

LAÍS AZEVEDO RODRIGUES

**BIOPROSPECÇÃO MOLECULAR DE ESPÉCIES VEGETAIS DA MATA
ATLÂNTICA LEVA A IDENTIFICAÇÃO DE *Casearia arborea* COMO FONTE DE
DITERPENOS CLERODÂNICOS COM POTENCIAL ATIVIDADE ANTITUMORAL**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientador: João Paulo Viana Leite

Coorientadores: Gustavo Costa Bressan
Alisson Andrade Almeida

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2022**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa

T

R696b
2022

Rodrigues, Lais Azevedo, 1991-

Bioprospecção molecular de espécies vegetais da Mata Atlântica leva a identificação de *Casearia arborea* como fonte de diterpenos clerodânicos com potencial atividade antitumoral / Lais Azevedo Rodrigues. – Viçosa, MG, 2022.

1 tese eletrônica (133 f.): il. (algumas color.).

Inclui anexos.

Orientador: João Paulo Viana Leite.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, 2022.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.506>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Bioprospecção. 2. Extratos vegetais - Mata Atlântica. 3. *Sorocea hilarii*. 4. *Casearia arborea*. 5. Agentes antineoplásicos. 6. Diterpenos clerodânicos. 7. Casearborina. I. Leite, João Paulo Viana, 1972-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada. III. Título.

CDD 22. ed. 615.321

Bibliotecário(a) responsável: Bruna Silva CRB-6/2552

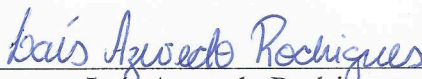
LAÍS AZEVEDO RODRIGUES

**BIOPROSPECÇÃO MOLECULAR DE ESPÉCIES VEGETAIS DA MATA
ATLÂNTICA LEVA A IDENTIFICAÇÃO DE *Casearia arborea* COMO FONTE DE
DITERPENOS CLERODÂNICOS COM POTENCIAL ATIVIDADE ANTITUMORAL**

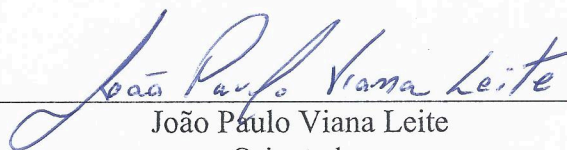
Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 10 de agosto de 2022

Assentimento:



Laís Azevedo Rodrigues
Autora



João Paulo Viana Leite
Orientador

A Deus, pela minha vida;
Aos meus pais, Eder e Terezinha, por todo amor e apoio;
Ao meu esposo, Ivan, por toda compreensão, companheirismo e amor;
Dedico.

AGRADECIMENTOS

Não se faz ciência sozinho e este trabalho científico só foi possível graças à colaboração e dedicação de muitas pessoas. Por isso, deixo aqui registrado meus sinceros agradecimentos...

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar a pós-graduação em Bioquímica Aplicada;

Ao meu orientador, Prof. João Paulo Viana Leite, pela dedicação, acompanhando de perto todo o andamento da pesquisa e a minha formação;

Ao meu coorientador, Prof. Gustavo Costa Bressan, pela coorientação com valiosas sugestões para o andamento do trabalho;

Ao meu coorientador, Alisson Andrade Almeida, por ter compartilhando comigo seus conhecimentos e por estar sempre disposto a contribuir;

Aos membros da banca examinadora, Profa. Cláudia do Ó Pessoa, Prof. Geraldo Célio Brandão, Prof. Antônio Demuner e Prof. Leando Licursi que aceitaram prontamente o convite e, cujas sugestões, contribuíram imensamente para a melhoria deste trabalho;

A pesquisadora Ana Caroline Zanatta Silva do Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista (UNESP) de Araraquara, por todo auxílio para a realização das análises de desreplicação;

Ao Prof. Leandro de Oliveira, bem como ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV, por prontamente nos auxiliar nas análises em Citometria de fluxo;

A Pesquisadora Betânia Barros Cota do Instituto René Rachou (Fiocruz Minas) de Belo Horizonte, que não mediu esforços para nos auxiliar no isolamento dos compostos de *Casearia arborea*;

Ao prof. Geraldo Célio Brandão, da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto, que nos auxiliou na realização e interpretação dos experimentos de Ressonância Magnética Nuclear;

A prof^a. Marisa Ionta da Universidade Federal de Alfenas, que gentilmente nos cedeu a linhagem celular de câncer de fígado essencial para continuidade do trabalho;

Ao prof. Carlos Moreira Miquelino Eleta Torres, do Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Viçosa, pelo auxílio ao acesso às espécies vegetais em fragmento de Mata Atlântica;

Aos professores e técnicos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular e do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada da UFV;

Aos amigos do grupo BIOPROS, em especial Ana Paula, Janaína, Iorrana, Camila, Bianca, Isabella, Luana, Victor, e as agregadas, Fernanda, Larissa, Thayara e Gislaine pela amizade, por todos os momentos vividos e por toda colaboração, vocês tornaram essa jornada mais prazerosa;

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica celular e Bioprodutos, em especial Juliana Ribeiro, Janine e Samuel, sou grata por toda colaboração durante o desenvolvimento da pesquisa e pela amizade que construímos;

A Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro;

Por fim, a todos que de alguma forma colaboraram e se fizeram presentes, meu muito obrigada.

RESUMO

RODRIGUES, Laís Azevedo, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2022. **Bioprospecção molecular de espécies vegetais da Mata Atlântica leva a identificação de *Casearia arborea* como fonte de diterpenos clerodânicos com potencial atividade antitumoral.** Orientador: João Paulo Viana Leite. Coorientadores: Gustavo Costa Bressan e Alisson Andrade Almeida.

A bioprospecção de produtos naturais a partir de coleções de extratos vegetais tem sido uma estratégia eficiente e promissora para a descoberta de novos fármacos antitumorais. O objetivo dessa pesquisa foi bioprospectar produtos naturais com potencial antitumoral de espécies vegetais nativas do bioma Mata Atlântica. Foi avaliado o potencial citotóxico de 282 extratos provenientes de 72 espécies em linhagens celulares B16F10 (melanoma), SW480 (adenocarcinoma de cólon), Jurkat (leucemia) e Vero (células epiteliais de rim de macaco). Os extratos promissores foram submetidos ao fracionamento biomonitorado e determinada a concentração inibitória do crescimento celular em 50% (IC₅₀). As espécies que apresentaram maior citotoxicidade foram *Sorocea hilarii* (Moraceae), espécie até então com escasso estudo fitoquímico e farmacológico e *Casearia arborea* (Salicaceae). Após fracionamento biomonitorado, foi realizado para as frações ativas um estudo de desreplicação, empregando-se dados de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrômetro de massas de alta resolução, em associação com a plataforma GNPS (Global Natural Product Social Molecular Networking). Para *S. hilarii* foram identificadas *clusters* moleculares referentes às classes megastigmanos, lignanas e saponinas esteroidais, enquanto para *C. arborea* foram identificados diterpenos clerodânicos e flavonoides. Na tentativa de isolar e identificar os compostos com atividade antitumoral, diferentes extratos de folhas de *C. arborea* foram obtidos. O extrato em diclorometano se mostrou mais citotóxico frente às linhagens SW480, MDA-MB-231 (câncer de mama) e Hep G2 (câncer de fígado). O fracionamento biomonitorado desse extrato levou a frações contendo diterpenos clerodânicos, sendo purificados e elucidados estruturalmente três diterpenos clerodânicos, dois deles inéditos: casearborina F e casearborina G. As estruturas químicas foram elucidadas empregando técnicas de espectroscopia de massas de alta resolução e por experimentos de Ressonância Magnética Nuclear unidimensional (RMN de ¹H, ¹³C, DEPT 135) e bidimensional (HMBC, HSQC e NOESY). Frações contendo estes compostos induziram a morte celular por apoptose, e apresentam as propriedades antimigratórias e anticlonogênicas, assim como atuam em G0/G1 no ciclo celular de células SW480. Essa

pesquisa mostra que espécies vegetais nativas da Mata Atlântica brasileira são potenciais fontes de compostos antitumorais, inclusive de novas moléculas bioativas.

Palavras-chave: Bioprospecção. Mata Atlântica. Antitumoral. *Sorocea hilarii*. *Casearia arborea*. Diterpenos clerodânicos. Casearborina

ABSTRACT

RODRIGUES, Laís Azevedo, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August 2022. **Molecular bioprospecting of plant species from the Atlantic Forest leads to the identification of *Casearia arborea* as a source of clerodane diterpenes with potential antitumor activity.** Advisor: João Paulo Viana Leite. Co-advisors: Gustavo Costa Bressan and Alisson Andrade Almeida.

The bioprospecting of natural products from collections of plant extracts has been an efficient and promising strategy for the discovery of new antitumor drugs. The objective of this research was to bioprospect natural products with antitumor potential from plant species native to the Brazilian Atlantic Forest biome. The cytotoxic potential of 282 extracts from 72 species was evaluated in cell lines, B16F10 (melanoma), SW480 (colon adenocarcinoma), Jurkat (leukemia) and Vero (monkey kidney epithelial cells). Promising extracts were submitted to biomonitoring fractionation and determined inhibiting cell growth by 50% (GI₅₀). The species that showed the greatest cytotoxicity were *Sorocea hilarii* (Moraceae), a species that until now had scarce phytochemical and pharmacological studies; and *Casearia arborea* (Salicaceae). After biomonitoring fractionation, a dereplication study was carried out for the active fractions, using data from high performance liquid chromatography, connected to a high resolution mass spectrometer, in association with the GNPS platform (Global Natural Product Social Molecular Networking). For *S. hilarii*, molecular clusters related to megastigmanes, lignans and steroidal saponins were identified. Whereas for *C. arborea*, clerodane diterpenes and flavonoids were identified. In an attempt to isolate and identify compounds with antitumor activity, different extracts from leaves of *C. arborea* were produced. The dichloromethane extract was more cytotoxic against SW480, MDA-MB-231 (breast cancer) and Hep G2 (liver cancer) strains. The biomonitoring fractionation of this extract led to fractions containing clerodane diterpenes, purifying and structurally elucidating three clerodane diterpenes, two of which were unpublished: casearborin F and casearborin G. The chemical structures were elucidated using high resolution mass spectroscopy techniques and one-dimensional (¹H, ¹³C, DEPT 135) and two-dimensional (HMBC, HSQC and NOESY) Nuclear Magnetic Resonance experiments. Fractions containing these compounds induced cell death by apoptosis, and have antimigratory and anticlonogenic properties, as well as acting on G0/G1 in the cell cycle of SW480 cells. This research shows that plant species native to the Brazilian Atlantic Forest are potential sources of antitumor compounds, including new bioactive molecules.

Keywords: Bioprospecting. Brazilian Atlantic Forest. Antitumor. *Sorocea hilarii*. *Casearia arborea*. Clerodane diterpenes. Casearborin.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL

- Figura 1.** Fotografia de campo (A) e distribuição geográfica com georreferenciamento já identificadas em território brasileiro (B) da espécie *Sorocea hilarii* Gaudich [37-38].....20
- Figura 2.** Fotografia de campo (A) e distribuição geográfica com georreferenciamento já identificadas em território brasileiro (B) da espécie *Casearia arborea* (Rich.) Urb [39,55].....21
- Figura 3.** Diterpenos clerodânicos, casearborinas A-E, isolados de *Casearia arborea* com atividade citotóxica em linhagem tumorais.....22

CAPÍTULO I – ARTIGO 1

- Figure 1.** Venn diagram representing the unique and common features of the 72 selected plant extracts. These extracts showed reduction of cell viability equal or greater than 70% for one or more tumor cell lines.....43
- Figure 2.** (A) Molecular network from UHPLC-ESI-HRMS data in the positive in mode for the *n*-butanol fraction of *Casearia arborea* leaf extract. (B) Detail for the main cluster (in magenta) of the molecular network, referring to the clerodane diterpenoids compounds.....46
- Figure 3.** (A) Molecular network from HPLC-ESI-HRMS data in a positive mode for the *n*-butanol fraction of *Sorocea hilarii* leaf extract. (B) Orange cluster corresponds to spirostane steroids and its saponin derivatives compounds. (C) Green cluster corresponds to megastimanes compounds.....48

Supplementary material

- Figure S1.** (A) MS/MS mass spectra of the precursor ion at *m/z* 607 (compound 15) of the clerodane diterpenoid chemical class in dichloromethane fraction of *Casearia arborea*. (B) Proposed fragmentation mechanism of the precursor ion at *m/z* 607.....60

CAPÍTULO II – ARTIGO 2

- Figura 1.** Viabilidade celular (%) de SW480 após tratamento com 32 grupos (10 µg/mL) obtidos por fracionamento cromatográfico do extrato de folhas de diclorometano de *Casearia arborea* pelo método MTT.....72
- Figura 2.** Efeito do extrato de folhas em diclorometano de *Casearia arborea* e dos grupos enriquecidos em diterpenos clerodânicos G16, G17 e G22 sobre a formação de colônias em células SW480.....73
- Figura 3.** Efeito do extrato de folhas em diclorometano de *Casearia arborea* e dos grupos enriquecidos em diterpenos clerodânicos G16, G17 e G22 sobre a migração de células SW480.....74

Figura 4. Efeito do extrato de folhas em diclorometano de *Casearia arborea* (EFDM) e dos grupos enriquecidos em diterpenos clerodânicos G16, G17 e G22 sobre a morte celular e o ciclo celular de SW480.....76

CAPÍTULO III – ARTIGO 3

Figura 1. Estrutura básica de diterpenos clerodânicos encontrados em plantas do gênero *Casearia*.....85

Figura 2. Estrutura de **Ca1** (casearborina B).....87

Figura 3. Estrutura de **Ca2** (casearborina F).....91

Figura 4. Estrutura de **Ca3** (casearborina G).....93

Material suplementar

Figura S1. Espectro de RMN ¹H do composto **Ca1** (CDCl₃, 400 MHz).....99

Figura S2. Expansão 1 do espectro de RMN ¹H do composto **Ca1** (CDCl₃, 400 MHz).....100

Figura S3. Expansão 2 do espectro de RMN ¹H do composto **Ca1** (CDCl₃, 400 MHz).....101

Figura S4. Espectro de RMN ¹³C do composto **Ca1** (CDCl₃, 100 MHz).....102

Figura S5. Expansão 1 do espectro de RMN ¹³C do composto **Ca1** (CDCl₃, 100 MHz).....103

Figura S6. Expansão 2 do espectro de RMN ¹³C do composto **Ca1** (CDCl₃, 100 MHz).....104

Figura S7. Subespectro DEPT 135° do composto **Ca1** (CDCl₃, 100 MHz).....105

Figura S8. Mapa do contorno HSQC do composto **Ca1** (CDCl₃, 100 MHz para ¹³C e 400 MHz para ¹H).....106

Figura S9. Expansão 1 do mapa do contorno HSQC do composto **Ca1** (CDCl₃, 100 MHz para ¹³C e 400 MHz para ¹H).....107

Figura S10. Expansão 2 do mapa do contorno HSQC do composto **Ca1** (CDCl₃, 100 MHz para ¹³C e 400 MHz para ¹H).....108

Figura S11. Mapa do contorno HMBC do composto **Ca1** (CDCl₃, 100 MHz para ¹³C e 400 MHz para ¹H).....109

Figura S12. Mapa do contorno NOESY do composto **Ca1** (CDCl₃, 400 MHz para ¹H).....110

Figura S13. Espectro de RMN ¹H do composto **Ca2** (CDCl₃, 400 MHz).....111

Figura S14. Expansão 1 do espectro de RMN ¹H do composto **Ca2** (CDCl₃, 400 MHz).....112

Figura S15. Expansão 2 do espectro de RMN ¹H do composto **Ca2** (CDCl₃, 400 MHz).....113

Figura S16. Espectro de RMN ^{13}C do composto Ca2 (CDCl_3 , 100 MHz).....	114
Figura S17. Subespectro DEPT 135° do composto Ca2 (CDCl_3 , 100 MHz).....	115
Figura S18. Mapa do contorno HSQC do composto Ca2 (CDCl_3 , 100 MHz para ^{13}C e 400 MHz para ^1H).....	116
Figura S19. Mapa do contorno HMBC do composto Ca2 (CDCl_3 , 100 MHz para ^{13}C e 400 MHz para ^1H).....	117
Figura S20. Mapa do contorno NOESY do composto Ca2 (CDCl_3 , 400 MHz para ^1H).....	118
Figura S21. Espectro de RMN ^1H do composto Ca3 (CDCl_3 , 400 MHz).....	119
Figura S22. Expansão 1 do espectro de RMN ^1H do composto Ca3 (CDCl_3 , 400 MHz).....	120
Figura S23. Expansão 2 do espectro de RMN ^1H do composto Ca3 (CDCl_3 , 400 MHz).....	121
Figura S24. Espectro de RMN ^{13}C do composto Ca3 (CDCl_3 , 100 MHz).....	122
Figura S25. Expansão 1 do espectro de RMN ^{13}C do composto Ca3 (CDCl_3 , 100 MHz).....	123
Figura S26. Expansão 2 do espectro de RMN ^{13}C do composto Ca3 (CDCl_3 , 100 MHz).....	124
Figura S27. Subespectro DEPT 135° do composto Ca3 (CDCl_3 , 100 MHz).....	125
Figura S28. Mapa do contorno HSQC do composto Ca3 (CDCl_3 , 100 MHz para ^{13}C e 400 MHz para ^1H).....	126
Figura S29. Expansão 1 do mapa do contorno HSQC do composto Ca3 (CDCl_3 , 100 MHz para ^{13}C e 400 MHz para ^1H).....	127
Figura S30. Expansão 2 do mapa do contorno HSQC do composto Ca3 (CDCl_3 , 100 MHz para ^{13}C e 400 MHz para ^1H).....	128
Figura S31. Mapa do contorno HMBC do composto Ca3 (CDCl_3 , 100 MHz para ^{13}C e 400 MHz para ^1H).....	129
Figura S32. Expansão 1 do mapa do contorno HMBC do composto Ca3 (CDCl_3 , 100 MHz para ^{13}C e 400 MHz para ^1H).....	130
Figura S33. Expansão 2 do mapa do contorno HMBC do composto Ca3 (CDCl_3 , 100 MHz para ^{13}C e 400 MHz para ^1H).....	131
Figura S34. Expansão 3 do mapa do contorno HMBC do composto Ca3 (CDCl_3 , 100 MHz para ^{13}C e 400 MHz para ^1H).....	132

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I – ARTIGO 1

Table 1. Cell Growth Inhibition (GI%) of the plant extracts against cancer cells using MTT assay.....38

Table 2. Concentration of extracts that inhibited 50% of cell growth GI₅₀ (µg/mL) selected by prescreening using MTT assay.....44

Table 3. Concentration of extracts or fractions from *Casearia arborea* and *Sorocea hilarii* leaves that inhibited 50% of cell growth GI₅₀ (µg/mL) and selectivity index (SI).....45

Supplementary material

Table S1. HPLC-MS/MS data of the annotated metabolites in dichromethane fraction from *Casearia arborea* leaves based on GNPS spectral library match.....55

Table S2. HPLC-MS/MS data of the annotated metabolites in *n*-butanolic fraction from *Sorocea hilarii* leaves.....61

CAPÍTULO II – ARTIGO 2

Tabela 1. Atividade citotóxica dos extratos de folhas de *Casearia arborea* produzidos por percolação seriada exaustiva frente a linhagens tumorais pelo método de MTT.....72

CAPÍTULO III – ARTIGO 3

Tabela 1. Dados espectroscópicos de RMN de ¹³C (100 MHz, δ_C, multiplicidade) e de ¹H (400 MHz, δ_H) e dos mapas de contorno HMBC e NOESY para o composto **Ca1** em CDCl₃.....88

Tabela 2. Dados espectroscópicos de RMN de ¹³C (100 MHz, δ_C, multiplicidade) e de ¹H (400 MHz, δ_H) e do mapa de contorno HMBC para o composto **Ca2** em CDCl₃.....90

Tabela 3. Dados espectroscópicos de RMN de ¹³C (100 MHz, δ_C, multiplicidade) e de ¹H (400 MHz, δ_H) e dos mapas de contorno HMBC e NOESY para o composto **Ca3** em CDCl₃.....92

Tabela 4. Dados espectroscópicos de RMN ¹³C para **Ca1**, **Ca2** e **Ca3**.....94

LISTA DE SIGLAS

BIOPROS	Bioprospecção Molecular no Uso Sustentável da Biodiversidade
DCM	Diclorometano
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
GGPP	Geranylgeranyl pirofosfato
GI₅₀	Concentration that inhibits 50% of cell growth
GNPS	Global Natural Product Social Molecular Networking
HMBC	Heteronuclear Multiple-Bond Correlation
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HPLC-ESI-HRMS	High Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-High Resolution Mass Spectrometry
HPLC-HRMS	High Performance Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry
HRESIMS	High resolution electrospray ionisation mass spectrometry
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation
IC₅₀	Concentração inibitória do crescimento celular em 50%
MeOH	Metanol
MS/MS	Tandem mass spectrometry
MTT	Dimethyl-2-thiazolyl Tetrazolium·bromide
NCI	National Cancer Institute
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
QTOF	Quadrupole and Time of Flight
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SFB	Soro Fetal Bovino
UV	Ultravioleta
SisGen	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	17
1.1 Coleções de extratos vegetais como estratégia de bioprospecção molecular na busca de novos medicamentos	17
1.2 Bioprospecção de extratos vegetais e o câncer	18
1.3 <i>Sorocea hilarii</i>	20
1.4 <i>Casearia arborea</i>	20
OBJETIVOS	23
Objetivo geral.....	23
Objetivos específicos	23
CAPÍTULO I – ARTIGO 1	30
Cytotoxic screening of the plants from the Brazilian Atlantic Forest led to the identification of <i>Casearia arborea</i> and <i>Sorocea hilarii</i> as source of antitumor compounds	31
1. Introduction.....	32
2. Materials and methods	33
2.1 Plant collections and extracts preparation.....	33
2.2 Bioguided fractionation.....	34
2.3 Cell culture	34
2.4 <i>In vitro</i> cytotoxicity assay	35
2.5 Statistical analysis	35
2.6 HPLC-ESI-HRMS analysis.....	35
2.7 Molecular Networking	36
3. Results and discussion	37
3.1 Cytotoxic screening in cancer cell lines.....	37
3.2 Fractionation bioguided by cytotoxicity	45
3.3 Dereplication analysis of active fractions	47
4. Conclusions.....	49
Supplementary material	54
CAPÍTULO II – ARTIGO 2.....	65
Atividade antitumoral em adenocarcinoma de cólon (SW480) de frações enriquecidas em diterpenos clerodânicos obtidas de <i>Casearia arborea</i> (Salicaceae)	66
1. Introdução	67
2. Materiais e métodos	68
2.1 Material vegetal e produção dos extratos.....	68
2.2 Cultivo celular.....	68

2.3 Avaliação da atividade citotóxica	68
2.4 Fracionamento biomonitorado	69
2.4.1 Fracionamento cromatográfico	69
2.4.2 Avaliação da atividade citotóxica	69
2.4.3 Prospecção fitoquímica dos grupos ativos.....	69
2.5 Ensaios biológicos com os grupos ativos.....	70
2.5.1 Formação de colônia.....	70
2.5.2 Migração	70
2.5.3 Apoptose	70
2.5.4 Ciclo celular.....	71
2.6 Análises estatísticas.....	71
3. Resultados e discussão	71
3.1 Fracionamento biomonitorado e prospecção fitoquímica	71
3.2 Ensaios biológicos com os grupos ativos.....	73
4. Conclusão.....	77
CAPÍTULO III – ARTIGO 3	80
Novos diterpenos clerodânicos peroxidados identificados em fração antitumoral de <i>Casearia arborea</i>	81
1. Introdução	82
2. Materiais e métodos	83
2.1 Procedimentos experimentais gerais	83
2.2 Material vegetal e obtenção do extrato	83
2.3 Extração e isolamento	83
2.4 Elucidação estrutural das substâncias isoladas	84
3. Resultados e discussão	85
4. Conclusão.....	94
Material suplementar	98
CONCLUSÃO FINAL	133

INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Coleções de extratos vegetais como estratégia de bioprospecção molecular na busca de novos medicamentos.

As constantes ações humanas vêm destruindo os ecossistemas e ameaçando a biodiversidade e a sobrevivência da vida na Terra [1]. Retardar e rever essa situação vem sendo o desafio da ciência [2]. Ao falar sobre biodiversidade, ressaltamos a biodiversidade brasileira, sendo o Brasil um país megadiverso, onde sua vegetação abriga a maior parte das espécies existentes, com uma variedade de ecossistemas que estão sob constante ameaça de extinção [3].

A Mata Atlântica é um dos biomas brasileiros que possui uma rica biodiversidade, entretanto é muito devastado pelas ações antrópicas, que vão desde a colonização e exploração do pau-brasil até a ocupação demográfica das grandes cidades, fazendo com que este bioma seja o segundo mais ameaçado de extinção e considerado um *hotspot* [4-5]. Atualmente, suas áreas remanescentes de vegetação nativa estão reduzidas a aproximadamente 12,4% da sua cobertura original [6]. Assim, a conservação e uso sustentável da Mata Atlântica são vistas como prioritárias [5,7]. Vale ressaltar que a pesquisa de bioprospecção farmacêutica além de possuir grande potencial para a descoberta de produtos naturais promissores para o tratamento de doenças pode ser um aliado para a conservação florestal [8].

Para se obter compostos bioativos de espécies vegetais com potencial de desenvolvimento de novos fármacos é necessário traçar estratégias [9-10]. Um destes meios é a triagem de grandes coleções de extrato. Neste método, é determinado os extratos vegetais bioativos mais promissores, passando por fracionamentos biomonitorados até isolar o composto ativo. Este procedimento é eficiente para otimizar o processo de obtenção de um possível novo medicamento [10-11].

O pioneiro a estabelecer grandes coleções de extratos com objetivo farmacológico foi o Departamento de Produtos Naturais do Instituto Nacional de Câncer (NCI), dos Estados Unidos, que em 1960 elaborou a primeira coleção de extratos utilizando a abordagem randômica. Essa coleção conta com mais de 230.000 amostras, de onde importantes agentes clínicos anticâncer como os taxanos e a camptotecina foram isolados [10].

Seguindo o modelo adotado pela NCI, o grupo de pesquisa BIOPROS (Bioprospecção Molecular no Uso Sustentável da Biodiversidade), formado por uma rede de parceria entre pesquisadores da Universidade Federal de Viçosa (UFV) e de outros centros de pesquisa, vem investindo esforços para a construção de uma coleção de extratos oriundos de espécies vegetais da Mata Atlântica. Atualmente, esta coleção conta com extratos de 126 espécies. Estes extratos têm sido direcionados para avaliação do potencial terapêutico dessas espécies frente a diferentes alvos, dentre eles antimicrobiano, antitumoral, anticolinesterásico e defensivos agrícolas [12-15].

Assim, a pesquisa de bioprospecção com espécies nativas de áreas *hotspots* envolvendo coleções de extratos de plantas pode constituir uma estratégia para o uso sustentável da biodiversidade no campo da saúde e para a economia [16]. Existem cerca de 250 mil espécies de plantas conhecidas mundialmente, no entanto, menos de 10% tem estudos fitoquímicos ou foram avaliadas frente a algum alvo biológico, mostrando que muitos compostos bioativos serão identificados e aplicados em biotecnologias para a sociedade [11].

1.2 Bioprospecção de extratos vegetais e o câncer

Câncer é um termo abrangente para definir um número extenso de doenças que são caracterizadas pela proliferação e crescimento anormal de células que podem atingir partes do corpo e se espalhar para outros órgãos. É a segunda principal causa de morte em todo o mundo, sendo responsável por 10 milhões de mortes em 2020 [17]. Os tipos de câncer mais comuns são mama, pulmão, cólon, próstata, pele e estômago, sendo que os que mais levam a óbito são os cânceres de pulmão, cólon, fígado, estômago e mama, estatisticamente nessa ordem [17].

Em evidência, o câncer de cólon se desenvolve a partir de vários fatores genéticos e epigenéticos que contribuem para formação de pólipos que eventualmente progridem para adenocarcinoma. A progressão para câncer é um processo heterogêneo, através de mutações que tem como alvo oncogenes, genes supressores de tumor e genes relacionados ao mecanismo de reparo do DNA. Por ser um tipo de câncer muito agressivo e dinâmico o prognóstico de sobrevida é diminuído e investir esforços na busca de terapias mais eficientes tem sido objetivo das pesquisas no intuito de reduzir o número de casos e óbitos por câncer de cólon [18-20].

O número de novos casos e mortes por câncer vem aumentando devido a fatores como crescimento populacional, aumento da expectativa de vida e maior exposição a fatores de risco, como o sedentarismo, tabagismo, obesidade, entre outros [21]. Agravantes que também

contribuem para a alta mortalidade são as metástases, que favorecem a disseminação do tumor devido a invasão dessas células cancerígenas para outros órgãos. Elas são responsáveis por mais de 90% das mortes relacionadas ao câncer [22]. Outro fator importante para a evolução da doença é sua heterogeneidade, o que faz com que as células tumorais se tornem resistentes e menos sensíveis as quimioterapias [23].

Tendo em vista os agravantes da doença e, conseqüentemente, sua agressividade, bem como a resistência aos quimioterápicos existe um forte interesse em se descobrir e desenvolver novos fármacos a partir de produtos naturais [24].

Os produtos naturais contribuíram para o arsenal terapêutico usado na clínica para uma infinidade de doenças [25]. No entanto, ainda há muito o que se conhecer quando se fala de produtos naturais. Ressaltando sua importância, de acordo com levantamento feito por Newman e Cragg (2020) [26] entre o período de 1946 a 2019, 64,17% de todos os novos compostos químicos descobertos para tratamento do câncer apresentaram em algum momento durante a pesquisa relação com produtos naturais, sendo estruturas derivadas ou farmacofóro proveniente dos mesmos.

Estratégias de bioprospecção na busca por novos quimioterápicos já se mostrou eficiente e promissora, tendo em vista a descoberta dos taxanos e a camptotecina através da coleção de extratos do NCI [10]. Recentemente, foi realizado uma pesquisa de bioprospecção em espécies vegetais do bioma Mata Atlântica, empregando a extratoteca BIOPROS. Esse estudo levou a descoberta de uma molécula inédita, nomeada Vitalutina, com alto potencial antitumoral. Se trata de um esteroide vitanolideo, isolado da espécie *Atheneae velutina* (Solanaceae), planta endêmica do Brasil [27].

Os produtos naturais conseguem atuar sobre processos de proliferação celular, diferenciação, morte celular e metástase interferindo na iniciação, desenvolvimento e progressão do câncer [28]. As pesquisas com produtos naturais vêm dedicando a investigar a atividade anticâncer tanto na carcinogênese quanto na progressão tumoral [29].

Assim, levando em consideração o alcance a diversos alvos, a diversidade química dos produtos naturais e sua importância como precursor na preparação de análogos e pro-fármacos mais eficientes, estratégias para bioprospectar esses compostos são favoráveis [30-32]. Nesse contexto, esse trabalho através de uma triagem inicial com 282 extratos identificou as espécies

Sorocea hilarii e *Casearia arborea* apresentando relevante atividade citotóxica contra linhagens tumorais de importância epidemiológica.

1.3 *Sorocea hilarii*.

O gênero *Sorocea* possui apenas 27 espécies distribuídas em região Neotropical [33]. No Brasil são cerca de 18 espécies identificadas, sendo a espécie *Sorocea hilarii* Gaudich. (Moraceae) nativa e endêmica, presente majoritariamente nos biomas Cerrado e Mata Atlântica (**Figura 01**) [34]. Alguns nomes populares são atribuídos como bainha-de-espada, canxim-mirim, cega-olho, cincho [35], bem como o uso tradicional como antipruriginoso [36]. No entanto, até o momento, a espécie é ainda pouco conhecida pela ciência, quanto ao perfil fitoquímico, e quanto a atribuição de atividades biológicas.

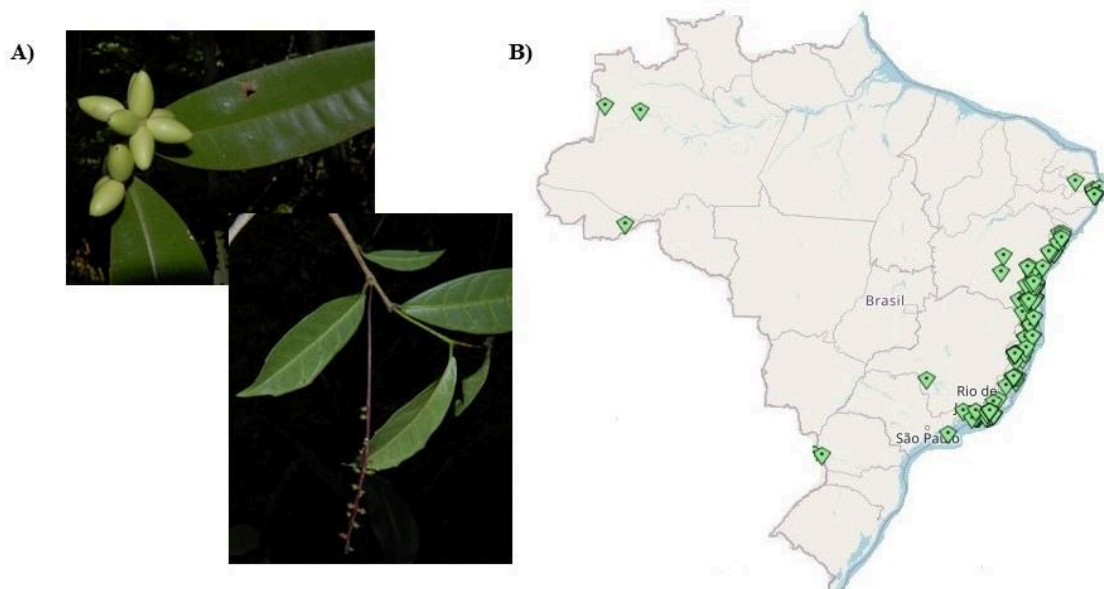


Figura 1. Fotografia de campo (A) e distribuição geográfica com georreferenciamento já identificadas em território brasileiro (B) da espécie *Sorocea hilarii* Gaudich [37-38].

1.4 *Casearia arborea*.

A espécie *Casearia arborea* (Rich.) Urb. (Salicaceae), conhecida popularmente como erva-de-lagarto, espeteiro ou pau-prego, é nativa do Brasil, mas amplamente distribuída em 19 países. No Brasil, esta espécie é encontrada nos biomas Cerrado, Amazônia e Mata Atlântica (**Figura 2**) [39-40].

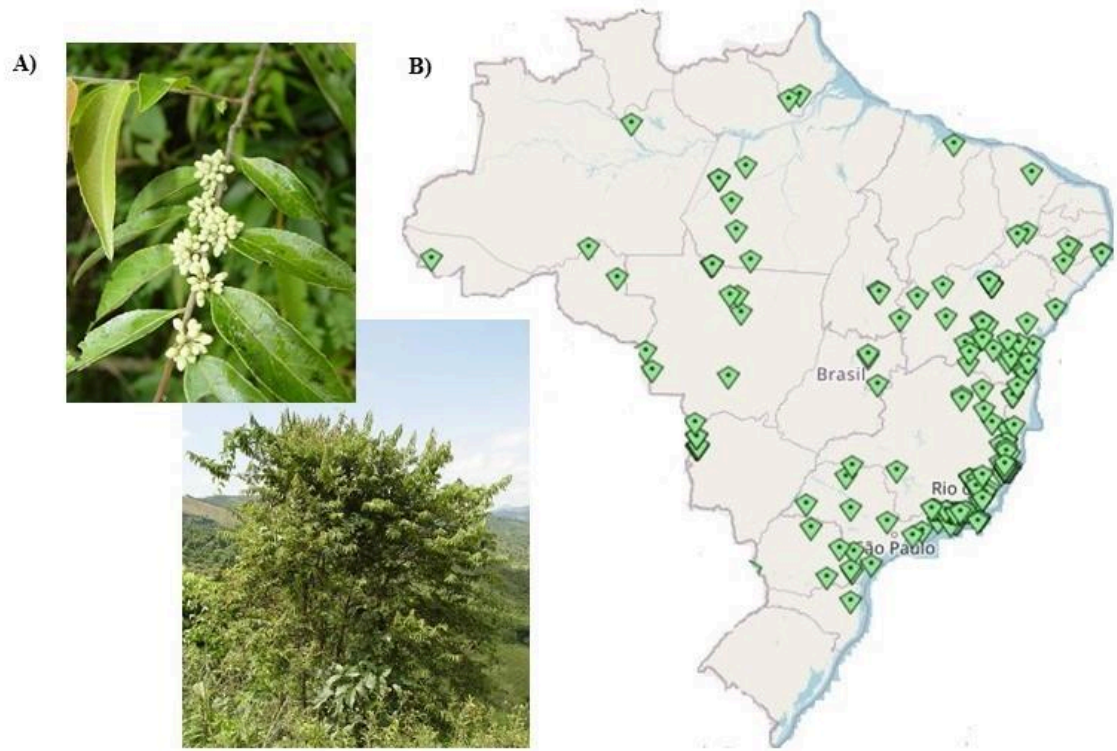


Figura 2. Fotografia de campo (A) e distribuição geográfica com georreferenciamento já identificadas em território brasileiro (B) da espécie *Casearia arborea* (Rich.) Urb [39,55].

Estudos farmacológicos com *C. arborea* confirmaram seu efeito antibacteriano, antifúngico, antileishmanicida e citotóxico [41-43]. Em evidência, o potencial citotóxico da espécie foi relatado em linhagens metastáticas de melanoma, gliossarcoma e carcinoma epitelial [43-44].

Alguns produtos naturais já foram identificados em *C. arborea* como flavonoides, esteroides e diterpenos [41,43,45-46]. Os diterpenos isolados de *C. arborea* são do tipo clerodânicos, casearborinas (**Figura 3**), que apresentam forte potencial contra o câncer, despertando o interesse dos cientistas [43,47].

O gênero *Casearia* possui cerca de 180 espécies e algumas dessas são de grande interesse devido às suas propriedades biológicas [48]. A espécie *Casearia sylvestris* é uma importante representante desse gênero devido à diversidade do seu perfil fitoquímico e às suas atribuições terapêuticas [49]. O avanço nas pesquisas realizadas com a espécie demonstra que esses diterpenos clerodânicos, as casearinas, são promissores ativos biológicos que atuam de forma perspicaz nos processos de desenvolvimento e na progressão tumoral [50-51].

Os diterpenos clerodânicos são biosintetizados a partir do geranylgeranyl pirofosfato (GGPP), apresentando uma grande diversidade estrutural que tem origem na ciclização da

cadeia de GGPP. Essa variedade estrutural é resultado de diferentes rearranjos em vias biosintéticas paralelas [52]. Esses diterpenoides bicíclicos, no genero *Casearia*, possuem estrutura básica formada pelos anéis A e B do sistema decalínico, com 2 metilas em C-8 e C-9, uma ligação dupla em C-3, uma cadeia lateral com 6 carbonos em C-9 (C-11 a C-16), contendo um dieno conjugado terminal C-12 (Z) e C-14, e um terceiro anel C furânico substituídos nos carbonos 18 e 19, frequentemente, com grupamento acetálico (**Figura 3**) [53]. Os diterpenos clerodânicos possuem sete diferentes tipos de classificação estrutural relacionado aos carbonos C11-C-16 e ao anel decalina. As casearborinas são classificadas como tipo I subtipo Ib, com um padrão de ligação dupla diferente na cadeia lateral acíclica C-11-C-16 e diferentes possibilidades de ésteres em C-2 ou C-6 [54].

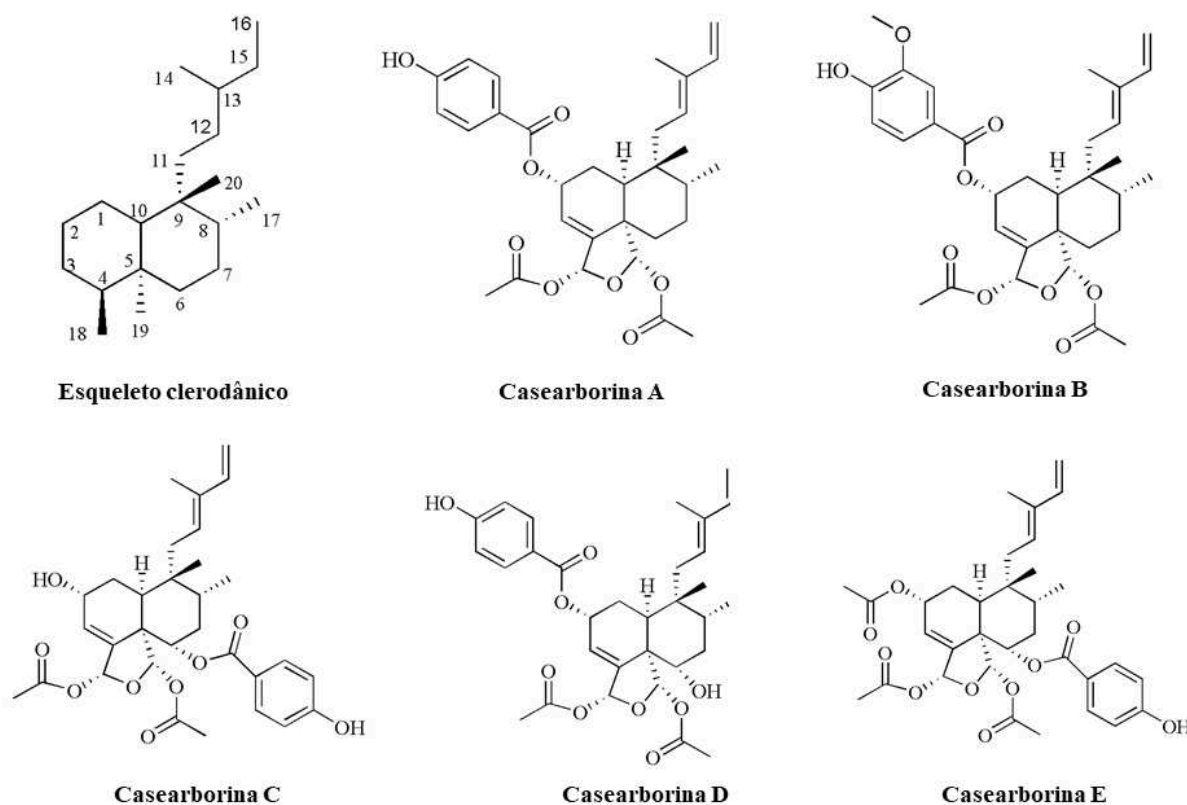


Figura 3. Diterpenos clerodânicos, casearborinas A-E, isolados de *Casearia arborea* com atividade citotóxica em linhagem tumorais.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Bioprospectar produtos naturais com potencial antitumoral de espécies vegetais da Mata Atlântica.

Objetivos específicos

- Avaliar a citotoxicidade de 282 extratos provenientes de 72 espécies nativas da Mata Atlântica em três linhagens tumorais, sendo elas melanoma (B16F10), câncer de cólon (SW480) e leucemia (Jurkat);
- Selecionar os extratos mais promissores para subsequentes fracionamentos biomonitorados por ensaios considerando os valores de IC₅₀;
- Determinar o índice de seletividade na linhagem não tumoral vero;
- Realizar estudo de desreplicação das frações bioativas, empregando dados de espectrometria de massas de alta resolução, em associação com a plataforma GNPS (Global Natural Product Social Molecular Networking);
- Identificar possíveis compostos responsáveis pela atividade citotóxica das frações ativas de *Sorocea hilarii* e *Casearia arborea*;
- Avaliar a citotoxicidade de diferentes extratos de folhas de *C.arborea* para SW480, Hep G2 (câncer de fígado), MDA-MB-231 (câncer de mama);
- Realizar fracionamento cromatográfico com monitoramento da atividade citotóxica em SW480 no extrato ativo de *C.arborea*;
- Determinar o efeito dos produtos naturais de *Casearia arborea* sobre fatores relacionados com o desenvolvimento do câncer de cólon (SW480);
- Isolar, purificar e elucidar estruturalmente os produtos naturais com atividade citotóxica da espécie *Casearia arborea*.

