



**HAL**  
open science

# Estudo Fitoquímico e atividades biológicas de varronia dardani e varronia leucocephala (Cordiaceae)

Carlos Arthur Gouveia Veloso

## ► To cite this version:

Carlos Arthur Gouveia Veloso. Estudo Fitoquímico e atividades biológicas de varronia dardani e varronia leucocephala (Cordiaceae). *Vegetal Biology*. Université de La Rochelle; Universidade federal da Paraíba (Brésil), 2022. Portuguese. NNT: 2022LAROS038 . tel-04243653

**HAL Id: tel-04243653**

**<https://theses.hal.science/tel-04243653>**

Submitted on 16 Oct 2023

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



# LA ROCHELLE UNIVERSITE

ÉCOLE DOCTORALE EUCLIDE  
*Sciences et Technologie*

Laboratoire Littoral Environnement et Sociétés (LIENSs) UMR 7266 CNRS  
Equipe Biotechnologies et Chimie des Bioressources pour la Santé (BCBS)

En cotutelle avec l'Université federale de Paraíba (UFPB) au Brésil

## THÈSE

Présentée par :

Carlos Arthur GOUVEIA VELOSO

Soutenue le 19 septembre 2022

Pour l'obtention du grade de Docteur de La Rochelle Université

Discipline : Chimie des Substances Naturelles

**Étude phytochimique et activités biologiques de *Varronia dardani* et  
*Varronia leucocephala* (Cordiaceae)**

JURY :

M. SOBRAL DA SILVA Marcelo	Professeur, Université Federale de Paraíba, Président du jury
M. GUEDES DA SILVA ALVEIDA Jackson Roberto	Professeur, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Rapporteur
M. QUINTANS JUNIOR Lucindo José	Professeur, Université Fédérale de Sergipe, Rapporteur
Mme THIERY Valérie	Professeure, La Rochelle Université, Examinatrice
Mme BORDENAVE Stéphanie	Maîtresse de conférences HDR, La Rochelle Université, Examinatrice
M. BARBOSA FILHO José Maria	Professeur, Université Federale de Paraíba, Examineur
M. FECHINE TAVARES Josean	Professeur, Université Federale de Paraíba, Examineur
M. PICOT Laurent	Maître de conférences HDR, La Rochelle Université, Directeur de thèse



*« Soyez comme l'oiseau posé pour un instant sur des rameaux trop  
frêles, qui sent ployer la branche, et qui chante pourtant, sachant  
qu'il a des ailes. »*

Victor Hugo



## REMERCIEMENTS

Je souhaite remercier le Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation et La Rochelle Université pour avoir financé les projets réalisés au sein du laboratoire LIENSs UMR 7266.

Je remercie le Comité 17 de la Ligue Nationale contre le Cancer et le projet Européen Interreg EnhanceMicroAlgae (EAPA\_338/2016) pour leurs financements.

Je souhaite remercier M. Olivier DE VIRON pour son accueil au sein du laboratoire LIENSs et Mme Ingrid FRUITIER-ARNAUDIN pour son accueil chaleureux au sein de l'équipe BCBS.

J'aimerais remercier M. Marcelo DA SILVA, M. Jackson ALMEIDA, M. Lucindo QUINTANS JUNIOR, Mme. Valérie THIERY, Mme. Stéphanie BORDENAVE, M. José BARBOSA-FILHO, M. Josean TAVARES, membres du jury, d'avoir accepté d'évaluer mon travail.

Je remercie a Dieu de m'avoir permis d'en arriver là et infiniment à ma mère, une guerrière, qui, même face à certaines difficultés, a réussi à m'éduquer, en cherchant toujours à m'offrir le meilleur. À ma tante Nelma Gouveia, pour m'avoir soutenu et encouragé tout au long de ma vie universitaire. Je remercie mon père et mes oncles, en particulier Fábio Gouveia, qui m'ont toujours soutenu, même de loin. À ma tante Neusa Gouveia (*in memoriam*).

A mes amis César Dantas, Fernanda Nóbrega, Sarah Dantas et Luiz Agra.

A mes professeurs Dr Vicente Carlos et Dr Laurent Picot.

Je dois beaucoup remercier mes amis de La Rochelle, Raimundo Oliveira (Juninho), Amanda Ventura, Livia Cupertino et Amandine Adirichard.

Aux Professeurs Dr Bagnólia Costa et Dr Fabiana Cavalcante pour m'avoir reçu dans leur laboratoire, avec leur étudiante Indyra Alencar, qui m'a aidé dans les expériences. Au botaniste Dr. José Iranildo Miranda de Melo pour l'identification des espèces étudiées.

A mes amis et compagnons de laboratoire à l'UFPB, Ana Rita Rodrigues, Natanael Teles, Gabriela Ribeiro, Emille Wannick, Anauara Lima, Thalisson Amorim, André Chaves, Rodrigo Andrade, Pedro Ramalho, Ranna Beatris et Kaio Aragão.

Je remercie a l'Université Fédérale de Paraíba (UFPB), au Conseil National pour le Développement Scientifique et Technologique (CNPq - Brésil) et à la Coordination pour l'amélioration du personnel de niveau supérieur (CAPES - Brésil) pour avoir financé mes recherches au Brésil et en France.

## RÉSUMÉ

Le Brésil est un pays qui présente une vaste biodiversité, en particulier dans la région de la Caatinga, dans le Nordeste. Dans ce biome poussent des plantes de la famille des Cordiaceae, qui sont utilisées par les communautés locales pour le traitement de certaines maladies. C'est notamment le cas des espèces *Varronia dardani* et *V. leucocephala*, dont les infusions sont utilisées pour soulager les douleurs gastriques, les coliques menstruelles et l'arthrite. L'objectif de ce travail était de contribuer à la connaissance de ces espèces, en étudiant leurs propriétés phytochimiques et biologiques. Le matériel végétal a été collecté à Serra Branca-PB et Maturéia-PB et soumis à des processus d'extraction. L'extrait éthanolique brut de *V. dardani* (EEB-VD) a été soumis à la détermination des composés phénoliques totaux et à la quantification de l'acide rosmarinique, considéré comme l'un des marqueurs chimiotaxonomiques de la famille des Cordiaceae. Un criblage a été effectué avec le EEB-VD pour évaluer son activité spasmolytique dans différents organes. L'activité antiproliférative des extraits et fractions de ces espèces a également été évaluée contre des cellules de mélanome humain (A2058). En utilisant des techniques de RMN, les composés isolés des espèces étudiées ont été identifiés. Le screening concernant l'activité dans le muscle lisse, a montré que l'extrait EEB-VD présente une activité spasmolytique non sélective dans différents tissus et pour différents agonistes testés, avec une puissance maximale sur l'utérus des rats. À partir de la fraction acétate d'éthyle du EEB-VD, il a été possible d'isoler et d'identifier cinq flavonoïdes, dont trois aglycones (isosakuranetine, naringenine et rhamnocitrine) et deux glycosylés (astragaline et isoquercitrine), en plus de l'acide rosmarinique. En ce qui concerne le test d'activité antiprolifératif sur cellules de mélanomes, la fraction isopropanolique de l'extrait de racines de *V. dardani* s'est révélée la plus active, et c'est à partir de cette fraction qu'a été isolé une nouvelle molécule, la vardanone, la première hydroanthraquinone rapportée dans l'espèce *V. dardani*. Ce composé a été évalué dans une étude chimio-informatique, dans laquelle l'activité de son groupe d'isomères sur la lignée cellulaire A2058 a été analysée, par rapport aux témoins positifs que sont la dacarbazine et le vemurafenib, des médicaments utilisés dans le schéma thérapeutique actuel du mélanome. La deuxième espèce la plus active dans les tests d'inhibition de prolifération était *V. leucocephala*, à partir de laquelle il a été possible d'isoler une saikosaponine, déjà isolée précédemment dans l'espèce. Ainsi, les résultats chimiques et biologiques, obtenus dans ce travail, ont contribué à la connaissance du genre *Varronia*, de plus, l'étude a révélé de nouvelles possibilités de recherche sur ces espèces grâce à la découverte de nouveaux métabolites secondaires, principalement de la classe des quinones.

**Mots clés :** Produits naturels ; anthraquinones ; flavonoïdes ; mélanome humain ; activité antispasmodique.

## RESUMO

O Brasil é um país que possui uma vasta biodiversidade, onde encontramos a região da Caatinga, representada por vegetais da família Cordiaceae, os quais são empregados pelas comunidades locais como uma alternativa para o tratamento de algumas doenças, como é o caso das espécies *Varronia dardani* e *V. leucocephala*, cujas infusões são utilizadas para o alívio das dores gástricas, cólica menstrual e artrite. Sendo assim, buscou-se contribuir para o conhecimento sobre essas espécies, mediante o estudo fitoquímico e biológico das mesmas. Para isso, o material vegetal foi coletado nos municípios de Serra Branca-PB e Maturéia-PB e submetidos a processos de extração. O extrato etanólico bruto de *V. dardani* (EEB-VD) foi submetido à determinação de fenólicos totais e à uma quantificação do ácido rosmarínico, considerado um dos marcadores quimiotaxonômicos da família Cordiaceae. Foi realizada uma triagem com o EEB-VD para avaliar a sua atividade espasmolítica em diversos órgãos. Além dessa atividade biológica, foi avaliada a atividade antiproliferativa dos extratos e frações de todas as espécies frente às células de melanoma humano (A2058). Através de técnicas de RMN foram identificadas as substâncias isoladas das espécies do estudo. A triagem relativa à atividade no músculo liso, mostrou que o EEB-VD apresentou uma atividade não seletiva nos diferentes tecidos e para os diferentes agonistas testados, apresentando maior potência no útero de ratos. Da fração acetato de etila do EEB-VD foi possível o isolamento e identificação de cinco flavonoides, sendo três agliconas (isosakuranetina, naringenina e ramnocitrina) e dois glicosilados (astragalina e isoquercitrina), além do ácido rosmarínico. Com relação ao teste citotóxico, a fração isopropanólica do extrato das raízes de *V. dardani* se mostrou mais ativa, e desta fração foi isolada a vardanona, primeira hidroantraquinona relatada na espécie *V. dardani*. O composto VD-R-I, foi utilizado para um estudo de quimioinformática, onde o conjunto de isômeros dessa substância foi analisado quanto à atividade na linhagem celular A2058 e foram observadas algumas interações entre resíduos de aminoácidos, comparando com o controle positivo dacarbazina e vemurafenibe, drogas utilizadas na terapia atual do melanoma. A segunda espécie mais ativa nos testes citotóxicos foi a *V. leucocephala*, de onde foi possível isolar uma saikosaponina, já isolada anteriormente na espécie. Logo, os resultados químicos e biológicos, obtidos nesse trabalho, contribuíram para o conhecimento sobre o gênero *Varronia*, ainda assim, o estudo revelou novas possibilidades de pesquisas nessas espécies envolvendo a busca de novos metabólitos secundários, principalmente da classe das quinonas.

**Palavras-chave:** Produtos naturais; antraquinonas; flavonoides; melanoma humano; atividade antiespasmódica.

## ABSTRACT

Brazil is a country that presents a vast biodiversity, where we find the Caatinga region, represented by plants of the Cordiaceae family, which are employed by local communities as an alternative for the treatment of some diseases, as is the case with the species *Varronia dardani* and *V. leucocephala*, whose infusions are used for the relief of gastric pain, menstrual colic, and arthritis. Therefore, the aim of this work was to contribute to the knowledge about these species, by studying their phytochemical and biological properties. To this end, the plant material was collected in the locations of Serra Branca-PB and Maturéia-PB and submitted to extraction processes. The crude ethanolic extract of *V. dardani* (CEE-VD) was submitted to the determination of total phenolics and to a quantification of rosmarinic acid, considered one of the chemotaxonomic markers of the Cordiaceae family. A screening was performed with CEE-VD to evaluate its spasmolytic activity in various organs. In addition to this biological activity, the antiproliferative activity of the extracts and fractions of all species was evaluated against human melanoma cells (A2058). Using NMR techniques, the compounds isolated from the study species were identified. The screening concerning the activity in smooth muscle, showed that CEE-VD showed a non-selective activity in the different tissues and for the different agonists tested, showing highest potency in the uterus of rats. From the ethyl acetate fraction of the CEE-VD it was possible the isolation and identification of five flavonoids, being three aglycones (isosakuranetin, naringenin, and rhamnocitrin) and two glycosylated (astragalin and isoquercitrin), besides rosmarinic acid. Regarding the cytotoxic test, the isopropanolic fraction of the extract of roots from *V. dardani* proved to be more active, and from this fraction the compound vardanone was isolated, the first hydroanthraquinone reported in *V. dardani* species. This compound, was used for a chemoinformatics study, where its set of isomers was analyzed for activity in the A2058 cell line and some interactions between amino acid residues were observed, compared to the positive controls dacarbazine and vemurafenib, drugs used in current melanoma therapy. The second most active species in the cytotoxic tests was *V. leucocephala*, from which it was possible to isolate a saikosaponin, already isolated previously in the species. Thus, the chemical and biological results, obtained in this work, contributed to the knowledge about the genus *Varronia*, furthermore, the study revealed new possibilities for research on these species involving the search for new secondary metabolites, mainly of the class of quinones.

**Key words:** Natural products; anthraquinones; flavonoids; human melanoma; antispasmodic activity.

## SOMMAIRE

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	<b>18</b>
2.1	A Caatinga .....	18
2.2	A Família Cordiaceae.....	19
2.2.1	O Gênero <i>Varronia</i> .....	22
2.2.1.1	A espécie <i>Varronia dardani</i> (Taroda) J.S. Mill. ....	23
2.2.1.2	A espécie <i>Varronia leucocephala</i> (Morici.) J.S. Mill. ....	25
2.2.1.3	Flavonoides encontrados no gênero <i>Varronia</i> .....	28
2.3	Antraquinonas.....	30
2.4	Músculo liso .....	32
2.5	O melanoma humano .....	33
2.6	A quimioinformática .....	35
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>38</b>
3.1	Objetivo geral.....	38
3.2	Objetivos específicos.....	38
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>40</b>
4.1	Métodos Cromatográficos.....	40
4.2	Métodos Espectroscópicos e Espectrométrico .....	41
4.2.1	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	41
4.2.2	Espectrometria de Massas (EM).....	41
4.3	Estudo fitoquímico .....	42
4.3.1	Coleta e identificação do material botânico.....	42
4.3.2	Processamento do material vegetal de <i>Varronia leucocephala</i> .....	42
4.3.3	Obtenção do Extrato Etanólico Bruto (EEB) de <i>Varronia leucocephala</i> .....	42
4.3.4	Isolamento e purificação dos constituintes químicos de <i>Varronia dardani</i> . 43	

4.3.4.1	<b>Fracionamento cromatográfico da fase acetato de etila de <i>Varronia dardani</i>.</b>	43
4.3.4.2	<b>Determinação de fenólicos totais.</b>	44
4.3.4.3	<b>Quantificação do ácido rosmarínico no extrato etanólico bruto de <i>Varronia dardani</i> (EEB-VD).</b>	45
4.4	<b>Ensaio <i>in vitro</i>.</b>	46
4.4.1	<b>Avaliação da atividade espasmolítica.</b>	46
4.4.1.1	<b>Material</b>	46
4.4.1.1.1	<b>Animais</b>	46
4.4.1.1.2	<b>Substâncias e reagentes</b>	46
4.4.1.1.3	<b>Soluções nutritivas</b>	47
4.4.1.1.4	<b>Aparelhos</b>	47
4.4.1.2	<b>Métodos</b>	48
4.4.1.2.1	<b>Preparação da solução-mãe do EEB-VD para os ensaios farmacológicos</b>	48
4.4.1.2.2	<b>Efeito do EEB-VD sobre as contrações tônicas induzidas por FEN em aorta isolada de rato</b>	48
4.4.1.2.3	<b>Efeito do EEB-VD sobre as contrações tônicas induzidas por CCh em traqueia isolada de rato</b>	49
4.4.1.2.4	<b>Investigação do efeito espasmolítico do EEB-VD em íleo isolado de cobaia</b>	50
4.4.1.2.4.1	<b>..... Efeito do EEB-VD frente às contrações fásicas induzidas por histamina ou por CCh</b>	50
4.4.1.2.4.2	<b>... Efeito do EEB-VD sobre as contrações tônicas induzidas por KCl, por histamina ou por CCh</b>	51
4.4.1.2.5	<b>Investigação do efeito espasmolítico do EEB-VD em útero isolado de rata</b>	51
4.4.1.2.5.1	<b>..... Efeito do EEB-VD frente às contrações fásicas induzidas por ocitocina ou por CCh</b>	51
4.4.1.2.5.2	<b>... Efeito tocolítico do EEB-VD sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina ou por KCl</b>	52
4.4.1.3	<b>Análise estatística</b>	53
4.5	<b>Fracionamento por Cromatografia Flash dos extratos etanólicos das espécies de <i>Varronia</i></b>	53

4.6	Atividade antiproliferativa de extratos e frações de <i>Varronia</i> em células de melanoma humano .....	55
4.7	Quimioinformática .....	57
4.7.1	Modelo de Predição .....	57
4.7.2	Banco de Dados do Modelo e curagem de dados.....	59
4.7.2.1	Descritores moleculares.....	60
4.7.2.2	Modelo de predição e validação estatística.....	61
4.7.2.3	Simulações de <i>Docking molecular</i> .....	63
4.7.2.3.1	Avaliação da interação molecular entre os compostos teste isômeros obtidos no extrato de <i>Varronia dardani</i> , os controles positivos Vemurafenib e Dacarbazina e o alvo molecular receptor de Tubulina. ....	63
4.7.2.3.2	Visualização das interações obtidas no acoplamento molecular e obtenção das figuras.....	65
4.8	Fracionamento cromatográfico da fração isopropanólica do extrato etanólico da espécie de <i>V. leucocephala</i> .....	65
5.	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	68
5.1.	Desenvolvimento do método cromatográfico para o isolamento de compostos na fase acetato de etila do Extrato Etanólico Bruto de <i>V. dardani</i> .....	68
5.2.	Identificação dos compostos isolados da fase acetato de etila do Extrato Etanólico Bruto de <i>V. dardani</i> .....	69
5.2.1.	Identificação estrutural de VD-1 .....	69
5.2.2.	Identificação estrutural de VD-2 .....	69
5.2.3.	Identificação estrutural de VD-3 .....	74
5.2.4.	Identificação estrutural de VD-4 .....	78
5.2.5.	Identificação estrutural de VD-5 .....	86
5.2.6.	Identificação estrutural de VD-6 .....	92
5.2.7.	Teor de compostos fenólicos do Extrato Etanólico Bruto de <i>Varronia dardani</i> (EEB-VD) .....	98
5.2.8.	Quantificação do ácido rosmarínico no extrato etanólico bruto de <i>Varronia dardani</i> (EEB-VD).....	100
5.2.9.	Avaliação da atividade espasmolítica .....	102
5.2.9.1.	Efeito do EEB-VD sobre as contrações tônicas induzidas por FEN em aorta isolada de rato.....	102

5.2.9.2. Efeito do EEB-VD sobre as contrações tônicas induzidas por CCh em traqueia isolada de rato.....	104
5.2.9.3. Efeito espasmolítico do EEB-VD em íleo isolado de cobaia.....	106
5.2.9.3.1. .... Efeito do EEB-VD frente às contrações fásicas induzidas por histamina ou por CCh .....	106
5.2.9.3.2. Efeito do EEB-VD sobre as contrações tônicas induzidas por KCl, por histamina ou por CCh .....	108
5.2.9.4. Efeito espasmolítico do EEB-VD em útero isolado de rata.....	110
5.2.9.4.1. .... Efeito do EEB-VD frente às contrações fásicas induzidas por ocitocina ou por CCh.....	110
5.2.9.4.2. .... Efeito tocolítico do EEB-VD sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina ou KCl em rata.....	112
5.2.10. Atividade antiproliferativa de extratos e frações de <i>Varronia</i> em células de melanoma humano .....	115
5.2.11. Elucidação estrutural de VD-R-1.....	117
5.2.12. Quimioinformática .....	125
5.2.12.1. <i>Quantitative Structure-Activity Relationship</i> (QSAR).....	125
5.2.12.2. <i>Docking molecular</i> .....	127
5.2.12.3. <i>Consensus Docking</i> .....	130
5.2.12.4. Análise das Interações do composto 03 com os alvos moleculares correspondentes ao receptor de Tubulina .....	136
5.1. Desenvolvimento do método cromatográfico para o isolamento de compostos na fração isopropanólica do extrato etanólico bruto de <i>V. leucocephala</i> .....	140
5.2. Identificação dos compostos isolados da fração isopropanólica do extrato etanólico bruto de <i>V. leucocephala</i> .....	141
5.2.1. Identificação estrutural de VL-1.....	141
<i>Figura 63 - Expansão do espectro de RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N) da substância VL-1 na região de 4,70 – 6,95 ppm.</i> .....	146
6. CONCLUSÃO .....	151
REFERÊNCIAS.....	154
ANNEXE 1 - Certificat du Comité d'éthique (Brésil).....	170



<b>ANNEXE 2 – Article “Flavonoids from <i>Varronia dardani</i> (Taroda) J.S. Mill (Cordiaceae) and the evaluation of spasmolytic activity of its crude ethanolic extract (2020)” .....</b>	<b>171</b>
--	------------

## LISTE DES ABBREVIATIONS

<b>ACN</b>	Acétonitrile
<b>APT</b>	<i>Attached Proton Test</i>
<b>BB</b>	<i>Broadband</i>
<b>CC</b>	Chromatographie sur colonne
<b>CCDA</b>	Chromatographie analytique en couche mince
<b>CCDP</b>	Chromatographie préparative en couche mince
<b>CDCl<sub>3</sub></b>	Chloroforme deutéré
<b>CD<sub>3</sub>OD</b>	Méthanol deutéré
<b>CI<sub>50</sub></b>	Concentration moyenne d'inhibition
<b>CLAE</b>	Chromatographie liquide à haute performance
<b>CLMP</b>	Chromatographie liquide à moyenne pression
<b>d</b>	Duplet
<b>dd</b>	Double duplet
<b>dl</b>	Duplet large
<b>DMSO</b>	Diméthylsulfoxyde
<b>EEB</b>	Extrait éthanolique brut
<b>EM</b>	Spectrométrie de masse
<b>HMBC</b>	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
<b>HPLC</b>	<i>High-Performance Liquid Chromatography</i>
<b>IV</b>	Infrarouge
<b>J</b>	Constante de couplage
<b>m</b>	Multiplet
<b>MeOH</b>	Méthanol
<b>MTT</b>	Bromure de 3-(4,5-Diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium
<b>OMS</b>	Organisation mondiale de la santé

<b>PN</b>	Produits naturels
<b>ppm</b>	Parties par million
<b>QPN</b>	Chimie des produits naturels
<b>QSAR</b>	<i>Quantitative Structure-Activity Relationship</i>
<b>RMN</b>	Résonance magnétique nucléaire
<b>VD-EEB</b>	Extrait éthanolique brut des parties aériennes de <i>Varronia dardani</i>
<b>VD-R-EEB</b>	Extrait éthanolique brut des racines de <i>Varronia dardani</i>
<b>VL-EEB</b>	Extrait éthanolique brut des parties aériennes de <i>Varronia leucocephala</i>
<b>s</b>	Simplet
<b>sl</b>	Simplet large
<b>δ</b>	Déplacement chimique

## LISTE DES FIGURES

Figura 1 - Biomas do Brasil.....	18
Figura 2 - Inflorescência e folhas de <i>V. dardani</i> .....	24
Figura 3 - Inflorescência e folhas de <i>V. leucocephala</i> .....	26
Figura 4 - Estrutura básica das flavanonas.....	29
Figura 5 - Esqueleto básico 9,10-antracenodiona.....	30
Figura 6 - Estrutura da quinizarina. ....	31
Figura 7 - Estruturas químicas do vemurafenibe e dacarbazina.....	64
Figura 8 - Cromatograma da fração VD-FA-11-12 da fase acetato de etila de <i>V. dardani</i> . ....	68
Figura 9 - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD) da substância VD-2. ....	72
Figura 10 - Expansão do espectro de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de VD-2 na região de 2,60 – 3,20 ppm.....	72
Figura 11 - Expansão do espectro de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de VD-2 na região de 5,2 – 7,4 ppm.....	73
Figura 12 - Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (100 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de VD-2.....	73
Figura 13 - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (500 MHz, CD <sub>3</sub> OD) da substância VD-3. ....	76
Figura 14 - Expansão do espectro de RMN de <sup>1</sup> H (500 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de VD-3 na região de 6,0 – 8,30 ppm.....	76
Figura 15 - Expansão do espectro de RMN de <sup>1</sup> H (500 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de VD-3 na região de 3,0 – 5,3 ppm.....	77
Figura 16 - Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (125 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de VD-3.....	77
Figura 17 - Expansão do espectro de HMBC (500 e 125 MHz, CD <sub>3</sub> OD) do composto VD-3 na região de 5,55 – 4,90 e 134,1 – 136,4 ppm.....	78
Figura 18 - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD) da substância VD-4. ....	82
Figura 19 - Expansão do espectro de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de VD-4 na região de 5,0 – 8,60 ppm.....	82
Figura 20 - Expansão do espectro de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de VD-4 na região de 3,0 – 3,85 ppm.....	83
Figura 21 - Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (100 MHz, CD <sub>3</sub> OD) da substância VD-4.....	83
Figura 22 - Expansão do espectro de RMN de <sup>13</sup> C (100 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de VD-4 na região de 90 – 185 ppm.....	84

<b>Figura 23 - Expansão do espectro de RMN de <math>^{13}\text{C}</math> (100 MHz, <math>\text{CD}_3\text{OD}</math>) de VD-4 na região de 59 – 81 ppm.....</b>	<b>84</b>
<b>Figura 24 - Mapa de contorno de <math>^1\text{H}</math> x <math>^{13}\text{C}</math> HMBC (<math>\text{CD}_3\text{OD}</math>, 400 e 100 MHz) da substância VD-4.....</b>	<b>85</b>
<b>Figura 25 - Expansão do espectro de HMBC (400 e 100 MHz, <math>\text{CD}_3\text{OD}</math>) do composto VD-4 na região de 7,95 – 4,80 e 70 – 180 ppm.....</b>	<b>85</b>
<b>Figura 26 - Expansão do espectro de HMBC (400 e 100 MHz, <math>\text{CD}_3\text{OD}</math>) do composto VD-4 na região de 2,60 – 4,10 e 55 – 110 ppm.....</b>	<b>86</b>
<b>Figura 27 - Espectro de RMN de <math>^1\text{H}</math> (400 MHz, <math>\text{CD}_3\text{OD}</math>) da substância VD-5. ....</b>	<b>89</b>
<b>Figura 28 - Expansão do espectro de RMN de <math>^1\text{H}</math> (400 MHz, <math>\text{CD}_3\text{OD}</math>) de VD-5 na região de 6,2 – 8,6 ppm.....</b>	<b>89</b>
<b>Figura 29 - Expansão do espectro de RMN de <math>^1\text{H}</math> (400 MHz, <math>\text{CD}_3\text{OD}</math>) de VD-5 na região de 3,0 – 5,3 ppm.....</b>	<b>90</b>
<b>Figura 30 - Espectro de RMN de <math>^{13}\text{C}</math> (100 MHz, <math>\text{CD}_3\text{OD}</math>) da substância VD-5. ....</b>	<b>90</b>
<b>Figura 31 - Mapa de contorno de <math>^1\text{H}</math> x <math>^{13}\text{C}</math> HMBC (<math>\text{CD}_3\text{OD}</math>, 400 e 100 MHz) da substância VD-5.....</b>	<b>91</b>
<b>Figura 32 - Expansão do espectro de HMBC (400 e 100 MHz, <math>\text{CD}_3\text{OD}</math>) da substância VD-5 na região de 8,35 – 6,0 e 90 – 175 ppm.....</b>	<b>91</b>
<b>Figura 33 - Expansão do espectro de HMBC (400 e 100 MHz, <math>\text{CD}_3\text{OD}</math>) da substância VD-5 na região de 7,20 – 3,50 e 130 – 210 ppm.....</b>	<b>92</b>
<b>Figura 34 - Principais correlações observadas no espectro de HMBC da substância VD-5.....</b>	<b>92</b>
<b>Figura 35 - Espectro de RMN de <math>^1\text{H}</math> (500 MHz, <math>\text{CD}_3\text{OD}</math>) da substância VD-6. ....</b>	<b>95</b>
<b>Figura 36 - Expansão do espectro de RMN de <math>^1\text{H}</math> (500 MHz, <math>\text{CD}_3\text{OD}</math>) de VD-6 na região de 5,0 – 7,8 ppm.....</b>	<b>96</b>
<b>Figura 37 - Expansão do espectro de RMN de <math>^1\text{H}</math> (500 MHz, <math>\text{CD}_3\text{OD}</math>) de VD-6 na região de 2,5 – 4,0 ppm.....</b>	<b>96</b>
<b>Figura 38 - Espectro de RMN de <math>^{13}\text{C}</math> (125 MHz, <math>\text{CD}_3\text{OD}</math>) da substância VD-6. ....</b>	<b>97</b>
<b>Figura 39 - Expansão do espectro de RMN de <math>^{13}\text{C}</math> (125 MHz, <math>\text{CD}_3\text{OD}</math>) de VD-6 na região de 100 – 185 ppm.....</b>	<b>97</b>
<b>Figura 40 - Expansão do espectro de RMN de <math>^{13}\text{C}</math> (125 MHz, <math>\text{CD}_3\text{OD}</math>) de VD-6 na região de 28 – 84 ppm.....</b>	<b>98</b>
<b>Figura 41 - Cromatograma do EEB-VD e identificação por UV do pico referente ao ácido rosmarínico em 15'42''.....</b>	<b>100</b>

<b>Figura 42 - Curva de pureza do ácido rosmarínico presente no EEB-VD. ....</b>	<b>101</b>
<b>Figura 43 - Registros originais representativos do efeito vasorrelaxante do EEB-VD em aorta isolada de rato pré-contraída com <math>3 \times 10^{-7}</math> M de FEN na presença (A) e na ausência (B) de endotélio funcional.....</b>	<b>103</b>
<b>Figura 44 - Registros originais representativos do efeito relaxante do EEB-VD em traqueia isolada de rato pré-contraída com <math>10^{-5}</math> M de CCh na presença (A) e na ausência (B) de epitélio funcional.....</b>	<b>105</b>
<b>Figura 45 - Registros originais representativos do efeito do EEB-VD sobre as contrações tônicas induzidas por KCl (A), por histamina (B) e por CCh (C) em íleo isolado de cobaia. ....</b>	<b>109</b>
<b>Figura 46 - Registros originais representativos do efeito tocolítico do EEB-VD sobre as contrações tônicas induzidas por <math>10^{-2}</math> UI/mL de ocitocina (A) e por 60 mM de KCl (B) em ratas. ....</b>	<b>113</b>
<b>Figura 47 - Inibição do crescimento das células A2058 após a exposição às concentrações crescentes (1-100 <math>\mu</math>M, 72h) do extrato etanólico bruto das raízes de <i>V. dardani</i> (VD-R) e da fração isopropanólica do extrato etanólico bruto das raízes de <i>V. dardani</i> (VD-R-I) (A). Tratamentos com VD-R e VD-R-I provocaram redução na densidade celular, encolhimento das células e arredondamento (setas pretas) (B e C). Os resultados são expressos como média <math>\pm</math> desvio padrão, os testes foram feitos em triplicata (n=3).....</b>	<b>117</b>
<b>Figura 48 - Espectro de IES-EM do composto VD-R-1. ....</b>	<b>118</b>
<b>Figura 49 - Espectro de infravermelho do composto VD-R-1 (KBr, <math>\text{cm}^{-1}</math>).....</b>	<b>118</b>
<b>Figura 50 - Espectro de RMN de <math>^1\text{H}</math> (400 MHz, <math>\text{CDCl}_3</math>) da substância VD-R-1..</b>	<b>121</b>
<b>Figura 51 - Expansão do espectro de RMN de <math>^1\text{H}</math> (400 MHz, <math>\text{CDCl}_3</math>) de VD-R-1 na região de 3,5 – 13 ppm.....</b>	<b>122</b>
<b>Figura 52 - Expansão do espectro de RMN de <math>^1\text{H}</math> (400 MHz, <math>\text{CDCl}_3</math>) de VD-R-1 na região de 0,7 – 2,7 ppm.....</b>	<b>122</b>
<b>Figura 53 - Espectro de RMN de <math>^{13}\text{C}</math> (100 MHz, <math>\text{CDCl}_3</math>) da substância VD-R-1.</b>	<b>123</b>
<b>Figura 54 - Espectro de HMBC (400 e 100 MHz, <math>\text{CDCl}_3</math>) de VD-R-1. ....</b>	<b>123</b>
<b>Figura 55 - Expansão do espectro de HMBC (400 e 100 MHz, <math>\text{CDCl}_3</math>) do composto VD-R-1 na região de 0,5 – 3,1 e 5 – 70 ppm.....</b>	<b>124</b>
<b>Figura 56 - Expansão do espectro de HMBC (400 e 100 MHz, <math>\text{CDCl}_3</math>) do composto VD-R-1 na região de 10,4 – 11,3 e 178 – 212 ppm. ....</b>	<b>124</b>

<b>Figura 57 - Curva <i>Receiver operating characteristic</i> (ROC) gerada para o modelo <i>Random Forest</i> (RF) com os descritores Dragon 7. Legenda: (A) Teste e (B) <i>Cross Validation</i>.</b> .....	126
<b>Figura 58 - Sobreposição dos ligantes redocado (em branco) e pose mais estável (em vermelho). Legenda: A) Colchicina ligante da enzima Complexo de tubulina e colchicina.</b> .....	129
<b>Figura 59 - Interações 2D e 3D entre o Composto 03 (A e B), a Dacarbazina (C), o Vemurafenibe (D) e o complexo de Tubulina-Colchicina (PDB: 4O2B). As ligações de hidrogênio são destacadas em verde e em azul; as interações hidrofóbicas são destacadas em rosa e as interações estéricas são destacadas em vermelho e em laranja. Resíduos: Asn (Asparagina), Lys (Lisina), Ala (Alanina), Leu (Leucina), Cys (Cisteína), Val (Valina), Met (Metionina), Ile (Isoleucina) e Asp (Ácido Aspártico).</b> .....	137
<b>Figura 60 - Interações 2D e 3D entre o Composto 03 (A e B), a Dacarbazina (C), o Vemurafenibe (D) e o complexo T2R-TTL-Nocodazol (PDB: 5CA1). As ligações de hidrogênio são destacadas em verde e em azul; as interações hidrofóbicas são destacadas em rosa e lilás e as interações estéricas são destacadas em vermelho. Resíduos: Asn (Asparagina), Lys (Lisina), Ala (Alanina), Leu (Leucina), Cys (Cisteína), Val (Valina), Ile (Isoleucina), Glu (Ácido Glutâmico) e Tyr (Tirosina).</b> .....	139
<b>Figura 61 - Cromatograma da fração VL-I do extrato etanólico bruto de <i>V. leucocephala</i>.</b> .....	141
<b>Figura 62 - Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N) da substância VL-1.</b> .....	146
<b>Figura 63 - Expansão do espectro de RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N) da substância VL-1 na região de 4,70 – 6,95 ppm.</b> .....	146
<b>Figura 64 - Expansão do espectro de RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N) da substância VL-1 na região de 0,6 – 4,7 ppm.</b> .....	147
<b>Figura 65 - Espectro de RMN de <sup>13</sup>C (125 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N) da substância VL-1.</b> .....	147
<b>Figura 66 - Espectro de HMBC (500 e 125 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N) de VL-1.</b> .....	148
<b>Figura 67 - Expansão do espectro de HMBC (500 e 125 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N) do composto VL-1 na região de 0,75 – 1,80 e 10 – 150 ppm.</b> .....	148
<b>Figura 68 - Espectro de HSQC (500 e 125 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N) de VL-1.</b> .....	149
<b>Figura 69 - Expansão do espectro de HSQC (500 e 125 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N) do composto VL-1 na região de 0,75 – 1,80 e 10 – 150 ppm.</b> .....	149

## LISTE DES TABLEAUX

Tabela 1 - Método utilizado na cromatografia líquida de alta eficiência da fração VD-FA-11-12 da fase acetato de etila de <i>Varronia dardani</i> .....	44
Tabela 2 - Programação utilizada para o fracionamento por Cromatografia <i>Flash</i> dos extratos etanólicos.....	54
Tabela 3 - Programação utilizada para o fracionamento por Cromatografia <i>Flash</i> da fração VD-R-I.....	54
Tabela 4 - Estruturas 2D dos isômeros de VD-R-1.....	57
Tabela 5 - Descrição das proteínas selecionadas no estudo.....	64
Tabela 6 - Método utilizado na CLAE da fração VL-I da fração isopropanólica de <i>V. leucocephala</i> . ....	66
Tabela 7 - Dados de RMN de <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C (400 e 100 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de VD-2, 4',5,7-trihydroxiflavanona (naringenina) em comparação aos dados de RMN de <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C (500 e 125 MHz, CD <sub>3</sub> OD) por SILVA e colaboradores (2013). ....	70
Tabela 8 - Dados de RMN de <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C (500 e 125 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de VD-3, canferol-3-O-glicosídeo (astragalina) em comparação aos dados de RMN de <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C (400 e 100 MHz, CD <sub>3</sub> OD) por GHAVAM-HAGHI & DINANI (2017).....	74
Tabela 9 - Dados de RMN de <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C (400 e 100 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de VD-4, quercetina-3-O-β-D-glicopiranosídeo (isoquercitrina) em comparação aos dados obtidos por ATAY et al. (2015) (600 e 150 MHz, CD <sub>3</sub> OD). ....	80
Tabela 10 - Dados de RMN de <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C (400 e 100 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de VD-5, ramnocitrina, em comparação aos dados obtidos por BODAKHE et al. (2012) (300 e 75 MHz, CD <sub>3</sub> OD). ....	87
Tabela 11 - Dados de RMN de <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C (500 e 125 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de VD-6, ácido rosmarínico em comparação aos dados obtidos por ELSBAEY et al. (2022)..	94
Tabela 12 - Teor de fenólicos totais em mg EAG/g de amostra por dia (n = 3) na concentração de 450 µg.mL <sup>-1</sup> .....	99
Tabela 13 - Concentrações utilizadas e média das áreas obtidas nos cromatogramas.....	101
Tabela 14 - Inibição de crescimento das células A2058 frente aos tratamentos dos extratos e frações das espécies de <i>Varronia</i> a 100 µg.ml <sup>-1</sup> após 48h de tratamento. ....	116



<b>Tabela 15 - Dados de RMN de <math>^1\text{H}</math>, <math>^{13}\text{C}</math> (400 e 100 MHz, <math>\text{CDCl}_3</math>) de VD-R-1, 5,8-dihidroxi-6-metoxi-1,4a-dimetil-1,2,3,4,4a,9,9a,10-octahidroantraceno-9,10-diona (vardanona).....</b>	<b>120</b>
<b>Tabela 16 - Resumo dos parâmetros correspondentes aos resultados obtidos para o modelo elaborado com os descritores Dragon 7. ....</b>	<b>125</b>
<b>Tabela 17 - Probabilidade de atividade dos isômeros de <i>V. dardani</i> (Taroda) contra a linhagem de células A2058 avaliadas pelo algoritmo Random Forest (RF). Em negrito encontram-se destacados os compostos considerados ativos pelo modelo.....</b>	<b>127</b>
<b>Tabela 18 - Valores de RMSD para as proteínas selecionadas no estudo.....</b>	<b>128</b>
<b>Tabela 19 - Valores de pontuação e probabilidade de atividade dos compostos em estudo para a enzima complexo Tubulina-Colchicina (PDB: 4O2B).....</b>	<b>131</b>
<b>Tabela 20 - Valores de pontuação e probabilidade de atividade dos compostos em estudo para a enzima Complexo T2R-TTL-Nocodazol (PDB: 5CA1).....</b>	<b>132</b>
<b>Tabela 21 - Valores de pontuação e probabilidade de atividade dos compostos em estudo para a enzima Complexo tubulina-vimblastina (PDB: 5J2T).....</b>	<b>133</b>
<b>Tabela 22 - Valores de probabilidade de atividade dos compostos em estudo para o Complexo de tubulina. ....</b>	<b>134</b>
<b>Tabela 23 - Valores de probabilidade combinada (ProbComb) entre as abordagens Ligand-based e Structure-based para os compostos frente a linhagem celular A2058 e o complexo de tubulina.....</b>	<b>135</b>
<b>Tabela 24 - Dados de RMN de <math>^1\text{H}</math>, <math>^{13}\text{C}</math> (500 e 125 MHz, <math>\text{C}_5\text{D}_5\text{N}</math>) de VL-1, 3-O-<math>\beta</math>-D-xilopiranosil-(1<math>\rightarrow</math>4)-<math>\beta</math>-D-glicopiranosil-(1<math>\rightarrow</math>2)-<math>\beta</math>-D-glicopiranosil-(1<math>\rightarrow</math>2)-<math>\beta</math>-D-glicopiranosilolean-11,13-dien-3<math>\beta</math>,16a,28-triol, em comparação aos dados obtidos por DINIZ et al. (2008), nas mesmas condições.....</b>	<b>143</b>

# **INTRODUCTION**

## 1 INTRODUÇÃO

As plantas possuem um papel de grande importância na vida do homem desde tempos imemoriais, sendo exploradas de diferentes modos para diversas finalidades, destacando-se a busca por tratamento e cura de doenças (WASWA et al., 2022). Evidências arqueológicas recentes apoiadas por dados históricos e etnográficos mostram um amplo consumo de plantas, principalmente venenosas e psicotrópicas, durante a era paleolítica. Ou seja, existem evidências que mostram que a partir do homem paleolítico, houve a construção do conhecimento e uso de metabólitos secundários de plantas (HARDY, 2020).

Ainda hoje, uma vasta parcela da população global ainda opta pela utilização de ingredientes ou preparações medicinais à base de ervas para a manutenção de seu bem-estar (KHANDOKAR et al., 2021). No Brasil, até os dias atuais, as plantas medicinais possuem papel significativo no cotidiano de diversas comunidades e representam, muitas vezes, o único recurso para tratar diversas enfermidades (DA MOTA et al., 2022), o que foi confirmado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), onde em um relatório, cita que cerca de 80% da população mundial ainda está habituada a utilizar derivados de plantas, para satisfazer total ou parcialmente suas necessidades primárias necessidade de saúde (SHIPA et al., 2022).

De todas as espécies de vegetais conhecidas globalmente, aproximadamente 20% é encontrado no Brasil, um país que possui uma biodiversidade extremamente rica, encontrada em vários biomas importantes (MANDOVA, 2022), e apesar do grande uso popular de plantas medicinais, muitas espécies ainda não foram estudadas quanto a sua composição química e atividade biológica, comprovando cientificamente suas propriedades terapêuticas. Diante desta problemática, muitos pesquisadores vêm desenvolvendo métodos de isolamento e identificação com o objetivo de descobrir novos princípios ativos e novas atividades farmacológicas de substâncias já conhecidas oriundas de plantas. Esses estudos são necessários para garantir o uso seguro e confiável de drogas vegetais através do entendimento do mecanismo de ação e efeitos colaterais ou tóxicos dessas plantas (FIRMO et al., 2011; AWARE et al., 2022).

A maioria das substâncias orgânicas conhecidas são produzidas pela natureza, destacando-se o reino vegetal que contribui largamente para o fornecimento de

metabólitos secundários. O metabolismo das plantas é dividido de acordo com as funções exercidas pelos compostos orgânicos sintetizados por elas, sendo classificados em metabólitos primários, que possuem função estrutural, plástica e de armazenamento de energia contribuindo para o crescimento e desenvolvimento da planta e, os metabólitos secundários que participam de mecanismos de defesa das plantas em resposta ao estresse ambiental, protegendo-as contra herbívoros e patógenos, servem de atrativos para os polinizadores, além disso, esses compostos estão relacionados a efeitos medicinais, principalmente para os seres humanos, tendo grande potencial na área farmacêutica para descoberta de novos fármacos (VIZZOTTO, KROLOW & WEBER, 2010; ALVES et al., 2017; BIRCHFIELD & MCINTOSH, 2020; ERB, ZÜST & ROBERT, 2021).

Atualmente, os estudos envolvendo a Química de Produtos Naturais (QPN), apesar do avanço da tecnologia, ainda oferecem alguns desafios, pois muitos metabólitos secundários, incluindo pequenas moléculas, apresentam estruturas extraordinariamente complexas, atividades farmacológicas e industriais significativas (CHUBATSU NUNES, NGUYEN & DANG, 2022). Mesmo com tantos obstáculos nessa área, a QPN apresenta um panorama futuro favorável para o desenvolvimento de muitos fármacos (SALES, 2020).

Assim sendo, nesse trabalho, buscou-se contribuir para a pesquisa de QPN, trabalhando com duas espécies pertencentes à caatinga e à uma família do Reino vegetal muito importante no que se diz respeito ao desenvolvimento de fitoterápicos. Serão apresentadas aqui, metodologias e resultados que foram compartilhadas entre quatro grupos de pesquisa, visando trocar experiências e assim enriquecer o trabalho.

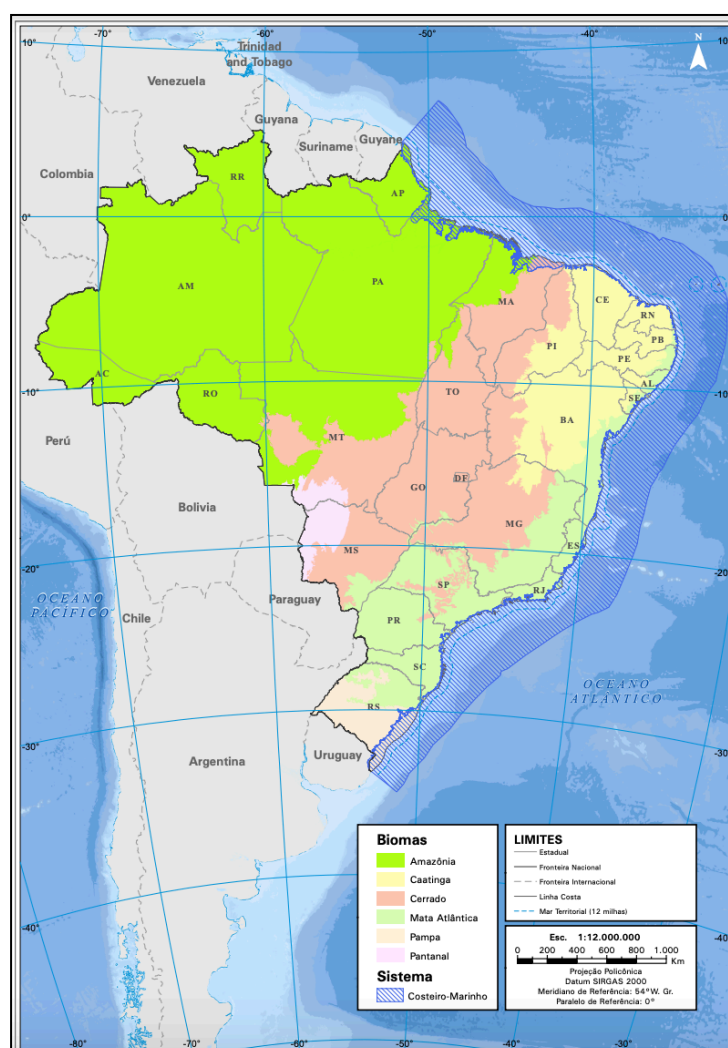
# **ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 A Caatinga

O Brasil é um dos países com maior biodiversidade do planeta possuindo a flora mais rica do mundo com mais de 56.000 espécies de plantas distribuídas nos biomas Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal (Figura 1). A caatinga ocorre em uma área no Brasil de 863.752 km<sup>2</sup>, ocupando cerca de 10% da área territorial brasileira, de acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE (BRASIL, 2019).

**Figura 1 - Biomas do Brasil**



**Fonte: IBGE (2019)**

A região da Caatinga é uma das maiores e mais biodiversas terras do mundo e está restrita ao nordeste do Brasil e norte do estado de Minas Gerais, representada por cerca de 5000 espécies, favorecendo a produção de altas taxas de metabólitos secundários por sua flora e apesar de ser um bioma exclusivamente brasileiro, ainda é pouco protegido e estudado por ser reconhecido como “pobre”, porém pesquisas recentes revelaram um grande potencial com ampla diversidade e endemismo (FERREIRA, 2017; CAVALCANTE et al., 2017; ALVES et al., 2017; SILVA, MOREIRA e FELISMINO, 2017; SILVA et al., 2018; DE ARAÚJO et al., 2022).

As comunidades locais das regiões da Caatinga, utilizam muitas plantas endêmicas como uma alternativa para o tratamento de algumas doenças. É importante ainda, destacar que existem diversos estudos que apontam o potencial farmacológico das plantas de caatinga (LUNA et al., 2022).

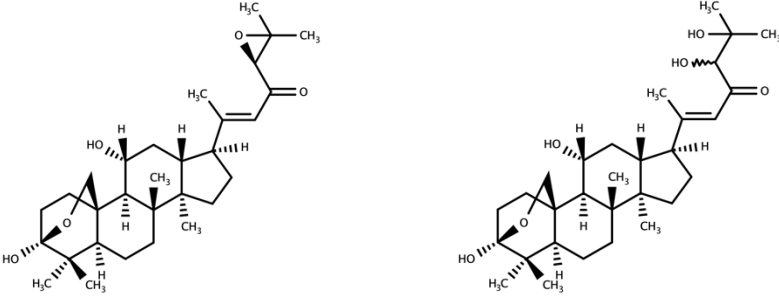
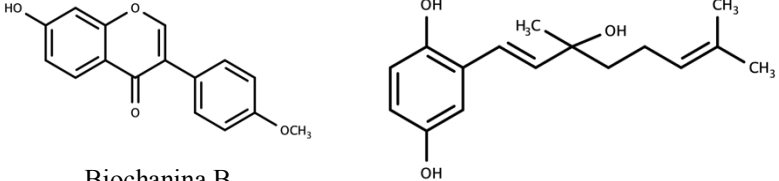
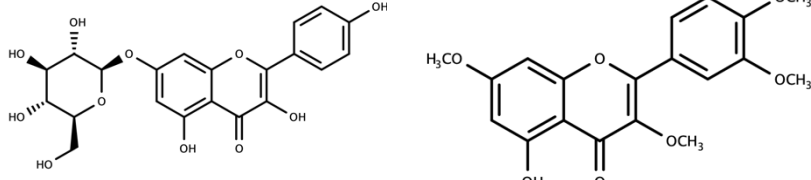
## 2.2 A Família Cordiaceae

A atual família Cordiaceae era tradicionalmente considerada uma subfamília de Boraginaceae, juntamente com Boraginoideae, Ehretioideae, Heliotropioideae e Wellstedioideae. Porém, estudos moleculares recentes elevaram estas subfamílias ao nível de famílias. Em 2016, o Angiosperm Phylogeny Group (APG) reconheceu a ordem Boraginales sendo composta por oito famílias: Codonaceae, Wellstediaceae, Boraginaceae, Hydrophyllaceae, Namaceae, Heliotropiaceae, Cordiaceae e Ehretiaceae, denotando a grande diversidade e a difícil circunscrição do grupo (LEAL-COSTA & AMÉLIA, 2017; MELO et al., 2018).

A família considerada monofilética, cosmopolita e provavelmente a mais complexa de Boraginales, apresenta cerca de 350 espécies, sendo 65 delas registradas no Brasil. Cordiaceae inclui três gêneros: *Coldenia* L., *Cordia* L. e *Varronia* P. Br., com distribuição predominantemente tropical, ocorrendo em todos os estados brasileiros, sendo representada na forma de árvores ou arbustos, raramente lianas, com folhas alternas ou opostas, inteiras, flores bissexuadas, simpétalas e frutos do tipo drupa, com quatro lóculos (NIZIO, 2015; DEMÉTRIO, 2017; WATANABE, HIURA e NOGUEIRA, 2017).

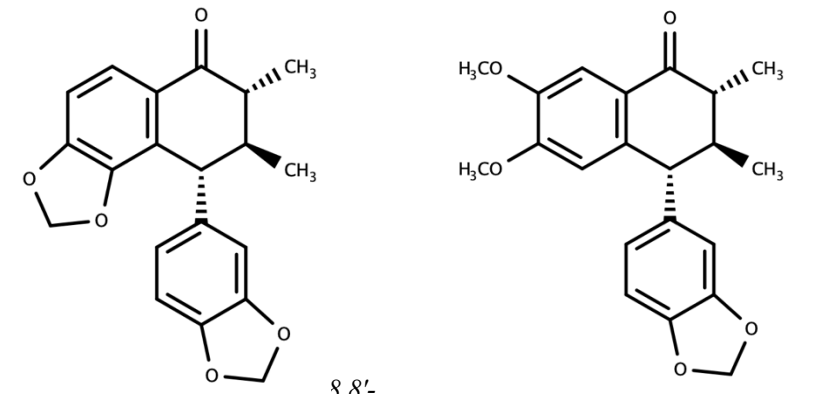
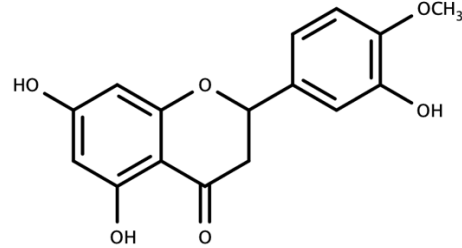
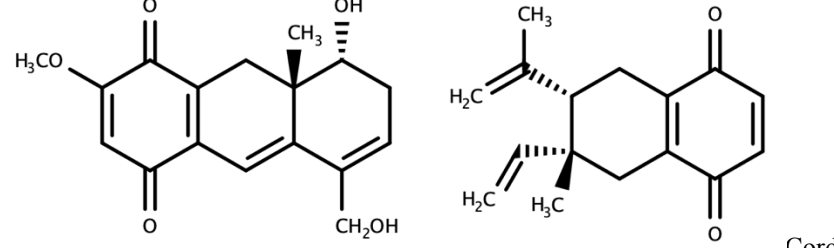
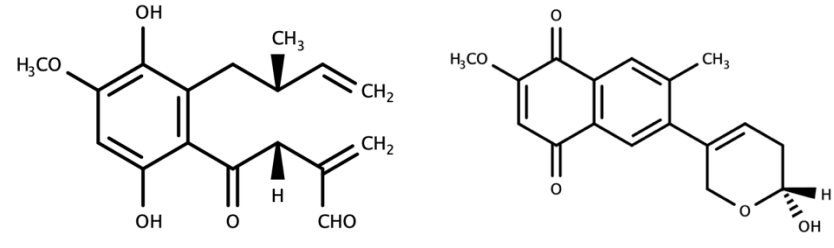
Muitas espécies pertencentes a essa família são utilizadas na medicina popular para tratamento de diversas afecções do trato gastrointestinal, urogenital, respiratório, cardíaco, vascular, sanguíneo, possuindo propriedades antimicrobianas, anti-inflamatória, anti-helmíntica, diurética, analgésica, entre outras. Diferentes classes de metabólitos secundários foram isoladas e identificadas em diferentes partes de plantas dessa família, incluindo lignanas, naftoquinonas, cromonas, saponinas, terpenoides, alcaloides, flavonoides e outros compostos fenólicos (VALE *et al.*, 2012; MATIAS *et al.*, 2015) (Quadro 1).

**Quadro 1 - Exemplos de substâncias identificadas e isoladas na família Cordiaceae.**

<i>Espécies</i>	<i>Substâncias</i>	<i>Referências</i>
<i>V. verbenacea</i> (Folhas)	 <p style="text-align: center;">Cordialina A                      Cordialina B</p>	VELDE <i>et al.</i> (1982)
<i>C. africana</i> (Raízes)	 <p style="text-align: center;">Biochanina B                      2- (2Z)-(3-hydroxy-3,7-dimetilocta-2,6- dienil)-1,4-benzenediol</p>	KAMAU <i>et al.</i> (2019)
<i>V. multispicata</i> (Folhas)	 <p style="text-align: center;">Populnina                      Retusina</p>	LOPES <i>et al.</i> (2019)



Quadro 1 – (Continuação).

<p><i>C. exaltata</i> (Folhas)</p>	 <p>8,8'- dimetil-3,4,3',4''-dimetilenodioxi- 7-oxo-2,7'-ciclolignana</p> <p>8,8'-dimetil-4,5-dimetoxi-3',4'- metilenodioxo-7-oxo-2,7'-ciclolignana</p>	<p>NOGUEIRA et al. (2013)</p>
<p><i>C. sebestena</i> (Flores)</p>	 <p>Hesperetina</p>	<p>PRAKASH et al. (2020)</p>
<p><i>C. trichotoma</i> (Caules)</p>	 <p>Oncocalixona A</p> <p>iacromo C</p>	<p>MENEZES et al. (2001)</p>
<p><i>C. glazioviana</i> (Caules)</p>	 <p>Cordiaquinol D</p> <p>6-[(2'R)-2'-hidroxi-3',6'-dihidro-2H- piran-5'-il]-2-metoxi-7- metilnaftaleno-1,4-diona</p>	<p>SILVA et al. (2021)</p>

### 2.2.1 O Gênero *Varronia*

O gênero *Varronia* P. Browne, pertencente à família Cordiaceae, por muito tempo foi descrito como um subgênero de *Cordia* (TARODA, 1984), no entanto, após realização de estudos filogenéticos houve a segregação de *Varronia* dos outros membros de *Cordia*, sendo classificado assim devido a sua significância morfológica e evidências moleculares, corroborando para que *Varronia* seja considerado um grupo monofilético distinto, sendo tratada como irmã de *Cordia* e, portanto, reconhecida a nível genérico. A diferença morfológica principal entre os gêneros *Cordia* e *Varronia* consiste nos tipos de hábitos e inflorescências: árvores com panículas abertas ou inflorescências cimosas pertencem ao gênero *Cordia* e arbustos com inflorescências condensadas, capitadas ou em forma de espigas pequenas e compactas pertencem ao gênero *Varronia* (MILLER e GOTTSCHLING, 2007).

Devido a mudança na filogenia, a nomenclatura de algumas espécies que antes estavam posicionadas dentro do gênero *Cordia* foi atualizada para *Varronia*, incluindo espécies como: *Varronia curassavica* Jacq; *Varronia globosa* Jacq; *Varronia leucocephala* (Moric.) J. S. Mill; *Varronia dardani* (Taroda) J. S. Mill, entre outras, todas distribuídas no Nordeste do Brasil (MELO, 2015).

O gênero *Varronia* inclui aproximadamente 125 espécies neotropicais, com seus principais centros de diversidade no México, nos Andes tropicais e no Brasil (MILLER & GOTTSCHLING, 2007). No Brasil, existem 30 espécies, das quais mais da metade são endêmicas e encontram-se distribuídas nos principais domínios fitogeográficos (Floresta Amazônica, Mata Atlântica, Cerrado e Caatinga). Seis espécies são endêmicas do Nordeste brasileiro: *Varronia dardani* (Taroda) J.S. Miller, *V. harleyi* (Taroda) J.S. Miller, *V. leucocephala* (Moricand) J.S. Miller, *V. leucomalloides* (Taroda) J.S. Miller, *V. mayoi* (Taroda) M.Stapf e *V. tarodaea* J.S. Miller, bem como uma nova espécie *Varronia mariana* E.C.O.Chagas & Costa-Lima (MELO et al., 2015; CHAGAS & COSTA-LIMA, 2018).

Muitas espécies pertencentes a este gênero são usadas na medicina popular, por apresentarem diversas propriedades como: antiúlcera, antimicrobiana, antifúngica, larvicida, anti-inflamatória e analgésica. Além do uso popular dessas plantas, diversos estudos têm sido realizados a fim de comprovar suas atividades biológicas (FREITAS,

2010). A *Varronia verbenacea*, basônimo *Cordia verbenacea*, é uma espécie muito importante desse gênero, pois a partir do seu óleo essencial, foi possível o desenvolvimento do primeiro medicamento fitoterápico totalmente desenvolvido no Brasil, o Acheflan<sup>®</sup>, presente tanto na forma de creme como de aerossol e a sua utilização tópica é indicada para o tratamento de dores musculares e tendinites (GOMES et al., 2019).

O gênero *Varronia* é relatado na literatura como fonte de diversos compostos como flavonoides, chalconas, quinonas e saponinas triterpênicas (DINIZ et al., 2008; MELO et al., 2012; DUARTE, 2015; DINIZ et al., 2015; VELOSO et al., 2020).

#### **2.2.1.1 A espécie *Varronia dardani* (Taroda) J.S. Mill.**

A espécie *Varronia dardani* (Taroda) J.S. Mill. (Figura 2, p. 24) tem como basônimo *Cordia dardani*, endêmica da caatinga do Brasil, sendo distribuída em Estados do Nordeste do país como: Alagoas, Sergipe, Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Rio Grande do Norte (STAPF, 2015). Estudos químicos realizados anteriormente de *V. dardani* relataram a presença de algumas classes de metabólitos secundários, principalmente terpenoides e flavonoides. Um estudo de prospecção fitoquímica para detecção de metabólitos secundários em extratos hidroalcoólicos de raiz, galhos e folhas, realizado em 2015, mostrou a presença de taninos flabobênicos, flavononóis, catequinas, flavanonas e quinonas (DUARTE, 2015).

