



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS
GENÉTICOS VEGETAIS**

ADRIANNE BASTOS FERREIRA

**Estudo fitoquímico e potencial bioativo de *Amburana acreana* Ducke
A. C. Sm.**

**Feira de Santana - BA
2024**

ADRIANNE BASTOS FERREIRA

**Estudo fitoquímico e potencial bioativo de *Amburana acreana* Ducke
A. C. Smb.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, da Universidade Estadual de Feira de Santana, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientador:

Prof. Dr. Clayton Queiroz Alves
Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS)

Coorientadores:

Profa. Dra. Rosane Moura Aguiar
Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB)
Prof. Dr. Nelson Gonçalo Mortágua Gomes
Universidade do Porto (UPorto)

**Feira de Santana - BA
2024**

Ficha Catalográfica - Biblioteca Central Julieta Carteadó - UEFS

Ferreira, Adriane Bastos

F439e Estudo fitoquímico e potencial bioativo de *Amburana acreana* Ducke A.C.Sm.
/ Adriane Bastos Ferreira. – 2024. 99 f.; il.

Orientador: Clayton Queiroz Alves

Co-orientadores: Rosane Moura Aguiar, Nelson Gonçalo Mortágua Gomes

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Feira de Santana. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Feira de Santana, 2024.

1.Cumaru-de-Cheiro. 2.Amburosídeo. 3.Metabólitos secundários. 4.RMN.
5.Perfil fenólico. 6.Anti-inflamatório. 7.Leishmaniose. 8.Ancoragem molecular. I.
Alves, Clayton Queiroz, orient. II. Aguiar, Rosane Moura, co-orient. III. Gomes,
Nelson Gonçalo Mortágua, coorient. IV. Universidade Estadual de Feira de Santana. V.
Título.

CDU: 582:615

Maria de Fátima de Jesus Moreira - Bibliotecária - CRB-5/1120

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Angélica Maria Lucchese
(Universidade Estadual de Feira de Santana – UEFS)

Prof. Dr. Franco Henrique Andrade
(Universidade Estadual de Feira de Santana – UEFS)

Profa. Dra. Eliane de Oliveira Silva
(Universidade Federal da Bahia – UFBA)

Mariluze Peixoto Cruz
(Universidade Federal da Bahia – UFBA)

Prof. Dr. Clayton Queiroz Alves
(Universidade Estadual de Feira de Santana – UEFS)
Orientador e Presidente da Banca

Feira de Santana – BA
2024

À mainha, por todo cuidado e afeto.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela força e sabedoria concedida para concluir esta etapa tão importante da minha formação acadêmica.

À minha mainha, pelas palavras de incentivo, pelo afeto, companheirismo e orações diárias ao longo da vida, especialmente, ao longo dessa jornada.

À minha família, meus pais, Adriana e Rogério; meus irmãos, Thayses, Ian e Maria; e ao meu padrasto, Carlos, por compartilharem comigo momentos de alegrias, por seus conselhos e por acreditarem que essa conquista seria possível.

Aos amigos, Anderson, Andrey, Ivan, Kleyton, Leila, Maida e Simone por todo o apoio, pelas palavras de encorajamento, pelos risos e também por enxugar as lágrimas. À Pâmela, que esteve presente em cada momento dessa jornada, trazendo otimismo e sempre ressaltando os aspectos positivos, mesmo nas situações mais adversas.

À Heiddy e Fátima, professoras e amigas queridas, que desde a graduação corroboram com meu crescimento pessoal, acadêmico e profissional. À Profa. Angélica, minha primeira orientadora, agradeço por me acolher em seu laboratório, onde tive meu primeiro contato com a pesquisa científica e me oportunizou seguir na trajetória.

Ao Prof. Clayton Queiroz, meu orientador, pela constante orientação, pelo vasto conhecimento compartilhado e por sempre estar disposto a ajudar. Sua dedicação à pesquisa e à ciência é uma fonte de inspiração.

À Profa. Rosane Moura, minha coorientadora, por seus conselhos valiosos, orientação e pela amizade. Por ser uma referência pra mim, em todos os aspectos.

Ao Prof. Gonçalo Mortágua, meu coorientador na Universidade do Porto, pela recepção gentil e acolhedora, pela orientação científica e pelas sugestões culturais que tornaram minha estadia em Portugal ainda mais enriquecedora.

Aos colegas de laboratório do LABQuim, LABIV, LAEX e LAQV/UP que sempre estiveram dispostos a contribuir positivamente com o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Humberto Freitas, Prof. Dr. Franco Leite e a Bruno Souza pela ajuda e parceria firmada no decorrer desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Rauldenis Santos, por disponibilizar o material vegetal de *Amburana acreana*.

Aos colegas da turma de doutorado do RGV de 2020.1 pelos momentos compartilhados, tanto de alegrias quanto de angustias.

Ao LABAREMN/UFBA, pelas análises de RMN.

Aos servidores do LABEXA, pela solicitude e por tornarem a jornada laboratorial mais leve.

Ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais e aos professores, por todo aprendizado e pela oportunidade de crescimento acadêmico e intelectual.

À Universidade Estadual de Feira de Santana, pela infraestrutura disponibilizada, que foi essencial para a realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), órgãos de fomento que financiaram o desenvolvimento desse trabalho.

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

“A mente que se abre a uma nova ideia, jamais volta ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

RESUMO

Espécies vegetais do gênero *Amburana* são utilizadas na medicina popular para o tratamento de doenças do sistema respiratório. Contudo, ainda são incipientes trabalhos científicos que destacam o potencial terapêutico das espécies. Nesse sentido, esta pesquisa teve como objetivo estudar o perfil fitoquímico do extrato foliar da *Amburana acreana* e avaliar o potencial bioativo dessa espécie. A coleta das folhas e preparo do extrato hidroetanólico (EAA) foram realizados no campus da Universidade Federal de Rondônia (UNIR), no município de Ji-Paraná. No extrato foliar da *A. acreana*, foi possível identificar por CLAE – DAD os seguintes compostos: ácido protocatecuico (1), ácido *p*-hidroxibenzoico (2), ácido vanílico (3), ácido *p*-cumárico (4), ácido siríngico (5), éster 4- β -D-glucopiranosiloxibenzílico (7), cumarina (8), amburosídio B (9) e derivados de flavonol glicosilados (6, 10 e 11). Os compostos 2, 3, 7, 8, 9 e o campesterol glicosilado foram isolados por cromatografia clássica em coluna e identificados por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (1D e 2D). O potencial antioxidante e anti-inflamatório do EAA e do amburosídio B (AMBB) foram avaliados por ensaios *in vitro* através da determinação da concentração de óxido nítrico e da atividade da enzima 5-lipoxigenase. O EAA apresentou $CI_{50} = 347,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $CI_{50} = 151,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ para redução dos níveis de NO e redução da atividade enzimática da 5-LOX, respectivamente. Já o AMBB reduziu os níveis de NO nas concentrações dependentes testadas (6,2 a 200 μM). No entanto, o composto apresentou redução da atividade enzimática da 5-LOX apenas na concentração de 100 μM , a maior concentração testada. O EAA e o AMBB também foram avaliados quanto à sua toxicidade por meio do ensaio com MTT, e ambos não apresentaram alteração mitocondrial em células de SH-SY5Y. Além disso, uma triagem *in vitro* utilizando o ensaio de deslocamento térmico e ensaios *in silico* de dinâmica molecular com o AMBB foi realizada para avaliar a capacidade antileishmania do composto. Os resultados demonstraram que o AMBB apresenta atividade antiparasitária e pode ser um composto promissor no desenvolvimento de novos fármacos contra leishmaniose.

Palavras-chave: “*Cumaru-de-Cheiro*”, amburosídio, metabólitos secundários, RMN, perfil fenólico, anti-inflamatório, leishmaniose, ancoragem molecular.

ABSTRACT

Plant species of the *Amburana* genus are used in folk medicine to treat diseases of the respiratory system. However, scientific studies highlighting the therapeutic potential of these species are still incipient. In this sense, this study aimed to study the phytochemical profile of the leaf extract of *Amburana acreana* and evaluate the bioactive potential of this species. The collection of leaves and preparation of the hydroethanolic extract (EAA) were carried out on the campus of the Federal University of Rondônia (UNIR), in the city of Ji-Paraná. In the leaf extract of *A. acreana*, it was possible to identify the following compounds by HPLC – DAD: protocatechuic acid (**1**), *p*-hydroxybenzoic acid (**2**), vanillic acid (**3**), *p*-coumaric acid (**4**), syringic acid (**5**), 4- β -D-glucopyranosyloxybenzyl ester (**7**), coumarin (**8**), amburoside B (**9**) and glycosylated flavonol derivatives (**6**, **10** and **11**). Compounds **2**, **3**, **7**, **8**, **9** and glycosylated campesterol were isolated by classical column chromatography and identified by Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy (1D and 2D). The antioxidant and anti-inflammatory potential of EAA and amburoside B (AMBB) were evaluated by *in vitro* assays by determining the nitric oxide concentration and 5-lipoxygenase enzyme activity. EAA showed $IC_{50} = 347.2 \mu\text{g mL}^{-1}$ and $IC_{50} = 151.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ for reducing NO levels and reducing 5-LOX enzymatic activity, respectively. AMBB reduced NO levels at the concentrations tested (6.2 to 200.0 μM). However, the compound showed a reduction in 5-LOX enzymatic activity only at a concentration of 100.0 μM , the highest concentration tested. EAA and AMBB were also evaluated for toxicity using the MTT assay, and both did not show mitochondrial alterations in SH-SY5Y cells. In addition, an *in vitro* screening using the thermal shift assay and *in silico* molecular dynamics assays with AMBB was performed to evaluate the antileishmanial capacity of the compound. The results demonstrated that AMBB has antiparasitic activity and may be a promising compound in the development of new drugs against leishmaniasis.

Keywords: “Cumaru-de-Cheiro”, amburoside, secondary metabolites, NMR, phenolic profile, anti-inflammatory, leishmaniasis, molecular docking.

LISTA DE FIGURAS

REFERENCIAL TEÓRICO

Figura 1. Alguns metabólitos especializados identificados no extrato do caule de *Amburana cearensis*. 1,2-benzopirona (1); ácido vanílico (2); ácido protocatecuico (3); β -sitosterol glicosilado; estigmasterol glicosilado (4); afrormosina (5); campeferol (6); isocampferídio (7); 4'-metoxifisetina (8); quercetina (9), amburosídio A (10) e amburosídio B (11).

Figura 2. Amburosídeos: A (1); B (2); C (3); D (4); E (5); F (6); G (7); H (8).

Figura 3. *Amburana acreana*, acesso, folhas e caule.

CAPÍTULO I

Figura 1. *Amburana acreana*, tronco e partes aéreas.

Figura 2. Fluxograma da metodologia de isolamento das seis substâncias químicas obtidas do extrato hidroetanólico das folhas *Amburana acreana*.

Figura 3. Representação estrutural dos compostos químicos isolados das folhas de *Amburana acreana*. (1) cumarina; (2) ácido *p*-hidroxibenzoico; (3) ácido vanílico; (4) campesterol glicosilado, (5) amburosídio B e (6) amburosídio I.

Figura 4: Concentração inibitória mínima do meropenem ($> 32 \mu\text{g mL}^{-1}$) em termos do percentual de inibição do crescimento bacteriano ($> 70\%$).

Figura 5. Concentração inibitória mínima (CIM) do amburosídio B ($1000 \mu\text{M}$) em termos de percentual de inibição do crescimento bacteriano ($19,3 \pm 0,5\%$) e a concentração inibitória fracionada (CIF) do amburosídio B combinada com o meropenem ($4 \mu\text{g mL}^{-1}$) em termos do percentual inibitório do crescimento bacteriano.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Figura S1. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3 , δ_{H} ppm) da cumarina isolada das folhas de *Amburana acreana*.

Figura S2. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3 , δ_{C} ppm) da cumarina isolada das folhas *Amburana acreana*.

Figura S3. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD , δ_{H} ppm) do composto ácido *p*-hidroxibenzoico isolado das folhas de *Amburana acreana*.

Figura S4. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CD_3OD , δ_{C} ppm) do composto ácido *p*-hidroxibenzoico isolado das folhas de *Amburana acreana*.

Figura S5. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD , δ_{H} ppm) do composto ácido vanílico isolado das folhas de *Amburana acreana*.

Figure S6. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CD_3OD , δ_{C} ppm) do composto ácido vanílico isolado das folhas *Amburana acreana*.

Figura S7. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD , δ_{H} ppm) do campesterol 3- β -D-glicosídeo composto isolado das folhas *Amburana acreana*.

Figura S8. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CD_3OD , δ_{C} ppm) do campesterol 3- β -D-glicosídeo isolado das folhas *Amburana acreana*.

Figura S9. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD , δ_{H} ppm) do amburosídeo B isolado das folhas de *Amburana acreana*.

Figura S10. Espectro de RMN de ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD , δ_{C} ppm) do amburosídeo B isolado das folhas de *Amburana acreana*.

Figura S11. Espectro de RMN de ^{13}C -DEPT 135 (125 MHz, CD_3OD , δ_{C} ppm) do amburosídeo B isolado das folhas de *Amburana acreana*.

Figura S12. HMQC mapa de contorno (CD_3OD , 125 x 500 MHz) do amburosídeo B.

Figura S13. HMBC mapa de contorno (CD_3OD , 125 x 500 MHz) do amburosídeo B.

Figura S14. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO, δ_{H} ppm) do amburosídeo I isolado das folhas de *Amburana acreana*.

Figura S15. Espectro de RMN de ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO, δ_{C} ppm) do amburosídeo I isolado das folhas de *Amburana acreana*.

Figura S16. HMQC mapa de contorno (DMSO, 125 x 500 MHz) do amburosídeo I.

Figura S17. HMBC mapa de contorno (DMSO, 125 x 500 MHz) do amburosídeo I.

CAPÍTULO II

Figura 1. Cromatograma CLAE-UV (280 nm) do extrato de hidroetanólico obtido das folhas de *A. acreana*. Identidade dos compostos como na Tabela 1.

Figura 2. Estrutura química dos compostos quantificados no extrato hidroetanólico da folha de *A. acreana*.

Figura 3. Efeitos de eliminação do extrato de folhas de *A. acreana* nos níveis de $\cdot\text{NO}$. Os resultados são mostrados como média $\pm$ SEM de três experimentos independentes realizados em triplicata. Significância estatística: *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Figura 4. Efeitos do extrato da folha de *A. acreana* na atividade enzimática de 5-LOX. Os resultados são mostrados como média $\pm$ SEM de três experimentos independentes realizados em triplicata. Significância estatística: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Figura 5. Efeitos do extrato da folha de *A. acreana* sobre a competência mitocondrial das células SH-SY5Y. Os resultados são mostrados como média $\pm$ SEM de três experimentos independentes realizados em triplicata.

CAPÍTULO III

Figura 1. Efeitos do amburosídio B isolado do extrato hidroetanólico das folhas de *Amburana acreana*: 1a) sobre os níveis de NO; 1b) inibitórios contra a atividade enzimática da 5-lipoxigenase; 1c) viabilidade de células neurais SH-SY5Y após 24 h de exposição.

Figura 2. Triagem do amburosídio B como potencial ligante de LbSOD a 2mM, no ensaio de deslocamento térmico (em comparação com o controle).

Figura 3. Posição de ancoragem mais favorável do amburosídio B em LmSOD ($-7,0 \text{ kcal mol}^{-1}$), analisada no servidor PLIP. Resíduos de proteína são mostrados em bastões azuis e AMBB é mostrado em bastões laranja (linhas azuis = ligações de hidrogênio; linhas cinzas tracejadas = interações hidrofóbicas; linhas amarelas tracejadas = pontes de salinas; linhas laranja tracejadas = interação π -cátion).

Figura 4. Estrutura representativa (tempo = 47150ps) da conformação LmSOD mais populosa ao longo da corrida DM (100000 ps). LmSOD é mostrado em 3D azul, AMBB é mostrado em bastões amarelos e os íons ferro são mostrados em esferas laranjas.

Figura 5. Gráfico de valores de RMSD para LmSOD (backbone) durante a execução do complexo de amburosídio B.

Figura 6. a) Gráfico de valores de FQMC para os resíduos da estrutura principal do LmSOD durante a execução do complexo AMBB (cadeia A = vermelho; cadeia B = rosa). b) Representação em 3D dos resultados de FQMC para LmSOD na execução do complexo AMBB. As regiões de pico de FQMC (acima da FQMC média) são rotuladas e destacadas (vermelho na cadeia A e rosa na cadeia B). AMBB é mostrado em bastões amarelos.

Figura 7. Gráfico do raio de rotação total para LmSOD durante a execução do complexo LmSOD/AMBB.

Figura 8. Gráfico da energia total do complexo LmSOD/AMBB durante a execução da DM.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Dados do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD , δ_{H} ppm) and ^{13}C (125 MHz, CD_3OD , δ_{C} ppm) do amburosídio B (5) isolado da porção clorofórmica do extrato hidroetanólico das folhas de *Amburana acreana* comparado com dados da literatura (Bravo *et al.*, 1999).

Tabela 2. Dados do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO, δ_{H} ppm) and ^{13}C (125 MHz, DMSO, δ_{C} ppm) do amburosídio I (6) isolado da porção clorofórmica do extrato hidroetanólico das folhas de *Amburana acreana* comparado com dados da literatura (Zidorn, Ellmerer-Müller, Stuppner, 2001).

MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela S1. Constituintes químicos isolados da porção clorofórmica do extrato foliar da *Amburana acreana*, com respectivas frações, identificação do composto, gradiente do solvente, massa obtida e solventes deuterados utilizados para análises de RMN de ^1H e ^{13}C .

Tabela S2. Dados do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3 , δ_{H} ppm) e ^{13}C (125 MHz, CDCl_3 , δ_{C} ppm) do perfil da cumarina (1) isolada da porção clorofórmica do extrato hidroetanólico das folhas de *Amburana acreana* comparado com dados da literatura (Duddeck e Kaiser, 1982).

Tabela S3. Dados do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD , δ_{H} ppm) and ^{13}C (125 MHz, CD_3OD , δ_{C} ppm) do ácido *p*-hidroxibenzoico (2) isolado da porção clorofórmica do extrato

hidroetanólico das folhas de *Amburana acreana* comparado com dados da literatura (Wang *et al.*, 2018).

Tabela S4. Dados do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD , δ_{H} ppm) e ^{13}C (125 MHz, CD_3OD , δ_{C} ppm) do ácido vanílico (**3**) isolado da porção clorofórmica do extrato hidroetanólico das folhas de *Amburana acreana* comparado com dados da literatura (WANG *et al.*, 2018).

Tabela S5. Dados do espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , δ_{H} ppm, 500 MHz,) and ^{13}C (CD_3OD , 125 MHz δ_{C} ppm) do campesterol 3- β -D-glicosídeo (**4**) isolado da porção clorofórmica do extrato hidroetanólico das folhas de *Amburana acreana* comparado com dados da literatura (JOHNSON *et al.*, 2020).

CAPÍTULO II

Tabela 1. Conteúdo de constituintes fenólicos no extrato hidroetanólico das folhas de *A. acreana*, análise de equação de regressão linear, LOD^a e LOQ^b.

CAPÍTULO III

Tabela 1. Ligações de hidrogênio com tempo de permanência $\geq 10\%$ no complexo LmSOD/AMBB calculado com Hbmap2grace.

LISTA DE ABREVIATURAS/SIGLAS/SÍMBOLOS

$\cdot\text{NO}$	Radical de óxido nítrico
5-LOX	5-lipoxigenase
AEE	Extrato de <i>Amburana acreana</i>
AMBA	Amburosídeo A
AMBB	Amburosídeo B
AMBI	Amburosídeo I
CC	Coluna Cromatográfica
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CCDP	Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
CD_3OD	Metanol deuterado

CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
CH ₃ COCH ₃	Acetona
CLAE – DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de fóton diodo
DEPT	Distortionless <i>Enhancement by Polarization Transfer</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
FBS	Soro bovino fetal
FQMR	Flutuação Quadrática Média da Raiz
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
LbSOD	Superóxido dismutase de <i>Leishmania braziliensis</i>
LC	Leishmaniose Cutânea
LmSOS	Superóxido dismutase de <i>Leishmania major</i>
LOD	Limite de detecção
LOQ	Limite de quantificação
MTT	tetrazólio azul de tiazolil
ONOO ⁻	Peroxinitrito
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMSD	Root-Mean-Square Deviation
S	Inclinação da reta
T _m	Temperatura de desnaturação
ΔT _m	Variação da temperatura de desnaturação
σ	Desvio padrão residual

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	19
REFERÊNCIAS.....	21
2 REFERENCIAL TEÓRICO	22
2.1 Família Fabaceae Lindl.....	22
2.3 Gênero <i>Amburana</i> Schwacke & Taubert.....	23
2.3.1 Potenciais atividades biológicas do gênero <i>Amburana</i>	24
2.3.2 Principais metabólitos especializados do gênero <i>Amburana</i>	27
2.2.3 <i>Amburana acreana</i>	29
REFERÊNCIAS.....	31
CAPÍTULO I: Constituintes Químicos das folhas de <i>Amburana acreana</i> Ducke A. C. Sm.	36
1 INTRODUÇÃO	37
2 MATERIAL E MÉTODOS	38
2.1 Material vegetal	38
2.2 Extração e isolamento dos constituintes químicos.....	39
2.3 Composição química por RMN.....	41
2.4 Ensaios bacterianos <i>in vitro</i>	42
2.4.1 Modelo bacteriano e condições de cultura	42
2.4.3 Determinação da Concentração Inibitória Fracionada (CIF)	43
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
3.1 Identificação dos compostos	43
3.2 Ensaios <i>in vitro</i>	51
4 CONCLUSÕES.....	53
REFERÊNCIAS.....	53
MATERIAL SUPLEMENTAR.....	56
CAPÍTULO II: Perfil fenólico, efeitos anti-inflamatórios e antioxidante de <i>Amburana acreana</i> Ducke	67
1 INTRODUÇÃO	68
2 MATERIAL E MÉTODOS	69
2.1 Produtos químicos, reagentes e equipamentos gerais	69
2.2 Material vegetal e extração.....	70
2.3 Caracterização qualitativa e quantitativa por CLAE-DAD	70
2.4 Efeitos de eliminação sobre o radical óxido nítrico (*NO)	71

2.5 Efeito inibitório da 5-lipoxigenase.....	71
2.6 Impacto na viabilidade celular de células neuronais SH-SY5Y	72
2.7 Análises estatísticas.....	72
3 RESULTADOS	72
3.1 Caracterização qualitativa e quantitativa do extrato foliar de <i>A. acreana</i> por CLAE-DAD.....	72
3.2 Extrato foliar de <i>A. acreana</i> e neutralização dos radicais $\cdot\text{NO}$	75
3.3 O extrato das folhas de <i>A. acreana</i> inibe significativamente a 5-LOX	76
3.4 Perfil toxicológico do extrato foliar de <i>A. acreana</i> sobre células SH-SY5Y neuronais ...	76
4 DISCUSSÃO	77
4.1 Bioativos fenólicos presentes nas folhas de <i>A. acreana</i>	77
4.2 Efeitos anti-inflamatórios e antirradicais do extrato foliar de <i>A. acreana</i> e possível influência da ação neuroprotetora	78
5 CONCLUSÕES.....	79
REFERÊNCIAS.....	79
CAPÍTULO III: Efeitos anti-inflamatórios <i>in vitro</i> e potencial leishmanicida <i>in silico</i> do amburosídio B, um glicosídeo fenólico de <i>Amburana acreana</i> Ducke	83
1 INTRODUÇÃO	84
2 MATERIAL E MÉTODOS	85
2.1 Isolamento do amburosídio B.....	85
2.2 Redução dos níveis de radicais de óxido nítrico, inibição da 5-lipoxigenase e viabilidade celular em células neurais	86
2.3 Ensaio leishmanicida <i>in vitro</i> e <i>in silico</i> com amburosídio B.....	86
2.3.1 Ensaio de deslocamento térmico (ThermoFluor [®]).....	86
2.3.2 Triagem do amburosídio B por ThermoFluor [®]	87
2.3.3 Atividade antileishmania <i>in silico</i> com AMBB.....	87
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	88
3.1 Potencial redutor dos radicais de NO, inibição da 5-LOX e viabilidade celular.....	88
3.2 Amburosídio B como potencial modulador de LbSOD por ThermoFluor [®]	90
3.3 Ensaio <i>in silico</i>	91
3.3.1 Potencial leishmanicida do Amburosídio B	91
4 CONCLUSÕES.....	97
REFERÊNCIAS.....	97
CONCLUSÃO GERAL	99

1 INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é considerado um dos países com maior biodiversidade do mundo, distribuída nos biomas da Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal. A preservação desses recursos genéticos juntamente com o conhecimento tradicional associado é essencial para a manutenção da variabilidade genética natural e dos ecossistemas. No entanto, preservar essa biodiversidade tem sido um grande desafio (Santos; Silva; Faria, 2023).

Historicamente, as plantas têm sido amplamente utilizadas na medicina popular, como fonte medicinal. Atualmente, medicamentos à base de plantas continuam sendo um dos principais recursos terapêuticos tanto em países em desenvolvimento quanto em países desenvolvidos. As espécies vegetais são frequentemente estudadas na busca por novos fármacos que possam prevenir e tratar doenças em diferentes áreas. Uma vez que as plantas contêm metabólitos especializados, substâncias quimicamente complexas com elevado potencial terapêutico. Esses compostos podem atuar em múltiplos alvos biológicos ou sofrer modificações estruturais que otimizam sua eficácia bioativa (Newman; Cragg, 2020; Santos *et al.*, 2022). Entre essas fontes promissoras, estão as espécies da família Fabaceae, frequentemente relatadas na literatura por seu potencial farmacológico, reforçado por apresentar polifenóis, uma das principais classes de compostos dessa família.

A família Fabaceae (Leguminosae) é considerada a maior do território brasileiro e uma das três maiores do mundo, junto às Myrtaceae e Orchidaceae. Ela é subdividida em seis subfamílias: Cercidoioideae, Caesalpinioideae, Papilionoideae, Detarioideae, Dialioideae e Duparquetioideae, sendo esta última a única não representada no Brasil. Globalmente, a Leguminosae compreende 795 gêneros e aproximadamente 20.000 espécies. No Brasil, segundo o Re flora (2024), existem 258 gêneros e 3.078 espécies, das quais 1.627 são endêmicas (Lewis *et al.*, 2005; Seleme, 2024).

O gênero *Amburana* (Fabaceae) é composto por três espécies: *A. acreana* (Ducke) A.C.Sm, *A. cearensis* (Allemão) A.C.Sm. e *A. erythrosperma* E.P.Seleme, C.H.Stirt. & V.F.Mansano. Essas espécies estão distribuídas em alguns países do continente sul-americano como Argentina, Brasil, Bolívia, Paraguai e Peru. No Brasil, a distribuição geográfica do gênero abrange as regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste (Seleme, 2015). Especificamente, *Amburana acreana* (Ducke) A. C. Sm é conhecida popularmente como “Cumaru-de-cheiro” e “Cerejeira” (Carvalho *et al.*,

2007; Seleme, 2015), sendo predominantemente encontrada na Floresta Amazônica, nos estados do Acre, Amazonas, Mato Grosso e Rondônia (Seleme, 2024).

A composição química das espécies do gênero *Amburana* ainda é pouco conhecida. Estudos prévios com *A. cearensis* relatam a presença de cumarinas, ácidos fenólicos, flavonoides e esteroides glicosilados. Recentemente, a análise com *A. acreana* revelou presença de substâncias pertencentes às mesmas classes, sugerindo uma correlação quimiotaxonômica entre as espécies (Bravo B *et al.*, 1999; Canuto; Lima; Silveira, 2010; Canuto *et al.*, 2014; Silveira *et al.*, 2022).

O potencial etnofarmacológico do gênero *Amburana* destaca o uso de diferentes partes das plantas no tratamento de doenças do sistema respiratório, distúrbios intestinais, úlceras cutâneas, infecções urinárias, bem como para cicatrização de feridas e como antiofídico no tratamento de picadas de cobra. Pesquisas científicas têm associado o potencial farmacológico das espécies aos seus metabólitos especializados, com destaque para os compostos fenólicos (De Araujo *et al.*, 2022; Silveira *et al.*, 2022).

Diante dessa perspectiva e da escassez de dados sobre a fitoquímica e farmacologia do gênero *Amburana*, em especial de *A. acreana*, esse trabalho tem como objetivo isolar e caracterizar os metabólitos especializados presentes no extrato foliar de *A. acreana*, sugerir um perfil químico e avaliar seu potencial bioativo por meio de ensaios *in vitro* e *in silico* do extrato e principais constituintes químicos.

Para isso, essa tese está organizada em 3 capítulos: O **capítulo I** intitulado “Constituintes Químicos das folhas de *Amburana acreana* Ducke A.C.Sm.” descreve o isolamento, purificação e identificação de metabólitos especializados obtido do extrato hidroetanólico das folhas de *A. acreana*, e avalia a capacidade do amburosídio B em inibir o crescimento de cepas de bactérias gram-negativa; O **capítulo II** intitulado como “Perfil fenólico, efeitos anti-inflamatórios e antioxidante de *Amburana acreana* Ducke” apresenta o perfil fenólico do extrato foliar de *A. acreana*, quantifica nove substâncias presentes no extrato e avalia a capacidade antioxidante e anti-inflamatória do extrato por meio de ensaios *in vitro*; e o **capítulo III** intitulado como “Efeitos anti-inflamatórios *in vitro* e potencial leishmanicida *in silico* do amburosídio B, um glicosídeo fenólico de *Amburana acreana* Ducke” que avalia a capacidade do amburosídio B reduzir os níveis de radicais de óxido nítrico e a atividade enzimática da 5-LOX, bem como investiga a potencial ação moduladora frente a enzimas superóxido dismutase de *Leishmania braziliensis* (LbSOD) através de ensaios de deslocamento térmico (ThermoFluor®).

REFERÊNCIAS

- BRAVO B, José A. *et al.* Bioactive phenolic glycosides from *Amburana cearensis*. **Phytochemistry**, [s. l.], vol. 50, no. 1, p. 71–74, 1999.
- CANUTO, Kirley M. *et al.* Amburanins A and B from *Amburana cearensis*: Daphnodorin-Type Biflavonoids that Modulate Human Neutrophil Degranulation. **J. Braz. Chem. Soc.**, [s. l.], vol. 25, no. 4, p. 639–647, 2014.
- CANUTO, Kirley Marques; SILVEIRA, Edilberto Rocha; BEZERRA, Antonio Marcos Esmeraldo. Estudo fitoquímico de espécimens cultivados de cumaru (*Amburana cearensis* A. C. Smith). **Química Nova**, [s. l.], vol. 33, no. 3, p. 662–666, 2010. Available at: <http://www.scielo.br/j/qn/a/x6H68r7zMMGm9zZNzWddVwt/?lang=pt>. Accessed at: 6 Mar. 2022.
- DE ARAÚJO, Ana Bruna *et al.* Antineuroinflammatory Effect of *Amburana cearensis* and Its Molecules Coumarin and Amburoside A by Inhibiting the MAPK Signaling Pathway in LPS-Activated BV-2 Microglial Cells. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [s. l.], vol. 2022, p. 1–14, 2022. Available at: <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2022/6304087/>. Accessed at: 24 Oct. 2022.
- FERREIRA, Adrienne *et al.* CHEMICAL CONSTITUENTS OF *Amburana acreana* Ducke A. C. Sm. LEAVES. **Química Nova**, [s. l.], vol. 48, no. 1, p. 1–6, 2025. Available at: https://quimicanova.sbq.org.br/audiencia_pdf.asp?aid2=9723&nomeArquivo=AR2023-0224.pdf.
- Lewis, G.P., Schrire, B.D., Mackinder, B.A. & Lock, J.M. (2005) *Legumes of the World*. Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond, U.K., 577 pp
- PAULO ERNANI RAMALHO CARVALHO. **Cerejeira-da-Amazônia *Amburana acreana***: 1517-5278. [S. l.: s. n.], 2007.
- SELEME, Elidiane P. *et al.* A TAXONOMIC REVIEW AND A NEW SPECIES OF THE SOUTH AMERICAN WOODY GENUS AMBURANA (LEGUMINOSAE, PAPILIONOIDEAE). **Phytotaxa**, [s. l.], vol. 212, no. 4, p. 249, 2015. Available at: <https://biotaxa.org/Phytotaxa/article/view/phytotaxa.212.4.1>.
- SELEME, E. P. **Amburana in Flora e Funga do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. [S. l.], 2024.
- SILVEIRA, Zildene de Sousa *et al.* Phytochemistry and Biological Activities of *Amburana cearensis* (Allema) AC Sm. **Molecules**, [s. l.], vol. 27, no. 2, p. 1–19, 2022.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Família Fabaceae Lindl.

