



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

MARCELINO SANTOS DO ROSÁRIO

**Isolamento, caracterização química e avaliação do potencial anti-leishmania das
flores de *Arrabidaea brachypoda* (DC) Bureau**

São Luís

2023

MARCELINO SANTOS DO ROSÁRIO

**Isolamento, caracterização química e avaliação do potencial anti-leishmania das
flores de *Arrabidaea brachypoda* (DC) Bureau**

Dissertação apresentada ao Curso de
Mestrado em Química do Centro de Ciências
Exatas e Tecnologia da Universidade
Federal do Maranhão.

Orientadora: Profa. Dra. Claudia Quintino
da Rocha.

São Luís

2023

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Santos do Rosário, Marcelino.

Isolamento, caracterização química e avaliação do potencial anti-leishmania das flores de Arrabidaea brachypoda DC Bureau / Marcelino Santos do Rosário. - 2023.

107 p.

Orientador(a): Claudia Quintino da Rocha.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Química/ccet, Universidade Federal do Maranhão, São Luís - MA, 2023.

1. Bignoniaceae. 2. Brachydinas. 3. Flavonoides. 4. GNPS. 5. Leishmaniose. I. Quintino da Rocha, Claudia.
II. Título.

MARCELINO SANTOS DO ROSÁRIO

**Isolamento, caracterização química e avaliação do potencial anti-leishmania das
flores de *Arrabidaea brachypoda* (DC) Bureau**

Dissertação apresentada ao Curso de
Mestrado em Química do Centro de Ciências
Exatas e Tecnologia da Universidade
Federal do Maranhão.

Aprovada em 05/01/2023

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Claudia Quintino da Rocha (PPGQUIM-UFMA) - Orientadora

**Prof. Dr. Raimundo Gonçalves de Oliveira Júnior (Université de Paris Cité) – 1º
examinador**

Prof. Dr. Renato Sonchini Gonçalves (PPGQUIM-UFMA) – 2º examinador

SÚMULA CURRICULAR

Dados pessoais

Nome: Marcelino Santos do Rosário

Naturalidade: São Luís - MA

Nacionalidade: Brasileiro

Formação acadêmica

Graduação em Licenciatura em Química pela Universidade Estadual do Maranhão (UEMA) no campus Universitário Paulo VI.

Pós-graduação: Mestrado em andamento (2021-2022)

Mestrado em Química, realizado no Departamento de Química da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), tendo como orientadora Profa. Dra. Cláudia Quintino da Rocha.

Título do projeto: Isolamento, caracterização química e avaliação do potencial anti-leishmania das flores de *Arrabidaea brachypoda* (DC) Bureau.

TRABALHOS CIENTÍFICOS

Resumos em congressos

Rosário, M. S. Nascimento, J. R.; Pinheiro, A. A.; Miranda, A. J.; Lima, A. S.; Rosário, C. J. R. M.; Silva, M. C. P.; Rocha, C. Q. **Potencial anti-parasitário do extrato e frações de *Fridericia platyphylla***. III COPNAT – CESMAC, 2022.

ROSÁRIO; M. S.; SERPELONI; J. M.; OLIVEIRA; L. C. B.; FUJIKIUMA; A.; TUTTIS, K.; RIBEIRO, D. L.; CÂMARA M. B. P.; ROCHA, C. Q.; CÔLUSUMA, I. M. S. **Atividade antitumoral da cirsimarina em células MCF-7 cultivadas em modelos 2D e 3D**. XXVI Simpósio brasileiro de produtos naturais. UFOPA, Santarém, Pará, 2022.

Rosário, M. S.; Pinheiro, A. A.; Miranda, A. J.; Bona, S. S. S.; Costa, I. S.; Santos, A. L. P.; SILVA, M. C.P.; ROCHA, C. Q. **Caracterização química e avaliação do potencial leishmanicida do extrato e frações de *Fridericia platyphylla* (Cham.) L.G. Lohmann**. VI Jornada Fluminense de Produtos Naturais, UFRJ-Macaé, 2022.

Pinheiro, A. A. ; Camara, M. B. P. ; Vasconcelos, L. N. ; Miranda, A. J. A. ; Rosário, M. S. ; Farias, J. R. ; Guerra, R. ; Rocha, C. Q. . **Caracterização química e avaliação do potencial biológico de *Annona tomentosa* r. E. Fr.** XIII Simpósio Brasileiro de Farmacognosia. 2021.

Miranda, a. J. A. ; Rosário, M. S. ; Soares, I. S. ; Farias, J. R. ; Guerra, R. ; Rocha, C. Q. **Antioxidant and antimicrobial potential of extract and fractions from *Clusia grandiflora* (Clusiaceae)**. 8th Brazilian Conference on Natural Products. 2021.

Rosário, M. S.; Lima, A. S.; Fernandes, Y. M. L.; Costa Junior, L. M.; Figueiredo, P. L. B.; Monteiro, O. S.; Maia, J. G. S.; Rocha, C. Q. **Avaliação anti-helmíntica e composição dos óleos essenciais de *Hyptis dilatata* Benth. e *Mesosphaerum suaveolens***

Kuntze da Amazônia. 2021. III Simpósio Regional Norte de Farmacognosia (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

Rosário, M. S.; Nascimento, J. R.; Pinheiro, A. A.; Miranda, A. J. A.; Rocha, C. Q. **Avaliação da atividade leishmanicida de flavonóides diméricos glicosilados de *Arrabidaea brachypoda*.** III Workshop do programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas, UNIFAL. 2021.

Miranda, A. J. A.; Pinheiro, A. A.; Rosário, M. S. ; Soares, I. S. ; Farias, J. R. ; Chagas, V. T. ; Guerra, R. ; Rocha, C. Q. . **Caracterização química e avaliação do potencial biológico de *Clusia grandiflora*.** XIII Simpósio Brasileiro de Farmacognosia. 2021.

Premiações científicas

Menção Honrosa - 1º Lugar na categoria E-banner, III COPNAT – CESMAC, 2022.

Estágio (PROCAD-AM)

Título do projeto: Isolamento e caracterização química do extrato e frações das flores de *Arrabidaea brachypoda*.

Bolsista: CAPES

Instituição: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

Local: Araraquara – SP.

Período: maio a outubro de 2022.

AGRADECIMENTOS

À Deus.

Gostaria de agradecer aos meus pais, por todo o incentivo, investimento, carinho e apoio durante a minha trajetória acadêmica e por sempre serem exemplo de pessoas para mim. Em segundo, à toda a minha família e em especial às minhas irmãs que sempre acreditaram em mim.

À minha orientadora Profa. Dra. Claudia Quintino da Rocha pela confiança, conhecimento e disposição e por todas as oportunidades que me concedeu. Tê-la como orientadora é uma grande honra e traz inspiração!

À Profa. Dra. Vanderlan da Silva Bolzani pela colaboração e por ter me recebido em seu laboratório durante meu estágio na Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

Ao grupo de pesquisa NUBBE, em especial os doutores Nivaldo Boralle, Juliana Rodrigues e João Bronzel pelo apoio técnico nos laboratórios e equipamentos. Aos grandes amigos que fiz neste lugar, Lucas Henrique, Edelson Dias, Givaldo Silva, Ana Zanatta e em especial Ana Letícia, por me receber tão bem, proporcionar momentos memoráveis e pela supervisão e todo apoio oferecido, sua parceria e amizade foram essenciais para esse trabalho acontecer.

À Dra. Helena Russo pela dedicação, ensinamentos transmitidos e conselhos. Ter sua colaboração foi essencial para o desenvolvimento deste trabalho. É uma pessoa na qual tenho muita admiração e respeito!

À Profa. Dra. Mayara Silva pela colaboração nos ensaios biológicos em *Leishmania amazonensis*.

Aos meus amigos de Araraquara por tornar tudo mais leve durante o meu estágio, em especial ao Éder Menezes por toda paciência, cumplicidade, companheirismo e incentivo tanto no âmbito pessoal quanto profissional.

A todos os alunos e amigos do Laboratório de Produtos Naturais – UFMA, ao qual faço parte, pela amizade e cooperação para a realização deste trabalho. Em especial Amanda Miranda, Samuel Buna, Isabela Sampaio, Jessyane Nascimento, Aldilene Lima e Carla Janaína. E dedico também à Aglaete Pinheiro por toda ajuda oferecida e por ter se tornado uma grande amiga para mim!

E a todos os meus amigos da vida que sempre se fizeram presente: Deivid, Davi, João, Thayanne, Karol, Mayanne e Hudson! Principalmente aos meus amigos Marcos

Vinicius e Camila Paes, que sempre estiveram ao meu lado!

Ao CNPq pela bolsa, e, à CAPES, pelo PROCAD-AM.

RESUMO

A leishmaniose é caracterizada como uma infecção protozoária transmitida através do repasto sanguíneo de um flebotomíneo. Os fármacos utilizados no tratamento apresentam uma série de efeitos colaterais, alto custo, elevada toxicidade e dificuldade na administração. Surge então os produtos naturais como alternativa ao tratamento convencional. Dentre eles, tem-se *Arrabidaea brachypoda*, que é um arbusto nativo do cerrado e comumente utilizado pela população brasileira para o tratamento de diversas doenças. Estudos anteriores realizados em extrato hidroetanólico mostraram que as raízes da planta são ricas em flavonoides diméricos, os quais atuam como possíveis agentes terapêuticos. O objetivo neste trabalho foi estudar a atividade antileishmania do extrato e frações das flores de *Arrabidaea brachypoda*, bem como o isolamento e caracterização química de compostos ativos. O extrato foi obtido pelo método de percolação com etanol/água (7:3) e particionado com diclorometano (DCM) e acetato de etila (AcOEt). Para investigar a diversidade química do extrato e frações de *Arrabidaea brachypoda* utilizou-se a plataforma GNPS (Global Natural Products Molecular Networking), sendo possível anotar 19 compostos das classes das flavonas, flavonois, flavanonas, isoflavonas, cumarina simples e ácido cinâmico e seus derivados através da análise de correspondências com as bibliotecas espectrais. O ensaio *in vitro* contra formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* indicou elevada atividade para a fração diclorometânica ($CI_{50} = 21,50 \mu\text{g/mL}$), evidenciando valores de inibição similares ao padrão testado (Anfotericina B). Foi então realizada a separação dos metabólitos presentes na fração DCM empregando técnicas cromatográficas: coluna aberta empacotada com sílica e cromatografia líquida de alta eficiência em escala semi-preparativa. Foram isoladas 6 substâncias, sendo 4 delas das classes das flavonas: apigenina, 5-metóxi-crisina, crisina e acacetina e dois flavonóides diméricos: brachydinas A e C, identificadas por UV, RMN e UPLC-QTOF-HRMS. Dentre os isolados, a 5-metóxi-crisina e a brachydina-C apresentaram os melhores valores de citotoxicidade frente às formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, apresentando valores de CI_{50} de 18,90 e 14,17 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Estas etapas de caracterização química contribuíram para a discussão do gênero e espécie da planta estudada, uma vez que grande parte dos estudos publicados se referem às raízes da *Arrabidaea brachypoda*. Por fim, os resultados obtidos a partir deste estudo evidenciam o potencial efeito biológico das flores de *Arrabidaea brachypoda* como possível agente farmacológico.

Palavras-chave: Bignoniaceae. Flavonoides. Brachydinas. GNPS. Leishmaniose.

ABSTRACT

Leishmaniasis is characterized as a protozoal infection transmitted through the blood meal of a sandfly. The drugs used in the treatment have a series of side effects, high cost, high toxicity and difficulty in administration. Natural products then appear as an alternative to conventional treatment. Among them, there is *Arrabidaea brachypoda*, which is a shrub native to the cerrado and commonly used by the Brazilian population for the treatment of various diseases. Previous studies performed on hydroethanolic extract showed that the roots of the plant are rich in dimeric flavonoids, which act as possible therapeutic agents. The objective of this work was to study the antileishmanial activity of the extract and fractions of the flowers of *Arrabidaea brachypoda*, as well as the isolation and chemical characterization of active compounds. The extract was obtained by the percolation method with ethanol/water (7:3) and partitioned with dichloromethane (DCM) and ethyl acetate (AcOEt). To investigate the chemical diversity of the extract and fractions of *Arrabidaea brachypoda*, the GNPS (Global Natural Products Molecular Networking) platform was used, making it possible to record 19 compounds from the classes of flavones, flavonols, flavanones, isoflavones, simple coumarin and cinnamic acid and their derivatives through the analysis of correspondences with the spectral libraries. The in vitro assay against promastigotes of *Leishmania amazonensis* indicated high activity for the dichloromethane fraction ($IC_{50} = 21.50 \mu\text{g/mL}$), showing inhibition values similar to the tested standard (Amphotericin B). The metabolites present in the DCM fraction were then separated using chromatographic techniques: open column packed with silica and high performance liquid chromatography on a semi-preparative scale. Six substances were isolated, 4 of them from the classes of flavones: apigenin, 5-methoxy-chrysin, chrysin and acacetin and two dimeric flavonoids: brachydins A and C, identified by UV, NMR and UPLC-QTOF-HRMS. Among the isolates, 5-methoxy-chrysin and brachyidin-C showed the best cytotoxicity values against the promastigotes of *Leishmania amazonensis*, with IC_{50} values of 18.90 and 14.17 $\mu\text{g/mL}$, respectively. These chemical characterization steps contributed to the discussion of the genus and species of the studied plant, since most of the published studies refer to the roots of *Arrabidaea brachypoda*. Finally, the results obtained from this study show the potential biological effect of *Arrabidaea brachypoda* flowers as a possible pharmacological agent.

Keywords: Bignoniaceae. Flavonoids. Brachydinas. GNPS. Leishmaniasis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Figura esquemática mostrando as formas de vida amastigota a direita e promastigota a esquerda.	23
Figura 2 – Estrutura dos quimioterápicos antimoniais pentavalentes.	24
Figura 3 – Estrutura dos quimioterápicos anfotericina B e pentamidina.	25
Figura 4 – Flavona isolada das folhas de <i>Lonchocarpus xull</i> e <i>Lonchocarpus yucatanensis</i> por Borges-Agaez <i>et al.</i> (2007).	26
Figura 5 – Fotografia de <i>Arrabidaea brachypoda</i> evidenciando as flores.	26
Figura 6 – Estrutura de alguns dos constituintes isolados de <i>Arrabidaea brachypoda</i>	28
Figura 7 – Estrutura dos flavonoides diméricos isolados por Rocha <i>et al.</i> (2016) do extrato hidroalcolico das raízes de <i>Arrabidaea. brachypoda</i>	30
Figura 8 – Formação de uma rede molecular a partir da inserção dos dados de Espectrometria de Massas (EMn), comparação dos espectros de massas para a geração do espectro de consenso e formação de agrupamento por similaridade (clusters).	30
Figura 9 – Fluxograma da partição líquido-líquido do extrato bruto de <i>A. brachypoda</i>	33
Figura 10 – Fluxograma do trabalho experimental realizado nas flores de <i>Arrabidaea brachypoda</i>	38
Figura 11 – Recorte da rede molecular para os compostos anotados para o extrato e frações de <i>Arrabidaea brachypoda</i>	40
Figura 12 – Representações das estruturas dos principais compostos anotados no GNPS.	44
Figura 13 – Região da rede molecular gerada em que se tem massas referentes às brachydinas agliconas $[M+Na]^+$	50
Figura 14 – Estrutura das brachydinas presentes nas amostras analisadas na plataforma GNPS $[M+Na]^+$	50
Figura 15 – Resultados do teste <i>in vitro</i> em <i>L. amazonensis</i> promastigota no a) extrato bruto, b) fração DCM, c) fração AcoEt e d) fração aquosa. Penta: controle positivo....	52
Figura 16 – Cromatogramas em gradiente exploratório 5-100 % de B em 40 min (254 nm) do extrato e das frações.	55
Figura 17 – Cromatogramas obtidos das frações advindas da FLAB_DCM (254nm).	56
Figura 18 – a) Espectros de absorção UV-Vis dos compostos majoritários isolados b) Cromatograma da fração diclorometânica das flores de <i>Arrabidaea brachypoda</i> por HPLC-DAD (254 nm).	57

Figura 19 – Estrutura básica dos flavonóides.....	57
Figura 20 – Estrutura química das flavonas isoladas das flores de <i>Arrabidaea brachypoda</i>	58
Figura 21 – Correlações HMBC (A e B) e NOESY 1D (C e D) das flavonas isoladas.	59
Figura 22 – Estruturas químicas das brachydinas A e C isoladas das flores de <i>Arrabidaea brachypoda</i>	61
Figura 23 – Correlações NOESY 1D (A) e HMBC (B) para a brachydina-A	61
Figura 24 – Espectro MS/MS obtido para o composto 01 (m/z 271.0610).....	66
Figura 25 – Proposta de fragmentação para a apigenina (m/z 271).....	66
Figura 26 – Espectro MS/MS para o composto 2 (m/z 269).....	67
Figura 27 – Proposta de fragmentação do íon m/z 269.	67
Figura 28 – Espectro M/S para a crisina (m/z 255.0659).	68
Figura 29 – Proposta de fragmentação para a crisina.....	68
Figura 30 – Espectro MS/MS para a acacetina (m/z 285.0765).	69
Figura 31 – Proposta de fragmentação para a acacetina.....	69
Figura 32 – Espectro MS/MS para a brachydina-A (m/z 525.1910).....	70
Figura 33 – Proposta de fragmentação para a brachydina-A.	70
Figura 34 – Espectro MS/MS para a brachydina-C (m/z 525.1910).	71
Figura 35 – Proposta de fragmentação para a brachydina-C.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Taxonomia da Planta <i>Arrabidaea brachypoda</i>	27
Tabela 2 – Resultado de análise via plataforma GNPS de dados de MS/MS de extrato bruto e frações de <i>Arrabidaea brachypoda</i>	42
Tabela 3 – Confirmação da fórmula molecular por espectrometria de massas de alta resolução dos compostos anotados no extrato e frações de <i>Arrabidaea brachypoda</i> (modo de ionização positivo).....	44
Tabela 4 – Determinação da CI ₅₀ (µg/mL) do extrato bruto e frações obtidas das flores de <i>Arrabidaea brachypoda</i> , frente às formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	52
Tabela 5 – Fracionamento da fração diclorometânica por cromatografia em coluna de sílica.....	56
Tabela 6 – Valores de deslocamento químico, multiplicidade e constante de acoplamento de RMN de ¹ H e ¹³ C RMN de ¹ H (600 Hz, CD ₃ OD em ppm) para as flavonas isoladas.	61
Tabela 7 – Dados de RMN ¹ H (600 Hz, CD ₃ OD em ppm) das brachydinas.	64
Tabela 8 – Propostas de identificação dos compostos isolados por UPLC-QTOF-HRMS.	65
Tabela 9 – Determinação da CI ₅₀ (µg/mL) dos isolados obtidos da fração DCM do extrato das flores de <i>Arrabidaea brachypoda</i> , frente às formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	72

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A: Fase móvel de menor força de eluição

ACN: Acetonitrila

AF: Ácido Fórmico

AcOEt: Acetato de Etila

B: Fase móvel de maior força de eluição

CD₃OD: Metanol Deuterado

CH₂CO₂: Ácido Fórmico

CI₅₀: Concentração Inibitória Média

COSY: *Correlation Spectroscopy*

DCM: Diclorometano

DEPTQ: *Distortionless Enhancement by Polarization Transfer with quaternary carbon detection*

EB: Extrato Bruto

ESI: *electrospray ionization* – ionização por eletrospray.

FLAB: Flores de *Arrabidaea brachypoda*.

GNPS: Global Natural Products Social Molecular Networking

H₂O: Água

HMBC: *Heteronuclear Multiple Bond Coherence*

HPLC: *high performance liquid chromatography* - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

HSQC: *Heteronuclear Single Quantum Coherence*

m/z: Relação massa/carga

IT: *Ion trap* (analisador de armadilha de íons)

J: Constante de acoplamento

MeOH: Metanol

MS: *mass spectrometry* – espectrometria de massas.

MS/MS: Espectrometria de Massas em Tandem

m/z: Relação massa/carga

NOESY: *Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*

PDA: *Photodiode array detector* – Detector de matriz de fotodiodos

ppm: Partes por milhão

UV-Vis: Detector Ultravioleta e Visível

[M-H]⁺: Modo de ionização positivo

RDA: Retro Diels-Alder

RMN: Ressonância Magnética Nuclear

SiBBR: Sistema de Informação sobre a Biodiversidade Brasileira

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

TOF: *Time off flight* – Tempo de voo

Q: Analisador do tipo Quadrupolo

UPLC: *Ultra-performance Liquid Chromatography* – Cromatografia Líquida Ultraeficiência

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 OBJETIVO	20
2.1 Objetivo Geral.....	20
2.2 Objetivos Específicos	21
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	21
3.1 Leishmaniose	21
3.2 Tratamento	23
3.3 <i>Arrabidaea brachypoda</i>	26
3.4 Análise metabolômica para a descoberta e identificação de metabólitos secundários em Produtos Naturais.....	30
4 METODOLOGIA.....	32
4.1 Coleta das flores	32
4.2 Preparo do extrato	32
4.3 Partição líquido-líquido.....	33
4.4 Atividade antiparasitária <i>in vitro</i> do extrato hidroalcoólico e frações.....	34
4.4.1 Parasitos	34
4.4.2 Atividade antipromastigota do extrato, frações e compostos isolados de <i>Arrabidaea brachypoda</i>	34
4.5 Fracionamento da fase diclorometânica	35
4.5.1. Cromatografia em coluna aberta.....	35
4.5.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em escala semi-preparativa.....	35
4.6 Cromatografia líquida acoplada a um íon trap com interface de ionização por eletrospray e um analisador de massas de baixa resolução (LC-ESI-IT-MS)	35
4.7 Processamento dos dados na plataforma GNPS	36
4.8 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ¹ H e de ¹³ C	37

4.9 Caracterização química das estruturas por UPLC-QTOF-MS	37
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1 Análise das redes moleculares	38
5.3 Atividade anti-promastigota do extrato e frações de <i>A. brachypoda</i>	51
5.2 Mapeamento químico	53
5.2.1 Rendimento do extrato e frações das flores de <i>A. brachypoda</i>	53
5.2.2 Perfil químico do extrato e frações	53
5.2.3 Ressonância Magnética Nuclear 1D e 2D.....	58
5.2.3 Caracterização química por UPLC-QTOF-HRMS	65
5.3 Atividade antipromastigotas dos compostos isolados da fração diclorometânica	72
CONCLUSÃO.....	75
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76

“As coisas mais belas do mundo não podem ser sentidas ou tocadas, elas são sentidas com o coração” (O pequeno Príncipe, Antóine de Saint-Exúpery)

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença infecciosa parasitária, causada por um protozoário do gênero *Leishmania*, membro da família Trypanosomatidae (GERVAZONI *et al.*, 2020). É classificada como uma doença negligenciada por atingir principalmente a população de baixa renda, chegando a afetar mais de 300 milhões de pessoas no mundo (GERVAZONI *et al.*, 2020; WHO, 2022).

No Brasil, os casos de leishmaniose são recorrentes em todo o território nacional e se apresentam de forma endêmica em estados como Rondônia, Pará, Amazonas, Bahia, Maranhão, Minas Gerais, São Paulo, Santa Catarina e Mato Grosso do Sul (MENDES *et al.*, 2016). Entre 2003 e 2018, houve no Brasil mais de 300.000 casos com média de 21.158 casos por ano. A região norte foi a região que mais sofreu com o número de casos nesse período, seguida pelo centro-oeste (LIMA-JÚNIOR, *et al.*, 2019).

O tratamento da doença é realizado com o uso da quimioterapia contra a leishmaniose através de fármacos e novas formulações. Por apresentar uma série de efeitos colaterais, é crescente a busca por novas substâncias oriundas de organismos vivos que possam ser utilizadas na terapia da doença (ANDRADE *et al.*, 2016; MAHMOUDVAND *et al.*, 2015). Uma das fontes utilizadas para o tratamento de diversas enfermidades são as plantas.

A utilização de plantas com fins medicinais tem como função a prevenção e o uso no processo terapêutico. Portanto, tem-se a utilização das plantas inteiras ou partes específicas para esse devido uso, o que ganha destaque na medicina tradicional do mundo, sendo utilizadas como matéria-prima na indústria farmacêutica (WANG *et al.*, 2020). O uso medicinal de plantas no Brasil tem influência da cultura indígena, porém percebe-se que com a chegada dos povos oriundos da Europa, houve também, a introdução de diversas plantas originárias da Europa no Brasil e que eram utilizadas não somente na medicina tradicional, mas como ervas aromáticas. Há também plantas trazidas da África, que são utilizadas não só na medicina, mas em seus rituais (Grandi *et al.*, 1989).

O Brasil possui uma diversidade de espécies vegetais advindas de um rico ecossistema: o cerrado, o pantanal, a floresta amazônica, a mata atlântica, entre outros biomas que contribuem com espécies vegetais distintas e contribuem todos para a flora brasileira (RODRIGUES *et al.*, 2020).

O cerrado brasileiro estende-se pelos estados de Rondônia, Bahia, Minas Gerais, Distrito Federal, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Maranhão, São Paulo,

Tocantins, Paraná e Piauí. Esse bioma é rico em espécies do gênero *Arrabidaea*, pertencente à família Bignoniaceae. O gênero *Arrabidaea* possui 170 espécies de características taxonômicas similares, arbustivas e de porte arbóreo (ROCHA, 2013).

Arrabidaea brachypoda (DC) Bureau (*A. brachypoda*) é um arbusto ramificado com flores em inflorescências terminais de cor rosa-púrpura (**Figura 5**). É tradicionalmente conhecida como cervejinha-do-campo. As espécies que compõem esse gênero são utilizadas na medicina tradicional como adstringente, antioxidante, anti-inflamatório, antimicrobiano, antitumoral e cicatrizante (ZORN *et al.*, 2001; PAULETI *et al.*, 2003; LEITE *et al.*, 2006; MARTIN *et al.*, 2008). O potencial biológico da *A. brachypoda* está relacionado à sua composição química.

Quanto ao perfil químico, a literatura relata metabólitos como: C-glucosilxantonas, fenilpropanóides, flavonóides, antocianidinas, derivados de alantoína, chalconas, cumarinas, taninos, glicosídeos cardiotônicos, esteróides, saponinas e triterpenos são os principais constituintes do gênero *Arrabidaea* (ROCHA *et al.*, 2016; ROCHA *et al.*, 2011). De acordo com Nascimento *et al.* (2022) cerca de 19 metabólitos (**Figura 6**) secundários de diferentes classes já foram isolados de extratos e frações de *A. brachypoda*. Dentre eles, pode-se citar flavonóides diméricos inéditos denominados brachydinas encontrados no extrato hidroetanólico das raízes, sendo reportados pela primeira vez na família Bignoniaceae (**Figura 7**).

Tendo em vista o amplo potencial biológico desta planta, com base em estudos iniciais antiparasitários das raízes de *A. brachypoda* e a similaridade do perfil químico das flores com o que já foi mapeado pela literatura, este estudo visa a caracterização química do extrato hidroetanólico e das frações diclorometânica, acetato e aquosa por meio de técnicas que auxiliam e aceleram essa investigação, como o uso da plataforma GNPS, bem como o isolamento dos compostos ativos por técnicas cromatográficas, espectrométricas, espectroscópicas e o ensaio antiparasitários dos extratos, frações e compostos das flores de *A. brachypoda*.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

- Isolar e caracterizar química do extrato hidroetanólico e frações das flores de *Arrabidaea brachypoda*.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a toxicidade *in vitro* em *Leishmania amazonensis* na forma promastigota do extrato hidroetanólico e frações.
- Realizar a caracterização química do extrato hidroetanólico e frações diclorometânica, acetato de etila e aquosa por cromatografia líquida acoplada à Espectrometria de Massas.
- Realizar uma análise não direcionada utilizando dados de espectrometria de massas junto à plataforma GNPS (Global Natural Products Social Molecular Networking) para correlacionar os resultados de MS com a rede molecular.
- Elucidar a estrutura química dos metabólitos secundários isolados por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e confirmação por Cromatografia Líquida de Ultra eficiência acoplada a um espectrômetro de massas de alta resolução (UPLC-QTOF-HRMS).

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Leishmaniose

As doenças tropicais são consideradas um dos maiores problemas de saúde no mundo, pois diferentes tipos de patologias estão espalhados em diversos países como a leishmaniose, que afeta diversas pessoas no mundo, principalmente as de baixa renda em continentes como África, Ásia, sendo endêmica em 98 países do mundo, onde 18 países são da América Latina, dentre eles o Brasil (CUNHA *et al.*, 2020; LIMA, 2020). A leishmaniose atinge principalmente a população em situação de pobreza devido as suas condições de sobrevivência, como a proximidade das florestas, a superlotação dos bairros e habitações, péssimo serviço de abastecimento de água e saneamento básico, falta de conhecimento em relação ao processo de transmissão e prevenção (ELKHOURY *et al.*, 2021). E pode-se estar associada à desnutrição relacionada com a pobreza, a um fraco sistema imunológico, o deslocamento geográfico de pacientes em locais endêmicos, as habitações precárias ou áreas com ocorrência da doença e dentre outros problemas sociais (PAL *et al.*, 2017). Nos seres humanos, é uma das doenças que se apresenta de diferentes formas, como manifestações na pele, lesões deformantes e incapacitantes (MARCONDES, 2016). A leishmaniose é uma doença negligenciada devido aos poucos recursos investidos no seu diagnóstico e tratamento, sendo responsáveis pela grande mortalidade e morbidade no ser humano (LIMA, 2020). A frequência de casos de leishmaniose está relacionada a principalmente aos fatores econômicos e sociais, levando

a exposição do ser humano a condições climáticas e ecológicas, principalmente a mudança climática o que torna mais fácil a interação entre homem e vetores. Isto faz com que tenha um aumento de casos todos os anos, pois as condições para a proliferação de vetores tornam-se mais favoráveis, fortalecendo o ciclo de transmissão da enfermidade (ELKHOURY *et al.*, 2021). Entre os anos de 2011 a 2020 percebeu um aumento no número de casos de leishmaniose, e uma das principais causas é o desmatamento, pois vetores perdem suas fontes alimentares habituais e migram para a zona urbana, percebendo também que devido a isso houve aumento dos casos em regiões do Brasil como sul, sudeste e centro-oeste (SILVA *et al.*, 2021). Um estudo do Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada (IPEA) relacionou o aumento de casos de leishmaniose com o desmatamento na Amazônia, evidenciando que a cada 1% de área desmatada de um município há o aumento de 8 a 9% dos casos de leishmaniose (SACARO-JÚNIOR; MATION; SAKOWSKI, 2016).

A leishmaniose é caracterizada como uma infecção protozoária transmitida pelo repasto sanguíneo de um flebotomíneo fêmea infectado no ser humano ou outros vertebrados (GOMES *et al.*, 2014). No Brasil, o principal vetor é do gênero *Lutzomyia*, conhecido popularmente como “mosquito palha”, “asa dura”, “asa branca”, “cangalhinha”, “birigui” ou “tatuquiras” (SILVA *et al.*, 2018; LIMA, 2020; NOGUEIRA, 2018). Portanto, a leishmaniose se caracteriza como uma doença infectoparasitária crônica causada por diversas espécies de parasitas do gênero *Leishmania*. No Brasil, as espécies que estão envolvidas nas infecções são principalmente a *Leishmania braziliensis*, *Leishmania amazonensis*, *Leishmania shawi*, *Leishmania naiffi* e *Leishmania linderbergi* (GOMES *et al.*, 2014). Como mostra a **Figura 1**, os parasitas se apresentam em seu ciclo de vida em duas formas evolutivas: a forma promastigota, que é flagelada e extracelular, apresentam corpo alongado e flagelo livre, e a forma amastigota, que é intracelular e sem movimentos, tem corpo ovóide e flagelo interno (FIOCRUZ, 1997). O ciclo de vida do parasita inicia-se no estágio extracelular, na forma promastigota e após o repasto sanguíneo do vetor, há o estágio intracelular na célula do hospedeiro, caracterizando-se por formas amastigotas que estão localizadas e se multiplicam no interior de vacúolos fagocíticos (fagolisossomos) das células do hospedeiro (MOUGNEAU *et al.*, 2011).

Figura 1 - Figura esquemática mostrando as formas de vida amastigota a direita e promastigota a esquerda.



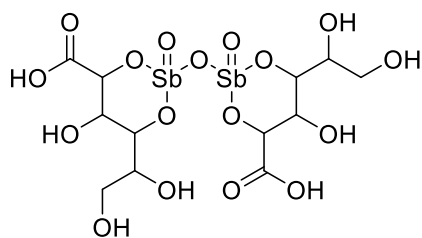
Fonte: Moraes et al., 2020.

A leishmaniose se apresenta em duas formas principais: cutânea ou tegumentar e visceral ou calazar (WHO, 2019). A forma visceral é de caráter crônico e é causada pelo protozoário *Leishmania infantum*. As suas manifestações clínicas em animais podem ser emagrecimento, hepatomegalia, esplenomegalia, dermatite granulomatosa ou ulcerativa, conjuntivite, entre outros. Já em humanos ocorrem febre, hepatoesplenomegalia e palidez cutâneo-mucosa, podendo estar acompanhado de tosse e diarreia (NOGUEIRA, 2018). A forma tegumentar (cutânea) é causada por três principais espécies: *Leishmania amazonensis*, *Leishmania guyanensis* e *Leishmania braziliensis*. Manifestando-se por úlcera cutânea, podendo ocorrer metástase (SILVEIRA, 2020).

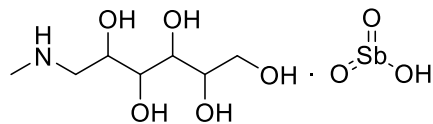
3.2 Tratamento

A partir do século 20, os medicamentos para o tratamento de leishmaniose começaram a serem desenvolvidos e desde então eles ainda permanecem, pois não existem vacinas para uso humano, tornando este um dos principais problemas. Para animais o Brasil disponibiliza a vacina LeishTec, pois apresenta resultados significativos em relação ao aumento de anticorpos. Apesar dos resultados positivos, o ministério da saúde não preconiza a utilização da vacina para o controle da leishmaniose no Brasil para fins de saúde pública, principalmente devido às desvantagens que ela apresenta, por exemplo, a ocorrência de efeitos colaterais como febre, diarreia, prurido, eritema, placas cutâneas, e até anafilaxia. (TESTASICCA *et al.*, 2014). Os fármacos utilizados no tratamento convencional apresentam uma série de efeitos colaterais, alto custo, elevada toxicidade e dificuldade na administração (LIMA, 2020). Dentre os medicamentos utilizados, pode-se citar os antimoniais pentavalentes, antimoniato de meglumina, pentostam e estibamina (**Figura 2**) (ALVARENGA *et al.*, 2021).

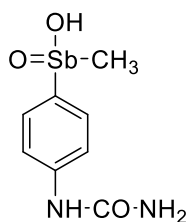
Figura 2 - Estrutura dos quimioterápicos antimoniais pentavalentes.



Pentostam



Antimoniato de meglumina

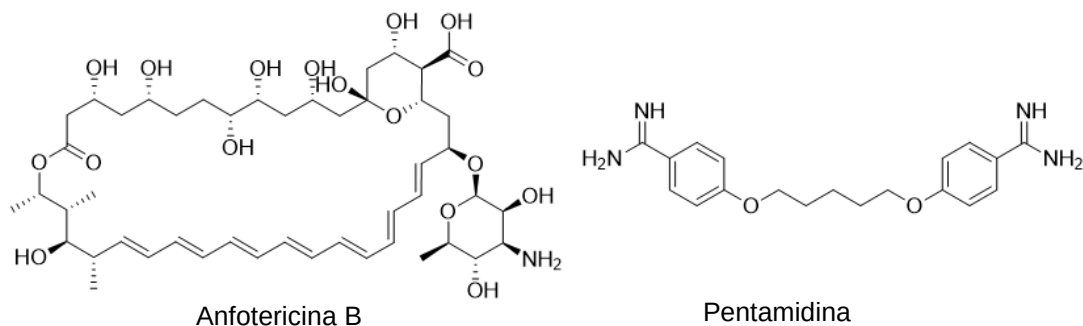


Estibamina

Fonte: Próprio autor.

Tem-se como alternativa ao uso de drogas pentavalentes, a anfotericina B e a pentamidina, como demonstrado na **Figura 3**. São de administração injetável e necessitam de acompanhamento para sua utilização, devido a seriedade dos efeitos colaterais. Além disso, esses fármacos não possuem um índice terapêutico favorável (CHAN-BACAB; PENA-RODRÍGUEZ, 2001). Dentre as desvantagens, pode-se citar a elevada toxicidade, dificuldades de administração e alto custo, além disso, apresentam graves efeitos adversos, como a mialgia, artralgia, aumento sérico das enzimas hepáticas, pancreatite, disfunção gastrointestinal, dores musculares difusas, enrijecimento das articulações, arritmias, pancitopenia, insuficiência renal reversível e cardiotoxicidade (SILVA-LÓPEZ, 2010). Em vista disso, percebe-se o abandono do tratamento pelos pacientes, o que justifica a resistência do parasita.

Figura 3 - Estrutura dos quimioterápicos anfotericina B e pentamidina.

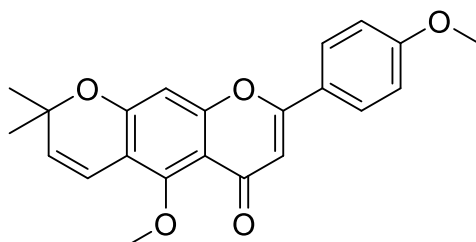


Fonte: Próprio autor.

O tratamento convencional ainda possui algumas dificuldades quanto aos casos de infecção persistente, resistência do parasita e a imunidade do hospedeiro. Por isso surge a necessidade dos produtos naturais como potencial alternativa, por serem de baixo custo, menor toxicidade e não apresentarem efeitos colaterais. Os produtos naturais vêm demonstrando potencial efeito terapêutico frente a *Leishmania*, através de extratos ou compostos ativos isolados. Os metabólitos secundários de plantas são de grande interesse devido a sua diversidade de atividades farmacológicas. Santos & Rodrigues (2017) em seu trabalho descrevem dentre as propriedades biológicas dos flavonóides a atividades antitumoral, antiviral, antimicrobiana, antioxidante, dentre outros. Uma outra classe comumente estudada e que apresenta um amplo espectro de atividades biológicas são os triterpenos, como atividade anticancerígena, hepatoprotetora, efeito sedativo, antialérgico e antiangiogênica (SILVA *et al.*, 2020). Dentre as classes já identificadas na *A. brachypoda*, tem-se as chalconas (ANDRADE *et al.*, 2020). Ferreira *et al.* (2018) afirma que as chalconas têm sido alvo de estudo pois possuem potencial antioxidante, antinociceptiva, anticonvulsivante e anti-inflamatória.

Estudos relatam o potencial leishmanicida de metabólitos secundários de plantas como alcalóides, chalconas, triterpenóides, entre outros (BORGES *et al.*, 2016). Borges-Agaez *et al.* (2007) isolou das folhas de *Lonchocarpus xull* e *Lonchocarpus yucatanensis* flavonas ativas contra promastigotas de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. donovani* como a 5,4'-dimetóxi-2,2-dimetil-pirano flavona (**Figura 4**). Outro estudo demonstrou que o extrato clorofórmico (CHCl₃) e a fração aquosa das partes aéreas de *Laennecia confusa* demonstraram propriedades leishmanicida (MARTÍNEZ *et al.*, 2012).

Figura 4 – Flavona isolada das folhas de *Lonchocarpus xull* e *Lonchocarpus yucatanensis* por Borges-Agaez *et al.* (2007).



Fonte: Próprio autor.

