



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DA BAHIA PROGRAMA PÓS-
GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
(PPGFARMA)**

Atividades biológicas de flavonoides isolados de *Erythroxylum rimosum*

Ivana Patrícia Dos Santos

Salvador

2025

Atividades biológicas de flavonoides isolados de *Erythroxylum rimosum*

Ivana Patrícia Dos Santos

Dissertação apresentada ao Programa Pós-Graduação *Stricto Sensu* Em Ciências Farmacêuticas (PPGFARMA), da Universidade do Estado da Bahia (UNEB) como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof. Dra. Erika Maria Oliveira Ribeiro

Co-Orientadora: Prof. Dra. Elisalva Teixeira
Guimarães

Linha de Pesquisa 01: Prospecção de Fármacos e
Recursos Naturais

Salvador

2025

FICHA CATALOGRÁFICA
Sistema de Bibliotecas da UNEB
Bibliotecária: Célia Maria da Costa CRB: 5/918

S237a Santos, Ivana Patrícia dos

Atividades biológicas de flavonoides isolados de *Erythroxylum rimosum* /
Ivana Patrícia dos Santos. – Salvador, 2025.

63f. : il.

Orientadora: Erika Maria Oliveira Ribeiro.

Coorientadora: Elisalva Teixeira Guimarães

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado da Bahia. Departamento
Ciências da Vida. Programa de Pós-Graduação Stricto Senso em Ciências
Farmacêuticas – PPGFARMA, Campus I. 2025.

Contém referências e anexos.


1. Flavonoides. 2. Leishmania. 3. Antioxidante. 4. Acetilcolinesterase. 5.
Relação estrutura-atividade. 6. *Erythroxylum*. I. Ribeiro, Erika Maria Oliveira. II.
Guimarães, Elisalva Teixeira. III. Universidade do Estado da Bahia. Departamento
de Ciências da Vida. Campus I. IV. Título.


CDD: 615


FOLHA DE APROVAÇÃO
" ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE FLAVONOIDES ISOLADOS DE FOLHAS DE
ERYTHROXYLUM RIMOSUM"


IVANA PATRICIA DOS SANTOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – PPGFARMA, em 10 de março de 2025, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestra em Ciências Farmacêuticas pela Universidade do Estado da Bahia, conforme avaliação da Banca Examinadora:


Professora Dr.^a ERIKA MARIA DE OLIVEIRA RIBEIRO
Universidade do Estado da Bahia -UNEB
Doutorado em Química
Universidade Federal da Bahia


Professora Dr.^a ELISALVA TEIXEIRA GUIMARAES
Universidade do Estado da Bahia-UNEB
Doutorado em Patologia
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/Fundação Oswaldo Cruz /BA


Professor Dr. VITOR HUGO MIGUES
Universidade do Estado da Bahia -UNEB
Doutorado em Química
Universidade Federal da Bahia


Professor Dr. CÁSSIO SANTANA MEIRA
Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial - SENAI
Doutorado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa
Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz

A minha mãe Eliete e a minha avó Maria, gratidão por todo amor, cuidado e carinho.

Agradecimentos

A Deus pelo sustento e sua inesgotável misericórdia.

A minha mãe e minha avó sempre presentes, cuidando de mim, oferecendo apoio em todos os momentos, além dos valiosos conselhos e orações diárias.

A Hênio por sua paciência em me ouvir e me acalmar, por enxergar sempre o lado positivo das coisas, tornando meus dias mais leves e felizes. À Síntia, pela confiança e por sempre me incentivar a perseverar. À Márcia, querida colega de trabalho, por suas orações, cuidado e pelo sorriso acolhedor com que sempre me recebe. À minha amiga Mari, agradeço pelos nossos encontros mais que especiais, para conversar, pelos valiosos conselhos e pela companhia que me faz tão bem.

Às professoras Erika e Elisalva, pela oportunidade, por acreditarem em meu potencial e pela troca de conhecimento ao longo dessa jornada.

À Francisnaira, minha sincera gratidão por segurar minha mão e me ajudar dentro e fora do laboratório; nossa troca foi incrível, obrigada por tudo. A Mariana Araujo, não esperava nos aproximarmos tanto durante o programa, mas reconheço que nosso encontro foi essencial e necessário.

A Gildeon pelo suporte, disponibilidade e acolhimento no laboratório.

Em especial agradeço a Robson Almeida e Janaina Magalhães que me auxiliam dentro e fora da UFBA, obrigada pela disponibilidade e pelo conhecimento compartilhado.

Ao PPGFARMA, especialmente à Léia Omena, agradeço pelo cuidado e atenção em cada detalhe, o programa não poderia ter uma secretaria melhor.

À Isabela César, agradeço por ser uma colega receptiva e disposta a compartilhar conhecimentos. A Clayton Guimarães, agradeço pela receptividade e energia incrível, conversar contigo fazia toda diferença no meu dia.

Ao pessoal do LETI, em especial a Rute, Karoline, Girlane, Jaque, Ivan, agradeço pela troca diária, pelas risadas e pela partilha de conhecimentos.

Lista de Abreviaturas

ATP	Adenosina Trifosfato
CC ₅₀	Concentração Citotóxica de 50% (do inglês: <i>50% Cytotoxicity Concentration</i>)
DA	Doença de Alzheimer
DMEM	Meio Eagle modificado por Dulbecco (do inglês: <i>Dulbecco's modified Eagle Medium</i>)
DP	Doença de Parkinson
DPPH	<i>Difenilpicrilhidrazil</i>
ELA	Esclerose Lateral Amiotrófica
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
IC ₅₀	Concentração Inibitória de 50% (do inglês: <i>50% Inhibitory Concentration</i>)
IS	Índice de Seletividade
Mφ	Macrófagos
mg	Miligramas
μg	Microgramas
μM	Micromolar
nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial da Saúde
PH	Potencial Hidrogeniônico
RNS	Espécies Reativas de Nitrogênio (do inglês: <i>Reactive Nitrogen Species</i>)
SBF	Soro Bovino Fetal

Lista de Figuras

Figura 1- Representantes da família <i>Erythroxylaceae</i>	17
Figura 2- Mapa de distribuição do gênero <i>Erythroxylum</i> no mundo.....	18
Figura 3 - Compostos ativos encontrados no gênero <i>Erythroxylum</i>	19
Figura 4 - <i>Erythroxylum rimosum</i> O. E. Schulz.	23
Figura 5 - Alcaloide, flavonoides e triterpenos isolados de <i>Erythroxylum rimosum</i>	24
Figura 6 - Estrutura fundamental dos flavonoides C6-C3-C6.....	25
Figura 7 - Biossíntese de flavonoides.....	25
Figura 8 - Estresse oxidativo em doenças neurodegenerativas.	28
Figura 9 - Representação das principais características da doença de Alzheimer.....	30
Figura 10 - Ciclo de vida da <i>Leishmania</i>	32
Figura 11 - Flavonoides isolados de <i>Erythroxylum rimosum</i> utilizados no estudo	34
Figura 12 - Efeito da ERA 8.3 e da ERA 10 frente à parasitos intracelulares de <i>Leishmania braziliensis</i>	43
Figura 13- Alterações ultraestruturais em promastigotas de <i>L. braziliensis</i> após o tratamento com ERA8.3 e ERA10	44
Figura 14 - Resultados das poses de docking molecular obtidas pelo programa GOLD 5.3.0 dos compostos Quercetina-3- <i>O</i> - β -galactopiranosídeo (A1) e Quercetina-3 β -glicopiranosídeo (B1) no sítio catalítico da arginase de <i>L. mexicana</i> (LmARG). Esquema 2D dos resíduos de aminoácidos envolvidos nas interações realizadas entre os referidos compostos e a arginase (A2 e B2).	47
Figura 15- Representação da redução do DPPH	48
Figura 16 - Porcentagem de atividade antioxidante dos flavonoides.	49
Figura 17 - Estruturas químicas da quercetina-3 β -glicopiranosídeo e da quercetina-3 β galactopiranosídeo, destacando a diferença na configuração do grupo hidroxila (OH).....	51
Figura 18 - Porcentagem de proteção oxidativa exibido pelos flavonoides no ensaio.....	53
Figura 19 - Porcentagem de inibição da enzima acetilcolinesterase frente aos flavonoides em diferentes concentrações tendo a eserina como padrão.	55
Figura 20 - Elementos farmacofóricos - chave dos flavonoides.....	56

Lista de Tabelas e Quadros

Tabela 1- Espécies <i>Erythroxylum</i> avaliadas <i>in vitro</i> quanto às suas propriedades biológicas.....	20
Tabela 2 - Citotoxicidade, atividade antileishmania e índice de seletividade dos flavonoides isolados de <i>Erythroxylum rimossum</i>	39
Tabela 3 - Determinação de atividade antioxidante dos flavonoides.....	48

Resumo

Introdução: Os flavonoides são metabólitos secundários produzidos pelas plantas e encontrados em relativa abundância, podendo ocorrer tanto na forma livre (aglicona) quanto ligados a açúcares (glicosídeos). Possuem diversas propriedades farmacológicas, destacando-se principalmente atividade imunomoduladora, antioxidante e antiparasitária, o que desperta grande interesse na indústria farmacêutica para o desenvolvimento de novos fármacos.

Objetivos: Este trabalho objetiva explorar o potencial biológico dos flavonoides isolados de *Erythroxylum rimosum* por meio de ensaios *in vitro*, além de discutir a relação entre a estrutura desses compostos e suas atividades identificadas.

Materiais e Métodos: Inicialmente, ensaios de citotoxicidade frente as células de mamíferos e a avaliação da viabilidade das formas promastigotas de *L. braziliensis* foram realizadas. A partir destes dados, foram determinados a CC_{50} e a IC_{50} dos flavonoides. A microscopia eletrônica de varredura foi empregada para verificar as possíveis alterações na morfologia das formas promastigotas de *L. braziliensis* após o tratamento. Estudos *in silico* avaliaram a interação dos flavonoides ERA 8.3 e ERA10 com a arginase de *Leishmania* por meio de docking molecular. O potencial antioxidante dos flavonoides, foi verificado através do ensaio de atividade antioxidante pelo método do radical DPPH e β -caroteno. Adicionalmente investigamos a capacidade dos flavonoides em inibir a enzima acetilcolinesterase.

Resultados: Os flavonoides não apresentaram citotoxicidade significativa para células de mamíferos, exibiram $CC_{50} > 100 \mu\text{M}$, enquanto os flavonoides ERA8.3 e ERA10, glicosilados com açúcar de seis carbonos, inibiram as formas promastigotas de *L. braziliensis* com IC_{50} de $10,34 \pm 0,7 \mu\text{M}$ e $10,14 \pm 0,5 \mu\text{M}$, respectivamente. Os flavonoides também foram capazes de reduzir o percentual de macrófagos infectados e a média do número de amastigotas após 24 horas de tratamento. Alterações morfológicas como perda da integridade da membrana, formação de bolhas e danos flagelares, foram observadas após análise ultraestrutural de promastigotas tratadas com ERA8.3 e ERA10. Os flavonoides apresentaram atividade antioxidante, a quercetina apresentou o melhor valor de concentração inibitória ($IC_{50} = 0,22 \text{ mg/mL}$), seguido pelo seu glicosídeo, ERA10 ($IC_{50} = 0,42 \text{ mg/mL}$). Os flavonoides glicosilados, ligados a açúcar de cinco carbonos, exibiram atividade inibitória moderada frente a enzima acetilcolinesterase.

Conclusão: Os resultados sugerem que os flavonoides em estudo apresentam importantes atividades antileishmania, antioxidante e de inibição da acetilcolinesterase. Estas atividades biológicas dos flavonoides estão intimamente associadas à sua estrutura química, sendo influenciada pela presença ou ausência de grupos funcionais, como hidroxilas e glicosídeos, localizados em posições específicas de sua estrutura básica.

Palavras-chave: *Erythroxylum*; *leishmania*; antioxidante; acetilcolinesterase; estrutura-atividade, flavonoides.

Abstract

Introduction: Flavonoids are secondary metabolites produced by plants and found in relative abundance. They can occur in free form (aglycone) and are linked to sugars (glycosides). They have several pharmacological properties, mainly immunomodulatory, antioxidant, and anti-parasitic activities, which arouses great interest in the pharmaceutical industry for developing new drugs. **Objectives:** This work aims to explore the biological potential of flavonoids isolated from *Erythroxylum rimosum* through *in vitro* assays and discuss the relationship between the structure of these compounds and their identified activities. **Method and Material:** Initially, cytotoxicity tests against mammalian cells and assessing the viability of promastigote forms of *L. braziliensis* were carried out. From these data, the CC₅₀ and IC₅₀ of flavonoids were determined. Scanning electron microscopy was used to verify possible changes in the morphology of promastigote forms of *L. braziliensis* after treatment. *In silico* studies evaluated the interaction of the ERA 8.3 and ERA10 flavonoids with *Leishmania* arginase through molecular docking. The antioxidant potential of flavonoids was verified through the antioxidant activity assay using the DPPH and β -carotene radical method. Additionally, we investigated the ability of flavonoids to inhibit the acetylcholinesterase enzyme. **Results:** The flavonoids did not show significant cytotoxicity for mammalian cells; they exhibited CC₅₀ > 100 μ M, while the flavonoids ERA8.3 and ERA10, glycosylated with six-carbon sugar, inhibited the promastigote forms of *L. braziliensis* with IC₅₀ of $10.34 \pm 0.7 \mu$ M and $10.14 \pm 0.5 \mu$ M, respectively. Flavonoids also reduced the percentage of infected macrophages and the average number of amastigotes after 24 hours of treatment. Morphological changes, such as membrane integrity loss, blisters formation, and flagellar damage, were observed after ultrastructural analysis of promastigotes treated with ERA8.3 and ERA10 flavonoids. Flavonoids showed antioxidant capacity; quercetin presented the best inhibitory concentration value (IC₅₀ = 0.22 mg/mL), followed by its glycoside, ERA10 (IC₅₀ = 0.42 mg/mL). Glycosylated flavonoids, linked to five-carbon sugar, exhibited moderate inhibitory activity against the enzyme acetylcholinesterase. **Conclusion:** The results suggest that the flavonoids under study have important antileishmanial, antioxidant, and acetylcholinesterase inhibition activities. These biological activities of flavonoids are closely associated with their chemical structure, influenced by the presence or absence of functional groups, such as hydroxyls and glycosides, located in specific positions of their basic structure.

Keywords: *Erythroxylum*; *leishmania*; antioxidant; acetylcholinesterase; structure-activity, flavonoids.

Sumário

1.INTRODUÇÃO.....	13
2.OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo geral.....	16
2.2 Objetivos específicos	16
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
3.1 Família <i>Erythroxylaceae</i>	17
3.2 Gênero <i>Erythroxylum</i>	18
3.2.1 Espécie <i>Erythroxylum rimosum</i>	23
3.3 Flavonoides	25
3.4 Atividade antioxidante	27
3.5 Atividade anticolinesterase.....	29
3.6 Atividade antileishmania.....	32
4.MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1 Obtenção dos compostos	34
4.2 Cultivo de parasitos.....	35
4.3 Teste de citotoxicidade sobre macrófagos <i>in vitro</i>	35
4.4 Ensaio de viabilidade celular.....	35
4.5 Ensaio de infecção de macrófagos por <i>L.braziliensis</i>	34
4.6 Índice de seletividade.....	36
4.7 Análise ultraestrutural por microscopia eletrônica de varredura.....	36

4.8 Estudo <i>in silico</i> de docking molecular	37
4.9. Atividade antioxidante.....	37
4.9.1 Método de sequestro do radical estável DPPH.....	38
4.9.2 Método de inibição da oxidação do β -caroteno/ácido linoleico	38
4.10 Atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase	39
4.11 Análises estatísticas	39
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1 Citotoxicidade dos flavonoides frente a macrófagos J774	40
5.2 Efeito dos flavonoides frente as formas promastigotas de <i>L. braziliensis</i>	40
5.3 Ensaio de infecção.....	41
5.4 Microscopia de varredura	44
5.5 Atividade <i>in silico</i>	44
5.6 Sequestro dos radicais livres de DPPH.....	48
5.7 Oxidação acoplada do β -caroteno/ácido linoleico	53
5.8 Inibição da enzima acetilcolinesterase.....	54
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	57
REFERÊNCIAS.....	58
ANEXOS	

1. INTRODUÇÃO

As plantas ocupam um lugar de destaque na humanidade desde os primórdios. Essa relação foi estabelecida quando os recursos da natureza eram utilizados para suprir necessidades de vestuário, abrigo, alimentação, bem como na prática médica e em rituais religiosos (Silva, 2020). Essa prática ancestral enraizada em diversas culturas ao redor do mundo resultou no acúmulo de conhecimento ao longo das gerações, desempenhando um papel fundamental nos avanços científicos atuais no campo de produtos naturais. O alto custo e a alta toxicidade de alguns medicamentos sintéticos, juntamente com a falta de acessibilidade aos serviços de saúde, levaram as pessoas a buscarem alternativas nos medicamentos de origem vegetal (Da Rocha *et al.*, 2021).

