

CÁSSIA GONÇALVES MAGALHÃES

**"ESTUDO FITOQUÍMICO DE PLANTAS DA REGIÃO DOS CAMPOS
GERAIS VISANDO A OBTENÇÃO DE PEPTÍDEOS CÍCLICOS"**

Relatório de Pós-doutorado
realizado na Universidade Estadual
Paulista (UNESP), Instituto de
Química, Araraquara.

Supervisora: Profa. Dra. Vanderlan
da Silva Bolzani

Araraquara

2025

SUMÁRIO

RESUMO.....	3
1. INTRODUÇÃO.....	4
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	5
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	9
4. CONCLUSÕES.....	15
5. PRODUÇÃO TÉCNICO-ACADÊMICA.....	16
6. AVALIAÇÃO GLOBAL DO ESTÁGIO.....	16
7. PLANO DE GESTÃO DE DADOS.....	17
8. REFERÊNCIAS.....	18
9. ANEXOS.....	20

Resumo

As atividades descritas no presente relatório referem-se ao estágio pós-doutoral realizado de 01 de março de 2024 a 01 de março de 2025, no Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – Campus Araraquara.

Foi realizada a investigação da presença de peptídeos cíclicos em espécies das famílias Fabaceae (oito espécies), Euphorbiaceae (duas espécies) nativas da região dos Campos Gerais, Paraná. Não foram detectados peptídeos cíclicos nas espécies estudadas. Todavia, por se tratar de uma classe de metabólitos pouco explorada, a investigação dessas substâncias deve ser continuada.

O perfil químico dos extratos estudados foi avaliado por metabolômica baseada em espectrometria de massas, a partir da construção de redes moleculares no *site* do GNPS. Os estudos de desreplcação permitiram anotar, de forma geral, flavonoides de diferentes classes.

A avaliação da atividade tripanocida e citotóxica dos extratos analisados foi realizada em parceria com outros grupos de pesquisa. As amostras não foram ativas contra formas epimastigotas de *T. cruzi*, tampouco contra as amostras de linhagens tumorais avaliadas. Contudo, a baixa toxicidade dos extratos estimula a continuidade de estudos contra formas amastigotas intracelulares de *T. cruzi*.

Dados parciais obtidos nessa pesquisa foram apresentados no *V Latin American Metabolic Profiling Society Meeting*, em Montevideu, Uruguai. Além disso, o primeiro artigo referente aos primeiros resultados alcançados foi submetido na revista *Química Nova*. Outras atividades foram realizadas, incluindo a participação na organização do Workshop INCT-BioNat- Reunião de Avaliação do Programa INCT-BioNat 2024, realizada em Araraquara, e a participação no "*First InCoffee: Fermentation, Sensory and Metabolomics*", na mesma cidade. O conhecimento adquirido durante esse estágio e estabelecimento de parceria entre o grupo de pesquisa da pós-doutoranda (QUIMIONAT) e o grupo onde o estágio foi realizado (NuBBE) foi a mola mestra para a implantação de nova linha de pesquisa no QUIMIONAT, relacionada à investigação de peptídeos cíclicos na flora brasileira, ainda pouco explorada no cenário nacional, bem como os estudos de

desreplicação de extratos baseados na construção de redes moleculares, que otimizam tempo e custo de análises em estudos fitoquímicos.

1. INTRODUÇÃO

Extratos vegetais são constituídos de uma mistura complexa de compostos de grande variedade estrutural, incluindo terpenos, alcaloides e flavonoides, estando relacionados à interação da planta com o ambiente, em resposta a fatores bióticos e abióticos (Erb & Kleibenstein, 2020). Além dessas substâncias, podem-se encontrar os peptídeos cíclicos, dos quais alguns são de ocorrência exclusiva em plantas. Esses são agrupados em três classes – orbitídeos, peptídeos derivados de girassol e ciclotídeos (Ramalho *et al.*, 2018). A peculiaridade estrutural desses compostos lhes confere alta resistência à degradação química, térmica ou enzimática (Pinto *et al.*, 2021). Trata-se de uma classe de metabólitos pouco explorada, mas com grande potencial bioativo, com destaque para as atividades antimicrobiana, anti-HIV, antimalárica, antitumoral (Craik *et al.*, 2018), entre outras.

Os peptídeos cíclicos estão presentes em espécies das famílias Euphorbiaceae, Verbenaceae, Lamiaceae e Fabaceae (Ramalho *et al.*, 2018; Pinto *et al.*, 2021). Como exemplo, o orbitídeo ribifolina foi isolado de *Jatropha ribifolia* (Euphorbiaceae), cujas sementes são utilizadas para produção de óleo e para aplicações de uso veterinário (Pinto *et al.*, 2015). Queiroz *et al.* (2024) reportaram o isolamento de orbitídeos do látex de *Croton campanulatus* (Euphorbiaceae), com sequenciamento diferente dos demais já observados para plantas desse gênero. De *Clitoria ternatea* (Fabaceae), foram isolados cliotídeos T1 e T2, que foram citotóxicos frente a células HeLa (Nguyen, 2011).

Um levantamento florístico das espécies presentes no campus Uvaranas da Universidade Estadual de Ponta Grossa, em Ponta Grossa, Paraná reporta a ocorrência de plantas nativas da região que são possíveis fonte desses metabólitos, tais como *Gymnanthes klotzschiana*, *Sapium glandulosum* (Euphorbiaceae), além de espécies dos gêneros *Calliandra* e *Senna* (Fabaceae), entre outras (Iarmul *et al.*, 2021). Contudo, até o presente momento, não foram encontrados dados a respeito do estudo fitoquímico dessas espécies com foco naquela classe de substâncias.

Para garantir o isolamento de novos compostos grau de pureza necessário para inequívoca caracterização e posterior realização de testes biológicos, são necessárias técnicas analíticas que garantam a eficiência do processo de separação.

O processo clássico de fracionamento de extratos vegetais visando o isolamento e caracterização dos compostos bioativos, apesar de exitoso, demanda bastante tempo e,

para a descoberta de compostos inéditos, pode ser ineficiente. Além disso, é frequente o isolamento de compostos já conhecidos. Essas limitações podem acabar desestimulando a busca por novas entidades químicas, ainda que a biodiversidade permaneça pouco explorada. Para contornar tal situação, a associação de ferramentas analíticas hifenadas, sobretudo LC-MS, a tratamentos computacionais constitui um eficiente método (DEMARQUE *et al.*, 2020). Nesse contexto, a estudos de desreplicação (identificação precoce de compostos conhecidos) por redes moleculares é bastante relevante, pois permite mapear, reunir e analisar conjuntos complexos de dados de forma rápida e mais fácil, uma vez que a busca de similaridades espectrais a partir da comparação entre dados amostrais possibilita reconhecer classes metabólicas, grupos funcionais e substituintes em matrizes complexas (PILON *et al.*, 2021). Tais redes podem ser construídas em plataformas como a do GNPS (*Global Natural Products Social Molecular Networking*) que organiza um vasto conjunto de dados de espectrometria de massa de acordo com a similaridade entre padrões de fragmentação (MS/MS) de íons precursores reportados. (GAUDENCIO *et al.*, 2023)

Tendo em vista a importância da descoberta de novos compostos bioativos, sobretudo de estruturas pouco relatadas, esse trabalho teve como objetivo investigar a presença de ciclopeptídeos em plantas nativas dos Campos Gerais, realizar o estudo do perfil metabolômico das espécies selecionadas por cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas e avaliar seu potencial citotóxico e tripanocida.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizada a investigação da presença de peptídeos cíclicos em plantas das famílias Fabaceae (oito espécies) e Euphorbiaceae (duas espécies) (Tabela 1, p.6) nativas da região dos Campos Gerais, Paraná.