3.3 *Arrabidaea brachypoda*

A família Bignoniaceae representa o grupo das lianas neotropicais e inclui cerca de 383 espécies (PACE; LOHMANN; ANGYALOSSY, 2009). Dentre as espécies desta família, tem-se *Arrabidaea brachypoda* (sinônimo *Fridericia platyphylla* (Cham.) L. G. Lohmann) (**Figura 5**) e é uma planta nativa do cerrado brasileiro, popularmente conhecida como “tintureiro”, “cipó-una” e “cervejinha-do-campo”.

Figura 5 – Fotografia de *Arrabidaea brachypoda* evidenciando as flores.



Fonte: Próprio autor.

Na medicina tradicional é utilizada no tratamento de úlceras gástricas, pedras nos rins e dores musculares (SERPELONI, 2019). É popularmente utilizada no tratamento de cálculos renais e dores articulares, por meio do elixir produzido a partir da maceração de suas cascas em água. Como produto final, tem-se uma solução com presença de espumas, característica que define o nome “cervejinha do campo”, sugere-se que as brachydinas sejam as principais responsáveis pela formação de espuma, tendo em vista que esses compostos isolados formam espumas quando em solução (ROCHA *et al.*, 2011; ROCHA, 2013). A **Tabela 1** indica o esquema taxonômico da espécie *A. brachypoda*. O gênero *Arrabidaea* possui 170 espécies de características taxonômicas similares, arbustivas e menos frequentemente de porte arbóreo (ROCHA, 2013). As

características morfológicas predominantes são: presença de folhas compostas e opostas com poucos exemplares do tipo simples, flores granevistosas, diclamídeas, hermafrodita pentâmeras, desimetriazigomorfa e corola pouco bilabiada; porção masculina com androceu composto por 4 estames didínamos e 1 estaminódio; quanto ao feminino, possui ovário súpero, bicarpelar, bilocular com 2 lóculos e muitos óvulos, além de fruto capsular seco, loculicida ou septicida, às vezes cápsula septífraga com sementes aladas (ROCHA, 2013).

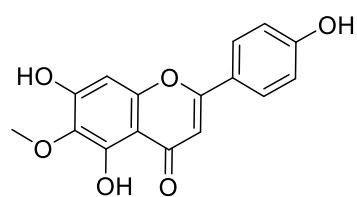
Tabela 1 - Taxonomia da planta *Arrabidaea brachypoda*.

Reino	Plantae
Superdivisão	Spermatophyta
Divisão	Magnoliopsida
Subclasse	Asteridae
Ordem	Scrophulariales
Família	Bignoniaceae
Gênero	<i>Arrabidaea</i>
Espécie	<i>Arrabidaea brachypoda</i>

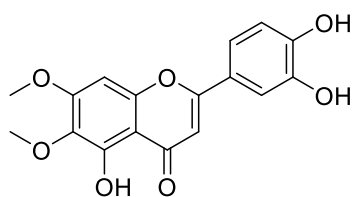
Fonte: SiBBR (2022).

Rezende-Júnior *et al.* (2020) demonstrou que compostos químicos da classe das chalconas presentes nas flores de *A. brachypoda* possuem atividade antimicrobiana, sendo capazes de agirem como uma alternativa contra *Staphylococcus aureus* multirresistente. Rocha *et al.* (2011) comprovou que o extrato etanólico de raízes de *A. brachypoda* apresenta atividade antinociceptiva, devido a presença de quercetina e compostos fenólicos. Segundo Rocha *et al.* (2016) o extrato hidroetanólico da raiz de *A. brachypoda* demonstrou efeito gastroprotetor significativo em ensaios *in vivo*, o estudo foi realizado em diferentes modelos de úlcera gástrica em ratos. A **Figura 6** apresenta alguns compostos já isolados de *A. brachypoda*.

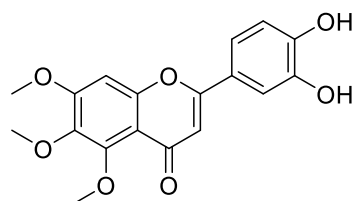
Figura 6 - Estrutura química de alguns dos constituintes químicos isolados de *Arrabidaea brachypoda*.



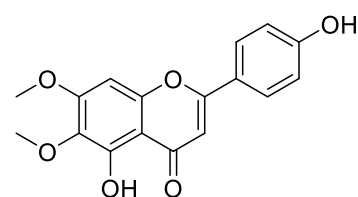
Hispidulina



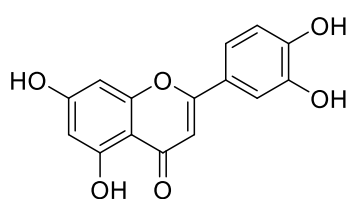
Cirsiliol



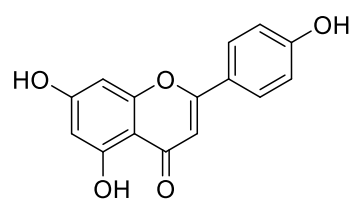
3',4'-dihidroxi-5,6,7-metóxi flavona



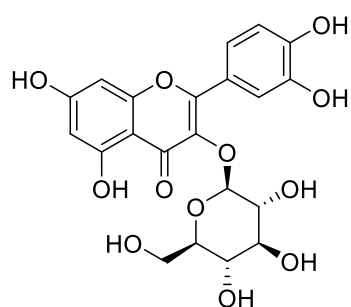
Cirsimaritina



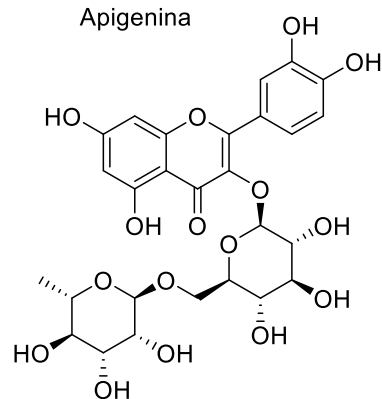
Luteolina



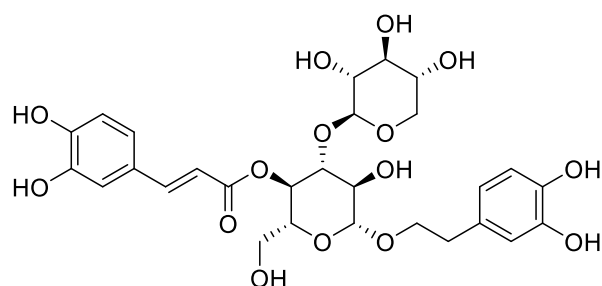
Apigenina



Isoquercitrina



Rutina



Conandrosídeo

Fonte: Próprio autor.

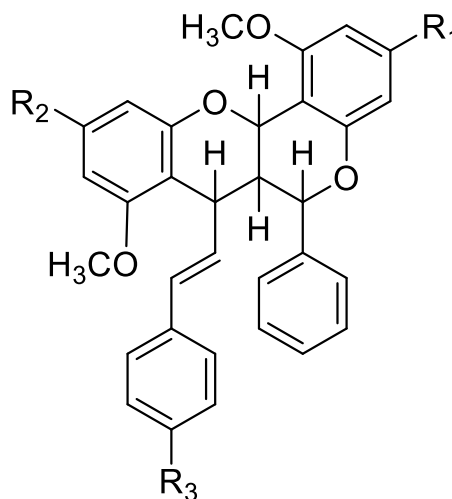
Diversos trabalhos realizados pelo Laboratório de Química de Produtos Naturais da Universidade Federal do Maranhão (LQPN/UFMA), avaliaram a atividade biológica de extratos hidroetanólicos, frações polares, apolares e compostos isolados das raízes de *A. brachypoda*. Estudos relataram a atividade antimicrobiana e antiparasitária de compostos isolados da fração diclorometânica de *A. brachypoda*, como por exemplo a atividade antifúngica da brachydina B (BRA-B) frente à *Candida albicans*. Também demonstrou atividade antibacteriana, tendo a capacidade de inibir um mecanismo associado à multirresistência em cepas de *Staphylococcus aureus* (ANDRADE *et al.*, 2019). Derivados halogenados das brachydinas apresentaram potencial efeito antiparasitário em *Leishmania amazonensis* e *Trypanosoma cruzi* (NEUENSCHWANDER *et al.*, 2020). Três brachydinas (A, B e C) de *A. brachypoda* foram testadas em *L. amazonensis*, apresentando elevada atividade *in vitro* (ROCHA *et al.*, 2019).

As brachydinas A, B e C extraídas do extrato hidroetanólico de *A. brachypoda* apresentaram citotoxicidade *in vitro* em linhagens de células de câncer de próstata, induzindo apoptose e necrose, apresentando valores de CI_{50} de 23,41, 4,28 e 4,44 μM , respectivamente, apresentando influência nos processos de proliferação e morte celular (NUNES *et al.*, 2020). Foi avaliado a atividade antiproliferativa e o mecanismo de ação da luteolina (**Figura 6**) extraída do extrato hidroetanólico *A. brachypoda* em células tumorais, sendo a célula glioblastoma a mais sensível, sendo capaz de inibir a migração e a tumorigênese da linhagem das células U-251 morte por apoptose por despolarização da membrana mitocondrial, fosforilação de proteínas e clivagem de enzimas específicas (FRANCO *et al.*, 2021). Um estudo realizado com um feniletanóide glicosilado denominado conandrosídeo (**Figura 6**), isolado do extrato etanólico, mostrou a capacidade deste composto de inibir a lipoxigenase, enzima que apresenta funções específicas em diversas patologias humanas (BERTANHA *et al.*, 2020).

As brachydinas (**Figura 7**) consistem de flavonóides diméricos fundidos nos anéis piranos e até então foram isoladas da fração diclorometânica das raízes de *A. brachypoda*. Acredita-se que podem ser oriundas da dimerização de chalconas. E podem ser formadas a partir de duas rotas: a partir da chalcona (2',4'-dihidroxi-6'-metóxicalcona) e outra via seria a cicloadição intramolecular da metil quinona para gerar o intermediário flaveno, após uma segunda cicloadição com outra molécula de quinona daria origem as braquidinas (NASCIMENTO, 2019).

Figura 7 - Estrutura dos flavonoides diméricos isolados por Rocha *et al.* (2016) no extrato hidroalcólico das raízes de *Arrabidaea. brachypoda*.

BRA	R ₁	R ₂	R ₃
A	OH	OH	OH
B	OH	OH	OCH ₃
C	OH	OH	H
D	GlucA	GlucA	OCH ₃
E	GlucA	OH	OH
F	OH	GlucA	OH
G	OH	GlucA	OCH ₃
H	OH	GlucA	H
I	GlucA	GlucA	H
J	GlucA	GlucA	OH



Fonte: Rocha *et al.* (2016).

Como mostra a literatura, compostos presentes no extrato das raízes de *A. brachypoda* apresentam elevado potencial antileishmania. Por isso, surge a necessidade da busca e avaliação leishmanicida dos compostos ativos presentes nas flores desta planta, a fim de buscar por alternativas ao tratamento convencional existente, objetivando reduzir a toxicidade ao organismo humano.

3.4 Análise metabolômica para a descoberta e identificação de metabólitos secundários em Produtos Naturais

Com o avanço da tecnologia, o interesse por ferramentas computacionais atrelada ao conhecimento da química de Produtos Naturais cresceu ao longo dos anos, tornando-se muito eficaz, principalmente, quando se trata na busca e isolamento de um composto bioativo, otimizando tempo em isolar um composto de interesse. As redes moleculares armazenam um mapa químico onde substâncias que possuem espectros semelhantes são agrupadas (ABREU, 2020). A metabolômica tem sido alvo de interesse de diversas áreas como medicina, farmacologia, química de produtos naturais, dentre outras.

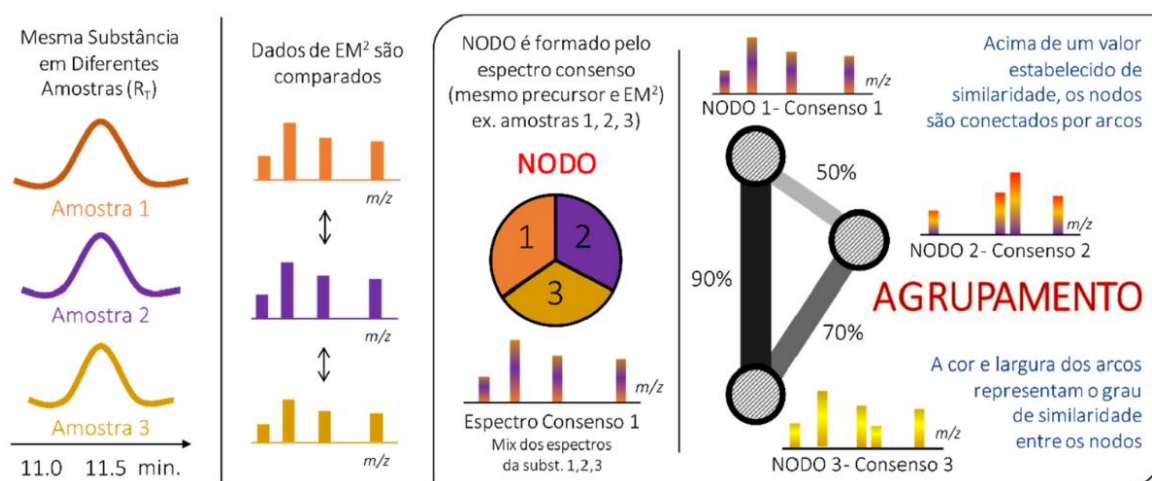
A metabolômica divide-se em “targeted” (alvo) e “untargeted” (não-alvo). As análises alvo destinam-se a busca por um grupo específico de metabólitos de interesse e

as análises não alvo são utilizadas para a busca pelo maior número possível de metabólitos em determinada amostra (MOURA *et al.*, 2021).

O GNPS (Global Natural Products Social Molecular networking) surgiu em 2012 e tem sido utilizado por diversas áreas, através de análises não direcionadas utilizando dados de espectrometria de massas (Pilon *et al.*, 2021). A rede molecular baseia-se na ideia de que estruturas semelhantes tendem a formar padrões semelhantes de fragmentação. E tem a capacidade de armazenar dados espectrais e disponibilizá-los para a comunidade científica, alimentando assim a base de dados. Possui mais de 93 milhões de dados com referências cruzadas e mais de 22 mil compostos registrados (SCHMID *et al.*, 2021; RIBEIRO, 2019).

Sendo assim, elas utilizam algoritmos matemáticos para organizar e interpretar dados de espectrometria de massas agrupando-os de acordo com o perfil de fragmentação referente à espectrometria de massas, associando as substâncias estruturalmente semelhantes como sendo de uma mesma família molecular (MOURA *et al.*, 2021). Essa rede é composta por nodos, vetores e clusters. O nodo representa um espectro, conectado a outros através de vetores. Os vetores são formados a partir da presença de fragmentos homólogos. Assim, os nodos se alinham através dos escores de cosseno e os vetores os agrupam em cluster de espectros análogos, como mostra a **Figura 8** (Pilon *et al.*, 2021).

Figura 8 - Formação de uma rede molecular a partir da inserção dos dados de Espectrometria de Massas (EMⁿ), comparação dos espectros de massas para a geração do espectro de consenso e formação de agrupamento por similaridade (clusters).



Fonte: Pilon *et al.*, 2021.

Com o crescimento dos estudos em metabolômica em diversas áreas, surge então diversas plataformas e *softwares* para auxiliar no pré-processamento e análise de

dados espectrais obtidos de amostras complexas de metabólitos. Essas ferramentas são úteis para relacionar moléculas semelhantes e identificar padrões de fragmentação, possibilitando também a identificação de moléculas ainda sem anotação, elevando a qualidade dos dados e reduzindo o tempo de processamento de dados (MOURA *et al.*, 2021).

Tendo em vista os resultados promissores já realizados pelo Laboratório de Química de Produtos Naturais (LQPN/ UFMA) relacionados à atividade leishmanicida de raízes de *A. brachypoda* e os já realizados pelo nosso grupo de pesquisa para as flores, foi possível relacionar a composição química de ambas as partes da planta, buscando portanto a elucidação dos metabólitos presentes no extrato e frações das flores, visando o isolamento dos compostos da fração DCM, pois é uma fração rica em classes de metabólitos secundários de interesse. Alguns resultados biológicos indicaram também que essa fração possui grande potencial biológico.

4 METODOLOGIA

4.1 Coleta das flores

As flores foram coletadas nas regiões de cerrado do estado de Minas Gerais, Brasil, na fazenda Sant'Ana da Serra no município de João Pinheiro (localização: 17°44'04.500 S, 46°10'04.400 W).

A identificação da planta foi realizada no Herbário José Badine da Universidade Federal de Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil pela botânica Dra. Maria Cristina Teixeira Braga Messias, depositando assim uma exsicata (n° 17.935). A autorização para coleta e estudos científicos foi cadastrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob o número A4551DE4.

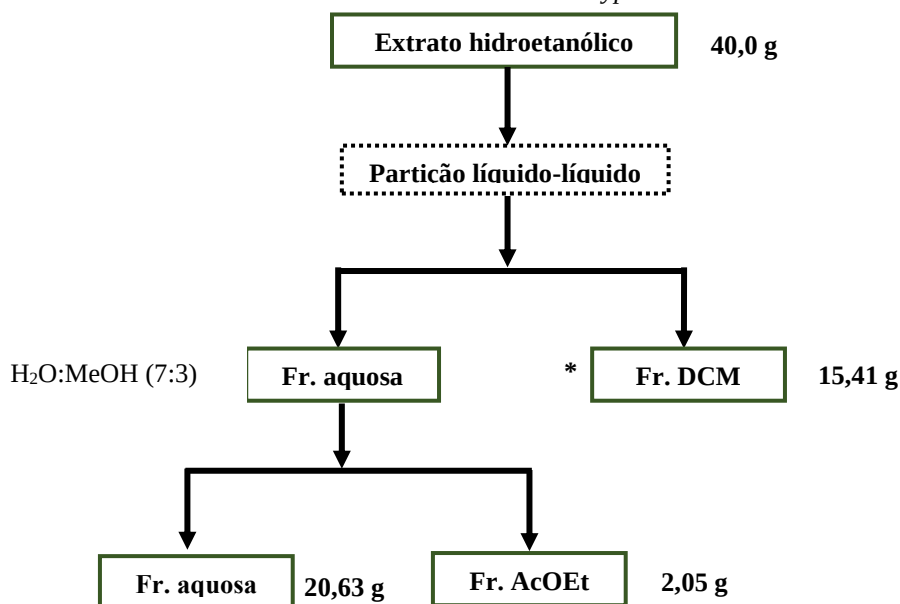
4.2 Preparo do extrato

Após secas, as flores de *A. brachypoda* foram trituradas em moinho de facas. O pó obtido foi levado para extração com etanol/água (7:3) por meio de percolação exaustiva. Após a extração, a solução extratora foi evaporada sob pressão reduzida, em temperatura menor que 40 °C. O extrato foi transferido para vidros sob abrigo da luz e posteriormente liofilizado para completa remoção de solventes.

4.3 Partição líquido-líquido

O Extrato Bruto (EB) foi submetido ao processo de extração líquido-líquido em larga escala, utilizando solventes de diferentes polaridades, conforme esquematizado na **Figura 9**. Em seguida, 40 g de extrato foram dissolvidos em água (H₂O) e metanol (MeOH) (7:3) e particionado com diclorometano (DCM), fração de interesse. Após a partição, a fase aquosa foi separada da fase orgânica e este processo foi repetido por 6 vezes, a fim de esgotar os compostos solúveis neste solvente. Em seguida, a fração aquosa foi particionada com acetato de etila (AcOEt) usando o mesmo processo da fração anterior. Após evaporação dos solventes, o extrato e as frações foram pesados (DCM: 15,41 g, AcOEt: 2,05 g e Fração aquosa: 20,63 g). Em seguida foram diluídos em metanol grau HPLC na concentração de 1,0 mg/mL, filtrados em filtro Millex de 0,22 µm e analisados por HPLC-PDA (Shimadzu) para obtenção dos seus perfis químicos. Utilizou-se o método exploratório de 5-100% de uma solução B (MeOH + 0,1% de ácido fórmico) em 40 minutos, utilizando uma coluna Luna 5 µm C18 100 Å (250 x 4,6 mm). Os componentes da fração diclorometânica foram isolados por cromatografia em coluna aberta de fase normal e em escala semi-preparativa de acordo com o item 4.4.

Figura 9 - Fluxograma da partição líquido-líquido do extrato bruto de *A. brachypoda*



*Fração de interesse.

Fonte: Próprio autor.

4.4 Atividade antiparasitária *in vitro* do extrato hidroalcoólico e frações

4.4.1 Parasitos

As formas promastigotas ($5 \times 10^5/\text{mL}$) de *Leishmania amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) foram cultivadas no Laboratório de Imunofisiologia (UFMA) em garrafas para cultura estéreis contendo meio Schneider (SIGMA), gentamicina ($50 \mu\text{g}/\text{mL}$) e suplementado com Soro Fetal Bovino (GIBCO) 10%, sendo acondicionadas em câmara de demanda bioquímica de oxigênio (BOD) à 27°C . Elas foram obtidas na fase estacionária, em culturas de 5 dias.

4.4.2 Atividade antipromastigota do extrato, frações e compostos isolados de *Arrabidaea brachypoda*

Após secos, o extrato e frações foram dissolvidos em DMSO a 1% em PBS (tampão fosfato-salino). O efeito anti-leishmania tanto do extrato e frações quanto da anfotericina B foi estudado em promastigotas ($5 \times 10^6/\text{mL}$ - $10 \mu\text{L}$), adicionadas em placas de 96 poços, na presença de diferentes concentrações do extrato (500; 250; 125; 62,5; 31,2; 15,6; 7,81 e $3,9 \mu\text{g}/\text{mL}$). As frações acetato, diclorometânica e aquosa foram testadas nas concentrações 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,625; $0,78125 \mu\text{g}/\text{mL}$. A fração considerada mais ativa foi levada para isolamento dos constituintes químicos e em seguida os compostos isolados foram testados nas concentrações 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,625; $0,78125 \mu\text{g}/\text{mL}$. Como controle positivo foi utilizada a Anfotericina B® (100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,625; $0,78125 \mu\text{g}/\text{mL}$) e o controle negativo foi preparado apenas com o meio de cultura Schneider. Também utilizou-se DMSO na mesma concentração testada como controle.

Após incubação, MTT (Brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil tetrazólio) (Sigma, EUA) ($5 \text{ mg}/\text{mL}$) foi adicionado na cultura, sucedendo-se nova incubação durante 3 h a 26°C . A viabilidade das formas promastigotas foi avaliada com base no metabolismo do MTT, sendo proporcional ao valor da absorbância gerada pelo espectrofotômetro, sob comprimento de onda a 540 nm. A porcentagem de citotoxicidade foi realizada de acordo com o cálculo:

$\% \text{ citotoxicidade} = (1 - \text{Densidade ótica do teste} / \text{Média do controle negativo}) \times 100$.

A concentração inibitória de 50% (CI_{50}) foi obtida por regressão não linear com o auxílio do *GraphPad Prism* versão 8.0.2.

4.5 Fracionamento da fase diclorometânica

4.5.1. Cromatografia em coluna aberta

Observando os dados antiparasitários, a fração diclorometânica foi considerada a mais ativa, portanto, foi levada para isolamento. A fração DCM foi fracionada em coluna cromatográfica de vidro (60 x 14 cm), o adsorvente utilizado foi sílica gel (0,063-0,200 mm) (160,0 g) e a fase móvel foi constituída de um gradiente de polaridade crescente de solventes, sendo eles hexano/acetato de etila com um fluxo de 3 mL/min, iniciando em 80% de hexano e diminuindo de 10 em 10% até 100% de acetato de etila. O empacotamento da coluna foi realizado com hexano e em seguida ocorreu a aplicação de 3,0 g da amostra no topo da coluna. No total foram coletados 241 frações com 3 mL cada, em seguida foram analisados em cromatografia de camada delgada (CCD) e agrupados de acordo com a pureza e semelhança do perfil na placa CCD. Após o agrupamento, obteve-se 14 grupos de frações.

4.5.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em escala semi-preparativa

As frações (FLAB-02, FLAB-03, FLAB-04, FLAB-05, 06 e FLAB-08) foram dissolvidas em MeOH grau HPLC para então os seus constituintes serem separados em cromatografia líquida de alta eficiência em escala semi-preparativa. Essas frações foram selecionadas para estudo devido ao perfil químico obtido por HPLC-PDA (Shimadzu), que mostra menor quantidade de picos e uma melhor separação entre eles (**Figura 16**). Alíquotas de 100 a 300 µL foram injetadas. A fase móvel foi constituída por solução A: H₂O + 0,1% AF e solução B: MeOH + 0,1% AF, em sistema gradiente de 60-100% de MeOH em 40 minutos para frações e fluxo de 4 mL/min. A coluna utilizada no experimento foi Luna 5 µm C18 100 Å (250 x 10 mm).

4.6 Cromatografia líquida acoplada a um íon trap com interface de ionização por eletrospray e um analisador de massas de baixa resolução (LC-ESI-IT-MS)

Os componentes A e B da fase móvel foram constituídos por água deionizada (A) e MeOH (B) pureza HPLC com adição de 0,1 % de HCOOH. As amostras (Extrato bruto, fração aquosa, fração DCM e fração AcOEt) foram analisadas em modo gradiente, com a % de B iniciando em 5% e aumentando para 100% após 40 minutos, utilizando um fluxo de 1 mL/min, utilizando uma coluna Luna 5 µm C18 100 Å (250 x 4.6 mm). O forno da coluna foi mantido em 35 °C durante todas as análises. A faixa de aquisição do comprimento de onda do detector DAD foi de 190-800 nm.

Os experimentos de espectrometria de massa foram realizados em um espectrômetro de massas modelo Bruker. A matriz estudada foi analisada por ionização por eletrospray (ESI), a fragmentação em múltiplos estágios (MS^2 e MS^3) foi realizada em uma interface de prisão de íon (IT). O modo positivo foi selecionado para a geração e análise dos espectros de massa para primeira ordem (MS) e o experimento foi feito nas seguintes condições: pressão do gás de nebulização foi estabelecida a 50,0 psi; temperatura capilar, 300 °C; voltagem de entrada do capilar de transferência foi mantida a -4500V. O gás de dessolvatação (N_2) com um fluxo 10 L/min e o gás de colisão foi o hélio (He). A aquisição da faixa foi m/z 50-1200. O software *Data Analysis* foi usado para adquirir e processar os dados.

4.7 Processamento dos dados na plataforma GNPS

Os dados brutos adquiridos no item 4.5 no formato “. d” em modo positivo foram convertidos para “. mzXML” utilizando o DataAnalysis Bruker, e esses dados convertidos foram utilizados para gerar as redes moleculares.

A rede molecular foi criada usando o fluxo de trabalho online (<https://ccms-ucsd.github.io/GNPSDocumentation/>) no site do GNPS (<http://gnps.ucsd.edu>). Os dados foram filtrados removendo todos os íons do fragmento MS/MS dentro de +/- 17 Da do precursor m/z . Os espectros de MS/MS foram filtrados por janela escolhendo apenas os 6 principais íons de fragmento na janela de +/- 50 Da em todo o espectro. As tolerâncias das massas do íon precursor e dos íons fragmento MS/MS foram ajustadas para 0,5 Da. Uma rede foi então criada onde as arestas foram filtradas para ter um valor de cosseno acima de 0,7 e mais de 4 picos correspondentes. Finalmente, o tamanho máximo de uma família molecular foi definido como 100. Os espectros foram então pesquisados nas bibliotecas espectrais do GNPS. Todas as correspondências mantidas entre espectros de rede e espectros de biblioteca precisavam ter uma pontuação acima de 0,7 e pelo menos 4 picos correspondentes (WANG *et al.*, 2016).

A análise das redes moleculares pode ser acessada em <https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=8c7037b5125647a8b2fa5314e2dc73de>.

4.8 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e de ^{13}C

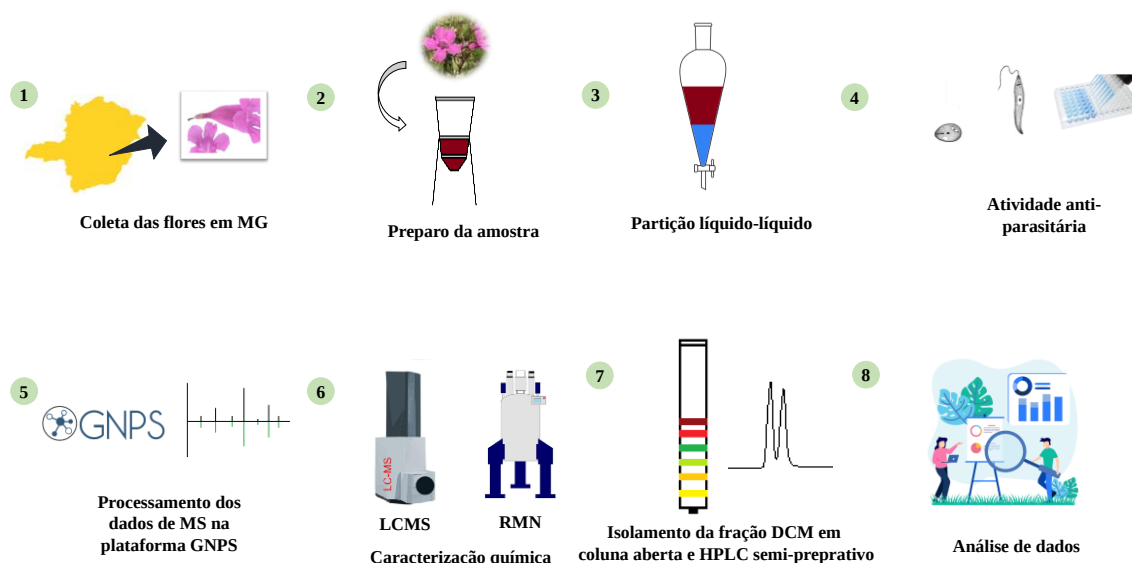
Os dados espectroscópicos de RMN de ^1H e ^{13}C , bem como os experimentos HMBC, HSQC, COSY, NOESY 1D foram obtidos em um equipamento da Bruker Ascend 600 MHz com campo magnético de 14,1 T. Os deslocamentos químicos foram referidos em partes por milhão (δ) usando o sinal residual do tetrametilsilano (TMS), CD_3OD sinais (δ_{H} 3.34; δ_{C} 49,86), como padrões internos para RMN de ^1H e de ^{13}C , e as constantes de acoplamento (J) são relatados em Hz. Os dados foram processados no software TopSpin da Bruker.

4.9 Caracterização química das estruturas por UPLC-QTOF-MS

As análises foram realizadas em um espectrômetro de massas UHR-ESI-TOF MaXis™ Impact (Ultra-high Resolution - Electrospray Ionization - Time of flight) equipado com eletrospray (ESI) como fonte de ionização e analisador quadrupolo-tempo de voo (Q-TOF) contendo uma coluna de C18 Acquity UPLC HSST3 (100 x 2,1 mm), com partículas de 1,8 μm e 100 Å de diâmetro do poro.

Utilizou-se um modo de eluição gradiente de 5 a 100% em 15 minutos. Sendo a fase A constituída de água deionizada e a fase B de ACN, ambas acidificadas com 0,1% de ácido fórmico. Os modos de aquisição escolhidos foram: positivo e negativo. Empregou-se uma faixa de varredura do detector DAD de 200 a 800 nm e a temperatura do forno da coluna de 35 °C. Os parâmetros de MS foram: a razão m/z dos íons fragmentados *auto* MS/MS, utilizando uma faixa de aquisição em m/z de 50-1500. A voltagem no capilar do eletrospray foi de 2,5 kV e a temperatura da fonte de ionização foi de 120 °C. O fluxo do gás de dessolvatação (N_2) foi ajustada a 800 L/h e a temperatura mantida a 350 °C. Para obtenção dos espectros de alta energia no MS/MS, fez-se uso de uma rampa de potencial de 15-35 eV. A energia de colisão utilizada foi de 6.0 eV. Os dados foram processados no software UNIFI 1.8 (Waters, Millford, USA).

Figura 10 – Fluxograma contendo as etapas do trabalho experimental realizado nas flores de *Arrabidaea brachypoda*.



Fonte: Próprio autor.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise das redes moleculares

De modo a se investigar a diversidade química presente no extrato bruto, fração diclorometânica, fração acetato de etila e fração aquosa, foi empregada a abordagem de visualização dos dados na forma de redes moleculares utilizando o fluxo de trabalho clássico. Para isso, utilizou-se os dados de espectrometria de massas em baixa resolução conforme os itens 4.4 e 4.5, que foram então processados na plataforma GNPS. Essa etapa inicial foi útil para que se pudesse realizar o mapeamento químico do extrato e frações pela anotação de compostos através da análise inicial das redes moleculares, para em seguida observar os padrões de fragmentação de cada composto anotado. E foi uma etapa importante para que se pudesse perceber as principais classes de metabólitos secundários presentes nessas amostras para que então pudesse ser realizada as etapas de ensaios biológicos, isolamento e caracterização química.

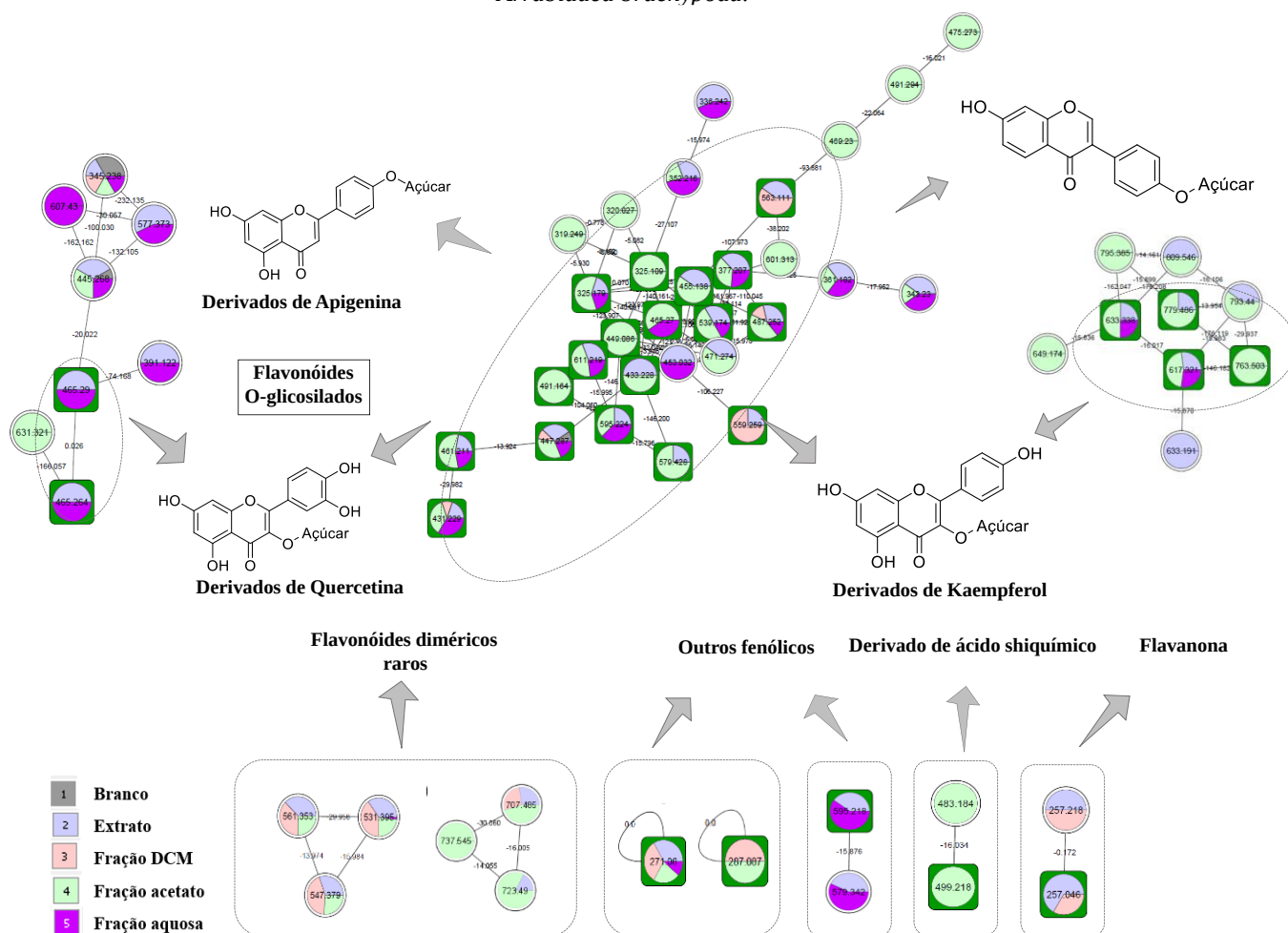
As redes moleculares foram construídas (**Apêndice 1**) para a visualização dos dados e a anotação de substâncias já conhecidas foi realizada através da comparação com bibliotecas espectrais publicamente disponíveis na plataforma. Mais especificamente, a anotação ocorreu através da comparação dos padrões de fragmentação MS/MS obtidas experimentalmente com os depositados nas bibliotecas espectrais. A rede molecular foi visualizada utilizando o software *Cytoscape* (SHANNON *et al.*, 2003). Os espectros

também presentes no branco (MeOH 100%) foram descartados para evitar possíveis erros na anotação dos compostos devido à interferência de contaminantes.

Como afirmado por Moura *et al.* (2021), as redes moleculares organizam os dados experimentais de MS/MS pelas correlações detectadas entre cada composto presente nas misturas, pois moléculas semelhantes tendem a apresentar fragmentações semelhantes. Cada nodo representa um espectro de fragmentação, sendo também associado ao seu íon precursor. As redes contendo compostos anotados pelas buscas nas bibliotecas espectrais e após inspeção manual são mostrados na **Figura 11**. A rede molecular foi organizada pela conexão entre os nodos por vetores, agrupando-os e ligando-os um ao outro pelas suas similaridades, sendo observados em sua maioria flavonóides glicosilados e não glicosilados, além de derivados do ácido quínico. Especificamente na espécie *A. brachypoda*, a literatura relata a presença de compostos denominados brachydinas. Estes compostos também foram agrupados pelos vetores sendo conectados às suas agliconas e, separadamente, os glicosilados.

A plataforma resultou em 67 correspondências com as bibliotecas espectrais e foram anotados 19 compostos das classes de flavonas, flavonois, flavanonas, isoflavonas, cumarina simples e ácido cinâmico e derivados e que estão de acordo com estudos anteriores relacionados à composição química das flores de *A. brachypoda* (ANDRADE *et al.*, 2020). É válido ressaltar, que o método de anotação de compostos não é uma identificação, mas sim uma sugestão da presença daquele composto. No caso desse trabalho, a anotação é baseada em padrões de fragmentação MS/MS de uma molécula. Em uma análise não direcionada, não se pode afirmar a posição de duplas ligações ou de substituintes, nem mesmo ter informações sobre centros assimétricos, para a identificação e confirmação do composto são necessárias outras técnicas espectrométricas de caracterização. Pode-se observar também que não foi possível anotar 48 compostos, tendo em vista que não houve boas correspondências, devido a alguns íons fragmentos importantes não estarem coerentes, e /ou que estavam presente no branco (cor cinza), e/ou eram característicos de compostos sintéticos e/ou também advindos de outros tipos de organismos. Portanto, como foram observadas fragmentações que não foram coerentes com a sugestão da plataforma ao comparar com os dados brutos, essas correspondências foram descartadas.

Figura 11 - Recorte da rede molecular para os compostos anotados para o extrato e frações de *Arrabidaea brachypoda*.



