

UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

JESSYANE RODRIGUES DO NASCIMENTO

**Desenvolvimento, Caracterização e Potencial Terapêutico de
Microemulsão Contendo Flavonoides Diméricos de *Fridericia plathyphylla*
(Cham.) L.G.Lohmann Família Bignoniaceae**

**Araraquara
2023**

JESSYANE RODRIGUES DO NASCIMENTO

**Desenvolvimento, Caracterização e Potencial Terapêutico de
Microemulsão Contendo Flavonoides Diméricos de *Fridericia
plathyphylla*(Cham.) L.G.Lohmann Família Bignoniaceae**

Tese apresentada ao Instituto de
Química, Universidade Estadual
Paulista, como parte dos requisitos
para a obtenção do título de Doutor
em Química.

Orientador: Prof. Dr. Wagner Vilegas

**Araraquara
2023**

N244d Nascimento, Jessyane Rodrigues do
Desenvolvimento, caracterização e potencial terapêutico de microemulsão contendo flavonoides diméricos de *Fridericia platyphylla* (Cham.) L.G.Lohmann Família Bignoniaceae / Jessyane Rodrigues do Nascimento. -- Araraquara, 2023
154 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Química, Araraquara
Orientador: Wagner Vilegas

1. Plantas do Cerrado. 2. Extratos vegetais. 3. Produtos naturais. 4. Flavonoides. 5. Nanoestruturas. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Química, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: “Desenvolvimento, Caracterização e Potencial Terapêutico de Microemulsão Contendo Flavonoides Diméricos de *Fridericia platyphylla*”

AUTORA: JESSYANE RODRIGUES DO NASCIMENTO

ORIENTADOR: WAGNER VILEGAS

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Química, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. WAGNER VILEGAS (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Biológicas e Ambientais / Instituto de Biociências do Campus do Litoral Paulista da Unesp

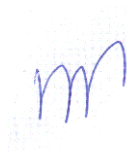
Prof. Dr. RENATO SONCHINI GONCALVES (Participação Virtual)
DEQU - Departamento de Química/CCET / Universidade Federal do Maranhão – UFMA

Prof. Dr. JOÃO HENRIQUE GHILARDI LAGO (Participação Virtual)
Departamento de Química Orgânica / Universidade Federal do ABC

Professor Adjunto JULIANA APARECIDA SEVERI (Participação Virtual)
Departamento de Farmácia e Nutrição / Centro de Ciências Agrárias / Universidade Federal do Espírito Santos - UFES - Alegre/ES

Profa. Dra. TAIS MARIA BAUAB (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da Unesp

Araraquara, 11 de outubro de 2023



Documento assinado digitalmente
WAGNER VILEGAS
Data: 11/10/2023 17:05:12-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

O presente estudo é de grande relevância para o cenário tecnológico nacional, uma vez que, o uso de planta da flora brasileira com fonte de princípios ativos tem se mostrado cada vez mais eficaz na busca de medicamentos e garante a auto sustentabilidade do país pelo seu caráter renovável. As principais contribuições científicas ou tecnológicas deste trabalho são: valorização da flora, especialmente o bioma cerrado; validação das plantas medicinais utilizadas pela população; obtenção de um bioproduto a base de uma fração ativa contendo flavonoides diméricos denominados de brachydinas, com promissora atividade antiproliferativa; publicação de artigos científicos em periódicos de impacto internacional, bem como a participação em simpósios, encontros e congressos de pesquisa e intercâmbio de metodologias e informações científicas.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

This study is of great relevance to the national technological scenario, since the use of plants from the Brazilian flora as a source of active ingredients has proven to be increasingly effective in the search for medicines and guarantees the country's self-sufficiency due to its renewable nature. The main scientific or technological contributions of this work are: evaluation of the flora, especially the Cerrado biome; validation of the medicinal plants used by the population; obtaining a bioproduct based on an active fraction containing dimeric flavonoids, called brachydins, with promising antiproliferative activity; publication of scientific articles in journals with international impact, as well as participation in research symposia, meetings and congresses, and exchange of methodologies and scientific information.

DADOS CURRICULARES

DADOS PESSOAIS

Nome: Jessyane Rodrigues do Nascimento

Filiação: Ana Cleide Rodrigues do Nascimento e Francisco Canario do Nascimento

Naturalidade: Bacabal-MA

Nome em citações bibliográficas: Nascimento, J.; Nascimento, J. R.; Nascimento, J. R. do; Do Nascimento, J. R.; Jessyane Rodrigues do Nascimento;

FORMAÇÃO ACADEMICA/TITULAÇÃO

2012-2016 Licenciatura Plena em Química

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Maranhão (IFMA), Bacabal, MA, Brasil

Título da monografia: “Caracterização Físico-química e funcional da farinha da amêndoa do babaçu (*Orbignya sp*)”

Orientador: Prof. Dr. Maron Stanley Silva Oliveira Gomes

2017-2019 Mestrado em Química

Universidade Federal do Maranhão (UFMA), São Luís, MA, Brasil

Título da dissertação: “Correlação entre Potencial Eletroquímico e Atividade Leishmanicida de compostos raros isolados de *Fridericia Platyphylla* (Cham.) L. G. Lohmann”

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Claudia Quintino da Rocha

2019-2023 Doutorado em Química

Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Química, Araraquara, SP, Brasil

Título da tese: “Desenvolvimento, Caracterização e Potencial Terapêutico de Microemulsão Contendo Flavonoides Diméricos de *Fridericia plathyphylla*”

Orientador: Prof. Dr. Wagner Vilegas

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

2013-2014 Iniciação científica

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Maranhão (IFMA), Bacabal, MA, Brasil

Título do projeto: “Mesocarpo de Babaçu (*Orbignya sp*) como adsorvente do surfactante dodecila-benzeno sulfonato de sódio (SDBS)”

Orientador: Prof. Dr. Maron Stanley Silva Oliveira Gomes

Bolsa: PIBITI CNPq/IFMA, Edital PRPGI N° 60, de 21 de março de 2013.

2014-2015 Iniciação científica

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Maranhão (IFMA), Bacabal, MA, Brasil

Título do projeto: “Potencial Tecnológico da farinha da amêndoa de coco babaçu *Orbignya sp*) e aplicação tecnológica”

Orientador: Prof. Dr. Maron Stanley Silva Oliveira Gomes

Bolsa: PIBITI CNPq/IFMA, Edital PRPGI N° 03.

2015-2016 Iniciação científica

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Maranhão (IFMA), Bacabal, MA, Brasil

Título do projeto: “Caracterização físico-química e funcional da farinha da amêndoa de coco babaçu *Orbignya sp*)”

Orientador: Prof. Ms. Carlos Alberto Lira Junior

Bolsa: Voluntária - PIBIC CNPq/FAPEMA/IFMA, Edital PRPGI N° 42, de 23 de Dezembro de 2014.

2015-2016 Iniciação científica

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Maranhão (IFMA), Bacabal, MA, Brasil

Título do projeto: “Caracterização físico-química do leite do coco babaçu *Orbignya sp*)”

Orientador: Prof. Ms. Carlos Alberto Lira Junior

Bolsa: Voluntária - PIBIC CNPq/FAPEMA/IFMA, Edital PRPGI N° 42, de 23 de Dezembro de 2014.

2021-2022 Estágio de docência

Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Química, Araraquara, SP, Brasil

Curso de Graduação: Química - Bacharel

Nome da Disciplina: Química Orgânica II

Carga Horária Total: 90 horas

Professor Responsável pela Disciplina: Profª Drª Isabele Rodrigues Nascimento

2021-2022 Orientação Acadêmica

Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Química, Araraquara, SP, Brasil

Curso de Graduação: Engenharia Industrial Madeireira – Campus
Experimental Itapeva UNESP
Nome da Disciplina: Química Orgânica
Carga Horária Total: 30 horas
Professor Responsável pela Disciplina: Prof. Dr. José Claudio
Caraschi

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigos completos publicados e/ou submetidos a periódicos indexados:

1. Franco, Y.; Lima, C.; Rosa, M.; Silva, V.; Reis, R.; Priolli, D.; Carvalho, P.; **Nascimento, J.**; Rocha, C.; Longato, G. Investigation of U-251 cell death triggered by flavonoid luteolin: towards a better understanding on its anticancer property against glioblastomas. *Natural Product Research.*, p. 1-7, 2020.
2. Serra, M.; Barroso, W.; Rocha, C. Q.; Furtado, P.; Silva, S. N.; Borges, A.; Tangerina, M.; **Nascimento, J. R.**; Vilegas, W.; Alves, A.; Barbeiro, D. F.; Souza, H. P.; Abreu, I. C.; Borges, M. O. R. Chemical characterization and wound healing property of *Jacaranda decurrens* Cham. (Bignoniaceae): Na experimental study based on molecular mechanisms, p. 1-13, 2020.
3. Nunes, H. L.; Tuttis, K.; Serpeloni, J. M.; **Nascimento, J. R. do**; da Rocha, C. Q.; Silva, V. A. O.; Silva, V. A. O.; Lengertc, A. V. H.; Reis, R. M.; de Syllos Cólus, I. M. Characterization of the *in vitro* cytotoxic effects of brachydins isolated from *Fridericia platyphylla* in a prostate cancer cell line. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 1–12, 2020.
4. De Oliveira, L. C. B.; Nunes, H. L.; Ribeiro, D. L.; **Do Nascimento, J. R.**; Da Rocha, C. Q.; De Syllos Cólus, I. M.; Serpeloni, J. M. Aglycone flavonoid brachyidin A shows selective cytotoxicity and antitumoral activity in human metastatic prostate (DU145) cancer cells. *Cytotechnology*, v. 2021, p. 1, 2021.
5. **Nascimento, J. R.**; Ribeiro, G. A. C.; Serrano, S. H. P.; Lima, R. B.; Tanaka, A. A.; Silva, I. S.; Rocha, C. Q. Electrochemical Behavior of Unusual Dimeric Flavonoids Isolated from *Fridericia platyphylla*. *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 32, n. 6, 1286-1293, 2021.
6. De Lima, C. A.; Cubero, M. C. Z.; Franco, Y. E. M.; Rodrigues, C. D. P.; **Do Nascimento, J. R.**; Vendramini-Costa, D. B.; Sciani, J. M.; Da Rocha, C. Q.; Longato, G. B. Antiproliferative Activity of Two Unusual Dimeric Flavonoids, Brachyidin E and Brachyidin F, Isolated from *Fridericia platyphylla* (Cham.) L.G.Lohmann: *In Vitro* and Molecular Docking Evaluation. *Biomed Research International*, v. 2022, p. 1-12, 2022.
7. De Oliveira, L. C. B.; Ribeiro, D. L.; **Do Nascimento, J. R.**; Da Rocha, C. Q.; De Syllos Cólus, I. M.; Serpeloni, J. M. Anticancer activities of Brachyidin C in human prostate tumor cells (DU145) grown in 2D and 3D models: stimulation of cell death

and downregulation of metalloproteinases in spheroids. *Chemical Biology & Drug Design*, p. 1-5, 2022.

8. Maciel-Silva, V. L.; Da Rocha, C. Q.; Alencar, L. M. R.; Castelo-Branco, P. V.; Sousa, I. H.; Azevedo-Santos, A. P.; Vale, A. A. M.; Monteiro, S. G.; Soares, R.-E. P.; Guimarães, S. J. A.; **Nascimento, J. R.**; Pereira, S. R. F. Unusual dimeric flavonoids (brachydins) induce ultrastructural membrane alterations associated with antitumor activity in cancer cell lines. *Drug And Chemical Toxicology*, v. 1, p. 1-12, 2022.
9. **Nascimento, J. R.**; Miranda, A. J. A.; Vieira, F. C.; Rodrigues, C. D. P.; Vasconcelos, L. N.; Filho, J. L. P.; Lopes, A. C. C. B.; Tangerina, M. M. P.; Vilegas, W.; Rocha, C. Q. A Review of the Phytochemistry and Pharmacological Properties of the Genus *Arrabidaea*. *Pharmaceuticals*, v. 15, p. 658, 2022.
10. **Jessyane Rodrigues do Nascimento**, Beatriz Santiago, Matheus Rodrigues, Gláucia Laís Nunes Lopes, Glaucio Monteiro Ferreira, Glécilla Colombelli de Souza Nunes, Renato Sonchini Gonçalves, André Luis Menezes Carvalho, Wagner Vilegas, Cláudia Quintino da Rocha. Innovative Microemulsion Loaded with Unusual Dimeric Flavonoids from *Fridericia platyphylla* (Cham.) L.G. Lohmann Roots. *AAPS pharmscitech*.v. 24, n. 212, 2023

Participação em eventos científicos:

1. 1º Lugar como Melhor apresentação na categoria pôster no I Congresso Maranhense de Análises Clínicas, I Congresso Maranhense de Análises Clínicas. 2019.
2. MENÇÃO HONROSA no VII Simpósio Plantas Medicinais do Vale do São Francisco e 1st France-Brazil Meeting on Natural Products, univasf. Correlação entre potencial eletroquímico e atividade leishmanicida de substâncias *Fridericia platyphylla* (Cham.) L. G. Lohmann. 2019.
3. MENÇÃO HONROSA no VII Simpósio Plantas Medicinais do Vale do São Francisco e 1st France-Brazil Meeting on Natural Products, univasf. Avaliação anticancerígena de um flavonóide raro isolado das raízes de *Fridericia platyphylla* em células de próstata. 2019.
4. Ricarte, K. M. P.; Pereira Filho, J. L.; Nascimento, J. R.; Tamara, M. B. P.; Fernandes, Y. M. L.; Pinheiro, A. A.; Rocha, C. Q.; Borges, A. C. R. Caracterização química do extrato bruto e das frações por HPLC-MS de sementes do fruto *Persea Americana* cultivado no Piauí. 1 st Brazilian Congress of Pharmaceutical Sciences in Piauí. 2019. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
5. Mandaji, C. M.; Camara, M. B. P.; Nascimento, J. R.; Nunes, G. S.; Rocha, C. Q. Potencialidade da vinagreira branca (*Hibiscus sabdariffa* L.) na proteção contra radiação ultravioleta. 59º Congresso Brasileiro de Química. 2019. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

6. Miranda, A. J. A.; Lima, C.; Cubero, M.; Franco, Y.; Rodrigues, C. D. P.; Nascimento, J. R.; Costa, D. B. V.; Rocha, C.; Longato, G. Atividade Antiproliferativa de flavonóides diméricos raros, isolados das raízes de *Arrabidaea brachypoda*. 43ª Reunião Anual Virtual da SBQ, 2020.
7. V Jornada Fluminense de Produtos Naturais, (online), 2020.
8. II Workshop do projeto PROCAD-AM/PPGQUIM, (online), São Luis-MA, Brasil, 2020.
9. 8th Brazilian Conference on Natural Products (BCNP). Electrochemical Behavior of Unusual Dimeric Flavonoids Isolated from *Fridericia platyphylla*. 2021. (Congresso).
10. XV Congresso da MutaGen-Brasil. Anticancer effects of the flavonoid Brachyidin C in human prostate tumor spheroids (DU145) via induction of apoptosis, suppression of cell growth, and inhibition of cell migration. 2021. (Congresso).

ORGANIZAÇÃO DE EVENTO

1. NASCIMENTO, J. R. et al. IV Workshop do Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQuim), Universidade Federal do Maranhão, São Luís - MA, 2018.
2. NASCIMENTO, J. R. et al. III Semana de Química e III Seminário PARFOR, Bacabal – MA, 2015.
3. NASCIMENTO, J. R. et al. I Workshop de Projetos e TCCs e I Encontro de Iniciação à Docência, Bacabal, 2015.
4. NASCIMENTO, J. R. et al. I semana de química e I seminário PARFOR, Bacabal – MA, 2013.
5. NASCIMENTO, J. R. et al. II OLIMPÍADAS DE CIÊNCIAS DO IFMA, Bacabal - MA, 2013.

CURSO DE APERFEIÇOAMENTO

- | | |
|-------------|--|
| 2023 | Avaliação qualitativa de risco: exposição a agentes químicos
Escola Nacional de Administração Pública, ENAP, Brasil.
Carga Horária Total: 52 horas |
| 2023 | Segurança Química em Laboratórios de Ensino e Pesquisa
Escola Nacional de Administração Pública, ENAP, Brasil.
Carga Horária Total: 52 horas |

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo seu infinito amor, bondade, por ter me iluminado e conseguido chegar até aqui.

Ao meu orientador Wagner Vilegas pela oportunidade de ser sua orientanda, pela confiança dedicada a mim, pelas experiências proporcionadas que me fizeram crescer. A prof^a Claudia Quintino da Rocha pela amizade, confiança, ensinamentos, paciência, experiência que pude adquirir durante esses anos de convívio. Pelo exemplo como pesquisadora, ser humano honesto, responsável e humilde que és.

À minha mãe, Ana Cleide, por ser a minha fonte de força, inspiração, coragem e determinação, por sempre acreditar que posso ir mais longe, e me incentivar nas minhas escolhas. Ao meu pai, Francisco, que apesar de não estar mais conosco acredito que ficaria feliz e orgulhoso com a concretização desse grande sonho.

Às minhas irmãs, Jessica, Gecyene e ao meu irmão Isac pelo apoio, dedicação e por acreditar em meus objetivos. Aos irmãos da igreja pelas orações realizadas, pelos votos de confiança e por todos os incentivos.

Aos meus queridos amigos do Laboratório de Química de Produtos Naturais (LQPN), Isabela, Isabele, Samuel, Isanna, Marcelino e Marcos, pelos momentos de alegria, descontração, desespero, ensinamentos, pela cooperação, pelo trabalho em equipe e apoio em todos os momentos que estivemos juntos. Obrigado a todos por fazerem parte da minha vida. À Aldilene e Carla Janaina pela amizade, ajuda, pelos conselhos, por terem se tornado não apenas companheiras de pesquisa, mas companheiras que vou levar para vida toda.

Em especial à Carla Daniele pela grande amiga que se tornou, pelos ensinamentos, momentos de descontração, pela disposição em sempre me ajudar, não foi ao acaso que nos conhecemos, sua amizade é um grande presente de Deus.

Ao Laboratório de Dermofarmácia, na pessoa do prof. André Menezes, Beatriz Santiago e Matheus Rodrigues pela colaboração no estudo de desenvolvimento da formulação.

À Glécilla Colombelli e Glaucio Ferreira pela colaboração e sempre estarem disponíveis em ajudar.

Ao Instituto de Química de Araraquara e ao Instituto de Biociências de São Vicente pela oportunidade de realizar o meu Doutorado na Instituição (UNESP).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior -Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho. Sou eternamente grata.

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo desenvolver uma microemulsão contendo a fração diclorometânica rica com esses flavonoides diméricos denominados brachydinas. Os constituintes da formulação foram escolhidos e o diagrama de fases pseudoternário foi construído utilizando o método de titulação para obtenção da região de formação de microemulsão. Foi realizado a incorporação nas proporções 3% e 5% de fração e realizado a caracterização em termos de tamanho das gotículas, potencial zeta e índice de polidispersão. Ambas as microemulsões apresentaram tamanho de partícula <100 nm e apenas a microemulsão com 3% apresentou valores de índice de polidispersão e potencial zeta mais próximo do ideal e, portanto, foi escolhida para continuidade ao estudo. As características físico-química e organolépticas foram avaliadas e revelaram pHs fisiologicamente aceitáveis para uso tópico/transdérmico e oral, índice de refração 1.42 ± 0.01 , densidade de massa $1.016 \text{ g/cm}^3 \pm 0.01$, limpidez e transparência características dessas microestruturas. A estabilidade das microemulsões foram avaliadas e mostraram bons perfis de estabilidade mesmo após aplicação de condições térmicas extremas, com baixa alteração nos valores de pH e teor de fração incorporada. O estudo de liberação *in vitro* revelou que a microemulsão permitiu a liberação controlada da fração com quantidade cumulativa liberada superior a 60% em 6 h. Ademais a fração ativa e microemulsão não apresentaram toxicidade no modelo experimental com larvas de *Tenebrio molitor* nas concentrações testadas. A microemulsão desenvolvida demonstrou excelentes propriedades físico-químicas, estabilidade, toxicidade e melhor capacidade de liberação do princípio ativo. Estes resultados fornecem uma base para aplicação da microemulsão como veículo de entrega dos flavonoides estudados. Além disso, foi realizado o isolamento das substâncias presentes na fração apolar utilizando cromatografia de fase normal, na perspectiva de obtenção dos padrões de brachydinas utilizada nos testes quantificação do teor da fração na microemulsão. Considerando os dados já publicados com as brachydinas quanto a sua expressiva atividade em câncer de próstata e mama, foi realizado o estudo de docagem molecular, para o entendimento dos possíveis alvos moleculares e mecanismos envolvidos com a carcinogênese, os resultados mostraram relevantes interações das brachydinas com o sítio alostérico da isoforma da proteína quinase MAPK14 (p38 α), proteína que está associada a várias funções biológicas principalmente em carcinogênese, levantando a hipótese que a formulação desenvolvida contendo as brachydinas poderá ser usada como alternativa no tratamento do câncer. Sendo assim, o presente trabalho, traz nova perspectiva no estudo de produtos naturais quanto a aplicação tecnológica da fração diclorometânica obtida do extrato das raízes de *F. platyphylla* por meio de sua incorporação bem-sucedida em formulação microemulsionada colaborando para exploração e valorização da flora brasileira. Além disso, como produto intelectual foi publicada uma revisão na revista Pharmaceuticals e um artigo com a formulação na revista AAPS PharmSciTech.

Palavras-chaves: Flavonoides diméricos, brachydinas, microemulsão.

ABSTRACT

The aim of this work was to develop a microemulsion containing the dichloromethane fraction rich in these dimeric flavonoids, called brachydins. The components of the formulation were selected and the pseudoternary phase diagram was constructed using the titration method to obtain the microemulsion formation region. Incorporation was carried out in 3% and 5% fractions and characterization was carried out in terms of droplet size, zeta potential and polydispersity index. Both microemulsions showed a particle size <100 nm and only the 3% microemulsion showed polydispersity index and zeta potential values closer to the ideal and was therefore selected for further study. The physicochemical and organoleptic properties were evaluated and showed physiologically acceptable pH values for topical/transdermal and oral use, a refractive index of 1.42 ± 0.01 , a density of $1.016 \text{ g/cm}^3 \pm 0.01$, and the clarity and transparency characteristic of these microstructures. The stability of the microemulsions was evaluated and showed good stability profiles even after application of extreme thermal conditions, with little change in pH values and content of incorporated fraction. The *in vitro* release study showed that the microemulsion allowed a controlled release of the fraction with a cumulative release of more than 60% in 6 hours. Moreover, the active fraction and the microemulsion showed no toxicity in the experimental model with *Tenebrio molitor* larvae at the concentrations tested. The developed microemulsion showed excellent physicochemical properties, stability, toxicity and better drug release capacity. These results provide a basis for the application of the microemulsion as a delivery vehicle for the studied flavonoids. In addition, the substances present in the apolar fraction were isolated using normal phase chromatography to obtain the brachydin standards used in the tests to quantify the content of the fraction in the microemulsion. Considering the data already published with brachydins regarding their significant activity in prostate and breast cancer, a molecular docking study was carried out to understand the possible molecular targets and mechanisms involved in carcinogenesis. The results showed relevant interactions of brachydins with the allosteric site of the MAPK14 protein kinase isoform (p38 α), a protein associated with various biological functions, especially in carcinogenesis, raising the hypothesis that the developed formulation containing brachydins could be used as an alternative in the treatment of cancer. Thus, this work brings a new perspective to the study of natural products in terms of the technological application of the dichloromethane fraction obtained from the extract of the roots of *F. platyphylla* through its successful incorporation in a microemulsion formulation, contributing to the exploration and valorization of Brazilian flora. In addition, as an intellectual product, a review was published in the journal *Pharmaceuticals* and an article with the formulation was published in the journal *AAPS PharmSciTech*.

Keywords: Dimeric flavonoids, brachydins, microemulsion.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - <i>Fridericia platyphylla</i> (Cham.) L. G. Lohmann.....	22
Figura 2 - Substâncias isoladas da espécie <i>Fridericia</i>	23
Figura 3 - Curva dose-resposta observada para células tumorais e não tumorais tratadas com fração DCM durante 48 h. Os valores são a média $\pm$ DP de três experiências independentes. A linha tracejada indica uma concentração inibitória (IC) de 50%.	26
Figura 4 - Efeito lítico da BrC A) e FDCM B) em eritrócitos de camundongos Swiss Mus musculus após 60 min. Triton X-100 1% foi usado como controle positivo.	28
Figura 5 - Frequência das classes de nucleotídeos e pontuações de danos no DNA determinadas para linhas celulares tratadas com fração DCM durante 24 h.	30
Figura 6 - Área de migração celular observada em células não tumorais da próstata (PNT2) e células tumorais da próstata (DU145) tratadas com fração DCM durante 24 h (A). Imagem das lacunas às 0 h e 24 h de DU145 (B).	31
Figura 7 - Imagens de microscopia de força atômica (AFM) de células e da superfície da membrana nuclear de células tumorais da próstata (DU145).	32
Figura 8 - Imagens de microscopia de força atômica (AFM) das células e da superfície da membrana nuclear das células não tumorais de próstata (PNT2).	33
Figura 9 - Rugosidade média (Rq) das células tumorais da próstata (DU145) e não tumorais da próstata (PNT2) tratadas com DCM durante 48 horas.	34
Figura 10 - Raízes de <i>Fridericia platyphylla</i>	36
Figura 11 - Fluxograma representando o isolamento por cromatografia da Fração DCM.	38
Figura 12 - Desenvolvimento do diagrama pseudoternário.	41
Figura 13 - Estudo da toxicidade em larvas do <i>Tenebrio</i> com (A) fração DCM e (B) ME3, após 7 dias.	46
Figura 14 - Perfil cromatográfico em CLAE/UV-vis do extrato etanol 70% das raízes de <i>Fridericia platyphylla</i> a 254 nm com destaque para os picos das brachydinas.	49
Figura 15 - Perfil cromatográfico da fração diclorometânica do extrato hidroetanólico das raízes de <i>Fridericia platyphylla</i> (λ = 254 nm) e espectros do UV.....	50
Figura 16 - Placas cromatográficas dos grupos 10, 12 e 13 em fase móvel hexano/acetato de etila (55/45) reveladas com anisaldeído.	51
Figura 17 - Cromatograma obtidos dos grupos 10, 12 e 13 no comprimento de onda de 254 nm em coluna de fase reversa (C18, Luna 150x4,6 μ m) no método cromatográfico 70 -100% de metanol em 35 min.....	52
Figura 18 - RMN de ^1H da substância 1.....	54
Figura 19 - Mapa de contorno HMBC da substância 1.....	55
Figura 20 - Espectro NOESY da substância 1.....	56
Figura 21 - Principais correlações no mapa de contorno HMBC e NOESY para a substância 1.....	56
Figura 22 - Espectro de massa obtido da substância 1.....	57
Figura 23 - Estrutura da brachydina 3.	58
Figura 24 - Espectro de RMN- ^1H da substância 2.....	58
Figura 25 - Espectro NOESY da substância 2.....	59
Figura 26 - Espectro HSQC da substância 2.	59
Figura 27 - Espectro de massa obtido da substância 2.....	60
Figura 28 - Estrutura da brachydina 2.	61

Figura 29 - Espectro de RMN-1H da substância 3.....	62
Figura 30 - Espectro HMBC obtido da substância 3.	62
Figura 31 - Espectro HSQC obtido da substância 3.	63
Figura 32 - Espectro NOESY obtido da substância 3.....	64
Figura 33 - Espectro de massa obtido da substância 3.....	64
Figura 34 - Estrutura da brachydina 1.	65
Figura 35 - Proposta de fragmentação para a $[M+H]^+$ da brachydina 1 considerando o mecanismo retro Diels Alder.	66
Figura 36 - Concentração (mg/g DW) das brachydinas 1-3 no extrato hidroetanólico (HE) e na fração diclorometânica (FDCM), respectivamente. As barras correspondem a valores médios $\pm$ S.D.; n = 3.	69
Figura 37 - Diagrama de fase pseudoternário para o sistema tween/transcutol, miristato de isopropila e água.	70
Figura 38 - Perfil cromatográfico da FDCM (A), microemulsão com FDCM (B) e microemulsão sem fração (C).	72
Figura 39 - Microemulsão com e sem fração DCM.	74
Figura 40 - Formulação com composição 3 e 5 % de FDCM (p/p).....	74
Figura 41 - Aparência macroscópica das MEs após os ciclos de congelamento/descongelamento, estresse térmico e estabilidade 30 dias.	80
Figura 42 - Perfis cromatográfico das ME, ME3. A) 30 dias a temperatura ambiente; B) Ciclos de gelo-degelo; C) Estresse térmico.....	81
Figura 43 - Comportamento reológico das ME e ME3. Reograma Tensão de cisalhamento versus taxa de cisalhamento.....	83
Figura 44 - Módulo elástico (G') e módulo de perda (G'') em função da frequência.....	85
Figura 45 - Espectros de absorção de (a) solvente EtOH:NaOH (pH 13, 0,1 M) (50:50, v/v), (b) microemulsão branco (ME), (c) microemulsão com 3% de fração (12 μ g/mL) e (d) solução de fração DCM (12 μ g/mL).	86
Figura 46 - Solubilidade da fração DCM em diferentes meios tampão (n = 3).....	86
Figura 47 - Perfil de liberação da fração em microemulsão e em solução.....	87
Figura 48 - Configuração mais estável da brachydina 1 - A) vista superior, B) vista lateral; brachydina 2 - C) vista superior, D) vista lateral; brachydina 3 - E) vista superior, F) vista lateral.....	91
Figura 49 - Mapas de Potencial Eletrostático da brachydina 1 - A) vista superior, B) vista lateral; brachydina 2 - C) vista superior, D) vista lateral; brachydina 3 - E) vista superior, F) vista lateral.	92
Figura 50 - Ancoragem molecular das brachydinas com MAPK14.	94
Figura 51 - Sítios alostéricos e modos de potencial ligação das brachydinas com a cavidade da MAP	96
Figura 52 - Energia livre de ligação dos ligante a proteína p38 α	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - A concentração inibitória (IC ₅₀), índice de seletividade (IS), inibição de crescimento e concentração letal média, calculados para cada linha celular tumoral tratada com fração DCM e doxorrubicina.	27
Tabela 2 - Massa do extrato etanol 70% e rendimento obtidos da percolação das raízes <i>Fridericia platyphylla</i>	49
Tabela 3 - Massas da fração diclorometano e aquosa e rendimentos na partição líquido/líquido.	50
Tabela 4 - Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C (500 e 125 MHz, CDO ₃ D em ppm) das substâncias.	67
Tabela 5 - Parâmetros MRM otimizados para a quantificação das brachydinas por UHPLC-MS/MS.	68
Tabela 6 - Parâmetros das curvas de calibração.	68
Tabela 7 - Composição centesimal da microemulsão.	71
Tabela 8 - Características preliminares das formulações.	76
Tabela 9 - Caracterização físico-química de microemulsão branco e microemulsão contendo FDCM.	78
Tabela 10 - Estabilidade das formulações testadas.	80
Tabela 11 - Valor médio do fluxo, quantidade liberada acumulada após 6 horas em microgramas (Q _{6h}) e quantidade liberada acumulada após 6 horas em porcentagem (Q _{6h} %).	88
Tabela 12 - Descrição dos modelos matemáticos avaliados para as amostras testadas (solução e microemulsão).	89
Tabela 13 - Propriedades eletrônicas calculadas para as brachydinas.	92

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

δ	Deslocamento químico
AcOEt	Acetato de etila
CCD	Cromatografia em camada delgada
CD3OD	Metanol deuterado
DCM	Diclorometano
DMSO	Dimetilsulfóxido
ESI	Electrospray ionization (Ionização por electrospray)
EtBr	Ethidium Bromide (Brometo de etídio)
EtOH	Etanol
H ₂ O	Água
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
hex	Hexano
HPLC/UV-vis	High Performance Liquid Chromatography Ultraviolet - Visible (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada com ultravioleta-visível)
HPLC-PDA	High Performance Liquid Chromatography - Photodiode Array Detector (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada com Detector de Arranjo de Fotodiodos)
HRESI/MS	Espectrometria de Massas de alta resolução
IC ₅₀	Concentração inibitória média
m/z	Relação massa carga
ME3	Microemulsão com 3% de fração DCM
ME5	Microemulsão com 5% de fração DCM
MeOH	Metanol
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SPE	Solid Fase Extraction (Extração em fase sólida)
UV	Ultravioleta
PFPT	Diagrama de fases pseudoternário
RH	Raio hidrodinâmico
IP	Índice de polidispersão
PZ	Potencial Zeta
FDCM	Fração diclorometânica
LSS	Lauril Sulfato de Sódio
BrA	Brachydina 1
BrB	Brachydina 2
BrC	Brachydina 3
LM	Levemente Modificadas
M	Modificada
SA	Sem Alteração
SF	Separação de Fases

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
1.1	Microemulsões e constituintes	18
1.2	Gênero <i>Fridericia</i> sinonímia <i>Arrabidaea</i>	20
1.3	<i>Fridericia platyphylla</i> (sin. <i>Arrabidaea brachypoda</i>).....	21
2	OBJETIVOS	35
2.1	Objetivo Geral	35
2.2	Objetivos específicos	35
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
3.1	Coleta e preparo do extrato	36
3.2	Partição Líquido/Líquido.....	37
3.3	Análises por CLAE/UV-vis	37
3.4	Reisolamento das brachydinas	38
3.5	Identificação das substâncias.....	39
3.6	Quantificação das substâncias.....	40
3.7	Construção do diagrama pseuternário.....	40
3.8	Seleção da formulação e incorporação da fração DCM	42
3.9	Análise da fração e microemulsões com e sem fração DCM por CLAE	42
3.10	Caracterização físico-química.....	42
3.10.1	Tamanho da partícula, potencial zeta e índice de polidispersão.....	42
3.10.2	pH.....	43
3.10.3	Índice de refração.....	43
3.10.4	Densidade relativa.....	43
3.10.5	Resistência a centrifugação.....	43
3.10.6	Estresse térmico	44
3.10.7	Estudo preliminar de estabilidade.....	44
3.10.8	Estabilidade acelerada	44
3.10.9	Reologia	44
3.11	Determinação da solubilidade de FDCM em meio tampão	45
3.12	Ensaio de liberação da fração DCM em microemulsão	45
3.13	Citotoxicidade em modelos in vivo alternativo	46
3.14	Docagem Molecular.....	47
3.15	Análise estatística.....	48
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.1	Obtenção do extrato das raízes de <i>Fridericia platyphylla</i> por percolação	49
4.2	Análise do extrato hidroetanólico por CLAE/UV	49
4.3	Extração líquido/líquido	50
4.4	Análise da fração diclorometânica.....	50
4.5	Isolamento das substâncias da fração DCM.....	51
4.6	Identificação estrutural das substâncias isoladas da fração diclorometânica	54
4.6.1	Identificação estrutural da substância 1	54
4.6.2	Identificação estrutural da substância 2	58
4.6.3	Identificação estrutural da substância 3.	62
4.7	Quantificação das brachydinas no extrato hidroetanólico e fração diclorometânica por UHPLC-MS/MS.....	67
4.8	Desenvolvimento e Caracterização da Microemulsão	69
4.8.1	Diagrama de Fase Pseudoternário (DFPT)	69
4.8.2	Seleção da formulação.....	71

4.8.3	Análise por CLAE das micromulsões.....	72
4.8.4	Avaliação Macroscópica visual	74
4.8.5	Caracterização preliminar	75
4.8.6	Caracterização Físico-química.....	78
4.8.7	Estudo de Estabilidade.....	79
4.8.8	Análise Reológica.....	82
4.8.9	Estudo de liberação controlada <i>in vitro</i>	86
4.9	Estudo de toxicidade in vivo em larvas do <i>Tenebrio molitor</i>	89
4.10	Molecular docking study	90
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	98

1 INTRODUÇÃO

A grande diversidade estrutural dos metabolitos produzidos pelas plantas faz com que o reino vegetal seja uma das mais antiga e principais fonte de fármacos. Os produtos naturais constituem um importante recurso para o mercado mundial de medicamentos, anualmente 1,1 trilhões de dólares são arrecadados e cerca de 25% destes é de medicamentos proveniente de origem vegetal (Calixto, 2019). Esse percentual seria maior se não fosse a baixa solubilidade aquosa de muitas substâncias de origem natural (Gomes, 2010).

Muitos produtos naturais biologicamente ativos, quando utilizados sem qualquer modificação, não apresentam resultados eficazes para uso terapêutico. Em muitos casos, o fracasso da utilização de fármacos de origem natural é atribuído à baixa concentração que alcança os alvos terapêuticos (Granada et al., 2007).

Sistemas de liberação de fármacos tais como nanopartículas, lipossomas, emulsões, microemulsões e soluções micelares, surgem nesse cenário na perspectiva de superar a limitação da baixa solubilidade dos candidatos a fármacos (Gomes, 2010). As novas alternativas de veiculação de fármacos trazem como perspectiva aprimorar a eficácia das formas farmacêuticas, através do aumento da solubilidade do fármaco, favorecendo melhor interação com o alvo biológico, capacidade de prolongar e controlar a liberação da substância ativa, proteção contra biotransformação, veiculação de fármacos hidrofóbicos pela via parental, e redução dos efeitos adversos decorrentes das flutuações plasmáticas causadas pela administração de várias doses diárias (Formariz et al., 2005; Fonseca et al., 2002; Gupte & Ciftci, 2004).

É essencial para qualquer candidato a fármaco sua absorção e sua capacidade de ser distribuído no alvo, a melhoria das propriedades terapêuticas de compostos isolados de plantas por meio de sua incorporação em sistemas de liberação constitui-se, portanto, uma estratégia importante de obtenção de novos medicamentos.

1.1 *Microemulsões e constituintes*

As microemulsões são prováveis sistemas de carreamento dos fármacos. Classificadas como dispersões líquidas isotrópicas, transparentes e

termodinamicamente estáveis, constituída por água, óleo, tensoativo e/ ou cotensoativo (Danielsson e Lindman, 1981). As microemulsões apresentam grande potencial de liberação de substâncias bioativas, pelas propriedades de solubilizar substâncias hidrofílicas em meio lipofílico ou lipofílica em meio aquoso e anfifílico na interface óleo/ água (Damasceno et al., 2011).

A formação de microestruturas em soluções contendo água e tensoativo é um fenômeno proveniente da auto-organização molecular para o alcance da estabilidade termodinâmica. As moléculas de tensoativos na presença de água se auto agregam formando uma variedade de estruturas, quando os parâmetros de concentração do tensoativos, presença de sal ou temperatura são alterados. Esse fenômeno é a base para a aplicação tecnológica dos tensoativos como sistemas organizados em aplicações biológicas (Formariz et al., 2005).

A mistura de componentes com polaridades e constantes dielétricas diferentes como óleo e água, na presença do tensoativo, formam agregados com diferentes regiões de solubilização que lhes permite a compartimentalização das substâncias ativas e o carreamento até o sítio alvo, além de possibilitar o controle da velocidade de liberação, sem a alteração da estrutura química da molécula (Kreilgaard, 2002; Santos, 2015).

As microemulsões apresentam as vantagens como transparência, alta estabilidade, fácil preparação e capacidade de incorporar diferentes classes de fármacos com diferentes propriedades físico-químicas (Santos, 2015).

A literatura reporta alguns trabalhos que utilizaram microemulsões com substâncias provenientes de produtos naturais. O di-hidrojasmonato de metila isolado da espécie *Jasminum officinale* possui atividade antiproliferativa contra várias linhagens de células cancerígenas e toxicidade seletiva, entretanto sua entrega sistêmica é altamente desafiadora devido à sua natureza lipofílica. Yehia et al., (2017) desenvolveu uma microemulsão composta por Capryol e ácido oleico na fase oleosa e os tensoativos Labrasol e Transcutol para administração transdérmica do derivado de jasmonato e avaliou sua eficácia na linhagem celular de câncer de mama (MCF-7). A microemulsão no estudo de permeação *ex vivo* na pele de camundongo demonstrou um fluxo de permeação significativamente maior de $0,07 \mu\text{L cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$ e coeficiente de permeabilidade de $3,39 \mu\text{L/h}$, aumentando assim a permeação do fármaco. Além disso, a citotoxicidade da formulação na linhagem celular MCF-7

apresentou IC₅₀ de 42,2 µL/mL (equivalente a 8,3 µL/mL de fármaco), o teste *in vivo* demonstrou também que a formulação preparada diminuiu significativamente a progressão do tumor com taxa de inibição de 54,5%.

A catequina do chá verde de *Camellia sinensis* exige diversos efeitos farmacológicos, incluindo atividade antimicrobiana, entretanto sua baixa disponibilidade e fraca estabilidade limitam seu uso. Uma microemulsão à base de Labrasol, Cremophor EL, glicerol e água foi desenvolvida formulando a combinação da catequina e cafeína. A eficiência antibacteriana da microemulsão foi avaliada e demonstrou valores de MIC 0,83 e 1,65 mg/ml evidenciando que o crescimento de *S. Epidermidis* e *E. coli* pode ser inibido em uma concentração mais baixa quando encapsulado na formulação. Além disso, a incorporação dos princípios ativos na microemulsão preservaram as propriedades antioxidantes das substâncias e a análise de citotoxicidade em células normais de mamíferos mostrou que a formulação foi segura para células de mamíferos (Gupta et al. 2019).

A curcumina é um polifenol obtido dos rizomas de *Curcuma longa* L. com promissoras atividades antioxidante, anti-inflamatórias e antitumoral, entretanto a baixa biodisponibilidade devido à baixa solubilidade em água dificulta sua aplicação clínica. Foram desenvolvidos três microemulsões contendo Cremophor EL, lecitina, Tween 20 e Tween 80 como surfactantes, e os óleos de gérmen de trigo, azeite e vitamina E como fase oleosa. A formulação otimizada foi obtida com vitamina E, e apresentou melhores resultados em termos de tamanho, polidispersidade, eficiência de encapsulamento e influência positiva na solubilidade da curcumina, que aumentou aproximadamente 10.000 vezes em comparação com solução aquosa (Bergonzi et al. 2014).

1.2 Gênero *Fridericia* sinonímia *Arrabidaea*

O Brasil representa o centro de diversidade da família Bignoniaceae, onde ocorrem 56 gêneros e aproximadamente 340 espécies, encontradas em diferentes tipos de ambientes, desde o Cerrado até as florestas tropicais e sempre-verdes, representando assim a principal família de lianas das florestas brasileiras (Bramara, 2017).

O gênero *Arrabidaea* atualmente denominado de *Fridericia* pertence à família Bignoniaceae, durante mais de um século foi considerado o maior gênero dessa

família, no entanto o número de espécies variou devido a novos sistemas de classificação em resultado da variação na morfologia do cálice, da corola, do fruto, da semente e da inflorescência (Sandwith, 1954; Sandwith, 1968; Gentry, 1973).

As espécies pertencentes a esse gênero podem ser subarbusto, arbusto ou árvore com ramos florais de 35-50 cm, folhas com pecíolos de 5 a 12 mm. Além disso, apresentam inflorescência paniculada terminal nos ramos axilares, e flores com um pequeno cálice tubular encimado por cinco dentes e uma corola em forma de sino, em cor de rosa a púrpura (Silva, 2003).

É particularmente no cerrado brasileiro a região de maior incidência do gênero *Fridericia*, algumas das espécies são amplamente utilizadas na medicina tradicional, mas pouco conhecidas pela comunidade científica de produtos naturais. Apenas sete das espécies foram investigadas do ponto de vista químico e farmacológico (Nascimento et al., 2022).

Arrabidaea chica (Bonpl.) Verl., é a espécie mais investigada, a literatura reporta a presença dos constituintes químicos flavonóides (Alcerito, 2002); carajurona, carajurina (Zorn, 2001), e 3-desoxiantocianidinas (Neto, 2003), utilizados em aplicações cosméticas. Há estudos com enfoque em espécies como *Arrabidaea samydoides* (Cham.) Sandwith, *Arrabidaea pulchra* (Cham.) Sandwith, *Arrabidaea triplinervia* (Mart. ex DC.) Baill, *Arrabidaea bilabiata* (Sprague) Sandwith, *Arrabidaea patellifera* (Schltdl.) Sandwith, e *Arrabidaea brachypoda* Bureau, popularmente utilizados como anti-sépticos, diuréticos, para tratamento de feridas, cólicas intestinais, diarreia e enterocolite. Os estudos dos extratos e compostos isolados desse gênero evidenciam as potencialidades biofarmacológicas através das atividades antifúngicas (Alcerito, 2002), antimaláricas (Pauletti, 2003a), antitumorais (Pauletti, 2003b), gastroprotetoras (Rocha, 2017) e anti-*T. cruzi* (Neuenschwander, 2020). A revisão completa do gênero *Fridericia platyphylla* poderá ser encontrada no artigo de revisão publicado e anexo ao presente trabalho (anexo I)

1.3 *Fridericia platyphylla* (sin. *Arrabidaea brachypoda*)

A espécie *Fridericia platyphylla* (Cham.) L.G.Lohmann é um arbusto nativo do Cerrado brasileiro, e possui entre 1,0 e 2,0 m de altura, abundantemente ramificado, com folhas simples e flores róseo-roxas em inflorescências terminais (Figura 1)

(Garcia, 2008). É popularmente conhecida como “cipó-una”, “tintureiro” ou “cervejinha do campo”, possui ampla distribuição geográfica, suas raízes são tradicionalmente usadas para o tratamento de pedras nos rins e dores nas articulações (artrite) (Lohmann, 2013; Kuhlmann, 2016; Rocha et al., 2011).

Figura 1 - *Fridericia platyphylla* (Cham.) L. G. Lohmann.

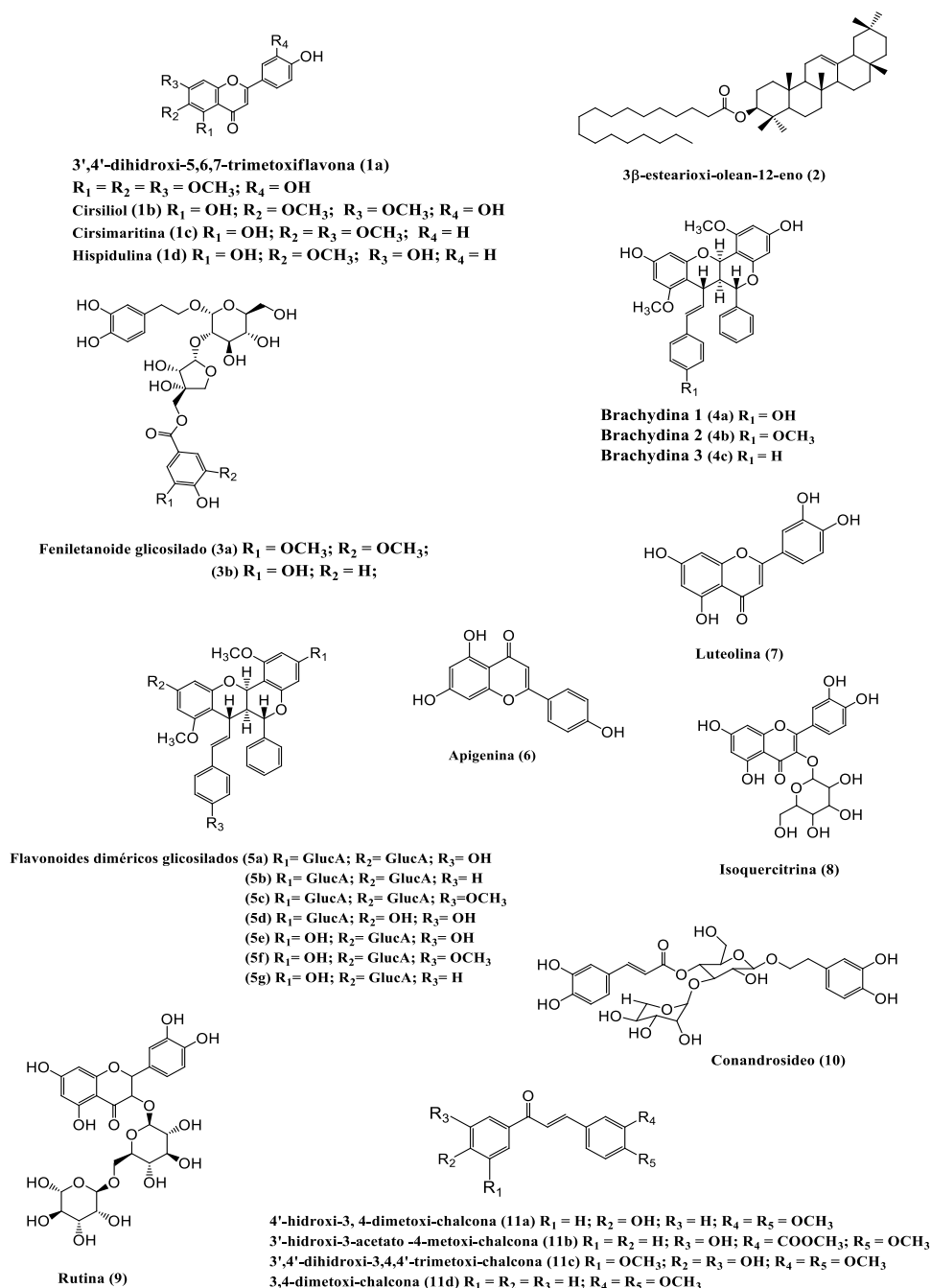


Fonte: Autora, 2023.

A investigação fitoquímica dos extratos hidroetanólico das folhas, flores, partes aéreas e raízes levou ao isolamento de diversos constituintes como, 3,4-dihidroxi-5,6,7-trimetoxiflavona (1a), cirsiol (1b) isolado pela primeira vez na família Bignoniaceae, cirsimarina (1c), hispidulina (1d) (Figura 2) (Alcerito, 2002). O triterpenoide do tipo oleanano, 3 β -estearioxi-olean-12-eno (2), dois derivados feniletanoides glicosilados (3a e 3b), três novos flavonóides diméricos raros, nomeadamente brachydina 1 (4a), 2 (4b), 3 (4c) isolado pela primeira vez na família, e sete flavonoides diméricos glicosilados incomuns (5a-g) foram isolados das raízes de *F. platyphylla* (Rocha, 2017; Rocha, 2019; Nunes, 2020; Salgado, 2020). Além disso, foram isolados os flavonoides apigenina (6), luteolina (7), isoquercitrina (8), rutina (9), conandrosídeo (10) e quatro chalconas das flores, nomeadas de 4'-hidroxi-3-4-dimetoxi-chalcona (11), 3'-hidroxi-3-acetato-4-metoxi-chalconas (12), 3',4'-

dihidroxi-3,4,4'-trimetoxi-chalcona (13) e 3,4-dimetoxi-chalcona (14) (Monteiro, 2020; Rezende-Júnior, 2020; Franco, 2020).

Figura 2 - Substâncias isoladas da espécie *Fridericia*.



Fonte: Autora (2023).

A atividade antifúngica do extrato bruto das folhas de *F. phatyphylla* levou a identificação das substâncias (1a), (1b), (1c), e (1d), que demonstraram significativa atividade contra o fungo *C. sphaerospermum* inibindo o crescimento do fungo em 1 μg do composto puro, com exceção da substância (1d) que exibiu valor de inibição do

crescimento de 10 µg. Os autores reforçaram o papel ecológico das substâncias obtidas ao indicarem que estas podem atuar como uma barreira física ou química contra os ataques de microrganismos (Alcerito, 2002).

O extrato etanólico das raízes demonstrou potentes efeitos anti-inflamatórios e analgésicos, apoiando a utilização tradicional desta planta no tratamento de algumas condições dolorosas e inflamatórias. O triterpenóide (2) inibiu as duas fases da estimulação dolorosa do teste da formalina semelhante à morfina. Além disso, inibiu significativamente o edema de patas de rato induzido por carragenina nas doses de 5, 10 e 15 mg/mL (p.o.), com valores de inibição do edema de 3 h pós-carragenina de 47,9%, 53,1% e 50,4%, respectivamente (Rocha, 2015).

O extrato hidroetanólico da raiz exerceu efeitos gastroprotetores significativos em modelo *in vivo*. A atividade foi avaliada através de vários modelos experimentais de úlcera gástrica em ratos (etanol absoluto, depleção de glutathiona, depleção de óxido nítrico, anti-inflamatório não esteroide, ligadura pilórica e ácido acético). O extrato reduziu significativamente as lesões gástricas em todos os modelos numa dosagem de 300 mg/kg (p.o) e promoveu a citoproteção da mucosa gástrica (Rocha, 2017).

A atividade antileishmania das brachydinas (4a), (4b) e (4c) foi avaliada e a substância (4b) foi a mais ativa contra a forma promastigota de *Leishmania* sp., além disso a quantificação *in vitro* dos macrófagos infectados de *Leishmania amazonensis* revelou que a (4b) foi a mais ativa contra as formas amastigotas intracelulares, e não apresentou toxicidade para a célula hospedeira. A combinação de anfotericina B e a substância (4b) exerceu um efeito indutor, indicando a ausência de qualquer interação entre elas (Rocha, 2019).

A citotoxicidade das brachydinas (4a), (4b) e (4c) em células tumorais da próstata humana (PC-3) foram avaliadas e os resultados evidenciaram valores de IC₅₀ de 23,41, 4,28 e 4,44 µM, respectivamente. Além disso, (4b) e (4c) aumentaram os níveis de p21 que estão relacionados com a parada do ciclo celular G1, as brachydinas (4a) e (4b) diminuíram as expressões de fosfo-AKT, que é responsável pelo ciclo e proliferação celular. Tais substâncias aumentaram os níveis da proteína relacionada com a reparação do DNA e indução de processos apoptóticos (Nunes, 2020).

A atividade anti-inflamatórias *in vitro* da fração diclorometânica (DCMAB); extrato hidroetanólico (HEAB); e as substâncias (4a), (4b), e (4c) em sinoviócitos de artrite foram avaliadas e a DCMAB apresentou inibição de 30% na liberação da citocina pró-inflamatória IL-6 a 25 µg/mL e o HEAB mostrou-se inativo; as substâncias (4b) e o (4c) diminuíram a liberação de IL-6 com inibições de 80% e 94%, respectivamente, enquanto a (4a) não demonstrou inibições significativas a 25 e 50 µM com valores percentuais de 10% e 24% de inibição, respectivamente (Salgado, 2020).

O composto (7) é um flavonoide com promissora atividade antitumoral. Este exibiu inibição da proliferação celular contra todas as linhas de células testadas, particularmente o glioblastoma U-251, no qual demonstrou boa seletividade para as células tumorais em comparação com o controle positivo. Também controlou a migração celular e a tumorigênese, causando a morte das células tumorais U-251 por apoptose através da despolarização da membrana mitocondrial (Franco, 2020).

A atividade inibidora da enzima 15-LOX envolvida em processos inflamatórios foi avaliada em teste *in vitro*. A substância (10) exibiu inibição da LOX com concentração inibitória de 7,8 µM, próxima a concentração do padrão quercetina IC₅₀ de 7,6 µM. Além disso, a conandrosida não foi citotóxica para as células normais, e a avaliação do complexo LOX-conandrosida apresentou uma pontuação de acoplamento ligeiramente superior à da quercetina (Bertanha, 2020).

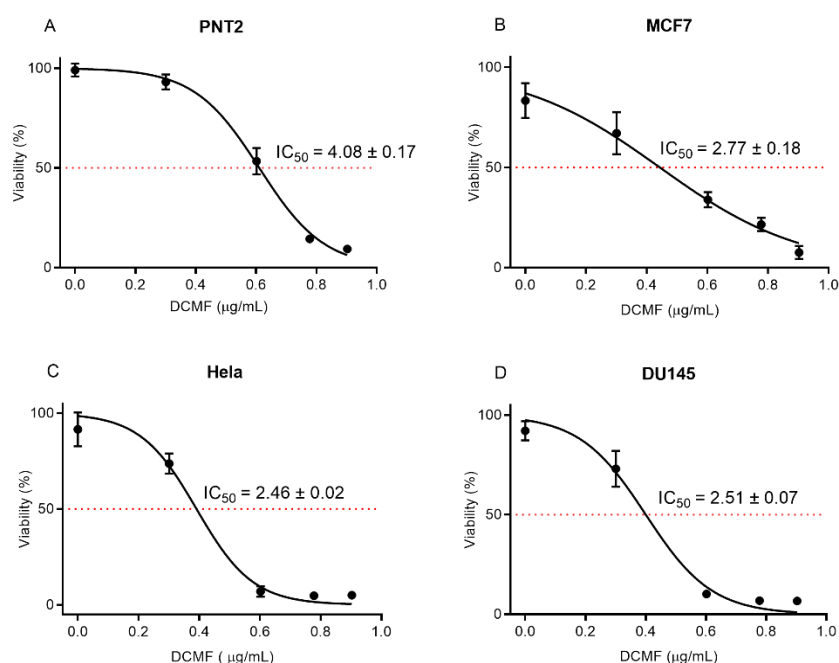
A atividade antiespasmódica das folhas foi avaliada empregando tecidos musculares lisos intestinais (jejuno) através das curvas de amplitude induzidas por carbacol (CCH). O extrato inibiu a contração e o relaxamento do jejuno isolado de ratos de forma significativa e dependente da concentração. Os autores também observaram o relaxamento significativo do jejuno de rato quando este foi pré-contraído por altas concentrações de potássio extracelular, demonstrando a participação do canal de potássio no mecanismo de relaxamento do extrato, o que deslocou ainda mais a curva do CaCl₂ para a direita, com diminuição do efeito máximo que é característico da inibição do influxo de Ca²⁺ através de canais de cálcio dependentes de voltagem, sinalizando potencial terapêutico para o tratamento de cólicas e/ou diarreia (Monteiro, 2020).

As chalconas (11a-d) não apresentaram qualquer atividade antimicrobiana nas estirpes de *S. aureus* testadas; no entanto, todas as chalconas aumentaram a atividade de NorA contra a estirpe SA1199-B, e a chalcona (11d) apresentou melhor

efeito modulador e boa capacidade de potencializar a ação de EtBr contra a estirpe SA1199-B. A ligação molecular das chalconas revelou interações com cavidades hidrofóbicas de NorA e MepA, indicando que a chalcona (11d) compete com o antibiótico pelos mesmos sítios de ligação de NorA e MepA (Rezende-Júnior, 2020).

A diversidade vegetal e ampla variedade de metabolitos produzidos pelas plantas permite a investigação desses metabolitos frente a diversas doenças. Considerando as potencialidades da fração orgânica das raízes de *F. platyphylla* investigou-se a atividade anticancerígena dessa fração em estudo realizado em colaboração com Maciel-Silva et al., (2023). Os resultados demonstraram os efeitos citotóxicos da fração DCM em células tumorais de mama (MCF-7), colo do útero (HeLa) e próstata (DU145), com valores de IC₅₀ igual a 2,77, 2,46, e 2,51 µg/mL, respectivamente. Ao tempo que as células não tumorais (PNT2) mostraram o IC₅₀ de 4,09 µg/mL (Figura 3).