A família Fabaceae, anteriormente conhecida como Leguminosae, é composta por plantas de flores pertencentes à classe Dicotiledônea, divisão Angiospermae e ordem Rosales. É considerada uma das três maiores famílias de angiospermas do mundo, sendo a maior no território brasileiro. A Fabaceae está dividida em seis subfamílias: Cercidoideae, Caesalpinioideae, Papilionoideae, Detarioideae, Dialioideae e Duparquetioideae, sendo esta, a única que não ocorre no Brasil (Seleme, 2024).

Com 795 gêneros e aproximadamente 20.000 espécies, a Fabaceae desempenha um papel importante nos ecossistemas terrestres e na economia, especialmente devido à associação com a maioria de bactérias fixadoras de nitrogênio, essenciais para o equilíbrio dos ecossistemas. Suas espécies estão presentes em praticamente todos os grandes biomas globais, incluindo florestas tropicais úmidas e sazonalmente secas, savanas, campos tropicais e temperados, desertos e semidesertos. No entanto, sua maior incidência é nas regiões tropicais e subtropicais. Em decorrência da sua diversidade, as espécies de Fabaceae podem ser encontradas em todos os continentes, exceto na Antártica (Macedo *et al.*, 2018; Seleme, 2024).

No Brasil, a família Fabaceae apresenta 258 gêneros e 3.078 espécies, sendo 1.627 endêmicas. Essas espécies são encontradas em todos os biomas brasileiros, mas é considerada mais abundante em espécies na Floresta amazônica e na Caatinga. Além de sua importância ecológica, têm considerável importância no setor alimentício, na produção de alimentos e matéria prima para indústrias; na agricultura e agrossilvicultura, pois auxiliam na produção de fertilizantes naturais. Também possuem destaque na farmacologia, por apresentarem espécies com diversas propriedades biológicas (Arrias; Alvarado; Calderón, 2019; Seleme, 2024).

No contexto das propriedades bioativas, diversas espécies de Fabaceae têm sido estudadas cientificamente com comprovação de suas atividades farmacológicas. Por exemplo, diferentes partes das espécies *Calpurnia áurea*, *Tamarindus indica* Liin. e *Crotalaria retusa* exibem atividade anti-inflamatória; *Senna spectabilis* tem ação anticonvulsivante; *Calliandra portoricensis* atividade analgésica, *Mimosa caesalpiniiifolia* possui atividade citotóxica, *Caesalpinia pyramidalis* tem efeito gastroprotetor e *Amburana cearensis* demonstra propriedades neuroprotetoras (Ayal; Belay; Kahaliw, 2019; Da Silva *et al.*, 2014; Komakech *et al.*, 2019; Pereira *et al.*, 2017).

Apesar de ser a maior família de angiosperma do território brasileiro, muitas espécies ainda não foram estudadas cientificamente, sugerindo um grande potencial para novas descobertas de compostos bioativos e aplicações terapêuticas.

2.3 Gênero *Amburana* Schwacke & Taubert

O gênero *Amburana* (Fabaceae, Leguminosae) foi descrito pela primeira vez em 1864 pelo botânico brasileiro Feire Allemão, com base na espécie *Torresea cearensis*, posteriormente reconhecida como sinônimo de *Torresia* Ruiz & Pavon (Poaceae). Em 1894, Schwacke & Taubert revisaram a classificação e reconheceram o gênero como *Amburana*, fundamentados na espécie *Amburana claudii*, atualmente denominada como *A. cearensis*. Em 1935, Ducke A.C.Sm, descreveu a espécie *A. acreana* (Ducke) como *Torresia acreana*, com algumas distinções na taxonomia e na distribuição geográfica em relação à *T. cearensis*. Smith, em 1940, sugeriu que *Amburana cearensis* deveria ser considerada sinônimo de *T. cearensis* Fr. Allem. e *A. claudii* Schwacke & Taub (Seleme, 2024; Seleme *et al.*, 2015; Ducke, 1949).

O gênero *Amburana* compreende três espécies: *A. acreana*, *A. cearensis* e *A. erythrosperma*. Endêmico da América do Sul, suas espécies estão distribuídas entre Argentina, Brasil, Bolívia, Paraguai e Peru. No Brasil, as espécies ocorrem especialmente nos estados do Acre, Amazonas, Bahia, Ceará, Espírito Santo, Mato Grosso, Minas Gerais, Pará, Pernambuco, Rio de Janeiro, Rondônia e São Paulo. Contudo, *A. erythrosperma* é endêmica da Bahia. As espécies do gênero são árvores a ambientes diversos, desde regiões de caatinga e áreas subtropicais sazonalmente secas até áreas sazonalmente inundadas, ao longo de rios (Carvalho, 2007; Seleme, 2024; Seleme *et al.*, 2015; Lewis *et al.*, 2005).

O gênero *Amburana* tem considerável relevância econômica devido à sua versatilidade de uso. Suas espécies são amplamente utilizadas em carpintaria, marcenaria fina, esculturas e construção civil. Além disso, possuem aplicações na indústria cosmética, sendo empregadas na fabricação de perfumes, cremes e aromatizantes. Na medicina popular, suas propriedades são valorizadas para o tratamento de diversas condições de saúde (de Veras *et al.*, 2023; Pereira *et al.*, 2017).

2.3.1 Potenciais atividades biológicas do gênero *Amburana*

Na medicina popular, a espécie *A. cearensis* é amplamente utilizada para o tratamento de variadas enfermidades. Diferentes partes da planta, como raízes e caules são utilizados no tratamento de doenças do sistema respiratório, incluindo bronquite, asma, rinite, gripe, tosse e sinusite (Silveira *et al.*, 2022). Além disso, a planta é tradicionalmente utilizada no combate à diarreia, problemas menstruais, doenças hepáticas, inflamações na próstata e ovário, dor de cabeça e dores musculares. As cascas do caule de *A. cearensis* são um recurso importante para indústria fitoterápica, sendo utilizadas na produção do “xarope de cumaru”, comercializado pelo Programa Farmácias Vivas e por empresas privadas (Canuto, *et al.*, 2006). Os uso de “lambedôs” caseiros, preparados a partir das cascas do caule, também é comumente utilizados para tratar doenças respiratórias (Agra *et al.*, 2007; Canuto *et al.*, 2008; Melo, C. A.; Souza, P. O.; Damasceno, 2014; Macedo *et al.*, 2018). Além das aplicações na medicina popular, estudos recentes têm investigado o potencial farmacológico das espécies do gênero *Amburana*. Evidências científicas indicam que o gênero pode ter atividades bactericidas, antioxidantes, anti-inflamatórias, neuroprotetora e leishmanicida.

Atividade bactericida

Estudos com a casca do caule de *A. cearensis* revelaram efeitos bactericidas contra uma ampla gama de bactérias, incluindo *Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus*, *S. caprie*, *S. intermedius*, *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Rhodococcus equi*, *Listeria* spp., *Corynebacterium* spp., *Aeromonas* spp., *Proteus* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus suis*, *Nocardia* spp., *Vibrio* spp., *Micrococcus* spp. e *Edwadiella* spp., com concentração bactericida mínima (CIM) de 31,2 a 333,3 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ (Sá *et al.*, 2014).

O extrato hidroetanólico das folhas de *A. cearensis* também demonstrou atividade frente à cepa *S. aureus* AS-ATCC 25923, com uma CIM de 512 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Entretanto, não foi verificada atividade direta contra *E. coli* (CIM > 1024 $\mu\text{L mL}^{-1}$) (Figueredo *et al.*, 2013). Silva e colaboradores (2014), relataram que o extrato hidroetanólico de *A. cearenses* apresenta atividade bacteriana contra *Acinetobacter* spp., com uma concentração bactericida mínima (CBM) de 9,37 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Entretanto, o extrato etanólico apresentou valor médio de CBM de 390,6 $\mu\text{L mL}^{-1}$ contra

Enterobacter spp.; 1302 $\mu\text{g mL}^{-1}$ contra *E. coli*; e 911,4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para o gênero *Klebsiella* spp. Resultados similares também foram obtidos por Peixoto e colaboradores (2016) (Da Silva *et al.*, 2014; Peixoto *et al.*, 2016).

Oliveira e colaboradores (2020) avaliaram o efeito sinérgico entre o extrato de sementes de *A. cearenses*, três frações obtidas da precipitação com sulfato de amônio e antibióticos como norfloxacino, penicilina e gentamicina, contra cepas de *S. aureus* e *E.coli*. Os resultados demonstraram uma inibição significativa do crescimento bacteriano quando o extrato foi combinado com os antibióticos (Oliveira, M. T. A. *et al.*, 2020).

Atividade antioxidante

A. cearensis apresenta um potencial antioxidante em diferentes partes da planta. Estudos com o extrato hidroetanólico das folhas e porções de acetato de etila e metanol revelaram uma atividade antioxidante significativa no ensaio de DPPH, com eficiência acima de 83% na concentração de 0,1 mg mL⁻¹. O extrato hidroetanólico da casca do caule também apresentou um alto potencial antioxidante, com ação de 94% na concentração de 1,0 mg mL⁻¹. O extrato hidroetanólico das sementes foi ainda mais eficaz, com atividade antioxidante nas concentrações de 30 a 120 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e IC₅₀ de 17,95 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A isoflavona, afrormosina, isolada da *A. cearensis* reduziu a formação de espécies reativas de oxigênio e íons superóxidos em ensaios de quimioluminescência por lucigenina (IC₅₀ >100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e luminol (IC₅₀ = 19,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (Aguiar *et al.*, 2017; dos Santos *et al.*, 2010).

Atividade anti-inflamatória

A. cearensis demonstra propriedades anti-inflamatórias por meio de seus extratos e compostos isolados. Entre os compostos bioativos identificados, incluem-se cumarina, amburosídio A e B (Canuto *et al.*, 2014; Leal *et al.*, 2008), ácido vanílico (Leal *et al.*, 2011) e afrormosina (de Araújo Lopes *et al.*, 2013), os quais estão correlacionados com atividades anti-inflamatórias da espécie (Silveira *et al.*, 2022). Estudos com óleos essenciais obtidos das folhas de *A. cearensis* apontam para redução nos níveis de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-1 β , fortalecendo seu potencial terapêutico para o tratamento de inflamações (de Veras *et al.*, 2023).

Atividade neuroprotetora

O potencial neuroprotetor de plantas medicinais é frequentemente atribuído à seus metabólitos especializados com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias. Esses compostos podem regular cascatas sinalizadoras intracelulares associadas à excitotoxicidade do glutamato, um fator importante no desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (Pereira, Erica P. L. *et al.*, 2017). Desta forma, espécies de *Amburana*, que apresentam esses perfis bioativos, demonstram promissores efeitos neuroprotetores.

Pierdoná e colaboradores (2014) demonstraram a ação neuroprotetora do extrato seco, fração fenólica e do amburosídio em células microgлияis, em concentração que variam de 5 a 200 mg mL⁻¹ (Pierdoná *et al.*, 2014). Esses resultados foram reforçados por Pereira e colaboradores (2017), que avaliaram o potencial neuroprotetor das sementes de *A. cearensis*. No estudo, os extratos hidroetanólico, hexânico, diclorometano e acetato de etila foram testados em células neurais PC12 expostas a danos neuronais induzidos por glutamato, e os efeitos neuroprotetores foram observados em concentração de 0,1 a 1000 µL mL⁻¹ (Pereira, Erica P. L. *et al.*, 2017).

Atividades citotóxicas

Extratos e compostos isolados de *A. cearensis* demonstraram atividade citotóxica contra diversas linhagens de células cancerígenas. Compostos como kaempferol, isokaempferol, amburosídio A e ácido protocatecuico apresentaram ação citotóxica significativa em linhagens de células cancerígenas, incluindo câncer de mama humano (MCF-7), de pele murino (B-16), do cólon humano (HCT-8) e de leucemia (EMC e HL-60) em diferentes concentrações. Além disso, o extrato hidroetanólico do caule de *A. cearensis* também exibiu citotoxicidade em fibroblastos (L929) e queratinócitos humanos (HaCaT) nas concentrações variando de 31,2 a 1000 µL mL⁻¹ (Costa-lotufo *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2020).

Atividade Leishmanicida

A espécie *A. cearensis* também apresenta potencial leishmanicida. Estudos com cumarina isolada do extrato das sementes da planta mostraram atividade antileishmania contra promastigotas de *Leishmania chagasi*, nas concentrações de 25 a 500 mg mL⁻¹ (Monteiro *et al.*, 2017). De maneira

similar, a cumarina isolada do extrato da casca do caule reduziu a viabilidade de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. donovani* na concentração de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Bravo B *et al.*, 1999; Silva *et al.*, 2020)

2.3.2 Principais metabólitos especializados do gênero *Amburana*

Os principais metabólitos especializados identificados em espécies de *Amburana* incluem cumarinas, ácidos fenólicos, glicosídeos fenólicos, flavonoides, esteroides e terpenoides (Figura 1). Em extratos da casca do caule de *A. cearensis* foram isolados a cumarina e amburosídeos A e B (Bravo *et al.*, 1999), os ácidos protocatecuico, vanílico (Leal *et al.*, 2011; Sá *et al.*, 2014) e (E)-o-cumárico (Canuto; Silveira, 2006). E Canuto, Lima e Silveira (20210) identificaram seis amburosídeos inéditos, denominados amburosídeo C-H (Canuto; Lima; Silveira, 2010).

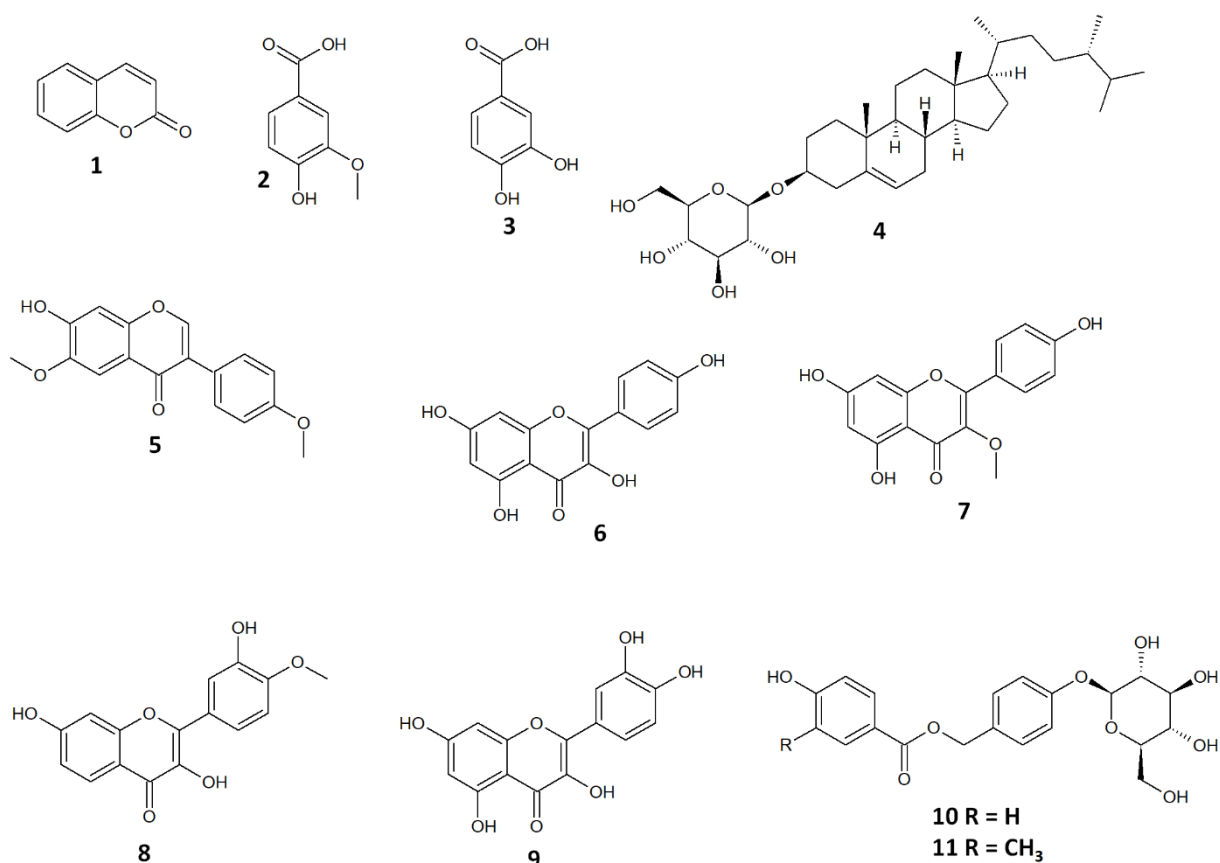


Figura 1. Alguns metabólitos especializados identificados no extrato do caule de *Amburana cearensis*. 1,2-benzopirona (1); ácido vanílico (2); ácido protocatecuico (3); β -sitosterol glicosilado; estigmasterol glicosilado (4); afrormosina (5); kaempferol (6); isokaempferídio (7); 4'-metoxifisetina (8); quercetina (9), amburosídeo A (10) e amburosídeo B (11).

Flavonoides também foram identificados, como afrormosina, isokaempferida, kaempferol, quercetina e 4'-metoxi-fiseti (Canuto; Silveira, 2006). Outros compostos notáveis incluem a diidroocumarina, escopoletina, o metil fenilpropanoide trans-3,3-dimetoxi-cinamato, ácido benzoico metil 3-metoxi-4-hidroxi benzoato; fenóis simples como catecol e guaiacol, além da antraquinona crisofanol. Os triterpenoides lupeol e amirina, bem como o e o esteroide γ -sitosterol e o metil éster metil palmitato também foram identificados (Negri *et al.*, 2004).

No extrato das folhas de *A. cearensis*, foram identificados os ácidos protocatecuico, epicatequina, ácido *p*-cumárico, ácido gálico e kaempferol (Gouveia *et al.*, 2016). Já do extrato foliar de *A. acreana*, foram isolados os ácidos *p*-hidroxibenzoico e vanílico, a cumarina, o amburosídio B e o campesterol glicosilado (Ferreira *et al.*, 2025).

Estudos com extrato das sementes de *A. cearensis* identificaram cumarina e 3-metil-cumarina; ésteres de ácidos graxos, com hexadecanoato de metila, 9-*cis*-11-*trans*-octadecadienoato, 13-*trans*-metil-octadecanoato de metila e 9,12-*cis*-9-octadecenoato de etila, além dos ácidos graxos, como acetato de hexadecanoato, acetato de octadecanoato e octadecanoato. Os esteroides γ -sitosterol, campesterol e estigmasterol, bem como o triterpenoide β -amirina, também foram identificados (Pereira *et al.*, 2017). Ademais, ácidos *L*-ascórbico, gálico e elágico, catequina, rutina, naringina, miricetina e morina foram identificados (Aguiar *et al.*, 2017).

Os amburosídeos (A-H) são glicosídicos fenólicos que apresentam estrutura base característica. Os primeiros estudos com *Amburana*, havia a hipótese de que esses compostos seriam marcadores quimiotaxômicos exclusivo o gênero. No entanto, investigações recentes identificaram alguns desses compostos em outros gêneros como o *Origanum* (Lamiaceae) e *Artemisia* (Asteraceae). Na espécie *Origanum vulgare* L. os amburosídeos A e H foram detectados, enquanto na espécie *Artemisia capillaris*, foram identificados os amburosídeos A e B. Todos os oito amburosídeos (A-H) já foram identificados em *A. cearensis* e apenas o foi identificado na *A. acreana* até o momento. A presença do amburosídio B no extrato foliar da *A. acreana*, permite sugerir que este composto pode ser um marcador quimiotaxonômico do gênero *Amburana* (Costa-lotufo *et al.*, 2003; Canuto; Lima; Silveira, 2010; Zhang *et al.*, 2014; Yu *et al.*, 2021; Ge *et al.*, 2023; Ferreira *et al.*, 2025).

Essas descobertas destacam a importância do estudo fitoquímico adicionais sobre o perfil químico entre as espécies de *Amburana* e seus correlatos. A compreensão das interações entre os compostos fenólicos e suas propriedades biológicas poderá direcionar novos caminhos para o uso terapêutico, bem como fornece informações sobre a evolução e a taxonomia do gênero.

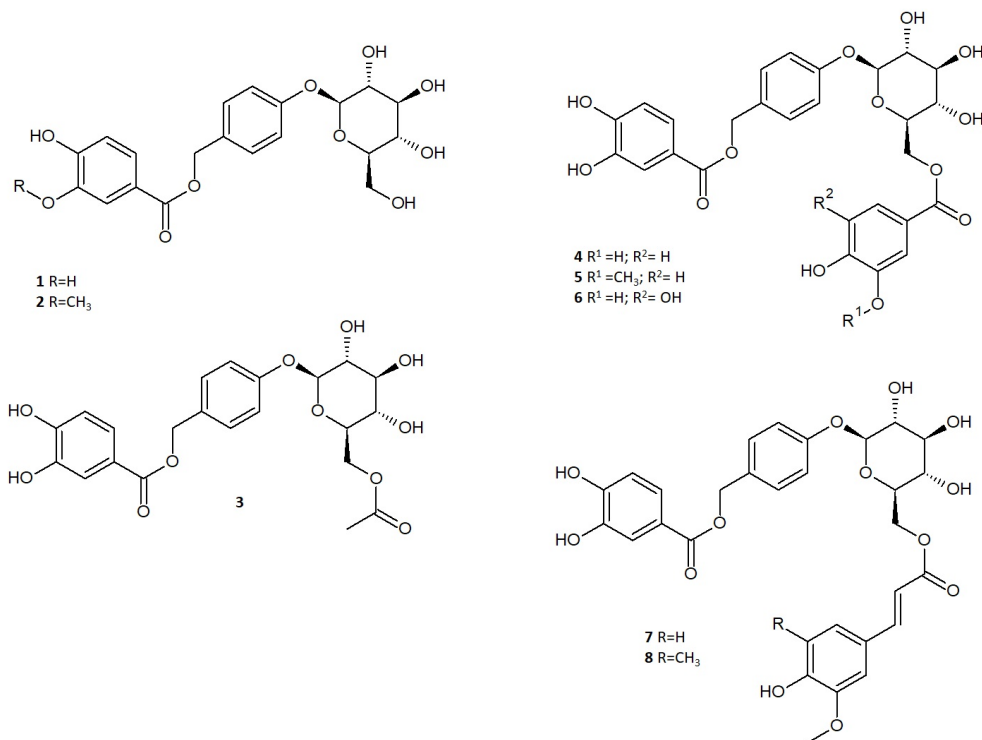


Figura 2. Amburosídeos: A (1); B (2); C (3); D (4); E (5); F (6); G (7); H (8).

2.2.3 *Amburana acreana*

Popularmente Conhecida como “*cumaru-de-cheiro*” e “*cerejeira*”, a espécie *Amburana acreana* (Ducke) A.C.Sm. possui sinônimas, como *Amburana cearenses* var. *acreana* (Ducke) J. F. Macbr. e *T. acreana* Ducke (Seleme *et al.*, 2015). A etimologia do nome genérico *Amburana* tem origem no nome popular de uma espécie encontrada no Ceará (*Amburana cearensis*), derivando de “ambú” e “rana”, um sufixo que indica semelhança. O epíteto específico “*acreana*” é justificado pelo fato de que o material foi coletado no estado do Acre (Carvalho, 2007).

O primeiro registro científico de *A. acreana* ocorreu em 1935, quando Ducke descreveu a espécie como uma árvore frondosa que pode alcançar altura de 15 a 35 metros, com um caule liso e um aroma característico de cumarinas (Figura 3). *A. acreana* pode se distinguir das outras duas

espécies do gênero pelo tom ferrugíneo mais escuro de seus caules (em contraste com o tom castanho de *A. cearensis* e *A. erythrosperma*) e pelo maior número de folíolos por folhas (17-25, em comparação com 7-15 em *A. cearensis* e 7-13 em *A. erythrosperma*) (Seleme, 2015). Essa espécie tem ocorrência predominantemente brasileira, com distribuição específica no sudoeste da floresta amazônica, abrangendo os estados de Rondônia, Acre, Amazonas e Mato Grosso. No entanto, também há registros de sua ocorrência na Argentina, Bolívia, Paraguai e Peru (Lorenzi, 1992; Leite *et al.*, 2005; Santiago *et al.*, 2014).



Figura 3. *Amburana acreana*, acesso, folhas e caule.

Fonte: Autora, 2022

A. acreana apresenta apreciado valor econômico. No Acre, é uma das principais espécies consumidas pelo mercado madeireiro nacional e internacional. A extração constante visando o setor comercial tornou a espécie vulnerável à extinção, em algumas regiões (Silva *et al.*, 2018). Por isso, os estudos majoritariamente disponíveis na literatura sobre *A. acreana* buscam avaliar formas de melhoramento de cultivo, preservação e conservação da espécie (Silva Bello *et al.*, 2008; Vieira; Weber; Scaramuzza, 2015; Silva *et al.*, 2018).

Diferentemente da *A. cearensis*, ainda há poucos estudos sobre o perfil químico da *A. acreana*. Estudos prévios realizados, sugerem uma similaridade fitoquímica entre as espécies, despertando, portanto, o interesse em elucidar a composição dos metabolitos especializados e o potencial farmacológico da planta.

REFERÊNCIAS

- AGRA, M. F. *et al.* Medicinal and poisonous diversity of the flora of ‘Cariri Paraibano’, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], vol. 111, no. 2, p. 383–395, 2007.
- AGUIAR, Aline Aires *et al.* Development of a rich fraction in phenolic compounds with high antioxidant and antimicrobial activity in *Amburana cearensis* seeds extracts. **Journal of Medicinal Plants Research**, [s. l.], vol. 11, no. 41, p. 648–655, 2017. Available at: <https://academicjournals.org/journal/JMPR/article-abstract/9974DA766506>. Accessed at: 24 Oct. 2022.
- ARRIAS, Julio Césas; ALVARADO, Diana; CALDERÓN, Manuel. **Adequação do teste de tetrazólio e fenotipagem computacional da qualidade fisiológica de sementes de *Amburana cearensis* A.C. Smith (Fabaceae)**. 2019. 5–10 f. [s. l.], 2019.
- AYAL, Getachew; BELAY, Assefa; KAHALIW, Wubayehu. Evaluation of wound healing and anti-inflammatory activity of the leaves of *Calpurnia aurea* (Ait.) Benth (fabaceae) in mice. **Wound Medicine**, [s. l.], vol. 25, no. 1, p. 100151, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.wndm.2019.100151>.
- BRAVO B, José A. *et al.* Bioactive phenolic glycosides from *Amburana cearensis*. **Phytochemistry**, [s. l.], vol. 50, no. 1, p. 71–74, 1999.
- CANUTO, Kirley M. *et al.* Amburanins A and B from *Amburana cearensis*: Daphnodorin-Type Biflavonoids that Modulate Human Neutrophil Degranulation. **J. Braz. Chem. Soc.**, [s. l.], vol. 25, no. 4, p. 639–647, 2014.
- CANUTO, Kirley M. *et al.* Uso de Plantas jovens de *Amburana Cearensis* A. C. Smith: Alternativa para Preservação e Exploração Econômica da Espécie. **Embrapa**, [s. l.], vol. 208, p. 24, 2008.
- CANUTO, Kirley M.K; LIMA, Mary Anne S.; SILVEIRA, Edilberto R. Amburosides C-H and 6-O-protocatechuoyl coumarin from *Amburana cearensis*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [s. l.], vol. 21, no. 9, p. 1746–1753, 2010. Available at: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-50532010000900022&lng=en&nrm=iso&tlng=en.
- CANUTO, Kirley Marques; SILVEIRA, Edilberto Rocha. CONSTITUINTES QUÍMICOS DA CASCA DO CAULE DE *Amburana cearensis* A.C. SMITH. **Química Nova**, [s. l.], vol. 29, no.

6, p. 1241–1243, 2006.

Ge, V *et al.* Antiproliferative Effects of Several Compounds Isolated from *Amburana cearensis* A. C. Smith. **Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences**, [s. l.], vol. 58, no. 9–10, p. 675–680, 2003. Available at: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/znc-2003-9-1014/html>. Accessed at: 12 Feb. 2023.

DA SILVA, Valdenice Félix *et al.* Potencial antimicrobiano de extratos etanólicos de plantas frente a bacilos gram negativos isolados da mucosa cérvico-vaginal de ovelhas criadas na região de Petrolina-PE. **Semina: Ciencias Agrarias**, [s. l.], vol. 35, no. 2, p. 883–890, 2014.

DE ARAÚJO LOPES, Amanda *et al.* Afrormosin, an Isoflavonoid from *Amburana cearensis* A. C. Smith, Modulates the Inflammatory Response of Stimulated Human Neutrophils. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, [s. l.], vol. 113, no. 6, p. 363–369, 2013. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/bcpt.12106>. Accessed at: 24 Oct. 2022.

DE VERAS, Bruno Oliveira *et al.* Antinociceptive and anti-inflammatory activities of essential oil of the leaves of *Amburana cearensis* (Allemão) A.C. Smith. from the semi-arid region of Northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], vol. 317, no. April, 2023.

DOS SANTOS, Priscila H. A. *et al.* Partial characterization and antimicrobial activity of peptides from *Amburana cearensis* seeds against phytopathogenic fungi and yeasts. **Acta Physiologiae Plantarum**, [s. l.], vol. 32, no. 3, p. 597–603, 2010. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s11738-009-0421-1>.

DUCKE, A. As leguminosas da Amazônia Brasileira: notas sobre a flora neotrópica - II. Belém, PA: Instituto Agrônômico do Norte, 1949. 248 p. (Boletim técnico, 18).

FERREIRA, Adrienne *et al.* CHEMICAL CONSTITUENTS OF *Amburana acreana* Ducke A. C. Sm. LEAVES. **Química Nova**, [s. l.], vol. 48, no. 1, p. 1–6, 2025. Available at: https://quimicanova.sbq.org.br/audiencia_pdf.asp?aid2=9723&nomeArquivo=AR2023-0224.pdf.

