UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS

Diversidade química e atividades farmacológicas da espécie *Justicia aequilabris*

JOANDA PAOLLA RAIMUNDO E SILVA

JOÃO PESSOA – PB
2022

JOANDA PAOLLA RAIMUNDO E SILVA

Diversidade química e atividades farmacológicas da espécie *Justicia aequilabris*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento às exigências para obtenção do título de Doutora em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, área de concentração Farmacoquímica.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Josean Fechine Tavares

João Pessoa – PB
2022

Catalogação na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S586d Silva, Joanda Paolla Raimundo e.
Diversidade química e atividades farmacológicas da espécie Justicia aequilabris / Joanda Paolla Raimundo e Silva. - João Pessoa, 2023.
179 f. : il.

Orientação: Josean Fechine Tavares.
Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. Farmacoquímica. 2. Desreplicação. 3. Espectrometria de massas. 4. Anti-inflamatório. 5. Atividade leishmanicida. I. Tavares, Josean Fechine. II. Título.

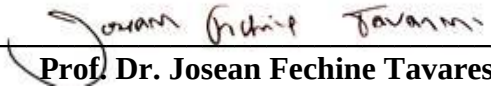
UFPB/BC CDU 547.9(043)

Elaborado por MAGNOLIA FELIX DE ARAUJO - CRB-15/883

JOANDA PAOLLA RAIMUNDO E SILVA

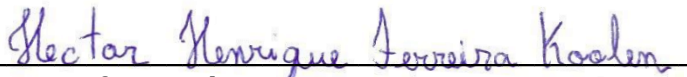
Isolamento de compostos bioativos guiado por rede molecular na espécie *Justicia aequilabris*

COMISSÃO EXAMINADORA



Prof. Dr. Josean Fechine Tavares
Doutor em Farmacoquímica de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos
Universidade Federal da Paraíba (Orientador)

Prof. Dr. Massuo Jorge Kato
Doutor em Química Orgânica
Universidade de São Paulo (Examinador Externo)



Prof. Dr. Héctor Henrique Ferreira Koolen
Doutor em Química
Universidade do Estado do Amazonas (Examinador Externo)

Documento assinado digitalmente
gov.br
MARIA DE FATIMA VANDERLEI DE SOUZA
Data: 20/12/2022 10:00:40-0300
Verifique em https://verificador.iti.br

Prof.ª. Dra. Maria de Fátima Vanderlei de Souza
Doutora em Química Orgânica
Universidade Federal da Paraíba (Examinadora Interna)

Documento assinado digitalmente
gov.br
SOCRATES GOLZIO DOS SANTOS
Data: 13/12/2022 10:07:49-0300
Verifique em https://verificador.iti.br

Prof. Dr. Sócrates Golzio dos Santos
Doutor em Farmacoquímica de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos
Universidade Federal da Paraíba (Examinador Interno)

AGRADECIMENTOS

Ao ver essas páginas escritas refletindo um trabalho de tantos anos só posso agradecer, essa luta teve apoio e ajuda de muitas pessoas especiais. Agradeço a quem nunca me deixou só, a quem foi minha força quando eu não podia mais, a Deus e minha querida mãezinha Maria. Agradeço aos meus pais, vocês são meu suporte desde sempre, suas orações, palavras e cuidados me acompanham e enchem meu coração com a certeza que já tenho tudo de mais importante nesta vida, esse título é vitória de vocês.

Aos meus irmãos, Paolla, Joaneide, Cida, Rangel e Jamilly um agradecimento gigantesco, o apoio de vocês me fez forte, tantas palavras lindas de força vocês me deram, ás vezes ficava surpresa, porque as pessoinhas da minha vida viraram adultos tão inteligentes e nobres, amo vocês e tenho muito orgulho das pessoas que se tornaram.

A toda minha família, avô, avó, tios, tias, primos e primas que sempre me apoiaram, em especial a tia indinha, a senhora sempre me deu tanto apoio, tanta alegria, que saudades eu sinto da senhora. Espero que tudo que aprendi possa voltar pra nossa família de alguma forma.

A Samuel por ser a leveza dos meus dias, por me escutar, me apoiar e me ajudar tanto, seu abraço foi meu acalanto neste período, muito obrigada por tudo. Te amo.

Agradeço aos meus amigos da vida toda, Cleildo, Laiane, Gisele, Tamires, Monik, Monique, Elaine e Thiago, vocês foram o maior presente que eu ganhei em vida, eu sempre vou ter um sorriso no rosto e o coração aquecido quando lembro de vocês. Não importa o lugar no mundo que estejamos sempre estamos dispostos a cuidar um do outro, amo vocês.

Agradeço a Anderson, Laiane e Sabrina, meus amigos mais corajosos, juntos aprendemos literalmente a plantar e colher, usar arame, furadeira, fazer uma composteira cheirosa (risos), lidar com adolescentes e pessoas. Tantas coisas enfrentamos juntos, mas acima de tudo, como foi gostoso e divertido trabalhar com vocês, meus dias foram mais leves na Pós-Graduação porque eu tinha vocês. Muito obrigada por tanto.

A Thalisson, Rose, George, Jordana, Juliana, Kaio, Márcio, Leuzinha e Gabriela, agradeço por todo suporte, por cada palavra, abraço, lanche, praia e tudo que fizemos juntos nesta caminhada de Pós, sou imensamente feliz por compartilhar a vida com vocês meus amigos.

A Lucas, Natan, Samuel Cibulski, Madalena, Rodrigo, Pedro, Diego, Ana Rita, Arthur, Yuri, César e Fiama agradeço todo companheirismo e apoio dentro e fora do laboratório.

Agradeço a Rose, seu Manoel, Júnior, Carol, Socrátes, Marcelo e Evandro por todo suporte, apoio, e as melhores conversas nesta trajetória.

Agradeço ao Professor Josean pela orientação e por todo suporte e conhecimento compartilhado na realização desta pesquisa. Ao Professor Marcelo Sobral pelo apoio no desenvolvimento da pesquisa, assim como, o suporte estrutural e financeiro.

Agradeço a banca examinadora por aceitar o convite e fazer parte da minha defesa, bem como por todo o conhecimento passado e todas as contribuições realizadas.

Aos órgãos de fomento CNPq e CAPES e ao Instituto Nacional Ciência e Tecnologia (INCT) por todo o auxílio financeiro fornecido a esta pesquisa, e a UFPB, pelo apoio estrutural e científico.

RESUMO

As espécies vegetais apresentam uma grande variabilidade de metabólitos secundários, que representam uma importante fonte de moléculas farmacologicamente ativas. As espécies do gênero *Justicia* já ofereceram a comunidade cientifica inúmeras moléculas bioativas, porém espécies como a *Justicia aequilabris* (Nees) Lindau, planta nativa e endêmica no Nordeste brasileiro não possuía estudos fitoquímicos e farmacológicos. Desta forma, o objetivo deste trabalho é investigar o perfil químico e farmacológico da *J. aequilabris*. Das partes aéreas da espécie foi obtido o extrato etanólico, sendo este particionado e as fases obtidas analisadas por CL-EM e redes moleculares. Estas ferramentas indicaram que a fase acetato de etila possuía a maior diversidade química, desta forma, esta fase foi fracionada e as subfrações obtidas foram analisadas por RMN, sendo elucidado os compostos inéditos, aequilabrinas A (**1**), B (**2**) e C (**3**), e identificado as moléculas, lariciresinol-4′-*O*-*β*-glicosídeo (**4**), alantoína (**5**) e roseosideo (**6**), secoisolariciresinol (**7**), pinoresinol-4-*O*-*β*-*D*-glicosídeo (**8**), epipinoresinol-4-*O*-*β*-*D*-glicosídeo (**9**), pinoresinol-4-*O*-*β*-*D*-apiosil-(1→2)-*β*-*D*-glicosídeo (**10**). Através de análise CL-EM^n do extrato foram desreplicados 22 compostos, sendo estes, lignanas, flavonoides e ácidos fenólicos. Por docking molecular os compostos **1-3** demostraram atividade agonista frente ao receptor glicocorticoide, desta forma, estes compostos foram direcionados para análises *in vitro*. As moléculas **1** (IC_{50} = 9,1 μM) e **2** (7,3 μM) apresentaram atividade inibitória significativa contra a produção de óxido nítrico, e uma taxa de inibição máxima da produção de IL-1*β* com valores de 23,5% (**1**), 27,3% (**2**) e 32,5% (**3**). Os dados das analises *in sílico* e *in vitro* sugerem que a atividade anti-inflamatória possui relação direta com a substituição em C9 e C-9'. Por triagem virtual os compostos **7-10** foram selecionados para análise *in vitro* da atividade leshmanicida frente às formas promastigotas de *L. major* e *L. braziliensis*, os compostos **7** (IC_{50} = 9,28 μM) e **9** (5,39 μM) apresentaram proeminente atividade frente a *L. braziliensis*. O uso de ferramentas como a rede molecular e o docking molecular foi essencial na priorização do isolamento de composto de interesse e direcionamento na analise farmacológica das moléculas, as lignanas descritas no trabalho apresentaram potencial atividade anti-inflamatória e leshmanicida.

Palavras-chave: Desreplicação, EM/EM, GNPS, Anti-inflamatório, leishmanicida.

ABSTRACT

Plant species show a great variability of secondary metabolites, which represent an important source of pharmacologically active molecules. Species of the genus *Justicia* have already offered the scientific community numerous bioactive molecules, but species such as *Justicia aequilabris* (Nees) Lindau, a native and endemic plant in Northeast Brazil, did not have phytochemical and pharmacological studies. Thus, the objective of this work is to investigate the chemical and pharmacological profile of *J. aequilabris*. The ethanolic extract was obtained from the aerial parts of the species, which was partitioned and the phases obtained analyzed by LC-MS and molecular networks. These tools indicated that the ethyl acetate phase had the greatest chemical diversity, so this phase was fractionated and the subfractions obtained were analyzed by NMR, with the unpublished compounds being elucidated, aequilabrine A (**1**), B (**2**) and C (**3**), and identify the molecules, lariciresinol-4′-*O*-*β*-glycoside (**4**), allantoin (**5**) and roseoside (**6**), secoisolariciresinol (**7**), pinoresinol-4-*O*-*β*-D-glycoside (**8**), epipinoresinol-4-*O*-*β*-D-glycoside (**9**), pinoresinol-4-*O*-*β*-D-apiosyl-(1→2)-*β*-D-glycoside (**10**). Through LC-EM^n analysis of the extract, 22 compounds were de-replicated, these being lignans, flavonoids and phenolic acids. By molecular docking compounds **1-3** showed agonist activity at the glucocorticoid receptor. Therefore, these compounds were directed to *in vitro* analyses. Molecules **1** (IC_{50} = 9.1 μM) and **2** (7.3 μM) showed significant inhibitory activity against nitric oxide production, and a maximum inhibition rate of IL-1*β* production with values of 23.5% (**1**) , 27.3% (**2**) and 32.5% (**3**). Data from *in silico* and *in vitro* analyzes suggest that anti-inflammatory activity is related to substitution at C9 and C-9'.By virtual screening, compounds **7-10** were selected for *in vitro* analysis of the leshmanicidal activity against the promastigote forms of *L. major* and *L. braziliensis*, compounds **7** (IC_{50} = 9.28 μM) and **9** (5.39 μM) showed prominent activity against *L. braziliensis*. The use of tools such as the molecular network and molecular docking was essential in prioritizing the isolation of the compound of interest and targeting the pharmacological analysis of the molecules, the lignans described in the work showed potential anti-inflammatory and leshmanicidal activity.

Keywords: Dereplication, MS/MS, GNPS, Anti-inflammatory, leishmanicidal.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Detalhes da espécie *J. aequilabris*.	20
Figura 2.	Distribuição de espécies *J. aequilabris* no Brasil.	20
Figura 3.	Principais esqueletos de lignanas.	21
Figura 4.	Via biossintética das lignanas.	22
Figura 5.	Estrutura da secoisolariciresinol diglicosideo.	24
Figura 6.	Estrutura das LDBB com atividades farmacológicas relatadas.	25
Figura 7.	As substâncias **1-5** são seguidas de seus respectivos números. Os nodos com borda em negrito tiveram suas substâncias anotadas. Nodos com borda azul em negrito representam compostos confirmados por padrão interno. Em cinza, os *clusters* desreplicados para ácidos fenólicos (E e F) e flavonoides (G, H e I) são encontrados. R_1 = H ou hexosideo, R_2 = pentosideo, R_3 = H ou hexosídeo-pentosídeo, R_4 = hexosídeo-desoxihexosídeo.* ligação cis ou trans.	62
Figura 8.	Correlações de HMBC, COSY e NOESY dos compostos **1-3**.	66
Figura 9.	Espectros de ECD experimental e calculado dos compostos **1−3**.	67
Figura 10.	Interações intermoleculares entre **1**, **2** e **3**, controle positivo e negativo com resíduos de aminoácidos do sítio ativo da proteína glicocorticóide (PDB ID 3CLD). → resíduos de aminoácidos importantes para interação e resposta no sítio ativo.	132
Figura 11.	Estrutura química da 8R, 8'R-secoisolariciresinol.	134
Figura 12.	Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, metanol-*d*4) do composto **7**.	135
Figura 13.	Expansão I do espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, metanol-*d*4) do composto **7**.	136
Figura 14.	Expansão II do espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, metanol-*d*4) do composto **7**.	136
Figura 15.	Espectro de RMN de ^{13}C – BB (100 MHz, metanol-*d4*) do composto **7**.	137
Figura 16.	Espectro de ECD do composto **7**.	138
Figura 17.	Estrutura química do pinoresinol-4-*O*-*β*-*D*-glicosídeo.	140
Figura 18.	Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, DMSO-*d*6) do composto **8**.	142
Figura 19.	Expansão I do espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, DMSO-*d*6) do	143

composto **8**.

Figura 20. Expansão II do espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, DMSO-*d*6) do composto **8**. 143

Figura 21. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO-*d*6) do composto **8**. 144

Figura 22. Mapa de contorno ^{1}H x ^{13}C HMQC (400 e 100 MHz, DMSO-*d*6) do composto **8**. 145

Figura 23. Mapa de contorno ^{1}H x ^{13}C HMBC (400 e 100 MHz, DMSO-*d*6) do composto **8**. 146

Figura 24. Estrutura química do epipinoresinol-4-*O*-*β*-*D*-glicosídeo. 147

Figura 25. Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, DMSO-*d*6) do composto **9**. 149

Figura 26. Espectro de RMN de ^{13}C (BB) em DMSO-d_6 (100 MHz) do composto **9**. 150

Figura 27. Mapa de contorno ^{1}H x ^{13}C HMBC (400 e 100 MHz, DMSO-*d*6) do composto **9**. 151

Figura 28. Estrutura química do pinoresinol 4-*O*-apiosil-(1→2)-*β*-glicosídeo. 152

Figura 29. Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, DMSO-*d*6) do composto **10**. 155

Figura 30. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO-*d*6) do composto **10**. 156

Figura 31. Mapa de contorno ^{1}H x ^{13}C HMQC (400 e 100 MHz, DMSO-*d*6) do composto **10**. 157

Figura 32. Expansão I do mapa de contorno ^{1}H x ^{13}C HMBC (400 e 100 MHz, DMSO-*d*6) do composto **10**. 158

Figura 33. Expansão II do mapa de contorno ^{1}H x ^{13}C HMBC (400 e 100 MHz, DMSO-*d*6) do composto **10**. 158

Figura 34. Espectro de massas EM^{3} do composto **10** no modo negativo. 159

- A lista de figuras das informações de suporte encontra-se na página 74.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Atividade biológica das LDBB.	27
Tabela 2.	Sistema de eluição MeOH/H_2O acidificada (0,1% de ácido fórmico) utilizado em coluna preparativa para fração B11-15.	53
Tabela 3.	Dados espectroscópicos de RMN ^{1}H e ^{13}C para os compostos **1-3** em C_5D_5N.	64
Tabela 4.	Citotoxicidade e efeito inibitório dos compostos **1-3** e secoisolariciresinol na produção de ON em macrófagos estimulados RAW 264.7[a]	69
Tabela 5.	Efeito Inibitório dos Compostos **1-3** e secoisolariciresinol na Produção de IL-1β em Macrófagos RAW 264.7 Estimulados.	70
Tabela 6.	*MolDock Score* do ligante agonista PDB.	131
Tabela 7.	Dados de RMN de ^{1}H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) do composto **7** obtido em Metanol-*d*4 (δ em ppm e *J* em Hz) em comparação dos deslocamentos químicos de RMN ^{1}H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) em DMSO-*d*6 da secoisolariciresinol por Fu et al. 2016.	134
Tabela 8.	Dados de RMN de ^{1}H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) do composto **8**, obtido em DMSO-*d*6 (δ em ppm e *J* em Hz) em comparação dos deslocamentos químicos de RMN ^{1}H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) em DMSO-*d*6, do pinoresinol-4-*O*-*β*-*D*-glicosídeo por Huang et al. 2016.	140
Tabela 9.	Dados de RMN de ^{1}H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) de **9**, obtido em DMSO-*d*6 (δ em ppm e *J* em Hz) em comparação dos deslocamentos químicos de RMN ^{1}H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) em metano-*d*4 do epipinoresinol-4-*O*-*β*-*D*-glucopiranosídeo por Shao et al. 2018.	148
Tabela 10.	Dados de RMN de ^{1}H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) do composto **10**, obtido em DMSO-*d*6 em comparação com os deslocamentos químicos de RMN ^{1}H (400 MHz) e ^{13}C (100	153

MHz) em Piridina-*d*5, do pinoresinol-4-*O*-*β*-D-apiosil-(1→2)-*O*-*β*-D-glicosídeo por Abe e Yamauchi (1989).

Tabela 11. Atividade antileishmania dos compostos **7**-**10** frente as formas promastigotas de *L. major* e *L. braziliensis*.. 160

- A lista de tabelas das informações de suporte encontra-se na página 74.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E FÓRMULAS

AcOEt - Acetato de etila

AINEs - Anti-inflamatórios não-esteroidais

APT - *Attached Proton Test*

BB - *Broad Band*

CC - Cromatografia em coluna

CCDA - Cromatografia em camada delgada analítica

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CL/EM – Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas

COSY - *Correlation Spectroscopy*

C_{18} - Octadecilsilano

d - Dubleto

DAD - *Detector Diode Array*

DEPT - *Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*

DFT - *Density Functional Theory*

dd - Duplo dubleto

DMSO-d6 - Dimetilsufóxido deuterado

CI_{50} - Concentração Inibitória Média

EM - Espectrometria de massas

EMAR - Espectro de massas em alta resolução

EM/EM ou EM^2 ou EM^n - Espectrômetro de massas em tandem

FAcOEt - Fase acetato de etila

GC - Glicocorticoides

GNPS - *Global Natural Product Social Molecular Networking*

HMBC - *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*

HSQC - *Heteronuclear Single Quantum Correlation*

HPLC - *High Performance Liquid Cromatography*

IFAs - Insumos Farmacêuticos Ativos

IES - Ionização por eletronspray

IV - Infravermelho

J - Constante de acoplamento

LDBB - Lignanas do tipo dibenzilbutano

m - Multipleto

MCDF - Métodos computacionais de design de fármacos

MeOH - Metanol

Min - Minuto

MHz - Mega-hertz

m/z - Relação massa-carga

$[M + H]^+$ - Molécula protonada

$[M – H]^-$ - Molécula desprotonada

NOESY - *Nuclear Overhauser Spectroscopy*

ppm - Partes por milhão

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

s - Simpleto

SDG - Secoisolariciresinol diglicosídeo

sl - Simpleto largo

TOF - Time-of-flight

t - Tripleto

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 16
2. REFERENCIAL TEÓRICO 18
2.1 *Justicia aequilabris*: um olhar sobre sua família e gênero 18
2.2 Lignanas 21
2.2.1 Biossíntese de lignanas 21
2.3 Lignanas do tipo dibenzilbutano (LDBB) e atividades farmacológicas 23
2.3.1 Secoisolariciresinol diglicosídeo (SDG) e enterolignanas 23
2.3.2 Revisão de literatura sobre atividade farmacológica de LDBB 24
2.3.2.1 Anti-inflamatório 26
2.3.2.2 Antimicrobiano 26
2.3.2.3 Antioxidante 36
2.3.2.4 Antiviral 36
2.3.2.5 Citotoxicidade 36
2.3.2.6 Estrogênica 37
2.3.2.7 Neuroprotetora 37
2.4 O uso da desreplicação na investigação de matrizes vegetais 37
2.5 Análises *in silico* na descoberta de novos IFAs 40
2. 6 Inflamação 43
2.7 Leishmaniose 46
3. OBJETIVO GERAL 50
3.2 Objetivos específicos 50
4 METODOLOGIA 51
4.1 Coleta do Material Vegetal 51
4.2 Obtenção do extrato etanólico bruto (EEB) 51
4.3 Retirada da clorofila 51
4.4 Partição do EEB 52
4. 5 Isolamento e purificação dos constituintes químicos de *J. aequilabris* 52
4. 5.1 Análise CLAE/EM^n 52
4.5.2 Rede molecular 52
4.5.3 Isolamento guiado 53
4.6 Ressonância Magnética Nuclear (RMN) 54
4.7 Espectrometria de massas de alta resolução (EMAR) 54

4. 8 Rotação óptica, ECD e infravermelho (IV) 55
4.9 Cálculos de RMN 55
4.9 Cálculos de ECD 55
4.10 Docking Molecular 56
4.11 Atividades farmacológicas 56
4.11.1 Ensaio de citotoxicidade 56
4.11.2 Ensaios de produção de óxido nítrico e citocinas 57
4.11.3 Análise estatística 57
4.11.4 Testes de atividade contra forma promastigota axênica de *L. major* e *L. braziliensis* 58
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 59
5.1 Isolamento guiado de lignanas anti-inflamatórias de *Justicia aequilabris* por abordagem de rede molecular 59
5.2 Docking molecular 131
5.3 Isolamento e identificação de lignanas com atividade leishmanicida 134
5.3.1 Determinação estrutural do composto 7 134
5.3.2 Determinação estrutural do composto 8 140
5.3.3 Determinação estrutural do composto 9 148
5.3.4 Determinação estrutural do composto 10 153
5.3.5 Atividade leishmanicida 161
6. CONCLUSÃO 162
REFERÊNCIAS 163

1. INTRODUÇÃO

As espécies vegetais constituem uma das fontes mais importantes de novas moléculas bioativas. Newman e Cragg (2020) investigaram os produtos naturais como fonte de novos medicamentos para diversas doenças no período de 1981 a 2019, e constataram que estes compostos são promissores na produção de medicamentos para diversas doenças e sintomas, como diabetes, câncer, infecções, entre outras afecções. Sendo assim, é importante a otimização dos processos de isolamento e identificação dos metabólitos secundários. A junção de técnicas analíticas, como cromatografia, espectrometria e espectroscopia possibilita obter com eficiência e rapidez uma grande quantidade de informações sobre o perfil químico de espécies vegetais, possibilitando o direcionamento para isolar metabólitos de interesse e a caracterização de compostos conhecidos, uma abordagem extremamente vantajosa frente às técnicas convencionais (RODRIGUES et al., 2006; FARAGA; PORZELA; WESSJOHANNA, 2012).

A rede molecular emergiu como uma técnica promissora para a análise metabolômica de espécies vegetais, pois estabelece uma rede de similaridade química entre os metabólitos com base na semelhança espectral dos íons gerados na espectrometria de massas (EM) e também permite a desreplicação por cruzar dados de EM/EM com bibliotecas espectrais, constituído atualmente uma técnica eficaz para priorizar os alvos de isolamento em pesquisa de produtos naturais e identificação de compostos conhecidos (KANG et al., 2018; PILON et al., 2021).

A obtenção e caracterização de metabólitos secundários é uma etapa importante na descoberta de Insumos Farmacêuticos Ativos (IFAs), porém o direcionamento destes para testes farmacológicos precisa ocorrer de forma racional para que não ocorra desperdício de tempo, recursos humanos e financeiros. A triagem de extratos contra uma variedade de alvos farmacológicos para se beneficiar da imensa diversidade química natural é uma preocupação em muitos laboratórios no mundo todo (LAUTIÉ et al. 2020). A bioinformática permitiu avanços tecnológicos no processamento de dados, este campo está relacionado a duas abordagens comuns, o *in silico* e docking molecular para melhorar e esclarecer a percepção científica das interações ligante-receptor, especialmente daquelas moléculas envolvidas no processo de elaboração de medicamentos (MITRA et al., 2022).

No semiárido brasileiro, observa-se crescente interesse pelo estudo das espécies vegetais da região (ALBUQUERQUE et al., 2007), uma vez que são potencialmente

ricas em propriedades curativas, sendo ainda pouco avaliadas acerca do poder bioativo de suas moléculas (ARRAIS et al., 2014). Estudos sobre o potencial químico e farmacológico das espécies presentes no semiárido podem contribuir não só para a valorização ecológica dessa região fitogeográfica, mas também para a seleção de espécies para bioprospecção, com retorno para a conservação da biodiversidade vegetal.

No Nordeste brasileiro as espécies do gênero *Justicia* (Acanthaceae) são comumente difundidas, estas são reconhecidas por suas propriedades medicinais e diversidade de metabolitos secundários, principalmente lignanas, flavonoides e alcaloides. A espécie *Justicia aequilabris* (Nees) Lindau habita a região do semiárido, sendo encontrada comumente na Caatinga, porém suas propriedades químicas e farmacológicas não foram avaliadas por estudo científico, no entanto, estudos prévios na sua família e gênero indicam a riqueza de constituintes potencialmente bioativos (CORRÊA; ALCÂNTARA, 2012; SOUZA et al., 2017). Diante do exposto, decidiu-se investigar a composição química de *J. aequilabris*, a fim de contribuir com o perfil químico da família Acanthaceae presente no semiárido paraibano e avaliar seu potencial farmacológico.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Justicia aequilabris*: um olhar sobre sua família e gênero

A família Acanthaceae possui 5.000 espécies, 191 gêneros, 19 subtribos, 10 tribos e quatro subfamílias (Nelsonioideae, Avicennioideae, Thunbergioideae e Acanthoideae). A subfamília Acanthoideae representa a maior diversidade taxonômica, com oito tribos: Acantheae, Physacantheae, Barlerieae, Andrographideae, Whitfieldieae, Neuracantheae, Ruellieae e Justiciae. Esta variedade classifica a Acanthaceae entre as 12 famílias mais diversas de angiospermas (ARIAS et al., 2022; MANZITTO-TRIPP et al., 2022).

As espécies desta família são ervas terrestres ou aquáticas, podendo apresenta-se como arbustos, lianas e raramente árvores, são distribuídos em praticamente todas as regiões do planeta, principalmente nos trópicos e regiões temperadas, com destaque para a diversidade encontrada na Ásia, África e Américas. No Brasil há cerca de 540 espécies e 40 gêneros desta família. Em latitudes temperadas a diversidade taxonômica entre as espécies de um mesmo gênero de Acanthaceae é notável, particularmente nos gêneros *Acanthus, Justicia* e *Ruellia* (SIMPSON, 2010; ARIAS et al. 2022; MANZITTO-TRIPP et al. 2022).

As espécies de Acanthaceae possuem excepcional diversidade morfológica, principalmente das formas florais e formas de crescimento. A diversidade morfológica floral inclui um amplo espectro de cores (vermelho, roxo, rosa, amarelo, laranja, branco, verde e azul), a diversidade de formas florais, assim como da morfologia da corola reflete a adaptação a uma variedade de polinizadores (abelhas, pássaros, borboletas, mariposas, moscas e morcegos). A beleza das suas flores também está ligada ao fato de muitas espécies possuírem importância econômica por serem comumente cultivadas como ornamentais (*Acanthus mollis, Aphelandra* spp e *Justicia* spp) (SIMPSON, 2010; MANZITTO-TRIPP et al. 2022).

O gênero *Justicia* está presente em regiões tropicais e subtropicais do continente americano, possui cerca de 600 espécies relatadas, sendo em sua maioria ervas e arbustos que possuem importância ornamental, ecológica e forrageira. A planta inteira é comumente usada pela população para o tratamento de doenças respiratórias, gastrointestinais e inflamação. Os estudos farmacológicos apontam proeminente atividade antitumoral de várias espécies, assim como, atividade antiviral e

antibacteriana (EZCURRA, 2002; CORREA; ALCÂNTARA, 2012; VERDAM et al., 2015; DENG et al., 2016; XIN-YA et al., 2019).

Alcaloides, cumarina, flavonoides, terpenoides e lignanas são relatados nas espécies de *Justicia*, porém as lignanas representam a classe de metabólitos que caracteriza o gênero, sendo as principais moléculas encontradas nas espécies, e são associadas às atividades farmacológicas e etnofarmacológicas observadas (CORREA; ALCÂNTARA, 2012; TEPONNO et al., 2016; WANG et al., 2022).

. *Justicia pectoralis* Jacq., *Justicia procumbens* L., *Justicia gendarussa* Burm. F., e *Justicia anselliana* (Nees) são as espécies que concentram maior número de estudos no gênero. A revisão de Correa e Alcântara (2012) sobre espécies do gênero *Justicia* aponta que apenas 23 espécies foram quimicamente investigadas, sendo 18 destas com estudos químicos e farmacológicos, sendo este um universo ínfimo em relação às 600 espécies de *Justicia* relatadas. Deste modo é necessário que o perfil químico e atividades farmacológicas de outras espécies de *Justicia* sejam investigados.

A espécie *Justicia aequilabris* (Nees) Lindau apresenta disposição de arbusto de 0,5-2 metros de altura, inflorescências em espigas, corola vermelha, brácteas verdes e por vezes possui as apicais com borda arroxeada (figura 1). É uma espécie endêmica e nativa do Brasil, sendo presente em todos os estados da região Nordeste e no estado de Minas Gerais (figura 2), nos domínios fitogeográficos da Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica (CÔRTES; RAPINI, 2013; OLIVEIRA; PRATA; FERREIRA, 2013; CHAGAS, 2022). *J. aequilabris* apresenta sinônimos relevantes e muitas espécies descritas por Nees e Lindau foram sinonimizadas nesta espécie, o que demonstra sua variabilidade morfológica, possivelmente associada à sua ampla distribuição (CÔRTES; RAPINI, 2013).

Apesar de pertencer à uma família e gênero com importantes metabólitos e atividades biológicas, a espécie *J. aequilabris* não possui estudos fitoquímicos e farmacológicos, desta forma, a sua caracterização pode apresentar informações singulares na descoberta de compostos bioativos.

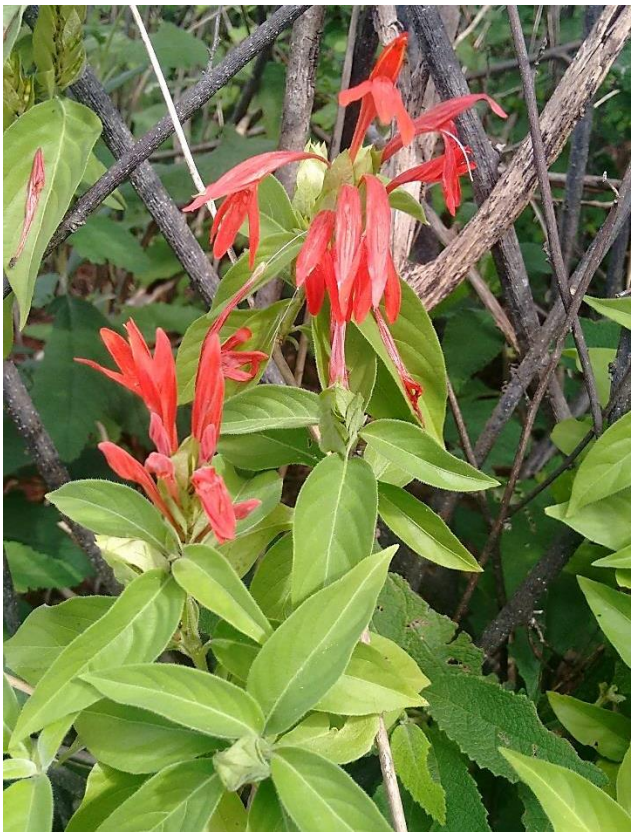


Figura 1. Detalhes da espécie *J. aequilabris*.

Fonte: Joanda P. R. Silva

Figura 2. Distribuição de espécies *J. aequilabris* no Brasil.

Fonte: Reflora Brasil.

2.2 Lignanas

Lignanas são formadas por dímeros de fenilpropanóides e são amplamente distribuídas nas angiospermas. Os seus compostos possuem diversos efeitos protetores à saúde humana. As lignanas são constituídas de vários subtipos estruturais (figura 3), como tetrahidrofurano, ariltetralina, dibenzilbutano, furofurano entre outros (BANSKOTA et al., 2004; TEPONNO et al., 2016; ZÁLEŠÁK; BOM; POSPÍŠIL, 2019; CUI et al., 2020; WANG et al., 2022).

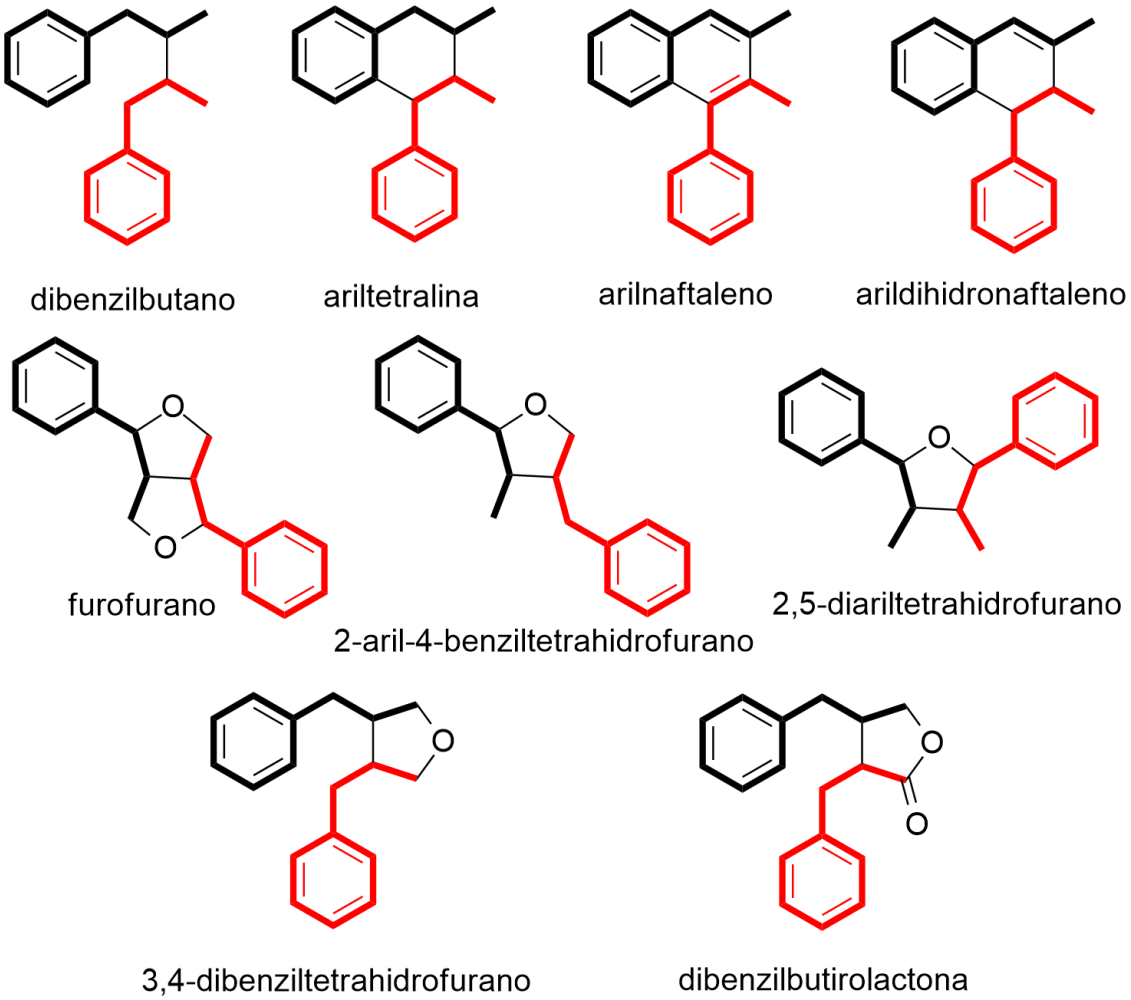


Figura 3. Principais esqueletos de lignanas.

2.2.1 Biossíntese de lignanas

As lignanas são metabólitos secundários originados da via do ácido chiquímico (etapa 1), o ácido cinâmico formado a partir do aminoácido fenilalanina, representa o bloco estrutural inicial C_6C_3 que dará origem as lignanas (figura 4) (DEWICK, 2002).

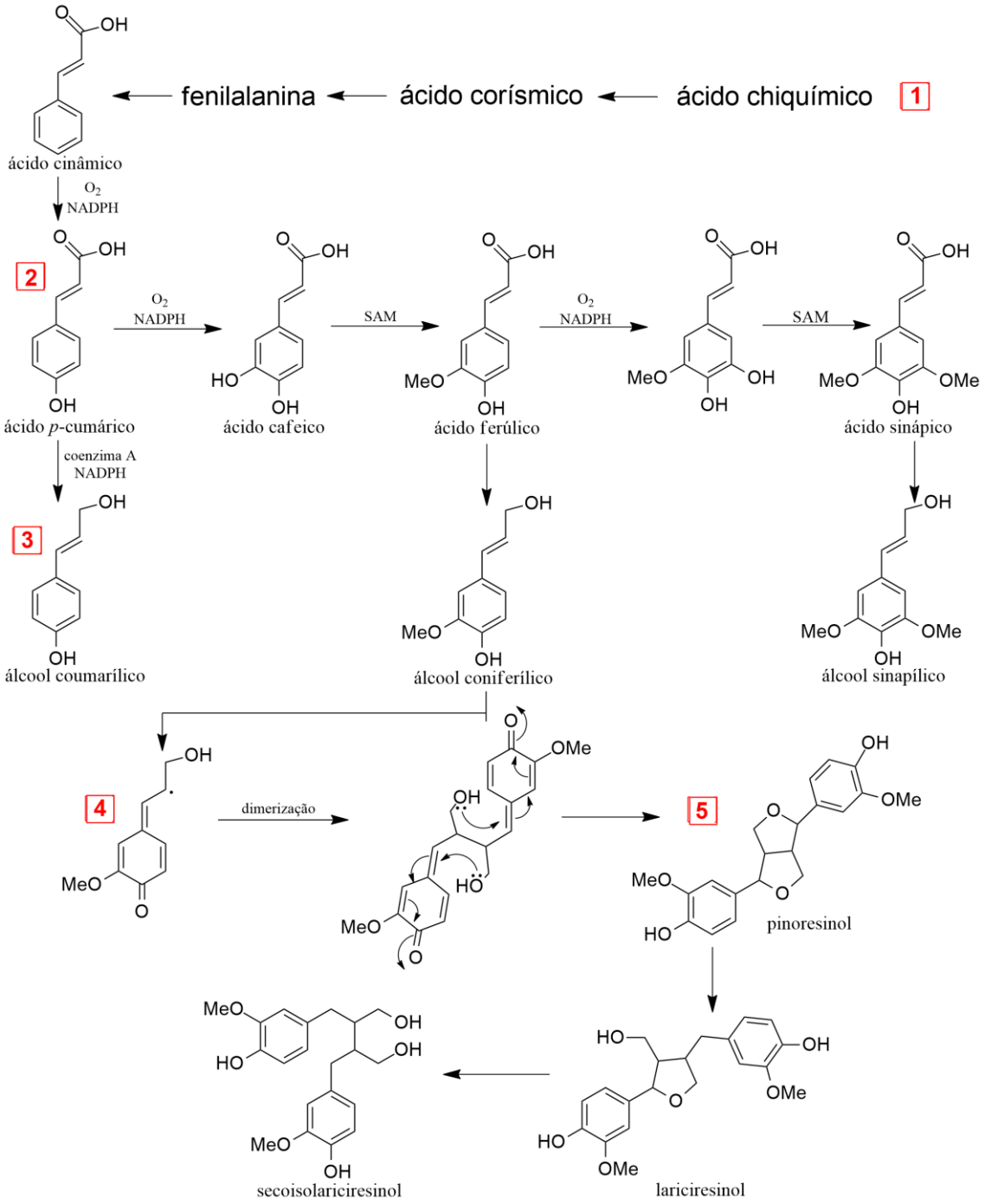


Figura 4. Via biossintética das lignanas do tipo dibenzilbutano.

Na etapa 2 observa-se a formação dos ácidos derivados do ácido cinâmico (ácido *p*-coumárico, caféico, ferúlico e sinápico) por reações de metilações mediadas pela enzima S-adenosil metionina (SAM) e hidroxilações devido a ação do O_2 e NADPH. Na etapa 3 ocorre a formação de álcoois através da redução de ácidos cinâmicos por

intermédio da coenzima A. O álcool coumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico são formados nesta etapa e estes três álcoois representam os monômeros precursores das diversas estruturas das lignanas e neolignanas (SIMÕES et al., 2017; ZÁLEŠÁK; BOM; POSPÍŠIL, 2019).

A enzima peroxidase promove a oxidação do grupo fenol do álcool coniferílico promovendo a deslocalização do elétron desemparelhado na etapa 4, possibilitando a formação de um radical estabilizado por ressonância. O emparelhamento radical de estruturas de ressonância podem então fornecer uma gama de sistemas diméricos contendo quinonametídeos reativos, que são suscetíveis ao ataque nucleofílico de grupos hidroxila no mesmo sistema, ou por moléculas de água externas. O acoplamento oxidativo de duas unidades de álcool coniferílico ocasiona a formação do pinoresinol (DEWICK, 2002; ZÁLEŠÁK; BOM; POSPÍŠIL, 2019). Na etapa 5 observa-se a biossíntese do secoisolariciresinol (dibenzilbutano) que possui como precursores o pinoresinol e lariciresinol.

2.3 Lignanas do tipo dibenzilbutano (LDBB) e atividades farmacológicas

Lignanas do tipo dibenzilbutano apresentam as unidades C_6C_3 e $C_6'C_3'$ ligadas entre C8 e C8′ (figura 3), geralmente apresentando modificações estruturais em C-3, 3′, C-4, 4′ e C-9, 9′ (ZALEŠA; BOM; POSPIŠIL, 2019). As LDBB apresentam inúmeros estudos de caráter *in-silico*, pré-clínicos e clínicos demostrando seu potencial terapêutico, sendo promissoras para produção de novos medicamentos e até mesmo para eleição de plantas como alimentos funcionais (KIYAMA, 2016; ZALEŠA; BOM; POSPIŠIL, 2019).

2.3.1 Secoisolariciresinol diglicosídeo (SDG) e enterolignanas

Dentro da classe das LDBB, a SDG (figura 5) é o composto com mais estudos relacionados, desde teste pré-clínicos a clínicos, apresentando atividades na redução da aterosclerose, anticâncer, diabetes, anti-inflamatória, entre outros, indicando que este composto oferece vários benefícios para a saúde (TOKUNAGA; WOODIN; STEGEMAN, 2016). A SDG é encontrada em alguns alimentos, mas está presente de forma pronunciada na linhaça. Após a ingestão, a SDG é convertida a secoisolariciresinol, que sofre metabolismo adicional pela microbiota intestinal para produzir enterodiol e enterolactona (GARCÍA-MATEOS et al., 2017). Estas lignanas são conhecidas como enterolignanas e possuem inúmeras atividades biológicas

relatadas, como antioxidante e estrogênica, alguns estudos epidemiológicos indicam que estas lignanas estão relacionadas à prevenção do câncer de mama (NESBITT; LAM; THOMPSON, 1999; LANDETE, 2012).

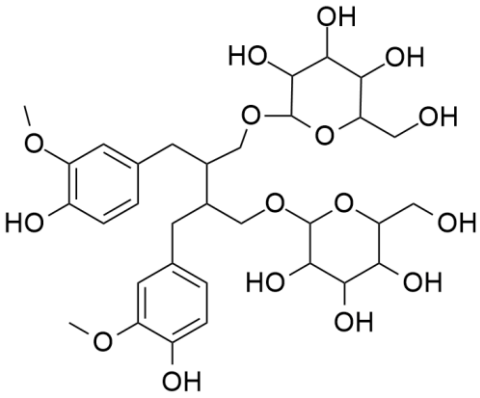


Figura 5. Estrutura da secoisolariciresinol diglicosideo.

2.3.2 Revisão de literatura sobre atividade farmacológica de LDBB

Em levantamento realizado do ano de 1991 até 2020 na base de dados ScienceDirect, foram encontrados 46 moléculas com esqueleto dibenzilbutano cuja atividade farmacológica era descrita (figura 6). Os metabólitos ácido meso-dihidroguaiarético (**1**), ácido dihidroguaiarético (**2**), secoisolariciresinol (**9**) e machilina A (**27**) foram os compostos com mais estudos relatados.

O ácido meso-dihidroguaiarético (**1**) e ácido dihidroguaiarético (**2**) são obtidos comumente na resina de guaiaco produzida a partir das espécies *Guaiacum officinale* L. e *G. sanctum* L. Estes metabólitos apresentaram relevantes atividades anti-inflamatória, antiparasitária, antimicrobiana, citotóxica e neuroprotetora, sendo moléculas potenciais para prosseguimento de estudos *in vitro.*

Machilina A (**27**) é um composto isolado principalmente da *Machilus thunbergii* que apresenta potencial para induzir a deposição de cálcio, e a diferenciação de osteoblastos, com provável atividade anabólica no metabolismo ósseo (LEE et al., 2009). A inibição da proliferação celular atualmente é a atividade mais relatada deste composto, obtendo significativa ação frente a várias linhagens celulares em testes *in vitro* (Tabela 1), sendo um candidato promissor para continuação de estudos pré-clínicos.

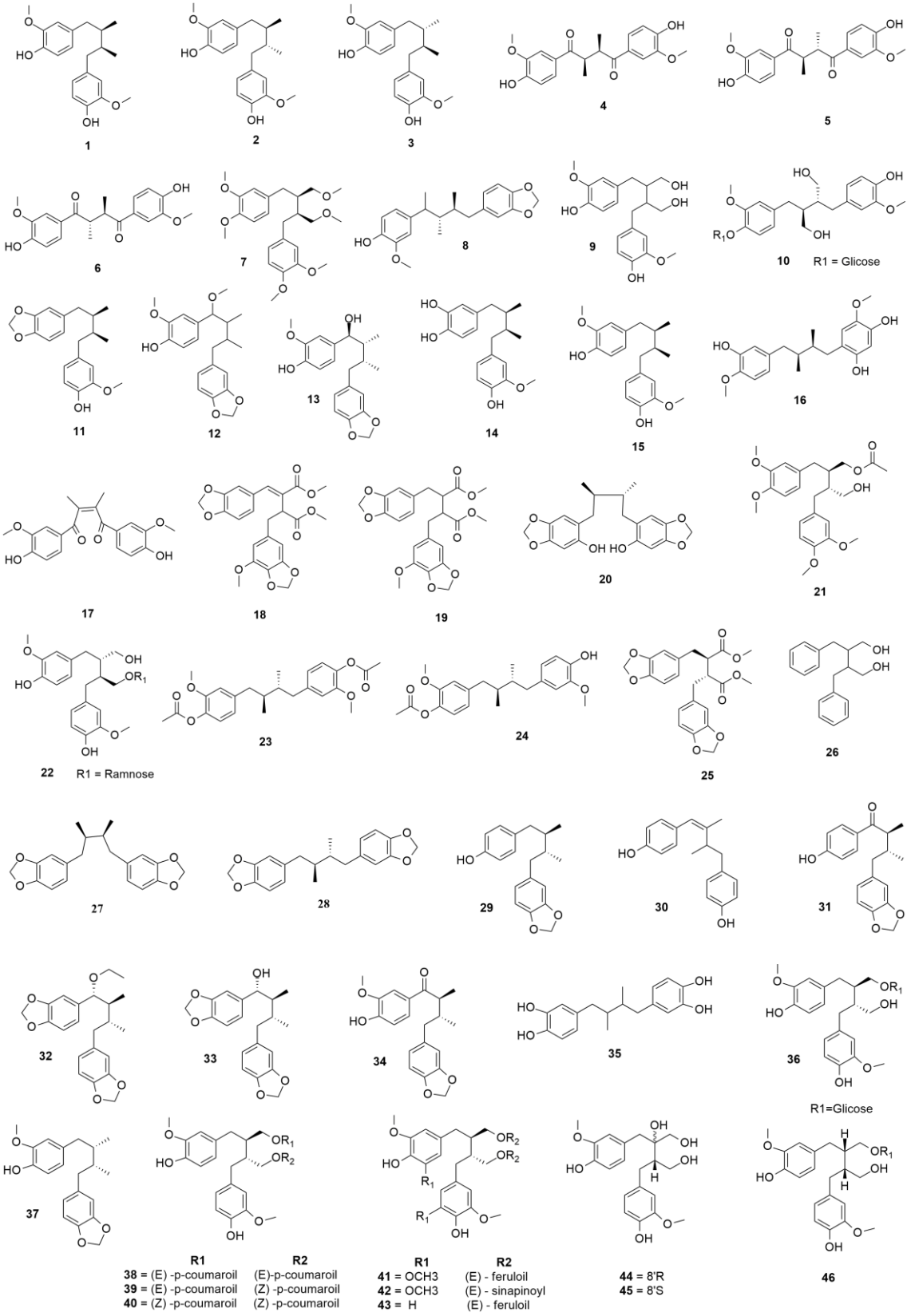


Figura 6. Estrutura das LDBB com atividades farmacológicas relatadas.

Secoisolariciresinol (**9**) apresenta muitas citações na literatura, principalmente por ser aglicona da SDG, e por ser precursora de enterolignanas geradas a partir da mesma na microbiota gastrointestinal de mamíferos (KEZIMANA et al. 2018). A secoisolariciresinol apresentou promissores resultados *in vivo* sobre seus efeitos estrogênicos e na adipogênese (TOMINAGA et al., 2009). Os estudos *in vitro* avaliados indicam que a secoisolariciresinol possui relevante atividade antioxidante quando comparada aos controles positivos utilizados, demonstrando ser promissora para estudos farmacológicos posteriores (BANSKOTA et al., 2004).

Existem dezenas de atividades farmacológicas descritas para as LDBB, segundo levantamento realizado as atividades com os maiores números de moléculas testadas (>5), foram anti-inflamatória, antimicrobiana, antioxidante, antiviral, citotóxica, estrogênica e neuroprotetora, como pode ser observado na tabela 1.

2.3.2.1 Anti-inflamatório

A inibição de mediadores da inflamação como o fator de necrose tumoral-α (TNF-α), a interleucina-1β (IL-1β) e a inibição da produção de óxido nítrico (ON) foram os principais mecanismos anti-inflamatórios no qual as lignanas foram avaliadas. Todas as moléculas testadas exibiram atividade anti-inflamatória, demostrando que esta atividade é promissora para que outras lignanas com este esqueleto sejam testadas, assim como, para que haja prosseguimento para analise *in vivo* das moléculas que foram avaliadas previamente.

2.3.2.2 Antimicrobiano

As lignanas derivadas do ácido dihidroguaiarético apresentaram atividades frente a fungos e bactérias Gram-positivas e negativas clinicamente importantes. A filantina apresentou capacidade de modular a atividade de fluoroquinolonas frente à cepa de *S. aureus* SA1199-B resistente, através da inibição da bomba de efluxo NorA, indicando um campo de atuação para as lignanas, como agentes potencializadores de antimicrobianos no tratamento de infecções. Porém a atividade antimicrobiana possui o maior número de moléculas que foram inativas (26,5%), após as análises descritas nos artigos, indicando que é necessária uma racionalização prévia para posterior avaliação *in vitro*, como abordagens computacionais para posterior direcionamento destas aos testes antimicrobianos.

Tabela 1. Atividade biológica das LDBB.

Nº	Molécula	Planta	Família	Parte usada	Resultado		Conclusão	Referencia
ANTI-INFLAMATÓRIO								
					P	***M*** (μM)		
17	Furoguaiaoxidina	*Guaiacum* sp	Zygophyllaceae	Resina	Produção de ON	24,7	Apresentou atividade anti-inflamatória	Nakano et al. 2017
	Ácido meso-dihidroguaiarético	*Guaiacum* sp	Zygophyllaceae	Resina	Produção de ON	29,0	Apresentou atividade anti-inflamatória	Nakano et al. 2017
1	Ácido meso-dihidroguaiarético	*Saururus chinensis*	Saururaceae	Raízes	Níveis de PGD2	9,8	Apresentou atividade anti-inflamatória	Moon et al. 2008
					Determinação de leucotrieno C4	1,3		
					Inibição a reação de desgranulação	11,4		
44	Alashinols F	*Syringa pinnatifolia*	Oleaceae	Casca do caule	Produção de ON	86,9	Apresentou atividade anti-inflamatória	Feng et al. 2017
45	Alashinols G	*Syringa pinnatifolia*	Oleaceae	Casca do caule	Produção de ON	103,1	Apresentou atividade anti-inflamatória	Feng et al. 2017
9	Secoisolariciresinol	*Syringa pinnatifolia*	Oleaceae	Casca do caule	Produção de ON	57,7	Apresentou atividade anti-inflamatória	Feng et al. 2017
46	Meso-secoisolariciresinol	*Syringa pinnatifolia*	Oleaceae	Casca do caule	Produção de ON	63,5	Apresentou atividade anti-inflamatória	Feng et al. 2017
7	Filantina	*Phyllanthus amarus*	Phyllanthaceae	Planta inteira	IL-1β	8,81	Apresentou atividade anti-inflamatória	Harikrishnan et al. 2018
					TNF-α	2,86		
ANTIMICROBIANO								
					Micro	**CIM**		
	Ácido meso-dihidroguaiarético	*Larrea tridentata*	Zygophyllaceae	-	*Mycobacterial tuberculosis*	50 μg/mL	Apresentou ação antibacteriana	Clemente-Soto et al. 2014
					Micro	***TC %***		
1	Ácido meso-dihidroguaiarético		Produto de síntese		*Bacillus subtilis*	1,6	Exibiu atividade antifúngica e antibacteriana	Kawaguchi et al. 2009
					Staphylococcus aureus	1,6		
					Listeria denitrificans	1,6		
					Alternaria alternata	30		
2	(−)-ácido dihidroguaiarético		Produto de síntese		*Bacillus subtilis*	1,6	Exibiu atividade	Kawaguchi et

					Staphylococcus aureus		3,1	antifúngica e antibacteriana	al. 2009
					Listeria denitrificans		0,4		
					Alternaria alternata		32		
					Bacillus subtilis		1,6		
3	(+)-ácido dihidroguaiarético		Produto de síntese		*Staphylococcus aureus*		3,1	Exibiu atividade antifúngica e antibacteriana	Kawaguchi et al. 2009
					Listeria denitrificans		0,4		
					Salmonela choleraesuis		3,1		
					Alternaria alternata		38		
4	Ácido 7,7’meso-dioxodihidroguaiarético		Produto de síntese		*Alternaria alternata*		39	Exibiu atividade antifúngica	Kawaguchi et al. 2009
					Listeria denitrificans		1,6		
5	(−) ácido 7,7’-dioxodihidroguaiarético		Produto de síntese		*Alternaria alternata*		51	Exibiu atividade antifúngica e antibacteriana	Kawaguchi et al. 2009
					Bacillus subtilis		13		
					Staphylococcus aureus		25		
6	(+)-ácido 7,7’-dioxodihidroguaiarético		Produto de síntese		*Listeria denitrificans*		6,3	Exibiu atividade antifúngica e antibacteriana	Kawaguchi et al. 2009
					Alternaria alternata		66		
					P	***Micro***	***M***		
7	Filantina	*Phyllanthus amarus*	Phyllanthaceae	Folhas	Atividade moduladora na resistência a Norfloxacino	*S. aureus* SA1199-B	64 para 12.7 μg/mL	Ação moduladora na resistência à fluoroquinolona	Ribeiro et al. 2019
						ANTIOXIDANTE			
					P	***M***	***C***		
8	Anwulignana	*Schisandra chinensis*	Schisandraceae	Fruto	DPPH (IC_{50}, μM)	11,2	25.3	Exibiu atividade antioxidante	Zhang et al. 2013
					P	***M***	***C***		
9	Secoisolariciresinol	-	-	-	Redução de zirnosan ativado PMNL-CL (%)	91,2	18,75	Exibiu alta atividade antioxidante	Prasad et al. 2000

	Secoisolariciresinol	*Taxus yunnanensis*	Taxaceae	Madeira	***P***	***M***	***C1***	***C2***	Exibiu atividade antioxidante	Banskota et al. 2002
					DPPH (IC_{50}, μM)	28,9	25,5	12,6		
	Secoisolariciresinol	*Rubus idaeus*	Rosaceae	Rizoma	***P***		***M***	***C***	Exibiu atividade antioxidante	Xu et al. 2017
					DPPH (IC_{50}, μg/mL)		78,4	7,46		
					ABTS (IC_{50}, μg/mL)		9,4	6,24		
					FRAP (50 μg/mL)		173,4	175,6		
	Secoisolariciresinol		Produto de síntese		***P***		***M***		Apresentou forte atividade antioxidante e inibiu danos mediados por radical peroxil AAPH do plasmídeo DNA	Hu;Yuan; Kitts, 2007
					DPPH (%)		91,2			
					AAPH-induced plasmid pBR322 DNA strand scission (%)		89,6			
9	Secoisolariciresinol		Produto de síntese		***P***	***M***	***C1***	***C2***	***C3***	Exibiu atividade antioxidante	Eklund et al. 2005
					EC_{50}/μM	9	17,3	18,7	21	
					*T*50% (30 μM)/min	5	2	2	81	
10	(-)-secoisolariciresinol 4-glucosídeo	*Fragaria* x *ananassa* Duch	Rosaceae	Fruto	***P***	***M***		***C***		Exibiu atividade antioxidante	Yang et al. 2016
					ABTS (IC_{50}, μM)	16,66		14,21		
					DPPH (IC_{50}, μM)	110,83		27,59		
					FRAP (mmol/g)	3,03		14,98		
15	4,4'-((2R,3S)-2,3-dimetilbutano-1,4-diol)bis(2-metoxifenol)	*Myristica fragrans*	Myristicaceae	Sementes	***P***	***M***		***C***	Apresentou atividade LDL-antioxidante	Kwon et al. 2008
					TBARS (IC_{50} μM)	7,5		3.1		
12	7-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-7'-(3',4'-metilenodioxifenil)-8,8'-lignana-7-metil éter					7,9			Apresentou atividade LDL-antioxidante	Kwon et al. 2008
13	4-((1S,2R,3R)-4-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-1-hidroxi-2,3-dimetilbutil)-2-metoxifenol					6,3			Apresentou atividade LDL-antioxidante	Kwon et al. 2008
14	Ácido heminordihidroguaiarético					3,6			Potente atividade LDL-antioxidante	Kwon et al. 2008

15	4,4'-((2*R*,3*S*)-2,3-dimetolbutano-1,4-diol)bis(2-metoxifenol)					2,6		Potente atividade LDL-antioxidante	Kwon et al. 2008
					P	***M***	***C***		
16	Ácido 2'-hidroxi dihidroguaiarético	*Saururus chinensis*	Saururaceae	Partes subterrâ-neas	TBARS (IC_{50} µM)	3,3	2,8	Apresentou atividade LDL-antioxidante	Lee et al. 2004
					DPPH (IC_{50}, µg/mL)	29,62	7,46		
					ABTS (IC_{50}, µg/mL)	8,50	6,24		
					FRAP (50 µg/mL)	120,42	175,69		
ANTIVIRAL									
					P	***M***	***C1***	***C2***	
18	Rinacantina E	*Rhinacanthus nasutus*	Acanthaceae	Planta inteira	EC_{50}^{D} µg/mL	1,7	0,054	-	Atividade antiviral significativa contra o vírus *influenza* tipo A	Kernan et al. 1997
					IC_{50}^{D} µg/mL	44	56	-		
					SI^{D}	26	1000	-		
					EC_{50}^{E} µg/mL	7,4	-	3,7		
					IC_{50}^{E} µg/mL	102	-	>200		
					SI^{E}	15	-	>59		
					P	***M***	***C1***	***C2***	
19	Rinacantina F	*Rhinacanthus nasutus*	Acanthaceae	Planta inteira	EC_{50}^{D}µg/mL	< 0,94	0,054	-	Atividade antiviral significativa contra o vírus *influenza* tipo A	Kernan et al. 1997
					IC_{50}^{D} µg/mL	17	56	-		
					SI^{D}	<18	1000	-		
					EC_{50}^{E} µg/mL	3,1	-	3,7		
					IC_{50}^{E} µg/mL	21	-	>200		
					SI^{E}	6,8	-	>59		
20	Saururina B	*Saururus chinensis*	Saururaceae	Rizomas	***P***	***M***	***C***	Mostrou atividade inibitória dose dependente da Protease do HIV-1	Lee et al. 2010
					protease HIV-1 IC_{50} (µM)	5,6	0,09		
21	Acetato de éter dimetílico de secoisolariciresinol	*Justicia procumbens*	Acantacheae	Partes aéreas	***P***	***M***	***C***	Exibiu atividade anti-HIV-1	Xu et al. 2019
					IC_{50} µmol·L^{-1}	5,27	0,0031		
					CC_{50} µmol·L^{-1}	11,6	>10		
					SI	2,2	>3200		

CITOTOXICIDADE									
8	Anwulignana	*Schisandra chinensis*	Schisandraceae	Fruto	***L***	***M*** **(**μM)	***C*** **(**μM)	Apresentou atividade citotóxica frente às células de câncer de próstata	Zhang et al. 2013
					RWPE-1	39.3	22.1		
22	(+)-secoisolariciresinol-*O*--*L*-ramnosídeo	*Lespedeza cuneata*	Fabaceae	Partes aéreas	***L***	***M*** **(**μM)	***C*** **(**μM)	Citotoxicidade fraca contra linhagens de células de câncer de mama	Baek et al. 2018
					Bt549	26.16	1.93		
					MDA-MB-231	24.38	1.36		
					HCC70	25.04	1.79		
2	(−)-ácido dihidroguaiarético	*Endiandra anthropo-phagorum*	Lauraceae	Raizes	***L***	***M*** **(**μM)	***C*(**μM)	Atividade citotóxica potente frente a células de carcinoma pulmonar	Davis et al. 2019
					A549	7.49	-		
	(−)-ácido dihidroguaiarético	*Pycnanthus angolensis*	Myristicaceae	Casca do caule	***L***	***M*(**μM)	***C1*(**μM)	***C2*** **(**μM)	
						7,7			
23	4,4′-diacetil-3,3′-dimetoxilignana		Produto de reação		EPG85-257RDB	15.5	6.2	4.0	Citotoxicidade alta e moderada frente à célula de carcinoma gástrico	Duarte et al. 2010
24	4′-hidroxi-3,3′,4-trimethoxilignana		Produto de reação			4.7				
25	Heliobuftalmina	*Pycnanthus angolensis*	Myristicaceae	Casca do caule		3,5				
26	Hattalina		Produto de síntese		***P***		***M***	Apresentou atividade inibitória frente à ATPase de tecido de câncer gástrico	Hirano et al. 1991
					Inibição da ATPase (%)		54,2		
27	Machilina A		Produto de síntese		***P***		***M***	Apresentou atividade inibitória	Chung et al. 2019

					Inibição da lactato desidrogenase A (IC_{50})			84 μM				
	Machilina A	*Machilus thunbergfi*	*Lauraceae*	Casca	***L***		***M*** ($IC_{50,}$μM)		***C*** ($IC_{50,}$μM)		Apresentou atividade frente as linhagens de carcinoma pulmonar, adenocarcinoma de mama e cólon	Lee et al. 2004
					A-549		12,4		0,7			
					MCF7		12,4		13,4			
					HCT-15		7,9		0,01			
					L	***M***	***C1***	***C2***	***C3***	***C4***		
	Machilina A	*Machilus thunbergfi*	*Lauraceae*	Casca	HL-60 (ng/mL)	26	14,5	3,9	2,4	5,4	Apresentou atividade inibitória frente a células de leucemia	Hirano; Gotoh; Oka, 1994
					MOLT-4 (ng/mL)	54	*22,4*	19	0,49	22		
					L				***M*(**μM)			
	Ácido meso-dihidroguaiarético	Banco (Natural Product Bank of Korea)									Mostrou efeitos citotóxicos sobre linhagens de câncer de mama	Choi et al. 2015
					4T-1				6,7			
1					MCF-7				19,6			
					L		***M*** **(**μM)		***C*** **(**μM)			
	Ácido meso-dihidroguaiarético	*Saururus chinensis*	Saururaceae	Folhas	AGS		14.02		-		Atividade inibitória significativa frente a células de câncer de estômago	Jeong et al. 2015
					NCI-N87		32.45		-			
					P			***M***	***C***			
	Secoisolariciresinol	Banco (The in-house Natural Product Database)			Inibição das metaloproteinases (MMP-1) (IC_{50} μM)			50,12	0,0041		Demonstrou atividade inibitória	Wang et al. 2012
9					***P***				***M***			
	Secoisolariciresinol	Produto de síntese			Supressão da formação de edema pericárdico causado por PCB126 (%)				87		Suprimiu anormalidades morfológicas em embriões de zebrafish expostos a PCB126	Tokunaga; Woodin; Stegeman, 2016

	Secoisolariciresinol	*Taxus yunnanensis*	Taxaceae	Madeira	***L*** HT-1080 (µg/mL) colon 26-L5 (µg/mL)	***M*** 5,9 60,2	***C*** 0,29 0,07	Exibiu atividade antiproliferativa em células de carcinoma do cólon e fibrossarcoma	Banskota et al. 2002
28	Erithro-6-austrobailignana	*Saururus chinensis*	Saururaceae	Folhas	***L*** AGS *NCI-N87*	***M* (µM)** 12.02 14.61	***C*(µM)** - -	Atividade inibitória significativa frente a células de câncer de estômago	Jeong et al. 2015
					ESTROGENICA				
29	4’-hidroxi-3,4-metilenodioxi-8,8’-lignana	*Iryanthera lancifolia*	Myristicaceae	Casca do caule	**P** RPP (%) RPE (%)	***M*** 0,01 68,7	***C*** 100 100	O composto foi ativo	Mesa-Siverio et al. 2008
30	(*E*)-4,4’-dihidroxi-7-en-8,8’-lignana	*Iryanthera lancifolia*	Myristicaceae	Casca do caule	**P** RPP (%) RPE (%)	***M*** 0,01 73,7	***C*** 100 100	O composto foi ativo	Mesa-Siverio et al. 2008
31	(8S,8’R)-4-hidroxi-3’,4’-metilenedioxi-7-ona-8,8’-lignana	*Iryanthera lancifolia*	Myristicaceae	Casca do caule	**P** RPP (%) RPE (%)	***M*** 0,01 50,1	***C*** 100 100	O composto foi ativo	Mesa-Siverio et al. 2008
32	(7R,8S,8’R)-7-etoxi-3,4:3’,4’-dimetilenodioxi-8,8’-lignana	*Iryanthera lancifolia*	Myristicaceae	Casca do caule	**P** RPP (%) RPE (%)	***M*** 0,01 84	***C*** 100 100	O composto foi ativo	Mesa-Siverio et al. 2008
33	Oleiferina C	*Iryanthera lancifolia*	Myristicaceae	Casca do caule	**P** RPP (%) RPE (%)	***M*** 0,01 47,8	***C*** 100 100	O composto foi ativo	Mesa-Siverio et al. 2008
34	Oleiferina D	*Iryanthera lancifolia*	Myristicaceae	Casca do caule	**P** RPP (%) RPE (%)	***M*** 0,01 42,8	***C*** 100 100	O composto foi ativo	Mesa-Siverio et al. 2008
27	Machilina A	*Iryanthera lancifolia*	Myristicaceae	Casca do caule	**P** RPP (%) RPE (%)	***M*** 0,01 13,5	***C*** 100 100	O composto foi ativo	Mesa-Siverio et al. 2008
35	Ácido nordihidroguaiarético		Produto de síntese		**P**	***M***	***C***	O composto foi ativo	Fujimoto et al.

