



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO



Campus Diadema
Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas
Departamento de Química

LUIZA DE CAMILLIS RODRIGUES

**Busca por compostos anti-leucemia a partir de
Swinglea glutinosa (Rutaceae)**

DIADEMA

2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO – UNIFESP

INSTITUTO DE CIÊNCIAS AMBIENTAIS, QUÍMICAS E FARMACÊUTICAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

LUIZA DE CAMILLIS RODRIGUES

Busca por compostos anti-leucemia a partir de *Swinglea glutinosa* (Rutaceae)

Relatório final da unidade curricular Projetos Dirigidos em Química, como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Química.

Orientador: Prof. Dr. Thiago André Moura Veiga

Diadema, 2021

Ficha Catalográfica

Dados Internacionais da Catalogação na Publicação (CIP)

Rodrigues, Luiza De Camillis

Busca por compostos anti-leucemia a partir de Swinglea glutinosa (Rutaceae) / Luiza De Camillis Rodrigues. -- Diadema, 2021.
73 f.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química) -
Universidade Federal de São Paulo - Campus Diadema, 2021.

Orientador: Thiago André Moura Veiga

1. Swinglea glutinosa. 2. Rutaceae. 3. Atividade anti-leucemia. 4. Amidas. 5. Desrepliação. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas,
Campus Diadema da Universidade Federal de São Paulo, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Para Maria de Lourdes e Luciana

Agradecimentos

Queria começar agradecendo a vida e à oportunidade da vida.

Quero agradecer a mãe Osun, deusa da minha vida. Meus agradecimentos à mãe Osun vão além desse trabalho, quero agradecer por me escolher para ser casa de orixá e por fazer tudo aquilo que ninguém pode fazer por mim. Hoje sou raspada, catulada e adoxada com o maior orgulho. A dúpé orisa.

Agradecer à minha mãe e avó que me criaram com tanto amor, que privilégio ter sido criada por duas mulheres tão inspiradoras, fortes, batalhadoras e únicas. Maria de Lourdes foi e sempre será minha inspiração como mulher, professora e pesquisadora, obrigada por tanto, espero que a senhora esteja orgulhosa de mim aí de cima. Não sei nem por onde começar pra agradecer a minha mãe, sempre tão presente, obrigada por ser meu único alicerce, a vida reservou que fôssemos uma dupla e somos até a eternidade, eu e você, invencíveis eu diria, eu te amo, tudo que eu sou devo a você.

Kaio, lembra todas as vezes que a gente falou que alguém nessa relação tem que manter a sanidade mental em dia quando o outro surta? Hahaha. Feliz que você sabe o exato lugar que ocupa na minha vida e não duvida disso por um minuto sequer, por mais distante que eu esteja. Quando eu poderia imaginar que encontraria minha versão masculina completa para ser meu melhor amigo? Xuxa gêmeas que fala né? Obrigada por ser tudo que você representa na minha vida, você é o irmão que a vida me deu, te cuido e te guardo, obrigada por me cuidar com tanto carinho, amo você.

Ana, eu nem sei por onde começar, você é minha dupla de laboratório e acho que juntas a gente forma um time e tanto. Aonde eu cheguei hoje tem muito de você, dos seus ensinamentos, da sua paciência, de tudo, saudade das nossas tardes no laboratório, você trouxe leveza para o que já era leve e bom, você é um presente que a pesquisa me deu e que eu quero levar para o resto da minha vida bem grudada em mim, obrigada por tudo, amo você.

André, o que é essa amizade né? Já me salvou de tantas que eu não tenho palavras para descrever a sua importância na minha vida, você é luz. Juliana, você é a flor que a vida me deu. Linda, obrigada, obrigada e obrigada, por estar lá tantas vezes que eu precisei, estou aqui por você, te amo. Lucas Martins, a gente sempre disse “vamos formar juntos em?” e não é que vamos? desde o 1º dia de aula, até o

último juntos, você fez meus dias muito melhores, obrigada por absolutamente tudo, saudades das esfihas pré-aula, estou aqui por você.

A todos meus amigos e amigas que estiveram presentes nesses últimos anos na minha vida, Júlia Santos, Leandro Barros, Thays de Sá, Victor Sipoloni, Giulia Barbosa, Ana Flávia, Ana Paula Sousa, Thiago Princhak, o que seria de mim sem vocês?

Queria agradecer ao Thiago, meu orientador, que colocou meus pés no chão tantas vezes e me ensinou tudo que está aqui escrito nesse trabalho, obrigada por me abrir as portas, me acolher e me ensinar. Obrigada também por confiar em mim e no meu trabalho.

Aos todos/as os/as integrantes do LaBiORG obrigada pelos cafés pós almoço e pelas ajudas quando eu não sabia nem por onde começar.

Queria agradecer à minha banca avaliadora, obrigada professor Marcus Craveiro da Universidade Federal de São Paulo e ao professor Sebastião da Cruz Silva da Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará por dedicarem parte do tempo de vocês lendo, contribuindo e participando da minha banca.

Por fim, agradeço ao Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas da Universidade Federal de São Paulo, pelo espaço físico e equipamentos, ao Instituto Agrônomo de Campinas, e às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPESP pelo auxílio financeiro.

Resumo

Foi conduzido o estudo químico da espécie vegetal *Swinglea glutinosa* (Rutaceae), uma planta tropical originária do sudeste asiático, caracterizada pela biossíntese de diferentes classes de compostos que possuem diversas atividades biológicas associadas. Para a exploração racional do perfil químico da espécie, utilizou-se a abordagem de desreplicação via cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada ao espectrômetro de massas de alta resolução (EMAR), bem como dados registrados na literatura, bancos de dados *in house* e bancos de dados comerciais de Produtos Naturais, além do uso da plataforma GNPS como um facilitador nesse processo. Assim, minimizou-se a chance de isolamento de compostos já descritos na literatura para a espécie. Os extratos e as frações que originaram os metabólitos isolados foram avaliados contra células de leucemia humana (linfoides e mieloides): Jurkat, K-562, Kasumi-1 e Raji. As avaliações preliminares mostraram que algumas frações (na concentração de 100 µg/mL) de *S. glutinosa* inibiram a viabilidade celular de algumas linhagens de leucemia. Com o estudo biomonitorado tentativo e a desreplicação molecular, foi possível isolar quatro compostos inéditos na espécie em estudo: Lansamida I, Lansiumamida B, N-(2-feniletil)cinamamida e Lansiumamida C.

Palavras-chave: *Swinglea glutinosa*, Rutaceae, atividade anti-leucemia, amidas, desreplicação

Abstract

The chemical study of the plant species *Swinglea glutinosa* (Rutaceae), a tropical plant originating from Southeast Asia, characterized by the biosynthesis of different classes of compounds that have several associated biological activities was conducted. For the rational exploration of the chemical profile of the species, we used the dereplication approach via high performance liquid chromatography (HPLC) coupled with a high-resolution mass spectrometer (HRMS), as well as data recorded in the literature, in house databases and commercial databases of Natural Products, in addition to the use of the GNPS platform as a facilitator in this process. Thus, the chance of isolation of compounds already described in the literature for the species was minimized. The extracts and fractions that originated the isolated metabolites were evaluated against human leukemia cells (lymphoid and myeloid): Jurkat, K-562, Kasumi-1 and Raji. Preliminary evaluations showed that some extract fractions (at a concentration of 100 µg/mL) of *S. glutinosa* inhibited the cell viability of some leukemia strains. With the tentative biomonitored study and molecular dereplication, it was possible to isolate four new compounds in the species under study: Lansamide I, Lansiumamide B, N-(2-phenylethyl)cinnamamide and Lansiumamide C.

Key-Words: *Swinglea glutinosa*, *Rutaceae*, *anti-leukemia activity*, *amide*

Lista de Figuras

Figura 1: Esquema geral da interação do metabolismo especial e essencial (Adaptado de DOS SANTOS, 2015)	12
Figura 2: Folhas da <i>Swinglea glutinosa</i> (CERQUEIRA, 2012)	14
Figura 3: Principais classes relatadas para o gênero <i>Swinglea</i>	14
Figura 4: Alcaloides isolados a partir de <i>Swinglea glutinosa</i>	18
Figura 5: Alguns dos quimioterápicos derivados de PNs usados atualmente	21
Figura 6: Estrutura molecular de noscapina e 9-nitronoscapina	22
Figura 7: (a) Esquema de como é um fluxo de informações dentro do GNPS entre pesquisadores e pesquisadoras de Produtos Naturais e entre espectros e dados contidos na plataforma. (b) Distribuição de usuários do GNPS no mundo, abastecendo de informações mais de 9200 pessoas (Adaptado de WANG et al).	25
Figura 8: Viabilidade celular da fração hexânica das folhas (FHF) frente à linhagem celular Kasumi-1	33
Figura 9: a) Viabilidade celular das frações obtidas de <i>Swinglea glutinosa</i> frente à linhagem celular KG-1. b) Viabilidade celular das frações obtidas de <i>Swinglea glutinosa</i> frente à linhagem celular Kasumi-1	34
Figura 10: Cromatograma da fração hexânica das folhas (FHF) de <i>S. glutinosa</i> . Destacado em cores os compostos já descritos em literatura e em cinza os compostos não relacionados com a espécie	35
Figura 11: Cromatograma de pico base da fração R5	36
Figura 12: Espectros referentes aos picos A (LC_2), B (LC_1) e C (Citrusinina I).	36
Figura 13: Cromatograma de pico base da fração R7	36
Figura 14: Espectros referentes aos picos D (LC_3) e E (LC_4).	37
Figura 15: Espectro de massas (ESI+) referente à substância Lansiumamida I (LC_1)	37
Figura 16: Espectro de massas (ESI+) referente à substância Lansiumamida B (LC_2).	38
Figura 17: Parte do esqueleto molecular dos núcleos aromáticos dos compostos LC_1 e LC_2	38

Figura 18: Parte do esqueleto molecular dos compostos LC_1 e LC_2 para a representação da configuração das ligações duplas.....	39
Figura 19: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, clorofórmio-d) da substância Lansamida I (LC_1)	40
Figura 20: Ampliação do espectro de RMN ^1H (300 MHz, clorofórmio-d) da substância Lansamida I (LC_1).....	41
Figura 21: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, clorofórmio-d) da substância Lansiumamida B (LC_2).	42
Figura 22: Ampliação do espectro de RMN ^1H (300 MHz, clorofórmio-d) da substância Lansiumamida B (LC_2).	43
Figura 23: Compostos LC_1 e LC_2 isolados de <i>Swinglea glutinosa</i>	44
Figura 24 : Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, acetona-d6) da substância Lansamida I (LC_1).	45
Figura 25: Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, acetona-d6) da substância Lansiumamida B (LC_2).	46
Figura 26: Esqueleto molecular do composto LC_3	48
Figura 27: Composto isolado LC_3 de <i>Swinglea glutinosa</i>	48
Figura 28: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, clorofórmio-d) da substância N-(2-feniletil) cinamamida (LC_3).	49
Figura 29: Ampliação do espectro de RMN ^1H (300 MHz, clorofórmio-d) da substância N-(2-feniletil)-cinamamida (LC_3).	50
Figura 30: Ampliação do espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, acetona-d6) da substância N-(2-feniletil)-cinamamida (LC_3).	51
Figura 31: Espectro de infravermelho N-(2-feniletil)cinamamida (LC_3).....	52
Figura 32: Espectro de massas (ESI+) referente à substância N-(2-feniletil)cinamamida (LC_3)	53
Figura 33: Composto isolado LC_4 de <i>Swinglea glutinosa</i>	55
Figura 34: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, clorofórmio-d) da substância Lansiumamida C (LC_4).	56
Figura 35: Ampliação do espectro de RMN ^1H (300 MHz, clorofórmio-d) da substância Lansiumamida C (LC_4).	57
Figura 36: Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, acetona-d6) da substância Lansiumamida C (LC_4).	58

Figura 37: Ampliação do espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, acetona- d_6) da substância Lansiumamida C (LC_4).	59
Figura 38: Espectro de massas (ESI+) referente à substância Lansiumamida C (LC_4)	60
Figura 39: Teste biológico dos compostos isolados de <i>S. glutinosa</i> em linhagem de Leucemia Mieloide Aguda (Kasumi-1)	61

Lista de Tabelas, Quadros e Esquemas

Tabela 1: Massa do material coletado, seco e extraído de <i>Swinglea glutinosa</i>	30
Tabela 2: Massa das subfrações (R1 – R10) da fração FHF	32
Tabela 3: Método cromatográfico usado para isolar compostos das frações R5 e R7.	32
Tabela 4: Dados de RMN ^1H e/ou ^{13}C obtidos para as substâncias LC_1 e LC_2.	47
Tabela 5: Dados de RMN ^1H e/ou ^{13}C obtidos para a substância LC_3.	53
Tabela 5: Dados de RMN ^1H e/ou ^{13}C obtidos para a substância LC_4.	60
Tabela 6: Tabela de correspondência dos códigos e seus respectivos nomes	61
Quadro 1: Compostos Isolados de <i>S. glutinosa</i> com suas respectivas atividades biológicas já descritas.	15
Esquema 1: Fluxograma de partição líquido-líquido do extrato em etanol das folhas de <i>Swinglea glutinosa</i>	31

Abreviaturas e Siglas

1D – unidimensional

Acetil-CoA – Acetil Coenzima A

ACN – acetonitrila

AcOEt – acetato de etila

ALL – Leucemia Linfoide Aguda

AML – Leucemia Mieloide Aguda

CCD – cromatografia em camada delgada

CCRF-CEM – Linhagem celular de linfoblasto

CDCl₃ – clorofórmio deuterado

CLAE – Cromatografia Liquida de Alta Eficiência

CL-EM – Cromatografia Liquida acoplada a Espectrometria de Massas

CL-EMAR – Cromatografia Liquida acoplada a Espectrometria de Massas de Alta Resolução

CLL – Leucemia Linfoide Crônica

CLM – Leucemia Mieloide Crônica

CL-RMN – Cromatografia Liquida acoplada a Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

CLUAE-EMAR – cromatografia liquida de ultra alta eficiência acoplada a espectrometria de massas de alta resolução

CL-UV – Cromatografia Liquida acoplada a Espectroscopia na Região do Ultravioleta

cm⁻¹ – Número de onda

d – duplete

DAD – Detector de Arranjo de Diodos

DNP – *Dictionary of Natural Products*

dt – duplo tripleto

EMAR – Espectrometria de massas de Alta Resolução

eV – eletrônvolt

FAC – fração em acetato de etila do caule

FAF – fração em acetato de etila das folhas

FaqF – fração aquosa das folhas

FBC – fração em n-butanol do caule

FBF – fração em n-butanol das folhas

FHC – fração em hexano do caule

FHF – fração em hexano das folhas

g – grama

GNPS – *Global Natural Products Social Molecular Networking*

h – hora

Hex – hexano

IAC – Instituto Agronômico de Campinas

IES – ionização por eletrospray

IV – Espectroscopia de Absorção da Região do infravermelho

J – Constante de acoplamento (Hz)

Jurkat – leucemia linfoide aguda

K-562 – Linhagem celular de leucemia mieloide crônica

Kasumi-1 – Linhagem celular de leucemia mieloide aguda

Kg – quilograma

KG-1 – Linhagem celular de leucemia mieloide aguda

m – Multiplete

m/z – Razão massa/carga

MeOH – metanol

MEP – Metil Eritritol Fosfato

MHz – megahertz

mL/min – mililitro por minuto

mm – milímetros

MS² ou MS/MS – Espectrometria de massas acoplada a espectrometria de massas

n-BuOH – n-butanol

nm – nanômetros

NuBBE – Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia

°C – graus Celsius

OMS – Organização Mundial da Saúde

PBMC – Células Monocleares de Sangue Periférico

PN - Produtos Naturais

ppm – partes por milhão

Raji – Linhagem celular de Linfoblasto Humano

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

RPMI 1640 – meio de cultura RPMI

s – simpleto

sl – simpleto largo

t – tripleto

U/mL – unidade de atividade enzimática

UCSD – *Natural Products Database*

UV – Espectroscopia de Absorção da Região do Ultravioleta

δ – deslocamento químico em ppm

λ – comprimento de onda

$\mu\text{g/mL}$ – micrograma por mililitro

μL – microlitro

Sumário

1. Introdução	11
1.2 A família Rutaceae	13
1.3. A espécie <i>Swinglea glutinosa</i>	14
1.4. A Leucemia e os Produtos Naturais	19
1.5. Estratégias para o acesso à produtos naturais bioativos: desreplicação molecular	22
2. Objetivos	26
2.1 Objetivo geral	26
2.2 Objetivos específicos	26
3. Materiais e métodos	27
3.1 Procedimentos gerais	27
3.1.1 Solventes	27
3.1.2 Procedimentos cromatográficos	27
3.1.3 Equipamentos	27
3.1.3.2 Materiais empregados nas análises cromatográficas	28
3.2 Avaliação do potencial biológico	29
3.2.1 Avaliação do Potencial frente as linhagens de leucemia humana <i>in vitro</i> (Citotoxicidade)	29
3.2.2 Cultura celular	29
3.2.3. Avaliação do potencial citotóxico	29
3.3. Coleta do material vegetal	29
3.4. Preparação dos extratos	30
3.5 Fracionamentos cromatográficos	31
4. Resultados e Discussão	33
4.1 Resultados preliminares	33

4.1.2 Avaliação preliminar da atividade citotóxica das frações do extrato.	33
4.1.3 Desreplicação e avaliação preliminar biológica das frações da FHF	34
4.2.2 Caracterização estrutural dos compostos isolados das folhas da <i>Swinglea glutinosa</i>	37
4.2.2.1 Composto LC_1 e LC_2: Lansamida I, Lansiumamida B	37
4.2.2.2 Composto LC_3: <i>N</i> -(2-feniletil)-cinamamida	47
4.2.2.3: Composto LC_4: Lansiumamida C	54
5. Atividade biológica	61
6. Considerações finais	63
7. Referências bibliográficas	64

1. Introdução

Os Produtos Naturais (PNs) vem sendo usados como agentes terapêuticos há muito tempo. Os primeiros vestígios do uso desses compostos foram em 2600 a.C. na Mesopotâmia, onde foi apresentado um relato com cerca de 1000 derivados de plantas medicinais (ATANASOV, WALTENBERGER, *et al.*, 2015). Em muitas culturas, foram empregados óleos, chás, remédios e derivados de plantas sem o conhecimento ou a caracterização dos princípios ativos, apenas utilizando experimentação humana (BERNARDINI, TIEZZI, *et al.*, 2017).

Essas substâncias são associadas a inúmeros compostos bioativos com potencial medicinal, permitindo muitas vezes a obtenção de novos fármacos (MARQUES e FARAH, 2009). No período entre 1981 e final de 2019, 67,9% dos fármacos relatados apresentam alguma relação estrutural com PNs ou derivados, sendo 13% anticâncer (NEWMAN e CRAGG, 2020).

Os PNs e seus derivados têm grande participação na medicina e observa-se cada vez mais o aumento do uso desse tipo de alternativa por conta da vasta flora mundial (PATRIDGE, GAREISS, *et al.*, 2016). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 80% da população de países em desenvolvimento faz uso de compostos naturais em suas medicinas tradicionais para atender às necessidades primárias de saúde (MARQUES e FARAH, 2009). Por serem medicinas de baixo custo e alta disponibilidade possuem grande importância nas comunidades com famílias de baixa renda (BESSA, BORGES, *et al.*, 2013). Mas não só países em desenvolvimento fazem uso de plantas medicinais, a população do mundo como um todo as utiliza para trazer melhor qualidade de vida de modo geral. (MARQUES e FARAH, 2009).

Dentro do contexto de exploração de PNs, a Fitoquímica é responsável pelo estudo de metabólitos biossintetizados por plantas; o metabolismo pode ser dividido em duas grandes divisões: o metabolismo primário, encarregado de produzir compostos que estão ligados às funções vitais da planta, como crescimento, reprodução, fotossíntese, respiração e transporte de solutos, e o metabolismo secundário ou especial, que produz compostos que não são necessários para todas

as plantas. Cada metabolismo tem sua particularidade, ocasionada por solo, espécie, ambiente, predadores, dentre outros fatores abióticos (SANTOS, 2015).

Algumas das funções desses compostos são: proteção contra herbivoria e atração de polinizadores. Os principais precursores das vias metabólicas para a biossíntese dos metabólitos especiais são a acetil coenzima A, o ácido chiquímico, o ácido mevalônico, e o metileritritol fosfato (Figura 1) (DEWICK, 2009). Além disso, são esses compostos os responsáveis pelas ações biológicas, portanto, torna-se importante o estudo químico de extratos, frações e/ou substâncias purificadas para descobrir o(s) composto(s) responsável(eis) pela ação sobre o alvo biológico.

