



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

Dissertação de Mestrado

**CORRELAÇÃO ENTRE POTENCIAL ELETROQUÍMICO E ATIVIDADE
LEISHMANICIDA DE COMPOSTOS RAROS ISOLADOS DE *Fridericia platyphylla*
(Cham.) L. G. LOHMANN**

Jessyane Rodrigues do Nascimento

São Luís-MA-Brasil

2019

JESSYANE RODRIGUES DO NASCIMENTO

**CORRELAÇÃO ENTRE POTENCIAL ELETROQUÍMICO E ATIVIDADE
LEISHMANICIDA DE COMPOSTOS RAROS ISOLADOS DE *Fridericia platyphylla*
(Cham.) L. G. LOHMANN**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Maranhão, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientadora: Dr^a Cláudia Quintino da Rocha

São Luís-MA-Brasil

2019

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

Nascimento, Jessyane Rodrigues do.

Correlação entre Potencial Eletroquímico e Atividade leishmanicida de Compostos Raros Isolados de *Fridericia platyphylla* Cham. L. G. LOHMANN / Jessyane Rodrigues do Nascimento. - 2019.

72 f.

Orientador(a): Cláudia Quintino da Rocha.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Química/ccet, Universidade Federal do Maranhão, Universidade Federal do Maranhão, 2019.

1. Braquidinas. 2. *Fridericia platyphylla*. 3. Leishmaniose. 4. Potencial de Oxidação. I. Quintino da Rocha, Cláudia. II. Título.

JESSYANE RODRIGUES DO NASCIMENTO

**CORRELAÇÃO ENTRE POTENCIAL ELETROQUÍMICO E ATIVIDADE
LEISHMANICIDA DE COMPOSTOS RAROS ISOLADOS DE *Fridericia platyphylla*
(Cham.) L. G. LOHMANN**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Maranhão, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Aprovada em 19/02/2019

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Cláudia Quintino da Rocha (Orientadora-UFMA)
Universidade Federal do Maranhão-UFMA

Prof. Dr. Roberto Batista de Lima (UFMA)
Universidade Federal do Maranhão-UFMA

Prof^ª Dr^ª Kiany Sirley Brandão Cavalcante (IFMA)
Instituto Federal DE Educação, Ciência e Tecnologia do Maranhão-IFMA

SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Nome: Jessyane Rodrigues do Nascimento

Naturalidade: Bacabal/MA

Nacionalidade: Brasileira

FORMAÇÃO ACADÊMICA

Graduação (2012-2016)

Licenciatura em Química – Instituto Federal de Educação, Ciências e Tecnologia do Maranhão - IFMA Campus Bacabal

Pós-Graduação: Mestrado em andamento (2017-2019)

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

Título do Projeto: “CORRELAÇÃO ENTRE POTENCIAL ELETROQUÍMICO E ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE COMPOSTOS RAROS ISOLADOS DE *Fridericia platyphylla* (Cham.) L. G. LOHMANN”.

TRABALHOS CIENTÍFICOS (2017-2018)

Resumos em congressos

NASCIMENTO, J. R.; ROCHA, C. Q.; RODRIGUES, C. D. P.; VIEIRA, F. C. ATIVIDADE LEISHMANICIDA EM MODELOS IN VITRO DE SUBSTÂNCIAS RARAS ISOLADAS *Fridericia platyphylla* (SIN. *Arrabidaea brachypoda*). V Congresso Maranhense de História da Medicina e XXV Jornada de Parasitologia e Medicina Tropical do Maranhão, 2017.

RODRIGUES, C. D. P.; NASCIMENTO, J. R.; SANTOS, A. L. P. A.; MARTINS, L. J. A.; ROCHA, C. Q. Isolamento de substâncias raras de *Arrabidaea brachypoda* e seu potencial para o tratamento de chagas. V Congresso Maranhense de História da Medicina e XXV Jornada de Parasitologia e Medicina Tropical do Maranhão, 2017.

DIAS, P.; **NASCIMENTO, J.**; FEITOSA, A.; TANGERINA, M.; VILEGAS, W.; FRANCO, Y.; LONGATO, G.; ROCHA, C. Avaliação da atividade antitumoral *in vitro* do extrato hidroetanólico da *Fridericia platyphylla* (SIN. *Arrabidaea brachypoda*). 58° CONGRESSO BRASILEIRA DE QUÍMICA, 2018.

SANTOS, A. L. P. A.; VASCONCELOS, L. N.; RESENDE, F. A.; **NASCIMENTO, J. R.**; ROCHA, C. Q.; RODRIGUES, C. D. P.; VIEIRA, F. C.; FILHO, J. L. O.; SEREJO, R. S. FERNANDES, Y. M. L. Avaliação da mutagenicidade e da estrogénicidade de extrato, fração e substâncias obtidas das flores da *Arrabidaea brachypoda*. 58° CONGRESSO BRASILEIRA DE QUÍMICA, 2018.

Artigos submetidos:

DIAS, P. H.; **NASCIMENTO, J. R.**; TANGERINA, M. M. P.; VILEGAS, W.; FRANCO, Y. E. M.; LONGATO, G. B.; ROCHA, C. Q. Simultaneous quantification of dimeric flavonoids in *Arrabidaea brachypoda* by Ultra Performance Liquid Chromatography coupled with Triple Quadrupole Mass Spectrometry (UPLC-MS) and *in vitro* Antiproliferative Evaluation. Natural Products Communications.

Mariana B. Serra, Wermerson A. Barroso, Cláudia Q. Rocha, Pablo G. R. Furtado, Antônio C. R. Borges, Selma N. Silva, Marcelo M. P. Tangerina, **Jessyane Rodrigues do Nascimento**, Wagner Vilegas, Denise F. Barbeiro, Heraldo P. Sousa, Iracelle C. Abreu, Marilene Oliveira da R. Borges. Wound healing activity of *Jacaranda decurrens* Cham. through modulation of inflammation and tissue repair genes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*.

Artigos em Redação:

Nascimento, J. R.; Vieira, F. C.; Rodrigues, C. D. P.; Santos, A. L. P. A.; Vasconcelos, L. N.; Martins, L. J. A.; Cunha, I. R. D.; Tangerina, M. M. P.; Rocha, C. Q. CHEMICAL, BIOLOGICAL AND PHARMACOLOGICAL ASPECTS OF THE *Arrabidaea* GENUS.

Nascimento, J. R.; Ribeiro, G. A. C.; Tanaka, A. A.; Silva, I. S.; Rocha, C. Q. Voltammetric analysis of unusual dimeric flavonoids from *Fridericia platyphylla*: Relationship whit the anti Anti-Trypanosoma cruzi and antileishmanial.

Premiações

2° Lugar como Melhor apresentação oral na categoria Parasitologia e Medicina Tropical do Maranhão, V Congresso Maranhense de História da Medicina e XXV Jornada de Parasitologia e Medicina Tropical do Maranhão, 2017.

1° Lugar como Melhor apresentação na categoria pôster no I Congresso Maranhense de Análises Clínicas (I COMAC), 2019.

Aos meus pais, Ana Cleide e Francisco, e aos meus irmãos Jéssica, Gecyene e Isac. Sem vocês, nada disso seria possível.

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo imenso amor, graça, força, e iluminação sem os quais nada seria realizado, ao seu refugio constante em quem tenho buscado abrigo nos momentos difíceis.

À minha família pelo apoio e incentivo, por sempre acreditarem e confiarem em mim.

À minha orientadora Dr^a Claudia Quintino da Rocha pelo carinho, amizade, paciência, e por ter compartilhado seus conhecimentos. Por ser uma pessoa maravilhosa, um exemplo de profissional.

Aos colaboradores Dr. Iranaldo Santos da Silva, Roberto Batista Lima e Auro Atsushi Tanaka. A Msc. Geysel Adriana Corrêa Ribeiro, pela paciência e amizade, por ter me ensinado e auxiliado nos teste eletroquímicos.

Ao Laboratório de Estudos Avançados em Fitomedicamentos, aos alunos de Iniciação Científica: Carla Danielle Pinheiro Rodrigues, Rafaela Serejo, Luna Vasconcelos, Ana Lurdes Portela de Araujo dos Santos, Felipe Costa Vieira, José Lima Pereira Filho, Lenivaldo Araujo Martins, Ícaro Rodrigues Dutra Cunha e Alana Feitosa pela amizade e momentos felizes que passamos juntos nesses dois anos.

Ao meu Orientador da Graduação Dr. Maron Stanley Silva Oliveira Gomes, por ter si tornado um amigo, sendo um dos maiores incentivadores para a concretização desse sonho.

Aos meus amigos da cidade de Bacabal em especial a Joélia Sousa de Melo e Eunice pela colaboração, a Sr^a Antonia Conceição, Maria José da Silva Pires, Rone Silva Pires, Ir. Conceição e Socorrinha pelas orações.

Aos amigos Gerlandy Leão, Eronita Leão e Lorivaldo Leão por terem me acolhido muito bem em sua casas. Aos colegas de Mestrado pela maravilhosa convivência e apoio, em especial a Nayane Kedna.

À FIOCRUZ (Salvador-BA).

A CAPES pela Bolsa e à FAPEMA pelos demais fomentos.

RESUMO

A leishmaniose é uma infecção protozoária responsável por mortalidades em diversos países. É uma doença negligenciada por atingir principalmente a população de baixa renda nos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento. Atualmente o tratamento é realizado com a anfotericina B e os antimoniais pentavalentes, entretanto estes apresentam alta toxicidade, baixa eficácia e alto custo que dificultam o tratamento. Assim, existe uma forte necessidade de tratamentos mais seguros e eficazes contra a leishmaniose. Nessa perspectiva o presente estudo avaliou o potencial leishmanicida *in vitro* e *in vivo* de flavonoides raros isolados da fase diclorometânica das raízes da *Fridericia platyphylla*. As substâncias isoladas foram denominadas de braquidinas-1, 2 e 3 e identificadas por UV, RMN e HPLC-PDA-ESI-IT/MS. Os resultados dos testes biológicos indicaram que as braquidinas-2 e 3 foram ativas para as formas amastigotas e promastigotas do parasita, sendo que a braquidina-2 mostrou-se mais potente para a forma amastigota (IC₅₀ 2.20 µM). Além disso as braquidinas 2 e 3 demonstraram baixa citotoxicidade CL₅₀ de 15,6 e 17,3 µM quando comparada com o grupo controle violeta de genciana LC₅₀ 0,48 µM. Realizou-se também um estudo eletroquímico das braquidinas, afim de correlacionar a capacidade leishmanicida com o potencial eletroquímico, tendo em vista que as propriedades fisico-químicas dos candidatos a fármacos desempenham papel importante no desenvolvimento e viabilidade destes. As técnicas voltamétricas, de pulso diferencial e cíclica, foram utilizadas para determinar os potenciais redox das braquidinas-1, 2 e 3, sendo estes 0,39 V, 0,60 V e 0,57 V respectivamente. Verificou-se a influência do pH e observou-se que pHs mais alcalinos facilitam a oxidação das braquidinas e que o processo eletródico de transporte das moléculas do analito até a superfície do eletrodo é controlado por difusão. Foi possível perceber uma relação direta entre os potenciais de oxidação e atividade leishmanicida das braquidinas, acredita-se que as substâncias que apresentam potenciais de oxidação mais positivos favorecem a atividade leishmanicida, uma vez que potenciais de oxidação menos positivos levam a oxidação mais fácil dos compostos, e como resultado desse processo pode ocasionar a biotransformação da substância, diminuindo sua atividade ou até mesmo inativá-las.

Palavras-chave: Leishmaniose. *Fridericia platyphylla*. Braquidinas. Potencial de Oxidação.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a protozoan infection responsible for mortality in several countries. It is a disease neglected because it reaches mainly the low-income population in underdeveloped and developing countries. Currently the treatment is carried out with amphotericin B and pentavalent antimonials, however these have high toxicity, low efficacy and high cost that make treatment difficult. Thus, there is a strong need for safer and more effective treatments against leishmaniasis. In this perspective the present study evaluated the leishmanicidal potential in vitro and in vivo of rare flavonoids isolated from the dichloromeric phase of the roots of *Fridericia platyphylla*. The isolated substances were named brachydins 1, 2 and 3 and identified by UV, NMR and HPLC-PDA-ESI-IT/MS. The results of the biological tests indicated that brachydins-2 and 3 were active for the amastigote and promastigote forms of the parasite, and brachyidin-2 was shown to be more potent for the amastigote form (IC₅₀ 2.20 μ M). In addition brachidines 2 and 3 demonstrated low LC₅₀ cytotoxicity of 15.6 and 17.3 μ M as compared to the violet control group of gentian LC₅₀ 0.48 μ M. An electrochemical study of brachyidin was carried out in order to correlate the leishmanicidal capacity with the electrochemical potential, considering that the physicochemical properties of drug candidates play an important role in the development and viability of these drugs. The differential pulse and cyclic pulse techniques were used to determine the redox potencies of brachidines-1, 2 and 3, being 0.39 V, 0.60 V and 0.57 V respectively. The pH influence was verified and it was observed that more alkaline pHs facilitate the oxidation of the brachidines and that the electrotransport process of the analyte molecules to the surface of the electrode is controlled by diffusion. It was possible to observe a direct relationship between the oxidation potencies and the leishmanicidal activity of the brachydins, it is believed that the substances that present more positive oxidation potentials favor the leishmanicidal activity, since less positive oxidation potentials lead to the easier oxidation of the compounds, and as a result of this process can cause the biotransformation of the substance, reducing its activity or even.

Key-words: Leishmania. *Fridericia platyphylla*. Brachydins. Potential Oxidation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura da Anfotericina B.....	19
Figura 2- Substâncias isoladas de plantas do cerrado com potencial biofarmacológico.....	21
Figura 3- <i>Fridericia platyphylla</i> (Cham.) L. G. Lohmann.....	22
Figura 4- Estrutura da quercetina.....	24
Figura 5- Sistema de detecção potenciostato/galvanostato utilizado para as medidas eletroquímicas .	29
Figura 6- Perfil cromatográfico da fase DCM (254 nm).....	30
Figura 7- Espectro de massa de fragmentação da braquidina 1	31
Figura 8- Espectro de massa de fragmentação da braquidina 2	32
Figura 9- Espectro de massa de fragmentação da braquidina 3	32
Figura 10- Biogênese das braquidinas	33
Figura 11- Efeito das braquidinas-2 e 3 contra amastigotas de <i>L. amazonensis</i> . (A) Porcentagem de células infectadas foi avaliada pela contagem de 100 células como número de parasitas. (B) Valor de p medido pelo teste T não pareado comparado ao grupo controle.	40
Figura 14- Voltamogramas cíclicos do eletrodo de carbono vítreo em solução tampão Britton Robinson (0,04 mol L ⁻¹) contendo BRA 1(A), BRA 2 (B) e BRA 3 (C) (0,3 mmol L ⁻¹) para diferentes velocidades de varredura de 20 a 100 mV s ⁻¹ , Ei = -0,1 V; Ef = 1,1 V no pH 10. Relação entre a corrente pico anódica (Ipa) em função da raiz quadrada das velocidades de varreduras de 20 a 100 mV S ⁻¹	43
Figura 15-Voltamogramas de pulso diferencial (correção de linha de base) obtidos com o eletrodo de carbono vítreo em solução tampão Britton Robinson (0,04 mol L ⁻¹) contendo Bra 1(A), Bra 2 (C) Bra 3 (E) (0,3 mmol L ⁻¹) em diferentes pHs (2, 4, 6, 7, 8, 10 e 12). Ei = 0 V; Ef = 1,1 V e velocidade de varredura = 50 mV s ⁻¹ ; Gráfico do Ep (●), Ip (●) do pico vs. pH (B) Bra 1, (D) Bra 2 e (F) Bra 3.....	46
Figura 16- Esquema de oxidação das braquidinas.	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz, CDOD em ppm) das braquidinas e dependensin.....	35
Tabela 2- IC_{50} (μM) das braquidinas contra <i>Leishmania amazonensis</i>	38
Tabela 3- Relação em potenciais anódicos das braquidinas e atividade leishmanicida.	49

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CCD – Cromatografia de camada delgada

ESI – Fonte de ionização eletrospray

EtOH – Etanol

HPLC-UV/VIS – Cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultravioleta e visível

IC₅₀ – Concentração inibitória 50%

IC₉₀ – Concentração inibitória 90%

K₄[Fe(CN)₆] – Ferrocianeto de potássio

m/z – relação massa/carga

MeOH – Metanol

MS² – Segunda fragmentação

MTT – Brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil tetrazólio

PBS – solução tampão fosfato

RAB AQ – Fase aquosa do extrato bruto

RAB DCM – Fase diclorometânica do extrato bruto

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

RMN de ¹³C - Ressonância Magnética Nuclear de ¹³C

RMN de ¹H – Ressonância Magnética Nuclear de ¹H

UV – Ultravioleta

δ – Deslocamento químico

Sumário

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVO.....	17
2.1	Objetivo Geral.....	17
2.2	Objetivos Específicos.....	17
3	REVISÃO DA LITERATURA.....	18
3.1	Leishmanioses	18
3.2	Tratamento	18
3.3	Cerrado.....	20
3.3.1	<i>Fridericia platyphylla</i> (Família Bignoniaceae).....	22
3.4	Potencial eletroquímico de compostos fenólicos	23
4	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	25
4.1	Procedimento Fitoquímicos.....	25
4.1.1	Coleta e preparo do extrato	25
4.1.2	Partição Líquido/Líquido	25
4.1.3	Fracionamento da fase diclorometânica	25
4.1.4	Identificação das substâncias.....	26
4.2	Atividade Antileishmanial <i>in vitro</i>	27
4.2.1	Ensaio <i>in vitro</i> : citotoxicidade pelo método de redução do MTT.....	27
4.2.2	Citotoxicidade para células de mamíferos.....	28
4.3	Estudos Eletroquímicos.....	28
4.3.1	Preparo das amostras	28
4.3.2	Medidas eletroquímicas.....	28
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.1	Identificação das substâncias isoladas da fase DCM do extrato EtOH 70% das raízes de <i>Fridericia platyphylla</i>	30
5.2	Atividade leishmanicida das braquidinas em ensaios <i>in vitro</i> contra formas Promastigotas e Amastigotas da <i>L. amazonensis</i>	37
5.3	Estudo eletroquímico e Relação estrutura Atividade (SAR).....	40
5.3.1	Estudo voltamétrico das braquidinas.....	40
5.3.2	Estudo dos processos oxidativos do par $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6^{4-}$ por voltametria cíclica sobre eletrodo de carbono vítreo	42
5.3.3	Influência da velocidade de varredura.....	43
5.3.4	Influência do pH.....	45

6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	50
	PERSPECTIVA DE TRABALHOS FUTUROS	51
	REFERÊNCIAS	51

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose humana é uma doença transmitida por vetores, causada por mais de 20 espécies de *Leishmania* em 98 países nos cinco continentes (ALVAR, 2012). É considerada como doença negligenciada por atingir principalmente a população de baixa renda nos países em desenvolvimento, com poucos investimentos em pesquisa e tecnologia para avançar no controle, na prevenção e tratamento (SANTOS, 2017).

O Brasil é o primeiro dos 12 países da América Latina com maior número de casos de leishmaniose tegumentar se destacando, principalmente, na forma cutânea com cerca de 20% evoluindo na forma mucosa (BRASIL, 2015). A busca por novos fármacos para o tratamento da leishmaniose é cada vez maior em virtude da toxicidade dos existentes e do aumento da resistência do parasita, o que representa uma ameaça ao controle da doença (MENEGUETTI, 2015).

Mesmo com a elevada incidência no Brasil e no mundo, poucas são as alternativas para o seu tratamento e os agentes terapêuticos atualmente disponíveis são pouco eficientes. Fica, portanto, evidente a necessidade urgente de novos candidatos a fármacos para o tratamento desta enfermidade (SANTOS et al., 2013). Ainda hoje a primeira escolha para o tratamento de leishmaniose tem sido o antimônio pentavalente (Sb^{5+}), sendo também utilizados amidinas, aminoglicosídeos e hexadecilfosfocolina (miltefosina), porém, alguns desses apresentam alta toxicidade para o paciente (FIGUEREDO et al., 2014).

A alta incidência da leishmaniose aliada às inúmeras limitações do tratamento tais como: efeitos tóxicos, baixa eficácia, alto custo, difícil administração, tempo prolongado do tratamento e resistência parasitária são os principais motivos que dificultam seu tratamento (BÔAS, 2013). Diante desse cenário, tornam-se necessários estudos que visam o isolamento de compostos ativos mais eficientes e menos tóxicos, para não fragilizar e acometer os pacientes que por vezes interrompem o tratamento em decorrência desses efeitos.

As plantas são uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais derivam diversos fármacos comercializados no mundo inteiro. O estudo químico e farmacológico das plantas medicinais possibilitou a obtenção de novos compostos com propriedades relevantes, como o taxol (anticancerígeno), a artemisinina (antimalárico), a morfina (analgésico), a emetina (antiprotozoário), a galangina (antibacteriano), e a colchichina (anti-inflamatório) (NEWMAN e CRAGG, 2012).

O Brasil possui a maior diversidade vegetal do planeta, contando com aproximadamente 55 mil espécies de plantas, distribuídas nos diferentes tipos de biomas: Floresta Amazônica, Cerrado, Mata Atlântica, Pantanal, Caatinga e Manguezal (ALBERNAZ, 2010; VIEIRA et al., 2010). Dentre as várias plantas brasileiras com potencial farmacológico, encontra-se *Fridericia platyphylla* cuja sinonímia *Arrabidaea brachypoda*, uma importante representante da família Bignoniaceae, com 56 gêneros e cerca de 340 espécies. Esta família apresenta diversas atividades como adstringentes, antitérmicos, antivirais, citotóxicos, anti-inflamatórios, antibacterianos, antifúngicos, antiparasitários, antimaláricos, antirreumáticos e anticarcinogênico (BRANDÃO et al., 2010).

Estudos realizados por ROCHA e colaboradores (2011) demonstraram que os extratos das raízes da *Fridericia platyphylla* possuem atividade analgésica efetiva e uma pronunciada atividade anti-inflamatória em modelos animais *in vivo*. Em 2015, Rocha confirmou a ação anti-inflamatória do extrato da raiz e evidenciou a presença triterpenos na espécie. No ano seguinte ROCHA (2016) apresentou os efeitos gastroprotetores do extrato da raiz da *Fridericia platyphylla* através de evidências da citoproteção ao mostrar uma série de compostos flavonoides diméricos incomuns responsáveis pelo efeito anti-úlceras registrados *in vivo*.

Estudos ainda realizados por ROCHA et al (2012) indicaram que o extrato hidroetanólico das raízes de *Fridericia platyphylla* apresentaram atividade leishmanicida *in vitro*. Com base na evidência de que a espécie é um arbusto o que lhe confere a possibilidade de cultivo e que esta apresenta grande potencial para o desenvolvimento de um novo fármaco para o tratamento alternativo da leishmaniose, o presente estudo realizou a avaliação leishmanicida e o comportamento eletroquímicos de substâncias majoritárias de esqueletos raros obtidos do extrato das raízes de *Fridericia platyphylla*, visando estabelecer uma correlação entre os resultados obtidos.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial leishmanicida de flavonoides incomuns isolados das raízes de *Fridericia platyphylla* e investigar o comportamento eletroquímico destes flavonoides por métodos eletroquímicos e correlacioná-los com o potencial farmacológico.

2.2 Objetivos Específicos

- Isolar 3 (três) flavonoides diméricos majoritários do extrato hidroetanólico de raízes de *Fridericia platyphylla*;
- Avaliar a capacidade desses compostos em inibir a invasão e multiplicação de promastigotas e amastigotas de *Leishmania* em macrófagos *in vitro* e *in vivo*;
- Avaliar a atividade citotóxica dos compostos nas formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*;
- Realizar estudos eletroquímicos dos 3 (três) flavonoides diméricos e sua correlação com a atividade farmacológica proposta.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Leishmanioses

As leishmanioses representam um complexo de doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania* com importante espectro clínico e diversidade epidemiológica, sendo uma das causas significativas de morbidade e mortalidade em 22 países do Novo Mundo e 66 países do Velho Mundo (ASSCHE et al., 2011).

De acordo com as manifestações clínicas, as leishmanioses podem ser classificadas em dois grandes grupos: tegumentar e visceral. A leishmaniose tegumentar, a forma mais comum, pode ainda ser subdividida em leishmaniose cutânea, mucocutânea e difusa, com manifestações clínicas variando desde pequenos nódulos a uma extensa destruição dos tecidos na pele. Já a leishmaniose visceral é considerada a forma mais severa, na qual os parasitos migram para diversos órgãos vitais causando febre prolongada, esplenomegalia, hipergamaglobulinemia e pancitopenia. Em poucos meses, os pacientes tornam-se gradualmente doentes e, se não tratados, vão a óbito (TIUMAN et al, 2011). Essa doença causa considerável morbidade e graves lesões nas pessoas afetadas.

