

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Leonardo Luiz Oliveira de Mello

**Investigação Química de Extratos de *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish
(Asteraceae) e seu Potencial Antiparasitário e de Substâncias Isoladas em Vermes
Adultos de *Schistosoma mansoni***

Juiz de Fora

2024

Leonardo Luiz Oliveira de Mello

Investigação Química de Extratos de *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish (Asteraceae) e seu Potencial Antiparasitário e de Substâncias Isoladas em Vermes Adultos de *Schistosoma mansoni*

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas-Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos

Orientador: Prof. Dr. Giovanni Wilson Amarante
Coorientador: Prof. Dr. Ademar Alves da Silva Filho

Juiz de Fora
2024

de Mello, Leonardo Luiz Oliveira.

Investigação Química de Extratos de *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish (Asteraceae) e seu Potencial Antiparasitário e de Substâncias Isoladas em Vermes Adultos de *Schistosoma mansoni* / Leonardo Luiz Oliveira de Mello. -- 2024.

80 p. : il.

Orientador: Giovanni Wilson Amarante

Coorientador: Ademar Alves da Silva Filho da Silva Filho

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2024.

1. *Eremanthus erythropappus*. 2. *Schistosoma mansoni*. 3. Triterpenoides. 4. Flavonoides. 5. Produtos naturais. I. Amarante, Giovanni Wilson, orient. II. da Silva Filho, Ademar Alves da Silva Filho, coorient. III. Título.

Leonardo Luiz Oliveira de Mello

Investigação Química de Extratos de *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish (Asteraceae) e seu Potencial Antiparasitário e de Substâncias Isoladas em Vermes Adultos de *Schistosoma mansoni*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos Ativos.

Aprovada em 07 de agosto de 2024.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Giovanni Wilson Amarante - Orientador

Universidade Federal de Juiz de Fora

Dr. Mauro Vieira de Almeida

Universidade Federal de Juiz de Fora

Dr. José Angelo Silveira Zuanazzi

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Juiz de Fora, 18/07/2024.



Documento assinado eletronicamente por **Giovanni Wilson Amarante, Professor(a)**, em 07/08/2024, às 16:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Mauro Vieira de Almeida, Professor(a)**, em 07/08/2024, às 17:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **José Angelo Silveira Zuanazzi, Usuário Externo**, em 12/08/2024, às 10:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **1871513** e o código CRC **02C4E5A2**.

Dedico este trabalho aos meus pais, amigos e professores que me inspiram e me auxiliaram na realização desta etapa em minha trajetória.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer inicialmente aos meus pais Giovani e Angélica por todo apoio e carinho durante toda a minha caminhada, sem vocês não seria possível chegar até aqui.

Gostaria de agradecer aos meus irmãos Daniel e André, os quais viram também de perto o árduo caminho concluído por mim nesta etapa, e que por meio de seu suporte incondicional pude ter êxito nesta nova conquista.

Gostaria de agradecer a minha noiva Carla Leal por seu companheirismo e apoio em todos os momentos. Sua leveza em ver o mundo e parceria torna a vida mais colorida e com certeza tiveram importância fundamental neste momento de minha vida.

Gostaria de agradecer aos meus orientadores Giovanni e Ademar por abrirem as portas de seus laboratórios e acreditarem em meu trabalho, sendo desta forma de grande importância em meu amadurecimento científico e profissional. Agradeço pela excelência na qual pude sintetizar novos conhecimentos e concluir este trabalho por meio de sua experiência e dedicação.

Gostaria de agradecer aos amigos dos laboratórios GPMS e NIPPAN os quais foram como duas novas famílias para mim. Obrigado por todo apoio e carinho durante meu mestrado, sem isso com certeza seria um caminho infinitamente mais difícil.

Gostaria por último de agradecer a agência de fomento FAPEMIG pelo apoio financeiro neste projeto (Processos APQ 00705-22 e APQ 03773-22) e pela bolsa de estudos concedida (APQ 03773-22) e a Universidade Federal de Juiz de Fora por ter sido tão frutífera nestes dois anos de mestrado acadêmico, com profissionais de excelência e pessoas de bom coração, sendo além de meu local de trabalho, uma casa durante esta etapa de meus estudos.

Muito obrigado!

“Se as portas da percepção fossem limpas, tudo pareceria ao homem como é: Infinito. Pois o homem se fechou até ver todas as coisas através das estreitas fendas de sua caverna.”
(William Blake, 1790, p.39).

RESUMO

Doenças tropicais negligenciadas (DTN's), tal como esquistossomoses provocadas por vermes do gênero *Schistosoma*, são expressivas helmintíases a qual acometem mais de 250 milhões de pessoas em todo mundo, onde estimasse que mais de 300 mil mortes anuais ocorram por infecções causadas por vermes trematódeos. Alternativas na quimioterapia contra tal enfermidade compreendem desde seu surgimento nos anos 1970, o derivado pirazino-quinolínico praziquantel (PZQ), o que somado a resiliência e potencial adaptativo dos parasitos, assim como uma baixa biodisponibilidade do PZQ, trazem maior complexidade no controle de infecções e eliminação desses helmintos. Desta forma, em meio a escassez de antiparasitários, produtos do metabolismo secundário de plantas, ainda constituem promissora fonte de metabólitos bioativos, os quais muita das vezes além de sua heterogeneidade a nível molecular em sítios ativos de doenças, são acompanhados de baixa toxicidade em modelos animais, sendo então atrativos para seu uso farmacológico. Neste contexto, algumas espécies da família Asteraceae, como as do gênero *Eremanthus*, possuem relatadas promissoras atividades esquistossomicidas em seus óleos essenciais e diferentes extratos vegetais. Desta forma, este trabalho teve por objetivo avaliar o potencial esquistossomicida de extratos de *E. erythropappus* e através da anotação de substâncias por análise de dados de MS/MS, conduzir uma investigação química desta espécie e posteriormente isolar substâncias relacionadas a atividade antiparasitária. Através das análises de UHPLC-MS/MS, dezesseis substâncias foram anotadas, onde lactonas sesquiterpênicas, triterpenoides pentacíclicos e flavonóides do tipo flavonol e flavona foram majoritariamente propostos. A partir do extrato LEE foram isolados os triterpenoides fridelina (1) e ácido betulínico (2) e a flavona acacetina (3), nos quais (2) e (3) encontram-se primeiramente reportados nesta espécie. A partir de ensaios *in vitro* frente ao *S. mansoni*, o extrato LEE demonstrou-se mais ativo que EEE, levando até 25µ/mL a morte e redução de atividade motora de vermes adultos de *Schistosoma*, onde a investigação dos metabólitos isolados relacionados a tal atividade revelou promissor potencial esquistossomicida da substância (2), a qual pode após 48h eliminar totalmente vermes machos e fêmeas e reduzir completamente sua mobilidade nas concentrações de 200µ/mL e 100µ/mL, mantendo tal efeito em 50µ/mL após 72h. Resultados obtidos trazem notável conhecimento fitoquímico e relacionado ao potencial antiparasitário de extratos da candeia-da-serra.

Palavras-chave: *Eremanthus erythropappus*, *Schistosoma mansoni*, triterpenoides pentacíclicos, flavonas, produtos naturais

ABSTRACT

Neglected tropical diseases (NTDs), such as schistosomiasis caused by worms of the genus *Schistosoma*, are expressive helminthiases that affect more than 250 million people worldwide, where it is estimated that more than 300 thousand deaths occur annually due to infections caused by trematode worms. Alternatives in chemotherapy against this disease include, since its emergence in the 1970s, the pyrazinoquinolinic derivative praziquantel (PZQ), which, added to the resilience and adaptive potential of parasites, as well as a low bioavailability of PZQ, lead to greater complexity in the control of infections and elimination of these helminths. Thus, in the midst of the scarcity of antiparasitics, products of the secondary metabolism of plants still constitute a promising source of bioactive metabolites, which often in addition to their heterogeneity at the molecular level in active sites of diseases, are accompanied by low toxicity in animal models, thus regarded attractive for their pharmacological use. In this context, some species of the Asteraceae family, such as those of *Eremanthus* genera, have reported promising schistosomicidal activities in their essential oils and different plant extracts. Therefore, this work aimed to evaluate the schistosomicidal potential of *E. erythropappus* extracts and through annotation of compounds by analysis of MS/MS data, to conduct a chemical investigation of this species and later isolate antiparasitic activity related metabolites. Through the UHPLC-MS/MS analyses, sixteen compounds were annotated, where sesquiterpene lactones, pentacyclic triterpenoids and flavonol and flavone type flavonoids were majorly detected. From the LEE extract, the triterpenoids fridelin (1) and betulinic acid (2) and the flavone acacetin (3) were isolated, in which (2) and (3) are first reported in this species. Regarding evaluation of antiparasitic activity at in vitro assays against *S. mansoni*, the LEE extract showed to be more active than EEE, leading to death and reduction of motor activity of adult *Schistosoma* worms until 25 µ/mL, where the investigation of the isolated metabolites related to such activity revealed promising schistosomicidal potential of compound (2), which after 48 hours post infection led to total elimination and complete mobility reduction of male and female worms at concentrations of 200 µ/mL and 100 µ/mL, maintaining this effect at 50 µ/mL after 72 hours. Results obtained bring remarkable phytochemical knowledge and related to the antiparasitic potential of candeia-da-serra extracts.

Keywords: *Eremanthus erythropappus*, *Schistosoma mansoni*, pentacyclic triterpenoids, flavones, Natural products

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	–	Ciclo de <i>Schistosoma</i>	16
Figura 2	–	Praziquantel.....	17
Figura 3	–	<i>Eremanthus erythropappus</i>	18
Figura 4	–	Sesquiterpenoides e triterpenoides em <i>Eremanthus</i>	19
Figura 5	–	Flavonóides de Lychnophorinae	20
Figura 6	–	Biossíntese de terpenoides	21
Figura 7	–	Arranjo conformacional de 2,3-óxido de esqualeno	22
Figura 8	–	Mecanismo de ciclização de triterpenoides	23
Figura 9	–	Biossíntese de cucurbitacinas.....	24
Figura 10	–	Formação de triterpenos do tipo lupano	25
Figura 11	–	Biossíntese de flavonóides	27
Figura 12	–	Lavado glandular de <i>E. erythropappus</i>	31
Figura 13	–	Extrato por lavagem glandular das partes aéreas (LEE).....	31
Figura 14	–	Extrato etanólico de <i>E. erythropappus</i> (EEE)	32
Figura 15	–	Separação do extrato por lavagem glandular de <i>E. erythropappus</i>	33
Figura 16	–	Extratos de <i>Eremanthus erythropappus</i> UHPLC-ESI-MS/MS modo positivo	37
Figura 17	–	Extratos de <i>Eremanthus erythropappus</i> UHPLC-ESI-MS/MS modo negativo	37
Figura 18	–	Fragmentação de triterpenos pentacíclicos	39
Figura 19	–	Frações obtidas por VLC	50
Figura 20	–	Fração 1.3.	50
Figura 21	–	Cristais de friedelina	51
Figura 22	–	Subfrações 3.1-4.5 da VLC	51
Figura 23	–	Subfrações 17-23 da coluna cromatográfica clássica	52
Figura 24	–	Cristais de ácido betulínico	52
Figura 25	–	Frações e cristais de acacetina.....	53
Figura 26	–	Espectro de RMN de ¹ H da friedelina	54
Figura 27	–	Espectro de RMN de ¹³ C da friedelina	55
Figura 28	–	Friedelina	56
Figura 29	–	Espectro de RMN de ¹ H do ácido betulínico	58

Figura 30	–	Espectro de RMN de ^{13}C do ácido betulínico	59
Figura 31	–	RMN de DEPT-135 e comparação com a literatura	60
Figura 32	–	Espectro no infravermelho do ácido betulínico	61
Figura 33	–	Ácido betulínico.....	62
Figura 34	–	Espectro de RMN de ^1H da acacetina em $\text{DMSO}-d_6$	63
Figura 35	–	Espectro de RMN de ^{13}C da acacetina em $\text{DMSO}-d_6$	63
Figura 36	–	Acacetina	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Extratos e metabólitos de <i>E. erythropappus</i>	35
Tabela 2	– Substâncias anotadas em extratos de <i>E. erythropappus</i> (LEE e EEE) por análise em UHPLC-ESI-MS/MS	46
Tabela 3	– RMN de ^1H e comparação com Ali <i>et al.</i> , 2010	54
Tabela 4	– RMN de ^{13}C e comparação com Escobedo-Martinez <i>et al.</i> , 2012	55
Tabela 5	– RMN de ^{13}C e comparação com Pohjala <i>et al.</i> , 2009.	59
Tabela 6	– Avaliação <i>in vitro</i> de extratos de <i>E. erythropappus</i> e substâncias isoladas contra vermes adultos de <i>S. mansoni</i>	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Acetil-CoA	Acetilcoenzima-A
BCS	Classificação biofarmacêutica
CBC	Cadeira-barco-cadeira
CCC	Cadeira-cadeira-cadeira
CID	Dissociação induzida por colisão
CYP450	Monooxigenase do citocromo P450
<i>d</i>	Dupleto
<i>ddd</i>	Duplo dupleto duplo
<i>dqd</i>	Dupleto de quartetos duplo
<i>dq</i>	Duplo quarteto
DMAPP	Difosfato de dimetilalila
DMSO- <i>d</i> ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
DTN's	Doenças tropicais negligenciadas
DXP	1-desóxi-D-xilulose-5-fosfato
EEE	Extrato em etanol das partes aéreas de <i>Eremanthus erythropappus</i>
FPP	Difosfato de farnesila
GNPS	Global Natural Products Social Molecular Networking
IPP	Difosfato de isopentenila
LEE	Extrato por lavagem glandular das partes aéreas de <i>Eremanthus erythropappus</i>
<i>m</i>	Multiplete
MVA	Ácido mevalônico
-OPP	Ânion difosfato
OSCs	Ciclasas de óxido de esqualeno
PKS	Policetídeo sintase
<i>qd</i>	Quarteto de dupletos
RDA	Retro-Diels-Alder
RMN de ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN de ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
ROS	Espécies reativas de oxigênio
<i>s</i>	Simpleto
TGs	Tricomas glandulares
TMS	Tetrametilsilano
TMZ	Temozolomida
VLC	Cromatografia líquida a vácuo

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	16
1.1	ESQUISTOSSOMOSE	16
1.2	<i>EREMANTHUS ERYTHROPAPPUS</i>	18
1.3	TRITERPENOIDES.....	21
1.4	FLAVONOIDES.....	27
2.	OBJETIVOS.....	28
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
3.	MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1	COLETA DO MATERIAL VEGETAL.....	29
3.2	ANÁLISE E ANOTAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS POR UHPLC–ESI-MS/MS	29
3.3	GLOBAL NATURAL PRODUCTS SOCIAL MOLECULAR NETWORKING (GNPS).....	30
3.4	PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS	30
3.5	FRACIONAMENTO DO EXTRATO DAS PARTES AÉREAS	32
3.6	IDENTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS ISOLADAS	33
3.7	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA <i>IN VITRO</i> FRENTE AO <i>S. MANSONI</i>	33
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1	SELETIVIDADE NA EXTRAÇÃO POR LAVAGEM GLANDULAR DAS PARTES AÉREAS DE <i>E. ERYTHROPAPPUS</i>	34
4.2	ANÁLISE POR UHPLC-ESI-MS/MS DE EXTRATOS DE <i>E. ERYTHROPAPPUS</i>	36
4.3	ISOLAMENTO DE SUBSTÂNCIAS (1), (2) E (3).....	50
4.4	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E IDENTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS ISOLADAS	53
4.5	ENSAIOS <i>IN VITRO</i> FRENTE A VERMES ADULTOS DE <i>SCHISTOSOMA</i> <i>MANSONI</i>	63
5.	CONCLUSÃO	66
	REFERÊNCIAS.....	67
	ANEXOS	77

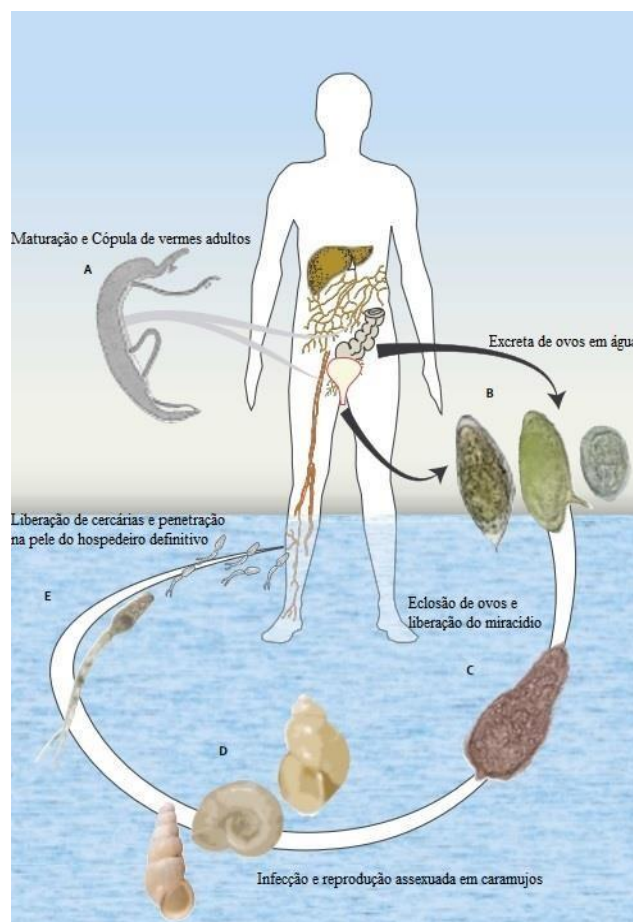
1. INTRODUÇÃO

1.1. ESQUISTOSSOMOSE

A esquistossomose ou bilharzíase, é uma doença tropical negligenciada, a qual acomete mais de 250 milhões de pessoas em todo mundo. Anualmente, estima-se que mais de 300 mil mortes ocorram por infecções ocasionadas por vermes trematódeos do gênero *Schistosoma*, sendo esta considerada desta forma, uma das mais expressivas helmintíases em termos de morbidade e mortalidade (Vale *et al.*, 2017; Souza *et al.*, 2017).

A infecção em humanos por esses helmintos, ocorrem, em sua maioria, pelas espécies de *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma intercalatum*, *Schistosoma mekongi* e *Schistosoma mansoni*, onde esta última encontra-se responsável pela esquistossomose hepática e intestinal em regiões como as do leste Mediterrâneo, África Subsaariana e América do Sul (De Castro *et al.*, 2013). Assim como as demais espécies de *Schistosoma*, *S. mansoni* possui um complexo ciclo de reprodução e infecção (**Figura 1**).

Figura 1. Ciclo de *Schistosoma*

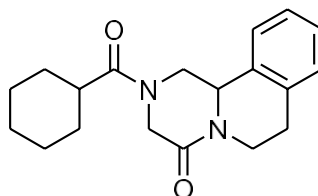


Fonte: Adaptado de Gryseels *et al.*, 2006

Resumidamente, vermes adultos fêmea, inseridas e associadas ao corpo do macho em seu canal ginecóforo, excretam ovos em água, os quais então eclodem liberando os miracídios capazes de infectar hospedeiros intermediários. Através de estímulos químicos e de luz, os miracídios buscam caramujos do gênero *Biomphalaria* sp., onde reproduzem-se de forma assexuada à esporocistos, de modo a se desenvolverem em cercarias liberadas novamente em água (Gryseels *et al.*, 2006). Ainda na fase aquática do ciclo, estas cercarias poderão penetrar a pele de humanos ou outros mamíferos (hospedeiro definitivo), alcançando o sistema porta hepático, transformando-se em esquistossômulos, os quais desenvolvem-se em vermes adultos. Por fim pares destes schistosomas migram à circulação mesentérica onde ocorre a cópula e liberação de ovos em urina e fezes, recomeçando o ciclo novamente (Gryseels *et al.*, 2006, De Castro *et al.*, 2013).

A resiliência e o potencial adaptativo destes parasitos em adversidade impostas a estes, como modulações na população de hospedeiros intermediários e definitivos, junto da proximidade constante de humanos a água fresca, dependência da irrigação na agricultura, proximidade a hospedeiros reservatório, predispõem uma maior prevalência de infecções e da doença (Rollison *et al.*, 2013). Além disso, desde seu surgimento na década de 1970, o praziquantel (PZQ) (**Figura 2**), um derivado pirazino-isoquinolínico, tem sido usado como único anti-helmíntico no tratamento da esquistossomose.

Figura 2. Praziquantel



Fonte: Elaborado pelo autor

Em razão de seu baixo custo, sensibilidade a todas as espécies de *Schistosoma* e mínimos efeitos adversos, justifica-se seu amplo uso como agente esquistossomicida (Vale *et al.*, 2017). Entretanto, a não responsividade no tratamento em vermes jovens, baixa adesão em crianças devido ao gosto amargo provocado por S-PZQ, baixa biodisponibilidade por sofrer extenso metabolismo de primeira passagem e reinfecção iminente mesmo com o uso de PZQ, são empecilhos comumente observados na quimioterapia com este anti-helmíntico (Vale *et al.*, 2017).

A busca por novos agentes esquistossomicidas tem recebido maior preocupação, visto a escassez dos mesmos e complexidade no controle da infecção, eliminação dos parasitos

devido a idiossincrasias de cada espécie e alto potencial adaptativo dos vermes. Somado a isso, a resistência humana em mudanças comportamentais, implica em maiores taxas de infecção e transmissão, trazendo maior dificuldade na eliminação desses helmintos (Rollison *et al.*, 2013). Nesta óptica, a investigação do potencial esquistossomicida de matrizes vegetais e seus metabólitos constituintes, tal como a *Eremanthus erythropappus*, pode constituir uma promissora estratégia na busca de novas substâncias no tratamento da esquistossomose.

1.2 EREMANTHUS ERYTHROPAPPUS

Pertencente à família Asteraceae e conhecida popularmente como candeia-da-serra, *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish (**Figura 3**), de sinonímia botânica *Vanillosmopsis erythropappa*, é predominante encontrada nas regiões do Nordeste, Sudeste, Centro-Oeste e Sul do Brasil (Silvério *et al.*, 2008), sendo esta comumente utilizada na medicina tradicional como cicatrizante, antiucelrogênico e no tratamento de infecções devido suas propriedades antiflogísticas e antimicrobianas (Soares *et al.*, 2011, Silvério *et al.*, 2013).

Figura 3. *Eremanthus erythropappus*



Fonte: Elaborado pelo autor

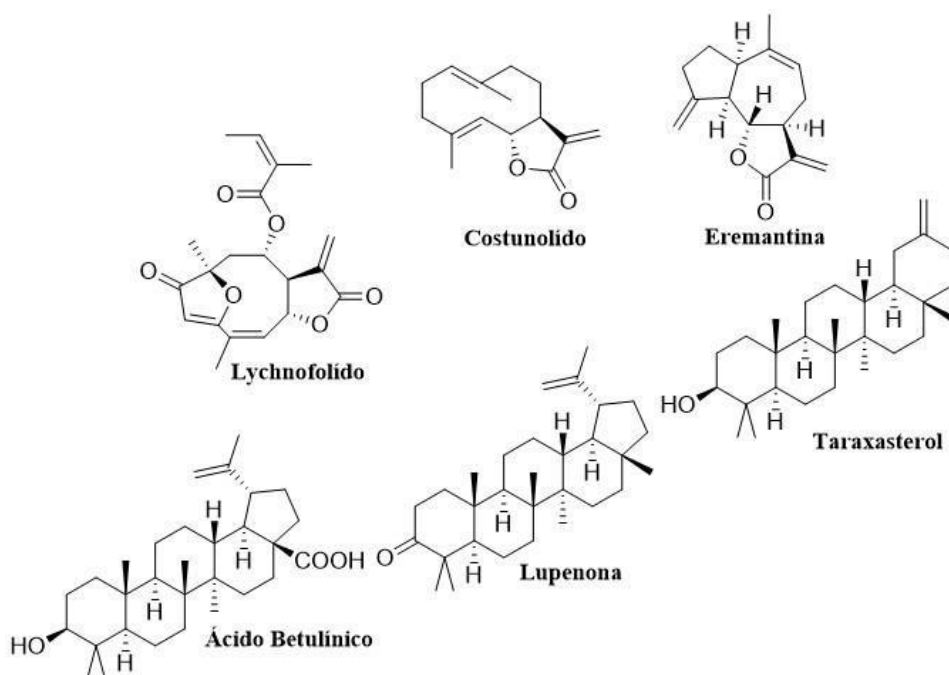
Além de seu uso popular, um notório apelo comercial é atribuído a candeia, em especial ao óleo essencial desta espécie vegetal, rico em α -bisabolol e outros sesquiterpenoides, o qual encontra-se utilizado em diversas preparações cosméticas e farmacêuticas em meio a propriedades anti-inflamatórias, atribuídas as substâncias obtidas por arraste à vapor (Keles *et al.*, 2010, Silvério *et al.*, 2013). Em meio ao seu uso etnomedicinal, a investigação das propriedades de extratos de *E. erythropappus* em diferentes solventes também é descrita, onde

o extrato etanólico da espécie apresentou notável atividade anti-inflamatória e antiulcerogênica em modelos animais, utilizando-se da carragenina como agente inflamatório e indometacina como anti-inflamatório e ulcerogênico (Silvério *et al.*, 2008).