FIGUEREDO, Fernando G. *et al.* Modulation of the Antibiotic Activity by Extracts from *Amburana cearensis* A. C. Smith and *Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan. **BioMed Research International**, [s. l.], vol. 2013, p. 1–5, 2013. Available at: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2013/640682/>.

GOUVEIA, B. B. *et al.* Supplemented base medium containing *Amburana cearensis* associated with FSH improves in vitro development of isolated goat preantral follicles. **Theriogenology**, [s. l.], vol. 86, no. 5, p. 1275–1284, 2016. Available at:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.068>.

KOMAKECH, Richard *et al.* Anti-inflammatory and analgesic potential of *Tamarindus indica* Linn. (Fabaceae): a narrative review. **Integrative Medicine Research**, [s. l.], vol. 8, no. 3, p. 181–186, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.imr.2019.07.002>.

LEAL, L. K.A.M. *et al.* A comparative chemical and pharmacological study of standardized extracts and vanillic acid from wild and cultivated *Amburana cearensis* A.C. Smith.

Phytomedicine, [s. l.], vol. 18, no. 2–3, p. 230–233, 2011.

LEAL, L.K.A.M. *et al.* Amburoside A, a glucoside from *Amburana cearensis*, protects mesencephalic cells against 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity. **Neuroscience Letters**, [s. l.], vol. 388, no. 2, p. 86–90, 2005. Available at:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304394005007172>. Accessed at: 6 Mar. 2022.

LEAL, Luzia Kalyne Almeida Moreira *et al.* Effects of amburoside a and isokaempferide, polyphenols from *amburana cearensis*, on rodent inflammatory processes and myeloperoxidase activity in human neutrophils. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, [s. l.], vol. 104, no. 3, p. 198–205, 2008.

LEITE, E. J. State-of-knowledge of *Amburana cearensis* (Fr. Allem.) A. C. Smith (Leguminosae: Papilionoideae) for genetic conservation in Brazil. *J. Nat. Conservat.*, v. 13, p. 49-65, 2005.

Lewis, G.P., Schrire, B.D., Mackinder, B.A. & Lock, J.M. (2005) *Legumes of the World*. Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond, U.K., 577 pp

LIMA PEREIRA, Érica Patrícia *et al.* *Amburana cearensis* seed extract protects brain mitochondria from oxidative stress and cerebellar cells from excitotoxicity induced by glutamate.

Journal of Ethnopharmacology, [s. l.], vol. 209, p. 157–166, 2017.

LORENZI, H. *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 1992. MAIA,

MACEDO, Julimery Gonçalves Ferreira *et al.* Analysis of the Variability of Therapeutic

Indications of Medicinal Species in the Northeast of Brazil: Comparative Study. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, [s. l.], vol. 2018, no. 1, 2018. Available at:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1155/2018/6769193>.

MELO, C. A.; SOUZA, P. O.; DAMASCENO, E. ATIVIDADE FARMACOLÓGICA DA PLANTA *Amburana cearensis* (IMBURANA) FRENTE A ESTUDO

ETNOFARMACOLÓGICO EM MONTE AZUL-MG. **Revista Brasileira de Pesquisa em Ciências da Saúde**, [s. l.], vol. 1, no. 2, p. 26–29, 2014.

MONTEIRO, Roxelane Martins *et al.* Antileishmanial Activity of Coumarin from *Amburana*

- cearensis Seeds. **OALib**, [s. l.], vol. 04, no. 11, p. 1–10, 2017. Available at: <http://www.oalib.com/paper/pdf/5288493>.
- NEGRI, Giuseppina *et al.* Chemistry of the stem bark of *Amburana cearensis* (Allemão) (A.C.SM.). **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, [s. l.], vol. 6, no. 3, p. 1–4, 2004.
- NEWMAN, David J.; CRAGG, Gordon M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, [s. l.], vol. 83, no. 3, p. 770–803, 2020.
- OLIVEIRA, M.T.A. *et al.* Serine protease inhibition and modulatory-antibiotic activity of the proteic extract and fractions from *Amburana cearensis*. **Food and Chemical Toxicology**, [s. l.], vol. 135, no. November 2019, p. 110946, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110946>.
- OLIVEIRA, Maria Tatiana Alves *et al.* UPLC–MS–QTOF analysis and antifungal activity of Cumaru (*Amburana cearensis*). **3 Biotech**, [s. l.], vol. 10, no. 12, p. 545, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02551-4>.
- PEIXOTO, Rodolfo de Moraes *et al.* Potencial antibacteriano de plantas nativas do bioma Caatinga frente a *staphylococcus* spp. Isolados de mastite em pequenos ruminantes. **Revista Caatinga**, [s. l.], vol. 29, no. 3, p. 758–763, 2016. Available at: <http://www.scielo.br/j/rcaat/a/6wgvLHNGJK5v9YsSNBVyRtL/?lang=en>. Accessed at: 24 Oct. 2022.
- PEREIRA, Erica P.L. *et al.* *Amburana cearensis* seed extracts protect PC-12 cells against toxicity induced by glutamate. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s. l.], vol. 27, no. 2, p. 199–205, 2017. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0102695X16304525>. Accessed at: 6 Mar. 2022.
- PIERDONÁ, T.M. *et al.* Evaluation of the neuroprotective effects of bioproducts from *Amburana cearensis* on microglial cells. **European Neuropsychopharmacology**, [s. l.], vol. 24, p. S264, 2014. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924977X14704146>.
- SÁ, Mirivaldo Barros *et al.* Phytochemistry and preliminary assessment of the antibacterial activity of chloroform extract of *amburana cearensis* (Allemão) A.C. Sm. against *klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing strains. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, [s. l.], vol. 2014, 2014.
- SANTIAGO, Alexandre Silva; PITA, Samuel Silva da Rocha; GUIMARÃES, Elisalva Teixeira.

Tratamento da leishmaniose, limitações da terapêutica atual e a necessidade de novas alternativas: Uma revisão narrativa. **Research, Society and Development**, [s. l.], vol. 10, no. 7, p. e29510716543, 2021.

SANTOS, Celise Villa dos; SILVA, Fábio Mascarenhas e.; FARIA, Leandro Innocentini Lopes de. The Brazilian Atlantic Forest genetic resources in patents and the challenges to control the economic use of biodiversity. **World Patent Information**, [s. l.], vol. 74, no. October 2022, 2023.

SELEME, E. P. **Amburana in Flora e Funga do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. [S. l.], 2024.

SILVA, Juliana Helena Castro e *et al.* Amburana cearensis: Pharmacological and Neuroprotective Effects of Its Compounds Juliana. **Molecules**, [s. l.], vol. 25, p. 1–16, 2020.

SILVA, Wesley Duarte da *et al.* CRESCIMENTO INICIAL DE Amburana acreana (DUCKE) A. C. SMITH A PARTIR DE SUBSTRATOS ALTERNATIVOS. [s. l.], vol. 5, p. 130, 2018.

SILVA BELLO, Eleonora P.De B.C. *et al.* Germinação de sementes de Amburana acreana (Ducke) A. C. Sm. submetidas a diferentes condições de temperatura e de estresse hídrico.

Revista Brasileira de Sementes, [s. l.], vol. 30, no. 3, p. 016–024, 2008. Available at: <http://www.scielo.br/j/rbs/a/3c4FppPmVdxH77qS5Dkqt4w/abstract/?format=html&lang=pt>. Accessed at: 16 Mar. 2022.

SILVEIRA, Zildene de Sousa *et al.* Phytochemistry and Biological Activities of Amburana cearensis (Allemão) A.C.Sm. **Molecules**, [s. l.], vol. 27, no. 2, p. 1–19, 2022.

VIEIRA, C.R.; WEBER, O.L.S.; SCARAMUZZA, J.F. Saturação por Bases e Doses de P no Crescimento e Nutrição de Mudanças de Cerejeira (Amburana acreana Ducke). **Nativa**, [s. l.], vol. 3, no. 1, p. 1–9, 2015.

YU, Huawei *et al.* Hypoglycemic activity of *Origanum vulgare* L. And its main chemical constituents identified with HPLC-ESI-QTOF-MS. **Food and Function**, [s. l.], vol. 12, no. 6, p. 2580–2590, 2021.

ZHANG, Xiao Li *et al.* Phenolic compounds from *Origanum vulgare* and their antioxidant and antiviral activities. **Food Chemistry**, [s. l.], vol. 152, p. 300–306, 2014. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.153>.

CAPÍTULO I: Constituintes Químicos das folhas de *Amburana acreana* Ducke A. C. Sm.

Resumo

Esse trabalho teve como objetivo isolar, purificar e caracterizar metabólitos especializados presentes nas folhas da espécie *Amburana acreana* nativa do estado de Rondônia, utilizando métodos de cromatografias clássicas e espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear 1D, 2D. Do extrato hidroetanólico foliar de *A. acreana* foi identificado o ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido vanílico, cumarina, campesterol glicosilado e o amburosídio B. Embora os compostos isolados já sejam conhecidos, até o momento, esse é o primeiro relato de isolamento e caracterização química de metabólitos especializados na espécie *A. acreana*. Além disso, ensaios *in vitro* indicaram que o amburosídio B não apresenta potencial inibitório sobre o crescimento de bactérias gram-negativas. Desta forma, é possível sugerir que o amburosídio B seja um marcador quimiotaxonômico do gênero *Amburana*.

Palavras-chave: *Amburana acreana*, composição química, “Cumaru-de-cheiro”, amburosídio, fitoquímica.

Abstract

This study aimed to isolate, purify and characterize secondary metabolites present in *Amburana acreana* leaves, native to the state of Rondônia, using classical chromatographic methods and 1D, 2D nuclear magnetic resonance spectroscopy. From the hydroethanolic leaves extract of *A. acreana*, *p*-hydroxybenzoic acid, vanillic acid, coumarin, campesterol 3- β -D-glucoside and amburoside B, all known compounds, were identified. To the best of our knowledge, this is the first report of isolation and chemical characterization of secondary metabolites in *A. acreana*. In addition, *in vitro* assays indicated that amburoside B does not have inhibitory potential on the growth of gram-negative bacteria. The presence of these compounds suggests that, thus far, amburoside (A and B) could be chemotaxonomic markers of the genus *Amburana*.

Keywords: *Amburana acreana*; chemical composition; “Cumaru-de-cheiro”; amburoside; phytochemistry.

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Amburana* pertence à família Fabaceae (Leguminosae, papilionoideae), uma das três maiores famílias de angiospermas do mundo, sendo considerada a maior família botânica no território brasileiro. Esse gênero é composto por apenas três espécies: *A. acreana*, *A. cearensis* e *A. erythrosperma* E.P.Seleme, C.H.Stirt. & V.F.Mansano, e são distribuídas em distintos países do subcontinente sul-americano – Argentina, Brasil, Bolívia, Paraguai e Peru (Carvalho, 1994; Carvalho 2007; Seleme *et al.*, 2015).

Amburana acreana (Ducke) A. C. Sm. é conhecida popularmente como Cumaru-de-cheiro e Cerejeira, apresenta sinonímia de *Amburana cearensis* var. *acreana* (Ducke) J. F. Macbr. e *Torresea acreana* Ducke (Figura 1) (Carvalho, 1994; Carvalho 2007; Seleme, 2023). Sua ocorrência é predominantemente brasileira, com distribuição específica no sudoeste da floresta amazônica, nos estados de Rondônia, Acre, Amazonas e Mato Grosso, embora tenha registros de ocorrência da espécie no norte da Argentina, sul da Bolívia e nordeste do Paraguai e Peru (Lorenzi, 1992; Seleme, 2023).



Figura 1. *Amburana acreana*, tronco e partes aéreas.

Fonte: Seleme, 2023

As espécies de *Amburana*, apresentam estimada relevância comercial, dada sua variada aplicabilidade, na indústria moveleira (devido a sua resistência, durabilidade e valor comercial), no setor de cosméticos (perfumaria, cremes e aromatizantes) e na medicina popular, no tratamento de doenças respiratórias, ação anti-inflamatória e analgésica (Carvalho, 1994; Seleme *et al.*, 2015). No entanto, a elevada demanda no setor da construção civil e moveleira tem provocado ameaça à existência das espécies do gênero. No Brasil, por exemplo, a espécie *A. acreana* está classificada na lista oficial na categoria “vulnerável”, sendo considerada uma das espécies madeiras prioritárias para programa de conservação de recursos genéticos na Amazônia (Carvalho, 2007).

Embora a principal finalidade comercial das espécies de *amburana* seja no mercado madeireiro a composição química do gênero tem despertado interesse em pesquisas no âmbito da fitoquímica e da farmacologia. Alguns metabólitos especializados já foram relatados em estudos com *A. cearensis* como a 1,2-benzopirona, isocampferídio, campferol, quercetina, 4'-metoxifisetina, afrormosina, 7-hidroxi-8,4'-dimetoxiisoflavona, os biflavonoides (amburanina A e B), ácido protocatecuico, ácido vanílico, amburosídeos (A-H), β -sitosterol, estigmasterol, 2,4-metilenocicloartanol, alfalona e 3,4-dimetoxi-cinamato de metila (Bravo *et al.*, 1999; Canuto, 2007; Santiago *et al.*, 2014; Seleme *et al.*, 2015).

Portanto, devido ao amplo uso etnofarmacológico de espécies do gênero *Amburana* e do incipiente conhecimento sobre a composição fitoquímica dessas espécies na literatura, sobretudo da *A. acreana*, torna-se essencial a caracterização fitoquímica da espécie. Desse modo, este estudo teve como objetivo isolar, purificar e identificar os constituintes químicos presentes no extrato hidroetanólico das folhas de *A. acreana*, bem como avaliar a ação do amburosídeo B contra um modelo bacteriano gram-negativo resistente a mediamnteos beta-lactâmicos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

As folhas de *A. acreana* foram coletadas na Fazenda São Vicente, no município de Ji-Paraná, Rondônia, Brasil, em setembro de 2017, sobre as coordenadas geográficas: S 10°52'57.9324'' e W 61°58'6.9422''. A certificação botânica da planta foi realizada pela Profa. Lorena de Souza Tavares Bressiani, no Herbário Antônio Dalla Marta do Centro Universitário

Luterano de Ji-Paraná (CEULJI/ULBRA), onde foi depositada uma exsicata e foi gerado o registro contendo informações sobre a ocorrência da espécie (RON:e3201). Além disso, a espécie foi registrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético (SisGen) sob o código ADA5ACA.

2.2 Extração e isolamento dos constituintes químicos

Cerca de 300,0 g de folhas de *A. acreana* foram secas em estufa com ar circulante a 40°C durante 7 dias e triturado em liquidificador industrial Vitalex® 3500 rpm. O material foi submetido a maceração a frio com etanol 94%, com volume de aproximadamente 2,5 L, durante 24 horas, por quatro vezes consecutivas. Após remoção do solvente em evaporador rotativo de pressão reduzida (QUIMIS®) e secagem com exaustor, foram obtidos 88,3g do extrato bruto (EAA). A coleta do material vegetal e obtenção do extrato bruto foi realizada na Universidade Federal de Rondônia (UNIR).

O isolamento e a purificação dos metabólitos especializados ocorreram no Laboratório de Pesquisa em Química – LABQuim, na Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), seguindo a metodologia sugerida por Matos (1997) (Matos, 1997). Aproximadamente 36 g do extrato foi ressuspenso em 200 mL de metanol/água (9:1) e particionado com 50 mL de hexano (por três vezes, utilizando o volume de 50 mL, em cada uma delas), para obtenção da porção hexânica (HAA). À fase hidrometanólica, foi adicionada 100 mL de água para obter uma proporção de 6:4 metanol/água (totalizando 300 mL), particionado com 75 mL de clorofórmio (por três vezes, utilizando o volume de 75 mL de cada uma delas), para obtenção da porção clorofórmica (CAA). Em seguida, o metanol foi removido por evaporador rotativo e a fase aquosa foi particionada com 40 mL de acetato de etila (por três vezes, totalizando o volume de 120 mL), da qual foi obtida a porção acetato de etila (ACAA). Após a remoção do solvente orgânicos, as massas das porções obtidas foram HAA (2,5579 g), CAA 914,8449 g) e ACAA (2,6584 g). Embora o processo de separação por cromatografia clássica gravitacional tenha sido realizado em todas as porções orgânicas, as análises tratadas nesse capítulo foram referentes a porção clorofórmica.

A porção CAA (14,7000 g) foi submetida à Cromatografia em Coluna cromatográfica (CC), utilizando aproximadamente 255,0g de sílica gel 60 (Acros, 0,063-0,200 mm) como fase estacionária e fase móvel hexano/acetona, em gradiente de polaridade, coletando porções de 100 mL, resultando em 340 frações que foram agrupadas em 39 frações (CAA1-CAA39) após análises

por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) reveladas em luz de radiação ultravioleta (254 nm) e vapores de iodo. Das 39 frações de CAA, as quatro frações de maior rendimento (m/m) foram selecionadas e analisadas por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e de ^{13}C (uni/bidimensional) (tabela S1).

O procedimento resultou no isolamento do composto **1** que apresentou precipitado de colocação branca de massa 20,7 mg. Os compostos **2** e **3**, obtidos em mistura, que apresentou precipitado amorfo de colocação branca e massa de 1,2712 g. As análises por CCD revelou a presença de duas bandas, indicando uma mistura de substâncias com diferentes fatores de retenção (R_f). As substâncias foram isoladas por Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP), em sílica gel 60 F₂₅₄, (placa de 20 x 20 cm para 20 x 20 cm, placa suporte de vidro, 60 Å de diâmetro médio de poros, Supelco®) e fase móvel clorofórmio/diclorometano (1:1) acidificada com 0,1% de ácido acético glacial, utilizando a massa de 70,6 mg da fração. Após a separação e purificação, os compostos **2** (14,7 mg) e **3** (18,8 mg) foram submetidos a análises por RMN de ^1H e ^{13}C . O composto **4** apresentou característica de sólido branco amorfo e massa de 10,8 mg. O composto **5** formou precipitado branco amorfo como massa de 4,3193 g, solúvel em metanol e o composto **6** apresentou características de sólido amorfo, com coloração amarelada e massa aproximada de 400,3 mg, solúvel em DMSO. A metodologia detalhada está representada na Figura 2.

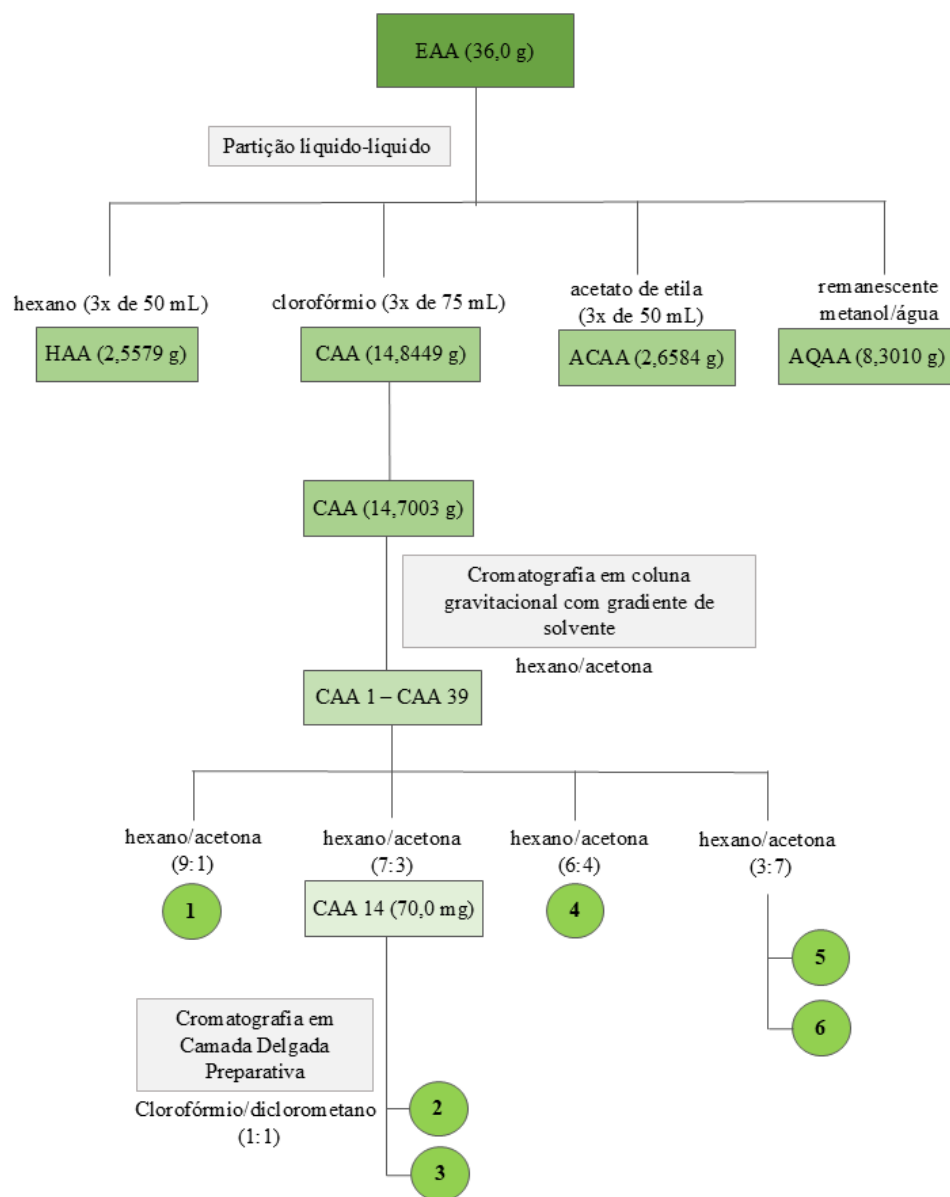


Figura 2. Fluxograma da metodologia de isolamento das seis substâncias químicas obtidas do extrato hidroetanólico das folhas *Amburana acreana*.

2.3 Composição química por RMN

Os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C (uni e bidimensionais), foram obtidos em espectrômetros Bruker, (modelos DRX-500), operando na frequência do hidrogênio a 500 MHz, e na frequência do carbono a 125 MHz, respectivamente. Solventes deuterados foram empregados para dissolução das amostras.

2.4 Ensaios bacterianos *in vitro*

2.4.1 Modelo bacteriano e condições de cultura

Os ensaios fenotípicos foram conduzidos com uma cepa bacteriana produtora de NDM-1 (*Enterobacter cloacae* CCBH10892) e resistente a fármacos beta-lactâmicos, pertencente à coleção de cultura do Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Clínica (LPMC) da Faculdade de Farmácia da UFBA.

2.4.2 Ensaios de microdiluição em caldo

A concentração inibitória mínima (CIM) do amburosídio B frente a bactéria *E. cloacae* CBBH 10892 foi determinada pelo método de microdiluição em caldo descrito no protocolo M7-A6 (CLSI, 2018). Resumidamente, o amburosídio foi diluído em água ultrapura estéril na concentração de trabalho de 10 mM, em seguida, diluições seriadas da substância foram realizadas em intervalo de concentrações entre 1000 e 7,8 µM em microplaca de 96 poços com fundo chato. A densidade da suspensão foi ajustada à escala 0,5 de McFarland com auxílio de densitômetro (Modelo DEN-1, Biosan). A concentração bacteriana final em cada poço foi de $1,5 \times 10^8$ células mL⁻¹. As microplacas foram incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 18-20 horas. Poços contendo apenas o caldo e o caldo + suspensão bacteriana foram usados como controle negativo (de esterilidade) e positivo (100% de crescimento bacteriano), respectivamente. Meropenem (concentrações entre 128 e 1 µg mL⁻¹) foi usado como antibiótico controle.

Após incubação, os valores de absorção à 620 nm foram coletados para todos os poços em espectrofotômetro de placa (Ayto, modelo RT-6000). Os valores de adsorção nos poços contendo o amburosídio B (Abs_{amb}), no controle positivo (Abs_{CP}) e no controle negativo (Abs_{CN}) foram usados para calcular o percentual de inibição do crescimento segundo a Fórmula 1:

$$\% \text{ inibição} = 100 - \frac{(Abs_{amb} - Abs_{CN})}{(Abs_{CP} - Abs_{CN})} \times 100 \quad (1)$$

Todos os ensaios foram realizados em triplicata e as análises estatísticas foram feitas no programa GraphPad Prisma software, v. 9.0, programa para Windows (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, Usa).

2.4.3 Determinação da Concentração Inibitória Fracionada (CIF)

A CIF é uma adaptação da CIM conforme descrito no protocolo M7-A6 (CLSI, 2018). Neste ensaio, diluições seriadas do amburosídio, no intervalo de 1000 a 7,8 μM , foram realizadas na presença de 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de meropenem (Moreira *et al*, 2021). Poços contendo apenas o caldo foram empregados como controle de esterilidade. O controle de crescimento bacteriano foi avaliado nas seguintes condições: poços contendo a suspensão bacteriana + meropenem (4 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Os poços contendo a suspensão bacteriana + EDTA (250 μM) + meropenem (4 $\mu\text{g mL}^{-1}$) foram empregados como controle de inibição de carbapenemase (NDM). Todos os experimentos foram realizados em triplicata e as análises dos resultados foram realizados conforme o ensaio de CIM.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Identificação dos compostos

O extrato hidroetanólico das folhas de *A. acreana* possibilitou o isolamento de compostos químicos da classe dos ácidos fenólicos, heterosídio fenólico glicosilados, cumarina e esteroide glicosilado. A identificação das substâncias foi realizada com base na análise de dados espectroscópicos de RMN de ^1H , ^{13}C e ^{13}C -DEPT-135, HMQC, HMBC e comparação com dados disponíveis na literatura. As análises espectrais permitiram a caracterização dos constituintes químicos: cumarina (**1**), ácido *p*-hidroxibenzoico (**2**), ácido vanílico (**3**), campesterol glicosilado (**4**) e amburosídio B (**5**) e amburosídio I (**6**) (Figura 3).

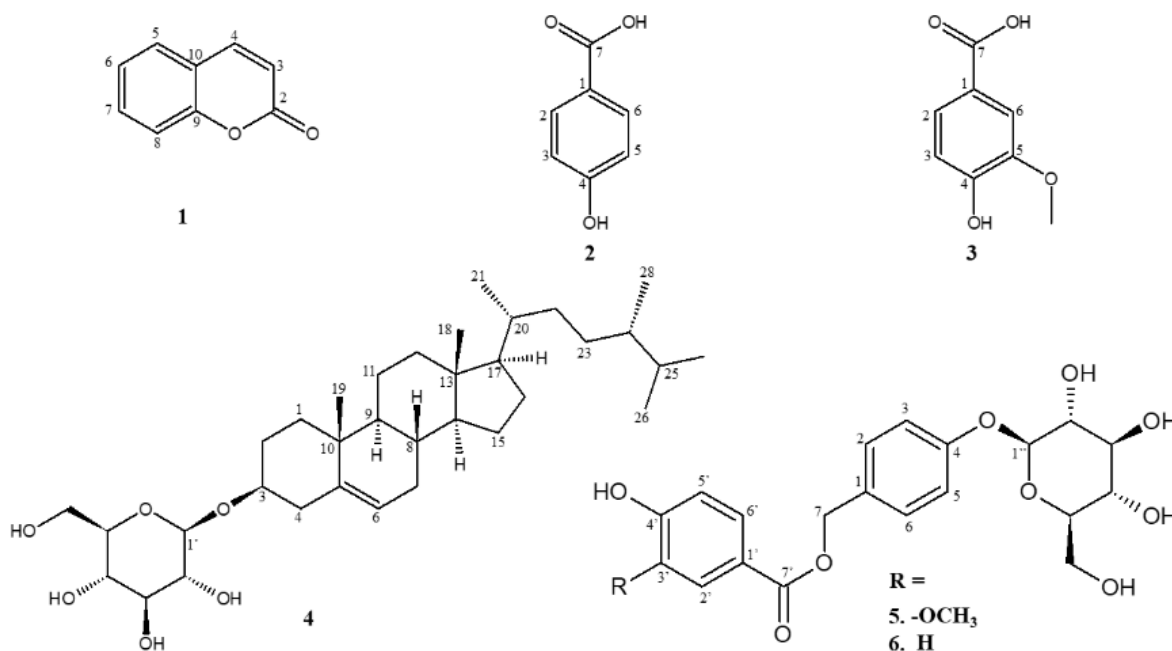


Figura 3. Representação estrutural dos compostos químicos isolados das folhas de *Amburana acreana*. (1) cumarina; (2) ácido *p*-hidroxibenzoico; (3) ácido vanílico; (4) campesterol glicosilado, (5) amburosídeo B e (6) amburosídeo I.

1,2-benzopirona (cumarina) (1)

Sólido branco; RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz): δ 7,72 (1H, d, J 9,5 Hz, H-4), 7,54 (1H, m, H-5) 7,49 (1H, dd, J 7,6, 1,5 Hz, H-7), 7,33 (1H, d, J 8,2 Hz, H-8), 7,29 (1H, m, H-6) 6,43 (1H, d, J 9,5 Hz, H-3). RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) δ 160,8 (C-2), 118,8 (C-10), 143,4 (C-4), 131,8 (C-7), 127,8 (C-5), 124,4 (C-6), 154,0 (C-9), 116,9 (C-8), 116,7 (C-3) (Tabela S2).

O composto **1** apresentou no espectro de RMN de ^1H (CDCl_3) dois multipletos em δ 7,51 (2H, m, H-5 e H-7) e 7,30 (2H, m, H-6 e H-8), relacionados aos hidrogênios aromáticos e dois dupletos em δ 7,72 (1H, d, J 9,5 Hz, H-4) e 6,43 (1H, d, J 9,5 Hz, H-3), associados aos hidrogênios *cis*-olefínicos (Figura S1).

O espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3) apresentou nove sinais espectrais, um deles em δ 160,7 (C-2) compatível com a carbonila lactônica α,β -insaturada, seis carbonos monohidrogenados em δ 143,4 (C-4), 131,8 (C-7), 127,8 (C-5); 124,4 (C-6); 116,8 (C-8) e 116,6 (C-3) e dois carbonos não hidrogenados em δ 154,0 (C-10) e 118,8 (C-9) (Figura S2). A dedução da fórmula molecular para o composto **1**, $\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_2$, foi realizada a partir dos dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C em

comparação com dados da literatura em Duddeck (1982) (Tabela S2) e sugere ao composto **1** a identificação de cumarina (Duddeck e Kaiser, 1982).

Ácido 4-hidroxibenzoico (ácido *p*-hidroxibenzoico) (**2**)

Sólido branco. RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD): δ 7,88 (2H, m, J 7,93 Hz, H-3,5), 6,82 (2H, m, J 7,93 Hz, H-2,6). RMN ^{13}C (125 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}-d_4$) δ 170,4 (C-7), 163,4 (C-4), 133,1 (C-3,5), 122,9 (C-1), 116,1 (C-2,6) (Tabela S3).

A substância **2** apresentou no espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) dois dubletos em δ 6,82 (2H, *d*, J 8,5, H-2,6) e 7,88 (2H, *d*, J 8,6, H-3,5) com valores de constantes de acoplamentos *orto/orto*, característicos de um anel aromático 1,4-dissubstituído (Figura S3).

Os sinais no espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) revelou 5 sinais espectrais, referente a 7 carbonos. O deslocamento químico em δ 170,4 (C-7) característico de carbono carbonílico de ácidos carboxílicos. Os sinais duplicados em δ 133,1 (C-3,5) e 116,1 (C-2,6), e os sinais identificados como pertencentes a carbonos não hidrogenados em δ 122,9 (C-1) e 163,4 (C-4), sendo este deslocamento, típico de carbono oxigenado (Figura S4). As informações presentes nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C em comparação com os dados da literatura permitiram identificar o composto **2** como ácido *p*-hidroxibenzoico (Wang *et al.*, 2018).

Ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzoico (ácido vanílico) (**3**)

RMN ^1H (CD_3OD , 500 MHz) δ 7,56 (2H, m, H-2), 6,84 (1H, *d*, H-5), 3,89 (3H, *s*, $-\text{OCH}_3$). RMN ^{13}C ($\text{CD}_3\text{OD}-d_4$, 125 MHz) δ 170,3 (C-7), 152,7 (C-4), 148,8 (C-3), 125,4 (C-6), 123,3 (C-1), 115,9 (C-5), 113,9 (C-2), 56,5 ($-\text{OCH}_3$) (Tabela S4).

O espectro de RMN de ^1H (CD_3OD) do composto **3** apresentou dois dupletos em δ 7,56 (1H, *d*, J 5,0 Hz, H-6) e 6,84 (1H, *d*, J 5,0 Hz, H-5), e um multipeto em δ 7,55 (1H, m, H-2), esses sinais foram associados a um anel benzênico trissubstituído. Já o singlete agudo em δ 3,89 (3H, *s*, $-\text{OMe}$) é característico de hidrogênios metoxílicos (Figura S5).

O espectro de RMN de ^{13}C (CD_3OD) registrou oito sinais referentes ao δ 170,3 (C-7) atribuído à carbonila de éster ou ácido e os sinais em δ 152,8 (C-3) e 148,8 C-4) atribuídos aos

carbonos aromáticos oxigenados. Os carbonos hidrogenados foram identificados como aromáticos em δ 125,4 (C-6), 115,7 (C-5) e 113,9 (C-2). O sinal em δ 56,5 (-OMe) foi associado à presença de metoxila e o sinal em δ 123,3 (C-1) é característico de carbono aromático não hidrogenado ligado a função ácido carboxílico (Figura S6).

Campesterol 3- β -D-glicosídeo (campesterol glicosilado) (**4**)

RMN ^1H (DMSO, 500 MHz) δ 5,33 (1 H, s, H-6), 4,22 (1H, d, J 8,0 Hz, H-1'), 3,44 (2H, m, H-6'), 3,05 (1H, m, H-3), 1,96 (1H, m, H-7) e 1,63 (1H, d, J 5,0 Hz, H-25). RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 125 MHz) δ 140,4 (C-5), 121,2 (C-6), 100,8 (C-1'), 76,9 (C-5'), 76,8 (C-4'), 76,7 (C-3'), 73,4 (C-2'), 70,1 (C-3), 61,1 (C-6'), 56,2 (C-14), 55,4 (C-17), 49,6 (C-9), 45,1 (C-24), 41,8 (C-13), 38,3 (C-4), 36,8 (C-1), 36,2 (C-10), 35,5 (C-20), 33,3 (C-12), 31,4 (C-7), 31,3 (C-8), 29,2 (C-2), 28,7 (C-25), 27,8 (C-16), 25,4 (C-23), 23,8 (C-15), 22,6 (C-22), 20,6 (C-11), 19,7 (C-27), 19,1 (C-26), 18,9 (C-19), 18,6 (C-21), 11,8 (C-18), 11,7 (C-28) (Tabela S5).

O espectro de RMN de ^1H (DMSO) do composto **4** apresentou um conjunto de deslocamentos químicos de alta multiplicidade em δ 0,65 a 1,97, característicos de hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos, similares a substâncias que possuem estrutura terpênica e/ou esteroidal. Foi sugerido um conjunto de unidade osídica devido a presença de sinais entre δ 4,22 (1H) e 4,88 – 4,86 (3H), característicos de hidrogênios carbinólico do grupo glicose ligado a osídica na posição C-3. O sinal em δ 3,65 – 3,63 (1H, dd, J 5,0 Hz, H-10) é característico de hidrogênio ligado a carbono na posição C-3 de esteroides. Também foi identificado um singlete largo em δ 5,33, típico de hidrogênio olefínico H-6 de esteroides, na posição C-6, indicando insaturação no carbono (C=C) na estrutura do composto (Figura S7) (Johnson *et al.*, 2020).

Os sinais no espectro de RMN ^{13}C (DMSO) revelou presença de 34 carbonos, sugestivos de compostos esteroides conjugados. Os sinais entre δ 11,66 e 22,59, são característicos de carbonos metílicos em esteroides. Os sinais em δ 140,43 (C-5), 41,84 (C-13) e δ 36,20 (C-10) foram sugeridos à carbonos quaternários. O sinal observado em δ 70,07 é característico de carbono oximetínico (C-3). O sinal em δ 100,78 foi indicativo para sugerir a presença do grupo de açúcar, cujo valor de referência está na faixa de absorção usualmente atribuída ao carbono anomérico da glicose (Figura S8) (Johnson *et al.*, 2020). Diante do perfil espectral e das informações presentes

nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C em comparação à registros da literatura (Johnson *et al.*, 2020), foi possível identificar o composto **4** como o campesterol glicosilado, seu primeiro relato em extratos de *Amburana acreana*.

Vanilato de 4-O- β -D-glicopiranosil-benzila (amburosídio B) (**5**)

RMN ^1H (CD_3OD , 500 MHz) δ 7,55 (1H, m, H-6'), 7,53 (1H, m, H-2'), 7,38 (2H, d, J 8,5 Hz, H-2, 6), 7,11 (2H, d, J 8,5 Hz, H-3, 5), 6,83 (1H, d, J 8,5 Hz, H-5'), 5,25 (2H, s, H-7), 4,93 (1H, d, J 4,3, H-1''), 3,90 (1H, m, H-6''), 3,87 (3H, s, $-\text{OCH}_3$), 3,69 (1H, dd, J 11,9, 4,9 Hz, H-6''), 3,47 (1H, m, H-3''), 3,46 (1H, m, H-2''), 3,43 (1H, m, H-5''), 3,39 (1H, m, H-4''). RMN ^{13}C ($\text{CD}_3\text{OD}-d_4$, 125 MHz) δ 168,1 (C-7'), 159,2 (C-4), 153,1 (C-4'), 148,9 (C-3'), 131,8 (C-1), 130,9 (C-2 e C-6), 125,2 (C-6'), 122,7 (C-1'), 117,9 (C-3 e C-5), 116,1 (C-5'), 113,6 (C-2'), 102,3 (C-1''), 78,3 (C-5''), 78,1 (C-3''), 75,0 (C-2''), 71,5 (C-4''), 67,3 (C-7), 62,6 (C-6''), 56,5 ($-\text{OMe}$) (tabela 1).

O espectro de RMN de ^1H (CD_3OD) referente ao composto **5** apresentou sinais em δ 7,38 (H-2,6) e 7,11 (H-3,5) (2H, d, J 8,2 Hz), correspondentes a um anel aromático *para*-disubstituído, e os sinais em δ 7,55 (1H, m, H-6'), 7,53 (1H, m, H-2') e 6,83 (1H, d, J 8,5, H-5'), referentes a um anel aromático trissubstituído. O singlete em δ 5,25 (2H, s), foi atribuído aos hidrogênios ligados a carbono oxigenado H-7. O conjunto de sinais na faixa de δ 4,93-3,45 foi atribuído a hidrogênios osídicos, exceto um singlete em δ 3,87 (3H, s, 3'-OMe), o qual é compatível com hidrogênios metoxílicos (Figura S9). Dezenove linhas espectrais foram exibidas no espectro de RMN de ^{13}C (CD_3OD) (Figura S10). O sinal em δ_{C} 168,1 (C-7') é característico a carbonila de éster e δ 159,2 (C-4); 153,0 (C-4') e 148,9 (C-3'), associadas a carbonos aromáticos oxigenados.

O espectro RMN de ^{13}C -DEPT135 (CD_3OD) complementou as informações obtidas no espectro de RMN de ^{13}C e auxiliou na prospecção estrutural da molécula. Foi identificada a presença de dez carbonos monohidrogenados (sinal C positivo), dos quais 5 foram relacionados aos carbonos aromáticos: δ 130,9 (C-2,6), 125,2 (C-6'), 117,9 (C-3,5), 116,1 (C-5') e 113,6 (C-2'), e os demais associados aos carbonos osídicos, δ 102,3 (C-1''), 78,3 (C-5''), 78,1 (C-3''), 75,0 (C-2'') e 71,5 (C-4''). Dois carbonos metilênicos oxigenados também foram identificados em δ 67,3 (C-7) e 62,6 (C-6''). O sinal em δ 56,6 (3'-OMe) confirmou a existência de uma metoxila e os sinais

em δ 131,9 (C-1) e 122,7 (C-1'), ausentes no espectro DEPT135, foram reconhecidas como pertencentes a carbonos aromáticos não-hidrogenados (Figura S11).

Tabela 1. Dados do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD , δ_{H} ppm) e ^{13}C (125 MHz, CD_3OD , δ_{C} ppm) do amburosídio B (**5**) isolado da porção clorofórmica do extrato hidroetanólico das folhas de *Amburana acreana* comparado com dados da literatura (Bravo *et al.*, 1999).

^{13}C	5				Amburosídio B	
	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	HMBC 2J	HMBC 3J	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)
1	131,8	-	5,25	7,11	130,7	-
2/6	130,9	7,38 (2H, d, J 8,5 Hz)	-	5,25	130,0	7,36 (2H, d, J 8,6 Hz)
3/5	117,9	7,11 (2H, d, J 8,5 Hz)	7,38	-	116,9	7,08 (2H, d, J 8,6 Hz)
4	159,2	-	7,11	7,38	157,5	-
7	67,3	5,25 (2H, s)	-	7,38	66,4	5,26 (2H, s)
1'	122,7	-	7,53	6,83	121,7	-
2'	113,6	7,53 (1H, m)	-	7,55	112,6	7,53 (1H, d, J 1,9 Hz)
3'	148,9	-	-	3,87;6,83	147,4	-
4'	153,1	-	6,83	7,53	151,3	-
5'	116,1	6,83 (1H, d, J 8,5 Hz)	-	-	114,9	6,87 (1H, d, J 8,2 Hz)
6'	125,2	7,55 (1H, m)	-	7,55	124,4	7,59 (1H, dd, J 8,2, 1,9 Hz)
7'	168,1	-	-	7,53; 7,53; 5,25	167,1	-
1''	102,3	4,93 (1H, d, J 4,3 Hz)	3,45	-	101,0	4,95 (1H, d, J 7,0 Hz)
2''	75,0	3,46 (1H, m)	3,47	-	73,6	3,56 (1H, t, J 9,4 Hz)
3''	78,1	3,47 (1H, m)	3,39	-	76,7	3,54 (1H, t, J 9,4 Hz)
4''	71,5	3,39 (1H, m)	3,47	-	70,1	3,52 (1H, t, J 9,4 Hz)
5''	78,3	3,43 (1H, m)	3,70	-	76,5	3,44 (1H, m)
6''	62,6	3,69 (1H, dd, J 11,9, 4,8 Hz), 3,90 (1H, m)	-	-	61,8	3,90 (1H, dd, J 12,3, 1,9 Hz), 3,77 (1H, dd, J 12,3, 4,4 Hz)
3'-OMe	56,5	3,87 (3H, s)	-	-	56,1	3,90 (3H, s)

O espectro RMN de ^{13}C -DEPT135 (CD_3OD) complementou as informações obtidas no espectro de RMN de ^{13}C e auxiliou na prospecção estrutural da molécula. Foi identificada a presença de dez carbonos monohidrogenados (sinal C positivo), dos quais 5 foram relacionados aos carbonos aromáticos: δ 130,9 (C-2,6), 125,2 (C-6'), 117,9 (C-3,5), 116,1 (C-5') e 113,6 (C-2'), e os demais associados aos carbonos osídicos, δ 102,3 (C-1''), 78,3 (C-5''), 78,1 (C-3''), 75,0 (C-2'') e 71,5 (C-4''). Dois carbonos metilênicos oxigenados também foram identificados em δ 67,3

(C-7) e 62,6 (C-6''). O sinal em δ 56,6 (3'-OMe) confirmou a existência de uma metoxila e os sinais em δ 131,9 (C-1) e 122,7 (C-1'), ausentes no espectro DEPT135, foram reconhecidas como pertencentes a carbonos aromáticos não-hidrogenados (Figura S11).

O espectro de RMN-HMQC mostrou os acoplamentos 1J entre os hidrogênios e carbonos de cada anel benzênico. O Espectro de RMN-HMBC mostrou as correlações de acoplamento 2J e 3J entre os hidrogênios e carbonos do composto químico. As informações espectrais de RMN de HMQC e HMBC está disponível no material suplementar, Figuras S12 e S13, respectivamente. Os dados permitiram identificar a substância **5** como amburosídio B (vanilato de 4-*O*- β -D-glicopiranosil-benzila) (Tabela 1).

Ester de 4-*O*- β -D-glicopiranosiloxibenzila (amburosídio I) (**6**)

RMN 1H (DMSO, 500 MHz) δ 7,82 (2H, d, J 8,2 Hz, H-2',6'), 7,38 (2H, d, J 7,9 Hz, H-3,5), 7,04 (2H, d, J 7,9 Hz, H-2,6), 6,84 (2H, d, J 8,2 Hz, H-3',5'), 5,22 (2H, s, H-7), 4,87 (1H, d, J 7,0 Hz, H-1''), 3,69 (1H, dd, J 11,6, 5,2 Hz, H-6''), 3,46 (1H, d, J 11,6 Hz, H-6''), 3,32 (1H, m, H-5''), 3,25 (1H, m, H-3''), 3,24 (1H, m, H-2''), 3,16 (1H, m, H-4''). RMN ^{13}C (DMSO, 125 MHz) δ 165,4 (C-7'), 162,1 (C-4'), 157,2 (C-4), 131,4 (C-2',6'), 129,6 (C-1), 129,5 (C-2,6), 120,2 (C-1'), 116,2 (C-3,5), 115,4 (C-3',5'), 100,3 (C-1''), 77,0 (C-5''), 76,6 (C-3''), 73,2 (C-2''), 69,7 (C-4''), 65,3 (C-7), 60,8 (C-6'') (Tabela 2).

O espectro de RMN de 1H (DMSO) referente ao composto **6** apresentou sinais em δ 7,38 (H-3,5) e 7,04 (H-2,6); e 7,82 (H-2',6') e 6,84 (H-3',5') correspondentes a dois anéis aromáticos *para*-dissubstituído, respectivamente. Um singlete em δ 5,22 (2H, s), atribuído aos hidrogênios ligados a carbono oxigenados H-7. E sinais entre δ 4,87-3,16, que foram atribuídos a hidrogênios osídicos (Figura S14). Dezesesseis sinais espectrais foram exibidos no espectro de RMN de ^{13}C (DMSO) (Figura S15). O sinal em δ 165,4 (C-7') é característico de carbonila de éster; δ 157,2 (C-4) e 162,1 (C-4'), associados a carbonos aromático oxigenados.

O mapa de contorno de RMN-HMQC mostrou acoplamentos 1J entre os hidrogênios e carbonos de cada anel benzênico, já o mapa de contorno de RMN-HMBC mostrou as correlações de acoplamento 2J e 3J entre os hidrogênios e carbonos do composto **6**. Os dados dos espectros bidimensionais de RMN de HMQC e HMBC estão disponíveis no material suplementar, Figuras

S16 e S17, respectivamente. As informações de RMN uni e bidimensionais, bem como os dados da literatura, permitiram identificar a substância **6** como amburosídio I (Ester de 4-*O*- β -D-glicopiranosiloxibenzila) (Tabela 2).

Tabela 2. Dados do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO, δ_{H} ppm) e ^{13}C (125 MHz, DMSO, δ_{C} ppm) do amburosídio I (**6**) isolado da porção clorofórmica do extrato hidroetanólico das folhas de *Amburana acreana* comparado com dados da literatura (Zidorn; Ellmerer-Müller; Stuppner, 2001).

^{13}C	6				éster 4- β -D-glucopiranosiloxibenzílico	
	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	HMBC 2J	HMBC 3J	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)
1	129,6	-	5,22, 7,04	7,38	131,8	-
2/6	129,5	7,04 (2H, d, J 7,9 Hz)	-	5,22	130,8	7,16 (2H, d)
3/5	116,2	7,38 (2H, d, J 7,9 Hz)	7,04	-	117,9	7,42 (2H, d)
4	157,2	-	7,38	7,04	159,1	-
7	65,30	5,22 (2H, s)	-	7,04	67,1	5,23 (2H, s)
1'	120,2	-	7,82	6,84	122,3	-
2'/6'	131,4	7,82 (2H, d, J 8,2 Hz)	6,84	-	132,8	7,92 (2H, d)
3'/5'	115,4	6,84 (2H, d, J 8,2 Hz)	7,82	-	116,3	6,86 (2H, d)
4'	162,1	-	6,84	7,82	163,7	-
7'	165,4	-	-	7,84; 5,24	168,1	-
1''	100,3	4,87 (1H, d, J 7,0 Hz)	3,24	-	102,3	4,95 (1H, d, J 7,5 Hz)
2''	73,2	3,24 (1H, m)	3,25	-	75,0	3,40 (1H, m)
3''	77,0	3,25 (1H, m)	3,16	-	78,5	3,44 (1H, m)
4''	69,7	3,16 (1H, m)	3,25	-	71,5	3,39 (1H, m)
5''	76,6	3,32 (1H, m)	3,46	-	78,2	3,44 (1H, m)
6''	60,8	3,69 (1H, d, J 11,6 Hz); 3,46 (1H, dd, J 11,6, 5,2)	-	-	62,6	3,92 (1H, dd, J 12,0, 2,0); 3,73 (1H, dd, J 12,0, 5,0)

Os amburosídeos são compostos fenólicos glicosídicos. Sugere-se que sua biogênese tenha início com a redução do ácido *p*-hidroxibenzoico a álcool *p*-hidroxibenzílico, o qual pode ser esterificado pelo ácido vanílico, através da hidroxila alcoólica (nucleófilo mais forte do que a hidroxila fenólica), formando o protocatecuato de *p*-hidroxibenzila. A glicosilação do éster com UDPglicose leva à síntese do amburosídio B. Existe uma diversidade de amburosídeos, eles variam de A-H, e até o momento, só haviam sido citados, exclusivamente, em espécies vegetais de A.

cearensis, sendo este estudo o primeiro registro científico do amburosídio B em *A. acreana* (Dewick, 2002; Canuto, 2007).

Os amburosídios A e B, compostos glicosídeos fenólicos, foram isolados da *Amburana cearensis* e foi avaliada a atividade antimalárica, anti-protozoária, antifúngica e antibacteriana *in vitro*, demonstrando moderada atividade antimalárica e antiprotozoária (Bravo *et al.*, 1999; Canuto, 2007; Leal *et al.*, 2008; Amaral, 2017; De Araújo *et al.*, 2022; Gouveia *et al.*, 2022). Silveira e colaboradores (2022), reuniram no artigo de revisão um compilado de estudos que analisaram o potencial farmacológico da espécie *A. cearensis* utilizando extratos da folha, da casca do caule, das sementes e compostos bioativos isolados. Os resultados demonstram que a cumarina (1,2 benzopirona) apresenta atividade anti-inflamatória, anti-edematogênica, antinociceptiva, miorrelaxante e antileishmania. A ação anti-inflamatória, neuroprotetora, hepatoprotetora e anti-edematogênica foi comprovada para o amburosídio A e o ácido vanílico também foi analisado e apresentou potencial antinociceptivo, anti-edematogênico e anti-inflamatório (Silveira *et al.*, 2022).

3.2 Ensaios *in vitro*

Primeiramente, um ensaio controle foi realizado para determinar a CIM do meropenem (Figura 4). Neste ensaio, verificou-se que o meropenem tem CIM $> 32 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($> 70\%$ de inibição) constatando a condição de resistente a meropenem acordo com protocolo M100 (CLSI, 2019).

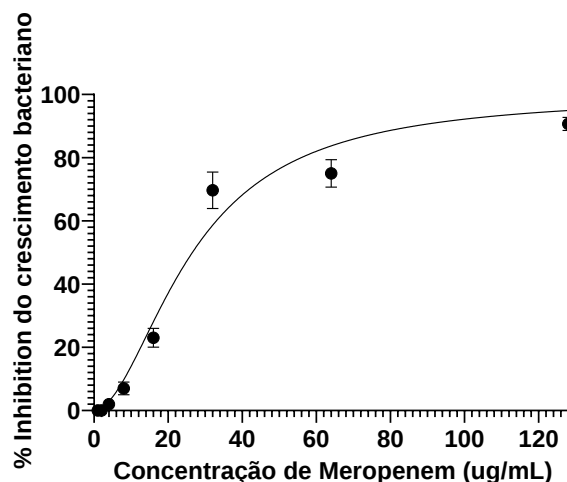


Figura 4: Concentração inibitória mínima do meropenem ($> 32 \mu\text{g mL}^{-1}$) em termos do percentual de inibição do crescimento bacteriano ($> 70\%$).

O ensaio de CIM foi conduzido para o amburosídio B (Figura 5) e indicou que esta substância na maior concentração utilizada (1000 μM) inibiu apenas $19,3 \pm 0,5\%$ do crescimento bacteriano, sugerindo que o amburosídio B não tem ação antibacteriana no modelo utilizado. A fim de verificar se o produto natural tem ação sobre a metalo-beta-lactamase NDM-1, concentrações crescentes de amburosídio B foram avaliadas em combinação com o antibiótico meropenem (4 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Neste ensaio denominado CIF, observa-se um aumento de inibição do crescimento da *E. cloacae* com o aumento de concentração do produto natural (Figura 5). Contudo, na maior concentração avaliada (1000 μM), a inibição foi de $45,2 \pm 1,2\%$, sugerindo que o amburosídio B tem baixa atividade sobre o mecanismo de resistência do modelo bacteriano. Para fins de comparação, o controle experimental da CIF (EDTA à 250 μM) inibiu $99,1 \pm 1,1\%$ do crescimento microbiano.

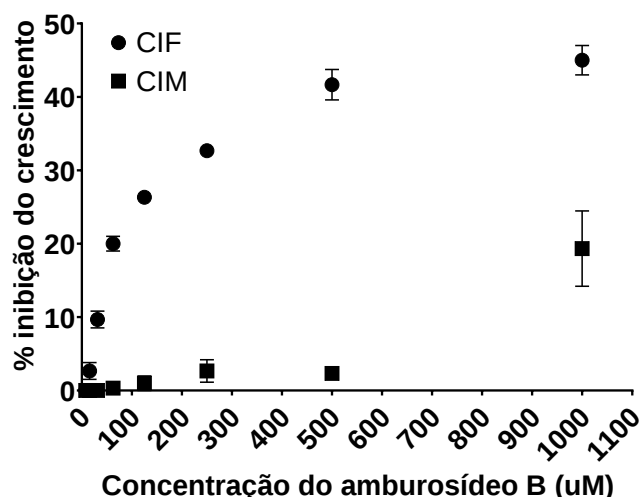


Figura 5. Concentração inibitória mínima (CIM) do amburosídio B (1000 μM) em termos de percentual de inibição do crescimento bacteriano ($19,3 \pm 0,5\%$) e a concentração inibitória fracionada (CIF) do amburosídio B combinada com o meropenem (4 $\mu\text{g mL}^{-1}$) em termos do percentual inibitório do crescimento bacteriano.

Embora o amburosídio B não seja ativo frente a NDM-1, a investigação se justifica uma vez que a descoberta de inibidores desta enzima é bastante desafiadora e tem sido motivo de preocupação dos órgãos de saúde pública mundiais, principalmente devido as características estruturais da NDM-1. Além disso, neste estudo foi empregado um modelo bacteriano gram-

negativo (*E. cloacae*), logo, não se pode afirmar que o amburosídio B seja ineficaz contra cepas gram-positivas.

4 CONCLUSÕES

O fracionamento cromatográfico do extrato hidroetanólico das folhas de *A. acreana* permitiu o isolamento e a caracterização química da cumarina (1), ácido *p*-hidroxibenzoico (2), ácido vanílico (3), campesterol glicosilado (4), amburosídio B (5) e amburosídio I (6), sendo os amburosídeos, os compostos majoritários do extrato hidroetanólico. A classe química dos amburosídeos são considerados possíveis marcadores quimiotaxonômico do gênero. Os testes *in vitro* realizados com cepa bacteriana gram-negativa produzida por NDM-1 indicaram que o amburosídio B não tem potencial para inibir o crescimento deste modelo bacteriano e a enzima NDM-1. As informações fitoquímicas fornecidas por esta pesquisa, contribui com o arcevo do gênero e fornece dados inéditos para a espécie *Amburana acreana*.

REFERÊNCIAS

- AMARAL, H. H. de S.; Extrato seco padronizado de *Amburana cearensis* cultivada e constituintes químicos modulam a inflamação em um novo modelo de asma exacerbada em camundongos balb/C e a resposta neutrofílica *in vitro*; Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Ceará, Brasil, 2017. [<http://repositorio.ufc.br/handle/riufc/28570>], accessed in february 2024.
- BRAVO B, J. A.; Sauvain, M.; Gimenez T., A.; Muñoz O., V.; Callapa, J.; Le Men-Olivier, L.; Massiot, G.; Lavaud, C.; **Phytochemistry** 1999, 50, 71. [[https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(98\)00497-X](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(98)00497-X)]
- CANUTO, K. M.; Aspectos Químicos do Estudo Interdisciplinar (Química-Agronomia-Farmacologia) de *Amburana cearensis* A.C. Smith; Tese de Doutorado, Universidade Federal do Ceará, Brasil, 2007.[<https://repositorio.ufc.br/handle/riufc/11124>], accessed in february 2024.
- Carvalho, P.E.R. Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira, 7th ed.; **Embrapa - CNPF/ SPI**. Colombo: 640p. 1994.

CARVALHO, P.E.R.; Cerejeira-da-Amazônia Amburana acreana, 2007.

[<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPF-2009-09/42346/1/Circular134.pdf>]
accessed in february 2024.

CLSI. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically (11th ed., Issue i). **Clinical and Laboratory Standards Institute.**, 2018.

<https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m07/>

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 29th ed.; CLSI supplement M100; **Clinical and Laboratory Standards Institute:** Wayne, PA, USA, 2019; ISBN1 978-1-68440-032-4. [Print]; ISBN2 978-1-68440-033-1.

De ARAÚJO, A. B.; Azul, F. V. C. S.; Silva, F. R. M.; De Almeida, T. S.; Oliveira, J. V. N.; Pimenta, A. T. Á.; Bezerra, A. M. E.; Machado, N. J.; Leal, L. K. A. M.; **Oxid. Med. Cell. Longev.** 2022, 2022, 1. [<https://doi.org/10.1155/2022/6304087>]

DEWICK, P.M. Medicinal natural products: a biosynthetic approach. 2th ed. London: West Sussex John Wiley & Sons, 2002. 507p.

DUDDECK, H.; Kaiser, M.; Org. Magn. Reson. 1982, 20, 55.

[<https://doi.org/10.1002/mrc.1270200202>]

GOUVEIA, B. B.; Barberino, R. S.; Menezes, V. G.; O Monte, A. P.; Lucia Silva, R. S.; Palheta Jr, R. C.; Rolim, L. A.; V Pereira, E. C.; Oliveira Jr, R. G.; Roberto S Almeida, J. G.; Helena Matos, M. T.; Apo, M.; Rls, S.; Jr, P. R.; Ecv, P.; Jr, O. R.; Jrgs, A.; **Iran. J. Basic Med. Sci.** 2022, 25, 683. [<https://doi.org/10.22038/IJBMS.2022.58927.13092>]

GraphPad Prism, version 6.0; **GraphPad Software**, San Diego, California, USA, 2016.

Johnson, O. O.; Bhat, S. G.; Ayoola, G. A.; Madayath, H.; Puthusseri, S. P.; Coker, H.; Trop. J. **Nat. Prod. Res.** 2020, 4, 1033. [<https://doi.org/10.26538/tjnpr/v4i12.2>]

LEAL, L. K. A. M.; Canuto, K. M.; Da Silva Costa, K. C.; Nobre-Júnior, H. V.; Vasconcelos, S. M.; Silveira, E. R.; Ferreira, M. V. P.; Fontenele, J. B.; Andrade, G. M.; De Barros Viana, G. S.; **Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.** 2008, 104, 198. [<https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2008.00329.x>] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19053991>

LEAL, L. K. A. M.; Fonseca, F. N.; Pereira, F. A.; Canuto, K. M.; Felipe, C. F. B.; Fontenele, J. B.; Pitombeira, M. V.; Silveira, E. R.; Viana, G. S. B.; **Planta Med.** 2008, 74, 497.

[<https://doi.org/10.1055/s-2008-1074501>]

- LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. **Editora Plantarium**, Nova Odessa, São Paulo, 1992, 191p.
- MATOS, F. J. A.; Introdução à fitoquímica experimental. 2th ed.; Fortaleza: EUFC, 1997.
- MOREIRA, J. S.; Galvão, D. S.; Xavier, C. F. C.; Cunha, S.; Pita, S. S. da R.; Reis, J. N.; Freitas, H. F. de; **J. Biomol. Struct. Dyn.** 2021, 40, 14223.
[<https://doi.org/10.1080/07391102.2021.2001379>]
- SANTIAGO, W. D.; Cardoso, M. G.; Santiago, J. D. A.; Gomes, M. S.; Rodrigues, L. M. A.; Brandão, R. M.; Cardoso, R. R.; Avila, G. B.; Silva, B. L.; Caetano, A. R. S.; **Am. J. Plant Sci.** 2014, 5, 3140. [<https://doi.org/10.4236/ajps.2014.521330>]
- SELEME, E. P.; Lewis, G. P.; Stirton, C. H.; Sartori, Â. L. B.; Mansano, V. F.; **Phytotaxa** 2015, 212, 249. [<https://doi.org/10.11646/phytotaxa.212.4.1>]
- SELEME, E.P. Amburana in Flora e Funga do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro.
[<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB22780>], accessed in march 2023.
- SILVEIRA, Z. de S.; Macêdo, N. S.; Bezerra, S. R.; Siyadatpanah, A.; Coutinho, H. D. M.; Seifi, Z.; Kim, B.; da Cunha, F. A. B.; Balbino, V. de Q.; **Molecules** 2022, 27, 1.
[<https://doi.org/10.3390/molecules27020505>]
- WANG, D.; Mu, Y.; Dong, H.; Yan, H.; Hao, C.; Wang, X.; Zhang, L.; **Molecules** 2018, 23,
[<https://doi.org/10.3390/molecules23010072>]
- ZIDORN, Christian; ELLMERER-MÜLLER, Ernst P.; STUPPNER, Hermann. A germacranolide and three hydroxybenzyl alcohol derivatives from Hieracium murorum and Crepis bocconi. **Phytochemical Analysis**, [s. l.], vol. 12, no. 4, p. 281–285, 2001. Available at: <https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pca.585>.