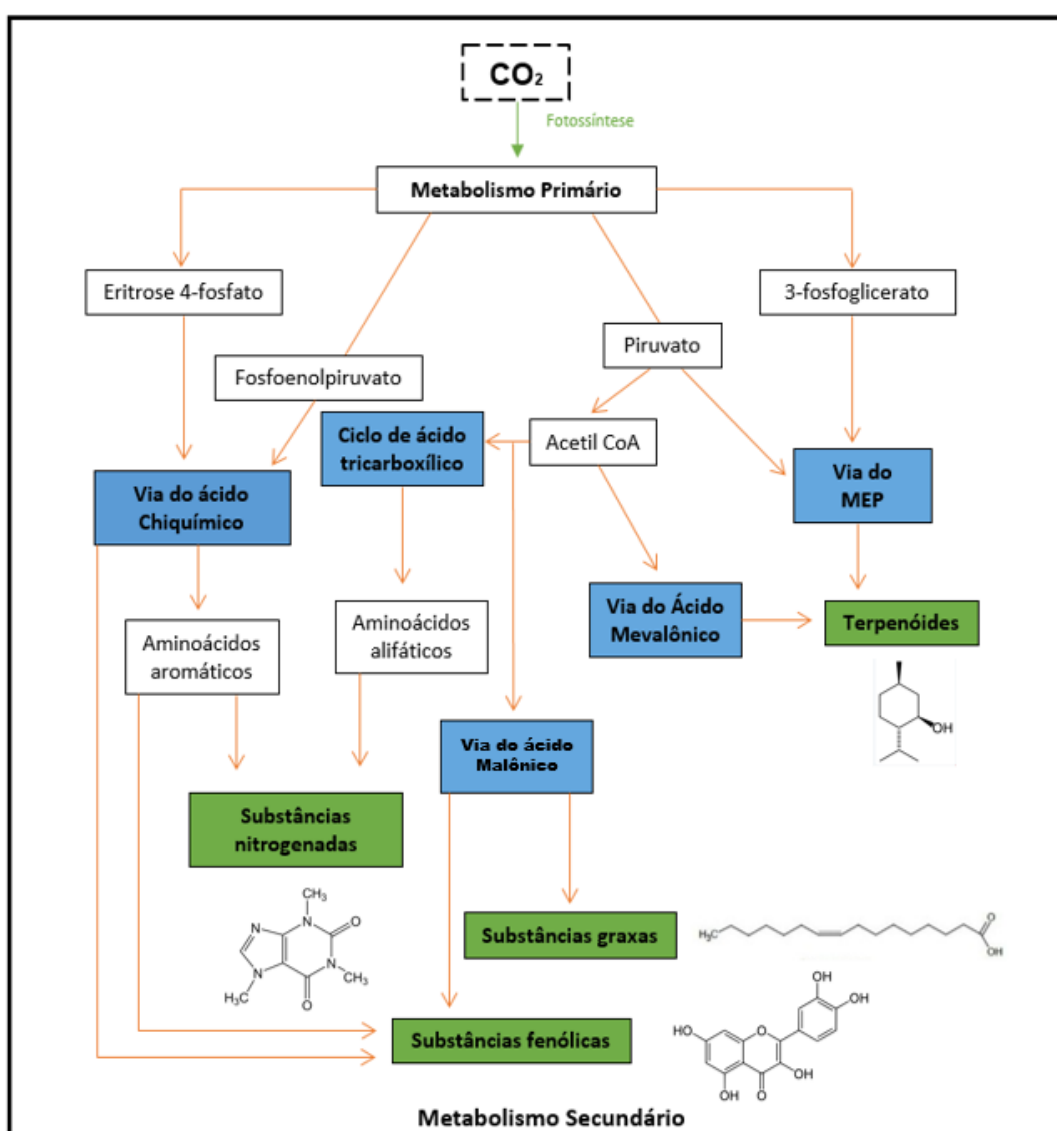


Figura 1: Esquema geral da interação do metabolismo especial e essencial (Adaptado de DOS SANTOS, 2015)

No Brasil, estima-se cerca de 55 mil espécies de vegetais, o que representa 22% da flora mundial (DAVID, WOLFENDER e DIAS, 2015); o que sugere que o nosso país pode fazer frente no descobrimento de novos princípios ativos. Esses aspectos reforçam a importância dos PNs no âmbito farmacêutico, e o quanto pesquisas que visam buscar compostos desconhecidos podem ajudar a descrever melhor a quimiodiversidade das espécies, gerando conhecimento e desenvolvimento mútuo para as áreas de interface. Dentre as famílias vegetais que produzem metabólitos especiais potencialmente ativos, destaca-se a família Rutaceae.

1.2 A família Rutaceae

A família Rutaceae possui 154 gêneros e cerca de 2100 espécies, distribuídas pelas regiões tropicais e temperadas do mundo (Flora do Brasil 2020), ocorrendo com maior intensidade na América tropical, Sul da África, Austrália e Ásia (CERQUEIRA, DOS SANTOS, *et al.*, 2012). Essa família apresenta pontuações translúcidas nas folhas que correspondem a um tecido multicelular produtor de óleos essenciais aromáticos (Flora do Brasil 2020). Diversos compostos da família Rutaceae apresentam atividade biológica, como por exemplo a pilocarpina, um alcaloide presente nas folhas de *Pilocarpus spp.*, utilizada no tratamento do glaucoma. Popularmente, a casca da raiz da *Erytrochiton spp.* é usada como vermífugo (Flora do Brasil 2020).

Além de inúmeros relatos de atividade biológica, a família Rutaceae também possui grande importância econômica devido às espécies do gênero *Citrus* que tem os frutos laranja, limão, tangerina e outros usados na indústria para produção de sucos e outros alimentícios, além do consumo direto da fruta e uso dos óleos essenciais na indústria de cosméticos e perfumaria (CERQUEIRA, DOS SANTOS, *et al.*, 2012). Dada a importância relatada, o estudo de espécies que pertencem a família Rutaceae se torna importante para a comunidade científica, a fim de ampliar o conhecimento de metabólitos com atividade biológica.

1.3. A espécie *Swinglea glutinosa*

Segundo Engler, *Swinglea glutinosa* é uma planta de gênero monotípico, pertencente à ordem Sapindales, família Rutaceae e subfamília Aurantioideae. Trata-se de uma planta tropical originária do sudeste asiático, mais precisamente das ilhas Filipinas. Já disseminada pelo mundo, pode ser encontrada na América Latina, como no oeste da Colômbia e no centro oeste brasileiro (CERQUEIRA, 2011).



Figura 2: Folhas da *Swinglea glutinosa* (CERQUEIRA, 2012)

S. glutinosa é arbustiva (Figura 2), e por essa razão é muito utilizada como planta ornamental, em cercas vivas ou barreira corta vento em plantações. É popularmente chamada de limão-swinglea. Essa espécie é caracterizada pela presença marcante de alcaloides do tipo acridônicos (FERREIRA, DOS SANTOS, *et al.*, 2016), amidas do tipo benzoiltiraminas, fenilacrilamidas e flavonoides (Figura 3).

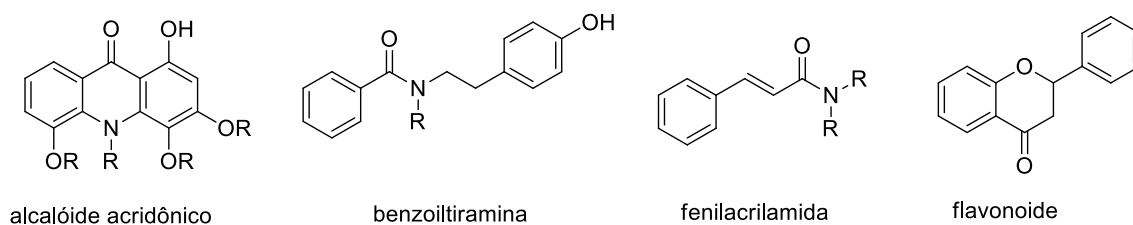


Figura 3: Principais classes relacionadas para o gênero *Swinglea*

Em termos de atividades biológicas associadas aos compostos obtidos a partir de *S. glutinosa*, pode-se destacar uma variedade de efeitos, os quais estão listados no Quadro 1.

Quadro 1: Compostos Isolados de *S. glutinosa* com suas respectivas atividades biológicas já descritas.

Legenda do composto	Nome do composto	Atividade	Referência
A	1,3,5-triidroxi-4-metoxi-10-metil-2,8-bis(3-metilbut-2-enil)acridin-9(10 <i>H</i>)-ona	Atividade antiparasitária; Efeito sobre as catepsinas L e V	(VIEIRA, RATTRAY e CROFT, 2009) ; (MARQUES, VIEIRA e SEVERINO, 2016)
B	1,3,5-tri-hidroxi-10-metil-2,8-bis-(3-metilbut-2-en-1-il)-9-(10 <i>H</i>)-acridinona	Atividade herbicida; Atividade antiparasitária	(FERREIRA, DOS SANTOS, <i>et al.</i> , 2016) (VIEIRA, RATTRAY e CROFT, 2009)
C	glicocitrina-IV	Atividade herbicida; Atividade antiparasitária; Efeito sobre catepsina L e V	(FERREIRA, DOS SANTOS, <i>et al.</i> , 2016) (VIEIRA, RATTRAY e CROFT, 2009); (MARQUES, VIEIRA e SEVERINO, 2016)
D	Citrusinina-II	Atividade antiparasitária	(VIEIRA, RATTRAY e CROFT, 2009)
E	Citrusinina-I	Atividade herbicida; Atividade antiparasitária	(FERREIRA, DOS SANTOS, <i>et al.</i> , 2016); (VIEIRA, RATTRAY e CROFT, 2009)
F	5-hidroxinoracronicina	Atividade antiparasitária	(VIEIRA, RATTRAY e CROFT, 2009)
G	2,3-dihidro4,9-dihidroxi-2-(2-hidroxipropan-2-il)-11-metoxi-10-metilfuro[3,2-b]-acridin-5(10 <i>H</i>)-ona	Atividade antiparasitária	(VIEIRA, RATTRAY e CROFT, 2009)

H	(3R) -2,3,4,7-tetra-hidro-3,5,8-tri-hidroxi-6-metoxi-2,2,7-trimetil-12H-pirano-[2,3-a]-acridin-12-ona	Atividade herbicida; Atividade antiparasitária	(FERREIRA, DOS SANTOS, <i>et al.</i> , 2016); (VIEIRA, RATTRAY e CROFT, 2009)
I	bis-5-hidroxinoracronicina	Atividade antiparasitária	(VIEIRA, RATTRAY e CROFT, 2009)
J	5-hidroxinoracronicina	Atividade antiparasitária	(VIEIRA, RATTRAY e CROFT, 2009)
K	Piranofolina	Atividade antiparasitária	(VIEIRA, RATTRAY e CROFT, 2009)
L	(2R)-2-terc-butil-3,10-di-hidro-4,9- di-hidroxi-11-metoxi-10-metilfuro- [3,2-b] acridin-5 (2H) -ona	Atividade antiparasitária	(VIEIRA, RATTRAY e CROFT, 2009)
M	1,3,5-triidroxi-10-metil-2,8-bis(3-metilbut-2-en-1-il)-9(10H)- acridinona	Atividade herbicida	(FERREIRA, DOS SANTOS, <i>et al.</i> , 2016)
N	Montrofolina	Atividade frente à linhagens celulares de câncer multirresistente	(KUETE, FOUOTSA, <i>et al.</i> , 2015)
O	1-hidroxi-4-metoxi-10-metilacridona	Atividade frente à linhagens celulares de câncer multirresistente	(KUETE, FOUOTSA, <i>et al.</i> , 2015)
P	Norevoxantina	Atividade frente à linhagens celulares de câncer multirresistente	(KUETE, FOUOTSA, <i>et al.</i> , 2015)
Q	Evoxantina	Atividade frente à linhagens celulares de câncer multirresistente	(KUETE, FOUOTSA, <i>et al.</i> , 2015)

R	1,3-dimetoxi-10-metilacridona	Atividade frente à linhagens celulares de câncer multirresistente	(KUETE, FOUOTSA, <i>et al.</i> , 2015)
----------	-------------------------------	--	--

Alguns relatos mostram que as acridonas apresentaram efeito antiparasitário sobre *Plasmodium falciparum* (causador da malária) e *Trypanosoma brucei rhodesiense* (causador da doença do sono) (SANTOS, VIEIRA, *et al.*, 2009) (SEVERINO, GUIDO, *et al.*, 2011), onze alcaloides acridônicos foram testados e o composto (**C**) (Figura 4) foi considerado o composto mais ativo frente a *P. falciparum* e o composto (**J**) foi o mais ativo frente à *T. b. rhodesiens* (VIEIRA, RATTRAY e CROFT, 2009).

Foi relatado ainda o efeito desses alcaloides sobre as catepsinas L e V; enzimas que degradam aleatoriamente proteínas no lisossomo, e que estão associadas a algumas doenças, como progressão de tumores malignos, distrofia muscular, doença de Alzheimer, artrite reumatoide e osteoporose. Para essa frente de estudo os compostos mais promissores foram os alcaloides (**A**) e (**C**) (Figura 4) (MARQUES, VIEIRA e SEVERINO, 2016).

Há também estudos que relatam a inibição *in vitro* da fotossíntese em diversas etapas da reação, associando essa classe de substâncias com a atividade herbicida. Entre os compostos apresentados, destacam-se (**E**) (**C**) e (**B**) (FERREIRA, DOS SANTOS, *et al.*, 2016). A acridona 1,3-dimetoxi-10-metilacridona (**R**) (Figura 4) apresentou atividade frente a células de câncer multirresistentes, e induziu apoptose em células de leucemia CCRF-CEM, devido a capacidade de aumento de espécies reativas de oxigênio, gerando estresse oxidativo (KUETE, FOUOTSA, *et al.*, 2015). Visto isso, entendemos a importância de estudos na busca por novos compostos provenientes de *S. glutinosa* com atividade biológica, em especial a atividade antileucemia.

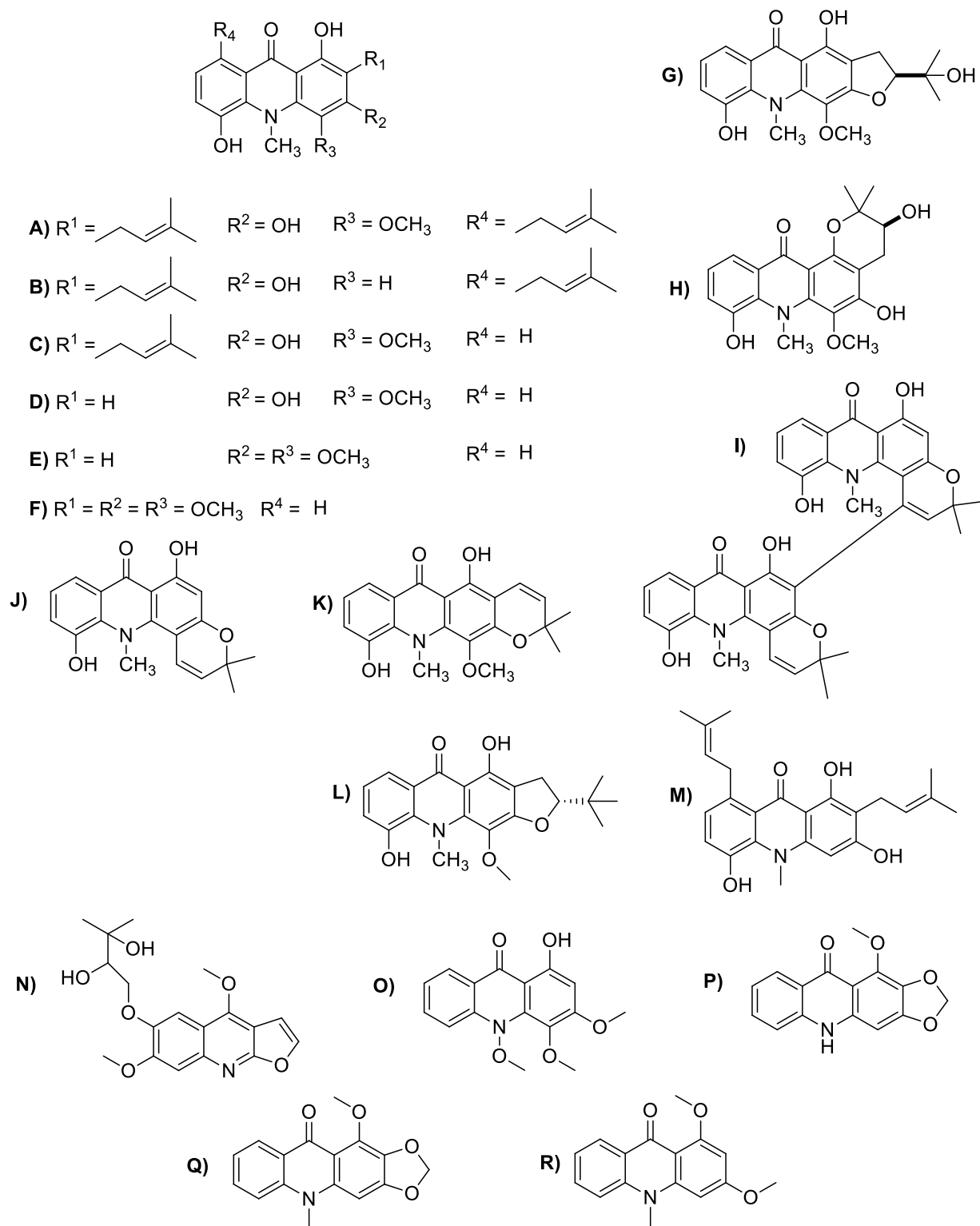


Figura 4: Alcaloides aislados a partir de *Swinglea glutinosa*.

1.4. A Leucemia e os Produtos Naturais

O avanço na área da oncologia associada aos produtos naturais cresceu representativamente nos séculos XX e XXI. Foram descobertas diversas substâncias que são usadas no tratamento de células consideradas malignas, evitando ou inibindo o crescimento de tumores (NEWMAN e CRAGG, 2007) (HARVEY, 2008).

No interior dos ossos, principalmente no esterno e bacia, encontramos um tecido líquido-gelatinoso chamado medula óssea. É nele que ocorre a produção das hemácias, dos leucócitos e das plaquetas (ABOUL-SOUD, EL-SHEMY, *et al.*, 2016). Nesse contexto, a leucemia trata-se de uma forma de câncer que atinge os leucócitos produzidos pela medula óssea, que desempenham importante papel no sistema imunológico. É uma doença que se caracteriza pelo acúmulo de leucócitos anormais na medula óssea, ou seja, produção anormal e descontrolada de células, cuja grande característica é a diminuição da apoptose (MORAES, MELLO, *et al.*, 2017); essa grande quantidade de células anormais prejudica ou impede a produção de hemácias, leucócitos e plaquetas, deixando o organismo suscetível às infecções (ABOUL-SOUD, EL-SHEMY, *et al.*, 2016). Essas células anormais, chamadas de células leucêmicas ou células cancerosas, podem invadir outros órgãos como fígado, baço, rins e até mesmo o cérebro.

A leucemia é classificada de acordo com os leucócitos que afetam e a sua taxa de crescimento, e por isso são chamadas de leucemia linfocítica, linfoblástica (ou linfóide) quando atinge os linfócitos; leucemia mielóide quando atinge os mielócitos (ABOUL-SOUD, EL-SHEMY, *et al.*, 2016).

Ainda não se sabe a real causa para a leucemia, porém acredita-se que o aparecimento desse tipo de câncer pode ser influenciado por fatores genéticos e ambientais. Assim como outros tipos de câncer, a leucemia é resultado de mutações no DNA, que podem ocorrer normalmente ou por exposição à radiação ou produtos cancerígenos (ABOUL-SOUD, EL-SHEMY, *et al.*, 2016).

Atualmente, de acordo com a edição de 2020 da *Cancer Facts & Figures*, estima-se cerca de 60 mil novos casos em 2020 nos Estados Unidos e cerca de 23 mil mortes. No Brasil, a leucemia é no 9º câncer mais incidente entre homens e o 11º entre as mulheres (ABRALE, 2020).

Existem 4 tipos de leucemia: Leucemia Mielóide Aguda (AML), Leucemia Mielóide Crônica (CLM), Leucemia Linfóide Crônica (CLL), Leucemia Linfóide Aguda (ALL). A Leucemia Mielóide Aguda é a leucemia mais comum entre os adultos, representando cerca de 80% dos casos, esse tipo se agrava conforme a idade do paciente e progride rapidamente se não existir tratamento (CALLEJA e KABASHNEH, 2020). A forma crônica é considerada menos severa que a forma aguda; o tratamento com inibidor de tirosina quinase, já vem sendo adotado desde 2001, apesar de surtir bons efeitos e proporcionar longevidade aos pacientes, sua qualidade de vida é menor do que o resto da população por conta dos efeitos colaterais do tratamento (DRULLION, LAFARDE, *et al.*, 2012).

A Leucemia Linfóide Aguda (LLA) é a leucemia que mais afeta as crianças, onde a taxa de cura está em torno de 90% e entre os adultos 40-50% (MAN, MORRIS e KENG, 2017). Já a forma crônica da doença é mais comum em adultos onde geralmente há boa resposta ao tratamento. Porém, em alguns casos observa-se resistência química aos tratamentos mais comuns (BLADT, DURR, *et al.*, 2013).

Hoje em dia já se conhece a eficiência dos PNs no tratamento do câncer e de outras enfermidades, alguns dos quimioterápicos derivados de plantas (Figura 5) que atualmente são empregados nos tratamentos são: a vimblastina (Velban®), usada para doença de Hodgkins e câncer de testículo (BRANDÃO, DAVID, *et al.*, 2010) e a vincristina (Oncovin®), usada no tratamento de linfomas e leucemia (BRANDÃO, DAVID, *et al.*, 2010) ambos são alcaloides extraídos das folhas de *Catharanthus roseus* (ABOUL-SOUD, EL-SHEMY, *et al.*, 2016) (BRANDÃO, DAVID, *et al.*, 2010). Outro alcaloide extraído de *Camptotheca accuminata*, camptotecina, usado no tratamento de câncer de cólon; o paclitaxel isolado de *Taxus brevifolia* (Taxol®), e utilizado no tratamento do câncer de mama (BRANDÃO, DAVID, *et al.*, 2010) (COSTA-LOTUFO, MONTENEGRO, *et al.*, 2010). Há também relatos do uso de derivados do tetrahydrocannabinol, proveniente da *Cannabis sativa* L. (Dronabinol e Nabilona), utilizado em tratamentos complementares na terapia do câncer nos Estados Unidos (DAVID, WOLFENDER e DIAS, 2015).