Além disso, os extratos em etanol, diclorometano e hexano foram avaliados quanto sua atividade antiparasitária em vermes de *Schistosoma mansoni in vitro*, de forma que maior escurecimento do tegumento, ausência de ovos no meio de cultura e redução da motilidade desses helmintos foram predominantemente observados no extrato diclorometânico em todas as concentrações testadas, sugerindo um promissor potencial esquistossomicida do mesmo (Almeida *et al.*, 2012).

As atividades biológicas difusas investigadas e observadas para extratos de *Eremanthus erythropappus*, estimula a busca por produtos do metabolismo secundário contidos nesta matriz vegetal que possam estar relacionados a tais propriedades farmacológicas. Desta forma, similarmente a outras espécies do gênero *Eremanthus*, a predominância de terpenoides é descrita dentre seus metabólitos, nos quais sesquiterpenos e triterpenos constituem maior percentual de representantes desta classe de substâncias (**Figura 4**) (Bohlmann *et al.*, 1982).

Figura 4. Sesquiterpenoides e triterpenoides em *Eremanthus*

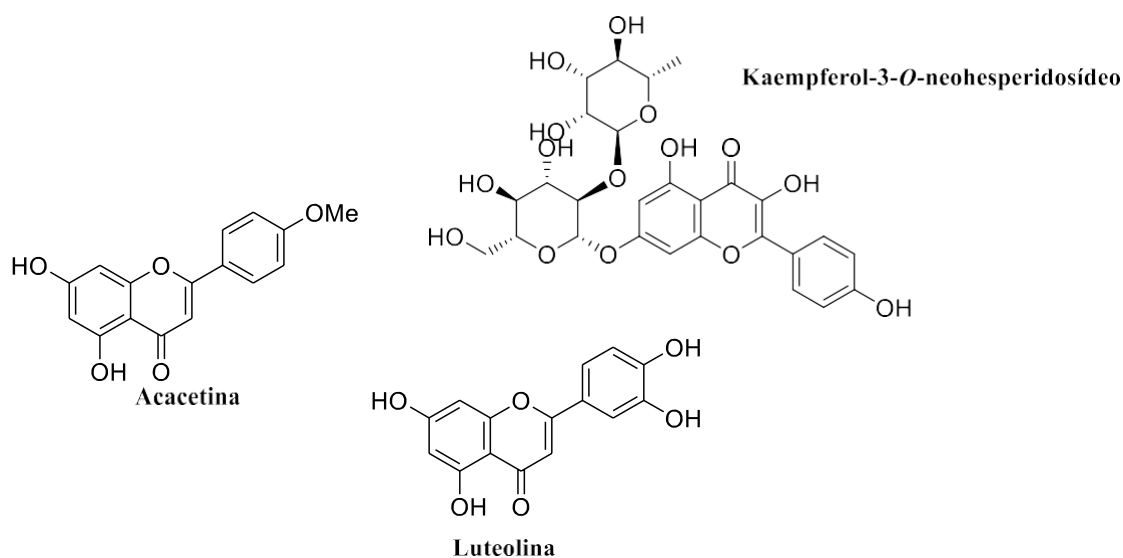


Fonte: Elaborado pelo autor

Triterpenoides pentacíclicos constituem um importante grupo de substâncias na candeia-da-serra, os quais são amplamente descritos por sua proeminente atividade antineoplásica, assim como uma toxicidade comedida em diversos de seus representantes. Porém, além de suas bioatividades, constituem ferramenta química importante na dominância vegetal, como observado no efeito alelopático exercido pela espécie vegetal em questão, onde triterpenoides do tipo lupano, sendo estes lupenona, taraxasterol e friedelina, puderam inibir o crescimento de raízes de *Lycopersicon esculentum* e *Echinochloa crusgalli* (Jorge *et al.*, 2022).

O potencial antioxidante de extratos de candeia avaliado por Del-Vechio-Vieira e colaboradores (Del-Vechio-Vieira *et al.*, 2017) apresentou maior efeito redutor em espécies reativas de oxigênio quando tais matrizes apresentavam maior concentração de flavonóides e outros polifenóis, em ensaios de DPPH, β -caroteno/ácido linoléico e de propriedade redutora de Fe^{+3} . Adicional a conferência de pigmentos a plantas, o qual é relacionado ao grau de oxidação de seu anel C, flavonóides constituem também um importante grupo de metabólitos em espécies de Lychnophorinae (**Figura 5**) (ex: *Eremanthus erythropappus*) (Keles *et al.*, 2010), atribuído em suma a suas diversas propriedades em sistemas biológicos, como na prevenção de neurodegeneração e redução de atividade osteoclástica em quadros de Alzheimer e osteoporose, respectivamente. Tais isoprenoides e polifenóis serão discutidos em maior detalhe nas próximas seções.

Figura 5. Flavonóides de Lychnophorinae



Fonte: Elaborado pelo autor

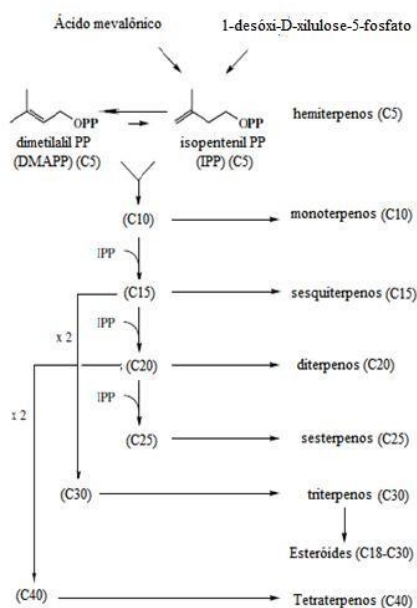
1.3 TRITERPENOIDES

Triterpenos ou triterpenoides são produtos do metabolismo secundário de matrizes de produtos naturais, e assim como os demais terpenos, possuem o isopreno como bloco construtor fundamental. Duas vias biossintéticas derivam os terpenos, sendo estas a via clássica do ácido mevalônico (MVA) e via da 1-desóxi-D-xilulose-5-fosfato (DXP) ou mevalonato independente (Dewick, 2009). Na via clássica, 2 moléculas de acetil-coenzima A (acetil-CoA) são condensadas para a formação de acetoacetil-CoA e então é adicionada uma terceira molécula de acetil-CoA, formando-se 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA. Este, por sua vez, é reduzido à mevalonato, que é convertido a difosfato de isopentenila (IPP) e difosfato de dimetilalila (DMAPP) (Dewick, 2009; Paduch *et al.*, 2007).

Na via mevalonato independente, 1-desoxi-D-xilulose-5-fosfato é formado a partir da condensação de piruvato e gliceraldeído-3-fosfato. O produto dessa reação sofre um rearranjo seguido de redução, dando origem a 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato, que é convertido às unidades isoprênicas bioativas (Dewick, 2009).

O encadeamento cabeça-cauda de unidades isoprênicas bioquimicamente ativas, ou seja, IPP e DMAPP, dão origem aos demais isoprenoides precursores de representantes da classe destes metabólitos, sendo alguns desses os monoterpenos, sequiterpenos e diterpenos, os quais derivam de difosfato de geranila (10 C), difosfato de farnesila (15 C) e difosfato de geranylgeranila (20 C) respectivamente, como mostra a **Figura 6** (Dewick, 2009)

Figura 6. Biossíntese de terpenoides

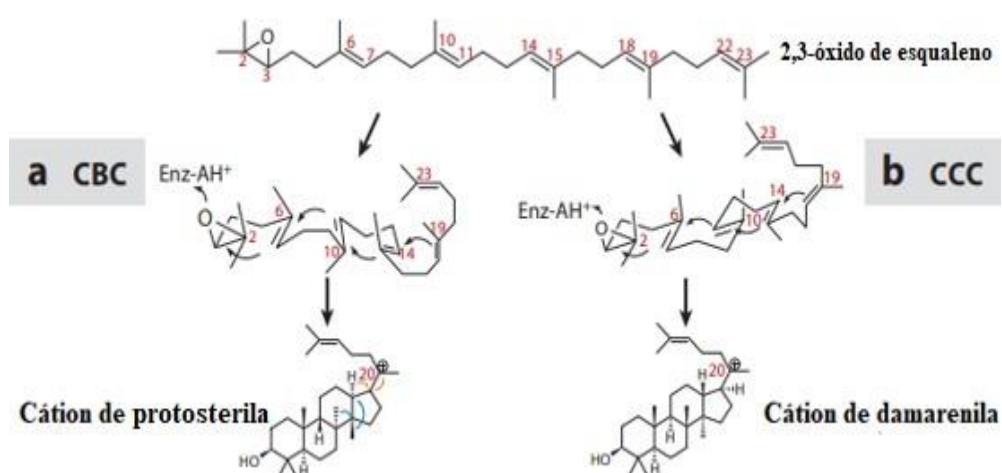


Fonte: Adaptado de Dewick, 2009

Entretanto, apesar de seus núcleos terpênicos fundamentais inteiramente compostos destas unidades de isopreno, os triterpenoides surgem a partir de uma condensação entre duas unidades de 15 carbonos de difosfato de farnesila (FPP), em um encadeamento do tipo cauda-cauda, levando a esqualeno, o qual será então oxidado a 2,3-óxido de esqualeno por ação da esqualeno epoxidase e que por sua vez, poderá levar a uma gama bastante diversificada de esqueletos triterpênicos, em reações de ciclização e funcionalização subsequentes (Dewick, 2009; Thimmappa *et al.*, 2014). Comumente, estes metabólitos têm sua origem biossintética a partir da via do ácido mevalônico, via esta comum a moléculas esteroides e colesteróis (Thimmappa *et al.*, 2014).

Em plantas, ciclases de óxido de esqualeno (OSCs) tem papel fundamental na diversidade estrutural de triterpenoides cíclicos, uma vez que vários genes expressos no genoma de vegetais, os quais correspondem a diferentes produtos de biossíntese, codificam estas enzimas, dando origem a múltiplos núcleos triterpênicos (Cárdenas *et al.*, 2019). Além disso, os arranjos conformacionais cadeira-barco-cadeira (CBC) ou cadeira-cadeira-cadeira (CCC) inicialmente adotados, traduzem a que via a ciclização por OSCs irá proceder, de forma que a predisposição a produtos como o cátion de protosterila e damarenila é favorecida em substratos de conformação CBC e CCC, respectivamente (Dewick, 2009) (**Figura 7**).

Figura 7. Arranjo conformacional de 2,3-óxido de esqualeno



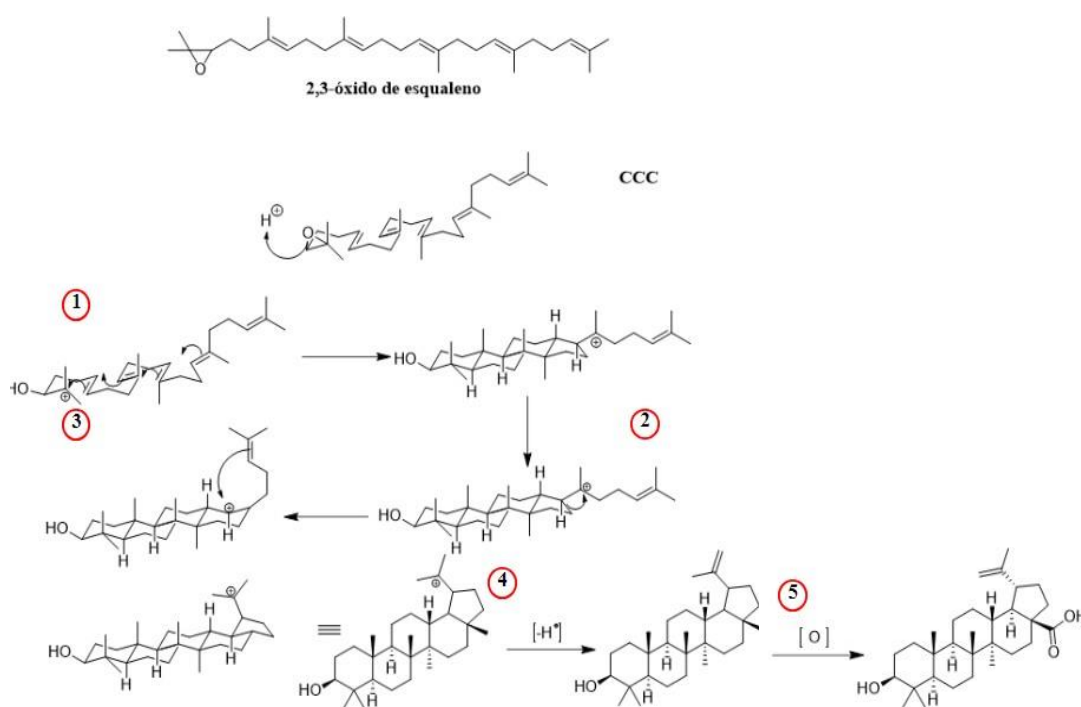
Fonte: Adaptado de Thimmappa *et al.*, 2014

A saída do ânion difosfato (-OPP) estabilizado por ressonância, constitui a etapa inicial para a ciclização de diversos terpenoides, como na biossíntese de diterpenos policíclicos naturais, em derivados do tipo pimarano, na qual a saída de -OPP leva a um cátion alílico,

resultante de adições eletrofílicas sucessivas, ciclizando a um íon de carbênio e isomerizando ao esqueleto iônico de pimarano (Bretmaier, 2006).

Entretanto, OSCs destes isoprenoides de 30 carbonos, tem o início dessas reações com a abertura do anel epóxido a partir de sua protonação, o que permite a formação de um cátion terciário, seguido de adições eletrofílicas em cascata por intermédio da formação de carbocátions e migrações de Wagner–Meerwein de alquila e hidreto (**Figura 8**). Desta forma, estas ciclases são classificadas como terpeno sintases do tipo II, enquanto as anteriores com a saída de -OPP, do tipo I (Oldfield *et al.*, 2012).

Figura 8. Mecanismo de ciclização de triterpenoides



Fonte: Adaptado de Dewick, 2009

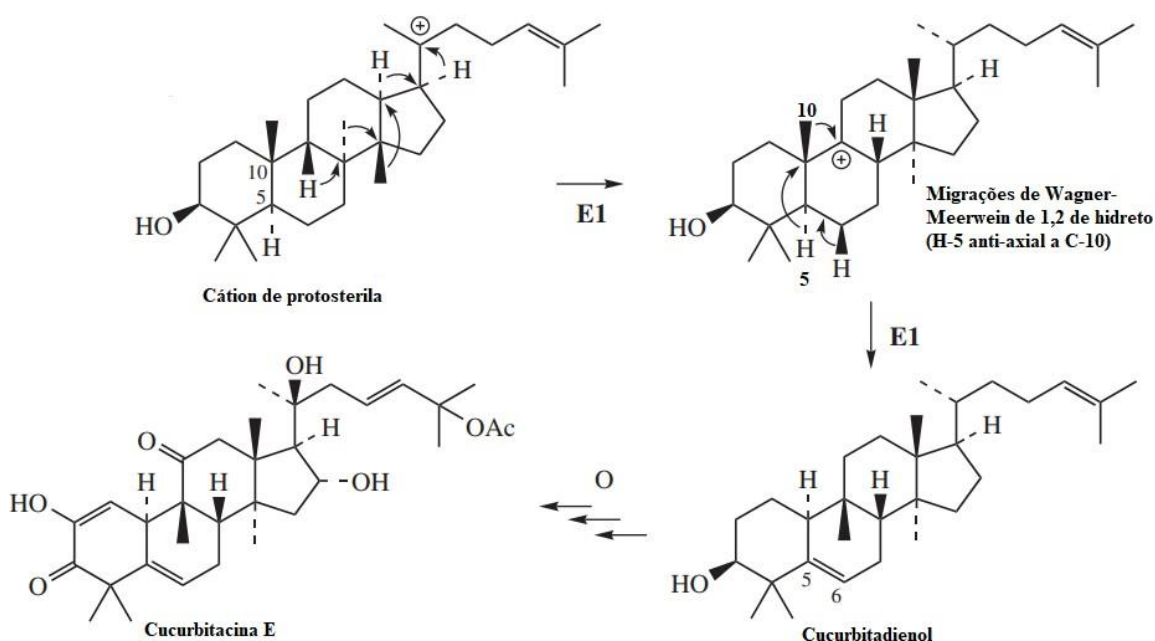
Monooxigenases do citocromo P450 (CYP450), constituem um amplo grupo de isoenzimas, sendo comumente descritas em reações de oxigenação de produtos do metabolismo secundário de plantas, dentre estes, os triterpenos, os quais compõem substratos para um número bastante limitado desta classe de hemoproteínas (Thimmappa *et al.*, 2014).

No entanto, a funcionalização de núcleos destas substâncias em reações de hidroxilação, acetilação, carboxilação catalisadas por CYP450 conferem junto de diferentes padrões de ciclização, maior heterogeneidade estrutural e química a triterpenoides, assim como a possibilidade de reações subsequentes devido a inserção de grupos funcionais, como a glicosilação da porção apolar (aglicona), dando origem a saponinas triterpênicas (Augustin *et al.*, 2011).

A gama de atividades biológicas de produtos oriundos de ambos os arranjos conformacionais (CBC e CCC) de óxido de esqualeno, são comumente atribuídas a características estruturais únicas de classes dessas substâncias (Cárdenas *et al.*, 2019), como por exemplo as cucurbitacinas, as quais partir da formação do cátion de protosterila, migrações sucessivas do tipo Wagner–Meerwein de 1,2 de hidreto poderão ocorrer, uma vez que a disposição antiperiplanar entre o próton H-5 e o carbono 10 atende a simetria necessária para a ocorrência destes rearranjos, culminando na formação de uma olefina entre os carbonos 5 e 6, seguido de oxidações do esqueleto triterpênico dando origem a tais triterpenos altamente oxigenados da família Cucurbitaceae (Dewick, 2009) (**Figura 9**).

Atividades citotóxicas e antitumorais são principalmente atribuídas as cucurbitacinas, porém propriedades antibacterianas, anti-inflamatórias, e hepato protetoras também são descritas para estes tipos estruturais (Valente *et al.*, 2004).

Figura 9. Biossíntese de cucurbitacinas

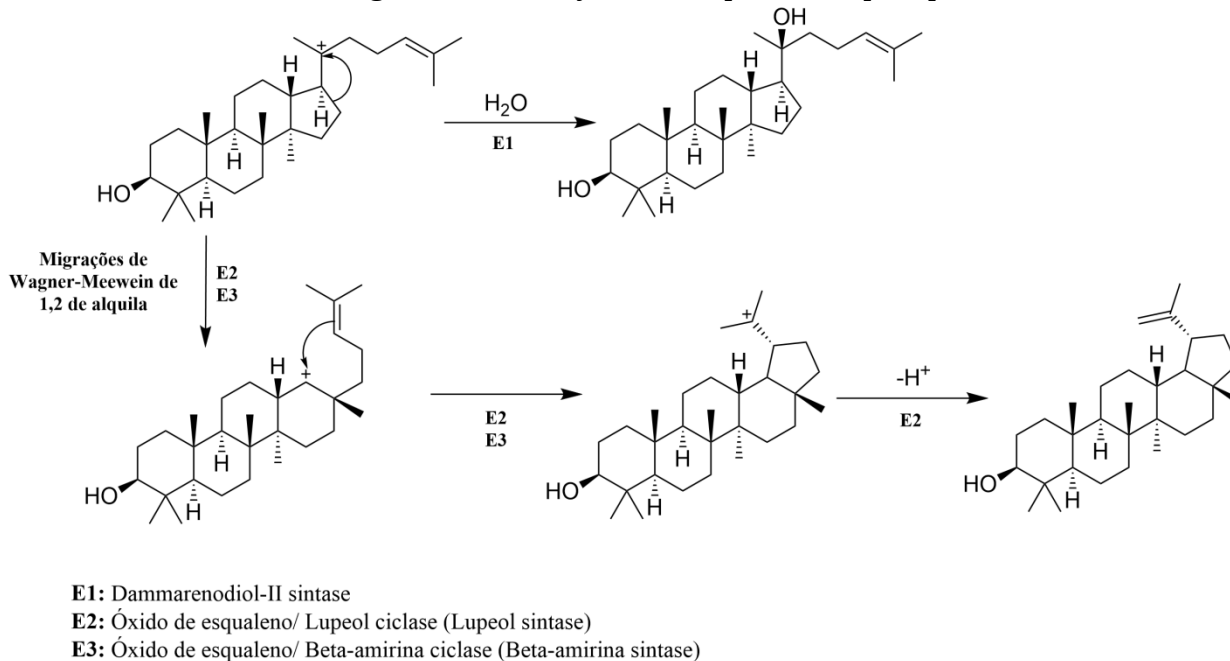


Fonte: Adaptado de Dewick, 2009

Além disso, diferente de fungos e animais, OSCs de plantas podem ainda catalisar ciclizações em um arranjo CCC de oxidoesqualeno, trazendo desta forma mais de 20.000 tipos estruturais diferentes produzidos por plantas (Hill *et al.*, 2012). Dentre metabólitos biossintetizados por esta via de ciclização, triterpenoides pentacíclicos do tipo lupano, onde a partir da conformação CCC de óxido de esqualeno, é formado o cátion de damarenila, em um mecanismo de ciclização também iniciado pela abertura do epóxido, formando um cátion terciário, seguido de sucessivas adições eletrofílicas. A formação de um carbocátion

secundário agora é favorecida, visto maior liberdade conformacional obtida através de uma migração de 1,2 de alquila, levando a expansão do anel de 5 membros para um de 6. O cátion de lupanila poderá então ser gerado a partir da formação do anel pentacíclico (**Figura 10**). Tais metabólitos são amplamente descritos por suas propriedades biológicas, sendo algumas vezes relacionados como promissoras substâncias em estudos de drogas multialvo (Liu *et al.*, 2021).

Figura 10. Formação de triterpenos do tipo lupano



Fonte: Adaptado de Dewick, 2009

Alguns desses lupanoides encontram-se em abundância em matrizes vegetais, como por exemplo, o lupeol, o qual é descrito por seu notável potencial antitumoral, onde a indução de oncogenes pró-apoptóticos no equilíbrio entre Bax:Bcl-2, alteração do equilíbrio redox com aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS) e ativação de p53, o que por sua vez leva a ativação de uma via pró-apoptótica com recaptção de Bcl-2, são alguns dos mecanismos descritos em suas propriedades antineoplásicas (Liu *et al.*, 2021).

Propriedades imunomoduladoras em infecções por protozoários patogênicos são também atribuídas a este triterpeno, onde a inibição de maturação de esquizontes em cepas de *Plasmodium* sp., atividade contra formas promastigota e amastigota e supressão da produção de óxido nítrico, reduzindo assim resposta anti-inflamatória, são respectivamente alguns dos mecanismos por qual lupeol desempenha suas atividades antimalária e antileishmania (Sharma *et al.*, 2020).

Dentre outras doenças tropicais negligenciadas (DTN's), lupeol demonstra-se promissor na busca de novos agentes esquistossomicidas, em meio a suas propriedades moluscicidas em caramujos de *Biomphalaria glabrata*, hospedeiro intermediário no ciclo de vida de vermes de *Schistosoma mansoni* (Menezes *et al.*, 1999).

Entretanto o uso clínico de lupeol é limitado devido a suas propriedades farmacocinéticas pouco satisfatórias, sendo classificado com uma substância de classe II no sistema de classificação biofarmacêutica (BCS), em razão de sua pouca solubilidade em água e boa penetrabilidade em membranas biológicas (Liu *et al.*, 2021).

Além disso, betulina e ácido betulínico, triterpenos do tipo lupano, que assim como lupeol, são descritos por sua proeminente atividade antiparasitária em DTN's. Possuem suas atividades antimalária por um mecanismo envolvendo a modulação estrutural na membrana de eritrócitos, bloqueando assim a entrada de merozoítos de *Plasmodium falciparum*, impedindo a subsequente lise celular e replicação destes parasitos (Isah *et al.*, 2016).

A avaliação do potencial esquistossomicida destes metabólitos foi também realizada, de forma que acentuada redução da viabilidade *in vitro* de Schistosoma adultos na presença cátions de fosfina derivados betulina e ácido betulínico foi observada, onde em um mecanismo sinérgico, a formação de ROS por esses derivados levou a danos aos tegumentos desses helmintos por desestabilização mitocondrial, assim como redução de sua motilidade devido ao aumento da ação catalítica de acetilcolinesterases (AChe) (Spivak *et al.*, 2014).

Dentre outros isoprenoides resultantes da ciclização em CCC do 2,3-óxido de esqualeno, triterpenoides do tipo friedelano, tais como a cetona friedelina, são descritos por uma ampla gama de bioatividades, além de papel fundamental na adaptação e defesa vegetal (Jorge *et al.*, 2022). Similarmente a lupanoides (ex: ácido betulínico), proeminente potencial antitumoral é relatado para friedelina em meio a diversos mecanismos, exemplificados, por exemplo, pela alteração do equilíbrio redox com aumento de ROS levando a danos ao DNA, assim como a supressão de via antiapoptóticas relacionadas a Bcl-2 e outros oncogenes (Singh, *et al.*, 2023). Além de outras propriedades relacionadas a este triterpeno, destaca-se também seu potencial antiparasitário, no qual alta eficiência na eliminação de cepas de *P. falciparum* resistentes a cloroquina foi observada em meio a um baixo valor de IC₅₀ (IC₅₀ de $7.20 \pm 0.5 \mu\text{M}$), assim como notáveis propriedades antileishmania e tripanocidas são relatadas (Singh, *et al.*, 2023).