Plantas com uma longa tradição de uso medicinal representam uma fonte abundante de constituintes ativos que oferecem benefícios medicinais ou preventivos contra diversas doenças e enfermidades. Diversos fitoquímicos tornaram-se essenciais para o avanço no desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos como a morfina, aspirina, atropina, ecopolamina, metformina entre outros. A importância dos compostos bioativos presentes nas plantas tem ampliado consideravelmente o interesse na pesquisa das atividades biológicas dessas substâncias, destacando seu potencial como agentes medicinais (Kowalski *et al.*, 2020).

Pesquisas demonstram que através dos fitoquímicos existe a possibilidade de criar novos compostos mais eficazes e menos tóxicos, com potencial para aplicação clínica no tratamento de diversas doenças. A rica tradição de conhecimento fitoterápico contribui para o campo da medicina natural e pesquisa científica como fonte de cuidados para a saúde da população mundial. Estima-se que atualmente mais de 50% dos medicamentos disponíveis no mercado farmacêutico, sejam de alguma forma derivados de plantas medicinais, o que demonstra sua importância e credibilidade frente aos usuários (Jamshidi-kia, 2018).

O gênero *Erythroxylum* abriga espécies que têm sido utilizadas pelos povos indígenas da América do Sul desde muito antes do processo de domesticação das plantas. Tanto a tradição cultural quanto às investigações científicas indicam aplicações promissoras dessas espécies que apresentam uma vasta gama de metabólitos. Estudos de filogenia molecular revelam um sistema dinâmico de interações e compostos, justificando assim futuras pesquisas que explorem

o potencial medicamentoso dessas plantas para o desenvolvimento de novos medicamentos (Restrepo *et al.*, 2019).

Atividades biológicas significativas, como ações antioxidante, citotóxica, leishmanicida e neuroprotetora, foram relatadas em extratos brutos e compostos isolados de diferentes espécies do gênero *Erythroxylum*, evidenciando seu potencial farmacológico. *E. suberosum*, *E. pungens* e *E. daphnites* apresentaram atividade anticancerígena; *E. alaternifolium* demonstrou potente efeito antioxidante; *E. hypericifolium* revelou ação antimicrobiana; *E. passerinum* destacou-se pela atividade leishmanicida; e *E. gonocladum* tem sido investigada por seu possível efeito neuroprotetor em modelos experimentais da Doença de Parkinson. (Matos de Macêdo *et al.*, 2022). Entretanto, a atividade potencial da maioria dos compostos ainda permanece desconhecida. Investigar a fundo a atividade biológica desses compostos fornecerá uma base sólida para a exploração dos recursos medicinais potenciais presentes neste gênero (Lv *et al.*, 2022).

As plantas são capazes de produzir uma vasta gama de componentes orgânicos classificados como metabólitos primários e secundários. Os primários são imprescindíveis no que tange o desenvolvimento da planta, possuem função plástica, estrutural e de armazenamento de energia, já os secundários, exercem funções relacionadas com a sobrevivência em ambientes desfavoráveis e na adaptação evolutiva da planta (Frota *et al.*, 2021).

Dentre os metabólitos secundários podemos citar os flavonoides que são encontrados com relativa abundância nas plantas, com diferentes formas estruturais, ocorrendo de forma livre (aglicona) ou ligado a açúcares (glicosídeos) com diversas propriedades farmacológicas (Slámová, 2018). Destaca-se pela presença de um núcleo 2-fenil-cromona e são biossintetizados a partir de derivados do ácido acético e da fenilalanina por meio da via do ácido chiquímico. Sua classificação é baseada no grau de oxidação, na configuração do anel C e na posição de ligação do anel B, o que contribui para uma melhor compreensão de suas propriedades e funções biológicas (Wang, 2018)

Os flavonoides, embora ainda não sejam completamente conhecidos, possuem grande potencial terapêutico e diversas atividades biológicas, como ação antiviral, antimicrobiana, antiparasitária, imunomoduladora, anti-inflamatória e antioxidante. Sua atividade antioxidante está diretamente relacionada à sua estrutura química e ao número de grupos hidroxila, tornando-se mais eficaz com um maior número dessas substituições, o que reforça sua relevância. Além

disso, os flavonoides também modulam funções enzimáticas essenciais, agindo como potentes inibidores de enzimas como xantina-oxidases, ciclo-oxigenases e lipoxigenases entre outras (Moraes *et al.*, 2022).

A atividade biológica dos flavonoides está predominantemente associada ao seu poder antioxidante, sendo a quercetina um dos flavonoides mais presentes na alimentação humana, comumente encontrado em frutas, vegetais e bebidas. Pesquisas realizadas tanto *in vitro* quanto *in vivo* indicam que a quercetina exibe uma ampla gama de efeitos biológicos, sendo reconhecida como um dos agentes mais eficazes na neutralização de radicais livres (Zymone *et al.*, 2022).

A presença dos glicosídeos aumenta a solubilidade e a estabilidade em água, melhora as propriedades farmacológicas dos flavonoides, eleva sua biodisponibilidade, e pode contribuir para a redução da toxicidade e dos efeitos colaterais (Roy *et al.*, 2022).

O Brasil é um país especialmente rico em plantas medicinais, possui a maior biodiversidade de ecossistema do mundo incluindo a floresta Amazônica e o cerrado, apresentando um grande potencial para o desenvolvimento de novas terapias baseadas no uso de produtos naturais. No entanto, apenas uma pequena parte dessa biodiversidade foi devidamente catalogada, o que indica que ainda sabemos muito pouco sobre as suas possíveis aplicações medicinais, oferecendo assim, uma oportunidade para a descoberta de novos compostos (Ribeiro *et al.*, 2018).

Diante do exposto, sabendo do potencial do gênero *Erythroxyllum* quanto a presença de flavonoides, e, por ser esse gênero encontrado amplamente no nordeste brasileiro, particularmente na Bahia, é de grande importância e faz-se necessário o estudo sobre as atividades biológicas de flavonoides isolados das folhas de *Erythroxyllum rimosum*, sendo estas, fonte potencial de substâncias inéditas e bioativas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar as propriedades biológicas de flavonoides isolados das folhas de *Erythroxylum rimosum*, estabelecendo uma conexão entre a estrutura química dessas moléculas e sua atividade biológica.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar a citotoxicidade dos flavonoides frente a macrófagos;
- Verificar se os flavonoides inibem a proliferação de promastigotas em cultura axênica e a infecção de macrófagos por *L. braziliensis*;
- Avaliar as alterações ultraestruturais no parasito após o tratamento com as moléculas em estudo;
- Estimar o potencial antioxidante dos flavonoides;
- Investigar a atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase pelos flavonoides;
- Discutir a relação estrutura-atividade biológica dos flavonoides isolados de *Erythroxylum rimosum*.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Família *Erythroxylaceae*

A família *Erythroxylaceae* compreende quatro gêneros (*Aneulophus*, *Erythroxylum*, *Nectaropetalum* e *Pinacopodium*), sendo o gênero *Erythroxylum* P. Browne o mais proeminente podendo ser encontrado nos quatro continentes principalmente na América tropical. Possui cerca de 240 espécies com distribuição pantropical, tendo o Brasil, registros de 123 espécies, sendo que aproximadamente 55% delas são encontradas no domínio da Mata Atlântica, com o registro de 46 espécies, onde a maioria delas restrita ao estado da Bahia (Costa-Lima, 2015).

A família *Erythroxylaceae* caracteriza-se por seus representantes apresentarem porte geralmente arbóreo ou arbustivo; folhas alternas, simples; estípulas intrapeciolares; inflorescência cimosa, frequentemente reduzida a uma única flor ou fascículos; flores bissexuais, actinomorfas, pentâmeras; estames em número duplo ao das pétalas; ovário súpero e fruto do tipo drupa. (Loiola *et al.*, 2007). A Figura 1 apresenta representantes da família *Erythroxylaceae*, evidenciando a diversidade morfológica das espécies pertencentes ao gênero *Erythroxylum*, amplamente distribuído em regiões tropicais e conhecido por sua relevância etnofarmacológica e potencial terapêutico.

Figura 1- Representantes da família *Erythroxylaceae*



Fonte: autor

3.2 Gênero *Erythroxylum*

O gênero *Erythroxylum* é o maior dentre os quatro gêneros da família Erythroxylaceae, apresentando cerca de 230 espécies distribuídas nas regiões tropicais na América do Sul, sendo a Venezuela e o Brasil, os principais centros de diversidade e endemismo (Figura 2). Para a flora brasileira, o gênero conta com 218 espécies, ocorrendo principalmente na floresta amazônica e na caatinga (Brito, 2024).

A Figura 2 ilustra o mapa de distribuição geográfica do gênero *Erythroxylum* em escala global. Observa-se que as espécies desse gênero estão amplamente distribuídas em regiões tropicais e subtropicais, indicando sua adaptação a climas quentes, com maior concentração na América do Sul. Sua presença em Américas, África e Ásia/Oceania sugere uma história evolutiva de dispersão geográfica ao longo do tempo. Essa ampla distribuição reforça a diversidade ecológica e o potencial bioativo do gênero, frequentemente associado a usos tradicionais e aplicações farmacológicas.

Figura 2- Mapa de distribuição do gênero *Erythroxylum* no mundo.



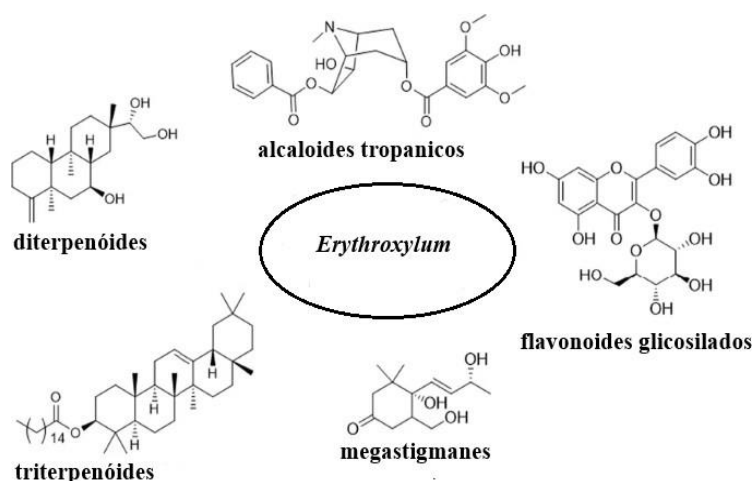
Fonte: Angiosperm Phylogeny website, version 14

Erythroxylum têm sido cultivados por milhares de anos pelas sociedades tradicionais sul-americanas muito antes do processo de domesticação das plantas. Poucos gêneros de plantas oferecem uma contribuição tão significativa quanto o *Erythroxylum*, tanto para indústrias legais altamente lucrativas, como a produção de refrigerantes, quanto para um dos maiores mercados ilícitos do planeta, o tráfico de cocaína (Restrepo *et al.*, 2019).

O gênero é especialmente conhecido por ser rico em alcaloides tropânicos, sendo a cocaína um de seus representantes mais notáveis. No entanto, através da pesquisa fitoquímica

foi possível identificar a presença de muitos outros compostos ativos em várias espécies de *Erythroxylum*. Até o momento, foram identificados um total de 383 compostos, dos quais 186 são alcaloides tropânicos e os outros 197 compostos incluem os diterpenos, triterpenos, alcaloides, flavonoides entre outros (Figura 3). Esse perfil de fitoconstituintes fornece uma visão abrangente do gênero, da diversidade de compostos e as potenciais atividades biológicas presentes nas plantas do gênero *Erythroxylum* (Lv Yulian *et.al*, 2022). A Figura 3 apresenta alguns dos compostos ativos identificados em espécies do gênero *Erythroxylum*. Esses compostos são amplamente associados a diversas atividades biológicas, evidenciando o potencial farmacológico e biotecnológico do gênero.

Figura 3 - Compostos ativos encontrados no gênero *Erythroxylum*



Adaptado: Lv *et al.*, 2022

Diante das diversas aplicações medicinais relatadas pela cultura popular, o gênero *Erythroxylum* demonstra ser promissor na investigação e descoberta de novas propriedades bioativas.

A atividade antioxidante de *Erythroxylum* está relacionada aos compostos fenólicos encontrados nas mesmas, cujos mecanismos de ação incluem a eliminação de radicais livres, a capacidade de quelar metais, a regulação da expressão gênica e a atuação como co-antioxidantes. Os flavonoides e compostos fenólicos desempenham um papel significativo como doadores de hidrogênio, promovendo a redução do estresse oxidativo (Matos de Macêdo *et al.*, 2022). A tabela 1 mostra as principais atividades biológicas avaliadas até o momento em espécies do gênero *Erythroxylum*.

Tabela 1 - Espécies de *Erythroxylum* avaliadas *in vitro* quanto às suas propriedades biológicas.

Espécie	Local de Coleta	Parte da Planta	Substâncias Isoladas	Atividades Avaliadas	Autor (Ano)
<i>E. alaternifolium</i>	Cuba	Folhas	-	Antioxidante	Ledoux <i>et al.</i> (2010)
<i>E. argentinum</i>	Brasil	Folha, Raiz	-	Analgésica, Anti-inflamatória, Anti-hipertensiva, Hipnótica, Efeito na contração e relaxamento muscular	Schmeda-hirschmann <i>et al.</i> (1992)
<i>E. bezerrae</i>	Brasil	-	Eritrobezerrina A, B, C, D, E e F	Anticâncer	Costa <i>et al.</i> (2017)
<i>E. bezerrae</i>	Brasil	Caule	Bezerraditerpeno A, B, C, D, E	Anti-inflamatória	Brito <i>et al.</i> (2023)
<i>E. bezerrae</i>	Brasil	Casca do Caule	Alcaloide tropânico EB7	Analgésica e Anti inflamatória	Ribeiro Liberato <i>et al.</i> (2024)
<i>E. caatingae</i>	Brasil	Folhas e Casca	-	Antimicrobiana, Anticâncer, Efeito na contração e relaxamento muscular	Silva <i>et al.</i> (2018); Silva <i>et al.</i> (2019)
<i>E. catuaba</i>	República Tcheca	Casca do caule	Catuabina A, B, C	Antimicrobiana, Antiviral	Pilna <i>et al.</i> (2015); Soares <i>et al.</i> (2005); de Oliveira <i>et al.</i> (2005)
<i>E. citrifolium</i>	Panamá	Tronco	-	Antiviral	Martínez <i>et al.</i> (1998)
<i>E. coca</i>	Peru, Chile, Alemanha	Folhas	-	Antimicrobiana, Antioxidante, Moduladora da CYP	Gamarra <i>et al.</i> (2017); Rodeiro <i>et al.</i> (2008)
<i>E. confusum</i>	Cuba	Folhas	-	Modulador CYP, Hepatoprotetor	Rodeiro <i>et al.</i> (2008)
<i>E. cuneatum</i>	Malásia	Folhas	-	Anticâncer, Efeito antidependente da morfina	Wesam <i>et al.</i> (2013); Suliman <i>et al.</i> (2016)
<i>E. daphnites</i>	Ilha Maurícia, Brasil	Folhas	-	Antimicrobiana, Anticâncer	Elias <i>et al.</i> (2017); Correia <i>et al.</i> (2018)
<i>E. fischeri</i>	Quênia	Folhas	-	Modulador CYP	Luck <i>et al.</i> (2015)