Cada nodo representa um espectro de massas, enquanto os vetores que os conectam representam a similaridade entre eles. Os gráficos de pizza representam a abundância relativa dos íons em cada amostra. Os nodos em que houve correspondências com a biblioteca estão destacados na cor verde (MANNOCHIO-RUSSO, 2022).

Fonte: Próprio autor.

Os metabólitos anotados estão presentes na **Tabela 2** e as representações das suas estruturas na **Figura 12**, tendo em vista que pode ser algum isômero, pois somente com a espectrometria de massas não podemos afirmar a posição exata dos substituintes. Na **Tabela 2**, pode-se observar que foram anotados compostos em que o valor de cosseno é maior ou igual a 0,7, conforme definido nos parâmetros da análise. Este valor de cosseno representa a similaridade espectral de MS/MS entre o espectro da amostra e os espectros presentes na biblioteca. A literatura afirma que quanto mais próximo de 1 mais idêntico são os espectros e o valor mais próximo de 0 indica que existem pouca similaridade entre os espectros (MOURA *et al.*, 2021). Porém, este não é o único parâmetro a ser observado. Todos os espectros de MS/MS foram adquiridos em espectrômetros de massas de baixa

resolução (LC-ESI-IT-MS) e os resultados da análise estão dispostos na **Tabela 2** e para a confirmação das fórmulas moleculares, utilizou-se um espectrômetro de alta resolução (UPLC-QTOF-HRMS) de maior precisão, obtendo o erro (≤ 10 ppm) com auxílio do *mass calculation* da universidade de Warwick disponível em https://warwick.ac.uk/fac/sci/chemistry/research/barrow/barrowgroup/calculators/mass_errors/, comparando os compostos anotados o que já foi reportado para o gênero na literatura em relação às classes já identificadas para esta espécie, os dados de alta resolução estão na **Tabela 3**.

Tabela 2 - Resultado de análise via plataforma GNPS de dados de MS/MS de extrato bruto e frações de *Arrabidaea brachypoda*.

#	Composto	Amostra	Íon precursor [M+H] ⁺	Fragmentos MS/MS	Cosseno	Classe NP
1	Apigenina-O-hexosídeo	EB, AcOEt	433	455 [M+Na] ⁺ / 433; 271; 153	0,95	Flavona
2	Apigenina-C-hexosídeo	AcOEt	433	455 [M+Na] ⁺ / 433; 343; 313; 271; 153	0,93	Flavanona
3	Kaempferol-O-hexosídeo	EB, AcOEt, DCM e Aq	449	449; 287; 153	0,94	Flavonol
4	Dihidróxi-flavanona	EB e DCM	257	257; 152; 104	0,90	Flavanona
5	Rutina	EB, AcOEt e Aq	611	633 [M+Na] ⁺ / 611; 303	0,89	Flavonol
6	Kaempferol-O-glucoronídeo	EB, AcOEt, DCM e Aq	461	483 [M+Na] ⁺ ; 461; 285; 153	0,88	Flavonol
7	Apigenina-O-rutinosídeo	EB e AcOEt	579	579; 271/ 271; 243; 153	0,87	Flavona
8	Kaempferol-O-rutinosídeo	EB, AcOEt e Aq	595	617 [M+Na] ⁺ / 595; 287; 153	0,86	Flavonol
9	Ácido clorogênico	EB, AcOEt e Aq	355	377 [M+Na] ⁺ / 355; 192; 185	0,86	Ácido cinâmico e derivados
10	Genisteína	EB e DCM	271	293 [M+Na] ⁺ / 271; 253; 153	0,85	Isoflavona
11	Kaempferol-O-hexose-di-deoxihexose	AcOEt	741	763 293 [M+Na] ⁺ / 741; 287; 153	0,83	Flavonol
12	Quercetina-O-hexosídeo	EB, AcOEt, DCM e Aq	465	487 [M+Na] ⁺ ; 465; 303; 153	0,83	Flavonol
13	Cumarina-O-hexose-glucoronídeo	EB e AcOEt	501	501; 325; 163; 145	0,78	Cumarina simples
14	Kaempferol-O-acetilhexosídeo	AcOEt	491	491; 287; 153	0,78	Flavonol
15	Alpinetina	EB, AcOEt e DCM	271	271; 256; 152	0,77	Flavavona

16	Luteolina	AcOEt e DCM	287	309 [M+Na] ⁺ / 287; 153; 133	0,77	Flavona
17	Daidzeína-O-glucoronídeo	EB, AcOEt, DCM e Aq	431	431; 255; 237/ 255; 137	0,75	Isoflavonas
18	Cameliasídeo A	EB e AcOEt	757	779 [M+Na] ⁺ / 757; 287; 153	0,74	Flavonol
19	Ácido dicafeoil-shiquímico	EB, AcOEt e DCM	499	499; 319; 163	0,71	Ácido cinâmico e derivados

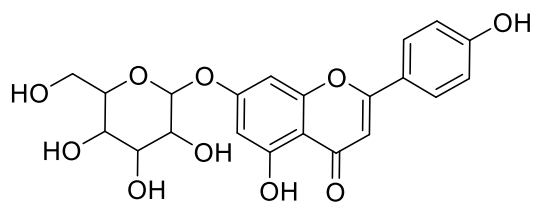
Fonte: Próprio autor. **EB:** Extrato Bruto. **AcOEt:** Fração acetato de etila. **DCM:** Fração diclorometânica. **Aq:** Fração aquosa. **Classe NP:** Classe de metabólito. **Cosseno:** valor de similaridade entre nodos.

Tabela 3 - Confirmação da fórmula molecular por espectrometria de massas de alta resolução dos compostos anotados no extrato e frações de *Arrabidaea brachypoda* (modo de ionização positivo).

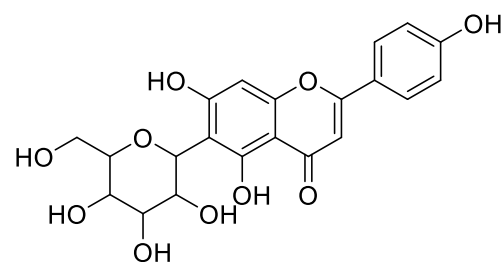
#	Composto	Fórmula molecular	[M+H] ⁺ observado	[M+H] ⁺ calculado	Erro (ppm)
1	Apigenina-O-hexosídeo	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₀	433,1123	433,1129	-1,40
2	Apigenina-C-hexosídeo	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₀	433,1501	433,1504	-0,69
3	Kaempferol-O-hexosídeo	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁	449,1075	449,1078	-0,66
4	Dihidróxi-flavanona	C ₁₅ H ₁₃ O ₄	257,0790	257,0808	-7,0
5	Rutina	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₆	611,1601	611,1606	-0,82
6	Kaempferol-O-glucoronídeo	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂	461,0877	461,0871	1,29
7	Apigenina-O-rutinosídeo	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₄	579,1719	579,1708	1,89
8	Kaempferol-O-rutinosídeo	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₅	595,1621	595,1657	-6,04
9	Ácido clorogênico	C ₁₆ H ₁₉ O ₉	355,1029	355,1024	1,40
10	Genisteína	C ₁₅ H ₁₁ O ₅	271,0606	271,0601	1,85
11	Kaempferol-O-hexose-di-deoxihexose	C ₃₃ H ₄₁ O ₁₉	741,1629	741,2237	0,67
12	Quercetina-O-hexosídeo	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₂	465,1033	465,1028	1,07
13	Cumarina-O-hexose-glucoronídeo	C ₂₁ H ₂₅ O ₁₄	501,1244	501,1238	1,20
14	Kaempferol-O-acetilhexosídeo	C ₂₃ H ₂₃ O ₁₂	491,1190	491,1184	1,22
15	Alpinetina	C ₁₆ H ₁₅ O ₄	271,0976	271,0965	4,05
16	Luteolina	C ₁₅ H ₁₁ O ₆	287,0556	287,0550	2,09
17	Daidzeína-O-glucoronídeo	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₀	431,0962	431,0973	-2,55
18	Cameliasídeo A	C ₃₃ H ₄₁ O ₂₀	757,2191	757,2186	0,66
19	Ácido dicafeoil-chiquímico	C ₂₅ H ₂₃ O ₁₁	499,1256	499,1235	4,21

Fonte: Próprio autor.

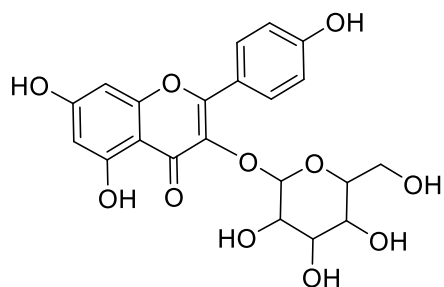
Figura 12 - Representações das estruturas dos principais compostos anotados no GNPS.



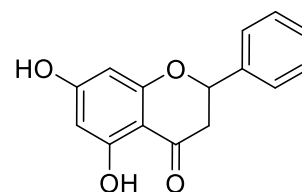
(1) Apigenina-O-hexosídeo



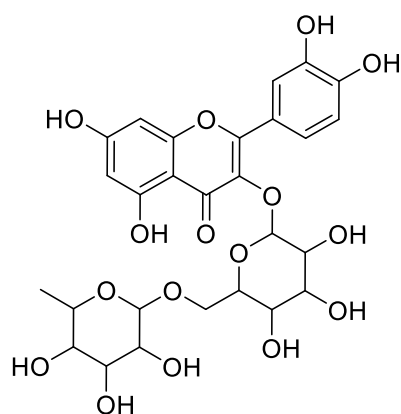
(2) Apigenina-C-hexosídeo



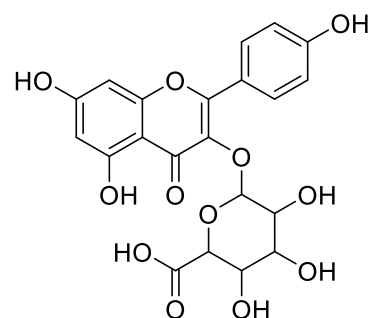
(3) Kaempferol-O-hexosídeo



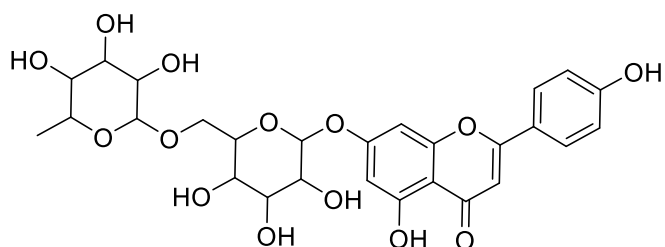
(4) Dihidróxi-flavanona



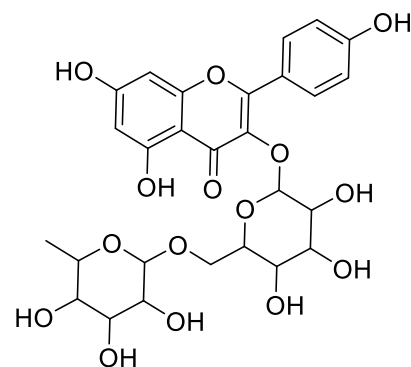
(5) Rutina



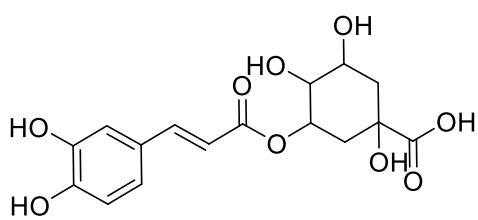
(6) Kaempferol-O-glucoronídeo



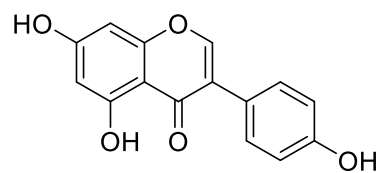
(7) Apigenina-O-rutinosídeo



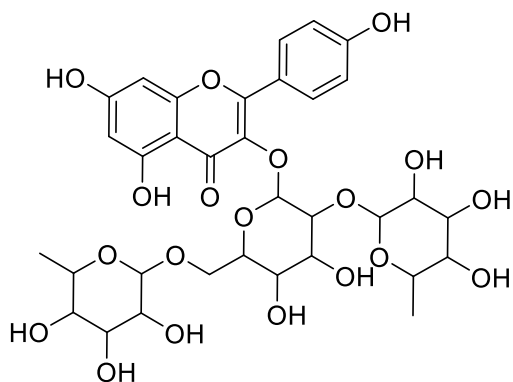
(8) Kaempferol-O-rutinosídeo



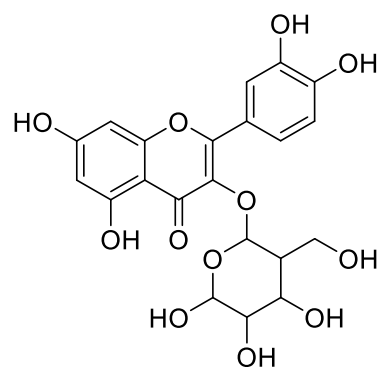
(9) Ácido clorogênico



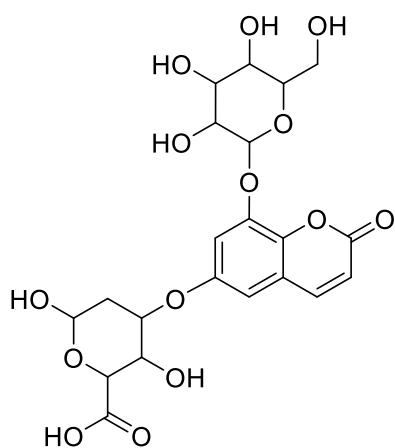
(10) Genisteína



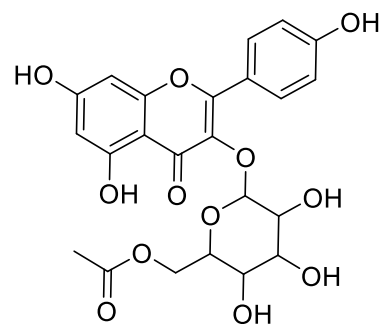
(11) Kaempferol-O-hexose-di-deóxihexose



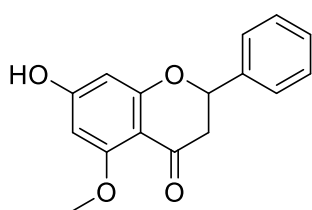
(12) Quercetina-O-hexosídeo



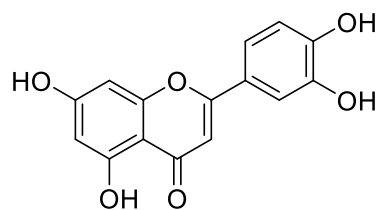
(13) Cumarina-O-hexose-O-glucoronídeo



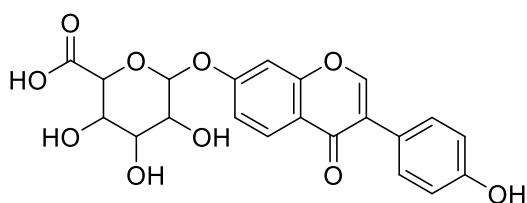
(14) Kaempferol-O-acetilhexosídeo



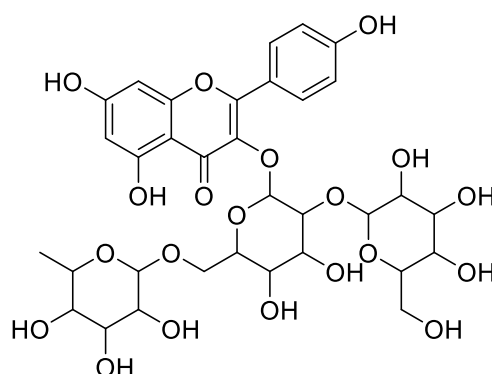
(15) Alpinetina



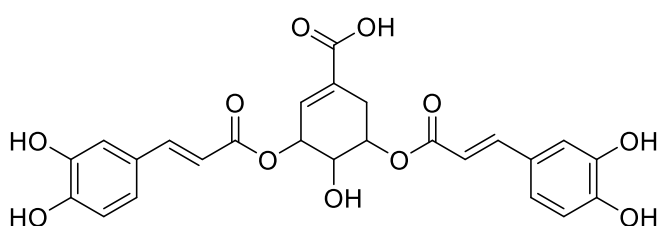
(16) Luteolina



(17) Daidzeína-O-glucoronídeo



(18) Cameliásídeo A



(19) Ácido dicafeoil-shiquímico

Fonte: Próprio autor.

Flavonoides *O*-glicosilados foram predominantes na fração acetato, na qual observando os padrões de fragmentação MS/MS observou-se as perdas características de 162 Da, 146 Da e 132 Da, correspondentes a hexose, deoxihexose e pentose, respectivamente (MANNOCHIO-RUSSO *et al.*, 2020). Sendo principalmente derivados de kaempferol (aglicona caracterizada por um fragmento em m/z 287), apigenina (aglicona em m/z 271) e quercetina (aglicona em m/z 303). Pode-se observar, que dentre os flavonoides anotados, tem-se íons protonados $[M+H]^+$ e aduto de sódio $[M+Na]^+$ e, de acordo com Mannocho-Russo (2022), estes fatores contribuem para que possam ter nodos repetidos que representam o mesmo composto; sendo assim, o número de nodos não representa o número de compostos presentes na amostra.

Dentre os flavonoides *O*-glicosilados presentes na fração AcOEt, observou-se a perda de 162 Da para os compostos **1** (m/z 433.23), **3** (m/z) e **12** (m/z 577.23). Em plantas, os flavonoides comumente se apresentam como glicosilados, principalmente porque as unidades de açúcar apresentam mais solubilidade e mobilidade, facilitando com que esses compostos não interfiram em mecanismos celulares vitais das plantas (VERVERIDIS *et al.*, 2007). Um estudo realizado por Garcia (2008) identificou flavonoides-*O*-glicosilados no extrato acetato de etila das folhas, caules e flores de *A.*

brachypoda. Foram anotados também flavonoides que apresentaram perda da porção hexose-deoxihexose (m/z 308) nos compostos **5** (m/z 611.22), **7** (m/z 579.43) e **8** (m/z 595.08). Houve também correspondências com compostos que apresentaram em sua estrutura uma maior porção glicosídica, como os compostos **11** (m/z 741.15) e **18** (m/z 757.46), que são caracterizados pelas perdas de 454 Da, referente a uma hexose (162 Da) e duas deoxihexoses (292 Da), e 470 Da, referente a uma deoxihexose (146 Da) e duas hexoses (324 Da), respectivamente.

Foi possível observar ainda, correspondência no extrato bruto e fração aquosa com um flavonoide C-glicosilado, caracterizado principalmente pela ligação C-C, em que apresenta uma hexose ligada à parte flavonoídica da molécula. A fragmentação de C-glicosilados tem como sua principal característica os fragmentos correspondentes a 120 Da e 90 Da, fragmentos esses registrados no composto **2** (m/z 433.24), sendo a apigenina a sua aglicona (m/z 271). Há relatos no gênero *Arrabidaea* em relação a presença de flavonoides C-glicosilados na composição química em *A. samydoides*, *A. chica* e *A. patellifera* (NASCIMENTO *et al.*, 2022). Flavonoides C-glicosilados podem ser considerados marcadores químicos, principalmente pela sua estabilidade química e diversidade estrutural (AMARAL, 2018; GOSMANN *et al.*, 2011). Também já foram reportados por participar da proteção UV das plantas, como é o caso da vicenina (SILVA *et al.*, 2014). Pensando em atividade biológica, um flavonoide C-glicosilado possui vantagem em relação a um O-glicosilado, principalmente pela estabilidade química da ligação C-C, sendo assim, ele não sofre a hidrólise comumente presente nos O-glicosilados.

Foram registradas anotações de compostos pertencentes às classes dos ácidos cinâmicos e derivados. Esses compostos podem ser determinados baseados na presença de fragmentos m/z 163, relacionado ao ácido cafeico. O composto **9** (m/z 355.04) e **19** (m/z 499.10) apresentam o registro do íon mais intenso m/z 163. Compostos dessa classe já foram relatados em *A. patellifera*, *A. samydoides* e *A. pulchra* (NASCIMENTO *et al.*, 2022). Outra classe de compostos presente foram as cumarinas, na qual houve um *match* relacionado e caracterizado pela presença do fragmento m/z 163, que está relacionado à hidróxi-cumarina e o fragmento m/z 145, relacionado à cumarina após a perda de 18 Da, fragmento característico da perda de água. Fragmentos esses registrados pelo composto **13** (m/z 501.10), que também há o registro da perda de 176 Da, referente ao ácido glucorônico, e de 162 Da, referente à hexose. A perda de ácido glucorônico também é observada nos compostos **6** (m/z 461.21), **17** (m/z 431.20), que possuem como agliconas

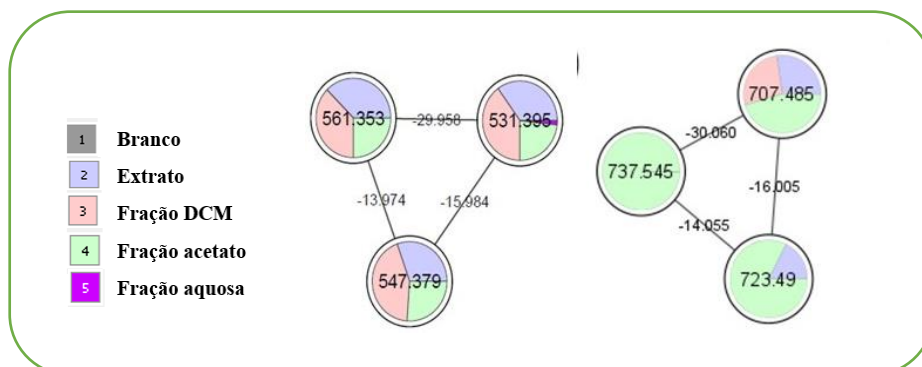
a daidzeína (m/z 255) e o kaempferol (m/z 287), respectivamente. O composto **14** (m/z 491.16) apresenta o kaempferol como sua aglicona e apresenta a perda da porção acetilhexosídeo, caracterizada pelo registro de 204 Da.

Foram também registrados íons referentes as agliconas dos flavonoides **4** (m/z 257.05), **10** (m/z 271.02), **15** (m/z 271.07) e **16** (m/z 287.07). Na qual os compostos **4**, **10** e **16** caracterizam-se principalmente pela fragmentação seguindo o mecanismo de Retro Diels Alder (RDA) registrando o íon fragmento m/z 153. Já o composto **15** registra primeiro a perda da metila (15 Da) e em seguida a fragmentação por RDA. Para os compostos **10** e **16** observou-se a presença de seus íons $[2M+H]^+$, m/z 542 e m/z 574, e a formação desses adutos é muito comum de ocorrer em espectrometria de massas (CROTTI *et al.*, 2006). A alpinetina é um composto que já foi encontrado em *A. triplinervia* por Leite *et al.* (2006). O kaempferol também é comum no gênero, sendo encontrado em *A. chica* por Barbosa *et al.* (2008). Outros estudos também demonstraram a presença de luteolina nos extratos etanólicos de *A. brachypoda* e *A. brachypoda* por Barbosa *et al.* (2008) e Franco *et al.* (2020). Não foram encontrados estudos que relataram a presença de daidzeína no gênero.

As redes moleculares, no *workflow* clássico, não indicaram correspondências para as brachydinas já relatadas na literatura devido à falta de dados disponíveis na biblioteca da plataforma GNPS, pois são moléculas recentemente relatadas e que ainda não foram depositadas. Porém, através da análise nas redes moleculares, foi possível observar o agrupamento de valores de m/z referentes às brachydinas agliconas predominantemente na fração diclorometânica (**Figura 13**). Como observado em estudos anteriores realizados por Rocha *et al.* (2016), as brachydinas agliconas já foram identificadas em extratos das raízes de *A. brachypoda*, confirmando assim a possível presença destes compostos no extrato das flores. Na **Figura 13** os íons destacados contém aducto de sódio (BRA-A, m/z 547,38 $[M+Na]^+$; BRA-B, m/z 561,35 $[M+Na]^+$ e BRA-C, m/z 531,32 $[M+Na]^+$), e são os nodos conectados referentes às brachydinas agliconas. Por outro lado, os nodos conectados referentes às brachydinas glicosiladas são observados predominantemente na fração acetato, e o íons também possuem a presença de um aducto de sódio (BRA-H m/z 723 $[M+Na]^+$, BRA-I m/z 737 $[M+Na]^+$, BRA-J m/z 707 $[M+Na]^+$). As estruturas das brachydinas putativamente anotadas estão na **Figura 14**. Devido às poucas correspondências com a biblioteca espectral e à presença das brachydinas na fração diclorometânica, deu-se prosseguimento com os estudos de melhoramento de

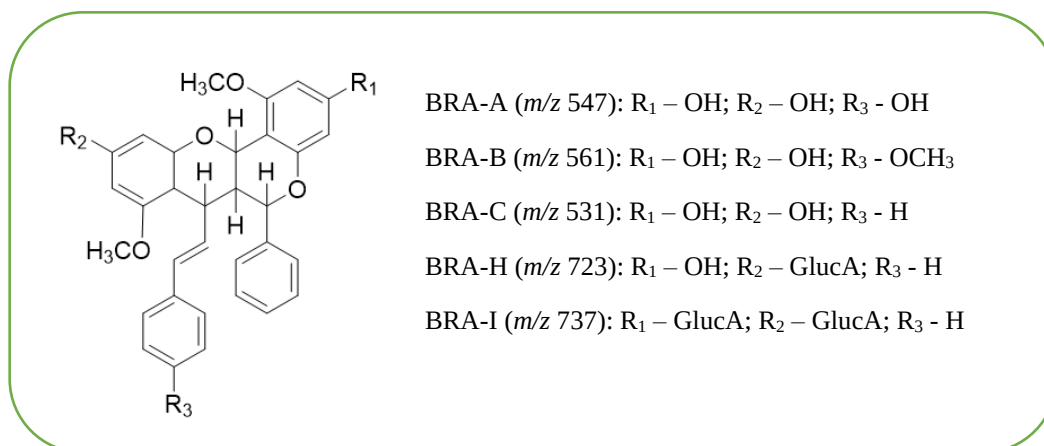
método cromatográfico e isolamento dos compostos presentes nesta amostra para posterior caracterização química.

Figura 13 - Região da rede molecular gerada em que se tem massas referentes às brachydinas agliconas[M+Na]



Fonte: Próprio autor.

Figura 14 - Estrutura das brachydinas presentes nas amostras analisadas na plataforma GNPS [M+Na]⁺.



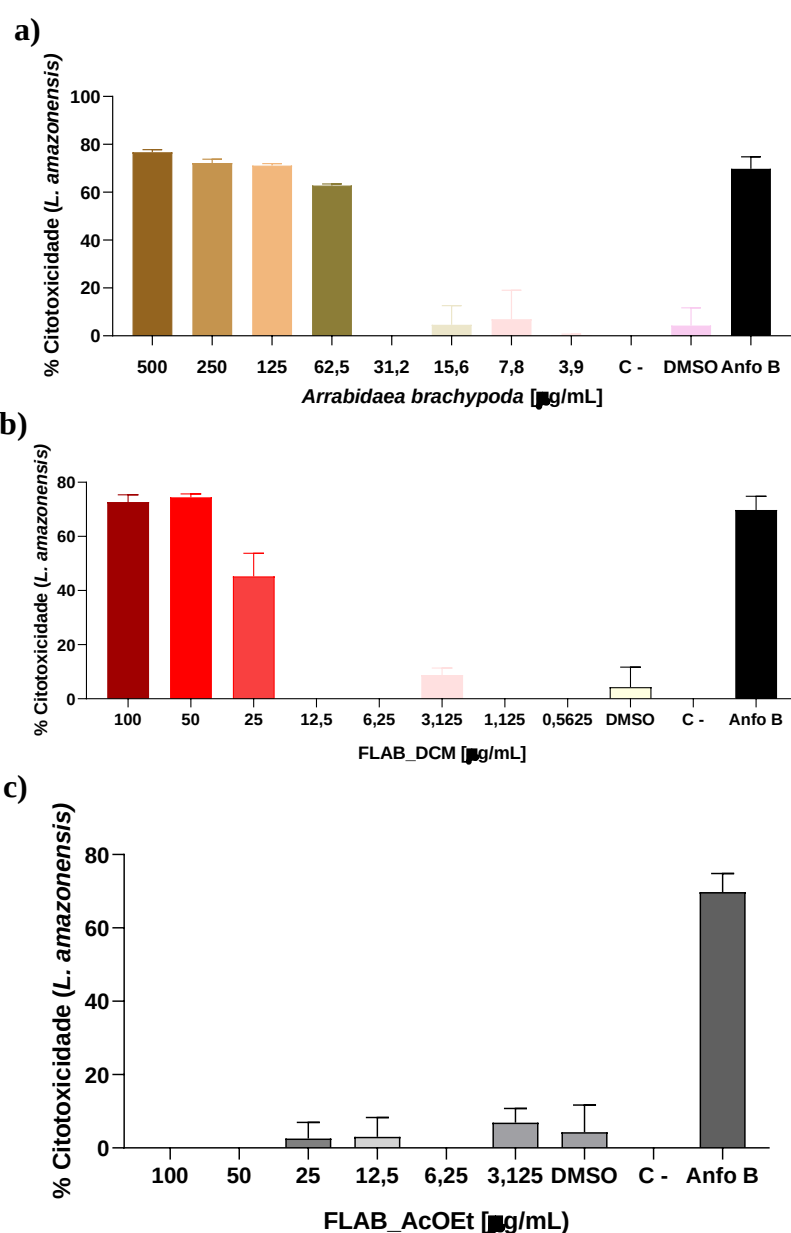
Fonte: Próprio autor.

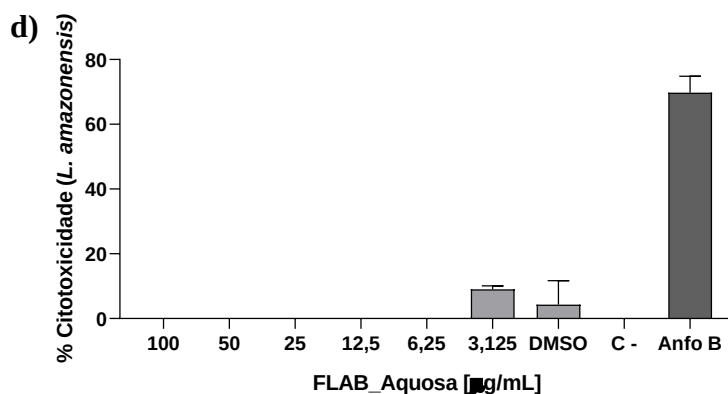
Por fim, percebe-se que nas redes moleculares no modo clássico, isômeros que apresentam o mesmo padrão de fragmentação são agrupados em um mesmo nodo (MANNOCHIO-RUSSO, 2022). Percebe-se também que houve na rede molecular nodos que não apresentaram correspondências com a plataforma GNPS, e não significa que a substância é inédita, pois as bibliotecas espectrais não são completas e apresentam limitações. Os dados de GNPS também indicaram que a fração DCM apresenta as brachydinas na sua composição química, informação importante para que se pudesse verificar a sua citotoxicidade em leishmania, tendo em vista que esses compostos já possuem atividade frente aos parasitas de *Leishmania amazonensis*.

5.3 Atividade anti-promastigota do extrato e frações de *A. brachypoda*

Como observado nos resultados da investigação química através da plataforma GNPS, no extrato hidroetanólico e nas frações das flores de *A. brachypoda* foi possível observar a presença de compostos químicos de diversas classes e também das brachydinas, sendo elas relatadas até então somente nas raízes dessa planta. Desta forma, foi investigado o potencial leishmanicida do extrato hidroetanólico e das frações das flores, baseando-se nas similaridades de composição química entre raízes e flores.

Figura 15 - Resultados do teste *in vitro* em *L. amazonensis* na forma promastigota no **a)** extrato bruto, **b)** fração DCM, **c)** Fração AcOEt e **d)** fração aquosa. Anfotericina B: controle positivo.





Fonte: Próprio autor.

Segundo Mota *et al.* (2015) os resultados de CI_{50} em parasitos podem ser classificados seguindo os seguintes critérios: $CI_{50} \leq 100 \mu\text{g/mL}$ – amostra ativa; CI_{50} entre 101 e 200 $\mu\text{g/mL}$ – amostra moderadamente ativa, e $CI_{50} \geq 200 \mu\text{g/mL}$ – amostra inativa. Pode-se observar o potencial efeito leishmanicida dos extratos e frações no gráfico da **Figura 15**, verificando que as amostras apresentam uma viabilidade celular significativa, causando assim a morte parasitária. Para a fração DCM, os resultados mostraram maior citotoxicidade para as células dos parasitas, já a fração aquosa não apresentou atividade significativa, provavelmente devido à alta polaridade dos compostos presentes nesta fração, tornando-os menos biodisponíveis por apresentarem baixa permeabilidade na membrana do parasita. Sendo válido ressaltar que o diclorometano é totalmente evaporado das amostras, eliminando assim a possibilidade de interferência do solvente nos resultados.

Tabela 4 - Determinação da CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) do extrato bruto e frações obtidas das flores de *Arrabidaea brachypoda*, frente às formas promastigotas de *L. amazonensis*.

EXTRATO/FRAÇÕES	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	R^2
FLAB_EB	53,93	0,97
FLAB_DCM	21,57	0,95
FLAB_AcoEt	>500	ND
FLAB_aquosa	>500	ND
Anfotericina B*	0,68	0,97

R^2 , coeficiente de regressão. O valor R^2 quantifica a qualidade do ajuste na curva de regressão não linear realizada para estimar o CI_{50} . ND: não determinado.

FLAB_EB: Extrato Bruto; FLAB_DCM: Fração diclorometânica; FLAB_AcoEt: Fração acetato de etila; FLAB_aquosa: Fração aquosa.

*Fármaco de referência para tratamento da leishmaniose.

Fonte: Próprio autor.

Em relação ao CI_{50} (**Tabela 4**), os dados mostram potente atividade antileishmania para fração DCM ($CI_{50} = 21,57 \mu\text{g/mL}$) e extrato Bruto ($CI_{50} = 53,93$

µg/mL). Em relação às frações acetato e aquosa, não foi possível determinar o seu CI_{50} , devido a sua baixa atividade leishmanicida, para encontrar-se o valor de CI_{50} teria que aumentar a concentração acima de 100 µg/mL. A anfotericina B mostrou atividade leishmanicida e um CI_{50} de 0,68 µg/mL, como já era esperado. Uma forma de se aproximar ao valor do padrão, seria a utilização de veículos de entrega dos princípios ativos, como por exemplo, microemulsões, nanoemulsões, nanocápsulas, entre outros. Os gráficos contendo as curvas de CI_{50} encontram-se nos apêndices de **39** e **40**.

De acordo com Silva-Silva (2021), no gênero *Arrabidaea* destaca-se o extrato bruto de *Arrabidaea chica*, que é rico em flavonoides, incluindo antocianidinas, chalconas, flavonas e flavonóis, o que pode estar associado à sua atividade leishmanicida. Para a composição química das raízes de *A. brachypoda*, já foram testadas três flavonóides inéditos contra as formas promastigotas de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum*, sendo a brachydina-B a mais ativa dos três contra a espécie *L. amazonensis* (Rocha *et al.*, 2019). Sugere-se que a atividade leishmanicida das flores de *A. brachypoda* pode estar relacionada à presença destes compostos na sua composição química, compostos aqui isolados. Portanto, partiu-se em busca dos compostos ativos da fração DCM, tendo em vista que é a fração mais ativa, realizando então a caracterização química por técnicas cromatográficas, espectroscópicas e espectrométricas.

5.2 Mapeamento químico

5.2.1 Rendimento do extrato e frações das flores de *A. brachypoda*

A preparação do extrato das flores de *A. brachypoda* seguiu a metodologia de extração e fracionamento já utilizado para esta espécie por Rocha e colaboradores (2016) para extração de metabólitos de interesse e a pesagem dos extratos e frações foi realizada após a evaporação dos solventes de acordo com os itens 4.2 e 4.3. A partir de 260 g de flores secas foram obtidos 50 g de extrato bruto, um rendimento de aproximadamente 19,23 % em relação à massa seca de flores. Em relação ao fracionamento, para a fração DCM obteve-se 15,41 g de fração para 40 g de extrato utilizado, obtendo um rendimento de 38,53 %, para a fração AcOEt obteve-se 2,05 g (5,13%). A fração aquosa pesou 20,63 g, com um rendimento de 51,58 %.

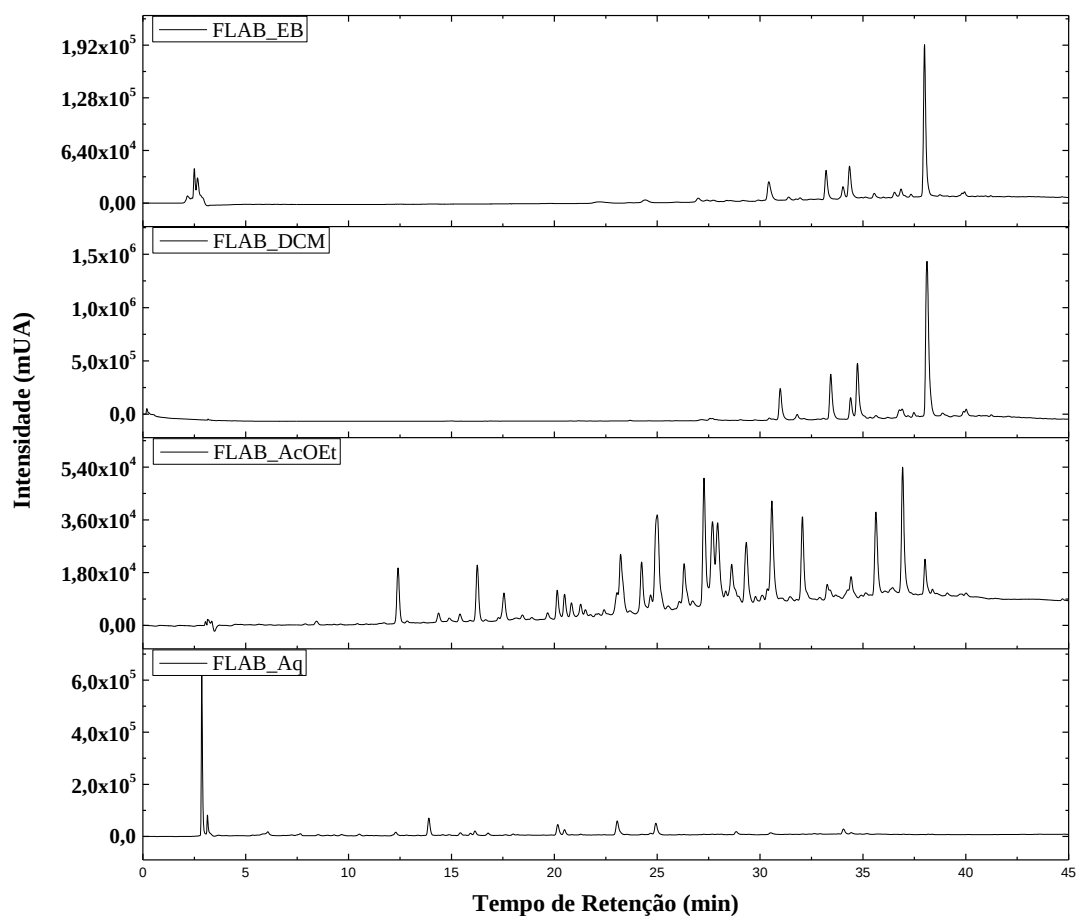
5.2.2 Perfil químico do extrato e frações

A partir do Extrato Bruto, realizou-se a partição líquido-líquido, a fim de facilitar o processo de isolamento e obter uma fração com menor quantidade de picos e com um intervalo maior no tempo de retenção, principalmente devido às diferenças

químicas em suas estruturas, o que altera suas polaridades. Podendo-se observar que os compostos presentes na FLAB_DCM apresentam média e baixa polaridade, e os compostos majoritários do EB foram extraídos nesta fração, portanto facilitando o isolamento. Já a FLAB_AcOEt, pode-se perceber que os picos minoritários presentes no extrato bruto estão presentes na fração acetato, tendo em vista que os majoritários do EB estão na fração DCM, portanto, a fração acetato possui uma grande quantidade de picos amplamente distribuídos no seu cromatograma. A FLAB_aquosa possui menor quantidade de picos, que estão localizados no início do cromatograma, sugerindo então que para essa fração os compostos de média e alta polaridade estivessem presentes.