**Figura 2 - Inflorescência e folhas de *V. dardani*.**

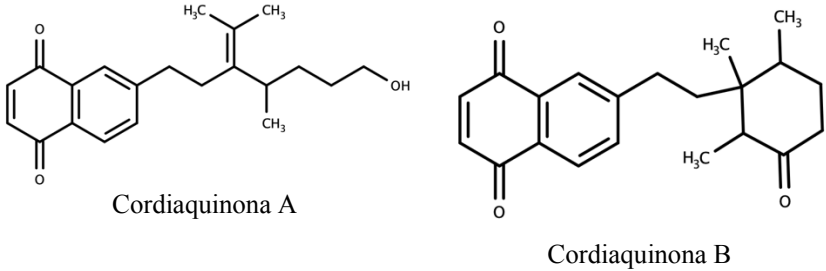
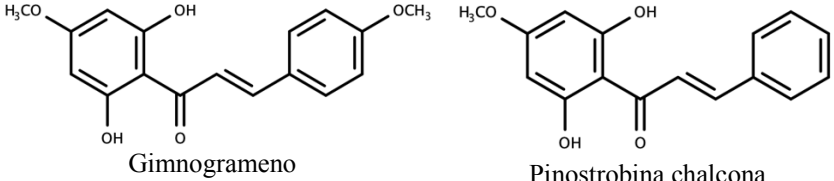


**Fonte:** Josean Fechine Tavares (2019).

No ano seguinte, outro estudo resultou no isolamento de duas naftoquinonas, Cordiaquinona A e Cordiaquinona B a partir do extrato diclorometânico das raízes (Quadro 2, p. 25), bem como no isolamento de duas flavonas, 5-hidroxi-7-metoxiflavanona (pinostrobina) e 5-hidroxi-7,4'-dimetoxiflavanona (sakuranetina-4'-metil éter) a partir da fase diclorometano do extrato hidroalcoólico das folhas de *V. dardani* (DE OLIVEIRA, 2016).

Em 2018, o estudo realizado por Veloso, possibilitou o isolamento de três compostos e duas misturas a partir da fase diclorometânica do extrato etanólico bruto das folhas de *V. dardani*, sendo estes: duas chalconas, pinostrobina chalcona e gimnogrameno; e quatro flavanonas, pinocembrina, isosakuranetina, pinostrobina e sakuranetina-4'-metil éter. Da atividade biológica testada, o óleo essencial inibiu o crescimento de *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus salivarius*, já o extrato etanólico bruto inibiu apenas o crescimento de *S. salivarius*. A pinocembrina, a pinostrobina chalcona e sua mistura com o gimnogrameno apresentaram forte inibição da formação do biofilme de *E. faecalis* na maior concentração testada (VELOSO, 2018).

**Quadro 2 - Alguns compostos isolados da espécie *V. dardani*.**

<i>Parte da planta</i>	<i>Substâncias</i>	<i>Referências</i>
<i>Raízes</i>	 <p style="text-align: center;">Cordiaquinona A                      Cordiaquinona B</p>	DE OLIVEIRA (2016)
<i>Folhas</i>	 <p style="text-align: center;">Gimnogrameno                      Pinostrobina chalcona</p>	VELOSO (2018)

De acordo com a revisão de literatura, alguns flavonoides têm sido relatados na espécie em questão, principalmente da classe das flavanonas, como por exemplo, a 5-hidroxi-7-metoxiflavanona (pinostrobina) e 5-hidroxi-7, 4'-dimetoxiflavanona (DE OLIVEIRA, 2016). Estes metabólitos, principalmente os glicosilados, possuem atividade espasmolítica em diversos músculos lisos, além de inibirem as enzimas monoaminoxidase A e catecol-*O*-metiltransferase e alguns flavonoides se ligam ao receptor GABA<sub>A</sub>, sendo responsável por tal ação (HANRAHAN, CHEBIB & JOHNSTON, 2011). Sendo assim, observa-se a necessidade da contribuição ao conhecimento químico e biológico, principalmente no que se diz respeito à avaliação da atividade espasmolítica desta espécie endêmica da Caatinga, a *V. dardani* (Taroda) J.S. Mill, pertencente à uma família com poucos estudos nessa área.

### 2.2.1.2 A espécie *Varronia leucocephala* (Moric.) J.S. Mill.

*Varronia leucocephala* (Moric.) J.S. Mill. (Figura 3, p. 26) é endêmica do bioma Caatinga, tem como sinonímia *Cordia leucocephala*, e é frequentemente encontrada em

solos arenosos nos estados do Piauí, Ceará, Paraíba, Pernambuco e Bahia (TÖLKE et al., 2013; MELO, 2015; VIEIRA, MELO & CONCEIÇÃO, 2015).

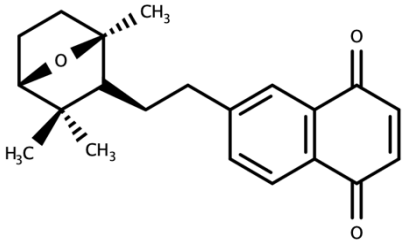
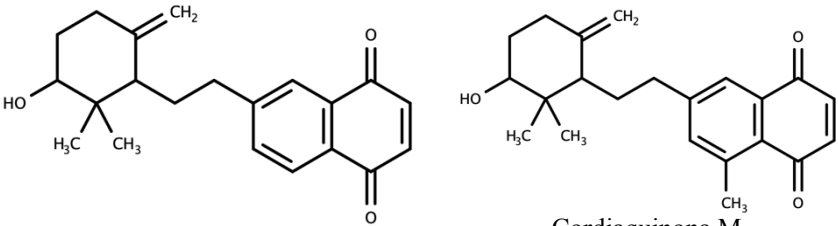
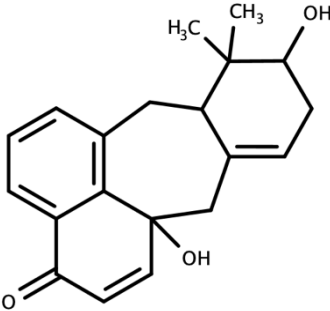
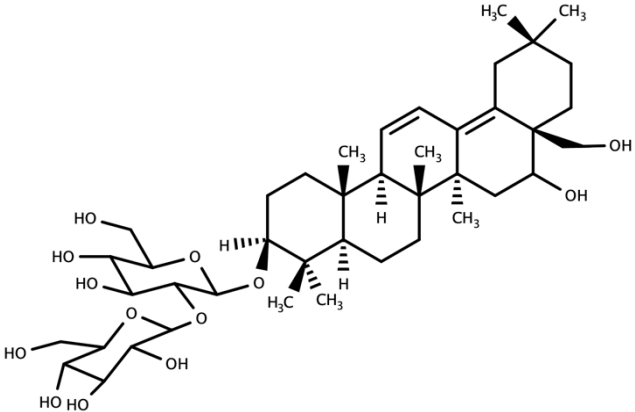
**Figura 3 - Inflorescência e folhas de *V. leucocephala*.**



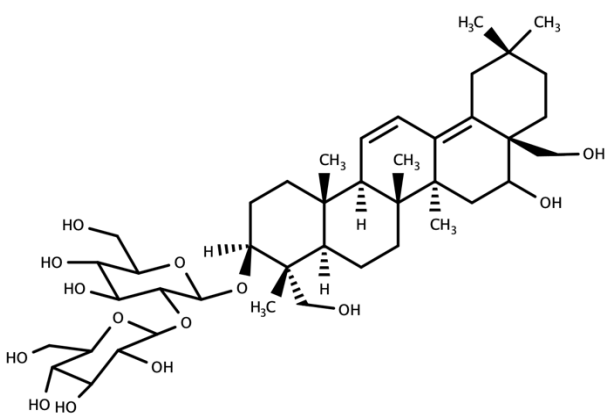
**Fonte:** Josean Fechine Tavares (2019).

Popularmente essa espécie é conhecida como “moleque-duro” e é vastamente utilizada como flor ornamental, devido a sua beleza (DANTAS et al., 2021). Várias partes da planta são utilizadas pela população para alívio das dores do reumatismo, indigestão, hemorragias, inflamação da garganta e artrite. Além disso, estudos mostraram o isolamento de saponinas triterpênicas das folhas de *V. leucocephala* e com raízes, outras pesquisas resultaram no isolamento de naftoquinonas com atividade citotóxica (ABRANTES & AGRA, 2004; DINIZ et al., 2008; MARINHO-FILHO et al., 2010; CASTRO & CAVALCANTE, 2011; FERNANDES et al., 2019) (Quadro 3, p. 27).

**Quadro 3 - Alguns compostos isolados da espécie *V. leucocephala*.**

<i>Parte da planta</i>	<i>Substâncias</i>	<i>Referências</i>
<i>Raízes</i>	 <p style="text-align: center;">Cordiaquinona J</p>	MARINHO-FILHO et al. (2010)
<i>Raízes</i>	 <p style="text-align: center;">Cordiaquinona L                      Cordiaquinona M</p>	DINIZ et al. (2008)
<i>Raízes</i>	 <p style="text-align: center;">Cordiaquinona P</p>	DINIZ et al. (2015)
<i>Folhas</i>	 <p style="text-align: center;">3-O-β-D-glicopiranosil-(1→2)-β-D-glicopiranosiloleano-11,13-dieno-3β,16α,28-triol</p>	MELO et al. (2012)

**Quadro 3** – (Continuação).

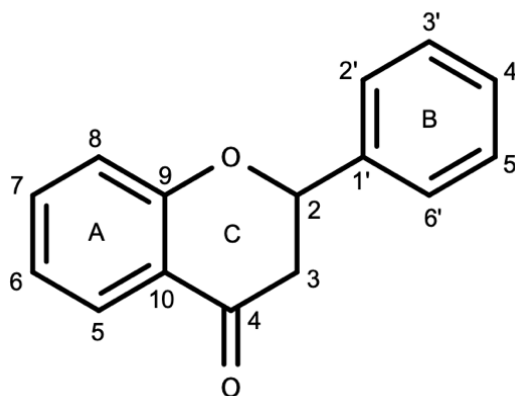
<p><i>Folhas</i></p>  <p><i>3-O-β-D-glicopiranosil-(1→2)-β-D-glicopiranosilsiloleano-11,13-dieno-3β,16α,23,28-tetrol</i></p>	<p><i>MELO et al. (2012)</i></p>
--	--------------------------------------

### 2.2.1.3 Flavonoides encontrados no gênero *Varronia*

Na constituição química de espécies desse gênero destaca-se a presença de flavonoides, principalmente os que possuem estrutura do tipo flavanonas (Figura 4, p. 29). Estes metabólitos são caracterizados pela presença de uma cadeia de três carbonos saturados e um átomo de oxigênio no C4 (D'ARCHIVIO et al, 2007). Há algumas décadas, estes eram considerados apenas como grupos menores de flavonoides (BOHM, 1994), como chalconas, di-hidrochalconas e auronas. No entanto, durante os últimos anos, o número total de flavanonas conhecidas aumentou ao ponto de que elas são agora consideradas uma das principais classes de flavonoides, assim como as flavonas, isoflavonas, flavonóis e antocianidinas (VEITCH & GRAYER, 2006; KHAN & DANGLES, 2014).



**Figura 4 - Estrutura básica das flavanonas.**



**Fonte:** Autoria própria (2022).

Como as flavanonas fazem parte do grupo dos flavonoides, elas apresentam além do efeito antioxidante, diversos efeitos biológicos, como atividade antiviral, antimicrobiana e antiinflamatória, inibem a agregação de plaquetas, são antiulcerogênicas e antialérgicas (GATTUSO et al., 2007).

Os flavonoides em geral fazem parte de um grande grupo de metabólitos naturais bem difundidos em plantas superiores. Eles são responsáveis pela cor das flores em angiospermas, mas flavonoides incolores foram relatados. Nos primórdios das pesquisas com flavonoides, os mesmos foram considerados subprodutos inúteis do metabolismo vegetal, no entanto, várias funções biológicas na planta são exercidas por vários membros da série, por exemplo, proteção UV, modulação enzimática e proteção contra agentes infecciosos (BUCKINGHAM; MUNASINGHE, 2015)

Estes metabólitos secundários são polifenólicos, derivados da via dos fenilpropanoides e do acetato, baseados em uma estrutura com quinze carbonos ( $C_6C_3C_6$ ) (DORNAS et al., 2007). Possuem dois anéis fenólicos substituídos (A e B) e um anel cromano (anel C) acoplado ao anel A. O anel C é heterocíclico com seis membros, pode ser encontrado com cinco membros (ex. auronas) ou na sua forma acíclica (chalconas) (DI CARLO et al., 1999; SISA et al., 2010). Os anéis (A, B e C) recebem a numeração com números ordinários para os núcleos A e C e os mesmos números seguidos por uma linha (') para o núcleo B (SIMÕES et al., 2017).

Diversos estudos mostraram que estes metabólitos promovem várias atividades terapêuticas. Eles evitam a formação de radicais livres, exercem atividade anti-

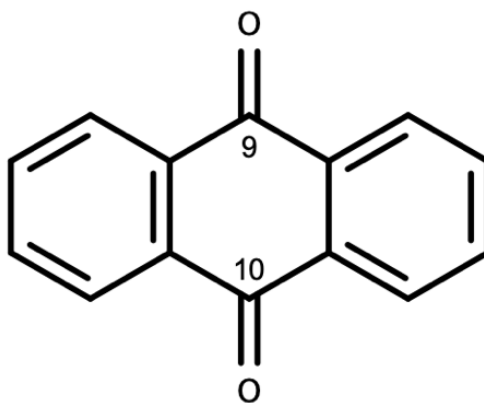
inflamatória por inibir enzimas da via do ácido araquidônico (COX-1, COX-2, 5-LOX) e outros mediadores da inflamação (elastase, histamina, etc.). Além disso, outras atividades foram comprovadas, como anti-hemorrágica, espasmolítica, diurética e antitumoral (MIDDLETON et al., 2000; NIJVELDT et al., 2001; REVANKAR et al., 2017). Sugeriu-se também que alguns flavonoides diminuem o risco de doença coronariana (MOJZISOVA et al., 2001; ISHIZAWA et al., 2011), e dietas ricas de flavonoides têm efeitos benéficos contra a resistência à insulina (CHUDNOVSKIY et al., 2014; BLUNDER et al., 2017).

### 2.3 Antraquinonas

As antraquinonas são metabólitos secundários muito abundantes na natureza e fazem parte da classe das quinonas, assim como as benzoquinonas e naftoquinonas. São consideradas como pigmentos naturais, com aproximadamente 700 compostos já descritos, isolados de plantas, líquens e fungos e muitos têm como esqueleto básico a 9,10-antracenediona (Figura 5, p. 31), um composto tricíclico aromático (DIAZ-MUÑOZ et al., 2018).

Essa classe de metabólitos é frequentemente identificada nas famílias Euphorbiaceae, Fabaceae, Rhamnaceae, Solanaceae, Bignoniaceae, Rubiaceae, Verbenaceae, entre outras (SEIGLER, 1998).

**Figura 5 - Esqueleto básico 9,10-antracenediona.**

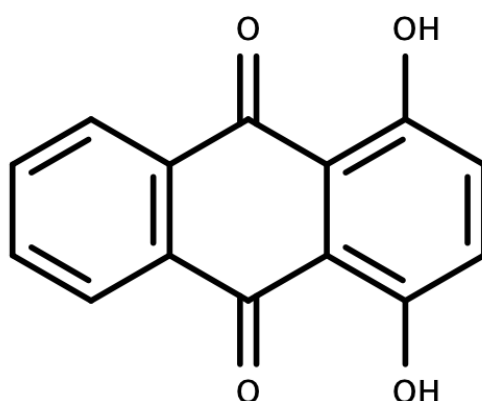


**Fonte:** Autoria própria (2022).

Os derivados antracênicos podem ser formados a partir de unidades provenientes de acetil- ou malonilcoenzima A, através do ácido o-succinilbenzoico ou do ácido p-hidroxibenzoico. Adicionalmente, algumas quinonas têm origem biossintética mista, com o anel formado pela via do acetato (policetídeo) e cadeia lateral derivada do isopreno (SIMÕES et al., 2017).

As hidroxiantraquinonas são derivados antracênicos, onde houve a substituição de um ou mais átomos de hidrogênio (H) por um grupo hidroxila. A quinizarina (Figura 6, p. 32) é a dihidroxiantraquinona mais comum (DIAZ-MUÑOZ et al., 2018). Muitas antraquinonas hidroxiladas são eficazes para superar a quimiorresistência de certas drogas quimioterápicas e também são comumente usadas como compostos antioxidantes em aplicações alimentícias e medicinais (RIVAS-SÁNCHEZ et al., 2021).

**Figura 6 - Estrutura da quinizarina.**



**Fonte:** Autoria própria (2022).

Outros derivados das antraquinonas são as hidroantraquinonas, que são resultantes da hidrogenação de um dos anéis aromáticos. Foram relatados vários efeitos biológicos das hidroantraquinonas, tais como atividades antimalárica, antimicrobiana, antiviral, citotóxica, inibitórias da cinase e fitotóxicas (LI et al., 2017; VO et al., 2020; KUANG et al., 2022).

## 2.4 Músculo liso

O músculo liso é bem distribuído em muitas partes do corpo e tem funções variadas e especializadas, baseadas em ciclos coordenados de contração e relaxamento (FRISMANTIENE et al., 2018). Alterações nesses ciclos coordenados são consideradas manifestações de que algo na fisiologia normal está perturbado, causando assim a dor, um estímulo que leva muitas pessoas a buscarem auxílio médico (MAYOKA et al., 2022).

Muitas plantas com atividade antiespasmódica têm sido utilizadas na medicina tradicional para aliviar as diferentes doenças desde a antiguidade. Atualmente, os compostos antiespasmódicos são usados para reduzir a ansiedade, a tensão emocional e musculoesquelética e a irritabilidade. (MARTÍNEZ-PÉREZ et al., 2018). Diversas patologias onde há uma alteração da contratilidade muscular lisa, como, asma, hipertensão arterial, disfunção erétil e complicações durante a gravidez são de grande interesse de pesquisa, por isso a busca de novos compostos com atividade atenuante dessa contração é extremamente importante (DE ALENCAR SILVA et al., 2020).

Neste sentido, vários óleos essenciais, extratos, fases e substâncias isoladas de algumas espécies da família Cordiaceae foram testadas em modelos, *in vivo* e/ou *in vitro*, mostrando-se ativas frente a diversos tipos de músculo liso (ALBAYATY, 2008; SÁNCHEZ-RECILLAS et al., 2019; FERREDE et al., 2021).

Como já foi falado anteriormente, a família Cordiaceae é rica em flavonoides, naftoquinonas e diversos ácidos fenólicos, e as atividades antiespasmódicas desses compostos já foram relatados na literatura (QIU et al., 2017; ALI, ASIF & KHAN, 2021; BLAŽEVIĆ et al., 2021).

O ácido rosmarínico, por exemplo, é um composto polifenólico, isolado de várias plantas da família Cordiaceae, que possui atividade antiespasmódica (TICLI et al., 2005; LI et al., 2010; BLAŽEVIĆ et al., 2021; GUAN et al., 2022). Além disso, o ácido rosmarínico é considerado um marcador quimiotaxonômico da família Boraginaceae, inclusive de muitas espécies que migraram para a família Cordiaceae (GANOS et al., 2020; GRAIKOU et al., 2021; GUAN et al., 2022).

Assim sendo, é interessante a hipótese de que a utilização das espécies do gênero *Varronia* pela população para aliviar cólicas menstruais, dores gastrointestinais ou outras alterações da contratilidade do músculo liso, seria devido à essas classes de metabólitos secundários.

## 2.5 O melanoma humano

Segundo o Instituto Nacional de Câncer – INCA (2022), o câncer é um termo que abrange diferentes tipos de doenças malignas que têm em comum o crescimento desordenado de células. Estas células se dividem rapidamente e geralmente são muito agressivas e incontroláveis, formando assim os tumores, que podem espalhar-se para diversas regiões do corpo. Quando começam em tecidos epiteliais, como pele ou mucosas, são denominados carcinomas. Se o ponto de partida são os tecidos conjuntivos, como osso, músculo ou cartilagem, são chamados sarcomas. No ano de 2018, no mundo todo, ocorreram cerca de 18 milhões de casos novos de câncer (17 milhões sem contar os casos de câncer de pele não melanoma) e 9,6 milhões de óbitos (9,5 milhões excluindo os cânceres de pele não melanoma) (BRAY et al., 2018).

O câncer de pele é a neoplasia de maior incidência no Brasil e vários fatores de risco têm sido atribuídos para o desenvolvimento dessa neoplasia, como por exemplo a cor da pele, horário e tempo de exposição ao sol (PIRES et al., 2018). Essa neoplasia afeta em grande parte a população branca, e de longe, a maior incidência tanto em homens quanto em mulheres está na Austrália e na Nova Zelândia (DE MELO et al., 2018).

Dois tipos de câncer de pele são relatados: os não melanoma, mais frequentes e menos agressivos, e os melanomas, mais agressivos, porém menos comuns (ZINK, 2014). O melanoma é raro em não brancos e, quando presente, está localizado principalmente em regiões não pigmentadas (KYRGIDIS, 2017). Antes de 1950, as taxas de incidência de melanoma eram muito baixas (menos de 5 casos por 100.000 pessoas/ano) na população branca e mostraram um tremendo aumento após a Segunda Guerra Mundial (GARBE et al., 2021).

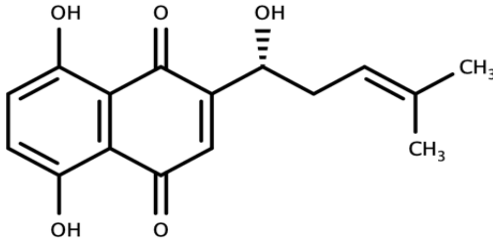
O melanoma é a neoplasia maligna que se forma a partir dos melanócitos, que cresce e se espalha mais rapidamente, apesar de ser menos comum, tem maior importância principalmente por seu potencial metastático (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2022). A distinção histopatológica precisa entre proliferações melanocíticas cutâneas benignas e malignas é crítica para um tratamento e prognóstico corretos (COLEBATCH et al., 2022). O tratamento atual do melanoma inclui a ressecção cirúrgica, radioterapia, quimioterapia, imunoterapia e terapia fotodinâmica. Embora a

quimioterapia com agentes terapêuticos como a dacarbazina e a temozolomida seja um importante tratamento paliativo dos melanomas, a resistência à apoptose é a principal causa da resistência aos medicamentos (MONTASERI, NKUNE & ABRAHAMSE, 2022).

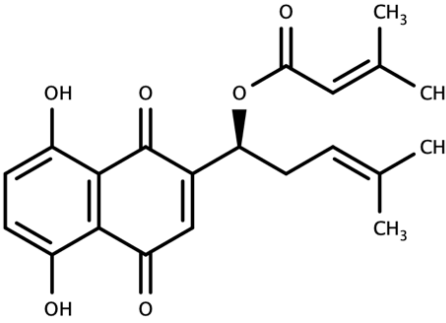
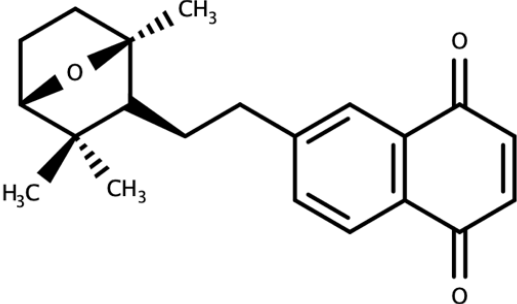
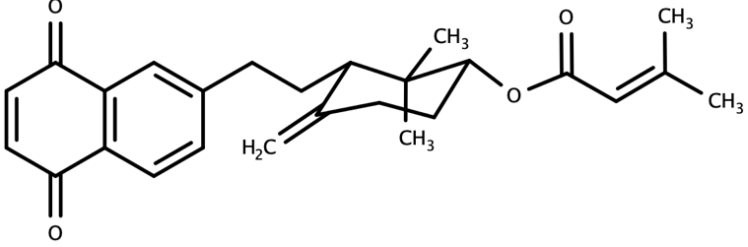
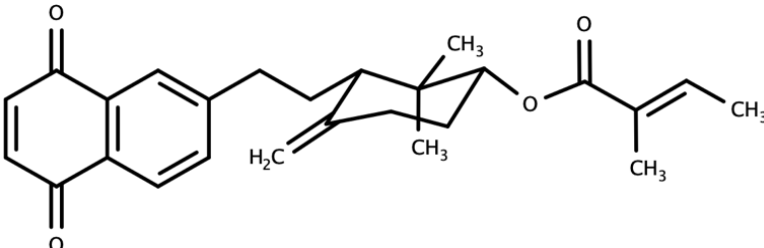
Dependendo do estágio do câncer, a radioterapia e a quimioterapia também podem ser utilizadas. Para o melanoma metastático, para o qual até alguns anos atrás somente eram oferecidos cuidados paliativos, com a chegada da imunoterapia e da terapia-alvo, atualmente disponibilizam-se novas drogas (INCA, 2022). Hoje no Brasil, os pacientes com melanoma metastático atendidos no Sistema Único de Saúde (SUS) têm como opção terapêutica o agente citotóxico dacarbazina, o qual introduz grupos alquil à guanina, provocando dano ao DNA tumoral. Apesar de ser considerado o tratamento padrão até recentemente, nunca foi testado em ensaios clínicos de fase III e seu efeito sobre a sobrevivência dos pacientes é incerto (BRASIL, 2018).

Levando em consideração o potencial invasivo e metastático do melanoma cutâneo, compostos de origem natural podem atuar bloqueando a migração ou adesão de células tumorais, por via da regulação da expressão de um ou mais alvos moleculares específicos, contribuindo assim, para a diminuição do tumor (ALQATHAMA & PRIETO, 2015; FURMAN-TOCZEK et al., 2016). Entre as principais classes de metabólitos secundários que foram avaliados no tratamento do melanoma, destacam-se os flavonoides (BYUN et al., 2019; SASSI et al., 2018), alcaloides (ROSALES et al., 2019), terpenoides (CHINEMBIRI et al., 2014) e naftoquinonas (Quadro 4).

**Quadro 4 - Exemplos de naftoquinonas com atividade antiproliferativa frente à células de melanoma humano.**

<i>Linhagens testadas</i>	<i>Substâncias</i>	<i>Referências</i>
A375 e A2058	 <p style="text-align: center;">Shikonina</p>	CAO et al. (2020a)

Quadro 4 – (Continuação).

A375 e A2058	 <p style="text-align: center;"><i>β, β-dimetilacrilshikonina</i></p>	CAO et al. (2020b)
MDA-MB-435	 <p style="text-align: center;">Cordiaquinona J</p>	MARINHO-FILHO et al. (2010)
MDA-MB-435	 <p style="text-align: center;">Cordiaquinona N</p>  <p style="text-align: center;">Cordiaquinona O</p>	FREITAS et al. (2012)

## 2.6 A quimioinformática

Definida como uma ciência interdisciplinar, a quimioinformática, termo cunhado por Frank Brown em 1998, é a “mistura de recursos de informação para transformar

dados em informação e informação em conhecimento, no intuito de tomar decisões melhores e mais rápidas na área de identificação e otimização de compostos líderes” (ALVES, MURATOV & ANDRADE, 2017).

Estudos envolvendo a quimioinformática conseguem realizar um processamento de volumosos conjuntos de dados experimentais combinados às estruturas moleculares, utilizando métodos estatísticos para a previsão principalmente de atividades biológicas (LIMA, 2015).

As Relações quantitativas de estrutura e atividade (QSARs - *Quantitative Structure-Activity Relationship*) são indiscutivelmente de imensa importância na química e bioquímica atuais (TANDON, CHAKRABORTY & SUHAG, 2019). O QSAR é uma abordagem desenvolvida para correlacionar as moléculas químicas com suas atividades biológicas com base em suas estruturas químicas. Devido ao papel significativo das estratégias de aprendizagem de máquinas na modelagem QSAR, esta área de pesquisa tem atraído atenção de pesquisadores no mundo todo (KEYVANPOUR & SHIRZAD, 2021).

Para se realizar uma avaliação farmacológica completa de uma substância isolada, geralmente quantidades elevadas são necessárias. Isso se torna um desafio desde a coleta de plantas endêmicas e com difícil acesso até o baixo rendimento final desse composto que poderá ser isolado (ATANASOV et al., 2015). Sendo assim, as pesquisas *in silico* surgiram como uma boa alternativa na química medicinal para projetar um determinado experimento e encontrar novos medicamentos, por exemplo, gerando com isso resultados bem-sucedidos com baixo custo em um curto espaço de tempo (ACEVEDO et al., 2017).

Um método *in silico* utilizado para projetar e analisar compostos baseado em sua estrutura é o *Docking Molecular*, que simula a interação molecular desses compostos prevendo o modo de ligação e afinidade entre os seus possíveis receptores (FAN, FU & ZHANG, 2019). A crescente atenção recebida por esse tipo de estudo, bem como a necessidade de melhorar sua confiabilidade, levou ao desenvolvimento de uma grande quantidade de novos algoritmos de docagem e atualmente, as abordagens de *Consensus Docking* demonstram melhorar a qualidade dos resultados do *docking* em comparação com os métodos de *docking* único (POLI & TUCCINARDI, 2020).



# **OBJECTIFS**

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Contribuir para o conhecimento da família Cordiaceae, bem como do gênero *Varronia*, através do estudo das espécies *V. dardani* e *V. leucocephala*.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Extrair, isolar, purificar, identificar e elucidar metabólitos secundários encontrados no extrato etanólico bruto das partes aéreas de *V. dardani* (EEB-VD);
- Determinar o teor de compostos fenólicos no EEB-VD;
- Quantificar o ácido rosmarínico no EEB-VD;
- Devido ao uso popular da espécie, investigar uma possível atividade espasmolítica do EEB-VD em útero de rata, aorta e traqueia de rato, íleo de cobaia;
- Realizar um isolamento bioguiado compostos bioativos das espécies estudadas, frente às células de melanoma humano (linhagem A2058).
- Desenvolver um estudo de quimioinformática para avaliar a atividade do composto isolado, utilizando um banco de dados construído com compostos ativos frente às células de melanoma humano (linhagem A2058).

# **MÉTHODOLOGIE**

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Métodos Cromatográficos

A cromatografia por exclusão em coluna foi realizada utilizando o Sephadex LH-20 (Amersham Biosciences), e como fase móvel o metanol p.a. da Sigma-Aldrich. Para as análises das amostras em Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA) foram utilizadas cromatofolhas de alumínio-sílica gel 60 PF<sub>254</sub> artigo 7749, Merck.

As revelações das cromatoplasmas foram realizadas por exposição à lâmpada de irradiação ultravioleta (UV) sob os comprimentos de onda 254 e 366 nm, por meio de aparelho Mineralight modelo UVGL-58 e também, por exposição à uma câmara saturada com vapores de iodo. As frações foram reunidas de acordo com seus perfis cromatográficos observados por esta técnica.

A etapa de desenvolvimento de método em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foi realizada em um cromatógrafo analítico da marca Shimadzu equipado com coluna de fase reversa C-18 da marca Kromasil, bomba LC-20AT, injetor automático SIL-20A HT, e detector UV-VIS-SPD-M20A com arranjo de diodo, como fase móvel foi utilizado água mili-Q acidificada (0,1% de ácido fórmico) e metanol grau HPLC da Merck. E em um cromatógrafo semi-preparativo da marca Shimadzu equipado com coluna de fase reversa C-18 da marca ACE<sup>®</sup>, módulo de bombeamento de solvente binário LC-6AD, injetor manual e detector UV-VIS-SPD-M10A. Como fase móvel foi utilizada água mili-Q acidificada (0,1% de ácido fórmico) e metanol grau HPLC da Merck. Este também foi empregado no preparo da amostra. A fase móvel consistiu de uma mistura de metanol (MeOH) e água acidificada com 0,1% de ácido fórmico, na proporção inicial de (35:65) MeOH/H<sub>2</sub>O acidificada. A eluição foi realizada em método por gradiente e, foram selecionados dois comprimentos de onda para detecção (254 nm e 280 nm). O software LC Solution<sup>®</sup> (Shimadzu, Japão) foi utilizado para o controle do equipamento, aquisição e análise dos dados.

## 4.2 Métodos Espectroscópicos e Espectrométrico

### 4.2.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e bidimensionais, foram obtidos em espectrômetros das marcas Bruker Ascend, operando a 400 MHz e Varian System, operando a 500 MHz do Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos da UFPB (LMCA-IPeFarM-UFPB). As amostras para análise foram preparadas dissolvendo-se as mesmas em solventes deuterados: clorofórmio ( $\text{CDCl}_3$ ) e metanol ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ), os quais foram utilizados como referência interna.

Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento ( $J$ ) em Hz.

As multiplicidades no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  foram indicadas segundo as convenções: *s* (simpleto), *sl* (simpleto largo), *d* (duplete), *dl* (duplete largo), *dd* (duplo duplete), *t* (triplete) e *m* (multiplete).

Os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  foram obtidos utilizando-se a técnica de APT e BB.

### 4.2.2 Espectrometria de Massas (EM)

Foi utilizado um espectrômetro de massas de alta resolução da marca Bruker, modelo micrOTOF II utilizando a técnica de Ionização por Eletrospray. Os parâmetros de análise do micrOTOF II foram: capilar 4,0 kV, IES no modo negativo, offset da placa final 500 V, nebulizador 35 psi, gás seco ( $\text{N}_2$ ) com fluxo de 8 L/h e temperatura de 300 °C. Os espectros ( $m/z$  50-1000) foram registrados a cada 2 s.

### **4.3 Estudo fitoquímico**

#### **4.3.1 Coleta e identificação do material botânico**

A utilização da espécie em questão, foi cadastrada na base de dados do Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen-Brasil) sob o protocolo A0E7358.

O extrato etanólico bruto e as fases de *Varronia dardani* (raízes e partes aéreas) foram reaproveitados do estudo da dissertação de mestrado do presente autor (VELOSO, 2018).

O material vegetal de *Varronia leucocephala* foi coletado no município de Maturéia, Paraíba, em julho de 2019.

As exsiccatas das espécies encontram-se catalogadas no Herbário Prof. Lauro Pires Xavier (JPB) do Centro de Ciências Exatas e da Natureza- UFPB, sob registro JPB 29509 (*V. dardani*) e JPB 41136 (*V. leucocephala*) sendo identificadas pelo botânico Prof. Dr. José Iranildo Miranda de Melo.

#### **4.3.2 Processamento do material vegetal de *Varronia leucocephala*.**

Todo material vegetal foi desidratado em estufa com ar circulante á temperatura de 40 °C durante 72 horas. Após secagem, foi submetido a um processo de pulverização em moinho mecânico, obtendo-se de material seco 1.230 g das partes aéreas de *V. leucocephala*.

#### **4.3.3 Obtenção do Extrato Etanólico Bruto (EEB) de *Varronia leucocephala*.**

O material vegetal seco e pulverizado foi submetido à maceração com etanol em um recipiente de aço inoxidável durante 72 horas. Este processo foi repetido por três vezes.

A solução extrativa resultante da maceração foi concentrada em rotaevaporador sob pressão reduzida, a uma temperatura média de 40 °C, sendo obtido 198,3 g de extrato, exibindo rendimento de 16,12%.

#### 4.3.4 Isolamento e purificação dos constituintes químicos de *Varronia dardani*.

##### 4.3.4.1 Fracionamento cromatográfico da fase acetato de etila de *Varronia dardani*.

A fase acetato de etila (3,0 g) foi submetida à cromatografia em coluna utilizando como fase estacionária Sephadex LH-20, e metanol (MeOH) como fase móvel. Foram coletadas 29 frações (VD-FA-1-29). Após secagem à temperatura ambiente, as frações foram reunidas por análise de seus fatores de retenção em cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) utilizando diferentes sistemas de eluição, em ordem crescente de polaridade. Como revelador físico foi utilizado a luz ultravioleta em dois comprimentos de onda (254 e 366 nm). Desta reunião foram obtidas 26 frações, sendo as de maior massa submetidas à Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em escala analítica para desenvolvimento de método.

A fração VD-FA-11-12 (59,7 mg) foi escolhida para separação em CLAE semi-preparativo, por apresentar um melhor perfil cromatográfico frente as demais.

Inicialmente, foi preparada uma solução com 1 mg da amostra em metanol grau HPLC, na concentração de 1 mg. mL<sup>-1</sup>. Empregou-se como fase móvel água milli-Q acidificada (0,1% de ácido fórmico) e metanol. A análise no cromatógrafo analítico permitiu desenvolver um método eficiente para o isolamento das substâncias presentes na fração. No método mais eficaz, a concentração de metanol variou de 35 á 100% em 130 minutos com fluxo de 0,6 mL.min<sup>-1</sup> (Tabela 1).

Na transposição para a escala semi-preparativa, preparou-se uma solução com 58 mg da amostra em 600 µL de metanol grau HPLC. Foram realizadas 6 injeções de 100 µL desta solução. Utilizou-se o mesmo método desenvolvido na fase analítica, no entanto foi empregado um fluxo de 3,5 mL.min<sup>-1</sup>. As frações obtidas foram então concentradas sob pressão reduzida á uma temperatura de 40 °C em rotaevaporador.

**Tabela 1 - Método utilizado na cromatografia líquida de alta eficiência da fração VD-FA-11-12 da fase acetato de etila de *Varronia dardani*.**

Tempo	Comando	Valor
0,01	Concentração de MeOH	35
100,00	Concentração de MeOH	70
105,00	Concentração de MeOH	100
125,00	Concentração de MeOH	100
130,00	Concentração de MeOH	35
130,01	Fim da corrida cromatográfica	

**Legenda:** MeOH - Metanol.

#### 4.3.4.2 Determinação de fenólicos totais.

Para a determinação do teor de fenólicos totais no EEB-VD, utilizou-se o método de Folin-Ciocalteu, com adaptações (CABRAL et al., 2009). Para a sua realização foi usado o ácido gálico para construir uma curva de calibração e assim determinar a quantidade de fenóis. O método de Folin consiste em adicionar 0,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu (10%) a 120  $\mu\text{L}$  da amostra na concentração de  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ , após isso, manter a reação em repouso por 8 minutos, sendo adicionado em seguida 400  $\mu\text{L}$  de carbonato de sódio (7,5%) para neutralizar a mistura, em seguida manter as amostras a temperatura ambiente e no escuro por 120 minutos, e transferi-las para placa de 96 poços (200 microlitros/poço) e a absorbância foi medida a 765 nm em espectrofotômetro UV-visível (PowerWave HT, BioTek). As análises foram realizadas em triplicatas (repetidas por três dias).

No teor de fenólicos totais as amostras analisadas devem ser contempladas pelo intervalo de concentração usado para obter a curva de calibração, que foi de 10; 20; 200; 250 e  $300 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ , e a partir dela, interpolar as absorbâncias das amostras para obter a quantidade de fenólicos totais sendo expressos em miligramas de equivalente de ácido gálico por grama de amostra ( $\text{mg EAG} / \text{g de amostra}$ ), sendo as análises realizadas em triplicatas (repetidas por três dias).



#### 4.3.4.3 Quantificação do ácido rosmarínico no extrato etanólico bruto de *Varronia dardani* (EEB-VD)

A quantificação do ácido rosmarínico no EEB-VD foi realizada utilizando o padrão químico: ácido rosmarínico, obtido da Sigma Aldrich, com teor de pureza > 98% e a partir da co-injeção do EEB-VD com padrão de ácido rosmarínico. Os solventes utilizados foram metanol grau HPLC (Tédia®, Brasil), ácido acético glacial e água ultrapura obtida por sistema de purificação Milli-Q (Millipore®). O software LC Solution® (Shimadzu, Japão) foi utilizado para o controle do equipamento, aquisição e análise dos dados.

As análises cromatográficas foram realizadas utilizando um sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) da Shimadzu (Prominence) equipado com módulo de bombeamento de solvente binário LC-20AT, auto injetor SIL-20A, um sistema de degaseificação DGU-20A5, detector SPD-M20A *diode array*. A coluna utilizada foi Kromasil® C18 (250 mm x 4.6 mm d.i. preenchido com partículas 5 µm), com pré-coluna SecurityGuard Gemini® C18 (4 mm x 3.0 mm d.i. preenchido com partículas 5 µm). O software LC Solution® (Shimadzu, Japão) foi utilizado para o controle do equipamento, aquisição e análise dos dados.

Para análise cromatográfica do EEB-VD, e do padrão foi utilizada a metodologia desenvolvida. Na qual a fase móvel utilizada foi metanol (MeOH) com água (H<sub>2</sub>O) ultrapura a 0,1% de ácido acético glacial numa proporção inicial de (38:48 v/v) MeOH/H<sub>2</sub>O (acid.). A corrida teve um tempo total de 60 minutos. A eluição foi realizada em modo gradiente, de 42 a 42% em 5 min, 42 a 45% em 9 min, 45 a 50% em 12 min, 50 a 45% em 15 min, 45 a 40% em 17 min, 40 a 38% em 20 min, 38 a 38% em 23 min, e permanecendo isocrático até 60 min. O volume de injeção foi de 20 µL, com a vazão da fase móvel constante de 0,6 mL.min<sup>-1</sup> e a detecção foi feita utilizando um detector de arranjo fotodiodo (DAD) em comprimento de onda de 330 nm.

O EEB foi diluído numa solução constituída por água-MeOH (1:1 v/v) até uma concentração final de 2 mg.mL<sup>-1</sup>. Os padrões foram diluídos na mesma solução acima descrita até que chegassem a uma concentração final de 1 mg.mL<sup>-1</sup>.

#### 4.4 Ensaios *in vitro*.

##### 4.4.1 Avaliação da atividade espasmolítica.

###### 4.4.1.1 Material

###### 4.4.1.1.1 Animais

Foram utilizadas cobaias (*Cavia porcellus*) de ambos os sexos, pesando  $436,4 \pm 6,9$  g, ratas virgens e ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) pesando  $203,0 \pm 4,0$  e  $365,7 \pm 9,4$  g, respectivamente, todos provenientes da Unidade de Produção Animal (UPA) do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPEFarM) da UFPB.

Antes dos experimentos os animais eram mantidos sob rigoroso controle alimentar com uma dieta balanceada a base de ração tipo *pellets* (Presence®) com livre acesso a água, com ventilação e temperatura ( $21 \pm 1$  °C) controladas e constantes, submetidos diariamente a um ciclo claro-escuro de 12 h, sendo o período claro das 06h00 às 18h00. Os experimentos eram realizados no período de 08h00 às 20h00. Todos os procedimentos experimentais eram realizados seguindo os princípios de cuidados com animais submetidos e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA (certidão 126/2017) da UFPB (Anexo 1).

###### 4.4.1.1.2 Substâncias e reagentes

O cloreto de cálcio di-hidratado ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), o sulfato de magnésio heptahidratado ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), o bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ), o cloreto de potássio (KCl), o fosfato de potássio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), o fosfato de sódio monobásico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ), o cloreto de magnésio di-hidratado ( $\text{MgCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), a glicose, o cloreto de sódio (NaCl), o ácido clorídrico (HCl) e o hidróxido de sódio (NaOH) foram obtidos da Êxodo Científica (Brasil).

O dietilestilbestrol, o diidrocloridrato de histamina, o cloridrato de carbamilcolina (CCh), o cloridrato de acetilcolina (ACh), o ácido araquidônico (AA), o cloridrato de L(-)-fenilefrina (FEN) e o Cremophor® foram obtidos da Sigma-Aldrich (Brasil). A ocitocina foi obtida da União Química (Brasil).

Estas substâncias, exceto o Cremophor®, foram mantidas em um “freezer” à temperatura de  $-20$  °C. Todas eram solubilizadas e diluídas em água destilada, exceto o

AA e o dietilestilbestrol, que foram dissolvidos em álcool etílico absoluto para obtenção da solução-estoque.

A mistura carbogênica (95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>) foi obtida da White Martins (Brasil).

#### 4.4.1.1.3 Soluções nutritivas

De acordo com os experimentos realizados eram utilizadas várias soluções nutritivas (ajustadas ao pH 7,4, com uma solução de HCl ou NaOH, 1 N), todas gaseificadas com carbogênio (95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>) e mantidas a 37 °C para traqueia de rato, aorta de rato e íleo de cobaia, e a 32 °C para útero de rata, cujas composições estão descritas abaixo:

**Composição da solução de Krebs (mM):** NaCl (118,0), KCl (4,5), MgSO<sub>4</sub> (5,7), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,1), CaCl<sub>2</sub> (2,5), glicose (11,0) e NaHCO<sub>3</sub> (25,0).

**Composição da solução de Krebs modificado por Sun e Benishin (1994) (mM):** NaCl (117,0), KCl (4,7), MgSO<sub>4</sub> (1,3), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,2), CaCl<sub>2</sub> (2,5), glicose (11,0) e NaHCO<sub>3</sub> (25,0).

**Composição da solução de Locke Ringer por Revuelta, Catabrana e Hidalgo (1997) (mM):** NaCl (154,0), KCl (5,6), MgCl<sub>2</sub> (2,1), CaCl<sub>2</sub> (2,2), glicose (5,6), NaHCO<sub>3</sub> (6,0).

Outras soluções poderão ser utilizadas a depender dos resultados obtidos.

#### 4.4.1.1.4 Aparelhos

Para o registro das contrações isotônicas, os órgãos eram suspensos em cubas de banho para órgãos isolados (5 mL) e conectados a uma alavanca isotônica de inscrição frontal acoplados a cilindros esfumaçados de um quimógrafo (DTF, Brasil). A temperatura das cubas era controlada com bombas termostáticas (BANHO-MARIA AVS-BM, Brasil, ou POLYSTAT 12002, Cole-Palmer, EUA).

Para registrar as contrações isométricas, os órgãos eram suspensos em cubas de banho para órgãos isolados (6 mL) modelo BOI-04 e conectados a transdutores de força isométricos modelo TIM 05 acoplados a um amplificador modelo AECAD04F. Este,

por sua vez, estava conectado a um sistema de aquisição digital com o software AQCAD versão 2.1.6 para aquisição dos dados e ANCAD para análise. O sistema contém uma bomba termostática modelo BT-60 que controla a temperatura das cubas. Todos os aparelhos foram adquiridos da AVS Projetos (São Paulo, SP, Brasil).

Todas as substâncias eram pesadas em balança analítica modelo AG200 e os animais em balança semianalítica modelo BG4001, ambas da Gehaka (Brasil).

Os valores de pH eram verificados através de um pHmetro digital PG 2000 (GEHAKA, Brasil).

#### **4.4.1.2 Métodos**

##### **4.4.1.2.1 Preparação da solução-mãe do EEB-VD para os ensaios farmacológicos**

O extrato foi solubilizado em Cremophor<sup>®</sup> e diluído em água destilada para obtenção da solução-estoque (10 mg/mL, 3% Cremophor<sup>®</sup> v/v) que era estocada a uma temperatura de 0 °C. A concentração final do Cremophor<sup>®</sup> na cuba nunca excedeu 0,01%, nesta concentração o Cremophor<sup>®</sup> é desprovido de efeito contrátil ou relaxante significativo no órgão estudado, de acordo com dados obtidos em experimentos anteriores.

As concentrações do EEB-VD eram utilizadas em múltiplos de 3, sendo a concentração submáxima 243 e a máxima 729 µg/mL. E era realizada uma curva concentração-resposta completa testando concentrações menores para verificar o zero e o efeito máximo ( $E_{max}$ ) do extrato, quando o efeito da concentração submáxima e máxima era superior a 50 e 70%, respectivamente.

##### **4.4.1.2.2 Efeito do EEB-VD sobre as contrações tônicas induzidas por FEN em aorta isolada de rato**

Os ratos eram eutanasiados por anestesia com cetamina 100 mg/kg (i.p.) e xilazina 10 mg/kg (i.p.), seguido por método complementar de decapitação com o auxílio de uma guilhotina. Um segmento da aorta torácica era retirado e limpo de todo o tecido conjuntivo e adiposo, em seguida, era seccionado em anéis de 3-5 mm. Para obtenção das respostas isométricas, os anéis eram suspensos individualmente por uma alça de aço inoxidável, em cubas de banho (6 mL) contendo solução de Krebs a 37 °C.

As preparações eram estabilizadas por um período de 60 minutos, durante o qual eram mantidas sob uma tensão de repouso de 1 grama e gaseificados com carbogênio. Durante esse período, a solução nutritiva era renovada a cada 15 minutos para prevenir a interferência de metabólitos (ALTURA; ALTURA, 1970).

Após o período de estabilização era induzida uma contração com  $3 \times 10^{-7}$  M de FEN e durante o componente tônico era adicionado  $10^{-6}$  M de ACh para verificar a integridade do endotélio (FURCHGOTT; ZAWDZKI, 1980). O endotélio vascular era considerado íntegro quando os anéis aórticos apresentassem relaxamento igual ou superior a 50%. Em relaxamento igual ou inferior a 10%, os anéis eram considerados sem endotélio funcional (AJAYA; GILANI; MUSTAFAA, 2003). Após a lavagem, esperou-se 30 minutos e durante o componente tônico de uma segunda resposta ao agonista, o EEB-VD era adicionado em preparações diferentes de maneira cumulativa à cuba.

O relaxamento foi expresso como a percentagem reversa da contração induzida por FEN. Os valores de  $CE_{50}$  foram obtidos por regressão não linear a partir das curvas concentrações-resposta obtidas para o EEB-VD em anéis com e sem endotélio funcional.

Após o relaxamento máximo produzido pelo EEB-VD, o tempo de reversão era observado.

#### **4.4.1.2.3 Efeito do EEB-VD sobre as contrações tônicas induzidas por CCh em traqueia isolada de rato**

Os ratos, após serem eutanasiados por anestesia com cetamina 100 mg/kg (i.p.) e xilazina 10 mg/kg (i.p.), seguido por método de exsanguinação, tinham a traqueia retirada e limpa, de modo a separá-la de todo o tecido conectivo e adiposo. O órgão era dividido em segmentos, contendo de 3 a 4 anéis de cartilagem. Os segmentos eram suspensos individualmente através de hastes de aço inoxidável em cubas de banho (6 mL), contendo solução nutritiva de Krebs sob tensão de 1 grama. Estes segmentos eram mantidos a uma temperatura de 37 °C e permaneceram em repouso durante 60 minutos, sendo a solução trocada a cada 15 minutos.

Após o período de estabilização era induzida uma contração com  $10^{-5}$  M de CCh, e durante o componente tônico era adicionado  $3 \times 10^{-4}$  M de AA para verificar a integridade do epitélio. O epitélio era considerado íntegro quando os anéis de traqueia

apresentaram relaxamento igual ou superior a 50%. Em relaxamento igual ou inferior a 10%, os anéis eram considerados sem epitélio funcional. Após a lavagem, esperou-se 30 minutos e durante o componente tônico de uma segunda resposta ao agonista, o EEB-VD era adicionado em preparações diferentes de maneira cumulativa à cuba (TSCHIRHART et al., 1987).

O relaxamento foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial induzida por CCh. Os valores de  $CE_{50}$  (concentração de uma substância que produz 50% do seu efeito máximo) foram calculados por regressão não linear a partir das curvas concentrações-resposta obtidas para o EEB-VD em anéis com e sem epitélio funcional.

Após o relaxamento máximo produzido pelo EEB-VD, o tempo de reversão era observado.

#### **4.4.1.2.4 Investigação do efeito espasmolítico do EEB-VD em íleo isolado de cobaia**

##### **4.4.1.2.4.1 Efeito do EEB-VD frente às contrações fásicas induzidas por histamina ou por CCh**

As cobaias eram mantidas em jejum por um período de 18 horas, tendo acesso à água *ad libitum* antes do início dos experimentos. Após este período, as cobaias eram eutanasiadas por anestesia com cetamina 100 mg/kg (i.p.) e xilazina 10 mg/kg (i.p.), seguido por método de exsanguinação. O abdômen era aberto e um segmento do íleo de aproximadamente 15 cm de comprimento era retirado e colocado em uma placa de Petri contendo solução nutritiva de Krebs modificado a 37 °C gaseificados com carbogênio.

Após cuidadosa dissecação, o segmento do íleo era seccionado em fragmentos de 2 a 3 cm de comprimento, suspensos individualmente em cubas de vidro e deixados em repouso por 30 minutos, tempo necessário para estabilização da preparação, durante este período a solução nutritiva era trocada a cada 15 minutos. Após o período de estabilização, era induzida uma contração com 40 mM de KCl para verificar a funcionalidade do órgão. A preparação era lavada e após 15 minutos duas contrações fásicas de magnitudes similares, com intervalo de 15 minutos entre ambas, eram obtidas com  $10^{-6}$  M de histamina ou de CCh, concentração submáxima que produz cerca de 80% da resposta máxima, e registradas através de uma alavanca isotônica de inscrição frontal acoplada ao cilindro esfumaçado de um quimógrafo. O EEB-VD era incubado

em diferentes concentrações por 15 minutos em preparações diferentes, e na presença deste, era induzida uma terceira contração utilizando um dos agonistas acima citados.

A inibição da resposta contrátil induzida pelos agonistas foi avaliada por comparação das respostas antes (controle) e após a adição do EEB-VD à cuba, sendo sua eficácia expressa como  $E_{max}$ . Os valores de  $CI_{50}$  (concentração da substância que inibe 50% do efeito máximo de um agonista) foram expressos como a média e o e.p.m. (erro padrão da média) dos valores individuais da  $CI_{50}$  obtidos em cada um dos experimentos e calculados por regressão não linear.

O tempo de reversão do efeito espasmolítico do EEB-VD era observado após a retirada do mesmo na concentração máxima utilizada.

#### **4.4.1.2.4.2 Efeito do EEB-VD sobre as contrações tônicas induzidas por KCl, por histamina ou por CCh**

O íleo era montado como descrito no item anterior. Após o período de estabilização, uma contração submáxima, registrada através de transdutores isométricos acoplados a um sistema de aquisição digital, era obtida com 40 mM de KCl ou por  $10^{-6}$  M de histamina ou de CCh, e sobre o componente tônico desta contração o EEB-VD era adicionado de maneira cumulativa à cuba em preparações diferentes.

O relaxamento produzido pelo EEB-VD foi expresso como a percentagem reversa da contração produzida pelos agentes contráteis. A potência e a eficácia relaxante do EEB-VD foram calculadas por regressão não linear e avaliadas comparando-se os valores da  $CE_{50}$  e do  $E_{max}$ , respectivamente.

Após o relaxamento máximo produzido pelo EEB-VD, o tempo de reversão era observado.

#### **4.4.1.2.5 Investigação do efeito espasmolítico do EEB-VD em útero isolado de rata**

##### **4.4.1.2.5.1 Efeito do EEB-VD frente às contrações fásicas induzidas por ocitocina ou por CCh**

As ratas eram tratadas 24 horas antes com dietilestilbestrol (0,1 mg/kg) por via subcutânea para sincronização hormonal do estro. Decorrido este tempo, as ratas eram

eutanasiadas por anestesia com cetamina 100 mg/kg (i.p.) e xilazina 10 mg/kg (i.p.), seguido por método complementar de decapitação com o auxílio de uma guilhotina. Após aberta a cavidade abdominal, era feita a dissecação do útero colocando-o em uma placa de Petri contendo solução nutritiva de Locke Ringer a 32 °C e gaseificados com carbogênio. Em seguida, os dois cornos uterinos eram separados por meio de uma incisão, abertos longitudinalmente, e cada um era suspenso verticalmente em cubas de banho para órgãos isolados (5 mL).

Estes tecidos eram mantidos sob tensão de 1 g e permaneciam em repouso por 40 minutos, tempo necessário para perfeita estabilização da preparação. Durante este período a solução nutritiva era trocada a cada 10 minutos (Adaptado de REVUELTA; CANTABRANA; HIDALGO, 1997). Após o período de estabilização, era induzida uma contração com 60 mM de KCl para verificar a funcionalidade do órgão.

Após um período de 15 minutos duas contrações fásicas de magnitudes similares, com intervalo de 15 minutos entre ambas, eram obtidas com  $10^{-2}$  UI/mL de ocitocina ou com  $10^{-5}$  M de CCh. O EEB-VD era incubado em diferentes concentrações por 15 minutos em preparações diferentes e independentes, e a inibição da resposta submáxima aos agonistas era avaliada por comparação das respostas antes (controle) e após a adição do extrato à cuba (REVUELTA; CANTABRANA; HIDALGO, 2000). Este efeito foi avaliado por comparação das respostas antes e após a adição do EEB-VD à cuba, sendo sua eficácia expressa como  $E_{max}$ . Os valores de  $CI_{50}$  foram calculados por regressão não linear.

O tempo de reversão do efeito tocolítico do EEB-VD era observado após a retirada do mesmo na concentração máxima utilizada.

#### **4.4.1.2.5.2 Efeito tocolítico do EEB-VD sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina ou por KCl**

O útero foi montado como descrito no item anterior. Após o período de estabilização, uma contração submáxima, registrada através de transdutores isométricos acoplados a um sistema de aquisição digital, era obtida com 60 mM de KCl para verificação da funcionalidade do órgão. Durante a fase tônica sustentada de uma segunda contração induzida por  $10^{-2}$  UI/mL de ocitocina ou por 60 mM de KCl, o EEB-VD era adicionado de maneira cumulativa à cuba em preparações diferentes.

O relaxamento produzido pelo extrato era expresso como a percentagem reversa da contração inicial induzida pelos agentes contráteis. A potência e a eficácia relaxante



do EEB-VD foram calculadas por regressão não linear e avaliadas comparando-se os valores da  $CE_{50}$  e do  $E_{max}$ , respectivamente.

Após o relaxamento máximo produzido pelo EEB-VD, o tempo de reversão era observado.

#### 4.4.1.3 Análise estatística

Todos os resultados obtidos foram expressos como média e erro padrão da média (e.p.m.) e analisados estatisticamente empregando-se o teste “t” (não pareado) ou análise de variância “one-way” (ANOVA) seguido do pós-teste de Tukey. A hipótese nula foi rejeitada quando  $p < 0,05$ . Os valores de  $CE_{50}$  e  $CI_{50}$  foram calculados por regressão não linear para todos os experimentos realizados (NEUBIG et al., 2003). Todos os resultados funcionais foram analisados pelo programa GraphPad Prism<sup>®</sup> versão 5.01 (GraphPad Software Inc., San Diego CA, E.U.A.).

#### 4.5 Fracionamento por Cromatografia Flash dos extratos etanólicos das espécies de *Varronia*

Os extratos etanólicos obtidos das partes aéreas de *Varronia leucocephala* e das raízes e partes aéreas de *V. dardani* foram submetidos à uma cromatografia flash de fase reversa para obter quatro frações: Fração isopropanol (F-I); Fração isopropanol/metanol (F-IM); Fração metanol (F-M) e Fração aquosa (F-A).

Os extratos secos foram solubilizados em metanol e adicionados a 3 g de Celite<sup>®</sup> 545 (Sigma Aldrich, França). Após a homogeneização manual e evaporação completa do solvente, a mistura foi colocada em uma pré-coluna, a qual foi conectada na parte superior de uma coluna PF-C18 (12 g, 15  $\mu$ m). A purificação foi realizada utilizando um sistema Interchim Puriflash<sup>®</sup> PF430, equipado com um coletor automático (10 mL por tubo) com uma fase móvel composta de um gradiente de solventes: A (isopropanol), B (metanol) e C (água). A eluição foi monitorada a 350 nm, utilizando uma vazão fixa (5 mL.min<sup>-1</sup>) e utilizando a programação descrita na Tabela 2.

**Tabela 2 - Programação utilizada para o fracionamento por Cromatografia *Flash* dos extratos etanólicos.**

<i>Tempo (minutos)</i>	<b>Tipo de eluição</b>	<b>Concentração</b>
0 – 30	Isocrática	100% de A
30 – 35	Gradiente	100% de A – 50% de A e 50% de B
35 – 65	Isocrática	50% de A e 50% de B
65 – 70	Gradiente	50% de A e 50% de B – 100% de B
70 – 100	Isocrática	100% de B
100 – 105	Gradiente	100% de B – 50% de B e 50% de C
105 – 135	Isocrática	100% de C

Uma alíquota de 560 mg da fração isopropanol das raízes de *Varronia dardani* (VD-R-I), considerada a mais ativa no teste de MTT, foi submetida a um fracionamento através da metodologia descrita anteriormente, utilizando a programação descrita na Tabela 3 e fase móvel composta de um gradiente de solventes: A (ciclohexano) e B (acetato de etila).

**Tabela 3 - Programação utilizada para o fracionamento por Cromatografia *Flash* da fração VD-R-I.**

<i>Tempo (minutos)</i>	<b>Tipo de eluição</b>	<b>Concentração</b>
0 – 10	Isocrática	5% de B
10 – 15	Gradiente	5% até 10% de B
15 – 25	Isocrática	10% de B
25 – 30	Gradiente	10% até 35% de B
30 – 40	Isocrática	35% de B
40 – 45	Gradiente	35% até 65% de B
45 – 55	Isocrática	65% de B
55 – 60	Gradiente	65% até 90% de B

**Tabela 3** – (Continuação)

<b>60 – 70</b>	<b>Isocrática</b>	<b>90% de B</b>
70 – 75	Gradiente	90% até 100% de B
75 – 80	Isocrática	100% de B

Foram coletados setenta e nove tubos, cada um contendo 10 mL. As frações foram submetidas à secagem utilizando evaporador rotativo à 45 °C e logo em seguida foram reunidas em 11 subfrações (VD-R-I-Fr.01 – VD-R-I-Fr.11) de acordo com os perfis cromatográficos analisados por CCDA, utilizando-se placas de sílica gel com suporte de alumínio (Merck® com indicador F-254, espessura de 200 µm e 20x20 cm de dimensão) adquiridas comercialmente. Após a eluição, as placas foram reveladas por exposição à luz UV nos comprimentos de onda 254 e 366 nm, no aparelho BOIT-LUB01 da marca Boitton.

A fração VD-R-I-Fr.02 teve melhor perfil cromatográfico e foi escolhida para ser submetida à uma CCDP utilizando placas preparativas de sílica gel 60 com indicador F-254 (Merck®) e uma mistura binária de ciclohexano:acetato de etila (9:1). Após a eluição, as placas foram reveladas por exposição à luz UV nos comprimentos de onda 254 e 366 nm. Foram coletadas quatro manchas (VD-R-I-Fr.02-M1 – VD-R-I-Fr.02-M4), as quais foram analisadas por RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C.