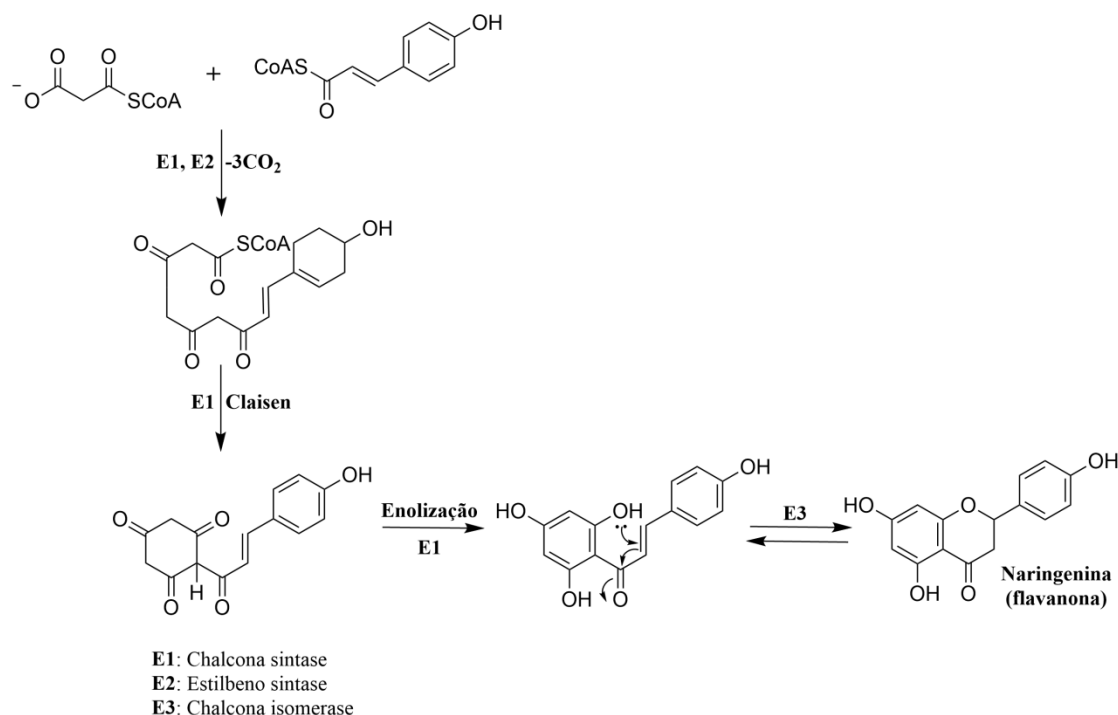
Portanto, devido, dentre outras atividades, tais produtos do metabolismo secundário de plantas apresentarem pronunciado potencial antiparasitário, a investigação de propriedades antihelmínticas frente a vermes adultos de *Schistosoma mansoni* destes tipos estruturais isolados neste trabalho foi realizada.

1.4 FLAVONÓIDES

Flavonóides são metabólitos especializados, os quais têm como unidade iniciadora uma molécula de cinamoil-CoA, que por sua vez deriva da via do ácido chiquímico através da atividade catalítica de cinamato-CoA ligase no fenilpropanoide ácido cinâmico (Dewick, 2009, Gaid *et al.*, 2012). Esta subunidade fenilpropanoídica inicial forma os anéis B e C, onde subsequente extensão de cadeia prosseguirá levando ao anel A por meio da condensação de três unidades de malonil-CoA, advindas da via do acetato-malonato, podendo ocorrer por meio de uma condensação aldólica ou claisen, originando stilbenos e chalconas respectivamente (Dewick, 2009) (**Figura 10**). Encontra-se importante ressaltar que ao contrário de policetídeos (ex: macrolídeos), nos quais a policetídeo sintase do tipo II (PKS-II) através de diferentes domínios enzimáticos realiza a biossíntese destes metabólitos (AT, ACP, KS), PKS's do tipo III, conhecidas também como chalcona-sintases, independem de um domínio ACP para ativação de substratos de acyl-CoA, agindo diretamente sob os mesmos na biossíntese de policetídeos aromáticos tais como flavonóides (Ben Shen, 2003).

A partir do ataque nucleofílico intramolecular do tipo adição de Michael na ligação dupla (α , β) da chalcona, precursora dos flavonoides, ocorre uma ciclização em β , originando a flavanona (**Figura 11**). A partir das flavanonas podem ser originadas as flavonas, flavonóis, isoflavonoides, antocianidinas e catequinas (Dewick, 2009). Dentre as diferentes formas que os flavonoides podem ser encontrados estão a glicosilada e metilada.

Figura 11. Biossíntese de flavonoides



Fonte: Adaptado de Dewick, 2009

A glicosilação e metilação podem ocorrer via oxigênio ou átomo de carbono, formando os flavonoides *O*- ou *C*-glicosídeos, assim como os *O*- ou *C*-metilados, respectivamente (Hofer, 2016; Koirala *et al.*, 2016). Em flavonoides *O*-glicosídeos as posições O3 no anel C e O7 no anel A são comumente glicosiladas enquanto em *O*-metilados, 3-OH (anel C), 7-OH (anel A), 3' e 4'-OH (anel B) (Hofer, 2016; Koirala *et al.*, 2016). Para os *C*-glicosídeos, é comum a glicosilação em C6 e C8 no anel A (Cavaliere *et al.*, 2005; Kachlicki *et al.*, 2016). Dentre os carboidratos, glicose, galactose, rhamnose, xilose, arabinose e rutinose são comumente ligados aos flavonoides (Cavaliere *et al.*, 2005; Hofer, 2016; Kachlicki *et al.*, 2016)

Além de suas propriedades antioxidantes, estes metabólitos são relacionados a diversas bioatividades, como pronunciado potencial antitumoral em diferentes linhagens de células de câncer de mama, de forma que em uma avaliação sistemática dos efeitos inibitórios de flavonoides na proteína de resistência ao câncer de mama (do inglês BCRP=breast cancer resistance protein) *in vitro* e *in vivo*, um de seus representantes, licochalcona-A, demonstrou uma inibição de 95% neste transportador transmembrana em células U251T e T98G resistentes a temozolomida (TMZ), que estruturalmente se deve ao anel B e a presença de grupos hidrofóbicos em 4', assim como hidroxilas e outros aceptores de ligação de hidrogênio nos carbonos 5 e 7 em seu núcleo flavonoídico fundamental (Nielsen *et al.*, 2004; Fan *et al.*, 2019).

Pronunciado potencial antiparasitário também é atribuído a estes metabólitos de via mista, como observado em um trabalho que avaliou o potencial sinérgico de alguns flavonóides no tratamento de malária com artemisinina, no qual a flavona acacetina apresentou notável atividade contra *P. falciparum* resistente a cloroquina (IC₅₀ = 13 µM) (Ferreira *et al.*, 2010), assim como o potencial esquistossomida de retrochalconas devido a vacuolização e dano ao tegumento de vermes adultos de *S. mansoni* (Souza *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2021).

2 OBJETIVOS

A partir dos extratos por lavagem glandular (LEE) e em etanol (EEE) das partes aéreas de *Eremanthus erythropappus*, este trabalho teve por objetivo realizar a investigação e comparação de seus perfis químicos por análises de UHPLC-ESI-MS/MS, assim como o isolamento de substâncias relacionadas ao potencial anti-helmíntico de tais matrizes em vermes trematódeos de *Schistosoma mansoni*.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Coletar das partes aéreas de *E. erythropappus*
- Obter o extrato por lavagem glandular das partes aéreas de *E. erythropappus* (LEE) para subsequente fracionamento
- Obter o extrato etanólico de *E. erythropappus* (EEE)
- Investigar o perfil químico dos extratos por análises de UHPLC-ESI-MS/MS nos modos de ionização positivo e negativo através da anotação de substâncias
- Comparar o perfil químico de extratos LEE e EEE através de análises de UHPLC-ESI-MS/MS nos modos de ionização positivo e negativo
- Realizar o isolamento de substâncias do extrato LEE
- Caracterizar e identificar substâncias isoladas por técnicas de análise instrumental como ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H), carbono 13 (RMN de ^{13}C) DEPT-135 e espectroscopia no infravermelho
- Avaliar o potencial antiparasitário *in vitro* dos extratos de *E. Erythropappus* e substâncias isoladas, frente a vermes de *Schistosoma mansoni*

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL

As partes aéreas (1,2 kg) de *E. erythropappus* foram coletadas no campus da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) (22° 13' 22" S, 44° 37' 59" W) no mês de agosto de 2022. A espécie vegetal trabalhada encontra-se com um exemplar já depositado herbário Leopoldo Krieger CESJF da UFJF sob o número 25363.

3.2 ANÁLISE E ANOTAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS POR UHPLC-ESI-MS/MS

Utilizou-se uma coluna Agilent InfinityLab Poroshell 120 C₁₈ (100 mm × 2,1 mm, 1,7 µm, Santa Clara, EUA), fluxo de 0,4 mL/min, e fase móvel de água e 0,1% ácido fórmico (A) e acetonitrila (B). Os extratos de LEE e EEE foram analisados utilizando-se um gradiente descrito da seguinte forma: 0–2 min, 5% B; 2–14 min, 5–98% B; 14–16 min, 98% B; e 16–20 min, 98–5% B. O compartimento da coluna e da fonte foram fixados em temperaturas de 40°C e 150°C, respectivamente, utilizando-se nitrogênio como gás carreador com fluxo de 10 L.min⁻¹ e pressão de gás do nebulizador de 4 bar. Os dados de MS foram adquiridos nos

modos de ionização positiva e negativa, usando uma faixa de massa entre m/z 50-1500 e uma dissociação induzida por colisão (CID) de energia de 30 eV. Processamento de cromatogramas e dados MS foram realizados no programa Thermo Xcalibur Qual Browser Versão 2.2 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, EUA). Além disso, a anotação de substâncias foi feita através da análise de seu padrão característico de fragmentação nos espectros de MS/MS e posterior comparação com literatura e bancos de dados, tais como ChemSpider, Scifinder, MassBank e Spectral Database for Organic Compounds.

3.3 GLOBAL NATURAL PRODUCTS SOCIAL MOLECULAR NETWORKING (GNPS)

Os dados espectrais de MS/MS foram analisados usando a plataforma GNPS (<https://gnps.ucsd.edu> acessado em 6 de abril de 2024), e hits obtidos nos modos de ionização positivo e negativo foram confirmados manualmente pela interpretação de seu padrão de fragmentação, confirmando assim as substâncias anotadas. Os dados de MS/MS foram convertidos para o formato mzXML usando o MS Convert e, em seguida, inseridos na plataforma GNPS. Após a conversão dos dados brutos MS/MS para o formato mzXML, os dados foram submetidos a processamento posterior através do software MZmine versão 3.28, seguido da interpretação dos espectros de íons do produto organizados em feature lists. Os dados coletados da biblioteca molecular GNPS podem ser encontrados em <https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=768bc5d42cd5483f976f2e62eacc9efb> para o modo positivo e no <https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=b1e98027b1b34cf7a5c70fc5f64ec5b0> para o modo negativo, acessados em 6 e 9 de abril de 2024, respectivamente.

3.4 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS

A partir do material vegetal coletado (*E. erythropappus*), foi feita a preparação do extrato por lavagem glandular das partes aéreas de *E. erythropappus*. A mistura de solventes MeOH e CH₂Cl₂ (1:1 v/v) foi utilizada como solução extratora, empregando-se 400 mL da solução a cada processo extrativo, a qual foi recuperada e reutilizada na extração subsequente, sendo realizadas um total de 26 extrações em MeOH e CH₂Cl₂ (1:1 v/v).

As partes aéreas do vegetal foram utilizadas em sua forma íntegra e fresca, sendo posteriormente transferidas para um frasco e então postas em contato com a mistura de solventes MeOH e CH₂Cl₂ (1:1 v/v) (**Figura 12**), onde o contato com o solvente extrator foi

de no máximo 25 segundos, a fim de obter-se maior seletividade no processo extrativo e extrair substâncias contidas na superfície glandular a partir da ruptura dos tricomas.

Figura 12. Lavado glandular de *E. erythropappus*



Fonte: Elaborado pelo autor

Após a extração na solução diclorometanólica, o lavado obtido foi devidamente filtrado e recuperado por evaporação-rotatória e transferido para um frasco previamente pesado. Desta forma, obteve-se 37,5 g de extrato por lavagem glandular das partes aéreas de *E. erythropappus* (LEE) (**Figura 13**).

Figura 13. Extrato por lavagem glandular das partes aéreas (LEE)



Fonte: Elaborado pelo autor

No intuito de posterior análise de seu perfil químico e atividade antiparasitária, assim como subsequente comparação de tais parâmetros com o extrato LEE, foi também realizado o preparo de um extrato etanólico de *E. erythropappus* (EEE) por meio de maceração estática a frio.

Desta forma, utilizou-se 120g de material vegetal para preparo do extrato, onde as partes aéreas desta planta foram totalmente submersas em etanol em temperatura ambiente, sendo o solvente extrator renovado após 24h (x2 400 mL). O material foi então filtrado e recuperado por evaporação-rotatória e transferido para um frasco previamente pesado, obtendo-se então 12g de material bruto (**Figura 14**).

Figura 14. Extrato etanólico de *E. erythropappus* (EEE)



Fonte: Elaborado pelo autor

3.5 FRACIONAMENTO DO EXTRATO DAS PARTES AÉREAS

Para o processamento do extrato das partes aéreas de *E. erythropappus*, foi proposto uma eluição em gradiente, devido a complexidade e diversidade de substâncias contidas nesta matriz, sendo possível desta forma a separação de metabólitos de polaridades distintas e próximas em meio a modulação da força da fase móvel. Portanto, através da cromatografia líquida à vácuo (VLC), uma técnica cromatográfica preparativa de média pressão, onde maior fluxo de solvente pode ser obtido devido ao vácuo contínuo na coluna (Hostettman, 1986), realizou-se a separação de 20 g do extrato por VLC.

A coluna foi preenchida com 3 partes de sílica de 40-63 μ m (300 g) e 1 parte de sílica de 60-200 μ m (100 g) de tamanho de partícula (**Figura 15**). Para maior adesão do empacotamento, 40 g de sílica 60H foi adicionada além da mistura (400 g) previamente feita.

Figura 15. Separação do extrato por lavagem glandular de *E. erythropappus*



Fonte: Elaborado pelo autor

No intuito de obter-se maior uniformidade da separação, a amostra foi incorporada ao celite e então a pastilha formada com a evaporação do solvente, adicionada ao topo da sílica. Desta forma, a corrida cromatográfica foi realizada em um gradiente linear de Hex/AcOEt, gradualmente aumentando-se a força cromatográfica em proporções de 5%-10%-15%-30%-50%-70%-100%.

3.6 IDENTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS ISOLADAS

Em propósito de identificação das substâncias isoladas, foram realizados experimentos de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H) carbono 13 (RMN de ^{13}C), e DEPT- 135, assim como em espectroscopia no infravermelho. As análises das amostras foram realizadas em um espectrômetro de RMN de 500 MHz, onde CDCl_3 e dimetilsulfóxido deuterado ($\text{DMSO}-d_6$) foram utilizados como solvente para os experimentos de RMN para (1) e (2), (3) respectivamente. Sinais residuais de solventes não deuterados foram utilizados como padrão interno.

3.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA *IN VITRO* FRENTE AO *S. MANSONI*

Estes ensaios foram realizados na Faculdade de Ciências de Guarulhos (FACIG), com a colaboração do Prof. Dr. Josué de Moraes, utilizando como base metodologias previamente publicadas pelo grupo (Pereira *et al.*, 2021; Queiroz *et al.*, 2021). Os ensaios *in vitro* com

vermes adultos de *S. mansoni* foram realizados com machos e fêmeas acasalados (Pereira *et al.*, 2021; Queiroz *et al.*, 2021). Os pares de vermes obtidos dos hamsters por perfusão serão lavados 2 vezes com o meio RPMI 1640 contendo penicilina 200 U/ml, estreptomicina 200 µg/mL e anfotericina B 2 µg/mL.

Posteriormente, os parasitas acasalados foram transferidos em placas para cultura de células com 24 poços contendo, por poço, 1 casal de vermes em 2 mL do meio RPMI 1640 supracitado, porém suplementado com 10% de soro fetal bovino e tamponado com HEPES 25 mM. Os vermes serão incubados com as amostras (derivados oxidados, em diferentes concentrações). Praziquantel (PZQ, 1 µM) foi utilizado como controle positivo e poços contendo somente meio de cultura serão usados como controle negativo (Pereira *et al.*, 2021; Queiroz *et al.*, 2021). As culturas de vermes adultos serão monitoradas por microscopia.

Para avaliar a atividade das amostras sobre o *S. mansoni* foram considerados os seguintes parâmetros: atividade motora (motilidade), alterações morfológicas no tegumento e a capacidade reprodutiva. A mortalidade dos vermes será julgada pela ausência de movimentos durante 2 minutos ou quando tocados com uma pinça (Pereira *et al.*, 2021; Queiroz *et al.*, 2021). As amostras que apresentaram atividade em *S. mansoni* serão avaliadas quanto a toxicidade em células de mamífero, utilizando testes rápidos colorimétricos e/ou fluorimétricos, como descrito pelo grupo (Pereira *et al.*, 2021; Queiroz *et al.*, 2021).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 SELETIVIDADE NA EXTRAÇÃO POR LAVAGEM GLANDULAR DAS PARTES AÉREAS DE *E. ERYTHROPAPPUS*

Tricomas glandulares (TGs) são estruturas epidérmicas especializadas, as quais diversos metabólitos comumente relacionados a defesa química contra herbivoria, infecções patogênicas, e exposição à radiação U.V., encontram-se sintetizados e armazenados (Yang *et al.*, 2023). Dentre tais metabólitos, derivados do isopreno pouco voláteis como os triterpenoides, também são descritos majoritariamente acumulados nos TGs das partes aéreas em algumas espécies da família Asteraceae, como a *Artemisia annua*, os quais além de compor a cutícula, uma camada hidrofóbica que garante a proteção do vegetal em condições de estresse do meio, são descritos por uma ampla gama de bioatividades (Moses *et al.*, 2015).

Nesta óptica, a extração por lavado glandular empregada como metodologia para obtenção do extrato de *E. erythropappus*, sendo um breve contato com o solvente a cada

extração é preconizado, o que por sua vez poderia levar a um enriquecimento destes tipos estruturais em meio a ruptura dos tricomas presente nas partes aéreas deste vegetal. A mistura de solventes $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1:1, v/v) utilizada como solução extratora foi mantida em contato com o material vegetal por até 25 segundos, sugerindo o maior direcionamento na extração apenas de substâncias armazenadas no tricomas da matriz vegetal utilizada.

Além disso, a partir de 1,2 kg de partes aéreas de *E. erythropappus* obteve-se 37,5 g de extrato, onde o rendimento do extrato em termos de peso seco foi de 3,125%. Comparou-se também neste trabalho LEE com um extrato obtido por maceração estática em etanol (EEE) da mesma planta, onde maior rendimento em termos de peso seco (10,0%) pode ser obtido. No entanto, isto poderia ser sugestivo de uma maior seletividade na extração de metabólitos contidos em estruturas de armazenamento previamente descritas, melhor evidenciado através da anotação de substâncias por meio da análise de dados de MS/MS obtidos.

Em meio ao seu uso na medicina tradicional, a caracterização química de constituintes bioativos do óleo essencial desta planta, encontra-se amplamente descrita, onde junto da presença majoritária de α -bisabolol, outros promissores metabólitos como o β -bisaboleno por seu potencial como adjuvante a ampicilina em infecções por *Staphylococcus aureus* (Silvério *et al.*, 2013), assim como a lactona sesquiterpênica eremantina, em meio as propriedades esquistossomicidas em vermes trematódeos de *S. mansoni* (Baker *et al.*, 1972), são também relatados na fração volátil deste vegetal.

Ainda amparado pelo uso etnomedicinal de *E. erythropappus*, a investigação de metabólitos contidos no extrato por lavagem glandular das partes aéreas, levou a anotação isoprenoides e flavonóides majoritariamente e um derivado de fenilpropanóide. Além disso, maior conhecimento pertinente aos constituintes desta matriz foram obtidos pela identificação de friedelina (**1**), previamente isolada na espécie, assim como o lupanoide ácido betulínico (**2**), observado em outras espécies do gênero, como *Eremanthus veadeiroensis* (Sacilotto *et al.*, 2002), e flavona acacetina (**3**) previamente descritas em outros vegetais de Lychnophorinae (Keles *et al.*, 2010). Em meio a uma revisão realizada neste trabalho (**Tabela 1.**), não foram encontrados relatos de ambas as substâncias (**2**) e (**3**) substância nesta matriz vegetal, nem tão pouco a obtenção através da metodologia proposta.

Tabela 1. Extratos e metabólitos de *E. erythropappus*

Material vegetal	Extrato	Metabólitos	Referência
------------------	---------	-------------	------------

Flores e folhas de <i>Eremanthus erythropappus</i>	Maceração em EtOH- Partição em CH ₂ Cl ₂	Fitol	Cantuária, 2018
Tronco de <i>Eremanthus erythropappus</i>	Percolação em hexano	Friedelina, friedelanol, eremantina, bisabolol	Baker <i>et al.</i> , 1972
Partes aéreas de <i>Eremanthus erythropappus</i>	Maceração em hexano	15-Desóxi-goyazensolido	Vichnewski <i>et al.</i> , 1976
Bugalhos do tronco <i>Eremanthus erythropappus</i>	Maceração em metanol	Taraxasterol, β -amirona, tricosano	Jorge <i>et al.</i> , 2022
Tronco de <i>Eremanthus erythropappus</i>	Percolação em Hexano	α -ciclocostunolido, eremantina, 4,15- α - epoxieremantina, 9,10- α - epoxieremantina, dehidrocostuslactona, costunolido, reinosina, santamarina, magnolialido, arbusculina A, 4-epi- arbusculina A, trifloculosido, estafiatona e eregogazina	Lima <i>et al.</i> , 1985
Flores e folhas de <i>Eremanthus erythropappus</i>	Maceração em EtOH- Fase hidroalcoólica (aquosa remanescente)	Quercetina e rutina	Cantuária, 2018
Folhas de <i>Eremanthus erythropappus</i>	Maceração em EtOH- Partição em hexano	β -cariofileno, óxido de cariofileno, aristoleno, friedelina, β -amirenol, acetato de α -amirenol	Soares <i>et al.</i> , 2011

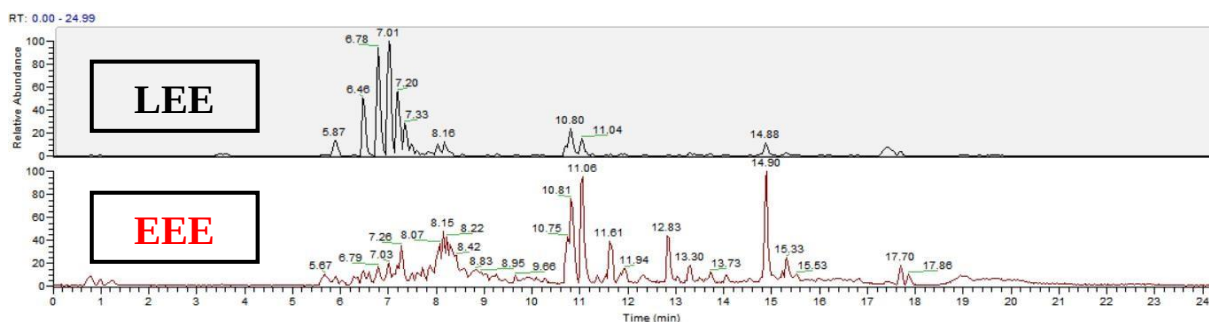
Fonte: Elaborado pelo autor

4.2 ANÁLISE POR UHPLC-ESI-MS/MS DE EXTRATOS DE *E. ERYTHROPAPPUS*

Em meio ao sucinto conhecimento em relação ao perfil químico na matriz vegetal de *E. erythropappus*, uma análise untargeted de LC-MS/MS foi utilizada como estratégia para anotação de substâncias, onde os modos de ionização positivo (**Figura 16**) e negativo (**Figura 17**) foram aplicados para investigação dos extratos desta planta. Além disso, 16 metabólitos foram tentativamente anotados através da análise inicial de dados espectrais usando a plataforma Global Natural Product Social Molecular Networking (GNPS), na qual

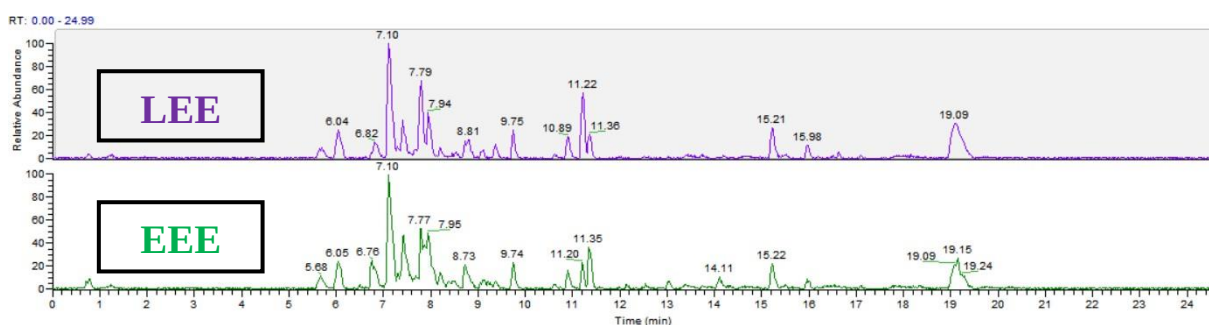
os hits obtidos foram posteriormente verificados manualmente quanto ao seu padrão de fragmentação pela interpretação dos dados de MS/MS, validando então substâncias propostas.