					Ligação com o receptor de estrógeno	3×10^{-5} M		3×10^{-9} M		2004
					Taxa de inibição (%)	58,6		98,2		
					Inibição da DGAT2 (μM)	173,5		18,2		
NEUROPROTETORA										
38	9,9′-di-O-(*E*)-p-coumaroil-(8*R*,8*R*′)-secoisolariciresinol	*Sageretia theezans*	Rhamnaceae	Galhos	***P***	***M***		***C***	Potentes efeitos protetores contra o estresse oxidativo induzido por glutamato	Kang et al. 2018
						63				
39	9-O-(*E*)-p-coumaroil-9′-O-(*Z*)-*p*-coumaroil-(8*R*,8*R*′)-secoisolariciresinol	*Sageretia theezans*	Rhamnaceae	Galhos	Neurotoxicidade induzida por glutamato (%)	73		52		Kang et al. 2018
40	9,9′-di-O-(Z)-p-coumaroil-(8*R*,8*R*′)-secoisolariciresinol	*Sageretia theezans*	Rhamnaceae	Galhos		74				Kang et al. 2018
41	9,9′-O-di-(*E*)-feruloil-meso-5,5′-dimetoxisecoisolariciresinol	*Lindera obtusiloba*	Lauraceae	Caule	***P***	***M***		***C***	Os compostos atenuaram significativamente a neurotoxicidade	Lee et al. 2010
						46		0,5		
42	9,9′-O-di-(*E*)-sinapinoil-meso-5,5′-dimetoxisecoisolariciresinol	*Lindera obtusiloba*	Lauraceae	Caule	Neurotoxicidade induzida por glutamato (%)	45.5				Lee et al. 2010
43	9,9′-O-di-(*E*)-feruloil-meso-secoisolariciresinol	*Lindera obtusiloba*	Lauraceae	Caule		70				Lee et al. 2010
27	Machilina A	*Machilus thunbergi*	Lauraceae	Casca	***P***	***M***	***C1***	***C2***	Exibiu atividade Neuroprotetora	Ma; Sung; kim, 2004
					Neurotoxicidade induzida por glutamato (%)	23,6	83,6	70,5		
1	Ácido meso-dihidroguaiarético	*Machilus thunbergi*	Lauraceae	Casca	***P***			***M***	Significativa proteção das células neuronais contra apoptose	Ma et al. 2006
					Prevenção a apoptose induzida por STS (%)			90		

				Redução da elevação de $[Ca^{2+}]_i$ induzido por STS (%)			60	induzida por estaurosporina		
				Redução da superprodução de EROs e peroxinitrito induzido por STS (%)			55			
				P	***M***	***C1***	***C2***			
Ácido meso-dihidroguaiarético	*Machilus thunbergi*	Lauraceae	Casca	Neurotoxicidade induzida por glutamato (%)	58,5	83,6	70,5	Significativa atividade neuroprotetora		Ma; Sung; kim, 2004

P = Parâmetro; M = Atividade expressa pela molécula; C = Controle; C1 = Controle 1; C2 = Controle 2; L= Linhagem celular; Micro = Microoganismo; CIM= Concentração inibitória mínima; EC_{50} /IC_{50} = 50% da concentração efetiva; CC_{50}= Atividade citotóxica; SI = índice de seletividade; TC = taxa de crescimento; RPE = *Relative Proliferative Effect*; RPP = *Relative Proliferative Potency*; ABTS: captura do radical 2,2´-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico; FRAP = Poder Antioxidante Redutor Férrico; DPPH = eliminação do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil; STS = *staurosporine*; TBARS = Atividades antioxidantes de LDL no ensaio TBARS; EROS= Espécies reativas de oxigênio; OR = *Odd ratios*; D =Vírus da gripe tipo A, ensaio de inibição de hemadsorção; E = Vírus influenza tipo A, ensaio de efeito citopático; PCB126 = 3,3',4,4',5-pentaclorobifenil; PMNLs-CL = quimiluminescência (CL) de polimorfonucleares ativados por zimosan leucócitos (PMNLs); DGAT = Diacilglicerol aciltransferase.

2.3.2.3 Antioxidante

As lignanas apresentaram ação antioxidante pronunciada, com moléculas com atividade promissoras quando comparadas ao controle positivo utilizado, como a anwulignana. A secoisolariciresinol apresentou atividade frente a diversos parâmetros testados (DPPH, ABTS, FRAP, entre outros) por diversos autores (PRASAD et al., 2000; EKLUND et al., 2005; HU; YUAN; KITT, 2007). Como este composto está presente em diversas frutas e vegetais, como ameixa e caju, mas principalmente linhaça (MILDER et al, 2005), esta informação demostra que a secoisolariciresinol pode gerar benefícios à saúde humana, visto que, a geração de radicais livres está no cerne e no envolvimento de vários processos patológicos.

2.3.2.4 Antiviral

A atividade antiviral é uma das mais associadas às lignanas, devido à substância mais conhecida da classe, a podofilotoxina, um agente anti-mitótico utilizado no tratamento de condilomas acuminados causados por infecção viral (BRÁS; SARDINHA; PACHECO, 2015), apesar da notoriedade desta atividade, não há muitos estudos com avaliação da atividade antiviral de LDBB. Entre os estudos disponíveis, as lignanas de *Rhinacanthus nasutus* apresentaram atividades potenciais contra o vírus da *influenza* tipo A. Diante cenário de epidemias virais recorrentes, há a necessidade da pesquisa de novos agentes antivirais, ferramentas como a triagem virtual e outras abordagens computacionais perfazem uma ferramenta potencial para pesquisa e direcionamento de lignanas para avaliação antiviral.

2.3.2.5 Citotoxicidade

A conjugação do epímero da podofilotoxina em C-4 com derivados de *D*-glicose proporcionou a produção do etoposídeo e teniposídeo, agentes quimioterápicos, utilizados em câncer de pulmão, linfoma, leucemia, entre outros (BRANDÃO et al., 2010; ZALEŠA; BOM; POSPIŠIL, 2019). A influência da atividade destes compostos pode indicar o grande número de trabalhos avaliando o potencial citotóxico entre outros mecanismos para o tratamento de câncer das lignanas, porém, um grande número de artigos não apresentam os valores dos controles positivos utilizados, dificultando a correlação da potência da atividade do composto em estudo. Aliado a este fato, 23,5 % das moléculas inativas reportadas nos artigos haviam sido testadas como agentes

anticâncer, demonstrado que o processo de escolha das moléculas para avaliação da citotoxicidade carece de outras ferramentas além da literatura.

2.3.2.6 Estrogênica

Lignanas possuem atividade estrogênica por atuar em vias de sinalização como no receptor de estrogênio (RE), vias da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), e funções celulares específicas (KIYAMA, 2016). As LDBB foram avaliadas principalmente pelo grau de proliferação (RPE) e potência estrogênica (RPP) tendo demostrado efeito estrogênico (MESA-SIVERIO et al., 2008), sendo, portanto uma importante a averiguação da atividade destas moléculas frente a doenças estrógeno dependentes. Devido a estes lignanas serem encontradas em plantas tradicionalmente alimentícias, a abordagem como suplemento pode ser também uma oportunidade para aplicação das LDBB (KIYAMA, 2016).

2.3.2.7 Neuroprotetora

A excitotoxicidade explica os mecanismos básicos da fisiopatologia da isquemia cerebral, sendo baseada na liberação excessiva de aminoácidos excitatórios. Uma isquemia promove uma excessiva liberação de glutamato, altas concentrações de glutamato inibem a captação de cistina através do antiporter cistina/glutamato, levando assim a uma depleção de glutationa, aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio e morte celular (GAGLIARDI, 2000; LEE et al., 2010). Desta forma, o estudo dos efeitos protetores das lignanas do tipo dibezilbutano contra o estresse oxidativo induzido pelo glutamato foi uma das avaliações mais comuns para mensuração do efeito neuroprotetor. As lignanas derivadas da secoisolariciresinol apresentaram promissores efeitos neuroprotetores, demostrando que são compostos de interesse para continuação de estudos clínicos.

2.4 O uso da desreplicação na investigação de matrizes vegetais

O arsenal de metabólitos contidos em uma espécie vegetal é inestimável para o desenvolvimento de novos medicamentos, ingredientes cosméticos, nutracêuticos ou produtos de origem biológica. Estima-se que há mais de 200.000 metabólitos no reino vegetal, e de acordo com o genoma, uma planta pode ter cerca de 5.000 produtos naturais (MUKHERJEE et al. 2017; ALVAREZ-RIVERA et al. 2019).

Na busca por compostos biologicamente ativos, a caracterização fitoquímica de metabólitos secundários representa a triagem inicial, seguida ou associada a analise farmacológica. Porém comumente ocorre o reisolamento de compostos conhecidos após laborioso fluxo de trabalho, formado por etapas de purificação e identificação, ou a investigação de materiais brutos irrelevantes em relação a uma aplicação biológica selecionada. Desta forma, há urgência no desenvolvimento de métodos rápidos para a identificação de novos compostos (CIESLA; MOADDEL, 2016; GOMES et al., 2017; ALVAREZ-RIVERA et al., 2019)

Técnicas cromatográficas, espectroscópicas e espectrométricas são as principais aliadas na análise de matrizes vegetais, o estabelecimento por meio destas técnicas do perfil quimico de matrizes complexas e conhecido como desreplicação (GAUDENCIO; PEREIRA, 2015). HPLC é a técnica de separação mais amplamente utilizada para caracterização fitoquímica de extratos botânicos, com a vantagem de uso de vários detectores, permitindo analisar diferentes classes de metabólitos (CIESLA; MOADDEL, 2016).

A combinação de cromatografia líquida e espectrometria de massa (EM) representa a hifenação de técnicas mais comumente usada para estabelecer o perfil químico de espécies vegetais, pois possibilita a identificação de estruturas moleculares, em pequenas concentrações, mesmo dentro de misturas complexas de compostos (CIESLA; MOADDEL, 2016; GANZERA; STURM, 2018). A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) permite a detecção de metabólitos voláteis ou derivatizados não voláteis em concentrações menores em comparação com outras técnicas para caracterização estrutural (ALVAREZ-RIVERA et al. 2019).

A versatilidade da EM baseia-se na possibilidade de aplicação de diferentes fenômenos físicos para ionização das moléculas analisadas e geração de seus fragmentos, aliado a aplicação de várias técnicas de EM, análise de cátions e ânions, e alta resolução dos analisadores. Técnicas computacionais podem ser usadas no processamento de dados de EM, posibilitando decifrar a fragmentação em massa de pequenas moléculas para a identificação global de metabolomas humanos, animais, vegetais e microbiota, resultando em uma compreensão mais profunda dos metabolismos (TSUGAWA, 2018; ALVAREZ-RIVERA et al. 2019).

O uso dos dados de CL-EM de alta resolução e espectrometria de massa em tandem geram dados estruturais, que possibilitam determinar a identidade dos compostos principais por pesquisa em bancos de dados e bibliotecas de espectros de

massa on-line de produtos naturais (MassBank, GNPS, Metlin, ReSpect e NIST) e por comparação com padrões. Os bancos são constitudos por fragmentação *in silico* e espectros EM/EM fornecidos por grupos de pesquisas, cuja interpretação exige refino por processo manual e demorado (KIND; FIEHN 2017; ROCHAT et al. 2017; TSUGAWA, 2018; ALVAREZ-RIVERA et al. 2019).

Global Natural Product Social Molecular Networking (GNPS) é uma plataforma online de análise de dados de espectrometria de massa em tandem (EM/EM). Destina-se a fornecer o máximo de informações químicas possível em um conjunto de dados EM/EM não direcionado. A rede molecular é uma das principais ferramentas do GNPS, ela cria uma tabela de dados estruturada que reflete a diversidade molecular, sendo capaz de identificar potenciais semelhanças entre todos os espectros EM/EM dentro do conjunto de dados e possibilita propagar a anotação para moléculas desconhecidas, mas relacionadas. A rede molecular pode ser integrada as bibliotecas espectrais do GNPS, permitindo o processo de desreplicação (WANG et al., 2016; ARON et al. 2020; VINCENTI et al. 2020).

Para padronizar os níveis de confianças de dados espectroscópicos e espectrométricos foi instituido o *Metabolomics Standards Initiative* (MSI), que objetiva identificar, desenvolver e divulgar uma descrição do consenso das melhores práticas de análise química relacionadas a todos os aspectos da metabolômica (SUMNER, et al. 2007). Schymanski e colaboradores (2014) propuseram cinco níveis de confiança para identificações baseadas em espectrometria de massas de alta resolução (EMAR), tendo em vista que nem sempre é possível ou mesmo significativo sintetizar cada substância ou confirmá-los através de métodos complementares.

O nível 1 e 2 são níveis de identificação estrutural, onde as informações experimentais sugerem fortemente uma estrutura molecular. No nível 1 (estrutura confirmada) a estrutura proposta foi confirmada por meio da comparação dos dados de EM, EM/EM e tempo de retenção com a substância padrão e se possível, um método ortogonal também deve ser usado, como RMN. No nível 2 (estrutura provável) ocorre correspondência com dados da literatura ou biblioteca espectrais onde a correspondência da estrutura do espectro é inequívoca. Os níveis 3 a 5 não identificam substâncias apresentam apenas informações pontuais sobre classe química, fórmula molecular e massa dos compostos. No nivel 3 existem evidências para possíveis estruturas, mas são informações insuficientes para apenas uma estrutura exata. No nível 4 conhece-se a fórmula molecular inequívoca, mas não há evidências suficientes para

propor possíveis estruturas e no nível 5, a massa exata (*m/z*) pode ser medida em uma amostra, porém falta informação para atribuir até mesmo uma fórmula molecular (SCHYMANSKI et al., 2014) .

2.5 Análises *in silico* na descoberta de novos IFAs

O rápido desenvolvimento da síntese combinatória e do screening de alto rendimento trouxe consigo a possibilidade de se gerar e avaliar farmacologicamente grande número de compostos em um intervalo de tempo relativamente curto. Entretanto, entre 1990 e 2013, o número de novas moléculas aprovadas pelo FDA não aumentou significativamente, sendo notada inclusive uma pequena redução. Essa diminuição é atribuída principalmente ao fato de que novas moléculas tendem a não ter propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas interessantes para o mercado (TIAN et al., 2015, WANG et al., 2015).

A pesquisa e desenvolvimento no campo farmacêutico apresenta um alto custo e uma crescente taxa de falha. Dessa forma, esforços multidisciplinares têm sido empregados para balancear esse risco, resultando no conjunto de procedimentos chamado “design racional de fármacos”, que se baseia no conhecimento de um alvo biológico. O aumento da capacidade computacional associado ao sequenciamento do genoma humano e ao desenvolvimento da cristalografia e da ressonância magnética nuclear possibilitou a caracterização de vários alvos terapêuticos, que puderam ser, então, empregados para a pesquisa farmacêutica, através de sua caracterização tridimensional (WANG et al., 2015; RUYCK et al., 2016).

Métodos computacionais de design de fármacos (MCDF) têm tido uma importância crescente no desenvolvimento de novos fármacos, uma vez que propiciam uma identificação de moléculas candidatas com custo-benefício eficiente e redução do uso de modelos animais na pesquisa farmacológica (BROGI et al., 2020). Em comparação com abordagens experimentais, métodos computacionais apresentam grandes vantagens como serem ecologicamente inócuos, rápidos, baratos, exatos e precederem a síntese. A utilização de métodos computacionais nessa atividade pode reduzir o custo de desenvolvimento em até 50% (WANG et al., 2015; YANG et al., 2018).

Muitos dos MCDF se baseiam na relação estrutura-atividade de moléculas para otimizá-las e desenvolvê-las, bem como entender os eventos moleculares decorrentes de sua interação biológica. Esses métodos podem ser utilizados na fase de descoberta, para

avaliar seu potencial de interação, e na fase de desenvolvimento, sendo feita a comparação com resultados *in vitro* e *in vivo*. Na fase de descoberta o principal papel desses métodos é a filtragem e seleção de compostos para posterior síntese e testagem, bem como para identificar outros potenciais usos para fármacos que já são aprovadas e comercializadas (PRIETO-MARTINEZ et al., 2019)

MCDF são frequentemente categorizados como métodos baseados em ligantes e métodos baseados em estrutura. Métodos baseados em ligantes são aqueles em que os compostos são usualmente representados por vários descritores e ranqueados por similaridade e conformação tridimensional. Nos métodos baseados em estrutura, os ligantes são primeiro posicionados nos sítios de ligação do alvo, e todas as suas conformações são ranqueadas a partir de funções de campo de força ou modelos empíricos (ZHANG; PEI; LAI, 2017). São exemplos destas técnicas, os métodos baseados em estrutura, como docking e dinâmica molecular, métodos baseados em ligantes, como a busca por similaridade e o QSAR, e métodos híbridos e baseados em *endpoints*, quando combinam métodos baseados em estrutura com métodos baseados em ligantes (PRIETO-MARTINEZ et al., 2019).

Dentre essas técnicas computacionais, a modelagem por homologia faz uso de informações estruturais para gerar modelos tridimensionais de alvos farmacológicos que ainda não foram cristalizados, sendo uma importante ferramenta para explorar e guiar o design de novos agentes terapêuticos. O termo docking surgiu na década de 1970 se referindo ao refinamento de um modelo estrutural em que a separação entre os pares de um complexo era otimizada através da orientação relativa entre os pares, mantendo-se fixa a geometria interna de cada um desses. Essa técnica ficou conhecida como docking rígido. O avanço e o desenvolvimento de ferramentas computacionais possibilitou considerar, nesta técnica, também as mudanças na geometria interna dos pares que interagem no modelo, sendo essa técnica chamada de docking flexível (RUYCK et al., 2016; PRIETO-MARTINEZ et al., 2019).

É frequente, atualmente, a utilização de estruturas não ligadas nos estudos de docking, ou seja, estruturas tais como ocorrem em solução, considerando certo grau de mudança conformacional entre os pares. Isso é importante porque proteínas em solução são rodeadas por moléculas de água, que são organizadas em camadas de hidratação e cujas propriedades eletrostáticas produzem importante contribuição no reconhecimento do alvo farmacológico por moléculas ligantes. Ferramentas como GOLD, GLIDE e

AUTODOCK podem incorporar moléculas de água nos modelos para predizer as posições de proteínas e ligantes em interação (RUYCK et al., 2016).

Simulações de dinâmica molecular também são utilizadas nessas fases, com o objetivo de confirmar a estabilidade do complexo ligante-alvo e estimar a energia livre de ligação do complexo (COZZA et al., 2017). A abordagem por dinâmica molecular é importante porque a estrutura cristalina de um alvo farmacológico representa um dos muitos substratos contidos na estrutura quaternária da proteína. Na maioria dos casos, a topologia da estrutura quaternária é conservada nos subestados, mas uma orientação diferente pode influenciar significativamente os resultados do docking. A dinâmica molecular pode ser utilizada para validar uma interação obtida por docking, quando aplicada como um filtro final após seus resultados (ZHAO; CAFLISCH, 2015).

Técnicas de screening virtual baseadas em estruturas fazem uso de algoritmos de docking para avaliar as propriedades farmacológicas potenciais de moléculas candidatas, sendo capazes de realizar uma testagem rápida de grandes bibliotecas de moléculas, propiciando um estudo eficiente e custo-efetivo. Estas técnicas também permitem identificar padrões moleculares e grupamentos que possibilitem a otimização da ação dos fármacos, bem como configurações dos alvos farmacológicos que propiciem sua interação com o fármaco. Esse tipo de experimento requer uma estrutura tridimensional exata do alvo almejado e uma biblioteca de compostos corretamente preparados para cálculos (COZZA et al., 2017).

Essas ferramentas também propiciam a avaliação da relação estrutura-atividade da molécula. Para tanto, aplica-se ferramentas de regressão ou de classificação, utilizadas para estabelecer quantitativamente modelos estatísticos para predizer as atividades de novas substâncias. A relação estrutura-atividade se baseia no conceito de que propriedades estruturais das moléculas são estritamente ligadas às suas atividades biológicas, através de propriedades como configuração eletrônica e estérica, lipofilicidade, polarizabilidade, entre outras (COZZA et al., 2017).

Independente do método, a testagem experimental costuma ser realizada após o docking, para observar e quantificar a real interação da molécula com o alvo. Dos modelos baseados em farmacóforos e em docking, modelos são criados baseados na estrutura dos alvos desejados e nas estruturas de ligantes conhecidos. Os ligantes são colocados nos sítios de ligação do alvo e em seguida avaliados através de funções de scoring (ZHANG, PEI; LAI, 2017).

A função de scoring compreende uma função matemática utilizada para calcular e predizer a força da interação não covalente entre as moléculas-teste e os alvos farmacológicos. Por vezes, mais de uma função é utilizada para a avaliação dessa interação, e seus resultados são combinados para aumentar a exatidão dos resultados e reduzir o número de falso-positivos, sendo esse procedimento denominado scoring consensual (COZZA et al., 2017).

Erros nos dados e violação no domínio de aplicabilidade são fatores que podem comprometer significativamente as avaliações realizadas. Por isso, recomenda-se sempre a utilização de um banco de dados suficientemente diverso, capaz de representar o banco de dados global, inclusive estimando-se os erros experimentais. O modelo aplicado deve ser validado pelo uso de um banco de dados externo para confirmar a habilidade preditiva do modelo, através da sua robustez (KAR; LESZCZYNSKI, 2020).

Para a validação de modelos, a European Chemicals Agency (ECA) e a OECD preconizam que os modelos devem apresentar um endpoint definido, um algoritmo não ambíguo, um domínio de aplicabilidade definido, medidas apropriadas de ajuste, robustez e produtividade e uma interpretação mecanística (WANG et al., 2015).

Diversas técnicas podem ser utilizadas para a construção de modelos, dentre as quais se destacam as de machine learning. Para a avaliação da qualidade dos modelos, frequentemente se utilizam o coeficiente de determinação (R^2), erro absoluto médio (MAE) e o erro quadrático médio (RMSE). Para modelos tradicionais binários ou de classificação múltipla, frequentemente a performance é medida com base na contagem de verdadeiro-positivos, verdadeiro-negativos, falso-positivos e falso-negativos (YANG et al., 2018).

Estudos têm observado que as propriedades moleculares apresentadas por compostos naturais estão mais próximas de fármacos do que aquelas de moléculas obtidas por síntese combinatória. Devido a isto, moléculas naturais têm recebido muita atenção por sua aplicabilidade como fármacos, bem como por servir como modelos para a produção de novos fármacos (TIAN et al., 2015).

2. 6 Inflamação

Diante da ocorrência de um dano tecidual (patógenos, células danificadas, produtos químicos ou irradiação), mediadores inflamatórios ativam leucócitos, e células de defesa como neutrófilos, macrófagos, dentre outras células migram para o tecido. As citocinas liberadas neste processo causam vasodilatação local, edema, aumento da

temperatura, sensibilização de nocireceptores e aumento de fluxo sanguíneo, este quadro caracteriza-se como um mecanismo de defesa que procede a tentar eliminar um corpo estranho e o dano causado ao tecido, com ações de fagocitose, cicatrização e regeneração do tecido afetado (KASSUYA, 2013; RITTER et al., 2020; KAUR; SINGH, 2022).

O processo inflamatório pode ser agudo ou crônico, a inflamação aguda possui início rápido e curta duração, geralmente dias, com atuação dos mediadores agindo sobre o plasma e células de defesa, com característica saída de leucócitos e proteínas do sistema vascular em direção ao local da lesão tecidual para remoção do agente agressor, ocorrendo neste processo o acúmulo de neutrófilos. A inflamação crônica é de longa duração, pode durar a vida inteira do indivíduo, é caracterizada pela presença de linfócitos T e macrófagos, as citocinas derivadas desses macrófagos podem modular a resposta imune localizada e regular a proliferação e atividade dos fibroblastos, estes causam remodelação da matriz extracelular e deposição de colágeno (FLEIT, 2014; KRIGER; MOYSÉS; MOYSÉS, 2016; RITTER et al., 2020).

O processo fibrótico e a hiperplasia na inflamação crônica ocorre através da proliferação vascular e do tecido conjuntivo, este processo está relacionado a intensidade, natureza e duração do estímulo lesivo. A inflamação crônica é responsável pelo desenvolvimento e progressão de inúmeras doenças, como: doenças autoimunes, distúrbios metabólicos, doenças neurodegenerativas, câncer, doenças cardiovasculares (DCV), entre outras. Por exemplo, a proteína C reativa (PCR), é apontada como preditora da ocorrência de DCV, visto que os níveis séricos deste marcador da inflamação têm forte associação com eventos coronarianos. Este quadro é tão grave que estima-se que atualmente 60% das mortes em todo o mundo são devido a doenças inflamatórias crônicas (GERALDO; ALFENAS, 2008; FLEIT, 2014; KAUR; SINGH, 2022).

Neste cenário, os insumos farmacêuticos ativos (IFAs) com ação anti-inflamatória são de primordial importância para controlar o processo inflamatório, regular seus danos ou evitar que novas lesões ocorram. Os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) e glicocorticoides (GC) são os fármacos mais utilizados para tratar as doenças inflamatórias (KASSUYA, 2013; FREITAS et al. 2019).

Os glicocorticoides (GC) são hormônios esteroides produzidos de forma endógena através da conversão do colesterol. Os IFAs da classe dos glicocorticoides são substâncias imunossupressoras e anti-inflamatórias potentes, eficazes e amplamente

utilizadas em processos inflamatórios agudos e crônicos. Os efeitos dos GC são mediados pela interação destes com os receptores de glicocorticoides (RG) (TORRES; INSUELA; CARVALHO, 2012; KASSUYA, 2013).

A atuação anti-inflamatória do RG ocorre devido a efeitos não genômicos e genômicos. Nos mecanismos genômicos o complexo GC-RG, DNA e moléculas co-ativadoras interagem com regiões promotoras de genes alvos e regulam sua transcrição por trans-repressão gênica (TRG) e trans-ativação gênica (TAG). A TRG constitui um processo de impedimento da transcrição de proteínas pró-inflamatórias através da desacetilação de genes do complexo de transcrição de moléculas pró-inflamatórias, o que induz a condensação do DNA e dificulta a transcrição de proteínas pró-inflamatórias. Enquanto que na TAG ocorre a facilitação da transcrição gênica de moléculas anti-inflamatórias através da acetilação de genes codificantes de proteínas anti-inflamatórias, como a ativação da a anexina-1 que inibe a fosfolipase A2 (TORRES; INSUELA; CARVALHO, 2012; KASSUYA, 2013; FREITAS et al., 2019).

O mecanismo não-genômico ocorre através de receptores na membrana celular e segundos mensageiros. O complexo GC-RG liga-se a fatores de transcrição, incluindo NF-κB e AP-1, impedindo que os mesmos codifiquem proteínas pró-inflamatórias. GC inibem a desgranulação anafilática e a secreção de diversas citocinas, incluindo fator de necrose tumoral (TNF)-α, IL-4, IL-5, IL-6 e IL-8, por mastócitos, os GC também atuam na modulação inflamatória do óxido nítrico através da supressão da óxido nítrico-sintase induzida (iNOS), esta é induzida por citocinas e lipopolissacarídeos, os GC inibem a indução, mas não a atividade das enzimas já induzidas (CERQUEIRA; YOSHIDA, 2002; TORRES; INSUELA; CARVALHO, 2012; KASSUYA, 2013). Os GC são comumentes utilizados no tratamento da asma, rinite alérgica, dermatite atópica, artrite reumatoide, entre outras doenças. Entre os IFAs disponíveis no mercado a betametasona, hidrocortisona, prednisolona, prednisona e dexametasona são as comumentes utilizadas em processos inflamatórios (TORRES; INSUELA; CARVALHO, 2012).

Os AINEs e GC possuem muitos efeitos colaterais que trazem riscos aos pacientes. O uso de CG está associado a uma toxicidade significativa que pode ter um impacto adverso duradouro na saúde geral do paciente. Deste modo, a busca por novos compostos que promovam a resolução da inflamação e tragam menos efeitos colaterais aos pacientes é um desafio para as pesquisas voltadas para a farmacologia da inflamação (FREITAS et al., 2019).

2.7 Leishmaniose

Leishmania é um protozoário parasita intracelular obrigatório, transmitido por vetor, da família dos tripanossomatídeos, que causa síndromes cutâneas, viscerais e mucocutâneas. Mais de 20 espécies do parasita leishmania foram caracterizadas e são transmitidas por aproximadamente 70 tipos de flebotomídeos (MANN et al., 2021).

A leishmaniose tegumentar compreende a forma cutânea e mucosal da leishmaniose. Embora seja não fatal, apresenta um espectro clínico amplo, com o surgimento de lesões únicas ou múltiplas na pele e mucosas. Esse quadro leva a deformidades físicas e efeitos psicológicos consideráveis (GALVÃO; RABELLO; COTA, 2017). A leishmaniose cutânea é causada pelos complexos *L. braziliensis* e *L. mexicana, L. donovani, L. major, L. infantum, L. aethiopica e L. tropica* (AZIM et al., 2021). Na última década, a prevalência mundial e a distribuição geográfica da leishmaniose cutânea expandiu-se, sendo essa doença atualmente reconhecida como complexa e altamente variável em termos de epidemiologia, etiologia, patologia e características clínicas (GALVÃO; RABELLO; COTA, 2017).

A forma mais letal da leishmaniose é a forma visceral (ou kala-azar, hindi para "febre negra"), que pode causar uma infecção sistêmica, afetando fígado, baço, sistema hematogênico e linfático. As espécies que são tipicamente associadas à doença visceral incluem *L. donovani, L. infantum e L. chagasi e L. infantum*. Manifestações severas da doença incluem caquexia, hepatoesplenomegalia, febre, pancitopenia e hipergamaglobulinemia, bem como fadiga, dor abdominal e perda de peso (MANN et al., 2021).

Leishmaniose é classificada pela OMS como uma doença emergente categoria 1, não controlada, sendo uma das seis mais importantes doenças tropicais. A OMS enfatiza a leishmaniose como uma das sete principais infecções, atualmente com cerca de 350 milhões de pessoas em 98 países sob risco de infecção. Estima-se que cerca de 12 milhões de pessoas são afetadas com a doença atualmente e cerca de 1,5 milhões de novos casos de leishmaniose cutânea são reportados anualmente. Aproximadamente 90% dos novos casos de leishmaniose cutânea ocorrem no Afeganistão, Arábia Saudita, Síria, Irã. Algéria, Iraque, Brasil e Peru. Crianças com menos de 10 anos de idade representam até 30% dos casos de leishmaniose cutânea em alguns países. Mais de 90% dos casos de leishmaniose visceral acontecem em cinco países: Índia, Sudão, Bangladesh, Nepal e Brasil. A cada ano, 500 mil casos de leishmaniose visceral são reportados, com 50 mil mortes (MONZOTE, 2009; BRITO; RABELLO; COTA, 2017;

GUTIÉRREZ-REBOLLEDO; DRIER-JONAS; JIMÉNEZ-ARELLANES, 2017; SOOSARAEI et al., 2017).

A transmissão da leishmania envolve vetores hematófagos, os parasitas multiplicam-se no trato digestivo do vetor, e são transmitidos para o hospedeiro mamífero durante a alimentação hematófaga. Nos vetores, a leishmania está presente na forma promastigota, sendo longas e extracelulares. No hospedeiro vertebrado, o parasita se multiplica dentro de macrófagos como amastigotas, que são esféricas e com um flagelo internalizado. Em seguida, o parasita rompe o macrófago e é fagocitado por novas células hospedeiras (MONZOTE, 2009).

A manifestação de diferentes formas da leishmaniose pode estar sujeita também a fatores genéticos da população, que influenciam o tipo de resposta imunológica que os pacientes apresentarão frente ao parasita (GHORBANI; FARHOUDI, 2018). Poucos avanços podem ser reconhecidos no tratamento da leishmaniose, entre eles o reconhecimento da inadmissibilidade da toxicidade associada aos antimoniais pentavalentes sistêmicos e o entendimento de que não é necessário um único tratamento ideal para todos os pacientes com leishmaniose, mas sim tratamentos mais apropriados para cada grupo de pacientes (BRITO, RABELLO; COTA, 2017).

Atualmente, o tratamento da leishmaniose emprega fármacos de primeira linha como os antimoniais pentavalentes, além de anfotericina B, pentamidina, miltefosina e paromomicina. Os fármacos possuem aplicabilidade limitada, devido ao seu alto custo, toxicidade e efeitos adversos, além da emergência da resistência parasitária a esses fármacos. A resistência da população ao tratamento também tem sido reportada, devido à sua toxicidade e efeitos adversos, que dificultam a aderência ao tratamento e contribui para a seleção de cepas resistentes do parasita (GUTIÉRREZ-REBOLLEDO, DRIER-JONAS; JIMÉNEZ-ARELLANES, 2017; GHORBANI; FARHOUDI, 2018; ROATT et al., 2020).

Antimoniais pentavalentes estão disponíveis a cerca de sete décadas e constituem a primeira linha de tratamento contra a leishmaniose. As duas principais formulações são o antimoniato de meglumina e o estibogluconato de sódio. O antimônio pentavalente se comporta como um pró-fármaco, que é reduzido no organismo para a forma trivalente, que possui alta afinidade para ligantes contendo nitrogênio e sulfidrila, como biomoléculas, tióis, peptídeos, proteínas e enzimas. Esses fármacos podem ser administrados por via intramuscular ou intravenosa, sendo biotransformados no fígado

para a forma trivalente, e com cerca de 50% do antimônio sendo excretado entre 24 e 76 horas pela via renal (MONZOTE, 2009; ROATT et al., 2020).

A forma trivalente do antimônio é mais tóxica, uma vez que apenas os amastigotas são sensíveis a forma pentavalente. Supõe-se que o antimônio age em diversos alvos, que incluem a via bioenergética do parasita, inibindo a glicólise e a oxidação de ácidos graxos e a inibição da fosforilação do ADP, além de bloquear grupos sulfidrila em proteínas do parasita e causar a inibição da DNA topoisomerase I. Além disso, o antimônio pode alterar o potencial redox dos tióis em ambas as formas do parasita, promovendo o fluxo de tióis, glutationa e tripanotiona, fazendo com que o parasita se torne mais susceptível ao estresse oxidativo (MONZOTE, 2009).

Apesar de serem a terapia padrão ouro, esses fármacos não podem ser considerados uma alternativa satisfatória, uma vez que necessitam da dosagem diária de injeções por 20 a 30 dias, não pode ser utilizada em mulheres grávidas e tem efeitos adversos severos, como falência renal, pancreatite, mialgia, teratogênese, neuropatia periférica, hepatoxicidade e cardiotoxicidade. Além disso, esses fármacos são caros e sua administração parenteral requer uma estrutura em serviços de saúde que nem sempre está disponível (GUTIÉRREZ-REBOLLEDO; DRIER-JONAS; JIMÉNEZ-ARELLANES, 2017; GALVÃO; RABELLO; COTA, 2017).

Além disso, é reportado o desenvolvimento de resistência parasítica a esses fármacos, fenômeno que envolve o uso de doses subterapêuticas, duração incorreta do tratamento e o uso de fármacos não padronizados (AMEEN, 2007). Diante disso, os principais achados que motivam a necessidade da substituição dos antimoniais pentavalentes na terapêutica anti-leishmania são a sua eficácia sub-ótima em algumas populações e a gravidade de seus efeitos adversos (GALVÃO; RABELLO; COTA, 2017).

Anfotericina B é um macrolídeo antifúngico poliênico, cuja atividade leishmanicida é atribuída à sua seletividade para esteróis substituídos, principalmente ergosterol. Entretanto, concentrações superiores do fármaco causam aumento do influxo catiônico e aniônico pela formação de poros aquosos, resultando em lise celular (MONZOTE, 2009). A anfotericina B é considerada um fármaco de segunda linha no tratamento da leishmaniose, tendo seu uso clínico limitado devido a efeitos adversos crônicos e agudos como febre, calafrios, nefrotoxicidade, hipocalemia, miocardite e morte. Além disso, esse fármaco possui biodisponibilidade muito baixa por via oral, tendo sido administrado por via intravenosa nas infecções sistêmicas. Na corrente

sanguínea, esse fármaco é transferido para lipoproteínas que são absorvidas nas células do hospedeiro, especialmente nos rins, contribuindo significativamente para a nefrotoxicidade. Anfotericina B tem sido recomendada como fármaco de segunda linha no tratamento de leishmaniose resistente aos antimoniais. Resistência a anfotericina B foi encontrada em cepas de *L. donovani*, que substituíram o ergosterol por colesterol exógeno combinado na sua membrana, apresentando também reduzida a concentração de espécies reativas de oxigênio (GHORBANI; FARHOUDI, 2018).

O desenvolvimento de fármacos para tratar doenças como a leishmaniose tem sido escasso, uma vez que essas doenças são mais incidentes em países em desenvolvimento, nos quais a indústria farmacêutica não iria receber grandes lucros. A OMS enfatizou a urgência no desenvolvimento de novas fármacos para o tratamento da leishmaniose (GUTIÉRREZ-REBOLLEDO; DRIER-JONAS; JIMÉNEZ-ARELLANES, 2017). Abordagens computacionais têm sido aplicadas para a reclassificação de fármacos já existentes no mercado, de maneira a identificar potenciais moléculas com atividade que já estejam disponíveis para a população. Abordagens como a bioinformática e a proteômica, além do docking molecular, têm sido cruciais na avaliação dos potenciais de fármacos frente a ligantes do parasita (ROATT et al., 2020).

3. OBJETIVO GERAL

Estabelecer o perfil químico da espécie *J. aequilabris* e avaliar seu potencial farmacológico.

3.2 Objetivos específicos

- Realizar a desreplicação do extrato bruto, fases e frações através da cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (CL/EM).
- Utilizar a ferramenta rede molecular para guiar o isolamento de novos metabólitos;
- Identificar e/ou elucidar a estrutura dos constituintes químicos purificados utilizando métodos espectrométricos e espectroscópicos, como a espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear (RMN).
- Utilizar as ferramentas computacionais docking molecular e triagem virtual para direcionar à avaliação da atividade farmacológica dos metabólitos isolados.
- Avaliar de forma *in vitro* a atividade antileshmania e anti-inflamatória dos compostos isolados.

4 METODOLOGIA

4.1 Coleta do Material Vegetal

A coleta das partes aéreas de *J. aequilabris* ocorreu no município de Monteiro-PB, em maio de 2017. Em seguida, a espécie foi encaminhada para o Prof. José Iranildo Miranda de Melo, botânico da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB) para identificação e depósito das exsicatas no Herbário Manuel de Arruda Câmara (HACAM-1252)-UEPB. O estudo da espécie *J. aequilabris* possui cadastro SisGen sob o número: A35A42B.

4.2 Obtenção do extrato etanólico bruto (EEB)

O material botânico foi seco em estufa com ar circulante a temperatura média de 40 °C até peso constante. Posteriormente, o material foi submetido a um processo de pulverização em moinho mecânico, para obtenção do pó da planta, obtendo 1 825 kg de material pulverizado da *J. aequilabris*. Em seguida, este foi submetido à maceração, utilizando o etanol (EtOH) a 96%, por 72 horas, sendo este processo repetido por três vezes. A solução extrativa obtida foi concentrada em evaporador rotativo sob pressão reduzida a uma temperatura de 40 °C, resultando em 140 g de EEB.

4.3 Retirada da clorofila

O EEB (140 g) da *J. aequilabris* foi acondicionado em erlenmeyer e diluído em etanol (96%). A solução etanólica foi levada a agitação em agitador magnético. Preparou-se uma solução de água destilada na proporção 7/3 $EtOH/H_2O$ e esta foi adicionada de forma contínua e em gotas a solução do EEB.

A solução obtida foi armazenada em freezer por 24 horas, após esse período a solução foi filtrada a vácuo (SOUZA et al., 2017), sendo a parte retida chamada de precipitado rico em clorofila (7,20 g). O sobrenadante foi concentrado em rotaevaporador e obteve-se o EEB pobre em clorofila (121 g), sobre este foi vertido hexano sobre agitação mecânica, para promoção da retirada das substâncias mais apolares do extrato. A fração do EEB solúvel em hexano resultou em uma solução que foi concentrada em rotaevaporador, obtendo-se a fase hexânica (6,69 g), a parte do extrato que não foi solúvel em hexano foi denominada de EEB desengordurado (EEBD) (106,2 g).

4.4 Partição do EEB

O EEBD de *J. Aequilabris* foi submetido a partição líquido:líquido com solventes de polaridade crescente. Uma alíquota de 50 gramas do EEB foi dissolvido em uma solução de MeOH:H_2O (7:3, v:v) obtendo-se uma solução hidroalcóolica, posteriormente, particionada com hexano, clorofórmio, acetato de etila e *n*-butanol, obtendo as respectivas fases particionadas (FP) e uma fase hidroalcoólica resultante.

4. 5 Isolamento e purificação dos constituintes químicos de *J. aequilabris*

4. 5.1 Análise CLAE/EM^n

O perfil químico do EEBD, fases particionadas e frações foram analisados por CLAE da marca Shimadzu, utilizando uma coluna analítica C18 (Kromasil - 250 mm x 4,6 mm x 5 μm), acoplado ao espectrômetro de massas (EM) da marca Bruker (modelo AmazonX), com Ionização por Eletrospray e analisador do tipo Ion Trap, situado no LMCA/IPeFarM-UFPB.

Para análise foi pesado 1 mg de cada amostra, com posterior solubilização em 1 mL de MeOH e filtração em filtro PVDF de 0,45 μm. O método cromatográfico desenvolvido utilizou os solventes metanol (solvente B) de grau cromatográfico (J.T. Baker) e água ultrapura tipo I (Mili-Q) acidificada com ácido fórmico (0,1%, v/v) (solvente A), com análise em gradiente de concentração (5 a 100% de B em 95 min), volume de injeção de 10 μL e taxa de fluxo de 0,6 mL/min. No espectrômetro de massas as amostras foram submetidas a uma fragmentação sequencial em EM^3. Os parâmetros utilizados foram: capilar 4,5 kV, offset da placa final 500 V, gás nebulizador 10 psi, gás seco (N_2) com fluxo de 8 mL/min e temperatura de 300 ºC.

4.5.2 Rede molecular

Os dados obtidos por CL-EM^2 do EEBD e fases particionadas foram convertidos para o formato mzXML diretamente do Bruker DataAnalysis 4.2. As redes moleculares foram geradas usando o GNPS (http://gnps.ucsd.edu) com os seguintes parâmetros: tolerância de massa do íon precursor de 2,0 Da, tolerância a íons fragmento de 0,5 Da, valor mínimo de cosseno de 0,7 e picos mínimos correspondentes de 6. Os dados foram posteriormente visualizados no software Cytoscape 3.7.1. Os compostos desreplicados foram identificados com base na comparação dos dados de EM/EM com padrões internos e a literatura.

4.5.3 Isolamento guiado

Após análises de CL-EM e rede molecular, a fase acetato de etila (FAcOEt) foi escolhida para realizar o isolamento dos compostos devido ao seu perfil químico rico em liganans. FAcOEt foi cromatografada (2,5 g) usando uma coluna Sephadex LH-20 e eluída com MeOH (100%) para obter 67 frações (A1-67). A fração A23 apresentou um precipitado branco que foi purificado por cristalização com MeOH para obter o composto **6** (9,4 mg). As frações foram monitoradas por TLC, e as frações que exibiram perfis cromatográficos idênticos foram combinadas e analisadas por CL-EM/EM^3. A fração rica em lignanas A14-30 (843,2 mg) foi purificada em cromatografia em coluna com Sephadex LH-20, tendo o MeOH 100% como eluente, obtendo desta forma, 17 frações (B1−17), que foram monitoradas por CL-EM/EM^{3}e posteriormente reunidas de acordo com a semelhança do seu perfil químico.

A fração B11-15 (551,3 mg) foi fracionada por CLAE preparativa usando MeOH e H_2O com 0,1% de ácido fórmico como eluente (8 mL/min) através de um sistema de gradiente com os seguintes parâmetros: 0-10 min (25-35% B), 10-40 min (35% B), 40-45 min (35-40% B), 45-60 min (40% B), 60-65 min (40-43% B), 65-85 min (43% B), 85-100 min (43-51% B) e 100-150 min (51% B) (tabela 2), obtendo os compostos **1** (13,5 mg), **2** (1,1 mg), **3** (5,9 mg), **4** (3,4 mg), **5** (1,3 mg), **7** (13,8 mg), **8** (4,4 mg), **9** (3,9 mg), **10** (2,6 mg).

Tabela 2. Sistema de eluição MeOH/H_2O acidificada (0,1% de ácido fórmico) utilizado em coluna preparativa para fração B11-15.

Tempo (minutos)	Concentração de MeOH (%)
0 -10	25-35
10-40	35
40-45	35-40
45-60	40
60-65	40-43
65-85	43
85-100	43-51
100-150	51

4.6 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ^{1}H e ^{13}C, uni e bidimensionais, foram obtidos nos espectrômetros das marcas BRUKER, modelo AVANCE III HD, operando a 400 MHz para hidrogênio (RMN de ^{1}H) e 100 MHz para carbono-13 (RMN de ^{13}C) e VARIAN operando a 500 MHz para RMN de ^{1}H e 125 MHz para RMN de ^{13}C. As amostras para análise foram preparadas dissolvendo-se as mesmas em solventes deuterados. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (*J*) em Hz, as multiplicidades no espectro de RMN de ^{1}H foram indicadas segundo as convenções: s (simpleto), (sl) simpleto largo, d (dubleto), dd (duplo dubleto), t (tripleto) e m (multipleto). Os espectros de RMN de ^{13}C foram obtidos utilizando-se a técnica de APT, BB e DEPT-135.

4.7 Espectrometria de massas de alta resolução (EMAR)

Para obtenção dos espectros de massas de alta resolução dos compostos isolados, foi utilizado espectrômetros de massas da marca Bruker, modelo microTOF II, pela técnica IES, modo positivo e negativo, utilizando os seguintes parâmetros de análise: capilar 4,0 kV, offset da placa final 500 V, nebulizador 5.8 psi, gás seco (N2), Injetado a um fluxo de 4 mL/min e temperatura de 180 ºC.

As amostras foram analisadas por injeção direta, desta forma, pesou-se 1 mg de cada uma e solubilizou-se em 1 mL de metanol (grau HPLC), a amostra então foi diluída até a concentração final de 426 ng/mL. As fases que foram desreplicadas também foram analisadas por EMAR, as amostras foram solubilizadas em metanol (1 mg/mL), com posterior filtração em filtros PVDF (Fluoreto de Polivinilideno), com malha de 0,45 μm. O método cromatográfico desenvolvido utilizou os solventes metanol (solvente B) de grau cromatográfico e água ultrapura tipo I (Mili-Q), acidificada com ácido fórmico (0,1% v/v) (solvente A), com análise em gradiente de concentração (5 a 100% de B em 95 minutos). O volume de injeção foi de 10 μL e taxa de fluxo foi de 0,6 mL/minuto. Os parâmetros utilizados foram: capilar 4,5 kV, offset da placa final 500 V, gás nebulizador 35 psi, gás seco (N_2) com fluxo de 8 mL/min e temperatura de 200 ºC no modo de ionização negativo.

4. 8 Rotação óptica, ECD e infravermelho (IV)

Um polarímetro JASCO P-2000 (Easton, MD, EUA) foi usado para medir as rotações ópticas a 25 °C. Os espectros de ECD e UV foram registrados em um espectropolarímetro J-815 CD de dicroísmo circular (DC) da JASCO. Os espectros de infravermelho (IV) foram registrados em um espectrômetro Shimadzu Proeminence IR Prestige-21 usando pastilhas de KBr.

4.9 Cálculos de RMN

Todas as buscas conformacionais foram realizadas para cada candidato do composto **1** usando o método de Monte Carlo e o Molecular Mechanic force field (MMFF) no pacote de software Spartan'10 (SPARTAN'10, 2010*)*. Inicialmente, para cada candidato, todas as conformações dentro de uma janela de 10 kcal mol^{-1} foram reotimizadas usando o método B3LYP/6-31G(d) DFT. Os confôrmeros com energia relativa <2,5 kcal mol^{-1}, representando mais de 90,0% da população total de Boltzmann, foram selecionados para os cálculos de GIAO RMN. Para simular os deslocamentos químicos de ^{13}C e ^{1}H RMN, foi realizado um procedimento de cálculo Gauge Included Atomic Orbitals-Hybrid Density Functional Theory (GIAO-HDFT) no nível de teoria GIAO-mPW1PW191/6-31G(d), usando o tetrametilsilano (TMS) como referência interna, no mesmo nível da teoria. Para a aplicação do parâmetro DP4+, os tensores de blindagem magnética ^{13}C e ^{1}H de todos os candidatos foram adicionados à planilha Excel fornecida pelos autores (GRIMBLAT; ZANARDI; SAROTTI, 2015). Complementando a análise DP4+, foi utilizada a nova metodologia ML-J-DP4, cálculos GIAO RMN conduzidos no nível de teoria RHF/STO-3G//MMFF foram usados para calcular as probabilidades ML-J-DP4 (TSAI et al., 2022). Todos os cálculos da teoria do funcional da densidade (DFT) foram realizados usando o software Gaussian 09 (FRISCH et al., 2016).

4.9 Cálculos de ECD

Análises conformacionais para compostos (**1-3**) foram realizadas através do software Spartan'14 usando o cálculo de campo de força de mecânica molecular MMFF94. Confôrmeros dentro de uma janela de energia de 10 kcaL/mol foram gerados e otimizados usando cálculos DFT no nível B3LYP/6-31G(d). Confôrmeros com uma distribuição de Boltzmann acima de 1% foram escolhidos para os cálculos de ECD em MeCN no nível B3LYP/6-311 +G(2d,p). O modelo de solvente IEF-PCM para MeCN

foi usado. Os espectros de ECD calculados foram obtidos por teoria funcional de densidade (DFT) e DFT dependente do tempo (TD-DFT) usando Gaussian 09 e analisados usando SpecDis v1.71.

4.10 Docking Molecular

Uma proteína do receptor de glicocorticóide no complexo com o agonista furoato de fluticasona foi copiada do PDB (Protein Data Bank, www.rcsb.org): receptor de glicocorticóide (transcrição, PDB ID 3CLD, ligante Furoato de fluticazona) (BIGGADIKE et al., 2008).

As estruturas isoladas foram submetidas ao docking molecular utilizando o Molegro Virtual Docker, versão 6.0.1 (MVD). Todas as moléculas de água foram mantidas para realizar o encaixe, e as estruturas de enzimas e compostos foram preparadas usando as mesmas configurações de parâmetros padrão no mesmo pacote de software (avaliação do ligante: ES interno, ligação H interna, Torções Sp2-Sp2, todos verificados; número de execuções: 10 execuções; algoritmo: MolDock SE; interações máximas: 1.500; tamanho máximo da população: 50; passos máximos: 300; fator de distância do vizinho: 1,00; número máximo de poses retornadas: 5). O procedimento de docking foi realizado usando um GRID de 10 Å de raio e 0,30 de resolução para cobrir o sítio de ligação do ligante de ambos os arquivos PDB. O RMSD (Root-Mean-Square Distance) foi adotado para comparar a distância média entre o ligante cristalizado e o ligante submetido ao docking molecular, onde um RMSD de até 2,0 Å permitiu que o docking fosse considerado válido (ONODERA; SATOU; HIROTA, 2007).

Modelos com características que se espera serem relevantes para a ligação do ligante e extraídos para ambos os ligantes foram gerados para realizar o encaixe. O algoritmo MolDock Score foi usado como função de pontuação e o algoritmo de busca MolDock foi usado (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006).

4.11 Atividades farmacológicas

4.11.1 Ensaio de citotoxicidade

Para determinações de óxido nítrico e IL-1β, células semelhantes a macrófagos Raw 264,7 Luc foram semeadas em placas de cultura de tecidos de 96 poços a 2×10^5 células/poço em meio DMEM suplementado com 10% de FBS e 50 μg/mL de gentamicina por 2 horas a 37 °C e 5% CO_2, seguindo os métodos previamente descritos

por Pereira et al. (2020), as células foram estimuladas com LPS (500 ng/mL, Sigma) e IFN-γ (5 ng/mL, Sigma) na presença de diferentes concentrações dos compostos de teste (2,0-50 μM), dexametasona (1,2-20 μM) ou veículo e incubados a 37 °C. Os sobrenadantes livres de células foram coletados em 24 h e mantidos a -80 °C. As concentrações de IL-1β em sobrenadantes de culturas de macrófagos foram determinadas por ensaio imunoenzimático (ELISA) usando o kit DuoSet da R&D Systems (Minneapolis, MN, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Os resultados foram expressos em picogramas de IL-1β por miligrama de proteína. o óxido nítrico foi quantificado pelo método de Griess.

4.11.2 Ensaios de produção de óxido nítrico e citocinas

Para determinações de óxido nítrico e IL-1β, células semelhantes a macrófagos Raw 264,7 Luc foram semeadas em placas de cultura de tecidos de 96 poços a 2×10^5 células/poço em meio DMEM suplementado com 10% de FBS e 50 μg/mL de gentamicina por 2 horas a 37 °C e 5% CO_2, seguindo os métodos previamente descritos (OPRETZKA et al., 2019; PEREIRA et al., 2020), as células foram estimuladas com LPS (500 ng/mL, Sigma) e IFN-γ (5 ng/mL, Sigma) na presença de diferentes concentrações dos compostos de teste (2,0-50 μM), dexametasona (1,2-20 μM) ou veículo e incubados a 37 °C. Os sobrenadantes livres de células foram coletados em 24 h e mantidos a -80 °C. As concentrações de IL-1β em sobrenadantes de culturas de macrófagos foram determinadas por ensaio imunoenzimático (ELISA) usando o kit DuoSet da R&D Systems (Minneapolis, MN, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Os resultados foram expressos em picogramas de IL-1β por miligrama de proteína. O óxido nítrico foi quantificado pelo método de Griess (GREEN et al., 1982).

4.11.3 Análise estatística

Os dados são apresentados como média ± desvio padrão (DP). As comparações entre os tratamentos foram feitas usando ANOVA de uma via com o teste post-hoc de Tukey. Todos os dados foram analisados usando o software Prism 5 (GraphPad, San Diego, CA, EUA). As diferenças estatísticas foram consideradas significativas se $p< 0,05$.

4.11.4 Testes de atividade contra forma promastigota axênica de *L. major* e *L. braziliensis*

As espécies *L. major* (MHOM/IL/80/Friedlin) e *L. braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903) foram mantidas *in vitro*, as promastigotas, a 26 ºC em meio Schneider para insetos suplementado (20% SFB, 100 U/mLpenicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, pH 7), conforme descrito por Rodrigues et al.(2015). O ensaio de inibição de crescimento para os parasitas foi realizado utilizando formas promastigotas na fase logarítmica, que foram cultivadas em placas de 96 poços contendo meio Schneider para inseto suplementado e 1 x 10^6 parasitas/mL, o teste foi realizado em triplicata, utilizando diferentes concentrações de lignanas (1,56–12,5 µM), antimoniato de meglumina (200–40.000 µM) e anfotericina B (0,031–2 µM) foram as drogas de referência.