<i>E. gonocladum</i>	Brasil	Partes aéreas	Astilbina	Anti-hipertensiva, Tratamento Parkinson	Todeschini <i>et al.</i> (2008); Zhu <i>et al.</i> (2015)
<i>E. hypericifolium</i>	Ilha Maurícia	Folhas, Caule	-	Antimicrobiana, Efeito na contração e relaxamento muscular	Gurib-Fakim <i>et al.</i> (1993)
<i>E. laurifolium</i>	Ilha Maurícia	Folhas, Casca, Caule	Quercitrina e Afzelina	Antimicrobiana, Antioxidante, Anti-hipertensiva, Antiplasmódica, Antiviral, Efeito na contração e relaxamento muscular	Fortin <i>et al.</i> (2002); Ledoux <i>et al.</i> (2010); Picot <i>et al.</i> (2014)
<i>E. macrocarpum</i>	Ilha Maurícia	Folhas, Casca, Galho, Caule	-	Antimicrobiana, Anticâncer, Antioxidante, Antidiabética, Colinérgica e Adrenérgica, Imunomoduladora	Neergheen <i>et al.</i> (2006); Ramhit <i>et al.</i> (2017)
<i>E. minutifolium</i>	Cuba	Folhas	-	Modulador CYP, Hepatoprotetor	Rodeiro <i>et al.</i> (2008)
<i>E. monogynum</i>	Índia	Folhas	4-metilergosta-7,23-dien-3 β -ol e 4-metil ergosta-7,24(28)-dien-3 β -ol	Antioxidante, Antiplasmódica	Singh <i>et al.</i> (2011)
<i>E. monogynum</i>	Índia	Folhas	4-metilergosta-7,23-dien-3 β -ol e 4-metil ergosta-7,24(28)-dien-3 β -ol	Agentes hipoglicemiantes	Devi (2023)
<i>E. novogranatense</i>	Peru	Folhas	-	Antimicrobiana	Gamarra <i>et al.</i> (2017)
<i>E. numularia</i>	Brasil	Folhas, Frutas	Rianodanol e 14-O-metil-rianodanol	Larvicida	Silva <i>et al.</i> (2019)
<i>E. ovalifolium</i>	Brasil	Folhas, Caule	-	Antimicrobiana, Antídoto	Oliveira <i>et al.</i> (2016)

<i>E. passerimum</i>	Brasil	Folhas, Frutas	-	Larvicida, Tripanocida, Leishmanicida	Silva <i>et al.</i> (2019)
<i>E. pervillei</i>	Madagascar	Raízes	Pervilleinas A, B, C, D, E, F; (±)- Pervilleina H; (±)- Cloridrato de Pervilleina A	Anticâncer, Colinérgica e Adrenérgica	Blum <i>et al.</i> (2000); Jullian <i>et al.</i> (2006)
<i>E. pungens</i>	Brasil	Folhas, Caule e Raízes	-	Anticâncer	Pereira <i>et al.</i> (2018)
<i>E. rimosum</i>	Brasil	Folhas	7β-acetoxi-3β,6β- dibenzoiloxitropano	Colinérgica e Adrenérgica	Ribeiro <i>et al.</i> (2013)
<i>E. rotundifolium</i>	República Dominicana	Caule	Alcaloides tropânicos	Anticâncer	Blum <i>et al.</i> (2000)
<i>E. sideroxyloides</i>	Ilha Maurícia	Casca, Caule, Folhas	-	Antimicrobiana, Antioxidante, Antiplasmódica, Antiviral, Efeito na contração e relaxamento muscular	Gurib-Fakim <i>et al.</i> (1993); Soobrattee <i>et al.</i> (2008)
<i>E. suberosum</i>	Brasil	Casca do caule, Folhas	-	Antimicrobiana, Anticâncer	Pereira <i>et al.</i> (2021)
<i>E. subrotundum</i>	Brasil	Folhas	-	Antimicrobiana	Correia <i>et al.</i> (2018)
<i>E. subsessile</i>	Brasil	Caule	-	Antídoto	Oliveira <i>et al.</i> (2016)
<i>E. vacciniifolium</i>	Brasil	Casca	-	Afrodisíaca	Costa <i>et al.</i> (2018)

Adaptado: Matos de Macêdo *et al.*, 2022

3.2.1 Espécie *Erythroxylum rimosum*

A espécie *E. rimosum* O. E. Schulz é considerada restrita da região Nordeste do Brasil, encontrada nos estados do Ceará, Piauí e Bahia, ocorrendo especialmente na vegetação de Restinga, Cerrado e Carrasco (Da Silva Lins *et al.*, 2020).

A Figura 4 apresenta a espécie *Erythroxylum rimosum* O. E. Schulz, pertencente à família Erythroxylaceae. A imagem destaca características morfológicas da planta, como folhas simples, alternas e de bordas inteiras, além de nervuras bem marcadas, típicas do gênero, além dos frutos do tipo drupa, que são comuns entre as espécies do grupo.

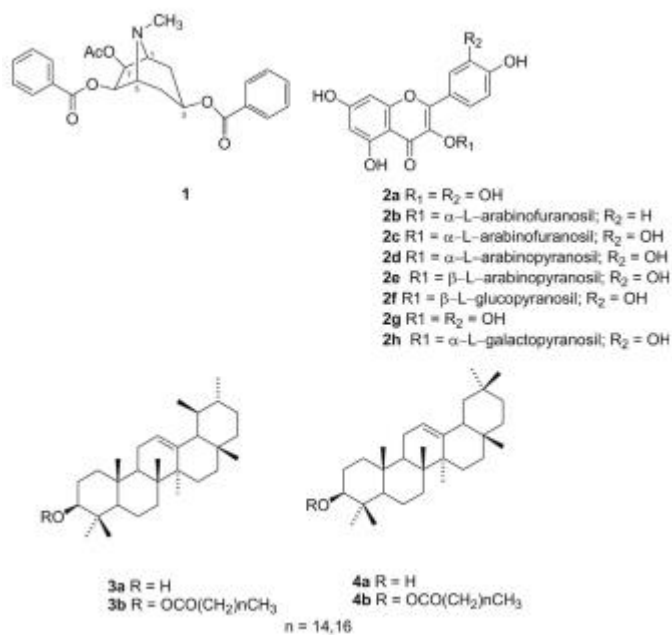
Figura 4 - *Erythroxylum rimosum* O. E. Schulz.



Fonte: biodiversity4all.org

Em estudo realizado por Ribeiro (2013), utilizando as fases hexânica, clorofórmica e acetato de etila obtidas a partir do extrato bruto metanólico, foi possível a identificação de alguns compostos, triterpenos pentacíclicos (α -amirina, β -amirina), esteroide (β -sitosterol), alcaloides tropânicos e também os flavonoides, tanto na forma livre quanto na presença de açúcar. (Figura 5)

Figura 5 - Alcaloide, flavonoides e triterpenos isolados de *Erythroxylum rimosum*

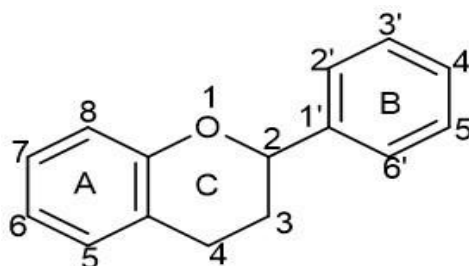


Fonte: Ribeiro *et al.*, 2013

3.3 Flavonoides

Os flavonoides são compostos naturais, polifenólicos que apresentam um esqueleto básico de quinze carbonos, compostos por dois anéis de benzeno aromáticos, conectados a um terceiro anel pirano heterocíclico (Figura 6).

Figura 6 - Estrutura fundamental dos flavonoides C6-C3-C6



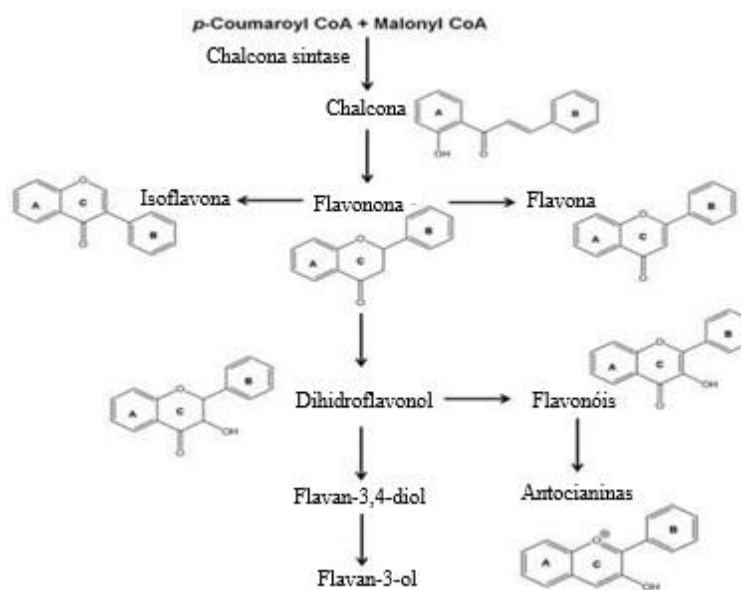
Fonte: Researchgate

A substituição e/ou configuração do grupo hidroxila nos anéis do flavonoide, pode impactar diretamente nas suas atividades biológicas (Alsharairi, 2021). Em relação a sua estrutura química, possui múltiplos alvos farmacológicos por ser um grupo fitoquímico amplamente diversificado de grande potencial terapêutico. Podem ser divididos de acordo com seu esqueleto químico em seis classes: flavonois, flavanonas, flavonas, isoflavonoides e antocianidinas (Figura 7) (Khan, 2019).

A via biossintética de flavonoides é um excelente exemplo de como uma série de enzimas pode gerar uma vasta diversidade de estruturas químicas a partir de alguns poucos precursores. Cada subclasse de flavonoide tem funções biológicas específicas na planta (proteção UV, pigmentação, defesa contra patógenos e herbívoros, atração de polinizadores, sinalização). A figura 7 mostra como a planta é capaz de gerar essa diversidade para atender a essas diferentes necessidades.

O esquema é uma representação clara e concisa das principais etapas e pontos de ramificação na biossíntese de flavonoides, demonstrando a complexidade e a engenhosidade das rotas metabólicas das plantas para produzir uma gama tão vasta de compostos com funções vitais.

Figura 7 - Biossíntese de flavonoides.



Adaptado: Dias, 2021.

A maioria dos flavonoides são encontrados na forma de glicosídeos, onde estão ligados a açúcares. O número e a posição dessas ligações de açúcar afetam a propriedade antioxidante do flavonoide. No entanto, as formas agliconas, onde não estão ligadas a açúcares, tendem a ter uma capacidade antioxidante maior. A ação antioxidante dos flavonoides pode ser uma combinação de vários desses mecanismos, como a eliminação de radicais e a inibição de funções enzimáticas (Dias, 2021).

A capacidade bioativa dos flavonoides pode variar dependendo de diversos fatores, como a estrutura química específica do flavonoide em questão, a presença ou ausência de grupos funcionais como as hidroxilas, no tipo de glicosídeo, na interação com sistemas biológicos, capacidade de neutralizar radicais livres, modular vias de sinalização celular e interação com enzimas específicas.

3.4 Atividade antioxidante

Os flavonoides têm atraído considerável interesse da comunidade científica devido a diversas pesquisas que evidenciam uma correlação direta entre a presença desses compostos, sejam eles sintéticos ou naturais no organismo trazendo benefícios à saúde.

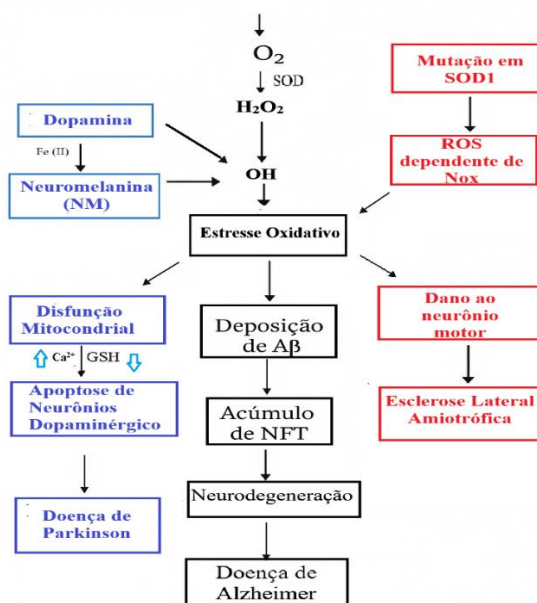
Sua principal ação biológica reside em seu potencial antioxidante, agindo como neutralizadores de radicais livres e como agentes quelantes de metais, essa ação retarda as reações de degradação celular causadas pela oxidação. A oxidação celular ocorre quando o oxigênio atmosférico interage com ácidos graxos insaturados, formando radicais peróxidos. Esse processo envolve a transferência de elétrons entre átomos, sendo a oxigênio o principal receptor no sistema de fluxo de elétrons, essencial para a produção de ATP (Adenosina trifosfato). No entanto, quando alguns elétrons ficam desemparelhados, podem originar radicais livres, moléculas instáveis devido às suas valências livres (Moraes *et al.*, 2022).

Os radicais livres são entidades químicas que possuem pelo menos um elétron desemparelhado em sua camada externa, conferindo-lhes geralmente uma alta reatividade. Nos sistemas biológicos, os radicais livres e moléculas reativas mais comuns derivam do oxigênio, sendo chamados de espécies reativas de oxigênio (ROS) e do nitrogênio, conhecidas como espécies reativas de nitrogênio (RNS) A formação de ROS ou RNS ocorre durante as reações de transferência de elétrons, envolvendo perda ou aquisição de elétrons (Jomova *et al.*, 2023).

Por influência da pressão do cotidiano, os organismos tendem a produzir uma quantidade maior de radicais livres. Esse desequilíbrio na produção de espécies reativas de oxigênio e na capacidade antioxidante para neutralizá-las é chamado de estresse oxidativo que pode causar danos às células normais do corpo, proteínas, lipídios e até no DNA (Deepika, 2022).

As EROS estão relacionadas à origem de doenças neurodegenerativas como doença de Parkinson (PK), doença de Alzheimer (DA) e da esclerose lateral amiotrófica (ELA) seja por meio de danos oxidativos na interação prejudicial com as mitocôndrias, causando a morte por apoptose dos neurônios dopaminérgicos, seja no aumento dos níveis de ferros que favorece a interação com o peróxido de hidrogênio, seja na mutação genética do gene superóxido dismutase-1 (SOD1) que pode resultar na morte de neurônios motores. Níveis elevados de estresse oxidativo tem sido frequentemente observados no cérebro de pacientes afetados por doenças neurodegenerativas. (Rodriguez- Arce, 2021). A figura 8 demonstra como o processo oxidativo influência no desenvolvimento das doenças neurodegenerativa.

Figura 8 - Estresse oxidativo em doenças neurodegenerativas. Azul: doença de Parkinson, preto: doença de Alzheimer e vermelho: esclerose lateral amiotrófica



Adaptado: Rodríguez-Arce, 2021

O diagrama solidifica o estresse oxidativo como um fator unificador e central na patogênese de várias doenças neurodegenerativas. Isso sugere que estratégias que visam reduzir o estresse oxidativo podem ter um papel terapêutico em diversas condições. Cada doença neurodegenerativa tem suas vias específicas (metabolismo da dopamina e disfunção mitocondrial para Parkinson; deposição de proteínas A β e tau para Alzheimer; mutação SOD1 e dano direto ao neurônio motor para ELA), mas todas convergem ou são iniciadas pelo estresse oxidativo.

Os antioxidantes desempenham um papel crucial na promoção da saúde humana devido às suas diversas propriedades bioativas como antienvhecimento, capacidade anticancerígena, preservação da saúde cerebral, ação antibacteriana, anti-inflamatória, antiparasitárias entre outras (Polat *et al.*, 2022).

Os principais grupos de antioxidantes encontrados nas plantas medicinais incluem antioxidantes fenólicos, terpenos, ácido ascórbico (vitamina C) e tocoferóis (vitamina E). O grupo de antioxidantes fenólicos, que compreende ácidos graxos fenólicos, flavonoides, antocianinas, lignanas e estilbenos, é o mais diversificado e contém até o momento mais de 10.000 compostos diferentes (Ziyatdinova, 2023).

3.5 Atividade anticolinesterase

A acetilcolinesterase é uma enzima colinérgica, encontrada nas junções neuromusculares pós-sinápticas, essencial na manutenção do sistema nervoso e periférico, responsável por hidrolisar a acetilcolina, um neurotransmissor que está associado a funções cognitivas, autonômicas e neuromusculares. Essa hidrólise é necessária a fim de permitir que o neurônio colinérgico retorne ao seu estado de repouso (Hung *et al.*, 2022).

A enzima tem recebido grande atenção por ser um potencial alvo de intervenção química, especialmente para o tratamento terapêutico da doença de Alzheimer. Trata-se de uma doença degenerativa, caracterizada pela neurodegeneração progressiva, causando perda de memória, comprometimento na linguagem, dificuldade motora e cognitiva entre outras. Essa relação entre doença e enzima foi estabelecida há aproximadamente 40 anos, através de estudos no cérebro de paciente com DA, levando em consideração o papel do neurotransmissor ACh no aprendizado e na memória (Eckroat, 2020).