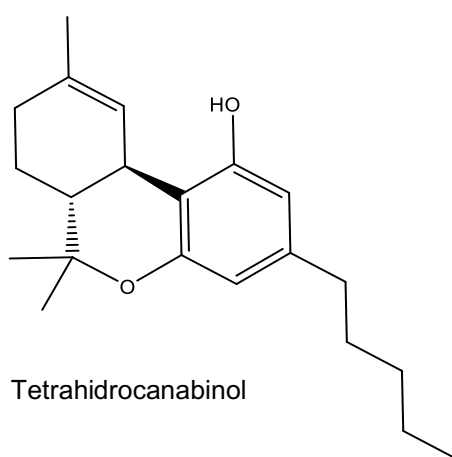
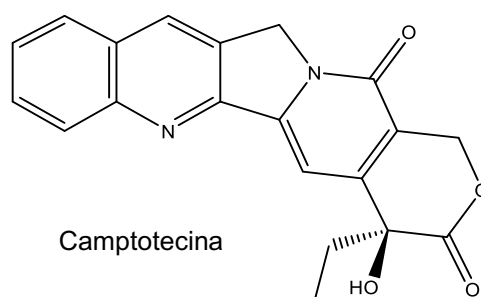
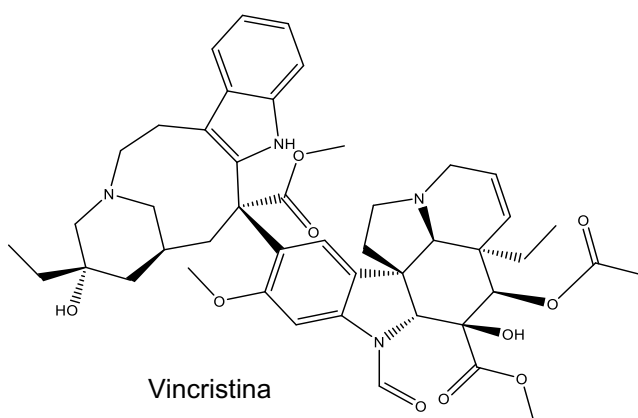
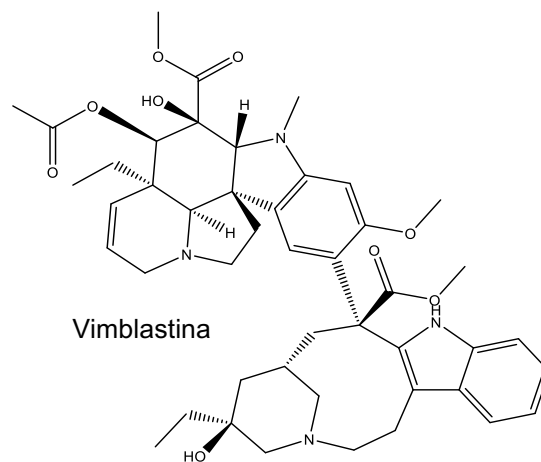
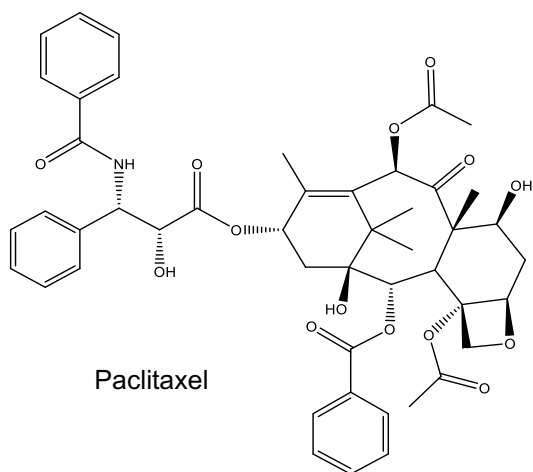


Figura 5: Alguns dos quimioterápicos derivados de PNs usados atualmente

Existem algumas substâncias (Figura 6) que ainda estão em fase de pesquisa pré-clínica, mas já obtiveram bons resultados, como a noscapina, obtida a partir da *Papaver somniferum*, e seu derivado 9-nitro-noscapina. A noscapina apresentou em ensaios *in vitro* 50% de inibição de crescimento de células cancerígenas do tipo

linfoma e baixa toxicidade. No ensaio com camundongos não apresentou problemas ao ser administrada por via oral e produziu a diminuição significativa na proliferação do tumor. Já o seu derivado causou apoptose de células T de linfoma sem apresentar toxicidade (LUCAS, STILL, *et al.*, 2010).

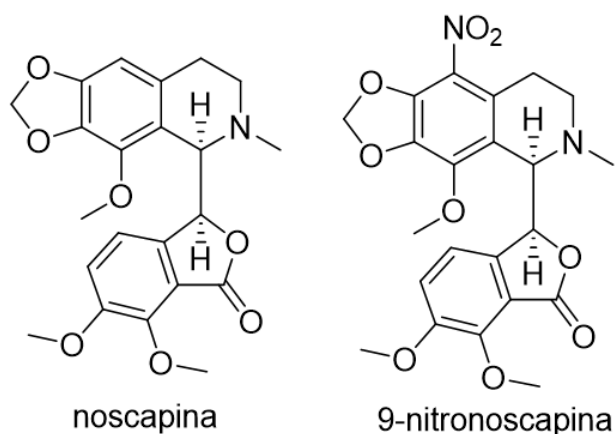


Figura 6: Estrutura molecular de noscapina e 9-nitronoscapina

Os estudos de PNs com atividade anticâncer citados acima apresentaram resultados significativos quanto ao uso separado dos compostos. Pesquisas (DU, HU, *et al.*, 2013) (LI, YANG, *et al.*, 2014) (KATO, MATSUI-YUASA, *et al.*, 2014) confirmam que também podem ser usados associados à métodos conhecidos, visando a melhora do efeito no tratamento de células cancerígenas.

1.5. Estratégias para o acesso à produtos naturais bioativos: desreplicação molecular

O reconhecimento rápido de substâncias em misturas pode aperfeiçoar a busca por compostos bioativos e aumentar a quantidade de estudos avançados e consequentemente de fármacos provenientes de fontes naturais. As técnicas de isolamento de metabólitos costumam ser lentas e com muitas etapas, e demandam a integração de conhecimento técnico, inovação, tecnologia e investimentos (LIMA, PHILOT, *et al.*, 2016). Sendo assim, destaca-se a importância da análise prévia e a triagem química de extratos, permitindo assim direcionar esforços para compostos de interesse incluindo os nunca relatados em literatura, economizando tempo e recursos (GAUDÊNCIO e PEREIRA, 2015).

Dentre as diversas abordagens, destaca-se a desreplicação molecular; que consiste na análise prévia de um produto natural, fração ou extrato pelo acoplamento de técnicas, antes das etapas de purificação (DINAN, 2005).

Como citado, a combinação de técnicas hifenadas - junção de duas ou mais técnicas analíticas que permitem maior eficiência e rapidez na análise - e de ferramentas de biologia molecular, fruto de muitos anos de pesquisa, possibilitou a investigação do sistema bioquímico de qualquer organismo, seja ele microbiano, vegetal ou animal (BERLINCK, BORGES, *et al.*, 2017). Após seu primeiro apogeu em 1960 com o advento das ferramentas de análise espectroscópica, hoje, a química de produtos naturais vive seu segundo momento de grande avanço, de maneira tão extensa e intensa que esta ciência teve que ser praticamente “desmembrada” em tópicos como química biológica, biologia química e química bio-orgânica, para além de suas especialidades mais reconhecidas, a fitoquímica e a farmacognosia (BERLINCK, BORGES, *et al.*, 2017).

A abordagem de desreplicação acopla por exemplo CL-UV, CL-RMN, CL-EM e CL-EM/EM (WOLFENDER, MARTI e QUEIROZ, 2010) (XU, WANG, *et al.*, 2014). Paralelamente à essas técnicas, são utilizados bancos de dados de PNs para auxiliar na acelerada identificação de compostos, tais como, *Dictionary of Natural Products* (DNP), *Natural products database* (UCSD), a base de dados NuBBE (sobre a biodiversidade brasileira), *AntiBase*, entre outros (HUBERT, NUZILLARD e RENAULT, 2017).

Outras duas plataformas utilizadas para o auxílio na busca por metabólitos novos são o software *Target Analysis*[®] (Bruker Daltonics) e a base *Global Natural Products Social Molecular Networking* (GNPS). O primeiro trata-se de um software de triagem alvo, que interage com o banco de dados de compostos conhecidos, através de um aplicativo (Excel) interno que gera listas de busca para programa, ilustrando de forma visual, compostos listados e que foram sugeridos a partir do banco de dados utilizado.

Por outro lado, o *Global Natural Products Social Molecular Networking* (GNPS), consiste em uma base de dados que permite a anotação dos compostos a partir de redes moleculares agrupadas por similaridade. Esse agrupamento ocorre por

correlação espectral e padrões de fragmentação (MS^2 ou MS/MS ou *tandem*), ou seja, compostos que apresentam similaridades em seus espectros de massa são agrupados em redes moleculares (*clusters* biossintéticos), também permite a desreplicação online e a análise automatizada de redes moleculares (Figura 7A) (WANG, CARVER, *et al.*, 2016).

A plataforma GNPS é pública e atualmente é a única que agrupa compostos em redes moleculares e com o maior acervo de espectros de massas de Produtos Naturais disponível (Figura 7B) (WANG, CARVER, *et al.*, 2016). Como pode ser alimentado pelos próprios usuários, o GNPS está em constante expansão, podendo gerar cada vez mais espectros de referência e redes moleculares ainda mais precisas. Dessa forma, isso possibilita a anotação acelerada de compostos conhecidos, permitindo assim, o investimento de tempo e recursos em compostos novos ou compostos de interesse (KLITGAARD, IVERSEN, *et al.*, 2014). Essa metodologia apresenta-se bastante útil para estudos com Produtos Naturais, já que há uma diminuição de tempo e um melhor direcionamento da rota de isolamento dos compostos e consequentemente da pesquisa (CARVALHO, RODRIGUES, *et al.*, 2019).

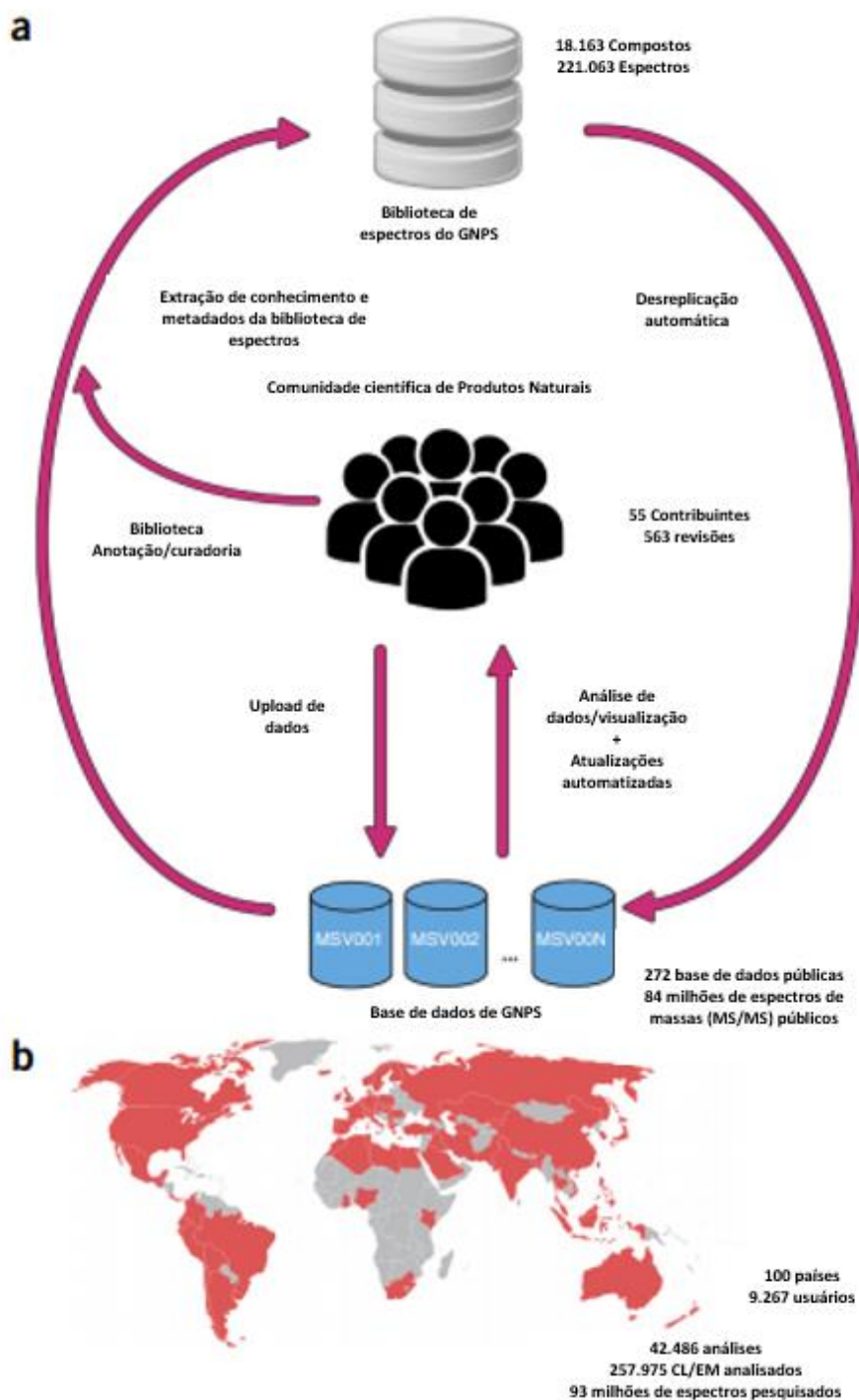


Figura 7: (a) Esquema de como é um fluxo de informações dentro do GNPS entre pesquisadores e pesquisadoras de Produtos Naturais e entre espectros e dados contidos na plataforma. (b) Distribuição de usuários do GNPS no mundo, abastecendo de informações mais de 9200 pessoas (Adaptado de WANG et al).

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Estudo exploratório do perfil químico da espécie *Swinglea glutinosa* através da descoberta e isolamento de novos metabólitos especiais. Para isso, será empregada a abordagem de desreplicação de produtos naturais via CL-EMAR, com a tentativa do estabelecimento do estudo biomonitorado pela atividade citotóxica das frações das folhas da espécie vegetal frente linhagens de leucemia humana (K-562, Kasumi-1, KG-1, Raji e CCRF-CEM).

2.2 Objetivos específicos

- Preparar extratos das folhas da espécie *Swinglea glutinosa*;
- Avaliar o efeito dos extratos de origem vegetal sobre células linfoides e mieloides de leucemia humana;
- Empregar a abordagem de desreplicação para a anotação de metabólitos de interesse nos extratos de *S. glutinosa*;
- Purificar as substâncias de interesse nas frações bioativas de *S. glutinosa* através de CLAE-preparativo.
- Elucidar a estrutura dos componentes ativos, através de técnicas espectroscópicas (RMN, UV e IV) e espectrometria de massas de alta resolução (EMAR);
- Realizar a avaliação frente linhagens de leucemia humana das substâncias purificadas.

3. Materiais e métodos

3.1 Procedimentos gerais

3.1.1 Solventes

Os solventes comuns utilizados nas extrações, partições, cromatografias em placa de sílica comparativa e cromatografias em coluna aberta foram hexano, diclorometano, clorofórmio, acetato de etila, metanol e etanol da marca LabSynth. Para a cromatografia líquida de alta eficiência e espectrometria de massas, foram utilizados metanol e acetonitrila com pureza grau CLAE das marcas Merck e Aldrich e água tipo-1, obtida em sistema purificador Milli-Q. Para solubilizar as amostras analisadas por espectroscopia de ressonância magnética nuclear foram utilizados clorofórmio, acetona e metanol deuterados das marcas Merck e Aldrich.

3.1.2 Procedimentos cromatográficos

As cromatografias em camada delgada comparativa foram realizadas em cromatoplasmas de gel de sílica (com indicador de fluorescência) suportadas em folha de alumínio da marca Merck com diferentes combinações de solventes, de acordo com o perfil dos compostos analisados. A revelação das placas foi feita com lâmpada de UV nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm, seguidas da revelação química com solução de vanilina ácida ou reagente de Dragendorff. Para as colunas abertas foi utilizado como fase estacionária sílica gel comum 80/120 Mesh.

3.1.3 Equipamentos

- Câmara de UV (Spectroline), modelo CM-10 com irradiações na região do ultravioleta (λ 254 e 365 nm); utilizado na revelação de placas cromatográficas;
- Banho Ultrassom (Quimis®); utilizado preparo de amostras para CL-EM;
- Centrífuga (Beckman), Microfuge R; utilizada no preparo de amostras para CLUAE-EMAR;
- Cromatógrafo líquido com detector DAD (Shimadzu): LC-6AD (semi-preparativo); utilizado para avaliar o perfil químico dos extratos e frações, bem como para o isolamento de substâncias;

- Estufa de circulação de ar (Ithik); utilizada na secagem de vidrarias;
- Rotoevaporador R-215 (Buchi) munido de controlador de vácuo modelo V-850 e bomba de diafragma modelo V-710; utilizado na remoção de solvente e obtenção dos extratos, frações e substâncias;
- Balança analítica (OHAUS), AR2140; utilizada na pesagem das amostras;
- Speed Vac (ThermoFisher Scientific); utilizado na remoção de solvente de pequenas quantidades de amostras;
- Ressonância magnética nuclear - RMN de ^1H e ^{13}C . Espectrômetro Ultrashield 300 Bruker Avance III 7,05 T, operando a 300 e 75 MHz, para os núcleos de ^1H e ^{13}C , respectivamente;
- LC-MS-ESI micrOTOF-QII (Bruker) com ionização por eletrospray (IES), operando a 30 eV; utilizado para caracterização de compostos isolados e na abordagem de desreplicação.

3.1.3.2 Materiais empregados nas análises cromatográficas

- Coluna Kinetex 2,6 μ C12 (analítica). Dimensão: 100 x 2,1 mm Phenomenex®;
- Coluna Synergi Max 4 μ RP-C12 (preparativa). Dimensão: 150 x 4,60 mm Phenomenex®;
- Coluna Luna 5 μ C18 (analítica). Dimensão: 250 x 4,6 mm Phenomenex®;
- Coluna Luna 5 μ C18 (preparativa). Dimensão: 250 x 10,0 mm Phenomenex®;
- Ácido Fórmico 98%, grau LC-MS.

3.2 Avaliação do potencial biológico

3.2.1 Avaliação do Potencial frente as linhagens de leucemia humana *in vitro* (Citotoxicidade)

Os ensaios frente as linhagens de leucemia humana foram realizados no departamento de bioquímica da Universidade Federal de São Paulo em colaboração com os professores Heron Fernandes Vieira Torquato e Edgard Julian Paredes-Gamero.

3.2.2 Cultura celular

As linhagens celulares de leucemia humana foram cultivadas em suspensão em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, em atmosfera umidificada a 37 ° C sob 5% de CO₂.

3.2.3. Avaliação do potencial citotóxico

As PBMC e as células de leucemia humana foram semeadas (10⁵ células/mL) em microplacas de 96 poços contendo meio com Vimblastina (controle positivo), extratos brutos (ou compostos puros) a 100 µg/mL. Após a incubação de 24 horas, os tratamentos foram removidos e adicionados 100 µL de solução Alamar Blue (10%). Após 5 h, a fluorescência é lida a 530 nm (excitação) e 590 nm (emissão) em leitor de microplacas FlexStation 3 (Molecular Devices, EUA). Cada experimento é realizado em triplicata.

3.3. Coleta do material vegetal

A espécie vegetal foi coletada na reserva do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) em 30 de abril de 2010 pela Professora Márcia Ortiz Mayo Marques. A Massa do material coletado, seco e do extrato etanólico estão na tabela 1.

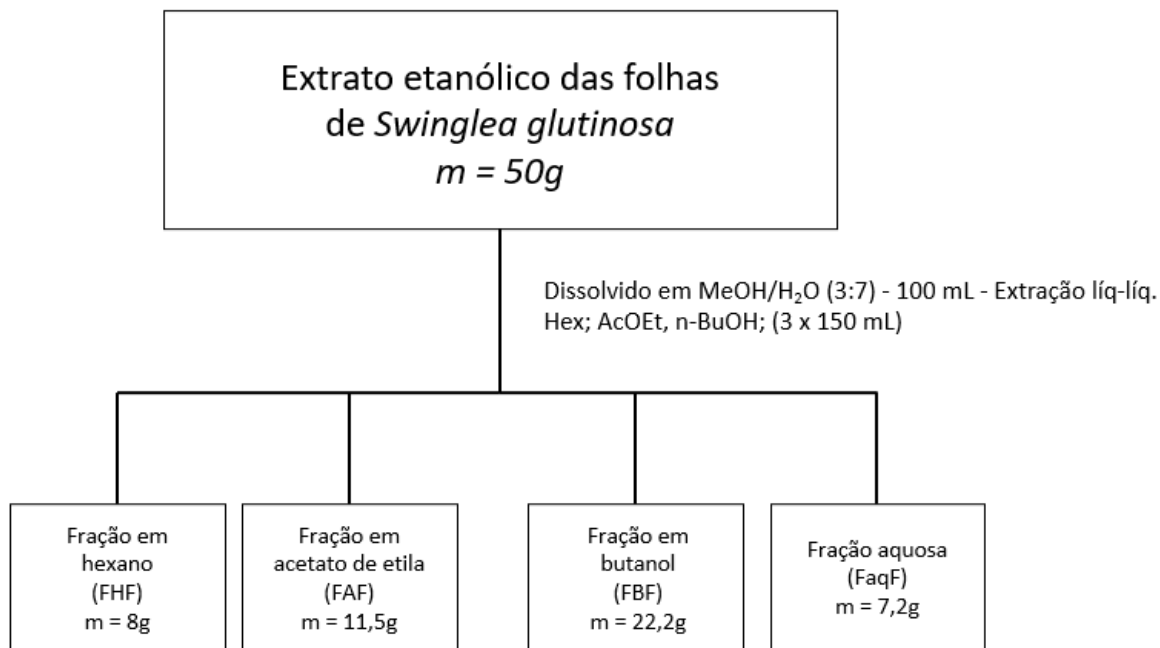
Tabela 1: Massa do material coletado, seco e extraído de *Swinglea glutinosa*.