As placas de cultura foram mantidas em incubadora de demanda de oxigênio (Eletrolab EL202, São Paulo, Brasil), a 26 °C, para promastigotas axênicas. Após 2 dias sob essas condições, 10 µL de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT, 5 mg/mL) foram adicionados a cada poço e as placas de cultura de células foram incubados por 4 h antes de adicionar 50 µL de solução de 10% de dodecil sulfato de sódio (SDS), para solubilizar os cristais de formazan. A densidade óptica da cultura foi medida em um leitor de espectrofotômetro de microplacas, a 540 nm (Biosystems modelo ELx800, Curitiba, Brasil).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Isolamento guiado de lignanas anti-inflamatórias de *Justicia aequilabris* por abordagem de rede molecular

Artigo publicado no *Journal of Natural Products* (Qualis: A1), v. 85, p. 2184–2191, 2022: doi.org/10.1021/acs.jnatprod.2c00478

Joanda P. R. e Silva,† Laiane C. O. Pereira,† Lucas S. Abreu,‡ Francisca S. V. Lins,† Thalisson A. de Souza,† Renan F. do Espírito-Santo,§ Renata P. C. Barros,† Cristiane F. Villarreal,⊥ José I. M. de Melo,† Marcus T. Scotti,† Vicente C. de O. Costa,† Lucas H. Martorano, ‡ Fernando M. dos S. Junior, ‡ Raimundo Braz Filho,‖ Marcelo S. da Silva,† and Josean F. Tavares*,†

†Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintético Bioativos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brasil
‡Departamento de Química, Instituto de Química, Universidade Federal Fluminense, Niterói, Brasil
§Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Brasil
⊥Escola de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brasil
‖ Departamento de Química, Instituto de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Brasil

RESUMO

Aqui, o isolamento de metabólitos secundários das partes aéreas de *Justicia aequilabris* guiado por HPLC-EM^n e análise de rede molecular é relatado. Vinte e dois compostos conhecidos foram desreplicados. Três novas lignanas (aequilabrinas A− C (**1**−**3**)) e três compostos conhecidos (lariciresinol-4'-*O*-*β*-glicose (**4**), roseosídeo (**5**) e alantoína (**6**)) foram obtidos. A atividade anti-inflamatória dos compostos **1-3** foi avaliada *in vitro* pela inibição da produção de óxido nítrico (ON) e atividade pró-inflamatória na citocina IL-1*β*. Os compostos **2** e **3** apresentaram atividade inibitória significativa contra a produção de ON, com valores de IC_{50} de 9,1 e 7,3 μM, respectivamente. A inibição máxima da produção de IL-1*β* foi de 23,5% (**1**), 27,3% (**2**) e 32,5% (**3**).

A inflamação é uma resposta do sistema imunológico que causa a liberação de um padrão complexo de mediadores inflamatórios. Uma resposta inflamatória persistente está associada com a patogênese de muitos distúrbios altamente prevalentes em todo o mundo, como doenças cardiovasculares, gastrointestinais, autoimunes e metabólicas (AGARWAL; SHANMUGAM, 2022; KAUR; SINGH, 2022).

As plantas do gênero *Justicia* (Acanthaceae) são conhecidas por apresentarem diversos produtos naturais bioativos (DAY et al., 2000; NAVARRO et al., 2001; CORREÂ; ALCÂNTARA, 2012; HEMMATI; SERADJ, 2016; GUTIERREZ, FLORES, GONZALEZ, 2018; ZHANG et al., 2018). As espécies de *Justicia* são comumente usadas para tratar doenças inflamatórias (ROJAS et al., 2003; MECKES et al., 2004; KANCHANAPOOM et al., 2005; KPOVIESSI et al., 2008; SARITHA; BRINDHA, 2013). Modelos de inflamação *in vitro* e *in vivo* indicam atividade anti-inflamatória significativa para essas espécies (STEVENSON, 1995; SANMUGAPRIYA; SHANMUGASUNDARAM; VENKATARAMAN, 2005; VERDAM, et al., 2005; JOTHIMANIV; KUMAR; SUBRAMANIA, 2010; LOCKLEAR, 2010; ONOJA et al., 2017; KUMAR et al., 2018; ANYASOR; OKANLAWON, OGUNBIYI, 2019; WENCESLAS et al., 2021). *Justicia aequilabris* (Nees) Lindau é uma espécie endêmica do Brasil encontrada principalmente na região Nordeste no bioma Caatinga (SILVA, MELO, SALES 2010; MAIA et al., 2020). Apesar disso, poucos estudos exploraram seu potencial químico e farmacológico.

A espectrometria de massa é atualmente uma ferramenta estratégica para desreplicar produtos naturais (HUBERT et al., 2017). Os dados EM/EM são fundamentais para a rede molecular, uma abordagem computacional baseada na similaridade espectral dos dados EM/EM, que demonstra as relações existentes entre as estruturas químicas. A rede molecular representa a principal ferramenta disponível na plataforma *Global Natural Product Social Molecular Networking* (GNPS) (ARON et al., 2020). Esta técnica tem sido utilizada com sucesso na descoberta de moléculas, pois permite a priorização do isolamento de novos compostos (KANG et al., 2018; ABREU et al., 2019).

Aqui, relatamos o uso de rede molecular para a desreplicação e isolamento guiado de lignanas de *J. aequilabris*. Três novas lignanas (**1**−**3**) e três substâncias conhecidas (**4**−**6**) foram identificados. A atividade anti-inflamatória dos compostos **1-3** foi analisado por testes *in vitro*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O extrato etanólico (EtOH) das partes aéreas de *J. aequilabris* foi avaliado por CL-EM/EM no modo negativo, e os dados foram processados através do GNPS (http://gnps.ucsd.edu). A rede molecular obtida apresentou 35 *clusters* e 354 nodos, 22 destes nodos obtiveram correspondência com a biblioteca espectral. Os *clusters* com substâncias anotadas foram investigados através do tempo de retenção, comparação dos espectros EM/EM com a literatura e padrões internos, desta forma, foram desreplicadas lignanas (B e C), ácidos fenólicos (E e F) e flavonoides (G, H e I) (Figura 7, Tabela S1). Os dados obtidos nesses processos foram usados para priorizar moléculas de interesse por meio de isolamento direcionado, compilados nos clusters A, B e C.

O *cluster* A exibiu nodos com *m/z* 403, 429 e 471 no modo negativo com uma similaridade de cosseno acima de 0,91. No espectro de EM^2, os perfis de fragmentação desses nodos apresentaram o íon fragmento com *m/z* 361 em comum (Esquema S2,58 S4 e S5). O espectro EM^3 do íon do fragmento apresentou os íons produto com *m/z* 346 ($-CH_3$), 343 ($-H_2O$), 331 ($-CH_2O$), 313 ($-CH_2O$ e $-H_2O$), 179 (*β*-clivagem) e 165(*β*-clivagem), padrão de fragmentação típico de secoisolariciresinol (Esquema S1) (EKLUND et al., 2008). No entanto, os padrões de fragmentação observados entre os íons precursores (*m/z* 403, 429 e 471) e o íon produto em comum (*m/z* 361) não foram encontrados na literatura, desta forma, foi priorizado o isolamento destas lignanas.

Além disso, fragmentação na fonte de ionização foi detectada nos espectros dos nodos com *m/z* 403 e 471 (Esquemas S2-S4). Para o íon com *m/z* 403 foi observado fragmentação na fonte de ionização devido à perda de CO_2 (44 Da), por mecanismo de eliminação α do íon precursor com *m/z* 447 $[M - H]^-$, e a presença em baixa intensidade do aduto com *m/z* 895 $[2M-H]^-$ (Esquema S4 e Figura S29). Da mesma forma, o íon precursor com *m/z* 559 $[M-H]^-$ e o aduto com *m/z* 1119 $[2M - H]^-$ foram observados para o íon com *m/z* 471 (Esquema S2 e Figura S12), o que sugere a perda de $2CO_2$ (88 Da). Para confirmar a fragmentação na fonte de ionização, o espectro de massa foi obtido no modo positivo, onde os íons com *m/z* 471 $[M + Na]^+$, 466 $[M + NH_4]^+$ e *m/z* 583 $[M+Na]^+$, 578 $[M+NH_4]^+$ foram observados no tempo de retenção correspondente aos íons com *m/z* 403 e 471 no modo negativo, respectivamente.

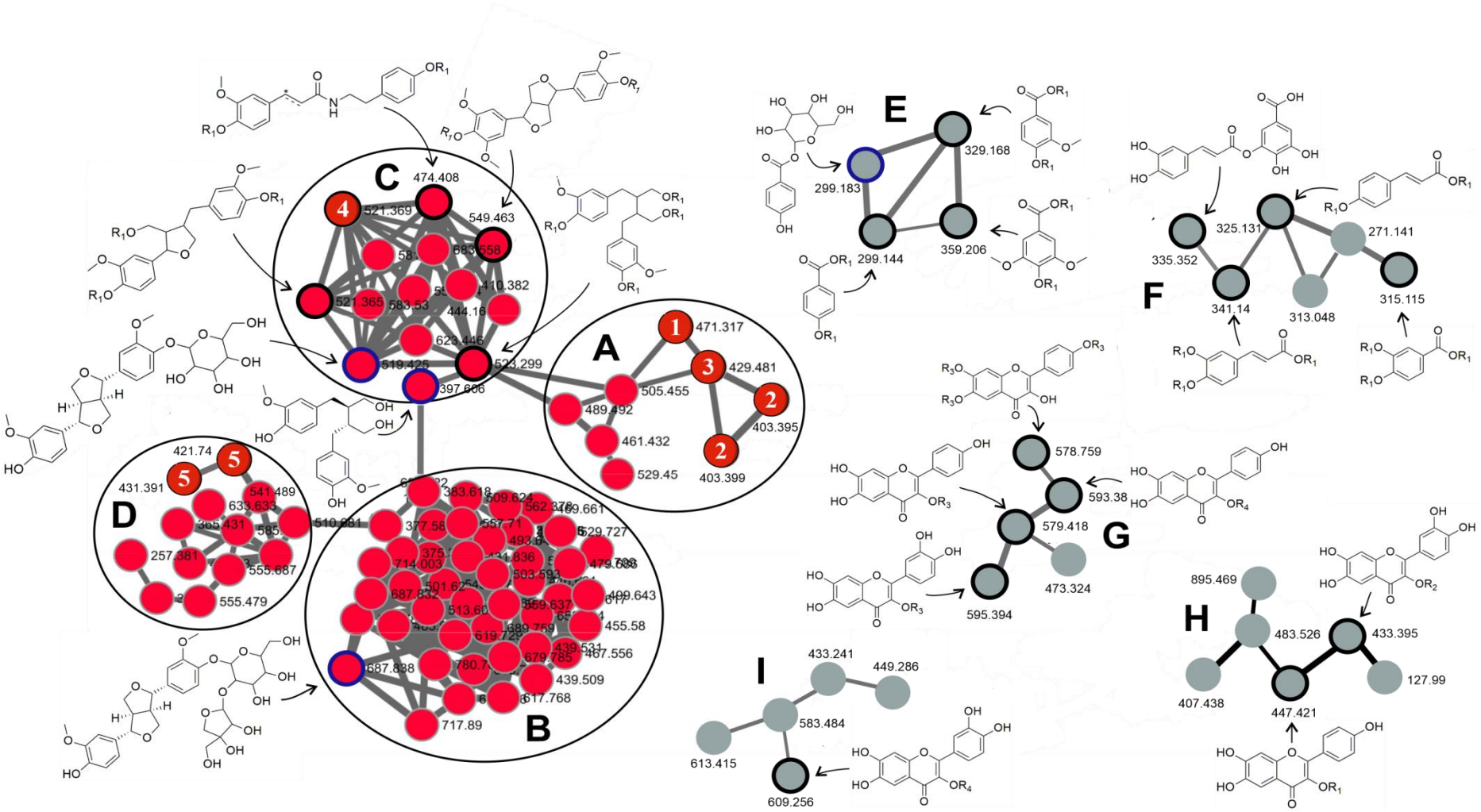
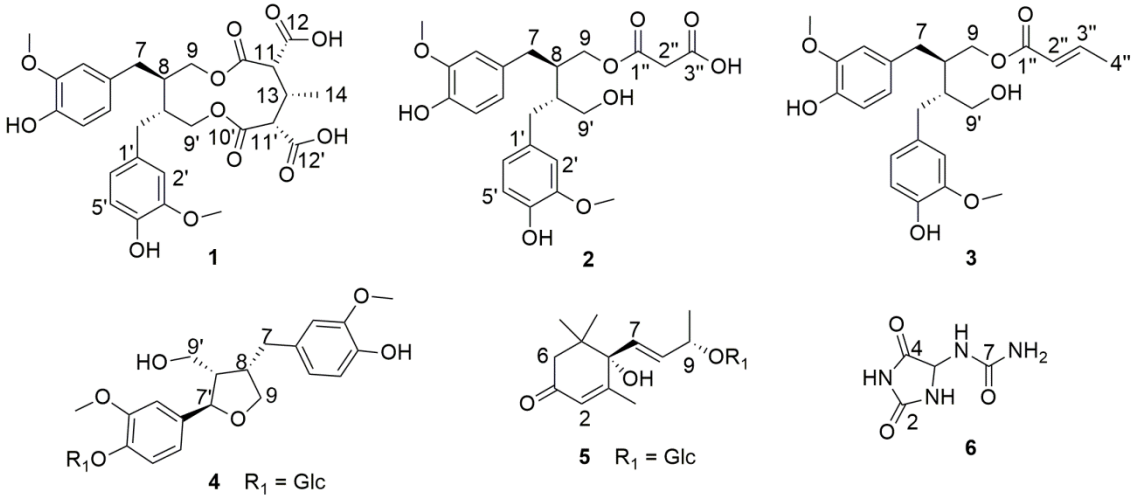


Figura 7. As substâncias **1-5** são seguidas de seus respectivos números. Os nodos com borda em negrito tiveram suas substâncias anotadas. Nodos com borda azul em negrito representa compostos confirmados por padrão interno. Em cinza, os *clusters* desreplicados para ácidos

fenólicos (E e F) e flavonoides (G, H e I) são encontrados. R_1 = H ou hexosideo, R_2 = pentosideo, R_3 = H ou hexosídeo-pentosídeo, R_4 = hexosídeo-desoxihexosídeo.* ligação cis ou trans.

Os *clusters* B e C apresentaram nodos cujo espectro EM^2 apresentaram perdas de 162 Da, o que indica a presença de hexose. A análise do perfil de fragmentação desses *clusters* com os dados da literatura e padrões internos indica a existência de heterosídeos de lignanas com esqueletos furano, furofurano e dibenzilbutano. Portanto, os nodos não desreplicados foram priorizados para isolamento. O *cluster* D também apresentou perdas de 162 Da, no entanto, não foi encontrada correlação entre os espectros de EM/EM com a literatura, de modo que esses compostos foram alvo para isolamento.

Para isolar as substâncias alvo, o extrato EtOH de *J. aequilabris* foi particionado sequencialmente e as frações obtidas foram analisadas por CL-EM. A fração acetato de etila (EtOAc) foi selecionada para o processo de isolamento. As subfrações com substâncias de interesse foram monitoradas por CL-EM através do perfil de fragmentação. No geral, quatro lignanas (**1**-**4**), um sesquiterpeno (**5**) e alantoína (**6**) foram isolados e estruturalmente caracterizados.



O Composto **1** foi isolado como um sólido amorfo amarelo. Sua fórmula molecular foi determinada como $C_{28}H_{32}O_{12}$ por EMAR, com *m/z* 559,1805 $[M - H]^-$ (calculado 559,1821), que indica 13 índices de deficiência de hidrogênio. O espectro de

RMN de ^{1}H apresentou os sinais de prótons aromáticos em δ_H 6,92 (d, *J* = 1,5 Hz), 7,15 (d, *J* = 7,5 Hz), 6,81 (dd, *J* = 7,5, 1,5 Hz) e 6,96 (d, *J* = 1,5 Hz), 7,18 (d, *J* = 8,0 Hz), 6,84 (*dd*, *J* = 8,0 e 1,5 Hz) (Tabela 3), que indica a presença de dois anéis aromáticos trissubstituídos. No espectro de RMN de ^{13}C, foram observados sinais de quatro carbonos de metileno, δ_C 36,7 (C-7), 36,5 (C-7'), 63,7 (C-9), 62,7 (C-9'), e dois carbonos sp3, δ_C 42,3 (C-8), 41,7 (C-8'), que indica uma estrutura C6C3−C6C3', semelhante ao secoisolariciresinol (ONOJA et al., 2017). Este mesmo espectro apresentou quatro sinais de carbonilas em δ_C 170,9 (C-10), 170,1 (C-10'), 171,2 (C-12) e 171,8 (C-12'), três carbonos metino em δ_C 35,1 (C-13), 58,0 (C-11) e 54,3 (C-11'), e um sinal de um carbono metil em δ_C 16,2 (C-14). No espectro HSQC, o conjunto de correlações entre δ_H 3,89/δ_C 35,1 (H-13/C-13), δ_H 4,07/58,0, 4,32/54,3 (H-11/C-11, H-11'/C-11'), e δ_H 1,89/16,2 (H-14/C-14) sugeriram esterificação na molécula de um resíduo de ácido beta-metilglutárico (AMIRHAERI et al., 1979; DEMARQUE et al., 2016).

Tabela 3. Dados espectroscópicos de RMN ^{1}H e ^{13}C para os compostos **1-3** em C_5D_5N.

	1[a]		**2**[b]		**3**[b]	
posição	δ_H (*J* em Hz)	δ_C	δ_H (*J* em Hz)	δ_C	δ_H (*J* em Hz)	δ_C
1		131,4		132,3		132,4
2	6.92, d (1,5)	113,5	7.03, d (1,6)	113,7	6.95, d (2,0)	113,6
3		148,9		148,8		148,9
4		146,7		146,4		146,6
5	7.15, d (7,5)	116,8	7.18, d (8,0)	116,5	7.17, d (8,0)[c]	116,6
6	6.81, dd (7.5, 1.5)	122,4	6.95, dd (8.0, 1.6)	122,6	6.89, dd (8.0, 2.0)	122,7
7*α*	3.04, m	36,7	3.10, dd (13.6, 7.2)	35,3	3.10, dd (13.6, 6.4)	35,4
7*β*	2.90, m[c]		2.94, dd (13.6, 8.4)		2.86, dd (13.6, 8.4)	
8	2.26, m[c]	42,3	2.77, m	40,7	2.78, m	40,6
9*α*	4.91, d (11.0)	63,7	4.80, dd (11.2, 6.0)	66,1	4.75, dd (11.4, 6.2)	65,4
9*β*	4.07, br d (11.0)[c]		4.57, dd (11.2, 6.0)		4.52, dd (11.4, 5.8)	
10		170,9				

11	4.07, br d (11,0)[c]	58,0				
12		171,2				
13	3.89, dq (6.5, 5.0)	35,1				
14	1.89, d (6,5)	16,2				
1′		131,3		133,0		133,1
2′	6.96, d (1,5)	113,5	7.01, d (2,0)	113,7	6.98, d (2,0)	
3′		148,8		148,8		148,9
4′		146,7		146,5		146,7
5′	7.18, d (8,0)	116,7	7.17, d (8,0)	116,5	7.17, d (8,0)[c]	116,6
6′	6.84, dd (8.0, 1.5)	122,3	6.90, dd (8.0, 1.6)	122,6	6.93, dd (8,2)	122,7
7′*α*	3.04, m[c]	36,5	3.03, m	35,2	3.0, d (7,6)	35,3
7′*β*	2.90, m[c]					
8′	2.26, m	41,7	2.49, m	44,0	2.45, m	44,4
9′*α*	5.18, d (11,5)	62,7	4.08, dd (5.6, 1.2)	61,8	4.10, dd (10.8, 6.2)	
9′*β*	3.95, dd (11.5, 3.3)				4.05, dd (10.8, 5.6)	
10′		170,1				
11′	4.32, d (5,0)	54,3				
12′		171,8				
1"				168,8		166,9
2"			3.82, s	43,7	5.96, dq (15.6, 1.6)	123,4
3"				170,6	7.02, dq (15.6, 6.8)	145,1
4"					1.65, dd (6.8, 1.6)	18,1
OCH_3-3	3.74, s	56,1	3.73, s	56,0	3.69, s	56,1
OCH_3-3′	3.79, s	56,0	3.75, s	56,0	3.71, s	56,1

[a]Realizado em 500 MHz. [b]Realizado em 400 MHz. [c] Sinais sobrepostos.

No espectro HMBC, os três conjuntos de correlações mútuas entre H_2-9 (δ_H 4,91 e 5,18) e H-11 (δH 4,07) com sinais em δ_C 170,9 (C-10) e δ_C 171,2 (C-12), de H-11 ′

(δ_H 4,32) com sinais em δ_C 170,1 (C-10') e 171,8 (C-12'), e H-14 (δ_H 1,89) com sinais em δ_C 58,0 (C-11), δ_C 54,3 (C-11) ′) e δ_C 35.1 (C-13) confirmaram a presença de um resíduo de ácido beta-metilglutárico no composto **1**. Essas correlações quando associadas aos dados do espectro COSY entre H-11/H-11′ e H-13, e a correlação do sinal H-13 com H-14 (δ_H 1,89) (Figura 8) corroboram com a presença de um anel de 11 membros no composto **1**. No espectro NOESY, pode-se observar uma correlação entre H-11 e H-11' e, portanto, sugere a mesma orientação entre estes hidrogênios (Figura S11).

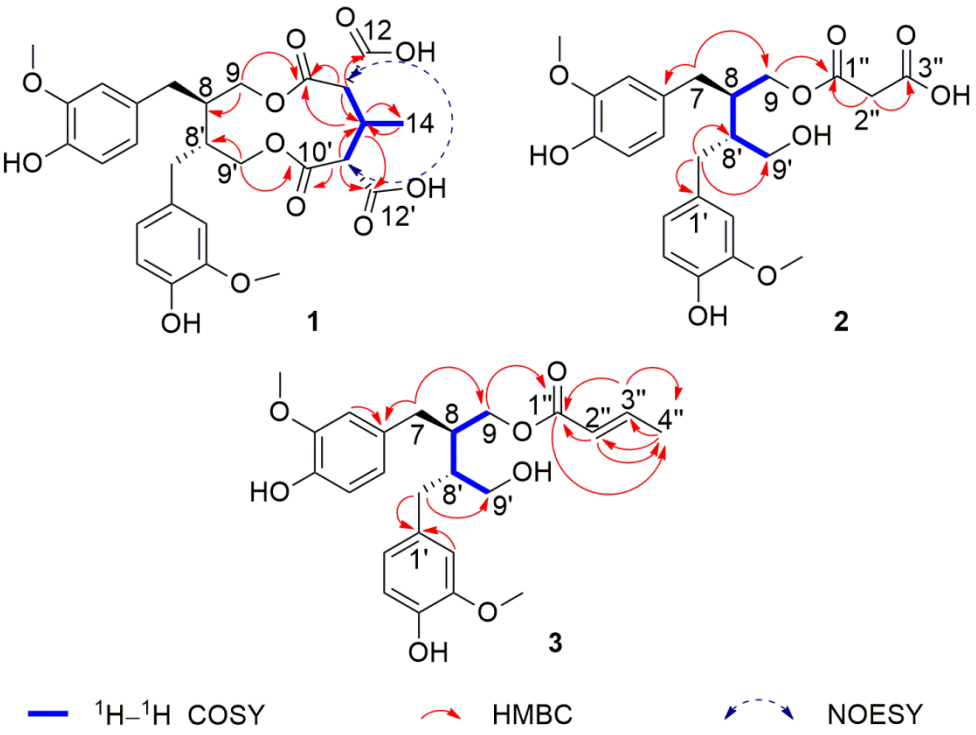


Figura 8. Correlações de HMBC, ^{1}H-^{1}H COSY e NOESY dos compostos **1-3**.

A fim de determinar a configuração relativa de C-11, C-13 e C-11', simulações de deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C e ^{1}H foram realizadas no mPW1PW91/6-31G(d)/Nível B3LYP/6-31G(d) (COSTA et al. 2015; COSTA et al., 2021). Após as simulações, foi aplicada a metodologia DP4+ (GRIMBLAT; ZANARDI; SAROTTI, 2015), obtendo-se 90% de probabilidade para o candidato com 11S*,11′R*,13S*, de acordo com os dados observados pelo espectro NOESY. Complementando a análise DP4+ e para posterior confirmação da configuração relativa, a nova metodologia ML-J-DP4, proposta por Tsai e colaboradores (2022), também foi aplicada. Mais uma vez, o candidato com 11S*,11′R*,13S* foi apontado como o correto com 99,9% de

probabilidade. Esses dados computacionais sugerem claramente que o candidato com 11S*,11′R*,13S* é de fato o melhor representante para a estrutura do composto isolado.

Com a configuração estereoquímica relativa atribuída de forma inequívoca, a seguir, focou-se na determinação da configuração absoluta por meio de espectroscopia de dicroísmo circular eletrônico (ECD). A Figura 9 mostra a comparação do espectro ECD experimental do composto **1** com os dados simulados para a média de Boltzmann dos confôrmeros de menor energia identificados para o diastereoisômero com uma configuração 8*R*,8'*R*,11*S*,11'*R*,13*S*. A boa concordância observada entre o espectro experimental e simulado permitiu a atribuição inequívoca da configuração absoluta do composto **1**, que foi definido como aequilabrina A. A proposta biossintética para o composto **1** está representada na Informação de suporte (Esquema S3).

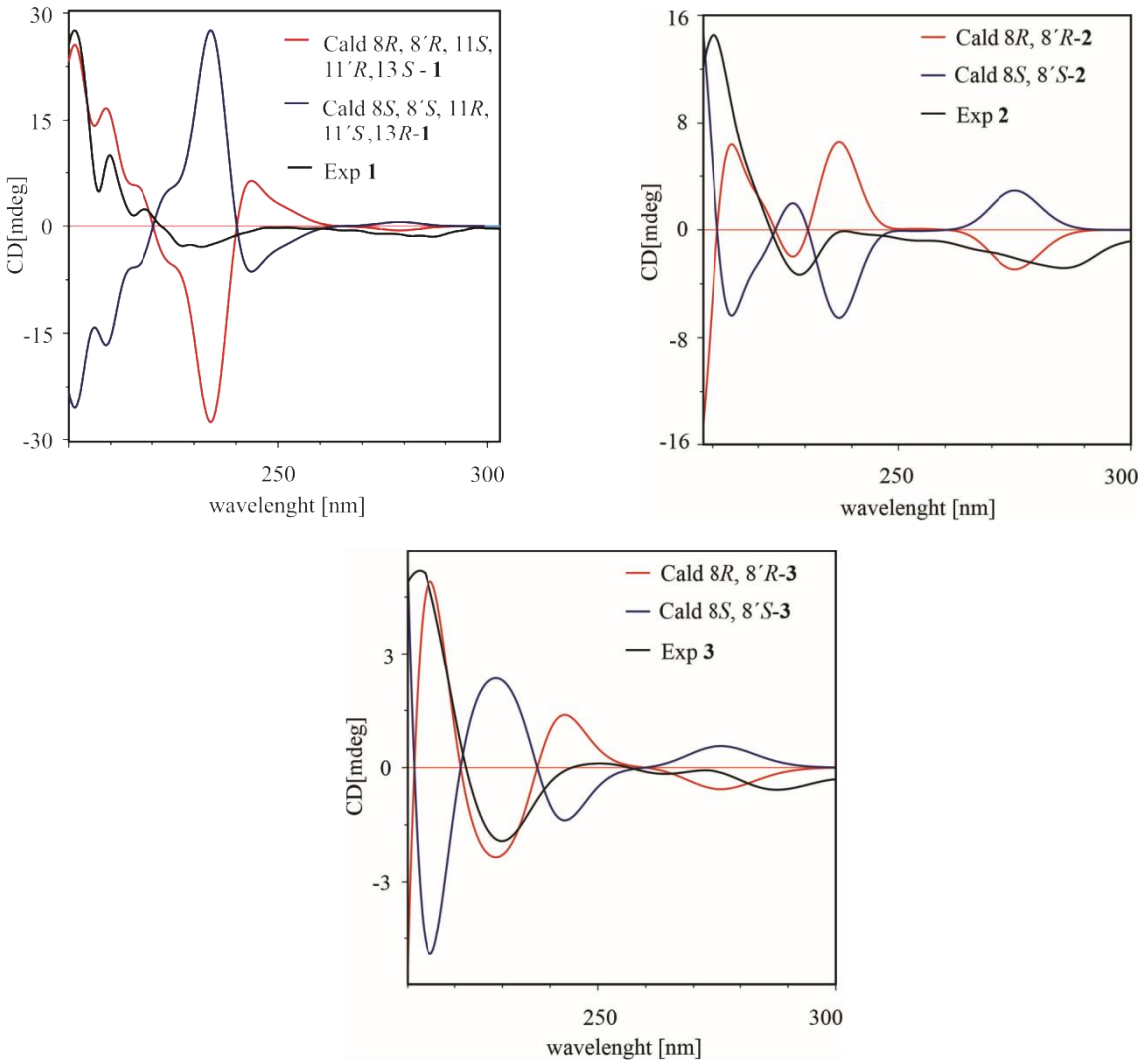


Figura 9. Espectros de ECD experimental e calculado dos compostos **1**−**3**.

O composto **2** foi isolado como um sólido amorfo incolor. Sua fórmula molecular foi definida como $C_{23}H_{28}O_9$ por EMAR, com *m/z* 447,1665 $[M - H]^-$ (calculado: 447,1661), indicando 10 índices de deficiência de hidrogênio. Os dados espectroscópicos de RMN do composto **2** indicam uma estrutura semelhante ao esqueleto secoisolariciresinol, no entanto, no espectro de RMN de ^{13}C, sinais de carbonilas, δ_C 168,8 (C-1″) e 170,6 (C-3″), e de carbono metilênico δ_C 43,7 (C-2″) (Tabela 3) foram observadas, no espectro de HSQC foi visualizada uma correlação entre δ_H 3,82 (s, H-2″) e C-2″. Portanto, as atribuições desses experimentos indicam a presença de uma unidade malonil, corroborada pela correlação entre carbonilas H-2″ e C-1″/C-3″ no espectro de HMBC. Além disso, a correlação no mapa de contorno de HMBC entre H_2-9 (δ_H 4,80, 4,57) e δ_C 168,8 (C-1″) confirma a posição da unidade malonil (Figura 8). A análise de ECD mostrou um forte efeito Cotton positivo em 208 nm e negativo em 229 e 285 nm, indicando a configuração absoluta (8*R*,8'*R*) (Figura 9). Estes padrões de efeito Cotton estão de acordo com a literatura publicada para análogos secoisolariciresinol (REN et al., 2015; FENG et al., 2017; KANG et al., 2018). Assim, o composto **2** foi definido como aequilabrina B.

O composto **3** foi isolado como um sólido amorfo amarelo. Sua fórmula molecular foi determinada como $C_{24}H_{30}O_7$ por EMAR com *m/z* 429,1922 $[M-H]^-$ (calculado: 429,1919), o que implica em 10 índices de deficiência de hidrogênio. A análise dos dados de RMN indicou que o composto **3** era semelhante ao composto **2** (Tabela 3), mas não apresentava o sinal de uma das carbonilas e dos prótons metilênicos do resíduo malonil. Enquanto isso, no espectro de RMN de ^1H e HSQC, os sinais de prótons metínico em δ_H 5,96 (dq, *J* = 15,6 e 1,6 Hz) e 7,02 (dq, *J* = 15,6 e 6,8 Hz) foram observados, assim como sua correlação com os carbonos olefínicos em δ_C 123,4 (C-2″) e 145,1 (C-3″), respectivamente, prótons metílicos em δ_H 1,65 (dd, *J* = 6,8, 1,6 Hz) correlacionavam-se com o carbono metilico em δ_C 18,1 (C-4″). No espectro HMBC, as correlações mútuas de H-2″ (δ_H 5,96), H-3″ (δ_H 7,02) e H_2-9 (δ_H 4,75, 4,52) com δ_C 166,9 (C-1″) confirmam a presença de um grupo 2-butenoil e sua localização em C-9. A análise dos dados experimentais e teóricos do ECD permitiram estabelecer a configuração absoluta como 8*R*,8′*R* para a estrutura (Figura 9), o composto **3** foi definido como aequilabrina C.

Os compostos **4-6** foram confirmados como lariciresinol-4'-*O*-*β*-glicosídeo (**4**) (SUGIYARNA; KIKUCHI, 1993; LI et al., 2015), roseosideo (**5**) (YAMANO; ITO, 2005) e alantoína (**6**) (XU; SUNG; HAN, 2011), de acordo com a comparação dos

dados espectrais com a literatura. Estes compostos são descritos pela primeira vez na espécie *J. aequilabris*, e este é o primeiro relato da presença de roseosideo (**5**) no gênero *Justicia*.

Os efeitos dos compostos **1-3** na viabilidade celular foram avaliados para estabelecer suas faixas de concentração não citotóxica. Para a viabilidade celular, o ensaio Alamar Blue foi utilizado por ser amplamente usado para avaliar a viabilidade celular com aplicação bem validada na identificação da citotoxicidade de moléculas. Conforme mostrado na Tabela 4, os compostos **2** e **3** apresentaram citotoxicidade apenas em altas concentrações e exibiram valores de CC_{50} de 173 e 92 μM, respectivamente. O Composto **1** não apresentou citotoxicidade em nenhuma das concentrações testadas; portanto, exibiu CC_{50} > 200 μM. Após determinar a faixa de concentração citotóxica dos compostos **1-3** em macrófagos da cepa RAW, foram avaliados os efeitos desses compostos na produção de ON e IL-1β pró-inflamatória por essas células estimuladas.

Tabela 4. Citotoxicidade e efeito inibitório dos compostos **1-3** e secoisolariciresinol na produção de ON em macrófagos estimulados RAW 264.7[a].

Compostos	IC_{50} (μM)[b]	CC_{50} (μM)[c]
1	23.4 ± 4.3	> 200
2	9.1 ± 1.7	173
3	7.3 ± 2.4	92
Secoisolariciresinol	N.D.	132
Dexametasona[d]	4.4 ± 0.2	-
Violeta genciana[d]	-	1.1

[a]Os valores são médias do desvio padrão ± (DP), n = 5. [b]IC_{50}: concentração inibitória de 50%. [c]CC_{50}: concentração citotóxica de 50%. [d] Controles positivos. N.D.: não determinado.

Os compostos **1**, **2** e **3** (16,7-50 μM) reduziram os níveis de nitrito em culturas de macrófagos estimulados com LPS e IFN-γ em comparação com as células estimuladas e tratadas com veículo ($p < 0,001$), mostrando valores de IC_{50} de 23,4, 9,1 e 7,3 μM, respectivamente. A dexametasona foi usada como droga padrão ouro e apresentou IC_{50} de 4,4 (Tabela 4). Esses resultados indicam que os compostos **1-3**

reduziram o óxido nítrico produzido pela estimulação de macrófagos, o que indica atividade anti-inflamatória. Consistente com esses resultados, o dados de ELISA mostram que os compostos **1** (6,3-50 μM), **2** (3,1-25 μM) e **3** (2,1-16,7 μM) reduziu a produção de IL-1β por macrófagos estimulados com LPS e IFN-γ de forma dose-dependente ($p < 0,01$).

Tabela 5. Efeito Inibitório dos Compostos **1-3** e secoisolariciresinol na Produção de IL-1β em Macrófagos RAW 264.7 Estimulados.

Compostos	IL-1*β* (pg/mg)	IL-1*β* (pg/mg)	IL-1*β* (pg/mg)	IL-1*β* (pg/mg)	Inibição máxima%
1	50 μM	25 μM	12.5 μM	6.25 μM	
	56.03±2.35[a]	70.23±0.9[a]	71.26±3.94	73.34±4.1	23.5
2	25 μM	12.5 μM	6.25 μM	3.125 μM	
	53.28±1.47[a]	66.03±1.24[a]	71.08±1.32	73.14±3.36	27.3
3	16.7 μM	8.35 μM	4.17 μM	2.08 μM	
	49.42±2.52[a]	65.71±4.15[a]	69.77±5.82	74.09±1.57	32.5
Secoisolariciresinol	16.7 μM	8.35 μM	4.17 μM	2.08 μM	
	73.0±1.71	72.76±1.06	73.03±1.25	74.91±4.20	0
Controle (veículo)		73.25±1.84			-
Dexametasona (10 μM)*		38.14±0.74			47.9

Os valores são médias do desvio padrão (DP) ±, n=5. [a]Diferente do grupo controle tratado com veículo ($p<0,001$). *Fármaco padrão ouro (controle positivo).

Os efeitos inibitórios máximos sobre a produção de IL-1*β*, induzidos por **1** (50 μM), **2** (25 μM) e **3** (16,7 μM), foram de 23,5%, 27,3% e 32,5%, respectivamente. O efeito inibitório máximo da dexametasona (10 μM) na produção de IL-1*β* foi de 47,9% (Tabela 5). Esses resultados indicam que os compostos **1-3** podem inibir as respostas dos macrófagos a estímulos inflamatórios. Considerando o papel fundamental dos macrófagos e seus mediadores nos processos inflamatórios, os dados reforçam o potencial anti-inflamatório dos compostos **1-3**.

O secoisolariciresinol, previamente isolado (MAIA et al. 2020), não demonstrou atividade inflamatória através da produção de ON e da citocina pró-inflamatória IL-1*β*. Esses resultados *in vitro* indicam que o padrão de substituição de C-9 e C-9' é importante para produção de respostas anti-inflamatórias. Estes dados demonstrar a

atividade anti-inflamatória dos compostos **1**, **2** e **3**, relatado pela primeira vez na literatura.

Os resultados demonstram a importância abordagem de rede molecular e CL-EM no isolamento de compostos de interesse, possibilitando agilidade no processo e otimização de recursos. Os dados reforçam a atividade anti-inflamatória da espécie *Justicia*.

SESSÃO EXPERIMENTAL

Aequilabrina A (**1**): sólido amorfo amarelo; $[\alpha]^{25}_{D}$ -14 (*c* 0,1, piridina); ECD (EtOH) λ_{max} ($\Delta\varepsilon$) 202 (28,07), 210 (10,47), 232 (−2,93), 287 (−1,49); IV (KBr) ν_{max} 3464, 2941, 2852, 1743, 1606, 1516, 1463, 1384, 1273, 1172 e 1031 cm^{-1}; dados de RMN de ^{1}H e ^{13}C, ver Tabela 3; EMAR: *m/z* 559,1805 $[M-H]^-$ (calculado para $C_{28}H_{31}O_{12}$, 559,1821, Δ = 2,9 ppm).

Aequilabrina B (**2**): sólido amorfo incolor; $[\alpha]^{25}_{D}$ -15 (*c* 0,1,piridina); ECD (EtOH) λ_{max} ($\Delta\varepsilon$) 208 (19,58), 229 (−4,22), 285 (−2,88); IV (KBr) ν_{max} 3442, 2924, 2858, 1728, 1606, 1516, 1460, 1384, 1276, 1155 e 1031 cm^{-1}; Dados de RMN de ^{1}H e ^{13}C, consulte a Tabela 3; EMAR: *m/z* 447,1665 $[M-H]^-$ (calculado para $C_{23}H_{27}O_9$, 447,1661, Δ = 1,0 ppm).

Aequilabrina C (**3**): sólido amorfo amarelo; $[\alpha]^{25}_{D}$ -22 (*c* 0,1,piridina); ECD (EtOH) λ_{max} ($\Delta\varepsilon$) 206 (11,08), 227 (-3,39), 289 (-1,05); IV (KBr) ν_{max} 3458, 2927, 2858, 1720, 1654, 1598, 1516, 1465, 1382, 1271, 1186 e 1031 cm^{-1}; Dados de RMN de ^{1}H e ^{13}C, ver a Tabela 3; EMAR: *m/z* 429,1922 $[M-H]^-$ (calculado para $C_{24}H_{29}O_7$, 429,1919, Δ = 0,7 ppm).

CONTEÚDO ASSOCIADO

Informações de suporte

As informações de suporte estão disponíveis gratuitamente em https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jnatprod.2c00478.

Dados de EM e RMN dos compostos **1-6** e compostos desreplicados (DOCX)

INFORMAÇÃO DO AUTOR

Autor Correspondente

Josean F. Tavares – Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 58037; orcid.org/0000-0003-0293 2605*Tel: +55 83 32167427. E-mail: josean@ltf.ufpb.br.

Contribuição dos Autores

O manuscrito foi escrito com a contribuição de todos autores. Todos autores deram sua aprovação para a versão final desse manuscrito. Todos autores contribuíram de forma igualitária.

Notas

Os autores declaram que não possuem interesse financeiro.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem às agências brasileiras, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES) (Código de Finanças 001) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro e bolsas, ao Instituto de Química − Campus de Araraquara − UNESP pelas análises do dicroísmo circular. Agradecemos também a colaboração com a Rede Norte-Nordeste de Fitoterápicos (INCT-RENNOFITO).

INFORMAÇÕES DE SUPORTE

Isolamento guiado de lignanas anti-inflamatórias de *Justicia aequilabris* por abordagem de rede molecular

Joanda P. R. e Silva,† Laiane C. O. Pereira,† Lucas S. Abreu,‡ Francisca S. V. Lins,† Thalisson A. de Souza,† Renan F. do Espírito-Santo,§ Renata P. C. Barros,† Cristiane F. Villarreal,⊥ José I. M. de Melo,† Marcus T. Scotti,† Vicente C. de O. Costa,† Lucas H. Martorano, ‡ Fernando M. dos S. Junior, ‡ Raimundo Braz Filho,‖ Marcelo S. da Silva,† and Josean F. Tavares*,†

†Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintético Bioativos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brasil

‡Departamento de Química, Instituto de Química, Universidade Federal Fluminense, Niterói, Brasil

§Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Brasil

⊥Escola de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brasil

‖ Departamento de Química, Instituto de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Brasil

SUMÁRIO

Dados dos compostos conhecidos isolados de *J. aequilabris* 76
Tabela S1. Dados CL-EM^3 e CL-EMAR dos compostos.....77
Figura S1. Cromatogramas de pico base do extrato etanólico das partes aéreas de *J. aequilabris* em modo negativo. 79
Esquema 1. Fragmentação da secoisolariciresinol.....80
Figura S2. Espectro de RMN de ^{1}H do composto **1** obtido em 500 MHz em piridina-d_5. ...81
Figura S3. Espectro de RMN de ^{1}H do composto **1** obtido em 500 MHz em piridina-d_5. (expansão)…….....82
Figura S4. Espectro de RMN de ^{1}H do composto **1** obtido em 500 MHz em piridina-d_5 (expansão) 83
Figura S5. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **1** obtido em 125 MHz em piridina-d_5 .....84**Erro! Indicador não definido.**
Figura S6. Espectro de RMN de ^{13}C DEPT-135 do composto **1** obtido em 125 MHz em piridina-d_5. 85
Figura S7. Espectro de HSQC do composto **1** obtido em 500 MHz (pyridine-d_5).....86
Figura S8. Espectro de HMBC do composto **1** obtido em 500 MHz (pyridine-d_5) 87
Figura S9.Espectro HMBC do composto **1** obtido em 500 MHz (pyridine-d_5) (expansão).....88
Figura S10. Espectro de COSY do composto **1** obtido em 500 MHz (pyridine-d_5).....89
Figura S11. Espectro de NOESY do composto **1** obtido em 500 MHz (pyridine-d_5).....90
Esquema 2**.** Proposta de fragmentação do composto **1**. 91
Figura S12.Espectro de EMAR (A) e CL-EM/EM (B) do composto **1** ($[M-H]^-$, modo negativo).....92
Esquema 3. Proposta de biossíntese do composto **1**.....93
Figura S13. Candidatos para a aequilabrina A……..…94
Tabela S2. Comparação dos deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C (δcal) simulados para todos os candidatos de aequilabrina A (GIAO-mPW1PW191/6-31G(d)//B3LYP/6-31G(d)) com os valores experimentais (δ_{exp}, 500 MHz, piridina- d_5) do produto natural isolado……..…….95
Tabela S3. Comparação dos deslocamentos químicos de RMN de ^{1}H (δcal) simulados para todos os candidatos de aequilabrina A (GIAO-mPW1PW191/6-31G(d)//B3LYP/6-31G(d)) com os valores experimentais (δ_{exp}, 500 MHz, piridina- d_5) do produto natural isolado……..….96
Figura S14. Valores de DP4$^+$ (todos os dados) obtidos pela correlação do cálculo dos deslocamentos quimicos de RMN de todos os candidatos de aequilabrina A com os dados experimentais de RMN do produto natural isolado…….97
Figura S15.Valores de ML-*J*-DP4 obtidos pela correlação do cálculo dos deslocamentos quimicos de RMN de todos os candidatos de aequilabrina A com os dados experimentais de RMN do produto natural isolado……...97
Figura S16. Confôrmeros de menor energia do isômero 1 da aequilabrina A no nível B3LYP/6-31G(d)……...98
Figura S17. Confôrmeros de menor energia do isômero 2 da aequilabrina A no nível B3LYP/6- 31G(d)…….……..…….101
Figura S18. Confôrmeros de menor energia do isômero 3 da aequilabrina A no nível B3LYP/6- 31G(d)……...……..…….103

Figura S19. Confôrmeros de menor energia do isômero 4 da aequilabrina A no nível B3LYP/6- 31G(d)……..……105
Figura S20.Espectro de RMN de ^{1}H do composto **2** obtido em 400 MHz (piridina-d_5).....106
Figura S21. Espectro de RMN de ^{1}H do composto **2** obtido em 400 MHz (piridina-d_5) (expansão).....107
Figura S22.Espectro de RMN de ^{1}H do composto **2** obtido em 400 MHz (piridina-d_5) (expansão).....108
Figura S23. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **2** obtido em 100 MHz (piridina-d_5).....109
Figura S24. Espectro de RMN de ^{13}C DEPT-135 do composto **2** obtido em 100 MHz (piridina-d_5).....110
Figura S25. Espectro de HSQC do composto **2** obtido em 400 MHz (pyridine-d_5).....111
Figura S26. Espectro de HMBC do composto **2** obtido em 400 MHz (piridina-d_5).....112
Figura S27. Espectro de HMBC do composto **2** obtido em 400 MHz (piridina-d_5) (expansão) 113
Figura S28. Espectro de COSY do composto **2** obtido em 400 MHz (piridina-d_5) 114
Esquema 4. Proposta de fragmentação do composto **2**.. 115
Figura S29. Espectro de EMAR (A) e CL-EM/EM (B) do composto **2** ([M−H]$^{-}$, modo negativo)……..……..…..116
Figura S30. Espectro de RMN de ^{1}H do composto **3** em 400 MHz (pyridine-d_5) 117
Figura S31. Espectro de RMN de ^{1}H do composto **3** em 400 MHz (piridina-d_5) (expansão) 118
Figura S32. Espectro de RMN de ^{1}H do composto **3** em 400 MHz (piridina-d_5) (expansão) 119
Figura S33. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **3** obtido em 100 MHz **(**pyridine-d_5) ..120
Figura S34. Espectro de RMN de ^{13}C DEPT-135 do composto **3** obtido em 100 MHz **(**pyridine-d_5) 121
Figura S35. Espectro de HSQC do composto **3** obtido em 400 MHz (piridina-d_5).....122
Figura S36. Espectro de HMBC do composto **3** obtido em 400 MHz (pyridine-d_5).....123
Figura S37. Espectro de COSY do composto **3** obtido em 400 MHz (piridina-d_5).....124
Esquema 5. Proposta de fragmentação do composto **3**.....125
Figura S38. Espectro de EMAR (A) e CL-EM/EM (B) do composto **3** ([M−H]$^{-}$)...…..…126
REFERENCIAS 127

Dados dos compostos conhecidos isolados de *J. aequilabris*

*Laricіresinol-4′-O-β-glucopiranosideo (**4**)*: pó amorfo amarelo; $[\alpha]^{25}_{D}$ −38 (*c* 0.1,MeOH); $C_{26}H_{34}O_{11}$; ^{1}H RMN (400 MHz, *DMSO-d*$_6$): δ 6.73 (1H, d, *J* = 1.9 Hz, H-2), 6.66 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-5), 6.56 (1H, dd, *J* = 8.0, 1.9 Hz, H-6), 2.80 (1H, dd, *J* = 13.4, 4.6 Hz, H-7a), 2.41 (1H, m, H-7b), 2.56 (1H, m, H-8), 3.88 (1H, m, H-9a), 3.56 (1H, m, H-9b), 3.73 (3H, s, OMe-3), 6,87 (1H, d, *J* = 1.9 Hz, H-2′), 7.01 (1H, d, *J* = 8.5 Hz, H-5′), 6.77 (1H, dd, *J* = 8.6, 1.9 Hz, H-6′), 4.71 (1H, d, *J* = 6.0 Hz, H-7′), 2.18 (1H, m, H-8′), 3.64 (1H, d, *J* = 1.92 Hz, H-9a′), 3.42 (m, H-9b′), 3.74 (3H, s, OMe-3′), 4.86 (1H, dd, *J* = 7.4 Hz, H-1″), 3.15–3.26 (4H, m, H-2″, H-5″), 3.67 (1H, m, H-6a″), 3.46 (m, H-6b″). ^{13}C RMN (100 MHz, *DMSO-d*$_6$): δ 131.7 (C, C-1), 112.7 (CH, C-2), 147.5 (C, C-3), 144.6 (C, C-4), 115.4 (CH, C-5), 120.6 (CH, C-6), 32.1 (CH_2, C-7), 42.0 (CH, C-8), 72.0 (CH_2, C-9), 55.6 (CH_3, OMe-3), 137.7 (C, C-1′), 110.1 (CH, C-2′), 148.8 (C, C-3′), 145.5 (C, C-4′), 115.0 (CH, C-5′), 117.8 (CH, C-6′), 81.7 (CH, C-7′), 52.0 (CH, C-8′), 60.7 (CH_2, C-9′), 55.7 (CH_3, OMe-3′), 100.2 (CH, C-1″), 73.3 (CH, C-2″), 77.0 (CH, C-3″), 69.7 (CH, C-4″), 76.9 (CH, C-5″), 58.6 (CH_2, C-6″). EMAR *m/z* 521.2029 $[M - H]^-$ (calculado $C_{26}H_{33}O_{11}$, 521.2028).

*Alantoína (**5**)*: cristal branco; $C_4H_6N_4O_3$; ^{1}H RMN (400 MHz, *DMSO-d*$_6$): δ 10.54 (1H, s, H-1), 8.05 (1H, s, H-3), 5.23 (1H, dd, *J* = 8.0, 1,2 Hz, H-5), 6.93 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-6), 5.80 (2H, s, H-8). ^{13}C RMN (100 MHz, *DMSO-d*$_6$): δ 156.8 (C, C-2), 173.6 (C, C-4), 62.4 (CH, C-5), 157.4 (C, C-7), EMAR *m/z* 159. 0509$[M + H]^+$ (calculado $C_4H_6N_4O_3$, 159.0512).

*Roseosideo (**6**)*: resina sólida incolor; $C_{19}H_{30}O_8$; ^{1}H RMN (400 MHz, *Metanol-d*$_4$): δ 5.87 (1H, t, *J* = 1.2 Hz, H-2), 2.61 (1H, d, *J* = 16.9 Hz, H-6a′), 2.17 (1H, d, *J* = 16.4 Hz, H-6b′), 5.97 (1H, dd, *J* = 15.6, 0.8 Hz, H-7), 5.73 (1H, dd, *J* = 15.6, 7.2, H-8), 4.53 (1H, m, H-9), 1.29 (3H, d, *J* = 6.5 Hz, H-10), 1.94 (3H, d, *J* = 1.3 Hz, H-11), 1.01, 1,04 (each 3H, s, H-12, H-13), 4.27 (1H, d, *J* = 7.7 Hz, H-1′), 3.12–3.28 (4H, m, H-2′, H-5′), 3.85 (1H, dd, *J* = 11.9, 2.2, H-6a′), 3.63 (1H, dd, *J* = 11.8, 6.1 Hz, H-6b′). ^{13}C RMN (100 MHz, *Metanol-d*$_4$): δ 201.3 (C, C-1), 127.1 (CH, C-2), 42.2 (C, C-5), 50.7 (CH_2, C-6), 133.8 (CH, C-7), 133.7 (CH, C-8), 74.6 (CH, C-9), 22, 2 (CH_3, C-10), 19.5 (CH_3, C-11), 24.6, 23.4 (CH_3, C-12, C-13), 101.2 (CH, C-1′), 74.9 (CH, C-2′), 78.3

(CH, C-3′), 71.6 (CH, C-4′), 78.2 (CH, C-5′), 62.8 (CH_2, C-6′). EMAR *m/z* de 385.1864 $[M-H]^-$ (calculado $C_{19}H_{29}O_8$, 385.1857).

Tabela S1: Dados CL-EM^3 e CL-EMAR dos compostos.

Pico	T.R	[M−H]$^-$	Formula	Erro (ppm)	EM^n *m/z*	Composto	Cluster	Referência
1	7.0	315.0711	$C_{13}H_{16}O_9$	3.3	EM^2 [315]: 153 EM^3 [315→153]: 109	Ácido protocatecuico - *O*-hexosideo	F	1, 2
2	7.3	299.0763	$C_{13}H_{16}O_8$	3.2	EM^2 [299]: 137 EM^3 [299 → 137]: 93	Ácido hidroxibenzóico - *O*- hexosideo	E	3
3	9,5	299.0762	$C_{13}H_{16}O_8$	3.6	EM^2 [299]: 179, 137 EM^3 [299 → 179]: 151; 136, 107 EM^3 [299 → 137]: 93	Ácido hidroxibenzóico 7-*O*-glicosídeo*	E	3
4	9.7	329.0863	$C_{14}H_{18}O_9$	4.5	EM^2 [329]: 167 EM^3 [329 → 167]: 152, 123,108	Ácido vanilinico-*O*-hexosideo	E	1
5	10.0	359.0972	$C_{15}H_{20}O_{10}$	3.1	EM^2 [359]: 299, 239, 197 EM^3 [359 → 197]: 182, 153, 138	Ácido siringico-*O*-hexosideo	E	1
6	14.5	341.0890	$C_{15}H_{18}O_9$	−3.5	EM^2 [341]: 179, 135	Ácido caféico-*O*-hexosideo	F	1
7	14.8	325.0936	$C_{15}H_{18}O_8$	−2.1	EM^2 [325]:163, 119 EM^3 [325→163]: 119	Ácido *p*-cumárico-*O*-hexosideo	F	1
8	22.2	335.0763	$C_{16}H_{16}O_8$	2.9	EM^2 [335]: 179; 135 EM^3 [335→ 179]: 135	Ácido 3-cafeoilquínico	F	4, 5
9	26.7	521.2029	$C_{26}H_{34}O_{11}$	−0.0	EM^2 [521]: 359, 329 EM^3 [521→359]: 329 EM^3 [521→329]: 299, 284, 192, 178, 160	Lariciresinol-*O*-hexosideo	C	6
10	32.5	687.2047 [M + 36]$^-$	$C_{31}H_{40}ClO_{15}$	2.0	EM^2 [687]: 651 EM^3 [687→651]: 519, 357, 343, 311	Pinoresinol-4-*O*-*β*-D-apiofuranosil-(1→2)-*β*-D-glicopiranosídeo*	B	6

11	34.4	549.1972	$C_{27}H_{34}O_{12}$	1.0	EM^2 [549]: 387 EM^3 [549→387]: 372, 181, 166, 151	Medioresinol-*O*-hexosideo	C	6, 7
12	35.2	519.1882	$C_{26}H_{32}O_{11}$	1.9	EM^2 [519]: 357 EM^3 [519→357]: 342, 311, 151, 136	Pinoresinol-4-*O*-*β*-D-glicosídeo*	C	6, 8
13	37.0	474.1779	$C_{24}H_{29}NO_9$	−1.9	EM^2 [474]: 312 EM^3 [474→312]: 297, 178, 135	*N*-Feruloil tiramina-*O*-hexosideo	C	9, 10
14	46.1	523.2190	$C_{26}H_{36}O_{11}$	−1.0	EM^2 [523]: 361 EM^3 [523→361]: 346, 343, 331, 313, 165, 179	Secoisolariciresinol-*O*-hexosideo	C	6, 11
15	52.6	595.1322	$C_{26}H_{28}O_{16}$	−2.9	EM^2 [595]: 595, 463, 301, 300 EM^3 [595→301]: 273, 257, 229, 193, 179, 151	Quercetina-3-*O*-hexosideo-pentosideo	G	12
16	60.2	397.1429 $[M + 36]^-$	$C_{20}H_{26}ClO_6$	−1.4	EM^2 [397]: 361 EM^3 [397→361]: 346, 343, 331, 313, 165, 179	Secoisolariciresinol*	C	6
17	61,5	609.1479	$C_{27}H_{30}O_{16}$	3.0	EM^2 [609]: 301 EM^3 [609→301]: 273, 257, 229, 193, 179, 151	Rutina	I	13, 14
18	66.4	579.1353	$C_{26}H_{28}O_{15}$	2.4	EM^2 [579]: 447, 285, 284 EM^3 [579→285]: 256, 240, 228, 212,151	Camferol-3-*O*-hexosideo pentosideo	G	15, 16
19	67.1	433.0758	$C_{20}H_{18}O_{11}$	4.3	EM^2 [433]: 300, 301 EM^3 [433→300]: 273, 257, 229, 193, 179, 151	Quercetina-3-*O*-pentosideo	H	17
20	70.7	579.1346	$C_{26}H_{28}O_{15}$	1.6	EM^2 [579]: 447, 285 EM^3 [579→285]: 256, 240, 212,151	Camferol-*O*-hexosideo pentosideo	G	15, 16
21	73.7	447.0915	$C_{21}H_{20}O_{11}$	4.0	EM^2 [447]: 284, 285, 256, 255 EM^3 [447→284]: 256, 240,229, 212,151, 107	Camferol-3-*O*-hexosideo	H	18
22	81.0	593.1301	$C_{30}H_{26}O_{13}$	0.1	EM^2 [593]: 447, 285, 284, 256, 255 EM^3 [593→285]: 256, 240, 212,151, 107	Camferol-3-*O*-hexosideo-deoxihexosideo	G	19

*Confirmado por padrão interno

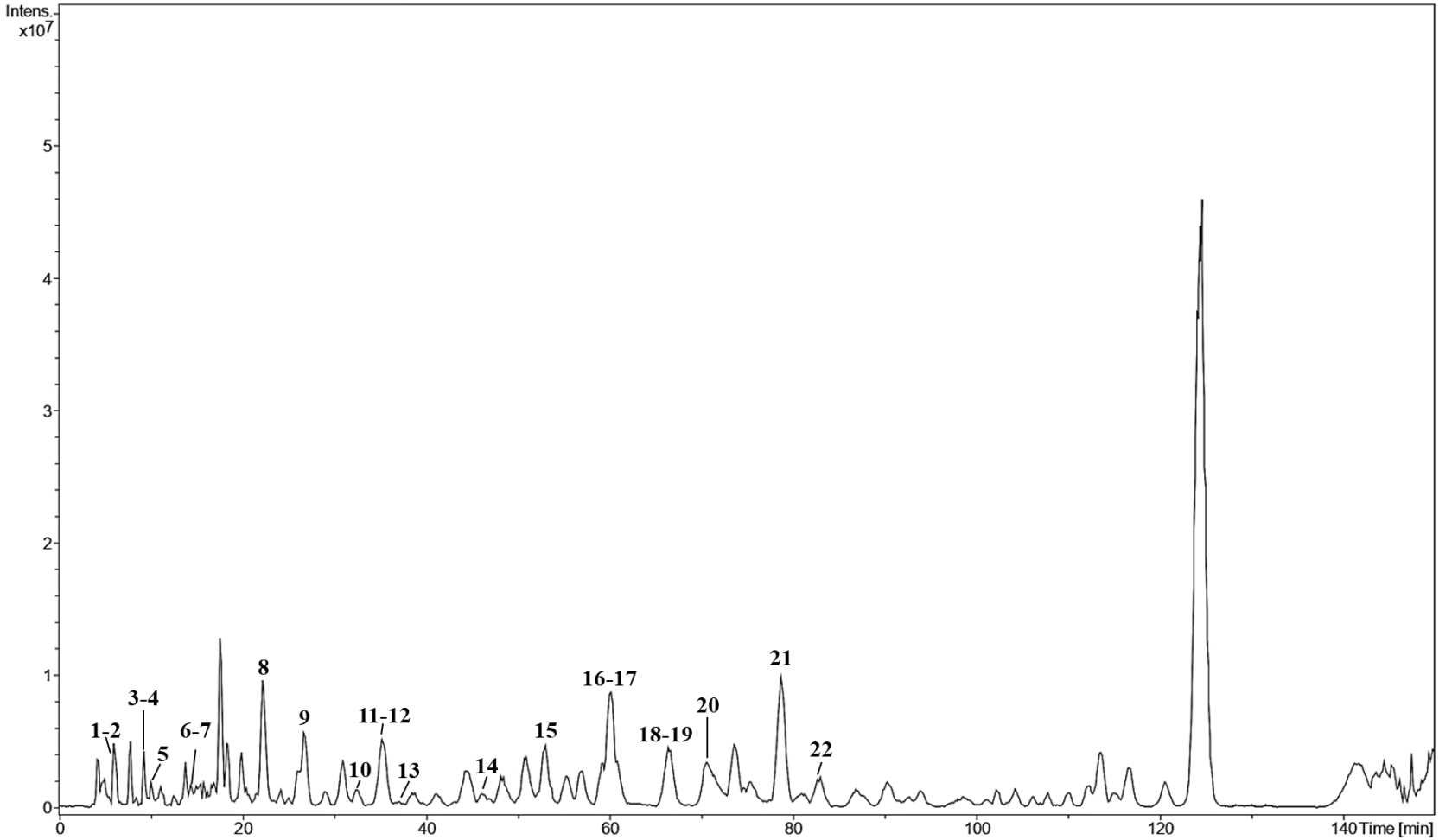
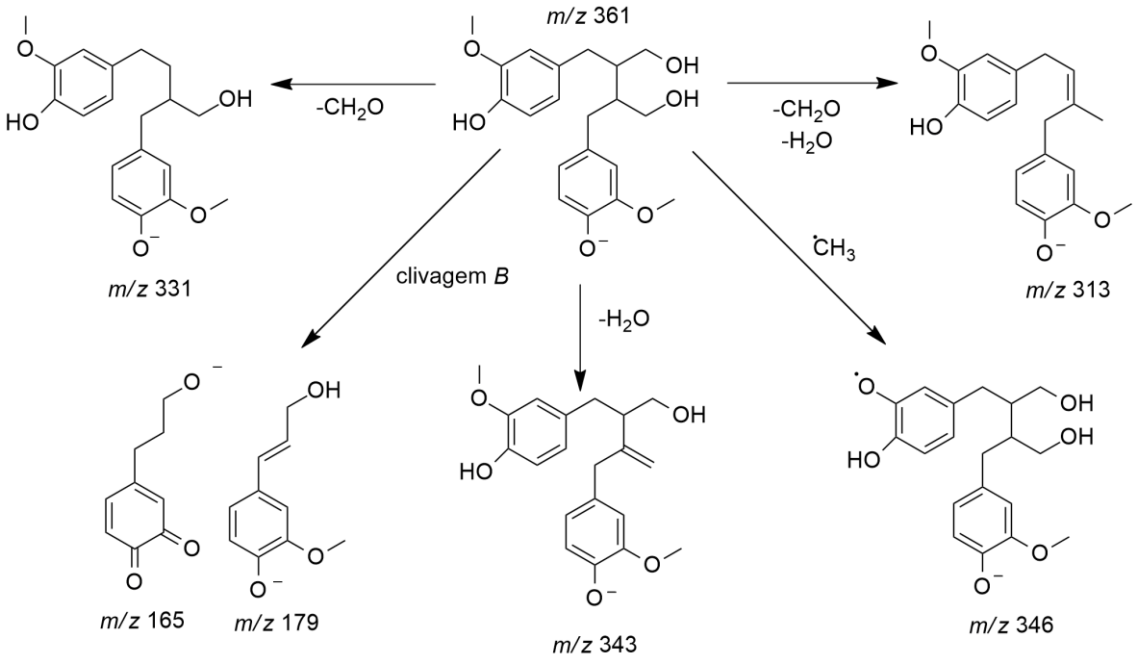


Figura S1. Cromatograma do pico base do extrato etanólico das partes aéreas de *J. aequilabris* em modo negativo.