A proteína Tau, localizadas internamente nos neurônios, desempenham a função de estabilizar os microtúbulos, da α -tubulina e β -tubulina, facilitando o transporte axonal. Em um cérebro saudável, a proteína Tau possui dois grupos fosfato por molécula, no entanto, em um cérebro com (DA), observa-se um aumento no número de grupos fosfato (6 a 8), indicando uma fosforilação anormal ou hiperfosforilação da Tau. Esse fenômeno compromete a capacidade da Tau de se ligar à tubulina, resultando na desestabilização da estrutura dos microtúbulos e, conseqüentemente, afetando as células neurais (De Castro Viero, 2022).

O acúmulo de proteína Tau, a formação e deposição das placas B amiloides e emaranhados neurofibrilares são as principais características fisiopatológicas da doença de Alzheimer. A degeneração do neurônio resulta em uma transmissão colinérgica deficiente, e também pode ocorrer através de estresse devido aos radicais livres, disfunção mitocondrial e inflamação dos neurônios (Arya *et al.*; 2021).

A figura 9 retrata a neurodegeneração como um processo multifatorial, com a inflamação e o estresse oxidativo agindo como gatilhos para uma série de eventos moleculares e celulares que levam à formação de agregados proteicos (placas de β -amiloide e emaranhados de Tau), disfunção de vias de sinalização, morte neuronal e um colapso geral da homeostase cerebral. Ela destaca as complexas interações que levam ao dano cerebral progressivo em doenças como a Doença de Alzheimer

Figura 9 - Representação das principais características da doença de Alzheimer. (↑ aumentar; ↓ diminuir)



Adaptado: Calderaro *et al.*, 2022

Segundo Maccioni *et al* (2022), proximadamente 52 milhões de pessoas são afetadas pela Doença de Alzheimer no mundo (Relatório Alzheimer OMS). Os agentes farmacológicos disponíveis oferecem apenas efeito paliativo devido à diversidade dos alvos patológicos associados à progressão da doença. Além dos efeitos relatados da DA na saúde humana, existe o impacto econômico associado à doença, que atinge a marca de um bilhão de dólares por ano.

Diversos produtos naturais demonstraram avanços promissores no tratamento da Doença de Alzheimer (DA). Um exemplo é a rutina devido aos seus efeitos neuroprotetores e perfil de segurança. Trata-se de um flavonoide glicosídeo natural, que exhibe uma variedade de efeitos biológicos, incluindo atividade neuroprotetora. Estudos farmacológicos destacam que tanto a rutina quanto seus glicosídeos têm a capacidade de proteger os neurônios dopaminérgicos, além de atenuar processos como apoptose e estresse oxidativo, associados principalmente a sua atividade antioxidante (Sun *et al.*, 2021).

Os inibidores da acetilcolinesterase (AChE) tornaram-se a principal classe terapêutica para déficits cognitivos na doença de Alzheimer (DA) desde 1997. Atualmente, donepezila, galantamina e rivastigmina são os principais medicamentos aprovados para tratar sintomas leves a moderados da doença. Esses compostos atuam bloqueando a manipulação da acetilcolina (ACh), um neurotransmissor essencial cuja deficiência está associada ao DA.

Ao aumentar a disponibilidade de ACh, esses inibidores melhoram a transmissão sináptica no sistema colinérgico, promovendo uma estabilização dos sintomas e, em alguns casos, uma melhora temporária da função cognitiva, contribuindo para retardar a progressão da variação neurológica (Cichon *et al.*, 2024).

A habilidade dos flavonoides de ultrapassar a barreira hematoencefálica é promissora e indica a possibilidade de exercer efeitos diretamente no cérebro, podendo atuar no combate a distúrbios neurodegenerativos. A busca por substâncias naturais no tratamento da DA é considerada crucial para a saúde cerebral, visto que esses compostos apresentam mecanismos biológicos e perfis de segurança amplamente documentados (Calderaro *et al.*, 2022).

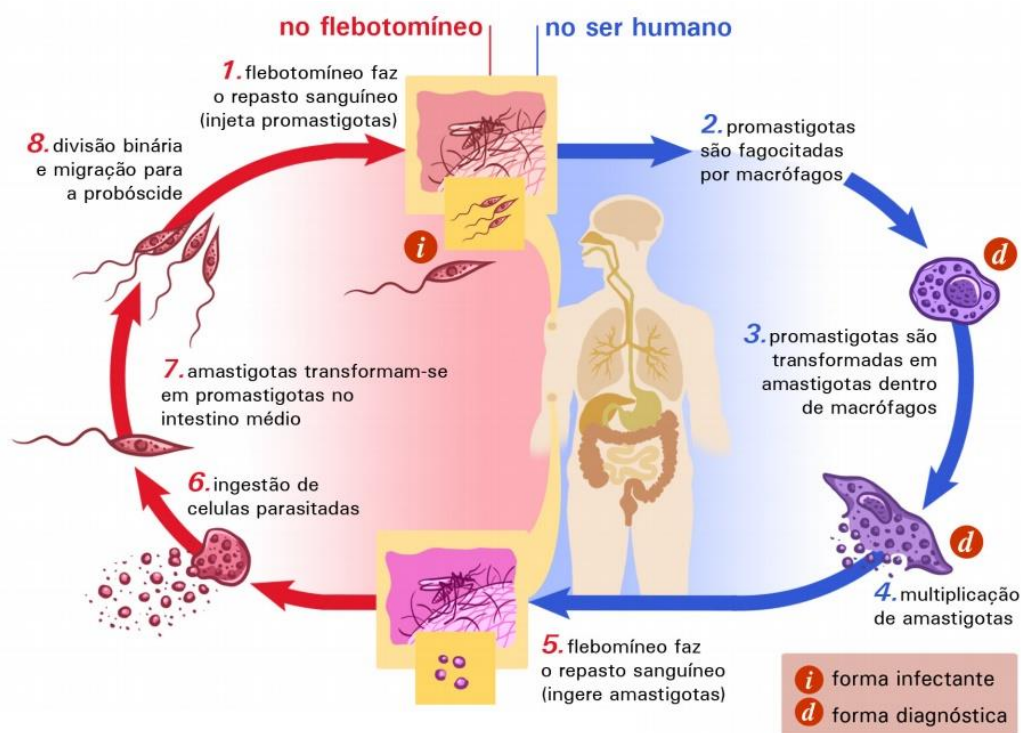
Perante isso, existe portanto, uma necessidade de estudos adicionais a fim de melhorar a caracterização dos fatores de risco que surgem com a progressão da doença, bem como para a identificação de medicamentos capazes de contrariar a evolução da doença e/ou defender seu desenvolvimento.

3.6 Atividade antileishmania

A leishmaniose é uma doença parasitária transmitida aos seres humanos por protozoários do gênero *Leishmania* através da picada de fêmeas do inseto vetor infectado, denominado de flebotomíneo. É endêmica em 98 países, geralmente em regiões tropicais e subtropicais atingidas pela pobreza e negligenciada, apesar de merecer atenção pelas suas manifestações clínicas e elevada incidência anual (Nigatu *et al.*, 2021).

Cerca de 20 espécies diferentes do parasito são conhecidas, com características morfológicas distintas durante seu ciclo de vida. As formas promastigotas, apresentam flagelos, são infectantes e colonizam o intestino do vetor flebotomíneo, enquanto as formas amastigotas são arredondadas e encontradas em nível intracelular, nos macrófagos, neutrófilos e células dendríticas de mamíferos infectados (Tajuddeen *et al.*, 2018).

Figura 10 - Ciclo de vida da *Leishmania*



Fonte: Sanarmed

A leishmaniose atinge cerca de 12 milhões de pessoas ao redor do mundo, com estimativas anuais entre 700 mil a 1 milhão de novos casos (OMS, 2023). A doença pode se manifestar de duas formas: a leishmaniose tegumentar, a forma clínica mais frequente, com cerca de 95% dos casos nas Américas, na bacia do Mediterrâneo, no Oriente Médio e na Ásia Central e a leishmaniose visceral, considerada a forma mais grave (Laurella *et al.*, 2023). Essas manifestações clínicas dependem de vários fatores, incluindo a espécie do parasito envolvido, a origem genética, a resposta imune do hospedeiro e a interação entre todas essas variáveis. A *L. braziliensis* e a *L. amazonensis*, por exemplo, são espécies causadoras da forma tegumentar da doença, enquanto a *L. infantum* causa a forma visceral (Pereira, 2020).

A atividade antioxidante tem sido alvo de estudos da indústria farmacêutica, por se acreditar que esse seja o mecanismo pelo qual os flavonoides produzem sua forte atividade contra diversas doenças. Estudos demonstraram seu potencial contra os diferentes padrões clínicos de leishmaniose. A quercetina, o ácido gálico e a rutina são alguns dos compostos de origem natural relatados por apresentar atividade antileishmania (Mehwish *et al.*, 2021).

Não existe vacina disponível para tratar ou prevenir a doença e os antimoniais pentavalentes têm sido utilizados como tratamento de primeira escolha há mais de 70 anos. A resistência aos antimoniais é um dos maiores obstáculos no tratamento da leishmaniose, causando falhas na terapia e alertando sobre a necessidade de estudos para a descoberta de novos medicamentos capazes de superar esse cenário (Gervazoni, 2018).

A anfotericina B é um antifúngico com excelente atividade antileishmania, utilizada como segunda opção no caso de falha terapêutica. Entretanto, assim como os antimoniais, apresenta efeitos colaterais graves, que obriga os pacientes a abandonarem o tratamento de forma precoce. Em sua forma lipossomal, a anfotericina é vulnerável a resistência devido ao seu longo tempo de meia vida dando origem a parasitos refratários (Chauhan, 2019).

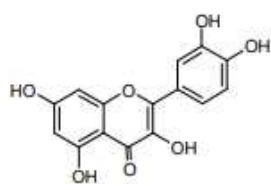
Neste contexto, a busca por alternativas terapêuticas na leishmaniose torna-se necessária devido ao alto custo, aos efeitos colaterais e aos regimes longos dos medicamentos atualmente disponíveis. Os produtos naturais, são uma fonte valiosa de ingredientes para medicamentos e tratamentos alternativos.

4.MATERIAIS E MÉTODOS

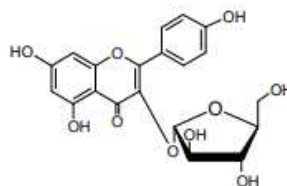
4.1 Obtenção dos compostos

Os flavonoides utilizados neste trabalho, foram isolados no Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Farmácia da Universidade Federal da Bahia e gentilmente cedidos ao nosso grupo de pesquisa. Os flavonoides foram obtidos a partir da fração acetato de etila do extrato vegetal, fase conhecida por concentrar compostos de natureza polifenólica, que foi submetida a procedimentos de purificação e isolamento. A caracterização estrutural dos flavonoides foi realizada por técnicas espectroscópicas, como ressonância magnética nuclear (RMN) e espectrometria de massas (EM), conforme descrito Ribeiro *et al.*, 2013 (Figura 11).

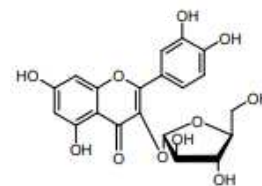
Figura 11 - Flavonoides isolados de *Erythroxylum rimosum* utilizados no estudo (ERA4: quercetina, ERA7: quercetina-3-*O*- α -arabinofuranosídeo, ERA8.3: quercetina-3 β -glicopiranosídeo, ERA10: quercetina-3-*O*- β -galactopiranosídeo, ERA5.1: kaempferol-3-*O*- α -arabinofuranosídeo)



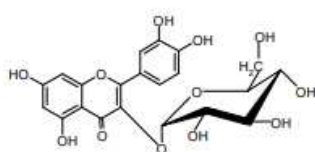
ERA 4



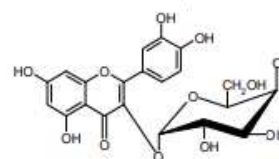
ERA 5.1



ERA 7



ERA 8.3



ERA 10

Fonte: Ribeiro *et al.*, 2013

4.2 Cultivo de parasitos

As formas promastigotas de *L. braziliensis* (MHOM/BR88/BA-3456) foram cultivadas em meio Schneider (Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, EUA) contendo 10% de soro bovino fetal (SBF, GIBCO, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA EUA), 50 µg/mL de gentamicina, (Life, Carlsbad, CA), pH 7,2 e incubados a 26°C. Os parasitos foram contados na câmara de Neubauer até atingirem a fase estacionária de crescimento e novas passagens foram realizadas.

4.3 Teste de citotoxicidade sobre macrófagos *in vitro*

Para a avaliação da atividade citotóxica dos flavonoides isolados de *Erythroxylum*, macrófagos da linhagem J774, foram incubados em placas de 96 poços (2×10^4 células/poço) em meio Eagle modificado por Dulbecco - DMEM, suplementado com 10% de SBF e 50 µg/mL de gentamicina e mantidos por 24 h em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Os compostos foram testados em séries de seis concentrações em triplicatas e incubados por 72 horas. Posteriormente, foram adicionados 20 µL/poço de Alamar Blue™ durante 6h. A leitura foi realizada no espectrofotômetro (leitor de microplaca, Spectramax 190, Molecular Devices, Sunnyvale, California, EUA) nos comprimentos de onda 570 e 600 nm. Os resultados foram expressos através dos valores da concentração citotóxica de 50% para as células (CC₅₀). Como controle positivo foi utilizada a violeta de genciana (Synth, São Paulo, SP, Brasil).

4.4 Ensaio de viabilidade celular

Promastigotas de *L. braziliensis* (1×10^6 por poço) foram adicionadas em placa de 96 poços contendo meio Schneider suplementado com 10% de SBF e 50 µg/mL de gentamicina e submetidas ao tratamento com diferentes concentrações dos flavonoides (100µM - 6,25µM; diluição seriada 1:2). Os parasitos foram incubados por 72 horas a 26°C. Em seguida, 20 µL/poço de Alamar Blue™ foi adicionado durante 2 horas antes da leitura. A leitura foi realizada no espectrofotômetro (Spectramax 190, Molecular Devices, Sunnyvale, California, EUA) nos comprimentos de onda de 570 e 600 nm. O percentual de inibição da cultura axênica foi determinado baseado no controle não tratado.

4.5 Ensaio de infecção de macrófagos por *L. braziliensis*

Em uma placa de 24 poços com lamínulas redondas de 13mm estéreis foram adicionados 5×10^5 macrófagos da linhagem tumoral J774 e, após incubação overnight, foram adicionadas promastigotas de *L. braziliensis* em fase estacionária (10:1). Após o período de 4h de infecção, o tratamento foi adicionado em duplicata com a ERA8.3 (2,5 μ M - 20 μ M), ERA10 (2,5 μ M - 20 μ M) e com a droga de referência anfotericina B (3 μ M); o controle negativo (CTL-) foi performedo utilizando RPMI suplementado com SBF a 10%. Após 24 horas, as células foram fixadas em metanol e coradas com giemsa (Dinâmica, Química Contemporânea Ltda, SP, Brasil). A porcentagem de macrófagos infectados e o número de amastigotas por macrófagos foram determinados pela contagem de 100 células/ poço. As micrografias foram capturadas em câmera acoplada ao microscópio óptico (Leica, ICC50W, Wetzlar, Alemanha) e as imagens analisadas através do aplicativo Leica Microsystems AirLab.

4.6 Índice de seletividade

O índice de seletividade (IS) foi calculado pela razão entre valor de CC_{50} obtido em macrófagos e o valor de IC_{50} obtido em promastigotas tratados com os compostos em estudo. O IS é utilizado para determinar quanto o composto testado é mais seletivo para o parasito sem causar danos para a viabilidade das células de mamíferos. Se o índice de seletividade for maior que 1, indica uma maior seletividade para as células-alvo, enquanto valores menores indicariam uma influência mais ampla.

4.7 Análise ultraestrutural por microscopia eletrônica de varredura

Promastigotas de *L. braziliensis* (5×10^7) foram adicionados em tubos eppendorf contendo 1mL de meio Schneider (Sigma) e tratados com ERA8.3 (5 μ M e 10 μ M), ERA10 (5 μ M e 10 μ M) e com a anfotericina B (3 μ M) por 24h a 26°C. Após o tratamento, as amostras foram fixadas e depois processadas na plataforma de microscopia eletrônica (FIOCRUZ/BA). Em suma, os parasitos foram fixados em solução de glutaraldeído 2% e tampão cacodilato de sódio 0,1M por 2h em temperatura ambiente. Após fixação, as amostras foram marcadas com solução contendo tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1M por 1h em temperatura ambiente. Os parasitos foram colocados em suporte de lamínulas de vidro com poly-L-lysina 0,01%, desidratados com série de etanol (30 a 100%) e submetidos ao ponto crítico (substituição do

etanol por CO₂). Em seguida, as amostras foram metalizadas com ouro e observado no microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-6390LV.