As espécies estudadas estão depositadas no herbário da UEPG (HUPG) e registradas no sistema de Patrimônio Genético (SisGen).

Tabela 1. Espécies estudadas no presente trabalho

Família	Espécie	Registro HUPG	Registro SisGen
Fabaceae	<i>Anadenanthera columbrina</i>	18364	A47F14A
	<i>Calliandra brevipes</i>	18827	A3B6DB9
	<i>C.tweedii</i>	21024	A47F14A
	<i>Cassia leptophylla</i>	21200	A47F14A
	<i>Enterolobium contortisiliquum</i>	18438	A6FF830
	<i>Mimosa bimucronata</i>	21192	A47F14A
	<i>Senna multijuga</i>	21655	A7481FE
	<i>S. macranthera</i>	18367	A6347C3
	Euphorbiaceae	<i>Sapium glandulosum</i>	21652
<i>Gymnanthes klotzchiana</i>		21644	A6FF830

O material vegetal obtido de cada espécie foi desidratado em estufa a 40°C por 48 h e posteriormente triturado em moinho analítico.

Investigação preliminar da ocorrência de ciclopeptídeos

Inicialmente, o estudo foi direcionado para a detecção de ciclopeptídeos (orbitídeos e/ou ciclótídeos) nas espécies selecionadas. Para tanto, 50 mg do material vegetal (folhas e galhos) foram submetidos à extração exaustiva, por 72h, utilizando-se 50 mL da mistura metanol/água (60:40) quando se tratava de espécies da família Fabaceae. Na sequência, cada extrato obtido foi submetido à extração líquido-líquido tendo o diclorometano como contra fase. Cada fase aquosa foi submetida à destilação por pressão reduzida em rotaevaporador, obtendo-se os respectivos extratos.

Para plantas da família Euphorbiaceae, a extração foi feita com 50 mL de etanol/água (95:5), mistura que era trocada a cada 24h, totalizando 72h de extração. Finalizado o período, cada extrato foi concentrado no rotaevaporador.

Pré-purificação dos extratos

Os extratos foram submetidos a uma pré-purificação no intuito de se trabalhar com as frações ricas em ciclopeptídeos. Para isso, 50 mg dos extratos brutos provenientes de folhas e caules foram solubilizados em 3,0 mL de acetonitrila (ACN) ou metanol (MeOH) grau HPLC e submetidos a extração em fase sólida em cartucho contendo 500 mg de C18, marca Phenomenex. O processo de eluição foi realizado com uma misturas de água e

0,01% de ácido fórmico (solvente A) e uma solução de acetonitrila (ACN) e 0,01% ácido fórmico (solvente B), variando-se a proporção do solvente B em 20%, 80% e 100%. A fração de interesse, com possível ocorrência de peptídeos era a de 80% B.

Análise por HPLC-DAD

Os perfis cromatográficos das frações foram obtidos utilizando-se HPLC-DAD Shimadzu® Prominence em escala analítica equipado com detector UV-VIS. O aparelho era equipado com bombas LC-6AD, detector DAD SPD-M20A, injetor automático SIL-10AF, controlador CBM-20A, forno CTO-20A e degaseificador DGU-20 A5R.

A detecção dos analitos foi realizada nos comprimentos de onda de 220 nm e 280 nm. O método cromatográfico empregado consistiu em um gradiente variando de 5 a 100% de solvente B em A, sendo a solução A composta por H₂O/ 0,010% ácido fórmico (CH₂O₂) e solução B constituída por ACN/ 0,010% de CH₂O₂. A análise foi realizada ao longo de 45 minutos, com fluxo de 1,0 mL/ min. Empregou-se uma coluna Phenomenex, Luna, com dimensões de 250 x 4,6 mm, tipo C₁₈, com partículas de 5µm e poro de 100Å. Os dados cromatográficos foram adquiridos e processados com o auxílio do software LC-Solutions (Shimadzu) versão 5.56 SP1.

Análises de LC-MS

A detecção dos orbitídeos foi realizada utilizando um espectrômetro de massa de baixa resolução (LC-MS) acoplado a um cromatógrafo Shimadzu®, que por sua vez estava acoplado a um espectrômetro de massas AmaZon-SL (Bruker Daltonics®). O sistema de cromatografia líquida é composto dos seguintes módulos: bombas (LC-20AD), forno (CTO-20A), degaseificador (DGU-20A3R), módulo de comunicação (CBM-20A) e detector de arranjo de diodos (SPD-M20A). A injeção de amostra (2 µL) foi realizada por meio de um injetor automático (SIL-20A HT).

As frações foram analisadas por cromatografia líquida em fase reversa à temperatura de 35 °C, com uma coluna Phenomenex Luna C₁₈, de dimensões de 250 x 4,6 mm, partículas de 5µm e poros de 100Å. A eluição foi realizada com um gradiente exploratório de 5%-100 de solvente B com vazão de 1 mL.min⁻¹ em 45 minutos, (solução **A**: H₂O/ 0,10% CH₂O₂ e solução **B**: ACN/ 0,10% CH₂O₂). Durante a análise, foram monitorados dois comprimentos de onda: 220 e 280 nm.

Os espectros de massas foram adquiridos em modo positivo na faixa de aquisição de *m/z* 400-2000. Os parâmetros da fonte de ionização por *electrospray* (ESI) do

espectrômetro de massas foram ajustados com voltagem de saída do capilar 140 V, voltagem do capilar de -3,5 kV, temperatura de dessolvatação 300 °C. Utilizou-se nitrogênio como gás de secagem e dessolvatação (7 psi, 4 L.min⁻¹, 230 °C). Os dados foram processados com o auxílio do software *Data Analysis* versão 4.1.

Processamento dos dados na plataforma GNPS

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

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

Preparo de extratos para testes de bioatividade e mapeamento químico por metabolômica baseada em LC-MS

Para o mapeamento químico e avaliação da bioatividade de extratos das espécies deste estudo, os extratos foram preparados com etanol na proporção de 1:10 (massa vegetal/solvente) por extração em banho ultrassônico a 40°C por 45 minutos. Em seguida, os extratos foram filtrados e submetidos à destilação a pressão reduzida em rotaevaporador.

Construiu-se uma rede molecular a fim de se verificar o perfil químico das espécies *A. colubrina* (AC), *Cassia leptophylla* (CL), *Senna multijuga* (SU) e *S. macranthera* (SM).

Avaliação da bioatividade dos extratos

Ensaio de atividade tripanocida

A avaliação do potencial tripanocida dos extratos foi realizada em colaboração com a professora Iriane Eger, do Departamento de Biologia Geral da UEPG.

Foram testados os extratos etanólicos de folhas de *C. tweedii* (FCT), *E. contortisiliquum* (EC), *S. multijuga* (SM), *M. bimucronata* (MB) e de folhas (FGK) e galhos (GGK) de *G. klotzchiana*. Os extratos foram solubilizados em DMSO a 100 µg mL⁻¹. Nos ensaios biológicos, a concentração final de DMSO foi de 1%.

Formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* (cepa Y) foram mantidas a 27 °C em meio LIT (*Liver infusion Tryptose*), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), através de dois repiques semanais. Todos os testes com epimastigotas foram realizados com parasitos coletados no quarto dia de cultivo. Para os ensaios de atividade tripanocida, 180 µL/poço de uma suspensão contendo 5 x 10⁶ mL⁻¹ epimastigotas de *T. cruzi* foram semeados em placas de 96 poços e incubados com 20 µL dos extratos nas concentrações de 5, 25, 50 e 100 µg mL⁻¹ ou µM por 48 horas a 27 °C. Como controle, utilizou-se DMSO 1%. O percentual de inibição sobre o parasita foi estimado em microscópio invertido através da observação da redução da motilidade, mudança na morfologia e integridade dos parasitas, seguido da técnica colorimétrica do MTT (Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio). A referência de atividade para extratos é CI₅₀ 10 µg mL⁻¹ (SIEUWERTS, 1995).