A leishmaniose é uma doença causada pelos protozoários da espécie *Leishmania amazonensis*, transmitida pela picada do mosquito fêmea da espécie flebotomíneos. Durante o repasto sanguíneo, flebotomíneos infectados injetam as promastigotas no hospedeiro humano, que então são fagocitadas por macrófagos e transformadas em amastigotas (MITROPOULOS et al., 2010).

Estes se multiplicam nas células infectadas e afetam diferentes tecidos e, dependendo da espécie de *Leishmania*, causam a manifestação clínica correspondente da doença. Os vetores da *Leishmania* Tegumentar Americana são insetos denominados flebotomíneos, pertencentes à Ordem Diptera, Família Psychodidae, Subfamília Phlebotominae, Gênero *Lutzomyia*. São conhecidos popularmente como mosquito palha, tatuquira, birigui, entre outros, dependendo da localização geográfica (MITROPOULOS et al., 2010).

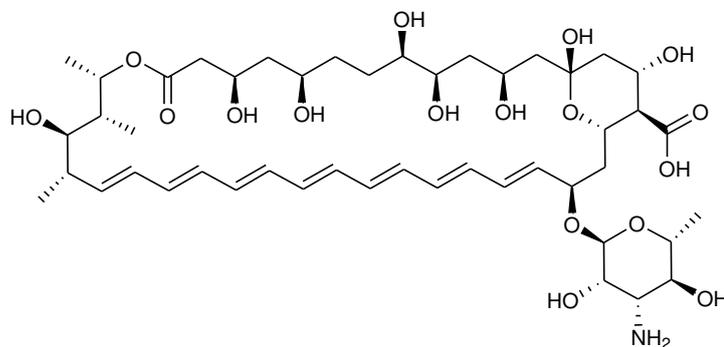
3.2 Tratamento

A anfotericina B é um antibiótico poliênico que tem uma excelente atividade *in vitro* na destruição de *leishmania* intra e extracelular, através de uma interferência no episterol precursor do ergosterol da membrana do parasito (DUARTE, 2009). É insolúvel em meio aquoso e, em sua formulação tradicional, é apresentada como uma mistura com o desoxicolato

que atua como surfactante. A infusão intravenosa da mistura coloidal causa severos efeitos colaterais tóxicos (MICHELETTI, 2012).

O nome anfotericina deriva da característica anfotérica de sua estrutura molecular, formando sais solúveis tanto em meio ácido como em básico. A anfotericina B é pouco solúvel na maioria dos solventes. A solubilidade pode ser aumentada em água por adição de lauril sulfato de sódio ou desoxicolato de sódio, também pode ser dissolvida em vesículas de lectina e colesterol e em esteroides constituintes de membranas naturais (GONÇALVES, 2011).

Figura 1- Estrutura da Anfotericina B



Fonte: Ganis et al (1971)

A anfotericina B apresenta em sua estrutura química 47 átomos de carbono, 17 átomos de oxigênios e uma amina, formando uma porção micosamina ligada a uma cadeia de duplas ligações e na posição oposta uma cadeia poli-hidroxilada, conferindo-lhe caráter anfipático (FILIPPIN, 2006).

O fármaco interage, preferencialmente, com os esteróis substituídos na posição 24 (ergosterol e episterol), comum na membrana dos parasitas. Entretanto, pode ligar-se também ao colesterol presente na membrana plasmática das células do hospedeiro, causando boa parte dos efeitos tóxicos. O intervalo de dose do desoxicolato de anfotericina B é de 0,5 a 1 mg/kg por dia, via intravenosa por 20 dias contínuos ou alternados com dose total entre 15 a 20 mg/kg. Os efeitos colaterais mais frequentes são: febre, cefaleia, náuseas, vômitos, hiporexia, tremores, calafrios, flebite, cianose, hipotensão, hipopotassemia, hipomagnesemia e alteração da função renal (BRASIL, 2011).

Apesar dos avanços no tratamento da leishmaniose, ainda é necessária a busca por medicamentos menos tóxicos, mais eficazes e mais acessíveis economicamente. As plantas, especialmente aquelas do cerrado, são potencial fonte de moléculas líderes para esses tratamentos (TIUMAN et al., 2011; SAHA et al., 2011).

3.3 Cerrado

O Cerrado brasileiro é reconhecido como a savana mais rica do mundo, abrigando 11.627 espécies de plantas nativas já catalogadas. Existe uma grande diversidade de habitats, que determinam uma notável alternância de espécies entre diferentes fitofisionomias. O cerrado é o segundo maior bioma da América do Sul, ocupando uma área de 2.036.448 km², cerca de 22% do território nacional. A sua área contínua incide sobre os estados de Goiás, Tocantins, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Bahia, Maranhão, Piauí, Rondônia, Paraná, São Paulo e Distrito Federal, além dos enclaves no Amapá, Roraima e Amazonas (BRASIL, 2018).

A riqueza dos metabólitos no bioma Cerrado tem sido reportada na literatura, em diversos relatos de atividade em modelos biológicos, a Figura 2 mostra as substâncias isoladas em espécies nativas do Cerrado.

O extrato hexânico da casca da raiz de *Simarouba versicolor* levou ao isolamento da glaucarubinona Fig. 2(a), substância bastante ativa sobre as células de câncer, apresentando resultados inéditos sobre as células HL-60 (leucemia), SF-295 (glioblastoma) e HCT-8 (côlon) (MESQUITA, 2009). Rodrigues et al., (2005) isolaram uma quinona natural, o lapachol Fig. 2(b), a partir do extrato bruto da madeira do caule de *Cybistax antisyphilitica* que apresentou atividade potente contra larvas de *Aedes aegypti*. O extrato da casca da raiz de *Casearia sylvestris* levou ao isolamento de um novo diterpeno clerodano Fig. 2(c), este composto mostrou atividade pronunciada no *Trypanosoma cruzi*, com concentração inibitória mínima (CIM) em 0,59 µg/mL (ESPINDOLA et al., 2004).

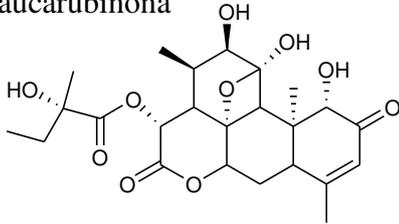
Sá et al.,(2018) avaliaram a atividade antifúngica do ácido gálico Fig. 2(d) e ácido valônico Fig. 2(e) isolados da fase aquosa do extrato das folhas da *Campomanesia adamantium* (Cambess.) ambos demonstraram significativa atividade antifúngica. Lião et al.,(2008) relataram a atividade tripanocida de triterpenóides, o tingenone Fig. 2(f) e o tingenol Fig. 2(g) isolados da raiz da *Cheiloclinium cognatum*.

Cunha et al., (2012) relataram o potencial esquistossomicida de flavonoides e terpenos isolados das plantas *Miconia langsdorffii* Cogn. (Melastomataceae), *Roupala montana* Aubl. (Proteaceae), *Struthanthus syringifolius* (Mart.) (Loranthaceae) e *Schefflera vinosa* (Cham. & Schltdl.) Frodin (Araliaceae). A betulina Fig. 2(h) e a quercetina 3-O-β-D-ramnosídeo Fig. 2(i) foram capazes de causar grande percentual de mortalidade parasitária, no quinto dia de tratamento a uma concentração de 100 µg/mL. Além disso a quercetina 3-O-β-

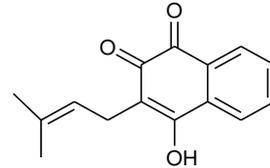
D-glucosídeo Fig. 2(j) e quercetina 3-O- β -D-ramnosídeo a 100 μ g/mL apresentaram redução significativa na atividade motora dos parasitas de 75% e 87,5% respectivamente.

Figura 2- Substâncias isoladas de plantas do cerrado com potencial biofarmacológico.

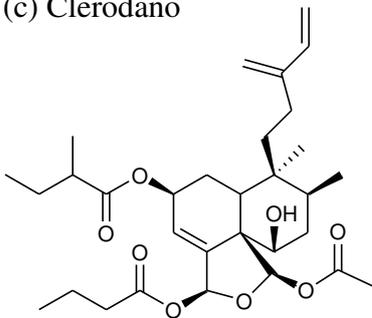
(a) Glaucarubinona



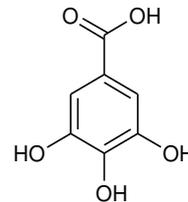
(b) Lapachol



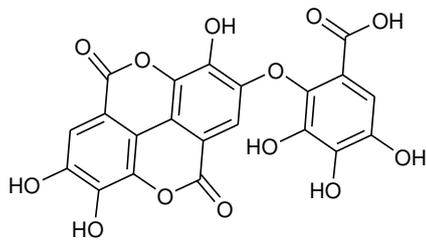
(c) Clerodano



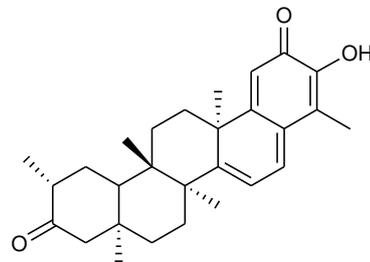
(d) Ácido gálico



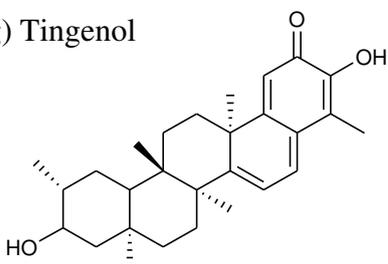
(e) Ácido valônico



(f) Tingenone



(g) Tingenol



(h) Betulina

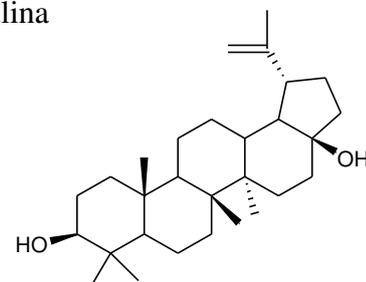
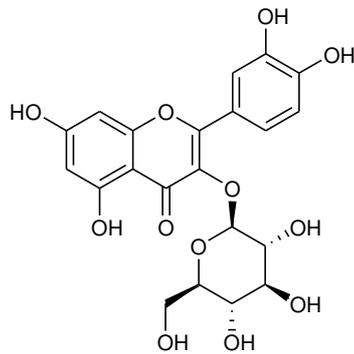
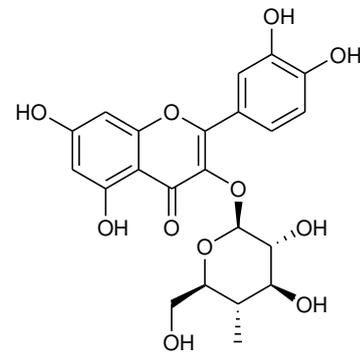


Figura 2- Continuação(i) Quercetina 3-*O*- β -D-ramnosídeo(j) Quercetina 3-*O*- β -D-glucosídeo

Fonte: Mesquita, 2009; Rodrigues et al 2005; Espindola et al 2004; Sá et al 2018; Lião et al 2008; Cunha et al 2012.

Essas substâncias apresentam profundo impacto em várias áreas, como agropecuárias, indústrias farmacêuticas e de cosméticos. Embora com uma rica diversidade vegetal, o cerrado ainda é pouco explorado e estudado. E o interesse da comunidade científica é ainda maior diante do cenário de desmatamento e da perda de biodiversidade do bioma. Dentre várias espécies com potencial químico e biológico daremos destaque a *Fridericia platyphylla*.

3.3.1 *Fridericia platyphylla* (Família Bignoniaceae)

Fridericia platyphylla é um arbusto nativo do Cerrado brasileiro, possui entre 1,0 e 2,0 m de altura, abundantemente ramificado, com folhas simples e flores róseo-roxas em inflorescências terminais (Figura 3). É popularmente conhecida como “cipó-una”, “tintureiro” ou “cervejinha do campo”, suas raízes são tradicionalmente usadas para o tratamento de pedras nos rins e dor nas articulações (artrite) (ALCERITO et al 2002; RODRIGUES et al 2006).

Figura 3- *Fridericia platyphylla* (Cham.) L. G. Lohmann



Fonte: Salles (2007)

Alguns estudos realizados com folhas de *Fridericia platyphylla* (sin. *A. brachypoda*) identificaram flavonoides como apigenina e luteolina (BLATT et al., 1998). Alcerito et al., 2002 isolaram quatro flavonoides a partir das folhas: cirsimaritina, hispidulina, cirsilinol e 3,4-dihidroxi-5,6,7-trimetoxiflavona. Há também relatos da presença de saponinas, glicosídeos cardiotônicos, compostos fenólicos, taninos, esteroides, triterpenos pentacíclicos, ácido betulínico, ácido ursólico, ácido oleanólico e flavonoides diméricos incomuns glicosilados e suas agliconas (ALCERITO et al., 2002; ROCHA et al., 2011; ROCHA, 2014; ROCHA, 2015; ROCHA, 2016).

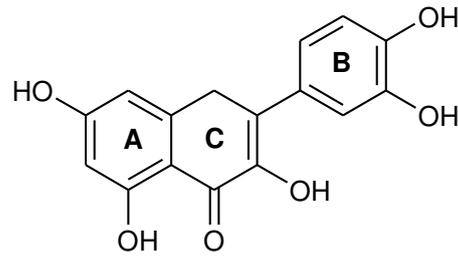
Não há informações na literatura sobre estudos envolvendo propriedade leishmanicida com compostos isolados das raízes de *Fridericia platyphylla*, bem como as propriedades eletroquímicas dos mesmos. O estudo aqui realizado visa compreender essas possíveis propriedades e estabelecer uma correlação entre as mesmas.

3.4 Potencial eletroquímico de compostos fenólicos

Metodologias eletroquímicas têm sido utilizadas com sucesso para estabelecer correlações entre estrutura, potencial de oxidação e atividade biológica de espécies eletroativas. Sua simplicidade operacional, maior sensibilidade, menor tempo de análise, menor consumo de reagentes e menores custos são algumas de suas vantagens (TEIXEIRA, 2009; BOZAL, 2010). As propriedades redox das drogas podem fornecer informações sobre seu destino metabólico ou seus processos redox *in vivo* ou atividade farmacêutica (KUMAR, 2008; DICULESCU, 2006). Um grande número de artigos empregando eletroanálise para determinação e/ou correlacionando atividade biológica ao comportamento redox de compostos fenólicos nos últimos anos tem sido publicado.

Pliuta et al (2018) desenvolveram um sensor eletroquímico constituído de eletrodo de pasta de carbono com uma grande capacidade de determinação da quercetina em produtos farmacêuticos e extratos de chá verde e preto com DPR de 3,5%. Ribeiro et al (2018) realizaram a determinação da catequina em chá verde, utilizando análise por injeção em batelada com detecção amperométrica de múltiplos pulsos, empregando um eletrodo de carbono vítreo. O método desenvolvido apresentou resultados concordantes em nível de confiança de 95% quando comparado com a técnica de HPLC, além de repetibilidade DPR igual a 3,5%, limite de detecção $1,6 \times 10^{-3} \mu\text{M}$ e limite de quantificação $5,2 \times 10^{-3} \mu\text{M}$.

A determinação da quercetina em um eletrodo de carbono vítreo foi realizada por Brett (2003), usando voltametria cíclica, pulso diferencial e onda quadrada em diferentes pHs, os dois picos de oxidação foram atribuídos aos dois grupos hidroxila do anel B (Fig. 4).

Figura 4- Estrutura da quercetina

Fonte: Brett (2003)

As propriedades nutracêuticas podem estar relacionadas à atividade eletroquímica dos flavonóides. Para aumentar a compreensão das relações de atividade, eletroquímica e os efeitos indutivos que os substituintes OH têm no potencial redox dos flavonóides, Arroyo-Currás et al (2016) realizaram experimentos de voltametria de onda quadrada e cálculos *ab initio* de flavonóis e antocianidinas. As medições revelaram que a atividade redox surge principalmente dos substituintes hidroxilas presentes no esqueleto flavan, e nas antocianidinas a presença da ligação éter bloqueou a reatividade da delfinidina na posição 3-OH, presumivelmente devido à redistribuição da densidade eletrônica da molécula neutra.

Fernandes (2012) desenvolveu biossensores para determinação de hidroquinona em creme dermatológico e ácido cafeico em erva-mate empregando a técnica de voltametria de onda quadrada, os biossensores apresentaram excelentes resultados para a repetibilidade, reprodutibilidade, seletividade e estabilidade. Os resultados obtidos na determinação de hidroquinona em produtos dermatológicos com este biossensor estão de acordo com aqueles obtidos com o método espectrofotométrico em um nível de 95% de confiança com valores de recuperação entre 98,3 a 104,5% e 92,8 a 103,1% para a recuperação de ácido cafeico nas amostras de erva-mate.

4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1 Procedimento Fitoquímicos

4.1.1 Coleta e preparo do extrato

As raízes de *Fridericia platyphylla* foram coletadas em abril de 2017 na fazenda Sant'Ana da Serra em João Pinheiro, Minas Gerais, Brasil. A planta foi identificada no Herbário José Badine da Universidade Federal de Ouro Preto pela botânica Dra. Maria Cristina Teixeira Braga Messias. Um voucher (n ° 17.935) foi depositado no Herbário da Universidade Federal de Ouro Preto em Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil.

As raízes foram secas a 50 °C em estufa por 72 h e trituradas em moinho de facas. O pó obtido foi extraído com etanol/água (7:3) por meio de percolação exaustiva. Após a extração, o líquido extrator foi evaporado sob pressão reduzida, em temperatura inferior a 40 °C. O extrato foi transferido para frascos de vidros e, posteriormente, liofilizado para completa remoção do solvente.

4.1.2 Partição Líquido/Líquido

O extrato hidroetanólico 70% foi dissolvido em água/metanol (7:3) e particionado com diclorometano, em seguida as fases aquosa e diclorometânica foram concentrada em evaporador rotativo e liofilizada para remoção de solventes.

4.1.3 Fracionamento da fase diclorometânica

A fase diclorometânica (3,5 g) foi fracionada em uma coluna de vidro, preenchida com um adsorvente, sílica gel 60 (0,063- 0,200 mm). O empacotamento da coluna foi realizado com hexano e em seguida ocorreu à injeção da amostra no topo da coluna. Um gradiente de polaridade crescente de solventes foi usado como fase móvel hexano/acetato de etila e acetato de etila/metanol. No total foram obtidas 19 frações que em seguidas foram analisadas por cromatografia em camada delgada e agrupadas de acordo com a semelhança do perfil. O grau de pureza das substâncias foi analisado por HPLC-UV/vis. Este procedimento permitiu o isolamento das três substâncias diméricas incomuns pertencentes às frações 14, 15 e 16.

4.1.4 Identificação das substâncias

4.1.4.1 Espectrometria de Massas

Os experimentos de espectrometria de massa foram realizados em LCQ Equipamento de frota (Thermo Scientific) equipado com um dispositivo de inserção direta da amostra via análise por injeção em fluxo (FIA). A matriz estudada foi analisada por ionização por eletrospray (ESI), a fragmentação em múltiplos estágios (MS^2 , MS^3 e MS^n) 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 para os demais experimentos em múltiplos estágios nas seguintes condições: tensão capilar, 25 V; Voltagem spray, 5 kV; e temperatura capilar, 275 °C. Um gás de arraste (N_2) com um fluxo de 8 unidades arbitrárias (A.U.), e o gás de colisão foi o hélio (He). A aquisição da faixa foi m/z 100-2000. O software Xcalibur versão 1.3 (Thermo Finnigan, Waltham, MA) foi usado para adquirir e processar os dados.

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

Os dados espectroscópicos de RMN foram registados num espectrômetro Varian Inova 500 MHz (Varian, Palo Alto, CA, EUA). Os deslocamentos químicos são 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.

4.1.4.3 Cromatografia Líquida (HPLC-UV/Vis)

A fase diclorometânica (5 mg) foi diluída em MeOH grau HPLC. Alíquotas de 20 μL foram injetadas diretamente na HPLC-UV com detecção a 254 nm. Utilizou-se um sistema (Shimadzu Corp. Quioto, Japão), constituído por um módulo de bombas binário, detector UV-Vis (SPA-10A). A coluna utilizada foi Luna 5 μm C18 100 Å (150 μm x 4,6 μm). A fase móvel foi constituída por água deionizada e MeOH acidificados com 0,01% de ácido fórmico, em sistema gradiente: 10–100% de MeOH em 70 min, fluxo de 1 mL/min.

4.2 Atividade Antileishmanial *in vitro*

4.2.1 Ensaios *in vitro*: citotoxicidade pelo método de redução do MTT

4.2.1.1 Promastigotas

Formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, foram obtidas durante a fase logarítmica de crescimento (3-4 dias), e reunidas por centrifugação, suspensas em meio RPMI completo (5×10^7 parasitos/mL), para posterior distribuição em uma placa de cultura de 96 poços. Em seguida, foram incubadas a 26 °C por 24 h na presença das braquidinas (0,2 a 20 μ M). Os controles consistiram de: suspensão de promastigotas e meio de cultura e suspensão de promastigotas e anfotericina B (Sigma, EUA). Após incubação, MTT (Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio) (Sigma, EUA) (5 mg/mL) foi adicionado na cultura, sucedendo-se nova incubação 3 h a 26° C. A viabilidade das formas promastigotas foi avaliada com base no metabolismo do MTT, sendo a mesma proporcional ao valor da absorbância gerada em espectrofotômetro, sob comprimento de onda a 570 nm. A porcentagem de parasitos viáveis foi determinada pelo índice de inibição do crescimento de promastigota (IP), dado pela quantidade de absorbância dos parasitos tratados com as braquidinas, em comparação ao controle negativo (Rocha et al 2018).

4.2.1.2 Amastigotas

Células peritoniais (1×10^5 macrófago/poço) foram adicionadas em tubos Eppendorfs e incubadas em atmosfera úmida a 37 °C por 3h (5% CO₂ e 95% ar) juntamente com formas promastigotas de *Leishmania Amazonensis* (5×10^5 parasitos/poço) em uma proporção de 5:1 (macrófago/promastigota). Após a infecção dos macrófagos, estes foram incubados (37 °C por 24 h, 5% CO e 95% ar) em presença das braquidinas. Após incubação, um volume de 100 μ L foi retirado da cultura e adicionado em lâminas para centrifugação em Cytospin (Fanem, São Paulo) por 5 min a 500 rpm. Essas lâminas foram, então, fixadas com metanol absoluto (Cromato Produtos Químicos Ltda.) para coloração com corante Giemsa e posterior análise microscópica. O número de amastigota intracelular foi determinado pela contagem de amastigotas em 100 macrófagos infectados por amostra e os resultados foram expressos como porcentagem de inibição em relação ao controle negativo, poço contendo apenas células e meio RPMI (Rocha et al 2018).

4.2.2 Citotoxicidade para células de mamíferos

Macrófagos de exsudato peritoneal obtidos de camundongos BALB/c foram semeados em placas de 96 poços a 1×10^5 células por poço em meio RPMI-1640 sem vermelho de fenol e suplementado com 10% de soro bovino fetal e 50 $\mu\text{g} / \text{mL}$ de gentamicina, e as células foram incubadas por 24 h a 37 °C e 5% de CO_2 . Em seguida, cada composto foi adicionado em concentrações de 0,24 a 20 μM em duplicado antes de ser incubado por 72 horas. Um total de 20 μL /poço de AlamarBlue (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) foi adicionado às placas e incubado durante 10h. As leituras colorimétricas foram realizadas a 570 e 600 nm. Os valores de LC_{50} foram calculados usando os pontos de dados coletados de três experimentos independentes. Violeta genciana foi usada como controle positivo em concentrações variando de 0,04 a 10 μM (Rocha et al, 2018).

4.3 Estudos Eletroquímicos

4.3.1 Preparo das amostras

Todos os reagentes utilizados neste trabalho foram de pureza analítica e preparados com água deionizada (resistividade $\leq 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$) obtida a partir de um sistema de purificação de água Milli-Q® Direct 8 (Millipore, Bedford, EUA).

A solução tampão Britton-Robinson 0,04 mol.L^{-1} foi constituída de ácido acético glacial, ácido fosfórico, ácido bórico e cloreto de potássio (Merck, pureza $\geq 98\%$) preparada de acordo com os procedimentos descritos por Ensafi et al. (2004).

