa, acetato de etila, <i>V. graminifolia</i> ; Planta completa, hexano, <i>V. piresiana</i> , <i>V. aff. carunculares</i>	(BRANCO; PEREIRA; CARDOSO; DE NETO <i>et al.</i> , 2001); (PINTO; PEIXOTO; FIORANI, 1984); (SILVA; VALENTE; PATITUCCI; PINTO <i>et al.</i> , 2001)
58	Diterpeno (cleistantano)	3,20-epoxy-3-hydroxy-cleistantha-8,11,13-trien-7-one		C ₂₀ H ₂₆ O ₃	Raízes, diclorometano, <i>V. gigantea</i>	(FERREIRA; CANTRELL; DUKE; ALI <i>et al.</i> , 2017)
59	Diterpeno (cleistantano)	7-oxo-cleistantha-8,11,13-trien-17-oic acid		C ₂₀ H ₂₆ O ₃	Caule, hexano, <i>V. flavicans</i>	(PINTO; ANTUNES; REZENDE; CORREIA, 1995)

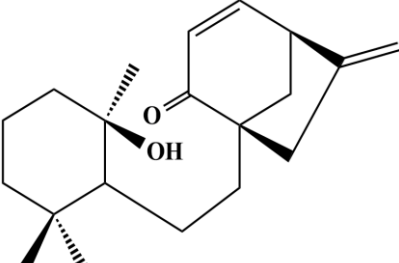
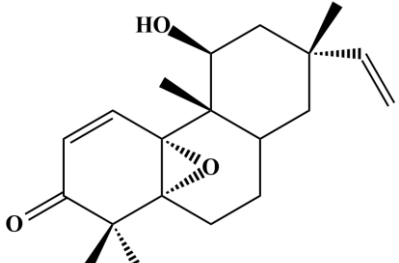
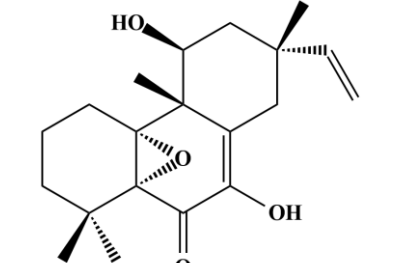
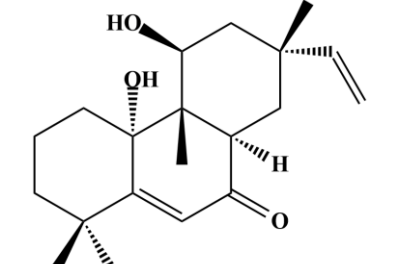
60	Diterpeno (cleistanano)	7-oxo-cleistantha-8,11,13-trien-19-oic acid		C ₂₀ H ₂₆ O ₃	Caule, hexano, <i>V. flavicans</i>	(PINTO; ANTUNES; REZENDE; CORREIA, 1995)
61	Diterpeno (cleistanano)	(3S,5S,7S,10R)-7 α ,16:7 β ,20-diepoxy-cleistantha-8,11,13-trien-3 β -ol		C ₂₀ H ₂₆ O ₃	Planta completa, hexano, <i>V. declinans</i>	(PINTO; EPIFANIO; PIZZOLATTI, 1992)
62	Diterpeno (cleistanano)	Cleistantha-8,11,13-trien-17,19-dioic acid		C ₂₀ H ₂₆ O ₄	Caule, hexano, <i>V. flavicans</i>	(PINTO; ANTUNES; REZENDE; CORREIA, 1995)
63	Diterpeno (cleistanano)	(4R,5S,10S)-Cleistantha-8,11,13-trien-19-al		C ₂₀ H ₂₈ O	Caule, hexano, <i>V. flavicans</i>	(PINTO; ZOCHER; QUEIROZ; KELECOM, 1987)

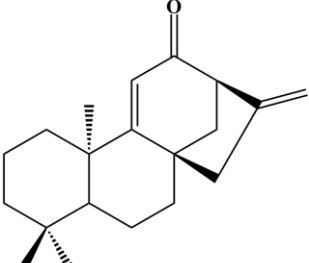
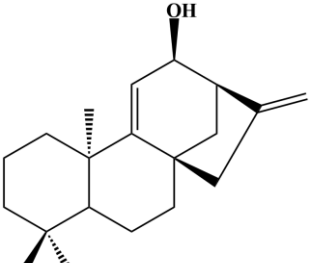
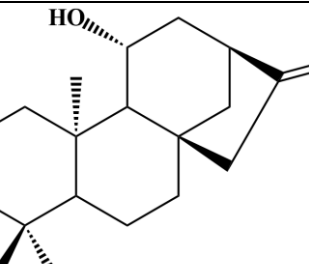
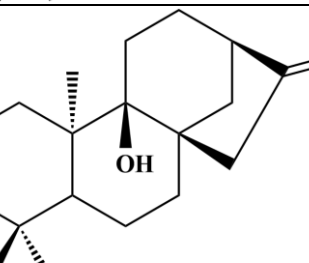
64	Diterpeno (cleistantano)	(5S,10S)- Cleistantha- 8,11,13-trien-7-one		C ₂₀ H ₂₈ O	Planta completa, metanol, <i>V. stipitata</i> ; Planta completa, etanol, <i>V. compacta</i> ; Planta completa, hexano, <i>V. flavicans</i> , <i>V. declinans</i> , <i>V. leptopetala</i> , <i>V. aff. carunculares</i>	(PINTO; ANTUNES; PIZZOLATTI; RUMJANEK, 1996); (RIEHL; PINTO, 2000); (PINTO; ANTUNES; REZENDE; CORREIA, 1995); (SILVA; VALENTE; PATITUCCI; PINTO <i>et al.</i> , 2001); (PINTO; EPIFANIO; PIZZOLATTI, 1992); (PINTO; PATITUCCI; SILVA; QUEIROZ <i>et al.</i> , 1983)
65	Diterpeno (cleistantano)	Cleistantha- 8,11,13-trien-17-al (veadeiral)		C ₂₀ H ₂₈ O	Caule, hexano, <i>V. flavicans</i>	(PINTO; ZOCHER; QUEIROZ; KELECOM, 1987)
66	Diterpeno (cleistantano)	Cleistantha- 8,11,13-trien-3-one		C ₂₀ H ₂₈ O	Planta completa, hexano, <i>V. aff. carunculares</i>	(SILVA; VALENTE; PATITUCCI; PINTO <i>et al.</i> , 2001)
67	Diterpeno (cleistantano)	Cleistantha- 8,11,13-trien-17-oic acid (veadeiroic acid)		C ₂₀ H ₂₈ O ₂	Caule, hexano, <i>V. flavicans</i>	(PINCHIN; MAYER; PINTO, 1978); (PINTO; ZOCHER; QUEIROZ; KELECOM, 1987)

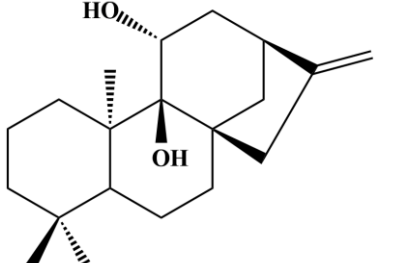
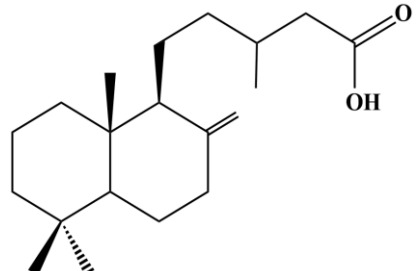
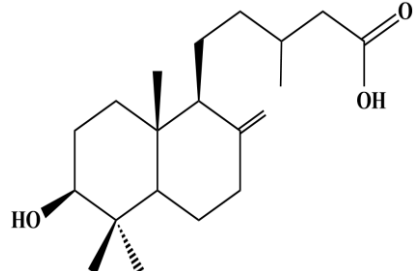
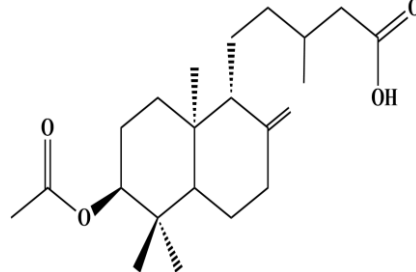
68	Diterpeno (cleistantano)	6 α -hydroxy- cleistantha-8,11,13- trien-7-one		C ₂₀ H ₂₈ O ₂	Planta completa, hexano, <i>V. aff. carunculares</i>	(SILVA; VALENTE; PATITUCCI; PINTO <i>et al.</i> , 2001)
69	Diterpeno (cleistantano)	20-hydroxy- cleistantha-8,11,13- trien-7-one		C ₂₀ H ₂₈ O ₂	Planta completa, hexano, <i>V. declinans</i> , <i>V. pusilla</i>	(PINTO; VALENTE; PIZZOLATTI, 1991); (PINTO; VALENTE; SILVA, 1988)
70	Diterpeno (cleistantano)	11-hydroxy- cleistantha-8,11,13- trien-7-one		C ₂₀ H ₂₈ O ₂	Planta completa, hexano, <i>V. nivea</i> , <i>V. aff. carunculares</i>	(PINTO; MAÇAIRA, 1988); (SILVA; VALENTE; PATITUCCI; PINTO <i>et al.</i> , 2001)
71	Diterpeno (cleistantano)	3-hydroxy- cleistantha-8,11,13- trien-7-one		C ₂₀ H ₂₈ O ₂	Raízes, diclorometano, <i>V. gigantea</i>	(FERREIRA; CANTRELL; DUKE; ALI <i>et al.</i> , 2017)

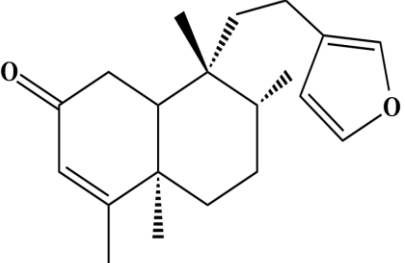
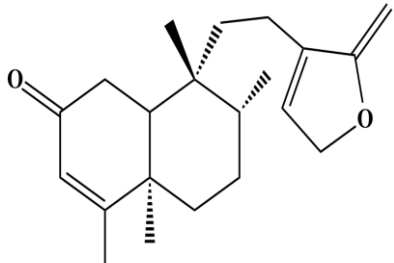
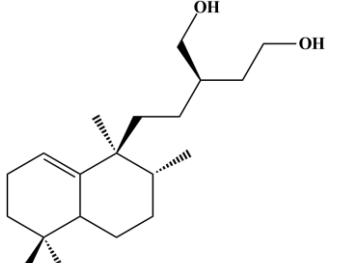
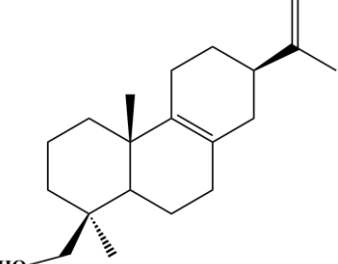
72	Diterpeno (cleistantano)	(4R,5S,10S)- Cleistantha- 8,11,13-trien-19-oic acid		C ₂₀ H ₂₈ O ₂	Caule, hexano, <i>V. flavicans</i>	(PINTO; ZOCHER; QUEIROZ; KELECOM, 1987)
73	Diterpeno (cleistantano)	14 α -hydroxy- cleistantha-8,12- dien-7,11-dione		C ₂₀ H ₂₈ O ₃	Planta completa, hexano, <i>V. nivea</i>	(PINTO; MAÇAIRA, 1988)
74	Diterpeno (cleistantano)	Cleistantha- 8,11,13-trien-17-ol (veadeirol)		C ₂₀ H ₃₀ O	Caule, hexano, <i>V. flavicans</i>	(PINCHIN; MAYER; PINTO, 1978); (PINTO; ZOCHER; QUEIROZ; KELECOM, 1987)
75	Diterpeno (cleistantano)	(4R,5S,10S)- Cleistantha- 8,11,13-trien-19-ol		C ₂₀ H ₃₀ O	Caule, hexano, <i>V. flavicans</i>	(PINTO; ZOCHER; QUEIROZ; KELECOM, 1987)

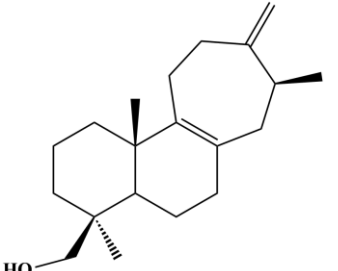
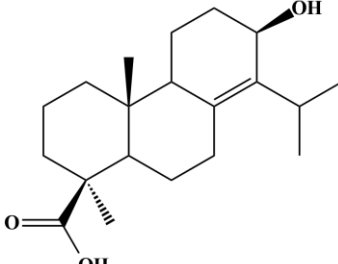
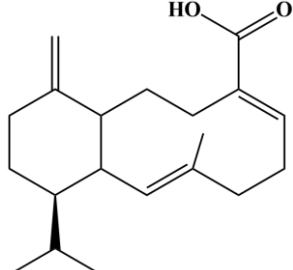
76	Diterpeno (cleistanano)	Cleistantha-8,11,13-trien-7 β -ol		C ₂₀ H ₃₀ O	Caule, hexano, <i>V. flavicans</i> ; Planta completa, hexano, <i>V. declinans</i> , <i>V. aff. carunculares</i>	(PINTO; ANTUNES; REZENDE; CORREIA, 1995); (SILVA; VALENTE; PATITUCCI; PINTO <i>et al.</i> , 2001); (PINTO; EPIFANIO; PIZZOLATTI, 1992)
77	Diterpeno (9,11 seco-rosano)	Velloziolide		C ₂₀ H ₂₆ O ₃	Planta completa, hexano, <i>V. cândida</i>	(PINTO; GONÇALVES; BRAZ-FILHO; NESZMELYI <i>et al.</i> , 1982)
78	Diterpeno (6,7 seco-rosano)	Candidalactone		C ₂₀ H ₂₈ O ₄	Planta completa, etanol, <i>V. candida</i> ; Planta completa, metanol, <i>V. candida</i>	(VALENTE; GUNATILAKA; KINGSTON; PATITUCCI <i>et al.</i> , 1997)
79	Diterpeno (seco-ent-kaurano)	Velloziolone		C ₂₀ H ₃₂ O ₂	Planta completa, hexano, <i>V. caput-ardeae</i>	(PINTO; PRADO; BRAZ-FILHO; HULL <i>et al.</i> , 1982)

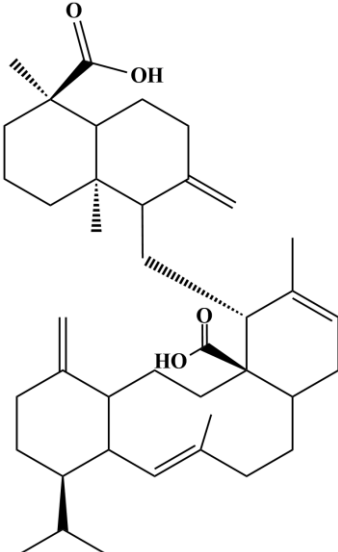
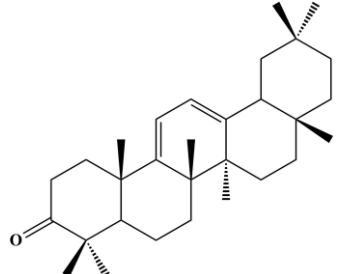
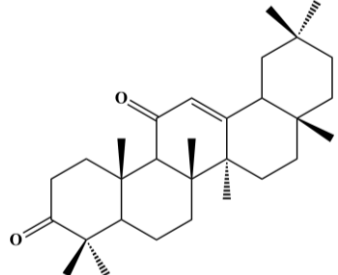
80	Diterpeno (seco-ent-kaurano)	11,12-dehidrovelloziolone		C ₂₀ H ₃₀ O ₂	Planta completa, hexano, V. <i>caput-ardeae</i>	(PINTO; PEREIRA; COMASSETO, 1983)
81	Diterpeno (rosano)	5,10-epoxy-11-hidroxi-rosane-1,15-dien-3-one (epoxicorcovadin)		C ₂₀ H ₂₈ O ₃	Planta completa, hexano, V. <i>cândida</i>	(PINTO; SCOFIELD; BRAZ-FILHO, 1983)
82	Diterpeno (rosano)	5,10-epoxy-7,11-dihidroxi-rosane-7,15-dien-6-one (epoxivellozin)		C ₂₀ H ₂₈ O ₄	Planta completa, hexano, V. <i>cândida</i>	(PINTO; SCOFIELD; BRAZ-FILHO, 1983)
83	Diterpeno (rosano)	10S,11R-dihidroxi-rosane-5,15-dien-7-one (candidenodiol)		C ₂₀ H ₃₀ O ₃	Planta completa, metanol, V. <i>cândida</i>	(VALENTE; GUNATILAKA; KINGSTON; PATITUCCI <i>et al.</i> , 1997)

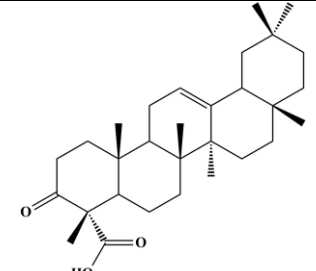
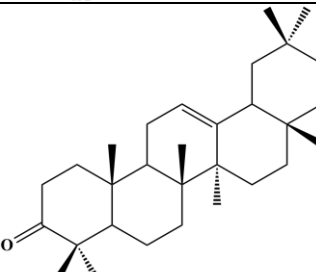
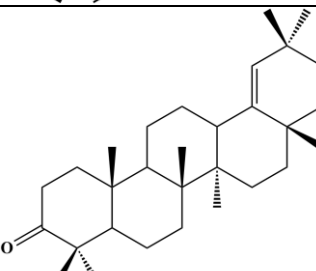
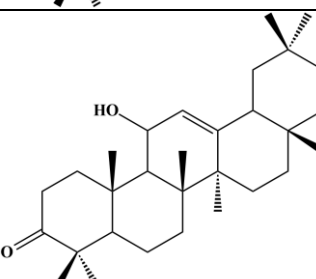
84	Diterpeno (ent-kaurano)	Ent-kaura-9(11),16-dien-12-one		C ₂₀ H ₂₈ O	Planta completa, hexano, V. <i>caput-ardeae</i>	(PINTO; PRADO; PINCHIN, 1981)
85	Diterpeno (ent-kaurano)	Ent-kaura-9(11),16-dien-12β-ol		C ₂₀ H ₃₀ O	Planta completa, hexano, V. <i>caput-ardeae</i>	(PINTO; PRADO; PINCHIN, 1981)
86	Diterpeno (ent-kaurano)	Ent-kaur-16-en-11α-ol		C ₂₀ H ₃₂ O	Planta completa, hexano, V. <i>caput-ardeae</i>	(PINTO; PINCHIN; PRADO, 1983)
87	Diterpeno (ent-kaurano)	Ent-kaur-16-en-9β-ol		C ₂₀ H ₃₂ O	Planta completa, hexano, V. <i>caput-ardeae</i>	(PINTO; PINCHIN; PRADO, 1983)

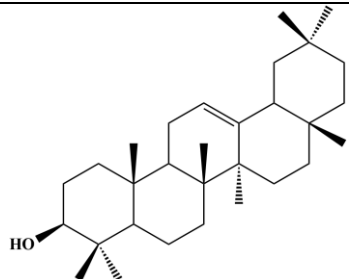
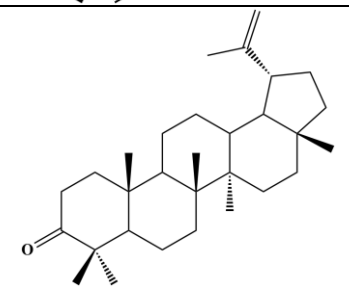
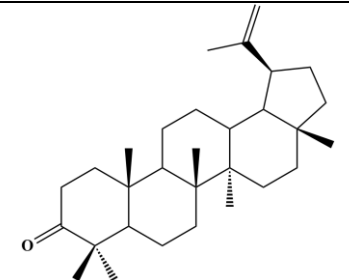
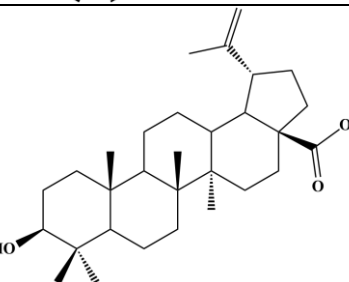
88	Diterpeno (ent-kaurano)	Ent-kaur-16-en-9 β ,11 α -diol		C ₂₀ H ₃₂ O ₂	Planta completa, hexano, <i>V. caput-ardeae</i>	(PINTO; PINCHIN; PRADO, 1983)
89	Diterpeno (labdano)	Labd-8(17)-en-15-oic acid		C ₂₀ H ₃₄ O ₂	Planta completa, acetato de etila, <i>V. graminifolia</i>	(BRANCO; PEREIRA; CARDOSO; DE NETO <i>et al.</i> , 2001)
90	Diterpeno (labdano)	3 β -hydroxylabd-8(17)-en-15-oic acid		C ₂₀ H ₃₄ O ₃	Planta completa, acetato de etila, <i>V. graminifolia</i> ; Planta completa, hexano, <i>V. graminifolia</i>	(BRANCO; PEREIRA; CARDOSO; DE NETO <i>et al.</i> , 2001); (BRANCO; PINTO; BRAZ-FILHO, 2004)
91	Diterpeno (labdano)	3 β -acetoxylabd-8(17)-en-15-oic acid		C ₂₂ H ₃₆ O ₄	Planta completa, acetato de etila, <i>V. graminifolia</i>	(BRANCO; PEREIRA; CARDOSO; DE NETO <i>et al.</i> , 2001)

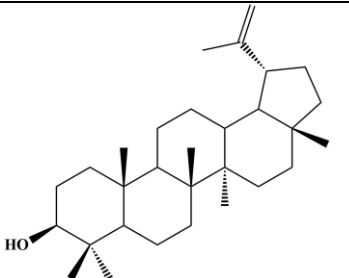
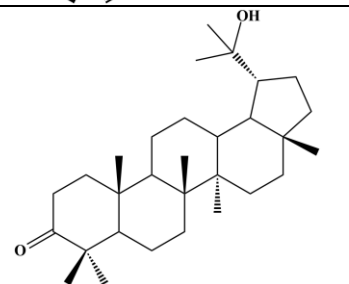
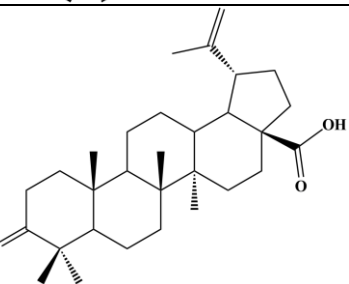
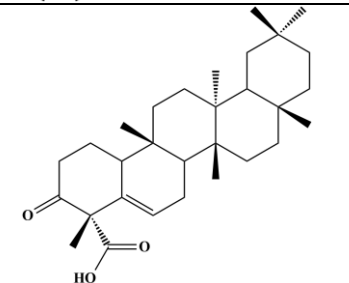
92	Diterpeno (clerodano)	15,16-epoxy- cleroda- 3,13(16),14-trien-2- one		C ₂₀ H ₂₈ O ₂	Planta completa, acetato de etila, <i>V. bicolor</i>	(PINTO; GARCEZ; QUEIROZ; FIORANI, 1994)
93	Diterpeno (clerodano)	2-oxo-cleroda-3,13- dien-15,16-olide		C ₂₀ H ₂₈ O ₃	Planta completa, acetato de etila, <i>V. bicolor</i>	(PINTO; GARCEZ; QUEIROZ; FIORANI, 1994)
94	Diterpeno (halimano)	(5R,8R,9S,13R)- halim-1(10)-ene- 15,16-diol		C ₂₀ H ₃₆ O ₂	Leaves, hexano, <i>V. kolbekii</i>	(SILVA; SANTOS JÚNIOR; BARBOSA; COSTA <i>et al.</i> , 2015)
95	Diterpeno (abietano)	Abieta-8,15-dien- 19-ol		C ₂₀ H ₃₂ O	Planta completa, hexano, <i>V.</i> <i>flavicans</i>	(PINTO; REZENDE; ANTUNES; CORREIA, 1996)

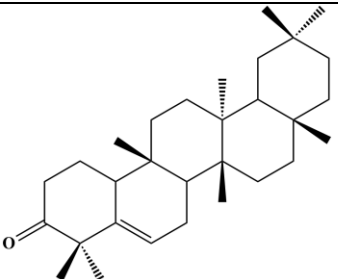
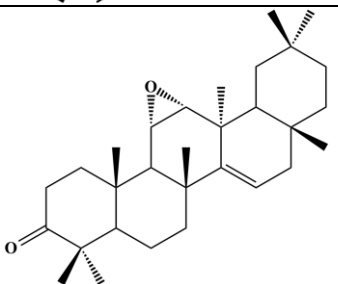
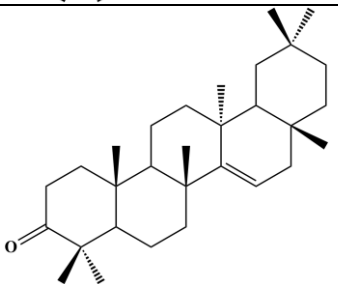
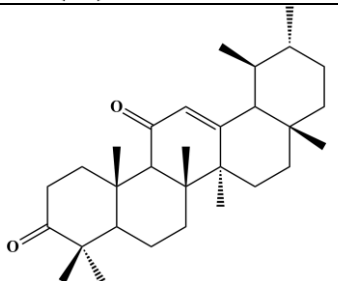
96	Diterpeno (estrobano)	Stroba-8,13(17)-dien-19-ol		$C_{20}H_{32}O$	Planta completa, hexano, V. <i>flavicans</i>	(PINTO; REZENDE; ANTUNES; CORREIA, 1996)
97	Diterpeno (totarano)	13 β -hydroxy-totar-8(14)-en-19-oic acid		$C_{20}H_{32}O_3$	Planta completa, hexano, V. <i>flavicans</i>	(PINTO; ZOCHER; REZENDE; GOTTLIEB, 1995)
98	Diterpeno (eunicelano)	Magdalenic acid		$C_{20}H_{30}O_2$	Planta completa, hexano, V. <i>magdalanae</i>	(PINTO; PIZZOLATTI; EPIFANIO; FRANKMÖLLE <i>et al.</i> , 1997)

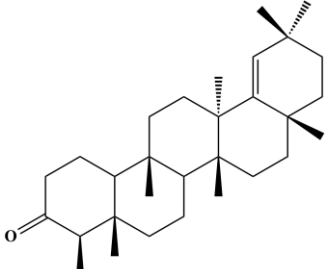
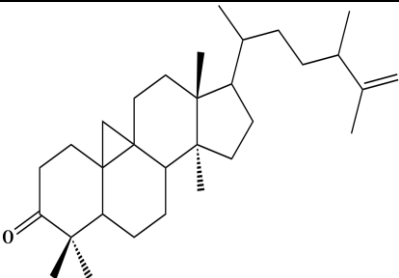
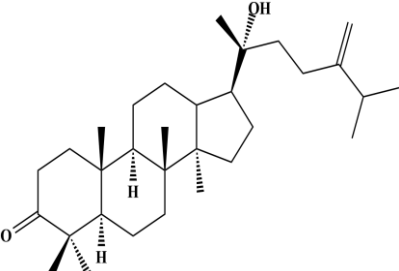
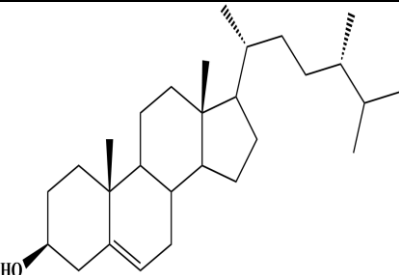
99	Bis-diterpeno (eunicelano/labdano)	Bismagdalenic acid		C ₄₀ H ₆₀ O ₄	Planta completa, hexano, <i>V. magdalenae</i>	(PINTO; PIZZOLATTI; EPIFANIO; FRANKMÖLLE <i>et al.</i> , 1997)
100	Triterpeno (oleanano)	Olean-9(11),12-dien-3-one		C ₃₀ H ₄₆ O	Planta completa, hexano, <i>V. compacta</i> , <i>V. graminifolia</i> ; Planta completa, metanol, <i>V. stipitata</i>	(BARNES; PEREIRA; SCOFIELD; BRAZ-FILHO <i>et al.</i> , 1984); (BRANCO; PINTO; BRAZ-FILHO, 2004); (PINTO; ANTUNES; PIZZOLATTI; RUMJANEK, 1996)
101	Triterpeno (oleanano)	Olean-12-en-3,11-dione		C ₃₀ H ₄₆ O ₂	Planta completa, hexano, <i>V. graminifolia</i>	(BRANCO; PINTO; BRAZ-FILHO, 2004)

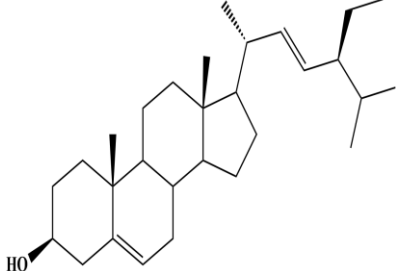
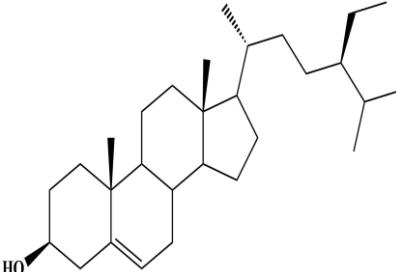
102	Triterpeno (oleanano)	3-oxo-olean-12-en-23-oic acid		C ₃₀ H ₄₆ O ₃	Planta completa, hexano, <i>V. graminifolia</i>	(BRANCO; PINTO; BRAZ-FILHO, 2004)
103	Triterpeno (oleanano)	Olean-12-en-3-one (β-amirone)		C ₃₀ H ₄₈ O	Planta completa, hexano, <i>V. graminifolia</i> ; Planta completa, metanol, <i>V. stipitata</i>	(BRANCO; PINTO; BRAZ-FILHO, 2004); (PINTO; ANTUNES; PIZZOLATTI; RUMJANEK, 1996)
104	Triterpeno (oleanano)	Olean-18-en-3-one		C ₃₀ H ₄₈ O	Planta completa, hexano, <i>V. graminifolia</i>	(BRANCO; PINTO; BRAZ-FILHO, 2004)
105	Triterpeno (oleanano)	11-hydroxy-olean-12-en-3-one		C ₃₀ H ₄₈ O ₂	Planta completa, hexano, <i>V. graminifolia</i>	(BRANCO; PINTO; BRAZ-FILHO, 2004)

106	Triterpeno (oleanano)	Olean-12-en-3-ol (β -amyrin)		C ₃₀ H ₅₀ O	Planta completa, hexano, <i>V. graminifolia</i> ; Planta completa, hexano, <i>V. aff. carunculares</i>	(BRANCO; PINTO; BRAZ-FILHO, 2004); (SILVA; VALENTE; PATITUCCI; PINTO <i>et al.</i> , 2001)
107	Triterpeno (lupano)	Lup-20(29)-en-3-one (lupenone)		C ₃₀ H ₄₈ O	Planta completa, hexano, <i>V. graminifolia</i> , <i>V. declinans</i> , <i>V. epidendroides</i> ; Planta completa, clorofórmio, <i>V. epidendroides</i> ; Raízes e caule, hexano, <i>V. compacta</i>	(PINTO; SILVA; MAYER; BRAZ-FILHO, 1979); (BRANCO; PINTO; BRAZ-FILHO, 2004); (PINTO; FURTADO; GONZAGA, 1990); (PINTO; EPIFANIO; PIZZOLATTI, 1992)
108	Triterpeno (lupano)	neo-Lup-20(29)-en-3-one (neo-lupenone)		C ₃₀ H ₄₈ O	Planta completa, hexano, <i>V. graminifolia</i>	(BRANCO; PINTO; BRAZ-FILHO, 2004)
109	Triterpeno (lupano)	3-hydroxy-lup-20(29)-en-28-oic acid (betulinic acid)		C ₃₀ H ₄₈ O ₃	Planta completa, hexano, <i>V. declinans</i> ; Planta completa, metanol, <i>V. stipitata</i>	(PINTO; ANTUNES; PIZZOLATTI; RUMJANEK, 1996); (PINTO; EPIFANIO; PIZZOLATTI, 1992)

110	Triterpeno (lupano)	Lup-20(29)-en-3 β -ol (lupeol)		C ₃₀ H ₅₀ O	Planta completa, hexano, <i>V. graminifolia</i> , <i>V. declinans</i> , <i>V. pusilla</i> , <i>V. epidendroides</i> ; Planta completa, clorofórmio, <i>V. epidendroides</i>	(BRANCO; PINTO; BRAZ-FILHO, 2004); (PINTO; EPIFANIO; PIZZOLATTI, 1992); (PINTO; VALENTE; SILVA, 1988); (PINTO; FURTADO; GONZAGA, 1990)
111	Triterpeno (lupano)	20-hydroxylupan-3-one		C ₃₀ H ₅₀ O ₂	Planta completa, metanol, <i>V. stipitata</i> ; Planta completa, clorofórmio, <i>V. epidendroides</i> ; Planta completa, acetato de etila, <i>V. nanuzae</i> ; Planta completa, hexano, <i>V. declinans</i> , <i>V. pusilla</i> , <i>V. epidendroides</i>	(PINTO; ANTUNES; PIZZOLATTI; RUMJANEK, 1996); (PINTO; SILVA; VALENTE, 1988); (PINTO; VALENTE; SILVA, 1988); (PINTO; FURTADO; GONZAGA, 1990); (PINTO; EPIFANIO; PIZZOLATTI, 1992)
112	Triterpeno (lupano)	3-oxo-lup-20(29)-en-28-oic acid (betulonic acid)		C ₃₀ H ₄₆ O ₃	Planta completa, hexano, <i>V. epidendroides</i> ; Planta completa, clorofórmio, <i>V. epidendroides</i>	(PINTO; FURTADO; GONZAGA, 1990)
113	Triterpeno (glutinano)	3-oxo-glutin-5-en-23-oic acid		C ₃₀ H ₄₆ O ₃	Planta completa, hexano, <i>V. graminifolia</i>	(BRANCO; PINTO; BRAZ-FILHO, 2004)

114	Triterpeno (glutinano)	Glutin-5-en-3-one		C ₃₀ H ₄₈ O	Planta completa, hexano, <i>V. graminifolia</i>	(BRANCO; PINTO; BRAZ-FILHO, 2004)
115	Triterpeno (taraxerano)	11 α ,12 α -epoxy- taraxer-14-en-3-one		C ₃₀ H ₄₆ O ₂	Planta completa, etanol, <i>V. compacta</i>	(RIEHL; PINTO, 2000)
116	Triterpeno (taraxerano)	Taraxer-14-en-3-one		C ₃₀ H ₄₈ O	Planta completa, hexano, <i>V. graminifolia</i> , <i>V. piresiana</i>	(BRANCO; PINTO; BRAZ-FILHO, 2004); (PINTO; PEIXOTO; FIORANI, 1984)
117	Triterpeno (ursano)	Ursan-12-en-3,11-dione		C ₃₀ H ₄₆ O ₂	Planta completa, hexano, <i>V. graminifolia</i>	(BRANCO; PINTO; BRAZ-FILHO, 2004)