Brevemente, a placa foi centrifugada por 5 minutos a 4000 rpm, o sobrenadante foi descartado e, em seguida, foram adicionados 50 µL da solução 2 mg mL⁻¹ de MTT em cada poço. Após 3 horas de incubação a 37 °C, a placa foi centrifugada a 4000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi removido e o sedimento de parasitas foi suspenso em 20 µL de SDS 10% em HCl 0,01 M e 80 µL de DMSO/poço para análise dos parasitas e solubilização dos cristais de formazan. Em seguida, a densidade óptica foi determinada a 570 nm em leitor de microplacas modelo Biotek EL 800.

As densidades ópticas foram convertidas em percentual de viabilidade em relação ao controle não tratado e utilizadas para o cálculo da CI₅₀ (concentração inibitória de 50%).

Ensaio de citotoxicidade e determinação do índice de seletividade (IS)

Fibroblastos da linhagem 3T3/A31 (ATCC-CCL163TM) (2×10^4 células/poço) foram incubados a 37°C e 5% de CO₂ com diferentes concentrações (25, 50, 100 e 200 µg/mL) das amostras vegetais ativas em placas de 96 poços, em um volume final de 200 mL de meio RPMI + 10% SBF. Após 48 horas de incubação a integridade do tapete celular foi observada em microscópio invertido, seguida do ensaio colorimétrico do MTT (SIEUWERTS et al., 1995). A seguir, a densidade óptica foi determinada a 570 nm em leitor de microplacas Biotek EL 800. Os extratos que apresentaram o melhor índice de seletividade (IS= citotoxicidade/efeito antiparasitário) serão utilizados em ensaios subsequentes de atividade contra formas amastigotas intracelulares de *T. cruzi*.

Análise estatística

Os valores de CI₅₀ (concentração inibitória de 50%) foram estimados a partir da triplicata de dois experimentos independentes, utilizando o programa GraphPad Prism Instat3®. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo teste de Tukey. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

Avaliação de atividade citotóxica frente a células tumorais

A avaliação da atividade citotóxica foi realizada conforme a metodologia de Mosmann, (1983). As análises foram realizadas na Universidade de São Paulo (USP), no Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais Marinhos, sob coordenação da Profa. Dra. Letícia Costa- Lotufo.

As amostras testadas (FCT, SM, EC) foram diluídas em DMSO às concentrações de 10 e 1 mg/mL. As linhagens celulares testadas foram: HCT-116 (carcinoma cólon-retal), MCF7 (adenocarcinoma de mama), MDAMB231 (adenocarcinoma de mama) e RPE1 (epitelial pigmentar de retina humana não tumoral).

Foram plaqueadas $0,6 \times 10^4$ células por poço, em placas de 96 poços (3×10^4 células/ml sendo 200 µL de meio/poço) para cada linhagem celular. Após 24 horas, os extratos foram adicionados nas concentrações de 50 µg/mL ou 5 µg/mL, em duplicata, e incubadas por 72 horas. A doxorrubicina (0,00064–10 µM) foi utilizada como controle positivo e dimetilsulfóxido (DMSO - 0,05%) como controle negativo. Após 72 horas de incubação, o sobrenadante foi substituído por meio de cultura contendo MTT (0,5 mg/mL). Três horas mais tarde, o sobrenadante foi removido, e após secagem da placa, o precipitado contendo azul de formazan de MTT foi dissolvido em 150 µL de DMSO, e a

absorbância foi medida a 570 nm (Mosmann, 1983). Foram realizados pelo menos dois experimentos independentes em HCT-116, MDAMB231, MCF7 e RPE1 em duplicata.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Investigação de orbitídeos e ciclotídeos

No processo cromatográfico, a eluição dos orbitídeos é observada dentro de uma faixa de tempo aproximada de 25 a 35 minutos, entre 50% e 70% da concentração de solução orgânica B. A eluição dos ciclotídeos, por sua vez, é observada dentro de uma faixa de tempo entre 18 e 20 minutos, correspondendo a 20% e 35% da concentração do eluente B (Santos, 2024). A detecção de sinais cromatográficos em tais intervalos, juntamente com uma absorção detectada no comprimento de onda de 220 nm (característico da absorção pela ligação peptídica), fornece indícios da presença de peptídeos. Além disso, a absorção que ocorre no comprimento de onda de 280 nm sugere a presença de aminoácidos aromáticos como triptofano, fenilalanina ou tirosina na estrutura peptídica (Pinto et al., 2018).

Na análise dos cromatogramas dos extratos estudados (Anexo 1 e 2), não se observaram sinais relativos a peptídeos nos comprimentos de ondas selecionados, nem nos tempos de retenção característicos dessa classe. Dessa forma, caso haja peptídeo na amostra, o mesmo encontra-se em concentração muito baixa, a ponto de não proporcionar boa absorção pelo detector.

Considerando que os orbitídeos mais comuns geralmente apresentam de 5 a 9 aminoácidos, as massas moleculares das substâncias correspondentes a esses são observadas dentro de uma faixa aproximada de 400-2000 Da (Santos, 2024). Contudo, ao se analisar os espectros de massa dos extratos estudados, constatou-se a ausência de sinais relativos a ciclotídeos e/ou orbitídeos. Embora esses metabólitos não tenham sido detectados nas espécies estudadas, é necessária a continuação dessa investigação, tendo em vista que metabólitos secundários são influenciados por fatores edafoclimáticos, além da sazonalidade.

Análise do perfil químico dos extratos

A análise das redes moleculares possibilitou o mapeamento químico dos extratos, facilitando o processo de anotação dos metabólitos secundários por meio da observação

dos padrões de fragmentação e da correlação com as bibliotecas espectrais. Todos os dados moleculares foram inspecionados manualmente, a fim de se excluir possíveis anotações presentes no branco (ACN) e/ou características de compostos sintéticos e/ou também advindas de outros tipos de organismos. Além disso, ao se verificar que as fragmentações não eram compatíveis com as bibliotecas espectrais, essas correspondências espectrais foram descartadas. A rede molecular obtida para as espécies de Euphorbiaceae estudadas não levaram a resultados conclusivos, uma vez que foram apontadas semelhanças que não poderiam ser anotadas, como compostos sintéticos. O processamento na plataforma GNPS resultou em 95 correspondências com as bibliotecas espectrais e permitiu a anotação de seis compostos, sendo flavonóis-O-glicosilados, um flavonol e uma flavona-C-glicosilada (Figura 1).