MATERIAL SUPLEMENTAR

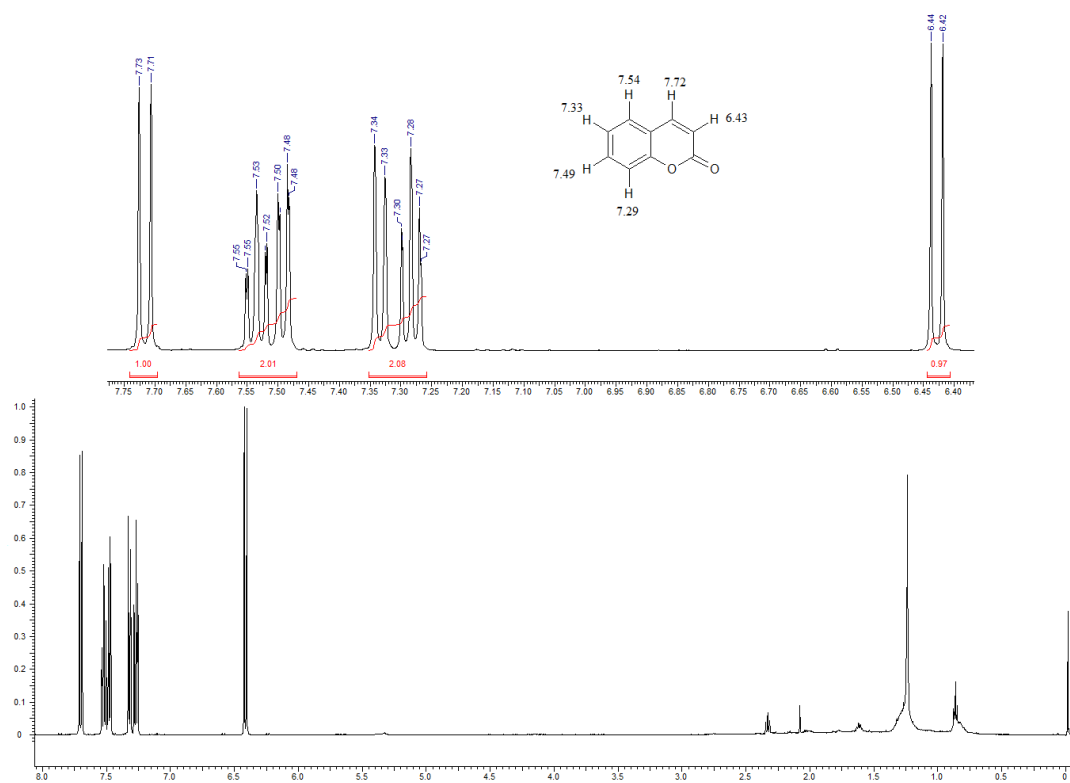


Figura S1. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3 , δH ppm) da cumarina isolada das folhas de *Amburana acreana*.

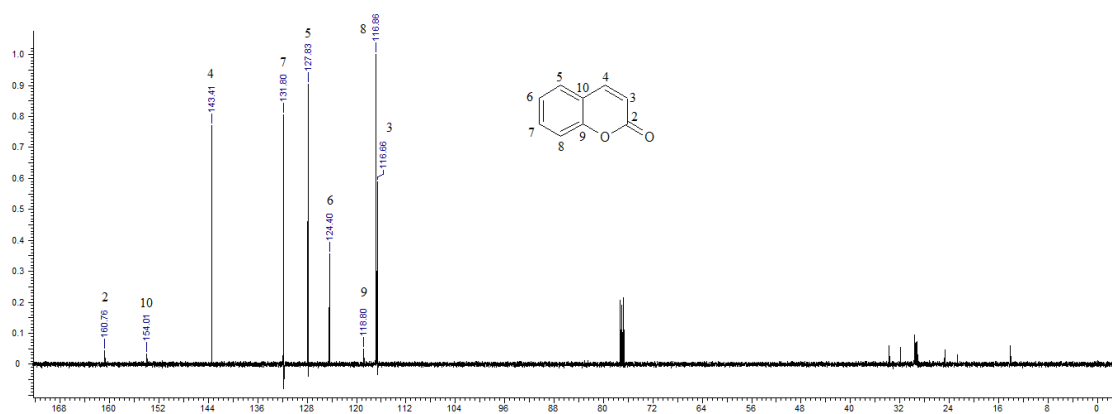


Figura S2. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3 , δC ppm) da cumarina isolada das folhas *Amburana acreana*.

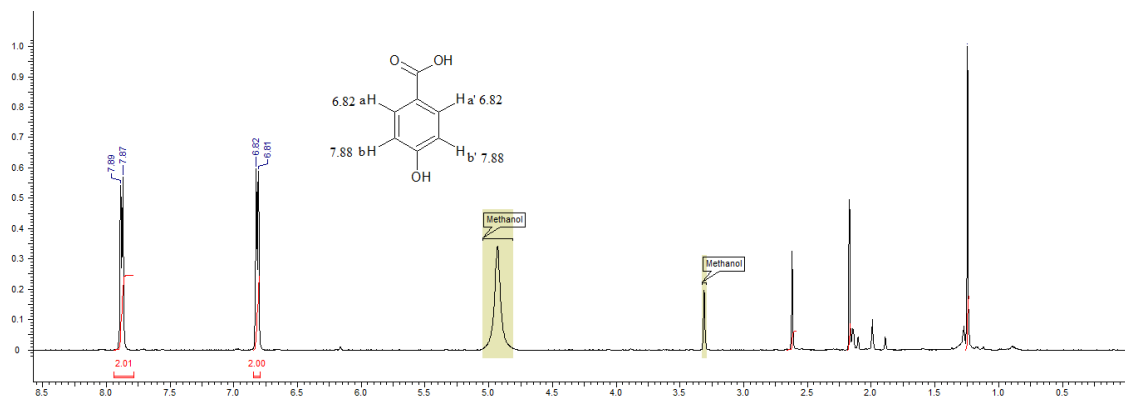


Figura S3. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD , δ_{H} ppm) do composto ácido *p*-hidroxibenzoico isolado das folhas de *Amburana acreana*.

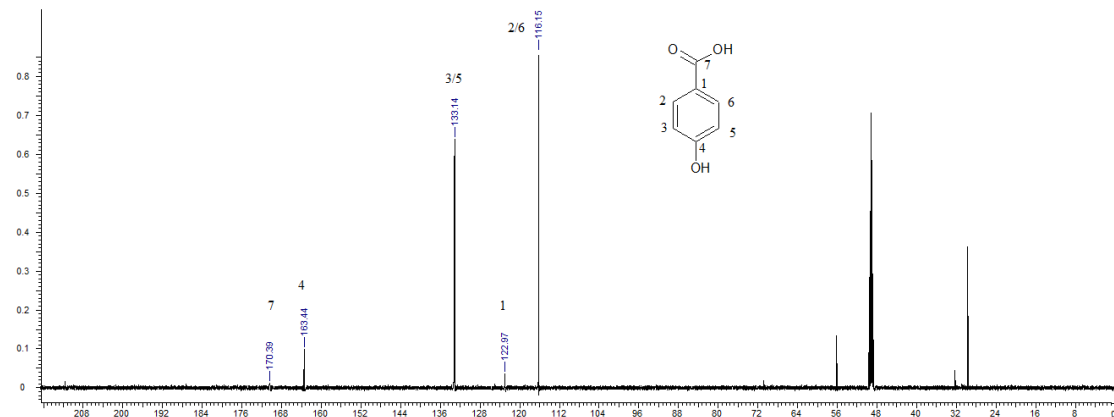


Figura S4. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CD_3OD , δ_{C} ppm) do composto ácido *p*-hidroxibenzoico isolado das folhas de *Amburana acreana*.

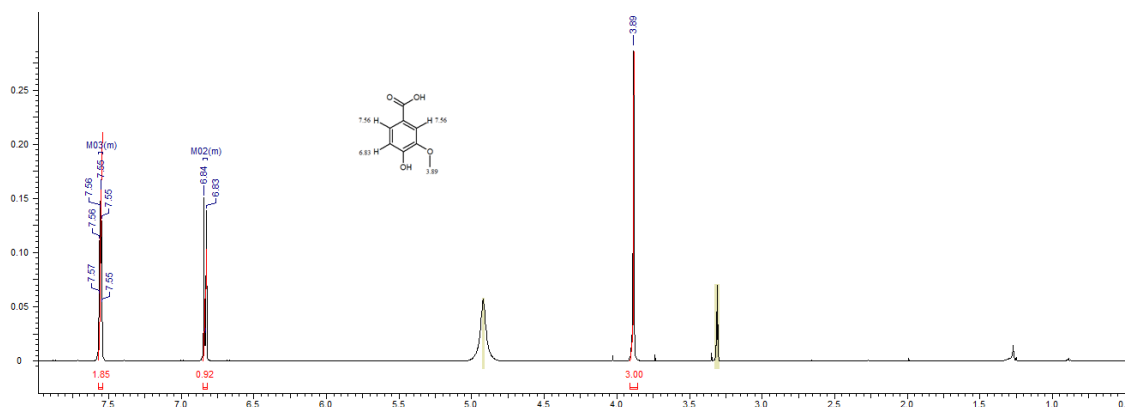


Figura S5. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD , δ_{H} ppm) do composto ácido vanílico isolado das folhas de *Amburana acreana*.

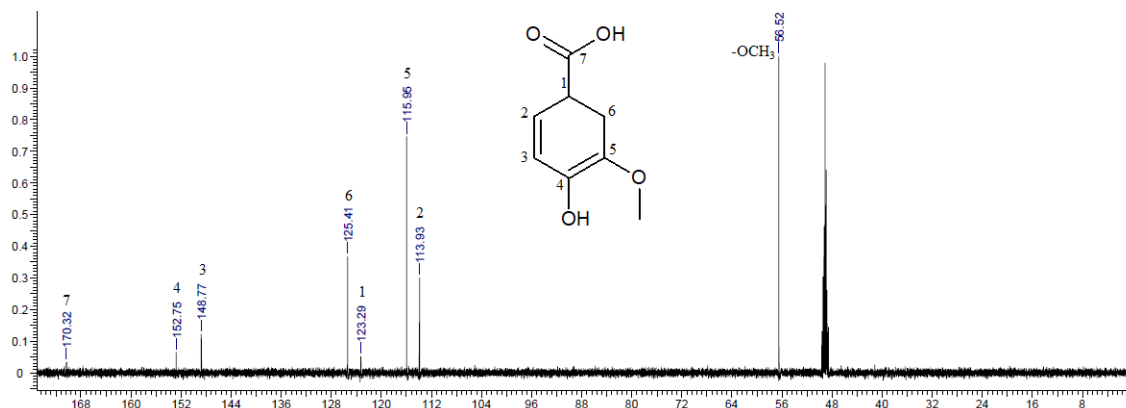


Figure S6. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CD_3OD , δ_{C} ppm) do composto ácido vanílico isolado das folhas *Amburana acreana*.

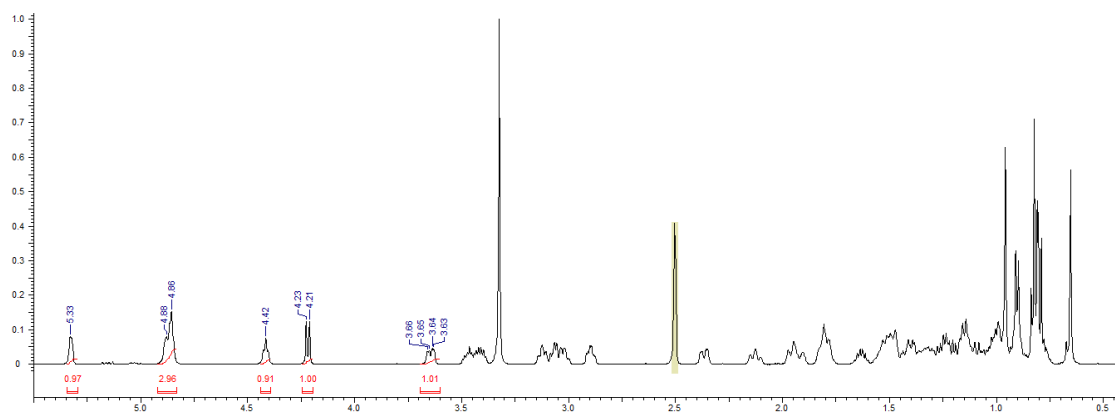


Figura S7. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD , δ_{H} ppm) do campesterol 3- β -D-glicosídeo composto isolado das folhas *Amburana acreana*.

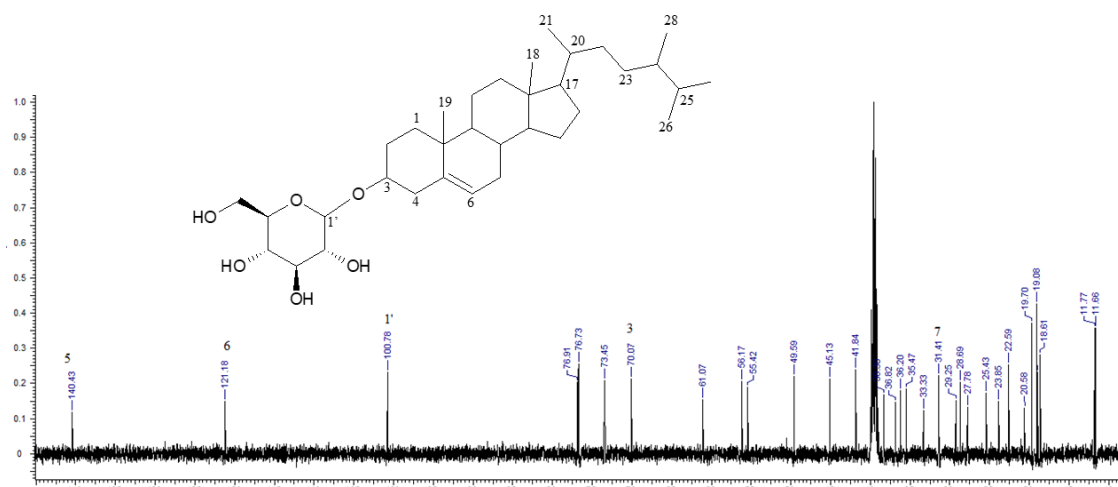


Figura S8. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CD_3OD , δ_{C} ppm) do campesterol 3- β -D-glicosídeo isolado das folhas *Amburana acreana*.

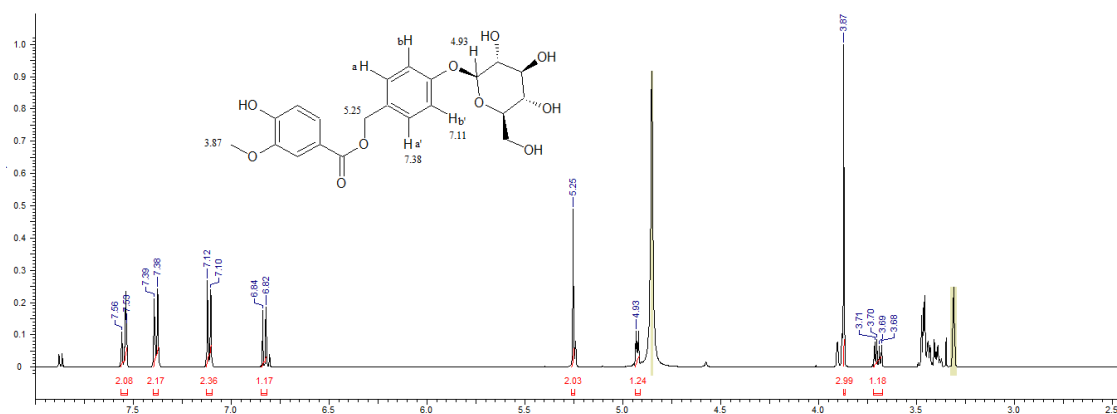


Figura S9. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD , δ_{H} ppm) do amburosídeo B isolado das folhas de *Amburana acreana*.

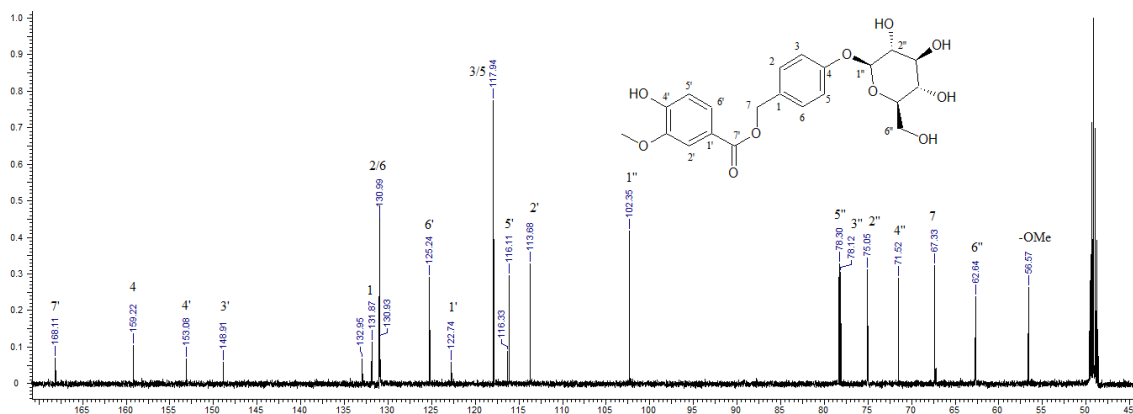


Figura S10. Espectro de RMN de ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD , δ_{C} ppm) do amburosídeo B isolado das folhas de *Amburana acreana*.

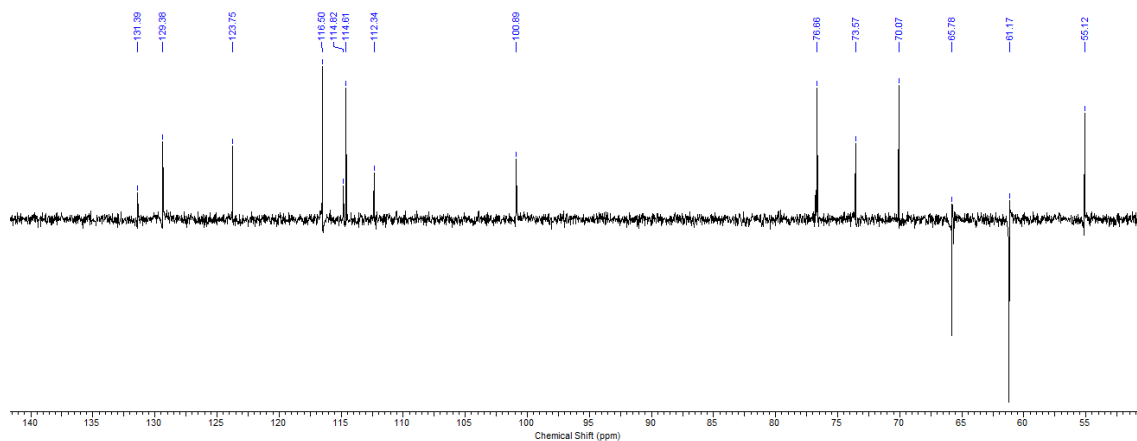


Figura S11. Espectro de RMN de ^{13}C -DEPT 135 (125 MHz, CD_3OD , δ_{C} ppm) do amburosídeo B isolado das folhas de *Amburana acreana*.

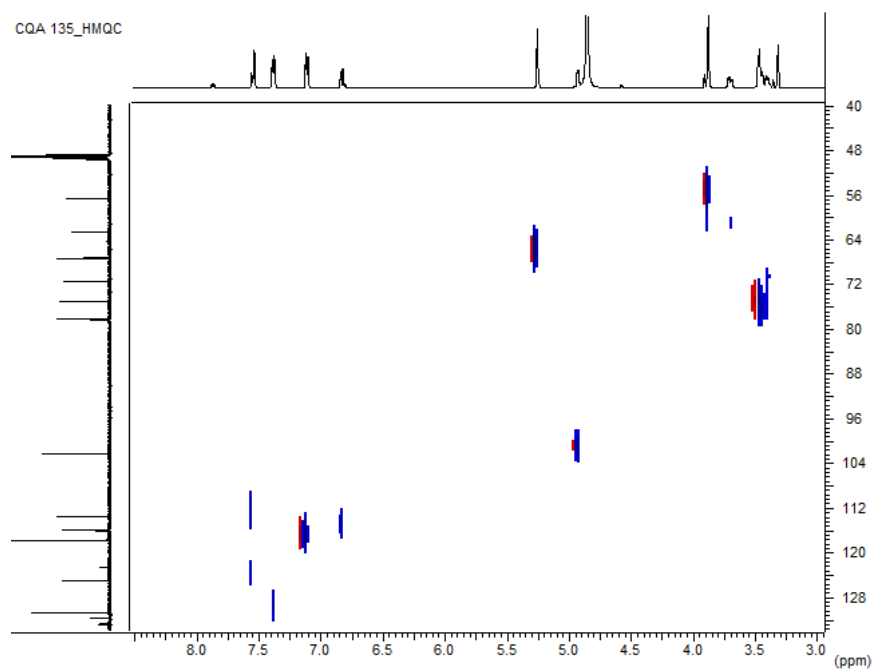


Figura S12. HMBC mapa de contorno (CD_3OD , 125 x 500 MHz) do amburosídeo B.

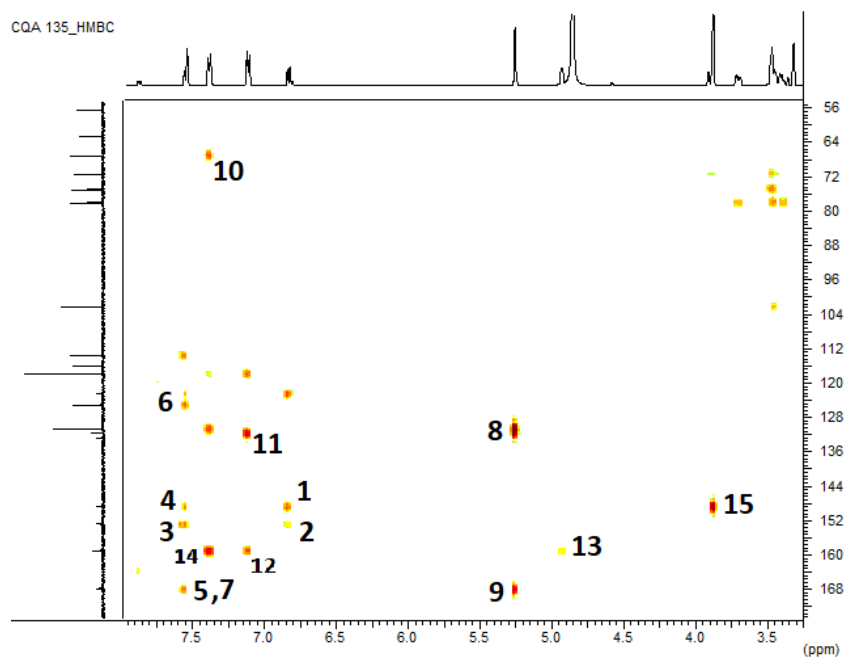


Figura S13. HMBC mapa de contorno (CD_3OD , 125 x 500 MHz) do amburosídeo B.

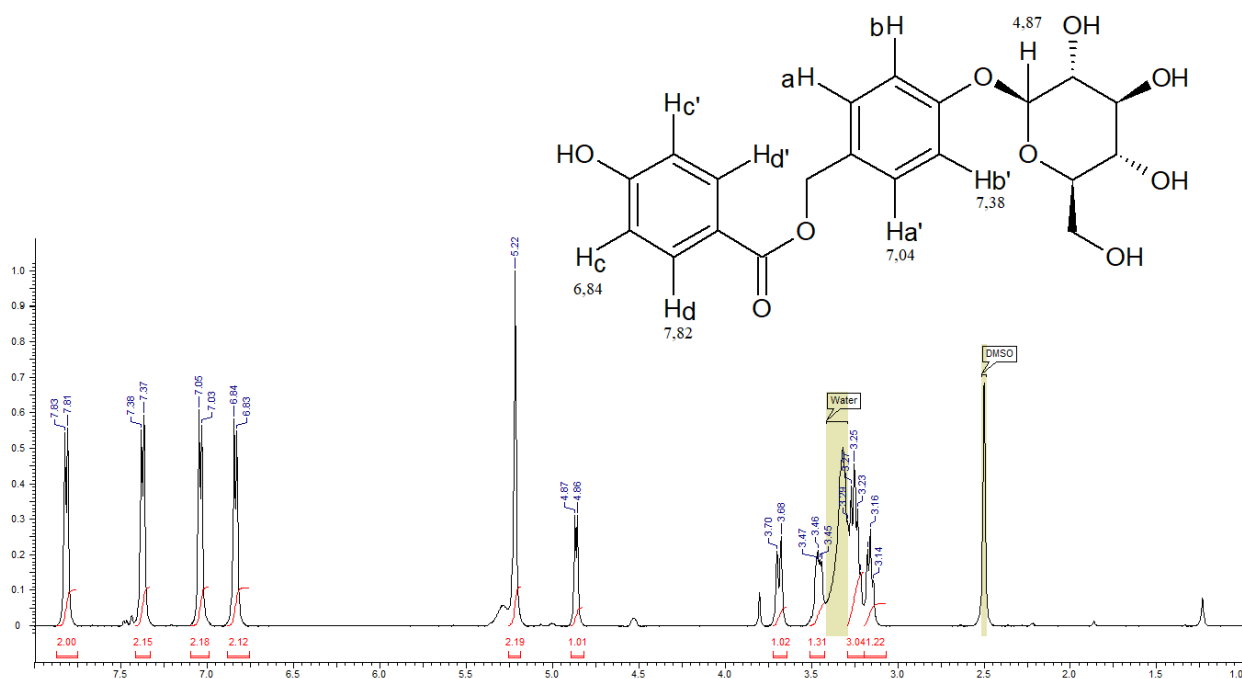


Figura S14. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO, δ_{H} ppm) do amburosídeo I isolado das folhas de *Amburana acreana*.

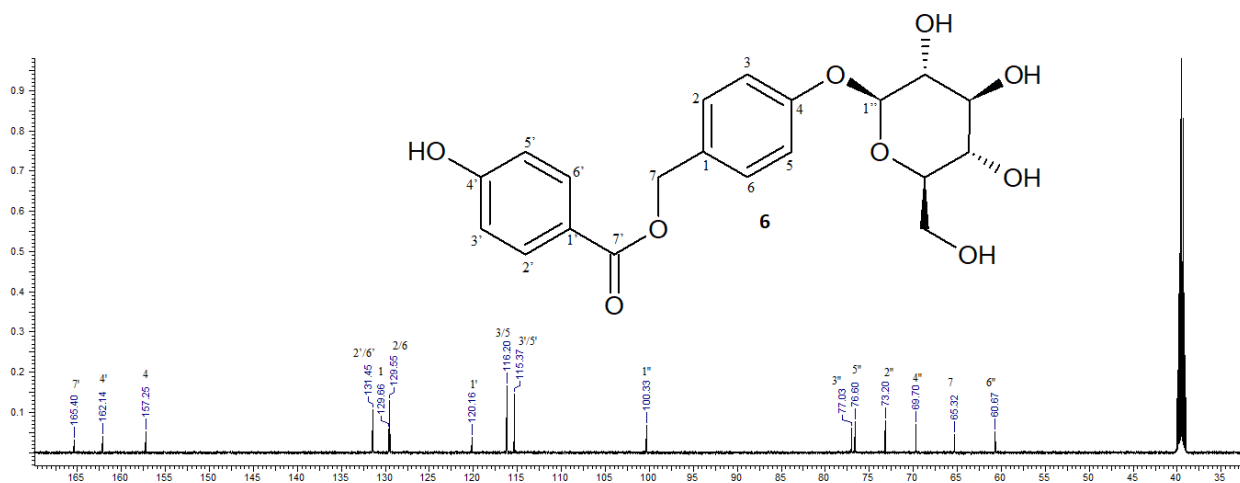


Figura S15. Espectro de RMN de ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO, δ_{C} ppm) do amburosídeo I isolado das folhas de *Amburana acreana*.

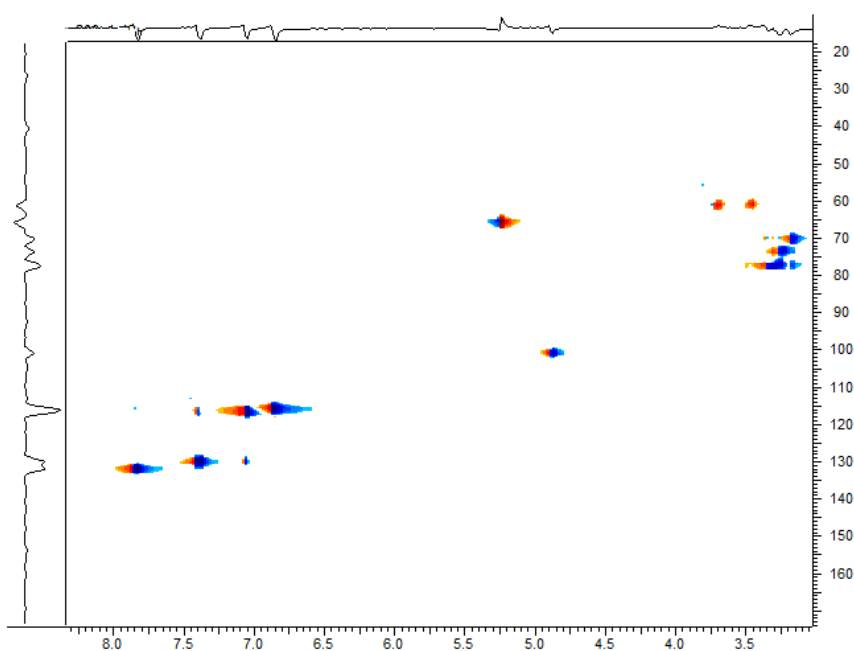


Figura S16. HMBC mapa de contorno (DMSO, 125 x 500 MHz) do amburosídeo I.

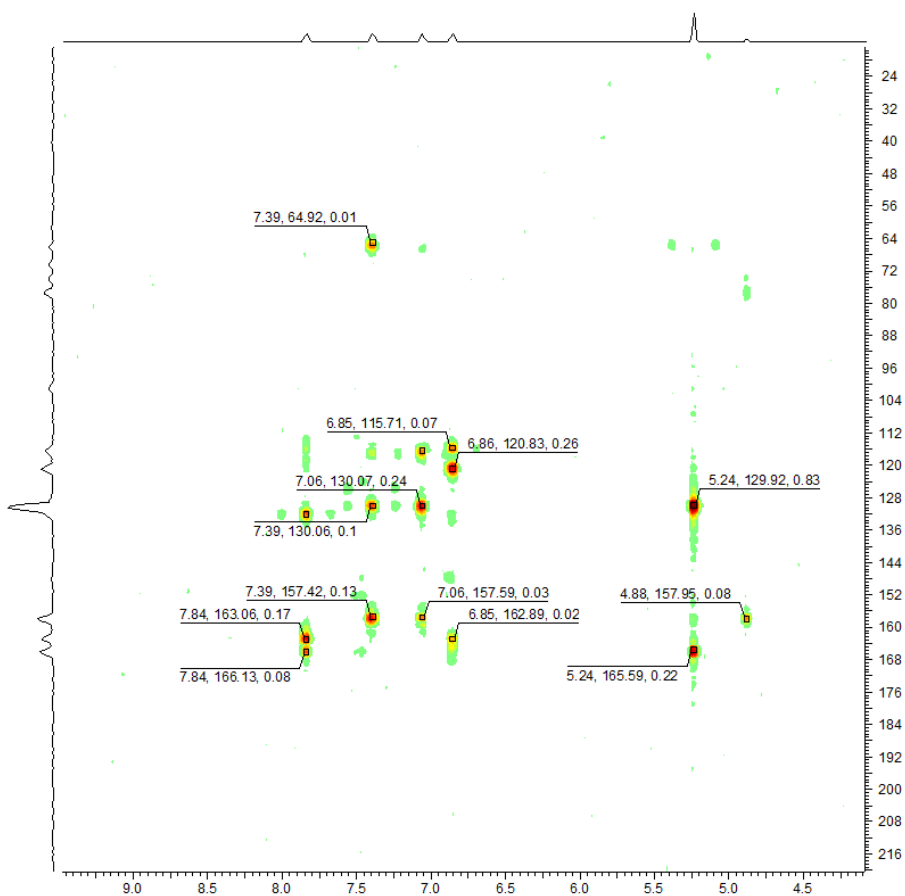


Figura S17. HMBC mapa de contorno (DMSO, 125 x 500 MHz) do amburosídeo I.