Referencias

- [1] Arruda D, Candido HG, Fonseca R. Amazon fires threaten Brazil's agribusiness. **Science**. 2019; 365(6460):1387-1387.
- [2] Nielsen KS, Marteau TM, Bauer JM, Bradbury RB, Broad S, Burgess G, Burgman M, Byerly H, Clayton S, Espelosin D, Ferraro PJ, Fisher B, Garnett EE, Jones JPG, Otieno M, Polasky S, Ricketts TH, Trevelyan R, Van der Linden S, Veríssimo D, Balmford A. Biodiversity conservation as a promising frontier for behavioural science. **Nat Hum Behav**. 2021; 5(5):550-556.
- [3] Fonseca CR, Venticinque EM. Biodiversity conservation gaps in Brazil: A role for systematic conservation planning. **Perspect Ecol Conserv**. 2018; 16(2):61-67.
- [4] Myers N, Mittermeier RA, Fonseca GAB, Kent J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**. 2000; 403(6772): 853-858.
- [5] Cunha AA, Cruz CBM, Fonseca GAB. Legal Atlantic Forest (Mata Atlântica Legal): integrating biogeography to public policies towards the conservation of the biodiversity hotspot. **Sustainability in Debate**. 2019; 10(3).
- [6] Fundação SOS Mata Atlântica e Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (SOSMA e INPE). **Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica, período 2017-2018**. Relatório técnico. 2019; 35.
- [7] Joly CA, Metzger JP, Tabarelli M. Experiences from the Brazilian Atlantic Forest: ecological findings and conservation initiatives. **New Phytologist**. 2014; 204(3):459- 473.
- [8] Tribess B, Pintarelli GM, Bini LA, Camargo A, Funez LA, Gasper AL, Zeni ALB. Ethnobotanical study of plants used for therapeutic purposes in the Atlantic Forest region, Southern Brazil. **J Ethnopharmacol**. 2015; 164:136-146.
- [9] Newman, D. Screening and identification of novel biologically active natural compounds. **F1000Research**. 2017; 6.
- [10] Thornburg CC, Britt JR, Evans JR, Akee RK, Whitt JA, Trinh SK, Grothaus PG. NCI program for natural product discovery: a publicly-accessible library of natural product fractions for high-throughput screening. **ACS Chem Biol**. 2018; 13(9):2484-2497.

- [11] Iqbal J, Abbasi BA, Mahmood T, Kanwal S, Ali B, Shah SA, Khalil AT. Plant-derived anticancer agents: A green anticancer approach. **Asian Pac J Trop Biomed**. 2017; 7(12):1129-1150.
- [12] Almeida AC, Rodrigues LA, Paulino GS, Aguilar AP., Almeida AA, Ferreira SO, Brandão GC, Leite JPV, Ribon AOB. Prenylated flavonoid-enriched fraction from *Maclura tinctoria* shows biological activity against *Staphylococcus aureus* and protects *Galleria mellonella* larvae from bacterial infection. **BMC Complement Alter Med**. 2019; 19(1):1-12.
- [13] Almeida AA, Lima GD, Simão MV, Moreira GA, Siqueira RP, Zanatta AC, Vilegas W, Neves MM, Bressan GC, Leite JP. Screening of plants from the Brazilian Atlantic Forest led to the identification of *Athenaea velutina* (Solanaceae) as a novel source of antimetastatic agents. **Int J Exp Pathol**. 2020; 101(3-4): 106-121.
- [14] Rodrigues LA, Almeida ADC, Gontijo DC, Salustiano IV, Almeida AA, Brandão GC, Ribon AOB, Leite JPV. Antibacterial screening of plants from the Brazilian Atlantic Forest led to the identification of active compounds in *Miconia latecrenata* (DC.) Naudin. **Nat Prod Res**. 2021; 35(24), 5904-5908.
- [15] Almeida, A. A., Leite, J. P. V., Simão, M. D. C., & Rody, H. V. S. Bioprospecção molecular de extratos vegetais: relato de experiência do grupo BIOPROS/UFV na busca de compostos antitumorais. **Revista Fitos**. 2022; (2): 238-246.
- [16] Atanasov AG, Waltenberger B, Pferschy-Wenzig EM, Linder T, Wawrosch C, Uhrin P, Rollinger JM. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. **Biotechnol Adv**. 2015; 33(8):1582-1614.
- [17] World Health Organization (WHO). **Câncer**. Sing in: < <http://www.who.int/cancer/en/> > ACESS: jun. 14/2022.
- [18] Grady WM, Markowitz SD. Genetic and epigenetic alterations in colon cancer. **Annu Rev Genom Hum Genet**. 2002; 3(1):101-128.
- [19] Mármol I, Sánchez-de-Diego C, Pradilla AD, Cerrada E, Rodríguez MJY. Colorectal carcinoma: a general overview and future perspectives in colorectal cancer. **Inter J Mol Sci**. 2017; 18(1):197.

- [20] Kuipers EJ, Grady WM, Lieberman D, Seufferlein T, Sung JJ, Boelens PG, Van de Velde CJH, Watanabe T. Colorectal cancer. **Nat Rev.** 2015; 1(1):1-25.
- [21] Bray F, Znaor A, Cueva P, Korir A, Swaminathan R, Ullrich A, Wang SA, Parkin DM. Planning and developing population-based cancer registration in low-or middle-income settings. **International Agency for Research on Cancer.** 2021; 43.
- [22] Suhail Y, Cain MP, Vanaja K, Kurywchak PA, Levchenko A, Kalluri R. Systems biology of cancer metastasis. **Cell Syst.** 2019; 9(2):109-127.
- [23] Dagogo-Jack I., Shaw AT. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. **Nat Rev.** 2018; 15(2):81.
- [24] Ren Y, de Blanco E JC, Fuchs JR, Soejarto DD, Burdette JE, Swanson SM, Kinghorn A D. Potential anticancer agents characterized from selected tropical plants. **J Nat Prod.** 2019; 82(3):657-679.
- [25] Atanasov AG, Zotchev SB, Dirsch VM, Supuran, CT. Natural products in drug discovery: advances and opportunities. **Nat Rev.**2021; 20(3):200-216.
- [26] Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. **J Nat Prod.** 2020; 83(3):770-803.
- [27] Almeida AA., Cota BB, Rodrigues LA, Dutra LL, Kohlhoff M, Bressan GC., Brandão GC, Leite JP. Withalutin, a new cytotoxic withanolide from *Athenaea velutina* (Sendtn.) D'Arcy. **Nat Prod Res.** 2022; 1-8.
- [28] Rajesh E, Sankari LS, Malathi L, Krupaa JR. Naturally occurring products in cancer therapy. **J Pharm Bioallied Sci.** 2015; 7(Suppl 1): S181–S183.
- [29] Pistollato F, Giampieri F, Battino M. The use of plant-derived bioactive compounds to target cancer stem cells and modulate tumor microenvironment. **Food Chem Toxicol.** 2015; 75:58-70.
- [30] Lowell AN, Santoro N, Swaney SM, Mcquade TJ, Schultz PJ, Larsen MJ, Sherman DH. Microscale adaptation of *in vitro* transcription/translation for high throughput screening of natural product extract libraries. **Chem Biol Drug Des.** 2015; 86(6):1331-1338.

- [31] Cragg GM, Newman DJ. Natural products as sources of anticancer agents: current approaches and perspectives. **In Natural Products as Source of Molecules with Therapeutic Potential**. Springer. 2018; 309-331
- [32] Li F, Wang Y, Li D, Chen Y, Dou QP. Are we seeing a resurgence in the use of natural products for new drug discovery? **Expert Opin Drug Dis**. 2019; 14(5):417-420.
- [33] Mattos L, Gaglioti L, Silva PR, Pederneiras LC, Romaniuc-Neto S. (2022). Molecular phylogenetics of *Sorocea* (Moraceae). **Phytotaxa**. 2022; 549(2):185-198.
- [34] Pederneiras LC, Ribeiro JELS, Mattos L. **Sorocea in Flora e Funga do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB10193>>. Acesso em: 03 jul. 2022
- [35] Corrêa MP. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Ministério da Agricultura, IBDF, Rio de Janeiro (publicação original 1978). 1984; 6:777.
- [36] Peckolt T, Peckolt G. **História das Plantas Úteis e Medicinais do Brasil** (título original: *Historia das Plantas Medicinaes e Uteis do Brazil*). Fino Traço, Belo Horizonte (publicação original 1888-1905). 2016; 1-8:900.
- [37] Kew. Royal Botanic Garden. **Plants of the World Online**. Available in <powo.science.kew.org> Access in July.03/2022.
- [38] Re flora. Herbário virtual. **Distribuição geográfica *Sorocea hilarii***. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/>> Acesso em 19 jun. 2022.
- [39] Marquete R, Medeiros EVSS. **Salicaceae in Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB14363>>. Acesso em: 21 jun. 2022.
- [40] Tropicos. Missouri Botanical Gardens. ***Casearia arborea* (Rich.) Urb. Distributions**. Available in <<http://legacy.tropicos.org/Name/13200435>>. Access in May.19/2020.
- [41] Leite-Ferreira MD, Rocha-Souza MS, Ramirez RRDA, Chaves OS, Teles YC, Pereira FDO, Souza MDFVD. Phytochemistry investigation of *Casearia arborea* (Rich.) Urb. (Salicaceae) and antimicrobial analysis of its diterpene. **Quim Nova**. 2018; 41(6):619-622.

- [42] Santos AL, Yamamoto ES, Passero LFD, Laurenti MD, Martins LF, Lima ML, Sartorelli, P. Antileishmanial activity and immunomodulatory effects of triclin isolated from leaves of *Casearia arborea* (Salicaceae). **Chem Biodivers**. 2017; 14(5):e1600458.
- [43] Beutler JA, McCall KL, Herbert K, Herald DL, Pettit GR, Johnson T, Shoemaker RH, Boyd MR. Novel cytotoxic diterpenes from *Casearia arborea*. **J Nat Prod**. 2000; 63(5):657-61.
- [44] Garo E, Dobrzyński M, Rossberg F, Fertig O, Pertz O, Hamburger, M. Looking for specific natural inhibitors targeting aberrant proliferation signaling in melanoma. **Plant Med International Open**. 2017; 4(S01): 114.
- [45] Santos AL, Soares MG, de Medeiros LS, Ferreira MJ, Sartorelli, P. Identification of flavonoid-3-O-glycosides from leaves of *Casearia arborea* (Salicaceae) by UHPLC-DAD-ESI-HRMS/MS combined with molecular networking and NMR. **Phytochem Anal**. 2021; 32(6), 891-898.
- [46] Anhesine N. B., Bueno P. C. P., Torres R. B., Lopes N. P., Cavalheiro A. J. Nonpolar and polar chemical profiling of six *Casearia* species (Salicaceae). **Biochem Syst Ecol**. 2019; 87:103954.
- [47] Islam MT. Diterpenes and their derivatives as potential anticancer agents. **Phytother Res**. 2017; 31(5):691-712.
- [48] Xia L, Guo Q, Tu P, Chai X. The genus *Casearia*: a phytochemical and pharmacological overview. **Phytochem Rev**. 2015; 14:99–135.
- [49] Bueno PCP, Abarca LFS, Anhesine N B, Giffoni MS, Pereira FMV, Torres RB, Sousa RWRS, Ferreira PMO, Pessoa C, Cavalheiro AJ. Intraspecific chemical variability and biological activity of *Casearia sylvestris* from different Brazilian biomes. **Planta Med**. 2021; 87(01/02):148-159.
- [50] Felipe KB, Kwiecinski MR, Silva FO, Bucker NF, Farias MS, Castro LSEPW, Grinevicius VMAS, Motta NS, Correia JFG, Rossi MH, Pedrosa, R. C. (2014). Inhibition of tumor proliferation associated with cell cycle arrest caused by extract and fraction from *Casearia sylvestris* (Salicaceae). **J Ethnopharmacol**. 2014; 155(3), 1492-1499.

[51] Ferreira PMP, Santos DB, Silva JN, Goudinho AF, Ramos CLS, Souza PC, Alemeids RSC, Moura DS, Oliveira R, Grisolia CK, Carneiro AJ, Melo-Calvancante AAC, Ferrira JRO, Moraes Filho MO, Pessoa C. Toxicological findings about an anticancer fraction with casearins described by traditional and alternative techniques as support to the Brazilian Unified Health System (SUS). **J Ethnopharmacol.** 2019 241, 112004.

[52] Hagiwara, H. Total syntheses of clerodane diterpenoids—a review. **Nat Prod Commun.** 2019; 14(6).

[53] Danuello A, Castro RC, Pilon AC, Bueno PCP, Pivatto M, Vieira Junior GM, Carneiro, AJ. Fragmentation study of clerodane diterpenes from *Casearia* species by tandem mass spectrometry (quadrupole time-of-flight and ion trap). **RCM.** 2020; 34:8781.

[54] Li R, Morris-Natschke SL, Lee KH. Clerodane diterpenes: sources, structures, and biological activities. **Nat Prod Rep.** 2016; 33(10):1166-1226.

[55] Re flora. Herbário virtual. **Distribuição geográfica *Casearia arborea*.** Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/>> Acesso em 21 jun. 2022.

CAPÍTULO I – ARTIGO 1

Cytotoxic screening of the plants from the Brazilian Atlantic Forest led to the identification of *Casearia arborea* and *Sorocea hilarii* as source of antitumor compounds.

Cytotoxic screening of the plants from the Brazilian Atlantic Forest led to the identification of *Casearia arborea* and *Sorocea hilarii* as source of antitumor compounds

Rodrigues LA^{*a}, Almeida AA^a, Agrizii AP^a, Pacheco N^a, Carvalho BCR^a, Zanatta AC^b,
Kohlhoff M^c, Torres CMME^d, Bressan GC^a, Leite JPV^{*a}.

^aDepartamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, 36570-900 Viçosa, Minas Gerais, Brazil.

^bUniversidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Química, Araraquara, São Paulo, Brazil.

^cRene Rachou Research Center, Fiocruz, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

^dDepartamento de Engenharia Florestal, Universidade Federal de Viçosa, 36570-900 Viçosa, Minas Gerais, Brazil.

* Laís Azevedo Rodrigues

Laboratório de Biodiversidade, Universidade Federal de Viçosa, Avenida Peter Henry Rolfs, s/nº, 36570-900 Viçosa, Minas Gerais, Brazil.

Tel.: +55 31 3899 3044

E-mail: laisazevedorodrigues@gmail.com

*João P. V. Leite

Laboratório de Biodiversidade, Universidade Federal de Viçosa, Avenida Peter Henry Rolfs, s/nº, 36570-900 Viçosa, Minas Gerais, Brazil.

Tel.: +55 31 3899 3044

E-mail: jpvleite@ufv.br

Abstract

Biodiversity is an important source of bioactive compounds, with various applications in the field of medicine. The investigation of the antitumor property of plant secondary metabolites, using natural product libraries, has led to the development of new anticancer agents. In the present study, the cytotoxic activity of 282 extracts from 72 native plant species of the Brazilian Atlantic Forest biome was evaluated. As a result, *Casearia arborea* and *Sorocea hilarii* leaves' extracts showed cytotoxic activity against three tumor cell lines tested (B16F10, SW480 and Jurkat). After bioassay-guided fractionation, the bioactive fractions were submitted to the dereplication study via High Performance Liquid Chromatography, connected to High-resolution Mass Spectrometry (HPLC-ESI-QTOF/MS) analysis, combined with a Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS) tool. A combination of bioactivity-guided and dereplication approaches resulted in the putative annotation of 27 clerodane diterpenes and 9 flavonoids as main compounds present in the cytotoxic fractions of *C. arborea*. In the case of the active fraction of *S. hilarii*, 10 megastigmans, 17 spirostane steroids derivatives and 2 lignans were putatively identified. In conclusion, *Casearia arborea* and *Sorocea hilarii* are potential sources of antitumor compounds.

Keywords: Cytotoxic, dereplication, GNPS, *Casearia arborea*, *Sorocea hilarii*

1. Introduction

Cancer is an uncontrolled proliferation and dedifferentiation of a normal cell, currently being one of the most common causes of death worldwide [1]. It is estimated that there are over 200 different types of cancer, affecting various tissues of the human body. Reducing the cancer-related death rate has become a health challenge, and has attracted the attention of researchers around the world [2]. In this discovery for effective and safe drugs for the treatment of cancer, an increasing number of studies have demonstrated the potentiality of natural products [3].

Although medicinal plants have been used by mankind since ancient times, biodiversity continues to be an important source of chemical constituents leading to drug discovery programs [4]. Natural products have played a key role in anticancer drug discovery, and an impressive number of natural components have been introduced into therapy [5]. Bioactive natural products can interfere in the carcinogenesis process through different abnormally activated molecular signaling pathways [6].

As a strategy for the discovery of new bioactive molecules for drug development, libraries of source organisms, including plants, have been implemented [7-8]. As prominent references, the US National Institute of Cancer (NCI-Frederick), through the screening of natural product libraries, led to the discovery of important taxanes and camptothecins as anticancer drugs [9-10]. For crude extracts with potential activity, fractionation guided by bioassays is used to continue the isolation of active natural products. In some cases, this fractionation procedure has been currently associated with dereplication research. The dereplication, carried out as a preliminary to in-depth phytochemical study, aims to detect known molecules in the semi-purified bioactive fraction and evaluate the possibility of isolating new bioactive compounds [11].

The introduction of the Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS), employing tandem Mass Spectrometer-coupled Liquid Chromatography data, has contributed to the study of dereplication of metabolites in complex matrices as plant extracts [12]. With the aid of public spectral libraries and employing annotation propagation bioinformatics tools with MS/MS spectra for unknown molecules, GNPS has helped to identify natural products, making the process faster and more efficient.

In this study, we report the cytotoxic screening of 282 extracts from 72 plant species native to the Brazilian Atlantic Forest. This biome is well known for its wide biological diversity, housing approximately 20,000 high plant species, most of them endemic [13]. Despite its high deforestation levels [14], this biome has great potential for bioprospecting. Our results identified extracts from *Casearia arborea* and *Sorocea hilarii* leaves with potential cytotoxic activity. Bioguided fractionation of these extracts, combined with dereplication studies, led to the identification of compounds related to the antitumor activity of the species.

2. Materials and methods

2.1 Plant collections and extracts preparation

The plant species were accessed in two distinct fragments of the Atlantic Forest: (1) *Parque Estadual de Itaúnas* (PEI), a *restinga* (herbaceous/shrubby coastal sand-dune habitats) region located in Conceição da Barra, Espírito Santo state (Latitude: 18° 25'5.97" - Longitude 39° 42'25.68 "W), and: (2) *Universidade Federal de Viçosa* (UFV), Viçosa, Minas Gerais state (Latitude: 20° 46'1.51 "S - Longitude 42° 52'24.48 "W). Both obtained legal authorization for collection through the *Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado* (SisGen). The authorization by PEI is under A381FA0 register, and

UFV's is registered as AA515AD. The voucher specimens collected in PEI were deposited in the SAMES/UFES Herbarium and of the UFV in the VIC Herbarium.

The production of the extracts followed the methodology described by Almeida (2020) [15]. Leaves and branches of 30 species from PEI and 42 species from UFV were collected. The plant material was dehydrated in an oven with air circulation at 40 °C, for 48 hours, and was then grinded. The dry material was deposited in a percolator for extraction at room temperature for sequential extraction, in a 1:5 ratio. First, with a solvent mixture of dichloromethane and methanol (DCM:MeOH 1:1), and then methanol (MeOH). After maceration for about 15 hours, each extract was concentrated in a rotary evaporator under reduced pressure and, subsequently, lyophilized. Then, the dry extract was stored in a freezer at -20 °C. A total of 282 extracts were produced from 72 species distributed in 35 botanical families.

2.2 Bioguided fractionation

An aliquot of 1,0 g of the two extracts with the most promising cytotoxic activity was put in the separating funnel and resuspended in 100 mL ultrapure water. Around 100 mL of *n*-hexane was added into the suspension and shaken until a dual phase was formed. The *n*-hexane phase was separated and the water phase was then re-shaken, in sequence, with dichloromethane, ethyl acetate and *n*-butanol, with the same volume at all times. The water phase was the last partition. These fractions were evaporated under reduced pressure and, after, lyophilized, until a dry extract was obtained. Then, the collected fractions were tested against B16F10 and SW480. The most active fraction of each extract was directed to HPLC-MS analysis for a dereplication study.

2.3 Cell culture

The cell lines used were Jurkat (leukemia, T-lymphocytes, non-adherent), B16-F10 (murine melanoma), SW480 (colon adenocarcinoma) and Vero. Culture in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine and 100 U/mL penicillin were used in the B16F10, Vero and Jurkat strains. Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) was supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine and 100 U/mL penicillin, used in the SW480 strain. These cells were maintained in a humidified 5% CO₂ incubator at 37 °C. For the assays, adherent cells were collected by enzymatic digestion (trypsin/EDTA).

2.4 *In vitro* cytotoxicity assay

To evaluate the cytotoxicity activity of each extract on Jurkat, B16-F10, SW480, and Vero cells, the MTT assay was employed. For bioguided fractionation, the Jurkat line was not used. The cells were seeded in 96-well plates at a cell density appropriate for each cell line: [Jurkat (8×10^4); B16-F10 (1×10^4); SW480 (0.7×10^4); Vero (1×10^4)]. After 24 hours, the cultures were treated with the different extracts (100 $\mu\text{g/mL}$). After 48 hours, 10 μL of MTT at 5 mg/mL was added to each well and incubated for 3 hours. Subsequently, the supernatant was discarded, and 100 μL of DMSO was added to each well to solubilize the Formazan crystals. In non-adherent strains, the plates were centrifuged before removing the supernatant. The absorbance was determined by spectrophotometric quantification at 540 nm.

Cytotoxic activity was established by comparing the absorbance values of the negative control (0.25% v/v DMSO) and the absorbances in the presence of the extracts. Through the calculation of cell inhibition:

$$\text{Cell inhibition} = 100 - \frac{\text{absorbance of the treated cells}}{\text{absorbance of the negative control}} \times 100$$

The extracts that inhibited cell growth by 70% or more in all three strains were retested at eight concentrations, ranging from 200 to 1.56 $\mu\text{g/mL}$, to determine the extract concentration that inhibits 50% of cell growth (GI_{50}). From the cell viability curve as a function of extract concentration for each cell line, the GI_{50} was calculated by non-linear regression analysis, using GraphPad Prism 6.0 statistical software (GraphPad Software Inc., CA, USA).

2.5 Statistical analysis

Statistical differences between groups were determined by one-way ANOVA, followed by Dunnett's post-test for multiple comparisons. Results were considered significant with $p < 0.05$. GraphPad Prism 6.0 statistical software (GraphPad Software Inc., CA, USA) was used to analyze the data.

2.6 HPLC-ESI-HRMS analysis

The untargeted analysis was carried out using a Shimadzu HPLC connected to QTOF mass spectrometer model MAXIS 3G Bruker Daltonics, equipped with electrospray ionization (ESI). The HPLC system consisted of LC10AD solvent pumps, a SLC 10A system controller, a CTO-10AS column oven, a SIL-20AC injector, and an UV detector (SPD-20A, Shimadzu, Japan). The samples were diluted in methanol in 1 mg/mL concentration, and filtered through

a PTFE filter (0.22 μm , 25 mm). A sample volume of 15 μL was injected into the Shimadzu Shim-Pack XR-ODS-III column (C18, 2.2 μm , 2.0 x 150 mm). The temperature was maintained at 40 $^{\circ}\text{C}$. The flow rate was maintained at 0.4 mL/min. For elution of the column, solvent A (0.1% formic acid in water) and solvent B (acetonitrile) were used with the following program: 5% B (0 to 5 min), a linear gradient to 100% B in 40 min, and a hold at 100% for 5 minutes. Analytical blank containing only the solvent MeOH was analyzed at the beginning and at the end of each sampling. The MS detection was performed in atmospheric pressure ionization-electrospray source positive mode (ESI-MS). The acquisition parameters were: collision gas, helium (He); nebulizing and drying gas, nitrogen; desolvation temperature, 200 $^{\circ}\text{C}$; desolvation gas flow, 8 L/min; capillary voltage, 4.5 kV. MS/MS was performed at a collision energy of 15-60 eV. The MS data was acquired using a range of m/z 100 to 1500, using a calibrant solution of 1 mM sodium formate in 50% 2-propanol.

2.7 Molecular Networking

Data files obtained from the mass spectra generated by HPLC-ESI-HRMS were first converted to .mzXML using ProteoWizard's MSConvert (version 3.0) [16]. The .mzML files were uploaded on Global Natural Product Social Molecular Networking (GNPS) platform [17] (<http://gnps.ucsd.edu>), using WinSCP software (version 5.17.3) [11]. The data was filtered by removing all MS/MS fragment ions within +/- 17 Da of the precursor m/z . MS/MS spectra were window filtered by choosing only the top 6 fragment ions in the +/- 50Da window throughout the spectrum. The precursor ion mass tolerance was set to 0.02 Da and a MS₂ fragment ion tolerance of 0.02 Da. A network was then created, where edges were filtered to have a cosine score above 0.7 and more than 5 matched peaks. Later on, edges between two nodes were kept in the network if and only if each one of the nodes appeared in each other's respective top 10 most similar nodes. Finally, the maximum size of a molecular family was set to 100, and the lowest scoring edges were removed from molecular families until the molecular family size was below this threshold. The spectra in the network were then searched against GNPS' spectral libraries. The library spectra were filtered in the same manner as the input data. All matches kept between network spectra and library spectra were required to have a score above 0.65, and at least 4 matched peaks [12]. For those features that did not have a match in the GNPS library, manual spectral annotation was performed. Thus, the chemical formula was predicted from the exact mass, and compounds were annotated according to the amount of hits in the Dictionary of Natural Products (GNPS [12], Dictionary of Natural Products [18] and LOTUS [19]) databases and reported literature data. In addition, structural confirmation was done by careful

inspection, based on the fragmentation patterns of each molecular family. Metabolites were annotated at level 3 annotation [20]. Additional chemical class annotations were assigned using the NPClassifier [21]. Molecular networks created were then visualized in Cytoscape 3.6.1[®] [12]. Features detected in the solvent blank were removed from the resulting feature table. The mass spectral molecular networking jobs are accessible at: <https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=728bff2c46344722a9284e4b0866d2db>., for dichloromethane leaves extract from *Casaria arborea* and <https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=f709a60212d94ccab0a15ce89c2dd48f> for *n*-butanolic leaves extract from *Sorocea hilarii*.

3. Results and discussion

3.1 Cytotoxic screening in cancer cell lines

Table 1 shows the results of cytotoxic activity of 282 extracts from 72 species of 35 botanical families. These results were evaluated by a MTT assay (**Table 1**).

Table 1. Cell Growth Inhibition (GI%) of the plant extracts against cancer cells using MTT assay.

Family	Plant Species	Voucher	Parts	GI (%) ^a ; Extracts ^b [100 µg/mL]					
				B16F10		SW480		Jurkat	
				D:M ^a	MeOH ^b	D:M ^a	MeOH ^b	D:M ^a	MeOH ^b
Achariaceae	<i>Carpatroche brasiliensis</i>	VIC20172	Leaves	37.6	31.4	27.7	11.0	41.6	15.5
			Stems	28.6	20.5	10.9	19.2	22.2	9.5
Anacardiaceae	<i>Byrsonima sericea</i>	SAMES7929	Leaves	7.1	NI ^c	47.1	47.6	39.0	48.1
			Stems	3.5	7.6	35.1	13.3	47.3	60.5
Annonaceae	<i>Annona glabra</i>	SAMES7927	Leaves	56.7	48.2	25.4	25.2	47.1	54.8
			Stems	76.7	37.3	69.7	33.5	67.5	65.2
Annonaceae	<i>Guatteria villosissima</i>	VIC20151	Leaves	NI	2.9	NI	NI	20.3	NI
			Stems	NI	NI	NI	NI	37.2	35.0
Annonaceae	<i>Rollinia laurifolia</i>	VIC20152	Leaves	NI	27.4	9.3	4.7	29.9	46.0
			Stems	NI	3.9	6.7	NI	42.4	7.0
Annonaceae	<i>Rollinia sylvatica</i>	VIC20154	Leaves	8.5	21.4	29.9	43.3	60.4	56.7
			Stems	34.3	27.8	73.8	49.9	81.9	40.6
Apocynaceae	<i>Hancornia speciosa</i>	SAMES7946	Leaves	31.4	14.0	25.8	NI	58.2	35.2
			Stems	19.1	NI	NI	NI	49.8	26.8
Apocynaceae	<i>Himatanthus phagedaenicus</i>	SAMES7934	Leaves	55.7	53.2	67.8	72.1	65.5	74.2
			Stems	60.9	39.8	59.4	41.3	78.4	79.9
Aquifoliaceae	<i>Ilex cerasifolia</i>	VIC16161	Leaves	NI	NI	NI	NI	37.8	27.3
			Stems	20.0	3.8	NI	NI	25.6	14.4
Aquifoliaceae	<i>Ilex integrifolia</i>	SAMES7941	Leaves	1.8	NI	NI	20.7	68.3	72.6
			Stems	80.0	58.9	62.7	37.0	81.2	79.3
Asparagaceae	<i>Herreria glaziovii</i>	SAMES7946	Aerial part	52.3	30.6	23.5	5.3	13.9	19.0
Bignoniaceae	<i>Jacaranda macrantha</i>	VIC20158	Leaves	NI	NI	NI	1.1	74.6	53.3
			Stems	18.0	NI	NI	NI	65.1	48.7
Bignoniaceae	<i>Zeyheria tuberculosa</i>	VIC31901	Leaves	17.2	NI	64.9	30.9	79.2	28.6
			Stems	22.7	NI	38.1	6.1	70.6	1.7
Boraginaceae	<i>Cordia glabrifolia</i>	SAMES7949	Leaves	35.9	6.2	21.1	25.7	3.4	26.7
			Stems	8.8	NF	43.7	NF	47.8	18.9

Table 1. (Continued)

Family	Plant Species	Voucher	Parts	GI (%) ^a ; Extracts ^b [100 µg/mL]					
				B16F10		SW480		Jurkat	
				D:M ^a	MeOH ^b	D:M ^a	MeOH ^b	D:M ^a	MeOH ^b
Boraginaceae	<i>Cordia taguayhensis</i>	SAMES7930	Leaves	NI	NI	1.6	27.3	47.2	60.1
			Stems	39.9	33.8	21.0	30.7	67.3	12.0
Burseraceae	<i>Trattinnickia ferruginea</i>	VIC20508	Leaves	25.8	2.6	NI	NI	NI	NI
			Stems	NI	NI	NI	NI	NI	NI
Burseraceae	<i>Protium heptaphyllum</i>	SAMES7931	Leaves	NI	NI	3.5	3.8	19.4	26.5
			Stems	16.8	NI	13.6	NI	76.8	62.9
Burseraceae	<i>Protium icicariba</i>	SAMES7938	Leaves	NI	NI	NI	NI	NI	48.2
			Stems	NI	NI	43.0	20.5	65.1	69.2
Celastraceae	<i>Maytenus distichophylla</i>	SAMES7936	Leaves	7.5	15.6	6.6	8.8	9.3	65.3
			Stems	NI	6.2	37.3	56.0	72.4	66.9
Celastraceae	<i>Maytenus obtusifolia</i>	SAMES7928	Leaves	NI	28.0	NI	6.3	NI	51.3
			Stems	68.4	21.1	38.6	NI	55.9	46.5
Celastraceae	<i>Maytenus robusta</i>	VIC20080	Leaves	8.9	14.8	NI	14.7	39.4	12.1
			Stems	NI	NI	NI	NI	49.9	55.9
Chrysobalanaceae	<i>Hirtella corymbosa</i>	SAMES7944	Leaves	15.3	54.0	28.5	34.9	66.8	66.0
			Stems	85.0	40.5	83.5	NI	84.1	63.3
Clusiaceae	<i>Tovomita glazioviana</i>	VIC2404	Leaves	59.2	NI	68.7	2.4	78.9	33.3
			Stems	64.8	NI	66.3	NI	78.5	66.4
Clusiaceae	<i>Tovomitopsis saldanhae</i>	VIC20184	Leaves	2.8	NI	25.6	0.5	76.2	51.0
			Stems	28.8	10.4	20.9	15.8	63.3	64.2
Clusiaceae	<i>Rheedia gardneriana</i>	VIC20515	Leaves	80.5	12.5	79.2	34.5	79.1	81.8
			Stems	45.6	10.6	14.2	17.4	74.4	69.4
Commelinaceae	<i>Dichorisandra procera</i>	SAMES7954	Aerial part	4.7	NI	16.1	8.4	NI	NI
Cunoniaceae	<i>Lamanonia ternata</i>	VIC20511	Leaves	14.2	NI	NI	NI	14.8	25.7
			Stems	NI	NI	NI	NI	16.8	20.7
Dilleniaceae	<i>Davilla morii</i>	SAMES7953	Leaves	NI	NI	NI	NI	NI	14.6
			Stems	34.3	22.1	15.7	8.6	40.7	49.1
Elaeocarpaceae	<i>Sloanea monosperma</i>	VIC20168	Leaves	NI	NI	18.7	13.0	22.5	45.2
			Stems	NI	NI	15.9	16.2	54.3	37.1

Table 1. (Continued)

Family	Plant Species	Voucher	Parts	GI (%) ^a ; Extracts ^b [100 µg/mL]					
				B16F10		SW480		Jurkat	
				D:M ^a	MeOH ^b	D:M ^a	MeOH ^b	D:M ^a	MeOH ^b
<i>Euphorbiaceae</i>	<i>Mabea fistulifera</i>	VIC20137	Leaves	27.3	24.3	4.6	0.2	29.3	35.5
			Stems	25.1	19.1	33.9	42.9	60.5	47.7
<i>Fabaceae</i>	<i>Andira fraxinifolia</i>	SAMES7945	Leaves	6.6	NI	9.0	NI	61.2	62.9
			Stems	NI	NI	12.9	32.0	71.1	71.2
<i>Fabaceae</i>	<i>Inga alba</i>	VIC20101	Leaves	NI	NI	NI	NI	73.7	86.2
			Stems	NI	NI	NI	NI	88.8	84.3
<i>Fabaceae</i>	<i>Inga fagifolia</i>	VIC20102	Leaves	NI	6.9	70.5	81.0	75.2	80.9
			Stems	10.4	1.2	65.1	69.5	84.0	84.8
<i>Fabaceae</i>	<i>Machaerium stiptatum</i>	VIC20115	Leaves	13.4	0.8	NI	NI	26.0	17.4
			Stems	NI	NI	NI	NI	29.9	4.3
<i>Fabaceae</i>	<i>Newtonia contorta</i>	VIC20104	Leaves	39.5	36.4	63.4	NI	75.5	70.0
			Stems	48.9	17.4	8.1	NI	55.7	NI
<i>Fabaceae</i>	<i>Platipodium elegans</i>	VIC20119	Leaves	NI	NI	58.3	8.9	84.1	33.1
			Stems	1.2	NI	25.9	7.6	53.9	39.2
<i>Fabaceae</i>	<i>Pseudopiptadenia contorta</i>	VIC36590	Leaves	51.2	15.5	78.6	44.4	83.7	84.4
			Stems	0.9	NI	8.3	NI	42.7	46.4
<i>Fabaceae</i>	<i>Swartzia elegans</i>	VIC20120	Leaves	3.3	7.3	24.6	36.4	26.2	84.0
			Stems	36.6	NI	63.1	40.5	83.4	47.8
<i>Fabaceae</i>	<i>Swartzia simplex</i>	SAMES7951	Leaves	38.3	19.3	56.7	26.5	4.9	NI
			Stems	70.0	45.6	82.1	62.5	70.0	62.7
<i>Lauraceae</i>	<i>Nectandra lanceolata</i>	VIC20188	Leaves	21.2	22.1	10.1	11.9	23.1	22.8
			Stems	19.9	5.3	NI	NI	81.8	29.9
<i>Lauraceae</i>	<i>Ocotea corymbosa</i>	VIC20190	Leaves	16.3	17.8	NI	NI	NI	NI
			Stems	1.5	NI	NI	NI	NI	NI
<i>Lauraceae</i>	<i>Ocotea notata</i>	SAMES7942	Leaves	NI	5.0	NI	26.4	58.8	68.9
			Stems	NI	NI	NI	24.0	67.4	69.1
<i>Lauraceae</i>	<i>Ocotea odorifera</i>	VIC2149	Leaves	16.4	19.7	24.8	13.3	NI	2.6
			Stems	30.7	0.4	20.3	NI	32.0	11.9
<i>Lauraceae</i>	<i>Persea pyrifolia</i>	VIC20200	Leaves	17.3	27.6	32.0	NI	77.2	19.5
			Stems	14.3	12.0	13.6	NI	50.7	5.4

Table 1. (Continued)

Family	Plant Species	Voucher	Parts	GI (%) ^a ; Extracts ^b [100 µg/mL]					
				B16F10		SW480		Jurkat	
				D:M ^a	MeOH ^b	D:M ^a	MeOH ^b	D:M ^a	MeOH ^b
Lauraceae	<i>Phyllostemonodaphne geminiflora</i>	VIC51751	Leaves	NI	NI	23.42	11.45	21.79	NI
			Stems	12.0	NI	NI	NI	26.9	53.6
Malpighiaceae	<i>Stigmaphyllon ciliatum</i>	SAMES7926	Aerial part	62.0	19.8	NI	NI	NI	16.6
Melastomataceae	<i>Miconia cinnamomifolia</i>	SAMES7952	Leaves	NI	NI	24.7	34.4	4.7	48.7
			Stems	NI	41.5	36.9	14.2	22.1	34.6
Meliaceae	<i>Trichilia catigua</i>	VIC20122	Leaves	NI	NI	16.3	NI	13.8	12.0
			Stems	NI	1.4	0.1	NI	33.9	32.6
Moraceae	<i>Sorocea hilarii</i>	SAMES7947	Leaves	87.2	71.8	90.2	89.1	73.8,	77.4
			Stems	NI	7.1	47.5	33.0	70.0	74.6
Myrtaceae	<i>Eugenia astringens</i>	SAMES7911	Leaves	64.9	47.9	33.2	47.2	65.9	69.6
			Stems	62.2	NI	41.1	19.7	64.7	45.3
Myrtaceae	<i>Eugenia brejoensis</i>	SAMES7937	Leaves	NI	NI	NI	2.5	20.1	51.9
			Stems	66.1	32.9	16.8	NI	69.2	50.2
Myrtaceae	<i>Eugenia leptoclada</i>	VIC20145	Leaves	28.8	NI	6.5	NI	77.9	70.8
			Stems	51.8	NI	NI	NI	19.19	NI
Myrtaceae	<i>Myrcia formosiana</i>	VIC20232	Leaves	12.6	NI	NI	NI	32.9	39.5
			Stems	26.5	NI	NI	NI	58.8	NI
Myrtaceae	<i>Myrciaria strigipes</i>	SAMES7932	Leaves	38.8	40.6	NI	NI	62.8	70.6
			Stems	90.0	43.5	73.4	31.7	75.8	63.3
Oleaceae	<i>Heisteria silvianii</i>	VIC20233	Leaves	NI	NI	NI	NI	65.5	3.8
			Stems	6.5	10.4	NI	NI	21.8	21.7
Piperaceae	<i>Piper arboreum</i>	SAMES7940	Leaves	52.5	21.1	55.5	26.0	74.5	76.0
			Stems	NI	23.7	8.9	0.8	72.9	49.9
Polygonaceae	<i>Coccoloba alnifolia</i>	SAMES7933	Leaves	26.0	30.5	10.9	7.5	NI	27.6
			Stems	NI	NI	5.8	NI	46.3	NI
Primulaceae	<i>Rhapanea umbellata</i>	VIC20522	Leaves	NI	20.5	12.1	10.5	73.8	60.8
			Stems	19.1	10.1	8.2	28.3	62.7	86.7
Rosaceae	<i>Prunus sellowii</i>	VIC20239	Leaves	NI	NI	14.1	NI	20.3	67.3
			Stems	54.2	NI	36.5	NI	78.4	48.8

Table 1. (Continued)

Family	Plant Species	Voucher	Parts	GI (%) ^a ; Extracts ^b [100 µg/mL]					
				B16F10		SW480		Jurkat	
				D:M ^a	MeOH ^b	D:M ^a	MeOH ^b	D:M ^a	MeOH ^b
Rubiaceae	<i>Amaiowa guianensis</i>	VIC51750	Leaves	NI	NI	NI	NI	21.4	NI
			Stems	6.9	11.9	NI	NI	21.0	NI
Rubiaceae	<i>Hillia tubiflora</i>	VIC20549	Leaves	2,8	9,5	6,2	NI	16,1	14,3
			Stems	6,5	13,8	NI	NI	31,5	13,0
Rubiaceae	<i>Palicourea guianensis</i>	VIC20551	Leaves	11.5	7.2	51.2	26.4	76.6	42.6
			Stems	18.9	5.0	9.1	NI	25.2	16.2
Rubiaceae	<i>Psychotria bahiensis</i>	SAMES7939	Leaves	23.7	19.1	33.1	48.0	8.3	25.5
			Stems	79.9	79.5	81.9	73.6	72.2	82.6
Rubiaceae	<i>Psychotria carthagenemis</i>	VIC20529	Leaves	NI	11.9	55.3	NI	38.4	57.3
			Stems	23.3	NI	9.5	NI	19.1	43.2
Rutaceae	<i>Conchocarpus insignis</i>	SAMES7948	Leaves	31.7	9.8	5.9	NI	3.1	49.8
			Stems	0.9	41.3	63.4	58.1	25.5	15.8
Rutaceae	<i>Hortia arborea</i>	VIC2279	Leaves	11.5	28.1	6.1	NI	81.7	57.3
			Stems	15.9	9.4	NI	5.8	81.1	49.5
Salicaceae	<i>Casearia arborea</i>	VIC20173	Leaves	80.9	82.4	77.7	70.0	79.7	79.8
			Stems	53.4	25.3	52.0	3.1	74.6	43.8
Salicaceae	<i>Casearia ulmifolia</i>	VIC51752	Leaves	15.7	24.5	17.0	34.7	77.1	76.1
			Stems	41.4	12.2	15.8	NI	86.6	9.3
Sapindaceae	<i>Allophylus edulis</i>	VIC20242	Leaves	15.4	NI	NI	NI	NI	2.4
			Stems	34.0	27.6	13.8	4.9	52.9	5.3
Sapindaceae	<i>Cupania emarginata</i>	SAMES7935	Leaves	81.3	81.3	79.8	79.8	78.7	78.5
			Stems	84.6	78.6	73.0	77.6	79.5	78.7
Siparunaceae	<i>Siparuna arianaeae</i>	VIC20221	Leaves	NI	NI	81.5	63.0	84.1	86.7
			Stems	NI	NI	15.2	17.5	27.1	71.1
Sapotaceae	<i>Manilkara subsericea</i>	SAMES7943	Leaves	21.6	11.0	NI	NI	59.5	27.9
			Stems	NI	NI	0.1	23.7	72.5	68.2

^aCell growth inhibition (GI%) was obtained from the formula $GI\% = [100 - (\text{absorbance of treated cells}/\text{control absorbance } 0.25\% \text{ DMSO}) \times 100]$. **NI** = no inhibition observed. B16F10 (murine melanoma). SW480 (human colorectal adenocarcinoma) and Jurkat (human acute T lymphocyte cell leukemia).

^b**D:M**: extract in dichloromethane: methanol (1:1); **M**: extract in methanol.

In general, a higher percentage of cytotoxic activity was observed in the extracts obtained with the solvent extracts DCM:MeOH (1:1) (64.3%), in relation to the solvent MeOH (35.7%). However, no differences were observed between leaves' and stems' extracts.

As preliminary results, 72 extracts reduced cell viability by more than 70% for at least one tumor cell line. Among these, some extracts showed specific cytotoxic activity for a specific tumor cell line, while others were active in common for two or three cancer cells, as shown in the Venn diagram (**Figure 1**). All these extracts are derived from eight plant species: *Hirtella corymbosa*, *Casearia arborea*, *Rheedia gardneriana*, *Swartzia simplex*, *Myrciaria strigipes*, *Psychotria bahiensis*, *Cupania emarginata* and *Sorocea hilarii*. This data shows the pharmacochemical potential of the library of extracts built from the Brazilian Atlantic Forest plant species.

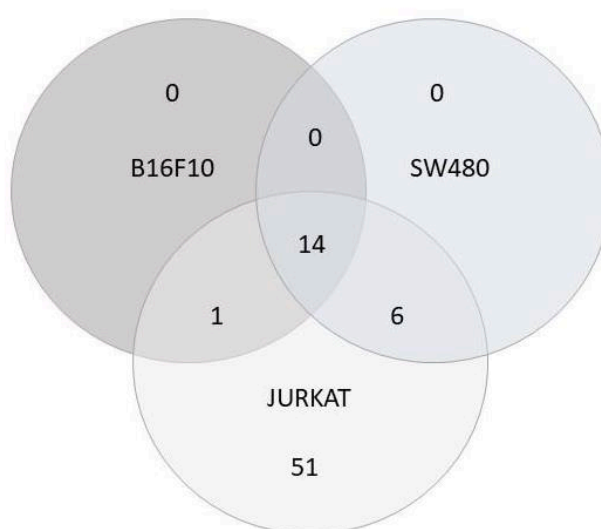


Figure 1. Venn diagram representing the unique and common features of the 72 selected plant extracts. These extracts showed reduction of cell viability equal or greater than 70% for one or more tumor cell lines.

Based on the Venn diagram, 14 extracts inhibited 70% or more cell growth for the three tumor cell lines selected to determine the GI_{50} (**Table 2**).

Table 2. Concentration of extracts that inhibited 50% of cell growth GI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) selected by prescreening using MTT assay.