Figura 3 - Curva dose-resposta observada para células tumorais e não tumorais tratadas com fração DCM durante 48 h. Os valores são a média $\pm$ DP de três experiências independentes. A linha tracejada indica uma concentração inibitória (IC) de 50%.



Fonte: Maciel-Silva et al., (2023).

O índice de seletividade (IS) calculado através da razão entre IC₅₀ para células não tumorais e células tumorais é apresentado na Tabela 1. Observa-se a

seletividade da fração DCM contra as células tumorais, com $IS \geq 1,48$. Além disso, o IS observado para as células HeLa foi três vezes superior quando comparada com as células tratadas com doxorrubicina (Maciel-Silva et al., 2023).

Tabela 1 - A concentração inibitória (IC₅₀), índice de seletividade (IS), inibição de crescimento e concentração letal média, calculados para cada linha celular tumoral tratada com fração DCM e doxorrubicina.

Linhagens tumorais	IC ₅₀ ± DP (SI)		% Inibição do crescimento ± DP*			CL ₅₀ *		
	FDCM	DXR	FDCM	DXR	BrC	FDCM	DXR	BrC
PNT2	4.08 ± 0.17	0.21 ±0.02	-	-	-	-	-	-
DU-145	2.51 ± 0.07 (1.63)	0.09 ±0.02 (2.33)	-	-	-	-	-	-
MCF-7	2.77 ± 0.18 (1.48)	0.13 ±0.05 (1.61)	-	-	-	-	-	-
HeLa	2.46 ± 0.02 (1.66)	0.40 ± 0.0 (0.5)	-	-	-	-	-	-
B-16/F-10	-	-	100,00 ± 0,12 (MA)	95,87 ± 5,32 (MA)	99,95 ± 0,04 (MA)	30,14	0,03	22,12
S180	-	-	98,54 ± 0,07 (MA)	92,40 ± 7,99 (MA)	98,36 ± 0,12 (MA)	20,37	1,85	17,15
CMSP	-	-	94,99 ± 0,25 (MA)	97,10 ± 3,65 (MA)	96,10 ± 0,17 (MA)	-	-	-
L-929	-	-	-	-	-	23,41	0,66	27,61
U-87	-	-	-	-	-	36,43	ND	22,65
CT-26WT	-	-	-	-	-	29,66	4,69	28,05

*Dados inéditos

IC₅₀: concentração inibitória de 50% das células, IS: índice de seletividade, CL₅₀: concentração letal média, FDCM: fração diclorometano, DRX: doxorrubicina, BrC: brachydina C. Os valores são a média ± DP de três experiências independentes.

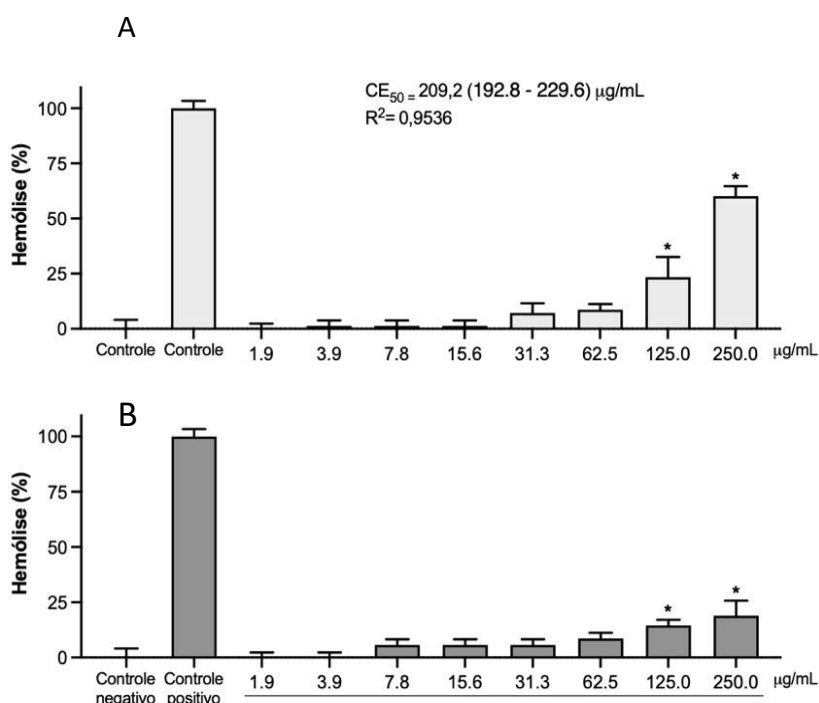
Fonte: Maciel-Silva et al., 2023.

A citotoxicidade *in vitro* da fração diclorometano (FDCM) e da brachydina 3 (BrC) foi avaliada em linhagens de células tumorais e normais (B16-F10, sarcoma 180) e células mononucleadas do sangue periférico-células normais (CMSP) em concentração única de 100 µg/mL. A Tabela 1 mostra a potente redução da viabilidade celular da fração e brachydina com valor percentual citotóxico próximo ao controle doxorrubicina.

Na busca por substâncias ativas com atividades farmacológicas promissoras faz-se necessário a investigação dos possíveis efeitos nocivos ao organismo, um dos ensaios utilizados é capacidade da substância ativa em causar danos às membranas eritrocitárias (Araújo et al., 2013; Kalaivani et al., 2011).

O ensaio hemolítico foi realizado objetivando avaliar o potencial da fração DCM e da brachydina 3 (BrC) em causar lesão à membrana plasmática das células. A Figura 4A-B mostra o efeito lítico da Br3 e fração DCM.

Figura 4 - Efeito lítico da BrC A) e FDCM B) em eritrócitos de camundongos Swiss Mus musculus após 60 min. Triton X-100 1% foi usado como controle positivo.

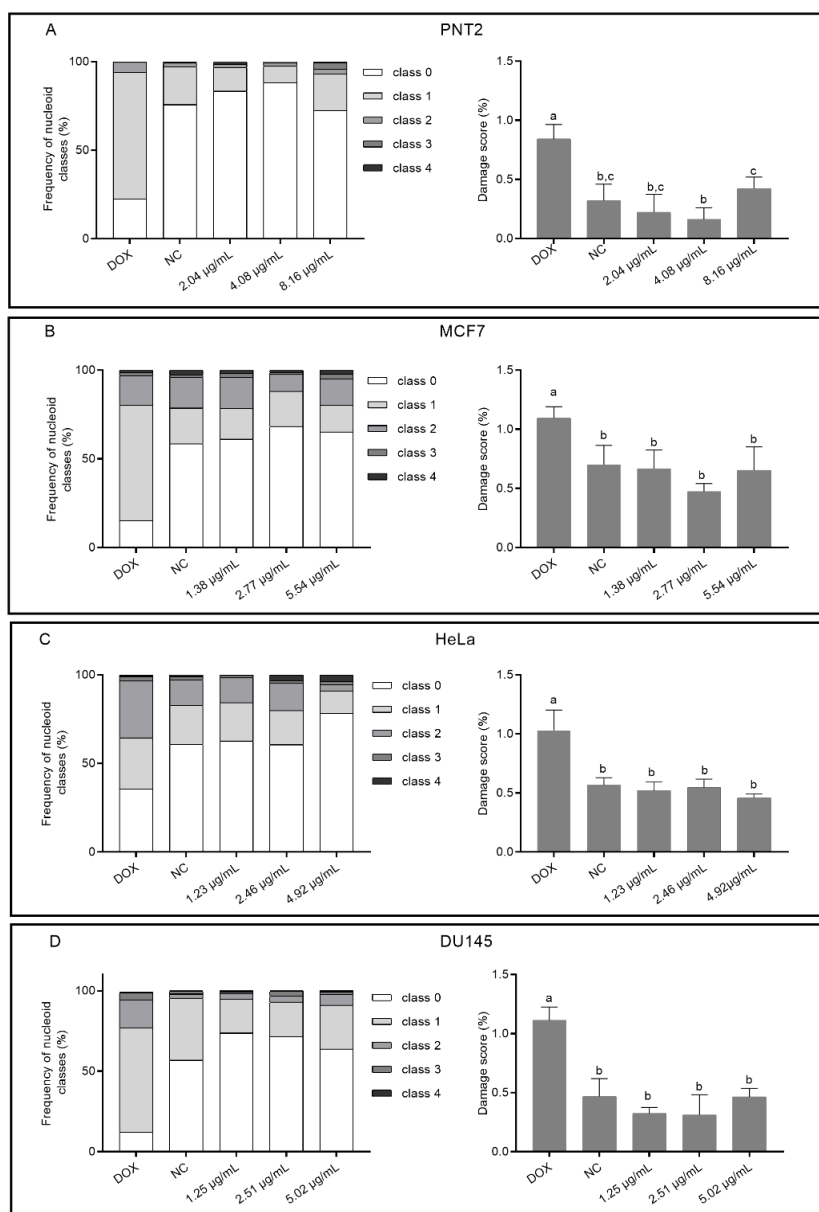


Valores são média ± E.P.M. da absorbância lida a 450 nm para detecção de extravasamento de hemoglobina. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão de medição (E.P.M.) da absorbância lida a 450 nm para detecção de extravasamento de hemoglobina em dois experimentos independentes. *p < 0,05 comparado ao controle por ANOVA seguido pelo teste de Student Newman-Keuls.

Os ensaios para determinar a capacidade hemolítica sobre eritrócitos humanos mostraram que apenas nas duas maiores concentrações as amostras demonstram potencial hemolítico. A FDCM não atingiu uma hemólise de 50% em nenhuma das concentrações testadas. Pode-se inferir que a FDCM não causa alto grau de hemólise e, portanto, não danificou a membrana plasmática dos eritrócitos, mostrando-se promissora, uma vez que a capacidade dos produtos naturais em não causar danos a membrana dos eritrócitos é altamente requerido (Araújo et al., 2013).

A análise genotóxica da fração DCM com valores de concentração de $\frac{1}{2}$ IC50, IC50 e duplo IC50, foi realizada pelo ensaio de cometas de células tumorais e não tumorais (Figura 5A-D). Observa-se que a fração DCM não lesionou o material genético (DNA) (Maciel-Silva et al., 2023), evidenciando a eficácia e segurança dos princípios ativos da fração DCM.

Figura 5 - Frequência das classes de nucleotídeos e pontuações de danos no DNA determinadas para linhas celulares tratadas com fração DCM durante 24 h.



A = células não tumorais (PNT2); B = células de cancro da mama (MCF7), C = células tumorais cervicais (HeLa), D = células tumorais da próstata (DU145), NC = controle negativo (DMEM) e Dox = doxorubicina. Os valores são a média $\pm$ DP de três experiências independentes. Letras diferentes significam diferença estatística por ANOVA seguida do teste de Tukey, $p < 0,05$.

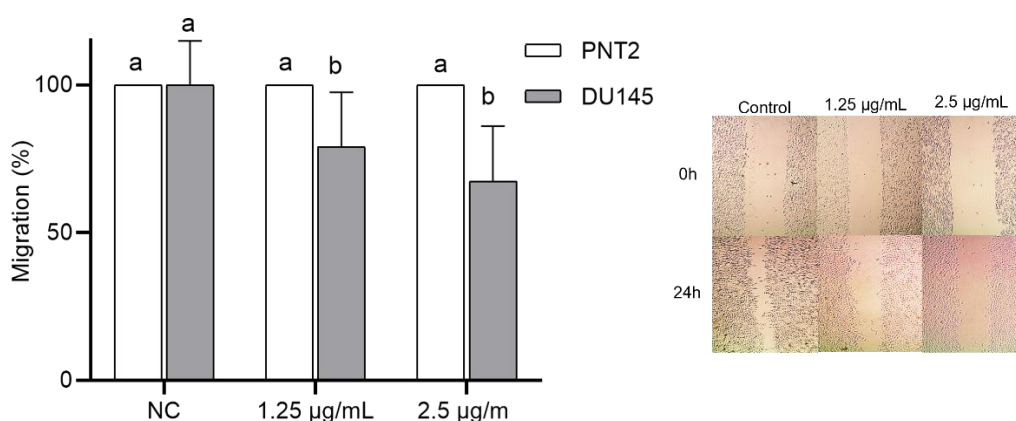
Fonte: Maciel-Silva et al., 2023.

A migração e invasão de células cancerígenas a outros órgãos é uma das principais causa de morte em pacientes com câncer metastático. As células cancerígenas podem se disseminar e migrar através de vários mecanismos

alternativos limitando a eficiência das terapias anti-metástase (Wu et al., 2021, van Zijl, 2011), nesse sentido é bastante encorajado que os potenciais candidatos a antineoplásicos apresentem atividade anti-invasão e anti-metástase (Steeg, Theodorescu, 2008). A capacidade de migração das células tumorais ao serem tratadas com fração DCM foi avaliada.

A Figura 6A-B apresenta as áreas de migração celular e as imagens das áreas de risco a 0 h e 24 h expostas a 1,25 e 2,5 µg/ml de fração DCM. Observa-se uma relação entre a concentração de DCM e a redução da motilidade das células tumorais (Fig. 6A). Além disso, quando as células tumorais foram expostas a 1,25 e 2,5 µg/ml de fração DCM as áreas de fechamento apresentaram valores de 20,94% e 32,56% respectivamente, enquanto nas células não tumorais não foi observado qualquer efeito, salientando a capacidade da fração em reduzir a migração das células tumorais de próstata (Maciel-Silva et al., 2023).

Figura 6 - Área de migração celular observada em células não tumorais da próstata (PNT2) e células tumorais da próstata (DU145) tratadas com fração DCM durante 24 h (A). Imagem das lacunas às 0 h e 24 h de DU145 (B).



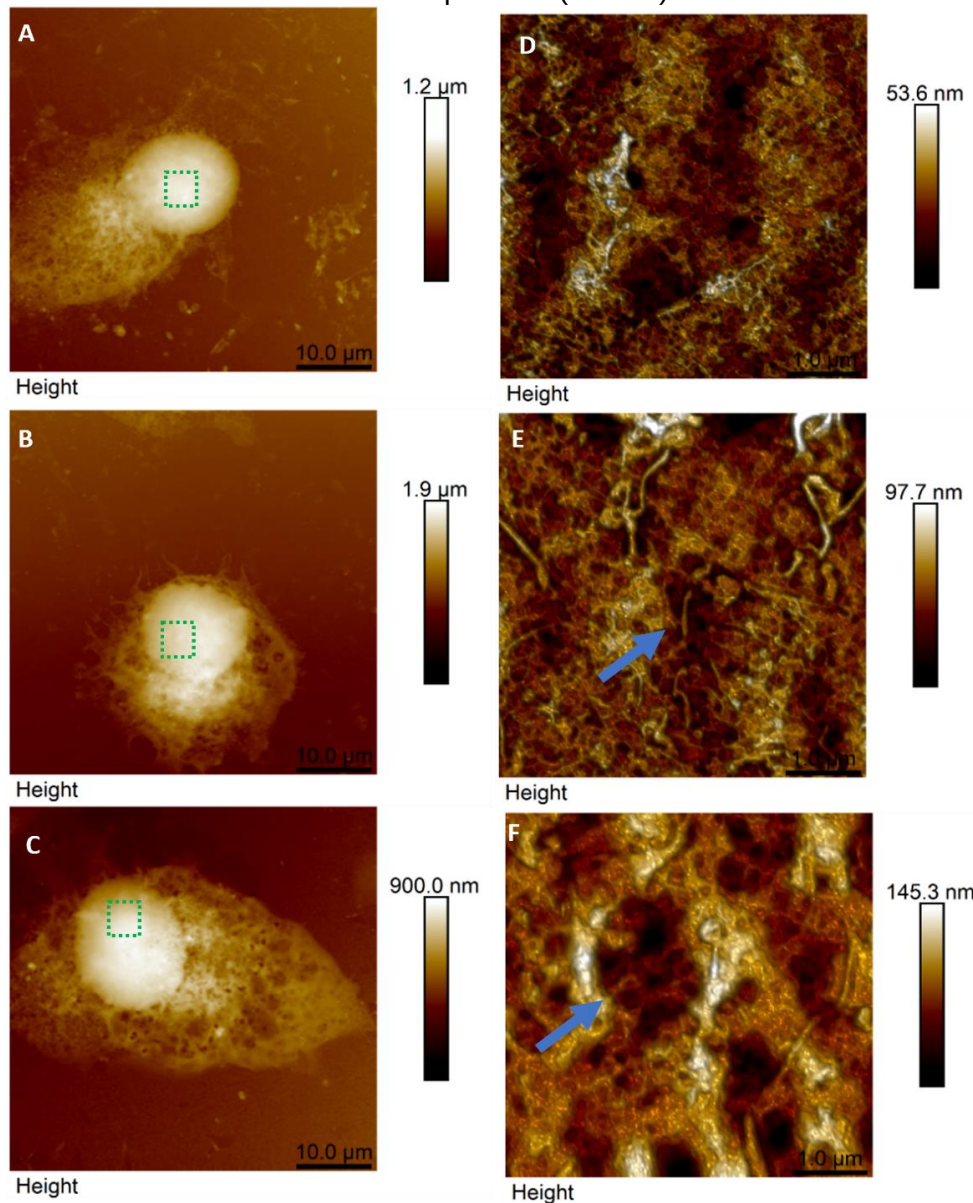
Letras diferentes significam uma diferença por ANOVA seguida do teste de Tukey ($p < 0,001$).
Fonte: Maciel-Silva et al., 2023.

As imagens de Microscopia de Força Atômica (AFM) foram utilizadas para analisar a morfologia das células tumorais (DU145) e não tumorais (PNT2) tratadas com fração DCM. Os mapas de AFM revelaram alterações ultra estruturais como buracos (setas azuis nas figuras 7D e E) nas superfícies da membrana nuclear das células tumorais de próstata (DU145) tratadas com fração DCM. As células não tumorais também receberam o mesmo tratamento e apresentaram menos alterações

na membrana celular (Figuras 8F, seta azul). A escala de cores castanha nas imagens indica alturas diferentes, as cores claras representam a topografia superior e cores escuras correspondente à topografia inferior.

A análise da membrana mostrou um aumento do número de furos e um aumento da rugosidade na superfície da membrana celular principalmente em concentração mais elevada de fração, sugerindo que a fração DCM tem a capacidade de lesionar a membrana das células tumorais, induzindo o aparecimento de rugosidade na membrana nuclear de maneira dependente da concentração (Maciel-Silva et al., 2023).

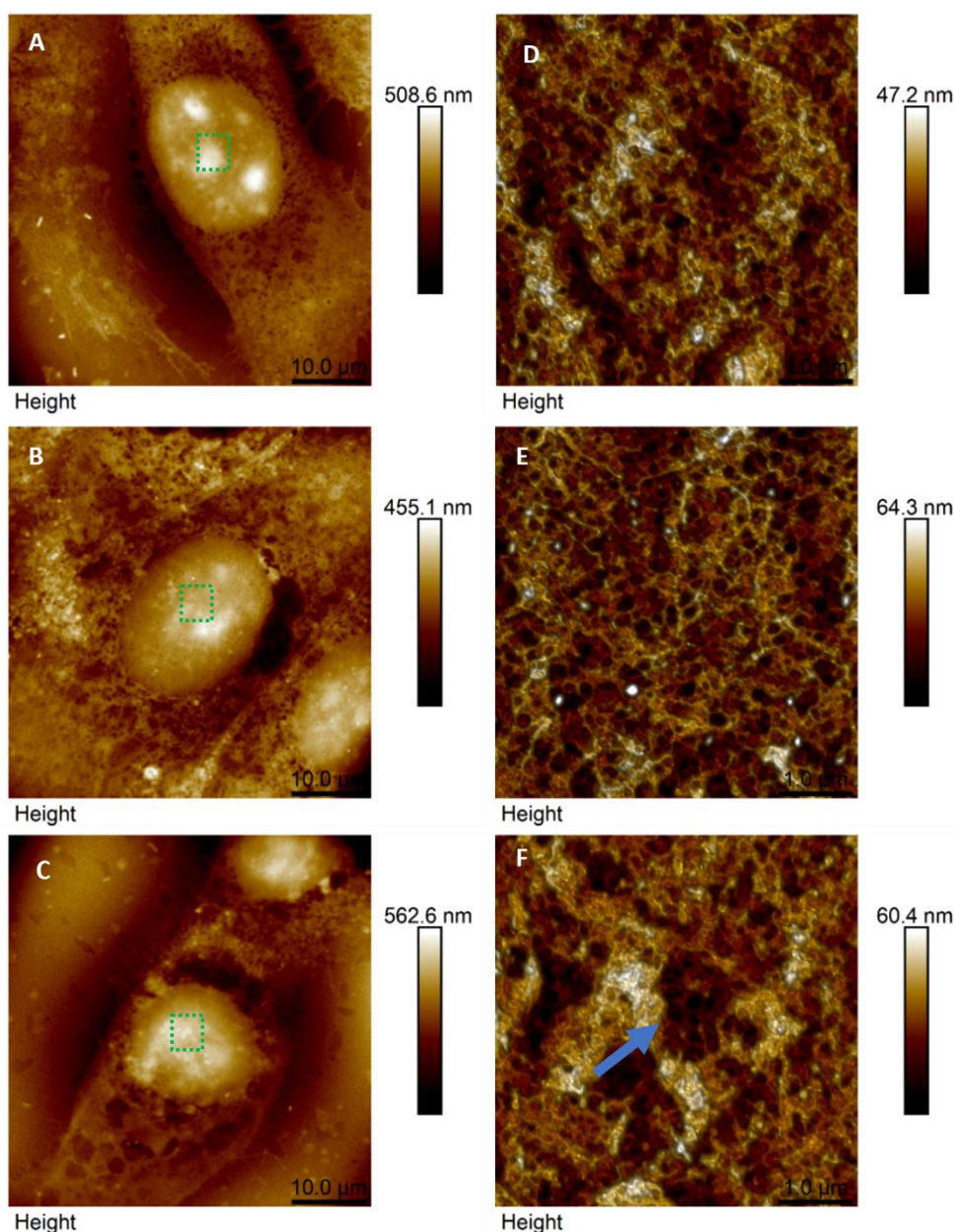
Figura 7 - Imagens de microscopia de força atômica (AFM) de células e da superfície da membrana nuclear de células tumorais da próstata (DU145).



Células tumorais não tratadas (A); células tumorais tratadas com 1,25 $\mu\text{g/mL}$ (B); células tumorais tratadas com 2,5 $\mu\text{g/mL}$ (C); imagens de ultra-estrutura (5 $\times$ 5 μm) na região celular correspondente indicada pela moldura verde (D), (E) e (F).

Fonte: Maciel-Silva et al., 2023.

Figura 8 - Imagens de microscopia de força atômica (AFM) das células e da superfície da membrana nuclear das células não tumorais de próstata (PNT2).

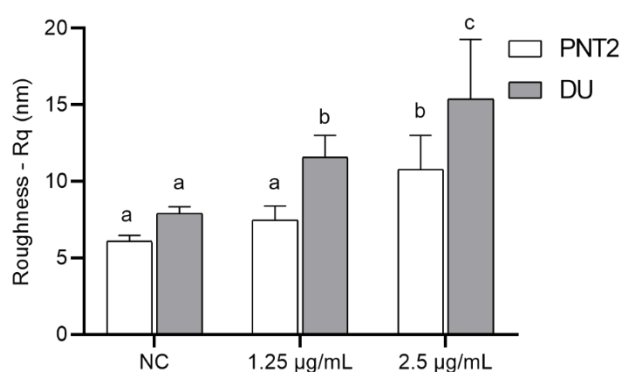


Células não tumorais não tratadas (A); células tratadas com 1,25 $\mu\text{g/mL}$ (B); células tratadas com 2,5 $\mu\text{g/mL}$ (C); imagens de ultra-estrutura (5 $\times$ 5 μm) na região celular correspondente indicada pela moldura verde (D), (E) e (F).

Fonte: Maciel-Silva et al., 2023.

Foi quantificado a rugosidade celular através da rugosidade média da superfície quadrada da membrana (Rq). A Figura 9 mostra a relação concentração/rugosidade, quanto maior a concentração de fração DCM maior a rugosidade das células tumorais, com valores de $11,6 \pm 1,42$ nm, e $15,37 \pm 3,9$ nm para as concentrações de $1,25 \mu\text{g/mL}$ e $2,5 \mu\text{g/mL}$ de fração DCM respectivamente. Enquanto nas células não tumorais (PNT2), a rugosidade foi $Rq = 10,78 \pm 2,23$ a $2,5 \mu\text{g/mL}$ de fração DCM e as células não tratadas o Rq foi de $7,9 \pm 0,43$ nm (Maciel-Silva et al., 2023).

Figura 9 - Rugosidade média (Rq) das células tumorais da próstata (DU145) e não tumorais da próstata (PNT2) tratadas com DCM durante 48 horas.



Letras diferentes significam que existe uma diferença por ANOVA seguida do teste de Tukey $p < 0,01$, exceto entre NC (DU145) e $2,5 \mu\text{g/mL}$ (PNT2), em que $p < 0,05$.
Fonte: Maciel-Silva et al., 2023.

Considerando os resultados apresentados observa-se promissora atividade da fração, estima-se que o desenvolvimento de uma formulação incorporando a presente amostra poderia demonstrar melhores resultados, uma vez que as formulações podem permitir melhor entrega do princípio ativo, resultando em melhor atividade farmacológica.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver e avaliar uma formulação do tipo microemulsão a base de fração rica em flavonoides diméricos denominados de brachydinas como agente terapêutico.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Preparar o extrato hidroetanólico das raízes de *Fridericia platyphylla*;
- ✓ Fracionar o extrato hidroetanólico para a obtenção das frações orgânica e aquosa;
- ✓ Reisolamento de brachydinas a partir do extrato hidroetanólico das raízes de *Fridericia platyphylla*;
- ✓ Desenvolver a formulação do tipo microemulsão contendo a fração diclorometânica (DCM);
- ✓ Realizar a caracterização morfológica, físico-química, reológica das microemulsões branco e com fração DCM;
- ✓ Analisar a estabilidade das microemulsões
- ✓ Avaliar a liberação *in vitro* da microemulsão com fração DCM;
- ✓ Avaliar a toxicidade da microemulsão com fração DCM em modelo experimental com larvas do *Tenebrio molitor*;
- ✓ Investigar os alvos moleculares de interação com as brachydinas por meio de docagem molecular.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Coleta e preparo do extrato

As raízes de *Fridericia platyphylla* foram coletadas em Fevereiro de 2019 na fazenda Sant'Ana da Serra em João Pinheiro, Minas Gerais, Brasil (Localização: 17°44'45"S, 46°10'44"W). A planta foi identificada no Herbário José Badine da Universidade Federal de Ouro Preto pela botânica Dra. Maria Cristina Teixeira Braga Messias. Um voucher (n° 17.935) foi depositado no Herbário da Universidade Federal de Ouro Preto em Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil. A planta foi coletada seguindo a legislação brasileira de proteção da biodiversidade (SisGen No. A451DE4).

Figura 10 - Raízes de *Fridericia platyphylla*.



Fonte: Autora (2023).

As raízes foram secas a 50 °C em estufa por 72 h e trituradas em moinho de facas. Uma quantidade fixa do pó foi intumescida com solvente extrator (1,5 L) etanol/água (7:3) por meio de percolação exaustiva durante 2 semanas com adição de solvente extrator no decorrer do processo de extração. O efluente foi coletado na vazão de 2-4 gotas/min/Kg. Foram utilizados um volume total de 3,6 L de solvente durante a percolação. Após a extração, o líquido extrator foi evaporado em evaporador rotativo sob pressão reduzida (Quimis – Q344B) equipado com bomba à vácuo (Prismatec 131 2VC), em temperatura inferior a 40 °C. O extrato foi transferido para

frascos de vidros e, posteriormente, a concentração do extrato foi realizada em liofilizador (Liotop K105) para completa remoção do solvente.

3.2 Partição Líquido/Líquido

Realizou-se a partição líquido/líquido do extrato hidroetanólico 70% com diclorometano. Inicialmente o extrato (34,8 g) foi dissolvido em 600 mL de água/metanol (8:2) e transferido para funil de separação de capacidade de 2L, em seguida o diclorometano foi adicionado ao funil, e o volume de 250 mL de diclorometano foram utilizados durante 3 coletas. A fase diclorometânica foi concentrada em evaporador rotativo e a fase aquosa foi liofilizada.

O preparo do extrato para análise cromatográfica foi realizado utilizando cartuchos de extração em fase sólida (SPE) de fase reversa constituído de octadecilsilano C₁₈ com 500 mg/mL (Supelco). Foi realizada a previa ativação do cartucho com 5 mL de MeOH, e equilibrado com 5 mL MeOH:H₂O (9:1, v/v), a eluição das substâncias ocorreu utilizando MeOH:H₂O (9:1, v/v), a solução resultante foi seca. O extrato seco obtido e as frações aquosa e DCM foram diluídas para 10 mg/mL em solvente grau CLAE e filtradas em membranas de PES (Kasvi) com poros de 0,22 µm.

3.3 Análises por CLAE/UV-vis

As análises cromatográficas foram realizadas em equipamento modelo Shimadzu (Shimadzu Corp. Quioto, Japão), constituído por um módulo de bombas binário, detector UV-vis. A coluna utilizada foi de fase reversa C18, modelo Luna (150 µm x 4,6 µm) com partículas de tamanho médio 5µm. Os solventes de eluição utilizados foram A (água e ácido fórmico a 0,01%) e B (metanol e ácido fórmico a 0,01%). O volume de injeção das amostras foram 10 µL com fluxo de 1 mL/min, e detecção a 254 nm. As amostras foram eluídas no modo gradiente: 70% a 100 % de B em 35 min.

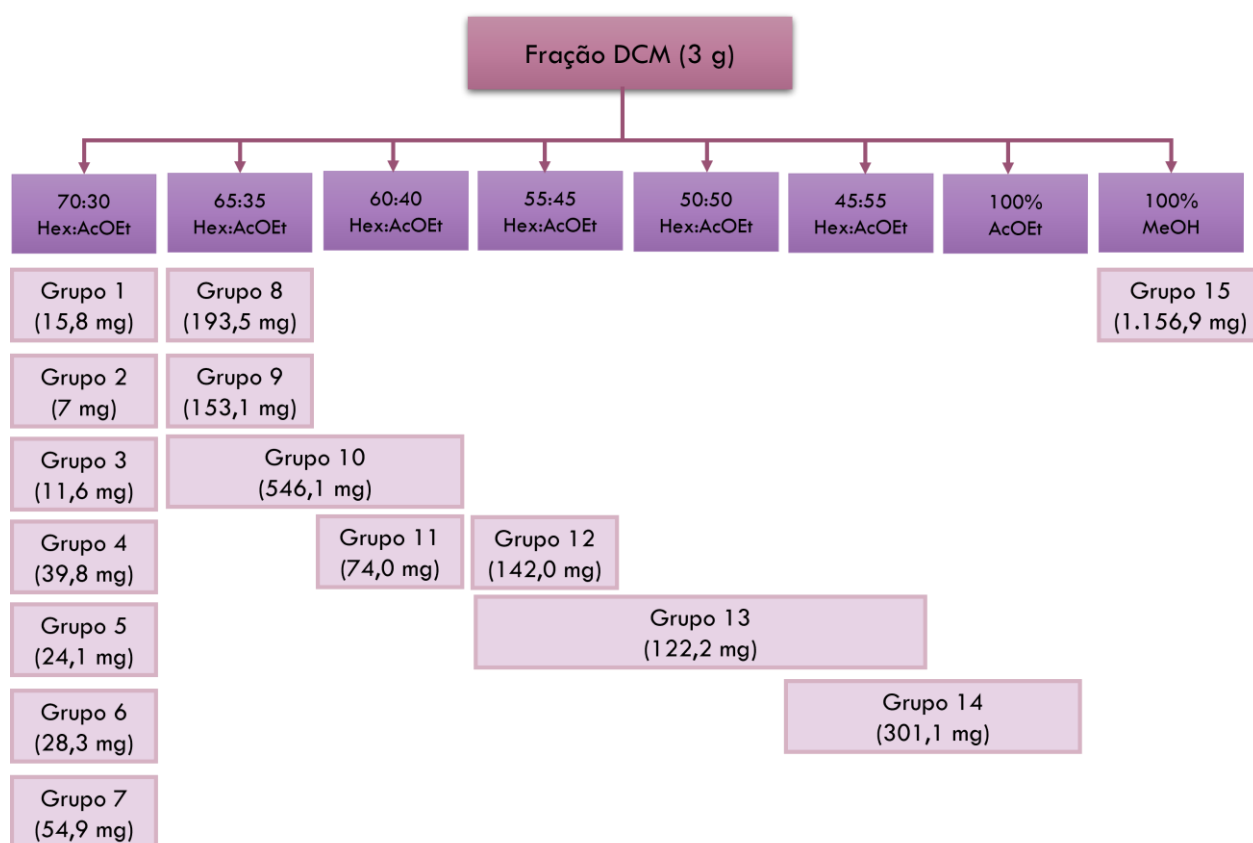
3.4 Reisolamento das brachydinas

Para a obtenção dos padrões das substâncias presentes na fração apolar foi realizado pela primeira vez o reisolamento utilizando cromatografia de fase normal, a qual adotou-se a seguinte metodologia.

Utilizou-se uma coluna de vidro de 60 cm de altura por 4,5 cm de diâmetro, recheada com 169 g de sílica gel 60 (0,063 - 0,200 mm Merk) na qual foi empacotada com Hexano: acetato de etila (70:30). Em seguida ocorreu à injeção da amostra no topo da coluna, a eluição da fase móvel foi realizada na forma de gradiente crescente de polaridade utilizando misturas de hexano, acetato de etila e metanol. Iniciou-se com 70% de hexano aumentando a polaridade da coluna com acetato de etila na proporção de 5% em 5% e posteriormente utilizou-se 100% de MeOH (Figura 4). Foram recolhidas 184 frações de 30 mL que foram evaporadas no rotaevaporador e reunidas segundo o resultado das análises realizadas por cromatografia em camada delgada. Foram utilizadas placas de camada delgadas de sílica gel em suporte de alumínio (60 F para TLC₂₅₄, Merk), recortadas no tamanho de 5x10 cm, a eluição foi realizada em cuba cromatográfica saturada com fase móvel hexano e acetato de etila (70:30; 55:45; 40:60). A revelação das placas foi realizada com luz UV (câmara com luz UV 254/356 nm) e anisaldeído/H₂SO₄ com posterior aquecimento em chapa aquecedora (SolidSteel).

A fração diclorometânica foi submetida ao fracionamento via cromatografia em coluna de acordo com a Figura 11.

Figura 11 - Fluxograma representando o isolamento por cromatografia da Fração DCM.



Fonte: Autora (2023).

Ao final da análise por CCD as frações coletadas foram agrupadas em 15 grupos de acordo com a semelhança de perfil. As respectivas massas das amostras estão apresentadas em miligramas.

Os grupos foram analisados em CLAE/UV-vis no modo gradiente: 70% a 100 % de B em 35 min.

3.5 Identificação das substâncias

Os grupos 10, 12 e 13 durante a análise por CLAE/UV-vis mostraram estar puros, estes foram solubilizados em solventes compatíveis e submetidos a análises espectroscópica.

As análises em espectrômetro de massas foram realizadas utilizando metanol (Merck) grau LC/MS, em equipamento (Thermo Scientific) equipado com um dispositivo de inserção direta da amostra via análise por injeção em fluxo (FIA). As amostras foram analisadas por ionização eletrospray (ESI), e a fragmentação foi realizada em múltiplos estágios (MS^2 , MS^3 e MS^n) em analisador do tipo íon trap (IT).

O modo positivo foi selecionado para a geração e análise dos espectros de massa para primeira ordem (MS) e para os demais experimentos em múltiplos estágios nas seguintes condições: tensão capilar, 25 V; Voltagem spray, 5 kV; e temperatura capilar, 275 °C. O gás de arraste utilizado foi nitrogênio (N₂) com um fluxo de 8 unidades arbitrárias (A.U.), e gás de colisão hélio (He). A aquisição da faixa foi *m/z* 100-2000. O software Xcalibur versão 1.3 (Thermo Finnigan, Waltham, MA) foi usado para aquisição e processamento dos dados.

Os dados espectroscópicos de RMN foram registrados em espectrômetro Varian Inova 500 MHz (Varian, Palo Alto, CA, EUA). Os desvios químicos são referidos em partes por milhão (δ) usando o sinal residual, CD₃OD (Aldrich) sinais (δ_H 3.34; δ_C 49,86) como padrões internos para RMN ¹H e ¹³C, e as constantes de acoplamento (J) são relatados em Hz.

3.6 Quantificação das substâncias

A quantificação das bradyquinas foi realizada através de metodologia validada, três curvas de calibração externas foram construídas nas concentrações: 500 ng/mL, 250 ng/mL, 125 ng/mL, 63 ng/mL, 31 ng/mL. O extrato hidroetanólico (HE) e fração diclorometânica (FDCM) metanol a 100% e alíquotas das amostras na concentração de 10 µg/mL foram analisadas em sistema UHPLC Acquity UPLC (Waters, Milford, MA, EUA) com analisador triplo quadrupolo, fonte de ionização eletrospray (ESI), equipado com uma coluna Waters UPLC BEH C18 (50 mm × 2,1 mm, 1,7 µm). O sistema de solventes consistiu em água (A) e acetonitrila (B) acidificados com ácido fórmico 0,1%. A eluição foi efetuada em modo gradiente a 40 °C (caudal de 400 µL/min): 5 a 60% B em 4,2 min, 60 a 70% B em 1,3 min, 70 a 100% B em 1,5 min, mantendo B a 100% durante 1 min e, por fim, um recondicionamento com 5% B durante min. O volume de injeção foi de 5 µL. As análises quantitativas foram efetuadas no modo de monitorização de reações múltiplas (MRM).

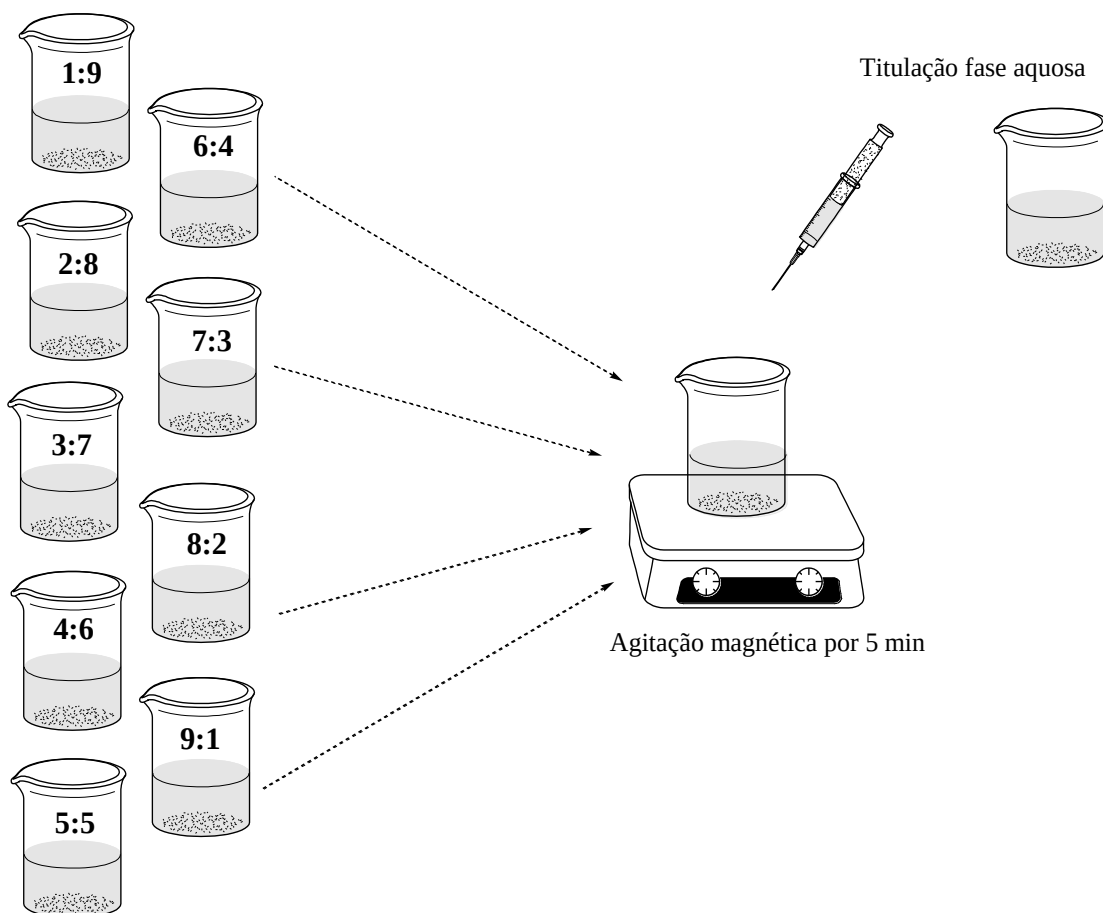
3.7 Construção do diagrama pseudoternário

O diagrama de fase pseudoternário foi construído utilizando como fase oleosa miristato de isopropila, os tensoativos Tween 80 e transcutool P na proporção de 1:1 e como fase aquosa a água destilada. As dispersões foram preparadas com diferentes

proporções óleo/tensoativo, seguindo a razão 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2 e 9:1, utilizando o método de titulação com água. Para a obtenção das dispersões manteve-se óleo/tensoativos sob agitação mecânica por 5 minutos e após a adição de água 10 minutos de agitação. As formulações obtidas foram caracterizadas visualmente em diferentes sistemas de acordo com o comportamento das fases, sendo classificadas em: separação de fases (SP), emulsão líquido opaca (ELO), emulsão branco leitosa (EBL), emulsão branco fluida (EBF) e microemulsão (ME). Após a preparação e caracterização de todas as formulações, o diagrama foi construído. Os resultados da classificação dos sistemas foram transferidos para o programa Triplot® onde foram obtidos os modelos gráficos dos diagramas pseudoternários (Silva et al., 2009). O estudo de desenvolvimento e incorporação da fração foi realizado no Laboratório de Dermofarmacia (LADERMO) da Universidade Federal do Piauí.

Figura 12 - Desenvolvimento do diagrama pseudoternário.

Proporção de tensoativo:miristato de isopropila



Fonte: Autora (2023).

3.8 Seleção da formulação e incorporação da fração DCM

Através da região de ME encontrada no DFPT, foi selecionada formulação para a incorporação da fração DCM e realização dos estudos de caracterização da ME. O preparo da microemulsão consistiu na pesagem dos constituintes da microemulsão, miristato, Tween 80, transcutool e água destilada. A princípio o Tween, transcutool e miristato foram adicionados e mantidos sobre agitação em temperatura ambiente por 5 min, em seguida a fração foi adicionada aos poucos e mantida sobre agitação até a completa incorporação, duas proporções de fração DCM 3 e 5% (p/p) foram incorporadas a formulação. A fase aquosa foi adicionada vagarosamente e mantida sobre agitação magnética durante 30 min, a fim de garantir a completa solubilização da amostra.

3.9 Análise da fração e microemulsões com e sem fração DCM por CLAE

Foram preparadas soluções concentradas de microemulsão com e sem fração DCM a 25 mg. mL⁻¹. Em seguida, as soluções foram filtradas em um filtro de membrana Millipore de 0,22 µm e analisadas por CLAE. Alíquotas de 5 µL foram injetadas no sistema CLAE/UV com detecção a 254 nm, coluna Luna 5µm C18 100 A (150 µm x 4,6 µm). Os solventes de eluição utilizados foram A (água e ácido fórmico a 0,01%) e B (metanol e ácido fórmico a 0,01%). As amostras foram eluídas em modo gradiente: 70% a 100 % de B em 35 min com fluxo de 1mL/min. Todas as análises foram realizadas em duplicata

3.10 Caracterização físico-química

3.10.1 Tamanho da partícula, potencial zeta e índice de polidispersão

A análise foi realizada através da técnica de espalhamento de luz dinâmico em equipamento Zetatrac® (Microtrac). A temperatura do sistema foi mantida a 25 °C e o diâmetro das gotículas (nm) e índice de polidispersão foram calculados. A medição do potencial zeta foi realizado por meio da mobilidade eletroforética da partícula dispersa em um campo elétrico. Alíquotas das amostras com volume de 100 µL foram diluídas em 1,5 mL de água milliQ, homogeneizada até a completa dispersão e submetidos à análise, utilizou-se a média±desvio padrão das amostras em triplicata

(Figueiredo, 2016). A caracterização foi realizada no Laboratório de Dermofarmacia (LADERMO) da Universidade Federal do Piauí.

3.10.2 pH

O pH das microemulsões foi aferido diretamente nas amostras utilizando potenciômetro digital (Bel Phs 3Bw) com eletrodo de vidro e sensor de temperatura previamente calibrado com soluções tampão a pH 4,0 e 7,0. As análises foram realizadas em triplicata (Dong et al., 2016).

3.10.3 Índice de refração

Utilizou-se um refratômetro (Abbe - Optronic) aferido com água deionizada (IR= 1,34), a temperatura de $25 \pm 0,5$ °C e as medições foram realizadas em triplicata (Dong et al., 2016).

3.10.4 Densidade relativa

A densidade relativa das microemulsões foi determinada pela razão da massa das amostras pela massa de igual volume de água a temperatura de 20 °C. Utilizou-se um picnômetro de vidro de 3 mL, limpo, seco e com seu peso registrado. As microemulsões foram transferidas para o picnômetro e seu peso registrado. A densidade relativa (dt) foi determinada através da diferença de massa do picnômetro cheio e vazio. Após a determinação da densidade relativa, foi calculada a densidade de massa (ρ_t) através da fórmula a seguir expressa em g/mL ou kg/L (ANVISA, 2010).

$$\rho_t = d_{\text{água}} \times dt + 0,0012$$

3.10.5 Resistência a centrifugação

As microemulsões ME e ME3 foram submetidas à centrifugação durante 30 min a 3000 rpm à temperatura ambiente em centrífuga (CENTRIBIO 80-2B). Em seguida, foi observada a ocorrência ou não de separação de fases ou de qualquer indício de instabilidade das amostras (Figueiredo, 2016).

3.10.6 Estresse térmico

As microemulsões (ME e ME3) foram submetidas ao estudo de estresse térmico, alíquotas de 4 mL foram mantidas em tubos de ensaio e submetidas ao aumento de temperatura na faixa de 40 a 80 °C, a temperatura foi elevada a 10°C a cada 30 minutos em banho termostático (QUIMIS Q344B2). As microemulsões foram avaliadas ao término de 30 minutos de cada temperatura após as formulações retornarem a temperatura ambiente. As amostras foram classificadas como levemente modificadas (LM), modificada (M), sem alteração (SA), e separação de fases (SF) (Baby et al., 2008).

3.10.7 Estudo preliminar de estabilidade

O teste envolveu ciclo de congelamento em refrigerador por 24 h a -5 ± 2 °C e descongelamento em estufa por 24 h a 50 ± 2 °C completando um ciclo. Ao final de 12 dias (6 ciclos), as formulações foram analisadas após a temperatura retornar à temperatura ambiente (25 °C). As características organolépticas, pH, e teor da fração foram os parâmetros analisados estatisticamente no início e ao final do estudo (Baby et al., 2008).

3.10.8 Estabilidade acelerada

As microemulsões ME e ME3 foram submetidas ao estudo de estabilidade acelerada, que consistiu no armazenamento das amostras em temperatura ambiente por um período de 30 dias. As amostras foram avaliadas no 1° e 30° dia após o preparo. Foram analisadas pH e concentração do marcador (Brasil, 2004; Pereira, 2008).

3.10.9 Reologia

As microemulsões foram analisadas em ensaios de fluxo e oscilação. O equipamento utilizado foi reômetro (MARS II, Haake Thermo Fisher Scientific Inc., Germany) de tensão controlada com placas cônicas de aço paralelas (C35/2° Ti) de 35 mm de diâmetro e separadas por uma distância fixa: 0,105 mm. As amostras foram mantidas inicialmente em equilíbrio durante um minuto e as análises de curvas foram obtidas em modo de fluxo com taxas de cisalhamento de 0 a 500 s⁻¹ e de 500 a 0 s⁻¹

(curvas ascendentes e descendentes). A curva ascendente foi medida a cada 150 s e depois diminuiu-se ao longo de 150 s. Todas as análises foram efetuadas a 25 °C. A análise foi realizada no Laboratório de Física da Universidade Estadual de Maringá.

3.11 Determinação da solubilidade de FDCM em meio tampão

O tampão tris (tris(hidroximetil)aminometano pH 7.4) foi preparado a partir da adição de 1,5 mL de HCl em solução de tampão. Em seguida colocou-se um excesso de fração DCM (5mg) em tubo de ensaio contendo 5 mL do tampão e a associação destes com etanol (10% EtOH), laurilsulfato de sódio (1% LSS) ou Tween 80 (1%). Cada tubo foi agitado a 100 rpm durante 72 h a 37 ± 2 °C. Posteriormente, centrifugou-se por 30 min a 3000 rpm. Filtrou-se a amostra, e em seguida, alíquotas de 4 mL do filtrado foram transferidos para cubetas. Foram realizadas varreduras espectrofotométricas em UV entre 400 e 200 nm de forma a detectar possíveis interferências espectrofotométricas no comprimento de onda utilizado.

3.12 Ensaio de liberação da fração DCM em microemulsão

O estudo de liberação da microemulsão estudada foi realizada em células de difusão de vidro do tipo “Franz” em equipamento Phoenix RDS Robotic Diffusion Statio. No compartimento doador sob a membrana de dialise (12.00 a 14.000 daltons) foram postos 400 mg de ME3 e solução de fração DCM e no compartimento receptor 10 mL do tampão Tris (50 mM; pH 7,4, 10% EtOH e 1% Tween). Foram realizadas coletas de 1 mL do meio receptor a cada 1 hora e a imediata reposição deste volume de tampão Tris por um período de 6 horas. A solução receptora foi mantida sob agitação magnética a 400 rpm e as amostras coletadas de forma automática (pontos de coleta: 1, 2, 3, 4, 5 e 6 horas) foram analisadas por espectroscopia por UV-VIS para a determinação do perfil de liberação. Um gráfico de porcentagem acumulada da fração liberada foi plotado versus o tempo. O perfil cinético de liberação envolvido foi investigado mediante aplicação de modelos matemáticos específicos tais como:

$$\text{Modelo de Ordem Zero: } Q = k_0 \cdot t + Q_0$$

$$\text{Modelo de Primeira Ordem: } Q = Q_1 \cdot e^{kt}$$

$$\text{Modelo de Higuchi: } Q = kH \cdot t^{1/2}$$

Modelo Korsmeyer–Peppas: $Q = kKP \cdot t^n$

Em que Q representa o fármaco cumulativo libertado num determinado momento t e Q_0 é a quantidade inicial do fármaco. As constantes k_0 , k_1 , k_H e kKP são as constantes de libertação definidas nos diferentes modelos. O parâmetro n é um expoente de difusão no modelo de Korsmeyers-Peppas.

3.13 Citotoxicidade em modelos *in vivo* alternativo

Para avaliar o grau de toxicidade que a fração e microemulsão poderiam causar foi utilizado o modelo experimental *in vivo* em larvas de *Tenebrio molitor*. As larvas foram adquiridas de um fornecedor comercial e acondicionadas em recipiente de vidro mantidas ao abrigo de luz a temperatura ambiente. Estes indivíduos foram alimentados *ad libitum* com ração composta por farelo de trigo, milho e aveia.

As larvas foram separadas e submetidas a assepsia, priorizando o mesmo tamanho, peso e estágio. Em seguida, foram colocadas 10 larvas com aproximadamente 100-200 mg em placas, postas sobre gelo para que as larvas ficassem em estágio de hibernação facilitando a manipulação destas. Com auxílio de seringas e agulhas descartáveis, 10µL de fração DCM em meio DMSO, microemulsão com DCM nas concentrações (1-100 µg/mL) e controles (DMSO e trauma) foram injetadas no terceiro anel das larvas. Posteriormente, as placas contendo as larvas foram armazenadas em temperatura ambiente sendo observadas a cada 24h durante 7 dias. A viabilidade das larvas foi avaliada pela ausência de movimento durante o teste (Figura 13).

Figura 13 - Estudo da toxicidade em larvas do *Tenebrio* com (A) fração DCM e (B) ME3, após 7 dias.



Fonte: Autora, 2023.

3.14 Docagem Molecular

A fração apolar do extrato hidroetanólico das raízes de *Fridericia platyphylla* que foi utilizada no desenvolvimento da formulação é rica em flavonoides diméricos agliconas, denominados de brachydinas, estas tem sido reportada na literatura com promissoras atividades anticancerígenas. Objetivando, portanto, a aplicação biofarmacológica da formulação desenvolvida, buscou-se compreender os mecanismos envolvidos nas interações das brachydinas com sítios alvos específicos por meio da docagem molecular.

O serviço Web TargetHunter (Wang, 2013) (https://www.cbligand.org/TargetHunter/search_target.php) foi utilizado para identificar o alvo específico de elevada afinidade com as brachydinas. Esta poderosa ferramenta utiliza o conjunto de dados ChemBL, descritores moleculares e a base de dados PDB através do algoritmo TAMOSIC para localizar eficientemente o alvo com base nos ligantes. No nosso estudo, concentramo-nos em identificar a p38- α MAP quinase (Over, 2013) como o alvo associado aos ligantes (brachydinas).

A ligação dos ligantes foi efetuada pelo software Autodock vina 1.2.3. (<https://vina.scripps.edu/>) (Trott, 2010). As execuções de acoplamento foram efetuadas com as definições predefinidas e a grelha de coordenadas (12 Å) direcionada para Leu69. As poses de acoplamento de brachydinas foram

determinadas de acordo com a função de aptidão de pontuação e a inspeção visual das poses (Fischer, 2021).

3.15 Análise estatística

A análise estatística dos dados foi efetuada através da análise de variância ANOVA one-way, em que os resultados foram considerados significativos quando a probabilidade foi inferior a 5% ($p < 0,05$, intervalo de confiança de 95%). O estudo de estabilidade foi submetido ao teste t de Student para avaliar possíveis diferenças estatísticas. Os resultados do estudo de liberação da fração DCM foram analisados por ANOVA, seguido do teste de Bonferroni, com significância estatística de $p \leq 0,001$ e $p \leq 0,0001$ entre os tempos de 2,3,4,5 e 6 horas. A avaliação estatística dos resultados foi feita com o software GraphPad Prism versão 6 e OriginLab®.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Obtenção do extrato das raízes de *Fridericia platyphylla* por percolação

O método de extração por percolação utilizou como solvente extrator EtOH:H₂O (7:3, v/v), essa metodologia foi empregada conforme Farmacopeia brasileira (Brasil, 2011), estando também de acordo com os estudos de Rocha (2017 e 2014), pioneira no estudo com essa espécie vegetal.

O rendimento obtido do extrato hidroetanólico 70% nesse trabalho é apresentado na Tabela 2.

Tabela 2 - Massa do extrato etanol 70% e rendimento obtidos da percolação das raízes *Fridericia platyphylla*.

Espécie	Massa (g) / Rendimento (%)
<i>Fridericia platyphylla</i> (200g)	34,8g (17,4%)

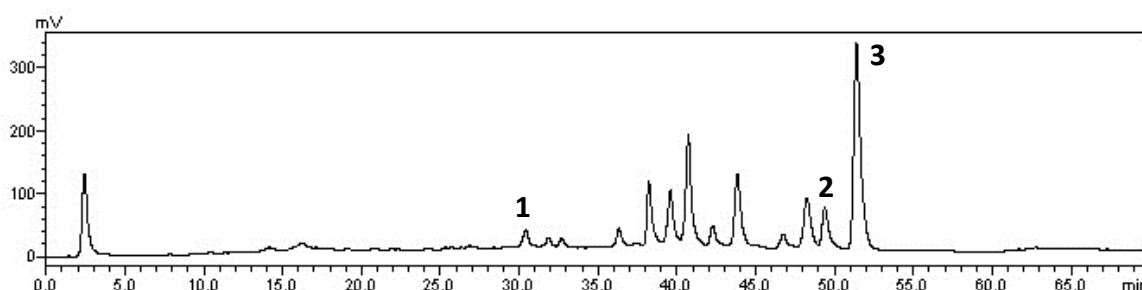
Fonte: Autora, 2023.

4.2 Análise do extrato hidroetanólico por CLAE/UV

A análise do extrato hidroetanólico 70% proveniente das raízes de *Fridericia platyphylla* foi realizada em CLAE/UV-vis utilizando coluna de fase reversa (C18) e sistema eluente água/metanol acidificados (0,01 % de ácido fórmico), a fim de verificar a natureza das substâncias presentes para posterior isolamento.

A Figura 14 apresenta o cromatograma do extrato e relewa presença das principais substâncias que absorvem no comprimento de onda monitorado de 254 nm.

Figura 14 - Perfil cromatográfico em CLAE/UV-vis do extrato etanol 70% das raízes de *Fridericia platyphylla* a 254 nm com destaque para os picos das brachydinas.



Fonte: Autora (2023).

4.3 Extração líquido/líquido

Realizou-se a partição líquido/líquido do extrato hidroetanólico 70% utilizando diclorometano como solvente extrator a fim de extrair as substâncias menos polares. Após a secagem de cada fração foi obtido as massas e rendimentos, conforme é apresentado na Tabela 3.

Tabela 3 - Massas da fração diclorometano e aquosa e rendimentos na partição líquido/líquido.