#### **4.6 Atividade antiproliferativa de extratos e frações de *Varronia* em células de melanoma humano**

A atividade antiproliferativa foi estudada utilizando a linhagem celular A2058 (ATCC® CRL-11147). As células A2058 são células de melanoma aderentes ao epitélio humano e altamente invasivas, derivadas de células linfonodais metastáticas obtidas de um paciente do sexo masculino de 43 anos. São tumorigênicas com 100% de frequência em camundongos *nude*, contêm a mutação oncogênica BRAF<sup>V600E</sup> e, portanto, são consideradas resistentes à quimioterapia convencional

Todos os experimentos de cultura de células foram realizados a 37°C. As células cresceram até se tornarem confluentes em flasks de 75 cm<sup>2</sup>, em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de solução antibiótica (penicilina-estreptomicina) (Dominique Dutscher, França), em uma atmosfera umidificada com 5% de CO<sub>2</sub>. Os extratos foram solubilizados em DMSO a 10<sup>-3</sup> M e diluídos no meio de cultura celular para se obter soluções com 200 µg.mL<sup>-1</sup>.

As células confluentes foram tripsinizadas e centrifugadas 1.500 g por 5 minutos. O sobrenadante contendo tripsina foi descartado e o sedimento celular foi ressuspensão em meio de cultura celular para se obter uma suspensão a 4.10<sup>4</sup> células.mL<sup>-1</sup>. No T<sub>0</sub>, 50 µL das soluções dos extratos foram depositadas em uma microplaca de fundo chato de 96 poços, para obter uma concentração final de 100 µg.mL<sup>-1</sup> e 50 µL da suspensão celular foram adicionados. As 2000 células adicionadas foram então cultivadas por 72h no meio de cultura celular contendo os extratos.

As concentrações finais de DMSO nos meios de cultura celular foram iguais ou inferiores a 1% e verificadas como não citotóxicas nas células A2058. Depois de 72h, 20µL de uma solução de MTT a 5 g.L<sup>-1</sup> foram adicionados a cada poço da microplaca, permitindo que células viáveis, contendo succinato mitocondrial desidrogenase funcional, metabolizassem o MTT formando o sal de formazan (azul) durante 4h. O meio de cultura celular foi então removido utilizando uma micropipeta multicanal (Eppendorf<sup>®</sup>, França) e os cristais de formazan foram dissolvidos em 200 µL de DMSO. As microplacas foram incubadas a 37°C durante 5 minutos para solubilizar os cristais de formazan e, após esse período, a absorbância foi lida a 550 nm usando um leitor de microplacas FLUOstar Omega (BMG Labtech<sup>®</sup>, França). Fotomicrografias após os tratamentos foram obtidas em um microscópio invertido Nikon Eclipse TS100 (ampliação x100) equipado com uma câmera digital.

A porcentagem de inibição do crescimento (IC) foi calculada como  $IC (\%) = 100 - ((A_{550 \text{ nm}} \text{ amostra} - A_{550 \text{ nm}} \text{ branco}) / (A_{550 \text{ nm}} \text{ controle} - A_{550 \text{ nm}} \text{ branco})) \times 100$ , onde  $A_{550 \text{ nm}} \text{ amostra}$ : média da absorbância de 8 poços contendo células e a amostra;  $A_{550 \text{ nm}} \text{ branco}$ : média da absorbância de 8 poços contendo meio de cultura de células de controle com 1% de DMSO e sem células;  $A_{550 \text{ nm}} \text{ controle}$ : média da absorbância de 8 poços contendo células cultivadas em meio de cultura de células de controle com 1% de DMSO. Os dados são expressos como  $IC (\%) \pm DP (\%)$  de ensaios em triplicata.

## 4.7 Quimioinformática

Os estudos de quimioinformática foram realizados em parceria com o Prof. Dr. Marcus Tullius Scotti, coordenador do Laboratório de Quimioinformática do PPgPNSB/CCS/UFPB.

### 4.7.1 Modelo de Predição

Para a construção do modelo de classificação, faz-se necessária a presença de uma série de predição. As moléculas em estudo, tratam-se dos 08 isômeros do composto VD-R-1, a vardanona. A Tabela 4 mostra as estruturas dos compostos em estudo.

**Tabela 4 - Estruturas 2D dos isômeros de VD-R-1.**

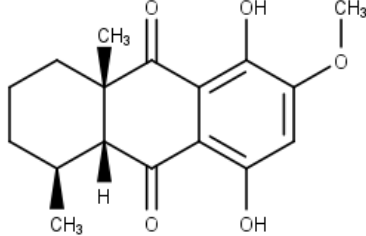
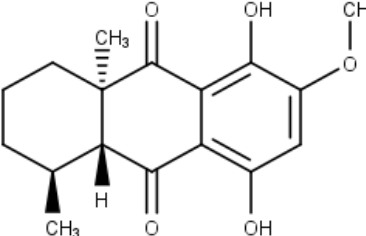
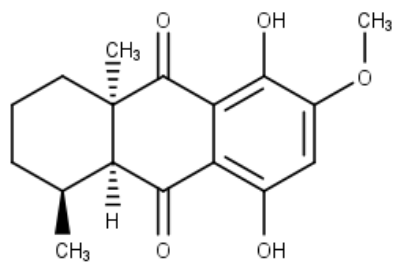
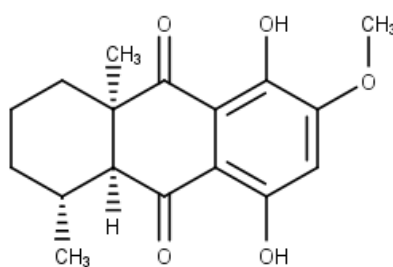
ID	Composto	Configuração
VD01		1 <i>S</i> ,4 <i>aR</i> ,9 <i>aR</i>
VD02		1 <i>S</i> ,4 <i>aR</i> ,9 <i>S</i>

Tabela 4 – (Continuação).

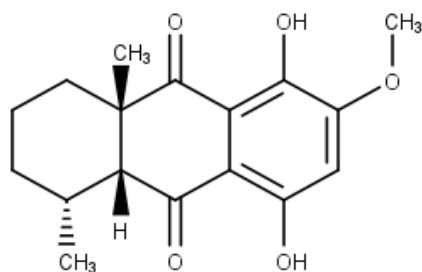
VD03

1*R*,4*aR*,9*aS*

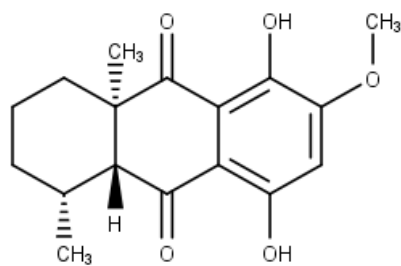
VD04

1*R*,4*aS*,9*aS*

VD05

1*S*,4*aS*,9*aR*

VD06

1*R*,4*aS*,9*aR*

**Tabela 4** – (Continuação).

VD07		1 <i>S</i> ,4 <i>aS</i> ,9 <i>aS</i>
VD08		1 <i>R</i> ,4 <i>aR</i> ,9 <i>aR</i>

#### 4.7.2 Banco de Dados do Modelo e curagem de dados

Foi elaborado um modelo de predição, sendo este referente à linhagem de células A2058 que representam um modelo celular de melanoma. O conjunto de dados para elaboração do modelo de classificação foi obtido a partir da base de dados eletrônica ChEMBL Data Base (<https://www.ebi.ac.uk/chembl/>). Estes dados tratam-se de compostos químicos testados *in vitro*, e com atividade inibitória da linhagem celular em estudo em estudo. Os compostos foram classificados de acordo com o valor da  $pIC_{50}$  ( $-\log IC_{50}$  (mol/L), a qual representa a concentração necessária para a inibição de 50% da linhagem celular em estudo.

O conjunto de dados referente a linhagem celular A2058 (ChEMBL ID: 613503) era constituído por 233 compostos em seu total. A fim de melhorar a classificação do modelo elaborado, foi colocada uma borda, em que o valor de  $pIC_{50}$  dos compostos retirados compreendeu a faixa de 5.52 a 4.75, totalizando 67 compostos retirados e 166 compostos restantes. Dessa forma, os compostos classificados como ativos, consistiram em um total de 85 compostos e apresentaram  $pIC_{50} \geq 5,52$ , já os compostos inativos possuíam valores de  $pIC_{50} \leq 4,75$  e totalizaram 81 compostos.

A curagem de dados do banco em estudo iniciou com a remoção das duplicatas no Programa Microsoft Excel (<https://office.live.com/>). A etapa de remoção de duplicatas faz-se importante, pois possibilita avaliar a qualidade dos dados experimentais e remover as estruturas químicas com registro duplicado dos experimentos, representando assim um dado experimental conflitante que afeta a qualidade do modelo (FOURCHES, MURATOV & TROPSHA, 2010). Após a remoção das duplicatas ocorreu a padronização dos valores do  $pIC_{50}$  e a posterior divisão das moléculas do banco em ativas e inativas.

Os SMILES correspondem a representação canônica da estrutura química do composto, estes foram utilizados como dados de entrada para as etapas posteriores, as quais consistiram em: (1) conversão das estruturas em 3D e padronização, realizada no software Standardizer program [JChem 17.18.0.1784, 2017, ChemAxon (<https://chemaxon.com/>)]. O protocolo de padronização incluiu a adição de átomos de Hidrogênio, Aromatização das estruturas e Remoção de sais; e (2) Obtenção dos descritores moleculares.

Com relação a padronização das moléculas da série de teste, estas foram desenhadas no Os compostos estudados no presente estudo, foram desenhados no programa Marvin Sketch 22.13 software, ChemAxon (<https://chemaxon.com/>). Após a obtenção do desenho, os compostos em estudo foram padronizados e convertidos em 3D pelo software Standardizer program [JChem 17.18.0.1784, 2017, ChemAxon (<https://chemaxon.com/>)].

#### **4.7.2.1 Descritores moleculares**

Os descritores correspondem a uma informação quantitativa sobre a identidade química da molécula. O cálculo de descritores foi utilizado para prever as propriedades biológicas e físico-químicas das moléculas em estudo. A determinação dos descritores é possibilitada quando as moléculas são convertidas em uma representação molecular que permite o tratamento matemático.

Neste trabalho foram utilizados os descritores pertencentes ao software Dragon 7.0, o qual apresenta a capacidade de calcular 5.270 descritores moleculares, os quais



estão distribuídos em 30 blocos lógicos e abrangem abordagens teóricas diversas (Kode Chemoinformatics ([https://chm.kode-solutions.net/products\\_dragon.php](https://chm.kode-solutions.net/products_dragon.php))).

#### 4.7.2.2 Modelo de predição e validação estatística

A elaboração do modelo de classificação, como também as análises estatísticas e avaliação da sua performance foram realizadas no KNIME 3.4.0 software (KNIME 3.4.0 The Konstanz Information Miner Copyright, 2003-2018) (<https://www.knime.com/>).

O banco de moléculas importado no *software* foi particionado pela ferramenta “*Partitioning*” com a opção de “Amostra estratificada”, ocorrendo, dessa forma a separação em Treino e Teste, o que representa percentuais de 80% e 20% de todos os compostos em estudo, respectivamente, ocorrendo assim, a seleção aleatória, porém preservando sempre a mesma proporção de substâncias ativas e inativas, em ambos conjuntos de dados sob estudo.

O Random Forest (RF) foi utilizado como algoritmo de cálculo, o qual caracteriza-se como um algoritmo supervisionado que se baseia na combinação de árvores de predição, de uma forma em que cada árvore depende dos valores de um vetor aleatório amostrado de forma independente e mantém-se a mesma distribuição de árvores na floresta (BREIMAN, 2001; ACEVEDO, 2017). A configuração utilizada durante as análises correspondeu a 200 árvores e a uma semente (seed) para a geração de números aleatórios (200-1).

Um outro artifício utilizado na avaliação foi o “*Domínio de Aplicabilidade*”, responsável por analisar os compostos dos conjuntos de testes, avaliando a confiabilidade das predições realizadas, como também compreende um espaço químico teórico que abrange os descritores do modelo e a resposta modelada que permite estimar a incerteza na previsão de um composto no conjunto de treinamento empregado no desenvolvimento do modelo (ROY, KAR & AMBURE, 2015). Este parâmetro é calculado de acordo com a fórmula:

$$DA = d + Z\sigma$$

Em que  $d$  e  $\sigma$  equivalem as distâncias euclidianas e o desvio padrão médio, respectivamente, dos compostos no conjunto de treinamento, e  $Z$  representa um valor de corte empírico.

Neste trabalho, o valor de  $Z$  utilizado foi 0,5 (ROY, KAR & AMBURE, 2015).

A avaliação da performance do modelo, sendo as performances dos testes internos e externos do modelo elaborado foram avaliadas quanto a quatro parâmetros, correspondendo a respectivamente: 1) Sensibilidade que equivale a taxa de verdadeiros positivos, ou seja, a taxa de compostos realmente ativos; 2) Especificidade a qual corresponde a taxa de verdadeiros negativos, ou seja, os compostos realmente inativos; 3) Precisão que denota a taxa de previsibilidade geral do modelo.

O desempenho do modelo foi avaliado pela curva *Receiver Operating Characteristic (ROC)*, este parâmetro avalia a sensibilidade e especificidade e para a avaliação do desempenho global foi utilizado o Coeficiente de Correlação de Matthews (do inglês, *Matthews Correlation Coefficient - MCC*), visto que, este parâmetro correlaciona as classificações binárias observadas e previstas, resultando em um valor situado entre -1 e +1, em que +1 indica uma predição perfeita; -1 corresponde a um total desacordo entre o valor predito e o observado; já o 0 demonstra uma previsão aleatória (MATTHEWS, 1975). Este parâmetro é representado pela seguinte fórmula:

$$MCC = \frac{VP \times VN - FP \times FN}{\sqrt{(VP + FP)(VP + FN)(VN + FP)(VN + FN)}}$$

Em que:

TP: Verdadeiro positivo (Variável positiva, classificada como positiva);

TN: Verdadeiro Negativo (Variável negativa, classificada como negativa);

FP: Falso Positivo (Variável negativa, classificada como positiva);

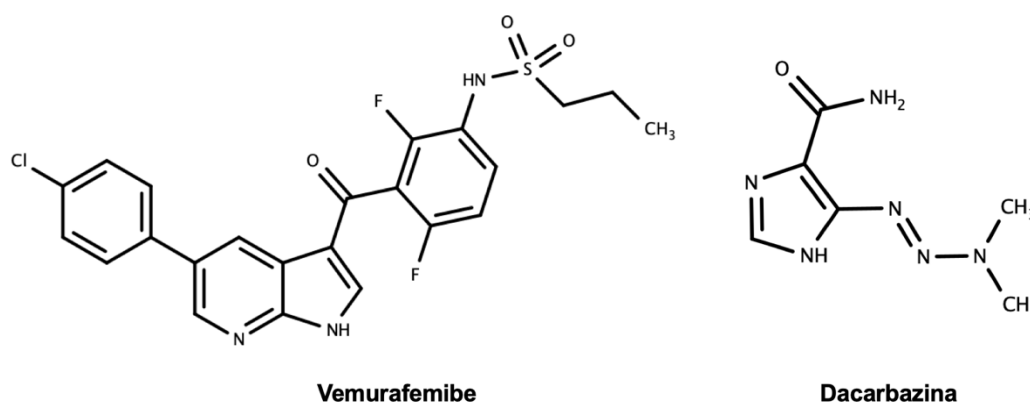
FN: Falso Negativo (variável positiva, classificada como negativa).

### 4.7.2.3 Simulações de *Docking molecular*

#### 4.7.2.3.1 Avaliação da interação molecular entre os compostos teste isômeros obtidos no extrato de *Varronia dardani*, os controles positivos Vemurafenib e Dacarbazina e o alvo molecular receptor de Tubulina.

A simulação de *docking* molecular foi utilizada para investigar o possível mecanismo de ação dos compostos teste isômeros obtidos no extrato de *Varronia dardani* (Taroda) para efeito anticâncer através da afinidade de ligação dos isômeros em estudo ao alvo molecular receptor de tubulina. As estruturas 3D do receptor de tubulina em estudo foram obtidas na biblioteca Protein Data Bank (PDB) (<https://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) (BERNSTEIN et al., 1977), sob os códigos (PDB ID: 4O2B – Complexo de tubulina e colchicina) (PROTA et al., 2014); (PDB ID: 5CA1 – Complexo T2R-TTL-Nocodazol) (WANG et al., 2016); (PDB ID: 5J2T - Complexo tubulina-vimblastina) (WAIGHT et al., 2016). Os fármacos antineoplásicos vemurafenibe e dacarbazina (Figura 7, p. 66) foram utilizados como controle positivo na simulação realizada para comparar os resultados de encaixe molecular com os compostos testes obtidos do extrato de *Varronia dardani* (Taroda) e avaliação da afinidade. Os dois fármacos são antineoplásicos com atividade comprovada no tratamento do câncer. O Vemurafenib é um inibidor da enzima B-Raf, desenvolvido para o tratamento do melanoma em estágio avançado (SHAW & NATHAN, 2013; SPAIN et al., 2016). Já a Dacarbazina tem como mecanismo de ação a alquilação, por meio da inibição do material genético e consequente formação de íons carbônio (IRADYAN et al., 2010; KOPROWSKA & CZYŻ, 2011). A descrição das proteínas utilizadas em estudo encontra-se na Tabela 5 (p. 66).

**Figura 7 - Estruturas químicas do vemurafenibe e dacarbazina.**



Fonte: Autoria própria (2022).

**Tabela 5 - Descrição das proteínas selecionadas no estudo.**

<i>Proteína</i>	<i>PDB ID</i>	<i>Controle Positivo</i>	<i>Resolução</i>	<i>Referência</i>
<i>Complexo de tubulina e colchicina</i>	4O2B	vemurafenibe e dacarbazina	2.30 Å	(PROTA et al., 2014)
<i>Complexo T2R-TTL-Nocodazol</i>	5CA1	vemurafenibe e dacarbazina	2.40 Å	(WANG et al., 2016)
<i>Complexo tubulina-vimblastina</i>	5J2T	vemurafenibe e dacarbazina	2.20 Å	(WAIGHT et al., 2016)

Na etapa de preparação, os controles positivos Vemurafenibe e a Dacarbazina, além dos compostos teste isômeros de *V. dardani* (Taroda) foram desenhados no programa *MarvinSketch* versão 19.9 (<https://chemaxon.com/products/marvin>), sendo obtida a estrutura 2D que foi salva no formato .sdf. Em seguida, as estruturas foram minimizadas pelo método da mecânica molecular, sendo esta etapa realizada no programa *Spartan* versão 14.0 ([https://store.wavefun.com/Spartan\\_Software\\_s/12.htm](https://store.wavefun.com/Spartan_Software_s/12.htm)). Após a inserção neste programa, as moléculas foram imediatamente convertidas em 3D e foi obtida a conformação mais estável. Os arquivos foram salvos no formato *Spartan document* e .sdf. Após a preparação dos compostos, foi realizado o *Docking*

molecular, com a inserção dos ligantes no programa *Molegro Virtual Docker* (MVD) versão 6.0.1.

O programa Molegro Virtual Docker v.6.0.1 (MVD) foi utilizado com os parâmetros predefinidos no mesmo software. Os compostos foram importados, para analisar a estabilidade do sistema através das interações identificadas com o sítio ativo da enzima, tomando como referência o valor energético do MolDock Score (THOMSEN & CHRISTENSEN, 2006). O algoritmo MolDock SE (Simplex Evolution) foi usado com os seguintes parâmetros: Um total de 10 execuções com um máximo de 1.500 interações usando uma população de 50 indivíduos, 2.000 etapas de minimização para cada resíduo flexível e 2.000 etapas de minimização global por simulação. As funções de pontuação MolDock Score (GRID) e PLANTS Score (GRID) foram usadas para calcular os valores de energia de encaixe. Um GRID foi fixado em 0,3 Å e a esfera de busca foi fixada em 15 Å de raio. Para a análise da energia do ligante, foram avaliadas as interações eletrostáticas internas, ligações de hidrogênio internas e torções  $sp^2-sp^2$ .

#### **4.7.2.3.2 Visualização das interações obtidas no acoplamento molecular e obtenção das figuras**

Para a realização da visualização das interações e obtenção das figuras de acoplamento molecular foram utilizados os programas Discovery Studio Visualizer v20.1.0.19295 - BIOVIA (2020) (<https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer-download>) e UCSF Chimera X 1.4 (<https://www.cgl.ucsf.edu/chimerax/>).

### **4.8 Fracionamento cromatográfico da fração isopropanólica do extrato etanólico da espécie de *V. leucocephala***

A *V. leucocephala* foi a segunda espécie mais ativa nos testes citotóxicos, e dentre suas frações, a fração isopropanólica (VL-I) se mostrou mais ativa, sendo assim, foi escolhida para ser submetida a um fracionamento por cromatografia de alta eficiência (CLAE).

A análise no cromatógrafo analítico permitiu desenvolver um método eficiente para o isolamento das substâncias presentes na fração VL-I. Inicialmente, foi preparada uma solução com 1 mg da amostra em acetonitrila (ACN) grau HPLC, na concentração de 1 mg. mL<sup>-1</sup>. Empregou-se como fase móvel água ultrapura acidificada (0,1% de ácido fórmico) e ACN. No método mais eficaz, a concentração de ACN variou de 5 a 100% em 60 minutos com fluxo de 0,6 mL.min<sup>-1</sup> (Tabela 6).

Na transposição para a escala semi-preparativa, preparou-se uma solução com 350 mg da amostra em 4 mL de ACN grau HPLC. Foram realizadas 20 injeções de 200 µL desta solução. Utilizou-se o mesmo método desenvolvido na fase analítica, no entanto foi empregado um fluxo de 3,5 mL.min<sup>-1</sup>. As frações obtidas foram então concentradas sob pressão reduzida à uma temperatura de 40 °C em rotaevaporador.

**Tabela 6 - Método utilizado na CLAE da fração VL-I da fração isopropanólica de *V. leucocephala*.**

Tempo	Comando	Valor
0,01	Concentração de ACN	5
50,00	Concentração de ACN	45
55,00	Concentração de ACN	65
60,00	Concentração de ACN	100
70,00	Concentração de ACN	100
75,00	Concentração de ACN	5
85,00	Concentração de ACN	5
85,01	Fim da corrida cromatográfica	

**Legenda:** ACN - Acetonitrila.

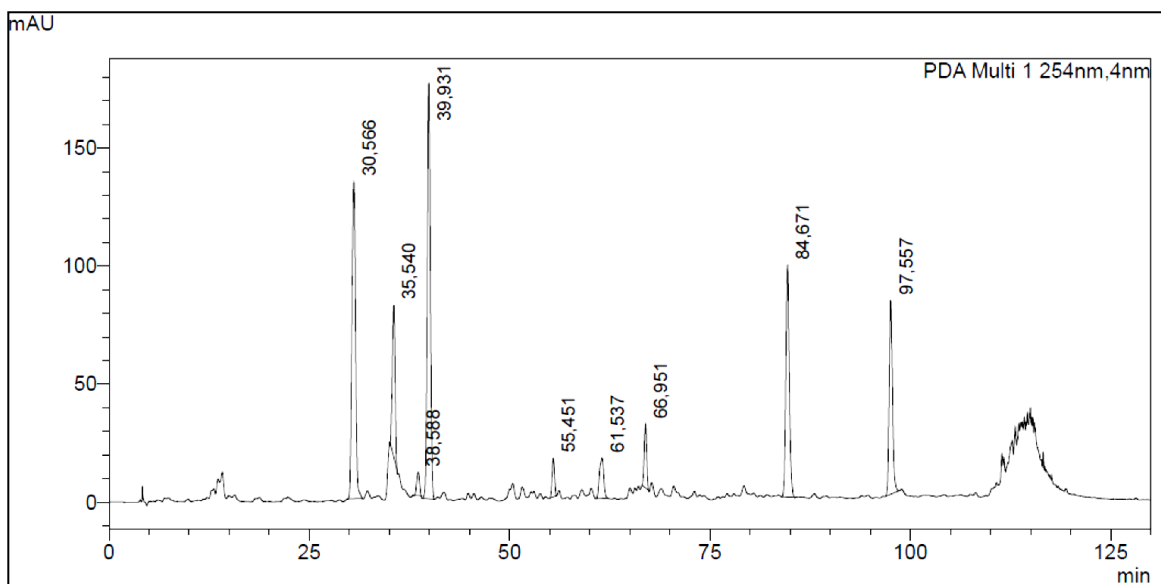
# **RÉSULTATS ET DISCUSSION**

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Desenvolvimento do método cromatográfico para o isolamento de compostos na fase acetato de etila do Extrato Etanólico Bruto de *V. dardani*

No cromatograma (Figura 8) foi possível observar 9 picos principais. Deste processo foram coletadas 9 frações (VD-FA-11-12.1-11-12.9) correspondentes aos 9 principais picos visualizados no cromatograma analítico. Posteriormente, estas frações foram analisadas por RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e HMBC para identificação/determinação estrutural, sendo possível identificar seis substâncias que foram codificadas como VD-1, correspondente à fração com tempo de retenção 66,95; VD-2, correspondente à fração em 39,93; VD-3, correspondente à fração com tempo de retenção em 38,58; VD-4, correspondente à fração em 30,56; VD-5, correspondente à fração em 84,67 e VD-6, correspondente à fração com tempo de retenção em 35,54.

**Figura 8 - Cromatograma da fração VD-FA-11-12 da fase acetato de etila de *V. dardani*.**

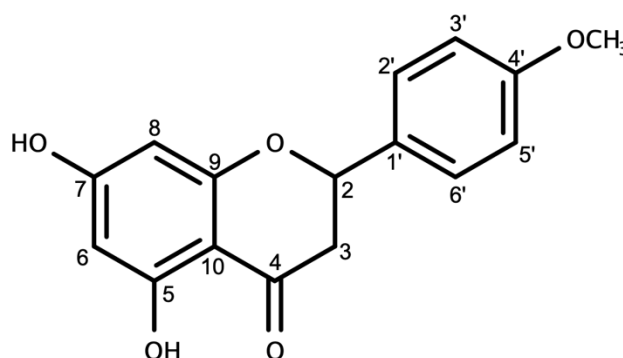




## 5.2. Identificação dos compostos isolados da fase acetato de etila do Extrato Etanólico Bruto de *V. dardani*

### 5.2.1. Identificação estrutural de VD-1

Após a análise dos dados espectrais de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e comparação com os dados da literatura, foi possível identificar a substância VD-1 como sendo 5,7-dihidroxi-4'-metoxiflavanona, ou isosakuranetina, isolada pelo presente autor em sua dissertação de mestrado (VELOSO, 2018).



**Isosakuranetina (VD-1)**

### 5.2.2. Identificação estrutural de VD-2

A substância VD-2 foi isolada na forma de pó amorfo amarelo-claro com 16 mg. O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) (Figuras 9-11, p. 75) da substância VD-2 foi bastante semelhante ao espectro da substância VD-1, onde foram observados três deslocamentos em  $\delta_{\text{H}}$  5,34 (dd; 1H;  $J = 12,8$  Hz e  $J = 2,8$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  3,11 (dd; 1H;  $J = 12,8$  Hz e  $J = 17,2$  Hz) e em  $\delta_{\text{H}}$  2,70 (dd; 1H;  $J = 17,2$  Hz e  $J = 2,8$  Hz), característicos dos hidrogênios carbinólico e metilênicos de flavanona. Este mesmo espectro mostrou ainda dois dupletos, um em  $\delta_{\text{H}}$  7,31 (H-2' e H-6') e outro em  $\delta_{\text{H}}$  6,81 (H-3' e H-5'), ambos com integral para dois hidrogênios cada, característico de sistema AA'BB' do anel B de um flavonoide. Além da ausência de um simpleto integrando para três hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  3,80 (4'-OCH<sub>3</sub>), o que diferencia essa substância da VD-1 (OLVEIRA, 2009).

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  APT (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) (Figura 12, p. 76) apresentou 13 sinais que foram atribuídos á 15 carbonos, sendo eles: 7 sinais para carbonos não hidrogenados (-C), 7 sinais para carbonos metínicos (-CH), e 1 sinal para carbono metilênico (- $\text{CH}_2$ ). Os sinais registrados mais relevantes foram o deslocamento do carbono oximetínico C-2 em  $\delta_{\text{C}}$  80,70, do carbono metilênico C-3 em  $\delta_{\text{C}}$  44,25 e da carbonila em  $\delta_{\text{C}}$  197,92 indicando a presença de hidroxilação em C-5 devido a formação de ligação de hidrogênio intramolecular (OLVEIRA, 2009). A principal diferença da substância VD-2 para VD-1, é a ausência do sinal da metoxila em  $\delta_{\text{C}}$  55,75. Os demais sinais de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  estão compilados na Tabela 7.

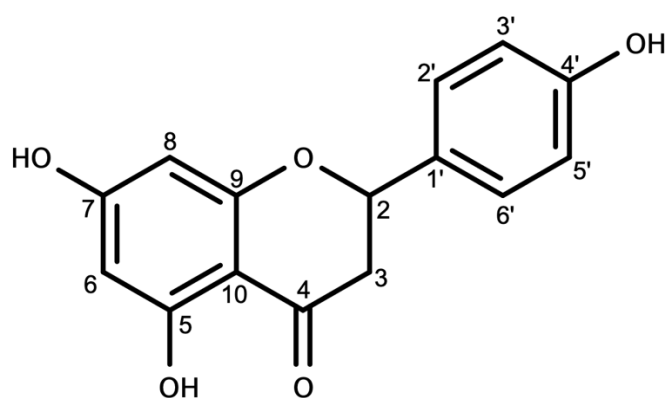
Após a análise dos dados espectrais de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e comparação com os dados da literatura, foi possível identificar a substância VD-2 como sendo 4',5,7-trihidroxi-flavanona, ou naringenina (SILVA *et al.*, 2013), isolada pela primeira vez na espécie em estudo, porém já relatada no gênero *Varronia*.

**Tabela 7 - Dados de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  (400 e 100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de VD-2, 4',5,7-trihidroxi-flavanona (naringenina) em comparação aos dados de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  (500 e 125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) por SILVA e colaboradores (2013).**

C	VD-2		Naringenina	
	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
2	5,34 (1H; dd; $J=12,8$ e $2,8$ Hz)	80,70	5,33 (1H; dd; $J=13,0$ e $3,0$ Hz)	80,47
3	3,11 (1H; dd; $J=17,2$ e $12,8$ Hz) 2,70 (1H; dd; $J=17,2$ e $2,8$ Hz)	44,25	3,10 (1H; dd; $J=17,0$ e $13,0$ Hz) 2,69 (1H; dd; $J=17,0$ e $3,0$ Hz)	44,02
4	-	195,40	-	197,70
5	-	165,16	-	164,80
6	5,88 (1H; d; $J=2,4$ Hz)	96,41	5,89 (1H; d; $J=2,0$ Hz)	96,16
7	-	168,44	-	168,30

Tabela 7 – (Continuação).

<b>8</b>	<b>5,87 (1H; d; <math>J = 2,4</math> Hz)</b>	<b>97,18</b>	<b>5,88 (1H; d; <math>J = 2,0</math> Hz)</b>	<b>97,05</b>
<b>9</b>	-	164,80	-	165,40
<b>10</b>	-	101,62	-	103,30
<b>1'</b>	-	131,32	-	131,00
<b>2'</b>	7,31 (2H; d; $J = 8,4$ Hz)	129,25	7,30 (2H; d; $J = 8,5$ Hz)	129,02
<b>3'</b>	6,81 (2H; d; $J = 8,4$ Hz)	116,55	6,81 (2H; d; $J = 8,0$ Hz)	116,33
<b>4'</b>	-	159,28	-	159,01
<b>5'</b>	6,81 (2H; d; $J = 8,4$ Hz)	116,55	6,81 (2H; d; $J = 8,0$ Hz)	116,33
<b>6'</b>	7,31 (2H; d; $J = 8,4$ Hz)	129,25	7,30 (2H; d; $J = 8,5$ Hz)	129,02
<b>4'-OCH<sub>3</sub></b>	-	-	-	-



Naringenina (VD-2)

Figura 9 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da substância VD-2.

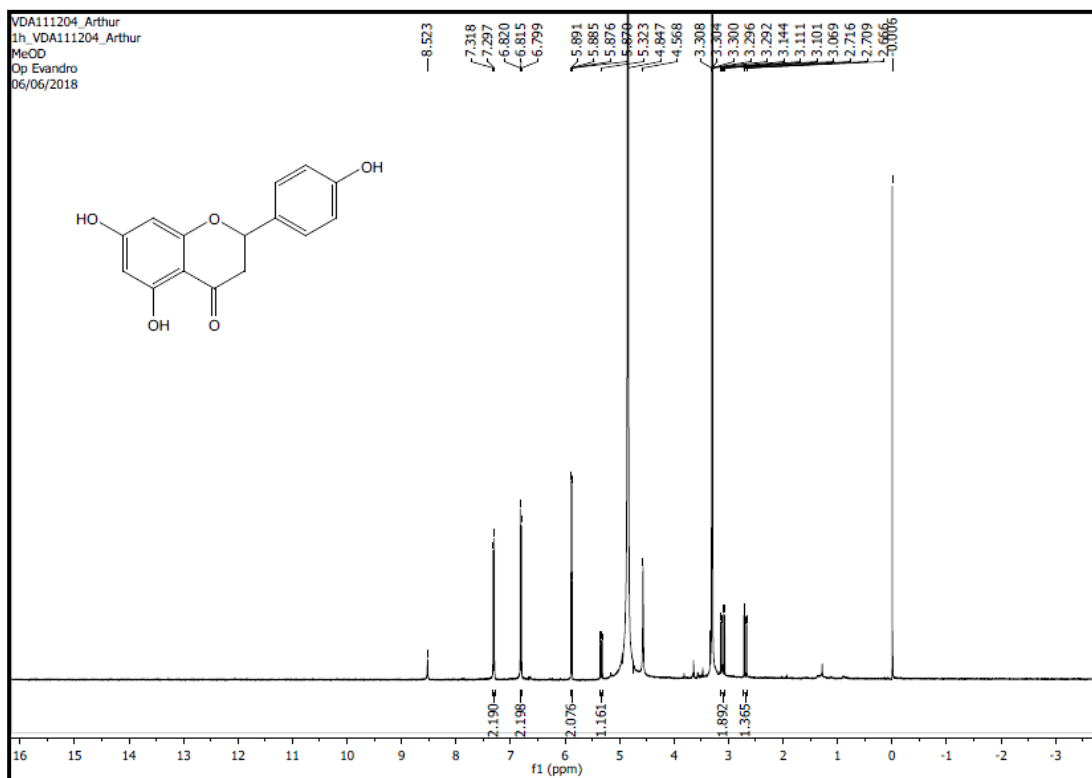


Figura 10 - Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de VD-2 na região de 2,60 –3,20 ppm.

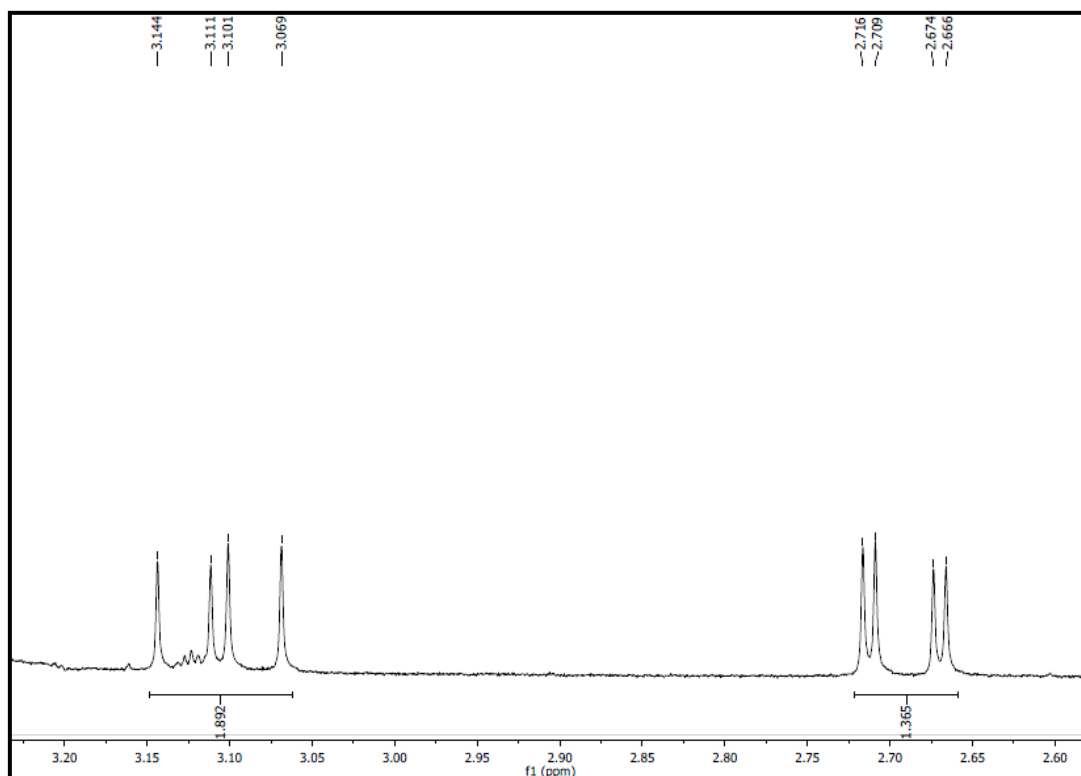


Figura 11 - Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de VD-2 na região de 5,2 – 7,4 ppm.

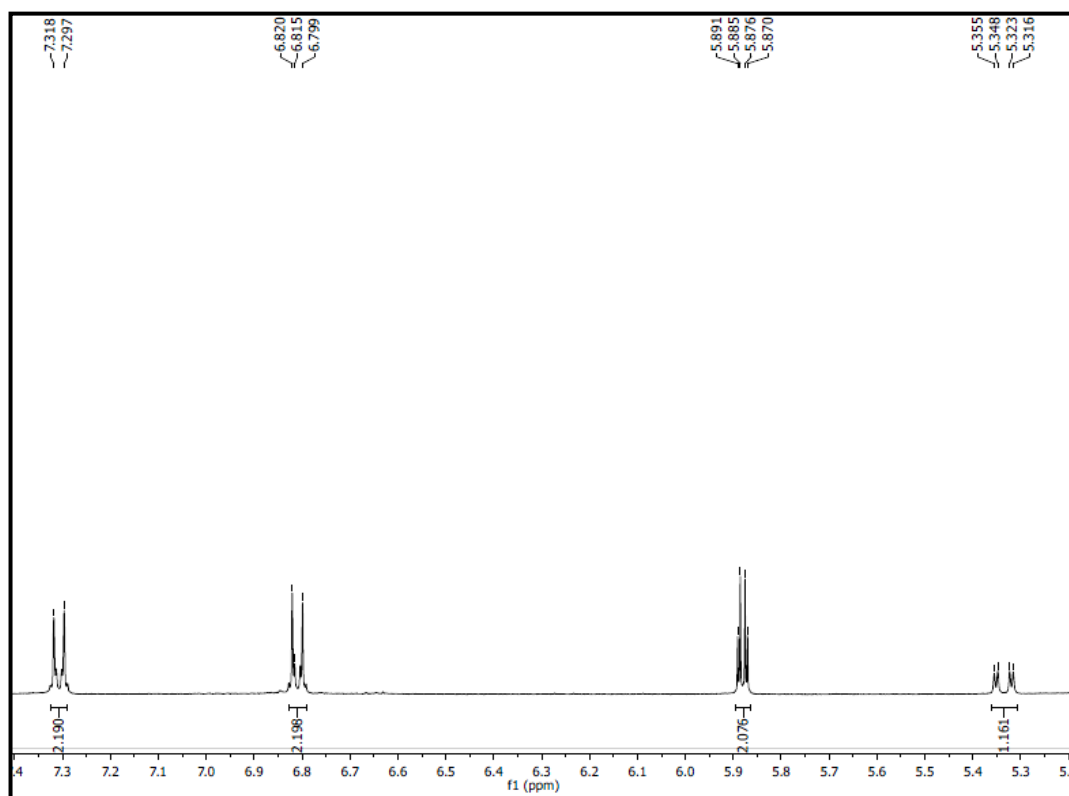
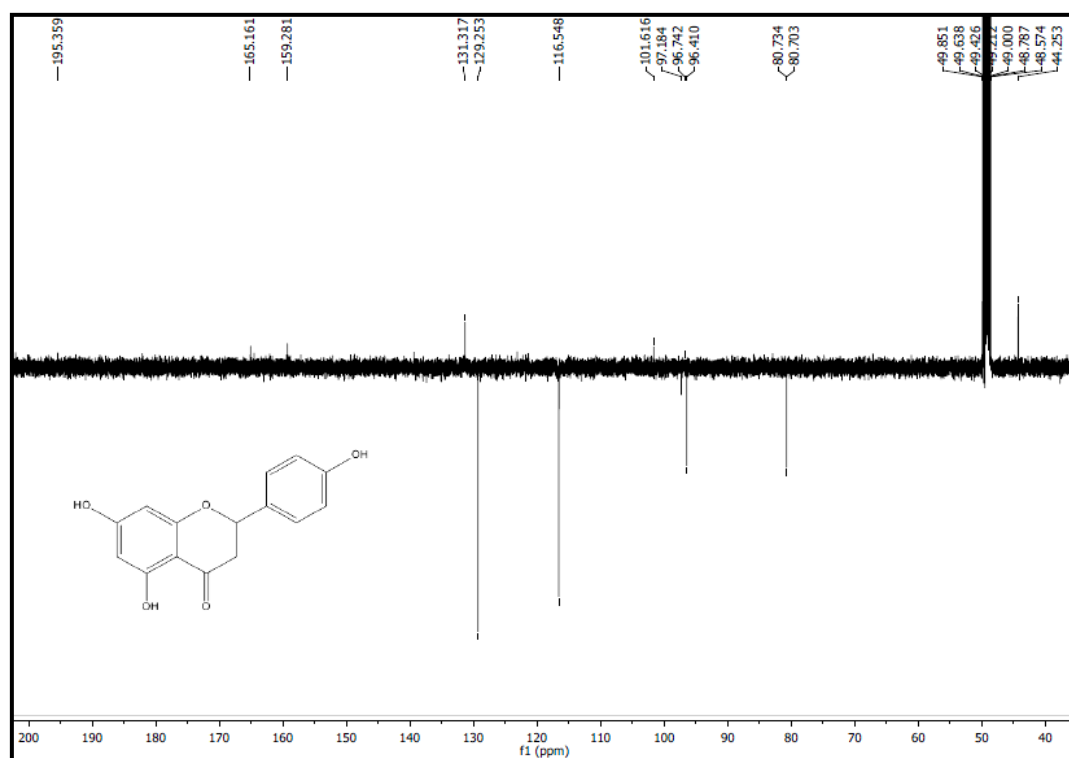


Figura 12 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de VD-2.



### 5.2.3. Identificação estrutural de VD-3

O composto codificado como VD-3, foi obtido como cristais amarelo-claros com massa de 17 mg.

Através dos dados espectrais de RMN de  $^1\text{H}$  (Figuras 13-15, p.79), foram identificados sinais característicos de um flavonol glicosilado, incluindo dos simpletos em  $\delta_{\text{H}}$  6,20 (s, 1H, H-6) e  $\delta_{\text{H}}$  6,39 (s, 1H, H-8) e dois dupletos, integrando para dois hidrogênios cada, em  $\delta_{\text{H}}$  6,90 (2H, d,  $J = 8,5$  Hz, H-2',6') e  $\delta_{\text{H}}$  8,07 (2H, d,  $J = 8,5$  Hz; H-3',5'), caracterizando um flavonoide com um anel B em um sistema AA'BB', revelando uma aglicona estruturalmente semelhante ao canferol (Tabela 8).

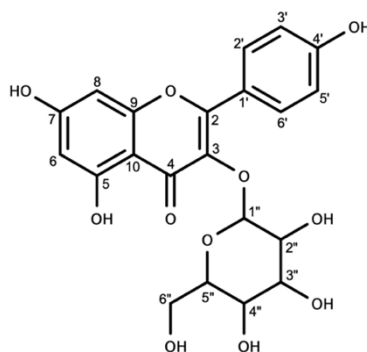
O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 16, p. 80) indicou a presença de 21 carbonos. Foram observados também, sinais característicos de uma unidade osídica, que em comparação com a literatura, foi identificada como uma unidade glicosídica (KIM et al., 2004; GHAVAM-HAGHI & DINANI, 2017). A ligação desta unidade ao carbono C-3 do flavonoide, foi confirmada através da correlação observada no mapa de contorno do HMBC (Figura 17, p. 81), entre o hidrogênio anomérico H-1'' em  $\delta_{\text{H}}$  5,24 (1H, d,  $J = 7,5$  Hz) e o carbono C-3 em  $\delta_{\text{C}}$  135,41 à três ligações ( $J_3$ ). De acordo com os dados obtidos e em comparação com a literatura, foi possível identificar o composto VD-3 como sendo o canferol-3-O-glicosídeo (Astragalina).

**Tabela 8 - Dados de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  (500 e 125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de VD-3, canferol-3-O-glicosídeo (astragalina) em comparação aos dados de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  (400 e 100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) por GHAVAM-HAGHI & DINANI (2017).**

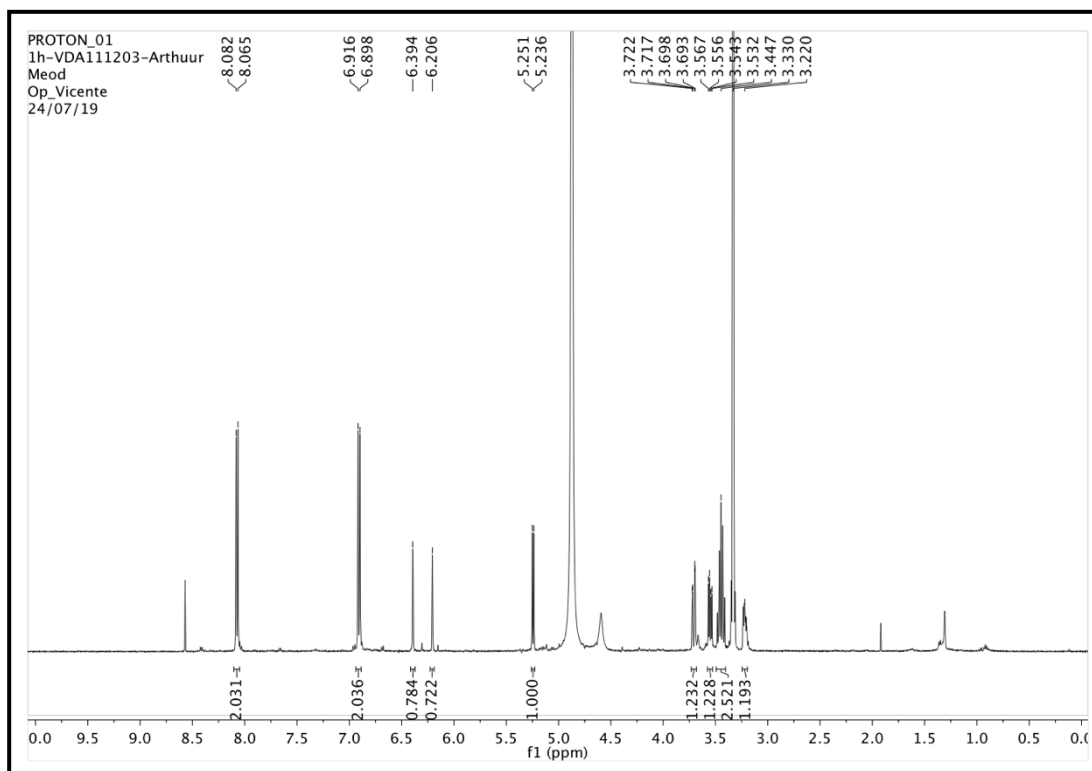
C	VD-3		Astragalina	
	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
2	-	161,59	-	162,82
3	-	135,41	-	135,65
4	-	179,35	-	179,50
5	-	163,01	-	161,54

**Tabela 8** – (Continuação).

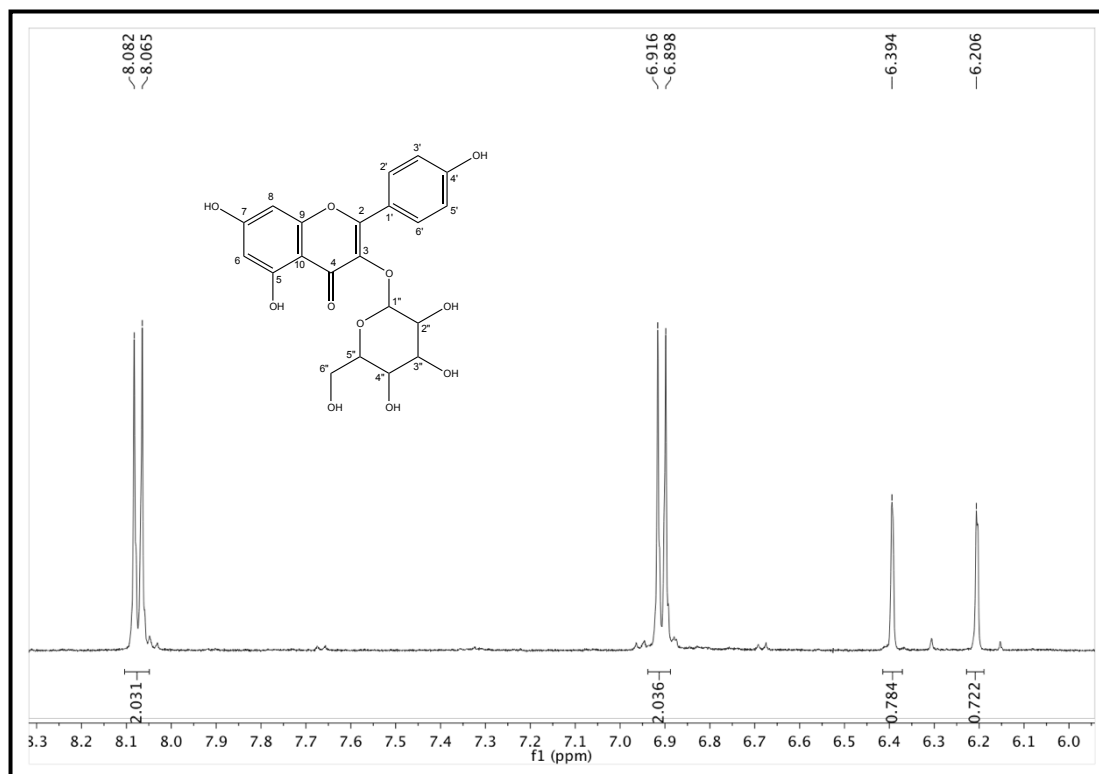
<b>6</b>	<b>6,20 (1H; s)</b>	<b>100,37</b>	<b>6,22 (1H; s)</b>	<b>99,73</b>
<b>7</b>	-	167,45	-	165,88
<b>8</b>	6,39 (1H; s)	95,07	6,41 (1H; s)	94,85
<b>9</b>	-	158,63	-	159,22
<b>10</b>	-	105,33	-	105,67
<b>1'</b>	-	122,82	-	122,58
<b>2', 6'</b>	6,90 (2H; d; $J = 8,5$ Hz)	132,24	6,91 (2H; d; $J = 8,5$ Hz)	132,31
<b>3', 5'</b>	8,07 (2H; d; $J = 8,5$ Hz)	116,08	8,07 (2H; d; $J = 8,5$ Hz)	116,12
<b>4'</b>	-	158,90	-	158,47
<b>1''</b>	5,24 (1H; d; $J = 7,5$ Hz)	104,21	5,26 (1H; d; $J = 7,2$ Hz)	103,87
<b>2''</b>	3,55 (1H; dd; $J = 5,5$ e 12 Hz)	75,73	3,46 (1H; dd; $J = 10,4$ e 3,6 Hz)	75,68
<b>3''</b>	3,45 (2H; m)	78,06	3,37 (1H; m)	77,94
<b>4''</b>	3,22 (1H; m)	71,35	3,24 (1H; m)	71,31
<b>5''</b>	3,45 (2H; m)	78,41	3,56 (1H; m)	78,41
<b>6''</b>	3,68 (1H; dd, $J = 2,5$ e 12 Hz)	62,63	3,70 (2H; d, $J = 11,5$ Hz)	62,64

**Astragalina VD-3**

**Figura 13 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da substância VD-3.**

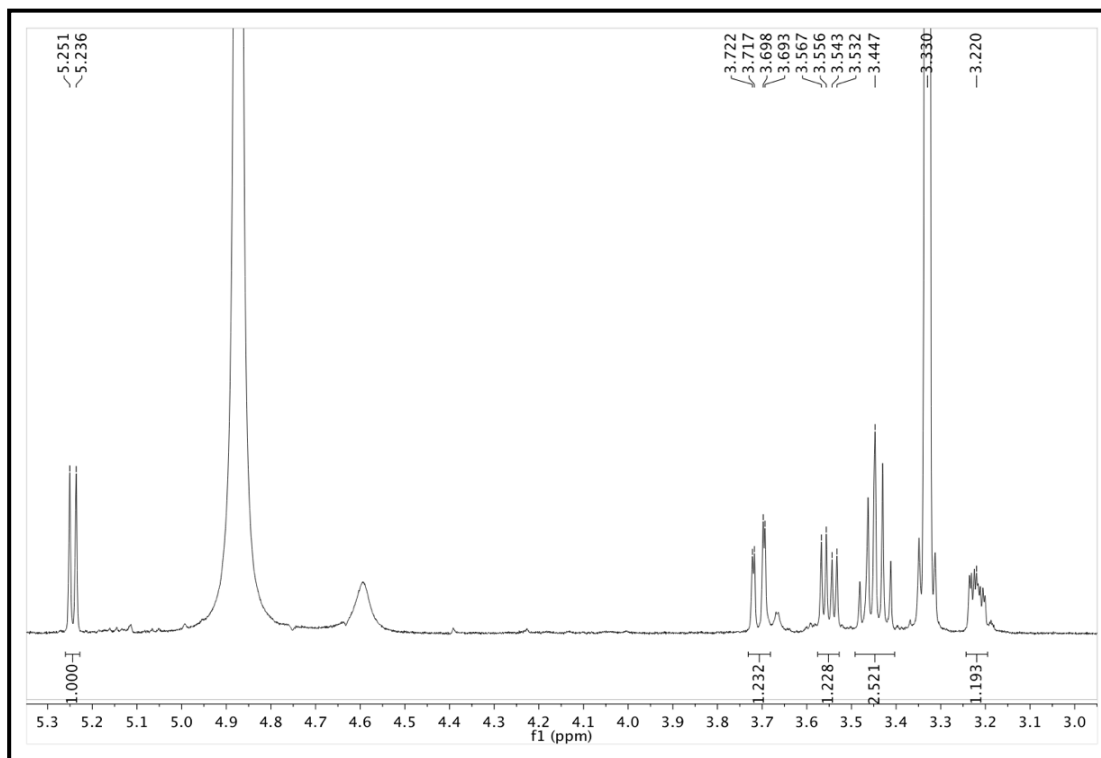


**Figura 14 - Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de VD-3 na região de 6,0 – 8,30 ppm.**

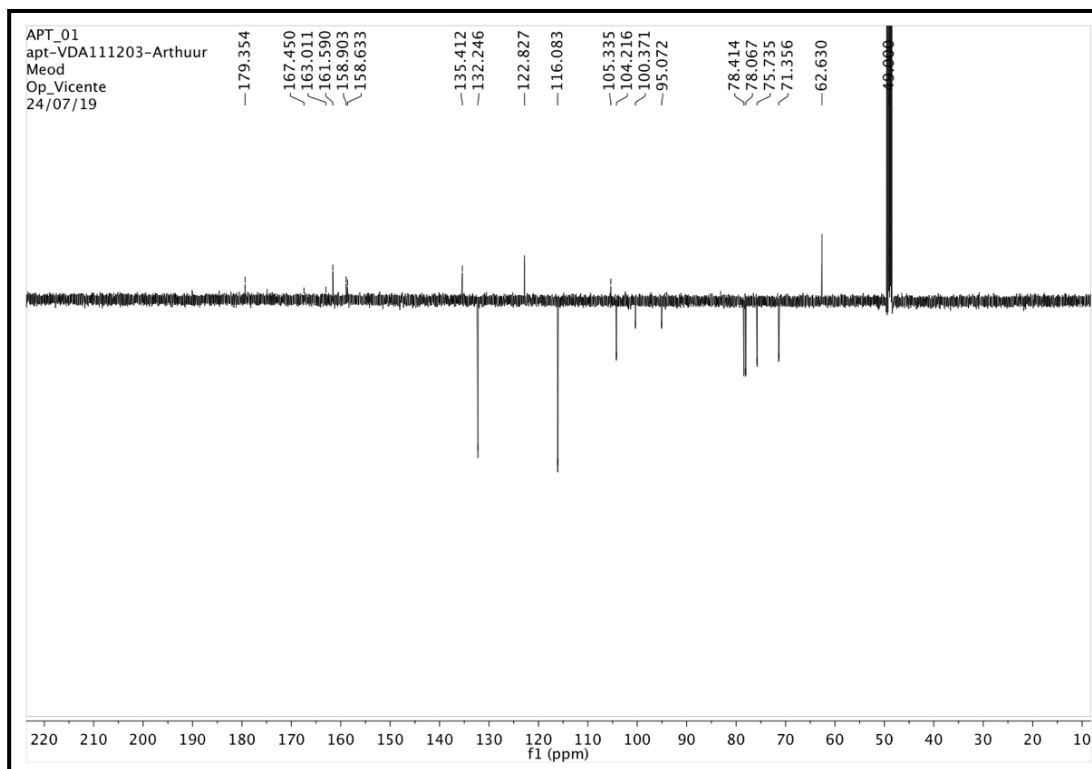




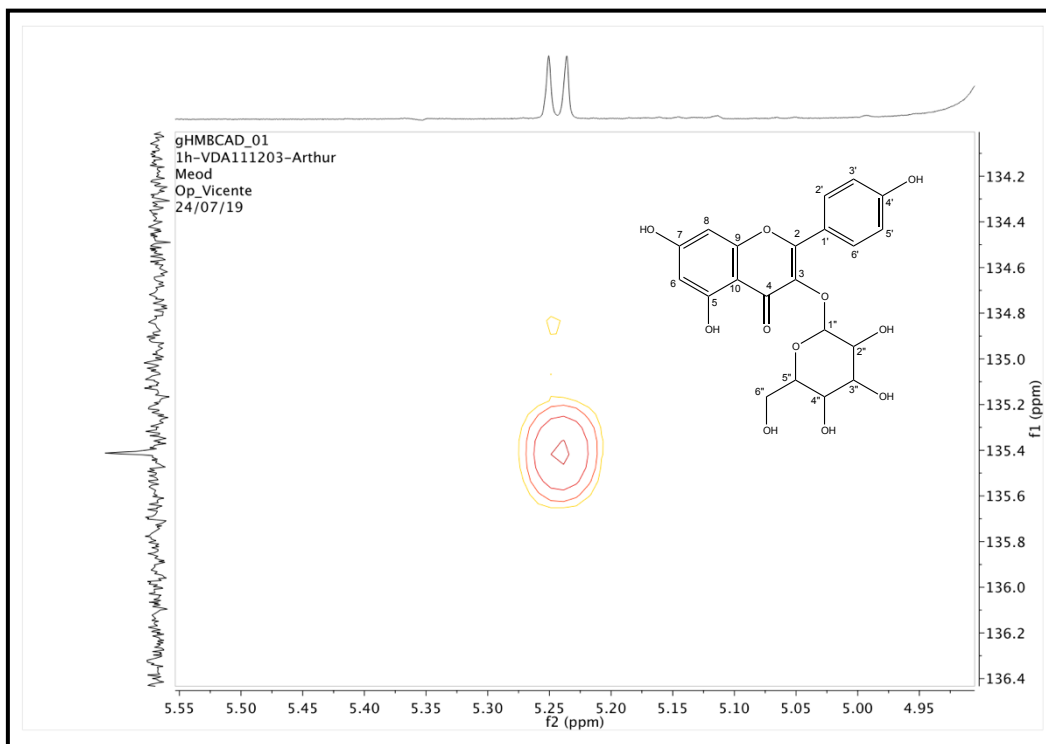
**Figura 15 - Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de VD-3 na região de 3,0 – 5,3 ppm.**



**Figura 16 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de VD-3.**



**Figura 17 - Expansão do espectro de HMBC (500 e 125 MHz, CD<sub>3</sub>OD) do composto VD-3 na região de 5,55 – 4,90 e 134,1 – 136,4 ppm.**



#### 5.2.4. Identificação estrutural de VD-4

A substância VD-4 foi isolada na forma de um pó amarelo amorfo com 14 mg. No espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) (Figuras 18-20, p. 85), foi possível observar três deslocamentos em  $\delta_H$  7,70 (1H, d,  $J = 2$  Hz),  $\delta_H$  6,86 (1H, d,  $J = 8,4$  Hz) e em  $\delta_H$  7,57 (1H, dd,  $J = 2$  e 8,4 Hz), atribuídos aos hidrogênios aromáticos H-2', H-5' e H-6' respectivamente, presentes no anel B de um sistema ABX de um flavonoide (ATAY et al., 2015). Ainda no mesmo espectro, dois deslocamentos essenciais foram observados, um em  $\delta_H$  6,20 (1H, d,  $J = 2$  Hz) e outro em  $\delta_H$  6,39 (1H, d,  $J = 2$  Hz), característicos de flavonoides que possuem anel A 5,7-dissubstituído, sendo estes sinais atribuídos aos hidrogênios H-8 e H-6, respectivamente. Observou-se também a ausência de um sinal característico do próton H-3, sugerindo assim uma substituição nessa região do anel C, e com isso confirmou-se uma estrutura semelhante a um flavonol, especificamente a quercetina. Além disso, foi possível sugerir a presença de uma unidade osídica, através de um conjunto de absorções em  $\delta_H$  3,21 – 3,70, típicos de

hidrogênios oximetínicos, além de um duplete em  $\delta_H$  5,22 (1H,  $J = 7,6$  Hz) referente ao hidrogênio anomérico.