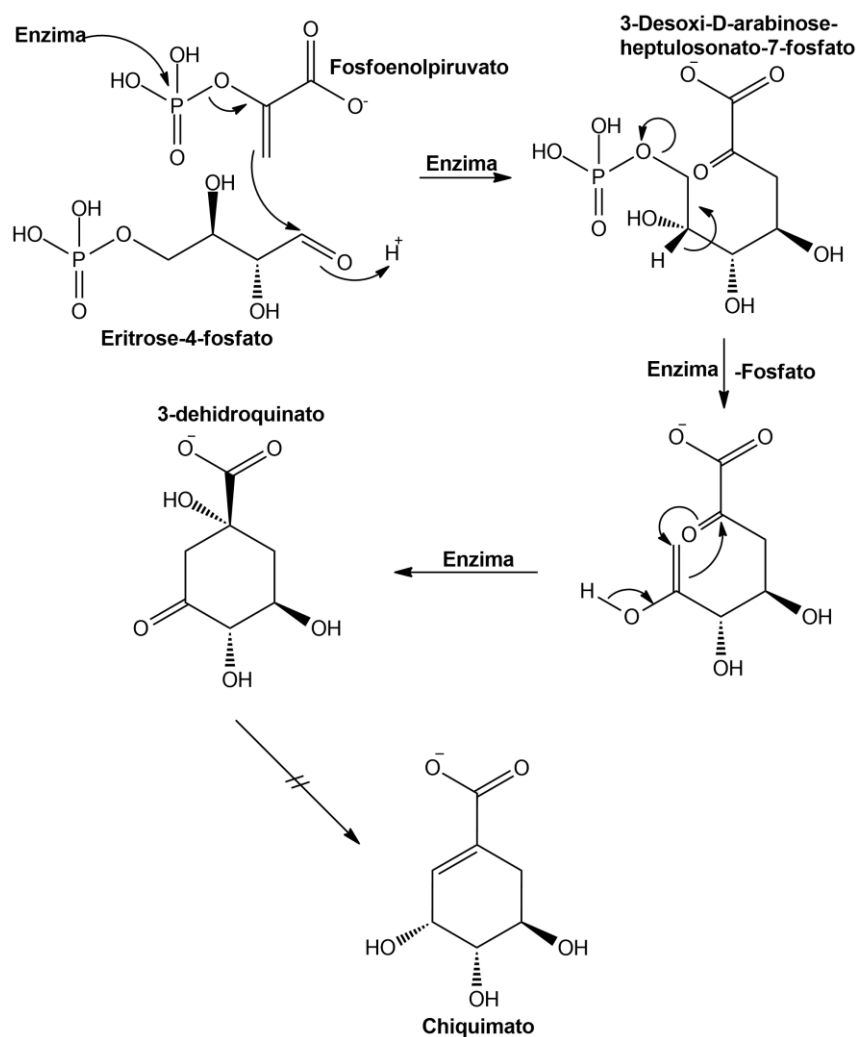
118	Triterpeno (friedelano)	Friedel-18-en-3-one		C ₃₀ H ₄₈ O	Planta completa, metanol, <i>V. stipitata</i>	(PINTO; ANTUNES; PIZZOLATTI; RUMJANEK, 1996)
119	Triterpeno (cicloartano)	24-methyl-cicloartan-25-en-3-one		C ₃₁ H ₅₀ O	Planta completa, hexano, <i>V. graminifolia</i>	(BRANCO; PINTO; BRAZ-FILHO, 2004)
120	Triterpeno (damarano)	(20R)-20-hydroxy-24-methylene-dammar-3-one (vellozone)		C ₃₁ H ₅₂ O ₂	Planta completa, clorofórmio, <i>V. epidendroides</i> ; Planta completa, hexano, <i>V. stipitata</i> , <i>V. epidendroides</i>	(PINTO; BAKER; GILBERT; PINCHIN <i>et al.</i> , 1980); (PINTO; FURTADO; GONZAGA, 1990)
121	Esteróide (ergostano)	(24R)-Ergost-5-en-3β-ol (campesterol)		C ₂₈ H ₄₈ O	Planta completa, metanol, <i>V. stipitata</i> ; Planta completa, hexano, <i>V. declinans</i>	(PINTO; ANTUNES; PIZZOLATTI; RUMJANEK, 1996); (PINTO; EPIFANIO; PIZZOLATTI, 1992)

122	Esteróide (Estigmastano)	Stigmasta-5,22- dien-3β-ol (stigmasterol)		C ₂₉ H ₄₈ O	Folhas, éter etílico, <i>V. candida</i> ; Planta completa, metanol, <i>V. stipitata</i> ; Planta completa, acetato de etila, <i>V. nanuzae</i> ; Planta completa, clorofórmio, <i>V. epidendroides</i> ; Planta completa, hexano, <i>V. piresiana</i> , <i>V. nanuzae</i> , <i>V. pusilla</i> , <i>V. epidendroides</i> , <i>V. declinans</i>	(BRANCO; PINTO; IFA; BRAZ-FILHO, 2002); (PINTO; ANTUNES; PIZZOLATTI; RUMJANEK, 1996); (PINTO; PEIXOTO; FIORANI, 1984); (PINTO; SILVA; VALENTE, 1988); (PINTO; VALENTE; SILVA, 1988); (PINTO; FURTADO; GONZAGA, 1990); (PINTO; EPIFANIO; PIZZOLATTI, 1992)
123	Esteróide (Estigmastano)	Stigmast-5-en-3β-ol (β-sitosterol)		C ₂₉ H ₅₀ O	Folhas, éter etílico, <i>V. candida</i> ; Planta completa, metanol, <i>V. stipitata</i> ; Planta completa, acetato de etila, <i>V. nanuzae</i> ; Planta completa, clorofórmio, <i>V. epidendroides</i> ; Planta completa, hexano, <i>V. piresiana</i> , <i>V. nanuzae</i> , <i>V. pusilla</i> , <i>V. epidendroides</i> , <i>V. declinans</i>	(BRANCO; PINTO; IFA; BRAZ-FILHO, 2002); (PINTO; ANTUNES; PIZZOLATTI; RUMJANEK, 1996); (PINTO; PEIXOTO; FIORANI, 1984); (PINTO; SILVA; VALENTE, 1988); (PINTO; VALENTE; SILVA, 1988); (PINTO; FURTADO; GONZAGA, 1990); (PINTO; EPIFANIO; PIZZOLATTI, 1992)

2.6.2.2 Flavonoides

Os flavonoides são compostos fenólicos de origem biossintética mista, derivando das vias do acetato (anel A) e do chiquimato (anel B). A via do chiquimato se inicia com a condensação aldólica de uma molécula de fosfoenol piruvato com uma molécula de eritrose-4-fosfato, gerando o 3-desoxi-D-arabinose-heptulosonato-7-fosfato. Em seguida ocorre-se a eliminação do grupo fosfato e a adição de uma carbonila, originando o 3-dehidroquinato. Mediante sucessivas reações de redução enzimáticas, ocorre a formação do chiquimato, conforme a rota simplificada apresentada na figura 13 (LOBO; LOURENÇO, 2007).

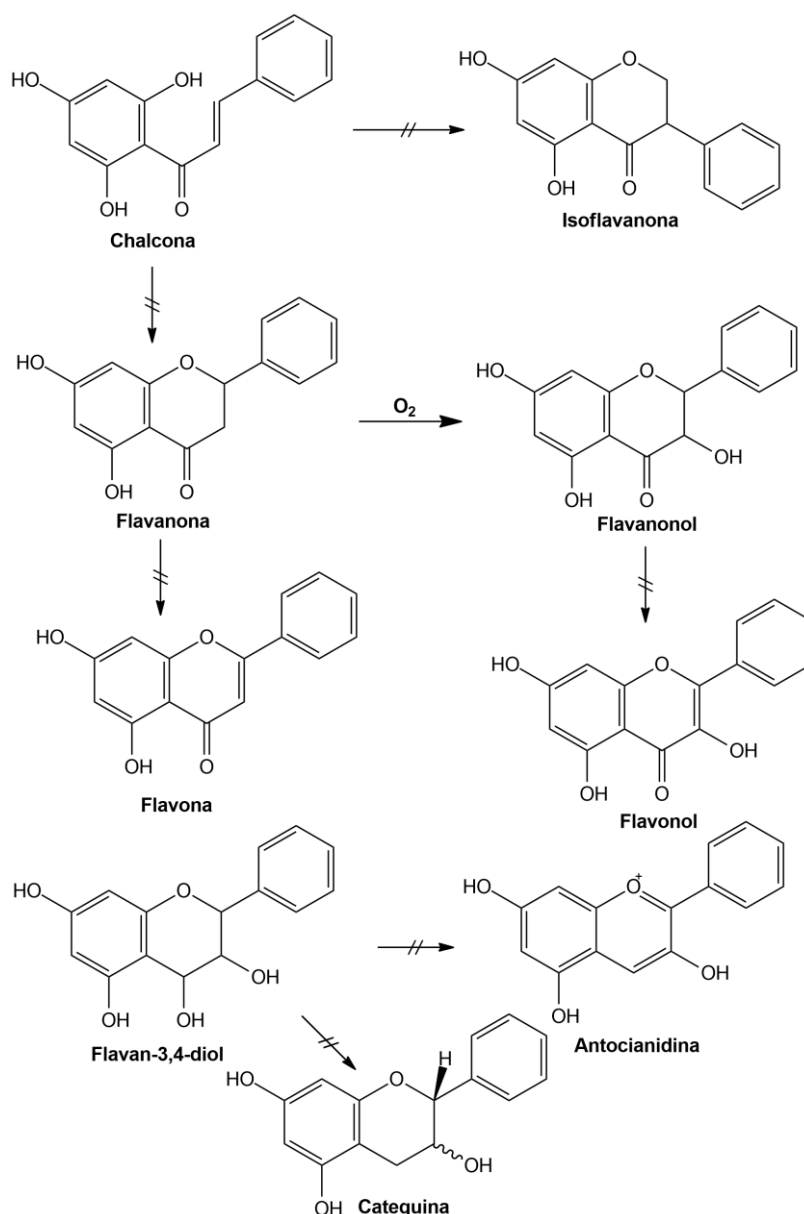
FIGURA 13 - Rota biossintética da via do chiquimato



Fonte: Produzida pelo autor, adaptado de (LOBO; LOURENÇO, 2007).

Transformações sucessivas no esqueleto do chiquimato originam o esqueleto básico dos fenilpropanóides (C_6C_3), que através da adição de moléculas de malonil-CoA, oriundas da via do acetato, originam o esqueleto da chalcona precursora dos derivados de flavonoides (DEWICK, 2002; LOBO; LOURENÇO, 2007). O esqueleto de diferentes compostos é formado de maneira sequencial por reações sucessivas catalisadas por enzimas específicas (figura 14).

FIGURA 14 - Esquema de formação sequencial dos derivados de flavonoides



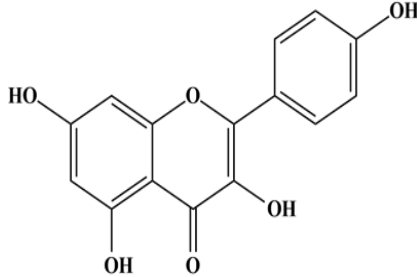
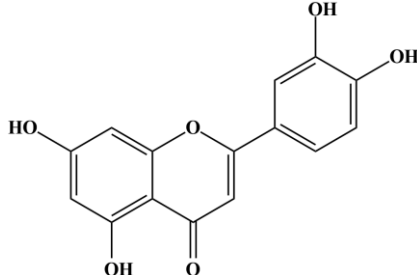
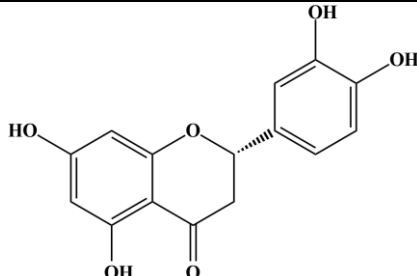
Fonte: Produzida pelo autor, adaptado de (LOBO; LOURENÇO, 2007).

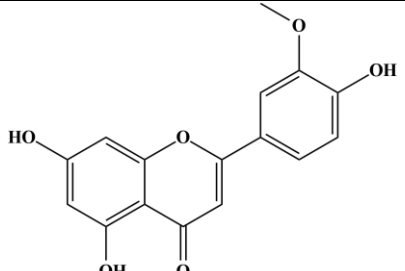
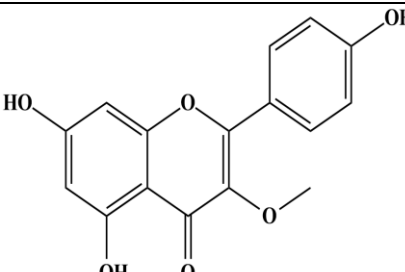
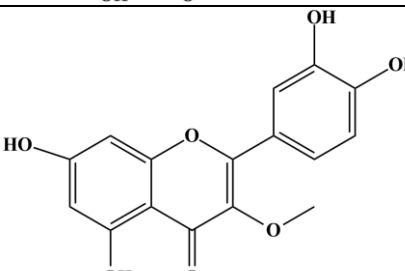
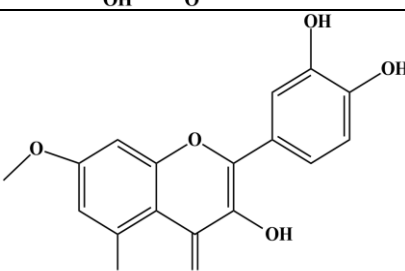
De acordo com Koirala *et al* (2016), as modificações posteriores que acontecem no esqueleto estrutural básico dos flavonoides, tais como hidroxilações, metilações,

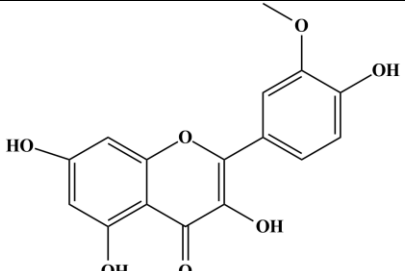
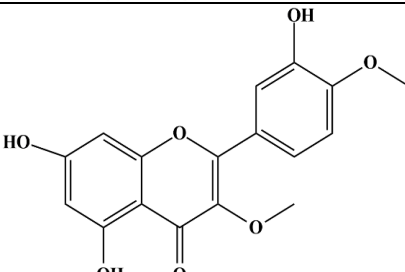
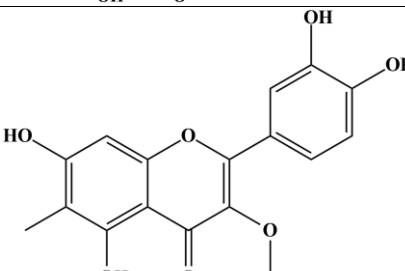
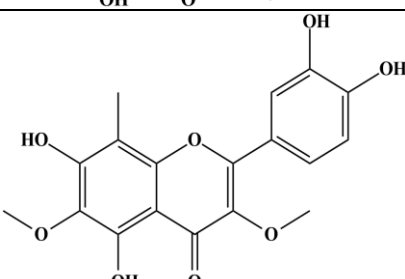
prenilações, oxidações e glicosilações são catalisadas por enzimas regioespecíficas que acabam conferindo uma ampla diversidade estrutural para a classe dos flavonoides.

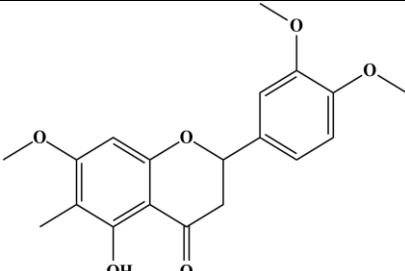
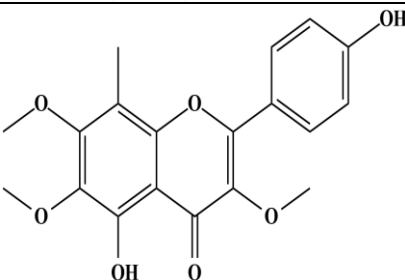
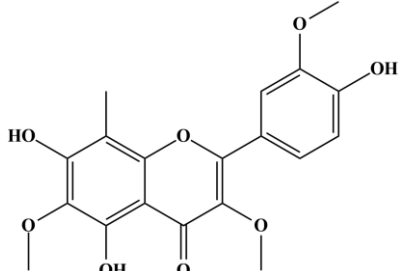
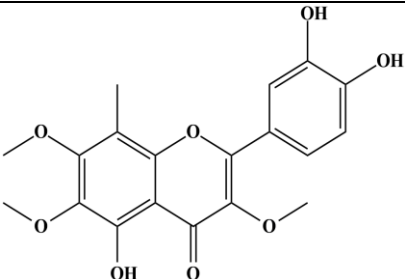
O levantamento resultou na identificação de 59 flavonoides isolados das espécies de *Vellozia*. Eles estão divididos entre flavonols, flavonas e flavanonas, possuindo derivados simples, C-metilados, O-metilados, C-glicosilados, O-glicosilados, prenilados e uma flavolignana, apresentados na tabela 2.

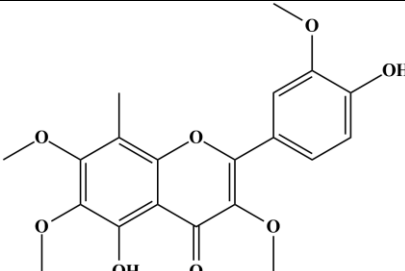
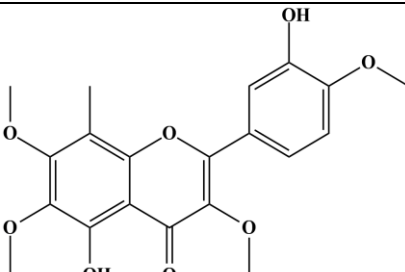
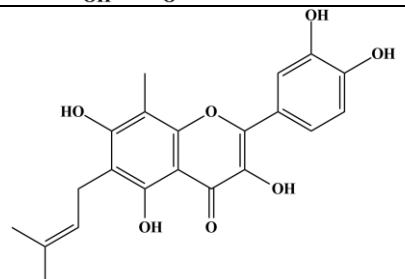
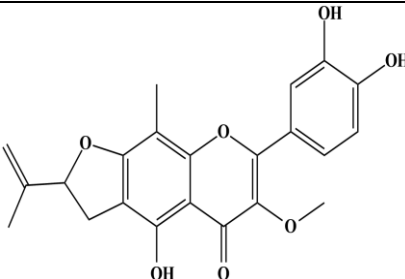
TABELA 2 - Flavonoides isolados de espécies de *Vellozia*

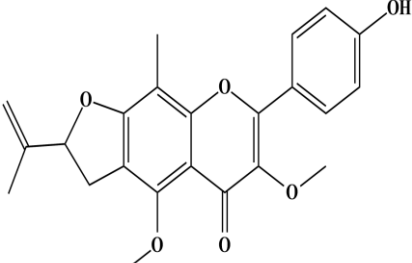
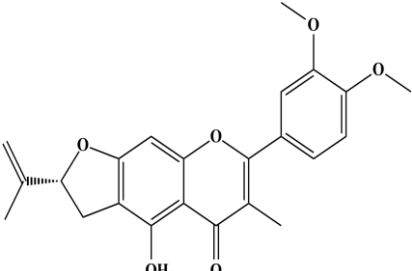
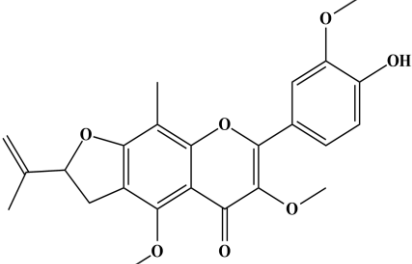
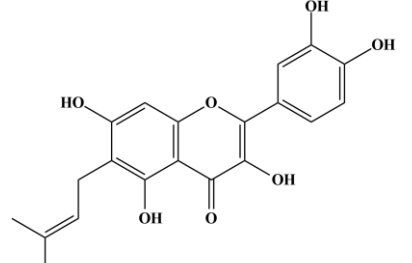
Número	Classe	Composto	Estrutura	Fórmula	Parte, solvente e espécie	Referência
124	Flavonoide simples (flavonol)	5,7,4'-trihydroxyflavonol (kaempferol)		C ₁₅ H ₁₀ O ₆	Folhas, 80% metanol, V. aff. <i>scoparia</i>	(HARBORNE; WILLIAMS; GREENHAM; EAGLES, 1994)
125	Flavonoide simples (flavona)	5,7,3',4'-tetrahydroxyflavone (luteolin)		C ₁₅ H ₁₀ O ₆	Folhas, 80% metanol, V. aff. <i>scoparia</i> , V. <i>phalocarpa</i> , V. <i>lilacina</i> , V. aff. <i>epidendroides</i>	(HARBORNE; WILLIAMS; GREENHAM; EAGLES, 1994); (WILLIAMS; GREENHAM; HARBORNE; EAGLES <i>et al.</i> , 1992)
126	Flavonoide simples (flavanona)	5,7,3',4'-tetrahydroxyflavanone (eriodictyol)		C ₁₅ H ₁₂ O ₆	Folhas, 80% metanol, V. <i>phalocarpa</i>	(HARBORNE; WILLIAMS; GREENHAM; EAGLES, 1994)

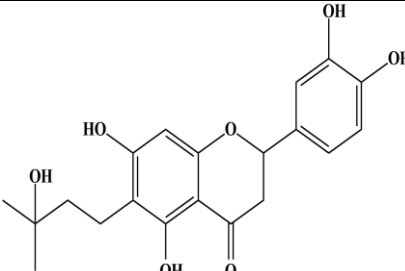
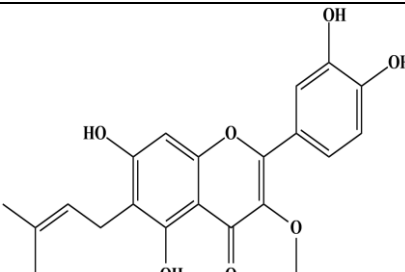
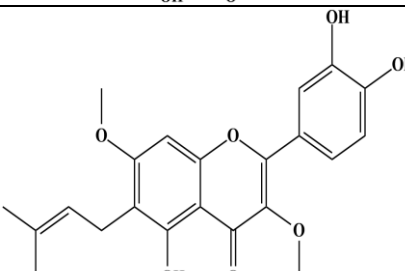
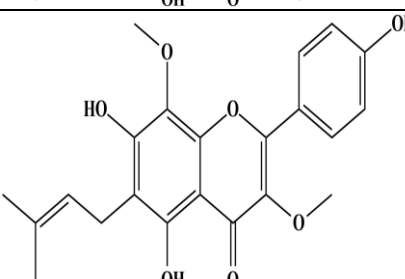
127	Flavonoide O-metilado (flavona)	5,7,4'-trihydroxy-3'-methoxyflavone (chrysoeriol)		C ₁₆ H ₁₂ O ₆	Folhas, 80% metanol, <i>V. aff. scoparia</i> , <i>V. phalocarpa</i>	(HARBORNE; WILLIAMS; GREENHAM; EAGLES, 1994)
128	Flavonoide O-metilado (flavonol)	Kaempferol 3-methyl ether		C ₁₆ H ₁₂ O ₆	Superfície das folhas, acetona, <i>V. aff. scoparia</i>	(HARBORNE; WILLIAMS; GREENHAM; EAGLES, 1994)
129	Flavonoide O-metilado (flavonol)	Quercetin 3-methyl ether		C ₁₆ H ₁₂ O ₇	Folhas, 80% metanol, <i>V. streptophylla</i>	(HARBORNE; GREENHAM; WILLIAMS; EAGLES <i>et al.</i> , 1992)
130	Flavonoide O-metilado (flavonol)	Quercetin 7-methyl ether (rhamnetin)		C ₁₆ H ₁₂ O ₇	Superfície das folhas, acetona, <i>V. streptophylla</i>	(HARBORNE; GREENHAM; WILLIAMS; EAGLES <i>et al.</i> , 1992)

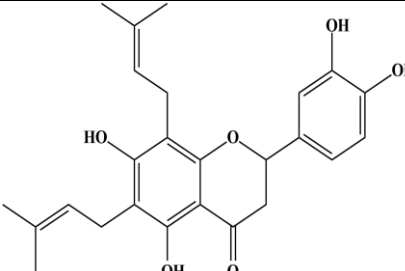
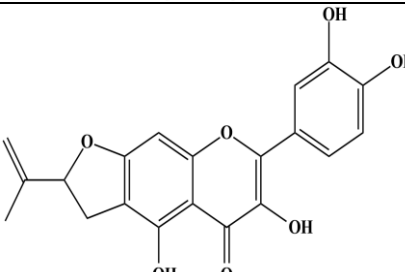
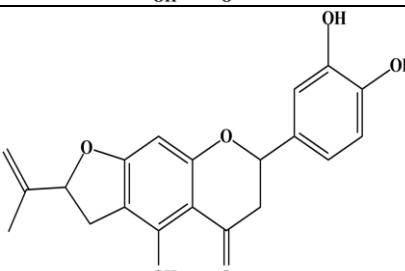
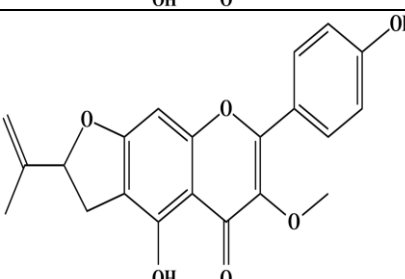
131	Flavonoide O-metilado (flavonol)	Quercetin 3'-methyl ether (isorhamnetin)		C ₁₆ H ₁₂ O ₇	Superfície das folhas, acetona, <i>V. streptophylla</i>	(HARBORNE; GREENHAM; WILLIAMS; EAGLES <i>et al.</i> , 1992)
132	Flavonoide O-metilado (flavonol)	Quercetin 3,4'-dimethyl ether		C ₁₇ H ₁₄ O ₇	Folhas, 80% metanol, <i>V. streptophylla</i>	(HARBORNE; GREENHAM; WILLIAMS; EAGLES <i>et al.</i> , 1992)
133	Flavonoide O- e C-metilado (flavonol)	6-C-methylquercetin 3-methyl ether		C ₁₇ H ₁₄ O ₇	Folhas, 80% metanol, <i>V. phalocarpa</i>	(HARBORNE; WILLIAMS; GREENHAM; EAGLES, 1994)
134	Flavonoide O- e C-metilado (flavonol)	8-C-methylquercetagenin 3,6-dimethyl ether		C ₁₈ H ₁₆ O ₈	Folhas, éter etílico, <i>V. cândida</i>	(BRANCO; PINTO; IFA; BRAZ-FILHO, 2002)

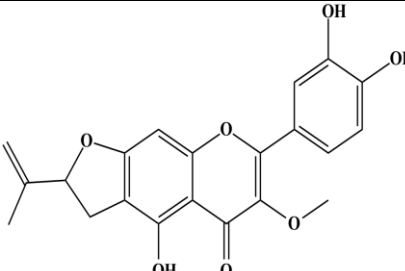
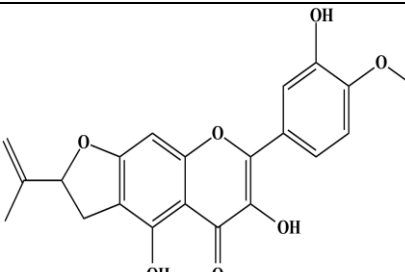
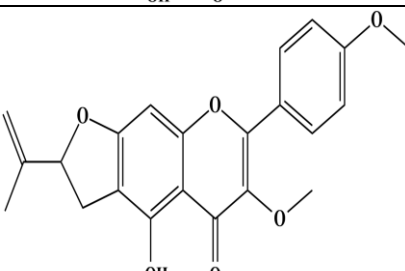
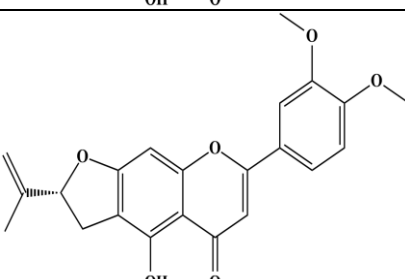
135	Flavonoide O- e C-metilado (flavanona)	6-C-methylepidictyol 7,3',4'-trimethyl ether	 <p>The structure shows a flavanone core with a methoxy group at C-6, a methyl group at C-7, and a 3,4,5-trimethoxyphenyl group at C-2.</p>	C ₁₉ H ₂₀ O ₆	Superfície das folhas, acetona, <i>V. nanuzae</i>	(HARBORNE; GREENHAM; WILLIAMS; EAGLES <i>et al.</i> , 1993)
136	Flavonoide O- e C-metilado (flavonol)	8-C-methyl-6-hydroxykaempferol 3,6,7-trimethyl ether	 <p>The structure shows a flavonol core with a methyl group at C-8, a hydroxyl group at C-6, and 3,6,7-trimethoxy groups on the A-ring.</p>	C ₁₉ H ₁₈ O ₇	Folhas, 80% metanol, <i>V. nanuzae</i> ; Superfície das folhas, acetona, <i>V. laevis</i>	(HARBORNE; GREENHAM; WILLIAMS; EAGLES <i>et al.</i> , 1993); (HARBORNE; WILLIAMS; GREENHAM; EAGLES, 1994)
137	Flavonoide O- e C-metilado (flavonol)	8-C-methylquercetagenin 3,6,3'-trimethyl ether	 <p>The structure shows a flavonol core with a methyl group at C-8, a hydroxyl group at C-6, and 3,6,3'-trimethoxy groups on the A-ring.</p>	C ₁₉ H ₁₈ O ₈	Folhas, 80% metanol, <i>V. nanuzae</i>	(HARBORNE; GREENHAM; WILLIAMS; EAGLES <i>et al.</i> , 1993)
138	Flavonoide O- e C-metilado (flavonol)	8-C-methylquercetagenin 3,6,7-trimethyl ether	 <p>The structure shows a flavonol core with a methyl group at C-8, a hydroxyl group at C-6, and 3,6,7-trimethoxy groups on the A-ring.</p>	C ₁₉ H ₁₈ O ₈	Folhas, éter etílico, <i>V. candida</i> ; Folhas, 80% metanol, <i>V. nanuzae</i> , <i>V. laevis</i> , <i>V. lilacina</i> , <i>V. aff. epidendroides</i>	(BRANCO; PINTO; IFA; BRAZ-FILHO, 2002); (HARBORNE; GREENHAM; WILLIAMS; EAGLES <i>et al.</i> , 1993); (HARBORNE; WILLIAMS; GREENHAM; EAGLES, 1994); (WILLIAMS; GREENHAM; HARBORNE; EAGLES <i>et al.</i> , 1992)

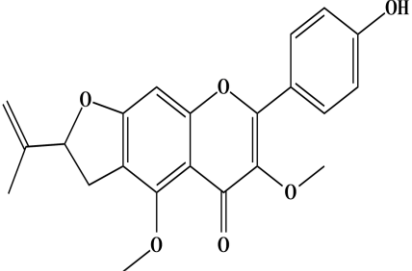
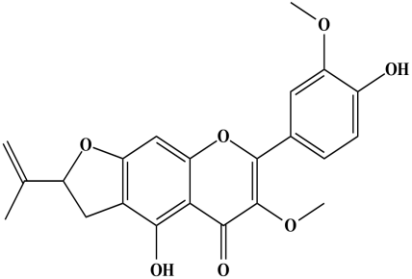
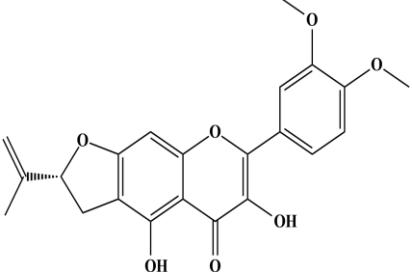
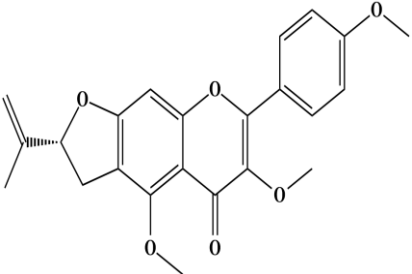
139	Flavonoide O- e C-metilado (flavonol)	8-C-methylquercetagenin 3,6,7,3'-tetramethyl ether		C ₂₀ H ₂₀ O ₈	Folhas, 80% metanol, <i>V. stipitata</i> , <i>V. laevis</i> , <i>V. lilacina</i> , <i>V. aff. epidendroides</i>	(HARBORNE; WILLIAMS; GREENHAM; EAGLES, 1994); (WILLIAMS; GREENHAM; HARBORNE; EAGLES <i>et al.</i> , 1992); (WILLIAMS; HARBORNE; GREENHAM; EAGLES <i>et al.</i> , 1993)
140	Flavonoide O- e C-metilado (flavonol)	8-C-methylquercetagenin 3,6,7,4'-tetramethyl ether		C ₂₀ H ₂₀ O ₈	Folhas, 80% metanol, <i>V. nanuzae</i> ; Superfície das folhas, acetona, <i>V. laevis</i> , <i>V. phalocarpa</i>	(HARBORNE; GREENHAM; WILLIAMS; EAGLES <i>et al.</i> , 1993); (HARBORNE; WILLIAMS; GREENHAM; EAGLES, 1994)
141	Flavonoide C-metilado e prenilado (flavonol)	8-C-methyl-6-prenylquercetin		C ₂₁ H ₂₀ O ₇	Folhas e bainhas, acetato de etila, <i>V. kolbekii</i>	(SILVA; CARVALHO; HAMERSKI; CASTRO <i>et al.</i> , 2012)
142	Flavonoide C- e O-metilado e prenilado (flavonol)	8-C-methylvelloquercetin 3-methyl ether		C ₂₂ H ₂₀ O ₇	Folhas, 80% metanol, <i>V. stipitata</i>	(WILLIAMS; HARBORNE; GREENHAM; EAGLES <i>et al.</i> , 1993)

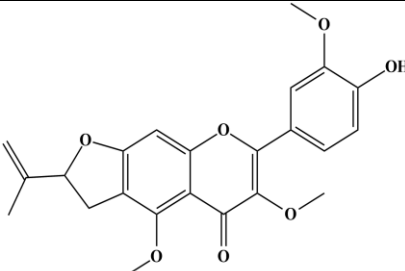
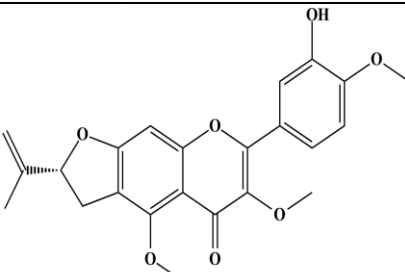
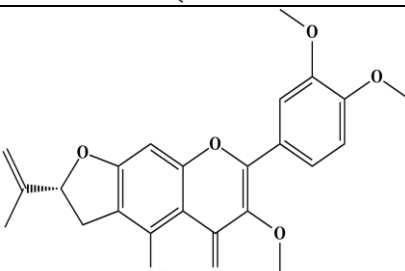
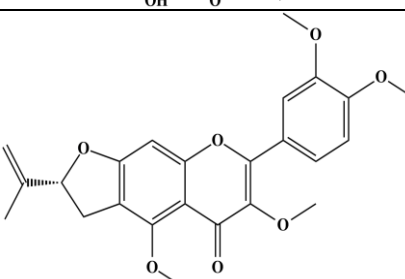
143	Flavonoide C- e O-metilado e prenilado (flavonol)	8-C-methylvellokaempferol 3,5-dimethyl ether		C ₂₃ H ₂₂ O ₆	Folhas, 80% metanol, <i>V. stipitata</i>	(WILLIAMS; HARBORNE; GREENHAM; EAGLES <i>et al.</i> , 1993)
144	Flavonoide C- e O-metilado e prenilado (flavona)	2''-isopropenyl-dihydrofurano (4'',5'':6,7) 3-C-methyluteolin 3',4'-dimethyl ether (3-C-methylvelloluteolin 3',4'-dimethyl ether)		C ₂₃ H ₂₂ O ₆	Raízes, caule e bainhas, hexano, <i>V. graminifolia</i>	(BRANCO; PINTO; BRAZ-FILHO, 2004)
145	Flavonoide C- e O-metilado e prenilado (flavonol)	8-C-methylvelloquercetin 3,5,3'-trimethyl ether		C ₂₄ H ₂₄ O ₇	Folhas, 80% metanol, <i>V. stipitata</i>	(WILLIAMS; HARBORNE; GREENHAM; EAGLES <i>et al.</i> , 1993)
146	Flavonoide prenilado (flavonol)	6-prenylquercetin		C ₂₀ H ₁₈ O ₇	Folhas e bainhas, acetato de etila, <i>V. kolbekii</i>	(SILVA; CARVALHO; HAMERSKI; CASTRO <i>et al.</i> , 2012)