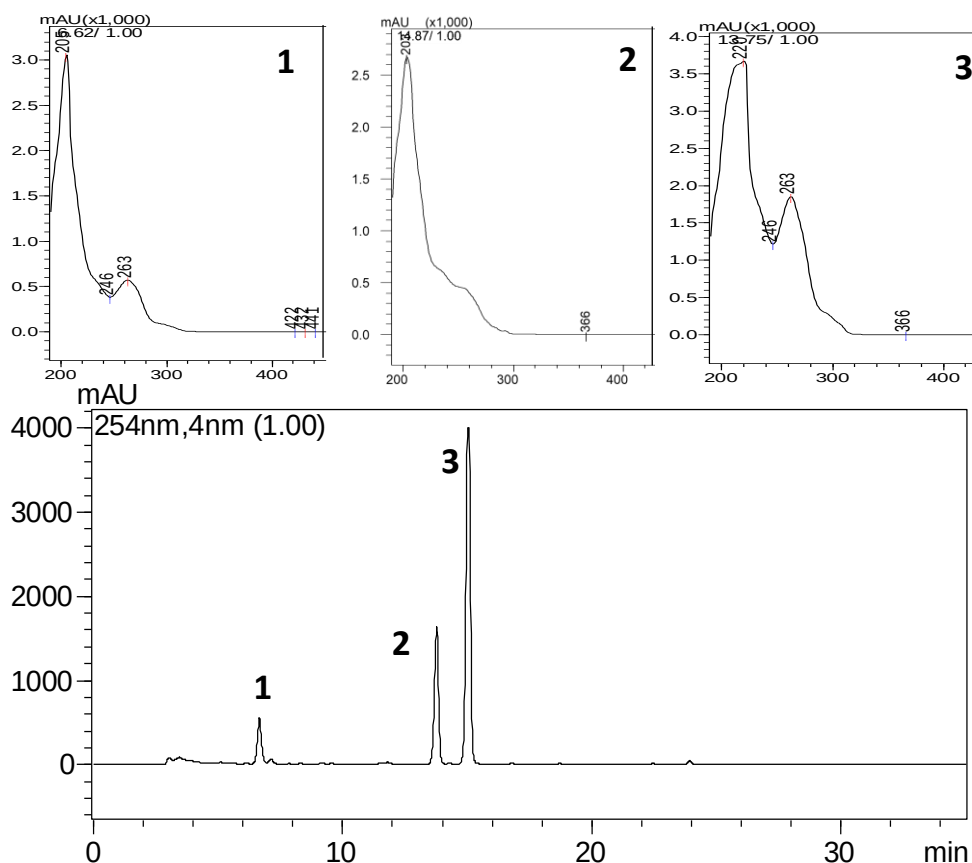
Fração	Massa (g)/Rendimento (%)
Diclorometano	4g / 11,72%
Hidrometanólica	26,1g / 76,48%

Fonte: Autora, 2023.

4.4 Análise da fração diclorometânica

O perfil cromatográfico por CLAE/PDA da fração diclorometano foi obtido no comprimento de onda de 254 nm. A figura 15 mostra que a fração DCM é constituída de 3 (três) picos principais de substâncias com espectro de UV semelhante, sugerindo que essas substâncias apresentam grupos cromóforos idênticos, as semelhanças espectrais revelam a presença de compostos fenólicos da classe dos flavonoides. Segundo a literatura os flavonoides absorvem no UV-visível com máximos de absorção (λ_{max}) entre 340 e 370 nm, devido a presença das ligações duplas dos anéis aromáticos (Markham, 1982, Arapitsas, 2008).

Figura 15 - Perfil cromatográfico da fração diclorometânica do extrato hidroetanólico das raízes de *Fridericia platyphylla* ($\lambda = 254$ nm) e espectros do UV.



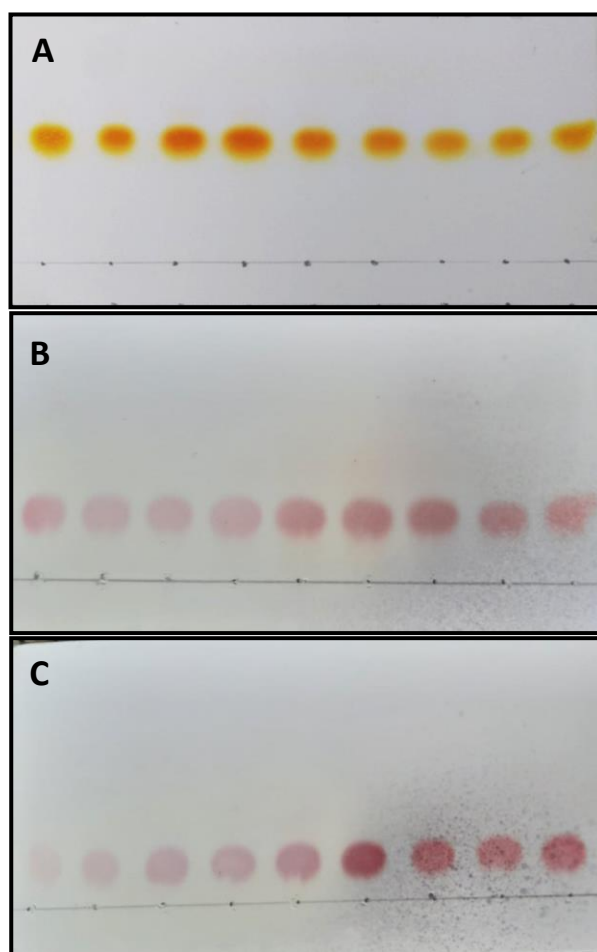
Fonte: Autora (2023).

4.5 Isolamento das substâncias da fração DCM

A fração diclorometânica foi purificada por cromatografia líquida de fase normal (método clássico), utilizando eluição gradiente com hexano/acetato de etila com polaridade crescente, seguido de metanol, conforme item 3.3 descrito na seção experimental.

A partir do plaqueamento das frações em CCD notou-se a presença de spots únicos nas placas cromatográficas, com diferentes fatores de retenção (RF), indicando moléculas com diferentes polaridades (Figura 16).

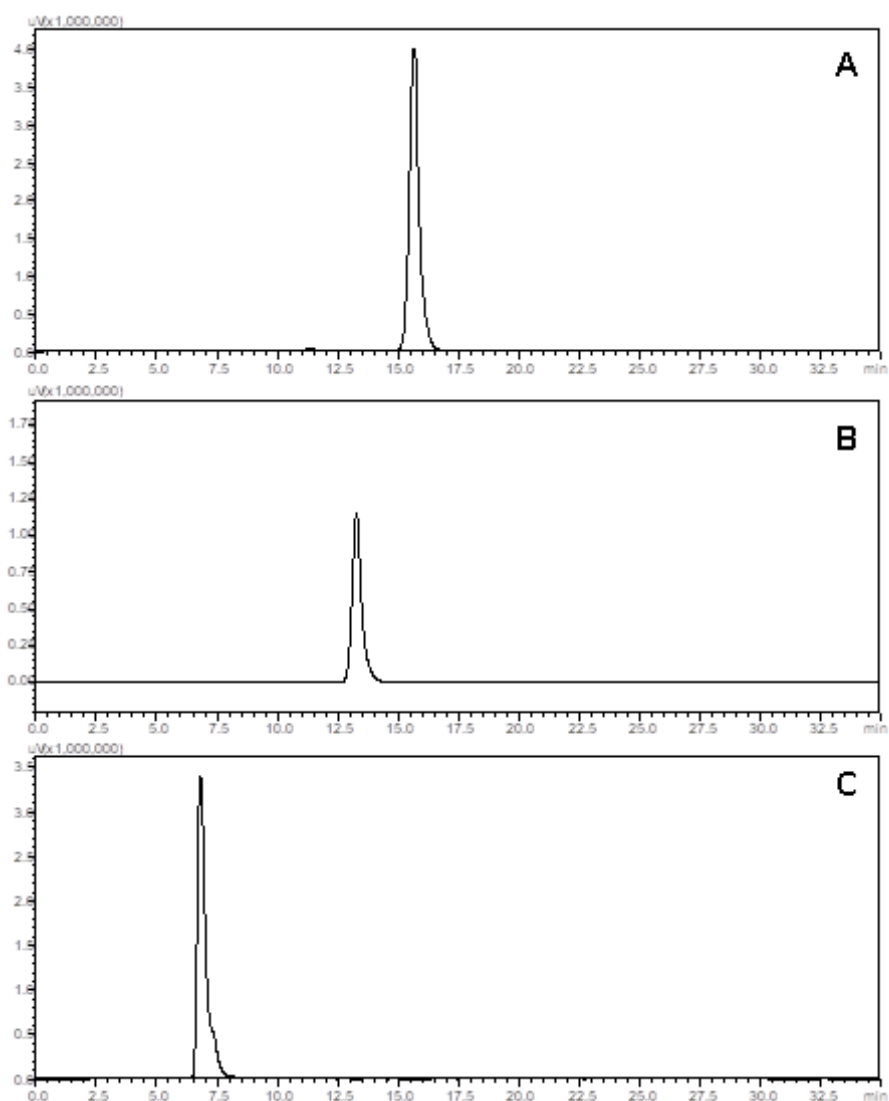
Figura 16 - Placas cromatográficas dos grupos 10, 12 e 13 em fase móvel hexano/acetato de etila (55/45) reveladas com anisaldeído.



Fonte: Autora (2023).

A partir das informações obtidas pelas placas realizou-se o agrupamento das frações de acordo com a semelhança de perfil. Os grupos 10, 12 e 13 mostraram-se puros, sólidos de coloração laranja, amarela e avermelhada, os quais foram lavados com acetona para uma melhor purificação. Todos os grupos foram analisados em CLAE-UV/vis. Os cromatogramas obtidos nesta etapa de separação são apresentados na Figura 17 (A, B e C).

Figura 17 - Cromatograma obtidos dos grupos 10, 12 e 13 no comprimento de onda de 254 nm em coluna de fase reversa (C18, Luna 150x4,6 μ m) no método cromatográfico 70 -100% de metanol em 35 min.



Fonte: Autora (2023).

As substâncias purificadas nesse procedimento foram denominadas substâncias **1** (546,1 mg), substância **2** (142,0 mg) e substância **3** (122,2 mg).

De acordo com os dados espectroscópicos de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e de ^{13}C , uni e bidimensional, e os dados de espectrometria de Massas de alta resolução (HRESI/MS), foram elucidadas estruturalmente as substâncias isoladas da fração diclorometânica.

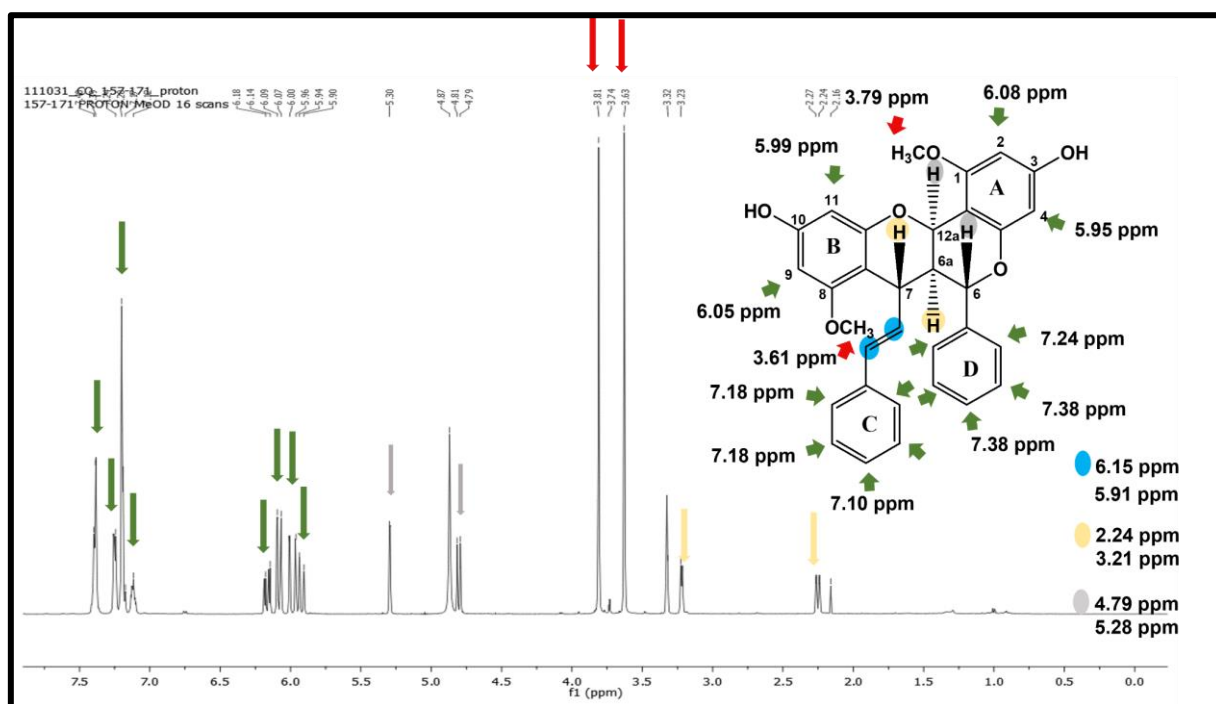
4.6 Identificação estrutural das substâncias isoladas da fração diclorometânica

4.6.1 Identificação estrutural da substância 1

A substância **1** (546,1 mg) foi obtida a partir do grupo 10 (elução hex:AcOEt 65:45, Figura 11), correspondente ao pico com $t_r = 15,7$ min (Figura 17A).

A análise da substância **1** (Figura 18, tabela 4), observou-se a presença de 14 hidrogênios ligados a anéis aromáticos, 2 etilênicos, 2 metílicos alifáticos e dois grupos metoxi que também foram confirmadas por HSQC. Os diferentes sinais aromáticos encontrados pertencem a quatro anéis independentes, denominados A, B, C e D.

Figura 18 - RMN de ^1H da substância 1.



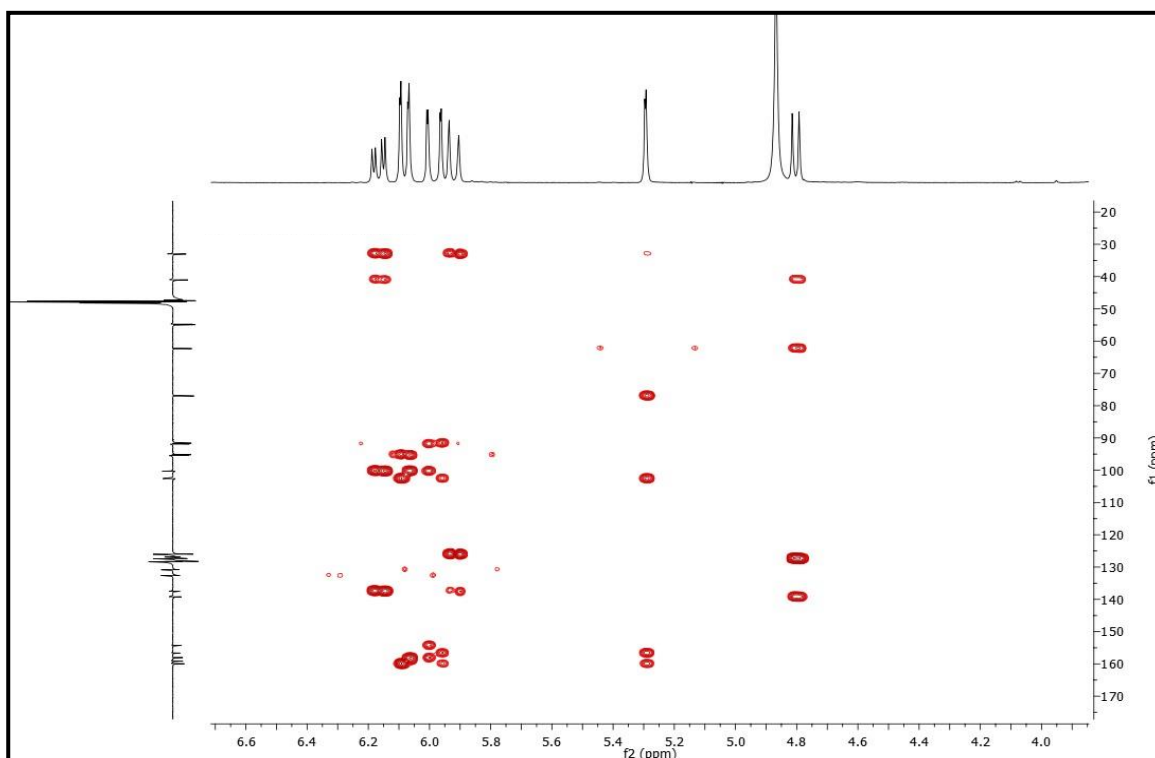
Fonte: Autora (2023).

Observou-se no espectro de RMN- ^1H sinais de um par de hidrogênio acoplado em meta com deslocamentos químicos em δ_{H} 6,08 e 5,95 ($J = 2,2$ Hz) a qual foi atribuído aos hidrogênios H-2 e H-4 no anel A. Para revelar as correlações a J^2 e J^3 dos hidrogênios e carbonos na molécula foi utilizado o mapa de contorno de HMBC (Figura 19), a qual pode-se observar as correlações estabelecida em CH_6 com os C-

6a, C-12a, C-2',6'; CH-12a com os C-6; C-12b, C-4a, C-1; $\text{CH-}\beta$ com os C-7, C-2'',6'' e C-1''; CH-4 com os C-2, C-12b, C-4a, C-3 (Figura 21). Os dados espectroscópicos também mostraram que este anel A, é constituído por três carbonos quaternários oxigenados (C-1, C-3 e C-4a δ_{C} 161,1, 161,1, 157,8) e um átomo de carbono adicional com hibridação sp^2 em C-12b a δ_{C} 103,8.

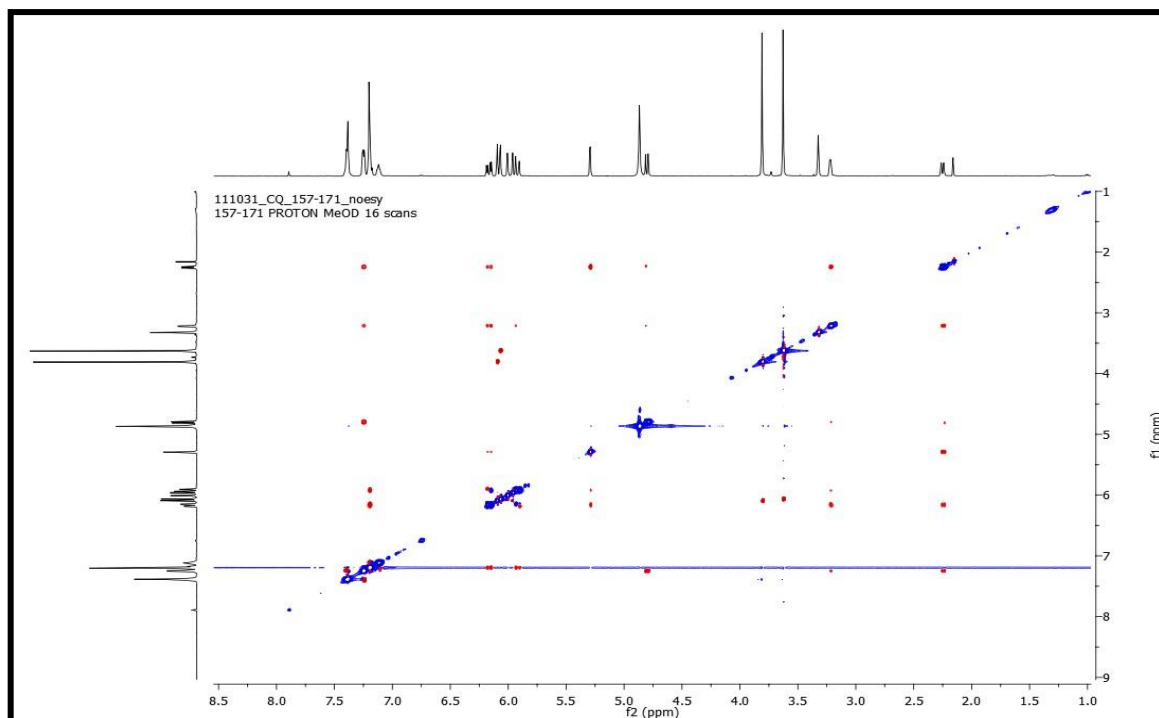
Da mesma forma que o anel A, o anel B apresenta um par de hidrogênios acoplados em meta δ_{H} 6,05 e 5,99 (J = 2,3 Hz) a qual foi atribuído aos hidrogênios H-9 e H-11, e foi substituído por três resíduos oxigenados e outros átomos de carbonos quaternários (C-8, C-10, C-11a e C-7a em δ_{C} 160,2, 159,2, 155,4 e 101,5). As correlações HMBC entre CH-11 com os C-9, C-7a, C-11a, C-10; CH-9 com os C-11, C-7a, C-8; $\text{CH-}\alpha$ com os C-7, C-6a, C-7a, C- β (Figura 21).

Figura 19 - Mapa de contorno HMBC da substância 1.



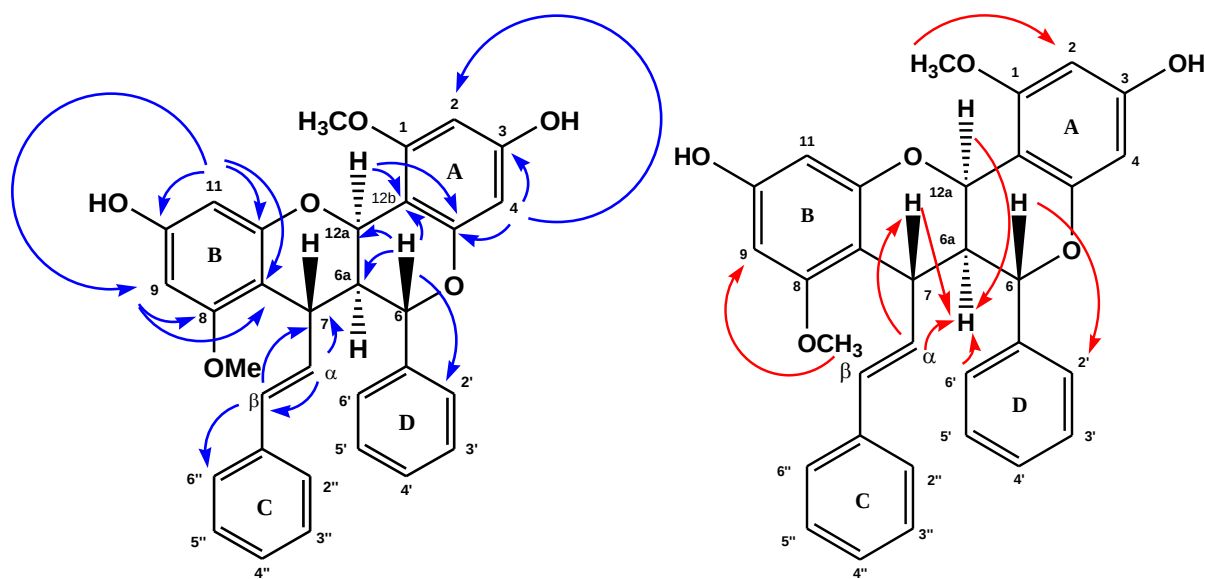
Fonte: Autora (2023).

Figura 20 - Espectro NOESY da substância 1.



Fonte: Autora (2023).

Figura 21 - Principais correlações no mapa de contorno HMBC e NOESY para a substância 1.

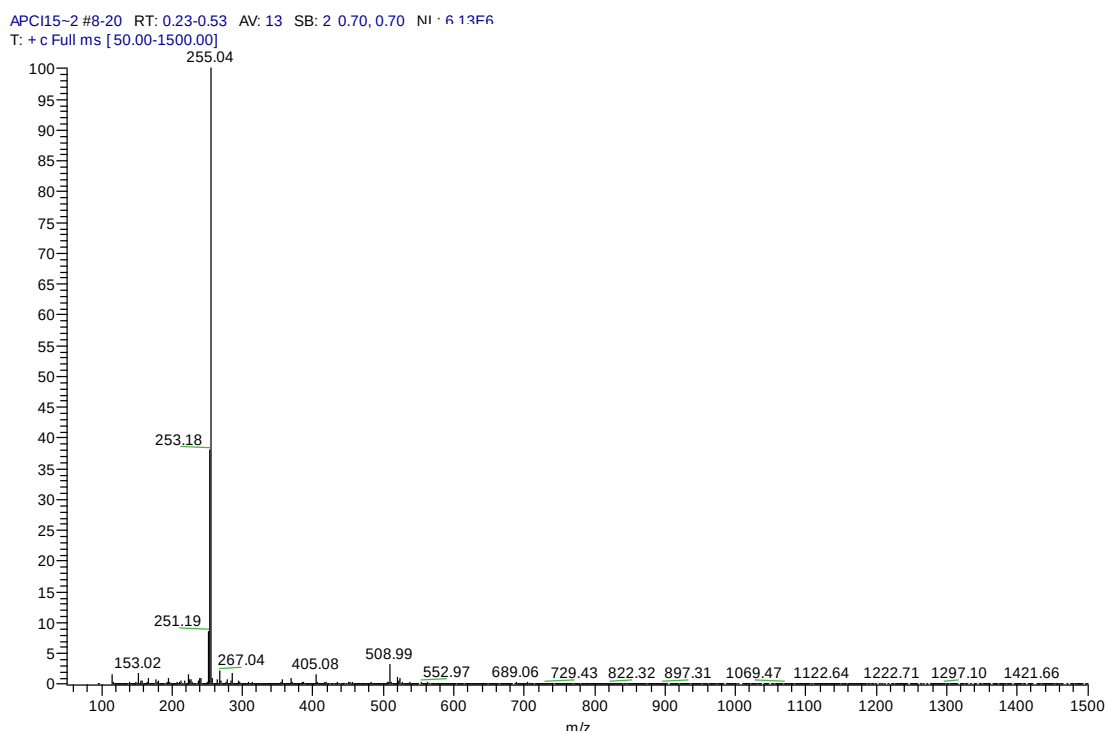


Fonte: Autora (2023).

Dois pares de hidrogênios acoplados em meta em δ_H 7,18 (H-2" e H-6") e (H-3" e H-5") foram designados para o anel C ao passo que os cinco prótons aromáticos restantes correspondem ao anel aromático D não substituído em δ_H 7,38 (H-3' e H-5'), 7,24 (H-2' e H-6'). Anel C não substituído em C-4" (δ_H 7,10) e em C-1" por uma ligação dupla *trans* (δ_H 6,15 e 5,91, $J = 15,7$ Hz). O anel D está diretamente ligado ao carbono C-6 (*g*HMBC entre H-2'/ H-6' e C-6). A posição dos dois grupos metoxilas a δ_H 3,79 e 3,61 foram designados por *g*HMBC, NOESY e correlações em C-1 (anel A) e C-8 (anel B).

O espectro de massas da substância **1** no modo positivo (Figura 22) registrou íon protonado $[M+H]^+$ m/z 508,99 e possibilitou obtenção do fragmento MS^2 de m/z 255,04 correspondendo a perda de m/z 253.

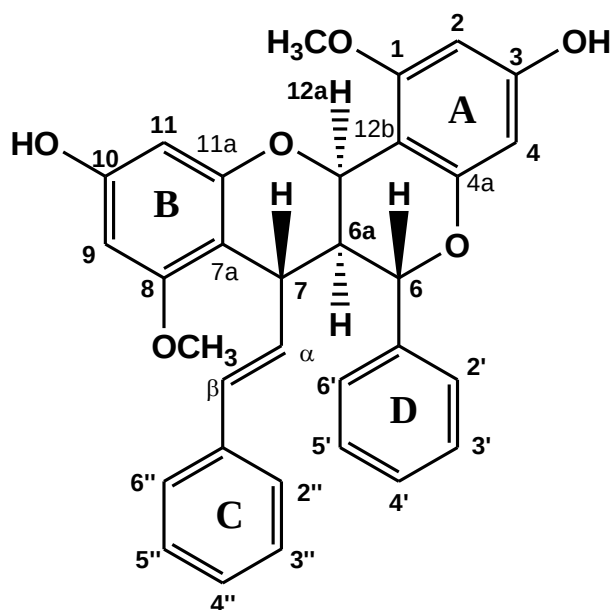
Figura 22 - Espectro de massa obtido da substância 1.



Fonte: Autora (2023).

A análise dos dados espectroscópicos e espectrométricos obtidos corroboram com Rocha et al. 2014, indicando, portanto, que a substância **1** isolada no presente trabalho trata-se da brachydina **3** (Figura 23) com a fórmula molecular $C_{32}H_{28}O_6$.

Figura 23 - Estrutura da brachydina 3.

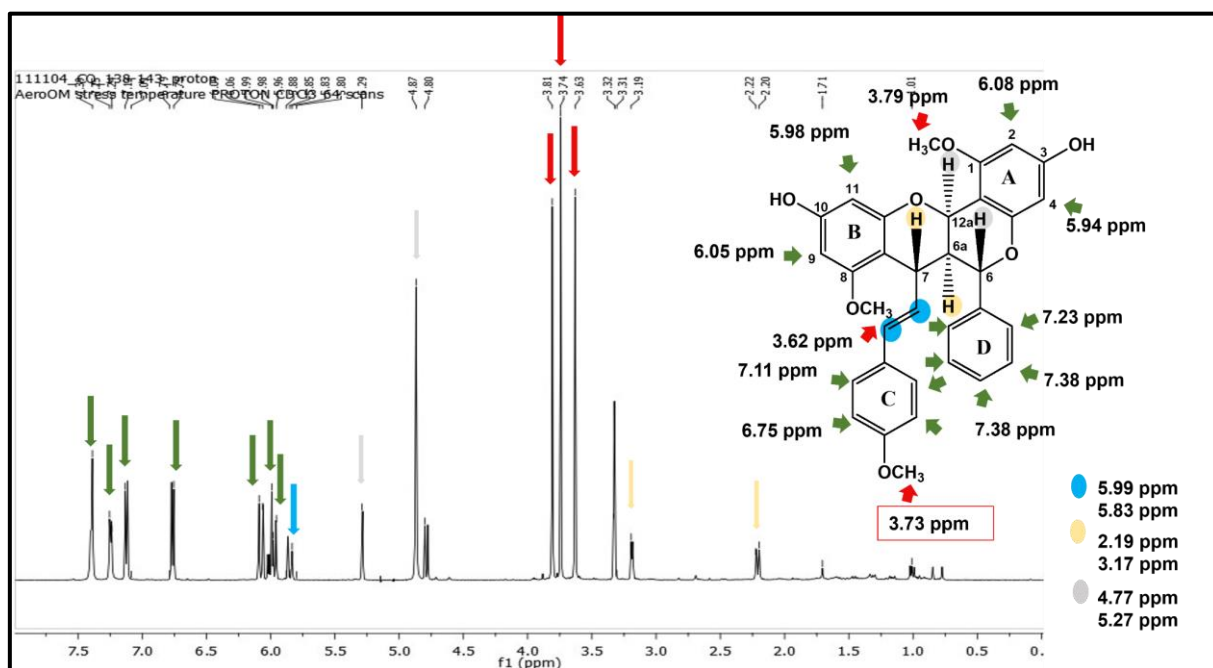


Fonte: Autora (2023).

4.6.2 Identificação estrutural da substância 2

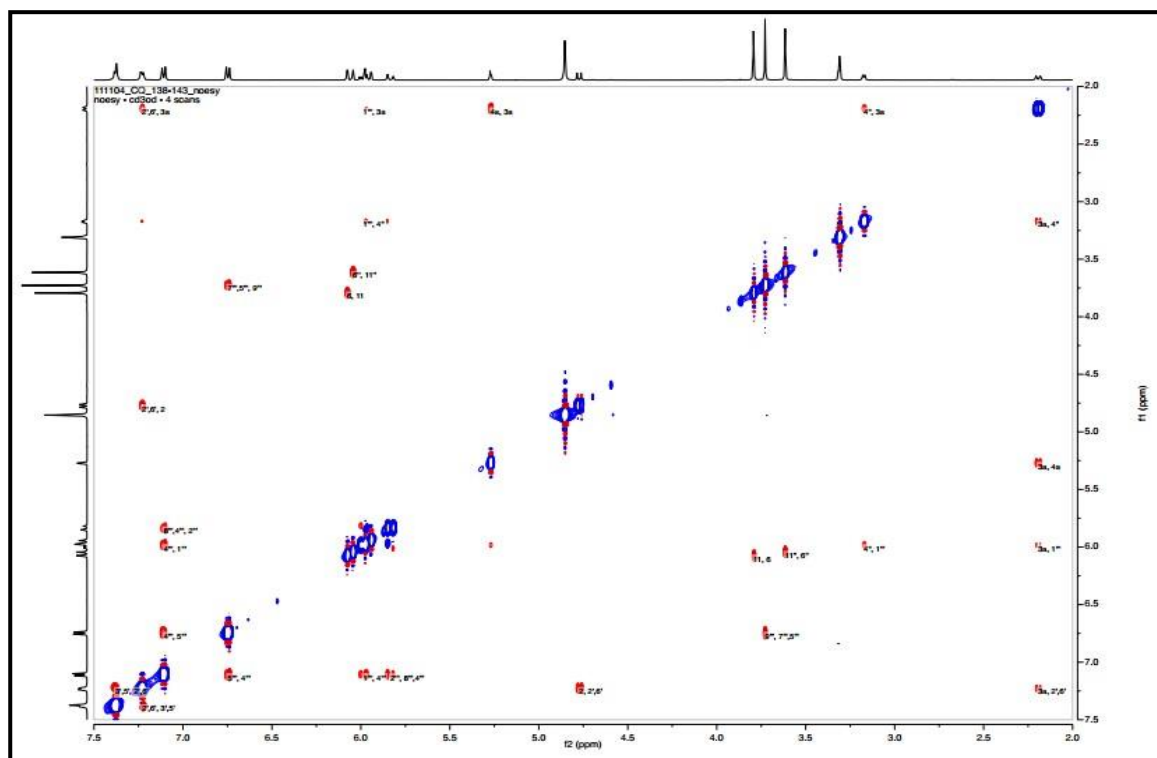
A substância **2** foi obtida a partir do grupo 12 (eluição hex:AcOEt 55:45, Figura 11), correspondente ao pico com $t_r = 13,2$ min (Figura 17B), com massa de 142,0 mg. Os espectros de RMN ^1H (Figura 24) apresentaram um padrão bastante semelhante à substância **1**, exceto o sinal para a metoxila OCH_3 (δ_{H} 3,73, s) localizada em C-4'' com base nos experimentos NOESY e HSQC (Figuras 25 e 26).

Figura 24 - Espectro de RMN- ^1H da substância 2.



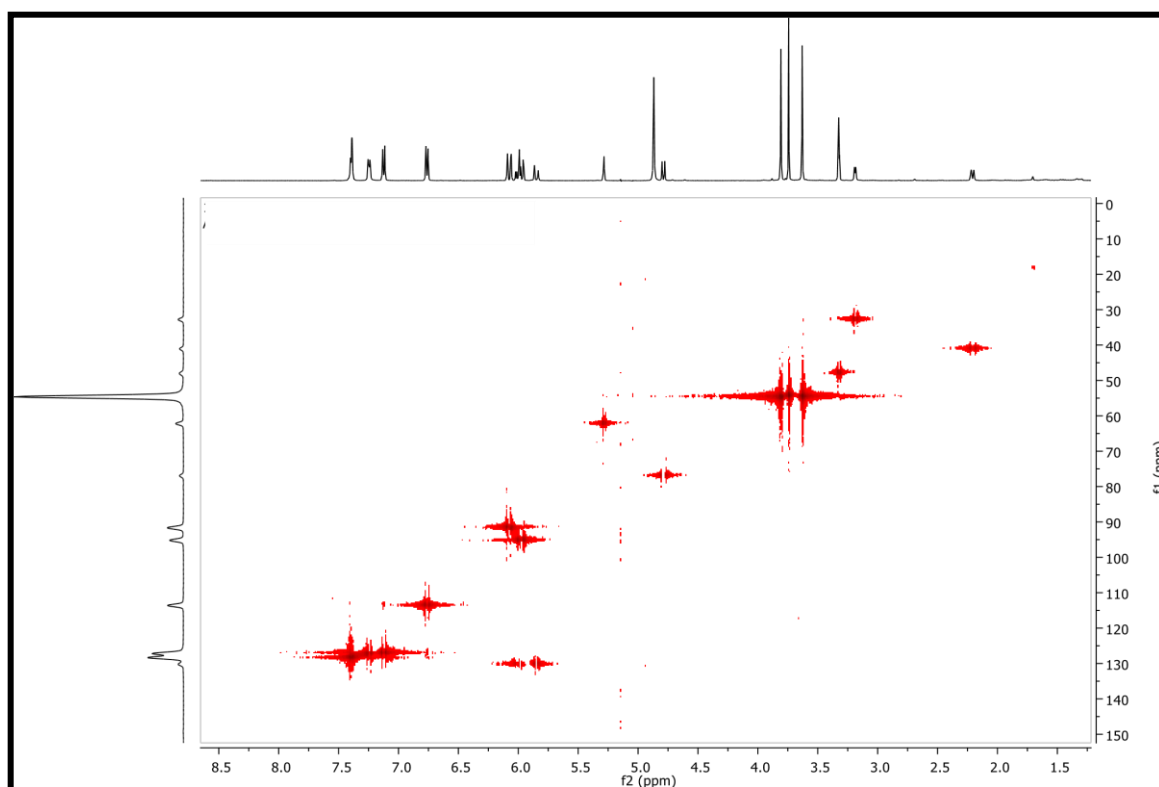
Fonte: Autora (2023).

Figura 25 - Espectro NOESY da substância 2.



Fonte: Autora (2023).

Figura 26 - Espectro HSQC da substância 2.



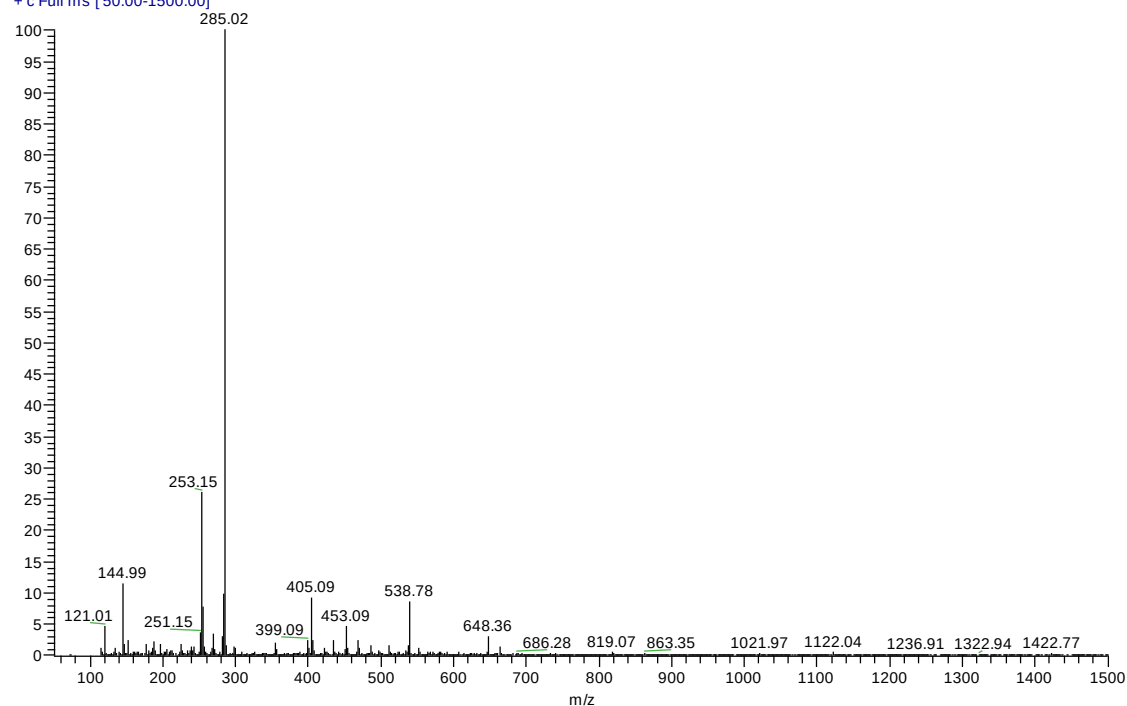
Fonte: Autora (2023).

As mesmas interações por NOESY apresentadas na substância **1** foram encontradas para substância **2**. Evidenciando, portanto, que a substância **2** trata-se de um derivado da substância **1**.

O espectro de massas da substância **2** (Figura 27) apresentou íon protonado com m/z 538,78, fragmento registrado MS^2 de m/z 285,02 correspondendo a perda de m/z 253.

Figura 27 - Espectro de massa obtido da substância **2**.

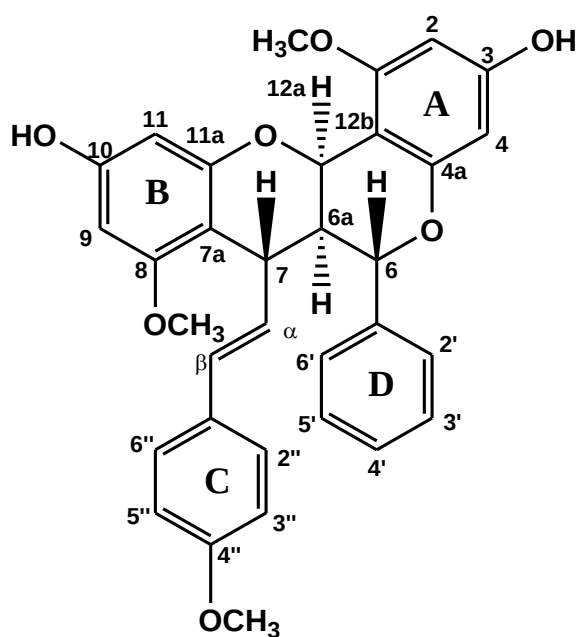
*Cl13-1 #9-23 RT: 0.28-0.62 AV: 15 SB: 2 0.98, 0.98 NL: 4.47E6
+ c Full ms [50.00-1500.00]



Fonte: Autora (2023).

Foi possível determinar a fórmula molecular $C_{33}H_{30}O_7$ para a substância **2**. Portanto, a substância **2** foi identificada como brachydina **2** (Figura 28), conforme dados da literatura.

Figura 28 - Estrutura da brachydina **2**.

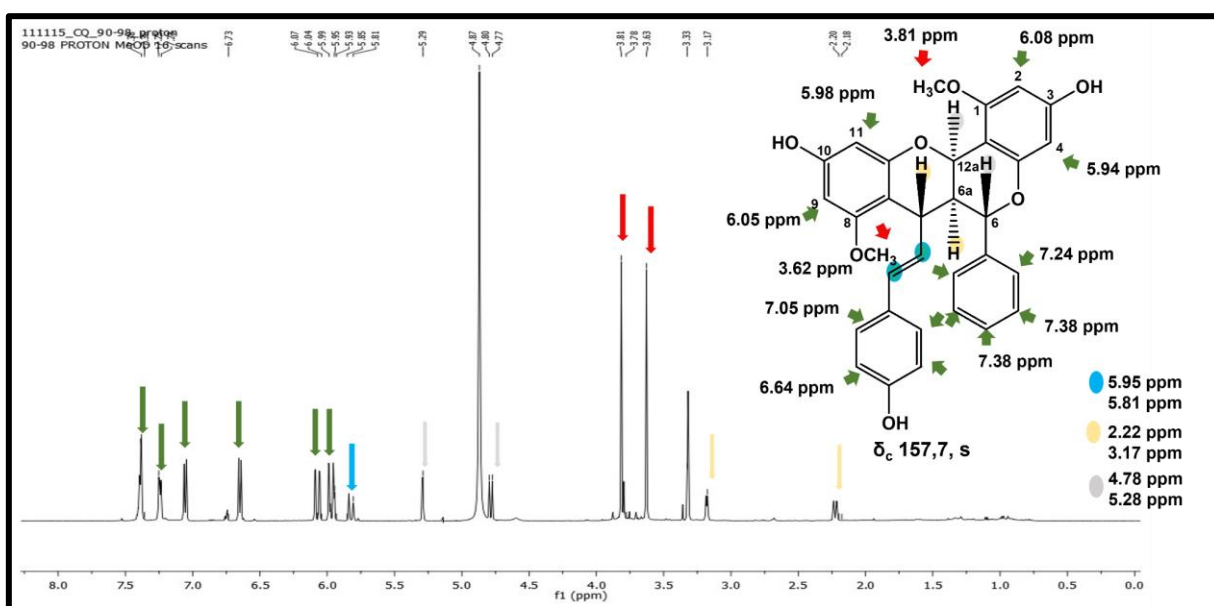


Fonte: Autora (2023).

4.6.3 Identificação estrutural da substância 3.

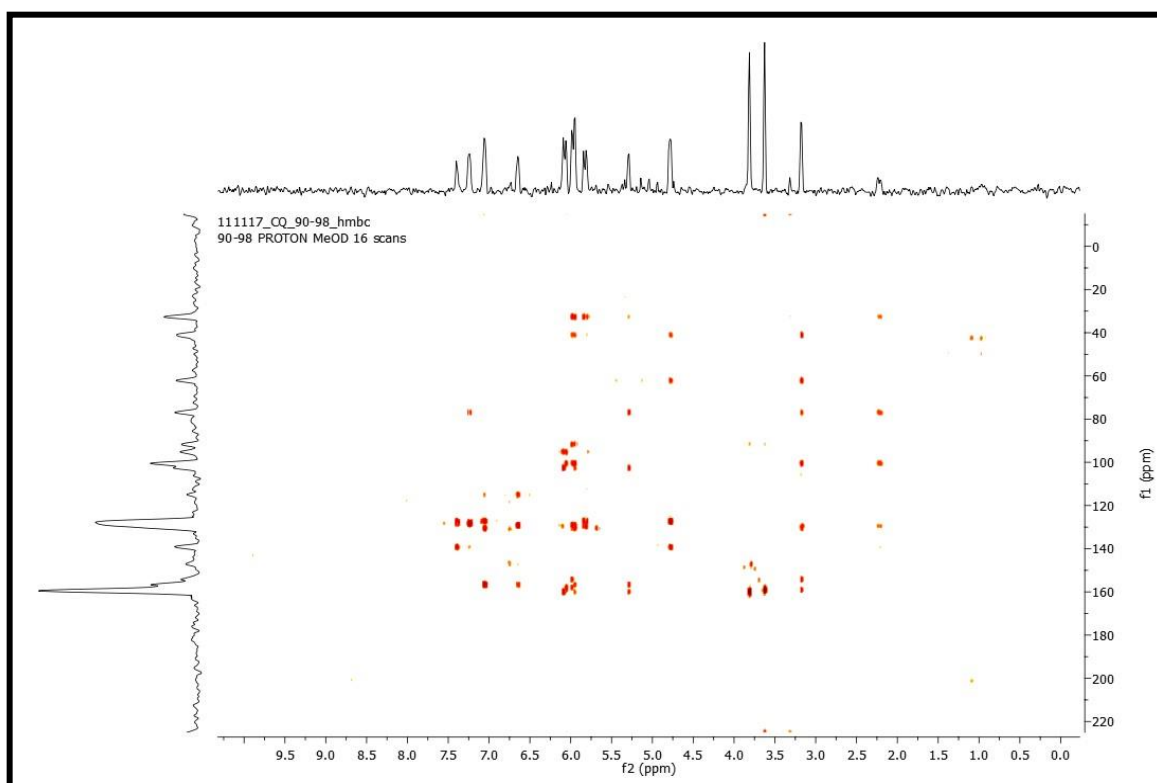
A substância **3** foi obtida a partir do grupo 13 (eluição hex:AcOEt 55:45, Figura 11), correspondente ao pico com tr = 6,8 min (Figura 17C), a massa obtida para essa substância correspondeu a 122,2 mg. O espectro de RMN-¹H (Figura 29) apresentou padrões semelhante as substâncias **1** e **2**. O anel C foi substituído em C-4" por um grupo hidroxila (δ_C 157,7) com base nos experimentos NOESY e HSQC (Figuras 30-32).

Figura 29 - Espectro de RMN-1H da substância 3.



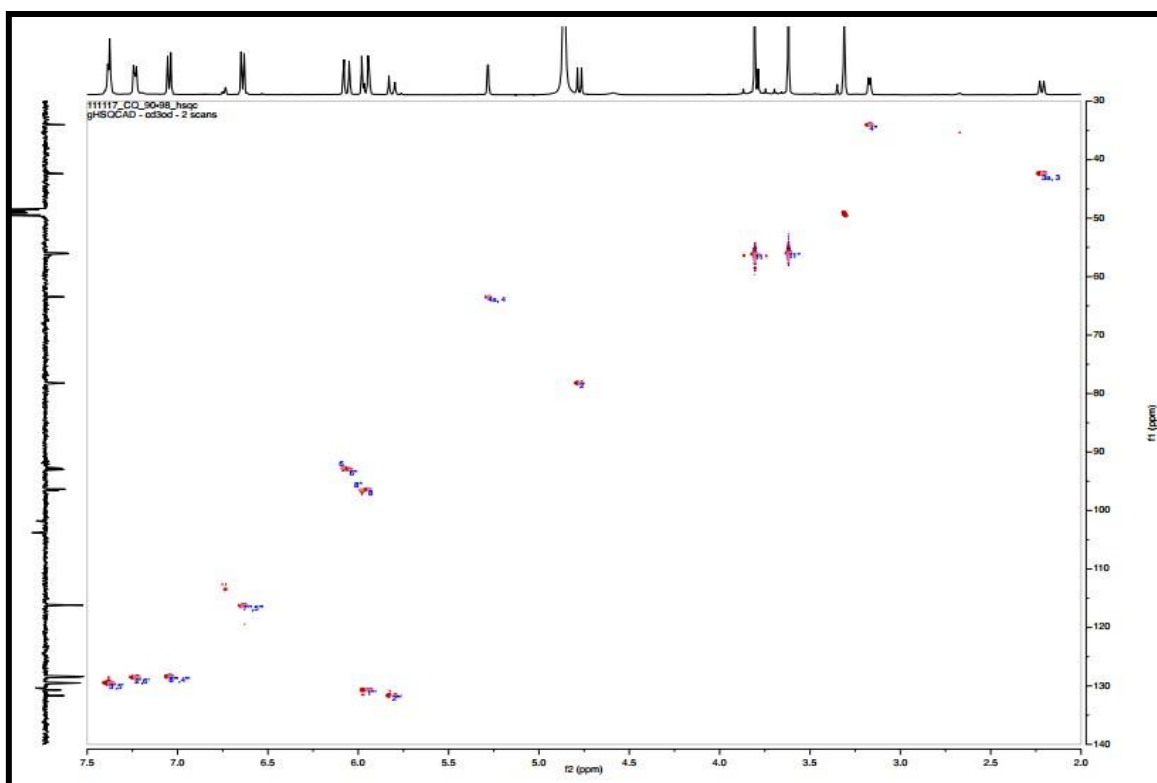
Fonte: Autora (2023).

Figura 30 - Espectro HMBC obtido da substância 3.



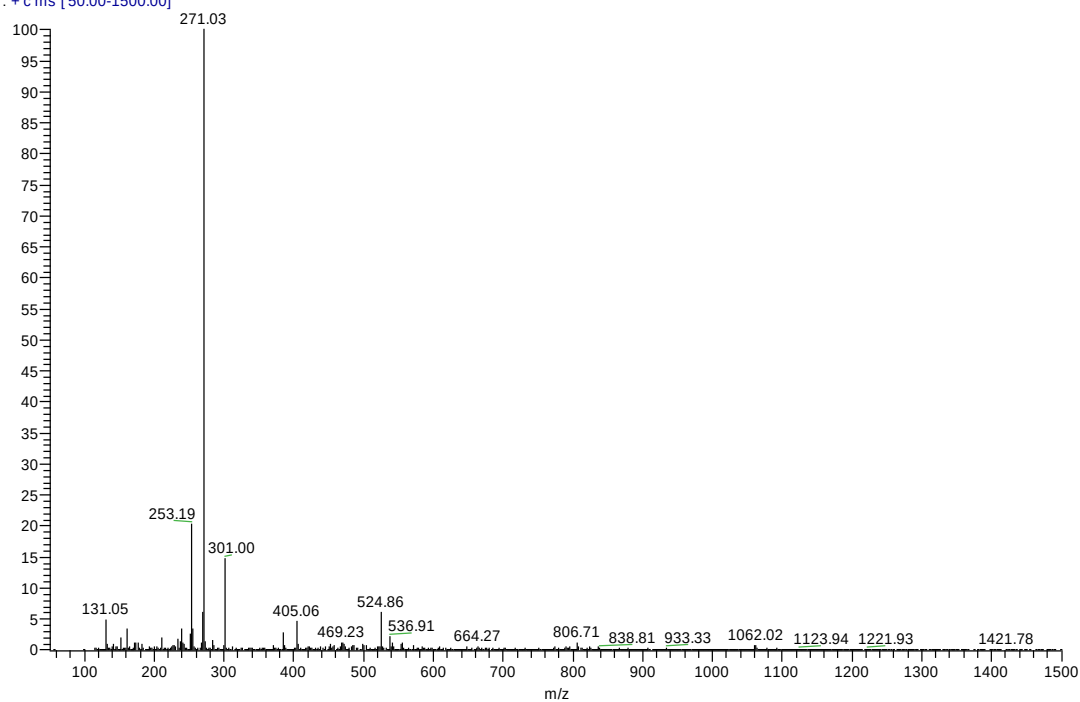
Fonte: Autora (2023).

Figura 31 - Espectro HSQC obtido da substância 3.



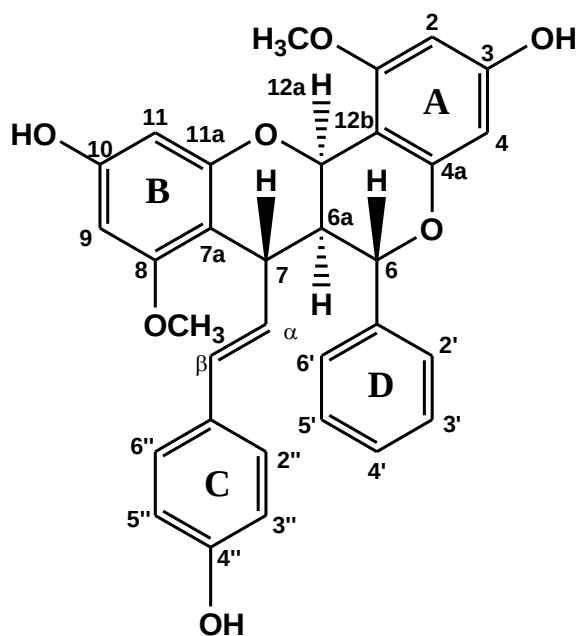
Fonte: Autora (2023).

APCI90-1 #32-44 RT: 0.72-0.99 AV: 13 SB: 2 0.99, 0.99 NI: 1 86F7
T: + c ms [50.00-1500.00]



Fonte: Autora (2023).

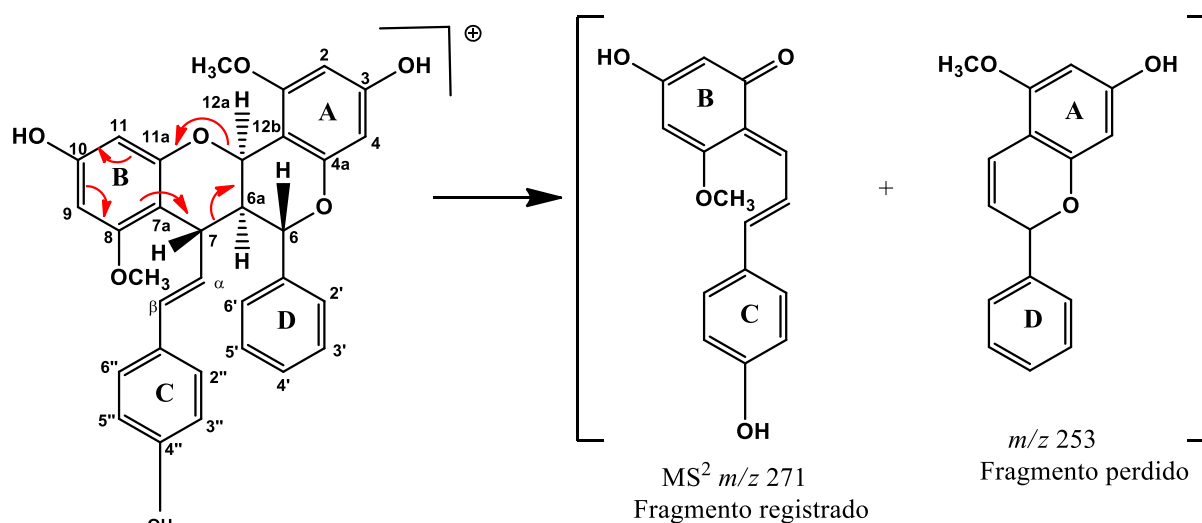
Figura 34 - Estrutura da brachydina 1.



Fonte: Autora (2023).

Uma reação de fragmentação foi proposta para justificar a formação do MS^2 m/z 271 com base na perda neutra de 253 u. A reação retro Diels-Alder (rDA) foi considerada para descrever a fragmentação do núcleo benzopireno, como ilustrado na Figura 35.

Figura 35 - Proposta de fragmentação para a $[M+H]^+$ da brachydina 1 considerando o mecanismo retro Diels Alder.



Fonte: Autora, 2023.

A fragmentação das brachydinas pelo mecanismo retro-Diels-Alder envolveu a formação dos dienos com m/z 255, 285, 271 e o dienófilos m/z 253 para as brachydinas 1, 2 e 3 respectivamente.

A tabela 4 a seguir estão compilados os dados de deslocamento químico RMN de ^{13}C e 1H .

Tabela 4 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz, CDO_3D em ppm) das substâncias.

Posição	Brachydina 1		Brachydina 2		Brachydina 3	
	δ_{H} (J)	δ_{C}	δ_{H} (J)	δ_{C}	δ_{H} (J)	δ_{C}
1		161,1; C		160,9; C		161,1; C
2	6,08 d (2,2)	92,8; CH	6,08 d (2,1)	92,7; CH	6,08 d (2,2)	92,8; CH
3		161,1; C		161,1; C		161,1; C
4	5,94 d (2,2)	96,4; CH	5,94 d (2,1)	96,3; CH	5,95 d (2,2)	96,4; CH
4a		157,8; C		157,7; C		157,8; C
6	4,78 d (11,2)	78,2; CH	4,77 d (11,3)	78,1; CH	4,79 d (11,3)	78,2; CH
6a	2,22 dt (11,2; 1,9)	42,4; CH	2,19 dt (11,3; 1,9)	42,3; CH	2,24 dt (11,3; 1,9)	42,2; CH
7	3,17 ddd (5,5 1,9; 1,6)	34,0; CH	3,17 ddd (5,6; 1,9; 1,6)	34,0; CH	3,21 ddd (5,7; 1,9; 1,7)	34,2; CH
7a		101,8; C		101,6; C		101,5; C
8		160,2; C		160,2; C		160,2; C
9	6,05 d (2,1)	93,0; CH	6,05 d (2,1)	93,0; CH	6,05 d (2,3)	93,0; CH
10		159,1; C		159,2; C		159,2; C
11	5,98 d (2,1)	96,5; CH	5,98 d (2,1)	96,5; CH	5,99 d (2,3)	96,6; CH
11a		155,4; C		155,3; C		155,4; C
12a	5,28 d (2,3)	63,5; CH	5,27 d (2,3)	63,4; CH	5,28 d (2,4)	63,5; CH
12b		103,8; C		103,7; C		103,8; C
1'		140,4; C		140,4; C		140,4; C
2',6'	7,24 d (7,6)	128,5; CH	7,23 d (7,0)	128,5; CH	7,24 d (7,6)	128,5; CH
3',5'	7,38 m	129,5; CH	7,38 m	129,5; CH	7,38 m	129; CH
4'	7,38 m	129,6; CH	7,38 m	129,5; CH	7,38 m	129,6; CH
A	5,95 dd (15,9; 5,5)	130,7; CH	5,99 dd (15,8; 5,6)	131,5; CH	6,15 dd (15,7; 5,7)	133,8; CH
B	5,81 dd (15,9; 1,6)	131,7; CH	5,83 dd (15,8; 1,6)	131,7; CH	5,91 dd (15,7; 1,7)	132,0; CH
1''		130,4; C		131,1; C		138,6; C
2'', 6''	7,05 d (8,6)	128,4; CH	7,11 d (8,8)	128,2; CH	7,18 m	127,2; CH
3'', 5''	6,64 d (8,6)	116,2; CH	6,75 d (8,8)	114,8; CH	7,18 m	129,4; CH
4''		157,7; C		160,2; C	7,10 m	128,0; C
OMe-1	3,81 s	56,1; CH_3	3,79 s	56,1; CH_3	3,79 s	56,1; CH_3
OMe-8	3,62 s	55,9; CH_3	3,62 s	55,9; CH_3	3,61 s	55,9; CH_3
OMe-4			3,73 s	55,6; CH_3		

Fonte: Autora, 2023.