No espectro de RMN de  $^{13}C$  – BB (100 MHz,  $CD_3OD$ ) (Figuras 21-23, p. 86), foram observados 21 sinais, os quais foram atribuídos a 21 carbonos, destes, 15 foram característicos de um esqueleto favonoídico ( $C_6-C_3-C_6$ ) e 6 atribuídos à uma unidade glicosídica, contribuindo assim, com a sugestão advinda dos analisados no espectro de RMN de  $^1H$ .

As substituições do anel B (sistema ABX) deste favonoide, foram observadas também no espectro de RMN de  $^{13}C$ , onde notaram-se os deslocamentos em  $\delta_C$  145,92 (C-3') e  $\delta_C$  149,87 (C-4'), característicos de carbonos aromáticos oxigenados. Os sinais em  $\delta_C$  117,54,  $\delta_C$  116,01 e  $\delta_C$  123,07 foram atribuídos aos carbonos aromáticos C-2', C-5' e C-6' respectivamente, corroborando com a sugestão da presença de um anel B em um sistema ABX (ATAY et al., 2015). Observaram-se ainda as presenças de deslocamentos atribuídos a um carbono não hidrogenado em  $\delta_C$  159,01 e a um carbono não hidrogenado e oxigenado em  $\delta_C$  135,59, sendo estes sinais condizentes com os carbonos C-2 e C-3 de flavonoides do tipo flavonol (PELTER, WARD & GRAY, 1976; AGRAWAL, 1989).

Ainda no espectro de RMN de  $^{13}C$ , o deslocamento em  $\delta_C$  179,49, foi atribuído à um carbono de uma carbonila quelada, ou seja, sugerindo a presença de um grupamento hidroxila no carbono C-5 do anel A em ligação de hidrogênio com a carbonila em C-4, pois segundo Tanaka e colaboradores (2014), ocorreria a proteção da carbonila caso não houvesse esta força intramolecular, e poderíamos observar esse deslocamento em cerca de 174 ppm. No mesmo espectro, o anel A (5,7-dissubstituído) foi sugerido através dos deslocamentos em  $\delta_C$  99,94 e  $\delta_C$  94,73, atribuídos aos carbonos metínicos  $sp^2$  C-6 e C-8 respectivamente. As substituições nos carbonos C-5 e C-7 foram sugeridas pelos deslocamentos em  $\delta_C$  163,06 e  $\delta_C$  166,17, respectivamente.

Os dados obtidos através do espectro de RMN de  $^{13}C$  corroboraram com a sugestão da presença de uma unidade osídica, pois foram observados deslocamentos entre  $\delta_C$  62,53 e  $\delta_C$  78,39, característicos de uma glicose, onde o sinal em  $\delta_C$  104,27 confirmou a presença de um carbono oximetínico dessa unidade osídica (ATAY et al., 2015).

No espectro de HMBC (Figuras 24-26, p. 88), foi possível observar a correlação entre os sinais do próton anomérico  $\delta_{\text{H}}$  5,22 (H-1'') com o carbono  $\delta_{\text{C}}$  135,59 (C-3), confirmando a inserção da unidade osídica no carbono C-3 do anel C do esqueleto favonoídico.

Após a análise dos dados espectrais de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e comparação com os dados da literatura (Tabela 9), foi possível identificar a substância VD-4 como sendo a quercetina-3-O- $\beta$ -D-glicopiranosídeo, conhecida como isoquercitrina, isolada pela primeira vez na espécie.

**Tabela 9 - Dados de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  (400 e 100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de VD-4, quercetina-3-O- $\beta$ -D-glicopiranosídeo (isoquercitrina) em comparação aos dados obtidos por ATAY et al. (2015) (600 e 150 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).**

C	VD-4		Isoquercitrina	
	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
2	-	159,01	-	158,80
3	-	135,59	-	136,00
4	-	179,49	-	179,60
5	-	163,06	-	163,10
6	6,20 (1H, d, $J = 2$ Hz)	99,94	6,20 (1H, d, $J = 1,7$ Hz)	99,90
7	-	166,17	-	166,70
8	6,39 (1H, d, $J = 2$ Hz)	94,73	6,39 (1H, d, $J = 1,7$ Hz)	94,80
9	-	158,49	-	158,60
10	-	105,66	-	105,50
1'	-	123,18	-	123,10
2'	7,70 (1H, d, $J = 2$ Hz)	117,54	7,66 (1H, d, $J = 2,2$ Hz)	116,10

**Tabela 9** – (Continuação).

3'	-	145,92	-	145,90
4'	-	149,87	-	150,00
5'	6,86 (1H, d, $J = 8,4$ Hz)	116,01	6,84 (1H, d, $J = 8,5$ Hz)	117,60
6'	7,57 (1H, dd, $J = 8,4$ e 2 Hz)	123,07	7,63 (1H, dd, $J = 8,5$ e 2,2 Hz)	123,20
1''	5,22 (1H, d, $J = 7,6$ Hz)	104,27	5,25 (1H, d, $J = 7,6$ Hz)	104,50
2''	3,47 (1H, dd, $J = 7,6$ e 9 Hz)	75,71	3,42 (1H, dd, $J = 7,6$ e 9 Hz)	75,80
3''	3,42 (1H, dd, $J = 6,9$ e 14,8 Hz)	78,10	3,48 (1H, m)	78,40
4''	3,34 (1H, m)	71,21	3,35 (1H, m)	71,30
5''	3,21 (1H, m)	78,39	3,22 (1H, m)	78,20
6''	3,56 (1H, dd, $J = 5,2$ e 12 Hz)	62,53	3,58 (1H, dd, $J = 5,5$ e 12 Hz)	62,60
	3,70 (1H, dd, $J = 2,8$ e 12 Hz)		3,71 (1H, dd, $J = 2,5$ e 12 Hz)	

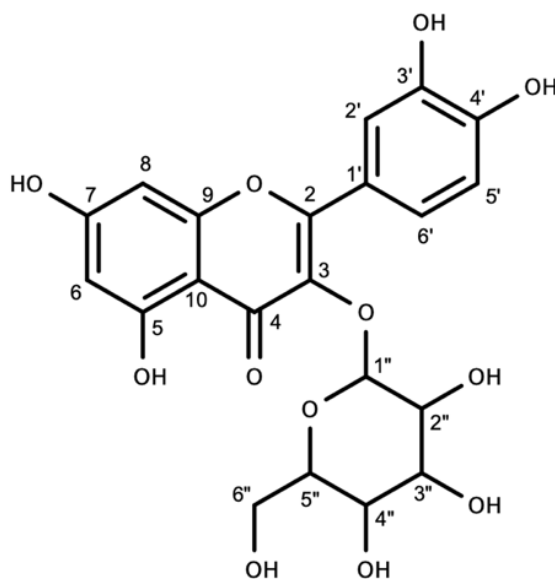
**Isoquercitrina (VD-4)**

Figura 18 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da substância VD-4.

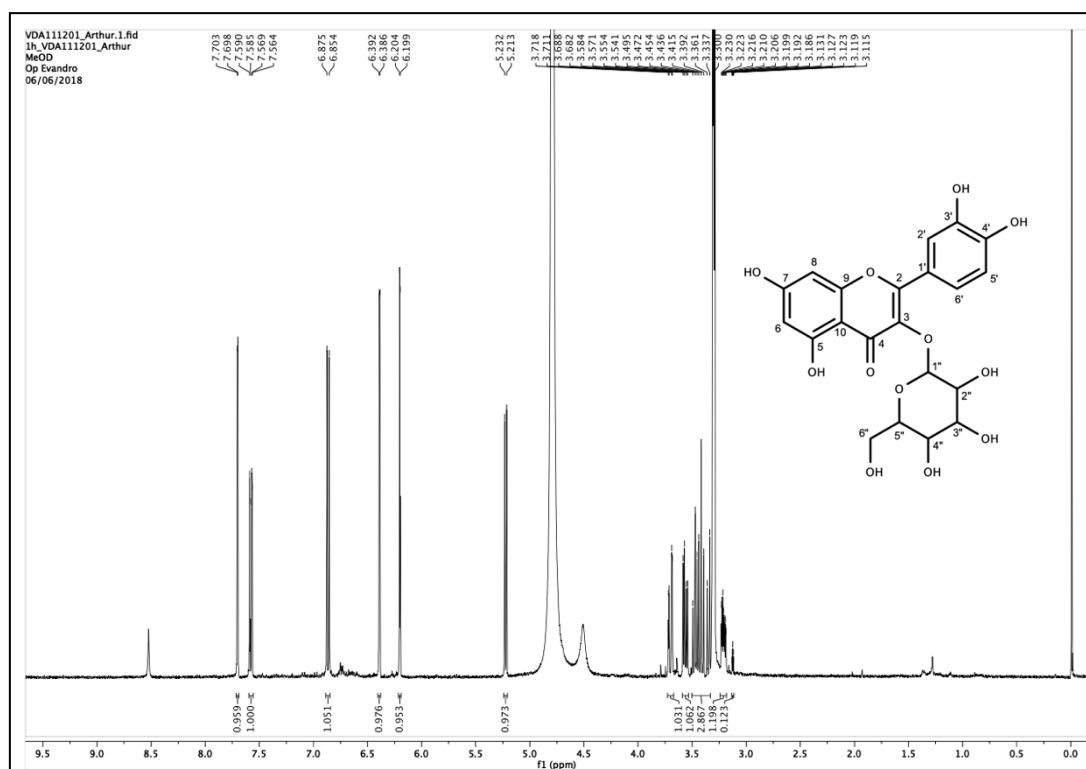
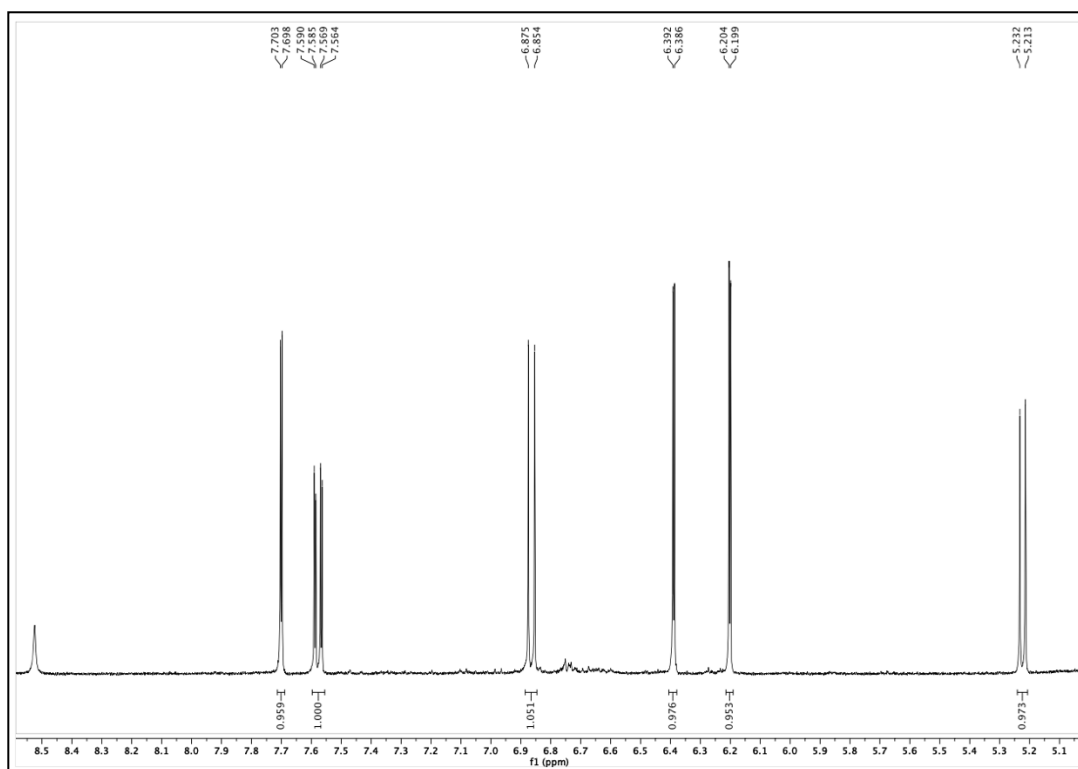
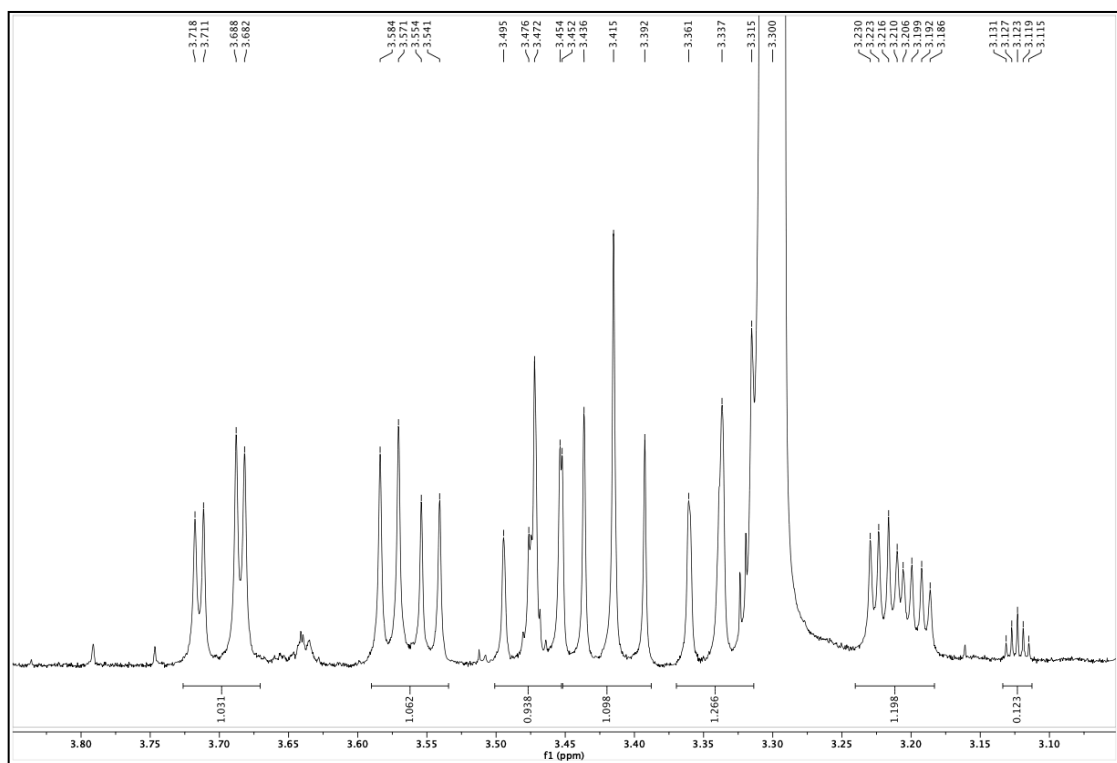


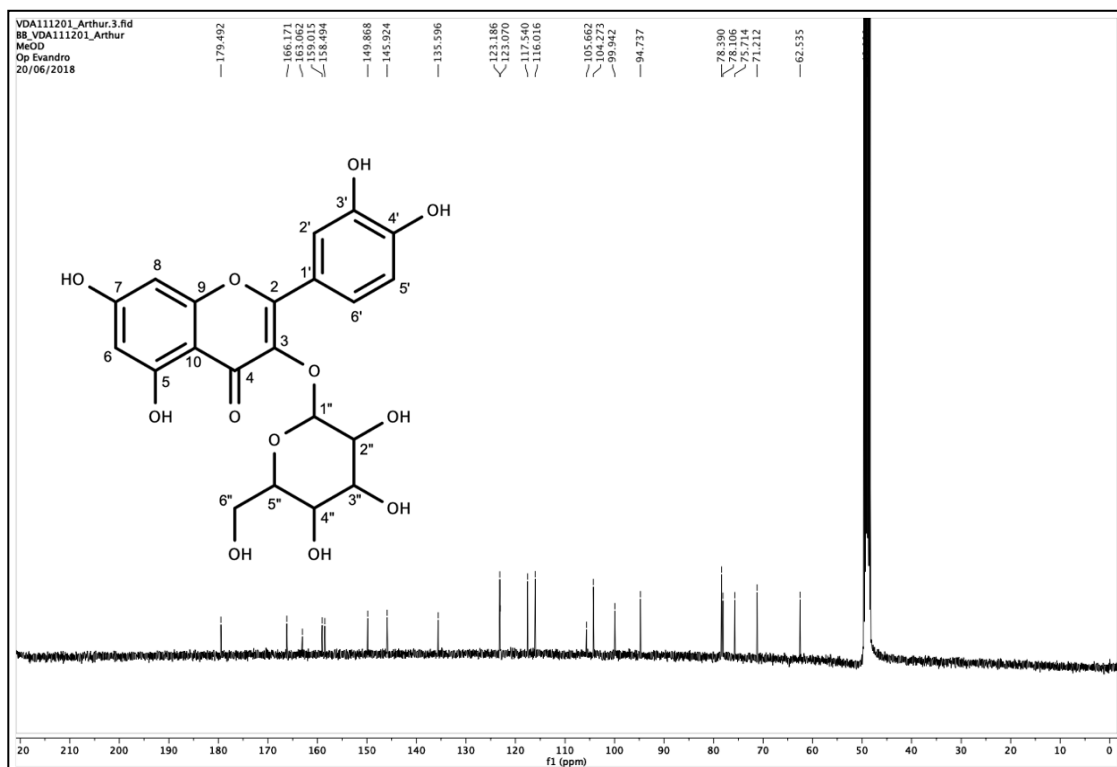
Figura 19 - Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de VD-4 na região de 5,0 – 8,60 ppm.



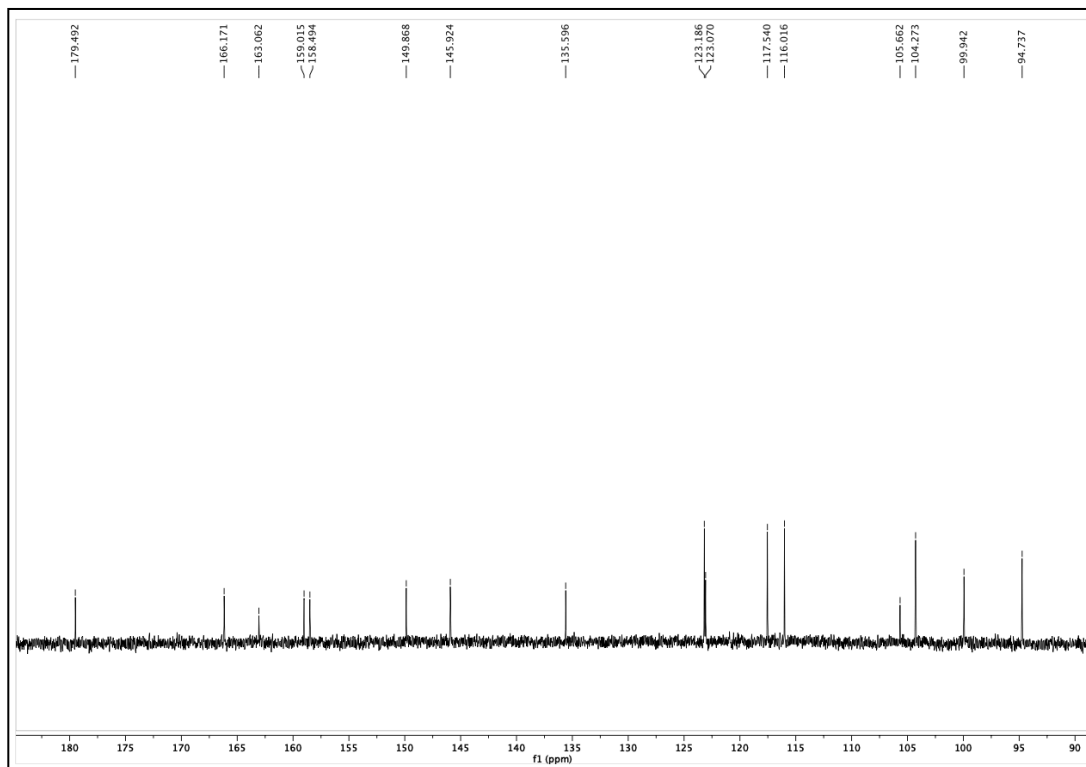
**Figura 20 - Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de VD-4 na região de 3,0 – 3,85 ppm.**



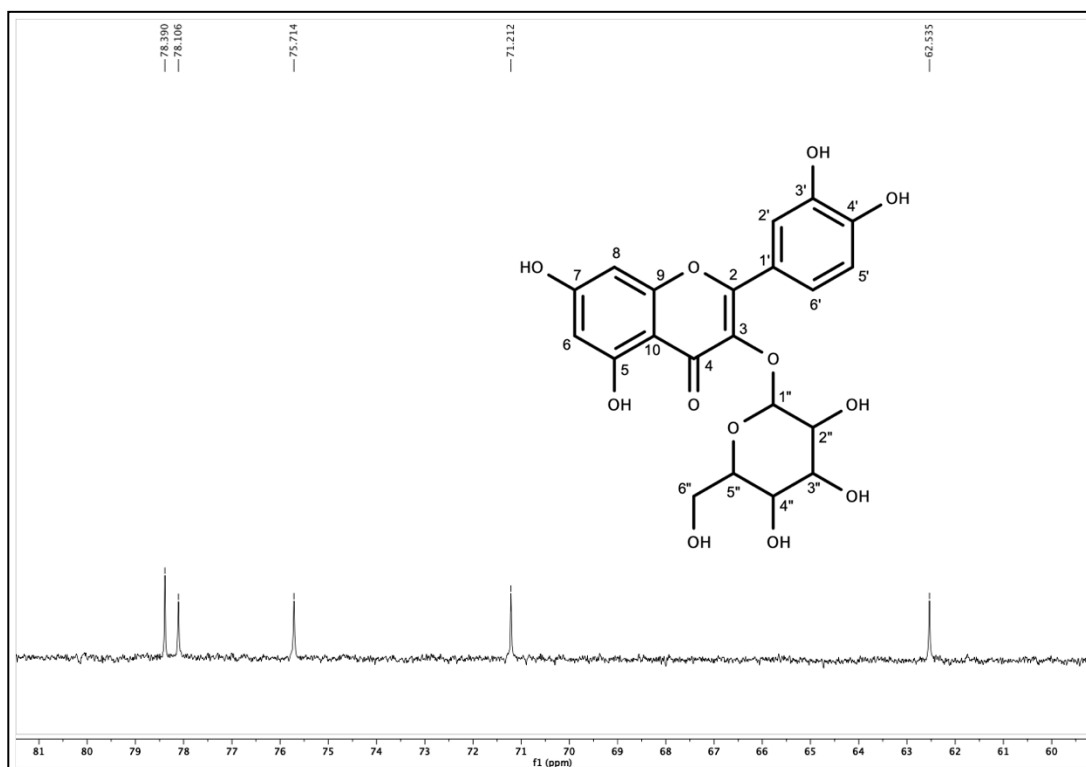
**Figura 21 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da substância VD-4.**



**Figura 22 - Expansão do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de VD-4 na região de 90 – 185 ppm.**

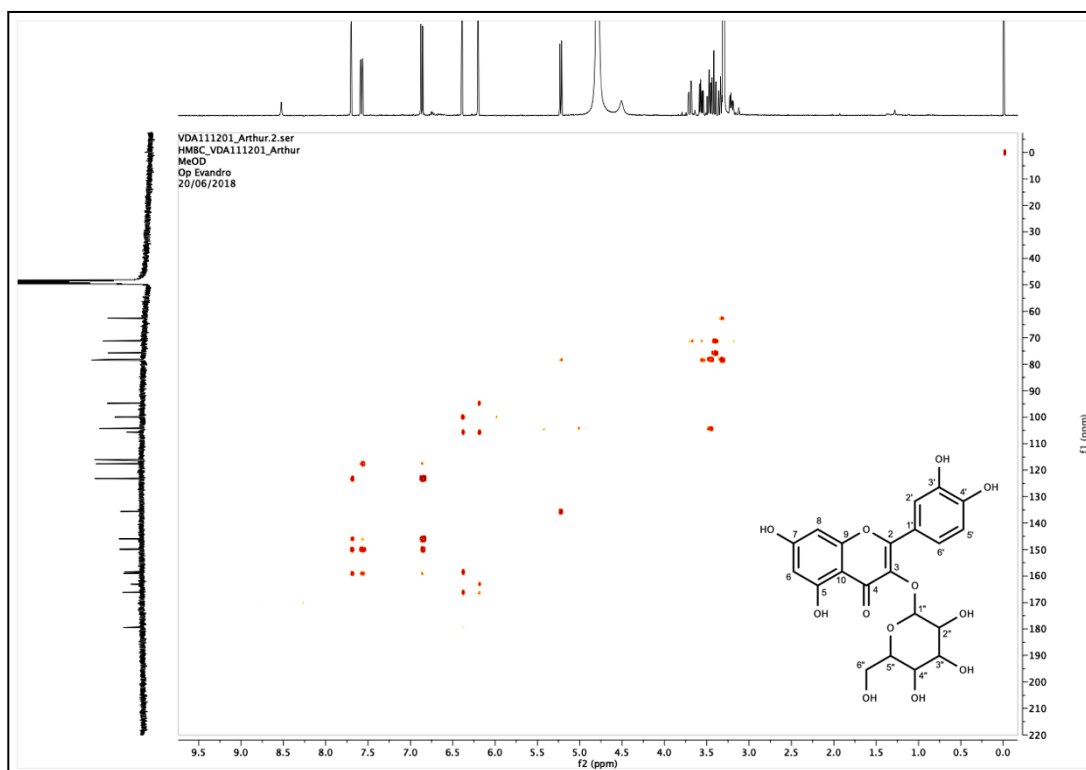


**Figura 23 - Expansão do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de VD-4 na região de 59 – 81 ppm.**

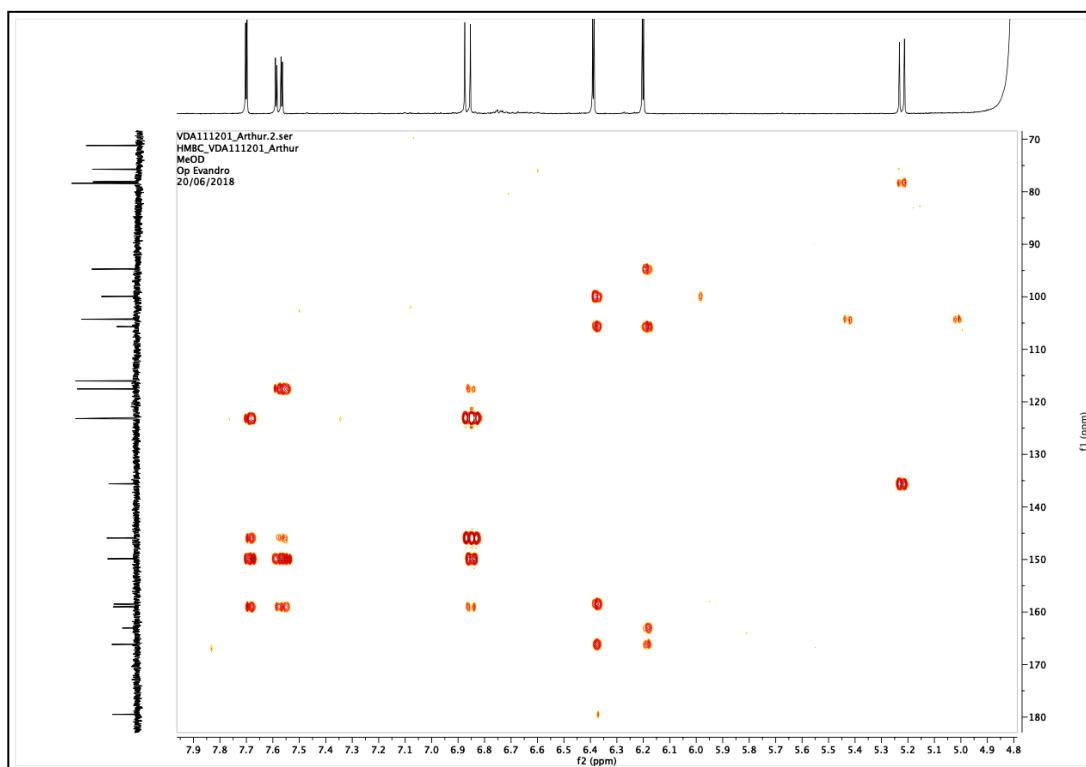




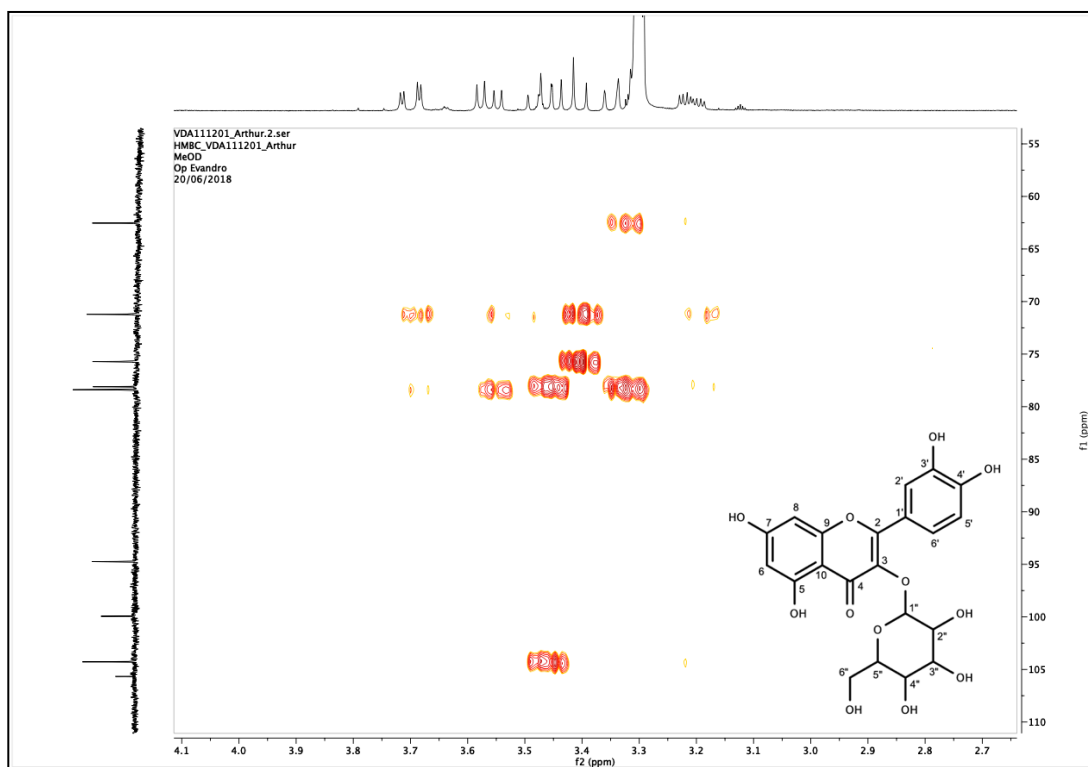
**Figura 24 - Mapa de contorno de  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  HMBC ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 e 100 MHz) da substância VD-4.**



**Figura 25 - Expansão do espectro de HMBC (400 e 100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) do composto VD-4 na região de 7,95 – 4,80 e 70 – 180 ppm.**



**Figura 26 - Expansão do espectro de HMBC (400 e 100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) do composto VD-4 na região de 2,60 – 4,10 e 55 – 110 ppm.**



### 5.2.5. Identificação estrutural de VD-5

O composto VD-5 foi isolado como cristais amarelos com massa de 2 mg. No espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) (Figuras 27-29, p. 92), foi possível observar dois dupletos, cada um integrando para dois hidrogênios, característicos de um anel B de um flavonoide com um sistema AA'BB'. Estes sinais foram  $\delta_H$  8,11 (2H, d,  $J = 8,8$  Hz) atribuído aos hidrogênios H-2' e H-6' e  $\delta_H$  6,91 (2H, d,  $J = 8,8$  Hz) atribuído aos hidrogênios H-3' e H-5'. Além disso foi possível observar no mesmo espectro, dois dupletos, um em  $\delta_H$  6,30 (1H, d,  $J = 2$  Hz) e outro em  $\delta_H$  6,59 (1H, d,  $J = 2$  Hz), os quais foram atribuídos aos prótons H-6 e H-8 do anel A do possível flavonoide, típico de acoplamento *meta*. Não foi atribuído nenhum sinal característico de hidrogênio H-3, sugerindo que houvesse uma substituição no carbono C-3, no anel C deste flavonoide. Um simpleto em  $\delta_H$  3,87 (3H), foi atribuído aos hidrogênios de uma metoxila, corroborando com os dados observados no espectro de RMN de <sup>13</sup>C. Sendo assim, haveria então três possibilidades de inserção desta metoxila, no C-3, no C-4' ou ainda no C-8.

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  APT (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) (Figura 30, p. 93), foram observados 5 sinais, os quais foram atribuídos a 7 carbonos, sendo eles 6 carbonos metínicos (-CH) e 1 carbono metoxilico (-OCH<sub>3</sub>).

A inserção da metoxila foi indicada pelo espectro de HMBC (Figuras 31-33, p. 94), onde foi possível observar a correlação entre os sinais dos hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  3,87 com o sinal do carbono  $\delta_{\text{C}}$  167,16, deslocamento que também teve correlação com os sinais dos hidrogênios  $\delta_{\text{H}}$  6,30 (H-6) e  $\delta_{\text{H}}$  6,59 (H-8), indicando então que o sinal em  $\delta_{\text{C}}$  167,16 seria do carbono C-7, onde a metoxila estaria inserida. Sendo assim, as posições C-5 ( $\delta_{\text{C}}$  162,34), C-3 (sinal não identificado) e C-4' ( $\delta_{\text{C}}$  177,76) estariam hidroxiladas. Os outros sinais dos carbonos que não apareceram no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , foram atribuídos de acordo com as correlações observadas no mapa de contorno do espectro de HMBC (Figura 34, p. 95).

Após a análise dos dados espectrais de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e comparação com os dados da literatura (Tabela 10), foi possível identificar a substância VD-5 como sendo 3,4',5-trihidroxi-7-metoxiflavona, ou rhamnocitrina (BODAKHE et al., 2012), isolada pela primeira vez na espécie *Varronia dardani*.

**Tabela 10 - Dados de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  (400 e 100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de VD-5, rhamnocitrina, em comparação aos dados obtidos por BODAKHE et al. (2012) (300 e 75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).**

C	VD-5		Rhamnocitrin	
	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
2	-	148,70	-	146,97
3	-	nd*	-	136,73
4	-	nd*	-	177,33
5	-	162,34	-	162,19
6	6,30 (1H, d, $J = 2$ Hz)	98,59	6,23 (1H, d, $J = 1,5$ Hz)	98,58

**Tabela 10** – (Continuação).

<b>7</b>	-	<b>167,16</b>	-	<b>167,07</b>
<b>8</b>	6,59 (1H, d, $J = 2$ Hz)	92,74	6,49 (1H, d, $J = 1,5$ Hz)	92,73
<b>9</b>	-	158,30	-	158,15
<b>10</b>	-	105,51	-	105,46
<b>1'</b>	-	123,77	-	123,65
<b>2'</b>	8,11 (2H, d, $J = 8,8$ Hz)	130,79	8,07 (2H, d, $J = 7,8$ Hz)	130,75
<b>3'</b>	6,91 (2H, d, $J = 8,8$ Hz)	116,35	6,87 (2H, dd, $J = 7,8$ Hz)	116,39
<b>4'</b>	-	160,78	-	160,83
<b>5'</b>	6,91 (2H, d, $J = 8,8$ Hz)	116,35	6,87 (2H, dd, $J = 7,8$ Hz)	116,39
<b>6'</b>	8,11 (2H, d, $J = 8,8$ Hz)	130,79	8,07 (2H, d, $J = 7,8$ Hz)	130,75
<b>7-OCH<sub>3</sub></b>	3,87 (3H, sl)	56,45	3,83 (3H, s)	56,47

nd\* - não detectado

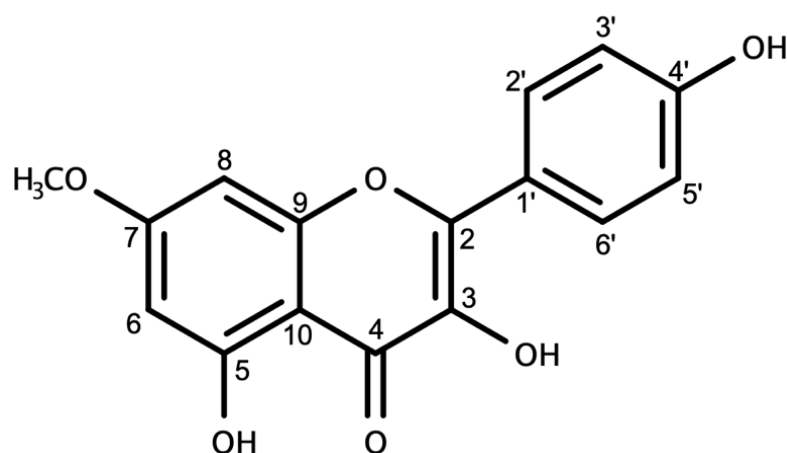
**Ramnocitrina (VD-6)**

Figura 27 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da substância VD-5.

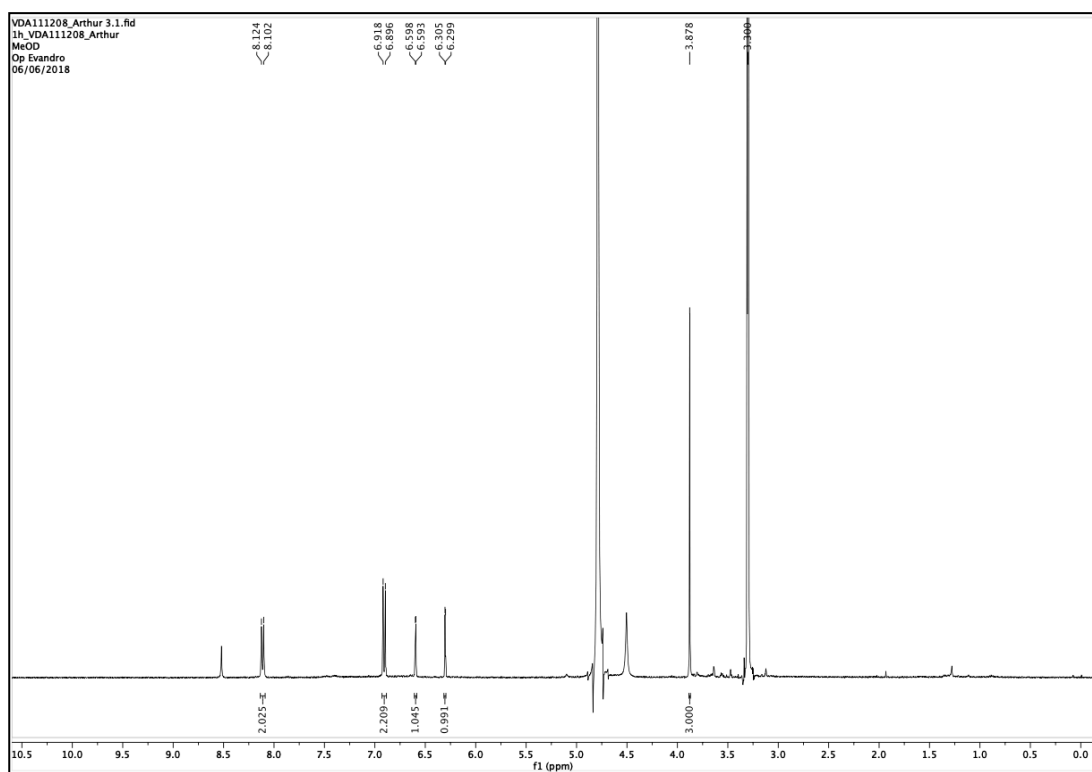
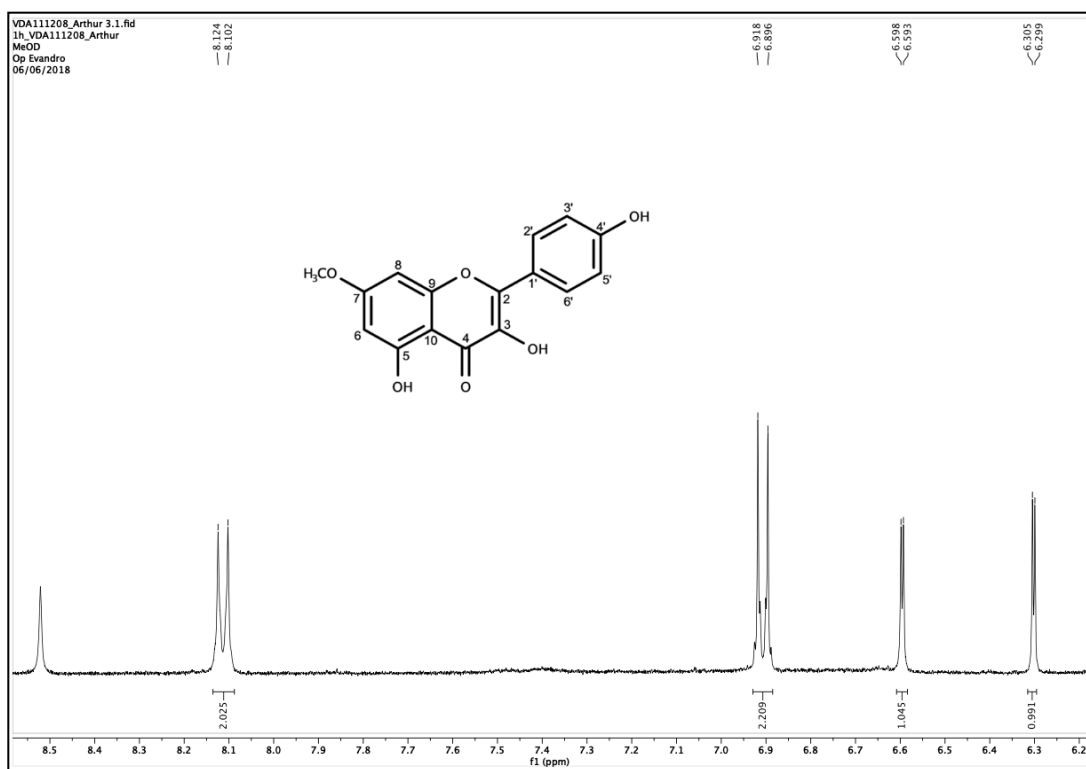
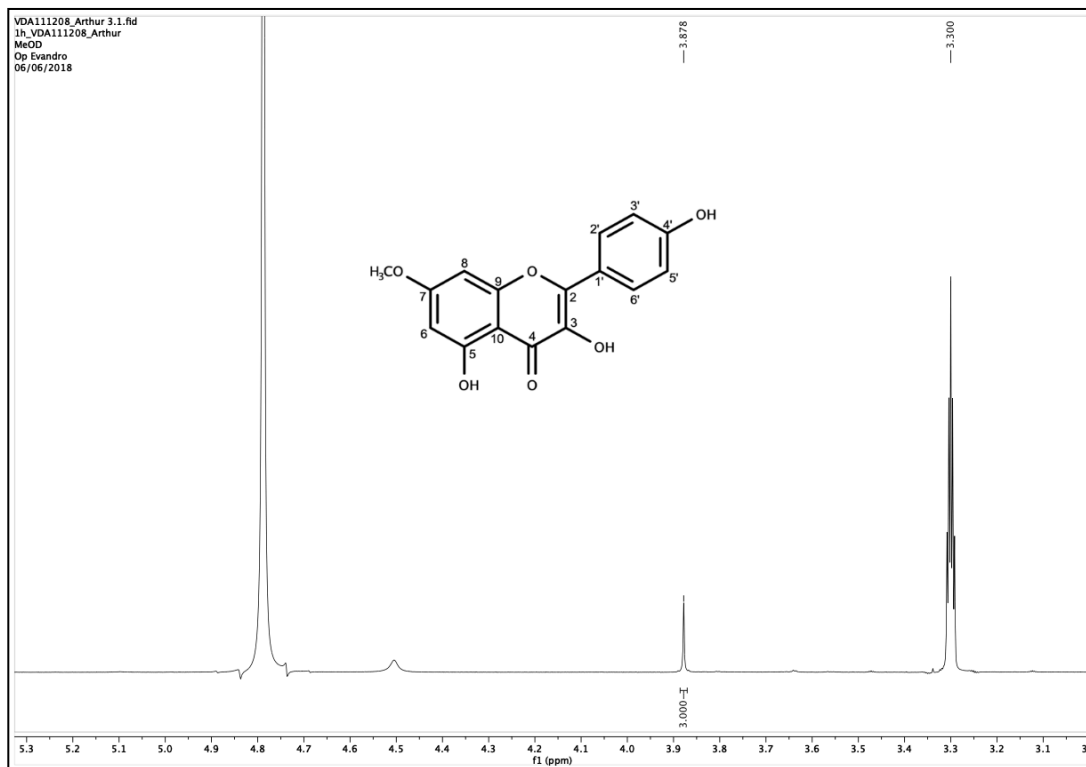


Figura 28 - Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de VD-5 na região de 6,2 – 8,6 ppm.



**Figura 29 - Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de VD-5 na região de 3,0 – 5,3 ppm.**



**Figura 30 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da substância VD-5.**

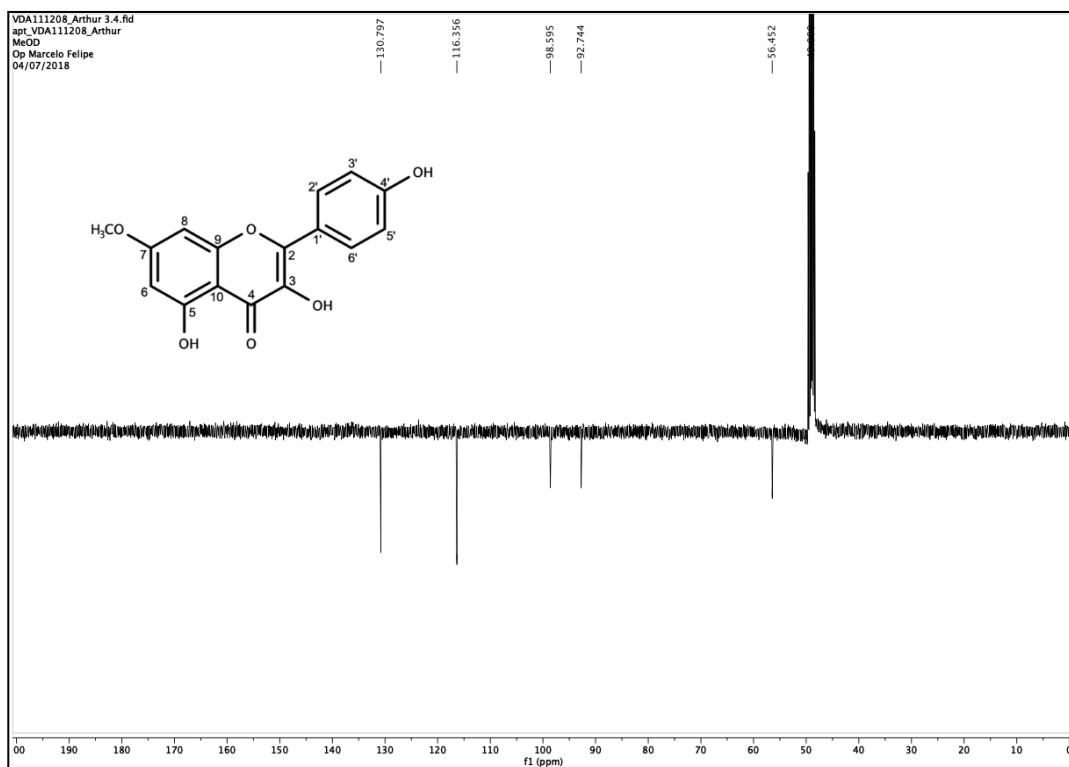


Figura 31 - Mapa de contorno de  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  HMBC ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 e 100 MHz) da substância VD-5.

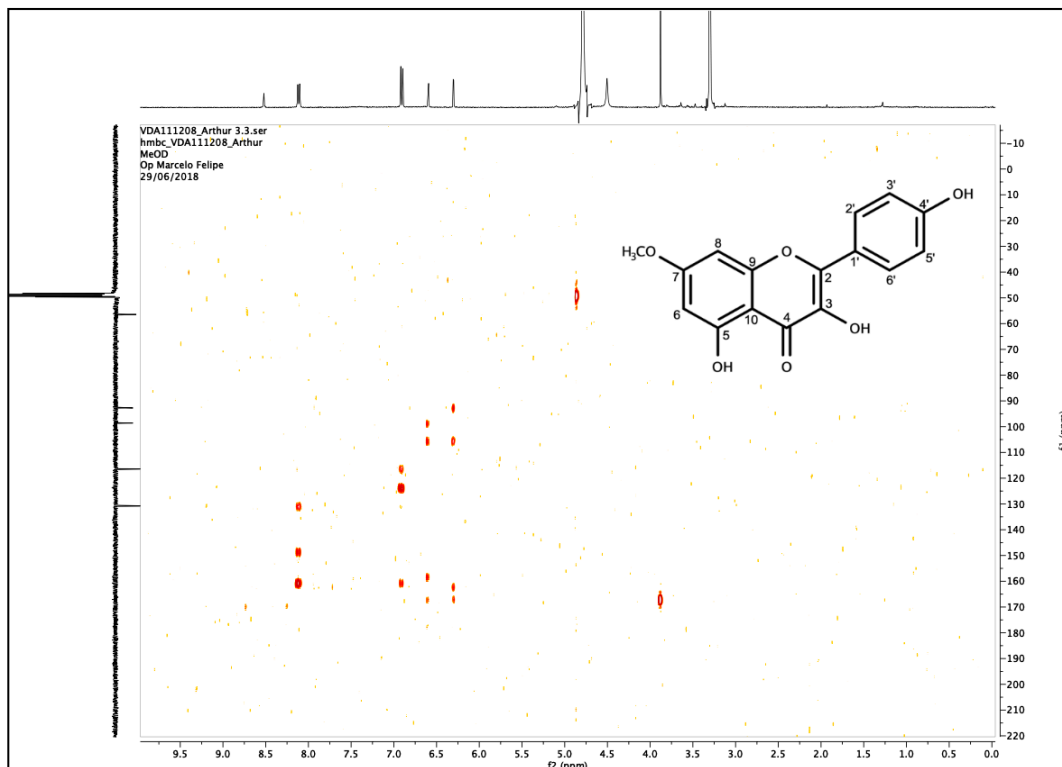
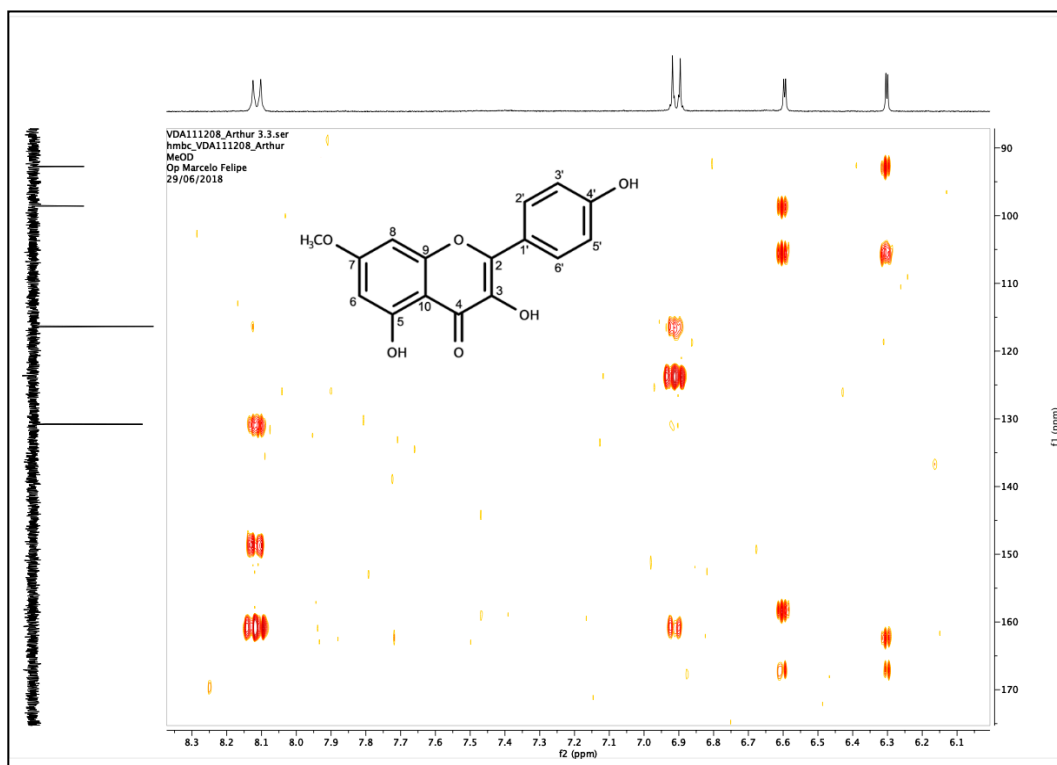
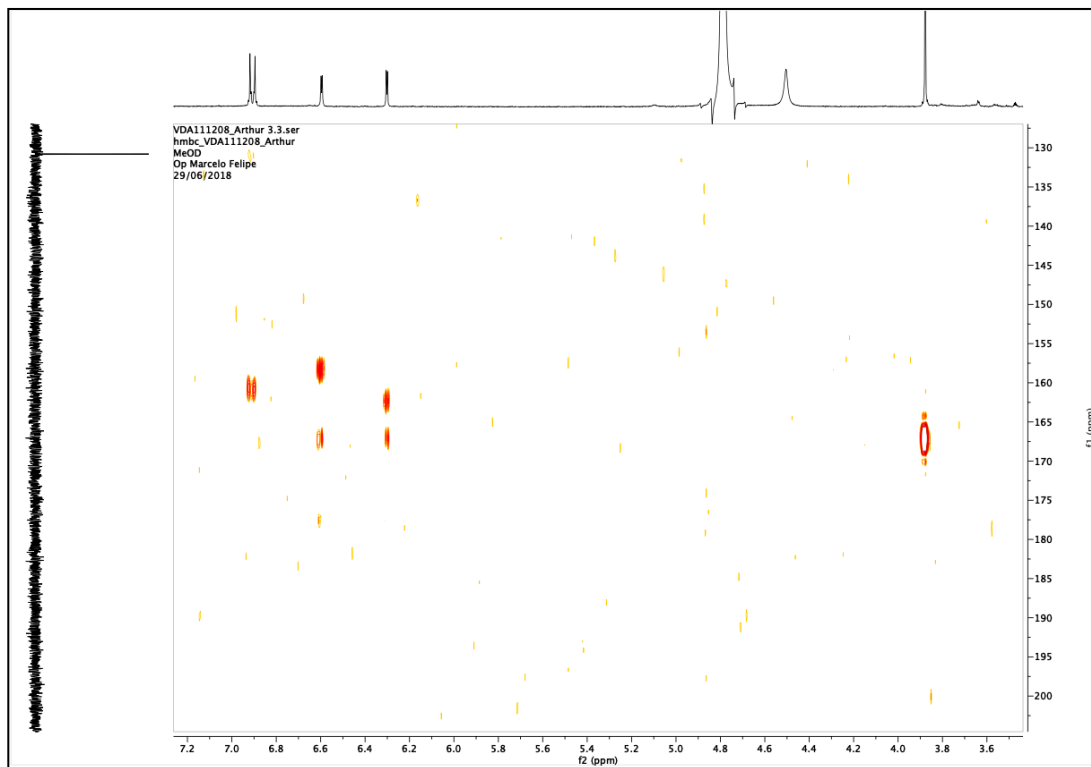


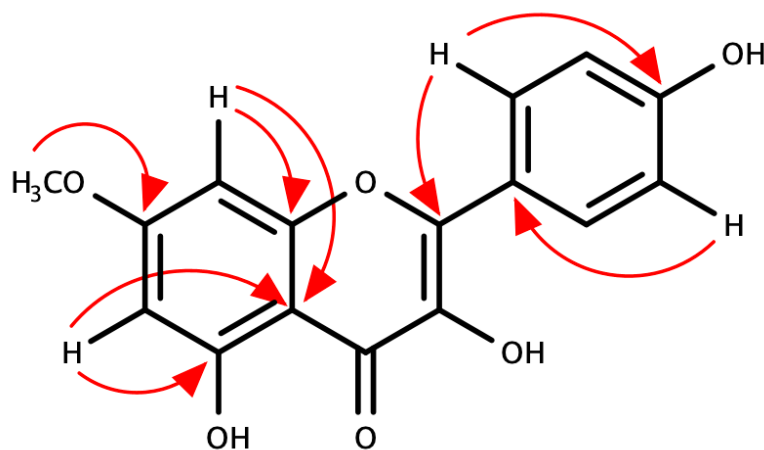
Figura 32 - Expansão do espectro de HMBC (400 e 100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da substância VD-5 na região de 8,35 – 6,0 e 90 – 175 ppm.



**Figura 33 - Expansão do espectro de HMBC (400 e 100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) da substância VD-5 na região de 7,20 – 3,50 e 130 – 210 ppm.**



**Figura 34 - Principais correlações observadas no espectro de HMBC da substância VD-5.**



### 5.2.6. Identificação estrutural de VD-6

O composto VD-6 foi isolado como um sólido amorfo marrom com massa de 3 mg. No espectro de RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) (Figuras 35-37, p. 98),



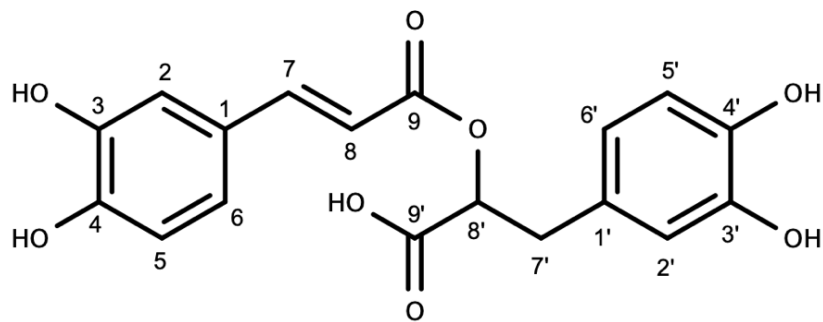
observaram-se dois dupletos, um em  $\delta_H$  7,55 (d,  $J = 16$  Hz) e outro em  $\delta_H$  6,28 (d,  $J = 16$  Hz), os quais foram atribuídos aos prótons olefínicos H-7 e H-8, confirmando a configuração *trans* da ligação através do valor da constante de acoplamento ( $J = 16$  Hz). Os prótons metilênicos H-7'a e H-7'b foram sugeridos através dos duplos dupletos em  $\delta_H$  3,11 (dd,  $J = 14,5$  e  $4,5$  Hz) e 3,02 (dd,  $J = 14,5$  e  $8,5$  Hz), respectivamente. Os prótons dos dois sistemas aromáticos ABX, foram propostos a partir dos deslocamentos químicos em  $\delta_H$  6,77 (d,  $J = 2$  Hz), 6,71 (d,  $J = 8$  Hz), 6,63 (dd,  $J = 2$  e  $8$  Hz), 7,06 (d,  $J = 2$  Hz), 6,79 (d,  $J = 8,5$  Hz) e 6,97 (1H, dd,  $J = 2$  e  $8,5$  Hz), os quais foram respectivamente atribuídos aos hidrogênios H-2', H-5', H-6', H-2, H-5 e H-6.

No espectro de RMN de  $^{13}C$  APT (125 MHz,  $CD_3OD$ ) (Figuras 38-40, p. 100), foram observados 18 sinais, os quais foram atribuídos a 18 carbonos, sendo oito a carbonos não hidrogenados (C), nove a carbonos metínicos (CH) e um a carbono metilênico ( $CH_2$ ). Os deslocamentos em  $\delta_C$  173,87 e  $\delta_C$  168,50 foram indicativos dos carbonos carbonílicos C-9' (carbono de carboxila) e C-9 (carbono de carbonila) respectivamente. Os carbonos aromáticos ligados às hidroxilas fenólicas, C-3', C-4', C-3 e C-4, foram sugeridos através dos sinais em  $\delta_C$  146,15; 145,25; 146,81 e 149,71, respectivamente. Já os carbonos aromáticos não-substituídos C-2', C-5', C-6', C-2, C-5 e C-6 foram indicados pelos deslocamentos químicos em  $\delta_C$  117,55; 116,27; 121,78; 115,19; 116,29; 123,12, respectivamente. Ainda foram observados os sinais em  $\delta_C$  147,60 e 114,54, os quais corresponderam aos carbonos olefínicos C-7 e C-8, respectivamente. Os sinais em  $\delta_C$  38,02 e 74,91 foram atribuídos aos carbonos C-7' e C-8', respectivamente. Os demais sinais estão compilados na Tabela 11 (p. 96).

Após comparação dos dados de RMN de  $^1H$  e de  $^{13}C$  de VD-6 com os dados descritos na literatura (ELSBAEY et al., 2022), foi possível definir que VD-6 se tratava do ácido rosmarínico, isolado pela primeira vez na espécie *Varronia dardani*.