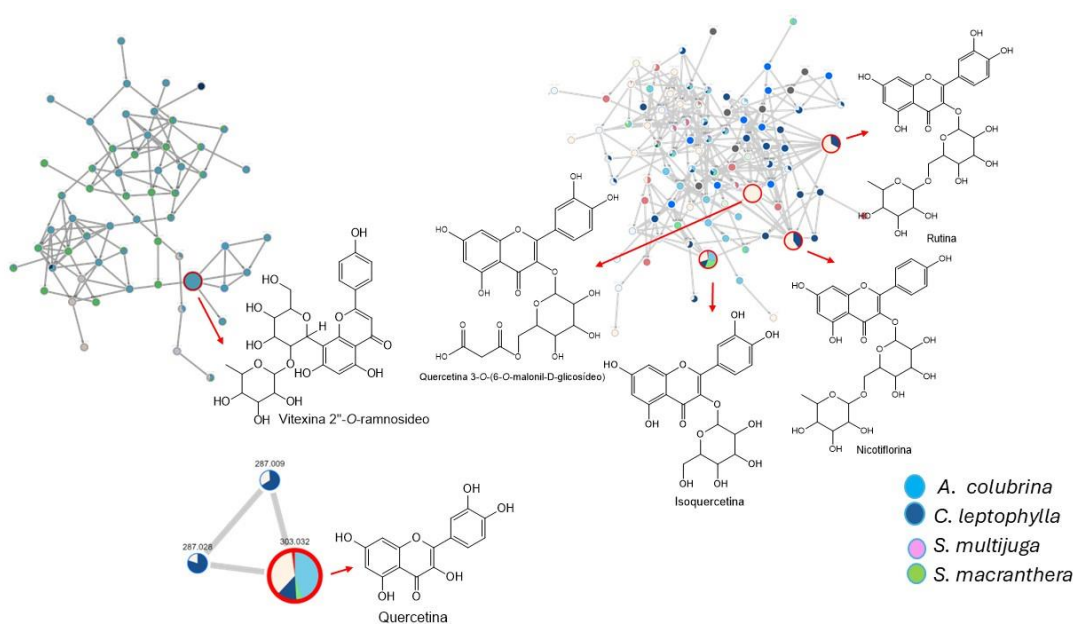


Figura 1. Redes moleculares e compostos anotados para os extratos de *A. colubrina*, *C. leptophylla*, *S. multijuga* e *S. macranthera*.

Foram anotados compostos cujo valor de cosseno fosse maior ou igual a 0,7 (Tabela 2, p.13), conforme definido nos parâmetros da análise. O parâmetro representa a similaridade espectral de MS/MS entre o espectro da amostra e os espectros presentes na biblioteca. Quanto mais próximo de 1, mais similares são os espectros (Moura *et al.*, 2022). Foram anotados derivados *O*-glicosilados de quercetina, caracterizados pela presença do íon fragmento m/z 303, correspondente à sua aglicona. Para o íon fragmento de m/z 465, sugere-se o composto isoquercetina, cuja fragmentação evidencia a perda de

uma unidade de hexose (162 Da), indicado pelo íon fragmento de m/z 303. Para a rutina (m/z 611), foi observada a eliminação do fragmento dissacarídeo (hexose mais deoxihexose, 308 Da), gerando o íon fragmento m/z 303, característico da aglicona. Essa mesma perda (308 Da) foi verificada para a nicotiflorina, gerando então o íon fragmento de m/z 287, confirmando a presença deste flavonoide (Zou et al., 2022). Para a quercetina-*O*-malonilglicosídeo, a perda característica de malonilexose (- 248 Da) originou o íon fragmento m/z 303, atribuído ao núcleo característico de um flavonol. Adicionalmente, a fragmentação dessa aglicona resultou na formação do íon m/z 257, relativo à perda de água e CO, um padrão típico desses flavonoides. Em seguida, observou-se o sinal de m/z 165, característico da reação retro Diels-Alder, devido à clivagem do anel C da quercetina (Lin et al., 2007).²² No entanto, para que haja determinação inequívoca da estrutura dos compostos, são necessárias técnicas espectroscópicas e espectrométricas complementares para a caracterização química, como a ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C .

Tabela 2. Metabólitos anotados do extrato etanólico das folhas de *A. colubrina* (AC), *C. leptophylla* (CL), *S. macranthera* (ST) e *S. multijuga* (SM)

Composto	Amostra	Íon precursor	Íons fragmento	Cosseno	Classe
Rutina	SM, CL	611	303	0,98	Flavonol-O-glicosilado
Nicotiflorina	SM, CL	595	287	0,93	Flavonol-O-glicosilado
Isoquercetina	SM, AC, CL	465	303	0,92	Flavonol glicosilado
Quercetin	AC, SM, CL, ST	303	257, 165	0,86	Flavonol
Vitexina-2"-O-rhamnosídeo	AC	579	433,415, 367	0,86	Flavona-C-glicosilada
quercetina-3-O-malonilglicosídeo	SM	551	303	0,81	Flavonol-O-glicosilado

A rutina foi previamente isolada de *S. multijuga*⁶ e para outras espécies do gênero *Cassia* (Abdelatif et al., 2023). A quercetina, além da aglicona de vitexina-2"-O-rhamnosídeo foram anteriormente reportadas para *A. colubrina*. Cabe destacar que flavonoides C-glicosilados são de ocorrência mais específica em Fabáceas (Delices et al., 2023).

Atividade tripanocida

Os extratos avaliados (FCT, EC, SM, MB, FGK e GGK) foram ineficazes contra formas epimastigotas de *T. cruzi* (CI₅₀ > 100 µg/mL) pois a maior concentração testada não chegou a inibir 50% do crescimento dos parasitas. A referência de atividade para extratos é CI₅₀ = 10 µg/mL). Considerando o potencial tripanocida de outras espécies da família Fabaceae, verificou-se que a biochanina A, uma isoflavona isolada dos frutos de *Cassia fistula*, exibiu promissora atividade contra *T. cruzi* (EC₅₀ = 18.32 µg mL⁻¹), sendo 24 vezes mais ativa que benzonidazol (Sharma *et al.*, 2021). De forma análoga, o triterpeno desmondina A, isolado de *Euphorbia desmondii* (Euphorbiaceae) inibiu de forma eficaz a replicação de formas amastigotas de *T. cruzi* nas células do hospedeiro (IC₅₀ = 2.5 ± 0.3 µM), com atividade comparável ao benzonidazol (3.6 ± 0.4 µM) (Saidu *et al.*, 2024). Essa constatação abre perspectivas para a continuidade da avaliação do potencial tripanocida de extratos obtidos de outras partes de dos vegetais avaliados, bem como de outras espécies das famílias Euphorbiaceae e Fabaceae.

Atividade citotóxica

A CC₅₀ (Concentração citotóxica de 50%) de dos extratos avaliados (FB, FCT, MB, FGK, GGK, SU) frente a fibroblastos da linhagem 3T3 estão expressos na tabela 5. Os extratos de maior toxicidade foram SU e FCT. No entanto, todos os extratos avaliados foram citotóxicos a concentrações superiores àquela usualmente avaliada (50 µg/mL). De maneira similar, o extrato hidroalcoólico de *S. occidentalis* não exibiu citotoxicidade significativa frente a esses fibroblastos, indicando a possibilidade de seu uso em formulações tópicas.²⁸ Devido a essa baixa toxicidade, a avaliação dos extratos contra formas amastigotas intracelulares de *T. cruzi* também deve ser pesquisada.

Tabela 3. Valores de CC₅₀ observados para os extratos avaliados frente às células 3T3.

Amostra	CC ₅₀
FB	427,20 ± 78,14
MB	288,38 ± 20,40
FCT	133,82 ± 7,06
FGK	313,94 ± 25,94
GGK	336,66 ± 68,07
SU	141,59 ± 7,31

Atividade citotóxica frente a células tumorais

As amostras são consideradas ativas quando a porcentagem de inibição de células tumorais é superior a 75%. Assim, constatou-se que os extratos pesquisados (FB, FCT, SU) não foram citotóxicos para as linhagens avaliadas (Figura 3 A-D). Contudo, devido à ausência de toxicidade para as células normais avaliadas, pretende-se continuar a avaliação dos extratos frente a diferentes linhagens celulares.