4.7 Quantificação das brachydinas no extrato hidroetanólico e fração diclorometânica por UHPLC-MS/MS

A quantificação das brachydinas presentes no extrato (HE) e na fração diclorometânica (FDCM) foram determinadas através de metodologia validada por cromatografia líquida de ultra performance acoplada ao espectrômetro de massa com fonte de íons do tipo ESI e analisador “armadilha de íons” tipo quadrupolo linear com recursos em tandem, no modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM). A

aquisição dos dados utilizado foi o modo positivo e os parâmetros de declustering potential (potencial de desagregação DP), entrance potential (Potencial de entrada PE), collision energy (energia de colisão EC), cell exit potential (saída da célula de colisão SC) de cada analito foram otimizados para aumentar a sensibilidade a uma transição específica a partir dos dados registados no espectro de massa (MS^2) e estão resumidos na Tabela 5.

Tabela 5 - Parâmetros MRM otimizados para a quantificação das brachydinas por UHPLC-MS/MS.

Substância	Íon precursor	MRM	PD (V)	PE (V)	EC (eV)	SC (V)	t (ms)
Brachydina 1	525	525 → 271	30	10	10	7	125
Brachydina 2	539	539 → 285	30	10	10	7	125
Brachydina 3	509	509 → 255	80	10	50	12	125

Legenda: MRS = Monitoramento das reações selecionadas; t = Tempo para aquisição dos dados (dwell time).

O intervalo das curvas de calibração foi estimado para cada composto e foi fixado em 31-500 ng/mL. Obtiveram-se assim cinco curvas de calibração de pontos de dados com $r^2 > 0,99$ (Tabela 6).

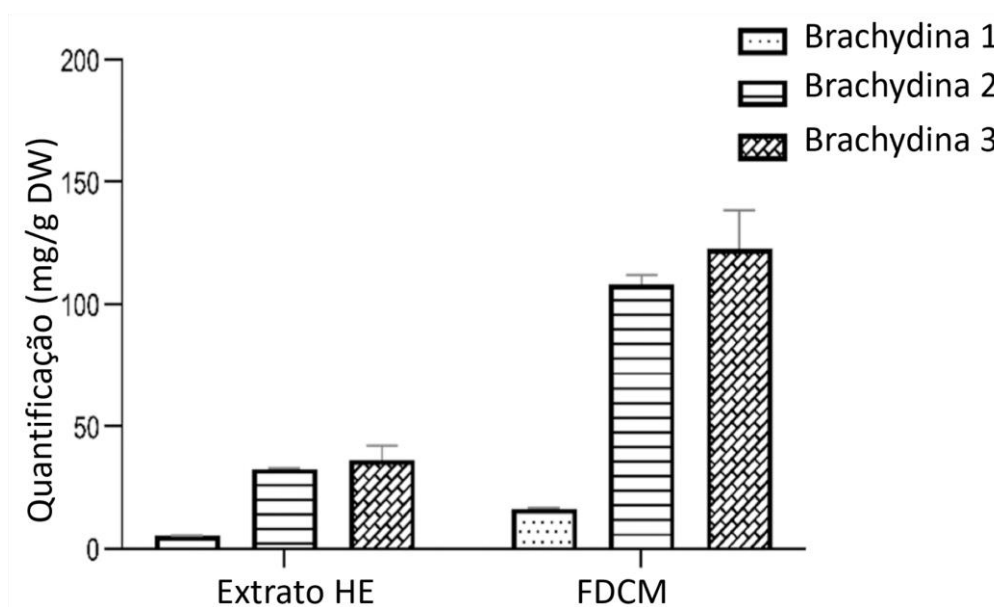
Tabela 6 - Parâmetros das curvas de calibração.

Substância	Função linear	r^2	LOD	LOQ
Brachydina 1	$y = 816x + 6,06 \cdot 10^3$	0,998	0,21	0,64
Brachydina 2	$y = 422x + 3,51 \cdot 10^3$		0,47	1,41
Brachydina 3	$y = 122x + 639$		1,42	4,25

Legenda: r^2 = coeficiente de correlação; LOD = limite de detecção; LOQ = limite de quantificação.

Os resultados obtidos a partir da análise quantitativa são apresentados na Figura 36. O teor total das brachydinas 1-3 foi 3,35 vezes superior na FDCM do que no extrato HE. Este fato era esperado, uma vez que no extrato são encontrados principalmente as brachydinas glicosiladas, e estas não são detectados por MRM. A brachydina 3 apresentou maior abundância na fração DCM (123 mg/g (DW: peso seco) e no HE (36 mg/g (DW)). As brachydinas 1 e 2 estavam presentes a 16 e 108 mg/g (DW) na fração DCM, respetivamente. Níveis mais baixos de brachydina 1 (5 mg/g) e 2 (33 mg/g (DW)) foram encontrados no extrato HE. Estes resultados quantificam, pela primeira vez, as quantidades das três brachydinas isoladas em ambas as amostras.

Figura 36 - Concentração (mg/g DW) das brachydinas 1-3 no extrato hidroetanólico (HE) e na fração diclorometânica (FDCM), respectivamente. As barras correspondem a valores médios $\pm$ S.D.; n = 3.



Considerando que a FDCM é composta pelas três brachydinas, e que esta apresenta grande potencial biológico, levando em consideração que o isolamento das substâncias ativas pode ser uma atividade complexa, longa e arenosa e que normalmente as substâncias que apresentam melhores efeitos biológicos estão presentes em menor proporção, torna-se indispensável a análise da potência das frações e das substâncias puras em relação à sua concentração. Nesse sentido a fração apolar obtida do extrato hidroetanólico das raízes de *F. phatyphylla* constituída de três flavonoides diméricos denominados de brachydinas, foi utilizada no desenvolvimento de uma formulação.

4.8 Desenvolvimento e Caracterização da Microemulsão

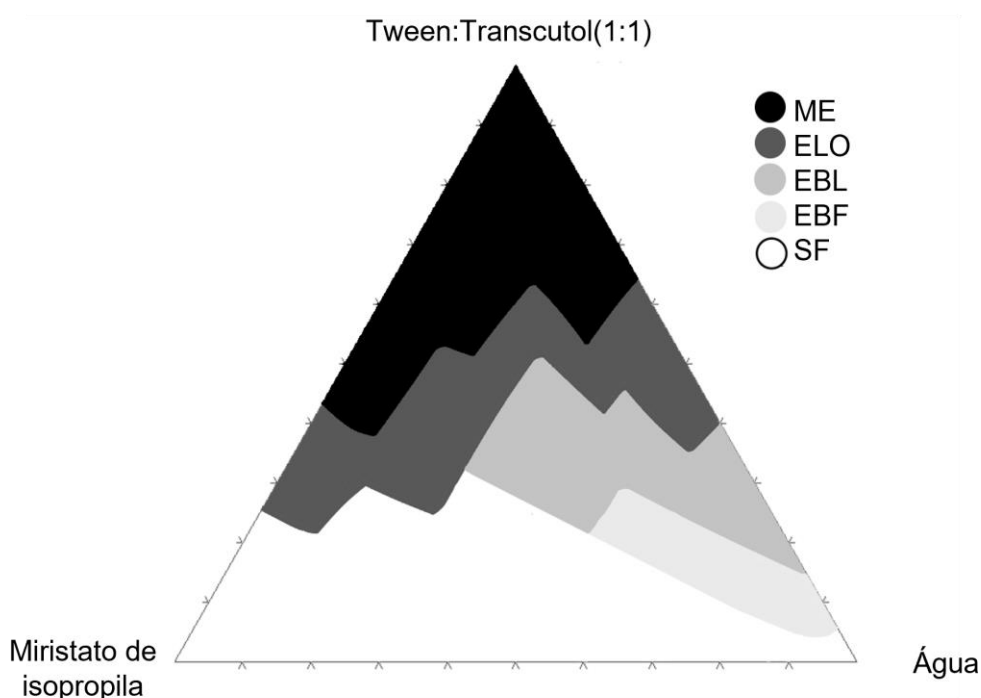
4.8.1 Diagrama de Fase Pseudoternário (DFPT)

O diagrama de fases pseudoternário (DFPT) descreve o comportamento dos componentes combinados e as estruturas formadas no sistema. Revelando em que condições experimentais é possível obter as microemulsões e as regiões limites de transição entre emulsões, fases separadas e bicontínuas (Oliveira, 2004; Damasceno *et al.*, 2011). Além disso, o diagrama permite identificar as diferentes proporções dos componentes, bem como avaliar os diferentes tipos de sistemas encontrados.

O DFPT pode ser obtido por meio de titulação aquosa dos sistemas com diferentes proporções dos constituintes gerando um amplo número de formulações, que posteriormente são classificadas de acordo com suas características. Normalmente as microemulsões diferenciam-se visualmente por apresentar-se opticamente transparente e translúcida, enquanto os demais sistemas apresentam-se como emulsões líquidas opacas, emulsões géis opacas, com elevada viscosidade ou com separação de fases (Djordjevic, et al. 2004).

A figura 37 representa o diagrama de fase pseudoternário obtido nesse estudo, caracterizando o comportamento de fases das misturas do tensoativo/cotensoativo, água e fase oleosa. Foi observada uma diversidade de estados, 5 zonas caracterizadas como microemulsão, emulsão branco fluida (EBF), emulsão branco leitosa (EBL), separação de fases (SF) e emulsão líquido opaca (ELO). Foi possível determinar a região de formação da microemulsão, região em que a energia empregada e a proporção dos componentes foram apropriadas para reduzir a tensão interfacial até a formação de um sistema homogêneo, límpido e translúcido (Silva, et al. 2009).

Figura 37 - Diagrama de fase pseudoternário para o sistema tween/transcutol, miristato de isopropila e água.



Fonte: Autora, 2023.

A composição da formulação de estudo foi selecionada com base no diagrama de fase, observando as transições de fases das formulações previstas através do diagrama construído.

4.8.2 Seleção da formulação

A partir do diagrama foi selecionada a região de formação de microemulsão para a incorporação da fração DCM. A Tabela 7 apresenta as proporções dos componentes da microemulsão branco.

Tabela 7 - Composição centesimal da microemulsão.

Componentes	Função	Proporção (%)
Tween	Tensoativo	30,87
Trancutol	Tensoativo	30,87
Miristato de isopropila	Fase oleosa	7,44
Água destilada	Fase aquosa	30,82

As microemulsões geralmente são constituídas de três a cinco componentes, tais como tensoativo, água, óleo e quando necessário, o cotensoativo (Dalmora and Oliveira 1999).

Os tensoativos não iônicos e/ou anfotéricos são os mais utilizados em aplicações farmacêuticas, devido baixa toxicidade às membranas celulares, baixa irritabilidade e elevada estabilidade química (Constantinides *et al.*, 1995). O Tween foi o tensoativo utilizado na formulação de estudo, e este é amplamente utilizado no desenvolvimento de microemulsões, pois apresenta maior estabilidade, melhor capacidade de encapsulamento proporcionando liberação controlada da substância, melhor estabilidade térmica, estabilidade a variações de pH e capacidade de incorporar elevadas concentrações de eletrólitos (Bonnet, 2010; Jácome, 2015).

O cotensoativo é responsável por diminuir a constante dielétrica da água permitindo a formação e estabilidade termodinâmica da ME, além de facilitar a solubilização dos fármacos (Vandamme, 2002). O cotensoativo escolhido para o desenvolvimento da ME foi o transcutool P, um importante solubilizante obtido da purificação do éter monoetílico de dietilenoglicol, possui capacidade de solubilizar ativos hidrofílicos e lipofílicos, além de apresentar baixo valor de EHL (equilíbrio

hidrófilo-lipofílico), garantindo maior solubilização do óleo e da água, maior estabilidade e menor tamanho de gotículas dos sistemas microemulsionados (Oliveira, 2014; Osborne, Musakhanian, 2018; Formariz et al, 2005).

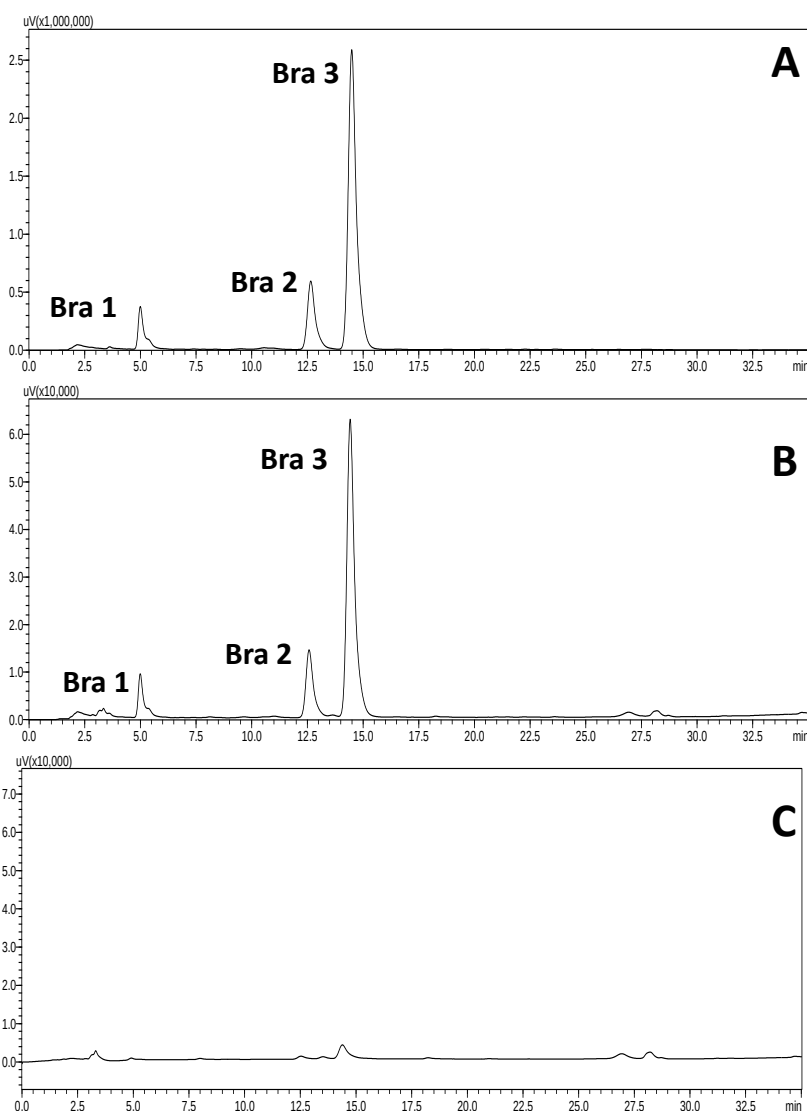
O transcutool P tem sido amplamente usado no desenvolvimento de ME's para melhorar a solubilidade e absorção oral do ácido retinóico all-trans (Subongkot, Ngawhirunpat, 2017), biodisponibilidade oral do docetaxel (Yin, 2009), solubilidade e biodisponibilidade da curcumina (Xiao, 2013), do fenofibrato (Hu, 2011a), do ibuprofeno (Hu, 2011b), e da ampelopsina (Solanki, 2012).

A fase oleosa foi composta pelo miristato de isopropila, um ésteres de ácido graxo de fórmula molecular $C_{17}H_{34}O_2$, conhecido como éster isopropílico do ácido mirístico ou tetradecanoato de isopropila, obtido pela reação do cloreto de miristila com 2-propanol. A maioria dos óleos utilizados nas microemulsões são volumosos e semi-polares, cuja função no desenvolvimento das ME's é a solubilização do fármaco (Gennaro, 2005; Gomes, 2010).

4.8.3 Análise por CLAE das micromulsões

Os perfis cromatográficos da fração DCM, ME3 e ME são apresentados na Figura 38 A-C.

Figura 38 - Perfil cromatográfico da FDCM (A), microemulsão com FDCM (B) e microemulsão sem fração (C).



Fonte: Autora, 2023.

O cromatograma do padrão da fração DCM apresentou picos de retenção nos tempos 5; 12,5 e 14 minutos referentes às brachydinas (Figura 38A). O cromatograma da amostra de microemulsão carregada com fração DCM (Figura 38B) mostrou picos nos tempos de retenção semelhante ao padrão da fração (Figura 38A) demonstrando a incorporação da fração a microemulsão desenvolvida. Os picos do cromatograma são bem resolvidos, indicando a alta especificidade do método, além disso, os componentes da microemulsão tiveram pouca interferência na análise (Figura 38C).

4.8.4 Avaliação Macroscópica visual

A análise macroscópica nos sistemas líquidos dispersos deve ser realizada avaliando-se condições como: limpidez, precipitação do fármaco disperso, cremagem, homogeneidade e transparência. Essa avaliação deve ocorrer com e sem adição de fármaco, uma vez que, é imprescindível avaliar a influência do princípio ativo no meio em que está disperso (Silveira, 2013).

A avaliação macroscópica das ME e ME3 foram realizada 48 horas após o seu preparo e está apresentada na Figura 39. Durante a obtenção das microemulsões, observou-se que a adição da fração DCM não modificou a limpidez e a viscosidade da microemulsão, a principal diferença foi a cor proveniente da coloração avermelhada que a fração DCM apresenta. Além disso não foi observado nenhum fenômeno de separação de fases ou turbidez, indicando boa estabilidade para ambas as formulações.

Figura 39 - Microemulsão com e sem fração DCM.



Fonte: Autora, 2023.

Foi realizada a incorporação de fração DCM nas proporções de 3% e 5%, conforme apresentado na Figura 40.

Figura 40 - Formulação com composição 3 e 5 % de FDCM (p/p).



Fonte: Autora, 2023.

Ambas as microemulsões obtidas mostraram-se opticamente transparente, estáveis e com aspecto homogêneo característico de uma microemulsão (Dalmora, Dalmora, and Oliveira 2001).

A transparência óptica das microemulsões é consequência de sua microestrutura (geralmente abaixo de 100 nm). Esses baixos valores de tamanho estão associados a uma enorme área interfacial que pode ser alcançada sem consumo de energia apenas devido à baixa tensão interfacial (γ) (geralmente 10^{-4} mJ/m²) (Tartaro, 2020).

Uma das teorias que tenta explicar o processo de formação das microemulsões, considera o papel indispensável do cotensoativo na redução da tensão interfacial responsável pela otimização da estabilidade termodinâmica das gotículas da fase interna da microemulsão (Rossi et al., 2007).

4.8.5 Caracterização preliminar

A Tabela 8 mostra as características preliminares das microemulsões ME, ME3 e ME5, quanto aos parâmetros de tamanho da gotícula (RH), potencial Zeta (PZ) e índice de polidispersão (IP), essas informações são importantes, pois permitem a identificação da dinâmica e estrutura das microemulsões.

Tabela 8 - Características preliminares das formulações.

Formulação	RH (nm)	IP	PZ (mV)
ME	75,36±3,4	0,248±0,07	- 5,15±049
ME3	65,40±9,8	0,543±0,11	- 49,03±2,89
ME5	36,70±7,0	0,604±0,12	- 63,20±8,9

Legenda: ME – microemulsão (branco); ME3 e ME5- microemulsão com 3% e 5 % de FDCM.

Fonte: Autora (2023).

Os sistemas dispersos possuem a capacidade de espalhar as ondas eletromagnéticas (luz) que o atravessam, esse fenômeno depende do tamanho das partículas que compõem o sistema, uma vez que a intensidade de luz espalhada é dependente da velocidade de difusão das partículas (Silva, 2001). O tamanho das gotículas, ou seja, o raio hidrodinâmico das partículas coloidais foi determinado através da técnica de espalhamento dinâmico de luz, que se baseia no movimento Browniano das gotículas em dispersão (Resende, 2014).

Em sistemas concentrado e viscoso é comum apresentar dificuldade de leitura em decorrência das interações entre as gotículas, sendo necessário nesses casos a realização da diluição a fim de facilitar a sua identificação (Lawrence, 2000; Aboofazeli et al. 2000; Formariz et al., 2006).

As microemulsões foram diluídas, a fim de minimizar as interações interpartículas do sistema concentrado evitando erros experimentais no que diz respeito o número de gotículas por unidade de volume. Os resultados mostram que a incorporação de fração DCM a microemulsão diminuiu o tamanho das gotículas de 75 nm para 65 nm na proporção de 3% de fração enquanto com 5% o tamanho foi de 36 nm. Todas as microemulsões apresentaram tamanho de gotícula compatível com o tamanho de microemulsão desejável (até 100 nm).

Possivelmente a diminuição do tamanho das gotículas em função do aumento da proporção de fração incorporada, é devido a presença dos grupos hidroxilas nas estruturas das brachydinas, o aumento da quantidade dessas moléculas permiti maior interação com os grupos hidrofílicos da fase oleosa e da camada emulsificante (tween e transcuto) produzindo maiores quantidade de ligações de hidrogênio, consequentemente, o tamanho médio de gotículas da microemulsão diminui devido o

encolhimento das gotículas resultante do maior número de interação por ligações de hidrogênio (Cui et al., 2009).

A determinação do potencial Zeta está relacionada a estabilidade eletrostática do sistema disperso e as interações entre as gotículas presentes (Khan et al., 2013). Sistemas mais estáveis tendem a apresentar potencial Zeta ≥ 20 mV, evidenciando o predomínio das forças de repulsão entre as gotículas sobre as forças de atração de Van der Waals, prevenindo, portanto, o contato e aglomeração das gotículas (Bose et al., 2013 e Bhandari; Kaur, 2013).

Quando em contato com a fase aquosa as gotículas dispersas apresentam cargas elétricas superficiais responsáveis pela dispersão e agregação dessas partículas. A superfície de gotícula de óleo dispersa em uma fase aquosa é formada por uma dupla camada elétrica, a camada fixa formada de íons de carga contrária a superfície da gotícula (camada de Stern) e outra camada móvel de íons denominada de camada difusa (Reis, 2014). O potencial zeta mede a diferença de potencial entre essas duas camadas, e caracteriza o sistema em relação a sua estabilidade eletrostática (Daltin, 2011; Hotza, 1997).

As formulações ME, ME3 e ME5 apresentaram valores de PZ $-5,15$; $-49,03$ e $-63,20$ mV respectivamente, observa-se que a adição da fração DCM aumentou o valor do PZ, não houve nenhuma evidência de instabilidade das microemulsões, todas as amostras mostraram-se estáveis. Kong e Park (2011) afirmam que valores de PZ acima de 30 mV devem ser considerados, visto que, estes asseguram contra a coalescência, deste modo o PZ não deve ser a única forma de prever a estabilidade do sistema. É necessário estudos posteriores de estabilidade a longo prazo para esclarecer melhor o perfil de estabilidade das formulações desenvolvidas (Aggarwal et al., 2013).

O índice de polidispersão é um indicador de distribuição de tamanho das gotículas. O conhecimento desse parâmetro é importante porque permite prever processos de instabilidade como a maturação de Ostwald. A diferença de solubilidade e curvatura das gotículas favorecem a transferência de massas, dessa forma, as gotículas muito pequenas se depositam nas gotículas grandes aumentando o seu diâmetro por meio da difusão, e conseqüentemente diminui a estabilidade termodinâmica do sistema (Capek, 2004; Almeida, 2012; Kourniatis et al. 2010).

Valores maiores de IP indicam menor uniformidade do tamanho, e valores próximo de zero revelam maior homogeneidade de tamanho entre as gotículas (Patel et al., 2013; Moghimipour; Salimi; Eftekhari, 2013). Acredita-se que os valores de índice de polidispersão ideal devam ser próximos a 0,3 (Rodrigues, 2012).

A microemulsão com fração que apresentou menor IP foi a ME3 com 0,543, indicando melhor distribuição de tamanho entre as gotículas, nesse sentido a ME3 foi escolhida para continuidade ao estudo por ter se apresentado mais monodispersa e estável.

4.8.6 Caracterização Físico-química

A Tabela 9 mostra os resultados obtidos da caracterização físico-química das amostras ME e ME3. O teste de centrifugação produz estresse na amostra através do aumento da mobilidade das partículas, podendo antecipar possíveis instabilidades como precipitação, separação de fases e coalescência (Brasil, 2004). Após a centrifugação a 3000 rpm por 30 min as formulações permaneceram inalteradas, não foi observado evidência visual de instabilidade física em termos de separação de fases e transparência.

Tabela 9 - Caracterização físico-química de microemulsão branco e microemulsão contendo FDCM.

Propriedades	ME	ME3
Aspecto macroscópico	Límpida e transparente	Límpida e transparente
Resistência a centrifugação	Estável	Estável
pH	7,80±0,09	6,69±0,05
Índice de refração	1,42±0,01	1,42±0,01
Densidade (g.cm ³)	1,016±0,01	1,016±0,01

Uma das características das microemulsões, diz respeito, a anisotropia. Uma amostra isotrópica quando submetida a um feixe de luz plano polarizado possui as mesmas propriedades ópticas em todas as direções, e, portanto, não há modificação na direção da luz incidida, não há a formação do fenômeno da dupla refração, conhecido como birrefringência.

A análise do índice de refração permitiu caracterizar o sistema microemulsionado quanto a sua isotropia, o valor de índice de refração para ambas as microemulsões ME e ME3 foi de 1,42, evidenciando que a incorporação da fração DCM não resultou na alteração na propriedade óptica da microemulsão desenvolvida, valor compatível ao que foi encontrado por Moghimipour, Salimi e Eftekhari (2013), Okur e colaboradores (2017) e Souza (2017), confirmando a transparência óptica das formulações.

A determinação do pH é um forte indicativo de estabilidade do sistema, uma vez que a redução do pH pode indicar a presença de ácidos graxos livres na formulação, proveniente da hidrólise dos tensoativos ou da fase oleosa, ou até mesmo das condições de processamento e armazenamento da amostra (Bruxel, et al. 2012). Os valores de pH observados são considerados fisiologicamente aceitáveis, para administração oral (1 a 7) e tópica (5,5 a 8) (Auton, 2005), uma vez que os valores apresentados estão dentro da faixa de maior estabilidade física e química para a maioria das formulações (Fronza, 2004). Além disso, as microemulsões ME e ME3 apresentaram densidade de massa com valor de $1,016\text{g/cm}^3 \pm 0,01$, valor próximo à densidade da água na temperatura de 20°C.

4.8.7 Estudo de Estabilidade

O estudo de estabilidade de formulações é uma ferramenta essencial para garantir segurança e eficácia do produto, uma vez que fornece indicações sobre seu comportamento, em determinado intervalo de tempo, frente a condições ambientais a que possa ser submetido, desde a fabricação até o término da validade (Brasil, 2004).

Os sistemas microemulsionados possuem baixa tensão interfacial que lhes garantem estabilidade termodinâmica quanto a sedimentação em temperatura constante. O aumento da agitação térmica pode fazer com que algumas formulações percam a estabilidade e formem agregados provenientes da coalescência das gotículas. Neste sentido, a temperatura modifica as propriedades do filme de tensoativos, resultando em mudanças estruturais (Jácome, 2015). A estabilidade das microemulsões ME e ME3 frente a mudanças de temperatura foi monitorada a 25 °C (para verificar a estabilidade à temperatura ambiente), -5 a 50°C (para verificar a estabilidade em condições aceleradas) e 40 a 80°C (para verificar a estabilidade sob estresse térmico), conforme descrito na Tabela 10. Todas as microemulsões

mostraram-se fisicamente estáveis, límpidas, transparentes e homogêneas em todas as condições testadas.

Tabela 10 - Estabilidade das formulações testadas.

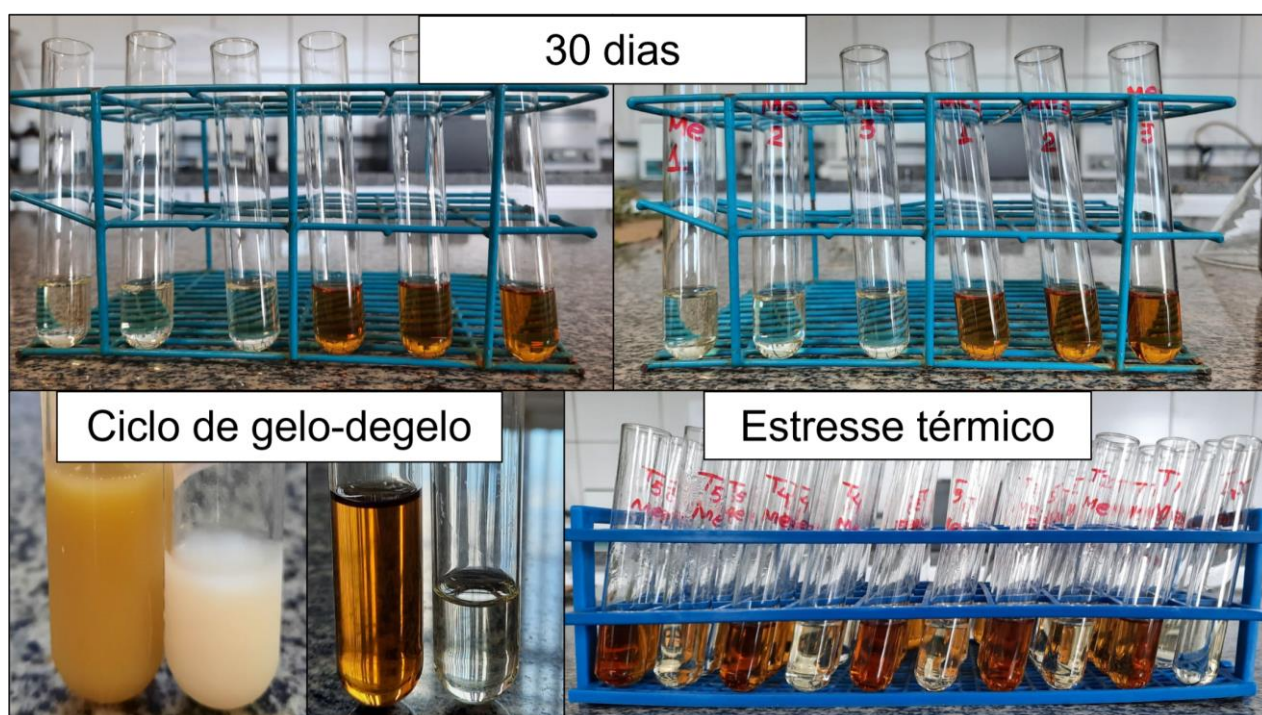
Formulação	T0	T30	Estresse Térmico	Ciclo gelo-degelo
Caracter. organolépticas				
ME	Normal	Normal	Normal	Normal
ME3	Normal	Normal	Normal	Normal
pH				
ME	7,80±0,09 ^A	7,71±0,25 ^A	7,96±0,06 ^A	7,64±0,12 ^A
ME3	6,69±0,05 ^B	6,76±0,05 ^B	6,83±0,02 ^B	7,03±0,09 ^B
Teor (%)				
ME	-	-	-	-
ME3	97,52±1,81	99,81±1,22	98,12±2,17	99,46±3,73

Legenda: T0 - tempo 0; T30 - tempo de 30 dias. As médias que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes.

Fonte: Autora (2023).

Não foi observada alteração macroscópica nas MEs, não ocorreu precipitação da fração DCM na ME3 mesmo após as condições térmicas aplicadas, o que indica que a microemulsão ME3 foi capaz de manter a fração DCM dissolvidas nas faixas de temperatura de 40 a 80°C, -5 a 50°C e temperatura ambiente (Figura 41).

Figura 41 - Aparência macroscópica das MEs após os ciclos de congelamento/descongelamento, estresse térmico e estabilidade 30 dias.

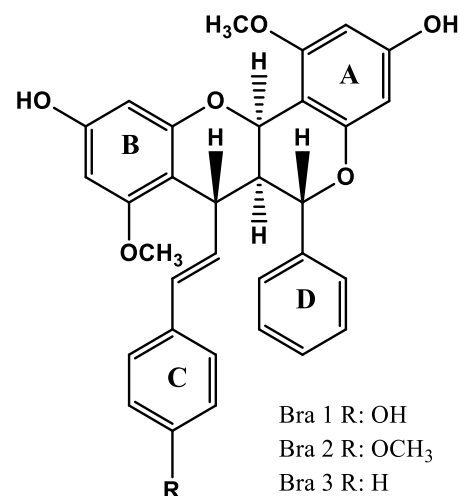
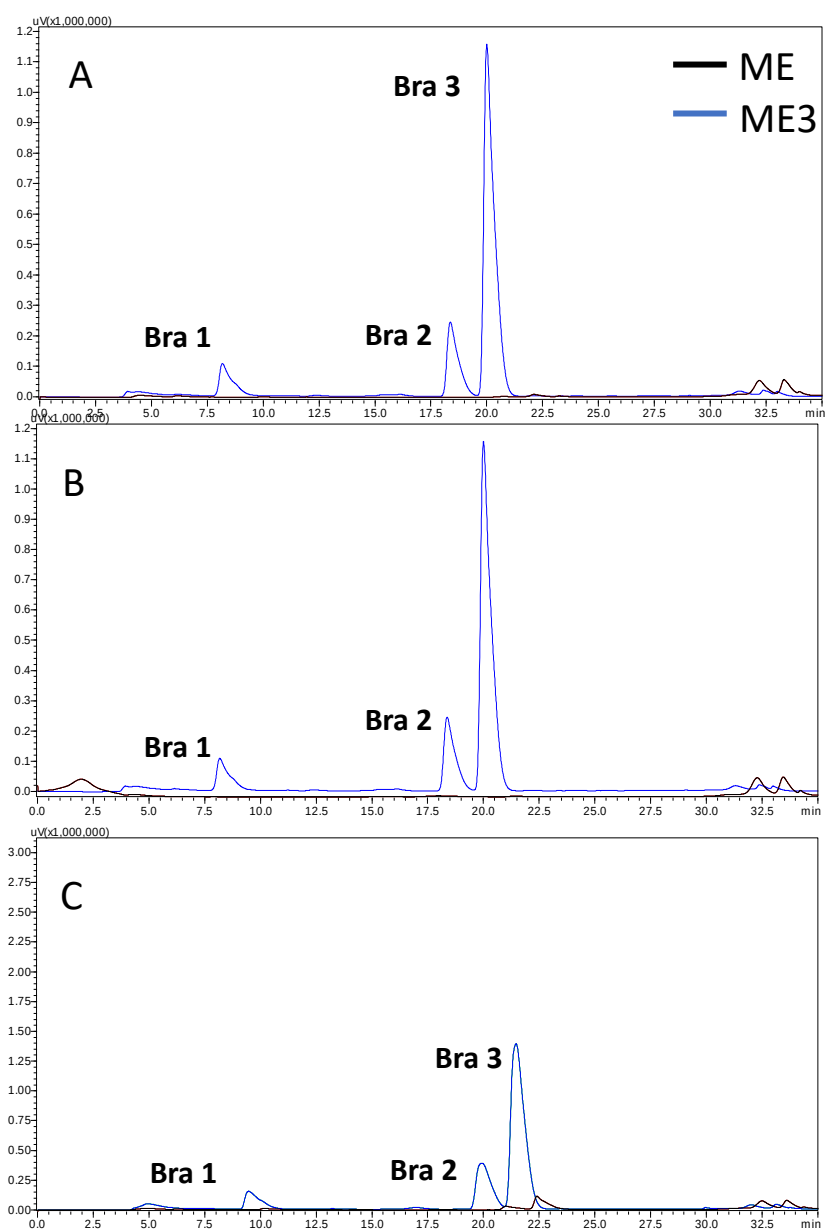


Fonte: Autora (2023).

O valor de pH serve como parâmetro de estabilidade química dos sistemas quando submetidos a estudos de estabilidade, já que variações nestes valores podem estar relacionadas com a ocorrência de reações de degradação, como oxidação, que podem acontecer na fase oleosa (Tadros et al., 2004). O pH das microemulsões ME e ME3 não sofreram alterações significativas em todos os testes, evidenciando a estabilidade química das microestruturas desenvolvidas.

Quando submetidas aos ciclos de gelo-degelo, estresse térmico e 30 dias a temperatura ambiente não foi observado alterações significativas nos teores da fração DCM. A Figura 42 A-C mostra os perfis cromatográficos das microemulsões ME3 (azul) e ME (preto), analisadas após os testes de estabilidade, 30 dias a temperatura ambiente, ciclos gelo-degelo e estresse térmico. Observa-se que não houve alteração dos perfis de absorção das brachydinas, evidenciando a integridade mesmo após condições extremas de temperaturas aplicadas, demonstrando, portanto, estabilidade termodinâmica da microemulsão desenvolvida.

Figura 42 - Perfis cromatográfico das ME, ME3. A) 30 dias a temperatura ambiente; B) Ciclos de gelo-degelo; C) Estresse térmico.



Fonte: Autora (2023).

4.8.8 Análise Reológica

A caracterização reológica de formulações revela informações importantes acerca da microestrutura estudada, uma vez que o comportamento reológico do fluido está relacionado com o tipo de arranjo e seu nível organizacional, permitindo avaliar a estabilidade física do sistema, bem como seu comportamento no local da aplicação (Welin-Berger, 2001; Harding, 2000).

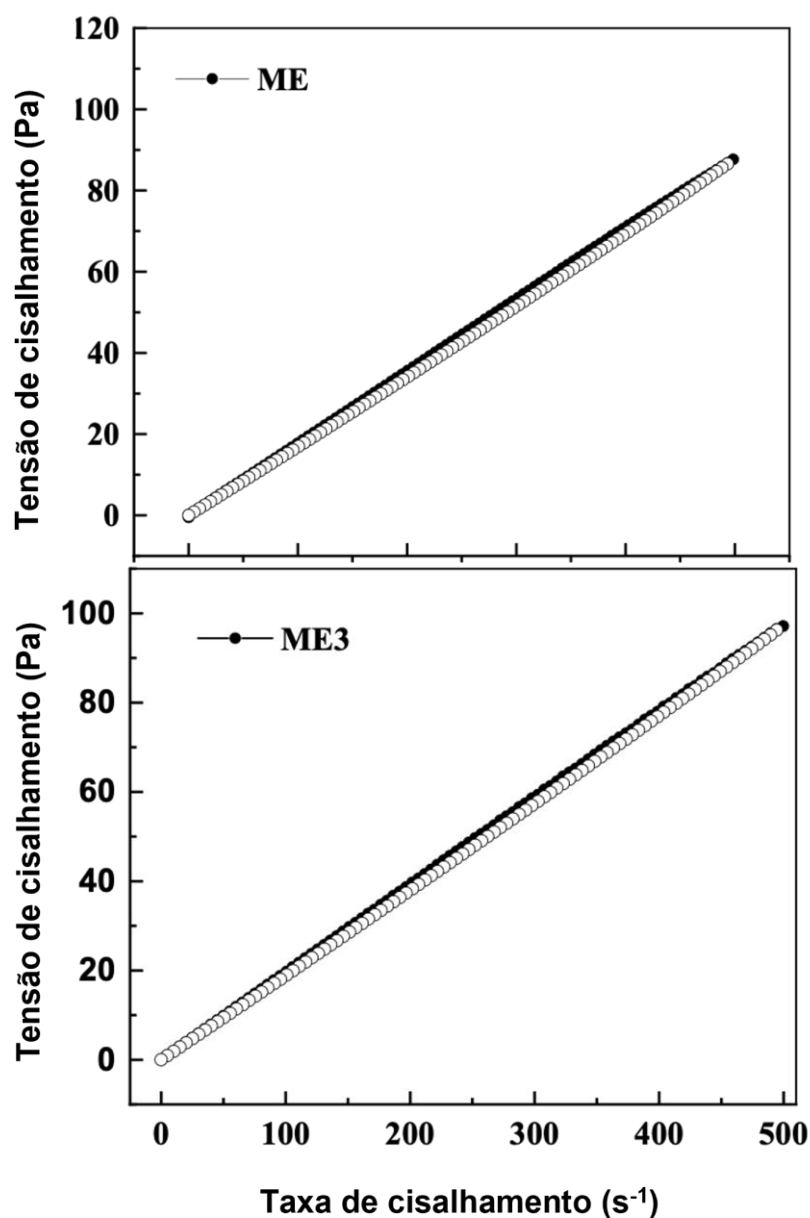
As análises reológicas são imprescindíveis no desenvolvimento de formulações e na caracterização físico-química de produtos farmacêuticos, tais como, pastas, cremes, emulsões, microemulsões, géis, suspensões e revestimento de comprimidos (Martin, 1993; Lieberman, 1989; Netz e George 2002).

As curvas de fluxo descendentes e ascendentes demonstram o comportamento de fluxo de um líquido, através da representação gráfica que correlaciona a tensão de cisalhamento (τ) e a taxa de cisalhamento ($\dot{\gamma}$).

O comportamento dos fluidos pode ser inicialmente dividido em newtonianos e não-newtonianos. Os fluidos newtonianos apresentam proporcionalidade entre a tensão e a taxa de cisalhamento, de modo que a viscosidade do sistema independe dos parâmetros de deformação e o escoamento inicia-se quando a tensão é aplicada, isto significa que a viscosidade do fluido é constante e não é afetada por mudanças na taxa de cisalhamento. A representação gráfica do comportamento reológico de um fluido classificado como newtoniano é uma reta com início na origem. Os que não se adequam a tal comportamento são classificados como não-newtonianos (Schramm, 2006).

Os reogramas presentes na Figura 43 representa a relação entre tensão e taxa de cisalhamento para as formulações ME e ME3. Os resultados obtidos evidenciam que as MEs desenvolvidas apresentaram comportamento newtoniano, ocorrendo uma sobreposição das curvas ascendentes e descendentes, e, portanto, gerando uma reta que passa pela origem, mostrando a relação linear entre a tensão e a taxa de cisalhamento. Fica evidente que a viscosidade das microemulsões não é afetada pela mudança dos parâmetros analisados de forma que o fluxo é constante (Schramm, 2006).

Figura 43 - Comportamento reológico das ME e ME3. Reograma Tensão de cisalhamento versus taxa de cisalhamento.



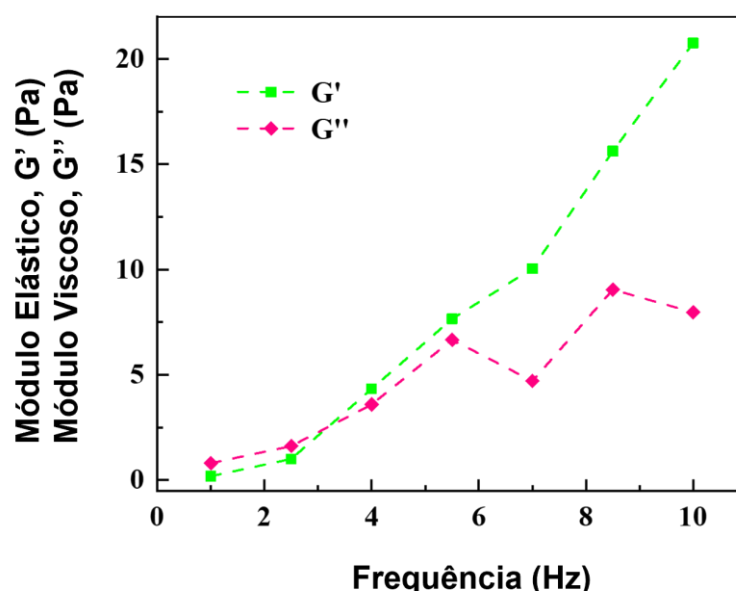
Fonte: Autora, 2023.

Sistemas isotrópicos, como as ME apresentaram uma baixa viscosidade e comportamento newtoniano, devido ao pequeno tamanho de gotícula e baixa interação entre as gotículas (Santana et al., 2012). Alterações estruturais e transições de fases nas MEs refletem na reologia.

A análise reológica oscilatória para a ME3 foi realizada, nesse tipo de análise a tensão de cisalhamento varia como uma onda senoidal e a relação entre as ondas de tensão aplicada e a deformação resultante fornece informações sobre os tipos de resposta (elástica ou viscosa) do sistema.

A análise da frequência oscilatória permite obter informações valiosas sobre a estrutura do sistema estudado. Os parâmetros obtidos nesta análise são o módulo de elasticidade (ou de armazenamento) (G') que representa a capacidade do material em armazenar energia, e o módulo de perda (ou viscoso) (G''), representa a capacidade do material em dissipar energia (Gonsenca, 2013; Ferreira, 2015). A evolução temporal dos módulos de armazenamento (G') e de perda (G'') em função da frequência aplicada para a ME3 é apresentada na Figura 44.

Figura 44 - Módulo elástico (G') e módulo de perda (G'') em função da frequência.



Fonte: Autora (2023).

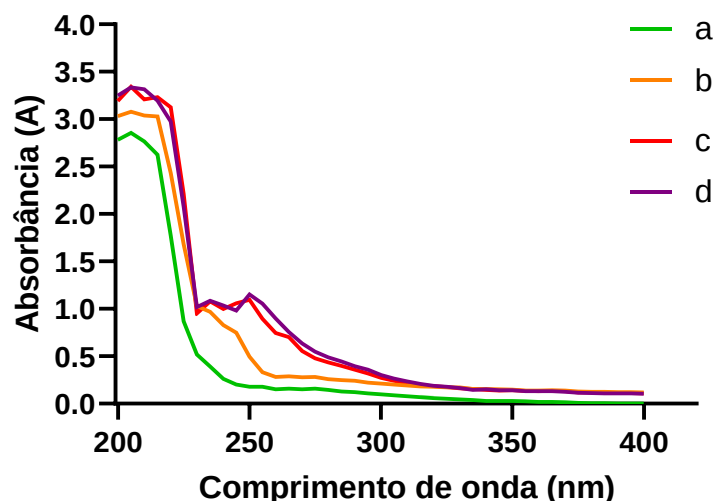
Se $G'' > G'$, o material apresenta o comportamento de um líquido viscoso. Se $G' > G''$, o sistema apresenta comportamento de um sólido elástico, como um gel. Em contrapartida, se $G'' = G'$ o material encontra-se na transição (Cruz et al. 2008; Ferreira, 2015). É possível observar $G'' > G'$ (baixas frequências) e no final do ensaio $G' > G''$ (altas frequências), de forma que a formulação examinada exibe um comportamento viscoelástico semelhante a um gel e são mais elásticas que viscosas.

O tamanho das gotículas e a viscosidade do sistema microemulsionado estão diretamente relacionados com a velocidade de liberação *in vitro* e com o processo de difusão *in vivo*, facilitando ou dificultando a disponibilidade da fração disponível do fármaco por unidade de tempo (Correa, 2005).

4.8.9 Estudo de liberação controlada *in vitro*

A detecção da fração DCM em espectrofotômetro foi realizado a fim monitorar os teores de DCM no teste de liberação controlada. Foram realizadas varreduras espectrofotométricas na região de UV 200 – 400 nm, conforme é apresentado na Figura 45, o método foi capaz de realizar a determinação da fração sem interferência significativa dos constituintes da microemulsão na região de UV no comprimento de onda 254 nm.

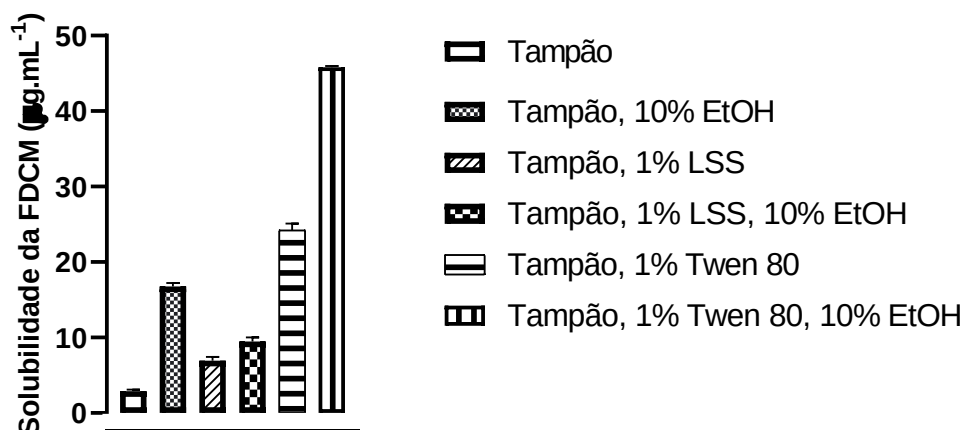
Figura 45 - Espectros de absorção de (a) solvente EtOH:NaOH (pH 13, 0,1 M) (50:50, v/v), (b) microemulsão branco (ME), (c) microemulsão com 3% de fração (12 µg/mL) e (d) solução de fração DCM (12 µg/mL).



Fonte: Autora (2023).

Com o objetivo de estabelecer as condições sink para o estudo de cinética de liberação *in vitro* foi determinado a solubilidade da fração DCM em diferentes meios tampão (Figura 46). O tampão na presença de 1% Twen e 10% EtOH foi o meio que apresentou maior capacidade de solubilidade da fração DCM ($45,82 \pm 0,18$), dessa forma, esse meio tampão mostra-se o mais adequado para a realização dos estudos de cinética de liberação *in vitro*. Os outros grupos que apresentaram maiores solubilidade em $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ foram: tampão tris com 1% de Tween 80 ($24,21 \pm 0,88$), tampão tris com 10% de EtOH ($16,79 \pm 0,45$). Enquanto que a fração no meio tampão foi a que apresentou menor solubilidade ($2,88 \pm 0,2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$).

Figura 46 - Solubilidade da fração DCM em diferentes meios tampão (n = 3).

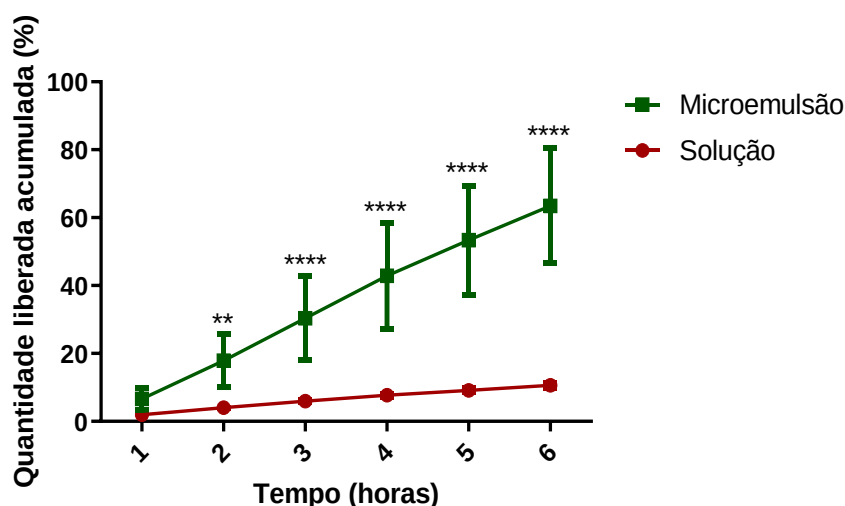


Fonte: Autora (2023).

O perfil de liberação *in vitro* é um importante parâmetro de caracterização de sistemas microestruturados que permiti observar a performance *in vivo* da formulação em escala microscópica e as interações entre o veículo e o ativo (Morais; Burgess, 2014).

O perfil de liberação da fração DCM pode ser observado na Figura 47, que representa a quantidade liberada acumulada em função do tempo para a ME3 e solução de fração DCM ao longo de 6 horas de ensaio.

Figura 47 - Perfil de liberação da fração em microemulsão e em solução.



Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão da média, $n=3$ para cada concentração. Análise estatística: Two way ANOVA, seguida pelo pós-teste de Bonferroni, admitindo-se diferença estatisticamente significativas (**: $p \leq 0,001$; ****: $p \leq 0,0001$) entre os tempos de 2,3,4,5 e 6 horas. Fonte: Autora (2023).

Os resultados indicaram que a microestrutura formulada permitiu a liberação da fração DCM de forma lenta e controlada, possivelmente devido ao aumento do coeficiente de solubilidade da fração no sistema nanoestruturado, evidenciando melhor liberação do ativo corroborado pela quantidade cumulativa liberada superior a 60% em 6 h.

Tabela 11 - Valor médio do fluxo, quantidade liberada acumulada após 6 horas em microgramas (Q6h) e quantidade liberada acumulada após 6 horas em porcentagem (Q6h %).

Formulação	Fluxo ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$)	Q6h (μg)	Q6h (%)
Solução	162,8792	1170,9523	10,6450
Microemulsão	1115,3093	6856,7836	63,4887

Há diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em todos os 3 parâmetros

A comparação estatística do fluxo ao longo de 6 h mostrou que a ME3 forneceu fluxo superior a solução saturada da fração DCM. Além disso, a solução saturada apresentou baixa quantidade acumulada cerca 10,6% em 6h enquanto a ME3 apresentou 63,48% (Tabela 11).

Nos últimos anos tem crescido o interesse pelas microemulsões, esses sistemas de liberação de fármacos permitem o encapsulamento de variadas classes de fármacos e possibilitam a lenta liberação do ativo, proporcionando efeito prolongado, evitando que a concentração plasmática acima do necessário seja atingida (Dalmora et al., 2001).

Os dados de liberação foram usados para determinar a cinética de liberação da fração ajustando-se a diferentes modelos matemáticos com os valores de correlação calculados apresentados na Tabela 12. Com base nos valores do coeficiente de determinação R^2 e a raiz do erro quadrático médio (RMSE), o modelo matemático de ordem zero mostrou melhor ajuste para os perfis de liberação da solução e ME3, uma vez que apresentou um R^2 mais elevado e valores de RMSE mais baixo. Este comportamento de liberação sugere que o sistema de liberação não sofre desestruturação e que o fármaco é liberado lentamente e independente de sua concentração. A literatura relata um padrão semelhante de liberação (Alireza Mortazavi, Pishrochi, Jafari Azar, 2013; Cojocar et al., 2015; Shaikh, Kshirsagar, Patil, 2015).

Tabela 12 - Descrição dos modelos matemáticos avaliados para as amostras testadas (solução e microemulsão).

Amostras	Modelo matemático	R ²	RMSE	MSC	Constantes
Solução	Ordem zero	0,9941	0,2478	4,6924	k0 = 1,727
	Primeira ordem	0,9929	0,2532	4,8227	k1 = 0,019
	Higuchi	0,8521	1,2489	1,5829	kH = 3,800
	Korsmeyer-Peppas	0,9686	0,5712	3,0089	kKP = 1,330; n = 1,142
Microemulsão	Ordem zero	0,9938	1,5665	5,2823	k0 = 0,012
	Primeira ordem	0,9101	6,4658	2,0788	k1 = 0,152
	Higuchi	0,7428	10,7249	1,0402	kH = 21,194
	Korsmeyer-Peppas	0,9194	6,1648	2,1284	kKP = 4,628; n = 1,562

Legenda: R²= Coeficiente de determinação ajustado. RMSE= raiz do erro quadrático médio. MSC= Critério de Seleção do Modelo. k0 = constante de liberação de ordem zero. k1= constante de liberação de primeira ordem. kH= Constante de liberação de Higuchi. kKP= constante de liberação incorporando características estruturais e geométricas da forma de dosagem do fármaco. N= expoente difusional que indica o mecanismo de liberação do fármaco.

Fonte: Autora (2023).

4.9 Estudo de toxicidade *in vivo* em larvas do *Tenebrio molitor*

O estudo da avaliação da toxicidade da microemulsão foi realizado utilizando modelo alternativo com larvas de *Tenebrio molitor*. Esse modelo tem sido bastante empregado como alternativa ao uso de animais, garantindo redução de custo e confiabilidade dos resultados (Morey et al., 2016). Há relatos de utilização das larvas de *T. molitor* para avaliação de atividade antimicrobiana, inseticida e toxicidade (Valk, Meijden, 2014; Wang, et al 2015).

A relação teste-controle realizada no modelo alternativo para avaliação da toxicidade da solução de fração DCM e ME3 ao longo de 7 dias após a administração das amostras, indicou um percentual de sobrevida após inoculação da fração DCM e ME3 nas concentrações de 1 a 100 µg.mL foi de 100%. As larvas permaneceram vivas

e com todos os movimentos preservados até o último dia do teste. Evidenciando que a fração DCM e ME3 não apresentaram toxicidade, mostrando-se, portanto, seguras.

4.10 *Molecular docking study*

Foi realizado os cálculos de minimização de energia para a obtenção da conformação de energia mínima. Os sistemas de estudo (brachydinas) foram otimizados como pode ser observado na Figura 48. A forma mais estável de dispor os átomos tem como aspecto marcante é a aproximação paralela dos anéis C e D. Os dados energéticos totais para três moléculas estudados podem ser observados nas Tabelas 13.

Figura 48 - Configuração mais estável da brachydina 1 - A) vista superior, B) vista lateral; brachydina 2 - C) vista superior, D) vista lateral; brachydina 3 - E) vista superior, F) vista lateral.