	Material fresco (kg)	Material seco (kg)	Extrato EtOH (g)
Galhos	1,50	0,076	45
Folhas	6,102	1,25	90,12
Raízes	-	-	-

3.4. Preparação dos extratos

O material vegetal foi subdividido em caule e folhas, para em seguida passar pelo processo de secagem em estufa de circulação de ar a 40 °C. Na sequência, foi promovida a pulverização em moinho de facas e a extração por maceração em etanol, durante nove dias, com a troca do solvente a cada três dias. Os extratos do caule e das folhas foram obtidos após evaporação dos solventes em evaporador rotatório.

O extrato etanólico (50 g) das folhas foi submetido à partição líquido-líquido com hexano, acetato de etila e butanol, gerando as frações hexânica, acetato de etila, butanólica e aquosa, conforme demonstrado no esquema 1.



Esquema 1: Fluxograma de partição líquido-líquido do extrato em etanol das folhas de *Swinglea glutinosa*.

3.5 Fracionamentos cromatográficos

O fracionamento cromatográfico foi iniciado com a fração hexânica das folhas (**FHF**, 8 g) por meio de coluna cromatográfica (diâmetro: 5,7 cm; altura: 30 cm), usando sílica como fase estacionária; hexano, acetato de etila e metanol foram empregados como eluentes no modo gradiente, começando com maior porcentagem de solvente apolar (hexano) e finalizando com metanol 100%. Esse fracionamento resultou em 44 subfrações (B1 - B44), que foram agrupadas por semelhança, após as análises por cromatografia em camada delgada (CCD), totalizando ao final 10 grupos de subfrações (R1 - R10), conforme descrito na tabela 2.

Tabela 2: Massa das subfrações (R1 – R10) da fração FHF

Código das Frações	Massa (g)
R1	m = 0,03
R2	m = 1,04
R3	m = 0,61
R4	m = 0,64
R5	m = 1,28
R6	m = 0,88
R7	m = 0,60
R8	m = 0,28
R9	m = 1,50
R10	m = 1,04

As 10 subfrações (R1 – R10) foram submetidas aos ensaios citotóxicos frente às linhagens de leucemia humana. As sub-frações R5 e R7 apresentaram efeito citotóxico e perfil cromatográfico favorável para isolamento dos compostos via CLAE. Por conta desses dois fatores foram submetidas ao sistema no modo preparativo (coluna C18 – 250 x 4,6 mm - Luna 5 μ), sob fluxo da fase móvel de 5 mL/min, cujo método está descrito na tabela 03. Essa metodologia permitiu a obtenção de quatro amostras com elevado grau de pureza: LC_1, LC_2, LC_3 e LC_4.

Tabela 3: Método cromatográfico usado para isolar compostos das frações R5 e R7.

Tempo (min)	% de solvente (ACN)
0,01	60
2,5	60
12	95
20	95
21	60
27	60

4. Resultados e Discussão

4.1 Resultados preliminares

4.1.2 Avaliação preliminar da atividade citotóxica das frações do extrato.

Como a base desse projeto é a abordagem de desreplicação, optou-se que o primeiro passo seria fazer a avaliação biológica das frações de extrato de *S. glutinosa* frente às linhagens de leucemia humana: Kasumi-1 (leucemia mieloide aguda), K562 (leucemia mieloide crônica) e Jurkat (leucemia linfóide aguda). As frações analisadas foram: do caule em hexano (FHC), em acetato de etila (FAC) e em n-butanol (FBC) e das folhas em hexano (FHF).

A fração FHF apresentou viabilidade celular em torno de 10% (Figura 8), significando que a fração inibiu o crescimento de 90% das células de leucemia humana da linhagem Kasumi-1. Após esse resultado optou-se por iniciar o estudo por essa fração, pois as demais apresentaram resultados pouco promissores de viabilidade celular, variando a atividade em média ou baixa, sendo assim, não foram priorizadas para esse estudo.

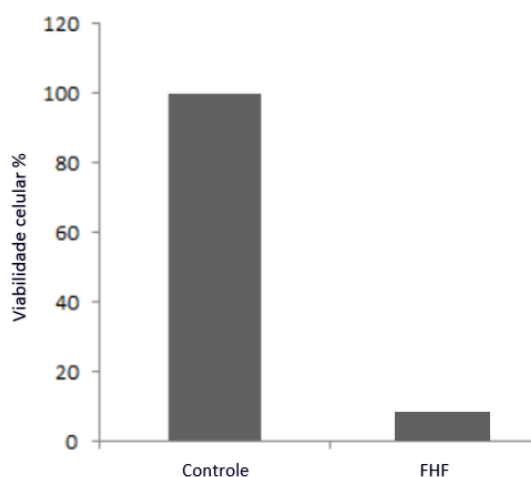


Figura 8: Viabilidade celular da fração hexânica das folhas (FHF) frente à linhagem celular Kasumi-1

4.1.3 Desrepliação e avaliação preliminar biológica das frações da FHF

Após o fracionamento cromatográfico da fração FHF, as sub-frações foram submetidas ao ensaio citotóxico frente às linhagens Kasumi-1 e KG-1 (ambas leucemias mieloide aguda) (Figura 9). As sub-frações (R) 3, 4, 6, 7, 8 e 9 apresentaram o mesmo padrão abaixo de 20% de viabilidade celular nas duas linhagens analisadas. O resultado da viabilidade celular somado às outras evidências anteriormente relatadas (Ver item 3.5 p. 32), nos fez optar por seguir com a purificação das sub-frações R5 e R7.

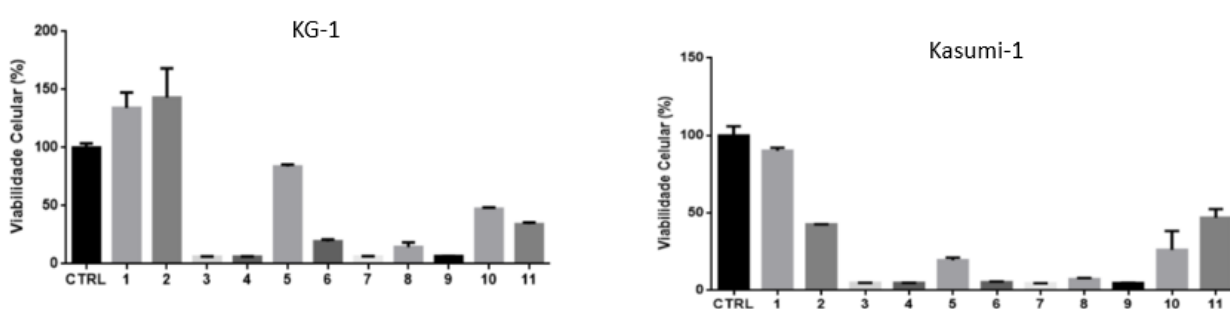


Figura 9: a) Viabilidade celular das frações obtidas de *Swinglea glutinosa* frente à linhagem celular KG-1. b) Viabilidade celular das frações obtidas de *Swinglea glutinosa* frente à linhagem celular Kasumi-1.

4.2 Purificação das substâncias

De acordo com a Figura 10, é possível observar que muitos compostos contidos no extrato da fração hexânica (FHF) possivelmente ainda não foram registrados na espécie em estudo. Além disso, essa fração apresentou efeito citotóxico frente às linhagens de leucemia humana como citado anteriormente.

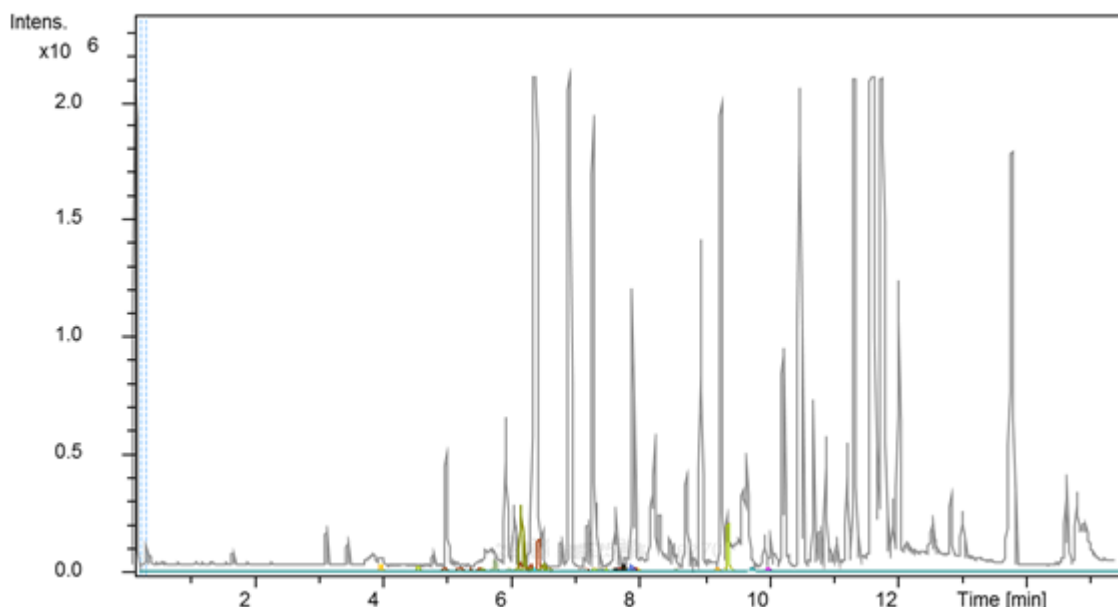


Figura 10: Cromatograma da fração hexânica das folhas (FHF) de *S. glutinosa*. Destacado em cores os compostos já descritos em literatura e em cinza os compostos não relacionados com a espécie

A fração (FHF) foi submetida a uma coluna cromatográfica de sílica, gerando 10 subfrações (R1 - R10) (Ver item 3.5 p. 31) As 10 subfrações foram submetidas a análises em CLUAE-EMAR, onde foi possível observar que as sub-frações R5 e R7 apresentaram perfis cromatográficos favoráveis ao isolamento de substâncias.

Abaixo (Figuras 11 e 13) estão os cromatogramas das frações R5 e R7. Na figura 11, contém os picos referentes aos íons m/z 264,1403 (**A**) e m/z 264,1386 (**B**) e o último pico corresponde ao íon m/z 301,2140 (**C**), composto já relatado para o gênero *Swinglea*, a citrusinina I. Já na figura 13, contém os picos referentes aos íons m/z 252,1374 (**D**) e m/z 266,1553 (**E**).

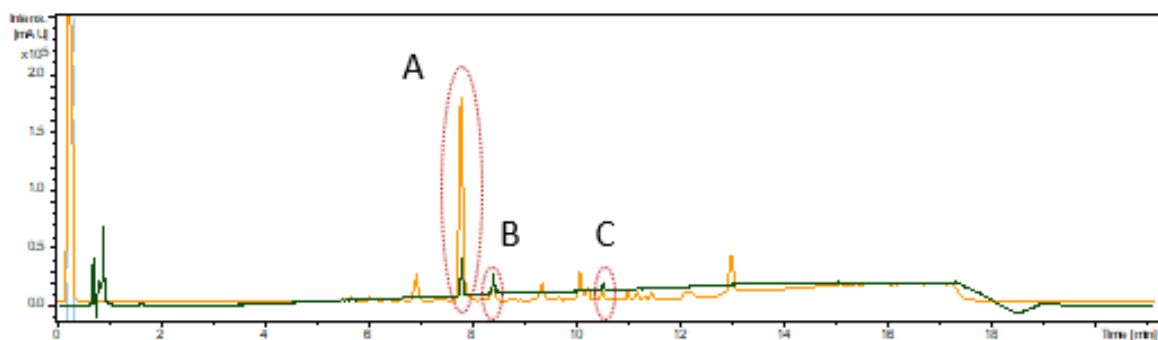


Figura 11: Cromatograma de pico base da fração R5

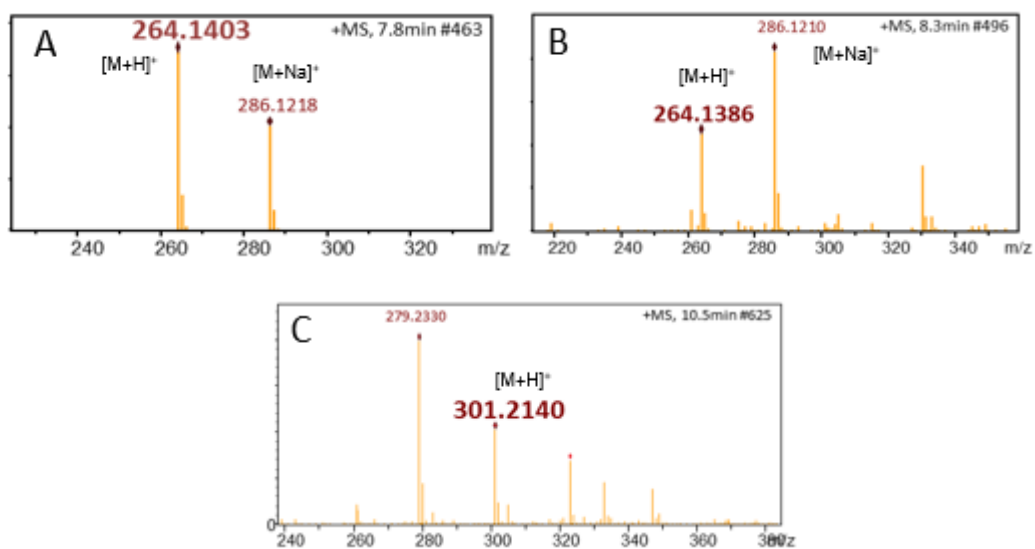


Figura 12: Espectros referentes aos picos A (LC_2), B (LC_1) e C (Citrusinina I).

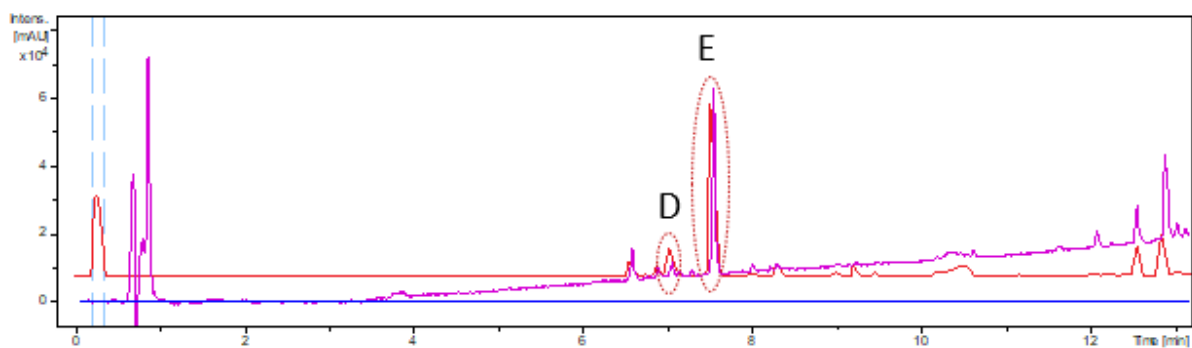


Figura 13: Cromatograma de pico base da fração R7

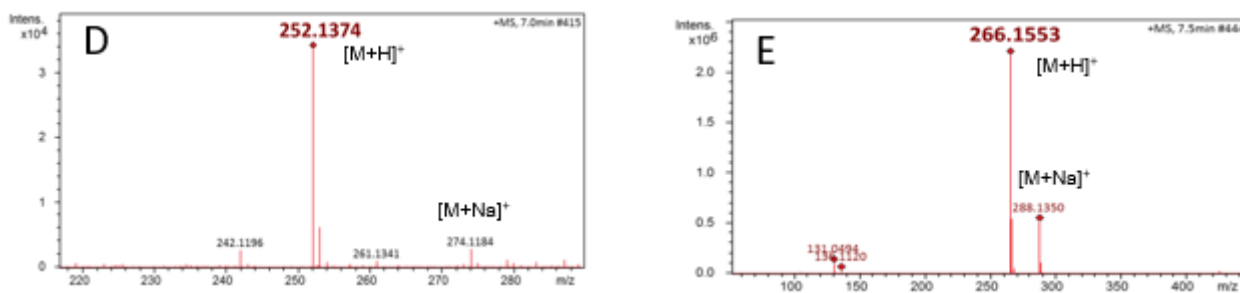


Figura 14: Espectros referentes aos picos D (LC_3) e E (LC_4).

Após análise dos espectros das sub-frações R5 e R7, foram submetidas ao processo de purificação em CLAE modo preparativo, a fim de isolar as bandas acima destacadas. (Ver Item 3.5 p. 32)

4.2.2 Caracterização estrutural dos compostos isolados das folhas da *Swinglea glutinosa*

4.2.2.1 Composto LC_1 e LC_2: Lansamida I, Lansiumamida B

Os espectros de massas das substâncias **LC_1** e **LC_2** apresentaram respectivamente os íons pseudomoleculares $[M+H]^+$ com m/z de 264,1379 (Figura 15) e 264,1381 (Figura 16), que corresponderam à fórmula molecular $C_{18}H_{18}NO$ (erros inferiores a 5 ppm). Isso indica que os compostos são estereoisômeros.

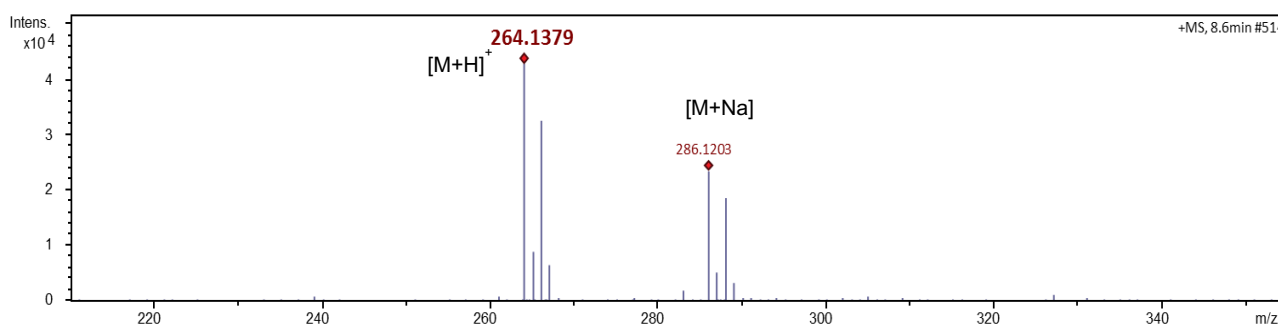


Figura 15: Espectro de massas (ESI+) referente à substância Lansiumamida I (LC_1).

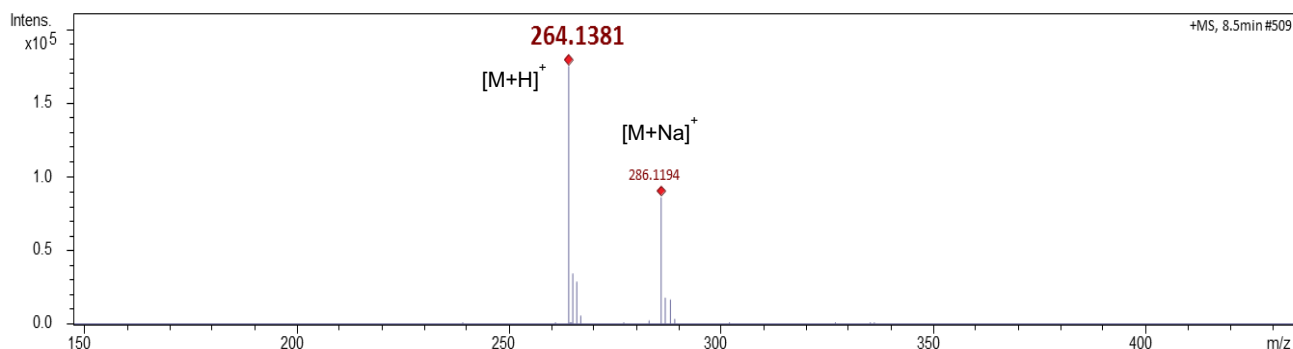


Figura 16: Espectro de massas (ESI+) referente à substância Lansiumamida B (LC_2).

Os sistemas aromáticos monossustituídos (Figura 17) foram identificados a partir dos espectros de RMN ^1H dos compostos LC_1 (Figura 19 e 20) e LC_2 (Figura 21 e 22) que apresentam um congestionamento de sinais entre δ 7,20 e 7,50, região de núcleos de hidrogênios aromáticos com integral de 10 hidrogênios.