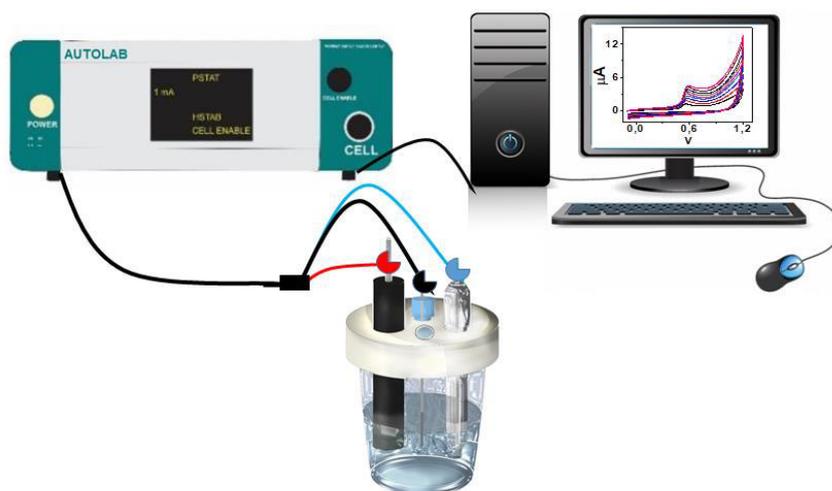
Foi preparada uma solução estoque padrão de cada composto a 300 μM em metanol e armazenada em geladeira em frasco âmbar (a solução foi estável durante pelo menos 1 mês). Antes da utilização, as soluções estoque foram diluídas na concentração desejada com o eletrólito suporte. As substâncias testadas A, B e C apresentaram sob a forma de um sólido amorfo e possuem baixa solubilidade em água, dessa forma utilizou-se 20% de metanol no eletrólito suporte para garantir a solubilidade da mesma.

4.3.2 Medidas eletroquímicas

As medidas eletroquímicas foram realizadas utilizando um Autolab PGSTAT 302N (Eco Chemie B. V., Utrecht, Holanda), acoplado a um computador dotado de um software GPES (Figura 5) para controle de potencial, aquisição e tratamento de dados. As técnicas eletroquímicas utilizadas foram: voltametria cíclica e voltametria de pulso diferencial.

O sistema utilizado foi constituído de uma célula eletroquímica, confeccionada em vidro Pyrex com capacidade de 5 mL, com uma tampa de teflon e entradas para o eletrodo de trabalho (carbono vítreo 0,5 cm² de área geométrica), o eletrodo de referência (prata/cloreto de prata (Ag/AgCl (3 mol.L⁻¹ KCl)) e o eletrodo auxiliar (um fio de platina), como mostrada na Figura 5.

Figura 5- Sistema de detecção potenciostato/galvanostato utilizado para as medidas eletroquímicas



Fonte: Autor (2019)

Antes de cada medida experimental, o eletrodo de carbono vítreo foi polido em feltro contendo suspensão aquosa de alumina de granulometria 0,05 μm (Micropolishing Material, Buehler Ltda). Antes do polimento, o eletrodo foi imerso em álcool metílico por 2 minutos em banho ultrassom (Unique, USC-1400), lavado com água deionizada em abundância, polido e levado ao banho ultrassom, para remoção de possíveis partículas provenientes do processo de polimento com alumina que ficam impregnadas na superfície do eletrodo de carbono vítreo.

Os estudos do pH do meio foram realizados com o ajuste do pH das soluções para o valor desejado através da adição de alíquotas da solução de hidróxido de sódio 3 mol L⁻¹ (Merck) utilizando pHmetro (Metrohm, 827 pH Lab).

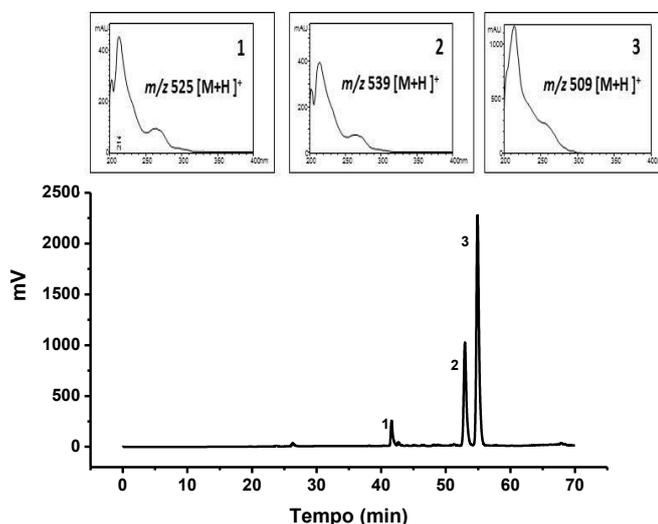
Os voltamogramas cíclicos das soluções das substâncias testadas foram obtidos em velocidades de varredura que variaram desde 10 a 100 mV s⁻¹.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Identificação das substâncias isoladas da fase DCM do extrato EtOH 70% das raízes de *Fridericia platyphylla*

Para a obtenção das informações sobre a composição química da fase DCM e melhor identificação dos constituintes da *Fridericia platyphylla*, uma análise por HPLC-UV/Vis foi realizada. O perfil cromatográfico da fase diclorometânica (Fig. 6) apresenta três picos nos tempos de retenção 42, 53 e 55 minutos, correspondentes às três substâncias majoritárias da fase, cujos espectros no UV correspondem os flavonoides diméricos incomuns.

Figura 6- Perfil cromatográfico da fase DCM (254 nm)

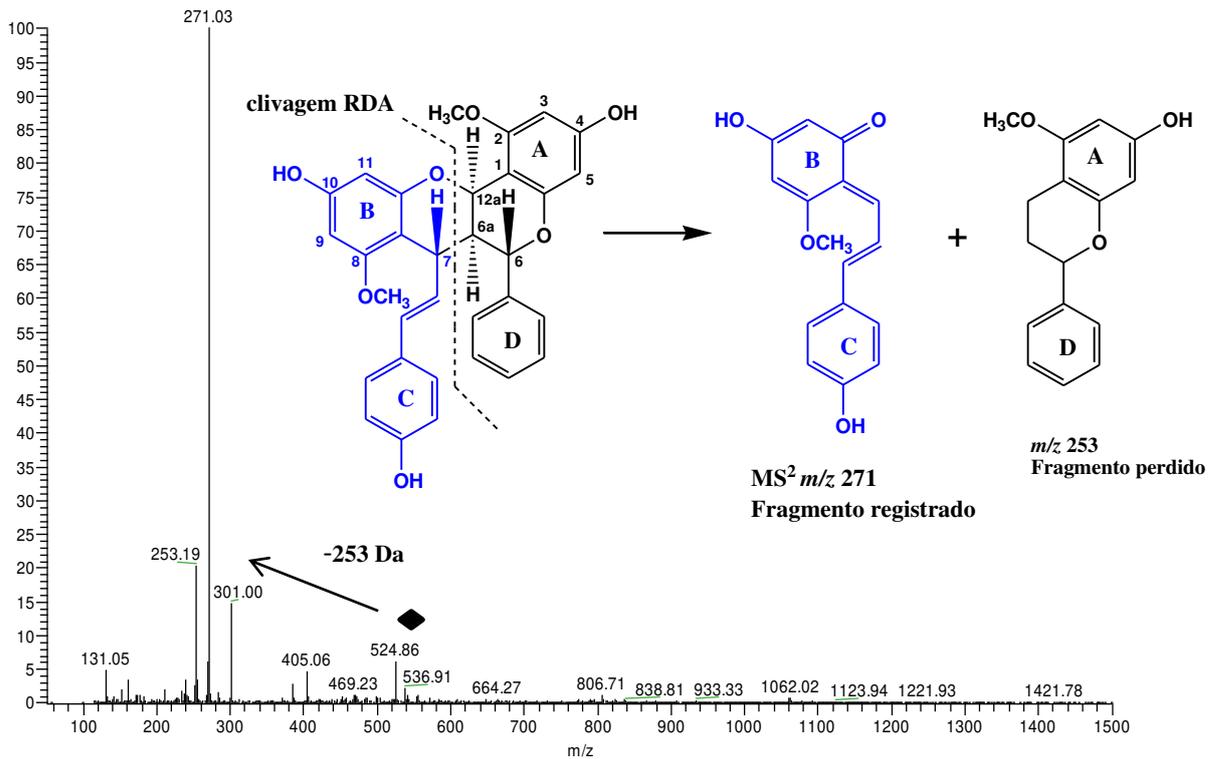


Fonte: Autor (2019)

Foram isoladas as 3 substâncias majoritárias da fase DCM. Os espectros no UV-DAD revelaram a presença de três substâncias fenólicas com o mesmo espectro de UV, sugerindo a presença de análogos semelhantes com o mesmo cromóforo. A substância braquidina-1 (50 mg) foi isolada como um sólido, assim como braquidina-2 (73 mg), e braquidina-3 (150 mg). A partir das técnicas espectroscópicas convencionais foi possível elucidar as estruturas das três braquidinas, cujos dados estão descritos à seguir.

O espectro de massas HPLC-ESI/MS para braquidina-1 (Fig. 7) mostrou um íon $[M+H]^+$ m/z 524,66 o que está de acordo com a fórmula molecular $C_{32}H_{28}O_7$. Para braquidina-2 (Fig. 8) mostrou um íon $[M+H]^+$ m/z 538,78 em conformidade com a fórmula molecular $C_{33}H_{30}O_7$ e para braquidina-3 (Fig. 9) um íon $[M+H]^+$ m/z 508,99 e fórmula molecular $C_{32}H_{28}O_6$.

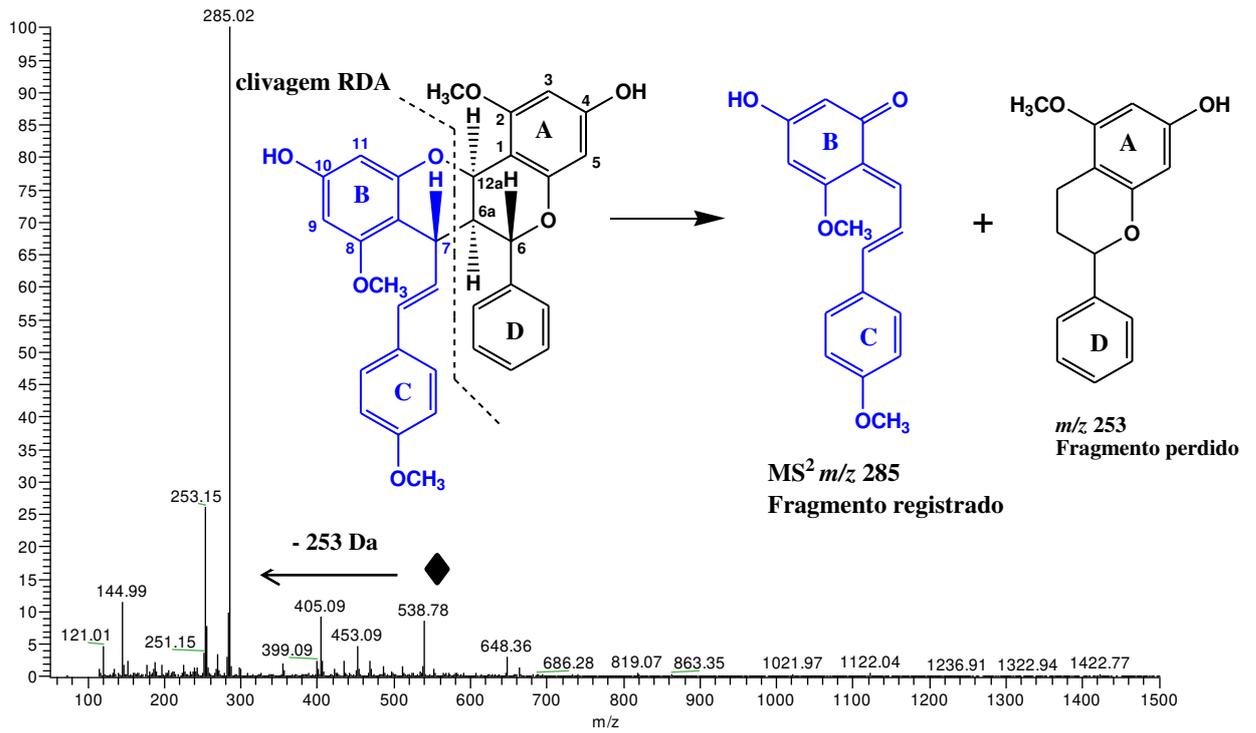
Figura 7- Espectro de massa de fragmentação da braquidina 1



Fonte: Autor (2019)

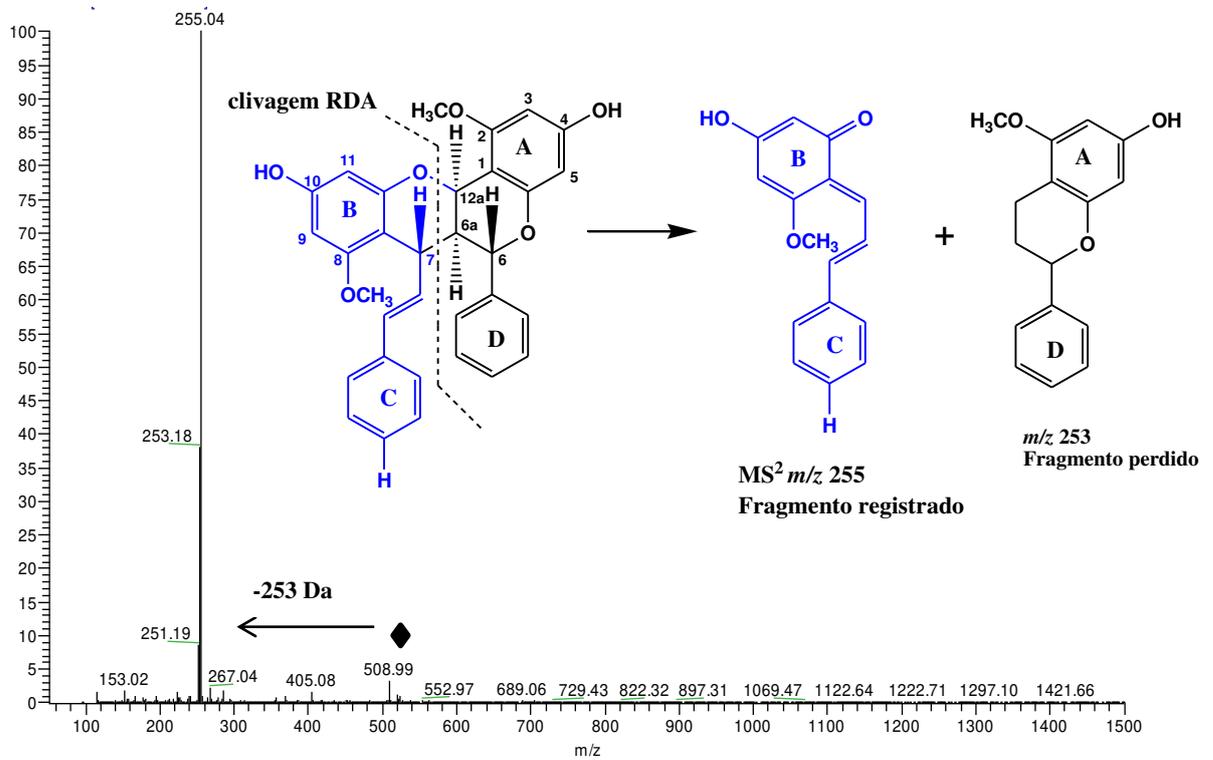
No espectro de massa de ionização por eletrospray (ESI-MS), modo positivo, verificou-se o aparecimento de um pico com m/z 524,66 correspondente à espécie $[M+H]^+$, tendo permitido obter informação relativamente à massa molecular da braquidina 1 (524 Da). O pico com m/z 271, correspondente a um fragmento resultante do mecanismo de fragmentação que envolve a clivagem RDA das ligações C12a e C6a do pirano acoplado ao anel B.

Figura 8- Espectro de massa de fragmentação da braquidina 2



Fonte: Autor (2019)

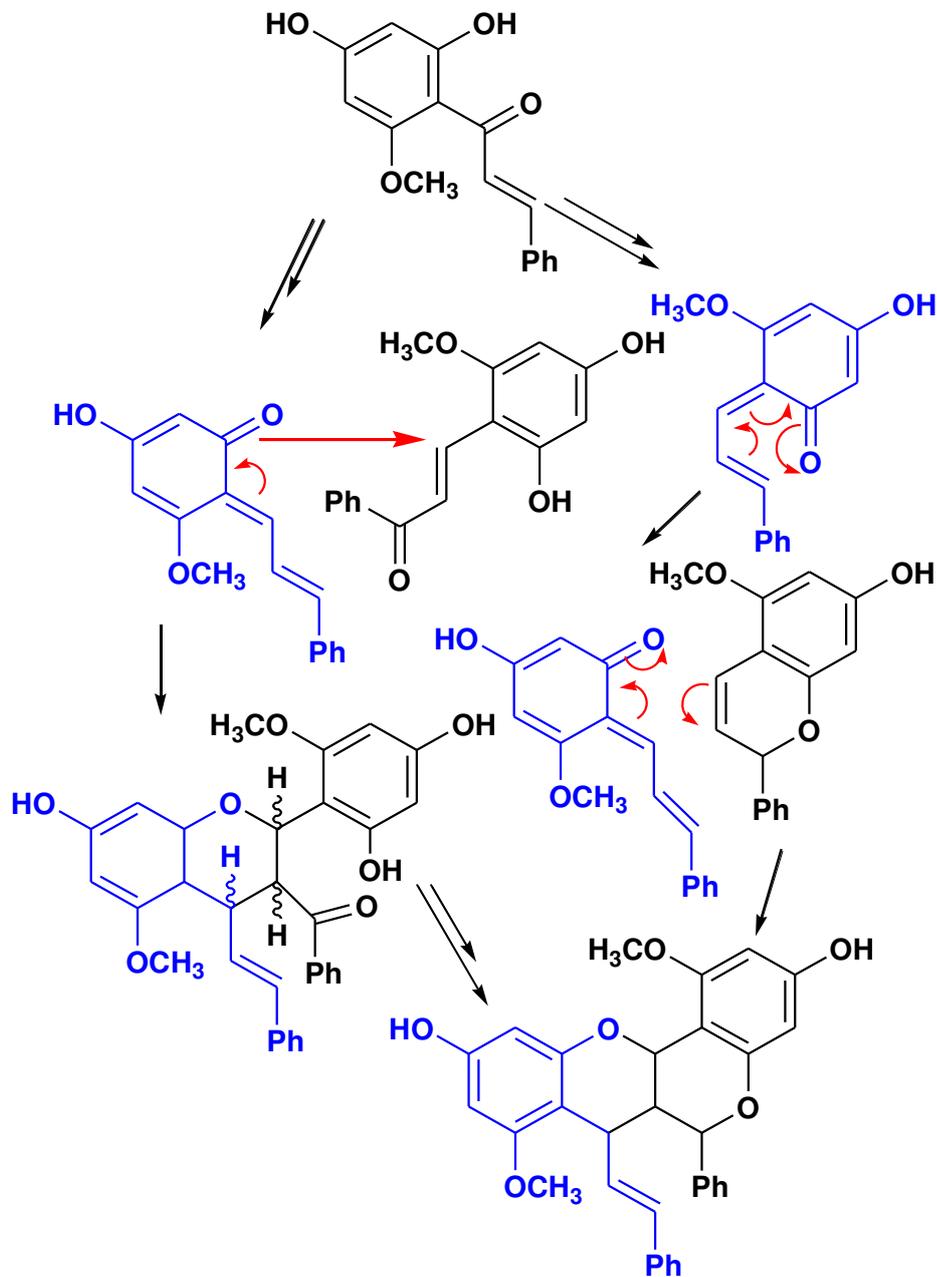
Figura 9- Espectro de massa de fragmentação da braquidina 3



Fonte: Autor (2019)

As braquidinas podem ser oriundas da dimerização de chalconas (figura 10), a fragmentação característica dos flavonoides ocorre a partir da clivagem no anel C pela reação retro Diels-Alder (MARKHAM, 1989). Observa-se repetidamente a fragmentação da retro Diels-Alder através da clivagem nas ligações entre as posições C-6a e C-12a no pirano acoplado ao anel B para as três braquidinas, resultando na perda de m/z 253 Da produzindo os fragmentos de m/z 271, 285 e 255 Da com valor de m/z dependentes dos substituintes no anel C conforme demonstrado nas Figuras 7, 8 e 9.

Figura 10- Biogênese das braquidinas



Acredita-se que as braquidinas podem ser formadas através de duas rotas: a partir da chalcona (2',4'-dihidroxi-6'-metoxichalcona) que geraria a metil quinona por meio da redução e consequente perda de água, a cicloadição entre a quinona e a chalcona produziria um derivado de uvarina que seria transformada em braquidina via formação hemiacetal seguida de redução. 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.

O sistema de anéis heterocíclico das braquidinas é bastante singular. A estrutura policíclica contém dois sistemas de anel de benzopirano fundidos, quatro estereocentros e uma ligação dupla trans. As três substâncias majoritárias de esqueletos raros obtidos da fase apolar do extrato da *Fridericia platyphylla*, apresentaram semelhança com a substância dependensin, um produto natural isolado a partir da planta da família Annonaceae, a *Uvaria dependens* (NKUNYA; WAIBEL; ACHENBACH, 1993).

O espectro de RMN de ^1H da substância braquidina-1 revelou a presença de 13 hidrogênios aromáticos, 2 etilênicos, 2 metínicos alifáticos e dois grupos metoxi que também foram confirmadas por HSQC. Os diferentes sinais aromáticos encontrados pertencem a quatro anéis independentes, denominados A, B, C e D. Os dados de RMN de ^1H e de ^{13}C das braquidinas e do dependensin estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1- Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz, CDOD em ppm) das braquidinas e dependensin

Posição	Braquidina 1		Braquidina 2		Braquidina 3		Dependensin	
	δ_{H} (J)	δ_{C}	δ_{H} (J)	δ_{C}	δ_{H} (J)	δ_{C}	δ_{H} (J)	δ_{C}
1		161.1, C		160.9, C		161.1, C		154.7
2	6.08 d (2.2)	92.8, CH	6.08 d (2.1)	92.7, CH	6.08 d (2.2)	92.8, CH	6.18 s	89.2
3		161.1, C		161.1, C		161.1, C		154.1
4	5.94 d (2.2)	96.4, CH	5.94 d (2.1)	96.3, CH	5.95 d (2.2)	96.4, CH		131.3
4a		157.8, C		157.7, C		157.8, C		149.4
6	4.78 d (11.2)	78.2, CH	4.77 d (11.3)	78.1, CH	4.79 d (11.3)	78.2, CH	4.97 d (11.0)	77.2
6a	2.22 dt (11.2, 1.9)	42.4, CH	2.19 dt (11.3, 1.9)	42.3, CH	2.24 dt (11.3, 1.9)	42.2, CH	2.31 ddd (11.0, 2.5, 1.5)	41.0
7	3.17 ddd (5.5, 1.9, 1.6)	34.0, CH	3.17 ddd (5.6, 1.9, 1.6)	34.0, CH	3.21 ddd (5.7, 1.9, 1.7)	34.2, CH	3.35 ddd (6.0, 1.5, 1.5)	33.0
7a		101.8, C		101.6, C		101.5, C		103.0
8		160.2, C		160.2, C		160.2, C		153.5
9	6.05 d (2.1)	93.0, CH	6.05 d (2.1)	93.0, CH	6.05 d (2.3)	93.0, CH	6.16 s	89.5
10		159.1, C		159.2, C		159.2, C		152.0
11	5.98 d (2.1)	96.5, CH	5.98 d (2.1)	96.5, CH	5.99 d (2.3)	96.6, CH		131.5
11a		155.4, C		155.3, C		155.4, C		147.2
12a	5.28 d (2.3)	63.5, CH	5.27 d (2.3)	63.4, CH	5.28 d (2.4)	63.5, CH	5.40 d (2.5)	62.5
12b		103.8, C		103.7, C		103.8, C		104.5
1'		140.4, C		140.4, C		140.4, C		138.8
2',6'	7.24 d (7.6)	128.5, CH	7.23 d (7.0)	128.5, CH	7.24 d (7.6)	128.5, CH	7.1-7.4	127.3
3',5'	7.38 m	129.5, CH	7.38 m	129.5, CH	7.38 m	129, CH	7.1-7.4	128.4 ^a
4'	7.38 m	129.6, CH	7.38 m	129.5, CH	7.38 m	129.6, CH	7.1-7.4	128.5 ^b
A	5.95 dd (15.9, 5.5)	130.7, CH	5.99 dd (15.8, 5.6)	131.5, CH	6.15 dd (15.7, 5.7)	133.8, CH	6.18 dd (15.5, 6.0)	132.5
B	5.81 dd (15.9, 1.6)	131.7, CH	5.83 dd (15.8, 1.6)	131.7, CH	5.91 dd (15.7, 1.7)	132.0, CH	5.99 dd (15.5, 1.5)	130.5
1''		130.4, C		131.1, C		138.6, C		137.3
2'', 6''	7.05 d (8.6)	128.4, CH	7.11 d (8.8)	128.2, CH	7.18 m	127.2, CH	7.1-7.4	126.2
3'', 5''	6.64 d (8.6)	116.2, CH	6.75 d (8.8)	114.8, CH	7.18 m	129.4, CH	7.1-7.4	128.4 ^a
4''		157.7, C		160.2, C	7.10 m	128.0, C	7.1-7.4	127.0 ^b
OMe-1	3.81 s	56.1, CH ₃	3.79 s	56.1, CH ₃	3.79 s	56.1, CH ₃	3.86 s	56.0
OMe-8	3.62 s	55.9, CH ₃	3.62 s	55.9, CH ₃	3.61 s	55.9, CH ₃	3.68 s	55.9
OMe-4			3.73 s	55.6, CH ₃			3.75 s	61.0

Fonte: Autor, 2019; NKUNYA; ROCHA et al, 2014, WAIBEL; ACHENBACH, 1993

Um par de prótons acoplado em meta em δ_H 6,08 e 5,94 ($J = 2,2$ Hz) foi atribuído aos hidrogênios H-2 e H-4 no anel A. As correlações HMBC também mostraram que este anel, é constituído por três carbonos quaternários oxigenados (C-1, C-3 e C-4a δ_C 161,1, 161,1, 157,8) e um átomo de carbono adicional com hibridação sp^2 em C-12b a δ_C 103,8. Este carbono está ligado a uma metoxila (δ_H 5,28, H-12a), como mostrado pelas correlações heteronucleares entre H-12a e C-1, C-4a e C-12b (ROCHA et al, 2014).