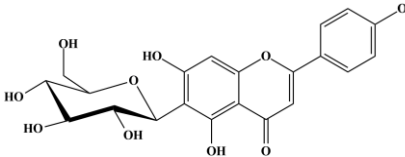
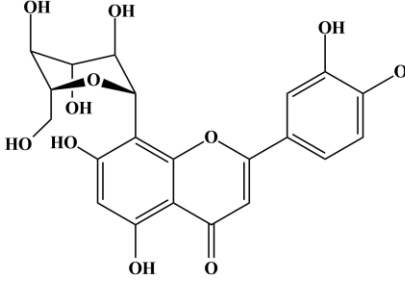
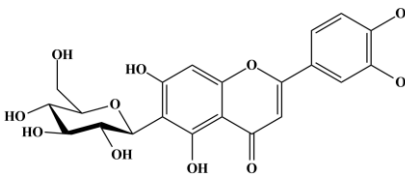
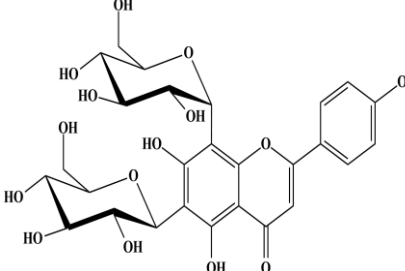
147	Flavonoide prenilado (flavanona)	6-(3-hydroxyisopentanyl)erio dictyol		C ₂₀ H ₂₂ O ₇	Superfície das folhas, acetona, <i>V. nanuzae</i>	(HARBORNE; GREENHAM; WILLIAMS; EAGLES <i>et al.</i> , 1993)
148	Flavonoide O-metilado e prenilado (flavonol)	6-prenylquercetin 3-methyl ether		C ₂₁ H ₂₀ O ₇	Superfície das folhas, acetona, <i>V. nanuzae</i> , <i>V. coronata</i>	(HARBORNE; GREENHAM; WILLIAMS; EAGLES <i>et al.</i> , 1993)
149	Flavonoide O-metilado e prenilado (flavonol)	6-prenylquercetin 3,7-dimethyl ether		C ₂₂ H ₂₂ O ₇	Superfície das folhas, acetona, <i>V. coronata</i>	(HARBORNE; GREENHAM; WILLIAMS; EAGLES <i>et al.</i> , 1993)
150	Flavonoide O-metilado e prenilado (flavonol)	6-prenylherbacetin 3,8-dimethyl ether		C ₂₂ H ₂₂ O ₇	Superfície das folhas, acetona, <i>V. aff. scoparia</i>	(HARBORNE; WILLIAMS; GREENHAM; EAGLES, 1994)

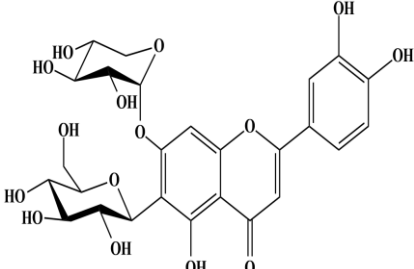
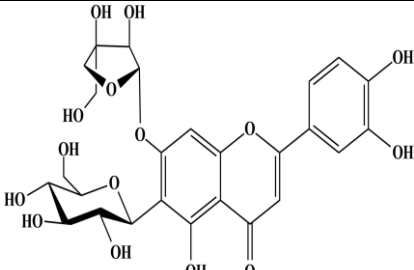
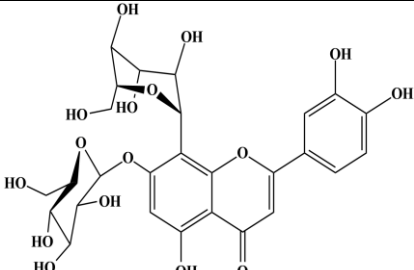
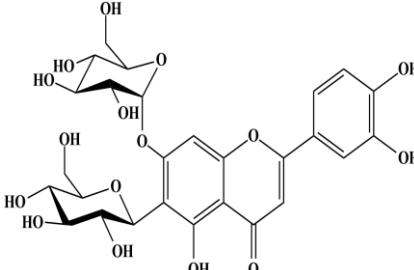
151	Flavonoide prenilado (flavanona)	6,8-diprenyleriodictyol		C ₂₅ H ₂₈ O ₆	Superfície das folhas, acetona, <i>V. nanuzae</i> , <i>V. coronata</i>	(HARBORNE; GREENHAM; WILLIAMS; EAGLES <i>et al.</i> , 1993)
152	Flavonoide prenilado (flavonol)	2''-isopropenyl-dihidrofurano (4'',5'':6,7) quercetin (velloquercetin)		C ₂₀ H ₁₆ O ₇	Superfície das folhas, acetona, <i>V. streptophylla</i>	(HARBORNE; GREENHAM; WILLIAMS; EAGLES <i>et al.</i> , 1992)
153	Flavonoide prenilado (flavanona)	2''-isopropenyl-dihidrofurano (4'',5'':6,7) eriodictyol (velloeriodictyol)		C ₂₀ H ₁₈ O ₆	Superfície das folhas, acetona, <i>V. glabra</i>	(HARBORNE; GREENHAM; WILLIAMS; EAGLES <i>et al.</i> , 1993)
154	Flavonoide O-metilado e prenilado (flavonol)	Vellokaempferol 3-methyl ether		C ₂₁ H ₁₈ O ₆	Superfície das folhas, acetona, <i>V. stipitata</i>	(HARBORNE; GREENHAM; WILLIAMS; EAGLES <i>et al.</i> , 1992)

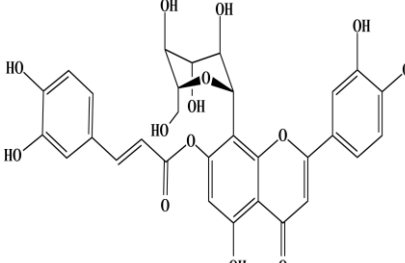
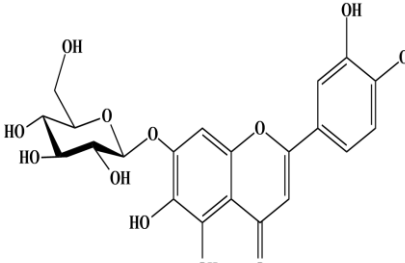
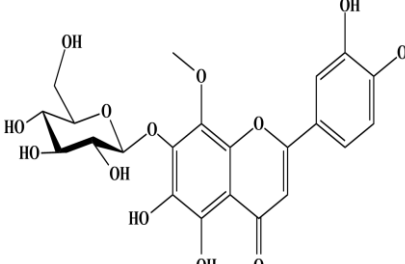
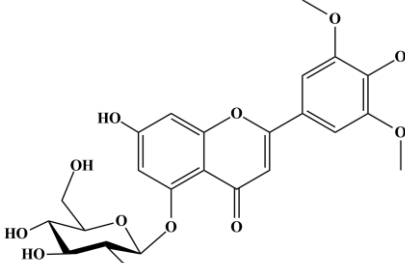
155	Flavonoide O-metilado e prenilado (flavonol)	Velloquercetin 3-methyl ether		C ₂₁ H ₁₈ O ₇	Folhas, 80% metanol, <i>V. stipitata</i>	(WILLIAMS; HARBORNE; GREENHAM; EAGLES <i>et al.</i> , 1993)
156	Flavonoide O-metilado e prenilado (flavonol)	Velloquercetin 4'-methyl ether		C ₂₁ H ₁₈ O ₇	Superfície das folhas, acetona, <i>V. streptophylla</i>	(HARBORNE; GREENHAM; WILLIAMS; EAGLES <i>et al.</i> , 1992)
157	Flavonoide O-metilado e prenilado (flavonol)	Vellokaempferol 3,4'-dimethyl ether		C ₂₂ H ₂₀ O ₆	Superfície das folhas, acetona, <i>V. stipitata</i>	(HARBORNE; GREENHAM; WILLIAMS; EAGLES <i>et al.</i> , 1992)
158	Flavonoide O-metilado e prenilado (flavona)	Velloluteolin 3',4'-dimethyl ether		C ₂₂ H ₂₀ O ₆	Raízes, caule e bainhas, hexano, <i>V. graminifolia</i>	(BRANCO; PINTO; BRAZ-FILHO, 2004)

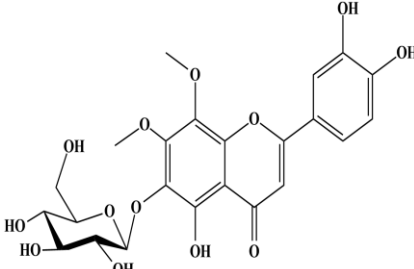
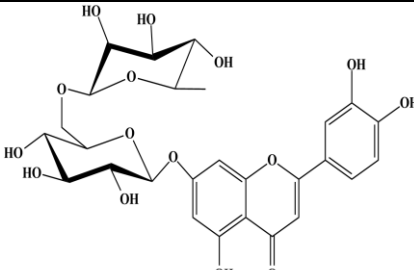
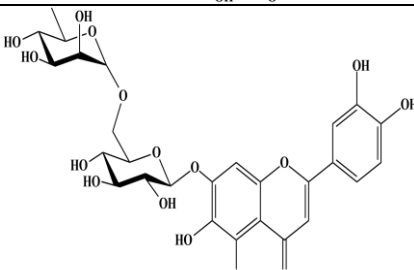
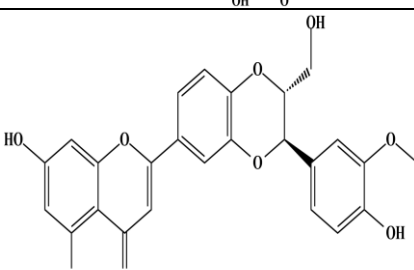
159	Flavonoide O-metilado e prenilado (flavonol)	Vellokaempferol 3,5-dimethyl ether			Folhas, 80% metanol, <i>V. stipitata</i>	(WILLIAMS; HARBORNE; GREENHAM; EAGLES <i>et al.</i> , 1993)
160	Flavonoide O-metilado e prenilado (flavonol)	Velloquercetin 3,3'-dimethyl ether		C ₂₂ H ₂₀ O ₇	Folhas, 80% metanol, <i>V. stipitata</i> ; Superfície das folhas, acetona, <i>V. stipitata</i> , <i>V. laevis</i>	(HARBORNE; GREENHAM; WILLIAMS; EAGLES <i>et al.</i> , 1992); (HARBORNE; WILLIAMS; GREENHAM; EAGLES, 1994); (WILLIAMS; HARBORNE; GREENHAM; EAGLES <i>et al.</i> , 1993)
161	Flavonoide O-metilado e prenilado (flavonol)	Velloquercetin 3',4'-dimethyl ether		C ₂₂ H ₂₀ O ₇	Planta completa, hexano, <i>V. graminifolia</i> ; Planta completa, acetato de etila, <i>V. graminifolia</i>	(BRANCO; BRAZ-FILHO; KAISER; PINTO, 1998); (BRANCO; PEREIRA; CARDOSO; DE NETO <i>et al.</i> , 2001)
162	Flavonoide O-metilado e prenilado (flavonol)	Vellokaempferol 3,5,4'-trimethyl ether		C ₂₃ H ₂₂ O ₆	Raízes, caule e bainhas, acetato de etila, <i>V. graminifolia</i>	(BRANCO; PEREIRA; CARDOSO; DE NETO <i>et al.</i> , 2001); (BRANCO; PINTO; BRAZ-FILHO, 2004)

163	Flavonoide O-metilado e prenilado (flavonol)	Velloquercetin 3,5,3'-trimethyl ether	 <p>The structure shows a flavonol core with a prenyl group at C-7, a methoxy group at C-3, and methoxy groups at C-5 and C-3'.</p>	C ₂₃ H ₂₂ O ₇	Folhas, 80% metanol, <i>V. stipitata</i>	(WILLIAMS; HARBORNE; GREENHAM; EAGLES <i>et al.</i> , 1993)
164	Flavonoide O-metilado e prenilado (flavonol)	Velloquercetin 3,5,4'-trimethyl ether	 <p>The structure shows a flavonol core with a prenyl group at C-7, a methoxy group at C-3, and methoxy groups at C-5 and C-4'.</p>	C ₂₃ H ₂₂ O ₇	Raízes, caule e bainhas, acetato de etila, <i>V. graminifolia</i>	(BRANCO; PEREIRA; CARDOSO; DE NETO <i>et al.</i> , 2001); (BRANCO; PINTO; BRAZ-FILHO, 2004)
165	Flavonoide O-metilado e prenilado (flavonol)	Velloquercetin 3,3',4'-trimethyl ether	 <p>The structure shows a flavonol core with a prenyl group at C-7, a hydroxyl group at C-3, and methoxy groups at C-3' and C-4'.</p>	C ₂₃ H ₂₂ O ₇	Planta completa, hexano, <i>V. graminifolia</i> ; Planta completa, acetato de etila, <i>V. graminifolia</i> ; Superfície das folhas, acetona, <i>V. stipitata</i>	(BRANCO; BRAZ-FILHO; KAISER; PINTO, 1998); (BRANCO; PEREIRA; CARDOSO; DE NETO <i>et al.</i> , 2001); (HARBORNE; GREENHAM; WILLIAMS; EAGLES <i>et al.</i> , 1992)
166	Flavonoide O-metilado e prenilado (flavonol)	Velloquercetin 3,5,3',4'-tetramethyl ether	 <p>The structure shows a flavonol core with a prenyl group at C-7, a methoxy group at C-3, and methoxy groups at C-5, C-3', and C-4'.</p>	C ₂₄ H ₂₄ O ₇	Raízes, caule e bainhas, acetato de etila, <i>V. graminifolia</i>	(BRANCO; PEREIRA; CARDOSO; DE NETO <i>et al.</i> , 2001); (BRANCO; PINTO; BRAZ-FILHO, 2004)

167	Flavonoide C-glicosilado (flavona)	Apigenin 6-glucoside (isovitexin)		C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	Superfície das folhas, acetona, <i>V. aff. scoparia</i>	(HARBORNE; WILLIAMS; GREENHAM; EAGLES, 1994)
168	Flavonoide C-glicosilado (flavona)	Luteolin 8-glucoside (orientin)		C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	Folhas, 80% metanol, <i>V. streptophylla</i> , <i>V. coronata</i> , <i>V. glabra</i> , <i>V. laevis</i> , <i>V. phalocarpa</i> , <i>V. lilacina</i> , <i>V. aff. epidendroides</i> , <i>V. aff. scoparia</i>	(HARBORNE; GREENHAM; WILLIAMS; EAGLES <i>et al.</i> , 1992); (HARBORNE; GREENHAM; WILLIAMS; EAGLES <i>et al.</i> , 1993); (HARBORNE; WILLIAMS; GREENHAM; EAGLES, 1994); (WILLIAMS; GREENHAM; HARBORNE; EAGLES <i>et al.</i> , 1992)
169	Flavonoide C-glicosilado (flavona)	Luteolin 6-glucoside (iso-orientin)		C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	Folhas, 80% metanol, <i>V. streptophylla</i> , <i>V. coronata</i> , <i>V. glabra</i> , <i>V. laevis</i> , <i>V. phalocarpa</i> , <i>V. lilacina</i> , <i>V. aff. epidendroides</i> , <i>V. aff. scoparia</i> , <i>V. stipitata</i>	(HARBORNE; GREENHAM; WILLIAMS; EAGLES <i>et al.</i> , 1992); (HARBORNE; GREENHAM; WILLIAMS; EAGLES <i>et al.</i> , 1993); (HARBORNE; WILLIAMS; GREENHAM; EAGLES, 1994); (WILLIAMS; GREENHAM; HARBORNE; EAGLES <i>et al.</i> , 1992); (WILLIAMS; HARBORNE; GREENHAM; EAGLES <i>et al.</i> , 1993)
170	Flavonoide C-glicosilado (flavona)	Apigenin 6,8-diglucoside (vicenin-2)		C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	Folhas, 80% metanol, <i>V. stipitata</i>	(WILLIAMS; HARBORNE; GREENHAM; EAGLES <i>et al.</i> , 1993)

171	Flavonoide C- e O-glicosilado (flavona)	Iso-orientin 7-xyloside		C ₂₆ H ₂₈ O ₁₅	Folhas, 80% metanol, <i>V. glabra</i>	(HARBORNE; GREENHAM; WILLIAMS; EAGLES <i>et al.</i> , 1993)
172	Flavonoide C- e O-glicosilado (flavona)	Iso-orientin 7-apioside		C ₂₆ H ₂₈ O ₁₅	Folhas, 80% metanol, <i>V. glabra</i> , <i>V. laevis</i> , <i>V. phalocarpa</i> , <i>V. lilacina</i> , <i>V. aff. epidendroides</i> , <i>V. streptophylla</i>	(HARBORNE; GREENHAM; WILLIAMS; EAGLES <i>et al.</i> , 1992); (HARBORNE; GREENHAM; WILLIAMS; EAGLES <i>et al.</i> , 1993); (HARBORNE; WILLIAMS; GREENHAM; EAGLES, 1994); (WILLIAMS; GREENHAM; HARBORNE; EAGLES <i>et al.</i> , 1992)
173	Flavonoide C- e O-glicosilado (flavona)	Orientin 7-glucoside		C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	Folhas, 80% metanol, <i>V. streptophylla</i>	(HARBORNE; GREENHAM; WILLIAMS; EAGLES <i>et al.</i> , 1992)
174	Flavonoide C- e O-glicosilado (flavona)	Iso-orientin 7-glucoside		C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	Folhas, 80% metanol, <i>V. glabra</i> , <i>V. coronata</i> , <i>V. phalocarpa</i> , <i>V. stipitata</i> , <i>V. aff. scoparia</i> , <i>V. streptophylla</i>	(HARBORNE; GREENHAM; WILLIAMS; EAGLES <i>et al.</i> , 1992); (HARBORNE; GREENHAM; WILLIAMS; EAGLES <i>et al.</i> , 1993); (HARBORNE; WILLIAMS; GREENHAM; EAGLES, 1994); (WILLIAMS; GREENHAM; HARBORNE; EAGLES <i>et al.</i> , 1993)

175	Flavonoide O-glicosilado (flavona)	Orientin 7-caffeate		$C_{30}H_{26}O_{14}$	Folhas, 80% metanol, <i>V. laevis</i> , <i>V. aff. scoparia</i>	(HARBORNE; WILLIAMS; GREENHAM; EAGLES, 1994)
176	Flavonoide O-glicosilado (flavona)	6-hydroxyluteolin 7-glucoside		$C_{21}H_{20}O_{12}$	Folhas, 80% metanol, <i>V. nanuzae</i>	(HARBORNE; GREENHAM; WILLIAMS; EAGLES <i>et al.</i> , 1993)
177	Flavonoide O-glicosilado e O-metilado (flavona)	Pleurostimin 7-glucoside		$C_{22}H_{22}O_{13}$	Folhas, 80% metanol, <i>V. nanuzae</i>	(HARBORNE; GREENHAM; WILLIAMS; EAGLES <i>et al.</i> , 1993)
178	Flavonoide O-glicosilado e O-metilado (flavona)	Tricin 5-glucoside		$C_{23}H_{24}O_{12}$	Folhas, 80% metanol, <i>V. glabra</i> , <i>V. coronata</i> , <i>V. lilacina</i> , <i>V. aff. epidendroides</i>	(HARBORNE; GREENHAM; WILLIAMS; EAGLES <i>et al.</i> , 1993); (WILLIAMS; GREENHAM; HARBORNE; EAGLES <i>et al.</i> , 1992)

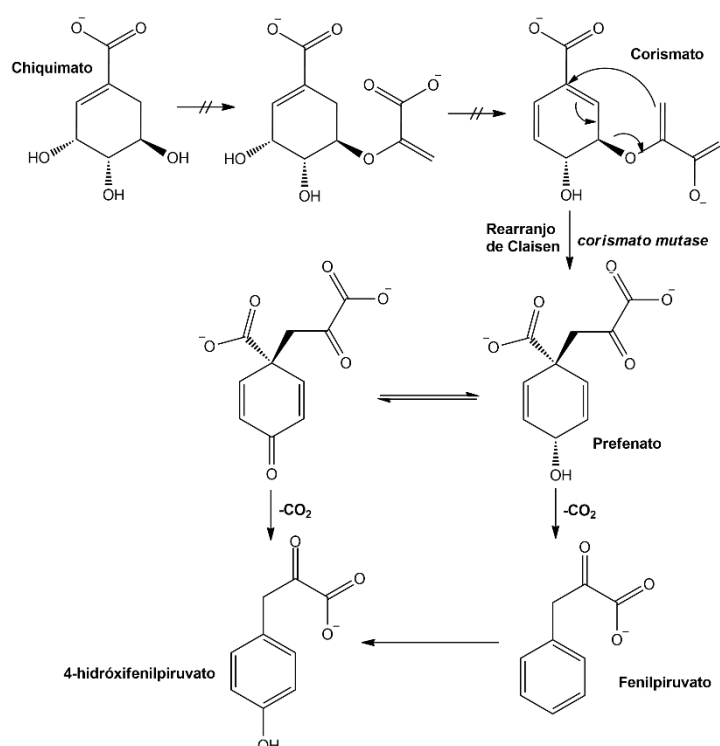
179	Flavonoide O-glicosilado e O-metilado (flavona)	Pleurostimin 7-methyl ether 6-glucoside		C ₂₃ H ₂₄ O ₁₃	Folhas, 80% metanol, <i>V. nanuzae</i>	(HARBORNE; GREENHAM; WILLIAMS; EAGLES <i>et al.</i> , 1993)
180	Flavonoide O-glicosilado (flavona)	Luteolin 7-rutinoside		C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	Folhas, 80% metanol, <i>V. aff. scoparia</i>	(HARBORNE; WILLIAMS; GREENHAM; EAGLES, 1994)
181	Flavonoide O-glicosilado (flavona)	6-hydroxyluteolin 7-rhamnosylglucoside		C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	Folhas, 80% metanol, <i>V. nanuzae</i>	(HARBORNE; GREENHAM; WILLIAMS; EAGLES <i>et al.</i> , 1993)
182	Flavolignana (flavona)	Hydnocarpin D		C ₂₅ H ₁₇ O ₉	Caule, 96% metanol, <i>V. variabilis</i>	(FLAUZINO; TOZATTI; SEQUEIRA; ANDRADE E SILVA <i>et al.</i> , 2015); (FLAUZINO; TOZATTI; SAMPAIO; BADOCO <i>et al.</i> , 2017)

É possível notar que as espécies do gênero *Vellozia* apresentam flavonoides característicos derivados de flavonoides comuns, como a quercetina (Velloquercetina, substâncias 152 e 163 [exemplos], tabela 2), kaempferol (Vellokaempferol, substâncias 143 e 154 [exemplos], tabela 2) e luteolina (Velloluteolina, substâncias 144 e 158 [exemplos], tabela 2). Esses derivados são exclusivos do gênero e facilmente identificáveis pela presença do grupo isoprenila formando um anel do tipo furano como substituintes em C-6 e C-7.

2.6.2.3 Demais classes

Além dos grupos já citados, o levantamento de substâncias na literatura resultou na identificação de outras substâncias de grupos minoritários, como os ácidos fenólicos e estilbenos, que derivam da via do chiquimato, assim como os flavonoides. A biossíntese de ambos os compostos ocorre pelos intermediários de esqueleto C_6C_3 (fenilpropanóides), que se inicia através da transformação do chiquimato em fenilpiruvato e em 4-hidróxifenilpiruvato (figura 15).

FIGURA 15 - Biossíntese do fenilpiruvato e do 4-hidróxifenilpiruvato

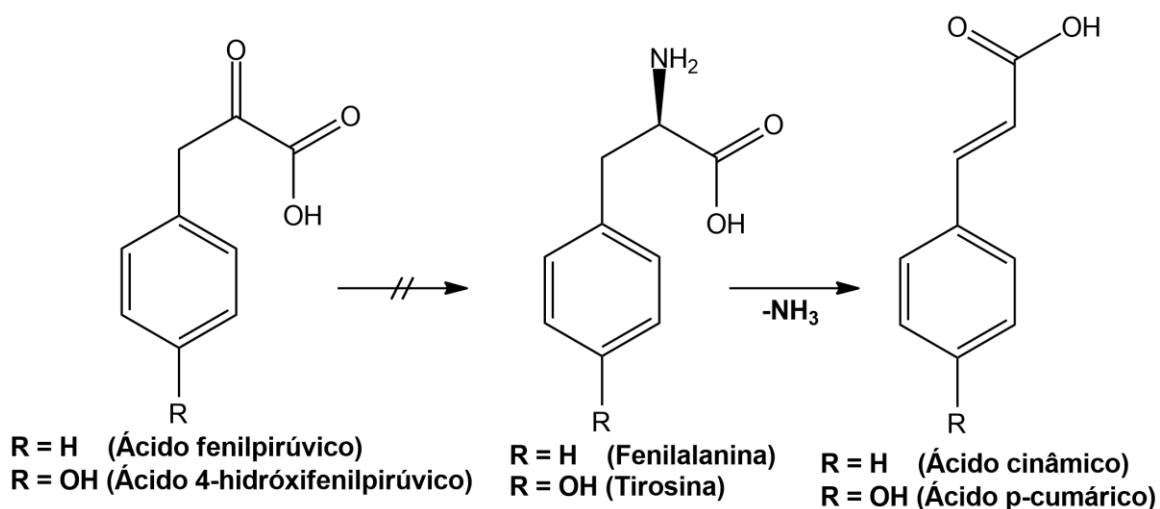


Fonte: Produzida pelo autor, adaptado de (LOBO; LOURENÇO, 2007).

Mediante reações enzimáticas, o chiquimato é transformado em corismato, que age como intermediário e é transformado em prefenato pela ação da enzima *corismato mutase* por meio do único rearranjo de Claisen conhecido na natureza. A perda de CO₂ seguida da perda de água resultam na formação de fenilpiruvato e 4-hidróxifenilpiruvato (DEWICK, 2002; LOBO; LOURENÇO, 2007).

Essas duas moléculas são utilizadas como intermediárias na formação dos dois aminoácidos aromáticos que servem de base para o esqueleto C₆C₃ dos fenilpropanóides, tirosina e fenilalanina, formados através da aminação e redução das moléculas de fenilpiruvato e 4-hidróxifenilpiruvato. A perda de amoníaco nesses aminoácidos cria uma ligação dupla conjugada na estrutura e forma os ácidos fenólicos mais simples: o ácido cinâmico (a partir da fenilalanina) e o ácido p-cumárico (a partir da tirosina), que vão servir de base para a formação de todos os outros (figura 16).

FIGURA 16 - Formação dos ácidos fenólicos

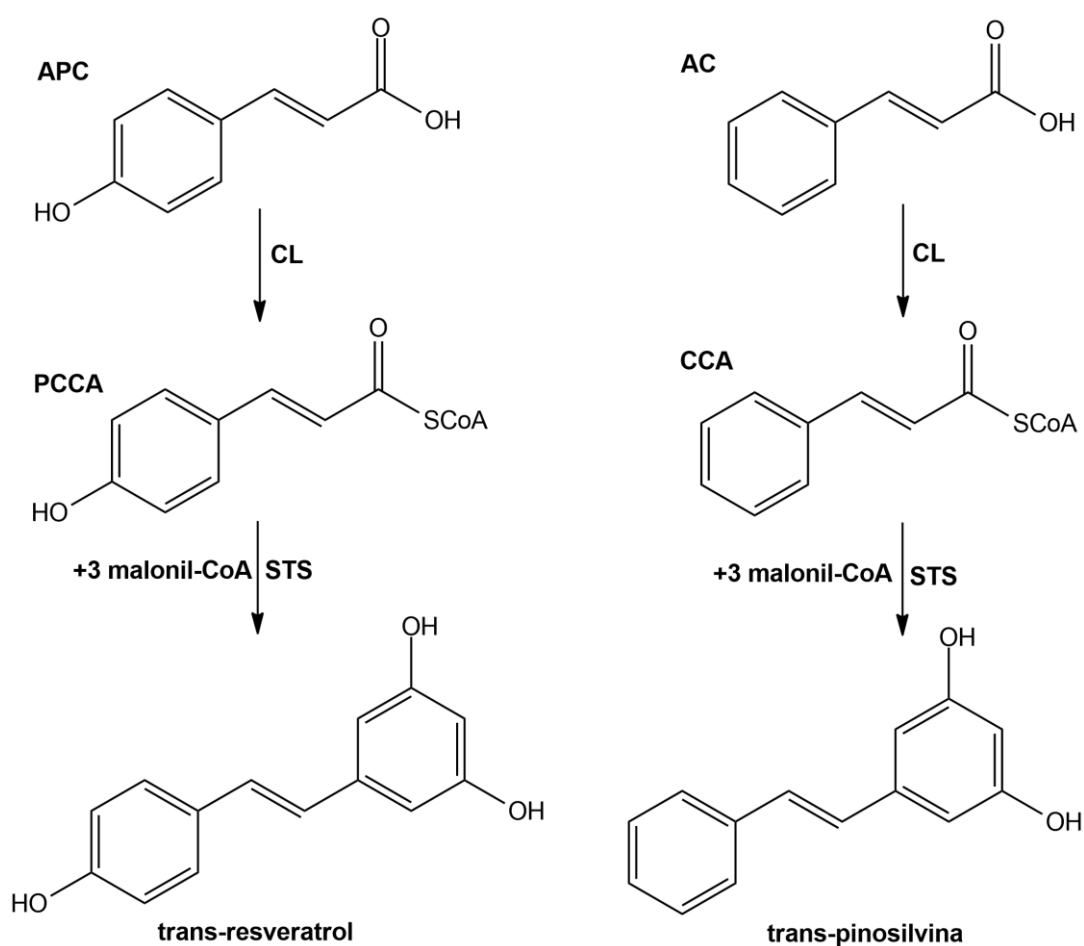


Fonte: Produzida pelo autor, adaptado de (LOBO; LOURENÇO, 2007).

O ácido 3,4-dihidróxicinâmico, ou ácido cafeico (substância 183, tabela 3), por exemplo, é formado nas plantas por meio de três etapas: a conversão da fenilalanina em ácido cinâmico, em ácido p-cumárico e por fim em ácido cafeico por meio das enzimas *fenilalanina amonia liase*, *cinamato 4-hidroxilase* e *p-cumarato 3-hidroxilase*. Em outra via alternativa (sintética), pode ser sintetizado através da tirosina pela conversão em ácido p-cumárico catalisada pela enzima *tirosina amonia liase* e pela hidroxilação na posição 3 do ácido formado para formar o ácido cafeico (LI; MAO; LIU; SONG *et al.*, 2020).

A biossíntese dos estilbenos nas plantas se inicia através da ativação dos ácidos fenólicos com uma molécula de CoA por meio da enzima *cumarato:CoA ligase* (CL). A partir daí, ocorre a adição direta de três unidades de malonil-CoA ao éster derivado correspondente (p-cumaroil-CoA ou cinamoil-CoA, por exemplo) catalisada pela enzima *estilbeno sintase* (STS) e gera a formação dos esqueletos mais simples de estilbenos, o trans-resveratrol (derivado do ácido p-cumárico) e trans-pinosilvina (derivado do ácido cinâmico), como demonstrado na figura 17 (DUBROVINA; KISELEV, 2017; WATTS; LEE; SCHMIDT-DANNERT, 2006).

FIGURA 17 - Biossíntese de estilbenos



APC – Ácido p-cumárico; **PCCA** – p-cumaroil-CoA; **AC** – Ácido cinâmico; **CCA** – cinamoil-CoA. **Enzimas:** **CL** – *cumarato:CoA ligase*; **STS** – *estilbeno sintase*.

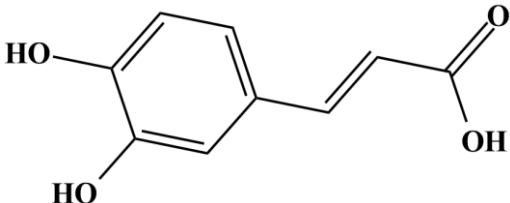
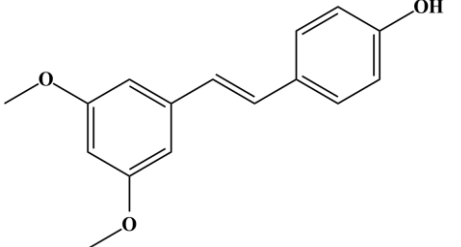
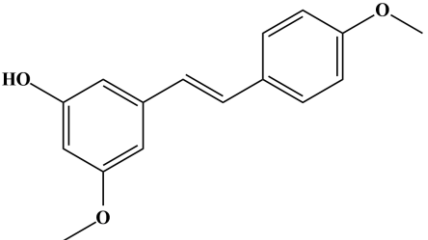
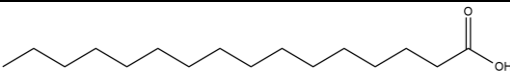
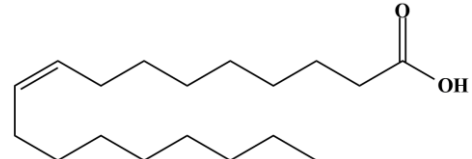
Fonte: Produzida pelo autor, adaptado de (DUBROVINA; KISELEV, 2017)

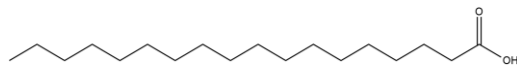
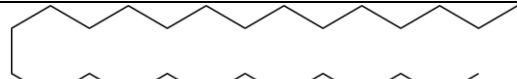




Dos estilbenos mais comuns, o resveratrol (que origina os derivados 184 e 185 da tabela 3) é o mais conhecido, uma vez que possui propriedades medicinais e atividades biológicas muito estudadas, havendo relatos na literatura de diversas

atividades, como antioxidante e anti-inflamatória além de efeito cardioprotetor e quimiopreventivo (DUBROVINA; KISELEV, 2017).

De um modo geral, foram identificados mais 11 metabólitos diferentes isolados de espécies do gênero *Vellozia*: 1 ácido fenólico, 2 estibenos, 3 ácidos graxos, 4 alcanos e 1 álcool, apresentados na tabela 3.

TABELA 3 - Substâncias de classes minoritárias isoladas das espécies de *Vellozia*

Número	Classe	Composto	Estrutura	Fórmula	Parte, solvente e espécie	Referência
183	Ácido fenólico	Ácido cafeico		C ₉ H ₈ O ₄	Planta completa, etanol, <i>V. nanuzae</i>	(PINTO; SILVA; VALENTE, 1988)
184	Estilbeno	Resveratrol 3,5-dimetil éter		C ₁₆ H ₁₆ O ₃	Superfície das folhas, acetona, <i>V. coronata</i>	(HARBORNE; GREENHAM; WILLIAMS; EAGLES <i>et al.</i> , 1993)
185	Estilbeno	Resveratrol 3,4'-dimetil éter		C ₁₆ H ₁₆ O ₃	Superfície das folhas, acetona, <i>V. coronata</i>	(HARBORNE; GREENHAM; WILLIAMS; EAGLES <i>et al.</i> , 1993)
186	Ácido graxo	Ácido palmítico		C ₁₆ H ₃₂ O ₂	Folhas, éter etílico, <i>V. candida</i> ; Planta completa, etanol, <i>V. nanuzae</i>	(BRANCO; PINTO; IFA; BRAZ-FILHO, 2002); (PINTO; SILVA; VALENTE, 1988)
187	Ácido graxo	Ácido oleico		C ₁₈ H ₃₄ O ₂	Planta completa, hexano, <i>V. nanuzae</i>	(PINTO; SILVA; VALENTE, 1988)

188	Ácido graxo	Ácido esteárico		$C_{18}H_{36}O_2$	Folhas, éter etílico, <i>V. cândida</i>	(BRANCO; PINTO; IFA; BRAZ-FILHO, 2002)
189	Alcano	Heptacosano		$C_{27}H_{56}$	Planta completa, hexano, <i>V. graminifolia</i>	(BRANCO; PINTO; BRAZ-FILHO, 2004)
190	Alcano	Octacosano		$C_{28}H_{58}$	Planta completa, hexano, <i>V. graminifolia</i>	(BRANCO; PINTO; BRAZ-FILHO, 2004)
191	Alcano	Nonacosano		$C_{29}H_{60}$	Planta completa, hexano, <i>V. graminifolia</i>	(BRANCO; PINTO; BRAZ-FILHO, 2004)
192	Alcano	Triacotano		$C_{30}H_{62}$	Planta completa, hexano, <i>V. graminifolia</i>	(BRANCO; PINTO; BRAZ-FILHO, 2004)
193	Álcool	Triacontan-1-ol		$C_{30}H_{62}O$	Root and stem, hexano, <i>V. compacta</i>	(PINTO; SILVA; MAYER; BRAZ-FILHO, 1979)

2.6.2.4 Atividade biológica das substâncias identificadas em *Vellozia*

Apesar da identificação de cerca de 200 substâncias diferentes no gênero *Vellozia*, os estudos que retratam atividades biológicas referente às substâncias são escassos. Apesar disso, os estudos fitoquímicos encontrados com testes biológicos associados foram agrupados na tabela 4.

