

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL PROGRAMA DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Caracterização química de *Selaginella sellowii* Hieron. (Selaginellaceae) e atividades
antileishmania, antibiofilme e antibacteriana**

Izadora Bonfim

Campo Grande-MS

2023

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL PROGRAMA DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

IZADORA BONFIM

Caracterização química de *Selaginella sellowii* Hieron. (Selaginellaceae) e atividades antileishmania, antibiofilme e antibacteriana

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas Alimento e Nutrição da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, sob a orientação da Prof.^a Dra. Denise Brentan da Silva.

Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Campo Grande-MS

2023

FOLHA DE APROVAÇÃO

Izadora Bonfim

Caracterização química de *Selaginella sellowii* Hieron. (Selaginellaceae) e atividades antileishmania, antibiofilme e antibacteriana

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientadora: Prof^a. Dra. Denise Brentan da Silva

Aprovada em:

Banca examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Dedico este trabalho à minha sobrinha Giuliana, cuja presença iluminou minha vida desde o momento em que chegou ao mundo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, primeiramente, que me ajudou a evoluir e me deu forças para concluir esta etapa de minha vida.

A Minha Família, aos meus pais e minha querida sobrinha Giuliana, meus irmãos de criação, especialmente Jonatham por todo apoio, amor e carinho.

Aos meus amigos de infância, e da vida por todo incentivo e carinho.

A meu cachorro, Yukito, por alegrar todos os dias.

Aos professores da UFMS e a todos os professores que me orientaram em algum momento da minha vida, com muita paciência e dedicação, ensinaram-me não somente o conteúdo programado, mas também o sentido da dedicação e do respeito.

A Luciana pelas discussões valiosas sobre RMN, obtenção de espectros e por essa enorme amizade iniciada.

Aos amigos que fiz no laboratório LaPNEM ao longo dos anos de trabalho, e pelo aprendizado proporcionado, não apenas pela amizade, mas também pelo valioso aprendizado que compartilhamos.

Um agradecimento especial à Prof^a. Dra. Denise Brentan da Silva, pela oportunidade, apoio, orientação, por sua amizade e por ter sempre acreditado em mim.

A Universidade Federal de Mato Grosso do Sul e ao Laboratório de Produtos Naturais e Espectrometria de Massas, pela oportunidade de realização deste trabalho de pesquisa.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

A Capes pela bolsa concedida.

“Nada na vida deve ser temido, apenas compreendido. Agora é hora de entender mais para temer menos.”

Marie Curie

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e símbolos.....	i
Resumo	iii
Abstract.....	iv

CAPÍTULO 1 - Introdução

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Leishmaniose	1
1.1.1.Tratamento	6
1.2. Infecções bacterianas e biofilmes	7
1.3. Produtos naturais como fontes para a busca de compostos bioativos.....	10
1.3.1.Produtos naturais como fonte promissora de novos antiparasitários	12
1.3.2.Produtos naturais como fonte promissora de novos antibióticos.....	17
1.4. Gênero <i>Selaginella</i>	20
1.4.1.Propriedades químicas e medicinais do gênero <i>Selaginella</i>	20
1.5. <i>Selaginella sellowii</i> Hieron	30
2. OBJETIVOS.....	32
2.1 Objetivo Geral.....	32
2.2 Objetivos Específicos.....	32
3. REFERÊNCIAS	33

CAPÍTULO 2 - Artigo

ABSTRACT	47
INTRODUCTION	48
EXPERIMENTAL SECTION.....	50
General Experimental Procedures.....	50
Plant material and collection area	51
Extraction and fractionated procedures.....	52
Isolation of phenylpropanoid derivatives procedures	52
Chemical analyses by LC-DAD-MS and LC-DAD.....	53

Culture of <i>Leishmania amazonensis</i>	54
Biological activity against amastigotes of <i>Leishmania amazonensis</i>	54
Cytotoxic Activity.....	55
Bacterial strains and culture conditions	55
Bacterial growth and biofilm formation evaluations	55
RESULTS AND DISCUSSION	57
Obtention of enriched fraction in glycosylated phenylpropanoid derivatives	57
Annotation of the constituents by LC-DAD-MS	60
Structural characterization of the isolated phenylpropanoids	64
Antileishmanial, antibacterial, and antibiofilm activities	72
CONCLUSIONS	74
REFERENCES	76
SUPPLEMENTARY MATERIAL	79

LISTA DE FIGURAS – CAPÍTULO 1

Figura 1. Distribuição de espécies de <i>Leishmania</i> no Brasil responsáveis pela transmissão da leishmaniose tegumentar.....	2
Figura 2. Taxa de incidência de leishmaniose tegumentar por estado (UF).	5
Figura 3. Taxa de incidência de leishmaniose visceral por estado (UF)	5
Figura 4. Ocorrência dos metabólitos secundários identificados em estudos fitoquímicos realizados com espécies do gênero <i>Selaginella</i>	21
Figura 5: Biflavonoides com ligações do tipo C-O-C isolados de espécies do gênero <i>Selaginella</i>	22
Figura 6. Biflavonoides com ligações do tipo C-C isolados de espécies do gênero <i>Selaginella</i>	23
Figura 7. Estruturas químicas de selaginellinas isoladas a partir de espécies de <i>Selaginella</i>	26
Figura 8. Estruturas químicas de alcalóides isolados a partir de espécies de <i>Selaginella</i>	27
Figura 9. Estruturas químicas de lignanas isoladas a partir de espécies de <i>Selaginella</i>	28
Figura 10. Estruturas químicas de terpenóides isoladas a partir de espécies de <i>Selaginella</i> ...	29
Figura 11. <i>Selaginella sellowii</i> . A: Reidratada B: Área da coleta em época de seca.	30

LISTA DE FIGURAS – CAPÍTULO 2

Figure 1. Chromatographic profile at 325 nm from the extract SsEtH and its fractions SsEtH_FrAc and SsEtH_FrMe of <i>Selaginella sellowii</i> . The ultraviolet spectra (240-400 nm) of bioflavonoids and phenylpropanoid derivatives were highlighted.....	59
Figure 2. Base peak chromatogram (negative ion mode) from the fraction SsEtH_frMe.....	60
Figure 3. Chemical structure of the phenylpropanoid 9	66
Figure 4. Effect of extracts (1-SsEtH and 2-SsAcMe) and fractions (3- SsEtH_FrMe, 4- SsEtH_FrAc, and 5-SsEtH _FrDC) on the <i>S. aureus</i> growth and biofilm formation at concentrations of 0.5 and 0.1 mg/mL (* $p \leq 0.01$, Student's t-test).....	74