Da mesma forma que o anel A, o anel B apresenta um par de hidrogênios acoplados em meta a δ_H 6,05 e 5,98 ($J = 2,1$ Hz) atribuídos aos H-9 e H-11, e também foi substituído por três resíduos oxigenados e outro átomo de carbono quaternário (C-8, C-10, C-11a e C-7a em δ_C 160,2, 159,1, 155,4 e 101,8). As correlações gHMBC entre H-7 e C-8, C11a e C-7a indicaram que este carbono foi ligado, neste caso ao H-7 (δ_H 3,17). O experimento gCOSY indicou ainda que o H-7 ainda está relacionado com um outro grupo metino H-6a (δ_H 2,22) ligado à metoxila H-6 (δ_H 7,78) e H-12a (ligado ao anel A). Isto indicou a presença de dois anéis fundidos de benzopirano, que também foi confirmado pelas várias correlações gHMBC observadas (ROCHA et al, 2014).

Dois pares de prótons acoplados em orto em δ_H 7,24 (H-2' e H-6') e 7,38 (H-3' e H-5') foram designados para o anel C ao passo que os cinco prótons aromáticos restantes correspondem ao anel aromático D não substituído em δ_H 6,64 (H-3" e H-5"), 7,05 (H-2" e H6"). Anel C foi substituído em C-4" por um grupo hidroxila (δ_C 157,7) e em C-1" por uma ligação dupla *trans* (δ_H 5,95 e 5,81, $J = 15,9$ Hz), que foi encontrado ligado ao hidrogênio metínico H-7 (gCOSY entre H-7 e H- α). Por outro lado, o anel C está diretamente ligado ao carbono C-6 (gHMBC entre H-2'/ H-6' e C-6). A posição dos dois grupos metoxilas a δ_H 3,81 e 3,62 foram designados por gHMBC, NOESY e correlações em C-1 (anel B) e C-8 (anel A).

As análises de RMN de braquidina-2 são semelhantes à de braquidina-1, mas diferem pela presença de um grupo metoxila adicional. A posição do grupo metoxila adicional foi localizada em C-4" com base nos experimentos NOESY e gHMBC (ROCHA et al, 2014).

Os dados de RMN da braquidina-3 foram semelhantes ao de braquidina-1 e braquidina-2. A diferença está na ausência de um grupo hidroxilo livre em C-4", o espectro de RMN de 1H apresentou um sinal a δ_H 7,10 correlacionando com um carbono δ_C 128,0 no experimento gHSQC atribuído a um próton aromático em C-4".

5.2 Atividade leishmanicida das braquidinas em ensaios *in vitro* contra formas Promastigotas e Amastigotas da *L. amazonensis*

Durante um procedimento de triagem preliminar para atividade contra *Leishmania amazonensis*, realizado por Rocha et al (2012) o extrato hidroetanólico 70% das raízes da *Fridericia platyphylla* exibiu um valor de IC₅₀ de 35,5 µg/mL contra formas promastigotas do parasita; um valor considerado bastante significativo para um extrato, já que a literatura classifica um extrato com atividade promissora aquele que apresenta valores de IC₅₀ abaixo de 100 µg/mL (Cos, 2006; Butterweck, 2012). A atividade antiparasitária foi identificada na fase DCM (diclorometano) com IC₅₀ 10,83 µg/mL, enquanto a fase aquosa foi inativa, possivelmente devido à alta polaridade dos compostos presentes, tendo em vista que a membrana destes microrganismos apresenta uma barreira natural apolar, o que dificultaria a permeação de seus constituintes ativos, sobretudo dos mais polares (PEREIRA, 2012).

A fase DCM apresentou excelente resultado quanto à atividade leishmanicida, o fracionamento do extrato bruto melhorou a atividade, evidenciando que a fase é alvo promissor de investigação, demonstrando a importância do estudo bioguiado de isolamento de metabólitos secundários os quais respondem individualmente pela atividade leishmanicida.

O isolamento dos constituintes ativos de plantas e a administração dos compostos puros é um modo pelo qual constituintes muito potentes podem ser transformados em produtos medicinais seguros de composição uniforme e consistente (FRÖHLICH, 2010). Após a investigação química dos constituintes da fase DCM que levou ao isolamento de três compostos diméricos incomuns, a atividade leishmanicida foi realizada para revelar os constituintes ativos contra a *Leishmania amazonensis*.

A atividade leishmanicida foi avaliada através da medida da viabilidade das Leishmanias pelo metabolismo do AlamarBlue após o período de tratamento com os compostos em concentrações de 0,2 a 20 µM contra a proliferação de promastigotas e amastigotas de *Leishmania amazonensis*. De acordo com os dados obtidos (Tabela 2) no teste *in vitro* os resultados indicaram que dois compostos são ativos, as braquidina-2 e 3 apresentaram capacidade de inibição do parasita, sendo que a braquidina 2 mostrou-se mais ativa para a forma amastigota do parasita.

Tabela 2- IC₅₀ (μM) das braquidinas contra *Leishmania amazonensis*.

<i>Leishmania amazonensis</i>		
Compostos	Promastigotas	Amastigotas
Braquidina-1	>20	N.A.
Braquidina-2	9.16 ± 1	2.20 ± 0.09
Braquidina-3	10 ± 0.80	6.25 ± 1.28
Anfotericina B	0.14 ± 0.01	0.10 ± 0.02

N.A: não ativa

Fonte: Rocha et al 2018

A forma amastigota da *leishmania*, parasita seu hospedeiro vertebrado, onde os flagelados inoculados são fagocitados por macrófagos teciduais do hospedeiro formando, assim, o vacúolo parasitóforo. Dentro do vacúolo parasitóforo, os amastigotas se replicam e após algum tempo, a célula hospedeira se rompe liberando esses amastigotas, que infectam outras células. No caso de espécies dermatrópicas os amastigotas se restringem à derme, porém quando se tratar de espécies visceralizantes, os amastigotas se disseminam invadindo órgãos como baço, fígado e medula óssea (BEATTIE; KAYE, 2011). É exatamente esta forma do parasita a mais severa que acomete o indivíduo, e a braquidina 2 apresentou alto poder de ação sobre a forma amastigota, inativando sua capacidade de infecção, comprovando seu potencial leishmanicida.

Os resultados do ensaio *in vitro* das braquidinas apresentaram diferença significativa em relação à estrutura atividade. Weniger (2006) verificou a influência dos grupos substituintes na atividade leishmanicida de biflavonóides, nos ensaios *in vitro* contra as formas amastigotas de *Leishmania donovani*, os flavonoides diméricos bilobetina, ginkgetina e isoginkgetina com a presença de grupos metoxílicos nas moléculas, mostraram-se mais ativos enquanto que os compostos 8-8''-biapigenina e amentoflavona sem grupos metoxílicos foram inativos.

A atividade leishmanicida também é potencializada pela presença das chalconas. Mello (2014) avaliou a atividade inibitória *in vitro* contra promastigotas e parasitas intracelulares após a infecção de *L. (V.) braziliensis*, de chalconas sintéticas com apenas substituintes metoxila acoplados ao anel aromático. Todas as chalconas testadas apresentaram efeito inibitório contra promastigotas de *L. (V.) braziliensis* após 24 h de incubação, com

concentrações que inibiram (IC_{50}) variando de $1,38 \pm 1,09 \mu\text{M}$ para $6,36 \pm 2,04 \mu\text{M}$, valores próximo ao composto de referência a anfotericina B ($4,25 \pm 0,91 \mu\text{M}$).

A presença do cromeno na estrutura das braquidinas é de grande relevância, uma vez que este grupo proporciona um caráter lipofílico às moléculas. Nicolaou (2000) ressalta que a característica mais importante das moléculas derivadas de benzopirano é o caráter lipofílico responsável por facilita sua liberação nas membranas biológicas.

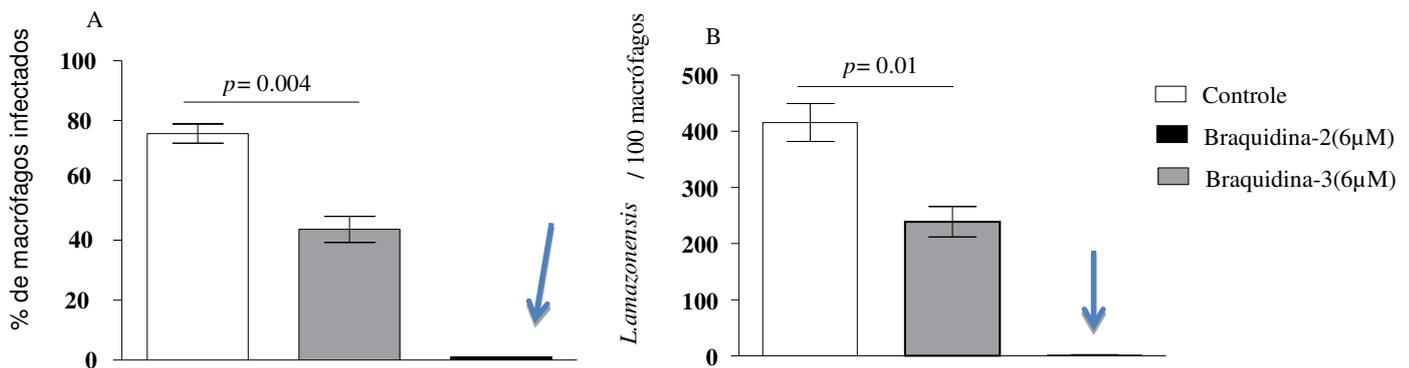
Os resultados sugerem ainda que além do cromeno, provavelmente os substituintes no anel C desempenham papel fundamental para o aumento na lipofilicidade e consequentemente a penetração do composto através da membrana celular do protozoário, uma vez que ambas as braquidinas possuem cromenos em suas estruturas, diferindo apenas nos grupo substituinte. A braquidina 2 mostrou-se mais ativa, possivelmente porque a presença do grupo metoxila é necessário para melhorar a penetração da membrana e inativar a arginase.

Silva (2012) sugere que, para que os novos fármacos sejam eficazes no combater da leishmaniose estes devem fazer um percurso para inibir a arginase, enzima da via metabólica da *leishmania*, necessária para proliferação do parasita e atenuação da infecção, que normalmente é encontrada no glicossoma do parasita na forma amastigota, do fagolissomo (lisossomo que realiza fagocitose) e dentro do macrófago. Desta forma é de fundamental importância à natureza lipofílica do novo fármaco uma vez, que este deverá atravessar diversas barreiras para conseguir inativar a arginase e assim comprometer a sobrevivência do parasita no hospedeiro.

Um importante critério na procura por compostos ativos com atividade leishmanicida é a avaliação da citotoxicidade em células do hospedeiro (SANTOS 2013). A citotoxicidade das braquidinas foi avaliada usando macrófagos, a braquidina-1 foi inativa em concentrações de até $20 \mu\text{M}$, e as braquidinas-2 e 3 exibiam valores de CL_{50} de $15,6$ e $17,3 \mu\text{M}$, respectivamente. Demonstrando ser menos citotóxicas que a violeta de genciana (LC_{50} $0,48 \mu\text{M}$) utilizada como referência. A partir da urgente necessidade de novos tratamentos mais eficazes, seguros e com menos efeitos colaterais as braquidinas surgem nessa perspectiva da substituição nos tratamentos convencionais, uma vez que apresentam a grande vantagem de serem menos tóxicas.

A atividade leishmanicida, foi avaliada através da eficácia do tratamento de murinos infectados pela Leishmania.

Figura 11- Efeito das braquidinas-2 e 3 contra amastigotas de *L. amazonensis*. **(A)** Porcentagem de células infectadas foi avaliada pela contagem de 100 células como número de parasitas. **(B)** Valor de p medido pelo teste T não pareado comparado ao grupo controle.



Fonte: Rocha et al 2019

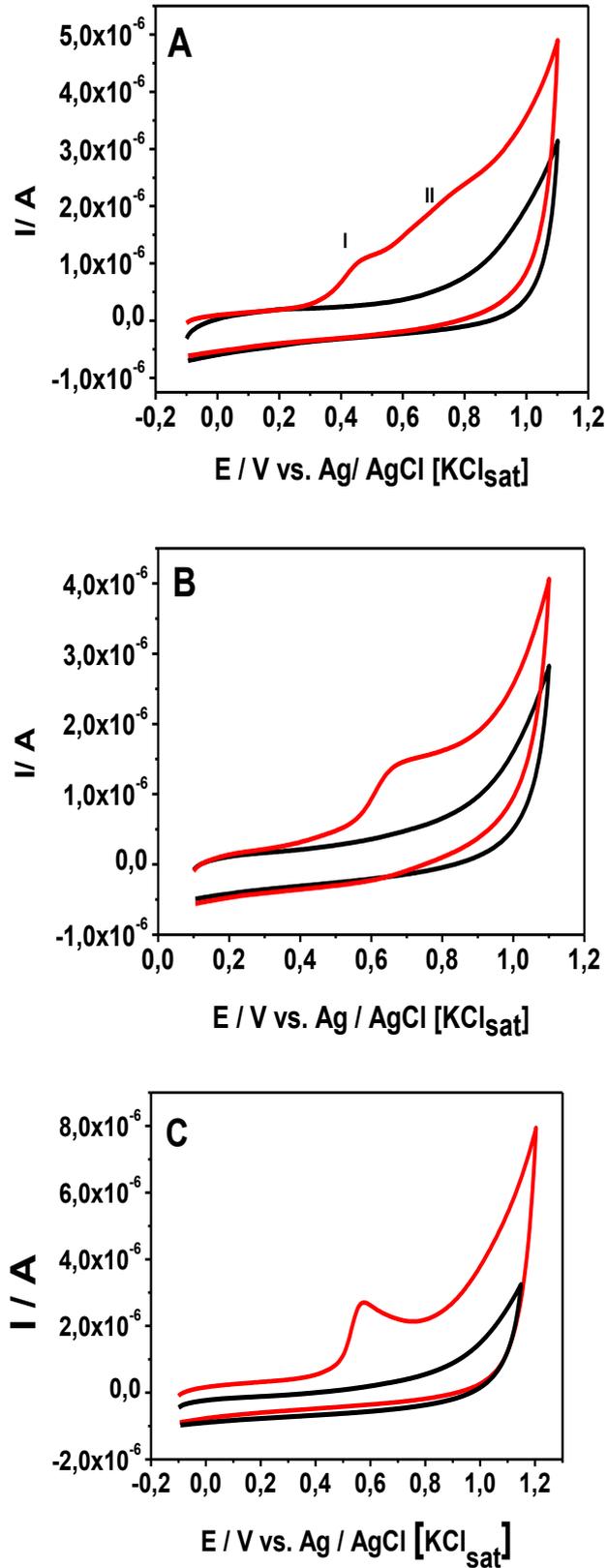
Observa-se uma redução no índice de infecção de macrófagos tratados com as braquidinas, ambas inibem o parasita intracelularmente, sendo que a braquidina-2 reduziu significativa o parasitismo em macrófagos, em relação ao grupo controle, houve também uma redução de 100% nos valores médios da contagem de parasitas nos macrófagos tratados com a braquidina-2, enfatizando que essa substância apresenta grande potencial para desenvolvimento de um novo fármaco para o tratamento da leishmaniose, uma vez que apresentou bons resultados em ambos os testes.

5.3 Estudo eletroquímico e Relação estrutura Atividade (SAR)

5.3.1 Estudo voltamétrico das braquidinas

O voltamograma cíclico obtido para a solução de braquidina 1 em tampão Briton Robson pH 7, Figura 12 (A), mostrou dois picos de oxidação em torno de 0,39 V e 0,66 V, o que caracteriza pelo menos dois processos de oxidação. Os voltamogramas das braquidinas 2 e 3 Fig. 12 (B) e (C) apresentaram apenas um pico e portanto apenas um processo de oxidação nos potenciais 0,60 V e 0,57 V respectivamente. Durante a varredura inversa não se observa picos de redução para ambas as braquidinas, demonstrando que o processo de oxidação destas, é irreversível para a faixa de varredura estudada.

Figura 12- Voltamogramas de voltametria cíclica obtidos com o eletrodo de carbono vítreo em solução tampão Britton Robinson ($0,04\text{ mol L}^{-1}$) contendo BRA 1 (A), BRA 2 (B) e BRA 3 (C) a $0,3\text{ mmol L}^{-1}$ no pH 7. $E_i = -0,1\text{ V}$; $E_f = 1,1\text{ V}$ Velocidade de varredura = 50 mV s^{-1}



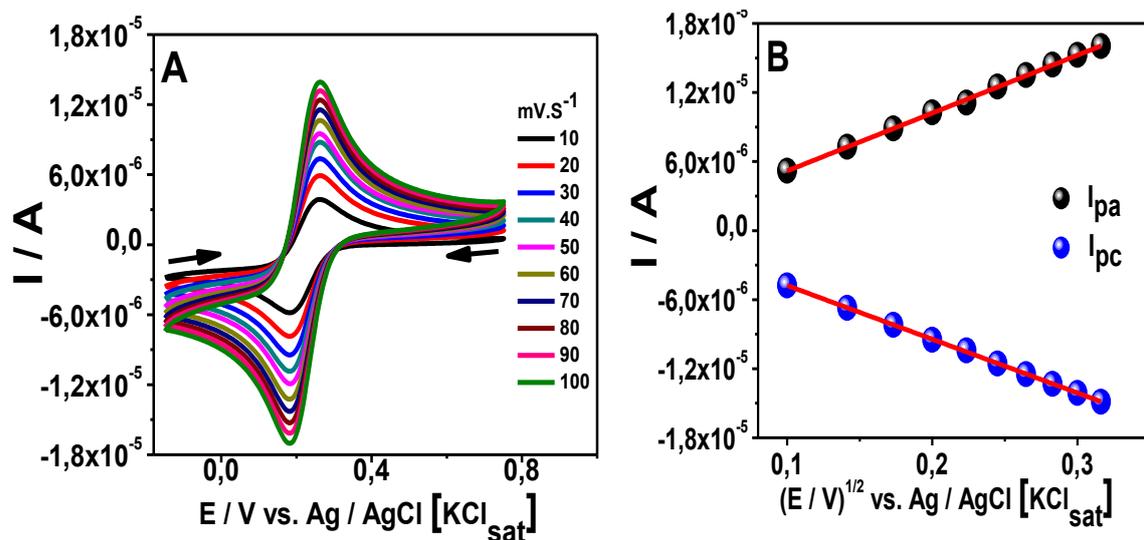
A braquidina 1 apresentou menor potencial de pico I (0,39 V) em relação as braquidinas 2 e 3 (0,60 e 0,57 V respectivamente), o que indica que a braquidina 1 é facilmente oxidada em relação às braquidinas que apresentam metoxila e hidrogênio como substituinte no anel C.

No geral os compostos fenólicos que contêm vários grupos hidroxila são mais facilmente oxidados, devido sua habilidade de doar prótons. Esses resultados são consistentes com o estudo apresentado por Gomes et al (2008), em que o comportamento eletroquímico das flavonas e 2-estirilcromonas, indicaram que o aumento do número de grupos hidroxila resultava na diminuição no potencial de pico anódico desses compostos.

5.3.2 Estudo dos processos oxidativos do par $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6^{4-}$ por voltametria cíclica sobre eletrodo de carbono vítreo

O voltamograma típicos do sistema Fe(III)/Fe(II) é apresentado na Figura 13. Verifica-se que o ferricianeto é considerado um sistema reversível, apresentando dois picos nos sentidos de varredura direta e inversa.

Figura 13- (A) Voltamogramas cíclicos do eletrodo de carbono vítreo em KCl 0,1 mol L⁻¹ contendo $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 0,001 mol L⁻¹ para diferentes velocidades de varredura de 10 a 100 mV s⁻¹. (B) Relação entre a corrente pico anódica (I_{pa}) e a catódica (I_{pc}) em função da raiz quadrada das velocidades de varreduras. $E_i = -0,1$ V; $E_f = 0,8$ V.



Fonte: Autor (2019)

$$I_{pa} = 5,02883 \times 10^{-5} + 1,52567 \times 10^{-7} v^{1/2} \quad (R = 0,999) \quad (1)$$

$$I_{p_c} = -4,6684 \times 10^{-5} - 1,01305 \times 10^{-7} v^{1/2} \quad (R = -0,999) \quad (2)$$

A área ativa efetiva do eletrodo foi calculada pela equação de Randles-Sevcik

$$I_p/V^{1/2} = (2,69 \times 10^5) \cdot A \cdot D^{1/2} n^{3/2} C \quad (3)$$

Onde o número de elétrons envolvidos (n) equivale a 1, a concentração das espécies eletroativas (C) igual a $0,001 \text{ mol L}^{-1}$ e o coeficiente de difusão (D) igual a $7,35 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ (PLIUTAA, 2018). Substituindo estes valores na eq. 3 o valor da área ativa encontrada corresponde a $6,617 \times 10^{-2} \text{ cm}^2$. O diâmetro do eletrodo corresponde a $0,3 \text{ cm}$ e a área real corresponde a $7,065 \times 10^{-2} \text{ cm}^2$.

5.3.3 Influência da velocidade de varredura

Para obter maiores informações sobre a influência da velocidade de varredura foi utilizada a voltametria de cíclica das braquidinas na faixa de $20 \text{ a } 100 \text{ mV s}^{-1}$ (Fig. 14 A, B e C).

Figura 12- Voltamogramas cíclicos do eletrodo de carbono vítreo em solução tampão Britton Robinson ($0,04 \text{ mol L}^{-1}$) contendo BRA 1(A), BRA 2 (B) e BRA 3 (C) ($0,3 \text{ mmol L}^{-1}$) para diferentes velocidades de varredura de $20 \text{ a } 100 \text{ mV s}^{-1}$, $E_i = -0,1 \text{ V}$; $E_f = 1,1 \text{ V}$ no pH 10. Relação entre a corrente pico anódica (I_{pa}) em função da raiz quadrada das velocidades de varreduras de $20 \text{ a } 100 \text{ mV s}^{-1}$.