TABELA 4 - Substâncias do gênero *Vellozia* que tiveram atividade biológica avaliada

Substância	Composto	Atividade biológica	Parte, solvente e espécie	Referência
11	10-hydroxy-20-nor-cleistantha-1,8,11,13-tetraen-3,7-dione	Atividade herbicida e larvicida	Raízes, diclorometano, <i>V. gigantea</i>	(FERREIRA; CANTRELL; DUKE; ALI <i>et al.</i> , 2017)
19	Isopimara-8(9),15-dien-1,3,7,11-tetraone			
58	3,20-epoxy-3-hydroxy-cleistantha-8,11,13-trien-7-one			
71	3-hydroxy-cleistantha-8,11,13-trien-7-one			
78	Candidalactone	Anticâncer	Planta completa, etanol, <i>V. candida</i> ; Planta completa, metanol, <i>V. cândida</i>	(VALENTE; GUNATILAKA; KINGSTON; PATITUCCI <i>et al.</i> , 1997)
94	(5R,8R,9S,13R)-halim-1(10)-ene-15,16-diol	Atividade citotóxica e antimicrobiana	Folhas, hexano, <i>V. kolbekii</i>	(SILVA; SANTOS JÚNIOR; BARBOSA; COSTA <i>et al.</i> , 2015)
141	8-C-methyl-6-prenylquercetin	Atividade antioxidante, antimutagênico e protetor	Folhas e bainhas, acetato de etila, <i>V. kolbekii</i>	(SILVA; CARVALHO; HAMERSKI; CASTRO <i>et al.</i> , 2012)
146	6-prenylquercetin			
182	Hydnocarpin D	Atividade esquistossomicida	Caule, 96% metanol, <i>V. variabilis</i>	(FLAUZINO; TOZATTI; SAMPAIO; BADOCCO <i>et al.</i> , 2017; FLAUZINO; TOZATTI; SEQUEIRA; ANDRADE E SILVA <i>et al.</i> , 2015)
184	Resveratrol 3,5-dimetil éter	Atividade antifúngica (em mistura)	Superfície das folhas, acetona, <i>V. coronata</i>	(HARBORNE; GREENHAM; WILLIAMS; EAGLES <i>et al.</i> , 1993)
185	Resveratrol 3,4'-dimetil éter			

Diterpenos (substâncias 11, 19, 58 e 71, tabela 1) isolados das raízes de *V. gigantea* apresentaram atividade herbicida contra alface (*Lactuca sativa*), lentilha (*Lemna paucicostata*) e *Agrostis stolonifera* além da atividade larvicida contra larvas

de *Aedes aegypti*, mais conhecido como mosquito da dengue (FERREIRA; CANTRELL; DUKE; ALI *et al.*, 2017).

A candidalactona e o candidenodiol tiveram atividade anticâncer avaliadas contra linhagens mutantes de *Saccharomyces cerevisiae*. A candidalactona apresentou toxicidade moderada enquanto o candidenodiol foi inativo (VALENTE; GUNATILAKA; KINGSTON; PATITUCCI *et al.*, 1997).

O estudo fitoquímico de extratos em hexano das folhas de *V. kolbekii* resultaram no isolamento de um diterpeno halimano que apresentou citotoxicidade contra linhagens de células de câncer: SF-295 (glioblastoma), MDA-MB-435 (melanoma) e HCT-8 (adenocarcinoma de cólon). Além disso, o diterpeno apresenta atividade antimicrobiana contra *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* com valores de CIM maiores que o encontrado para o cloranfenicol, utilizado como controle positivo (SILVA; SANTOS JÚNIOR; BARBOSA; COSTA *et al.*, 2015).

Dois flavonoides derivados da quercetina isolados de extratos de *V. kolbekii* apresentaram atividade antioxidante e foram capazes de aumentar a tolerância ao estresse oxidativo em *Saccharomyces cerevisiae* (uma espécie de levedura), apresentando efeito protetor. Além disso, a 6-prenilquercetina e a 8-C-metil-6-prenilquercetina apresentaram atividade antimutagênica na proteína p53, que é considerada como um gene supressor de tumores (SILVA; CARVALHO; HAMERSKI; CASTRO *et al.*, 2012).

Por fim, a flavolignana hidnocarpina D isolada do extrato em metanol 96% do caule de *V. variabilis* apresentou atividade esquistossomicida contra vermes adultos de *Schistosoma mansoni* (FLAUZINO; TOZATTI; SAMPAIO; BADOCCO *et al.*, 2017; FLAUZINO; TOZATTI; SEQUEIRA; ANDRADE E SILVA *et al.*, 2015) e a mistura dos dois estilbenos encontrados na *V. coronata*, resveratrol 3,5-dimetil éter e resveratrol 3,4'-dimetil éter apresentou atividade antifúngica contra *Cladosporium fulvum* (HARBORNE; GREENHAM; WILLIAMS; EAGLES *et al.*, 1993).

2.6.3 *Vellozia pyrantha* A. A. Conceição

A *Vellozia pyrantha* A. A. Conceição, conhecida por candombá, é uma espécie endêmica da Serra do Candombá, situada no Vale do Capão, pertencente ao município de Palmeiras, no Parque Nacional da Chapada Diamantina (BA). A espécie é encontrada na vegetação dos campos rupestres numa altitude média de 1300 metros. Até 2017, a *V. pyrantha* era confundida com a *V. sincorana* por conta da sua utilização e semelhanças, sendo descrita da forma correta pela primeira vez por Conceição *et al* (2017).

Na região do PNCD, o nome comum candombá é dado para diferentes plantas que foram utilizadas por centenas de anos na mineração por meio de tochas, velas, cola e incenso para afastar espíritos maus e atualmente são utilizadas apenas para acender fornos e fogões, como a *V. sincorana* e a *V. variabilis*, além da própria *V. pyrantha* (CONCEIÇÃO; SOUZA; CARNEIRO; MENEZES, 2017; OLIVEIRA; SCHMIDT; ALBUQUERQUE; CONCEIÇÃO, 2015).

Apesar da escassez de publicações, a primeira menção ao candombá é feita por Euclides da Cunha, no famoso clássico da literatura Os Sertões, de 1984 e evidencia o uso do candombá como tochas: “E se é preciso avançar a despeito da noite [...] basta-lhe partir e acender um ramo verde de candombá e agitar pelas veredas [...] um archote fulgurante...” (CUNHA, 1984).

Uma característica específica da *V. pyrantha* é a sua dependência ao fogo (*pyrantha*, do grego *pyro*, que significa fogo e *anthos*, flores) em sua reprodução e na geração de recursos para animais, uma vez que as suas flores aparecem após as queimadas e essas queimadas iniciam um florescimento massivo da espécie. A sua capacidade de florescimento após as queimadas é impressionante, ocorrendo junto com a frutificação em cerca de 40 dias após o fogo, o que torna a sua resina (devido à inflamabilidade) influenciadora natural do ciclo de nutrientes do bioma, alimentando muitos insetos por alguns períodos de tempo, por exemplo (CONCEIÇÃO; ALENCAR; SOUZA; MOURA *et al.*, 2013; CONCEIÇÃO; ORR, 2012). De acordo com Conceição *et al* (2017), outras espécies de *Vellozia* tem a capacidade de apresentar

florescimento abundante após queimadas, como a *V. gigantea* e a *V. peripherica*, porém só a *V. pyrantha* apresenta a sua capacidade diretamente dependente do fogo.

Essa dependência é facilmente observada em notícias encontradas na mídia, como nas seguintes notícias, veiculadas entre dezembro de 2015 e março de 2016 no jornal G1 Bahia: “Incêndio devastou 51 mil hectares na Chapada em 3 meses, diz secretário”, “Após longo incêndio, chuva enche cachoeiras na Chapada Diamantina” e “Flores nascem em área destruída por incêndio na Chapada Diamantina (BA)” (INCÊNDIO..., 2015; APÓS..., 2016; FLORES..., 2016). De acordo com as reportagens, um grande incêndio se espalhou em outubro de 2015 e durou por três meses, devastando 51 mil hectares de vegetação, vindo a ser controlado por completo apenas com a ajuda das chuvas que caíram na região no mês de janeiro do ano seguinte. Dois meses depois, no mês de março, as flores do candombá voltaram a florescer sobre o toco das árvores queimadas após 17 anos sem florescer. Numa dessas notícias, Abel Augusto Conceição (que descreveu a espécie em 2017), fala:

“Essa florada exuberante e maravilhosa é uma cena extremamente rara. Essa população de candombá floresceu há 17 anos e somente agora deu flor novamente. Ela depende do fogo, e só floresce com o fogo. Então, se não pegar fogo não tem flor. Ela só existe dentro do parque nacional da Chapada. No caso do Candombá, ela floresce depois de 30 dias do fogo. Além disso, a quantidade de néctar é fabulosa.” (FLORES..., 2016)

A *V. pyrantha* (figura 18) apresenta em sua estrutura flores de tom lilás e violeta e folhas compridas e numerosas que não se desprendem do caule, sendo morfológicamente similar à *V. sincorana* mas apresentando como principais diferenças as bainhas curvas invés de enroladas, as flores de tom lilás invés de brancas e a dependência de seu florescimento ao fogo invés de apenas possuir resistência (CONCEIÇÃO, 2018).

FIGURA 18 - Espécimes de *V. pyrantha* fotografadas no Vale do Capão, PNCD



A, C, D – espécimes completos de *V. pyrantha*; **B** – tronco de *V. pyrantha*; **E, F** – florescimento de *V. pyrantha* nas queimadas de 2015/16.

Fonte: Acervo pessoal (A-D) e G1 Bahia (E-F).

Apesar do uso tradicional e das diferentes importâncias da espécie, os estudos encontrados não relatam qualquer composição química ou atividades biológicas de *V. pyrantha*, nem com o nome de *V. sincorana* (CONCEIÇÃO, 2018; CONCEIÇÃO; ALENCAR; SOUZA; MOURA *et al.*, 2013; CONCEIÇÃO; ORR, 2012; CONCEIÇÃO; SOUZA; CARNEIRO; MENEZES, 2017; OLIVEIRA; SCHMIDT; ALBUQUERQUE; CONCEIÇÃO, 2015; SOUZA; SCHMIDT; CONCEIÇÃO, 2018), garantindo ineditismo a esse trabalho.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Realizar o estudo metabolômico da resina de *Vellozia pyrantha* A. A. Conceição e das suas atividades antioxidante, citotóxica e antimicrobiana.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a atividade antioxidante das amostras obtidas;
- Quantificar os fenólicos totais das amostras de *V. pyrantha*;
- Avaliar a atividade antimicrobiana das amostras contra bactérias (Gram-positivas e Gram-negativas) e fungos;
- Avaliar a atividade citotóxica das amostras frente à diferentes linhagens de células tumorais;
- Obter o perfil metabólico das amostras por cromatografia líquida de alta resolução acoplada a espectrometria de massas;
- Identificar os metabólitos secundários de *V. pyrantha* via CL-EM;
- Correlacionar o perfil metabólico com as atividades biológicas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAL VEGETAL

A resina da *Vellozia pyrantha* (figura 19) foi coletada no Vale do Capão, município de Palmeiras – BA, localizado no Parque Nacional da Chapada Diamantina nas coordenadas 11°9'0"S e 42°3'0"O. Foram coletados aproximadamente 19 g da resina bruta, identificada por VV-EB.

FIGURA 19 - Resina de *V. pyrantha*

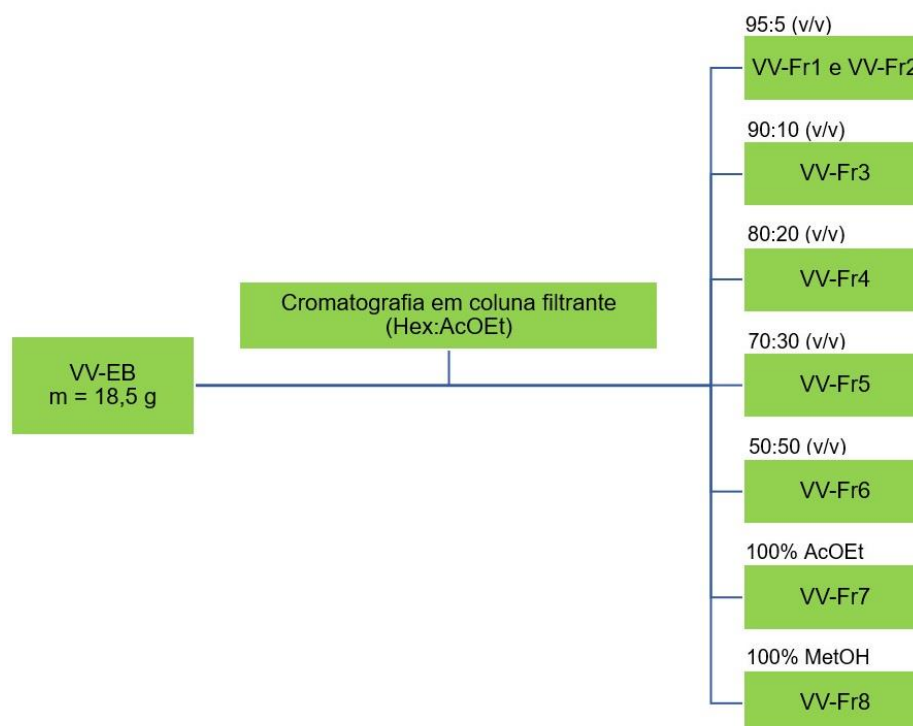


Fonte: Acervo pessoal.

4.2 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Uma alíquota da amostra VV-EB foi fracionada por cromatografia em coluna filtrante (CCF) em sílica gel (Merck, 70–230 mesh) com gradiente de polaridade (Hexano:acetato de etila-metanol 100%) resultando na obtenção de 8 frações (VV-Fr1 – VV-Fr8), conforme o fluxograma apresentado na figura 20. As soluções obtidas diretamente da coluna foram concentradas num aparelho de evaporação rotativa sob pressão reduzida (Fisatom, 4000 Laborota echo, Alemanha).

FIGURA 20 - Fluxograma de fracionamento da VV-EB e obtenção das frações



Fonte: Produzido pelo autor.

4.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A atividade antioxidante foi avaliada pelo método do sequestro do radical DPPH, como descrito por Santos *et al* (2018) com modificações. Inicialmente, uma solução de DPPH foi preparada pela dissolução de 2,4 mg em 50 mL de metanol (120

mmol L⁻¹). Essa solução foi armazenada no escuro por 1 hora com períodos de agitação para garantir a dissolução completa do DPPH. Com a solução pronta, preparou-se a curva analítica nas concentrações de 0 a 60 µg mL⁻¹ (A, apêndice A). A curva padrão do DPPH foi utilizada para calcular o IC₅₀ (concentração que representa a metade da concentração inibitória máxima) dos extratos por meio da interpolação da absorbância das amostras com o valor da concentração obtida na equação da reta construída ($y = 0,00892155x - 0,01048452$).

As curvas de consumo de DPPH das frações (apêndice B) foi feita pela adição de 400 µL de DPPH (120 mmol L⁻¹; metanol) à 400 µL de uma solução das amostras em concentrações variadas para fornecer 800 µL da solução reacional com concentrações finais dos extratos variando de 50 a 1000 µg·mL⁻¹. O meio reacional era mantido em abrigo da luz por 30 minutos e a sua absorbância foi medida em 515 nm num leitor de microplacas (VersaMax™, EUA).

O metanol foi utilizado como branco, uma solução de DPPH (1,0 mL; 120 mmol·L⁻¹) e metanol (1,0 mL) como controle negativo e ácido gálico foi utilizado como controle positivo (B, apêndice A).

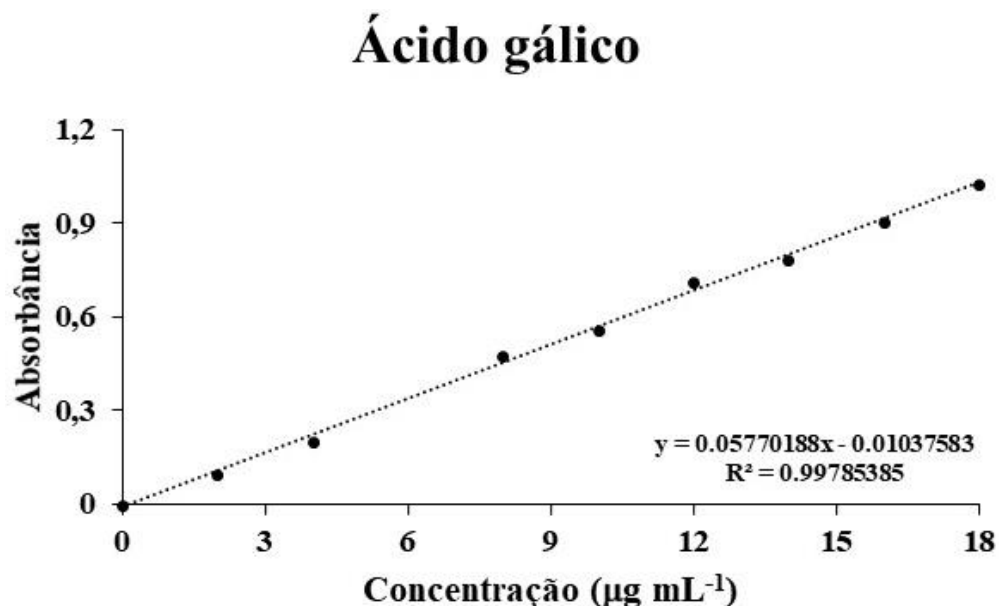
Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos como IC₅₀. Os extratos que apresentaram valores de IC₅₀ > 1000 µg·mL⁻¹ foram considerados inativos.

4.4 TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS

A determinação do teor de fenólicos totais foi realizada conforme metodologia de Santos *et al* (2018) com modificações. Inicialmente, 100 µL do extrato (na concentração de 2 mg·mL⁻¹) foram misturados com 50 µL do reagente de Folin-Ciocalteu e 750 µL de água. Após um minuto, 100 µL de solução de carbonato de sódio (Na₂CO₃, 15% m/v) foram adicionados à mistura, atingindo um volume final de 1 mL. A mistura reacional foi mantida no escuro durante 120 min. Após este tempo, a absorbância foi lida a 725 nm por um leitor de microplacas (VersaMax™, EUA). A curva padrão de ácido gálico (figura 21) foi utilizada para calcular o conteúdo fenólico total nos extratos por meio da interpolação da absorbância das amostras com a

equação da reta construída ($y = 0,05770188x - 0,01037583$) e os resultados foram expressos em $\text{mg}\cdot\text{EAG}\cdot\text{g}^{-1}$ de extrato.

FIGURA 21 - Curva analítica do ácido gálico



Fonte: Dados experimentais obtidos pelo autor.

4.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Os ensaios de susceptibilidade antimicrobiana foram realizados no laboratório de ensaios biológicos da UNEB pelo método de microdiluição em caldo contra nove micro-organismos diferentes, segundo metodologia de Santos *et al* (2018) e seguindo as normas M07 e M38 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2018a; b).

4.5.1 Preparo das amostras

Para realização dos ensaios, as amostras foram solubilizadas em solução de dimetilsulfóxido (DMSO) a 20% em água para preparação das soluções estoque na concentração de $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$. As frações menos polares apresentaram baixa

solubilização em DMSO e para garantir a solubilização completa das amostras, foram adicionados 1% de Tween-80 e a solução final foi homogeneizada via vórtex.

Todo material utilizado nos ensaios antimicrobianos, com exceção das amostras, era autoclavado no tempo adequado (20 minutos para meios de cultivo e 30 minutos para ponteiras e vidrarias) antes do experimento e descartado adequadamente (soluções de hipoclorito para as placas de 96 poços e 40 minutos na autoclave para materiais contaminados) ao final.

4.5.2 Micro-organismos testados

As amostras foram testadas para obtenção dos valores de CIM frente à quatro bactérias Gram-positivas: *Bacillus subtilis* (ATCC 10240), *Bacillus cereus* (CCT 0096), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), três bactérias Gram-negativas: *Escherichia coli* (ATCC 94863), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Salmonella choleraesuis* (ATCC 14028) e dois fungos: *Candida albicans* (ATCC 18804) e *Candida glabrata* (CCT 0728), adquiridos da Coleção de Culturas Tropical (CCT) da Fundação André Tosello. As cepas foram mantidas em meios de cultivo ágar nutriente (bactérias) e ágar de levedura e malte (fungos) com repiques periódicos para ativação das culturas.

4.5.3 Microdiluição em caldo

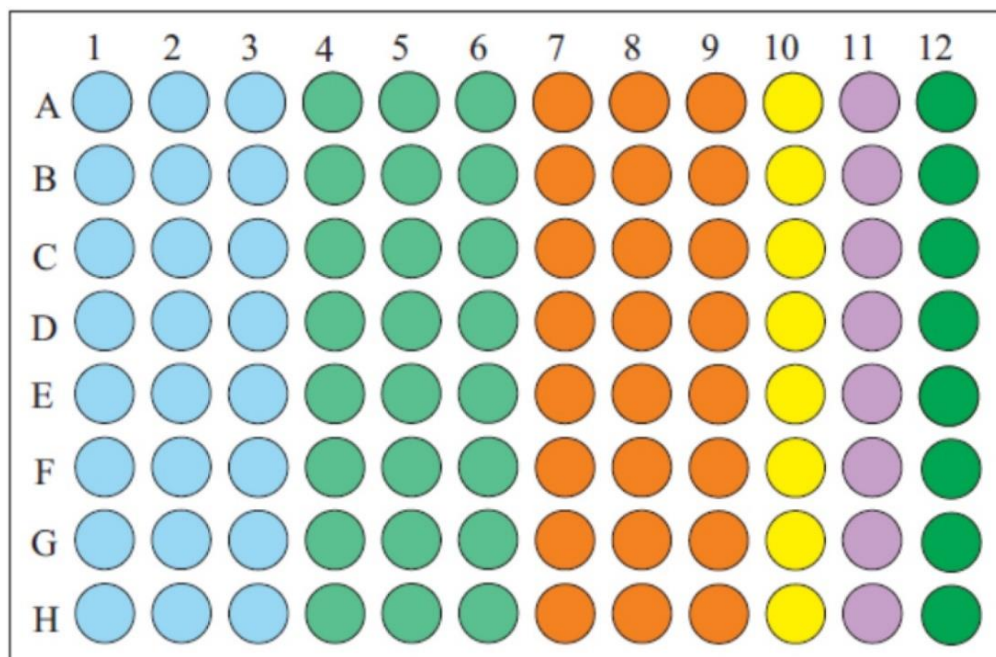
Os testes de microdiluição são realizados em placas de Elisa de 96 poços, cujo esquema está representado na figura 22.

Na primeira etapa do teste, todos os poços foram preenchidos com 100 µL de meio de cultivo líquido (caldo nutriente [Acumedia] para bactéria e caldo de levedura [BD] e malte [Acumedia] para fungos).

Em seguida, na fileira A, adicionou-se em triplicata, 100 µL de cada solução estoque das amostras testadas (amostra 1 – colunas 1,2,3; amostra 2 – colunas 4,5,6; amostra 3 – colunas 7,8,9), além de 100 µL do controle positivo (antibiótico) na coluna

10 e de 100 μL da mistura da solução do diluente na fileira 11 com o intuito de avaliar se o diluente apresentaria qualquer toxicidade. A fileira 12 foi utilizada como controle negativo e recebe até então apenas o meio de cultivo.

FIGURA 22 - Esquema representativo das placas de Elisa



Fonte: Adaptado de Santos (2016).

Após a adição de todas as soluções, realizam-se as diluições seriadas, que ocorriam por meio da transferência de 100 μL do conteúdo da fileira A para a fileira B, da fileira B para a fileira C e assim sucessivamente, até a fileira H.

Ao fim da microdiluição, deve-se preparar o inóculo do micro-organismo pela comparação de sua turbidez com a escala 0.5 de McFarland, que indica a existência de $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônia (UFC) por mL. Dilui-se este inóculo em meio de cultivo na proporção de 100 μL do inóculo para 10 mL de meio de cultivo apropriado e transfere-se 100 μL desta suspensão para todos os poços da placa, incluindo a coluna 12. Dessa forma, com as soluções-estoque em $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$, as concentrações testadas variaram de 3,9 a $500 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Como controle positivo foram utilizados cloranfenicol ($0,19 - 25 \mu\text{g mL}^{-1}$) e benzilpenicilina ($0,039 - 5 \mu\text{g mL}^{-1}$) para bactérias Gram-positivas, sulfato de gentamicina ($0,039 - 5 \mu\text{g mL}^{-1}$) para bactérias Gram-negativas e Ioprox ($0,39 - 50 \mu\text{g mL}^{-1}$) para fungos.

No fim do processo, as placas foram vedadas e colocadas para incubação por um período de 24 horas (a 36°C, para bactérias) e 72 horas (a 26°C para fungos) em incubadora BOD (QUIMIS, Q315M15). Após o período de incubação, as placas eram examinadas em busca da obtenção do CIM mediante a ausência de turbidez, que indica a falta de crescimento do micro-organismo.

4.5.4 Concentração bactericida (CBM) e fungicida (CFM) mínima

Para as concentrações que apresentavam inibição, retirava-se uma alíquota de 10 µL (em triplicata) de cada poço com resultado positivo e transferia para placas de petri com o meio de cultivo sólido (ágar [kasvi] + caldo nutriente [Acumedia] ou ágar [kasvi] + extrato de levedura [BD] e malte [Acumedia]). Em seguida, as placas eram vedadas e submetidas a um novo período de incubação. Esse segundo ensaio era realizado em busca dos valores da CBM ou da CFM, dependendo do micro-organismo testado.

4.6 ATIVIDADE CITOTÓXICA

Este ensaio foi realizado com a permissão do Conselho de Gestão do Patrimônio Genético conforme a certidão nº AA9C491 apresentada no anexo A. Os ensaios foram feitos na Fundação Oswaldo Cruz, no Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz – FIOCRUZ, pelos pesquisadores do Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia – LETI.

4.6.1 Preparo das amostras

As amostras foram diluídas em DMSO puro estéril na concentração de 10 mg mL⁻¹. Para os ensaios de concentração única realizados inicialmente para a avaliação da porcentagem de inibição celular, as amostras foram testadas em 50 µg mL⁻¹. Após

os primeiros resultados, a obtenção do IC₅₀ foi feita em concentrações que variaram de 0,19 a 50 µg mL⁻¹.

4.6.2 Células

Foram utilizadas as linhagens de células MCF-7 (carcinoma de mama humano), HCT116 (carcinoma de cólon humano), HepG2 (carcinoma hepatocelular humano), RC-5 (fibroblasto de pulmão humano) e B16F10 (melanoma murino), todas obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC).

As células foram cultivadas em garrafas para cultura celular (75 cm³, volume de 250 mL), os meios utilizados foram RPMI 1640 suplementados com 10% de soro bovino fetal. As células foram mantidas em incubadoras com atmosfera de 5 % de CO₂ a 37 °C.

Diariamente acompanhava-se o crescimento celular com a utilização de microscópio de inversão e o meio foi trocado sempre que o crescimento celular atingia confluência necessária para renovação de nutrientes. Para a manutenção de células aderidas utilizou-se tripsina (0,25%) para que as células soltassem das paredes das garrafas. As culturas de células apresentavam negativas para mico-plasma, conforme avaliado pela colocação com Hoechst (Mycoplasma Stain Kit, Cat. MYC1, Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, USA).

4.6.3 Ensaio de citotoxicidade

A citotoxicidade das amostras foi obtida pelo ensaio do *alamar blue* após 72 horas de exposição com os compostos testes segundo a metodologia de Ahmed, Gogal e Walsh (1994). A doxorubicina foi utilizada como controle positivo e o controle negativo recebeu a mesma quantidade de DMSO. Inicialmente, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços (100 µL/poço de uma solução de 0,3 x 10⁶ células/mL para células em suspensão e de 0,7 x 10⁵ células/mL para células aderidas). Após 24 horas de incubação, os compostos testes dissolvidos em DMSO foram adicionados em cada poço e incubadas por 72 horas. Quatro horas antes do

final do período de incubação, 20 μL da solução estoque de *alamar blue* (0,312 mg/mL) foram adicionados a cada poço e as absorvâncias foram mensuradas nos comprimentos de onda de 570 nm (*alamar blue* reduzido) e 595 nm (*alamar blue* oxidado) utilizando uma leitora de placa.

A porcentagem de inibição foi calculada e registrada a porcentagem de inibição x log da concentração e determinado suas IC_{50} a partir de regressão não-linear utilizando o programa Prisma versão 5.0 (GraphPad Software).

4.7 PERFIL METABOLÔMICO

A obtenção do perfil metabolômico das amostras foi realizada no Instituto de Química da Universidade de São Paulo (USP), no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Algas.

4.7.1 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (CLAE-EM)

As análises de CLAE-EM foram realizadas usando um sistema de cromatografia líquida (Prominence, Shimadzu Co., Japão) acoplado a um espectrômetro de massa de tempo de voo quadrupolo (microTOF II, Bruker Daltonics, Alemanha). A separação foi realizada em coluna C18 (3,0mm x 150 mm, 2,6 μm , Kinetex, Phenomenex), mantida a 40°C e utilizando acetonitrila grau HPLC e água deionizada, ambos acidulados com 0,1% (v/v) de ácido fórmico, como fase móvel com uma taxa de fluxo de 0,2 mL min^{-1} . A eluição foi feita por gradiente: 25%B durante 2 min – 25 a 80%B em 20 min – 80 a 90%B em 2 min. A coluna foi recondicionada com 25%B durante 3 min.

O EM foi operado em modo positivo com 3,2 kV na interface ESI e gás seco a 350°C. Os espectros de varredura completos foram adquiridos de 50 a 1000 m/z .

Inicialmente, um miligrama de amostra foi dissolvido em acetonitrila (1,0 mL) para preparar a solução estoque em 1 mg $\cdot\text{mL}^{-1}$. Em seguida, 500 μL dessa solução

foram posteriormente diluídos em 500 µL de acetonitrila e injetados diretamente no equipamento.

4.7.2 Processamento dos dados da CLAE-EM

Os dados foram processados no pacote XCMS rodando na plataforma *online* disponível em <<https://xcmsonline.scripps.edu/>>. O método “*centWave*” foi usado para pico de amostragem e os parâmetros XCMS foram faixa de largura do pico cromatográfico (peakwidth = 3 a 30 segundos), relação sinal-ruído (snthresh = 5,0) e largura de banda (bw = 10).

A tabela com características moleculares foi obtida, contendo os tempos de retenção alinhados, razão *m/z* e intensidades.

4.7.3 Identificação dos metabólitos

Os dados de massa molecular de alta resolução (apresentada na tabela do apêndice C) das substâncias isoladas do gênero *Vellozia* (apresentadas nas tabelas 1, 2 e 3) foram calculados pela ferramenta “*Exact Mass Calculator*”, disponível em <<https://www.sisweb.com/referenc/tools/exactmass.htm>>.

Com os valores das massas de alta resolução, o intervalo de *m/z* para os possíveis adutos $[M+H]^+$ e $[M+Na]^+$, que são os mais comuns em análises de CLAE-EM, foi calculado utilizando um desvio de 10 ppm através de uma ferramenta fornecida pela Universidade de Warwick disponível *online* em <https://www.warwick.ac.uk/fac/sci/chemistry/research/barrow/barrowgroup/calculators/mass_errors>.

Por fim, para a identificação dos metabólitos de *V. pyrantha*, os dados experimentais da tabela de CLAE-EM foram cruzados com os dados teóricos das massas do intervalo obtido pela ferramenta das substâncias já isoladas de *Vellozia* e descritas na literatura.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

4.8.1 Atividade antioxidante e teor de fenólicos totais

As análises estatísticas dos resultados da atividade antioxidante e da quantificação de fenóis totais foram realizadas utilizando o *software* SISVAR. A análise de variância foi utilizada para identificar diferenças estatisticamente significativas entre as amostras ($P < 0,05$), seguidas pelos testes de comparação múltipla de Tukey. Ambos os resultados são apresentados como a média das repetições \pm desvios padrão.

4.8.2 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (CLAE-EM)

Os dados de CLAE-EM transformados, agrupados e alinhados foram carregados no MetaboAnalyst 4.0, um *software* analítico *online* para estudos de metabolômica de alto rendimento disponível em <http://www.metaboanalyst.ca> para que fossem normalizados e as análises estatísticas fossem feitas. Os resultados pós-normalização estão apresentados no anexo B.

A normalização foi feita pela mediana, a transformação dos dados foi feita pela raiz cúbica e o escalonamento foi automático (*auto scaling*), sendo centralizado na média e dividido pelo desvio padrão de cada variável. Com os dados devidamente normalizados, os resultados da análise estatística uni e multivariada foram obtidos por meio de diferentes ferramentas disponíveis na mesma plataforma *online*.

5 RESULTADOS

A CCF da amostra VV-EB resultou na obtenção de 8 frações, cujos códigos, massas e sistema de eluentes estão apresentados na tabela abaixo:

TABELA 5 - Fracionamento da VV-EB por CCF

Amostra	Eluente	Massa (g)
VV-Fr1	Hex:AcOEt (95:5)	0,96
VV-Fr2	Hex:AcOEt (95:5)	5,32
VV-Fr3	Hex:AcOEt (90:10)	1,80
VV-Fr4	Hex:AcOEt (80:20)	3,11
VV-Fr5	Hex:AcOEt (70:30)	1,29
VV-Fr6	Hex:AcOEt (50:50)	3,14
VV-Fr7	100% AcOEt	1,39
VV-Fr8	100% MetOH	0,32

Hex – Hexano; AcOEt – Acetato de etila; MetOH – Metanol.

5.1 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS

A avaliação da atividade antioxidante foi feita pelo método do sequestro do radical livre DPPH e o teor de fenólicos totais foi quantificado pelo método de Folin-Ciocalteu, expressados em IC₅₀ (µg mL⁻¹) e em mg EAG·g⁻¹, respectivamente.

O IC₅₀ representa a quantidade de extrato necessária para consumir 50% de todo DPPH disponível e por conta disso, quanto menor o valor de IC₅₀, maior a atividade antioxidante da amostra. Os resultados obtidos estão representados na tabela 6 e nas figuras 23 e 24.

TABELA 6 - Resultados da atividade antioxidante e teor de fenólicos totais

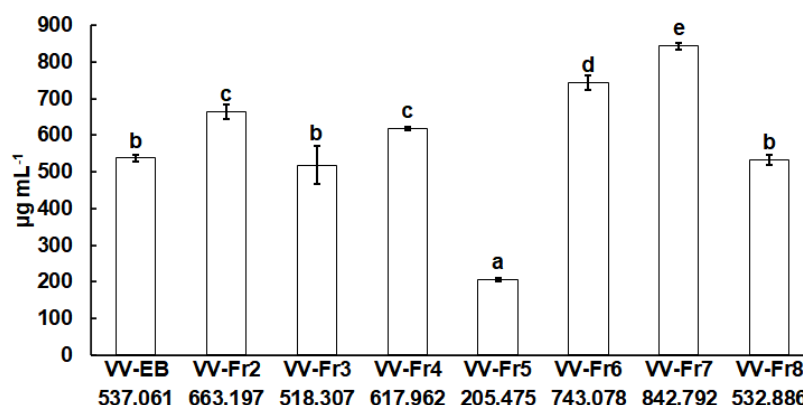
Amostra	Atividade antioxidante (IC ₅₀ , µg mL ⁻¹)	Teor de fenólicos totais (mgEAG g ⁻¹)
VV-EB	537,06 ± 8,97	154,26 ± 5,02
VV-Fr1	>1000	74,44 ± 2,84
VV-Fr2	663,20 ± 19,04	67,00 ± 3,23
VV-Fr3	518,31 ± 52,68	85,20 ± 3,79
VV-Fr4	617,96 ± 3,57	84,34 ± 4,02
VV-Fr5	205,48 ± 3,37	55,99 ± 1,84
VV-Fr6	743,08 ± 21,09	29,38 ± 2,50
VV-Fr7	842,79 ± 10,23	30,77 ± 2,14
VV-Fr8	532,89 ± 13,01	14,09 ± 0,94
Ácido gálico	1,98 ± 0,02	-

A resina bruta (VV-EB) apresenta um valor de IC₅₀ de 537,06 µg mL⁻¹. Esse valor é potencializado em VV-Fr5, que apresentou a maior atividade antioxidante dentre todas as amostras, com IC₅₀ de 205,48 µg mL⁻¹. Duas das frações apresentaram atividade antioxidante semelhante à da resina, as frações VV-Fr3 e VV-Fr-8, com IC₅₀ de 518,31 µg mL⁻¹ e 532,89 µg mL⁻¹, respectivamente.

Ao mesmo tempo, as demais frações apresentaram uma diminuição na atividade antioxidante, com valores de IC₅₀ menores nas amostras VV-Fr2 (663,20 µg mL⁻¹), VV-Fr4 (617,96 µg mL⁻¹), VV-Fr6 (743,08 µg mL⁻¹) e VV-Fr7 (842,79 µg mL⁻¹).

Por último, notou-se que a amostra VV-Fr1 não apresentou uma atividade antioxidante detectável na concentração utilizada e pelo método do sequestro do radical livre DPPH, utilizado nesse estudo.