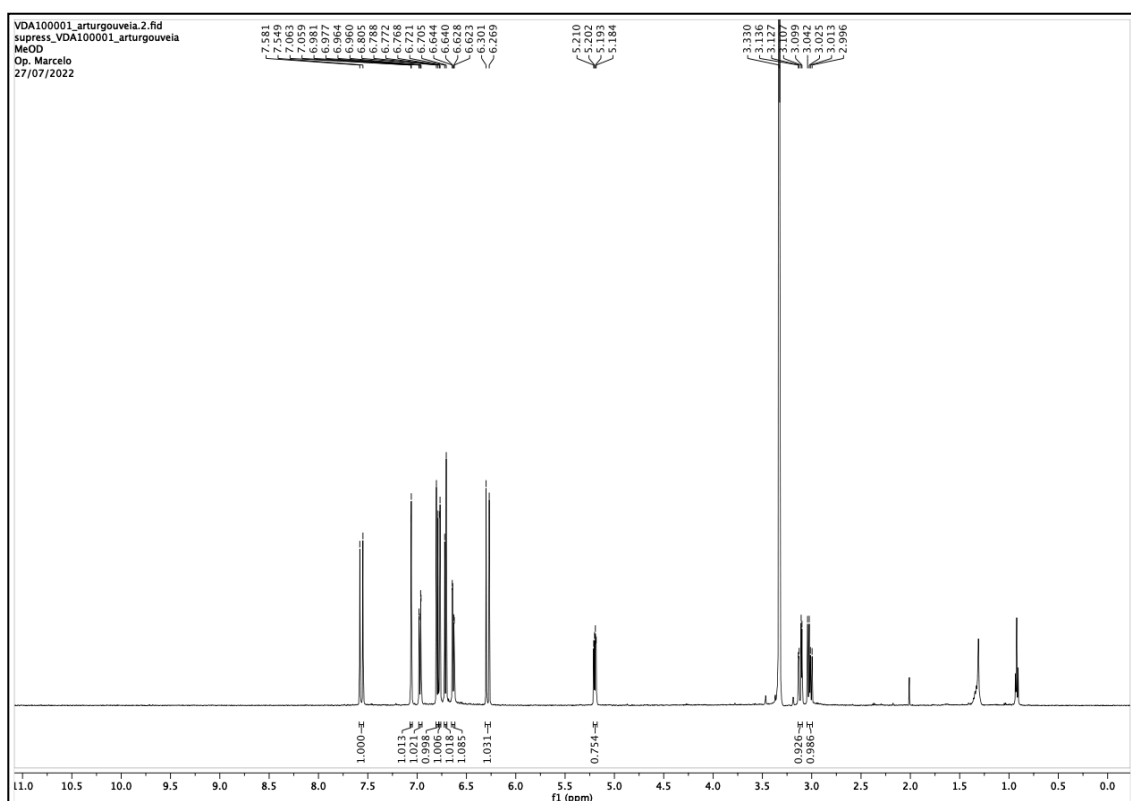
**Tabela 11 - Dados de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  (500 e 125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de VD-6, ácido rosmarínico em comparação aos dados obtidos por ELSBAEY et al. (2022).**

C	VD-6		Ácido rosmarínico	
	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
1	-	127,70	-	127,7
2	7,06 (1H, d, $J = 2$ Hz)	115,19	7,04 (1H, sl)	115,2
3	-	146,81	-	146,8
4	-	149,71	-	149,7
5	6,79 (1H, d, $J = 8,5$ Hz)	116,29	6,78 (1H, d, $J = 8$ Hz)	116,5
6	6,97 (1H, dd, $J = 2$ e $8,5$ Hz)	123,12	6,95 (1H, dd, $J = 8$ Hz)	123,1
7	7,55 (1H, d, $J = 16$ Hz)	147,60	7,54 (1H, d, $J = 16$ Hz)	147,5
8	6,28 (1H, d, $J = 16$ Hz)	114,54	6,26 (1H, d, $J = 16$ Hz)	114,6
9	-	168,50	-	168,5
1'	-	129,46	-	129,5
2'	6,77 (1H, d, $J = 2$ Hz)	117,55	6,75 (sl)	117,6
3'	-	146,15	-	146,1
4'	-	145,25	-	145,2
5'	6,71 (1H, d, $J = 8$ Hz)	116,27	6,69 (1H, d, $J = 8$ Hz)	116,3
6'	6,63 (1H, dd, $J = 2$ e $8$ Hz)	121,78	6,62 (1H, dd, $J = 8$ Hz)	121,8
7'	3,11 (1H, dd, $J = 14,5$ e $4,5$ Hz) 3,02 (1H, dd, $J = 14,5$ e $8,5$ Hz)	38,02	3,10 (1H, dd) 3,00 (1H, dd) 5,12 (1H, dd)	38,1
8'	5,19 (1H, dd, $J = 4$ e $8,5$ Hz)	74,91	-	74,6
9'	-	173,87	-	168,5

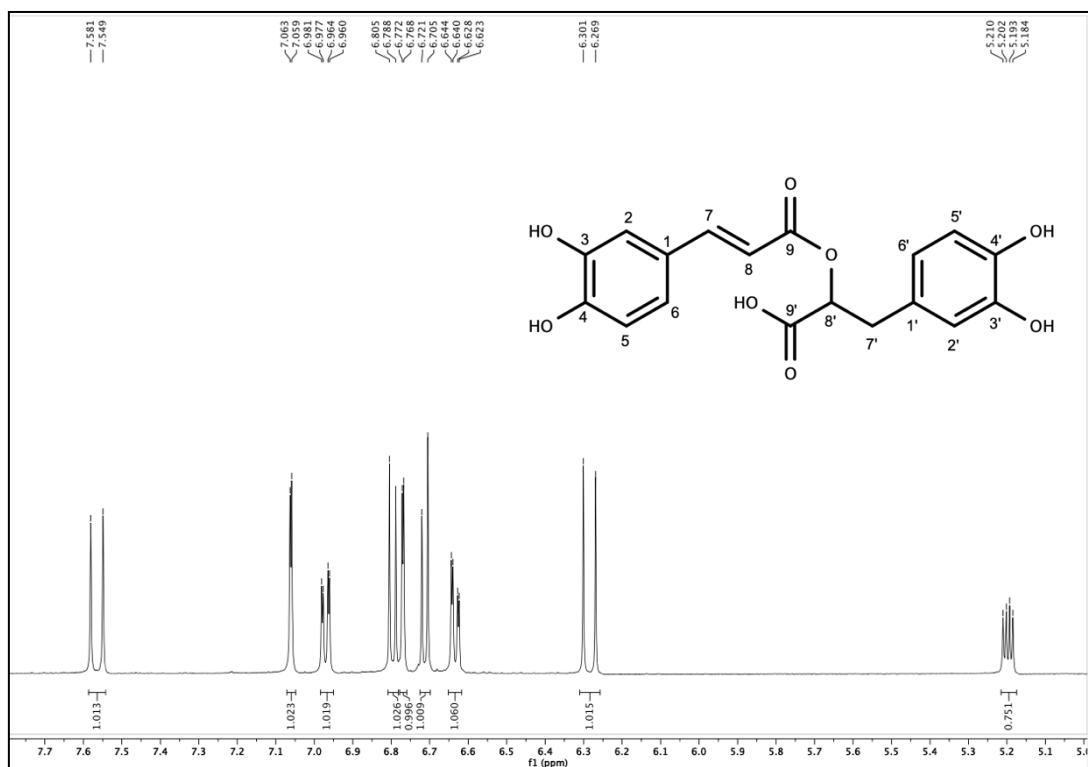


Ácido rosmarínico (VD-6)

Figura 35 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da substância VD-6.



**Figura 36 - Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de VD-6 na região de 5,0 – 7,8 ppm.**



**Figura 37 - Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de VD-6 na região de 2,5 – 4,0 ppm.**

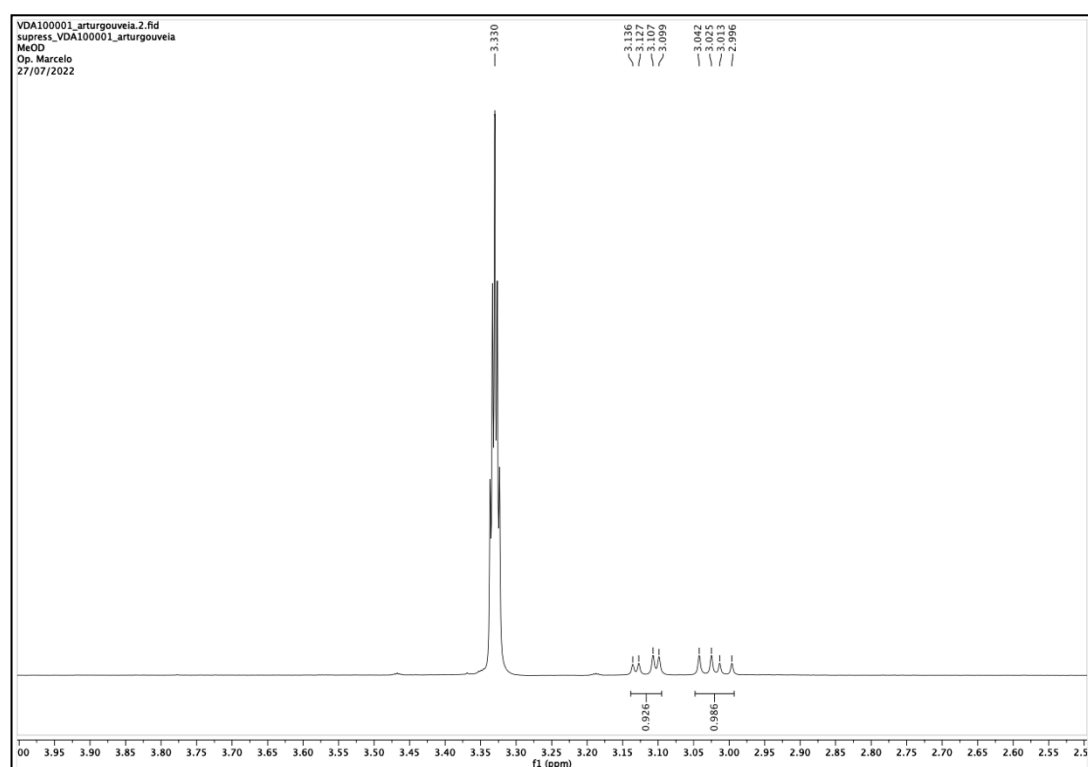


Figura 38 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da substância VD-6.

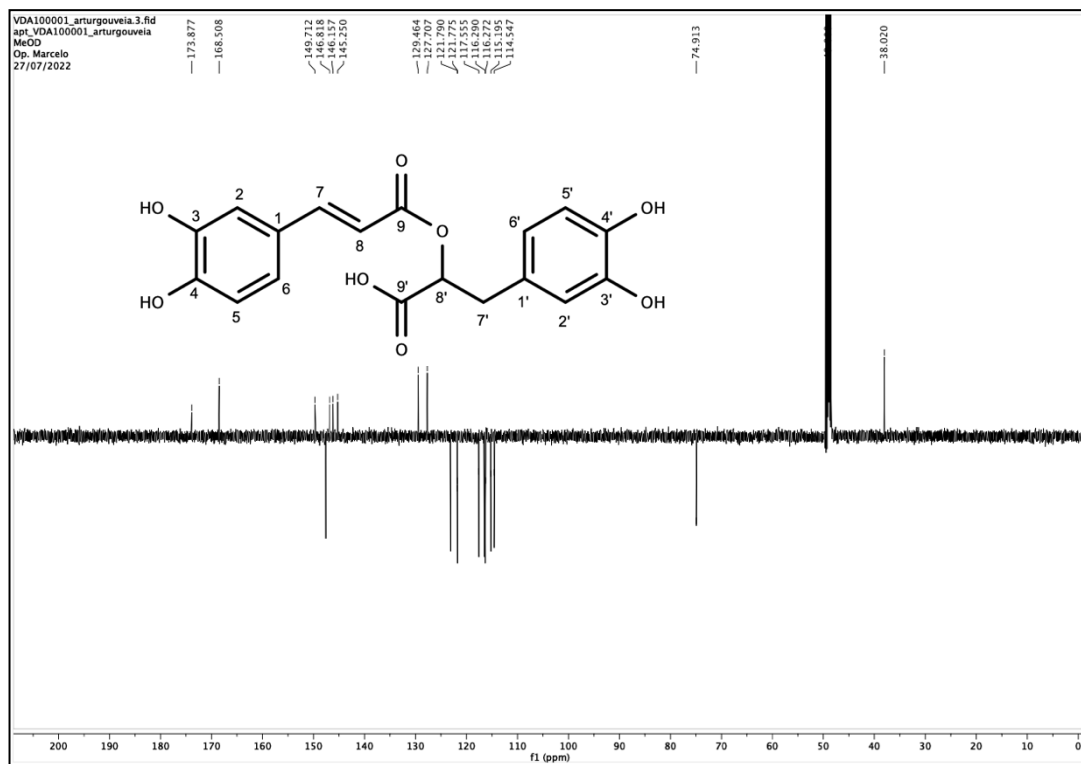
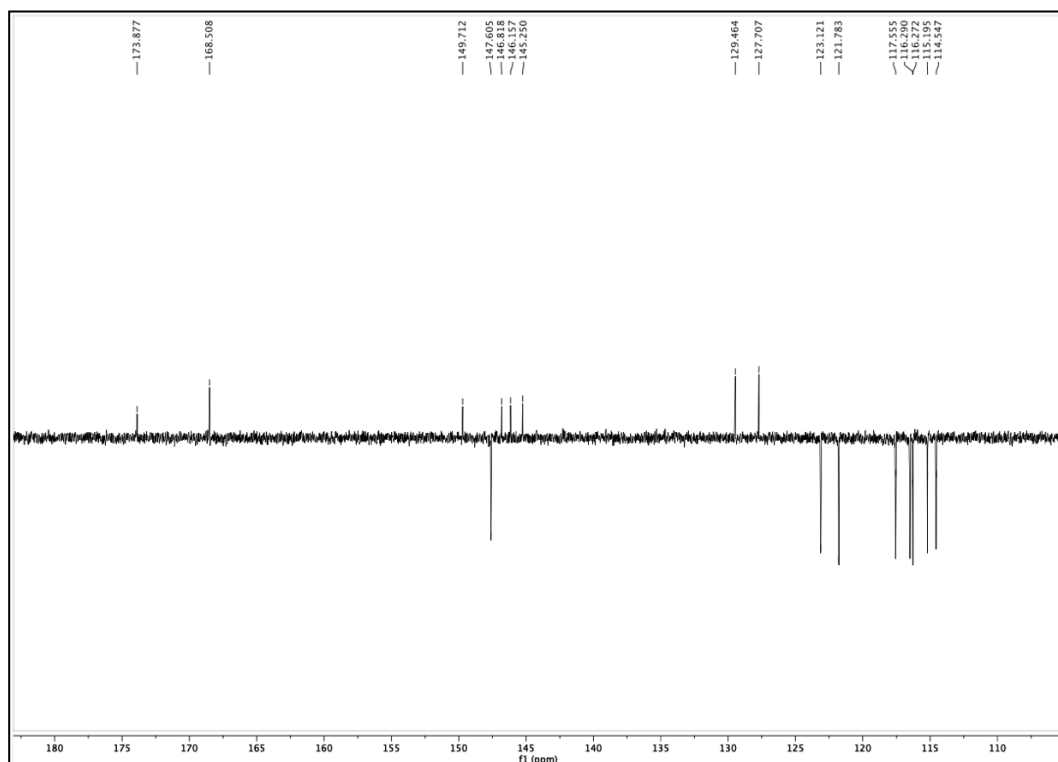
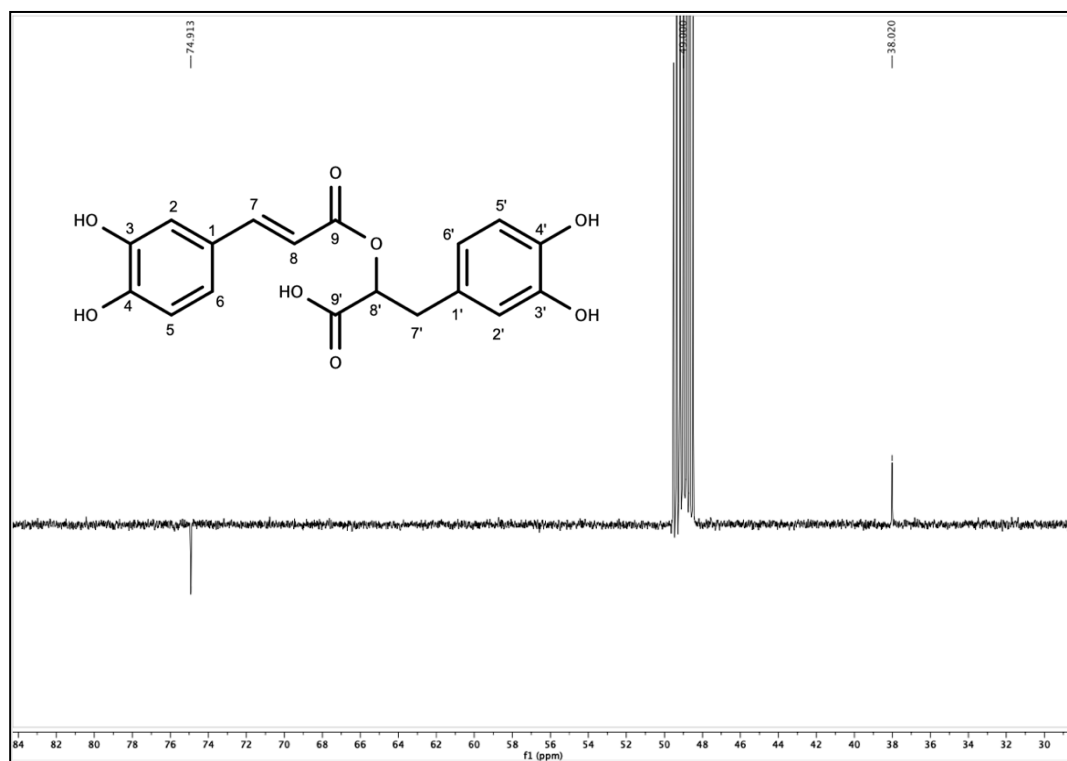


Figura 39 - Expansão do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de VD-6 na região de 100 – 185 ppm.



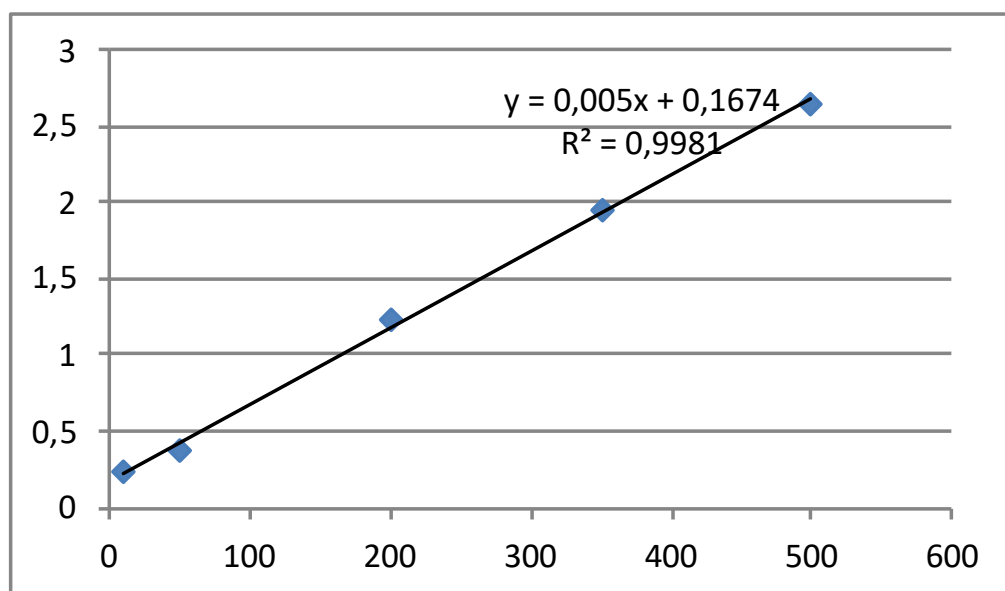
**Figura 40 - Expansão do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de VD-6 na região de 28 – 84 ppm.**



### 5.2.7. Teor de compostos fenólicos do Extrato Etanólico Bruto de *Varronia dardani* (EEB-VD)

Utilizando o método do Folin-Ciocalteu, foi possível construir a equação de regressão linear e o  $R^2$  do padrão, ácido gálico (10; 50; 200; 350; 500 e 650  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), encontram-se no Gráfico 1 abaixo. Esta foi feita para posterior interpolação dos dados e para calcularmos o teor de fenóis em mg EAG/g de amostra na concentração de 450  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Tabela 12 e Gráfico 1, p. 101).

**Gráfico 1 - Curva padrão da quantificação de fenólicos totais empregando ácido gálico como substância de referência. Absorbância = 765 nm.**



**Tabela 12 - Teor de fenólicos totais em mg EAG/g de amostra por dia (n = 3) na concentração de 450  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .**

Amostra	Teor de Fenólicos (mg EAG/g)		
	1º dia	2º dia	3º dia
<b>EEB-VD</b>	114,92 $\pm$ 1,4	117,12 $\pm$ 3,4	116,12 $\pm$ 0,5

Diante dos dados apresentados, foi possível observar que o EEB-VD apresentou um teor de compostos fenólicos de 116,05  $\pm$  1,1 mg EAG/g).

Outros trabalhos realizaram a determinação de fenólicos totais em espécies da família Cordiaceae, como foi o caso da *Cordia speciosa*, com 167,61 mg EAG/g (HIKMAWANTI et al., 2020) e *C. myxa*, com 5,76  $\pm$  0.23 mg EAG/g (ABDEL-ALEEM et al., 2019).

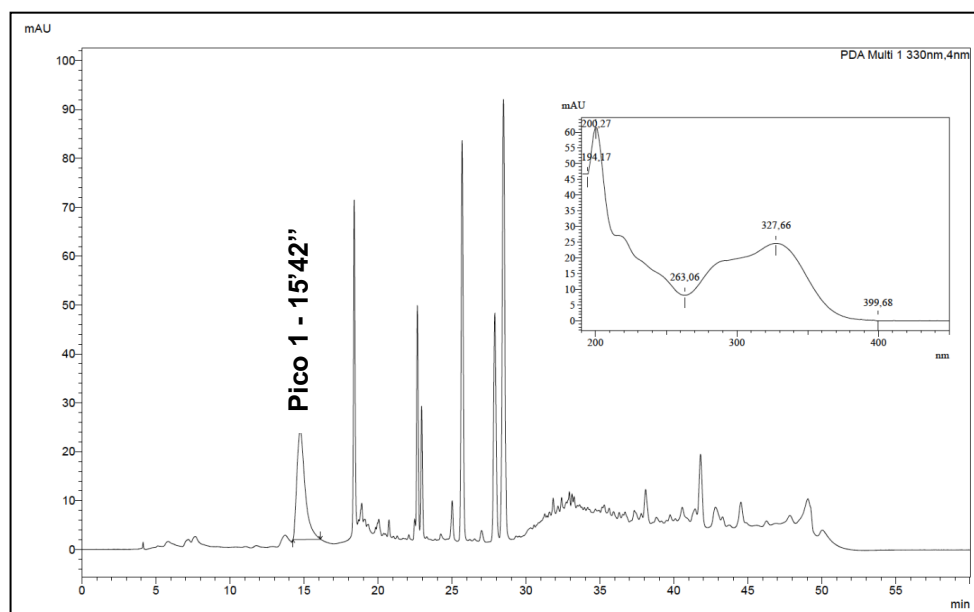
É considerada muito importante a determinação do teor de fenólicos totais, visto que estes compostos podem exibir atividade antioxidante, e as pesquisas envolvendo antioxidantes como agentes terapêuticos a fim de evitar danos causados por radicais livres no corpo humano têm sido realizadas há anos (KUPINA et al., 2019).

Os compostos fenólicos estão relacionados, em diversos estudos, com a elevada atividade citotóxica frente à diversas linhagens de células neoplásicas, efeito atribuído principalmente à sua forte atividade antioxidante e à ativação da morte de células apoptóticas (KOZYRA et al., 2019; ŽITEK et al., 2020; KYRIAKOU et al., 2021). Pesquisas evidenciam também a correlação entre o elevado teor de compostos fenólicos com o efeito antidiarreico, espasmolítico, broncodilatador, vasodilatador, fornecendo a base farmacológica para a etnofarmacologia de diversas espécies (KHAN, KHAN & SHAH, 2018; IMTIAZ et al., 2019).

### 5.2.8. Quantificação do ácido rosmarínico no extrato etanólico bruto de *Varronia dardani* (EEB-VD)

A partir da análise cromatográfica em CLAE, foi possível observar o perfil cromatográfico do EEB-VD (Figura 41), e identificar a presença do ácido rosmarínico a partir do seu padrão. Escolheu-se o ácido rosmarínico, pois este é considerado um dos marcadores quimiotaxonômico da família Cordiaceae (GANOS et al., 2020; GRAIKOU et al., 2021; GUAN et al., 2022).

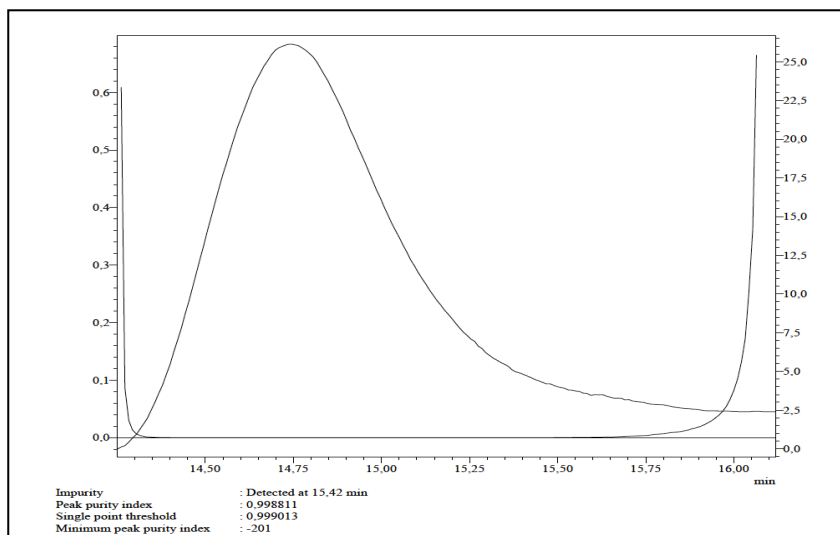
**Figura 41 - Cromatograma do EEB-VD e identificação por UV do pico referente ao ácido rosmarínico em 15'42''.**





Observou-se no cromatograma do EEB-VD (Figura 41, p. 103) o pico com tempo de retenção em 15'42'', o qual foi denominado como "Pico 1" e revelou um índice de pureza de 0,998 (Figura 42).

**Figura 42 - Curva de pureza do ácido rosmarínico presente no EEB-VD.**



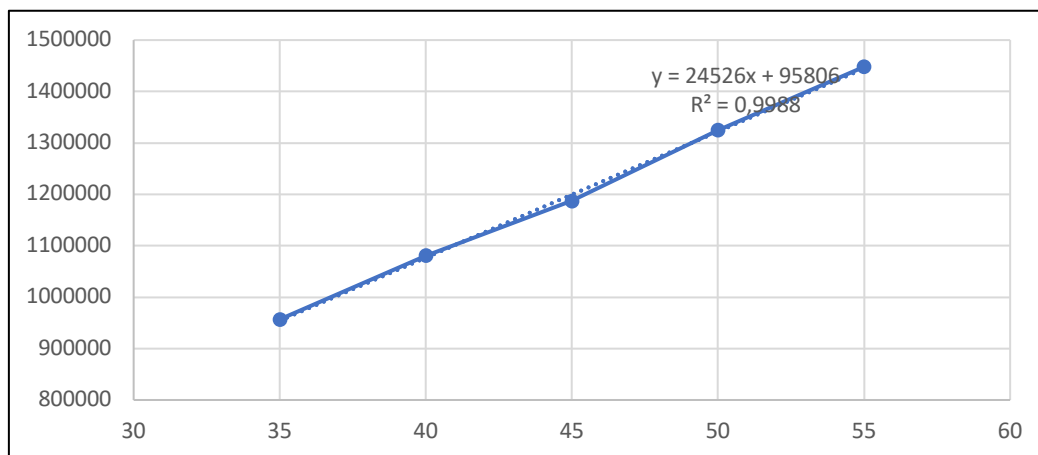
Todas a injeções foram feitas em triplicatas, e a partir dos dados obtidos nesses cromatogramas, foram feitas as médias das áreas do pico referente ao ácido rosmarínico, como descrito na Tabela 13.

**Tabela 13 - Concentrações utilizadas e média das áreas obtidas nos cromatogramas**

Concentrações	Áreas (média)
35 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	956780
40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	1080730
45 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	1187295
50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	1256452
55 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	1470298

A curva de calibração do padrão ácido rosmarínico forneceu uma equação da reta:  $y = 24526x + 95806$ , e um  $R^2 = 0,9988$  (Gráfico 2, p. 105). A partir dos destes dados foi possível quantificar o AR existente no extrato testado.

**Gráfico 2 - Curva de calibração do padrão ácido rosmarínico.**



Após a análise dos dados obtidos é possível então observar que para cada 2 mg de EEB de *Varronia dardani* a quantidade de ácido rosmarínico é  $43,0815 \pm 2,4174 \mu\text{g}$ .

Assim sendo, até aqui foi confirmado que a espécie *V. dardani* é rica em compostos polifenólicos, e que isso poderia justificar a sua utilização pela população como adjuvante principalmente no alívio de cólicas menstruais e distúrbios gastrointestinais. Para isso, foi realizada uma triagem para avaliar a sua atividade espasmolítica em diversos órgãos, cujo resultado será descrito no item a seguir.

## 5.2.9. Avaliação da atividade espasmolítica

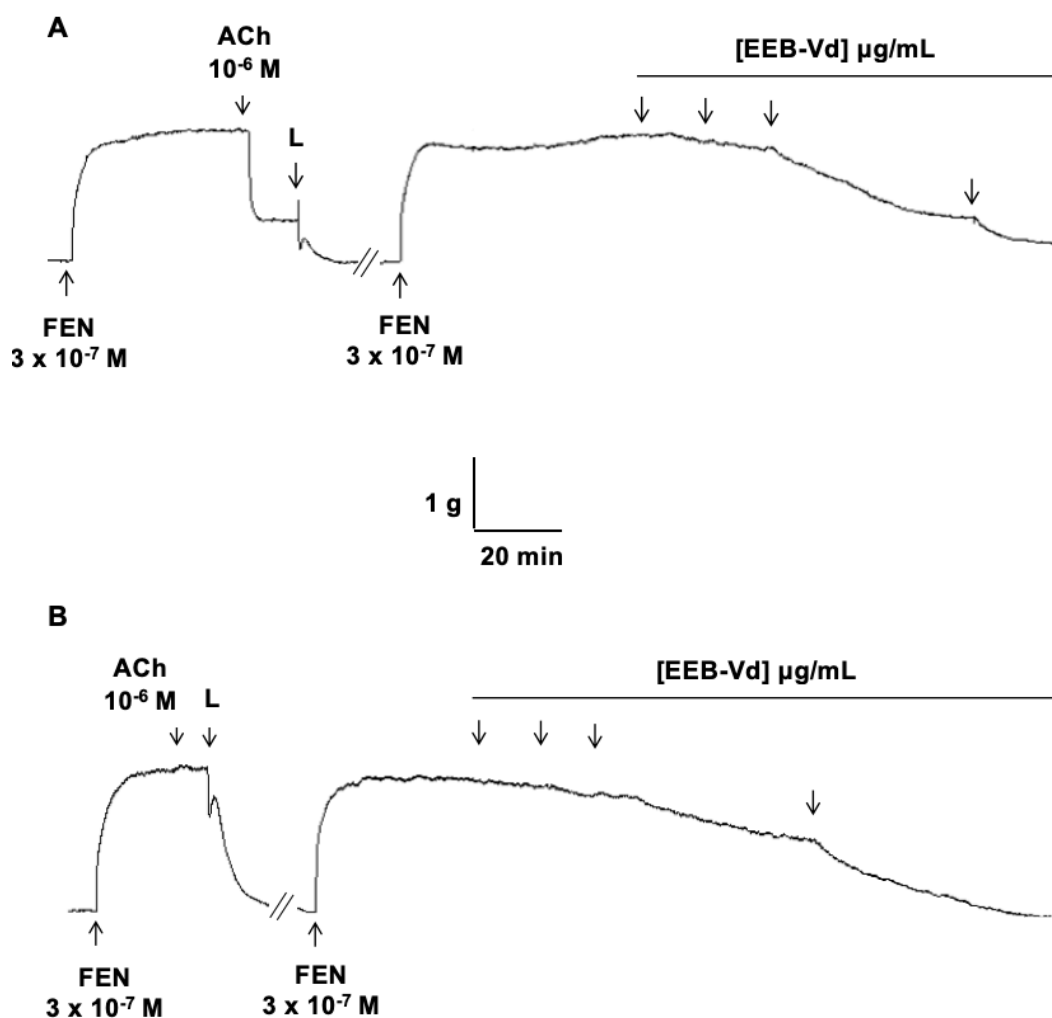
### 5.2.9.1. Efeito do EEB-VD sobre as contrações tônicas induzidas por FEN em aorta isolada de rato

O EEB-VD (27; 81; 243 e 729  $\mu\text{g/mL}$ ,  $n = 5$ ) relaxou de maneira equipotente a aorta de rato pré-contraída com  $3 \times 10^{-7}$  M de FEN tanto na presença ( $E_{\text{max}} = 75,4 \pm 3,5\%$ ,  $CE_{50} = 238,0 \pm 4,7 \mu\text{g/mL}$ ) quanto na ausência ( $E_{\text{max}} = 94,4 \pm 7,8\%$ ,  $CE_{50} = 236,8 \pm 14,8 \mu\text{g/mL}$ ) de endotélio funcional (Figura 43, p. 106 e Gráfico 3, p. 107).

A responsividade da aorta à fenilefrina na presença e na ausência de endotélio funcional foi restaurada em  $61,2 \pm 9,7$  e  $52,7 \pm 7,1\%$ , respectivamente, em 2 horas após a retirada do EEB-VD da cuba.

O tempo médio para que o EEB-VD alcançasse o seu efeito relaxante máximo total era cerca de 2 horas, tanto na presença quanto na ausência de epitélio funcional.

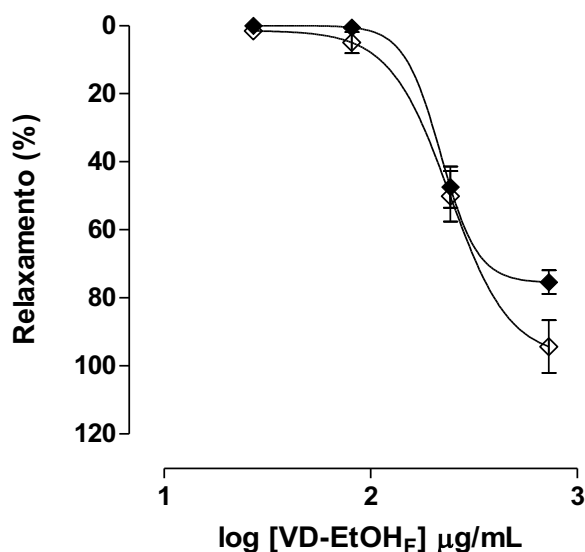
**Figura 43 - Registros originais representativos do efeito vasorrelaxante do EEB-VD em aorta isolada de rato pré-contraída com  $3 \times 10^{-7}$  M de FEN na presença (A) e na ausência (B) de endotélio funcional.**



As setas para baixo representam a adição cumulativa do EEB-VD nas concentrações de 27-729 µg/mL. FEN = fenilefrina, ACh = acetilcolina, L = lavagem.

Fonte: Autor, 2022.

**Gráfico 3** - Efeito vasorrelaxante do EEB-VD sobre as contrações tônicas induzidas por  $3 \times 10^{-7}$  M de FEN na presença (◆) e na ausência (◇) de endotélio funcional em aorta isolada de rato.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5).

Fonte: Autor, 2022.

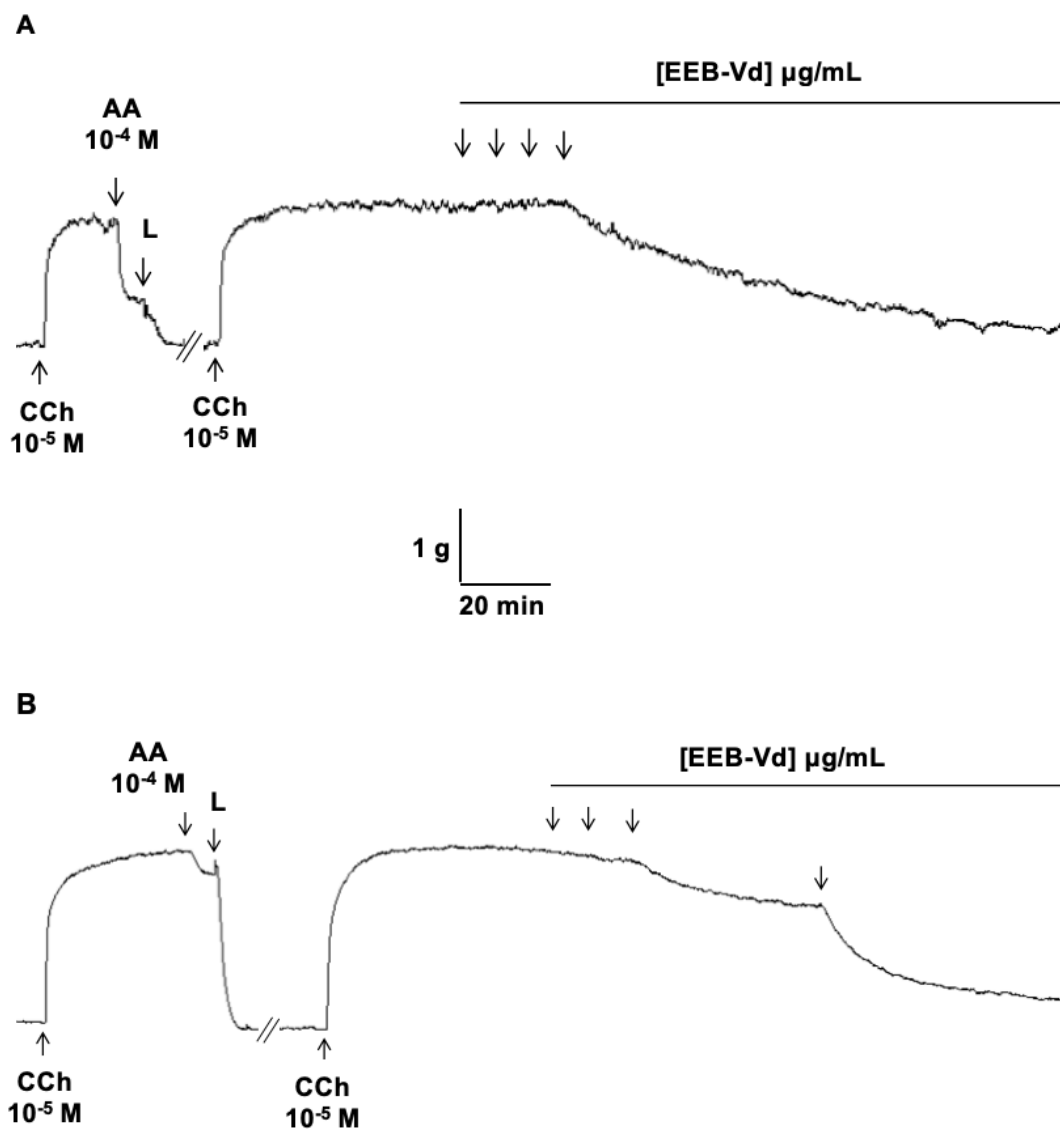
#### 5.2.9.2. Efeito do EEB-VD sobre as contrações tônicas induzidas por CCh em traqueia isolada de rato

O EEB-VD (27; 81; 243 e 729 µg/mL, n = 5) relaxou de maneira equipotente e dependente de concentração a traqueia de rato pré-contraída com  $10^{-5}$  M de CCh tanto na presença ( $E_{\max} = 65,3 \pm 7,3\%$ ,  $CE_{50} = 330,3 \pm 37,7$  µg/mL e  $R^2 = 0,9925 \pm 0,0059$ ) quanto na ausência ( $E_{\max} = 87,3 \pm 6,4\%$ ,  $CE_{50} = 280,5 \pm 12,7$  µg/mL e  $R^2 = 0,9896 \pm 0,0049$ ) de epitélio funcional (Figura 44, p. 108 e Gráfico 4, p. 109).

A responsividade da traqueia ao CCh na presença epitélio funcional, foi restaurada em  $60,5 \pm 5,5\%$ , em 2 horas após a retirada do EEB-VD da cuba.

O tempo médio para que o EEB-VD alcançasse o seu efeito relaxante máximo total era cerca de 3 horas, tanto na presença quanto na ausência de epitélio funcional.

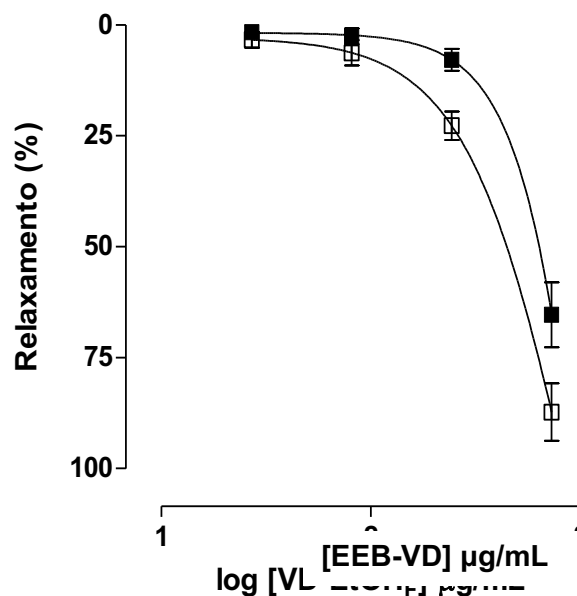
**Figura 44 - Registros originais representativos do efeito relaxante do EEB-VD em traqueia isolada de rato pré-contráida com  $10^{-5}$  M de CCh na presença (A) e na ausência (B) de epitélio funcional.**



As setas para baixo representam a adição cumulativa do EEB-VD nas concentrações de 27-729  $\mu\text{g/mL}$ . CCh = carbacol, AA = ácido aráquidônico, L = lavagem.

**Fonte:** Autor, 2022.

**Gráfico 4** - Efeito relaxante do EEB-VD sobre as contrações tônicas induzidas por  $10^{-5}$  M de CCh na presença (■) e na ausência (□) de epitélio funcional em traqueia isolada de rato.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5).

Fonte: Autor, 2019.

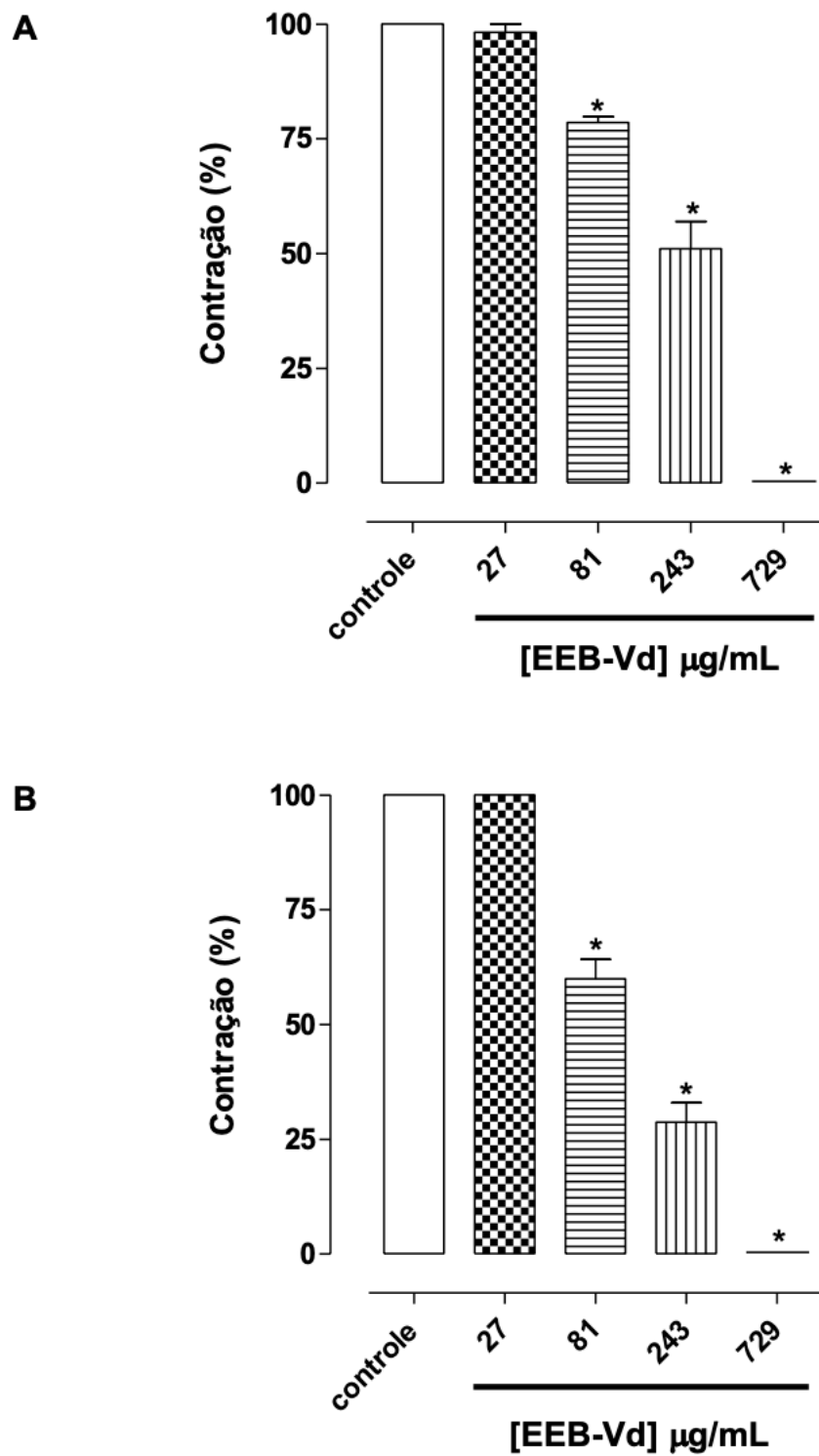
### 5.2.9.3. Efeito espasmolítico do EEB-VD em íleo isolado de cobaia

#### 5.2.9.3.1. Efeito do EEB-VD frente às contrações fásicas induzidas por histamina ou por CCh

O EEB-VD (27; 81; 243 e 729 µg/mL, n = 5) antagonizou de maneira dependente de concentração as contrações fásicas induzidas tanto por  $10^{-6}$  M de histamina ( $E_{max} = 100\%$ ,  $CI_{50} = 222,6 \pm 26,9$  µg/mL e  $R^2 = 0,9660 \pm 0,0083$ ) como de CCh ( $E_{max} = 100\%$ ,  $CI_{50} = 123,1 \pm 15,4$  µg/mL e  $R^2 = 0,9739 \pm 0,0033$ ), sendo cerca de 2 vezes mais potente em inibir as contrações fásicas induzidas pelo CCh (Gráfico 5, p. 111).

A responsividade do íleo à histamina e ao CCh foi restaurada em  $33,8 \pm 3,8$  e  $35,0 \pm 5,0$  minutos após a retirada do EEB-VD da cuba.

Gráfico 5 - Efeito do EEB-VD frente às contrações fásicas induzidas por  $10^{-6}$  M de histamina (A) ou de CCh (B) em íleo isolado de cobaia.



As colunas e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5). \* $p < 0,05$  (Controle vs EEB-VD).

Fonte: Autor, 2022.

### 5.2.9.3.2. Efeito do EEB-VD sobre as contrações tônicas induzidas por KCl, por histamina ou por CCh

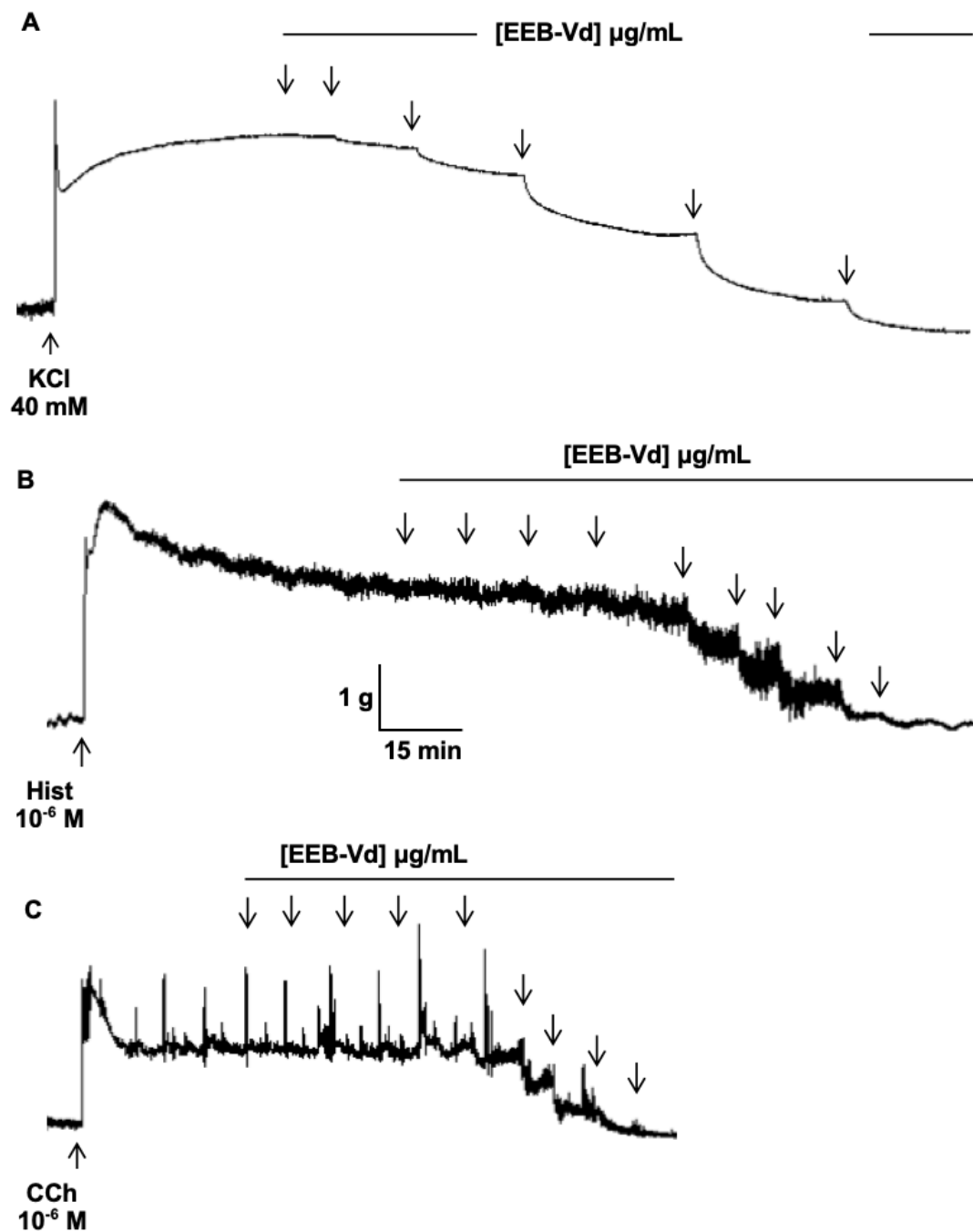
O EEB-VD (0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 9; 27; 81; 243 e 729  $\mu\text{g/mL}$ ,  $n = 5$ ) também relaxou de maneira equipotente e dependente de concentração o íleo de cobaia pré-contraído com 40 mM de KCl ( $E_{\text{max}} = 108,0 \pm 2,0\%$ ,  $CE_{50} = 30,3 \pm 2,2 \mu\text{g/mL}$  e  $R^2 = 0,9943 \pm 0,0024$ ), com  $10^{-6}$  M de histamina ( $E_{\text{max}} = 113,7 \pm 4,1\%$ ,  $CE_{50} = 32,7 \pm 5,8 \mu\text{g/mL}$  e  $R^2 = 0,9850 \pm 0,0017$ ) ou com  $10^{-6}$  M de CCh ( $E_{\text{max}} = 119,1 \pm 7,1\%$ ,  $CE_{50} = 49,0 \pm 5,5 \mu\text{g/mL}$  e  $R^2 = 0,9785 \pm 0,0171$ ) (Figura 45, p. 112 e Gráfico 6, p. 113).

A responsividade do íleo ao KCl, histamina e CCh foi restaurada em  $49,0 \pm 9,2$ ,  $51,3 \pm 8,3$  e  $35,0 \pm 5,0\%$ , respectivamente, em 2 horas após a retirada do VD-EtOH<sub>F</sub> da cuba.

O tempo médio para que o EEB-VD alcançasse o seu efeito relaxante máximo total era cerca de 2 horas para o KCl e histamina e de 1 hora para o CCh.



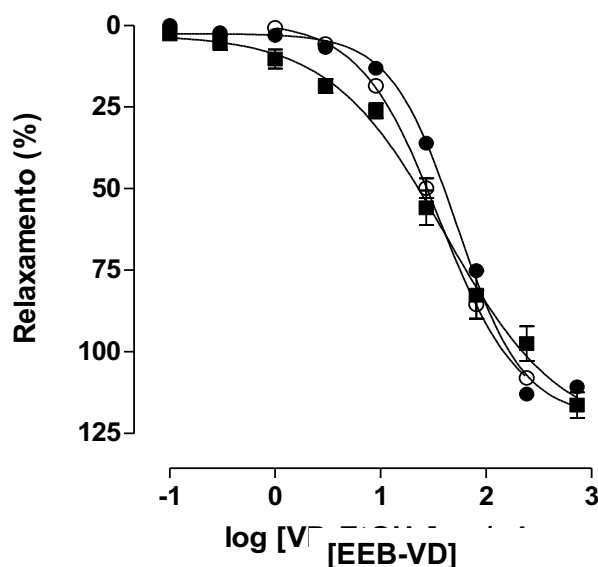
**Figura 45 - Registros originais representativos do efeito do EEB-VD sobre as contrações tônicas induzidas por KCl (A), por histamina (B) e por CCh (C) em fêlo isolado de cobraia.**



As setas para baixo representam a adição cumulativa do EEB-VD nas concentrações de 1-243 µg/mL (A), 0,1-729 µg/mL (B e C). KCl = cloreto de potássio, Hist = histamina, CCh = carbacol, L = lavagem.

Fonte: Autor, 2022.

**Gráfico 6 - Efeito do EEB-VD sobre as contrações tônicas induzidas por 40 mM de KCl (○), por 10<sup>-6</sup> M de histamina (▼) e por 10<sup>-6</sup> M de CCh (▲) em íleo isolado de cobaia.**



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5).

Fonte: Autor, 2022.

#### 5.2.9.4. Efeito espasmolítico do EEB-VD em útero isolado de rata

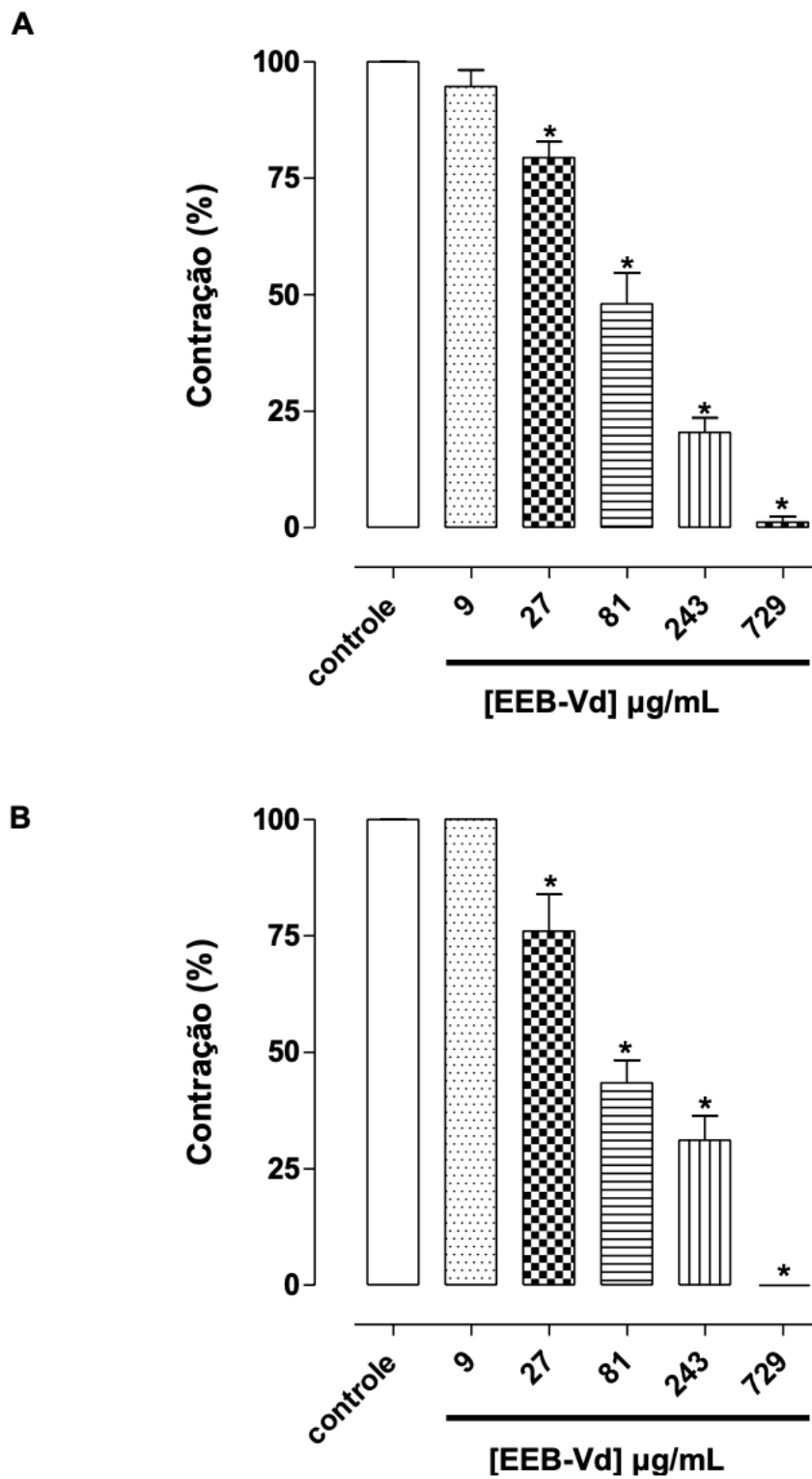
##### 5.2.9.4.1. Efeito do EEB-VD frente às contrações fásicas induzidas por ocitocina ou por CCh

O EEB-VD (9; 27; 81; 243 e 729  $\mu\text{g/mL}$ , n = 5) antagonizou de maneira equipotente e dependente de concentração as contrações fásicas induzidas tanto por 10<sup>-2</sup> UI/mL de ocitocina ( $E_{\text{max}} = 98,8 \pm 1,2\%$ ,  $CI_{50} = 82,2 \pm 14,4 \mu\text{g/mL}$  e  $R^2 = 0,9921 \pm 0,0023$ ), como por 10<sup>-5</sup> M de CCh ( $E_{\text{max}} = 100\%$ ,  $CI_{50} = 80,8 \pm 16,3 \mu\text{g/mL}$  e  $R^2 = 0,9358 \pm 0,0197$ ) (Gráfico 7, p. 115).

A responsividade do útero à ocitocina e ao CCh foi restaurada em  $97,5 \pm 14,4$  e  $40,0 \pm 5,0$  minutos, respectivamente, após a retirada do EEB-VD da cuba.

O tempo médio para que o EEB-VD alcançasse o seu efeito relaxante máximo total era cerca de 4 horas.

**Gráfico 7 - Efeito do EEB-VD frente às contrações fásicas induzidas por  $10^{-2}$  UI/mL de ocitocina (A) ou por  $10^{-5}$  M de CCh (B) em útero isolado de rata.**



As colunas e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5). \* $p < 0,05$  (Controle vs EEB-VD).

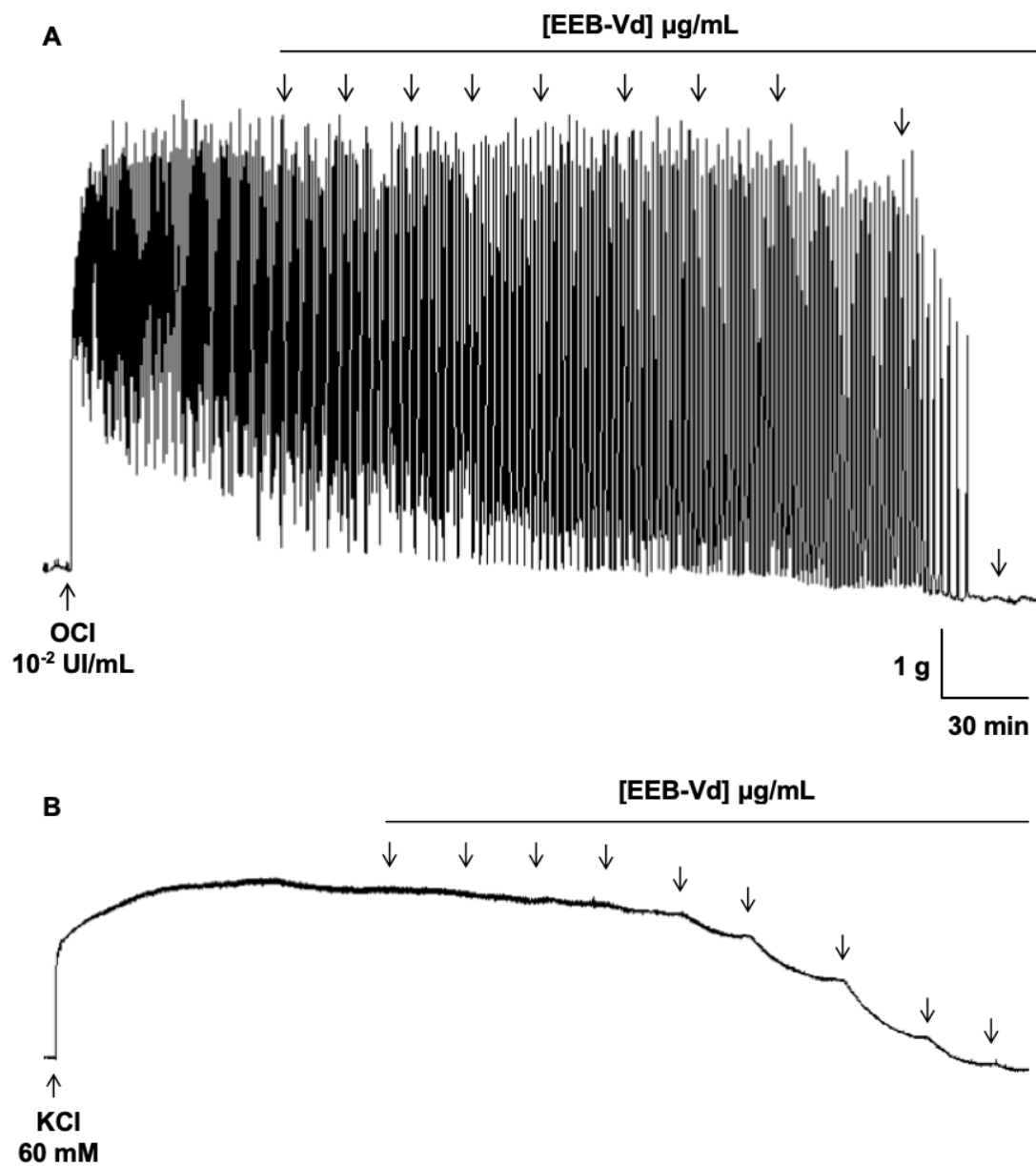
**Fonte:** Autor, 2022.