Para análise do perfil cromatográfico da fração DCM e isolamento das substâncias majoritárias, realizou-se a obtenção do perfil químico por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC/UV-Vis), utilizando um método gradiente de 60-100% MeOH:H₂O em 40 minutos (**Figura 16**). Os espectros de absorção UV-Vis (254 nm) dos compostos mostram a presença de compostos fenólicos.

Figura 16 - Cromatogramas em gradiente exploratório 5-100 % de B em 40 min (254 nm) do extrato e das frações.



Fonte: Próprio autor.

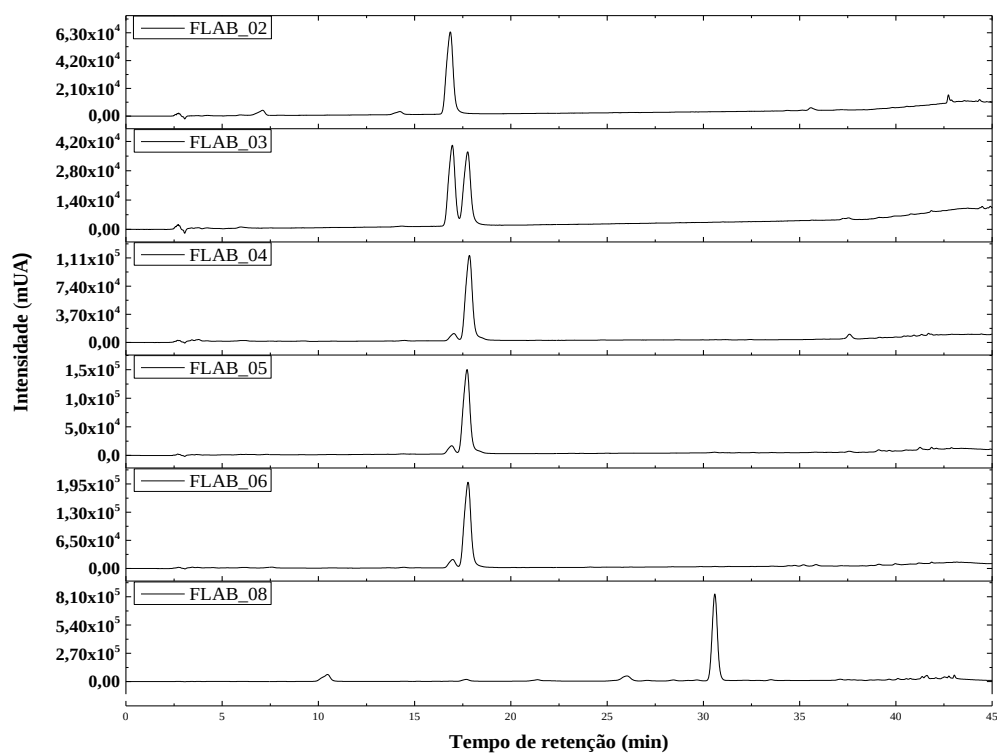
Os grupos de frações que foram coletados em coluna de fase normal empacotada com sílica (**Tabela 5**), foram então selecionadas para uma separação mais acurada no HPLC em escala semi-preparativa, utilizando um método de 60 a 100% de B em 40 minutos, como mostra a **Figura 17**. Sendo possível então obter 6 subfrações que foram então levadas para elucidação estrutural por técnicas espectroscópicas.

Tabela 5 - Fracionamento da fase diclorometânica por cromatografia em coluna de sílica.

Fração	Proporção de Hex:AcOEt	Massa (mg)
FLAB-01	8:2	7,6
FLAB-02	8:2	28,4
FLAB-03	8:2	316,8
FLAB-04	8:2	86,8
FLAB-05	7:3	28,1
FLAB-06	7:3	114,0
FLAB-07	6:4	65,6
FLAB-08	6:4	114,6
FLAB-09	5:5	155,8
FLAB-10	4:6	32,4
FLAB-11	3:7	85,9
FLAB-12	2:8	104,8
FLAB-13	2:8	93,0
FLAB-14	0:1	47,6

Fonte: Próprio autor.

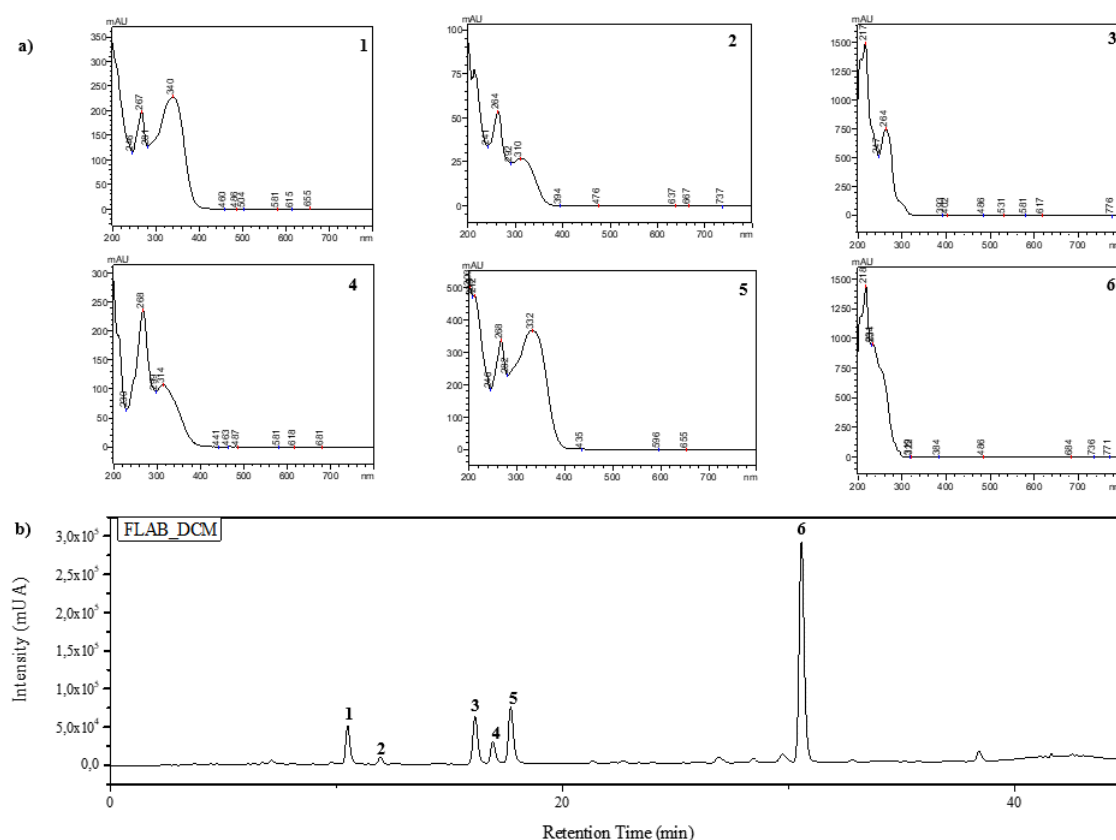
Figura 17 - Cromatogramas obtidos das frações advindas da FLAB_DCM (254nm).



Fonte: Próprio autor.

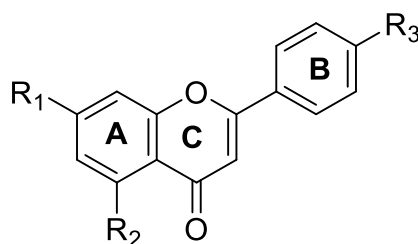
O cromatograma presente na **Figura 18b** mostrou presença de diferentes metabólitos secundários na fração DCM. Os espectros UVs presentes na **Figura 18a** mostram que a classe predominante nesta fração são os flavonóides, sendo quatro compostos pertencentes das subclasses das flavonas (**1**, **2**, **4** e **5**) e dois flavonóides diméricos inéditos (**3** e **6**) no gênero e que ainda não tinham sido reportados nas flores desta espécie. Torres *et al.* (2018) afirma que os flavonóides e seus derivados apresentam bandas de absorção entre 250-270 nm e 320-360 nm. Essas bandas são atribuídas ao anel A e o anel B, a estrutura básica de um flavonoide está presente na **Figura 19**.

Figura 18 – a) Espectros de absorção UV-Vis dos compostos majoritários isolados e b) cromatograma da fração diclorometânica das flores de *Arrabidaea brachypoda* por HPLC-DAD (254 nm).



Fonte: Próprio autor.

Figura 19 - Estrutura básica dos flavonoides.



Fonte: Próprio autor.

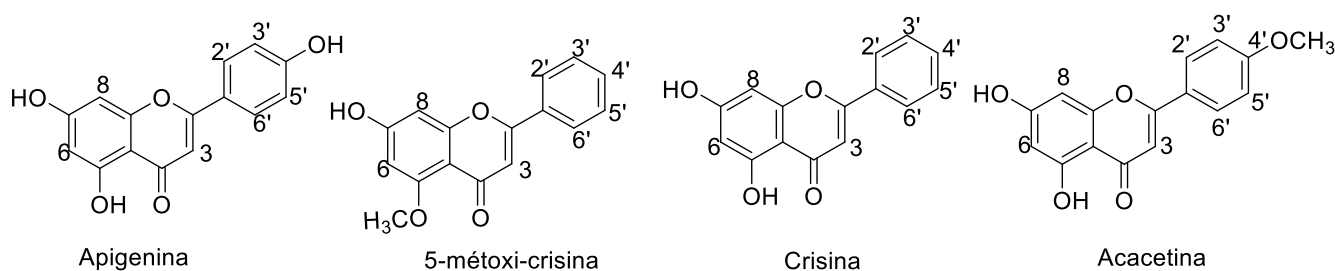
As flavonas apresentam máximos de absorção em 240-270 nm para o comprimento de onda com máximo de absorção (banda II) e entre 300-360 nm para a banda I (MARKHAN e ANDERSEN, 2005). Os máximos de absorção das bandas A e B podem apresentar diferenças dependendo de cada flavonoide, isso se deve ao fato da presença dos ligantes em cada anel, contribuindo para o deslocamento batocrômico (SILVA, 2016). Em caso da presença de oxigênio no anel A da flavona (R_1 ou R_2) e não no anel B (R_3), a banda II tende a ser mais acentuada e a banda I mais fraca (MABRY; MARKHAM; THOMAS, 1970), como observado nos compostos **2** e **4**, sugerindo então que estes compostos não possuem oxigênio no anel B. Mas em moléculas semelhantes que apresentam oxigenação no anel B, a banda I tende a ser mais visível, como observado nas moléculas **1** e **5**, logo, devem apresentar oxigênio no anel B. Os compostos **3** e **6**, apresentam espectros UVs semelhantes, sugerindo a presença de 2 compostos fenólicos análogos com grupos cromóforos semelhantes, percebendo-se que se trata de flavonóides que não apresentam as bandas comumente presentes nestas classes, provavelmente devido à sobreposição de sinais dos cromóforos em uma única banda, que pode estar relacionado à dimerização.

No entanto, somente os espectros UV-Vis não são suficientes para uma elucidação estrutural completa, portanto, deu-se a continuidade com os estudos de caracterização químicas das moléculas por espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear, cujo as informações estão dispostas a seguir.

5.2.3 Ressonância Magnética Nuclear 1D e 2D

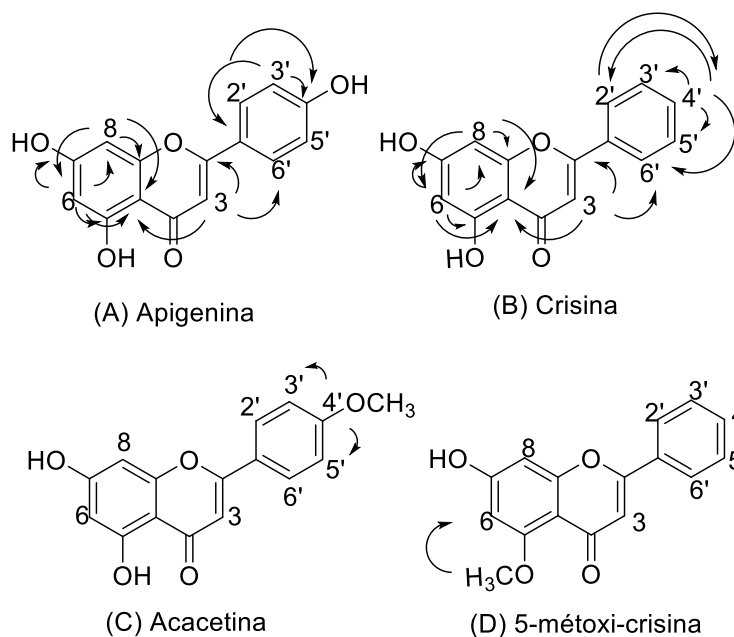
Em relação ao RMN, os espectros ^1H , DEPTQ, HMBC, HSQC, COSY e NOESY encontram-se nos **apêndices 2 ao 38** os dados de deslocamento químico nas **Tabelas 6 e 7**. As estruturas químicas das flavonas encontram-se na **Figura 20** e das brachydinas isoladas encontram-se na **Figura 22**.

Figura 20 - Estruturas químicas das flavonas isoladas das flores de *Arrabidaea brachypoda*.



Fonte: Próprio autor.

Figura 21 - Correlações HMBC (A e B) e NOESY 1D (C e D) das flavonas isoladas.



Fonte: Próprio autor.

Para a apigenina, um duplete para o par de prótons acoplado em meta foi observado para apigenina em δ_H 6.11 e 6.50, sendo atribuídos aos hidrogênios aromáticos do anel A. Um singlete em δ_H 6.60 foi atribuído ao H da posição 3 do anel C. Quatro prótons aromáticos (2', 3', 5' e 6') na posição orto foram observados em δ_H 6.93 e 7.86, como o anel B do composto apresenta simetria, há somente um sinal para os hidrogênios 2' e 6' e outro para os hidrogênios 3' e 5', devido a equivalência magnética. O espectro RMN- ^{13}C desse composto mostrou a presença de 15 carbonos, sendo 5 oxigenados (C-2, C-5, C-7, C-9 e C-4' em δ_C 164.66, 161.36, 164.93, 158.01 e 161.85, respectivamente), 2 quaternários sp^2 (δ_C em 121.87 e 103.91, respectivamente), 7 metínicos em δ_C 98.74, 93.64, 102.44, 128.07 (2C) e 115.62 (2C) e o sinal correspondente à carbonila (δ_C 182.55). As correlações HMBC (**Figura 21**) confirmaram as posições de H-6 e H-8 no anel A, também confirmou que o composto é uma flavona pelas correlações existentes no hidrogênio olefínico em H-3 com C-1', C-2 e C-10. Para o anel B observou-se as correlações entre δ_H 6.84 e δ_C 115.62, 121,87 e 161,85 e entre δ_H 7.76 e δ_C 128.07 e 161.85. O experimento COSY ainda evidenciou que o H-3 está relacionado ao H-2' e H-6' e confirmou a relação entre H-6 e H-8 e entre H-2'/H-6' e H-3'/H-5'.

Da mesma forma, para a Acacetina há o acoplamento em meta em δ_H 6.13 e 6.38 de hidrogênios na posição H-6 e H-8 no anel A. Em δ_H 6.55 é observado um singlete para o hidrogênio na posição 3 do anel C. Há também a presença de uma metoxila no anel

B em δ_H 3.79 (s, 3H) H-4'. Os prótons aromáticos do anel B foram observados em δ_H 6.99 e 7.86 para os hidrogênios em 2' e 6' e 3' e 5' em orto, respectivamente, devido à simetria presente no anel B. A acacetina apresenta correlações HMBC semelhantes à apigenina. A diferença entre a apigenina e a acacetina consiste em um grupo OCH_3 em δ_C 54.66, ligado com o C-4', como observado por HSQC. O espectro NOESY 1D (**Figura 21**), confirmou a posição desse grupo, mostrando a sua correlação com os prótons aromáticos em δ_H 6.99, tendo em vista que este experimento mostra quais átomos de hidrogênio estão próximos no espaço (abaixo de 4 ou 5 Å).

A crisina e a 5-metóxi-crisina são flavonas que não apresentam substituintes oxigenados no anel B, e isso é observado pelo multipletto característico de anel aromático monossustituído presente em δ_H 7.59 e 7.45 nas posições H-3', 4' e 5' do anel B, respectivamente. Esse multipletto deve-se ao fato do H-4' acoplar orto com os H-3' e H-5' e meta com os H-2' e H-3'. Portanto, para H-4' observou-se correlações HMBC com C-2'/C-6' e C-3'/C-5'. Os prótons nas posições 2' e 6' apresentam um único sinal em δ_H 7.86 para a metóxi-crisina e δ_H 7.99 para a crisina, também devido à equivalência magnética. Outros deslocamentos característicos de região aromática são em δ_H 6.25 e 6.51 para os prótons acoplados em meta no anel A para a crisina e δ_H 6.35 e 6.50 para a metóxi-crisina. O singleto em δ_H 6.76 é o próton na posição 3 do anel B da crisina e para a metóxi-crisina esse singleto é em δ_H 6.50. Esses compostos apresentam correlações HSQC, HMBC e COSY similares aos compostos anteriores. Para a metóxi-crisina, observou um NOESY (**Figura 21**) da metoxila (δ_H 3.81) relacionado ao próton aromático em δ_H 6.35, confirmando a posição deste grupo em C-5.

Para todas as flavonas isoladas, os experimentos COSY (**apêndice 6, 11, 17 e 23**) confirmaram o acoplamento meta dos prótons no anel A e os acoplamentos orto dos prótons do anel B através das suas correlações. Os valores de deslocamento químico estão de acordo com a **Tabela 6**.

Tabela 6 – Valores de deslocamento químico, multiplicidade e constante de acoplamento de RMN de ^1H e ^{13}C (600 MHz, CD_3OD em ppm) para as flavonas isoladas.

Apigenina			Acacetina			5-metóxi-crisina			Crisina		
Posição	δ_{H} (mult., J=Hz)	δ_{C}	Posição	δ_{H} (mult., J=Hz)	δ_{C}	Posição	δ_{H} (mult., J=Hz)	δ_{C}	Posição	δ_{H} (mult., J=Hz)	δ_{C}
2		164.66			164.53	2		163.80			164.29
3	6.50 (s, 1H)	102.44	3	6.55 (s, 1H)	102.94	3	6.50 (s, 1H)	105.02	3	6.76 (s, 1H)	104.23
4		182.55			182.56	4		182.73			182.54
5		161.36			161.90	5		161.19			161.93
6	6.11 (d, 1H, J=1.7)	98.74	6	6.13 (d, 1H, J= 2.1 Hz)	98.75	6	6.11 (d, 1H, J= 1.7)	96.91	6	6.25 (d, 1H, J=2.0)	99.00
7		164.93			164.76	7		165.80			165.05
8	6.36 (d, 1H, J=1.7)	93.64	8	6.38 (d, 1H, J = 2.0 Hz)	93.71	8	6.36 (d, 1H, J= 1.7)	95.08	8	6.51 (d, 1H, J=1.6)	93.84
9		158.01			158.07	9		160.19			158.21
10		103.91			104.00	10		106.27			104.71
1'		121.87			123.20	1'		131.16			131.15
2' e 6'	7.76 (d, 2H, J=8.7)	128.07	2' e 6'	7.86 (d, 2H, J=9.0)	128.00	2' e 6'	7.76 (d, 2H, J= 8.7)	125.80	2' e 6'	7.99 (dd, J=2.40; 2H, J=7.2)	126.06
3' e 5'	6.84 (d, 2H, J=8.2)	115.62	3' e 5'	6.99 (d, 2H, J=9.0)	114.25	3' e 5'	6.84 (d, 2H, J= 8.2)	128.81	3' e 5'	7.59 (m, 2H)	129.02
4'	-	161.85	4'	-	163.04	4'	-	131.62	4'	7. 59 (m, 1H)	131.77
-	-	-	OCH ₃	3.79 (s, 3H)	54.66	OCH ₃	3.81 (s, 3H)	55.05	-	-	-

Fonte: Próprio autor.

Para as brachydinas, observa-se a presença de maior número de sinais na região aromática devido aos seus quatro anéis e alguns sinais na região dos alifáticos no experimento de hidrogênio. Percebendo também a presença de similaridades nas suas estruturas (**Figura 22**) e com poucas diferenças nos seus espectros.

Figura 22 – Estrutura química das brachydinas A e C isoladas das flores de *Arrabidaea brachypoda*.

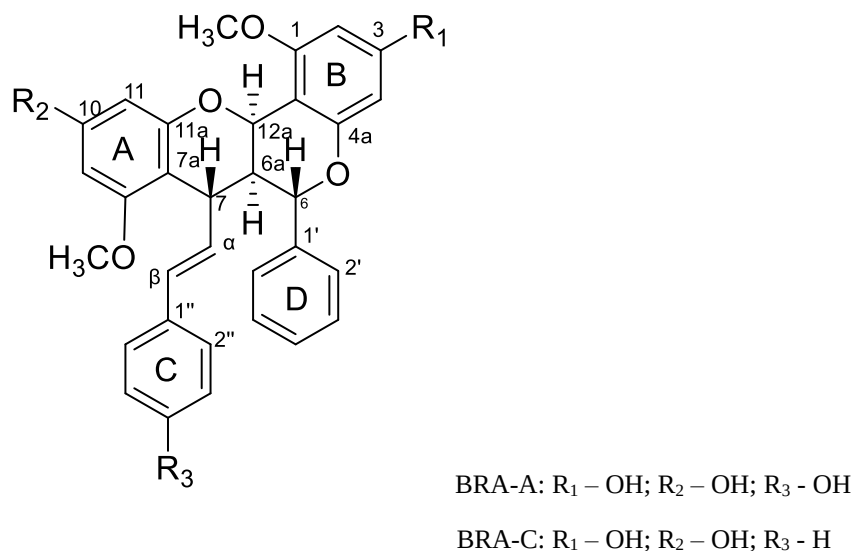
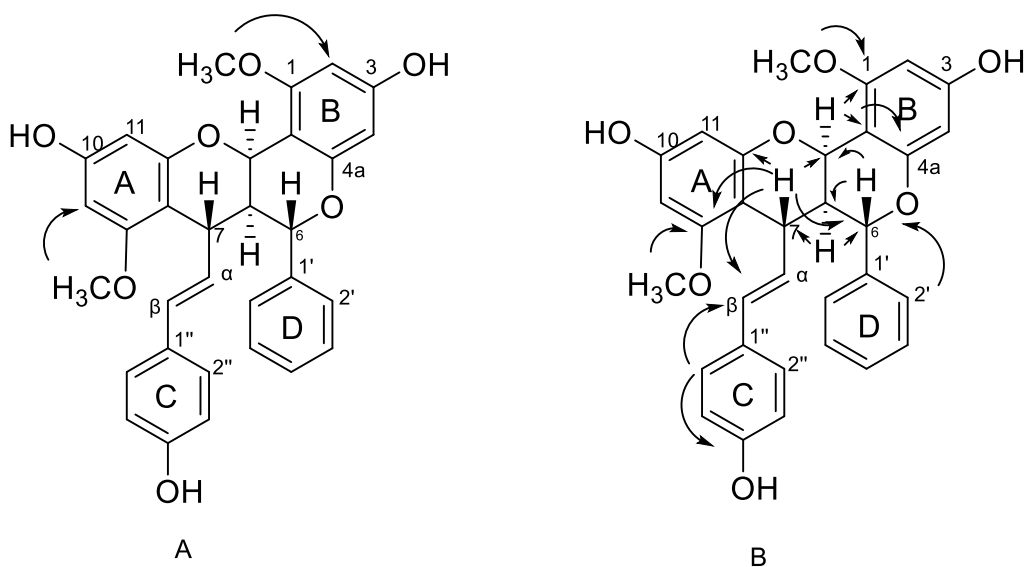


Figura 23 - Correlações NOESY 1D (A) e HMBC (B) para a brachydina-A.



Fonte: Próprio autor.

Para a brachydina-A, observou-se deslocamentos característicos para prótons aromáticos acoplados em meta, sendo eles H-2 e H-4 no anel A. As correlações HMBC mostraram que esse anel é constituído por três carbonos quaternários oxigenados (C-1,

C-3 e C-4a, δ_C 159.67, 159.69 e 156.41, respectivamente) e outro átomo com hibridação sp^2 em C-12b a δ_C 102.40.

Da mesma forma que o anel A, o anel B apresenta um par de prótons acoplados em meta, H-9 e H-11. Também apresenta em sua estrutura três resíduos oxigenados e outro átomo de carbono quaternário (C-8, C-10, C-11a e C-7a em δ_C 158.82, 157.52 e 100.33). As correlações HMBC entre H-7 e C-8, C-11a e C-7a indicaram que este último carbono foi ligado ao H-7 (δ_H 3.07). O experimento COSY indicou ainda que o H-7 está relacionado com um grupo metínico H-6a (δ_H 2.13) e H-12a (δ_H 5.18), ligado ao anel A. Sendo assim, percebeu-se a presença de dois anéis fundidos de benzopirano, que também foi confirmado pelas várias correlações HMBC (**Figura 23**) observadas (ROCHA *et al.*, 2014).

Dois pares de prótons acoplados em orto em δ_H 6.96 (H-2" e H-6") e 6.55 (H-3" e H-5") foram designados para o anel C e os outros cinco prótons aromáticos restantes correspondem ao anel aromático D não substituído em δ_H 7.29 (H-3', 4' e H-5'), 7.13 (H-2' e H-6'). Anel C foi substituído em C-4" por um grupo hidroxila (δ_C 156.38) e em C-1" por uma ligação dupla trans relacionada aos prótons α e β ($J=15.8$ Hz), que está diretamente próximo ao hidrogênio metínico H-7 (δ_H 3.07). Há também a presença de duas metoxilas em δ_H 3.72 (OMe-1) e 3.52 (OMe-8). Por outro lado, o anel D está diretamente ligado ao carbono C-6 (HMBC entre H-2'/H'-6 e C6). As posições dos dois grupos metoxilas foram designados por HMBC e NOESY (**Figura 23**), na qual observou correlações entre OMe-8 e H-9 e OMe-1 e H-2. Os dados de RMN- ^1H estão conforme descritos por ROCHA *et al.* (2014). Os dados de RMN da brachydina C são semelhantes aos da brachydina A, mostrando um padrão de sinais análogos, como observado na **Tabela 7**, a diferença é a presença de um próton aromático na posição C-4" ao invés de um OH, que no espectro de hidrogênio apresentou um sinal em δ_H 7.00, correlacionando com um carbono δ_C 157.82 no experimento HSQC.

Tabela 7 - Dados de RMN ^1H (600 Hz, CD_3OD em ppm) das brachydinas.

Brachydina-A			Brachydina-C		
Posição	δ_{H} (mult., J=Hz)	δ_{C}	Posição	δ_{H} (mult., J=Hz)	δ_{C}
1		159.67			159.69
2	5.98 (d, 1H, J= 2.10)	91.37	2	5.98 (d, 1H, J= 2.3)	91.42
3		159.69			159.73
4	5.84 (d, 1H, J= 2.10)	94.96	4	5.84 (d, 1H, J= 2.3)	95.00
4a		156.41			157.82
6	4.67 (d, 1H, J= 10.8)	76.85	6	4.68 (d, 1H, J= 11.3)	76.76
6a	2.13 (dt, 1H, J=11.2)	41.06	6a	2.13 (d, 1H, J=11.2)	40.80
7	3.07 (ddd, 1H, J= 5.40)	32.73	7	3.10 (ddd, 1H, J=5.20)	32.83
7a		100.33			100.08
8		158.82			157.82
9	5.95 (d, 1H, J= 2.10)	91.61	9	5.95 (d, 1H, J=2.30)	91.65
10		157.72			158.86
11	5.87 (d, 1H, J= 2.10)	95.12	11	5.89 (d, 1H, J=2.40)	95.18
11a		153.97			154.02
12a	5.18 (d, 1H, J= 2.40)	62.06	12a	5.18 (d, 1H, J= 2.40)	62.09
12b		102.40			102.36
1'		139.06			137.26
2', 6'	7.13 (d, 2H, J= 7.96)	127.33	2', 6'	7.13 (d, 2H, J= 7.70)	127.17
3', 5'	7.29 (m, 3H)	128.11	3', 5'	7.27 (m, 2H)	128.05
4'	-	128.98	4'	7.27 (m, 1 H)	128.28
A	5.86 (dd, 1H, J= 15.8)	129.30	A	6.05 (dd, 1H, J= 15.7)	130.64
B	5.71 (dd, 1H, J= 15.8)	130.31	B	5.80 (dd, 1H, J= 15.7)	132.38
1''		128.22			128.14
2'', 6''	6.96 (d, 2H, J= 8.40)	126.98	2'', 6''	7.08 (m, 2H)	126.66
3'', 5''	6.55 (d, 2H, J= 8.40)	114.86	3'', 5''	7.08 (m, 2H)	125.81
4''	6.55 (d, 2H, J= 8.40)	156.38	4''	7.00 (m, 1H)	157.82
OMe-1	3.72 (s, 3 H)	54.70	OMe-1	3.69 (s, 3H)	54.69
OMe-8	3.52 (s, 3H)	54.54	OMe-8	3.51 (s, 3H)	54.56

Fonte: Próprio autor.

5.2.3 UPLC-QTOF-HRMS

Os espectros de massas para os compostos isolados foram obtidos por um espectrômetro de massas de alta resolução. Os dados obtidos estão dispostos na **Tabela 8**.

Tabela 8 - Propostas de identificação dos compostos isolados por UPLC-QTOF-HRMS.

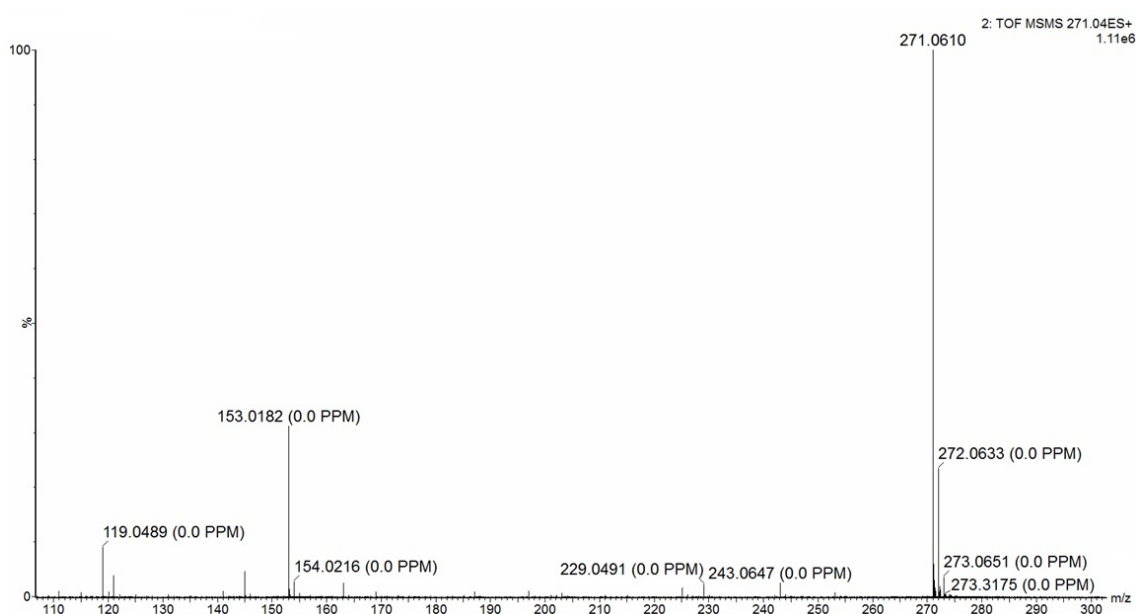
Nº	Composto	Fórmula molecular	Tr (min)	[M+H] ⁺ calculado	[M+H] ⁺ observado	Erro (ppm)
1	Apigenina	C ₁₅ H ₁₁ O ₅	9.9	271.0611	271.0610	-0.37
2	5-metóxi-crisina	C ₁₅ H ₁₃ O ₄	11.8	269.0819	269.0815	-1.49
3	Brachydina-A	C ₃₂ H ₂₉ O ₇	13.6	525.1919	525.1910	-1.71
4	Crisina	C ₁₅ H ₁₁ O ₄	14.4	255.0662	255.0659	-1.96
5	Acacetina	C ₁₆ H ₁₃ O ₅	14.9	285.0768	285.0765	-1.05
6	Brachydina-C	C ₃₂ H ₂₉ O ₆	25.9	509.1969	509.1898	-9.91

Tr: Tempo de retenção

Fonte: Próprio autor.

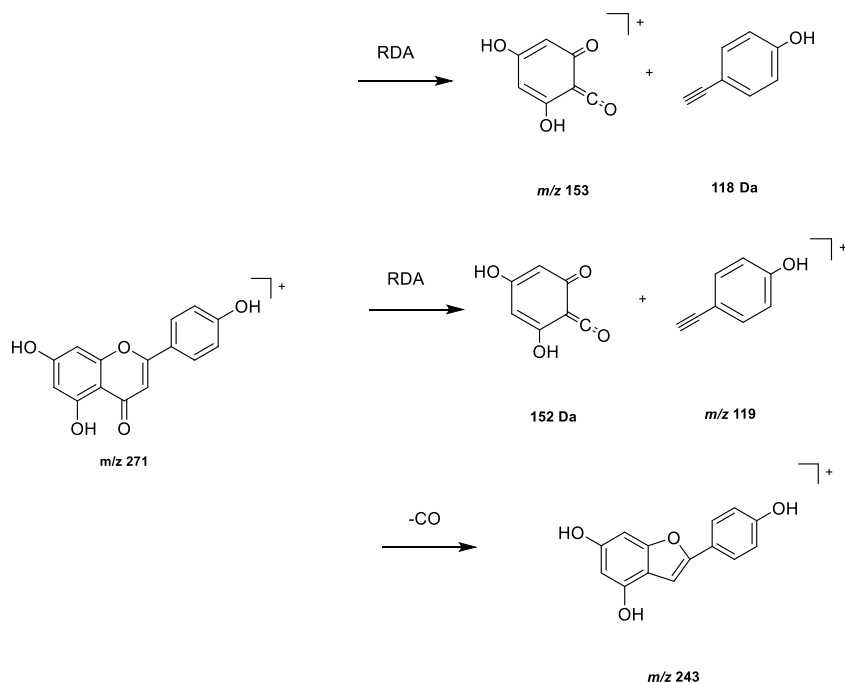
Para os dados de espectrometria de massas de alta resolução, o composto **1** apresentou um íon molecular protonado [M+H]⁺ *m/z* 271.0610, correspondendo à apigenina (C₁₅H₁₃O₄) (**Figura 24**). Como pode-se observar na **Figura 25**, o composto seguiu o padrão de fragmentação por Retro-Diels Alder (RDA) nos carbonos 2 e 3 do anel C, comumente reportado pela literatura para os flavonóides, caracterizado pela formação do íon fragmento *m/z* 153. Verificou-se uma segunda possibilidade de RDA, registrando o íon fragmento *m/z* 119. Há também a perda de CO (28 Da), através da formação do íon *m/z* 243.

Figura 24 - Espectro MS/MS obtido para o composto 01 (m/z 271.0610).



Fonte: Próprio autor.

Figura 25- Proposta de fragmentação para a apigenina (m/z 271).

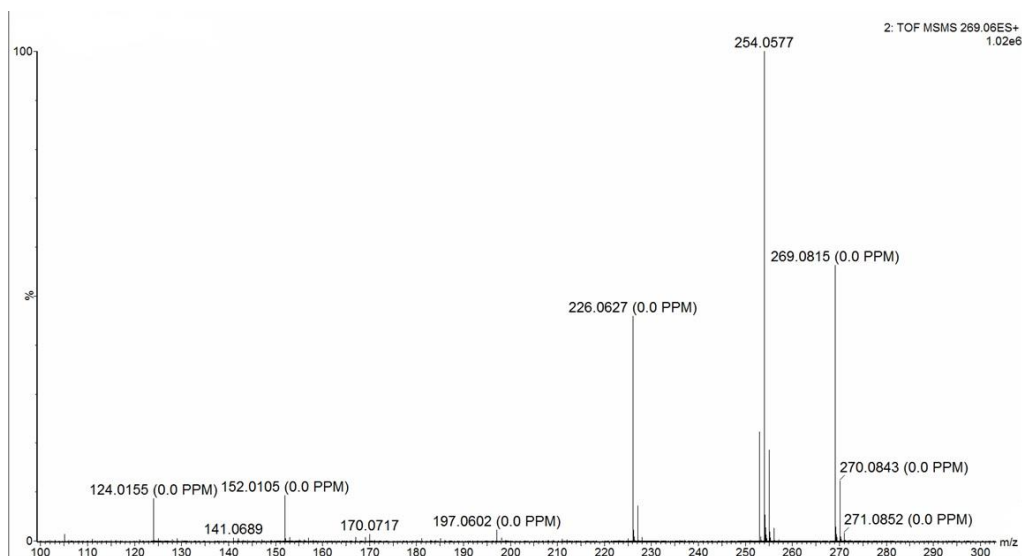


Fonte: Próprio autor.

A 5-metóxi-crisina (**2**), apresentou um valor de m/z de 269.0815 (**Figura 26**), correspondendo à fórmula molecular $C_{15}H_{13}O_4$. Como proposta de fragmentação deste composto (**Figura 27**), tem-se a perda de 15 Da, correspondente a uma metila, obtendo então o registro do íon m/z 254. Em seguida, há a perda de 28 Da, perda característica de

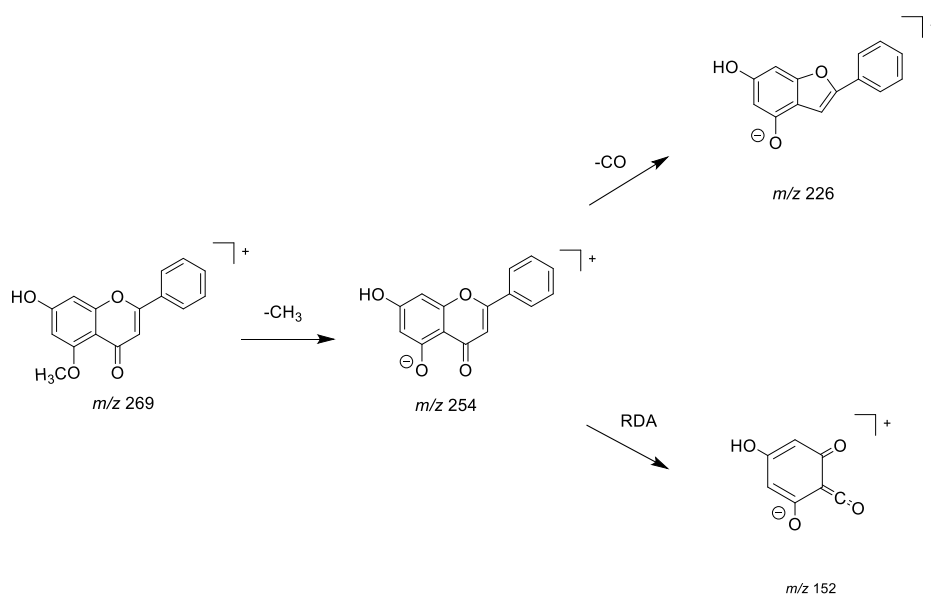
carbonila e/ou a ocorrência da RDA no anel C da flavona, adquirindo o fragmento registrado com o m/z 152.