FIGURA 23 - Atividade antioxidante das amostras de *V. pyrantha*

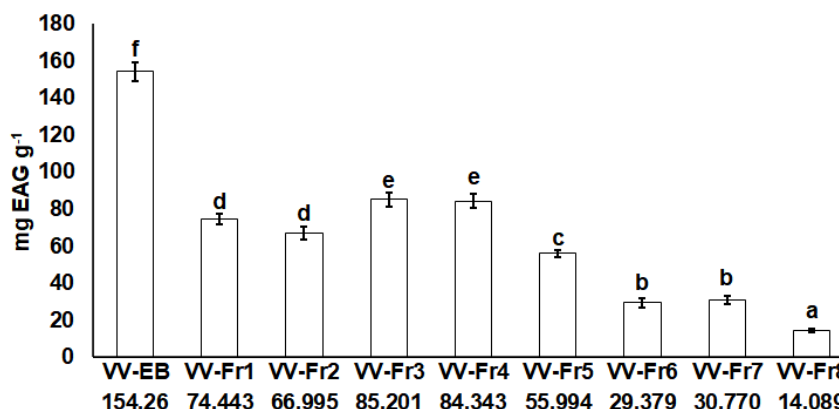


IC₅₀ do ácido gálico (controle positivo) = 1,98 ± 0,02 µg mL⁻¹. Letras diferentes indicam diferença significativa entre as amostras pelo teste de Tukey (p < 0,05).

Fonte: Dados experimentais obtidos pelo autor.

Em relação à quantificação de fenólicos, a resina apresentou um total de 154,26 mg EAG g⁻¹, enquanto todas as frações apresentaram valores menores, destacando-se a fração VV-Fr3 e VV-Fr4, com os maiores valores (depois da resina): 85,20 mg EAG g⁻¹ e 84,34 mg EAG g⁻¹, respectivamente.

Os demais valores foram de 67,00 mg EAG g⁻¹ (VV-Fr2), 55,99 mg EAG g⁻¹ (VV-Fr5), 29,38 mg EAG g⁻¹ (VV-Fr6), 30,77 mg EAG g⁻¹ (VV-Fr7) e 14,09 mg EAG g⁻¹. A fração VV-Fr1, apesar de não apresentar atividade antioxidante, obteve 74,44 mg EAG g⁻¹ na quantificação de fenólicos totais.

FIGURA 24 - Teor de fenólicos totais das amostras de *V. pyrantha*

Letras diferentes indicam diferença significativa entre as amostras pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: Dados experimentais obtidos pelo autor.

Através do teste de Tukey é possível observar que as amostras VV-EB, VV-Fr3 e VV-Fr8 não possuem diferença significativa estatisticamente nos dados de atividade antioxidante, diferente da VV-Fr5 (que apresentou a maior atividade), que apresentou diferença estatística.

Para o teor de fenólicos, as quatro amostras citadas na atividade antioxidante apresentam diferença estatística pelo mesmo teste. Em relação às amostras com maior quantidade de fenólicos, a resina bruta apresenta diferença estatística em relação às amostras VV-Fr3 e VV-Fr4, que não apresentam diferença.

5.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A atividade antimicrobiana das amostras de *V. pyrantha* foi avaliada pelo método da microdiluição em caldo. A resina (VV-EB) e as frações VV-Fr7 e VV-Fr8 apresentaram atividade contra *S. aureus* com CIM de 62.5, 3.125 e 12.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, sendo VV-Fr7 e VV-Fr8 bactericidas nas concentrações de 6.25 e 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

As frações VV-Fr2, VV-Fr4, VV-Fr5 e VV-Fr6 foram bacteriostáticas contra *S. epidermidis*, apresentando CIM de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para a VV-Fr2 e 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para as demais.

Frente à *B. subtilis*, as frações VV-Fr1 até VV-Fr6 apresentaram atividade com CIM de 500, 100, 100, 250, 500 e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente e a fração VV-Fr3 foi bactericida em 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. As frações VV-Fr7 e VV-Fr8 foram ativas contra *B. cereus* com MIC de 250 e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Em relação às bactérias Gram-negativas, todas as amostras foram ativas contra *S. choleraesuis* possuindo valores de CIM entre 100 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para as frações e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para a resina, além de apresentaram atividade bactericida em 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (VV-EB), 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (VV-Fr2, VV-Fr7 e VV-Fr8) e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (VV-Fr3). Já em relação à atividade contra *E. coli*, apenas a fração VV-Fr6 apresentou atividade, com CIM de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Nas concentrações testadas, nenhuma amostra apresentou atividade contra os demais micro-organismos e os dados obtidos de CIM e CMM, bem como a atividade biológica dos controles positivos utilizados está apresentado na tabela 7.

De um modo geral, pode-se observar que não houve seletividade nas amostras, havendo efeito bacteriostático e bactericida contra ambos os tipos de bactéria (Gram-positiva e Gram-negativa).

A atividade antimicrobiana contra *S. choleraesuis* e *S. aureus* foram potencializadas pelo fracionamento da resina, uma vez que os valores de CIM das frações foram maiores que os valores da resina contra esses dois micro-organismos.

A falta de atividade da resina e o aparecimento de atividade das frações contra *S. epidermidis*, *B. subtilis*, *B. cereus* e *E. coli* evidencia um possível efeito antagonista das substâncias na resina, já que o fracionamento da resina (separação das substâncias) resultou na aparição de atividade antimicrobiana.

Além disso, é interessante a observação de que a VV-Fr7 obteve efeito bactericida na mesma concentração (3,125 $\mu\text{g mL}^{-1}$) em que o controle positivo (cloranfenicol) foi bacteriostático contra *S. aureus*.

TABELA 7 - Atividade antimicrobiana das amostras de *V. pyrantha*

Amostras	Bactérias Gram-positivas				Bactérias Gram-negativas			Fungos	
	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. choleraesuis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>
VV-EB	62,5 (n.a.)	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	500 (500)	n.a.	n.a.
VV-Fr1	n.a.	n.a.	500 (n.a.)	n.a.	n.a.	n.a.	100 (n.a.)	n.a.	n.a.
VV-Fr2	n.a.	100 (n.a.)	100 (n.a.)	n.a.	n.a.	n.a.	50 (100)	n.a.	n.a.
VV-Fr3	n.a.	n.a.	100 (100)	n.a.	n.a.	n.a.	50 (50)	n.a.	n.a.
VV-Fr4	n.a.	25 (n.a.)	250 (n.a.)	n.a.	n.a.	n.a.	100 (n.a.)	n.a.	n.a.
VV-Fr5	n.a.	25 (n.a.)	500 (n.a.)	n.a.	n.a.	n.a.	100 (n.a.)	n.a.	n.a.
VV-Fr6	n.a.	25 (n.a.)	500 (n.a.)	n.a.	100 (n.a.)	n.a.	100 (n.a.)	n.a.	n.a.
VV-Fr7	3,125 (6,25)	n.a.	n.a.	250 (n.a.)	n.a.	n.a.	100 (100)	n.a.	n.a.
VV-Fr8	12,5 (25)	n.a.	n.a.	500 (n.a.)	n.a.	n.a.	50 (100)	n.a.	n.a.
Cloranfenicol	3,125 (n.a.)	3,125 (n.a.)	1,562 (1,562)	3,125 (6,25)	-	-	-	-	-
Benzilpenicilina	0,039 (n.a.)	2,5 (n.a.)	0,078 (0,078)	-	-	-	-	-	-
Garamicina	-	-	-	-	0,625 (n.a.)	1,25 (n.a.)	0,039 (0,078)	-	-
Loprox	-	-	-	-	-	-	-	12,5 (n.a.)	12,5 (25)

CIM (CMM) em $\mu\text{g mL}^{-1}$. N.a.: não-ativa nas concentrações testadas. **Micro-organismos:** *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella choleraesuis*, *Candida albicans* e *Candida glabrata*. **Concentrações testadas** (em $\mu\text{g mL}^{-1}$): amostras (3,9 – 500), cloranfenicol (0,19 – 25), benzilpenicilina (0,039 – 5), sulfato de gentamicina (0,039 – 5) e loprox (0,39 – 50).

5.3 ATIVIDADE CITOTÓXICA

A viabilidade das amostras para atividade citotóxica em células tumorais foi analisada em um ensaio de concentração única utilizando as amostras na concentração de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os resultados obtidos nesses ensaios estão apresentados na forma de porcentagens de inibição celular \pm erro padrão (tabela 8) da média de dois experimentos independentes realizados em triplicata pelo método do *alamar blue* após 72 horas de exposição.

TABELA 8 - Porcentagem de inibição de proliferação celular em concentração única das amostras de *V. pyrantha*

Amostra	HCT116	B16F10
VV-EB	116,8 \pm 9,80	90,36 \pm 20,86
VV-Fr1	94,67 \pm 13,07	75,51 \pm 10,90
VV-Fr2	116,7 \pm 10,56	107,1 \pm 6,72
VV-Fr3	116,4 \pm 10,39	106,8 \pm 6,59
VV-Fr4	116,1 \pm 9,74	107,1 \pm 6,32
VV-Fr5	116,7 \pm 10,38	107,7 \pm 6,18
VV-Fr6	113,8 \pm 9,40	107,3 \pm 6,03
VV-Fr7	116,9 \pm 10,70	107,7 \pm 6,21
VV-Fr8	59,50 \pm 18,33	83,49 \pm 11,83
DOX	82,84 \pm 15,32	103,3 \pm 5,46

Linhagens: HCT116 (carcinoma de cólon humano) e B16F10 (melanoma murino).
Concentração testada: 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$. **Controle positivo:** doxorubicina (DOX).

As amostras de *V. pyrantha* apresentaram resultados de inibição entre 116,9% (VV-Fr7) e 59,50% (VV-Fr8) para a linhagem HCT116, representante do carcinoma de cólon humano. Para as células B16F10, de melanoma murino, os valores apresentaram variação de 107,7% (VV-Fr5 e VV-Fr7) a 75,51% (VV-Fr1).

A fração VV-Fr7 se destacou na atividade citotóxica, apresentando os maiores valores de inibição para ambas as linhagens enquanto os menores valores foram observados na fração VV-Fr8 (para a HCT116) e em VV-Fr1 (para a B16F10).

Além disso, em ambos os casos é interessante notar que os valores de porcentagem são semelhantes para a maior parte das amostras, permanecendo em torno de 116% para HCT116 (VV-EB, VV-Fr2, VV-Fr3, VV-Fr4, VV-Fr5 e VV-Fr7) e em torno de 107% para o B16F10 (VV-Fr2, VV-Fr4, VV-Fr5, VV-Fr6 e VV-Fr7).

De acordo com o protocolo do LETI/FIOCRUZ, todas as amostras com pelo menos 75% de inibição da proliferação celular para pelo menos uma das linhagens são consideradas ativas e selecionadas para o cálculo do valor de IC₅₀ por regressão não-linear através do programa GraphPad Prisma versão 5.0. Dessa forma, todas as amostras foram selecionadas para o cálculo de IC₅₀ por apresentarem resultados promissores. Os resultados obtidos contra diferentes linhagens estão apresentados na tabela 9, com os valores de IC₅₀ e seus respectivos intervalos de confiança de 95%, obtidos a partir de três experimentos independentes realizados em duplicata pelo método do *alamar blue* após 72 horas de exposição com as células:

TABELA 9 - Valores de IC₅₀ para atividade citotóxica das amostras de *V. pyrantha* contra diferentes linhagens de células tumorais e não tumorais (MRC-5)

Amostra	MCF-7	HCT116	HepG2	B16F10	MRC-5
VV-EB	21,98 19,16 – 25,22	20,08 13,91 – 28,97	20,50 16,04 – 26,20	12,17 9,85 – 15,02	26,47 21,54 – 32,54
VV-Fr1	28,65 23,60 – 34,78	30,44 25,72 – 36,02	41,80 34,11 – 51,23	34,46 28,33 – 41,93	39,28 32,41 – 47,60
VV-Fr2	18,05 14,98 – 21,74	19,93 13,93 – 28,52	21,12 17,13 – 26,03	11,16 8,31 – 14,98	20,17 16,40 – 24,80
VV-Fr3	19,89 14,06 – 28,12	14,96 10,65 – 21,03	16,44 13,04 – 20,72	6,96 5,29 – 9,22	20,22 15,96 – 25,61
VV-Fr4	16,12 11,45 – 22,70	15,95 11,87 – 21,44	16,07 13,27 – 19,47	14,53 10,79 – 19,56	16,89 14,56 – 19,59
VV-Fr5	22,63 14,89 – 34,40	26,68 25,32 – 28,12	19,88 9,83 – 40,18	12,87 10,76 – 15,39	30,58 22,88 – 40,87
VV-Fr6	16,29 9,67 – 27,45	27,23 25,27 – 29,33	26,85 18,86 – 38,23	19,08 16,04 – 22,69	30,86 22,29 – 42,71
VV-Fr7	20,92 14,66 – 29,85	27,70 25,06 – 30,61	28,12 24,67 – 32,05	16,25 11,64 – 22,68	29,03 23,35 – 36,09
VV-Fr8	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
DOX	1,56 0,93 – 2,61	0,06 0,05 – 0,08	0,03 0,01 – 0,07	0,03 0,02 – 0,05	1,73 1,00 – 2,99

n.a.: não-ativa nas concentrações testadas. **Linhagens:** MCF-7 (carcinoma de mama humano), HCT116 (carcinoma de cólon humano), HepG2 (carcinoma hepatocelular humano), B16F10 (melanoma murino), MRC-5 (fibroblasto de pulmão humano). **Concentrações testadas:** 0,19 – 50 µg mL⁻¹. **Controle positivo:** doxorubicina (DOX).

Conforme esperado, a fração VV-Fr8 não apresentou citotoxicidade para nenhuma das células testadas. O extrato bruto apresentou IC₅₀ de 21,98 µg mL⁻¹ para MCF-7. Esse valor foi potencializado para as frações VV-Fr2 (18,05 µg mL⁻¹), VV-Fr3 (19,89 µg mL⁻¹), VV-Fr4 (16,12 µg mL⁻¹), VV-Fr6 (16,29 µg mL⁻¹) e VV-Fr7 (20,92 µg mL⁻¹) enquanto as demais frações apresentaram menor atividade, com valores de 28,65 µg mL⁻¹ (VV-Fr1) e 22,63 µg mL⁻¹ (VV-Fr5).

Em relação às células de carcinoma de cólon, HCT116, o valor de IC₅₀ do extrato bruto (20,08 µg mL⁻¹) foi potencializado nas frações VV-Fr2 (19,93 µg mL⁻¹),

VV-Fr3 ($14,96 \mu\text{g mL}^{-1}$) e VV-Fr4 ($15,95 \mu\text{g mL}^{-1}$) e enfraquecido nas frações VV-Fr1 ($30,44 \mu\text{g mL}^{-1}$), VV-Fr5 ($26,68 \mu\text{g mL}^{-1}$), VV-Fr6 ($27,23 \mu\text{g mL}^{-1}$) e VV-Fr7 ($27,70 \mu\text{g mL}^{-1}$).

O VV-EB apresentou citotoxicidade em $20,50 \mu\text{g mL}^{-1}$ contra as células de carcinoma hepatocelular (HepG2) enquanto as frações VV-Fr3 ($16,44 \mu\text{g mL}^{-1}$), VV-Fr4 ($16,07 \mu\text{g mL}^{-1}$) e VV-Fr5 ($19,88 \mu\text{g mL}^{-1}$) apresentaram melhor atividade. As frações VV-Fr1, VV-Fr2, VV-Fr6 e VV-Fr7 tiveram IC_{50} de 41,80, 21,12, 26,85 e 28,12 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente.

Contra o câncer de pele, representado pelas células de melanoma murino (B16F10), o VV-EB apresentou IC_{50} de $12,17 \mu\text{g mL}^{-1}$ enquanto as frações VV-Fr2 ($11,16 \mu\text{g mL}^{-1}$) e VV-Fr3 ($6,96 \mu\text{g mL}^{-1}$) apresentaram melhor atividade. As frações VV-Fr1, VV-Fr4, VV-Fr5, VV-Fr6 e VV-Fr7 tiveram IC_{50} de 34,46, 14,53, 12,87 e 19,08 e 16,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente.

As células de fibroblasto de pulmão representam células não tumorais, servindo como um tipo de controle. A atividade citotóxica quantificada apresentou os resultados de $26,47 \mu\text{g mL}^{-1}$ para o VV-EB, $39,28 \mu\text{g mL}^{-1}$ para VV-Fr1, $20,17 \mu\text{g mL}^{-1}$ para VV-Fr2, $20,22 \mu\text{g mL}^{-1}$ para VV-Fr3, $16,89 \mu\text{g mL}^{-1}$ VV-Fr4, $30,58 \mu\text{g mL}^{-1}$ para VV-Fr5, $30,86 \mu\text{g mL}^{-1}$ VV-Fr6 e $29,03 \mu\text{g mL}^{-1}$ para VV-Fr7.

Embora a metodologia *in vitro* utilizando cultura de células tumorais humanas seja prática e eficiente na identificação de princípios ativos e em estudo de mecanismo de ação, a etapa fundamental para o desenvolvimento de novas drogas é a comprovação de sua atividade biológica em modelos experimentais *in vivo*, utilizando animais de laboratório, uma vez que a atividade observada em modelos *in vitro* nem sempre se repetem nos modelos *in vivo* por conta de problemas de biodisponibilidade ou de metabolização daquelas substâncias no organismo de um animal (SMITH; NGO; MARTIN; WOLF, 2005).

Dessa forma, os valores obtidos pelo método do *alamar blue* representam certa toxicidade para as células testadas, inclusive para células saudáveis, mas os ensaios *in vivo* precisam ser realizados para que os resultados sejam realmente significativos em relação à isso, já que o modelo *in vivo* vai permitir a obtenção de informações sobre a farmacocinética e a farmacodinâmica do novo composto.

Segundo o programa de triagem de drogas citotóxicas utilizado pelo LETI/FIOCRUZ, os extratos com valores de IC₅₀ menores que 30 µg mL⁻¹ são considerados promissores (BOIK, 2001; SUFFNESS; PEZZUTO, 1990). Deste modo, dentre as amostras testadas, observa-se que todas, com exceção da VV-Fr8, apresentaram atividade citotóxica promissora. No entanto, um estudo combinado dos modelos *in vitro* e *in vivo* é o mais indicado para uma conclusão mais definitiva a respeito do potencial anticâncer dessas amostras.

5.4 PERFIL METABOLÔMICO

Uma breve análise das tabelas de substâncias isoladas do gênero *Vellozia* permite a observação de diversos isômeros, ou seja, diferentes substâncias com mesma fórmula molecular e conseqüentemente, mesma massa molecular. Desta forma, a identificação do perfil metabolômico foi realizada identificando os compostos por suas fórmulas moleculares.

O cruzamento dos dados teóricos (calculados pelas plataformas *online*) com os experimentais (obtidos por CLAE-EM) por meio das fórmulas moleculares levou até a identificação de 11 substâncias, todas com diferentes isômeros (1 flavonoide, 9 diterpenos e 1 norditerpeno). Ou seja, 11 metabólitos identificados apenas pela fórmula e massa molecular. Além disso, foram identificadas mais 17 substâncias de estrutura definida (sem a presença de isômeros): 7 norditerpenos, 6 diterpenos, 1 bisditerpeno, 1 triterpeno, 1 esteroide e 1 ácido graxo.

Os dados apresentados na tabela 10 incluem os dados descritivos das substâncias e isômeros identificados. A estrutura desses compostos pode ser vista nas tabelas 1, 2 e 3 (páginas 52, 87 e 106) de acordo com a informação encontrada na coluna "identificação" (tabela 10), que indica o número e a tabela específica em que essas substâncias aparecem no tópico das substâncias identificadas do gênero *Vellozia* encontradas no levantamento. Os dados experimentais de CLAE-EM descritos na tabela 10 incluem os valores de desvio, a classe dos metabólitos, nomes, tempos de retenção, fórmulas moleculares, massas moleculares e os adutos utilizados na identificação. Das substâncias identificadas, quatro se destacam por apresentar

atividades biológicas já reportadas na literatura, não havendo relato da atividade biológica das demais.

A fórmula molecular $C_{20}H_{28}O_4$ refere-se a duas possíveis substâncias: os isômeros candidalactona (78, tabela 1) e epoxivellozina (82, tabela 1). A candidalactona foi isolada anteriormente por Valente *et al* (1997) da *V. cândida*, tendo atividade anticâncer avaliada contra linhagens mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* e apresentando toxicidade moderada.

A Isopimara-8(9),15-dien-1,3,7,11-tetraona (19, tabela 1) e os dois possíveis isômeros 3,20-epóxi-3-hidróxi-cleistantha-8,11,13-trien-7-ona ($C_{20}H_{26}O_3$, 58, tabela 1) e 3-hidróxi-cleistantha-8,11,13-trien-7-ona ($C_{20}H_{28}O_2$, 71, tabela 1) foram isolados da *V. gigantea* por Ferreira *et al* (2017) e apresentaram atividade herbicida contra alface (*Lactuca sativa*), lentilha (*Lemna paucicostata*) e *Agrostis stolonifera* além da atividade larvicida contra larvas de *Aedes aegypti*.

TABELA 10 - Metabólitos identificados nas amostras da resina de *V. pyrantha* por CLAE-EM

Identificação	ΔPPM	Classe	Nome	RT (min)	Fórmula	Massa	Aduto
3, T1	6.46	Norditerpeno	13,14,15,16-tetranor-friedolabd-5(6)-en-12-ol	19.57	C ₁₆ H ₂₈ O	259.2021096	[M+Na] ⁺
4, T1	7.28	Norditerpeno	2-oxo-13,14,15,16-tetranor-clerod-3-en-12-oic acid	19.50	C ₁₆ H ₂₄ O ₃	265.1823012	[M+H] ⁺
5, T1	1.10	Norditerpeno	13-hydroxy-15,16-bis-nor-isopimarane-8,20-olide	15.38	C ₁₈ H ₂₈ O ₃	315.1932691	[M+Na] ⁺
6, T1	1.91	Norditerpeno	(20R)-8,20-epoxy-15,16-bis-nor-isopimarane-13,20-diol	15.40	C ₁₈ H ₃₀ O ₃	317.2086583	[M+Na] ⁺
7, T1	0.73	Norditerpeno	7β,8β,13α-trihydroxy-15,16-bis-nor-isopimar-18-oic acid	18.10	C ₁₈ H ₃₀ O ₅	327.2173881	[M+H] ⁺
13, T1	5.65	Norditerpeno	20-nor-isopimara-8(9),15-dien-7,11-dione	19.32	C ₁₉ H ₂₆ O ₂	309.1813025	[M+Na] ⁺
16/17, T1	4.95	Norditerpeno	8-hydroxy-18-nor-isopimara-4(19),15-dien-7-one (norcompactone) / 11β-hydroxy-20-nor-isopimara-8(9),15-dien-7-one	14.81	C ₁₉ H ₂₈ O ₂	289.2142382	[M+H] ⁺
18, T1	6.57	Norditerpeno	8,14-dihydroxy-18-nor-isopimara-4(19),15-dien-7-one	13.65	C ₁₉ H ₂₈ O ₃	305.2136745	[M+H] ⁺
48, T1	9.59	Diterpeno	Cleistantha-6,8,11,13-tetraene	21.14	C ₂₀ H ₂₈	269.2243441	[M+H] ⁺
51, T1	5.51	Diterpeno	Cleistantha-1,8,11,13-tetraen-3,7-dione	15.83	C ₂₀ H ₂₄ O ₂	297.1838188	[M+H] ⁺
52/53/54, T1	2.34	Diterpeno	7-oxo-cleistantha-8,11,13-trien-19,20β-olide / 3-oxo-cleistantha-8,11,13-trien-7,16-olide / (5S,7S,10R)-7α,16:7β,20-diepoxy-cleistantha-8,11,13-trien-3-one	16.16	C ₂₀ H ₂₄ O ₃	313.1796384	[M+H] ⁺
19, T1	1.36	Diterpeno	Isopimara-8(9),15-dien-1,3,7,11-tetraone	13.72	C ₂₀ H ₂₄ O ₄	329.1748374	[M+H] ⁺
55, T1	11.22	Diterpeno	Cleistantha-5,8,11,13-tetraen-7-one	14.46	C ₂₀ H ₂₆ O	283.2030139	[M+H] ⁺
56/57, T1	0.48	Diterpeno	7-oxo-cleistantha-8,11,13-trien-20-al / Cleistantha-8,11,13-trien-3,7-dione	20.44	C ₂₀ H ₂₆ O ₂	321.1832032	[M+Na] ⁺
20/58/59/60/61/77, T1	8.73	Diterpeno	7-oxo-isopimara-8(9),15-dien-12,20-olide / 3,20-epoxy-3-hydroxy-cleistantha-8,11,13-trien-7-one / 7-oxo-cleistantha-8,11,13-trien-17-oic acid / 7-oxo-cleistantha-8,11,13-trien-19-oic acid / (3S,5S,7S,10R)-7α,16:7β,20-diepoxy-cleistantha-8,11,13-trien-3β-ol / Velloziolide	15.38	C ₂₀ H ₂₆ O ₃	315.1932691	[M+H] ⁺
62, T1	1.22	Diterpeno	Cleistantha-8,11,13-trien-17,19-dioic acid	14.96	C ₂₀ H ₂₆ O ₄	353.1724488	[M+Na] ⁺
63/64/65/66/84, T1	5.84	Diterpeno	(4R,5S,10S)-Cleistantha-8,11,13-trien-19-al / (5S,10S)-Cleistantha-8,11,13-trien-7-one / Cleistantha-8,11,13-trien-17-al (veadeiral) / Cleistantha-8,11,13-trien-3-one / Ent-kaura-9(11),16-dien-12-one	0.10	C ₂₀ H ₂₈ O	307.2019915	[M+Na] ⁺
21/67/68/69/70/71/72/92, T1	3.82	Diterpeno	Isopimara-8(9),15-dien-7,11-dione / Cleistantha-8,11,13-trien-17-oic acid (veadeiroic acid) / 6α-hydroxy-cleistantha-8,11,13-trien-7-one / 20-hydroxy-cleistantha-8,11,13-trien-7-one / 11-hydroxy-cleistantha-8,11,13-trien-7-one / 3-hydroxy-cleistantha-8,11,13-trien-7-one / (4R,5S,10S)-Cleistantha-8,11,13-trien-19-oic acid / 15,16-epoxy-cleroda-3,13(16),14-trien-2-one	14.51	C ₂₀ H ₂₈ O ₂	323.1974642	[M+Na] ⁺

22/73/81/93, T1	2.36	Diterpeno	12 β -hydroxy-isopimara-8(9),15-dien-7,11-dione / 14 α -hydroxy-cleistantha-8,12-dien-7,11-dione / 5,10-epoxy-11-hydroxy-rosane-1,15-dien-3-one (epoxicorcovadin) / 2-oxo-cleroda-3,13-dien-15,16-olide	16.95	C ₂₀ H ₂₈ O ₃	339.1928139	[M+Na] ⁺
78/82, T1	3.98	Diterpeno	Candidalactone / 5,10-epoxy-7,11-dihydroxy-rosane-7,15-dien-6-one (epoxivellozin)	15.98	C ₂₀ H ₂₈ O ₄	355.1871175	[M+Na] ⁺
26/83, T1	6.31	Diterpeno	15,16-epoxy-11 β -hydroxy-isopimar-8(9)-en-7-one (11 β -hydroxy-nanuzone) / 10S,11R-dihydroxy-rosane-5,15-dien-7-one (candidenodiol)	15.02	C ₂₀ H ₃₀ O ₃	319.2253057	[M+H] ⁺
28, T1	4.83	Diterpeno	8,14 β -dihydroxy-7-oxo-isopimar-15-en-18-oic acid	14.72	C ₂₀ H ₃₀ O ₅	351.2154548	[M+H] ⁺
44/45/90, T1	9.42	Diterpeno	Isopimar-15-en-7,8,18-triol (compactotriol) / Isopimar-15-en-7,8,14-triol / 3 β -hydroxylabd-8(17)-en-15-oic acid	19.31	C ₂₀ H ₃₄ O ₃	345.2373126	[M+Na] ⁺
99, T1	4.96	Bisditerpeno	Bismagdalenic acid	15.05	C ₄₀ H ₆₀ O ₄	605.4539824	[M+H] ⁺
111, T1	7.90	Triterpeno	20-hydroxylupan-3-one	21.27	C ₃₀ H ₅₀ O ₂	465.3745271	[M+Na] ⁺
122, T1	6.12	Esteroides	Stigmasta-5,22-dien-3 β -ol (stigmasterol)	22.77	C ₂₉ H ₄₈ O	435.362949	[M+Na] ⁺
145/166, T2	5.86	Flavonoide	8-C-methylvelloquercetin 3,5,3'-trimethyl ether/Velloquercetin 3,5,3',4'-tetramethyl ether	0.07	C ₂₄ H ₂₄ O ₇	425.1575406	[M+H] ⁺
187, T3	6.37	Ácido graxo	Ácido oleico	19.41	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	305.2437056	[M+Na] ⁺

T1: tabela 1 (página 52), **T2:** tabela 2 (página 87), **T3:** tabela 3 (página 106).

6 DISCUSSÃO

As análises por CLAE-EM resultam na obtenção de cromatogramas e espectros de massa complexos, não dando uma lista comparativa ou clara dos metabólitos presentes, por exemplo. Por conta disso, o tratamento de dados metabolômicos é dividido em processamento de dados e análise dos dados.

O processamento de dados tem o objetivo principal de transformar os dados brutos tridimensionais (como os valores de relação m/z , tempo de retenção e intensidade ou área detectada) dos cromatogramas e espectros em dados em uma matriz bidimensional com a intensidade de cada metabólito encontrado nas amostras (CANUTO, 2016; YI; DONG; YUN; DENG *et al.*, 2016).

Outras etapas importantes no processamento de dados metabolômicos são o alinhamento dos picos e o preenchimento de lacunas, ambas realizadas por algoritmos. A primeira etapa é feita para corrigir oscilações aleatórias de tempo de retenção de um mesmo pico entre diferentes amostras e a segunda é utilizada para recuperar sinais que podem ter sido eliminados nas etapas anteriores (BELINATO; BAZIOLI; SUSSULINI; AUGUSTO *et al.*, 2019).

Diversos processos podem diminuir a exatidão e precisão das análises por CLAE-EM. Os sinais analíticos do cromatograma, por exemplo, possuem influência dos ruídos e da sensibilidade do equipamento. Por conta disso, os dados metabolômicos precisam ser normalizados para que sejam diminuídos os erros tendenciosos e a integridade das diferenças biológicas seja mantida (CANUTO, 2016; KALOGIOURI; AALIZADEH; DASENAKI; THOMAIDIS, 2020).

De acordo com Yi *et al* (2016), a normalização remove variações confusas atribuídas a fontes experimentais, como ruído analítico ou de viés experimental, e retém variações relevantes atribuídas a eventos biológicos.

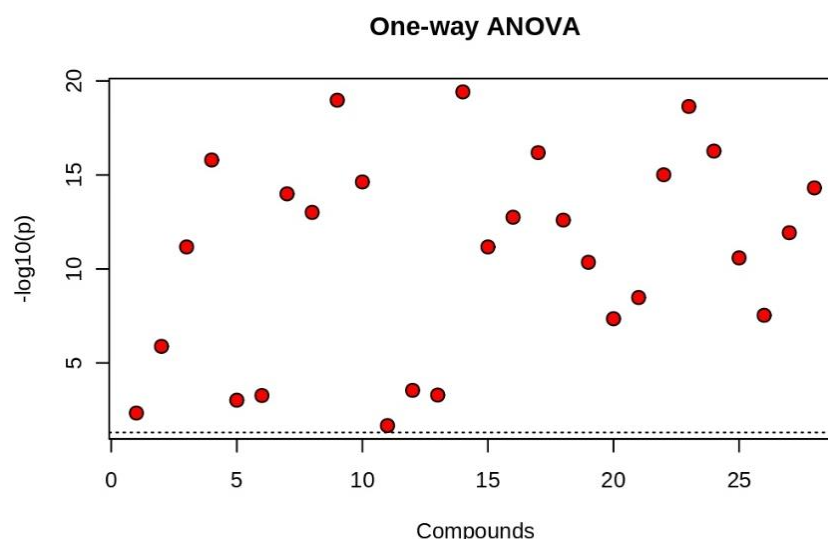
Dessa forma, para que amostras diferentes sejam comparadas entre si no mesmo estudo, a variação sistêmica e escalar dos dados deve deixar de existir, exigindo que a normalização dos dados seja feita (BELINATO; BAZIOLI; SUSSULINI; AUGUSTO *et al.*, 2019).

Com a matriz de dados devidamente obtida, as informações relevantes são retiradas por meio das análises estatísticas. A análise de variância de uma via (*one way ANOVA*) é uma ferramenta estatística utilizada para avaliar a variância de diferentes grupos e determinar se os dados advêm de populações iguais ou diferentes, atribuindo significância aos compostos identificados em análises (HOFFMAN, 2015; KALOGIOURI; AALIZADEH; DASENAKI; THOMAIDIS, 2020).

No entanto, os resultados da ANOVA não identificam quais as diferenças existentes entre os grupos. Para que as diferenças sejam exploradas, os testes de de comparação múltipla, ou *post hoc*, são recomendados, a exemplo do teste de menor diferença significativa (LSD) de Fisher, que compara as médias em pares e cria intervalos de confiança para todas as diferenças de pares. Sendo assim, o gráfico de ANOVA, junto com os valores do teste de *post hoc* ajudam na seleção dos dados mais relevantes no conjunto de amostras testado, determinando quais valores são significantes na diferenciação dos grupos de amostra.

Os dados de CLAE-EM foram submetidos à ANOVA (figura 25) e quando constatada diferenças significativas, as médias eram comparadas pelo método de LSD conforma os dados apresentados no *post hoc* disponível no anexo C.

FIGURA 25 - ANOVA dos compostos identificados por CLAE-EM



Cada ponto representa uma fórmula molecular das apresentadas na tabela 10.

Fonte: Dados experimentais plotados pelo MetaboAnalyst 4.0

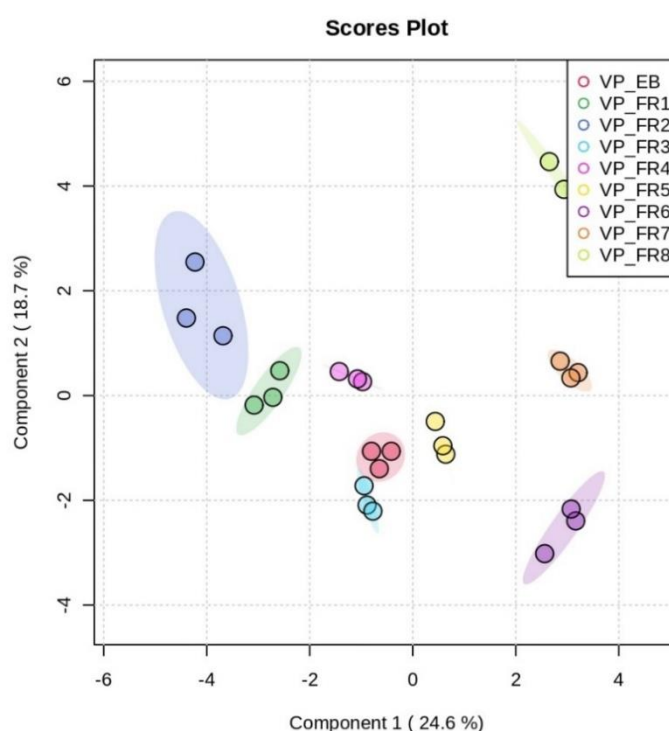
De modo geral, todos os metabólitos apresentados acima da linha tracejada num gráfico de ANOVA apresentam variação significativa. Desta forma, todas as 28

substâncias identificadas apresentam variação significativa na diferenciação das amostras de resina e frações de *V. pyrantha* mediante a análise de variância.

A análise multivariada foi feita principalmente por análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA, do inglês, *Partial Least Squares-Discriminant Analysis*) e análise de agrupamento hierárquico. A PLS-DA é um método supervisionado de análise multivariada que permite a classificação de diferentes amostras de acordo com o seu perfil metabólico, associando uma classe a cada observação e permitindo a visualização de separações entre as amostras analisadas (WESTERHUIS; HOEFSLOOT; SMIT; VIS *et al.*, 2008).

O gráfico de PLS-DA é bastante utilizado em análises metabolômicas por fornecer a visualização gráfica da classificação dos dados, permitindo a identificação de padrões de separação e ajudando no estabelecimento de relações entre as diferentes amostras (KALOGIOURI; AALIZADEH; DASENAKI; THOMAIDIS, 2020; SUGIMOTO; KAWAKAMI; ROBERT; SOGA *et al.*, 2012). A semelhança na composição das amostras de *V. pyrantha* foi visualizada e avaliada por PLSA-DA (figura 26).