Tabela S1. Constituintes químicos isolados da porção clorofórmica do extrato foliar da *Amburana acreana*, com respectivas frações, identificação do composto, gradiente do solvente, massa obtida e solventes deuterados utilizados para análises de RMN de ^1H e ^{13}C .

Fração	Composto	Gradiente do solvente	Massa obtida do composto (mg)	Solvente solúvel
CAA [21-25]	1	hexano	20,7	CHCl_3
CAA [152-172] ₁	2	hexano/acetona 7:3	14,7	CD_3OD
CAA [152-172] ₂	3	hexano/acetona 7:3	18,8	CD_3OD
CAA [215-221]	4	hexano/acetona 6:4	10,8	DMSO
CAA [262-267]	5	hexano/acetona 3:7	4.3193,0	CD_3OD
CAA [262-267]	6	hexano/acetona 3:7	400,3	DMSO

Tabela S2. Dados do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3 , δ_{H} ppm) e ^{13}C (125 MHz, CDCl_3 , δ_{C} ppm) do perfil da cumarina (**1**) isolada da porção clorofórmica do extrato hidroetanólico das folhas de *Amburana acreana* comparado com dados da literatura (Duddeck e Kaiser, 1982).

C	1		Cumarina δ_{C} (ppm)
	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	
2	160,7	-	160,9
3	116,6	6,43 (1H, d, J 9,5 Hz)	117,0
4	143,4	7,72 (1H, d, J 9,5 Hz)	143,5
5	127,8	7,54 (1H, m)	128,0
6	124,4	7,29 (1H, m)	124,6
7	131,8	7,49 (1H, dd, J 7,6; 1,5 Hz)	132,0
8	116,8	7,33 (1H, d, J 8,2 Hz)	116,9
9	118,8	-	119,5
10	154,0	-	154,2

Tabela S3. Dados do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD , δ_{H} ppm) and ^{13}C (125 MHz, CD_3OD , δ_{C} ppm) do ácido *p*-hidroxibenzoico (**2**) isolado da porção clorofórmica do extrato hidroetanólico das folhas de *Amburana acreana* comparado com dados da literatura (Wang *et al.*, 2018).

C	2		ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	
	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)
1	122,9	-	121,5	-
2/6	116,1	6,82 (2H, d, J 7,9 Hz)	114,6	6,81(2H, d, J 8,8 Hz)
3/5	133,1	7,88 (2H, d, J 7,9 Hz)	131,6	7,87 (2H, d, J 8,8 Hz)
4	163,4	-	162,0	-
7	170,4	-	168,8	-

Tabela S4. Dados do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD , δ_{H} ppm) e ^{13}C (125 MHz, CD_3OD , δ_{C} ppm) do ácido vanílico (**3**) isolado da porção clorofórmica do extrato hidroetanólico das folhas de *Amburana acreana* comparado com dados da literatura (Wang *et al.*, 2018).

C	3		Ácido vanílico	
	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)
1	123,3	-	121,7	-
2	113,9	7,55 (1H, m)	112,6	7,55 (1H, m)
3	148,8	-	147,0	-
4	152,7	-	151,0	-
5	115,9	6,84 (1H, d, J 5,0 Hz)	114,8	6,83 (1H, d, J 8,7 Hz)
6	125,4	7,56 (1H, d, J 5,0 Hz)	123,6	7,55 (1H, m)
7	170,3	-	167,5	-
3-OMe	56,5	3,89 (3H, s)	55,6	3,89 (3H, s)

Tabela S5. Dados do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD , δ_{H} ppm) e ^{13}C (125 MHz, CD_3OD , δ_{C} ppm) do campesterol 3- β -D-glicosídeo (**4**) isolado da porção clorofórmica do extrato hidroetanólico das folhas de *Amburana acreana* comparado com dados da literatura (Johnson *et al.*, 2020).

C	4		campesterol 3- β -D-glicosídeo	
	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)
1	36,82		36,83	
2	29,25		29,26	
3	70,07	3,05 (1H, m)	70,10	3,05 (ddd, J 13,6, 7,3, 3,5 Hz)
4	38,30		38,30	
5	140,43		140,44	
6	121,18	5,33 (1H, s)	120,20	5,33 (d, J 4,9 Hz)
7	31,41	1,96 (1H, m)	31,42	1,97 (d, J 12,5 Hz)
8	31,36		31,37	
9	49,59		49,60	
10	36,20		36,21	
11	20,58		20,59	
12	33,33		33,34	
13	41,84		41,85	
14	56,17		56,17	
15	23,85		23,86	
16	27,78		25,44	
17	55,42		55,43	
18	11,66		11,67	
19	18,93		18,61	
20	35,47		35,48	
21	18,61		18,93	
22	22,59		22,60	
23	25,43		27,78	
24	45,13		45,14	
25	28,69	1,63 (1H, d, J 5,0 Hz)	28,70	1,64 (td, J 7,0, 6,6, 4,9 Hz)
26	19,08		19,09	
27	19,70		19,71	
28	11,77		11,78	
Glicosídeo				
1'	100,78	4,22 (1H, d, J 8,0 Hz)	100,78	4,22 (d, J 7,7 Hz)
2'	73,45		73,46	
3'	76,73		76,74	
4'	76,75		76,77	
5'	76,91		76,91	
6'	61,07	3,44 (2H, m)	61,09	3,44 (ddt, J 11,9, 6,5 Hz)

CAPÍTULO II: Perfil fenólico, efeitos anti-inflamatórios e antioxidante de *Amburana acreana* Ducke

Resumo

Este estudo fornece a primeira caracterização química e farmacológica das folhas de *Amburana acreana* (Ducke) A.C.Sm., uma espécie fortemente relacionada à *Amburana cearensis*, reconhecida por seu potencial etnomedicinal. Através da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à detecção por arranjo de diodos (CLAE-DAD) onze constituintes fenólicos foram identificados, incluindo amburosídeos B e o éster 4- β -D-glucopiranosiloxibenzílico (amburosídeo I), que respondem pela maior parte do conteúdo fenólico do extrato. O extrato demonstrou significativa atividade de eliminação dos radicais de óxido nítrico ($\cdot$ NO) e potencial para inibir a enzima 5-lipoxigenase (5-LOX), com valores de IC₅₀ de $347,2 \pm 19,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $151,1 \pm 8,9 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. O extrato não apresentou efeitos citotóxicos nas células neuronais SH-SY5Y. Essas descobertas sugerem que *A. acreana* pode possuir potencial neuroprotetor, principalmente por meio de mecanismos anti-inflamatórios e antioxidantes. A presença de amburosídeos e outros compostos fenólicos reforça ainda mais a proximidade taxonômica entre *A. acreana* e *A. cearensis*, enfatizando a relevância de espécie como fonte de compostos bioativos.

Palavras-chave: Cumarina; etnofarmacologia; radicais livres; *Torresia acreana*, ácido vanílico; amburosídeo

Abstract

This study provides the first chemical and pharmacological characterization of *Amburana acreana* (Ducke) A.C.Sm. leaves, a species closely related to the ethnomedicinal recognized *Amburana cearensis*. Using High-performance liquid chromatography coupled with diode array detection (HPLC-DAD) eleven phenolic constituents were identified, including amburoside B and 4- β -D-glucopyranosyloxybenzyl ester, which account for the majority of the extracts phenolic content. The extract demonstrated significant scavenging activity against nitric oxide ($\cdot$ NO) radicals and potent inhibition of the 5-lipoxygenase (5-LOX) enzyme, with IC₅₀ values of $347.2 \pm 19.4 \mu\text{g mL}^{-1}$ and $151.1 \pm 8.9 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectively. The extract exhibited no cytotoxic effects on SH-SY5Y neuronal cells. These findings suggest that *A. acreana* may possess neuroprotective potential, primarily through anti-inflammatory and antioxidant mechanisms. The presence of amburoside and other phenolic compounds further supports the taxonomic proximity between *A. acreana* and *A. cearensis*, emphasizing the relevance of *A. acreana* as a source of bioactive compounds.

Keywords: Coumarin; ethnopharmacology; Free radicals; *Torresia acreana*; vanillic acid; amburoside

1 INTRODUÇÃO

Amburana é um gênero de plantas lenhosas que inclui três espécies reconhecidas, *A. acreana* (Ducke), *A. cearensis* e *A. erythrosperma* E.P.Seleme, predominantemente encontradas no Brasil, mas também ocorrendo na Argentina, Bolívia, Paraguai e Peru (Seleme *et al.*, 2015).

Ao contrário das outras espécies, há inúmeros relatos sobre o uso etnomedicinal, composição química e propriedades farmacológicas de *Amburana cearensis* (Allemão) A.C.Sm. (Silva *et al.*, 2020; Silveira *et al.*, 2022). Pesquisas etnomedicinais sobre o uso de plantas medicinais na América do Sul, particularmente no Brasil, indicam claramente o uso frequente desta planta, principalmente para o tratamento de doenças respiratórias como bronquite, asma, rinite, gripe, tosse e sinusite (Agra *et al.*, 2007; de Albuquerque *et al.*, 2007; De Medeiros *et al.*, 2013). Um ensaio controlado por placebo realizado com quase 50 participantes fornece evidências clínicas preliminares sobre a eficácia do xarope obtido de *A. cearensis* como terapia complementar na asma leve persistente (Carvalho *et al.*, 2012).

No entanto, a ampla diversidade de efeitos medicinais empiricamente atribuídos, nomeadamente anti-inflamatórios (De Medeiros *et al.*, 2013; Júnior *et al.*, 2011; Ribeiro *et al.*, 2014), tem motivado uma maior caracterização do perfil farmacológico da planta. Uma série de estudos *in vitro* e *in vivo* fornecem dados pré-clínicos sobre os efeitos anti-inflamatórios de *A. cearensis*, demonstrando a capacidade de diferentes extratos de reduzir os níveis de TNF- α e IL-1 β , bem como a migração de leucócitos, que fundamenta a redução do edema de pata em ratos (de Veras *et al.*, 2023; Leal *et al.*, 2003). Os efeitos benéficos sobre a neuroinflamação também foram relatados e decorrem da interferência na via de sinalização MAPK e da inibição da iNOS em células microgliais BV-2 (De Araújo *et al.*, 2022). Embora várias classes estruturais de constituintes tenham sido identificadas na espécie (Silva *et al.*, 2020; Silveira *et al.*, 2022), os compostos fenólicos parecem estar subjacentes à maioria das propriedades anti-inflamatórias de *A. cearensis*, nomeadamente através dos efeitos do ácido vanílico (Leal *et al.*, 2011), amburosídio A (Leal *et al.*, 2009; De Araújo *et al.*, 2022) e isokaempferideo (Leal *et al.*, 2009).

A. cearensis e *Amburana acreana* (Ducke) A.C.Sm. são taxonomicamente relacionadas, com alguns autores tendo proposto anteriormente a reclassificação desta última como uma variedade de *A. cearensis* (Seleme *et al.*, 2015). Embora suas características morfológicas distintas

e distribuições separadas as diferenciem claramente (Seleme *et al.*, 2015), não há praticamente nenhum estudo cobrindo a composição química e os efeitos biológicos de *A. acreana*.

Popularmente conhecida no Brasil como '*Amburana-de-cheiro*', '*Cerejeira*' ou '*Cumaru-de-cheiro*', *A. acreana* é valorizada principalmente na indústria madeireira (Bello *et al.*, 2008; Fermino Junior e Scherwinski-Pereira, 2012), com poucas pesquisas etnomedicinais sobre seu uso na medicina popular. Ao contrário de *A. cearensis*, o uso medicinal de *A. acreana* parece ser mais limitado, com atribuição empírica de efeitos analgésicos e expectorantes (Carvalho, 2007). Recentemente, o isolamento de seis constituintes fenólicos do extrato hidroetanólico de folhas de *A. acreana*, o que nos levou a sugerir que o amburosídio B pode ser um marcador quimiotaxonômico do gênero (Ferreira *et al.*, 2025).

A similaridade taxonômica entre *A. cearensis* e *A. acreana* pode demonstrar um perfil químico similar, e a última espécie também pode indicar compostos químicos relevantes envolvidos na resposta inflamatória. Desta forma, uma análise qualitativa e quantitativa aprofundada das folhas de *A. acreana* foi conduzida usando análise CLAE-DAD, enquanto a interferência potencial com mediadores inflamatórios e espécies radicais de relevância fisiológica, que cooperam na iniciação e exacerbação da resposta neuroinflamatória, foi avaliada por meio de experimentos *in vitro*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Produtos químicos, reagentes e equipamentos gerais

A Merck KGaA (Darmstadt, Alemanha) forneceu o isopropanol e o metanol LiChrosolv[®]. O etanol foi obtido da Fisher Scientific UK (Loughborough, Reino Unido). O dimetilsulfóxido (DMSO) foi obtido da Carlo Erba Reagents (Val de Reuil, França). A menos que especificado de outra forma, todos os outros solventes e reagentes gerais foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

Os padrões fitoquímicos ácido *p*-cumárico, cumarina, ácido *p*-hidroxibenzóico, ácido protocatecuico, ácido siríngico e ácido vanílico foram adquiridos da Extrasynthèse S.A. (Genay, França), enquanto a quercetina foi obtida da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Os amburosídeos B e o éster 4- β -D-glicopiranosil-oxibenzílico, denominado como amburosídio I,

foram isolados por cromatografia em coluna, purificados por CLAE-DAD semipreparativo e identificados por experimentos de ressonância magnética nuclear 1D e 2D (Ferreira *et al.*, 2025).

Azul de tripiano, brometo de tetrazólio azul de tiazolil (MTT), meio Eagle modificado por Dulbecco+ F12 (DMEM+F12), soro bovino fetal (FBS) e solução de penicilina-estreptomicina foram obtidos da GIBCO, Invitrogen (Grand Island, NY, EUA).

As leituras de absorbância foram realizadas usando um leitor de microplacas Multiskan™ GO da Thermo Fisher Scientific Oy (Vantaa, Finlândia).

2.2 Material vegetal e extração

Amostras de folhas de *A. acreana* foram coletadas em setembro de 2017 na Fazenda São Vicente, Ji-Paraná, Rondônia, Brasil (S 10°52'57.9324'' e W 61°58'6.9422''). Um espécime voucher do material vegetal foi depositado no Centro Universitário Luterano de Ji-Paraná (CEULJI/ULBRA). Informações adicionais podem ser acessadas por meio do registro da instituição RON:e3201 e no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético (SisGen) sob o código ADA5ACA.

O extrato das folhas de *A. acreana* foi obtido por remaceração a frio, seguindo o procedimento descrito por Ferreira e colaboradores (2025). Resumidamente, 300,0 g de folhas secas e moídas foram maceradas com 2,5 L de etanol absoluto à temperatura ambiente por 24 h, quatro vezes consecutivas. O solvente foi removido em evaporador rotativo sob pressão reduzida (QUIMIS®, São Paulo, Brasil), obtendo-se 88,3 g de extrato bruto (EAA).

2.3 Caracterização qualitativa e quantitativa por CLAE-DAD

O extrato de folhas de *A. acreana* foi analisado usando uma unidade analítica de CLAE (Gilson Medical Electronics, Villiers le Bel, França) equipada com uma coluna Spherisorb ODS2 RP-C18 de 250 x 4,6 mm e 5 µm da Waters® (Dublin, Irlanda). O resíduo seco foi redissolvido em metanol, filtrado através de uma membrana de PTFE de 0,45 µm (Millipore, Bedford, MA, EUA) e analisado em triplicata. A fase móvel compreendeu dois solventes: água acidificada com 5% de ácido fórmico (A) e metanol (B), com o gradiente começando em 5% de B, aumentando para 15% de B em 3 minutos, 25% de B em 13 min, 30% de B em 25 min, 35% de B em 35 min, 45% de B em 39 min, permanecendo em 45% de B até 42 min, então aumentando para 55% de B em 47 min. A vazão foi definida em 0,9 mL min⁻¹.

A detecção foi realizada usando um detector de arranjo de diodos (DAD) da série Agilent 1100 (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemanha). Dados espectrais foram coletados para todos os picos na faixa de 200–700 nm, com cromatogramas registrados em 280 nm.

Curvas de calibração foram construídas usando um mínimo de cinco concentrações diferentes de cada composto puro, analisadas em triplicata, correspondendo à faixa de concentração presente no extrato de *A. acreana*. Ácido protocatecuico (1), ácido *p*-hidroxibenzoico (2), ácido vanílico (3), ácido *p*-cumárico (4), ácido sirínico (5), amburosídio I (7), cumarina (8) e amburosídio B (9) foram quantificados usando suas respectivas curvas de calibração. A linearidade foi avaliada usando os coeficientes de determinação (R^2) das curvas de regressão e os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foram calculados com base no desvio padrão residual (σ) das curvas e suas inclinações (S), com LOD determinado como $3,3\sigma/S$ e LOQ como $10\sigma/S$ (Tabela 1).

Os dados cromatográficos foram analisados usando o software Clarity, versão 5.04.158, da DataApex Ltd. (Praga, República Tcheca).

2.4 Efeitos de eliminação sobre o radical óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$)

A atividade de eliminação contra $\cdot\text{NO}$ foi avaliada por meio de uma abordagem espectrofotométrica livre de células com base no método Griess (Cebollada *et al.*, 2023). Os extratos foram dissolvidos em tampão fosfato e 100 μL de cada diluição foram adicionados a uma placa de 96 poços junto com 100 μL de nitroprussiato de sódio (20 mM; Riedel-de Haën, St. Louis, MO, EUA), seguido por uma incubação de 60 minutos sob luz. Depois, 100 μL de reagente Griess (compreendendo 1,0% de sulfanilamida e 0,1% de N-(1)-naftiletilenodiamina em 2% de ácido fosfórico) foram adicionados e a mistura foi incubada no escuro por 10 minutos antes de medir a absorbância a 560 nm. N-(1)-Naftiletilenodiamina e sulfanilamida foram adquiridas da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Para contabilizar a interferência do extrato, um branco foi preparado substituindo o reagente de Griess por 2% de ácido fosfórico. A quercetina foi usada como um inibidor de referência derivado de planta.

2.5 Efeito inibitório da 5-lipoxigenase

A inibição da atividade enzimática da 5-lipoxigenase (5-LOX) foi avaliada seguindo a conversão do ácido linoleico em ácido 13-hidroperoxilinoico como em Andrade e colaboradores

(2023). Em resumo, 20 µL do extrato foram misturados com 20 µL de 5-LOX de soja (100 U, EC 1.13.11.12) e 200 µL de tampão fosfato (0,1 M, pH 9), sendo então pré-incubados em temperatura ambiente por 5 min. Depois, 20 µL de ácido linolênico (4,18 mM) foram adicionados para iniciar a reação, que foi monitorada por espectrofotometria por 3 minutos a 234 nm. A 5-LOX e o ácido linoleico foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). A quercetina foi usada como controle positivo.

2.6 Impacto na viabilidade celular de células neuronais SH-SY5Y

A toxicidade preliminar em células neuronais foi avaliada usando o ensaio MTT, que serviu como um indicador da função mitocondrial (Cebollada *et al.*, 2023). Células SH-SY5Y (ATCC®; Manassas, Virginia, EUA) foram semeadas em placas de 96 poços a uma densidade de 40.000 células por poço. Após incubação por 24 h a 37 °C em uma atmosfera umidificada com 5% de CO₂, o meio foi substituído por concentrações variadas do extrato, e as células foram cultivadas por mais 24 h. Em seguida, 100 µL de solução MTT (0,5 mg mL⁻¹) foram adicionados a cada poço, e as células foram incubadas a 37 °C por 90 min. Os cristais de formazano resultantes foram dissolvidos em 200 µL de uma mistura de DMSO (3:1) e quantificados espectrofotometricamente a 560 nm.

2.7 Análises estatísticas

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os dados foram analisados usando o GraphPad Prism 8. Os resultados foram relatados como a média e o erro padrão da média (SEM) de observações triplicadas. ANOVA ($p < 0,05$) foi empregada para avaliar variações significativas. Outliers foram monitorados pelo teste de Grubbs.

3 RESULTADOS

3.1 Caracterização qualitativa e quantitativa do extrato foliar de *A. acreana* por CLAE-DAD

A caracterização qualitativa do extrato hidroetanólico obtido das folhas de *A. acreana* permitiu detectar onze constituintes fenólicos, sendo quatro derivados do ácido benzoico (**1-3** e **5**),

três derivados do ácido cinâmico (**4**, **7** e **9**), uma cumarina (**8**) e três flavonóis glicosilados (**6**, **10** e **11**) (Figura 1).

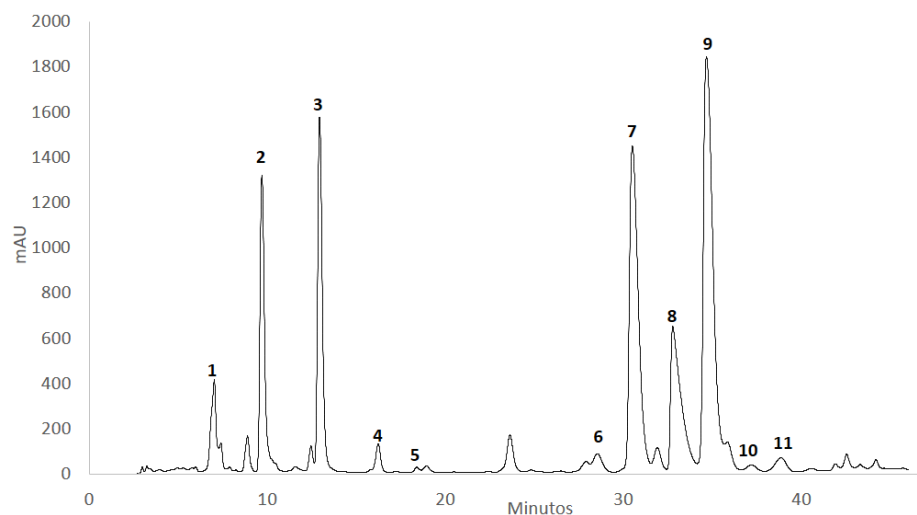


Figura 1. Perfil cromatográfico (CLAE-DAD 280 nm) do extrato foliar hidroetanólico da *Amburana acreana*. Compostos identificados: ácido protocatecuico (**1**), ácido *p*-hidroxibenzoico (**2**), ácido vanílico (**3**), ácido *p*-cumárico (**4**), ácido siríngico (**5**), éster 4- β -D-glucopiranosiloxibenzílico (**6**), cumarina (**8**), amburosídio B (**9**) e derivados desconhecidos de flavonol glicosilados (**6**, **10** e **11**).

As substâncias foram identificadas por comparação dos dados espectrais UV/Vis e dados cromatográficos como, tempo de retenção dos padrões autênticos, das bandas cromatográficas da amostra e por coinjeção dos padrões e amostra. Enquanto os constituintes **6**, **10** e **11** foram identificados como derivados de kaempferol glicosilados devido aos seus dados espectrais característicos. Os derivados do ácido benzoico incluem ácido protocatecuico (**1**), ácido *p*-hidroxibenzoico (**2**), ácido vanílico (**3**) e ácido siríngico (**5**), enquanto os derivados do ácido cinâmico foram identificados como sendo ácido *p*-cumárico (**4**), amburosídio I (**7**) e amburosídio B (**9**) (Tabela 1). O constituinte **8** foi identificado como 1,2-benzopirona (cumarina). As representações estruturais dos compostos estão representadas na Figura 2.

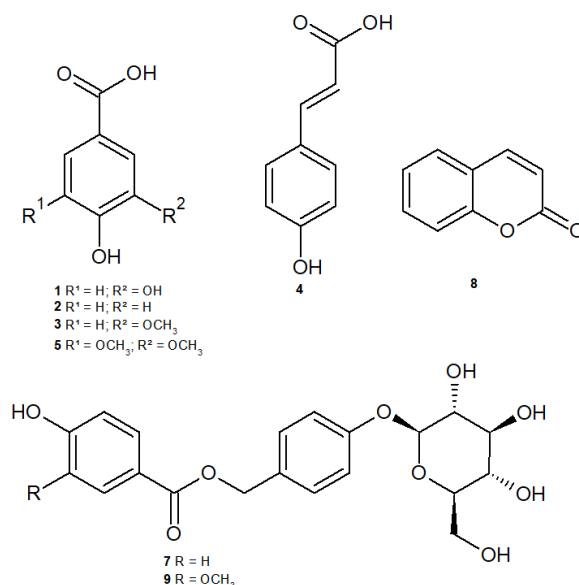


Figura 2. Estrutura química dos compostos quantificados no extrato hidroetanólico da folha de *A. acreana*.

Tabela 1. Conteúdo de constituintes fenólicos no extrato hidroetanólico das folhas de *A. acreana*, análise de equação de regressão linear, LOD^a e LOQ^b.

Compostos	Conteúdo ($\mu\text{g g}^{-1}$ extrato seco)	Equação da regressão			LOD ^a	LOQ ^b
		Inclinação (S)	Intercessão (b)	R ² (n=3)		
ácido protocatecuico	7,73 $\pm$ 0,37	26,60	370,82	0,973	3,66	10,99
ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	24,95 $\pm$ 2,52	17,94	1336,10	0,995	67,86	203,80
ácido vanílico	24,04 $\pm$ 1,07	31,35	798,07	0,989	7,52	22,59
ácido <i>p</i> -cumárico	0,12 $\pm$ 0,008	63,91	4,67	0,992	0,07	0,21
ácido siríngico	1,54 $\pm$ 0,06	32,81	2,62	0,968	0,30	0,90
amburosídio I	163,02 $\pm$ 11,03	7,82	429,23	0,955	10,53	31,62
cumarina	10,35 $\pm$ 0,42	57,11	310,28	0,978	1,41	4,24
amburosídio B	214,12 $\pm$ 16,12	8,01	1004,30	0,972	27,38	82,23
Total	445,87 $\pm$ 31,61					

^a Limit of detection; ^b Limit of quantification.

A análise quantitativa mostra que o principal constituinte do extrato da folha de *A. acreana* é o amburosídio B (9), seguido pelo amburosídio I (7), que juntos respondem por quase 85% do conteúdo fenólico quantificável total (Tabela 1). Há também um conteúdo significativo em derivados do ácido benzoico ($58,26 \pm 4,02 \mu\text{g g}^{-1}$ de extrato seco) que constituem 13,1% do extrato.

3.2 Extrato foliar de *A. acreana* e neutralização dos radicais $\cdot\text{NO}$

A produção de radicais livres é um fator fundamental estabelecido no processo de neuroenvelhecimento, principalmente por meio da elicitação e exacerbação de cascatas inflamatórias, bem como efeitos diretos em estruturas ricas em lipídios e DNA (Di Napoli e Shah, 2011; Ghasemi e Fatemi, 2014). Dentro do conjunto de radicais livres, o $\cdot\text{NO}$ é categorizado como perigoso, sua superprodução ocasiona à formação de Espécies Reativas de Nitrogênio (ERN), particularmente peroxinitrito (ONOO^-), um dos derivados de NO mais tóxicos que contribui para o estresse nitrosativo em células neuronais ao prejudicar a função mitocondrial e interromper várias proteínas essenciais para a fisiologia neuronal normal (Ghasemi e Fatemi, 2014). Consequentemente, a neutralização do $\cdot\text{NO}$ é uma das estratégias investigacionais mais comuns para identificar agentes capazes de contribuir para a atenuação do estresse radical no nível neuronal.

A capacidade do extrato da folha de *A. acreana* de neutralizar $\cdot\text{NO}$ foi avaliada usando o método de Griess. Conforme mostrado na Figura 3, o extrato sequestrou significativamente $\cdot\text{NO}$ em toda a faixa de concentrações testadas de maneira dependente da concentração. Enquanto o valor estimado de IC_{50} do EAA ($\text{IC}_{50} = 347,2 \pm 19,4 \mu\text{g mL}^{-1}$) demonstra uma menor capacidade de sequestro em comparação à quercetina ($\text{IC}_{50} = 49,8 \pm 1,5 \mu\text{g mL}^{-1}$), o extrato de *A. acreana* provocou uma redução nos níveis de $\cdot\text{NO}$ em 59,3% na concentração mais alta testada (Figura 3).

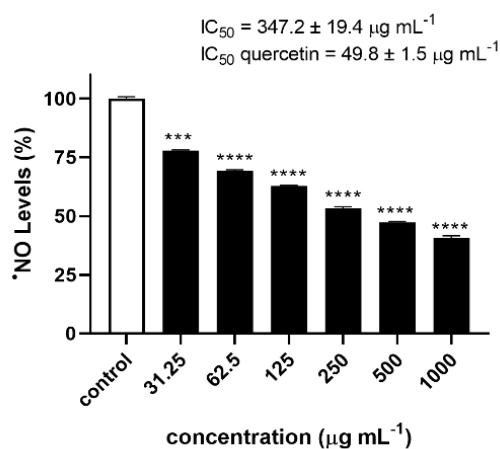


Figura 3. Efeitos de eliminação do extrato de folhas de *A. acreana* nos níveis de $\cdot\text{NO}$. Os resultados são mostrados como média $\pm$ SEM de três experimentos independentes realizados em triplicata. Significância estatística: *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

3.3 O extrato das folhas de *A. acreana* inibe significativamente a 5-LOX

Devido ao papel essencial e à abundância particular de lipídios nas membranas neuronais, que fornecem a base estrutural que mantém a integridade e a fluidez da célula, a peroxidação lipídica é particularmente perigosa para as estruturas neuronais (Gaschler e Stockwell, 2017). As lipoxigenases são conhecidas por contribuir para o acúmulo de peróxidos lipídicos dentro das estruturas neuronais, e a 5-LOX, em particular, tem recebido atenção considerável devido ao seu papel em múltiplas condições inflamatórias, incluindo doenças neurodegenerativas (Steinhilber e Hofmann, 2014; Gaschler e Stockwell, 2017).

Quando exposta a concentrações variando de $31,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ do extrato das folhas de *A. acreana*, a 5-LOX foi significativamente inibida, com um valor de IC_{50} de $151,1 \pm 8,9 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 4). O extrato da folha de *A. acreana* foi particularmente eficaz na dose de $250 \mu\text{g mL}^{-1}$, reduzindo a atividade enzimática para 31,3%, enquanto a dose de $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ diminuiu a atividade enzimática para 57,7% (Figura 4).