LISTA DE FIGURAS – SUPPLEMENTARY MATERIAL

Figure S1. Chromatogram at 270 nm of SsEtH_frMe fraction from SsEtH extract of the <i>S. sellowii</i> by semipreparative LC-DAD.....	80
Figure S2. Base peak chromatogram (black) and at 210-800 nm (blue) of peak P19 obtained by semipreparative LC-DAD-MS (negative ion mode) analyses. This peak is relative to compound 9 (table 1) at m/z 818.2202 $[M-2H]^{-2}$ ($C_{72}H_{86}O_{43}$).	81
Figure S3. 1H NMR (D_2O , 500 MHz) of the isolated phenylpropanoid 9	82
Figure S4. Correlation observed in the 1H - 1H COSY NMR spectra, contour map of the phenylpropapoid 9 (D_2O , 500MHz for 1H)......	83
Figure S5. Expanded COSY contour map of the phenylpropapoid 9 (D_2O , 500MHz for 1H). Highlight for the hydrogens in the region 6.12 to 7.47 ppm.	84
Figure S6. Correlation observed in the 1H - ^{13}C HSQC contour map of the phenylpropapoid 9 (D_2O , 500MHz for 1H).	85
Figure S7. A: Main correlations obtained between hydrogen and carbon in the HMBC spectrum of the compound 9	86
Figure S8. Correlation observed in the 1H - ^{13}C HMBC contour map of the phenylpropapoid 9 (D_2O , 500MHz for 1H). Highlight for the hydrogens in the region 2.50 to 8.00 ppm.	87
Figure S9. Expanded HMBC contour map of the phenylpropapoid 9 (D_2O , 500MHz for 1H). Highlight for the hydrogens in the region 6.12 to 7.47 ppm.	88
Figure S10. 1H NMR (D_2O , 500 MHz) of the isolated phenylpropanoid 9 . Highlight for the hydrogens in the region 4.09 to 5.39 ppm.....	89
Figure S11. Structure of the sugars α/β glucopyranose and galactopyranose	89
Figure S12. Expanded HMBC contour map of the phenylpropapoid 9 (D_2O , 500MHz for 1H). Highlight for the hydrogen 3.74 ppm.....	90
Figure S13. Expanded HMBC contour map of the phenylpropapoid 9 (D_2O , 500MHz for 1H). Highlight for the hydrogen 4.09 ppm.....	91
Figure S14. Correlation observed in the 1H - ^{13}C HMBC contour map of the phenylpropapoid 9 (D_2O , 500MHz for 1H). Highlight for the hydrogens in the region 4.00 to 8.00 ppm and carbon 110.0 to 175.0 ppm.....	92
Figure S15. Correlation observed in the 1H - ^{13}C HMBC contour map of the phenylpropapoid 9 (D_2O , 500MHz for 1H). Highlight for the hydrogens in the region 2.00 to 6.00 ppm and carbon 54.0 to 110.0 ppm.....	93

LISTA DE TABELAS – CAPÍTULO 1

Tabela 1. Fármacos inspirados em produtos naturais	12
Tabela 2. Plantas medicinais e seus compostos bioativos	14

LISTA DE TABELAS – CAPÍTULO 2

Table 1. Annotated compounds from <i>S. sellowii</i> by LC-DAD-MS	62
Table 2. NMR spectral data (D ₂ O, 500 MHz) from phenylpropanoid 9	69
Table 3. Antileishmanial activities from extracts and fractions of <i>S. sellowii</i>	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ASE	<i>Accelerated solvent extraction</i>
ATP	Adenosina Trifosfato
CC ₅₀	Concentração Citotóxica de 50%
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CLAE-DAD-EM	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao espectrômetro de massas
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CL	<i>Cutaneous Leishmaniasis</i>
DAD	Detector Arranjo de Diodo
DMSO	Dimetilsulfóxido
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
GTP	Trifosfato de Guanosina
HPAN	Herbário do Pantanal
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IC ₅₀	<i>Inhibitory Concentration de 50%</i>
IES	Ionização por Eletrospray
LC	Leishmaniose Cutânea
LCD	Leishmaniose Cutânea Difusa
LC-DAD-MS	<i>High Performance Liquid Chromatography coupled to a diode array detector and mass spectrometer</i>
LC-DAD	<i>Liquid Chromatography coupled to a diode array detector</i>
LM	Leishmaniose Mucosa
LT	Leishmaniose Tegumentar
LV	Leishmaniose Visceral

MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
OMS	Organização Mundial da Saúde
Q-TOF	Analizador do tipo Quadrupolo- Tempo de Voo
RDA	Retro Diels-Alder
UFMS	Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
UV	Ultravioleta
VL	<i>Visceral Leishmaniasis</i>
SsHxDC	Extrato de <i>S. sellowii</i> obtido com hexano e diclorometano 8:2
SsAcMe	Extrato de <i>S. sellowii</i> obtido com acetato de etila e metanol 1:1
SsEtH	Extrato de <i>S. sellowii</i> obtido com etanol e água 7:3
SsAcMe_FrDC	Fração diclorometano obtida por partição líquido-líquido do extrato acetato de etila e metanol 1:1 de <i>S. sellowii</i>
SsAcMe_FrAc	Fração acetato de etila obtida por partição líquido-líquido do extrato de <i>S. sellowii</i> obtido com acetato de etila e metanol 1:1
SsAcMe_FrMe	Fração metanol e água 1:1 obtida por partição líquido-líquido do extrato acetato de etila e metanol 1:1 de <i>S. sellowii</i>
SsEtH_FrDC	Fração diclorometano obtida por partição líquido-líquido do extrato etanol e água 7:3 de <i>S. sellowii</i>
SsEtH_FrAc	Fração acetato de etila obtida por partição líquido-líquido do extrato etanol:água 7:3 de <i>S. sellowii</i>
SsEtH_FrMe	Fração metanol e água 1:1 obtida por partição líquido-líquido do extrato de <i>S. sellowii</i> obtido com etanol e água 7:3
<i>m/z</i>	Massa sobre carga
[M-H] ⁻	Íon desprotonado
[M+H] ⁺	Íon protonado