4.8 Estudo *in silico* de docking molecular

O programa GOLD 5.3.0 (Jones *et al.*, 2008), através da função ChemPLP, foi utilizado para realizar o acoplamento dos flavonoides ERA8.3 e ERA10 na região do sítio catalítico da estrutura da arginase de *L. mexicana* (*LmARG*) obtida do Protein Data Bank, código PDB 4IU1 (D'Antonio *et al.*, 2013). Antes do cálculo do docking, as estruturas dos compostos foram desenhadas através do programa Marvin Sketch 16.9.5 (Chemaxon, 2015), através do qual também foi selecionado os tautômeros mais confiáveis dos referidos compostos considerando o perfil de protonação em pH = 7,0. Posteriormente, o módulo CONCORD do SYBYL®-X 2.0 (Tripos, 2010) foi empregado para gerar as estruturas 3D dos inibidores. A otimização das estruturas 3D dos inibidores foi realizada utilizando o método Gradiente Conjugado(GC) com critério de convergência de 0,001 cal mol⁻¹, empregando o campo de força Tripos ($\epsilon = 80,4$), e estabelecendo um máximo de 50.000 interações (Clark; Cramer; Van Opdenbosch, 1989). Além disso, cargas Gasteiger Huckel (Gasteiger; Marsili; Tetrahedron, 1980) foram atribuídas aos compostos na plataforma SYBYL®-X 2.0 (Tripos, 2010). Também previamente aos cálculos, o programa GOLD 5.3.0 (Jones *et al.*, 2008) foi avaliado quanto à capacidade de reproduzir, no respectivo sítio de ligação, a pose do inibidor competitivo Nor-noha, co-cristalizado à estrutura da arginase de *L. mexicana*. Os resultados foram analisados com auxílio dos programas Pymol (Schrödinger; DeLano, 2009) e PoseView (Stierand; Maass; Rarey 2010)

4.9. Atividade antioxidante

4.9.1 Método de sequestro do radical estável DPPH

Os flavonoides foram inicialmente diluídos em metanol, alcançando uma concentração inicial de 5,0 mg/mL. Posteriormente, foram realizadas diluições seriadas (1:2) a partir dessa solução original, resultando em concentrações de 2,5; 1,25; 0,625; 0,3125; 0,15625; 0,07813; 0,03906 mg/mL. O teste foi conduzido em triplicata, adicionando-se 50 µL de cada solução de flavonoides em uma placa de 96 poços. Em seguida, foram acrescentados 200 µL da solução de DPPH a cada poço. O hidroxitolueno de butila (BHT) foi utilizado como padrão, enquanto o metanol serviu como controle (branco). A placa foi incubada ao abrigo da luz por 40 minutos, em seguida a redução do radical DPPH foi medida monitorando o decréscimo na absorção a 600 nm. Após a leitura, foi calculada a porcentagem de atividade antioxidante, segundo a fórmula abaixo:

$$\% \text{ antioxidante} = [(\text{Abs do DPPH} - \text{Abs da amostra}) / (\text{Abs DPPH})] * 100\%$$

Após a obtenção dos dados de porcentagem de atividade antioxidante, foi possível gerar o gráfico representando a porcentagem de inibição antioxidante do radical DPPH em relação à concentração dos compostos. Além disso, calculou-se o valor de IC₅₀, que é definido como a concentração inibitória do antioxidante necessária para reduzir a concentração inicial de DPPH em 50%, por meio da equação da reta

4.9.2 Método de inibição da oxidação do β-caroteno/ácido linoleico

Os flavonoides foram inicialmente diluídos em metanol, para obter uma concentração de 1,0mg/mL. Para o preparo da solução de β-caroteno, 0,5 mg da substância (Sigma-Aldrich) foi dissolvido em 1 mL de clorofórmio. Essa mistura foi então transferida para um balão de 200 mL onde foi adicionado 200µL de Tween 80 como agente emulsificante (Synth, São Paulo, SP, Brasil), 25µL de ácido linoleico como agente oxidante (TCI). Após a evaporação do clorofórmio, 50 mL de água foi acrescentada. Na placa de 96 poços foi adicionado 160 µL da emulsão β-caroteno/ácido linoléico, 40 µL de cada flavonoide testado ou de antioxidante sintético (BHT) em diferentes concentrações, tais experimentos foram realizados em triplicata.

Para o controle negativo, a amostra foi substituída por 25 µl de metanol. A cinética de descoloração da emulsão foi medida a 470 nm antes e após a incubação a 50 °C, em tempos que variaram de T0, 30, 60, 90 e 120 min. A atividade antioxidante de cada amostra foi expressa em porcentagem e calculada pela seguinte equação:

$$\% \text{Inibição} = (\text{Abic} - \text{Abfc}) - (\text{Abiam} - \text{Abfam}) / (\text{Abic} - \text{Abfc}) \times 100$$

Onde: Abic = Absorbância inicial do controle, Abfc = Absorbância final do controle, Abiam = Absorbância inicial da amostra e Abfam = Absorbância final da amostra.

4.10 Atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase

Para a realização deste teste, foram adicionados em cada poço da microplaca 140 µL de tampão fosfato (pH 8,0), 10 µL da enzima acetilcolinesterase (0,5 U/mL), 20 µL de ácido 5,5-ditio-bis-2-nitrobenzólico (DTNB) (10 mM) - Thermo Scientific™ e 20 µL da amostra. A seguir, foi realizada a leitura da absorbância no espectrofotômetro a 405 nm. Para iniciar a reação, foi acrescentado 20 µL do iodeto de acetilcolina (Sigma Aldrich) A Eserina (fisostigmina) foi utilizada como padrão, e o metanol como controle. A placa foi protegida ao abrigo da luz, com a reação monitorada a cada minuto por 10 minutos. A inibição foi calculada em porcentagem usando a fórmula:

$$\% \text{Inibição} = (\text{Abc} - \text{Abam}) / \text{Abc} \times 100$$

Onde: **Abc** corresponde à absorbância do controle e **Abam** à absorbância da amostra

4.11 Análises estatísticas

Os valores numéricos apresentados nas tabelas e gráficos são expressos como média ± erro padrão da média, obtidos a partir de experimentos independentes realizados em triplicata. A análise estatística das diferenças entre os grupos experimentais foi realizada por meio de análise de variância de uma via (One-Way ANOVA), seguida do teste de Dunnett/ Tukey, utilizado para comparações com o grupo controle. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p \leq 0,05$, $p < 0,01$ ou $p < 0,001$, sendo indicadas por asteriscos nos gráficos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Citotoxicidade dos flavonoides frente a macrófagos J774

A determinação da concentração citotóxica de 50% (CC₅₀) foi realizada em macrófagos de linhagem J774 e os valores dos flavonoides em estudo foram comparados com a violeta de genciana (CC₅₀ = 0,3 µM), a droga citotóxica de referência (Tabela 2). Os compostos ERA7, ERA8.3 e o ERA10 tem como estrutura base a quercetina e a presença de açúcar, nenhum deles exibiram citotoxicidade frente a linhagem celular após 72h de tratamento. O composto ERA5.1.1, tem como estrutura base o kaempferol, que apresenta uma hidroxila a menos em relação a quercetina, ligado a uma porção de açúcar em forma de pentose, apresentou valor de CC₅₀ menor em relação aos outros compostos (CC₅₀ = 29,4 µM). A ausência do grupo hidroxila na posição C-3' do anel B, característica do kaempferol, pode ter reduzido o potencial do flavonoide, influenciado para uma maior reatividade celular. Além disso, a presença de uma pentose ligada à estrutura base pode ter influenciado tanto na solubilidade quanto na interação com componentes celulares, facilitando a entrada do composto nas células e, possivelmente, aumentando seus efeitos citotóxicos. Assim, a combinação entre menor número de grupos hidroxila e a presença da porção glicosídica pode justificar o perfil mais citóxico observado para ERA5.1.1.

A anfotericina B, fármaco amplamente utilizado no tratamento das leishmanioses, apresentou um valor de CC₅₀ de 3,3 µM. Estes resultados sugerem que os flavonoides usados nesse trabalho, exibem menor citotoxicidade quando comparado com a anfotericina B.

Tabela 2 - Citotoxicidade, atividade antileishmania e índice de seletividade dos flavonoides isolados de *Erythroxylum*.

Flavonoides	Macrófagos J774 CC ₅₀ Mφ (µM)	Promastigotas de <i>L. braziliensis</i> IC ₅₀ ± DP (µM)	Índice de Seletividade (CC ₅₀ /IC ₅₀)
ERA4	-	-	-
ERA5.1.1	29,4	>100	-
ERA7	>100	54,7 ± 0,2	1,8
ERA8.3	>100	10,3 ± 0,7	9,6
ERA10	>100	10,1 ± 0,5	9,8
Anfotericina B	3,3 ± 0,5	2,3 ± 0,2	1,4
Violeta Genciana	0,3	ND	ND

CC₅₀= concentração citotóxica de 50%; IC₅₀= concentração inibitória de 50%; ND= Não determinado

Os valores de CC₅₀ e IC₅₀ são apresentados como média ± DP de três experimentos. A análise estatística foi feita por ANOVA one-way com pós-teste de Dunnett (p < 0,05).

5.2 Efeito dos flavonoides frente as formas promastigotas de *L. braziliensis*.

Os flavonoides também foram avaliados quanto a atividade antileishmania, frente às formas promastigotas de *L. braziliensis* em cultura axênica (Tabela 2). Os flavonoides ERA8.3 (quercetina-3 β -glicopiranosídeo) e o ERA10 (quercetina-3-*O*- β -galactopiranosídeo) apresentaram valores de IC₅₀ de 10,34 \pm 0,7 e 10,14 \pm 0,5, respectivamente.

O índice de seletividade foi calculado pela razão entre os valores de CC₅₀ e IC₅₀ e indica o quanto o flavonoide é mais seletivo para o parasito do que para células de mamíferos. Os flavonoides ERA8.3 e ERA10 foram > que 9,6 ou 9,8 vezes mais seletivos para as formas promastigotas de *L. braziliensis*, respectivamente. A presença do açúcar com seis carbonos na estrutura do composto, em configuração β pode ter contribuído para a atividade antileishmania.

O compostos ERA7 (quercetina-3-*O*- α -arabinofuranosídeo) e ERA5.1.1, (kaempferol-3-*O*- α -arabinofuranosídeo), apresentam na sua estrutura um açúcar em forma de pentose, ambos no carbono 3 da quercetina. Estes compostos não apresentaram atividade no ensaio, demonstrando que a natureza do açúcar como substituinte influencia diretamente num possível resultado farmacológico do flavonoide.

O composto ERA4 (quercetina) que apesar de apresentar uma quantidade significativa de hidroxilas disponíveis e ser bastante conhecida pela sua propriedade antioxidante não apresentou atividade antileishmania. Isso demonstra que, a presença de um açúcar com seis carbonos é fundamental na disponibilidade do composto e que possui relação direta com a atividade leishmanicida.

A presença do açúcar aumenta a estabilidade química dos flavonoides *in vitro*, aprimora sua biodisponibilidade, preserva seu esqueleto nativo, resultando em um efeito inibitório ampliado. O esqueleto fundamental dos flavonoides, juntamente com os locais específicos de ligação e o tipo de unidade de açúcar, desempenha um papel crucial na determinação do potencial resultado farmacológico (Sajid *et al.*, 2021).

5.3 Ensaio de infecção

A porcentagem de macrófagos infectados e o número médio de amastigotas por campo foram quantificados após o tratamento com os flavonoides ERA10 (5 μ M) e ERA8.3 (5 μ M), em comparação com a anfotericina B (3 μ M) e o controle sem tratamento.

Uma redução significativa no percentual de macrófagos infectados e na média do número de amastigotas/campo foi observada após 24 horas de tratamento (Figura 12). A proporção de macrófagos J774 infectados por *L. braziliensis* sofreu redução significativa após 24 h de tratamento com as substâncias testadas. No grupo controle, aproximadamente 70 % das células permaneceram infectadas. A ERA 10 (5 μ M) diminuiu esse percentual para cerca de 45 %, correspondendo a uma inibição de ~36 % em comparação ao controle ($p < 0,05$). Já a ERA 8.3 (5 μ M) foi ainda mais eficaz, reduzindo a infecção para aproximadamente 40 % dos macrófagos, ou seja, uma inibição de ~43 % ($p < 0,01$).

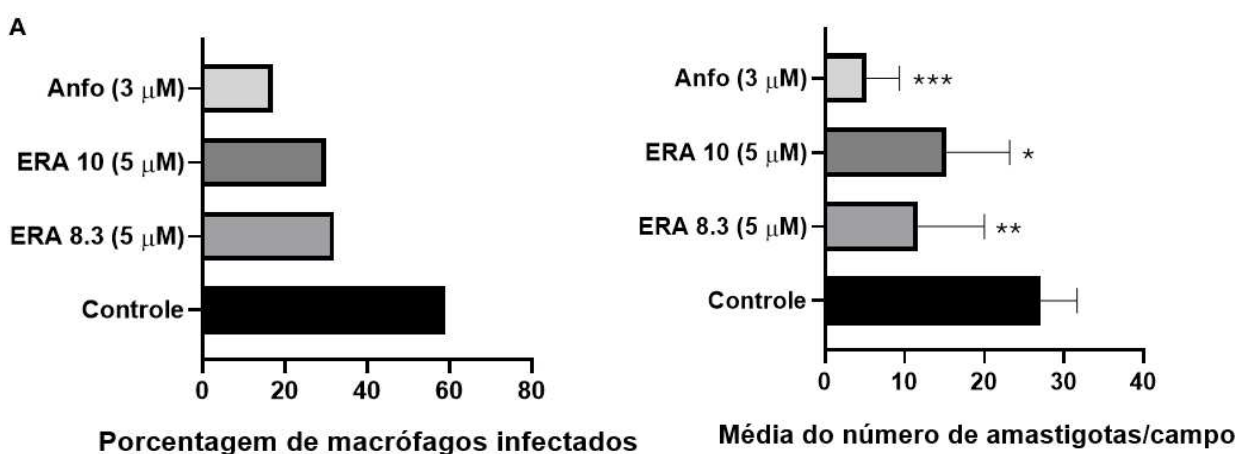
Quando avaliamos o número médio de amastigotas por campo (100 macrófagos contados), o padrão se mantém: a ERA 10 reduziu de ~30 para ~22 amastigotas por campo (~27 % de inibição; $p < 0,05$), enquanto a ERA 8.3 alcançou uma diminuição de ~30 para ~18 amastigotas (~40 % de inibição; $p < 0,01$). Esses resultados indicam que, além de reduzir o número de células infectadas, ambos os compostos limitam a proliferação ou a sobrevivência intracelular dos parasitos remanescentes.

Como esperado, a anfotericina B (3 μ M), padrão ouro no tratamento da leishmaniose, reduziu o número de células infectadas e de parasitos intracelulares, o percentual de macrófagos J774 infectados de ~70 % (controle) para ~20 %, o que representa cerca de 71 % de inibição, e diminuiu o número médio de amastigotas de ~30 para ~5 por campo, ou seja 83 % de inibição. Em comparação, a ERA 8.3 (5 μ M) inibiu ~43 % dos macrófagos infectados e ~40 % das amastigotas, enquanto a ERA 10 (5 μ M) apresentou inibições de ~36 % e ~27 %, respectivamente. O flavonoide ERA 8.3 destaca-se sobre a ERA 10, sugerindo que alterações estruturais específicas podem otimizar a afinidade ou a penetração celular.

No estudo realizado por Gervanozi (2018), o flavonoide 2'-Hydroxyflavanone (2HF) foi testado em macrófagos murinos infectados com a forma amastigota de *L. amazonensis* e reduziu significativamente o índice de infecção intracelular e o número de amastigotas por macrófago, sem apresentar toxicidade significativa às células hospedeiras. Além disso, em modelo murino de leishmaniose cutânea, o 2HF diminuiu o tamanho das lesões e a carga parasitária no local da infecção sem sinais de toxicidade sistêmica.

Isso demonstra que os flavonoides podem interferir de maneira eficaz na sobrevivência intracelular de *Leishmania* em macrófagos, confirmando o potencial desses compostos como agentes antileishmania.

Figura 12. Efeito da ERA8.3 e da ERA10 frente à parasitos intracelulares de *Leishmania braziliensis*. Macrófagos J774 foram infectados por promastigotas de *L. braziliensis* e foram tratados com ERA8.3 e ERA10 (5 μM) ou anfotericina B (3 μM). Após 24h de tratamento, o percentual de células infectadas (A) e a média do número de amastigotas por campo (B) foram mensurados em 100 macrófagos. Os resultados são representados pela média \pm SD, com teste one-way ANOVA seguido do pós-teste de Dunnett. * $P < 0,05$ vs. controle (CTL-), ** $P < 0,01$ vs. CTL-, *** $P < 0,001$ vs. CTL-.