Esquema 1. Fragmentação do secoisolariciresinol.

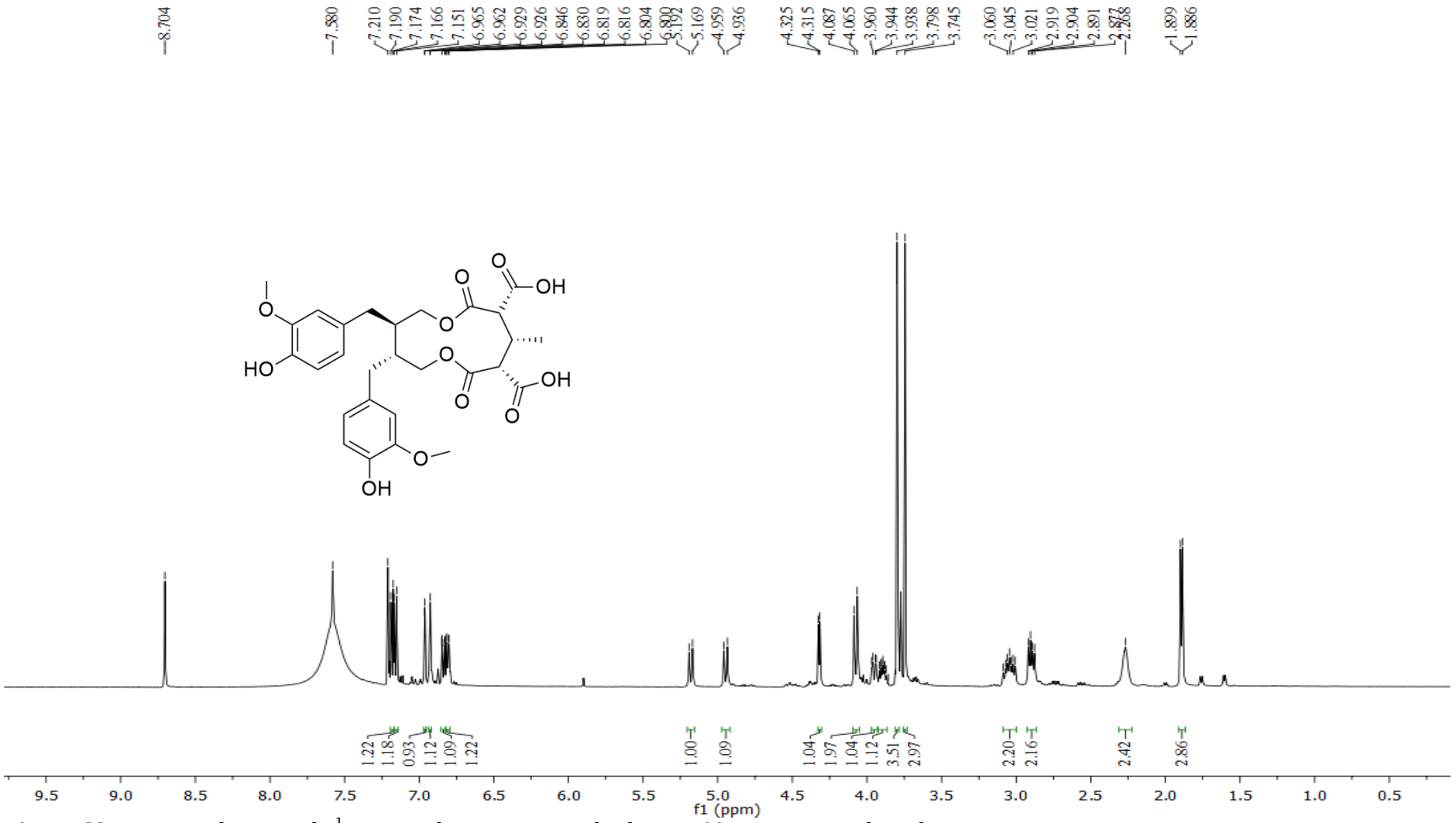


Figura S2. Espectro de RMN de ^{1}H NMR do composto **1** obtido em 500 MHz em piridina-d_5.

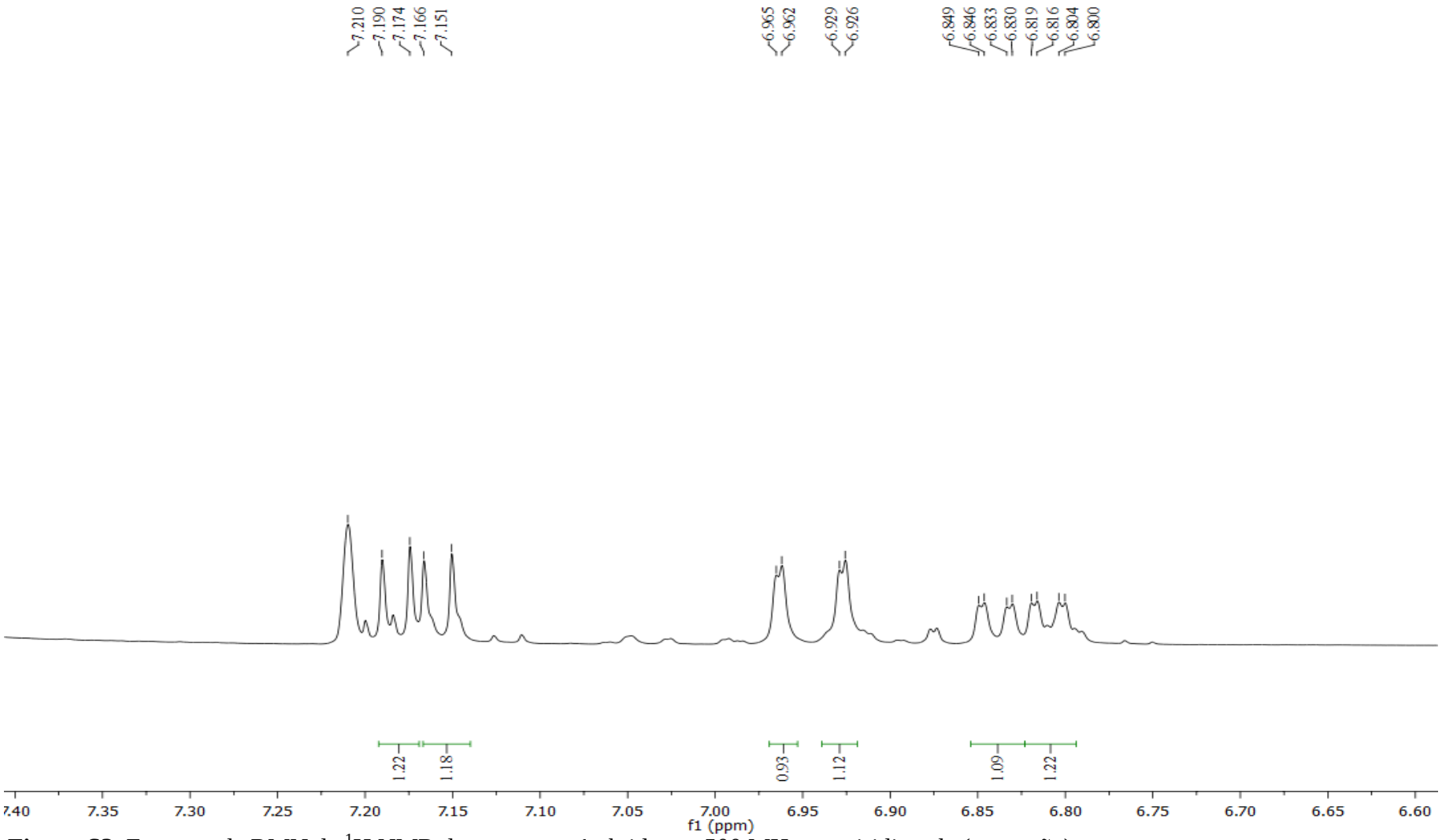


Figura S3. Espectro de RMN de ^{1}H NMR do composto **1** obtido em 500 MHz em piridina-$d_{5.}$ (expansão)

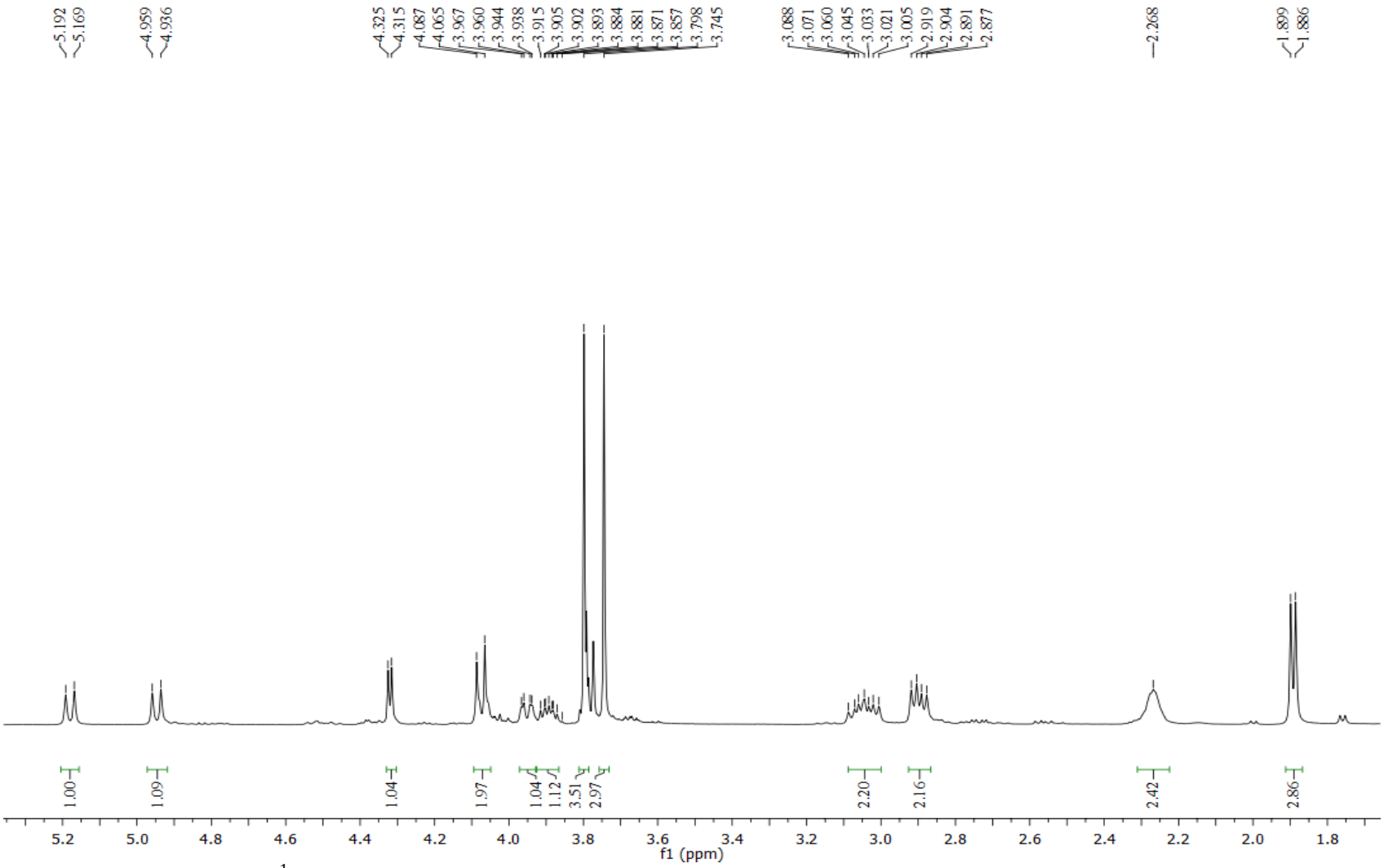


Figura S4. Espectro de RMN de ^{1}H NMR do composto **1** obtido em 500 MHz em piridina-d_5 (expansão)

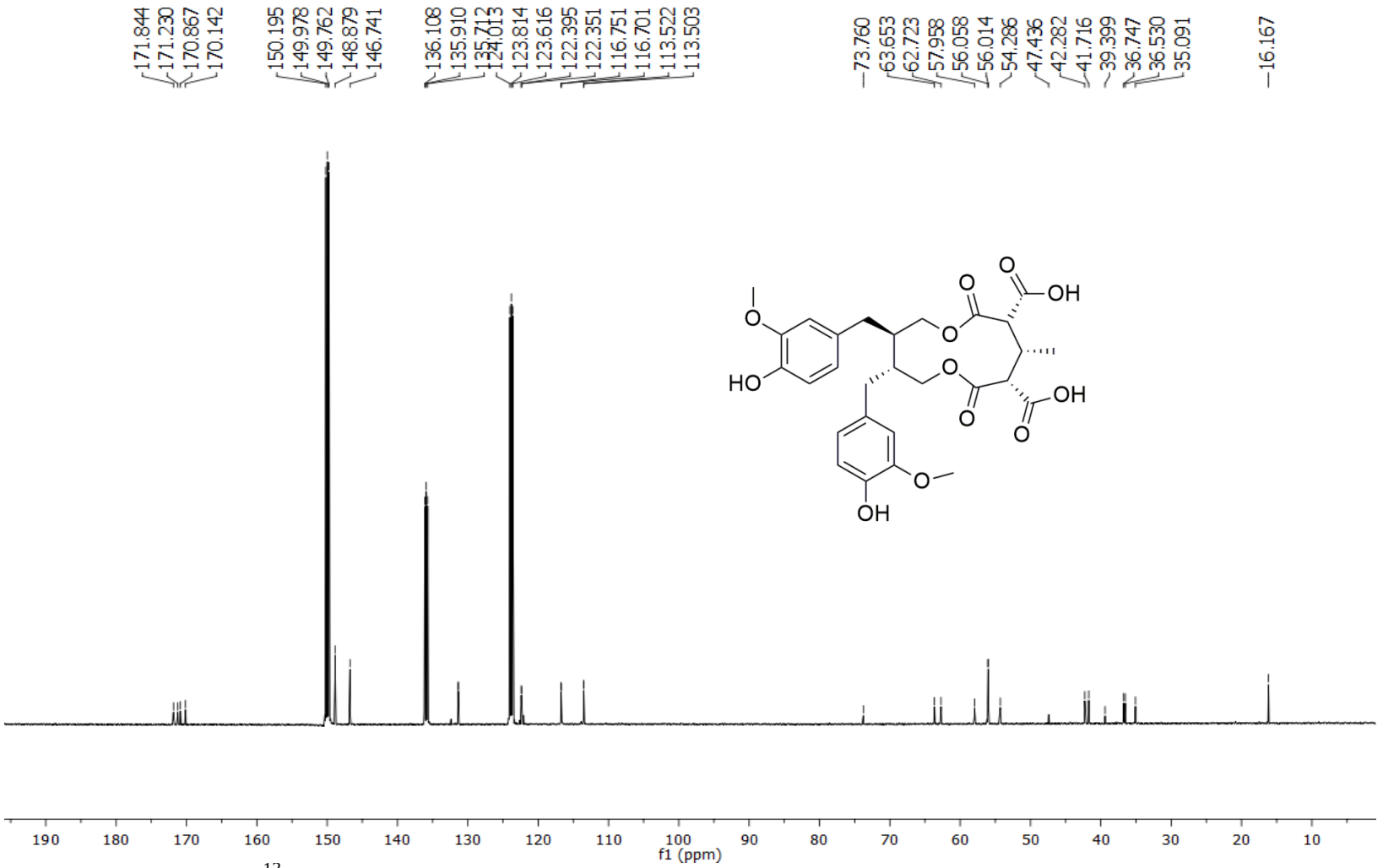


Figura S5. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **1** obtido em 125 MHz em piridina-d_5.

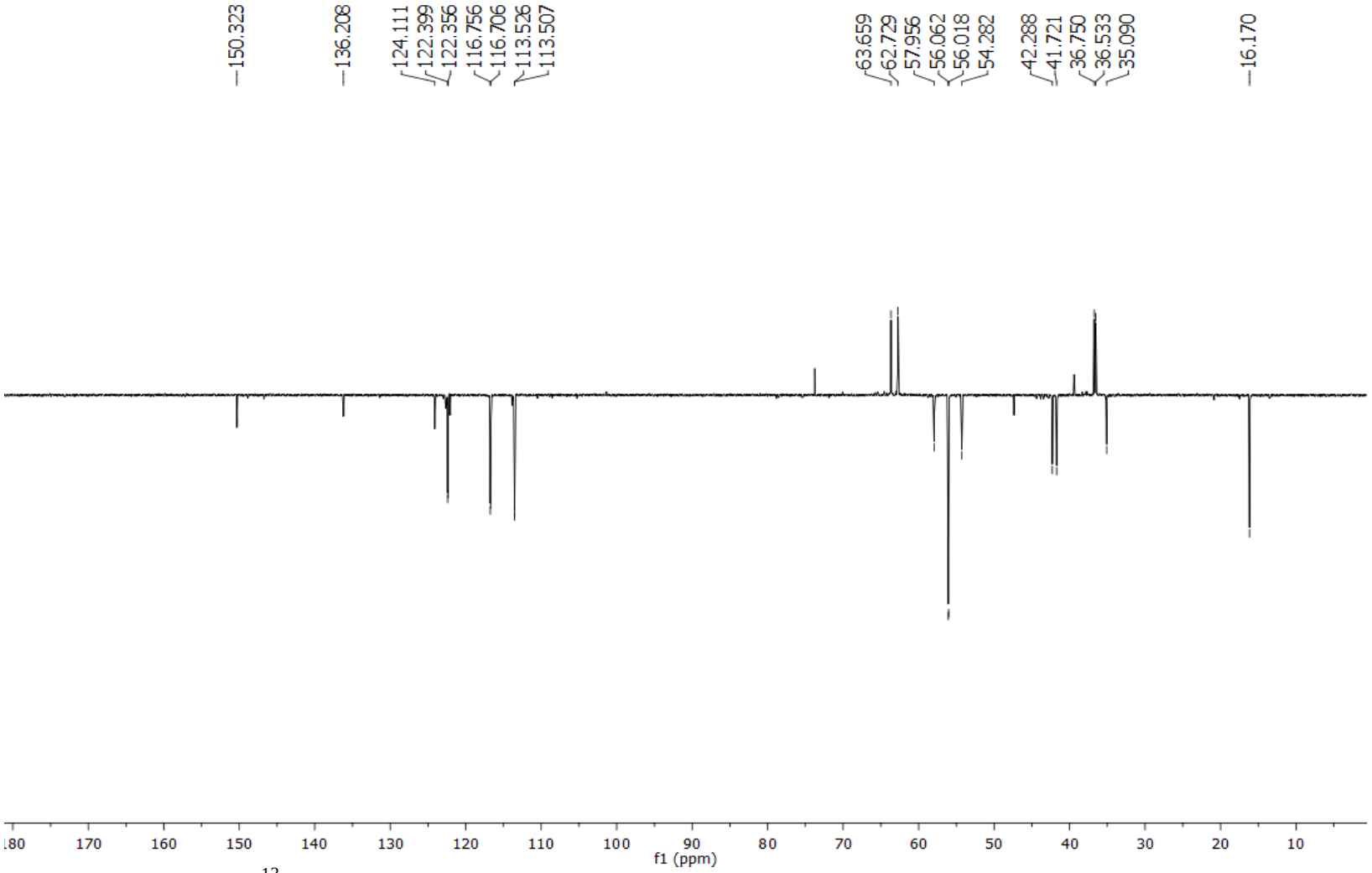


Figura S6. Espectro de RMN de ^{13}C DEPT-135 do composto **1** obtido em 125 MHz em piridina-d_5.

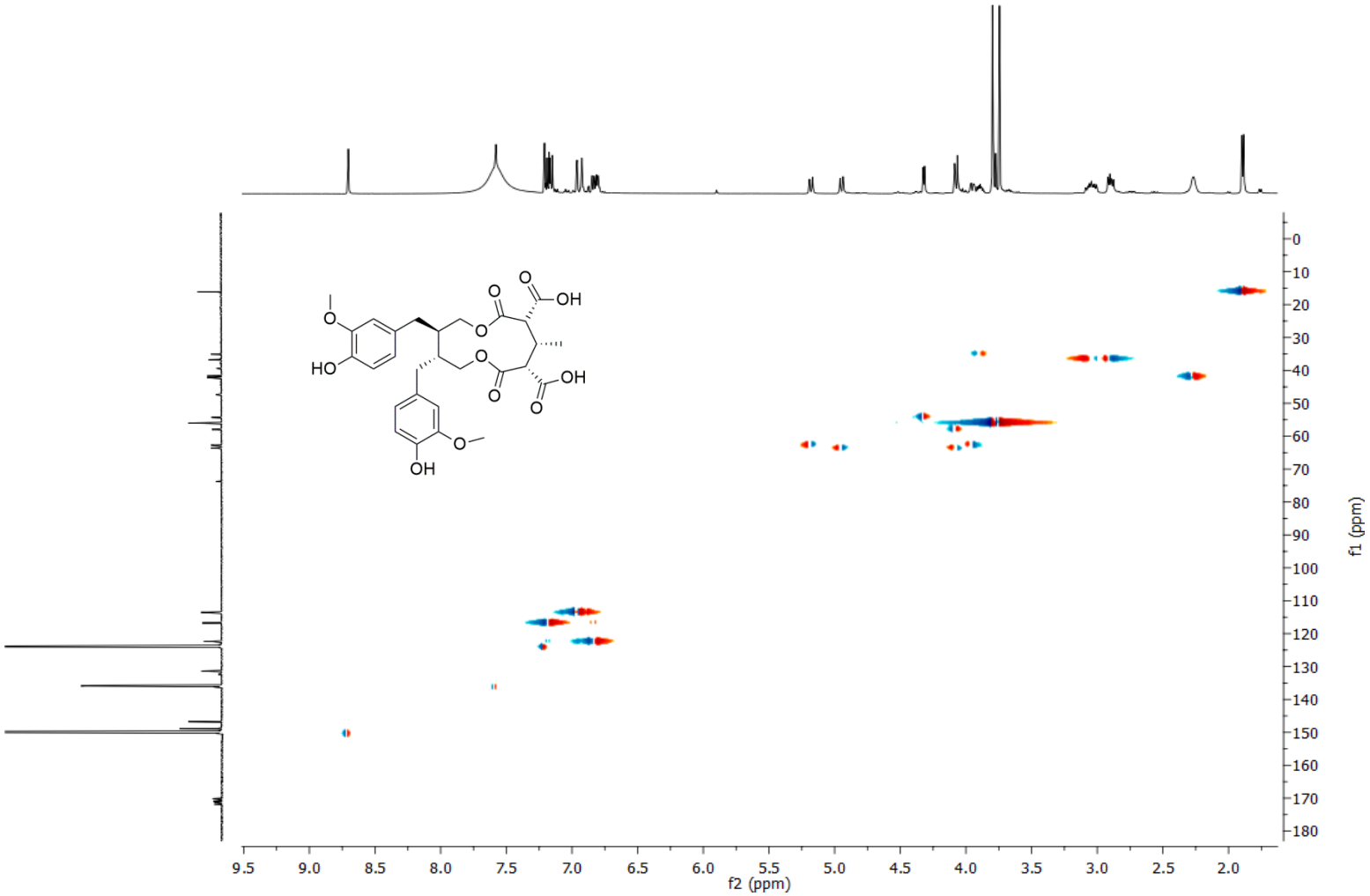


Figura S7. Espectro de HSQC do composto **1** obtido em 500 MHz (pyridine-d_5)

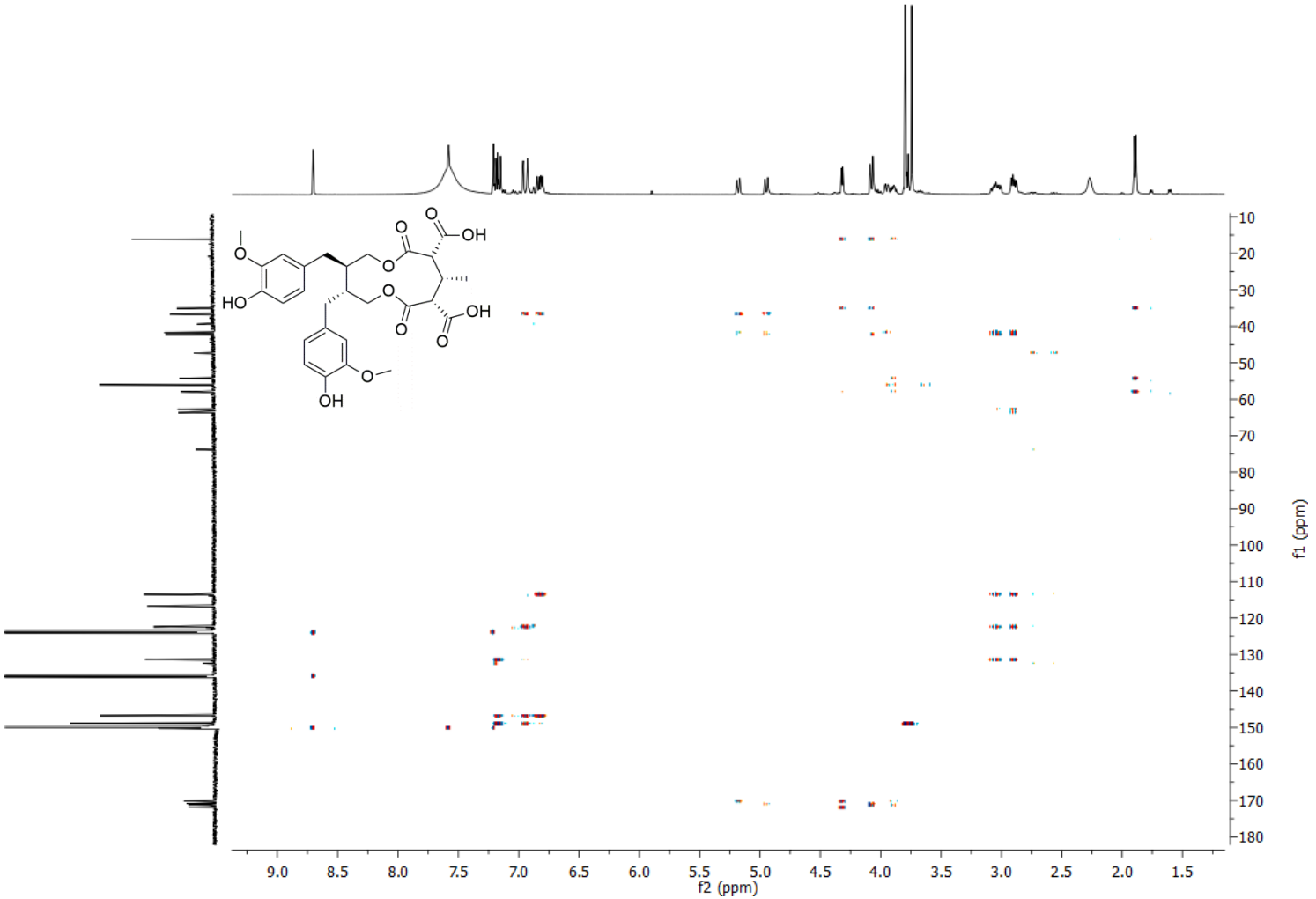


Figura S8. Espectro de HMBC do composto **1** obtido em 500 MHz (pyridine-d_5)

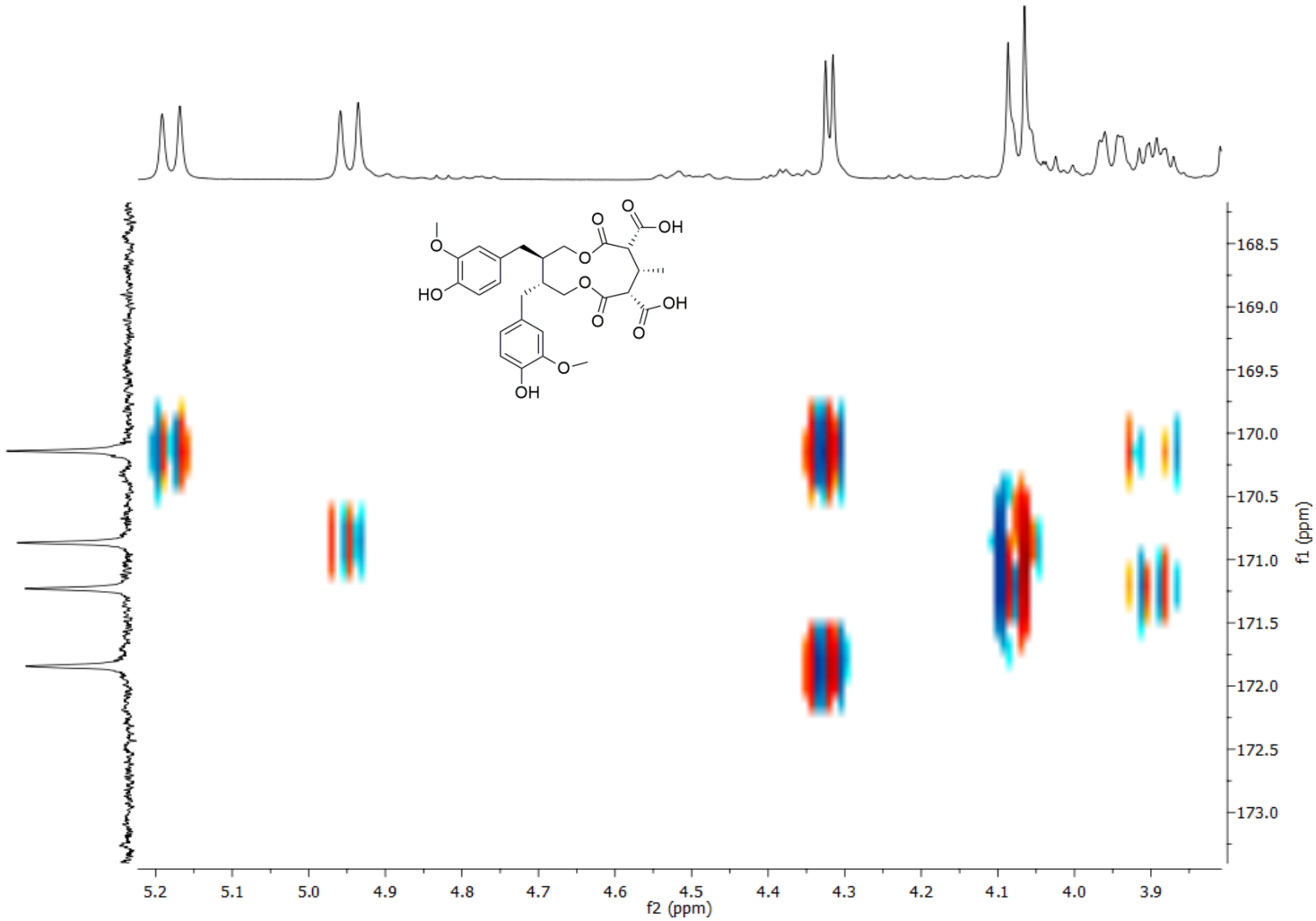


Figura S9. Espectro HMBC do composto **1** obtido em 500 MHz (pyridine-d_5) (expansão)

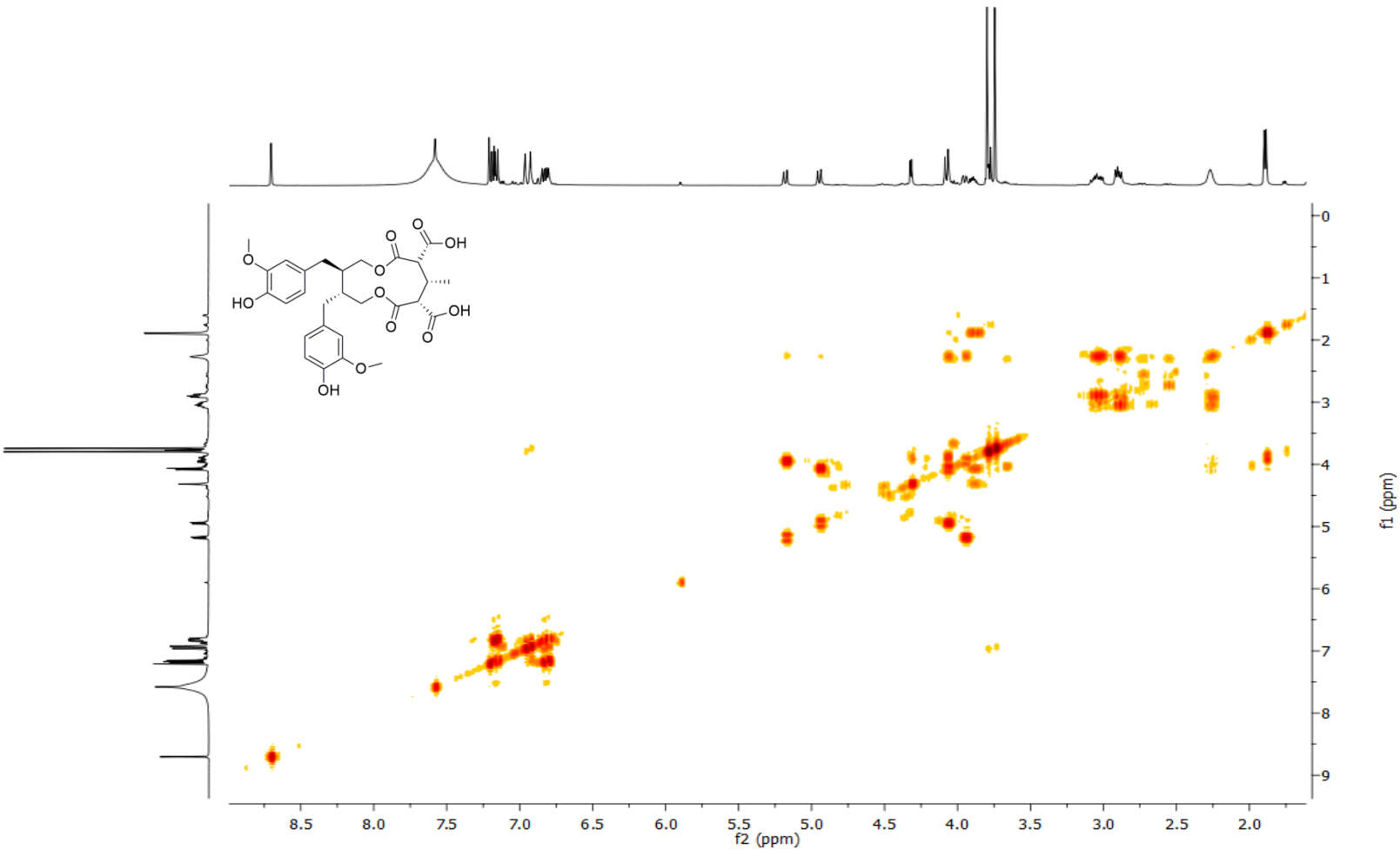


Figura S10. Espectro de COSY do composto **1** obtido em 500 MHz (pyridine-d_5)

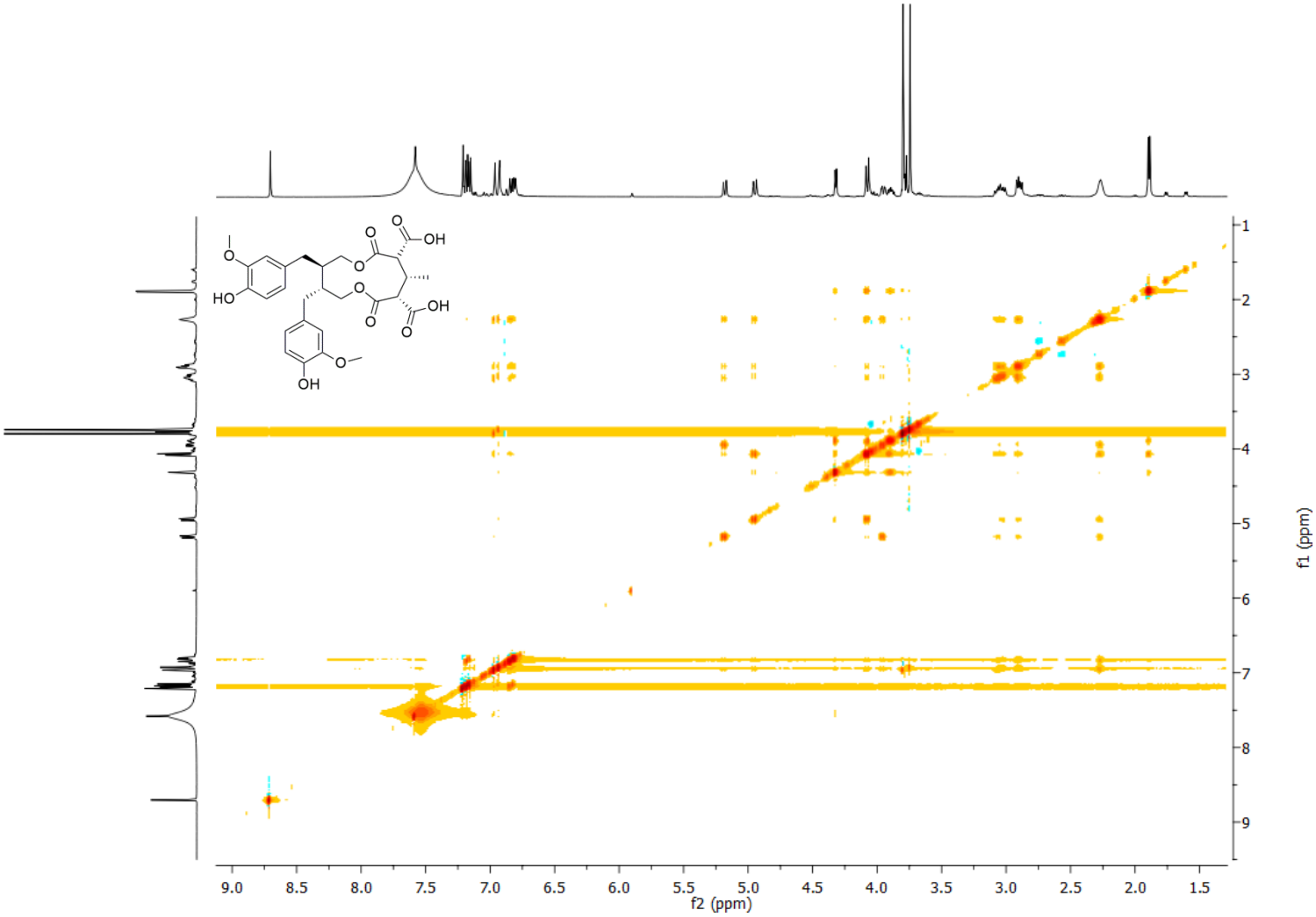
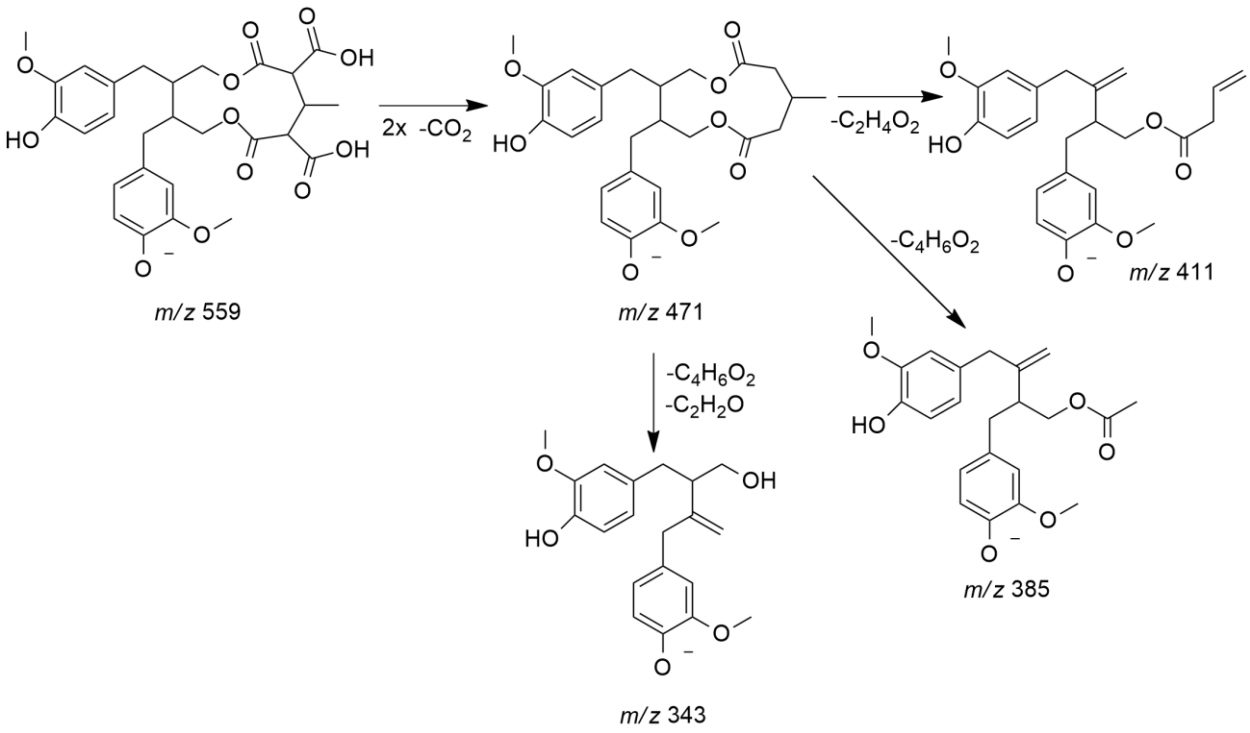


Figura S11. Espectro de NOESY do composto **1** obtido em 500 MHz (pyridine-d_5)



Esquema 2. Proposta de fragmentação do composto **1**

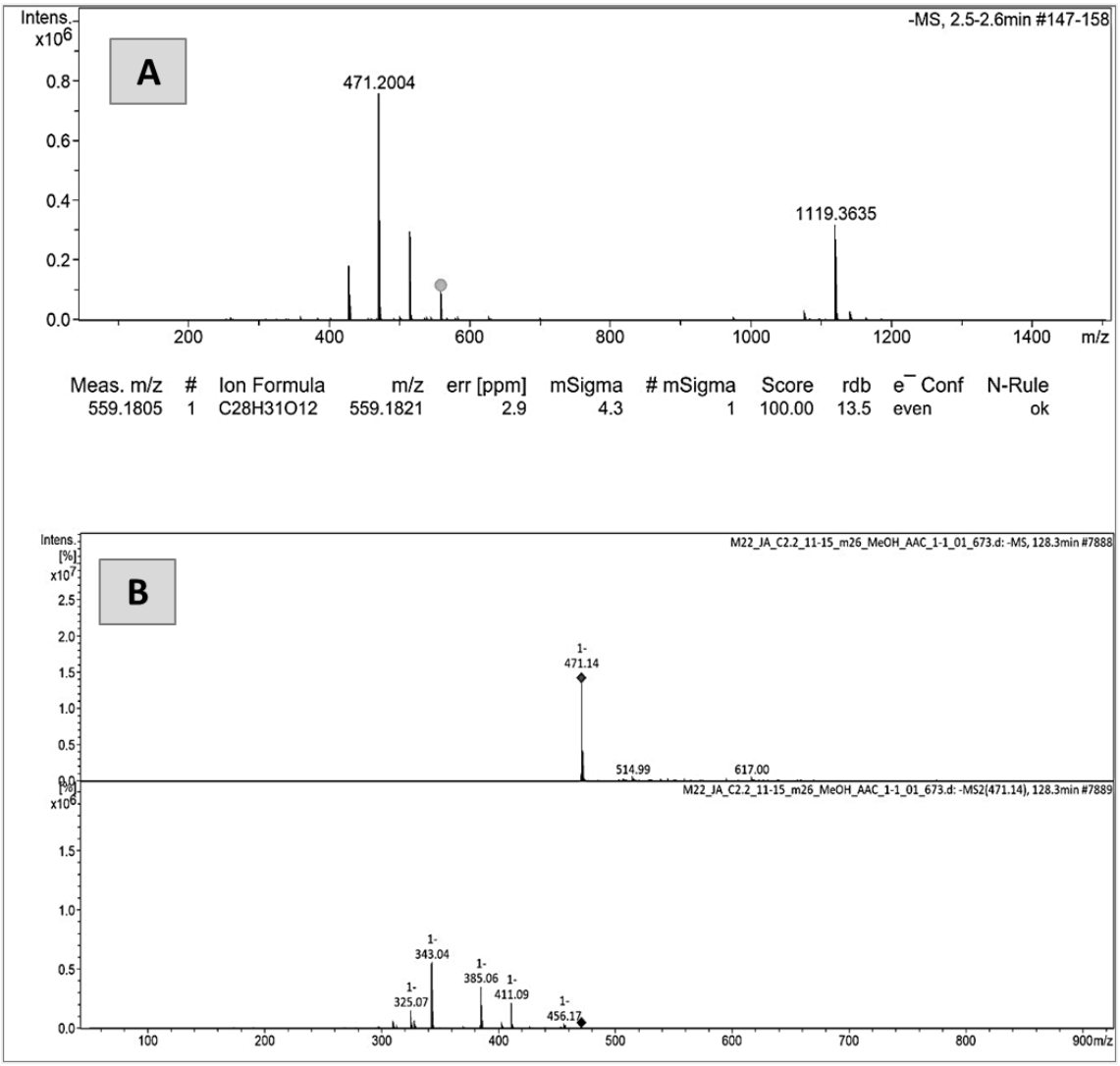
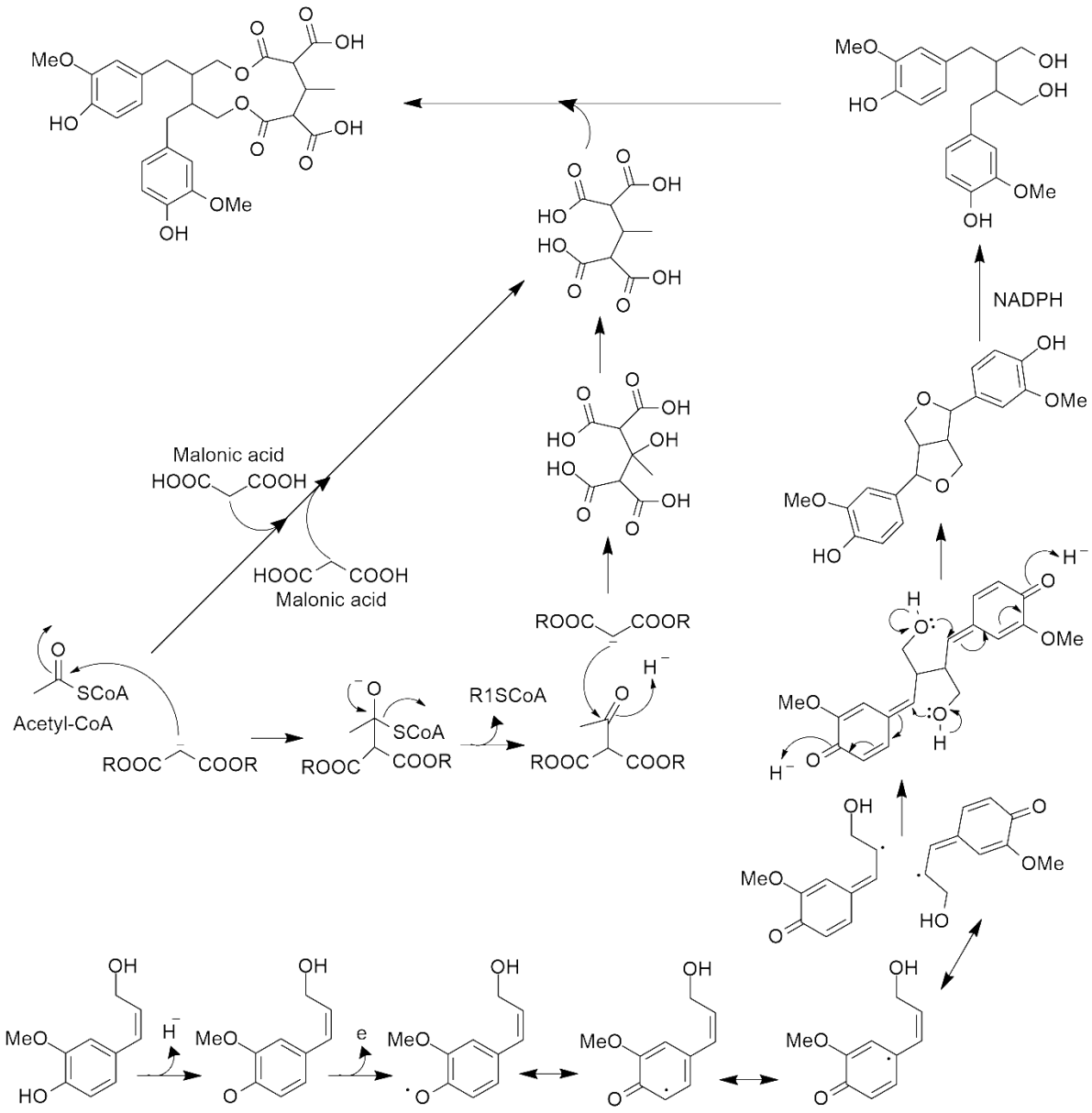


Figura S12. Espectro de EMAR (A) e CL-EM/EM (B) do composto **1** ($[M - H]^-$, modo negativo)



Esquema 3. Proposta de biossíntese do composto **1**

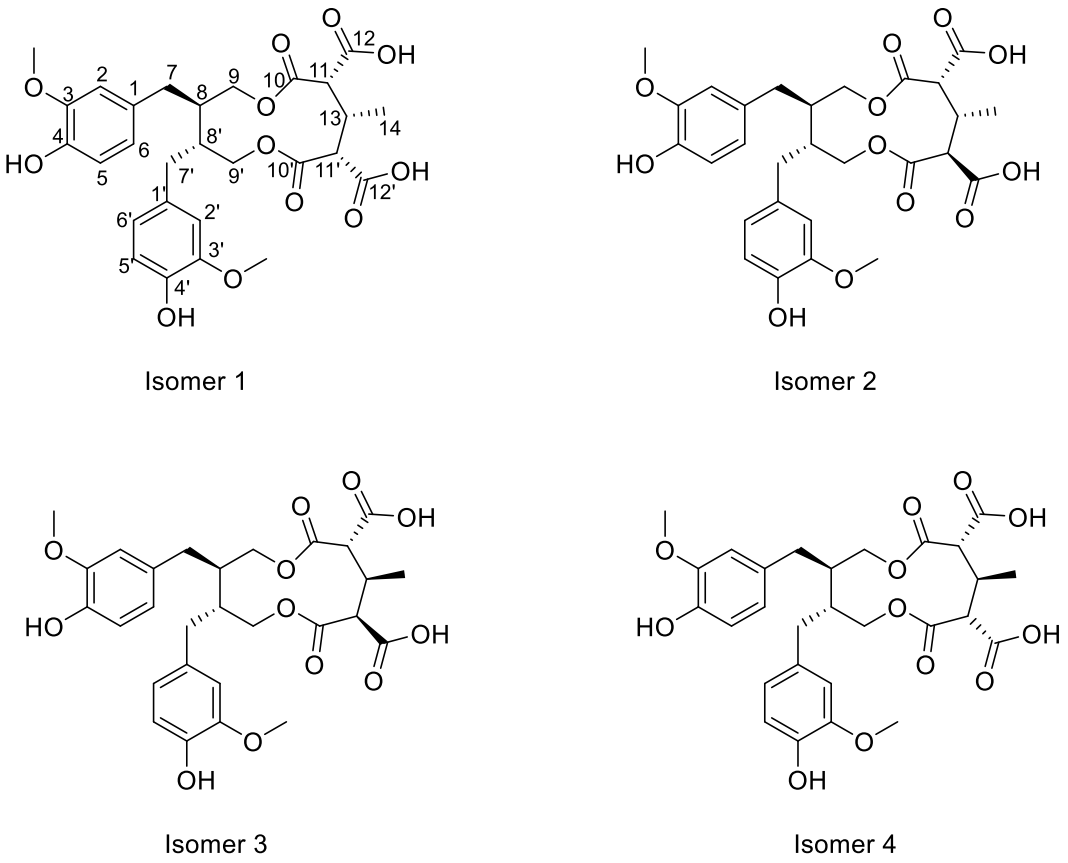


Figura S13. Candidatos para a aequilabrina A.

Tabela S2. Comparação dos deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C (δcal) simulados para todos os candidatos de aequilabrina A (GIAO-mPW1PW191/6-31G(d)//B3LYP/6-31G(d)) com os valores experimentais (δ_{exp}, 500 MHz, piridina- d5) do produto natural isolado.

Posição	Isômero 1 (δ_{cal} ^{13}C, ppm)	Isômero 2 (δ_{cal} ^{13}C, ppm)	Isômero 3 (δ_{cal} ^{13}C, ppm)	Isômero 4 (δ_{cal} ^{13}C, ppm)	Exp. (δ_{exp} ^{13}C, ppm
1	124.0	124.1	123.7	123.7	131.4
2	107.2	105.4	106.0	107.6	113.5
3	139.1	139.4	139.4	139.1	148.9
4	139.5	139.4	139.5	139.5	146.7
5	110.3	109.4	109.9	110.1	116.8
6	116.8	118.4	117.4	117.2	122.4
7	37.4	37.4	37.5	37.7	36.7
8	44.0	39.3	41.4	47.3	42.3
9	63.7	62.3	63.8	62.2	63.7
10	165.2	162.0	163.8	161.3	170.9
11	53.2	51.8	54.8	57.2	58.0
12	161.2	161.6	162.1	161.2	171.2
13	37.0	36.8	35.4	36.1	35.1
14	14.2	15.9	17.6	21.0	16.2
1’	123.3	124.6	124.5	124.4	131.35
2’	107.5	106.4	106.9	108.5	113.5
3’	139.2	139.1	139.0	139.1	148.87
4’	139.6	139.3	139.3	139.2	146.74
5’	110.1	109.7	110.1	109.8	116.7
6’	117.0	117.9	117.3	117.0	122.35
7’	37.6	36.7	37.0	37.4	36.5
8’	44.1	39.8	40.5	43.9	41.7
9’	62.1	64.3	63.4	61.5	62.7
10’	163.1	162.5	162.7	160.7	170.1
11’	57.0	55.1	51.8	55.8	54.3
12’	161.6	160.9	162.2	163.1	171.8
OCH_3-3	53.3	53.1	53.3	53.6	56.1
OCH_3-3’	53.5	53.2	53.2	53.8	56.0
MAD	**5.1**	**5.2**	**4.9**	**5.2**	
RMSD	**5.9**	**6.2**	**5.9**	**6.1**	

Tabela S3. Comparação dos deslocamentos químicos de RMN de ^{1}H (δcal) simulados para todos os candidatos de aequilabrina A (GIAO-mPW1PW191/6-31G(d)//B3LYP/6-31G(d)) com os valores experimentais (δ_{exp}, 500 MHz, piridina- d5) do produto natural isolado.