Figura 16. UHPLC-ESI-MS/MS extratos de *Eremanthus erythropappus* em modo positivo



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 17. UHPLC-ESI-MS/MS de extratos de *Eremanthus erythropappus* em modo negativo



Fonte: Elaborado pelo autor

Lactonas sesquiterpênicas (LSTs) são frequentemente relatadas para espécies de candeia (ex: *Eremanthus erythropappus*), as quais comumente apresentam uma porção reativa α -metileno- γ -butirolactona, onde relatos substanciais na literatura relacionam esta a uma maior e seletiva toxicidade para parasitas unicelulares, levando a uma notável atividade antiparasitária de tais tipos estruturais (Schmidt, 2018). Dentre esses isoprenóides, as LSTs do tipo furanoheliangolído puderam trazer maior discernimento em relação à química de ambos os extratos LEE e EEE.

Os íons precursores em m/z 361 $[M+H]^+$ e m/z 375 $[M+H]^+$, detectados apenas no extrato LEE, foram relacionados respectivamente a ionização de goyazensólido (4) e centraterina (5) (**Anexos, Tabela 2.**), onde íons produto observados trouxeram um padrão de fragmentação característico relatado para esses sesquiterpenóides, como uma perda neutra inicial de H_2O (-18 Da) sugestivo de um grupo hidroxila em C-15 atribuído a íons fragmento em m/z 343 (4) e m/z 356 (5), seguido de eliminação da carboxila $[M+H-R-CO_2H]$ do íon precursor resultando no mesmo íon fragmento em m/z 275 para (4) e (5), o que sugere por sua vez diferentes substituintes na carboxila. Fragmentos subsequentes foram relacionados a perdas consecutivas de unidades CO (-28 Da) e H_2O (-18 Da) (Crotti *et al.*, 2005). Além disso, uma via de fragmentação adicional levando a um íon acílio em vez da perda direta de $[M+H-R-CO_2H]$ foi descrita por Crotti e colaboradores (Crotti *et al.*, 2005), o que é sugestivo de Budleina A, um isômero de (5), apresentando um íon fragmento em m/z 83 de maior abundância relativa favorecido nesta via de fragmentação secundária, onde a ausência desse íon fragmento nos dados espectrais obtidos leva a maior evidência de centraterina como substância proposta (**Anexos, Tabela 2.**).

O lichnofolído (6), outra lactona do tipo furanoheliangolído, foi também anotada em meio às análises de ambos os extratos de *E. erythropappus* (**Anexos, Tabela 2.**). Após a formação do íon precursor m/z 359 $[M+H]^+$, procedeu-se um padrão de fragmentação característico desses metabólitos, como por exemplo, a eliminação direta $[M+H-R-CO_2H]$ da molécula protonada em m/z 259 (Crotti *et al.*, 2005). Os íons produto subsequentes são atribuídos a perdas consecutivas de unidades de H_2O (m/z 241) e CO (m/z 185, m/z 213), igualmente observadas para goyazensólido e centraterina previamente descritas.

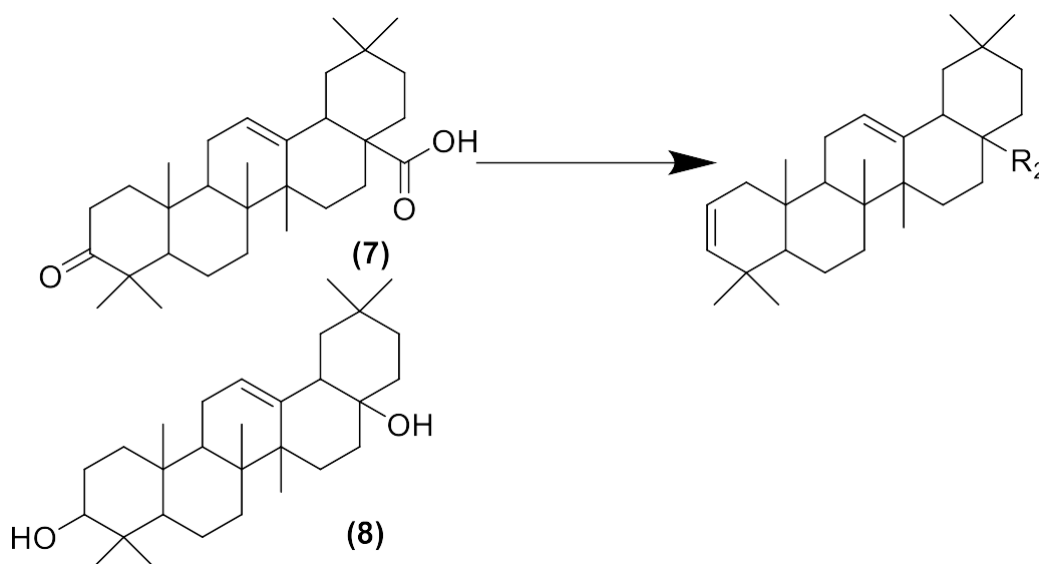
Assim como em outras espécies brasileiras da tribo Vernonieae, tais lactonas sesquiterpênicas foram também previamente descritas em *E. erythropappus* (Gallon *et al.*, 2018). No entanto, os dados obtidos apontaram (4) e (5) apenas para o extrato de LEE, o que juntamente com outros metabólitos anotados, como triterpenóides do tipo oleanano, trazem respaldo adicional de uma seletividade envolvendo a extração de metabólitos contidos em tricomas glandulares.

A ionização em modo positivo também levou à detecção de alguns triterpenóides pentacíclicos, tais como do tipo oleanano, ursano, lupano e friedelano. Embora alguns desses isoprenóides de 30 carbonos contenham átomos de hidrogênio ácidos (ex: ácido betulínico), o que por sua vez poderia trazer uma maior sensibilidade à geração de íons precursores no modo de ionização negativa (Yang *et al.*, 2007, Sun *et al.*, 2019), respectivos íons produto

foram melhor visualizados no modo positivo, permitindo a anotação dos metabólitos através da investigação de seu padrão de fragmentação nos dados MS/MS obtidos.

Entre os oleanóides, o composto (7) apresentou atribuições semelhantes às relatadas na literatura (Sun *et al.*, 2019), o que possibilitou a anotação de ácido oleanônico no extrato LEE $[M+H]^+$ em m/z 455. A detecção de um sinal devido à perda neutra de água do íon precursor $[M+H-H_2O]^+$ em m/z 437, foi prontamente observado no que se acredita estar relacionado a remoção do substituinte C-3 levando a formação de um alceno, como visto para outros triterpenos pentacíclicos do tipo oleanano (**Figura 18**) (Uddin *et al.*, 2021). O alceno resultante da primeira desidratação poderá então sofrer uma segunda perda de água observado pelo íon fragmento em m/z 419, levando à formação de um íon acílio em C-28, cuja a eliminação posterior é detectada pela eliminação de uma unidade de CO (m/z 409) (**Anexos, Tabela 2.**).

Figura 18. Fragmentação de triterpenos pentacíclicos



Fonte: Adaptado de Sun *et al.*, 2019

Adicionalmente, perdas neutras, as quais são relacionadas a uma projeção da diferença entre o íon precursor e o íon produto, são uma maneira útil de detectar espécies específicas e confirmar dados de MS/MS (Aisporna *et al.*, 2022). Desta forma, tais fragmentos neutros são comumente observados em triterpenóides pentacíclicos, como descrito por Sun e colaboradores (Sun *et al.*, 2019) para eritrodíol na eliminação de um grupo metileno (-14 Da) procedida após uma segunda perda de H₂O, similarmente visto para o composto (7) levando a formação do íon em m/z 395 (**Anexos, Tabela 2.**).

Como descrito acima, o mecanismo de fragmentação em modo positivo de triterpenos pentacíclicos geralmente envolve a quebra da ligação do substituinte C-3 diretamente de seu

íon molecular (ex: cetona, hidroxila ou grupo éster) (**Figura 18**), e fragmentações subsequentes, originam desta forma íons fragmento diagnósticos para tais substâncias (Uddin *et al.*, 2021). Neste contexto, o oleanóide eritrodiol detectado m/z 443 $[M+H]^+$ (**8**) (**Anexos, Tabela 2.**), demonstrou prontamente uma perda inicial característica de H_2O do íon precursor $[M+H-H_2O]$ evidenciada por um íon fragmento em m/z 425, sugestivo de um grupo hidroxila em C-3. Além de uma eliminação característica de um grupo metileno do íon precursor em m/z 411, fragmentos seguintes em m/z 237 ($C_{16}H_{27}O^+$) e m/z 197 ($C_{13}H_{21}O^+$), sugerem a possível ocorrência de um mecanismo do tipo retro-Diels-Alder (RDA) no anel C.

Além disso, o uvaol triterpenóide tipo ursano (**9**) foi detectado em ambas as matrizes investigadas por *E. erythropappus* (extratos LEE e EEE). A análise dos dados de MS/MS (**9**) levou a atribuições semelhantes de (**8**), além do mesmo íon precursor (**Anexos, Tabela 2.**). Ambos os metabólitos podem ser diferenciados como isômeros de posição devido à sua respectiva razão de abundância de isótopos de íons precursores, como descrito anteriormente por Sun e colaboradores (Sun *et al.*, 2019). Portanto, o eritrodiol (**8**) é descrito com uma razão de abundância de 2:1, enquanto o íon precursor do uvaol m/z 443 $[M+H]^+$ obtido nos dados de MS/MS apresentou uma razão de abundância de $> 2:1$, como mostrado nos dados espectrais obtidos (**Anexos**).

Friedelina (**1**), uma cetona triterpênica do tipo friedelano, foi também detectada dentre os terpenóides pentacíclicos anotados. Neste contexto, os espectros de MS permitiram a detecção de um íon precursor em m/z 427 $[M+H]^+$, relacionado à friedelina protonada (**Anexos, Tabela 2.**). Além disso, o perfil de fragmentação obtido pelas análises do espectro de MS/MS obtido, encontrou-se em concordância com as atribuições feitas por Naumoska e colaboradores (Naumoska *et al.*, 2015), onde íons fragmento característicos foram detectados, como a eliminação de H_2O do íon molecular em m/z 409, relacionada à quebra da cetona em C-3.

Triterpenóides do tipo lupano, diferente de isoprenoides descritos anteriormente, apresentam um anel E de cinco membros ligado a um grupo alílico em seu núcleo pentacíclico (Dewick, 2009). Em relação a essa classe de metabólitos, o ácido betulínico (**2**), no qual são relatadas notáveis bioatividades, como seu potencial antiparasitário proeminente frente a vermes adultos de *S. mansoni* (Spivak *et al.*, 2014), foi também identificado em ambos os extratos LEE e EEE (**Anexos, Tabela 2.**).

Os espectros de MS/MS de (**2**) trazem uma proeminente perda de H_2O do íon precursor m/z 457 $[M+H]^+$ em m/z 439 $[M+H-H_2O]^+$, diagnóstico de uma hidroxila como substituinte em C-3, como previamente descrito nestes lupanoides (Yang *et al.*, 2007, Sun *et al.*, 2019). A

formação do alceno $[M+H-H_2O]^+$, semelhante a triterpenos do tipo oleanano (**Figura 18**), prosseguiu com uma segunda eliminação de água do grupo carboxila C-28 resultando no íon fragmento em m/z 421, na qual após a formação do íon acílio, procedeu com a eliminação da unidade de CO resultando no íon fragmento em m/z 393.

Hits obtidos após análise inicial no GNPS em modo negativo consistiram fundamentalmente em substâncias de caráter redutor, majoritariamente flavonoides como flavonóis e flavonas e seus glicosídeos, assim como um derivado de fenilpropanóide. O potencial antioxidante dos extratos de candeia-da-serra foi avaliado em relatos da literatura por ensaios como o DPPH, poder redutor de Fe^{+3} e β -caroteno/ácido linoléico (Del-Vechio-Vieira *et al.*, 2017), onde a triagem fitoquímica através da reação com diferentes reagentes para detecção de compostos e análise estatística, mostrou pronunciado efeito sequestrador de radicais livres quando flavonoides e outros fenólicos foram encontrados majoritariamente nos extratos.

Neste contexto, a flavona apigenina (**10**) foi tentativamente anotada (**Anexos, Tabela 2.**), em meio à detecção de alguns fragmentos principais após o íon precursor $[M-H]^-$ m/z 269, como a perda inicial da unidade de CO em m/z 240, atribuída à fragmentação do anel C devido à eliminação do grupo carbonila, como visto para demais flavonas (ex: luteolina) (Fabre e Rustan, 2001). Outro íon produto foi detectado em m/z 227, que semelhante a outras flavonas contendo uma hidroxila em C-4', procedeu com a eliminação de uma unidade C_2H_2O (-42Da) do íon precursor $[M-H]^-$, em um mecanismo semelhante ao descrito por Ma e colaboradores (Ma *et al.*, 1997), onde a fragmentação do anel C leva a uma nova ciclização envolvendo o anel B. Além disso, uma perda subsequente de CO_2 do íon $[M-H-C_2H_2O]$ leva a outro fragmento comum relatado em m/z 181, onde ocorre contração do anel A, seguida por uma quebra mediada por reação de retro-Diels-Alder, dando origem a mais um fragmento característico em m/z 151 (Fabre e Rustan, 2001, Hvatum, 2004).

Flavonóis, metabólitos secundários que apresentam uma fração α -hidroxicetona no anel C do núcleo flavonoídico, também foram detectados. Em relação a tais produtos biossintéticos, o derivado O-glicosídeo de quercetina, isoquercetina (**11**) m/z 463 $[M-H]^-$ (**Anexos, Tabela 2.**), apresentou íons fragmento típicos, como por exemplo, visto em m/z 301 atribuídos à perda neutra de uma hexose (-162Da) do íon precursor $[M-H]^-$, liberando assim sua aglicona como produto (Lu *et al.*, 2013).

Fragmentos subsequentes foram atribuídos à fragmentação da quercetina $[M-H-C_6H_{12}O_6]^-$, apresentando íons produto correspondentes aos relatados por Fabre e Rustan (Fabre e Rustan, 2001), o que sugere um mesmo mecanismo de fragmentação, onde uma

eliminação inicial de CO ocorre por quebra e contração do anel C dando o íon fragmento em m/z 271, também relatado em um estudo envolvendo quantificação de (11) e seu isômero estrutural hiperosídeo (Zhou *et al.*, 2011). Outras atribuições realizadas relacionam-se à eliminação de CO₂ em m/z 257, ocorrendo também no anel C, gerando uma estrutura semelhante a de estilbenos com uma ligação dupla cis diaril substituída, seguido por uma RDA resultando no íon fragmento em m/z 151.

Isorhamnetina-3-O-galactosídeo (12) foi tentativamente anotado devido a íons fragmentos característicos desta substância nos dados de MS/MS obtidos, como a ruptura proeminente da porção glicosídica do íon precursor aniônico m/z 477 [M-H]⁻, resultando em m/z 315 como fragmento [M-H-C₆H₁₂O₆]⁻ relacionado à aglicona livre (Ruiz *et al.*, 2014). Como relatado para outros compostos do tipo flavonol, propusemos que da mesma forma, a perda de grupo metila (-15Da) também é observada para a isorhamnetina (aglicona livre), levando à detecção do íon produto em m/z 300. Além disso, alguns outros fragmentos característicos em m/z 271 e m/z 256, são sugestivos de perdas de CO, CO₂ respectivamente, seguido de uma retro-Diels-Alder levando ao íon fragmento em m/z 151, o que por sua vez fornecem evidências adicionais de (12) como flavonol proposto (**Anexos, Tabela 2.**).

Derivados dissacarídicos de tais substâncias foram também detectados nas matrizes investigadas. Kaempferol, um flavonol comumente relatado para várias espécies vegetais e com grande importância dentro do campo nutracêutico (Georgiev *et al.*, 2014), foi detectado como seu derivado glicosídico Kaempferol-7-O-neohesperidosídeo (13) m/z 593 [M-H]⁻, onde pela análise dos dados espectrais de MS/MS obtidos, resultados consistentes com as atribuições feitas por Sánchez-Rabaneda e colaboradores (Sánchez-Rabaneda, *et al.*, 2003) foram alcançados (**Anexos, Tabela 2.**).

No entanto, a literatura relata fragmentação direta da porção glicosídica como um dissacarídeo (-308Da) levando ao íon produto m/z 285 de kaempferol livre (Sánchez-Rabaneda, *et al.*, 2003), enquanto aqui descrevemos uma perda consecutiva de deoxihexose (-146Da) e uma hexose (-162Da), resultando respectivamente em íons fragmento em m/z 447 e m/z 285 do íon precursor [M-H]⁻, no qual este último íon (m/z 285) apresentou maior abundância relativa. Vale ressaltar que uma energia de colisão mais branda na dissociação molecular (30 v) foi usada neste trabalho em relação à literatura reportada, o que pode ter sido fundamental para essa diferença detectada. Evidências adicionais para o composto proposto (13) puderam ser obtidas, uma vez que alguns íons principais de fragmentação de sua aglicona foram detectados, tais como eliminação de unidade de CO (m/z 256) e perda de CO₂ (m/z 240), também diretamente da aglicona (m/z 285), seguido por uma segunda unidade de CO

(m/z 212) como fragmento do íon produto anterior $[M-H-CO_2-CO]^-$ (Fabre e Rustan, 2001, Sánchez-Rabaneda, *et al.*, 2003).

Flavonoides C-glicosídeos são comumente relatados, entre outras agliconas, por ocorrer em compostos do tipo flavona. Em uma revisão sobre a química e a ocorrência biossintética de metabólitos naturais contendo C-glicosídeos (por exemplo, flavonoides, xantonas, cromonas), Franz e Grün (Franz e Grün, 1983) delinearam um padrão de substituição um tanto sistemático de ocorrência da ligação C-C com a porção do açúcar nas posições 6 e 8 do anel A, quando estes são encontrados orto e para a hidroxilas fenólicas (ou seja, em C-5 e C-7). Isso pode estar relacionado a uma maior nucleofilicidade trazido por grupos orto/para-orientadores nessas posições (C-5 e C-7), embora a proposição de uma via biossintética clara para esta C-glicosilação ainda não se encontre relatada até o momento.

Nesse sentido, a flavona Vicenina-II (**14**) foi proposta como substância anotada no decorrer da verificação de dados espectrais de MS/MS (**Anexos, Tabela 2.**). Atribuições semelhantes a Silva e colaboradores (Silva *et al.*, 2014) foram feitas, como íons produto relacionados à fragmentação de hexoses em m/z 473 (-120Da) diretamente do íon precursor e em m/z 353 (-120Da) relacionado a fragmentação do íon anterior.

De acordo com a literatura relatada a (**14**), íons fragmento menos abundantes detectados foram sugestivos de mecanismos de fragmentação secundários (Silva *et al.*, 2014). Neste contexto, em m/z 502 devido à fragmentação do açúcar em C-6 diretamente do íon precursor, a fragmentação subsequente da hexose em C-8 poderá levar a duas possíveis quebras, ilustradas pela geração dos íons produto m/z 413 e m/z 383. Deve-se ressaltar que nenhuma ligação C-glicosídeo resultou na aglicona livre ao longo da via de fragmentação relatada, como visto para perdas neutras de hexoses (-162 Da) em derivados de O-glicosídeos de flavonas, o que pode ser devido a diferenças de eletronegatividade e labilidade entre as ligações C-C e C-O.

Além disso, o íon precursor aniônico em m/z 283 $[M-H]^-$ sugeriu a presença da 5,7-hidroxiflavona acacetina (**3**) (**Anexos, Tabela 2.**). Íons fragmentos apontaram perdas características para este flavonoide, tais como a eliminação de CH_3 (-15Da) do grupo metoxi em C-4' em m/z 268 (Yin *et al.*, 2019). Adicionalmente, este flavonoide (**3**) foi isolado do extrato por lavagem glandular de *E. erythropappus* (LEE), o que traz maior validação aos dados de fragmentação de MS/MS descritos para (**3**).

Luteolina (**15**) m/z 285 $[M-H]^-$, entre outras flavonas, foi também anotada nas matrizes de *E. erythropappus* analisadas (**Anexos, Tabela 2.**). Um padrão de fragmentação semelhante aos relatados em trabalhos envolvendo quantificação deste composto em plasmas de

camundongos foi detectado após análise de dados espectrais (Cheruvu *et al.*, 2018), como uma perda inicial de unidade de CO levando ao íon fragmento em m/z 257 do íon precursor $[M-H]^-$ devido à fragmentação do anel C.

Fragmentos adicionais foram concordantes com aqueles relatados por Fabre e Rustan (Fabre e Rustan, 2001), que também sugeriram uma série de possíveis mecanismos de fragmentação para esse metabólito, tais como, ao contrário da eliminação inicial de uma unidade de CO, ocorrer uma eliminação da unidade C_2H_2O do íon precursor $[M-H-C_2H_2O]^-$ em m/z 243, seguida de perda de CO_2 em m/z 241 levando à retrociclicização do anel C e contração do anel A. A eliminação de uma unidade de CO_2 a partir do íon em m/z 243 também foi detectada, dando o íon produto m/z 199. Além disso, o íon fragmento em m/z 217 pode ser atribuído a uma eliminação de C_3O_2 diretamente do íon precursor $[M-H-C_3O_2]^-$, sendo por sua vez sugestiva de outro possível mecanismo mencionado. Portanto, a comparação da literatura permitiu anotar a luteolina como substância proposta.

Outro conjunto de metabólitos detectados nos dados adquiridos de MS foram os do tipo di-*O*-cafeoilquínicos. A cinarina foi inicialmente obtida como metabólito atingido em análises preliminares da biblioteca GNPS em ambos os extratos de LEE e EEE, porém nossa investigação da fragmentação de MS/MS, encontrava-se de acordo com um de seus isômeros, o ácido 3,5-di-*O*-cafeoilquínico (**16**).

Uma unidade cafeoila foi prontamente detectada como íon fragmento (m/z 353) do íon precursor $[M-H]^-$ em m/z 515, seguida por outra perda da segunda unidade cafeoila, como mostrado pelo íon produto em m/z 191 (**Anexos, Tabela 2.**). Embora a primeira eliminação do substituinte cafeoila seja mais proeminente devido a uma maior abundância relativa desta entre todos os outros íons do produto, a eliminação da segunda unidade pode estar ocorrendo rapidamente, como descrito por relatos anteriores (Wu *et al.*, 2007).

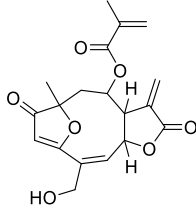
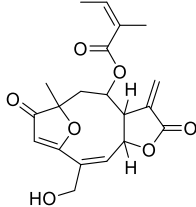
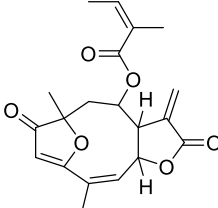
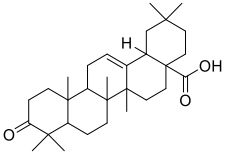
No entanto, alguns outros íons fragmentos menos abundantes levaram a possíveis atribuições, como perdas de água em m/z 335 e CO_2H em m/z 291 após a eliminação da primeira unidade de cafeoila, ocorrendo diretamente do núcleo de ácido quinínico.

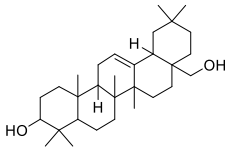
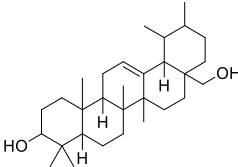
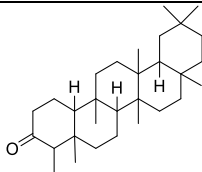
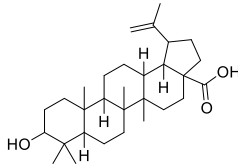
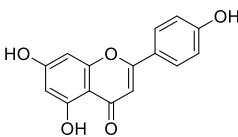
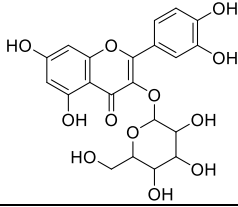
O modo negativo mostrou alguns metabólitos notáveis não relatados para extratos de *E. erythropappus*, como (**13**), além do C-glicosídeo Vicenina-II (**14**) detectado apenas no extrato etanólico (EEE), o que pode sugerir uma extração favorecida de metabólitos mais polares, porém esta afirmação seria de natureza especulativa, no sentido de que mais investigações seriam necessárias.