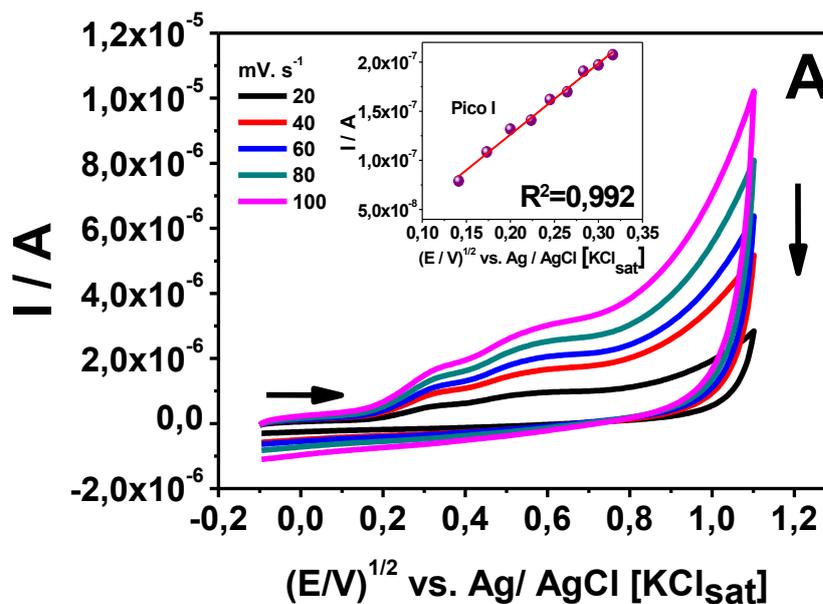
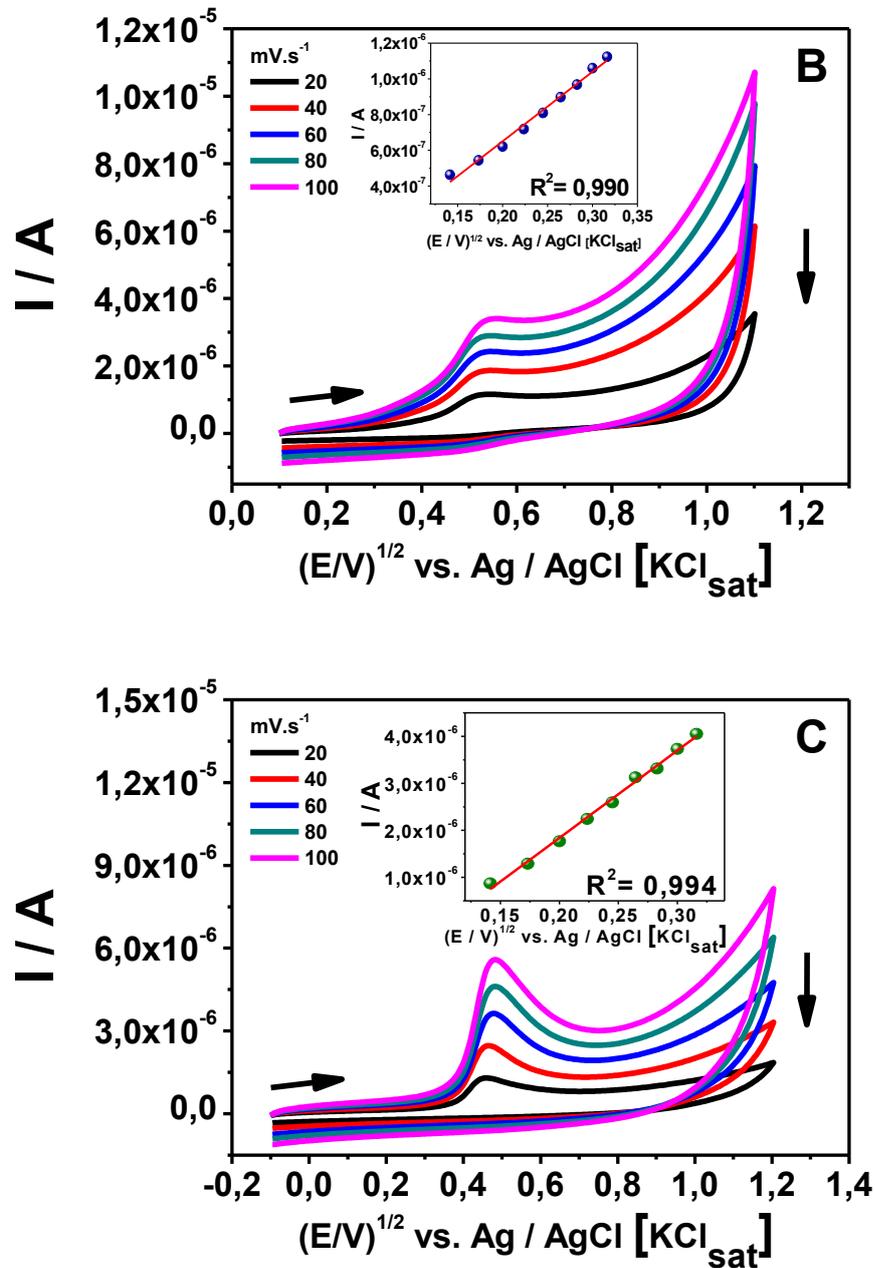


Figura 14-Continuação



Fonte: Autor (2019)

Analisando a Figura 14 (Apêndice P), nota-se que existe uma dependência linear entre corrente de pico anódica (i_{pa}) e raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{1/2}$) para ambos os picos anódicos, ou seja, essa dependência linear nos sugere que o processo eletródico ocorre através do transporte das moléculas do analito até a superfície do eletrodo por difusão (WANG et al., 2007; XIAO et al., 2007).

A linearidade das correntes de pico de oxidação com a raiz quadrada da velocidade de varredura ($V \cdot s^{-1}$), para as BRA 1, 2 e 3 são descritas pelas seguintes equações, respectivamente:

$$I_{p_a} = -1,9058 \times 10^{-8} + 7,25823 \times 10^{-7} v^{1/2} \quad (R = 0,994) \quad (4)$$

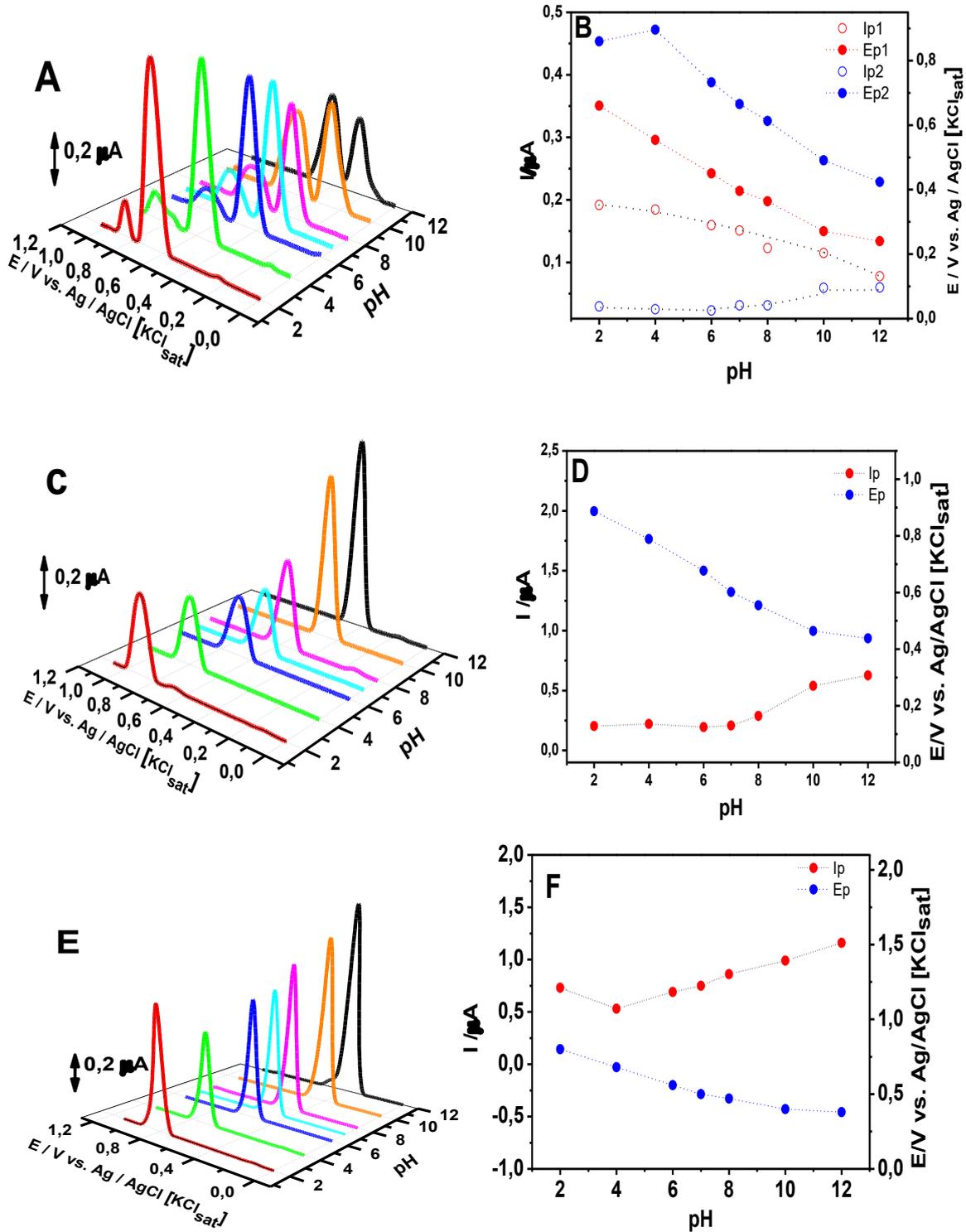
$$I_{p_a} = -1,2845 \times 10^{-7} + 3,89474 \times 10^{-6} v^{1/2} \quad (R = 0,990) \quad (5)$$

$$I_{p_a} = -1,87916 \times 10^{-6} + 1,85902 \times 10^{-5} v^{1/2} \quad (R = 0,994) \quad (6)$$

5.3.4 Influência do pH

O estudo de pH das braquidinas foi realizado por voltametria de pulso diferencial na faixa de pH 2 à 12 representado pelas Figuras 15 (A, B, C, D, E, F). Observa-se que os potenciais de picos anódicos para as braquidinas 1, 2 e 3 deslocaram para valores menos positivos com o aumento de pH, percebe-se que em meio alcalino, as braquidinas são facilmente oxidadas, de forma que a oxidação é dependente do pH. O deslocamento dos potenciais de pico anódico para valores menos positivos é resultado do aumento da concentração de OH^- , e por consequência a remoção de H^+ torna-se favorecida permitindo a ionização das moléculas (BARBOSA, 2011).

Figura 13- Voltamogramas de pulso diferencial (correção de linha de base) obtidos com o eletrodo de carbono vítreo em solução tampão Britton Robinson ($0,04 \text{ mol L}^{-1}$) contendo Bra 1(A), Bra 2 (C) Bra 3 (E) ($0,3 \text{ mmol L}^{-1}$) em diferentes pHs (2, 4, 6, 7, 8, 10 e 12). $E_i = 0 \text{ V}$; $E_f = 1,1 \text{ V}$ e velocidade de varredura = 50 mV s^{-1} ; Gráfico do E_p (●), I_p (●) do pico vs. pH (B) Bra 1, (D) Bra 2 e (F) Bra 3.



As equações da reta que relacionam E_p versus pH para as braquidinas estão apresentadas abaixo:

$$E_{p1} \text{ Bra 1 (V)} = 0,75 - 0,050 \text{ pH} \quad (7)$$

$$E_{p2} \text{ Bra 1 (V)} = 1,09 - 0,058 \text{ pH} \quad (8)$$

$$E_p \text{ Bra 2 (V)} = 1,00 - 0,056 \text{ pH} \quad (9)$$

$$E_p \text{ Bra 3 (V)} = 0,98 - 0,058 \text{ pH} \quad (10)$$

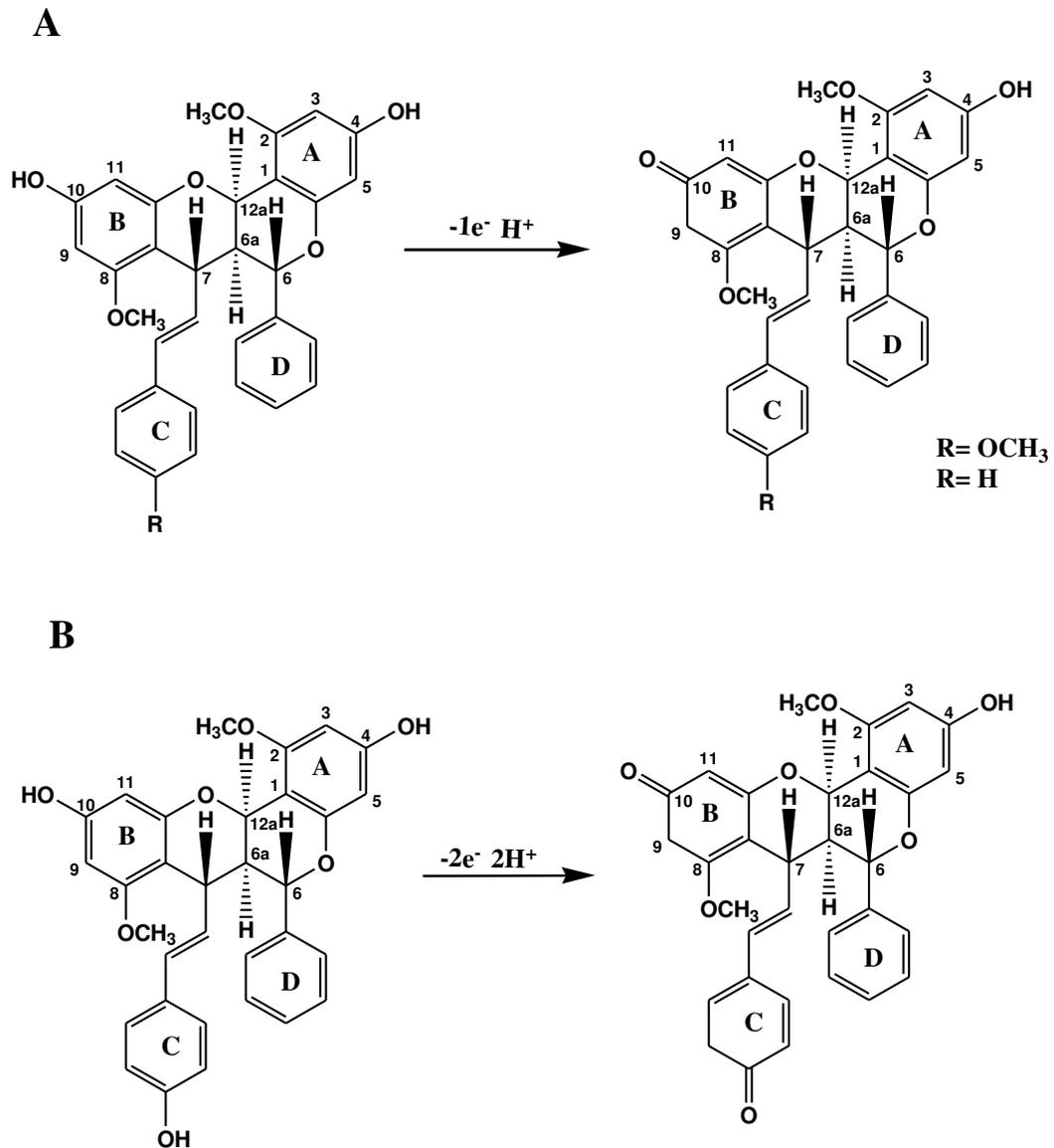
As inclinações das retas foram de aproximadamente 50 mV e 58 mV para os pico 1 e 2 da Bra 1, 56 mV para Bra 2 e 58 mV para Bra 3 na faixa de pH 2-8 com exceção do pico 2 da Bra 2 em que a inclinação calculada foi correspondente a faixa de pH 4-12. Os valores das inclinações das retas mencionadas acima sugerem que o mecanismo de oxidação envolve a troca do mesmo número de prótons e elétrons (SMITH, 2006).

Os números de elétrons (n) envolvidos foi determinado por meio da Equação 11. Para esse processo foi encontrado valor de n muito próximo de 1 para as Bra 2 e 3, o que indica que o processo de oxidação dessas braquidinas envolve a transferência de um elétron, e consequentemente, um próton. Enquanto para a Bra 1, um elétron foi calculado para cada pico, resultando em n igual a 2, ou seja dois elétrons e dois prótons.

$$W_{1/2} = 3,52RT/nF \quad (11)$$

A partir das informações obtidas sobre a oxidação das braquidinas, o mecanismo de oxidação foi proposto (Fig. 16). Acredita-se que a oxidação das Bra 2 e 3 ocorre na hidroxila do anel B, esse efeito pode ser atribuído a presença da porção olefina que aumenta o poder de elétrons doador do substituinte ligado a este anel, possibilitando a ressonância no anel B após a oxidação. Desta forma o hidrogênio da hidroxila é liberado como próton e depois um elétron é retirado, formando um radical fenoxi.

Figura 14- Esquema de oxidação das braquidinas.



Fonte: Autor (2019)

Para a Bra 1 (Fig. 16B), acredita-se que a primeira oxidação ocorre na hidroxila do anel C, provavelmente o grupo hidroxila presente neste anel encontra-se mais suscetível a oxidação, devido a presença da porção olefina, que facilita a deslocalização eletrônica do anel C contribuindo para sua estabilização. E a segunda oxidação ocorre na hidroxila do C-10 do anel B, assim como as outras braquidinas. A primeira etapa da reação de oxidação da braquidina 1 esta de acordo com o estudo realizado por Gomes (2008) em a porção estirilo desempenha importante função na estabilização das 2-estirilcromonas após a oxidação, possibilitando a esta família de compostos heterocíclicos menores potenciais de oxidação e consequentemente melhores atividades antioxidantes, quando comparadas com as flavonas.

A eficácia da terapia medicamentosa resulta da complexa interação de múltiplos processos que regulam a disposição do fármaco e resposta (WILKINSON, 2001; ROSS, 2001). As propriedades físico-químicas de um fármaco afetam a extensão da absorção do fármaco e o acesso aos compartimentos alvo (RICHARD, 2005).

Os potenciais de pico e os valores da avaliação da atividade leishmanicida estão resumidos na Tabela 3.

Tabela 3- Relação em potenciais anódicos das braquidinas e atividade leishmanicida.

Compostos	IC ₅₀ (μM)	Ep _a 1 (V)	Ep _a 2 (V)
Braquidina-1	N.A.	0,39	0,66
Braquidina-2	2.20 ± 0.09	0,60	-
Braquidina-3	6.25 ± 1.28	0,57	-

N.A: não ativa

Fonte: Autor (2019)

Acredita-se que a capacidade de inibição da forma amastigota da *Leishmania amazonensis* pode estar relacionada com potenciais de oxidação mais positivos, corroborado pela braquidina 2. Os fármacos em sua maioria são modificados no organismo, por uma grande variedade de transformações biológicas, tornando-os inativos e/ou tóxicos. Os potenciais de oxidação menos positivos facilitam o processo de oxidação e durante o processo de oxidação, as moléculas podem resultar em compostos estruturalmente modificados (biotransformação), apresentando profundo impacto sobre o efeito farmacológico, resultando baixa biodisponibilidade e alterando o mecanismo de ação.

A biotransformação de fármacos pode ser dividida em duas fases. A fase I consiste nas reações de oxidação, e hidrólise, ocasionando sempre uma modificação estrutural do fármaco, o que na maioria das vezes pode levar a sua inativação. Na fase II, conhecida como fase de conjugação, ocorrem reações de conjugação do fármaco com substâncias endógenas, visando facilitar sua excreção (COSTA, 1999).

Todos os medicamentos se alteram e essas modificações devem-se a fatores externos (pH, temperatura, luz, umidade, oxidação) e/ou a fatores internos (interações entre fármacos e os solventes e ou adjuvantes, compostos dos recipientes, presença de impurezas, entre outros). As alterações podem levar à perda parcial ou total da atividade do medicamento ou à formação de produtos que possuem maior toxicidade do que o fármaco que lhes deu origem (Prista et al., 1990; Fernández et al., 2001).

De acordo com Papanikos et al. (2002), quanto maior o valor de E_{p_a} menor é o seu poder de elétron doador e desta forma, teoricamente, maior a sua estabilidade química. Os processos oxidativos são umas das principais causas de instabilidade dos fármacos (Gennaro et al., 2000; Lachman et al., 2001), nessa perspectiva a estabilidade oxidativa, apresenta-se como fator importante para o desenvolvimento de novos fármacos, uma vez que como perspectiva de trabalhos futuros pretende-se desenvolver uma formulação com os compostos obtidos de *Fridericia platyphylla* para tratamento da leishmaniose, sendo portanto a estabilidade oxidativa de extrema relevância para o planejamento do tipo de formulação que será desenvolvida.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir da fase diclorometânica do extrato hidroetanólico das raízes da *Fridericia platyphylla* foi possível reisolar três flavonoides diméricos raros por cromatografia em coluna aberta pela primeira vez. Estas substâncias foram identificadas como compostos polifenólicos, constituídos por quatro anéis aromáticos (A, B, C e D) e dois grupamentos pironas. As braquidinas apresentam um núcleo base comum, flavonoides dimerizados, diferindo apenas no substituinte do anel C. As braquidinas 2 e 3 mostraram potente atividade contra a *Leishmania Amazonensis*, nas formas promastigotas e amastigotas. Observou-se que a braquidina-2 apresentou mais ativa contra a amastigota, a forma mais severa do parasita, provavelmente por apresentar uma estrutura mais lipofílica, e por consequência ter mais facilidade em romper a parede da membrana do protozoário e assim inativar a enzima que mantém o parasita.

Observou-se atividade da braquidina-2 na redução do parasitismo nos macrófagos, esta se mostrou mais ativa, provavelmente por apresentar uma estrutura mais lipofílica, e por consequência ter mais facilidade em romper a parede da membrana do protozoário e assim inativar possivelmente a arginase. Com base nos resultados dos testes *in vitro* e a baixa citotoxicidade fica evidente que a braquidina 2 mostra-se bastante promissora para o desenvolvimento de um novo fármaco para o tratamento da leishmaniose.

O estudo das propriedades eletroquímicas das braquidinas foi realizado por voltametria cíclica e de pulso diferencial, na qual foi observada uma resposta de um único pico de oxidação para as braquidinas 2 e 3 (0,60 e 0,57 respectivamente), com exceção da braquidina 1 que apresentou dois picos de oxidação irreversível no potencial 0,39 V e 0,66 V. Observou-se uma dependência do potencial de pico em função do aumento do pH, demonstrando que

em pHs mais alcalinos as braquidinas tendem a oxidar com mais facilidade. A influência da velocidade de varredura também foi avaliada, observando uma dependência linear entre corrente de pico anódico e raiz quadrada da velocidade de varredura, evidenciando que o processo eletródico de transporte das moléculas do analito até a superfície do eletrodo é controlado por difusão. Tendo em vista que as propriedades físico-químicas de um fármaco afetam a extensão da absorção do fármaco e o acesso aos sítios alvo, relacionou-se a capacidade de inibição da *Leishmania* com os potenciais de pico, observou-se que potenciais mais positivos favorece a atividade leishmanicida. Vale ressaltar que potenciais de oxidação menos positivos levam a processos oxidativos mais fáceis, e esses processos de oxidação podem resultar na biotransformação da substância, tornando-a ineficientes ou prejudiciais. O presente estudo é de grande relevância para o cenário tecnológico nacional, uma vez que representa um incentivo para a exploração e valorização do Cerrado brasileiro, de forma que o produto intelectual aqui gerado poderá proporcionar um produto biotecnológico.

PERSPECTIVA DE TRABALHOS FUTUROS

- Desenvolver formulações nanoestruturada contendo substâncias isoladas das raízes de *Fridericia platyphylla* com atividade antiparasitária.
- Avaliar o efeito das nanoestruturas com os compostos encapsulados em ensaios de avaliação *in vitro*.

REFERÊNCIAS

ALBERNAZ, L.C.; de PAULA, J.E.; ROMERO, G. A. S; SILVA, M. R. R.; GRELLIER, P.; MAMBU, L.; ESPINDOLA, L.S. Investigation of plant extracts in traditional medicine of the Brazilian Cerrado against protozoans and yeasts. *Journal of Ethnopharmacology*. 131: 116–121. 2010.

ALCERITO, T.; BARBO, F. E.; NEGRI, G.; SANTOS, D. Y. A. C.; MEDA, C. I.; YOUNG, M. C. M.; CHÁVEZ, D.; BLATT, C. T. T. Foliar epicuticular wax of *Arrabidaea brachypoda* : flavonoids and antifungal activity. *Biochemical Systematics and Ecology*, 30: 7, 677-683, 2002.

ALVAR, J.; VELEZ, I. D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoSOne*, 7ed., 2012.

ARROYO-CURRÁS, N.; ROSAS-GARCÍA, V. M.; VIDEA, M. Substituent Inductive Effects on the Electrochemical Oxidation of Flavonoids Studied by Square Wave Voltammetry and Ab Initio Calculations. *Molecules*, 21(11), 2016.

ASSCHE, T. V.; DESCHACHT, M.; DA LUZ, R. A. I.; MAES, L.; COS, P. *Leishmania*–macrophage interactions: Insights into the redox biology. *Free Radical Biology & Medicine*. 51: 337–351. 2011.

BARBOSA, N. L. Caracterização eletroquímica e estudos mecânico-quânticos para obtenção de propriedades eletrônicas de parabenos. Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal de Goiás, Faculdade de Farmácia, 2011.

BLATT, C. T. T.; DOS SANTOS, M.M.D.; SALATINO, A. Flavonoids of Bignoniaceae from the “cerrado” and their possible taxonomic significance. *Pl. Syst. Evol.* 210:289-297, 1998.