Figura 26 - Espectro MS/MS para o composto 2 (m/z 269).



Fonte: Próprio autor.

Figura 27 - Proposta de fragmentação do íon m/z 269.

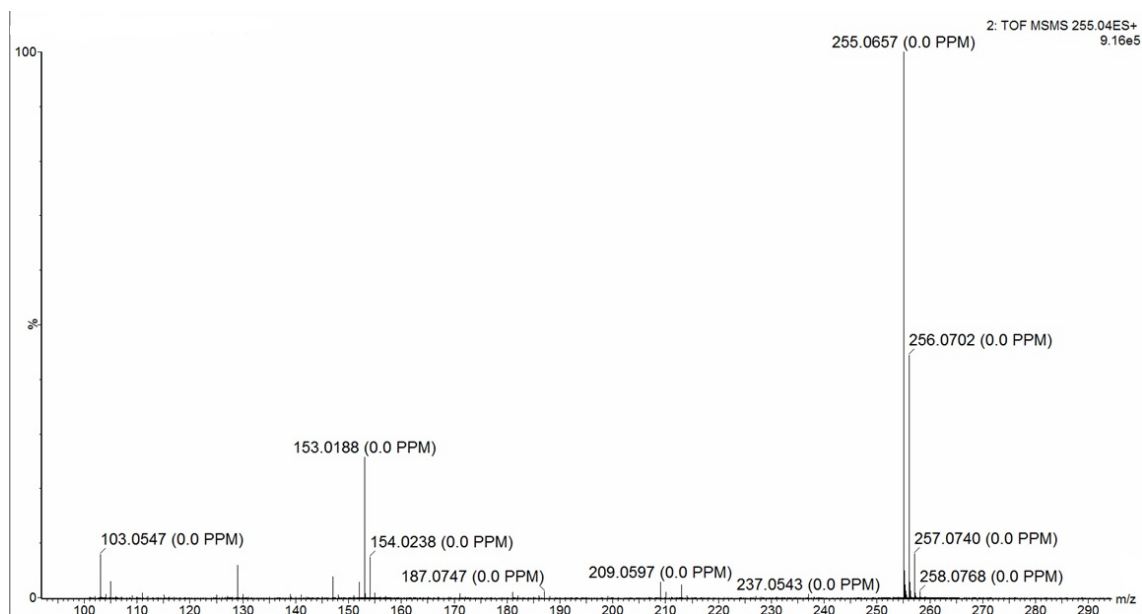


Fonte: Próprio autor.

Para a crisina foi registrado um valor de m/z de 255.0659 (**Figura 28**), correspondente à fórmula molecular $C_{15}H_{11}O_4$. Em relação ao mecanismo de fragmentação desse composto (**Figura 29**), observa-se perdas neutras de 18 Da, relacionada a H_2O após a protonação do composto e perda de 28 Da referente ao CO. Há

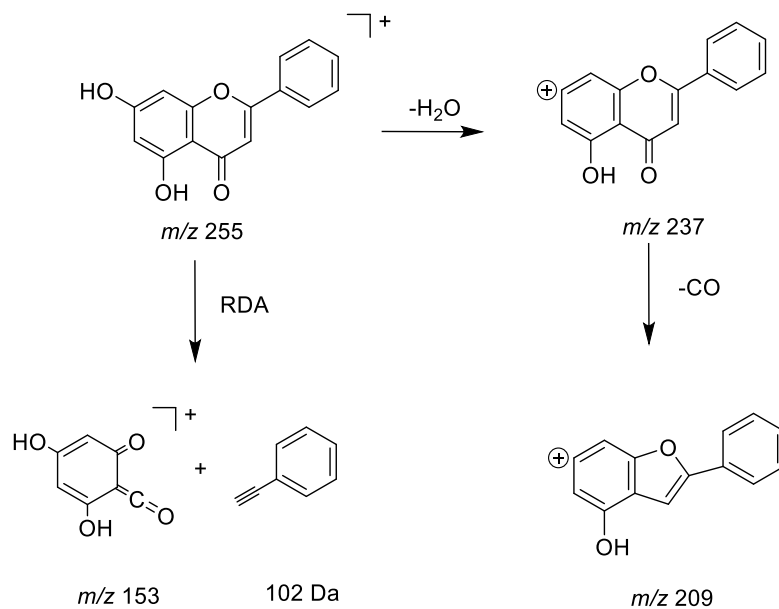
também a fragmentação por Retro Diels-Alder no anel C, registrando o íon fragmento m/z 153.

Figura 28 - Espectro M/S para a crisina (m/z 255.0659).



Fonte: Próprio autor.

Figura 29 - Proposta de fragmentação para a crisina.

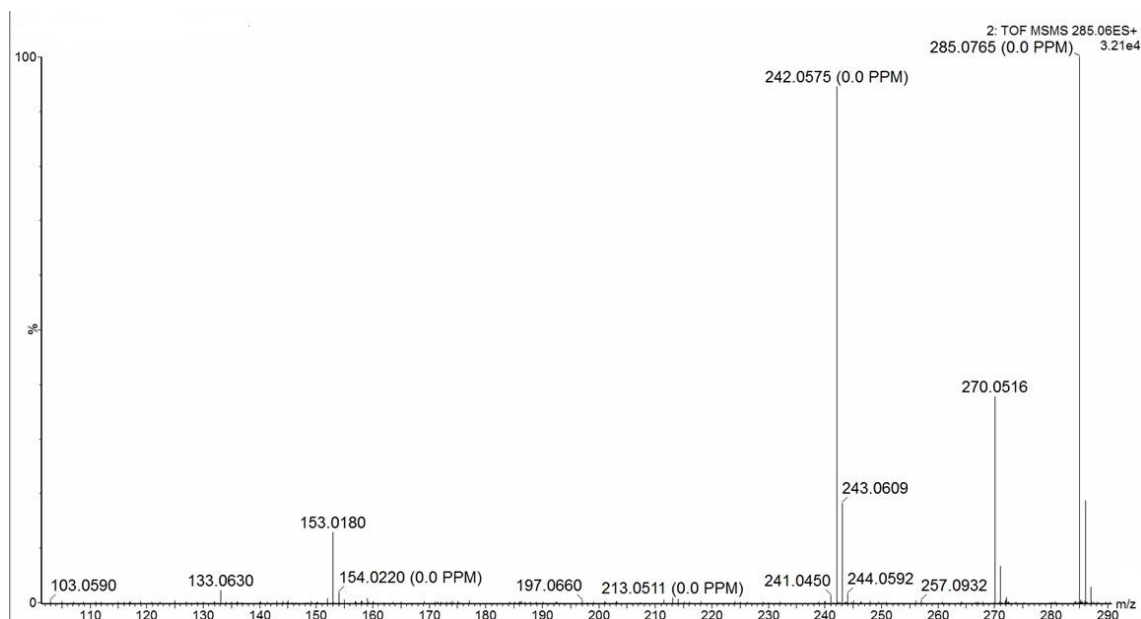


Fonte: Próprio autor.

Para a acacetina ($C_{16}H_{13}O_5$), o íon molecular registrado possui valor m/z 285.0765 (**Figura 30**). Como observado na **Figura 31**, esse composto fragmenta por

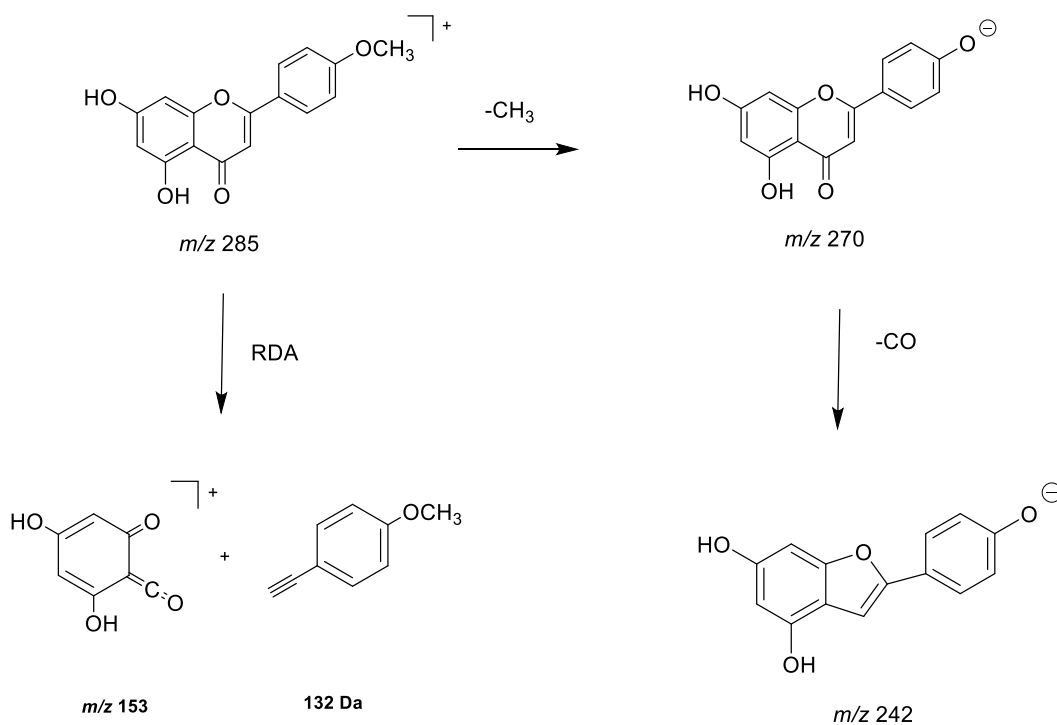
Retro Diels-Alder no anel C, pela presença do fragmento registrado m/z 153. Observou-se também perdas neutras de CH_3 (15 Da) e CO (28 Da).

Figura 30 - Espectro MS/MS para a acacetina (m/z 285.0765).



Fonte: Próprio autor.

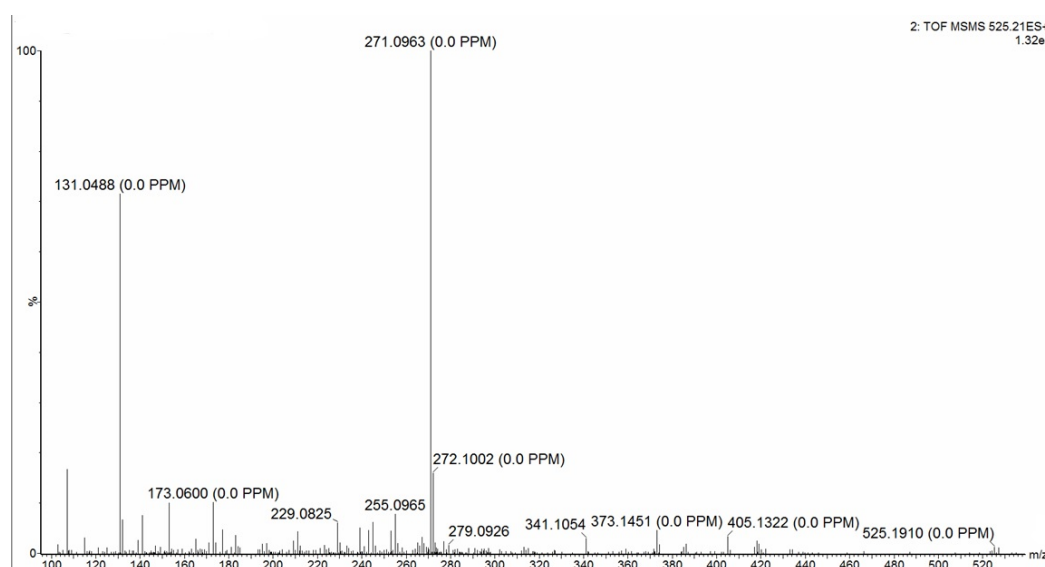
Figura 31 - Proposta de fragmentação para a acacetina



Fonte: Próprio autor.

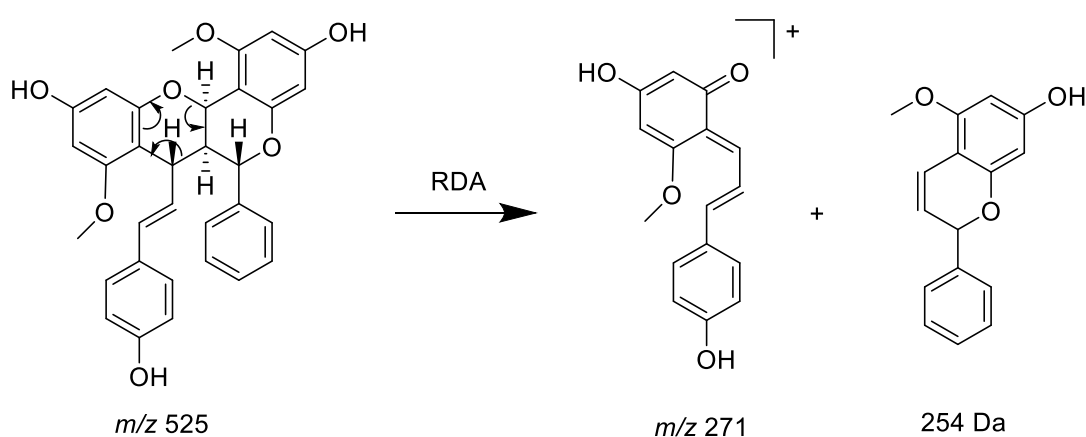
Para as brachydinas A e C os valores de m/z encontrados foram 525.1910 e 509.1918 (**Figura 32 e 34**) corresponde às fórmulas moleculares $C_{32}H_{29}O_7$ e $C_{32}H_{29}O_6$, respectivamente. Esses compostos seguem o padrão de fragmentação Retro Diels-Alder conforme descrito por Rocha *et al.* (2014), na qual ocorre a clivagem da ligação entre as posições C-6a e C-12a no pirano acoplado ao anel B, resultando na perda de 254 Da e registrando os íons fragmentos m/z 271 e 255, respectivamente, conforme **Figuras 33 e 35**.

Figura 32 - Espectro MS/MS para a brachydina-A (m/z 525.1910).



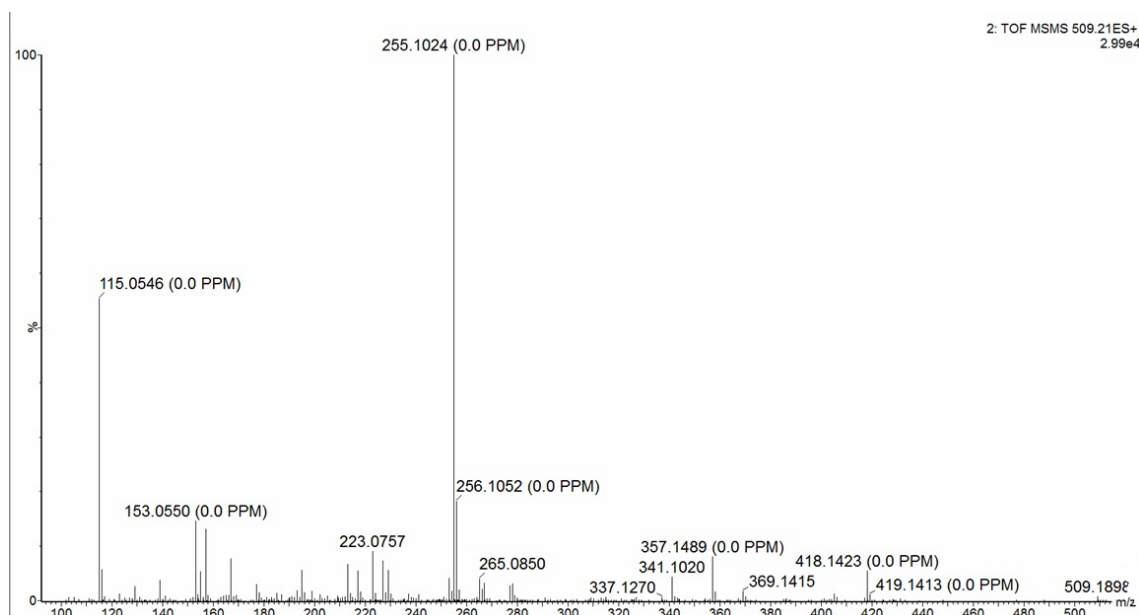
Fonte: Próprio autor.

Figura 33 - Proposta de fragmentação para a brachydina-A.



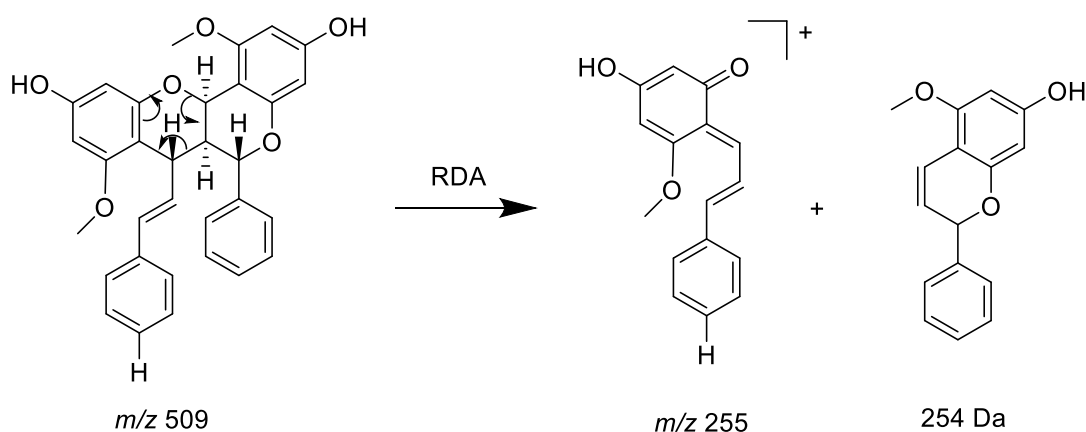
Fonte: Próprio autor.

Figura 34 - Espectro MS/MS para a brachydina-C (m/z 509.1918).



Fonte: Próprio autor.

Figura 35 - Proposta de fragmentação para a brachydina-C.



Fonte: Próprio autor.

Sendo assim, foi possível comprovar a presença de duas brachydinas nas flores de *A. brachypoda*, compostos até então relatados somente nas raízes desta planta por Rocha e colaboradores (2014). A Apigenina é um composto que já foi relatado nos extratos etanólicos das folhas de *A. brachypoda* e *A. chica* (MONTEIRO *et al.*, 2020; do AMARAL *et al.*, 2012). A crisina já foi reportada em *A. samydoides* (PAULETTI; SILVA, YOUNG; 2003), porém é a primeira vez que é relatada na espécie aqui estudada

e não há relatos da crisina metoxilada no gênero. Zorn *et al.* (2001) em seu estudo isolou e identificou a acacetina nas folhas de *A. chica*, porém a substância ainda não tinha sido relatada em *A. brachypoda*.

5.3 Atividade antipromastigotas dos compostos isolados da fração diclorometânica

Após o isolamento e caracterização química dos compostos, foram realizados ensaios frente às formas promastigotas de *L. amazonensis*.

Tabela 9 - Determinação da CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) dos isolados obtidos da fração DCM do extrato das flores de *Arrabidaea brachypoda*, frente às formas promastigotas de *L. amazonensis*.

Compostos	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	R^2
01	50,20	0,94
02	18,09	0,98
03	25,10	0,97
04	>100	ND
05	>100	ND
06	14,17	0,98
Anfotericina B*	0,68	0,97

R^2 , coeficiente de regressão. O valor R^2 quantifica a qualidade do ajuste na curva de regressão não linear realizada para estimar o CI_{50} .

01: Apigenina; 02: 5-metóxi-crisina; 03: Brachydina-A; 04: Crisina; 05: Acacetina; 06: Brachydina-C.

*Fármaco de referência para tratamento da leishmaniose.

Fonte: próprio autor.

A atividade leishmanicida foi avaliada através da medida da viabilidade celular após o período de tratamento com os compostos em concentrações 100 a 0,7 $\mu\text{g/mL}$ contra a proliferação de promastigotas de *Leishmania amazonensis*. A literatura afirma que compostos isolados para serem considerados ativos devem apresentar um valor de $CI_{50} < 20 \mu\text{M}$ (BUTTERWECK; NAHRSTEDT, 2012). De acordo com os dados obtidos (**Tabela 9**) no teste *in vitro* os resultados indicaram que os compostos mais ativos foram a 5-metóxi-crisina (02) e a brachydina-C (06), com valores de CI_{50} de 18,09 (70,04 μM) e 14,17 (27,89 μM) $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. A presença de grupos metóxi nas flavonas potencializam o seu efeito leishmanicida, o que se observa quando se compara com a flavona 01 (apigenina) que possui somente hidroxilas na sua estrutura e apresentou um CI_{50} de 50,20 $\mu\text{g/mL}$ (185,92 μM). A brachydina-A exibiu CI_{50} de 25,10 (47,90 μM) $\mu\text{g/mL}$, valor esse que já era esperado, pois estudos anteriores mostram que é a brachydina que apresenta os maiores valores de citotoxicidade frente aos parasitas (Rocha *et al.*, 2019). Quanto a anfotericina B apresentou um valor de CI_{50} de 0,68 $\mu\text{g/mL}$ (0,74 μM), que já era esperado para o fármaco padrão.

Não foi possível determinar o valor de CI_{50} dos compostos 05 e 06, tendo em vista que não apresentaram citotoxicidade significativa frente aos parasitas.

Diversos compostos fenólicos dentre eles, as flavonas, demonstram potencial efeito anti-parasitário para as formas promastigotas de *L. amazonensis*, com valores de CI_{50} similares ao da anfotericina B (controle positivo). Esses compostos também apresentam citotoxicidade inferior ao relatado no tratamento com o fármaco, apresentando então resultados promissores (FLORENTINO; 2018). Um estudo realizado por Fonseca-Silva (2015) verificou que em *L. amazonensis* a apigenina apresenta um CI_{50} de 23,7 μ M, inibindo a proliferação dos parasitas por concentração-dependência. Estudos em *L. Donovanii* mostraram que a acacetina apresenta um CI_{50} de 18 μ m e a crisina um CI_{50} de 13,0 μ m (SILVA FILHO *et al.* 2009; RAJ *et al.*, 2019). Três flavonóides diméricos isolados do extrato hidroetanólico das raízes de *A. brachypoda* já foram testados em *Leishmania sp.*, na qual a brachydina-B foi o composto que apresentou maior atividade, com um CI_{50} de 9.16 μ M para a forma promastigota e 2.20 μ M para a forma amastigota. Em seguida, a brachydina-C apresentou CI_{50} de 10 μ M para a forma promastigota e 6.25 μ M para a forma amastigota. Já a brachydina-A não apresenta um valor de CI_{50} favorável, sendo um valor >20 μ M (Rocha *et al.*, 2019). Não foram encontrados estudos relacionados ao potencial leishmanicida da crisina metoxilada. Os gráficos contendo as curvas de CI_{50} encontram-se nos apêndices de **41** a **43**.

No que se refere à relação estrutura – atividade antiparasitária, de acordo com os estudos realizados por Tasdemir *et al.*, (2006), foi possível concluir que a quercetina e derivados (7,8 – dihidroxiflavona) são anti-protozoários potentes e eficazes. Foi verificado que a maioria dos compostos mais ativos que apresentam atividade leishmanicida têm uma estrutura típica de flavona (2,3 e C - 4 da função ceto) e/ou uma subestrutura de catecol sem obstáculos no anel B, no esqueleto benzocromona e em 7,8 – dihidroxiflavona. De acordo com Moraes *et al.* (2020) a presença de ligações duplas, grupos hidroxila e metoxila são importantes para a atividade antileishmania de flavonoides.

Para a relação estrutura-atividade das brachydinas, percebe-se que a presença de um grupo cromo em suas estruturas confere maior lipofilicidade às moléculas, e o caráter apolar das moléculas confere maior atividade, uma vez que penetram com mais facilidade a membrana dos parasitas (Nicolau *et al.*, 2000).

Observa-se que nenhum dos compostos isolados apresentou valor de CI_{50} para o valor limite (<20 μ M) recomendado pela literatura para compostos isolados. Contudo,

descarta-se a possibilidade de sinergismo, pois os flavonoides isolados neste trabalho apresentam ligação dupla entre C-2 e C-3 no anel C, e grupos hidroxila e metoxila, portanto esperava-se maior citotoxicidade para as células dos parasitas, e também pelo que se é observado na literatura em relação a atividade antiparasitária dos flavonoides. Considerando ainda a relação estrutura-atividade e o que já é relatado das brachydinas na literatura, esperava-se melhores resultados de atividade para esses isolados.

CONCLUSÃO

Por meio de técnicas cromatográficas e espectroscópicas, foi possível isolar e caracterizar 4 compostos das classes das flavonas (apigenina, metóxi-crisina, crisina e acacetina) e 2 flavonóides diméricos inéditos no gênero, denominados Brachydinas A e C. Por meio dos espectros das análises por RMN e espectrometria de massas, foi possível evidenciar diferenças estruturais nesses compostos. A análises dos espectros de massas permitiu a identificação das substâncias por comparação dos padrões de fragmentação conhecidos na literatura.

Com o auxílio da plataforma GNPS, foi possível investigar a diversidade química do extrato e frações desta espécie, sendo capaz de anotar compostos das classes de flavonas, flavonois, flavanonas, isoflavonas, cumarina simples e ácido cinâmico e derivados e que estão de acordo com estudos anteriores relacionados à composição química das flores de *A. brachypoda*.

Os resultados da atividade leishmanicida foram promissores, tendo a fração diclorometânica como destaque, apresentando uma atividade inibitória contra promastigotas de *L. amazonensis* de 21,57 µg/mL. Os compostos isolados não apresentaram CI₅₀ significativos, mas sabe-se que flavonas apresentam atividade antiparasitária, portanto o resultado não poderia estar associado ao sinergismo dos compostos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, L. S. **Investigação fitoquímica e bioatividade de espécies de Euphorbiaceae da Caatinga**. Tese doutorado. Programa de pós-graduação em Produtos Naturais e ativos biosintéticos. Universidade Federal da Paraíba. Paraíba. 2020.
- ALVARENGA, T. A.; ALVES, O. J. A.; PAGOTTI, M. C.; CUNHA, W. R.; ANDRADE, M. L.; DE FÁTIMA SALES, J.; PAULETTI, P. M. *In vitro* antileishmanial activity of *Anacardium othonianum* and isolated compounds against *Leishmania amazonenses*. **Acta brasiliensis**, vol. 5, n. 01, p. 44-47, 2021.
- AMARAL, J. G. ***Passiflora L. (Passifloraceae): estudos fitoquímicos suportados no desenvolvimento de estratégias de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas***. Tese de doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP. São Paulo. 2018.
- ANDRADE, M. A.; AZEVEDO, C. D. S.; MOTTA, F. N.; SANTOS, M. L. D.; SILVA, C. L.; SANTANA, J. M. D.; BASTOS, I. Essential oils: *in vitro* activity against *Leishmania amazonensis*, cytotoxicity and chemical composition. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 8, n. 444, p. 1-8, 2016.
- ANDRADE, L. M.; DE OLIVEIRA, A. B. M.; LEAL, A. L. A. B.; DE ALCÂNTARA OLIVEIRA, F. A.; PORTELA, A. L.; NETO, J. D. S. L.; BARRETO, H. M. Antimicrobial activity and inhibition of the NorA efflux pump of *Staphylococcus aureus* by extract and isolated compounds from *Arrabidaea brachypoda*. **Microbial pathogenesis**, v. 140, p. 103935. 2020.
- BARBOSA, W. L. R.; PINTO, L. D. N.; QUIGNARD, E.; VIEIRA, J. M. D. S.; SILVA JR, J. O. C.; ALBUQUERQUE, S. *Arrabidaea chica* (HBK) Verlot: phytochemical approach, antifungal and trypanocidal activities. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 544-548, 2008.
- BERTANHA, C. S.; GIMENEZ, V. M.; FURTADO, R. A.; TAVARES, D. C.; CUNHA, W. R.; SILVA, M. L.; PAULETTI, P. M. Isolation, *in vitro* and *in silico* Evaluation of Phenylethanoid Glycoside from *Arrabidaea brachypoda* as Lipxygenase Inhibitor. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 31, n. 4, p. 849-855. 2020.
- BORGES, J. C.; RAMOS, A. S.; SANTANA, L. M. B. **Potencial leishmanicida de produtos naturais contra *Leishmania amazonensis***. II CONBRACIS. Campina Grande. Paraíba. 2016.
- BORGES-ARGAEZ, R.; BALNBURY, L.; FLOWERS, A.; GIMÉNEZ-TURBA, A.; RUIZ, G.; WATERMAN, P. G.; PENA-RODRIGUEZ, L. M. Cytotoxic and antiprotozoal activity of flavonoids from *Lonchocarpus* spp. **Phytomedicine**, v. 14, n. 8, p. 530-533, 2007.

BOTELHO, B. O.; GAZOLLA, P. A. R.; PINTO, R. T.; TEIXEIRA, R. R.; COSTA, A. V.; DE QUEIROZ, V. T. **Atividade leishmanicida de 1,2,3-triazóis via “click chemistry”**. Tópicos Especiais em Ciência Animal. Editor: CAUFES. 2018.

BUTTERWECK, Veronika; NAHRSTEDT, Adolf. What is the best strategy for preclinical testing of botanicals? A critical perspective. **Planta Medica**, v. 78, n. 08, p. 747-754, 2012.

CHAN-BACAB, M.J.; PENA-RODRÍGUEZ, L.M. Plant Natural Product with Leishmanicidal Activity. **Natural Product Reports**. V. 18, n. 6, p. 675-688, 2001.

CUNHA, L. F.; COSTA, C. M.; BARROSO, P. R.; KATO, K. C.; OLIVEIRA, F. D.; MENDONÇA FILHO, C. V.; MARTINS, H. R. Phytochemical screening and biological assays of ethanolic leaf extract of *Senna rugosa*. **Pharmacognosy**, v. 71, p. 912019, 2020.

DO AMARAL, R.R.; SANTOS, A.A.D.; SARAVIA, A.; BOTAS, G.; CRUZ, R.A.S.; FERNANDES, C.P.; ROCHA, L.; BOYLAN, F. Biological activities of *Arrabidaea chica* (Bonpl.) B. Verl. leaves. **Latin America Journal of Pharmacy**, v. 31, p. 451–455, 2012.

ELKHOURY, A. N. S. M.; MAGALHÃES LIMA, D.; SALOMÓN, O. D.; BUZANOVSKY, L. P.; SABOYÁ-DÍAZ, M. I.; VALADAS, S. Y.; SANCHEZ-VAZQUEZ, M. J. Interacción entre los determinantes medioambientales y socioeconómicos para el riesgo para leishmaniasis cutánea em América Latina. **Revista Panamericana de Salud Publica**, vol. 45, p. 49, n. 10, 2021.

FERREIRA, M. K. A.; FONTENELLE, R. O. D. S.; MAGALHÃES, F. E. A.; BANDEIRA, P. N.; DE MENEZESE, J. E. S. A.; DOS SANTOS, H. S. Potencial farmacológico de chalconas: uma breve revisão. **Revista Virtual de química**. v. 10, n. 5, p. 1455-1473, 2018.

FLORENTINO, J. V. **Síntese de chalconas e flavonas e avaliação dos potenciais inibitórios frente às isoformas de ATP-difosfohidrolase de *S. mansoni***. Dissertação de mestrado, Programa de Pós-Graduação. Universidade Federal De Juiz De Fora, Minas Gerais. 2018.

FONSECA-SILVA, F.; CANTO-CAVALHEIRO, M. M.; MENNA-BARRETO, R. F.; ALMEIDA-AMARAL, E. E. Effect of Apigenin on *Leishmania amazonensis* is associated with reactive oxygen species production followed by mitochondrial dysfunction. **Journal of natural products**, v. 78, n. 4, p. 880-884, 2015.

FRANCO, Y. E.; DE LIMA, C. A.; ROSA, M. N.; SILVA, V. A.; REIS, R. M.; PRIOLLI, D. G.; LONGATO, G. B. Investigation of U-251 cell death triggered by flavonoid luteolin: towards a better understanding on its anticancer property against glioblastomas. **Natural product research**, v. 35, n. 22, p. 4807-4813, 2021.

GARCIA, F. **Estudo fitoquímico da fração AcOEt do extrato etanólico das folhas de Arrabidaea brachypoda (DC) Bureau – Bignoniaceae e atividades antioxidante e inibitória da enzima mieloperoxidase das substâncias isoladas.** Dissertação de mestrado, Programa de pós-graduação em química. Universidade Estadual Paulista. São Paulo. 2008.

GERVAZONI, L. F.; BARCELLOS, G. B.; FERREIRA-PAES, T.; ALMEIDA-AMARAL, E. E. Use of Natural products in leishmaniosis chemotherapy: an overview. **Frontiers in chemistry**, v. 08, p. 1031, 2020.

GOMES, C. M.; DE PAULA, N. A.; MORAIS, O. O. D.; SOARES, K. A.; ROSELINO, A. M.; SAMPAIO, R. N. R. Complementary exams in the diagnosis of American tegumentar leishmaniasis. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 89, p. 701-709, 2014.

GOSMANN, G.; PROVENSÍ, G.; COMUNELLO, L. N.; RATES, S. M. K. Composição química e aspectos farmacológicos de espécies de Passiflora L. (Passifloraceae). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 9, n. 01, p. 88-99, 2011.

GRANDI, T. S. M.; TRINDADE, J. A. D.; PINTO, M. J. F.; FERREIRA, L. L.; CATELLA, A. C. Plantas medicinais de Minas Gerais, Brasil. **Acta Botânica Brasileira**. v. 3, n. 2, p. 185-224, 1989.

LEITE, J. P. V.; OLIVEIRA, A. B.; LOMBARDI, J. A.; S FILHO, J. D.; CHIARI, E. Trypanocidal activity of triterpenes from *Arrabidaea triplinervia* and derivatives. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.29, n. 11, p.2307-309, 2006.

LIMA, V. S. **Estudo *in vitro* da atividade anti-leishmania de compostos sintéticos derivados espiro-acridínicos sobre *Leishmania amazonensis*.** Trabalho de Conclusão de curso – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa – PB, 2020.

LIMA-JÚNIOR, F. E. F. Nome dos autores. **Leishmaniose tegumentar.** Boletim Epidemiológico. 50: 40-41. Vigilância em Saúde no Brasil 2003|2009: da criação da Secretaria de Vigilância em Saúde aos dias atuais). 2019.

MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. The systematic identification of flavonoids. **Berlin: Springer Verlag**, p. 41-164, 1970.

MAHMOUDVAND, H.; DEZAKI, E. S.; EZATPOUR, B.; SHARIFI, I.; KHEIRANDISH, F.; RASHIDIPOUR, M. *In vitro* and *In vivo* antileishmanial activities of *pistaciavera* essential oil. **Planta Medica**, v. 82, n. 04, p. 279-284, 2015.

MANNOCHIO-RUSSO, H.; BUENO, P. C. P.; BAUERMEISTER, A.; DE ALMEIDA, R. F.; DORRESTEIN, P. C.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S. Can statistical evaluation tools for chromatographic method development assist in the natural products workflow? A case study on selected species of the plant family Malpighiaceae. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 11, p. 3239-3249, 2020.

MANNOCHIO RUSSO, H. **Metabolomic tools for chemosystematic studies and identification of bioactive natural products in Malpighiaceae species**. Tese de doutorado, Programa de Pós-Graduação em Química. Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2022.

MARCONDES, M. Leishmanioses. In: LARSSON, R. L. **Tratado de Medicina Externa**. 1. ed. São Paulo. Interebook Editorial, p. 313-344, 2016.

MARKHAN e ANDERSEN. Flavonoids: chemistry, biochemistry, and applications. **Editora informa**, 2005.

MARTIN, F.; HAY, A. E.; CRESSEND, D.; REIST, M.; VIVAS, L.; GUPTA, M. P.; HOSTETTMANN, K. Antioxidant C-glucosylxanthones from the leaves of *Arrabidaea patellifera*. **Journal of Natural Products**, v.71, n. 11, p.1887-890, 2008.

MARTÍNEZ RUIZ, M. G.; RICHARD-GREENBLATT, M.; JUÁREZ, Z. N.; AV-GAY, Y.; BACH, H.; HERNÁNDEZ, L. R. Antimicrobial, antiparasitic, anti-inflammatory and cytotoxic activities of *Laennecia confusa*. **The Scientific World Journal**, v. 2012, 2012.

MENDES, C. S.; COELHO, A. B.; FÉRES, J. G.; SOUZA, E. C. D.; CUNHA, D. A. D. Impacto das mudanças climáticas sobre a leishmaniose no Brasil. **Ciência & saúde coletiva**, v. 21, p. 263-272, 2016.

MISHRA, J.; SAXENA, A.; SINGH, S. Chemotherapy of Leishmaniasis: Past, Present and Future. **Current medicinal chemistry**, v. 14, p. 1153-1159, 2007.

MONTEIRO, F. S.; DA SILVA COSTA, J. R.; MARTINS, L. J. A.; DA ROCHA, C. Q.; BORGES, A. C. R.; DA ROCHA BORGES, M. O. Hydroalcoholic extract of leaves of *Arrabidaea brachypoda* (Dc.) bureau present antispasmodic activity mediated through calcium influx blockage. **Revista de Ciencias Farmacêuticas Básica Aplicada**, v. 41, p. 1–13, 2020.

MORAIS, L. S.; DUSI, R. G.; DEMARQUE, D. P.; SILVA, R. L.; ALBERNAZ, L. C.; BAO, S. N.; ESPINDOLA, L. S. Antileishmanial compounds from *Connarus suberosus*: Metabolomics, isolation and mechanism of action. **PloS one**, v. 15, n. 11, p. e0241855, 2020.

MOTA, E. F.; ROSARIO, D. M.; VEIGA, A. S. S.; BRASIL, D. D. S. B.; SILVEIRA, F. T.; DOLABELA, M. F. Biological activities of *Croton palanostigma* Klotzsch. **Pharmacnosy Magazine**, v. 11, n. 43, p. 1-6, 2015.

MOUGNEAU, E.; BIHL, F.; GLAICHENHAUS, N. Cell biology and immunology of Leishmania. **Immunol. Rev.**, v. 240, n. 1, p. 286-296, 2011.

MOURA, M. S.; BELLETE, B. S.; VIEIRA, L. C. C.; SAMPAIOA, O. M. Uso de redes moleculares para anotações de compostos em metabolômica. **Revista Virtual de Química**, 2021.

NASCIMENTO, J. R. **Correlação entre potencial eletroquímico e atividade leishmanicida de compostos raros isolados de *Fridericia platyphylla* (cham.) L. G. Lohmann**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Maranhão, São Luís – MA, 2019.

NASCIMENTO, J. R.; MIRANDA, A. J. A.; VIEIRA, F. C.; RODRIGUES, C. D. P.; VASCONCELOS, L. N.; PEREIRA FILHO, J. L.; ROCHA, C. Q. A Review of the Phytochemistry and Pharmacological Properties of the Genus *Arrabidaea*. **Pharmaceuticals**, v. 15, n. 6, p. 658, 2022.

NEUENSCHWANDER, A.; ROCHA, V. P.; BASTOS, T. M.; MARCOURT, L.; MORIN, H.; ROCHA, C. Q.; QUEIROZ, E. F. Production of highly active antiparasitic compounds from the controlled halogenation of the *Arrabidaea brachypoda* crude plant extract. *Journal of Natural Products*. v. 83, n. 9, p. 2631-2640. 2020.