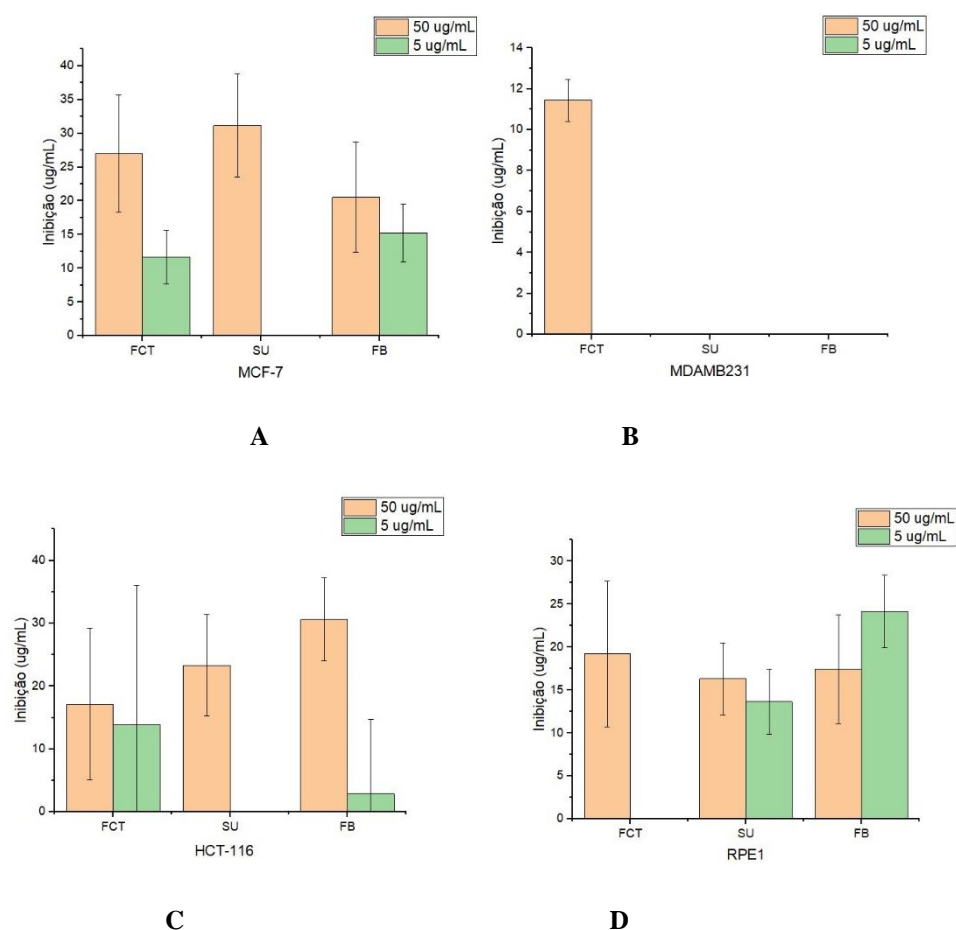


Figura 2. Avaliação do potencial citotóxico dos extratos FCT, SU e FB frente às linhagens MCF-7 (A), MDAMB (B), HCT-116 (C) e RPE 1(D).

4. CONCLUSÕES

O presente estudo permitiu a prospecção de peptídeos cíclicos em oito espécies nativas da flora dos Campos Gerais. Embora compostos dessa classe não tenham sido

detectados em tais espécies, esses dados estimulam a continuidade da investigação desses metabólitos em outras espécies das famílias Euphorbiaceae e Fabaceae, por se tratar de uma classe pouco estudada no Brasil. O perfil químico observado por estudos de metabolômica baseada em espectrometria de massas evidenciou a presença de flavonoides e suas formas glicosiladas. Apesar dos extratos avaliados não exibirem citotoxicidade frente às linhagens tumorais ensaiadas nem frente a formas epimastigotas de *T. cruzi*, é relevante avaliar seu potencial contra formas amastigotas de *T. cruzi*, bem como para outras linhagens celulares.

5. PRODUÇÃO TÉCNICO-ACADÊMICA

a) Artigo submetido

O artigo intitulado "Detecção de flavonoides com propriedades tripanocida e antioxidante nas folhas e caules de *Senna multijuga* (Fabaceae)" foi submetido à revista Química Nova.

b) Resumo publicado em evento

Apresentação do trabalho "*Chemical profile of species from Fabaceae Family: Untargeted Analysis by mass spectrometry and molecular networking*" sob a forma de pôster no V Latin American Metabolic Profiling Society Meeting, em Montevideu, Uruguai.

c) Organização de eventos

Participação na organização do Workshop INCT-BioNat- Reunião de Avaliação do Programa INCT-BioNat. 2024. Araraquara, São Paulo, Brasil.

d) Participação em curso

Participação no "*First InCoffee: Fermentation, Sensory and Metabolomics*", Araraquara, São Paulo, Brasil.

6. AVALIAÇÃO GLOBAL DO ESTÁGIO

De maneira incontestável, a realização do estágio pós-doutoral no Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais (NuBBE) do Instituto de Química da UNESP (IQ-UNESP) me proporcionou grande aprendizado. Adquiri conhecimento

relativo à detecção de peptídeos cíclicos de origem vegetal, uma classe de metabólitos pouco explorada e com grande potencial bioativo, bem como em estudos do perfil químico de espécies vegetais a partir de estudos de metabolômica baseada em espectrometria de massas.

As metas propostas no início do estágio foram cumpridas, uma vez que houve a firmação da parceria entre a pós-doutoranda e a supervisora desse estágio em estudos futuros de caracterização daquela classe de compostos, além da submissão do primeiro artigo relativo aos resultados obtidos nesse trabalho. Destaco também oportunidade de colaboração com outros grupos de pesquisa na realização de ensaios de bioatividade de produtos naturais. A participação em seminários de estudantes de pós-graduação e professores convidados, frequentemente promovidos pelo IQ-UNESP, foi de grande relevância para conhecer a pesquisa de alto nível desenvolvida naquela instituição.

Definitivamente, os ensinamentos transmitidos pela professora Vanderlan Bolzani, referência internacional na área de Química de Produtos Naturais, principalmente durante as reuniões de grupo, foram profícuos. Além disso, a convivência e troca experiências com pesquisadores renomados na área de Química de Produtos Naturais lotados no IQ-UNESP foi muito proveitosa. Como aquele instituto recebe estudantes de diversas partes do Brasil e estrangeiros, a convivência e troca de experiências com estudantes de diferentes culturas foi bastante enriquecedora.

De fato, todo o aprendizado durante o estágio será um estímulo na iniciação e consolidação da linha de pesquisa em peptídeos cíclicos de origem vegetal, bem como em estudos de metabolômica baseada em espectrometria de massas na instituição onde estou vinculada, o que contribuirá para a ampliação do conhecimento nessa área tão promissora.

7. PLANO DE GESTÃO DE DADOS

Os resultados descritos neste relatório são protegidos por propriedade intelectual e só podem ser divulgados mediante autorização.

Todos os artigos e comunicações científicas oriundos a partir dos dados contidos neste projeto serão preferencialmente publicadas em periódicos de alto impacto na área, disponíveis na plataforma Periódicos CAPES e/ou outras que possuam a modalidade *open access*, uma vez que se pretende difundir e divulgar o conhecimento produzido no

NuBBE, um laboratório de pesquisas em produtos naturais que coloca a ciência brasileira em alto patamar no cenário internacional.

9. REFERÊNCIAS

Abdellatif, N. *et al.* Review on Phytochemical Constituents of Plants of Genus *Cassia*. **Records of Pharmaceutical and Biomedical Sciences**, v. 7, n. 2, p. 93-110, 2023.

CRAIK, D. J. *et al.* Ribosomally-synthesised cyclic peptides from plants as drug leads and pharmaceutical scaffolds. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 26, n. 10, p. 2727-2737, 2018.

DELICES, Merline *et al.* *Anadenanthera colubrina* (Vell) Brenan: Ethnobotanical, phytochemical, pharmacological and toxicological aspects. **Journal of ethnopharmacology**, v. 300, p. 115745, 2023.

DEMARQUE, D. P. *et al.* Mass spectrometry-based metabolomics approach in the isolation of bioactive natural products. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1051, 2020.