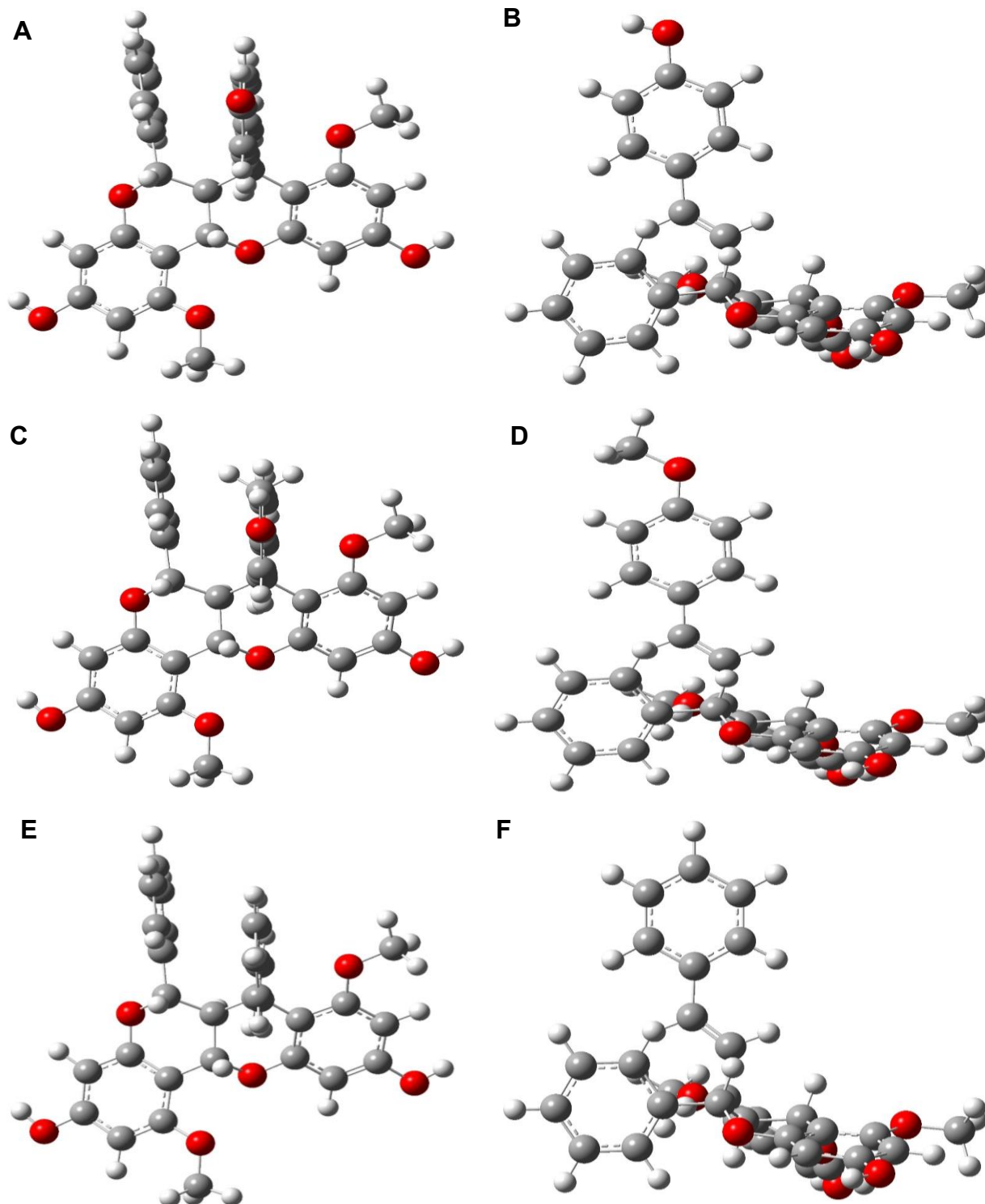


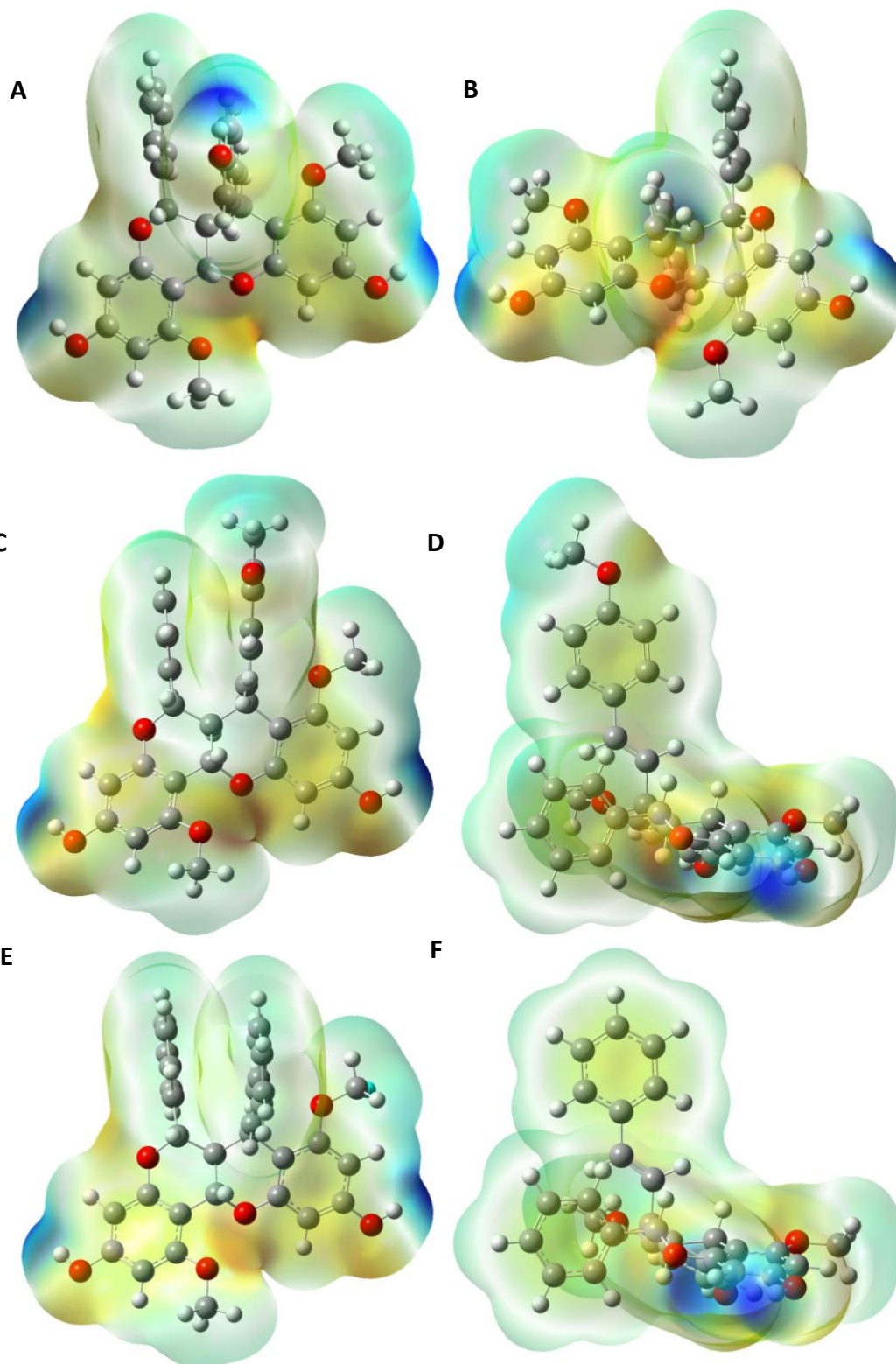
Tabela 13 - Propriedades eletrônicas calculadas para as brachydinas

Brachydinas	Energia (KeV)	μ (D)	HOMO (eV)	LUMO (eV)	GAP H-L (eV)	U (eV)	H (eV)	G (eV)	S (eV)
1 (OH)	- 48,00	4,1000	-	-	-	15,4051	15,4309	12,6451	7,19 x 10 ⁻⁴
			5,5273	0,8481	4,6792				
2 (OCH₃)	- 49,04	4,3245	-	-	-	16,2074	16,2331	13,3394	9,71 x 10 ⁻³
			5,4835	0,8046	4,6758				
3 (H)	- 46,00	2,8313	-	-	-	14,4478	15,2848	12,5637	9,13 x 10 ⁻³
			5,6740	1,0527	4,6212				

Legenda: μ – Momento de dipolo; U – Energia; H – Entalpia; G – Energia de Gibbs; S – Entropia.

Os Mapas de Potencial Eletrostático (MPE) apresentado na Figura 49, indicaram que não houve diferença entre as brachydinas 2 e 3, a maior parte da molécula dessas substâncias possuem uma distribuição de cargas similar. Esse resultado é muito interessante pelo ponto de vista da bioquímica porque muito da atividade de um composto é relacionado basicamente a forma como as cargas se distribuem espacialmente na estrutura molecular. Assim, uma enzima que seja quimicamente sensível à distribuição de cargas de uma molécula será sensível também aos análogos estruturais desta molécula, quando for preservado o MPE.

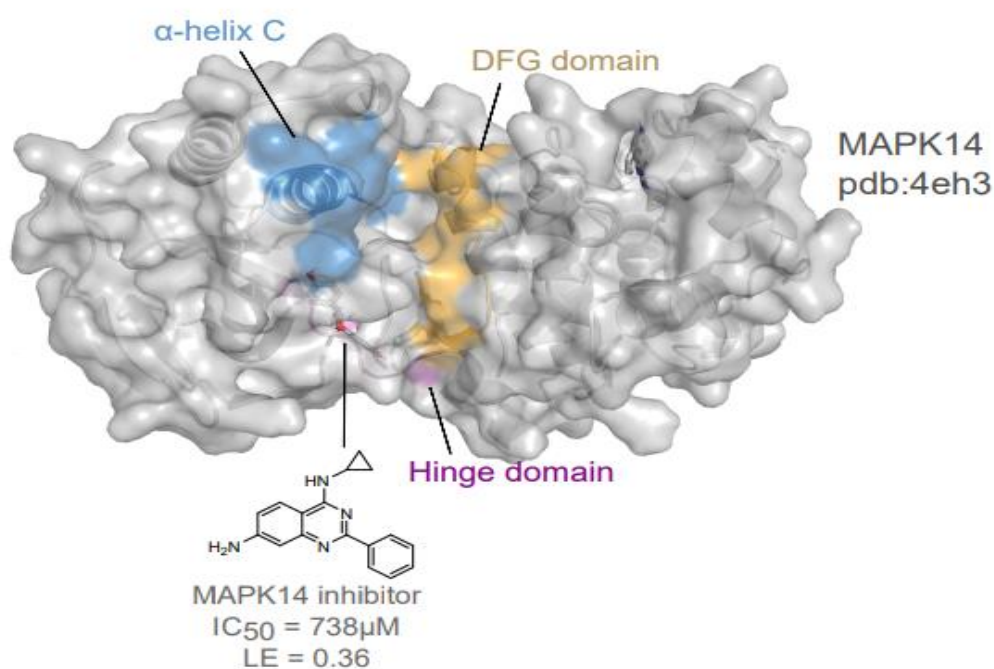
Figura 49 - Mapas de Potencial Eletrostático da brachydina 1 - A) vista superior, B) vista lateral; brachydina 2 - C) vista superior, D) vista lateral; brachydina 3 - E) vista superior, F) vista lateral.



Os resultados apresentados nesse estudo e os apresentados por Maciel-Silva et al., 2023, Serpeloni (2023) e Nunes (2020), sugerem que as brachydinas apresentam importante atividade inibitória da proliferação das células tumorais. Nesse sentido, as brachydinas 1, 2 e 3 (BrA, BrB e BrC) foram submetidas à análise de docking molecular a fim de encontrar possíveis alvos moleculares para esses ligantes, com a perspectiva de melhor entendimento dos mecanismos de que controlam os processos celulares envolvidos com a carcinogênese.

Para identificar as proteínas específicas envolvidas nos processos celulares associados à carcinogênese, foram realizadas simulações de acoplamento. A docagem inversa foi utilizada para avaliar o modo de ligação da molécula com os locais de ligação de múltiplos alvos proteicos, com o objetivo de identificar proteínas com fortes afinidades de ligação para o ligante e potenciais alvos (Li, 2013). O rastreo *in silico*, representado na Figura 50, identificou com êxito interações relevantes entre as brachydinas e o local alostérico da isoforma da proteína quinase MAPK14 (p38 α). Essa proteína está envolvida em inúmeras vias de sinalização que regulam várias funções biológicas, incluindo a modulação de redes de sinalização pró-inflamatórias e a biossíntese de citocinas como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e a interleucina-1 β (IL-1 β) em células imunes (Yokota, 2016).

Figura 50 - Ancoragem molecular das brachydinas com MAPK14.



Fonte: Autora (2023).

As MAPKs (proteínas quinases ativadas por mitogênio) são proteínas quinases de serina/treonina responsáveis pelo processamento e regulação das propriedades celulares em resposta a estímulos extracelulares. Essas quinases têm emergido como alvos importantes na busca de novas aplicações terapêuticas devido ao seu envolvimento em diversos eventos celulares como diferenciação, mitogênese, sobrevivência celular e apoptose (Lee, 2017).

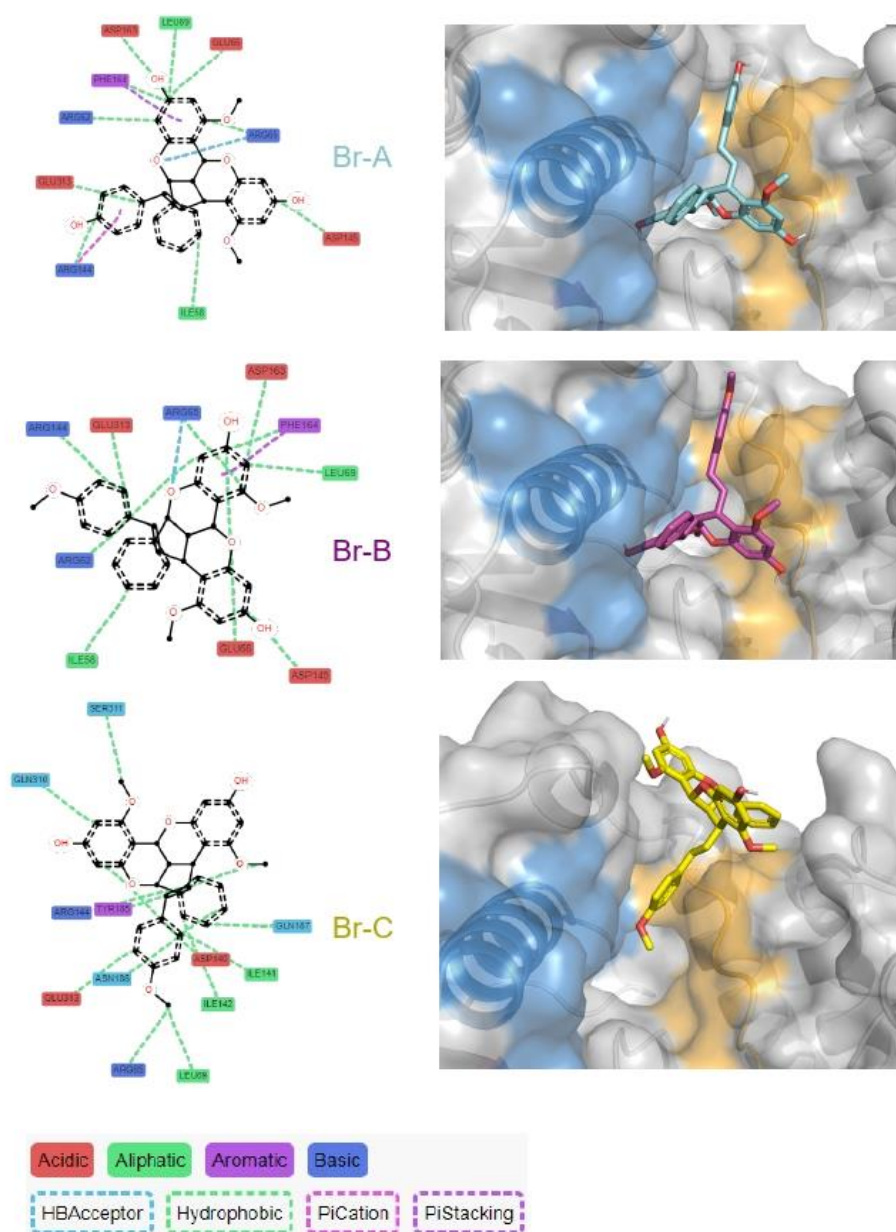
Dentre as quatro isoformas da p38 MAPK (α , β , γ e δ), a isoforma p38 α foi a primeira a ser descoberta e tem sido amplamente estudada no contexto de alvos inflamatórios, doenças degenerativas e carcinogênese (Lee, 2017; Canovas, 2021). A inibição da sinalização p38 α tem mostrado associações com diferentes tipos de células tumorais, o que tem incentivado mais estudos investigando esta via como um potencial alvo farmacológico no desenvolvimento de imunoterápicos e quimioterápicos eficazes.

A literatura tem destacado a p38 α como um alvo terapêutico em estudos pré-clínicos centrados na atividade anticancerígena. A inibição da p38 tem sido associada a vários resultados, incluindo o aumento da citotoxicidade da cisplatina em células da glândula mamária de camundongos com tumores mamários, levando a reduções no tamanho do tumor e malignidade *in vivo* (Pereira, 2013). Além disso, foi demonstrado que houve diminuição da metástase do cancro da mama, reduzindo a destruição óssea associada ao tumor induzida pela quimioterapia em ratos implantados com células cancerígenas (Murali, 2018). A inibição da p38 levou ao aumento da eficácia terapêutica do Sorafenib em camundongos com carcinomas hepatocelulares (Rudalska, 2014), à redução do crescimento de tumores do cólon (Gupta, 2014), ao aumento da produção do fator de necrose tumoral em 50% das células de leucemia humana (Lalaoui, 2016), à ruptura do nicho imunoprivilegiado e à diminuição da progressão tumoral (Katlinski, 2017), aumento da citotoxicidade do taxano através do aumento da instabilidade cromossômica em modelos murinos e xenoenxertos derivados de pacientes com potenciação prolongada dos efeitos do taxano em 75% dos xenoenxertos (Canovas, 2018), aumento das propriedades imunossupressoras *in vivo* das células T antitumorais e funcionalidades melhoradas de células T humanas reativas a tumores (Gurusamy, 2020), bem como redução do crescimento tumoral,

angiogênese, metástases pulmonares e diminuição da acumulação de populações mieloides pró-tumorais (Zonneville, 2020).

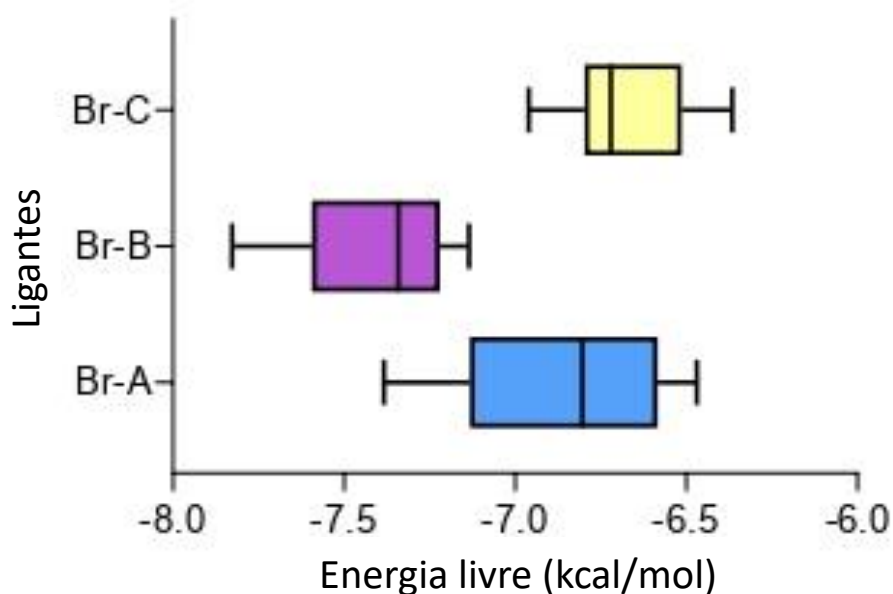
Como pode ser observado na Figura 51, as brachydinas BrA e BrB apresentam uma semelhança estrutural, têm um padrão de interação comum com os resíduos ARG65, ARG62, PH164, GLU313 e interações na parte inferior da cavidade com ASP145 e ILE58. Em contrapartida, a BrC apresentou algumas diferenças no seu modo de ligação específico, incluindo interações com SER311, GLN310, TYR185, ASP140, ASN186 e, na cavidade, com GLN187, GLU313 e ASN186.

Figura 51 - Sítios alostéricos e modos de potencial ligação das brachydinas com a cavidade da MAP



Fonte: Autora (2023).

Figura 52 - Energia livre de ligação dos ligante a proteína p38 α .



Fonte: Autora (2023).

A Figura 52 ilustra a energia livre de ligação estimada de cada ligante (brachydinas) em associação com a proteína p38 α (receptor). Nomeadamente, a BrB apresentou a energia de ligação mais baixa, indicando a afinidade mais elevada para a p38 α . A interação ligante/receptor com a energia livre de ligação mais baixa é normalmente a mais favorecida. Esta observação é ainda apoiada pelos notáveis resultados relatados por Nunes (2020), demonstrando a excepcional citotoxicidade do flavonoide dimérico contra a linha celular de cancro da próstata humano (PC-3). A BrB apresentou um valor IC₅₀ de 4,28 μ M, comparável ao fármaco de referência cisplatina (3,3 μ M) utilizado no tratamento do cancro da próstata. Além disso, a BrB induziu a morte celular por apoptose/necrose, na concentração de 3,84 μ M, reduziu a expressão de fosfo-AKT (AKT serina/treonina quinase), um regulador crucial do ciclo celular e da proliferação. O estudo de Serpeloni (2023) confirmou ainda que a BrB é um candidato potente para a terapia do cancro da próstata metastático (DU145). Os efeitos citotóxicos foram observados em concentrações $\geq 1,50$ μ M após 24 horas de tratamento em células 2D, e concentrações mais altas produziram efeitos citotóxicos com durações de tratamento mais longas (48, 72 e 168 horas). O tratamento com BrB

resultou na redução da área/volume de esferóides tumorais 3D, diminuiu a migração/invasão celular em monocamadas 2D a uma concentração de 6 μM e promoveu efeitos antimigratórios em esferóides tumorais DU145 ($\geq 30 \mu\text{M}$).

Por conseguinte, as afinidades de ligação previstas oferecem informações valiosas sobre a atividade variável dos ligantes estudados, salientando os resultados promissores apresentados pela BrB na investigação dos seus efeitos antitumorais contra o cancro da próstata.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo químico do extrato hidroetanólico 70% das raízes da espécie *F. phatyphylla* demonstrou bom rendimento e permitiu a obtenção de uma fração orgânica proveniente da partição com diclorometano rica em flavonoides diméricos.

A incorporação da fração DCM em formulação do tipo microemulsão utilizando água, miristato de isopropila como fase oleosa e os tensoativos Tween 80 e Transcutol P por meio do diagrama de fases pseudoternário permitiu a obtenção de uma microemulsão homogênea, opticamente transparente e termodinamicamente estável.

Foram incorporadas duas proporções de fração a microemulsão 3% e 5% (p/p), e as características físicas dessas microestruturas foram avaliadas e a ME3 foi escolhida para continuidade do estudo, uma vez que esta apresentou melhor estabilidade eletrostática com PZ - 49,03 e maior uniformidade de tamanho com IP 0,543. Já que sistemas mais monodispersos e estáveis são requeridos para aplicações farmacêuticas.

As microemulsões ME e ME3 foram analisadas quanto a resistência à centrifugação e demonstraram-se visualmente estáveis após o aumento da mobilidade das partículas, mostram-se também isotrópicas com valor de índice de refração 1,42, característica das microemulsões, pHs fisiologicamente aceitáveis (7,80 e 6,69) e densidade de massa de 1,016g/cm³.

A caracterização reológica das formulações evidenciou comportamento newtoniano por meio da sobreposição das curvas ascendentes e descendentes com representação gráfica linear da tensão e taxa de cisalhamento. Além disso, a análise oscilatória mostrou que a estrutura do fluido desenvolvido é classificada como líquido

com propriedades viscoelásticas, parâmetro importante na velocidade de liberação do ativo.

O estudo da estabilidade das microemulsões nas condições monitoradas de temperatura ambiente por 30 dias, ciclos de gelo-degelo (-5 a 50°C) e estresse térmico (40 a 80°C) constatou a estabilidade da microemulsão ao demonstrar a integridade dos ativos presente na fração.

Os resultados do estudo de liberação indicaram que a microemulsão tem capacidade de liberação lenta e controlada da fração com quantidade cumulativa superior a 60% em 6 horas.

A avaliação da toxicidade da microemulsão ME3 e fração DCM em larvas do *Tenebrio molitor* durante 7 dias, confirmou que as amostras estudadas não apresentam toxicidade, uma vez que as larvas permaneceram vivas e com seus movimentos preservados ao final do teste, garantindo maior segurança na continuidade da investigação da fração DCM em estudos com atividades biofarmacológicas.

Ademais, foi realizado o isolamento e identificação de três substâncias presentes na fração, denominadas de brachydyinas, por meio da cromatografia em coluna aberta, utilizando modo gradiente de eluição. Essas substâncias têm sido reportadas na literatura com promissora atividade antineoplásicas, foi realizada a docagem moléculas desses ligantes (brachydyinas) com alvos moleculares envolvidos com a carcinogênese. As brachydyinas apresentaram significativas interações com o sítio alostérico da isoforma da proteína quinase MAPK14 (p38 α), proteína está associada a várias funções biológicas principalmente em atividades anticancerígena.

Os resultados desse estudo trazem novas perspectivas quanto a incorporação bem-sucedida da fração DCM na formulação desenvolvida, conduzindo a um cenário de valorização dos produtos naturais provenientes da biodiversidade brasileira. Sendo necessário estudos mais aprofundados para avaliar a atividade antineoplásica da microemulsão em modelo experimental *in vivo*, realizar a incorporação das brachydyinas na microestrutura a fim de analisar a eficácia destas e a possibilidade de efeito sinérgico. Esse é o primeiro estudo de desenvolvimento de produto realizado com a espécie *Fridericia platyphylla*.

REFERÊNCIAS

- ABOOFAZELI, R.; BARLOW, D. J.; LAWRENCE, M. J. Particle size analysis of concentrated phospholipid microemulsions: I. Total intensity light scattering. **AAPS PharmSci.** v. 2, n. 13, 2000.
- Agencia Nacional de Vigilância Sanitária . Farmacopéia Brasileira. 5. ed. Brasília: Anvisa, v. 2, 2010.
- AGGARWAL, N.; GOINDI, S.; KHURANA, R. Formulation, Characterization and evaluation of an optimized microemulsion formulation of griseofulvin for topical application. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 105, p. 158–166, 2013.
- ALCERITO, T.; BARBO, F. E.; NEGRI, G.; SANTOS, D. Y. A. C.; MEDA, C. I.; YOUNG, M. C. M.; CHÁVEZ, D.; BLATT, C. T. T. Foliar epicuticular wax of *Arrabidaea brachypoda*: Flavonoids and antifungal activity. **Biochem. Syst. Ecol.** v. 30, n. 7, p. 677–683, 2002.
- ALIREZA MORTAZAVI, S.; PISHROCHI, S.; JAFARI AZAR, Z. Formulation and *in vitro* evaluation of tretinoin microemulsion as a potential carrier for dermal drug delivery. **Ira J. Pharm. Research**, v. 12, n. 4, p. 599–609, 2013.
- ALMEIDA, T. C. A. **Avaliação da estabilidade de emulsões concentradas em bebidas**. 2012. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.
- ARAPITSAS P. Identification and quantification of polyphenolic compounds from okra seeds and skins. **Food chem.**, v. 110, n. 4, p. 1041 – 1045, 2008.
- ARAÚJO, L. C. C.; AGUIAR, J. S.; NAPOLEÃO, T. H.; MOTA, F. V. B.; BARROS, A. L. S. Evaluation of Cytotoxic and Anti-Inflammatory Activities of Extracts and Lectins from *Moringa oleifera* Seeds. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, p. e81973, 2013.
- AUTON, M. E. Delineamento de Formas Farmacêuticas, 2ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.
- BABY, A.R.; HAROUTIOUNIAN-FILHO, C.A.; SARRUF, F.D.; TAVANTE-JÚNIOR, C.R.; PINTO, C.A.S.O.; ZAGUE, V.; ARÊAS, E.P.G.; KANEKO, T.M.; VELASCO, M.V.R. Estabilidade e estudo de penetração cutânea *in vitro* da rutina veiculada em uma emulsão cosmética através de um modelo de biomembrana alternativo. **Rev. Bras. Ciên. Farm.** v. 44, n.2, p.233-248, 2008.
- BERGONZI, M. C.; HAMDOUCH, R.; MAZZACUVA, F.; ISACCHI, B.; BILIA, A. R. Optimization, characterization and *in vitro* evaluation of curcumin microemulsions. **LWT-Food Sci Technol**, v. 59, p. 148–155, 2014.
- BERTANHA, C. S.; GIMENEZ, V. M. M.; FURTADO, R. A.; TAVARES, D. C. Isolation, *in vitro* and *in silico* Evaluation of Phenylethanoid Glycoside from *Arrabidaea brachypoda* as Lipooxygenase Inhibitor. **J. Braz. Chem. Soc**, v. 13, n. 4, p. 849–855, 2020.

BHANDARI, R.; KAUR, I. P. Pharmacokinetics, tissue distribution and relative bioavailability of isoniazid-solid lipid nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 441, n.1-2, p.202-12, 2013.

BONNET, S.; DE VERNAL, A.; HILLAIRES-MARCEL, C.; RADI, T.; HUSUM, K. Variability of sea-surface temperature and sea-ice cover in the Fram Strait over the last two millennia. **Marine Micropaleontology**, v. 74, n. 3-4, 59–74, 2010.

BOSE, S.; DU, Y.; TAKHISTOV, P.; MICHNIAK-KOHN, B. Formulation optimization and topical delivery of quercetin from solid lipid based nanosystems. **International Journal of Pharmaceutics**, v.441, n.1-2, p.56-66, 2013.

BRAMARA, B. V. B.; VASAVI, H. S.; SUDEEP, H. V.; SHYAM PRASAD, K. Hydroalcoholic extract from *Lepidium meyenii* (Black Maca) root exerts wound healing activity in Streptozotocin-induced diabetic rats. **Wound Med.**, v. 19, p. 75–81, 2017.

BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. P.; COUTO, R. D.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVID, J. M. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1359–1369, 2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira**. Brasília: Anvisa, 2011.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos**. 1. ed. Brasília: ANVISA, 2004.

BRUXEL, F.; LAUX, M.; WILD, L. B.; FRAGA, M.; KOESTER, L. S.; TEIXEIRA, H. F. Nanoemulsões como sistemas de liberação parenteral de fármacos. **Química Nova**, v. 35, n. 9, p. 1827–1840, 2012.

CALIXTO, J. B. The role of natural products in modern drug discovery. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91 (Supl. 3), p. e20190105, 2019.

CANOVAS, B., NEBRED, A. R. Diversity and versatility of p38 kinase signalling in health and disease. **Nat Rev Mol Cell Biol** 22, p. 346–366, 2021.

CANOVAS, B.; IGEA, A.; SARTORI, A. A.; GOMIS, R. R.; PAULL, T. T.; ISODA, M.; PÉREZ-MONTOYO, H.; SERRA, V.; GONZÁLEZ-SUÁREZ, E.; STRACKER, T. H.; NEBRED, A. R. Targeting p38 α increases DNA damage, chromosome instability, and the anti-tumoral response to taxanes in breast cancer cells. **Cancer Cell**, v. 33, n. 6, p. 1094–1110.e8, 2018.

CAPEK, I. Degradation of kinetically-stable o/w emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*, v.107, p.125-155, 2004.

CHORILLI, M.; BRIZANTE, A. C.; RODRIGUES, C. A.; REGINA, H.; SALGADO, N. Aspectos gerais em sistemas transdérmicos de liberação de fármacos General aspects in transdermal systems of drugs release. **Rev. Bras. Farm**, v. 88, n. 1, p. 7–13, 2007.

CODERCH, C.; MORREALE, A.; GAGO, F. Tubulin-based structure-affinity relationships for antimetabolic Vinca alkaloids. **Anti-cancer agents in medicinal chemistry**, v. 12, n. 3, p. 219–25, 2012.

COJOCARU, V.; RANETTI, A. E.; HINESCU, L. G.; IONESCU, M.; COSMESCU, C.; POȘTOARĂ, A. G.; CİNTEZĂ, L. O. Formulation and Evaluation of in Vitro Release Kinetics of Na³ Cdtpa Decorporation Agent Embedded in Microemulsion-Based Gel Formulation for Topical Delivery. **Farmacia**, v. 63, n. 5, p. 656–664, 2015.

CONSTANTINIDES, P. P.; LANCASTER, C. M.; MARCELLO, J.; CHIOSSOME, D. C.; ORNER, D.; HIDALGO, I.; SMITH, P. L.; SARKAHIAN, A. B.; YIV, S. H.; OWEN, A. J. Enhanced intestinal absorption of an RGD peptide from water-in-oil microemulsions of different composition and particle size. **J. Control. Rel.**, v.34, p.109-116, 1995.

CORRÊA, A. D.; BATISTA, R. S.; QUINTAS, L. E. M. **Plantas medicinais: do cultivo à terapêutica**. 7^a ed. Vozes, 2008.

CORREA, M. A.; SCARPA, M. V.; FRANZINI, M. C.; OLIVEIRA, A. G. On the incorporation of the nonsteroidal anti-inflammatory naproxen into cationic O/W microemulsions. **Colloids Surf. B**, v. 43, p. 106-112, 2005.

CRUZ, S. A.; FARAH, M.; ZANIN, M.; BRETAS, R. E. S. Avaliação das propriedades reológicas de blendas de PEAD virgem/PEAD reciclado. **Polímeros**, v. 18, n. 2, p. 144-51, 2008.

CUI, J.; YU, B.; ZHAO, Y.; ZHU, W.; LI, H.; LOU, H.; ZHAI, G. Enhancement of oral absorption of curcumin by self-microemulsifying drug delivery systems. **Int. J. Pharm.**, v. 371, n. 1-2, p. 148-55, 2009.

DALMORA, M. E. A.; DALMORA, S. L.; OLIVEIRA, A. G. Inclusion complex of piroxicam with b-cyclodextrin and incorporation in cationic microemulsion. In vitro drug release and *in vivo* topical anti-inflammatory effect. **Int. J. Pharm.**, v.222, p.45-55, 2001.

DALMORA, M. E. A.; OLIVEIRA, A. G. Inclusion complex of piroxicam with b-cyclodextrin and incorporation in hexadecyltrimethylammonium bromide based microemulsion. **Int. J. Pharm., Amsterdam**, v.184, p.157-164, 1999.

DALTIN, D. Tensoativos: química, propriedades e aplicações. Blucher, 2011.

DAMASCENO, D. P. G. L.; SILVA, J. A.; OLIVEIRA, E. E.; SILVEIRA, W. L. L.; ARAÚJO, I. B.; OLIVEIRA, A. G. Microemulsão: um promissor carreador para moléculas insolúveis. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.** v. 32, n.1, p. 9-18, 2011.

DANIELSSON, I.; LINDMAN, B. The definition of microemulsion. **Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.** v.3, n.4, p.391-392, 1981.

DJORDJEVIC, L.; PRIMORAC, M.; STUPAR, M.; KRAJISNIK, D. Characterization of caprylocaproyl macrogolglycerides based microemulsion drug delivery vehicles for an amphiphilic drug. **Int. J. Pharm.**, v. 271, n.1-2, p. 11-9, 2004.

DO NASCIMENTO, J. R.; ALVES, M. A. D. J.; VIEIRA, F. C.; RODRIGUES, C. D. P.; VASCONCELOS, L. N.; FILHO, J. L. P.; LOPES, A. C. C. B.; TANGERINA, M. M. P.; VILEGAS, W.; DA ROCHA, C. Q. A Review of the Phytochemistry and Pharmacological Properties of the Genus *Arrabidaea*. **Pharmaceuticals**, v. 15, n. 6, p. 658, 2022.

DONG, X.; ZHU, Q.; DAI, Y.; HE, J.; PAN, H.; CHEN, J.; ZHENG, Z. P. Encapsulation artocarpone and ascorbic acid in O/W microemulsions: Preparation, characterization, and antibrowning effects in apple juice. **Food Chem.**, v. 192, p. 1033–1040, 2016.

DU, X.; KHAN, A. R.; FU, M.; JI, J.; YU, A.; ZHAI, G. Current development in the formulations of non-injection administration of paclitaxel. **Int. J. Pharm.**, v. 542, n. 1–2, p. 242–252, 2018.

ERCOLAK, V.; SAHIN, B.; GUNALDI, M.; DUMAN, B. B.; AFSAR, C. U. Efficacy of paclitaxel in the treatment of Kaposi sarcoma. **European review for medical and pharmacological sciences**, v. 19, n. 21, p. 4095–100, 2015.

FERREIRA, S. G.; CONCEIÇÃO, V. S.; GOUVEIA, N. S.; SANTOS, G. S.; SANTOS, R. L. C.; LIRA, A. A. M.; CAVALCANTI, S. C. H.; SARMENTO, V. H. V.; NUNES, R. S. An environmentally safe larvicide against *Aedes aegypti* based on in situ gelling nanostructured surfactant systems containing an essential oil. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 456, p. 190-196, 2015.

FIGUEIREDO, K. A.; NEVES, J. K. O.; SILVA, J. A. DA.; FREITAS, R. M. DE.; & CARVALHO, A. L. M. Phenobarbital loaded microemulsion: development, kinetic release and quality control. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 52, n. 2, p. 251–264, 2016.

FISCHER, A.; SMIEŠKO, M.; SELLNER, M.; LILL, M. A. Decision Making in Structure-Based Drug Discovery: Visual Inspection of Docking Results. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 64, n. 5, p. 2489–2500, 2021.

FONSECA, C.; SIMÕES, S.; GASPAR, R. Paclitaxel-loaded PLGA nanoparticles: preparation, physicochemical characterization and in vitro antitumor activity. **J Cont Release**, v. 83, p. 273-86, 2002.

FORMARIZ, T. P.; URBAN, M. C. C.; JÚNIOR, A. A. S.; GREMIÃO, M. P. D.; OLIVEIRA, A. G. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 3, p. 301-313, 2005.

FORMARIZ, T. P.; SARMENTO, V. H. V.; SILVA-JUNIOR, A. A.; SCARPA, M. V.; SANTILLI, C. V.; OLIVEIRA, A. G. Doxorubicin biocompatible O/W microemulsion stabilized by mixed surfactant containing soya phosphatidylcholine. **Colloids Surf**, v.51, n.1, p. 54-61, 2006.

FRANCO, Y. E. M.; LIMA, C. A.; ROSA, M. N.; SILVA, V. A. O.; REIS, R. M.; PRIOLLI, G. G.; CARVALHO, P. O.; NASCIMENTO, J. R.; ROCHA, C. Q.; LONGATO, G. B. Investigation of U-251 cell death triggered by flavonoid luteolin:

towards a better understanding on its anticancer property against glioblastomas. **Nat. Prod. Res.**, v. 35, n. 22, p. 4807-4813, 2021.

FRIBERG, S. E.; BOTHOREL, P. **Microemulsions: Structure and dynamics**. CRC: Boca Raton, 1988.

FRIBERG, S. E.; VENABLE, R. L. In: **Encyclopedia of emulsions technology**. Becker, P. Marcel Dekker, 1983.

FRONZA, T.; CAMPOS, A.; TEIXEIRA, H. Nanoemulsões como sistemas de liberação de Fármacos Oftálmicos. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v. 23, n. 4, p. 558-566, 2004.

GALVAN, G. L. **Avaliação genotóxica de efluentes químicos de instituição de Ensino e pesquisa utilizando como bioindicador o *altiparanae* (Characidae)**. 2011. DiSSERTAÇÃO (Mestrado em Ecologia e Conservação) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

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

GENNARO, A. R. **Remington: The Science and Practice of Pharmacy**. 21st ed. Lippincott Williams e Wilkins, 2005.

GENTRY, A. H. Generic delimitations of Central American Bignoniaceae. **Brittonia**, v. 25, n. 3, p. 226–242, 1973.

GEORGE, V. C.; DELLAIRE, G.; RUPASINGHE, H. P. V. Plant flavonoids in cancer chemoprevention: role in genome stability. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 45, p. 1–14, 2017.

GOMES, F. E. S. **Obtenção de sistemas microemulsionados e estudo de simulação por dinâmica molecular de sistemas micelares objetivando a veiculação de produtos naturais bioativos**. 2010. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2010.

GOMES, F. E. S. **Obtenção de sistemas microemulsionados e estudo de simulação por dinâmica molecular de sistemas micelares objetivando a veiculação de produtos naturais bioativos**. 2010. Tese (Doutorado em Química). Universidade Federal do rio Grande do Norte, Natal, 2010.

GONSENCA, M.; BEŠTER-ROGAC, M.; GAŠPERLIN, M. Lecithin based lamellar liquid crystals as a physiologically acceptable dermal delivery system for ascorbyl palmitate. **Eur J. Pharma Sci.** v. 50, n. 1, p. 114–122, 2013.

GRANADA, A.; NEMEN, D.; DORA, C.L.; NECKEL, G.L.; LEMOS-SENNA, E. **O emprego de sistemas de liberação como estratégia para melhorar as propriedades terapêuticas de fármacos de origem natural: o exemplo da**

camptotecina e seus derivados. Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl., v. 28, n.2, p.129-139, 2007.

GUPTA, J.; DEL BARCO BARRANTES, I.; IGEA, A.; SAKELLARIOU, S.; PATERAS, I. S.; GORGOULIS, V. G.; NEBRED, A. R. Dual function of p38 α MAPK in colon cancer: suppression of colitis-associated tumor initiation but requirement for cancer cell survival. **Cancer Cell**, v. 25, p. 484–500, 2014.

GUPTA, S.; BANSAL, R.; ALI, J.; GABRANI, R.; DANG, S. Development and characterization of Polyphenon 60 and caffeine microemulsion for enhanced antibacterial activity. **BioMed Res. Int.**, 2014.

GUPTE, A.; CIFTCI, K. Formulation and characterization of paclitaxel, 5-FU and paclitaxel +5-FU micrispheres. **Int J Pharm**, v. 276, p. 93-106, 2004.

GURUSAMY, D.; HENNING, A. N.; YAMAMOTO, T. N.; YU, Z.; ZACHARAKIS, N.; KRISHNA, S.; KISHTON, R. J.; VODNALA, S. K.; EIDIZADEH, A.; JIA, L.; KARIYA, C. M.; BLACK, M. A.; EIL, R.; PALMER, D. C.; PAN, J. H.; SUKUMAR, M.; PATEL, S. J.; RESTIFO, N. P. Multi-phenotype CRISPR–Cas9 screen identifies p38 kinase as a target for adoptive immunotherapies. **Cancer Cell**, v. 37, p. 818–833.e9, 2020.

HARDING, C. R.; WATKINSON, A.; RAWLINGS, A. V.; SCOTT, I. R. Dry skin, moisturization and corneodesmolysis. **Int J Cosmet Sci.** v. 22, n. 1, p. 21-52, 2000.

HOTZA, D. Artigo revisão: colagem de folhas cerâmicas. **Cerâmicas**, v. 43, p. 283-284, 1997.

HU, L.; WU, H.; NIU, F.; YAN, C.; YANG, X.; JIA, Y. Design of fenofibrate microemulsion for improved bioavailability. **Int. J. Pharm.**, v. 420, n. 2, p. 251-5, 2011a.

HU, L.; YANG, J.; LIU, W.; LI, L. Preparation and evaluation of ibuprofen-loaded microemulsion for improvement of oral bioavailability. **Drug Deliv.** v. 18, n. 1, p. 90-5. 2011b.

JÁCOME, R. C. **Desenvolvimento e caracterização de microemulsões para veiculação de RNA interferente na pele.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual da Paraíba, 2015.

KALAIVANI, T.; RAJASEKARAN, C.; SUTHINDHIRAN, K.; MATHEW, L. Free Radical Scavenging, Cytotoxic and Hemolytic Activities from Leaves of *Acacia nilotica* (L.) Wild. ex. *Delile subsp. indica* (Benth.) Brenan. **Evid Based Complement Alternat Med.**, v. 2011, p. 274741, 2011.

KATLINSKI, K. V.; GUI, J.; KATLINSKAYA, Y. V.; ORTIZ, A.; CHAKRABORTY, R.; BHATTACHARYA, S.; CARBONE, C. J.; BEITING, D. P.; GIRONDO, M. A.; PECK, A. R.; PURÉ, E.; CHATTERJI, P.; RUSTGI, A. K.; DIEHL, J. A.; KOUMENIS, C.; RUI, H.; FUCHS, S. Y. Inactivation of interferon receptor promotes the establishment of

immune privileged tumor microenvironment. **Cancer Cell**, v. 31, n. 2, p. 194–207, 2017.

KHAN, J.; ALEXANDER, A.; AJAZUDDIN; SARAF, S.; SARAF, S. Recent advances and future prospects of phyto-phospholipid complexation technique for improving pharmacokinetic profile of plant actives. **Journal of Controlled Release**, v.168, n.1, p.50-60, 2013.

KONG, M.; PARK, H. J. Stability investigation of hyaluronic acid based nanoemulsion and its potential as transdermal carrier. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n.n3, p. 1303–1310, 2011.

KOURNIATIS, L.R.; SPINELLI, L. S.; MANSUR, C. R. E.; GONZÁLEZ, G. Nanoemulsões óleo de laranja/água preparadas em homogeneizador de alta pressão. **Química Nova**. v. 33, n. 2, p. 295–300, 2010.

KREILGAARD, M. Influence of microemulsions on cutaneous drug delivery. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 54 Suppl 1, p. S77-98, 2002.

KUHLMANN, M. Estratégias de dispersão de sementes no bioma Cerrado: considerações ecológicas e filogenéticas. Tese (Doutorado) Universidade de Brasília, 2016.

LALAOUI, N. HÄNGGI, K.; BRUMATTI, G.; CHAU, D.; NGUYEN, N. Y.; VASILIKOS, L.; SPILGIES, L. M.; HECKMANN, D. A.; MA, C.; GHISI, M.; SALMON, J. M.; MATTHEWS, G. M.; DE VALLE, E.; MOUJALLED, D. M.; MENON, M. B.; SPALL, S. K.; GLASER, S. P.; RICHMOND, J.; LOCK, R. B.; CONDON, S. M.; GUGASYAN, R.; GAESTEL, M.; GUTHRIDGE, M.; JOHNSTONE, R. W.; MUNOZ, L.; WEI, A.; EKERT, P. G.; VAUX, D. L.; WONG, W. W.; SILKE, J. Targeting p38 or MK2 enhances the anti-leukemic activity of smac-mimetics. **Cancer Cell**, v. 29, n. 2, p. 145–158, 2016.

LAWRENCE, M. J.; REES, G. D. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 45, n. 1, p. 89–121, 2000.

LEE, J. K.; KIM, N. J. Recent Advances in the Inhibition of p38 MAPK as a Potential Strategy for the Treatment of Alzheimer's Disease. **Molecules**, v. 22, n. 8, p. 1287, 2017.

LI, G. B.; YANG, L.L.; XU, Y.; WANG, W. J.; LI, L. L.; YANG, S. Y. A combined molecular docking-based and pharmacophore-based target prediction strategy with a probabilistic fusion method for target ranking. **J. Mol. Grah. Model.**, v. 44, p. 278–285, 2013.

LIEBERMAN, H. A.; RIEGER, M. M.; BANKER, G. S. **Pharmaceutical dosage forms: disperse systemas**. Marcel Bekker, 1989.

LOHMANN, L. G. **Bignoniaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2013.

MACIEL-SILVA, V. L.; DA ROCHA, C. Q.; ALENCAR, L. M. R.; CASTELO-BRANCO, P. V.; SOUSA, I. H.; AZEVEDO-SANTOS, A. P.; VALE, A. A. M.; MONTEIRO, S. G.; SOARES, R. P.; GUIMARÃES, S. J. A.; NASCIMENTO, J. R.; PEREIRA, S. R. F. Unusual dimeric flavonoids (brachydins) induce ultrastructural membrane alterations associated with antitumor activity in cancer cell lines. **Drug Chem Toxicol.**, v. 46, n. 4, p. 665-676, 2023.

MARKHAM, K. R. **Techniques of flavonoid identification**. Academic Press, 1982.

MARTIN, A.; WARBRICK, J.; CAMMARATTA, A. Rheology in physical pharmacy. **Philadelphia**: Lea & Febiger, 1993.

MOGHIMIPOUR, E.; SALIMI, A.; EFTEKHARI, S. Design and characterization of microemulsion systems for naproxen. **Adv Pharm Bull**, v. 3, n. 1 p. 63-71, 2013.

MONTEIRO, F. S.; COSTA, J. R. S.; MARTINS, L. J. A.; ROCHA, C. Q.; BORGES, A. C. R.; BORGES, M. O. R. Hydroalcoholic extract of leaves of *Arrabidaea brachypoda* (Dc.) bureau present antispasmodic activity mediated through calcium influx blockage. **Rev. Ciencias Farm. Basica e Apl.**, v. 41, p. 1–13, 2020.

MORAIS, J. M.; BURGESS, D. J. In vitro release testing methods for vitamin e nanoemulsions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 475, n. 1, p. 393–400, 2014.

MOREY, A. T.; DE SOUZA, F. C.; SANTOS, J. P.; PEREIRA, C. A.; CARDOSO, J. D.; DE ALMEIDA, R. S.; COSTA, M. A.; DE MELLO, J. C.; NAKAMURA, C. V.; PINGE-FILHO, P.; YAMAUCHI, L. M.; YAMADA-OGATTA, S. F. Antifungal Activity of Condensed Tannins from *Stryphnodendron adstringens*: Effect on *Candida tropicalis* Growth and Adhesion Properties. **Curr. Pharm. Biotechnol.**, v. 17, n. 4, p. 365-37, 2016.

MURALI, B.; REN, Q.; LUO, X.; FAGET, D. V.; WANG, C.; JOHNSON, R. M.; GRUOSSO, T.; FLANAGAN, K. C.; FU, Y.; LEAHY, K.; ALSPACH, E.; SU, X.; ROSS, M. H.; BURNETTE, B.; WEILBAECHER, K. N.; PARK, M.; MBALAVIELE, G.; MONAHAN, J. B.; STEWART, S. A. Inhibition of the stromal p38MAPK/MK2 pathway limits breast cancer metastases and chemotherapy-induced bone loss. **Cancer Res.**, v. 78, p. 5618–5630, 2018.

NETO, G. G.; MORAIS, R. G. Recursos medicinais de espécies do Cerrado de Mato Grosso: um estudo bibliográfico. **Acta Bot. Brasilica**, v. 17, n. 4, p. 561–584, 2003.

NETZ, P. A.; GEORGE, G. O. Reologia em Fundamentos de físico-química: uma abordagem conceitual para as ciências farmacêuticas. **Artmed**, 2002.

NEUENSCHWANDER, A.; ROCHA, V. P. C.; BASTOS, T. M.; MARCOURT, L.; MORIN, H.; DA ROCHA C. Q.; GRIMALDI, G. B.; DE SOUSA, K. A. F.; BORGES, J. N.; RIVARA-MINTEN, E.; WOLFENDER, J. L.; SOARES, M. B.P.; QUEIROZ, E. F. Production of highly active antiparasitic compounds from the controlled halogenation of the *Arrabidaea brachypoda* crude plant extract. **J. Nat. Prod.**, v. 83, n. 9, p. 2631–2640, 2020.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 3, p. 461–477, 2007.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **J Nat Prod.** v. 66, n. 7, p. 1022-37, 2003.

NUNES, H. L.; TUTTIS, K.; SERPELONI, J. M.; NASCIMENTO, J. R.; DA ROCHA, C. Q.; SILVA, V. A. O.; LENGERT, A. V. H.; REIS, R. M.; DE SYLLOS CÓLUS, I. M. Characterization of the in vitro cytotoxic effects of brachydins isolated from *Fridericia platyphylla* in a prostate cancer cell line. **J. Toxicol. Environ. Heal. - Part A Curr.**, v. 83, n. 15–16, p. 547–558, 2020.

OKUR, N.U.; ÇAĞLAR, E. Ş.; ARPA, M. D.; KARASULU, H. Y. Preparation and evaluation of novel microemulsion-based hydrogels for dermal delivery of benzocaine. **Pharm Dev Technol.** v. 22, n. 4, p. 500-510, 2017.

OLIVEIRA, A. G.; SCARPA, M. V.; CORREA, M. A.; CERA, L. F. R.; FORMARIZ, T. P. Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. **Química Nova**, v. 27, n. 1, 2004.

OLIVEIRA, E. C. V. **Desenvolvimento de nanoemulsões contendo ácido ursólico para otimização do tratamento da doença de chagas.** Tese (Doutorado em Ciências), Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, 2014.

ONG, S. M.; SAEKI, K.; TANAKA, Y.; NISHIMURA, R.; NAKAGAWA, T. Effects of etoposide alone and in combination with piroxicam on canine osteosarcoma cell lines. **The Veterinary Journal**, v. 218, p. 51–59, 2016.

OSBORNE, D. W.; MUSAKKANIAN, J. Skin penetration and permeation properties of Transcutol® – Neat ou diluted mixtures. **AAPS PharmSciTech**, v. 19, n. 8, p. 3512-3533, 2018.

OVER, B.; WETZEL, S.; GRÜTTER, C.; NAKAI, Y.; RENNER, S.; RAUH, D.; WALMANN, H. Natural-product-derived fragments for fragment-based ligand discovery. **Nature Chem** 5, p. 21–28, 2013.

PATEL, R. B.; PATEL, M. R.; BHATT, K. K.; PATEL, B. G. Formulation consideration and characterization of microemulsion drug delivery system for transnasal administration of carbamazepine. **Bulletin of Faculty of Pharmacy**, v. 51, p. 243-253, 2013.

PAULETTI, P. M.; BOLZANI, V. S.; YOUNG, M. C. M. Constituintes químicos de *Arrabidaea samydoides* (Bignoniaceae). **Quim. Nova**, v. 26, n. 5, p. 641–643, 2003b.

PAULETTI, P. M.; CASTRO-GAMBOA, I.; SILVA, D. H. S.; YOUNG, M. C. M.; TOMAZELA, D. M.; EBERLIN, M. N.; BOLZANI, V. S. New Antioxidant C-Glucosylxanthones from the Stems of *Arrabidaea samydoides*. **J. Nat. Prod.**, v. 66, n. 10, p. 1384–1387, 2003a.

PEREIRA, G. G. **Obtenção de nanoemulsões O/A à base de óleo de semente de**

uva e oliva aditivadas de metoxicinamato de octila e estudo do potencial antioxidante e fotoprotetor das emulsões. 2008, Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

PEREIRA, L.; IGEA, A.; CANOVAS, B.; DOLADO, I.; NEBRED, A. R. A. Inhibition of p38 MAPK sensitizes tumour cells to cisplatin-induced apoptosis mediated by reactive oxygen species and JNK. **EMBO Mol. Med.**, v. 5, p.1759–1774, 2013.

RAYAN, A.; RAIYN, J.; FALAH, M. Nature is the best source of anticancer drugs: Indexing natural products for their anticancer bioactivity. **PLoS ONE**, v. 12, n. 11, p. 1–12, 2017.

REIS, M. Y. F. A. **Desenvolvimento e caracterização de microemulsão com óleo de babaçu (*Orbignya phalerata*) para uso tópico.** Trabalho de conclusão de curso (graduação em Farmácia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2014.

RESENDE, Q. G. M. **Estudo da formação de microemulsões contendo óleo essencial de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck: efeito dos co-tensoativos e avaliação da interação das microemulsões com modelo de estrato córneo.** Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Sergipe, 2014.

REZENDE-JÚNIOR, L. M.; ANDRADE, L. M. S.; LEAL, A. L. A. B.; MESQUITA, A. B. S.; SANTOS, A. L. P. A.; NETO, J. S. L.; BARRETO, H. M. Chalcones Isolated from *Arrabidaea brachypoda* Flowers as Inhibitors of NorA and MepA Multidrug Efflux Pumps of *Staphylococcus aureus*. **Antibiotics**, v. 9, n. 351, p. 2–12, 2020.

ROCHA, C. Q.; DE-FARIA, F. M.; MARCOURT, L.; EBRAHIMI, S. N.; KITANO, B. T.; GHILARDI, A. F.; FERREIRA, A. L.; DE ALMEIDA, A. C. A.; DUNDER, R. J.; SOUZA-BRITO, A. M.; HAMBURGER, M.; VILEGAS, W.; QUEIROZ, E. F.; WOLFENDER, J-L. Gastroprotective effects of hydroethanolic root extract of *Arrabidaea brachypoda*: Evidence of cytoprotection and isolation of unusual glycosylated polyphenols. **Phytochemistry**, v. 135, p. 93–105, 2017.

ROCHA, C. Q.; QUEIROZ, E. F.; MEIRA, C. S.; MARCOURT, L. ; MOREIRA, D. R. M.; SOARES, M. B. P.; WOLFENDER, J-L.; VILEGAS, W. Dimeric flavonoids from *Arrabidaea brachypoda* and assessment of their anti-Trypanosoma cruzi activity. **Journal of Natural Products**, v. 77, n. 6, p. 1345-50, 2014.

ROCHA, C. Q.; VILEGAS, F.C.; SANTA-CECÍLIA, F. V.; CAVALCANTE, G. P.; VILEGAS, W.; GIUSTI-PAIVA, A.; SANTOS, M. H. Oleanane-type triterpenoid: An anti-inflammatory compound of the roots *Arrabidaea brachypoda*. **Rev. Bras. Farmacogn.** v. 25, n. 3, p. 228–232, 2015.

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

ROCHA, V. P. C.; ROCHA, C. Q.; QUEIROZ, E. F.; MARCOURT, L.; VILEGAS, W.;

GRIMALDI, G. B.; FURRER, P.; ALLÉMANN, É.; WOLFENDER, J.-L.; SOARES, M. B. P. Antileishmanial activity of dimeric flavonoids isolated from *Arrabidaea brachypoda*. **Molecules**, v. 24, n. 1, p. 1–13, 2019.

RODRIGUES, A. R. O. **Desenvolvimento de magnetolipossomas baseados em nanopartículas de níquel com coroa de sílica para aplicações na entrega de fármacos antitumorais**. 2012 (Mestrado em Biofísica e Bionanossistemas), Universidade do Minho, Braga, 2012.

ROSSI, C. G. F. T.; DANTAS, T. N. C.; DANTAS NETO, A. A.; MACIEL, M. A. M. Microemulsões: Uma abordagem básica e perspectivas para aplicabilidade industrial. **Ver. Uni. Rural. Sér. Cien. Exatas e da Terra**, v. 26, p. 45-66, 2007.

RUDALSKA, R.; DAUCH, D.; LONGERICH, T.; MCJUNKIN, K.; WUESTEFELD, T.; KANG, T. W.; HOHMEYER, A.; PESIC, M.; LEIBOLD, J.; VON THUN, A.; SCHIRMACHER, P.; ZUBER, J.; WEISS, K. H.; POWERS, S.; MALEK, N. P.; EILERS, M.; SIPOS, B.; LOWE, S. W.; GEFFERS, R.; LAUFER, S.; ZENDER, L. *In vivo* RNAi screening identifies a mechanism of sorafenib resistance in liver cancer. **Nat. Med.**, v. 20, p. 1138–1146, 2014.