Posição	Isômero 1 (δ_{cal} ^{1}H, ppm)	Isômero 2 (δ_{cal} ^{1}H, ppm)	Isômero 3 (δ_{cal} ^{1}H, ppm)	Isômero 4 (δ_{cal} ^{1}H, ppm)	Exp. (δ_{exp} ^{1}H, ppm
2	6.56	6.00	6.29	6.56	6.92
5	6.76	6.69	6.75	6.80	7.15
6	6.76	6.66	6.69	6.80	6.81
7	2.87	2.74	2.76	2.91	3.04
7	2.82	2.69	2.71	2.57	2.90
8	2.01	1.72	1.86	1.89	2.26
9	4.83	5.08	5.04	4.95	4.91
9	3.59	3.54	3.66	3.59	4.07
11	3.23	3.42	3.42	3.08	4.07
13	3.30	3.31	3.18	3.88	3.89
14	1.34	1.40	1.30	1.15	1.89
2’	6.59	6.14	6.45	7.13	6.96
5’	6.75	6.73	6.78	6.68	7.18
6’	6.71	6.63	6.72	6.65	6.84
7’	2.80	2.79	3.01	3.07	3.04
7’	2.56	2.70	2.74	2.32	2.90
8’	1.83	1.76	1.81	1.75	2.26
9’	5.07	4.72	4.52	4.05	5.18
9’	3.72	3.69	3.86	4.04	3.95
11’	3.52	3.25	3.75	3.17	4.32
OCH_3-3	3.68	3.56	3.68	3.70	3.74
OCH_3-3’	3.72	3.62	3.71	3.62	3.79
MAD	**0.30**	**0.40**	**0.32**	**0.37**	
RMSD	**0.38**	**0.47**	**0.40**	**0.50**	

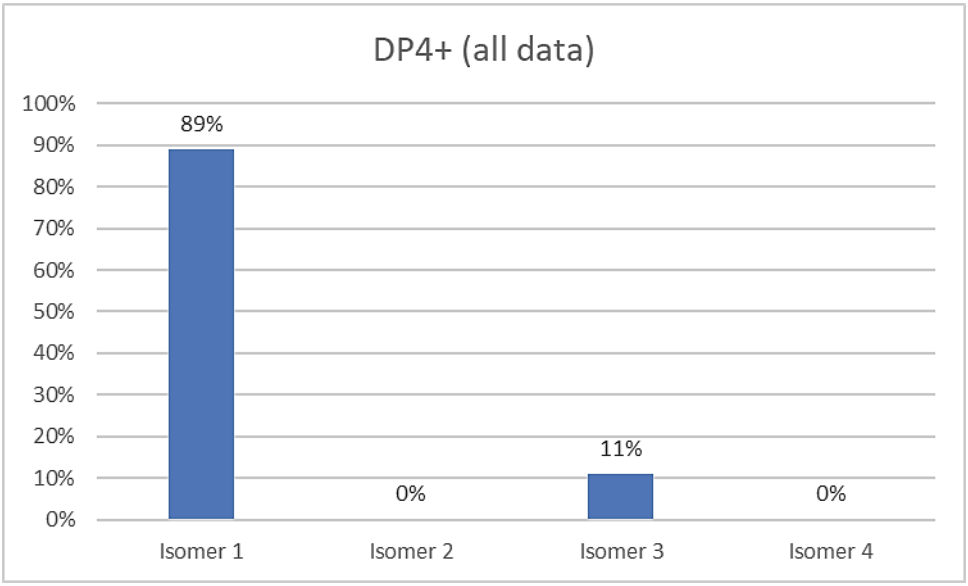


Figura S14. Valores de DP4+ (todos os dados) obtidos pela correlação do cálculo dos deslocamentos quimicos de RMN de todos os candidatos de aequilabrina A com os dados experimentais de RMN do produto natural isolado

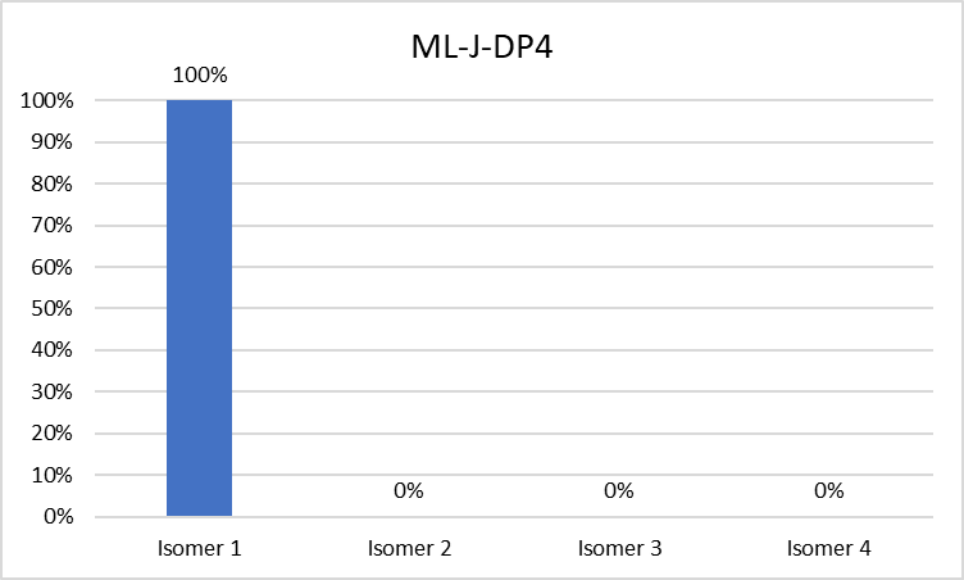


Figura S15. Valores de ML-*J*-DP4 obtidos pela correlação do cálculo dos deslocamentos quimicos de RMN de todos os candidatos de aequilabrina A com os dados experimentais de RMN do produto natural isolado

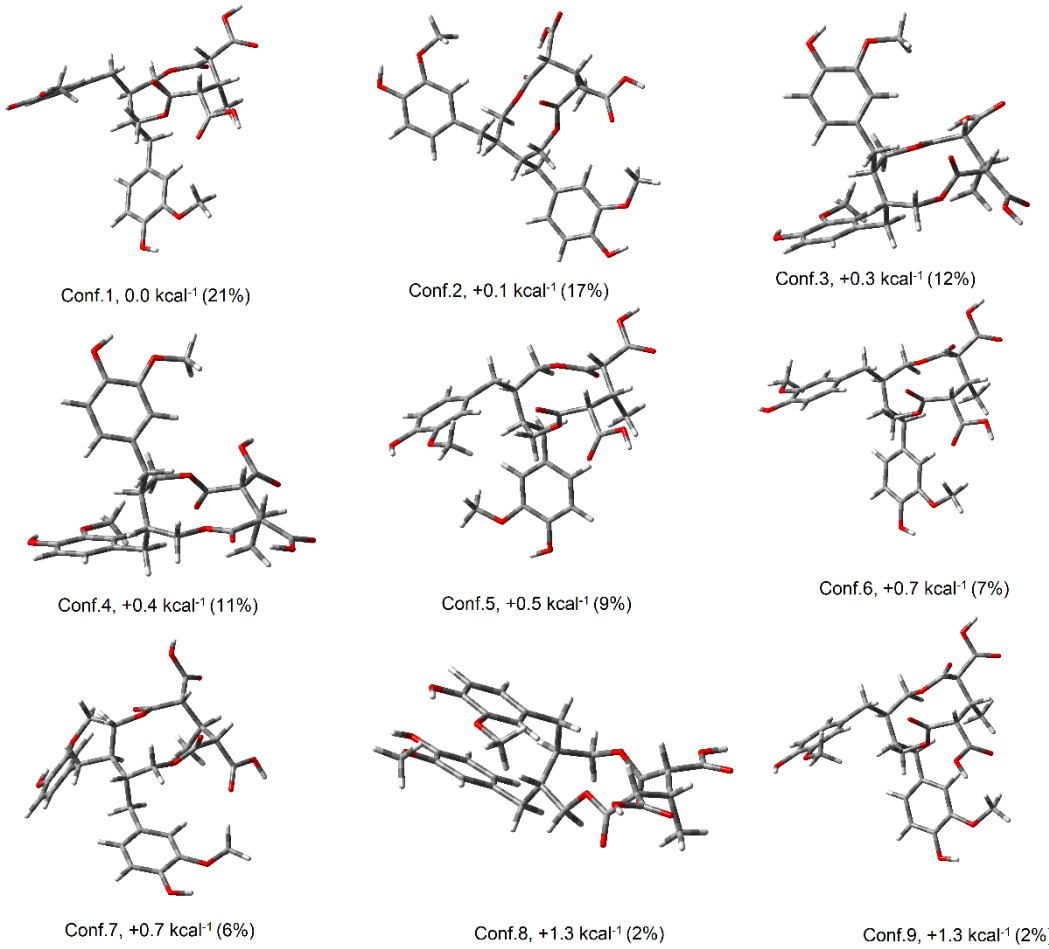


Figura S16. Confôrmeros de menor energia do isômero 1 da aequilabrina A no nível B3LYP/6-31G(d).

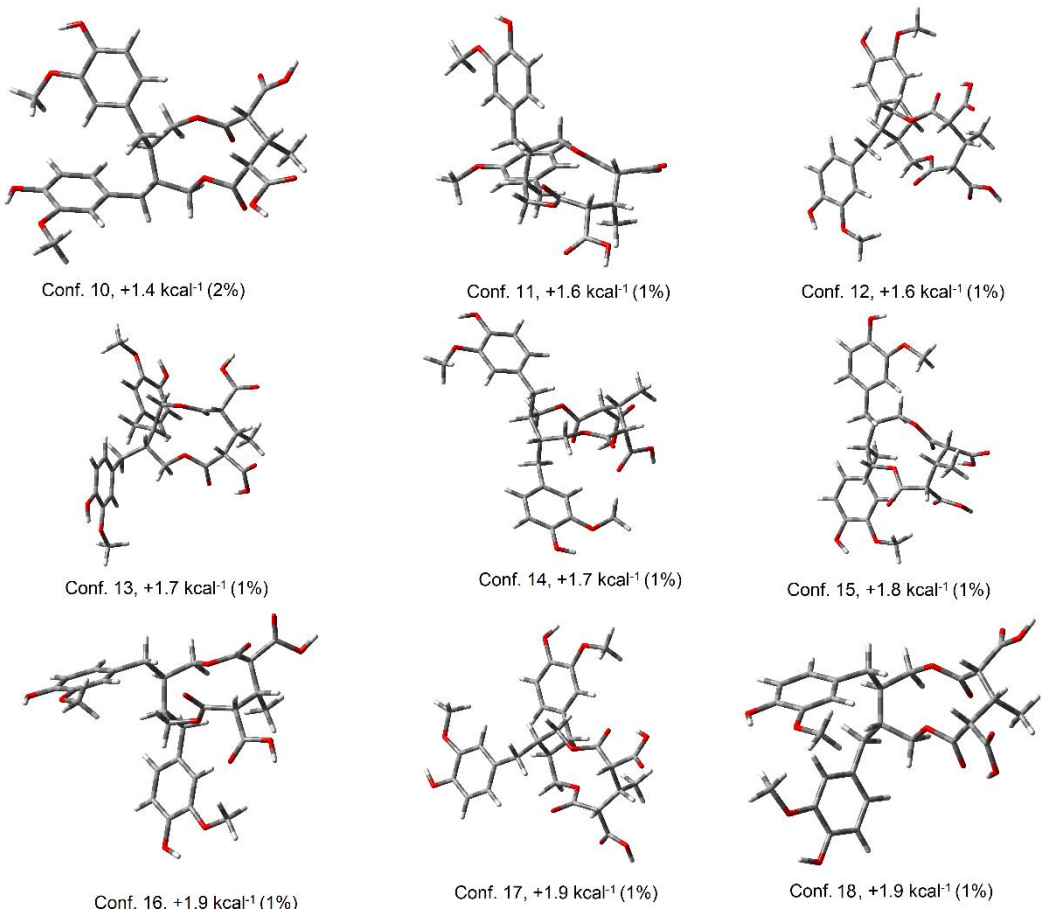


Figura S16. Confôrmeros de menor energia do isômero 1 da aequilabrina A no nível B3LYP/6-31G(d) (continuação)

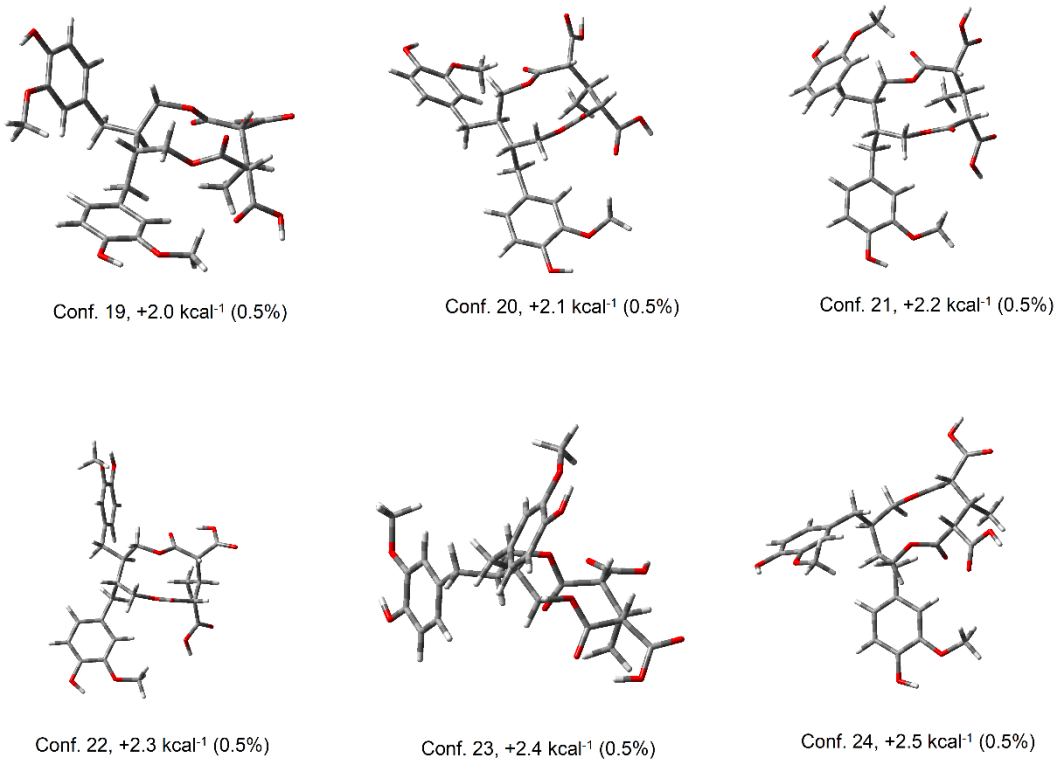


Figura S16. Confôrmeros de menor energia do isômero 1 da aequilabrina A no nível B3LYP/6-31G(d) (continuação)

Aequilabrina A – Isômero 1: 98 confôrmeros com energia relativa dentro de 10 kcal mol^{-1} do confôrmero de menor energia foram selecionados para geometria adicional otimizada no nível B3LYP/6-31G(d). Foram identificados 24 confôrmeros com energia relativa <2,5 kcal mol^{-1}, correspondendo a mais de 98% da distribuição total de Boltzmann.

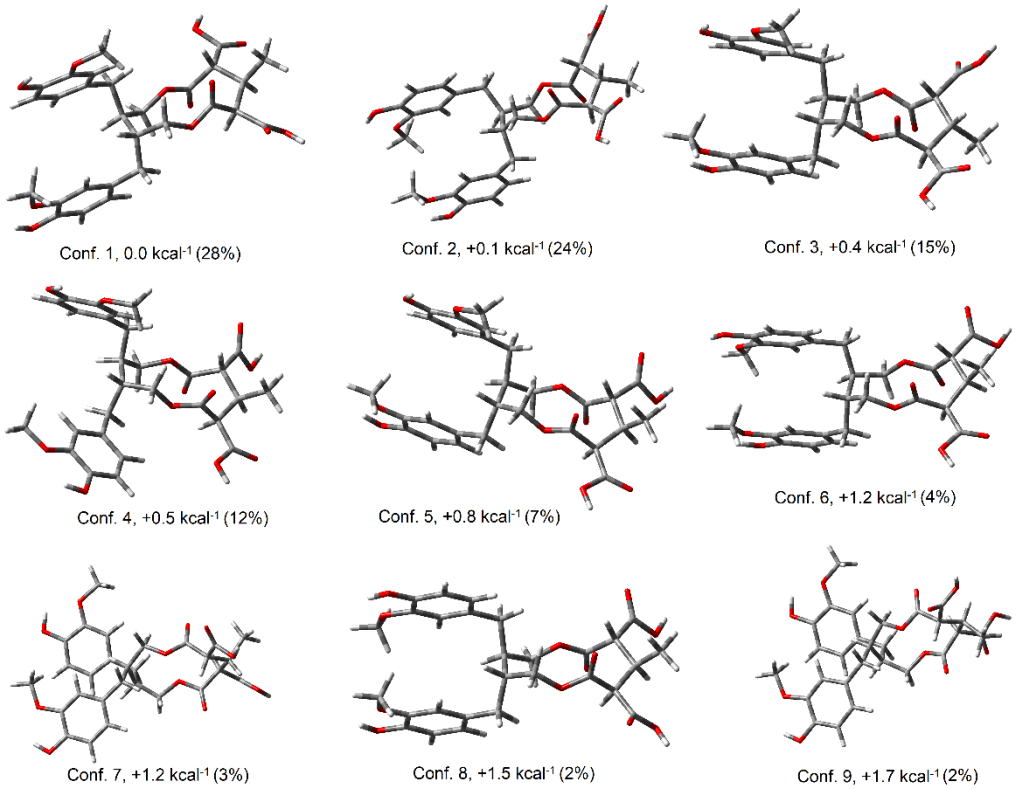


Figura S17. Confôrmeros de menor energia do Isômero 2 da aequilabrina A no nível B3LYP/6-31G(d).

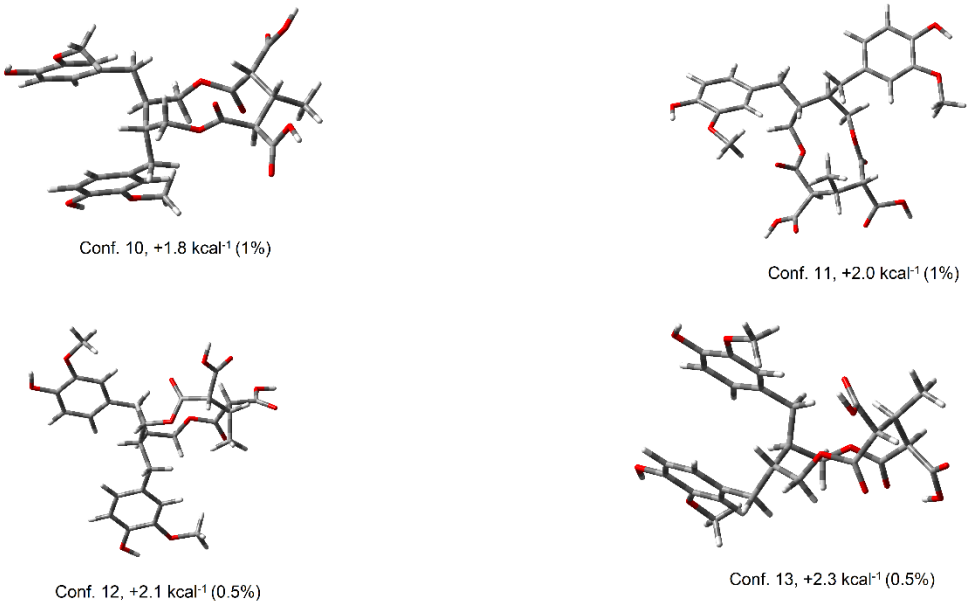


Figura S17. Confôrmeros de menor energia do Isômero 2 da aequilabrina A no nível B3LYP/6-31G(d) (continuação)

Aequilabrina A – Isômero 2: 99 confôrmeros com energia relativa dentro de 10 kcal mol^{-1} do confórmero de menor energia foram selecionados para geometria adicional otimizada no nível B3LYP/6-31G(d). Foram identificados 13 confôrmeros com energia relativa <2,5 kcal mol^{-1}, correspondendo a mais de 98% da distribuição total de Boltzmann.

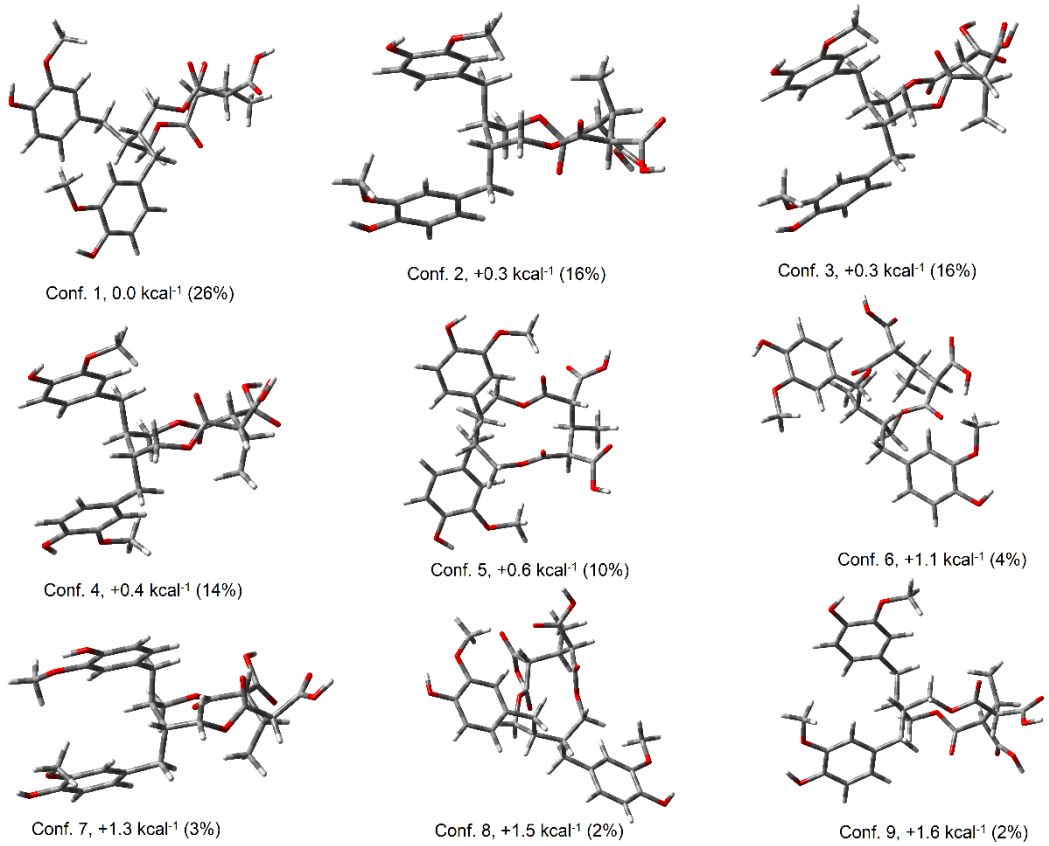


Figura S18. Confôrmeros de menor energia do Isômero 3 da aequilabrina A no nível B3LYP/6-31G(d)

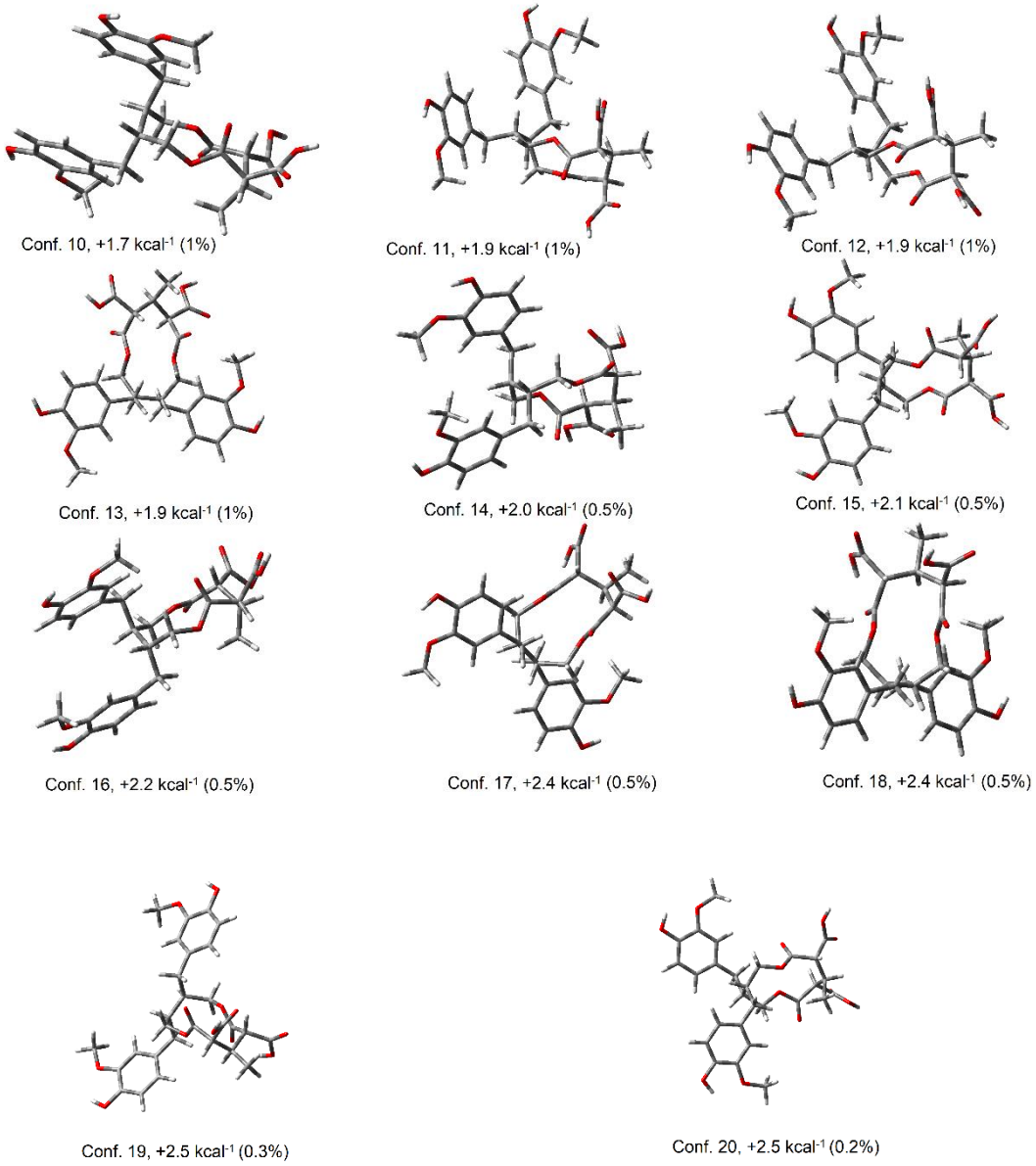


Figura S18. Confôrmeros de menor energia do Isômero 3 da aequilabrina A no nível B3LYP/6-31G(d) (continuação)

Aequilabrina A – Isômero 3: 98 confôrmeros com energia relativa dentro de 10 kcal mol^{-1} do confôrmero de menor energia foram selecionados para geometria adicional otimizada no nível B3LYP/6-31G(d). Foram identificados 20 confôrmeros com energia relativa < 2,5 kcal mol^{-1}, correspondendo a mais de 97% da distribuição total de Boltzmann.

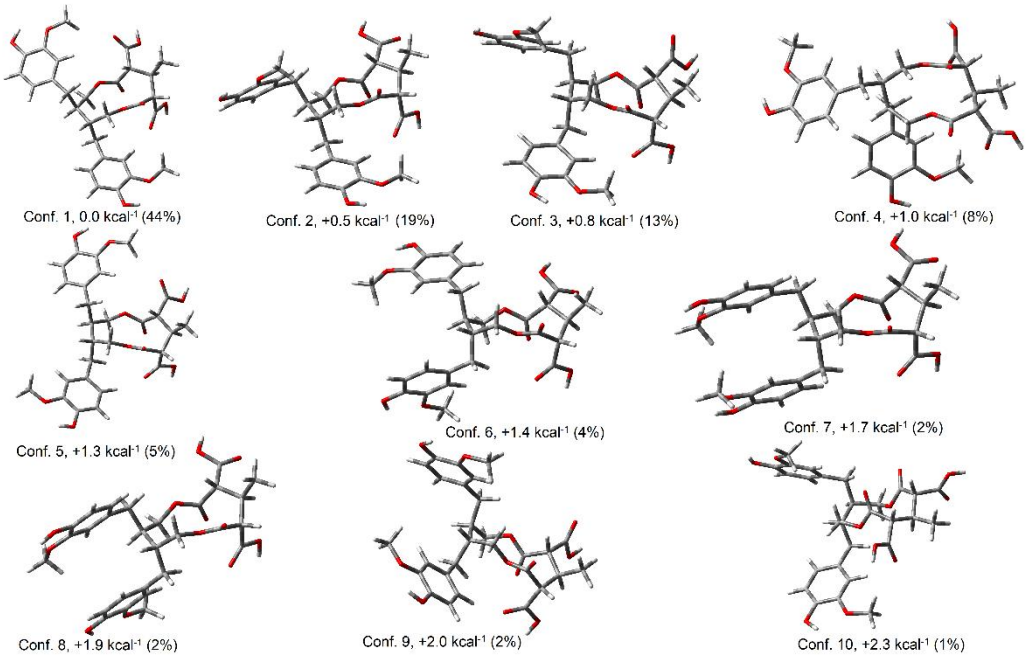


Figura S19. Confôrmeros de menor energia do Isômero 4 da aequilabrina A no nível B3LYP/6-31G(d)

Aequilabrina A – Isômero 4: 99 confôrmeros com energia relativa dentro de 10 kcal mol^{-1} do confôrmero de menor energia foram selecionados para geometria adicional otimizada no nível B3LYP/6-31G(d). Foram identificados 10 confórmeros com energia relativa < 2,5 kcal mol^{-1}, correspondendo a mais de 96% da distribuição total de Boltzmann.

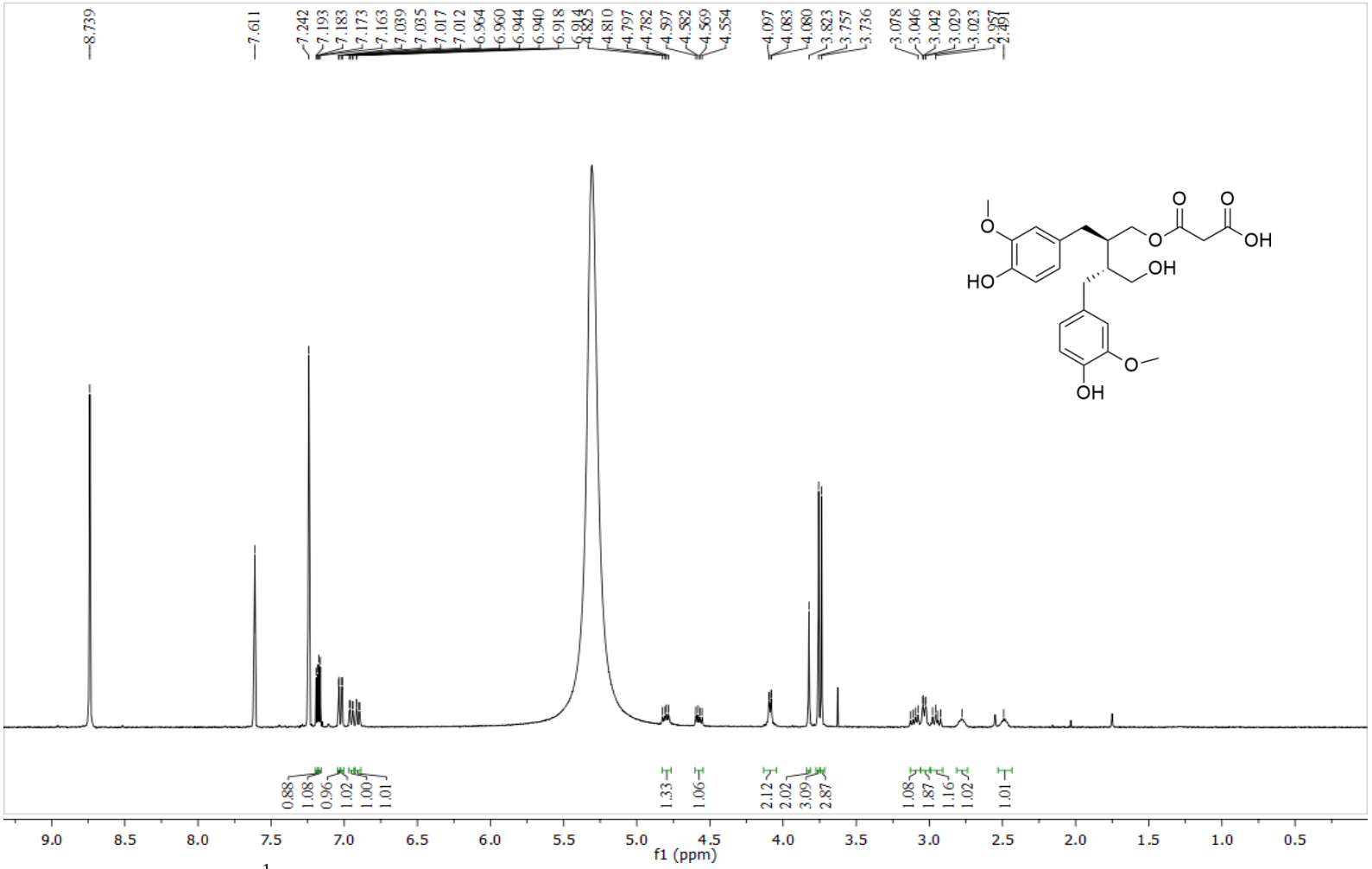


Figura S20. Espectro de RMN de ^{1}H do composto **2** obtido em 400 MHz (piridina-d_5)

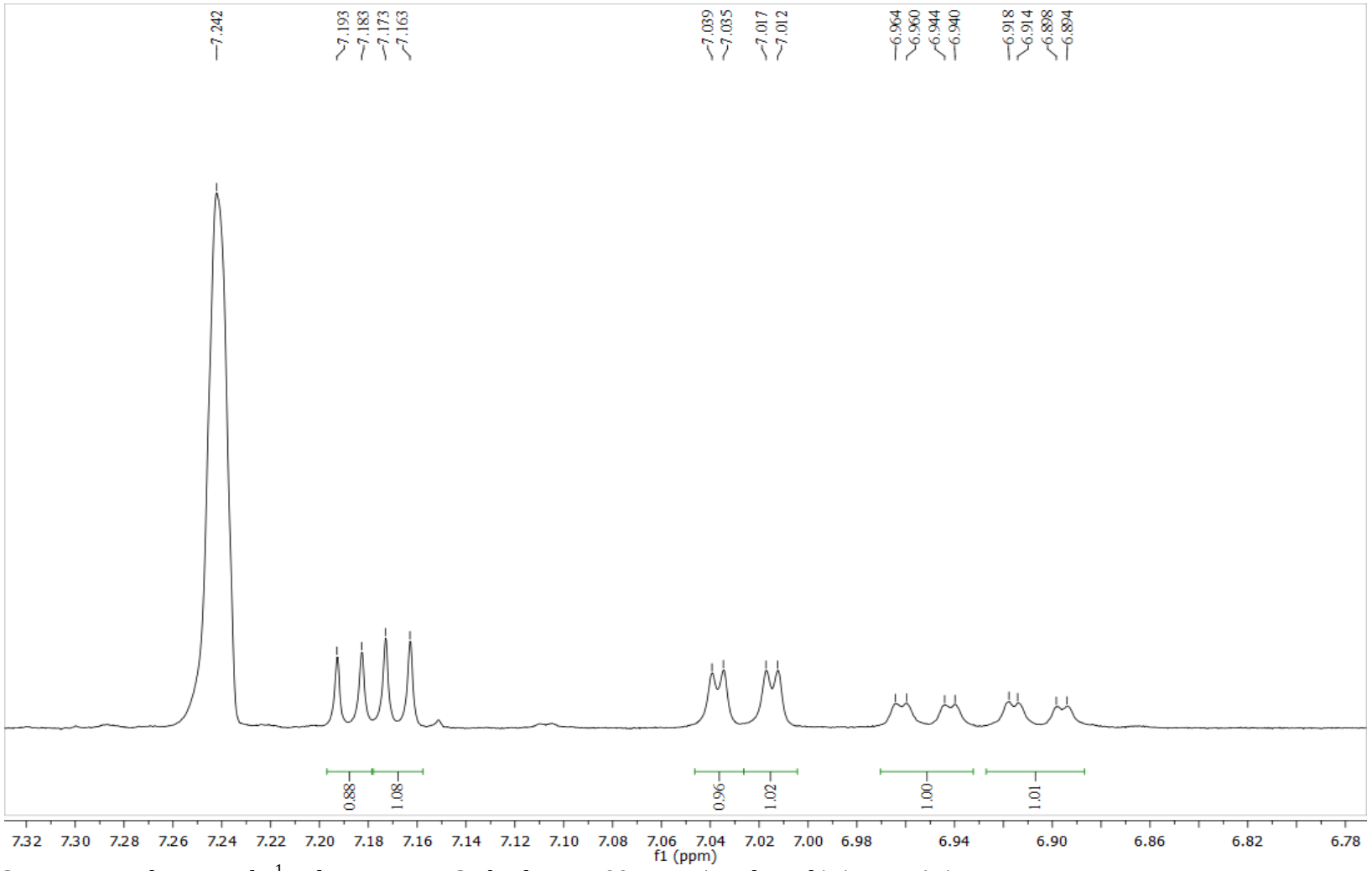


Figura S21. Espectro de RMN de ^{1}H do composto **2** obtido em 400 MHz (piridina-d_5) (expansão)

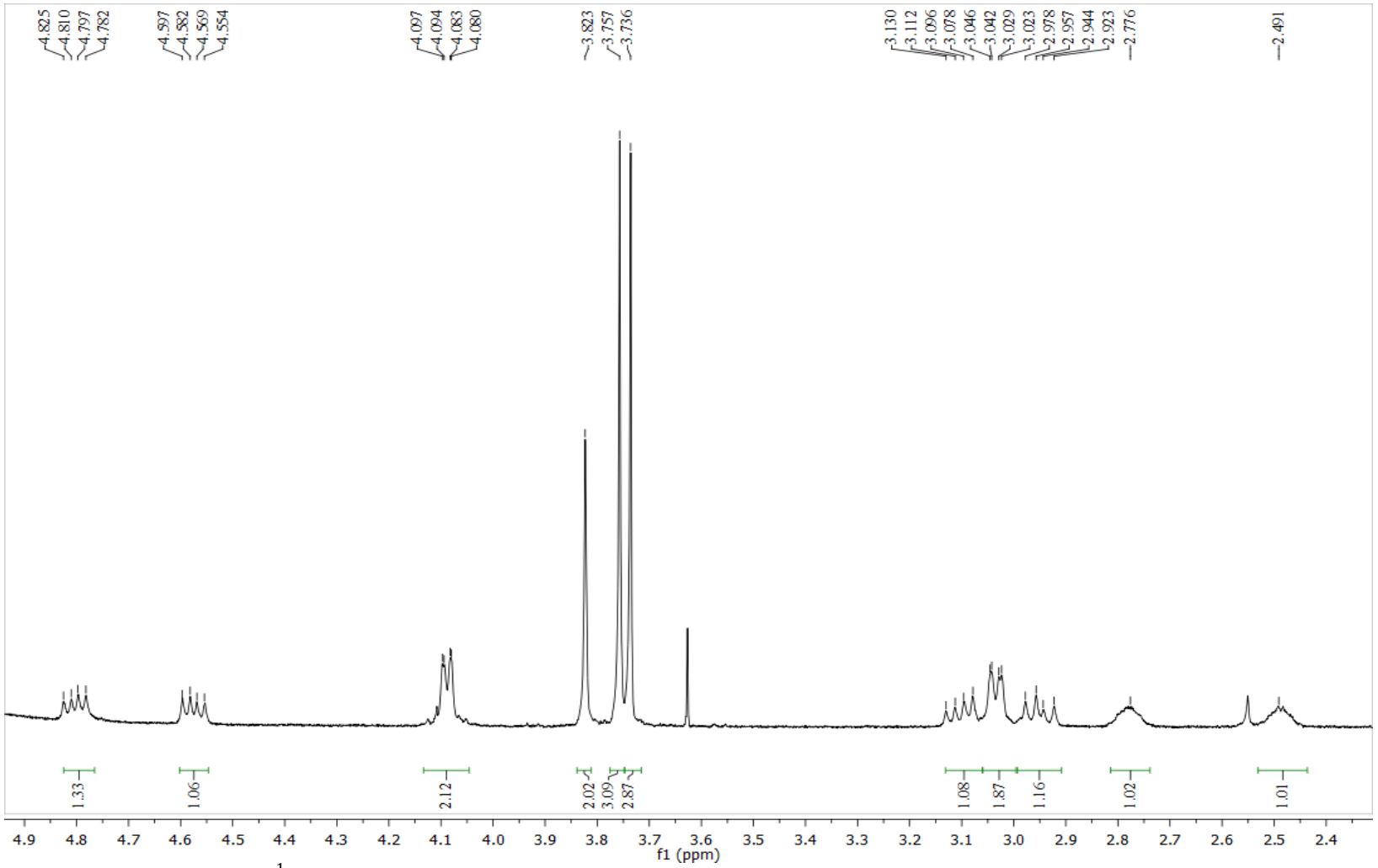


Figura S22. Espectro de RMN de ^{1}H do composto **2** obtido em 400 MHz (piridina-d_5) (expansão)

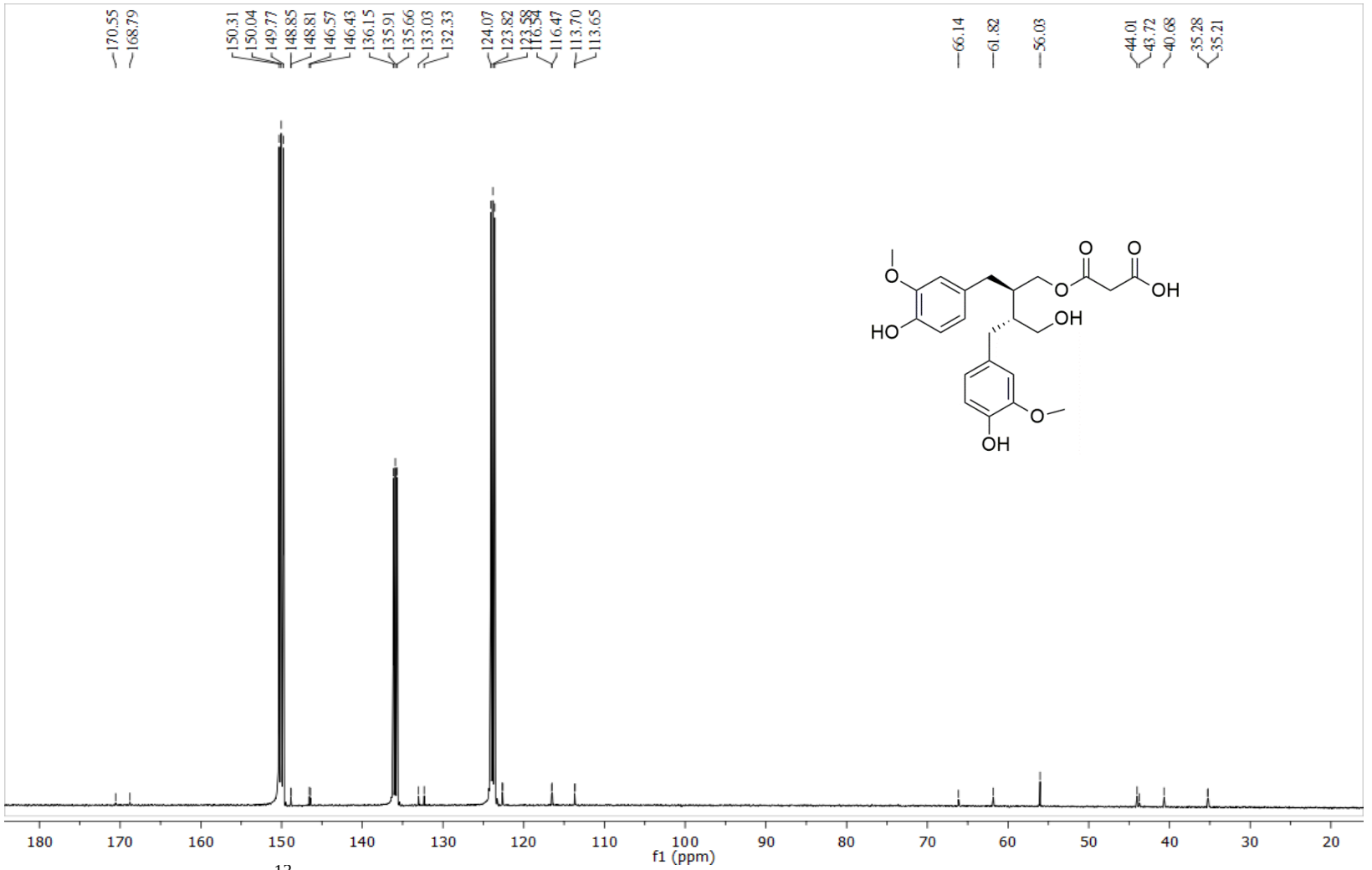


Figura S23. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **2** obtido em 100 MHz (piridina-d_5)

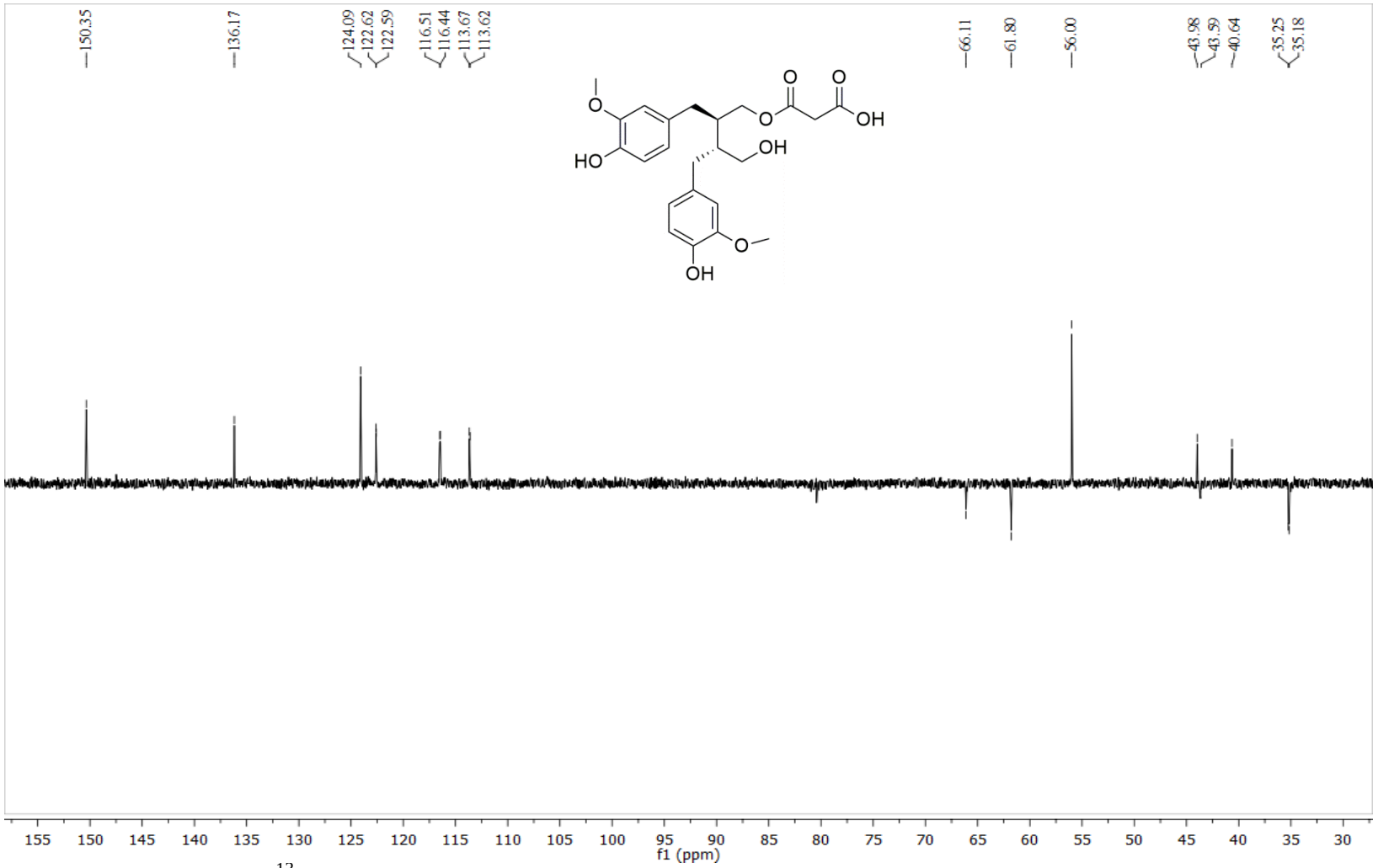


Figura S24. Espectro de RMN de ^{13}C DEPT-135 do composto **2** obtido em 100 MHz (piridina-d_5)

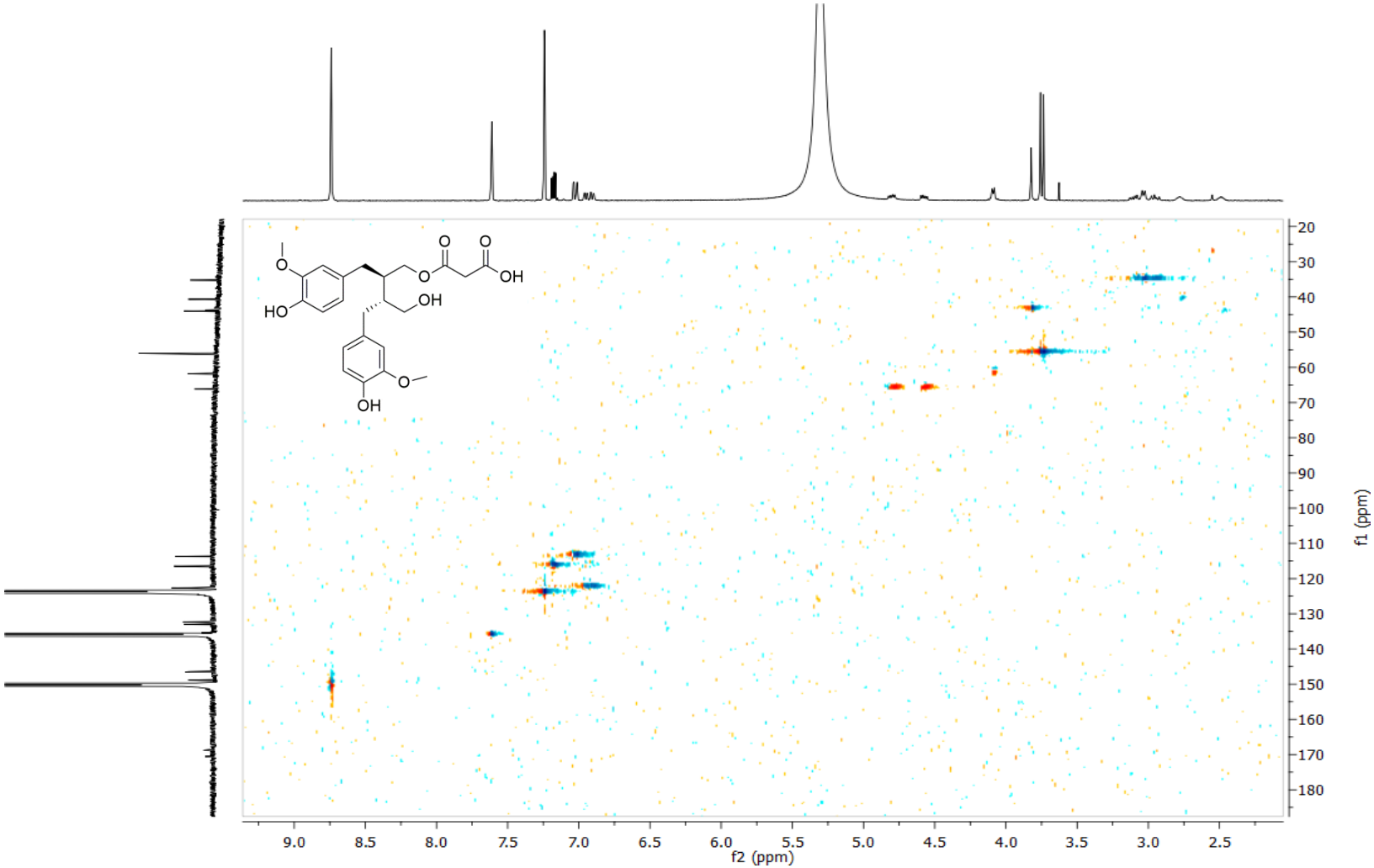


Figura S25. Espectro de HSQC do composto **2** obtido em 400 MHz (pyridine-d_5)

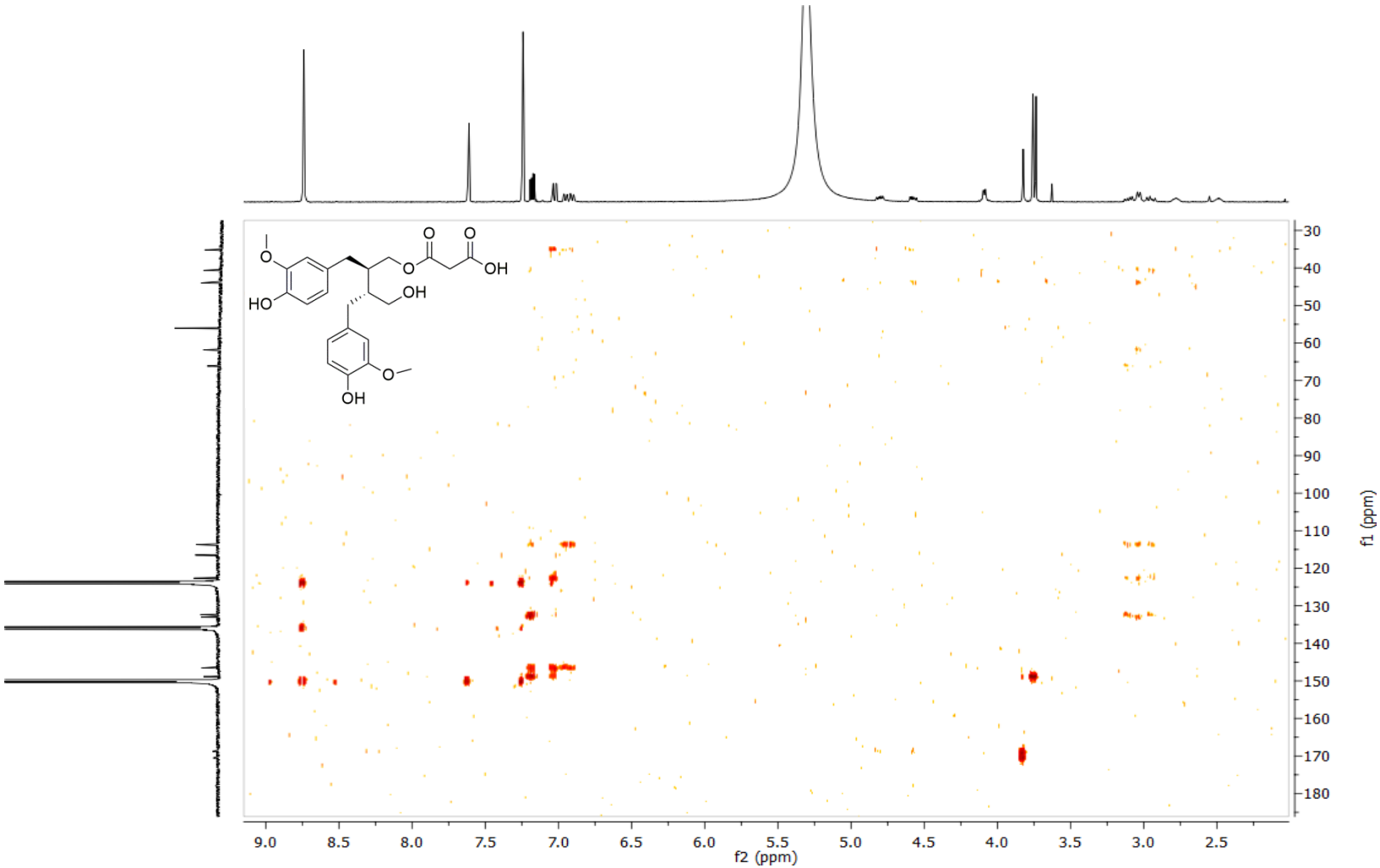


Figura S26. Espectro de HMBC do composto **2** obtido em 400 MHz (piridina-d_5)

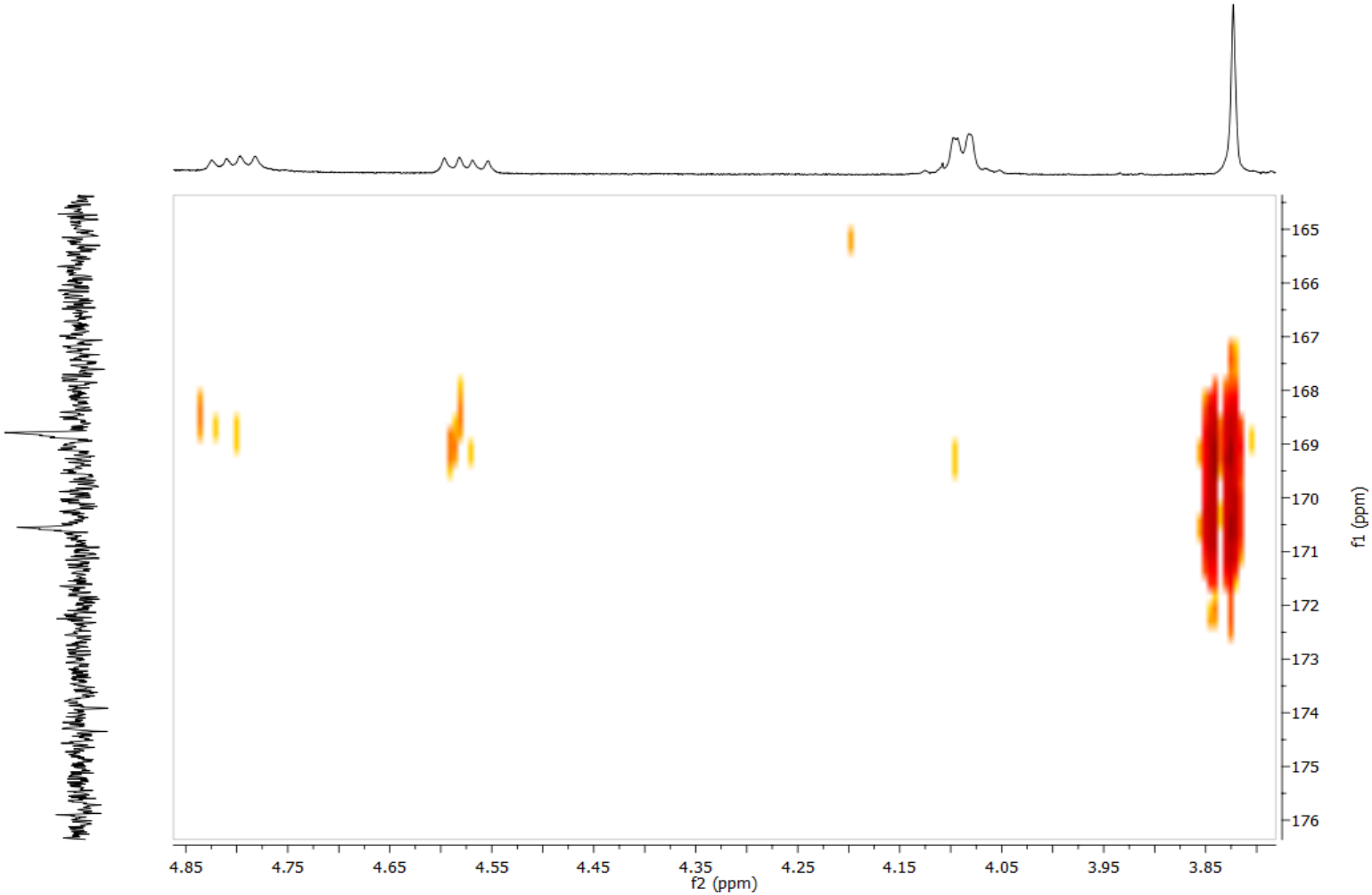


Figura S27. Espectro de HMBC do composto **2** obtido em 400 MHz (piridina-d_5) (expansão)

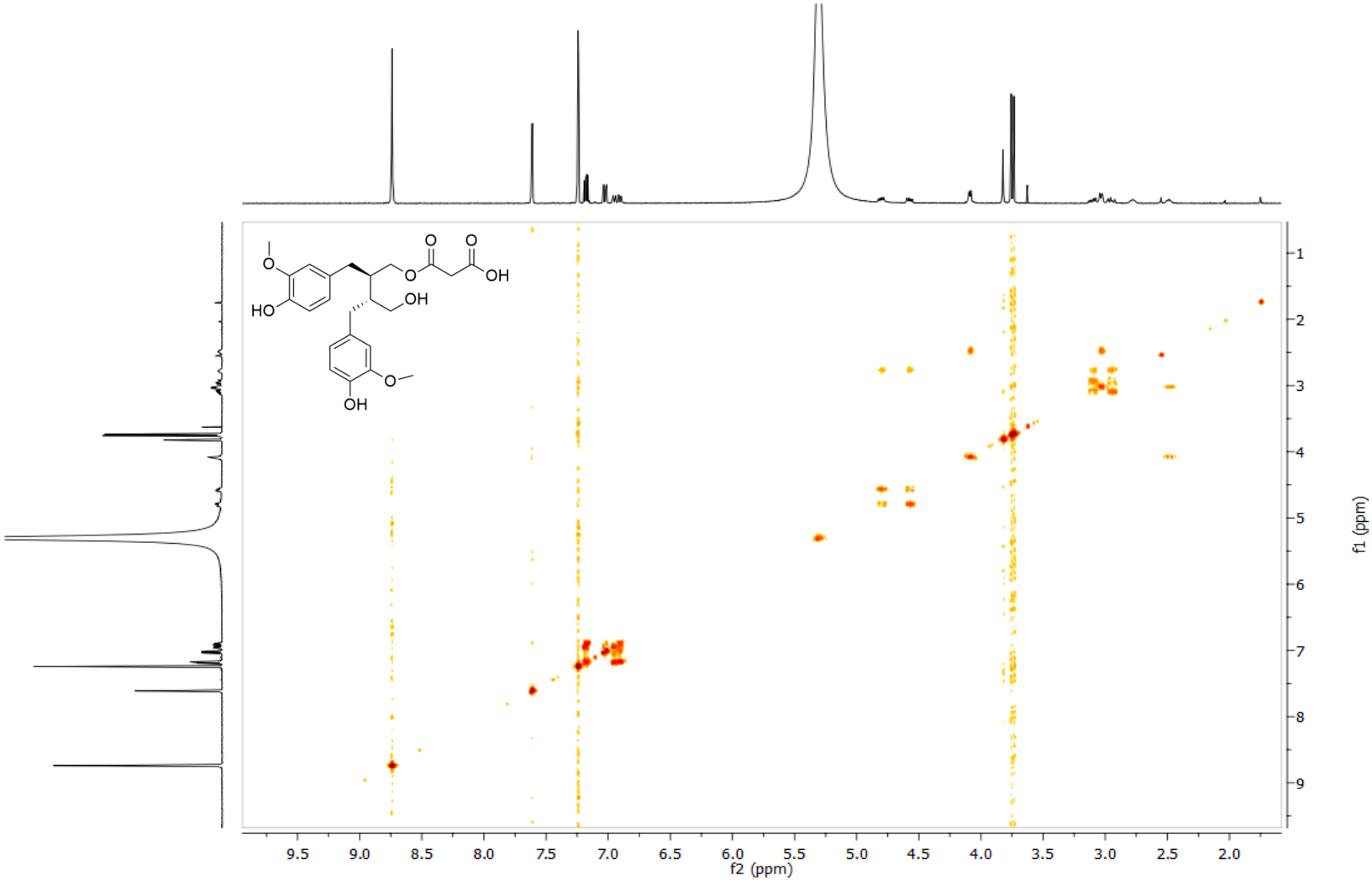
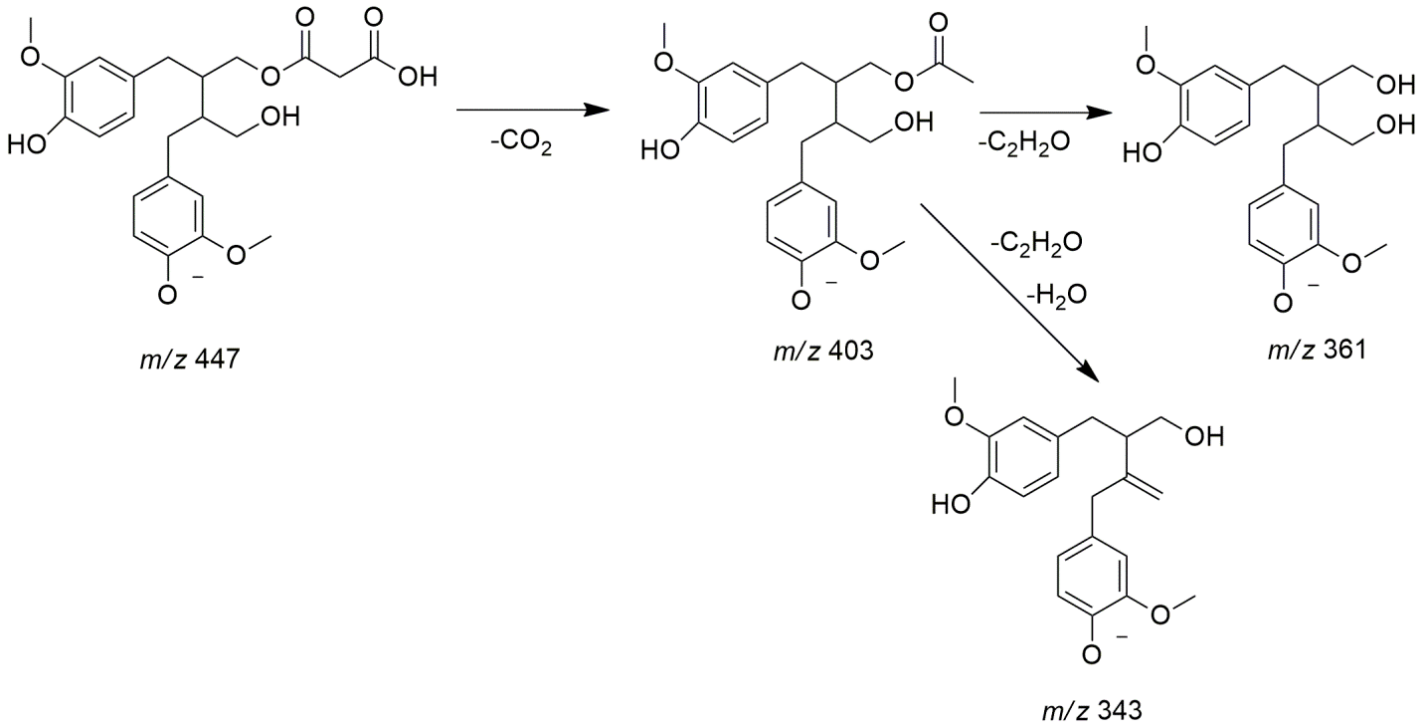


Figura S28. Espectro de COSY do composto **2** obtido em 400 MHz (piridina-d_5)



Esquema 4. Proposta de fragmentação do composto **2**.