BÔAS, G. K.; VILLAS, OLIVEIRA, L. F. G.; BENJAMIN, G. Oportunidades para inovação no tratamento da leishmaniose usando o potencial das plantas e produtos naturais como fontes de novos fármacos. *Revista Fitos*, Rio de Janeiro, v. 8, n. 1, p.1-72, 2013.

BOZAL, B.; USLU, B.; ÖZKAN, S. A. A Review of Electroanalytical Techniques for Determination of Anti-HIV Drugs. *International Journal of Electrochemistry*, 11, 1–17, 2011.

BRANDÃO, G. C.; KROON, E. G.; DOS SANTOS, J. R.; STEHMANN, J. R.; LOMBARDI, J. A.; OLIVEIRA, A. B. Antiviral activity of Bignoniaceae species occurring in the State of Minas Gerais (Brazil). *Letters in Applied Microbiology*, v. 51, n. 4, p. 469-476, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Leishmaniose visceral. Recomendações clínicas para redução da letalidade. Série A. Normas e Manuais Técnicos. 2011.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações. Brasil lidera casos de leishmaniose tegumentar na América Latina e Amazonas registra mais de 9 mil casos nos últimos anos. 2015. Disponível em: <<http://portal.inpa.gov.br/index.php/component/content/article?id=2238>>. Acesso em: 20 maio 2018.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. O Bioma Cerrado. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biomas/cerrado>>. Acesso em: 11 maio 2018.

BRETT, A. M. O.; GHICA, M. E. Electrochemical Oxidation of Quercetin. *Electroanalysis*, 15(2), 1745-1750, 2003.

BUTTERWECK, V.; NAHRSTEDT, A. What Is the Best Strategy for Preclinical Testing of Botanicals? A Critical Perspective. *Planta Med.* 78: 747–754, 2012.

COS, P.; VLIETINCK, A. J.; BERGHE, D. V.; MAES, L. Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. *J Ethnopharmacol* 106: 290–302, 2006.

COSTA, T. D. & STRECK, E. L. Isoformas do citocromo P450 e outros fatores que alteram a biotransformação de fármacos *Infarma*, v. 11, n. 11/12, p. 36-41, 1999.

CUNHA, N. L.; UCHÔA, C. J. M.; CINTRA, L. S. In Vitro Schistosomicidal Activity of Some Brazilian Cerrado Species and Their Isolated Compounds. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012.

DICULESCU, V. C.; KUMBHAT, S.; BRETT, A. M. O. Electrochemical Behaviour of Isatin at a Glassy Carbon Electrode, *Analytica Chimica Acta*, 575(2), 2006.

DUARTE, M. I. S.; BADARÓ, R. S. Leishmaniose visceral (calazar). In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. Tratado de infectologia. 4.ed. São Paulo: Atheneu, p. 1707-36, 2009.

ENSAFI, A. A.; KHAYAMIAN T.; KHALOO, S. S. Application of adsorptive cathodic differential pulse stripping method for simultaneous determination of copper and molybdenum using pyrogallol red. *Analytical Chimica Acta*, v. 505, p. 201-207, 2004.

ESPINDOLA, L. S.; VASCONCELOS Jr. J. R.; de MESQUITA, M. L.; MARQUIÉ, P.; de PAULA, J. E.; MAMBU, L.; SANTANA, J. M. Trypanocidal activity of a new diterpene from *Casearia sylvestris* var. *lingua*. *Planta Medica*. 70: 1093– 1095. 2004.

FERNANDES, S. C. Biossensores eletroquímicos para compostos fenólicos usando novos materiais. Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Programa de Pós-Graduação em Química, Florianópolis, 2012.

FIGUEREDO, F. G.; TINTINO, S. R.; BRITO, D. I. V.; BRAGA, M. F. B. M.; LEITE, N. F.; LUCENA, B. F. F.; SOBRAL, S. C. E.; GOMEZ, M. C. V.; COUTINHO, H. D. M. Avaliação das potenciais atividades tripanocida e antileishmania do extrato de folhas de *Piper arboreum* (Piperaceae) e de suas frações. *Rev Ciênc Farm Básica Apl* 35: 149-154, 2014.

FILIPPIN, F. B. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. *RBCFRev. Bras. Ciênc. Farm.*, v. 42, n. 2, p. 167-194, 2006.

FRÖHLICH, J. K. et al. Compostos isolados de *Jatropha isabelli* (müell arg) como atividade gastroprotetora. *Saúde (Santa Maria)*, v. 36, n. 2, p. 19-27, 2010.

GANIS, P.; AUITABILE, G.; MECHLINKI, W.; SCHAFFNER, C.P. Polyene macrolide antibiotic amphotericin B. Crystal structure of the N-iodo-acetyl derivative. *J. Amer. Chem. Soc.*, v. 93, p. 4560-4564, 1971.

GARCIA, F. Estudo fitoquímico da fração acetato do extrato etanólico das folhas de *Arrabidaea brachypoda* (DC) Bureau – Bignoniaceae e atividades antioxidante e inibitória da enzima mieloperoxidase das substâncias isoladas. 2008. 101f. Dissertação (Mestrado em Química na Área de Química Orgânica) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.

GOMES, A.; FERNANDES E.; GARCIA, M. B. Q.; SILVA, A. M.,S.; PINTO, D. C. G. A.; SANTOS, C. M. M.; CAVALEIRO, J. A. S.; LIMA, J. L. F. C. Cyclic voltammetric analysis of 2-styrylchromones: Relationship with the antioxidant activity. *Bioorg. Med. Chem.* 16:7939–7943, 2008.

GONÇALVES, A. H. Mecanismo de ação e toxicidade da anfotericina B no tratamento de micoses. Monografia-Instituto de Ciências Biológicas: Universidade Federal de Minas Gerais, 2011.

KUMAR, S. A.; TANG, C. F.; CHEN, S. M. Poly (4- Amino-1-1'-azobenzene-3,4'-disulfonic Acid) Coated Elec- trode for Selective Detection of Dopamine from Its Inter- ferences, *Talanta*, 74(4), 860-866, 2008.

LIÃO, L. M.; SILVA, G. A.; MONTEIRO, M. R.; ALBURQUERQUE, S. Trypanocidal Activity of Quinonemethide Triterpenoids from *Cheiloclinium cognatum* (Hippocrateaceae). *Z. Naturforsch.* 63 c, 207-210, 2008.

MARKHAM, K. R. Methods in plant biochemistry: Flavones, flavonols and their glycosides; Harborne, J. B.; Mabry, T. J., eds.; Academic Press: New York, p. 197-235, 1989.

MARTINS, J. R. P. Nota técnica número 52/2011 CGDT/DEVIT/SVS/MS. Orientações sobre a utilização da anfotericina B para o tratamento de pacientes com as leishmanioses. Brasília: Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis, Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis, 2011.2p

MASEK, A.; CHRZESCIJANSKA, E.; ZABORSKI, M. Electrooxidation of morin hydrate at a Pt electrode studied by cyclic voltammetry, Food Chemistry, 148, 18-23, 2014.

MASEK, A.; ZABORSKI, M.; CHRZESCIJANSKA, E. Electrooxidation of flavonoids at platinum electrode studied by cyclic voltammetry, Food Chemistry, 127(2), 699-704, 2011.

MELLO, TATIANE F.P.; BITENCOURT, HERIBERTO R.; PEDROSO, RAISSA B.; ARISTIDES, SANDRA M.A.; LONARDONI, MARIA V.C.; SILVEIRA, THAIS G.V. Leishmanicidal activity of synthetic chalcones in *Leishmania* (Viannia) braziliensis. Experimental Parasitology, 136, 27-34, 2014.

MENEGUETTI, D. U. O. Plantas da Amazônia Brasileira com Potencial Leishmanicida *in vitro* –Ver. Patol. Trop. v. 44, n. 4, p. 359-374, 2015.

MESQUITA, M. L. Potencial antitumoral de substâncias isoladas de plantas do Cerrado brasileiro: estudos preliminares do mecanismo de ação da atividade citotóxica. Tese-Programa de Pós Graduação em Ciências Médicas, Universidade de Brasília, 2009.

MICHELETTI, A. C.; BEATRIZ, A. Progressos recentes na pesquisa de compostos orgânicos com potencial atividade leishmanicida. Revista Virtual de Química, v. 4, n. 3, p. 268-286, 2012.

MITROPOULOS, P.; KONIDAS, P.; DURKIN-KONIDAS, M. New World cutaneous leishmaniasis: Updated review of current and future diagnosis and treatment. Journal of the American Academy of Dermatology. 63: 309-322. 2010.

NADY, H.; EL-RABIEI, M. M.; ABD EL-HAFEZ, G. M. Electrochemical oxidation behavior of some hazardous phenolic compounds in acidic solution, Egyptian Journal of Petroleum, 26 (3), 669-678, 2017.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. Journal of Natural Products, v. 75, n. 3, p. 311-335, 2012.

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. *J. Am. Chem. Soc.*, 122 (41), 9939–9953, 2000.

OLIVEIRA, L. F.; SCHUBACH, A. O.; MARTINS, M. M.; PASSOS, S. L.; OLIVEIRA, R. V.; MARZOCHI, M. C.; ANDRADE, C. A. Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. Acta Tropica, 118:87-96, 2011.

PAPANIKOS, A.; EKLUND, J.; JACKSON, W. R.; KENCHE, V. B.; CAMPI, E. M.; ROBERTSON, A. D.; JARROTT, B.; BEART, P. M.; MUNRO, F. E.; CALLAWAY, J. K. Cyclic voltammetry as an indicator of antioxidant activity. Australian Journal of Chemistry, v. 55(3), p. 205-212, 2002.

PEREIRA, I. O. Determinação da atividade leishmanicida, Antiproteolítica e antioxidante de *Arrabidaea brachypoda*. Tese (Doutorado) Universidade Estadual Paulista. Araraquara, 2012.

PLIUTAA, K.; CHEBOTAREVA, A.; KOICHEVAA, A.; BEVZIUKA, K.; SNIGURA, D. Development of a novel voltammetric sensor for the determination of quercetin onto electrochemically pretreated carbon-paste electrode. *Analytical Methods*, 2018.

RIBEIRO, G. C.; ROCHA, C. Q.; TANAKA, A.; SILVA, I. S. D. A Fast, Direct and Sensitive Analysis Method for Catechins Determination in Green Tea by Batch Injection Analysis with Multiple-Pulse Amperometry (BIA-MPA). *Anal. Methods*, 2018.

RICHARD, H. H.; RICHARD, B. K. Transporters and drug therapy: Implications for drug disposition and disease. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 78(3):260-77, 2005.

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, p. 396-401, 2011.

ROCHA, C. Q. et al. Leishmanicidal activity of parts from *Arrabidaea brachypoda* (DC) Bureau (Bignoniaceae). *Rev. Univ. Vale do Rio Verde*, v. 10, n. 1, p. 49-55, 2012.

ROCHA, C. Q.; QUEIROZ, E. F.; MEIRA, C. S.; MOREIRA, D. R. M.; SOARES, M. B. P.; MARCOURT, L.; VILEGAS, W.; WOLFENDER, J. Dimeric Flavonoids from *Arrabidaea brachypoda* and Assessment of Their Anti-*Trypanosoma cruzi* Activity. *Journal of Natural Products (Print)*, v. 77, p. 1345-1350, 2014.

ROCHA, C. Q.; VILELA, F. C.; SANTA-CECÍLIA, F. V.; CAVALCANTE, G. P.; VILEGAS, W.; GIUSTI-PAIVA, A.; SANTOS, M. H. Oleanane-type triterpenoid: an anti-inflammatory compound of the roots *Arrabidaea brachypoda*. *Revista Brasileira de Farmacognosia (Impresso)*, v. 25, p. 228-232, 2015.

ROCHA C. Q., et al., Gastroprotective effects of hydroethanolic root extract of *Arrabidaea brachypoda*: Evidences of cytoprotection and isolation of unusual glycosylated polyphenols, *Phytochemistry*, 2016.

ROCHA, V.; ROCHA, C.; QUEIROZ, E.; MARCOURT, L.; VILEGAS, W.; GRIMALDI, G.; FURRER, P.; ALLÉMANN, E.; WOLFENDER, JEAN-LUC; SOARES, M. Antileishmanial Activity of Dimeric Flavonoids Isolated from *Arrabidaea brachypoda*. *Molecules*. 24. 1. 2018.

RODRIGUES, A. M. S.; de PAULA, J. E.; ROBLLOT, F.; FOURNET, A.; ESPINDOLA, L. S. Larvicidal activity of *Cybistax antisyphilitica* against larvae. *Fitoterapia*. 76: 755–757. 2005.

RODRIGUES, E.; MENDES, F.R.; NEGRI, G. Plants indicated by Brazilian Indians to central nervous system disturbances: a bibliographical approach *Current Medicinal Chemistry-Central Nervous System Agents*, 6, 211-244, 2006.

ROSS, E. M.; KENAKIN, T. P. Pharmacodynamics: mechanisms of drug action and the relationship between drug concentration and effect. In: Hardman JG, Limbird LE, Gilman AG, editors. *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. New York: McGrawHill; p. 31-43, 2001.

SÁ, STONE.; CHAUL, L.T.; ALVES, V. F.; FIUZA, T. S.; TRESVENZOL, L. M. F.; FERRI, P. H.; BORGES, L. L.; PAULA, J.R. Phytochemistry and antimicrobial activity of *Campomanesia adamantium*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 28: 3, 303-311, 2018.

SAHA, P.; MUKHOPADHYAY, D.; CHATTERJEE, M. Immunomodulation by chemotherapeutic agents against Leishmaniasis. *International Immunopharmacology*. 11: 1668–1679. 2011.

SALLES, A. E. H. Jardim Botânico de Brasília, 2007.

SANTOS, C. M. M.; GARCIA, B. Q.; SILVA, A. M. S.; MORLIÈRE, R. S.; FERNANDES, P. E. Electrochemical characterization of bioactive hydroxyxanthenes by cyclic voltammetry, *Tetrahedron Letters*, 54(1), 85-90, 2013.

SANTOS, C. S. et al . Representações sociais de profissionais de saúde sobre doenças negligenciadas. *Esc. Anna Nery*, Rio de Janeiro, v. 21, n. 1, 2017.

SANTOS, K. K. A.; ROLÓN, M.; VEGA, C.; DE ARIAS, A. R.; COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M. Atividade leishmanicida in vitro de *Eugenia uniflora* e *Momordica charantia*. *Rev Ciênc Farm Básica Apl.*, 34(1):47-50, 2013.

SILVA, M. F. L.; ZAMPIERI, R. A.; MUXEL, S. M.; BEVERLEY, S. M.; FLOETER-WINTER, L. M. *Leishmania amazonensis* Arginase Compartmentalization in the Glycosome Is Important for Parasite Infectivity. *PLoS ONE* 7 (3):e34022. 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034022> de (2012).

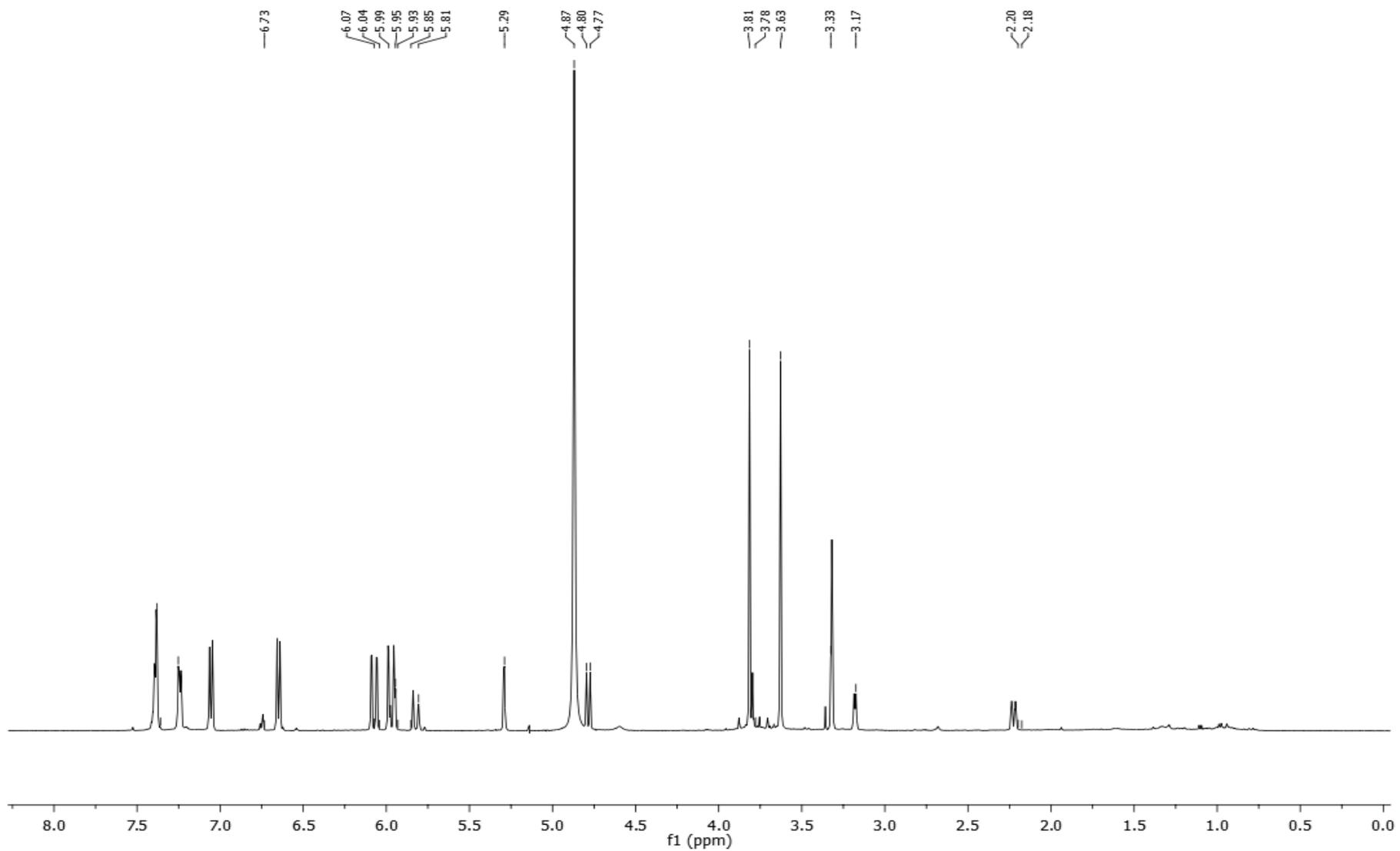
TEIXEIRA, J. G.; DIAS, C. B.; TEIXEIRA, D. M. Electrochemical Characterization and Quantification of the Strong Antioxidant and Antitumor Agent Pomiferin. *Electroanalysis*, 21(21), 2345-2353, 2009.

TIUMAN, T.S.; SANTOS, A.O.; UEDA-NAKAMURA, T.; FILHO, B.P.D.; NAKAMURA C.V. Recent advances in leishmaniasis treatment. *International Journal of Infectious Diseases*. 15: e525–e532. 2011.

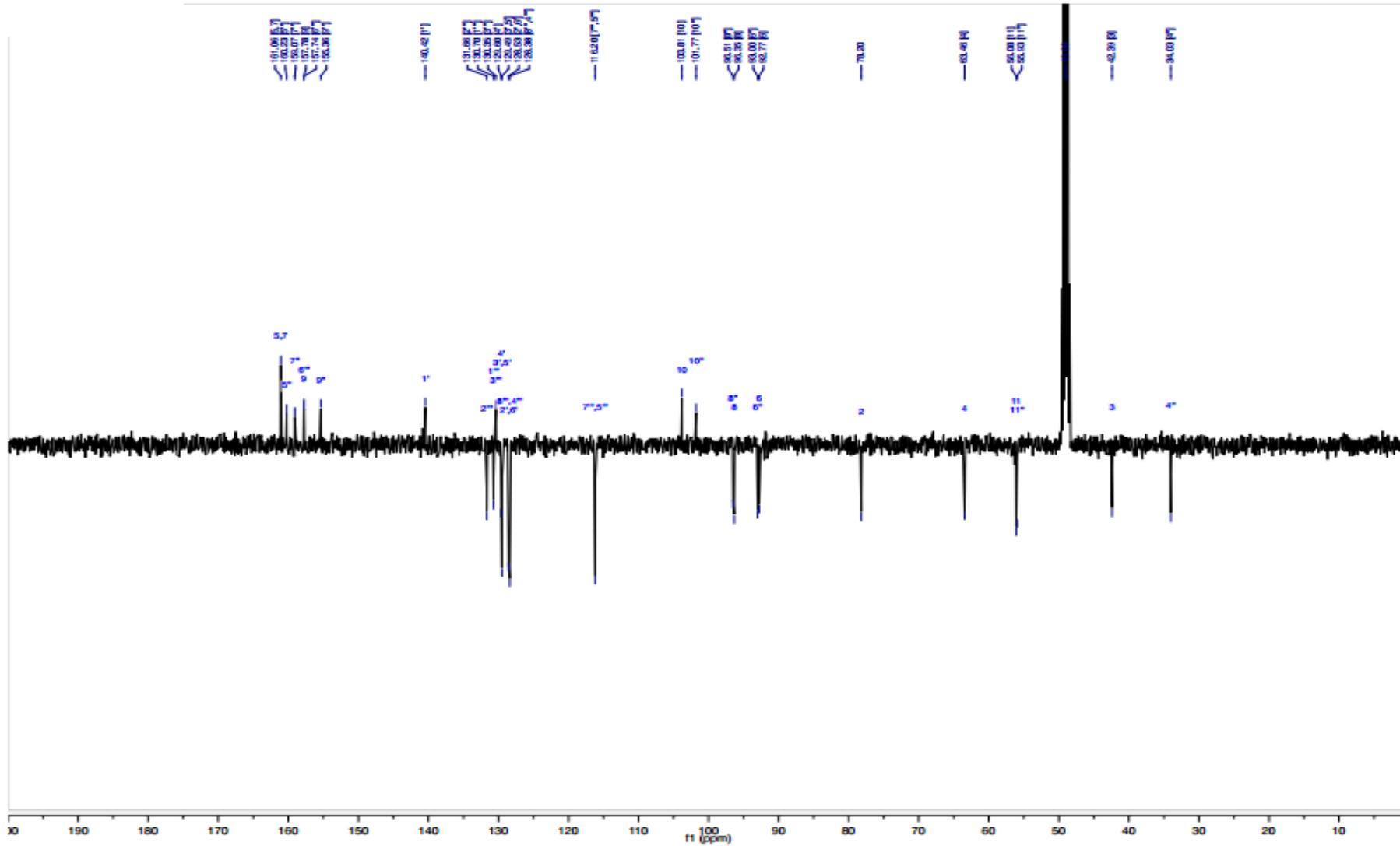
VIEIRA, S. C. H.; SÓLON, S.; VIEIRA, M. C.; ZÁRATE, N. A. H. Levantamento de fitoterápicos manipulados em farmácias magistrais de Dourados-MS. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 20, n. 1, p. 28-34, 2010.