FIGURA 26 - Gráfico de PLS-DA das amostras de *V. pyrantha*



Fonte: Dados experimentais plotados pelo MetaboAnalyst 4.0

O componente principal 1 explicou 24,6% da variância total enquanto o componente principal 2 explicou 18,7% da variância total.

A maior parte da variação na composição dos metabólitos pode ser atribuída ao gradiente de polaridade utilizado no fracionamento inicial da VV-EB, uma vez que a polaridade do solvente vai afetar no tipo de metabólitos extraídos, que por sua vez, vai afetar a composição das amostras. Por conta disso, pode-se inferir que a composição das amostras polares (obtidas em sistemas com maior polaridade e em metanol) é bem diferente da composição das amostras apolares (obtidas em hexano e nos sistemas iniciais).

A simples análise visual do gráfico de PLS-AD permite a visualização de que a VV-EB se encontra no centro da distribuição no gráfico, com as frações iniciais (VV-Fr1, VV-Fr2, VV-Fr3, VV-Fr4 e VV-Fr5) ao redor enquanto as últimas frações (VV-Fr6, VV-Fr7 e VV-Fr8) encontram-se mais afastadas das outras. Logo, percebe-se que a inferência acerca da composição diferente por conta da polaridade está correta.

O gráfico permite identificar também que a composição de VV-Fr1, VV-Fr2, e VV-Fr4 apresentam maior semelhança entre si enquanto VV-Fr3 e VV-Fr5 se assemelham mais com a resina bruta (VV-EB). As amostras mais polares são diferentes das demais, mas também não se agrupam, possuindo composição diferente também entre elas mesmas.

Com o intuito de avaliar a qualidade e confiabilidade dos resultados apresentados na PLS-DA, a validação cruzada (*cross validation*, CV) é utilizada, funcionando como um método de validação de modelos de classificação como a PCA e a PLS-DA. A CV é uma das técnicas de validação mais utilizadas por conta da sua capacidade de selecionar os modelos com base na capacidade de previsão dos mesmos (WESTERHUIS; HOEFSLOOT; SMIT; VIS *et al.*, 2008).

A PLS-DA foi avaliada pelo método *Leave One Out Cross Validation* (LOOCV). Esse método consiste em escolher uma das amostras para compor o conjunto de validação e as demais amostras remanescentes são usadas para o conjunto de treinamento. Posteriormente uma nova amostra é retirada para integrar o conjunto de treinamento até que todas sejam avaliadas (CHONG; WISHART; XIA, 2019; WESTERHUIS; HOEFSLOOT; SMIT; VIS *et al.*, 2008)

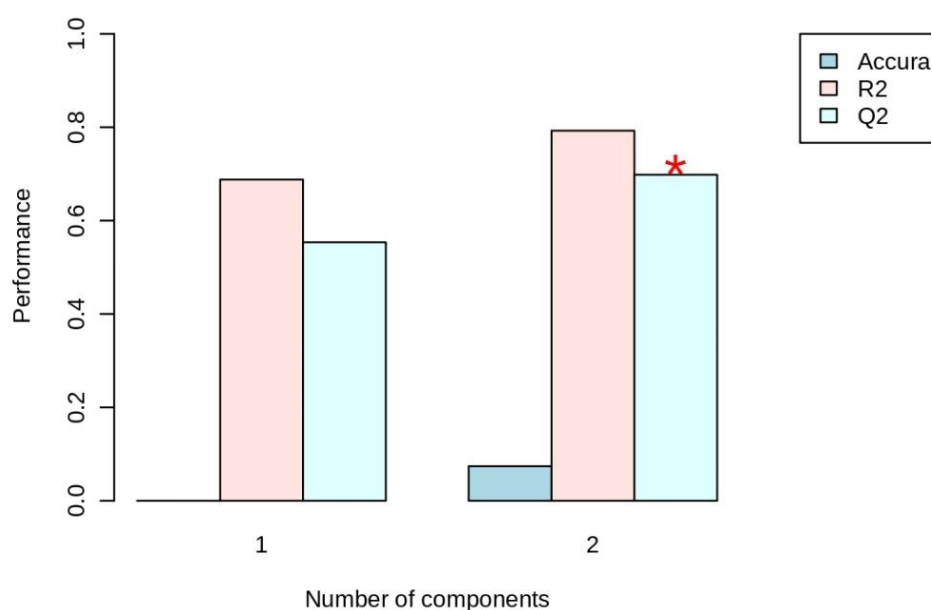
Existem três fatores obtidos nas análises de validação cruzada: a eficácia da previsão (*Accuracy*) e os parâmetros de exatidão Q^2 e R^2 . Na validação cruzada da PLS-DA das amostras de *V. pyrantha* (figura 27) os valores obtidos são descritos na tabela 11.

TABELA 11 - Parâmetros da validação cruzada de amostras de *V. pyrantha*

Medida	Componente 1	Componente 2
<i>Accuracy</i>	0.0	0.074074
Q^2	0.55363	0.69823
R^2	0.68782	0.79266

De acordo com Cohen (1988) e Hair Jr. *et al* (2014) , os valores de R^2 acima de 26% e Q^2 maior que zero garantem relevância às análises. Sendo assim, a validação cruzada do modelo plotado (figura 27) então garantiu relevância ao PLS-DA, uma vez que foram apresentados valores de R^2 em 79.2% e Q^2 de 0.69.

FIGURA 27 - Validação cruzada da PLS-DA das amostras

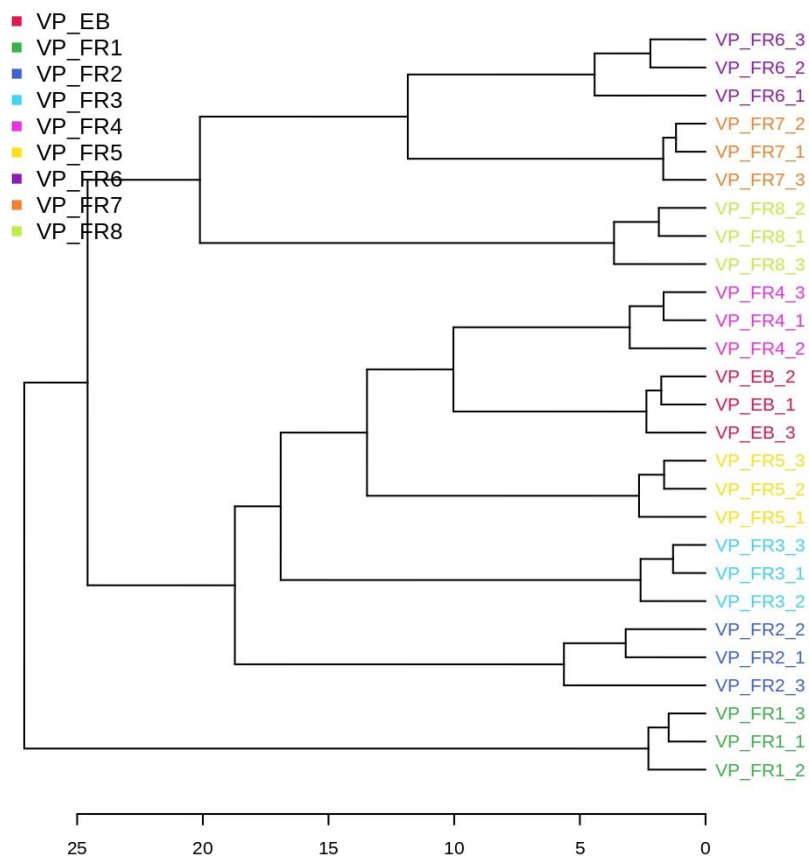


Fonte: Dados experimentais plotados pelo MetaboAnalyst 4.0

A semelhança na composição das amostras foi visualizada também por análise de agrupamento hierárquico (*clustering analysis*), um método estatístico que envolve a divisão dos dados estudados em diferentes subgrupos organizados hierarquicamente por meio de dendogramas (SUGIMOTO; KAWAKAMI; ROBERT; SOGA *et al.*, 2012). De um modo geral, as observações de agrupamento visualizadas

na PLS-DA foram confirmadas pelo agrupamento hierárquico, conforme pode ser visto na figura 28:

FIGURA 28 - Análise de agrupamento



Fonte: Dados experimentais plotados pelo MetaboAnalyst 4.0

É possível identificar no gráfico de *clustering* que a composição das frações VV-Fr2, VV-Fr3, VV-Fr4 e VV-Fr5 é semelhante à composição da resina (VV-EB) enquanto as frações VV-Fr6, VV-Fr7 e VV-Fr8 possuem composição semelhante entre elas. Mais uma vez, é observado que a VV-EB está posicionada no centro do agrupamento e que a composição das amostras, no geral, pode ser separada em relação à polaridade das amostras.

A diferença observada na análise de agrupamento em relação à PLS-DA é a composição da VV-Fr1, que não forma agrupamento, estando em hierarquia com o agrupamento de todas as outras amostras. Essa diferença pode não ser tão significativa, uma vez que o agrupamento hierárquico utiliza medidas estatísticas

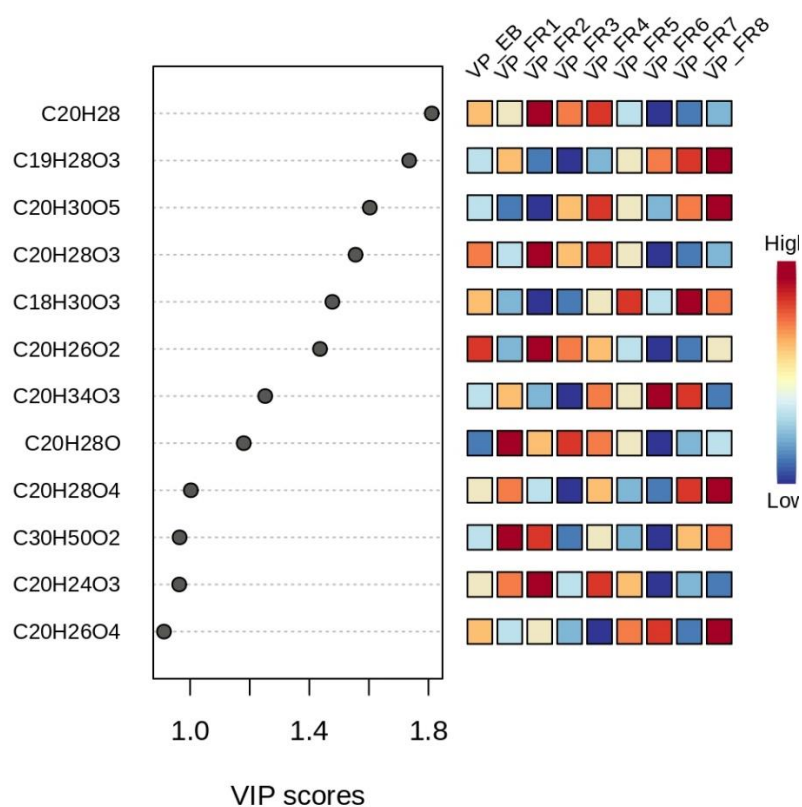
simples para calcular a distância entre diferentes amostras biológicas e raras vezes essa distância é igual a distância biológica real (CHONG; WISHART; XIA, 2019).

A seleção de variáveis é uma ferramenta que visa extrair informações acerca de metabólitos importantes a partir dos valores experimentais, como os valores de m/z detectados por espectrometria de massas, com o intuito de responder as questões biológicas e por conta disso desempenha um papel essencial na área de metabolômica (YI; DONG; YUN; DENG *et al.*, 2016)

Os metabólitos de *V. pyrantha* discriminantes que contribuem para a separação das amostras foram selecionados nos modelos de PLS-DA através do gráfico de Importância da Variável na Projeção (*Variable Importance on Projection*, VIP) utilizando os valores de VIP score ($VIP > 1$), que de acordo com Yi *et al* (2016), indicam a importância de cada variável dentro do modelo projetado em um PLS-DA.

Das 28 substâncias identificadas nas amostras de *V. pyrantha*, nove apresentaram valores de $VIP > 1$, conforme pode ser observado no gráfico de VIP (figura 29) e nos resultados obtidos no MetaboAnalyst 4.0 (anexo D).

FIGURA 29 - Gráfico de VIP scores das amostras e metabólitos de *V. pyrantha*



Fonte: Dados experimentais plotados pelo MetaboAnalyst 4.0

Os metabólitos discriminantes nas amostras de *V. pyrantha* foram os de fórmula molecular $C_{20}H_{28}O_4$, $C_{20}H_{28}O$, $C_{20}H_{34}O_3$, $C_{20}H_{26}O_2$, $C_{18}H_{30}O_3$, $C_{20}H_{28}O_3$, $C_{20}H_{30}O_5$, $C_{19}H_{28}O_3$ e $C_{20}H_{28}$, todos diterpenos com valores de VIP score entre 1,01 ($C_{20}H_{28}O_4$) e 1,70 ($C_{20}H_{28}$). Dessa forma, o metabólito mais importante nas nossas análises foi o Cleistanta-6,8,11,13-tetraeno ($C_{20}H_{28}$), um diterpeno aromático de esqueleto cleistantano. A maior contribuição de um diterpeno de esqueleto isopimarano ou cleistantano já era esperada, uma vez que o levantamento bibliográfico das substâncias isoladas anteriormente no gênero *Vellozia* resultou na identificação de 123 terpenóides, com aproximadamente 100 diterpenos (predominando os de esqueleto isopimarano e cleistantano).

Dos 9 diterpenos discriminantes, quatro possuem estrutura definida: (20R)-8,20-epóxi-15,16-bis-nor-isopimarano-13,20-diol ($C_{18}H_{30}O_3$), ácido 8,14 β -dihidróxi-7-oxo-isopimar-15-en-18-óico ($C_{20}H_{30}O_5$), 8,14-dihidróxi-18-nor-isopimara-4(19),15-dien-7-ona ($C_{19}H_{28}O_3$), Cleistanta-6,8,11,13-tetraeno ($C_{20}H_{28}$). Os demais são isômeros de mesmo esqueleto ou de esqueletos semelhantes: $C_{20}H_{28}O_4$ (candidalactona ou epoxivellozina), $C_{20}H_{28}O$ ((4R,5S,10S)-Cleistanta-8,11,13-trien-19-al, (5S,10S)-Cleistanta-8,11,13-trien-7-ona, Cleistanta-8,11,13-trien-17-al, Cleistanta-8,11,13-trien-3-ona ou Ent-kaura-9(11),16-dien-12-ona), $C_{20}H_{34}O_3$ (Isopimar-15-en-7,8,18-triol, Isopimar-15-en-7,8,14-triol ou ácido 3 β -hidróxilabd-8(17)-en-15-óico), $C_{20}H_{26}O_2$ (7-oxo-cleistanta-8,11,13-trien-20-al ou Cleistanta-8,11,13-trien-3,7-diona), $C_{20}H_{28}O_3$ (12 β -hidróxi-isopimara-8(9),15-dien-7,11-diona, 14 α -hidróxi-cleistanta-8,12-dien-7,11-diona, 5,10-epóxi-11-hidróxi-rosano-1,15-dien-3-ona ou 2-oxo-cleroda-3,13-dien-15,16-olídeo).

Devido à alta complexidade dos dados metabolômicos, algumas ferramentas são utilizadas para facilitar a visualização dos metabólitos identificados nas condições avaliadas. A utilização dessas ferramentas garante uma melhor visualização e, conseqüentemente, a compreensão das mudanças do metaboloma de um sistema biológico bem como das possíveis respostas de quaisquer experimentos (BELINATO; BAZIOLI; SUSSULINI; AUGUSTO *et al.*, 2019; SUGIMOTO; KAWAKAMI; ROBERT; SOGA *et al.*, 2012).

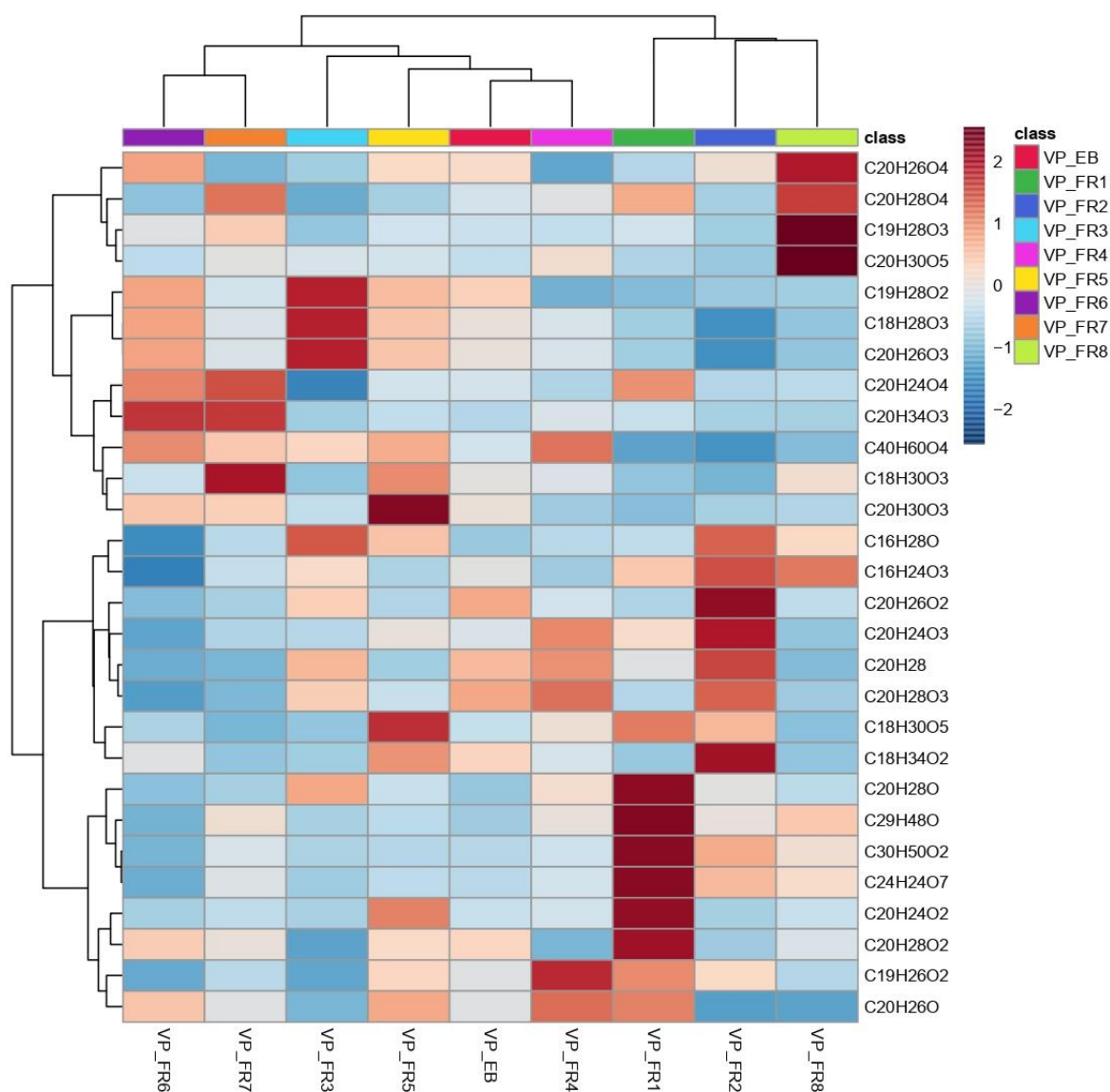
O *heatmap* é uma técnica de visualização muito utilizada que converte uma tabela numérica em um mapa bidimensional colorido para prover uma vista intuitiva dos dados acerca da composição das amostras. O mapa abrange cores do azul ao

vermelho, apresentando áreas “frias” (cor azul, baixa concentração do metabólito) e áreas “quentes” (cor vermelha, alta concentração do metabólito) (CHONG; WISHART; XIA, 2019).

Esses gráficos, em conjunto com os dados dos gráficos de VIP, permitem a avaliação da distribuição dos metabólitos nas amostras com o intuito de atribuir significância aos resultados de ensaios biológicos.

A compreensão das mudanças do metaboloma da *V. pyrantha* e das possíveis respostas às atividades biológicas foi obtida pela análise do *heatmap* (figura 30), plotado pelo MetaboAnalyst 4.0.

FIGURA 30 - Gráfico de *heatmap* das amostras de *V. pyrantha*



Fonte: Dados experimentais plotados pelo MetaboAnalyst 4.0

As análises de VIP em conjunto com o gráfico de *heatmap* resultaram nas seguintes observações acerca dos metabólitos discriminantes nas análises estatísticas das amostras de *V. pyrantha*: O cleistanta-6,8,11,13-tetraeno ($C_{20}H_{28}$), metabólito de maior importância, está concentrado nas frações VV-Fr2, VV-Fr3 e VV-Fr4, além da resina (VV-EB). O norditerpeno epoxidado (20R)-8,20-epóxi-15,16-bis-nor-isopimarano-13,20-diol ($C_{18}H_{30}O_3$) se concentra na amostra VV-Fr7 e em menor quantidade na VV-Fr5. O diterpeno ácido 8,14 β -dihidróxi-7-oxo-isopimar-15-en-18-óico ($C_{20}H_{30}O_5$) e o norditerpeno 8,14-dihidróxi-18-nor-isopimara-4(19),15-dien-7-ona ($C_{19}H_{28}O_3$) se concentram na VV-Fr8. O metabólito $C_{20}H_{28}O_4$ está concentrado em VV-Fr8, apresentando menores quantidades nas amostras VV-Fr1 e VV-Fr7. O diterpeno $C_{20}H_{28}O$ concentra-se na VV-Fr1 e apresenta menor quantidade em VV-Fr3. Em VV-Fr6 e VV-Fr7 estão as maiores concentrações de $C_{20}H_{34}O_3$ e em VV-EB e VV-Fr2 estão os diterpenos cleistantanos $C_{20}H_{26}O_2$. Por fim, o diterpeno $C_{20}H_{28}O_3$ se concentra nas amostras VV-EB, VV-Fr2, VV-Fr3 e VV-Fr4.

De um modo mais geral, focando na relação dos 28 metabólitos com as nove amostras, pode-se observar que as frações iniciais VV-Fr1, VV-Fr2, VV-Fr3 e as frações finais VV-Fr6, VV-Fr7, VV-Fr8 concentram as maiores quantidades de metabólitos, discriminantes ou não.

Observa-se que os diterpenos e norditerpenos de esqueleto cleistantano e isopimarano foram identificados em maior quantidade. Na literatura, há relatos de atividade citotóxica, antimicrobiana, fitotóxica e antioxidante de diterpenos e norditerpenos isopimaranos e cleistantano isolados de diferentes fontes (ARIEFTA *et al.*, 2018; ELSHAMY *et al.*, 2020; GENG *et al.*, 2021; LEE *et al.*, 2007; LIANG *et al.*, 2016; MINH *et al.*, 2011; RIJO *et al.*, 2009; ZHENG *et al.*, 2018). Desse modo, a identificação dessas substâncias nas amostras de *V. pyrantha* justifica a existência das atividades biológicas obtidas experimentalmente.

O melhor resultado de atividade antioxidante das amostras de *V. pyrantha* nos ensaios de sequestro de DPPH foi apresentado por VV-Fr5, obtendo IC_{50} de 205,48 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Apesar disso, esse valor ainda é 250 vezes menor que o IC_{50} do controle positivo (1,98 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Observa-se no *heatmap* que nessa fração estão concentrados diterpenos e norditerpenos, como $C_{20}H_{30}O_3$ e $C_{18}H_{30}O_5$.

A atividade antioxidante de qualquer composto normalmente advém de compostos fenólicos como flavonoides e antocianinas. No entanto, de acordo com Elfalleh, Kirkan e Sarikurkcu (2019), a atividade antioxidante de um composto está vinculada à quantidade de hidroxilas livres e à conjugação de cadeiras laterais para anéis aromáticos.

Através da identificação dos metabólitos da VV-Fr5 pode-se inferir que o resultado da atividade antioxidante advém da presença de diterpenos aromáticos, que podem estabilizar os radicais livres por ressonância e apresentar atividade biológica, como os norditerpenos bioativos isolados de *Delphinium linearilobum* e os diterpenos bioativos isolados de *Lobophytum compactum* (KOLAK; ÖZTÜRK; ÖZGÖKÇE; ULUBELEN, 2006; MINH; KIEM; NHIEM; CUONG *et al.*, 2011).

A falta de identificação de compostos fenólicos no metaboloma de *V. pyrantha* por CLAE-EM é outra informação que daria dicas acerca da baixa ou nenhuma atividade antioxidante nas amostras. Além disso, apenas um flavonoide foi identificado nas amostras, o que indicaria baixas quantidades na quantificação de fenólicos totais.

O maior resultado foi observado para a VV-EB (154,26 mg EAG g⁻¹), que pelo *heatmap*, apresenta baixas concentrações para todos os metabólitos, registrando a presença apenas de diterpenos (C₂₀H₂₈, C₂₀H₂₈O₃, C₂₀H₂₆O₂). Uma vez que a relação entre os compostos fenólicos e a atividade antioxidante é proporcional, era esperado que a VV-Fr5 apresentasse os maiores valores enquanto o seu resultado experimental foi um dos mais baixos (55,99 mg EAG g⁻¹). Curiosamente, a única amostra sem atividade antioxidante quantificável (VV-Fr1) foi a única em que o flavonoide C₂₄H₂₄O₇ é encontrada em altas concentrações pelo *heatmap* e apresentou 74,44 mg EAG g⁻¹ na quantificação de fenólicos totais.

A maior quantificação na resina bruta pode ser justificada pelo método utilizado, já que o método de Folin-Ciocalteu quantifica agentes redutores no geral e até então, tanto no levantamento quanto na identificação por CLAE-EM, foram identificados diversos diterpenos com capacidade redutora.

As amostras VV-Fr7 e VV-Fr8 concentraram os melhores resultados de atividade antimicrobiana. Conforme citado anteriormente, as amostras mais polares estão no grupo que contém a maior concentração dos metabólitos identificados, possuindo concentrações elevadas dos metabólitos C₂₀H₂₆O₄, C₂₀H₂₈O₄, C₁₉H₂₈O₃,

$C_{20}H_{30}O_5$ (VV-Fr8) e $C_{18}H_{34}O_2$, $C_{20}H_{26}O_2$, $C_{20}H_{24}O_3$ e $C_{20}H_{28}$ (VV-Fr7), o que pode indicar a existência de atividade antimicrobiana decorrente dessas substâncias, proveniente de sinergismo ou da ação individual dos metabólitos.

A mesma observação pode ser dita com relação à atividade citotóxica, uma vez que houveram resultados considerados como promissores pelo protocolo da FIOCRUZ para todas as amostras e a composição observada pela análise do *heatmap* é formada pelas altas concentrações de diterpenos e norditerpenos, conforme comentários anteriores.

7 CONCLUSÃO

A relação direta entre o consumo de alimentos ou utilização de produtos com substâncias bioativas (antioxidantes ou antimicrobianas) com o tratamento e/ou prevenção de diversas doenças, como as infecciosas ou o câncer, torna necessária a descoberta constante de novas substâncias e novas fontes de metabólitos bioativos.

Nesse trabalho, a atividade antioxidante, antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e citotóxica contra quatro linhagens de células tumorais da resina de *Vellozia pyrantha* e de suas frações derivadas de uma simples cromatografia em coluna foi comprovada, dando significância e importância ao estudo e utilização da planta de forma tradicional. É importante ressaltar que esse trabalho é inédito, não existindo quaisquer publicações acerca da atividade biológica ou composição química da espécie, contribuindo para a classificação taxonômica da mesma.

Estudos de correlação devem ser feitos para avaliar a contribuição direta das substâncias identificadas na atividade biológica encontrada e a atividade *in vivo* das amostras deve ser avaliada para que a atividade anticâncer das amostras seja obtida, uma vez que os testes *in vitro* apresentaram atividade potencial. É interessante também que o estudo fitoquímico da planta seja feito para que as substâncias identificadas por CLAE-EM através de fórmula molecular tenham a sua estrutura definida por meio de técnicas espectroscópicas como RMN e EM.

Além disso, o estudo fitoquímico de maneira bioguiada pode tornar-se útil para o isolamento e identificação de substâncias com atividades biológicas presentes na resina bruta estudada. Por conta disso, é importante a continuação do estudo metabólico da resina de *V. pyrantha*.

REFERÊNCIAS

- ABDELHALIM, K. A.; UZEL, A.; ÜNAL, N. G. Virulence determinants and genetic diversity of adherent-invasive *Escherichia coli* (AIEC) strains isolated from patients with Crohn's disease. **Microbial Pathogenesis**, 145, 2020.
- ABREU, P. M.; HEGGIE, W. Terpenóides e Esteróides. *In*: LOBO, A. M. e LOURENÇO, A. M. (Ed.). **Biossíntese de Produtos Naturais**. Lisboa: IST Press, 2007. cap. 4, p. 119-150.
- ADEBAYO, I. A.; ARSAD, H.; KAMAL, N. N. S. b. N. M.; SAMIAN, M. R. The hexane fraction of the *Moringa oleifera* Lam seed extract induces apoptosis, causes cell cycle arrest, and modulates expression of HSP60, NPM, PGK1, RCN1, and PDIA1 in MCF7 cells. **South African Journal of Botany**, 129, p. 379-387, 2020.
- AGOSTINI-COSTA, T. S.; VIEIRA, R. F.; BIZZO, H. R.; SILVEIRA, D. *et al.* Secondary Metabolites. *In*: DHANARASU, S. (Ed.). **Chromatography and Its Applications**: InTech, 2012. cap. 8, p. 131-164.
- AHMED, S. A.; GOGAL, R. M.; WALSH, J. E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: An alternative to [³H]thymidine incorporation assay. **Journal of Immunological methods**, 170, n. 2, p. 211-224, 1994.
- AKERELE, O. Summary of WHO Guidelines for the Assessment of Herbal Medicines. **HerbalGram**, 28, p. 13-19, 1993.
- ALDER, K. D.; LEE, I.; MUNGER, A. M.; KWON, H. K. *et al.* Intracellular *Staphylococcus aureus* in bone and joint infections: A mechanism of disease recurrence, inflammation, and bone and cartilage destruction. **Bone**, 2020.
- ALVES, E. A.; GUIMARÃES, A. C. R. Cultivo celular. *In*: **Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde - Volume 2**. Rio de Janeiro: EPSJV, 2010. v. 2, cap. 5, p. 215-252. (Coleção Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde).
- ALVES, M. F.; SCOTTI, M. T.; SCOTTI, L.; DOS SANTOS, S. G. *et al.* Alkaloids From the Family Menispermaceae: A New Source of Compounds Selective for β -Adrenergic Receptors. *In*: SPECK-PLANCHE, A. (Ed.). **Multi-Scale Approaches in Drug Discovery**: Elsevier, 2017. cap. 4, p. 83-98.

AMARAL, S. M.; CORTÊS, A. Q.; PIRES, F. R. Pneumonia nosocomial: Importância do microambiente oral. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, 35, n. 11, p. 1116-1124, 2009.

APÓS longo incêndio, chuva enche cachoeiras na Chapada Diamantina. **G1 Bahia**, 2016. Disponível em: <<http://g1.globo.com/bahia/noticia/2016/01/apos-longo-incendio-chuva-enche-cachoeiras-na-chapada-diamantina.html>>. Acesso em: outubro de 2020.

ARAÚJO, T. A. S.; ALENCAR, N. L.; AMORIM, E. L. C.; ALBUQUERQUE, U. P. A new approach to study medicinal plants with tannins and flavonoids contents from the local knowledge. **Journal of Ethnopharmacology**, 120, p. 72-80, 2008.

ARIEFTA, N. R.; KIRISTIANA, P.; ABOSHI, T.; MURAYAMA, T. *et al.* New isocoumarins, naphthoquinones, and a cleistanthane-type diterpene from *Nectria pseudotrichia* 120-1NP. **Fitoterapia**, 127, p. 356-361, 2018.

ASLANTÜRK, Ö. S. *In vitro* cytotoxicity and cell viability assays: Principles, advantages, and disadvantages. *In*: LARRAMENDY, M. L. e SOLONESKI, S. (Ed.). **Genotoxicity - A Predictable Risk to Our Actual World**: InTech, 2018. cap. 1, p. 1-17.

AYENSU, E. S. Biological and Morphological Aspects of the Velloziaceae. **Biotropica**, 5, n. 3, p. 135-149, 1973.

BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S. K. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, 6, p. 71-79, 2016.

BARBACENIA. Flora do Brasil 2020 under construction. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://servicos.jbrj.gov.br/flora/search/Barbacenia>>, 2020. Acesso em: outubro de 2020.

BARNES, R. A.; PEREIRA, A. L.; SCOFIELD, T. C. V.; BRAZ-FILHO, R. *et al.* A new triterpene from *Vellozia compacta*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, 32, n. 9, p. 3674-3677, 1984.

BARRON, D.; IBRAHIM, R. K. Isoprenylated flavonoids - A survey. **Phytochemistry**, 43, n. 5, p. 921-982, 1996.

BELINATO, J. R.; BAZIOLI, J. M.; SUSSULINI, A.; AUGUSTO, F. *et al.* Metabolômica microbiana: Inovações e aplicações. **Química Nova**, 42, n. 5, p. 546-559, 2019.

BESSER, J. M. *Salmonella* epidemiology: A whirlwind of change. **Food Microbiology**, 71, p. 55-59, 2018.

BOIK, J. **Natural compounds in cancer therapy**. Minnesota, USA: Oregon Medical Press, 2001. 521 p.

BOX, J. D. Investigation of the Folin-Ciocalteu phenol reagent for the determination of polyphenolic substances in natural waters. **Water Research**, 17, n. 5, p. 511-525, 1983.

BRANCO, A.; BRAZ-FILHO, R.; KAISER, C. R.; PINTO, A. C. Two monoisoprenylated flavonoids from *Vellozia graminifolia*. **Phytochemistry**, 47, n. 3, p. 471-474, 1998.

BRANCO, A.; PEREIRA, A. D. S.; CARDOSO, J. N.; DE NETO, F. R. A. *et al.* Further lipophilic flavonols in *Vellozia graminifolia* (Velloziaceae) by high temperature gas chromatography: Quick detection of new compounds. **Phytochemical Analysis**, 12, n. 4, p. 266-270, 2001. Article.

BRANCO, A.; PINTO, A. C.; BRAZ-FILHO, R. Chemical constituents from *Vellozia graminifolia* (Velloziaceae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 76, n. 3, p. 505-518, 2004.

BRANCO, A.; PINTO, A. C.; IFA, D. R.; BRAZ-FILHO, R. Two 8C-methylated flavonols from the leaves of *Vellozia candida* Mikan (Velloziaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 13, n. 3, p. 318-323, 2002.

BRANDÃO, M. G. L.; PIGNAL, M.; ROMANIUC, S.; GRAEL, C. F. F. *et al.* Useful Brazilian plants listed in the field books of the French naturalist Auguste de Saint-Hilaire (1779–1853). **Journal of Ethnopharmacology**, 143, p. 488-500, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Portaria n. 6 de 31 de Janeiro de 1995**, Diário Oficial da União de 31 de Janeiro de 1995.

BRASIL. **Cerrado: Ecologia, biodiversidade e conservação**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. **Controle dos cânceres do colo do útero e da mama**, p. 124, 2013.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **O Bioma Cerrado**, Disponível em: <www.mma.gov.br/biomas/cerrado.html>, 2020.

BYARUGABA, D. K. A view on antimicrobial resistance in developing countries and responsible risk factors. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 24, p. 105-110, 2004.

CANUTO, G. A. B. **Avaliação metabolômica comparativa *in vitro* de fármaco candidato ao tratamento de leishmaniose**. 2016. 130 f. Tese (Doutorado) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

CANUTO, G. A. B.; COSTA, J. L.; CRUZ, P. L. R.; SOUZA, A. R. L. *et al.* Metabolômica: Definições, estado-da-arte e aplicações representativas. **Química Nova**, 41, n. 1, p. 75-91, 2018.

CHABNER, B. A.; ROBERTS JR, T. G. Chemotherapy and the war on cancer. **Nature Reviews Cancer**, 5, p. 65-72, 2005.

CHAIKUL, P.; SRIPISUT, T.; CHANPIROM, S.; DITTHAWUTTHIKUL, N. Anti-skin aging activities of green tea (*Camellia sinensis* (L) Kuntze) in B16F10 melanoma cells and human skin fibroblasts. **European Journal of Integrative Medicine**, 40, 2020.