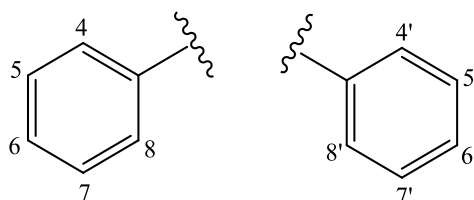


Figura 17: Parte do esqueleto molecular dos núcleos aromáticos dos compostos LC_1 e LC_2

Os compostos **LC_1** e **LC_2** também apresentam par de dupletos na região característica de hidrogênio ligado a Csp^2 . Para **LC_1** em δ 7,02 e 6,07 com constante de acoplamento média de $J = 14,8$ Hz, já para **LC_2** esses dupletos são observados em δ 6,50 e δ 6,24 com constante de acoplamento média de $J = 8,6$ Hz. Os valores da constante de acoplamento calculados foram essenciais para a definição da isomeria geométrica dos compostos, e principalmente para a diferenciação entre eles. Os valores calculados indicaram que **LC_1** tem uma ligação dupla com configuração *E*, enquanto **LC_2** possui a ligação dupla com a configuração *Z*. Em princípio, esses sinais foram atribuídos aos hidrogênios das posições 2' e 3', justamente para diferenciar a configuração da ligação dupla entre $\text{C2}' - \text{C3}'$. Ainda na região de núcleos olefínicos, observa-se também outro par de dupletos para ambas as substâncias: **LC_1**, δ 7,32 e δ 7,77 com constante de acoplamento média de $J = 16$ Hz; **LC_2**, δ 7,63 e δ 6,93 com constante de acoplamento média de $J = 15,3$ Hz.

Esses sinais foram atribuídos aos hidrogênios conectados aos carbonos C2 – C3. De modo, que podemos sugerir que **LC_1** apresenta ligações duplas **EE**, enquanto **LC_2** possui as suas ligações duplas do tipo **EZ** (Figura 18), confirmando assim o par de isômeros sugerido pelo espectro de massas.

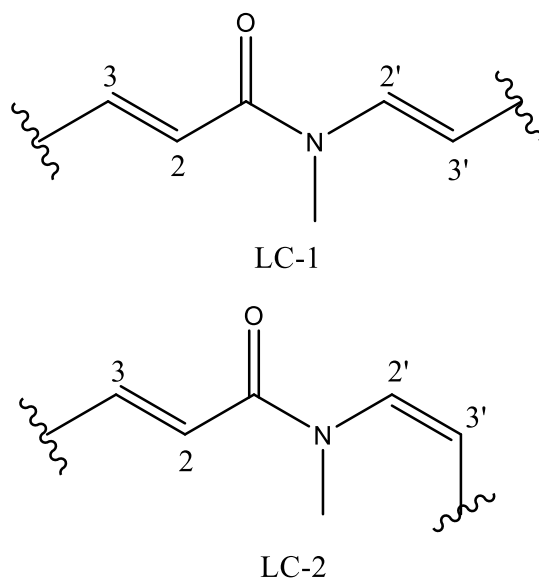


Figura 18: Parte do esqueleto molecular dos compostos LC_1 e LC_2 para a representação da configuração das ligações duplas.

LC_1 e **LC_2** apresentam também singletos na região característica de núcleos de hidrogênio metílicos (integral para 3H) ligados a heteroátomo, que são observados em δ 3,37 e 3,09, respectivamente, os quais foram atribuídos às metilas conectadas ao átomo de nitrogênio. Dessa forma, atendemos adequadamente a fórmula molecular, que sugere a presença de um átomo de nitrogênio na molécula.

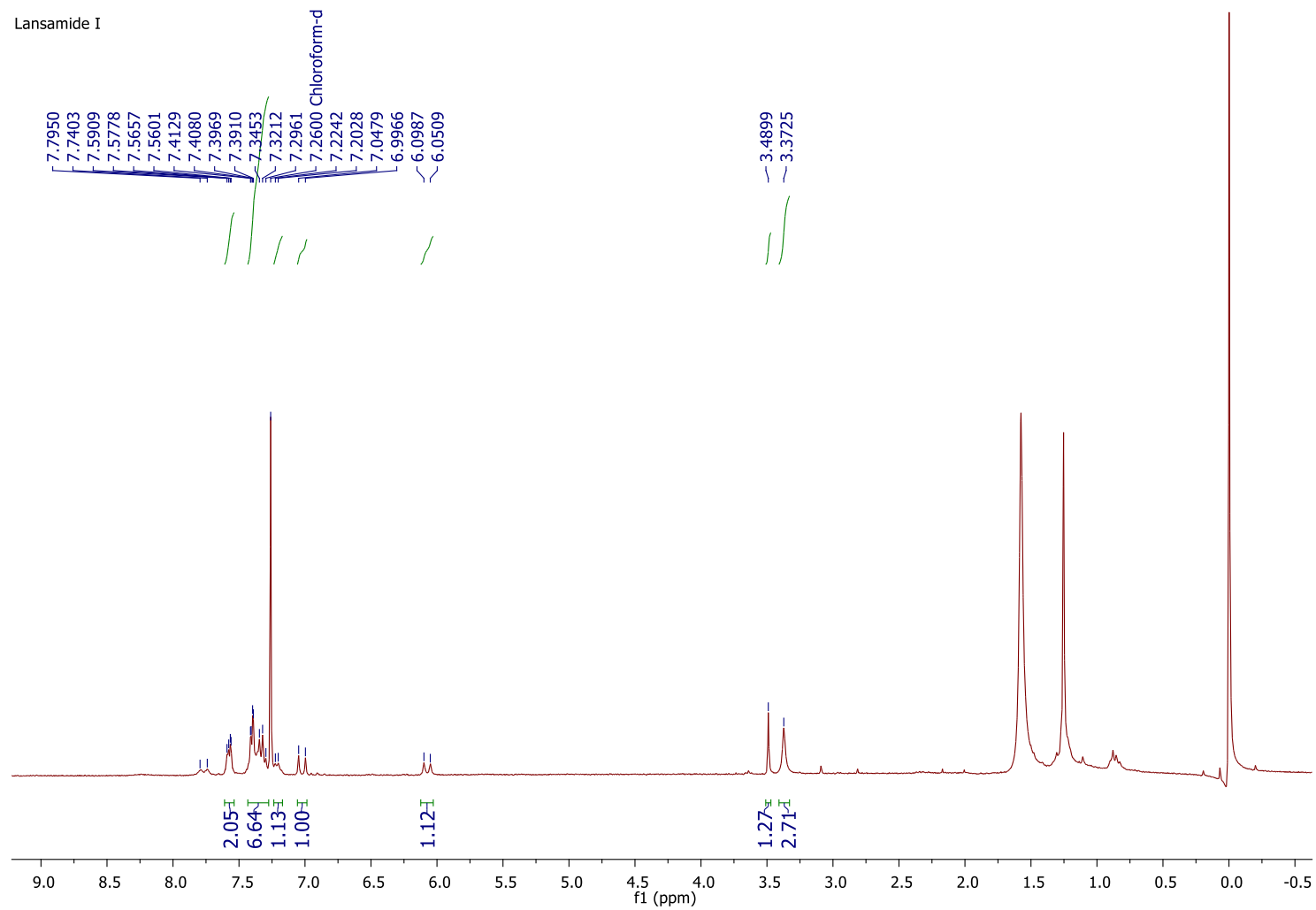


Figura 19: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, clorofórmio-d) da substância Lansamida I (LC_1)

Lansamide I

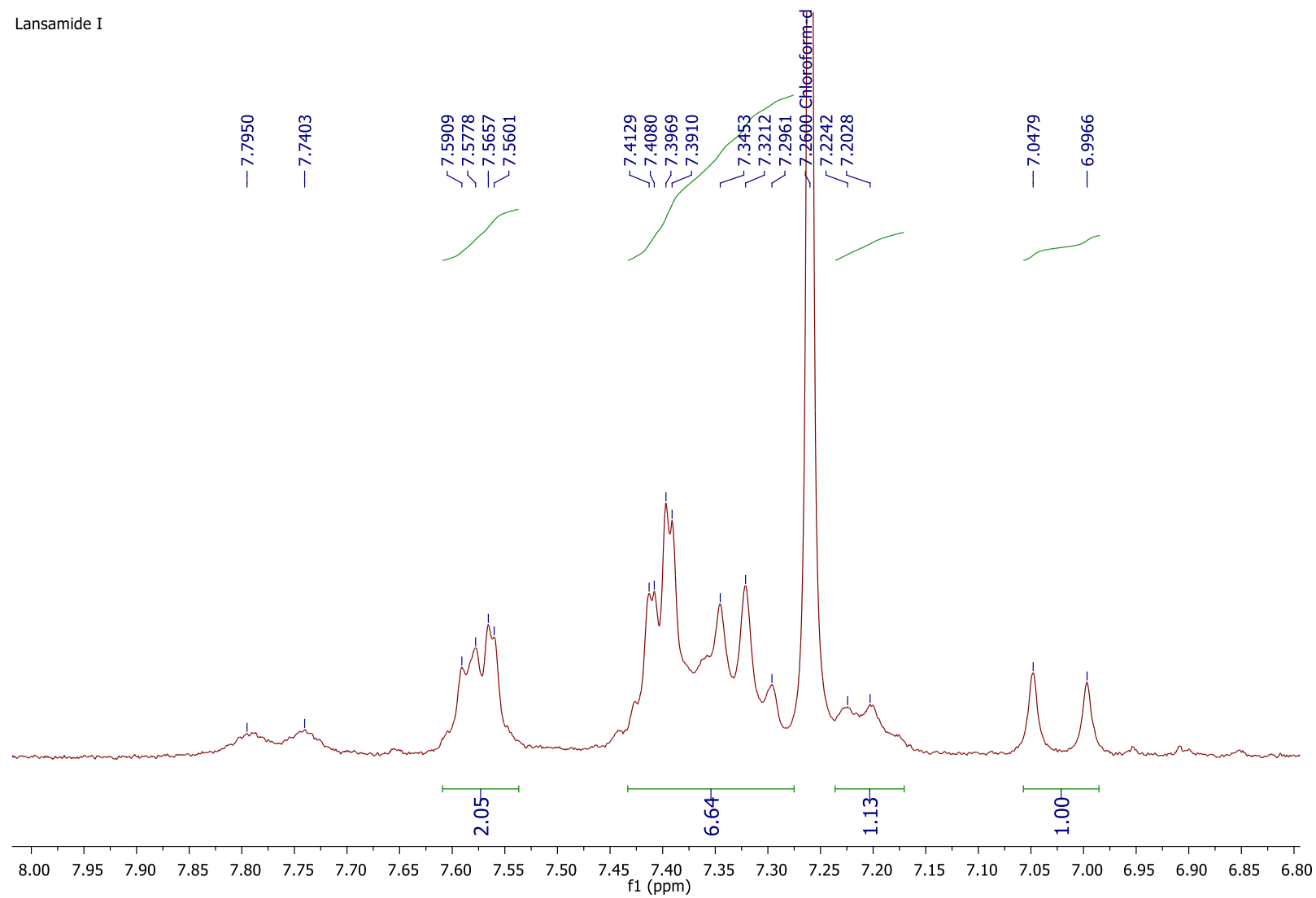


Figura 20: Ampliação do espectro de RMN ¹H (300 MHz, clorofórmio-d) da substância Lansamida I (LC_1).

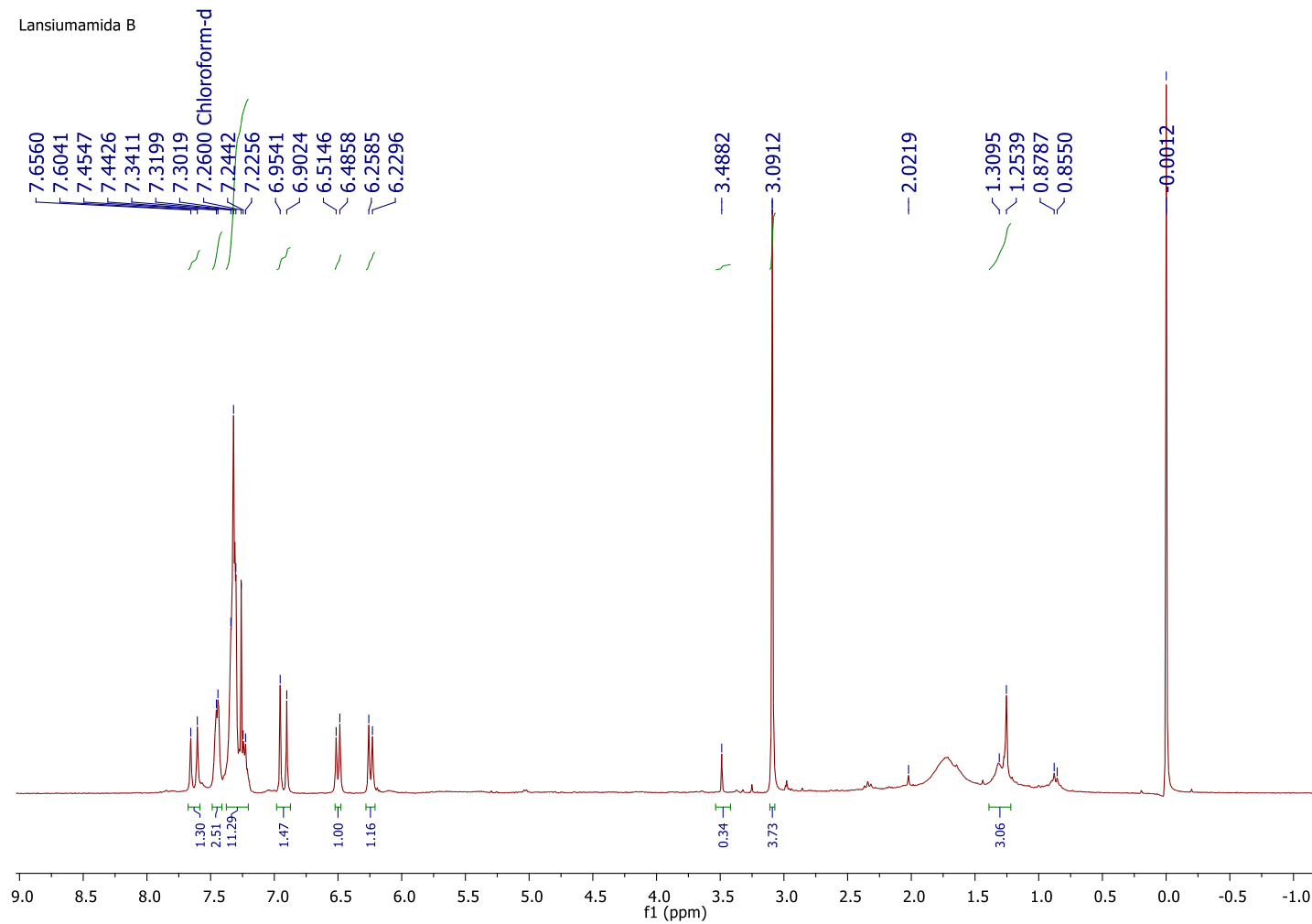


Figura 21: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, clorofórmio-d) da substância Lansiumamida B (LC_2).

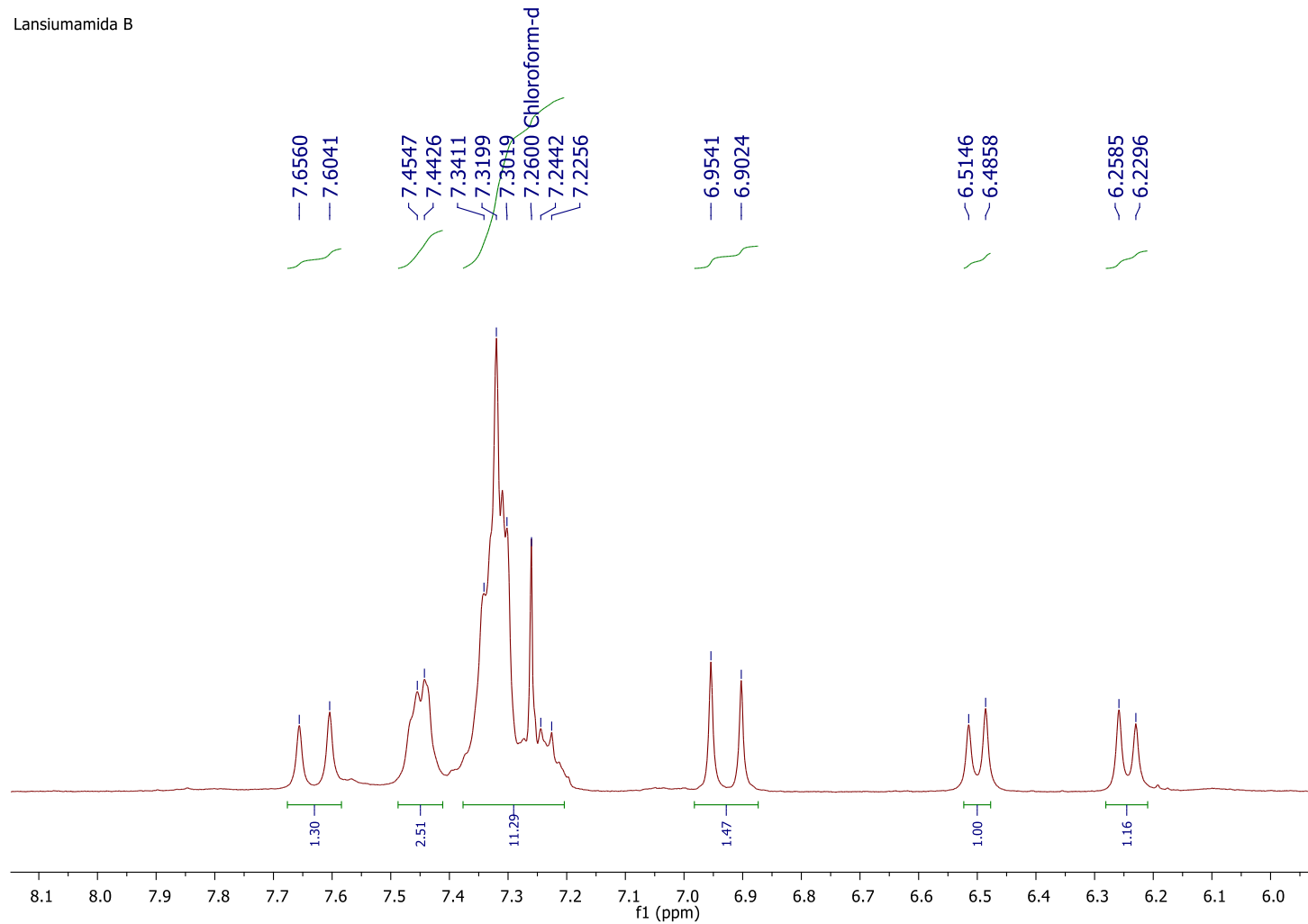


Figura 22: Ampliação do espectro de RMN ^1H (300 MHz, clorofórmio-d) da substância Lansiumamida B (LC_2).

São observados, nos espectros de RMN de ^{13}C dos compostos LC_1 e LC_2 (Figura 24 e 25), 4 sinais principais de carbono olefínicos sugerindo a presença de duas ligações duplas nas adjacências do grupo amida, atribuídos à C3' (δ 118), C2 (δ 124), C2' (δ 135) e C3 (δ 141). A Determinação da estereoquímica correta dessas ligações duplas é dada pela constante de acoplamento dos hidrogênios discutida anteriormente. Observa-se também sinais em δ 33,6 no composto LC_2 e em δ 29,8 no composto LC_1, os quais foram atribuídos às metilas ligadas ao nitrogênio do grupo amida. A partir dos dados obtidos de RMN, pode-se determinar que os compostos LC_1 e LC_2 são as amigas, Lansamida I e Lantiumamida B, respectivamente (Figura 23). Os dados espectroscópicos dos compostos estão apresentados na Tabela 4.