RESUMO

Selaginella sellowii Hieron. (Selaginellaceae), pertence à família Selaginellaceae, é uma espécie resistente à dessecação. O extrato polar desta espécie exibiu em sua composição biflavonoides e fenilpropanoides, além disso também exibiu potente atividade contra *Leishmania amazonensis*. Entretanto, ainda há escassez na literatura com relação a informação estrutural dos fenilpropapoides e seu papel nessa potente atividade antileishmania. Devido aos diversos cenários epidemiológicos, a vigilância e o controle das leishmanioses continuam sendo um desafio, o que as torna um problema de saúde pública constante nas Américas. Aliado a isso, ao longo da história, os antimoniais pentavalentes tem sido usados como primeira opção de tratamento a infecção por *L. amazonensis*, no entanto, estes apresentam diversos efeitos colaterais, além do aumento dos índices de resistência dos parasitas. Além das infecções parasitárias, faz-se necessário considerar as doenças bacterianas. O uso excessivo e inadequado dos antibióticos tem levado ao desenvolvimento de resistência bacteriana, o qual é considerado um grave problema de saúde pública mundial sendo que aproximadamente 80% das infecções estão associadas a biofilmes bacterianos. Assim, se faz necessário o desenvolvimento de novas estratégias de tratamentos, bem como é urgente a ampliação das pesquisas em busca de agentes antileishmania, antibiofilmes e antibacterianos. Aqui, desenvolvemos um método para obter duas frações enriquecidas compostas por biflavonóides e derivados fenilpropanóides, visando compreender um possível papel desses diferentes componentes para as atividades antileishmania, antibacteriana e antibiofilme. Os extratos foram obtidos por extração acelerada por solvente (ASE) com solventes para a obtenção dos extratos etanol e água 7:3 v/v (SsEtH) e acetato de etila e metanol 1:1 v/v (SsAcMe). O extrato SsEtH foi submetido à extração líquido-líquido e suas frações acetato de etila (SsEtH_FrAc) e hidrometanólica (SsEtH_FrMe) apresentaram principalmente bioflavonoides e derivados fenilpropanoides em sua composição, respectivamente. O extrato SsAcMe e a fração SsEtH_FrDC mostraram melhor atividade antileishmania e antibiofilme. O extrato SsAcMe exibiu IC₅₀ de 78,8 µg/mL contra as formas amastigotas de *L. amazonensis*, como também inibiu em 90% a formação do biofilme de *Staphylococcus aureus* e sem afetar o crescimento bacteriano. A fração SsEtH_FrDC apresentou uma IC₅₀ de 34,1 µg/mL contra amastigotas de *L. amazonensis* e inibiu a formação de biofilme, porém na maior concentração avaliada (0.5 mg/mL) também reduziu o crescimento bacteriano. As amostras foram analisadas por LC-DAD e LC-DAD-MS. Os biflavonoides amentoflavona (**14**), robustaflavona (**15**) e éter metílico de robustaflavona (**16**) foram os principais metabólitos anotados de SsEtH_FrAc. A partir da fração SsEtH_FrMe, derivados glicosilados de fenilpropanóides foram anotados, incluindo ácido tri-*O*-hexosil cafeico (**1**), hexa-*O*-hexosil tetra-ácido cafeico (**2**, **4**, **9**, **11**, **12**), hexa-*O*-hexosil di-ácido cafeico (**3**), tetra-*O*-hexosil di-ácido cafeico (**5**, **7**), hepta-*O*-hexosil tetra-ácido cafeico (**6**, **8**), penta-*O*-hexosil tri-ácido cafeico (**10**) e tri-*O*-hexosil tetra-ácido cafeico (**13**). Os compostos **6**, **7**, **8**, **9** e **10** foram isolados por HPLC-DAD em escala semipreparativa de fase reversa e caracterizados estruturalmente por RMN. A substância **9** foi caracterizada como o novo derivado fenilpropanoide glicosilado, o bis-1''-*O*-caffeoil(1''→4)-β-gluco/galacpiranosil(9→2'')-α-gluco/galactopiranosil(1'''→3''')-caffeoil-(2'''→9')-β-gluco/galactopiranosídeo.

Palavras-chave: Fenilpropanoide, *Leishmania*, Biflavonoide, Ácido cafeico, Antibacteriano, antibiofilme

ABSTRACT

Selaginella sellowii Hieron. (Selaginellaceae), belongs to the Selaginellaceae family, is a desiccation resistant species. The polar extract of this species exhibited in its composition biflavonoids and phenylpropanoids, in addition it also exhibited potent activity against *Leishmania amazonensis*. However, there is still a shortage in the literature regarding the structural information of phenylpropanoids and their role in this potent antileishmanial activity. Due to the different epidemiological scenarios, the surveillance and control of leishmaniasis remain a challenge, which makes them a constant public health problem in the Americas. Allied to this, throughout history, pentavalent antimonials have been used as the first option for treating infection by *L. amazonensis*, however, these have several side effects, in addition to increasing the levels of resistance of the parasites. In addition to parasitic infections, it is necessary to consider bacterial diseases. The excessive and inappropriate use of antibiotics has led to the development of bacterial resistance, which is considered a serious public health problem worldwide, with approximately 80% of infections are associated with bacterial biofilms. Thus, the development of new treatment strategies is necessary, as well as the expansion of research in search of antileishmania, antibiofilms and antibacterial agents. Here, we developed a method to obtain two enriched fractions composed of biflavonoids and phenylpropanoid derivatives, aiming to understand a possible role of these different components for antileishmania, antibacterial and antibiofilm activities. The extracts were obtained by accelerated solvent extraction (ASE) with solvents to obtain ethanol and water 7:3 v/v (SsEtH) and ethyl acetate and methanol 1:1 v/v (SsAcMe) extracts. The SsEtH extract was subjected to liquid-liquid extraction and its ethyl acetate (SsEtH_FrAc) and hydromethanolic (SsEtH_FrMe) fractions showed mainly bioflavonoids and phenylpropanoid derivatives in their composition, respectively. The SsAcMe extract and the SsEtH_FrDC fraction showed better antileishmania and antibiofilm activity. The SsAcMe extract exhibited an IC_{50} of 78.8 $\mu\text{g/mL}$ against amastigotes of *L. amazonensis*, as well as inhibiting the formation of *Staphylococcus aureus* biofilm by 90% and without affecting bacterial growth. The SsEtH_FrDC fraction showed an IC_{50} of 34.1 $\mu\text{g/mL}$ against amastigotes of *L. amazonensis* and inhibited biofilm formation, but at the highest concentration evaluated (0.5 mg/mL) it also reduced bacterial growth. Samples were analyzed by LC-DAD and LC-DAD-MS. The biflavonoids amentoflavone (**14**), robustaflavone (**15**) and robustaflavone methyl ether (**16**) were the main annotated metabolites of SsEtH_FrAc. From the SsEtH_FrMe fraction, glycosylated derivatives of phenylpropanoids were annotated, including tri-*O*-hexosyl caffeic acid (**1**), hexa-*O*-hexosyl tetra caffeic acid (**2**, **4**, **9**, **11**, **12**), hexa-*O*-hexosyl di-caffeic acid (**3**), tetra-*O*-hexosyl di-caffeic acid (**5**, **7**), hepta-*O*-hexosyl tetra-caffeic acid (**6**, **8**), penta-*O*-hexosyl tri-caffeic acid (**10**) and tri-*O*-hexosyl tetracaffeic acid (**13**). Compounds **6**, **7**, **8**, **9** and **10** were isolated by reverse phase semi-prep scale DAD-HPLC and structurally characterized by NMR. Substance **9** was characterized as the new glycosylated phenylpropanoid derivative bis-1''-*O*-caffeoyl(1''→4)- β -gluco/galacpyranosyl(9→2''')- α -gluco/galactopyranosyl(1'''→3''')-caffeoyl-(2'''→9')- β -gluco/galactopyranoside,