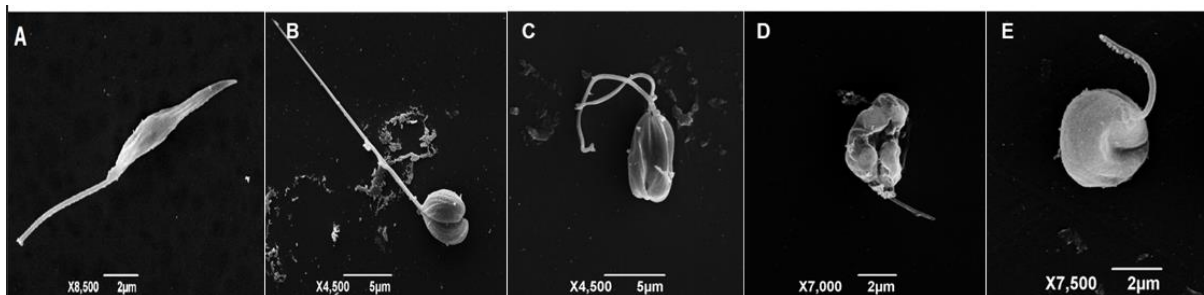
5.4 Microscopia de varredura

A análise ultraestrutural por microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi empregada para avaliar as alterações morfológicas em promastigotas *L. braziliensis* tratadas ou não com os flavonoides ERA 8.3 ou ERA 10.

Os parasitos não tratados preservaram suas características morfológicas típicas, evidenciando integridade da membrana superficial, contorno celular bem definidos, alongamento típico do corpo celular com extremidades afiladas e a presença de um flagelo longo, íntegro e funcional, essencial para a motilidade e sobrevivência no vetor, como pode ser observado na figura 13A.

Os parasitos tratados sofreram alterações morfológicas, abaulamentos irregulares e modificação do formato celular, que passa de fusiforme para uma conformação mais esférica e anormal. Perda da integridade da membrana plasmática, desorganização da estrutura celular, encurtamento do flagelo também foram alterações observadas, o que compromete características típicas da morfologia promastigota (Figuras 13B, C, D e E)

Figura 13- Alterações ultraestruturais em promastigotas de *L. braziliensis* após o tratamento com ERA8.3 (13 B e C), ERA10 (13 D e E) nas concentrações de (5 μ M e 10 μ M) respectivamente e controle não tratado (13 A) por microscopia eletrônica de varredura.



Estudo realizado por Mehwish *et al.* (2021) os parasitos de *L. donovani* tratados com a quercetina, ácido gálico e rutina, apresentaram várias alterações morfológicas significativas, observadas por microscopia eletrônica de transmissão. Entre as principais mudanças, distorção do bolso flagelar, afetando a motilidade do parasita, e no aumento de vacúolos citoplasmáticos, indicativo de disfunção celular. Além disso, foi observada a formação de corpos lipídicos e a condensação da cromatina nuclear, sugerindo indução de estresse e morte celular programada.

5.5 Atividade *in silico*

Estudos *in silico* demonstraram que a inclusão de açúcar frequentemente resulta em um aumento na biodisponibilidade da porção aglicona, sendo esta influenciada pela natureza específica do açúcar substituinte tornando o composto mais eficaz. A posição desses segmentos parece ser crucial na sua eficácia, os compostos substituídos no carbono 3, apresentaram maior potencial do que aqueles que foram substituídos no carbono 7 (Cherrak, 2020).

Os flavonoides isoquercetina ERA8.3 (glicose) e hiperina ERA10 (galactose) frente a formas promastigotas de *Leishmania braziliensis*, ambos apresentam açúcar no carbono C-3.

Em relação a atividade desses compostos frente a parasitos do gênero *Leishmania*, tem-se o trabalho de Da Silva (2012) que descreve a atividade inibitória da isoquercetina frente a enzima arginase de *L. amazonensis* (LaARG) mediante interação em seu sítio catalítico. Verifica-se que a LaARG apresenta 86,9% de identidade sequencial global frente a arginase de *L. braziliensis* (LbARG). Se a comparação ocorrer na região do sítio catalítico, esse percentual é de 100% de identidade sequencial. Tal semelhança estrutural altamente conservada sugere que a isoquercetina iniba também a arginase de LbARG.

Adicionalmente a semelhança estrutural entre isoquercetina e hiperina, epímeros que diferem apenas na configuração de uma hidroxila do carbono 4 do açúcar, sugere que esta última também haja como inibidor da LbARG.

Até então não se tem menção, pelo menos não foi possível identificar nas buscas realizadas pelos autores, da atividade da hiperina frente a LbARG, tampouco se tem descritas as interações intermoleculares entre esse composto e a referida enzima. Nesse sentido, os fatores estruturais que explicariam a inibição da LbARG tanto pela quercetina quanto pela hiperina podem ser analisados com auxílio de ferramentas *in silico* como acoplamento molecular.

Embora as coordenadas da estrutura 3D da LbARG, necessárias para a realização dos estudos *in silico*, não estejam disponíveis no Protein Data Bank, a estrutura da LmARG em complexo com inibidor competitivo nor-NOHA foi elucidada (PDB = 4IU1, D'Antonio *et al.*, 2013). A LmARG, por sua vez, apresenta 84,9% de identidade sequencial global e 88,2% de identidade local na região do sítio catalítico frente a enzima de *L. braziliensis*. Dado o elevado grau de conservação estrutural entre as enzimas, os estudos de acoplamento dos compostos foram conduzidos frente a LmARG, cujos resultados refletem de forma confiável as interações intermoleculares que ocorreriam entre esses compostos frente ao sítio catalítico da enzima de *L. braziliensis*.

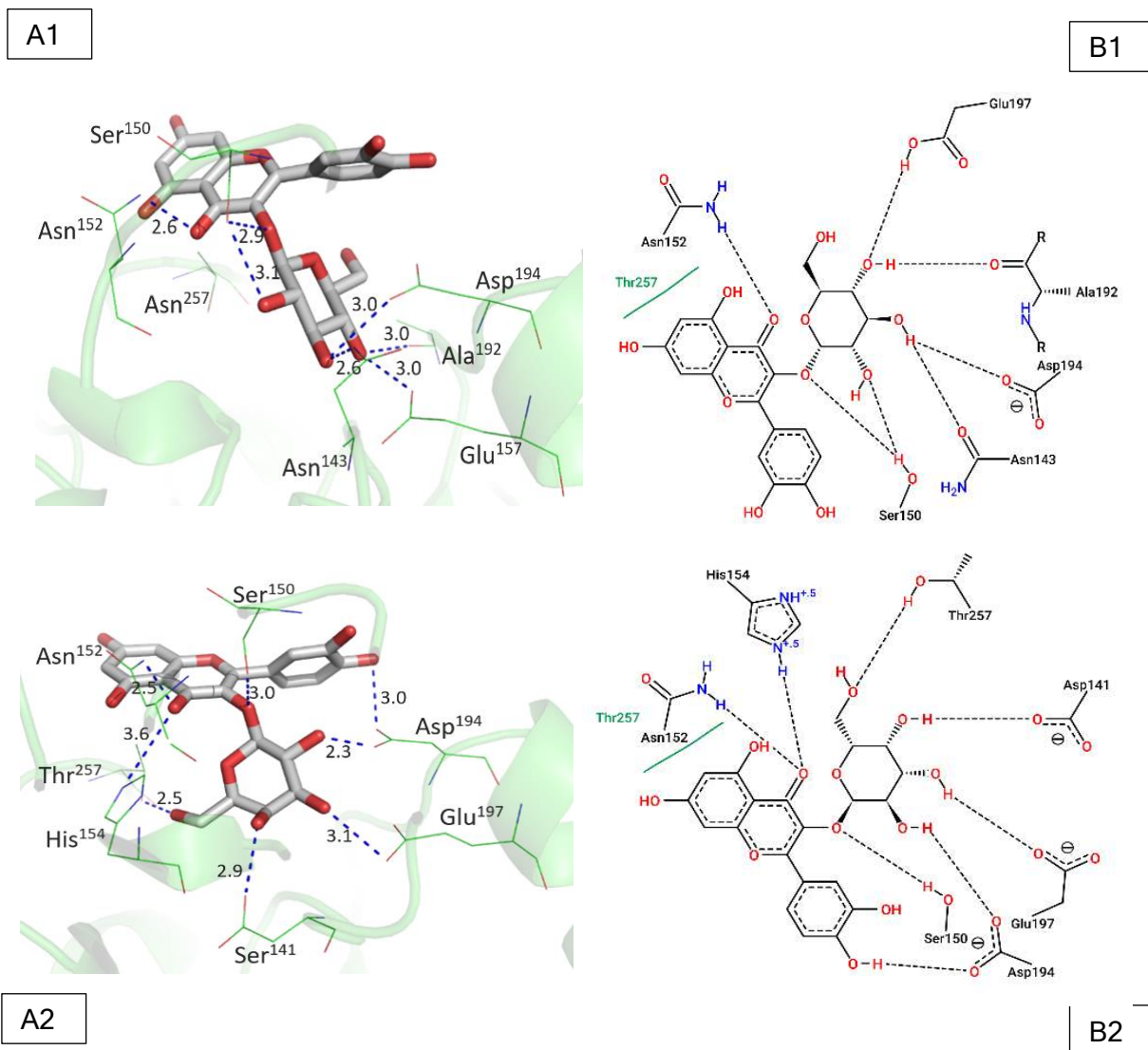
Assim, a figura 14 apresenta as orientações espaciais bem como interações realizadas entre os compostos e os resíduos do sítio catalítico da LmARG. O núcleo quercetina de ambos os compostos apresenta orientações espaciais e interações semelhantes frente a LmARG, sendo aceptores de ligações de hidrogênio da Ser150 e Asn152, bem como realizando interações hidrofóbicas com a Thr257, (Figura A2) A Thr257 e Asn152, por sua vez, interagem com o inibidor competitivo da arginase de *L. mexicana* nor-NOHA (D'Antonio *et al.*, 2013).

Todavia, apenas no composto ERA8.3 a porção catecol do núcleo quercetina se aproxima o suficiente do Asp194 (3,0Å) para agir como doador de ligação de hidrogênio. Dados semelhantes foram identificados por Da Silva (2012), que observou que a porção catecol da quercetina interage com o resíduo de Asp141 da LaARG, doando ligação de hidrogênio.

Apesar da semelhança estrutural das porções moleculares da glicose e galactose, compostos ERA10 e ERA8.3, respectivamente, a quiralidade no carbono 4 desses grupamentos determina diferentes tipos de interações realizadas com a arginase. Os aminoácidos Ala192, Asn143 (que recebem ligações de hidrogênio) e Ser150 (que doa uma ligação de hidrogênio) só são acessados pela glicose do ERA10, enquanto os resíduos Asp141 (aceptor de ligação de hidrogênio) e Thr257 (doador de ligação de hidrogênio) realizam interações apenas com a galactose do ERA8.3 (Figura B2).

Os aminoácidos Asp194 e Glu197, por sua vez, realizam interações tanto com a glicose quanto galactose. Todos os aminoácidos da estrutura da LmARG que realizam interações com os compostos ERA10 e ERA8.3 segundo a simulação *in silico* são idênticos na arginase de LbARG. As exceções são os resíduos Asp194, cuja correspondência na LmARG é o resíduo similar Glu, e a alanina192 de LmARG, não conservado na LbARG, que possui um Asp como correspondência, o que não deve influenciar na confiabilidade dos resultados.

Figura 14 - Resultados das poses de docking molecular obtidas pelo programa GOLD 5.3.0 dos compostos Quercetina-3-*O*- β -galactopiranosídeo (A1) e Quercetina-3 β -glicopiranosídeo (B1) no sítio catalítico da arginase de *L. mexicana* (LmARG). Esquema 2D dos resíduos de aminoácidos envolvidos nas interações realizadas entre os referidos compostos e a arginase (A2 e B2).

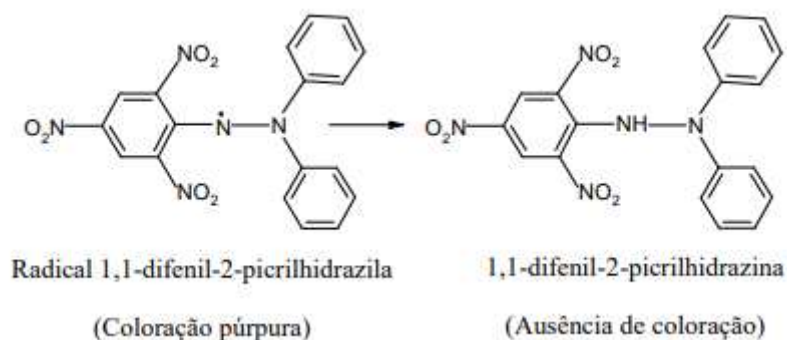


5.6 Sequestro dos radicais livres de DPPH

A capacidade dos flavonoides de sequestrar os radicais livres e, por consequência, estabilizar as reações induzidas por oxigênio é bastante conhecida e tem sido alvo da indústria farmacêutica no desenvolvimento de novos fármacos.

O ensaio DPPH é uma abordagem não enzimática bastante empregada a fim de fornecer informações fundamentais sobre a capacidade de compostos em eliminar radicais livres. O radical DPPH· exibe uma notável estabilidade e uma intensa cor violeta. O único elétron presente no átomo de nitrogênio no radical DPPH é reduzido para formar a hidrazina (DPPH-H), tal formação leva a uma transição da coloração da solução de violeta para um tom amarelo pálido (Figura 15). Este fenômeno resulta da redução do radical DPPH por meio da transferência de átomos de hidrogênio provenientes dos antioxidantes, que atuam como doadores de H (Gulcin, 2023)

Figura 15 - Representação da redução do DPPH

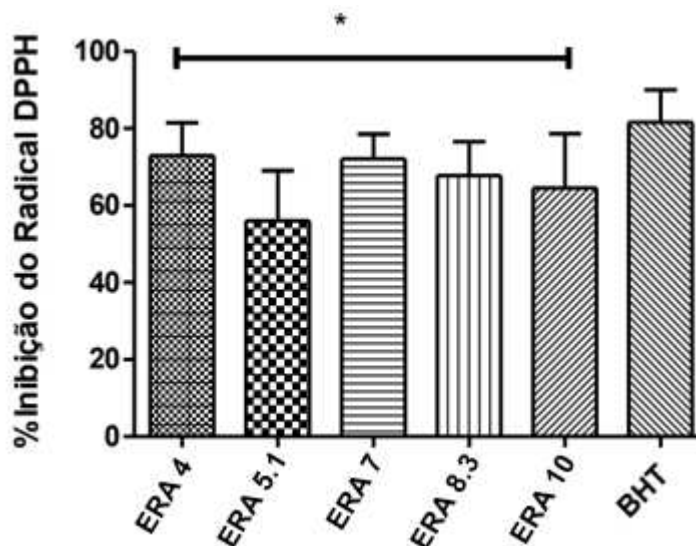


Fonte: Ribeiro 2011

As atividades biológicas dos flavonoides estão relacionadas com sua capacidade de atuar como quelantes e oxidantes. Eles desempenham um papel significativo na quelação de metais, como ferro e cobre, prevenindo assim a formação de radicais livres contendo oxigênio durante o processo metabólico do oxigênio (Naróg, 2023).

Os flavonoides ERA4, ERA5.1.1, ERA7, ERA8.3 e ERA10, foram submetidos à avaliação de suas propriedades antioxidantes, revelando um notável poder de eliminação de radicais DPPH que pode ser observado na figura 16.

Figura 16 - Avaliação da atividade antioxidante dos flavonoides por meio da inibição do radical DPPH comparados ao padrão BHT. Os resultados são expressos em percentual de inibição do radical DPPH (média \pm desvio padrão, n = 3). A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA one-way, seguida do pós-teste de Tukey. *P < 0,05.



Os flavonoides ERA7, ERA4 e o ERA8.3 apresentaram os maiores valores percentuais de potencial antioxidante, respectivamente, seguidos do ERA10 e ERA5.1.1. De maneira geral, a atividade como doador de prótons e elétrons aumenta proporcionalmente em relação ao número de hidroxilas presentes na molécula, isso justifica o flavonoide ter apresentado um percentual menor, já que seu esqueleto básico é formado pelo kaempferol, que possui um grupo hidroxila a menos no anel B.