ERB, Matthias; KLIEBENSTEIN, Daniel J. Plant secondary metabolites as defenses, regulators, and primary metabolites: the blurred functional trichotomy. **Plant physiology**, v. 184, n. 1, p. 39-52, 2020.

GAUDÊNCIO, S. P. *et al.* Advanced methods for natural products discovery: bioactivity screening, dereplication, metabolomics profiling, genomic sequencing, databases and informatic tools, and structure elucidation. **Marine Drugs**, v. 21, n. 5, p. 308, 2023.

IARMUL, J. *et al.* Árvores e arbustos do Campus de Uvaranas da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), Estado do Paraná. **Revista da Sociedade Brasileira de Arborização Urbana**, v. 16, n. 4, p. 37-55, 2021.

LIN, L. Z.; HARNLY, J. M. A Screening Method for the Identification of Glycosylated Flavonoids and Other Phenolic Compounds Using a Standard Analytical Approach for All Plant Materials. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 1084–1096, 2007.

MOURA, Mariana S. et al. Uso de redes moleculares para anotações de compostos em metabolômica. **Revista Virtual de Química**, v. 14, p. 214, 2022.

NGUYEN, G. K. T. et al. Discovery and Characterization of Novel Cyclotides Originated from Chimeric Precursors Consisting of Albumin-1 Chain a and Cyclotide Domains in the Fabaceae Family. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 27, p.24275-24287, 2011.

PILON, A. C. et al. Redes moleculares: Uma análise sobre anotações e descoberta de novos ativos. **Química Nova**, v. 44, p. 1168-1179, 2021.

PINTO, M. E. F. et al. Ribifolin, an orbitide from *Jatropha ribifolia*, and its potential antimalarial activity. **Journal of Natural products**, v. 78, n. 3, p. 374-380, 2015.

PINTO, M. E. F. et al. Inhibition of breast cancer cell migration by cyclotides isolated from *Pombalia calceolaria*. **Journal of Natural Products**, v. 81, n. 5, p. 1203-1208, 2018.

PINTO, M. E. F. et al. Cyclotides from Brazilian *Palicourea sessilis* and their effects on human lymphocytes. **Journal of Natural Products**, v. 84, n. 1, p. 81-90, 2021.

QUEIROZ, S. A. S. et al. [1-7-N α C]-Crocaorb A1 and A2, orbitides from the latex of *Croton campanulatus*. **Fitoterapia**, v. 178, p. 106183, 2024.

RAMALHO, S. D. et al. Biologically active orbitides from the Euphorbiaceae family. **Planta Medica**, v. 84, p. 558-567, 2018.

SAIDU, M. B. et al. Euphane and Tirucallane Triterpenes with Trypanocidal Activity from *Euphorbia desmondii*. **Journal of Natural Products**, v. 87, n. 9, p. 2281-2291, 2024.

SANTOS, A. L. P. D. **Do cerrado à mata atlântica, investigação de orbitídeos e ciclótídeos da biodiversidade brasileira**. 2024 Tese (Doutorado em Química) Instituto

de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara 2024. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/>. Acesso em: 16 março 2025.

SERRANO, M. A. R. *et al.* Acetylcholinesterase Inhibitory Pyridine Alkaloids of the Leaves of *Senna multijuga*. **Journal of Natural Products**, v. 73, n. 3, p. 482-484, 2010..

SHARMA, A. *et al.* Pharmacological and chemical potential of *Cassia fistula* L- a critical review. **Journal of Herbal Medicine**, v. 26, p.100407, 2021.

SIEUWERTS, A. M. *et al.* The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: How to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell culture in vitro for the assessment of growth characteristics, IC50- values and cell survival. **European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry**, v. 33, p. 813-823, 1995.

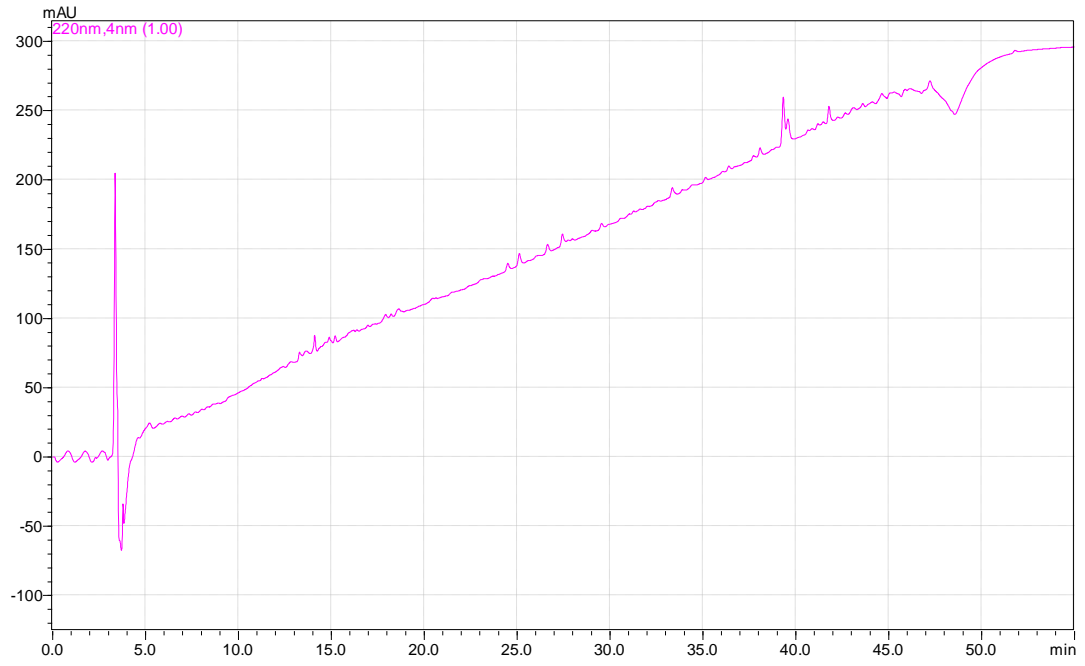
VIGBEDOR, B. Y. *et al.* Isolation and identification of flavanone derivative eriodictyol from the methanol extract of *Azelia africana* bark and its antimicrobial and antioxidant activities. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2023, n. 1, p. 9345047, 2023.

WANG, M. *et al.* Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. **Nature Biotechnology**, v. 34, n. 8, p. 828-837, 2016.

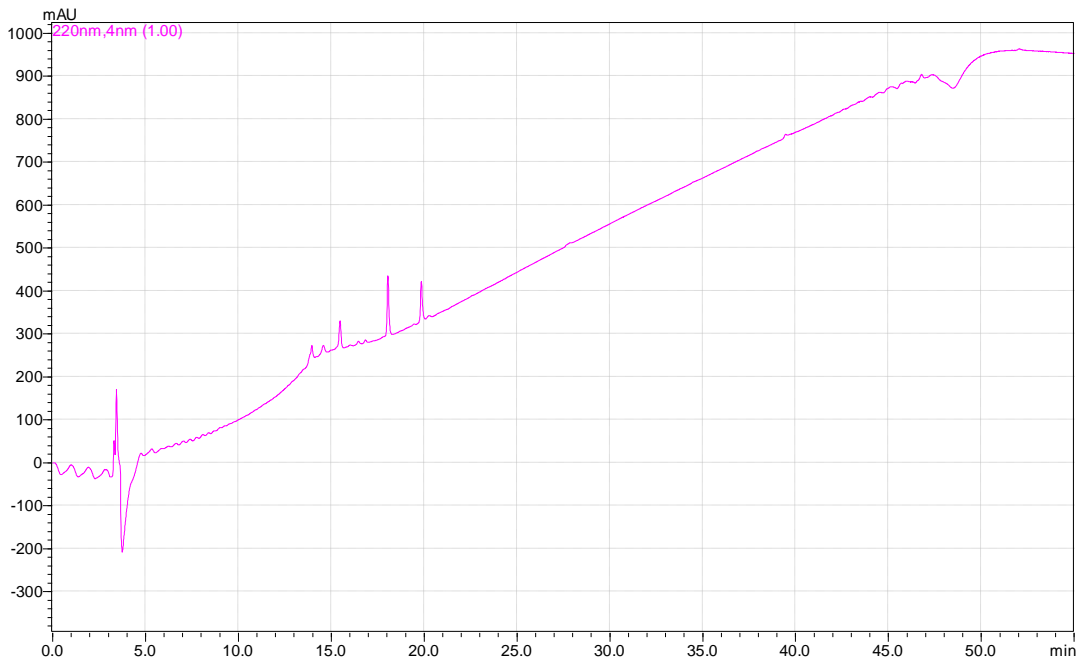
ZOU, X. Y.; *et al.* Systematic Identification of Bioactive Compositions in Leaves of *Morus* Cultivars Using UHPLC-ESI-QTOF-MS/MS and Comprehensive Screening of High-Quality Resources. **Separations**, v. 9, p. 76, 2022.