Keywords: Phenylpropanoid, *Leishmania*, biflavonoid, Caffeic acid, antibacterial, antibiofilm

CAPÍTULO 1 - Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Leishmaniose

A leishmaniose é causada por protozoários do gênero *Leishmania*, a qual é uma doença infecciosa transmitida pela picada do vetor flebotomíneo, que afeta principalmente seres humanos e animais domésticos (GONTIJO & CARVALHO, 2003; WHO, 2023). Por apresentar grande impacto na área da saúde pública e ser endêmica em países subdesenvolvidos, a leishmaniose está no grupo das doenças que são conhecidas como doenças negligenciadas incapacitando ou matando milhões de pessoas. Além disso as doenças negligenciadas representam uma necessidade médica importante que permanece não atendida, com indicadores inaceitáveis e investimentos reduzidos em pesquisas, produção de medicamentos e em seu controle, as quais continuam sendo algumas das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo (VALVERDE, 2013; PAHO, 2022).

O responsável pela transmissão dos agentes etiológicos das leishmanioses é o inseto flebotomíneo do gênero *Lutzomvia*, popularmente conhecido como “mosquito palha”, “birigui” ou “cangalhinha” encontrado principalmente nas regiões tropicais e subtropicais. É importante ressaltar que apenas suas fêmeas transmitem os parasitas, por serem hematófagas (BRASIL, 2017; BRASIL, 2022).

Os parasitas pertencentes ao gênero *Leishmania* apresentam em seu ciclo biológico duas formas evolutivas principais, sendo estas as formas promastigotas e amastigotas. Para o hospedeiro vertebrado, a promastigota é a forma infectante. Esta possui flagelo livre, sendo encontrada no tubo digestório do inseto vetor e multiplica-se através de divisão binária simples. Para o hospedeiro invertebrado, a forma infectante é a amastigota, a qual não possui flagelo livre, sendo encontrada nos hospedeiros vertebrados e infecta células do sistema mononuclear fagocitário (BASANO&CAMARGO, 2004; GONTIJO et al., 2012).

No Brasil foram identificadas sete espécies responsáveis pela leishmaniose tegumentar (LT), tendo como principais agentes as espécies: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (V.) guyanensis* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (**Figura 1**) (BRASIL, 2017; BRASIL, 2022). A LT, é uma doença que afeta tanto o homem quanto espécies de animais silvestres e domésticos, possuindo diferentes formas clínicas como a cutânea, mucocutânea e cutânea difusa (BRASIL, 2017; BRASIL, 2022). Além disso, também foram identificadas duas espécies causadoras da leishmania visceral (LV) mundialmente, sendo elas a *Leishmania (L.) donovani* e a *Leishmania. (L.) chagasi*, ambas pertencentes ao complexo

Leishmania donovani, sendo a *L. (L.) chagasi* o principal agente etiológico no Brasil (BRASIL, 2014; BRASIL, 2022).

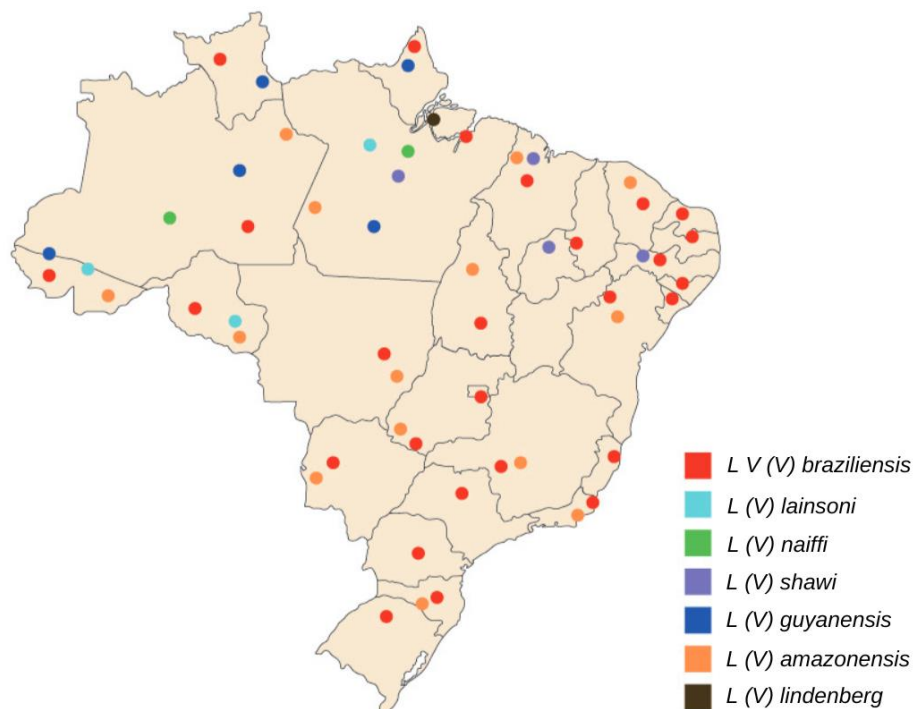


Figura 1. Distribuição de espécies de *Leishmania* no Brasil responsáveis pela transmissão da leishmaniose tegumentar. Fonte: https://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf

As diferentes manifestações clínicas da leishmaniose dão um amplo espectro da infecção e da doença causada pelas diferentes espécies de *Leishmania*, apresentando fenótipos que variam de formas brandas como infecção assintomática, lesões cutâneas únicas localizadas, podendo ter algumas que curam de forma espontânea, e até manifestações crônicas e recorrentes. As leishmanioses cutâneas (LC), mucocutâneas (LM) e leishmanioses cutâneas difusas (LCD) levam a deformações físicas, incapacitando o hospedeiro, além da leishmaniose visceral que é uma doença potencialmente fatal (LV) (GONTIJO & CARVALHO, 2003; BRASIL, 2014; BRASIL, 2017; PAHO, 2021; BRASIL, 2022).