#### **5.2.9.4.2. Efeito tocolítico do EEB-VD sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina ou KCl em rata**

O EEB-VD (0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 9; 27; 81; 243 e 729  $\mu\text{g/mL}$ ) relaxou de maneira equipotente e dependente de concentração o útero de rata pré-contraído com  $10^{-2}$  UI/mL de ocitocina ( $E_{\text{max}} = 106,4 \pm 3,2\%$ ,  $CE_{50} = 33,3 \pm 0,6 \mu\text{g/mL}$  e  $R^2 = 0,9122 \pm 0,0366$ ) e com 60 mM de KCl ( $E_{\text{max}} = 101,3 \pm 1,9\%$ ,  $CE_{50} = 27,7 \pm 3,1 \mu\text{g/mL}$  e  $R^2 = 0,9914 \pm 0,0034$ ) (Figura 46, p. 116 e Gráfico 8, p. 117).

A responsividade do útero à ocitocina e ao KCl foi restaurada em  $96,0 \pm 1,0$  e  $36,4 \pm 6,9\%$ , respectivamente, em 2 horas após a retirada do EEB-VD da cuba.

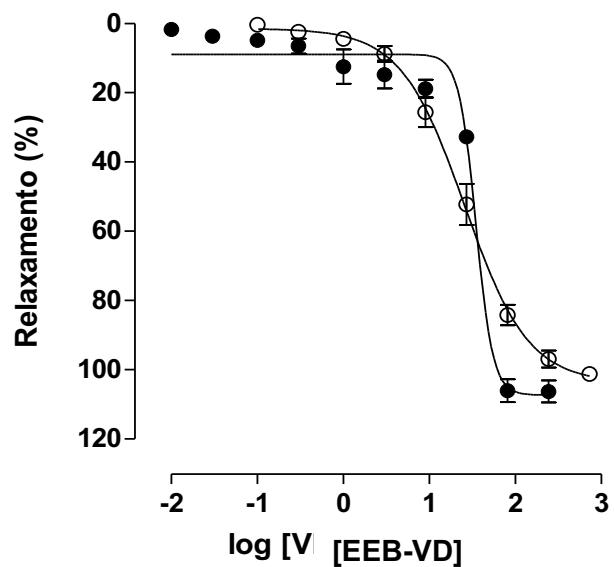
**Figura 46 - Registros originais representativos do efeito tocolítico do EEB-VD sobre as contrações tônicas induzidas por  $10^{-2}$  UI/mL de ocitocina (A) e por 60 mM de KCl (B) em ratas.**



As setas para baixo representam a adição cumulativa do EEB-VD nas concentrações de 0,01-243  $\mu\text{g/mL}$  (A), 0,1-729  $\mu\text{g/mL}$  (B). OCI = ocitocina, KCl = cloreto de potássio.

Fonte: Autor, 2022.

**Gráfico 8 - Efeito do EEB-VD sobre as contrações tônicas induzidas por  $10^{-2}$  UI/mL de ocitocina (●) e por 60 mM de KCl (○) em ratas.**



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5).

**Fonte:** Autor, 2022.

#### 5.2.10. Atividade antiproliferativa de extratos e frações de *Varronia* em células de melanoma humano

A estratégia geral foi a de selecionar extratos e frações das três espécies de *Varronia* com base na sua atividade antiproliferativa em células de melanoma A2058. As alterações morfológicas das células de melanoma tratadas com os diversos extratos e frações também foram avaliadas por observações microscópicas e comparadas com células de controle não tratadas.

Os extratos etanólicos das partes aéreas de *V. dardani* (VD-EEB) e de suas raízes (VD-R-EEB) induziram respectivamente  $84,52 \pm 4,58\%$  e  $86,13 \pm 5,37\%$  de inibição de crescimento e foram consideradas altamente antiproliferativos em células de melanoma quimiorresistentes (Tabela 14, p. 118). Em contrapartida, o extrato etanólico bruto das partes aéreas de *V. leucocephala* (VL-EEB) induziu uma atividade antiproliferativa baixa a moderada, com  $46,33 \pm 4,94\%$  de inibição de crescimento celular, embora uma atividade elevada induzida pela sua fração isopropanólica (VL-I) pudesse ser notada ( $87,09 \pm 1,51\%$  de inibição de crescimento).

A observação das células tratadas confirmou a citotoxicidade de VD-EEB e VD-R-EEB e citotoxicidade moderada de VG-EEB e VL-EEB (Figura 47, p. 120). Considerando a elevada atividade antiproliferativa demonstrada pelo VD-R-EEB e sua fração mais apolar (VD-R-I), foi selecionada esta última amostra para isolamento de compostos de com possível atividade antimelanoma.

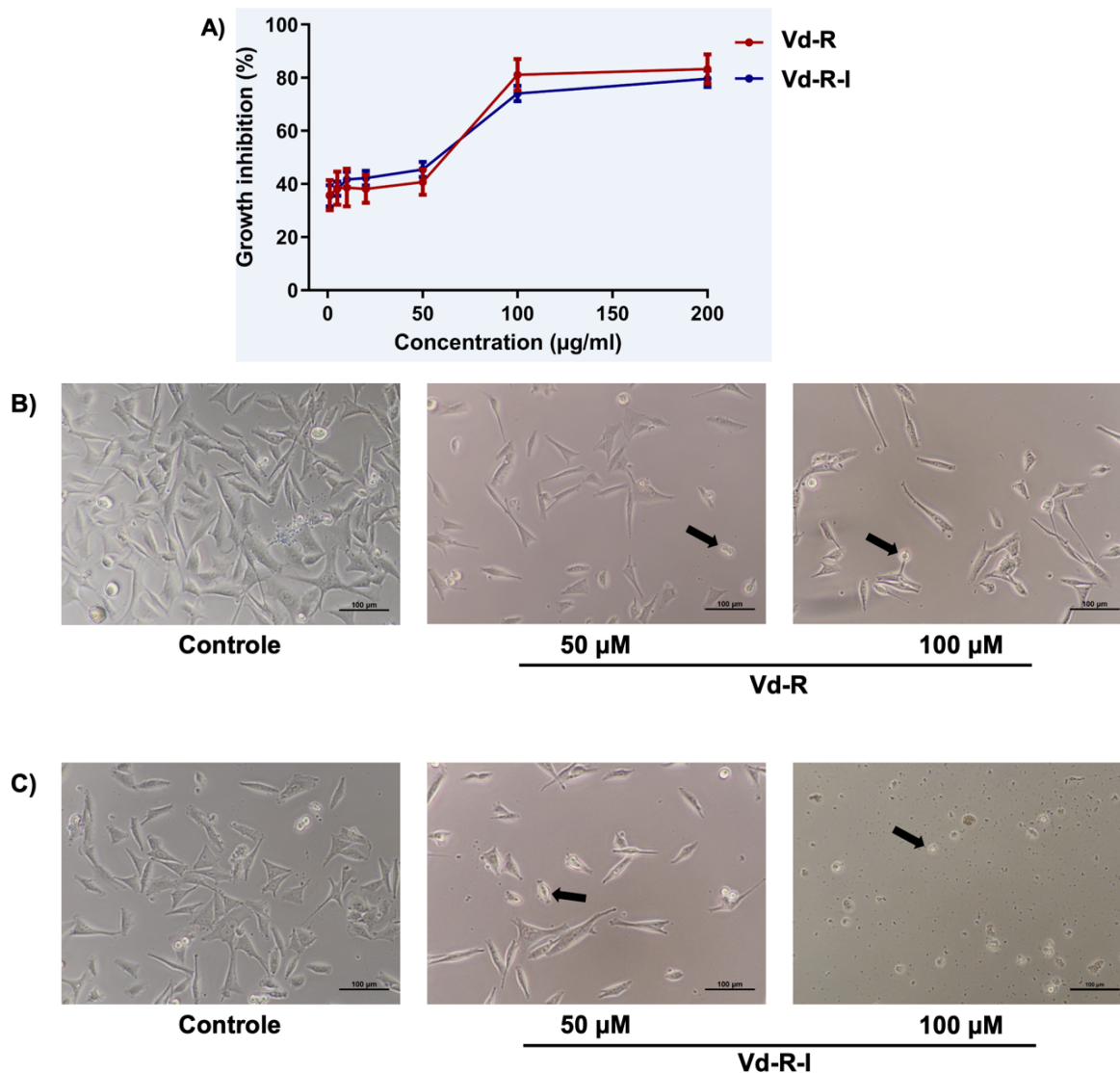
**Tabela 14 - Inibição de crescimento das células A2058 frente aos tratamentos dos extratos e frações das espécies de *Varronia* a 100  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  após 48h de tratamento.**

Extrato ou fração	Inibição de crescimento em 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ após 48h de tratamento
	(% controle $\pm$ DP, n=3)
<b>VD-EEB</b>	<b>84.52 <math>\pm</math> 4.58</b>
VD-EEB-Hex	65.21 $\pm$ 4.72
VD-EEB-DCM	31.47 $\pm$ 4.92
VD-EEB-Acet	51.73 $\pm$ 4.92
<b>VD-R-EEB</b>	<b>86.13 <math>\pm</math> 5.37</b>
<b>VD-R- I</b>	<b>78.18 <math>\pm</math> 3.17</b>
<b>VD-R- IM</b>	<b>70.94 <math>\pm</math> 3.91</b>
VD-R- M	0.88 $\pm$ 4.08
VD-R-A	4.79 $\pm$ 3.32
VL-EEB	46.33 $\pm$ 4.94
<b>VL-I</b>	<b>87.09 <math>\pm</math> 1.51</b>
VL-IM	20.71 $\pm$ 4.59
VL-M	77.76 $\pm$ 2.86
VL-A	69.81 $\pm$ 2.53

O extrato etanólico bruto das raízes de *V. dardani* (VD-R) e a fração isopropanólica do extrato etanólico bruto das raízes de *V. dardani* (VD-R-I) (1-100  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) reduziram o número de células A2058 viáveis de modo concentração dependente, quando comparado com o grupo controle, exibindo uma  $\text{CI}_{50}$  de 19,92  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  e 18,72  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , respectivamente (Figura 47, p. 120). As células não tratadas exibiram morfologia epitelial regular e tornaram-se sub-confluentes após 72h, indicando uma alta taxa de proliferação. Em contrapartida, tratamentos com Vd-R e Vd-R-I (50 e 100  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) provocaram redução da densidade celular, retração e arredondamento celular (setas pretas) (Figura 47, p. 120).



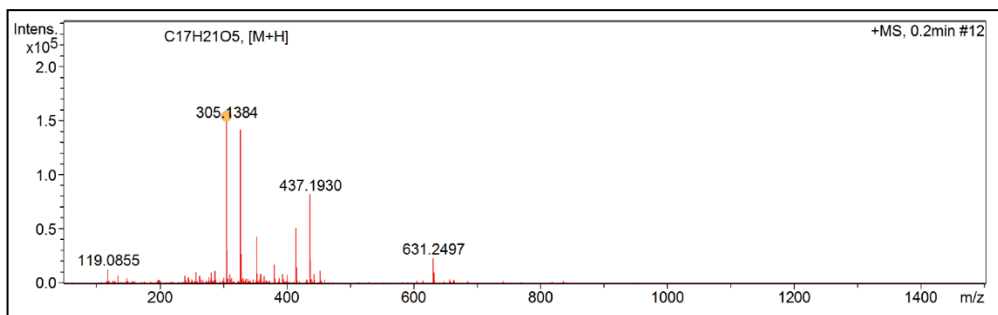
**Figura 47 - Inibição do crescimento das células A2058 após a exposição às concentrações crescentes (1-100  $\mu\text{M}$ , 72h) do extrato etanólico bruto das raízes de *V. dardani* (VD-R) e da fração isopropanólica do extrato etanólico bruto das raízes de *V. dardani* (VD-R-I) (A). Tratamentos com VD-R e VD-R-I provocaram redução na densidade celular, encolhimento das células e arredondamento (setas pretas) (B e C). Os resultados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão, os testes foram feitos em triplicata (n=3).**



### 5.2.11. Elucidação estrutural de VD-R-1

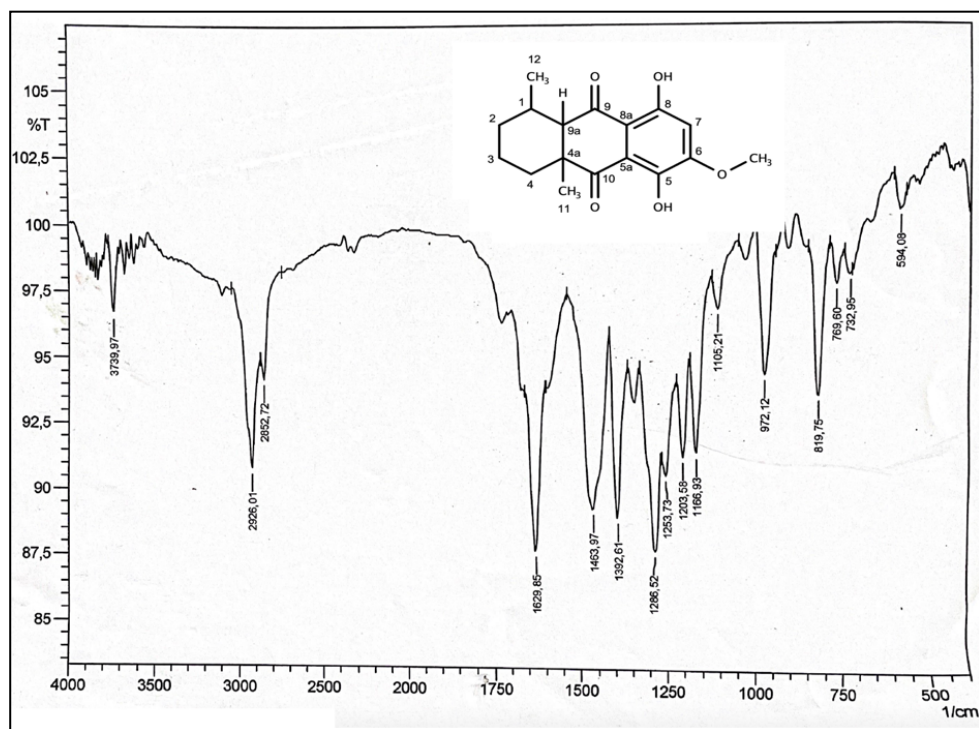
O composto VD-R-1, obtido como um sólido amarelo claro, foi analisado por HRIESEM e apresentou o pico do íon molecular em  $m/z$  305,1384  $[\text{M}+\text{H}]^+$  compatível com a fórmula molecular  $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{O}_5$  (calcd. 305,1384, erro = -0,1ppm) (Figura 48, p. 121).

**Figura 48 - Espectro de IES-EM do composto VD-R-1.**



O espectro de infravermelho (Figura 49) mostrou absorção de uma banda em  $3739\text{ cm}^{-1}$  característico de grupamentos  $\text{-OH}$ , banda de carbonila em  $1629\text{ cm}^{-1}$ , característico do grupo carbonila quelado de quinonas (DIAZ-MUÑOZ et al., 2018), absorções em  $1463$  e  $1629\text{ cm}^{-1}$  de  $\text{C}=\text{C}$  de aromático, além do sinal em  $1105\text{ cm}^{-1}$  de estiramento  $\text{C-O}$ .

**Figura 49 - Espectro de infravermelho do composto VD-R-1 (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ).**



No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) (Figuras 50-52, p. 124) observaram-se dois sinais mais desprotegidos, um em  $\delta_{\text{H}}$  12,38 e  $\delta_{\text{H}}$  11,49, cada um integrando para um hidrogênio, sendo já conhecidos como hidrogênios quelados com carbonilas de um núcleo básico de antraquinonas e naftoquinonas (BORGATI, DE SOUZA & DE OLIVEIRA, 2019; PROCHÁZKOVÁ et al., 2020). Ainda o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  foi observado apenas um sinal na região de próton aromático, integrando para um hidrogênio, em  $\delta_{\text{H}}$  6,62 (s). Os dados espectroscópicos revelaram também a presença de um anel aromático 1,2,3,4,6-pentassubstituído. Foi observado um simpleto em  $\delta_{\text{H}}$  3,93, integrando para três hidrogênios, o qual foi relacionado à presença de uma metoxila. Assim sendo, pelo espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , foi possível sugerir que o esqueleto da substância VD-R-1 se assemelhava ao de uma antraquinona, metoxilada (JI et al., 2022).

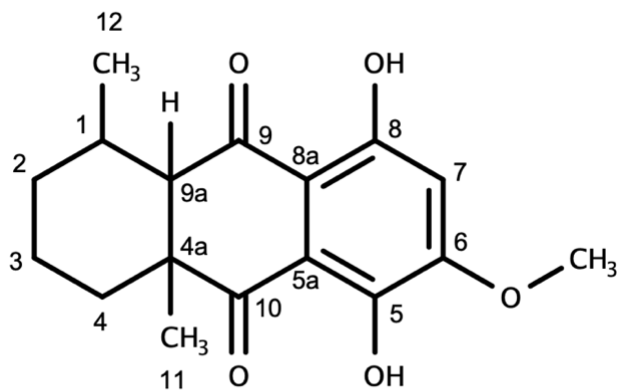
O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  APT (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) (Figura 53, p. 126) do composto VD-R-1 apresentou 17 sinais que foram atribuídos a 17 carbonos, sendo eles: 8 sinais para carbonos não hidrogenados (-C), 3 sinais para carbonos metínicos (-CH), 3 sinais para carbonos metilênicos (- $\text{CH}_2$ ), 2 sinais para carbonos metílicos (- $\text{CH}_3$ ) e 1 sinal para carbono metoxílico (- $\text{OCH}_3$ ). Os três deslocamentos característicos de carbonos metilênicos,  $\delta_{\text{C}}$  34,80,  $\delta_{\text{C}}$  20,14 e  $\delta_{\text{C}}$  32,42, foram atribuídos respectivamente aos carbonos C-2, C-3 e C-4, do anel "A", o que indicou a ausência de insaturação do mesmo. Os outros carbonos do mesmo anel foram sugeridos através dos sinais em  $\delta_{\text{C}}$  27,07,  $\delta_{\text{C}}$  48,16 e  $\delta_{\text{C}}$  59,22, os quais foram atribuídos aos carbonos C-1, C-4a e C-9a. No mesmo espectro, foram observados sinais de carbonos aromáticos não hidrogenados em  $\delta_{\text{C}}$  115,19,  $\delta_{\text{C}}$  144,07,  $\delta_{\text{C}}$  156,42,  $\delta_{\text{C}}$  158,08 e  $\delta_{\text{C}}$  105,22, os quais foram atribuídos respectivamente aos carbonos C-5a, C-5, C-6, C-8 e C-8a do anel "C". O carbono C-7 do mesmo anel foi sugerido pelo sinal em  $\delta_{\text{C}}$  106,00. Ainda no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  foram observados dois sinais característicos de carbono de carbonila, um em  $\delta_{\text{C}}$  206,27 e outro em  $\delta_{\text{C}}$  204,40, atribuídos aos carbonos C-9 e C-10, respectivamente (BORGATI, DE SOUZA & DE OLIVEIRA, 2019; PROCHÁZKOVÁ et al., 2020; JI et al., 2022).

No mapa de contorno do espectro de HMBC (Figuras 54-56, p. 126), foi possível observar a correlação entre os sinais dos hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  3,93 com o sinal do carbono  $\delta_{\text{C}}$  156,42, indicando que a metoxila estaria inserida no carbono C-6, no anel "C" (LI, LI & WANG, 2018). Ainda no mesmo mapa de contorno, foram observadas correlações, que indicaram a inserção de uma metila nos carbonos C-1 ( $\delta_{\text{H}}$  1,17 e  $\delta_{\text{C}}$

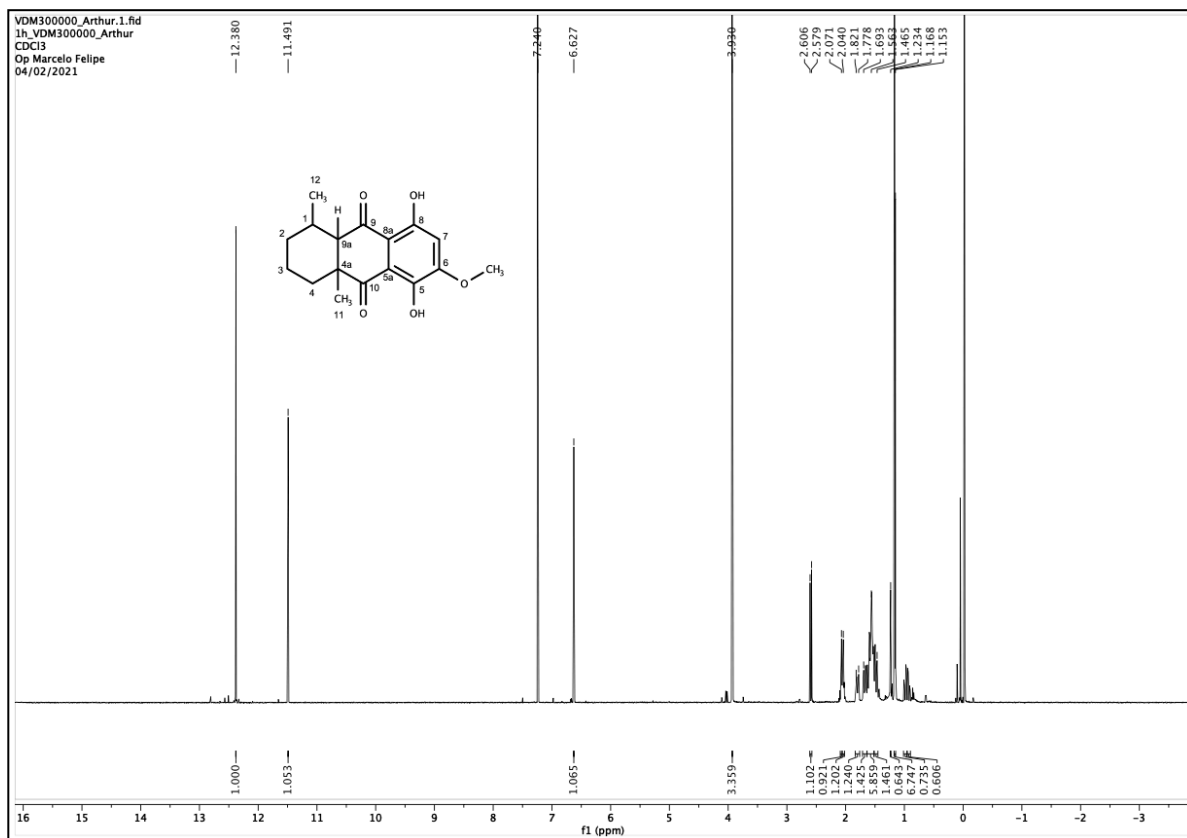
21,64) e C-4a ( $\delta_H$  1,16 e  $\delta_C$  19,78). As posições das hidroxilas queladas foram estabelecidas através das correlações entre os sinais em  $\delta_H$  11,49 (5-OH) e  $\delta_C$  204,40 (C-10); e  $\delta_H$  12,38 (8-OH) e  $\delta_C$  206,27 (C-9) à quatro ligações (WISSETSAI, LEKPHROM & SCHEVENELS, 2019; JI et al., 2022). Com base nesses dados e em comparação com estruturas semelhantes encontradas na literatura (Tabela 15), foi possível a elucidação estrutural da substância VD-R-1, a qual recebeu o nome de vardanona.

**Tabela 15 - Dados de RMN de  $^1H$ ,  $^{13}C$  (400 e 100 MHz,  $CDCl_3$ ) de VD-R-1, 5,8-dihidroxi-6-metoxi-1,4a-dimetil-1,2,3,4,4a,9,9a,10-octahidroantraceno-9,10-diona (vardanona).**

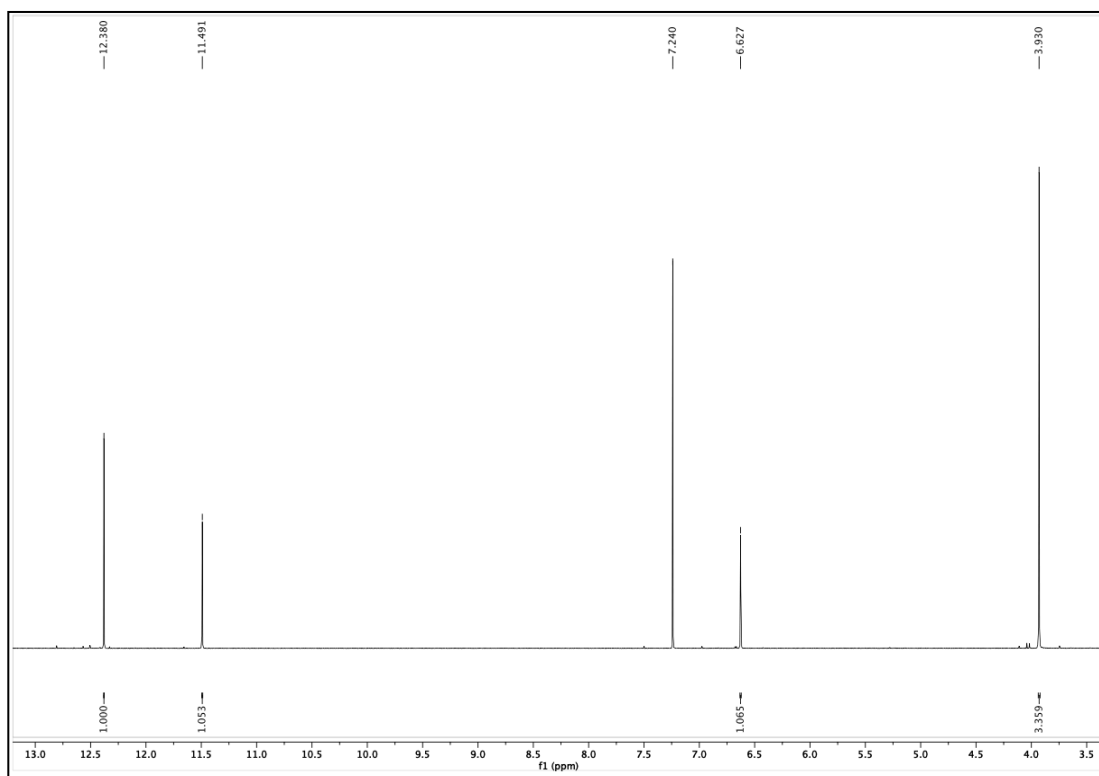
Posição	$\delta_H$	$\delta_C$	Posição	$\delta_H$	$\delta_C$
<b>1</b>	2,05 (1H, m)	27,07	<b>8a</b>	-	105,22
<b>2</b>	1,67 (1H, m)	34,80	<b>9a</b>	2,59 (1H, d, $J = 10,8$ Hz)	59,22
<b>3</b>	1,48 (1H, m) 0,95 (1H, m)	20,14	<b>9</b>	-	206,27
<b>4</b>	2,05 (1H, m) 1,80 (1H, dd, $J = 3,6$ e $14$ Hz)	32,42	<b>10</b>	-	204,40
<b>4a</b>	-	48,16	<b>11</b>	1,17 (3H, s)	21,64
<b>5</b>	-	144,07	<b>12</b>	1,16 (3H, d, $J = 6,9$ Hz)	19,78
<b>5a</b>	-	115,19	<b>6-OMe</b>	3,93 (3H, s)	56,50
<b>6</b>	-	156,42	<b>5-OH</b>	11,49 (1H, s)	-
<b>7</b>	6,62 (1H, s)	106,00	<b>8-OH</b>	12,38 (1H, s)	-
<b>8</b>	-	158,08			



Vardanona (VD-R-1)

Figura 50 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância VD-R-1.

**Figura 51 - Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de VD-R-1 na região de 3,5 – 13 ppm.**



**Figura 52 - Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de VD-R-1 na região de 0,7 – 2,7 ppm.**

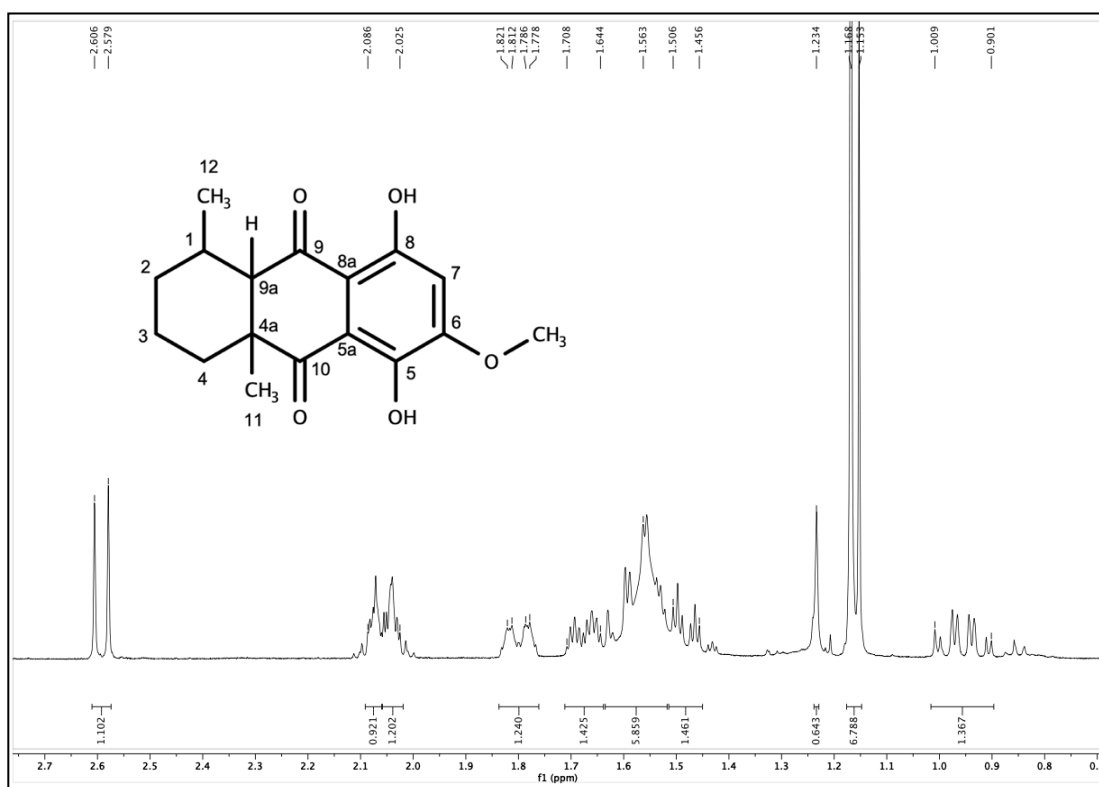


Figura 53 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância VD-R-1.

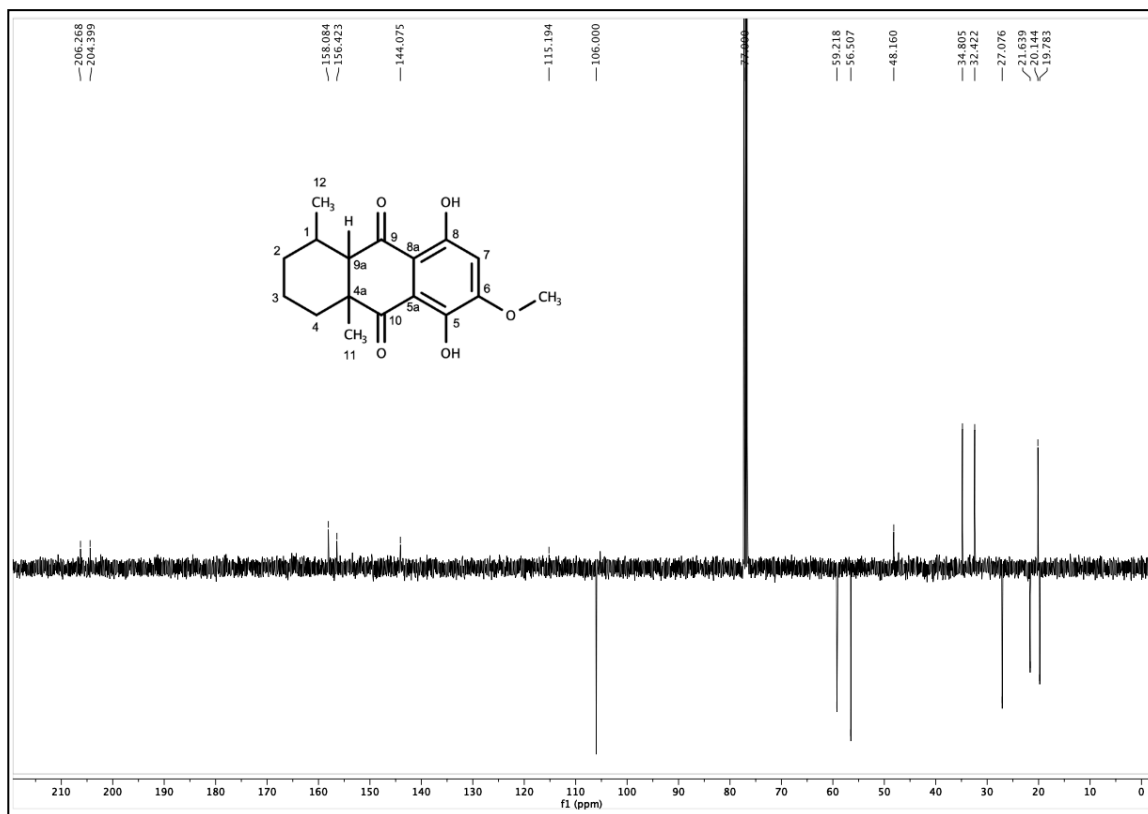
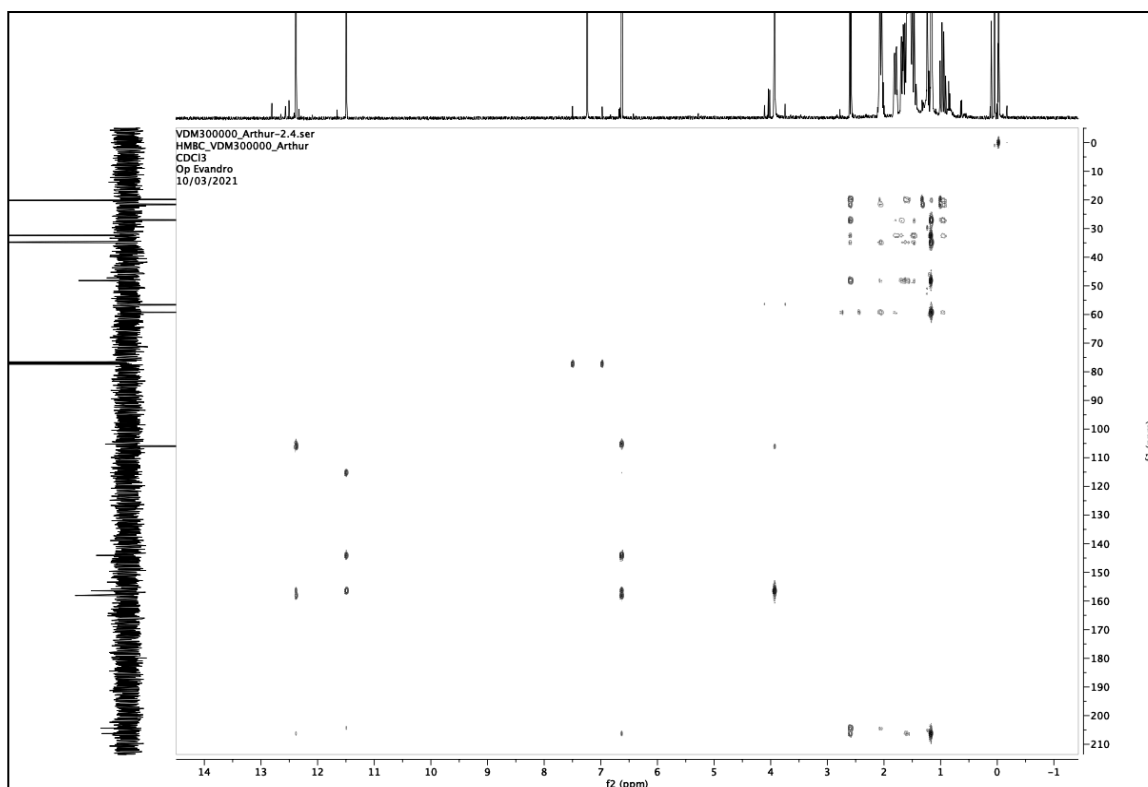
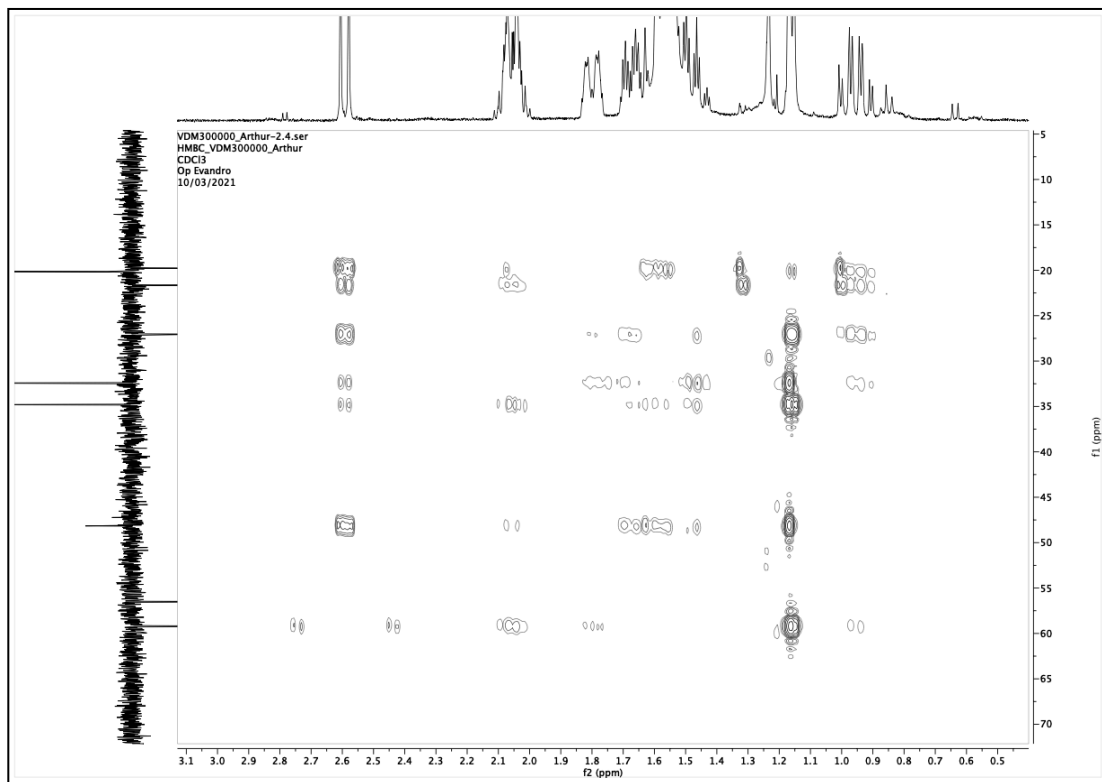


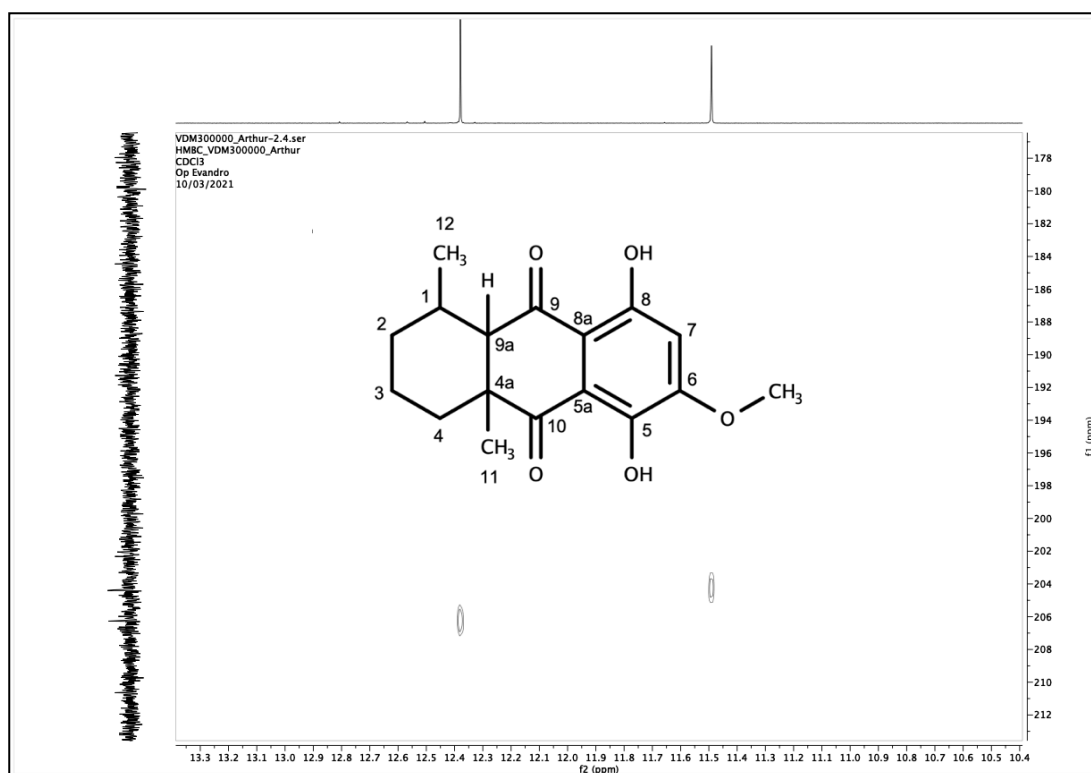
Figura 54 - Espectro de HMBC (400 e 100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de VD-R-1.



**Figura 55 - Expansão do espectro de HMBC (400 e 100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do composto VD-R-1 na região de 0,5 – 3,1 e 5 – 70 ppm.**



**Figura 56 - Expansão do espectro de HMBC (400 e 100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do composto VD-R-1 na região de 10,4 – 11,3 e 178 – 212 ppm.**





### 5.2.12. Quimioinformática

Devida à baixa quantidade isolada da substância VD-R-1, optou-se por realizar um estudo de quimioinformática, utilizando a mesma linhagem celular (A2058) do ensaio citotóxico como banco de dados. Como a substância possui três estereocentros, seguindo a regra do 2<sup>n</sup>, resolveu-se utilizar os oito possíveis isômeros.

#### 5.2.12.1. *Quantitative Structure-Activity Relationship (QSAR)*

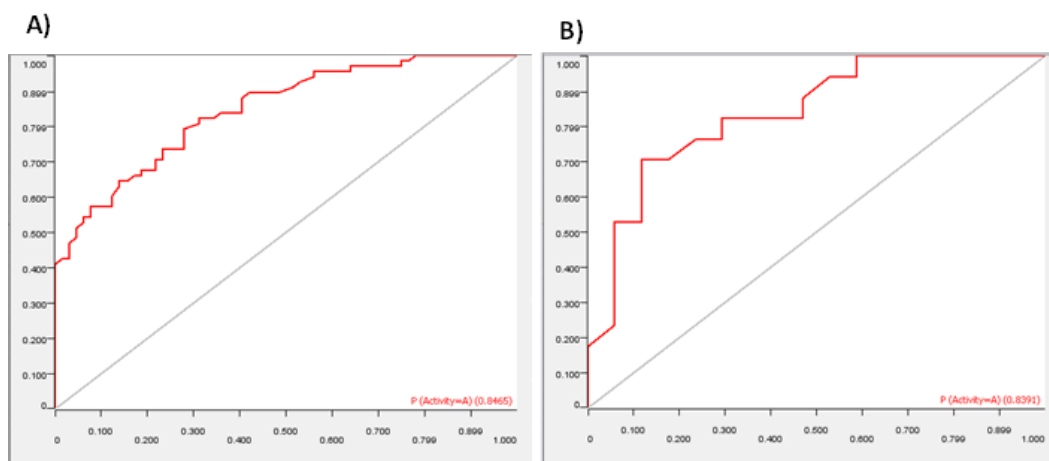
Para realizar a triagem virtual baseada no ligante (*Ligand Based*), um modelo de predição foi construído usando o algoritmo Random Forest (RF). Para a construção desse modelo, foram calculados descritores moleculares para o banco de moléculas com atividade inibitória conhecida para a linhagem de células A2058, obtido através do banco de dados ChEMBL.

O modelo de RF foi avaliado quanto ao seu poder preditivo, utilizando os parâmetros de especificidade, sensibilidade, precisão, exatidão (AUC), valor predito positivo (PPV) e valor predito negativo (NPV), além de desempenho e robustez, como também pela curva *Receiver's Operating Characteristic (ROC)* e coeficiente de correlação de Mathews (MCC). A Tabela 16 descreve as características dos modelos, em termos de poder preditivo e robustez, e a Figura 57 (p. 129) mostra o desempenho do modelo. De acordo com os resultados, foi observado que o modelo apresentou uma ótima classificação, desempenho e robustez.

**Tabela 16 - Resumo dos parâmetros correspondentes aos resultados obtidos para o modelo elaborado com os descritores Dragon 7.**

Linhagem	Validação	Especificidade	Sensibilidade	Acurácia	PPV	NPV	MCC	AUC
A2058	Test	0.78	0.70	0.74	0.76	0.70	0.53	0.84
	Cross	0.70	0.76	0.73	0.72	0.75	0.51	0.83

**Figura 57 - Curva *Receiver operating characteristic* (ROC) gerada para o modelo *Random Forest* (RF) com os descritores Dragon 7. Legenda: (A) Teste e (B) *Cross Validation*.**



Após a validação do modelo, o conjunto de isômeros do extrato de *V. dardani* (Taroda) foi analisado quanto à atividade na linhagem celular A2058, utilizando o modelo de predição elaborado. Como o modelo elaborado demonstrou um bom desempenho, este foi utilizado para selecionar a conformação potencialmente ativa para a linhagem celular A2058.

O algoritmo RF possibilitou selecionar compostos com potencial ativo, que apresentassem probabilidades  $\geq 50\%$  para a linhagem celular A2058 (Tabela 17, p. 129). Dessa forma, todas as configurações em estudo apresentaram probabilidades acima de 50%, sendo possível classificá-las como potencialmente ativas, visto que, as probabilidades obtidas variaram entre 54% e 60%, tendo o composto 08 obtido a probabilidade mais alta (60%). Além disso, o domínio de aplicabilidade foi confiável para todas as conformações em estudo, demonstrando que os compostos se encontram no espaço químico do modelo elaborado. Dessa forma, segundo os resultados demonstrados, as conformações obtidas no extrato de *V. dardani* (Taroda) são potencialmente ativas para a linhagem celular A2058.

**Tabela 17 - Probabilidade de atividade dos isômeros de *V. dardani* (Taroda) contra a linhagem de células A2058 avaliadas pelo algoritmo Random Forest (RF). Em negrito encontram-se destacados os compostos considerados ativos pelo modelo.**

Composto	Probabilidade (%)	Domínio de Aplicabilidade (DA)	Predição
01	<b>56</b>	<b>Confiável</b>	<b>Ativo</b>
02	<b>54</b>	<b>Confiável</b>	<b>Ativo</b>
03	<b>58</b>	<b>Confiável</b>	<b>Ativo</b>
04	<b>54</b>	<b>Confiável</b>	<b>Ativo</b>
05	<b>55</b>	<b>Confiável</b>	<b>Ativo</b>
06	<b>55</b>	<b>Confiável</b>	<b>Ativo</b>
07	<b>57</b>	<b>Confiável</b>	<b>Ativo</b>
08	<b>60</b>	<b>Confiável</b>	<b>Ativo</b>

**Legenda:** Em negrito, compostos com probabilidade acima de 50%. Em vermelho, composto com probabilidade mais alta.

#### 5.2.12.2. *Docking molecular*

Os isômeros de *V. dardani* (Taroda) foram submetidos ao rastreamento por meio de *Docking molecular* em 3 proteínas correspondentes ao receptor de tubulina. Os resultados de docking foram gerados usando três funções de pontuação, o MolDock Score, o Rerank Score e o PLANTS Score. Valores mais negativos indicaram melhores previsões para a maioria das funções de pontuação. A proteína em que o composto obteve valores de energia de ligação menor ou próximo aos controles positivos em pelo menos uma função de pontuação foi considerada ativa.

Os resultados de docking gerados pelas três funções de pontuação foram validados pelo *redocking* do ligante cristalográfico com as três proteínas investigadas. Os desvios da raiz quadrada média (RMSDs) das poses de ajuste obtidas foram calculados em comparação com a estrutura cristalina. Os valores RMSD inferiores a 2 Å indicam um grau ideal de confiabilidade de triagem. As informações sobre as

estruturas de partida e os resultados da validação de *redocking* são mostradas na Tabela 18.

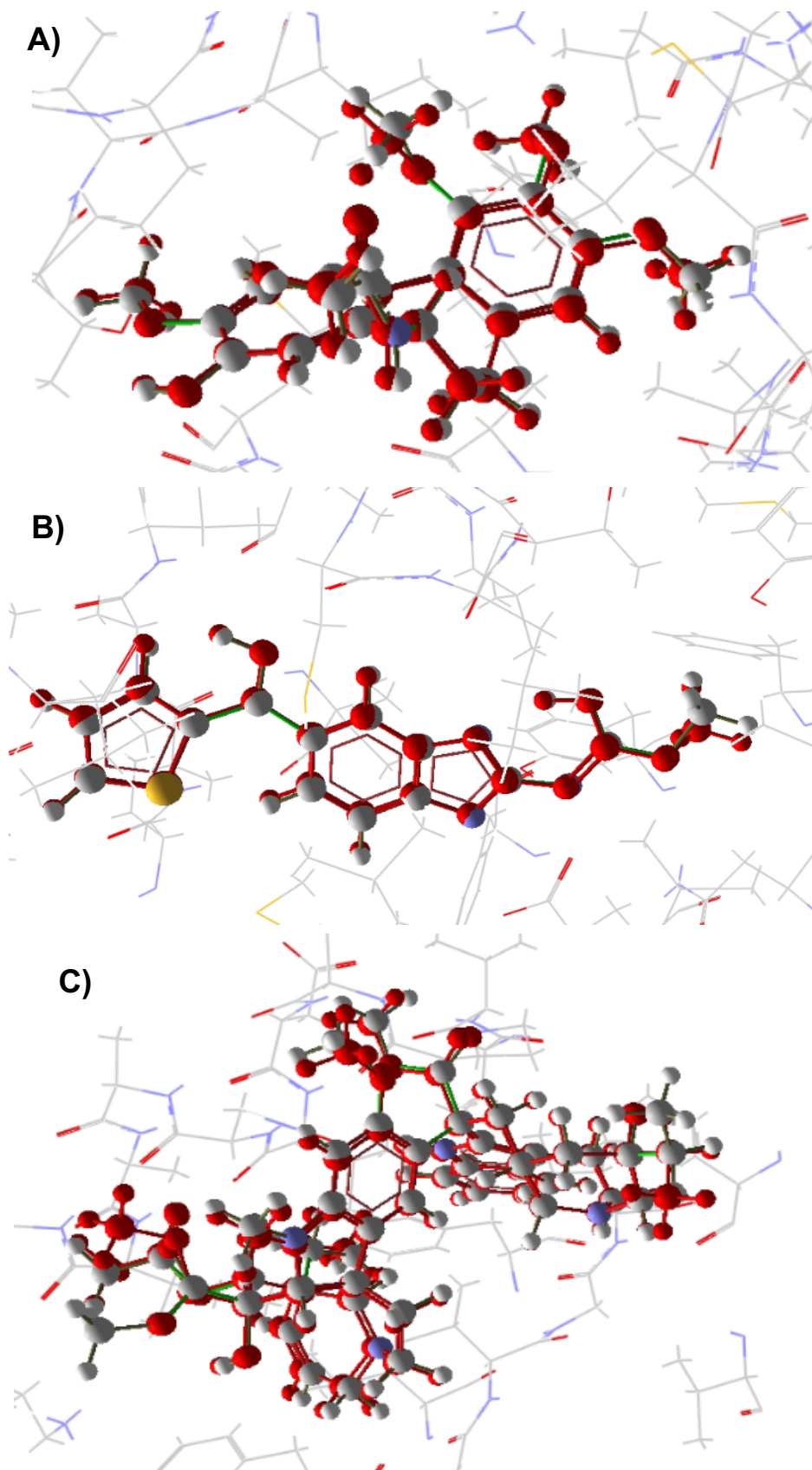
**Tabela 18 - Valores de RMSD para as proteínas selecionadas no estudo.**

Proteína (PDB)	Ligante PDB	Score Ligante	Score <i>Redocking</i>	RMSD
Complexo de tubulina e colchicina (PDB: 4O2B)	Colchicina	-132.624	-132.546	0.19
Complexo T2R-TTL-Nocodazol (PDB: 5CA1)	Nodoconazol	-116.528	-118.812	0.27
Complexo tubulina-vimblastina (PDB: 5J2T)	Vimblastina	-138.838	-141.864	0.34

Durante a análise de *redocking*, todos os valores RMSD estavam abaixo de 2,0 Å, ou seja, as poses geradas posicionaram o ligante corretamente no local ativo. Dessa forma, o programa forneceu valores considerados satisfatórios para a validação do *Docking*.

A posição espacial dos ligantes redocados com as respectivas enzimas, como também a posição destes co-cristalizados com as enzimas encontra-se ilustrados na Figura 58 (p. 132).

**Figura 58 - Sobreposição dos ligantes redocado (em branco) e pose mais estável (em vermelho). Legenda: A) Colchicina ligante da enzima Complexo de tubulina e colchicina.**



Os resultados de RMSD podem ser confirmados pela sobreposição do ligante com a estrutura co-cristalizada, como demonstrado na figura. É possível visualizar a posição espacial dos respectivos ligantes docados em relação ao ligante co-cristalizado e notar uma semelhança na posição dos átomos das duas estruturas.

### 5.2.12.3. *Consensus Docking*

As 08 conformações obtidas de *V. dardani* (Taroda) também foram submetidas a uma avaliação de consenso de docking para aumentar a confiabilidade do método e diminuir o número de falsos positivos.

Após a realização das simulações de *Docking molecular*, os resultados foram padronizados para cada função de pontuação usando a fórmula de probabilidade de *Docking* (ProbDc) (ACEVEDO, 2017; ACEVEDO et al., 2018):

$$ProbDc = \frac{E_{Lig}}{E_{MLig}}, se E_{Lig} < E_{Inib}$$

Em que ELig é a energia do ligante, EMLig é a energia do ligante com o menor Score e EInib é a energia do inibidor obtida a partir dos dados cristalográficos da proteína de teste. O maior valor em ProbDc é igual a 1. Assim, apenas os compostos que obtiveram valores de energia iguais ou superiores à energia de interação do ligante inibidor cristalográfico foram considerados potencialmente ativos. Em seguida, foi realizada uma média dos resultados padronizados para cada função de pontuação (ACEVEDO, 2017; BARROS et al., 2018). Os resultados do consenso de *Docking molecular* para as três enzimas em estudo, de acordo com os *Scores* obtidos pelas três funções de pontuação selecionadas, encontram-se demonstrados nas Tabelas 19-22 (p. 133-136).

**Tabela 19 - Valores de pontuação e probabilidade de atividade dos compostos em estudo para a enzima complexo Tubulina-Colchicina (PDB: 4O2B).**

Composto	Moldock Score	(p) Moldock Score	Rerank Score	(p) Rerank Score	PLANTS Score	(p) PLANTS Score	(p) Enzima
01	<b>-87.358</b>	<b>0.67</b>	<b>-64.314</b>	<b>0.59</b>	<b>-425.577</b>	<b>0.93</b>	<b>0.73</b>
02	<b>-88.166</b>	<b>0.68</b>	-53.779	0.50	<b>-428.372</b>	<b>0.94</b>	<b>0.70</b>
03	<b>-96.172</b>	<b>0.74</b>	<b>-69.497</b>	<b>0.64</b>	<b>-434.019</b>	<b>0.95</b>	<b>0.78</b>
04	<b>-91.805</b>	<b>0.71</b>	<b>-73.537</b>	<b>0.68</b>	<b>-428.937</b>	<b>0.94</b>	<b>0.78</b>
05	<b>-88.469</b>	<b>0.68</b>	-54.105	0.50	<b>-427.626</b>	<b>0.93</b>	<b>0.71</b>
06	<b>-84.900</b>	<b>0.66</b>	-14.714	0.13	<b>-397.769</b>	<b>0.87</b>	0.55
07	<b>-87.241</b>	<b>0.67</b>	-52.554	0.48	<b>-399.551</b>	<b>0.87</b>	<b>0.68</b>
08	<b>-86.367</b>	<b>0.67</b>	-49.228	0.45	<b>-407.983</b>	<b>0.89</b>	<b>0.67</b>
Dacarbazina	-76.805	0.59	-56.636	0.52	-250.925	0.55	0.55
Vemurafenibe	<b>-128.483</b>	<b>1</b>	<b>-107.396</b>	<b>1</b>	<b>-455.299</b>	<b>1</b>	<b>1</b>

**Legenda:** Em negrito, os compostos com maior afinidade que o controle positivo, em vermelho encontra-se o melhor resultado.

Os resultados demonstrados na Tabela 19, informam que todos os compostos em estudo apresentaram *Score* negativo, indicando que ocorreu interação com o alvo em estudo. A maior afinidade foi obtida pelo controle positivo Vemurafenibe, o qual obteve a maior probabilidade em todos os algoritmos em estudo, como também obteve a maior probabilidade total na enzima, resultando em 1. Em relação ao controle positivo Dacarbazina, os compostos em estudo apresentaram maior afinidade, visto que, a probabilidade total obtida para este composto correspondeu a 0.55, enquanto que sete conformações apresentaram valores totais superiores, correspondendo a: C08 (p = 0.67), C07 (p = 0.68), C02 (p = 0.70), C05 (p = 0.71), C01 (p = 0.73) e C03 e C04 (p = 0.78). O Composto 06 apresentou probabilidade total igual ao valor obtido pelo controle Dacarbazina. Isso demonstra uma maior afinidade dos compostos em estudo quando comparado ao controle positivo Dacarbazina. A Tabela 20 (p. 134) mostra os resultados obtidos para o Complexo T2R-TTL-Nocodazol (PDB: 5CA1).

**Tabela 20 - Valores de pontuação e probabilidade de atividade dos compostos em estudo para a enzima Complexo T2R-TTL-Nocodazol (PDB: 5CA1).**

Composto	Moldock Score	(p) Moldock Score	Rerank Score	(p) Rerank Score	PLANTS Score	(p) PLANTS Score	(p) Enzima
01	-93.689	0.67	-58.258	0.63	<b>-422.181</b>	<b>0.84</b>	<b>0.71</b>
02	<b>-100.75</b>	<b>0.72</b>	<b>-79.477</b>	<b>0.87</b>	<b>-453.846</b>	<b>0.90</b>	<b>0.83</b>
03	<b>-101.851</b>	<b>0.72</b>	-38.915	0.42	<b>-423.294</b>	<b>0.84</b>	<b>0.66</b>
04	<b>-103.078</b>	<b>0.73</b>	<b>-63.657</b>	<b>0.69</b>	<b>-427.217</b>	<b>0.85</b>	<b>0.76</b>
05	-91.215	0.65	1.631	0	<b>-436.063</b>	<b>0.86</b>	0.50
06	-91.089	0.65	-4.287	0.04	<b>-435.117</b>	<b>0.86</b>	0.52
07	-93.304	0.66	-3.100	0.03	<b>-436.23</b>	<b>0.87</b>	0.52
08	<b>-95.849</b>	<b>0.68</b>	-23.188	0.25	<b>-445.557</b>	<b>0.88</b>	0.60
Dacarbazina	<b>-95.366</b>	<b>0.68</b>	-61.226	0.67	-299.338	0.59	0.65
Vemurafenibe	<b>-139.65</b>	<b>1</b>	<b>-91.206</b>	<b>1</b>	<b>-501.25</b>	<b>1</b>	<b>1</b>

**Legenda:** Em negrito, os compostos com maior afinidade que o controle positivo, em vermelho encontra-se o melhor resultado.