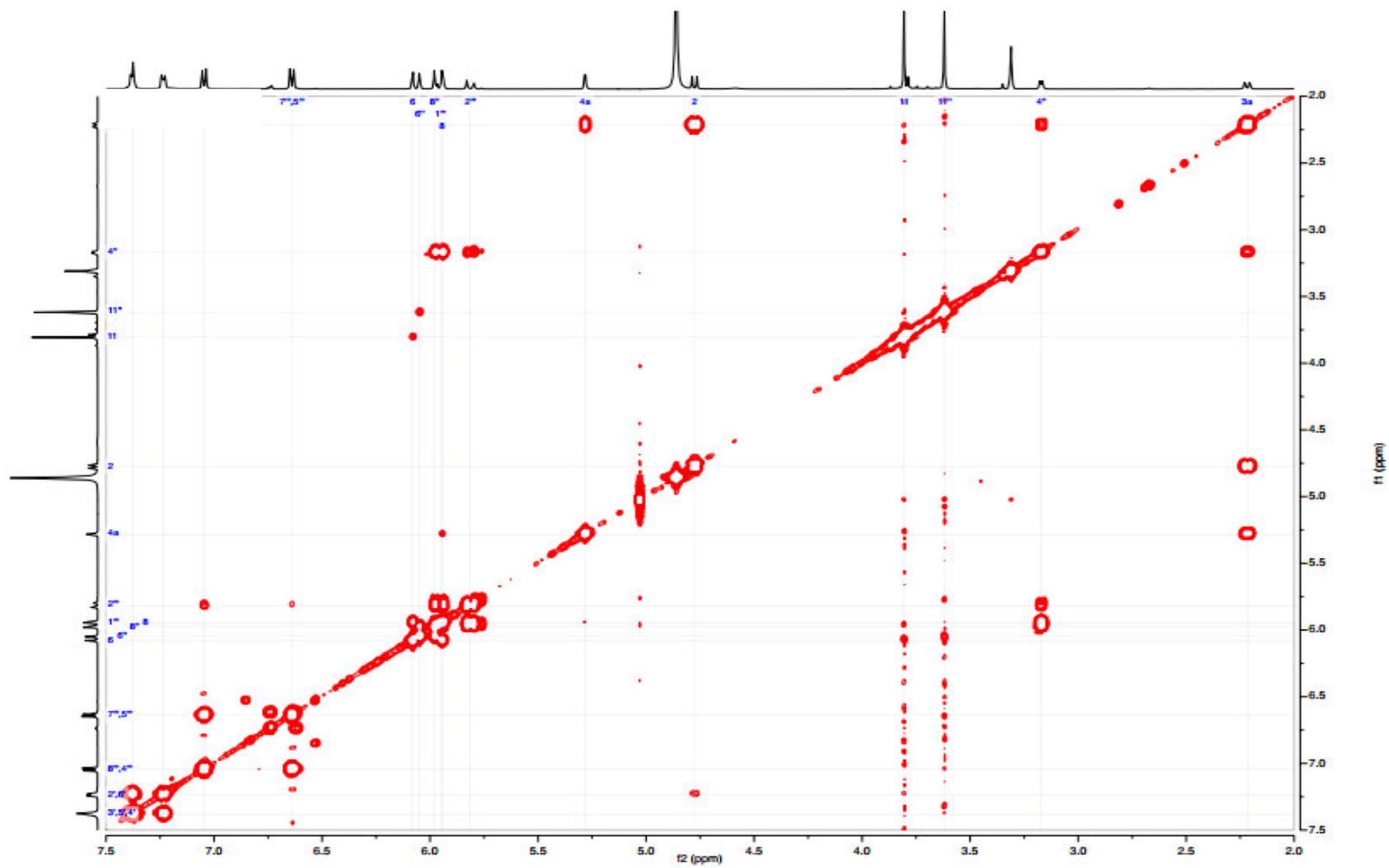
WENIGER, B.; VONTHRON-SÉNÉCHEAU, C.; KAISER, M.; BRUN, R.; ANTON, R. Comparative antiplasmodial, leishmanicidal and antitrypanosomal activities of several biflavonoids. *Phytomedicine*. 13(3):176-80, 2006.

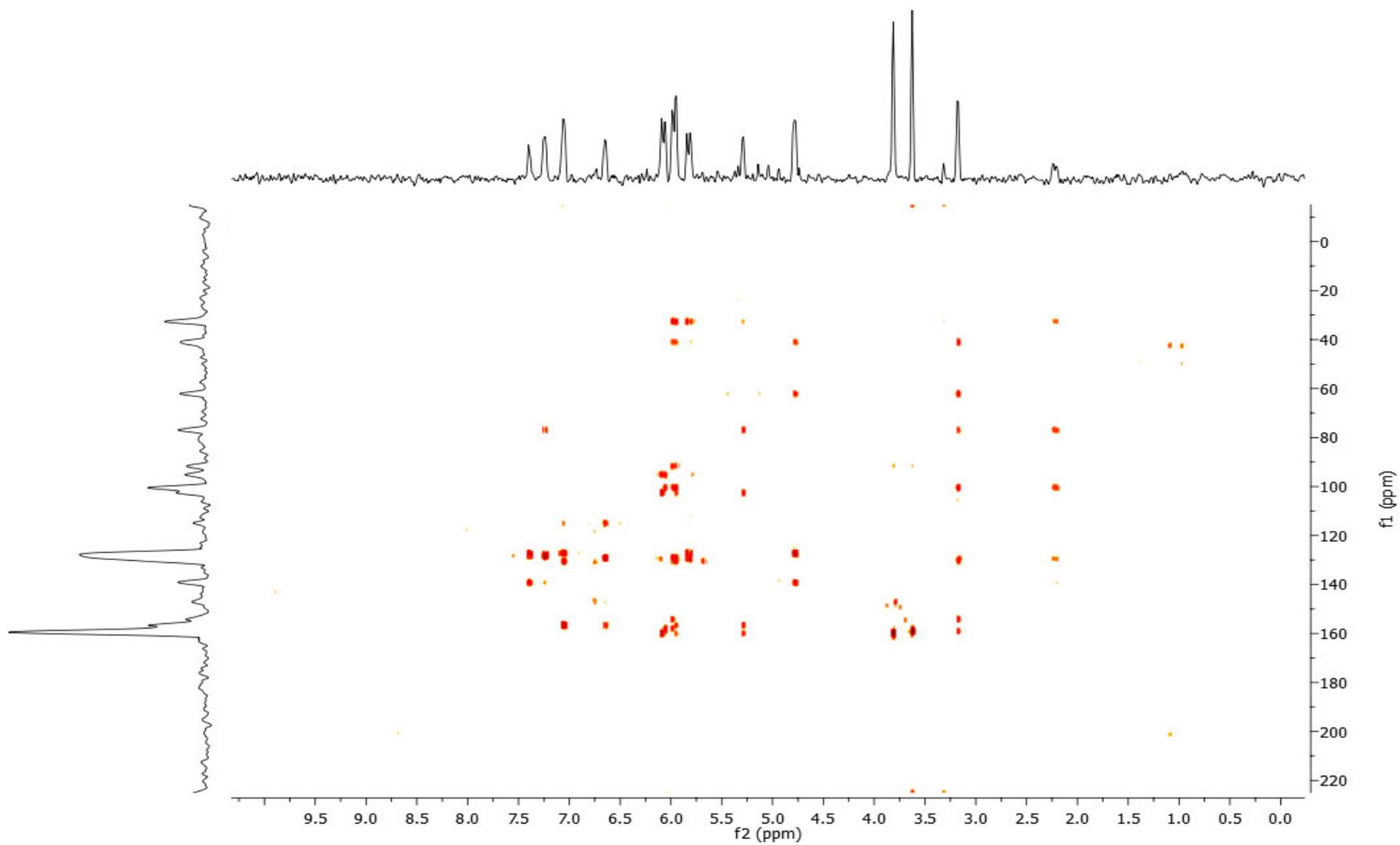
WILKINSON, G. Pharmacokinetics: the dynamics of drug absorption, distribution, and elimination. In: Hardman JG, Limbird LE, Gilman AG, editors. *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. New York: McGraw-Hill; p. 3-29, 2001.

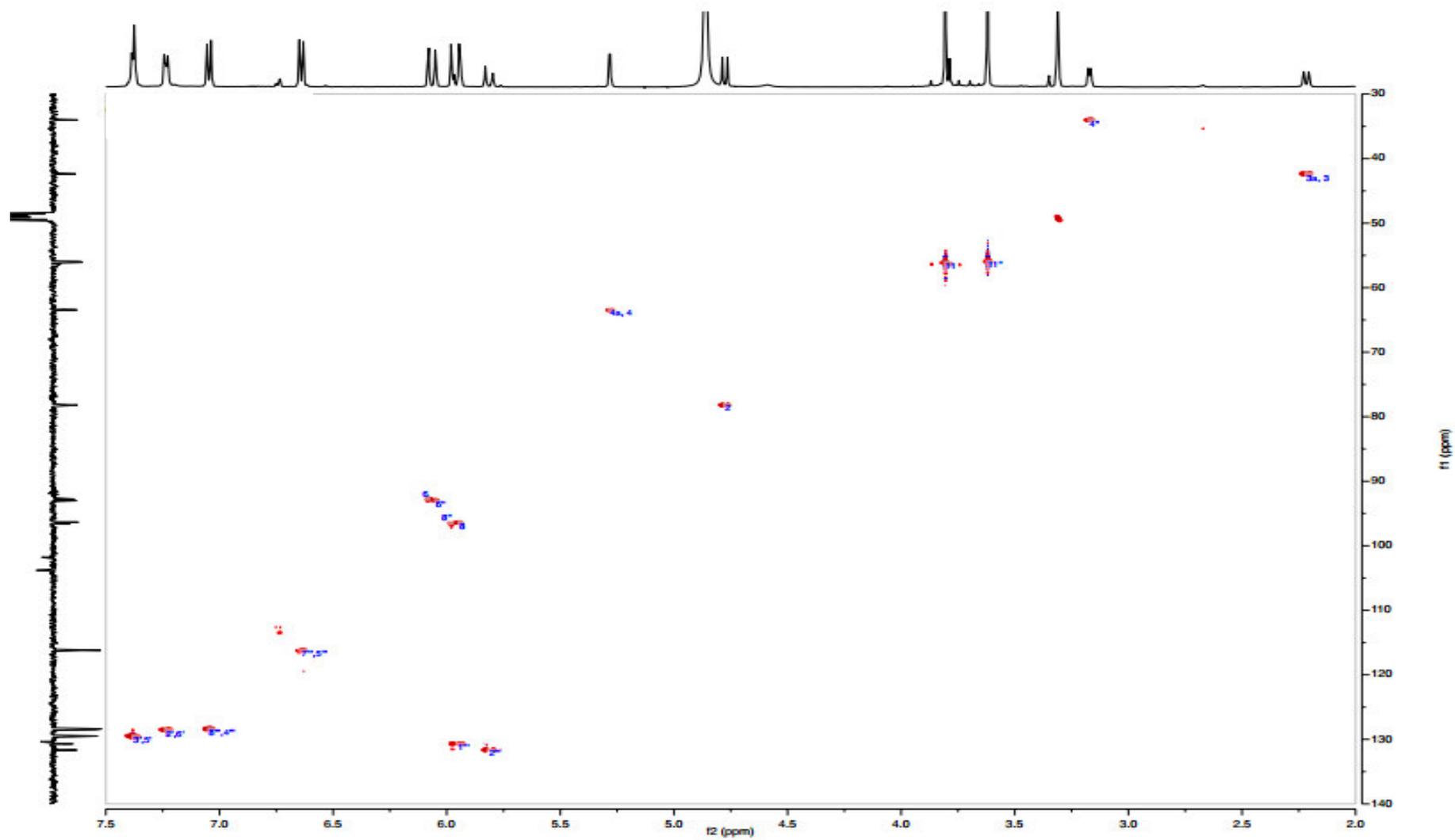
APÊNDICE A – RMN DE ^1H DA SUBSTÂNCIA BRAQUIDINA 1

APÊNDICE B – ESPECTRO APT DA BRAQUIDINA 1

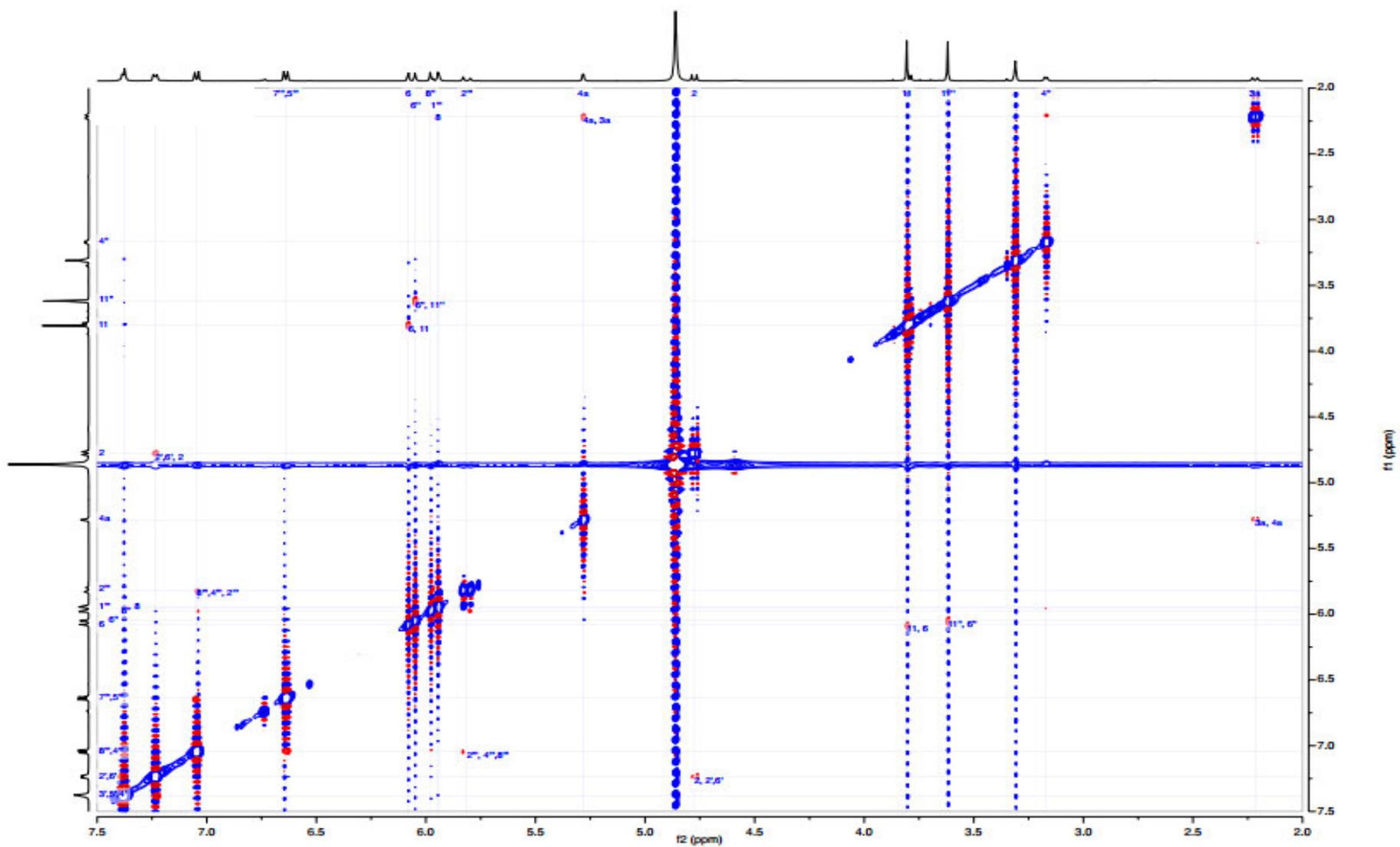


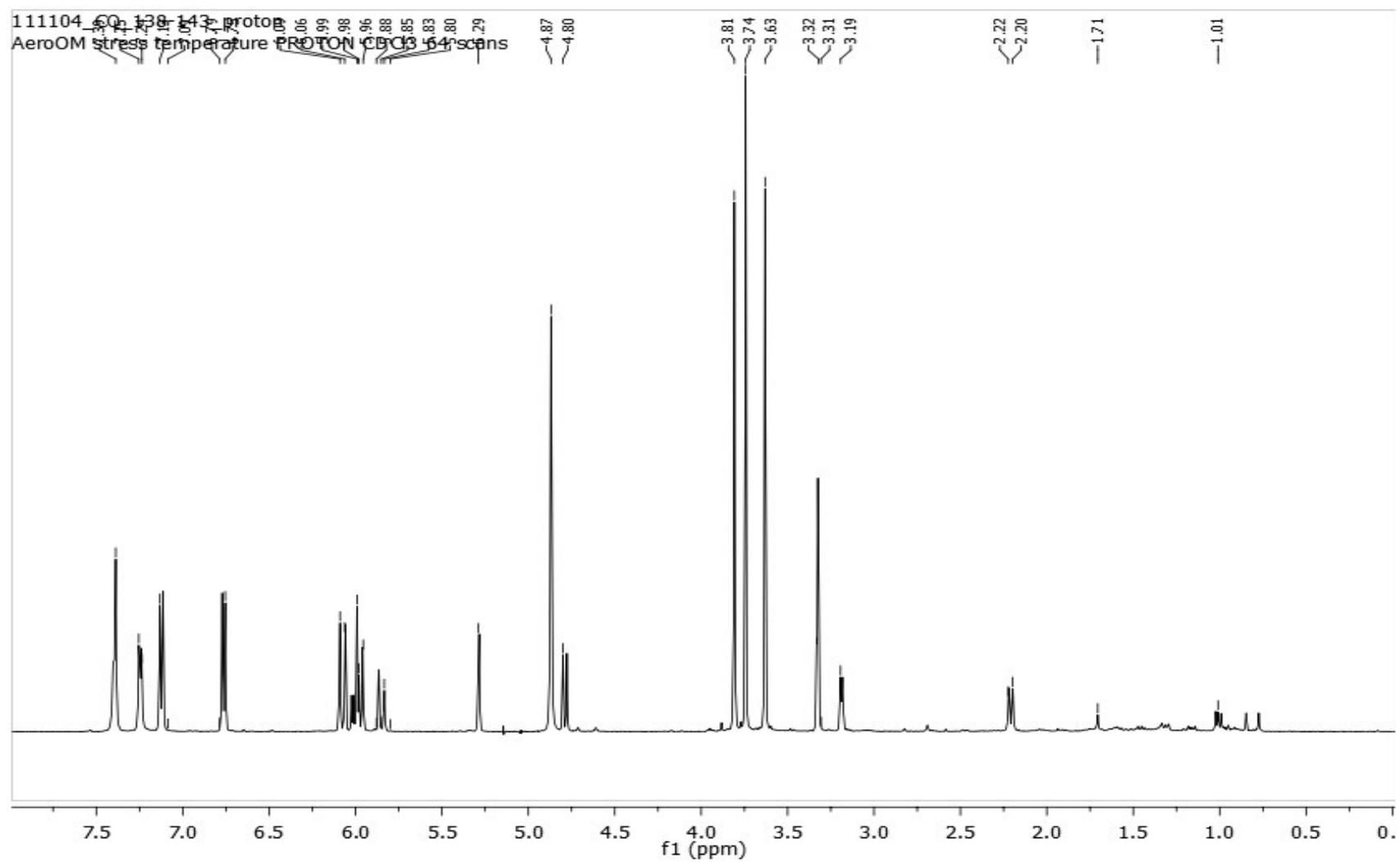
APÊNDICE C - MAPA DE CONTORNOS g COSY DA BRAQUIDINA 1

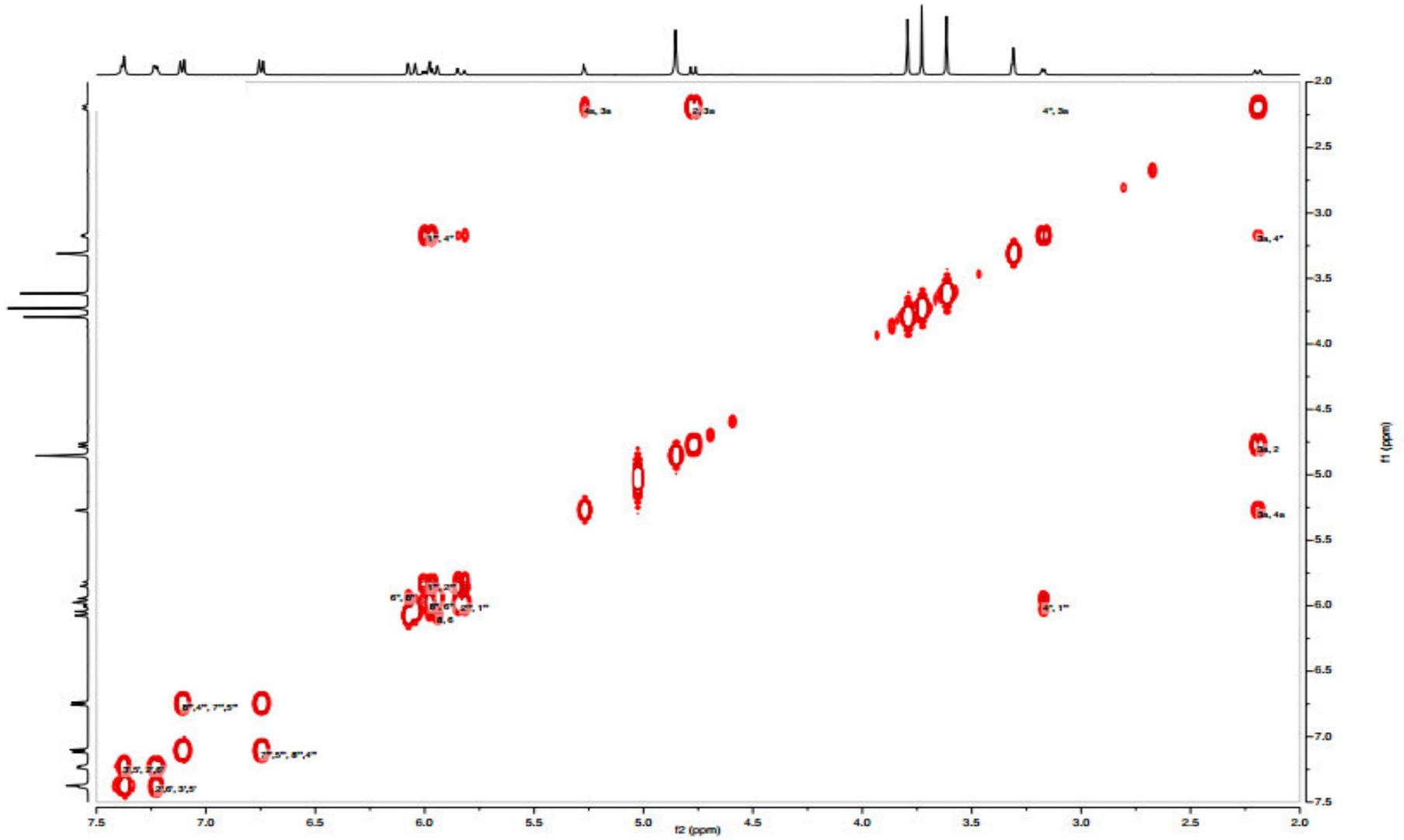
APÊNDICE D - MAPA DE CONTORNOS g HMBC DA BRAQUIDINA 1

APÊNDICE E - MAPA DE CONTORNOS g HSQC DA BRAQUIDINA 1

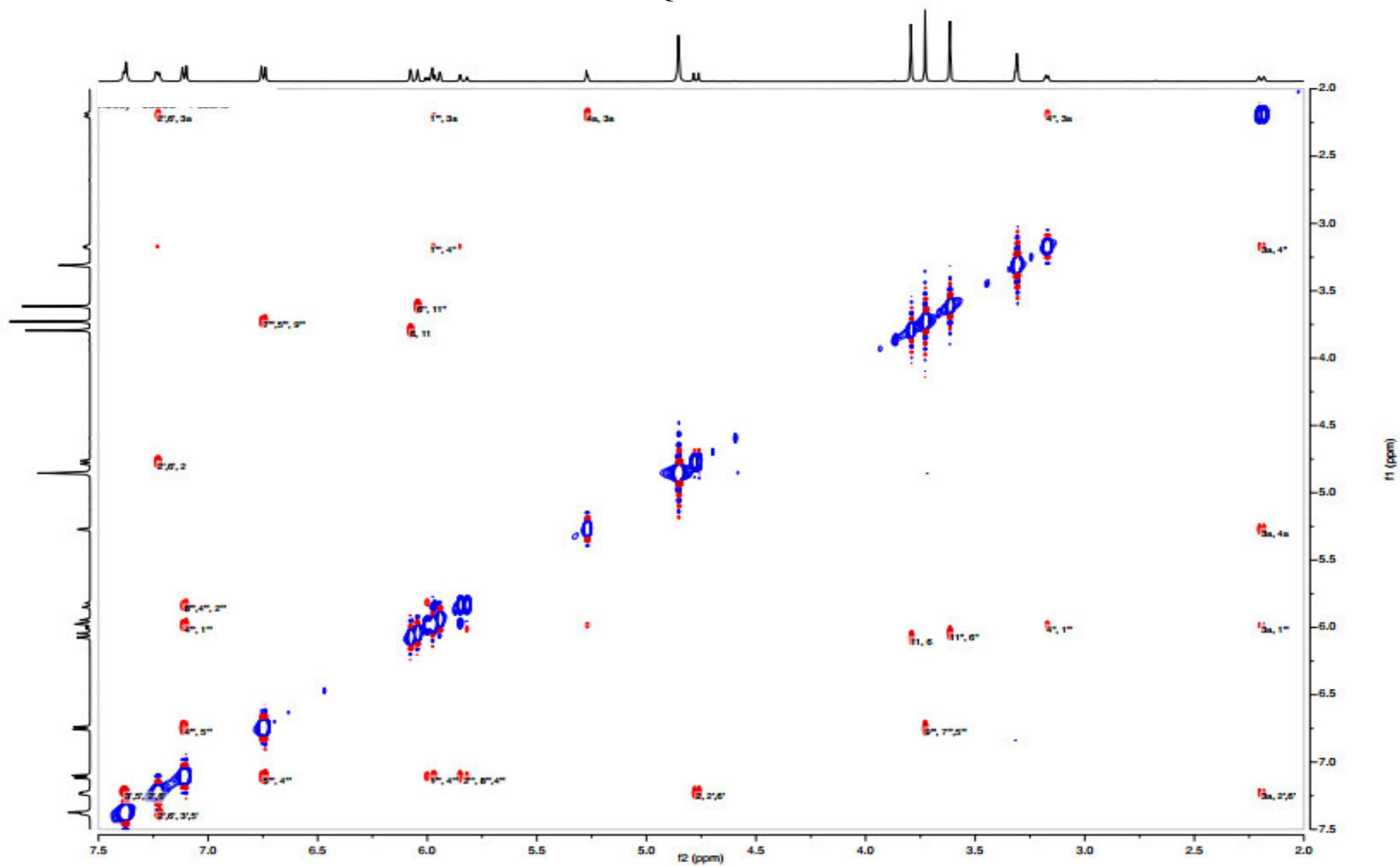
APÊNDICE F - MAPA DE CONTORNO NOESY DA BRAQUIDINA 1