A LC produz lesões únicas ou múltiplas no local da picada do flebotômio. As lesões são ulcerativas com bordas elevadas e fundo granular, geralmente autocurativas e respondem bem ao tratamento. São causadas principalmente por *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis* (BRASIL, 2017; BRASIL, 2022).

A LCD é a forma mais rara e grave de LT, ocorrendo em até 2% dos casos. Caracteriza-se por lesões difusas não ulceradas com formação de placas e múltiplos nódulos por toda a pele onde se encontra um grande número de amastigotas, sendo resultado de uma metástase do

parasita de um sítio de infecção para outro por meio dos vasos linfáticos ou migração de macrófagos infectados. Normalmente ocorre em pacientes com uma resposta imune ineficaz, o que conduz a um estado de anergia imunológica contra o parasita e, conseqüentemente, dificulta o tratamento e ocorrência de recaídas. A espécie responsável por esta forma clínica no Brasil é *L. (L.) amazonensis* (BRASIL, 2017; BRASIL, 2022).

Segundo a Organização Mundial da Saúde, 86% dos casos de LM causada por *L. (V.) brasiliensis* ocorrem na Bolívia, Brasil e Peru. Origina-se da lesão primária (LC) e meses ou anos depois o paciente sofre disseminação metastática de formas amastigotas para a região vestibulo-farínge nasal, causando lesões destrutivas secundárias e afetando mucosas e cartilagens com severas alterações anatômicas e alargamento nasal, popularmente chamado de "nariz de anta" ou "nariz de tapir" (BRASIL, 2017; BRASIL, 2022; PAHO, 2022). Com o tempo o processo ulcerativo pode evoluir atingindo lábios e disseminando pela face do paciente levando a dificuldades de respirar, falar e se alimentar, o que afeta drasticamente a vida do paciente. As recaídas e uma resposta terapêutica ineficiente para esta doença são frequentemente descritas no Brasil (BRASIL, 2017; BRASIL, 2022).

A LV também conhecida como calazar é uma doença sistêmica grave de evolução crônica que atinge principalmente as células do sistema mononuclear fagocitário. Apresenta sinais e sintomas inespecíficos como febre, fadiga, perda de apetite, perda de peso, palidez cutâneo-mucosa e hepatoesplenomegalia, e quando não tratada 90% dos casos chega a óbito. No Brasil a forma de transmissão é por meio da picada de fêmeas de insetos flebotomíneos das espécies *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi* contaminados pelo agente etiológico *L. (L.) chagasi* (BRASIL, 2014; PAHO, 2021; BRASIL, 2022; OPAS, 2023).

Leishmania (Leishmania) amazonensis (Kinetoplastidae: Trypanosomatidae), pertencente ao complexo *Leishmania mexicana*, ocorre predominantemente na Bacia Amazônica, porém também é encontrado em várias regiões do território nacional (Nordeste, Sudeste, Sul e Centro-Oeste). Em Mato Grosso do Sul, Dorval e colaboradores (2006), demonstraram que cerca de 70% do total de pacientes que tiveram o diagnóstico confirmado como leishmaniose tegumentar (LT) apresentaram *L. amazonensis* como espécie causadora.

No período de 2001 a 2021, foi reportado um total de 1.105.545 casos novos de leishmaniose cutânea (LC) e mucocutânea (LM), com uma média anual de 52.645 em 17 países da América Latina. O ano de 2021 apresentou o menor número de casos registrados nesse período. Contudo, houve um aumento de 4,4% de casos em pequenos municípios e também um aumento de 15% de casos ocorridos nas regiões de fronteiras internacionais na América Latina. No Brasil, foram reportados 15.023 novos casos de LC e LM, sendo 95% de LC e 5% de LM.

Do total de casos no Brasil, 19,6% dos casos ocorreram nas regiões de fronteira, sendo a região Norte a que possui o risco de transmissão mais elevado (PAHO, 2022).

Já no contexto da leishmaniose visceral (LV), foram registrados, no mesmo período, 69.665 novos casos em 9 dos 13 países com transmissão de LV da região das Américas, com a média anual de 2.488 casos, sendo que o Brasil em 2021 apresentou 97% dos casos totais. Os dados apontaram que os 5 municípios com o maior número de casos são Fortaleza (Ceará), Belo Horizonte (Minas Gerais), São Luís (Maranhão), Araguaína (Tocantis) e Paraupébas (Pará). O Brasil também registra as cinco maiores taxas de incidência de LV, sendo elas pertencentes aos estados de Tocantis, Roraima e Goiás (PAHO, 2022).

Segundo o Ministério da Saúde no ano de 2020, LT e LV estão disseminadas por todos os estados do Brasil, sendo que a **figura 2** é um mapa que apresenta a ocorrência de LT nos estados brasileiros, onde Amazonas, Pará, Mato Grosso, Bahia e Minas Gerais apresentam o maior número de casos registrados, seguidos de Acre, Ceará, Goiás, Maceió e Rondônia com média ocorrência, e apesar dos demais estados apresentarem um menor índice de casos, é importante ressaltar que não há nenhum estado brasileiro que não tenha registro de LT (BRASIL^a, 2020).

Para LV, os dados são apresentados na **figura 3** revelam que os estados do Pará, Tocantins, Maceió, Piauí, Ceará, Bahia e Minas Gerais apresentam os mais elevados números de casos. De média ocorrência para LV, foi registrado os estados de São Paulo, Pernambuco e Alagoas, seguido pelo número de ocorrências dos estados de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Rio Grande do Norte, Paraíba, Sergipe e Roraima (BRASIL^b, 2020).