NICOLAOU, K. C.; PFEFFERKORN, J. A.; ROECKER, A. J.; CAO, G.-Q.; BARLUENGA, S.; MITCHELL, H. J. Natural Product-like Combinatorial Libraries Based on Privileged Structures. 1. General Principles and Solid-Phase Synthesis of Benzopyrans. **Journal America Chemical Society**, vol. 122, n. 41, p. 9939–9953, 2000.

NUNES, H. L.; TUTTIS, K.; SERPELONI, J. M.; NASCIMENTO, J. R. D.; DA ROCHA, C. Q.; SILVA, V. A. O.; DE SYLLOS CÓLUS, I. M. Characterization of the *in vitro* cytotoxic effects of brachydins isolated from *Fridericia platyphylla* in a prostate câncer cell line. **Journal of tototoxicology and environmental health**. v. 83, n. 16, p. 547-558, 2020.

NOGUEIRA, R. A. **Leishmaniose visceral em São Luís: uma avaliação após a descontinuidade do programa de controle de zoonoses**. Dissertação de mestrado, Programa de pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, São Luís – MA, 2018.

PACE, M. R.; LOHMANN, L. G.; ANGYALOSSY, V. The rise and evolution of the cambial variant in Bignoniaceae (Bignoniaceae). **Evolution & development**, v. 11, n. 5, p. 465-479, 2009.

PAL, B.; MURTI, K.; SIDDIQUI, N. A.; DAS, P.; LAL, C. S.; BABU, R.; PANDEY, K. Assesment of quality of life in patients with post kalaazar dermal leishmaniasis.

Health Quality of Life outcomes, v. 15, n. 148, 2017.

PAULETTI, P.M.; BOLZANI, V.S.; YOUNG, M.C.M. Constituintes químicos de *Arrabidaea samydoides* (Bignoniaceae). **Química Nova**, v. 26, p. 641–643, 2003.

RAJ, S.; SAHA, G.; SASIDHARAN, S.; DUBEY, V. K.; SAUDAGAR, P.

Biochemical characterization and chemical validation of Leishmania MAP Kinase-3 as a potential drug target. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-11, 2019.

REZENDE-JÚNIOR, L. M.; ANDRADE, L. M. D. S.; LEAL, A. L. A. B.; MESQUITA, A. B. D. S.; SANTOS, A. L. P. D. A. D.; NETO, J. D. S. L.; BARRETO, H. M. Chalcones isolated from *Arrabidaea brachypoda* flowers as inhibitor of NorA and MepA multidrug Efflux Pumps of *Staphylococcus aureus*. **Antibiotics**, v. 9, n. 6, p. 351, 2020.

RIBEIRO, A. I. **Estudo químico dos fungos *stachybotris levispora e curvularai inaequalis*: uso da rede molecular para a identificação de novos metabólitos**. Tese de doutorado, Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, 2019.

ROCHA, C. Q.; VILELA, F. C.; CAVALCANTE, G. P.; SANTA-CECÍLIA, F. V.; SANTOS-E-SILVA, L.; DOS SANTOS, M. H.; GIUSTI-PAIVA, A. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Arrabidaea brachypoda* (DC.) bureau roots. **Journal of ethnopharmacology**, v. 133, n. 2, p. 396-401, 2011.

ROCHA, C. Q. DA. **ESTUDO FITOQUÍMICO, AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANALGÉSICA E ANTI-INFLAMATÓRIA DE EXTRATOS E SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE *Arrabidaea brachypoda* (DC.) BUREAU (BIGNONIACEAE)**. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Química. Universidade Federal De Alfenas, Minas Gerais, 2013.

ROCHA, C. Q.; DE-FARIA, F. M.; MARCOURT, L.; EBRAHIMI, S. N.; KITANO, B. T.; GHILARDI, A. F.; WOLFENDER, J. L. Gastroprotective effects of hydroethanolic root extract of *Arrabidaea brachypoda*: evidences of cytoprotection and isolation of unusual glycosylated polyphenols. **Phytochemistry**, v. 135, p. 1-13, 2016.

ROCHA, V. P.; ROCHA, C. Q.; FERREIRA QUEIROZ, E.; MARCOURT, L.; VILEGAS, W.; GRIMALDI, G. B.; SOARES, M. B. Antileishmanial activity of

Dimeric Flavonoids isolated from *Arrabidaea brachypoda*. **Molecules**, v. 24, n. 1, p. 1, 2018.

RODRIGUES, T. A.; NETO, J. L.; CARVALHO, T. D. A. R.; BARBOSA, M. E.; GUEDES, J. C.; DE CARVALHO, A. V. A valorização das plantas medicinais como alternativa à saúde: um estudo etnobotânico. **Revista Ibero Americana de Ciências Ambientais**. V. 11, n. 1, p. 411-428, 2020.

SACARO-JÚNIOR, N. L.; MATION, L. F.; SAKOWSKI, P. A. M. Efeito do desmatamento sobre malária e leishmaniose na Amazônia. 2016 Acesso em 05/12/2022. Disponível em <
https://www.ipea.gov.br/desafios/index.php?option=com_content&view=article&id=3271&catid=29&Itemid=34 >.

SALLES, A. E. H. **Jardim botânico de Brasília**, 2007.

SCHMID, R.; PETRAS, D.; NOTHIAS, L. F.; WANG, M.; ARON, A. T.; JAGELS, A.; DORRESTEIN, P. C. Ion identity molecular networking for mass spectrometry based metabolomics in the GNPS environment. **Nature communications**, v. 12, n. 1, p. 1-12, 2021.

SANTOS, Daniel Sousa; RODRIGUES, Mayara Mikelle Farias. Atividades farmacológicas dos flavonoides: um estudo de revisão. **Estação Científica (UNIFAP)**, v. 7, n. 3, p. 29-35, 2017.

SHANNON, P.; MARKIEL, A.; OZIER, O.; BALIGA, N. S.; WANG, J. T.; RAMAGE, D.; IDEKER, T. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. **Genome research**, v. 13, n. 11, p. 2498-2504, 2003.

SERPELONI, J. M.; SPECIAN, A. F. L.; RIBEIRO, D. L.; BENÍCIO, L. M.; NUNES, H. L.; FRANCHI, L. P.; CÓLUS, I. M. S. *Fridericia platyphylla* (Cham.) L. G. Lohmann root extract exerts cytotoxic and antiproliferative effects on gastric tumor cells and downregulates BCL-XL, BIRC5, and MET genes. **Human and experimental toxicology**, v. 39, n. 3, p. 338-354, 2020.

SILVA, A. C. Z. **Padronização dos extratos polares das partes aéreas de *Actinocephalus divaricatus* (Körn.) Sano (Eriocaulaceae)**. Dissertação de mestrado.

Programa de Pós-graduação em Química. Universidade Estadual Paulista, São Paulo. 2016.

SILVA, M. C. P. D.; BRITO, J. M.; FERREIRA, A. D. S.; VALE, A. A. M.; SANTOS, A. P. A. D.; SILVA, L. A.; GUERRA, R. N. M. Antileishmanial and immunomodulatory effect of babaçu-loaded PLGA microparticles: a useful drug target to *Leishmania amazonenses* infection. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2018, 2018.

SILVA, D. B.; TURATTI, I. C. C.; GOUVEIA, D. R.; ERNST, M.; TEIXEIRA, S. P.; LOPES, N. P. Mass Spectrometry of Flavonoid Vicenin-2, Based Sunlight Barriers in *Lychnophora* Species. Scientific **Reports**, v. 4, n. 1, p. 1-8, 2014.

SILVA, F. C. O.; FERREIRA, M. K. A.; SILVA, A. W.; MATOS, M. G. C.; MAGALHÃES, F. E.; SILVA, P. T.; SANTOS, H. S. Bioatividades de Triterpenos isolados de plantas: Uma breve revisão. **Revista Virtual Química**, v. 12, n. 1, 2020.

SILVA FILHO, A. A.; RESENDE, D. O.; FUKUI, M. J.; SANTOS, F. F.; PAULETTI, P. M.; CUNHA, W. R.; NANAYAKKARA, N. P. D. *In vitro* antileishmanial, antiplasmodial and cytotoxic activities of phenolics and triterpenoids from *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae). **Fitoterapia**, v. 80, n. 8, p. 478-482, 2009.

SILVA-LÓPEZ, R. E. Proteases de *Leishmania*: novos alvos para o desenvolvimento racional de fármacos. **Química Nova**, v. 33, p. 1541-1548, 2010.

SILVA, M.; PACHECO, W. L.; SAUERBIER, G. O gerenciamento ambiental e seu impacto na leishmaniose. **Revista multidisciplinar em saúde**, v.3, n. 2, 2021.

SILVEIRA, S. J. S. **Perfil clínico e epidemiológico da leishmaniose tegumentar americana no Hospital de Doenças Tropicais da Universidade Federal de Tocantins**. Dissertação de mestrado, Instituto de pesquisas energéticas e nucleares, São Paulo, 2020.

SILVA-SILVA, J. V.; MORAGAS-TELLIS, C. J.; CHAGAS, M. S.; SOUZA, P. V. R.; MOREIRA, D. L.; HARDOIM, D. J.; ALMEIDA-SOUZA, F. Cajurin: a anthocyanidin from *Arrabidaea chica* as a potencial marker of antileishmanial activity. **Biomedicine & pharmacotherapy**, v. 141, p. 111910, 2021.

SISTEMA DE INFORMAÇÃO SOBRE A BIODIVERSIDADE BRASILEIRA. **Fridericia platyphylla (Cham.) L.G.Lohmann.** Disponível em: <<https://ala-bie.sibbr.gov.br/ala-bie/species/384391#classification>>. Acesso em: 08 set. 2022.

Tasdemir, D., Kaiser, M., Brun, R., Yardley, V., Schmidt, T.J., Tosun, F., Ruedi, P. (2006). Antitrypanosomal and Antileishmanial Activities of Flavonoids and Their Analogues: In Vitro, In Vivo, Structure – Activity Relationship and Quantitative Structure – Activity Relationship Studies. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(4), pp. 1352 – 1364.

TESTASICCA, M. C.; DOS SANTOS, M. S.; MACHADO, L. M.; SERUFO, A. V.; DORO, D.; AVELAR, D.; TIBÚRCIO, A. M.; ABRANTES, C.; MACHADO-COELHO, G. L.; GRIMALDI, G. JR., GAZZINELLI, R. T.; FERNANDES, A. P. Antibody responses induced by leish-tec®, an a2-based vaccine for visceral leishmaniasis, in a heterogeneous canine population. **Veterinary parasitology**, v. 204, n. 3-4, p. 169– 176, 2014.

TORRES, D. D. S.; PEREIRA, E. C.; SAMPAIO, P. A.; DE SOUZA, N. A.; FERRAZ, C. A.; OLIVEIRA, A. P. D.; ROLIM, L. A. Influência do método extrativo no teor de flavonoides de *Cnidocolus quercifolius* pohl (euphorbiaceae) e atividade antioxidante. **Química Nova**, v. 41, n. 7, p. 743-747, 2018.

VERVERIDIS, F.; TRANTAS, E.; DOUGLAS, C.; VOLLMER, G.; KRETZSCHMAR, G.; PANOPOULOS, N. Biotechnology of flavonoids and other phenylpropanoid-derived natural products. Part I: Chemical diversity, impacts on plant biology and human health. **Biotechnology Journal: Healthcare Nutrition Technology**, v. 2, n. 10, p. 1214-1234, 2007.

WANG, W.; XU, J.; FANG, H.; LI, Z.; LI, M. Advances and challenges in medicinal plant breeding. **Plant Science**. v. 298, n. 110573, 2020.

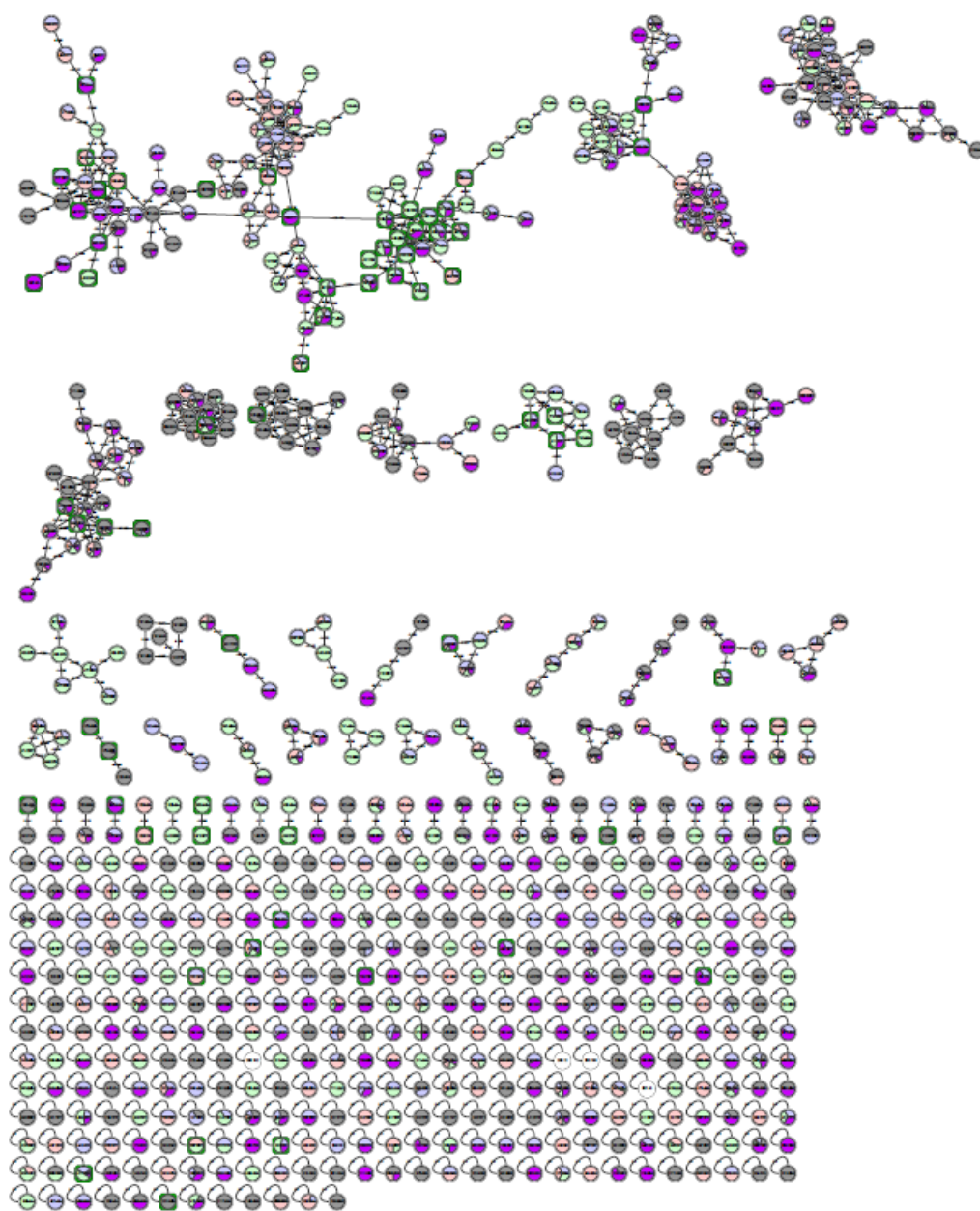
WANG, M.; CARVER, J. J.; PHELAN, V. V.; SANCHEZ, L. M.; GARG, N.; PENG, Y.; BANDEIRA, N. "Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking." **Nature Biotechnology**, v. 34, n. 8, p. 828-837, 2016.

WHO. **Global health observatory data repositior. World health organization.** Disponível em <http://apps.who.int> acessado em fevereiro de 2022.

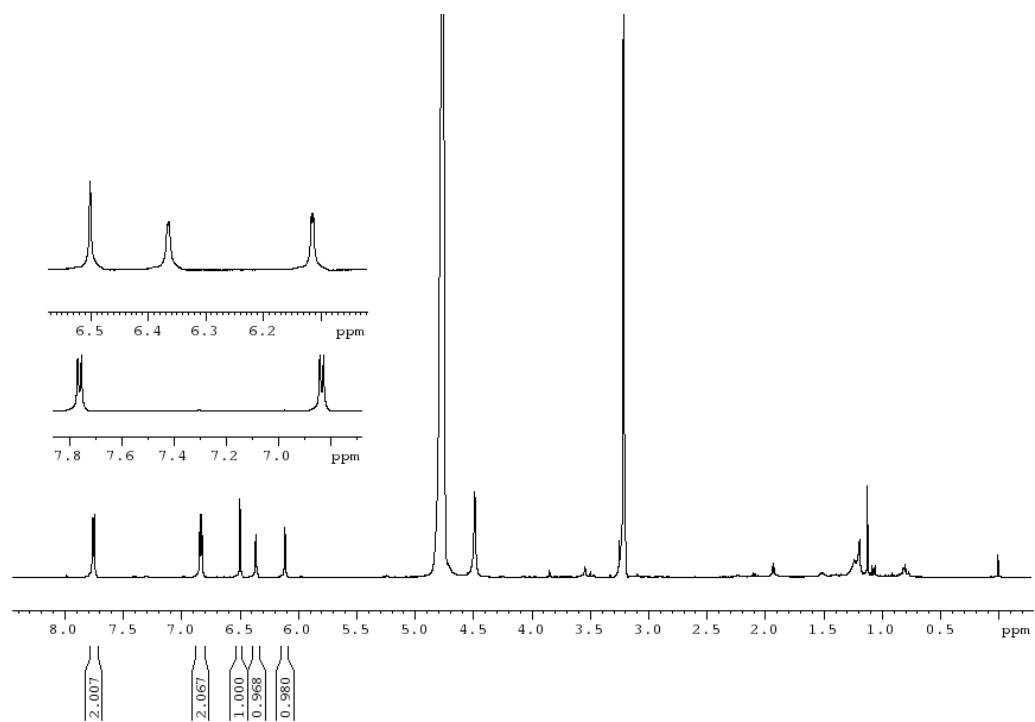
WHO. **World health organization. Global health repository.** Disponível em <http://apps.who.int> acessado em fevereiro de 2022.

ZORN, B.; GARCÍA-PIÑERES, A. J.; CASTRO, V.; MURILLO, R.; MORA, G.;
MERFORT, I. 3-Desoxyanthocyanidins from *Arrabidaea chica*. **Phytochemistry**, v.56,
p.831- 35, 2001.

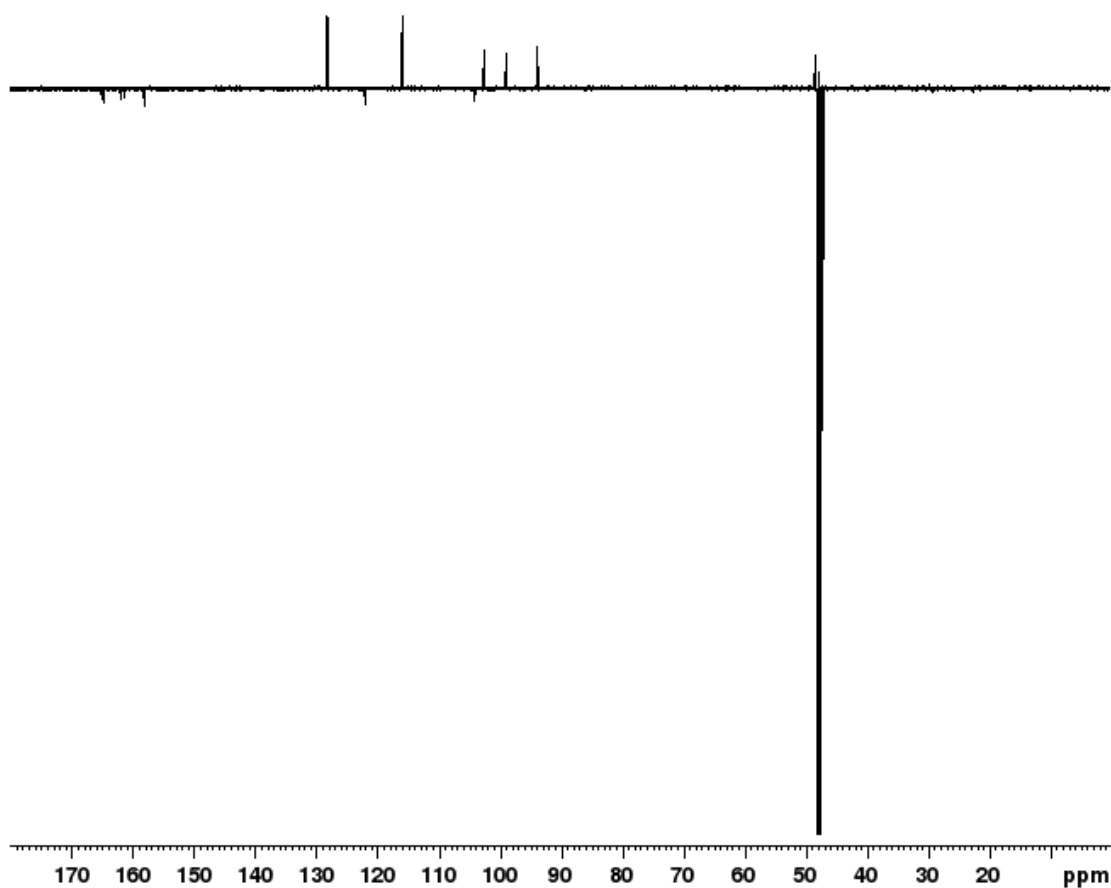
APÊNDICE 1 - Rede molecular completa gerada no software *cytoscape*.



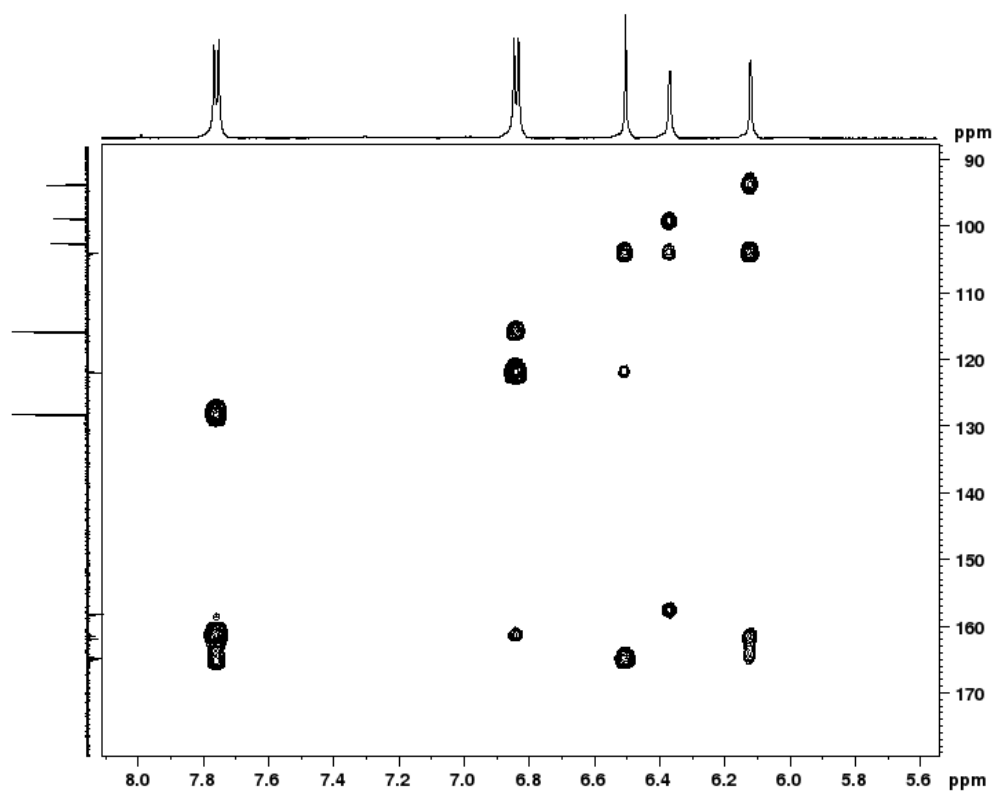
APÊNDICE 2– Espectro de RMN-¹H da apigenina.



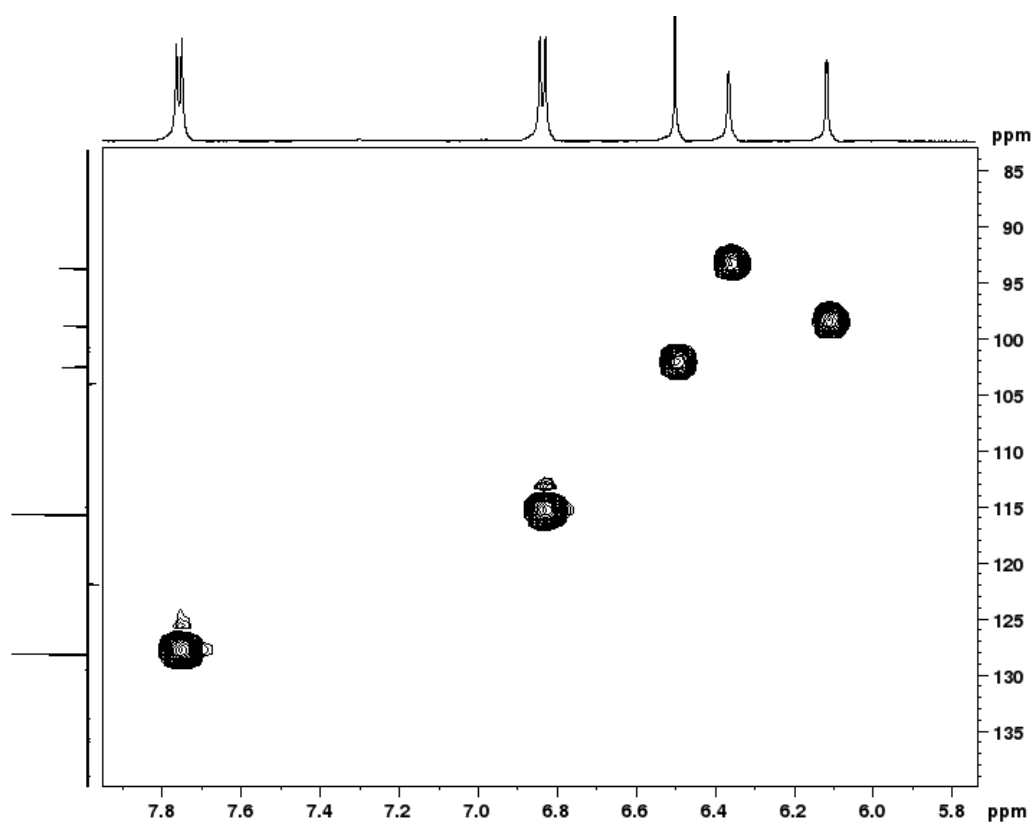
APÊNDICE 3 – Espectro DEPTQ da apigenina (CD₃OD; 150 MHz)



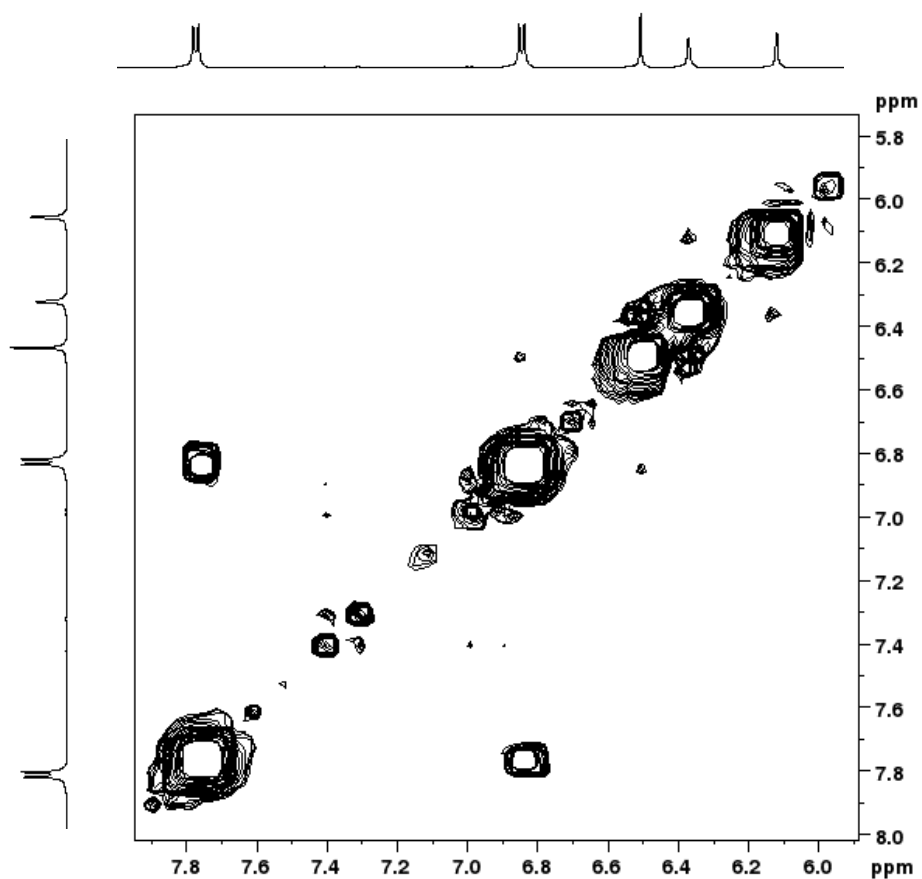
APÊNDICE 4 – Mapa de contorno HMBC da apigenina ampliado (CD₃OD; 150 MHz)



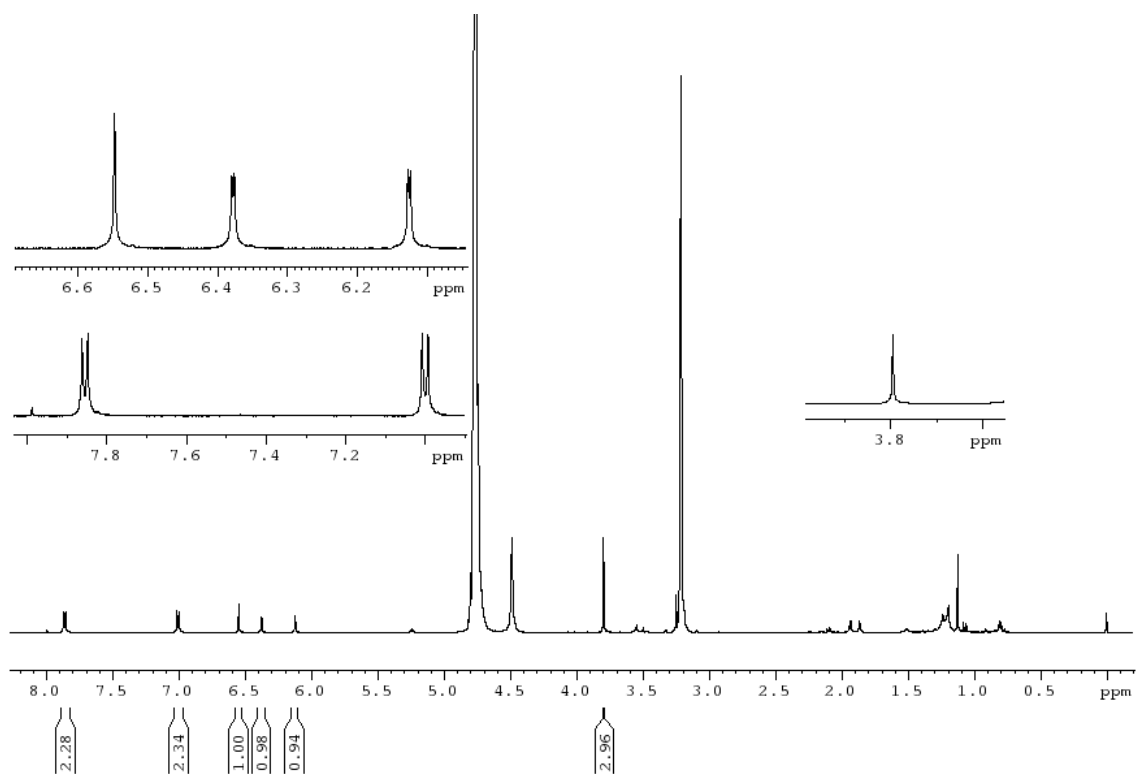
APÊNDICE 5 – Mapa de contorno HSQC da Apigenina ampliado (CD₃OD; 150 MHz)



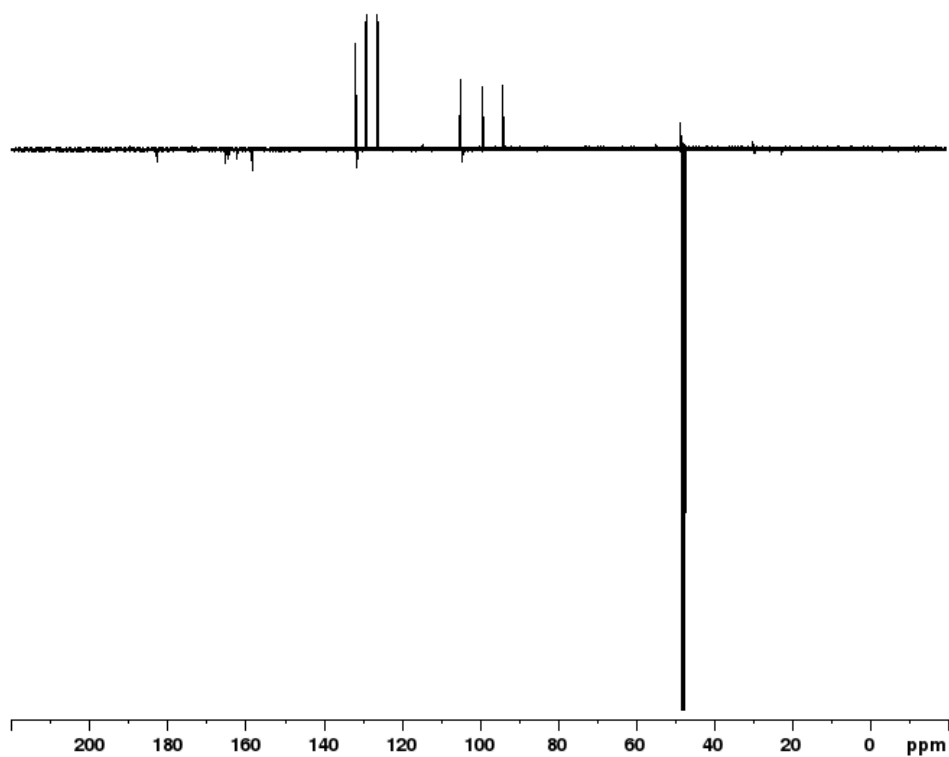
APÊNDICE 6 – Mapa de contorno COSY da apigenina ampliado (CD₃OD; 150 MHz)



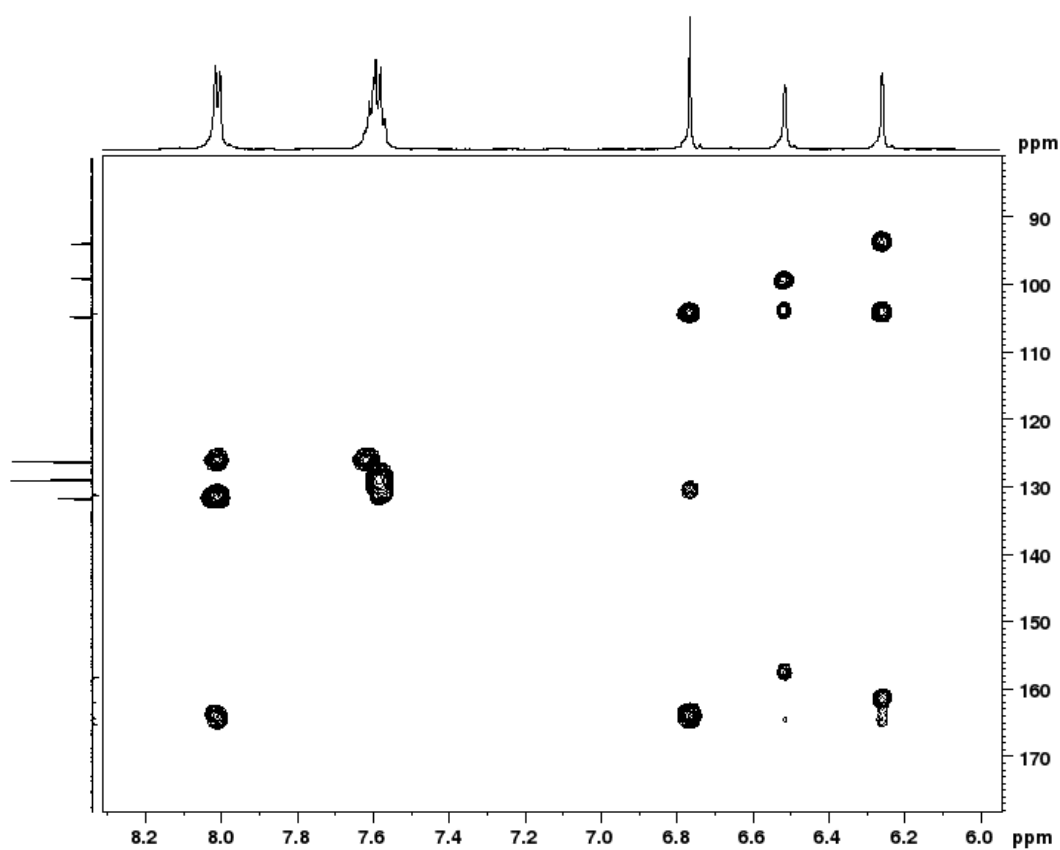
APÊNDICE 7 – Espectro de RMN- ^1H da acetina.



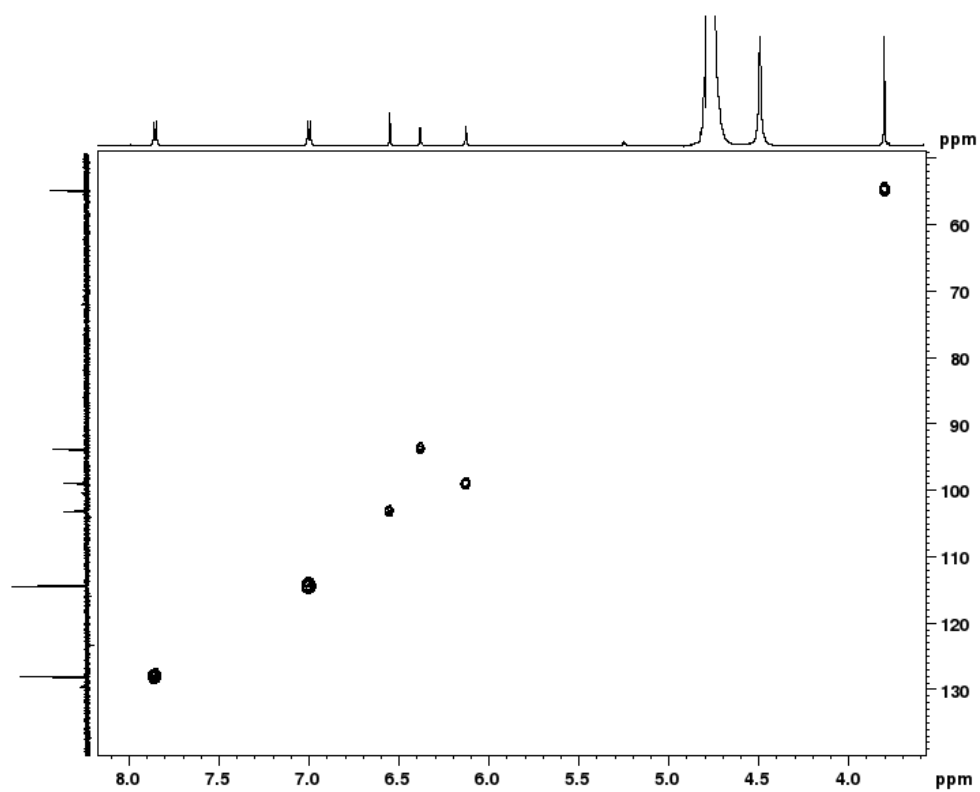
APÊNDICE 8 – Espectro DEPTQ da acetina (CD_3OD ; 150 MHz).