Family	Species	Parts	Solvent ^a	B16F10 ^b	SW480 ^b	Jurkat ^b
Chrysobalanaceae	<i>Hirtella carymbosa</i>	Stems	DCM:MeOH (1:1)	80.5±17.1	65.6±3.3	156.3±7.0
Clusiaceae	<i>Rheedia gardneriana</i>	Leaves	DCM:MeOH (1:1)	31.6±1.9	66.8±5.7	40.6±7.5
Fabaceae	<i>Swartzia simplex</i>	Stems	DCM:MeOH (1:1)	114.4±8.8	38.8±2.5	51.1±1.6
Moraceae	<i>Sorocea hilarii</i>	Leaves	DCM:MeOH (1:1)	24.3±3.6	19.7±2.5	17.2±5.40
		Leaves	MeOH	28.1±4.2	16.3±1.0	20.0±10.6
Myrtaceae	<i>Myrciaria strigipes</i>	Stems	DCM:MeOH (1:1)	142.3±1.3	54.6±4.0	103.7±13.7
Rubiaceae	<i>Psychotria bahiensis</i>	Stems	DCM:MeOH (1:1)	148.3±6.6	31.8±1.0	ID ^b
		Stems	MeOH	ID	32.1±1.8	ID
Salicaceae	<i>Casearia arborea</i>	Leaves	DCM:MeOH (1:1)	19.0±2.4	18.1±0.8	7.2±0.4
		Leaves	MeOH	40.1±0.6	37.1±5.5	46.6±7.4
Sapindaceae	<i>Cupania emarginata</i>	Leaves	DCM:MeOH (1:1)	ID	ID	ID
		Leaves	MeOH	ID	ID	ID
		Stems	DCM:MeOH (1:1)	113.6±12.6	68.8±12.0	85.3±11.7
		Stems	MeOH	ID	171.0±29.9	ID

^a **DCM:MeOH (1:1)**: dichloromethane:methanol (1:1) extract; **MeOH**: methanol extract; ^bData are reported as $\mu\text{g/mL}$ for 3 replicates per treatment of 3 independent tests after 48 h of treatment. The data are expressed as the mean \pm standard error. **ID**: indeterminated.

From this result of GI_{50} , the DCM:MeOH (1:1) extracts from the leaves of *Casearia arborea* (Rich.) Urb. (Salicaceae) and *Sorocea hilarri* Gaudich (Moraceae) showed the lowest GI_{50} values for the three cell lines tested, and were therefore considered promising to cytotoxic natural product identification [22]. Both extracts were subjected to bioguided fractionation, and were later screened *in vitro* for its cytotoxic activity.

3.2 Fractionation bioguided by cytotoxicity

For each of the active extracts, fractionation by partition was performed using five different solvents. The collected fractions were then tested against B16F10, SW480 and Vero cell lines (**Table 3**).

Table 3. Concentration of extracts or fractions from *Casearia arborea* and *Sorocea hilarii* leaves that inhibited 50% of cell growth GI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) and selectivity index (SI).

Species	Sample	Cell lines			SI	
		B16F10	SW480	VERO	VERO/ B16F10	VERO/ SW480
<i>Casearia arborea</i>	DCM:MeOH (1:1) extracts	19.0±2.4^a	18.1±0.8^a	50.8±4.6 ^a	3	3
	Hexane fraction	8.2±1.2 ^b	17.7±2.8 ^a	52.1±0.7 ^a	6	3
	Dichloromethane fraction	2.8±0.3^b	9.2±1.1^b	34.2±0.7 ^b	12	4
	Ethyl acetate fraction	35.2±4.2 ^c	121.8±23.8 ^c	>200 ^c	-	-
	<i>n</i> -Butanol fraction	55.5±13.0 ^d	100.7±23.2 ^c	>200 ^c	-	-
	Water fraction	>200 ^e	>200 ^d	>200 ^c	-	-
<i>Sorocea hilarii</i>	DCM:MeOH (1:1) extracts	24.3±3.6^a	19.9±2.2^a	17.4±3.2 ^a	0.7	0.9
	Hexane fraction	74.1±12.4 ^b	57.6±7.0 ^b	54.7±1.8 ^b	0.7	0.9
	Dichloromethane fraction	62.9±5.0 ^b	46.7±6.2 ^b	22.2±1.7 ^a	0.4	0.5
	Ethyl acetate fraction	103.5±12.2 ^c	44.3±6.3 ^b	45.9±3.8 ^b	0.5	1
	<i>n</i> -Butanol fraction	23.8±0.6^a	11.6±1.1^c	8.6±1.7 ^c	0.4	0.7
	Water fraction	>200 ^d	99.3±21.3 ^d	>200 ^d	-	-

*Equal superscript letters in the same column indicate no significant differences between means ($p < 0.05$) by the one-way ANOVA followed by Dunnett's post-test. Cytotoxic assays were performed in triplicate with three independent experiments. Results were expressed as means \pm standard error. **DCM:MeOH** - Dichloromethane:Methanol. ** Selectivity index (SI) = GI_{50} (Vero)/ GI_{50} (B16F10).

In the case of *C. arborea* extract, the dichloromethane fraction concentrated the bioactive compounds, providing a significant increase ($p < 0.05$) in cytotoxic activity in relation to the initial extract, for both cell lines. Furthermore, this fraction exhibited a high selectivity index (SI) for Vero cells. There was no significant difference between the GI_{50} of the *Sorocea hilarii* DCM:MeOH (1:1) extract ($24.3 \pm 3.6 \mu\text{g/mL}$) compared with its bioactive *n*-butanol fraction ($23.8 \pm 0.6 \mu\text{g/mL}$) for B16F10. In SW480 there is a reduction of the GI_{50} from $18.1 \pm$

0.8 $\mu\text{g/mL}$ to $9.2 \pm 1.1 \mu\text{g/mL}$ from extract to fraction, respectively. However, the *n*-butanol fraction showed selectivity index < 1 , compared with non-cancerous Vero cells.

The active fraction of each extract was subjected to dereplication analysis, using HPLC-ESI-HRMS data combined with molecular networking by the GNPS platform for the putative annotation of possible bioactive compounds.

3.3 Dereplication analysis of active fractions

The MS/MS data, analyzed in the GNPS platform for dichloromethane fraction of *C. arborea* and *n*-butanol fraction of *S. hilarii*, generated a molecular networking with precursor ions represented as nodes, which were grouped into clusters, according to the chemical similarity (cosine score). MS/MS data dereplication was performed by searching spectral libraries, which allowed the annotation of 39 compounds in *C. arborea* (**Supplementary Table S1**) from 6 different molecular families, including 27 clerodane diterpenoids, 1 flavan-3-ol, 2 proanthocyanins, 5 flavonols, 3 flavones and 1 cinnamic acid derivative (**Figure 2**).

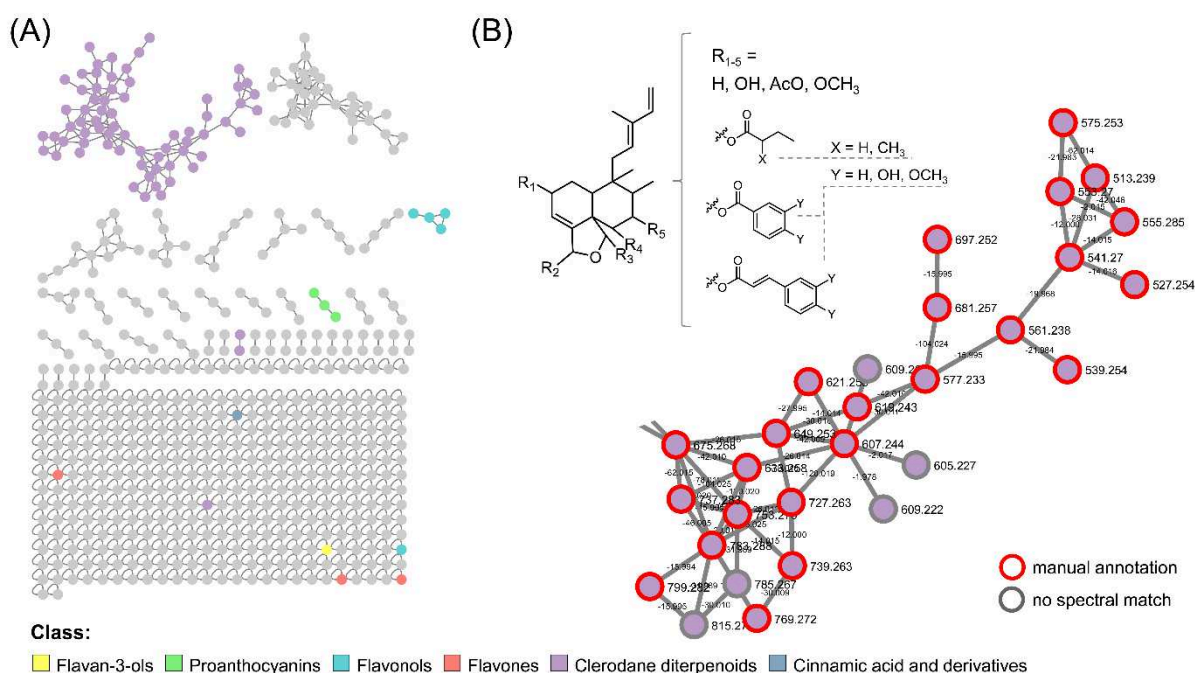


Figure 2. (A) Molecular network from UHPLC-ESI-HRMS data in the positive in mode for the dichloromethane fraction of *Casearia arborea* leaf extract. (B) Detail for the main cluster (in magenta) of the molecular network, referring to the clerodane diterpenoids compounds. *Numbers inside the nodes correspond to the m/z accurate masses (Da). **Nodes manually annotated are circled in red. Nodes circled in gray did not show spectral match.

A priori, *Casearia* species are known for the presence of a wide variety of clerodane diterpenes, considered chemotaxonomic markers for this genus. These clerodane diterpenes

have a basic structure, containing a decalin system (A and B rings) linked to a tetrahydrofuran ring, normally containing oxygenated substituents, mainly ester groups. The main product ions formed by MS/MS involved neutral losses of 18, 42, 60, 150 and 168 Da, mainly associated with the cleavage of the ester groups, as acetate and benzoate derivatives, present in the basic structure (**Supplementary Figure S1**). This fragmentation pattern, which is in agreement with reports published in the literature, implies the presence of casearin-type clerodane diterpenes [23]. Other metabolites, present in the active fraction, are phenolic compounds, which are clustered into a molecular family, such as flavonols and proanthocyanidins. In the MS/MS fragmentation flavonoids, there was evidence of loss of their sugar attachments, resulting in aglycones, such as quercetin, luteolin and kaempferol (**Supplementary Table S1**).

Some of the clerodane-type diterpenes and flavonoids (**Figure 2**), identified in the dichloromethane fraction, were also identified in *C. arborea* by Beutler et al. (2000) [24] and Santos et al. (2021) [25], respectively. The genus *Casearia* has about 180 species, distributed in tropical and subtropical zones. Several species of this genus have attracted great interest due to their pharmacological properties, mainly antitumor activities, which are attributed to the presence of clerodane diterpene compounds [26].

Nevertheless, this is the first time that the cytotoxic activity of this species has been reported to colon adenocarcinoma and jurkat cancer cell lines. There are studies reporting the antitumor activity of *C. arborea* to metastatic melanoma tumor lines A2058 [27] and LOX IMV I [24], and also to gliosarcoma (SF539) [24]. Both of these studies attributed the antitumor activity of *C. arborea* to clerodane diterpenes. This data reinforces that clerodane-type diterpenes, identified in the active dichloromethane fraction, are responsible for the cytotoxic activity of *C. arborea*.

The resulting molecular networking of the *n*-butanol active fraction from *Sorocea hilarii* allowed to annotate 29 compounds (**Supplementary Table S2**), categorized into three different clusters, including 10 megastigmanes, 17 spirostane steroids and its saponin derivatives and 2 lignans (**Figure 3**). The molecular family referring to megastigmanes was initially constructed from four spectral matches (m/z 373, 387, 389 and 505), and followed by fragmentation analysis generated by connecting nodes. Megastigmanes are norterpenoides (C-13 skeleton), derived from the oxidative degradation of carotenoids (apocarotenoides) [28]. Its basic skeleton α -ionol is commonly linked to sugar units. During MS/MS fragmentation, it was possible to notice that megastigmanes lost sugar units, such as hexoside and pentoside, resulting in aglycone exposure. Another molecular family annotated in the *S. hilarii* fraction was steroidal saponins with

spirostane-type aglycone. The generated cluster, based on MS2 fragments, include the sapogenins spirostenol and spirostadienol, with a m/z 415.3206 and 413.3048, respectively. The remaining 14 saponins annotated are mainly derived from these two sapogenins, showing losses of sugars. Additionally, a minor cluster and isolated nodes were characterized as lignans, being annotated with five compounds (**Supplementary Table S2**).

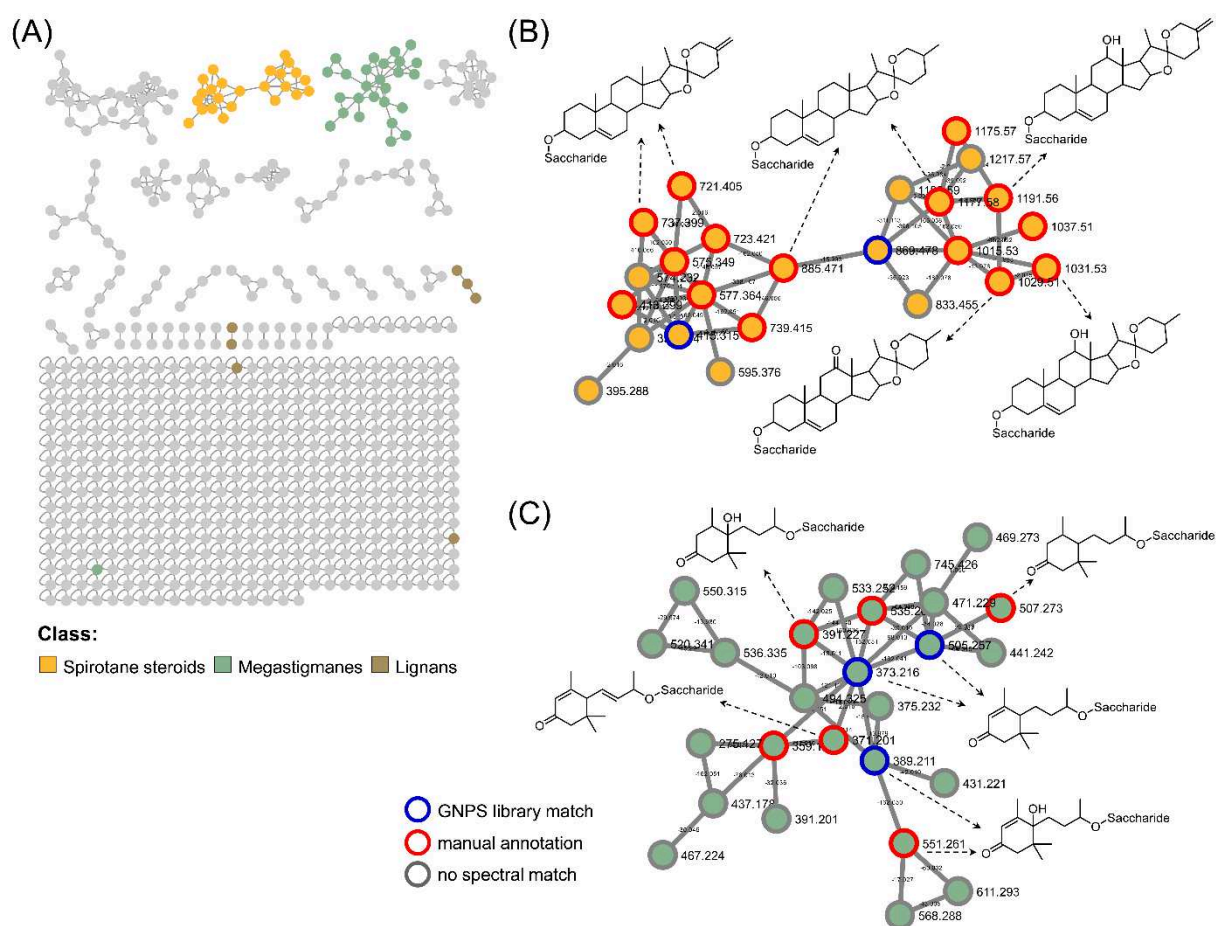


Figure 3. (A) Molecular network from HPLC-ESI-HRMS data in a positive mode for the *n*-butanol fraction of *Sorocea hilarii* leaf extract. (B) Orange cluster corresponds to spirostane steroids and its saponin derivatives compounds. (C) Green cluster corresponds to megastigmanes compounds. *Numbers inside the nodes correspond to the m/z accurate masses (Da). **Nodes annotated through the GNPS spectral library are circled in blue. ***Nodes manually annotated are circled in red. ****Nodes circled in gray did not show spectral match. *****Saccharide chain consists of pentosides, deoxyhexosides and hexosides that are linked to the aglycones by *O*-glycosidic bonds.

The neotropical genus *Sorocea* (Moraceae) contains approximately 27 species [29]. The species *S. hilarii* is endemic to Brazil, and there are no studies reporting its chemical or pharmacological properties. Megastigmanes, spirostane steroids derivatives and lignans were reported for the first time in *S. hilarii* (**Figure 3**). However, in the Moraceae family, the presence of megastigmanes [30-31], steroidal saponins [32-33] and lignans [34] has been described. There are several reports of the cytotoxic activity of megastigmane glycosides for

various tumor lines, including colon cancer [35] and melanoma [36]. In the molecular families of lignans, podophyllotoxin stands out, a lignan with high cytotoxic and anticancer power that has been widely studied and used in clinical therapy [37-38]. These natural products, identified in the *n*-butanol fraction of *S. hilarii*, can be considered the probable cytotoxic actives of this species.

4. Conclusions

Natural products of plant origin have been a promising source for the discovery of new antitumor drugs. After screening 282 extracts, the species *Casearia arborea* and *Sorocea hilarii* have proved to be the most promising sources for cytotoxic compounds. Applying a molecular network tool using HPLC-ESI-HRMS data for the active fractions of *C. arborea* and *S. hilarii*, combined with silico dereplication approaches, it was possible to characterize the constituents responsible for the cytotoxicity of these two species. In the case of *C. arborea*, clerodane diterpenes must be responsible for the cytotoxic activity of the bioactive dichloromethane fraction. The molecular network of the active fraction evidenced the cluster formed by this class of secondary metabolites, being annotated 27 clerodane diterpenoids. In the case of *Sorocea hilarii*, we demonstrate herein that mesgastigmans derivatives and lignans are possibly the compounds responsible for the cytotoxic activity. These findings provide evidence that not only one class of compounds, but both, contribute to the observed cytotoxic activity of *S. hilarii*. The chemical isolation and biological evaluation of these supposedly bioactive metabolites will be important to reveal the potential of these two species as a source of antitumor compounds.

Acknowledgments

We thank *Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais* (Fapemig) for the financial support for the development of this work. The authors also thank CAPES, for the doctoral scholarship of L.A.R.

Conflict of interests

The authors declare no potential conflict of interest.

References

- [1] Singh S, Sharma B, Kanwar SS, Kumar A. Lead Phytochemicals for Anticancer Drug Development. **Front Plant Sci.** 2016; 8(7):1667.
- [2] Cui W, Aouidate A, Wang S, Yu Q, Li Y, Yuan S. Discovering Anti-Cancer Drugs via Computational Methods. **Front Pharmacol.** 2020; 11:733.
- [3] Chen H, Li R, Zhang F, Yao Q, Guo Y. A scientometric visualization analysis for natural products on cancer research from 2008 to 2020. **Front Pharmacol.** 2021; 12:650141.
- [4] Newman DJ, Cragg GM. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **J Nat Prod.** 2020; 83(3):770-803.
- [5] Atanasov AG, Zotchev SB, Dirsch VM, The International Natural Product Sciences Taskforce, Supuran CT. Natural products in drug discovery: advances and opportunities. **Nat Rev Drug Discov.** 2021; 20:200–216.
- [6] Fabiani R. Antitumoral Properties of Natural Products. **Molecules.** 2020; 25(3):650.
- [7] Lautié E, Russo O, Ducrot P, Boutin JA. Unraveling Plant Natural Chemical Diversity for Drug Discovery Purposes. **Front Pharmacol.** 2020; 7(11):397.
- [8] Wilson BAP, Thornburg CC, Curtis J, Henrich CJ, Grkovic T, O'Keefe BR Creating and screening natural product libraries. **Nat. Prod. Rep.** 2020; 37:893.
- [9] Thornburg CC, Britt JR, Evans JR, Akee RK, Whitt JA, Trinh SK et al. NCI program for natural product discovery: a publicly-accessible library of natural product fractions for high-throughput screening. **ACS chem biol.** 2018; 13(9):2484-2497.
- [10] Rosa MN, Silva LRV, Longato GB, Evangelista AF, Gomes INF, Alves ALV et al. Bioprospecting of natural compounds from Brazilian cerrado biome plants in human cervical cancer cell lines. **Int J Mol Sci.** 2021; 22:3383.
- [11] Nothias LF, Nothias-Esposito M, da Silva R, Wang M, Protsyuk I, Zhang Z, Sarvepalli A, Leyssen P, Touboul D, Costa J, Paolini J, Alexandrov T, Litaudon M, Dorrestein PC. Bioactivity-Based Molecular Networking for the Discovery of Drug Leads in Natural Product Bioassay-Guided Fractionation. **J Nat Prod.** 2018; 81(4):758-767.
- [12] Wang, Mingxun, et al. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. **Nat. Biotechnol.** 2016; 34(8):828-837.

- [13] Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**. 2000; 403:853-858.
- [14] Joly CA, Metzger JP, Tabarelli M. Experiences from the Brazilian Atlantic Forest: ecological findings and conservation initiatives. **New Phytol**. 2014; 204:459-473.
- [15] Almeida AA, Lima GDA, Simão MVRC, Moreira GA, Siqueira RP, Zanatta AC et al. Screening of plants from the Brazilian Atlantic Forest led to identification of *Athenaea velutina* (Solanaceae) as a novel source of antimetastatic agents. **Int J Exp Pathol**. 2020; 101(3-4):106-121.
- [16] ProteoWizard. <https://proteowizard.sourceforge.io/>, (accessed 10 January 2022).
- [17] GNPS: Global Natural Products Social Molecular Networking. <https://gnps.ucsd.edu/>, (accessed 10 January 2022).
- [18] Rutz A, Sorokina M, Galgonek J, Mietchen D, Willighagen E, Gaudry A, Allard PM. The LOTUS initiative for open knowledge management in natural products research. **Elife**. 2022; 11:e70780.
- [19] LOTUS. <https://lotus.naturalproducts.net/>, (accessed 20 February 2022).
- [20] Sumner, LW, Amberg A, Barrett D, Beale MH, Beger R, Daykin CA, Viant MR. Proposed minimum reporting standards for chemical analysis. **Metabolomics**. 2007; 3(3):211-221.
- [21] Kim HW, Wang M, Leber CA, Nothias LF, Reher R, Kang KB, Cottrell GW. NPClassifier: a deep neural network-based structural classification tool for natural products. **J Nat Prod**. 2021; 84(11):2795-2807.
- [22] He M, Grkovic T, Evans JR, Thornburg CC, Akee RK, Thompson JR, Whitt JA, Harris MJ, Loyal J, Britt JR, Jia L, White JD, Newman DJ, O'Keefe BR. The NCI library of traditional Chinese medicinal plant extracts—Preliminary assessment of the NCI-60 activity and chemical profiling of selected species. **Fitoterapia**. 2019; 137:104285.
- [23] Danuello A, Castro RC, Pilon AC, Bueno PCP, Pivatto M, Vieira Junior GM, Cavalheiro, AJ. Fragmentation study of clerodane diterpenes from *Casearia* species by tandem mass spectrometry (quadrupole time-of-flight and ion trap). **RCM**. 2020; 34:8781.

- [24] Beutler JA, McCall KL, Herbert K, Herald DL, Pettit GR, Johnson T, Shoemaker RH, Boyd MR. Novel cytotoxic diterpenes from *Casearia arborea*. **J Nat Prod.** 2000; 63(5):657-61.
- [25] Santos AL, Soares MG, Medeiros LS, Ferreira MJ, Sartorelli P. Identification of flavonoid-3-O-glycosides from leaves of *Casearia arborea* (Salicaceae) by UHPLC-DAD-ESI-HRMS/MS combined with molecular networking and NMR. **Phytochem. Anal.** 2021; 32:891–898.
- [26] Xia L, Guo Q, Tu P, Chai X. The genus *Casearia*: a phytochemical and pharmacological overview. **Phytochem Rev.** 2015; 14:99–135.
- [27] Garo E, Dobrzyński M, Rossberg F, Fertig O, Pertz O, Hamburger M. Looking for specific natural inhibitors targeting aberrant proliferation signaling in melanoma. **Planta Med.** 2017; 4(S01):114.
- [28] Rao AS. Isolation, absolute configuration and bioactivities of megastigmanes or C13 isonorterpinoides. **Chem Int.** 2017; 3(1):69-91.
- [29] SiBBR. Sistema da Informação sobre a Biodiversidade Brasileira. Available in: <https://ala-bie.sibbr.gov.br/ala-bie/species/339791?lang=pt_BR#classification>. Access in 02/25/2022.
- [30] Van KP, Cuong NX, Nhiem NX, Hang DT, Nam NH, Ban NK, Minh CV, Bing Z, Jang HD, Kim YH. Chemical constituents and antioxidant activity of *Ficus callosa*. **Nat Prod Commun.** 2011;6(2):159-62.
- [31] Nascimento M, Arruda AC, Aruda MSP, Muler AH, Yoshioka CY. Aripuanin, a megastigmane skeleton from *Ficus aripuanensis*. **Fitoterapia.** 1999; 70:628-629.
- [32] Islam S, Shajib MS, Rashid RB, Khan MF, Al-Mansur M, Datta BK, Rashid M. Antinociceptive activities of *Artocarpus lacucha* Buch-ham (Moraceae) and its isolated phenolic compound, catechin, in mice. **BMC Complement Altern Med.** 2019; 19(1):1-13.
- [33] González AG, Hernández JC, León F, Padrón JI, Estévez F, Quintana J, Bermejo J. Steroidal Saponins from the Bark of *Dracaena draco* and Their Cytotoxic Activities. **J Nat Prod.** 2003; 66(6):793-798.

[34] Baetas AC, Gomes LF, Rodrigues AP, Maués LA, Crespo-López ME, Macchi BD, Silva EO, Arruda MS, Nascimento JL. *In vitro* cytotoxicity of lignans isolated from *Ficus citrifolia* P. Miller (Moraceae) on C6 glioma cell line. **Glo Adv Res J Med Med Sci.** 2018; 7:77-84.

[35] Aati HY, Perveen S, Al-Qahtani J, Peng J, Al-Taweel A, Alqahtani AS et al. Euphocactoside, a New Megastigmane Glycoside from *Euphorbia cactus* Growing in Saudi Arabia. **Plants.**2022; 11(6):811.

[36] Panza E, Tersigni M, Iorizzi M, Zollo F, De Marino S, Festa C et al. Lauroside B, a megastigmane glycoside from *Laurus nobilis* (bay laurel) leaves, induces apoptosis in human melanoma cell lines by inhibiting NF- κ B activation. **J Nat Prod.** 2011; 74(2):228-233.

[37] Zhao W, Cong Y, Li HM, Li S, Shen Y, Qi Q, Zhang Y, Yue-Zhong L, Tang YJ. Challenges and potential for improving the druggability of podophyllotoxin-derived drugs in cancer chemotherapy. **Nat Prod Rep.** 2021; 38(3):470-488.

[38] Shah Z, Gohar UF, Jamshed I, Mushtaq A, Mukhtar H, Zia-UI-Haq M, Toma SI, Manea R, Moga M, Popovici B. Podophyllotoxin: history, recent advances and future prospects. **Biomolecules.** 2021; 11(4):603.

Supplementary material

Cytotoxic screening of the plants from the Brazilian Atlantic Forest led to the identification of *Casearia arborea* and *Sorocea hilarii* as source of antitumor compounds

Rodrigues LA^{*a}, Almeida AA^a, Agrizii AP^a, Pacheco N^a, Carvalho BCR^a, Zanatta AC^b,
Kohlhoff M^c, Torres CMME^d, Bressan GC^a, Leite JPV^{*a}.

^aDepartamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, 36570-900 Viçosa, Minas Gerais, Brazil.

^bInstituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, São Paulo, Brazil

^cRene Rachou Research Center, Fiocruz, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

^dDepartamento de Engenharia Florestal, Universidade Federal de Viçosa, 36570-900 Viçosa, Minas Gerais, Brazil.

Table S1. HPLC-MS/MS data of the annotated metabolites in dichromethane fraction from *Casearia arborea* leaves based on GNPS spectral library match.

Peak	RT (min.)	[M+H] Observed Mass (m/z)	Calculated Mass (m/z)	Molecular Formula	Error (ppm)	MS/MS Fragments (m/z)	Annotated compounds	Chemical class ^a	Reference/ Database ^b
1	9.33	291.0859	291.0869	C ₁₅ H ₁₅ O ₆	-3.3	165.0547, 147.0450, 139.0394, 123.0446	Catechin or (epi)catechin	Flavan-3-ols	GNPS
2	9.49	355.1025	355.1029	C ₁₆ H ₁₉ O ₉	-1.2	163.0393, 145.9863	Neochlorogenic acid	Cinnamic acid and derivatives	GNPS
3	10.55	579.1489	579.1503	C ₃₀ H ₂₇ O ₁₂	-2.3	427.1020, 291.0862, 163.0391	(epi)catechin-(epi)catechin	Proanthocyanins	GNPS
4	11.55	867.2142	867.2136	C ₄₅ H ₃₉ O ₁₈	0.6	715.1612, 579.1532, 453.1215, 409.0898, 291.0864, 289.0709	(epi)catechin-(epi)catechin-(epi)catechin	Proanthocyanins	DNP
5	12.73	611.1615	611.1612	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₆	0.5	465.1031, 303.0500	Quercetin- <i>O</i> -deoxyhexoside-hexoside	Flavonols	GNPS
6	12.95	433.1135	433.1135	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₀	<0.1	337.0708, 313.0716, 283.0597	Apigenin- <i>C</i> -hexoside	Flavones	GNPS
7	12.98	465.1033	465.1033	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₂	<0.1	487.0851 [M+Na], 303.0503	Quercetin- <i>O</i> -hexoside	Flavonols	GNPS
8	13.45	435.0925	435.0927	C ₂₀ H ₁₉ O ₁₁	-0.6	457.0743 [M+Na], 303.0503	Quercetin- <i>O</i> -pentoside	Flavonols	GNPS
9	13.93	449.1086	449.1084	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁	0.5	303.0501	Quercetin- <i>O</i> -deoxyhexoside	Flavonols	GNPS
10	14.03	595.1669	595.1663	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₅	1.0	463.1247, 301.0713	Methoxy-luteolin- <i>O</i> -hexoside-pentoside	Flavones	GNPS
11	14.69	419.0987	419.0978	C ₂₀ H ₁₉ O ₁₀	2.1	287.0553, 153.0190	Kaempferol- <i>O</i> -pentoside	Flavonols	GNPS
12	18.24	331.0814	331.0818	C ₁₇ H ₁₅ O ₇	-1.1	287.0550, 153.0167	5,7,4'-trihydroxy-3',5'-dimethoxyflavone (Tricin)	Flavones	GNPS

Table S1. (Continued)

Peak	RT (min.)	[M+H] Observed Mass (m/z)	Calculated Mass (m/z)	Molecular Formula	Error (ppm)	MS/MS Fragments (m/z)	Annotated compounds	Chemical class ^a	Reference/ Database ^b
13	25.35	799.2924 [M+Na] ⁺	799.2942	C ₄₂ H ₄₈ NaO ₁₄	-2.2	739.2714, 679.2517, 529.2157, 335.1582, 177.0551, 151.0392	diacetoxy-18,19-epoxy-feruloyloxy-(4-hydroxy-3-methoxybenzoyloxy)-hydroxy-clerodatriene	Clerodane diterpenoids	proposed
14	25.40	577.2411 [M+Na] ⁺	577.2414	C ₃₁ H ₃₈ NaO ₉	-0.4	517.2202, 475.2083, 457.1986, 337.1776, 297.1848, 279.1745	diacetoxy-18,19-epoxy-(4-hydroxybenzoyloxy)-hydroxy-clerodatriene	Clerodane diterpenoids	Beutler et al., 2000 (LOTUS)
15	27.72	607.2518 [M+Na] ⁺	607.2519	C ₃₂ H ₄₀ NaO ₁₀	-0.2	547.2304, 505.2200, 487.2091, 319.1667, 151.0393	diacetoxy-18,19-epoxy-(4-hydroxy-3-methoxybenzoyloxy)-hydroxy-clerodatriene	Clerodane diterpenoids	proposed
16	27.90	769.2832 [M+Na] ⁺	769.2836	C ₄₁ H ₄₆ NaO ₁₃	-0.5	709.2615, 649.2409, 487.2092, 319.1701, 297.1845, 163.0388, 151.0391	diacetoxy-18,19-epoxy-caffeoyloxy-(4-hydroxy-3-methoxybenzoyloxy)-clerodatriene	Clerodane diterpenoids	proposed
17	28.15	739.2726 [M+Na] ⁺	739.2731	C ₄₀ H ₄₄ NaO ₁₂	-1.0	679.2517, 619.2299, 457.1977, 319.1657, 297.1757, 163.0390	diacetoxy-18,19-epoxy-caffeoyloxy-(4-hydroxybenzoyloxy)-clerodatriene	Clerodane diterpenoids	proposed
18	28.40	577.2420 [M+Na] ⁺	577.2414	C ₃₁ H ₃₈ NaO ₉	1.1	517.2192, 475.2094, 457.1976	diacetoxy-18,19-epoxy-(4-hydroxybenzoyloxy)-hydroxy-clerodatriene	Clerodane diterpenoids	Beutler et al., 2000 (LOTUS)
19	28.45	513.2455 [M+Na] ⁺	513.2464	C ₂₇ H ₃₈ NaO ₈	-1.8	453.2267, 411.2136, 393.2035, 329.2097, 297.2052, 279.1730	triacetoxy-18,19-epoxy-methoxy-clerodatriene	Clerodane diterpenoids	Prakash et al., 2002 (LOTUS)

Table S1. (Continued)

Peak	RT (min.)	[M+H] Observed Mass (m/z)	Calculated Mass (m/z)	Molecular Formula	Error (ppm)	MS/MS Fragments (m/z)	Annotated compounds	Chemical class ^a	Reference/ Database ^b
20	28.62	633.2667 [M+Na] ⁺	633.2676	C ₃₄ H ₄₂ NaO ₁ 0	-1.4	573.2470, 513.2255, 319.1675, 297.1826, 177.0548	diacetoxy-18,19- epoxy-feruloyloxy- hydroxy-clerodatriene	Clerodane diterpenoids	proposed
21	28.80	621.2672 [M+Na] ⁺	621.2676	C ₃₃ H ₄₂ NaO ₁ 0	-0.6	519.2351, 501.2249, 351.1940, 329.2109, 311.1996, 297.1861, 279.1751, 151.0393	diacetoxy-18,19- epoxy-(4-hydroxy-3- methoxybenzoyloxy)- methoxy-clerodatriene	Clerodane diterpenoids	proposed
22	28.87	527.2620 [M+Na] ⁺	527.2621	C ₂₈ H ₄₀ NaO ₈	-0.2	467.2422, 425.2297, 407.2185	diacetoxy-18,19- epoxy-butanoyloxy- hydroxy-clerodatriene	Clerodane diterpenoids	Danuello et al., 2020
23	28.96	697.2621 [M+Na] ⁺	697.2625	C ₃₈ H ₄₂ NaO ₁ 1	-0.6	637.2396, 595.2304, 577.2191, 517.2218, 475.2166, 457.1981, 319.1682, 297.1848, 279.1761	diacetoxy-18,19- epoxy-bis(4- hydroxybenzoyloxy)- clerodatriene	Clerodane diterpenoids	proposed
24	29.50	727.2728 [M+Na] ⁺	727.2731	C ₃₉ H ₄₄ NaO ₁ 2	-0.3	625.2415, 607.2304, 667.2504, 457.1989, 319.1648, 297.1850, 279.1744, 151.0393	diacetoxy-18,19- epoxy-(4-hydroxy-3- methoxybenzoyloxy)- (4- hydroxybenzoyloxy)- clerodatriene	Clerodane diterpenoids	proposed
25	29.23	619.2517 [M+Na] ⁺	619.2519	C ₃₃ H ₄₀ NaO ₁ 0	-0.4	559.2302, 517.2205, 499.2095, 439.2103, 379.1881, 279.1846	triacetoxy-18,19- epoxy-(4- hydroxybenzoyloxy)- clerodatriene	Clerodane diterpenoids	Danuello et al., 2020
26	29.44	753.2885 [M+Na] ⁺	753.2887	C ₄₁ H ₄₆ NaO ₁ 2	-0.3	693.2670, 651.2570, 633.2462, 457.1986, 319.1670, 297.1856, 177.0548	diacetoxy-18,19- epoxy-feruloyloxy-(4- hydroxybenzoyloxy)- clerodatriene	Clerodane diterpenoids	proposed

Table S1. (Continued)

Peak	RT (min.)	[M+H] Observed Mass (<i>m/z</i>)	Calculated Mass (<i>m/z</i>)	Molecular Formula	Error (ppm)	MS/MS Fragments (<i>m/z</i>)	Annotated compounds	Chemical class ^a	Reference/ Database ^b
27	29.65	539.2616 [M+Na] ⁺	539.2621	C ₂₉ H ₄₀ NaO ₈	-0.9	479.2415, 437.2299, 419.2199, 397.2381, 297.1846, 279.1749	diacetoxy-18,19- epoxy- methylbutenoyloxy- hydroxy-clerodatriene	Clerodane diterpenoids	proposed
28	29.79	649.2615 [M+Na] ⁺	649.2625	C ₃₄ H ₄₂ NaO ₁₁	-1.5	589.2405, 547.2298, 529.2196, 439.2081, 379.1875, 339.1951, 297.1841	triacetoxy-18,19- epoxy-(4-hydroxy-3- methoxybenzoyloxy)- clerodatriene	Clerodane diterpenoids	proposed
29	29.91	783.2988 [M+Na] ⁺	783.2993	C ₄₂ H ₄₈ NaO ₁₃	-0.6	723.2778, 681.2674, 663.2569, 487.2094, 379.1878, 319.1662, 297.1854, 177.0542, 151.0393	diacetoxy-18,19- epoxy-feruloyloxy-(4- hydroxy-3- methoxybenzoyloxy)- clerodatriene	Clerodane diterpenoids	proposed
30	30.02	561.2459 [M+Na] ⁺	561.2464	C ₃₁ H ₃₈ NaO ₈	-1.0	501.2254, 459.2147, 441.2037, 297.1843, 279.1743	diacetoxy-18,19- epoxy-benzoyloxy- hydroxy-clerodatriene	Clerodane diterpenoids	Vieira Júnior et al. 2009 (LOTUS)
31	30.31	675.2778 [M+Na] ⁺	675.2781	C ₃₆ H ₄₄ NaO ₁₁	-0.5	615.2564, 573.2468, 555.2356, 379.1885, 297.1851, 177.0547	triacetoxy-18,19- epoxy-feruloyloxy- clerodatriene	Clerodane diterpenoids	proposed
32	30.33	541.2771 [M+Na] ⁺	541.2777	C ₂₉ H ₄₂ NaO ₈	-1.2	481.2567, 439.2444, 421.2351, 311.2016 297.1847, 279.1744	diacetoxy-18,19- epoxy-butanoyloxy- methoxy-clerodatriene	Clerodane diterpenoids	Morita et al., 1991 (LOTUS)
33	30.74	591.2577 [M+Na] ⁺	591.2570	C ₃₂ H ₄₀ NaO ₉	1.2	531.2367, 489.2255, 471.2147, 321.1823, 151.0394	diacetoxy-18,19- epoxy-(4-hydroxy-3- methoxybenzoyloxy)- clerodatriene	Clerodane diterpenoids	Beutler et al., 2000 (LOTUS)

Table S1. (Continued)

Peak	RT (min.)	[M+H] Observed Mass (m/z)	Calculated Mass (m/z)	Molecular Formula	Error (ppm)	MS/MS Fragments (m/z)	Annotated compounds	Chemical class ^a	Reference/ Database ^b
34	31.77	555.2929 [M+Na] ⁺	555.2934	C ₃₀ H ₄₄ NaO ₈	-0.9	495.2708, 453.2620, 435.2500, 319.1660, 311.2001, 297.1842, 279.1738	diacetoxy-18,19-epoxy-methylbutanoyloxy-methoxy-clerodatriene	Clerodane diterpenoids	Gibbons et al., 1996, Khan et al., 1990(2), Prakash et al., 2002 (LOTUS)
35	32.23	681.2670 [M+Na] ⁺	681.2676	C ₃₈ H ₄₂ NaO ₁₀	-0.8	621.2464, 579.2347, 561.2247, 501.2232, 441.2033, 319.6208, 297.1848, 279.1739	diacetoxy-18,19-epoxy-benzoyloxy-(4-hydroxybenzoyloxy)-clerodatriene	Clerodane diterpenoids	proposed
36	32.71	575.2608 [M+Na] ⁺	575.2621	C ₃₂ H ₄₀ NaO ₈	-2.2	515.2386, 473.2295, 455.2176, 311.2003, 297.1841, 279.1736	diacetoxy-18,19-epoxy-benzoyloxy-methoxy-clerodatriene	Clerodane diterpenoids	proposed
37	33.79	737.2934 [M+Na] ⁺	737.2938	C ₄₁ H ₄₆ NaO ₁₁	-0.5	677.2732, 635.2591, 617.2515, 441.2035, 297.1857, 177.0547	diacetoxy-18,19-epoxy-feruloyloxy-benzoyloxy-clerodatriene	Clerodane diterpenoids	proposed
38	33.89	553.2771 [M+Na] ⁺	553.2777	C ₃₀ H ₄₂ NaO ₈	-1.2	493.2583, 451.2454, 433.2339, 371.2208, 329.2106, 311.1999, 297.1839, 279.1760	diacetoxy-18,19-epoxy-methylbutenoyloxy-methoxy-clerodatriene	Clerodane diterpenoids	Proposed
39	34.06	545.2498 [M+Na] ⁺	523.2696	C ₃₁ H ₃₈ NaO ₇	-3.2	523.2670 [M+H] ⁺ , 485.2298, 425.2087, 363.1957, 321.1821, 281.1892	diacetoxy-18,19-epoxy-benzoyloxy-clerodatriene	Clerodane diterpenoids	Khan et al., 1990 (LOTUS)

^a Chemical class annotations were assigned using the NPClassifier [21]; ^b Database source: GNPS [13] and Dictionary of Natural Products [18].

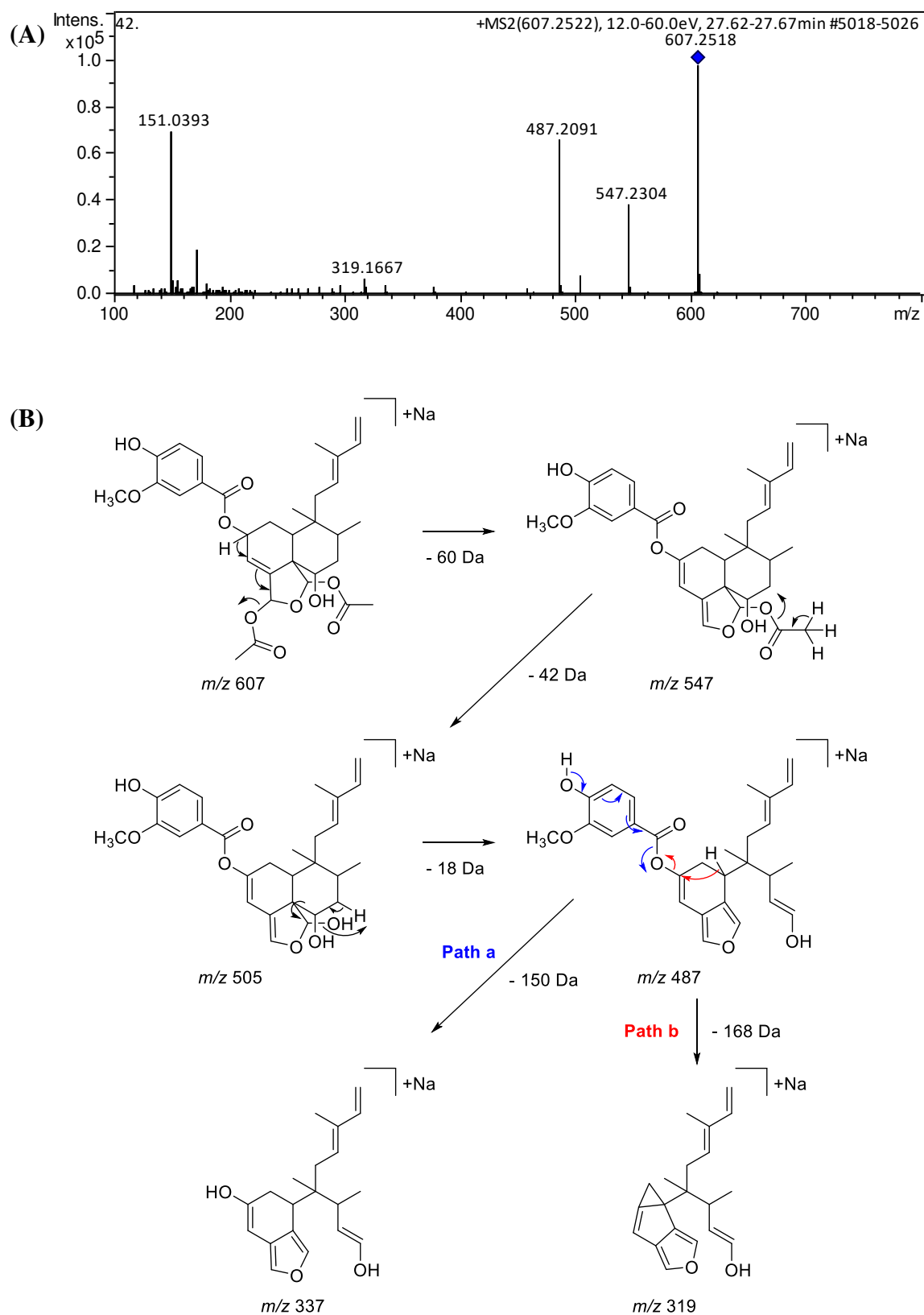


Figure S1. (A) MS/MS mass spectra of the precursor ion at m/z 607 (compound **15**) of the clerodane diterpenoid chemical class in dichloromethane fraction of *Casearia arborea*. (B) Proposed fragmentation mechanism of the precursor ion at m/z 607.