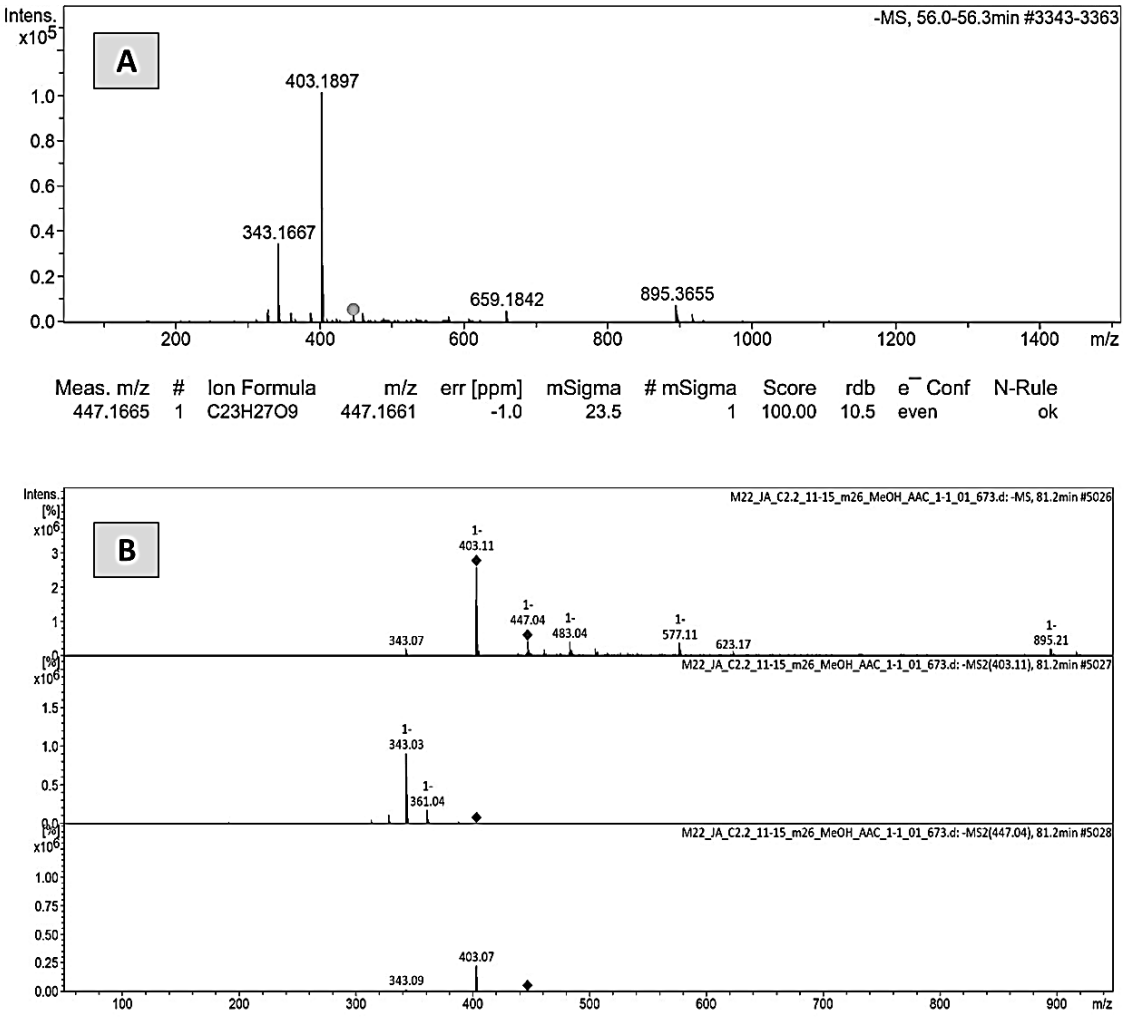


Figura S29. Espectro de EMAR (A) e CL-EM/EM (B) do composto **2** ([M – H]¯, modo negativo).

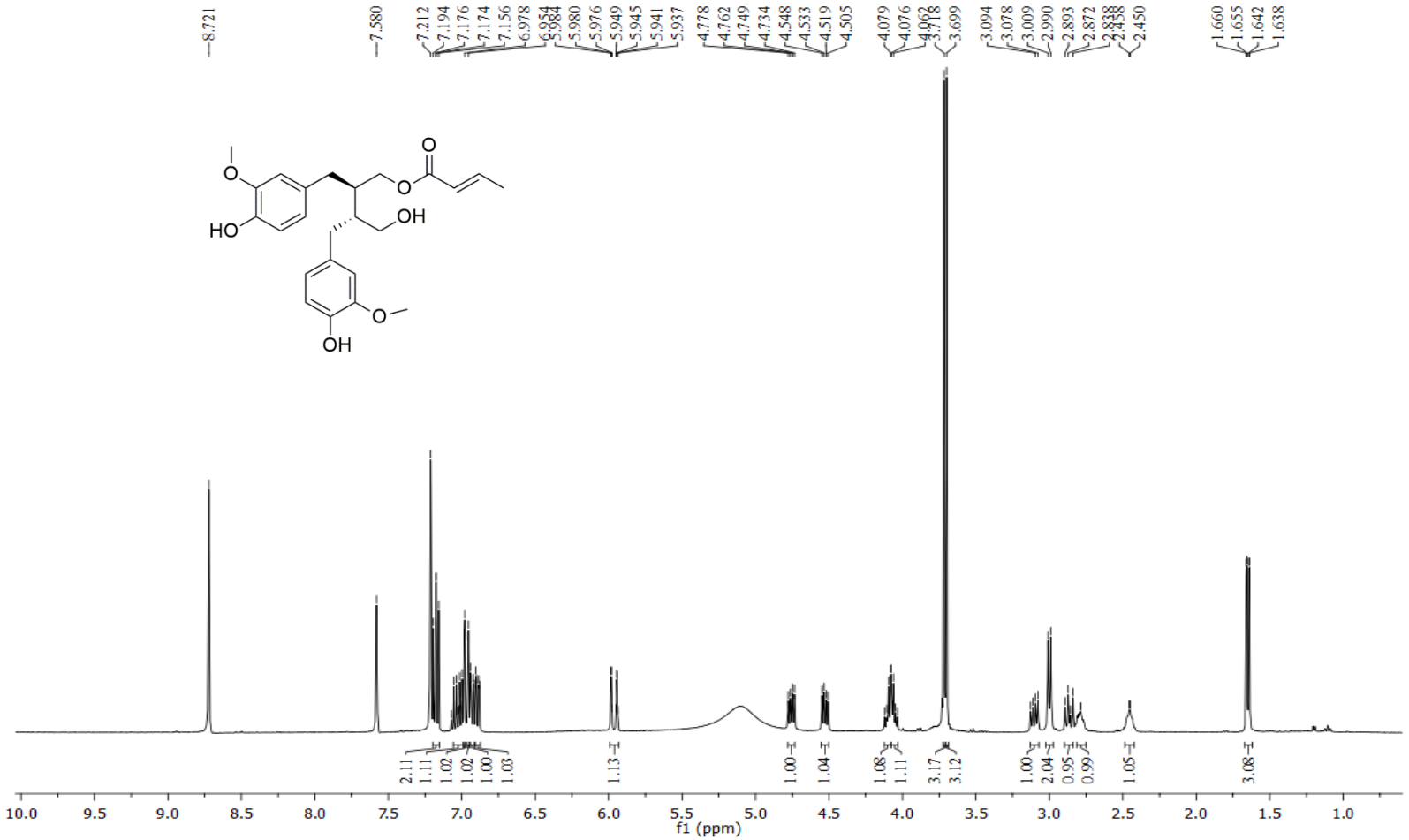


Figura S30. Espectro de RMN de ^{1}H do composto **3** em 400 MHz (pyridine-d_5)

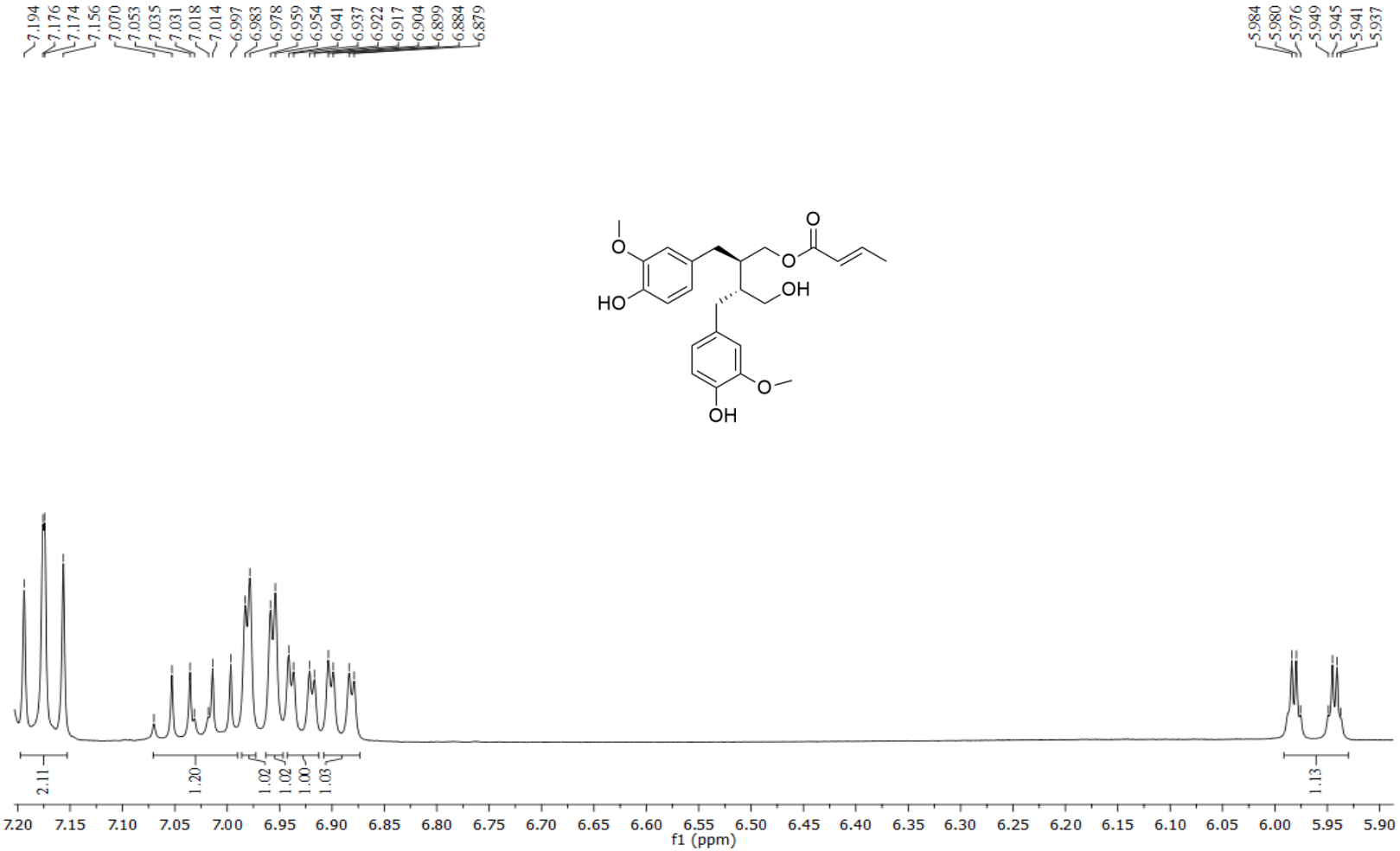


Figura S31. Espectro de RMN de ^{1}H do composto **3** em 400 MHz (piridina-d_5) (expansão)

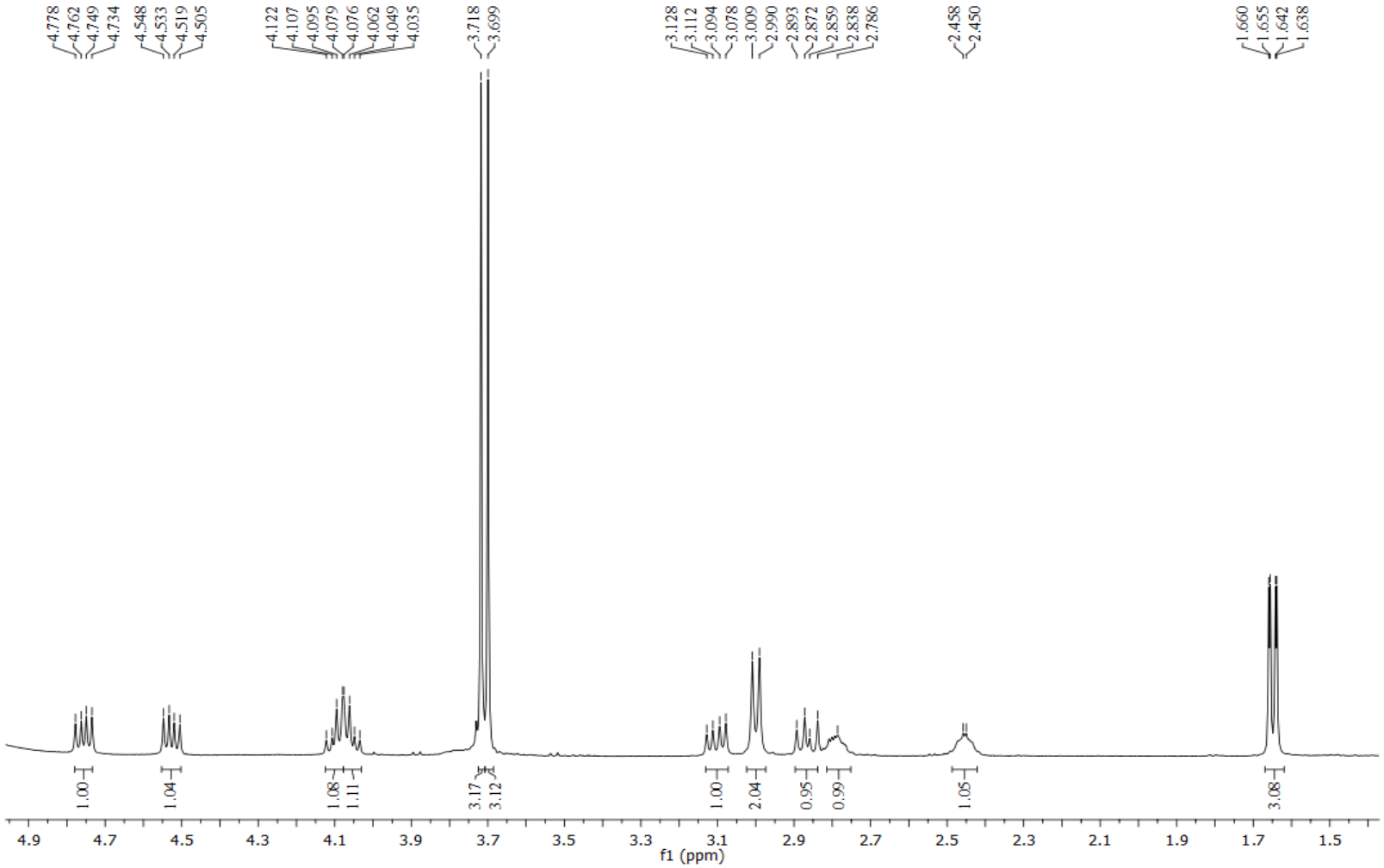


Figura S32. Espectro de RMN de ^{1}H do composto **3** em 400 MHz (piridina-d_5) (expansão)

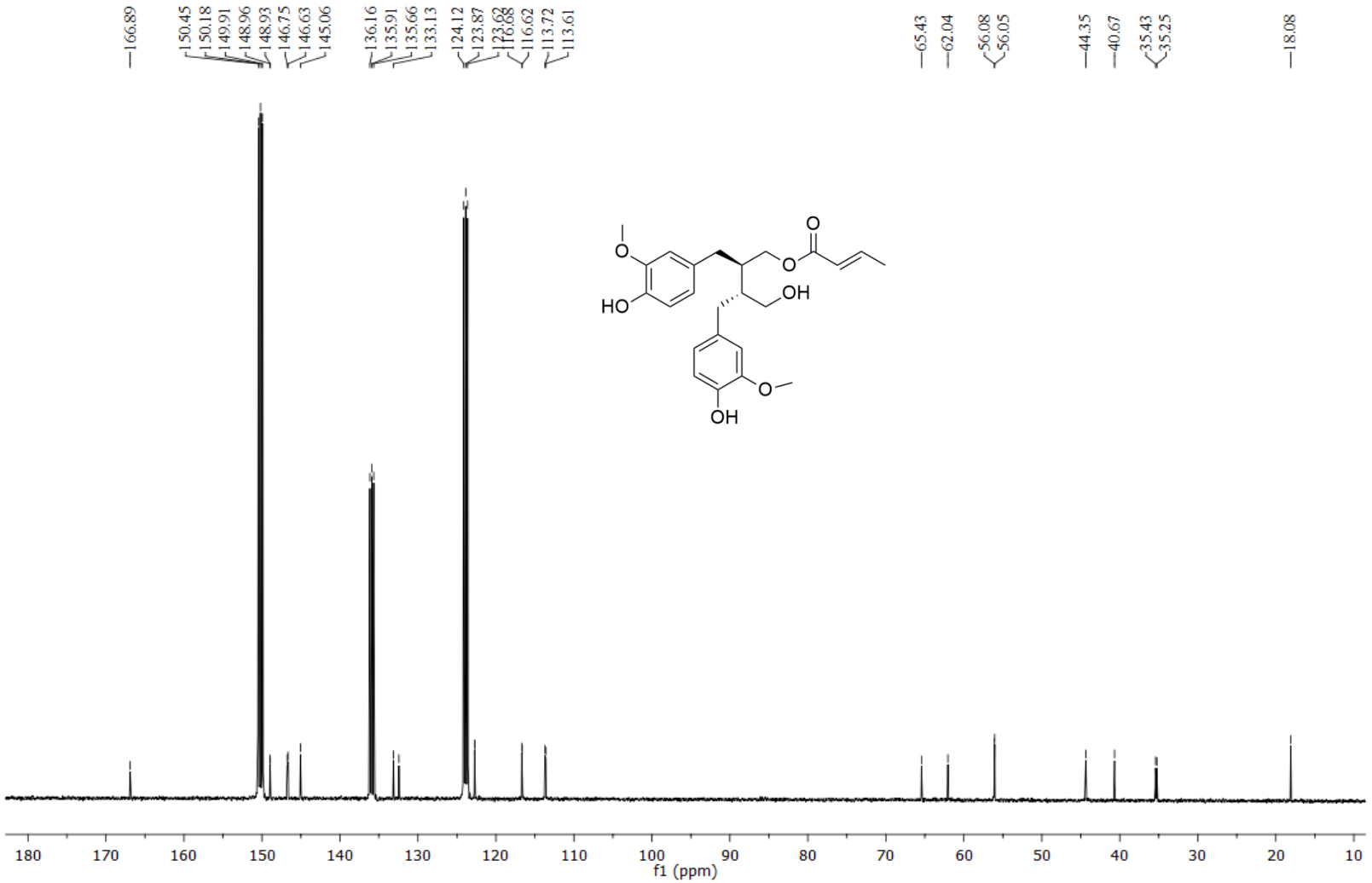


Figura S33. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **3** obtido em 100 MHz **(**pyridine-d_5)

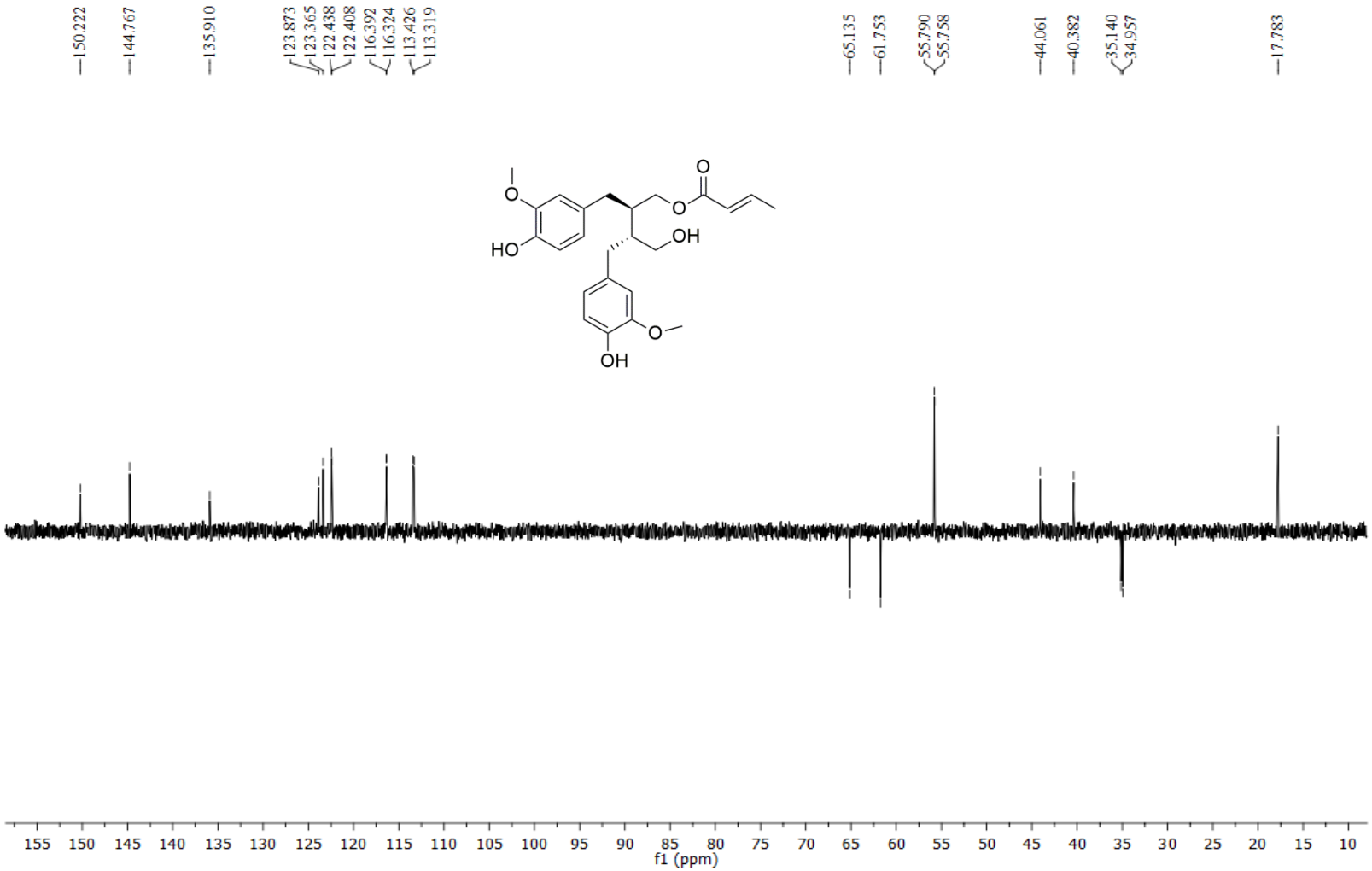


Figure S34. Espectro de RMN de ^{13}C DEPT-135 do composto **3** obtido em 100 MHz **(**pyridine-d_5)

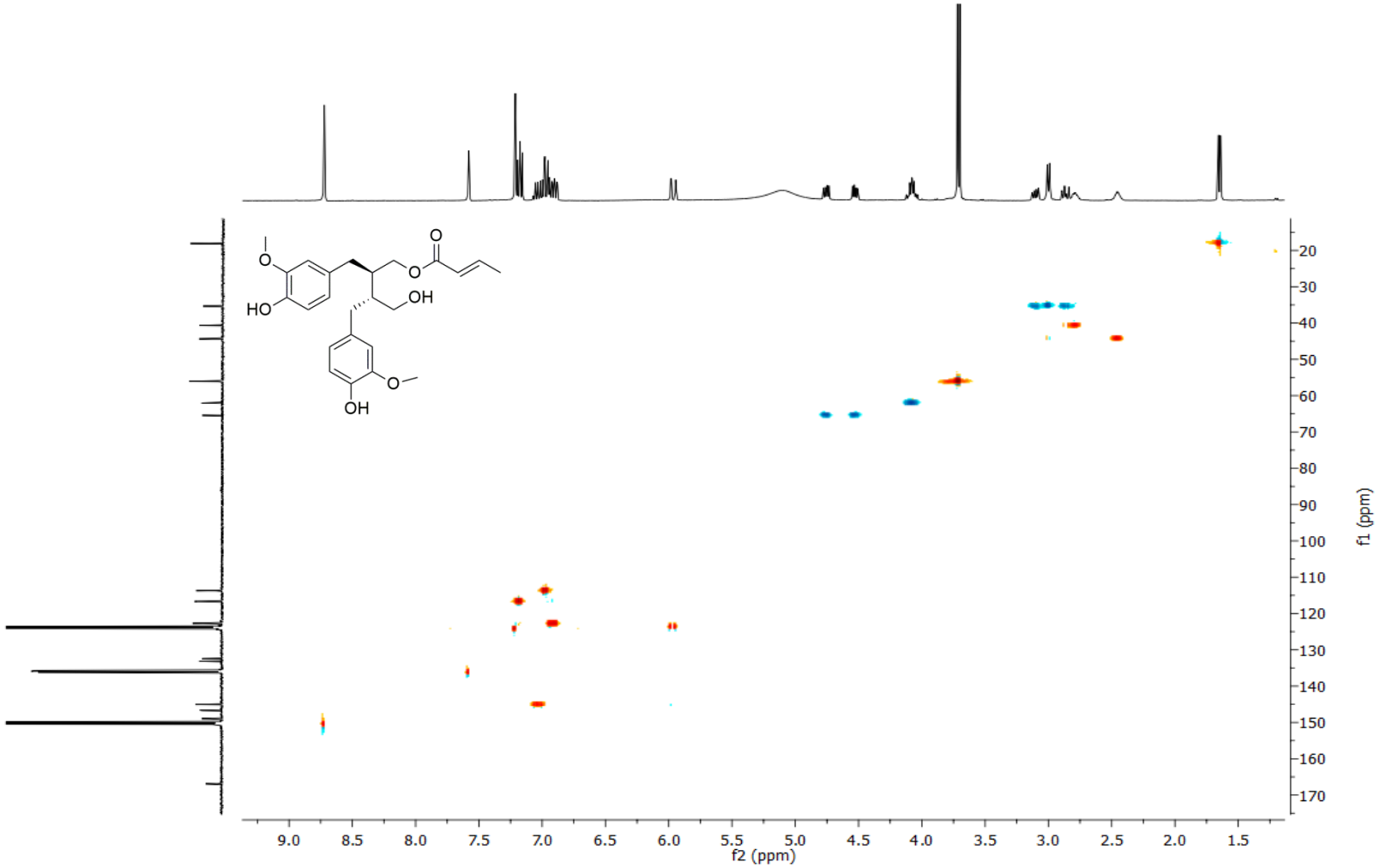


Figura S35. Espectro de HSQC do composto **3** obtido em 400 MHz (piridina-$d_{5)}$

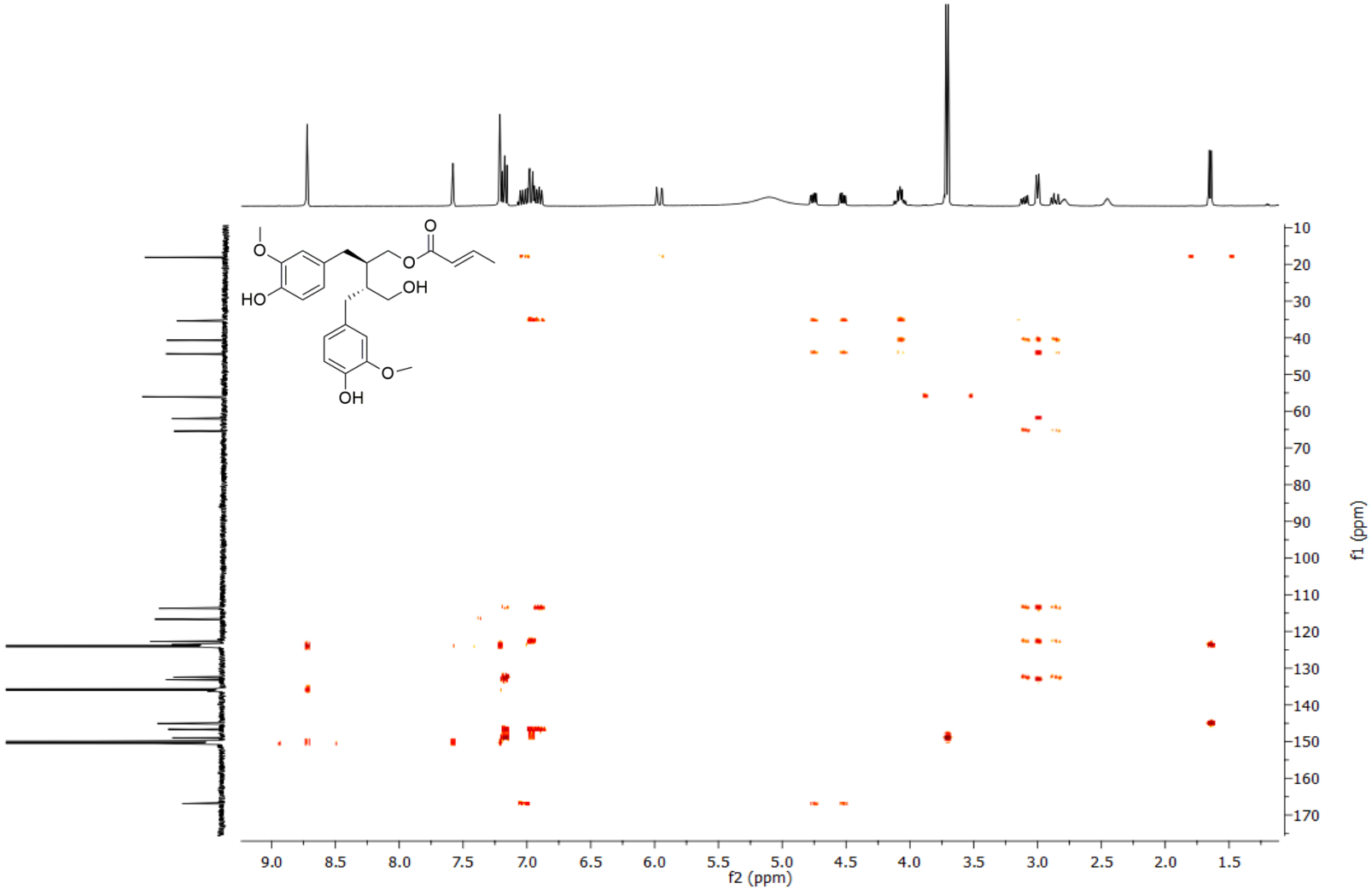


Figura S36. Espectro de HMBC do composto **3** obtido em 400 MHz (pyridine-d_5)

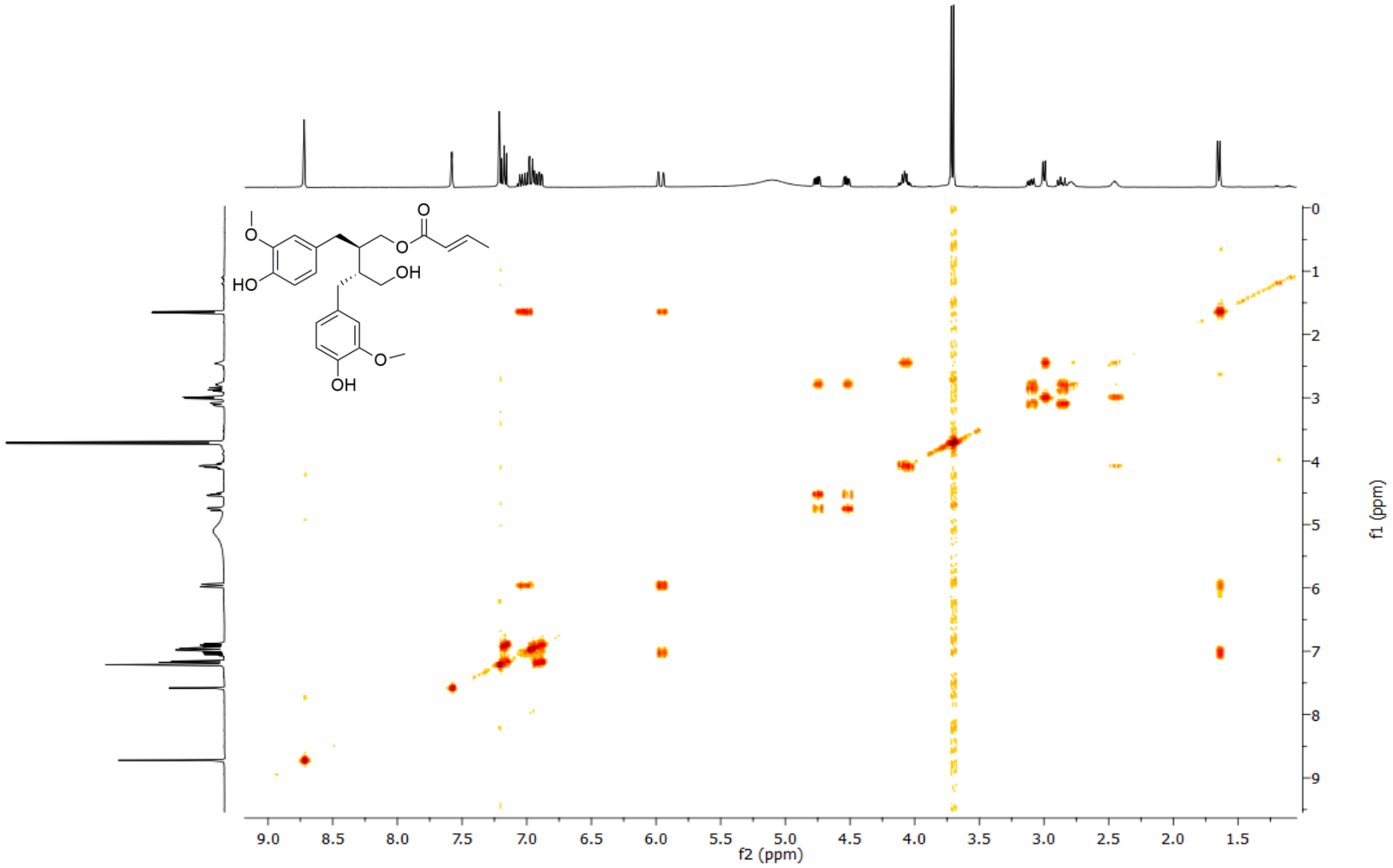
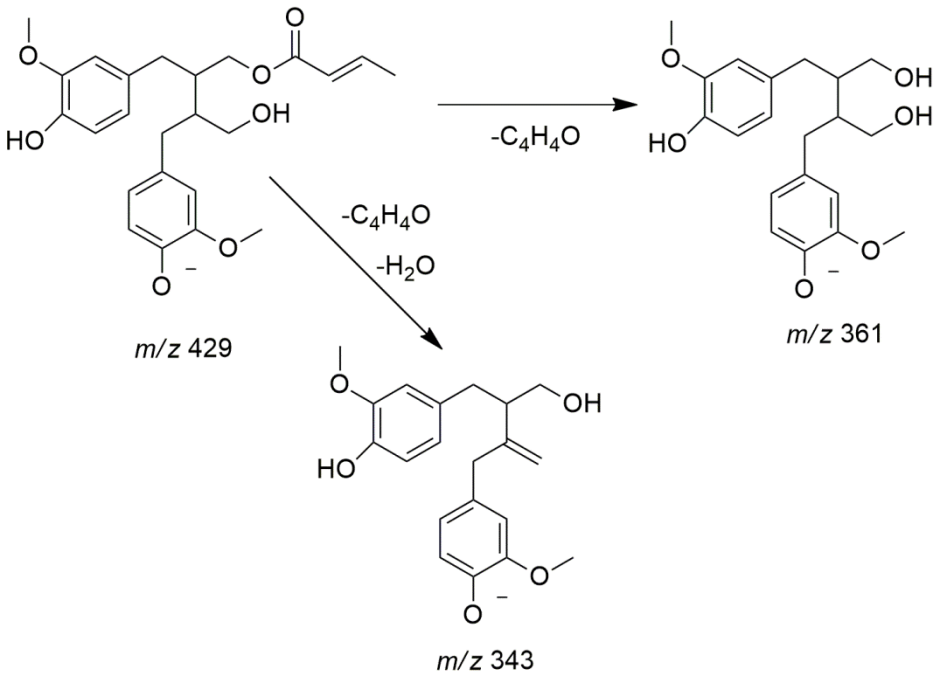
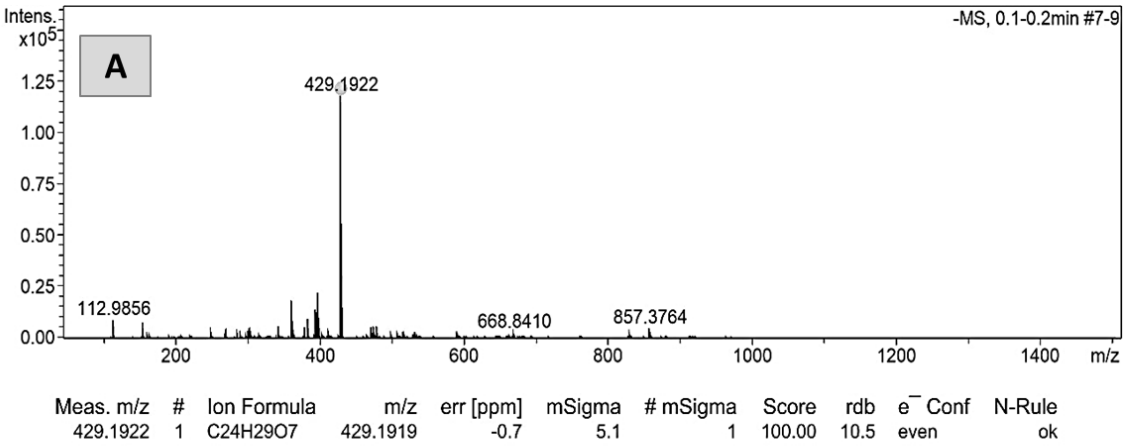


Figura S37. Espectro de COSY do composto **3** obtido em 400 MHz (piridina-d_5)



Esquema 5. Proposta de fragmentação do composto **3**



Meas. m/z	#	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma	# mSigma	Score	rdb	e⁻ Conf	N-Rule
429.1922	1	C24H29O7	429.1919	-0.7	5.1	1	100.00	10.5	even	ok

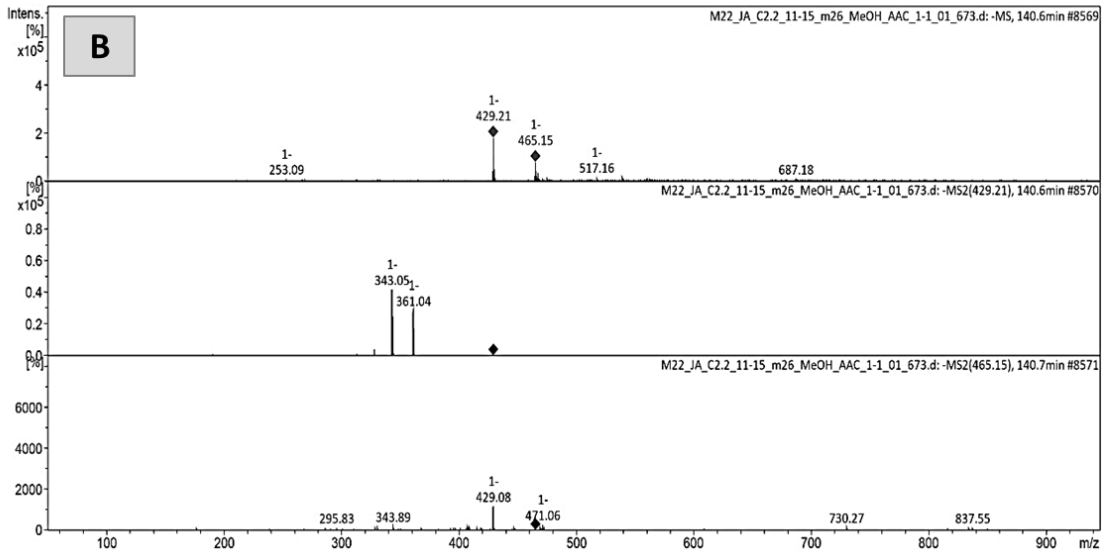


Figura S38. Espectro de EMAR (A) e CL-EM/EM (B)do composto **3** ([M–H]⁻, modo negativo)

REFERÊNCIAS

(1) Fang,N.; Yu, S.; Prior, R, L. LC/MS/MS Characterization of Phenolic Constituents in Dried Plums. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2002,** *50*, 3579−3585.

(2) Li, S.; Lin, Z.; Jiang, H.; Tong, L.; Wang, H.; Chen, S., Rapid Identification and Assignation of the Active Ingredients in Fufang Banbianlian Injection Using HPLC-DAD-ESI-IT-TOF-MS. *Journal of Chromatographic Science* **2016,** *54*, 1225-1237.

(3) Bystrom, L. M.; Lewis, B. A.; Brown, D. L.; Rodriguez, E.; Obendorf, R. L., Characterization of phenolics by LC-UV/vis, LC-MS/MS and sugars by GC in *Melicoccus bijugatus* Jacq. 'Montgomery' fruits. *Food Chemistry* **2008,** *111* (4), 1017-1024.

(4) Jaiswal, R.; Sovdat, T.; Vivan, F.; Kuhnert, N., Profiling and characterization by LC-MSn of the chlorogenic acids and hydroxycinnamoylshikimate esters in mate (*Ilex paraguariensis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2010,** *58*, 5471-5484.

(5). Parveen, I.; Threadgill, M. D.; Hauck, B.; Donnison, I.; Winters, A., Isolation, identification and quantitation of hydroxycinnamic acid conjugates, potential platform chemicals, in the leaves and stems of *Miscanthus x giganteus* using LC-ESI-MSn. *Phytochemistry* **2011,** *72*, 2376-84.

(6) Eklund, P. C.; Backman, M. J.; Kronberg, L. A.; Smeds, A. I.; Sjoholm, R. E., Identification of lignans by liquid chromatography-electrospray ionization ion-trap mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry: JMS* **2008,** *43*, 97-107.

(7) Caleja, C.; Finimundy, T. C.; Pereira, C.; Barros, L.; Calhelha, R. C.; Sokovic, M. et al., Challenges of traditional herbal teas: plant infusions and their mixtures with bioactive properties. *Food & Function* **2019,** *10*, 5939-5951.

(8) Guo, H.; Liu, A. H.; Ye, M.; Yang, M.; Guo, D. A., Characterization of phenolic compounds in the fruits of *Forsythia suspensa* by high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry: RCM* **2007,** *21*, 715-729.

(9) Rodriguez-Medina, I. C.; Beltran-Debon, R.; Molina, V. M.; Alonso-Villaverde, C.; Joven, J.; Menendez, J. A.; Segura-Carretero, A.; Fernandez-Gutierrez, A., Direct characterization of aqueous extract of *Hibiscus sabdariffa* using HPLC with diode array detection coupled to ESI and ion trap MS. *Journal of Separation Science* **2009,** *32*, 3441-3448.

(10) Shan, L.; Wu, Y.; Yuan, L.; Zhang, Y.; Xu, Y.; Li, Y., Rapid Screening of Chemical Constituents in Rhizoma Anemarrhenae by UPLC-Q-TOF/MS Combined with Data Postprocessing Techniques. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM* **2017**.

(11) Calani, L.; Beghe, D.; Mena, P.; Del Rio, D.; Bruni, R.; Fabbri, A. et al., Ultra-HPLC-MS(n) (Poly)phenolic profiling and chemometric analysis of juices from ancient *Punica granatum* L. Cultivars: a nontargeted approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2013,** *61*, 5600-5609.

(12) Chen, G.; Li, X.; Saleri, F.; Guo, M., Analysis of Flavonoids in *Rhamnus davurica* and Its Antiproliferative Activities. *Molecules* **2016,** *21*.

(13) Simirgiotis, M. J.; Benites, J.; Areche, C.; Sepulveda, B., Antioxidant Capacities and Analysis of Phenolic Compounds in Three Endemic Nolana Species by HPLC-PDA-ESI-MS. *Molecules* **2015,** *20*, 11490-507.

(14) Wang, M.; Cao, A.; Ouyang, C.; Li, Y.; Wei, Y., Rapid screening and identification of non-target flavonoid components in invasive weeds by LC/MS-IT-TOF. *Analytical Methods* **2015,** *7*, 10207-10216.

(15) Fabre, N.; Rustan, I.; Hoffman, E.; Quetin-Leclercq., 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* **2001,** *12*, 707–715.

(16) Schmeda-Hirschmann, G.; Quispe, C.; Gonzalez, B., Phenolic profiling of the South American "Baylahuen" tea (*Haplopappus* spp., Asteraceae) by HPLC-DAD-ESI-MS. *Molecules* **2015,** *20*, 913-928.

(17) Li, C.; Seeram, N. P., Ultra-fast liquid chromatography coupled with electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry for the rapid phenolic profiling of red maple (*Acer rubrum*) leaves. *Journal of Separation Science* **2018,** *41*, 2331-2346.

(18) Chen, H. J.; Inbaraj, B. S.; Chen, B. H., Determination of phenolic acids and flavonoids in *Taraxacum formosanum* Kitam by liquid chromatography-tandem mass spectrometry coupled with a post-column derivatization technique. *International Journal of Molecular Sciences* **2012,** *13*, 260-85.

(19) Zhang, Y.; Xiong, H.; Xu, X.; Xue, X.; Liu, M.; Xu, S. et al., Compounds Identification in Semen Cuscutae by Ultra-High-Performance Liquid Chromatography (UPLCs) Coupled to Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Molecules* **2018,** *23*.

5.2 Docking molecular

O potencial farmacológico dos compostos isolados de *J. aequilabris* foi inicialmente investigado através de uma abordagem *in silico* usando a ferramenta de docking molecular para investigar uma possível interação entre os compostos isolados e o receptor de glicocorticóide (RG), que é responsável pela supressão de múltiplos genes inflamatórios. Este alvo foi selecionado com base nos resultados consolidados que as espécies do gênero *Justicia* e seus metabólitos apresentaram para o tratamento de doenças inflamatórias.

O docking molecular é baseado no projeto estrutural para prever os componentes ativos (JIAO et al., 2021). Assim, a possível interação entre as lignanas isoladas e GR foi investigada em estudos de docking molecular. O domínio de ligação do ligante do receptor de glicocorticóide complexado com furoato de fluticazona (FF) (PDB: 3CLD) foi utilizado no estudo. Os autores que cristalizaram essa proteína observaram maior afinidade desse agonista glicocorticóide com o RG do que a dexametasona devido às suas interações na bolsa lipofílica 17α do receptor. Os principais resíduos de aminoácidos do GR foram selecionados no software Molegro Virtual Docker, versão 6.0.1 (MVD), para realizar o estudo de docking molecular (BIGGADIKE et al., 2008).

O redocking e cálculo do RMSD obtiveram um valor de 0,31 que validou o estudo de docking molecular. A dexametasona foi utilizada no estudo de docking como segundo controle positivo, e a molécula de secoisolariciresinol, descrita anteriormente em *J. aequilabris* (MAIA et al., 2020), foi utilizada para estudar a relação estrutura-atividade.

Os compostos **1**, **2** e **3** apresentaram energias de interação menores do que as duas moléculas usadas como controle positivo, portanto, apresentaram potencial de interação no GR. Os dados de energia de interação pontuados pelo MolDock Score estão disponíveis na Tabela 6.

As substituições em C-9 e C-9' do composto **1** tornam a molécula mais volumosa e proporciona característica mais polar. Essas características e sua conformação mais estável ajudam a interagir com os resíduos de aminoácidos Ile 747, Met 646 e Tyr 735 (Figura 10); No entanto, eles também prejudicam sua probabilidade de interação no RG porque o composto **1** tem uma interação desfavorável com o resíduo de aminoácido Leu 563, que pertence ao sítio ativo do RG.

Tabela 6. *MolDock Score* do ligante agonista PDB.

Compostos	MolDock Score (kcal/mol)
1	−142,7
2	−169,4
3	−163,9
Secoisolariciresinol	−127,0
Furoato de Fluticasona	−141,6
Dexametasona	−137,4

A presença de um grupo malonil em C-9 no composto **2** possibilita uma configuração com mais aceptores e doadores de hidrogênio para a molécula, o que fortalece as interações desta molécula com resíduos de aminoácidos no sítio ativo da proteína GR (Ile 747, Met 646 e Tyr 735) (Figura 10). O composto **2** também interage com o resíduo de aminoácido Gln 642 através de pontes de hidrogênio, e essa interação também foi observada nos controles positivos. Esses dados fornecem suporte para o melhor desempenho do composto **2** no MolDock Score, o que implica que é a molécula com maior probabilidade de atividade agonista no RG devido à sua menor energia de interação.

O composto **3** também interage com os resíduos de aminoácidos Ile 747, Met 646 e Tyr 735 (Figura 10) e mostra afinidade semelhante ao composto **2**. No entanto, a conformação assumida por esta molécula torna a hidroxila em C-9' um ponto de interação desfavorável com o resíduo de aminoácido Gln 642.

A molécula de secoisolariciresinol apresentou uma energia de interação inferior a FF e dexametasona (Tabela 6), e sua conformação no sítio ativo da proteína não apresentou grandes interações desta molécula com resíduos de aminoácidos do sítio ativo RG (Ile 747, Met 646 e Tyr 735) (Figura 10). Em comparação com os compostos **1-3**, os dados *in silico* de secoisolariciresinol mostram que as substituições em C-9 e C-9' permitiram interações de moléculas com o sítio ativo RG, principalmente com Ile 747, Met 646 e Tyr 735, o que os permitiu para gerar uma resposta agonista.

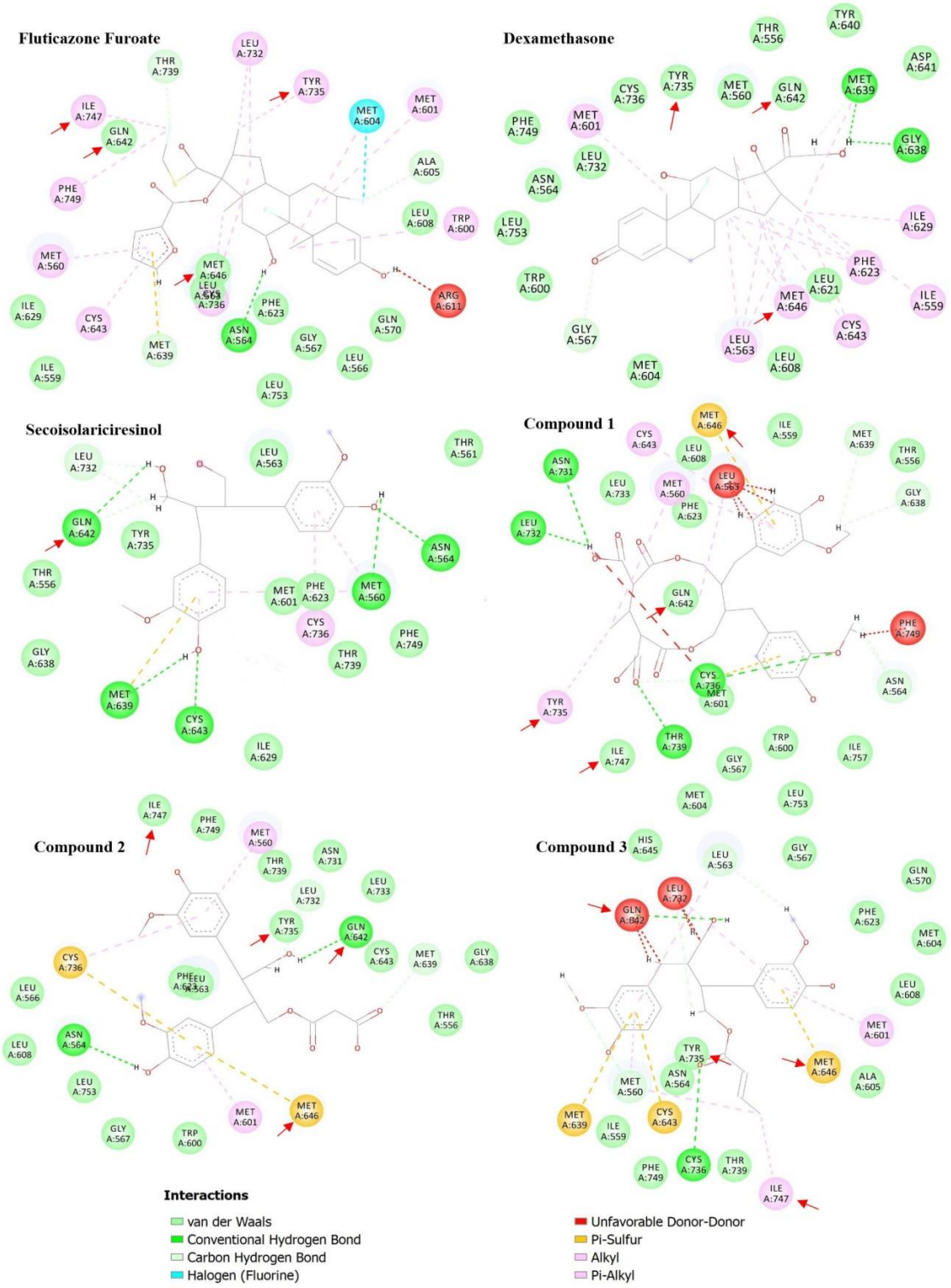


Figura 10. Interações intermoleculares entre **1**, **2** e **3**, controle positivo e negativo com resíduos de aminoácidos do sítio ativo da proteína glicocorticóide (PDB ID 3CLD). → resíduos de aminoácidos importantes para interação e resposta no sítio ativo.

As análises de docking molecular demostraram que os compostos **1**-**3** possuem possível atividade agonista no RG, desta forma, possuem potencial anti-inflamatório, esta hipótese foi confirmada através dos estudos farmacológicos *in vitro* que foram realizados com avaliação da produção de óxido nítrico e IL-1β via estimulação de macrófagos. Estes resultados preliminares classificam estas moléculas como candidatas a mais estudos de investigação da atividade anti-inflamatória.

5.3 Isolamento e identificação de lignanas com atividade leishmanicida

5.3.1 Determinação estrutural do composto 7

O composto **7** (13,8 mg) possui aspecto sólido amorfo amarelado. O seu espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz) apresentou sistema ABX característico: δ_H 6, 58 (2H, d, J = 1,6 Hz), δ_H 6,66 (2H, d, J = 8,0 Hz) e δ_H 6,54 (2H, d, J = 1,6 e 8,0 Hz) (figura 12 e 13), evidenciando assim, a existência de anel aromático trisubstituído na molécula. A integral de ambos sinais (2H), corrobora com a presença de duas unidades aromáticas com provável simetria. O espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) (figura 15) exibiu sinais característicos de anel aromático (δ_C 133,8; 113,3; 115,7 e 122,6), sendo que, os deslocamentos em δ_C 145,3, 148,3 e 56,1 sugeriram funções oxigenadas nas substituições das posições C-3 e C-4 do anel aromático.

A presença de três sinais de carbono (δ_C 35,9, 44,0 e 62,0), aliado aos dez sinais de hidrogênios observados: δ_H 2,65 (2H, m), 2,55 (2H, m), 3,59 (4H, m) e δ_H 1,90 (2H, s), sugeriu uma estrutura C_6C_3 dimérica, que corrobora com a estrutura base das lignanas. O deslocamento em δ_H 3,59 (4H, m), evidenciou desproteção ocasionada por provável elemento eletronegativo, como ocorre comumente na presença de hidroxila em C-9 nas lignanas. Os picos em δ_H 2,65 (2H, m) e 2,55 (2H, m) (figura 14) são consistentes aos hidrogênios benzílicos 7a-a' e 7b-b', respectivamente. O deslocamento em δ_H 1,90 (2H, m), indica que a ligação das duas unidades diméricas ocorre entre 8 e 8' na molécula, desta forma, a estrutura caracteriza lignana do tipo dibenzilbutano.

A molécula apresentou $[\alpha]^{25}_D$ = -27 (*c* 0,1, MeOH), a análise de ECD confirmou a configuração absoluta (8*R*,8'*R*) (figura 16). Com base nos dados espectrais (tabela 7) e em comparação com a literatura (FU et al., 2016), a estrutura foi identificada como 8*R*,8'*R*-secoisolariciresinol (figura 11).

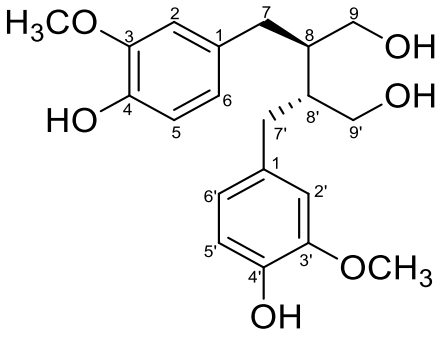


Figura 11. Estrutura química da 8*R*, 8'*R*-secoisolariciresinol.

Tabela 7. Dados de RMN de ^{1}H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) do composto **7** obtido em Metanol-*d*4 (δ em ppm e *J* em Hz) em comparação dos deslocamentos químicos de RMN ^{1}H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) em DMSO-*d*6 da secoisolariciresinol por Fu et al. 2016.