Para o Complexo T2R-TTL-Nocodazol (Tabela 20), os resultados demonstrados, informam que a maioria dos compostos em estudo apresentou *Score* negativo, indicando que ocorreu interação com o alvo em estudo. A maior afinidade foi obtida pelo controle positivo Vemurafenibe, o qual obteve a maior probabilidade em todos os algoritmos em estudo, como também obteve a maior probabilidade total na enzima, resultando em 1. Em relação ao controle positivo Dacarbazina, três compostos em estudo apresentaram maior afinidade, visto que, a probabilidade total obtida para este composto correspondeu a 0.65, enquanto que três conformações apresentaram valores totais superiores, correspondendo a: C03 (p = 0.66), C01 (p = 0.71), C04 (p = 0.76) e C02 (p = 0.83). Isso demonstra uma maior afinidade dos compostos em estudo quando comparado ao controle positivo Dacarbazina. A Tabela 21 (p. 136) mostra os resultados obtidos para o Complexo tubulina-vimblastina (PDB: 5J2T).



**Tabela 21 - Valores de pontuação e probabilidade de atividade dos compostos em estudo para a enzima Complexo tubulina-vimblastina (PDB: 5J2T).**

Composto	Moldock Score	(p) Moldock Score	Rerank Score	(p) Rerank Score	PLANTS Score	(p) PLANTS Score	(p) Enzima
01	-44.542	0.63	-34.122	0.73	<b>-214.103</b>	<b>0.70</b>	0.68
02	-42.506	0.60	-30.823	0.66	<b>-211.982</b>	<b>0.69</b>	0.65
03	-40.475	0.57	-26.441	0.56	<b>-217.866</b>	<b>0.71</b>	0.61
04	-37.229	0.52	-25.12	0.53	<b>-217.876</b>	<b>0.71</b>	0.59
05	-41.419	0.58	-31.821	0.68	<b>-217.418</b>	<b>0.71</b>	0.66
06	-49.802	0.70	18.224	0	<b>-208.557</b>	<b>0.68</b>	0.46
07	-51.641	0.73	13.673	0	<b>-210.239</b>	<b>0.69</b>	0.47
08	-49.824	0.70	17.853	0	<b>-209.224</b>	<b>0.68</b>	0.46
Dacarbazina	-68.113	0.96	<b>-46.598</b>	<b>1</b>	-133.845	0.44	<b>0.80</b>
Vemurafenibe	<b>-70.5269</b>	<b>1</b>	-37.224	0.79	<b>-303.969</b>	<b>1</b>	<b>0.93</b>

**Legenda:** Em negrito, os compostos com maior afinidade que o controle positivo, em vermelho encontra-se o melhor resultado.

Para o Complexo Complexo tubulina-vimblastina, os resultados demonstrados na Tabela 21, informam que a maioria dos compostos em estudo apresentou *Score* negativo, indicando que ocorreu interação com o alvo em estudo. A maior afinidade foi obtida pelo controle positivo Vemurafenibe, o qual obteve a maior probabilidade total na enzima, resultando em 0.93. Os isômeros em estudo, não apresentaram afinidade maior que os controles positivos selecionados para este alvo, visto que a Dacarbazina apresentou a segunda maior probabilidade correspondendo a 0.80. Dessa forma, pode-se perceber que os isômeros do extrato de *V. dardani* apresentam uma maior probabilidade de afinidade para os alvos complexo Tubulina-Colchicina e Complexo T2R-TTL-Nocodazol.

Como todos os alvos em estudo correspondem a receptores de Tubulina, então foi realizado o cálculo da média total para esse receptor, por meio da soma da probabilidade obtida para cada uma das enzimas e divisão pelo número de alvos em estudo. Os resultados encontram-se na Tabela 22 (p. 136).

**Tabela 22 - Valores de probabilidade de atividade dos compostos em estudo para o Complexo de tubulina.**

Composto	(p) Complexo Tubulina- Colchicina (PDB: 4O2B)	(p) Complexo T2R-TTL- Nocodazol (PDB: 5CA1)	(p) Complexo tubulina- vimblastina (PDB: 5J2T)	(p) Total Complexo de Tubulina
01	<b>0.73</b>	<b>0.71</b>	0.68	<b>0.71</b>
02	<b>0.70</b>	<b>0.83</b>	0.65	<b>0.73</b>
03	<b>0.78</b>	<b>0.66</b>	0.61	<b>0.68</b>
04	<b>0.78</b>	<b>0.76</b>	0.59	<b>0.71</b>
05	<b>0.71</b>	0.50	0.66	0.62
06	0.55	0.52	0.46	0.51
07	<b>0.68</b>	0.52	0.47	0.56
08	<b>0.67</b>	0.60	0.46	0.58
Dacarbazina	0.55	0.65	<b>0.80</b>	0.67
Vemurafenibe	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0.93</b>	<b>0.97</b>

**Legenda:** Em negrito, os compostos com maior afinidade que o controle positivo, em vermelho encontra-se o melhor resultado.

Os resultados da Tabela 22 mostram que todos os compostos referentes as configurações do extrato de *V. dardani* (Taroda) apresentaram probabilidades superior a 0.50, além disso, os compostos C01 (p = 0.71), C02 (p = 0.73), C03 (p = 0.68) e C04 (p = 0.71), apresentaram probabilidade superior ao controle positivo Dacarbazina que correspondeu a p = 0.67, indicando dessa forma, a afinidade desses compostos ao complexo de Tubulina. A maior probabilidade para o complexo em estudo foi obtida pelo controle positivo Vemurafenibe (p = 0.97), um potente inibidor utilizado no tratamento de melanoma em estágio avançado.

#### **Análise combinada baseada no Ligante (*Ligand based*) e na Estrutura (*Structure based*)**

Uma segunda análise de consenso foi realizada para identificar compostos com potencial *multitarget*, que demonstram as probabilidades de serem potenciais ativos

para mais de uma proteína, com base no modelo de RF e docking. Nesse caso, foram utilizados todos os resultados da previsão da atividade biológica das conformações em estudo de *V. dardani* (Taroda) e estes foram combinados com os resultados da docagem. Essa análise combinada, além de selecionar os compostos ativos, é capaz de selecionar os compostos mais potentes combinando duas importantes metodologias, baseadas no ligante e na estrutura (ACEVEDO, 2017; ACEVEDO et al., 2018; BARROS et al., 2018). Para esta análise, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$Prob_{Comb} = \frac{(ProbDc + (1 + ESP) \times P_{Activity})}{2 + ESP}, \text{ Se } Prob_{Comb} > 0.5$$

onde ProbDc é a probabilidade de um composto estar ativo na análise de acoplamento molecular, ESP é o valor da especificidade do modelo de RF e PActivity é o valor de probabilidade de um composto estar ativo no modelo de RF. A probabilidade combinada (ProbComb), baseada no ligante e na estrutura, pode aumentar o poder preditivo dos modelos e diminuir o número de falsos positivos. Para que as moléculas sejam consideradas potencialmente ativas, os valores de probabilidade devem ser iguais ou superiores a 0,5. Quanto maior o valor de ProbComb, maior o potencial da molécula. Os valores de probabilidade combinados foram calculados para todas as conformações e para a probabilidade total no complexo de tubulina em estudo. Os dados referentes a probabilidade combinada entre as abordagens *Ligand-based* e *Structure-based* encontram-se na Tabela 23.

**Tabela 23 - Valores de probabilidade combinada (ProbComb) entre as abordagens Ligand-based e Structure-based para os compostos frente a linhagem celular A2058 e o complexo de tubulina.**

Composto	(p)	(p)	ProbComb
	Modelo D7 - A2058	Docking molecular - complexo de tubulina	
01	0.56	<b>0.71</b>	<b>0.618</b>
02	0.54	<b>0.73</b>	<b>0.609</b>
03	<b>0.58</b>	<b>0.68</b>	<b>0.619</b>
04	0.54	<b>0.71</b>	<b>0.602</b>
05	0.55	0.62	0.580
06	0.55	0.51	0.540
07	0.57	0.56	0.566

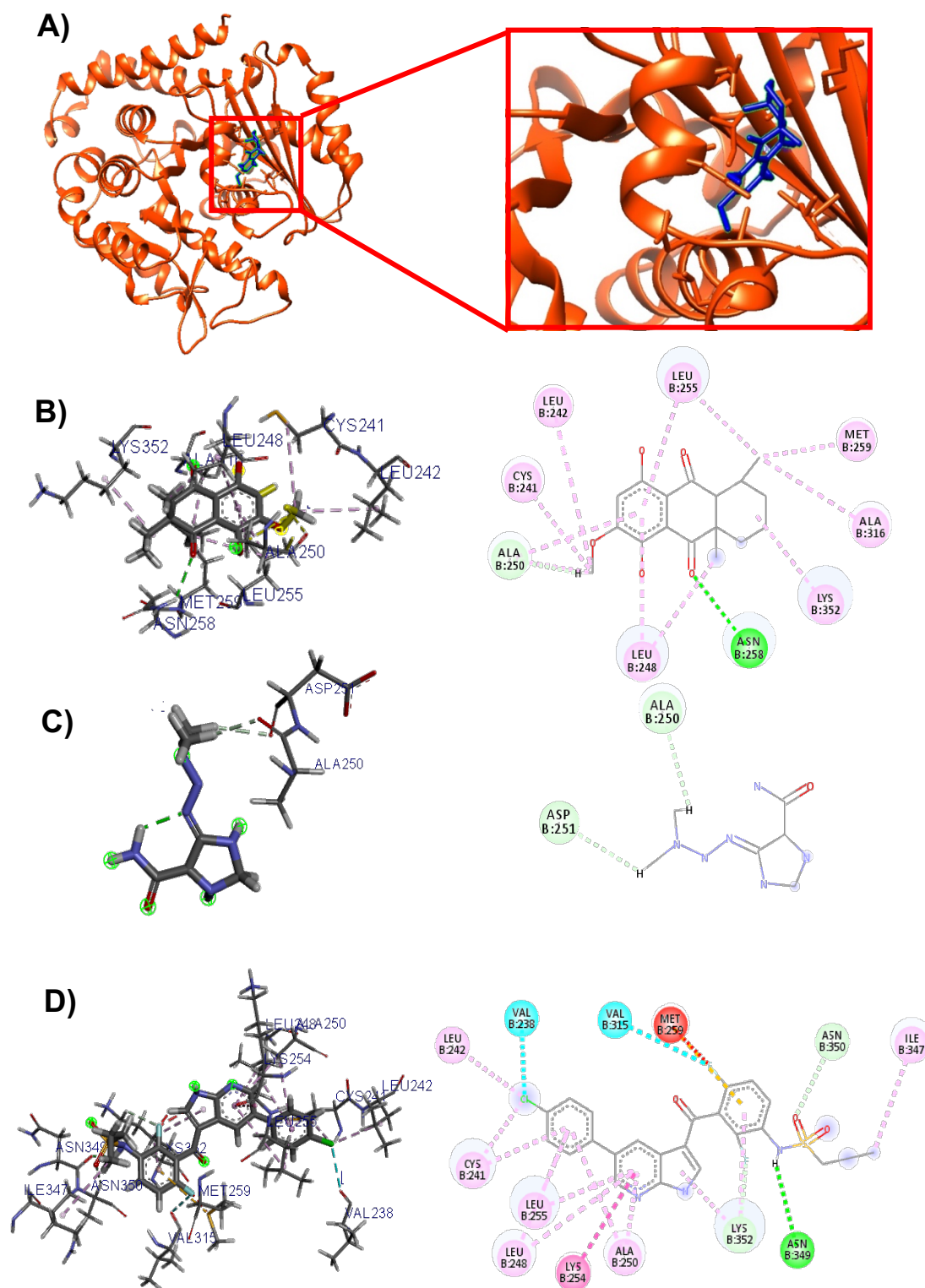
---

Após realizar a análise combinada, com base no ligante e estrutura, e usando a fórmula para identificar moléculas potencialmente ativas, foi perceptível que todos os compostos em estudo apresentaram probabilidades acima de 50%. O valor de probabilidade obtido ficou compreendido entre 54% a 61%. Os cinco compostos de melhor performance foram: C08 ( $p = 0.597$ ), C04 ( $p = 0.602$ ), C02 ( $p = 0.609$ ), C01 ( $p = 0.618$ ) e C03 ( $p = 0.619$ ). O composto 03 foi considerado de maior probabilidade, pois apresentou uma maior probabilidade na abordagem *Ligand-based*, correspondendo a probabilidade de 58%, sendo maior quando comparado ao composto 01 que apresentou 56%.

#### **5.2.12.4. Análise das Interações do composto 03 com os alvos moleculares correspondentes ao receptor de Tubulina**

Os compostos em estudo apresentaram valores de probabilidade combinada acima de 50%, porém a conformação 3 foi escolhida para avaliação das interações estabelecidas, pois apresentou o maior valor entre os compostos da série. As macromoléculas avaliadas corresponderam ao complexo de Tubulina-Colchicina (PDB: 4O2B) e ao complexo T2R-TTL-Nocodazol (PDB: 5CA1), visto que, nesses alvos a conformação em estudo e os demais compostos apresentaram maior afinidade quando comparado ao controle Dacarbazina. A Figura 59 (p. 140) mostra o acoplamento molecular do Composto 03 (A e B), a Dacarbazina (C), o Vemurafenibe (D) e o complexo de Tubulina-Colchicina (PDB: 4O2B).

**Figura 59 - Interações 2D e 3D entre o Composto 03 (A e B), a Dacarbazina (C), o Vemurafenibe (D) e o complexo de Tubulina-Colchicina (PDB: 4O2B). As ligações de hidrogênio são destacadas em verde e em azul; as interações hidrofóbicas são destacadas em rosa e as interações estéricas são destacadas em vermelho e em laranja. Resíduos: Asn (Asparagina), Lys (Lisina), Ala (Alanina), Leu (Leucina), Cys (Cisteína), Val (Valina), Met (Metionina), Ile (Isoleucina) e Asp (Ácido Aspártico).**



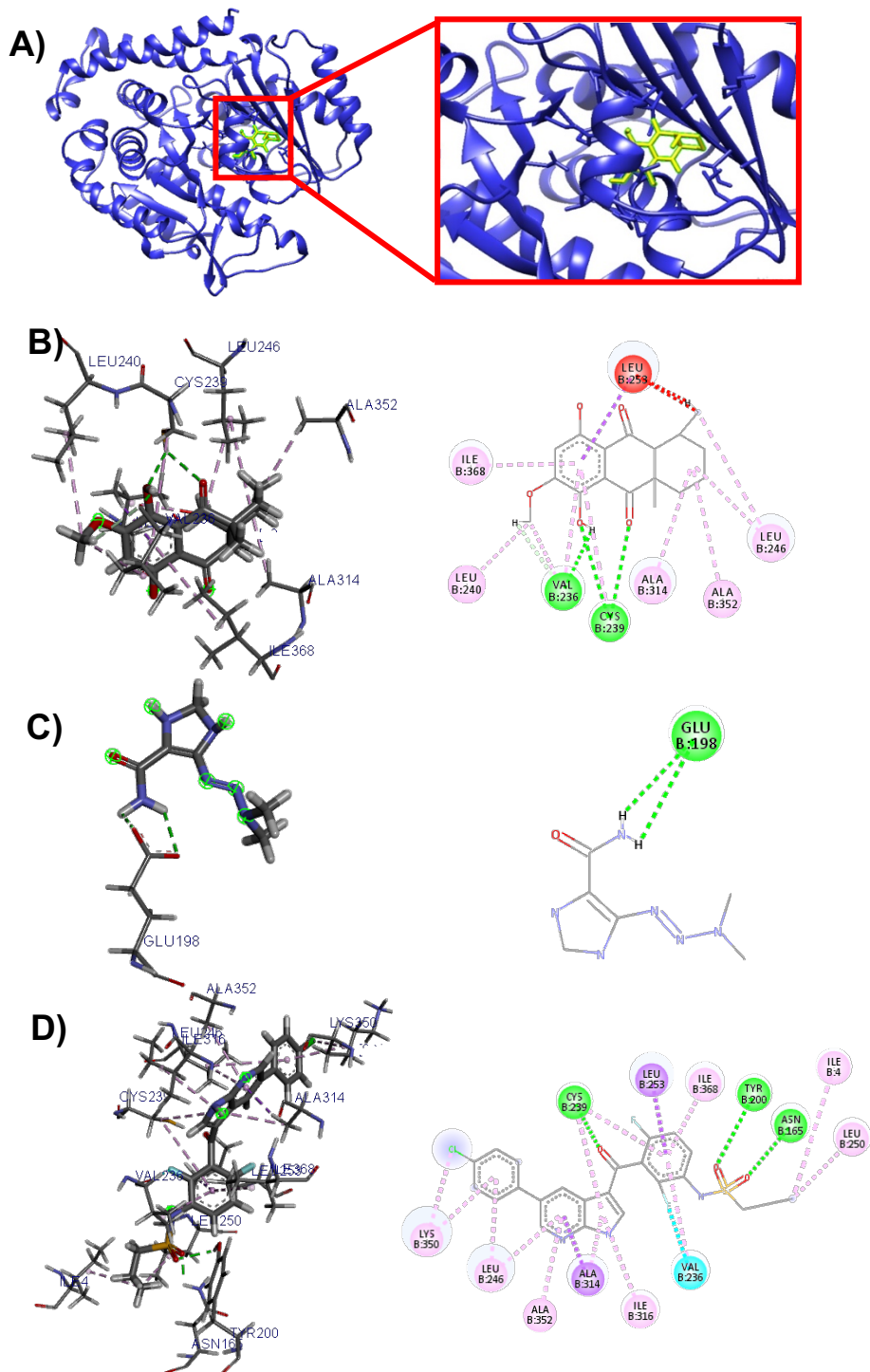
No acoplamento molecular do Composto 03 com a macromolécula Complexo de Tubulina-Colchicina (PDB: 4O2B), foram observadas interações hidrofóbicas (linha tracejada em rosa) que ocorreram em maior número e interações de hidrogênio (linhas tracejadas em verde). As interações hidrofóbicas foram estabelecidas com os resíduos: Cys 241, Leu 242, Leu 255 (2 interações), Met 259, Ala 316, Lys 352, Leu 248 (2 interações) e Ala 250 (2 interações). As interações de hidrogênio compreenderam os resíduos Asn 258 e Ala 250.

Para o controle positivo Dacarbazina foram observadas apenas interações de hidrogênio (linhas tracejadas em verde) estabelecidas com os resíduos Ala 250 e Asp 251. Vale mencionar que o composto 03 apresentou interação semelhante a Dacarbazina, referente ao resíduo Ala 250 da interação de hidrogênio.

Com relação ao controle positivo Vemurafenibe, este foi o único que apresentou interações de hidrogênio (linhas tracejadas em verde e azul), interações hidrofóbicas (linhas tracejadas em rosa) e interações estéricas (linhas tracejadas em vermelho e em laranja). Os resíduos Asn 349, Lys 352, Val 238, Val 315 e Asn 350 compreenderam as ligações de hidrogênio. As interações hidrofóbicas foram formadas através dos aminoácidos Ile 347, Lys 352 (2 interações), Ala 250 (2 interações), Lys 254, Leu 248 (2 interações), Leu 255, Cys 241 (2 interações) e Leu 242. As interações estéricas ocorreram apenas com por meio do resíduo Met 259 (2 interações). O composto 03 apresentou interações semelhantes ao controle positivo Vemurafenibe, sendo referente as interações hidrofóbicas dos resíduos: Leu 242, Cys 241, Leu 255, Ala 250 e Lys 352.

O acoplamento molecular do Composto 03 (A e B), a Dacarbazina (C), o Vemurafenibe (D) e o complexo T2R-TTL-Nocodazol (PDB: 5CA1) é demonstrado na Figura 60 (p. 142).

**Figura 60 - Interações 2D e 3D entre o Composto 03 (A e B), a Dacarbazina (C), o Vemurafenibe (D) e o complexo T2R-TTL-Nocodazol (PDB: 5CA1). As ligações de hidrogênio são destacadas em verde e em azul; as interações hidrofóbicas são destacadas em rosa e lilás e as interações estéricas são destacadas em vermelho.**  
**Resíduos: Asn (Asparagina), Lys (Lisina), Ala (Alanina), Leu (Leucina), Cys (Cisteína), Val (Valina), Ile (Isoleucina), Glu (Ácido Glutâmico) e Tyr (Tirosina).**



No acoplamento molecular do Composto 03 com a macromolécula Complexo de Tubulina-Colchicina (PDB: 4O2B), foram observadas interações hidrofóbicas (linha tracejada em rosa) que ocorreram em maior número, interações estéricas (linhas tracejadas em vermelho) e interações de hidrogênio (linhas tracejadas em verde). As interações hidrofóbicas foram estabelecidas com os resíduos: Leu 259, Ile 368, Leu 240, Val 236 (2 interações), Cys 239, Ala 314, Ala 352, e Leu 246 (2 interações). As interações de hidrogênio compreenderam os resíduos Val 236 e Cys 239 (2 interações). As únicas interações estéricas que ocorreram foram estabelecidas pelo aminoácido Leu 259 (2 interações).

Para o controle positivo Dacarbazina foram observadas apenas duas interações de hidrogênio (linhas tracejadas em verde) estabelecidas com o resíduo Glu 198. Vale mencionar que o composto não 03 apresentou interação semelhante a Dacarbazina nesta macromolécula.

Com relação ao controle positivo Vemurafenibe, este apresentou interações de hidrogênio (linhas tracejadas em verde e azul) e interações hidrofóbicas (linhas tracejadas em rosa e lilás). Os resíduos Cys 239, Tyr 200, Asn 165 e Val 236 compreenderam as ligações de hidrogênio. As interações hidrofóbicas foram mais abrangentes e se formaram através dos aminoácidos: Leu 250, Ile 4, Ile 368, Leu 253, Cys 239 (2 interações), Lys 350 (2 interações), Leu 246 (2 interações), Ala 252 (2 interações), Ala 314 (2 interações), Ile 316 e Val 236. O composto 03 apresentou interações semelhantes ao controle positivo Vemurafenibe, sendo referente as interações hidrofóbicas dos resíduos: Val 236, Cys 239, Ala 314, Ala 352 e Leu 246. Além disso, foram observadas coincidências nos resíduos das interações de hidrogênio correspondentes a: Cys 239 e Val 236.

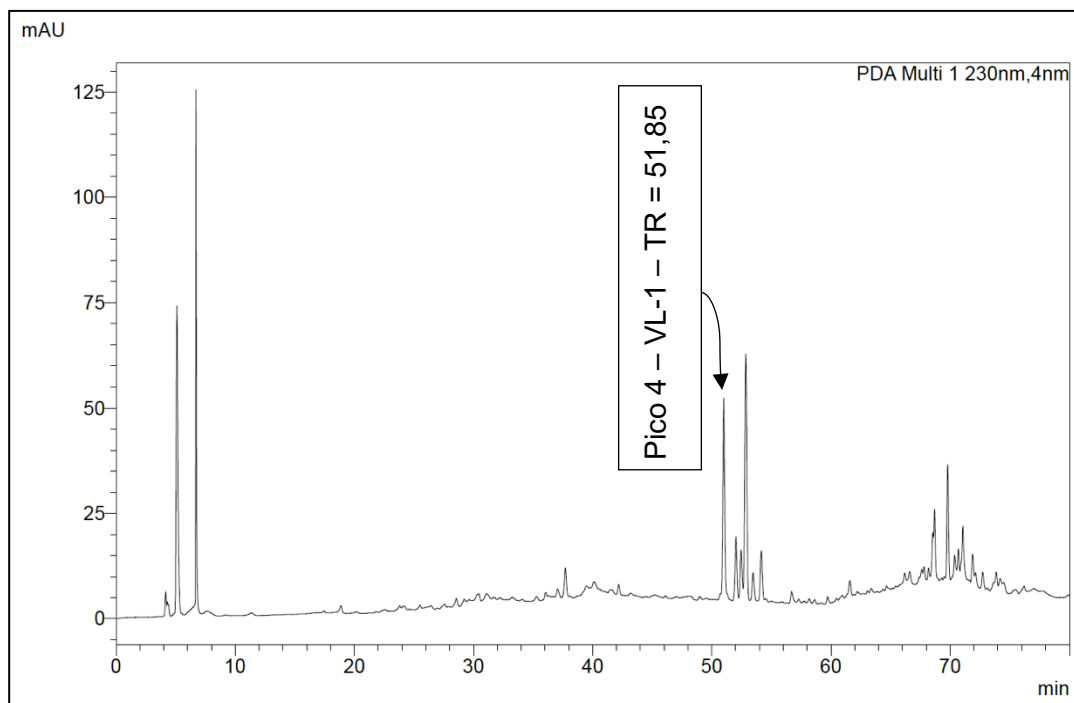
### **5.1. Desenvolvimento do método cromatográfico para o isolamento de compostos na fração isopropanólica do extrato etanólico bruto de *V. leucocephala***

No cromatograma (Figura 61) foi possível observar 12 picos principais. Deste processo foram coletadas 12 frações (VL-I-1 a VL-I-12) correspondentes aos 12 principais picos visualizados no cromatograma analítico. Posteriormente, estas frações



foram analisadas por RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e bidimensional para identificação estrutural, sendo possível identificar um composto, o qual foi codificado como VL-1, correspondente à fração com tempo de retenção 51,85.

**Figura 61 - Cromatograma da fração VL-I do extrato etanólico bruto de *V. leucocephala*.**



## 5.2. Identificação dos compostos isolados da fração isopropanólica do extrato etanólico bruto de *V. leucocephala*

### 5.2.1. Identificação estrutural de VL-1

O composto codificado como VL-1 foi isolado na forma de um sólido branco amorfo com massa de 3 mg.

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) (Figuras 62-64, p. 149), foi possível observar a presença de quatro dupletos característicos de prótons anoméricos em  $\delta_{\text{H}}$  4,96; 5,95; 5,51 e 5,36, os quais foram atribuídos aos hidrogênios H-1', H-1'', H-1''' e H-1''', respectivamente, e os quais no mapa de contorno de HMBC (Figuras 66 e 67, p. 151), mostraram correlação com os carbonos anoméricos em  $\delta_{\text{C}}$  104,53 (C-1'),  $\delta_{\text{C}}$

102,95 (C-1''),  $\delta_C$  105,57 (C-1''') e  $\delta_C$  105,30 (C-1''''). No mesmo espectro foram observados sinais característicos de hidrogênios olefínicos em  $\delta_H$  5,64 (d,  $J = 10,5$  Hz) e  $\delta_H$  6,69 (dd,  $J = 10,5$  e 3 Hz), os quais, através da observação de picos transversais no espectro bidimensional de correlação heteronuclear direta de  $^{13}C \times ^1H$  (HSQC), foram correlacionados aos carbonos em  $\delta_C$  125,83 (C-11) e  $\delta_C$  125,97 (C-12).

No espectro de RMN de  $^{13}C$  – DEPT 135° (125 MHz,  $C_5D_5N$ ) (Figura 65, p. 150), foi possível observar a presença de 45 linhas espectrais, o que permitiu conhecer o padrão de hidrogenação de alguns átomos de carbono, dos quais 7 foram correspondentes a átomos de carbonos metílicos ( $CH_3$ ), 13 metilênicos ( $CH_2$ ), 25 metínicos ( $CH$ ) e, através das correlações do mapa de contorno de HMBC, foram observados 5 sinais característicos de átomos de carbonos não hidrogenados.

Juntamente com dados anteriores, pôde-se identificar a aglicona desta saponina como sendo de natureza triterpênicica do tipo olean-11,13(18)-dieno, e isso foi confirmado através dos deslocamentos químicos característicos observados no RMN de  $^{13}C$  e HSQC (Figura 68 e 69, p. 152) em  $\delta_C$  135,77 (C-13);  $\delta_C$  125,97 (C-12) e  $\delta_C$  125,83 (C-11) (MELO et al., 2012).

O carbono carbinólico (C-3) foi identificado através dos dados exibidos no espectro bidimensional de correlação heteronuclear – HSQC, onde foi possível observar a correlação de um hidrogênio em  $\delta_H$  3,32 (dd,  $J = 11,5$  e 4,5 Hz) com o carbono metínico oxigenado em  $\delta_C$  91,50 (C-3), o qual exibiu correlações observadas no mapa de contorno do espectro de HMBC com os simpletos atribuídos aos hidrogênios metílicos H-23 e H-24 em  $\delta_H$  1,28 e  $\delta_H$  1,11, respectivamente.

A genina foi identificada como Saikogenina b2, pois através da análise dos espectros de HSQC e RMN  $^{13}C$  – DEPT, observou-se a presença de dois grupos hidroxilas em  $\delta_C$  67,35 (C-16) e  $\delta_C$  64,43 (C-28) (WU et al., 2020). Através dos dados espectrais de  $^1H$ ,  $^{13}C$  e bidimensionais foi possível sugerir que as unidades osídicas que estariam conectadas à genina seriam três glicosídicas e uma xilosídica (DINIZ et al., 2008).

Sendo assim, através da análise dos espectros e em comparação com os dados da literatura, foi possível identificar o composto VL-1 como sendo a 3-O- $\beta$ -D-xilopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glicopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glicopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-

glicopiranosilolean-11,13-dien-3 $\beta$ ,16a,28-triol, saponina isolada pela primeira vez na espécie *V. leucocephala* por Diniz e colaboradores em 2008. Esses e outros dados estão listados na Tabela 24.

**Tabela 24 - Dados de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  (500 e 125 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de VL-1, 3-O- $\beta$ -D-xilopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glicopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glicopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glicopiranosilolean-11,13-dien-3 $\beta$ ,16a,28-triol, em comparação aos dados obtidos por DINIZ et al. (2008), nas mesmas condições.**

	VL-1		Referência	
	$\delta_c$	$\delta_H$	$\delta_c$	$\delta_H$
<b>C</b>				
4	39,41	-	40,23	-
8	41,36	-	41,56	-
10	36,10	-	37,00	-
13	135,77	-	136,53	-
14	41,63	-	42,39	-
17	nd*	-	45,84	-
18	nd*	-	133,62	-
20	nd*	-	33,12	-
<b>CH</b>		-		
3	91,50	3,32 (dd, $J = 4,5$ e $11,5$ Hz)	89,45	3,30 (dd)
5	55,02	0,75 (dl, 10,5)	55,83	0,78 (dl, 9,0)
9	53,43	2,04 (sl)	54,24	2,06 (sl)
11	125,83	5,64 (d, $J = 10,5$ Hz)	126,62	5,67 (d, $J = 10,5$ Hz)
12	125,97	6,69 (dd, $J = 10,5$ e $3$ Hz)	126,77	6,72 (dd)
16	67,35	4,83 (sl)	68,17	4,86 (sl)

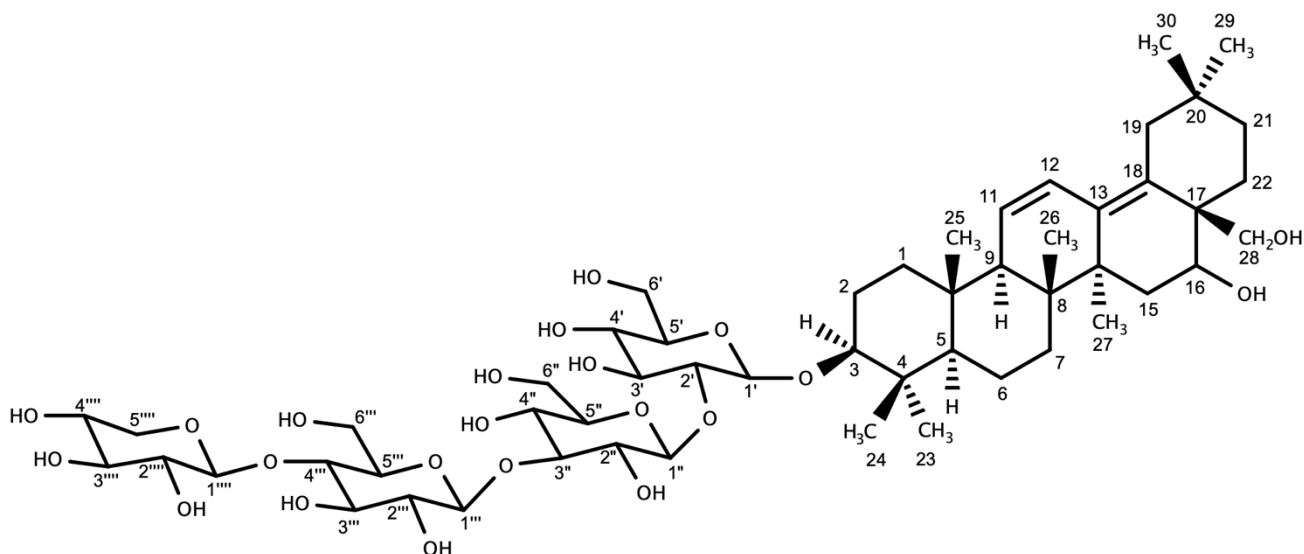
**Tabela 24** – (Continuação).

<b>CH<sub>2</sub></b>				
1	38,63	nd*	38,81	1,74, 0,98
2	26,27	nd*	27,08	2,30, 1,90
6	18,25	nd*	19,06	1,56, 1,37
7	35,14	1,28	33,07	1,37
15	31,58	nd*	32,40	1,89, 1,48
19	38,73	2,65 (d, $J = 15$ Hz)	39,54	2,68 (d, $J = 15,5$ Hz)
		1,92 (d, $J = 15$ Hz)		1,94 (d, $J = 15,5$ Hz)
21	38,00	nd*	35,17	1,86, 1,48
22	24,13	2,20	24,94	2,25, 1,85
28	64,43	4,32 (d, $J = 11$ Hz)	65,25	4,26 (d, $J = 11,2$ Hz)
		3,76 (d, $J = 11$ Hz)		3,78 (d, $J = 11,2$ Hz)
<b>CH<sub>3</sub></b>				
23	27,60	1,28 (s)	28,42	1,30 (s)
24	16,07	1,11 (s)	16,89	1,13 (s)
25	18,03	0,87 (s)	18,85	0,90 (s)
26	16,89	0,84 (s)	17,70	0,86 (s)
27	21,64	1,72 (s)	22,46	1,74 (s)
29	32,26	0,99 (s)	33,12	1,01 (s)
30	24,80	1,04 (s)	25,61	1,04 (s)
<b>Unidades osídicas</b>				
C-1'	104,53	4,83 (d)	105,31	4,98 (d, $J = 7,7$ Hz)
C-2'	85,50	4,14	83,83	4,14
C-3'	78,19	4,44 (t, $J = 9,5$ Hz)	78,96	4,46 (t, $J = 8,9$ Hz)
C-4'	70,43	4,15	71,23	4,15
C-5'	77,46	3,96 (m)	78,81	3,98
C-6'	62,56	4,46	63,36	4,58
		4,35		4,38
C-1''	102,95	5,51 (d, $J = 8$ Hz)	103,78	5,53 (d, $J = 7,5$ Hz)
C-2''	88,64	4,17	86,30	4,17
C-3''	78,18	4,43	78,26	4,29 (t, $J = 8,9$ Hz)
C-4''	71,32	4,21	72,14	4,22

**Tabela 24** – (Continuação).

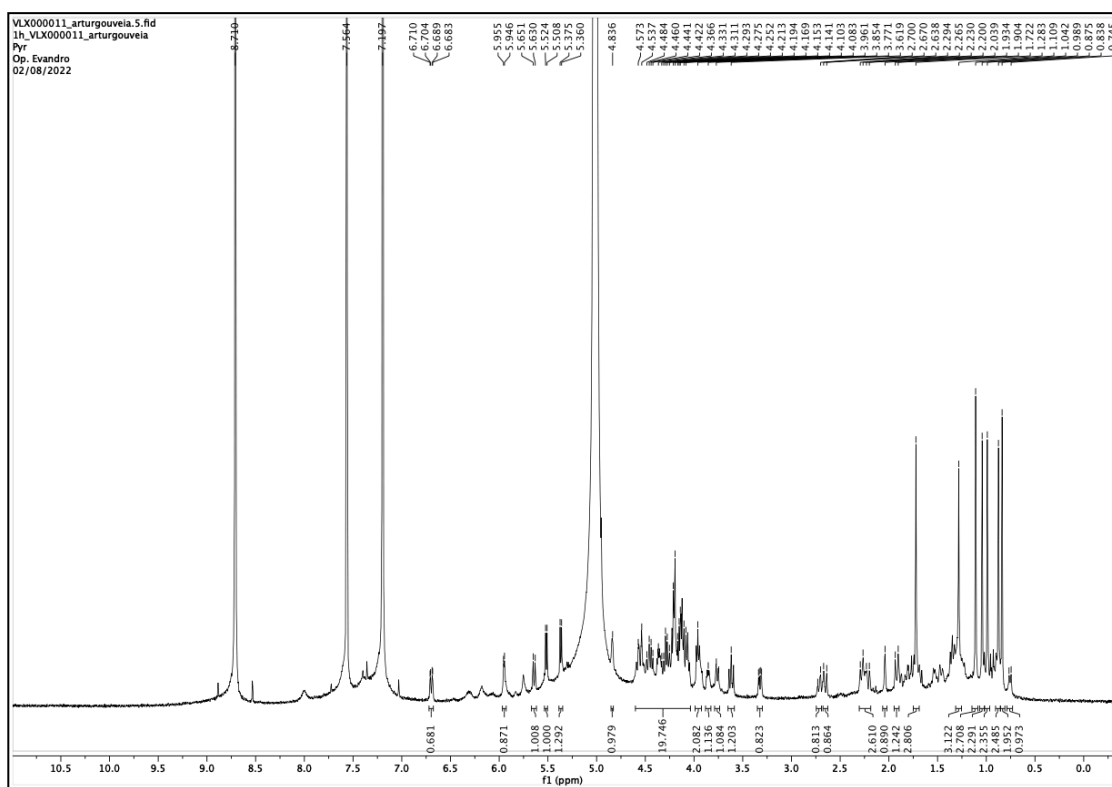
C-5''	77,41	3,85 (m)	78,19	3,87 (m)
C-6''	62,56	4,46 (m)	63,36	4,52 (dd, $J = 11,6$ e $2,4$ Hz)
		4,35		4,40
C-1'''	105,57	5,36 (d, $J = 7,5$ Hz)	106,37	5,39 (d, $J = 7,5$ Hz)
C-2'''	75,94	4,10	76,74	4,10
C-3'''	75,34	4,19	76,12	4,22
C-4'''	80,32	4,19	81,08	4,22
C-5'''	75,81	3,96 (m)	77,66	3,95
C-6'''	61,26	4,56	62,05	4,59 (dl)
		4,53		4,56 (dd)
C-1''''	105,30	4,97 (d)	106,06	5,00 (d, $J = 7,8$ Hz)
C-2''''	74,57	3,97	75,36	3,98
C-3''''	78,02	4,08	78,81	4,08
C-4''''	70,50	4,14	71,41	4,14
C-5''''	67,06	4,25	67,86	4,23
		3,62 (t, $J = 11$ Hz)		3,64 (t, $J = 10,4$ Hz)

nd\* - não detectado

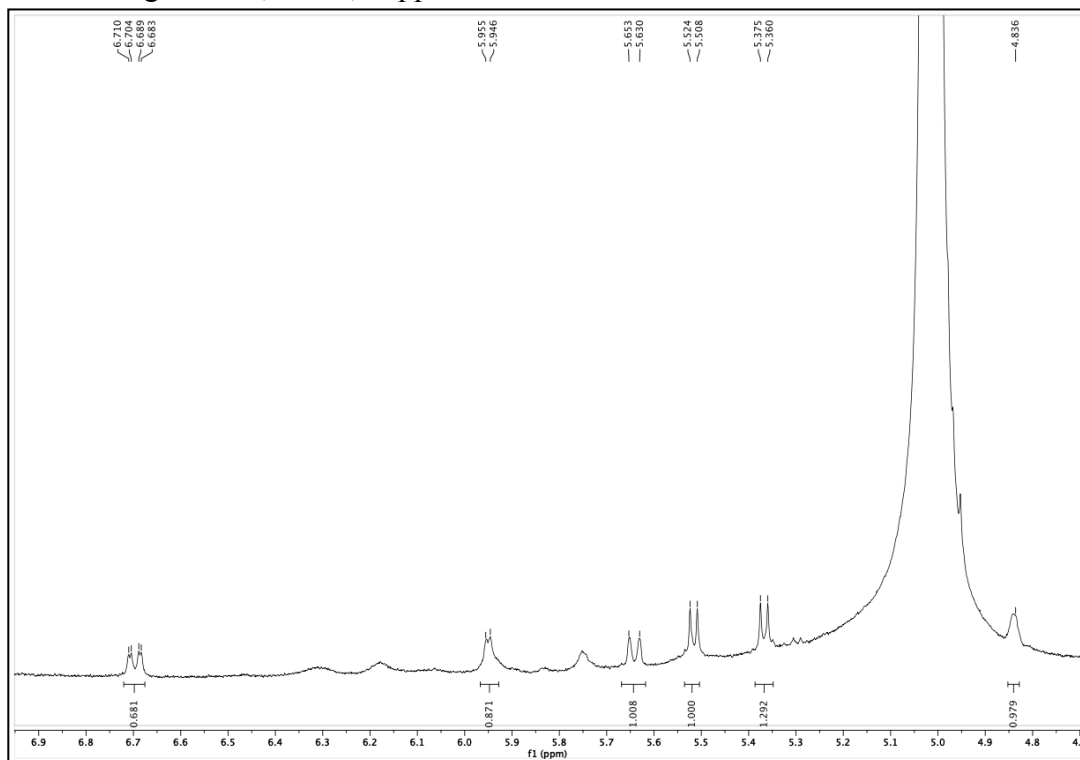


**3-O- $\beta$ -D-xilopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glicopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glicopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glicopiranosilolean-11,13-dien-3 $\beta$ ,16a,28-triol (VL-1)**

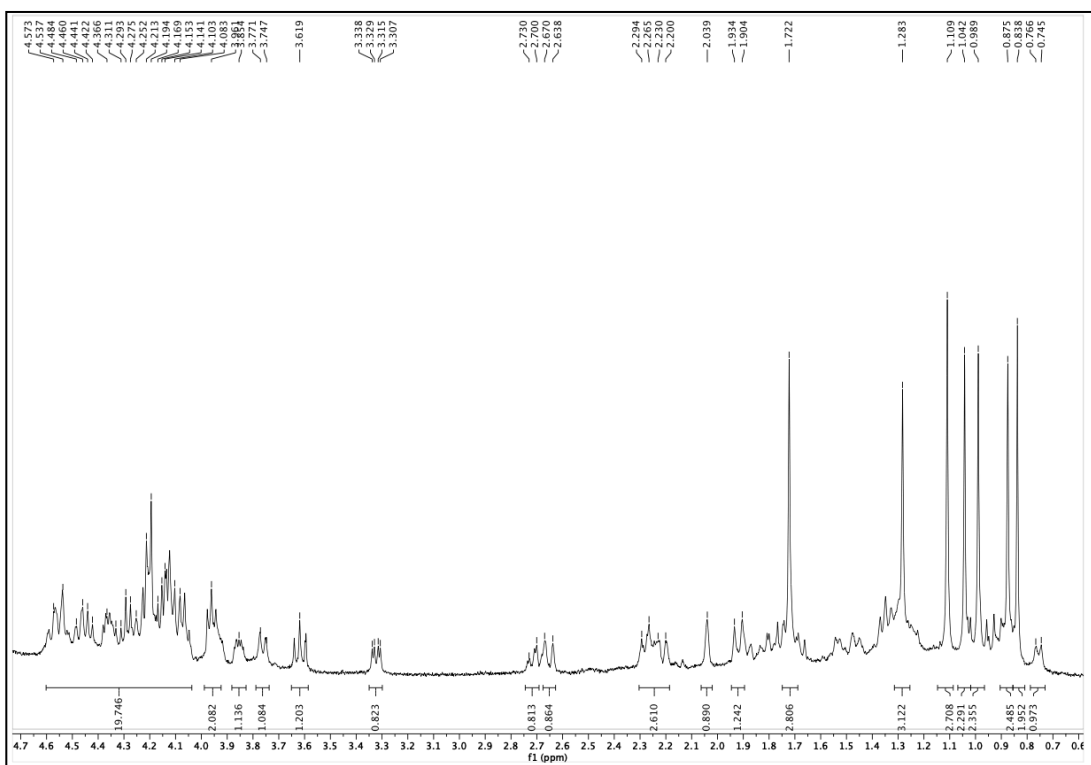
**Figura 62 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) da substância VL-1.**



**Figura 63 - Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) da substância VL-1 na região de 4,70 – 6,95 ppm.**



**Figura 64 - Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) da substância VL-1 na região de 0,6 – 4,7 ppm.**



**Figura 65 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) da substância VL-1**

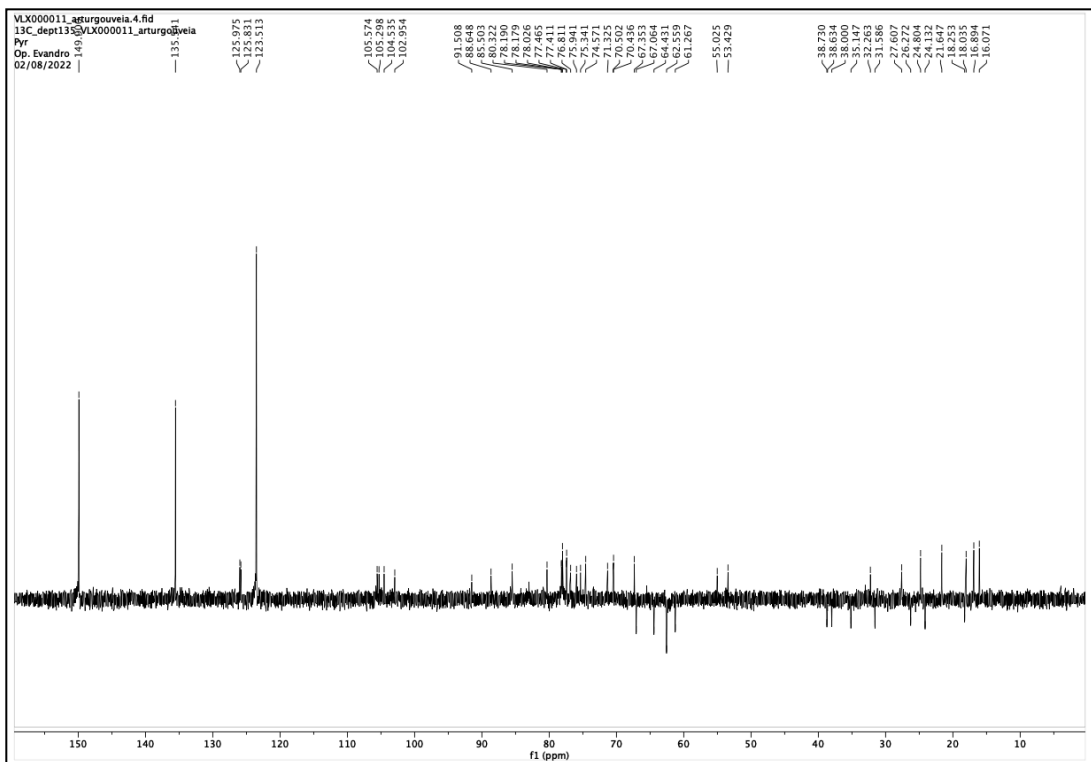


Figura 66 - Espectro de HMBC (500 e 125 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N) de VL-1.

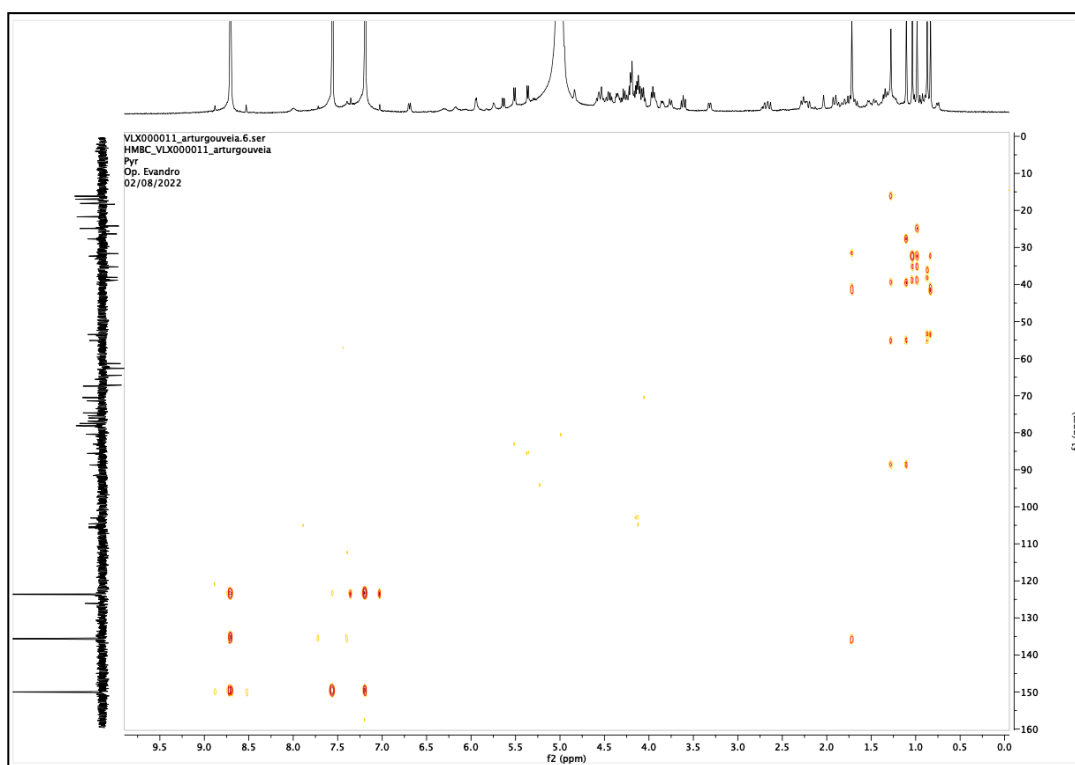


Figura 67 - Expansão do espectro de HMBC (500 e 125 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N) do composto VL-1 na região de 0,75 – 1,80 e 10 – 150 ppm.

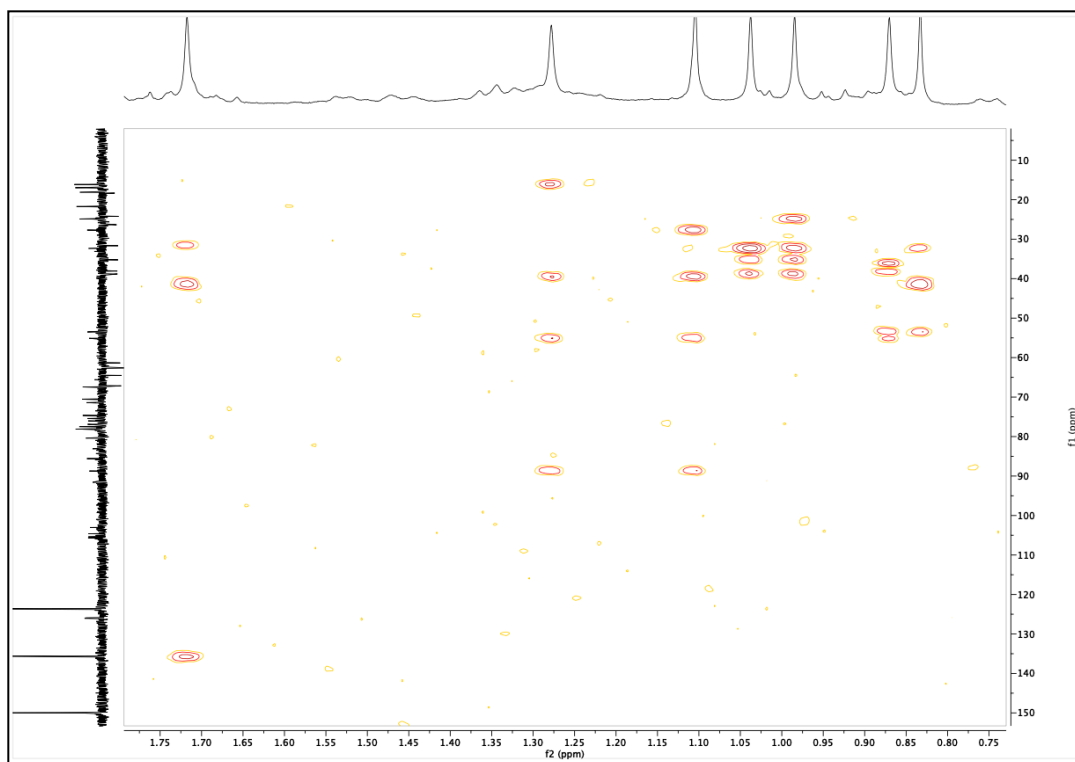




Figura 68 - Espectro de HSQC (500 e 125 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N) de VL-1.

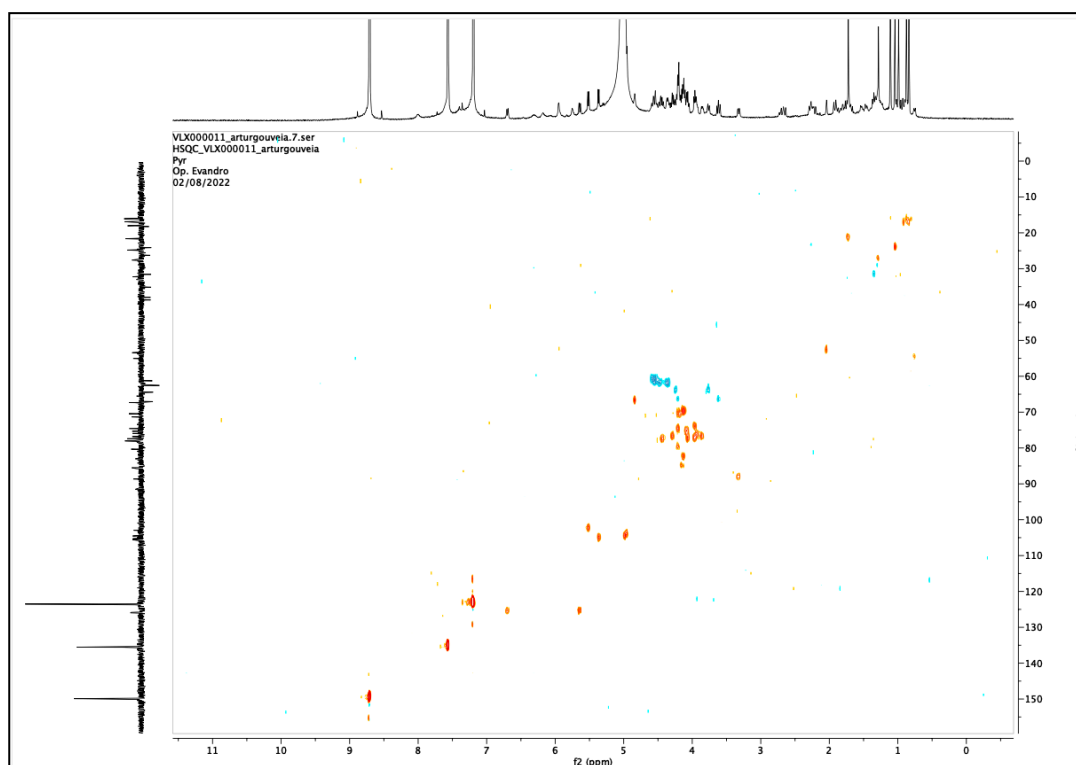
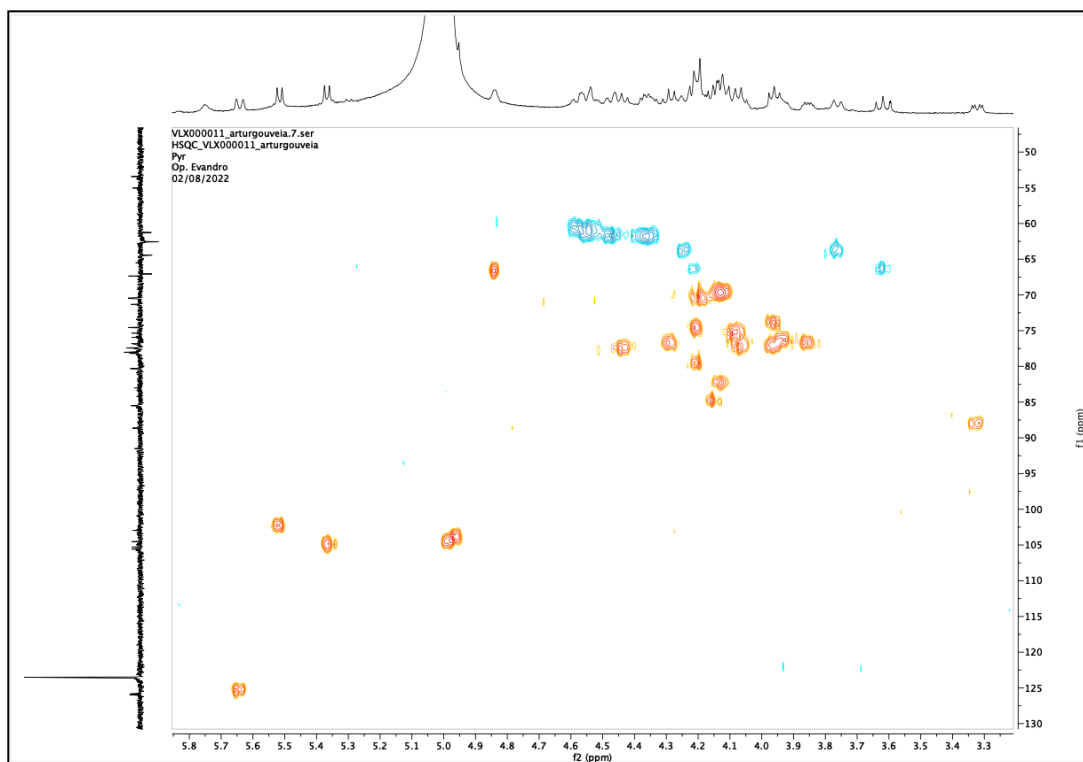


Figura 69 - Expansão do espectro de HSQC (500 e 125 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N) do composto VL-1 na região de 0,75 – 1,80 e 10 – 150 ppm.



## **CONCLUSION**

## 6. CONCLUSÃO

O estudo fitoquímico da fase acetato de etila do extrato das partes aéreas de *V. dardani*, resultou no isolamento de seis metabólitos secundários, sendo cinco flavonoides e o ácido rosmarínico, corroborando assim com outros estudos encontrados na literatura sobre o gênero *Varronia*, os quais também relataram o isolamento de diversos flavonoides e ácidos fenólicos.

Ainda com o extrato etanólico bruto de *V. dardani* (EEB-VD) foram realizadas a determinação de fenólicos totais e a quantificação do ácido rosmarínico, o qual é considerado um dos marcadores quimiotaxonômicos da família Cordiaceae. Esses testes foram um pretexto para tentar confirmar a hipótese de que os compostos fenólicos seriam responsáveis pelo possível efeito antiespasmódico, visto que essa espécie é utilizada tradicionalmente pela população, para aliviar as dores causadas pela cólica menstrual ou distúrbios gastrointestinais. Os testes farmacológicos mostraram que o EEB-VD apresentou uma atividade não seletiva nos diferentes tecidos e para os diferentes agonistas testados, apresentando maior potência no útero de ratos, sugerindo uma ação em uma via de sinalização comum tanto para a ocitocina quanto para a CCh, sendo necessário um estudo mais aprofundado para determinar o mecanismo de ação responsável por esse efeito.

Como existem diversos relatos na literatura de isolamento de quinonas no gênero *Cordia*, e sabendo que essa classe de metabólitos possui em sua maioria atividade citotóxica frente à diversas linhagens celulares, houve o interesse de realizar um estudo bioguiado utilizando as espécies *V. dardani* (partes aéreas e raízes) e *V. leucocephala* (partes aéreas), frente às células de melanoma humano (A2058). O extrato das raízes de *V. dardani* se mostrou o mais ativo, sendo assim, este foi submetido a um fracionamento cromatográfico, de onde foi possível o isolamento de uma hidroantraquinona (VD-R-I), relatada pela primeira vez na família Cordiaceae.

Devido ao baixo rendimento no isolamento do composto VD-R-I, decidiu-se realizar um estudo de quimioinformática, onde o conjunto de isômeros da substância foi analisado quanto à atividade na linhagem celular A2058, e segundo os resultados demonstrados, os isômeros são potencialmente ativos. A conformação 3 (1R,4aR,9aS) foi escolhida para avaliação das interações estabelecidas, pois apresentou o maior valor

entre os compostos da série. Foram observadas algumas interações entre resíduos de aminoácidos, comparando com o controle positivo dacarbazina e vemurafenibe, drogas utilizadas na terapia atual do melanoma. Sendo assim, seria interessante o reisolamento em maior quantidade dessa substância, para que se possa realizar testes confirmatórios *in vitro*, assim como determinar seu mecanismo de ação citotóxico frente às células A2058.

Já o extrato etanólico bruto das partes aéreas de *V. leucocephala*, teve o segundo melhor resultado dentre as espécies testadas no ensaio citotóxico, sendo a sua fração isopropanólica a mais ativa das suas frações. Assim sendo, esta fração foi submetida a um fracionamento cromatográfico de onde foi possível isolar uma saikosaponina, já isolada anteriormente na espécie.

Portanto, os resultados químicos e biológicos, obtidos nesse trabalho, contribuíram para o conhecimento sobre o gênero *Varronia*, ainda assim, o estudo revelou novas possibilidades de pesquisas envolvendo a busca de novos metabólitos secundários, principalmente da classe das quinonas, nessas espécies.