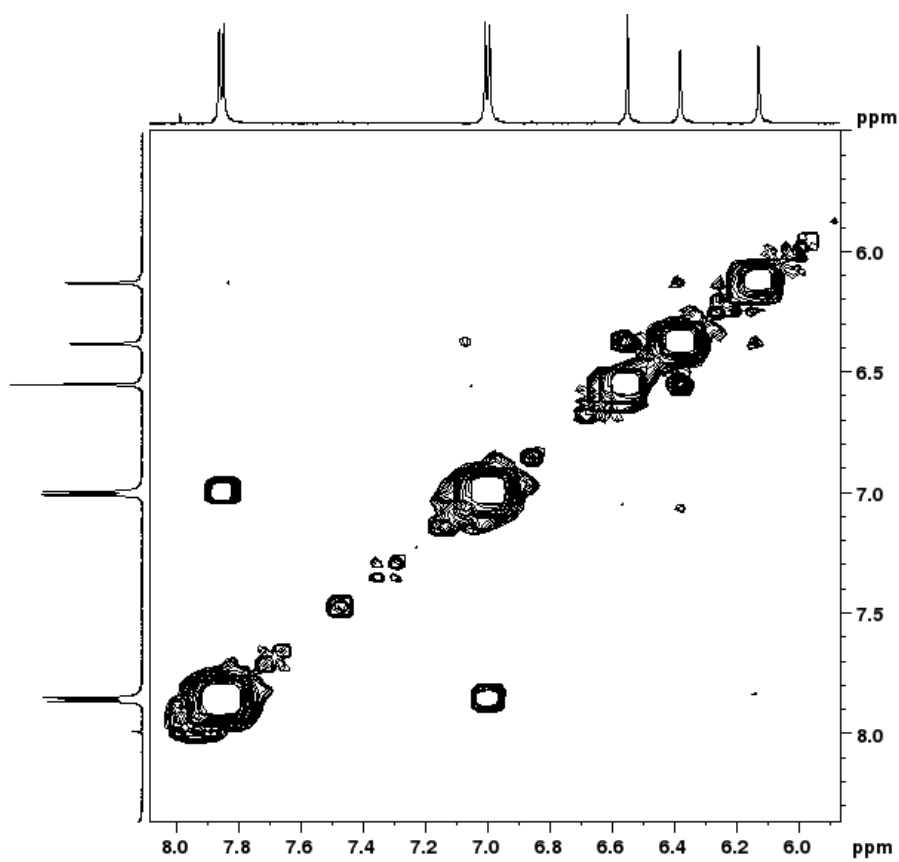
APÊNDICE 9 – Mapa de contorno HMBC da acacetina ampliado (CD₃OD; 150 MHz)



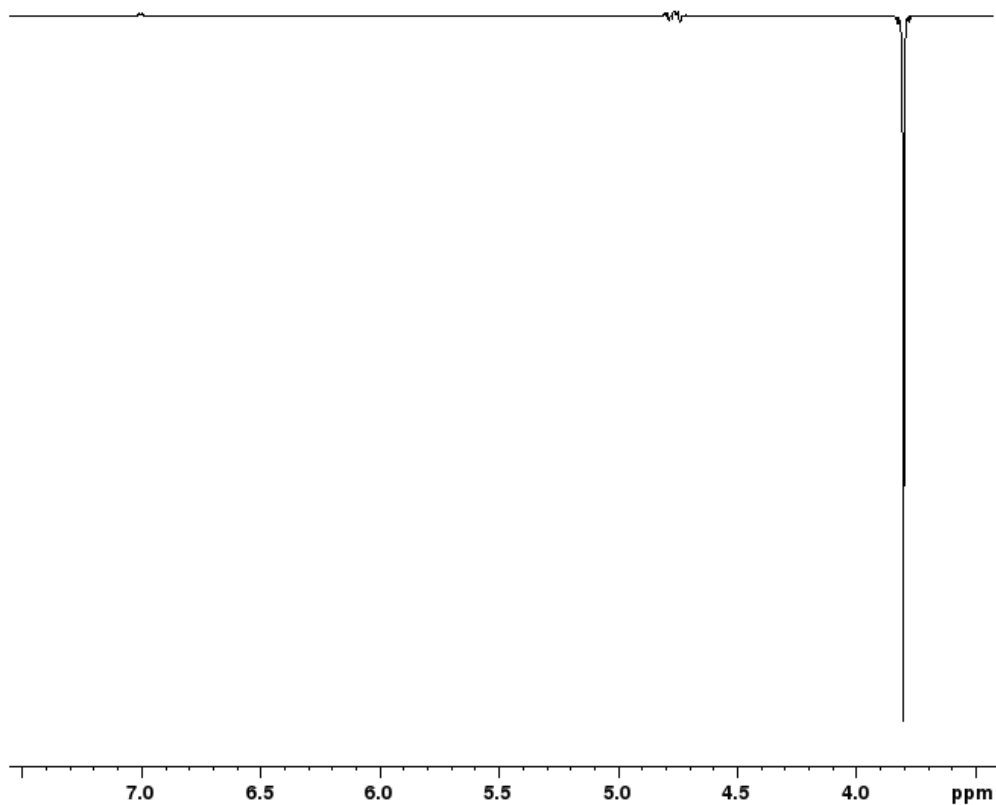
APÊNDICE 10 – Mapa de contorno HSQC da Acacetina ampliado (CD₃OD; 150 MHz)



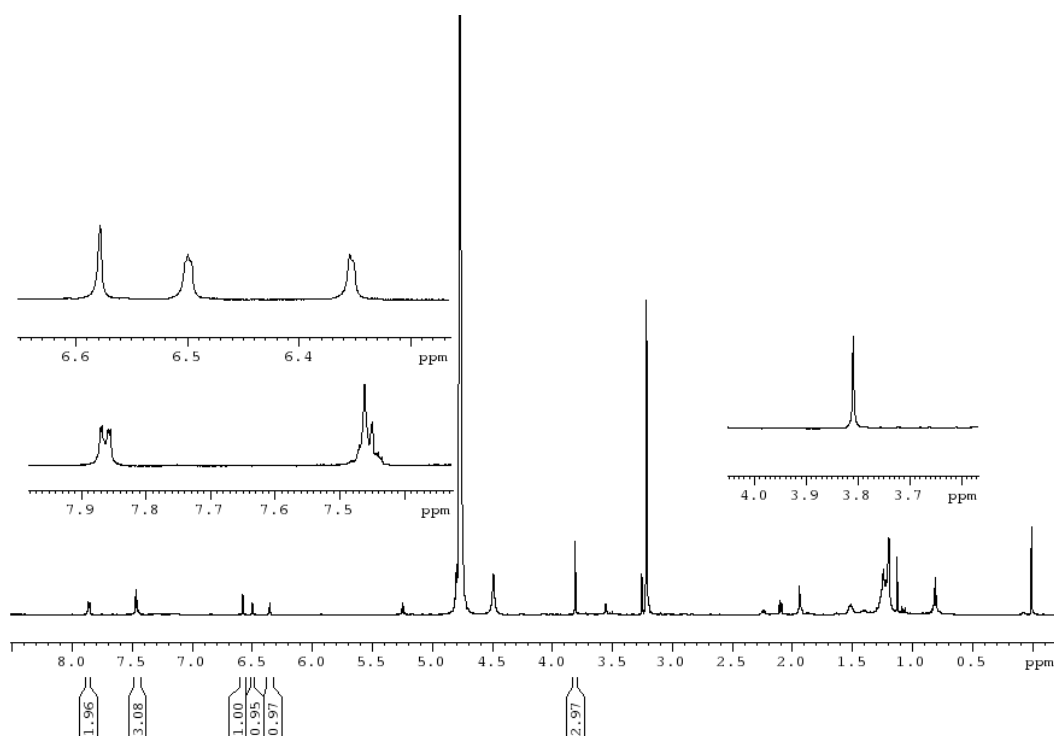
APÊNDICE 11 – Mapa de contorno COSY da acetina ampliado (CD₃OD; 150 MHz)



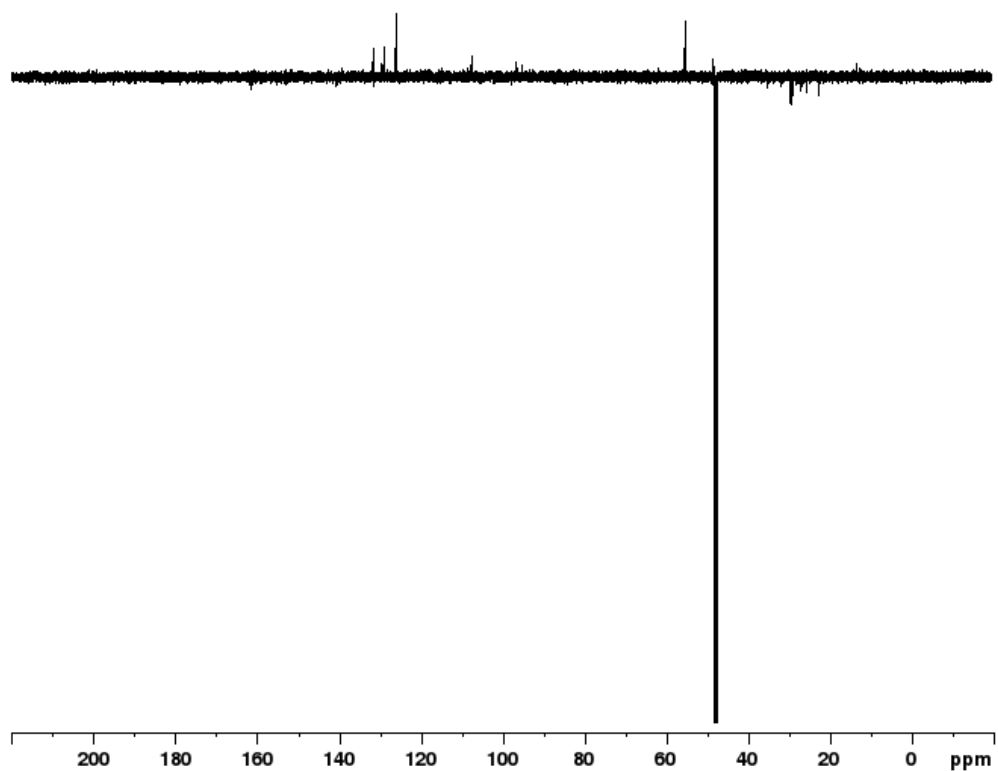
APÊNDICE 12 – Espectro NOESY-1D da acetina irradiado em 3.79 ppm.



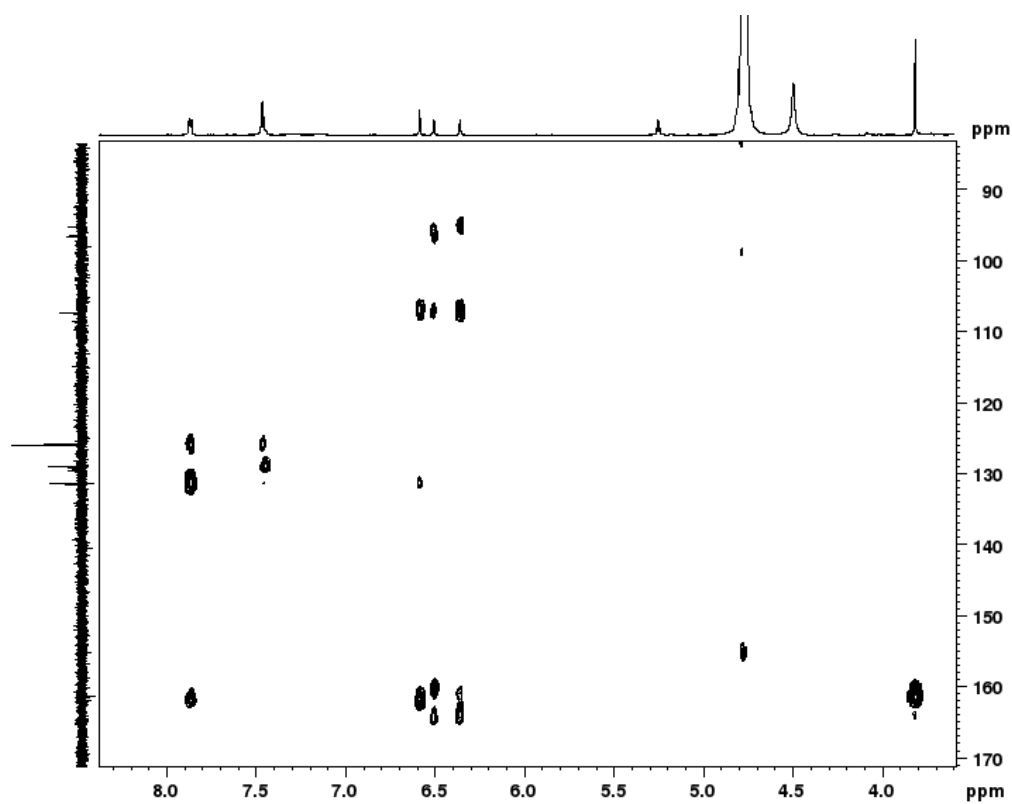
APÊNDICE 13 – Espectro de RMN-¹H da 5-metóxi-crisina



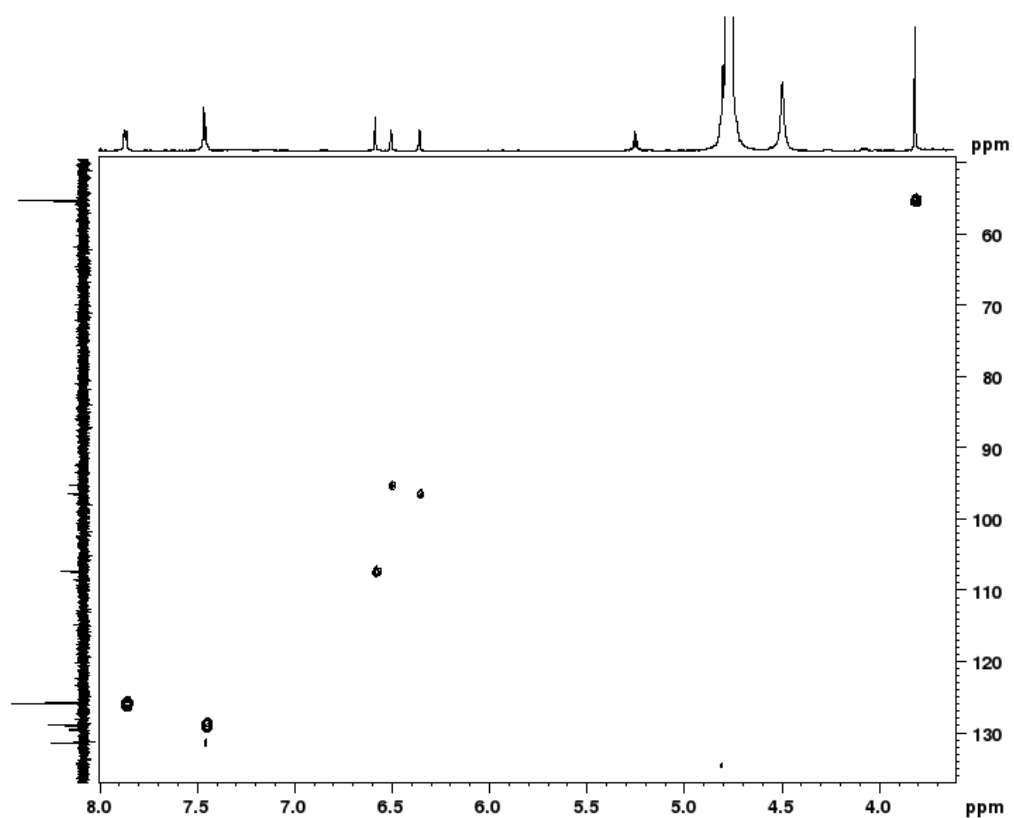
APÊNDICE 14 – Espectro DEPTQ da 5-metóxi-crisina (CD₃OD; 150 MHz)



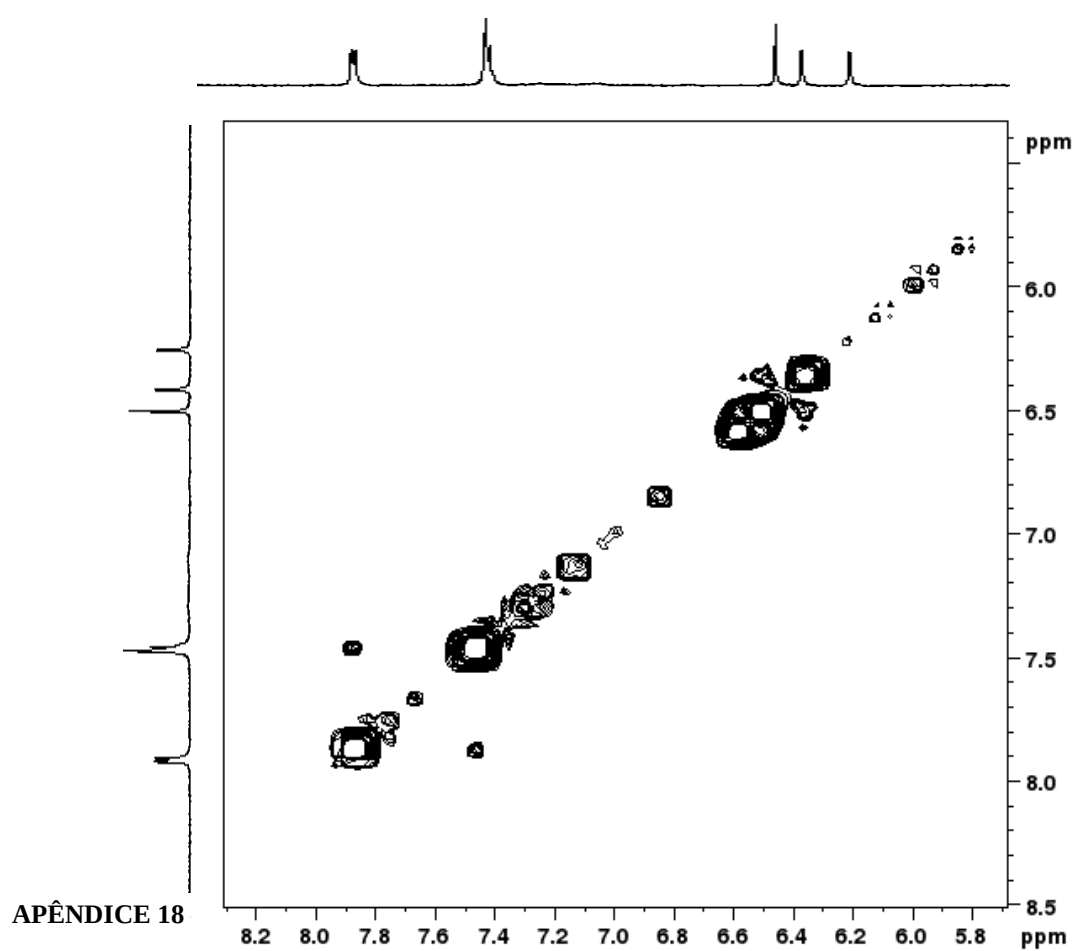
APÊNDICE 15 – Mapa de contorno HMBC da 5-metóxi-crisina ampliado (CD₃OD; 150 MHz)



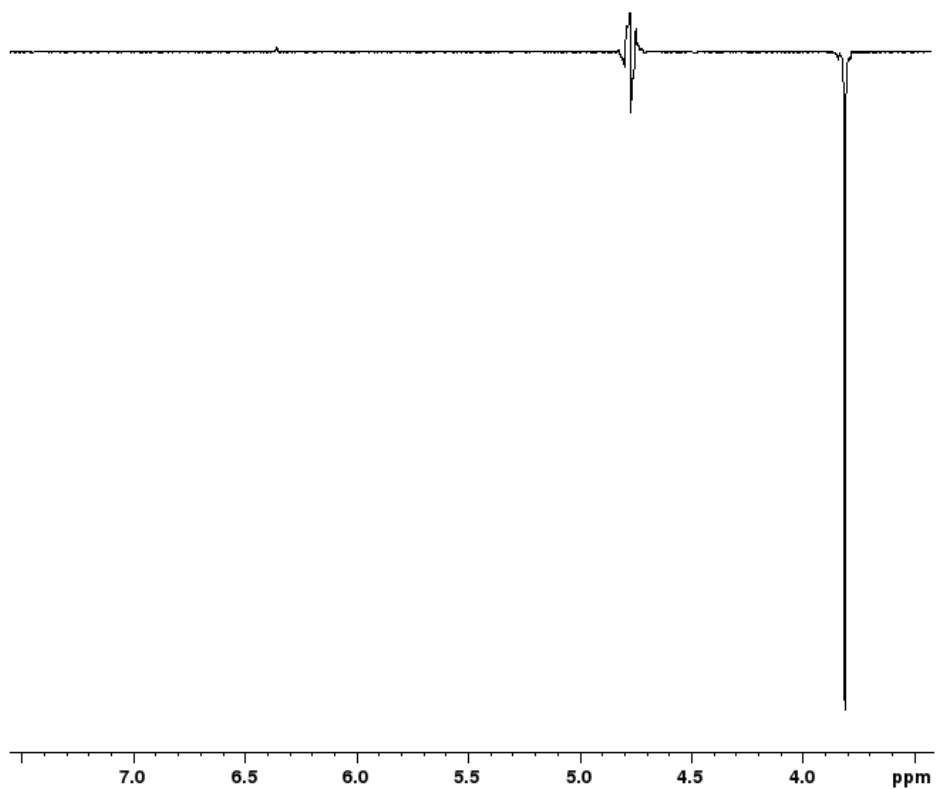
APÊNDICE 16 – Mapa de contorno HSQC da 5-metóxi-crisina ampliado (CD₃OD; 150 MHz)



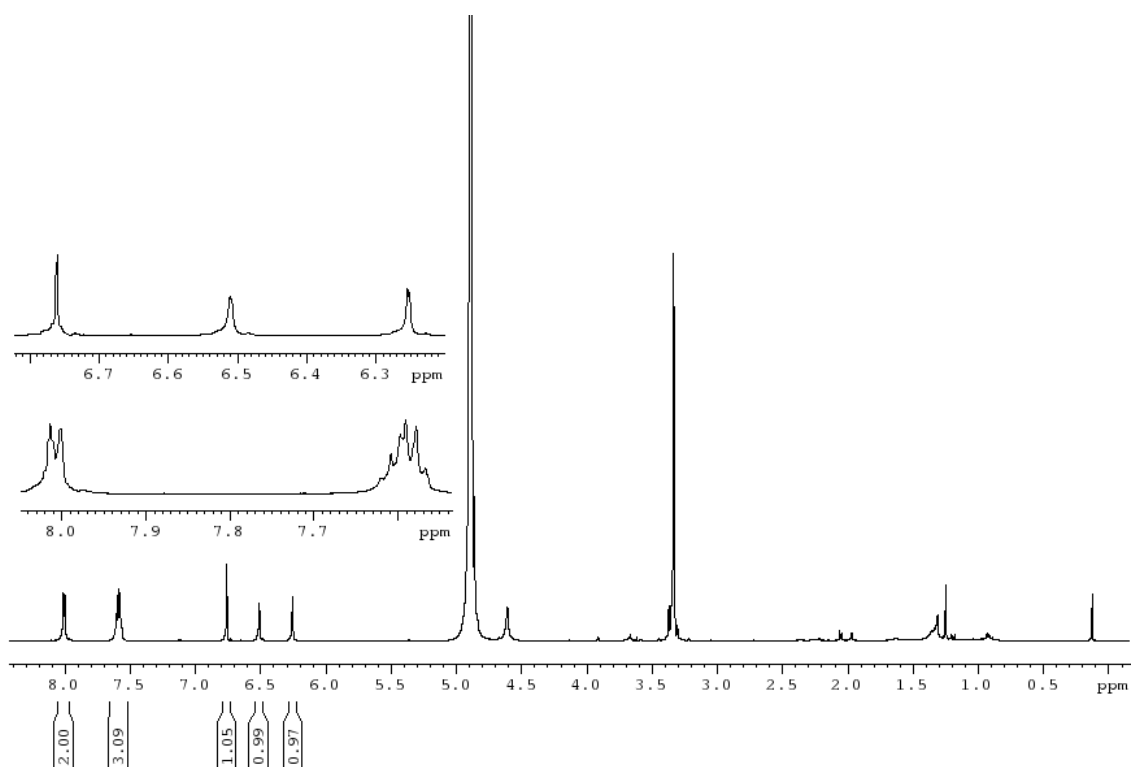
APÊNDICE 17 – Mapa de contorno COSY da 5-metóxi-crisina ampliado (CD₃OD; 150 MHz)



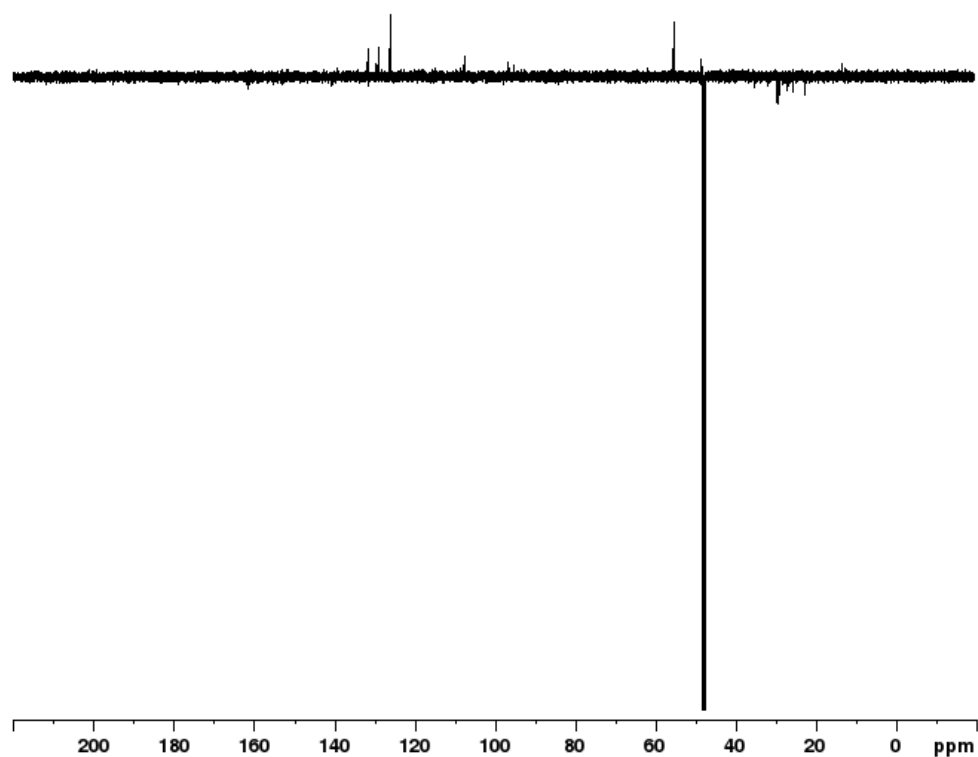
APÊNDICE 18



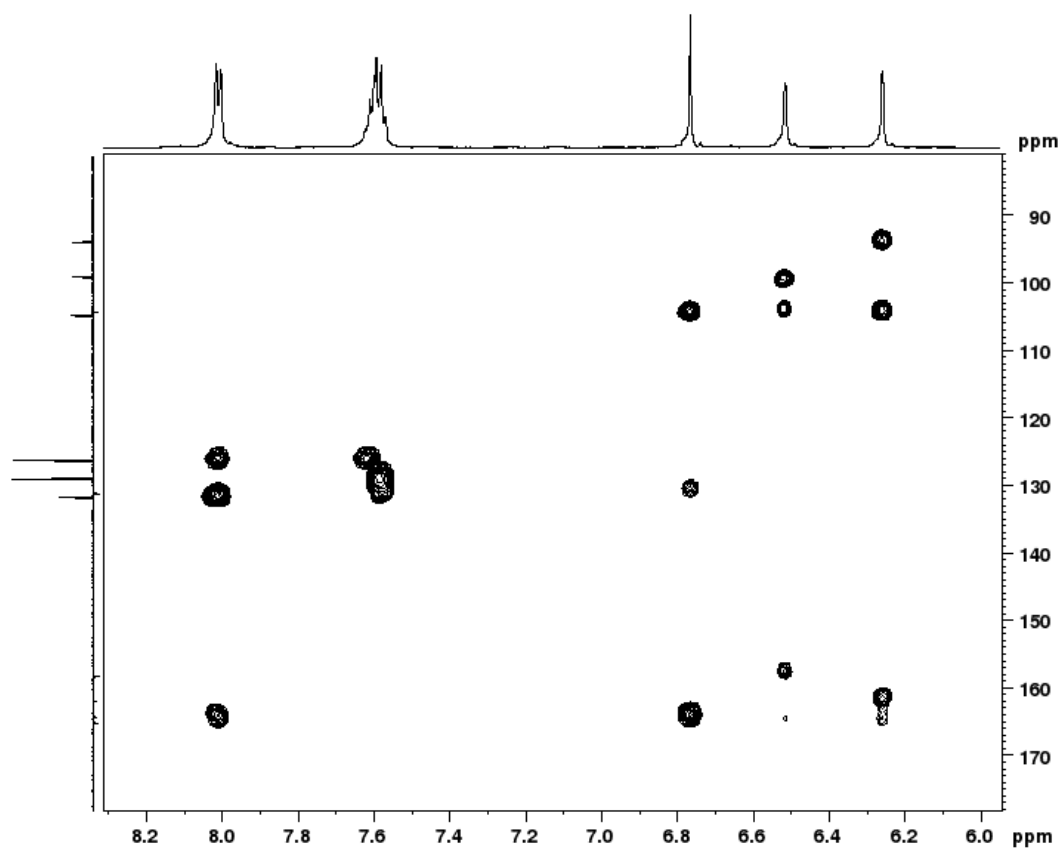
APÊNDICE 19 – Espectro de RMN- ^1H da crisina.



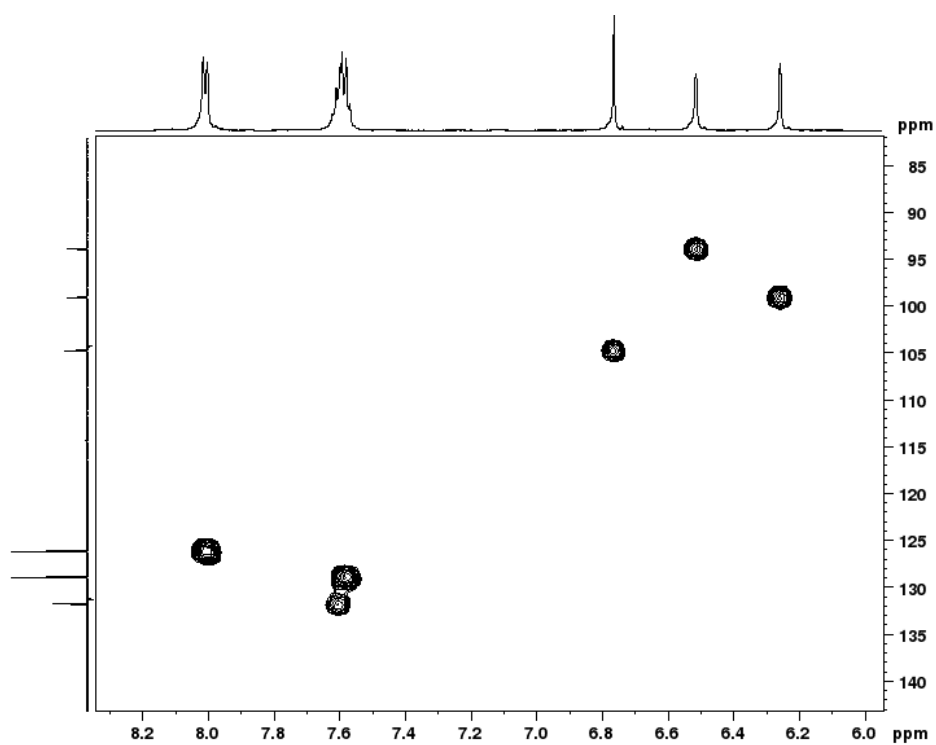
APÊNDICE 20 – Espectro DEPTQ da crisina (CD_3OD ; 150 MHz)



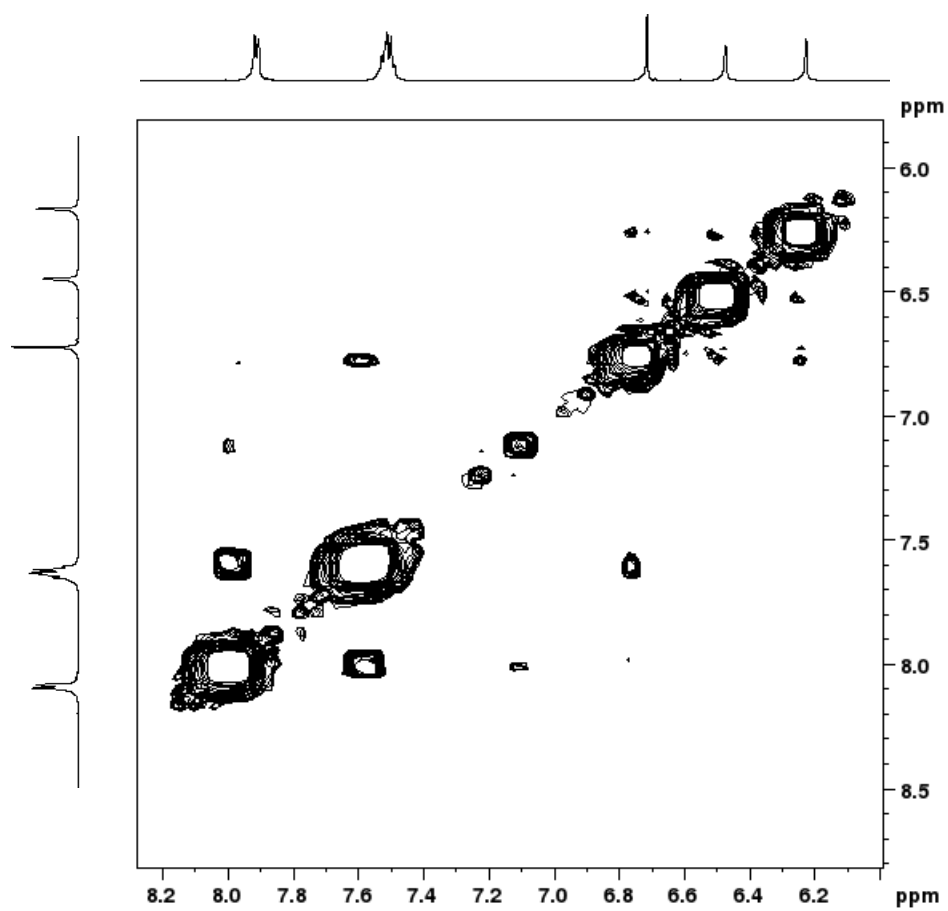
APÊNDICE 21 – Mapa de contorno HMBC da crisina ampliado (CD_3OD ; 150 MHz)



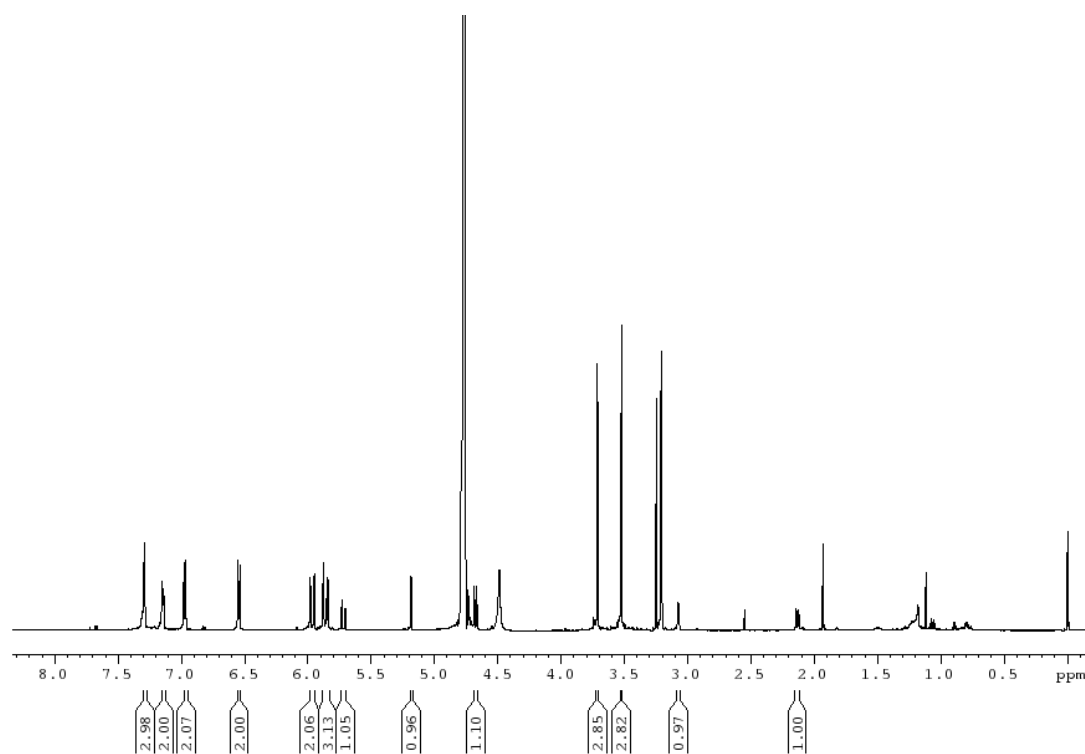
APÊNDICE 22 – Mapa de contorno HSQC da crisina ampliado (CD_3OD ; 150 MHz)



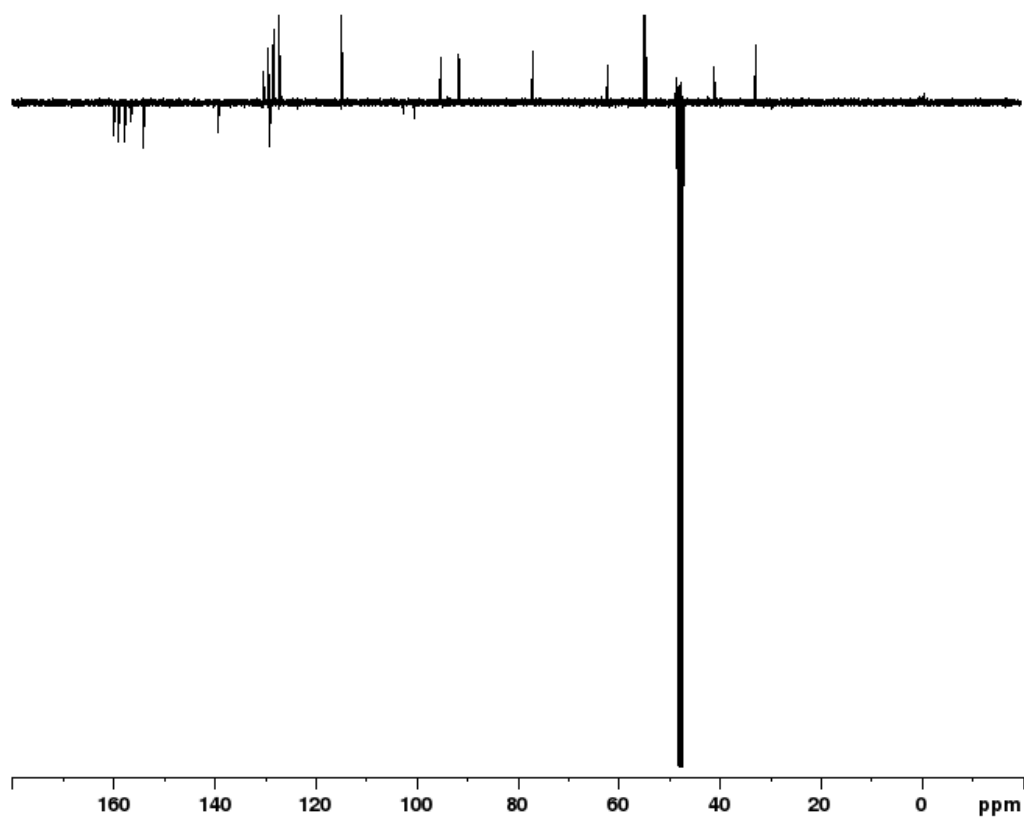
APÊNDICE 23 – Mapa de contorno COSY da crisina ampliado (CD_3OD ; 150 MHz)



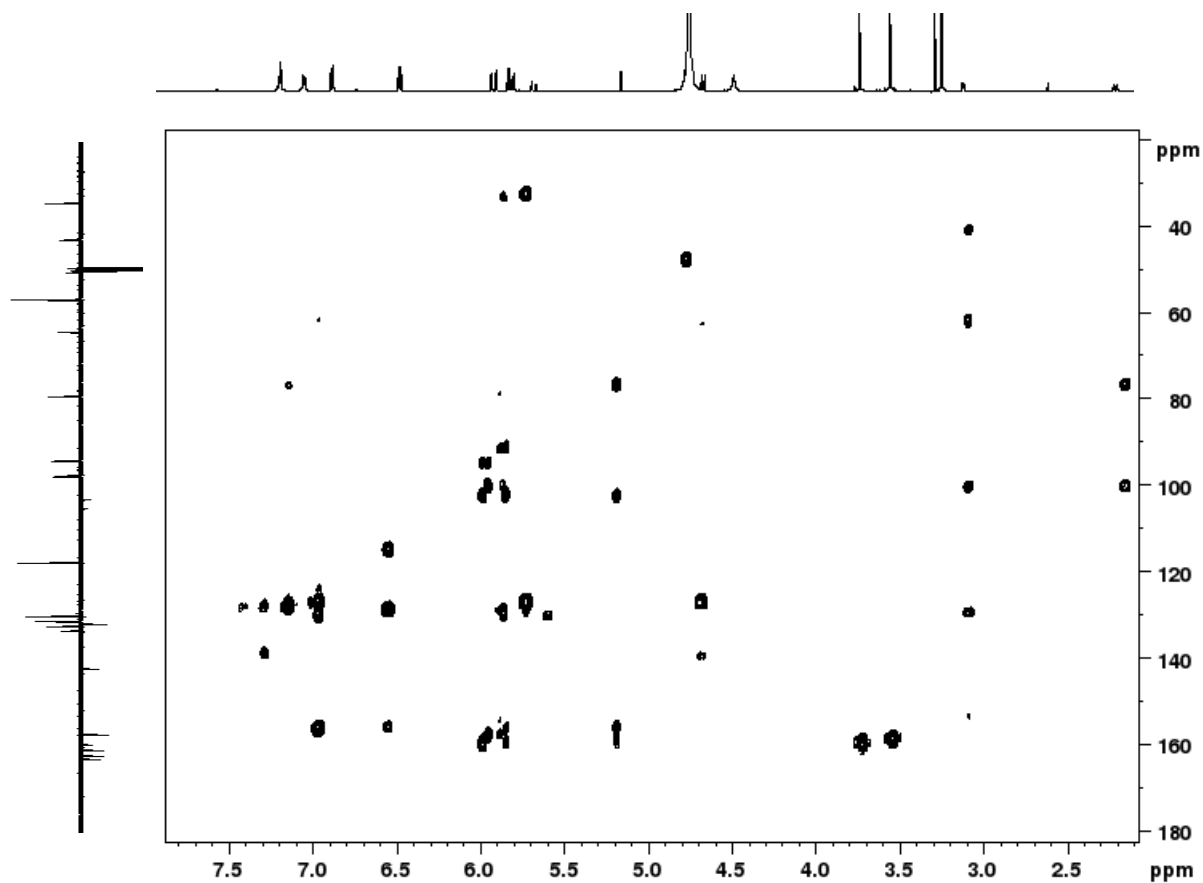
APÊNDICE 24 – Espectro de RMN- ^1H da brachydina-A.