Table S2. HPLC-MS/MS data of the annotated metabolites in *n*-butanolic fraction from *Sorocea hilarii* leaves.

Peak	RT (min.)	[M+H] ⁺ Observed Mass (<i>m/z</i>)	Calculated Mass (<i>m/z</i>)	Molecular Formula	Error (ppm)	MS ² Fragments (<i>m/z</i>)	Annotated compounds	Chemical class ^a	Reference/ Database ^b
1	10.17	551.2693	551.2704	C ₂₅ H ₄₃ O ₁₃	-1.9	389.2150, 227.1637, 209.1532, 191.1433	Dihydroxy-megastigmanenone <i>O</i> -hexoside-hexoside	Megastigmanes	proposed
2	11.32	387.2010	387.2019	C ₁₉ H ₃₁ O ₈	-2.3	225.1482, 207.1377	Dihydroxy-megastigmadienone <i>O</i> -hexoside	Megastigmanes	GNPS
3	11.40	389.2168	389.2175	C ₁₉ H ₃₃ O ₈	-1.8	227.1640, 209.1535, 191.1430, 149.0961	Dihydroxy-megastigmanenone <i>O</i> -hexoside	Megastigmanes	GNPS
4	11.42	359.1697	359.1706	C ₁₇ H ₂₇ O ₈	-2.5	197.1171, 179.1076	Hydroxy-dinor-megastigmenolide <i>O</i> -hexoside	Megastigmanes	DNP
5	11.71	391.2326	391.2332	C ₁₉ H ₃₅ O ₈	-1.5	373.2173, 229.1797, 211.1698, 193.1590	Dihydroxy-megastigmanone <i>O</i> -hexoside	Megastigmanes	DNP
6	12.95	503.1909	503.1917	C ₂₆ H ₃₁ O ₁₀	-1.6	485.1793, 341.1381, 323.1273, 311.1274, 251.1064, 175.0753, 137.0598	Glycosylated lignan	Lignans	GNPS
7	13.13	533.2010	533.2023	C ₂₇ H ₃₃ O ₁₁	-2.4	373.2223, 371.1484, 353.1370, 341.1386, 281.1166, 211.1688, 167.0704	Glycosylated lignan	Lignans	DNP
8	13.17	535.2748	535.2755	C ₂₅ H ₄₃ O ₁₂	-1.2	373.2220, 211.1693, 193.1591	Hydroxy-megastigmanenone <i>O</i> -hexoside-hexoside	Megastigmanes	DNP

Table S2. (Continued)

Peak	RT (min.)	[M+H] ⁺ Observed Mass (<i>m/z</i>)	Calculated Mass (<i>m/z</i>)	Molecular Formula	Error (ppm)	MS ² Fragments (<i>m/z</i>)	Annotated compounds	Chemical class ^a	Reference/ Database ^b
9	13.22	373.2220	373.2226	C ₁₉ H ₃₃ O ₇	-1.7	211.1692, 193.1591	Hydroxy-megastigmanenone <i>O</i> -hexoside	Megastigmanes	GNPS
10	13.23	507.2799	507.2805	C ₂₄ H ₄₃ O ₁₁	-1.3	375.2375, 295.1028, 213.1846, 195.1748, 177.1638	Hydroxy-megastigmanone <i>O</i> -hexoside-pentoside	Megastigmanes	proposed
11	13.88	371.2062	371.2070	C ₁₉ H ₃₁ O ₇	-2.1	209.1537, 191.1433, 137.0963, 133.1013	Hydroxy-megastigmadienone <i>O</i> -hexoside	Megastigmanes	DNP
12	13.90	505.2641	505.2649	C ₂₄ H ₄₁ O ₁₁	-1.6	373.2228, 211.1694, 193.1591, 175.1484, 135.1169	Hydroxy-megastigmanenone <i>O</i> -pentoside-hexoside	Megastigmanes	GNPS
13	14.02	419.1703	419.1706	C ₂₂ H ₂₇ O ₈	-0.7	265.1066, 235.0970, 217.0861, 205.0858, 167.0706	(<i>epi</i>)syringaresinol	Lignans	GNPS
14	14.79	1191.5798	1191.5793	C ₅₇ H ₉₁ O ₂₆	-0.1	1011.5175, 883.4755, 865.4605, 737.4099, 719.3978, 591.3523, 429.3000, 411.2892, 393.2784, 293.1229, 239.0909	<i>O</i> -(hexoside-deoxyhexoside-deoxyhexoside-hexoside) spirostadienediol	Spirostane steroids	proposed
15	16.14	1175.5872	1175.5903	C ₅₀ H ₉₅ O ₃₀	-3.1	1013.5320, 867.4727, 721.4127, 575.3576, 413.3050, 293.1226, 271.2055, 253.1950	<i>O</i> -(hexoside-deoxyhexoside-deoxyhexoside-hexoside) spirostadienol	Spirostane steroids	proposed
16	16.24	737.4114	737.4112	C ₃₉ H ₆₁ O ₁₃	0.2	575.3575, 433.2591, 271.2055, 253.1950	<i>O</i> -(hexoside-hexoside) spirostadienol	Spirostane steroids	DNP
17	16.26	1177.6013	1177.6006	C ₅₇ H ₉₃ O ₂₅	0.6	1015.5476, 869.4884, 723.4309, 577.3732, 415.3206, 253.1946	<i>O</i> -(hexoside-deoxyhexoside-deoxyhexoside-hexoside) spirostenol	Spirostane steroids	DNP

Table S2. (Continued)

Peak	RT (min.)	[M+H] ⁺ Observed Mass (<i>m/z</i>)	Calculated Mass (<i>m/z</i>)	Molecular Formula	Error (ppm)	MS ² Fragments (<i>m/z</i>)	Annotated compounds	Chemical class ^a	Reference/ Database ^b
18	16.31	885.4837	885.4848	C ₄₅ H ₇₃ O ₁₇	-1.2	723.4308, 579.3136, 577.3747, 433.2568, 415.3205, 397.3110, 271.2053, 253.1952	<i>O</i> -(hexoside-deoxyhexoside-hexoside) spirostenol	Spirostane steroids	DNP
19	17.98	739.4265	739.4269	C ₃₉ H ₆₃ O ₁₃	-0.5	577.3715, 415.3210, 271.2058, 253.1955	<i>O</i> -(hexoside-hexoside) spirostenol	Spirostane steroids	DNP
20	21.08	1029.5262	1029.5265	C ₅₁ H ₈₁ O ₂₁	-0.8	883.4658, 737.4097, 591.3513, 429.2995, 411.2889, 285.1846	<i>O</i> -(deoxyhexoside-deoxyhexoside-deoxyhexoside-hexoside) spirostenone	Spirostane steroids	DNP
21	21.6	575.3576	575.3584	C ₃₃ H ₅₁ O ₈	-1.4	433.2572, 271.2050, 253.1946, 157.1015	<i>O</i> -hexoside spirostadienol	Spirostane steroids	DNP
22	21.85	1031.5419	1031.5427	C ₅₁ H ₈₃ O ₂₁	-0.8	885.4804, 739.4283, 721.4152, 593.3662, 575.3575, 431.3151, 413.3046, 395.2939, 293.1229	<i>O</i> -(deoxyhexoside-deoxyhexoside-deoxyhexoside-hexoside) spirostenediol	Spirostane steroids	DNP
23	22.39	1029.5262	1029.5270	C ₅₁ H ₈₁ O ₂₁	-0.8	883.4658, 737.4097, 591.3513, 429.2995, 411.2889, 285.1846	<i>O</i> -(deoxyhexoside-deoxyhexoside-deoxyhexoside-hexoside) spirostenone	Spirostane steroids	DNP
24	24.19	721.4154	721.4163	C ₃₉ H ₆₁ O ₁₂	-1.3	579.3109, 575.3719, 413.3037, 395.2923, 271.2062, 253.1947	<i>O</i> -(deoxyhexoside-hexoside) spirostadienol	Spirostane steroids	DNP
25	24.3	413.3048	413.3056	C ₂₇ H ₄₁ O ₃	-1.9	271.2059, 253.1947, 157.1015	spirostadienol	Spirostane steroids	GNPS
26	24.98	1015.5468	1015.5478	C ₅₁ H ₈₃ O ₂₀	-1.0	869.4887, 723.4314, 577.3733, 415.3204	<i>O</i> -(deoxyhexoside-deoxyhexoside-deoxyhexoside-hexoside) spirostenol	Spirostane steroids	DNP
27	25.11	577.3737	577.3740	C ₃₃ H ₅₃ O ₈	-0.6	433.2581, 415.3195, 271.2051, 253.1948, 157.1011	<i>O</i> -hexoside spirostenol	Spirostane steroids	DNP

Table S2. (Continued)

Peak	RT (min.)	[M+H] ⁺ Observed Mass (<i>m/z</i>)	Calculated Mass (<i>m/z</i>)	Molecular Formula	Error (ppm)	MS ² Fragments (<i>m/z</i>)	Annotated compounds	Chemical class ^a	Reference/ Database ^b
28	25.15	723.4317	723.4320	C ₃₉ H ₆₃ O ₁₂	-0.4	579.3164, 433.2581, 415.3211, 397.3094, 271.2054, 253.1949	<i>O</i> -(deoxyhexoside-deoxyhexoside) spirostenol	Spirostane steroids	DNP
29	26.05	869.4892	869.4899	C ₄₅ H ₇₃ O ₁₆	-0.8	577.3746, 415.3214, 271.2059, 253.1953	<i>O</i> -(deoxyhexoside-deoxyhexoside-hexoside) spirostenol	Spirostane steroids	GNPS
30	26.92	415.3206	415.3212	C ₂₇ H ₄₃ O ₃	-1.5	271.2057, 253.1955, 157.1018	spirostenol	Spirostane steroids	GNPS

^a Chemical class annotations were assigned using the NPClassifier [21]; ^b Database source: GNPS [13] and Dictionary of Natural Products [18].

CAPÍTULO II – ARTIGO 2

Atividade antitumoral em adenocarcinoma de cólon (SW480) de frações enriquecidas em diterpenos clerodânicos obtidas de *Casearia arborea* (Salicaceae).

Atividade antitumoral em adenocarcinoma de cólon (SW480) de frações enriquecidas em diterpenos clerodânicos obtidas de *Casearia arborea* (Salicaceae).

Rodrigues LA^a, Almeida AA^a, Souza JRR^a, Paiva SIS^a, Torres CMME^b, Oliveira LL^c, Bressan GC^a, Leite JPV^a.

^aDepartamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, 36570-900 Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

^bDepartamento de Engenharia Florestal, Universidade Federal de Viçosa, 36570-900 Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

^cDepartamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, 36570-900 Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

Resumo

O câncer de cólon é responsável por quase 10% dos óbitos em pacientes portadores de câncer. A busca pela redução da taxa de mortalidade vem sendo objetivo da ciência através da descoberta de novos agentes quimioterápicos. Os produtos naturais têm demonstrado eficácia na inibição da proliferação e invasão dos tumores, sendo por isso, considerados moléculas promissoras para o desenvolvimento de novas drogas antitumorais. O objetivo deste trabalho foi bioprospectar produtos naturais ativos em *Casearia arborea* e avaliar a sua atuação em alguns mecanismos utilizados para o desenvolvimento de adenocarcinoma de cólon (SW480). Inicialmente foram coletadas folhas de *C. arborea* e produzido extratos utilizando a metodologia de percolação exaustiva seriada com os solventes hexano, diclorometano, acetato de etila e etanol. Em uma triagem inicial, foi avaliado o potencial citotóxico desses extratos pelo método de MTT em três linhagens tumorais, SW480, MDA-MB-231 (câncer de mama) e Hep G2 (câncer de fígado). A partir desta triagem, observou-se que os produtos naturais ativos se concentraram no extrato produzido em diclorometano. Esse extrato foi submetido ao fracionamento cromatográfico utilizando coluna de sílica gel onde obteve-se 32 grupos. Em uma segunda triagem, os grupos foram avaliados em uma única concentração (10 µg/mL) em SW480. Como resultado, 4 grupos apresentaram inibição da viabilidade celular $\geq 80\%$, assim esses grupos foram avaliados quanto a concentração que inibe 50% do crescimento celular (IC₅₀). Os grupos denominados G16, G17 e G22 apresentaram os menores valores de IC₅₀.

Esses grupos foram submetidos a prospecção fitoquímica, no qual foi identificado diterpenos clerodânicos, indicando um enriquecimento desses produtos naturais nesses grupos. Posteriormente foram realizados os ensaios de formação de colônia, migração, morte celular e avaliação do ciclo celular. Os grupos G16, G17 e G22 apresentaram redução na formação de clones e migração de SW480, e os grupos G16 e G17 induziram a morte celular por apoptose. Além disso, o grupo G17 atuou na distribuição do ciclo celular reduzindo a porcentagem de células na fase G0/G1. Através de uma estratégia eficiente foi possível chegar em frações enriquecidas em diterpenos clerodânicos obtidas de *C. arborea*, que demonstraram afetar processos importantes para o desenvolvimento e progressão do câncer de cólon.

Palavras-chave: *Casearia arborea*, diterpenos clerodânicos, câncer de cólon, metástase, morte celular.

1. Introdução

O câncer é a segunda principal causa de morte em todo mundo, sendo o responsável por 10 milhões de óbitos em 2020. Os tipos de câncer mais comuns são os de pulmão, mama e cólon. Em 2020, o câncer de cólon acometeu 1,9 milhões de pessoas, sendo o segundo tipo de câncer que mais leva a óbito [1]. Por ser um câncer muito agressivo, metastático e com características muito heterogêneas, se faz necessário a busca por quimioterápicos eficazes [2].

Os produtos naturais se consagraram como importantes compostos direcionados ao desenvolvimento de medicamentos usados na terapia clínica, principalmente contra o câncer [3]. Recentemente um número expressivo de fármacos com origem em produtos naturais foram aprovados para serem usados na terapia clínica [4]. Sendo assim, a busca de novos quimioterápicos a partir de produtos naturais é uma forte tendência que assegura a descoberta de compostos com uma grande diversidade química e com alto potencial antitumoral [5]. Os produtos naturais são capazes de atuar em vários mecanismos utilizados pelas células cancerígenas para o desenvolvimento e progressão do tumor, dentre esses, impedindo o surgimento de metástases, induzindo a morte celular por apoptose ou afetando a divisão celular ao bloquear fases do ciclo celular [6].

Os produtos naturais isolados da espécie *Casearia arborea*, como diterpenos do tipo clerodânicos, possuem atividade citotóxica confirmada contra diversos tipos de câncer [7]. Em trabalhos anteriores (Capítulo I – Artigo 1), nosso grupo de pesquisa relatou a atividade de *C. arborea* em adenocarcinoma de cólon e atribuiu essa atividade aos diterpenos do tipo

clerodânicos. Assim, o objetivo desse trabalho foi bioprospectar os produtos naturais bioativos de *Casearia arborea* e avaliar sua atividade em alguns mecanismos utilizados pelas células tumorais para o desenvolvimento e progressão do adenocarcinoma de cólon.

2. Materiais e métodos

2.1 Material vegetal e produção dos extratos

Folhas de *C. arborea* foram coletadas em fragmento de Mata Atlântica localizado no município de Viçosa, Minas Gerais (20° 45' 14" S e 42° 52' 53" W). O registro de autorização de coleta foi obtido pelo Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen), número de cadastro AA515AD. A identificação botânica foi realizada por Ronaldo Marquete e a exsicata depositada no Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro – RJ, sobre número de tombo RB 808529. Após a secagem em estufa ventilada à temperatura abaixo de 40 °C, as folhas foram trituradas em moinho de faca. Em seguida, 1,0 kg de folhas secas foi submetido à extração por percolação seriada empregando sucessivamente hexano, diclorometano, acetato de etila e etanol, de forma exaustiva. Todos os extratos foram evaporados até a secura, sob vácuo, usando um evaporador rotativo a 40 °C e, posteriormente, liofilizados e pesados. Ao final foram obtidos os extratos secos em hexano (27,3 g), diclorometano (30 g), acetato de etila (8,13 g) e etanol (30 g).

2.2 Cultivo celular

As linhagens celulares utilizadas nesse trabalho foram Hep G2 (carcinoma hepatocelular), MDA-MB-231 (adenocarcinoma de mama), SW480 (adenocarcinoma de cólon). A cultura em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 2 mM de L-glutamina e 100 U/ml de penicilina foi usado para cultivo das linhagens. Essas células foram mantidas em atmosfera controlada com 95% ar, 5% de CO₂ a 37 °C. Para os ensaios, as células foram coletadas por digestão enzimática (tripsina/EDTA).

2.3 Avaliação da atividade citotóxica

Para avaliação da atividade citotóxica desses extratos foi realizado o ensaio pelo método MTT determinando a concentração que inibe 50% do crescimento celular (IC₅₀). As células foram semeadas em placas de 96 poços a uma densidade celular apropriada para cada linhagem: [Hep G2 (1 x 10⁴); MDA-MB-231 (0,65 x 10⁴) e SW480 (0,7 x 10⁴)]. Após 24h, as culturas foram tratadas com os diferentes extratos em concentrações que variam de 100 a 1,56 µg/mL.

O dimetilsulfóxido (DMSO), veículo usado para a solubilização das amostras, foi utilizado como controle negativo em uma concentração de 0,4% (v/v). Após as 48 h, 10 µL de MTT a 5 mg/mL foram adicionados a cada poço e incubados por 3 h. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e 100 µL de DMSO foi adicionado a cada poço para solubilizar os cristais de Formazan. A absorbância foi determinada por quantificação espectrofotométrica em 540nm. O IC₅₀ foi calculado por uma análise de regressão não linear usando o software estatístico GraphPad Prisma 6 a partir da curva de viabilidade celular pela concentração do extrato.

2.4 Fracionamento biomonitorado

2.4.1 Fracionamento cromatográfico

O extrato diclorometânico das folhas de *C. arborea* (15,0 g), com comprovada atividade citotóxica, foi adsorvido em Si gel (3 g), introduzido no topo da coluna de gel de Si (70-270 Mesh/ 240 g/ 30 x 5 cm) e eluído com gradiente de hexano, seguido por hexano-diclorometano e, posteriormente, diclorometano-acetato de etila, coletando-se frações de 100 mL. Foram coletadas um total de 427 frações. Após as frações serem submetidas à análise por Cromatografia em camada delgada (CCD), foram reunidas em 32 grupos, por similaridade dos perfis fitoquímicos. Todos os grupos foram submetidos à secagem e, posteriormente, à análise de citotoxicidade.

2.4.2 Avaliação da atividade citotóxica

A atividade citotóxica dos 32 grupos foi determinada pelo ensaio em MTT descrito em 2.3. Inicialmente, foi feita uma triagem ao qual avaliou a viabilidade celular de SW480 obtida após o tratamento dos grupos em uma concentração de 10 µg/mL. Para todos os grupos que reduziram a viabilidade celular nesta concentração em 80% ou mais foi determinado o IC₅₀ para linhagem SW480.

2.4.3 Prospecção fitoquímica dos grupos ativos

Os grupos ativos foram submetidos a prospecção fitoquímica para investigar a presença de terpenos utilizando cromatografia em camada delgada, empregando como fase estacionária cromatofolha de sílica gel F254 e revelador específico Liberman-Burchard.

2.5 Ensaios biológicos os com grupos ativos

2.5.1 Formação de colônia

Este ensaio avalia a sobrevivência e a capacidade das células em formar clones [8]. Foram semeadas 1000 células de SW480 em poços de placas de 6 poços contendo 2 mL de meio DMEM suplementado com 10% de SFB. Após 24 horas foi adicionado os grupos ativos nas concentrações de $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$ e $\frac{3}{4}$ do valor de IC_{50} , bem como DMSO (0,4% v/v) nos poços de controle negativo. Após 24 horas o meio de cultivo foi retirado e trocado por meio DMEM suplementado com 2% de SFB. Essas placas foram armazenadas em estufa de CO_2 a 5% umidificada a 37 °C por 9 dias. No nono dia, as colônias foram fixadas e coradas com solução de azul de toluidina (0,5% v/v) e metanol (20% v/v). O número total de colônias foi contado usando o software ImageJ.

2.5.2 Migração

Este ensaio avalia a capacidade do composto em inibir a motilidade celular impedindo a cicatrização de feridas [9]. Foram semeadas 4×10^5 células de SW480 em poços de placas de 24 poços contendo 1 mL de meio DMEM suplementado com 10% de SFB. Após 24h, a monocamada de células com confluência de 80% foi então riscada com uma ponta de pipeta estéril de 200 μ L. Posteriormente, os poços foram lavados e adicionados 1 mL de meio DMEM suplementado com 10% de SFB. Em seguida, foi adicionado os grupos ativos nas concentrações de $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$ e $\frac{3}{4}$ do valor de IC_{50} , bem como DMSO (0,4% v/v) nos poços de controle negativo. Após 72h, foram capturadas as imagens usando um microscópio invertido (Evos FL, ThermoFisher Scientific, MA, EUA). A área de fechamento da ferida foi determinada usando o software ImageJ e a porcentagem de migração celular foi calculada em relação ao controle.

2.5.3 Apoptose

Foi avaliada a morte por apoptose pela detecção da expressão de fosfatidilserina usando Anexina V-FITC [10]. Em placas de 24 poços foram semeadas $2,5 \times 10^5$ células de SW480 por poço contendo 1 mL de meio DMEM suplementado com 10% de SFB. Após 24h, foi adicionado os grupos ativos na concentração de $\frac{3}{4}$ do valor de IC_{50} , bem como DMSO (0,4% v/v) nos poços de controle negativo. Depois de 24h, as células foram retiradas das placas e passadas para microtubo, centrifugadas e ressuspendidas em 300 μ l de meio DMEM sem SFB. Em cada microtubo foi adicionado 3 μ l de Anexina V-FITC e incubadas sobre abrigo da luz por 2h. Nos 15 min que antecede a leitura, foram adicionados 2,5 μ l de Iodeto de propídeo (100 μ g/mL)

para avaliar a apoptose tardia. As amostras celulares então foram analisadas utilizando Citômetro de Fluxo (BD FACSVersTM).

2.5.4 Ciclo celular

A análise de ciclo celular foi realizada para avaliar o conteúdo de DNA através da coloração com Iodeto de propídeo [11]. Em placas de 24 poços foram semeadas $2,5 \times 10^5$ células de SW480 por poço contendo 1 mL de meio DMEM suplementado com 10% de SFB. Após 24h, foi adicionado os grupos ativos na concentração de $\frac{3}{4}$ do valor de IC₅₀, bem como DMSO (0,4% v/v) nos poços de controle negativo. Após 24h, as células foram retiradas das placas e passadas para microtubo, centrifugadas e ressuspendidas em etanol 70% (v/v), centrifugadas novamente e ressuspendidas em 200 µL de RNase (0,2 mg/mL) e 5 µL de Iodeto de propídeo (1 mg/mL). Posteriormente, as amostras celulares foram incubadas sobre abrigo da luz em estufa a 37 °C por 3h e analisadas utilizando Citômetro de Fluxo (BD FACSVersTM).

2.6 Análises estatísticas

As diferenças estatísticas foram determinadas por ANOVA seguida de pós-teste de Dunnet. Os resultados foram considerados significativos com $p < 0,05$. O software estatístico GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., CA, EUA) foi usado para analisar esses dados. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

3. Resultados e discussões

3.1 Fracionamento biomonitorado e prospecção fitoquímica.

A atividade citotóxica dos extratos de *Casearia arborea* em linhagens tumorais (Hep G2, MDA-MB-231 e SW480) foi determinada pelo ensaio de MTT. Nesta primeira triagem, o extrato em diclorometano apresentou o menor valor de IC₅₀ para todas as linhagens tumorais testadas (**Tabela 01**), sendo, portanto, o mais citotóxico. A partir destes resultados, o extrato em diclorometano foi selecionado para fracionamento cromatográfico utilizando coluna de sílica gel. Ao final do processo obteve-se 32 grupos. Estes grupos foram reavaliados na concentração de 10 µg/mL a fim de determinar a inibição da viabilidade celular em SW480 (**Figura 1**).

Tabela 01. Atividade citotóxica dos extratos de folhas de *Casearia arborea* produzidos por percolação seriada exaustiva frente a linhagens tumorais pelo método de MTT.

Extrato	Linhagens celulares (IC ₅₀ µg/mL)		
	SW480	MDA-MB-231	HEPG2
Hexano	35,40±2,5	21,45±3,26	42,32±4,84
Diclorometano	3,83±1,03	5,37±0,47	12,39±0,37
Acetato de Etila	ID	ID	ID
Etanol	ID	ID	ID

*ID= IC₅₀ indeterminado. **Controle negativo considerado 100% de viabilidade celular: DMSO (0,4% v/v).

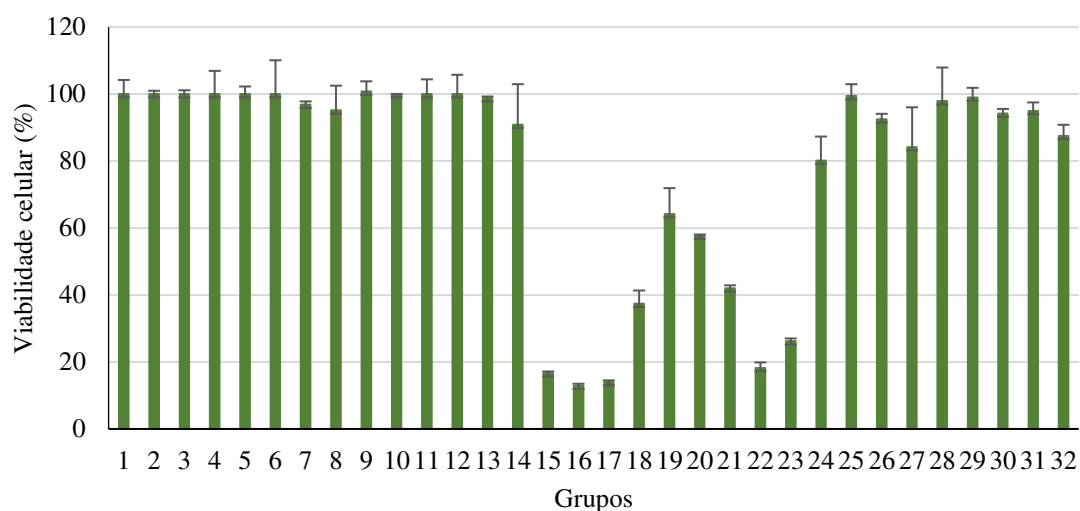


Figura 1. Viabilidade celular (%) de SW480 após tratamento com 32 grupos (10 µg/mL) obtidos por fracionamento cromatográfico do extrato de folhas de diclorometano de *Casearia arborea* pelo método MTT. *Controle negativo considerado 100% de viabilidade celular: DMSO (0,4% v/v).

Os grupos 15, 16, 17 e 22 reduziram a viabilidade celular em 80% ou mais (**Figura 1**) sendo selecionados para determinação do IC₅₀ em SW480 pelo método MTT. Após essa avaliação, obtivemos os seguintes valores de IC₅₀, G15 de 9,18±0,61 µg/mL, G16 de 3,90±0,54 µg/mL, G17 de 5,95±1,04 µg/mL e G22 de 4,22±0,25 µg/mL. Dessa forma, os grupos que apresentaram menores valores de IC₅₀ e, portanto, maior atividade citotóxica concentrando os compostos ativos foram G16, G17 e G22. Esses grupos foram submetidos a prospecção fitoquímica, identificando a classe de produtos naturais terpenos, em concordância com trabalhos anteriores (Capítulo 1- Artigo 1) que identificaram majoritariamente em *C. arborea* a presença de diterpenos do tipo clerodânicos. Este resultado demonstra que a extração seletiva de produtos naturais com atividade biológica é otimizada na escolha do melhor solvente extrator e na eliminação de compostos interferentes através do fracionamento cromatográfico [12]. Assim, os grupos mais citotóxicos (G16, G17 e G22) foram analisados quanto a outros

parâmetros biológicos relacionados ao desenvolvimento e progressão do câncer de cólon (SW480).

3.2 Ensaios biológicos com os grupos ativos

O ensaio de formação de colônia ou ensaio de clonogenicidade avaliou a capacidade das células tratadas com extrato de folhas em diclorometano (EFDM) e com os grupos G16, G17 e G22 em formar clones. Após os tratamentos, observou-se que em todas as concentrações testadas, houve redução significativa ($P < 0,001$) na formação de colônias em relação ao controle (**Figura 2**), que foi de 210 colônias. Quando comparados os grupos em relação ao EFDM foi notado uma grande redução no número de colônias. Por exemplo, na maior concentração testada, $\frac{3}{4}$ do IC_{50} , o EFDM com cerca de 100 colônias foram formadas, G22 formaram-se 4 colônias e os grupos G16 e G17 nenhuma colônia foi observada.

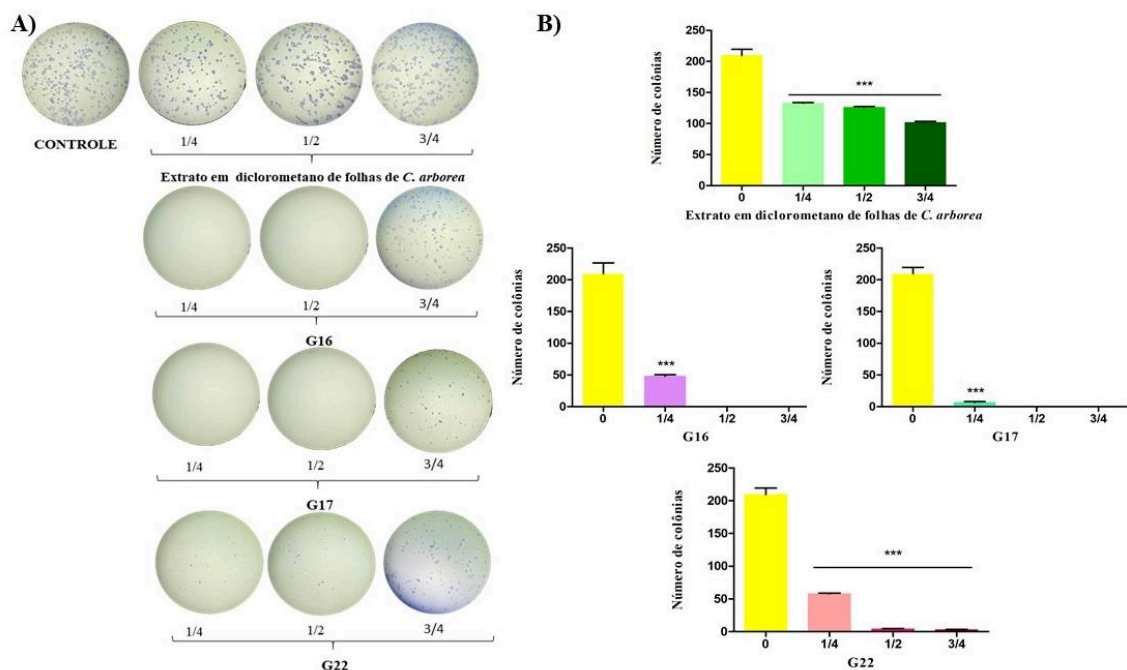


Figura 2. Efeito do extrato de folhas em diclorometano de *Casearia arborea* e dos grupos enriquecidos em diterpenos clerodânicos G16, G17 e G22 sobre a formação de colônias em células SW480. (A) Imagem representativa do ensaio de formação de colônia em que as células foram coradas com azul de toluidina. (B) Quantificação dos clones formados após o tratamento com o extrato em diclorometano de *C. arborea* e dos grupos G16, G17 e G22. *Os tratamentos foram feitos em concentrações abaixo do valor de IC_{50} , sendo, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$, $\frac{3}{4}$ do valor do IC_{50} . ** A estatística foi aplicada em relação aos resultados (média ± DP) do controle negativo (DMSO 0,4% v/v) e obtidas por ANOVA unidirecional com pós-teste de Dunnett (***P < 0,001).

O método utilizado para determinar o efeito migratório *in vitro* das células de SW480 consiste em um risco na monocamada celular e a observação através da captura de imagens do

fechamento dessa “ferida” pela motilidade das células, sendo um método que imita a migração celular *in vivo* na cicatrização de feridas [13].

Ao analisar o potencial migratório de SW480 foi observado uma redução significativa na porcentagem de migração dos tratamentos nas concentrações mais altas testadas, $\frac{1}{2}$ e $\frac{3}{4}$ do IC_{50} , em relação ao grupo controle (**Figura 3**). Ao compararmos os tratamentos, observamos uma redução ainda mais alta dos grupos em relação ao EFDM. Em destaque, os grupos G16 e G17, reduziram significativamente o percentual de migração para menos de 20% a partir da concentração igual a $\frac{1}{2} IC_{50}$.

A migração celular é fundamental para o desenvolvimento do câncer pois as células precisam migrar para colonizar outros órgãos sendo o passo inicial da metástase, isso ocorre através de interações célula-célula e célula-meio extracelular [14].

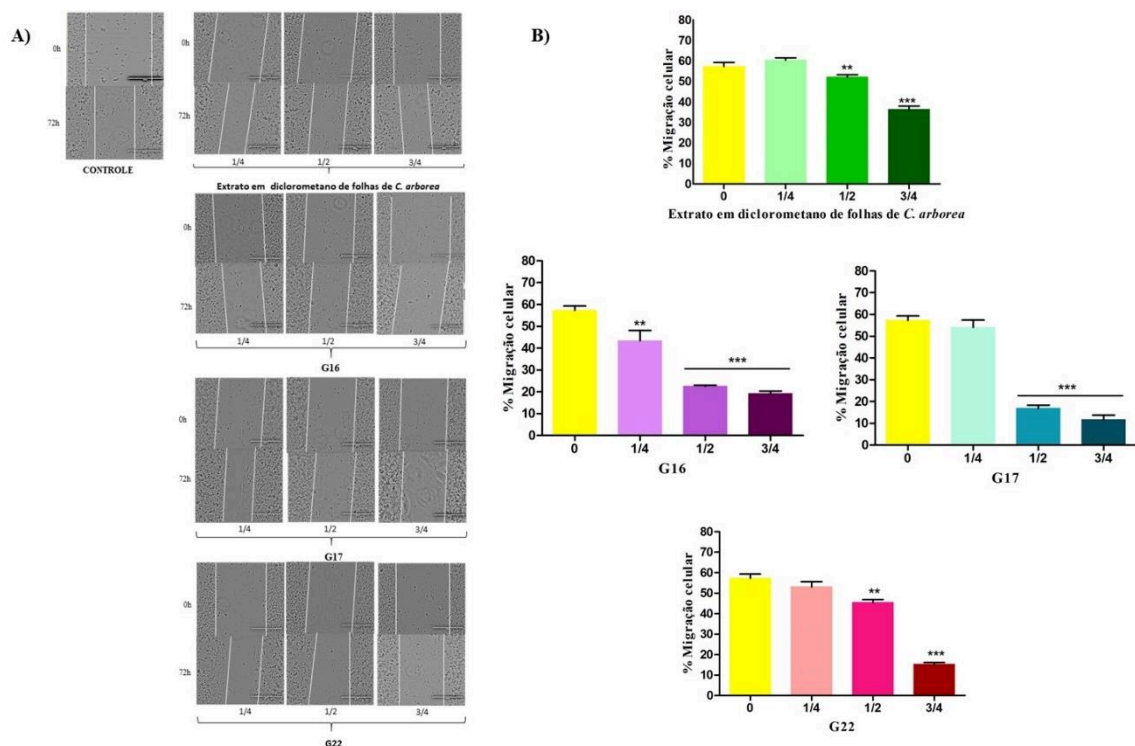


Figura 3. Efeito do extrato de folhas em diclorometano de *Casearia arborea* e dos grupos enriquecidos em diterpenos clerodânicos G16, G17 e G22 sobre a migração de células SW480. (A) Imagem representativa do ensaio de migração após incubação em um aumento de 100x. (B) Percentual (%) de migração celular após o tratamento com o extrato em diclorometano de *C. arborea* e dos grupos G16, G17 e G22. *Os tratamentos foram feitos em concentrações abaixo do valor de IC_{50} , sendo, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$, $\frac{3}{4}$ do valor do IC_{50} . ** A largura da ferida foi medida e a porcentagem de migração celular foi expressa como a média \pm DP da diferença de largura no tempo de 72 horas em relação a 0 horas. A estatística foi aplicada em relação aos resultados do controle negativo (DMSO 0,4% v/v) e obtidas por ANOVA unidirecional com pós-teste de Dunnett (** P <0,01; ***P < 0,001).

A morte por apoptose foi investigada em citômetro de fluxo utilizando a marcação com anexina V-FITC e iodeto de propídeo. Os grupos G16 e G17 induziram a morte celular preferencialmente por apoptose (**Figura 4**). Na concentração testada de $\frac{3}{4}$ do IC₅₀, estes grupos apresentam significativo aumento de células em apoptose quando comparadas ao controle negativo, ao EFDm e ao G22. A porcentagem de células em apoptose foi de 20% e 30% para os grupos G16 e G17, respectivamente.

A morte celular por apoptose é um evento naturalmente programado, no entanto, caso ocorra um desequilíbrio deste processo bioquímico, muitas doenças como câncer podem acontecer. Devido a essa desregulação pela inibição de vias apoptóticas, drogas anticâncer que induzem a apoptose são relevantes [15-16].

A distribuição do ciclo celular de SW480 foi analisada em citometria de fluxo usando a coloração com iodeto de propídeo. Os resultados (**Figura 4**) demonstram que, na concentração testada ($\frac{3}{4}$ do IC₅₀), apenas o grupo G17 alterou significativamente ($P < 0,01$) o ciclo celular reduzindo a fase G₀/G₁.

As mutações ocorridas na divisão celular de células cancerígenas perturbam o controle do ciclo celular levando a uma divisão contínua e excessiva, as células tumorais criam vários mecanismos para impedir que essas células saiam do ciclo e ainda assim se mantenham viáveis [17].

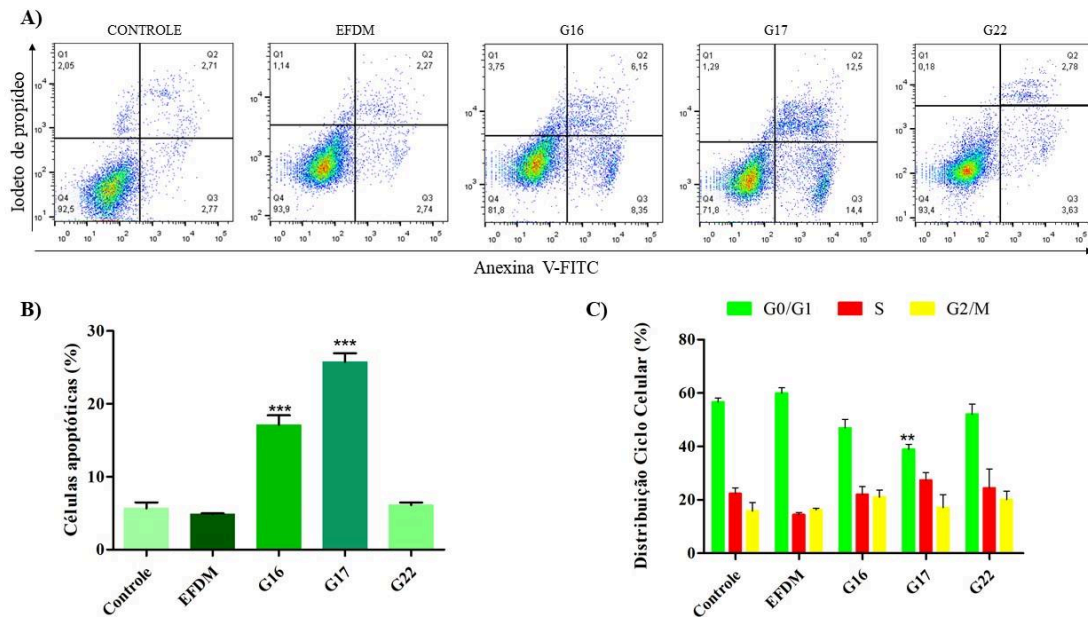


Figura 4. Efeito do extrato de folhas em diclorometano de *Casearia arborea* (EFDM) e dos grupos enriquecidos em diterpenos clerodânicos G16, G17 e G22 sobre a morte celular e o ciclo celular de SW480. **A)** Análise em citômetro de fluxo demonstrando a coloração com anexina V-FITC e iodeto de propídeo. **B)** Percentual (%) de células apoptóticas. **C)** Percentual (%) de distribuição do ciclo celular. *Os tratamentos foram feitos na concentração de $\frac{3}{4}$ do valor do IC_{50} . ** A estatística foi aplicada em relação aos resultados (média \pm DP) do controle negativo (DMSO 0,4% v/v) e obtidas por ANOVA unidirecional com pós-teste de Dunnett (** P < 0,01; ***P < 0,001).

Dessa forma, observou-se que os compostos ativos de *C. arborea* em concentrações não citotóxicas reduziu significativamente a formação de clones e a migração celular, além de induzir a morte por apoptose e interferir no ciclo celular de células de adenocarcinoma de cólon.

Os terpenos possuem grande potencial anticâncer podendo atuar como uma importante ferramenta terapêutica, e muitas pesquisas vêm sendo realizadas a fim de comprovar esse potencial contra diversas vias de desenvolvimento do câncer [18]. Mais especificamente, as casearinas, um tipo de diterpeno clerodânico isolado do gênero *Casearia*, possuem relatos de citotoxicidade contra diversos tipos de câncer desde 1990 [19], além de apresentarem indução de apoptose, bloqueio de ciclo celular e inibição clonogênica [20-21], como observado para os grupos enriquecidos em terpenos G16, G17 e G22. Dessa forma, os resultados deste estudo são relevantes haja visto que o câncer de cólon é agressivo, metastático e com altas taxas de mortalidade, causado por mutações heterogêneas que tem como alvo genes supressores de tumor e oncogenes [2].

4. Conclusão

A bioprospecção molecular em *Casearia arborea* empregando uma estratégia eficiente de triagem e fracionamento bioguiado permitiu a obtenção de frações enriquecidas em terpenos com potencial atividade anticlonogênica, antimigratória, além de demonstrar redução do ciclo celular na fase G0/G1 e a indução de morte por apoptose em células tumorais de câncer de cólon. Os terpenos presentes nos grupos ativos confirmam uma correlação entre o composto e a atividade biológica observada. Mais estudos para purificação e confirmação estrutural destes compostos fazem-se necessários.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; Outorga: GD 142313 / 2015-7) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG; Outorga: CDS - APQ-02540-15) pelo apoio financeiro. Ao Núcleo de Microanálise e Microscopia da Universidade Federal de Viçosa pelo apoio na realização dos experimentos.

Conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesses potencial.

Referencias

- [1] World Health Organization (WHO). **Cancer**. Sing in: < <http://www.who.int/cancer/en/> >Acesso: 13/06/2022.
- [2] Kuipers EJ, Grady WM, Lieberman D, Seufferlein T, Sung JJ, Boelens PG, Van de Velde CJH, Watanabe T. Colorectal cancer. **Nat Rev**. 2015; 1(1):1-25.
- [3] Atanasov AG, Zotchev SB, Dirsch VM, Supuran, CT. Natural products in drug discovery: advances and opportunities. **Nat Rev**.2021; 20(3):200-216.
- [4] Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. **J Nat Prod**. 2020; 83(3):770-803.
- [5] Chen H, Li R, Zhang F, Yao Q, Guo Y. A scientometric visualization analysis for natural products on cancer research from 2008 to 2020. **Front Pharmacol**. 2021; 12:650141.