Os outros tem como estrutura básica a quercetina que é um flavonoide conhecido pela sua propriedade antioxidante e alguns aspectos em sua estrutura química contribuem para essa propriedade, como por exemplo a presença do grupo hidroxila em diferentes posições, sua interação da carbonila em C-4 com a fração catecol e a hidroxila em C-3 facilita a deslocalização de elétrons no anel B, conferindo à quercetina um status como um dos antioxidantes de baixo peso molecular mais potentes, especialmente em condições *in vitro* (Heřmánková, *et al.*, 2019).

A partir da equação da reta para cada um dos flavonoides testados, calculou-se os IC₅₀, cujos valores estão representados na Tabela 3.

Tabela 3 – Determinação de atividade antioxidante dos flavonoides

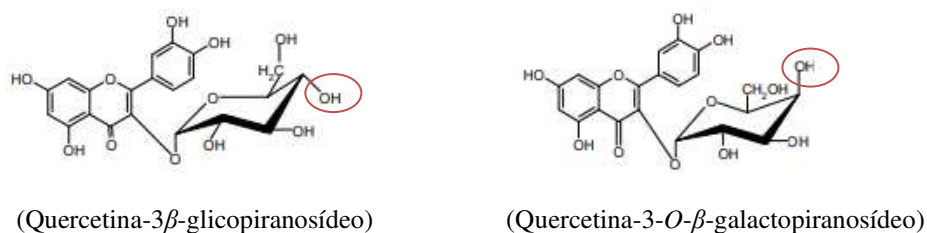
Flavonoides	IC ₅₀ mg/MI
ERA4	0,22
ERA5.1.1	2,46
ERA7	0,61
ERA8.3	0,42
ERA10	1,37
BHT	0,60

Analisando a tabela 3, é possível observar que o composto ERA4 (quercetina), foi o que exibiu o menor valor de IC₅₀ (0,22 mg/mL), indicando ser o composto com o maior potencial antioxidante, quando comparado aos outros compostos. Levando em consideração os alvos estruturais da quercetina, a presença do grupo hidroxila na posição orto do anel B, parece estabilizar o radical e acredita-se que seja um dos locais responsáveis pela quelação de metais. A ligação dupla entre C-2 e C-3 no anel C exerce um papel fundamental na interação com a carbonila em C-4, promovendo a deslocalização eletrônica no anel B. Além disso, a configuração cetol, formada pela carbonila em C-4 e pelas hidroxilas em C-3 ou C-5, atua como um sítio potencial de quelação para metais (Abou Baker,2022).

Os compostos ERA8.3 (Quercetina-3 β -glicopiranosídeo) e ERA10 (Quercetina- 3-*O*- β -galactopiranosídeo), ambos contendo um açúcar com seis carbonos em sua estrutura, exibiram resultados distintos, com IC₅₀ de 0,42mg/mL e 1,37mg/mL, respectivamente.

Essa discrepância pode estar relacionada à disposição tridimensional dos substituintes na estrutura dos compostos. A glicose e a galactose são epímeros, açúcar que difere apenas na configuração de um único carbono assimétrico. Ambos são monossacarídeos, isômeros, o que implica que possuem a mesma forma molecular- C₆H₁₂O₆, mas diferem no arranjo espacial de átomos. A diferença específica ocorre no carbono 4 (C4) do anel hexagonal, na galactose o grupo OH, neste carbono está voltado para cima, enquanto na glicose está voltado para baixo, essa variação na orientação dos grupos funcionais, confere propriedades distintas a esses açúcares, como pode ser observado na figura 17.

Figura 17 - Estruturas químicas da quercetina-3 β -glicopiranosídeo e da quercetina-3-O- β -galactopiranosídeo, destacando a diferença na configuração do grupo hidroxila (OH)

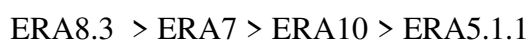


Fonte: Ribeiro 2011

Já os compostos ERA7 (Quercetina-3-O- α -arabinofuranosídeo) e o ERA5.1.1(Kaempferol-3-O- α -arabinofuranosídeo) apresentam um açúcar na mesma posição em forma de pentose, porém se diferenciam na estrutura básica do flavonoide, o kaempferol apresenta apenas um grupo OH no anel B, enquanto a quercetina apresenta dois grupos OH adjacentes nesse anel, os flavonoides apresentaram valores de $IC_{50} = 0,61\text{mg/mL}$ e $2,46\text{mg/mL}$ respectivamente, quanto maior o número de hidroxilas livres, e a localização dessas hidroxilas no esqueleto, maior será a capacidade desse flavonoide em reduzir o estresse oxidativo.

A disposição dos substituintes, em especial as hidroxilas, tem grande relevância na atividade antioxidante. Conforme observado em muitos antioxidantes polifenólicos, tanto a quantidade quanto a posição dos grupos hidroxila no anel B dos flavonoides desempenham um papel significativo nos mecanismos de atividade antioxidante. Notavelmente, a presença de uma estrutura 3',4'-catecol no anel B exerce uma forte influência no aumento da atividade antioxidante (Zhang *et al.*, 2020).

A quantidade e a posição dos substituintes hidroxila nos anéis moleculares exercem influência na distribuição da carga eletrônica, resultando em alterações na polaridade, lipofilicidade e capacidade doadora-aceitadora da molécula. Todos esses fatores desempenham um papel significativo na atividade biológica desses compostos, afetando aspectos como a permeabilidade da membrana celular e a capacidade antioxidante (Lewandowski, *et al.*, 2020). O flavonoide ERA4 (quercetina) apresentou o menor valor de IC_{50} ($0,22\text{mg/mL}$), seguido dos seus glicosídeos, como mostra a sequência decrescente abaixo:



Estudos com a quercetina e seus derivados quercetina-3-*O*-glicosídeo e quercetina-3-*O*-rutinosídeo, demonstraram que os derivados glicosilados apresentaram a capacidade antioxidante reduzida em relação a sua aglicona. Os resultados indicam que a glicosilação na posição 3 (3-glicosilação) consistentemente reduziu a atividade antioxidante, decorrente da substituição do grupo hidroxila na posição 3 e da desordem na planaridade molecular causada pela quebra do glicosídeo (Xiao *et al.*, 2021). Quando comparamos o flavonoide ERA4 que apresentou o menor IC₅₀ (0,22 mg/mL), com o BHT, utilizado como controle positivo, que apresentou uma IC₅₀ de 0,60 mg/mL, observamos que o ERA4 foi aproximadamente 2,7 vezes mais potente que o BHT, pois requer uma concentração menor para atingir o mesmo efeito antioxidante.

Essa diferença sugere que o ERA4 pode ter uma interação mais eficiente com os radicais livres, possivelmente devido à sua estrutura química, uma vez na forma livre, possui maior facilidade para doar elétrons, capturando os radicais livre com maior eficiência.

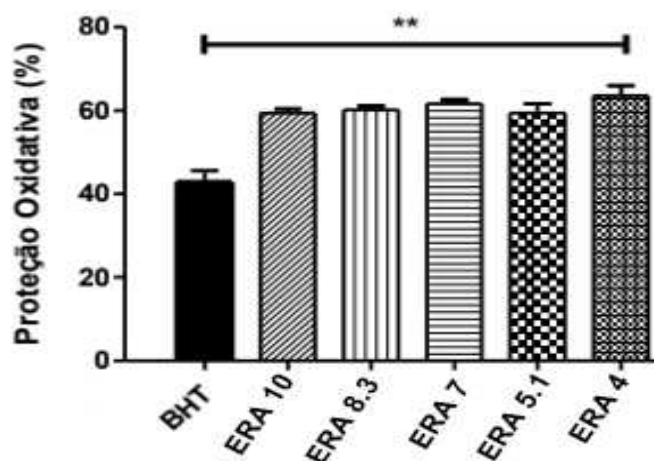
5.7 Oxidação acoplada do β -caroteno/ácido linoleico

O ensaio avalia a capacidade de um extrato ou substância em inibir a oxidação do ácido linoleico em um sistema de emulsão aquosa contendo β -caroteno. O mecanismo de ação envolve o branqueamento dos carotenoides, devido ao processo de oxidação induzido pelo calor, sendo essa descoloração inibida por antioxidantes que doam átomos de hidrogênio para neutralizar radicais livres (Pendota *et al.*, 2020).

A Figura 18 apresenta os percentuais de proteção oxidativa obtidos no ensaio β -caroteno/ácido linoleico. Nas condições experimentais, todos os flavonoides testados demonstraram capacidade significativa de retardar a oxidação do ácido linoleico, com destaque para a fração ERA4, que apresentou o maior valor de proteção (~65–70%) quando comparado com seus glicosídeos. Levando em consideração a sua estrutura química, seu elevado poder antioxidante está associado a dois grupos farmacóforos presentes em sua estrutura: um grupo catecol no anel B e um grupo hidroxila (OH) na posição C-3 (Khan, 2019).

Os resultados obtidos no ensaio de DPPH apresentaram uma alta semelhança com os valores observados no ensaio β -caroteno/ácido linoleico, indicando que a atividade antioxidante dos flavonoides foi consistente em ambos os métodos, independentemente do sistema de avaliação utilizado.

Figura 18 - Efeito dos flavonoides na proteção oxidativa frente ao sistema β -caroteno/ácido linoleico. Os flavonoides foram avaliados quanto à sua capacidade antioxidante e comparados ao padrão BHT. Os dados representam a média \pm desvio padrão (n=3). A análise estatística foi realizada por ANOVA one-way, seguida do pós-teste de Tukey. *P < 0,01 vs. BHT.



5.8 Inibição da enzima acetilcolinesterase

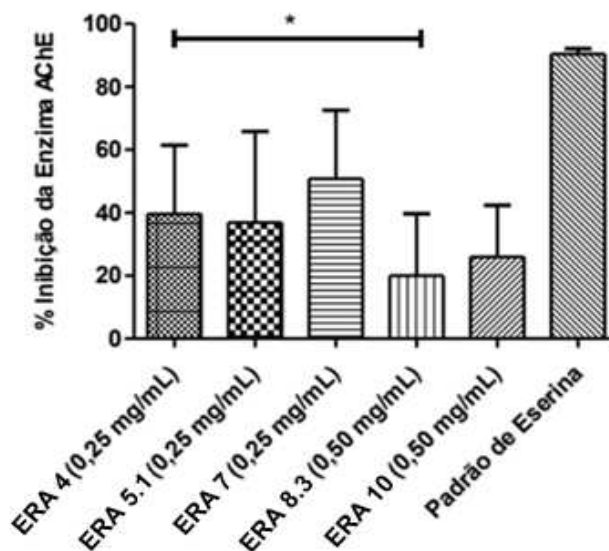
A acetilcolinesterase (AChE) desempenha um papel crucial na regulação dos níveis de acetilcolina nas sinapses e junções neuromusculares, atuando como um elemento fundamental para o encerramento dos impulsos nervosos. Na Doença de Alzheimer, a redução da acetilcolina é um dos principais fatores associados ao declínio cognitivo progressivo, dessa forma, a inibição da AChE tem sido uma estratégia terapêutica amplamente investigada e aplicada no tratamento dessa condição neurodegenerativa (Lou *et al.*, 2022).

Os flavonoides foram avaliados em diferentes concentrações (1 mg/mL – 0,125 mg/mL) com o objetivo de investigar seu potencial como inibidores da enzima acetilcolinesterase. No entanto, os resultados obtidos demonstraram que os flavonoides não exibiram atividade inibitória significativa na maior concentração testada, que foi de 1 mg/mL. Esse fenômeno pode estar relacionado a uma característica já conhecida da quercetina, denominado efeito bifásico em que ela apresenta efeitos opostos dependendo da dose administrada. Em doses baixas, a quercetina pode gerar efeitos benéficos, enquanto em doses elevadas podem desencadear reações opostas, como um efeito pró-oxidativo (Kang *et al.*, 2022).

Em concentrações mais baixas, os flavonoides demonstraram uma inibição moderada da AChE, contribuindo para a manutenção dos níveis de acetilcolina, favorecendo à função cognitiva. Contudo, em concentrações mais altas, devido ao efeito pró-oxidativo, podem ter gerado um aumento excessivo na produção de radicais livres, o que pode ter comprometido a atividade da AChE, diminuindo assim sua eficácia ou degradando a enzima.

O gráfico apresentado na figura 19 apresenta os resultados do ensaio de inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE) realizado com os cinco flavonoides em diferentes concentrações. O padrão eserina, utilizado como controle positivo, exibiu a maior atividade inibitória, atingindo aproximadamente 100% de inibição da AChE.

Figura 19 – Porcentagem de inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE) pelos flavonoides. As amostras foram testadas nas concentrações indicadas e comparadas ao padrão de eserina. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão (n = 3). A análise estatística foi realizada por ANOVA one-way, seguida do pós-teste de Tukey. *P < 0,05 vs. Padrão de Eserina.



Entre os compostos testados, os flavonoides ERA4, ERA5.1.1 e ERA7, avaliados na concentração de 0,25 mg/mL, demonstraram atividades inibitórias moderadas, variando entre aproximadamente 40% e 60%. Essa atividade se mostrou superior em relação aos compostos ERA8.3 e ERA10, testados na concentração de 0,50 mg/mL, que apresentaram uma eficácia inibitória menor. Esses achados sugerem que os flavonoides ERA4, ERA5.1.1 e ERA7 possuem maior potencial como inibidores da AChE, especialmente quando administrados em concentrações mais baixas, reforçando a hipótese do efeito bifásico observado na quercetina. Embora atuem em diversos alvos, os flavonoides têm sido amplamente estudados devido ao seu potencial neuroprotetor, demonstrando eficácia na prevenção de distúrbios neurodegenerativos e podem retardar esse processo.

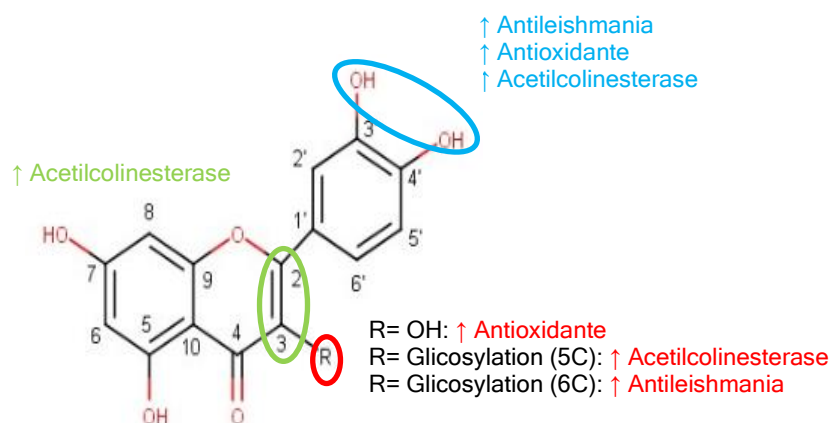
No contexto da Doença de Alzheimer, sua ação benéfica está associada, principalmente, à redução da toxicidade do peptídeo beta-amiloide ($A\beta$) e à diminuição do estresse oxidativo, dois fatores cruciais para a progressão da doença (Khan, Haroon *et al.*,2019; Carrillo-Martinez *et al.*,2024). O flavonoide ERA4 (quercetina), apresenta um grupo hidroxila (OH) na posição C-3, sendo amplamente reconhecido por suas propriedades antioxidantes, no caso específico da Doença de Alzheimer, a hidroxilação nessa posição é fundamental para a quelação de metais, a neutralização de espécies reativas de oxigênio e a prevenção da agregação do peptídeo $A\beta$ (Olennikov *et al.*,2017).

As estruturas químicas dos flavonoides desempenharam um papel determinante na interação com a enzima acetilcolinesterase. A presença de grupos hidroxila no anel A dos flavonoides, combinada à ligação dupla entre os carbonos C-2 e C-3, favorece a interação desses compostos com a AChE. Essa disposição estrutural facilita a formação de ligações de hidrogênio e potencializa as propriedades inibitórias dos flavonoides sobre a enzima AChE (Smyrska-Wieleba, 2023).

Com base nas respectivas estruturas químicas, é possível inferir que os flavonoides ERA5.1 e ERA7 que contêm um açúcar de 5 carbonos em sua composição, apresentam percentuais de inibição superiores aos demais flavonoides testados. A presença desse açúcar, parece aumentar a afinidade dos flavonoides pela AChE, resultando em uma maior eficácia inibitória. O flavonoide ERA7, cuja estrutura é derivada da quercetina, exibiu um percentual de inibição superior a 50%.

Portanto, verifica-se que os flavonoides revelaram-se compostos farmacologicamente ativos, exibindo diversas atividades biológicas, mostrando que o padrão e/o tipo de substituição pode ter influência no potencial bioativo dos mesmos, sendo considerados elementos farmacofóricos-chave dos flavonoides (Figura 20).