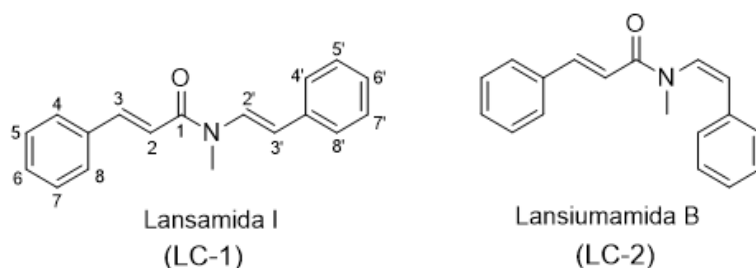


Figura 23: Compostos LC_1 e LC_2 isolados de *Swinglea glutinosa*

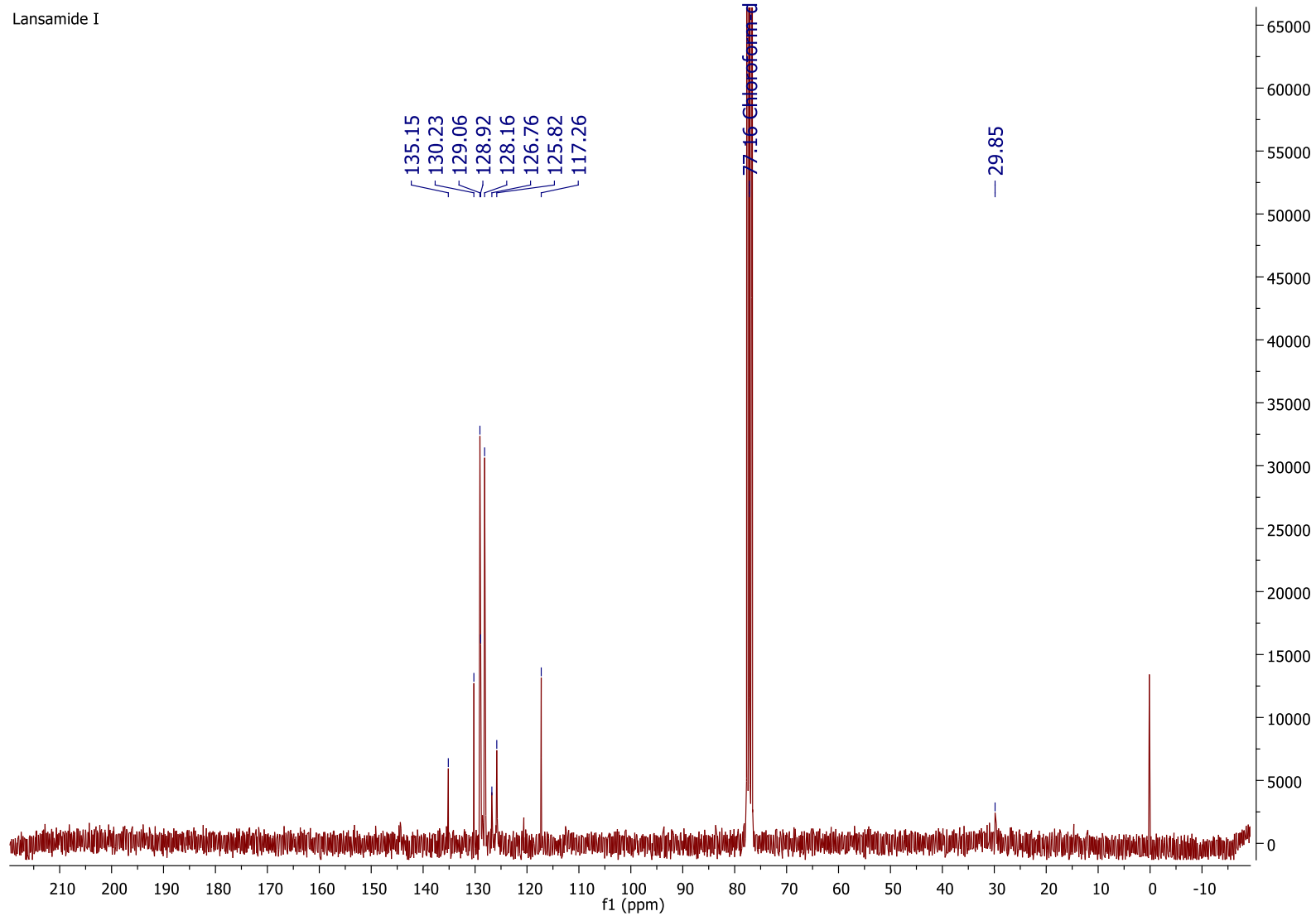


Figura 24 : Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, acetona-d₆) da substância Lansamida I (LC_1).

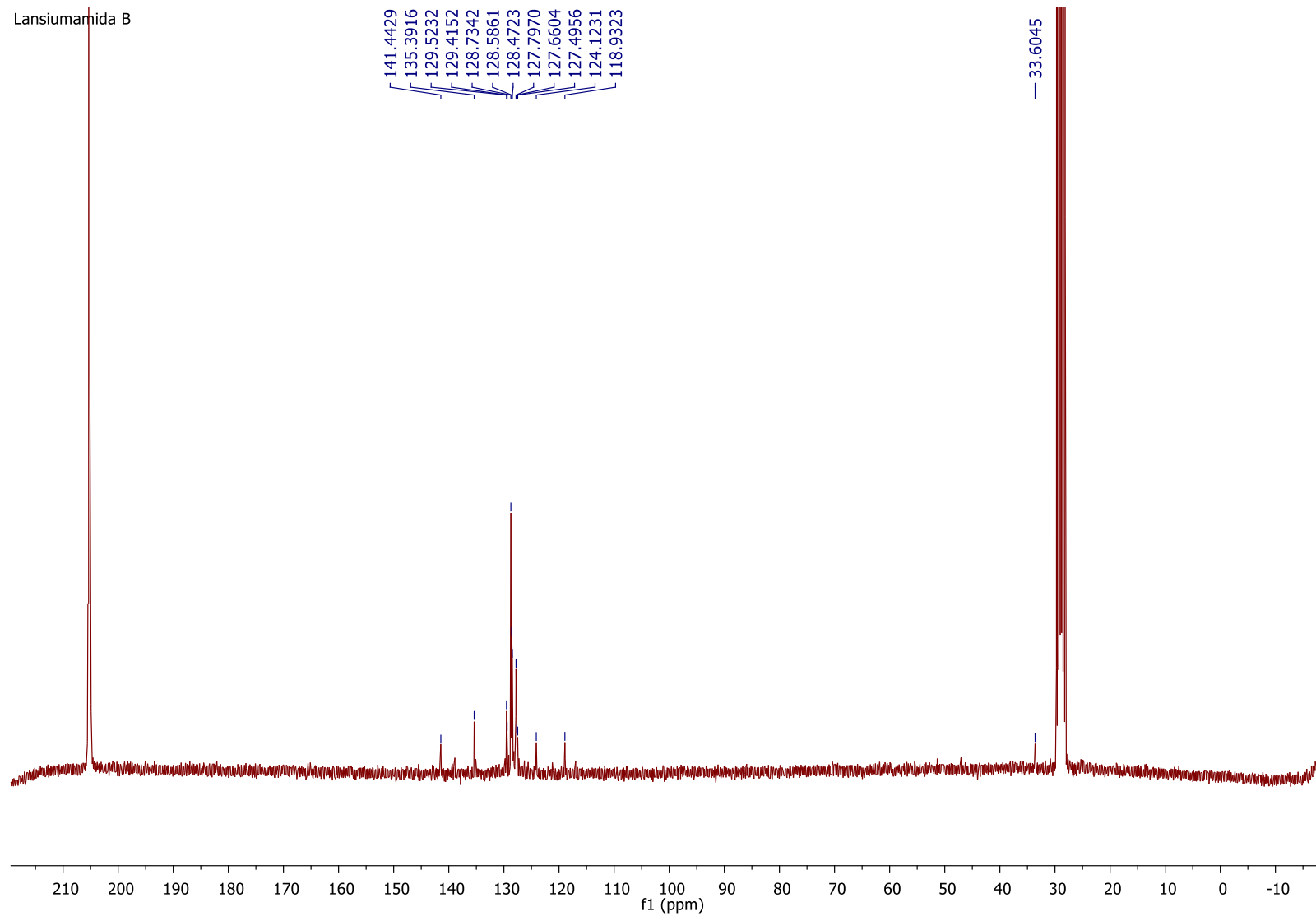


Figura 25: Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, acetona- d_6) da substância Lansiumamida B (LC_2).

Tabela 4: Dados de RMN ^1H e/ou ^{13}C obtidos para as substâncias LC_1 e LC_2.

Posição	Composto LC_1		Composto LC_2			
	δ_{H} , exp, multiplicidade e	δ_{H} lit.	δ_{H} exp.	δ_{H} lit.	δ_{C} exp.	δ_{C} lit.
	J (Hz)	multiplicidade e	multiplicidade e	multiplicidade e		
	J (Hz)		J (Hz)	J (Hz)		
1						166,4
2	7,02 (<i>d</i> , 14)	7,02 (<i>d</i> , 15,5)	6,93 (<i>d</i> , 15)	6,93 (<i>d</i> , 15,6)	124,1	125
3	7,77 (<i>d</i> , 16,4)	7,76 (<i>d</i> , 15,2)	7,55 (<i>d</i> , 15)	7,63 (<i>d</i> , 15,6)	141, 4	142,6
4-9	7,20-7,59 (<i>m</i>)	7,43-7,62 (<i>m</i>)	7,20-7,34 (<i>m</i>)	7,20 -7,35 (<i>m</i>)	127,5-129,5	127,9-129,6
2'	7,32 (<i>d</i> , 15,4)	7,40 (<i>d</i> , 16)	6,50 (<i>d</i> , 8,6)	6,49 (<i>d</i> , 8,7)	135,4	135,1
3'	6,07 (<i>d</i> , 14,3)	6,06 (<i>d</i> , 16).	6,24 (<i>d</i> , 8,7)	6,23 (<i>d</i> , 8,7)	118,9	118,3
4'-9'	7,20-7,59(<i>m</i>)	7,1-7,39 (<i>m</i>)	7,2-7,34 (<i>m</i>)	7,2 -7,35 (<i>m</i>)	127,5-129,5	127,9-129,6
N-H						
N-CH ₃	3,37 (<i>s</i>)	3,36 (<i>s</i>)	3,09	3,08 (<i>s</i> ,)	33,6	34,6

*Valores experimentais para **LC_1** (CDCl₃) e **LC_2** (Acetona-d₆), obtidos por RMN de ^1H (300 MHz).

*Valores da literatura do composto **LC_1**, obtidos por RMN de ^1H (200 MHz, CDCl₃) (GOOBEN, BLANCHOT, *et al.*, 2011).

*Valores da literatura do composto **LC_2**, obtidos por RMN de ^1H e ^{13}C (600 MHz e 150 MHz, CDCl₃) (GOOBEN, BLANCHOT, *et al.*, 2011)

4.2.2.2 Composto LC_3: N-(2-feniletil)-cinamamida

O composto **LC_3** apresenta perfil semelhante ao observado nos outros dois compostos citados anteriormente, **LC_1** e **LC_2**. Apesar das semelhanças, os simpletos (figuras 28 e 29) das metilas ligadas ao nitrogênio na região entre δ 3,7 e 3,1 (Tabela 5) não foi observado. No entanto, foi observado um singleto alargado em δ 5,50, indicando que poderia haver um hidrogênio ligado ao nitrogênio e não uma metila como nos compostos **LC_1** e **LC_2**. Outro ponto importante a ser mencionado é que no espectro de ^1H de LC_3, não se observa mais a presença de um par de dupletos que corresponde aos hidrogênios das posições 2' e 3', bem como no espectro de ^{13}C que também não é observado os sinais referentes aos carbonos olefínicos C2' e C3' (Figura 30). Isso sugere que possivelmente ocorreu uma reação de redução desta ligação dupla (Figura 27).

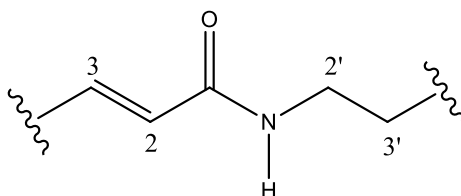
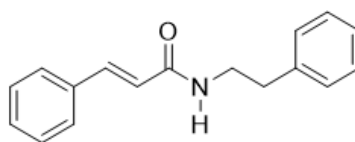


Figura 26: Esqueleto molecular do composto LC_3

Para confirmar a presença de N-H foi realizado o experimento de infravermelho (figura 31), onde foi possível observar uma banda de estiramento em torno de 3446 cm^{-1} , frequência característica de ligação N-H, bem como em torno de 1446 cm^{-1} a banda de absorção atribuída à deformação angular de $\text{Csp}^3\text{-H}$, e em 2900 cm^{-1} , devida à deformação axial de $\text{Csp}^3\text{-H}$ (SILVERSTEIN, WEBSTER e KIEMLE, 2006). O espectro de massas apresentou íon pseudomolecular $[\text{M}+\text{H}]^+$ de $m/z\ 252,1371$, novamente sugere a presença de um átomo de nitrogênio, e isso nos permitiu sugerir a fórmula molecular $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{NO}$ (erro de 3,5 ppm) (figura 32). Com base nos dados de RMN, IV e massas, foi possível identificar o composto LC_3 como a amida *N*-(2-feniletil)-cinamamida (Figura 27).



**N - (2-feniletil) cinamamida
(LC-3)**

Figura 27: Composto isolado LC_3 de *Swinglea glutinosa*.

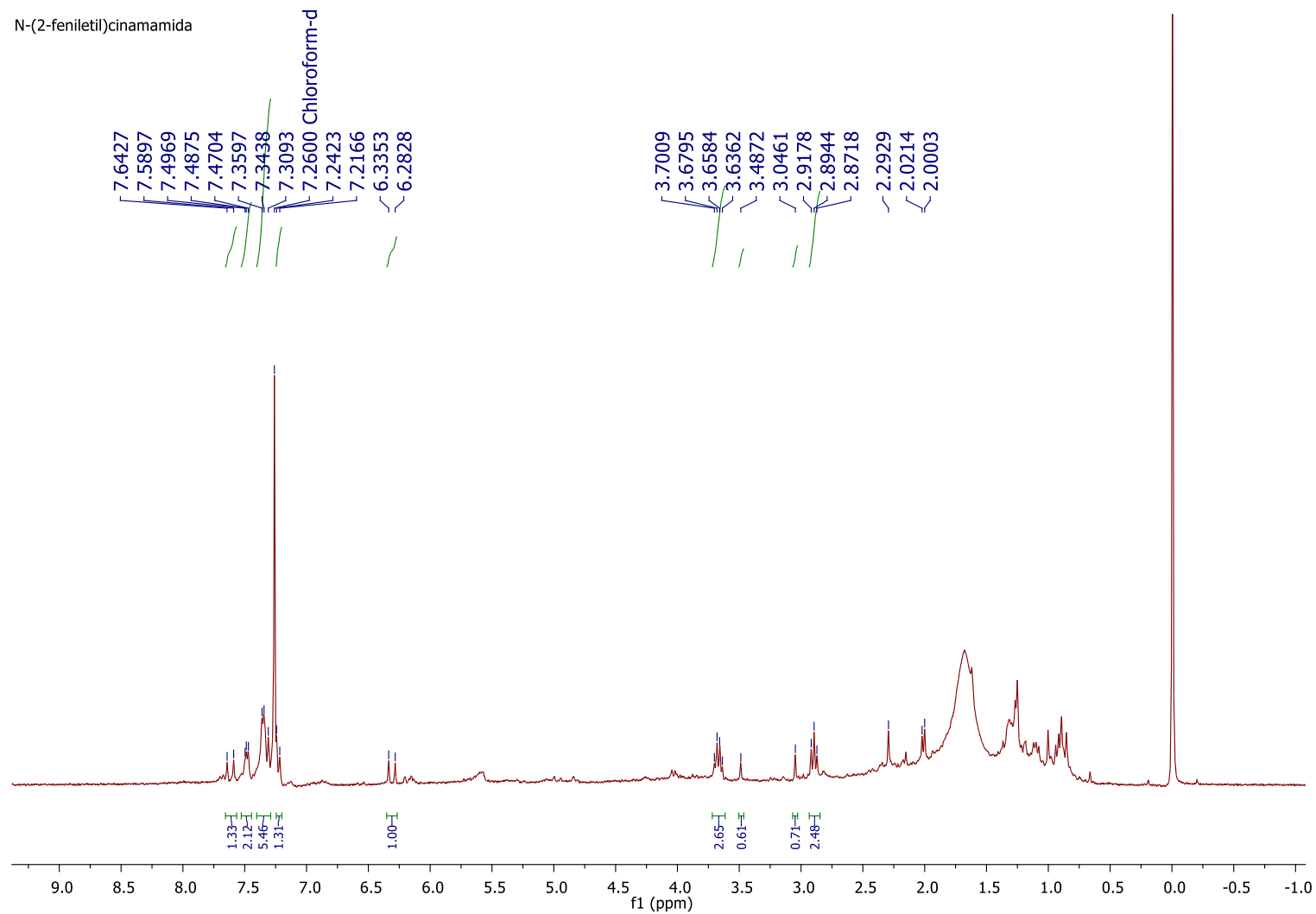


Figura 28: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, clorofórmio-d) da substância N-(2-feniletil) cinamamida (LC_3).

N-(2-feniletil)cinamamida

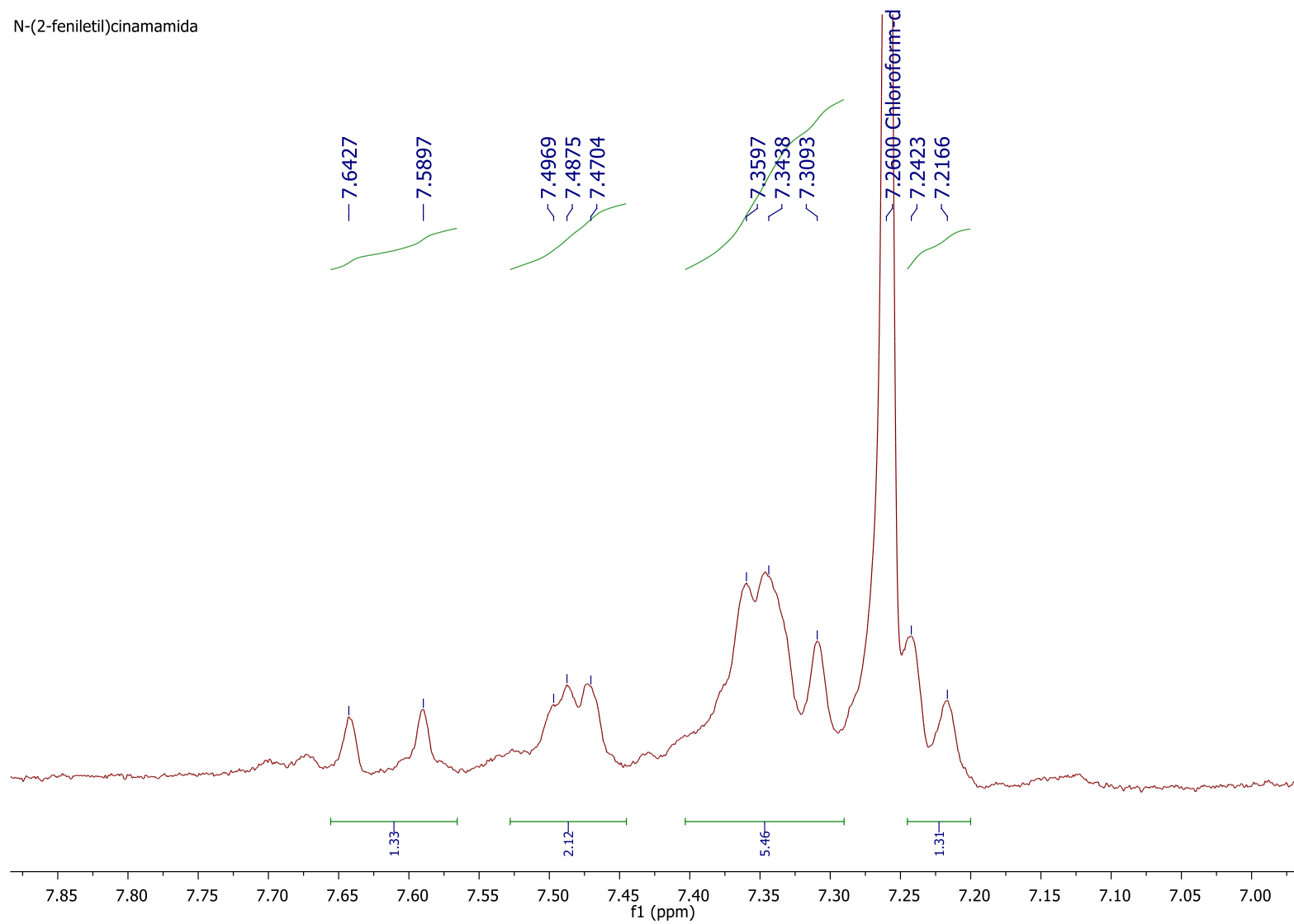


Figura 29: Ampliação do espectro de RMN ^1H (300 MHz, clorofórmio-d) da substância *N*-(2-feniletil)-cinamamida (LC_3).

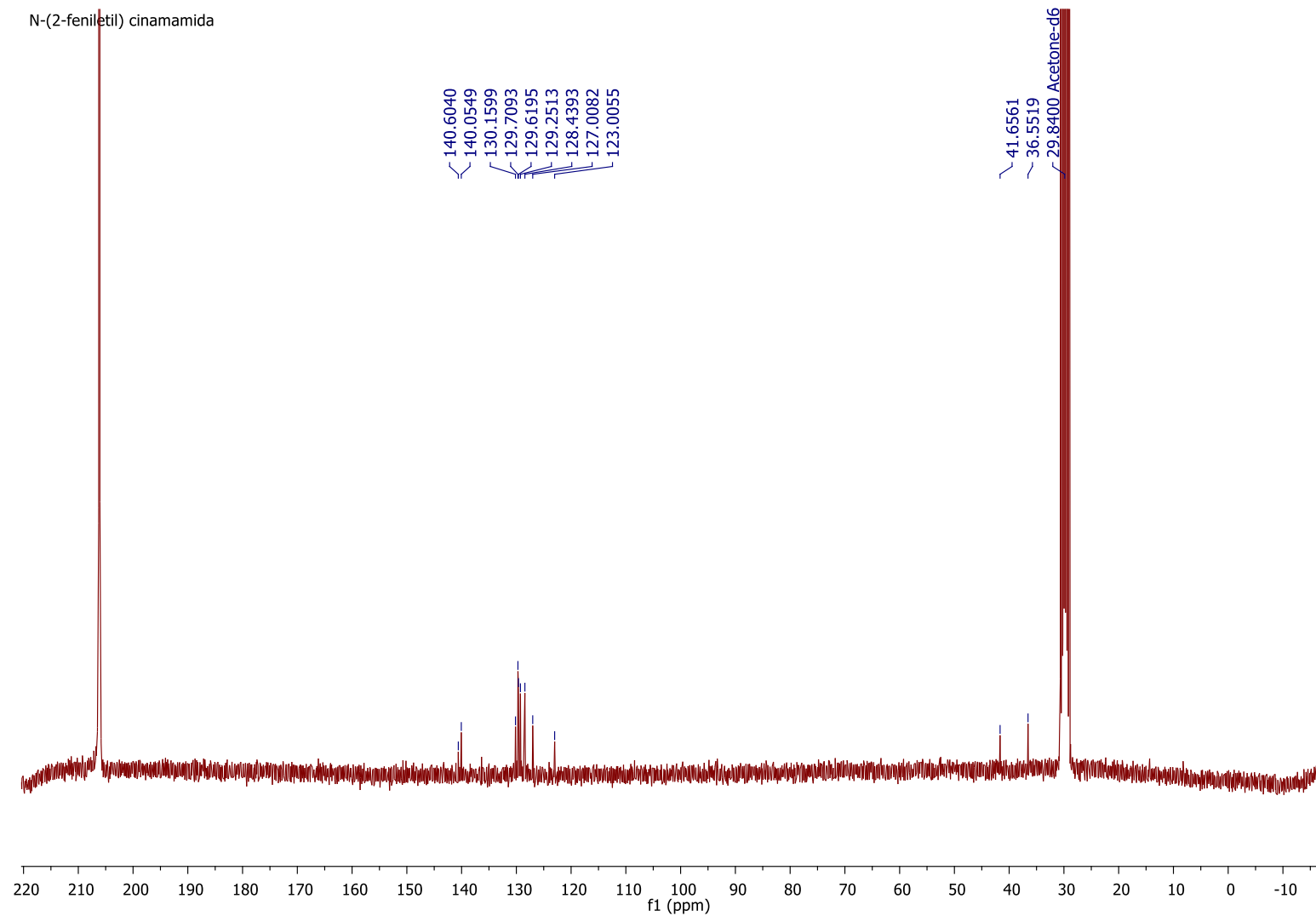


Figura 30: Ampliação do espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, acetona- d_6) da substância N-(2-fenil)etil)-cinamamida (LC_3).