CHAVES, T. L.; RICARDO, L.; PAULA-SOUZA, J. d.; BRANDÃO, M. G. L. Useful Brazilian plants under the view of the writer-naturalist João Guimarães Rosa. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 25, n. 5, p. 437-444, 2015.

CHEN, X.; LIANG, L.; HAN, C. Borate suppresses the scavenging activity of gallic acid and plant polyphenol extracts on DPPH radical: A potential interference to DPPH assay. **LWT**, 131, 2020.

CHIRAG J, P.; TYAGI, S.; HALLIGUDI, N.; YADAV, J. *et al.* Antioxidant activity of herbal plants: A recent review. **Journal of Drug Discovery and Therapeutics**, 1, n. 8, p. 1-8, 2013.

CHONG, J.; WISHART, D. S.; XIA, J. Using MetaboAnalyst 4.0 for comprehensive and integrative metabolomics data analysis. **Current Protocols in Bioinformatics**, 68, n. 1, p. 1-128, 2019.

CHRISTENHUSZ, M. J. M.; BYNG, J. W. The number of known plants species in the world and its annual increase. **Phytotaxa**, 261, n. 3, p. 201-217, 2016.

CLSI. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically - Approved Standard**. Eleventh ed. Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018a. (NCCLS document M07, v. 38).

CLSI. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi - Approved Standard**. Third ed. Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018b. (NCCLS document M38, v. 37).

COHEN, J. **Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences**. 2nd ed. USA: Lawrence Erlbaum Associates, 1988.

CONCEIÇÃO, A. A. Plant ecology in 'campos rupestres' of the Chapada Diamantina, Bahia. *In*: QUEIROZ, L. P. d.; RAPINI, A., *et al* (Ed.). **Towards greater knowledge of the brazilian semi-arid Biodiversity**. Brasília: Ministério da Ciência e Tecnologia, 2006. cap. 9, p. 59-63.

CONCEIÇÃO, A. A. A hot case for conservation: Candombá (*Vellozia pyrantha*), a flammable plant endemic to a national park is used to make a fire and threatened by fire suppression policy. **Journal for Nature Conservation**, 45, p. 118-121, 2018.

CONCEIÇÃO, A. A.; ALENCAR, T. G.; SOUZA, J. M.; MOURA, A. D. C. *et al*. Massive post-fire flowering events in a tropical mountain region of Brazil: High episodic supply of floral resources. **Acta Botanica Brasilica**, 27, n. 4, p. 847-850, 2013. Article.

CONCEIÇÃO, A. A.; GIULIETTI, A. M. Composição florística e aspectos estruturais de campo rupestre em dois platôs do Morro do Pai Inácio, Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. **Hoehnea**, 29, p. 37-48, 2002.

CONCEIÇÃO, A. A.; ORR, B. J. Post-fire flowering and fruiting in *Vellozia sincorana*, a caulescent rosette plant endemic to Northeast Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, 26, n. 1, p. 94-100, 2012. Article.

CONCEIÇÃO, A. A.; PIRANI, J. R. Delimitação de habitats em campos rupestres na Chapada Diamantina, Bahia: Substratos, composição florística e aspectos estruturais. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, 23, p. 85-111, 2005.

CONCEIÇÃO, A. A.; SOUZA, J. M.; CARNEIRO, J. S.; MENEZES, N. L. Old for people, new for science: a previously undescribed species of harvested *Vellozia* (Velloziaceae) endemic to the Chapada Diamantina National Park, Bahia (Brazil). **Phytotaxa**, 329, n. 3, p. 253-261, Dec 2017.

COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; ALVES, A. P. N. N.; MADEIRA, S. V. F. *et al*. A Contribuição dos produtos naturais como fonte de novos fármacos anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual de Química**, 2, n. 1, p. 47-58, 2010.

CRAGG, G. M.; GROTHAUS, P. G.; NEWMAN, D. J. Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. **Chemical Reviews**, 109, n. 7, p. 3012-3043, 2009.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1830, n. 6, p. 3670-3695, 2013.

CUNHA, E. d. **Os Sertões**. São Paulo: Três, 1984.

DADAR, M.; TIWARI, R.; KARTHIK, K.; CHAKRABORTY, S. *et al.* *Candida albicans* - Biology, molecular characterization, pathogenicity, and advances in diagnosis and control – An update. **Microbial Pathogenesis**, 117, p. 128-138, 2018.

DANTAS, A. L. A.; VALENTE, L. M. M.; DE MORAIS, L. A. S.; FELICIANO, G. *et al.* *In vitro* study of *Vellozia pusilla* Pohl (Velloziaceae), a Brazilian plant species: Antitumoral activity and labeling of blood elements. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 48, n. SPECIL ISS. 2, p. 57-61, 2005. Article.

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**, 14, n. 1, p. 126-128, 2003. Article.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**. England: John Wiley & Sons Ltd, 2002.

DUBROVINA, A. S.; KISELEV, K. V. Regulation of stilbene biosynthesis in plants. **Planta**, 246, p. 597-623, 2017.

ELFALLEH, W.; KIRKAN, B.; SARIKURKCU, C. Antioxidant potential and phenolic composition of extracts from *Stachys tmolea*: An endemic plant from Turkey. **Industrial Crops & Products**, 127, p. 212–216, 2019.

ELISABETSKY, E.; COSTA-CAMPOS, L. Medicinal plant genetic resources and international cooperation: The Brazilian perspective. **Journal of Ethnopharmacology**, 51, n. 1-3, p. 111-120, 1996.

ELSHAMY, A. I.; MOHAMED, T. A.; SWAPANA, N.; YONEYAMA, T. *et al.* Cytotoxic polyoxygenated isopimarane diterpenoids from the edible rhizomes of *Kaempferia galanga* (kencur). **Industrial Crops & Products**, 158, 2020.

FAGG, C. W.; LUGHADHA, E. N.; MILLIKEN, W.; HIND, D. J. N. *et al.* Useful Brazilian plants listed in the manuscripts and publications of the Scottish medic and naturalist George Gardner (1812–1849). **Journal of Ethnopharmacology**, 161, p. 18-29, 2015.

FAHN, A. Functions and location of secretory tissues in plants and their possible evolutionary trends **Israel Journal of Plant Sciences**, 50, p. 59-64, 2002.

FERNÁNDEZ-NO, I. C.; BÖHME, K.; DÍAZ-BAO, M.; CEPEDA, A. *et al.* Characterisation and profiling of *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* and *Bacillus licheniformis* by MALDI-TOF mass fingerprinting. **Food Microbiology**, 33, n. 2, p. 235-242, 2013.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: Conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FERREIRA, M. C.; CANTRELL, C. L.; DUKE, S. O.; ALI, A. *et al.* New pesticidal diterpenoids from *Vellozia gigantea* (Velloziaceae), an endemic neotropical plant living in the endangered brazilian biome rupestrian grasslands. **Molecules**, 22, 2017.

FIEHN, O. Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks. **Comparative and Functional Genomics**, 2, n. 3, p. 155-168, 2001.

FLAUZINO, L. G. B.; TOZATTI, M. G.; SAMPAIO, D. F. G.; BADOCCO, F. R. *et al.* In vitro schistosomicidal activity of hydnocarpin D, a flavolignans isolated from *Vellozia variabilis* stem. *In: 3rd International Conference on Biopharmaceutics and Biologic Drugs & 5th International Pharmacy Conference, 2017, Philadelphia, USA.* 9. J Bioequiv Availab, Dec. 5. DOI: 10.4172/0975-0851-C1-030.

FLAUZINO, L. G. B.; TOZATTI, M. G.; SEQUEIRA, B. M.; ANDRADE E SILVA, M. L. *et al.* Identificação da flavolignana Hydnocarpin D isolada de *Vellozia variabilis* (Velloziaceae). *In: 38ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ), 2015, Águas de Lindóia, SP.*

FLORES nascem em área destruída por incêndio na Chapada Diamantina (BA). **G1 Bahia**, 2016. Disponível em: <<http://g1.globo.com/bahia/noticia/2016/03/flores-nascem-em-area-destruida-por-incendio-na-chapada-diamantina-ba.html>>. Acesso em: outubro de 2020.

FRANCISCO, W. C. **Ação do fogo no cerrado**. Brasil Escola, Disponível em: <www.brasilecola.uol.com.br/brasil/a-acao-fogo-no-cerrado.htm>, 2020. Acesso em: outubro de 2020.

FUNARI, C. S.; CASTRO-GAMBOA, I.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S. Metabolômica, uma abordagem otimizada para exploração da biodiversidade brasileira: estado da arte, perspectivas e desafios. **Química Nova**, 36, n. 10, p. 1605-1609, 2013.

GBD. 2015 Risk Factors Collaborators. Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990–2015: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. **Lancet**, 388, n. 10053, p. 1659-1724, 2016.

GENG, H.-C.; ZHU, H.-T.; WANG, D.; YANG, W.-N. *et al.* Phyllanacidins A–C, three new cleistanthane diterpenoids from *Phyllanthus acidus* and their cytotoxicities. **Fitoterapia**, 148, 2021.

GUAN, Z.; WU, J.; WANG, C.; ZHANG, F. *et al.* Investigation of the preventive effect of Sijunzi decoction on mitomycin C-induced immunotoxicity in rats by ¹H NMR and MS-based untargeted metabolomic analysis. **Journal of Ethnopharmacology**, 210, p. 179-191, 2018.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: Importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

GUPTA, P.; MEENA, R. C.; KUMAR, N. Functional characterization of *Candida glabrata* ORF, *CAGL0M02233g* for its role in stress tolerance and virulence. **Microbial Pathogenesis**, 149, 2020.

HAIR JR., J. F.; SARSTEDT, M.; HOPKINS, L.; KUPPELWIESER, V. G. Partial least squares structural equation modeling (PLS-SEM): An emerging tool in business research. **European Business Review**, 26, n. 2, p. 106-121, 2014.

HARBORNE, J. B. **Introduction to Ecological Biochemistry**. London: Academic Press, 1988.

HARBORNE, J. B.; GREENHAM, J.; WILLIAMS, C.; EAGLES, J. *et al.* Six dihydrofuranoflavonols from the leaf surface of *Vellozia*. **Phytochemistry**, 31, n. 1, p. 305-308, 1992. Article.

HARBORNE, J. B.; GREENHAM, J.; WILLIAMS, C. A.; EAGLES, J. *et al.* Ten isoprenylated and C-methylated flavonoids from the leaves of three *Vellozia* species. **Phytochemistry**, 34, n. 1, p. 219-226, 1993. Article.

HARBORNE, J. B.; MABRY, J. J. **The Flavonoids: Advanced in Research**. New York: Chapman & Hall, 1987.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A.; GREENHAM, J.; EAGLES, J. Variations in the lipophilic and vacuolar flavonoids of the genus *Vellozia*. **Phytochemistry**, 35, n. 6, p. 1475-1480, 1994. Article.

HARLEY, R. M. Introduction. *In*: STANNARD, B. L. (Ed.). **Flora of the Pico das Almas: Chapada Diamantina, Bahia, Brazil**. Richmond, Surrey: Royal Botanic Gardens Kew, 1995. p. 43-76.

HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. **Drug Discovery Today**, 13, n. 19/20, p. 894-901, 2008.

HEYMAN, H. M.; MEYER, J. J. M. NMR-based metabolomics as a quality control tool for herbal products. **South African Journal of Botany**, 82, p. 21-32, 2012.

HICKS, S. **Desert Plants and People**. San Antonio: The Naylor Company, 1966.

HILLMAN, E. T.; READNOUR, L. R.; SOLOMON, K. V. Exploiting the natural product potential of fungi with integrated -omics and synthetic biology approaches. **Current Opinion in Systems Biology**, 5, p. 50-56, 2017.

HOFFMAN, J. I. E. Analysis of Variance I. One-Way. *In*: **Biostatistics for Medical and Biomedical Practitioners**: Academic Press, 2015. cap. 25, p. 391-420.

HOUSMAN, G.; BYLER, S.; HEERBOTH, S.; LAPINSKA, K. *et al.* Drug resistance in cancer: An overview. **Cancers**, 6, n. 3, p. 1769-1792, 2014.

ICMBIO. **Parna da Chapada da Diamantina**. Disponível em: <<https://www.icmbio.gov.br/portal/unidadesdeconservacao/biomas-brasileiros/caatinga/unidades-de-conservacao-caatinga/2129-parna-da-chapada-da-diamantina>>, 2020a. Acesso em: outubro de 2020.

ICMBIO. **Parque Nacional da Chapada Diamantina**. Disponível em: <<https://www.icmbio.gov.br/portal/visitacao1/unidades-abertas-a-visitacao/9396-parque-nacional-da-chapada-da-diamantina>>, 2020b. Acesso em: outubro de 2020.

INCÊNDIO devastou 51 mil hectares na Chapada em 3 meses, diz secretário. **G1 Bahia**, 2015. Disponível em: <<http://g1.globo.com/bahia/noticia/2015/12/incendio-devastou-51-mil-hectares-na-chapada-em-3-meses-diz-secretario.html>>. . Acesso em: outubro de 2020.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, I. N. C. A. **ABC do câncer: Abordagens básicas para o controle do câncer**. Rio de Janeiro: INCA, 2011.

JOAQUIM, E. O.; SILVA, T. M.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R. C. L.; MORAES, M. G. *et al.* Diversity of reserve carbohydrates in herbaceous species from Brazilian *campo rupestre* reveals similar functional traits to endure environmental stresses. **Flora**, 238, p. 201-209, 2018.

JORGE, T. F.; MATA, A. T.; ANTÓNIO, C. Mass spectrometry as a quantitative tool in plant metabolomics. **Philosophical Transactions of the Royal Society A**, 374, n. 2079, p. 1-26, 2016.

KALOGIOURI, N. P.; AALIZADEH, R.; DASENAKI, M. E.; THOMAIDIS, N. S. Application of High Resolution Mass Spectrometric methods coupled with chemometric techniques in olive oil authenticity studies - A review. **Analytica Chimica Acta**, 1134, n. 16, p. 150-173, 2020.

KAMBOJ, A.; RANA, A.; KAUR, R.; JAIN, U. K. Application and Analysis of the Folin Ciocalteu Method for the Determination of the Total Phenolic Content from Leaves, Stems and Seeds of *Cucumis sativus* L. **Journal of Pharmacy Research**, 9, n. 5, p. 323-329, 2015.

KATO, M. J. Global phytochemistry: The Brazilian approach. **Phytochemistry**, 57, n. 5, p. 621-623, 2001.

KLEIN-JÚNIOR, L. C.; CORRÊA, R.; HEYDEN, Y. V.; FILHO, V. C. All that glitters is not gold: Panning cytotoxic natural products and derivatives with a fused tricyclic backbone by the estimation of their leadlikeness for cancer treatment. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 166, p. 1-10, 2019.

KOIRALA, N. Methylation of flavonoids: Chemical structures, bioactivities, progress and perspectives for biotechnological production. **Enzyme and Microbial Technology**, 86, p. 103-116, 2016.

KOLAK, U.; ÖZTÜRK, M.; ÖZGÖKÇE, F.; ULUBELEN, A. Norditerpene alkaloids from *Delphinium linearilobum* and antioxidant activity. **Phytochemistry**, 67, n. 19, p. 2170-2175, 2006.

KUEHNBAUM, N. L.; BRITZ-MCKIBBIN, P. New advances in separation science for metabolomics: Resolving chemical diversity in a Post-Genomic Era. **Chemical Reviews**, 113, n. 4, p. 2437-2468, 2013.

KUSARI, S.; SINGH, S.; JAYABASKARAN, C. Rethinking production of Taxol® (paclitaxel) using endophyte biotechnology. **Trends in Biotechnology**, 32, n. 6, p. 304-311, 2014.

LANGENHEIM, J. H. **Plant Resins: Chemistry, Evolution, Ecology and Ethnobotany**. Portland: Timber Press, 2003. 586 p.

LEE, K. J.; CHOI, J. H.; JEONG, H. G. Hepatoprotective and antioxidant effects of the coffee diterpenes kahweol and cafestol on carbon tetrachloride-induced liver damage in mice. **Food and Chemical Toxicology**, 45, n. 11, p. 2118-2125, 2007.

LI, Y.; MAO, J.; LIU, Q.; SONG, X. *et al.* De Novo Biosynthesis of caffeic acid from glucose by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. **ACS Synthetic Biology**, 9, n. 4, p. 756-765, 2020.

LIANG, X.-R.; MIAO, F.-P.; SONG, Y.-P.; LIU, X.-H. *et al.* Citrinovirin with a new norditerpene skeleton from the marine algicolous fungus *Trichoderma citrinoviride*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 26, n. 20, p. 5029-5031, 2016.

LOBO, A. M.; LOURENÇO, A. M. Metabolitos Derivados do Ácido Xiquímico. *In*: LOBO, A. M. e LOURENÇO, A. M. (Ed.). **Biossíntese de Produtos Naturais**. Lisboa: IST Press, 2007. cap. 5, p. 151-192.

LOUSADA, J. M.; BORBA, E. L.; RIBEIRO, K. T.; RIBEIRO, L. C. *et al.* Genetic structure and variability of the endemic and vulnerable *Vellozia gigantea* (Velloziaceae) associated with the landscape in the Espinhaço Range, in southeastern Brazil: implications for conservation. **Genetica**, 139, p. 431-440, 2011.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JUNIOR, V. F.; GRYNBERG, N. F. *et al.* Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MANDEL, S.; YODIM, M. B. H. Catechin polyphenols: Neurodegeneration and neuroprotection in neurodegenerative diseases. **Free Radical Biology and Medicine**, 37, n. 3, p. 304-317, 2004.

MANNA, P.; JAIN, S. K. Obesity, Oxidative Stress, Adipose Tissue Dysfunction, and the Associated Health Risks: Causes and Therapeutic Strategies. **Metabolic Syndrome and Related Disorders**, 13, n. 10, p. 423-444, 2015.

MARTINS, L. C.; PAIVA, E. A. S. Flammable resin in *Vellozia variabilis* (Velloziaceae): Gland structure and chemical composition. **Flora**, 219, p. 94-100, 2016. Article.

MCGAW, L. J.; ELGORASHI, E. E.; ELOFF, J. N. Cytotoxicity of african medicinal plants against normal animal and human cells. *In*: **Toxicological Survey of African Medicinal Plants**: Elsevier, 2014. p. 181-233.

MELLO-SILVA, R.; MONTSERRAT, L. Depicting *Barbacenia flava* and *Vellozia intermedia* with a short history of illustrated Velloziaceae. **Kew Bulletin**, 70, p. 10, 2015.

MELLO-SILVA, R.; SANTOS, D. Y. A. C.; SALATINO, M. L. F.; MOTTA, L. B. *et al.* Five vicarious genera from Gondwana: the Velloziaceae as shown by molecules and morphology. **Annals of Botany**, 108, p. 87-102, 2011.

MENEZES, N. L.; MELLO-SILVA, R.; MAYO, S. J. A cladistic analysis of the Velloziaceae. **Kew Bulletin**, 49, n. 1, p. 71-92, 1993.

MENG, D.; ZHANG, P.; ZHANG, L.; WANG, H. *et al.* Detection of cellular redox reactions and antioxidant activity assays. **Journal of Functional Foods**, 37, p. 467-479, 2017.

MINH, C. V.; KIEM, P. V.; NHIEM, N. X.; CUONG, N. X. *et al.* Cytotoxic and antioxidant activities of diterpenes and sterols from the Vietnamese soft coral *Lobophytum compactum*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 21, n. 7, p. 2155-2159, 2011.

MISHRA, B. B.; TIWARI, V. K. Natural products: An evolving role in future drug discovery. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 46, n. 10, p. 4769-4807, 2011.

MMA. **Biodiversidade Brasileira: Avaliação e identificação de áreas e ações prioritárias para conservação, utilização sustentável e repartição dos benefícios da biodiversidade nos biomas brasileiros**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2002. 404 p.

MMA. **Biodiversidade e Conservação da Chapada Diamantina**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2005. 435 p.

MMA; ICMBIO. **Relatório Parametrizado - Unidade de Conservação: Parque Nacional da Chapada Diamantina**, Disponível em: <http://sistemas.mma.gov.br/cnuc/index.php?ido=relatorioparametrizado.exibeRelatorio&relatorioPadrao=true&idUc=137>, 2012.

MOHAMED, S.; ELMOHAMADY, M. N.; ABDELRAHMAN, S.; AMER, M. M. *et al.* Antibacterial effects of antibiotics and cell-free preparations of probiotics against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* associated with conjunctivitis. **Saudi Pharmaceutical Journal**, 2020.

MORALES, M.; GARCIA, Q. S.; SIQUEIRA-SILVA, A. I.; SILVA, M. C. *et al.* Tocotrienols in *Vellozia gigantea* leaves: occurrence and modulation by seasonal and plant size effects. **Planta**, 240, p. 437-446, 2014.

MUNHOZ, C. B. R.; FELFILI, J. M. Reproductive phenology of an herbaceous-subshrub layer of a Savannah (Campo Sujo) in the Cerrado Biosphere Reserve I, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, 67, n. 2, p. 299-307, 2007.

NEVES, S. P. S.; CONCEIÇÃO, A. A. Campo rupestre recém-queimado na Chapada Diamantina, Bahia, Brasil: Plantas de rebrota e sementes, com espécies endêmicas na rocha. **Acta Botanica Brasilica**, 24, n. 3, p. 697-707, 2010.

NEWBY, J. A.; HOWARD, C. V. Environmental influences in cancer aetiology. **Journal of Nutritional & Environmental Medicine**, 15, n. 2-3, p. 56-114, 2005.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, 83, n. 3, p. 770-803, 2020.

NIMSE, S. B.; PAL, D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. **RSC Advances**, 5, n. 35, p. 27986-28006, 2015.

O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European Journal of Biochemistry**, 267, n. 17, p. 5421-5426, 2000.

OLIVEIRA, A. C. d.; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F.; SILVA, C. A. *et al.* Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, 32, n. 3, p. 689-702, 2009.

OLIVEIRA, R. C. S.; SCHMIDT, I. B.; ALBUQUERQUE, U. P.; CONCEIÇÃO, A. A. Ethnobotany and Harvesting Impacts on Candombá (*Vellozia* aff. *sincorana*), A Multiple Use Shrub Species Endemic to Northeast Brazil. **Economic Botany**, 69, n. 4, p. 318-329, 2015. Article.

OLIVEIRA, R. S.; ABRAHÃO, A.; PEREIRA, C.; TEODORO, G. S. *et al.* Ecophysiology of *campos rupestres* plants. In: FERNANDES, G. W. (Ed.). **Ecology and conservation of mountain-top grasslands in Brasil**. Switzerland: Springer International, 2016. p. 227-272.

OLIVEIRA, W. F.; SILVA, P. M. S.; SILVA, R. C. S.; SILVA, G. M. M. *et al.* *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* infections on implants. **Journal of Hospital Infection**, 98, n. 2, p. 111-117, 2018.

PATRICK, G. L. Antibacterial agents. In: **An introduction to medicinal chemistry**. Fifth ed. United Kingdom: Oxford University Press, 2013a. cap. 19, p. 413-467.

PATRICK, G. L. Anticancer agents. *In: An introduction to medicinal chemistry*. Fifth ed. United Kingdom: Oxford University Press, 2013b. cap. 21, p. 514-577.

PATRICK, G. L. Drug discovery: finding a lead. *In: An introduction to medicinal chemistry*. Fifth ed. United Kingdom: Oxford University Press, 2013c. cap. 12, p. 189-214.

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

PINTO, A. C.; ANTUNES, O. A. C.; PIZZOLATTI, M. G.; RUMJANEK, V. M. A tetranorfriedolabdane diterpene from *Vellozia stipitata*. **Phytochemistry**, 42, n. 3, p. 771-774, 1996. Article.

PINTO, A. C.; ANTUNES, O. A. C.; REZENDE, C. M.; CORREIA, C. R. D. Minor cleisthantane and tetranorfriedolabdane from *Vellozia flavicans*. **Phytochemistry**, 38, n. 5, p. 1269-1271, 1995.

PINTO, A. C.; ANTUNES, O. A. C.; REZENDE, C. M.; CORREIA, C. R. D. Separation of acidic components of *Vellozia flavicans* by silica gel/potassium hydroxide chromatography. **Phytochemical Analysis**, 8, p. 14-17, 1997. Article.

PINTO, A. C.; BAKER, P. M.; GILBERT, B.; PINCHIN, R. *et al.* Vellozone, a tetracyclic triterpene from *Vellozia stipitata*. **Phytochemistry**, 19, p. 2486-2487, 1980.

PINTO, A. C.; BORGES, C. Six diterpenes from *Vellozia compacta*. **Phytochemistry**, 22, n. 9, p. 2011-2015, 1983.

PINTO, A. C.; BRITO, L. C.; ZUKERMAN-SCHPHECTOR, J.; EPIFANIO, R. A. A bis-nor-diterpene from *Vellozia variabilis*. **Phytochemistry**, 33, n. 5, p. 1269-1271, 1993. Article.

PINTO, A. C.; EPIFANIO, R. A.; CAMARGO, W. Synthesis of enantiomeric gibberellin analogs from natural isopimarenes. **Tetrahedron**, 49, n. 23, p. 5039-5046, Jun 1993.

PINTO, A. C.; EPIFANIO, R. A.; PIZZOLATTI, M.; REZENDE, C. M. *et al.* Two norditerpenes with an isopimarane skeleton from *Vellozia variabilis*. **Phytochemistry**, 31, n. 5, p. 1679-1680, 1992. Article.

PINTO, A. C.; EPIFANIO, R. A.; PIZZOLATTI, M. G. Diterpenoids from *Vellozia declinans*. **Phytochemistry**, 31, n. 12, p. 4241-4243, 1992.

PINTO, A. C.; FIGUEIREDO, M. R.; BRITO, L. C.; PEREIRA, A. L. ^{13}C NMR of Isopimarane Diterpenes. Part 4. Diterpenes from *Vellozia patens*. **Química Nova**, 9, n. 3, p. 222-223, 1986.

PINTO, A. C.; FIGUEIREDO, M. R.; EPIFANIO, R. A. Diterpenes from *Vellozia patens*. **Phytochemistry**, 31, n. 5, p. 1681-1686, 1992.

PINTO, A. C.; FURTADO, V. L. R.; GONZAGA, L. Terpenoid constituents from *Vellozia epidendroides*. **Química Nova**, 13, n. 1, p. 64, 1990.

PINTO, A. C.; GARCEZ, W. S.; HULL, W. E.; NESZMELYI, A. *et al.* 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**, n. 8, p. 464-465, 1983.

PINTO, A. C.; GARCEZ, W. S.; QUEIROZ, P. P. S.; FIORANI, N. G. Clerodanes and tetranorclerodane from *Vellozia bicolor*. **Phytochemistry**, 37, n. 4, p. 1115-1117, 1994.

PINTO, A. C.; GONÇALVES, M. L. A.; BRAZ-FILHO, R.; NESZMELYI, A. *et al.* Natural abundance ^{13}C - ^{13}C coupling constants observed via double quantum coherence: structural elucidation of velloziolide, a diterpene with a novel skeleton. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, n. 5, p. 293-295, 1982.

PINTO, A. C.; GONZAGA, L.; FIORANI, N. G. M. A naphthalenic norditerpene from Velloziaceae. **Phytochemistry**, 23, n. 4, p. 918-919, 1984.

PINTO, A. C.; MAÇAIRA, A. M. P. Two diterpenes with a cleistanthane skeleton from *Vellozia nivea*. **Phytochemistry**, 27, n. 12, p. 3973-3974, 1988.

PINTO, A. C.; PATITUCCI, M. L.; SILVA, R. S. d.; QUEIROZ, P. P. S. *et al.* Pimarane and cleistanthane diterpenes from Velloziaceae: Absolute configuration and biomimetic conversion. **Tetrahedron**, 39, n. 20, p. 3351-3354, 1983.

PINTO, A. C.; PATITUCCI, M. L.; ZOCHER, D. H. T.; KELECOM, A. Absolute configuration of four cleistanthane diterpenes from Velloziaceae. **Phytochemistry**, 24, n. 10, p. 2345-2347, 1985.

PINTO, A. C.; PEIXOTO, E. M.; FIORANI, N. G. M. Diterpenes with pimarane and cleistanthane skeletons from *Vellozia piresiana*. **Phytochemistry**, 23, n. 6, 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**, 6, n. 2, p. 71, 1983.

PINTO, A. C.; PINCHIN, R.; PRADO, S. K. d. Three ent-kaurene diterpenes from *Vellozia caput-ardeae*. **Phytochemistry**, 22, n. 9, p. 2017-2019, 1983.

PINTO, A. C.; PINCHIN, R.; ZOCHER, D. H. T.; LOPES, C. C. Two naphthalenic nor-diterpenes from Velloziaceae. **Tetrahedron Letters**, n. 5, p. 405-406, 1979.

PINTO, A. C.; PIZZOLATTI, M. G.; EPIFANIO, R. A.; FRANKMÖLLE, W. *et al.* The isolation of novel diterpenoids, including a C₄₀ bis-diterpenoid, from the brazilian plant *Vellozia magdalenae* (Velloziaceae). **Tetrahedron**, 53, n. 6, p. 2005-2012, 1997. Article.

PINTO, A. C.; PRADO, S. K. d.; BRAZ-FILHO, R.; HULL, W. E. *et al.* 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**, 23, n. 50, p. 5267-5270, 1982.

PINTO, A. C.; PRADO, S. K. d.; PINCHIN, R. Two kaurenes from *Vellozia caput-ardeae*. **Phytochemistry**, 20, n. 3, p. 520-521, 1981.

PINTO, A. C.; QUEIROZ, P. P. S.; GARCEZ, W. S. Diterpenes from *Vellozia bicolor*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2, n. 1, 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**, 42, n. 3, p. 767-769, 1996. Article.

PINTO, A. C.; RIBEIRO, N. M.; BRITO, L.; TINANT, B. *et al.* Three new norditerpenes with an isopimarane skeleton from *Vellozia variabilis*. **Bulletin des Sociétés Chimiques Belges**, 97, n. 11-12, p. 1067-1074, 1988. Article.

PINTO, A. C.; SCOFIELD, T. C. V.; BRAZ-FILHO, R. Two new diterpenes with a rosane skeleton from Velloziaceae. **Tetrahedron Letters**, 24, n. 46, p. 5043-5046, 1983.

PINTO, A. C.; SILVA, A. J. R.; MAYER, L. M. U.; BRAZ-FILHO, R. Compactone, a new diterpenoid from *Vellozia compacta*. **Phytochemistry**, 18, p. 2036-2037, 1979.

PINTO, A. C.; SILVA, R. S. d.; VALENTE, L. M. M. Diterpenes from *Vellozia nanuzae*. **Phytochemistry**, 27, n. 12, p. 3909-3911, 1988.

PINTO, A. C.; VALENTE, L. M. M.; PIZZOLATTI, M. G. Two diterpenes with a cleistanthane skeleton from *Vellozia declinans*. **Phytochemistry**, 30, n. 9, p. 3136-3138, 1991.

PINTO, A. C.; VALENTE, L. M. M.; SILVA, R. S. d. Norditerpenoids from *Vellozia pusilla*. **Phytochemistry**, 27, n. 12, p. 3913-3915, 1988.

PINTO, A. C.; ZOCHER, D. H. T.; QUEIROZ, P. P. S.; KELECOM, A. Diterpenoids from *Vellozia flavicans*. **Phytochemistry**, 26, n. 8, 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**, 6, n. 3, p. 209-213, 1995.

QUINTÃO, F. J. O.; TAVARES, R. S. N.; VIEIRA-FILHO, S. A.; SOUZA, G. H. B. *et al.* Hydroalcoholic extracts of *Vellozia squamata*: Study of its nanoemulsions for pharmaceutical or cosmetic applications. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, 23, n. 1, p. 101-107, 2013. Article.

RAVAGNANI, O. M. Subsídios para o estudo da medicina popular no Brasil. **Perspectivas**, 4, p. 65-73, 1981.

RIBEIRO, D. A.; OLIVEIRA, L. G. S.; MACÊDO, D. G.; MENEZES, I. R. A. *et al.* Promising medicinal plants for bioprospection in a Cerrado area of Chapada do Araripe, Northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, 155, n. 3, p. 1522-1533, 2014.

RIBEIRO, J. F.; WALTER, B. M. T. As Principais Fitofisionomias do Bioma Cerrado. *In*: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. d., *et al* (Ed.). **Cerrado: Ecologia e Flora**. Brasília: EMBRAPA-CERRADOS, 2008. v. 2, cap. 3, p. 88-166.

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

RIJO, P.; SIMÕES, M. F.; DUARTE, A.; RODRÍGUEZ, B. Isopimarane diterpenoids from *Aeollanthus rydingianus* and their antimicrobial activity. **Phytochemistry**, 70, n. 9, p. 1161-1165, 2009.

RIOS, J. L.; RECIO, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, 100, p. 80-84, 2005.

SALATINO, A.; SALATINO, M. L. F.; MELLO-SILVA, R.; DUERHOLT-OLIVEIRA, I. An appraisal of the plasticity of alkane profiles of some species of Velloziaceae **Biochemical Systematics and Ecology**, 19, n. 3, p. 241-248, 1991.

SALATINO, A.; SALATINO, M. L. F.; SANTOS, D. Y. A. C.; PATRÍCIO, M. C. B. Distribution and evolution of secondary metabolites in Eriocaulaceae, Lythraceae and Velloziaceae from “campos rupestres”. **Genetics and Molecular Biology**, 23, n. 4, p. 931-940, 2000.

SALATINO, M. L. F.; SALATINO, A.; MENEZES, N. L.; MELLO-SILVA, R. Alkanes of foliar epicuticular waxes of Velloziaceae. **Phytochemistry**, 28, n. 4, p. 1105-1114, 1989.

SALEH, J. Murine models of melanoma. **Pathology - Research and Practice**, 214, n. 9, p. 1235-1238, 2018.

SANTOS, F. S. d. **As plantas brasileiras, os jesuítas e os índigenas do Brasil: História e ciência na Triaga Brasileira (séc. XVII-XVIII)**. São Paulo: Casa do Novo Autor Editora, 2009. 240 p.

SANTOS, M. M. S. **Atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos de plantas medicinais sobre patógenos de origem alimentar (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella Typhimurium*)**. 2016. Dissertação (Mestrado Acadêmico) -, Universidade Federal do Tocantins, Palmas, TO.

SANTOS, P. M.; BATISTA, D. L. J.; RIBEIRO, L. A. F.; BOFFO, E. F. *et al.* Identification of antioxidant and antimicrobial compounds from the oilseed crop *Ricinus communis* using a multiplatform metabolite profiling approach. **Industrial Crops & Products**, 124, p. 834-844, 2018.

SCHAEFER, C. E.; CÂNDIDO, H. G.; CORRÊA, G. R.; NUNES, J. A. *et al.* Soils associated with rupestrian grasslands. *In*: FERNANDES, G. W. (Ed.). **Ecology and conservation of mountain-top grasslands in Brasil**. Switzerland: Springer International, 2016. p. 55-68.

SEIGLER, D. S. **Plant Secondary Metabolism**. New York: Springer Science + Business Media LLC, 1998.

SILVA, A. A. d.; GONÇALVES, R. C. Espécies reativas do oxigênio e as doenças respiratórias em grandes animais. **Ciência Rural**, 40, n. 4, p. 994-1002, 2010.

SILVA, C. G.; CARVALHO, C. D. F.; HAMERSKI, L.; CASTRO, F. A. V. *et al.* Protective effects of flavonoids and extract from *Vellozia kolbekii* Alves against

oxidative stress induced by hydrogen peroxide in yeast. **Journal of Natural Medicines**, 66, n. 2, p. 367-372, 2012. Article.

SILVA, C. G.; SANTOS JÚNIOR, H. M.; BARBOSA, J. P.; COSTA, G. L. *et al.* Structure elucidation, antimicrobial and cytotoxic activities of a halimane isolated from *Vellozia kolbekii* Alves (Velloziaceae). **Chemistry & Biodiversity**, 12, p. 1891-1901, 2015. Article.

SILVA, D. H. S.; CASTRO-GAMBOA, I.; BOLZANI, V. S. Plant diversity from Brazilian Cerrado and Atlantic Forest as a tool for prospecting potential therapeutic drugs. *In*: MANDER, L. e LUI, H. W. (Ed.). **Comprehensive Natural Products II - Chemistry and Biology**. Oxford: Elsevier, 2010. cap. 3.05, p. 95-133.

SILVA, G. C. d.; VALENTE, L. M. M.; PATITUCCI, M. L.; PINTO, A. C. *et al.* Diterpenóides com esqueleto cleistantano de *Vellozia* AFF. *carunculares* Martius Ex Seubert (Velloziaceae). **Química Nova**, 24, n. 5, p. 619-625, 2001.