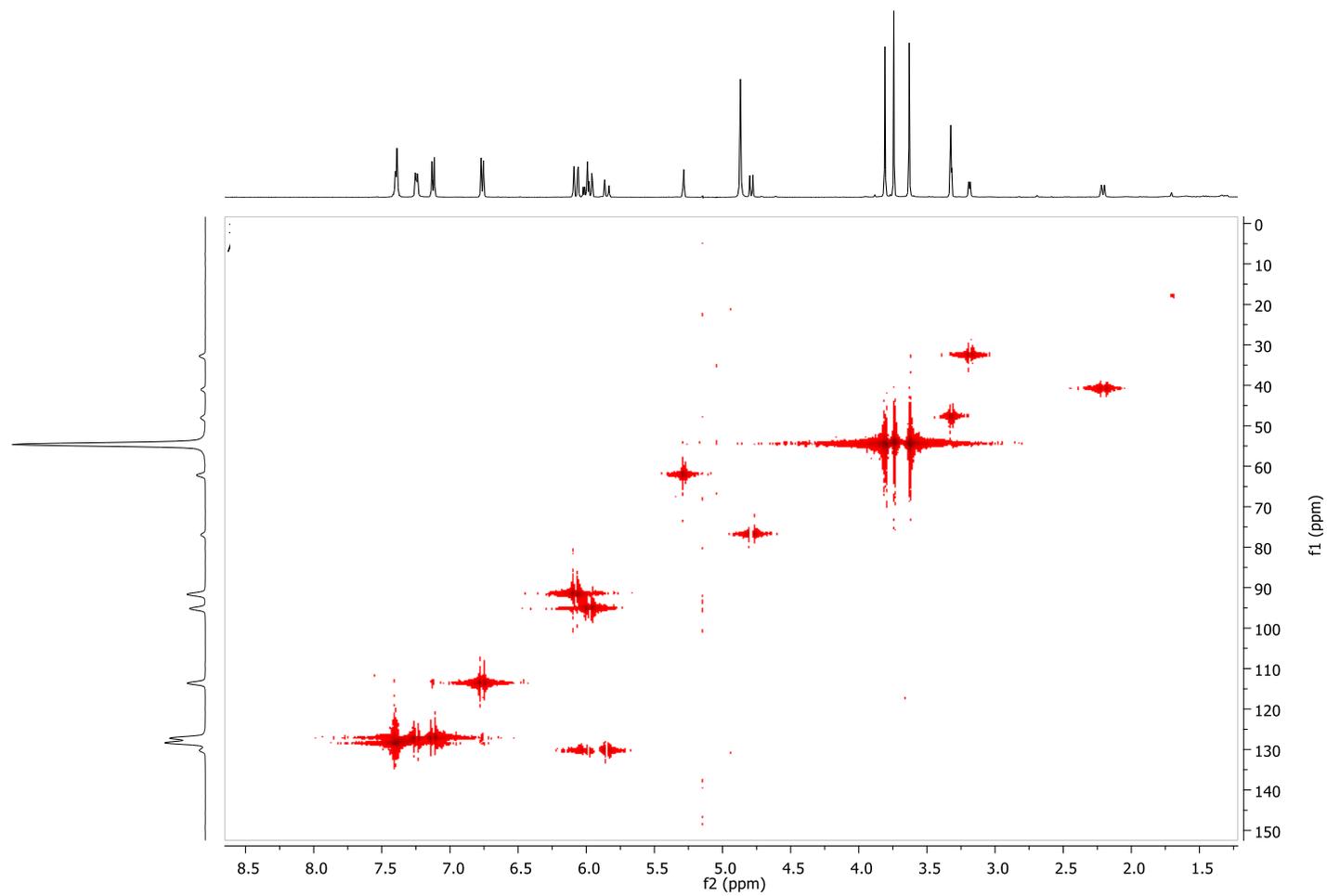


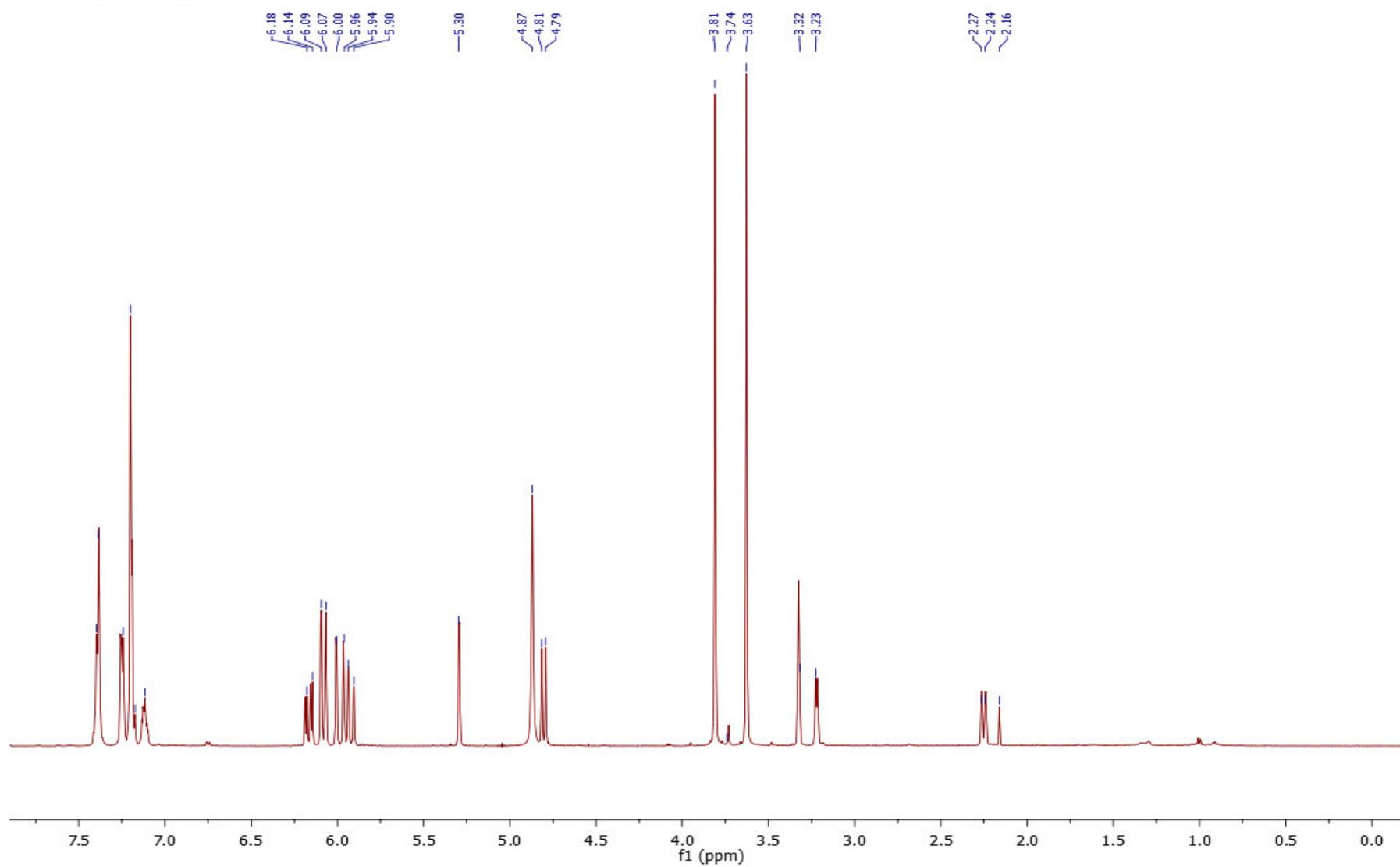
APÊNDICE G - ESPECTRO DE RMN DE ¹H DA BRAQUIDINA 2

APÊNDICE H - MAPA DE CONTORNO g COSY DA BRAQUIDINA 2

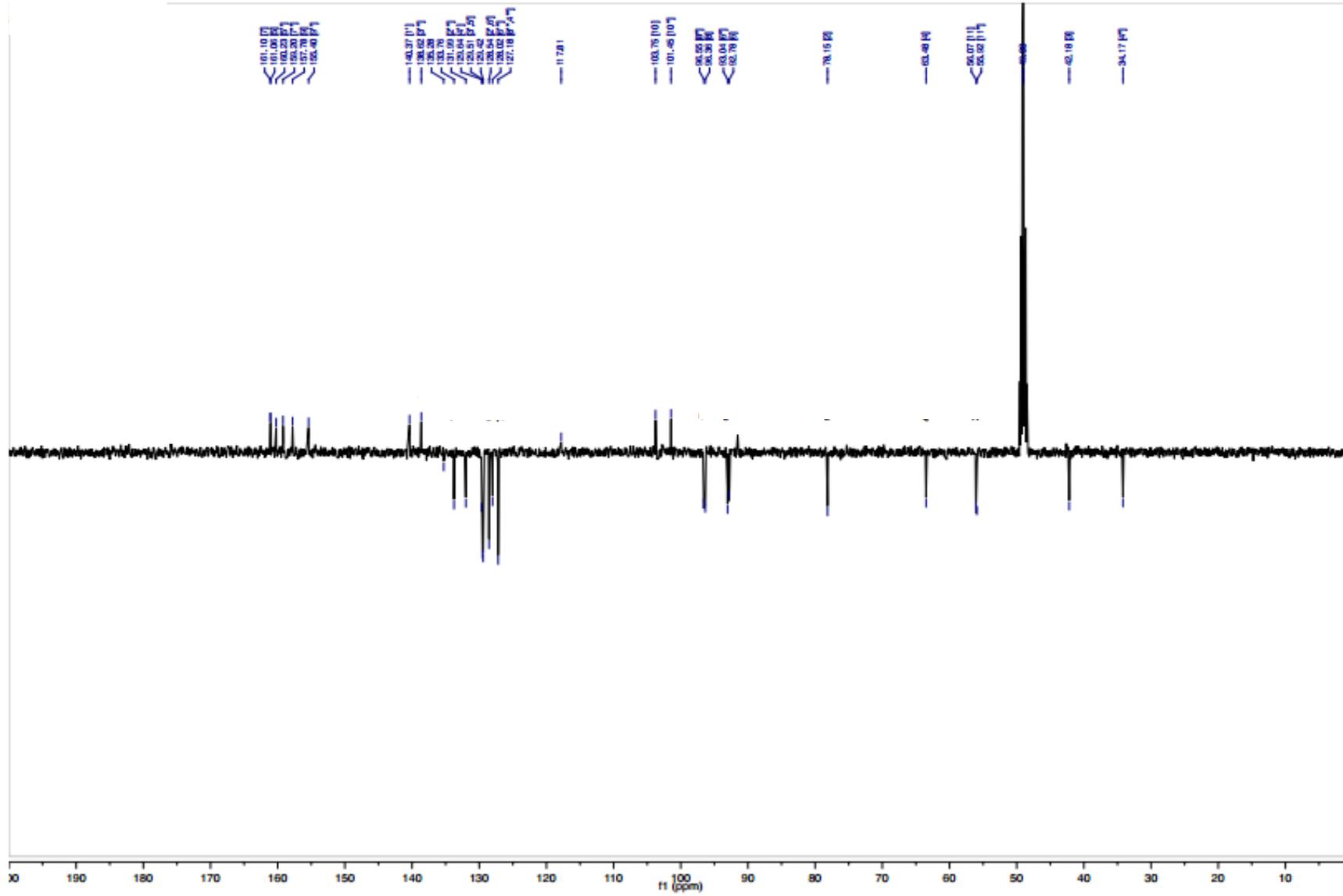
APÊNDICE I - MAPA DE CONTORNO NOESY DA BRAQUIDINA 2

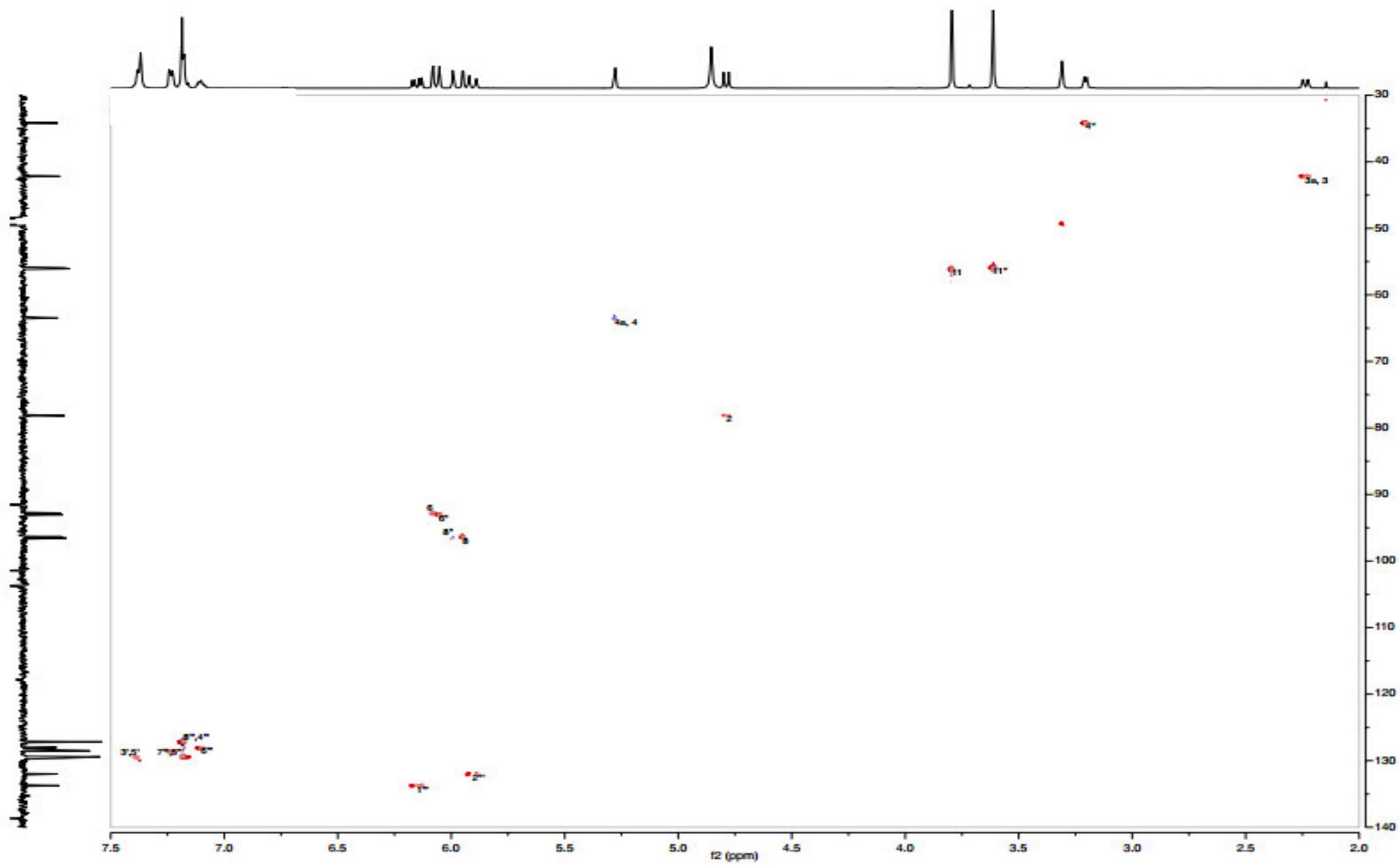


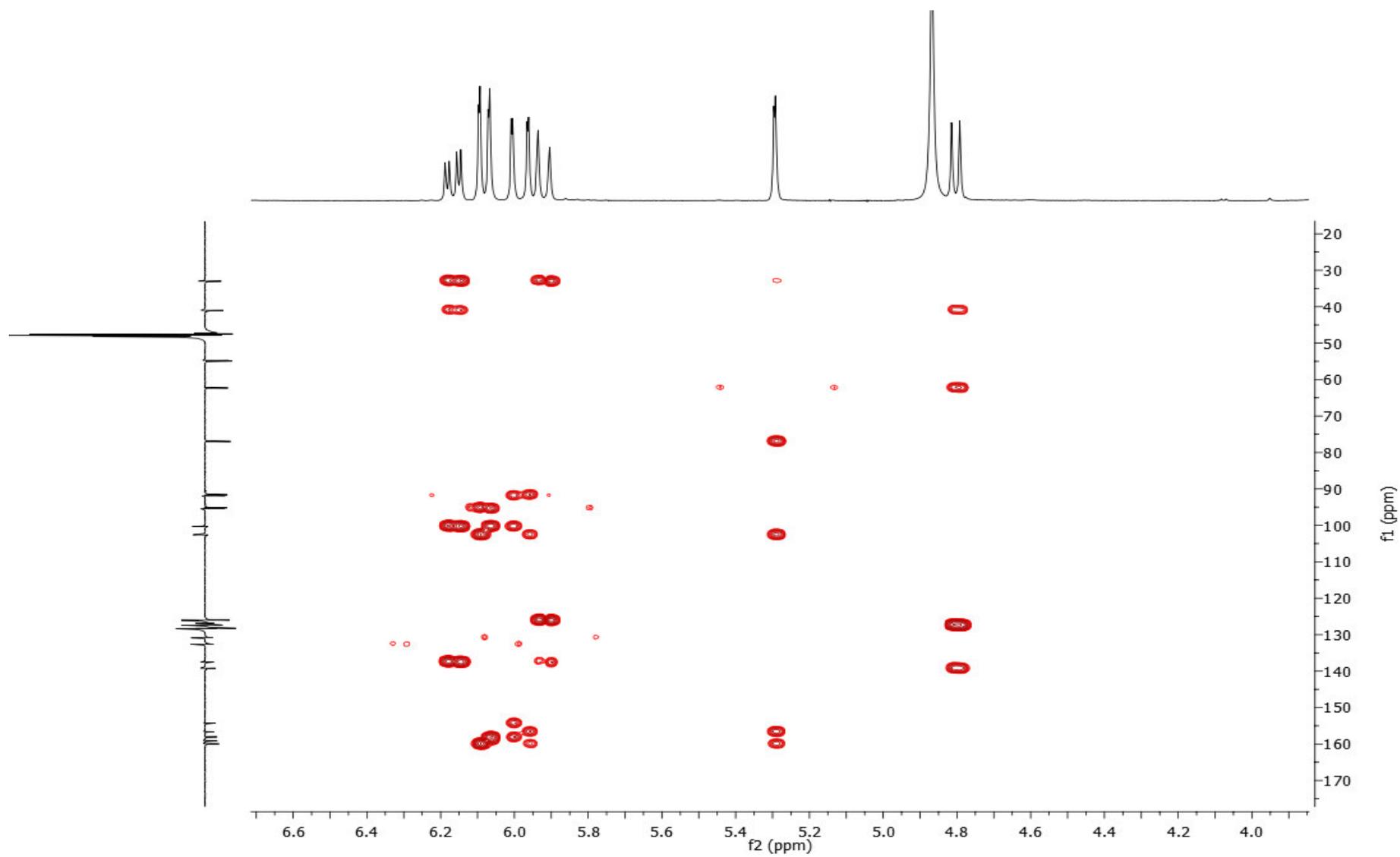
APÊNDICE J - MAPA DE CONTORNO g HSQC DA BRAQUIDINA 2

APÊNDICE K - ESPECTRO DE RMN DE ¹H DA BRAQUIDINA 3

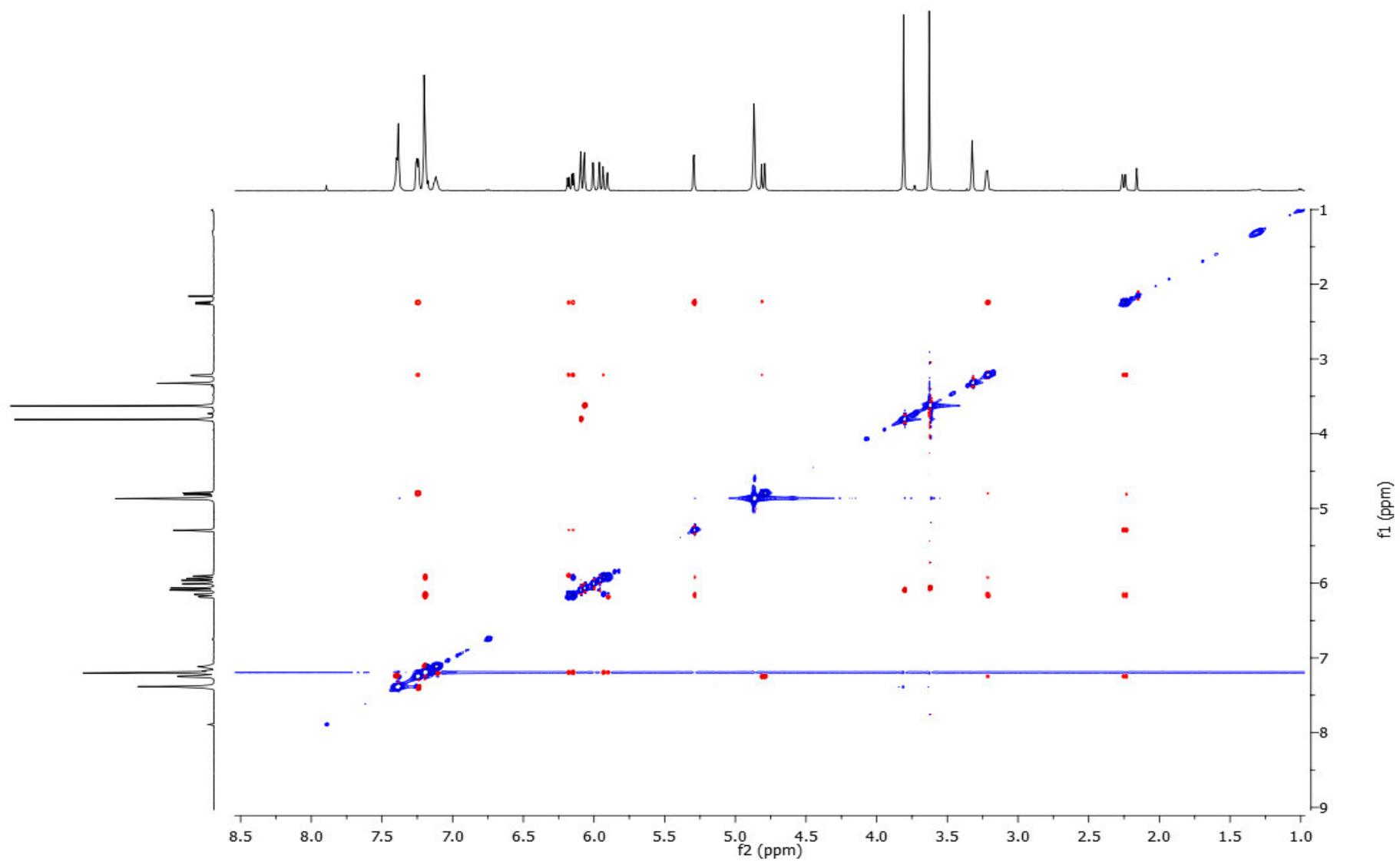
APÊNDICE L - ESPECTRO APT DA BRAQUIDINA 3



APÊNDICE M - MAPA DE CONTORNOS g HSQC DA BRAQUIDINA 3

APÊNDICE N - MAPA DE CONTORNOS g HMBC DA BRAQUIDINA 3

APÊNDICE O - MAPA DE CONTORNOS NOESY DA BRAQUIDINA 3



APÊNDICE P – ESTUDO DE VELOCIDADE

$(E/V)^{1/2}$ vs. Ag/AgCl[KCl _{sat}]	Bra 1	Bra 2	Bra 3
	I/A	I/A	I/A
0,14142	7,902E-8	4,633E-7	8,7245E-7
0,1732	1,085E-7	5,439E-7	1,2905E-6
0,2	1,318E-7	6,213E-7	1,766E-6
0,22361	1,409E-7	7,187E-7	2,244E-6
0,24495	1,619E-7	8,092E-7	2,594E-6
0,26458	1,698E-7	8,976E-7	3,128E-6
0,28284	1,906E-7	9,678E-7	3,317E-6
0,3	1,971E-7	1,06E-6	3,733E-6
0,31623	2,075E-7	1,1235E-6	4,0525E-6