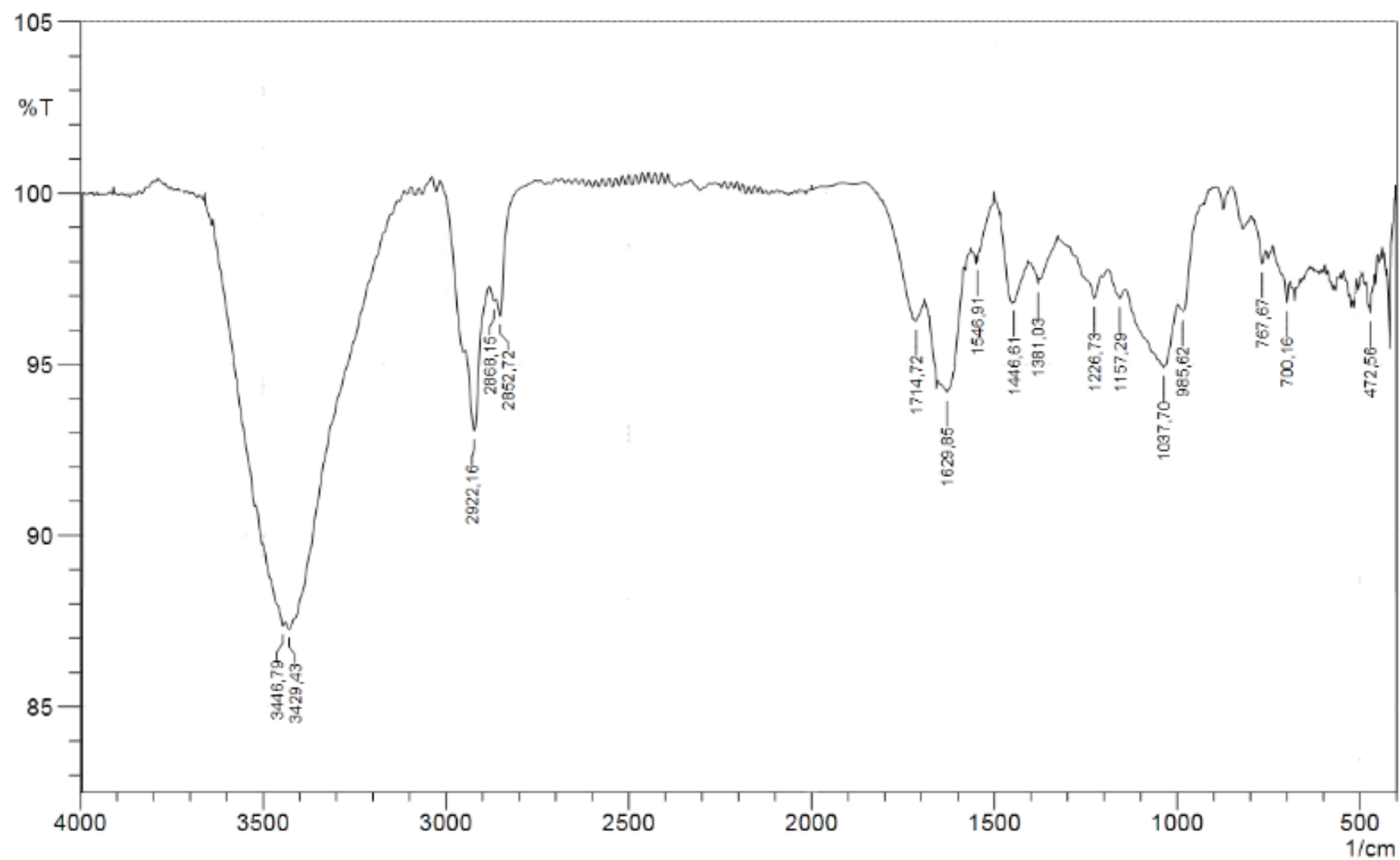


Figura 31: Espectro de infravermelho *N*-(2-feniletil)cinamamida (LC_3).

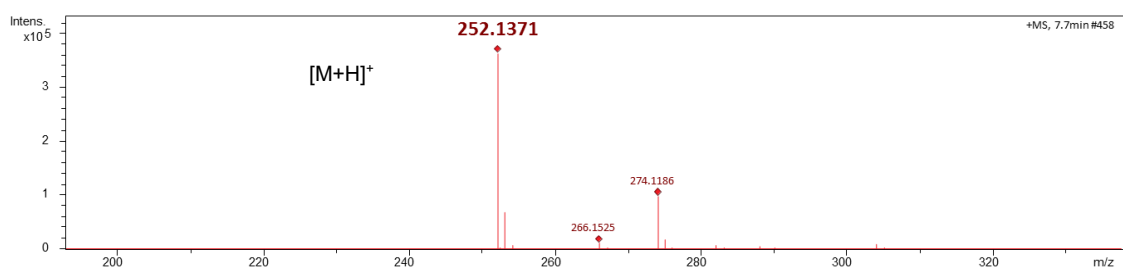


Figura 32: Espectro de massas (ESI+) referente à substância *N*-(2-feniletil)cinamamida (LC_3)

Tabela 5: Dados de RMN ^1H e/ou ^{13}C obtidos para a substância LC_3.

Composto LC_3			
Posição	$\delta_{\text{H, exp.}}$ multiplicidade e J (Hz)	$\delta_{\text{H, lit.}}$ multiplicidade e J (Hz)	$\delta_{\text{C exp.}}$
1			
2	6,31 (d, 15,6)	6.35 (d, 16)	123
3	7,54 (d, 15,5)	7.65 (d, 16)	140,5
4-9	7,22 - 7,50 (m)	7.24–7.59 (m)	130,2 – 127,0
2'	3,67 (t)	3.70 (dt, 7 e 6)	41,6
3'	2,89 (t)	2.92 (t, 2, 7)	36,5
4'-9'	7,23 - 7,50 (m)	7.24–7.59 (m)	130,2 – 127,0
N-H	5,60 (s/)	5.67 (s/)	36,5
N-CH ₃			

*Valores experimentais para **LC_3**, obtidos por RMN de ^1H e ^{13}C (300 e 75 MHz, respectivamente; CDCl_3).

*Valores da literatura do composto **LC_3**, obtidos por RMN de ^1H (100 MHz, CDCl_3) (YAMAZAKI, KAWANO e UEBAYASI, 2008)

4.2.2.3: Composto LC_4: Lansiumamida C

No espectro de RMN ^1H (Figura 34 e 35) do composto **LC_4**, podemos observar uma integral para 20 átomos de hidrogênio nos sinais referentes aos hidrogênios do anel aromático. Observa-se também quatro dupletos em δ 6,58, 6,87, 7,57 e 7,72 com suas respectivas constantes de acoplamento de 15,4 Hz, 15,4 Hz, 15,6 Hz e 15,4 Hz, sendo assim, é possível concluir, por conta da constante de acoplamento, que o composto possui uma ligação dupla cuja configuração é do tipo *E*.

Foi possível ainda observar os sinais de hidrogênios ligados a carbonos sp^3 , sendo esses: o hidrogênio H2' é visto em δ 3,71 e o H3' em δ 2,95, como um tripleto e um quadrupeto, respectivamente. Esse perfil também é observado no espectro de RMN ^1H do composto **LC_3**, porém há uma diferença entre **LC_3** e **LC_4**, pois observa-se um singleto na região característica de grupos N-CH₃, em δ 3,07, já antes observado nos compostos **LC_1** e **LC_2**.

No espectro de RMN de ^{13}C de **LC_4** (Figuras 36 e 37), observou-se o carbono C2' em δ 51,9 e 50,7, e o carbono C3' em δ 36,1 e 35,9. Em δ 142,2 e 141,7 encontram-se os sinais de C2, e em δ 119,5 e 119,3 sinais do carbono C3. Observa-se também o carbono metílico ligado ao nitrogênio em δ 34,3 e 34,1. Na região entre δ 140,6 e 127,0 estão os sinais característicos de carbonos aromáticos. O sinal da carbonila é visto em δ 166,5, região típica de carbonila de amidas. Curiosamente, nota-se que há duplicação dos sinais, em ambos os experimentos 1D.

Acreditamos que, como os experimentos de RMN são realizados em temperatura ambiente, a livre rotação ao longo do eixo C2' – C3' permite a observação de dois confôrmeros em solução para **LC_4**. Suspeitamos ainda que a presença da metila ligada ao nitrogênio corrobora para o estabelecimento da segunda conformação, dado o seu volume estérico e a sua proximidade espacial com a carbonila. É importante mencionar que esse efeito não foi observado para o composto **LC_3**, já que o mesmo não possui o grupo N-CH₃, e sim N-H. Para solucionar essa questão, a expectativa é a de realizarmos o experimento de RMN de ¹H com temperatura de 0°C, pois assim acreditamos que a rotação da ligação C2' – C3' aconteça de forma mais lenta ou até mesmo não aconteça (TYCKO, 2013). A comparação de nossos dados com os registrados na literatura (LIN, 1989) sugerem que essa substância se trata da Lansamida C (Figura 33). Os dados espectroscópicos estão apresentados na tabela 5.

Após a análise do espectro de RMN ¹H foi levantada a hipótese que o composto **LC_4** poderia se tratar de uma mistura ou apresentar duas conformações possíveis. No entanto, o composto **LC_4** também foi analisado por CLAE-EMAR. O seu cromatograma apresentou uma única banda com elevado grau de pureza, o que descartou a hipótese de uma mistura de substâncias. Além disso, seu espectro de massas (figura 38) apresentou o íon pseudomolecular [M+H]⁺ com *m/z* de 266,1554, que corresponde à fórmula molecular C₁₈H₂₀NO (erro de 3,3 ppm), o que está condizente com os demais compostos discutidos anteriormente, **LC_1** a **LC_3**.

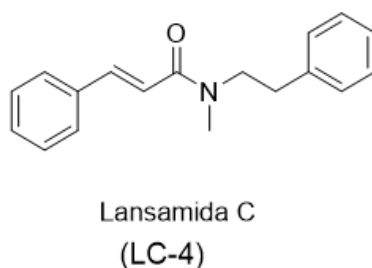


Figura 33: Composto isolado LC_4 de *Swinglea glutinosa*.

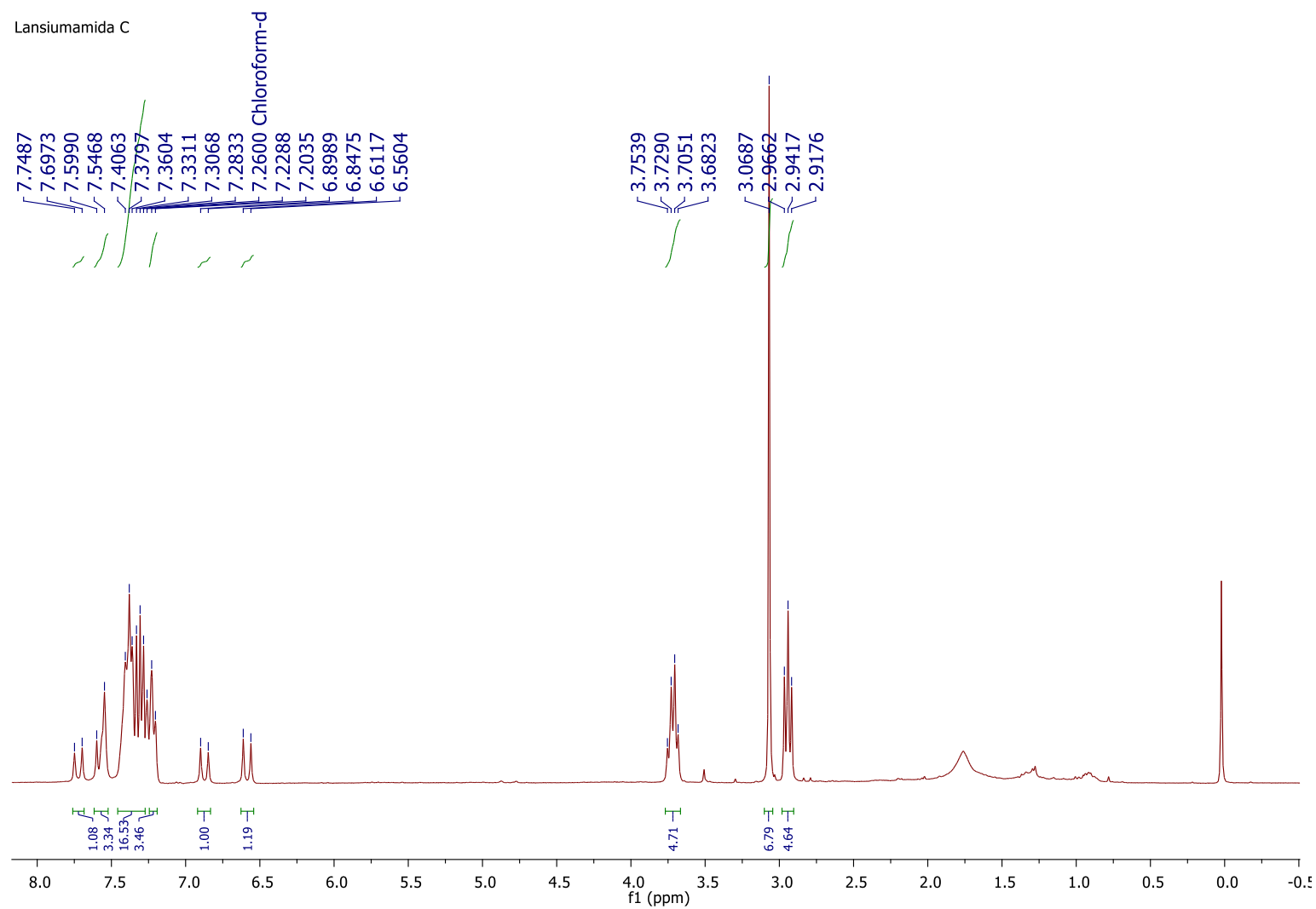


Figura 34: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, clorofórmio-d) da substância Lansiumamida C (LC_4).

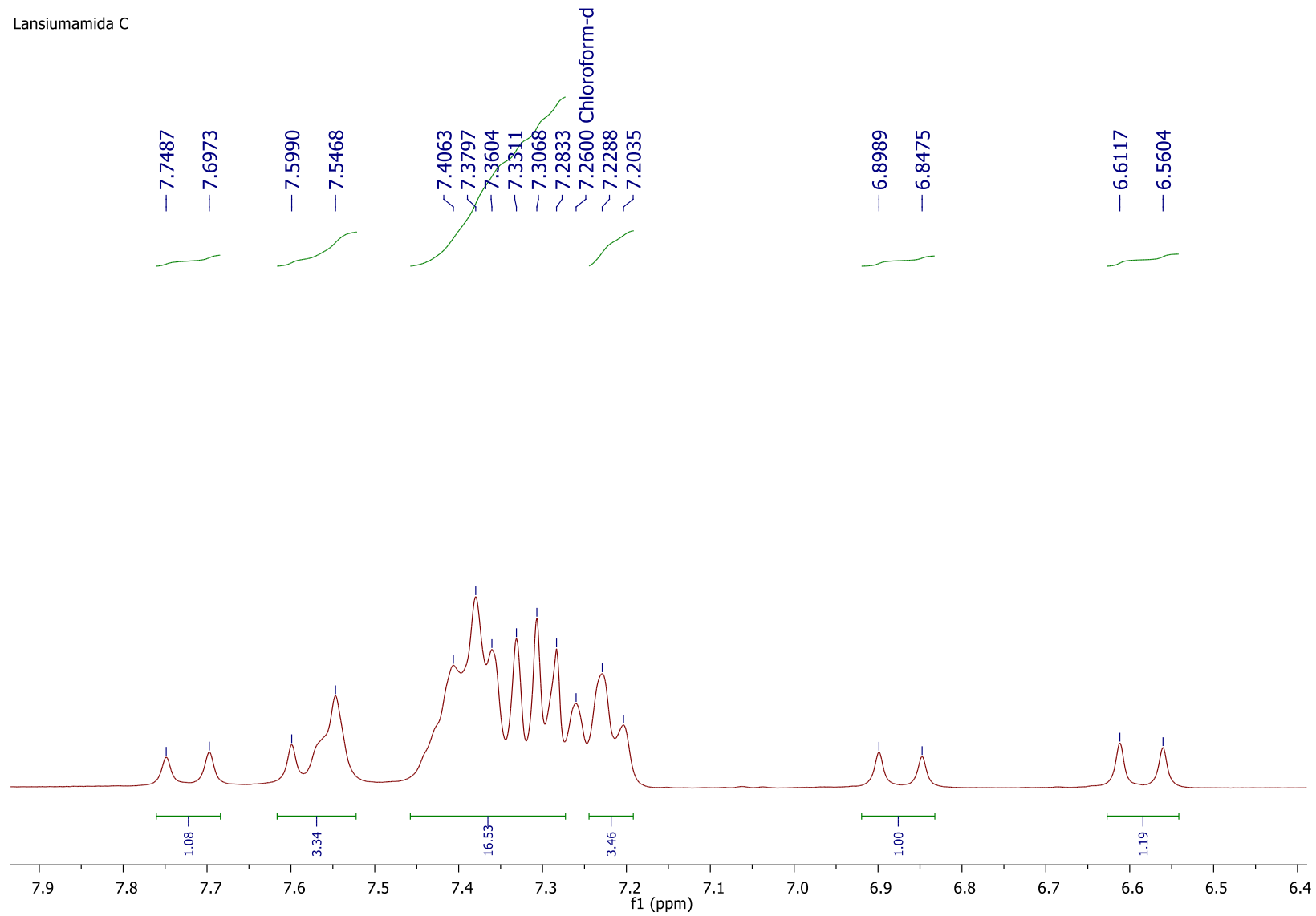


Figura 35: Ampliação do espectro de RMN ^1H (300 MHz, clorofórmio-d) da substância Lansiumamida C (LC_4).

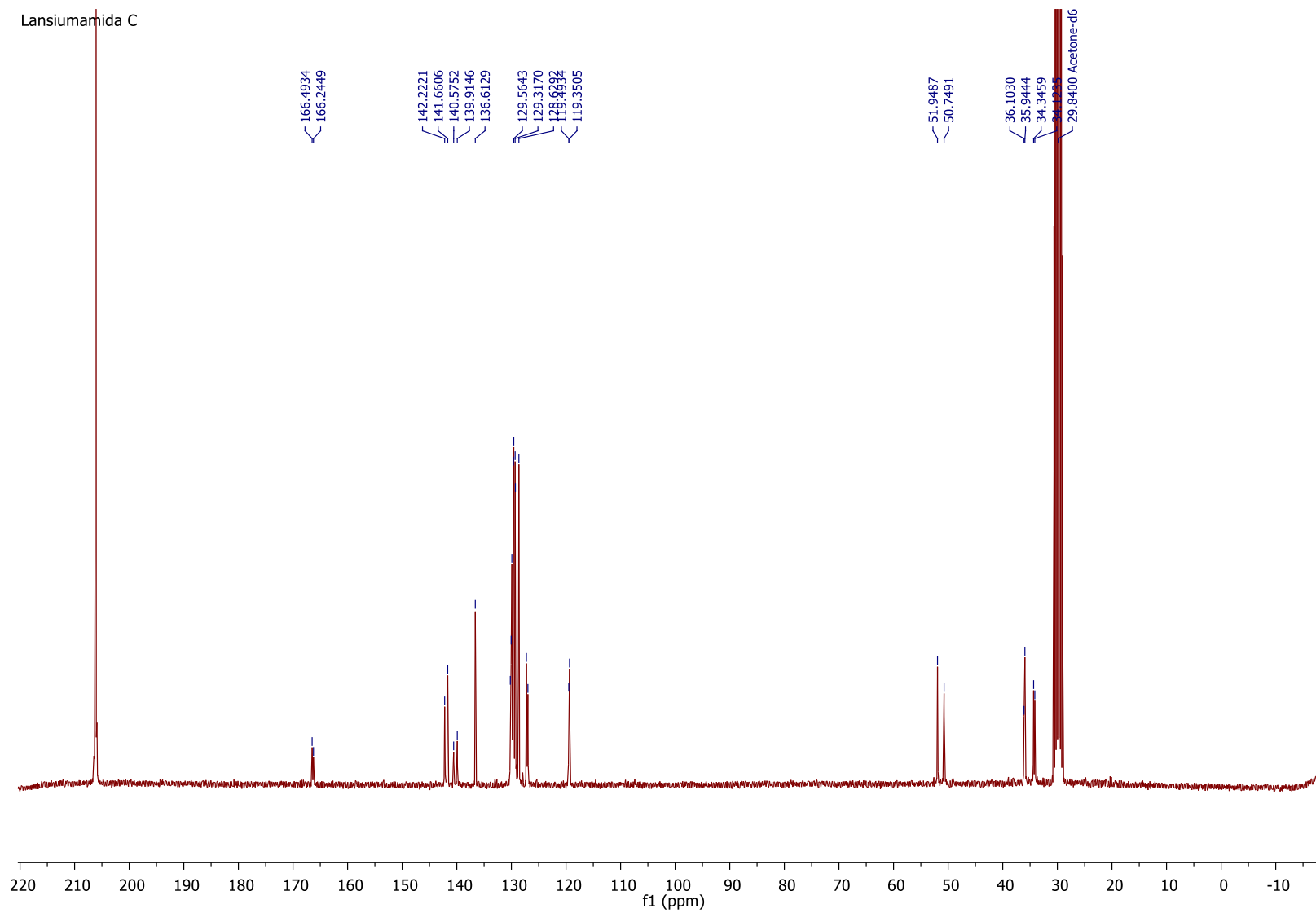


Figura 36: Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, acetona- d_6) da substância Lansiumamida C (LC_4).