SALGADO, C.; MORIN, H.; CORIOLANO, N. A.; NEFF, L.; ROCHA, C. Q.; VILEGAS, W.; MARCOURT, L.; WOLFENDER, J.-L.; JORDAN, O.; QUEIROZ, E. F.; ALLÉMANN, E. *In Vitro* Anti-Inflammatory Activity in Arthritic Synoviocytes of *A. brachypoda* Root Extracts and Its Unusual Dimeric Flavonoids. **Molecules**, v. 25, n. 21, p. 1–13, 2020.

SANDWITH, N. Y. Contributions to the Flora of Tropical America : LVII. Studies in Bignoniaceae, XX. **Springer behalf R. Bot. Gard.**, v. 9, n. 4, p. 597–614, 1954.

SANDWITH, N. Y. Contributions to the Flora of Tropical America: LXXVI. Notes on Bignoniaceae: XXIX: *Arrabidaea* in Martius's 'Flora brasiliensis' and Subsequently. **Springer behalf R. Bot. Gard.**, v. 22, n. 3, p. 403–420, 1968.

SANTANA, R. C.; FASOLIN, L. H.; CUNHA, R. L. Effects of a cosurfactant on the shear-dependent structures of systems composed of biocompatible ingredients. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 398, p. 54-63, 2012.

SANTOS, G. S. **Obtenção e avaliação de sistemas estabilizados por tensoativos contendo óleo essencial *Syzygium Aromaticum* com potencial para controle larvídica de *Aedes aegypti***. 2015. Monografia (Bacharel em Farmácia) - Universidade Federal de Sergipe, 2015.

SATHISH, M.; KAVITHA, B.; NAYAK, V. L.; TANGELLA, Y.; AJITHA, A.; NEKKANTI, S.; ALARIFI, A.; SHANKARAIHAH, N.; NAGESH, N.; KAMAL, A. Synthesis of podophyllotoxin linked β -carboline congeners as potential anticancer agents and DNA topoisomerase II inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 144, p. 557–571, 2018.

SCHRAMM, G. **Reologia e Reometria: Fundamentos teóricos e práticos**. 2ª ed.,

Artliber, 2006.

SERPELONI, J. M.; RIBEIRO, D. L.; WEISS, G. F.; DE OLIVEIRA, L. C. B.; FUJIIKE, A. Y.; NUNES, H. L.; DA ROCHA, C. Q.; GUEMBAROVSKI, R. L.; CÔLUS, I. M.S. Flavonoid brachyidin B decreases viability, proliferation, and migration in human metastatic prostate (DU145) cells grown in 2D and 3D culture models. **Toxicology Research**, v. 12, p. 321-331, 2023.

SHAIKH, H. K., KSHIRSAGAR, R. V., PATIL, S. G. Mathematical models for drug release characterization: A review. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 4, p. 324–338, 2015.

SILVA, C. R. S. H. **Estudo de sistemas microemulsionados para aplicação na extração e formulações de própolis**. 2001. Dissertação (Mestrado). Instituto de Química Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2001.

SILVA, J. A.; SANTANA, D. P.; BEDOR, D. G. C.; BORBA, V. F. C.; LIRA, A. A. M.; EGITO, E. S. T. Estudo de liberação e permeação in vitro do diclofenaco de dietilamônio em microemulsão gel-like. **Química Nova**, v. 32, n.6, p. 1389–1393, 2009.

SILVA, M. M.; QUEIROZ, L. P. A família Bignoniaceae na região de Catolés, Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. **Sitientibus série Ciências Biológicas**, v. 3, p. 3–21, 2003.

SILVEIRA, W. L. L.; DAMASCENO, B. P. G. L.; SILVA, K. G. H.; OLIVEIRA, A. G.; EGITO, E. S. T. Aspectos fundamentais no desenvolvimento de sistemas microemulsionados contendo anfotericina B para uso oftálmico. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n. 1, p. 9-15, 2013.

SOLANKI, S. S.; SARKAR, B.; DHANWANI, R. K. Microemulsion drug delivery system: for bioavailability enhancement of ampelopsin. **ISRN Pharm.**, 2012.

SOUSA, M. J. B. **Avaliação do Potencial Genotóxico e Mutagênico de Extratos Padronizados de *Caesalpinia ferrea* (jucá) e *Brosimum gaudichaudii* (inharé)**. 2017. Dissertação (Mestrado em Genética) - Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiânia, 2017.

SOUZA, F. M. **Desenvolvimento de microemulsão contendo minoxidil para o tratamento da alopecia**. 2017. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2017.

SOUZA, P. O. **Avaliação da atividade antitumoral do extrato de *Achyrocline satureioides***. 2018. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2018.

STEEG, P; Theodorescu, D. Metastasis: a therapeutic target for cancer. **Nat Rev Clin Oncol**, v. 5, n. 4, p. 206–219, 2008.

SUBONGKOT T.; NGAWHIRUNPAT T. Development of a novel microemulsion for oral absorption enhancement of all-trans retinoic acid. **Int J Nanomedicine**. v. 3, n.

12, p. 5585-5599, 2017.

TADROS, T.; IZQUIERDO, P.; ESQUENA, J.; SOLANS, C. Formation and stability of nano-emulsions. **Advances in colloid and interface science**, v. 108- 109, p. 303–318, 2004.

TARTARO, G.; MATEOS, H.; SCHIRONE, D.; ANGELICO, R.; PALAZZO, G. Microemulsion Microstructure(s): A Tutorial Review. **Nanomaterials**, v. 10, n. 9, p. 1657, 2020.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **J Comput Chem.**, v. 31, n. 2, p. 455-61, 2010.

VALK, T. V. D., MEIJDEN, A. V. D. Toxicity of scorpion venom in chick embryo and mealworm assay depending on the use of the soluble fraction versus the whole venom. **Toxicon**, v. 88, p. 38-43, 2014.

VAN ZIJL, F.; KRUPITZA, G.; MIKULITS, W. Initial steps of metastasis: cell invasion and endothelial transmigration. **Mutat. Res.**, v. 728, p. 23–34, 2011.

VANDAMME, T. Microemulsions as ocular drug delivery systems: recent developments and future challenges. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 21, n.1, p. 15–34, 2002.

VELDHOEN, R. A.; BANMAN, S. L.; HEMMERLING, D. R.; ODSSEN, R.; SIMMEN, T.; SIMMONDS, A. J.; UNDERHILL, D. A.; GOPING, I. S. The chemotherapeutic agent paclitaxel inhibits autophagy through two distinct mechanisms that regulate apoptosis. **Oncogene**, v. 32, n. 6, p. 736–746, 2013.

WANG, L.; MA, C.; WIPF, P.; LIU, H.; SU, W.; XIE, X. Q. TargetHunter: an *in silico* target identification tool for predicting therapeutic potential of small organic molecules based on chemogenomic database. **AAPS Journal**, v. 15, n. 2, p. 395-406, 2013.

WANG, X.; HAO, Q.; CHEN, Y.; JIANG, S.; YANG, Q.; LI, Q. The effect of chemical composition and bioactivity of several essential oils on *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae). **J. Insect. Sci.** v. 15, n. 1, 2015.

WELIN-BERGER K. Formulations, release and skin penetration of topical anesthetics. 2001. Uppsala University, Medicinska vetenskapsområdet, Faculty of Pharmacy, Uppsala, 2001.

WINK, M. Modes of Action of Herbal Medicines and Plant Secondary Metabolites. **Medicines**, v. 2, n. 3, p. 251–286, 2015.

Wu, J. S.; Jiang, J.; Chen, B. J.; Wang, K.; Tang, Y. L.; Liang, X. H. Plasticity of cancer cell invasion: Patterns and mechanisms. **Translational oncology**, v. 14, n.1, 2021.

XIAO, Y.; CHEN, X.; YANG, L.; ZHU, X.; ZOU, L.; MENG, F.; PING, Q. Preparation and oral bioavailability study of curcuminoid-loaded microemulsion. **J Agric Food**

Chem., v. 61, n.15, p. 3654-60, 2013.

YIN, S.-C.; GUO, W.; TAO, Z.-Z. Picropodophyllin inhibits tumor growth of human nasopharyngeal carcinoma in a mouse model. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 439, n. 1, p. 1–5, 2013.

YIN, Y.-M., CUI, F.-D., MU, C.-F., CHOI, M.-K., KIM, J. S., CHUNG, S.-J., KIM, D.-D. Docetaxel microemulsion for enhanced oral bioavailability: Preparation and in vitro and *in vivo* evaluation. **Journal of Controlled Release**, v. 140, n. 2, p. 86–94, 2009.

YOKOTA, T.; WANG, Y. p38 MAP kinases in the heart. **Gene**, v. 10, n. 575, p. 369-376, 2016.

YOU, Y. Podophyllotoxin derivatives: current synthetic approaches for new anticancer agents. **Current Pharmaceutical Design**, v. 11, n. 13, p. 1695–1717, 2005.

ZONNEVILLE, J.; COLLIGAN, S.; GRANT, S.; MILLER, A.; WALLACE, P.; ABRAMS, S. I.; BAKIN, A. V. Blockade of p38 kinase impedes the mobilization of protumorigenic myeloid populations to impact breast cancer metastasis. **Int. J. Cancer**, v. 147, p. 2279–2292, 2020.

ZORN, B.; GARCI, A. J.; CASTRO, V.; MURILLO, R.; MORA, G.; MERFORT, I. 3-Desoxyanthocyanidins from *Arrabidaea chica*. **Phytochemistry**, v. 56, p. 831–835, 2001.



Review

A Review of the Phytochemistry and Pharmacological Properties of the Genus Arrabidaea

Jessyane Rodrigues do Nascimento ¹, Amanda de Jesus Alves Miranda ² , Felipe Costa Vieira ², Carla Daniele Pinheiro Rodrigues ² , Luna Nascimento Vasconcelos ² , José Lima Pereira Filho ², Auxiliadora Cristina Corrêa Barata Lopes ³, Marcelo Marucci Pereira Tangerina ⁴ , Wagner Vilegas ¹ and Cláudia Quintino da Rocha ^{2,3,*}

- ¹ Institut of Biosciences, Coastal Campus of São Vicente, Universidade Estadual Paulista-UNESP, São Vicente 11330-900, SP, Brazil; jessyane.nascimento@unesp.br (J.R.d.N.); vilegasw@gmail.com (W.V.)
- ² Department of Chemistry, Federal University of Maranhão-UFMA, São Luís 65080-805, MA, Brazil; amanda.quimica14@gmail.com (A.d.J.A.M.); felipe.cv@discente.ufma.br (F.C.V.); krla.pinheiro12@gmail.com (C.D.P.R.); luna.n.vasconcelos@gmail.com (L.N.V.); jlp.filho@outlook.com (J.L.P.F.)
- ³ Biodiversity and Biotechnology Graduate Program-BIONORTE, Federal University of Maranhão-UFMA, São Luís 65080-805, MA, Brazil; auxiliadorabarata@hotmail.com
- ⁴ Botany Department, Institute of Biosciences, University of São Paulo-USP, São Paulo 05508-090, SP, Brazil; marcelomptang@gmail.com
- * Correspondence: rocha.claudia@ufma.br



Citation: do Nascimento, J.R.; de Jesus Alves Miranda, A.; Vieira, F.C.; Rodrigues, C.D.P.; Vasconcelos, L.N.; Filho, J.L.P.; Lopes, A.C.C.B.; Tangerina, M.M.P.; Vilegas, W.; da Rocha, C.Q. A Review of the Phytochemistry and Pharmacological Properties of the Genus Arrabidaea. *Pharmaceuticals* **2022**, *15*, 658. <https://doi.org/10.3390/ph15060658>

Academic Editor: Daniela De Vita

Received: 29 March 2022

Accepted: 23 May 2022

Published: 25 May 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The genus Arrabidaea, consisting of ~170 species, belongs to the family Bignoniaceae, distributed around the Neotropics and temperate zone. The center of diversity of the family is in Brazil, where 56 genera and about 340 species exist. Most species of the genus Arrabidaea are traditionally utilized as diuretics and antiseptics, as well as for treating intestinal colic, diarrhea, kidney stones, rheumatoid arthritis, wounds, and enterocolitis. The genus is chemically diverse with different substance classes; most of them are triterpenes, phenolic acids, and flavonoids, and they exhibit valuable pharmacological properties, such as antitumor, antioxidant, leishmanicidal, trypanocidal, anti-inflammatory, and healing properties. This review presents information on the chemical constituents isolated from seven Arrabidaea species, and the pharmacological activities of the extracts, fractions and pure substances isolated since 1994, obtained from electronic databases. The various constituents present in the different species of this genus demonstrate a wide pharmacological potential for the development of new therapeutic agents, however its potential has been underestimated.

Keywords: chemical composition; pharmacological activity; Arrabidaea; Cerrado

1. Introduction

Bignoniaceae species are widely utilized for ornamental purposes owing to the beauty of their flowers (e.g., Ipê), as well as for civil construction and the production of musical instruments owing to the hardness of the wood [1].

Brazil represents the diversity center of the family, where 56 genera and ~340 species, including many endemic taxa, occur. The Bignoniaceae species are found in different kinds of environments ranging from the Cerrado to the rain and evergreen forests, thus representing the main family of lianas in Brazilian forests. The species from this taxon, whose jacarandás (*Jacaranda brasiliiana*), as well as yellow and purple ipês (*Tabebuia alba* and *Tabebuia avellanedae*), are the most representative examples of the family, are distributed in tropical regions globally, although they are more common in the American continent [2].

The genus Arrabidaea has a complex taxonomy since many characteristics are shared with species of other genera. The species can be a sub-shrub, a shrub, and even an upright tree with floral branches of 35–50 cm (the youngest being slightly flattened), with leaves with petioles of 5 to 10 mm, and sometimes 12 mm, as well as a simple blade. Further, it

exhibits terminal panicle inflorescence in the axillary branches, and flowers with small tubular calice topped by five teeth and a bell-shaped corolla. The flowers exhibit pink to purple corollas, are rarely white, and are never yellow [3]. The genus *Arrabidaea* for over a century was the largest genus within the family Bignoniaceae, however the number of species varied due to new classification systems as a result of variation in the calyx, corolla, fruit, seed and inflorescence morphology [4–6].

There are little data available in the literature on the chemotaxonomy, chemical composition and biological activities; *Arrabidaea chica* (Bonpl.) Verl., is the most investigated species, reporting the presence of the chemical constituents phytosterols, flavonoids [7], and pigments such as carajurone, carajurine [8], and 3-desoxyanthocyanidins [9], utilized in cosmetics. Furthermore, some studies focused on species, such as *Arrabidaea samyoides* (Cham.) Sandwith, *Arrabidaea pulchra* (Cham.) Sandwith, *Arrabidaea triplinervia* (Mart. ex DC.) Baill., *Arrabidaea bilabiata* (Sprague) Sandwith, *Arrabidaea patellifera* (Schltdl.) Sandwith, and *Arrabidaea brachypoda* Bureau, because of their well-known utilization as antiseptics and diuretics, as well as for the treatment of wounds, intestinal colic, diarrhea, and enterocolitis. The phytochemical and pharmacological studies of these species have also revealed the antifungal [7], antimalarial [10], antitumoral [1], gastroprotective [11], and anti-*Trypanosoma cruzi* [12] activities of the extracts and isolated compounds, thus elucidating the bio-pharmacological potentials of this plant genus.

In Brazilian ecosystems, particularly in the Cerrado, the genus *Arrabidaea* occurs in great numbers, and in the southeast region, some species are widely used in traditional medicine, but little is known by the scientific community of their natural chemistry products. Only seven of them have been investigated from a chemical and pharmacological point of view.

The Cerrado is the second largest biome in South America; it is greatly significant as a source of alternative medicines for treating different diseases. Although the flora of the Cerrado is extremely rich, only 1.5% of its extension is protected by law [9]. The deforestation rate in this biome exhibited an increase of 13%, totaling a suppressed native vegetation area of 7340 km², in the year 2020 alone [13].

In this sense, the present review critically evaluates the biological, pharmacological, and chemical potential data gathered from the literature for seven species of the *Arrabidaea* genus, in only species chemically and biologically examined, in order to investigate the species from this biome that have been facing a fragmentation process and the risk of becoming extinct without knowing their chemical-pharmacological properties.

2. Materials and Methods

A systematic literature review was conducted by searching three electronic scientific journal databases: Scielo, Science Direct, and PubMed. A search filter was applied to delimit the period between the years 1994 and 2021, and three sets of keywords were utilized: “*Arrabidaea* and *Fridericia*”, “*Arrabidaea* or *Fridericia*”, and “*Arrabidaea* and pharmacological applications”. The primary search identified 747 results, of which the articles were selected by excluding conference papers, course completion papers, scientific reports, drafts, and articles that were indexed in two or more databases. The selected articles were manually reviewed to identify and exclude articles that did not meet these criteria, and in the end, 56 articles were selected for this review on the genus *Arrabidaea* syn. *Fridericia*. Figure 1 illustrates the selection process.

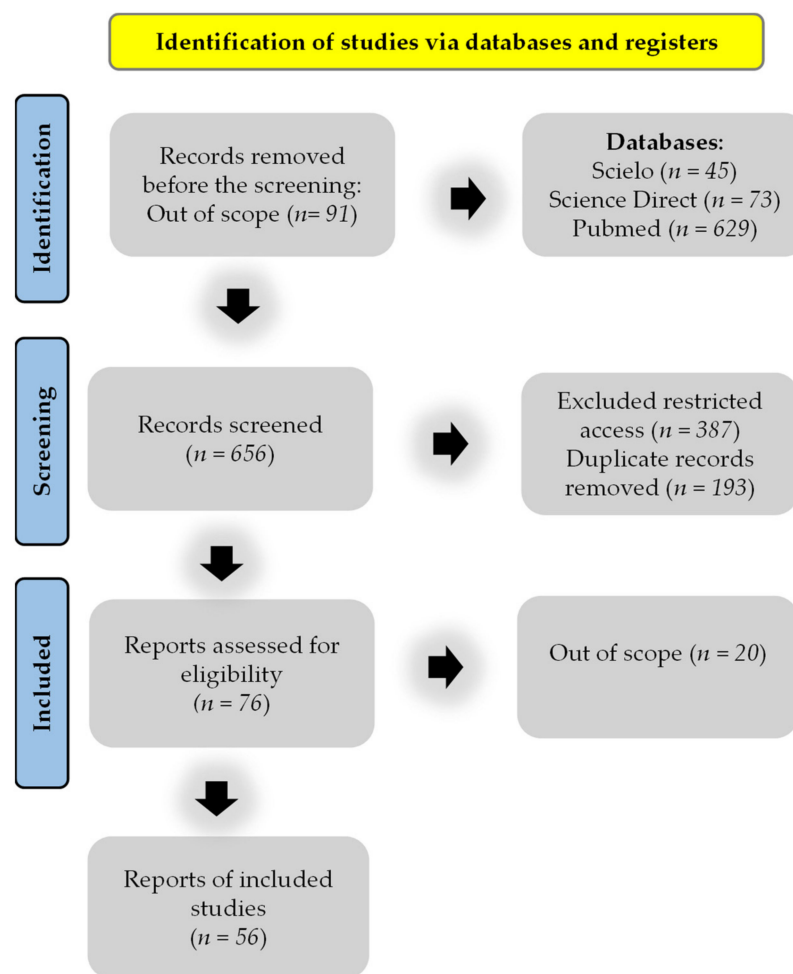


Figure 1. Flow diagram of the reference screening and inclusion.

3. Results and Discussion

3.1. Main Bio-Pharmacological Properties and Chemical Composition of the Species from the Genus *Arrabidaea*

3.1.1. *A. samydoides*

Synonyms: *Arrabidaea samydoides* (Cham.) Sandwith, *Fridericia samydoides* (Cham.) L.G. Lohmann, *Arrabidaea anguillulicarpa*, *Bignonia samydoides* (Cham.), *Bignonia varians* (DC.), *Panterpa varians* (DC.) Miers.

Main Chemical Composition of *A. samydoides*

The chemical composition from the leaves, and stems of *A. samydoides* included lupeol (1), sitosterol (2), stigmasterol (3), chrysin (4), 3 β ,16 α -dihydroxy-olean-12-en (5a), erythrodiol (5b), uvaol (6a), and ursolic acid (6b), 2-(2'-O-trans-caffeoyl)-C- β -D-glucopyranosyl-1,3,6,7-tetrahydroxyxanthone (7a), 2-(2'-O-trans-cinnamoyl)-C- β -D-glucopyranosyl-1,3,6,7-tetrahydroxyxanthone (7b), and 2-(2'-O-trans-coumaroyl)-C- β -D-glucopyranosyl-1,3,6,7-tetrahydroxyxanthone (7c), mangiferin (7d), 2-(2'-O-benzoyl)-C- β -D-glucopyranosyl-1,3,6,7-tetrahydroxyxanthone (7e), muraxanthone (7f) [1,10] (Table 1).

Table 1. Structure and bio-pharmacological properties of isolated compounds from *A. samydoides*.

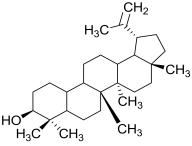
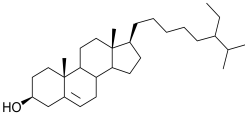
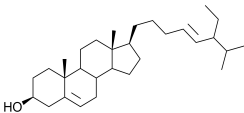
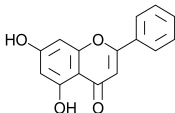
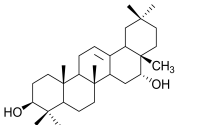
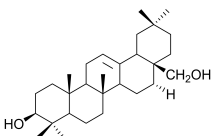
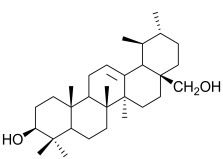
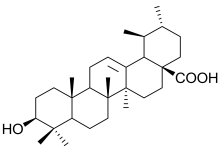
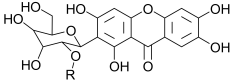
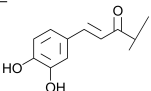
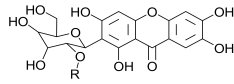
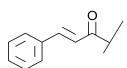
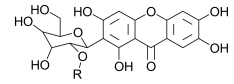
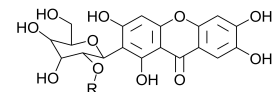
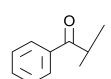
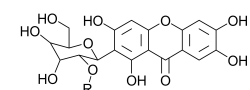
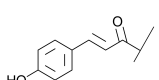
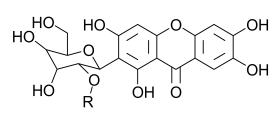
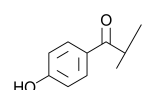
N°	Compound Structure and Name	Species Name	Plant Part, Solvent	Biological Effect	Ref.
1	 Lupeol	<i>A. samydoides</i>	Leaves and stem, EtOH	Not evaluated	[1]
2	 Sitosterol	<i>A. samydoides</i>	Leaves and stem, EtOH	Not evaluated	[1]
3	 Stigmasterol	<i>A. samydoides</i> and <i>A. bilabiata</i>	Leaves and stem, EtOH	Not evaluated	[1]
4	 Chrysin	<i>A. samydoides</i>	Leaves and stem, EtOH	Not evaluated	[1]
5a	 3β, 16α-dihydroxy-olean-12-ene	<i>A. samydoides</i>	Leaves and stem, EtOH	Not evaluated	[1]
5b	 Erythrodiol	<i>A. samydoides</i>	Leaves and stem, EtOH	Not evaluated	[1]
6a	 Uvaol	<i>A. samydoides</i> and <i>A. pulchra</i> and <i>A. triplinervia</i> and <i>A. bilabiata</i>	Leaves and stem, EtOH	Not evaluated	[1]
6b	 Ursolic acid	<i>A. samydoides</i>	Leaves and stem, EtOH	Trypanocidal	[1,14–16]

Table 1. Cont.

N°	Compound Structure and Name	Species Name	Plant Part, Solvent	Biological Effect	Ref.
7a	 2-(2'- <i>O</i> -trans-caffeoyl)-C- -D-glucopyranosyl-1,3,6,7-tetrahydroxyxanthone R = 	<i>A. samydoidea</i>	Stem, EtOH	Antioxidant	[10]
7b	 2-(2'- <i>O</i> -trans-cinnamoyl)-C- -D-glucopyranosyl-1,3,6,7-tetrahydroxyxanthone R = 	<i>A. samydoidea</i>	Stem, EtOH	Non active	[10]
7c	 2-(2'- <i>O</i> -trans-coumaroyl)-C- -D-glucopyranosyl-1,3,6,7-tetrahydroxyxanthone R = H	<i>A. samydoidea</i>	Stem, EtOH	Non active	[10]
7d	 Mangiferin R = 	<i>A. samydoidea</i>	Stem, EtOH	Non active	[10]
7e	 2-(2'- <i>O</i> -benzoyl)-C- -D-glucopyranosyl-1,3,6,7-tetrahydroxyxanthone R = 	<i>A. samydoidea</i>	Stem, EtOH	Non active	[10]
7f	 Muraxanthone R = 	<i>A. samydoidea</i>	Stem, EtOH	Antioxidant	[10]

Bio-Pharmacological Properties of *A. samydoidea*

A representative species of the medicinal potential of this genus is *A. samydoidea*. In 2003, researchers reported the chemical and pharmacological studies of this species. The subsequent fractionation and purification of the bioactive components demonstrated a gradual decrease in the bioactivity of the sub-fractions compared with the inhibition values

that were determined by the crude extract in the evaluation of the activity toward repairing of DNA [1]. The authors attributed this activity loss to factors which were related to the synergistic effect resulting from the chromatographic separation of substances (a common result in bio-guided chemical studies). The compounds isolated from the stem and leaves of *A. samydoides* included (1), (2), (3), (4), (5a), (5b), (6a), and (6b) [1]. By focusing on the detection of the antitumoral activity during the screening tests in the DNA repair, the raw extract of the stem of *A. samydoides* exhibited inhibitory activity against the growth of mutant strains of *Saccharomyces cerevisiae* in the rad+ and rad 52Y lines with values of 12.0 and 13.0 mm, respectively, and was inactive toward the RS 321 lineage. Further, the CHCl₃ fraction of the extract exhibited inhibitory activity against the rad+ (11.0 mm), and rad 52Y (12.0 mm) lines, while the purified substances of the bioactive fractions demonstrated a gradual decrease in their bioactivity [1].

In another study, Bolzani and collaborators reported the isolation of three C-glucosylxanthones, (7a), (7b), and (7c), from the stems of *A. samydoides*. Furthermore, they also isolated three known glucosylxanthones, (7d), (7e), and (7f). The xanthones, (7a) and (7f), exhibited moderate activity against free radicals through the reduction of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), as well as an antioxidant activity, which was confirmed from its properties that were measured via high-performance liquid chromatography equipped with an electrochemical detector (HPLC–EICD) [10].

The antioxidant activity of *A. samydoides* was also reported in Part 2 of the study by [17]. They reported the antiviral activities of the three strains (VHH-1, EMCV, and VACV) that were employed in the study with EC₅₀ values approximating that of the drug aciclovir. In the same study, the antioxidants, C-glucosyl xanthone, acylated derivatives, and mangiferin, were isolated from the species (*A. samydoides*), and the latter was observed via HPLC-diode-array detection (DAD) as the major constituent of the leaf samples of *A. samydoides*. Mangiferin is known for its potent antiviral activity, although the results observed in *Arrabidaea* might be related to the presence of another compound in the plant since isolated mangiferin is less active (EC₅₀ = 218.1 ± 3.4 µg/mL) [17].

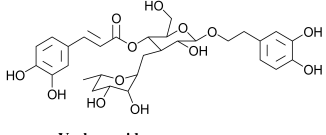
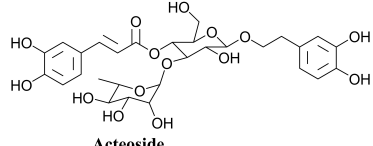
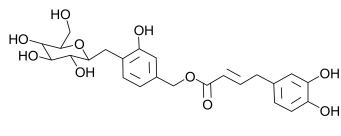
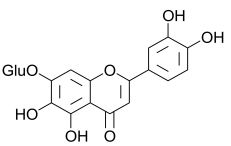
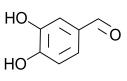
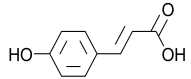
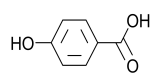
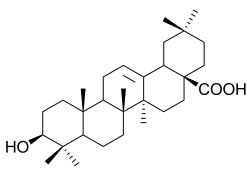
3.1.2. *A. pulchra*

Synonyms: *Arrabidaea pulchra* (Cham.) Sandwith, *Fridericia pulchella* (Cham.) L.G. Lohmann, *Arrabidaea tobatiensis*, *Bignonia pulchella* (Cham.), *Cuspidaria pulchella* (Cham.) Baill, *Cuspidaria pulchella* (Cham.) K. Schum. *Lundia pauciflora*, *Lundia pauciflora* Mart. ex DC., *Mansoa schwackei* Bureau & K. Schum., *Paracarpaea pulchella*.

Main Chemical Composition of *A. pulchra*

The most abundant constituents in *A. pulchra* are phenylethanoid glycosides verbascoside (8a), acteoside (8b), caffeoylcalleryanin (9), 6-hydroxyluteolin-7-O-β-glucoside (10) 3,4-dihydroxybenzaldehyde (11), *p*-coumaric acid (12), *p*-hydroxybenzoic acid (13), oleanolic acid (14) (Table 2) and ursolic acid (6a), also present in *A. samydoides* [14–16,18].

Table 2. Structure and bio-pharmacological properties of isolated compounds from *A. pulchra*.

N°	Compound Structure and Name	Species Name	Plant Part, Solvent	Biological Effect	Ref.
8a	 Verbascoside	<i>A. pulchra</i>	Leaves, EtOH	Antiviral	[14]
8b	 Acteoside	<i>A. pulchra</i>	Aerial parts, EtOH	15-LOX inhibitory	[18]
9	 Caffeoylcleryanin	<i>A. pulchra</i>	Leaves and aerial parts EtOH	Antiviral and 15-LOX inhibitory	[14,18]
10	 6-hydroxyluteolin-7-O-β-glucoside	<i>A. pulchra</i>	Aerial parts, EtOH	15-LOX inhibitory	[18]
11	 3,4-dihydroxybenzaldehyde	<i>A. pulchra</i>	Aerial parts, EtOH	Non active	[15]
12	 <i>p</i> -coumaric acid	<i>A. pulchra</i>	Aerial parts, EtOH	Non active	[15]
13	 <i>p</i> -hydroxybenzoic acid	<i>A. pulchra</i>	Aerial parts, EtOH	Non active	[15]
14	 Oleanolic acid	<i>A. pulchra</i> and <i>A. triplinervia</i>	Aerial parts, EtOH	Trypanocidal	[15,16]

Bio-Pharmacological Properties of *A. pulchra*

The *Arrabidaea pulchra* (Cham.) Sandwith belongs to the *Bignoniaceae* family, which is a liana exhibiting membranaceous, calice with multicellular trichomes and a reddish glandular apex distributed throughout the inflorescence, thus imparting this species with a brownish color [3]. In Brazil, plants belonging to this family are distributed from the Amazon to the Rio Grande do Sul; they do not exhibit a unique habitat.

A phytochemical study of the ethanolic extract of the leaves of *A. pulchra* revealed that tannins and flavonoids were its major constituents; the literature has reported the

significant antitumoral activities of these substances. The bioassay of the cell viability of the extract exerted an in vitro cytotoxic effect on the concentrations of 500 and 100 µg/mL after 24 h of incubation under the cells of the PC-3 lineage (prostate cancer). It also exhibited an antiproliferative activity of >50% of the cytotoxic effect of the doxorubicin concentration (5 µg/mL) that was employed as a positive control, thus representing a cytotoxic effect, which was superior to the standard drug [19].

An antiviral screening study of the species belonging to the *Bignoniaceae* family occurring in Minas Gerais revealed that the ethanolic extract of *A. pulchra* leaves exhibited relevant antiviral activity compared with those of 34 extracts of 18 plant species that were selected based on ethnopharmacological and taxonomic criteria [17].

The activity of the extract of *A. pulchra* was evaluated against human herpesvirus (HSV-1) and Western Reserve virus Vaccinia (VACV-WR), as well as RNA viruses, murine encephalomyelitis virus (EMCV), and dengue virus (DENV-2), by the colorimetric assay of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium (MTT). Its cytotoxicity was determined in LLCMK2, after which the Vero cells and selectivity indexes (SI) were calculated. The extract exhibited activity against DENV-2 ($EC_{50} = 46.8 \pm 1.6$ µg/mL) and SI of 2.7 [14].

Compounds (8a) and (6a) exhibited similar anti-DENV-2 profiles, with SI values of 3.8 and 3.1, respectively. Moreover, (8a) and (9) inhibited the replications of DENV-2 with EC_{50} values of 3.4 and 2.8 µg/mL, respectively, although (9) exerted a less cytotoxic effect on the LLC-Mk2 cells, resulting in a more favorable SI (20.0). However, regarding (8a), the SI value (3.8) was approximately five times lower. Compound (9) was the most effective anti-DENV-2 constituent, exhibiting 100% inhibition at 10 µg/mL [14].

The authors evaluated the lipoxygenase (LOX) inhibitory activities of the n-hexane, ethyl acetate (EtOAc), n-butanol, and hydromethanolic fractions of *A. pulchra* ethanolic extract. The n-butanol fraction obtained the best inhibition value of the enzyme, 15-LOX, from 62.8 to 25 µg/mL, representing the most relevant inhibition within the assay. Compounds 9 and 8b exhibited significant inhibitory activities with IC_{50} values of 1.59 and 1.76 µM, while the utilized positive control (Zileuton) obtained a value of 1.54 µM [18]. The cytotoxicity assay was performed for (9), (8b), and (10) in the cell lines, GM07492-A (human lung fibroblasts), B16F10 (murine melanoma), and HepG2 (human hepatocellular carcinoma). Compound (9) did not exert a cytotoxic effect with a CC_{50} value of >800 µM, while (8b) reduced the cell viability of the B16F10 and HepG2 lines ($CC_{50} = 176.8$ and 271.2 µM, respectively). Compound (10) exhibited CC_{50} values of 513.0, 499.0, and 283.2 µM for GM07492-A, B16F10, and HepG2, respectively, indicating that (8b) and (10) exhibited cell selectivity [18]. The authors also evaluated the in vitro schistosomicidal activities of the hexane (FH), buthanolic, hydromethanolic, and EtOAc fractions of the areas of the *A. pulchra* extract against adult worms, *Schistosoma mansoni*. The in vitro test revealed that the incubation of *S. mansoni* worms in 100 µg/mL ethanolic extract of *A. pulchra* induced the deaths of 25% of the worms within 120 h and reduced the motor activities of the others; however, no significant integumentary changes were identified. EAA demonstrated the highest effectiveness among the tested fractions, whereas the incubation (100 µg/mL) for 120 h accounted for 50% of the deaths and a visible reduction in motor activity, while the FH, buthanolic, and hydromethanolic fractions exhibited inactivity. The following five substances were isolated from ethanol extract of leaves: (11), (12), (13), (6a), and (14). Compounds (11) and (12) could only separate coupled adult *S. mansoni* worms at 100 µM [15].

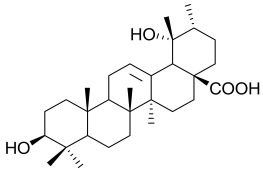
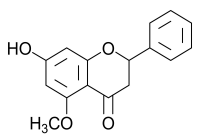
3.1.3. *A. triplinervia*

Synonyms: *Arrabidaea triplinervia* (Mart. ex DC.) Baill., *Fridericia triplinervia* (Mart. ex DC.) L.G. Lohmann, *Arrabidaea ateramnantha* Bureau & K. Schum, *Arrabidaea triplinervia* var. *brachycalix* Hassl., *Bignonia triplinervia* Mart., *Bignonia triplinervia* Mart. ex DC., *Petastoma triplinervia* (Mart. ex DC.) Miers, *Saritatea triplinervia* (Mart. ex DC.) Dugand.

Main Chemical Composition of *A. triplinervia*

The chemical composition of the hydroethanol extracts of *A. triplinervia* leaves demonstrated the presence of three triterpenes, namely ursolic acid (**6a**), oleanolic acid (**14**), pomolic acid (**15**), and alpinetine (**16**) (Table 3) [16].

Table 3. Structure and bio-pharmacological properties of isolated compounds from *A. triplinervia*.

N°	Compound Structure and Name	Species Name	Plant Part, Solvent	Biological Effect	Ref.
15	 Pomolic acid	<i>A. triplinervia</i>	Leaves, EtOH	Non active	[16]
16	 Alpinetine	<i>A. triplinervia</i>	Leaves, EtOH	Non active	[16]

Bio-Pharmacological Properties of *A. triplinervia*

The ethanolic extract of *A. triplinervia* leaves exhibits significant trypanocidal activity in vitro against *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes, the etiological agent of Chagas' disease, causing the total elimination of the blood parasites at a concentration of 5.0 mg/mL; a decrease of ~50% of the parasites was observed at 2.5 mg/mL [16]. The ursolic and oleanolic acids exhibited significant trypanocidal activities that resulted in the total elimination of active parasites at concentrations of 0.4 and 1.6 mg/mL, respectively. Alpinetine was inactive at the tested concentrations, while pomolic acid was not tested owing to the availability of an insufficient quantity. The structure–activity relationships (SAR) of a series of synthetic compounds from the ursolic acid derivatives and oleanolic acid were studied, and the presence of the free hydroxyl and/or carboxylic groups is necessary for the trypanocidal activity since they could be deduced from the effects of acetates, methyl esters, and the aldehydes derivatives [16].

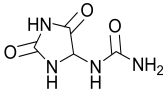
3.1.4. *A. bilabiata*

Synonyms: *Arrabidaea bilabiata* (Sprague) Sandwith, *Tanaecium bilabiatum* (Sprague) L.G. Lohmann, *Adenocalymna bilabiatum* (Sprague) Sandwith, *Arrabidaea cuminaensis* A. Samp., *Arrabidaea kuhlmannii* A. Samp., *Memora bilabiata* Sprague, *Memora nobilis* Miers, *Pseudocalymma kuhlmannii* (A. Samp.) J.C. Gomes.

Main Chemical Composition of *A. bilabiata*

The chemical constituents isolated in *A. bilabiata* were monofluoroacetic acid (**17**), (**3**) and (**6a**), as well as allantoin (**18**) [20,21]. The secondary metabolites were found mainly in the leaves, seeds and aerial parts of the plant (Table 4).

Table 4. Structure and bio-pharmacological properties of isolated compounds from *A. bilabiata*.

N°	Compound Structure and Name	Species Name	Plant Part, Solvent	Biological Effect	Ref.
17	 Monofluoroacetic acid	<i>A. bilabiata</i>	Seeds and leaves, aqueous extract	Not evaluated	[21]
18	 Allantoin	<i>A. bilabiata</i> and <i>A. chica</i>	Aerial parts, IsopOH	Motor activity	[20,22]

Bio-Pharmacological Properties of *A. bilabiata*

Arrabidaea bilabiata, popularly known as “chibata” or “gibata”, is an essential toxic *Bignoniaceae* that accounts for many cattle deaths, which occur in the extensive floodplain regions of the Amazon basin [23]. *Arrabidaea bilabiata* and *Palicourea marcgravii* exhibit potentially lethal effects on the animals after ingestion, requiring 1–10 min between the appearance of the first symptoms and the occurrence of eventual death. The toxic principle, (17), was isolated from both species; *A. bilabiata* exhibited the highest concentration in seeds by a factor of 21 [21].

In the authors’ experiments, the sensitivities of buffalo and cattle to *A. bilabiata* were verified, as well as the difference between toxicities of the new and ripe leaves at different periods of the year (end of dry and rainy seasons). It was verified that, although the clinical-pathological picture was essentially the same, the buffalo demonstrated more resistance to the toxic action of *A. bilabiata*, at least two times that of cattle. The experiments also demonstrated that the new leaves of this plant were two times as toxic as the ripe leaves, while October represented the greatest toxicity. Moreover, the lowest doses that caused the deaths of the animals were 3 and 2 g/kg new leaves for the buffalo and cattle, respectively. These data also indicated that the lower incidence of intoxication by the plants that caused sudden deaths in the buffalo in the Amazon was possibly due to the greater resistance of this animal species since their preferred habitat is the floodplain regions, the habitat of *A. bilabiata* (a plant, which is less toxic than *Palicourea marcgravii* St. Hil. that is found on terra firm, the preferred habitat for cattle) [24].

Proceeding with the studies on the toxicity of *A. bilabiata*, the authors [23] conducted a study employing mature leaves and sprouts, which were collected in the same place and at the same periods of flood and drought employing rabbits because it is a species that is sensitive to intoxication by this plant. In the experiments employing sprouts that were collected in October, the lowest dose, which caused the deaths of the rabbits, was 0.5 g/kg; in May, it was 1.0 g/kg. Conversely, the lowest doses for the mature leaves that were collected in October and May were 4.0 and 6.0 g/kg, respectively, further proving that the new leaves, which were collected in October, were more toxic than the ripe ones. This confirms the data that were previously obtained from cattle and buffaloes [23].

Monofluoroacetic acid (MF) is one of the most toxic substances already discovered and has been isolated from several plants; its ingestion causes “sudden death” of several animals, leading to significant economic losses. Studies have revealed that *A. bilabiata* is responsible for the deaths of several cattle. The administration of acetamide to animals that were intoxicated by MF exerted considerable protective effects. The protective effect of acetamide on rat poisoning by MF and the aqueous extracts from eight toxic plant species, including *A. bilabiata*, was evaluated. When previously administered in sufficiently high doses, acetamide could prevent the appearances of medical signs or the death of all MF-intoxicated mice, as well as those intoxicated by fresh leaves of *P. marcgravii* or with concentrated extracts of *Palicourea marcgravii*, *Palicourea juruana*, *Palicourea elegans*, *Arrabidaea bilabiata*, *Arrabidaea rigida*, and *Arrabidaea exotropica*, confirming the presence of

MF and availing subsidies for the development of genetic studies in Brazil involving the metabolism of MF by rumen bacteria [25].

However, some authors have argued that MF would not be the only toxic active principle that determined the deaths of animals that ingested the plant; they opined that there might be other compounds that could cause the deaths of animals and exert a synergistic effect with MF to contribute to the toxicity of the species. To isolate the active principle, the dichloromethanolic, methanolic, and isopropanolic extracts of the aerial parts of *A. bilabiata* were prepared. These extracts were administered orally to rats (doses = 0.5–2 mg/kg) to determine the substances that affected spontaneous motor activities. The isopropanolic extract significantly increased the long and short pause movements with values of 112% and 54%, respectively, while the methanolic extract increased motor activity but did not obtain statistical significance [20].

The chemical analysis ensured the isolation and identification of (3) and (6a) from the dichloromethane (DCM) extract, as well as (18) from the isopropanolic extract, because only (18) exhibited sufficient mass available to realign the motor activity test. At doses of 1, 2, 12, and 120 mg/kg, there was an increase in the prolonged pause movements but not for a short duration in the tested lower doses. However, in the highest dose tested (60 mg/kg), (18) could slightly reduce the motor activity in rats. Additionally, the *in vitro* activities of the extracts were analyzed against *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus* sp., and *Candida albicans*. All the microbial strains demonstrated resistance toward the extracts except *C. albicans*, indicating its possible antifungal activity [20].

3.1.5. *A. brachypoda*

Synonyms: *Arrabidaea brachypoda* Bureau, *Arrabidaea brachypoda* var. *platyphylla* (DC.) Bureau, *Fridericia platyphylla* (Cham.) L.G. Lohmann, *Alsocydia firmula* Mart., *Alsocydia firmula* Mart. ex DC., *Arrabidaea bangii* Sprague, *Arrabidaea elliptica* Bureau & Schumann, *Arrabidaea macrophylla* Schumann, *Arrabidaea platyphylla* (Cham.) Bureau & Schumann, *Bignonia brachypoda* var. *platyphylla* (Cham.) DC., *Bignonia platyphylla* Cham., *Bignonia regnelliana* Sond., *Petastoma simplicifolium* Miers.

Main Chemical Composition of *A. brachypoda*

Based on spectroscopic methods, a total of nineteen substances were isolated and characterized from leaves, flowers, aerial parts and roots of ethanolic hydroethanolic extract of *A. brachypoda*; namely, the flavonoids 3,4-dihydroxy-5,6,7-trimethoxyflavone (19a), cirsiol (19b), cirsimaritin (19c), and hispidulin (19d) (Table 5), were isolated, indicating the first time that (19b) would be discussed in the *Bignoniaceae* family [7]. In addition, an oleanane-type triterpenoid, 3 β -estearioxi-olean-12-eno (20), was isolated from the hydroethanolic extract of the roots [26]. The phytochemical investigation of the hydroethanolic root extract (HE) made possible the isolation of two glycosylated phenylethanoid derivatives (21a and 21b), three rare novel dimeric flavonoids, namely brachydins 1 (22a), 2 (22b), 3 (22c), and unusual glycosylated dimeric flavonoids (22d–j), which were reported for the first time in the *Bignoniaceae* family [11,27–29]. Compounds (23a–23p) were derived from halogenation (bromination, iodination, and chlorination) reactions [12]. A phenylethanoid glycoside, namely conadroside (24) was isolated from leaves of *A. brachypoda* by Bertanha et al. [30]. The chemical characterization of the leaves extract revealed the presence of flavonoids apigenin (25), luteolin (26), isoquercitrin (27), rutin (28); furthermore, four chalcones were isolated from the flowers, namely 4'-hydroxy-3,4-dimethoxy-chalcone (29), 3'-hydroxy-3-acetate, 4-methoxy-chalcones (30), 3',4'-dihydroxy, 3,4,4'-trimethoxy-chalcone (31), and 3,4-dimethoxy-chalcone (32) [31–33].

Table 5. Structure and bio-pharmacological properties of isolated compounds from *A. brachypoda*.

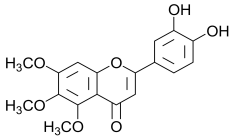
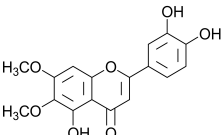
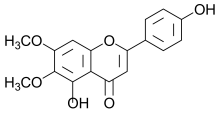
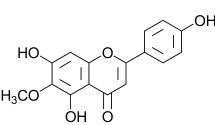
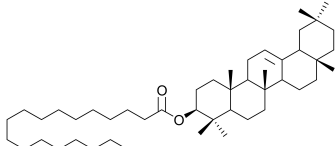
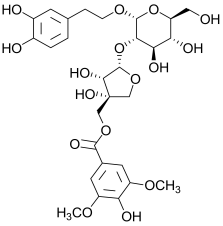
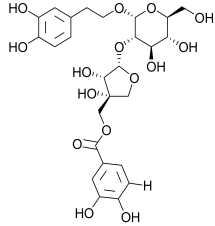
N°	Compound Structure and Name	Species Name	Plant Part, Solvent	Biological Effect	Ref.
19a	 3',4'-dihydroxy-5,6,7-trimethoxyflavone	<i>A. brachypoda</i>	Leaves, chloroform	Fungicide	[7]
19b	 Cirsiol	<i>A. brachypoda</i>	Leaves, chloroform	Fungicide	[7]
19c	 Cirsimaritin	<i>A. brachypoda</i>	Leaves, chloroform	Fungicide	[7]
19d	 Hispidulin	<i>A. brachypoda</i> and <i>A. chica</i>	Leaves, chloroform	Non active	[7,34]
20	 3β-stearioxi-olean-12-eno	<i>A. brachypoda</i>	Roots, EtOH	Anti-inflammatory	[26]
21a	 Glycosylated phenylethanoid	<i>A. brachypoda</i>	Roots, EtOH	Not evaluated	[11]
21b	 Glycosylated phenylethanoid	<i>A. brachypoda</i>	Roots, EtOH	Not evaluated	[11]

Table 5. Cont.

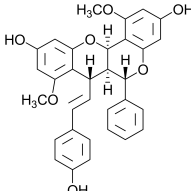
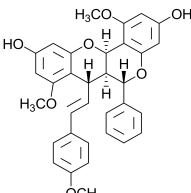
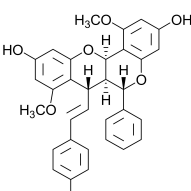
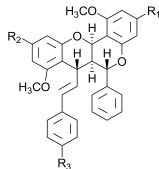
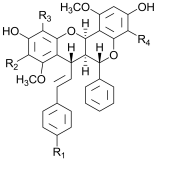
N°	Compound Structure and Name	Species Name	Plant Part, Solvent	Biological Effect	Ref.
22a	 Brachyidin 1	<i>A. brachypoda</i>	Roots, EtOH	Antiproliferative	[11,27–29]
22b	 Brachyidin 2	<i>A. brachypoda</i>	Roots, EtOH	Leishmania, Antiproliferative and arthritis	[11,27–29]
22c	 Brachyidin 3	<i>A. brachypoda</i>	Roots, EtOH	Antiproliferative and arthritis	[11,27,28]
22d–j	 Glycosylated dimeric flavonoids (22d) R ₁ = GlucA; R ₂ = GlucA; R ₃ = OH (22e) R ₁ = GlucA; R ₂ = GlucA; R ₃ = H (22f) R ₁ = GlucA; R ₂ = GlucA; R ₃ = OCH ₃ (22g) R ₁ = GlucA; R ₂ = OH; R ₃ = OH (22h) R ₁ = OH; R ₂ = GlucA; R ₃ = OH (22i) R ₁ = OH; R ₂ = GlucA; R ₃ = OCH ₃ (22j) R ₁ = OH; R ₂ = GlucA; R ₃ = H	<i>A. brachypoda</i>	Roots, EtOH	Gastroprotective	[11]
23a–p	 Halogenated brachyidin (23a) R ₁ = OH; R ₂ = H; R ₃ = Br; R ₄ = Br (23b) R ₁ = OH; R ₂ = Br; R ₃ = Br; R ₄ = Br (23c) R ₁ = OCH ₃ ; R ₂ = H; R ₃ = Br; R ₄ = H (23d) R ₁ = OCH ₃ ; R ₂ = H; R ₃ = Br; R ₄ = Br (23e) R ₁ = H; R ₂ = H; R ₃ = Br; R ₄ = Br (23f) R ₁ = OCH ₃ ; R ₂ = Br; R ₃ = Br; R ₄ = Br (23g) R ₁ = H; R ₂ = Br; R ₃ = Br; R ₄ = Br (23h) R ₁ = OH; R ₂ = H; R ₃ = I; R ₄ = I (23i) R ₁ = OCH ₃ ; R ₂ = H; R ₃ = I; R ₄ = H (23j) R ₁ = H; R ₂ = H; R ₃ = I; R ₄ = H (23k) R ₁ = OCH ₃ ; R ₂ = H; R ₃ = H; R ₄ = I (23l) R ₁ = OCH ₃ ; R ₂ = H; R ₃ = I; R ₄ = I (23m) R ₁ = H; R ₂ = H; R ₃ = I; R ₄ = I (23n) R ₁ = OCH ₃ ; R ₂ = H; R ₃ = Cl; R ₄ = H (23o) R ₁ = H; R ₂ = H; R ₃ = Cl; R ₄ = H (23p) R ₁ = OCH ₃ ; R ₂ = H; R ₃ = Cl; R ₄ = Cl	<i>A. brachypoda</i>	Roots, EtOH	Trypanocidal (23e, 23k, 23n, 23o) and Leishmanicidal (23g and 23o)	[12]

Table 5. Cont.

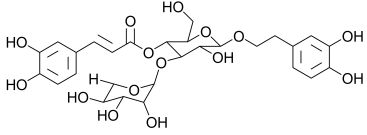
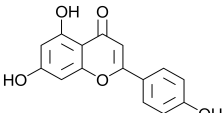
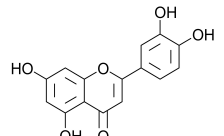
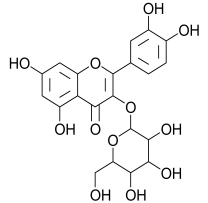
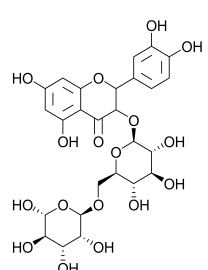
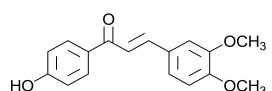
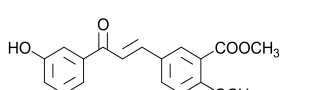
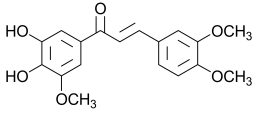
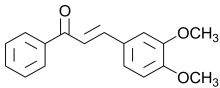
N°	Compound Structure and Name	Species Name	Plant Part, Solvent	Biological Effect	Ref.
24	 Conandroside	<i>A. brachypoda</i>	Aerial parts, EtOH	Inhibition of LOX	[30]
25	 Apigenin	<i>A. brachypoda</i> and <i>A. chica</i>	Leaves, EtOH	Not evaluated	[31,35]
26	 Luteolin	<i>A. brachypoda</i> and <i>A. chica</i>	Leaves and roots, EtOH	Antiproliferative and diuretic	[31,33,35,36]
27	 Isoquercitrin	<i>A. brachypoda</i> and <i>A. chica</i>	Leaves, EtOH	Not evaluated	[31]
28	 Rutin	<i>A. brachypoda</i>	Leaves, EtOH	Not evaluated	[31]
29	 4'-hydroxy-3,4-dimethoxy-chalcone	<i>A. brachypoda</i>	Flowers, EtOH	Non active	[32]
30	 3'-hydroxy-3-acetate-4-methoxy-chalcone	<i>A. brachypoda</i>	Flowers, EtOH	Non active	[32]

Table 5. Cont.

N°	Compound Structure and Name	Species Name	Plant Part, Solvent	Biological Effect	Ref.
31	 3',4'-dihydroxy-3,4,4'-trimethoxy-chalcone	<i>A. brachypoda</i>	Flowers, EtOH	Non active	[32]
32	 3,4-dimethoxy-chalcone	<i>A. brachypoda</i>	Flowers, EtOH	Antimicrobial	[32]

Bio-Pharmacological Properties of *A. brachypoda*

This is one of the species most studied by our research group. We have investigated extracts from the roots, leaves, and flowers. In 2014, we isolated for the first time a class of unusual dimeric flavonoids. This class of flavonoids was named brachydins.

A. brachypoda is a native plant from the Brazilian Cerrado; it is popularly known as “cipó-una” or “tintureiro”, and exhibits scandent bushes of up to 70 cm, possesses cylindrical branches, and is striated glabrous with lenticules. It is marked by the absence of pseudostipules. Its leaves are 1-2-foliolated with leaflets of 8–10 × 4–5 cm. The leaves are oblong and obovate, leathery, concolor, exhibiting acuminate and rounded acuminate apices, sometimes mucronulate. It exhibits an entire border, that is flat with a cuneate base, palmated nervation, glabrous adaxial, and abaxial faces; its petioles are 1.5–2 cm, exhibiting simple tendrils. Its inflorescences are thyrsus with a glabrous inflorescence axis. Its epicalyx is absent, and it exhibits toothed calyx, is glabrous, and possesses pink to purple corolla with entirely white tracks. The infundibuliform is densely tomentosus, and the stamens include glabrous antennas and reduced staminodes that are glabrous; it exhibits a conspicuous nectary disk. The septifragal capsule is 21–25 × 1.5–2, which is coriaceous, glabrous, exhibits a persistent calyx, as well as wing membranous seeds [3].

The antifungal activity of the raw CHCl₃ extract, as well as the compounds that were isolated via the direct bioautography method on TLC plates, have been reported. The epicuticular waxes of the leaves of *A. brachypoda* were analyzed, and flavonoids, such as (19a), (19b), (19c), and (19d), as well as the first report of (19a) as a natural product (it had been reported as a synthesized compound that exhibited inhibitory activity against arachidonate 5-LOX) [37]. The bioassay comprising the suspension of *C. sphaerospermum* spores revealed that flavonoids (19a), (19b), and (19c) were potent fungi-toxic agents that inhibited fungus growth in 1 µg of the pure compound, while (19d) was the least active, exhibiting a growth inhibition value of 10 µg. It is believed that its epicuticular wax can act as a physical or chemical barrier against the attacks of microorganisms; the inhibition of the growth of the fungus, *C. sphaerospermum*, by the flavonoids that were isolated from the wax, *A. brachypoda*, is a crucial indication, which reinforces the ecological role of these compounds [7].

A study carried out with the ethanolic extract of *A. brachypoda* roots has been shown to exert anti-inflammatory and analgesic effects, thus supporting the traditional utilization of this plant in the treatment of some painful and inflammatory conditions. The chemical profile of an *A. brachypoda* root extract revealed that flavonoids and triterpenes are its main constituents. The oleanane-type triterpenoid (20) inhibited the two phases of the painful stimulation of the formalin test similarly to morphine. Further, it significantly inhibited the carrageenan-induced edema of rat paws at doses of 5, 10, and 15 mg/mL (p.o.), with 3 h post-carrageenan edema inhibitor values of 47.9%, 53.1%, and 50.4%, respectively [26].

The hydroethanolic extract of the *A. brachypoda* root (HEAB) exerted significant gastroprotective effects in vivo. The activity was evaluated via several experimental gastric ulcer models in rats (absolute ethanol, glutathione depletion, nitric oxide depletion, non-steroidal anti-inflammatory, pyloric ligation, and acetic acid). The extract significantly reduced the gastric lesions in all the models at a dosage of 300 mg/kg (p.o) and achieved the cytoprotection of the gastric mucosa [11].

A study evaluated the antileishmania activities of three rare novel dimeric flavonoids, namely brachydins (**22a**), (**22b**), and (**22c**), substances uncommon in the *Bignoniaceae* family-purified *A. brachypoda*. Brachyidin (**22b**) was the most active against the promastigote form of *Leishmania* sp.; the in vitro quantification of the infected macrophages of *Leishmania amazonensis* revealed that (**22b**) was the most active against intracellular amastigotes but without exhibiting host cell toxicity. The combination of amphotericin B (the reference drug employed for conventional treatment) and the substance (**22b**) exerted an inductive effect, indicating the absence of any interaction between them. When administered to *L. amazonensis*-infected mice, both oral and topical treatments were ineffective against the parasite. Thus, brachydins might benefit from new studies for developing a new active structure against *Leishmania* [27].

The same authors achieved the halogenation of brachydins to increase their thermal and oxidative stabilities and evaluate their antiparasitic activity against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania amazonensis*. Thus, 16 compounds (**23a–23p**) were derived from the halogenation (bromination, iodination, and chlorination) reactions; among them, (**23g**) and (**23o**), which were derived from bromine and chlorine, respectively, demonstrated effectiveness against the amastigote form of *L. amazonensis*, besides exhibiting higher SI. They were more active than the original compounds. Regarding the activity, the *T. cruzi* compounds (**23e**), (**23k**), (**23n**), and (**23o**) exhibited the best IC₅₀ values. Moreover, (**23a**) and (**23h**), which were obtained from the inactive derivative, demonstrated the highest activity, indicating that the bromine and iodine insertions could increase the biological activity of the original natural products [12].