SILVA, J. M. C. d.; BATES, J. M. Biogeographic patterns and conservation in the South American Cerrado: A tropical savanna hotspot. **Bioscience**, 52, n. 3, p. 225-233, 2002.

SILVEIRA, F. A. O.; NEGREIROS, D.; BARBOSA, N. P. U.; BUISSON, E. *et al.* Ecology and evolution of plant diversity in the endangered campo rupestre: A neglected conservation priority. **Plant Soil**, 403, p. 129-152, 2016.

SMITH, J. A.; NGO, H.; MARTIN, M. C.; WOLF, J. K. An evaluation of citotoxicity of the taxane and platinum agents combination treatment in a panel of human ovarian carcinoma cell lines. **Gynecology Oncology**, 98, n. 1, p. 141-145, 2005.

SMITH, L. B.; AYENSU, E. S. Classification of Old World Velloziaceae. **Kew Bulletin**, 29, n. 1, p. 181-205, 1974.

SMITH, L. B.; AYENSU, E. S. **A Revision of American Velloziaceae**. Washington: Smithsonian Institution Press, 1976. 172 p. (Smithsonian Contributions to Botany, v. 30).

SOUSA, R. **Cerrado**. Brasil Escola, Disponível em: <www.brasilecola.uol.com.br/brasil/cerrado.htm>, 2020. Acesso em: outubro de 2020.

SOUZA, J. M.; SCHMIDT, I. B.; CONCEIÇÃO, A. A. How do fire and harvesting affect the population dynamics of a dominant endemic Velloziaceae species in campo rupestre? **Flora**, 238, p. 225-233, 2018. Article.

SUFFNESS, M.; PEZZUTO, J. M. Assays related to cancer drug discovery. *In*: HOSTETTMANN, K. (Ed.). **Methods in Plant Biochemistry: Assays for Bioactivity**. London: Academic Press, 1990. p. 71-133.

SUGIMOTO, M.; KAWAKAMI, M.; ROBERT, M.; SOGA, T. *et al.* Bioinformatics tools for mass spectroscopy-based metabolomic data processing and analysis. **Current Bioinformatics**, 7, n. 1, p. 96-108, 2012.

TAYLOR, P. W.; STAPLETON, P. D.; LUZIO, J. P. New ways to treat bacterial infections. **Drug Discovery Today**, 7, n. 21, p. 1086-1091, 2002.

TIWARI, P.; KUMAR, B.; KAUR, M.; KAUR, G. *et al.* Phytochemical screening and extraction: A review. **Internationale Pharmaceutica Scientia**, 1, n. 1, p. 98-106, 2011.

TOLEDO, A. C. O.; HIRATA, L. L.; BUFFON, M. C. M.; MIGUEL, M. D. *et al.* Fitoterápicos: Uma abordagem farmacotécnica. **Revista Lecta**, 21, n. 1/2, p. 7-13, 2003.

TRIBUIANI, N.; DA SILVA, A. M.; FERRAZ, M. C.; SILVA, M. G. *et al.* *Vellozia flavicans* Mart. ex Schult. hydroalcoholic extract inhibits the neuromuscular blockade induced by *Bothrops jararacussu* venom. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, 14, 2014. Article.

VAILATI-RIBONI, M.; PALOMBO, V.; LOOR, J. J. What Are Omics Sciences? *In*: **Periparturient Diseases of Dairy Cows**. Switzerland: Springer, Cham, 2017. cap. 1, p. 1-7.

VALENTE, L. M. M.; GUNATILAKA, A. A. L.; KINGSTON, D. G. I.; PATITUCCI, M. L. *et al.* A bioactive seco-rosane diterpenoid from *Vellozia candida*. **Journal of Natural Products**, 60, p. 478-481, 1997. Article.

VASCONCELOS, M. F. d. O que são campos rupestres e campos de altitude nos topos de montanha do Leste do Brasil? **Revista Brasileira de Botânica**, 34, n. 2, p. 241-246, 2011.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: Cura segura? **Química Nova**, 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VELLOZIA. Flora do Brasil 2020 under construction. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://servicos.jbrj.gov.br/flora/search/Vellozia>>, 2020. Acesso em: outubro de 2020.

VELLOZIACEAE. **Flora do Brasil 2020 under construction**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://servicos.ibrij.gov.br/flora/search/Velloziaceae>>, 2020. Acesso em: outubro de 2020.

WALSH, C. Antibiotics: Initial concepts. *In: Antibiotics: Actions, origins, resistance*. Washington: ASM Press, 2003a. cap. 1, p. 3-9.

WALSH, C. Contexts and challenges for the use of new antibiotics. *In: Antibiotics: Actions, origins, resistance*. Washington: ASM Press, 2003b. cap. 17, p. 285-295.

WATT, J. M.; BREYER, B. M. G. **Medicinal and poisonous plants of Southern and Eastern Africa**. London: Lewingstone, 1962.

WATTS, K. T.; LEE, P. C.; SCHMIDT-DANNERT, C. Biosynthesis of plant-specific stilbene polyketides in metabolically engineered *Escherichia coli*. **BMC Biotechnology**, 6, p. 12, 2006.

WESTERHUIS, J. A.; HOEFSLOOT, H. C. J.; SMIT, S.; VIS, D. J. *et al.* Assessment of PLSDA cross validation. **Metabolomics**, 4, p. 81-89, 2008.

WFO. **Vellozia Vand.** Disponível em: <<http://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-4000040100>>, 2020. Acesso em: outubro de 2020.

WILLIAMS, C. A.; GREENHAM, J.; HARBORNE, J. B.; EAGLES, J. *et al.* Occurrence of C-methylflavonols in leaves of *Vellozia*. **Phytochemistry**, 31, n. 2, p. 555-557, 1992. Article.

WILLIAMS, C. A.; HARBORNE, J. B.; GREENHAM, J.; EAGLES, J. Differences in flavonoid patterns between *genera* within the Velloziaceae. **Phytochemistry**, 36, n. 4, p. 931-940, 1994. Article.

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

WILLIAMS, C. A.; HARBORNE, J. B.; MENEZES, N. L. The utility of leaf flavonoids as taxonomic markers in the subfamily and generic classification of the Velloziaceae. **Biochemical Systematics and Ecology**, 19, n. 6, p. 483-495, 1991.

WOJARSKI, J.; OCHMAN, M.; MEDRALA, W.; KULACZKOWSKA, Z. *et al.* Bacterial Infections During Hospital Stay and Their Impact on Mortality After Lung Transplantation: A Single-Center Study. **Transplantation Proceedings**, 50, n. 7, p. 2064-2069, 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, W. H. O. **Regulatory situation of herbal medicines: A worldwide review**. Programme on Traditional Medicine, 1998. 45 p. (Technical documents).

WORLD HEALTH ORGANIZATION, W. H. O. **World Cancer Report 2014**. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2014. (World Cancer Reports).

WORLD HEALTH ORGANIZATION, W. H. O. **Guide for establishing a pathology laboratory in the context of cancer control**. Geneva: World Health Organization, 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, W. H. O. **Cancer Country Profile 2020: Brazil**. Geneva: World Health Organization, 2020.

WWF-BRASIL. Bioma Cerrado: A savana mais biodiversa do mundo está ameaçada. **WWF-Brasil**, p. 1-32, 2019. Disponível em: www.wwf.org.br/informacoes/biblioteca/publicacoes_cerrado/?74962/Bioma-Cerrado.

YI, L.; DONG, N.; YUN, Y.; DENG, B. *et al.* Chemometric methods in data processing of mass spectrometry-based metabolomics: A review. **Analytica Chimica Acta**, 914, n. 31, p. 17-34, 2016.

ZAIDAN, L. B. P.; CARREIRA, R. C. Seed germination in Cerrado species. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, 20, n. 3, p. 167-181, 2008.

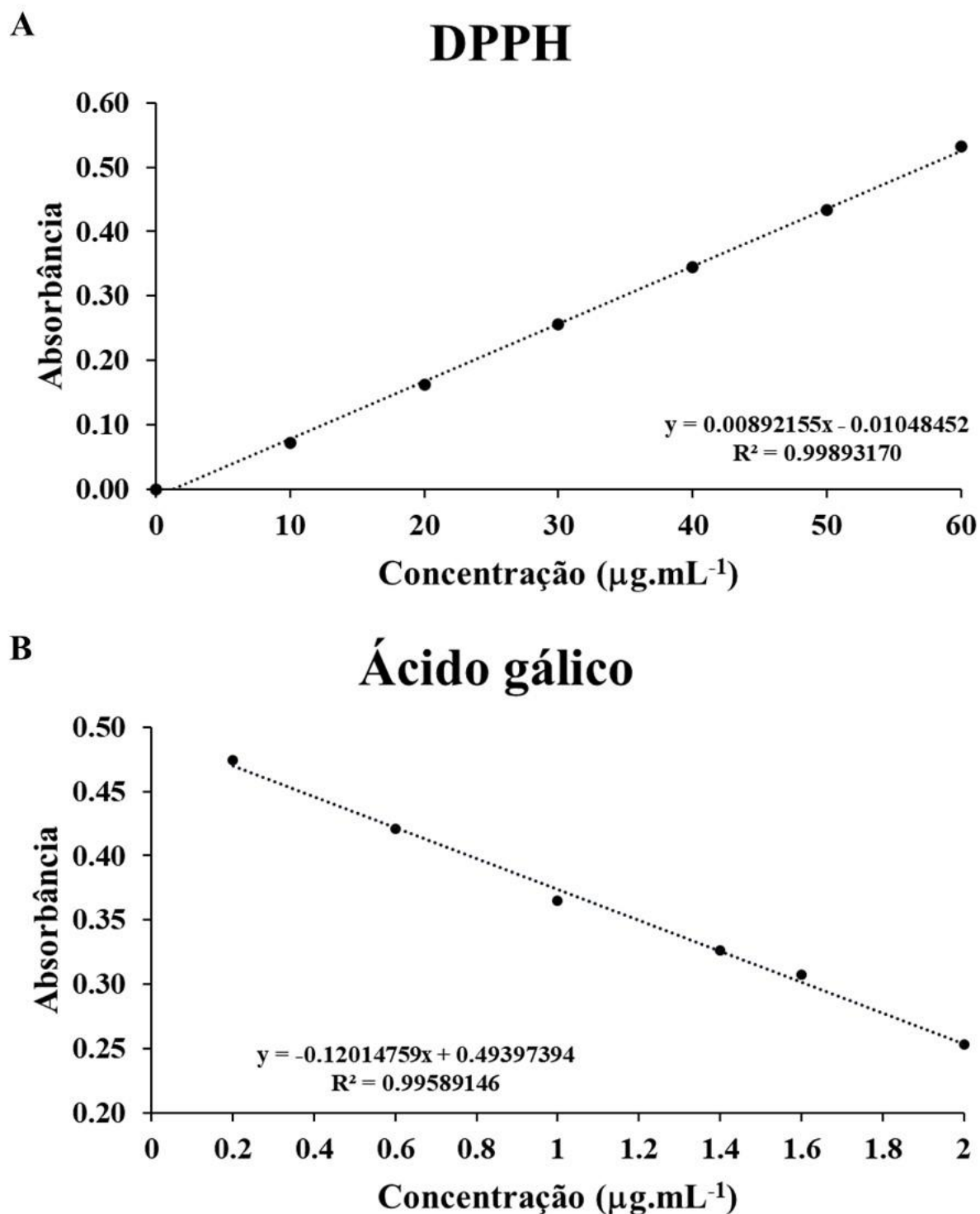
ZANETTI, J. S.; OLIVEIRA, L. R.; RIBEIRO-SILVA, A. Câncer de mama: De perfis moleculares a células tronco. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, 9, n. 1, p. 277-292, 2011.

ZAPPI, D. C.; FILARDI, F. L. R.; LEITMAN, P.; SOUZA, V. C. *et al.* Growing knowledge: An overview of Seed Plant diversity in Brazil. **Rodriguésia**, 66, n. 4, p. 1085-1113, 2015.

ZHANG, A.; SUN, H.; WANG, P.; HAN, Y. *et al.* Modern analytical techniques in metabolomics analysis. **Analyst**, 137, n. 2, p. 293-300, 2012.

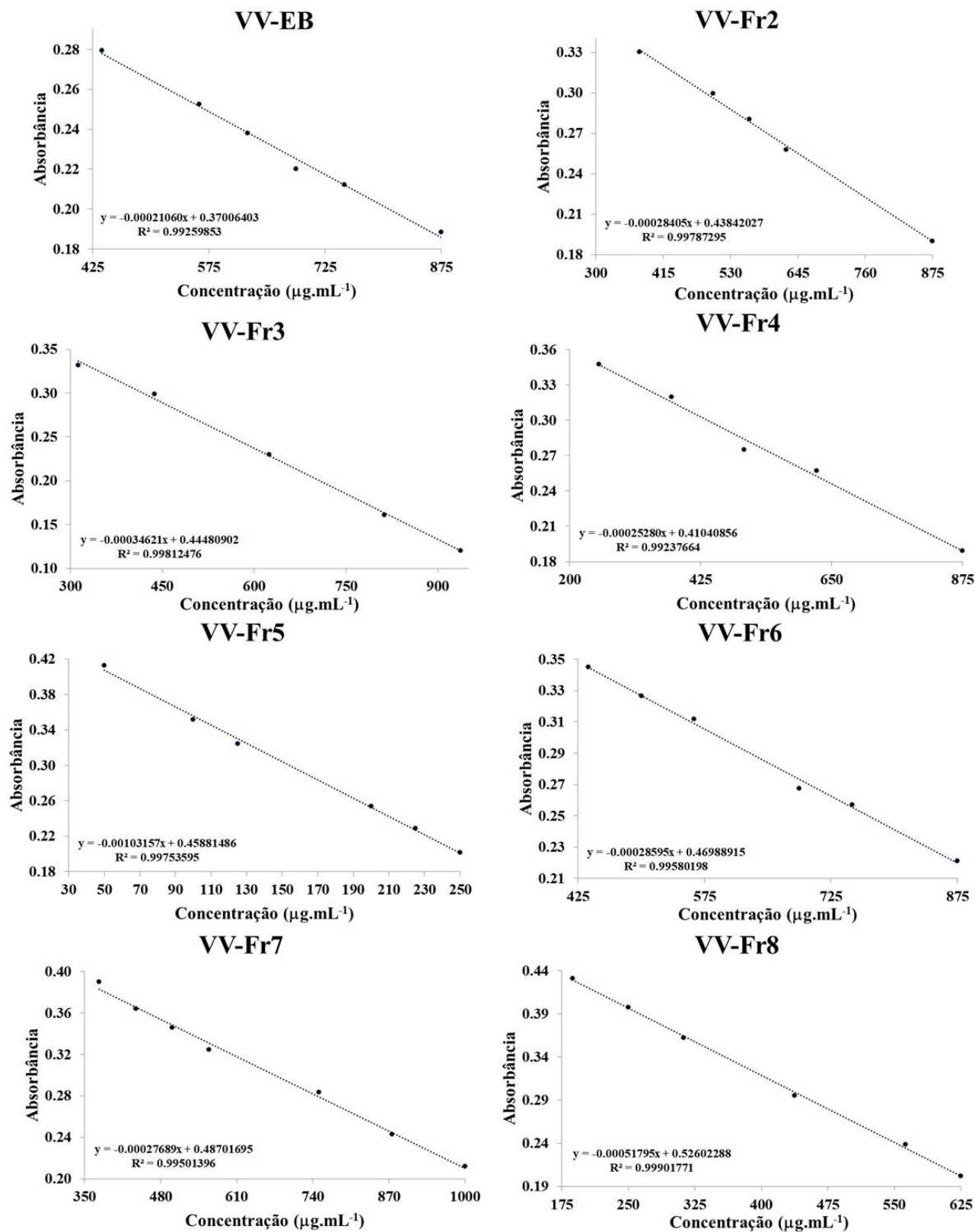
ZHENG, X.-H.; YANG, J.; LV, J.-J.; ZHU, H.-T. *et al.* Phyllaciduloids A–D: Four new cleistanthane diterpenoids from *Phyllanthus acidus* (L.) Skeels. **Fitoterapia**, 125, p. 89-93, 2018.

APÊNDICE A – Curva de calibração do DPPH e consumo do ácido gálico



A – Curva de calibração do DPPH; B – Curva de consumo de DPPH do ácido gálico (controle positivo).

APÊNDICE B – Consumo de DPPH das amostras de *V. pyrantha*



APÊNDICE C – Massas de alta resolução dos compostos de *Vellozia*

Fórmula molecular	[M] ⁺	[M+H] ⁺	[M+Na] ⁺
Diterpenos↓	-	-	-
C ₁₆ H ₂₈ O	236.214015	237.221840	259.203785
C ₁₆ H ₂₆ O ₂	250.193280	251.201104	273.183050
C ₁₆ H ₂₄ O ₃	264.172545	265.180370	287.162315
C ₁₆ H ₂₄ O ₄	280.167460	281.175285	303.157230
C ₁₈ H ₂₈ O ₃	292.203845	293.211670	315.193615
C ₁₈ H ₃₀ O ₃	294.219495	295.227320	317.209264
C ₁₈ H ₃₀ O ₅	326.209325	327.217150	349.199095
C ₁₉ H ₁₈ O ₂	278.130680	279.138505	301.120450
C ₁₉ H ₂₀ O ₂	280.146330	281.154155	303.136100
C ₁₉ H ₂₂ O	266.167065	267.174890	289.156835
C ₁₉ H ₂₂ O ₃	298.156895	299.164720	321.146665
C ₁₉ H ₂₄ O ₃	300.172545	301.180370	323.162315
C ₁₉ H ₂₆ O ₂	286.193280	287.201105	309.183050
C ₁₉ H ₂₆ O ₃	302.188195	303.196020	325.177965
C ₁₉ H ₂₆ O ₄	318.183110	319.190934	341.172880
C ₁₉ H ₂₈ O ₂	288.208930	289.216755	311.198700
C ₁₉ H ₂₈ O ₃	304.203845	305.211670	327.193615
C ₂₀ H ₂₈	268.219100	269.226925	291.208870
C ₂₀ H ₃₀	270.234750	271.242575	293.224520
C ₂₀ H ₂₂ O ₃	310.156895	311.164720	333.146665
C ₂₀ H ₂₄ O ₂	296.177630	297.185455	319.167400
C ₂₀ H ₂₄ O ₃	312.172545	313.180370	335.162315
C ₂₀ H ₂₄ O ₄	328.167460	329.175285	351.157230
C ₂₀ H ₂₆ O	282.198365	283.206190	305.188135
C ₂₀ H ₂₆ O ₂	298.193280	299.201105	321.183050
C ₂₀ H ₂₆ O ₃	314.188195	315.196020	337.177965
C ₂₀ H ₂₆ O ₄	330.183110	331.190934	353.172880
C ₂₀ H ₂₈ O	284.214015	285.221840	307.203785
C ₂₀ H ₂₈ O ₂	300.208930	301.216755	323.198700
C ₂₀ H ₂₈ O ₃	316.203845	317.211670	339.193615
C ₂₀ H ₂₈ O ₄	332.198760	333.206585	355.188530
C ₂₀ H ₃₀ O	286.229665	287.237490	309.219435
C ₂₀ H ₃₀ O ₂	302.224580	303.232404	325.214349
C ₂₀ H ₃₀ O ₃	318.219495	319.227320	341.209264
C ₂₀ H ₃₀ O ₄	334.214410	335.222235	357.204180
C ₂₀ H ₃₀ O ₅	350.209325	351.217150	373.199095
C ₂₀ H ₃₂ O	288.245315	289.253140	311.235085
C ₂₀ H ₃₂ O ₂	304.240230	305.248055	327.230000
C ₂₀ H ₃₂ O ₃	320.235145	321.242970	343.224915
C ₂₀ H ₃₂ O ₄	336.230060	337.237885	359.219830
C ₂₀ H ₃₂ O ₅	352.224975	353.232800	375.214745
C ₂₀ H ₃₃ O ₃ Cl	356.211823	357.219648	379.201593
C ₂₀ H ₃₄ O ₂	306.255880	307.263705	329.245650
C ₂₀ H ₃₄ O ₃	322.250795	323.258620	345.240565
C ₂₀ H ₃₆ O ₂	308.271530	309.279355	331.261300
C ₂₁ H ₃₄ O ₃	334.250795	335.258620	357.240565
C ₂₂ H ₃₆ O ₄	364.261359	365.269185	387.251130
C ₄₀ H ₆₀ O ₄	604.449160	605.456985	627.438930
Triterpenos↓	-	-	-
C ₃₀ H ₄₆ O	422.354865	423.362690	445.344635
C ₃₀ H ₄₆ O ₂	438.349780	439.357605	461.339550
C ₃₀ H ₄₆ O ₃	454.344695	455.352520	477.334465

C ₃₀ H ₄₈ O	424.370515	425.378340	447.360285
C ₃₀ H ₄₈ O ₂	440.365430	441.373255	463.355199
C ₃₀ H ₄₈ O ₃	456.360345	457.368169	479.350114
C ₃₀ H ₅₀ O	426.386165	427.393990	449.375935
C ₃₀ H ₅₀ O ₂	442.381080	443.388905	465.370850
C ₃₁ H ₅₀ O	438.386165	439.393990	461.375935
C ₃₁ H ₅₂ O ₂	456.396730	457.404555	479.386500
Esteroides↓	-	-	-
C ₂₈ H ₄₈ O	400.370515	401.378340	423.360285
C ₂₉ H ₄₈ O	412.370515	413.378340	435.360285
C ₂₉ H ₅₀ O	414.386165	415.393990	437.375935
Flavonoides↓	-	-	-
C ₁₅ H ₁₀ O ₆	286.047740	287.055565	309.037510
C ₁₅ H ₁₂ O ₆	288.063390	289.071215	311.053160
C ₁₆ H ₁₂ O ₆	300.063390	301.071215	323.053160
C ₁₆ H ₁₂ O ₇	316.058305	317.066130	339.048075
C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330.073955	331.081780	353.063725
C ₁₈ H ₁₆ O ₈	360.084520	361.092345	383.074290
C ₁₉ H ₁₈ O ₇	358.105255	359.113079	381.095024
C ₁₉ H ₁₈ O ₈	374.100170	375.107995	397.089940
C ₁₉ H ₂₀ O ₆	344.125990	345.133815	367.115760
C ₂₀ H ₁₆ O ₇	368.089605	369.097430	391.079375
C ₂₀ H ₁₈ O ₆	354.110340	355.118165	377.100110
C ₂₀ H ₁₈ O ₇	370.105255	371.113079	393.095024
C ₂₀ H ₂₀ O ₈	388.115820	389.123645	411.105590
C ₂₀ H ₂₂ O ₇	374.136555	375.144380	397.126324
C ₂₁ H ₁₈ O ₆	366.110340	367.118165	389.100110
C ₂₁ H ₁₈ O ₇	382.105255	383.113079	405.095024
C ₂₁ H ₂₀ O ₇	384.120905	385.128730	407.11067
C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	432.105649	433.113475	455.095420
C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	448.100564	449.108390	471.090335
C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	464.095480	465.103305	487.085250
C ₂₂ H ₂₀ O ₆	380.125990	381.133815	403.115760
C ₂₂ H ₂₀ O ₇	396.120905	397.128730	419.110675
C ₂₂ H ₂₂ O ₇	398.136555	399.144380	421.126324
C ₂₂ H ₂₂ O ₁₃	494.106045	495.113870	517.095815
C ₂₃ H ₂₂ O ₆	394.141640	395.149465	417.131409
C ₂₃ H ₂₂ O ₇	410.136555	411.144380	433.126324
C ₂₃ H ₂₄ O ₁₂	492.126780	493.134605	515.116550
C ₂₃ H ₂₄ O ₁₃	508.121695	509.129520	531.111465
C ₂₄ H ₂₄ O ₇	424.152205	425.160030	447.141975
C ₂₅ H ₂₈ O ₆	424.188590	425.196415	447.178360
C ₂₅ H ₂₀ O ₉	464.110735	465.118560	487.100505
C ₂₆ H ₂₈ O ₁₅	580.142825	581.150650	603.132595
C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	594.158475	595.166300	617.148245
C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	610.153390	611.161215	633.143160
C ₃₀ H ₂₆ O ₁₄	610.132260	611.140085	633.122030
Outros↓	-	-	-
C ₉ H ₈ O ₄	180.042260	181.050085	203.032030
C ₂₇ H ₅₆	380.438200	381.446025	403.427969
C ₂₈ H ₅₈	394.453850	395.461675	417.443620
C ₂₉ H ₆₀	408.469500	409.477325	431.459270
C ₃₀ H ₆₂	422.485150	423.492975	445.474920
C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256.240230	257.248055	279.230000
C ₁₆ H ₁₆ O ₃	256.109945	257.117770	279.099715
C ₁₈ H ₃₄ O ₂	282.255880	283.263705	305.245650
C ₁₈ H ₃₆ O ₂	284.271530	285.279355	307.261300
C ₃₀ H ₆₂ O	438.480064	439.487890	461.469835

ANEXO A – Certidão de acesso ao patrimônio genético



**Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Certidão

Cadastro nº AA9C491

Declaramos, nos termos do art. 41 do Decreto nº 8.772/2016, que o cadastro de acesso ao patrimônio genético ou conhecimento tradicional associado, abaixo identificado e resumido, no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado foi submetido ao procedimento administrativo de verificação e não foi objeto de requerimentos admitidos de verificação de indícios de irregularidades ou, caso tenha sido, o requerimento de verificação não foi acatado pelo CGen.

Número do cadastro: **AA9C491**
 Usuário: **UFBA**
 CPF/CNPJ: **15.180.714/0001-04**
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

Espécie

Vellozia pyrantha

Título da Atividade: **Avaliação metabolômica, estudo fitoquímico e avaliação da atividade antioxidante, citotóxica e antimicrobiana das substâncias isoladas de Vellozia pyrantha**

Equipe

PAULO ROBERTO RIBEIRO DE JESUS	UFBA
Luiz Augusto Figueiredo Ribeiro	UFBA
Lourdes Cardoso de Souza Neta	UNEB

Data do Cadastro: **17/09/2018 18:42:29**
 Situação do Cadastro: **Concluído**

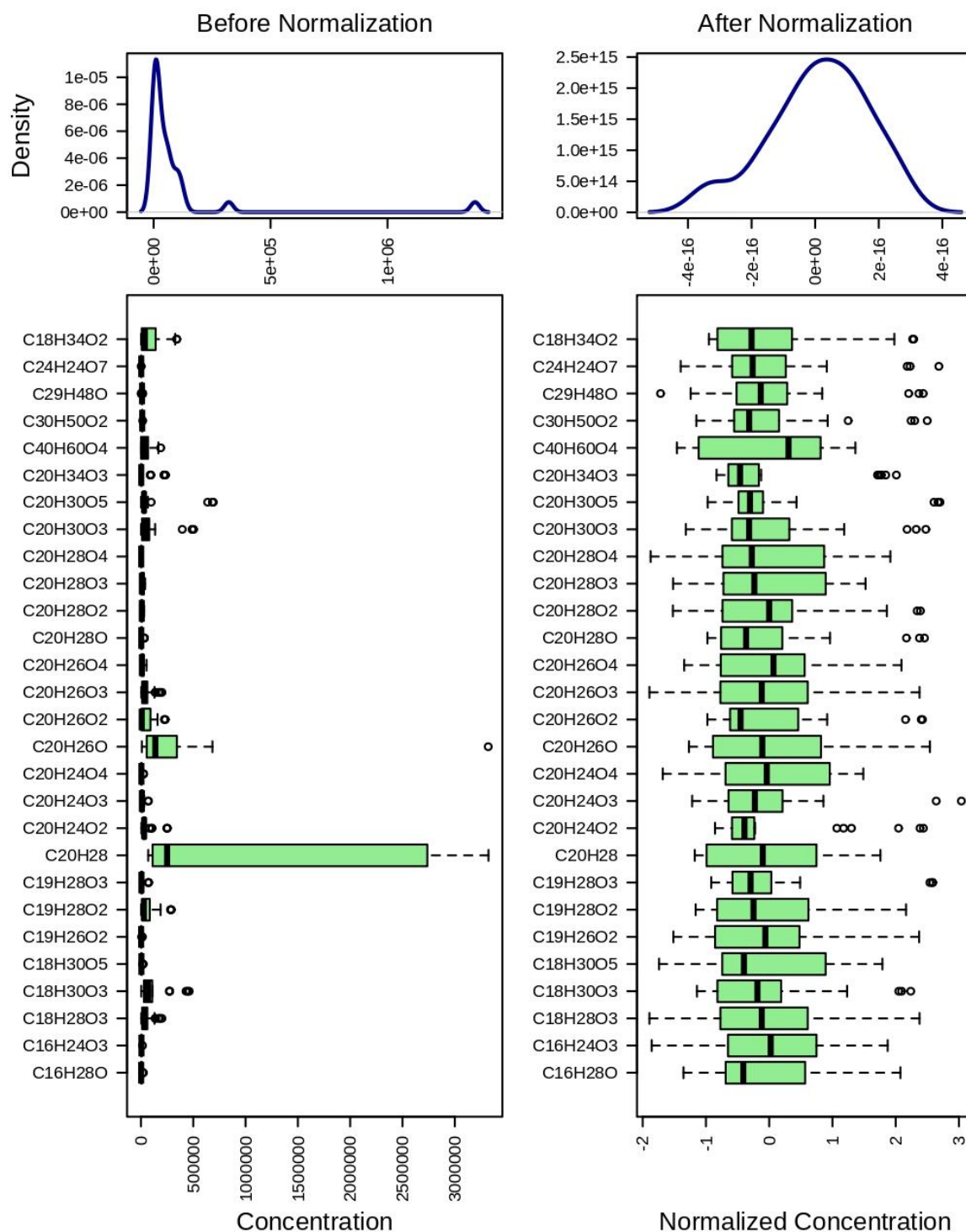


Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em 18:25 de 11/03/2019.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
 ASSOCIADO - **SISGEN**

ANEXO B – Normalização dos dados de CLAE-EM



ANEXO C – Resultados do *post hoc* utilizando LSD de Fisher

Fórmula	f. value	p. value	-log10(p)	FDR	Fisher's LSD
C ₂₀ H ₂₆ O ₂	585.98	3.8164e-20	19.418	1.0686e-18	VP_EB - VP_FR1
C ₂₀ H ₂₈	523.19	1.0528e-19	18.978	1.4739e-18	VP_EB - VP_FR1
C ₂₀ H ₃₄ O ₃	480.26	2.2648e-19	18.645	2.1138e-18	VP_FR1 - VP_EB
C ₄₀ H ₆₀ O ₄	260.38	5.3445e-17	16.272	3.6491e-16	VP_EB - VP_FR1
C ₂₀ H ₂₈ O	254.64	6.5162e-17	16.186	3.6491e-16	VP_FR1 - VP_EB
C ₁₈ H ₃₀ O ₃	230.23	1.5964e-16	15.797	7.45e-16	VP_EB - VP_FR1
C ₂₀ H ₃₀ O ₅	187.84	9.7146e-16	15.013	3.8858e-15	VP_EB - VP_FR2
C ₂₀ H ₂₄ O ₂	170.03	2.3473e-15	14.629	8.2157e-15	VP_FR1 - VP_EB
C ₁₈ H ₃₄ O ₂	156.57	4.8676e-15	14.313	1.5144e-14	VP_EB - VP_FR1
C ₁₉ H ₂₈ O ₂	144.16	1.0088e-14	13.996	2.8247e-14	VP_EB - VP_FR1
C ₁₉ H ₂₈ O ₃	111.33	9.7905e-14	13.009	2.4921e-13	VP_EB - VP_FR2
C ₂₀ H ₂₆ O ₄	104.08	1.7662e-13	12.753	4.1211e-13	VP_EB - VP_FR1
C ₂₀ H ₂₈ O ₂	99.972	2.5124e-13	12.6	5.4114e-13	VP_FR1 - VP_EB
C ₂₄ H ₂₄ O ₇	83.69	1.1837e-12	11.927	2.3674e-12	VP_FR1 - VP_EB
C ₁₈ H ₂₈ O ₃	68.477	6.7293e-12	11.172	1.1776e-11	VP_EB - VP_FR1
C ₂₀ H ₂₆ O ₃	68.477	6.7293e-12	11.172	1.1776e-11	VP_EB - VP_FR1
C ₃₀ H ₅₀ O ₂	58.579	2.5761e-11	10.589	4.2429e-11,	VP_FR1 - VP_EB
C ₂₀ H ₂₈ O ₃	54.999	4.4184e-11	10.355	6.873e-11	VP_EB - VP_FR1
C ₂₀ H ₃₀ O ₃	32.92	3.3063e-09	8.4807	4.8724e-09	VP_EB - VP_FR1
C ₂₉ H ₄₈ O	25.215	2.9063e-08	7.5367	4.0688e-08	VP_FR1 - VP_EB
C ₂₀ H ₂₈ O ₄	23.912	4.4481e-08	7.3518	5.9308e-08	VP_FR1 - VP_EB
C ₁₆ H ₂₄ O ₃	15.47	1.3123e-06	5.882	1.6702e-06	VP_FR2 - VP_EB
C ₂₀ H ₂₄ O ₄	7.1035	0.00028605	3.5436	0.00034823	VP_FR1 - VP_EB
C ₂₀ H ₂₆ O	6.4658	0.0005082	3.294	0.00059291	VP_FR1 - VP_EB
C ₁₉ H ₂₆ O ₂	6.4065	0.0005371	3.2699	0.00060155	VP_FR4 - VP_EB
C ₁₈ H ₃₀ O ₅	5.8092	0.00095482	3.0201	0.0010283	VP_FR1 - VP_EB
C ₁₆ H ₂₈ O	4.3456	0.0046084	2.3364	0.0047791	VP_FR2 - VP_EB
C ₂₀ H ₂₄ O ₃	3.1181	0.02146	1.6684	0.02146	VP_FR2 - VP_EB
C ₂₀ H ₂₆ O ₂	585.98	3.8164e-20	19.418	1.0686e-18	VP_EB - VP_FR1
C ₂₀ H ₂₈	523.19	1.0528e-19	18.978	1.4739e-18	VP_EB - VP_FR1

ANEXO D – Valores de VIP scores dos metabólitos de *V. pyrantha*

Composto	Comp. 1	Comp. 2	Comp. 3
C ₂₀ H ₂₈	1.8111	1.6871	1.6093
C ₁₉ H ₂₈ O ₃	1.7352	1.6886	1.6333
C ₂₀ H ₃₀ O ₅	1.6032	1.6098	1.538
C ₂₀ H ₂₈ O ₃	1.5553	1.4489	1.3835
C ₁₈ H ₃₀ O ₃	1.4774	1.3804	1.3167
C ₂₀ H ₂₆ O ₂	1.4359	1.3376	1.2929
C ₂₀ H ₃₄ O ₃	1.2519	1.1679	1.1616
C ₂₀ H ₂₈ O	1.1799	1.1042	1.0637
C ₂₀ H ₂₈ O ₄	1.0024	0.98073	1.0623
C ₃₀ H ₅₀ O ₂	0.96463	0.93074	0.90791
C ₂₀ H ₂₄ O ₃	0.96339	1.0312	1.0309
C ₂₀ H ₂₆ O ₄	0.91215	0.85443	0.87942
C ₄₀ H ₆₀ O ₄	0.89362	0.83653	1.0135
C ₂₄ H ₂₄ O ₇	0.87975	0.86368	0.84838
C ₁₈ H ₃₄ O ₂	0.85903	0.83595	0.85273
C ₁₈ H ₃₀ O ₅	0.83805	0.80713	0.8429
C ₁₉ H ₂₆ O ₂	0.76536	0.77091	0.73667
C ₂₀ H ₃₀ O ₃	0.72842	0.69447	0.71804
C ₂₀ H ₂₄ O ₂	0.7094	0.67222	0.65725
C ₂₀ H ₂₄ O ₄	0.53296	0.56268	0.56545
C ₁₆ H ₂₄ O ₃	0.5151	0.7136	0.70329
C ₂₀ H ₂₈ O ₂	0.51319	0.78502	1.0234
C ₂₉ H ₄₈ O	0.42171	0.5146	0.5147
C ₂₀ H ₂₆ O	0.28877	0.35518	0.38151
C ₁₆ H ₂₈ O	0.25798	0.68979	0.82619
C ₁₈ H ₂₈ O ₃	0.15127	0.57264	0.61859
C ₂₀ H ₂₆ O ₃	0.15127	0.57264	0.61859
C ₁₉ H ₂₈ O ₂	0.0461	0.65032	0.62697