7				**Secoisolariciresinol**	
Posição		δ_C	δ_H	δ_C	δ_H
1 - 1’	C	133,8	-	132,3	-
2 - 2’	CH	113,3	6,58 (2H, d, *J* = 1,6)	111,8	6,57 (2H, d, *J* = 1,6)
3 - 3’	C	148,7	-	147,3	-
4 – 4’	C	145,3	-	143,9	-
5 – 5’	CH	115,7	6,66 (2H, d, *J* = 8,0)	114,2	6,64 (2H, d, *J* = 8,0)
6 – 6’	CH	122,6	6,54 (2H, dd, *J* = 1,6 e 8,0)	121,2	6,53 (2H, d, *J* = 1,6 e 8,0)
7 – 7’	CH_2	35,9	2,65 (2H, m, Ha, a’) 2,55 (2H, m, Hb, b’)	34,6	2,65 (2H, dd, *J* = 7,6 e 14,0 Ha , a’) 2,54 (2H, dd, *J* = 7,6 e 14,0, Hb, b′)
8 – 8’	CH	44,0	1,90 (2H, m)	42,6	1,89 (2H, t, *J* = 6,0)
9 – 9’	CH_2	62,0	3,59 (4H, m)	60,6	3,56 (4H, m)
OCH_3	CH_3	56,1	3,72 (6H, s)	54,6	3,72 (6H, s)

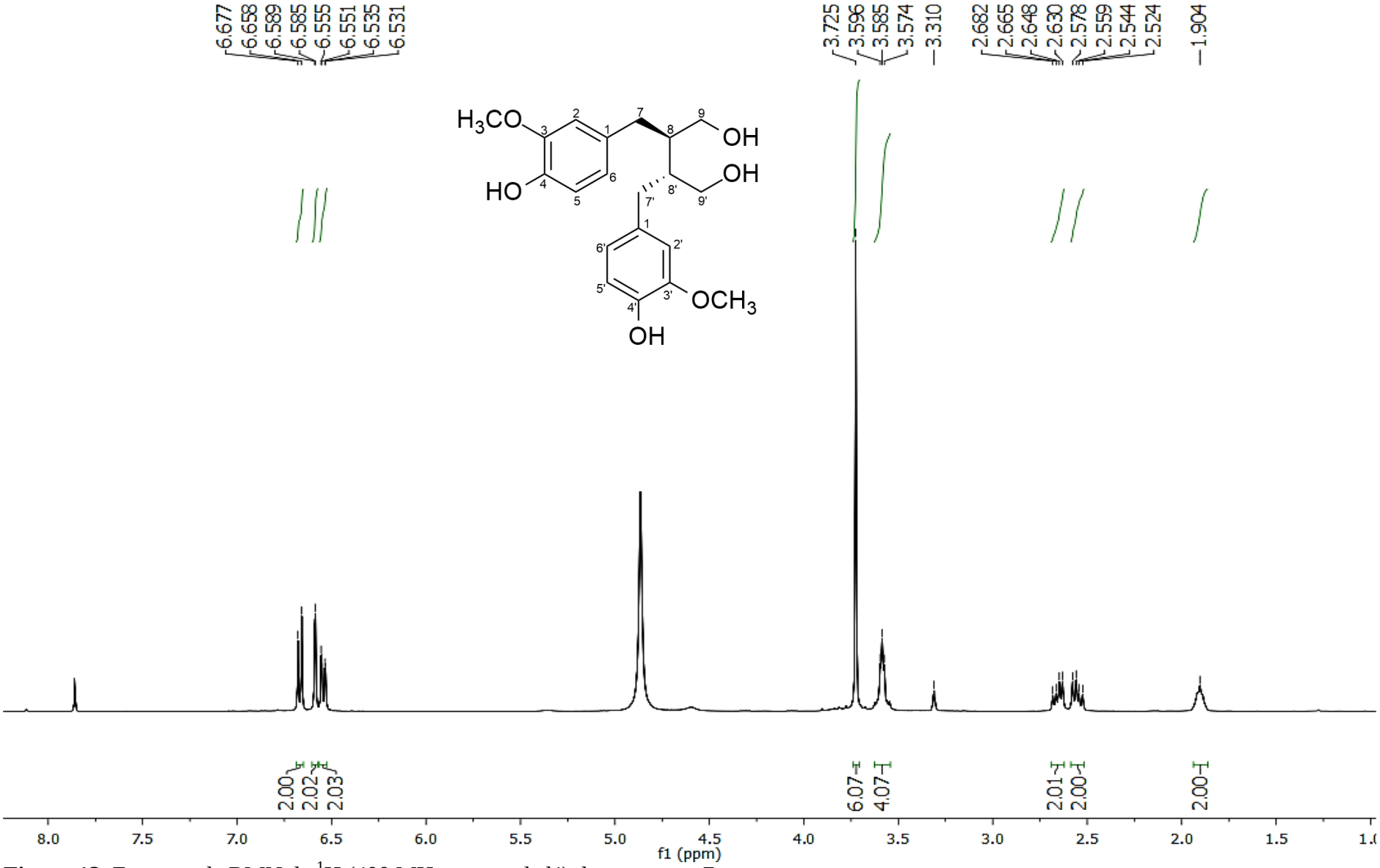


Figura 12. Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, metanol-*d*4) do composto **7**.

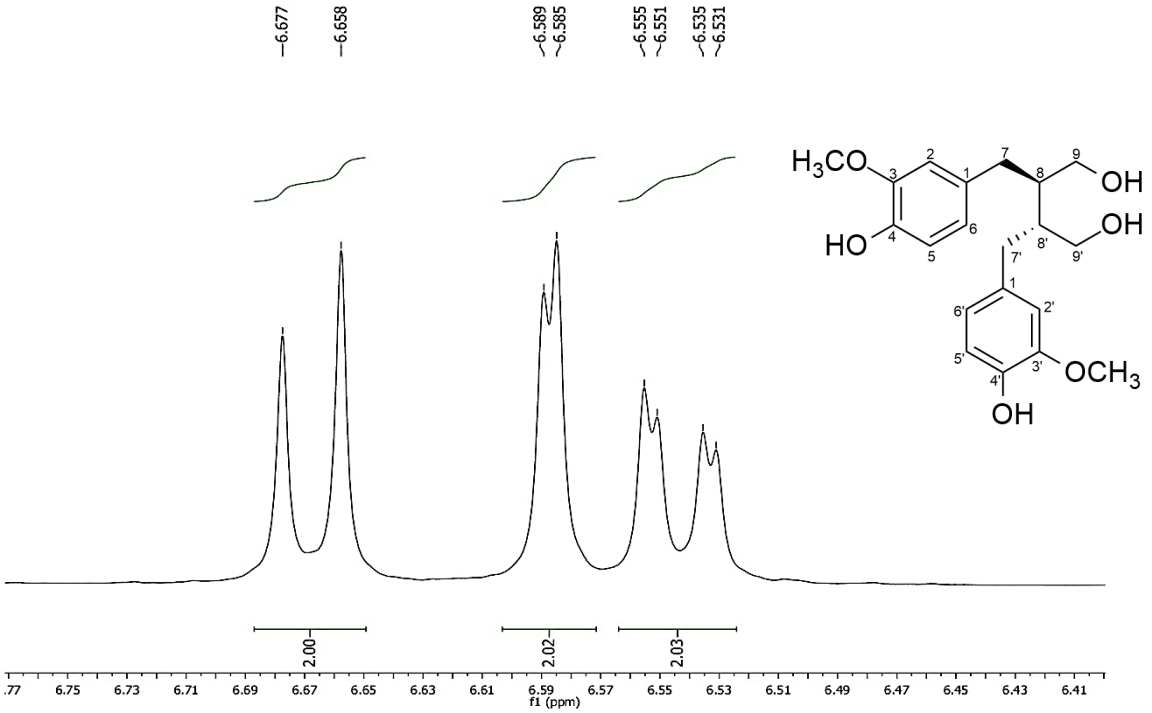


Figura 13. Expansão I do espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, metanol-*d*4) composto **7**.

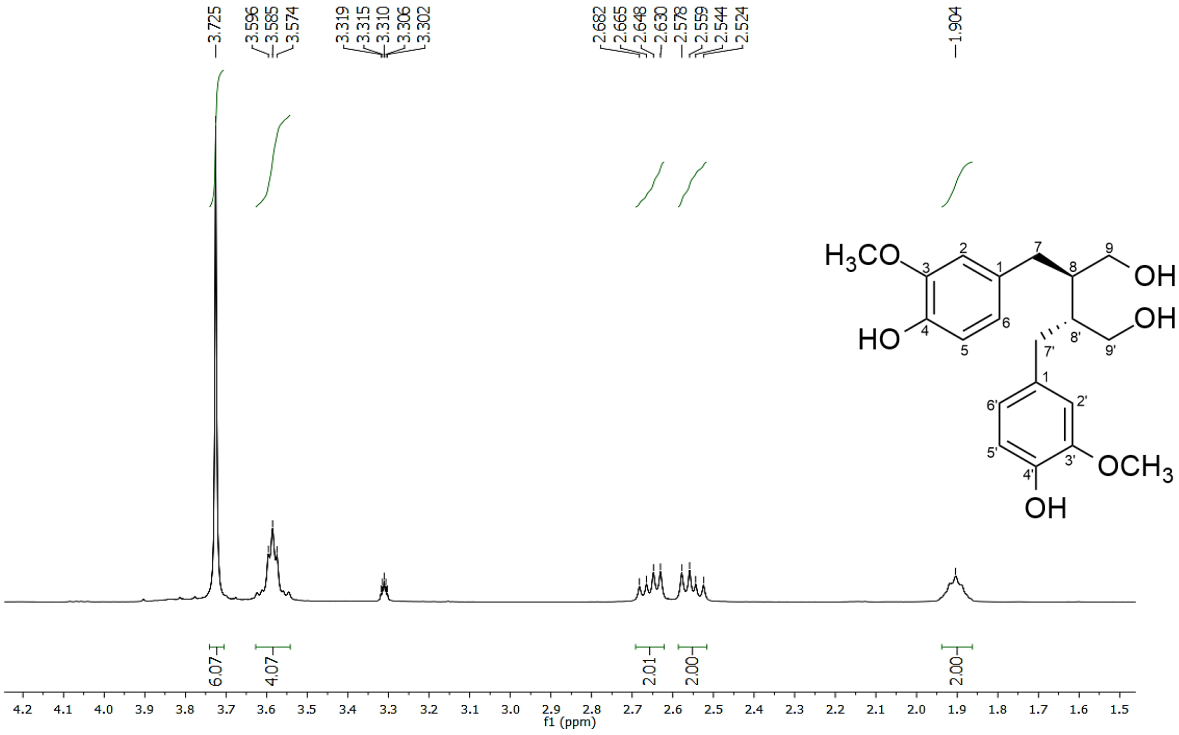


Figura 14. Expansão II do espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, metanol-*d*4) do composto **7**.

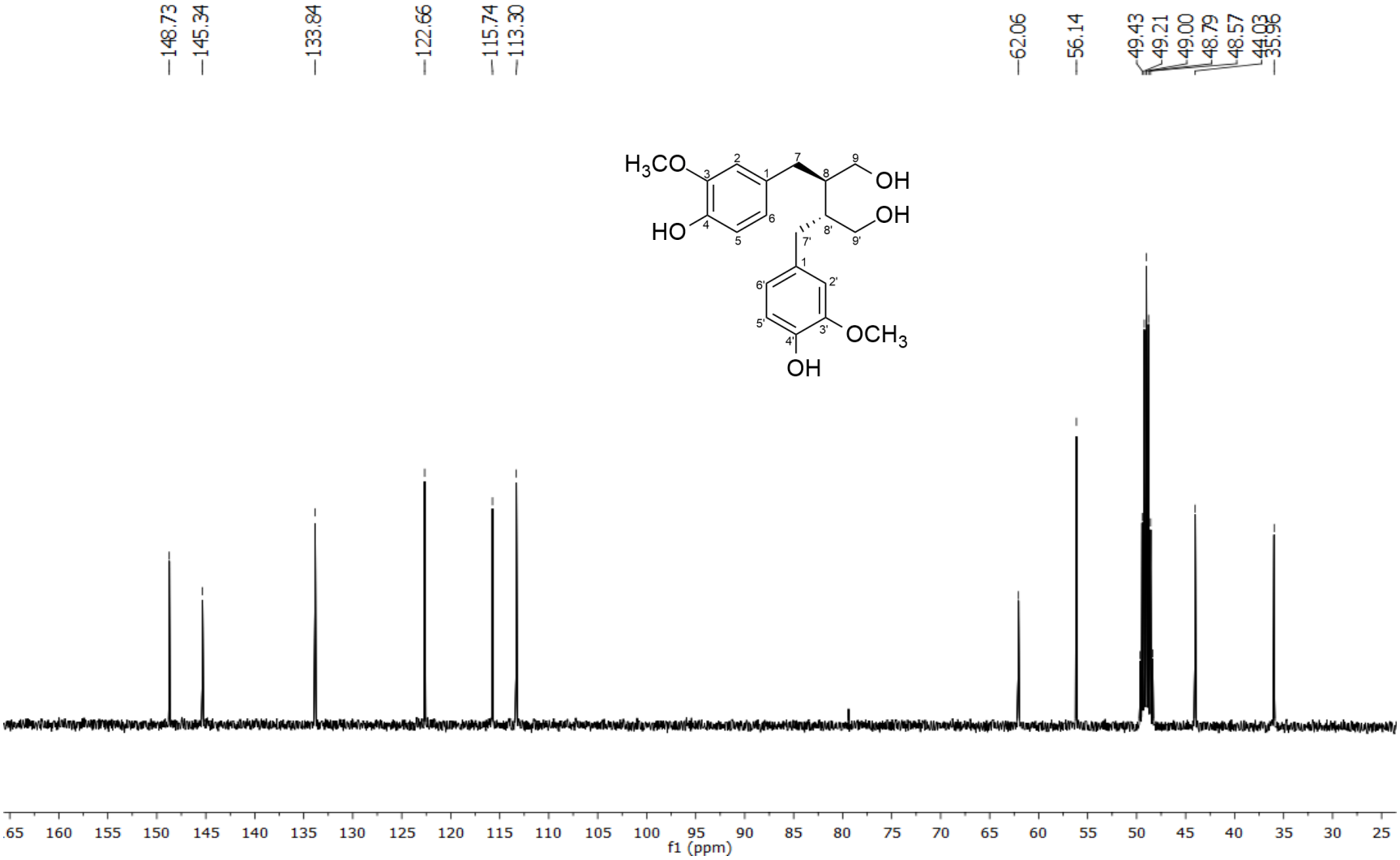


Figura 15. Espectro de RMN de ^{13}C – BB- (100 MHz, metanol-*d4*) do composto **7**.

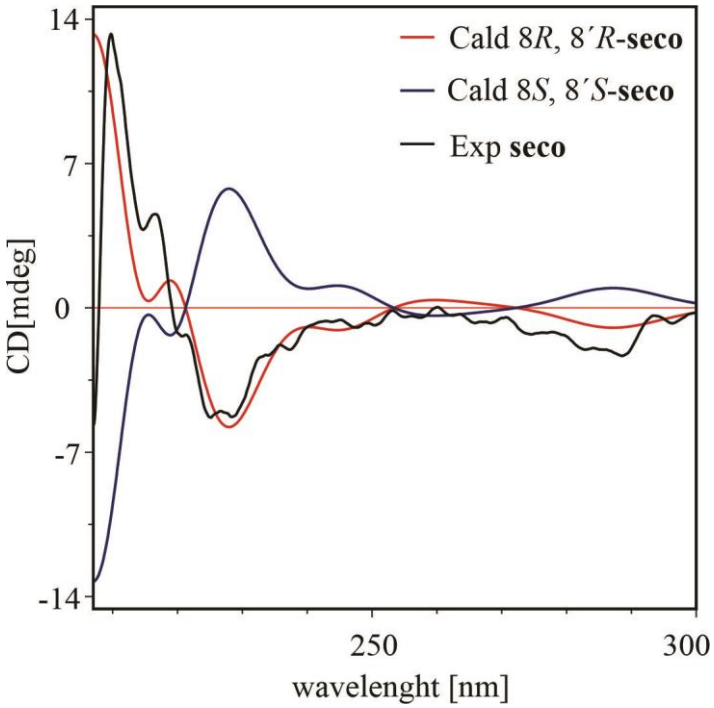


Figura 16. Espectro de ECD do composto **7**.

5.3.2 Determinação estrutural do composto 8

O composto 8 apresentou-se como cristais amarelos com 4,4 mg. Ao analisar o espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz) (figura 18), evidenciou-se a existência de dois anéis aromáticos trissubstituído, devido ao sistema ABX observado através de δ_H 6,94 (1H, d, *J* = 1,8 Hz), 7,02 (1H, d, *J* = 8,4 Hz), 6,84 (1H, dd, *J* = 1,8 e 8,4 Hz) e 6,88 (1H, d, *J* = 1,4 Hz), 6,73 (2H, m) (figura 19). Há presença de metoxilas ligadas a anel aromático foi apontada pelo mapa de contorno HMBC, onde δ_H 3,76 (3H, s) correlaciona-se com δ_C 146,0 e δ_H 3,75 (3H, s) com δ_C 147,6.

Os sinais em δ_H 4,66 (1H, d, *J* = 4,1 Hz), 4,65 (1H, d, *J* = 4,4 Hz), 3,04 (2H, m) 3,73 (2H, m) e 4,13 (2H, m) (figura 20) no espectro de RMN de ^{1}H, somado aos sinais no espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) (figura 21), δc 84,9; 85,2; 53,7; 53,6; 71,09 e 71,01 configuram a presença de unidade C_6C_3 na molécula com núcleo 7,9′: 7′, 9-diepoxi, característico de lignanas do tipo furofurânicas.

Segundo Shao et al. (2018), a porção 7,9′: 7′, 9-diepoxi de lignanas furofurânicas de procedência natural ocorre na configuração *cis*-fundida, e segundo suas pesquisas, os desvios químicos de $\Delta\delta_{H\text{-}9}$ e $\Delta\delta_{H\text{-}9'}$ são resultado das configurações relativas de C-7/C-8 e C-7′/C-8′. Deste modo, o composto **8** exibiu, $\Delta\delta_{H\text{-}9}$ e $\Delta\delta_{H\text{-}9'}$ = 4,13 - 3,13, de forma que $\Delta\delta_{H\text{-}9;\ H\text{-}9'}$ correspondeu a 0,40. Classificando a molécula como 7-H/8-H *trans* e 7′-H/8′-H *trans.*

O espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) e o mapa de contorno de HMQC (figura 22) apresentou sinais e correlações características de unidade osídica: δc 100,2 (C-1”), 73,2 (C-2”), 76,9 (C-3”), 69,7 (C-4”), 77,0 (C-5”) e 60,7 (C-6”), consonante a existência no espectro de RMN de ^{1}H de hidrogênio anomérico δ_H e 4,86 (1H, d, *J* = 7,6 Hz), atribuindo configuração do tipo β ao hexosídeo. No mapa de contorno de HMBC foi observada a correlação a J_3 de H-1” com δ_C 146,0 (C-4) indicando o local da ligação osídica na molécula (figura 23).

De acordo com a análise espectral e em comparação com os dados reportados por Huang et al. (2016) (tabela 8), o composto **8** foi identificada por pinoresinol-4-*O*-β-*D*-glicosídeo (figura 17).

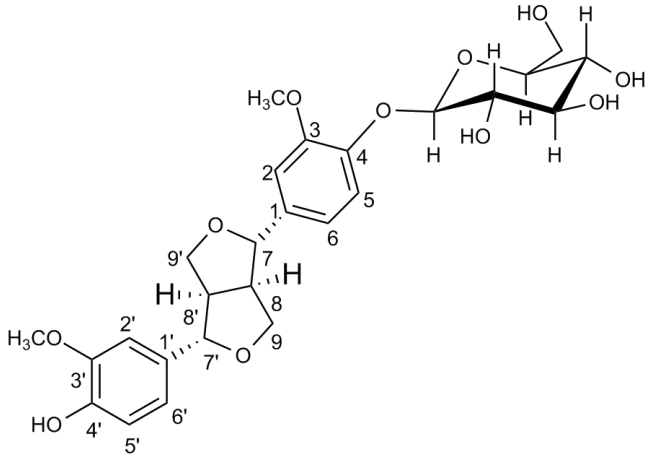


Figura 17. Estrutura química do pinoresinol-4-*O*-*β*-*D*-glicosídeo.

Tabela 8. Dados de RMN de ^{1}H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) do composto **8**, obtido em DMSO-*d*6 (δ em ppm e *J* em Hz) em comparação dos deslocamentos químicos de RMN ^{1}H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) em DMSO-*d*6, do pinoresinol-4-*O*-*β*-*D*-glicosídeo por Huang et al. 2016.

		8				**Pinoresinol-4-*O*-*β*-*D*-glicosídeo**	
Carbono		HSQC		HMBC			
		δ_C	δ_H	($^{2}J_{CH}$)	($^{3}J_{CH}$)	δ_C	δ_H
1	C	135,2	-	H-7	H-5	135,2	-
2	CH	110,6	6,94 (1H, d, *J* = 1,8)		H-6, H-7	110,6	6,95 (1H, d, *J* = 1,5)
3	C	148,8	-	H-2	H-5	148,9	-
4	C	146,0	-	H-5	H-1”,H-2, H-6, CH_3O -3	145,9	-
5	CH	115,25	7,02 (1H, d, *J* = 8,4)			115,3	7,05 (1H, d, *J* = 8,4)
6	CH	118,7	6,84 (1H, dd, *J* = 1,8 e 8,4)	H-5	H-2	118,6	6,87 (1H, dd, *J* = 8,4 e 1,5)
7	CH	84,9	4,66 (1H, d, *J* = 4,1)		H-2	84,9	4,67(1H, d, *J* = 3,8)
8	CH	53,7	3,04 (2H, m)		H-7	53,7	3,06 (2H, m)
9	CH_2	71,09	*3,73 (2H, m)*		H-7	70,9	3,81(2H, m)

			4,13 (2H, m)				4,16(2H, m)
3-OCH_3	CH_3	55,7	*3,76 (3H, s)*			55,7	3,77 (3H, s)
1’	C	132,2	-	H-7’		132,2	-
2’	CH	110,4	6,88 (1H, d, *J* = 1,4)		H-7’	110,4	6,89 (1H, d, *J* = 1,5)
3’	C	147,6	-	H-2’		147,5	-
4’	C	145,9	-		H-2’, CH_3O -3’	145,8	-
5’	CH	115,21	6,73 (2H, m)			115,1	6,72 (1H,d, *J* = 8,1)
6’	CH	118,2			H-2’	118,1	6,75 (1H, dd, *J* = 8,5 e 1,5)
7’	CH	85,2	4,65 (1H, d, *J* = 4,4)		H-2’	85,2	4,61(1H, d, *J* = 4)
8’	CH	53,6	3,04 (2H, m)	H-7’		53,6	3,06 (2H, m)
9’	CH2	71,01	3,73 (2H, m) 4,13 (2H, m)		H-7’	71,0	3,81(2H, m) 4,16(2H, m)
-OCH_3’	CH_3	55,6	3,75 (3H, s)			55,6	3,75 (3H, s)
1”	CH	100,2	4,86 (1H, d, *J* = 5,3)			100,2	4,89 (1H, d, *J* = 6,6)
2”	CH	73,2				73,2	
3”	CH	76,8	3,15 e 3,25 (4H, *m*)			76,9	
4”	CH	69,7				69,7	3,10 -3,67 (6H, m)
5”	CH	77,0				77,0	
6”	CH_2	60,7	3,64 (1H, m) 3,43 (m)			60,7	

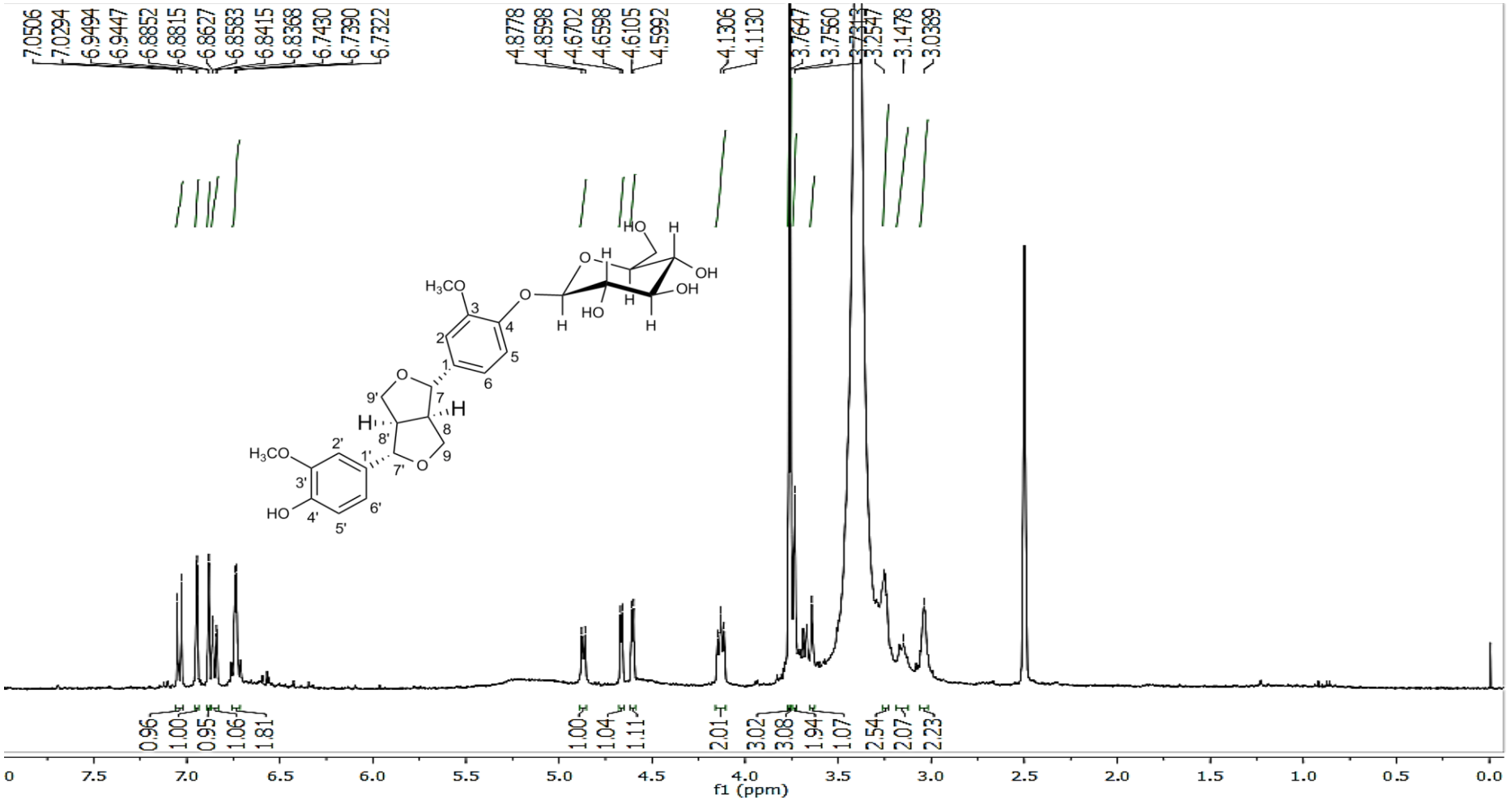


Figura 18. Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, DMSO-*d*6) do composto **8**.

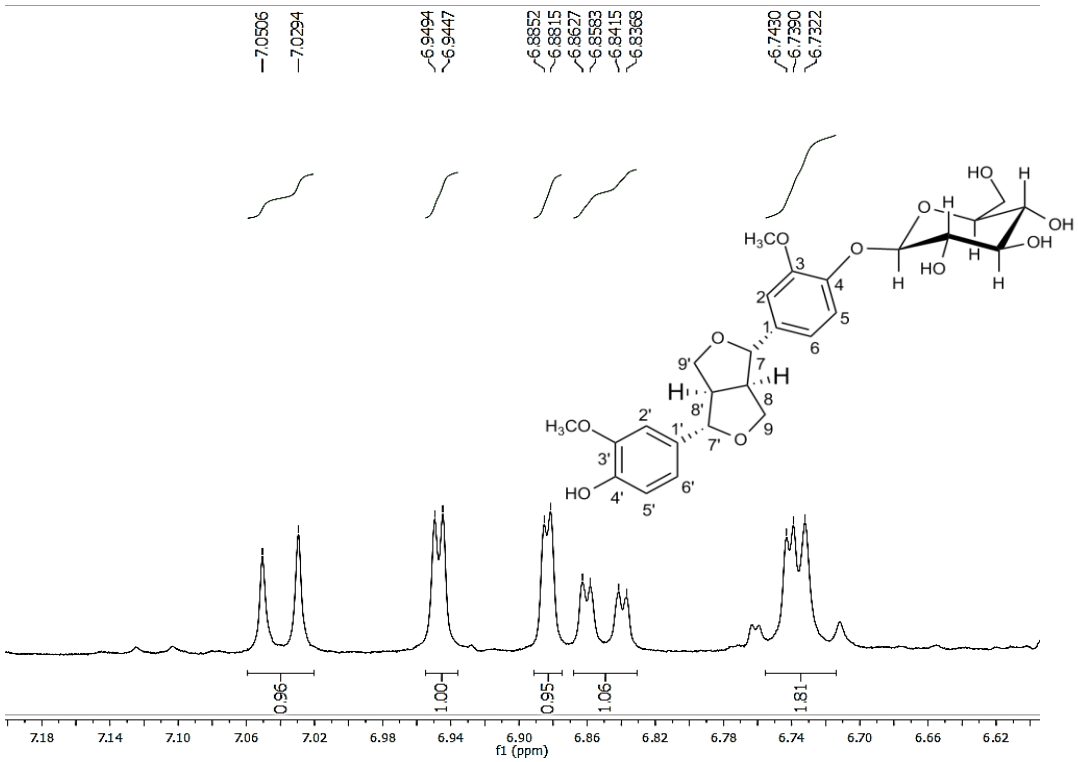


Figura 19. Expansão I de espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, DMSO-*d*6) do composto **8**.

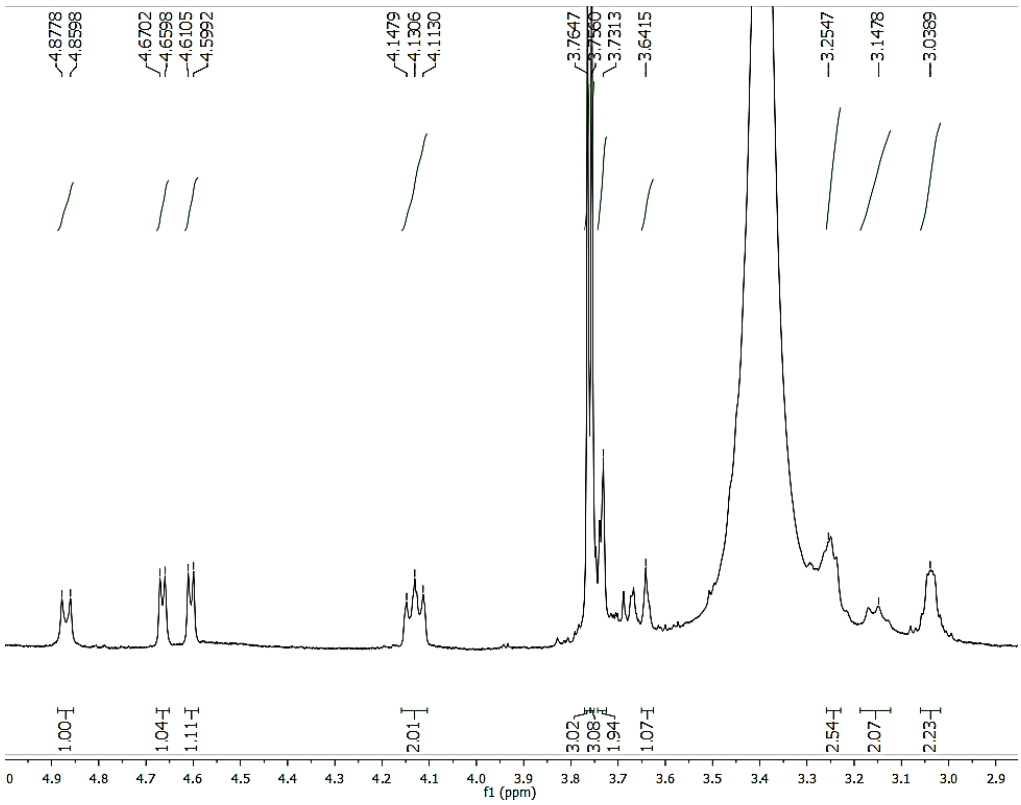


Figura 20. Expansão II do espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, DMSO-*d*6) do composto **8**.

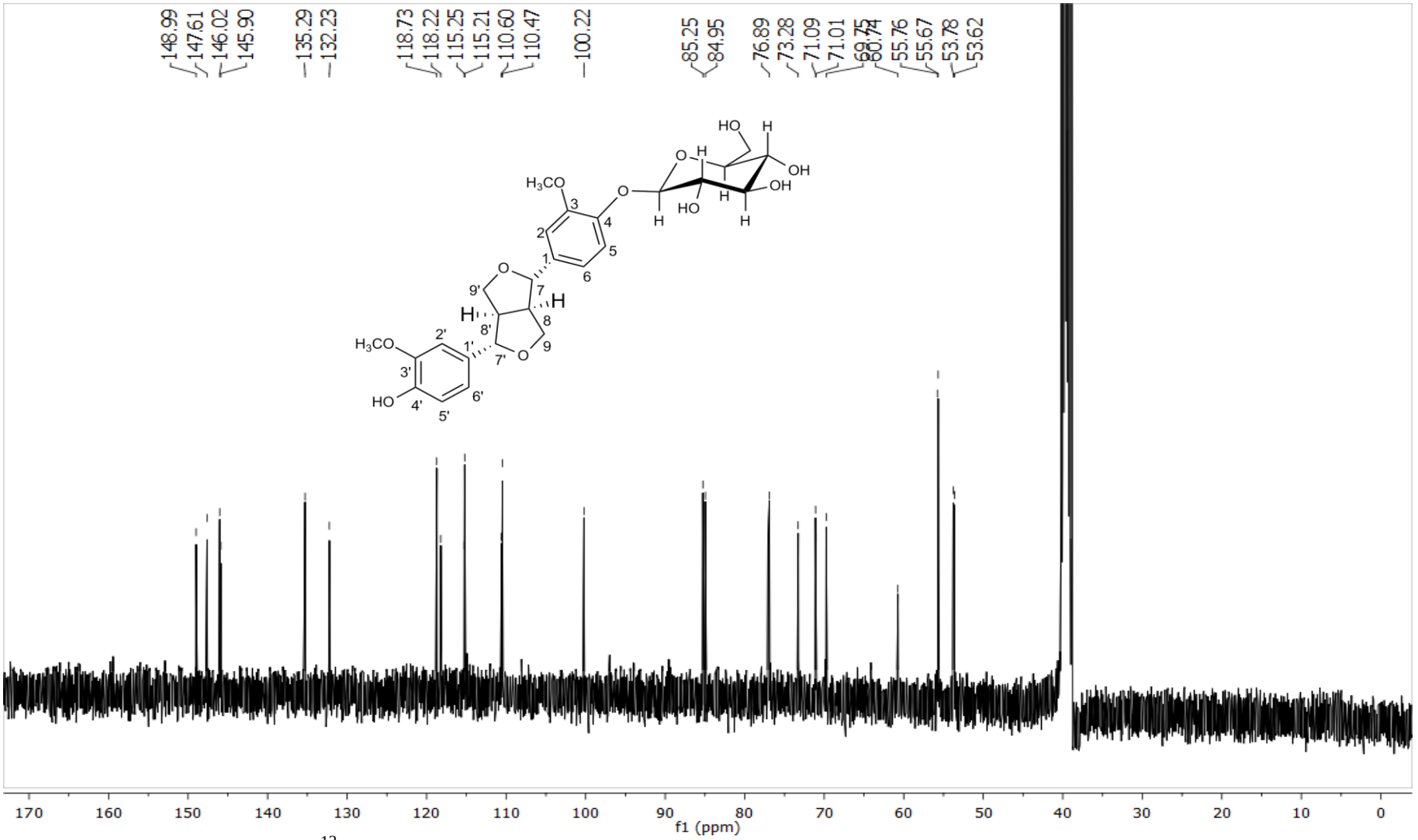


Figura 21. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO-*d*6) do composto **8**.

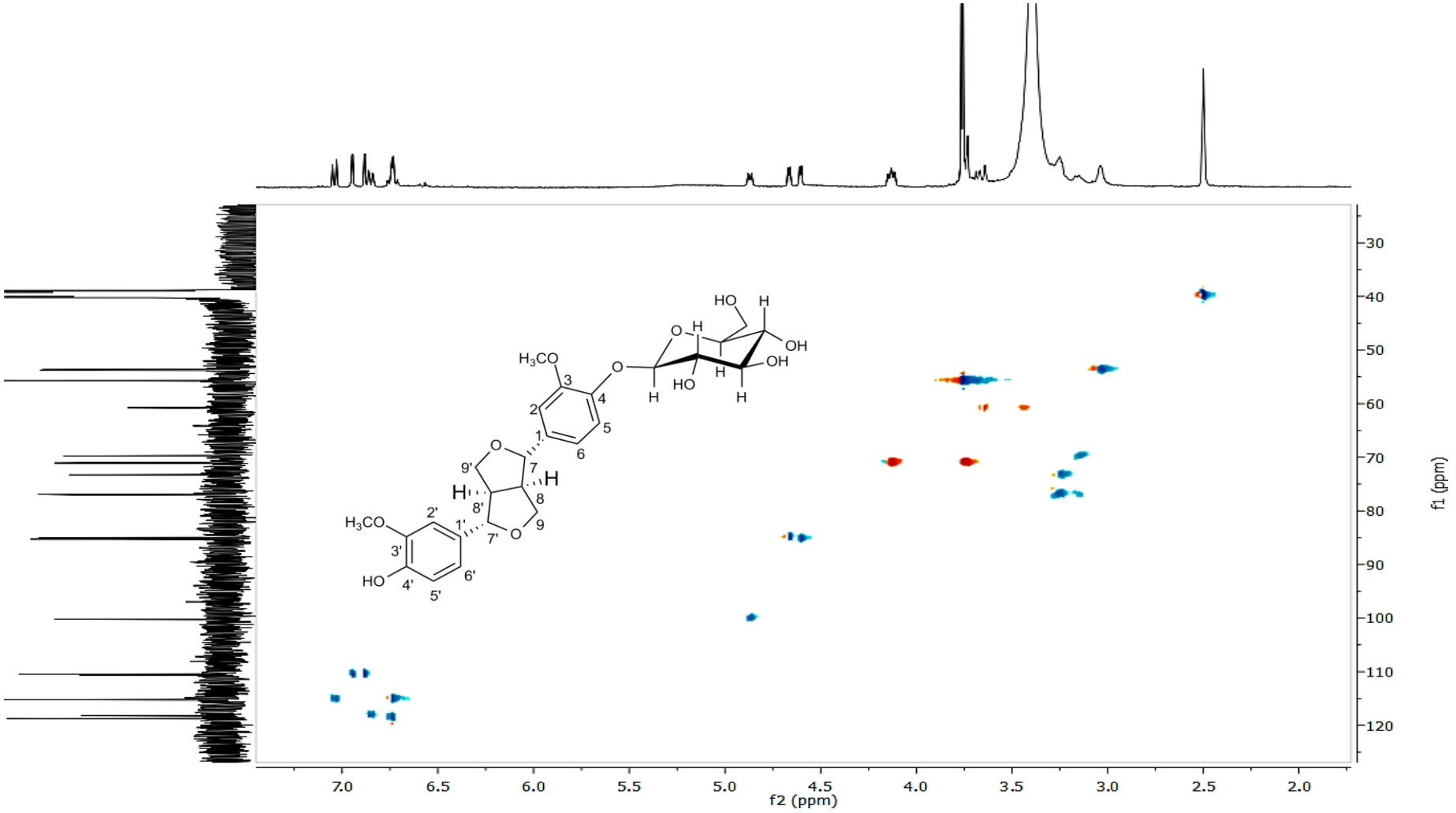


Figura 22. Mapa de contorno ^{1}H x ^{13}C HMQC (400 e 100 MHz, DMSO-*d*6) do composto **8**.

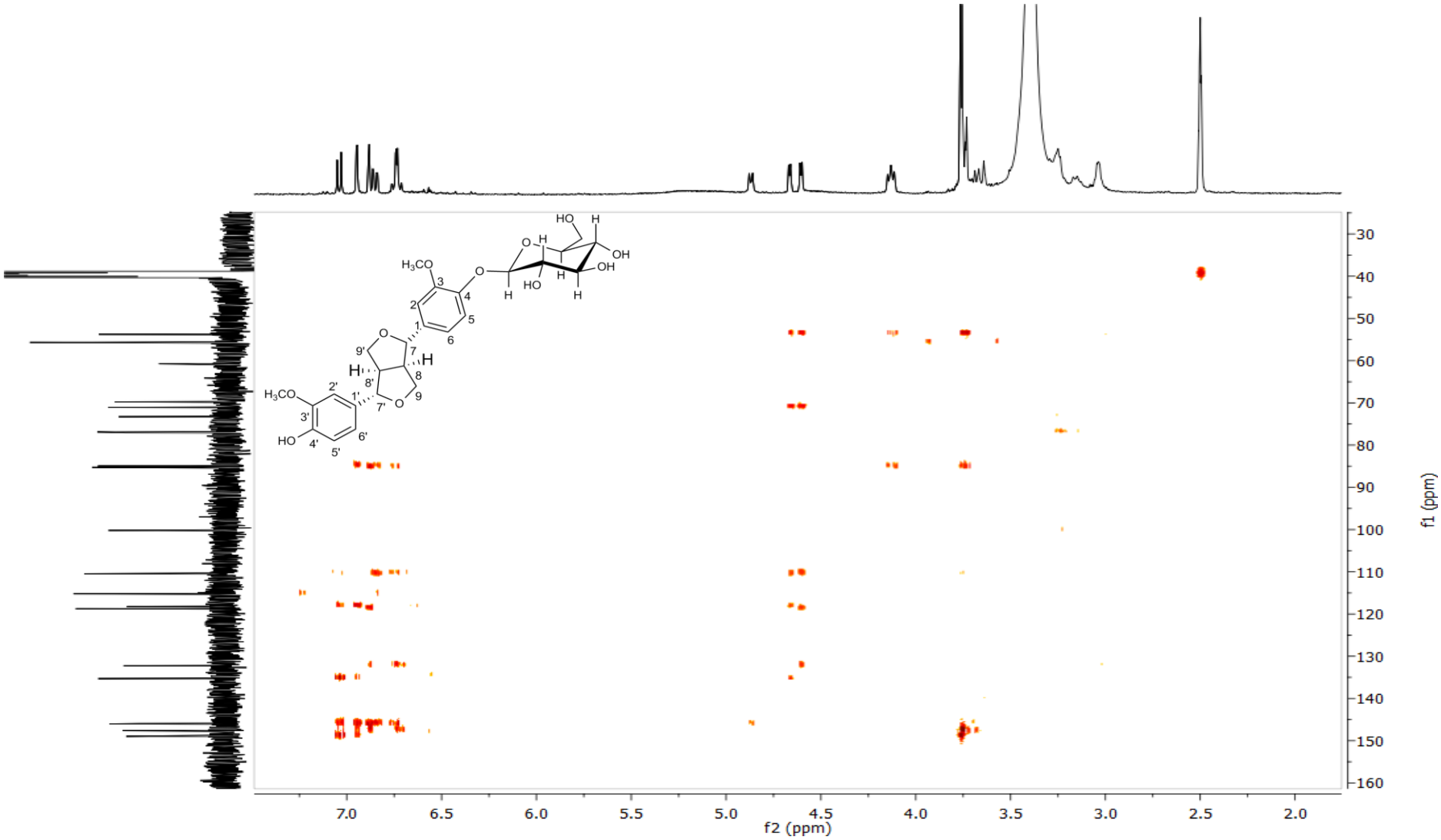


Figura 23. Mapa de contorno ^{1}H x ^{13}C HMBC (400 e 100 MHz, DMSO-*d*6) do composto **8**.

5.3.3 Determinação estrutural do composto 9

O composto **9** visualmente mostrou-se como um sólido amorfo amarelo (3,9 mg). Ao analisar o espectro de RMN de ^{1}H e ^{13}C (figura 25 e 26), observou-se que sua estrutura era semelhante ao composto **8**, tratando-se, desta forma, de uma lignana furofurânica glicosilada. A configuração relativa foi definida de acordo com Shao et al. (2018), onde, $\Delta\delta_{H\text{-}9}$ = 0,34 e $\Delta\delta_{H\text{-}9'}$ = 0,65, valores correspondentes a 7-H/8-H *trans*, 7′-H/8′-H *cis*. No mapa de contorno de HMBC foi observado a correlação a J_3 de H-1” com δ_C 145,3 (C-4) indicando o local da ligação osídica na molécula (figura 27). De acordo com a análise espectral (tabela 9) e em comparação com os dados reportados por Shao et al. (2018) (tabela 9), o composto **9** foi identificada por epipinoresinol-4-*O*-*β*-*D*-glicosídeo (figura 24).

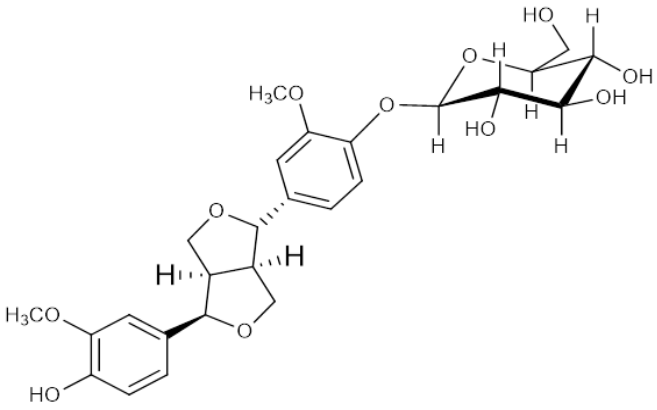


Figura 24. Estrutura química do epipinoresinol-4-*O*-*β*-*D*-glicosídeo.

Tabela 9. Dados de RMN de ^{1}H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) de **9**, obtido em DMSO-*d*6 (δ em ppm e *J* em Hz) em comparação dos deslocamentos químicos de RMN ^{1}H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) em metano-*d*4 do epipinoresinol-4-*O*-*β*-*D*-glucopiranosídeo por Shao et al. 2018.

9				**Epipinoresinol-4-*O*-*β*-*D*-glucopiranosídeo**	
Carbono		HSQC			
		δ_C	δ_H	δ_C	δ_H
1	C	135,4	-	137,5	-
2	CH	110,4	6,95 (1H, d, *J* = 2,0)	111,1	6,97 (d, *J* =2,0)
3	C	148,9	-	150,9	-
4	C	145,9	-	147,5	-
5	CH	115,1	7,03 (1H, d, *J* = 8,5)	115,9	7,09 (d, *J* = 8,0)
6	CH	118,2	6,85 (1H, dd, *J* = 2,0 e 8,5)	119,8	6,86 (dd, *J* = 8,0 e 2,0)
7	CH	86,8	4,36 (1H, d, *J* = 6,8)	89,0	4,41(d, *J* = 7,0)
8	CH	54,1	2,82 (1H, m)	55,8	2,86 (m)
9	CH_2	70,3	4,07 (1H, d, *J* = 9,9) 3,73 (2H, m)	71,9	4,07 (9,5) 3,81
3-OCH_3	CH_3	55,7	3,75 (6H, m)	56,6	3,81 (s)
1’	C	129,7	-	131,3	-
2’	CH	109,8	6,88 (1H, sl)	110,4	6,91(d, *J* = 1,5)
3’	C	147,4	-	148,8	-
4’	C	145,3	-	146,6	-
5’	CH	115,2	6,73 (2H, sl)	117,9	6,73 (d, *J* = 8,5)
6’	CH	118,0		119,3	6,75 (dd, *J* = 8,5 e 1,5)
7’	CH	81,4	4,75 (1H, d, *J* = 6,8)	83,5	4,80
8’	CH	49,4	3,32 (m)	49,5	3,33(m)
9’	CH_2	69,0	3,73 (2H, m) 3,08 (1H, m)	70,7	3,75 (t, 9,0) 3,23(m)
-OCH_3’	CH_3	55,6	3,75 (6H, m)	56,3	3,80 (s)
1”	CH	100,1	4,87 (1H, d, *J* =7,4)	102,8	4,83 (d, *J* = 7,5)
2”	CH	73,3	3,24 (2H, m)	74,8	3,42
3”	CH	76,9	3,24(2H, m)	77,8	3,40
4”	CH	69,7	3,15 (2H, m)	71,3	3,34
5”	CH	77,1	3,15 (2H, m)	78,2	3,33
6”	CH_2	60,7	3,64 (1H, m) 3,44 (m)	62,4	3,81 (m) 3,63 (dd, *J* = 5,0 e 12,0)

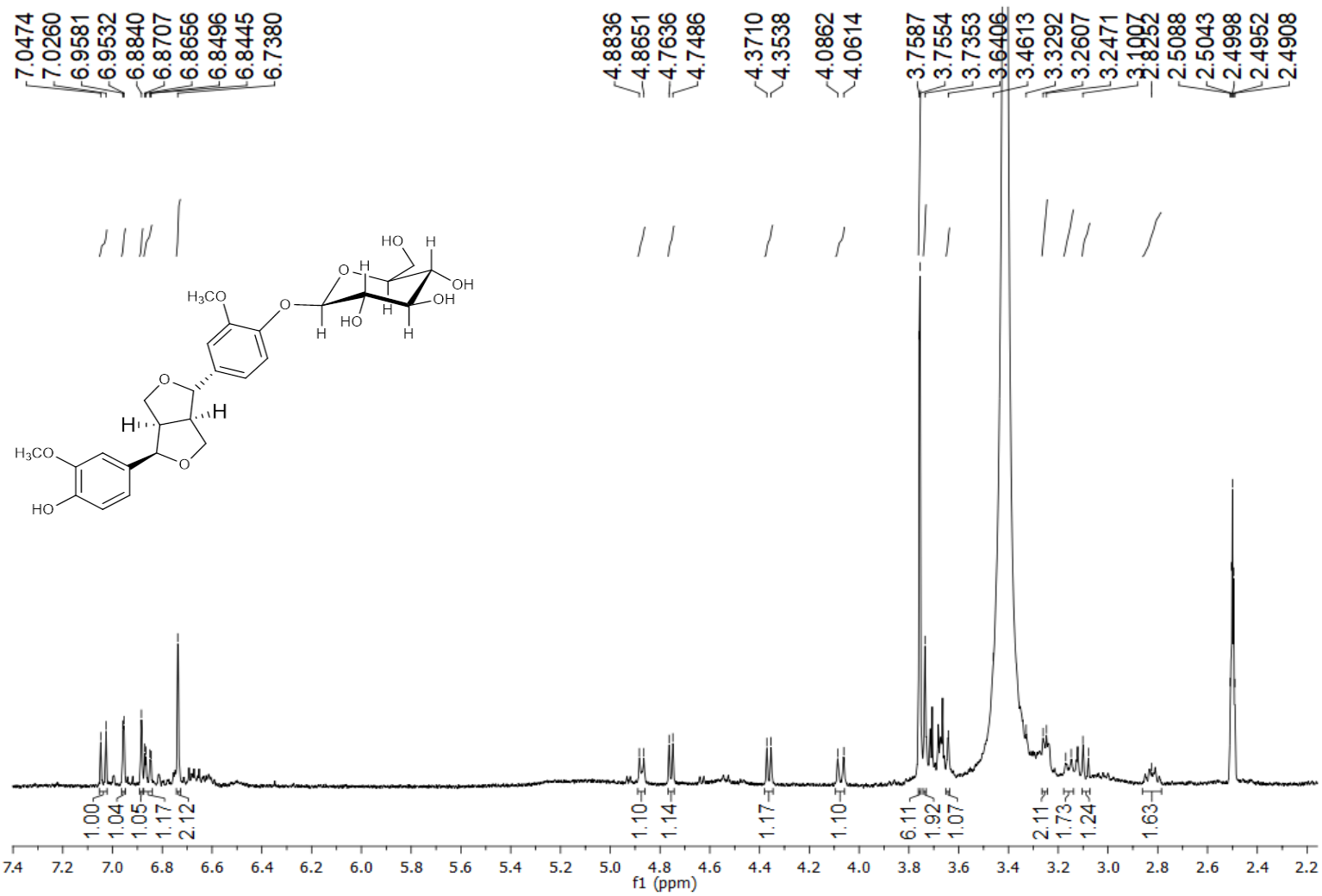


Figura 25. Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, DMSO-*d*6) do composto **9**.

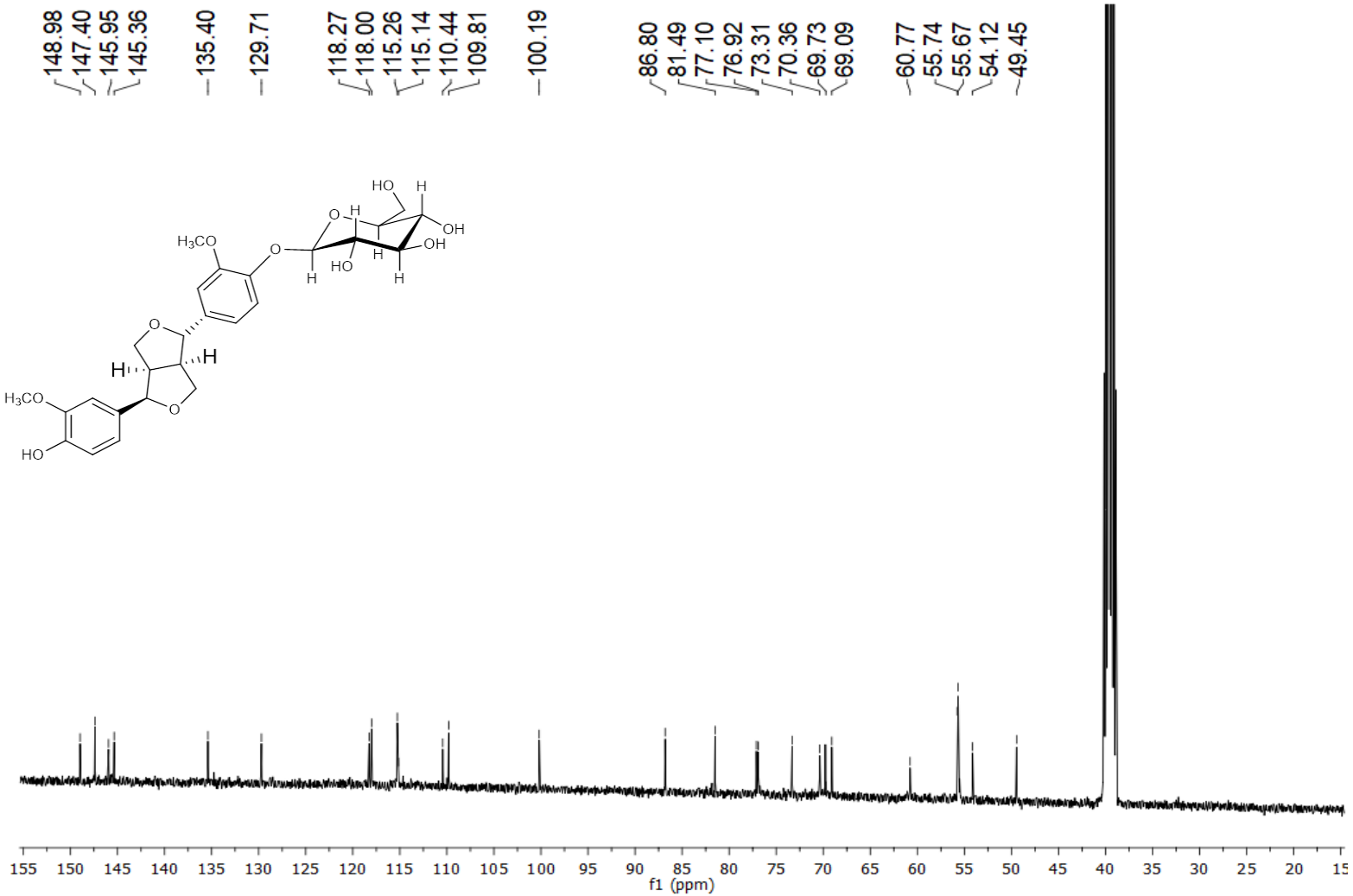


Figura 26. Espectro de RMN de ^{13}C (BB) em DMSO-d_6 (100 MHz) do composto **9**.

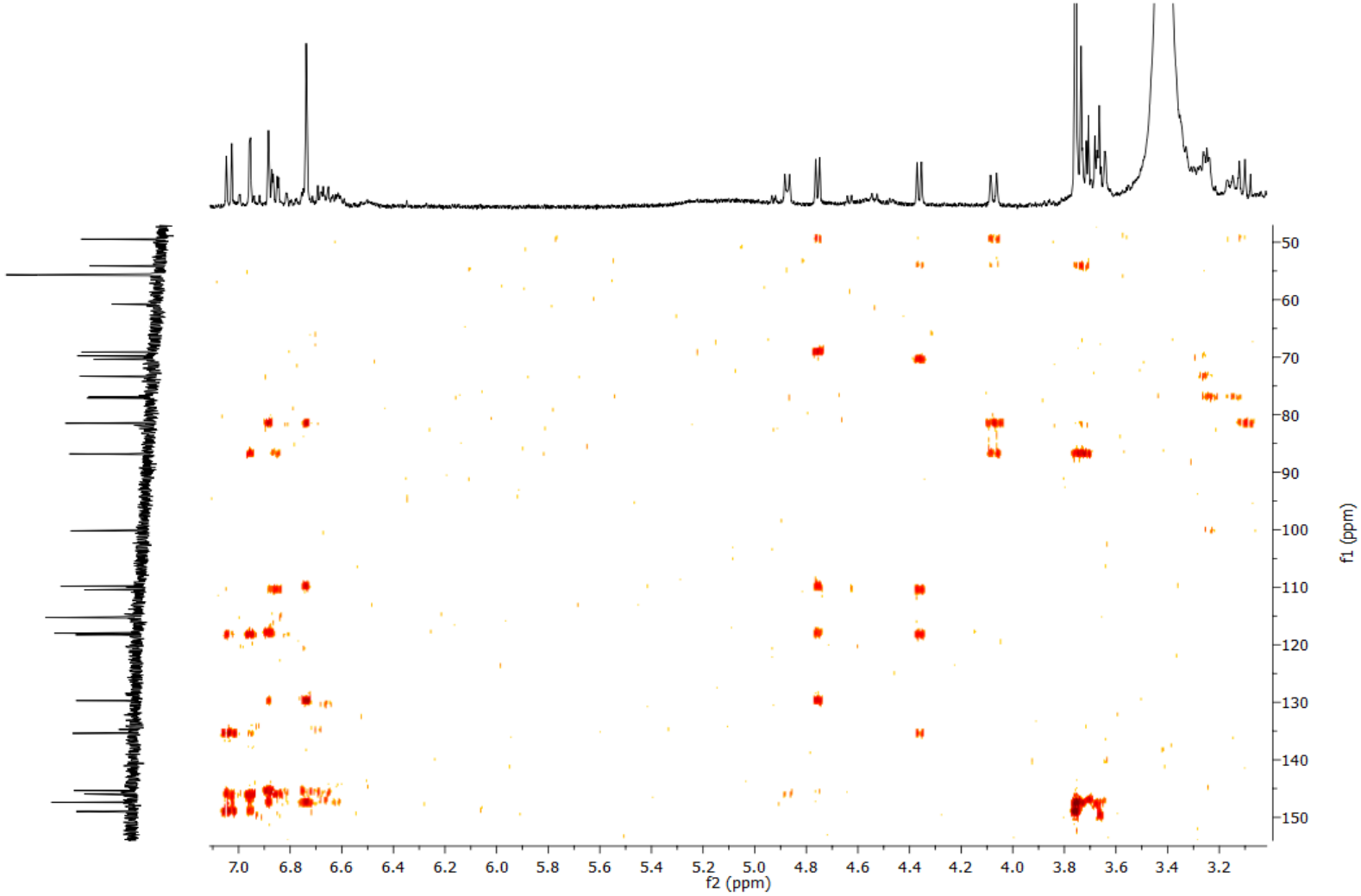


Figura 27. Mapa de contorno ^{1}H x ^{13}C HMBC (400 e 100 MHz, DMSO-*d*6) do composto **9**.

5.3.4 Determinação estrutural do composto 10

O composto **10** apresentou-se como cristais amarelos com 2,6 mg. Ao analisar o espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz) (figura 29) e de ^{13}C (100 MHz) (figura 30) do composto **10**, observou-se a semelhança espectral com o composto **8**, porém o espectro de carbono evidenciava sinais indicativos de uma segunda unidade osídica. Corroborando com o espectro de massas, cujo íon precursor com *m/z* 651 $[M-H]^-$, apresentou em EM/EM o pico base com *m/z* 357 (pinoresinol), indicando a perca de 294 Da, provavelmente de uma unidade de hexose e pentose (162 + 132 = 294) (figura 34).

Através do mapa de contorno de HMQC (figura 31), foi possível definir os sinais da pentose, e devido a correlação existente entre H-4b”’ e H-1” com o carbono quaternário C-3”’ vista por HMBC (figura 32), foi possível inferir que a pentose tratava-se de um unidade de apiose. No mapa de contorno de HMBC, foi observado a correlação a J_3 de H-1”’ da apiose com δ_C 75,1 (C-2”) da glicose e a correlação de a J_3 de H-2” da glicose com o 108,39 (C-1”’) da apiose (figura 33), confirmando a presença de dissacarídeo na molécula, localizado no pinoresinol na posição C4, devido a correlação a J_3 de H-1” da glicose com δ_C 145,9 (C-4). A configuração relativa foi definida de acordo Shao et al. (2018), onde, $\Delta\delta_{H\text{-}9}$ e $\Delta\delta_{H\text{-}9'}$ de do composto **10** corresponderam a 0,40, classificando a molécula como 7-H/8-H *trans*, 7′-H/8′-H *trans.*

De acordo com todos os dados espectroscópicos e espectometricos analisados, o composto **10** foi identificada como pinoresinol 4-*O*-apiosil-(1→2)-*β*-glicosídeo (figura 28), conforme comparado com os dados de Abe e Yamauchi (1989) (tabela 10).