- [6] Pistollato F, Giampieri F, Battino M. The use of plant-derived bioactive compounds to target cancer stem cells and modulate tumor microenvironment. **Food Chem Toxicol.** 2015; 75:58-70.
- [7] Beutler JA, McCall KL, Herbert K, Herald DL, Pettit GR, Johnson T, Shoemaker RH, Boyd MR. Novel cytotoxic diterpenes from *Casearia arborea*. **J Nat Prod.** 2000; 63(5):657-61.
- [8] Franken NA, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, Van Bree C. Clonogenic assay of cells *in vitro*. **Nat Protoc.** 2006; 1(5):2315-2319.
- [9] Rodriguez LG, Wu X, Guan JL. Wound-healing assay. **Methods Mol Biol.** 2005; 294:23-29.
- [10] Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, Van Oers MH. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. **Blood.** 1994; 84(5):1415-1420.
- [11] Pozarowski P, Darzynkiewicz Z. Analysis of cell cycle by flow cytometry. **Methods Mol Biol.** 2004; 2081:301-311.
- [12] Almeida AA, Lima GD, Eiterer M, Rodrigues LA, do Vale JÁ, Zanatta AC, Bressan GC, Oliveira LL, Leite, J. P. A Withanolide-rich fraction of *Athenaea velutina* induces apoptosis and cell cycle arrest in melanoma B16F10 cells. **Planta Med.** 2022; 88(06):429-439.
- [13] Liang CC, Park AY, Guan JL. *In vitro* scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration *in vitro*. **Nat. protoc.** 2007; 2(2):329-333.
- [14] Friedl P, Gilmour D. Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. **Nat Rev.** 2009; 10(7):445-457.
- [15] Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. **Cancer.** 1994; 73(8):2013-2026.
- [16] Pfeffer CM, Singh AT. (2018). Apoptosis: a target for anticancer therapy. **Inter J Mol Sci.** 2018; 19(2):448.
- [17] Matthews HK, Bertoli C, de Bruin RA. Cell cycle control in cancer. **Nat Rev.** 2022; 23(1):74-88.

- [18] Islam MT. Diterpenes and their derivatives as potential anticancer agents. **Phytother Res.** 2017; 31(5):691-712.
- [19] Itokawa H, Totsuka N, Morita H, Takeya K, Iitaka Y, Schenkel EP, Motidome M. (1990). New antitumor principles, casearins AF, for *Casearia sylvestris* Sw.(Flacourtiaceae). **Chem Pharm Bull.** 1990; 38(12):3384-3388.
- [20] Ferreira-Silva GA, Lages CCL, Sartorelli P, Hasegawa FR, Soares MG, Ionta M. Casearin D inhibits ERK phosphorylation and induces downregulation of cyclin D1 in HepG2 cells. **Toxicol.** 2017; 38:27-32.
- [21] Ferreira PMP, Santos DB, Silva JN, Goudinho AF, Ramos CLS, Souza PC, Almeida RSC, Mourad DS, Oliveira R, Grisolia CK, Cavalleiro AJ, Calvalcante AACM, Ferreira JRO, Morais Filho MO, Pessoa C. Toxicological findings about an anticancer fraction with casearins described by traditional and alternative techniques as support to the Brazilian Unified Health System (SUS). **J Ethnopharmacol.** 2019; 241:112004.

CAPÍTULO III – ARTIGO 3

Novos diterpenos clerodânicos peroxidados identificados em fração antitumoral de
Casearia arborea.

Novos diterpenos clerodânicos peroxidados identificados em fração antitumoral de *Casearia arborea*.

Rodrigues LA^a, Almeida AA^a, Dutra LL^a, Torres CMME^b, Cota BB^c, Brandão GC^d, Bressan GC^a, Leite JPV^a.

^aDepartamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, 36570-900 Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

^bDepartamento de Engenharia Florestal, Universidade Federal de Viçosa, 36570-900 Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

^cInstituto Rene-Rachou, Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Belo Horizonte, Brasil.

^dEscola de Farmácia, Departamento de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, 35400-000 Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil.

Resumo

Os diterpenos clerodânicos são importantes marcadores quimiotaxonômicos com potencial farmacológico para a espécie *Casearia arborea*. Em trabalhos anteriores, obtivemos através de fracionamento biomonitorado uma fração antitumoral enriquecida em diterpenos clerodânicos. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi isolar e identificar novos diterpenos clerodânicos em fração antitumoral de *C. arborea*. A partir do extrato de folhas em diclorometano de *C. arborea* realizou-se o fracionamento cromatográfico e através da análise de dados espectrais empregando técnicas de espectroscopia de massas de alta resolução e por experimentos de Ressonância Magnética Nuclear monodimensionais (RMN de ¹H, ¹³C, DEPT 135) e bidimensionais (HMBC, HSQC e NOESY) foi possível isolar e identificar 3 diterpenos clerodânicos, sendo casearborina B e dois novos diterpenos clerodânicos peroxidados, casearborina F e casearborina G.

Palavras-chave: *Casearia arborea*, diterpenos clerodânicos, casearborina.

1. Introdução

Há anos os produtos naturais vêm sendo isolados de organismos vivos e empregados como agentes farmacológicos em diferentes doenças. Isto deve-se a diversidade química destes compostos, muitas vezes inéditos e com grande dificuldade de serem obtidos por síntese química [1]. Associado a este fato, a biodiversidade brasileira é considerada uma fonte incalculável de substâncias químicas com potencial uso para o desenvolvimento de medicamentos ainda desconhecidos pelos cientistas [2].

O gênero *Casearia* é amplamente distribuído pela África, Ásia, Austrália, Américas e Ilhas do Pacífico, com cerca de pouco mais de 48 mil registros georreferenciados. Ao todo são catalogadas 180 espécies, sendo que, no Brasil, existem cerca de 50 espécies distribuídas pelos biomas [3-4]. Algumas destas espécies, como a *Casearia silvestre*, apresentam relatos de atividade biológica e alguns produtos naturais já foram identificados [5-6]. Entre os compostos isolados de *C. silvestre*, destacam-se os diterpenos do tipo clerodânicos, importantes biomarcadores do gênero [7-8].

A biossíntese química dos diterpenos clerodânicos ocorre a partir do geranylgeranyl pirofostafos com várias vias biosintéticas paralelas que contribuem para a diversidade de compostos químicos presentes nessa classe de produtos naturais [9]. São mais de 1300 compostos já identificados que possuem uma estereoquímica em núcleos decalina e alguns desses compostos apresentam extraordinárias propriedades farmacológicas [8,10].

A espécie *Casearia arborea* (Rich.) Urb. (Salicaceae) tem sido estudada quanto ao seu potencial terapêutico apresentando atividade antimicrobiana, antileishmania e antitumoral [11-13]. Quanto ao perfil fitoquímico, já foram isolados flavonoides, esteroides e diterpenos do tipo clerodânicos [14-15]. Beutler et al. (2000) [13] atribuíram atividade citotóxica a esses diterpenos isolados de *C. arborea*. Trabalhos anteriores (Capítulo II – Artigo 2) demonstraram a atuação de uma fração enriquecida em diterpenos clerodânicos nos processos de desenvolvimento e progressão tumoral. Neste contexto, o objetivo deste trabalho visa isolar e elucidar estruturalmente os diterpenos clerodânicos presentes em fração antitumoral de *Casearia arborea*.

2. Materiais e métodos

2.1 Procedimentos experimentais gerais

HPLC foi realizada usando um sistema em escala semipreparativa em cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu®, constituído de injetor manual, detector no UV modelo SPD-10A-UV, duas bombas modelo LC-6AD e coluna C-18 (Shim-pack®, 5 µM, 20 x 250 mm, i.d.) ou de sílica gel Shim-pack® (5 µM, 20 x 250 mm, i.d.). A cromatografia em camada fina (CCD) foi realizada com placas de sílica gel G60/F254 (0.25 mm, Merck, Darmstadt, Germany). O reagente revelador Lieberman Burchard foi usado para a detecção de terpenos durante o fracionamento. Todos os dados HRESIMS foram obtidos com um espectrômetro de massa Bruker maXis ESI-QTOF (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) acoplado a Shimadzu Nexera HPLC system (Kyoto, Japan), equipado com detector fotodiodo SPD-M20A. Os espectros de RMN foram registrados com um espectrômetro Bruker Ascend 400 (Bruker BioSpin Group, German), operando a 400 MHz (¹H) e 150 MHz (¹³C), com desvios químicos dados em ppm (δ) para análises de RMN ¹H e de ¹³C.

2.2 Material vegetal e obtenção do extrato

Folhas de *C. arborea* foram coletadas em fragmento de Mata Atlântica localizado no município de Viçosa, Minas Gerais (20° 45' 14" S e 42° 52' 53" W). O registro de autorização de coleta foi obtido pelo Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen), número de cadastro AA515AD. A identificação botânica foi realizada por Ronaldo Marquete e a exsicata depositada no Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro – RJ, sobre número de tombo RB 808529. Após submetido a secagem em estufa ventilada à temperatura abaixo de 40 °C, as folhas foram trituradas em moinho de faca. Em seguida, 1,0 kg de folhas secas foi submetido ao processo de desgorduramento com hexano, empregando percolação. Em seguida, realizou-se a extração com diclorometano. Ambas as extrações foram realizadas de forma exaustiva e os extratos foram concentrados sob pressão reduzida usando evaporador rotativo a 40 °C e, posteriormente, liofilizados, obtendo 30g (rendimento de 3%) de extrato seco diclorometânico (DECa).

2.3 Extração e isolamento

15g de DECa foram submetidos a fracionamento cromatográfico em coluna de gel de Si (70-270 Mesh) e eluido com gradiente de hexano, seguido por hexano-diclorometano e,

posteriormente, diclorometano-acetato de etila, coletando-se frações de 100 mL. Foram coletadas um total de 427 frações. Após as frações serem submetidas à análise por CCD, foram reunidas em 32 grupos, por similaridade dos perfis cromatográficos. As frações contendo terpenos foram detectadas empregando reagente revelador de Liebermann Burchard.

O grupo G16 (1.040 mg), por apresentar maior massa entre aqueles que apresentaram resultado positivo quanto à presença de terpenos, foi recromatografado. Uma alíquota de 750 mg de G16 (dividido em 5 partes iguais) foi fracionada em coluna de sílica gel (230-400 mesh), usando gradiente de eluição isocrático com fase móvel diclorometano e acetato de etila (9:1). Para cada coluna cromatográfica, foram coletadas 35 frações, que após monitoramento por CCD, usando o revelador para terpenos Liebermann-Burchard, foram agrupadas em 4 grupos nomeados como GF1 (176,6 mg), GF2 (278 mg), GF3 (86 mg) e GF4 (26 mg).

Ao grupo GF2 foram realizadas duas tentativas de purificação dos diterpenos clerodânicos empregando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em escala semipreparativa. Primeiramente, uma alíquota de GF2 (150 mg) foi solubilizada em mistura metanol e água (75:25) v/v e centrifugada por 5 min à 6400 xg. Três alíquotas de 1 ml cada do sobrenadante foram injetadas em HPLC empregando coluna em fase reversa (Shim-pack® C-18, 5 µM, 20 x 250 mm, i.d.), fluxo de 7 mL/min e detecção no UV em 220 e 254 nm e gradiente de metanol em água (10%→75% em 40 min; 75%→100% em 1 min; 100% em 9 min), resultando no isolamento do composto **Ca1** (18,6 mg). Em outra tentativa, 128 mg de GF2 foram submetidos ao HPLC semipreparativa usando coluna de sílica gel Shim-pack® (5 µM, 20 x 250 mm, i.d.), eluída com uma mistura isocrática de (99,9:0,01) % v/v de diclorometano em methanol, fluxo de 7 ml/min e detecção no UV em 254 nm. Esse procedimento resultou na purificação dos compostos **Ca2** (11 mg) e **Ca3** (17,9mg).

2.4 Elucidação estrutural das substâncias isoladas

Para obtenção dos espectros de massas, as amostras foram submetidas à análise de espectrômetros de massas de alta resolução, pela técnica de ionização por eletrospray no modo positivo. Os espectros de RMN unidimensionais (¹H, ¹³C e DEPT135) e os mapas de contorno bidimensionais (HSQC, HMBC e NOESY), em material suplementar, foram obtidos em espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear Bruker Ascend 400, do Laboratório Multiusuário de Caracterização de Moléculas da Escola de Farmácia-UFOP. Como padrão interno utilizou-se o tetrametilsilano (TMS) e as amostras foram solubilizadas em clorofórmio

deuterado (CDCl_3). Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em ppm, e as constantes de acoplamento (J) em Hz.

3. Resultados e discussão

O emprego de técnicas cromatográficas sequenciais resultou no isolamento e identificação de um diterpeno clerodânico conhecido (**Ca1**) e de outros dois inéditos (**Ca2** e **Ca3**). Esta classe de compostos é considerada marcador quimiotaxonômico para o gênero *Casearia* [6], cuja estrutura básica é formada pelos anéis A e B do sistema decalínico, com 2 metilas em C-8 e C9, uma ligação dupla em C-3, uma cadeia lateral com 6 carbonos em C-9 (C-11 a C16), contendo um dieno conjugado terminal C-12 (Z) e C-14, e um terceiro anel C furânico substituídos nos carbonos 18 e 19, frequentemente, com grupamento acetálico. Além disso, outros substituintes oxigenados (ésteres, éteres, hidroxilas ou cetonas) podem estar presentes nos carbonos 2, 6 e 7 (**Figura 1**) [16]. As estruturas dos compostos purificados foram elucidadas com base em dados de espectrometria de massas de alta resolução (HRMS), ressonância magnética nuclear unidimensional e bidimensional e por comparação com valores relatados na literatura.

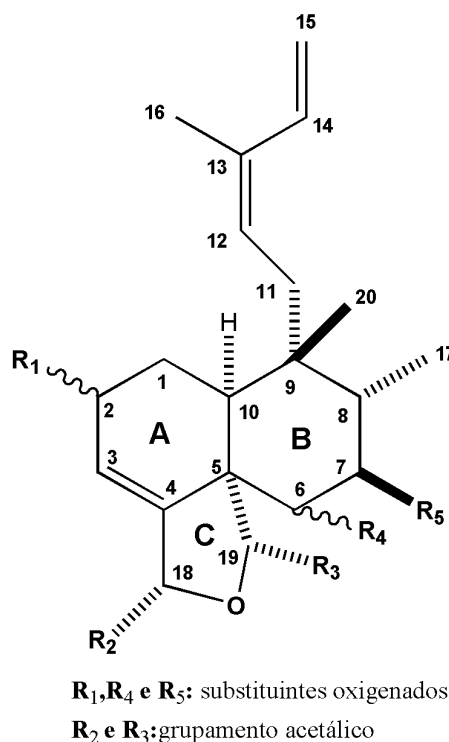


Figura 1. Estrutura básica de diterpenos clerodânicos encontrados em plantas do gênero *Casearia*.

O composto **Ca1** foi obtido como um sólido amorfo branco. Sua fórmula molecular foi definida por HRESIMS (modo positivo) como $C_{32}H_{40}O_9$, baseado no pico do íon aducto $[M + Na]^+ C_{32}H_{40}NaO_9$ com m/z 591,2579 (calculado em 591,2570, erro de 1,5 ppm). Essa fórmula molecular indica a presença de treze graus de instauração que poderia ser estimado pela presença de três anéis, três carbonilas, três ligações duplas, e um anel benzeno adicional.

A comparação dos dados de RMN da amostra com dados da literatura auxiliou na caracterização estrutural dessa substância. Os dados de RMN ^{13}C (**Tabela 1**) revelaram 32 sinais atribuíveis a 10 carbonos quaternários (incluindo três carbonilas), 11 metínicos, cinco metilênicos e seis metilas. A multiplicidade desses sinais foi confirmada pelo experimento DEPT135 (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer, utilizando ângulo de 135 °C). Os deslocamentos observados foram consistentes com uma subestrutura contendo o sistema decalínico (anéis A e B) e um anel tetrahydrofurano diacetálico, característico de um diterpeno clerodânico.

Completa atribuição da estrutura planar de **Ca1** foi possível pela interpretação dos mapas de contorno de HSQC e HMBC. Pelo espectro de HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation) e HMBC (Heteronuclear Multiple-Bond Correlation) foi possível atribuir sinais referentes a duas unidades de acetil [δ_C 170,3 e 21,46, δ_H 2,06 (3H, s); δ_C 169,94 e 21,66, δ_H 1,92 (3H, s)] e de uma unidade benzoato 3-metoxi,4-hidroxi substituído. Os sinais referentes a unidade benzoato foram claramente evidenciados pelo par de dubletos de 8,4 Hz no RMN 1H e pelos sinais de correlação observados pelo HMBC entre o sinal da carbonila δ_C 165,87 (C-7') e os sinais δ_H 7,57 (H-2') e 7,64 (H-6') (**Tabela 1**). Os 20 carbonos restantes no espectro de RMN ^{13}C foram atribuídos ao esqueleto estrutural diterpênico. As posições de ligação dos dois grupos acetil foram atribuídas pelas correlações exibidas pelo espectro de HMBC. Um desses grupos acetil ligado ao C-18 foi deduzido pela correlação observada entre o sinal δ_C 170,63 e o sinal δ_H 6,67 (H-18); e para o segundo grupo acetato, o sinal δ_C 169,94 e o sinal δ_H 6,36 (H-19). Pelas estruturas já relatadas para os diterpenos clerodânicos do tipo casearinas, dois possíveis sítios de ligação do grupo benzoato seriam no C-2 ou no C-6. A correlação a longa distância do sinal em δ_C 29,28 (C-6) com aquele em δ_H 6,36 (H-19) eliminou a possível ligação do grupo benzoato ao C-6, evidenciando, assim, sua ligação ao C-2. Os sinais foram consistentes com a do composto casearborina B (**Figura 2**), previamente isolado de *Casearia arborea* [13].

Os dois sinais de carbonos metínicos acetais em δ 94,54 (C-18) e 99,04 (C-19), bem como a presença de dois grupos metílicos (C-17 e C-20) ligados aos C-8 e C-9, respectivamente, corroboram com o padrão estrutural de diterpeno do tipo clerodânico. A correlação observada entre o sinal δ_C 99.04 (C-19) e os sinais δ_H 1.52 e 1,74 de C-6, pelo espectro HMBC, sugeriu que não havia substituinte neste carbono, um padrão semelhante ao composto casearborina B.

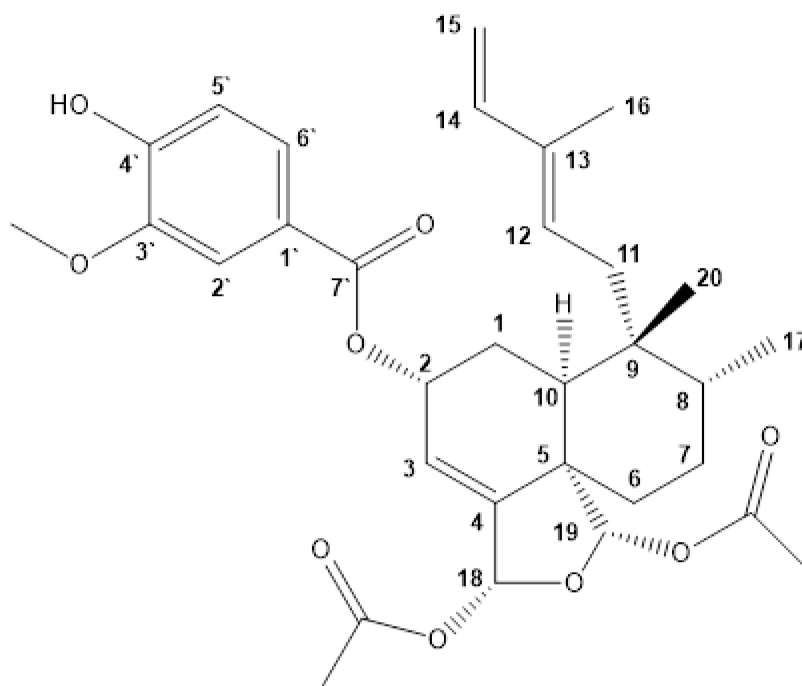


Figura 2. Estrutura de *Ca1* (casearborina B).

Análises de espectro de HMBC também revelou a presença de uma cadeia lateral butadieno-2-substituído contendo um sistema β , γ -insaturado (dupla ligação em C-12 e C-14). A ligação dessa cadeia no C-9 foi confirmada pela correlação do sinal do hidrogênio δ_C 27,56 (C-11) com δ_H 0,88 (H-17).

A configuração relativa dos centros quirais foram atribuídas com base nas constantes de acoplamento de RMN 1H , deslocamentos químicos de RMN ^{13}C e pelas correlações por NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy), em comparação com dados da literatura. Foram observadas correlações NOESY entre H-17 e H-7; H-17 e H-11; H-18 e H-6a; H-18 e H-3; H-19 e H-7a; H-19 e H-11 e H-20 e H-10. A configuração da dupla ligação de C-12,13 foi determinada como trans, baseada no fator de blindagem do sinal de C-16.

Tabela 1. Dados espectroscópicos de RMN de ^{13}C (100 MHz, δ_{C} , multiplicidade) e de ^1H (400 MHz, δ_{H}) e dos mapas de contorno HMBC e NOESY para o composto **Ca1** em CDCl_3 .

Carbono	^{13}C δ	^1H δ (J em Hz)*	Correlação HMBC	NOESY
C1	26,54 CH ₂	2,02 (m)	H-3 (J3)	
C2	67,30 CH	5,57 (m)		
C3	120,60 CH	6,00 (d, 4.0)	H-18	
C4	147,27 C		H-19 (J3)	
C5	49,39 C		H-3 (J3), H-10 (J2), H-19 (J2)	
C6	29,28 CH ₂	1,52 (m) e 1,74 (m)	H-19 (J3)	
C7	30,66 CH ₂	1,78 (m) e 2,21 (m)	H-20 (J4)	
C8	36,73 CH	1,62 (m)	H-10 (J3), H-20 (J3)	
C9	37,68 C		H-17 (J3)	
C10	35,18 CH	2,33 (m)		
C11	27,56 CH ₂	1,45 (m)	H-17 (J4)	
C12	129,43 CH	5,43 (m)	H-14 (J3)	
C13	135,85 C		H-15	
C14	141,42 CH	6,24 (m)	H-12 (J3)	
C15	111,13 CH ₂	4,91 (d, 10.8); 5,06 (d, 17.2)		
C16	12,21 CH ₃	1,65 (s)	H-14	
C17	15,85 CH ₃	0,88 (d, 6.8)		H17/H7 e H17/H11
C18	94,54 CH	6,67 (s)	H-3 (J3), H19 (J3)	H18/H6 H18/H3
C19	99,04 CH	6,36 (s)	H-18 (J3)	H19/H7 e H19/H11
C20	25,99 CH ₃	0,84 (s)		H20/H10
18-OAc	170,63 C		H-18 (J3)	
CH ₃	21,46 CH ₃	2,06 (s)		
19-OAc	169,94 C		H-19 (J3)	
CH ₃	21,66 CH ₃	1,92 (s)		
C1`	122,83 C		H-5` (J3)	
C2`	112,08 CH	7,57 (s)	H-6` (J3)	
C3`	146,49 C		H-5` (J3), OCH ₃	
C4`	150,38 C		H-2` (J3), H-5` (J2), H-6` (J3)	
C5`	114,20 CH	6,96 (d, 8.4)		
C6`	124,19 CH	7,64 (d, 8.4)	H-2` (J3)	
C7`	165,87 C		H-2` (J3), H-6` (J3)	
OCH ₃	56,23 CH ₃	3,94 (s)		

Nota: s (simpleto), d (duplete), dd (duplo duplete), m (multiplete). J (constante de acoplamento). * Atribuição com auxílio de HSQC.

A fórmula molecular para **Ca2** foi determinada como $\text{C}_{32}\text{H}_{40}\text{O}_{13}$, de acordo com o íon aducto $[\text{M} + \text{Na}]^+$, $\text{C}_{32}\text{H}_{40}\text{NaO}_{13}$, com m/z 655,2362 (calculado em 655,2367, erro de -0,7 ppm), diferindo em 4 átomos de oxigênio adicionais em relação à **Ca1** e mantendo o mesmo grau de insaturação. O espectro de RMN de ^{13}C revelou a presença de 32 sinais de carbono (**Tabela 2**), estando de acordo com a fórmula molecular. Suas multiplicidades foram deduzidas dos

resultados das análises de RMN ^{13}C DEPT como dez carbonos não hidrogenados (sendo três cetonas a δ_{C} 170,49; 170,01 e 165,88), onze metínicos, seis metilênicos e cinco metilas (**Tabela 2**). A interpretação dos dados de RMN indicou claramente se tratar de uma estrutura bastante similar à **Ca1**. Os sinais de espectros de RMN ^1H e ^{13}C de **Ca2**, em relação ao composto **Ca1** diferiram principalmente na região da cadeia lateral ligada à C-9. Observou-se que os sinais para a unidade de butadieno 2-substituído foram substituídos por sinais indicando o componente estrutural 1,2-dioxina-3,6-dihidro (endoperóxido). As correlações de longa distância dos sinais em C-16 (δ 70,03) com aquele em δ_{H} 4,64 (H-14), como também entre C-12 (δ 82,35) e δ_{H} 4,64 (H-14), corroboram com essa atribuição. A presença do elemento 1,2-dioxina-3,6-dihidro na estrutura de diterpenos clerodânicos foi descrita por Calderón et al. (2017) [17]. Outra diferença significativa observada no espectro de RMN ^{13}C de **Ca2** foi a presença adicional próton oximetínico em campo mais desprotegido δ_{C} 82,35 (C-12), sugerindo a presença de uma funcionalidade peróxido, que é consistente com a presença de simpleto largo em δ 4,51 no espectro de RMN ^1H . A presença de elemento estrutural peróxido em diterpenos clerodânicos foi relatada por Hussien et al. (2020) [18], sendo bastante raro nessa classe de compostos. Beutler et al. (2000 [13] relatou uma série de diterpenos clerodânicos em *C. arborea*, atribuindo a esses compostos os nomes de casearborina (A – E). Contudo, como **Ca2** trata-se de um novo composto, atribui-se o nome de casearborina F (**Figura 3**).

Tabela 2. Dados espectroscópicos de RMN de ^{13}C (100 MHz, δ_{C} , multiplicidade) e de ^1H (400 MHz, δ_{H}) e do mapa de contorno HMBC para o composto **Ca2** em CDCl_3 .

Carbono	^{13}C δ (mult.)	^1H δ (HSQC)	Correlação HMBC	NOESY
C1	26,55 CH_2	1,96 e 2,15	H-10 (J3)	
C2	67,09 CH	5,56		
C3	120,69 CH	5,99	H-18 (J3),	
C4	146,93 C		H-19 (J3)	
C5	49,59 C		H-3 (J3), H-10 (J2), H-19 (J2)	
C6	29,53 CH_2	1,55 e 1,77	H-3 (J4), H-19 (J3)	
C7	33,71 CH_2	1,26 e 1,29	H-17 (J3)	
C8	37,36 CH	1,59 (m)		
C9	37,99 C		H-17 (J3)	
C10	38,20 CH	2,06 (m)	H-6 (J2), H-10 (J3), H-20 (J3)	
C11	27,44 CH_2	1,43 (m)	H-20 (J3)	
C12	82,35 CH	4,51 (sl)	H-14 (J3)	
C13	135,85 C			
C14	122,44 CH	5,87 (m)		
C15	69,92 CH_2	4,51 (sl)		
C16	70,03 CH_2	4,64 (sl)	H-14 (J3)	
C17	15,98 CH_3	0,94 (d, J6.8Hz)		H17/H12
C18	94,50 CH	6,67 (s)	H-19 (J3)	H18/H6
C19	99,64 CH	6,25 (s)	H-18 (J3)	H19/H7 H19/H11
C20	25,54 CH_3	1,06 (s)		
18-OAc	170,49 C=O		H-18 (J3)	
CH ₃	21,46 CH_3	2,05 (s)		
19-OAc	170,01 C=O		H-19 (J3)	
CH ₃	21,75 CH_3	1,99 (s)		
C1 [`]	122,70 C		H-2 [`] (J2), H-5 [`] (J3)	
C2 [`]	112,10 CH	7,56 (d, J1.6Hz)	H-6 [`] (J3)	
C3 [`]	146,51 C		H-5 [`] (J3), OCH ₃ (J3)	
C4 [`]	150,42 C		H-2 [`] (J3), H-5 [`] (J2), H-6 [`] (J3)	
C5 [`]	114,23 CH	6,94 (d, J8.4Hz)		
C6 [`]	124,15 CH	7,61 (dd, J8.4Hz e 1.6Hz)	H-2 [`] (J3),	
C7 [`]	165,88 C=O		H-2 [`] (J3), H-6 [`] (J3)	
OCH ₃	56,27 CH_3	3,94 (s)		

Nota: s (simpleto), d (dupleto), dd (duplo dupleto), m (multipleto). J (constante de acoplamento). * Atribuição com auxílio de HSQC.

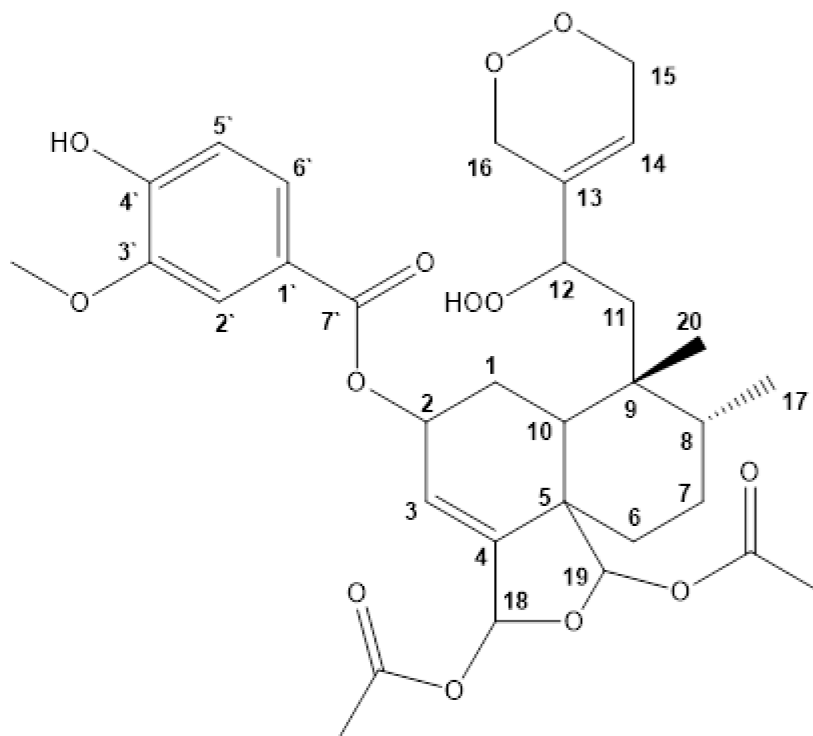


Figura 3. Estrutura de *Ca2* (casearborina F).

O espectro obtido por HRESIMS (modo positivo) de *Ca3* exibiu pico de íon molecular 623.2469 $[M + Na]^+$ (calculado para $C_{32}H_{40}NaO_{11}$; m/z 623,2468, erro de 0,1), consistente com a fórmula molecular $C_{32}H_{40}O_{11}$. Sinais referentes a dois grupos metilas [δ_H 1,07 (3H, s, H-20), δ_C 24,98 (C-20) e δ_H 0,95 (3H, d, 6,8 Hz, H-17), δ_C 16,04 (C-17)], dois carbonos metínicos de acetal [δ_H 6,66 (1H, s, H-18), δ_C 94,55 (C18) e δ_H 6,19 (1H, s), δ_C 99,60 (C-19)], dois grupamentos de acetoxi [δ_C 170,53 e 21,46, δ_H 2,03 (3H, s); e δ_C 169,98 e 21,88, δ_H 1,89 (3H, s)], além dos sinais referentes a uma unidade benzoato 3-metoxi,4-hidroxi substituído, foram consistentes com o esqueleto carbônico de diterpeno clerodânico. Assim, os dados de RMN de 1H e ^{13}C para o composto *Ca3* foram muito semelhantes aos de *Ca2*, exceto em relação ao grupamento ligado ao C-9. Os sinais referentes ao grupamento 1,2-dioxina-3,6-dihidro (endoperóxido) foi substituído por de um butadieno 2-substituído [$(\delta_C$ 145,96 (C-13), δ_H 6,28 (1H, d, J 6,8 Hz, H-14), δ_C 135,53 (C-14), δ_H 5,16 (2H, m, H-15a, H-15b), δ_C 116,07 (C-15), δ_H 5,27 (2H, H-16a e H-16b), δ_C 117,48 (C-16)]. Esta atribuição foi corroborada com correlações de longa distância dos sinais em C-13 (δ 145,96) com δ_H 5,16 (H-15), além da correlação entre o C-16 (δ 117,48) com aqueles em δ 4,64 (H-12) e 6,28 (H-14).

Tabela 3. Dados espectroscópicos de RMN de ^{13}C (100 MHz, δ_{C} , multiplicidade) e de ^1H (400 MHz, δ_{H}) e dos mapas de contorno HMBC e NOESY para o composto **Ca3** em CDCl_3 .

Carbono	^{13}C δ (mult.)	^1H δ (HSQC)	Correlação HMBC
C1	26,55 CH_2	1,96 e 2,15	H-2 (J3), H-3 (J3)
C2	67,12 CH	5,55 (m)	
C3	120,48 CH	5,96 (m)	H-1 (J3), H-18 (J3)
C4	147,09 C		H-19 (J3)
C5	49,63 C		H-1 (J3), H-3 (J3), H-10 (J2)
C6	29,59 CH_2	1,53 e 1,79	
C7	37,0 CH_2	1,22 e 1,27	
C8	37,11 CH	0,95	H-20 (J3)
C9	38,34 C		H-12 (J3), H-17 (J3)
C10	39,66 CH	2,0 (m)	H-1 (J2), H-6 (J3), H-8 (J3)
C11	27,44 CH_2		H-20 (J3)
C12	83,13 CH	4,64	H-14 (J3), H-16 (J3),
C13	145,96 C		H-15 (J3)
C14	135,53 CH	6,28 (d, J6,8Hz)	
C15	116,07 CH_2	5,16 (m)	
C16	117,48 CH_2	5,27 (m)	H-12 (J3), H-14 (J3)
C17	16,04 CH_3	0,95 (d, J6,8Hz)	H-7 (J3), H-8 (J2),
C18	94,55 CH	6,66 (s)	H-19 (J3),
C19	99,60 CH	6,19 (s)	H-18 (J3),
C20	24,98 CH_3	1,07 (s)	
18-OAc	170,53 C=O		H-18 (J3)
CH_3	21,46 CH_3	2,03 (s)	
19-OAc	169,98 C=O		H-19 (J3)
CH_3	21,88 CH_3	1,89 (s)	
C1 $\hat{\text{C}}$	122,76 C		H-5 $\hat{\text{C}}$ (J3)
C2 $\hat{\text{C}}$	112,11 CH	7,56 (s)	H-6 $\hat{\text{C}}$ (J3)
C3 $\hat{\text{C}}$	146,49 C		H-5 $\hat{\text{C}}$ (J3), OCH3 (J3)
C4 $\hat{\text{C}}$	150,37 C		H-2 $\hat{\text{C}}$ (J3), H-5 $\hat{\text{C}}$ (J2), H-6 $\hat{\text{C}}$ (J3)
C5 $\hat{\text{C}}$	114,37 CH	6,92 (d, J8,4Hz)	
C6 $\hat{\text{C}}$	124,13 CH	7,61 (d, J8,4Hz)	H-2 $\hat{\text{C}}$ (J3),
C7 $\hat{\text{C}}$	165,85 C=O		H-2 $\hat{\text{C}}$ (J3), H-6 $\hat{\text{C}}$ (J3)
OCH $\hat{\text{C}}$ $_3$	56,25 CH_3	3,93 (s)	

Nota: s (simpleto), d (duplete), dd (duplo duplete), m (multiplete). J (constante de acoplamento). * Atribuição com auxílio de HSQC.

Os espectros também mostraram a presença de um próton de oxometínico em δ_{H} 4,51 (1H, m), atribuído à presença do grupo peróxido ligado ao C-12, sendo sua posição na molécula evidenciada pelo acoplamento à longa distância entre δ_{C} 83,13 (C-12) e os sinais δ_{H} 6,28 (H-14) e 5,27 (H-16). **Ca3** também se trata de uma substância inédita, sendo atribuída a denominação de casearborina G (**Figura 4**).

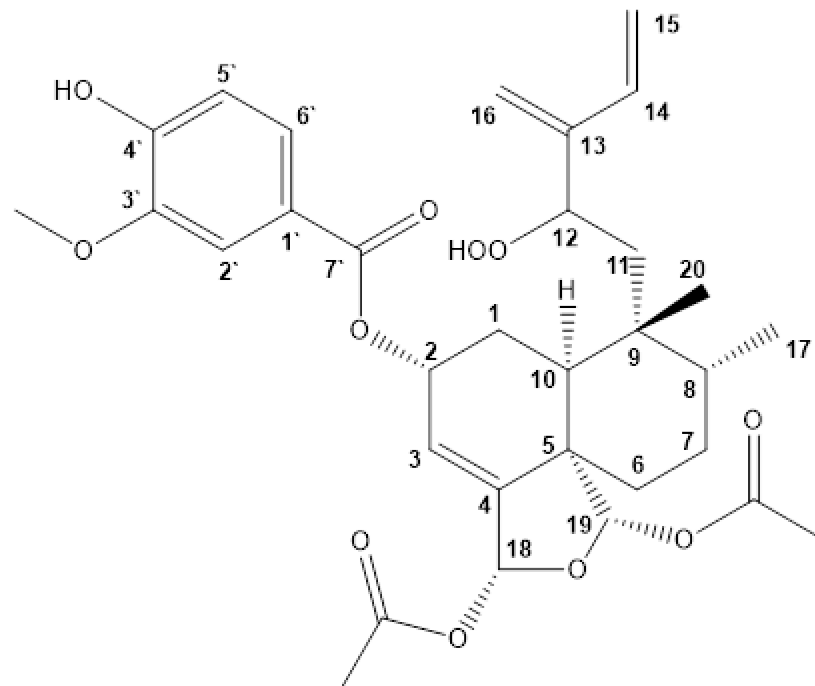


Figura 4. Estrutura de *Ca3* (casearborina G).

A **Tabela 4** mostra dos dados de espectroscopia de RMN ^{13}C dos três compostos isolados da fração citotóxica de *Casearia arborea*.

Tabela 4. Dados espectroscópicos de RMN ^{13}C para *Ca1*, *Ca2* e *Ca3*.

Posição	<i>Ca1</i> δ_c ppm	<i>Ca2</i> δ_c ppm	<i>Ca3</i> δ_c ppm
C1	26,54 CH ₂	26,55 CH ₂	26,55 CH ₂
C2	67,30 CH	67,12 CH	67,09 CH
C3	120,60 CH	120,48 CH	120,69 CH
C4	147,27 C	147,09 C	146,93 C
C5	49,39 C	49,63 C	49,59 C
C6	29,28 CH ₂	29,59 CH ₂	29,53 CH ₂
C7	30,66 CH ₂	37,00 CH ₂	33,71 CH ₂
C8	36,73 CH	37,11 CH	37,36 CH
C9	37,68 C	38,34 C	37,99 C
C10	35,18 CH	39,66 CH	38,20 CH
C11	27,56 CH ₂	27,44 CH ₂	27,44 CH ₂
C12	129,43 CH	83,13 CH	82,35 CH
C13	135,85 C	145,96 C	135,85 C
C14	141,42 CH	135,5 CH	122,44 CH
C15	111,13 CH ₂	116,07 CH ₂	69,92 CH ₂
C16	12,21 CH ₃	117,48 CH ₂	70,03 CH ₂
C17	15,85 CH ₃	16,04 CH ₃	15,98 CH ₃
C18	94,54 CH	94,55 CH	94,50 CH
C19	99,04 CH	99,60 CH	99,64 CH
C20	25,99 CH ₃	24,98 CH ₃	25,54 CH ₃
18-OAc	170,63 C	170,53 C	170,49 C
CH ₃	21,46 CH ₃	21,46 CH ₃	21,46 CH ₃
19-OAc	169,94 C	169,98 C	170,00 C
CH ₃	21,66 CH ₃	21,88 CH ₃	21,75 CH ₃
C1'	122,83 C	122,76 C	122,70 C
C2'	112,08 CH	112,11 CH	112,10 CH
C3'	146,49 C	146,49 C	146,51 C
C4'	150,38 C	150,37 C	150,42 C
C5'	114,20 CH	114,37 CH	114,23 CH
C6'	124,19 CH	124,13 CH	124,15 CH
C7'	165,87 C	165,88 C	165,88 C
OCH ₃	56,23 CH ₃	56,25 CH ₃	56,27 CH ₃

4. Conclusão

Dois novos peróxidos de diterpeno clerodânicos peroxidados, denominados casearborina F (*Ca2*) e casearborina G (*Ca3*), juntamente com o composto casearborina B (*Ca1*), previamente já relatada, foram isolados das folhas de *Casearia arborea*. Suas estruturas foram determinadas usando uma combinação de técnicas espectroscópicas, incluindo UHPLC-ESI-HRMS e análises monodimensional e bidimensional de RMN (^1H , ^{13}C , DEPT, HMQC, HMBC e NOESY).

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; Outorga: GD 142313 / 2015-7) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG; Outorga: CDS - APQ-02540-15) pelo apoio financeiro.

Conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Referências

- [1] Atanasov AG, Zotchev SB, Dirsch VM, Supuran, CT. Natural products in drug discovery: advances and opportunities. **Nat Rev.**2021; 20(3):200-216.
- [2] Fonseca CR, Venticinque EM. Biodiversity conservation gaps in Brazil: A role for systematic conservation planning. **Perspect Ecol Conserv.** 2018; 16(2):61-67.
- [3] **Salicaceae in Flora e Funga do Brasil.** Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB14361>>. Acesso em: 22 jun. 2022.
- [4] GBIF. **Casearia Jacq. in GBIF Secretariat.** 2022. GBIF Backbone Taxonomy. Sing in: <gbif.org/pt/species/2874105>. Acesso: 27/06/2022.
- [5] Bueno PCP, Abarca LFS, Anhesine N B, Giffoni MS, Pereira FMV, Torres RB, Sousa RWRS, Ferreira PMO, Pessoa C, Cavalheiro AJ. Intraspecific chemical variability and biological activity of *Casearia sylvestris* from different Brazilian biomes. **Planta Med.** 2021; 87(01/02):148-159.
- [6] Xia L, Guo Q, Tu P, Chai X. The genus *Casearia*: a phytochemical and pharmacological overview. **Phytochem Rev.** 2015; 14:99–135.
- [7] Ferreira PMP, Santos DB, Silva JN, Goudinho AF, Ramos CLS, Souza PC, Alemeids RSC, Moura DS, Oliveira R, Grisolia CK, Carvalheiro AJ, Melo-Calvancante AAC, Ferrira JRO, Moraes Filho MO, Pessoa C. Toxicological findings about an anticancer fraction with casearins described by traditional and alternative techniques as support to the Brazilian Unified Health System (SUS). **J Ethnopharmacol.** 2019 241, 112004.

- [8] Islam MT. Diterpenes and their derivatives as potential anticancer agents. **Phytother Res.** 2017; 31(5):691-712.
- [9] Li R, Morris-Natschke SL, Lee KH. Clerodane diterpenes: sources, structures, and biological activities. **Nat Prod Rep.** 2016; 33(10):1166-1226.
- [10] Hagiwara, H. Total syntheses of clerodane diterpenoids—a review. **Nat Prod Commun.** 2019; 14(6).
- [11] Leite-Ferreira MD, Rocha-Souza MS, Ramirez RRDA, Chaves OS, Teles YC, Pereira FDO, Souza MDFVD. Phytochemistry investigation of *Casearia Arborea* (Rich.) Urb.(Salicaceae) and antimicrobial analysis of its diterpene. **Quim Nova.** 2018; 41(6):619-622.
- [12] Santos AL, Yamamoto ES, Passero LFD, Laurenti MD, Martins LF, Lima ML, Sartorelli, P. Antileishmanial activity and immunomodulatory effects of triclin isolated from leaves of *Casearia arborea* (Salicaceae). **Chem Biodivers.** 2017; 14(5):e1600458.
- [13] Beutler JA, McCall KL, Herbert K, Herald DL, Pettit GR, Johnson T, Shoemaker RH, Boyd MR. Novel cytotoxic diterpenes from *Casearia arborea*. **J Nat Prod.** 2000; 63(5):657-61
- [14] Santos AL, Soares MG, de Medeiros LS, Ferreira MJ, Sartorelli, P. Identification of flavonoid-3-O-glycosides from leaves of *Casearia arborea* (Salicaceae) by UHPLC-DAD-ESI-HRMS/MS combined with molecular networking and NMR. **Phytochem Anal.** 2021; 32(6), 891-898.
- [15] Anhesine N. B., Bueno P. C. P., Torres R. B., Lopes N. P., Cavalheiro A. J. Nonpolar and polar chemical profiling of six *Casearia* species (Salicaceae). **Biochem Syst Ecol.** 2019; 87:103954.
- [16] Danuello A, Castro RC, Pilon AC, Bueno PCP, Pivatto M, Vieira Junior GM, Cavalheiro, AJ. Fragmentation study of clerodane diterpenes from *Casearia* species by tandem mass spectrometry (quadrupole time-of-flight and ion trap). **RCM.** 2020; 34:8781.
- [17] Calderón C, De Ford C, Castro V, Merfort I, Murillo R. Cytotoxic Clerodane Diterpenes from *Zuelania guidonia*. **J Nat Prod.** 2014; 77(3): 455-463.