LOX is an essential enzyme that is involved in inflammatory processes. Similar to *A. brachypoda*, its anti-inflammatory activity has been reported. The authors developed a procedure for directly identifying bioactive compounds in raw plant extracts, as well as evaluating the inhibitory activity of 15-LOX in vitro. Compound (**24**) achieved the inhibition of LOX with an inhibitory concentration of 7.8 µM, which is close to the standard, quercetin, with an IC₅₀ value of 7.6 µM. Furthermore, conandroside was not cytotoxic to normal cells; it was confirmed as an LOX inhibitor; an evaluation of the LOX–conandroside complex exhibited a slightly higher docking score than quercetin [30].

The cytotoxicities of the dimeric flavonoids, (**22a**), (**22b**), and (**22c**), which were isolated from the *A. brachypoda* roots, were evaluated in human prostate tumor cells (PC-3) where they exhibited IC₅₀ values of 23.41, 4.28, and 4.44 µM, respectively. Additionally, (**22b**) and (**22c**) increased the p21 levels that are related to the G1 cell cycle arrest; (**22a**) and (**22b**) decreased the expressions of phospho-AKT, which is responsible for cell cycle and proliferation. The two brachydins increased the levels of a protein that is related to the repair of DNA, as well as the induction of apoptotic processes [28].

The antispasmodic activity of the HE of the leaves (EH-FAB) of *A. brachypoda* was evaluated employing intestinal smooth muscle tissues (jejunum) through the carbachol-induced amplitude curves (CCH). EH-FAB inhibited the contraction and relaxation of isolated rat jejunum in a significant and concentration-dependent manner. The authors also observed the significant relaxation of the rat jejunum when it was precontracted by high concentrations of extracellular potassium, demonstrating the participation of the potassium channel in the relaxation mechanism of EH-FAB, and this further shifted the CaCl₂ curve to the right, with a decrease in the maximal effect that is characteristic of the CaV inhibition of the calcium influx [31].

The chalcones (**29**, **30**, **31** and **32**) did not exhibit any antimicrobial activity on the tested *S. aureus* strains; however, all the chalcones increased the activity of NorA against the SA1199-B strain, and chalcone (**32**) exhibited the best modulatory effect and good ability

to potentiate the action of EtBr against the SA1199-B strain. The molecular docking of the chalcones revealed that they could bind in the hydrophobic cavities of NorA and MepA, indicating that chalcone (32) competes with the antibiotic for the same NorA and Mep binding sites [32].

Compound (26) is a flavonoid with promising biological activities, including antitumor activity. This substance (26) was isolated from *A. brachypoda* leaves and tested on a panel of tumor cell lines in different tissues where it exhibited promising activity against all the tested cell lines, particularly U-251 glioblastoma, against which it exhibited good selectivity for the tumor cells compared with the positive control. It also controlled cell migration and tumorigenesis by inhibiting the IGF1 R/PI3K/AKT/mTOR pathway, causing the deaths of the U-251 tumor cells by apoptosis via the depolarization of the mitochondrial membrane [33].

A. brachypoda is a plant which is traditionally utilized to treat joint pains. The authors evaluated the in vitro anti-inflammatory activities of dichloromethane fraction (DCMAB); hydroethanolic extract (HEAB); and (22a), (22b), and (22c) in arthritis synoviocytes. DCMAB achieved 30% inhibition in the release of the pro-inflammatory cytokine IL-6 at 25 µg/mL, and HEAB was inactive; conversely, (22b) and (22c) decreased the release of IL-6 with 80% and 94% inhibitions, respectively, while (22a) did not achieve significant inhibitions at 25 and 50 µM with percentage values of 10% and 24% inhibition, respectively. The activity of DCMAB could be related to the higher amounts of (22b) and (22c), as revealed from the quantifications of the fractions: 108 and 123 mg/g, respectively [29].

3.1.6. *A. chica*

Synonyms: *Arrabidaea chica* (Bonpl.) Verl., *Fridericia chica* (Bonpl.) L.G. Lohmann, *Adenocalymma portoricensis* A. Stahl, *Arrabidaea acutifolia* DC., *Arrabidaea chica* (Bonpl.) Verl., *Arrabidaea chica* F. cuprea (Cham.) Sandwith, *Bignonia chica* (Bonpl.), *Bignonia cuprea* (Cham.), *Bignonia rubescens* S. Moore, *Bignonia rufescens* DC., *Bignonia thyrsoides* DC., *Bignonia triphylla* Willd. ex DC., *Lundia chica* (Bonpl.) Seem., *Temnocydia carajura* Mart. ex DC., *Vasconcellia acutifolia* Mart. ex DC.

Main Chemical Composition of *A. chica*

The guided fractionation of the hydroalcoholic *A. chica* extract (ACE) facilitated the isolation of four 3-deoxyanthocyanidins, namely 6,7-dihydroxy-5,4-dimethoxy-flavylium (33a, carajurin), 6,7,4'-trihydroxy-5-methoxy-flavylium (33b, carajurone), 6,7,3',4'-tetrahydroxy-5-methoxy-flavylium (33c), and 6,7,3'-trihydroxy-5,4'-dimethoxy-flavylium (33d) [8] (Table 6). In addition, a new flavone, 6,7,3',4'-tetrahydroxy-5-methoxy flavone (34), which is called carajuflavone, three flavonoids, vicienin-2 (35), kaempferol (36), and 4'-hydroxy-3,7-dimethoxyflavone (37), were reported for the first time in the genus *Arrabidaea* [38,39]. The chemical profile of the leaves allowed the isolation and identification of scutellarin (38a) and a rich fraction of the compound (33b), 6,7-trihydroxy-5-methoxyflavone (39), β-carotene (40a), α-carotene (40b), 6,7,3',4'-tetrahydroxy-5-methoxyflavilium-O-glucuronide(41a), scutellarein-O-glucuronide (41b), and 5-methyl-scutellarein-O-glucuronide (41c) [34,36,40–42]. The compounds (26), (19a) and (25) have also been found in *A. chica*.

Table 6. Structure and bio-pharmacological properties of isolated compounds from *A. chica*.

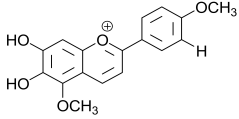
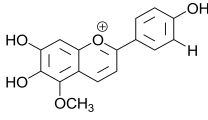
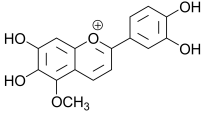
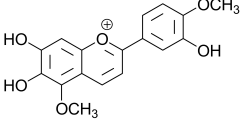
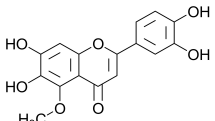
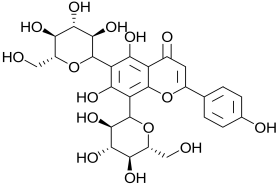
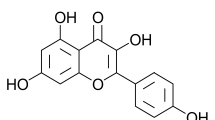
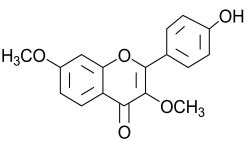
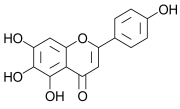
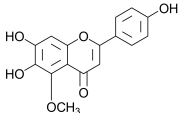
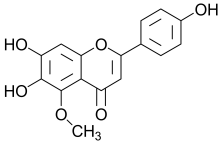
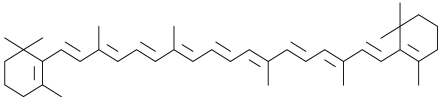
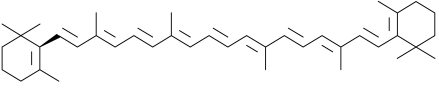
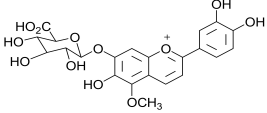
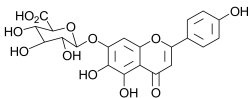
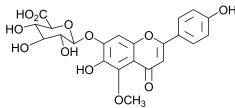
N°	Compound Structure and Name	Species Name	Plant Part, Solvent	Biological Effect	Ref.
33a	 6,7-dihydroxy-5,4'-dimethoxy-flavylium	<i>A. chica</i>	Leaves, Et ₂ O	Inhibited NF-kB	[8,42]
33b	 6,7,4'-trihydroxy-5-methoxy-flavylium	<i>A. chica</i>	Leaves, Et ₂ O	Non active	[8,40]
33c	 6,7,3',4'-tetrahydroxy-5-methoxy-flavylium	<i>A. chica</i>	Leaves, Et ₂ O	Non active	[8,42]
33d	 6,7,3'-trihydroxy-5,4'-dimethoxy-flavylium	<i>A. chica</i>	Leaves, Et ₂ O	Non active	[8,42]
34	 6,7,3',4'-tetrahydroxy-5-methoxyflavone	<i>A. chica</i>	Leaves, MeOH	Non active	[39]
35	 Vicenin-2	<i>A. chica</i>	Leaves, EtOH	Not evaluated	[38]
36	 Kaempferol	<i>A. chica</i>	Leaves, EtOH	Not evaluated	[38]
37	 4'-hydroxy-3,7-dimethoxyflavone	<i>A. chica</i>	Leaves, EtOH	Not evaluated	[38]

Table 6. Cont.

N°	Compound Structure and Name	Species Name	Plant Part, Solvent	Biological Effect	Ref.
38a	 Scutellarein	<i>A. chica</i>	Leaves, EtOH	Non active	[34,36,40]
38b	 5-methyl-scutellarein	<i>A. chica</i>	Leaves, EtOH	Not evaluated	[34]
39	 6,7-trihydroxy-5-methoxyflavone	<i>A. chica</i>	Leaves, EtOH	Anti-inflammatory	[41]
40a	 β -carotene	<i>A. chica</i>	Leaves, Acetone	Not evaluated	[36]
40b	 α -carotene	<i>A. chica</i>	Leaves, Acetone	Not evaluated	[36]
41a	 6,7,3',4'-tetrahydroxy-5-methoxyflavilium-O-glucuronide	<i>A. chica</i>	Leaves, EtOH	Not evaluated	[34]
41b	 Scutellarein-O-glucuronide	<i>A. chica</i>	Leaves, EtOH	Not evaluated	[34]
41c	 5-methyl-scutellarein-O-glucuronide	<i>A. chica</i>	Leaves, EtOH	Not evaluated	[34]

Bio-Pharmacological Properties of *A. chica*

The *Bignoniaceae*, *Arrabidaea chica*, known as “carajuru”, “pouca panga”, “chica”, or “pariri”, is a woody vine that is distributed around tropical America. The leaves of this plant are employed as an anti-inflammatory agent and astringent, as well as medicine for stomach aches, bloody diarrhea, leucorrhea, anemia, and leukemia in the Amazon region. The *in vivo* pharmacological inhibition of NF- κ B of the isolated substances was evaluated to determine whether they substantially modulate the inflammatory processes exhibited by the extract. As observed, anthocyanidin (33a) accounted for the inhibition

of the transcription factor, NF- κ B, which is a phenomenon that is responsible for anti-inflammatory activities [8].

The biological tests of the isolated compounds revealed that (34) exhibited low inhibitory activity toward the release of enzymes and the production of superoxides in rabbit neutrophils, as simulated, employing formyl-methionyl-leucil-phenylalanine (FMLP), while (26) achieved the high inhibition of the neutrophil response effects [39].

An evaluation of the trypanocidal activity of the ethanolic extract of the leaves revealed its activity against the trypomastigote forms of *T. cruzi* at a concentration of 4 mg/kg at which it induced 41% cell lysis; this fraction (ethanolic extract) also induced 71.0% and 54% cell lysis at a concentration of 2 mg/mL [38].

The healing ability of an *A. chica* leaf extract was studied via in vitro tests, such as fibroblast growth stimulation and collagen production. The extract increased collagen production similar to vitamin C and (18), which were utilized as control. The in vivo test revealed that the extract could reduce 13% of skin lesions within only two days of topical application; moreover, it demonstrated 96% wound healing after 10 days, while the control group, which was treated with (18), exhibited 87% healing. These findings indicated that the extract was more efficient in wound healing than the positive control. The ethanol-induced ulcer healing activity of *A. chica* was also evaluated in rats in which the extract was administered orally, and the results demonstrated that it reduced the lesion rates by 76% and 90%, while the control reduced them by 96% [22].

The aqueous (EA) and ethanolic (EE) extracts of *A. chica* leaves were evaluated for their in vivo antitumor properties. The phytochemical analysis of the extracts revealed the presence of different classes of secondary metabolites, such as anthocyanidins, flavonoids, tannins, and saponins. At 30 mg/kg, the EE and EA reduced the development of Ehrlich solid tumor in the rats after ten days of oral administration. The reduction of the tumor size in the EE group was accompanied by an increase in the number of neutrophils in the blood. Conversely, the reduced growth of the tumor in the AE group did not change the number of neutrophils in the blood. Further, no adverse side effects were observed owing to the treatment [43].

The effects of the EA of *A. chica* on the edema caused by *Bothrops atrox* and *Crotalus durissus ruruima* snake venom were studied in orally, intraperitoneally, and subcutaneously treated albino rats. The extract inhibited the edema when it was subcutaneously and intraperitoneally administered with values of 55.87% and 65.70% for the genera *Bothrops* and *Crotalus*, respectively; the inhibition values were 79.81% and 92.52%, respectively, while the oral route exhibited inactivity probably because it was more susceptible to chemical transformations caused by enzymatic processes in the intestinal tract, which alters its inhibitory function. Additionally, histopathological analysis was employed to demonstrate the inhibition of granulocyte infiltration and myocytolysis, which were induced by a snake toxin [44].

The authors [45] employed in vitro anticancer activity models to evaluate the influence of the variation in the relative proportion of anthocyanidins in the methanolic extracts of *A. chica* leaves that were collected over 13 months and prepared with and without enzymatic treatments on a panel of nine human tumor cell lines, MCF-7 (breast), NCI-ADR/RES (ovary with multiple resistance phenotypes), UACC-62 (melanoma), NCI-H460 (lung), PC-3 (prostate), HT29 (colon), OVCAR-03 (ovary), 786-0 (kidney), and K562 (leukemia), while the antioxidant activity was evaluated via the DPPH test. The raw extract, which was not treated with xylanases, stimulated the growth of fibroblasts of the 3T3 lineage in concentrations of 0.25, 2.5, and 25 μ g/mL between January and June. After the enzymatic treatment, the extracts exhibited in vitro antiproliferative activity between January and August. Furthermore, all the extracts reduced the effective cellular concentration of TGI by 250 μ g/mL and induced fibroblast growth. In the DPPH tests, the untreated raw extract exhibited moderate antioxidant activity, while the treated extract improved the antioxidant activity. These results indicated that the presence of anthocyanidins favors this property [45].

In vivo assays were employed to evaluate the effect of foliar ethyl extract in Wistar rats [46]. Therein, the oral administration of the extract in doses of 300, 500, and 600 mg/kg for seven days inhibited carbon tetrachloride-induced liver damage; these results demonstrated a reduction of the serum levels of the glutamic-pyruvic transaminase enzymes by 85.34%, 88.59%, and 93.72%, while the levels of the oxaloacetic glutamic transaminase were 56.86%, 65.27%, and 68.95%, respectively. Additionally, the serum bilirubin levels were 83.81%, 83.12%, and 84.14%, which were similar to a 35 mg/kg dose of standard silymarin drug [46].

The antioxidant capacity of EE of *A. chica* leaves and their partitions in hexane, DCM, EtOAc, and butanol were evaluated at concentrations of 5, 10, 25, 50, 125, and 250 µg/mL. The DCM fraction exhibited better antioxidant capacity owing to its high concentration of (26). The in vivo assay employing Wistar rats was performed to evaluate the diuretic activity of the extract. For the assay, 25, 50, 100, and 200 mg/kg doses were administered, and furosemide was employed as the positive control (50 mg/kg). After the treatment, the urine volumes were measured for 6 h with collections every 2 h. The results demonstrated that FH (dose = 100 mg/kg) increased the urinary volume by 79.26% compared with the negative control (water). The treatment with (26) increased the volume by 93.92% when the same dose was administered [35].

The pharmacognostic analysis of the *A. chica* leaves was performed to facilitate the standardization and quality control of the plant material for application in natural products. The test to determine loss due to desiccation revealed a variation coefficient of 9.18%, while the determination of the total ash content was 6.07%. Further, the phytochemical test of the 70% hydroalcoholic dye of *A. chica* indicated the presence of the following classes of metabolites: reducing sugars, alkaloids, anthocyanidins, anthraquinones, anthocyanins, steroids, triterpenoids, phenols, flavonols, flavanones, saponins, and condensed tannins [47].

In 2013, some researchers obtained anthocyanins from *A. chica* leaves via sequential extraction in a fixed bed employing supercritical carbon dioxide (scCO₂). The percentage of the general yields of the nonpolar scCO₂ extract and CO₂/ethanol mixture (80:20) were 0.65% and 2.40%, respectively. However, the addition of 6.0% water to the mixture increased the percentage yield to 50% in the latter. The test of the total phenols and flavonoids revealed that the extraction with CO₂/ethanol (80/20) without water yielded an extract with a high concentration of gallic-acid-derived phenolic compounds. The hydroalcoholic extract (70:30), which was obtained via conventional methods, exhibited a higher concentration of phenolic compounds. The comparative chromatograms of the sequential extraction revealed that the extract, which was obtained at the third stage of the process employing water, considerably reduced the presence of anthocyanins, while the extraction employing the pure scCO₂ solvent exhibited selectivity toward carajurine. Finally, the conventional ethanolic extract exhibited better values of carajurine concentration, even with a low total yield [48].

The cytotoxic potential of 70% HE of the leaves of *A. chica* was investigated in the CHO-K1 cell line (Chinese hamster ovary), where the administration of doses up to 3000 mg/kg in mice did not reveal signs or symptoms of acute toxicity. Regarding the assessment of chronic toxicity, the groups that were tested with the same dose until the fifth week exhibited weight gain, and the group treated with a 500 mg/kg dose did not exhibit metabolic changes. The treated group exhibited changes in the number of leukocytes. No cytotoxic effect was observed on the CHO-K1 cells since cell viability was not affected in the assay with decreasing concentrations (IC₅₀ = >200 µg/mL) of HE. Regarding the antimicrobial effect, except for the *Helicobacter pylori* (MIC 12.5 µg/mL) and *Enterococcus faecalis* (MIC 100 µg/mL) strains, the 70% HE of *A. chica* could not inhibit the bacterial and fungal growth of the tested species. Furthermore, a quantitative phytochemical analysis of ACE mainly revealed the presence of the phenolic compounds, among which were flavones and flavonols (4.02%), flavanones and dihydroflavonols (0.11%), and anthocyanins (0.06%), as well as the pigments, lycopene, and β-carotene [49].

The leishmanicidal activity of FH of ACE was tested against *Leishmania amazonensis* and *L. infantum*, and the most active fraction (B2) revealed MIC values of 37.2 and 18.6 µg/mL, respectively, causing a significant reduction of the peptidases in both species. Moreover, compared with the untreated parasites, relevant mitochondrial alterations were observed in the promastigote forms of *L. infantum*. The phytochemical analysis of B2 mainly revealed the presence of the following compounds: linolenic acid, methyl ester, n-hexadecanoic acid, octadecanoic acid, and gamma-sitosterol [50].

Like osteoarthritis, tendinopathy has been treated with traditional medicines, such as *A. chica*. It exerted healing effects on the tendons of seven separate groups of animals, following partial transection. The topical application of the extract during the healing process stimulated the synthesis of total collagen between the 7th and 21st day, thus proving the effectiveness of the raw extract of *A. chica* in wound healing [51].

A previous study [52] also demonstrated the efficiency of *A. chica* in the treatment of anemia, inflammation, intestinal colic, hepatitis, and skin infections. The research group evaluated the crude aqueous extract and the fractions of *Arrabidaea* in Salmonella tests to investigate the mutagenic potential of the chemical compounds in *A. chica*. However, the compounds did not exhibit any mutagenic response to Salmonella strains, as well as to genotoxicity in hamster ovary cells, owing to the phytochemical composition of known anti-inflammatory compounds with high concentrations.

As previously reported, the extract of *A. chica* is applied to traditional medicine to induce several biological activities, particularly anti-inflammatory, antimicrobial, diuretic, and antioxidant activities, as well as act as a wound-healing agent. The DCM fraction exhibited excellent antioxidant activity, and this result is due to the presence of flavonoids, mainly (26). Studies have confirmed that *Arrabidaea chica* can also be employed for the treatment of urinary infection [35]; the ethanolic and hexane extracts obtained positive results regarding diuretic activity with different doses.

The application of nanotechnology to extracts greatly benefits phytotherapy, thus emphasizing the advantages of nanotechnology, such as supply, bioavailability, and pharmaceutical products. The authors [53] reported the preparation and characterization of NPs (polymeric nanoparticles), which together with the extract, induced cell viability at very low concentrations. The antiulcerogenic activity was also evaluated, and the result demonstrated that the fusion of NPs with the extract could reduce the ulcerative lesion, making it possible to encapsulate the extract in NPs.

The Brazilian Amazonian population employs *A. chica* leaves to traditionally treat anemia, although the mineral content of this species is unknown. The authors [54] determined the elemental mineral contents (Cu, Fe, Mn, and Zn) of leaves and teas that were obtained via the decoction and infusion of three varieties of the species (AC1, AC2, and AC3) via flame atomic absorption spectrometry. Generally, all the varieties of the studied species exhibited mineral levels, although AC2 exhibited higher concentrations of all the studied minerals and forms of extraction. Fe was more abundant in the dried leaves (38.4–115.5 µg/g), while Mn was the most abundant in decoction (56.1–62.7%) and infusion (45.6–63.6%) extractions.

Further, *A. chica* leaves are utilized by indigenous groups to clean wounds and treat fungal infections. The cytotoxicity test of CHO-K1 demonstrated that HEFc and (38a) did not exhibit cytotoxicity with IC₅₀ values of >200 and >40 µg/mL, respectively, while the positive control (doxorubicin) was highly cytotoxic with IC₅₀ of 0.30 ± 0.04 µg/mL. HEFc and the fraction containing (33b) exhibited good activity against the tested bacteria, while (38a) did not exhibit activity. The mechanism of the antibacterial action of HEFc was studied with the nucleotide leakage assay in a medium containing *S. pyogenes* (MIC, 12.5 µg/mL). HEFc caused leakage in the order of 88.9% within 12 h and 90.0% leakage when associated with amoxicillin [40].

The ethanolic crude extract, as well as chloroform (FC), methanol, and EAA fractions of *A. chica* leaves and stems, were evaluated for their cytotoxicity against *Leishmania amazonensis* promastigotes at 24, 48, and 72 h intervals, followed by their healing effect

on the surgical skin lesions of Swiss mice. The extract exhibited a 50% reduction in the viability of *L. amazonensis* promastigotes at a concentration of 125 µg/mL and the tested incubation intervals. The FC, methanol, and EAA fractions also exhibited a 50% reduction in viability at concentrations of 120, 120, and 60 µg/mL, respectively. EAA acted against the parasite at a lower concentration than the extract. Furthermore, the phytochemical screening of the crude extract revealed the presence of flavonoids, tannins, anthocyanidins, and chalcones. Regarding the healing activity, the extract exhibited satisfactory responses during angiogenesis and collagen deposition; however, the extract did not accelerate the healing of the lesions possibly because of local and systemic factors [55].

The quantitative analysis indicated that 8.77 ± 0.23 mg/g of the compound (39) was present in the extract. The oral pretreatment of LPS-induced peritonitis in mice employing HEFc and (39) achieved the decreased migration of leukocytes into the peritoneal cavity by 44.0% at a single dose of 20 mg/kg of the extract, as well as 56.0% and 67.0% for doses of 4 and 20 mg/kg of (39), respectively, in addition to the reduced concentrations of pro-inflammatory cytokines (TNF α and IL-1b) [41].

The carotenoid and phenolic compound profiles of the freeze-dried leaves and hydromethanolic extract of *A. chica* were determined via HPLC-DAD-MS, and the main compounds identified include (38a) (15,147.22 µg/g, dry basis, b.d.), (27) (204.28 µg/g, b.d.), (40a) (129.5 µg/g, b.d.), and (40b) (79.86 µg/g, b.d.). Additionally, the presence of ascorbic acid (152.7 µg/g) in *A. chica* leaves was reported for the first time. The extract containing 86.81 µM Trolox/g of the fresh leaves was also demonstrated as an excellent ABTS free-radical scavenger; it inhibited the degradation of tryptophan by $^1\text{O}_2$ at all concentrations and exerted a concentration-dependent effect at an IC₅₀ value of 177 µg/mL [36].

The potential mutagenic and genotoxic/antigenotoxic effects of CF of *A. chica* leaves (Ac-CF) was investigated and showed that they did not exert any mutagenic effect on the tested *Salmonella typhimurium* strains at any of the concentrations (5 and 250 µg Ac-CF/plate). Furthermore, Ac-CF exhibited negative responses regarding mutagenicity and genotoxicity in mice and exerted an antigenotoxic effect by decreasing hydrogen peroxide-induced oxidative DNA damage by >50% in their blood and livers [56].

ACE was still employed to evaluate its antitumor effect that is associated with a chemotherapeutic agent, which is employed in cancer treatment (vincristine), as well as its ability to attenuate the development of DMBA-induced breast carcinoma in rats. Fluorescence imaging confirmed that ACE alone or ACE combined with vincristine (50%) reduced the presence and volume of breast tumors compared with the control group. The vincristine-treated group exhibited higher levels of ALT, AST, and GGT (parameters that are associated with high vincristine toxicity). However, a significant reduction was observed in the liver and hematologic toxicity of the ACE + 50% vincristine-treated group. Furthermore, the ACE-treated rats exhibited better albumin and transaminase levels probably because of the antioxidant components of ACE [57].

The leishmanicidal activities of anthocyanidins from four morphotypes of *A. chica* that were collected during summer and winter were evaluated. The multivariate analysis of the morphotypes revealed the presence of (33a), (33b), (33c) and (33d). Further, two different groups were recognized: Group I containing (33c) and Group II with a high (33a) content. The morphotype ACIV(S) extract, which is rich in carajurin, exhibited the best leishmanicidal activity among all the extracts that were analyzed (IC₅₀ = 101.5 µg/mL) [42].

The physicochemical and biological characteristics of a flexible film containing chitosan and alginate that were incorporated into standardized ACE, Verlot, were evaluated to verify the influence of adding a surfactant and silicone-based compounds to obtain a dense and porous flexible structure as a device for releasing bioactive compounds into lesions. The incorporation of a surfactant and silicone gel ensured that a porous matrix was obtained, which also increased the intumescence of the polymeric matrix. The formulations containing a surfactant exhibited better performances regarding flexibility and deformation to rupture. Additionally, the presence of the standardized ACE did not negatively affect

the characteristics of the membranes; it demonstrated release concentration values of 89–99 µg/mL, which are within the therapeutic range [58].

The antioxidant capacities of the FH, FC, and EAA from the leaf extract (EC) of *A. chica* were evaluated with 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and the xanthine/luminol/xanthine oxidase system. FC exhibited the best antioxidant activity among the other fractions ($EC_{50} = 7.3$ and 0.33 µg/mL). Moreover, FC and CE exerted photoprotective effects by reducing ultraviolet (UV)-induced cell damage, inhibiting ROS production, and preventing lipid peroxidation [59].

Next, the photoprotective activity and toxicity level of the formulations based on a non-ionic cream containing the extract (5.0%), as well as FH and EAA (2.50%) obtained from *A. chica* leaves, were evaluated. The extract and fractions exhibited good optical absorption in the UV regions, including UVA and UVB. The formulation obtained without adding the inorganic UV filters that are commonly employed in commercial sunscreens exhibited an ex vivo percutaneous penetration rate similar to that of the positive control, as well as the ability to remain on the skin for 180 min. The macroscopic and histopathological analysis did not reveal any signs of irritation and significant alterations to the skins of the groups that were treated with the formulation; moreover, no renal or hepatic toxicities were observed similar to the control group [60].

The intestinal anti-inflammatory activity of HEFc was investigated. The group, which was treated with the plant extract (5-fluorouracil), exhibited partially preserved villi and crypts, reduced infiltration, and preserved muscle layers; the experimental intestinal mucositis model exhibited reduced weight changes [34].

The hydroalcoholic ACE exhibited cytoprotection over the epithelial and osteoblastic cells that were exposed to zoledronic acid. The cells which were treated with the extract exhibited increased cell viability with values of 74.10–82.30% at concentrations of 5 and 10 µg/mL for fibroblasts and 66% for the pre-osteoblasts and a lower caspase 3/7 [61].

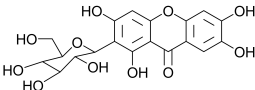
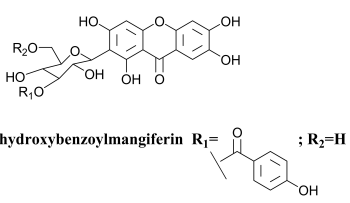
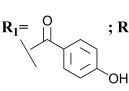
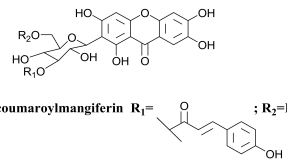
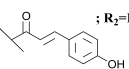
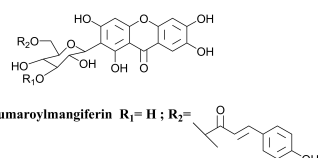
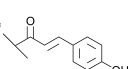
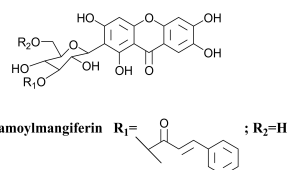
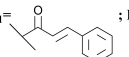
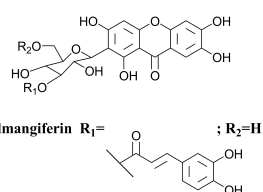
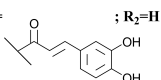
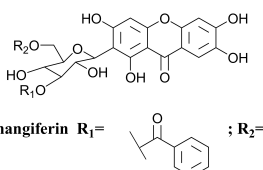
3.1.7. *A. patellifera*

Synonyms: *Arrabidaea patellifera* (Schltdl.) Sandwith, *Fridericia patellifera* (Schltdl.) L.G. Lohmann, *Anemopaegma cupulatum* (Splitg.) Bureau & K. Schum., *Arrabidaea broadwayi* (Sprague & Riley) Sandwith, *Arrabidaea patellifera* (Schltdl.) Sandwith, *Bignonia patellifera* (Schltdl.), *Cuspidaria mollis* Kränzlin, *Micropaegma cupulatum* (Splitg.) Pichon, *Parmentiera patellifera* (Schltdl.) Miers, *Petastoma breviflorum* Standl., *Tabebuia neurophylla* Miq., *Tanaecium paniculatum* Siebert ex DC.

Main Chemical Composition of *A. patellifera*

The chemical investigation of the methanolic extract of *A. patellifera* leaves, a Bignoniaceae from Panama, obtained the isolation of mangiferin (**42a**), and six mangiferin derivatives, namely 3'-O-*p*-hydroxy benzoyl mangiferin (**42b**), 3'-O-trans-coumaroyl-mangiferin (**42c**), 6'-O-trans-coumaroyl-mangiferin (**42d**), 3'-O-trans-cinnamoylmangiferin (**42e**), 3'-O-trans-caffeoylmangiferin (**42f**), and 3'-O-benzoylmangiferin (**42g**) (Table 7) [62].

Table 7. Structure and bio-pharmacological properties of isolated compounds from *A. patellifera*.

N°	Compound Structure and Name	Species Name	Plant Part, Solvent	Biological Effect	Ref.
42a	 Mangiferin	<i>A. patellifera</i>	Leaves, MeOH	Antioxidant and <i>Plasmodium falciparum</i>	[62]
42b	 3'-O- <i>p</i> -hydroxybenzoylmangiferin $R_1 =$  ; $R_2 = H$	<i>A. patellifera</i>	Leaves, MeOH	Antioxidant and <i>Plasmodium falciparum</i>	[62]
42c	 3'-O- <i>trans</i> -coumaroylmangiferin $R_1 =$  ; $R_2 = H$	<i>A. patellifera</i>	Leaves, MeOH	Antioxidant and <i>Plasmodium falciparum</i>	[62]
42d	 6'-O- <i>trans</i> -coumaroylmangiferin $R_1 = H$; $R_2 =$ 	<i>A. patellifera</i>	Leaves, MeOH	Antioxidant and <i>Plasmodium falciparum</i>	[62]
42e	 3'-O- <i>trans</i> -cinnamoylmangiferin $R_1 =$  ; $R_2 = H$	<i>A. patellifera</i>	Leaves, MeOH	Antioxidant	[62]
42f	 3'-O- <i>trans</i> -caffeoylmangiferin $R_1 =$  ; $R_2 = H$	<i>A. patellifera</i>	Leaves, MeOH	Antioxidant	[62]
42g	 3'-O-benzoylmangiferin $R_1 =$  ; $R_2 = H$	<i>A. patellifera</i>	Leaves, MeOH	Antioxidant	[62]

Bio-Pharmacological Properties of *A. patellifera*

The compounds (42a–42g) exhibit antioxidant and radical scavenging activities, and four of them were relatively active in vitro against *Plasmodium falciparum* [62].

The reports of chemical, biological and pharmacological aspects from seven species of Arrabidaea are sufficient to valorize this genus. These species revealed a great diversity of unknown and bioactive compounds with varied molecular patterns, with xanthones the typical type of compound to the genus, since they were found in different species.

The healing properties reported may also be associated with activities of isolated compounds reported in Arrabidaea genus. The literature reports the isolation of several secondary metabolites in species from this genus distributed in tropical and subtropical regions all over the world. These studies showed the occurrence of substances of

various other classes with triterpenes, flavonoids, and other phenolic compounds. Studies of ethnopharmacological data validation confirmed several popular indications to a lot of species of Arrabidaea, including antibacterial, antifungal, anti-inflammatory, and antioxidant activities.

The continuous identification of new metabolites from Arrabidaea, allied to new methods of pharmacological and biological evaluation in projects of bioprospection of drugs, is determinant in the revaluation of several vegetal extracts, aiming at the search for new chemical classes and the identification of active metabolites, being rather selective to certain biological targets.

Obviously, members from the Arrabidaea genus have significant potential with promising pharmacological activities of extracts in the context of traditional medicine, especially in the field of tropical diseases, skin issues, and venereal diseases. Pharmacological studies must be performed considering the traditional method of preparation and application.

4. Conclusions

The genus Arrabidaea contains abundant phytoconstituents, mainly comprising flavonoids, triterpenes, and xanthenes. Moreover, the genus Arrabidaea exhibits significant pharmacological potentials and promising activities, such as antioxidant, antimicrobial, anticancer, antileishmanial, antiprotozoal, and anti-inflammatory activities. The knowledge obtained from this review can increase the efficacy of the already employed traditional applications of these plants and promote their cultural values afterward. This review also stimulates chemical and bio-pharmacological studies with the genus Arrabidaea and serves as an alert for the elaboration of strategies for the preservation of Brazilian biodiversity.

Author Contributions: Conceptualization, J.R.d.N. and C.Q.d.R.; methodology, J.R.d.N. and C.Q.d.R.; software, J.R.d.N.; validation, J.R.d.N., W.V. and C.Q.d.R.; formal analysis, J.R.d.N., C.Q.d.R. and W.V.; investigation, J.R.d.N., A.d.J.A.M., F.C.V., C.D.P.R., A.C.C.B.L., M.M.P.T., J.L.P.F. and C.Q.d.R.; resources, C.Q.d.R. and W.V.; data curation, J.R.d.N. and C.Q.d.R.; writing—original draft preparation, J.R.d.N., A.d.J.A.M., F.C.V., C.D.P.R., A.C.C.B.L., M.M.P.T., J.L.P.F., L.N.V. and C.Q.d.R.; writing—review and editing, J.R.d.N. and C.Q.d.R.; visualization, J.R.d.N. and C.Q.d.R.; supervision, C.Q.d.R. and W.V.; project administration, C.Q.d.R.; funding acquisition, C.Q.d.R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes—Brasil, finance code: 001), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Proc. CNPq.: 311090/2021-4 and Proc. CNPq: 409680/2021-4) and FAPEMA (Proc.: UNIVERSAL-00849/18).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data sharing not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Pauletti, P.M.; Bolzani, V.S.; Young, M.C.M. Constituintes químicos de *Arrabidaea samydoidea* (Bignoniaceae). *Quim. Nova* **2003**, *26*, 641–643. [\[CrossRef\]](#)
2. Bramara, B.V.B.; Vasavi, H.S.; Sudeep, H.V.; Shyam Prasad, K. Hydroalcoholic extract from *Lepidium meyenii* (Black Maca) root exerts wound healing activity in Streptozotocin-induced diabetic rats. *Wound Med.* **2017**, *19*, 75–81. [\[CrossRef\]](#)
3. Silva, M.M.; Queiroz, L.P. A família Bignoniaceae na região de Catolés, Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. *Sitientibus Série Ciências Biológicas* **2003**, *3*, 3–21.
4. Sandwith, N.Y. Contributions to the Flora of Tropical America: LVII. Studies in Bignoniaceae, XX. *Kew Bull.* **1954**, *9*, 597–614. [\[CrossRef\]](#)
5. Sandwith, N.Y. Contributions to the Flora of Tropical America: LXXVI. Notes on Bignoniaceae: XXIX: Arrabidaea in Martius's "Flora brasiliensis" and Subsequently. *Kew Bull.* **1968**, *22*, 403–420. [\[CrossRef\]](#)
6. Gentry, A.H. Generic delimitations of Central American Bignoniaceae. *Brittonia* **1973**, *25*, 226–242. [\[CrossRef\]](#)

7. Alcerito, T.; Barbo, F.E.; Negri, G.; Santos, D.Y.A.C.; Meda, C.I.; Young, M.C.M.; Chávez, D.; Blatt, C.T.T. Foliar epicuticular wax of *Arrabidaea brachypoda*: Flavonoids and antifungal activity. *Biochem. Syst. Ecol.* **2002**, *30*, 677–683. [\[CrossRef\]](#)
8. Zorn, B.; Garcá, A.J.; Castro, V.; Murillo, R.; Mora, G.; Melfort, I. 3-Desoxyanthocyanidins from *Arrabidaea chica*. *Phytochemistry* **2001**, *56*, 831–835. [\[CrossRef\]](#)
9. Neto, G.G.; Morais, R.G. Recursos medicinais de espécies do Cerrado de Mato Grosso: Um estudo bibliográfico. *Acta Bot. Bras.* **2003**, *17*, 561–584. [\[CrossRef\]](#)
10. Pauletti, P.M.; Castro-Gamboa, I.; Silva, D.H.S.; Young, M.C.M.; Tomazela, D.M.; Eberlin, M.N.; Bolzani, V.S. New Antioxidant C-Glucosylxanthones from the Stems of *Arrabidaea samydoides*. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 1384–1387. [\[CrossRef\]](#)
11. Rocha, C.Q.; De-Faria, F.M.; Marcourt, L.; Ebrahimi, S.N.; Kitano, B.T.; Ghilardi, A.F.; Luiz Ferreira, A.; de Almeida, A.C.A.; Dunder, R.J.; Souza-Brito, A.R.M.; et al. Gastroprotective effects of hydroethanolic root extract of *Arrabidaea brachypoda*: Evidences of cytoprotection and isolation of unusual glycosylated polyphenols. *Phytochemistry* **2017**, *135*, 93–105. [\[CrossRef\]](#)
12. Neuenschwander, A.; Rocha, V.P.C.; Bastos, T.M.; Marcourt, L.; Morin, H.; Rocha, C.Q.; Grimaldi, G.B.; de Sousa, K.A.F.; Borges, J.N.; Rivara-Minten, E.; et al. Production of highly active antiparasitic compounds from the controlled halogenation of the *Arrabidaea brachypoda* crude plant extract. *J. Nat. Prod.* **2020**, *83*, 2631–2640. [\[CrossRef\]](#)
13. Silva Junior, C.H.L.; Pessôa, A.C.M.; Carvalho, N.S. The Brazilian Amazon deforestation rate in 2020 is the greatest of the decade. *Nat. Ecol. Evol.* **2021**, *5*, 144–145. [\[CrossRef\]](#)
14. Brandão, G.C.; Kroon, E.G.; Souza, D.E.R.; Filho, J.D.S.; Oliveira, A.B. Chemistry and antiviral activity of *Arrabidaea pulchra* (Bignoniaceae). *Molecules* **2013**, *18*, 9919–9932. [\[CrossRef\]](#)
15. Alvarenga, A.T.; Bêdo, T.R.F.O.; Braguine, C.G.; Gonçalves, U.O.; Magalhães, L.G.; Rodrigues, V.; Gimenez, V.M.M.; Groppo, M.; Silva, M.L.A.; Cunha, W.R.; et al. Evaluation of *Cuspidaria pulchra* and its Isolated Compounds Against *Schistosoma mansoni* Adult Worms. *Int. J. Biotechnol. Wellness Ind.* **2012**, *1*, 122–127. [\[CrossRef\]](#)
16. Leite, J.P.V.; Oliveira, A.B.; Lombardi, J.A.; Filho, J.D.S.; Chiari, E. Trypanocidal activity of triterpenes from *Arrabidaea triplinervia* and derivatives. *Biol. Pharm. Bull.* **2006**, *29*, 2307–2309. [\[CrossRef\]](#)
17. Brandão, G.C.; Kroon, E.G.; Dos Santos, J.R.; Stehmann, J.R.; Lombardi, J.A.; Braga De Oliveira, A. Antiviral activity of Bignoniaceae species occurring in the state of Minas Gerais (Brazil): Part 1. *Lett. Appl. Microbiol.* **2010**, *51*, 469–476. [\[CrossRef\]](#)
18. Alvarenga, T.A.; Bertanha, C.S.; de Oliveira, P.F.; Tavares, D.C.; Gimenez, V.M.M.; Silva, M.L.A.; Cunha, W.R.; Januário, A.H.; Pauletti, P.M. Lipoxigenase inhibitory activity of *Cuspidaria pulchra* and isolated compounds. *Nat. Prod. Res.* **2014**, *29*, 1083–1086. [\[CrossRef\]](#)
19. Leite, J.P.V.; Lombardi, J.A.; Chiari, E.; Oliveira, A.B. Isolamento biomonitorado de uma substância tripanossomicida de *Arrabidaea triplinervia* (Bignoniaceae), o ácido ursólico. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2001**, *11*, 77–87. [\[CrossRef\]](#)
20. Gonzalez, B.; Suarez-Roca, H.; Bravo, A.; Salas-Auvert, R.; Avila, D. Chemical composition and biological activity of extracts from *Arrabidaea bilabiata*. *Pharm. Biol.* **2000**, *38*, 287–290. [\[CrossRef\]](#)
21. Krebs, H.C.; Kemmerling, W.; Habermehl, G. Qualitative and quantitative determination of fluoroacetic acid in *Arrabidaea bilabiata* and *Palicourea marCGravii* by ¹⁹F-NMR spectroscopy. *Toxicon* **1994**, *32*, 909–913. [\[CrossRef\]](#)
22. Jorge, M.P.; Madjarof, C.; Ruiz, A.L.T.G.; Fernandes, A.T.; Rodrigues, R.A.F.; de Oliveira Sousa, I.M.; Foglio, M.A.; de Carvalho, J.E. Evaluation of wound healing properties of *Arrabidaea chica* Verlot extract. *J. Ethnopharmacol.* **2008**, *118*, 361–366. [\[CrossRef\]](#)
23. Jabour, F.F.; Seixas, J.N.; Tokarnia, C.H.; Brito, M.F.V. Variação da toxidez de *Arrabidaea bilabiata* (Bignoniaceae) em coelhos. *Pesqui. Veterinária Bras.* **2006**, *26*, 171–176. [\[CrossRef\]](#)
24. Tokarnia, C.H.; Barbosa, J.D.; Oliveira, C.M.C.; Brito, M.F.; Oliveira, R.B.; Barbas, L.A.L. Aspectos epidemiológicos e clínico-patológicos comparados da intoxicação por *Arrabidaea bilabiata* (Bignoniaceae) em búfalos e bovinos. *Pesqui. Veterinária Bras.* **2004**, *24*, 74–79. [\[CrossRef\]](#)
25. Peixoto, T.C.; Oliveira, L.I.; Caldas, S.A.; Junior, F.E.A.C.; Carvalho, M.G.; França, T.N.; Peixoto, P.V. Efeito protetor da acetamida sobre as intoxicações experimentais em ratos por monofluoroacetato de sódio e por algumas plantas brasileiras que causam morte súbita. *Pesqui. Vet. Bras.* **2011**, *31*, 938–952. [\[CrossRef\]](#)
26. Da Rocha, C.Q.; Vilela, F.C.; Santa-Cecília, F.V.; Cavalcante, G.P.; Vilegas, W.; Giusti-Paiva, A.; dos Santos, M.H. Oleanane-type triterpenoid: An anti-inflammatory compound of the roots *Arrabidaea brachypoda*. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2015**, *25*, 228–232. [\[CrossRef\]](#)
27. Rocha, V.P.C.; Rocha, C.Q.; Queiroz, E.F.; Marcourt, L.; Vilegas, W.; Grimaldi, G.B.; Furrer, P.; Allémann, E.; Wolfender, J.; Soares, M.B.P. Antileishmanial activity of dimeric flavonoids isolated from *Arrabidaea brachypoda*. *Molecules* **2019**, *24*, 1. [\[CrossRef\]](#)
28. Nunes, H.L.; Tuttis, K.; Serpeloni, J.M.; Nascimento, J.R.; da Rocha, C.Q.; Silva, V.A.O.; Lengert, A.V.H.; Reis, R.M.; Cólus, I.M. Characterization of the in vitro cytotoxic effects of brachydins isolated from *Fridericia platyphylla* in a prostate cancer cell line. *J. Toxicol. Environ. Health-Part A Curr. Issues* **2020**, *83*, 547–558. [\[CrossRef\]](#)
29. Salgado, C.; Morin, H.; Aquino, N.; Neff, L.; Rocha, C.Q.; Vilegas, W.; Marcourt, L.; Wolfender, J.; Jordan, O.; Queiroz, E.F.; et al. In Vitro Anti-Inflammatory Activity in Arthritic Synoviocytes of *A. brachypoda* Root Extracts and Its Unusual Dimeric Flavonoids. *Molecules* **2020**, *25*, 5219. [\[CrossRef\]](#)
30. Bertanha, C.S.; Gimenez, V.M.M.; Furtado, R.A.; Tavares, D.C.; Cunha, W.R.; Silva, M.L.A.; Januario, A.H.; Borges, A.; Kawano, D.F.; Parreira, R.L.T.; et al. Isolation, in vitro and in silico Evaluation of Phenylethanoid Glycoside from *Arrabidaea brachypoda* as Lipoxigenase Inhibitor. *J. Braz. Chem. Soc* **2020**, *13*, 849–855. [\[CrossRef\]](#)

31. Monteiro, F.S.; Costa, J.R.S.; Martins, L.J.A.; Rocha, C.Q.; Borges, A.C.R.; Borges, M.O.R. Hydroalcoholic extract of leaves of *Arrabidaea brachypoda* (Dc.) bureau present antispasmodic activity mediated through calcium influx blockage. *Rev. Ciencias Farm. Basica Apl.* **2020**, *41*, 1–13. [\[CrossRef\]](#)
32. Rezende-Júnior, L.M.; Leal, L.M.S.A.; Alves, A.L.; Mesquita, A.B.S.; Santos, A.L.P.A.; Neto, J.S.L.; Siqueira-Júnior, J.P.; Nogueira, C.E.S.; Kaatz, G.W.; Coutinho, H.D.M.; et al. Chalcones Isolated from *Arrabidaea brachypoda* Flowers as Inhibitors of NorA and MepA Multidrug Efflux Pumps of *Staphylococcus aureus*. *Antibiotics* **2020**, *9*, 351. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Franco, Y.E.M.; Lima, C.A.; Rosa, M.N.; Silva, V.A.O.; Reis, R.M.; Priolli, D.G.; Carvalho, P.O.; Nascimento, J.R.; Rocha, C.Q.; Longato, G.B. Investigation of U-251 cell death triggered by flavonoid luteolin: Towards a better understanding on its anticancer property against glioblastomas. *Nat. Prod. Res.* **2020**, *35*, 4807–4813. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Takenaka, I.; Tavares, M.; Amorim, J.M.; de Barros, P.A.V.; Brandão, G.C.; Contarini, S.M.L.; Souza, S.; Melo, E.L.; de Almeida-Leite, C.M.; Martins, F.S.; et al. Chemical Characterization and Anti-inflammatory Assessment of the Hydroethanolic Extract of *Fridericia chica*. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2020**, *30*, 559–567. [\[CrossRef\]](#)
35. Do Amaral, R.R.; Santos, A.A.D.; Saravia, A.; Botas, G.; Cruz, R.A.S.; Fernandes, C.P.; Rocha, L.; Boylan, F. Biological activities of *Arrabidaea chica* (Bonpl.) B. Verl. leaves. *Lat. Am. J. Pharm.* **2012**, *31*, 451–455.
36. Siqueira, F.C.; Leitão, D.S.T.C.; Mercadante, A.Z.; Chisté, R.C.; Lopes, A.S. Profile of phenolic compounds and carotenoids of *Arrabidaea chica* leaves and the in vitro singlet oxygen quenching capacity of their hydrophilic extract. *Food Res. Int.* **2019**, *126*, 108597. [\[CrossRef\]](#)
37. Horie, T.; Tominaga, H.; Kawamura, Y.; Hada, T.; Ueda, N.; Amano, Y.; Yamamoto, S. Syntheses of 5,7,8- and 5,6,7-Trioxxygenated 3-Alkyl-3',4'-dihydroxyflavones and Their Inhibitory Activities against Arachidonate 5-Lipoxygenase. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 2169–2176. [\[CrossRef\]](#)
38. Barbosa, W.L.R.; Pinto, L.N.; Quignard, E.; Vieira, J.M.S.; Silva, J.O.C.; Albuquerque, S. *Arrabidaea chica* (HBK) Verlot: Phytochemical approach, antifungal and trypanocidal activities. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2008**, *18*, 544–548. [\[CrossRef\]](#)
39. Takemura, O.S.; Iinuma, M.; Tosa, H.; Miguel, O.G.; Moreira, E.A.; Nozawa, Y. A flavone from leaves of *Arrabidaea chica* F. cuprea. *Phytochemistry* **1995**, *38*, 1299–1300. [\[CrossRef\]](#)
40. Violante, I.M.P.; Carollo, C.A.; Silva, L.I.; Oliveira, A.Q.C.; Pardinho, F.C.; Garcez, W.S.; Garcez, F.R.; Arunachalam, K.; Martins, D.T.O. Cytotoxicity and antibacterial activity of scutellarein and carajurone-enriched fraction obtained from the hydroethanolic extract of the leaves of *Fridericia chica* (Bonpl.) L.G. Lohmann. *Nat. Prod. Res.* **2020**, *35*, 5287–5293. [\[CrossRef\]](#)
41. Lima, J.C.S.; de Oliveira, R.G.; Silva, V.C.; de Sousa, P.T.; Violante, I.M.P.; Macho, A.; Martins, D.T.O. Anti-inflammatory activity of 4',6,7-trihydroxy-5-methoxyflavone from *Fridericia chica* (Bonpl.) L.G. Lohmann. *Nat. Prod. Res.* **2020**, *34*, 726–730. [\[CrossRef\]](#)
42. Moragas-Tellis, C.J.; Almeida-Souza, F.; Chagas, M.S.S.; de Souza, P.V.R.; Silva-Silva, J.V.; Ramos, Y.J.; Moreira, D.L.; Calabrese, K.S.; Behrens, M.D. The influence of anthocyanidin profile on antileishmanial activity of *Arrabidaea chica* morphotypes. *Molecules* **2020**, *25*, 3547. [\[CrossRef\]](#)
43. Ribeiro, A.F.C.; Telles, T.C.; Ferraz, V.P.; Souza-Fagundes, E.M.; Cassali, G.D.; Carvalho, A.T.; Melo, M.M. Effect of *Arrabidaea chica* extracts on the Ehrlich solid tumor development. *Braz. J. Pharmacogn.* **2012**, *22*, 364–373. [\[CrossRef\]](#)
44. Oliveira, D.P.C.; Borrás, M.R.L.; Ferreira, L.C.L.; López-Lozano, J.L. Atividade antiinflamatória do extrato aquoso de *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verl. sobre o edema induzido por venenos de serpentes amazônicas. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2009**, *19*, 643–649. [\[CrossRef\]](#)
45. Taffarello, D.; Jorge, M.P.; Sousa, I.M.O.; Duarte, M.C.T.; Figueira, G.M.; Queiroz, N.C.A.; Rodrigues, R.A.F.; De Carvalho, J.E.; Goes, A.L.T.R.; Foglio, M.A.; et al. Atividade de extratos de *Arrabidaea chica* (HUMB. & BONPL.) verlot obtidos por processos biotecnológicos sobre a proliferação de fibroblastos e células tumorais humanas. *Quim. Nova* **2013**, *36*, 431–436. [\[CrossRef\]](#)
46. Medeiros, B.J.L.; Costa, K.S.; Ribeiro, J.F.A.; Silva, J.O.C.; Barbosa, W.L.R.; Carvalho, J.C.T. Liver protective activity of a hydroethanolic extract of *Arrabidaea chica* (Humb. and Bonpl.) B. Verl. (pariri). *Pharmacogn. Res.* **2011**, *3*, 79–84. [\[CrossRef\]](#)
47. Alves, M.S.M.; Mendes, P.C.; Vieira, J.G.P.; Ozela, E.F.; Barbosa, W.L.R.; Júnior, J.O.C.S. Análise farmacognóstica das folhas de *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verlt. Bignoniaceae. *Braz. J. Pharmacogn.* **2010**, *20*, 215–221. [\[CrossRef\]](#)
48. Paula, J.T.; Paviani, L.C.; Foglio, M.A.; Sousa, I.M.O.; Cabral, F.A. Extraction of anthocyanins from *Arrabidaea chica* in fixed bed using CO₂ and CO₂/ethanol/water mixtures as solvents. *J. Supercrit. Fluids* **2013**, *81*, 33–41. [\[CrossRef\]](#)
49. Mafioleti, L.; Junior, I.F.S.; Colodel, E.M.; Flach, A.; Martins, D.T.O. Evaluation of the toxicity and antimicrobial activity of hydroethanolic extract of *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verl. *J. Ethnopharmacol.* **2013**, *150*, 576–582. [\[CrossRef\]](#)
50. Rodrigues, I.A.; Azevedo, M.M.B.; Chaves, F.C.M.; Alviano, C.S.; Alviano, D.S.; Vermelho, A.B. *Arrabidaea chica* hexanic extract induces mitochondrion damage and peptidase inhibition on *Leishmania* spp. *Biomed Res. Int.* **2014**, *2014*, 985171. [\[CrossRef\]](#)
51. Aro, A.A.; Simões, G.F.; Esquisatto, M.A.M.; Foglio, M.A.; Carvalho, J.E.; Oliveira, A.L.R.; Gomes, L.; Pimentel, E.R. *Arrabidaea chica* extract improves gait recovery and changes collagen content during healing of the Achilles tendon. *Injury* **2013**, *44*, 884–892. [\[CrossRef\]](#)
52. Gemelli, T.F.; Prado, L.S.; Santos, F.S.; Souza, A.P.; Guecheva, T.N.; Henriques, J.A.P.; Ferraz, A.B.F.; Corrêa, D.S.; Dihl, R.R.; Picada, J.N. Evaluation of Safety of *Arrabidaea chica* Verlot (Bignoniaceae), a Plant with Healing Properties. *J. Toxicol. Environ. Health-Part A Curr. Issues* **2015**, *78*, 1170–1180. [\[CrossRef\]](#)
53. Servat-Medina, L.; González-Gómez, A.; Reyes-Ortega, F.; Sousa, I.M.O.; Queiroz, N.C.A.; Zago, P.M.W.; Jorge, M.P.; Monteiro, K.M.; de Carvalho, J.E.; San Román, J.; et al. Chitosan–tripolyphosphate nanoparticles as *Arrabidaea chica* standardized extract carrier: Synthesis, characterization, biocompatibility, and antiulcerogenic activity. *Int. J. Nanomed.* **2015**, *10*, 3897–3909. [\[CrossRef\]](#)

54. Magalhães, I.R.S.; Soares, A.O.; Araújo, L.M.; Da Costa, P.R.C.; Roland, I.A.; Borrás, M.R.L. Determination of Cu, Fe, Mn, and Zn in the leaves and tea of *Arrabidaea chica* (Humb. & Bompl.) Verl. *Biol. Trace Elem. Res.* **2009**, *132*, 239–246. [\[CrossRef\]](#)
55. Sá, J.C.; Almeida-Souza, F.; Mondêgo-Oliveira, R.; Oliveira, I.S.S.; Lamarck, L.; Magalhães, I.F.B.; Ataídes-Lima, A.F.; Ferreira, H.S.; Abreu-Silva, A.L. Leishmanicidal, cytotoxicity and wound healing potential of *Arrabidaea chica* Verlot. *BMC Complement. Altern. Med.* **2016**, *16*, 1. [\[CrossRef\]](#)
56. Dos Santos, V.C.; Longo, T.B.; Garcia, A.L.H.; Richter, M.F.; Guecheva, T.N.; Henriques, J.A.P.; Ferraz, A.B.F.; Picada, J.N. Evaluation of the mutagenicity and genotoxicity of *Arrabidaea chica* verlot (Bignoneaceae), an amazon plant with medicinal properties. *J. Toxicol. Environ. Health-Part A Curr. Issues* **2013**, *76*, 381–390. [\[CrossRef\]](#)
57. Rocha, K.B.F.; Oliveira, C.N.; Azevedo, I.M.; de Macedo, R.; Medeiros, A.C. Effect of *Arrabidaea chica* extract against chemically induced breast cancer in animal model. *Acta Cir. Bras.* **2019**, *34*, e201901001. [\[CrossRef\]](#)
58. Pires, A.L.R.; Westin, C.B.; Hernandez-Montelongo, J.; Sousa, I.M.O.; Foglio, M.A.; Moraes, A.M. Flexible, dense and porous chitosan and alginate membranes containing the standardized extract of *Arrabidaea chica* Verlot for the treatment of skin lesions. *Mater. Sci. Eng. C* **2020**, *112*, 110869. [\[CrossRef\]](#)
59. Ribeiro, F.M.; Volpato, H.; Lazarin-Bidóia, D.; Desoti, V.C.; de Souza, R.O.; Fonseca, M.J.V.; Ueda-Nakamura, T.; Nakamura, C.V.; Silva, S.O. The extended production of UV-induced reactive oxygen species in L929 fibroblasts is attenuated by posttreatment with *Arrabidaea chica* through scavenging mechanisms. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2018**, *178*, 175–181. [\[CrossRef\]](#)
60. Siraichi, J.T.G.; Pedrochi, F.; Natali, M.R.M.; Ueda-Nakamura, T.; Filho, B.P.D.; Bento, A.C.; Baesso, M.L.; Nakamura, C.V. Ultraviolet (UVB and UVA) photoprotector activity and percutaneous penetration of extracts obtained from *Arrabidaea chica*. *Appl. Spectrosc.* **2013**, *67*, 1179–1184. [\[CrossRef\]](#)
61. Zago, P.M.W.; Sousa, I.M.O.; Servat-Medina, L.; Jorge, M.P.; Neto, L.G.L.; Hass, V.; Li, X.; Ruiz, A.L.T.G.; Saxena, D.; Foglio, M.A. Standardized *Arrabidaea chica* extract shows cytoprotective effects in zoledronic acid-treated fibroblasts and osteoblasts. *Clin. Cosmet. Investig. Dent.* **2020**, *12*, 327–333. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
62. Martin, F.; Hay, A.E.; Cressend, D.; Reist, M.; Vivas, L.; Gupta, M.P.; Carrupt, P.A.; Hostettmann, K. Antioxidant C-glucosylxanthones from the leaves of *Arrabidaea patellifera*. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 1887–1890. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)



Innovative Microemulsion Loaded with Unusual Dimeric Flavonoids from *Fridericia platyphylla* (Cham.) L.G. Lohmann Roots

Jessyane Rodrigues do Nascimento¹ · Beatriz Santiago² · Matheus Rodrigues² · Gláucia Laís Nunes Lopes² · Glaucio Monteiro Ferreira³ · Glécilla Colombelli de Souza Nunes⁴ · Renato Sonchini Gonçalves⁵ · André Luis Menezes Carvalho² · Wagner Vilegas¹ · Cláudia Quintino da Rocha⁵

Received: 10 July 2023 / Accepted: 13 September 2023

© The Author(s), under exclusive licence to American Association of Pharmaceutical Scientists 2023

Abstract

Fridericia platyphylla (Cham.) L.G. Lohmann is a species native to the Brazilian cerrado, with promising bioactivity. The organic fraction of the roots is rich in unusual dimeric flavonoids, reported as potential candidates for cancer treatment. The exploration of these flavonoids is very important, considering their diverse biological activities and the need for innovative therapeutic options. This work aimed to develop and characterize a microemulsion loaded with a non-polar fraction (DCM). The constituents were chosen, and the pseudo-ternary diagram was constructed to determine the region of microemulsion formation. The microemulsions blank (ME), with 3% (ME3) and 5% (ME5) of fraction DCM, were characterized in terms of droplet size, zeta potential, and polydispersity index. Both MEs showed particle sizes <100 nm; only ME3 exhibited better values for polydispersity index and zeta potential and was therefore selected for further study. The organoleptic and physicochemical characteristics were evaluated, revealing limpidity and transparency typical of these microstructures, physiologically acceptable pH, refractive index of 1.42 ± 0.01 , and density of $1.017 \text{ g/cm}^3 \pm 0.01$. The stability tests showed good stability profiles even after exposure to extreme thermal conditions, with minimal changes in pH and the content of the incorporated fraction. The *in vitro* release study demonstrated that ME3 enabled the controlled release of the fraction, with a cumulative amount released over 60% within 6 h. Furthermore, fraction DCM and ME3 exhibited no toxicity in *Tenebrio molitor* larvae. The developed microemulsion exhibited excellent properties, so this study represents the first successful attempt to develop a formulation that incorporates the dimeric flavonoid fraction.