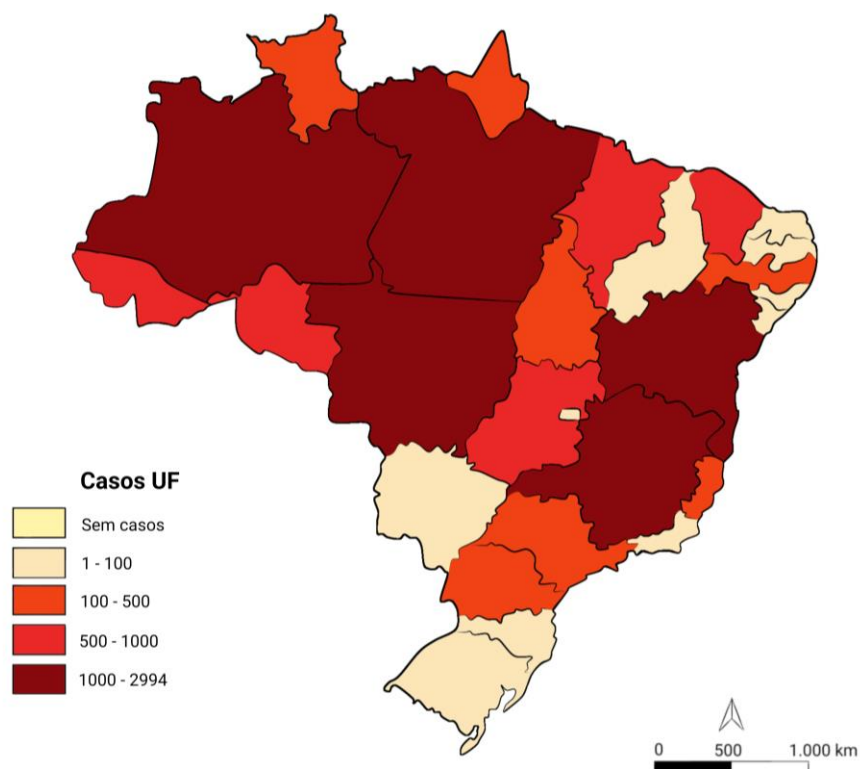


Figura 2. Taxa de incidência de leishmaniose tegumentar por estado (UF). Fonte: SVS/MS, 2020: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/lt/arquivos/lt-graficos-e-mapas.pdf>

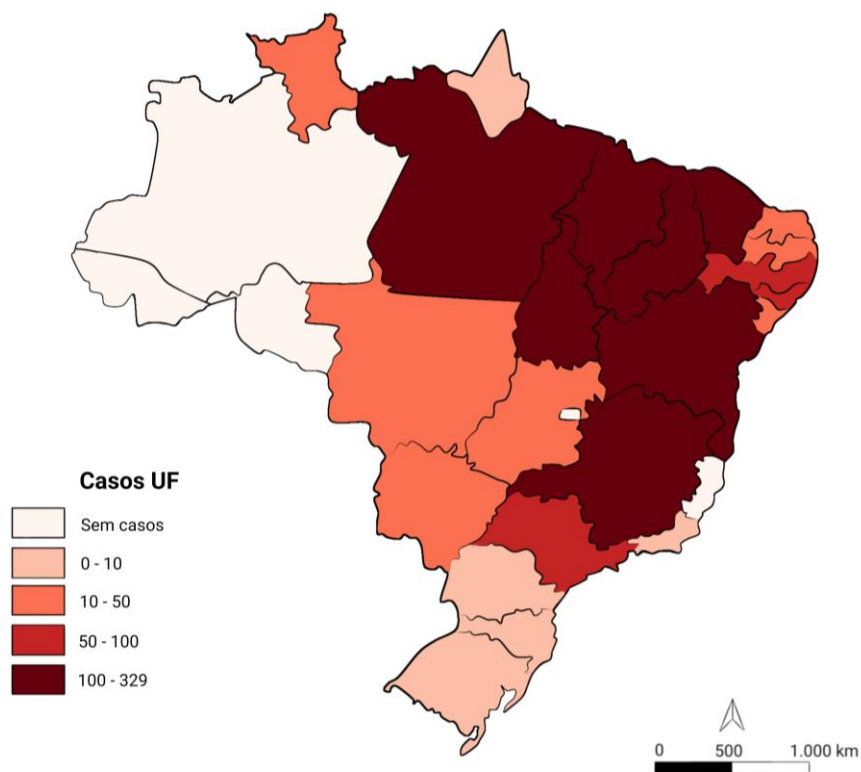


Figura 3. Taxa de incidência de leishmaniose visceral por estado (UF) Fonte: SVS/MS, 2020 : <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/leishmaniose-visceral/arquivos/lv-graficos-e-mapas.pdf>

1.1.1. Tratamento

A quimioterapia existente para leishmaniose apresenta sérias limitações, sendo muitas vezes ineficaz, além de possuir um alto custo e efeitos colaterais graves. A forma de aplicação dos diferentes quimioterápicos existentes são feitas por vias intravenosa ou intramuscular de maneira prolongada, o que dificulta a aderência aos tratamentos pelos pacientes e consequentemente a eficácia da terapia (BERMAN et al., 1985; BERMAN, 1988; LIMA et al., 2007; SAMPAIO et al., 2007; BRASIL, 2014; BASTOS et al., 2016; BRASIL, 2017; PONTE-SUCRE et al., 2017). Os problemas demonstrados geram lacunas no tratamento, levando também a reincidência e resistência dos parasitas (RATH et al., 2003; MCGWIRE & SATOSKAR, 2013; BRASIL, 2014; BRASIL, 2017; PONTE-SUCRE et al., 2017).

Ao longo da história, os antimoniais pentavalentes têm sido utilizados na terapêutica como primeira opção de tratamento, no entanto, estes apresentam diversos efeitos colaterais, além do aumento dos índices de resistência dos parasitas ao tratamento em várias regiões do planeta (PONTE-SUCRE et al., 2017).

O antimoniato de *N*-metil glucamina (Glucantime®), um antimonial que possui como mecanismo de ação a inibição da glicólise e da oxidação dos ácidos graxos, é frequentemente o fármaco de primeira escolha no tratamento. Este fármaco provoca uma diminuição de trifosfato de adenosina (ATP) e trifosfato de guanosina (GTP) do parasita nas formas amastigotas. No entanto, assim como demais medicamentos desta classe, apresenta sérias limitações de uso por demonstrar cardiotoxicidade, hepatotoxicidade e nefrotoxicidade, sendo também contraindicado para gestantes e idosos (RATH et al., 2003; MCGWIRE & SATOSKAR, 2013; BRASIL, 2017).

Alternativamente o tratamento da leishmaniose pode ser realizado com anfotericina B e pentamidina, porém estes fármacos também apresentam efeitos colaterais graves e alta toxicidade renal, hepática e cardíaca. A anfotericina B demonstrou notável potencial antileishmania, atuando diretamente no episterol, precursor do ergosterol na membrana citoplasmática, *in vitro* nas formas promastigotas e *in vivo* nas formas amastigotas de *Leishmania* spp. Com o intuito de amenizar seus efeitos colaterais, a formulação lipossomal foi desenvolvida para ser administrada por via intravenosa e esta não apresenta toxicidade hepática e renal. Esta formulação é registrada na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para o tratamento da LV (BRASIL, 2014; BRASIL, 2017; BRASIL, 2022).