**RÉFÉRENCES  
BIBLIOGRAPHIQUES**

## REFERÊNCIAS

- ABDEL-ALEEM, E. R.; ATTIA, E. Z.; FARAG, F. F.; SAMY, M. N. Total phenolic and flavonoid contents and antioxidant, anti-inflammatory, analgesic, antipyretic and antidiabetic activities of *Cordia myxa* L. leaves. **Clinical Phytoscience**, v. 5, n. 29, 2019.
- ABRANTES, H. F. L.; AGRA, M. DE F. Estudo etnomedicinal das Boraginaceae na caatinga paraibana, Brasil. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 85, p. 7-12, 2004.
- ACEVEDO, C. A. H. **Estudos Quimiotaxonômicos e Triagem Virtual de Sesquiterpenos Lactonizados Isolados Da Família Asteraceae Com Potencial Atividade Leishmanicida e Tripanocida**. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa – PB, 2017.
- ACEVEDO, C. H.; SCOTTI, L.; FEITOSA ALVES, M.; FORMIGA MELO DINIZ, M.; SCOTTI, M. Computer-Aided Drug Design Using Sesquiterpene Lactones as Sources of New Structures with Potential Activity against Infectious Neglected Diseases. **Molecules**, v. 22, n. 1, 2017.
- ACEVEDO, C. H.; SCOTTI, L.; SCOTTI, M. T. *In Silico* Studies Designed to Select Sesquiterpene Lactones with Potential Antichagasic Activity from an In-House Asteraceae Database. **ChemMedChem**, v. 13, n. 6, p. 634–645, 2018.
- AGRAWAL, P.K. **Carbon-13 NMR of Flavonoids**. New York: Elsevier, 1989.
- AJAYA, M.; GILANIB, A. H.; MUSTAFAA, M. R. Effects of flavonoids on vascular smooth muscle of the isolated rat thoracic aorta. **Life Sciences**, v. 74, p. 603-612, 2003.
- ALBAYATY, M. A. A. Mechanism of the Tracheal Smooth Muscle Relaxant Activity of the *Cordia myxa* Plant Extract in Sheep. **The Iraqi Journal of Veterinary Medicine**, v. 32, n. 2, p. 214-226, 2008.
- ALI, S. S.; ASIF, M.; KHAN, N. A. Anti-Atherosclerosis and Anti-Hypertensive Effects of Flavonoid Isorhamnetin Isolated from the Bark of *Cordia dichotoma* L. **Journal of Pharmaceutical Research International**, v. 33, n. 42B, p. 316-338, 2021.
- ALQATHAMA, A.; PRIETO, J. M. Natural products with therapeutic potential in melanoma metastasis. **Natural Products Reports**, v. 32, p. 1170-1182, 2015.
- ALTURA, B. M.; ALTURA, B. T. Differential effects of substrate depletion on drug-induced contractions of rabbit aorta. **American Journal of Physiology**, v. 219, p. 1698 - 1705, 1970.
- ALVES, V.; BRAGA, R.; MURATOV, E.; ANDRADE, C. QUIMIOINFORMÁTICA: UMA INTRODUÇÃO. **Química Nova**, v. 41, n. 2, p. 202-212, 2017.

ALVES, J. V. D. O.; SILVA, D. S. J. da; LIMA, M. R. C.; SILVA, M. V. D. Efeito antioxidante de planta restrita ao bioma caatinga: Jacarandá (*Jacaranda rugosa*). **Blucher Biophysics Proceedings**, p. 77-78, 2017.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Melanoma Skin Cancer**. ACS, 2022. Disponível em < <https://www.cancer.org/cancer/melanoma-skin-cancer.html>>, Acesso em 04/08/2022.

ATANASOV, A. G.; WALTENBERGER, B.; PFERSCHY-WENZIG, E.-M.; LINDER, T.; WAWROSCHEK, C.; UHRIN, P.; TEMML, V.; WANG, L.; SCHWAIGER, S.; HEISS, E. H.; ROLLINGER, J. M.; SCHUSTER, D.; BREUSS, J. M.; BOCHKOV, V.; MIHOVILOVIC, M. D.; KOPP, B.; BAUER, R.; DIRSCH, V. M.; STUPPNER, H. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 8, p. 1582-1614, 2015.

ATAY, İ.; KIRMIZIBEKMEZ, H.; GÖREN, A. C.; YEŞİLADA, E. Secondary metabolites from *Sambucus ebulus*. **Turkish Journal of Chemistry**, v. 39, n. 1, p. 34-41, 2015.

AWARE, C. B.; PATIL, D. N.; SURYAWANSHI, S. S.; MALI, P. R.; RANE, M. R.; GURAV, R. G.; JADHAV, J. P. Natural bioactive products as promising therapeutics: A review of natural product-based drug development. **South African Journal of Botany**, (no prelo), p. 1 – 17, 2022.

BARROS, R. P. C.; DA CUNHA, E. V. L.; CATÃO, R. M. R.; SCOTTI, L.; SOUZA, M. S. R.; BRÁS, A. A. Q.; SCOTTI, M. T. Virtual Screening of Secondary Metabolites of the Genus *Solanum* with Potential Antimicrobial Activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 28, n. 6, p. 686–691, 2018.

BIRCHFIELD, A. S.; MCINTOSH, C. A. Metabolic engineering and synthetic biology of plant natural products – A minireview. **Current Plant Biology**, v. 24, 2020.

BLAŽEVIĆ, T.; REZNICEK, G.; DING, L.; YANG, G.; HAISS, P.; HEISS, E. H.; DIRSCH, V. M.; LIU, R. Short Chain ( $\leq C_4$ ) Esterification Increases Bioavailability of Rosmarinic Acid and Its Potency to Inhibit Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, 2021.

BODAKHE, S. H.; RAM, A.; VERMA, S.; PANDEY, D. P. Anticataract activity of rhamnocitrin isolated from *Bauhinia variegata* stem bark. **Oriental Pharmacy and Experimental Medicine**, v. 12, p. 227–232, 2012.

BOHM, B. A. The minor flavonoids. In: Harborne, J.B. (Ed.), **The Flavonoids: Advances in Research Since**. Chapman & Hall, London, UK, p. 387–440, 1994.

BORGATI, T.; DE SOUZA, J.; DE OLIVEIRA, A. A Complete and Unambiguous  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR Signals Assignment of para- naphthoquinones, ortho- and para-furanonaphthoquinones. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, n. 6, p. 1138-1149, 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde, **Relatório de recomendação da Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS - Ipilimumabe para tratamento de pacientes com melanoma metastático**. Número 391. Brasília – DF, 2018.

BRAY, F.; FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; SIEGEL, R. L.; TORRE, L. A.; JEMAL, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394-424, 2018.

BREIMAN, L. Random Forest. **Machine Learning**, v. 45, n. 1, p. 5–32, 2001.

BUCKINGHAM, J.; MUNASINGHE, V. **Dictionary of Flavonoids with CD-ROM**. Boca Raton, FL: CRC Press, 2015.

BYUN, E.; KIM, H.; SONG, H.; KIM, W. Hesperidin structurally modified by gamma irradiation induces apoptosis in murine melanoma B16BL6 cells and inhibits both subcutaneous tumor growth and metastasis in C57BL/6 mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 127, p. 19-30, 2019.

CABRAL, I. S. R.; OLDONI, T. L. C.; PRADO, A.; BEZERRA, R. M. N.; ALENCAR, S. M. D.; IKEGAKI, M.; ROSALEN, P. L. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Química Nova**, v. 32, p. 1523-1527, 2009.

CAO, H.-H.; LIU, D.-Y.; LAI, Y.-C.; CHEN, Y.-Y.; YU, L.-Z.; SHAO, M.; LIU, J.-S. Inhibition of the STAT3 Signaling Pathway Contributes to the Anti-Melanoma Activities of Shikonin. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, 2020a.

CAO, H.; ZHANG, W.; LIU, D.; HOU, M.; LIU, S.; HE, W.; LIN, J.; SHAO, M. Identification, in vitro evaluation and modeling studies of the constituents from the roots of *Arnebia euchroma* for antitumor activity and STAT3 inhibition. **Bioorganic Chemistry**, v. 96, 2020b.

CASTRO, A. S.; CAVALCANTE, A. **Flores da Caatinga**. Campina Grande: Instituto Nacional do Semiárido, p. 59, 2011.

CAVALCANTE, M. Z. B.; DULTRA, D. F. S.; SILVA, H. L. C.; COTTING, J. C.; SILVA, S. D. P. da; SIQUEIRA FILHO, J. A. de. Potencial ornamental de espécies do Bioma Caatinga. **Comunicata Scientiae**, v. 8, n. 1, p. 43-58, jan. 2017.

CHAGAS, E. C. O.; COSTA-LIMA, J. L. da. A New Species of *Varronia* (Cordiaceae, Boraginales) from Northeastern Brazil. **Systematic Botany**, v. 43, n. 4, p. 1026–1029, nov. 2018.

CHINEMBIRI, T. N. Review of Natural Compounds for Potential Skin Cancer Treatment. **Molecules**, v. 19, p. 11679-11721, 2014.

CHUBATSU NUNES, H. H.; NGUYEN, T.-D.; DANG, T.-T. T. Chemoenzymatic synthesis of natural products using plant biocatalysts. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 35, 2022.



COLEBATCH, A. J.; PAVER, E. C.; VERGARA, I. A.; THOMPSON, J. F.; LONG, G. V.; WILMOTT, J. S.; SCOLYER, R. A. Elevated non-coding promoter mutations are associated with malignant transformation of melanocytic naevi to melanoma. **Pathology**, 2022.

DA MOTA, L. A.; PEREIRA, D. T. M.; ASSIS, M. E. S.; MARQUES, S. B.; DA SILVA, B. B. Etnofarmacologia de plantas medicinais utilizadas pela população rural e ribeirinha do município de Itacoatiara-AM. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 5, 2022.

DANTAS, D. L.; DE ARAÚJO, C. A.; DE SOUZA NETO, P. R.; RUFINO DE FREITAS, J. J. R. de F. J.; A. GOMES DA CÂMARA, C.; N. DE OLIVEIRA, R.; C. RUFINO DE FREITAS, J.; R. DE FREITAS FILHO, J. Advances in the Synthesis, Biological Activities and Applications of Cordiaquinones in the *Cordia* Genus: A Review. **Revista Virtual de Química**, v. 13, n. 6, p. 1353-1371, 2021.

DE ALENCAR SILVA, A.; PEREIRA-DE-MORAIS, L.; RODRIGUES DA SILVA, R. E.; DE MENEZES DANTAS, D.; BRITO MILFONT, C. G.; GOMES, M. F.; ARAÚJO, I. M.; KERNTOPF, M. R.; ALENCAR DE MENEZES, I. R.; BARBOSA, R. Pharmacological screening of the phenolic compound caffeic acid using rat aorta, uterus and ileum smooth muscle. **Chemico-Biological Interactions**, v. 332, 2020.

DE ARAÚJO, H. F. P.; GARDA, A. A.; GIRÃO E SILVA, W. A. de; NASCIMENTO, N. F. F. do; MARIANO, E. de F.; SILVA, J. M. C. da. The Caatinga region is a system and not an aggregate. **Journal of Arid Environments**, v. 203, 2022.

DE MELO, A. C.; WAINSTEIN, A. J. A.; BUZAID, A. C.; THULER, L. C. S. Melanoma signature in Brazil: epidemiology, incidence, mortality, and trend lessons from a continental mixed population country in the past 15 years. **Melanoma Research**, v. 28, p. 629–636, 2018.

DE OLIVEIRA, F. A. G. **Contribuição ao estudo fitoquímico da espécie *Varronia dardani* (Taroda) J.S. Mill (Boraginaceae)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Naturais) – Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, Mossoró, 2016.

DE OLIVEIRA, J. C. S.; DA CAMARA, C. A. G.; SCHWARTZ, M. O. E. Volatile Constituents of the Stem and Leaves of *Cordia* Species from Mountain Forests of Pernambuco (North-eastern Brazil). **Journal of Essential Oil Research**, v. 19, n. 5, p. 444-448, 2007.

DEMÉTRIO, A. M. **Morfoanatomia da folha de *Varronia monosperma* (Cordiaceae)**. Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.

DI CARLO, G.; MASCOLO, N.; IZZO, A. A.; CAPASSO, F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life Sciences**, v. 65, n. 4, p. 337–353, 1999.

DIAZ-MUÑOZ, G.; MIRANDA, I. L.; SARTORI, S. K.; DE REZENDE, D. C.; DIAZ, M. A. N. In: Chapter 11: Anthraquinones: An Overview. **Studies in Natural Products Chemistry**, Elsevier, 2018.

DINIZ, J. C.; VIANA, F. A. V.; OLIVEIRA, I. B. DE; MACIEL, M. A. M.; TORRES, M. DA C. M.; SILVEIRA, E. R.; BRAZ-FILHO, R.; PESSOA, O. D. L. New triterpenic saponins of *Cordia leucocephala* (Boraginaceae). **31 Annual meeting of the Brazilian Chemical Society From oil to biomass: solutions for a better world**, 2008.

DINIZ, J. C.; VIANA, F. A.; OLIVEIRA, O. F.; MACIEL, M. A. M.; TORRES, M. da C. de M.; BRAZ-FILHO, R.; SILVEIRA, E. R.; PESSOA, O. D. L. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR assignments for two new cordiaquinones from roots of *Cordia leucocephala*. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 47, p. 190-193, 2008.

DINIZ, J. C.; VIANA, F. A.; TORRES, M. da C. M.; BRAZ-FILHO, R.; SILVEIRA, E. R.; PESSOA, O. D. L. An Uncommon Naphthaquinoid and a New Lignan Derivative from the Roots of *Cordia leucocephala* Moric. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, n. 2, p. 325-330, 2015.

DORNAS, W. C.; OLIVEIRA, T. T. D.; RODRIGUES-DAS-DORES, R. G.; SANTOS, A. F. D.; NAGEM, T. J. Flavonóides: Potencial terapêutico no estresse oxidativo. **Revista de Ciências Farmaceuticas Basica e Aplicada**, v. 28, n. 31, p. 241–249, 2007.

DUARTE, B. A. M. **Estudo químico e biológico do óleo essencial da *Varronia dardani* (Taroda) J.S. Mill (Boraginaceae)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Naturais) – Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, Mossoró, 2015.

ELSBAEY, M.; IBRAHIM, M. A. A.; SHAWKY, A. M.; MIYAMOTO, T. *Eryngium creticum* L.: Chemical Characterization, SARS-CoV-2 Inhibitory Activity, and *In Silico* Study. **American Chemical Society**, v. 7, n. 26, p. 22725–22734, 2022.

ERB, M.; ZÜST, T.; ROBERT, C. A. M. Using plant chemistry to improve interactions between plants, herbivores and their natural enemies: challenges and opportunities. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 70, p. 262 – 265, 2021.

FALKENBERG, M. DE B. Quinonas. In: Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. 1ed. Porto Alegre: Artmed, v. 1, 2017.

FAN, J.; FU, A.; ZHANG, L. Progress in molecular docking. **Quantitative Biology**, v. 7, p. 83-89, 2019.

FEREDE, Y. A.; ZEWDU, W. S.; ZELEKE, M. M.; ALEMU, M. A. Evaluation of Antidiarrheal Activity of 80% Methanolic Extract of the Leaves of *Cordia africana* (Lamiaceae) in Mice. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2021.

FERNANDES, M. D. S. da S.; MORAIS, M. B. de; MESQUITA-OLIVEIRA, F. F.; ULISSES, C.; MEDEIROS, J. F. de; ALBUQUERQUE, C. C. de. Arbuscular

mycorrhizal fungi and auxin associated with microelements in the development of cuttings of *Varronia leucocephala*. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 23, n. 3, 2019.

FERREIRA, F. N. **Conhecimento e usos de plantas medicinais e suas interconexões com a saúde pública do município de Arauá/SE**. 2017. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento e Meio Ambiente) – Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2017.

FIRMO, W. C. A.; MENEZES, V. J. M.; PASSOS, C. E. C.; DIAS, C. N.; ALVES, L. P. L.; DIAS, I. C. L.; NETO, M. S.; OLEA, R. S. G. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. **Cadernos de Pesquisa**, v. 18, 2011.

FOURCHES, D.; MURATOV, E.; TROPSHA, A. Trust, but verify: on the importance of chemical structure curation in cheminformatics and QSAR modeling research. **Journal of chemical information and modeling**, v. 50, n. 7, p. 1189-1204, 2010.

FREITAS, H. P. S. **Estudo químico e farmacológico de *Cordia polycephala* (Lam.) I. M. Johnston (Boraginaceae)**. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

FREITAS, H. P. S.; MAIA, A. I. V.; SILVEIRA, E. R.; MARINHO FILHO, J. D. B.; MORAES, M. O.; PESSOA, C.; LOTUFO, L. V. C.; PESSOA, O. D. L. Cytotoxic cordiaquinones from the roots of *Cordia polycephala*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 8, p. 1558-1562, 2012.

FRISMANTIENE, A.; PHILIPPOVA, M.; ERNE, P.; RESINK, T. J. Smooth muscle cell-driven vascular diseases and molecular mechanisms of VSMC plasticity. **Cellular Signalling**, v. 52, p. 48-64, 2018.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelium cell in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, n. 5789, p. 373 - 376, 1980.

FURMAN-TOCZEK, D. et al. A review of selected natural phytochemicals in preventing and treating malignant skin neoplasms. **Journal of Pre-Clinical and Clinical Research**, v. 10, p. 127-130, 2016.

GANOS, C.; ALIGIANNIS, N.; CHINOU, I.; NAZIRIS, N.; CHOUNTOULESI, M.; MROCZEK, T.; GRAIKOU, K. *Rindera graeca* (Boraginaceae) Phytochemical Profile and Biological Activities. **Molecules**, v. 25, n. 16, p. 1-13, 2020.

GARBE, C.; KEIM, U.; GANDINI, S.; AMARAL, T.; KATALINIC, A.; HOLLEZCEK, B.; MARTUS, P.; FLATZ, L.; LEITER, U.; WHITEMAN, D. Epidemiology of cutaneous melanoma and keratinocyte cancer in white populations 1943–2036. **European Journal of Cancer**, v. 152, p. 18-25, 2021.

GATTUSO, G.; BARRECA, D.; GARGIULLI, C.; LEUZZI, U.; CARISTI, C. Flavonoid composition of citrus juices. **Molecules**, v. 12, n. 8, p. 1641-1673, 2007.

GOMES, M. V. da S.; DA SILVA, J. D.; RIBEIRO, A. F.; CABRAL, L. M.; DE SOUSA, V. P. Development and validation of a quantification method for  $\alpha$ -humulene and trans-caryophyllene in *Cordia verbenacea* by high performance liquid chromatography. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 53, 2019.

GRAIKOU, K.; DAMIANAKOS, H.; GANOS, C.; SYKŁOWSKA-BARANEK, K.; JEZIOREK, M.; PIETROSIUK, A.; ROUSSAKIS, C.; CHINO, I. Chemical Profile and Screening of Bioactive Metabolites of *Rindera graeca* (A. DC.) Bois. & Heldr. (Boraginaceae) *In Vitro* Cultures. **Plants**, v. 10, n. 5, 2021.

GUAN, H.; LUO, W.; BAO, B.; CAO, Y.; CHENG, F.; YU, S.; FAN, Q.; ZHANG, L.; WU, Q.; SHAN, M. A Comprehensive Review of Rosmarinic Acid: From Phytochemistry to Pharmacology and Its New Insight. **Molecules**, v. 27, p. 1-28, 2022.

HANRAHAN, J. R.; CHEBIB, M.; JOHNSTON, G. A. R. Flavonoid modulation of GABA<sub>A</sub> receptors. **British Journal of Pharmacology**, v. 163, n. 2, 2011.

HARDY, K. Paleomedicine and the Evolutionary Context of Medicinal Plant Use. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 31, p. 1 – 15, 2020.

HIKMAWANTI, N. P.; HANANI, E.; SAPITRI, Y.; NINGRUM, W. Total Phenolic Content and Antioxidant Activity of Different Extracts of *Cordia sebestena* L. Leaves. **Pharmacognosy Journal**, v. 12, n. 6, p. 1311-1316, 2020.

IMTIAZ, S.; ALEEM, A.; SAQIB, F.; ORMENISAN, A.; ELENA NECULAU, A.; ANASTASIU, C. The Potential Involvement of an ATP-Dependent Potassium Channel-Opening Mechanism in the Smooth Muscle Relaxant Properties of *Tamarix dioica* Roxb. **Biomolecules**, v. 9, n. 11, 2019.

INCA. **Câncer de pele - melanoma - versão para Profissionais de Saúde**. Disponível em < <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/tipos/pele-melanoma/versao-para-profissionais-de-saude>>, Acesso em 04/08/2022.

INCA. **O que é o câncer**. INCA, 2022. Disponível em < <https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer>> Acesso em 04/08/2022.

IRADYAN, M. A.; IRADYAN, N. S.; STEPANYAN, G. M.; ARSENYAN, F. G.; GARIBDZHANYAN, B. T. Antitumor Activity of Imidazole Derivatives: Dacarbazine and the New Alkylating Agent Imidazene. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 44, n. 4, p. 175-182, 2010.

JI, X.-S.; DAI, D.-C.; WANG, Y.-T.; CUI, J.-Y.; LI, H.-X.; SONG, X.-M.; YI, J.-L.; ZHOU, X.-M. Two new anthraquinone derivatives from *Saprosma crassipes* H. S. Lo. **Natural Product Research**, 2022.

KAMAU, R. W.; MIDIWO, J. O.; MGANI, Q. A.; MASILA, V. M.; OMOSA, L. K.; BWIRE, R. N.; JACOB, M. R.; WIGGERS, F. T.; MUHAMMAD, I. Oleanolic Acid and other Compounds Isolated from *Cordia africana* Lam which Inhibit Vancomycin Resistant *Enterococcus*. **Pharmacognosy Communications**, v. 9, n. 3, p. 91-95, 2019.

- KEYVANPOUR, M. R.; SHIRZAD, M. B. An Analysis of QSAR Research Based on Machine Learning Concepts. **Current Drug Discovery Technologies**, v. 18, n. 1, p. 17-30, 2021.
- KHAN, M. K.; DANGLES, O. A comprehensive review on flavanones, the major citrus polyphenols. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 33, n. 1, p. 85-104, 2014.
- KHAN, S.; KHAN, T.; SHAH, A. J. Total phenolic and flavonoid contents and antihypertensive effect of the crude extract and fractions of *Calamintha vulgaris*. **Phytomedicine**, v. 47, p. 174-183, 2018.
- KHANDOKAR, L.; BARI, Md. S.; SEIDEL, V.; HAQUE, Md. A. Ethnomedicinal uses, phytochemistry, pharmacological activities and toxicological profile of *Glycosmia pentaphylla* (Retz.) DC.: A review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 278, 2021.
- KIM, H. Y.; MOON, B. H.; LEE, H. J.; CHOI, D. H. Flavonol glycosides from the leaves of *Eucommia ulmoides* O. with glycation inhibitory activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 93, p. 227–230, 2004.
- KOPROWSKA, K.; CZYŻ, M. Dacarbazine, a Chemotherapeutic against Metastatic Melanoma and a Reference Drug for New Treatment Modalities. **Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej** (Online), v. 65, p. 734-751, 2011.
- KOZYRA, M.; KORGA, A.; OSTROWSKA, M.; HUMENIUK, E.; ADAMCZUK, G.; GIEROBA, R.; MAKUCH-KOCKA, A.; DUDKA, J. Cytotoxic activity of methanolic fractions of different *Marrubium* spp. Against melanoma cells is independent of antioxidant activity and total phenolic content. **FEBS Open Bio**, v. 10, p. 86-95, 2019.
- KUANG, Q.-X.; LUO, Y.; LEI, L.-R.; GUO, W.-X.; LI, X.-A.; WANG, Y.-M.; HUO, X.-Y.; LIU, M.-D.; ZHANG, Q.; FENG, D.; HUANG, L.-J.; WANG, D.; GU, Y.-C.; DENG, Y.; GUO, D.-L. Hydroanthraquinones from *Nigrospora sphaerica* and Their Anti-inflammatory Activity Uncovered by Transcriptome Analysis. **Journal of Natural Products**, v. 85, n. 6, p. 1474–1485, 2022.
- KUPINA, S.; FIELDS, C.; ROMAN, M. C.; BRUNELLE, S. L. Determination of Total Phenolic Content Using the Folin-C Assay: Single-Laboratory Validation, First Action 2017.13. **Journal of AOAC INTERNATIONAL**, v. 101, n. 5, p. 1466–1472, 2019.
- KYRGIDIS, A. Chapter 1 - Melanoma Epidemiology. *In*: ARGENZIANO, G.; LALLAS, A.; LONGO, C.; MOSCARELLA, E.; KYRGIDIS, A.; FERRARA, G. **Cutaneous Melanoma: A Pocket Guide for Diagnosis and Management**, Elsevier, p. 1-9, 2017.
- KYRIAKOU, S.; TRAGKOLA, V.; PLIOUKAS, M.; ANESTOPOULOS, I.; CHATZOPOULOU, P. S.; SARROU, E.; TRAFALIS, D. T.; DELIGIORGI, M. V.; FRANCO, R.; PAPPAS, A.; PANAYIOTIDIS, M. I. Chemical and Biological Characterization of the Anticancer Potency of *Salvia fruticosa* in a Model of Human Malignant Melanoma. **Plants**, v. 10, n. 11, 2021.

LEAL-COSTA, M. V.; AMÉLIA, R. P. Anatomia foliar de *Varronia curassavica* Jacq. (Cordiaceae). **Revista Fitos**, Rio de Janeiro, v. 11, n. 1, p. 33-39, 2017.

LI, H.-L.; LI, X.-M.; LI, X.; WANG, C.-Y.; LIU, H.; KASSACK, M. U.; MENG, L.-H.; WANG, B.-G. Antioxidant Hydroanthraquinones from the Marine Algal-Derived Endophytic Fungus *Talaromyces islandicus* EN-501. *Journal of Natural Products*, v. 80, n. 1, p. 162–168, 2017.

LI, L.; LI, M. H.; LI-JIA; XU, L. J.; GUO, N.; WU-LAN, T. N. SHI, R. B.; PENG, Y.; XIAO, P. G. Distribution of seven polyphenols in several medicinal plants of Boraginaceae in China. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, n. 12, p. 1216-1221, 2010.

LI, X.; LI, X.-M.; WANG, B.-G. Structural Revision of Wentiquinone C and Related Congeners from Anthraquinones to Xanthenes Using Chemical Derivatization and NMR Analysis. **Marine Drugs**, v. 17, n. 1, 2018.

LIMA, L. S. Químioinformática, **Revista Ciência Elementar**, v. 3, n. 2, p. 130-132, 2015.

LOPES, K.; OLIVEIRA, J.; SOUSA-JUNIOR, F. J. C.; SANTOS, T. da F.; ANDRADE, D.; ANDRADE, S. L.; PEREIRA, W. L.; GOMES, P. W. P.; MONTEIRO, M. C.; E SILVA, C. Y. Y.; DA SILVA, M. N.; MAIA, C. F.; FONTES-JÚNIOR, E. A. Chemical Composition, Toxicity, Antinociceptive, and Anti-Inflammatory Activity of Dry Aqueous Extract of *Varronia multispicata* (Cham.) Borhidi (Cordiaceae) Leaves. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, p. 1-15, 2019.

LUNA, E. M.; LOPES, H. T. O.; RODRIGUES, F. A. Á.; COUTINHO, H. D. M.; DE OLIVEIRA, L. C. C. Antioxidant potential of the Caatinga flora. **Phytomedicine Plus**, v. 2, n. 2, 2022.

MANDOVA, T. Natural Products Research & The Wealth of Brazilian Biodiversity (NPR & WBB). **Phytochemistry Letters**, v. 47, p. 180 – 186, 2022.

MARINHO-FILHO, J. D. B.; BEZERRA, D. P.; ARAÚJO, A. J.; MONTENEGRO, R. C.; PESSOA, C.; DINIZ, J. C.; VIANA, F. A.; PESSOA, O. D. L.; SILVEIRA, E. R.; DE MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V. Oxidative stress induction by (+)-cordiaquinone J triggers both mitochondria-dependent apoptosis and necrosis in leukemia cells. **Chemico-Biological Interactions**, v. 183, n. 3, p. 369-379, 2010.

MARTÍNEZ-PÉREZ, E. F.; JUÁREZ, Z. N.; HERNÁNDEZ, L. R.; BACH, H. Natural Antispasmodics: Source, Stereochemical Configuration, and Biological Activity. **BioMed Research International**, 2018.

MATTHEWS, B. W. Comparison of the Predicted and Observed Secondary Structure of T4 Phage Lysozyme. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure**, v. 405, n. 2, p. 442-451, 1975.

MATIAS, E. F. F.; ALVES, E. F.; SILVA, M. K. N.; CARVALHO, V. R. A.; COUTINHO, H. D. M.; COSTA, J. G. M. The genus *Cordia*: botanists, ethno, chemical



and pharmacological aspects. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 5, p. 542-552, 2015.

MAYOKA, G.; MUTAI, P.; OKALEBO, F.; JUMA, D. Acute toxicity, analgesic, and smooth muscle relaxant effects of the aqueous root extract of *Asparagus racemosus* from Kenya. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 16, n. 3, p. 102-110, 2022.

MELO, J. I. M. de; PAULINO, R. C.; OLIVEIRA, R. C.; VIEIRA, D. D. Flora of Rio Grande do Norte, Brazil: Boraginales. **Phytotaxa**, v. 357, n. 4, p. 235-260, 2018.

MELO, J. I. M. de. Synopsis of Boraginaceae sensu lato in the Caatingas of the São Francisco River, Northeastern Brazil. **Anales del Jardín Botánico de Madrid**, v. 72, p. 1-8, 2015.

MELO, M. A H.; VIANA, F. A.; DINIZ, J. C.; DE OLIVEIRA, F. M.; SARAFIM, S. A. Saponinas das folhas de *Cordia leucocephala* Moric. In: **Salão de Iniciação Científica (8.: 2012: Mossoró, RN) Anais do 8º Salão de Iniciação Científica; 1º Encontro de Pesquisa e Pós-graduação - UERN**, Mossoró - RN, 2012.

MENEZES, J. E. S. A.; LEMOS, T. L. G.; SILVEIRA, E. R.; BRAZ-FILHO, R.; PESSOA, O. D. L. Trichotomol, a New Cadinenediol from *Cordia trichotoma*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 12, n. 6, p. 787-790, 2001.

MILLER, J.; GOTTSCHLING, M. Generic Classification in the Cordiaceae (Boraginales): Resurrection of the Genus *Varronia* P. Br. **Taxon**, v. 56, n. 1, p. 163-169, 2007.

MONTASERI, H.; NKUNE, N. W.; ABRAHAMSE, H. Active targeted photodynamic therapeutic effect of silver-based nanohybrids on melanoma cancer cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 11, 2022.

NEUBIG, R. R.; SPEDDING, M.; KENAKIN, T.; CHRISTOPOULOS, A. International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. XXXVIII. Update on terms and symbols in quantitative pharmacology. **Pharmacological Reviews**, v. 55, n. 4, p. 597-606, 2003.

NIZIO, D. A. de C. **Estudo fitoquímico e atividades antifúngica e antiprotozoária do óleo essencial de genótipos de erva-baleeira (*Varronia curassavica* Jacq.)**. 2015. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2015.

NOGUEIRA, T. B. DE S. DE S.; NOGUEIRA, R. B. DE S. DE S.; ANTAS E SILVA, D.; TAVARES, J. F.; LIMA, E. DE O.; PEREIRA, F. DE O.; DE SOUZA FERNANDES, M.; DE MEDEIROS, F.; DO SOCORRO FERREIRA RODRIGUES SARQUIS, R.; FILHO, R.; DA SILVA MACIEL, J.; DE SOUZA, M. DE F. V. First Chemical Constituents from *Cordia exaltata* Lam and Antimicrobial Activity of Two Neolignans. **Molecules**, v. 18, p. 11086-11099, 2013.

OZA, M. J.; KULKARNI, Y. A. Traditional uses, phytochemistry and pharmacology of the medicinal species of the genus *Cordia* (Boraginaceae). **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 69, p. 755-789, 2017.

PELTER, A.; WARD, R.S.; GRAY, T.I. The Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance spectra of Flavonoids and related compounds. **Journal of the Chemical Society**, v. 23, p. 2475-2483, 1976.

PIRES, C. A. A.; FAYAL, A. P.; CAVALCANTE, R. H.; FAYAL, S. P.; LOPES, N. S.; FAYAL, F. P.; DOS SANTOS, M. A. L. Câncer de pele: caracterização do perfil e avaliação da proteção solar dos pacientes atendidos em serviço universitário. **Journal of Health & Biological Sciences**, v. 6, n. 1, p. 54-59, 2018.

POLI, G.; TUCCINARDI, T. Consensus Docking in Drug Discovery. **Current Bioactive Compounds**, v. 16, n. 3, p. 182-190, 2020.

PRAKASH, S.; ELAVARASAN, N.; SUBASHINI, K.; KANAGA, S.; DHANDAPANI, R.; SIVANANDAM, M.; KUMARADHAS, P.; THIRUNAVUKKARASU, C.; SUJATHA, V. Isolation of hesperetin - A flavonoid from *Cordia sebestena* flower extract through antioxidant assay guided method and its antibacterial, anticancer effect on cervical cancer via *in vitro* and *in silico* molecular docking studies. **Journal of Molecular Structure**, v. 1207, 2020.

PROCHÁZKOVÁ, E.; KUCHERAK, O.; STODŮLKOVÁ, E.; TOŠNER, Z.; CÍSAŘOVÁ, I.; FLIEGER, M.; KOLAŘÍK, M.; BASZCZYŃSKI, O. NMR Structure Elucidation of Naphthoquinones from *Quambalaria cyanescens*. **Journal of Natural Products**, v. 84, p. 46-55, 2020.

PROTA, A. E.; DANIEL, F.; BACHMANN, F.; BARGSTEN, K.; BUEY, R. M.; POHLMANN, J.; REINELT, S.; LANE, H.; STEINMETZ, M. O. The Novel Microtubule-Destabilizing Drug BAL27862 Binds to the Colchicine Site of Tubulin with Distinct Effects on Microtubule Organization. **Journal of Molecular Biology**, v. 426, n. 8, p. 1848-1860, 2014.

QIU, Z.; ZHOU, J.; HU, J.; WU, Y.; ZHENG, G. Total flavonoids from *Ampelopsis megalophylla* suppress proliferation of vascular smooth muscle cells *in vivo* and *in vitro*. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 53, n. 3, 2018.

REVUELTA, M. P.; CANTABRANA, B.; HIDALGO, A. Depolarization dependent effect of flavonoids in rat uterine smooth muscle contraction elicited by CaCl<sub>2</sub>. **General Pharmacology**, v. 29, n. 5, p. 847-857, 1997.

RIVAS-SÁNCHEZ, A. K.; GUZMÁN-HERNÁNDEZ, D. S.; RAMÍREZ-SILVA, M. T.; ROMERO-ROMO, M.; PALOMAR-PARDAVÉ, M. Quinizarin characterization and quantification in aqueous media using UV-VIS spectrophotometry and cyclic voltammetry. **Dyes and Pigments**, v. 184, 2021.

ROSALES, P.; MARINHO, F.; GOWER, A. et al. Bio-guided search of active indole alkaloids from *Tabernaemontana catharinensis*: Antitumour activity, toxicity *in silico* and molecular modelling studies. **Bioorganic Chemistry**, v. 85, p. 66-74, 2019.

ROY, K.; KAR, S.; AMBURE, P. On a Simple Approach for Determining Applicability Domain of QSAR Models. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 145, p. 22-29, 2015.



SALES, K. A. **Alcaloides e sesquiterpenoides de *Anaxagorea dolichocarpa*: isolamento, caracterização estrutural e citotoxicidade**. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, p. 24, 2020.

SÁNCHEZ-RECILLAS, A.; RIVERO-MEDINA, L.; ORTIZ-ANDRADE, R.; ARAUJO-LEÓN, J. A.; FLORES-GUIDO, J. S. Airway smooth muscle relaxant activity of *Cordia dodecandra* A. DC. mainly by cAMP increase and calcium channel blockade. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 229, p. 280-287, 2019.

SASSI, A.; MAATOUK, M.; EL GUEDER, D. et al. Chrysin, a natural and biologically active flavonoid suppresses tumor growth of mouse B16F10 melanoma cells: In vitro and In vivo study. **Chemico-Biological Interactions**, v. 283, p. 10-19, 2018.

SEIGLER, D. S. Benzoquinones, Naphthoquinones, and Anthraquinones. In: **Plant Secondary Metabolism**. Springer, Estados Unidos, 1998.

SHAW, H. M.; NATHAN, P. D. Vemurafenib in Melanoma. **Expert Review of Anticancer Therapy**, v. 13, n. 5, p. 513-522, 2013.

SHIPA, S. J.; KHANDOKAR, L.; BARI, Md. S.; QAIS, N.; RASHID, M. A.; HAQUE, Md. A.; MOHAMED, I. N. An insight into the anti-ulcerogenic potentials of medicinal herbs and their bioactive metabolites. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 293, 2022.

SILVA, A. K.; PINTO, F.; CANUTO, K.; BRAZ-FILHO, R.; SILVA, R. A.; SANTOS, F.; MONTEIRO, N.; SILVEIRA, E.; PESSOA, O. Anti-Inflammatory Meroterpenoids of *Cordia glazioviana* (Boraginaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 32, n. 7, p. 1424-1434, 2021.

SISA, M.; BONNET, S. L.; FERREIRA, D.; VAN DER WESTHUIZEN, J. H. Photochemistry of flavonoids. **Molecules**, v. 15, n. 8, p. 5196–5245, 2010.

SOUSA, V. F. de; SANTOS, C. A. G.; MELO, J. I. M. de. Boraginales Juss. ex Bercht. & J. Presl em uma área de Caatinga na Microrregião do Curimataú Ocidental, Estado da Paraíba, Nordeste do Brasil. **Hoehnea**, v. 48, 2021.

SILVA, E. R.; GONÇALVES, D. N.; OLIVEIRA, M. S.; ESPÍRITO SANTO, C. A. F.; CALDEIRA, A. J. R. Levantamento Etnobotânico das plantas medicinais usadas por pacientes do Sistema Único de Saúde na cidade de Anápolis/GO, com ênfase no Bioma Cerrado. In: Congresso de Ensino, Pesquisa e Extensão da UEG, 4., 2018, Anápolis-GO. **Anais [...]**. Anápolis: Campus de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Estadual de Goiás, 2018.

SILVA, M. O. M.; MOREIRA, L. M. C. C.; FELISMINO, D. C. Levantamento etnofarmacológico de espécies medicinais em área da reserva florestal de caatinga no município de Santa Cruz do Capibaribe-PE. **BIOFARM**, v. 13, n. 1, mar. 2017.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia - do Produto Natural ao Medicamento**. 1. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

SPAIN, L.; GOODE, E.; MCGOVERN, Y.; JOSHI, K.; LARKIN, J. The Combination of Vemurafenib and Cobimetinib in Advanced Melanoma. **Expert Opinion on Orphan Drugs**, v. 4, n. 11, p. 1105-1111, 2016.

STAPF, M.N.S. 2015. *Varronia* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB105417>. Acesso em: 19 jul. 2022.

SUN, Y. D; BENISHIN, C. G. K<sup>+</sup> channel openers relax longitudinal muscle of guinea-pig ileum. **European Journal of Pharmacology**, v. 271, p. 453-459, 1994.

TANAKA, K.; OHGO, Y.; KATAYANAGI, I.; YASUI, K.; HIRAMOTO, S.; IKEMOTO, H.; NAKATA, Y.; MIYOSHI, N.; ISEMURA, M.; OHASHI, N.; IMAI, S. Antiinflammatory effects of green soybean extract irradiated with visible light. **Scientific Reports**, v.4, n. 4732, 2014.

TANDON, H.; CHAKRABORTY, T.; SUHAG, V. A Concise Review on the Significance of QSAR in Drug Design. **Chemical and Biomolecular Engineering**, v. 4, n. 4, p. 45-51, 2019.

TARODA, Neusa. Taxonomic studies on Brazilian species of *Cordia* L. (Boraginaceae). **Tese (Doutorado em Filogenia)** – Universidade de Santo André, Santo André, 1984.

THOMSEN, R.; CHRISTENSEN, M. H. MolDock: A New Technique for High-Accuracy Molecular Docking. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, n. 11, p. 3315-3321, 2006.

TICLI, F. K.; HAGE, L. I. S.; CAMBRAIA, R. S.; PEREIRA, P. S.; MAGRO, Â. J.; FONTES, M. R. M.; STÁBELI, R. G.; GIGLIO, J. R.; FRANÇA, S. C.; SOARES, A. M.; SAMPAIO, S. V. Rosmarinic acid, a new snake venom phospholipase A2 inhibitor from *Cordia verbenacea* (Boraginaceae): antiserum action potentiation and molecular interaction. **Toxicon**, v. 46, p. 318–327, 2005.

TÖLKE, E. E. A. D.; DE MELO, J. I. M.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M.; LACCHIA, A. P. S. Leaf anatomy with emphasis on separation of two species of *Varronia* P.Br. (Cordiaceae) of the Brazilian semi-arid region. **Brazilian Journal of Botany**, v. 36, n. 3, p. 189–201, 2013.

TSCHIRHART, E.; FROSSARD, N.; BERTRAND, C.; LANDRY, Y. Arachidonic acid metabolites and airway epithelium-dependent relaxant factor. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 243, n. 1, p. 310-316, 1987.

VALE, A. E. do; DAVID, J. M.; SANTOS, E. O. dos; DAVID, J. P.; SILVA, L. C. R. C. e; BAHIA, M. V.; BRANDÃO, H. N. An unusual caffeic acid derived bicyclic [2.2.2] octane lignan and other constituents from *Cordia rufescens*. **Phytochemistry**, v. 76, p. 158-161, 2012.

VEITCH, N. C.; GRAYER, R. J. Chalcones, dihydrochalcones, and aurones. In:

ANDERSEN, O. M.; MARKHAM, K. R. **Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications**. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, p. 1003–1100, 2006.

VELOSO, C. A. G. **Estudo fitoquímico e avaliação da atividade antimicrobiana das folhas de *Varronia dardani* (Taroda) J. S. Mill (Boraginaceae) e de seu óleo essencial**. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2018.

VELOSO, C. A. G.; FIGUEIREDO, I. A. DE ; DA SILVA, G. R.; MIRANDA DE MELO, J. I.; S. DA SILVA, M.; TAVARES, J. F.; DE A. CAVALCANTE, F.; DE O. COSTA, V. C. Flavonoids from *Varronia dardani* (Taroda) J.S. Mill (Cordiaceae) and the evaluation of spasmolytic activity of its crude ethanolic extract. **Natural Product Research**, v. 35. n. 21, 2020.

VIEIRA, D. D.; MELO, J. I. M. de; CONCEIÇÃO, A. de S. Boraginales Juss. ex Bercht. & J. Presl na Ecorregião Raso da Catarina, Bahia, Brasil. **Biota Neotropica**, v. 15, n. 3, 2015.

VIEIRA, N. C.; ESPÍNDOLA, L. S.; SANTANA, J. M.; VERAS, M. L.; PESSOA, O. D. L.; PINHEIRO, S. M.; DE ARAÚJO, R. M.; LIMA, M. A. S.; SILVEIRA, E. R. Trypanocidal activity of a new pterocarpan and other secondary metabolites of plants from Northeastern Brazil flora. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 1676–1682, 2008.

VIZZOTTO, M.; KROLOW, A. C.; WEBER, G. E. B. Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância. **Embrapa Clima Temperado. Documentos, 316**. Embrapa, Pelotas-RS, 2010.

VO, Q. V.; THONG, N. M.; LE HUYEN, T.; NAM, P. C.; TAM, N. M.; HOA, N. T.; MECHLER, A. A thermodynamic and kinetic study of the antioxidant activity of natural hydroanthraquinones. **RSC Advances**, v. 10, p. 20089–20097, 2020.

WANG, Y.; ZHANG, H.; GIGANT, B.; YU, Y.; WU, Y.; CHEN, X.; LAI, Q.; YANG, Z.; CHEN, Q.; YANG, J. Structures of a Diverse Set of Colchicine Binding Site Inhibitors in Complex with Tubulin Provide a Rationale for Drug Discovery. **The FEBS Journal**, v. 283, n. 1, p. 102-111, 2016.

WRIGHT, A. B.; BARGSTEN, K.; DORONINA, S.; STEINMETZ, M. O.; SUSSMAN, D.; PROTA, A. E. Structural Basis of Microtubule Destabilization by Potent Auristatin Anti-Mitotics. **PLoS One**, v. 11, n. 8, 2016.

WASWA, E. N.; LI, J.; MKALA, E. M.; WANGA, V. O.; MUTINDA, E. S.; NANJALA, C.; ODAGO, W. O.; KATUMO, D. M.; GICHUA, M. K.; GITURU, R. W.; HU, G.-W.; WANG, Q.-F. Ethnobotany, phytochemistry, pharmacology, and toxicology of the genus *Sambucus* L. (Viburnaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 292, 2022.

WATANABE, M. T. C.; HIURA, A. L.; NOGUEIRA, M. G. C. Flora das cangas da Serra dos Carajás, Pará, Brasil: Cordiaceae. **Rodriguésia**, v. 68, n. 3 (especial), p. 955-960, 2017.

WISETSAI, A.; LEKPHROM, R.; SCHEVENELS, F. T. New anthracene and anthraquinone metabolites from *Prismatomeris filamentosa* and their antibacterial activities. **Natural Product Research**, v. 35, n. 10, p. 1582-1589, 2019.

WU, M.; WANG, M.; ZHANG, Y.; ZHOU, J.; XU, L.; XIA, G.; YAN, Z.; SHEN, Y.; YANG, H. Efficient and clean preparation of rare prosaikogenin D by enzymatic hydrolysis of saikosaponin B2 and response surface methodology optimization. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 142, 2020.

ZINK, B. S. Câncer de pele: a importância do seu diagnóstico, tratamento e prevenção. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**, v. 13, n. 1, p. 76-83, 2014.

ŽITEK, T.; DARIŠ, B.; FINŠGAR, M.; KNEZ, Ž.; BJELIĆ, D.; KNEZ HRNČIČ, M. The Effect of Polyphenolics in Extracts from Natural Materials on Metabolic Activity of Metastatic Melanoma WM-266-4 Cells. **Applied Sciences**, v. 10, n. 10, 2020.

## **ANNEXES**

## ANNEXE 1 - Certificat du Comité d'éthique (Brésil)



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
GABINETE DA VICE-REITORIA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)



## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “**Estudo fitoquímico e farmacológico de *Varronia dardani* (Boraginaceae)**” protocolo nº **126/2017** sob a responsabilidade do pesquisador Dr. **Vicente Carlos de Oliveira Costa** – que envolve a produção, manutenção e/ou a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA-UFPB) em reunião de 14/12/2017.

Vigência do Projeto	2018 - 2019
Espécie/linhagem	Rato <i>Wistar</i> ( <i>Rattus Norvegicus</i> ) Cobaia ( <i>Cavia porcellus</i> )
Número de animais	Rato <i>Wistar</i> – 24 machos e 24 fêmeas Cobaia – 24 machos
Idade/peso	8 semanas
Sexo	Machos e fêmeas
Origem	Biotério Prof. Thomas George IPerFarM

Prof. Dra. Islania Giselia Albuquerque Gonçalves  
Coordenadora da CEUA-UFPB

## ANNEXE 2 – Article “Flavonoids from *Varronia dardani* (Taroda) J.S. Mill (Cordiaceae) and the evaluation of spasmolytic activity of its crude ethanolic extract (2020)”

NATURAL PRODUCT RESEARCH  
<https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1753737>



BRIEF REPORT



### Flavonoids from *Varronia dardani* (Taroda) J.S. Mill (cordiaceae) and the evaluation of spasmolytic activity of its crude ethanolic extract

Carlos Arthur G. Veloso<sup>a</sup> , Indyra Alencar D. Figueiredo<sup>a</sup>, Gleice Rayanne da Silva<sup>a</sup>, José Iranildo Miranda de Melo<sup>b</sup>, Marcelo S. da Silva<sup>a,c</sup>, Josean F. Tavares<sup>a,c</sup>, Fabiana de A. Cavalcante<sup>a,d</sup> and Vicente Carlos de O. Costa<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Natural and Synthetic Bioactive Products, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil; <sup>b</sup>Department of Biology, State University of Paraíba, Campina Grande, Brazil; <sup>c</sup>Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil; <sup>d</sup>Department of Physiology and Pathology, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil

#### ABSTRACT

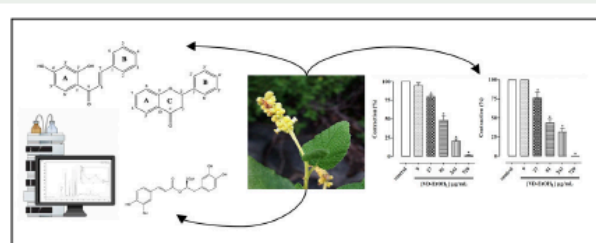
Pharmacological studies show spasmolytic activity for various species of *Varronia*. Thus, based on the taxonomy criteria, the aim of this study was to contribute to chemical and biological knowledge, especially regarding the evaluation of spasmolytic activity of the ethanolic extract from *Varronia dardani* leaves (VD-EtOH<sub>L</sub>) on rat aorta and trachea, guinea-pig ileum and rat uterus. Were used High and Medium Performance Liquid Chromatography. Wistar rats and guinea-pigs were used for pharmacological assays. All experimental protocols were approved by Animal Ethics Committee of UFPB (126/2017). Two chalcones (pinostrobin chalcone and gymnogrammene), five flavanones (pinocembrin, isosakuranetin, pinostrobin, sakuranetin 4'-methyl ether, naringenin) and a flavonoid glycosilated (astragalin) were identified based on data of <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C Nuclear Magnetic Resonance. This study also showed that VD-EtOH<sub>L</sub> has a non-selective spasmolytic activity, presenting greater relaxing potency in rat uterus, suggesting that flavonoids isolated from VD-EtOH<sub>L</sub> may be responsible for spasmolytic activity of this extract.

#### ARTICLE HISTORY

Received 24 February 2020  
 Accepted 4 April 2020

#### KEYWORDS

Flavanones; chalcones; smooth muscle; spasmolytic activity



CONTACT Vicente Carlos de O. Costa vicente@ltp.ufpb.br; Fabiana de A. Cavalcante fabianacavalcante@ltp.ufpb.br

Supplemental data for this article can be accessed at <https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1753737>.

© 2020 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

## 1. Introduction

The species *Varronia dardani* (Taroda) J.S. Mill has as basinonym *Cordia dardani* Taroda (Miller 2007) and is well distributed in the states of northeastern Brazil (Stapf 2015). Previous studies of *V. dardani* reported the presence of some secondary metabolites, mainly flavonoids (De Oliveira 2016). Some flavonoids, besides inhibiting the enzymes monoaminoxidase A and catechol-O-methyltransferase and bind to GABA<sub>A</sub> receptor, being responsible for such action (Hanrahan et al. 2011; Alves et al. 2017). Thus, there was a need to contribute to chemical and biological knowledge of this endemic Caatinga species.

## 2. Results and discussion

### 2.1. Identification of isolated constituents by NMR

The analysis of <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectrum of all the fractions, allowed the identification of 8 compounds already known in the literature. The pinostrobin chalcone, gym-nogrammene, pinocembrin, isosakuranetin, pinostrobin, sakuranetin 4'-methyl ether, naringenin and astragalín, based on <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR data reported by Wei et al. (2013), Miles and Main (1985), Ching et al. (2007), Kim et al. (1999), Junior et al., (2017), Oyama and Kondo (2004), Da Silva et al. (2015) and Ghavam-Haghi and Dinani (2017) respectively.

### 2.2. Quantification of rosmarinic acid by HPLC

It was possible identify the presence of rosmarinic acid ( $R_t = 14.749$  min; purity index = 0.998). After analyzing the data obtained, it can then be observed that for each 2 mg of *V. dardani* extract the amount of rosmarinic acid is  $43.0815 \pm 2.4174$   $\mu$ g.

### 2.3. Effect of VD-EtOH<sub>L</sub> on phenylephrine-induced tonic contractions in rat aorta

It was noticed that the VD-EtOH<sub>L</sub> (27; 81; 243 and 729  $\mu$ g/mL, n = 5) relaxed in an equipotent manner and dependent on concentration the pre-contracted rat aorta with  $3 \times 10^{-7}$  M phenylephrine in both the presence ( $E_{max} = 75.4 \pm 3.5\%$ ,  $EC_{50} = 238.0 \pm 4.7$   $\mu$ g/mL) and absence ( $E_{max} = 94.4 \pm 7.8\%$ ,  $EC_{50} = 236.8 \pm 14.8$   $\mu$ g/mL) of a functional endothelium (Figures S3 and S4), suggesting that endothelium-derived relaxing factors are not involved in the relaxing mechanism of VD-EtOH<sub>L</sub>. The mean time for extract to reach its maximum total relaxing effect was about 3 hours, both in the presence and absence of functional endothelium.

### 2.4. Effect of VD-EtOH<sub>L</sub> on CCh-induced tonic contractions in rat trachea

In the airways, epithelial cells also modulate smooth muscle reactivity by releasing epithelium-derived relaxing factors (Hashiba et al. 1999). Thus, the VD-EtOH<sub>L</sub> (27; 81; 243 and 729  $\mu$ g/mL, n = 5) relaxed in an equipotent manner and dependent on concentration the pre-contracted rat trachea with  $10^{-5}$  M of CCh both in the presence ( $E_{max} =$



$65.3 \pm 7.3\%$ ,  $EC_{50} = 330.3 \pm 37.7 \mu\text{g/mL}$ ) and absence ( $E_{\text{max}} = 87.3 \pm 6.4\%$ ,  $EC_{50} = 280.5 \pm 12.7 \mu\text{g/mL}$ ) of a functional epithelium (Figures S3 and S4), suggesting that epithelium-derived relaxing factors are not involved in the relaxing mechanism this extract. The mean time for VD-EtOH<sub>L</sub> to reach its maximum total relaxing effect was about 3 hours, both in the presence and absence of functional epithelium.

### 2.5. Effect of VD-EtOH<sub>L</sub> on histamine- and CCh-induced phasic contractions in guinea-pig ileum


It was decided to evaluate the effect of VD-EtOH<sub>L</sub> against the phasic component of contraction induced by different contractile agents, such as histamine and carbachol (CCh). And we observed that the extract (27; 81; 243 e 729  $\mu\text{g/mL}$ ,  $n = 5$ ) antagonized in a concentration-dependent manner the phasic contractions induced by both  $10^{-6}$  M histamine ( $E_{\text{max}} = 100\%$ ,  $IC_{50} = 222.6 \pm 26.9 \mu\text{g/mL}$ ) and  $10^{-6}$  M CCh ( $E_{\text{max}} = 100\%$ ,  $IC_{50} = 123.1 \pm 15.4 \mu\text{g/mL}$ ), being about 2 times more potent in inhibiting CCh-induced phasic contractions (Figure S6). These results suggest that the spasmolytic effect of VD-EtOH<sub>L</sub> on guinea-pig ileum may be due to muscarinic receptor antagonism, however, further experiments are needed to confirm these data. Pinostrobin, a flavonoid isolated from VD-EtOH<sub>L</sub>, has also shown spasmolytic activity on guinea-pig (Meckes et al. 1998) and rat ileum (Mata et al., 1997), suggesting that this component may be responsible for the spasmolytic activity of this extract on guinea-pig ileum.

### 2.6. Effect of VD-EtOH<sub>L</sub> on oxytocin- and CCh-induced phasic contractions in the rat uterus

It was decided to evaluate the *in vitro* tocolytic effect of extract on the phasic component of uterine contraction induced by both oxytocin and CCh. The VD-EtOH<sub>L</sub> (9-729  $\mu\text{g/mL}$ ,  $n = 5$ ) antagonized in an equipotent and concentration-dependent manner the phasic contractions induced by both  $10^{-2}$  UI/mL oxytocin ( $E_{\text{max}} = 98.8 \pm 1.2\%$ ,  $IC_{50} = 82.2 \pm 14.4 \mu\text{g/mL}$ ), and  $10^{-5}$  M CCh ( $E_{\text{max}} = 100\%$ ,  $IC_{50} = 80.8 \pm 16.3 \mu\text{g/mL}$ ) (Figure S6), presenting higher potency on rat uterus, suggesting an action in a common signaling pathway for both oxytocin and CCh, not involving antagonism of oxytocinergic or muscarinic receptors. Pinoembrin, narigenin (Achar et al. 2000) and sakuranetin (Rojas et al. 1996), flavonoids isolated from VD-EtOH<sub>L</sub>, have also been reported to have tocolytic activity in rats, and these may be responsible for tocolytic activity of the extract.

## 3. Conclusions

The phytochemical study of the aerial parts of *V. dardani* resulted in the isolation of two chalcones, five flavanones and a flavonoid glycosilated. This study also showed that VD-EtOH<sub>L</sub> presents a non-selective spasmolytic activity, presenting a greater relaxing potency in the rat uterus, suggesting that flavonoids isolated from VD-EtOH<sub>L</sub> may be responsible for spasmolytic activity of this extract. In view of this, the present work

4  C. A. G. VELOSO ET AL.

contributes to the chemical and biological knowledge of the genus *Varronia*, through the study of the species *V. dardani*.

### Acknowledgment

The authors thank Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) and Council for Scientific and Technological Development (CNPq) for financial support and Federal University of Paraíba and Postgraduate Program in Natural and Synthetic Bioactive Products for experimental support.

### Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the author(s).

### Funding

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

### ORCID

Carlos Arthur G. Veloso  0000-0003-4917-6106

### References

- Achar SL, Rao GP, Srinivasan KK. 2000. Isolation and synthesis of 2-phenyl benzopyranones and comparative evaluation of their smooth muscle relaxant activity. *Indian J Pharm Sci.* 62(5):393.
- Alves JVO, Silva DSJ, da Lima MRC, da Silva MV. 2017. Efeito antioxidante de planta restrita ao bioma caatinga: Jacarandá (*Jacaranda rugosa*). In: Encontro Anual de Biofísica, v. 4, Recife-PE. Anais [...]. Recife: Biociências, UFPE, p. 77–78.
- Ching AYL, Wah TS, Sukari MA, Lian GEC, Rahmani M, Khalid K. 2007. Characterization of flavonoid derivatives from *Boesenbergia rotunda* (L.). *Malays J Anal Sci.* 11:154–159.
- Da Silva L, Faqueti L, Reginatto F, dos Santos A, Barison A, Biavatti M. 2015. Phytochemical analysis of *Vernonanthura tweedieana* and a validated UPLC-PDA method for the quantification of eriodictyol. *Rev Bras Farmacogn.* 25(4):375–381.
- De Oliveira FAG. 2016. Contribuição ao estudo fitoquímico da espécie *Varronia dardani* (Taroda) J.S. Mill (Boraginaceae). [Master Thesis]. Brazil: Mestrado em Ciências Naturais – Universidade do Estado do Rio Grande do Norte.
- Ghavam-Haghi F, Dinani MS. 2017. Isolation and identification of Astragalin and 2-methoxy tyrosol from the bulbs of *Allium paradoxum*. *J Herb Med Pharmacol.* 6:114–118.
- Hanrahan J, Chebib M, Johnston G. 2011. Flavonoid modulation of GABA<sub>A</sub> receptors. *Br J Pharmacol.* 163(2):234–245.
- Hashiba KM, Sato T, Hirota K, Hashimoto Y, Matsuki A. 1999. The relaxant effect of propofol on guinea pig tracheal muscle is independent of airway epithelial function and beta-adrenoceptor activity. *Anesth Analg.* 89(1):191–196.
- Júnior W A R, Gomes D B, Zanchet B, Schönell A P, Diel K A, Banzato T P, Ruiz A L, Carvalho J E, Neppel A, Barison A, et al. 2017. Antiproliferative effects of pinostrobin and 5,6-dehydrokavain isolated from leaves of *Alpinia zerumbet*. *Revista Brasileira De Farmacognosia.* 27(5):592–598. doi:10.1016/j.bjp.2017.05.007.

- Kim D, Bae E, Han M. 1999. Anti-*Helicobacter pylori* activity of the metabolites of poncirin from *Poncirus trifoliata* by human intestinal bacteria. *Biol Pharm Bull.* 22(4):422–424.
- Mata R, Rojas A, Acevedo L, Estrada S, Calzada F, Rojas I, Bye R, Linares E. 1997. Smooth Muscle Relaxing Flavonoids and Terpenoids from *Conyza filaginoides*\*. *Planta Med.* 63(01):31–35. doi: 10.1055/s-2006-957598.
- Meckes M, Paz D, Acosta J, Mata R. 1998. The effects of chrysin and pinostrobin, two flavonoids isolated from *Teloxys graveolens* leaves, on isolated guinea-pig ileum. *Phytomedicine.* 5(6): 459–463.
- Miles C, Main L. 1985. Kinetics and mechanism of the cyclisation of 2',6'-dihydroxy-4,4'-dimethoxy-chalcone; influence of the 6'-hydroxy group on the rate of cyclisation under neutral conditions. *J Chem Soc, Perkin Trans.* 2(10):1639–1642.
- Miller JS. 2007. New Boraginales from Tropical America 5: New names and typifications for Neotropical species of *Cordia* and *Varronia*. *Novon.* 17(3):372–375.
- Oyama K, Kondo T. 2004. Total synthesis of flavocommelin, a component of the blue supra-molecular pigment from *Commelina communis*, on the basis of direct 6-C-glycosylation of flavan. *J Org Chem.* 69(16):5240–5246.
- Rojas A, Cruz S, Ponce-Monter H, Mata R. 1996. Smooth muscle relaxing compounds from *Dodonaea viscosa*. *Planta Med.* 62(2):154–159.
- Stapf MNS. 2015. *Varronia* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. [accessed 5 June 2019]. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB105417>
- Wei Z, Jin S, Luo M, Pan Y, Li T, Qi X, Efferth T, Fu Y, Zu Y. 2013. Variation in contents of main active components and antioxidant activity in leaves of different pigeon pea cultivars during growth. *J Agric Food Chem.* 61(42):10002–10009.