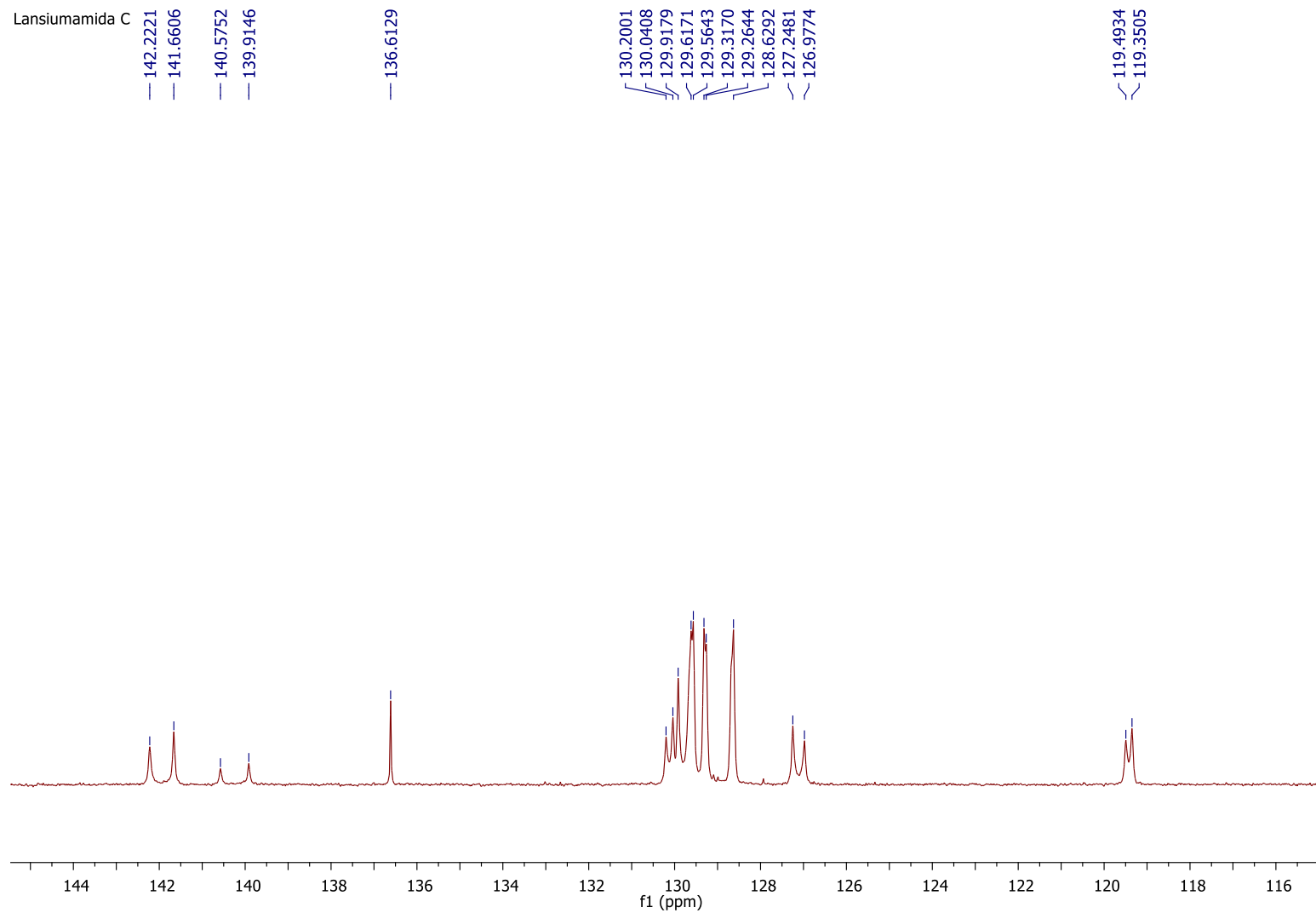


Figura 37: Ampliação do espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, acetona- d_6) da substância Lansiumamida C (LC_4).

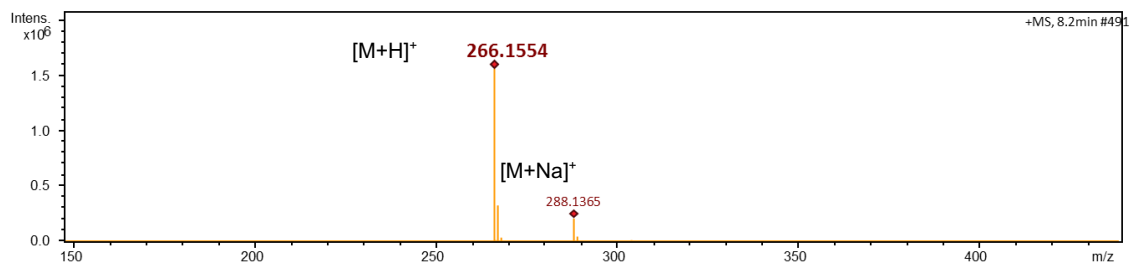


Figura 38: Espectro de massas (ESI+) referente à substância Lansiumamida C (LC_4)

Tabela 6: Dados de RMN ^1H e/ou ^{13}C obtidos para a substância LC_4.

Composto LC_4			
Posição	$\delta_{\text{H, exp.}}$ multiplicidade e J (Hz)	$\delta_{\text{H, lit.}}$ multiplicidade e J (Hz)	$d_{\text{C exp.}}$
1			166,5 / 166,3
2	6,58 (d, 15,4)	6,52 (d, 16)	119,5 / 119,3
3	7,45 (d, 15,4)	7,66 (d)	142,2 / 141,7
4-9	7,20 -7,41 (m)	7,0 - 7,50 (m)	140,6 - 127,0
2'	3,71 (t)	3,67 (t)	51,9 / 50,7
3'	2,94 (t)	2,90 (t)	36,1 / 35,9
4'-9'	7,20 - 7,41 (m)	7,00 -7,50 (m)	140,6 - 127,0
N-H			
N-CH ₃	3,07 (s)	3,04 (s)	34,3 / 34,1

*Valores experimentais para LC_4, obtidos por RMN de ^1H e ^{13}C (300 e 75 MHz, respectivamente; CDCl_3).

*Valores da literatura do composto LC_4, obtidos por RMN de ^1H (100 MHz, CDCl_3) (LIN, 1989)

5. Atividade biológica

Como descrito anteriormente (Ver item 4.1.3 p. 34) o extrato hexânico da espécie em estudo e os grupos R5 e R7, obtidas deste, apresentaram boa atividade biológica contra linhagens de leucemia humana. Ao final do isolamento dos compostos e caracterização, realizou-se o mesmo estudo biológico com as 4 substâncias isoladas. Na tabela 7 encontra-se a correspondência dos códigos com os respectivos nomes dos compostos e a atividade biológica (Figura 39) associada à linhagem de Leucemia Mieloide Aguda, Kasumi-1.

Tabela 7: Tabela de correspondência dos códigos e seus respectivos nomes

Código Teste biológico	Código amostra	Nome do composto
1	LC_2	Lansiumamida B
2	LC_3	N-(2-feniletil)cinamamida
3	LC_4	Lansiumamida C
4	LC_1	Lansamida I

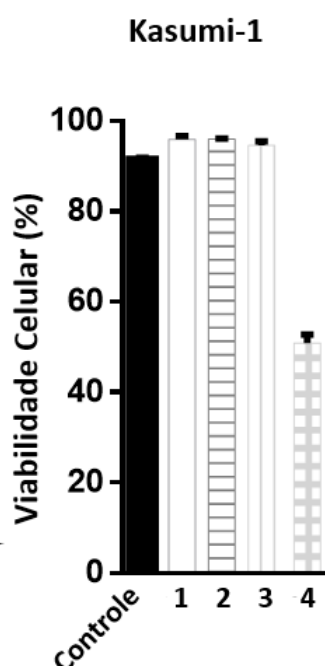


Figura 39: Teste biológico dos compostos isolados de *S. glutinosa* em linhagem de Leucemia Mieloide Aguda (Kasumi-1)

Como apresentado acima, as substâncias isoladas apresentaram viabilidade celular acima do controle na 1, 2 e 3 (LC_2, LC_3, LC_4 respectivamente), ou seja, não foi observado resultados esperados na linhagem estudada. Já na substância 4 (LC_1) obteve-se viabilidade celular em torno de 50%, isso quer dizer que a substância foi responsável por inibir o crescimento celular de células de Leucemia Mieloide aguda em 50%.

Após analisar os resultados da atividade biológica das frações R5 e R7, levantou-se a hipótese que é decorrente do efeito sinérgico entre os compostos presentes nas frações. Isso sugere que devemos investir os esforços para a elucidação dos mecanismos de ação das sub-frações que originaram as substâncias puras. No entanto, devido a situação causada pela pandemia, os ensaios foram interrompidos.

6. Considerações finais

O estudo químico da espécie vegetal *S. glutinosa* permitiu o isolamento de quatro substâncias pertencentes à classe das fenilacrilamidas. A abordagem de desreplicação foi fundamental para esse processo, permitindo isolar substâncias nunca antes associadas à espécie em estudo. Essas informações fazem parte do conjunto de dados que foi publicado recentemente na literatura (<https://doi.org/10.3390/molecules25010153>). As substâncias purificadas corroboraram para a ampliação do conhecimento do perfil químico da espécie *S. glutinosa*, o qual está coerente para uma planta pertencente à família Rutaceae.

A avaliação do potencial biológico frente às linhagens de leucemia humana, quando feito ainda no extrato em hexano das folhas, apresentou viabilidade celular em torno de 10%, significando que a fração inibiu o crescimento de 90% das células de leucemia humana da linhagem Kasumi-1. Já quando feito nas sub-frações do extrato, a fração R5 apresentou viabilidade celular em torno de 20% e a fração R7 em torno de 10%, ambas testadas em células da linhagem Kasumi-1. Os compostos isolados apresentaram alta viabilidade celular, sugerindo que existe a possibilidade da atividade biológica estar associada ao efeito sinérgico entre os compostos quando estão em mistura nas sub-frações citotóxicas.

Com isto, é possível sugerir que as frações R5 e R7 podem ser utilizados na busca de alternativas terapêuticas contra linhagens de leucemia humana baseada em produtos naturais, porém ainda são necessários estudos mais aprofundados para entender melhor a relação estrutura-atividade bem como a interação no organismo humano, além do efeito sinérgico entre os componentes de cada grupo.

7. Referências bibliográficas

- ABOUL-SOUD, M. A. M. *et al.* Effects of plant derived anti leukemic drugs on individualized leukemic cell population profiles in Egyptian patients. **Oncology Letters**, v. 11, p. 642-648, 2016.
- ASSOCIAÇÃO Brasileira de Leucemia e Linfoma. **Site da Associação Brasileira de Leucemia e Linfoma**. Disponível em: <www.abrale.org.br>. Acesso em: 15 Dezembro 2020.
- ATANASOV, A. G. *et al.* Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. **Biotechnology Advances**, v. 33, p. 1582-1614, 2015.
- BEIRIGO, P. J. D. S. *et al.* [1-8-NaC]-Zanriorb A1, a Proapoptotic Orbitide from Leaves of *Zanthoxylum riedelianum*. **Journal of Natural Products**, v. 79, p. 1454-1458, 2016.
- BERLINCK, R. G. S. *et al.* The Chemistry of Natural Products in Brazil in the XXI Century. **Química Nova**, v. 40, p. 706-710, 2017.
- BERNARDINI, S. *et al.* Natural products for human health: an historical overview of the drug discovery approaches. **Natural Product Research**, v. 32, p. 1-25, 2017.
- BESSA, N. G. F. D. *et al.* Prospeção fitoquímica preliminar de plantas nativas do cerrado de uso popular. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 15, p. 692-707, 2013.
- BLADT, T. T. *et al.* Bio-Activity and Dereplication-Based Discovery of Ophiobolins and Other Fungal Secondary Metabolites Targeting Leukemia Cells. **Molecules**, v. 18, p. 14629-14650, 2013.
- BOUSLIMANI, A. *et al.* Mass spectrometry of natural products: current, emerging and future technologies. **Natural Products Reports**, v. 31, p. 718-729, 2014.
- BRANDÃO, H. N. *et al.* Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, v. 33, p. 1359-1369, 2010.
- CALLEJA, R.; KABASHNEH, S. Acute Myeloid Leukemia: A "heat to Toe" Examination. **Cureus**, v. 12, p. e8526, 2020.
- CARVALHO, A. C. D. *et al.* Integrated Analytical Tools for Accessing Acridones and Unrelated Phenylacrylamides from *Swinglea glutinosa*. **Molecules**, v. 25, p. 153, 2019.
- CERQUEIRA, C. D. N. **Estudo fitoquímico e quimiossistemático de Galipea, Swinglea (Rutaceae) e avaliação do potencial biológico dos compostos isolados**. UFSCar. São Carlos, p. 160. 2011.
- CERQUEIRA, C. D. N. *et al.* Novas n-benzoiltiraminas de *Swinglea glutinosa* (Rutaceae). **Química Nova**, v. 35, p. 2181-2185, 2012.

COSTA-LOTUFO, L. V. *et al.* The Contribution of Natural Products as Source of New Anticancer Drugs: Studies Carried Out at the National Experimental Oncology Laboratory from the Federal University of Ceará. **Revista Virtual de Química**, v. 2, p. 47-58, 2010.

DAVID, B.; WOLFENDER, J.-L.; DIAS, D. A. The pharmaceutical industry and natural products: historical status and new trends. **Phytochemistry Reviews**, v. 14, p. 299-315, 2015.

DEWICK, P. M. **Medicinal Medical Approach: A biosynthetic Approach**. 3rd. ed. [S.l.]: Wiley, 2009.

DINAN, L. **Dereplication and partial identification of compounds**. 2nd. ed. [S.l.]: Humana Press, 2005.

DRULLION, C. *et al.* Mycophenolic Acid Overcomes Imatinib and Nilotinib Resistance of Chronic Myeloid Leukemia Cells by Apoptosis or a Senescent-Like Cell Cycle Arrest. **Leukemia Research and Treatment**, v. 2012, p. 861301, 2012.

DU, Q. *et al.* Synergistic anticancer effects of curcumin and resveratrol in Hepa1-6 hepatocellular carcinoma cells. **Oncology Reports**, v. 29, p. 1851-1858, 2013.

FERREIRA, P. H. A. *et al.* Acridone Alkaloids from *Swinglea glutinosa* (Rutaceae) and Their Effects on Photosynthesis. **Chemistry and Biodiversity**, v. 13, p. 100-106, 2016.

FLORA do Brasil 2020. **Site da Flora do Brasil 2020, Segundo o Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br>>. Acesso em: 11 Dezembro 2020.

GAUDÊNCIO, S. P.; PEREIRA, F. Dereplication: racing to speed up the natural products discovery process. **Natural Product Reports**, v. 32, p. 779-810, 2015.

GOOBEN, L. J. *et al.* Synthesis of Botryllamides and Lansiumamides via Ruthenium-Catalyzed Hydroamidation of Alkynes. **Synlett**, v. 11, p. 1685-1687, 2011.

HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 13, p. 894-901, 2008.

HUBERT, J.; NUZILLARD, J.-M.; RENAULT, J.-H. Dereplication strategies in natural product research: How many tools and methodologies behind the same concept? **Phytochemistry Reviews**, v. 16, p. 55-95, 2017.

KATO, R. *et al.* The synergistic effect of 1'-acetoxychavicol acetate and sodium butyrate on the death of human hepatocellular carcinoma cells. **Chemico-Biological Interactions**, v. 212, p. 1-10, 2014.

KLITGAARD, A. *et al.* Aggressive dereplication using UHPLC-DAD-QTOF: Screening extracts for up to 3000 fungal secondary metabolites. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 406, p. 1933-1943, 2014.

KUETE, V. *et al.* Cytotoxicity of a naturally occurring furoquinoline alkaloid and four acridone alkaloids towards multi-factorial drug-resistant cancer cells. **Phytomedicine**, v. 22, p. 946-951, 2015.

LI, P. *et al.* Synergic effects of artemisinin and resveratrol in cancer cells. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 140, p. 2065-2075, 2014.

LIMA, A. N. *et al.* Use o Machine Learning Approaches for Novel Durg Discovery. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 11, p. 225-239, 2016.

LIN, J.-H. Cinnamamide derivatives from *Clausena lansium*. **Phytochemistry**, v. 28, p. 621-622, 1989.

LUCAS, D. M. *et al.* Potential of Plant-Derived Natural Products in the Treatment of Leukemia and Lymphoma. **Current Drug Targets**, v. 11, p. 812-822, 2010.

MAN, L. M.; MORRIS, A. L.; KENG, M. New Therapeutic Strategies in Acute Lymphocytic Leukemia. **Current Hematologic Malignancy Reports**, v. 12, p. 197-206, 2017.

MARQUES, E. F.; VIEIRA, P. C.; SEVERINO, P. Acridone alkaloids as Inhibitors of Cathepsin L and V. **Quimica Nova**, v. 39, p. 58-62, 2016.

MARQUES, V.; FARAH, A. Chlorogenic acids and related compounds in medicinal plants and infusions. **Food Chemistry**, v. 113, p. 1370-1376, 2009.

MORAES, E. S. *et al.* Análise de indivíduos com leucemia: limitações do sistema de vigilância de câncer. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 22, p. 3321-3332, 2017.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

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

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

PATRIDGE, E. *et al.* An analysis of FDA-approved drugs: natural products and their derivatives. **Drug Discovery Today**, v. 21, p. 204-207, 2016.

PINTO, A. C. *et al.* Produtos naturais: Atualidade, desafios e perspectivas. **Quimica Nova**, v. 25, p. 45-61, 2002.

QUEIROZ, A. F. S. *et al.* Growth inhibitory activity of a novel lectin from *Cliona varians* against K562 human erythroleukemia cells. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 63, p. 1023-1033, 2009.

SANTOS, D. A. P. D. *et al.* Antiparasitic Activities of Acridone Alkaloids from from *Swinglea glutinosa* (Bl.) Merr. **Journal od the Brazilian Chemical Society**, v. 20, p. 644-651, 2009.

SANTOS, D. Y. A. C. D. **Botânica aplicada: Metabólitos secundários na interação planta-ambiente**. Universidade de São Paulo. São Paulo, p. 124. 2015.

SEVERINO, R. P. *et al.* Acridone alkaloids as potent inhibitors of cathepsin v. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 1477-1481, 2011.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 7a. ed. [S.l.]: LTC, 2006.

SMYTH, W. F. *et al.* Dereplication of phytochemicals in plants by LC-ESI- MS and ESI-MS n. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 33, p. 45-54, 2012.

SOUZA, M. V. N. *et al.* Natural Products in Advance Clinical Trials Applied to Cancer. **Fitos**, v. 3, p. 25-42, 2007.

TYCKO, R. NMR at Low and Ultra-Low Temperatures. **Accounts of Chemical Research**, v. 46, p. 1923-1932, 2013.

VIEIRA, P. C.; RATTRAY, L.; CROFT, S. L. Antiparasitic Activities of Acridone Alkaloids from *Swinglea glutinosa* (Bl.) Merr. Djalma. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, p. 2181-2185, 2009.

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

WOLFENDER, J.-L.; MARTI, G.; QUEIROZ, E. F. Advances in Techniques for Profiling Crude Extracts and for the Rapid Identification of Natural Products: Dereplication, Quality Control and Metabolomics. **Current Organic Chemistry**, v. 14, p. 1808, 2010.

XU, Y.-J. *et al.* Recent developments and applications of metabolomics in microbiological investigations. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 56, p. 37-48, 2014.

YAMAZAKI, Y.; KAWANO, Y.; UEBAYASI, M. Induction of adiponectin by natural and synthetic phenolamides in mouse and human preadipocytes and its enhancement by docosahexaenoic acid. **Life Sciences**, v. 82, p. 290-300, 2008.