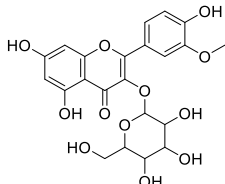
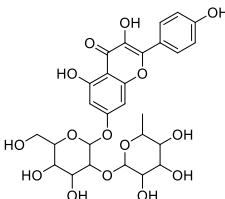
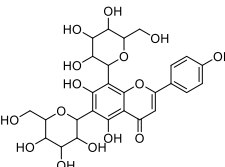
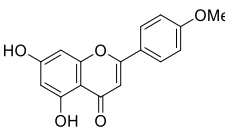
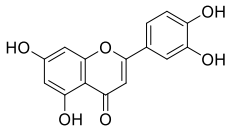
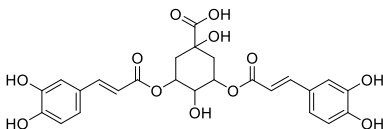
No entanto, a análise de UHPLC-ESI-MS/MS em modo positivo trouxe maiores características distinguíveis entre os extratos de LEE e EEE, onde substâncias (**4**), (**5**), (**7**), (**8**)

relacionados à defesa da planta foram apenas detectadas no extrato LEE, implicando que um conteúdo mais rico de lactonas sesquiterpênicas e triterpenóides pentacíclicos poderia ser obtido ao aplicar-se um método de extração por lavagem glandular, obtendo-se seletivamente metabólitos contidos em tricomas glandulares. Além disso, substâncias isoladas trazem maior respaldo a esta hipótese, assim como contribuem para maior conhecimento pertinente a química desta espécie, onde metabólitos não previamente relatados puderam ser obtidos.

Tabela 2. Substâncias anotadas em extratos de *E. erythropappus* (LEE e EEE) por análise em UHPLC-ESI-MS/MS

<i>Extrato de E. erythropappus</i>	$[M+H]^+$ (m/z)	$[M-H]^-$ (m/z)	Formula Molecular	MS/MS (MS ²)	Substância Proposta	Referência	Estrutura Química
LEE	361	-	C ₁₉ H ₂₀ O ₇	343, 275, 257, 229, 211, 201, 179, 133	Goyazensolido (4)	Crotti <i>et al.</i> , 2005	
LEE	375	-	C ₂₀ H ₂₂ O ₇	356, 275, 256, 229, 211, 199	Centraterina (5)	Crotti <i>et al.</i> , 2005	
LEE/EEE	359	-	C ₂₀ H ₂₂ O ₆	340, 313, 276, 259, 241, 230, 213, 185,	Lychnofolido (6)	Crotti <i>et al.</i> , 2005	
LEE	455	-	C ₃₀ H ₄₆ O ₃	437, 419, 409, 395, 367, 323	Ácido oleanônico (7)	Sun <i>et al.</i> , 2019	

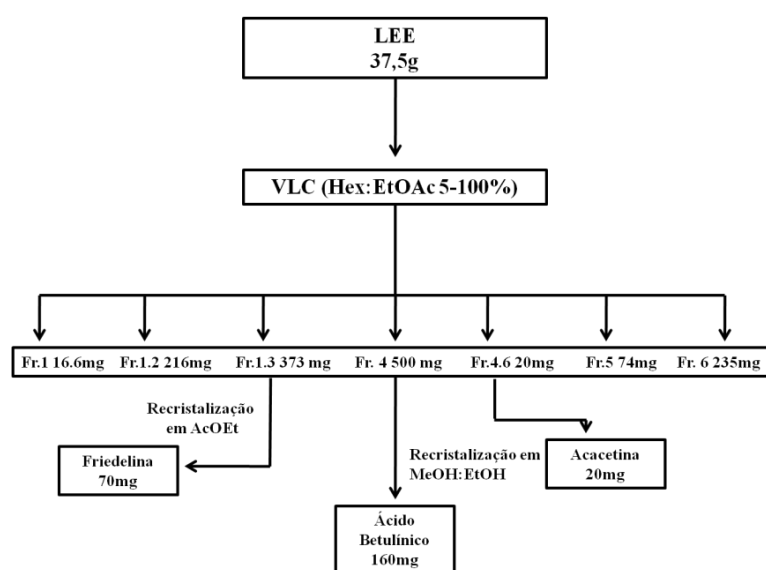
LEE	443	-	C ₃₀ H ₅₀ O ₂	425, 411, 396, 313, 285, 237, 197	Eritrodiol (8)	Sun <i>et al.</i> , 2019	
LEE/EEE	443	-	C ₃₀ H ₅₀ O ₂	425,385, 367,351, 313, 197	Uvaol (9)	Sun <i>et al.</i> , 2019	
LEE/EEE	427	-	C ₃₀ H ₅₀ O	409, 381, 368, 339, 358	Friedelina (1)	Naumoska <i>et al.</i> , 2015	
LEE/EEE	457	-	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	439, 421, 393, 369, 325, 313	Ácido betulínico (2)	Sun <i>et al.</i> , 2019	
LEE/EEE	-	269	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	240, 227, 210, 197, 181, 183 168,151, 83	Apigenina (10)	Hvattum, 2002	
LEE/EEE	-	463	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	301, 271, 257, 161, 151	Isoquercetina (11)	Lu <i>et al.</i> , 2013	
LEE/EEE	-	477	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	315, 300,	Isorhamnetina-	Ruiz <i>et al.</i> ,	

				285, 271, 256, 242, 216, 190, 151, 144	3-O- galactosideo (12)	2014	
LEE/EEE	-	593	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	447, 327, 285, 256, 240, 212	Kaempferol-7- O- neohesperidosi deo (13)	Sánchez- Rabáneda <i>et al.</i> , 2003	
EEE	-	593	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	502, 473, 413, 383, 353 311, 297	Vicenina-II (14)	Silva <i>et al.</i> , 2014	
LEE/EEE	-	283	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	268	Acacetina (3)	Yin <i>et al.</i> , 2019	
LEE/EEE	-	285	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	257, 243, 241, 217, 199, 185, 174, 168	Luteolina (15)	Cheruvu <i>et al.</i> , 2018	
LEE/EEE	-	515	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	353, 335, 291, 191 178	Ácido 3,5-di- O- caffeoilquínico (16)	Wu <i>et al.</i> , 2007	

4.3. ISOLAMENTO DE SUBSTÂNCIAS (1), (2) E (3)

Em meio à complexidade de matrizes fonte de produtos naturais, tais como extratos vegetais, foi-se proposto um fracionamento através de uma eluição em gradiente do extrato por lavagem glandular de *E. erythropappus* (LEE), onde misturas de hexano e acetato de etila em gradual aumento de polaridade foram utilizadas como fase móvel. Sucintamente, após a separação cromatográfica de 20g do extrato LEE por cromatografia líquida à vácuo (VLC), subfrações obtidas foram então reunidas quanto ao seu perfil cromatográfico em análises por cromatografia em camada delgada (CCD), dando origem a 7 frações principais (**Figura 19**).

Figura 19. Frações obtidas por VLC



Fonte: Elaborado pelo autor

Prontamente, na 1ª etapa do gradiente (Hex/AcOEt-5%) frações enriquecidas puderam ser obtidas, de forma que a partir de testes com solventes de média polaridade, a recrystalização em acetato de etila da fração 1.3 (Fr. 1.3) (200mg) (**Figura 20**) levou a obtenção de cristais de friedelina (1) (50mg) (**Figura 21**).

Figura 20. Fração 1.3



Fonte: Elaborado pelo autor

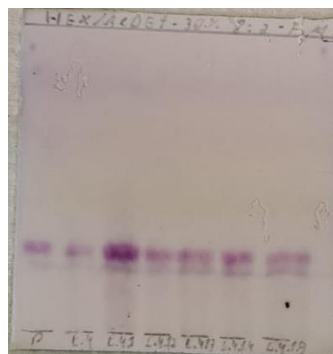
Figura 21. Cristais de friedelina



Fonte: Elaborado pelo autor

Adicionalmente, outro triterpenoide pentacíclico pode ser isolado, onde partir da 3ª etapa do gradiente (Hex/AcOEt-15%), uma mancha atribuída a este tipo estrutural pode ser observada, terminando na 4ª etapa do gradiente (Hex/AcOEt-30%). Desta forma, foram reunidas as subfrações 3.1 a 3.4, 4.0 a 4.5 referentes aos grupos de frações 3 e 4 respectivamente, levando a 895 mg de produto obtido (**Figura 22**)

Figura 22. Subfrações 3.1-4.5 da VLC



Fonte: Elaborado pelo autor

As frações obtidas (3.1-4.5) foram então submetidas a uma etapa final de purificação, onde inicialmente uma separação em cromatografia em gel de sílica foi feita, a qual foi também acompanhada por CCD, dando origem então a 34 subfrações. Dentre essas, as subfrações 17 à 23 (**Figura 23**) demonstram similaridade de perfil cromatográfico entre si, sendo desta forma reunidas e resultando em 300mg de produto obtido.

Figura 23. Subfrações 17-23 da coluna cromatográfica clássica

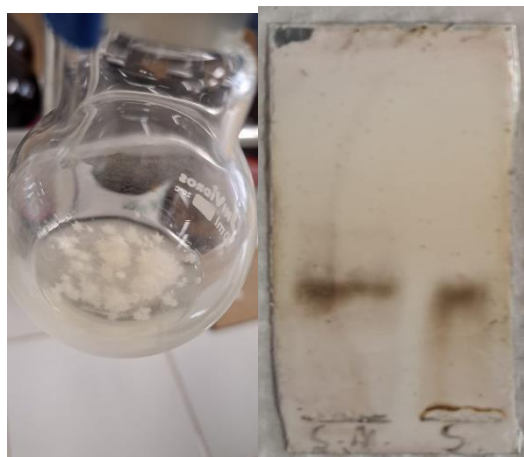


Fonte: Elaborado pelo autor

Por fim, foram conduzidos testes de solventes em alíquotas da fração purificada, a fim de resolver a co-eluição de impurezas junto ao produto obtido. Portanto, em meio a aparente apolaridade da substância, foram preconizados solventes ou misturas de solvente de média-alta polaridade.

Resultados promissores puderam ser obtidos através da mistura de solventes MeOH/EtOH (1:1, v/v). A reorganização do sólido em uma estrutura cristalina era iniciada somente no período de 24 h, formando cristais bem finos em formato de agulha, os quais por sua vez aglomeravam-se em pequenos grumos posteriormente dissociando-se no processo de filtragem do sólido cristalino. Ao final de sucessivas recristalizações, 160 mg do produto pode ser obtido, identificado posteriormente como o lupanoide ácido betulínico (2) (**Figura 24**).

Figura 24. Cristais de ácido betulínico



Fonte: Elaborado pelo autor

Além disso, a composição de Hex/AcOEt-30% (4ª etapa) como fase móvel ainda levou a obtenção de cristais amarelo pálido, nas frações 4.6 (Fr. 4.6) e 4.7 (Fr. 4.7) (**Figura 25**), estes por sua vez foram rinsados em CH_2Cl_2 para a eliminação de impurezas e então filtrados, recolhidos e colocados em um frasco previamente pesado, resultando em 20mg do que posteriormente foi identificado como a flavona acacetina (3).

Figura 25. Frações e cristais de acacetina

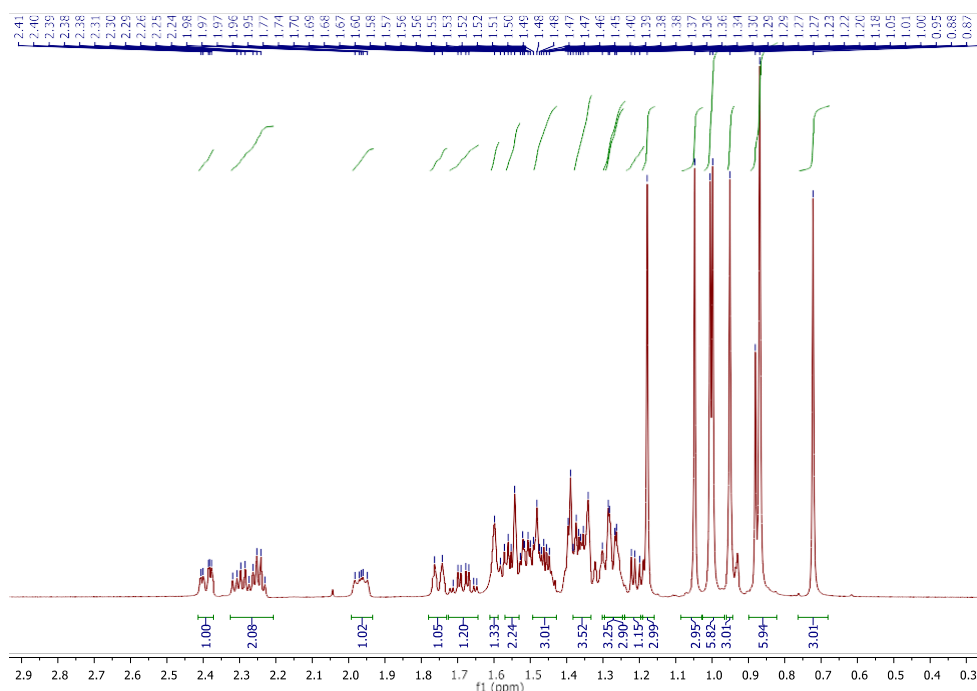


Fonte: Elaborado pelo autor

4.4. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E IDENTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS ISOLADAS

Na busca de possíveis metabólitos em *E. erythropappus*, uma revisão por Keles e colaboradores (Keles *et al.*, 2010), descreveu os terpenoides como constituintes majoritários em espécies de *Eremanthus*. Apesar da escassez de informações sobre a composição química da candeia, a **Tabela 1** reúne tais derivados do isopreno compondo a maioria dos metabólitos isolados desta matriz vegetal, onde sesquiterpenoides e triterpenoides foram principalmente obtidos dos extratos relatados.

Em relação a este grupo de metabólitos, a expansão do anel de cinco membros do esqueleto lupano, seguida por rearranjos de Wagner-Meerwein (deslocamentos de grupos alquila e hidreto), permitida por uma conformação axial-axial entre grupos envolvidos no rearranjo, originando o cátion friedenil, levando então à friedelina após oxidação subsequente (Singh *et al.*, 2023). Este friedelano (**1**), previamente relatado para *E. erythropappus* (Baker *et al.*, 1972, Jorge *et al.*, 2022), foi isolado neste trabalho, onde a comparação com a literatura levou a atribuições semelhantes em seus espectros de RMN de ^1H (**Figura 26**) e RMN de ^{13}C (**Figura 27**), permitindo a identificação da friedelina (**Figura 28**).

Figura 26: Espectro de RMN de ^1H de friedelina

Fonte: Elaborado pelo autor

Sinais de absorção na região de hidrogênios de carbonos sp^3 não ligados a heteroátomo puderam ser observados entre 0.73-1.18 ppm, respectivamente, 1.18 (3H, s), 1.05 (3H, s), 1.00 (6H, d), 0.95 (3H, s), 0.87 (6H, d), 0.73 (3H, s), o que por sua vez diz respeito ao padrão característico de 8 metilas no esqueleto fundamental de friedelanos. Além disso, a **Tabela 3** traz a comparação com atribuições feitas por Ali e colaboradores (Ali *et al.*, 2010) de forma que maior respaldo ao isolamento desta cetona triterpênica é obtido.

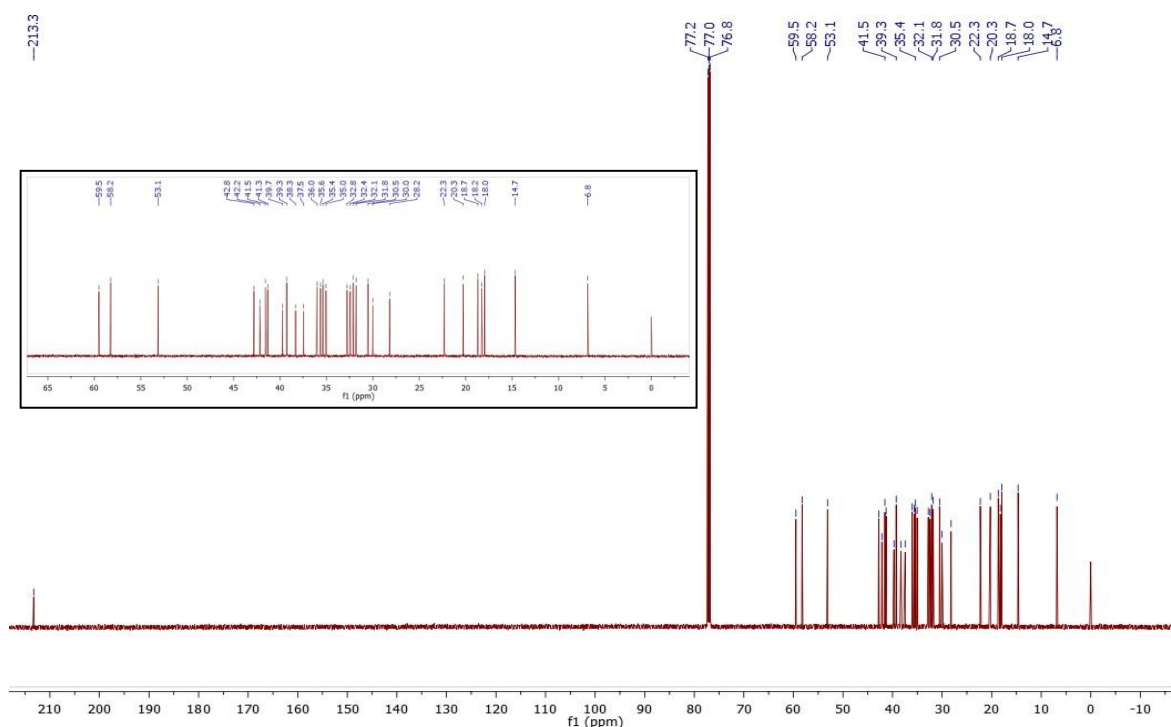
Tabela 3. RMN de ^1H e comparação com Ali *et al.*, 2010

$\delta^1\text{H}$ Isolado	$\delta^1\text{H}$ Ali et al., 2010
2.37 (1H, ddd)	2.38 (1H, m)
2.28 (2H, dq)	2.27 (2H, m)
1.95 (1H, m)	1.95 (1H, m)
1.75 (1H, d)	1.92-1.18 (m)
1.70 (1H, dqd)	-
1.60 (1H, m)	-
1.55 (2H, m)	-
1.45 (3H, m)	-
1.38 (3H, m)	-
1.26 (3H, m)	-
1.18 (3H, s)	1.16 (3H, s)

1.05 (3H, s)	1.03 (3H, s)
1.00 (6H, d)	0.99 (6H, s)
0.95 (3H, s)	0.93 (3H, s)
0.87 (6H, d)	0.86 (3H, d)
0.73 (3H, s)	0.70(3H, s)

Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 27: Espectro de RMN de ^{13}C de friedelina



Fonte: Elaborado pelo autor

Após a interpretação do espectro de RMN de ^{13}C de friedelina (**Figura 27**), observa-se prontamente a presença de 30 sinais de absorção, em sua maioria em região característica a carbonos do tipo sp^3 não ligados a heteroátomo, além de apenas 1 sinal em campo baixo referente a uma carbonila de cetona (213.3 ppm), característico a tal substituinte em C-3. A comparação feita com dados da literatura também foi realizada, demonstrando alta similaridade a atribuições feitas por Escobedo-Martinez e colaboradores (Escobedo-Martínez *et al.*, 2012) (**Tabela 4.**) possibilitando a identificação desta substância (1) (**Figura 28**).

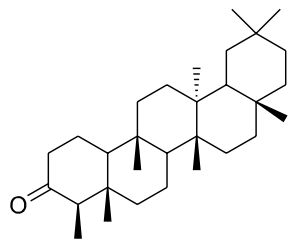
Tabela 4. RMN de ^{13}C e comparação com Escobedo-Martinez *et al.*, 2012

$\delta^{13}\text{C}$ Isolado	$\delta^{13}\text{C}$ Escobedo-Martinez <i>et al.</i> , 2012
213.3	213.33

59.5	59.5
58.2	58.24
53.1	53.12
42.8	42.81
42.2	42.16
41.5	41.54
41.3	41.31
39.7	39.72
39.3	39.27
38.3	38.31
37,5	37.46
36.0	36.03
35.6	35.64
35.4	35.36
35.0	35.04
32.8	32.79
32.4	32.44
32.1	32.1
31.8	31.79
30.5	30.52
30.0	30.1
28.2	28.18
22.3	22.3
20.3	20.27
18.7	18.67
18.2	18.25
18.0	17.96
14.7	14.67
6.8	6.83

Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 28. Friedelina

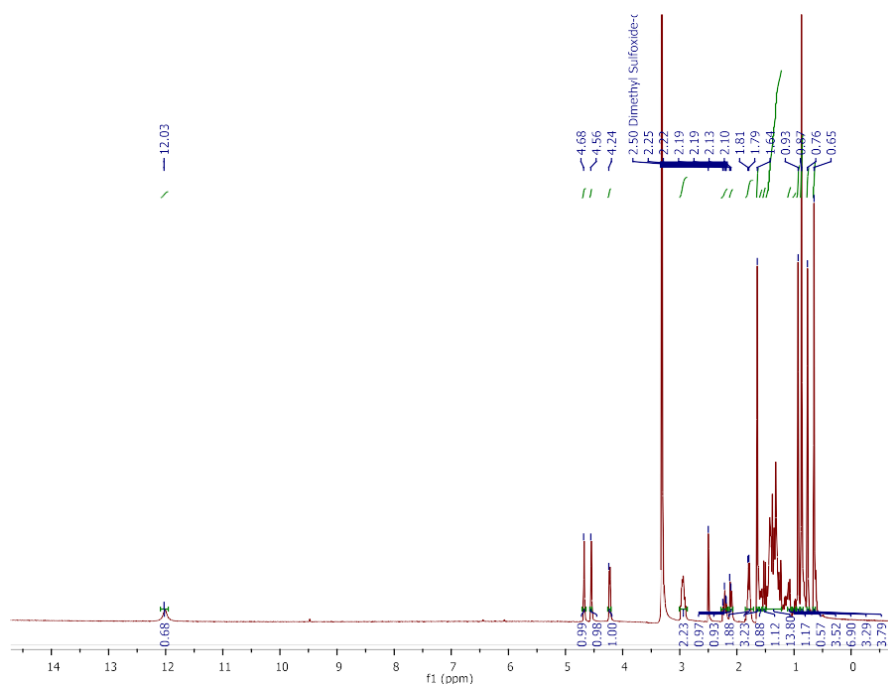


Fonte: Elaborado pelo autor

Posteriormente, após o isolamento e purificação de frações de interesse do extrato LEE (frações 17-23, 160mg), estas foram analisadas por RMN de ^1H , ^{13}C e DEPT-135, de forma que a presença de 30 sinais de absorção no espectro de ^{13}C , somado aos achados da literatura, sugeriu-se a obtenção de um triterpeno como metabólito isolado, revelando assim após as análises por técnicas espectroscópicas, a presença do ácido betulínico.

Em meio a interpretação do espectro de ^1H (**Figura 29**), alguns sinais de absorção característicos para um esqueleto do tipo lupano puderam ser observados, o que posteriormente foi confirmado por meio da comparação com atribuições descritas na literatura, chegando-se ao ácido betulínico. Inicialmente, a presença de um sinal em 12 ppm sendo este um simpleto largo (sl), sugeriu a presença de um hidrogênio de carboxila, o que corrobora nas análises de RMN de ^{13}C , onde um sinal em 177.1 ppm em região característica de carbono de ácido carboxílico foi observado. Ainda, em campo baixo, dois sinais de absorção em 4.68 e 4.56 ppm. sugerem o acoplamento entre dois hidrogênios metilênicos de olefina, podendo desta forma serem atribuídos a dupla exocíclica do esqueleto lupano, sendo observados na forma de dois simpletos devido ao pequeno acoplamento destes hidrogênios diastereotópicos. Além disso, a presença de sinais de absorção referentes a hidrogênios metílicos homotópicos de 6 metilas entre 0,65-1.64 ppm. foram observados, assim como um hidrogênio em 4.24 ppm em um sinal alargado, o que por sua vez mostrou-se pouco conclusivo ao se tratar de um hidrogênio de hidroxila, ou de um carbono carbinólico na posição 3, ambos comuns para lupanóides.