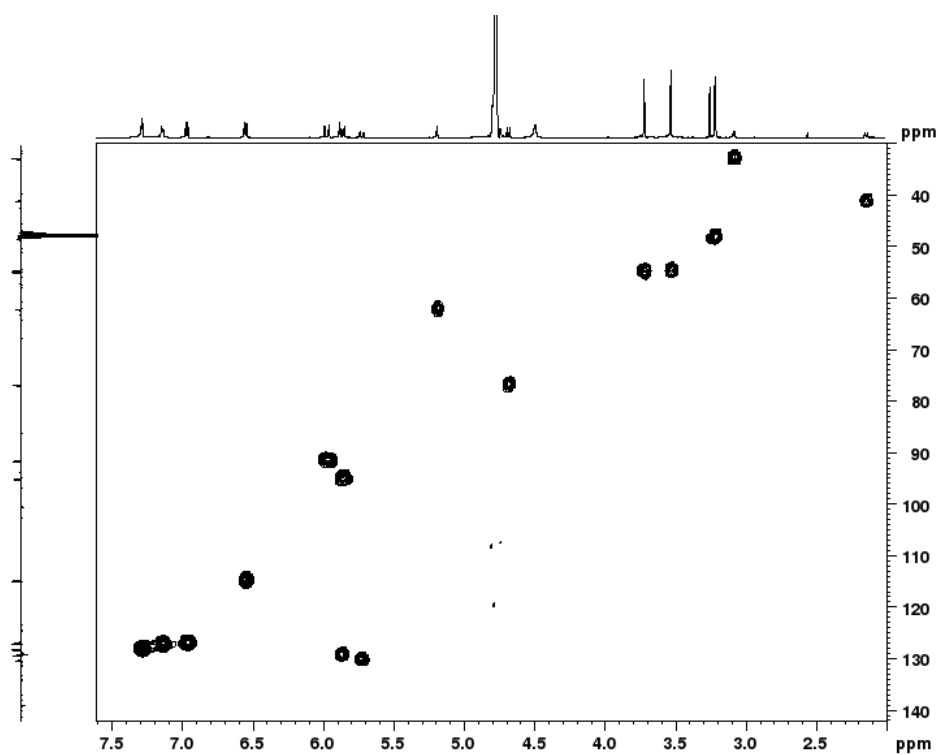
APÊNDICE 25 – Espectro DEPTQ da Brachydina A (CD₃OD; 150 MHz)



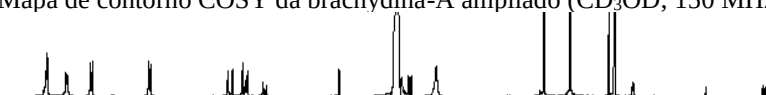
APÊNDICE 26 – Mapa de contorno HMBC da brachydina-A ampliado (CD₃OD; 150 MHz)

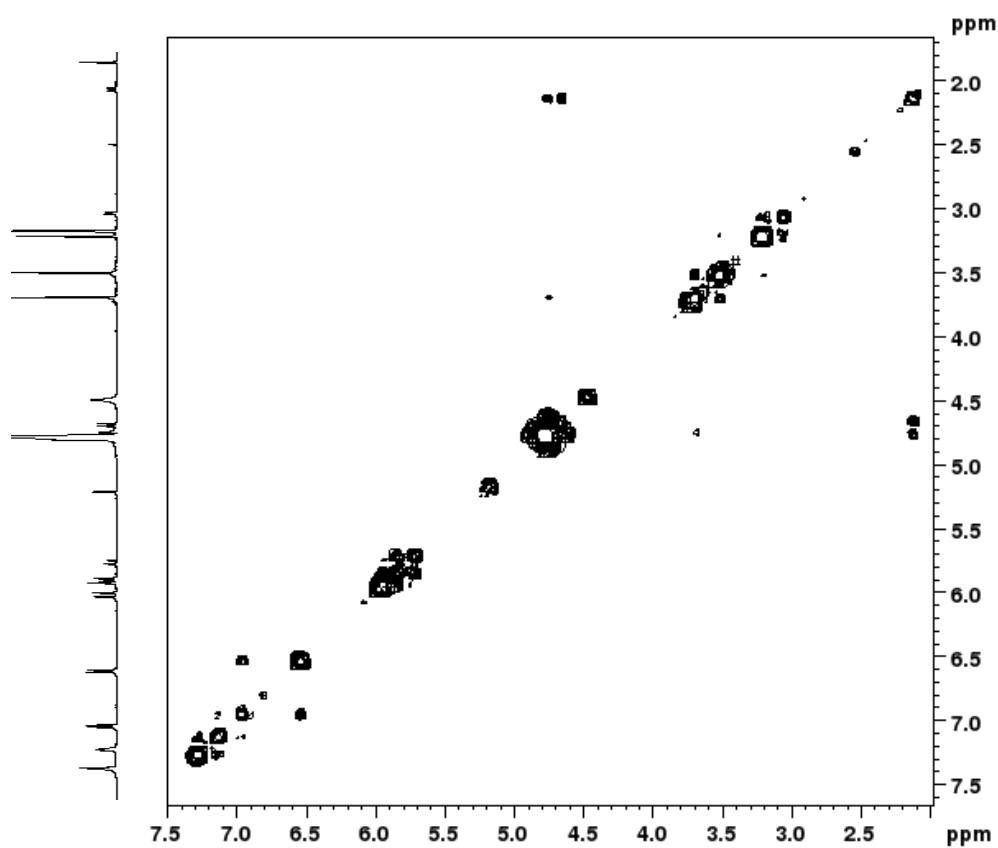


APÊNDICE 27 – Mapa de contorno HSQC da brachydina-A ampliado (CD₃OD; 150 MHz)

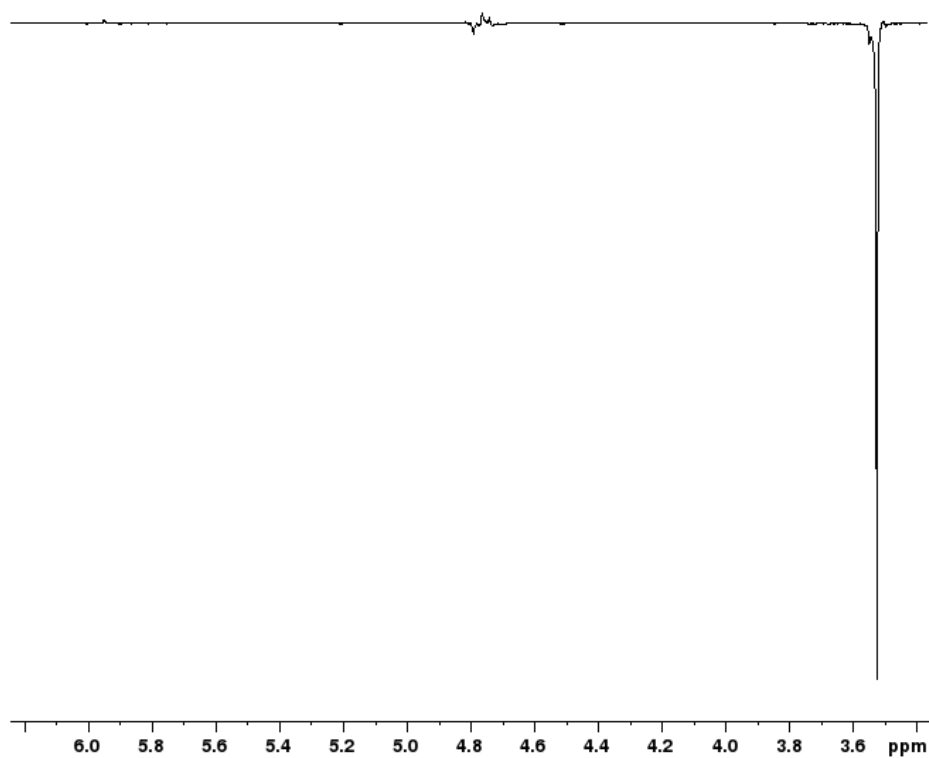


APÊNDICE 28 – Mapa de contorno COSY da brachydina-A ampliado (CD₃OD; 150 MHz)

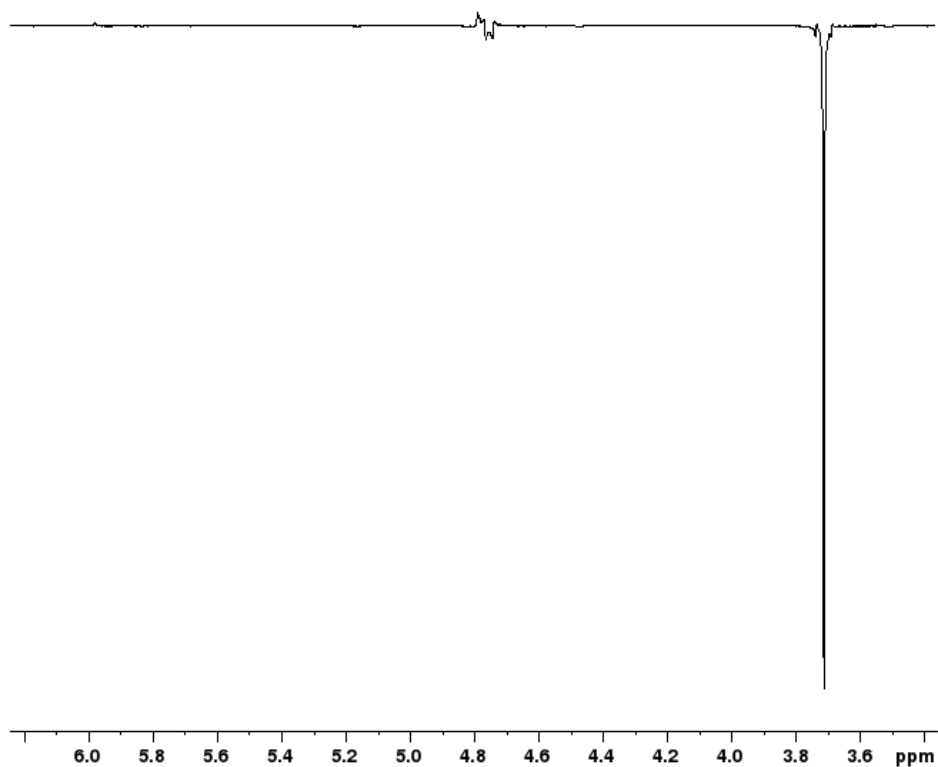




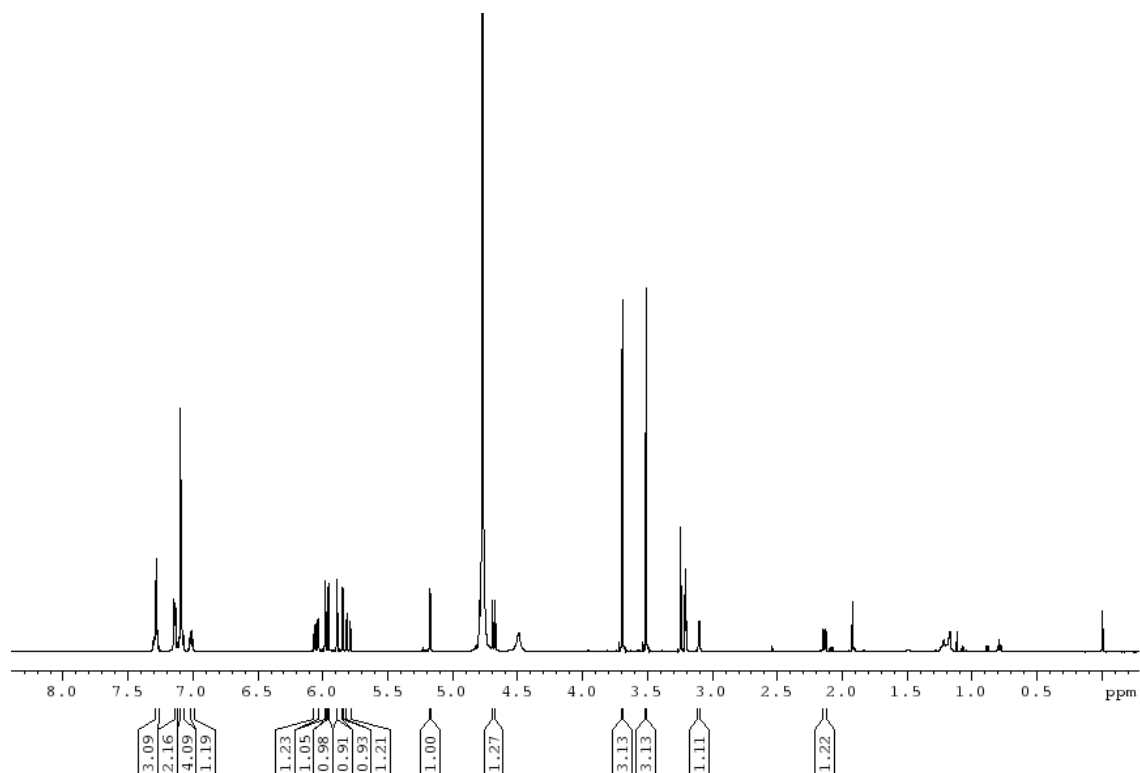
APÊNDICE 30 –Espectro NOESY-1D da brachydina-A irradiado em 3.52 ppm.



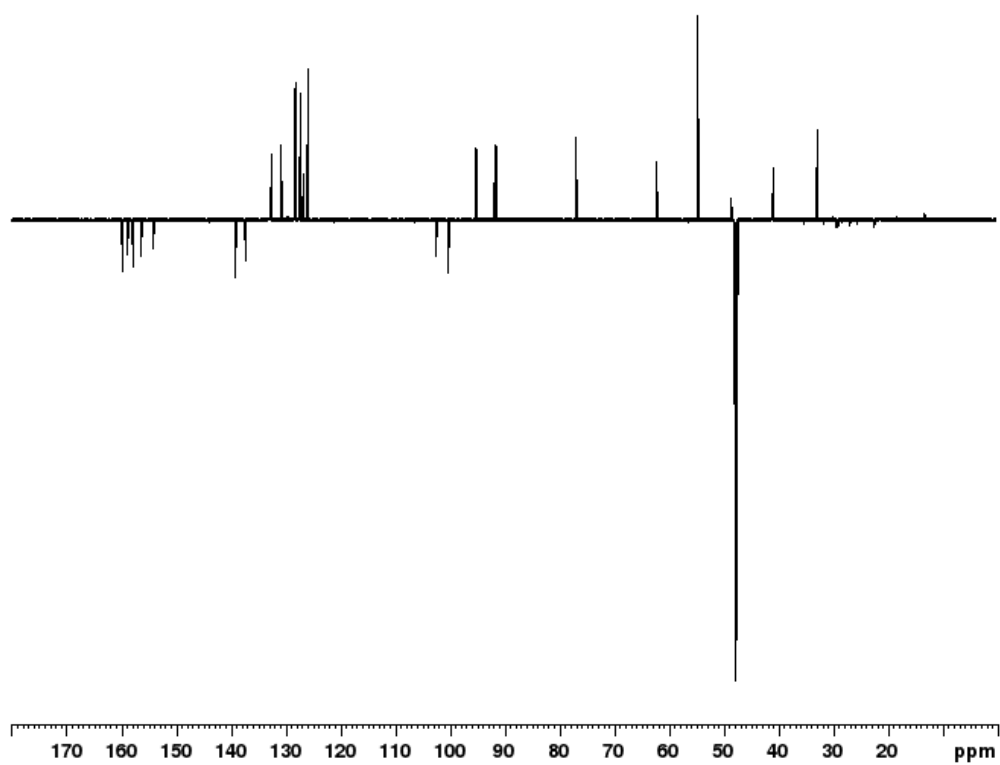
APÊNDICE 31 – Espectro NOESY-1D da brachydina-A irradiado em 3.72 ppm



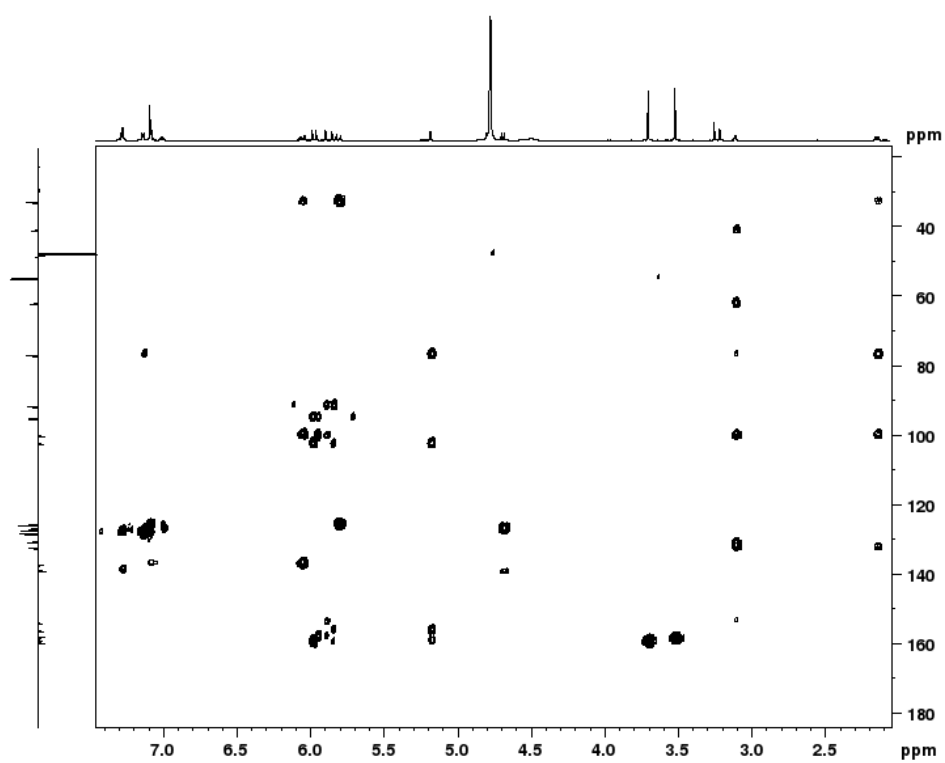
APÊNDICE 32 – Espectro de RMN-¹H da brachydina-C.



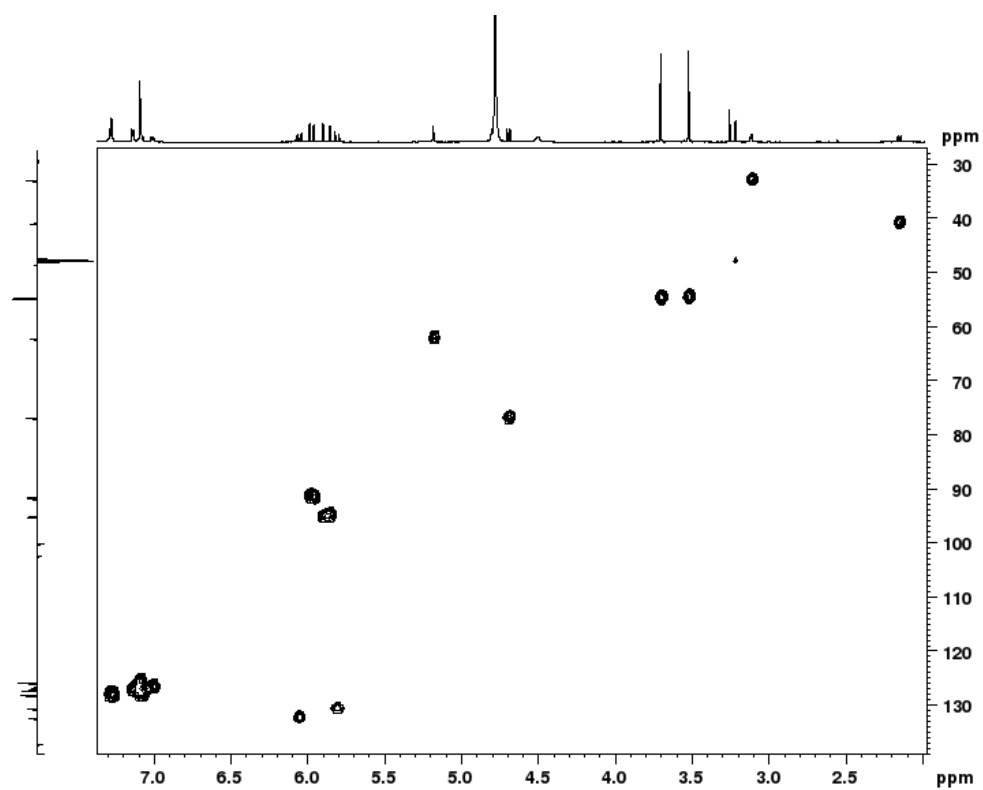
APÊNDICE 33 – Espectro DEPTQ da Brachydina C (CD₃OD; 150 MHz)



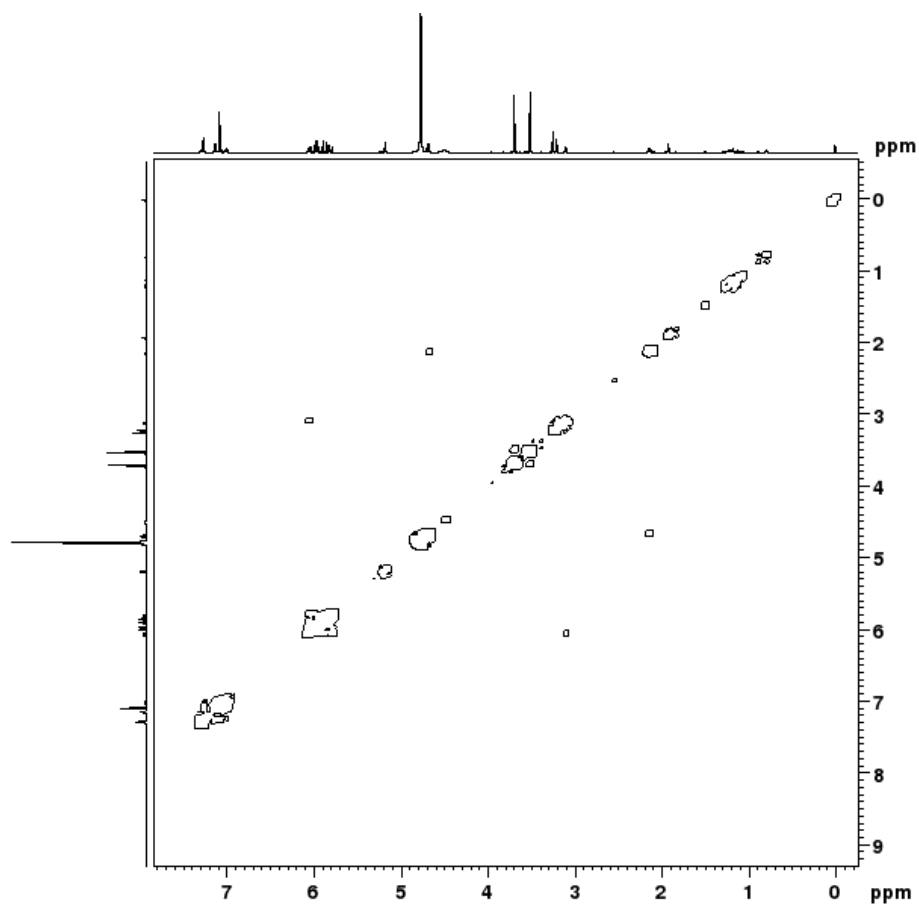
APÊNDICE 34 – Mapa de contorno HMBC da brachydina-C ampliado (CD_3OD ; 150 MHz)



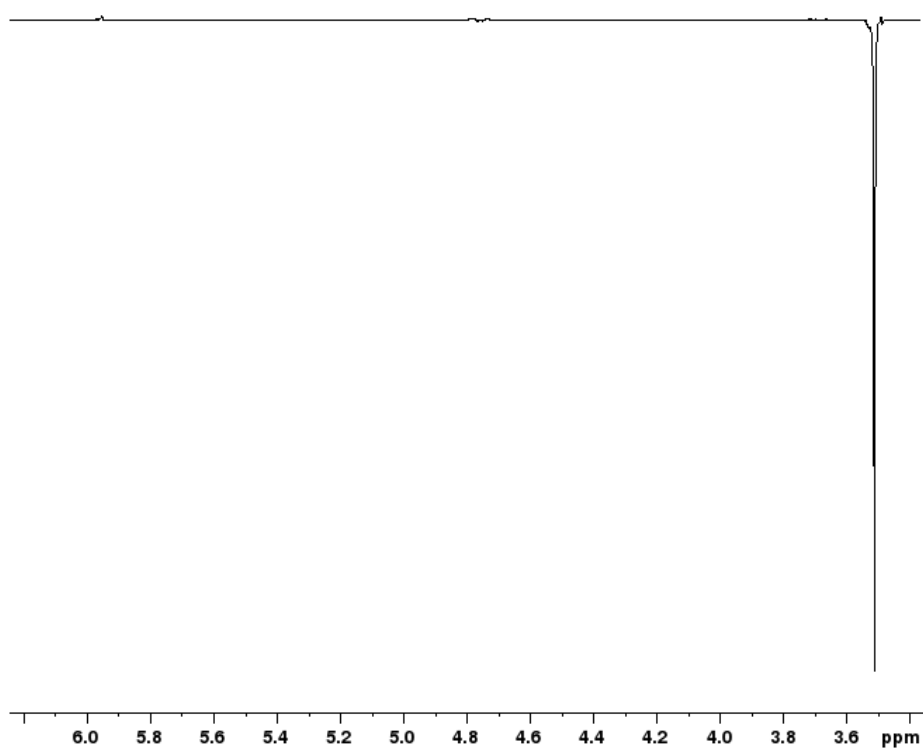
APÊNDICE 35 – Mapa de contorno HSQC da brachydina-C ampliado (CD₃OD; 150 MHz)



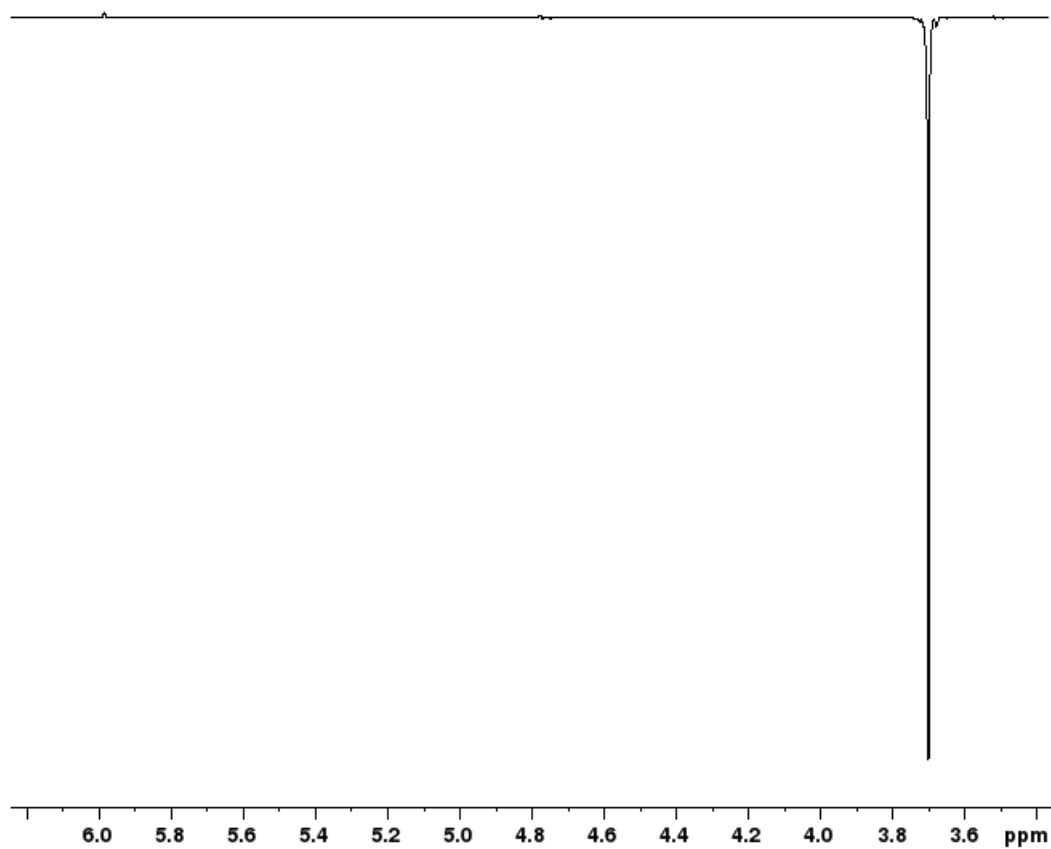
APÊNDICE 36 – Mapa de contorno COSY da brachydina-C ampliado (CD₃OD; 150 MHz)



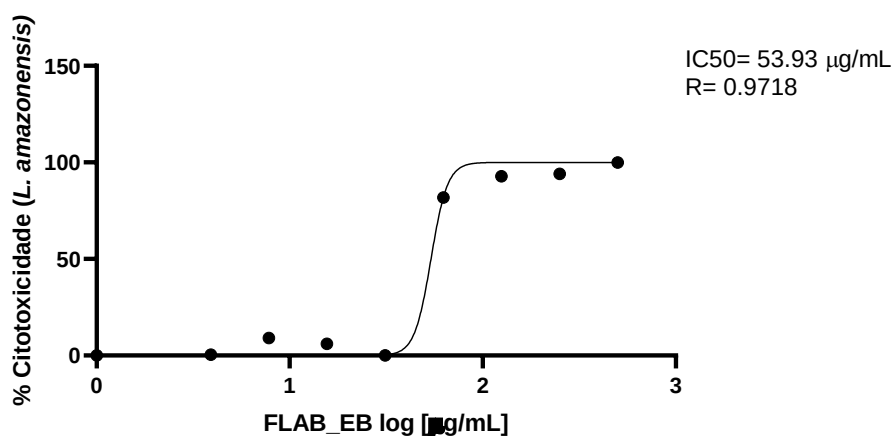
APÊNDICE 37 – Espectro NOESY-1D da brachydina-C irradiado em 3.51 ppm



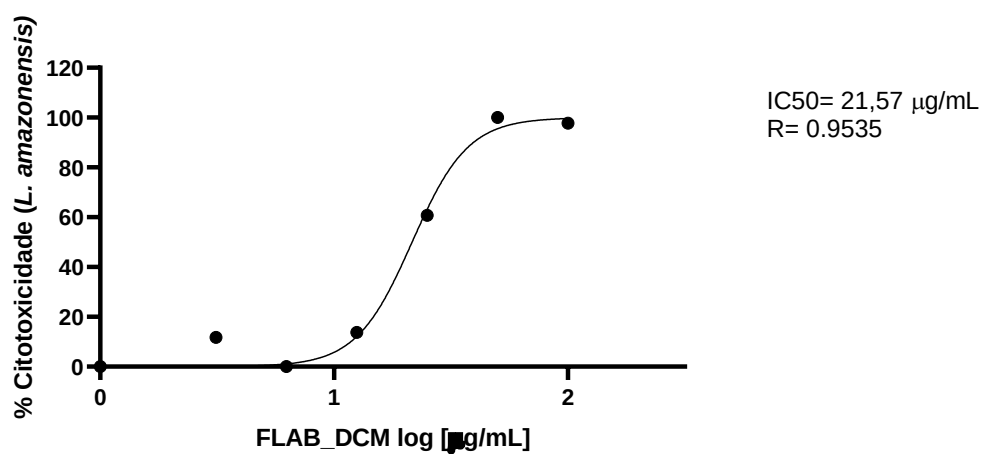
APÊNDICE 38 – Espectro NOESY-1D da brachydina-C irradiado em 3.69 ppm



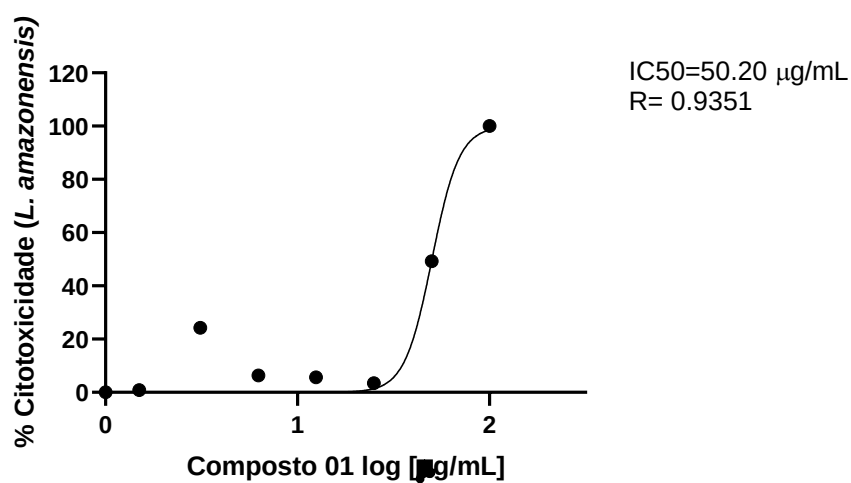
Apêndice 39- Curva concentração-resposta para obtenção do CI_{50} do extrato bruto.



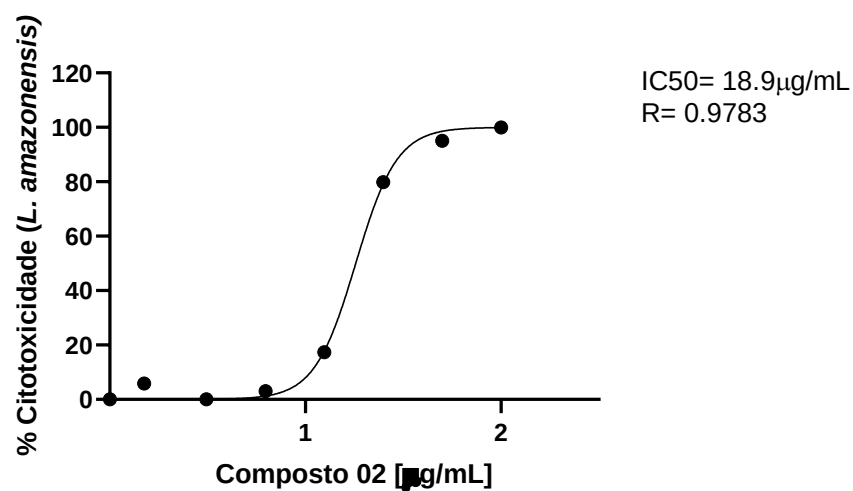
Apêndice 40 - Curva concentração-resposta para obtenção do CI_{50} da fração diclorometânica.



Apêndice 41 - Curva concentração-resposta para obtenção do CI_{50} da apigenina.



Apêndice 42 - Curva concentração-resposta para obtenção do CI_{50} da 5-metóxi-crisina.



Apêndice 43 - Curva concentração-resposta para obtenção do CI_{50} da brachydina-C.