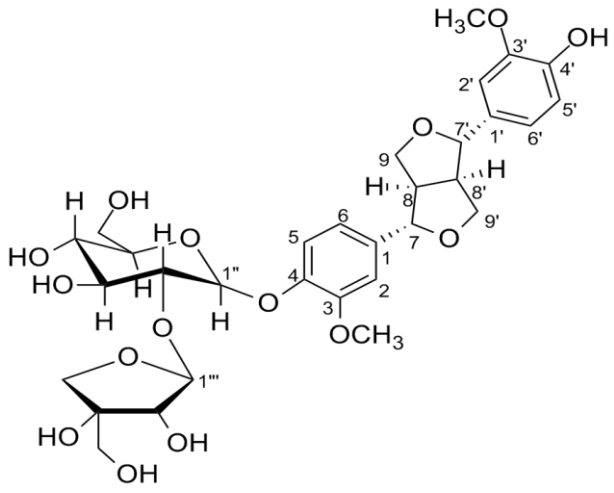


Figura 28. Estrutura química do pinoresinol 4-*O*-apiosil-(1→2)-*β*-glicosídeo.

Tabela 10. Dados de RMN de ^{1}H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) do composto **10**, obtido em DMSO-*d*6 em comparação com os deslocamentos químicos de RMN ^{1}H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) em Piridina-*d*5, do pinoresinol-4-*O*-*β*-D-apiosil-(1→2)-O-β-D-glicosídeo por Abe e Yamauchi (1989).

10						**Pinoresinol-4-*O*-*β*-D-apiosil-(1→2)-*O*-*β*-*D*-glicosídeo**	
Carbono		HSQC		HMBC			
		δ_C	δ_H	(^{2}JCH)	(^{3}JCH)	δ_C	δ_H
1	C	135,2	-		H-5	136, 3	
2	CH	110,5	6,94 (1H, m)		H-6	111, 3	7.20 (d, *J* = 2)
3	C	148,8	-		H-5	147,1	
4	C	145,9	-		H-2, H-6, H-1”	150, 2	
5	CH	115,1	7,00 (1H, m)	H-6		116,5	7,50 (d, *J* = 8)
6	CH	118,7	6,82 (1H, m)		H-2	118,8	6,96 (dd, *J* = 8 e 2)
7	CH	85,2	4,65 (1H, d, *J* = 4)		H-2	86,0	4,91 (d, *J* = 5)
8	CH	53,7	3,04 (2H, m)	H-7		54,7	3,10-3,24 (m)
9	CH_2	71,0	3,73 (2H, m) 4,13 (2H, m)		H-7	71, 9	
3-OCH3	CH_3	55,6	3,76 (6H, s)			56,1	3.84
1’	C	132,2	-			133,1	
2’	CH	110,3	6,88 (1H, m)			110,0	7,24 (d, *J* = 2)
3’	C	147,5	-			147, 8	
4’	C	145,7	-		H-2’	148, 8	
5’	CH	115,0	6,73 (2H, m)			116,4	7,26 (d, *J* = 8)
6’	CH	118,0			H-2’	119,7	7,08 (dd, *J* = 8 e 2)
7’	CH	84,9	4,61 (1H, d, *J* = 4,4)		H-2’	86,3	4,94 (d, *J* = 5)
8’	CH	53,5	3,04 (2H, m)	H-7’		54, 7	3,10-3,24 (m)
9’	CH_2	71,01	3,73 (2H, m)		H-7’	71,9	

			4,13 (2H, m)				
-OCH3’	CH_3	55,6	3,76 (6H, s)			56,0	3,79
1”	CH	98,5	4,86 (1H, d, *J* = 7,6)	H-2”		100,6	5,7(d, *J* = 8)
2”	CH	75,1	3,51 (m)		H-1”’	76,8	4,57 (t, *J* = 8)
3”	CH	77,2	3,44 (m)	H-2”		79,0	4,36 (dd, *J* = 8 e 9)
4”	CH	70,0	3,17 (m)			71,5	4,20 (t, *J* = 9)
5”	CH	76,8	3,29 (m)			78,6	4,00 (m)
6”	CH_2	60,6	3,67 (1H, m) 3,44 (m)			62,3	4,47(dd, *J* = l2 e 2) 4,27 (dd, *J* = 12 e 4)
1”’	CH	108,3	5,41 (1H, m)		H-2”, H-4b”’	110,3	6,62 (s)
2”’	CH	76,1	3,76 (m)			78,0	4,85 (s)
3”’	C	79,3	-	H-4b”’	H-1”’	80,8	
4”’	CH_2	73,9	4,03 (1H, d, *J* = 9,2) 3,57 (1H, d, *J* = 9,2)			75,1	4,43 (d, *J* = 9) 4,91 (d, *J* = 9)
5”’	CH_2	64,5	3,29 (m)		H-4a”’	66,4	

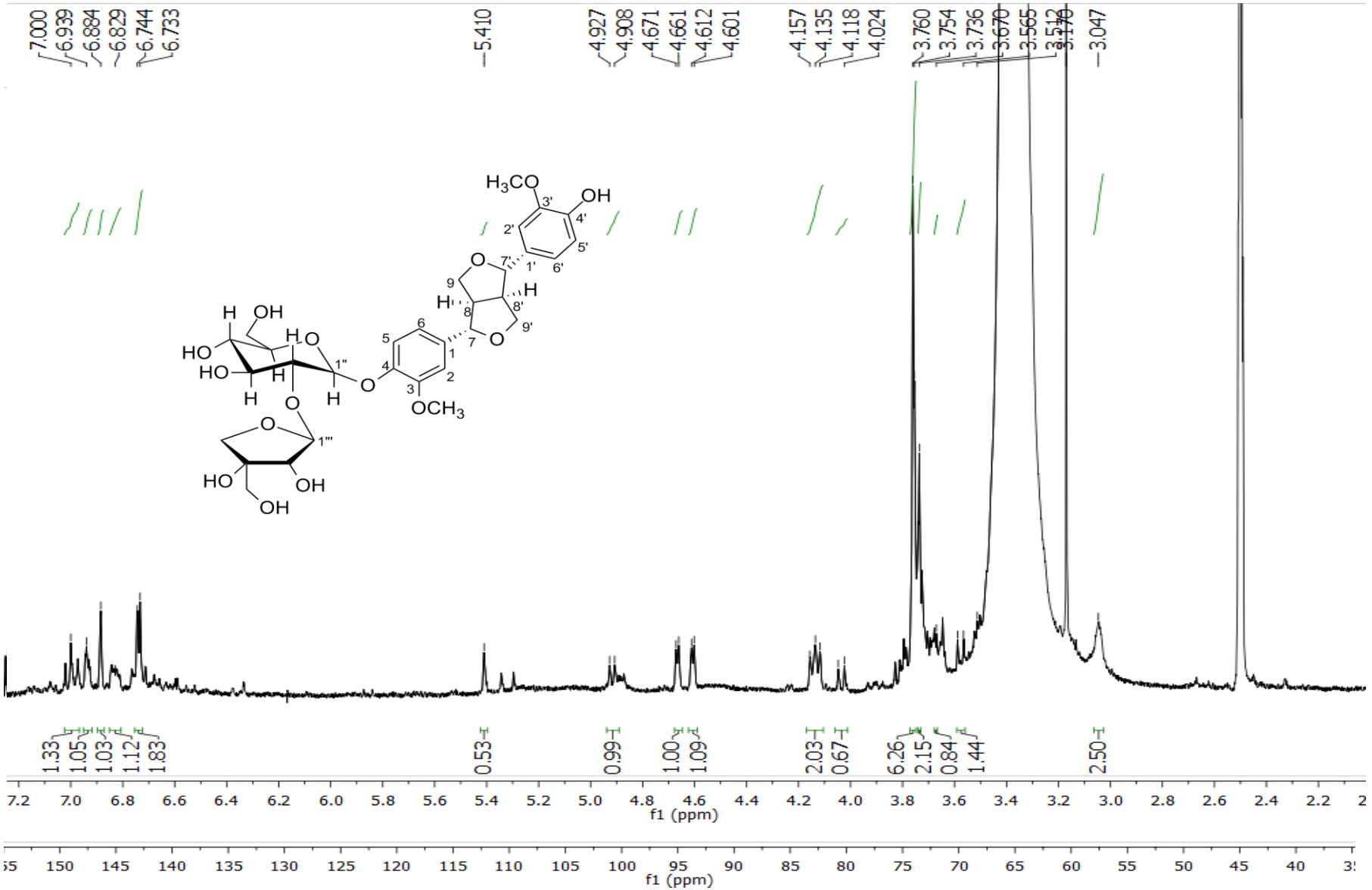


Figura 29. Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, DMSO-*d*6) do composto **10**.

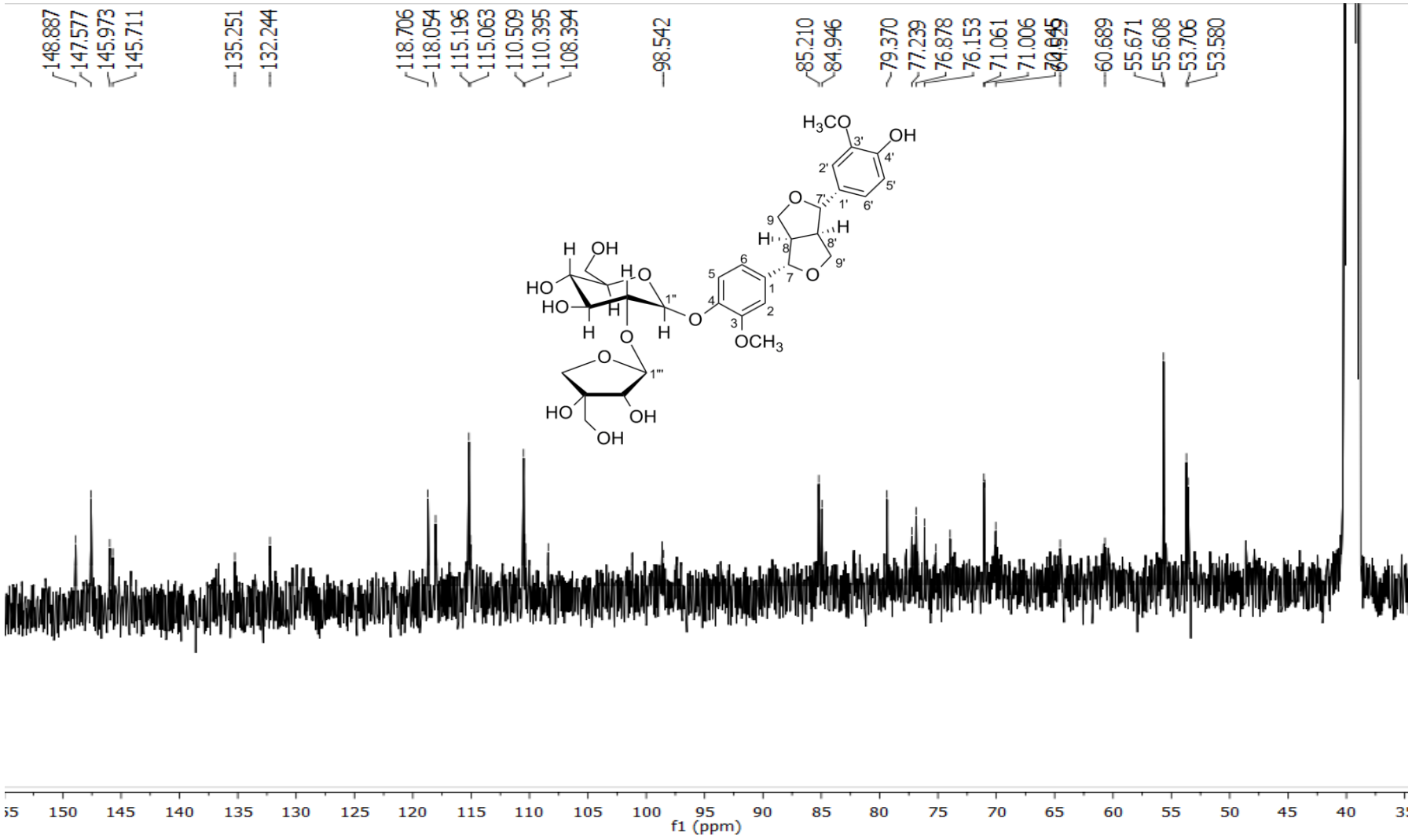


Figura 30. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO-*d*6) do composto **10**.

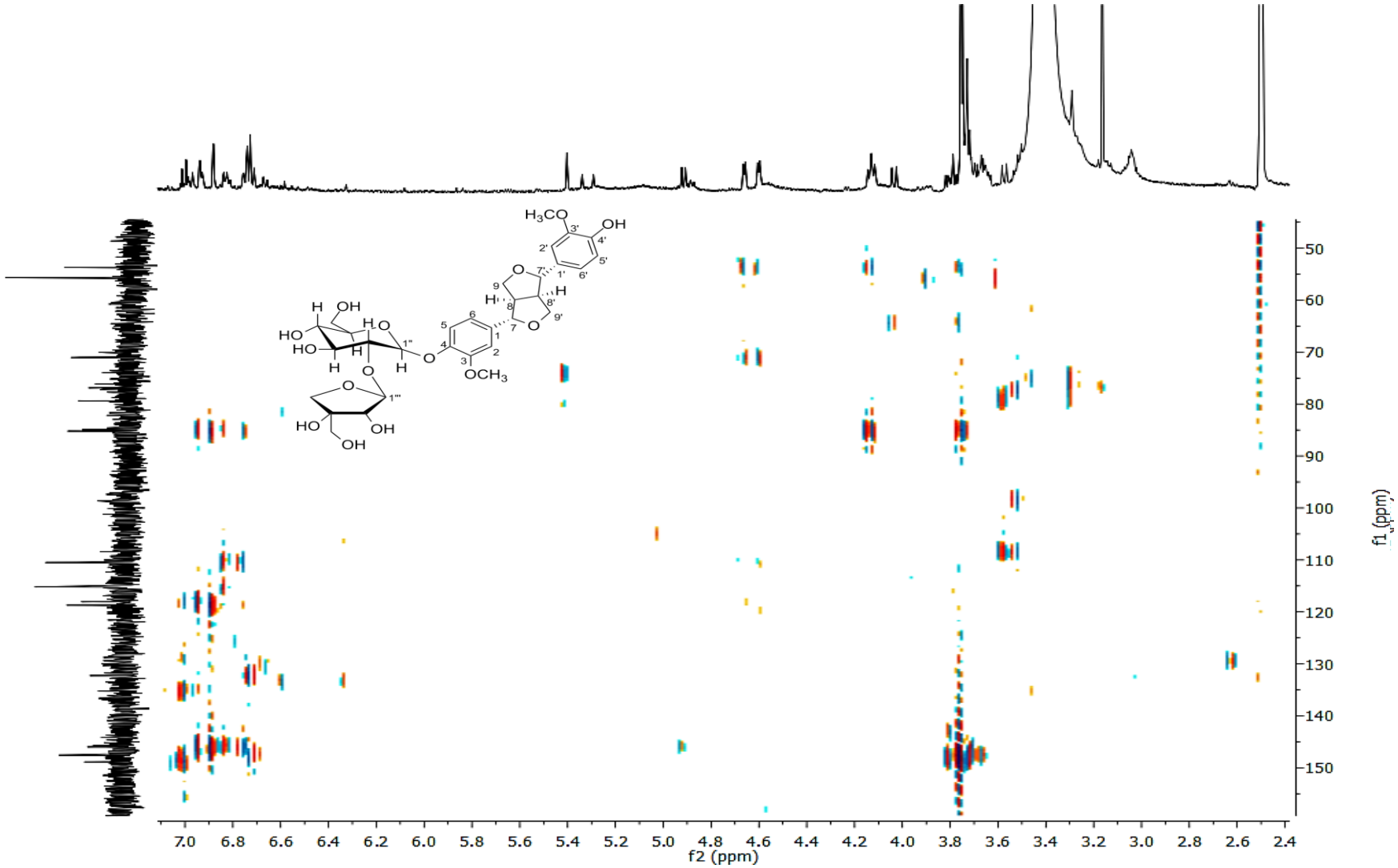


Figura 31. Mapa de contorno ^{1}H x ^{13}C HMQC (400 e 100 MHz, DMSO-*d*6) do composto **10**.

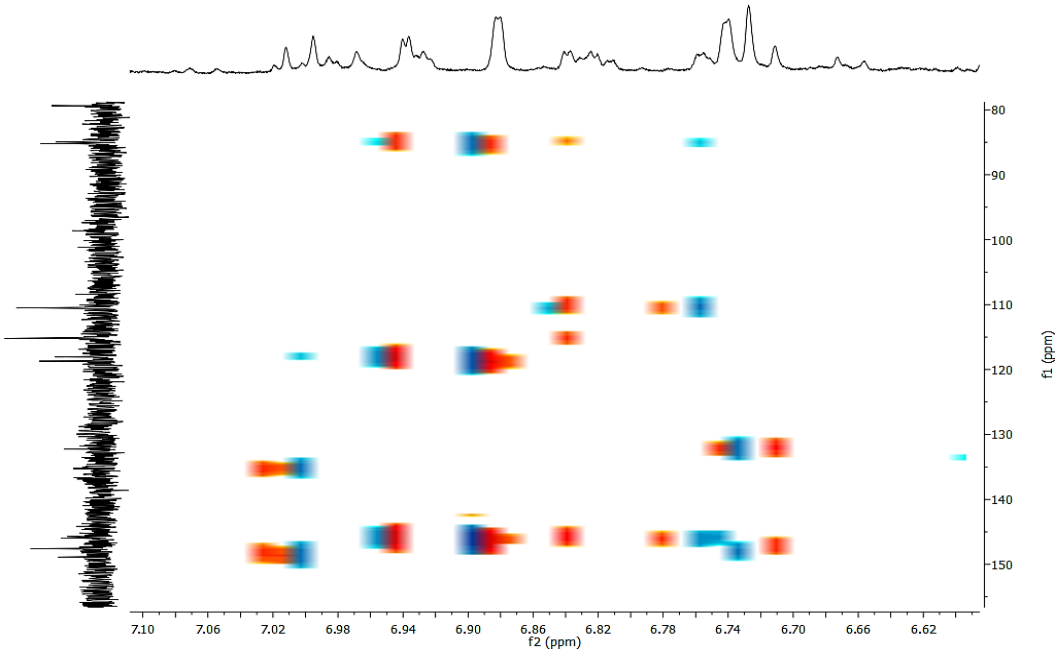


Figura 32. Expansão I do mapa de contorno ^{1}H x ^{13}C HMBC (400 e 100 MHz, DMSO-*d*6) do composto **10**.

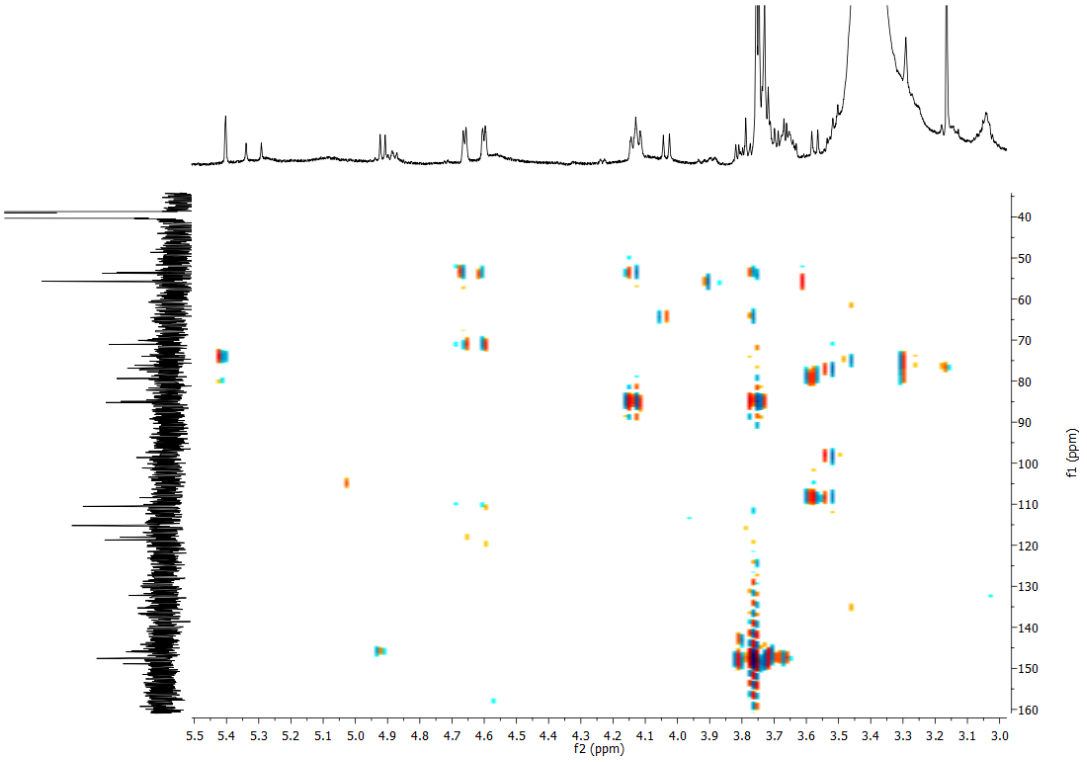


Figura 33. Expansão II do mapa de contorno ^{1}H x ^{13}C HMBC (400 e 100 MHz, DMSO-*d*6) do composto **10**.

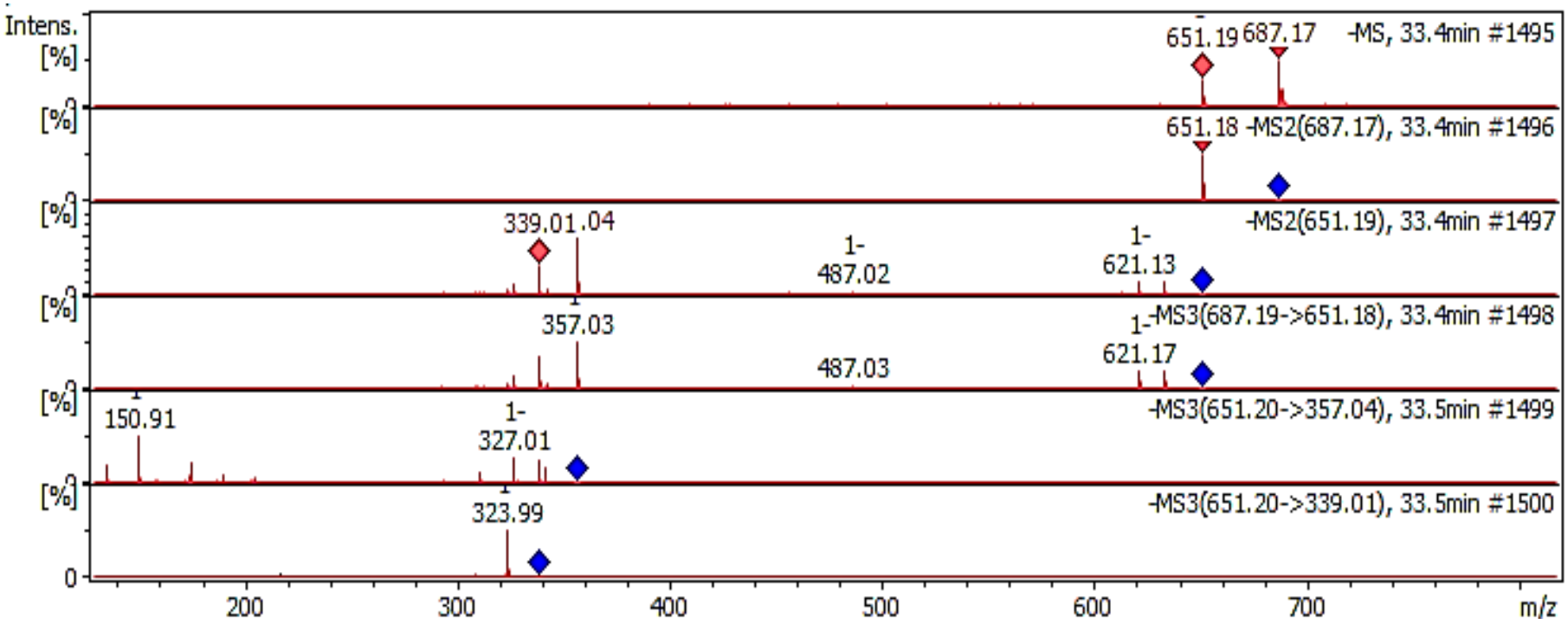


Figura 34. Espectro de massas EM^3 do composto **10** no modo negativo.

5.3.5 Atividade leishmanicida

Após triagem virtual, as moléculas **7-10** demostraram promissora atividade leshmanicida frente as espécies de *L. major* e *L. braziliensis* , para comprovação desta atividade testes *in vitro* foram realizados com as formas promastigotas de *L. major* e *L. braziliensis* (tabela 11).

Tabela 11. Atividade antileishmania dos compostos **7-10** frente as formas promastigotas de *L. major* e *L. braziliensis*.

Composto	**IC_{50} (µM)**	
	L. major	***L. braziliensis***
Secoisolariciresinol (**7**)	-	9,28
Pinoresinol-4-*O*-*β*-D-glicopiranosideo (**8**)	>50	36,35
Epipinoresinol-4-*O*-*β*-D-glucopiranosideo (**9**)	36,51	5,39
Pinoresinol-4-*O*-*β*-D-apiofuranosil-(1→2)-*β*-D-glucopiranosideo (**10**)	>50	13,77
Antimoniato de meglumina*	>40	>40
Anforeticina B*	12,4	18

*controle positivo

Todas as lignanas testadas tiveram atividade frente a *L. braziliensis*, com destaque para a molécula secoisolariciresinol, que apresentou IC_{50} de 9,28 µM, atividade expressiva quando comparada aos controles positivos (tabela 11). As lignanas do tipo furofurânica apresentaram notável atividade leishimanicida, sendo o epipinoresinol-4-*O*-*β*-D-glucopiranosideo a molécula com melhor desempenho, esta foi ativa contra *L. major* e *L. braziliensis*, sendo a molécula mais potente entre as testadas para *L. braziliensis*, portanto essa molécula é uma exelente candidata para prosseguir com testes *in vitro* e *in vivo*. Importante salientar que as pinoresinol-4-*O*-*β*-D-glicopiranosideo e epipinoresinol-4-*O*-*β*-D-glucopiranosideo são estereoisômeros, de acordo com os resultados apresentados a posição do anel não ligado ao resíduo de glicose é relevante para atividade intrínseca destas moléclas frente os alvos das formas promastigotas de *L. major* e *L. braziliensis.* Os resultados desta atividade estão descritos no artigo de Maia et al. (2020).

6. CONCLUSÃO

Após desreplicação usando CL/EM verificou-se uma riqueza de metabólitos secundários na espécie *J. aequilabris*, com presença de ácidos fenólicos, flavonoides e lignanas. A rede molecular permitiu visualizar lignanas de interesse e direcionar o isolamento destas, de forma que, foram isoladas três lignanas inéditas, aequilabrina A, B e C e sete compostos conhecidos: lariciresinol-4′-*O*-*β*-glicosídeo, alantoína e roseosideo, secoisolariciresinol, pinoresinol-4-*O*-*β*-*D*-glicosídeo, epipinoresinol-4-*O*-*β*-*D*-glicosídeo e pinoresinol-4-*O*-*β*-*D*-apiosil-(1→2)-*β*-*D*-glicosideo. Ferramentas computacionais como o docking molecular e triagem virtual permitiram direcionar as lignanas para as atividades farmacológicas promissoras de cada esqueleto. As lignanas derivadas da secoisolariciresinol apresentararam potencial anti-inflamatório *in vitro*, com possível relação estrutura atividade relacionada às substituições em C-9 e C-9'. As lignanas furofurânicas apresentaram atividades leishmanicida proeminente, com resultados melhores que os IFAs usualmente utilizados no tratamento para leishmaniose. Desta forma, conclui-se que o uso de ferramentas como desreplicação, rede molecular e abordagens computacionais são fundamentais para racionalizar o processo de obtenção de produtos naturais e avaliação da atividade farmacológica dos compostos isolados.

REFERÊNCIAS

ABE, F.; YAMAUCHI, T. Lignan glycosides from *Parsonsia laevigata*, **Phytochemistry**. v, 28, n.6, p. 1737-1741, 1998.

ABREU, L. S. *et al.* Tri- and Diterpenoids from Stillingia loranthacea as Inhibitors of Zika Virus Replication. **Journal Natural Products**, v. 82, n. 10, p. 2721-2730, 2019.

AGARWAL, H. S.; KUMAR, V. Mechanism-based approach of medicinal plants mediated treatment of inflammatory disorders: A review. **South African Journal of Botany**, v. 147, p. 380-390, 2022.

ALBUQUERQUE, U.P. *et al*. Medicinal plants of the Caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. **J. Ethnopharmacology**, v.114, p. 325–54, 2007.

ALFENAS, R. C. G.; GERALDO, J. M. Papel da Dieta na Prevenção e no Controle da Inflamação Crônica – Evidências Atuais. **Arq Bras Endocrinol Metab.**, v. 52, p. 951-967, 2008.

ALVAREZ-RIVERA, G. *et al.* Recent applications of high resolution mass spectrometry for the characterization of plant natural products. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 112, p. 87-101, 2019.

AMEEN, M. Cutaneous leishmaniasis: therapeutic strategies and future directions. **Expert Opin. Pharmacother**, v. 16, 2007.

AMIRHAERI, S. *et al*. ^{1}H and ^{13}C NMR Studies on Malonic and Ethyhnalonic Acids and their Cobalt(II1) Complexes. **Inorganica Chimica Acta,** v. 33, p. 57-61, 1979.

ANYASOR, G. N.; OKANLAWON, A. A.; OGUNBIYI, B. Evaluation of anti-inflammatory activity of J*usticia secunda* Vahl leaf extract using in vitro and in vivo inflammation models. **Clinical Phytoscience**, v. 5, n. 1, 2019.

ARRAIS, L.G. *et al.* Atividade antimicrobiana dos extratos metanólicos da raiz, caule e folhas de Croton pulegioides Baill. (Zabelê), **Rev. Bras. Pl. Med.** v. 16, n. 2, p. 316-322. 2014.

ARIAS, J. D. *et al.* An Evolutionary Framework of Acanthaceae Based on Transcriptomes and Genome Skims. **Systematic Botany**, v. 47, n. 3, 2022.

ARON, A. T. *et al.* Reproducible molecular networking of untargeted mass spectrometry data using GNPS. **Nat Protoc**, v. 15, n. 6, p. 1954-1991, 2020.

AZIM, M. *et al.* Therapeutic advances in the topical treatment of cutaneous leishmaniasis: A review. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 15, n. 3, 2021.

BAEK, J. *et al.* Lignan Glycosides and Flavonoid Glycosides from the Aerial Portion of *Lespedeza cuneata* and Their Biological Evaluations. **Molecules**, v. 23, n. 8, 2018.

BANSKOTA, A. H. *et al.* Three New C-14 Oxygenated Taxanes from the Wood of Taxus yunnanensis. **Journal Natural Products**, v. 65, p. 1700-1702, 2002.

BANSKOTA, A. H. *et al.* Secoisolariciresinol and isotaxiresinol inhibit tumor necrosis factor-alpha-dependent hepatic apoptosis in mice. **Life Sci**, v. 74, n. 22, p. 2781-2792, 2004.

BIGGADIKE, K. *et al*. X-ray Crystal Structure of the Novel Enhanced-Affinity Glucocorticoid Agonist Fluticasone Furoate in the Glucocorticoid Receptor-Ligand Binding Domain. **J. Med. Chem.**, v. 51, p. 3349–3352, 2008.

BRAGA RIBEIRO, A. M. *et al.* Antimicrobial activity of *Phyllanthus amarus* Schumach. & Thonn and inhibition of the NorA efflux pump of *Staphylococcus aureus* by Phyllanthin. **Microb Pathog**, v. 130, p. 242-246, 2019.

BRANDÃO, H. N. *et al*. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Quimica Nova**, v. 33, n. 6, p. 1359-1369, 2010.

BRÁS, F.; SARDINHA, R.; PACHECO, A. Therapeutic procedures in the treatment of condylomata acuminata. **Acta Obstet Ginecol Port**, v. 9, n. 5, p. 383-392, 2015.

BRITO, N. C.; RABELLO, A.; COTA, G. F. Efficacy of pentavalent antimoniate intralesional infiltration therapy for cutaneous leishmaniasis: A systematic review. **PLoS One**, v. 12, n. 9, 2017.

BROGI, S. *et al.* Editorial: In silico Methods for Drug Design and Discovery. **Front Chem**, v. 8, p. 612, 2020.

BYSTROM, L. M. *et al.* Characterization of phenolics by LC-UV/vis, LC-MS/MS and sugars by GC in *Melicoccus bijugatus* Jacq. 'Montgomery' fruits. **Food Chem**, v. 111, n. 4, p. 1017-1024, 2008.

CALANI, L. *et al.* Ultra-HPLC-MS(n) (Poly)phenolic profiling and chemometric analysis of juices from ancient Punica granatum L. Cultivars: a nontargeted approach. **J Agric Food Chem**, v. 61, n. 23, p. 5600-5609, 2013.

CARVALHO, R. C. INSUELA, D. B. R.; CARVALHO, V. F. Mecanismos celulares e moleculares da ação antiinflamatória dos glicocorticóides. **Corpus et Scientia**, v.8, n. 2, p. 36-51, 2012.

CERQUEIRA, N. F.; YOSHIDA, W. B. Óxido nítrico. Revisão. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 17, 2002.

CHAGAS, E.C.O.; COSTA-LIMA, J.L. *Justicia* in Flora e Funga do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro.Disponível em: <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB25065>. Acesso em: 15 nov. 2022

CHEN, G.; LI, X.; SALERI, F.; GUO, M. Analysis of Flavonoids in *Rhamnus davurica* and Its Antiproliferative Activities. **Molecules**, v. 21, n. 10, 2016.

CHEN, H. J.; INBARAJ, B. S.; CHEN, B. H. Determination of phenolic acids and flavonoids in *Taraxacum formosanum* Kitam by liquid chromatography-tandem mass

spectrometry coupled with a post-column derivatization technique. **Int J Mol Sci**, v.13, n. 1, p. 260-285, 2012.

CHOI, M. S. *et al.* Meso-dihydroguaiaretic acid induces apoptosis and inhibits cell migration via p38 activation and EGFR/Src/intergrin beta3 downregulation in breast cancer cells. **Life Sci**, v. 141, p. 81-89, 2015.

CHUNG, T. W. *et al.* Machilin A Inhibits Tumor Growth and Macrophage M2 Polarization Through the Reduction of Lactic Acid. **Cancers (Basel)**, v. 11, n. 7, Jul 9 2019.

CIESLA, L.; MOADDEL, R. Comparison of analytical techniques for the identification of bioactive compounds from natural products. **Nat Prod Rep**, v. 33, n. 10, p. 1131-1145, 2016.

CLEMENTE-SOTO, A. F. *et al.* Potential mechanism of action of meso-dihydroguaiaretic acid on *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. **Molecules**, v. 19, n. 12, p. 20170-20182, 2014.

CORRÊA, G. M.; ALCANTARA A. F. C. Chemical constituents and biological activities of species of Justicia - a review. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 1, p. 220-238, 2012.

CÔRTES, A. L. A.; RAPINI, A. Justicieae (Acanthaceae) do Semiárido do Estado da Bahia, Brasil. **Hoehnea**, v. 40, n.2, p. 253-292, 2013.

COZZA, G. The Development of CK2 Inhibitors: From Traditional Pharmacology to *in Silico* Rational Drug Design. **Pharmaceuticals (Basel)**, v.10, n. 1, 2017.

CUI, Q. *et al*. Lignans and Their Derivatives from Plants as Antivirals. **Molecules**, 25, n. 1, 2020.

DAVIS, R. A. *et al*. Isolation, structure elucidation and cytotoxic evaluation of endiandrin B from the Australian rainforest plant *Endiandra anthropophagorum*. **Bioorganic & medicinal chemistry**. v. 14, n. 3, 2009.

DAY, S.H. *et al*. New Lignan Glycosides with Potent Antiinflammatory Effect, Isolated from Justicia ciliata. **Journal of Natural Products**, v.63, p. 1560−1562, 2000.

DEMARQUE, D. P. *et al.* Fragmentation reactions using electrospray ionization mass spectrometry: an important tool for the structural elucidation and characterization of synthetic and natural products. **Nat Prod Rep**, v. 33, n. 3, p. 432-455, 2016.

DENG, Y. *et al*. Wuacanthus (Acanthaceae), a new Chinese endemic genus segregated from Justicia (Acanthaceae). **Plant Diversity**, v.38, n. 6, p. 312-321, 2016.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic approach.** John Wiley e Sons Ltda, United Kingdom, 2ª ed., 2002.

DUARTE, N. *et al.* Phenolic compounds as selective antineoplasic agents against multidrug-resistant human cancer cells. **Planta Med**, v.76, n. 10, p. 975-980, 2010.

EKLUND, P. C. *et al.* Chemical studies on antioxidant mechanisms and free radical scavenging properties of lignans. **Org Biomol Chem**, v. 3, n. 18, p. 3336-3347, 2005.

EKLUND, P. C. *et al.* Identification of lignans by liquid chromatography-electrospray ionization ion-trap mass spectrometry. **J Mass Spectrom**, v. 43, n. 1, p. 97-107, 2008.

EZCURRA, C. El Género *Justicia* (Acanthaceae) en Sudamérica Austral. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 89, n. 2, p. 225-280, 2002.

FARAGA, M. A.; PORZELA, A.; WESSJOHANNA, L. A. Comparative metabolite profiling and fingerprinting of medicinal licorice roots using multiplex approach of GC-MS, LC-MS and 1D-NMR techniques. **Phytochemistry**, v. 76, p. 60-72, 2012.

FENG, X. *et al*. Alashinols F and G, two lignans from stem bark of Syringa pinnatifolia. **Natural Product Research**, 31, n. 13, p. 1555-1560, 2017.

FLEIT, H. B. Chronic Inflammation. In: MCMANUS, L. M; MITCHELL R. N. **Pathobiology of Human Disease: A Dynamic Encyclopedia of Disease Mechanisms**. Elsevier, p. 300-314, 2014.

FREITAS, P. R. *et al*. Abordagens terapêuticas nas doenças inflamatórias: uma revisão. **Revista Interfaces**, v. 7, n. 2, 2019.

FRISCH, G. W. *et al*. **Gaussian 09, Revision A.02**, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2016

FU, M. Q. *et al*. Chemical Constituents from Roots of *Millettia speciose*. **Chinese Herbal Medicines**. v. 8, n.4, p. 385-389, 2016.

FUJIMOTO, N.; KOHTA, R.; KITAMURA, S. Estrogenic activity of an antioxidant, nordihydroguaiaretic acid (NDGA). **Life Sci**, v.74, n. 11, p. 1417-1425, Jan 30 2004.

GAGLIARDI, R. J. Neuroprotection, excitotoxicicity and NMDA antagonists. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 58, p. 583-588, 2000.

GALVAO, E. L.; RABELLO, A.; COTA, G. F. Efficacy of azole therapy for tegumentary leishmaniasis: A systematic review and meta-analysis. **PLoS One**, v. 12, n. 10, 2017.

GANZERA, M.; STURM, S. Recent advances on HPLC/MS in medicinal plant analysis-An update covering 2011-2016. **J Pharm Biomed Anal**, v. 147, p. 211-233, 2018.

GARCÍA-MATEOS, D. *et al.* The Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2) influences the levels of enterolignans and their metabolites in plasma, milk and mammary gland. **Journal of Functional Foods**, v. 35, p. 648-654, 2017.

GAUDENCIO, S. P.; PEREIRA, F. Dereplication: racing to speed up the natural products discovery process. **Nat Prod Rep**, v. 32, n. 6, p. 779-810, 2015.

GHORBANI, M.; FARHOUDI, R. Leishmaniasis in humans: drug or vaccine therapy? **Drug Des Devel Ther**, 12, p. 25-40, 2018.

GRIMBLAT, N.; ZANARDI, M. M.;SAROTTI, A. M. Beyond DP4: an Improved Probability for the Stereochemical Assignment of Isomeric Compounds using Quantum Chemical Calculations of NMR Shifts. **Journal of Organic Chemistry**, v. 80, p.12526−12534, 2015.

GUTIERREZ-REBOLLEDO, G. A.; DRIER-JONAS, S.; JIMENEZ-ARELLANES, M. A. Natural compounds and extracts from Mexican medicinal plants with anti-leishmaniasis activity: An update. **Asian Pac J Trop Med**, v. 10, n. 12, p. 1105-1110, 2017.

HARIKRISHNAN, H. *et al*. Phyllanthin from Phyllanthus amarus inhibits LPS-induced proinflammatory responses in U937 macrophages via downregulation of NF-κB/MAPK/PI3K-Akt signaling pathways. **Phytotherapy Research**, v. 32, p. 1-10, 2018.

HEMMATI, S.; SERADJ, H. Justicidin B: A Promising Bioactive Lignan. **Molecules**, v. 21, n. 7, 2016.

HIRANO, T. *et al*. Differential sensitivity of human gastric cancer ATPase and normal gastric mucosa ATPase to the synthetic mammalian lignan analogue 2,3-dibenzylbutane-1,4-diol (hattalin). **Cancer Invest**, v. 9, n. 2, p. 145-150, 1991.

HIRANO, T.; GOTON, M.; OKA, K. Natural flavonoids and lignans are potent cytostatic agents against human leukemic hl-60 cells. **Life Sciences,** v. 55, n. 13, p. 1061-1069, 1994.

HU, C.; YUAN, Y. V.; KITTS, D. D. Antioxidant activities of the flaxseed lignan secoisolariciresinol diglucoside, its aglycone secoisolariciresinol and the mammalian

lignans enterodiol and enterolactone in vitro. **Food Chem Toxicol**, v. 45, n. 11, p. 2219-2227, 2007.

HUANG, S. W. *et al*. Secoiridoids and lignans from the leaves of *Diospyros kaki* Thunb. with antioxidant and neuroprotective activities. **Journal of Functional Foods**, v. 24 p.183–195, 2016.

JAISWAL, R. *et al.* Profiling and characterization by LC-MSn of the chlorogenic acids and hydroxycinnamoylshikimate esters in mate (Ilex paraguariensis). **J Agric Food Chem**, v. 58, n. 9, p. 5471-5484, 2010.

JEONG, H. J. *et al.* Inhibitory effects of *Saururus chinensis* and its components on stomach cancer cells. **Phytomedicine**, v. 22, n. 2, p. 256-261, 2015.

JIAO, X.; *et al*. A comprehensive application: Molecular docking and network pharmacology for the prediction of bioactive constituents and elucidation of mechanisms of action in component-based Chinese medicine. **Computational Biology and Chemistry**, v. 90, 2021.

JOTHIMANIV, C.; KUMAR, R. S.; SUBRAMANIA, N. Anti-Inflammatory and Analgesic Activities of Ethanol Extract of Aerial Parts of *Justicia gendarussa* Burm. **International Journal of Pharmacology**, v. 6, n. 3, p. 278-283, 2010.

KANCHANAPOOM, T. *et al.* Justiciosides E-G, Triterpenoidal Glycosides with an Unusual Skeleton from *Justicia betonica.* **Tetrahedron, v.** 61, n. 10, 2005.

KANG, K. B. *et al.* Targeted Isolation of Neuroprotective Dicoumaroyl Neolignans and Lignans from *Sageretia theezans* Using in Silico Molecular Network Annotation Propagation-Based Dereplication. **Journal Natural Products**, v. 81, n. 8, p. 1819-1828, 2018.

KAR, S.; LESZCZYNSKI, J. Open access *in silico* tools to predict the ADMET profiling of drug candidates. **Expert Opin Drug Discov**, v. 15, n. 12, p. 1473-1487, 2020.

KASSUYA, C. A. L. **Aspectos gerais da inflamação e da dor**. 1. ed. Dourados: Editora UFGD, 2013.

KAUR, B.; SINGH, P. Inflammation: Biochemistry, cellular targets, anti-inflammatory agents and challenges with special emphasis on cyclooxygenase-2. **Bioorg Chem**, v. 121, 2022.

KAWAGUCHI, Y. *et al.* Antimicrobial activity of stereoisomers of butane-type lignans. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 73, n. 8, p. 1806-1810, 2009.

KERNAN, M. R. *et al*. Two New Lignans with Activity against Influenza Virus from the Medicinal Plant Rhinacanthus nasutus. **J. Nat. Prod.**, v. 60, p. 635-637, 1997.

KEZIMANA, P. *et al.* Secoisolariciresinol Diglucoside of Flaxseed and Its Metabolites: Biosynthesis and Potential for Nutraceuticals. **Front Genet**, v. 9, p. 641, 2018.

KIKUCHI, M.; SUGIYAMA, M. Characterization of lariciresinol glucosides from *osmanthus asiaticus.* **Heterocycles**, v. 36, n. 1, p. 117-121, 1993.

KIND, T.; FIEHN, O. Strategies for dereplication of natural compounds using high-resolution tandem mass spectrometry. **Phytochem Lett**, v. 21, p. 313-319, 2017.

KIYAMA, R. Biological effects induced by estrogenic activity of lignans. **Trends in Food Science & Technology**, v. 54, p. 186-196, 2016.

KPOVIESSI, D. S. *et al.* Validation of a method for the determination of sterols and triterpenes in the aerial part of *Justicia anselliana* (Nees) T. Anders by capillary gas chromatography. **J Pharm Biomed Anal**, v. 48, n. 4, p. 1127-1135, 2008.

KUMAR, K. S. *et al.* Isolation, identification and characterization of apigenin from *Justicia gendarussa* and its anti-inflammatory activity. **Int Immunopharmacol**, v. 59, p. 157-167, 2018.

KWON, H. S. *et al.* Low-density lipoprotein (LDL)-antioxidant lignans from Myristica fragrans seeds. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 18, n. 1, p. 194-198, Jan 1 2008.

LANDETE, J. M. Plant and mammalian lignans: A review of source, intake, metabolism, intestinal bacteria and health. **Food Research International**, v. 46, n. 1, p. 410-424, 2012.

LAUTIÉ, E. *et al.* Unraveling Plant Natural Chemical Diversity for Drug Discovery Purposes. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, 2020.

LEE, K, Y. *et al*. New Secoisolariciresinol Derivatives from *Lindera obtusiloba* Stems and Their Neuroprotective Activities. **Planta Med**, v. 76, n. 3, p. 291-294, 2010.

LEE, S. U. *et al*. Machilin A Isolated from Myristica fragrans Stimulates Osteoblast Differentiation. **Planta Med**, v. 75, p. 152–157, 2009.

LEE, W. S. *et al.* Antioxidant activities of a new lignan and a neolignan from *Saururus chinensis*. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 14, n. 22, p. 5623-5628, 2004.

LI, C.; SEERAM, N. P. Ultra-fast liquid chromatography coupled with electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry for the rapid phenolic profiling of red maple (Acer rubrum) leaves. **J Sep Sci**, v. 41, n. 11, p. 2331-2346, 2018.

LI, J.*et al.* Lariciresinol-4-O-beta-D-glucopyranoside from the root of *Isatis indigotica* inhibits influenza A virus-induced pro-inflammatory response. **J Ethnopharmacol**, v. 174, p. 379-386, 2015.

LI, S. *et al.* Rapid Identification and Assignation of the Active Ingredients in Fufang Banbianlian Injection Using HPLC-DAD-ESI-IT-TOF-MS. **J Chromatogr Sci**, v. 54, n. 7, p. 1225-1237, 2016.

LOCKLEAR, T. D. *et al.* Estrogenic and progestagenic effects of extracts of J*usticia pectoralis* Jacq., an herbal medicine from Costa Rica used for the treatment of menopause and PMS. **Maturitas**, v. 66, n. 3, p. 315-322, 2010.

MA, J. C.; SUNG, H. S.; KIM, Y. C. Neuroprotective lignans from the bark of *Machilus thunbergii*. **Planta Med**, v. 70, n. 1, p. 79-80, 2004.

MA, C. J.; LEE, M. K.; KIM, Y. C. meso-Dihydroguaiaretic acid attenuates the neurotoxic effect of staurosporine in primary rat cortical cultures. **Neuropharmacology**, v. 50, n. 6, p. 733-740, 2006.

MAIA, M. D. S. *et al.* Virtual Screening and the In Vitro Assessment of the Antileishmanial Activity of Lignans. **Molecules**, v. 25, n. 10, 2020.

MANN, S. *et al.* A Review of Leishmaniasis: Current Knowledge and Future Directions. **Curr Trop Med Rep**, v. 8, n. 2, p. 121-132, 2021.

MANZITTO-TRIPP, E. A. *et al.* Revised classification of Acanthaceae and worldwide dichotomous keys. **Taxon**, v. 71, n. 1, p. 103-153, 2021.

MECKES, M. *et al.* Activity of some Mexican medicinal plant extracts on carrageenan-induced rat paw edema. **Phytomedicine**, v.11, n. 5, p. 446-451, 2004.

MESA-SIVERIO, D. *et al.* Structure and estrogenic activity of new lignans from *Iryanthera lancifolia*. **Bioorg Med Chem**, v.16, n. 6, p. 3387-3394, 2008.

MILDER, I. E. *et al.* Lignan contents of Dutch plant foods: a database including lariciresinol, pinoresinol, secoisolariciresinol and matairesinol. **Br J Nutr**, v. 93, n. 3, p. 393-402, 2005.

MONZOTE, L. Current Treatment of Leishmaniasis: A Review. **The Open Antimicrobial Agents Journal**, v. 1, p. 9-19, 2009.

MOON, T. C. *et al.* Meso-dihydroguaiaretic acid isolated from Saururus chinensis inhibits cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase in mouse bone marrow-derived mast cells. **Arch Pharm Res**, v. 31, n. 5, p. 606-610, 2008.

NAKANO, Y. *et al*. Lignans from guaiac resin decrease nitric oxide production in interleukin 1b-treated hepatocytes. **J Nat Med**, v. 71, p. 190–197, 2017.

NAVARRO, E. *et al.* Pharmacological Effects of Elenoside, an Arylnaphthalene Lignan. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 24, n. 3, p. 254-258, 2001.

NESBITT, P.D.; LAM, Y.;THOMPSON, L. U. Human metabolism of mammalian lignan precursors in raw and processed flaxseed. **Am J Clin Nutr.** v. 69, p. 549–555, 1999.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **J Nat Prod**, v. 83, n. 3, p. 770-803, 2020.

NIANBAI FANG, S. Y., AND RONALD L. PRIOR. LC/MS/MS Characterization of Phenolic Constituents in Dried Plums. **J. Agric. Food Chem.**, v. 50, p. 3579−3585, 2002.

OLIVEIRA, D. G.; PRATA, A.P.; FERREIRA, R. A. Herbáceas da Caatinga: composição florística, fitossociologia e estratégias de sobrevivência em uma comunidade vegetal. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 8, n. 4, p. 623-633, 2013.

ONODERA, K.; SATOU, K.; HIROTA, H. Evaluations of Molecular Docking Programs for Virtual Screening. **J. Chem. Inf. Model.**, v. 47, p. 1609-1618, 2007.

ONOJA, S. O. *et al*. Antioxidant, anti-inflammatory and antinociceptive activities of methanolic extract of *Justicia secunda* Vahl leaf. **Alexandria Journal of Medicine**, v. 53, p. 207−213, 2017.

OPRETZKA, L. C. F. *et al.* Natural chromones as potential anti-inflammatory agents: Pharmacological properties and related mechanisms. **Int Immunopharmacol**, v.72, p. 31-39, 2019.

PARVEEN, I. *et al.* Isolation, identification and quantitation of hydroxycinnamic acid conjugates, potential platform chemicals, in the leaves and stems of Miscanthus x giganteus using LC-ESI-MSn. **Phytochemistry**, v. 72, n. 18, p. 2376-2384, 2011.

PEREIRA, L. C. O. *et al.* Bioactive Compounds from the Aerial Parts of *Evolvulus linarioides*. **J Nat Prod**, v. 83, n. 5, p. 1515-1523, 2020.

PEREZ GUTIERREZ, R.; MOTA FLORES, J.; NEIRA GONZALEZ, A. Anti-inflammatory effect of procumbenoside B from *Justicia spicigera* on lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages and zebrafish model. **Pharmacognosy Research**, v. 10, n. 2, p. 218, 2018.

PILON, A. C. *et al.* Redes moleculares: uma análise sobre anotações e descoberta de novos ativos. **Química Nova**, v. 44, n. 9, p. 1168-1179, 2021.

PRASAD, K. Antioxidant Activity of Secoisolariciresinol Diglucoside-derived Metabolites, Secoisolariciresinol, Enterodiol, and Enterolactone. **Int J Angiol**, v. 9, n. 4, p. 220-225, 2000.

PRIETO-MARTÍNEZ, F. D. *et al*. Computational Drug Design Methods—Current and Future Perspectives. p. 19-44, 2019.

RITTER, J. *et al*. **Rang & Dale: Farmacologia**, GEN: Guanabara Koogan, 9ªed., 2020.

ROATT, B. M. *et al.* Recent advances and new strategies on leishmaniasis treatment. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 104, n. 21, p. 8965-8977, 2020.

ROCHAT, B. Proposed Confidence Scale and ID Score in the Identification of Known-Unknown Compounds Using High Resolution MS Data. **J. Am. Soc**. **Mass Spectrom.** v. 28, p. 709–723, 2017.

RODRIGUES, M. V. N. *et al*. O emprego de técnicas hifenadas no estudo de plantas medicinais. ***MultiCiência***, v. 7, 2006.

RODRIGUEZ-MEDINA, I. C. *et al.* Direct characterization of aqueous extract of *Hibiscus sabdariffa* using HPLC with diode array detection coupled to ESI and ion trap MS. **J Sep Sci**, v. 32, n. 20, p. 3441-3448, 2009.

ROJAS, R. *et al.* Antimicrobial activity of selected Peruvian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 88, n. 2-3, p. 199-204, 2003.

RUYCK, J. *et al.* Molecular docking as a popular tool in drug design, an in silico travel. **Adv Appl Bioinform Chem**, v. 9, p. 1-11, 2016.

SANMUGAPRIYA, E; SHANMUGASUNDARAM, P.; VENKATARAMAN, S. Anti-inflammatory activity of Justicia prostrata gamble in acute and sub-acute models of inflammatio. **Inflammopharmacology**, v. 13, p. 493–500, 2005.

SARITHA, B.; BRINDHA, P. Review on Ethnopharmacognosy of *Justicia tranquebariensis* L. – A Traditional Siddha Drug. **International Journal of PharmTech Research**,v. 5, n. 2, p. 467-474, 2013.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; QUISPE, C.; GONZALEZ, B. Phenolic profiling of the South American "Baylahuen" tea (Haplopappus spp., Asteraceae) by HPLC-DAD-ESI-MS. **Molecules**, v. 20, n. 1, p. 913-928, 2015.

SCHYMANSKI, E. L. *et al.* Identifying small molecules via high resolution mass spectrometry: communicating confidence. **Environ Sci Technol**, v. 48, n. 4, p. 2097-2098, 2014.

SHAN, L. *et al.* Rapid Screening of Chemical Constituents in Rhizoma Anemarrhenae by UPLC-Q-TOF/MS Combined with Data Postprocessing Techniques. **Evid Based Complement Alternat Med**, 2017, 2017.

SHAO, S. Y. *et al*. Efficient Method for Determining the Relative Configuration of Furofuran Lignans by ^{1}H NMR Spectroscopy. **J Nat Prod**. v. 81, n.4, p.1023-1028, 2018.

SILVA, M. J.; MELO, J. I. M.; SALES, M. F. Flora da região de xingó, Alagoas e Sergipe: Acanthaceae a. Juss. **Revista Caatinga**, v. 23, n. 2, 2010.

SIMIRGIOTIS, M. J. *et al*. Antioxidant Capacities and Analysis of Phenolic Compounds in Three Endemic Nolana Species by HPLC-PDA-ESI-MS. **Molecules**, v.20, n. 6, p. 11490-11507, 2015.

SIMÕES, C. M. O. *et al*. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento.** Porto Alegre: Artmed, 2017, 486 p.

SIMPSON, M. G. Diversity and Classification of Flowering Plants. In: **Plant Systematics**, 2ª ed.. p. 275-448, 2010.

SOOSARAEI, M. *et al.* Medicinal plants with promising antileishmanial activity in Iran: a systematic review and meta-analysis. **Ann Med Surg (Lond)**, v. 21, p. 63-80, 2017.

SOUZA, L. *et al.* Brazoides A-D, New Alkaloids from Justicia gendarussa Burm. F. Species. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2016.

STEVENSON, R. **Studies in Natural Products Chemis**. Elsevier Science, 1995.

SUMNER, L. W. *et al.* Proposed minimum reporting standards for chemical analysis Chemical Analysis Working Group (CAWG) Metabolomics Standards Initiative (MSI). **Metabolomics**, v.3, n. 3, p. 211-221, 2007.

TEPONNO, R. B.; KUSARI, S.; SPITELLER, M. Recent advances in research on lignans and neolignans. **Natural Product Reports**, v.33, p. 1044-1092, 2016.

THOMSEN, R.; CHRISTENSEN, M. H. MolDock: a new technique for high-accuracy molecular docking. **J Med Chem**, v. 49, n. 11, p. 3315-3321, 2006.

TIAN, S. *et al.* The application of in silico drug-likeness predictions in pharmaceutical research. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 86, p. 2-10, 2015.

TOKUNAGA, S.; WOODIN, B. R.; STEGEMAN, J. J. Plant lignan secoisolariciresinol suppresses pericardial edema caused by dioxin-like compounds in developing zebrafish: Implications for suppression of morphological abnormalities. **Food Chem Toxicol**,v. 96, p. 160-166, 2016.

TOMINAGA, S. *et al.* The Effect of Secoisolariciresinol on 3T3-L1 Adipocytes and the Relationship between Molecular Structure and Activity. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 73, n. 1, p. 35-39, 2009.

TSAI, Y. H.; *et al*. An Integrated Quantum Mechanics-Machine Learning Approach for Ultrafast NMR Structural Elucidation. **Organic Letters**, 2022.

VERDAM, M. C. S. *et al.* Anti-inflammatory action of Justicia acuminatissima leaves. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 3, p. 264-268, 2015.

VINCENTI, F. *et al.* Molecular Networking: A Useful Tool for the Identification of New Psychoactive Substances in Seizures by LC-HRMS. **Front Chem**, v. 8, 2020.

WANG, L. *et al.* Natural products as a gold mine for selective matrix metalloproteinases inhibitors. **Bioorg Med Chem**, v. 20, n. 13, p. 4164-4171, 2012.

WANG, L. X. *et al*. Review of lignans from 2019 to 2021: Newly reported compounds, diverse activities, structure-activity relationships and clinical applications. **Phytochemistry**, v. 202, 2022.

WANG, M. *et al.* Rapid screening and identification of non-target flavonoid components in invasive weeds by LC/MS-IT-TOF. **Analytical Methods**, v. 7, n. 24, p. 10207-10216, 2015.

WANG, M. *et al*. Sharing and community curation of mass spectrometry data with GNPS. **Nat Biotechnol.** v.34, n.8, p. 828–837, 2016.

WANG, Y. *et al.* In silicoADME/T modelling for rational drug design. **Quarterly Reviews of Biophysics**, 48, n. 4, p. 488-515, 2015.

WENCESLAS, K. D. K. *et al.* Anti-inflammatory effects of an aqueous extract of *justicia flava* (forsk) vahl (Acanthaceae) in rats. **Asian J Pharm Clin Res**, v. 14, n. 8, p. 146-153, 2021.

XU, B.; SUNG, C.; HAN, B. Crystal Structure Characterization of Natural Allantoin from Edible Lichen Umbilicaria esculenta. **Crystals**, v. 1, n. 3, p. 128-135, 2011.

XU, Y. *et al.* Bioactive lignans and flavones with in vitro antioxidant and neuroprotective properties from Rubus idaeus rhizome. **Journal of Functional Foods**, v. 32, p. 160-169, 2017.

XU, X. Y.*et al.* Anti-HIV lignans from Justicia procumbens. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v.17, n. 12, p. 945-952, 2019.

YAMANO, Y.; ITO, M. Synthesis of Optically Active Vomifoliol and Roseoside Stereoisomers. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 53, n. 5, p. 541-546, 2005.

YANG, D. *et al*. Phenolics from strawberry cv. Falandi and their antioxidant and alpha-glucosidase inhibitory activities. **Food Chem**, v.194, p. 857-863, 2016.

YANG, H. *et al.* In Silico Prediction of Chemical Toxicity for Drug Design Using Machine Learning Methods and Structural Alerts. **Front Chem**, v. 6, p. 30, 2018.

ZALESAK, F.; BON, D. J. D.; POSPISIL, J. Lignans and Neolignans: Plant secondary metabolites as a reservoir of biologically active substances. **Pharmacol Res**, v. 146, p. 2019.

ZHANG, C. Y. *et al.* Sesquiterpenes and lignans from the flower buds of Daphne genkwa and their nitric oxide inhibitory activities. **Nat Prod Res**, v.32, n. 24, p. 2893-2899, Dec 2018.

ZHANG, L. *et al*. Antioxidant and anti-proliferative activities of five compounds from Schisandra chinensis fruit. **Industrial Crops and Products**, v.50, p. 690-693, 2013.

ZHANG, W.; PEI, J.; LAI, L. Computational Multitarget Drug Design. **J Chem Inf Model**, v. 57, n. 3, p. 403-412, 2017.

ZHANG, Y. *et al.* Compounds Identification in Semen Cuscutae by Ultra-High-Performance Liquid Chromatography (UPLCs) Coupled to Electrospray Ionization Mass Spectrometry. **Molecules**, v.23, n. 5, 2018.

ZHAO, H.; CAFLISCH, A. Molecular dynamics in drug design. **Eur J Med Chem**, v. 91, p. 4-14, 2015.