Figura 29. Espectro de RMN de ^1H do ácido betulínico

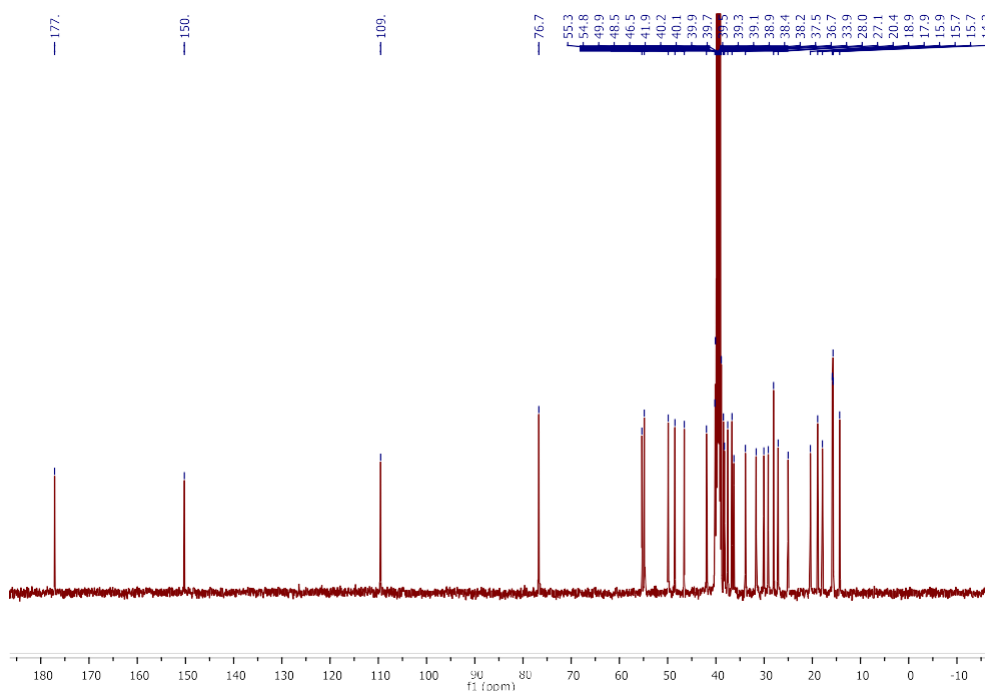


Fonte: Elaborado pelo autor

Através da análise do espectro de RMN de ^{13}C do ácido betulínico (**Figura 30**), a presença de sinais de absorção para 30 carbonos pode ser atribuída, sendo majoritariamente observados na região entre 15-55 ppm., região esta característica para carbonos de hibridização sp^3 não ligados a elementos eletronegativos. Além disso, a presença da hidroxila no carbono 3 (Dewick, 2009), traduz outra característica estrutural de triterpenos do tipo lupano, onde um sinal de absorção em 76.7 ppm. foi observado, sugestivo a um carbono sp^3 ligado a um átomo de oxigênio.

Em campo baixo, dois sinais de absorção em 109.5 e 150.2 ppm, sugerem a presença de carbonos olefínicos, atribuídos desta forma a ligação dupla exocíclica no anel de cinco membros da substância proposta assim como um sinal em região característica de carbonilas de ácido carboxílico em 177.1 ppm. Maior evidência é trazida para a identificação do ácido lupélico, através da análise do carbono-17 diretamente ligado a carboxila, o qual apesar de ser um carbono do tipo sp^3 , espera-se esse estar mais desblindado por se tratar de um carbono quaternário, e também devido ao efeito indutivo exercido pela carbonila. Logo, é razoável a sua atribuição ao sinal de absorção em 55.3 ppm observado no espectro, sendo então um carbono sp^3 mais desblindado que os demais.

Figura 30. Espectro de RMN de ^{13}C do ácido betulínico



Fonte: Elaborado pelo autor

A comparação das atribuições feitas com dados de RMN de ^1H ^{13}C e DEPT-135 descritos na literatura, foi também realizada, o que por sua vez respalda a caracterização

proposta para o ácido betulínico. A tabela a seguir (**Tabela 5**), traz a caracterização deste triterpenoide por RMN de ^{13}C feita por Pohjala e colaboradores (Pohjala *et al.*, 2009), onde DMSO- d_6 foi também utilizado na obtenção dos espectros de RMN.

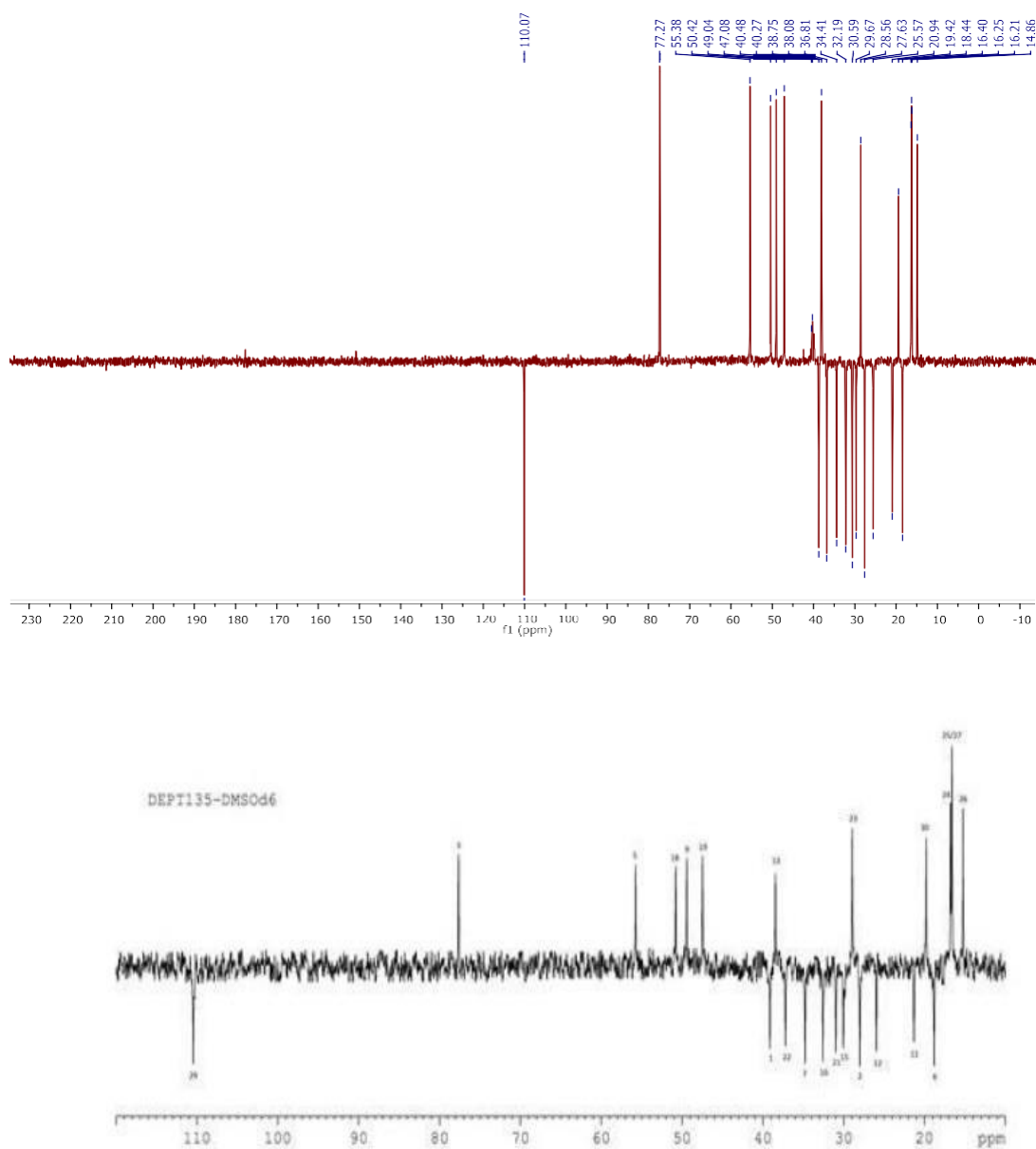
Tabela 5. RMN de ^{13}C comparação com Pohjala *et al.*, 2009

$\delta^{13}\text{C}$ Isolado	$\delta^{13}\text{C}$ Pohjala <i>et al.</i> , 2009
177.1	177.3
150.2	150.3
109.5	109.7
76.7	76.8
55.3	55.4
54.8	54.9
49.9	50.0
48.5	48.6
46.5	46.6
41.9	42.0
40.2	40.3
38.4	38.5
38.2	38.3
37.5	37.6
36.7	36.7
36.3	36.4
33.9	34.0
31.6	31.7
30.1	30.1
29.1	29.2
28.1	28.1
27.1	27.2
25.0	25.1
20.4	20.4
18.9	19.0
17.9	18.0
15.9	16.0
15.7	15.8
15.7	15.7
14.3	14.4

Fonte: Elaborado pelo autor

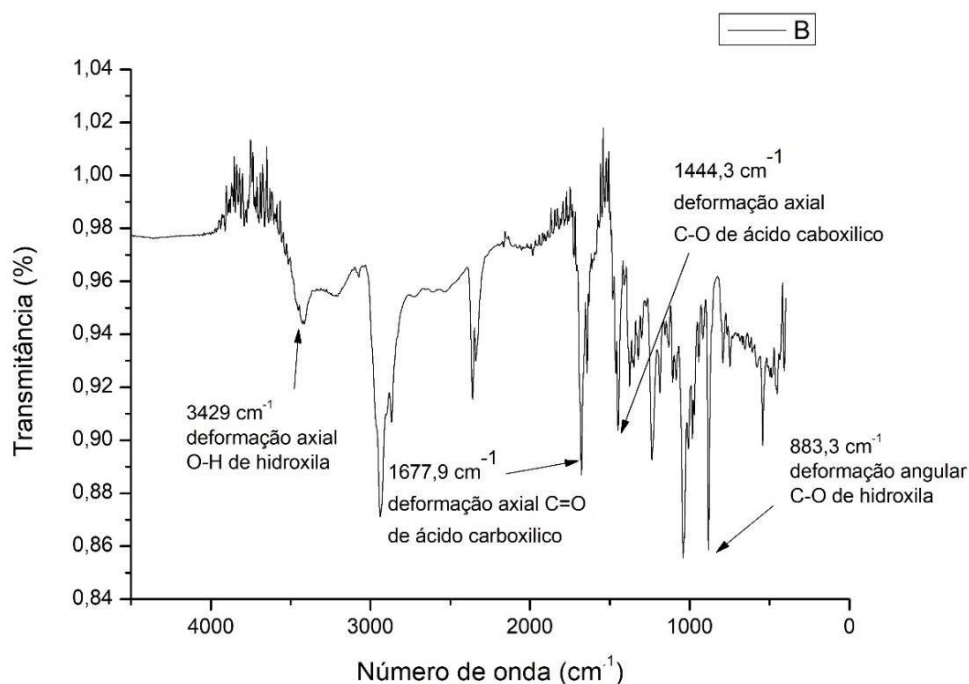
Além disso, a partir de experimentos de DEPT-135 (**Figura 31**), o padrão de carbonos hidrogenados pode ser também identificado, de forma que atribuições também similares a literatura (Noviany & Osman, 2021) foram obtidas. Desta forma, seis metilas, seis metinas e onze metilenos foram identificados, conforme mostrado a seguir.

Figura 31. RMN de DEPT-135 e comparação com a literatura



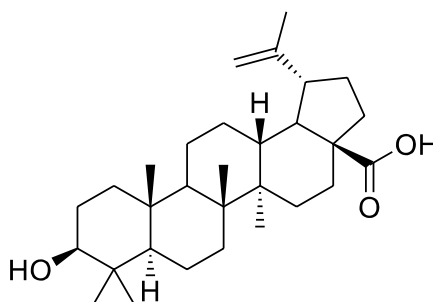
Fonte: Elaborado pelo autor

A confirmação dos diferentes grupos funcionais foi também realizada através de análises por espectroscopia no infravermelho, de forma que alguns sinais característicos desta substância, como a sua carbonila e hidroxila de ácido carboxílico, assim como sua hidroxila presente no carbono 3, puderam ser detectados (**Figura 32**).

Figura 32. Espectro no infravermelho do ácido betulínico

Fonte: Elaborado pelo autor

Conforme assinalado (**Figura 32**), bandas de absorção características das ligações carbono-oxigênio puderam ser atribuídas no espectro obtido. Desta forma, frequências de estiramento referentes a carbonila do ácido carboxílico em 1677,9 cm⁻¹, uma banda mais intensa de largura média em 3429 cm⁻¹ atribuído ao grupo O-H do álcool secundário no carbono 3 de banda mais larga, assim como em menores frequências devido a ressonância na carboxila, frequências de 1444,3 cm⁻¹ e 883,3cm⁻¹ referentes respectivamente, as ligações C-O da carbonila e a hidroxila do C-28 do mesmo ácido (2) (**Figura 33**)

Figura 33. Ácido betulínico

Fonte: Elaborado pelo autor

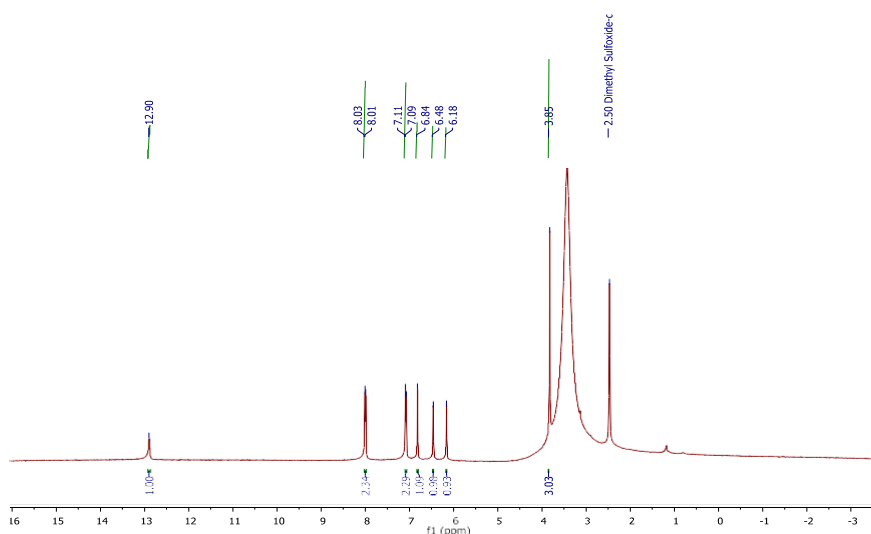
Outra classe de metabólitos frequentemente relatada para espécies de *Eremanthus* são os flavonoides (Keles *et al.*, 2010), formados por uma unidade iniciadora de cinamoil-CoA, ocorrendo então uma extensão de cadeia por condensação de claisen ou aldol com três unidades de malonil-CoA, levando a chalconas e estilbenos, respectivamente (Dewick, 2009).

As chalconas, por sua vez, através do fechamento inicial do anel C em uma adição de Michael a carbonila α,β -insaturada, atuam como precursores de vários derivados de flavonoides, tais como flavononas e flavonas (Dewick, 2009).

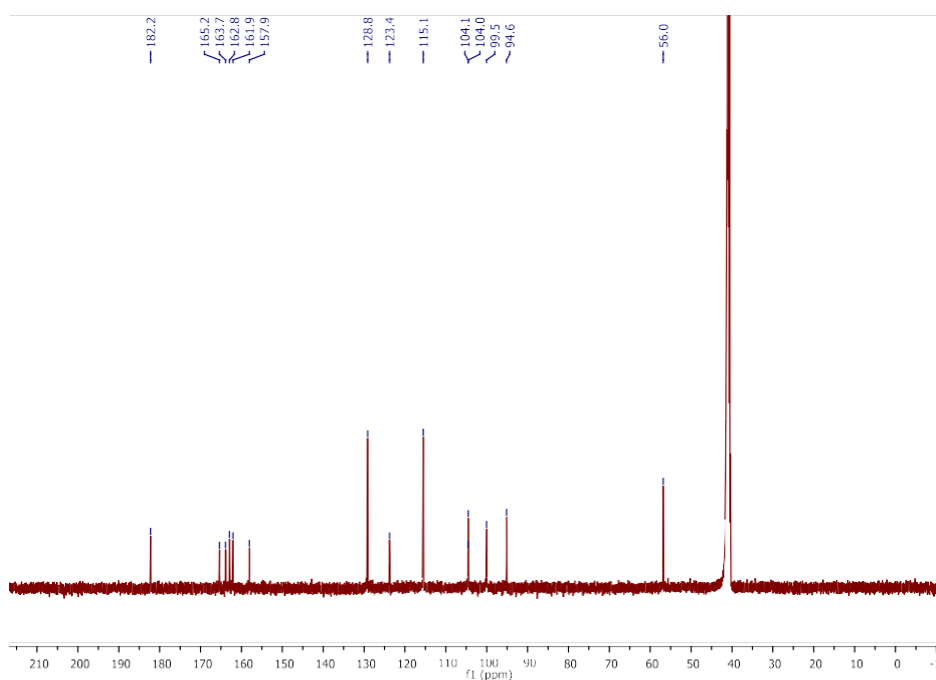
Neste contexto, a flavona acetina (**3**) pode também ser pela primeira vez isolada desta planta. Estes metabólitos comumente apresentam um característico próton em baixo campo da hidroxila em C-5 (5-OH) no anel A, devido à ligação de hidrogênio com o grupo carbonila do anel C, assim como relatado por Aksnes e colaboradores (Asknes *et al.*, 1996) na identificação de flavonas polihidroxiadas. Portanto, a análise por RMN de ^1H (**Figura 34**) da substância (**3**) apresentou tal sinal característico em 12.92 ppm (1H, s), sugestivo deste próton 5-OH desblindado devido a interação com a carbonila de cetona (182.2 ppm), descrito também em um trabalho envolvendo a síntese total da acetina (Zhao *et al.*, 2016).

Atribuições subsequentes no espectro de ^1H trazem maior conhecimento do padrão de substituição em ambos os anéis A e B, como indicam dupletos em 8.02 ppm (2H, *d*) e 7.10 ppm (2H, *d*), sugestivos de um plano de simetria em um padrão dissustituído no anel B, devido à presença da metoxila em C-4' evidenciado por prótons homotópicos não acoplados em 3.85 (3H, s), resultando em dois acoplamentos do tipo *orto* ($J_3 = 10$ Hz) de cada lado do anel B. Evidências adicionais do isolamento desta 5,7-hidroxiflavona foram obtidas por análise de RMN de ^{13}C (**Figura 35**), onde sinais de absorção característicos em alto campo dos carbonos C-6 e C-8 no anel A foram observados em 99.5 e 94.6 ppm, respectivamente, nos quais tal blindagem pode ser atribuída a grupos *orto*-, *para*- orientadores nas posições C-5 (162.8 ppm) e C-7 (165.2 ppm), semelhantes à crisina, também uma 5, 7-hidroxiflavona (Markham, 1989), possibilitando a identificação de (**3**) (**Figura 36**)

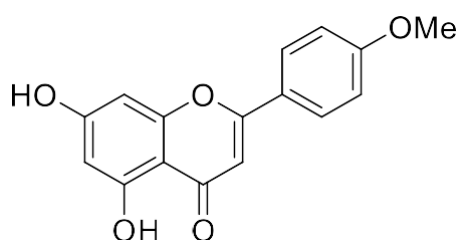
Figura 34. Espectro de RMN de ^1H da acetina em $\text{DMSO}-d_6$



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 35. Espectro de RMN de ^{13}C da acacetina em $\text{DMSO}-d_6$ 

Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 36. Acacetina

Fonte: Elaborado pelo autor

4.5 ENSAIOS *IN VITRO* FRENTE A VERMES ADULTOS DE *SCHISTOSOMA MANSONI*

Em meio à análise química de extratos de *E. erythropapus* (LEE e EEE) por UHPLC-MS/MS, a anotação de lactonas sesquiterpênicas, triterpenoides pentacíclicos e flavonóides livres e O- e C-glicosilados, sugeriu a presença de tais substâncias, o que somado a pronunciada propriedade antiparasitária de tais tipos estruturais, estimulou a investigação da potencial atividade antihelmíntica frente a vermes adultos de *S. mansoni* dos extratos, confirmado posteriormente por análises *in vitro*, onde a eliminação de vermes machos e fêmeas e diminuição da motilidade foram utilizados como parâmetros na avaliação. Desta forma, a partir da comparação de ambos os extratos (LEE e EEE), observou-se após a incubação nas concentrações de 200 e 100 $\mu\text{g/mL}$ a morte total e completa redução da motilidade de vermes machos e fêmeas para o extrato por lavagem glandular de *E.*

erythropappus (LEE) em 24h e mantido após 72h . Além disso, LEE demonstrou mesmo efeito posteriormente à 48h de incubação na concentração de 50µ/mL, assim como morte parcial (após 72h) e redução total da motilidade (após 48h) de tais helmintos em 25µ/mL. Para o extrato etanólico (EEE), apenas redução leve de atividade motora foi observada em 200 µg/mL até 72h (**Tabela 6**).

Tabela 6 – Avaliação *in vitro* de extratos de *E. erythropappus* e substâncias isoladas contra vermes adultos de *S. mansoni*.

Grupo	Período de incubação (h)	Morte dos parasitas (%)		Redução da atividade motora (%) *			
				Moderada		Significativa	
		M	F	M	F	M	F
Controle	Imediatamente	-	-	-	-	-	-
	24	-	-	-	-	-	-
	48	-	-	-	-	-	-
	72	-	-	-	-	-	-
0,5% DMSO	Imediatamente	-	-	-	-	-	-
	24	-	-	-	-	-	-
	48	-	-	-	-	-	-
	72	-	-	-	-	-	-
PZQ 1 µg/mL	Imediatamente	100	100	-	-	100	100
	24	100	100	-	-	100	100
	48	100	100	-	-	100	100
	72	100	100	-	-	100	100
Extrato por lavagem glandular de <i>E. erythropappus</i> (LEE)							
200 µg/mL	Imediatamente	-	-	-	-	-	-
	24	100	100	-	-	100	100
	48	100	100	-	-	100	100
	72	100	100	-	-	100	100
100 µg/mL	Imediatamente	-	-	-	-	-	-
	24	100	100	-	-	100	100
	48	100	100	-	-	100	100
	72	100	100	-	-	100	100
50 µg/mL	Imediatamente	-	-	-	-	-	-
	24	-	-	10	100	-	-
	48	100	-	-	-	100	100
	72	100	100	-	-	100	100
25 µg/mL	Imediatamente	-	-	-	-	-	-
	24	-	-	-	100	-	-
	48	-	-	10	-	100	100

	72	30	30	-	-	100	100
Extrato etanólico de <i>E. erythropappus</i> (EEE)							
	Imediatamente	-	-	-	-	-	-
200 µg/mL	24	-	-	50	50	-	-
	48	-	-	50	50	-	-
	72	-	-	50	50	-	-
Friedelina							
	Imediatamente	-	-	-	-	-	-
200 µg/mL	24	-	-	-	-	-	-
	48	-	-	-	-	-	-
	72	-	-	-	-	-	-
Acacetina							
	Imediatamente	-	-	-	-	-	-
200 µg/mL	24	-	-	-	-	-	-
	48	-	-	-	-	-	-
	72	-	-	-	-	-	-
Ácido Betulínico							
	Imediatamente	-	-	-	-	-	-
200 µg/mL	24	100	-	-	-	100	-
	48	100	100	-	-	100	100
	72	100	100	-	-	100	100
100 µg/mL	Imediatamente	-	-	-	-	-	-
	24	100	60	-	-	100	60
	48	100	100	-	-	100	100
	72	100	100	-	-	100	100
50 µg/mL	Imediatamente	-	-	-	-	-	-
	24	-	-	-	-	-	-
	48	-	-	-	-	-	-
	72	100	100	-	-	100	100

- Não houve resultado significativo

* ensaio realizado em triplicata.

Relacionado ao promissor potencial esquistossomicida do extrato LEE, buscou-se investigar a relação dos metabólitos isolados desta matriz com tal propriedade antiparasitária. Desta forma, resultados obtidos após a incubação dos parasitos com as substâncias (1), (2) e (3), levaram a observação de propriedades antihelmínticas do ácido betulínico (2) o qual após 24h, levou a morte e redução da capacidade motora total em vermes machos e parcial em

fêmeas em concentrações de 200 µg/mL e 100 µg/mL, onde após 48h vermes de ambos os sexos foram totalmente eliminados com perda completa de motilidade, mantendo-se tal efeito após 72h. Adicionalmente, o mesmo efeito foi observado na concentração de 50 µg/mL após 72h pós infecção (**Tabela 6**). Substâncias (1) e (3) não demonstraram qualquer atividade nas concentrações testadas (**Tabela 6**).

5 CONCLUSÃO

O perfil por UHPLC-MS/MS de extratos de *E. erythropappus*, onde metabólitos contidos nos tricomas glandulares constituíram principais diferenças entre as matrizes, assim como o isolamento de metabólitos não previamente reportados na espécie estudada, trazem compreensivo conhecimento pertinente ao perfil químico da candeia-da-serra.

Dentre os extratos, observou-se maior expressividade no potencial esquistossomicida para o extrato por lavagem glandular das partes aéreas de *E. erythropappus*, de forma que maior respaldo para seu subsequente fracionamento e investigação de constituintes relacionados a tal atividade foi estimulado. As propriedades antiparasitárias observadas para o ácido betulínico endossam seu promissor potencial como agente esquistossomicida, no entanto em meio à detecção deste metabólito em ambos os extratos, indica-se a possibilidade de um mecanismo sinérgico na atividade esquistossomicida do extrato LEE. Tais resultados preliminares sugerem que dentre o conjunto de metabólitos responsáveis por efeitos em vermes adultos de *Schistosoma*, podem estar os triterpenoides pentacíclicos do tipo lupano, o que somado a comparação no perfil químico de ambos os extratos, onde lactonas sesquiterpênicas e triterpenoides constituíram tipos estruturais que trouxeram diferenças entre tais matrizes, a seletividade de extração de metabólitos relacionados ao estresse externo pode ter papel fundamental em uma atividade mais expressiva do extrato LEE frente ao *S. mansoni*.