Figura 20 - Elementos farmacofóricos-chave dos flavonoides



Fonte: autor

6. CONCLUSÃO

Os flavonoides não manifestaram atividade citotóxica frente a células de mamíferos, indicando que a estrutura química dos compostos não exerceram influência na variação da sua atividade. Entretanto, observou-se que os flavonoides com açúcar de seis carbonos, em configuração beta (ERA8.3 e ERA10), demonstraram uma notável capacidade de inibir as formas promastigotas de *L. braziliensis*.

No teste de infecção *in vitro*, foram capazes de reduzir significativamente a infecção de macrófagos J774 e o número de amastigotas intracelulares. O flavonoide ERA8.3 foi mais eficaz que a ERA10, com uma redução maior tanto no percentual de macrófagos infectados quanto no número de amastigotas por célula, sugerindo que modificações estruturais específicas no composto podem melhorar sua capacidade de penetração e interação com alvos celulares críticos.

Através da MEV foi possível observar alterações morfológicas significativas nos parasitas como abaulamentos irregulares, encurtamento do flagelo, formação de blebs, além de alteração do formato celular, passando de fusiforme para esférico. Essas mudanças sugerem perda de integridade estrutural, comprometendo na motilidade e na sobrevivência do parasita, o que evidencia o impacto do tratamento na organização celular e na morfologia promastigota.

Em relação à atividade antioxidante, a quercetina destacou-se em comparação com seus derivados glicosilados, evidenciando que a presença do grupo hidroxila desempenha um papel fundamental na atividade antioxidante do flavonoide.

Além disso, os flavonoides contendo açúcar de cinco carbonos exibiram atividade leve a moderada frente a enzima acetilcolinesterase, sugerindo que o açúcar conjugado influenciou de maneira positiva nessa atividade.

De maneira geral, os flavonoides demonstraram ser compostos com significativa atividade farmacológica, apresentando diversas ações biológicas. Observou-se que o padrão e/ou tipo de substituição podem influenciar diretamente seu potencial bioativo, reforçando seu papel como elementos farmacofóricos essenciais.

REFERÊNCIAS

ABOU BAKER, Doha H. Uma revisão etnofarmacológica sobre as propriedades terapêuticas dos flavonóides e seus mecanismos de ação: Uma revisão abrangente baseada em conhecimentos atualizados. **Relatórios de Toxicologia**, v. 9, p. 445-469, 2022

ALSHARAIRI, Naser A. Scutellaria baicalensis and their natural flavone compounds as potential medicinal drugs for the treatment of nicotine-induced non-small-cell lung cancer and asthma. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n. 10, p. 5243, 2021

ARYA, Ashwani *et al.* Potencial inibitório da acetilcolinesterase de vários análogos de sesquiterpeno para terapia da doença de Alzheimer. **Biomoléculas**, v. 11, n. 3, pág. 350, 2021

BRITO, Luana San de Oliveira. ***Erythroxylum bezerrae* Plowman: isolamento, caracterização e avaliação da atividade farmacológica de seus metabólitos secundários**. 2022. 218 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2024.

CALDERARO, Antonella *et al.* The Neuroprotective Potentiality of Flavonoids on Alzheimer's Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 23, p. 14835, 2022.

CARRILLO-MAARTINEZ, Eber Josue *et al.* Quercetin, a flavonoid with great pharmacological capacity. **Molecules**, v. 29, n. 5, p. 1000, 2024.

CHAUHAN, Kalpana; KAUR, Gurpreet; KAUR, Sukhbir. Avaliação da eficácia antileishmania do Salidroside contra a cepa de *Leishmania donovani* sensível e resistente ao SSG. **Parasitologia internacional**, v. 72, p. 101928, 2019.

CHERRAK, Sabri Ahmed; MERZOUK, Hafida; MOKHTARI-SOULIMANE, Nassima. Potenciais flavonóides glicosilados bioativos como principais inibidores de protease do SARS-CoV-2: estudos de acoplamento e simulação molecular. **Plos one**, v. 15, n. 10, pág. e0240653, 2020.

CICHON, Natalia *et al.* Mechanistic and Therapeutic Insights into Flavonoid-Based Inhibition of Acetylcholinesterase: Implications for Neurodegenerative Diseases. **Nutrients**, v. 17, n. 1, p. 78, 2024.

COSTA-LIMA, James Lucas da; ALVES, Marccus. Flora da Usina São José, Igarassu, Pernambuco: *Erythroxylaceae*. **Rodriguésia**, v. 66, p. 285-295, 2015.

D'ANTONIO, Edward L. *et al.* Crystal structure of arginase from *Leishmania mexicana* and implications for the inhibition of polyamine biosynthesis in parasitic infections. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 535, n. 2, p. 163-176, 2013.

DA ROCHA, Luiz Paulo Bezerra *et al.* Uso de plantas medicinais: Histórico e relevância. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 10, p. e44101018282-e44101018282, 2021.

DA SILVA, Edson Roberto; DO CARMO MAQUIAVELI, Cláudia; MAGALHÃES, Prislaine Pupolin. Os flavonóis leishmanicidas quercetina e quercitrina têm como alvo a arginase de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Parasitologia experimental**, v. 130, n. 3, pág. 183-188, 2012

DA SILVA, Suelen Santos *et al.* Brazilian propolis antileishmanial and immunomodulatory effects. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, n. 1, p. 673058, 2013

DA SILVA LINS, Jociano *et al.* Investigação fitoquímica de *Erythroxylum rimosum* OE Schulz. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 10, p. 79618-79641, 2020.

DE CASTRO VIERO, Ana Luiza; DOMBROWSKI, Patrícia Andréia. Plantas medicinais e a doença de Alzheimer Medicinal plants and Alzheimer's disease. **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n. 3, p. 16007-16021, 2022.

DEEPIKA, Maurya, Pawan Kumar. Health benefits of quercetin in age-related diseases. **Molecules**, v. 27, n. 8, p. 2498, 2022.

DEVI, J. Achyutha; BINDU, G.; KIRAN, S. Ravi. Evaluation of in vitro glucose metabolism potential of sterols and essential oil extracts from *Erythroxylum monogynum* Roxb. using cell lines and enzyme inhibition models. **South African Journal of Botany**, v. 159, p. 110-130, 2023.

DIAS, Maria Celeste; PINTO, Diana CGA; SILVA, Artur MS. Flavonóides vegetais: Características químicas e atividade biológica. **Moléculas**, v. 26, n. 17, pág. 5377, 2021

ECKROAT, Todd J.; MANROSS, Danielle L.; COWAN, Seth C. Inibidores de acetilcolinesterase multialvos baseados em tacrina fundidos 2015–presente: Síntese e atividade biológica. **Jornal internacional de ciências moleculares**, v. 21, n. 17, pág. 5965, 2020

GERVAZONI, Luiza FO; GONÇALVES-OZÓRIO, Gabriella; ALMEIDA-AMARAL, Elmo E. 2' Hydroxyflavanone activity *in vitro* and *in vivo* against wild-type and antimony-resistant *Leishmania amazonensis*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 12, p. e0006930, 2018.

GULCIN, İlhami; ALWASEL, Saleh H. Ensaio de eliminação de radicais DPPH. **Processos**, v. 11, n. 8, pág. 2248, 2023.

HEŘMÁNKOVÁ, Eva *et al.* Redox properties of individual quercetin moieties. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 143, p. 240-251, 2019.

HUNG, Nguyen Huy *et al.* Acetylcholinesterase inhibitory activities of essential oils from Vietnamese traditional medicinal plants. **Molecules**, v. 27, n. 20, p. 7092, 2022.

JAMSHIDI-KIA, Fatemeh; LORIGOOINI, Zahra; AMINI-KHOEI, Hossein. Plantas medicinais: História passada e perspectiva futura. **Journal of herbmed pharmacology**, v. 7, n. 1, p. 1-7, 2017

JOMOVA, Klaudia *et al.* Espécies reativas de oxigênio, toxicidade, estresse oxidativo e antioxidante: doenças crônicas e envelhecimento. **Arquivos de Toxicologia**, v 97, n.10, p. 2499-25727, 2023.

KHAN, Haroon *et al.* Neuroprotective effects of quercetin in Alzheimer's disease. **Biomolecules**, v. 10, n. 1, p. 59, 2019

KANG, Sang Gu *et al.* Anti-inflammatory, antioxidative, and nitric oxide-scavenging activities of a quercetin nanosuspension with polyethylene glycol in LPS-induced RAW 264.7 macrophages. **Molecules**, v. 27, n. 21, p. 7432, 2022.

KOWALSKI, Layza *et al.* Atividade antimicrobiana de flavonoides: uma revisão de literatura. **Revista Interdisciplinar em Ciências da Saúde e Biológicas**, v. 4, n. 1, p. 51-65, 2020

LAURELLA, Laura C. *et al.* Compostos antiprotozoários de *Mikania periplocifolia* (Asteraceae). **Fitoterapia**, v. 167, pág. 105499, 2023.

LEWANDOWSKI, Włodzimierz *et al.* Correlations between molecular structure and biological activity in "logical series" of dietary chromone derivatives. **PLoS One**, v. 15, n. 8, p. e0229477, 2020.

LOU, Yueyue *et al.* Natural antioxidants, tyrosinase and acetylcholinesterase inhibitors from *Cercis glabra* leaves. **Molecules**, v. 27, n. 24, p. 8667, 2022.

LOIOLA, Maria Iracema Bezerra *et al.* Flora da Paraíba, Brasil: *Erythroxylaceae* Kunth. **Acta Botanica Brasilica**, v. 21, p. 473-487, 2007.

LV, Yulian *et al.* Avanços na química e bioatividade do gênero *Erythroxylum*. **Produtos Naturais e Bioprospeção**, v. 12, n. 1, pág. 15, 2022.

MACCIONI, Ricardo Benjamin *et al.* Novos compostos nutracêuticos na prevenção do Alzheimer. **Biomoléculas**, v.12 ,n.2, p. 249, 2022

MATOS DE MACÊDO, Luíza *et al.* Atividades biológicas avaliadas *in vitro* de espécies do gênero *Erythroxylum*: uma revisão de literatura. **Revista Colombiana de Ciências Químico-Farmacéuticas**, v. 51, n. 1, p. 316-347, 2022

MEHWISH, Shaila *et al.* Apoptose induzida por bioflavonóides e danos ao DNA em amastigotas e promastigotas de *Leishmania donovani*: Decifrando o modo de ação. **Moléculas**, v. 26, n. 19, pág. 5843, 2021

MORAES, Giovanna Vizzaccaro *et al.* Potencial antioxidante dos flavonóides e aplicações terapêuticas. **Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento**, v. 11, não. 14, pág. e238111436225-e238111436225, 2022

NARÓG, Dorota, Sobkowiak, Andrzej. Eletroquímica de Flavonóides. **Moléculas**, v. 28, n. 22, pág. 7618, 2023.

NIGATU, Hulubanchi et al. *In vitro* antileishmanial activity of some Ethiopian medicinal plants. **Journal of Experimental Pharmacology**, p. 15-22, 2021.

OLENNIKOV, Daniil N. et al. Isorhamnetin and quercetin derivatives as anti-acetylcholinesterase principles of marigold (*Calendula officinalis*) flowers and preparations. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 8, p. 1685, 2017.

OMS, Organização Mundial da Saúde (2023)

PENDOTA, S. C. et al. Antimicrobial, antioxidant and cytotoxicity of isolated compounds from leaves of *Pappea capensis*. **South African journal of botany**, v. 108, p. 272-277, 2017.

PEREIRA, Isabela AG et al. Parasitological and immunological evaluation of a novel chemotherapeutic agent against visceral leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 42, n. 12, p. e12784, 2020

POLAT, Derya Çiçek et al. Perfis Fitoquímicos, Atividades Antioxidantes, Citotóxicas e Antiinflamatórias de Plantas Medicinais Tradicionais: *Centaurea pichleri* subsp. *pichleri*, *Conyza canadensis* e *Jasminum fruticans*. **Moléculas**, v. 27, n. 23, pág. 8249, 2022.

RESTREPO, David A. et al. *Erythroxylum* in focus: an interdisciplinary review of an overlooked genus. **Molecules**, v. 24, n. 20, p. 3788, 2019.

RIBEIRO LIBERATO, Hortência et al. Tropane Alkaloid Isolated from *Erythroxylum bezerrae* Exhibits Neuropharmacological Potential in an Adult Zebrafish (*Danio rerio*) Model. **Chemistry & Biodiversity**, v. 21, n. 8, p. e202400786, 2024.

RIBEIRO, Victor Pena et al. Brazilian medicinal plants with corroborated anti-inflammatory activities: a review. **Pharmaceutical biology**, v. 56, n. 1, p. 253-268, 2018.

RODRIGUEZ-ARCE, Esteban; SALDIAS, Marianela. Propriedades antioxidantes de complexos metálicos flavonóides e sua potencial inclusão no desenvolvimento de novas estratégias para o tratamento de doenças neurodegenerativas. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 143, p. 112236, 2021.

ROY, Arpita et al. Flavonoids a bioactive compound from medicinal plants and its therapeutic applications. **BioMed research international**, v. 2022, n. 1, p. 5445291, 2022

SAJID, Moon et al. Synthetic biology towards improved flavonoid pharmacokinetics. **Biomolecules**, v. 11, n. 5, p. 754, 2021

SLÁMOVÁ, Kristýna; KAPESOVÁ, Jana; VALENTOVÁ, Kateřina. "Sweet flavonoids": Glycosidase-catalyzed modifications. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 7, p. 2126, 2018

SMYRSKA-WIELEBA, Natalia; MROCZEK, Tomasz. Natural inhibitors of cholinesterases: chemistry, structure–activity and methods of their analysis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 3, p. 2722, 2023.

SUN, Xiao-ying *et al.* A rotina previne a patologia da tau e a neuroinflamação em um modelo de rato com doença de Alzheimer. **Jornal de neuroinflamação**, v. 18, n. 1, pág. 1-14, 2021.

TAJUDDEEN, Nasir *et al.* O potencial quimioterápico das chalconas contra as leishmanioses: uma revisão. **Revista Internacional de Agentes Antimicrobianos**, v. 51, n. 3, pág. 311-318, 2018.

WANG, Tian-yang; LI, Qing; BI, Kai-shun. Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. **Asian journal of pharmaceutical sciences**, v. 13, n. 1, p. 12-23, 2018

XIAO, Zhengcao *et al.* Relações entre estrutura e capacidade antioxidante e atividade de flavonóis glicosilados. **Alimentos**, v. 10, n. 4, pág. 849, 2021.

ZHANG, Qiang *et al.* Identification of Six Flavonoids as Novel Cellular Antioxidants and Their Structure-Activity Relationship. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2020, n. 1, p. 4150897, 2020.

ZYMONE, Kristina *et al.* Diferentes efeitos dos glicosídeos de quercetina e da quercetina na função mitocondrial renal - desacoplamento, redução do citocromo C e atividade antioxidante. **Moléculas**, v. 27, n. 19, pág. 6377, 2022

ZIYATDINOVA, Guzel; KALMYKOVA, Alena. Caracterização eletroquímica das propriedades antioxidantes de plantas e produtos medicinais: Uma revisão. **Molecules**, v. 28, n. 5, p. 2308, 2023.

ANEXO

COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO NA REVISTA
PLANTA MÉDICA 2025

[Home](#)[Author](#)

Submission Confirmation

[Print](#)

Thank you for your submission

Submitted to

Planta Medica

Manuscript ID

PLAMED-2025-02-0096-OP

Title

Analysis of the structure-activity relationship of flavonoids isolated from *Erythroxylum rimosum* leaves O. E. Schulz

Authors

Dos Santos, Ivana Patrícia
Santos, Francisnaira S.
Vitória, Débora O.
Almeida Silva, Robson
do Vale, Janaina
Marques, Gildeon
do Vale, Ademir
Soares, Milena
de Oliveira, Geovana
Costa, Maria Eduarda V.
Araujo, Taise
Teles, André Braga
Guimarães, Elisalva
Ribeiro, Erika Maria de Oliveira

Date Submitted

03-Feb-2025

Author Dashboard

© Clarivate | © ScholarOne, Inc., 2025. All Rights Reserved.

ScholarOne Manuscripts and ScholarOne are registered trademarks of ScholarOne, Inc.

ScholarOne Manuscripts Patents #7,257,767 and #7,263,655.

[@Clarivate for Academia & Government](#) | [System Requirements](#) | [Privacy Statement](#) | [Terms of Use](#) | [Definições de cookies](#) | [Accessibility](#)