[18] Hussien TA, Mahmoud AA, Mohamed NS, Shahat AA, El-Seedi HR, Hegazy MF. New rare ent-clerodane diterpene peroxides from egyptian mountain tea (Qourtom) and its chemosystem as herbal remedies and phytonutrients agents. **Molecules**. 2020; 25(9):2172.

Material suplementar

Novos diterpenos clerodânicos peroxidados identificados em fração citotóxica de *Casearia arborea*

Rodrigues LA^a, Almeida AA^a, Dutra LL^a, Torres CMME^b, Cota BB^c, Brandão GC^d,
Bressan GC^a, Leite JPV^a.

^aDepartamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, 36570-900 Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

^bDepartamento de Engenharia Florestal, Universidade Federal de Viçosa, 36570-900 Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

^cInstituto Rene-Rachou, Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Belo Horizonte, Brasil.

^dEscola de Farmácia, Departamento de Farmácia, 12 Universidade Federal de Ouro Preto, 35400-000 Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil.

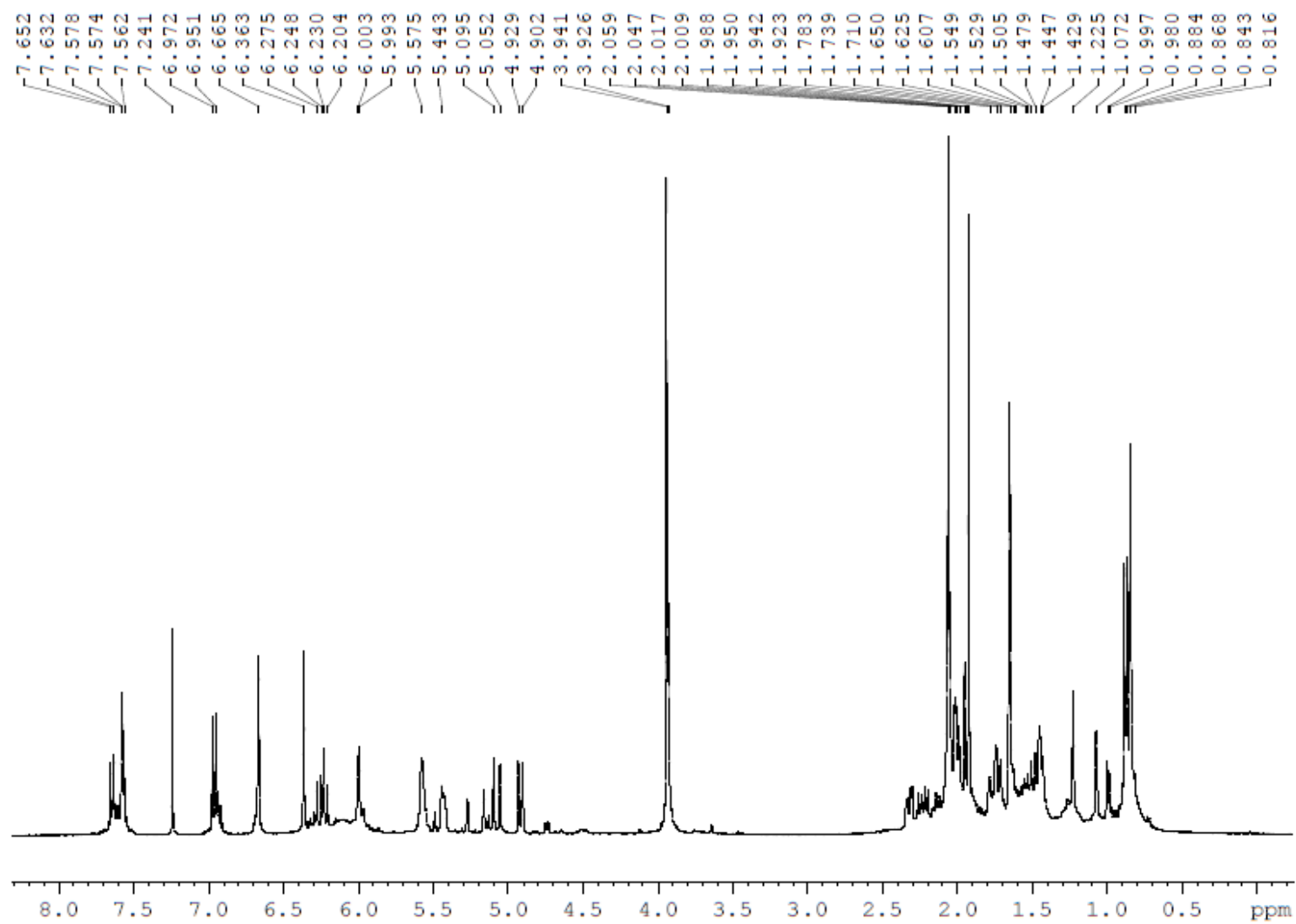


Figura S1. Espectro de RMN ^1H do composto *Ca1* (CDCl_3 , 400 MHz).

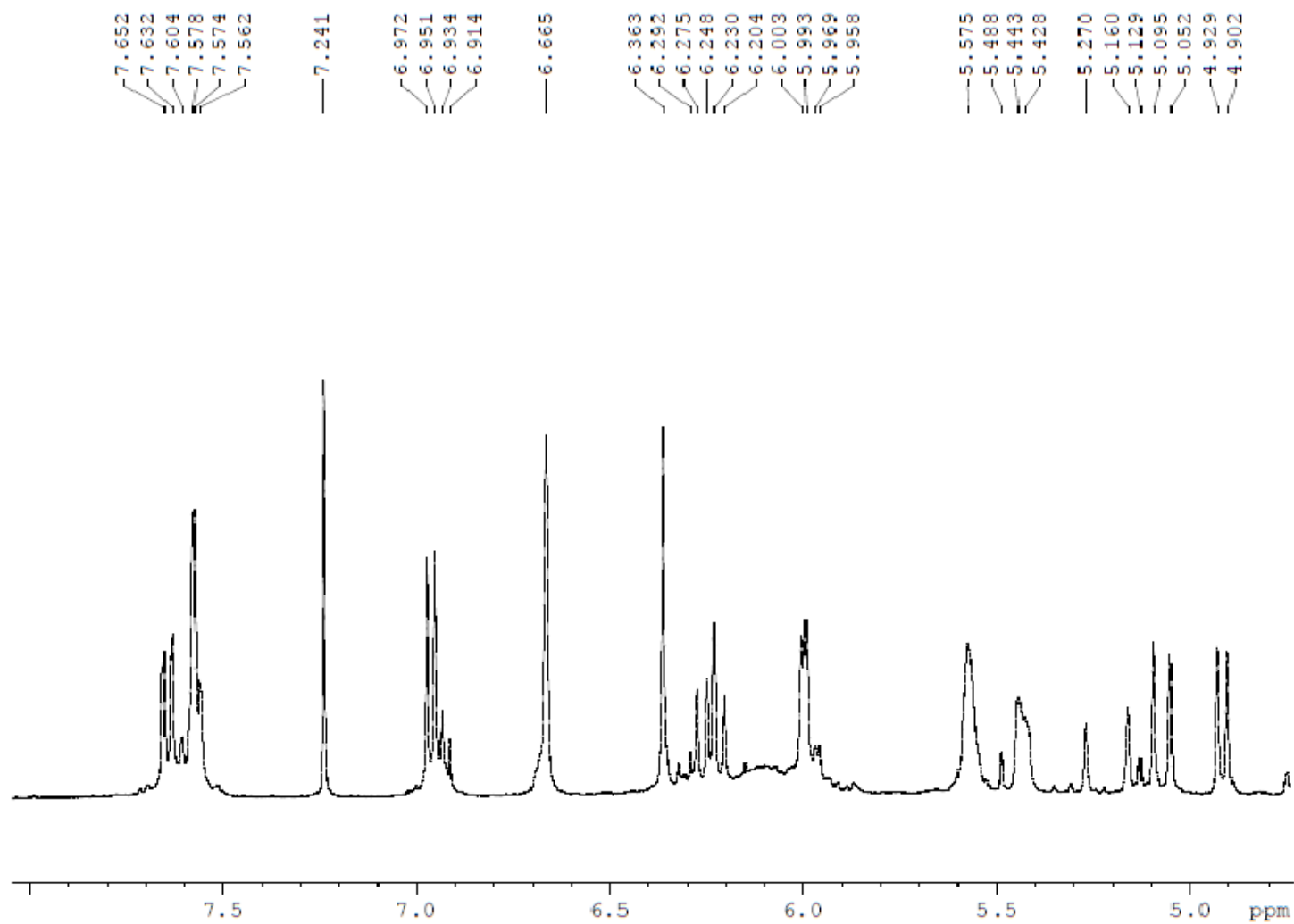


Figura S2. Expansão 1 do espectro de RMN ^1H do composto *Ca1* (CDCl_3 , 400 MHz).

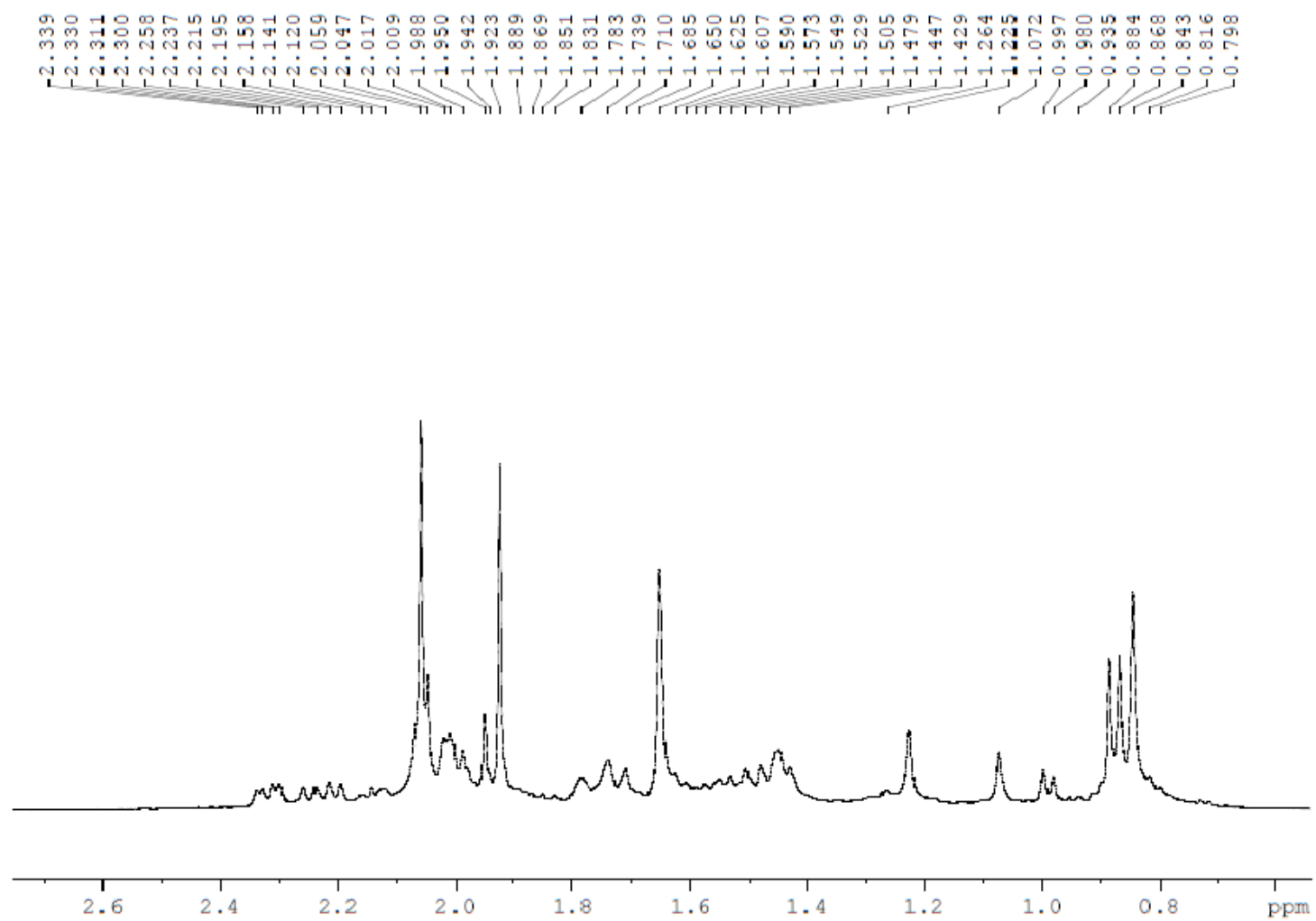


Figura S3. Expansão 2 do espectro de RMN ^1H do composto **Ca1** (CDCl_3 , 400 MHz).

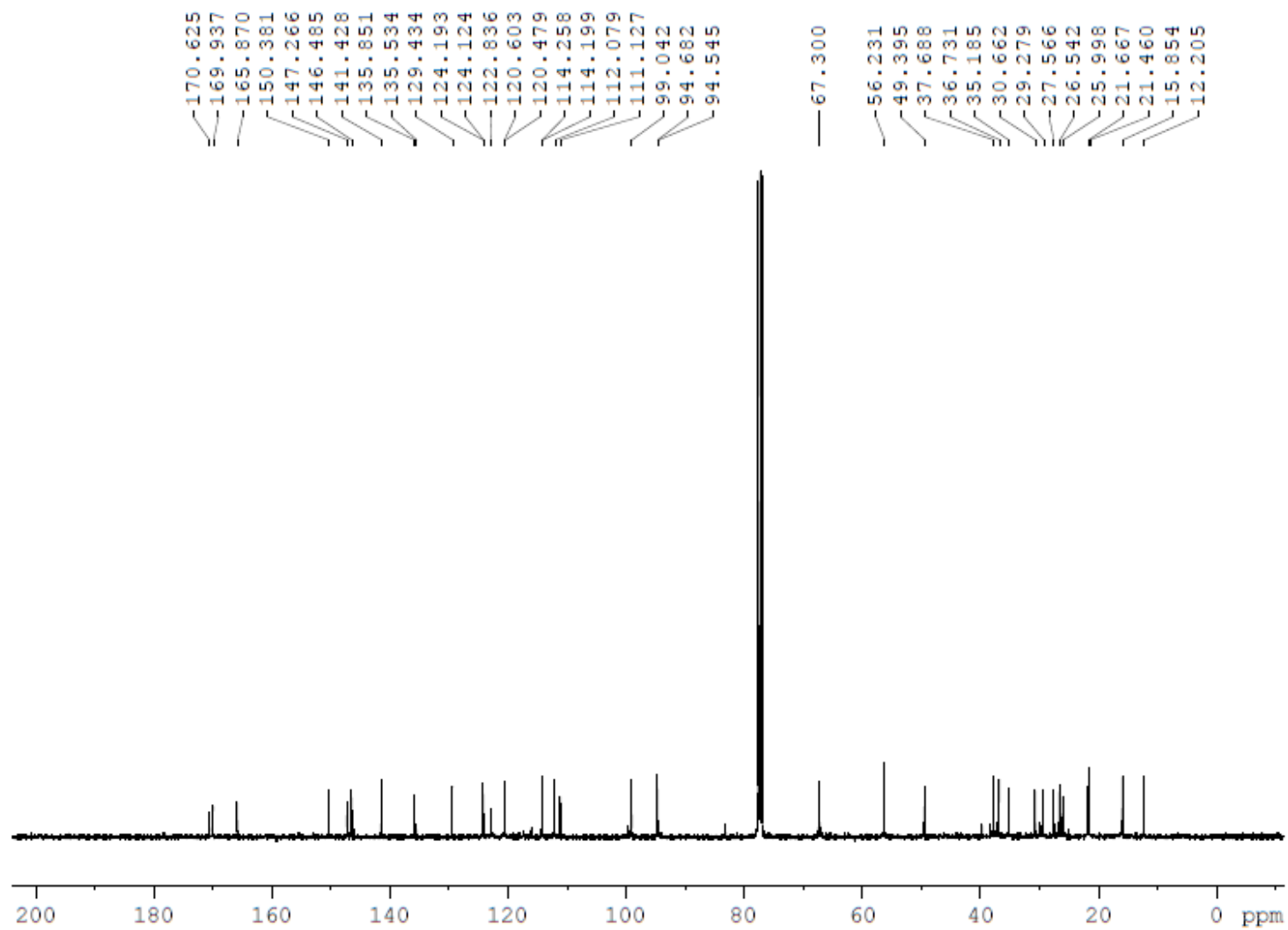


Figura S4. Espectro de RMN ^{13}C do composto *Ca1* (CDCl_3 , 100 MHz).

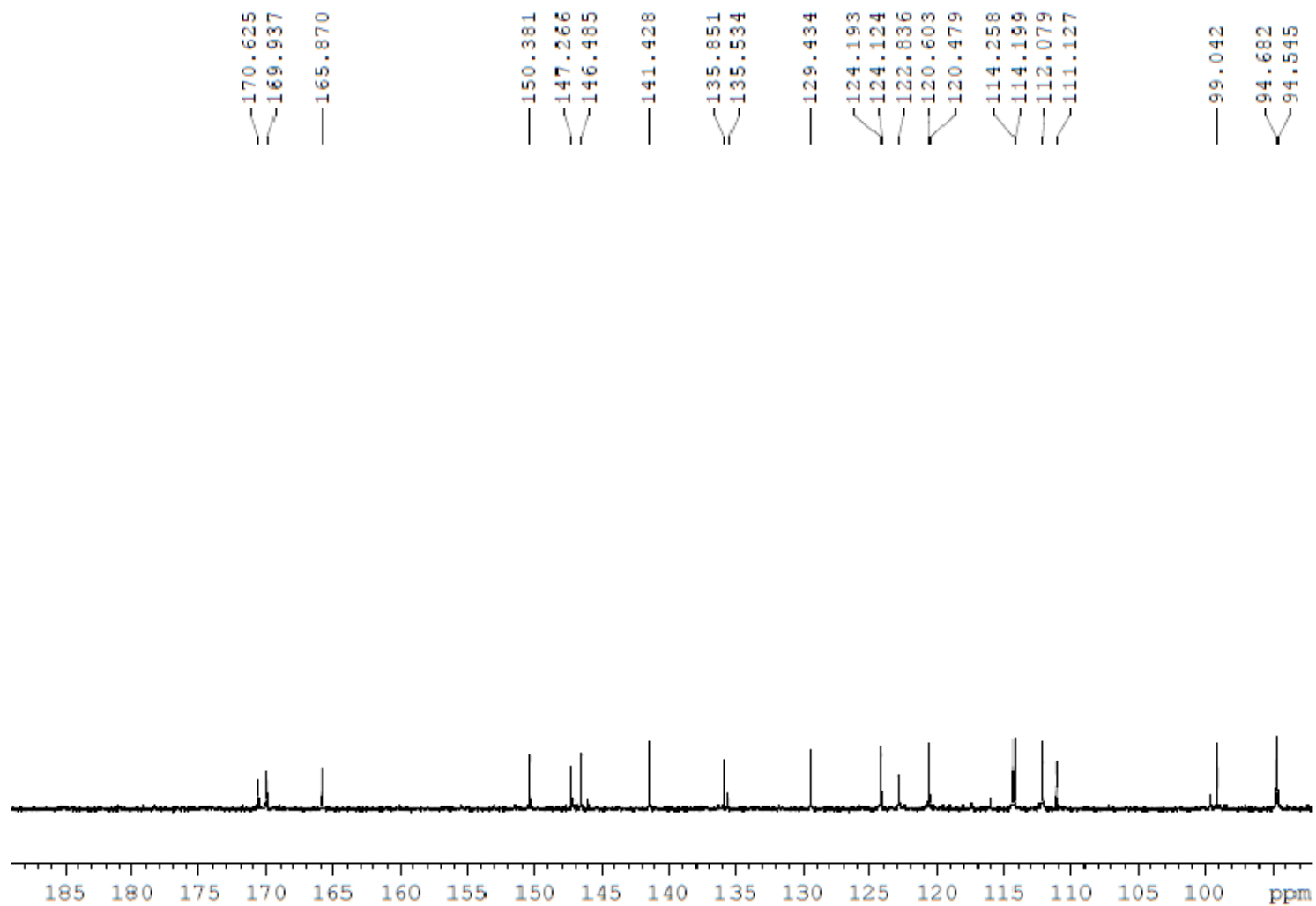


Figura S5. Expansão 1 do espectro de RMN ^{13}C do composto **Ca1** (CDCl_3 , 100 MHz).

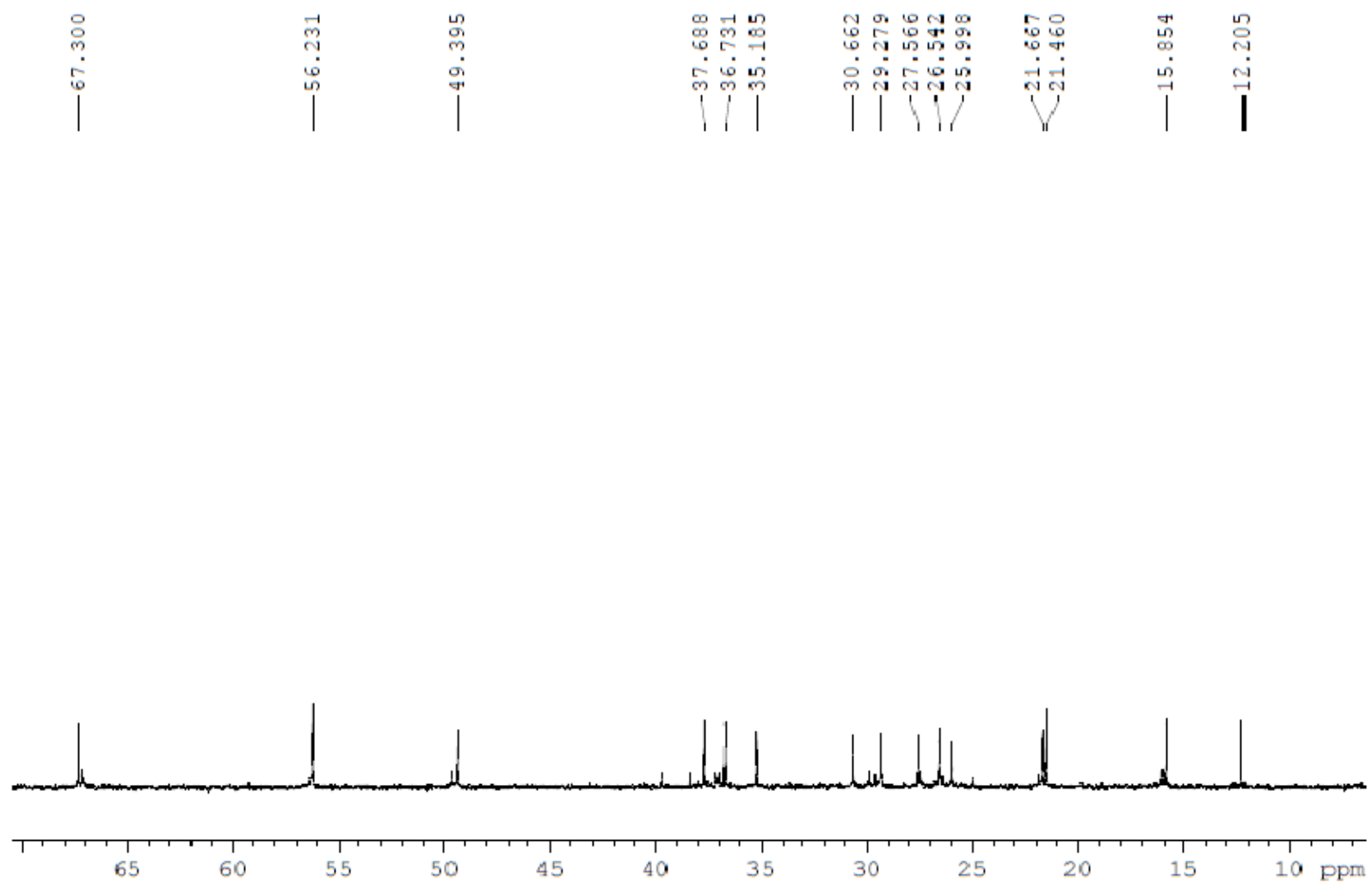


Figura S6. Expansão 2 do espectro de RMN ^{13}C do composto **Ca1** (CDCl_3 , 100 MHz).

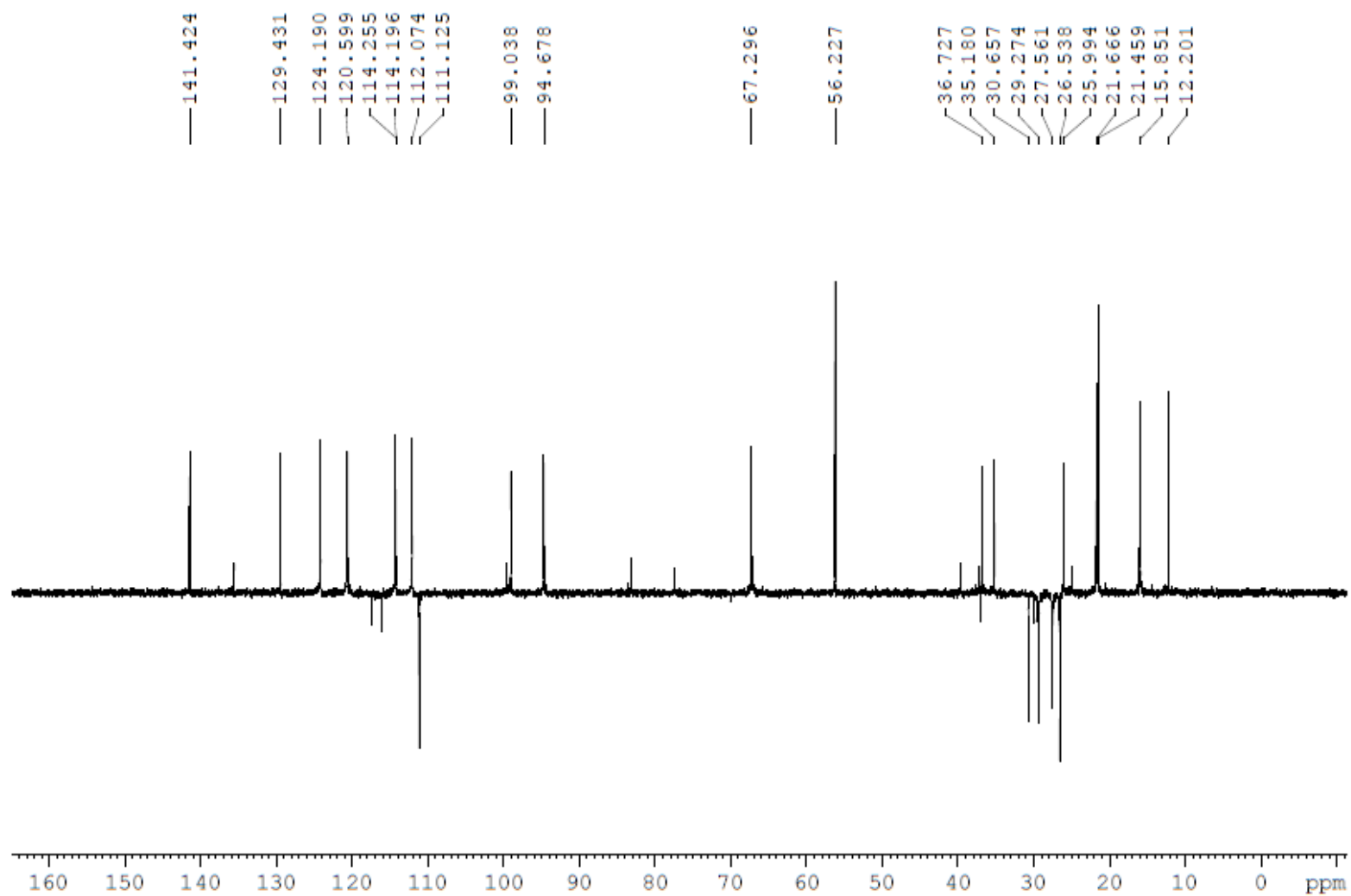


Figura S7. Subespectro DEPT 135° do composto **Ca1** (CDCl₃, 100 MHz).

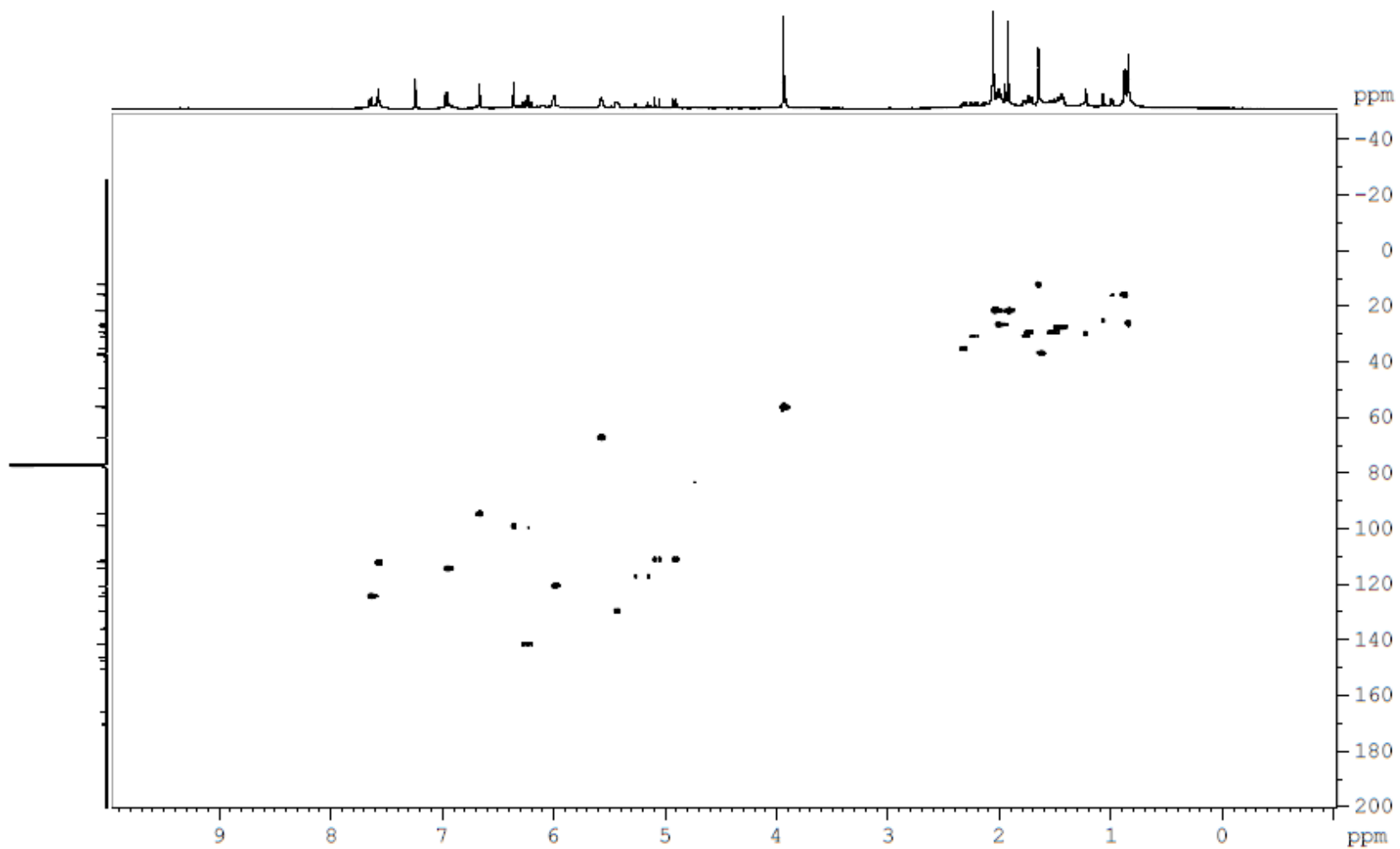


Figura S8. Mapa de contorno HSQC do composto **Ca1** (CDCl_3 , 100 MHz para ^{13}C e 400 MHz para ^1H).

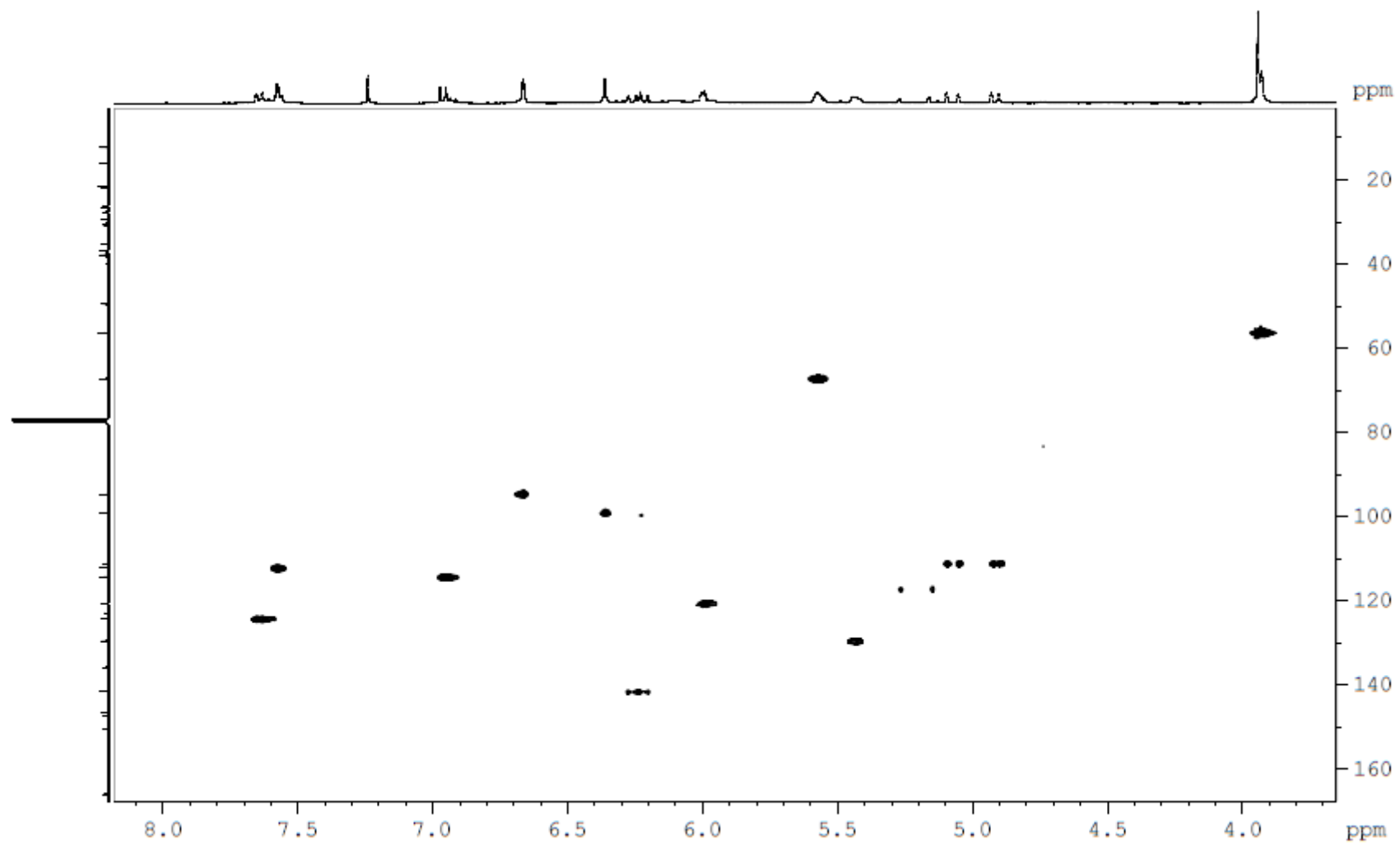


Figura S9. Expansão 1 do mapa de contorno HSQC do composto *Ca1* (CDCl_3 , 100 MHz para ^{13}C e 400 MHz para ^1H).

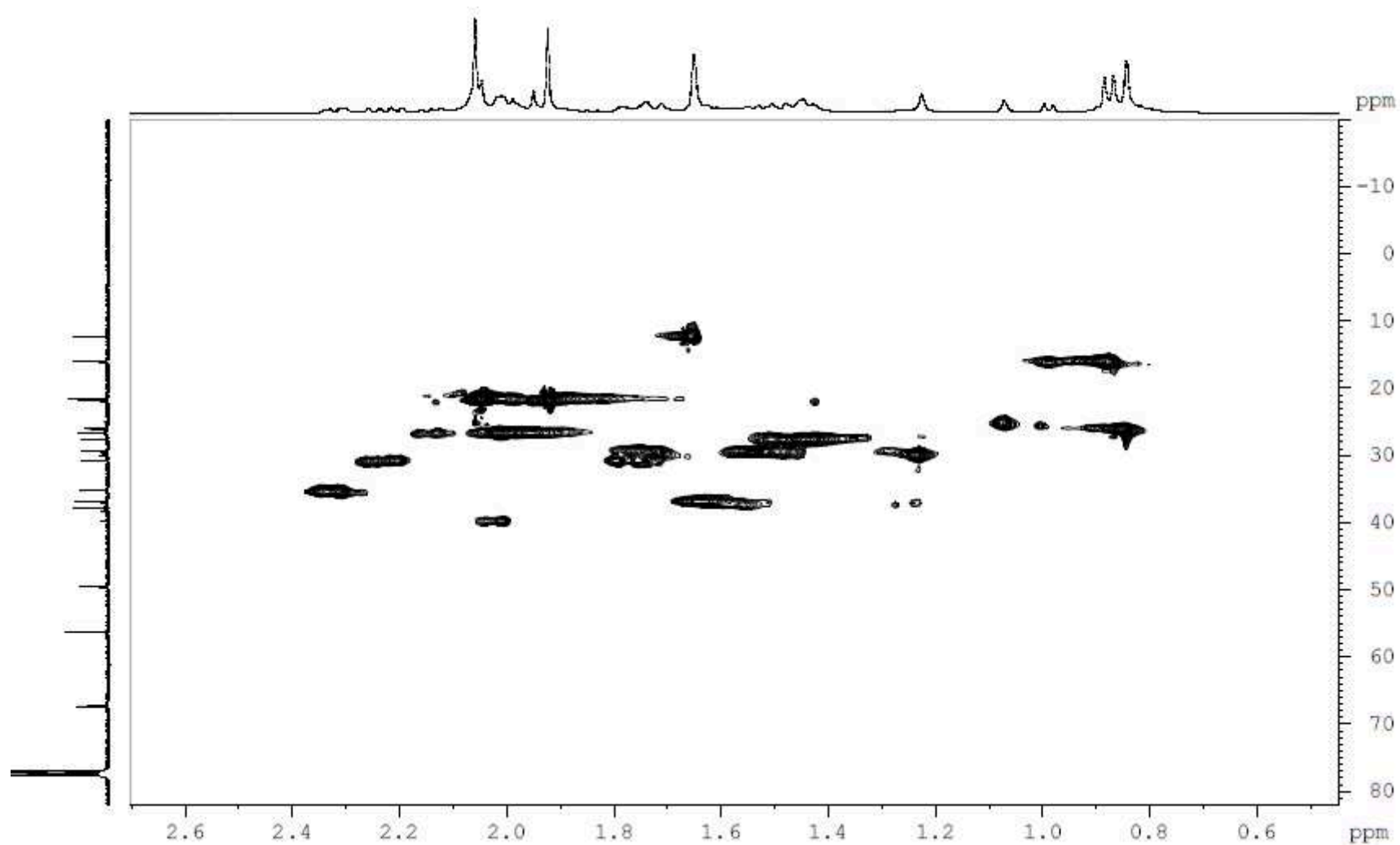


Figura S10. Expansão 2 do mapa de contorno HSQC do composto *Ca1* (CDCl_3 , 100 MHz para ^{13}C e 400 MHz para ^1H).

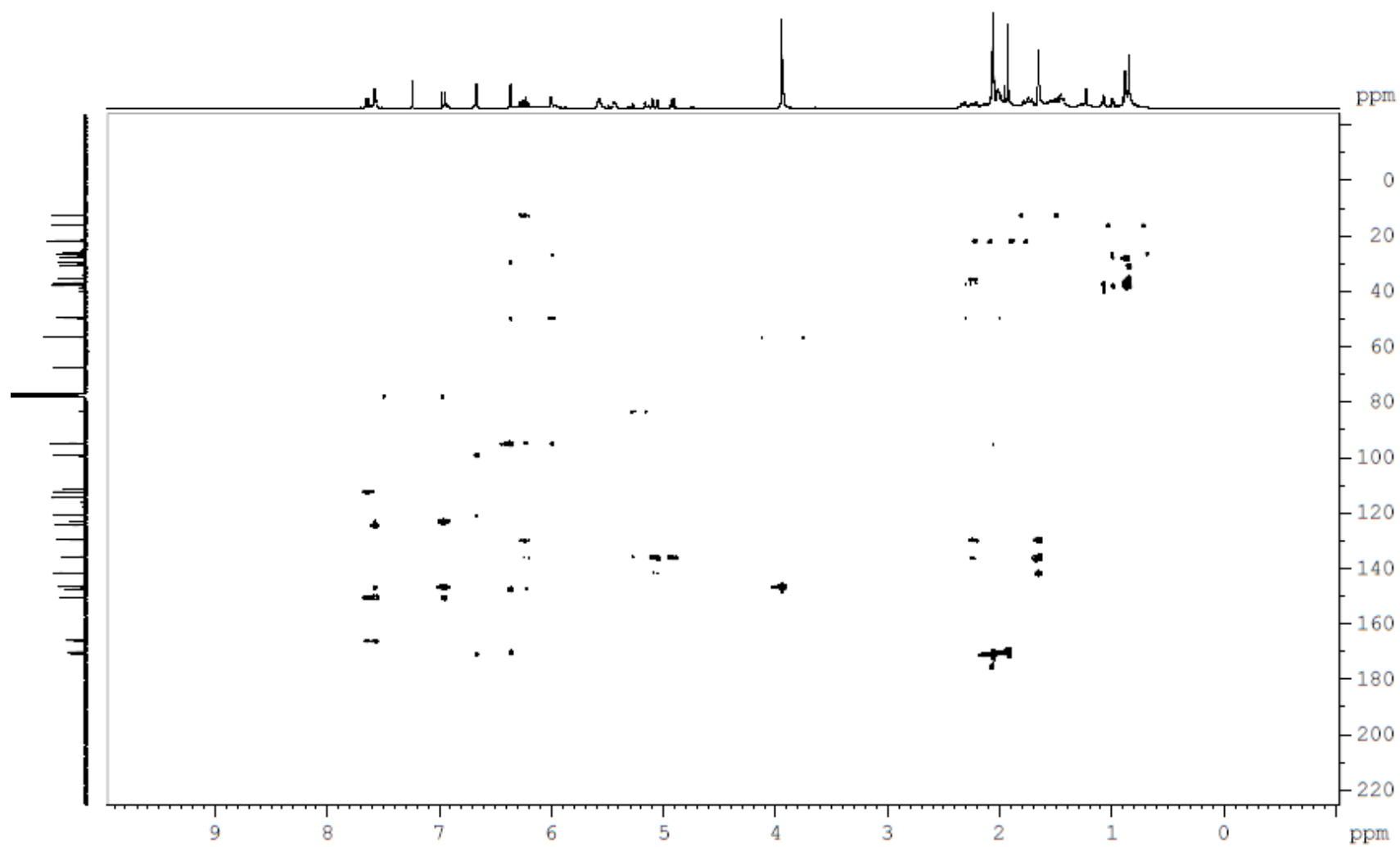


Figura S11. Mapa de contorno HMBC do composto **Ca1** (CDCl_3 , 100 MHz para ^{13}C e 400 MHz para ^1H).