Keywords brachydins · dimeric flavonoids · *fridericia platyphylla* · microemulsion

Introduction

Throughout human history, the use of plants for medical purposes has been a long-standing practice. Natural products derived from plants, animals, and minerals have formed the basis for the treatment of various human diseases [1–3]. Plants are widely recognized as the primary source of bioactive compounds with potential therapeutic applications, making them the oldest known repository of medicinal substances [3]. As a result, the exploration of plant extracts as therapeutic agents has recently gained significant momentum in recent times, underscoring their relevance and importance [4].

Fridericia platyphylla (Cham.) L.G. Lohmann, commonly known as “cipó-una,” “tintureiro,” or “cervejinha do campo,” is a shrub native to the Brazilian Cerrado region. This species has a wide distribution and is well known for its traditional

✉ Cláudia Quintino da Rocha
rocha.claudia@ufma.br

¹ Institut of Biosciences, Coastal Campus of São Vicente, Paulista State University-UNESP, São Vicente, São Paulo, Brazil

² Department of Pharmacy, Federal University of Piauí, Teresina, Brazil

³ Department of Clinical and Toxicological Analyses, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

⁴ Research Nucleus in Pharmaceutical Sciences Program, State University of Maringá, Paraná, Brazil

⁵ Department of Chemistry, Federal University of Maranhão, São Luís 11330-900, Brazil

use in treating conditions such as kidney stones and joint pain, particularly through the utilization of its roots [5, 6].

Phytochemical analysis of the hydroethanolic extract obtained from the roots of *F. platyphylla* has yielded several constituents. Among them are two glycosylated phenylethanoid derivatives, seven glycosylated dimeric flavonoids, and three previously unreported dimeric flavonoids that are rare within the Bignoniaceae family. These newly discovered flavonoids have been named brachydins 1, 2, and 3 [7, 8] and have been reported in the literature with promising activity against promastigote and amastigote forms of *Leishmania amazonensis* [9], against prostate tumor cells PC-3 [10], metastatic prostate cancer (DU145) in 2D and 3D cells [11–16], with anti-inflammatory activity [17], microbial activity by inhibiting the NorA gene in *Staphylococcus aureus* strain [18], and antiproliferative activity in gastric tumors [19].

The solubility of bioactive compounds from *F. platyphylla* poses a significant challenge in the development of new release systems. Around 40% of newly developed chemical compounds exhibit low solubility in water, leading to poor absorption and limited bioavailability of these drugs [20].

The development of drug formulations provides an interesting approach to facilitate their transportation across different classes, while also improving drug bioavailability and safeguarding against *in vitro* degradation and *in vivo* metabolism when administered through various routes [21]. Formulations offer enhanced pharmacokinetic properties, including improved cellular absorption, prolonged half-life, and increased circulation time in the bloodstream, thereby contributing to the successful clinical application of drugs [22]. Microemulsions have garnered significant interest as potential vehicles for drug release due to their capacity to incorporate drugs with diverse solubility profiles, as well as their clarity and ease of preparation [23].

Considering the promising biological activities that brachydinas A, B, and C have shown in recent studies, the aim of the study was to develop a formulation containing the fraction enriched with the three rare dimeric flavonoids extracted from the hydroethanolic extract of *F. platyphylla*, to evaluate the toxicity of this microemulsion on *Tenebrio molitor* larvae, and to explore the potential of these substances present in the face of the urgent need to develop new innovative and effective therapeutic options, in addition to allowing the valorization of natural products from Brazilian biodiversity.

Materials and methods

Preparation of Extract and Fraction

The roots of *F. platyphylla* were collected in January 2020 at the Sant'Ana da Serra farm in João Pinheiro, Minas Gerais,

Brazil (location: 17°44'45"S, 46°10'44"W). The plant was identified at the José Badine Herbarium, Universidade Federal de Ouro Preto, and the voucher (n° 17.935) was deposited in the Herbarium of the Universidade Federal de Ouro Preto in Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil. The collection of the plant was conducted in accordance with Brazilian legislation on the protection of biodiversity (SisGen No. A451DE4).

The roots were dried, crushed, and subjected to successive percolation at room temperature using 70% ethanol. The resulting extract was evaporated under reduced pressure (40°C) and then lyophilized to obtain the crude extract. Subsequently, the hydroethanolic extract underwent liquid-liquid partitioning using dichloromethane and a mixture of water:methanol [8]. The yield of the dichloromethane fraction (FDCM) was 30%.

The extract and dichloromethane fraction (FDCM) were analyzed using a Shimadzu model HPLC system (Shimadzu Corp. Kyoto, Japan), which included a binary pump module and a UV-PDA detector set at 254 nm. The analysis was performed on a 5- μ m C18 100 A L column (150 μ m $\times$ 4.6 μ m). The mobile phase comprised a gradient mixture of water and methanol acidified with 0.01% formic acid, with a flow rate of 1 mL/min. The gradient elution ranged from 70 to 100% methanol over a period of 70 min.

Pseudo-ternary Phase Diagram Construction

To construct the pseudo-ternary phase diagram, the surfactant (Tween 80) and co-surfactant (Transcutol) were selected in a 1:1 ratio. Various mixtures were prepared with different ratios of oil (isopropyl myristate) to surfactant, following the ratios of 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2, and 9:1. These mixtures were then titrated with distilled water. The resulting formulations were visually evaluated and categorized based on the observed phase behavior, including phase separation (PS), opaque liquid emulsion (OLE), milky white emulsion (MWE), white fluid emulsion (WFE), and microemulsion (ME).

Microemulsion Preparation

The microemulsion formation area was mapped by constructing pseudo-ternary diagrams and allowed the preparation of the microemulsion from the previous weighing of all components. Tween and transcutol were solubilized under constant stirring at room temperature for 2 min, then the oil phase was added, and after complete solubilization, the FDCM were added in the proportions of 3% and 5% (w/w) and homogenized until their complete incorporation. The aqueous phase was slowly added and stirred until a homogeneous and transparent system was obtained.

Physical-chemical Characterization

Particle Size and Polydispersity Index (PDI)

The hydrodynamic diameter of the droplets was measured in triplicate using Zetatrac® equipment (Microtrac, Thailand) employing the dynamic light scattering (DLS) technique, as described in the literature [24].

pH

The pH measurement of the microemulsions was conducted using a digital potentiometer (Bel Engineering® CD12, Italy) that had been calibrated with pH 4.0 and 7.0 buffer solutions, as described in the study [25].

Refractive Index

The refractive index of the samples was measured at a temperature of $25 \pm 0.5^\circ\text{C}$ using an Abbe refractometer (model Q767B), as described in the study [25].

Rheology

The rheological analysis of the samples was conducted using a controlled stress rheometer (MARS II, Haake Thermo Fisher Scientific Inc., Germany) equipped with a parallel steel cone-plate geometry (C35/2° Ti) of 35 mm diameter, with a fixed distance of 0.105 mm between the plates. All measurements were carried out at a temperature of 25°C . Prior to analysis, the samples were allowed to equilibrate for 1 min. Two flow curves were obtained by varying the shear rates from 0 to 500 s^{-1} and then from 500 to 0 s^{-1} . The up curve was measured every 150 s, followed by a decrease over 150 s.

Thermodynamic Stability Studies

Centrifugation Resistance

The stability of the microemulsions was analyzed using a centrifuge (Centribio 80-2B, Brazil) at room temperature, with a rotation speed of 3000 rpm for 30 min. Any occurrence of phase separation or evidence of instability in the samples was subsequently noted [24].

Thermal Stress

The microemulsions underwent temperature variation from 40 to 80°C , with increments of 10°C every 30 min, using a thermostatic bath (Quimis Q344B2, Brazil). After each 30-min interval, when the formulations were brought back to room temperature, the microemulsions were evaluated. The

samples were classified based on their appearance: slightly modified (SM), modified (M), no change (NC), or phase separation (SP) [26].

Freeze-thaw Cycle

The organoleptic characteristics, pH, and content of the fraction were the parameters analyzed statistically at the start and end of the study. The analysis involved subjecting the microemulsions to six freeze-thaw cycles, which consisted of freezing them in a refrigerator at $-5 \pm 2^\circ\text{C}$ for 24 h, followed by thawing in an oven at $50 \pm 2^\circ\text{C}$ for 24 h. After completing the cycles, the microemulsions were evaluated [26].

Accelerated Stability

The microemulsions were subjected to the accelerated stability study, which consisted of storing the samples at room temperature (25°C) for 30 days. The samples were evaluated on the 1st and 30th day after preparation, and the pH and concentration of the fraction were analyzed.

Kinetics Stability

The release study of the microemulsion under investigation was conducted using “Franz” type glass diffusion cells (Phoenix RDS Robotic Diffusion Station) consisting of two compartments. In the donor compartment, 0.4 g of the microemulsion was placed on a dialysis membrane with a diameter of 21 mm and a pore size of $25\text{ \AA}$. The receiver compartment was filled with Tris buffer solution (50 mM; pH 7.4) containing 10% ethanol and 1% Tween to maintain sink conditions. Samples of 1 mL were collected from the receiving medium at hourly intervals for a duration of 6 h, with immediate replacement of the collected volume with fresh Tris buffer. The receiving solution was continuously stirred using a magnetic stirrer at 400 rpm and maintained at a constant temperature of $32 \pm 0.5^\circ\text{C}$. The collected samples (at 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, and 6 h) were analyzed using UV-VIS ($\lambda = 254\text{ nm}$) spectroscopy to determine the release profile. A cumulative percentage plot of the released fraction over time was generated to visualize the release behavior [27].

Mathematical Models

To determine the drug release mechanism, the experimental data were fitted to different kinetic models using the DDSolver add-in for Microsoft Excel®. The model that best described the release data was evaluated based on the adjusted coefficient of determination (adjusted R^2) and the root mean square error (RMSE). The best-fitting method was the one with the highest adjusted R^2 and lowest RMSE [28]. The release data of fraction DCM from microemulsion was

fitted using mathematical models used in the literature, with the following equations:

Zero – order model : $Q = K_0 t + Q_0$

First – order model : $Q = Q_1 e^{kt}$

Higuchi model : $Q = kH t^{1/2}$

Korsmeyer – Peppas model : $Q = kKP t^n$

where Q represents the cumulative drug released at a particular time t , and Q_0 is the initial amount of the drug. The constants k_0 , k_1 , kH , and kKP are the release constants defined in the different models. Parameter n is a diffusional exponent in the Korsmeyer–Peppas model.

Cytotoxicity In Vivo Models

Tenebrio molitor larvae were used for *in vivo* cytotoxicity evaluation. Fourteen experimental groups were employed in the study, consisting of healthy *T. molitor* larvae weighing approximately 100–200 mg, which were randomly assigned into groups of 10 larvae each. They were injected with 10 μ L of DCM fraction, microemulsion with DCM at concentrations ranging from 1 to 100 μ g/mL, and control groups (DMSO and trauma). Larval viability was assessed after 24 h based on the absence of movement for 7 days.

Statistical Analysis

The data obtained were subjected to statistical analysis using a one-way analysis of variance (ANOVA) to determine the significance of the results, with a probability threshold of $p < 0.05$ (95% confidence interval) indicating statistical significance. The stability study was subjected to Student's t-test to assess possible statistical differences. The results of the DCM fraction release study were analyzed by ANOVA, followed by Bonferroni's test, with statistical significance of $p \leq 0.001$ and $p \leq 0.0001$ between the times of 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, and 6 h. GraphPad Prism version 6 software was employed for the statistical analysis of the results.

Results

Preparation of Extract and Fraction

The dichloromethane fraction was analyzed using high-performance liquid chromatography with ultraviolet-photodiode array detection (HPLC-UV/PDA), which showed the presence of three compounds exhibiting similar UV spectra.

Through the isolation process of the active constituents in the fraction, three dimeric flavonoids, namely brachydins A, B, and C (Fig. 1), were identified [7].

Pseudo-ternary Phase Diagram

A pseudo-ternary diagram is a valuable tool used to characterize the behavior of combined components and the structures formed within a system. It helps determine the conditions required for the formation of microemulsions and identifies the transitional boundaries between emulsions, separated phases, and bicontinuous phases [29]. Moreover, the diagram enables the identification of different component proportions and facilitates the evaluation of various types of systems present.

The phase diagram presented in Fig. 2 illustrates the behavior of the system comprising isopropyl myristate and the surfactants Tween 80 and Transcutol in a 1:1 ratio. This diagram was utilized to examine the phase characteristics of the developed system upon the addition of increasing amounts of water.

The diagram shows five distinct zones, which have been characterized as phase separation (PS), opaque liquid emulsion (OLE), milky white emulsion (MWE), white fluid emulsion (WFE), and microemulsion (ME).

Physicochemical Characterization of Microemulsion

The average droplet size (DLS) and polydispersity index (PDI) of the blank microemulsion (ME), microemulsion with 3% FDCM (ME3), and microemulsion with 5% FDCM (ME5) were analyzed and are presented in Table I.

The physicochemical characterization of ME and ME3 is presented in Table II.

From the pseudo-ternary diagram, the microemulsion forming region was selected for the incorporation of the DCM fraction. Table III shows the proportions of the components of the blank microemulsion (ME).

The macroscopic evaluation of the ME and ME3 was performed 48 h after their preparation and is shown in Fig. 3. Both microemulsions obtained were optically transparent, stable, and with a homogeneous appearance characteristic of a microemulsion [30].

Evaluation of the Flow and Viscoelastic Properties of the Microemulsion

The behavior of a fluid is determined by the type and level of organization within the system [31]. Such systems can exhibit either Newtonian or non-Newtonian characteristics. Newtonian fluids are those in which the shear stress is directly proportional to the strain rate, resulting in a linear relationship represented by a straight line originating from the origin of the axes [32].

Fig. 1 Chromatographic profile of the dichloromethane fraction of the hydroethanolic extract of *F. platyphylla* roots ($\lambda = 254$ nm), UV spectra, and chemical structure of the three dimeric flavonoids (brachydins)

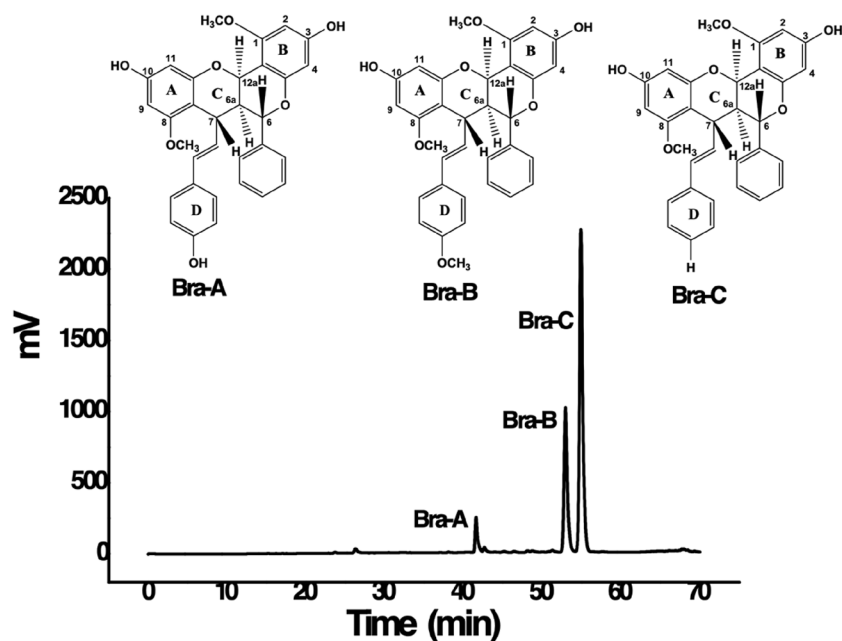


Fig. 2 Pseudo-ternary phase diagram for the tween/transcutol system, isopropyl myristate, and water

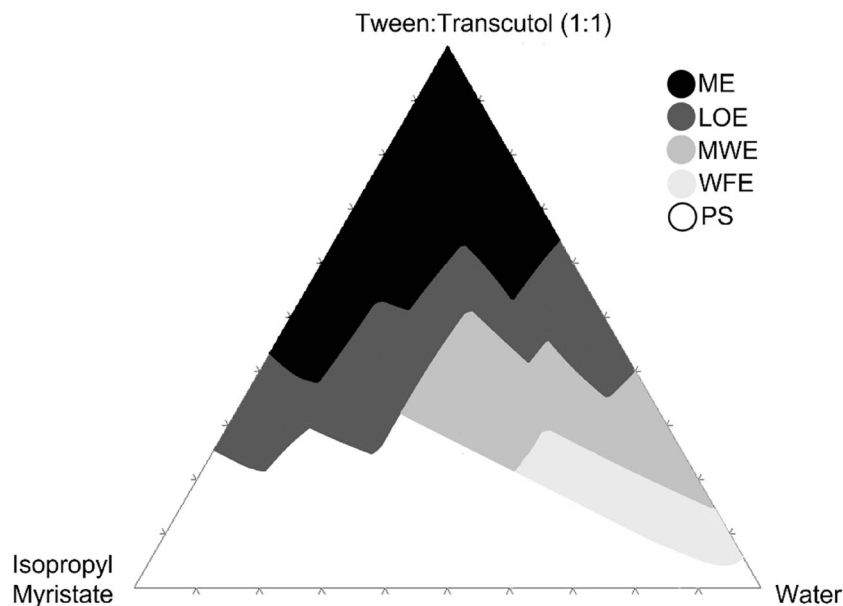


Table I Average Droplet Size, Polydispersity Index, and Zeta Potential of Microemulsions ME0, ME3, and ME5

Formulation	DLS (nm)	PDI
ME	75,36±3,4	0,248±0,07
ME3	65,40±9,8	0,543±0,11
ME5	36,70±7,0	0,604±0,12

Table II Physicochemical Characterization of White Microemulsion and Microemulsion Containing FDCM

Properties	ME	ME3
Macroscopic aspect	Clear and transparent	Clear and transparent
Centrifugation resistance	Stable	Stable
pH	7,80±0,09	6,69±0,05
Refractive Index	1,42±0,01	1,42±0,01
Density (g.cm ³)	1,017±0,01	1,017±0,01

Table III Composition of the Microemulsion

Components	Function	Proportion (%)
Tween	Surfactant	30,87
Transcutol	Surfactant	30,87
Isopropyl myristate	Oil phase	7,44
Distilled water	Aqueous phase	30,82

**Fig. 3** Microemulsion with and without DCM fraction

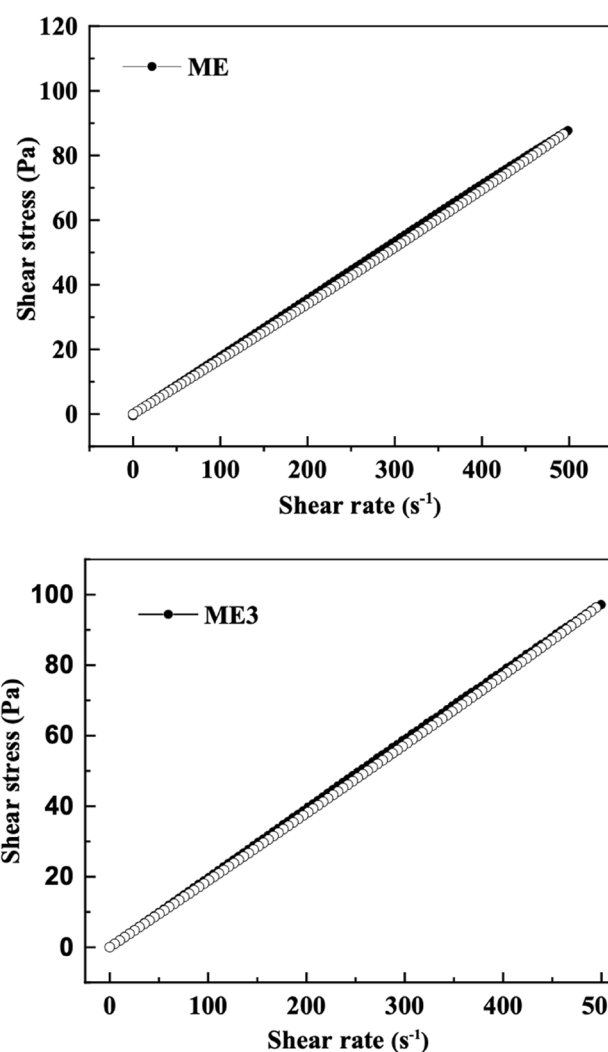
The rheograms present in Fig. 3 represent the relationship between shear stress and shear rate for ME and ME3 formulations.

Figure 4 shows the storage modulus, G' , and loss modulus, G'' , as a function of angular frequency for ME3.

Formulation Stability

The stability of ME and ME3 microemulsions was monitored at 25°C (to verify stability at room temperature), –5 to 50°C (to verify stability under accelerated conditions), and 40 to 80°C (to verify stability under heat stress), as described in Table III. All microemulsions were physically stable, clear, transparent, and homogeneous under all tested conditions.

No precipitation of the DCM fraction was observed in ME3 even after the applied thermal conditions, which indicates that the ME3 microemulsion was able to keep the DCM fraction dissolved in the temperature ranges of 40 to 80°C and –5 to 50°C.

**Fig. 4** The flow curves of the microemulsions ME and ME3, being ● upward, ○ downward

In Vitro Release Evaluation

The *in vitro* release profiles of the microemulsion (ME3) and DCM solution (LC) are shown in Fig. 5.

The results indicated that the formulated microstructure facilitated the slow and controlled release of the DCM fraction.

Statistical analysis of the flux over a period of 6 h demonstrated that ME3 exhibited a significantly higher flux compared with the saturated solution of the DCM fraction. Moreover, the saturated solution exhibited a low cumulative amount of approximately 10.6% over the 6-h period, whereas ME3 displayed a much higher cumulative amount of 63.48% (Table IV).

The release data was utilized to analyze the release kinetics of the fraction by fitting various mathematical models, and the corresponding correlation values are presented in

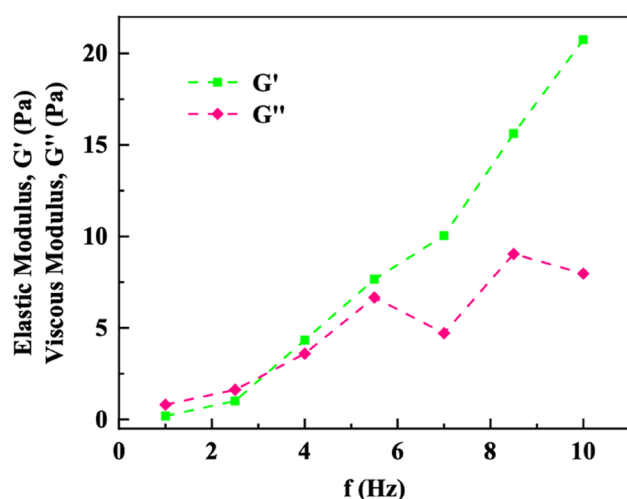


Fig. 5 Elastic (G') and viscous modulus (G'') as a function of frequency

Table IV Stability of the Formulations Tested

Formulation	T0	T30	Thermal stress	Freeze-thaw cycle
<i>Organoleptic characteristics</i>				
ME	Normal	Normal	Normal	Normal
ME3	Normal	Normal	Normal	Normal
<i>pH</i>				
ME	7,80±0,09 ^A	7,71±0,25 ^A	7,96±0,06 ^A	7,64±0,12 ^A
ME3	6,69±0,05 ^B	6,76±0,05 ^B	6,83±0,02 ^B	7,03±0,09 ^B
<i>Fraction content (%)</i>				
ME	-	-	-	-
ME3	97,52±1,81	99,81±1,22	98,12±2,17	99,46±3,73

Data are expressed as mean $\pm$ SD ($n = 3$). T0, time 0; T30, time 30 days. Averages that do not share a letter are significantly different

Table V. Among all the models, the zero-order mathematical model exhibited the best fit for the release profiles of LC and ME3, as indicated by its higher coefficient of determination (R^2) and lower root mean square error (RMSE) values.

In Vivo Toxicity Study on *Tenebrio Molitor* Larvae

The toxicity evaluation study of the microemulsion was performed using an alternative model with *Tenebrio molitor* larvae. This model has been widely used as an alternative to the use of animals, ensuring cost reduction and reliability of results [33]. *T. molitor* larvae have been reported to be used to evaluate antimicrobial, insecticidal, and cytotoxic activity [34, 35].

The test-control relationship performed in the alternative model for evaluating the toxicity of the DCM solution

Table V Average Flux Value, the Cumulative Released Amount after 6 h in Micrograms (Q6h), and Cumulative Released Amount After 6 h in Percent (Q6h%)

Formulation	Flow ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$)	Q6h (μg)	Q6h (%)
LC	162,879	1170,952	10,645
ME3	1115,309	6856,784	63,489

There is a statistically significant difference ($p < 0.05$) in all 3 parameters

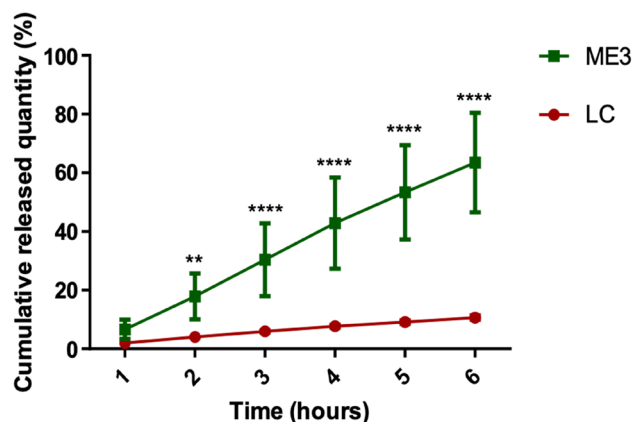


Fig. 6 Release profile of the fraction in microemulsion and solution

and ME3 (Fig. 6) fraction solution resulted in the survival curve of the larvae over 7 days after administration of the samples.

The survival percentage after inoculating the DCM and ME3 fraction at 1 to 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}$ concentrations were 100% (Fig. 7).

Discussion

The composition of the study formulation was chosen based on the phase diagram. Once the region of microemulsion formation was identified, the ratios of the components were established to replicate microemulsions both with and without the DCM fraction. Additionally, the diagram allows for the prediction of phase transitions in the formulations (Table VI).

The white microemulsion (ME) showed significantly larger average particle size compared to the 3% and 5% DCM fraction microemulsions (ME3 and ME5), indicating that the inclusion of the fraction in the microemulsion led to a reduction in particle size. The presence of hydroxy groups in the brachydins structures can form strong interactions with isopropyl myristate, while the emulsifying layer composed of Tween and transcitol facilitates the formation of hydrogen bonds. These interactions may be responsible for the reduction in droplet size observed in the microemulsions

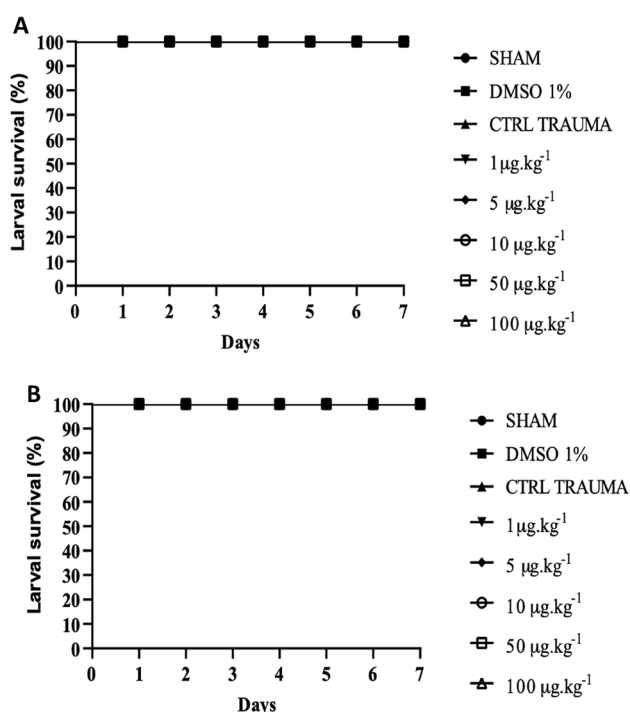


Fig. 7 Percentage of survival of the *Tenebrio* larvae

containing the DCM fraction [36]. All microemulsions exhibited droplet sizes within the desired range for microemulsions (up to 100 nm) [37].

The Polydispersity Index (PDI) provides information about the uniformity of droplet size distribution. Higher PDI values indicate less uniformity among droplets [38], while values closer to zero indicate higher homogeneity in droplet sizes [39]. In the case of ME3, the PDI value of 0.543 ± 0.11 suggests a moderately polydisperse droplet distribution [40].

ME3 presented significantly better values of charge and size distribution among the droplets, proving to be more

monodisperse and electrostatically stable, and was therefore chosen for further study.

The centrifugation test is a crucial characterization parameter as it applies stress to the sample by increasing the gravitational force. This helps identify potential instabilities such as precipitation, phase separation, and coalescence, among others [41]. After being subjected to centrifugation at 3000 rpm for 30 min, the formulations displayed no signs of phase separation or changes in transparency. This indicates that both the ME and ME3 microemulsions exhibited no visual evidence of physical instability and no precipitation of the DCM fraction.

The refractive index is a useful parameter for characterizing the isotropy of a system. Isotropic aggregates do not exhibit double refraction or birefringence, meaning they do not deviate from the plane of incident light. The refractive index value of the samples, both ME and ME3 microemulsions, was measured at 1.42 ± 0.01 . This consistent value indicates that there was no variation in the refractive index, confirming the characteristic isotropic nature of microemulsions.

The pH values observed in the ME and ME3 microemulsions are within the range considered physiologically acceptable for both oral (1 to 7) and topical administration (5.5 to 8) [42] since the values presented are within the range of highest physical and chemical stability for most formulations [43]. In addition, the relative density of these microemulsions was measured to be $1.017 \text{ g/cm}^3 \pm 0.01$, which closely approximates the density of water at 20°C.

The results obtained by rheological analysis show that the developed MEs presented Newtonian behavior, with an overlapping of the ascending and descending curves, therefore generating a line that passes through the origin, showing the linear relationship between the stress and the shear rate. This behavior is repeated in the added active formulation. This means that the viscosity is not affected by changes in the shear rate and that the flow is constant [32].

Table VI Description of the Mathematical Models Evaluated for the Samples Tested (Solution and Microemulsion)

Samples	Model	Equation	R^2	RMSE	Constants
LC	Zero order	$Q = k_0 \cdot t + Q_0$	0,994	0,248	$k_0 = 1,727$
	First order	$Q = Q_1 \cdot e^{kt}$	0,993	0,253	$k_1 = 0,019$
	Higuchi	$Q = kH \cdot t^{1/2}$	0,852	1,249	$kH = 3,800$
	Korsmeyer-Peppas	$Q = kKP \cdot t^n$	0,969	0,571	$kKP = 1,330; n = 1,142$
ME3	Zero order	$Q = k_0 \cdot t + Q_0$	0,994	1,566	$k_0 = 0,012$
	First order	$Q = Q_1 \cdot e^{kt}$	0,910	6,466	$k_1 = 0,152$
	Higuchi	$Q = kH \cdot t^{1/2}$	0,743	10,725	$kH = 21,194$
	Korsmeyer-Peppas	$Q = kKP \cdot t^n$	0,919	6,165	$kKP = 4,628; n = 1,562$

R^2 ; adjusted coefficient of determination; $RMSE$, root mean square error; k_0 , zero-order release constant; k_1 , first-order release constant; kH , Higuchi's release constant; kKP , release constant incorporating structural and geometric characteristics of the drug dosage form; n , diffusional exponent that indicates the drug release mechanism

Isotropic systems, such as MEs, showed low viscosity and Newtonian behavior due to the small droplet size and low interaction between droplets [44]. Structural changes and phase transitions in MEs are reflected in rheology.

The viscoelastic property of the ME3 microemulsion has been studied by measuring the elastic (or storage) modulus (G'), which represents the ability of the material to store energy, and the loss (or viscous) modulus (G''), which represents the ability of the material to dissipate energy [45, 46]. The material exhibits the behavior of a viscous liquid if $G'' > G'$, the behavior of an elastic solid with a gel-like appearance if $G' > G''$, and if $G'' = G'$ the material is in transition [46, 47].

Systems that exhibit viscoelastic properties are shown to be highly structured with large interactions between their constituents. This property is recommended for pharmaceutical products to improve their application [48–50]. Droplet size and viscosity of the microemulsion system are directly related to the speed of release *in vitro* and the diffusion process *in vivo*, facilitating or hindering the availability of the available fraction of drug per unit of time [51].

The chemical stability study of the developed microstructures, concerning pH parameters and content of the DCM fraction, shows that the ME and ME3 microemulsions did not undergo significant changes in all tests performed. The pH value serves as a parameter of the chemical stability of the systems when submitted to stability studies since variations in these values can be related to the occurrence of degradation reactions, such as oxidation, which can happen in the oil phase [52].

No significant alterations were detected in the content of the DCM fraction after subjecting it to freeze-thaw, heat stress, and 30 cycles at room temperature. This indicates the preservation of the integrity of the brachydins within the microemulsion, even under extreme temperature conditions. These findings provide evidence of the thermodynamic stability of the system.

The results of the *in vitro* release test indicated better release of the DCM fraction in the microemulsion. This may be attributed to the increased solubility coefficient of the fraction in the nanostructured system, leading to improved release of the active agent. This finding is supported by the cumulative amount released, which exceeded 60% within 6 hours.

In recent years, there has been an increasing interest in microemulsions as drug delivery systems. These systems offer the ability to encapsulate diverse types of drugs and facilitate a controlled release of the active ingredients, resulting in a prolonged effect. This controlled release mechanism helps prevent the plasma concentration from exceeding the required levels, as reported in the literature [53].

The release profile of the DCM fraction in solution and ME3 followed the zero-order mathematical model. This

release behavior suggests that the release system remains structurally intact, and the drug is released slowly and independently of its concentration. Similar release patterns have been reported in the literature [54–56], supporting these findings.

Since ancient times, society has used medicinal plants as a strategy to treat or prevent diseases [57]. However, substances present in herbal preparations are not exempt from toxicity, activating oxidative pathways and/or causing cellular damage [58, 59]. The *in vivo* toxicity study aims to evaluate the compound safety profile by monitoring abrupt behavioral changes and mortality [60] to assess potential risks and/or therapeutic purposes.

In the present study, *Tenebrio molitor* larvae were used to evaluate the toxicity of FDCM and ME as it is a feasible, safe, and reliable alternative experimental model. The results showed that FDCM and ME3 were not toxic at the concentrations tested, as the larvae remained alive and with all movements preserved until the last day of the test, demonstrating the safety of the samples analyzed.

The transdermal route of administration has been extensively studied due to its ability to solubilize various lipophilic and hydrophilic compounds, increase solute concentration, and enhance skin permeation [61–65]. This route of administration offers advantages over other routes of administration because it is painless, non-invasive, easy to administer, increases patient compliance, and avoids the disadvantages of first-pass metabolism of the oral route [66]. Given the numerous advantages of transdermal delivery, the microemulsion in this study was designed to increase the cutaneous permeability of pharmacologically active agents.

Conclusions

A microemulsion formulation was developed using isopropyl myristate as the oil phase, Tween and Transcutol as surfactants, and co-solvent and aqueous phases. The developed microemulsion exhibited favorable physicochemical and thermodynamic stability, along with the excellent capability for incorporating the DCM fraction derived from *Fridericia platyphylla* roots. The release rate of the fraction in the microemulsion surpassed that of the soluble fraction, and the toxicity evaluation conducted on *Tenebrio molitor* larvae indicated the absence of toxicity for both the fraction and the microemulsion, confirming their safety. In conclusion, these results highlight the potential of the formulated microemulsion.

Author contribution JRN: methodology, validation, investigation, formal analysis, writing original draft; BS, MR, GLNL, GMF, GCSN, RSG: methodology, validation, investigation; ALM and WV: methodology, validation, conceptualization, investigation, and writing review;

CQR: methodology, validation, conceptualization, investigation, resources, writing original draft, writing review and editing, project administration, funding acquisition, formal analysis.

Funding The authors are grateful for the financial support provided by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) [(Grant n°: 311090/2021-4 and 403668/2022-0, C.Q.R)], Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES)-finance code 001. J.R.N was the recipient of a fellowship from CAPES.

Declarations

Conflict of interest The authors declare no competing interests.

References

- Firenzuoli F, Gori L. Herbal medicine today: clinical and research issues. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2007;4(SUPPL. 1):37–40. <https://doi.org/10.1093/ecam/nem096>.
- Jamshidi-Kia F, Lorigooini Z, Amini-Khoei H. Medicinal plants: past history and future perspective. *J HerbMed Pharmacol*. 2018;7(1): 1–7. <https://doi.org/10.15171/jhp.2018.01>.
- Wink M. Modes of action of herbal medicines and plant secondary metabolites. *Medicines*. 2015;2(3):251–86. <https://doi.org/10.3390/medicines2030251>.
- Raffa D, Maggio B, Raimondi MV, Plescia F, Daidone G. Recent discoveries of anticancer flavonoids. *Eur J Med Chem*. 2017;142:213–28. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.07.034>.
- Kuhlmann MP. Estratégias de dispersão de sementes no bioma Cerrado: Considerações Ecológicas e Filogenéticas. 2016;353. <https://doi.org/10.26512/2016.03.T.20630>.
- Rocha CQ, Vilela FC, Cavalcante GP, Santa-Cecília FV, Santos-E-Silva L, Dos Santos MH, et al. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of Arrabidaea brachypoda (DC) Bureau roots. *J Ethnopharmacol*. 2011;133(2):396–401. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.10.009>.
- Rocha CQ, Queiroz EF, Meira CS, Moreira DRM, Soares MBP, Marcourt L, et al. Dimeric flavonoids from Arrabidaea brachypoda and assessment of their anti-trypanosoma cruzi activity. *J Nat Prod*. 2014;77(6):1345–50. <https://doi.org/10.1021/np401060j>.
- Rocha CQ, De-Faria FM, Marcourt L, Ebrahimi SN, Kitano BT, Ghilardi AF, et al. Gastroprotective effects of hydroethanolic root extract of Arrabidaea brachypoda: evidences of cytoprotection and isolation of unusual glycosylated polyphenols. *Phytochemistry*. 2017;135:93–105. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2016.12.002>.
- Rocha VPC, Rocha CR, Queiroz EF, Marcourt L, Vilegas W, Grimaldi G, Furrer P, Allémann E, Wolfender J-L, Soares M. Antileishmanial activity of dimeric flavonoids isolated from Arrabidaea brachypoda. *Molecules*. 2019;24(1):1–13. <https://doi.org/10.3390/molecules24010001>.
- Nunes HL, Tuttis K, Serpeloni JM, Nascimento JRD, da Rocha CQ, Silva VAO, Lengert AVH, Reis RM, de SyllosCólus IM. Characterization of the invitro cytotoxic effects of brachydins isolated from Fridericia platyphylla in a prostate cancer cell line. *J Toxicol Environ Health A*. 2020;83(15–16):547–58. <https://doi.org/10.1080/15287394.2020.1784339>.
- Serpeloni JM, Ribeiro DL, Weiss GF, De Oliveira LCB, Fujiike AY, Nunes HL, Da Rocha CQ, Guembarovski RL, Cólus IMS. Flavonoid brachyidin B decreases viability, proliferation, and migration in human metastatic prostate (DU145) cells grown in 2D and 3D culture models. *Toxicology Research*. 2023;12:321–31. <https://doi.org/10.1093/toxres/tfad019>.
- Oliveira LCB, Ribeiro DL, Nascimento JR, Rocha CQ, Cólus IMS, Serpeloni JM. Anticancer activities of Brachyidin C in human prostate tumor cells (DU145) grown in 2D and 3D models: stimulation of cell death and downregulation of metalloproteinases in spheroids. *Chem Biol Drug Des*. 2022;100:747–62. <https://doi.org/10.1111/cbdd.14112>.
- Ribeiro DL, Tuttis K, Oliveira LCB, Serpeloni JM, Gomes INF, Lengert AVH, Rocha CQ, Reis RM, Cólus IMS, Antunes LMG. The Antitumoral/antimetastatic action of the flavonoid brachyidin A in metastatic prostate tumor spheroids in vitro is mediated by (Parthanatos) PARP-related cell death. *Pharmaceutics*. 2022;14:963. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14050963>.
- De Oliveira LCB, Nunes HL, Ribeiro DL, Do Nascimento JR, Da Rocha CQ, De Syllos Cólus IM, Serpeloni JM. Aglycone flavonoid brachyidin A shows selective cytotoxicity and antitumoral activity in human metastatic prostate (DU145) cancer cells. *Cytotechnology*. 2021;1:1. <https://doi.org/10.1007/s10616-021-00495-y>.
- Oliveira LC, Fujiike AY, Ribeiro DL, Da Rocha CQ, Cólus IMDS, Serpeloni JM. Cytotoxic and antiproliferative effects of -brachyidin C' in DU-145 cells grown in 3D multicellular tumor spheroids. *Toxicol Lett*. 2021;350:S109. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(21\)00503-8](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(21)00503-8).
- Nunes HL, Tuttis K, Serpeloni JM, Nascimento JR, Da Rocha CQ, Silva VAO, Lengert AVH, Reis RM, De Syllos Cólus IM. Characterization of the in vitro cytotoxic effects of brachydins isolated from Fridericia platyphylla in a prostate cancer cell line. *J Toxicol Environ Health - A: Curr. Issues*. 2020;1:1–12. <https://doi.org/10.1080/15287394.2020.1784339>.
- Salgado C, Morin H, Aquino NC, Neff L, Rocha CQ, Vilegas W, Marcourt L, Wolfender J, Jordan O, Queiroz EF, Allemann E. In Vitro Anti-Inflammatory Activity in Arthritic Synoviocytes of A. brachypoda root extracts and its unusual dimeric flavonoids. *Molecules*. 2020;25:5219. <https://doi.org/10.3390/molecules25215219>.
- Andrade LMA, De Oliveira ABM, Leal ALAB, Oliveira FAA, Portela AL, Neto JSL, De Siqueira-Júnior JP, Kaatz GW, Da Rocha CQ, Barreto HM. Antimicrobial activity and inhibition of the NorA efflux pump of Staphylococcus aureus by extract and isolated compounds from Arrabidaea brachypoda. *Micro Pathog*. 2020;140:103935. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103935>.
- Serpeloni JM, Specian AFL, Ribeiro DL, Benício LM, Nunes HL, Franchi LP, Rocha CQ, Vilegas W, Varanda EA, Cólus IMS. Fridericia platyphylla (Cham.) L.G. Lohmann root extract exerts cytotoxic and antiproliferative effects on gastric tumor cells and downregulates BCL-XL, BIRC5, and MET genes. *Human Exper Toxicol*. 2020;39:338–54. <https://doi.org/10.1177/0960327119888261>.
- Lipinski C. Poor aqueous solubility — an industry wide problem in drug discovery. *Am Pharm Rev*. 2002;5:82–5.
- Lee DH, Yeom DW, Song YS, Cho HR, Choi YS, Kang MJ, et al. Improved oral absorption of dutasteride via Soluplus®-based supersaturable self-emulsifying drug delivery system (S-SEDDS). *Int J Pharm*. 2015;478(1):341–7. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.11.060>.
- Aslan B, Ozpolat B, Sood AK, Lopez-Berestein G. Nanotechnology in cancer therapy. *J Drug Target*. 2013;21(10):904–13. <https://doi.org/10.3109/1061186X.2013.837469>.
- Patel V, Kukadiya H, Mashru R, Surti N, Mandal S. Development of microemulsion for solubility enhancement of clopidogrel. *Ira J Pharm Res*. 2010;9(4):327–34.
- Figueiredo KA, Neves JKO, Silva JA, Freitas RMD, Carvalho ALM. Phenobarbital loaded microemulsion: development, kinetic release and quality control. *Braz J Pharm Sci*. 2016;52(2):251–64. <https://doi.org/10.1590/S1984-82502016000200003>.
- Dong X, Zhu Q, Dai Y, He J, Pan H, Chen J, et al. Encapsulation artocarpone and ascorbic acid in O/W microemulsions:

- preparation, characterization, and antibrowning effects in apple juice. *Food Chem.* 2016;192:1033–40. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.124>.
26. Baby AR, Haroutiounian-Filho CA, Sarruf FD, Tavante-Júnior CR, Pinto CASO, Zague V. Stability and in vitro skin penetration study of rutin in a cosmetic emulsion using an alternative biomembrane model. *Rev Bras Ciên Farm.* 2008;44(2):233–48. <https://doi.org/10.1590/S1516-93322008000200009>.
 27. Simon A, Amaro MI, Healy AM, Cabral LM, Sousa VP. Comparative evaluation of rivastigmine permeation from a transdermal system in the Franz cell using synthetic membranes and pig ear skin with in vivo-in vitro correlation. *Int J Pharm.* 2016;512:234–41. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.08.052>.
 28. Zhang Y, Huo M, Zhou J, Zou A, Li W, Yao C, et al. DDSolver: an add-in program for modeling and comparison of drug dissolution profiles. *AAPS J.* 2010;12(3):263–71. <https://doi.org/10.1208/s12248-010-9185-1>.
 29. Silva JA, Santana DP, Bedor DGC, Borba VFC, Lira AAM, Egito EST. In vitro release and permeation of a diclofenac diethylamine from microemulsion gel-like. *Quim Nova.* 2009;32(6):1389–93. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000600005>.
 30. Dalmora MEA, Dalmora SL, Oliveira AG. Inclusion complex of piroxicam with b-cyclodextrin and incorporation in cationic microemulsion In vitro drug release and in vivo topical anti-inflammatory effect. *Int J Pharm.* 2001;222:45–55. [https://doi.org/10.1016/s0378-5173\(01\)00692-5](https://doi.org/10.1016/s0378-5173(01)00692-5).
 31. Formariz TP, Urban MCC, Silva-Júnior AA, Gremião MD, Oliveira AG. Microemulsion and liquid crystals as drug delivery systems. *Rev Bras Ciên Farm.* 2005;41(3):301–13. <https://doi.org/10.1590/S1516-93322005000300003>.
 32. Schramm G. Rheology and rheometry: theoretical and practical fundamentals, 1st ed. São Paulo:Artliber; 2006.
 33. Morey AT, De Souza FC, Santos JP, Pereira CA, Cardoso JD, De Almeida RS, et al. Antifungal activity of condensed tannins from *Stryphnodendron adstringens*: effect on *Candida tropicalis* growth and adhesion properties. *Curr Pharm Biotechnol.* 2016;17(4):365–37. <https://doi.org/10.2174/1389201017666151223123712>.
 34. Valk TVD, Meijden AVD. Toxicity of scorpion venom in chick embryo and mealworm assay depending on the use of the soluble fraction versus the whole venom. *Toxicon.* 2014;88:38–43. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.06.007>.
 35. Wang X, Hao Q, Chen Y, Jiang S, Yang Q, Li Q. The effect of chemical composition and bioactivity of several essential oils on *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae). *J Insect Sci.* 2015;15(1):116. <https://doi.org/10.1093/jisesa/iev093>.
 36. Cui J, Yu B, Zhao Y, Zhu W, Li H, Lou. Enhancement of oral absorption of curcumin by self-microemulsifying drug delivery systems. *Int J Pharm.* 2009;371(1):148–155. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.12.009>.
 37. Tartaro G, Mateos H, Schirone D, Angelico R, Palazzo G. Microemulsion microstructure(s): a tutorial review. *Nanomaterials.* 2020;10(9):1657. <https://doi.org/10.3390/nano10091657>.
 38. Patel RB, Patel MR, Bhatt KK, Patel BG. Formulation consideration and characterization of microemulsion drug delivery system for transnasal administration of carbamazepine. *Bull Faculty Pharm Cairo Univ.* 2013;51:243–53. <https://doi.org/10.1016/j.bfopcu.2013.07.002>.
 39. Moghimipour E, Salimi A, Eftekhari S. Design and characterization of microemulsion systems for naproxen. *Adv Pharm Bull.* 2013;3(1):63–71. <https://doi.org/10.5681/apb.2013.011>.
 40. Nemichand SK, Laxman SD. Solubility Enhancement of nebivolol by micro emulsion technique. *J Young Pharm.* 2016;8(4):356–67. <https://doi.org/10.5530/jyp.2016.4.11>.
 41. Brazil. National Health Surveillance Agency. In: *Cosmetic Product Stability Guide*. first ed. Brasília: ANVISA. 2004. <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/cosmeticos/manuais-e-guias/guia-de-estabilidade-de-cosmeticos.pdf/view>. accessed 29 June 2023.
 42. Auton, ME. *Delineamento de Formas Farmacêuticas*, 2nd ed. Porto Alegre: Artmed; 2005.
 43. Fronza T, Campos A, Teixeira H. Nanoemulsões como sistemas de liberação de Fármacos Oftálmicos. *Acta Farmacêutica Bonaerense.* 2004;23(4):558–66.
 44. Santana RC, Fasolin LH, Cunha RL. Effects of a cosurfactant on the shear-dependent structures of systems composed of biocompatible ingredients. *Colloids Surf Physicochem Eng Aspects.* 2012;398:54–63. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2012.02.009>.
 45. Gonsenca M, Bešter-Rogac M, Gašperlin M. Lecithin based lamellar liquid crystals as a physiologically acceptable dermal delivery system for ascorbyl palmitate. *Eur J Pharma Sci.* 2013;50(1):114–22. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2013.04.029>.
 46. Ferreira SG, Conceição VS, Gouveia NS, Santos GS, Santos RLC, Lira AAM, et al. An environmentally safe larvicide against *Aedes aegypti* based on in situ gelling nanostructured surfactant systems containing an essential oil. *J Colloid Interface Sci.* 2015;456:190–196. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2015.06.012>.
 47. Cruz SA, Farah M, Zanin M, Bretas RES. Evaluation of rheological properties of virgin HDPE/recycled HDPE blends. *Polímeros.* 2008;18(2):144–51. <https://doi.org/10.1590/S0104-14282008000200012>.
 48. Campanholi KDS, Braga G, Da Silva JB, Da Rocha NL, De Francisco LMB, De Oliveira ÉL, et al. Biomedical platform development of a chlorophyll-based extract for topical photodynamic therapy: mechanical and spectroscopic properties. *Langmuir.* 2018;34:8230–824. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b00658>.
 49. Da Silva JB, Cook MT, Bruschi ML. Thermoresponsive systems composed of poloxamer 407 and HPMC or NaCMC: mechanical, rheological and sol-gel transition analysis. *Carbohydr Polym.* 2020;240:116268. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116268>.
 50. Da Silva-Junior RC, Campanholi KDS, De Moraes FAP, Pozza MSDS, De Castro-Hoshino LV, Baesso ML, et al. Photothermal stimuli-responsive hydrogel containing safranin for mastitis treatment in veterinary using phototherapy. *ACS Appl Bio Mater.* 2022;4:581–96.
 51. Correa MA, Scarpa MV, Franzini MC, Oliveira AG. On the incorporation of the nonsteroidal anti-inflammatory naproxen into cationic O/W microemulsions. *Colloids Surf B.* 2005;43(2):106–12. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2005.04.005>.
 52. Tadros T, Izquierdo P, Esquena J, Solans C. Formation and stability of nano-emulsions. *Adv Colloid Interf Sci.* 2004;108(109):303–18. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2003.10.023>.
 53. Dalmora MEA, Dalmora SL, Oliveira AG. Inclusion complex of piroxicam with b-cyclodextrin and incorporation in cationic microemulsion In vitro drug release and in vivo topical anti-inflammatory effect. *Int J Pharm.* 2001;222:45–55. [https://doi.org/10.1016/s0378-5173\(01\)00692-5](https://doi.org/10.1016/s0378-5173(01)00692-5).
 54. Alireza MS, Pishrochi S, Jafari AZ. Formulation and in vitro evaluation of tretinoin microemulsion as a potential carrier for dermal drug delivery. *Ira J Pharm Res.* 2013;12(4):599–609.
 55. Cojocaru V, Ranetti AE, Hinescu LG, Ionescu M, Cosmescu C, Poștoarcă AG. Formulation and evaluation of in vitro release kinetics of Na 3 Cadtpa decorporation agent embedded in microemulsion-based gel formulation for topical delivery. *Farmacia* 2015;63(5):656–664. https://farmaciajournal.com/wp-content/uploads/2015-05-art-06-Cojocaru_Victor_656-664.
 56. Shaikh HK, Kshirsagar RV, Patil SG. Mathematical models for drug release characterization: a review. *World J Pharm Pharmaceut Sci.* 2015;4(4):324–38.
 57. Shaikh HK, Kshirsagar RV, Patil SG. Mathematical models for drug release characterization: a review. *World J Pharm Pharmaceut Sci.* 2015;4(4):324–38.

58. Ejeh SA, Abalaka SE, Usende IL, Alimi YA, Oyelowo FO. Acute toxicity, oxidative stress response and clinicopathological changes in Wistar rats exposed to aqueous extract of *Uvaria chamae* leaves. *Scientific African*. 2019;3:e00068. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2019.e00068>.
59. Moreira D de L, Teixeira SS, Monteiro MHD, De-Oliveira ACAX, Paumgartten FJR. Traditional use and safety of herbal medicines. *Rev Bras Farmacogn*. 2014;24(2):248–57. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2014.03.006>
60. Farooq U, Khan A, Naz S, Rauf A, Khan H, Khan A, Ullah I, Bukhari SM. Sedative and antinociceptive activities of two new sesquiterpenes isolated from *Ricinus communis*. *Chin J Nat Med*. 2018;16(3):225–30. [https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(18\)30051-7](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(18)30051-7).
61. Debnath BK, Saha UK, Sahoo N. A comprehensive review on the application of emulsions as an alternative fuel for diesel engines. *Renew Sustain Energy Rev*. 2014;42:196–211. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.10.023>.
62. Zhao JH, Ji L, Wang H, Chen ZQ, Zhang YT, Liu Y, Feng NP. Microemulsion-based novel transdermal delivery system of tetramethylpyrazine: preparation and evaluation in vitro and in vivo. *Int J Nanomed*. 2011;6:1611–9. <https://doi.org/10.2147/IJN.S23597>.
63. Zhang YT, Zhao JH, Zhang SJ, Zhong YZ, Wang Z, Liu Y, Shi F, Feng NP. Enhanced transdermal delivery of evodiamine and rutaecarpine using microemulsion. *Int J Nanomed*. 2011;6:2469–82. <https://doi.org/10.2147/IJN.S25258>.
64. Zhang J, Michniak-Kohn B. Investigation of microemulsion microstructures and their relationship to transdermal permeation of model drugs: ketoprofen lidocaine, and caffeine. *Int J Pharm*. 2011;421:34–44. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.09.014>.
65. Sintov AC, Greenberg I. Comparative percutaneous permeation study using caffeine-loaded microemulsion showing low reliability of the frozen/thawed skin models. *Int J Pharm*. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.05.040>.
66. Silva JA, Santana DP, Bedor DGC, Borba VFC, Lira AMM, Egito EST. Estudo de liberação e permeação in vitro do diclofenaco de dietilamônio em microemulsão gel-like. *Quim Nova*. 2009;32:1389–93. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000600005>.

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Springer Nature or its licensor (e.g. a society or other partner) holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.