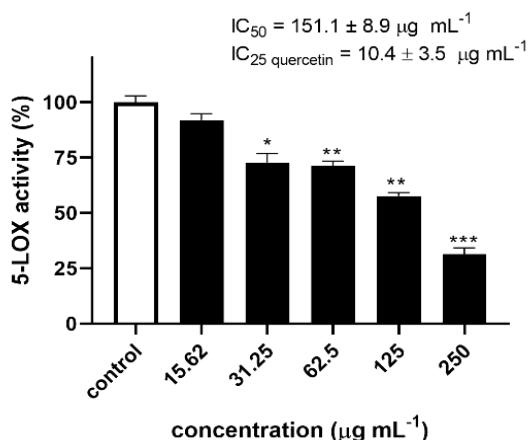


Figura 4. Efeitos do extrato da folha de *A. acreana* na atividade enzimática de 5-LOX. Os resultados são mostrados como média $\pm$ SEM de três experimentos independentes realizados em triplicata. Significância estatística: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

3.4 Perfil toxicológico do extrato foliar de *A. acreana* sobre células SH-SY5Y neuronais

A morte neuronal é provocada por uma série de estímulos tóxicos, bem como por eventos fisiopatológicos que desencadeiam ou contribuem para o início de várias doenças neurodegenerativas, com inflamação crônica e estresse oxidativo no início dos eventos endógenos (Glass *et al.*, 2010). Citocinas e mediadores pró-inflamatórios, juntamente com ERN e outras

espécies radicais, são conhecidos por atuar diretamente nos neurônios para induzir a apoptose (McCoy e Tansey, 2008; Glass *et al.*, 2010).

A potencial interferência na viabilidade das células SH-SY5Y foi avaliada usando o ensaio MTT após um tratamento de 24 horas com extrato da folha de *A. acreana* (Figura 5). Conforme observado na Figura 5, nenhuma interferência significativa no desempenho mitocondrial das células SH-SY5Y foi observada nas concentrações de extrato variando de 31,25 a 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

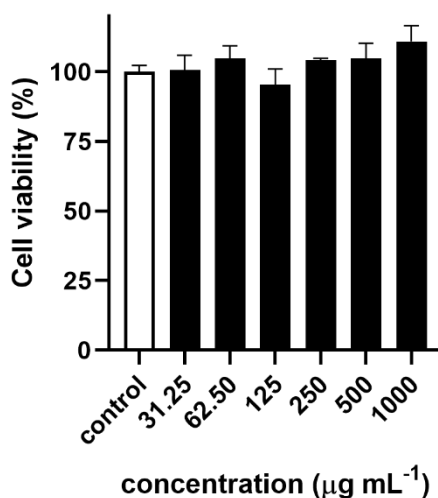


Figura 4. Efeitos do extrato da folha de *A. acreana* sobre a competência mitocondrial das células SH-SY5Y. Os resultados são mostrados como média $\pm$ SEM de três experimentos independentes realizados em triplicata.

4 DISCUSSÃO

4.1 Bioativos fenólicos presentes nas folhas de *A. acreana*

Recentemente, Ferreira e colaboradores (2025) apresentou o primeiro registro científico sobre a composição química da *A. acreana*, detalhando o isolamento dos compostos fenólicos ácido *p*-hidroxibenzóico, ácido vanílico, cumarina, amburosídio B, juntamente com o esterol, campesterol 3- β -D-glicosídeo (Ferreira *et al.*, 2025). No trabalho atual, quatro constituintes não relatados anteriormente são identificados, os derivados do ácido benzoico ácido protocatecuico (**1**) e ácido siríngico (**5**), ácido *p*-cumárico (**4**) e éster 4- β -D-glucopiranosiloxibenzílico (**7**), denominado de amburosídio I, devido a sua estrutura base característica de amburosídio. Este composto é relatado pela primeira vez no gênero *Amburana* (Tabela 1).

Os resultados obtidos reforçam ainda mais a proximidade taxonômica com *A. cearensis* e apoiam a identificação do amburosídiol B (9) como marcador quimiotaxonômico do gênero *Amburana* (Bravo B et al., 1999; Canuto et al., 2010; Costa-Lotufo et al., 2003). Embora os constituintes fenólicos ácido protocatecuico (1), ácido *p*-hidroxibenzóico (2), ácido vanílico (3), ácido *p*-cumárico (4), ácido siríngico (5) e cumarina (8) sejam de ampla ocorrência em gêneros taxonomicamente não relacionados, eles também são metabólitos especializados de *A. cearensis*, apoiando assim a relação taxonômica entre as duas espécies (Aquino et al., 2005; Canuto et al., 2010).

4.2 Efeitos anti-inflamatórios e antirradicais do extrato foliar de *A. acreana* e possível influência da ação neuroprotetora

As propriedades anti-inflamatória e antioxidante da *A. acreana* são descritas pela primeira vez. Pesquisas anteriores sobre os efeitos neuroprotetores e anti-inflamatórios da *A. cearensis* em casos neurotóxicos, no início e no agravamento de várias doenças neurodegenerativas, são relacionados aos seus metabólitos especializados (Leal et al., 2005; Lima; Pereira et al., 2017; De Araújo et al., 2022). Considerando a similaridade taxonômica entre as espécies *A. cearensis* e *A. acreana* sugere-se que a investigação entre esses efeitos neuroprotetores possam também estar relacionados à constituintes químicos de *A. acreana*.

O extrato hidroetanólico de *A. acreana* exibe efeitos de eliminação significativos em $\cdot\text{NO}$ (Figura 3), e destaca-se também, pela capacidade de inibir a enzima metabolizadora de eicosanóides 5-LOX (Figura 4). Tais efeitos parecem ser mediados por vários constituintes fenólicos identificados no extrato, e este pode ser indicado como uma fonte de bioativos fenólicos anti-inflamatórios e antioxidante.

Ácido protocatecuico (1), ácido *p*-hidroxibenzóico (2), ácido vanílico (3), ácido *p*-cumárico (4), amburosídiol A e cumarina (8) são relatados como agentes ativos para a produção de $\cdot\text{NO}$, tanto em ensaios livres de células (Kang et al., 2006; Ślusarczyk et al., 2009) quanto em ensaios celulares (Leal et al., 2005; de Araújo et al., 2022), sendo possível levantar a hipótese de que os efeitos de eliminação podem resultar de um efeito sinérgico.

5 CONCLUSÕES

Este estudo expande o conhecimento sobre a composição química de *A. acreana*, anteriormente limitado a quatro constituintes fenólicos e um derivado de campesterol. Foram identificados mais quatro compostos fenólicos adicionais, juntamente com os amburosídeos B e I (éster 4- β -D-glucopiranosiloxibenzílico), reforçando a estreita relação taxonômica entre *A. cearensis* e *A. acreana*. Além disso, este estudo indica potencial propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes da *A. acreana*, acrescentando informações bioativas inéditas para a espécie e reforçando o potencial farmacológico do gênero *Amburana*.

Apesar da novidade de identificar propriedades de eliminação de radicais $\cdot$ NO e efeitos anti-inflamatórios associados à inibição da 5-lipoxigenase, esses resultados se alinham com as atividades anti-inflamatórias e antirradicais conhecidas de extratos ricos em fenólicos. O extrato também demonstrou um perfil toxicológico seguro contra células neuronais, destacando seu potencial papel neuroprotetor contra mediadores envolvidos na neuroinflamação.

Embora os resultados contribuam com novas descobertas sobre as propriedades bioativas da *A. acreana*, os dados limitados sobre o potencial terapêutico dos principais constituintes, ou seja, os amburosídeos, necessitam de mais pesquisas para elucidar completamente seus efeitos bioativos. Estudos futuros devem ter como objetivo explorar os mecanismos subjacentes a essas atividades e avaliar suas potenciais aplicações em contextos terapêuticos.

REFERÊNCIAS

- AGRA, M. F. *et al.* Medicinal and poisonous diversity of the flora of ‘Cariri Paraibano’, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], vol. 111, no. 2, p. 383–395, 2007.
- ANDRADE, Catarina *et al.* Kitul, a food plant with antidiabetic-like effects: Reduction of intracellular reactive species in glucose-stimulated RIN-5F pancreatic β -cells and mitigation of pro-inflammatory mediators in activated RAW 264.7 macrophages. **Food Research International**, [s. l.], vol. 167, no. November 2022, p. 112615, 2023. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996923001606>.
- B. B. GOUVEIA *et al.* Effect of ovarian tissue transportation in *Amburana cearensis* extract on the morphology and apoptosis of goat preantral follicles. **Animal Reproduction**, [s. l.], vol. 12, no. 2, p. 316–323, 2004. Available at: <http://revistas.bvs-vet.org.br/animreprod/article/view/26592>.
- BRAVO B, José A. *et al.* Bioactive phenolic glycosides from *Amburana cearensis*. **Phytochemistry**, [s. l.], vol. 50, no. 1, p. 71–74, 1999.

CANUTO, Kirley M.K; LIMA, Mary Anne S.; SILVEIRA, Edilberto R. Amburosides C-H and 6-O-protocatechuoyl coumarin from Amburana cearensis. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [s. l.], vol. 21, no. 9, p. 1746–1753, 2010. Available at: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-50532010000900022&lng=en&nrm=iso&tlng=en.

CANUTO, Kirley Marques; SILVEIRA, Edilberto Rocha. CONSTITUINTES QUÍMICOS DA CASCA DO CAULE DE Amburana cearensis A.C. SMITH. **Quimica Nova**, [s. l.], vol. 29, no. 6, p. 1241–1243, 2006.

CARVALHO, Elisete Mendes *et al.* Efficacy and safety of cumaru syrup as complementary therapy in mild persistent asthma: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], vol. 48, no. 4, p. 629–637, 2012. Available at: <http://www.scielo.br/j/bjps/a/8YQ8qHqJZt9JvkcrYJxgSVy/?lang=en>. Accessed at: 12 Feb. 2023.

CEBOLLADA, Pilar *et al.* An integrated in vitro approach on the enzymatic and antioxidant mechanisms of four commercially available essential oils (*Copaifera officinalis*, *Gaultheria fragrantissima*, *Helichrysum italicum*, and *Syzygium aromaticum*) traditionally used topically for their anti-inflammatory effects. **Frontiers in Pharmacology**, [s. l.], vol. 14, no. January, p. 1–11, 2023.

COSTA-LOTUFO, V *et al.* Antiproliferative Effects of Several Compounds Isolated from Amburana cearensis A. C. Smith. **Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences**, [s. l.], vol. 58, no. 9–10, p. 675–680, 2003. Available at: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/znc-2003-9-1014/html>. Accessed at: 12 Feb. 2023.

DE ALBUQUERQUE, Ulysses Paulino *et al.* Medicinal and magic plants from a public market in northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], vol. 110, no. 1, p. 76–91, 2007.

DE ARAÚJO, Ana Bruna *et al.* Antineuroinflammatory Effect of Amburana cearensis and Its Molecules Coumarin and Amburoside A by Inhibiting the MAPK Signaling Pathway in LPS-Activated BV-2 Microglial Cells. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [s. l.], vol. 2022, p. 1–14, 2022. Available at: <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2022/6304087/>. Accessed at: 24 Oct. 2022.

DE MEDEIROS, Patrícia Muniz; LADIO, Ana Haydée; ALBUQUERQUE, Ulysses Paulino. Patterns of medicinal plant use by inhabitants of Brazilian urban and rural areas: A macroscale investigation based on available literature. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], vol. 150, no. 2, p. 729–746, 2013. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2013.09.026>.

DE VERAS, Bruno Oliveira *et al.* Antinociceptive and anti-inflammatory activities of essential oil of the leaves of Amburana cearensis (Allemão) A.C. Smith. from the semi-arid region of Northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], vol. 317, no. April, 2023.

DI NAPOLI, Mario; SHAH, Imtiaz M. Neuroinflammation and cerebrovascular disease in old age: A translational medicine perspective. **Journal of Aging Research**, [s. l.], vol. 2011, 2011.

FERREIRA, Adrienne *et al.* CHEMICAL CONSTITUENTS OF Amburana acreana Ducke A. C.

Sm. LEAVES. **Química Nova**, [s. l.], vol. 48, no. 1, p. 1–6, 2025. Available at: https://quimicanova.sbq.org.br/audiencia_pdf.asp?aid2=9723&nomeArquivo=AR2023-0224.pdf.

GASCHLER, Michael M.; STOCKWELL, Brent R. Lipid peroxidation in cell death. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], vol. 482, no. 3, p. 419–425, 2017.

GHASEMI, Mehdi; FATEMI, Ali. Pathologic role of glial nitric oxide in adult and pediatric neuroinflammatory diseases. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, [s. l.], vol. 45, p. 168–182, 2014. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.06.002>.

GLASS, Christopher K. *et al.* Mechanisms Underlying Inflammation in Neurodegeneration. **Cell**, [s. l.], vol. 140, no. 6, p. 918–934, 2010.

HABZA-KOWALSKA, Ewa *et al.* Some dietary phenolic compounds can activate thyroid peroxidase and inhibit lipoxygenase-preliminary study in the model systems. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], vol. 22, no. 10, 2021.

JÚNIOR, Washington Soares Ferreira; LADIO, Ana Haydée; ALBUQUERQUE, Ulysses Paulino De. Resilience and adaptation in the use of medicinal plants with suspected anti-inflammatory activity in the Brazilian Northeast. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], vol. 138, no. 1, p. 238–252, 2011.

KI, Sung Kang *et al.* Study on the nitric oxide scavenging effects of ginseng and its compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], vol. 54, no. 7, p. 2558–2562, 2006.

LEAL, L. K.A.M. *et al.* A comparative chemical and pharmacological study of standardized extracts and vanillic acid from wild and cultivated *Amburana cearensis* A.C. Smith. **Phytomedicine**, [s. l.], vol. 18, no. 2–3, p. 230–233, 2011.

LEAL, L.K.A.M. *et al.* Amburoside A, a glucoside from *Amburana cearensis*, protects mesencephalic cells against 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity. **Neuroscience Letters**, [s. l.], vol. 388, no. 2, p. 86–90, 2005. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304394005007172>. Accessed at: 6 Mar. 2022.

LEAL, Luzia Kalyne Almeida Moreira *et al.* Effects of amburoside a and isokaempferide, polyphenols from *amburana cearensis*, on rodent inflammatory processes and myeloperoxidase activity in human neutrophils. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, [s. l.], vol. 104, no. 3, p. 198–205, 2008.

MCCOY, Melissa K.; TANSEY, Malú G. TNF signaling inhibition in the CNS: Implications for normal brain function and neurodegenerative disease. **Journal of Neuroinflammation**, [s. l.], vol. 5, p. 1–13, 2008.

PAULO CESAR POETA FERMINO JUNIOR; SCHERWINSKI-PEREIRA, Jonny Everson. GERMINAÇÃO E PROPAGAÇÃO IN VITRO DE CEREJEIRA (*Amburana acreana* (Ducke) A.C. Smith - FABACEAE). **Acta Biomedica Scientifica**, [s. l.], vol. 22, no. 3–2, p. 1–9, 2012.

PAULO ERNANI RAMALHO CARVALHO. **Cerejeira-da-Amazônia *Amburana acreana***: 1517-5278. [S. l.: s. n.], 2007.

PEREIRA *et al.* *Amburana cearensis* seed extract protects brain mitochondria from oxidative

stress and cerebellar cells from excitotoxicity induced by glutamate. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], vol. 209, p. 157–166, 2017. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378874116324497>. Accessed at: 21 Sep. 2022.

PEREIRA, Erica P.L. *et al.* Amburana cearensis seed extracts protect PC-12 cells against toxicity induced by glutamate. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s. l.], vol. 27, no. 2, p. 199–205, 2017. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0102695X16304525>. Accessed at: 6 Mar. 2022.

RIBEIRO, Daiany Alves *et al.* Promising medicinal plants for bioprospection in a Cerrado area of Chapada do Araripe, Northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], vol. 155, no. 3, p. 1522–1533, 2014. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2014.07.042>.

SELEME, Elidiane P. *et al.* A TAXONOMIC REVIEW AND A NEW SPECIES OF THE SOUTH AMERICAN WOODY GENUS AMBURANA (LEGUMINOSAE, PAPILIONOIDEAE). **Phytotaxa**, [s. l.], vol. 212, no. 4, p. 249, 2015. Available at: <https://biotaxa.org/Phytotaxa/article/view/phytotaxa.212.4.1>.

SILVA, Juliana Helena Castro e *et al.* Amburana cearensis: Pharmacological and Neuroprotective Effects of Its Compounds Juliana. **Molecules**, [s. l.], vol. 25, p. 1–16, 2020.

SILVA BELLO, Eleonora P.De B.C. *et al.* Germinação de sementes de Amburana acreana (Ducke) A. C. Sm. submetidas a diferentes condições de temperatura e de estresse hídrico. **Revista Brasileira de Sementes**, [s. l.], vol. 30, no. 3, p. 016–024, 2008. Available at: <http://www.scielo.br/j/rbs/a/3c4FppPmVdxH77qS5Dkqt4w/abstract/?format=html&lang=pt>. Accessed at: 16 Mar. 2022.

SILVEIRA, Zildene de Sousa *et al.* Phytochemistry and Biological Activities of Amburana cearensis (Allemão) A.C.Sm. **Molecules**, [s. l.], vol. 27, no. 2, p. 1–19, 2022.

ŚLUSARCZYK, Sylwester *et al.* Antioxidant activity of polyphenols from Lycopodium lucidius Turcz. **Food Chemistry**, [s. l.], vol. 113, no. 1, p. 134–138, 2009.

STEINHILBER, Dieter; HOFMANN, Bettina. Recent Advances in the Search for Novel 5-Lipoxygenase Inhibitors. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, [s. l.], vol. 114, no. 1, p. 70–77, 2014. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/bcpt.12114>.

CAPÍTULO III: Efeitos anti-inflamatórios *in vitro* e potencial leishmanicida *in silico* do amburosídio B, um glicosídeo fenólico de *Amburana acreana* Ducke

Resumo

As leishmanioses, doenças parasitárias negligenciadas, seguem sendo um desafio para a saúde pública devido à limitadas opções terapêuticas e seus efeitos colaterais. Em busca de novas alternativas, as plantas medicinais têm sido investigadas como fontes promissoras de novos tratamentos para doenças parasitárias, devido à sua diversidade de compostos bioativos com potencial terapêutico. Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo investigar os efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios *in vitro* e a capacidade parasitária e *in silico* do amburosídio B (AMBB), isolado das folhas de *Amburana acreana*. O AMBB demonstrou eficácia na redução dos níveis de radicais de óxido nítrico, com efeito dose-dependente em concentrações de 6,25 a 200 μM . No entanto, a atividade inibitória contra a enzima 5-lipoxigenase foi considerada moderada. Contudo, o composto não apresentou toxicidade aparente em sistemas celulares de HS-SY5Y. Em ensaios de deslocamento térmico com ThermoFluor[®], o AMBB interagiu com a enzima superóxido dismutase de *Leishmania braziliensis* (LbSOD), sugerindo a desestabilização da conformação proteica, o que indica potencial ação antiparasitária contra *Leishmania*. Os estudos *in silico* confirmam uma interação enzimática estável entre o AMBB e a superóxido dismutase de *L. major* (LmSOD). Assim, os resultados sugerem que o amburosídio B possui capacidade antioxidante frente ao radical $\cdot\text{NO}$ e pode ser um candidato promissor para o desenvolvimento de novas terapias antileishmania.

Palavras-chave: *Leishmania*, ancoragem molecular, “cerejeira”, amburosídio, anti-inflamatório

Abstract

Leishmaniasis, a supervised parasitic disease, continues to be a challenge for public health due to the limitations of therapeutic options and their side effects. In search of new alternatives, medicinal plants have been investigated as promising sources of new treatments for parasitic diseases, due to their diversity of bioactive compounds with therapeutic potential. In this context, the present study aimed to investigate the therapeutic potential of amburoside B (AMBB), isolated from the leaves of *Amburana acreana*, evaluating its antioxidant, anti-inflammatory and parasitic properties *in vitro* and *in silico*. AMBB demonstrated efficacy in reducing nitric oxide radical levels, with dose-dependent effect at concentrations of 6.25 to 200.0 μM . However, the inhibitory activity against the enzyme 5-lipoxygenase was considered moderate. However, the compound did not show apparent toxicity in HS-SY5Y cell systems. In thermal introduction assays with ThermoFluor[®], AMBB interacted with the superoxide dismutase enzyme from *Leishmania braziliensis* (LbSOD), indicating destabilization of the protein conformation, which indicates a potential antiparasitic action against *Leishmania*. *In silico* studies confirmed a stable enzymatic interaction between AMBB and the superoxide dismutase from *L. major* (LmSOD). Thus, the results suggest that amburoside B has antioxidant capacity against the $\cdot\text{NO}$ radical and may be a promising candidate for the development of new antileishmanial therapies.

Keywords: *Leishmania*, molecular anchoring, “cerejeira”, amburoside, anti-inflammatory

1 INTRODUÇÃO

Leishmanioses são doenças infecto-parasitárias, não contagiosas, causadas por protozoários de diferentes espécies do gênero *Leishmania* que têm a capacidade de invadir e se reproduzir dentro das células que compõe o sistema imunológico do hospedeiro infectado (PACE D, 2014) (Wyrepkowski *et al.*, 2020). As principais formas clínicas da leishmaniose são a Tegumentar (LT) e a Visceral (LV). Segundo dados da Organização Pan-americana de Saúde, entre os anos de 2001 e 2018, foram registrados 989.096 casos de LT (cutânea e mucosa) no continente americano (Santiago; Pita; Guimarães, 2021).

A Leishmaniose Tegumentar constitui um problema de saúde pública em 98 países, distribuídos nos continentes da África, Américas, Ásia e Europa. Informações anuais, indicam cerca de dois milhões de novos casos registrados por ano e mais de 15 milhões de pessoas infectadas no mundo. Em 2018, foram notificados mais de 46 mil novos casos da leishmaniose cutânea e mucosa nas Américas, sendo que o Brasil apresentou a maior concentração de casos, com cerca de 35% (Branco Junior *et al.*, 2022; OPAS, 2019).

Atualmente, as principais formas de tratamento da leishmaniose tegumentar consistem na utilização de medicações de primeira linha, os antimoniais pentavalentes, ou de medicamentos de segunda linha, como a anfotericina B ou pentamidina. No entanto, essas medicações apresentam alta toxicidade, efeitos colaterais adversos e custo elevado. Por isso, novas alternativas terapêuticas, como a identificação de moléculas de fonte naturais, estão sendo investigadas para atuarem no desenvolvimento de melhores abordagens terapêuticas para esta doença tropical negligenciada (Cortes *et al.*, 2020; Martins *et al.*, 2024).

Desde meados da década de 1980, quando a busca por produtos naturais antileishmania se tornou proeminente, diversos metabólitos originados de plantas foram relatados no tratamento contra leishmaniose. Apesar do grande peso molecular de alguns produtos naturais, o que os torna menos semelhantes a medicamentos sintéticos, a diversidade estrutural, a possível redução dos efeitos colaterais, a redução no tempo de tratamento e o controle da resistência emergente dos medicamentos tradicionais são fatores que reiteram o interesse em plantas para o desenvolvimento de novos tratamentos, substituindo as alternativas sintéticas (Cortes *et al.*, 2020; Tariq *et al.*, 2016).

Os tratamentos para atividade antileishmania utilizam substâncias isoladas e extratos de plantas endêmicas de diferentes regiões pertencentes às famílias Annonaceae, Euphorbiaceae, Rutaceae, Myrsinaceae, Liliaceae, Araliaceae Simaroubaceae e Fabaceae (Kuroyanagi *et al.*, 2012; Tariq *et al.*, 2016; Cortes *et al.*, 2020). O gênero *Amburana* (Fabaceae) apresenta potencial atividade contra *Leishmania amazonenses*, *L. braziliensis* e *L. donovani* e a cumarina, isolada da *A. cearensis* foi eficaz contra a *L. chagasi* (Monteiro *et al.*, 2017; Silveira *et al.*, 2022).

Os principais metabólitos especializados do gênero *Amburana* são os compostos fenólicos, como a cumarina, os derivados do ácido hidroxibenzoicos e os fenólicos glicosilados, conhecidos como amburosídeos. Essa classe de compostos químicos apresenta oito variações (amburosídeos A-H) e tem sido encontrada em diferentes partes das plantas do gênero, como cascas do caule, sementes e folhas (Leal *et al.*, 2005; Canuto; Lima; Silveira, 2010; Ferreira *et al.*, 2025). Devido às suas propriedades antioxidantes, antineuroinflamatórias, antifúngicas e anti-inflamatórias, os amburosídeos vêm sendo utilizados em estudos de priorização de novos candidatos a fármacos, mostrando-se uma fonte promissora para o desenvolvimento de novos medicamentos (Oliveira *et al.*, 2020; De Araújo *et al.*, 2022; Nascimento; da Silva-Júnior, 2022).

Desta forma, considerando os resultados promissores do potencial terapêutico do gênero *Amburana* e a escassez de dados da espécie *A. acreana*, esta pesquisa teve como objetivo avaliar a capacidade anti-inflamatória e antioxidante, *in vitro*, do amburosídeo B, e seu potencial leishmanicida em sistema *in silico*, utilizando ensaios enzimático com superóxido dismutase (LbSOD e LmSOD) no ensaio de deslocamento térmico.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Isolamento do amburosídeo B

O amburosídeo B foi isolado do extrato hidroetanólico das folhas de *A. acreana* oriundas do estado de Rondônia (SisGen número ADA5ACA), seguindo as metodologias de coleta e isolamento descritas nas seções 2.1 e 2.2 do capítulo 1 (página 38). A caracterização química do composto foi realizada por espectroscopia de RMN de ^1H e ^{13}C (uni/bidimenssinaol) e comparação

com registros da literatura, conforme descrito no capítulo 1, sessão 3.1 composto 5 (Ferreira *et al.*, 2025).

2.2 Redução dos níveis de radicais de óxido nítrico, inibição da 5-lipoxigenase e viabilidade celular em células neurais

As metodologias utilizadas para os ensaios *in vitro* de determinação dos níveis de óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$), atividade enzimática da 5-lipoxigenase (5-LOX) e a viabilidade celular através do ensaio com MTT, estão descritos no capítulo II da tese, nas secções 2.4, 2.5 e 2.6, respectivamente. As análises estatísticas foram conduzidas no software GraphPad 6.0, seguindo os mesmos parâmetros descritos no capítulo II da tese, seção 2.7.

2.3 Ensaios leishmanicida *in vitro* e *in silico* com amburosídio B

As etapas de clonagem de gene, expressão heteróloga, purificação cromatográfica e avaliação da atividade de LbSOD foram realizadas por Brito e colaboradores (2018) (Brito *et al.*, 2018). O ensaio do deslocamento térmico com o amburosídio B e as proteínas da enzima *Leishmania braziliensis* (LbSOD), bem como os ensaios de modelagem molecular com proteínas da enzima *Leishmania major* (LmSOD) foram realizados em parceria com os laboratórios LMM/LABIO/UEFS por Souza e colaboradores, 2023/2024.

2.3.1 Ensaios de deslocamento térmico (Thermofluor[®])

Os ensaios foram realizados em aparelho RT-PCR (BIO-RAD CFX96), utilizando placa de PCR de 96 poços (PCR placas 96 poços BioRad[®]), seladas com filme transparente BioRad[®], em triplicata. As placas foram centrifugadas durante 2 minutos, 2000 rpm, 25 °C, em seguida, submetidas ao aquecimento de 25 a 87 °C com incrementos de 1 °C por minuto e o sinal de fluorescência foi acompanhado com SYPRO Orange[®], em comprimentos de onda de 492 (excitação) e 610 nm (emissão).

Os resultados obtidos pelo software da Applied Biosystems 7500 (v2.0) foram submetidos ao processamento e análise na planilha do Excel 2007 (<ftp://ftp.sgc.ox.ac.uk/pub/biophysics>). Os valores da Temperatura de desenovelamento (T_m) foram calculados por ajuste não linear das

curvas obtidas a uma função sigmoidal de Boltzmann, usando GraphPad Prism versão 5.0 para Windows (GraphPad® Software, San Diego, CA, EUA, www.graphpad.com). As análises comparativas entre as diferentes condições empregadas na variação da temperatura de desenovelamento (ΔT_m) foram consideradas significativamente diferentes quando $p < 0,05$, de acordo com o teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn para comparações múltiplas.

2.3.2 Triagem do amburosídio B por ThermoFluor®

O efeito do amburosídio B sobre estabilidade térmica de LbSOD foi avaliado em uma única concentração (concentração final de 2 mM) e um volume equivalente de DMSO (5% v/v) foi utilizado como controle ($\Delta T_m = 0,0$). Resumidamente, LbSOD (5 μ M) foi diluída em tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 7,0) suplementado com NaCl 100 mM e SYPRO Orange® (diluição 1: 100). As placas de 96 poços foram aquecidas de 25 a 87 °C em incrementos de 1 °C por minuto. Os resultados foram analisados conforme descrito na seção anterior.

2.3.3 Atividade antileishmania *in silico* com AMBB

Devido à indisponibilidade de uma estrutura cristalográfica da superóxido dismutase B2 de *Leishmania braziliensis* no Protein Data Bank – PDB (<https://www.rcsb.org/>), a estrutura depositada da superóxido dismutase de *Leishmania major* (LmSOD; código PDB:4F2N) foi usada para as etapas subsequentes, pois é a estrutura de *Leishmania* mais próxima disponível (identidade sequencial: 41,97%; cobertura sequencial: 93%).

O amburosídio B (AMBB) foi ancorado no LmSOD através do AutoDock Vina (Eberhardt *et al.*, 2021), com uma caixa de grade centrada em um sítio alostérico previamente descrito para um *Leishmania* SOD (Souza *et al.*, 2021). A posição energeticamente mais favorável de ancoragem foi analisada no servidor *Protein-Ligand Interaction Profiler* – PLIP (Adasme *et al.*, 2021) usado para uma posição inicial para dinâmica molecular (DM). A rotina da DM do complexo AMBB/LmSOD foi realizada com o software GROMACS 2024.2 (Abraham *et al.*, 2015). A topologia AMBB construída no servidor Bio2byte ACPYPE (Kagami *et al.*, 2023; Silva; Vranken, 2012).

O complexo foi construído usando o campo de força AMBER99SB-ILDN, que foi adaptado para incluir ferro em sua topologia. Ele foi solvatado com água TIP3P e minimizado usando uma corrida de descida mais íngreme com um número ilimitado de etapas e uma tolerância máxima de energia de 1000,0 KJ/mol/nm. O equilíbrio foi realizado em conjuntos NVT e NPT subsequentes para 100 ps cada, seguido por uma corrida produtiva de 100 ns. A estabilidade do sistema foi avaliada usando Desvio Quadrático Médio da Raiz (DQMR), Flutuação Quadrática Média da Raiz (FQMR), raio de giração e gráficos de energia total, todos calculados com módulos GROMACS.

Uma estrutura representativa do complexo LmSOD/AMBB foi obtida por meio do módulo de agrupamento GROMACS, empregando o método de união GROMOS (van Gunsteren; Daura; Mark, 2002) com um valor de corte de 0,10 nm. A estrutura média do maior cluster foi selecionada e usada para avaliar a permanência da ligação de hidrogênio nos complexos usando Hbmap2grace (<http://lmdm.biof.ufrj.br/software/>), filtrando e descrevendo ligações de hidrogênio relevantes com uma permanência de $\geq 10\%$ nas trajetórias (Pita *et al.*, 2012)

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Potencial redutor dos radicais de NO, inibição da 5-LOX e viabilidade celular

As análises dos níveis de concentração de óxido nítrico, da atividade enzimática da 5-lipoxigenase e da viabilidade celular realizadas com o amburosídio B apresentaram resultados promissores para a capacidade antioxidante do compostos e discreto potencial anti-inflamatório. Contudo, não foram observadas interferências do AMBB na função mitocondrial das células HS-SY5Y.