ANEXOS

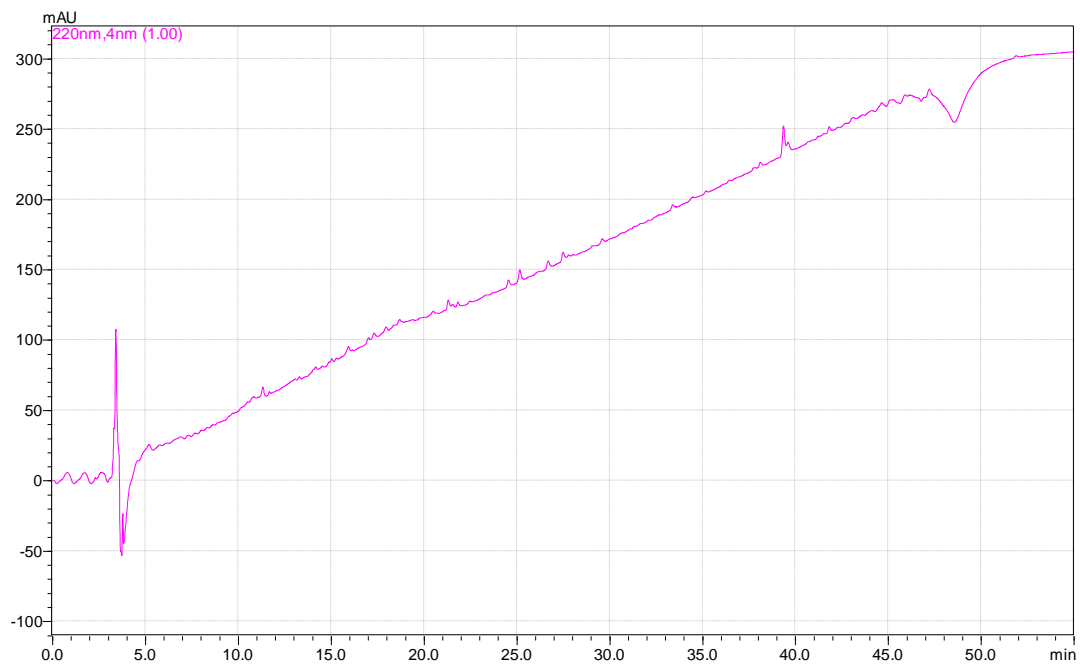
Anexo 1- Cromatogramas ($\lambda = 220\text{nm}$) dos extratos das folhas de *S. glandulosum* (A), *C. tweedii* (B), *G. klotzchiana* (C), *A. colubrina* (D), *Cassia leptophylla* (E), *S. multijuga* (F) e *S. macranthera* (G).