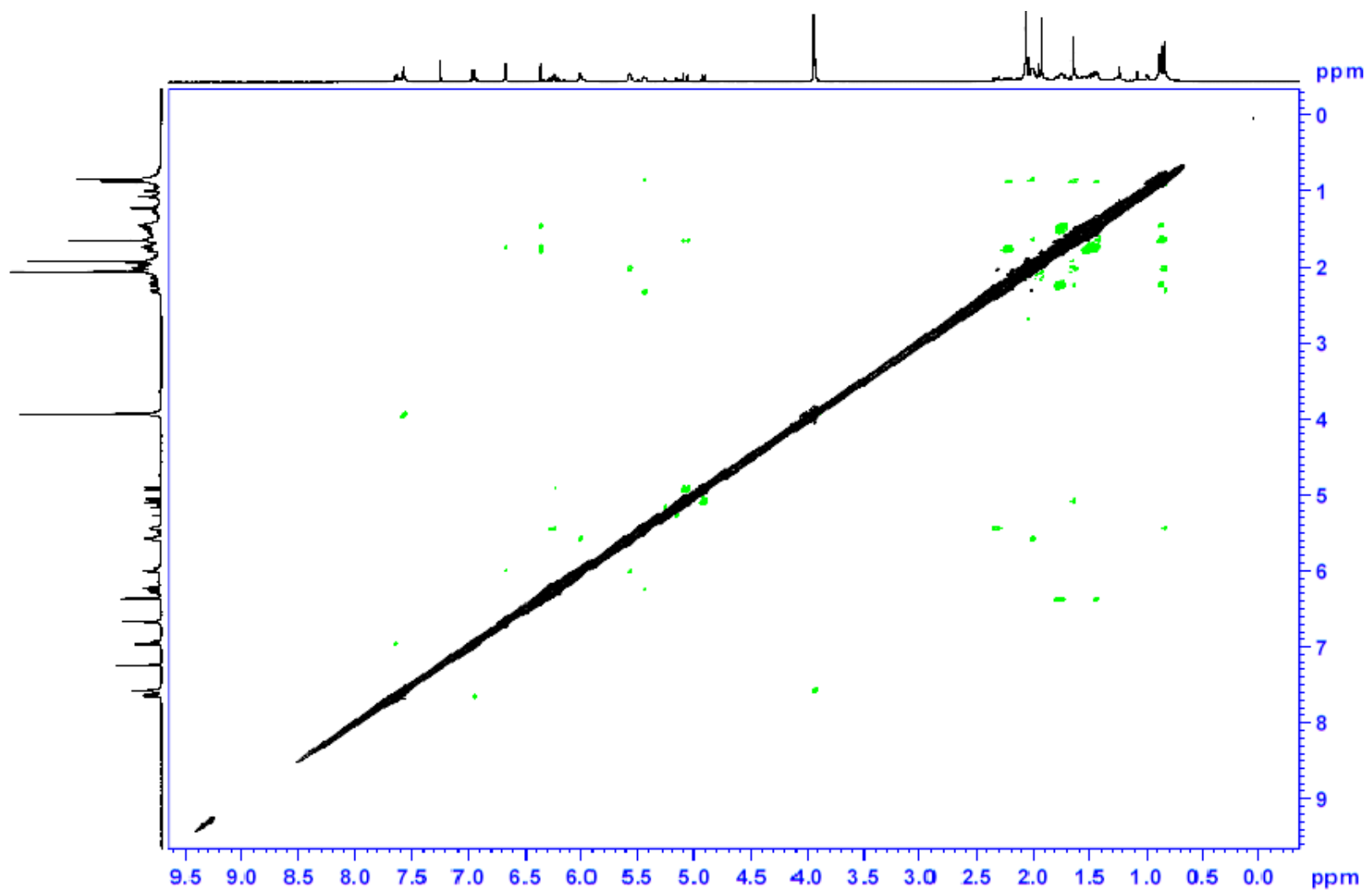


Figura S 12. Mapa de contorno NOESY do composto *Ca1* (CDCl₃, 400 MHz para ¹H).

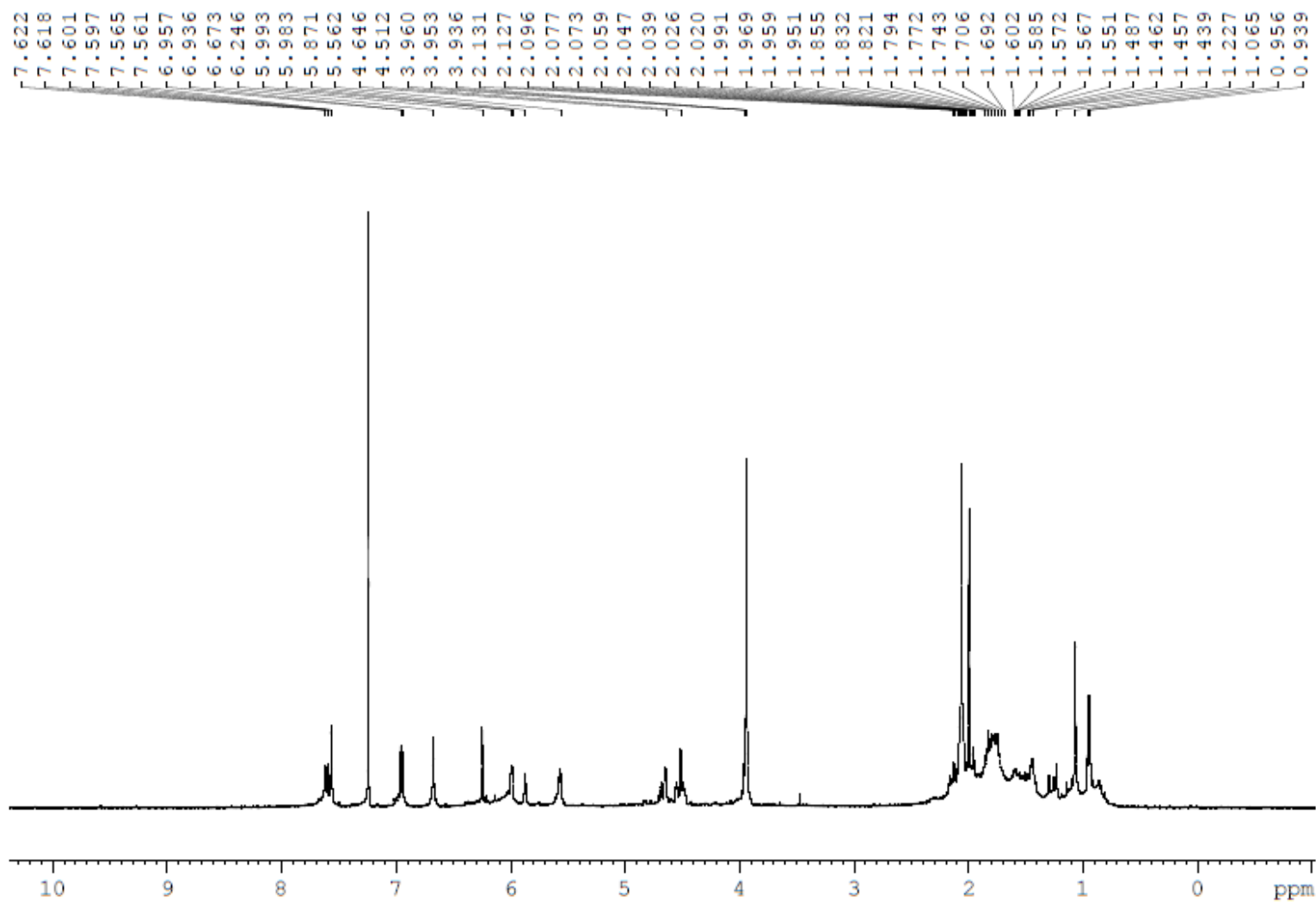


Figura S13. Espectro de RMN ^1H do composto *Ca2* (CDCl_3 , 400 MHz).

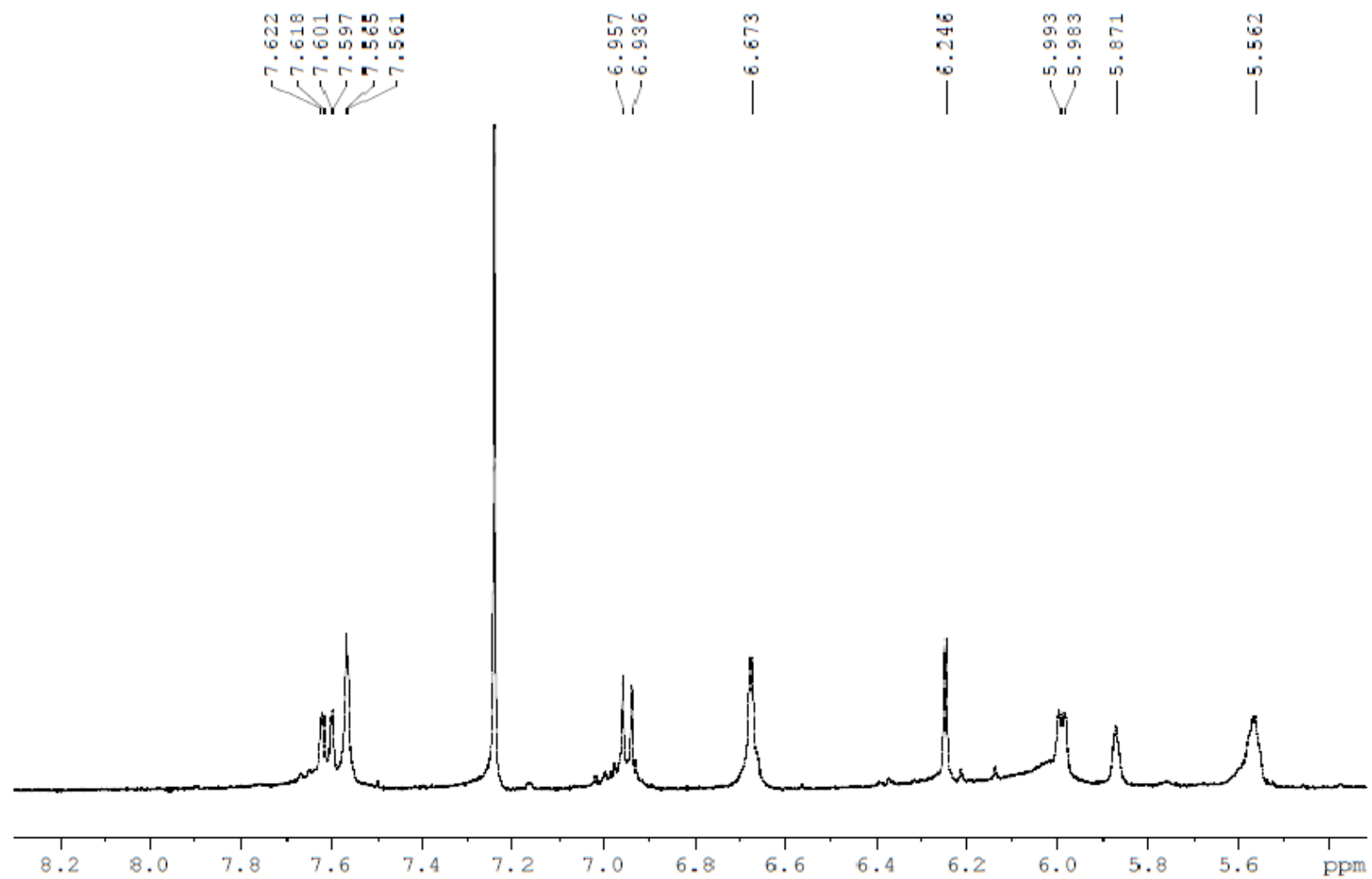


Figura S14. Expansão 1 do espectro de RMN ^1H do composto *Ca2* (CDCl_3 , 400 MHz).

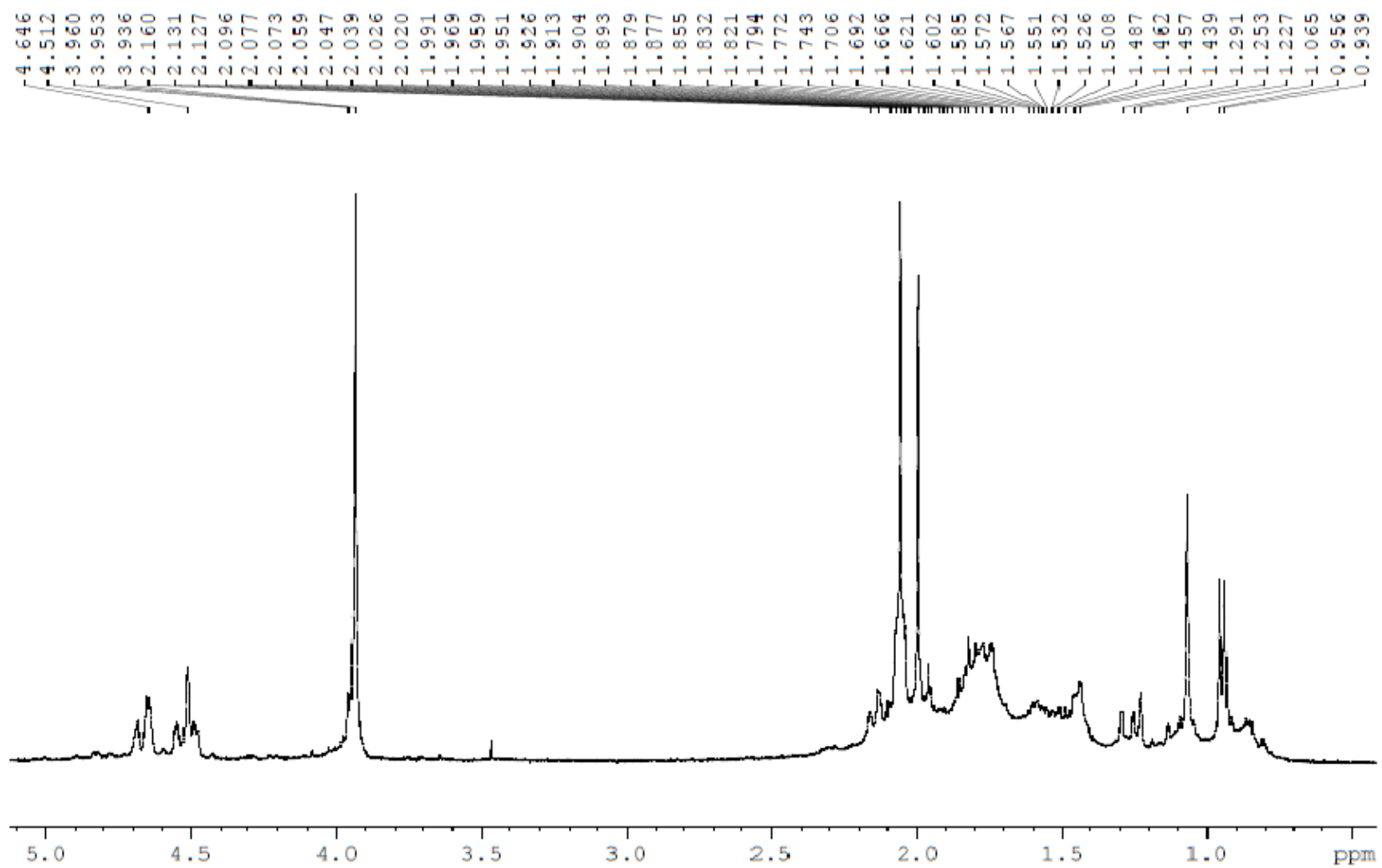


Figura S15. Expansão 2 do espectro de RMN ^1H do composto *Ca2* (CDCl_3 , 400 MHz).

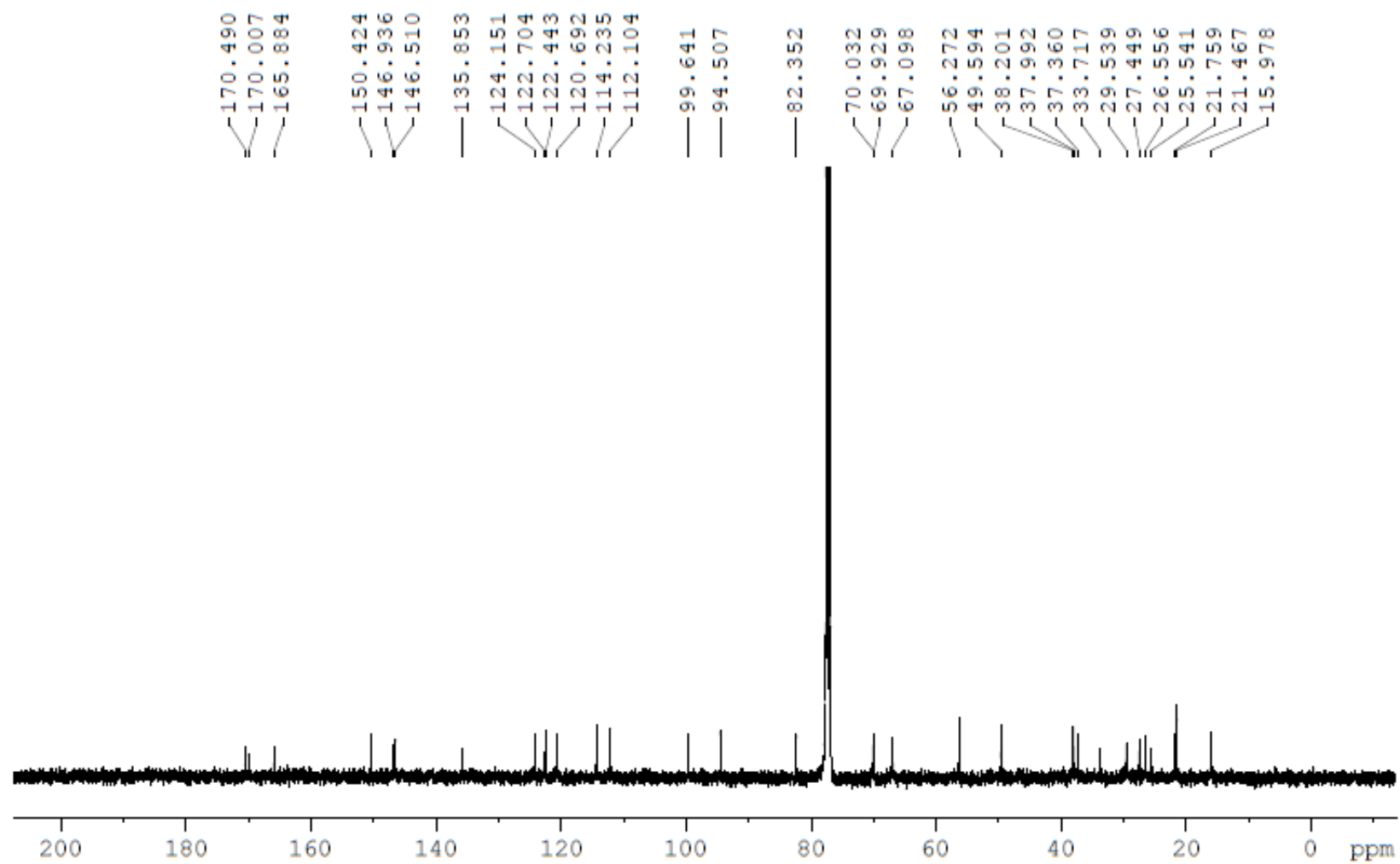


Figura S16. Espectro de RMN ^{13}C do composto *Ca2* (CDCl_3 , 100 MHz).

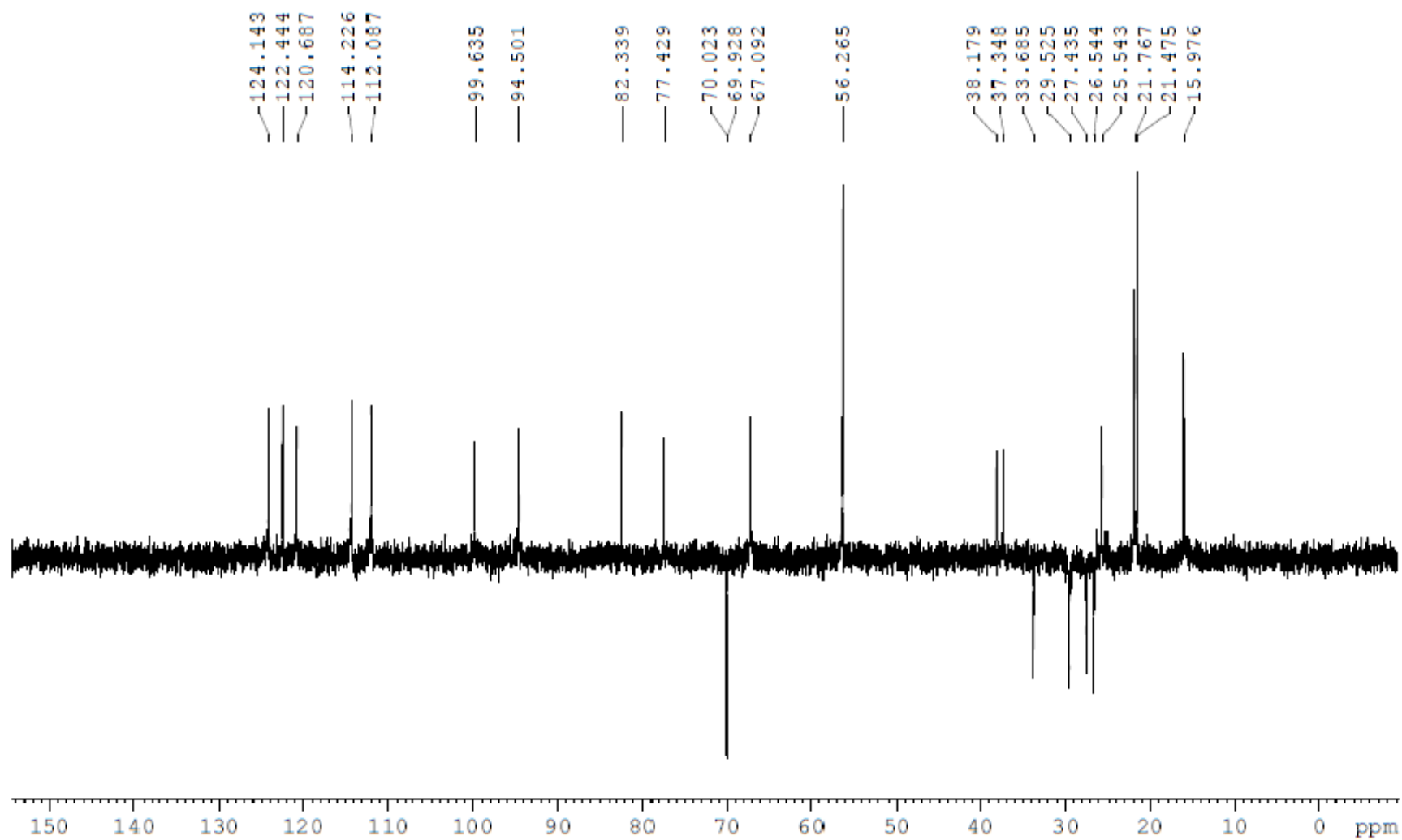


Figura S17. Subespectro DEPT 135° do composto *Ca2* (CDCl₃, 100 MHz).

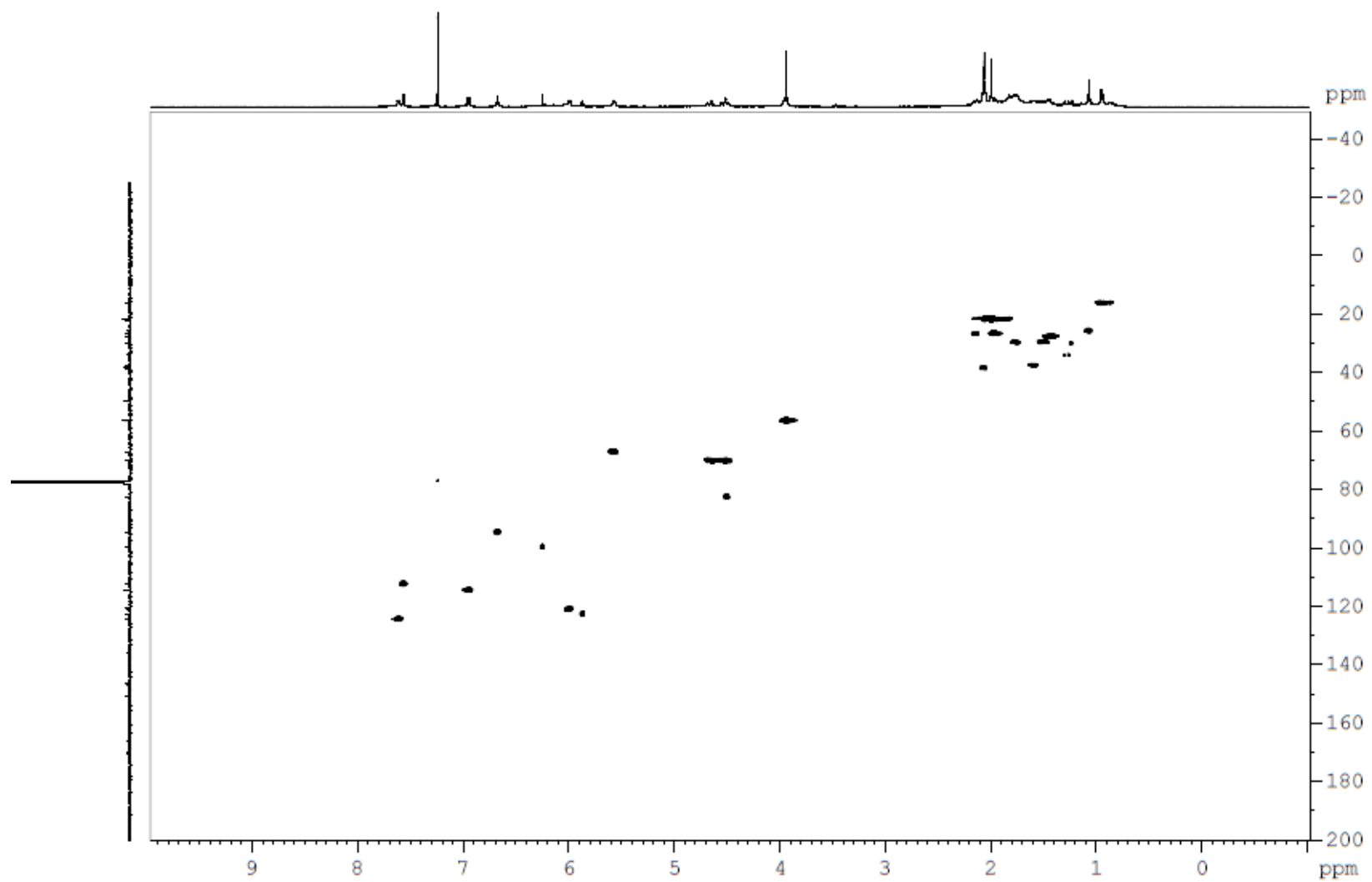


Figura S18. Mapa de contorno HSQC do composto *Ca2* (CDCl_3 , 100 MHz para ^{13}C e 400 MHz para ^1H).

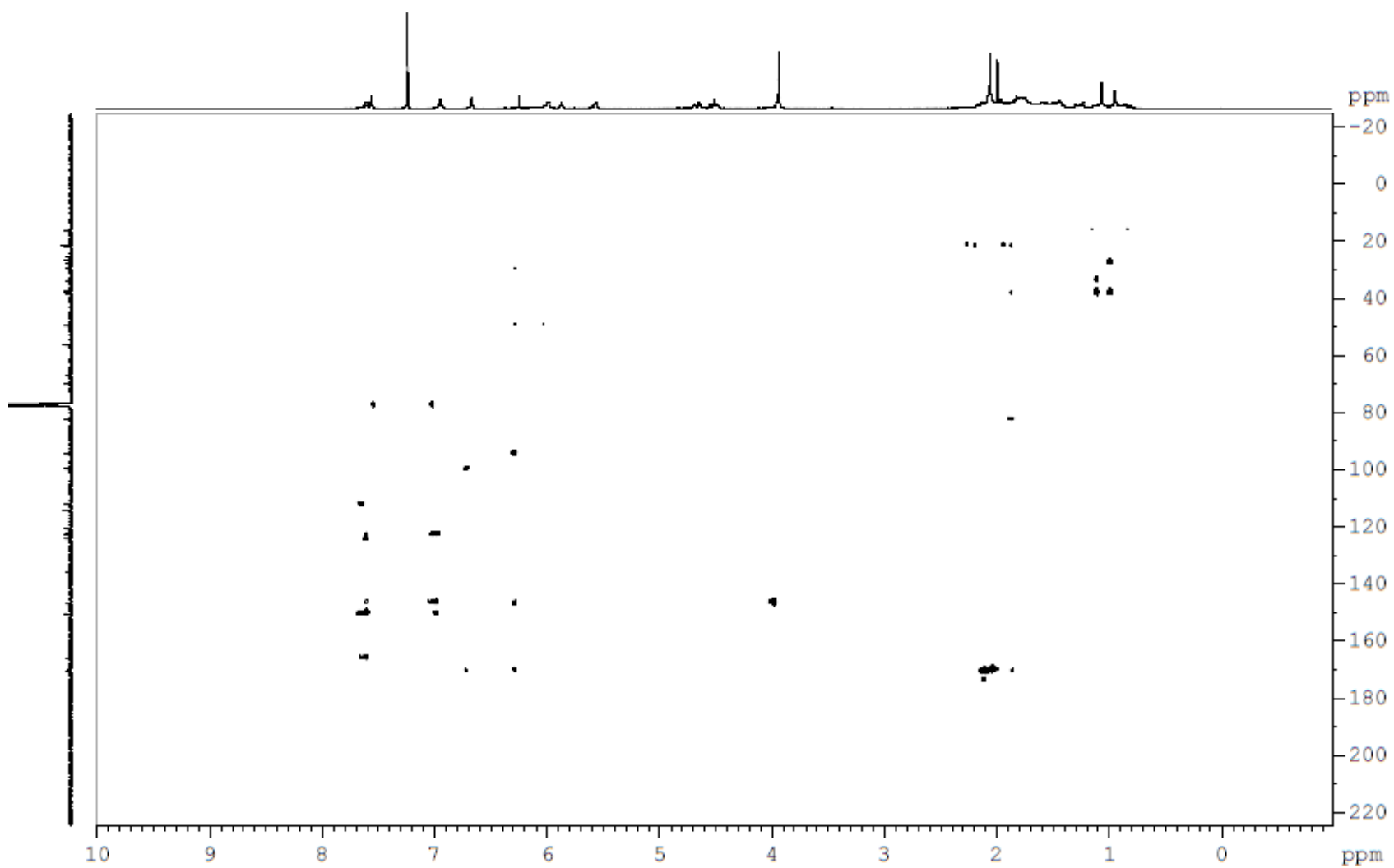


Figura S19. Mapa de contorno HMBC do composto *Ca2* (CDCl_3 , 100 MHz para ^{13}C e 400 MHz para ^1H).

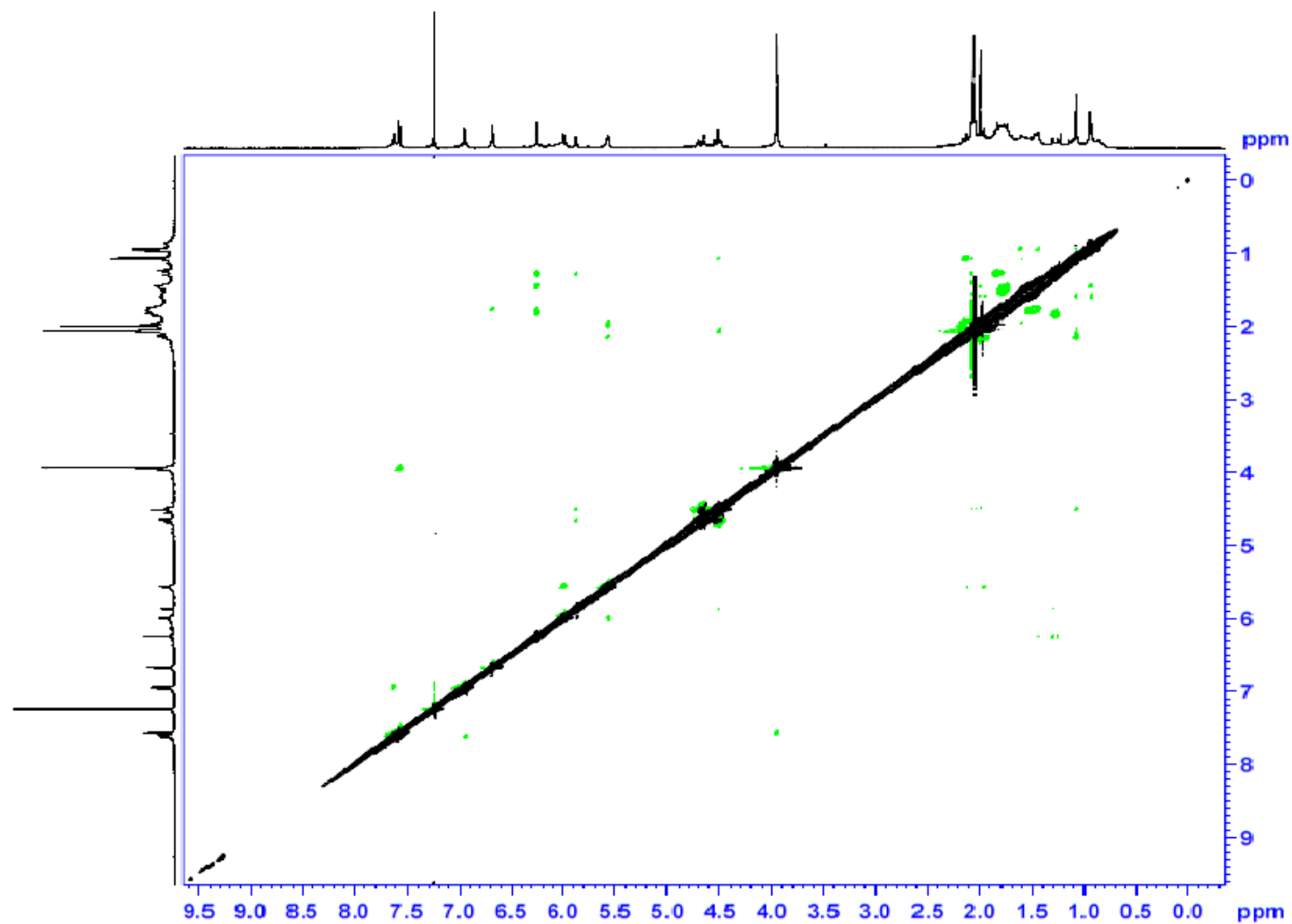


Figura S20. Mapa de contorno NOESY do composto *Ca2* (CDCl₃, 400 MHz para ¹H).

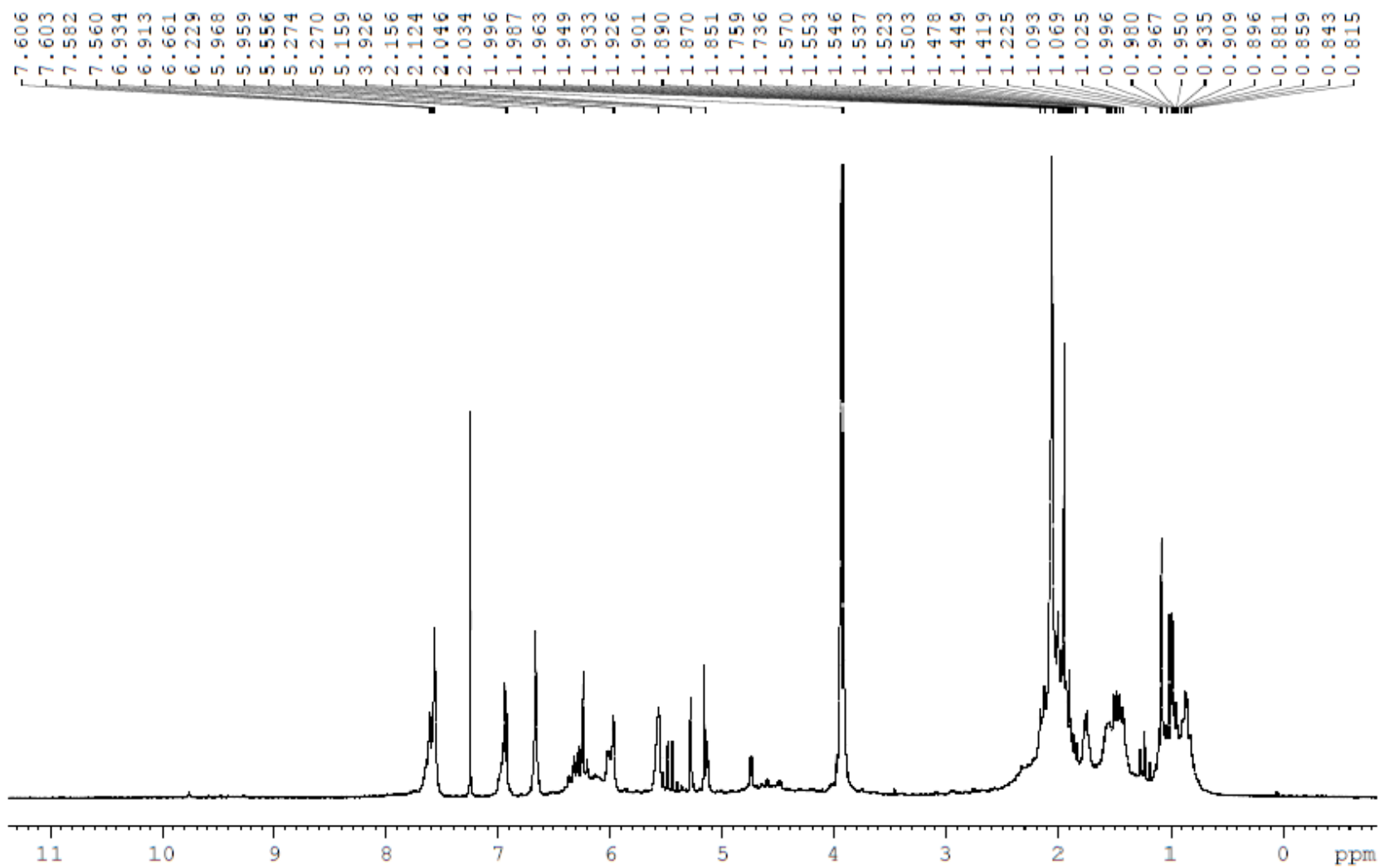


Figura S21. Espectro de RMN ^1H do composto *Ca3* (CDCl_3 , 400 MHz).

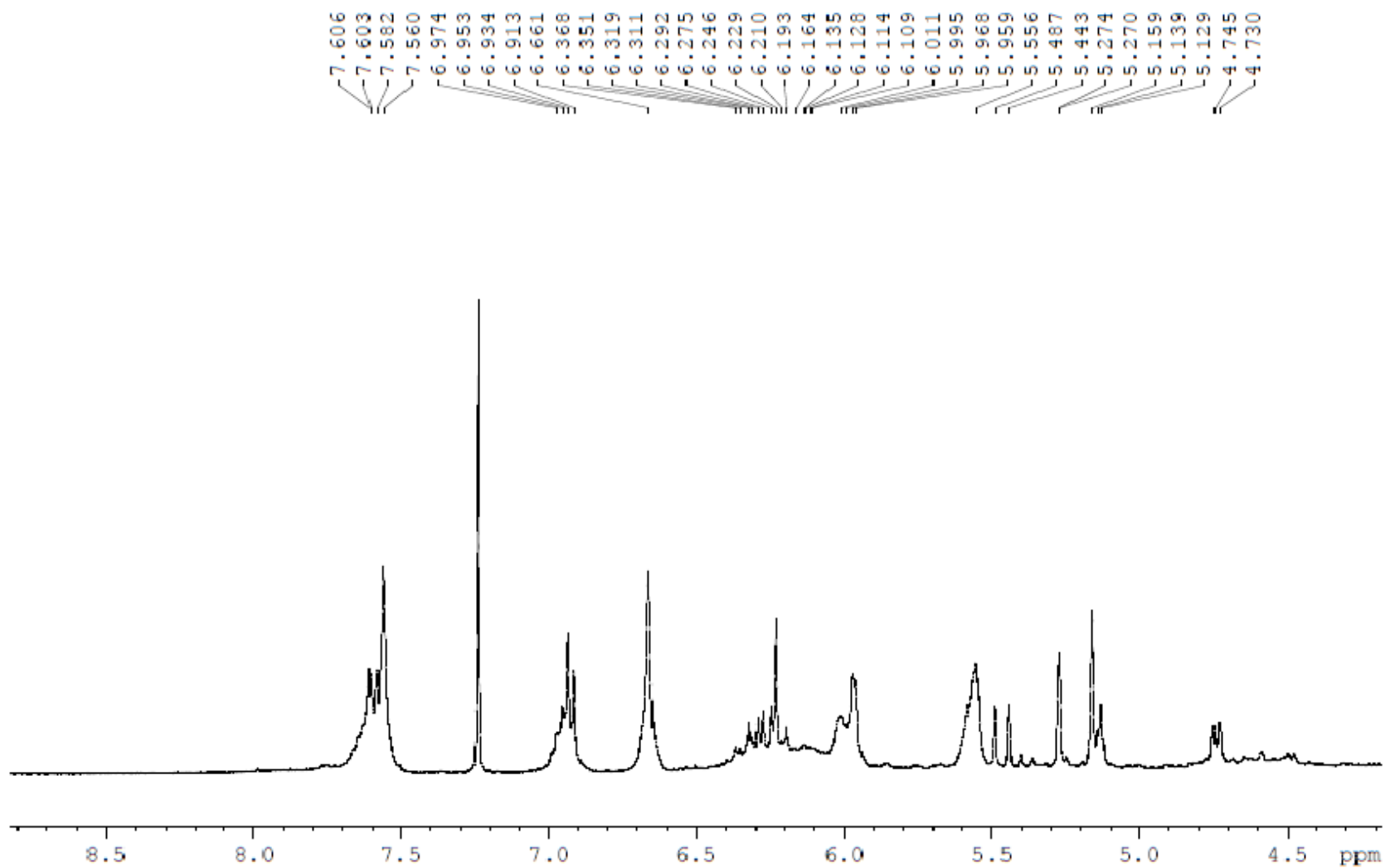


Figura S22. Expansão 1 do espectro de RMN ^1H do composto *Ca3* (CDCl_3 , 400 MHz).

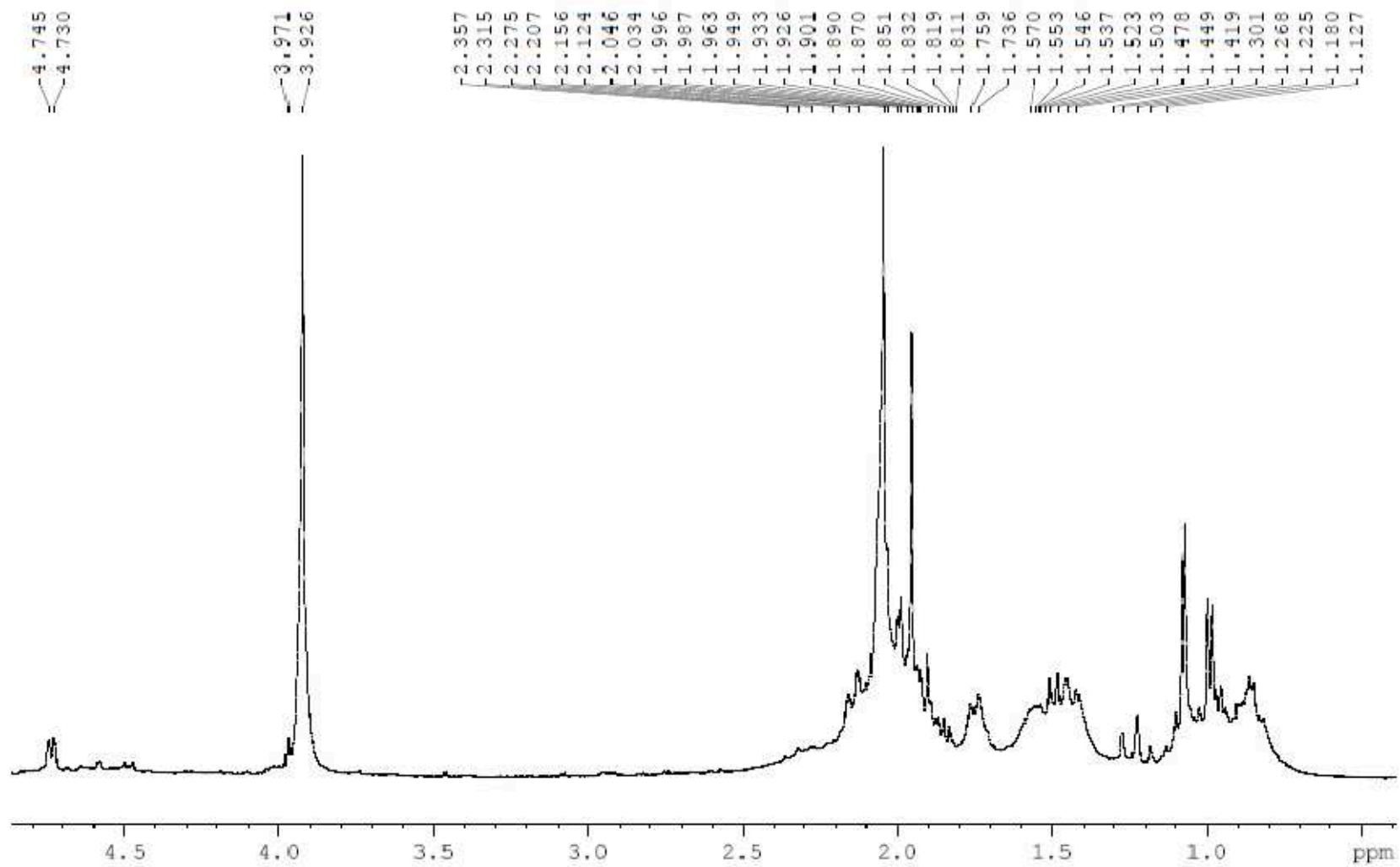


Figura S23. Expansão 2 do espectro de RMN ^1H do composto *Ca3* (CDCl_3 , 400 MHz).