REFERÊNCIAS

- Aisporna, A.; Benton, H.P.; Chen, A.; Derks, R.J.E.; Galano, J.M.; Giera, M.; Siuzdak, G.; Neutral Loss Mass Spectral Data Enhances Molecular Similarity Analysis in METLIN, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 33, 530–534, 2022
- Ali, M.S.; Ahmed, Z.; Ngoupayo, J.; Ali, M.I.; Terpenoids from *Clerodendrum formicarum* Gürke (Lamiaceae) of Cameroon, *Zeitschrift für Naturforschung B*, 65b, 521–524, 2010
- Almeida, L.M.S.; Farani, P.G.S.; Tosta, L.A.; Silvério, M.S.; Sousa, O.V.; Mattos, A.C.A.; Coelho, P.M.Z.; Vasconcelos, E.G.; Faria-Pinto, P.; In vitro evaluation of the schistosomicidal potential of *Eremanthus erythropappus* (DC) McLeisch (Asteraceae) extracts, *Natural Product Research*, 26 (22), 2137-2143, 2012
- Asknes, D.W.; Standnes, A.; Andersen, O.M.; Complete Assignment of the ¹H and ¹³C NMR Spectra of Flavone and its A-Ring Hydroxyl Derivatives, *MAGNETIC RESONANCE IN CHEMISTRY*, 34, 820-823 1996
- Augustin, J.M.; Kuzina, V.; Andersen, S.B.; Bak, S.; Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins, *Phytochemistry* 72, 435–57, 2011
- Baker, P.M.; Fortes, C.C.; Fortes, E.G.; Gazinelli, G.; Gilbertl, G.; Lopes, J.N.C.; Pellegrino, J.; Tomassini, T.C.B.; Vichnewsky, W.; Chemoprophylactic agents in schistosomiasis : eremanthine, costunolide, α -cyclocostunolide and bisabolol, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 24, 853-857, 1972
- Bohlmann, F.; Zdero, C.; Robinson, H.; King, R. M.; Germacranolides from *Lychnophora species*, *Phytochemistry*, 21, 1087, 1982
- Breitmaier, E.; Terpenes: Flavours, Fragrances, Pharmaca, Pheromones, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2006

Cantuária, V.L.; ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DA ESPÉCIE *Eremanthus erythropappus* (DC) MacLeish (ASTERACEAE), 2018, Dissertação (Mestrado), Curso de Farmácia, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2018

Cárdenas, P.D.; Almeida, A.; Bak, S.; Evolution of Structural Diversity of Triterpenoids, *Frontiers in Plant Science*, 10, 1523, 2019

Cavaliere, C.; Foglia, P.; Pastorini, E.; Samperi, R.; Laganá, A.; Identification and mass spectrometric characterization of glycosylated flavonoids in *Triticum durum* plants by high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 19(21), 3143-3158, 2005

Cheruvu, H.S.; Yadav, N.K.; Valicherla, G.R.; Arya, R.K.; Hussain, Z.; Sharma, C.; Arya, K.R.; Singh, R.K.; Datta, D.; Gayen, J.R.; LC-MS/MS method for the simultaneous quantification of luteolin, wedelolactone and apigenin in mice plasma using hansen solubility parameters for liquid-liquid extraction: Application to pharmacokinetics of *Eclipta alba* chloroform fraction, *Journal of Chromatography B*, 1081-1082, 76-86, 2018

Crotti, A.E.M.; Lopes, J.L.C.; Lopes, N.P.; Triple quadrupole tandem mass spectrometry of sesquiterpene lactones: a study of goyazensolide and its congeners, *JOURNAL OF MASS SPECTROMETRY*, 40, 1030–1034, 2005

De Castro, C.C.B.; Dias, M.M.; De Rezende, T.P.; Magalhães, L.G.; Da Silva Filho, A.A.; Fighting Multidrug Resistance with Herbal Extracts, Essential Oils and Their Components, *Capítulo 8-Natural Products with Activity Against Schistosoma Species*, 109-134, 2013

Del-Vechio-Vieira, G.; Minateli, M.M.; Pinheiro, R.P.; Almeida, F.L.A.; Alves, M.S.; De Souza, O.V.; Antioxidant and Cytotoxic Properties of the Ethanol Extract and Fractions from *Eremanthus erythropappus* (DC) MacLeish Leaves, *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 9(2), 195-200, 2017

Dewick, P.M., Medicinal Natural Products A Biosynthetic Approach. 3a edição, John Wiley & Sons, Ltd, 2009

Escobedo-Martínez, C.; Lozada, M.C.; Hernández-Ortega, S.; Villarreal, M.L.; Gnecco, D.; Enríquez, R.G.; Reynolds, W.; ^1H and ^{13}C NMR characterization of new cycloartane triterpenes from *Mangifera indica*, Magnetic Resonance in Chemistry, 50, 52-57, 2010

Fabre N.; Rustan, I.; Hoffmann, E.; Quetin-Leclercq, J.; Determination of Flavone, Flavonol, and Flavanone Aglycones by Negative Ion Liquid Chromatography Electrospray Ion Trap Mass Spectrometry, Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 12, 707-715, 2001

Fan, X.; Bai, J.; Zhao, S.; Hu, M.; Sun, Y.; Wang, B.; Ji, M.; Jing, J.; Wang, X.; Hu, J.; Li, Y.; Evaluation of inhibitory effects of flavonoids on breast cancer resistance protein (BCRP): From library screening to biological evaluation to structure-activity relationship, Toxicology in vitro, 61, 104642, 2019

Ferreira, J.F.S.; Luthria, D.L.; Sasaki, T.; Heyerick, A.; Flavonoids from *Artemisia annua* L. as Antioxidants and Their Potential Synergism with Artemisinin against Malaria and Cancer, Molecules, 15(5), 3135-3170, 2010

Franz, G.; Grün, M.; Chemistry, Occurrence and Biosynthesis of C-Glycosyl Compounds in Plants, Journal of Medicinal Plant Research, 47, 131-140, 1983

Gaid, M.M.; Sircar, D.; Müller, A.; Beuerle, T.; Liu, B.; Ernst, L.; Hänsch, L.; Beerhues, L.; Cinnamate:CoA Ligase Initiates the Biosynthesis of a Benzoate-Derived Xanthone Phytoalexin in *Hypericum calycinum* Cell Cultures, Plant Physiology, 160, 1267-1280, 2012

Gallon, M.E.; Jayesimi, A.; Gobbo-Neto, L.; LC-UV-HRMS dereplication of secondary metabolites from Brazilian Vernoniaeae (Asteraceae) species supported through in-house database, Biochemical Systematics and Ecology, 78, 5-16, 2018

Georgiev, V.; Ananga, A.; Tsoleva, V.; Recent Advances and Uses of Grape Flavonoids as Nutraceuticals, Nutrients, 6(1), 391-415, 2014

Gryseels, B.; Polman, K.; Clerinx, J.; Kestens, L.; Human Schistosomiasis, *The Lancet*, 368, 1106-1118, 2006

Hill, R.A; Connolly, J.D.; Triterpenoids. *Natural Product Reports*, 29, 780–818, 2012

Hofer, B.; Recent developments in the enzymatic *O*-glycosilation of flavonoids. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(10), 4269-4281, 2016

Hvattum, E.; Determination of phenolic compounds in rose hip (*Rosa canina*), using liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry and diode-array detection, *RAPID COMMUNICATIONS IN MASS SPECTROMETRY*, 16, 655-662, 2002

Isah, M.B.; Ibrahim, M.A.; Mohammed, A.; Aliyu, A.B.; Masola, B.; Coetzer, T.H.T.; A systematic review of pentacyclic triterpenes and their derivatives as chemotherapeutic agents against tropical parasitic diseases, *Parasitology*, 143, 1219-1231, 2016

Jorge, N.C.; Guedes, L.M.; Aguilera, N.; Becerra, J.; Isaias, R.M.S.; Allelopathic potential of the extracts of non-galled stems and globoid stem galls of *Eremanthus erythropappus* (DC) McLeish (Asteraceae), *Biochemical Systematics and Ecology*, 100, 104379, 2022

Kachlicki, P.; Piasecka, A.; Stobiecki, M.; Marczak, L.; Structural characterization of flavonoid glycoconjugates and their derivatives with mass spectrometric techniques. *Molecules*, 21, 1494, 2016

Keles, L.C.; De Melo, N.I.; Aguiar, G.P.; Wakabayashi, K.A.L.; De Carvalho, C.E.; Cunha, W.R; Crotti, A.E.M.; Lopes, J.L.C.; Lopes, N.P.; LYCHNOPHORINAE (ASTERACEAE): A SURVEY OF ITS CHEMICAL CONSTITUENTS AND BIOLOGICAL ACTIVITIES, *Química Nova*, 33 (10), 2245-2260, 2010

Lima, P.D.D.B.; Garcia, M.; Rabi, J.A.; SELECTIVE EXTRACTION OF α -METHYLENE- γ -LACTONES. REINVESTIGATION OF VANILLOSMOPSIS ERYTHROPAPPA, *Journal of Natural Products*, 48 (6), 986-988, 1985

Liu, K.; Zhang, X.; Xie, L.; Deng, M.; Chen, H.; Song, J.; Long, J.; Li, X.; Luo, J.; Lupeol and its derivatives as anticancer and anti-inflammatory agents: Molecular mechanisms and therapeutic efficacy, *Pharmalogical Research*, 164, 105373, 2021

Lu, L.; Qian, D.; Yang, J.; Jiang, S.; Guo, J.; Shang, E.; Duan, J.; Identification of isoquercitrin metabolites produced by human intestinal bacteria using UPLC-Q-TOF/MS, *Biomedical Chromatography*, 27: 509–514, 2013

Ma, Y. L.; Li, Q. M.; Van den Heuvel, H.; Clayes, M.; Characterization of flavone and flavonol aglycones by collision-induced dissociation tandem mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 11, 1357-1364, 1997

Markham, K.R.; Flavones, Flavonols and their Glycosides, *Methods in Plant Biochemistry*, 1, 197-235, 1989

Menezes, F.S.; Silva, C.S.; Pereira, N.A.; Matos, F.J.A.; Borsatto, A.S.; Kaplan, M.A.C.; Molluscicidal Constituents of *Marsypianthes chamaedrys*, 13, 433-435, 1999

Moses, T.; Pollier, J.; Shen, Q.; Soetaert, S.; Reed, J.; Errfelinck, M.L.; Van Nieuwerburgh, F.C.W.; Bossche, R.V.; Osbourn, A.; Thevelein, J.M.; Deforce, D.; Tang, K.; Goossens, A.; OSC2 and CYP716A14v2 Catalyze the Biosynthesis of Triterpenoids for the Cuticle of Aerial Organs of *Artemisia annua*, *Plant Cell*, 1, 286-301, 2015

Naumoska, K.; Vovk, I.; Analysis of triterpenoids and phytosterols in vegetables by thin-layer chromatography coupled to tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1381, 229–238, 2015

Nielsen, S.F.; Boesen, T.; Larsen, M.; Schonning, K.; Kromann, H.; Antibacterial chalcones: bioisosteric replacement of the 40 -hydroxy group, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 12, 3047- 3054, 2004

Noviany; Hosman, H.; Structure Elucidation of Betulinic Acid from *Sesbania grandiflora* Root, *Journal of Physics: Conference Series*, 1751, 012090, 2021

Oldfield, E.; Lin, F.Y.; Terpene biosynthesis: modularity rules, *Angewandte Chemie*, 51, 1124–37, 2012

Paduch, R.; Kandefer-Szerszeń, M.; Trytek, M., Fiedurek, J.; Terpenes: substances useful in human healthcare. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 55, 315–327, 2007

Pereira, V.R.D.; Silveira, L.G.; Mengarda, A.C.; Alves Júnior, I.J.; Zuza, O; Miguel, F.B.; Silva, P.M.; Almeida, A.C.; Torres, D.S.; Pinto, P.L.S.; Coimbra, E.S.; Moraes, J.; Couri, M.R.C.; Da Silva Filho, A.A.. Antischistosomal properties of aurone derivatives against juvenile and adult worms of *Schistosoma mansoni*. *Acta Tropica*, 213, 105741, 2021

Pohjala, L.; Alakurtti, S.; Ahola, T.; Yli-Kauhaluoma, J.; Tammela, P.; Betulin-Derived Compounds as Inhibitors of Alphavirus Replication, *Journal of Natural Products*, 72, 1917-1926, 2009

Queiroz, L.S.; Ferreira, EA; Mengarda, AC; Pinto, PLS; Coimbra, ES; Moraes, J; Denadai, AML; Da Silva Filho, A.A.; In vitro and in vivo evaluation of cnicin from blessed thistle (*Centaurea benedicta*) and its inclusion complexes with cyclodextrins against *Schistosoma mansoni*. *Parasitology Research*, 120, 1321–1333, 2021

Rollison, D.; Knopp, S.; Levitz, S.; Stohard, J.R.; Tchuenté, L.A.T.; Garba, A.; Mohammed, K.A.; Schur, N.; Person, B.; Colley, D.G.; Utzinger, J.; Time to set the agenda for schistosomiasis elimination, *Acta Tropica*, 128, 423-440, 2013

Ruiz, A.; Zapata, M.; Sabando, C.; Bustamante, L.; Baer, D.V.; Vergara, C.; Mardones, C.; Flavonols, Alkaloids, and Antioxidant Capacity of Edible Wild *Berberis* Species from Patagonia, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 51, 12407–12417, 2014

Sacilotto, A.C.B.C.; Sartori, F.T.; Vichnewsky, W.; Chemical constituents of *Eremanthus veadeiroensis* (Asteraceae), *Biochemical Systematics and Ecology*, 30 897-900, 2002

Sánchez-Rabaneda, F.; Jáuregui, O.; Casals, I.; Andrés-Lacueva, C.; Izquierdo-Pulido, M.; Lamuela-Raventós, R.M.; Liquid chromatographic/electrospray ionization tandem mass spectrometric study of the phenolic composition of cocoa (*Theobroma cacao*), *JOURNAL OF MASS SPECTROMETRY*, 38, 35–42, 2003

Schmidt, T.J.; Structure-Activity and Activity-Activity Relationships of Sesquiterpene Lactones, Springer International Publishing AG, Nova York, 349-371, 2018

Sharma, N.; Palia, P.; Chaudhary, A.; Verma, S.K.; Kumar, I.; A Review on Pharmacological Activities of Lupeol and its Triterpene Derivatives, *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 10, 325-332, 2020

Shen, B.; Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms, *Current Opinion in Chemical Biology*, 7, 285-295, 2003

Silva, D.B.; Turatti, I.C.C.; Gouveia, D.R.; Ernst, M.; Teixeira, S.P.; Lopes, N.P.; Mass Spectrometry of Flavonoid Vicenin-2, Based Sunlight Barriers in *Lychnophora* species, *Scientific Reports*, 4, 4309, 2014

Silva, L.M.; Marconato, D.G.; Da Silva, M.P.N.; Raposo, N.R.B.; Facchini, G.F.S.; Macedo, G.C.; Teixeira, F.S.; Salvadori, M.C.B.S.; Pinto, P.F.; Moraes, J.; Pittela, F.; Da Silva Filho, A.A.; Licochalcone A-loaded solid lipid nanoparticles improve antischistosomal activity in vitro and in vivo, *Nanomedicine*, 16(19), 1641-1655, 2021

Silvério, M.S.; Del-Vechio-Vieira, G.; Pinto, M.A.O.; Alves, M.S.; Sousa O.V.; Chemical Composition and Biological Activities of Essential Oils of *Eremanthus erythropappus* (DC) McLeisch (Asteraceae), *Molecules*, 18, 9785-9796, 2013

Silvério, M.S.; Souza, O.V.; Del-Vechio-Vieira, G.; Miranda, M.A.; Matheus, F.C.; Kaplan, M.A.C.; Propriedades farmacológicas do extrato etanólico de *Eremanthus erythropappus* (DC.) McLeisch (Asteraceae), *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18 (3), 430-435, 2008

Singh, S.K.; Shrivastava, S.; Mishra, A.K.; Kumar, D.; Pandey, V.K.; Srivastava, P.; Pradhan, B.; Behera, B.C.; Bahuguna, A.; Baek, K.H.; Friedelin: Structure, Biosynthesis, Extraction, and Its Potential Health Impact, *Molecules*, 28, 7760, 2023

Singh, S.K.; Shrivastava, S.; Mishra, A.K.; Kumar, D.; Pandey, V.K.; Srivastava, P.; Pradhan, B.; Behera, B.C.; Bahuguna, A.; Baek, K.H.; Friedelin: Structure, Biosynthesis, Extraction, and Its Potential Health Impact, *Molecules* 28, 7760, 2023

Soares T.V.; Fabri. L.R.; COMPOSIÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE E CITOTÓXICO DAS FOLHAS DE *Eremanthus erythropappus* (DC) MCLEISH (CANDEIA), *Revista Eletrônica de Farmácia*, 3, 41-52, 2011

Souza, R. L.; Gonçalves, U.O.; Badoco, F.R.; Galvão, L.S.; Santos, R.A.; De Carvalho, P.H.D.; De Carvalho, L.S.A.; Da Silva Filho, A.A.; Veneziani, R.C.S.; Rodrigues, V.; Ambrósio, S.R.; Magalhães, L.G.; Licochalcone A induces morphological and biochemical alterations in *Schistosoma mansoni* adult worms. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 96, p. 64–71, 2017

Spivak, A.Y.; Keiser, J.; Vargas, M.; Gubaidullin, R.R.; Nedopekina, D.A.; Shakurova, E.R.; Khalitova, R.R.; Odinokov, V.N.; Synthesis and activity of new triphenylphosphonium derivatives of betulin and betulinic acid against *Schistosoma mansoni* *in vitro* and *in vivo*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 22, 6297, 6304, 2014

Sun, Y.; Feng, F.; Nie, B.; Cao, J.; Zhang, F.; High throughput identification of pentacyclic triterpenes in *Hippophae rhamnoides* using multiple neutral loss markers scanning combined with substructure recognition (MNLSR), *Talanta*, 120011, 2019

Thimmappa, R.; Geisler, K.; Louveau, T.; O'Maille, P.; Osbourn, A.; Triterpene Biosynthesis in Plants, *Annual Review of Plant Biology*, 65, 225-257, 2014

Uddin, J.; Muhsinah, A.B.; Imran, M.; Khan, M.N.; Musharraf, S.G.; Structure–fragmentation study of pentacyclic triterpenoids using electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry (ESI-QTOFMS/MS), *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 36 ,1-12, 2021

Vale, N.; Gouveia, M.J.; Rinaldi, G.; Brindley, P.J.; Gärtner, F.; Costa, J.M.C.; Praziquantel for Schistosomiasis: Single-Drug Metabolism Revisited, Mode of Action, and Resistance, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61, 5, 2017

Valente, L.M.M.; CUCURBITACINAS E SUAS PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS, *Química Nova*, 27 (6), 944-948, 2004

Vichnewsky, W.; Lopes, J.N.C.; Dos Santos Filho, D.; Herz, W.; 15-DEOXYGOYAZENSOLIDE, A NEW HELIANGOLIDE FROM VANILLOSMOPSIS ERYTHROPAPPA, *Phytochemistry*, 15, 1775-1776, 1976

Wu, C.; Chen, F.; Wang, X.; Wu, Y.; Dong, M.; He, G.; Galyean, R.D.; He, L.; Huang, G.; Identification of Antioxidant Phenolic Compounds in Feverfew (*Tanacetum parthenium*) by HPLC-ESI-MS/MS and NMR, *Phytochemical Analysis*, 18, 401–410 2007

Yang, M.; Wang, X.; Guan, S.; Xia, J.; Analysis of Triterpenoids in *Ganoderma lucidum* Using Liquid Chromatography Coupled with Electrospray Ionization Mass Spectrometry, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 18, 927–939, 2007

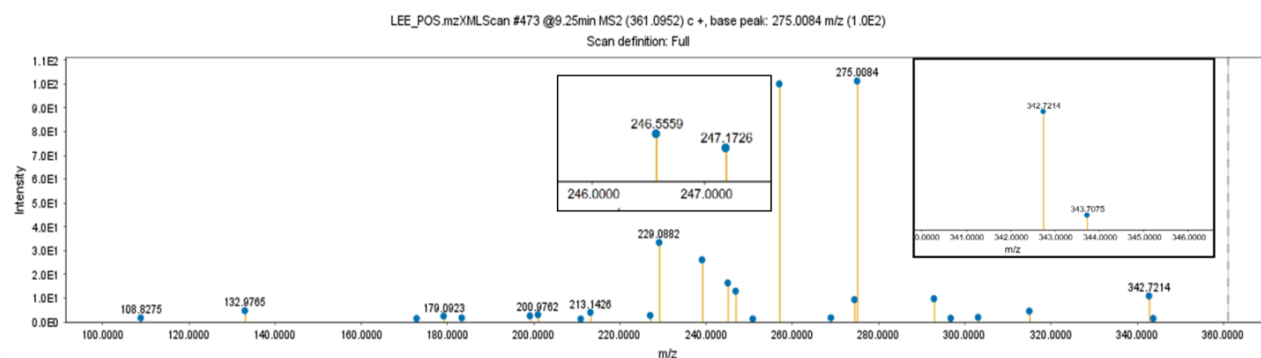
Yin, J.; Ma, Y.; Liang, C.; Gao, J.; Wang, H.; Zhang, L.; A Systematic Study of the Metabolites of Dietary Acacetin in Vivo and in Vitro Based on UHPLC-Q-TOF-MS/MS Analysis, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67, 5530-5543, 2019

Zhao, Y.; Cai, L.; Sui, Q.; Lin, F.; Jiang, W.; Chen, J.; Lu, W.; Gao, Q.; Facile Synthesis of Acacetin and Its Derivatives, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 26, 3577–3580, 2016

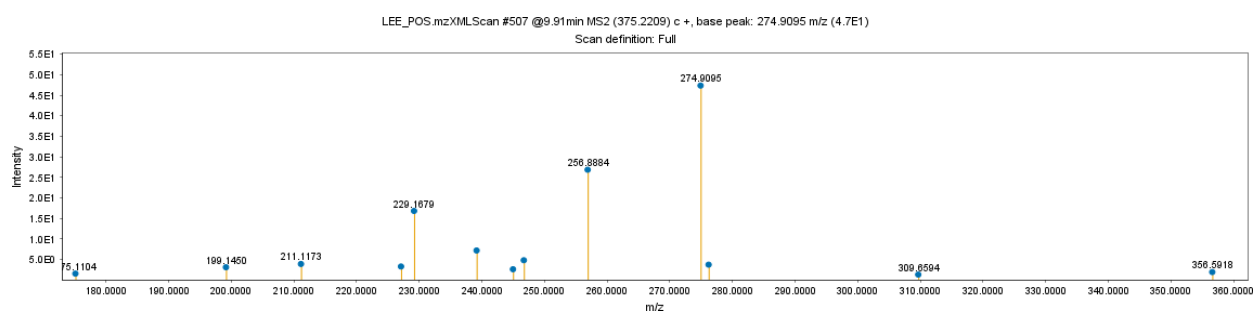
Zhou, C.; Liu, Y.; Su, D.; Gao, G.; Zhou, X.; Sun, L.; Ba, X.; Chen, X.; Bi, K.; A Sensitive LC–MS–MS Method for Simultaneous Quantification of Two Structural Isomers, Hyperoside and Isoquercitrin: Application to Pharmacokinetic Studies, *Chromatographia*, 73, 353–359, 2011

ANEXOS
Espectros de MS/MS (MS²) de Extratos por lavagem glandular (LEE) e
Maceração em EtOH (EEE)

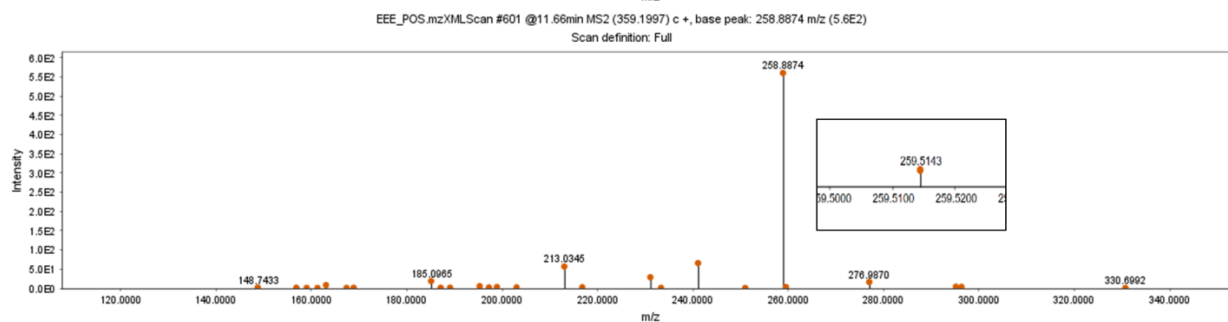
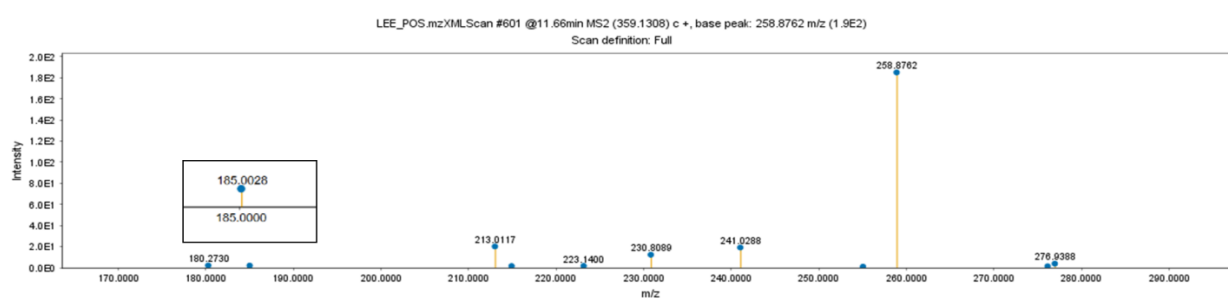
Goyazensólido MS/MS m/z 361 [M+H]⁺