A



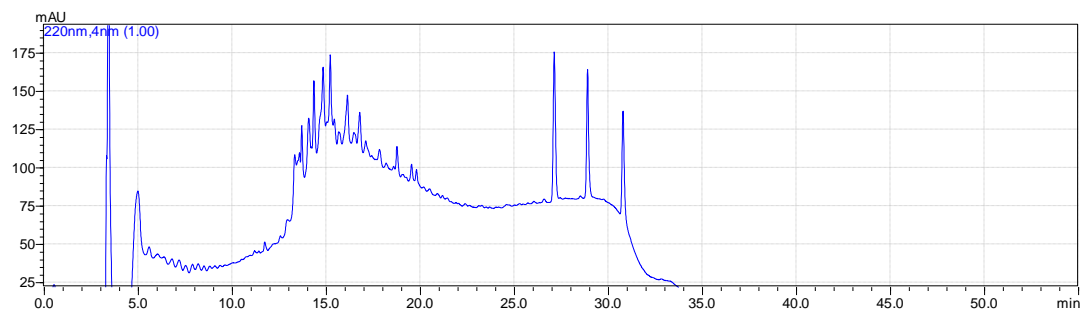
B



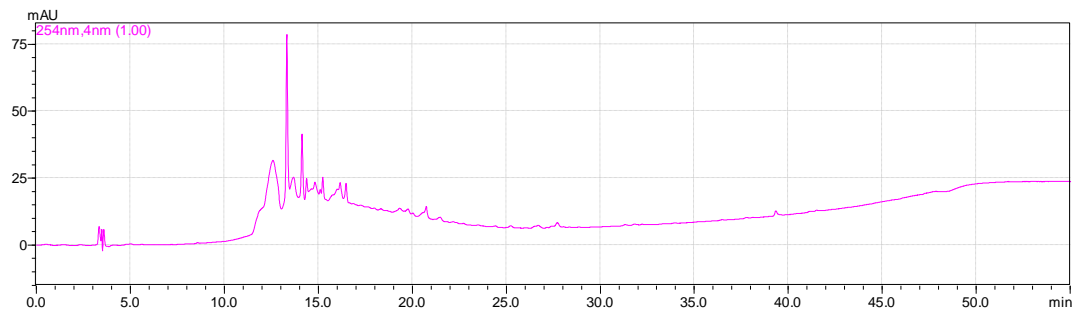
C



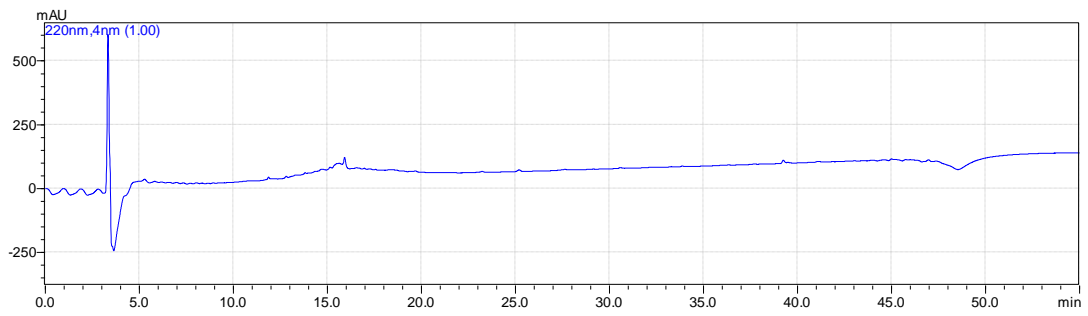
D



E

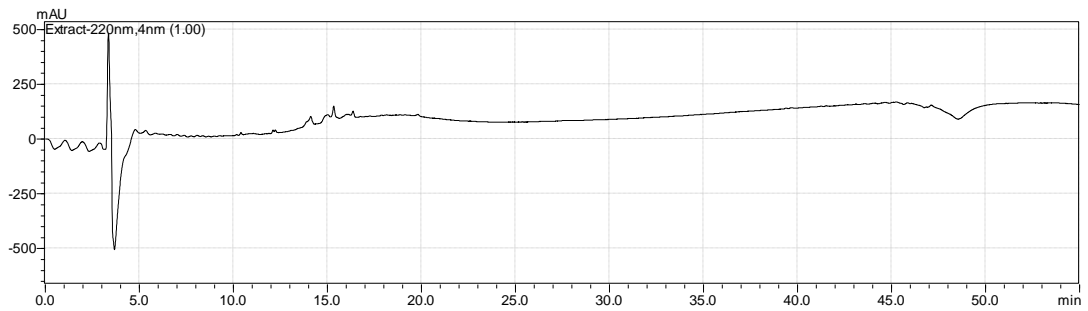


F

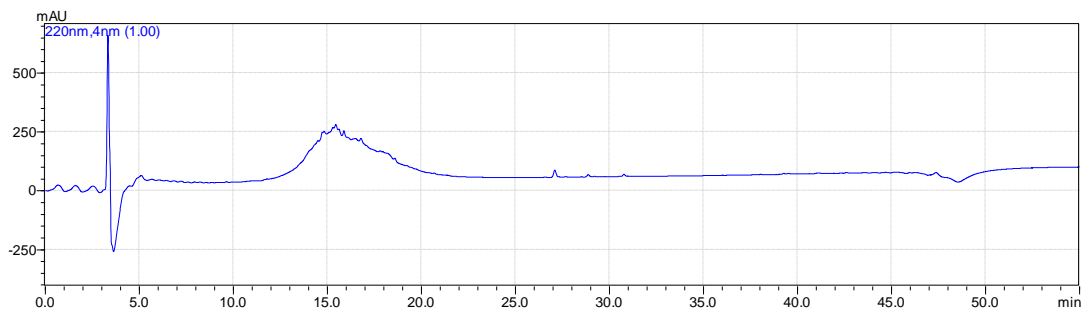


G

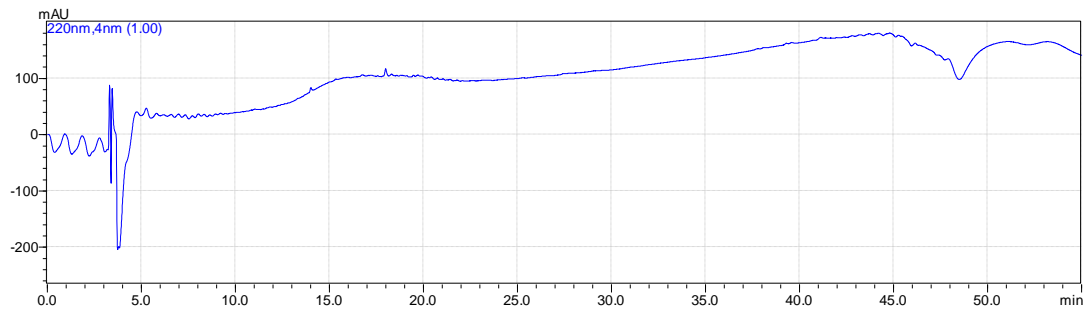
Anexo 1- Cromatogramas ($\lambda = 220\text{nm}$) dos extratos das galhos de *A. colubrina* (A), *C. leptophylla* (B), *S. multijuga* (C).



A



B



C

ANEXO 3. Comprovante de submissão de artigo

The screenshot shows an email interface with the following content:

Química Nova - Manuscript ID QN-2025-0043
1 mensagem

Admin QN <onbehalf@manuscriptcentral.com> 14 de fevereiro de 2025 às 21:20
Responder a: quimicanova@sbq.org.br
Para: cgmagalhaes@uepg.br
Cc: cgmagalhaes@uepg.br, leticiapiresalp@gmail.com, marcelino.santos@unesp.br, kazmierczak.elton@gmail.com, 2340160001@uepg.br, capessoa@uepg.br, iriane.eger@gmail.com, bolzaniv@gmail.com

14-Feb-2025

Dear Dr. MAGALHAES:

Your manuscript entitled "Detecção de flavonoides com propriedades tripanocida e antioxidante nas folhas e caules de Senna multijuga (Fabaceae)" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in the Química Nova.

Your manuscript ID is QN-2025-0043.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <https://mc04.manuscriptcentral.com/qn-scielo> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <https://mc04.manuscriptcentral.com/qn-scielo>.

Be aware of the new Article Processing Charges (APC) practiced since April 05, 2021 (<http://quimicanova.sbq.org.br/conteudo.asp?page=14>).

Thank you for submitting your manuscript to the Química Nova.

Sincerely,
Química Nova Editorial Office

The bottom of the screenshot shows a Windows taskbar with the date 01/04/2025 and time 11:53.

ANEXO 4. Parecer da supervisora em relação às atividades desenvolvidas pela pós-doutoranda

Araraquara, 10 de março de 2025

Parecer das atividades do Estágio de Pós-doutorado no NuBBE

Da Professora Cássia Gonçalves Magalhães
Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG)

Período de 01/03/2024 a 01/03/2025

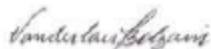
Parecer

A Professora Cássia Gonçalves Magalhães, realizou estágio de Pós-doutorado, no Instituto de Química, UNESP em Araraquara, durante o período de 04/03/2024 a 03/03/2025, sob a minha supervisão, onde atuou ativamente no projeto nacional, INCT BioNat (CNPq/FAPESP) que sou coordenadora. Neste período a professora Cássia conquistou os professores e estudantes de pós-graduação do nosso núcleo de pesquisa, o NuBBE, hoje celebrando 25 anos de sua criação, como também de todo o Departamento de Bioquímica e Química Orgânica, devido ao seu profissionalismo, excelência na condução de sua pesquisa, colaboração e entusiasmo junto aos demais estudantes de IC, MS, Dr e Pós-doc atuais, que estão desenvolvendo suas atividades de pesquisas no NuBBE, um laboratório reconhecido mundialmente pelos estudos sobre os últimos avanços em metodologias de vanguardas sobre produtos naturais de biodiversidade brasileira.

Neste período a professora Cássia com afastamento integral de sua instituição de origem, trabalhou em tempo integral semanalmente, incluindo horas extras que teve que vir à Instituição devido a demanda de uso de equipamentos de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e de ^{13}C , espectrometria de massas e cromatógrafos líquidos de alta performance que são agendados de acordo com as necessidades de cada pesquisa.

Com esmero, Cássia trabalhou incansável neste período de seu estágio de Pós-doutorado, em que a parabenizo pela maneira dinâmica e ousada, não só cumpriu com o rigor, mas, também como docente colaborou para o programa de PG do Instituto de Química/Araraquara, importantíssimo também para a avaliação institucional da UNESP.

A professora Cássia desenvolveu suas pesquisas aqui, focada na linha do NuBBE, na área de produtos naturais onde também teve reconhecimento unânime, devido ao componente inovador do tema que decidiu abordar, dando destaque ao grupo de pesquisa em que atua e à pós-graduação do IQ UNESP: internacionalização e desenvolvimento institucional. O desempenho e a excelência da professora em todas as atividades fins da Universidade é gratificante, o que me deixa numa posição extremamente confortável para elaboração deste parecer. Aproveito também para parabenizar a professora Cássia e a sua Universidade pelo seu trabalho e atuação destacada.



Vanderlan da Silva Bolzani
Full Professor of Chemistry, IQ-UNESP
Natural Products Chemistry & Medicinal Chemistry
Member Elected for TWAS, FRSC, ABC and ACIESP
Office: +55 16 33019660 / Mobile: +55 11 998583442