As pentamidinas, diaminas aromáticas usadas no tratamento de LT em áreas endêmicas dos continentes Africano, Americano e Asiático, são encontradas em duas formas

distintas, o di- β -hidroxietano sulfonato (isotionato) e di- β -hidroximetil-sulfonato (mesilato). Os efeitos adversos relatados para essa classe de medicamentos incluem dor, enduração e abscessos estéreis no local da aplicação, náuseas, vômitos, tontura, adinamia, mialgias, cefaleia, hipotensão, lipotímias, síncope, hipoglicemia e hiperglicemia. Além disso, por apresentarem interferência no metabolismo da glicose, o uso desses medicamentos pode desencadear o diabetes mellitus (BRASIL, 2014; BRASIL, 2017; BRASIL, 2022).

Desta maneira, os tratamentos disponíveis para as leishmanioses são ainda limitados, o que torna mais difícil o combate à doença (MONGE-MAILLO & LÓPEZ-VÉLEZ, 2013; BRASIL, 2014; BRASIL, 2017; WHO/PAHO, 2022; BRASIL, 2022). Além disso, é importante ressaltar que as pessoas em situações precárias são as mais afetadas por essa doença, uma vez que são mais propensas a fatores de risco como desnutrição e baixa imunidade (BRASIL, 2014; BRASIL, 2017; WHO/PAHO, 2022). Assim, é urgente a ampliação das pesquisas em busca de novos agentes para o tratamento da leishmaniose que representem novas possibilidades com reduzida toxicidade e custos mais baixos.

1.2. Infecções bacterianas e biofilmes

A descoberta dos antibióticos revolucionou a medicina moderna, possibilitando o tratamento de infecções bacterianas e aumento da expectativa de vida em seres humanos. No entanto, o uso excessivo e inadequado desses medicamentos tem levado ao desenvolvimento de resistência bacteriana, o qual é considerado um grave problema de saúde pública mundial (O'NEILL 2016; EU, 2019; MOHAMMAD & THOMSON, 2019; ONU, 2019; OMS, 2021; MURRAY et al., 2022). Segundo o relatório da Organização Mundial da Saúde, a resistência aos antibióticos é uma das ameaças mais significativas à saúde global, com potencial para tornar infecções comuns em incontroláveis e com grande risco a vida como, por exemplo, pneumonia e infecções do trato urinário (OMS, 2021).

Com base em modelos estatísticos preditivos obtidos, houve uma estimativa de 4,95 milhões mortes em todo mundo associada à resistência antimicrobiana (RAM) em 2019, sendo que deste 1,27 milhões de mortes foram atribuídas à bactérias resistentes a antibióticos (MURRAY et al., 2022). É estimado que, se este cenário continuar a aumentar, até 2050 poderão ocorrer 10 milhões de mortes anuais relacionadas a infecções resistentes a antimicrobianos e com um custo de cerca de US\$ 100 trilhões (KRAKER et al., 2016; O'NEILL, 2016; MURRAY et al., 2022).

A resistência bacteriana a múltiplos fármacos é um problema complexo, sendo uma das principais causas o uso irracional de antibióticos nas áreas médica e agrícola. Muitos médicos prescrevem antibióticos sem ter necessidade ou sem levar em consideração a identificação correta do agente infeccioso, a gravidade da doença ou o tempo de tratamento necessário. Como resultado, as espécies bacterianas tornaram-se resistentes aos antibióticos existentes, levando a uma redução nas opções de tratamento (MOHAMMAD & THOMSON, 2019). Este cenário agravou-se com a terapia para Covid-19 com a utilização de antimicrobianos de amplo espectro, como por exemplo o uso de antibióticos da classe macrolídeos por tempo prolongado (SULTAN et al., 2018; RAMSON et al., 2020).

Outro problema importante é a falta de desenvolvimento de novos antibióticos. A maioria dos antibióticos atualmente disponíveis foi descoberto há décadas e poucos novos fármacos estão sendo lançados no mercado. Isso se deve, em parte, à complexidade do processo de desenvolvimento de novos medicamentos, mas também devido à falta de incentivos financeiros para essa área nas indústrias farmacêuticas, o que está relacionado com a rapidez do desenvolvimento de resistência aos antibióticos e seu impacto negativo no faturamento das indústrias farmacêuticas (SILVER, 2011; VENTOLA, 2015; O'NEILL, 2016; EU, 2019; MOHAMMAD & THOMSON, 2019; ONU, 2019).

Os relatórios da Organização das Nações Unidas e da União Europeia, por exemplo, abordaram a crescente preocupação com a resistência antimicrobiana e apontaram a necessidade de estabelecer objetivos claros para melhorar essa situação. Uma das estratégias propostas nesses relatórios é o investimento e incentivo ao desenvolvimento de novos antibióticos, que possibilitaria tratamentos mais específicos e direcionados para infecções bacterianas e com menor incidência de efeitos colaterais indesejados. Além disso, novos antibióticos podem ser projetados para serem mais seguros e eficazes do que os existentes, melhorando os resultados do tratamento (OMS, 2021; EU, 2019).

As principais bactérias associadas à resistência e elevada incidência de mortes são *Escherichia coli*, seguido por *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella entérica*, sendo que apenas *S. aureus* foi responsável por 100 mil mortes no ano de 2019 (SILVA & LINCOPAN, 2012; CANTAS et al., 2013; ECONOMOU & GOUSIA, 2015; OTO, 2018; OMS, 2021; MURRAY et al., 2022).

A bactéria *S. aureus*, uma bactéria gram-positiva de formato esférico, e que faz parte da microbiota humana, é frequentemente encontrada no trato respiratório superior e na pele. Embora o *S. aureus* geralmente atue como um comensal da microbiota humana, ela também

pode se tornar um patógeno oportunista, causando uma variedade de infecções potencialmente graves (MOHAMMAD & THOMSON, 2019; VESTBY et al., 2020; CUSSOLIM, et al., 2021; OMS, 2021). Além disso, é importante ressaltar não somente a necessidade de desenvolvimento de novas estratégias para o tratamento de infecções por *S. aureus*, como também no desenvolvimento de novos antibióticos baseados em estudos de suscetibilidade que cepas resistentes apresentam devido a seus mecanismos de defesa adquiridos, uma vez que essa bactéria é capaz de desenvolver resistência aos antibióticos com grande facilidade, sendo considerado um patógeno prioritário (CUSSOLIM, et al., 2021; OMS, 2021).

No ambiente hospitalar, *S. aureus* pode se tornar resistente a múltiplos antibióticos, além do risco de formação de biofilmes podendo causar infecções graves e recorrentes em pacientes hospitalizados, especialmente para aqueles que já estão debilitados ou imunocomprometidos (CASCIOFERRO et al., 2021; CUSSOLIM, et al., 2021; OMS, 2021).