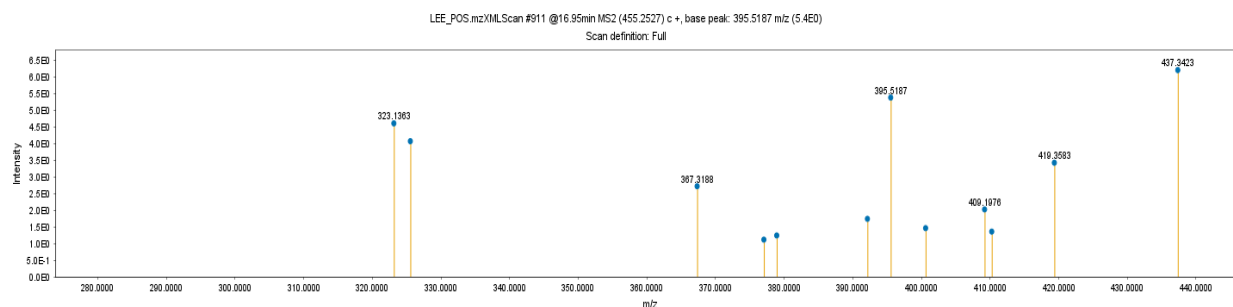
Centraterina MS/MS m/z 375 [M+H]⁺



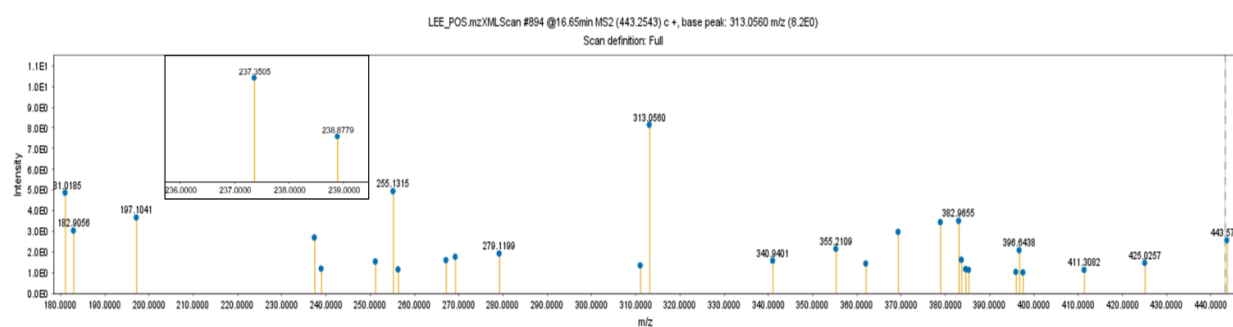
Lichnofólido MS/MS m/z 359 [M+H]⁺ de extratos LEE e EEE



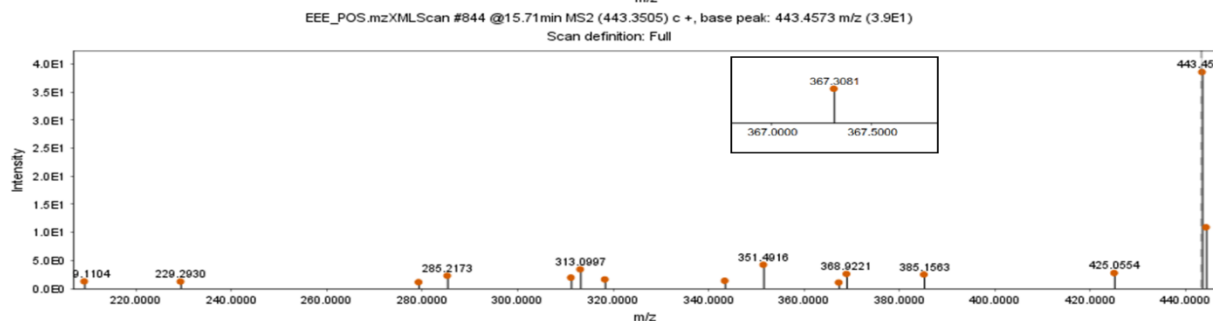
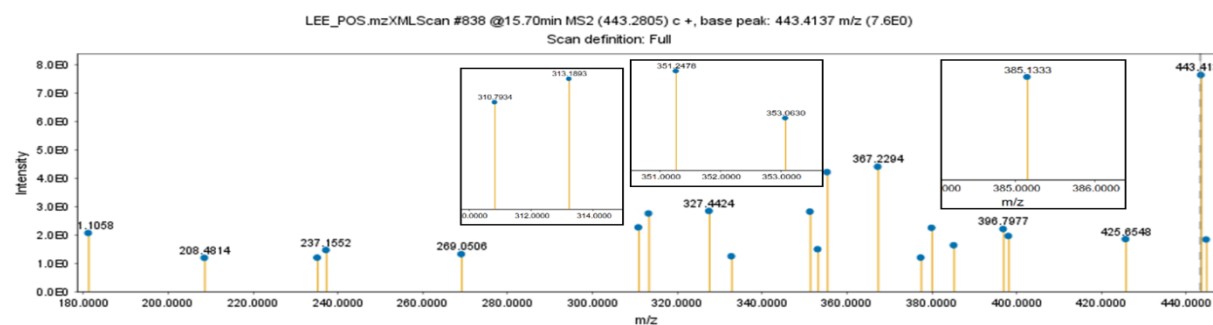
Ácido Oleanônico MS/MS m/z 455 $[M+H]^+$ do extrato LEE



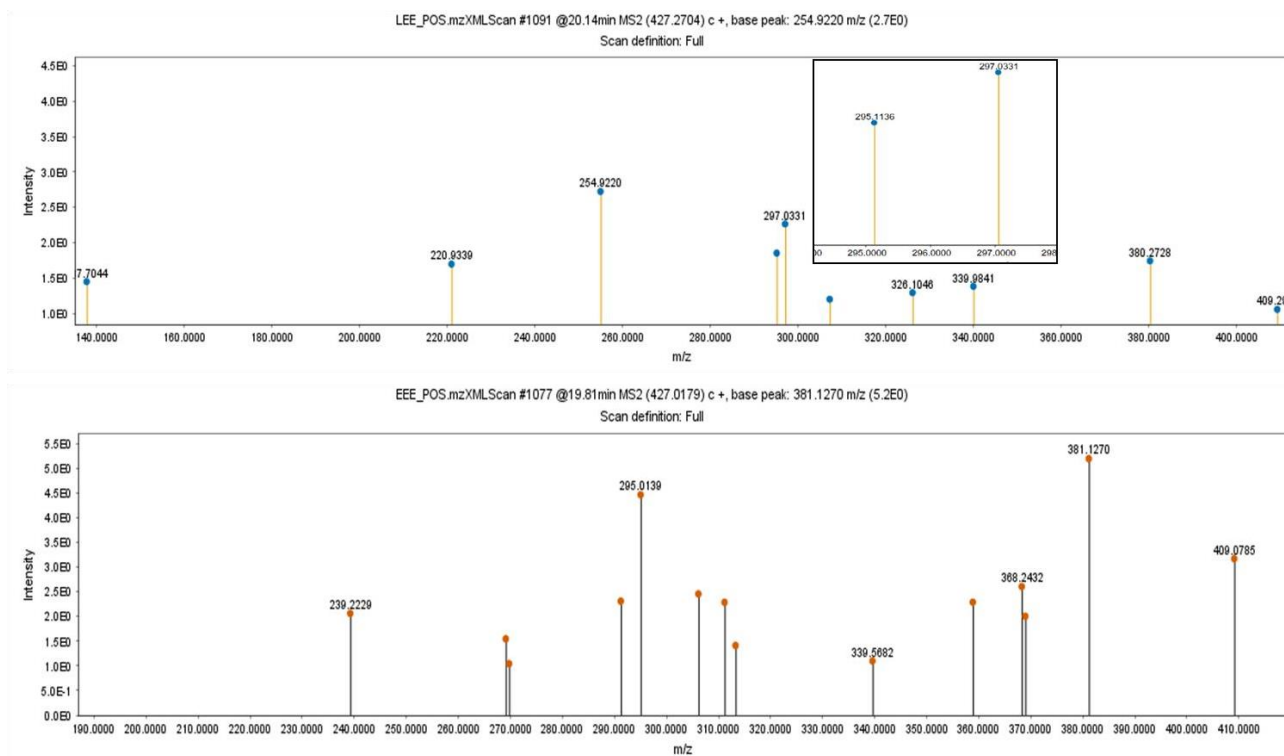
Eritrodiol MS/MS m/z 443 $[M+H]^+$ do extrato LEE



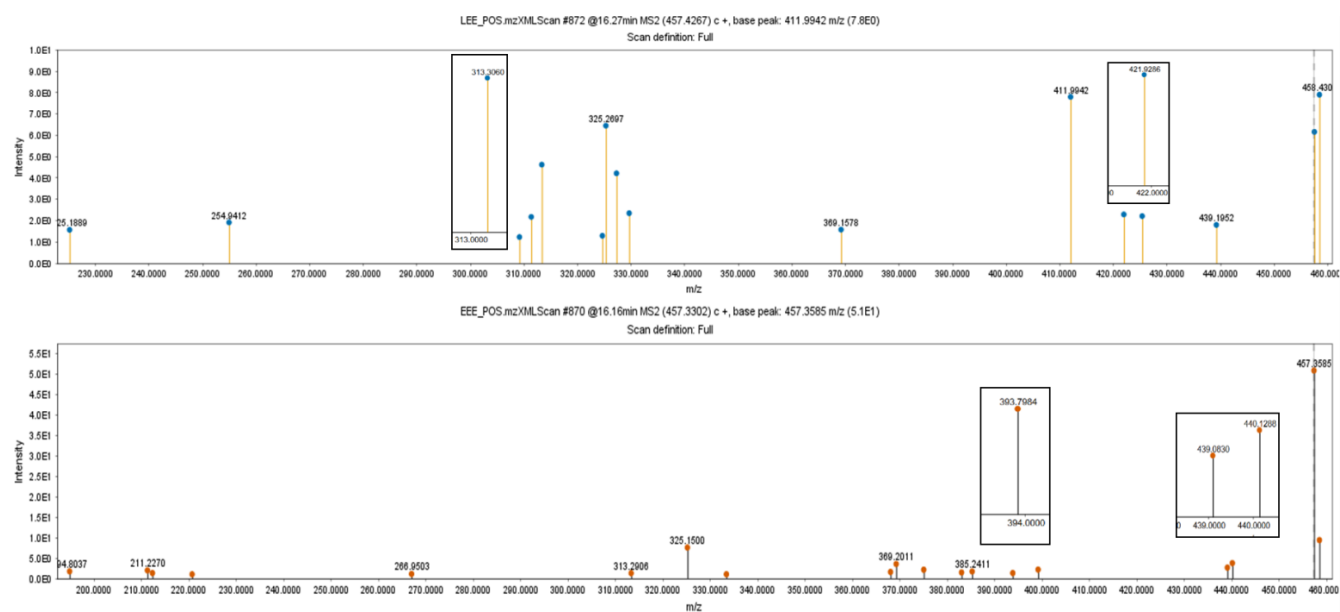
Uvaol MS/MS m/z 443 $[M+H]^+$ dos extratos LEE e EEE



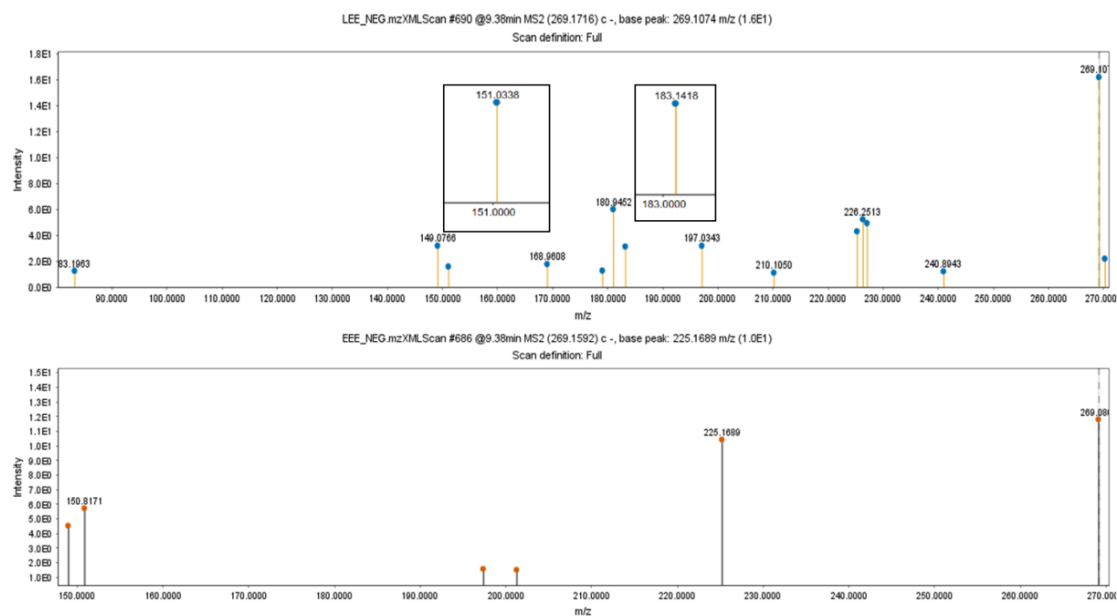
Friedelina MS/MS m/z 427 $[M+H]^+$ dos extratos LEE e EEE



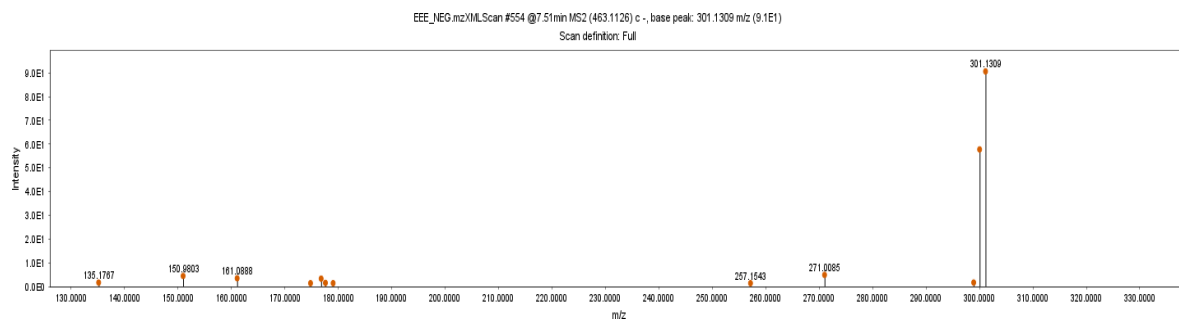
Ácido betulínico MS/MS m/z 457 $[M+H]^+$ dos extratos LEE e EEE



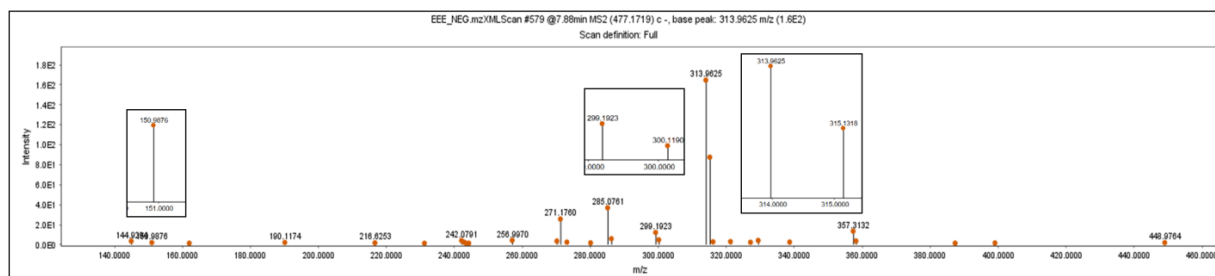
Apigenina MS/MS m/z 269 $[M-H]^-$ dos extratos LEE e EEE



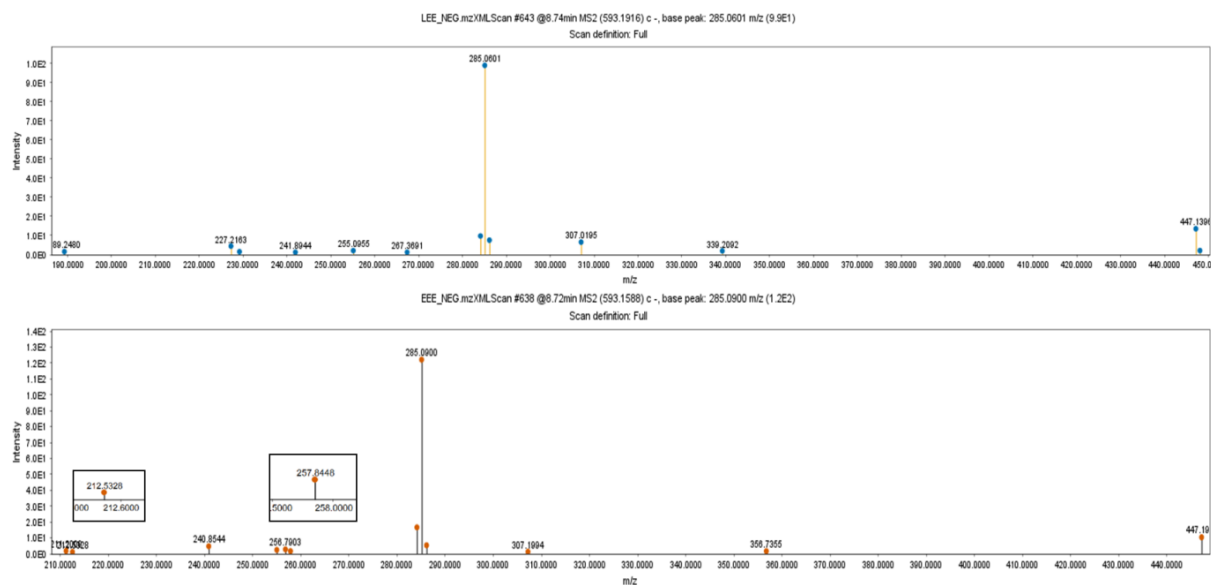
Isoquercetina MS/MS m/z 463 $[M-H]^-$ do extrato EEE



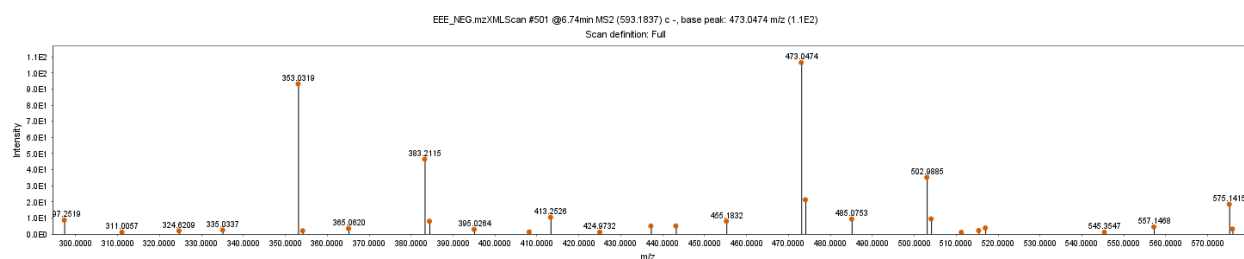
Isorhamnetina-3-O-galactosídeo MS/MS m/z 477 $[M-H]^-$ do extrato EEE



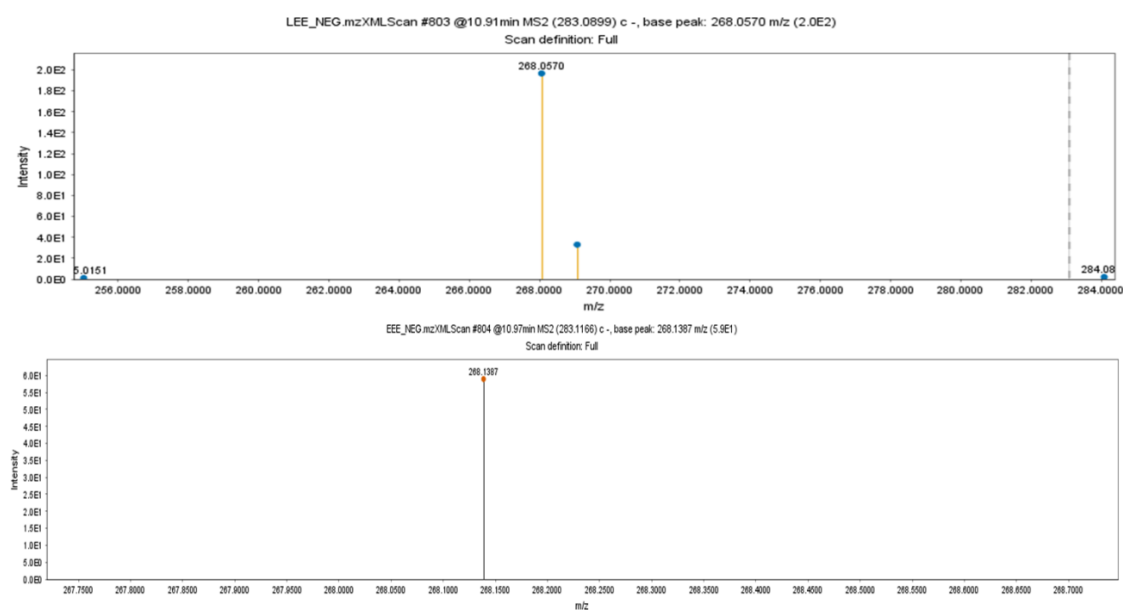
Kaempferol-7-O-neohesperidosídeo MS/MS m/z 593 $[M-H]^-$ dos extratos LEE e EEE



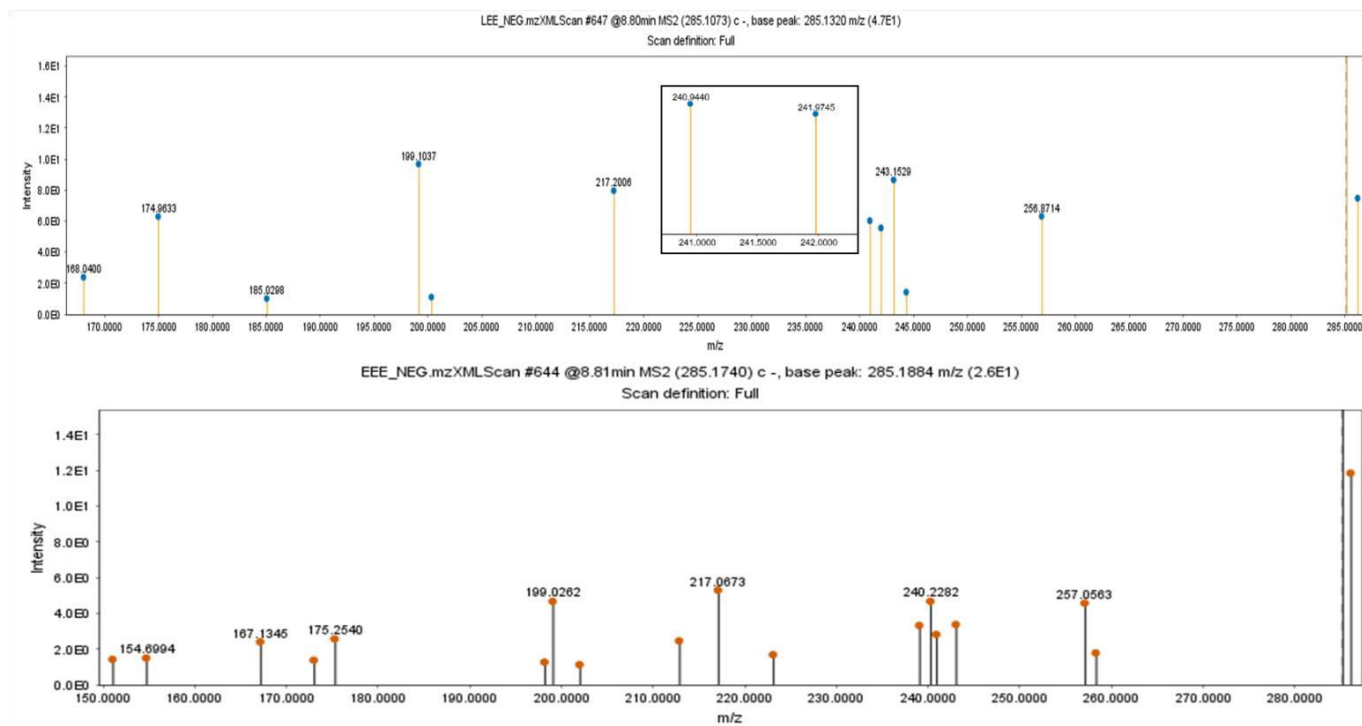
Vicenina-II MS/MS m/z 593 $[M-H]^-$ do extrato EEE



Acacetina MS/MS m/z 283 $[M-H]^-$ dos extratos LEE e EEE



Luteolina MS/MS m/z 285 $[M-H]^-$ dos extratos LEE e EEE



Ácido 3,5-di-O-caffeoilquínico MS/MS m/z 515 $[M-H]^-$ dos extratos LEE e EEE