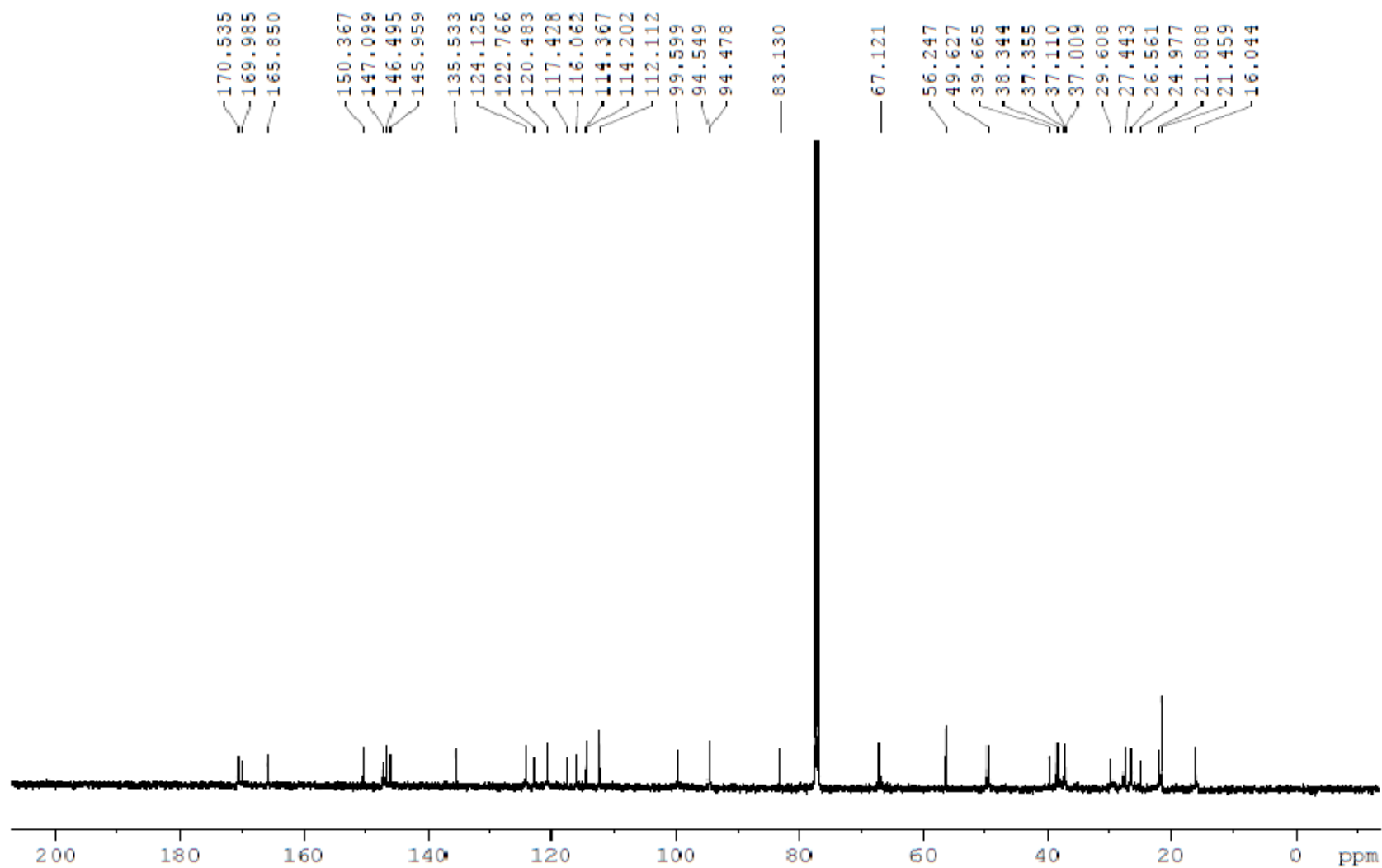


Figura S24. Espectro de RMN ^{13}C do composto *Ca3* (CDCl_3 , 100 MHz).

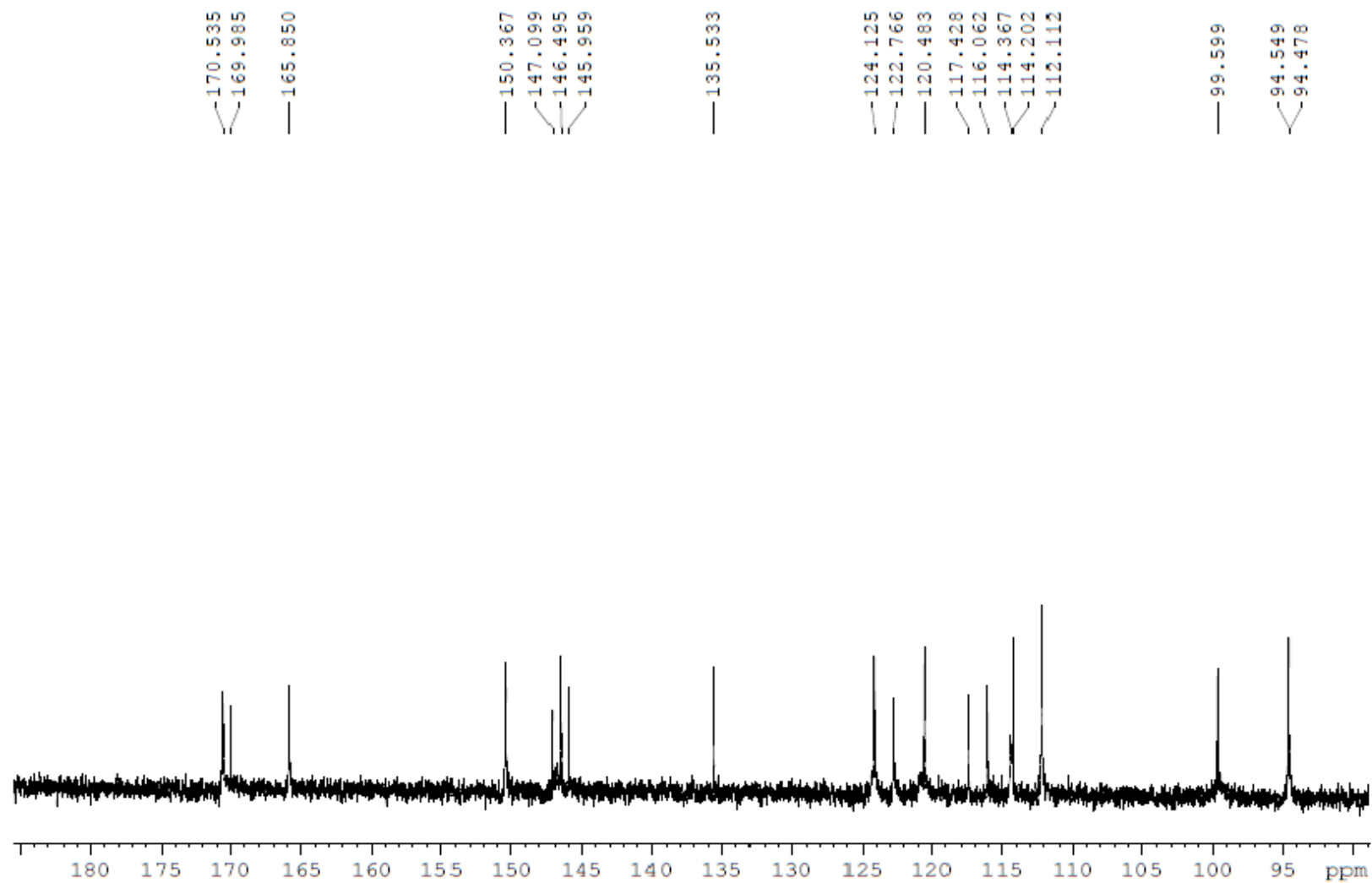


Figura S25. Expansão 1 do espectro de RMN ^{13}C do composto *Ca3* (CDCl_3 , 100 MHz).

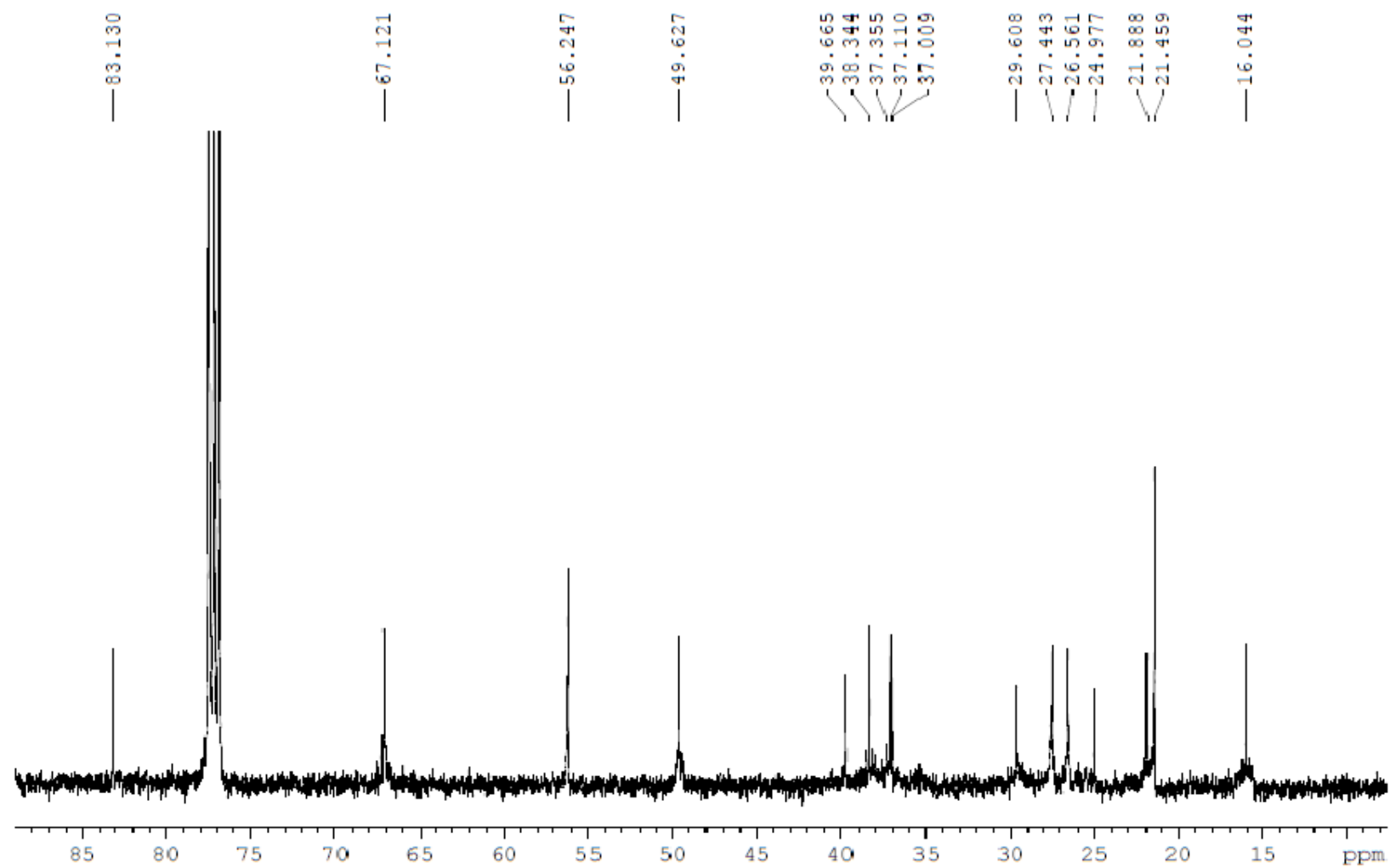


Figura S26. Expansão 2 do espectro de RMN ^{13}C do composto *Ca3* (CDCl_3 , 100 MHz).

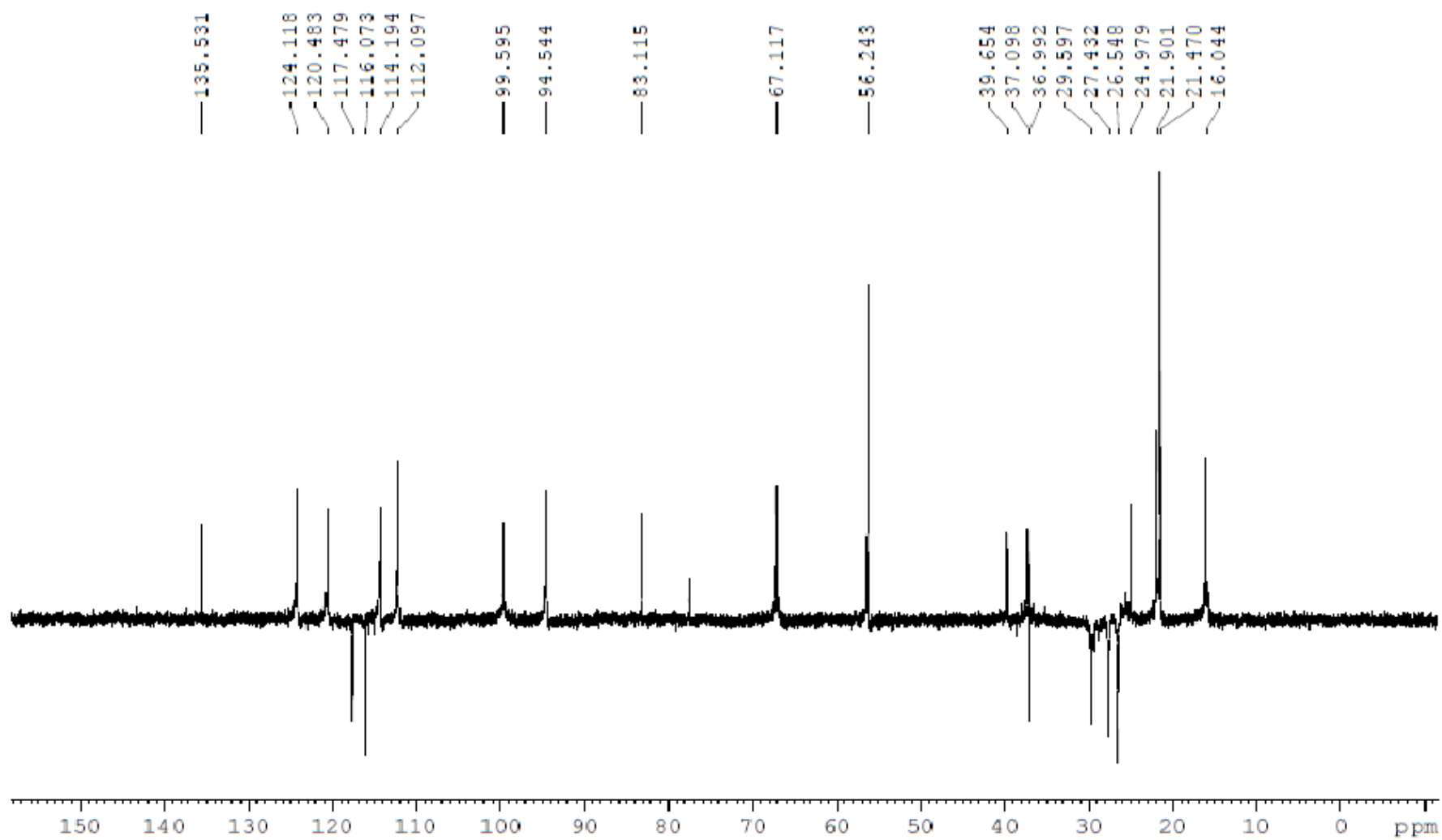


Figura S27. Subespectro DEPT 135° do composto *Ca3* (CDCl₃, 100 MHz).

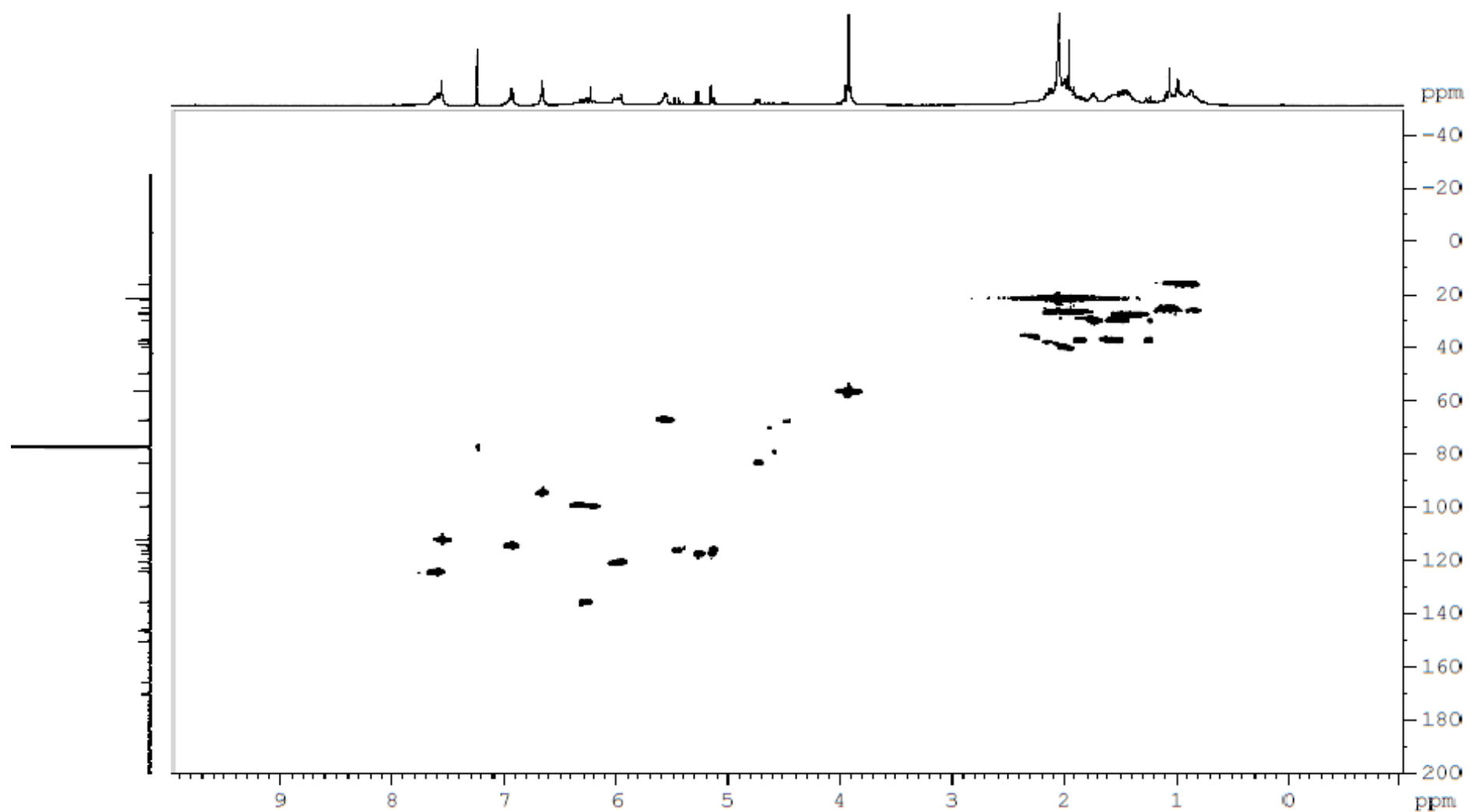


Figura S28. Mapa de contorno HSQC do composto *Ca3* (CDCl_3 , 100 MHz para ^{13}C e 400 MHz para ^1H).

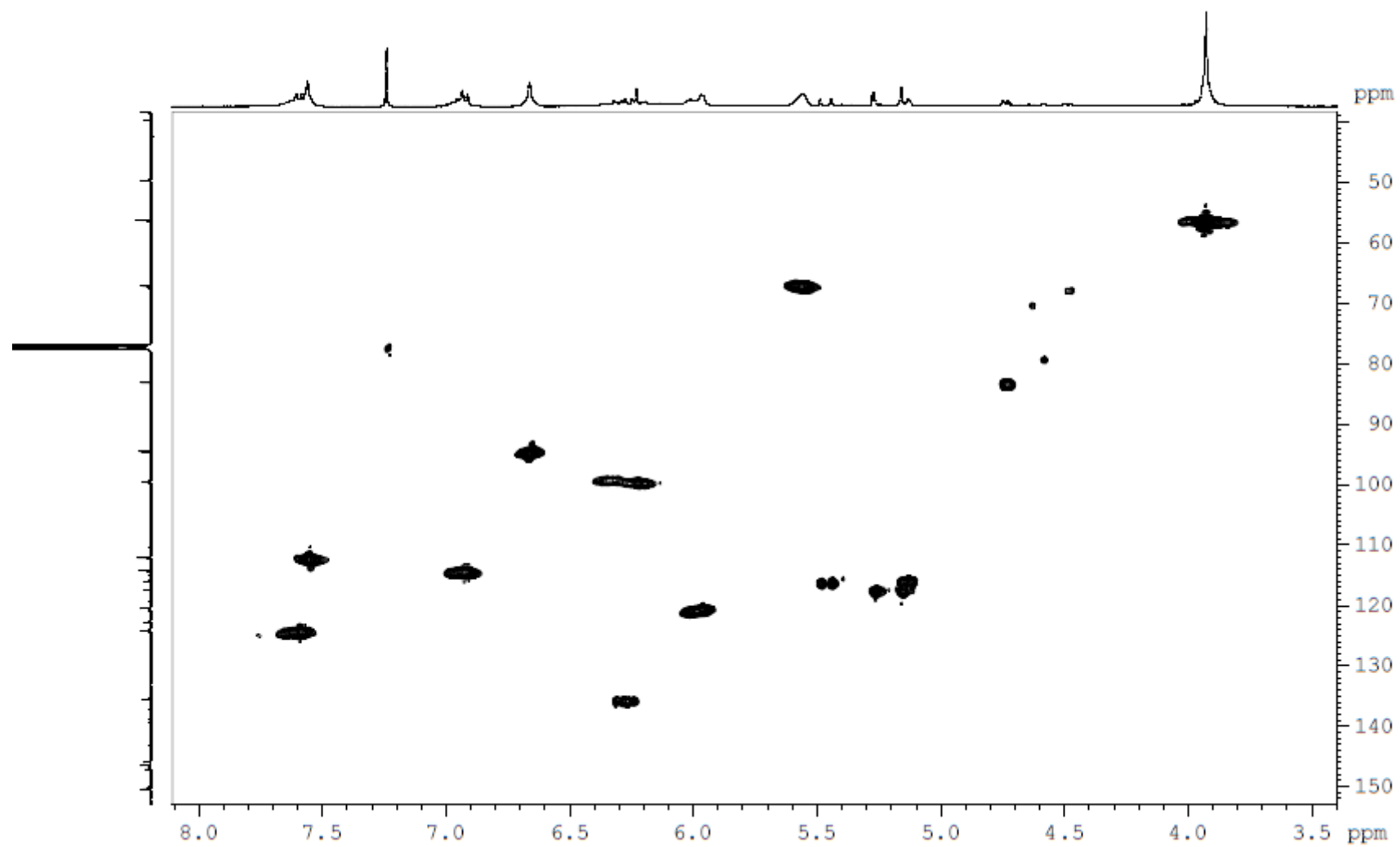


Figura S29. Expansão 1 do mapa de contorno HSQC do composto *Ca3* (CDCl_3 , 100 MHz para ^{13}C e 400 MHz para ^1H).

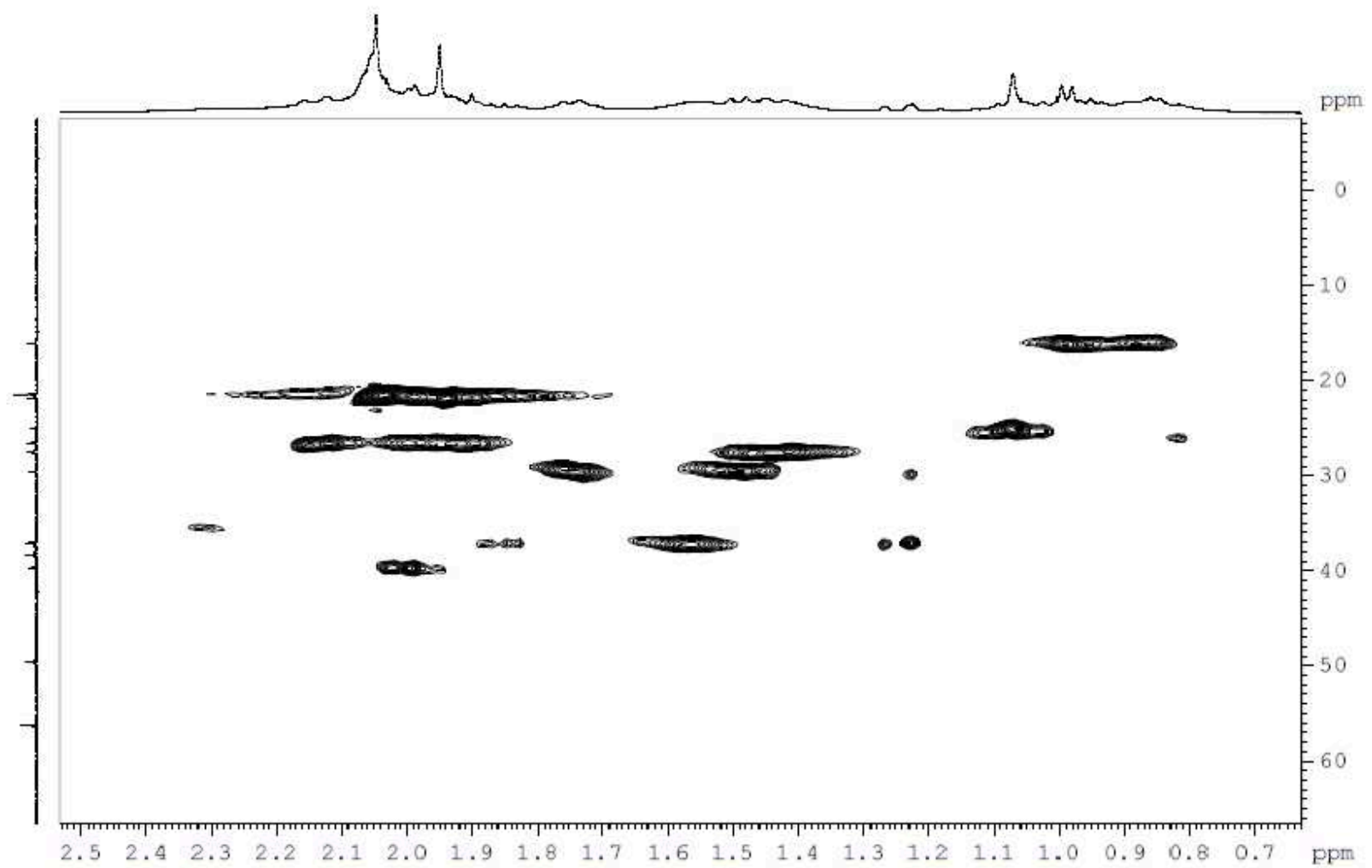


Figura S30. Expansão 2 do mapa de contorno HSQC do composto *Ca3* (CDCl_3 , 100 MHz para ^{13}C e 400 MHz para ^1H).

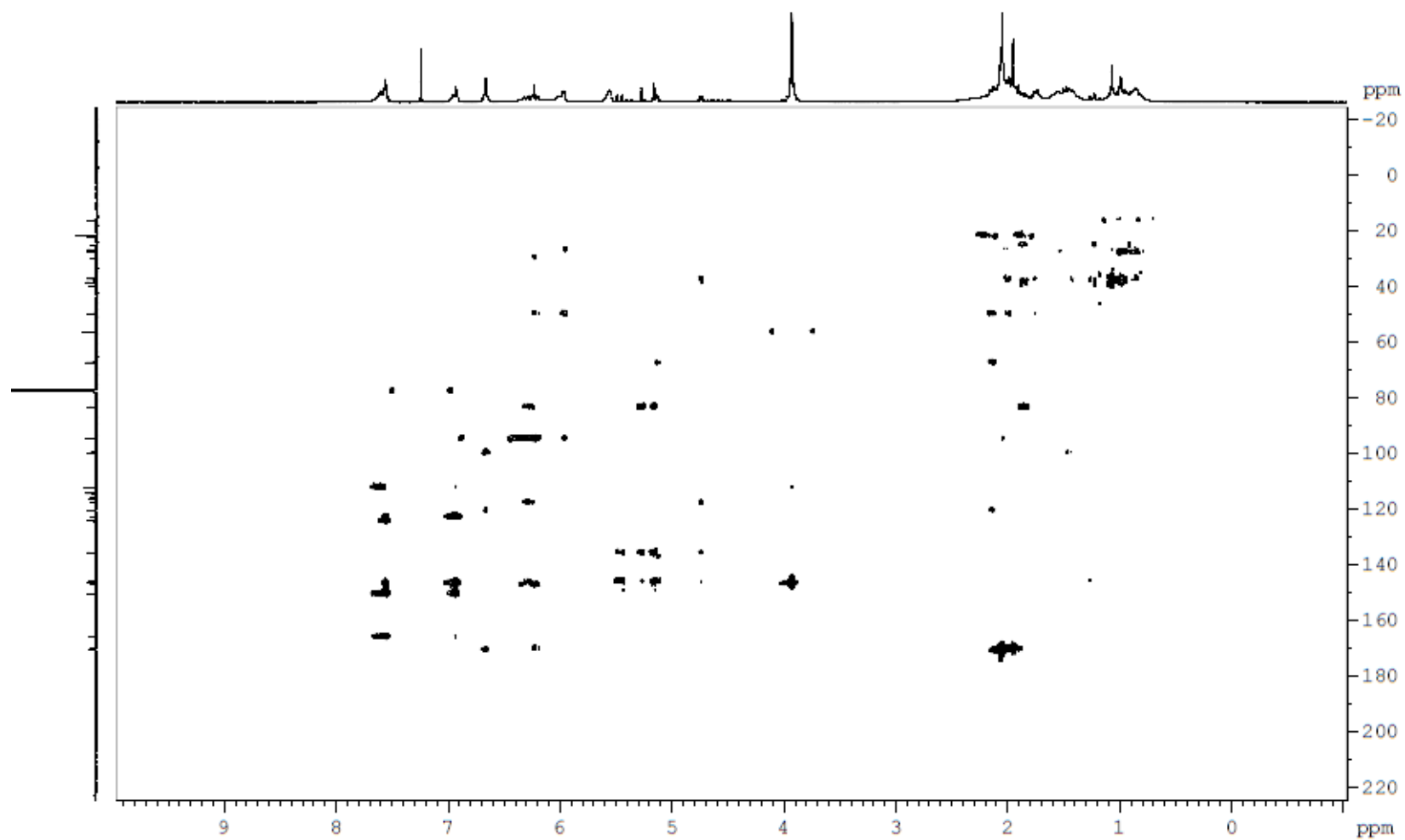


Figura S31. Mapa de contorno HMBC do composto *Ca3* (CDCl_3 , 100 MHz para ^{13}C e 400 MHz para ^1H).

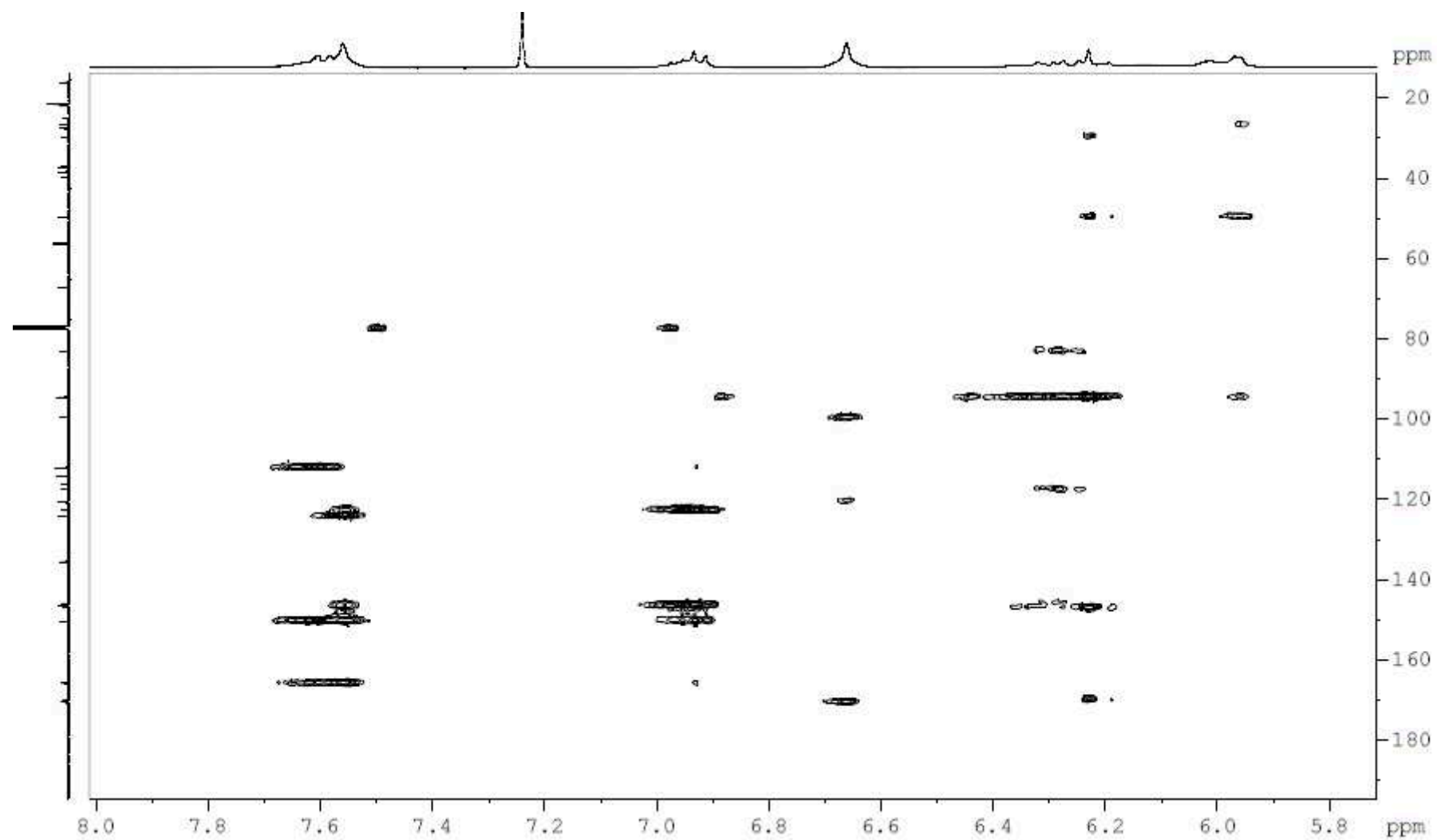


Figura S32. Expansão 1 do mapa de contorno HMBC do composto *Ca3* (CDCl_3 , 100 MHz para ^{13}C e 400 MHz para ^1H).

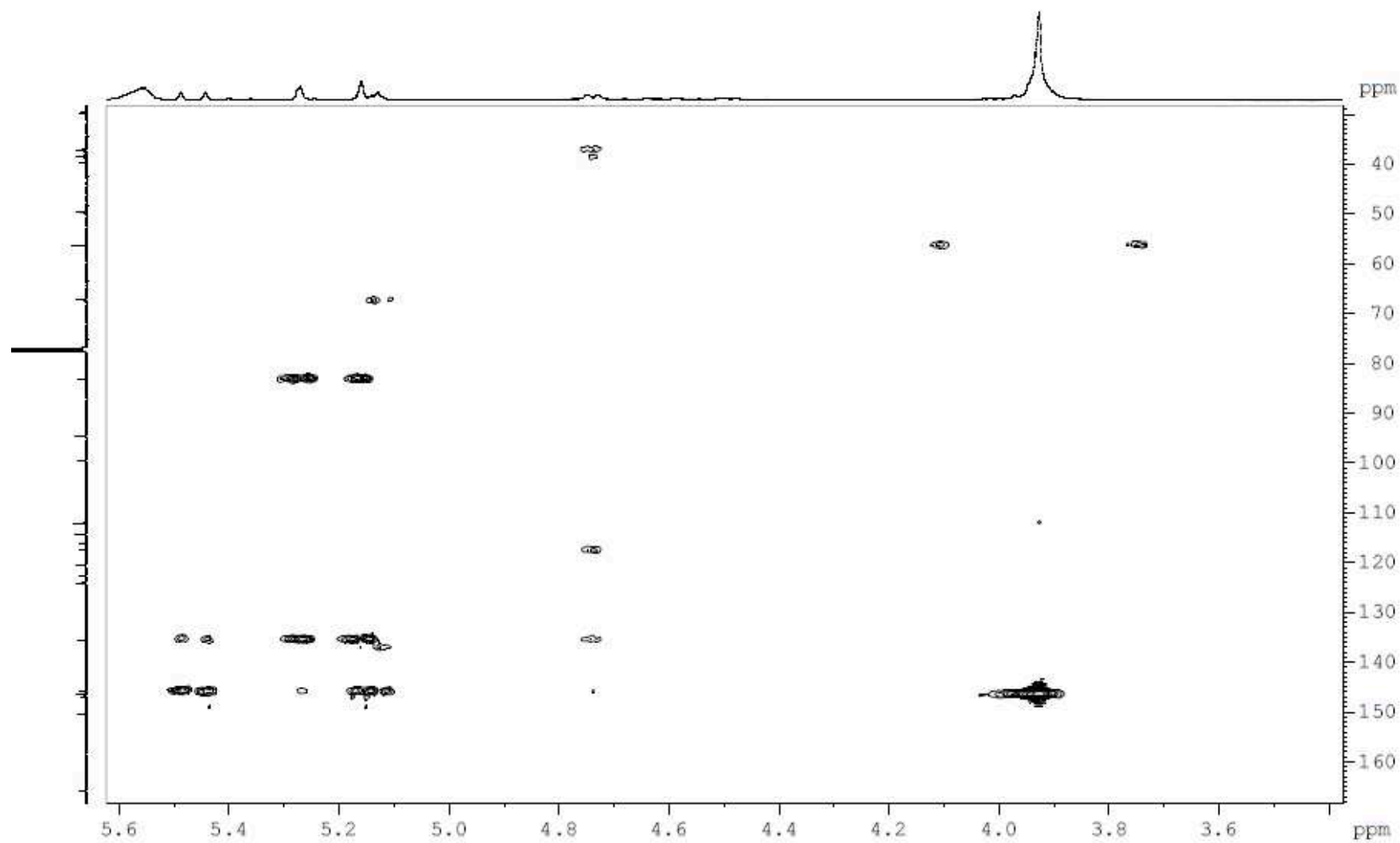


Figura S33. Expansão 2 do mapa de contorno HMBC do composto *Ca3* (CDCl₃, 100 MHz para ¹³C e 400 MHz para ¹H).

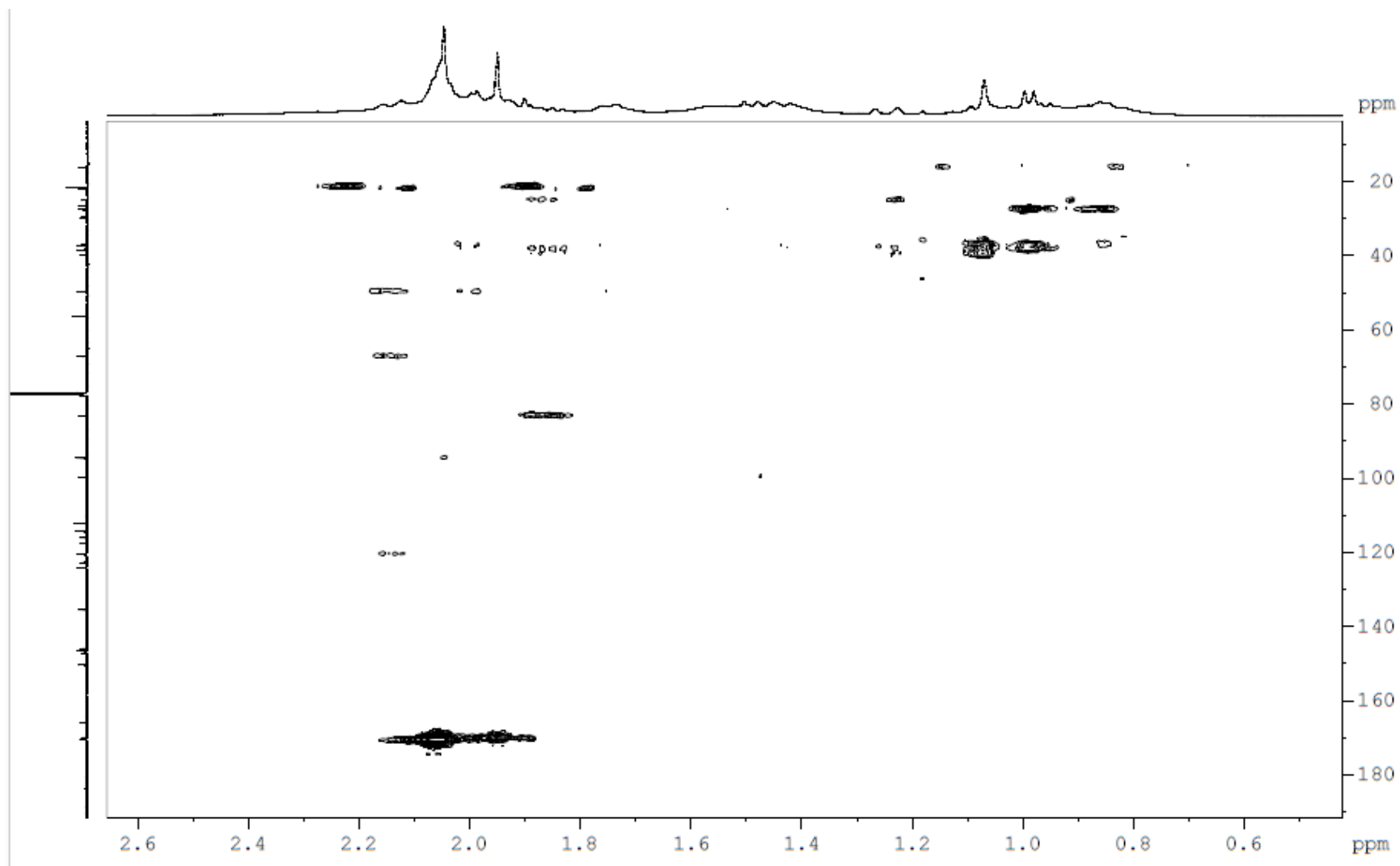


Figura S34. Expansão 3 do mapa de contorno HMBC do composto *Ca3* (CDCl₃, 100 MHz para ¹³C e 400 MHz para ¹H).

CONCLUSÃO FINAL

Este trabalho avaliou a atividade citotóxica de 282 extratos oriundos de 72 espécies vegetais típicas da Mata Atlântica. Os resultados preliminares revelaram duas espécies promissoras, *Casearia arborea* e *Sorocea hilarii*. Através da análise de dados espectrofométricos em ferramentas de rede molecular aplicando desrepliação foi possível identificar os produtos naturais presentes nas frações citotóxicas dessas duas espécies. Para fração diclorometânica de *Casearia arborea*, os diterpenos clerodânicos identificados podem ser os responsáveis pela atividade. Na fração *n*-butanólica de *Sorocea hilarri*, não apenas uma classe de produtos naturais identificados, mas sim duas, são prováveis responsáveis pela atividade citotóxica, sendo elas megastigmanos e lignanas. Reforçando a importância da pesquisa com bioprospecção molecular ao revelar um grande potencial farmacológico de espécies do bioma Mata Atlântica. Os compostos ativos dessas espécies podem ser importantes agentes antitumorais.

Nesse sentido, a espécie *Casearia arborea* foi selecionada para o isolamento e a identificação de produtos naturais ativos que atuem no desenvolvimento do câncer de cólon. Utilizando fracionamento cromatográfico biomonitorado, foi possível chegarmos a frações enriquecidas em diterpenos clerodânicos. Essas frações demonstraram inibir a formação de clones e a migração celular, induzir a morte celular por apoptose e interferir na distribuição do ciclo celular de células cancerosas de cólon SW480. Posteriormente foi feita a purificação desses diterpenos clerodânicos de *Casearia arborea*. Foi possível isolar 3 diterpenos clerodânicos, dois deles inéditos: casearborina F e casearborina G. Para continuidade dos estudos, esses novos diterpenos clerodânicos podem ser analisados a fim de obter mais informações que reforcem como esses compostos atuam contra o câncer de cólon e então se tornar um possível medicamento anticâncer.

Iniciar a pesquisa com uma grande coleção de extratos e conseguir ao final obter produtos naturais isolados com potencial antitumoral e inéditos é valioso. A bioprospecção mais uma vez se mostra eficiente na busca de produtos naturais com potencial antitumoral.