O amburosídio B foi capaz de reduzir os níveis de NO nas concentrações dependentes avaliadas (6,2 a 200 $\mu\text{M mL}^{-1}$), sendo mais expressivo em maiores concentrações, conforme evidenciado na Figura 1a. Nas doses dependentes de 200 $\mu\text{M mL}^{-1}$ e 100 $\mu\text{M mL}^{-1}$, o composto reduziu os níveis de NO para 69,2% e 80,2% (**** $p > 0,0001$), respectivamente. Entretanto, sua eficácia ainda é considerada moderada quando comparado à quercetina, composto de referência, que apresenta concentração inibitória de $\text{CI}_{50} = 49,8 \mu\text{g mL}^{-1}$.

A capacidade anti-inflamatória do amburosídio B foi determinada através do ensaio de redução da atividade enzimática da 5-LOX, uma enzima que catalisa a oxidação de ácidos graxos,

responsável pela produção de leucotrienos, considerados os principais mediadores da inflamação. Os resultados mostram que o AMBB apresentou discreta capacidade de inibir a enzima 5-LOX para 65,8% na dose dependente de $100 \mu\text{M mL}^{-1}$ (* $p > 0,1$), no entanto, nas demais concentrações de 3,1 a $50,0 \mu\text{M mL}^{-1}$, o composto não apresentou interferência significativa na atividade enzimática (Figura 1b). Por outro lado, a quercetina apresenta $\text{IC}_{50} = 3,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $\text{CI}_{25} = 10,5 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Após a avaliação dos efeitos do amburosídio B sobre os níveis de óxido nítrico e a atividade enzimática da 5-LOX, foi realizada uma análise da viabilidade celular para determinar se o composto possui toxicidade em células neurais SH-SY5Y. Foram realizados ensaios de MTT *in vitro* em concentrações crescentes do composto, de 6,2 a $200 \mu\text{M mL}^{-1}$, durante 24 horas. Como mostra a Figura 1c, não foi possível identificar interferência estatisticamente significativa do AMBB na atividade mitocondrial das células neurais SH-SY5Y, nas concentrações avaliadas. Nesse contexto, os resultados indicam que o composto não apresenta toxicidade às células na faixa de concentrações avaliadas.

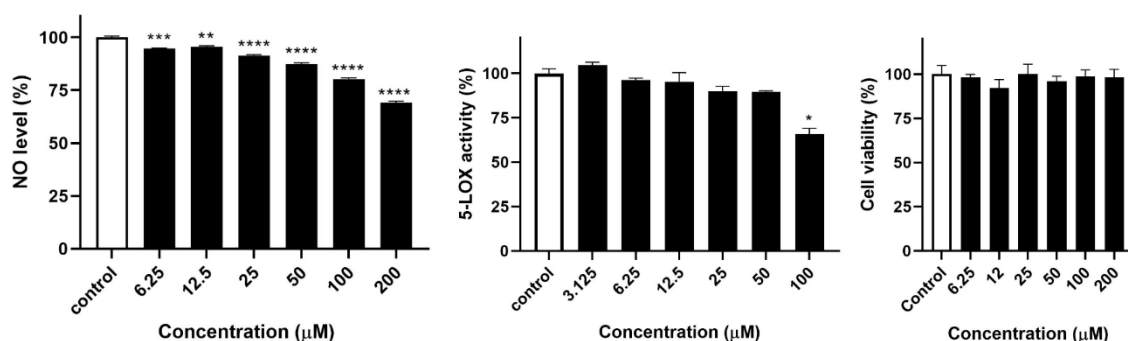


Figura 1. Efeitos do amburosídio B isolado do extrato hidroetanólico das folhas de *Amburana acreana*: 1a) sobre os níveis de NO; 1b) inibitórios contra a atividade enzimática da 5-lipoxigenase; 1c) viabilidade de células neurais SH-SY5Y após 24 h de exposição.

Compostos químicos que reduzem a concentração de óxido nítrico podem auxiliar na redução da resposta imune que permite a sobrevivência do parasita, nesse caso, a *Leishmania*. Em espécies de *Leishmania* que apresentam resistência ao óxido nítrico, substâncias que auxiliam na redução de NO podem aumentar a eficácia das terapias antileishmanianas, tornando os parasitas mais suscetíveis ao tratamento. Além disso, a inibição dos níveis de NO auxilia no controle das

respostas inflamatórias associadas à leishmaniose, resultando em melhores efeitos clínicos (Souza *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2012; Pinho *et al.*, 2022). Desse modo, os resultados favoráveis obtidos da ação do amburosídio B na redução dos níveis de NO no sistema *in vitro* sugerem a utilização do composto para análises do seu potencial leishmanicida, utilizando o ensaio de deslocamento térmico ThermoFluor.

3.2 Amburosídio B como potencial modulador de LbSOD por ThermoFluor®

As metodologias de HTS (do inglês: High throughput screening) visa a triagem de uma biblioteca de compostos diretamente contra um alvo. Essa estratégia de identificação de ligantes demanda a utilização de ensaios secundários para confirmação do mecanismo de ação dos compostos identificados (Hughes *et al.*, 2011).

A condição que muitos ensaios realizados com SOD dependam de métodos indiretos, que estão expostos a interferências por condições de oxirredução, torna esse tipo de análise um problema comum para as etapas de identificação de inibidores de LbSOD. Para minimizar o número de falso-positivos, é comum empregar um segundo ensaio de confirmação. Assim, os ensaios elementares de triagem descritos neste trabalho dependem da ligação covalente de Isotiocianato de Fluoresceína (FITC) à proteína alvo (Breen; Raverdeau; Voorheis, 2016). Uma vez que LbSOD foi conjugada com FITC, qualquer alteração na conformação da proteína proporciona alteração na fluorescência. Caso o amburosídio B promova mudanças conformacionais que exponham um resíduo marcado com FITC, um aumento no sinal de fluorescência é observado. Em compensação, se a ligação do ligante esconde o resíduo marcado com FITC, espera-se uma redução do sinal.

Dessa forma, o amburosídio B foi testado como um potencial inibidor do LbSOD por ensaio de deslocamento térmico (ThermoFluor®). Os resultados mostram que, comparado ao controle negativo, o AMBB foi capaz de atingir uma média de deslocamento térmico de -1 °C, o que indica que sua interação com o LbSOD prioriza as conformações desnoveladas (e parcialmente desdobradas) da proteína, conforme mostra a Figura 2. As alterações das interações são responsáveis pela redução na capacidade de LbSOD suportar a variação na temperatura. Assim, estudos *in silico* que avaliam a capacidade de modulação alostérica e distúrbio proteico foi realizado com o AMBB visando uma nova alternativa de tratamento para a *Leishmania*.

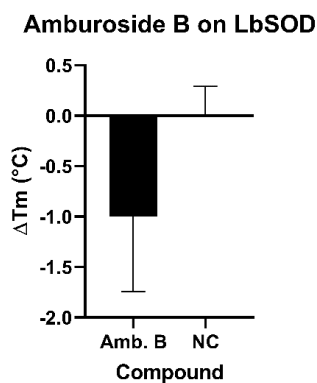


Figura 2. Triagem do amburosídio B como potencial ligante de LbSOD a 2mM, no ensaio de deslocamento térmico (em comparação com o controle).

3.3 Ensaios *in silico*

3.3.1 Potencial leishmanicida do Amburosídio B

A posição mais favorável do amburosídio B em LmSOD obtida na rotina de ancoragem molecular mostrou um total de 15 características (7 ligações de hidrogênio; 5 interações hidrofóbicas; 2 pontes salinas e 1 interação π -cátion). Os resíduos envolvidos são LEU29, ARG30, GLU34, PRO36, THR37, GLY39, TRP112 e LYS113. O complexo obteve um valor de energia de $-7,0$ Kcal mol⁻¹ no Autodock Vina e as interações do complexo são mostradas na Figura 3.

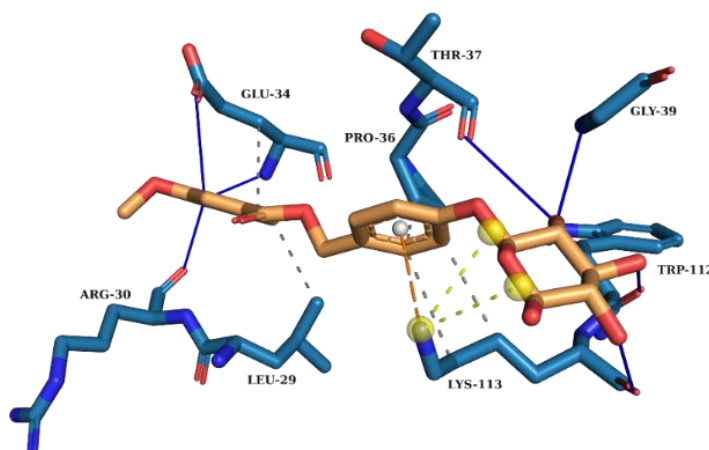


Figura 3. Posição de ancoragem mais favorável do amburosídio B em LmSOD ($-7,0$ kcal mol⁻¹), analisada no servidor PLIP. Resíduos de proteína são mostrados em bastões azuis e AMBB é mostrado em bastões laranja (linhas azuis = ligações de hidrogênio; linhas cinzas tracejadas = interações hidrofóbicas; linhas amarelas tracejadas = pontes de salinas; linhas laranja tracejadas = interação π -cátion).

O complexo foi submetido a dinâmica molecular. As conformações proteicas ao longo da trajetória foram agrupadas e a estrutura do meio de maior cluster (que aparece 47150 ps na trajetória) foi escolhida como uma estrutura representativa da DM LmSOD/AMBB, como mostrado na Figura 4.

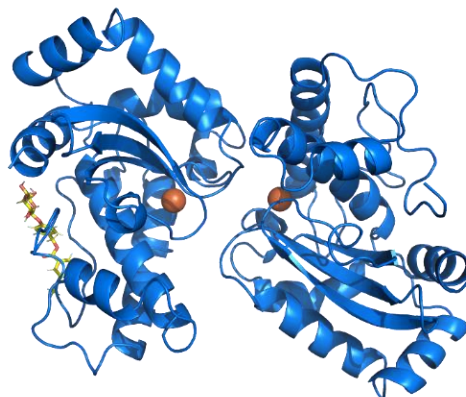


Figura 4. Estrutura representativa (tempo = 47150ps) da conformação LmSOD mais populosa ao longo da corrida DM (100000 ps). LmSOD é mostrado em 3D azul, AMBB é mostrado em bastões amarelos e os íons ferro são mostrados em esferas laranjas.

Como um método de avaliação da estabilidade do complexo durante a execução da DM, o RMSD (Root-Mean-Square Deviation) foi calculado. O sistema permaneceu estável, marcando um RMSD médio de $0,49 \pm 0,02$ nm. Embora a flutuação da proteína tenha atingido o pico próximo a 0,625 próximo ao final da execução, o sistema conseguiu retornar aos seus valores RMSD anteriores. Um gráfico dos valores de RMSD para o backbone LmSOD é mostrado na Figura 5.

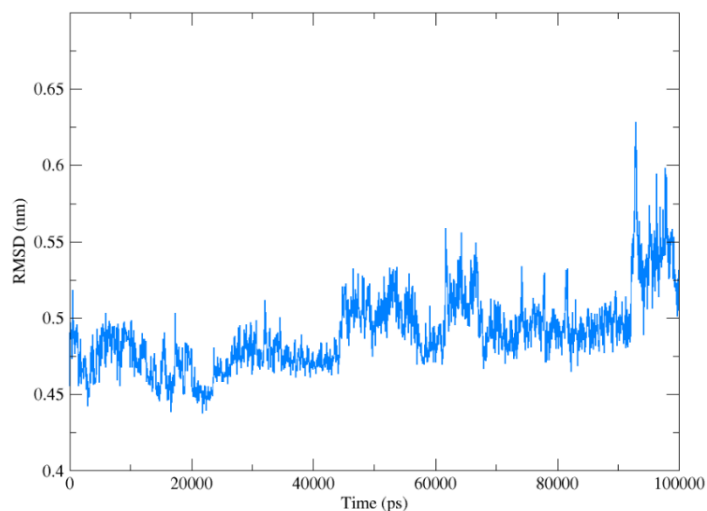


Figura 5. Gráfico de valores de DQMD para LmSOD (backbone) durante a execução do complexo de amburosídio B.

Para identificar quais regiões são responsáveis pelas variações de conformação da proteína foi calculada uma Flutuação Quadrática Média por Cadeia (FQMC) dos resíduos do backbone. Como esperado, as regiões que mais flutuaram em ambas as cadeias são as regiões de loop. Enquanto a cadeia A pontuou valores médios de FQMC de $0,07 \pm 0,03$ nm, a cadeia B pontuou $0,06 \pm 0,03$ nm. O gráfico dos valores de FQMC para ambas as cadeias é mostrado na Figura 6a. A representação em 3D dos intervalos de resíduos que representam os picos de flutuação (que pontuaram acima da FQMC média para cada cadeia) nos gráficos, são destacados na Figura 6b.

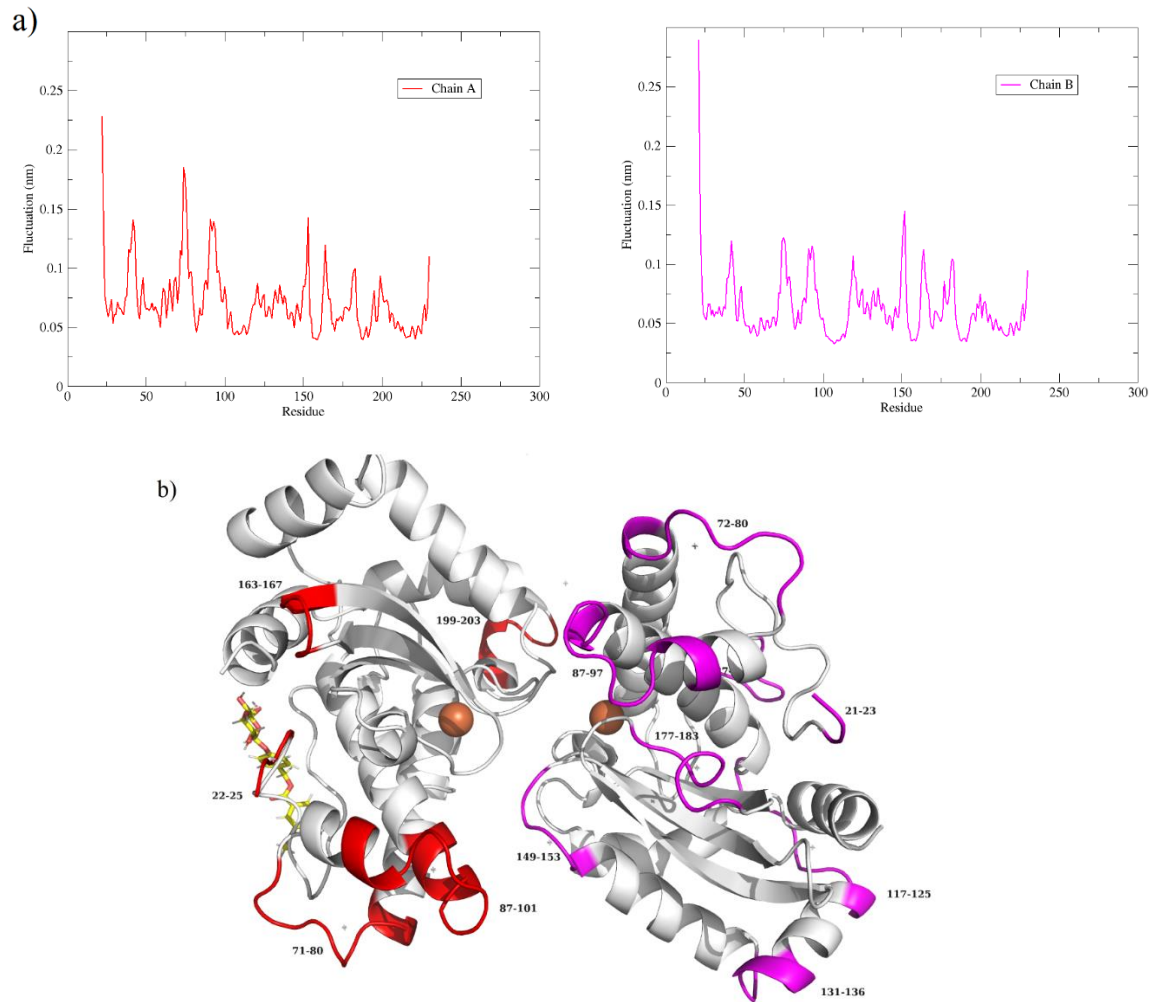


Figura 6. a) Gráfico de valores de FQM para os resíduos da estrutura principal do LmSOD durante a execução do complexo AMBB (cadeia A = vermelho; cadeia B = rosa). b) Representação em 3D dos resultados de FQM para LmSOD na execução do complexo AMBB. As regiões de pico de FQM (acima da FQM média) são rotuladas e destacadas (vermelho na cadeia A e rosa na cadeia B). AMBB é mostrado em bastões amarelos.

A compactação do sistema durante a corrida DM foi medida através do seu raio de rotação total. O complexo marcou um raio de rotação média de 0,2 nm, com variações muito discretas, o que confirma ainda mais sua estabilidade. Um gráfico do raio de rotação para o sistema LmSOD/AMBB é mostrado na Figura 7.

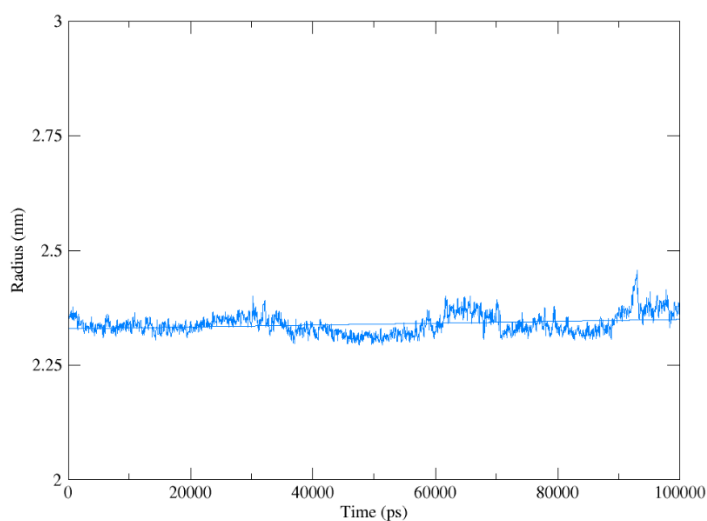


Figura 7. Gráfico do raio de rotação total para LmSOD durante a execução do complexo LmSOD/AMBB.

Como uma forma de medir o quão energeticamente favorável é o sistema, a energia total ao longo da corrida DM foi calculada. O sistema LmSOD/AMBB marcou uma média de $-6,64125 \times 10 \text{ kJ mol}^{-1}$, o que novamente mostra que as interações são energeticamente favoráveis. O gráfico da energia total para LmSOD/AMBB é mostrado na Figura 8.

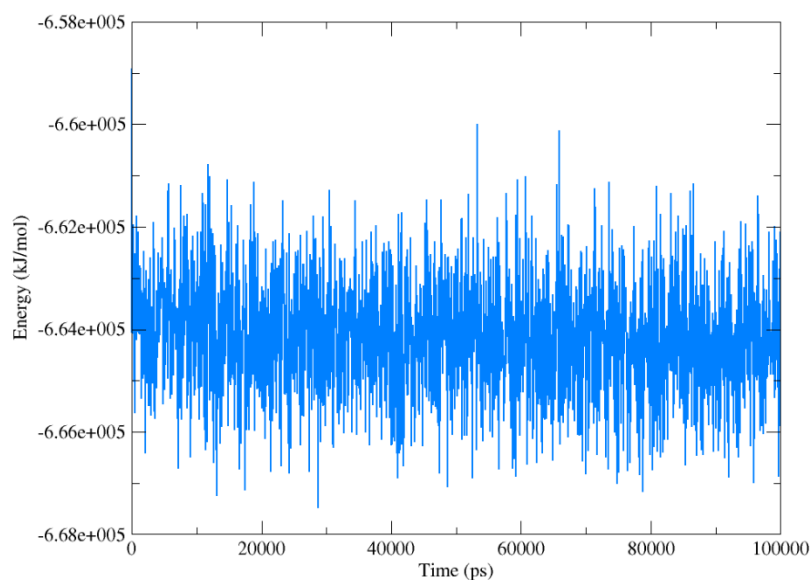


Figura 8. Gráfico da energia total do complexo LmSOD/AMBB durante a execução da DM.

As ligações de hidrogênio relevantes (tempo de permanência $\geq 10\%$) estabelecidas na execução da DM são mostradas na Tabela 1. Os principais resíduos envolvidos neste tipo de interação são HIS28, ARG30, GLU34, HIS105, LYS113, HIS223 e ARG227. Destes, ARG30, GLU34 e LYS113 coincidem com os resultados de docking, com ARG30 e LYS113 pontuando quase permanência em tempo integral nas execuções DM (100% e 96%, respectivamente). Esses resultados são mostrados na Tabela 1.

Os estudos *in silico* corroboram com os ensaios biológicos, pois a execução da DM não demonstra apenas estabilidade geral, padrões energéticos e conformacionais favoráveis para o sistema, mas também destaca interações-chave do amburosídio B com resíduos de LmSOD como ARG30 e LYS113 durando 96% ou mais do tempo de execução. Essas descobertas sugerem que o amburosídio B é capaz de exercer a modulação alostérica em SODs, com um impacto direto na estabilidade do homodímero, o que pode ser observado no perfil de deslocamento negativo do composto nos ensaios de deslocamento térmico com LbSOD.

Tabela 1. Ligações de hidrogênio com tempo de permanência $\geq 10\%$ no complexo LmSOD/AMBB calculado com Hbmap2grace.

Doador	Aceptor	Valor	Porcentagem (%)
HIS28 N	AMBB O7	311	31,07
HIS28 NE2	AMBB O6	273	27,27
ARG30 N	AMBB O3	218	21,78
ARG30 N	AMBB O9	969	96,80
GLU34 N	AMBB O3	396	39,56
HIS105 NE2	AMBB O3	719	71,83
LYS113 NZ	AMBB O1	784	78,32
LYS113 NZ	AMBB O8	741	74,03
HIS223 NE2	AMBB O2	166	16,58
HIS223 NE2	AMBB O4	202	20,18
ARG227 NH1	AMBB O2	263	26,27
ARG227 NH1	AMBB O7	230	22,98
ARG227 NH2	AMBB O2	196	19,58
AMBB O2	HIS223 ND1	181	18,08
AMBB O3	ARG30 O	1001	100,00
AMBB O7	HIS28 ND1	487	48,65

4 CONCLUSÕES

Este estudo demonstra que o amburosídio B, composto majoritário nas folhas de *Amburana acreana*, apresenta propriedade antioxidante significativa, considerando seus efeitos redutores nos níveis de $\cdot\text{NO}$ de maneira dose-dependente. Esses resultados sugerem que o AMBB como potencial modulador terapêutico antileishmaniais, especialmente em espécies resistentes a este radical livre. No entanto, a atividade anti-inflamatória do composto foi moderada, refletindo uma inibição limitada da enzima 5-lipoxigenase, o que indica uma possível restrição nesse mecanismo de ação anti-inflamatório.

Os ensaios *in vitro* com ThermoFluor® indicam o amburosídio B como um possível modulador alostérico da LbSOD, promovendo a desestabilização conformacional da enzima, o que potencialmente comprometeria a capacidade da *Leishmania* de tolerar o estresse oxidativo. Adicionalmente, os ensaios de modelagem molecular *in silico* demonstra a estabilidade do complexo LmSOD/AMBB, destacando a capacidade do composto de interagir com a enzima de forma estável.

Assim, o AMBB pode ser considerado um composto candidato promissor para o desenvolvimento de novas terapias antileishmania. No entanto, é crucial a realização de estudos adicionais *in vivo* para validar os efeitos observados e aprofundar a compreensão sobre o potencial terapêutico do AMBB em modelos experimentais de leishmaniose. A exploração contínua de moléculas naturais, como o amburosídio B, pode abrir novas perspectivas no tratamento de doenças parasitárias negligenciadas, ampliando as opções terapêuticas disponíveis.

REFERÊNCIAS

- BRITO, Camila C.B. et al. Molecular Cloning and Biochemical Characterization of Iron Superoxide Dismutase from *Leishmania braziliensis*. **Molecular Biotechnology**, [s. l.], vol. 60, no. 8, p. 595–600, 2018. Available at: <http://dx.doi.org/10.1007/s12033-018-0095-2>.
- BOIVIN, S.; KOZAK, S.; MEIJERS, R. Optimization of protein purification and characterization using ThermoFluor screens. **Protein Expression and Purification**, v. 91, n. 2, p. 192–206, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pep.2013.08.002>>.
- CORTES, S.; BRUNO DE SOUSA, C.; MORAIS, T.; LAGO, J.; CAMPINO, L. Potential of the natural products against leishmaniasis in Old World - a review of in-vitro studies. **Pathogens and Global Health**, v. 114, n. 4, p. 170–182, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/20477724.2020.1754655>>.
- CUMMINGS, M. D.; FARNUM, M. A.; NELEN, M. I. Universal screening methods and applications of ThermoFluor®. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 11, n. 7, p. 854–863, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1177/1087057106292746>>.

- DOS SANTOS NASCIMENTO, I. J.; DA SILVA-JÚNIOR, E. F. TNF- α Inhibitors from Natural Compounds: An Overview, CADD Approaches, and their Exploration for Anti-inflammatory Agents. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, v. 25, n. 14, p. 2317–2340, 2021.
- HENRIQUEZ-FIGUEROA, A.; ALCON, M.; MORENO, E.; SANMARTÍN, C.; ESPUELAS, S.; LUCIO, H. de; JIMÉNEZ-RUIZ, A.; PLANO, D. Next generation of selenocyanate and diselenides with upgraded leishmanicidal activity. **Bioorganic Chemistry**, v. 138, n. May, 2023.
- JOHNSON, O. O.; BHAT, S. G.; AYOOLA, G. A.; MADAYATH, H.; PUTHUSSERI, S. P.; COKER, H. Isolated compounds from the roots of flabellaria paniculata cav. (malpighiaceae) and their effects on mcf-7 breast cancer cells. **Tropical Journal of Natural Product Research**, v. 4, n. 12, p. 1033–1038, 2020. Disponível em: <<https://www.tjnpr.org>>. Acesso em: 9 nov. 2022.
- MATULIS, D.; KRANZ, J. K.; SALEMME, F. R.; TODD, M. J. Thermodynamic stability of carbonic anhydrase: Measurements of binding affinity and stoichiometry using thermofluor. **Biochemistry**, v. 44, n. 13, p. 5258–5266, 2005.
- OPAS. Leishmanioses informe epidemiológico das Americas. **Pratique Vet**, n. 117, p. 59–62, 2019.
- REINHARD, L.; MAYERHOFER, H.; GEERLOF, A.; MUELLER-DIECKMANN, J.; WEISS, M. S. Optimization of protein buffer cocktails using Thermofluor. Acta Crystallographica Section F: **Structural Biology and Crystallization Communications**, v. 69, n. 2, p. 209–214, 2013.
- SANTIAGO, A. S.; PITA, S. S. da R.; GUIMARÃES, E. T. Tratamento da leishmaniose, limitações da terapêutica atual e a necessidade de novas alternativas: Uma revisão narrativa. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 7, p. e29510716543, 2021.
- SANTOS, S. P.; BANDEIRAS, T. M.; PINTO, A. F.; TEIXEIRA, M.; CARRONDO, M. A.; ROMÃO, C. V. Thermofluor-based optimization strategy for the stabilization and crystallization of Campylobacter jejuni desulforubrythrin. **Protein Expression and Purification**, v. 81, n. 2, p. 193–200, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pep.2011.10.001>>.
- SHENG, Y.; ABREU, I. A.; CABELLI, D. E.; MARONEY, M. J.; MILLER, A. F.; TEIXEIRA, M.; VALENTINE, J. S. Superoxide dismutases and superoxide reductases. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 7, p. 3854–3918, 2014.
- Tariq A, Adnan M, Amber R, et al. Ethnomedicines and anti-parasitic activities of Pakistani medicinal plants against Plasmodia and Leishmania parasites. **Ann Clin Microbiol Antimicrob**. 2016;15(1):52.
- VENKATRAMAN, J.; BHAT, J.; SOLAPURE, S. M.; SANDESH, J.; SARKAR, D.; AISHWARYA, S.; MUKHERJEE, K.; DATTA, S.; MALOLANARASIMHAN, K.; BANDODKAR, B.; DAS, K. S. Screening, identification, and characterization of mechanistically diverse inhibitors of the Mycobacterium tuberculosis enzyme, pantothenate kinase (CoaA). **Journal of Biomolecular Screening**, v. 17, n. 3, p. 293–302, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1177/1087057111423069>>.
- WANG, D.; MU, Y.; DONG, H.; YAN, H.; HAO, C.; WANG, X.; ZHANG, L. Chemical constituents of the ethyl acetate extract from diaphragma juglandis fructus and their inhibitory activity on nitric oxide production in vitro. **Molecules**, v. 23, n. 1, 2018.
- ZHANG, X. F.; ZHANG, J.; LIU, L. Fluorescence properties of twenty fluorescein derivatives: Lifetime, quantum yield, absorption and emission spectra. **Journal of Fluorescence**, v. 24, n. 3, p. 819–826, 2014.

CONCLUSÃO GERAL

Este estudo representa uma contribuição significativa ao entendimento do perfil químico e bioativo de *Amburana acreana*, com a identificação de compostos importantes, como a cumarina, ácidos fenólicos, éster 4- β -D-glucopiranosiloxibenzílico (amburosídio I) e amburosídio B, composto majoritário no extrato hidroetanólico das folhas. Os resultados sugerem que os amburosídeos, especialmente o amburosídio B, são compostos recorrentes nas espécies do gênero *Amburana* e reforça a relação taxonômica entre *A. cearensis* e *A. acreana*.

Esta pesquisa indica *A. acreana* como uma espécie de características bioativas que merece mais investigação, principalmente em relação à neuroproteção e à eliminação de radicais. Além disso, foram indicadas propriedades antioxidantes promissoras do amburosídio B, sugerindo seu potencial terapêutico, particularmente contra doenças inflamatórias e parasitárias, como a leishmaniose. Também foi possível destacar o potencial antioxidante do AMBB, especialmente em relação a enzimas envolvidas no estresse oxidativo da *Leishmania*, demonstrando ser um composto relevante no desenvolvimento de terapias inovadoras contra espécies resistentes.

Contudo, os dados obtidos, embora inéditos e inovadores, reforçam a necessidade de estudos adicionais, especialmente *in vivo*, para validar os efeitos observados e esclarecer os mecanismos de ação envolvidos. A compreensão mais detalhada da ação dos amburosídeos B e I e dos outros constituintes fenólicos nas propriedades farmacológicas de *A. acreana* pode permitir novas perspectivas para o uso terapêutico dessas moléculas, sobretudo no tratamento de doenças negligenciadas, como a leishmaniose. Dessa forma, a investigação contínua da biodiversidade brasileira e dos recursos genéticos vegetais, como os encontrados no gênero *Amburana*, pode ser essencial para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas, originadas de produtos naturais.