Os biofilmes são complexas comunidades microbianas que se fixam a superfícies e produzem uma matriz extracelular de polissacarídeos, proteínas e DNA. Essa matriz protege as bactérias de fatores externos, como antibióticos e o sistema imunológico, ocorrendo com diversas bactérias como *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* e outras (TRENTIN, 2013; SHOJI & CHEN, 2020; CHENG et al., 2021; SAUER et al., 2022; ZHAO et al., 2023). A proteção proporcionada às bactérias pelos biofilmes torna-os muito resistentes e difíceis de serem erradicados, contribuindo para o estabelecimento, manutenção e recorrência da infecção por mais tempo (TRENTIN, 2013; WOLFMEIER, 2018; VERDEROSA, 2019; SHOJI & CHEN, 2020).

A resistência bacteriana a antibióticos tem sido amplamente relacionada com a formação dos biofilmes, tendo aproximadamente 80% das infecções associadas a biofilmes bacterianos, o que resulta em um grande desafio tendo em vista que os tratamentos acabam se tornando cada vez menos acessíveis, com alto custo e complexidade de realização. Isto é devido ao fato de que os atuais antibióticos utilizados na terapêutica não possuem a capacidade de penetrar nos biofilmes e atacar as bactérias presentes, sendo necessário o uso de antibióticos mais específicos e, muitas vezes, um período de internação maior (TRENTIN, 2013; ALLISSON et al., 2017; DESMOND et al., 2018; SHARMA et al., 2018). Desta maneira, os biofilmes podem atuar como reservatórios de bactérias e são considerados as principais causas de persistência das infecções, incluindo as respiratórias causadas por *Haemophilus influenzae* e infecções na cavidade oral causadas por *S. aureus* (GREENE et al., 2016; ZACCHINO et al., 2017; KHAN et al., 2021).

Estudos associaram a patogenicidade de *S. aureus* à sua capacidade de formação de biofilme, observando que os biofilmes de *S. aureus* são resistentes aos antibióticos e ao sistema imunológico do hospedeiro, o que dificulta o tratamento das infecções causadas por essa bactéria (OTO, 2018; CHENG et al., 2021; JEAN-PIERRE et al., 2022). Entre as principais razões pelas quais *S. aureus* é capaz de formar biofilmes, está na sua capacidade de aderir a superfícies. Uma variedade de proteínas e polissacarídeos gerados pela bactéria, ajudam a sustentar suas células à superfície e a formar uma camada protetora extracelular. Essa aderência é mediada por uma variedade de fatores de virulência, como proteínas específicas presente em sua parede celular (YAO et al., 2005; OTO, 2018; ZHAO et al., 2020; CHENG et al., 2021).

A busca por novas terapias antimicrobianas capazes de combater as bactérias e seus biofilmes se torna imprescindível devido a gravidade das infecções bacterianas, resistência bacteriana aos antibióticos e a queda no número de novos fármacos antibacterianos lançados no mercado (OMS, 2021). Diante disto, nos últimos anos, a busca por novos antibióticos a partir de produtos naturais tem se intensificado graças à diversidade química e biológica desses recursos. A maioria dos antibióticos atualmente utilizados na prática clínica é derivada de produtos naturais, como a penicilina e a eritromicina (TRETIN, 2011; NEWMAN & CRAGG, 2020). Além disso, um estudo recente identificou que aproximadamente 48% dos antibióticos aprovados para uso clínico no período de 1981 a 2019 são produtos naturais ou derivados desses, o que demonstra a importância dessa fonte para a descoberta de novos antibacterianos (NEWMAN & CRAGG, 2020).

1.3. Produtos naturais como fontes para a busca de compostos bioativos

Desde a época ancestral a humanidade estabeleceu relações muito particulares com as plantas utilizando-as como alimento e elemento de cura para suas doenças e ferimentos, construindo, por meio de técnicas e práticas, uma sabedoria popular que formou as bases para a etnofarmacologia (SOBRINHO et al., 2016). Ainda hoje diversos países subdesenvolvidos dependem de medicamentos de fontes naturais, sendo estes, às vezes, a única alternativa de tratamento para diversas doenças (DIAS et al., 2012; BEKONO et al., 2020; NAVEED et al., 2020; STONE et al., 2021).

Como estratégia para busca de novos tratamentos medicinais pode-se utilizar uma abordagem etnofarmacológica, na qual combinamos conhecimento popular sobre plantas medicinais adquirido de forma empírica durante milênios com estudos químicos e farmacológicos. Desta forma, o uso tradicional funciona como pré-triagem quanto à

propriedade terapêutica diante de uma infinidade de fontes naturais terapêuticas ainda desconhecidas (ELISABETSKY, 2003; BRUHN & RIVIER, 2019; TAYLOR & WERNEKE, 2019). Como exemplo é possível citar o fitofármaco oriundo da árvore *Salix alba*, conhecida popularmente como salgueiro-branco, no qual o chá da casca é empregado para dores e afecções de origem inflamatória, sendo isolado e purificado a partir de seu extrato o ácido salicílico que, posteriormente, foi estruturalmente modificado por síntese para dar origem ao medicamento ácido acetilsalicílico, princípio ativo da aspirina (DESBOROUGH & KEELING, 2017). Ainda no contexto do uso de produtos naturais e seus derivados destaca-se o fitoterápico *Ginkgo biloba*, já utilizado desde a antiguidade na medicina tradicional chinesa, por ser rico em compostos fenólicos e comumente empregado na prevenção de transtornos circulatórios e cardiovasculares (MAHMOUDIAN-SANI et al., 2017).

Atualmente, há uma grande quantidade de fármacos que são produtos naturais ou derivados do mesmo (NEWMAN & CRAGG, 2020; STONE et al., 2021), como podemos observar nos dados sumarizados na **tabela 1**. Nessa tabela, contém exemplos descritos na literatura de medicamentos importantes para o câncer como vincristina, vimblastina e paclitaxel, bem como antibióticos, antifúngicos, antiparasitários, antivirais e antidiabéticos oriundos ou inspirados em produtos naturais entre os anos de 1981 e 2019 levantados por Newman e Cragg (2020).

No levantamento realizado por Newman e Cragg (2020), vale ressaltar a quantidade de antibióticos e anticancerígenos de origem em produtos naturais não modificados (n) e os derivados de um produto natural com modificações (semissíntese - dn) comparado com os obtidos por síntese (s), reafirmando a importância dos produtos naturais para o desenvolvimento de fármacos (**Tabela 1**). Outro ponto interessante, é o baixo número de novos fármacos antiparasitários de origem natural e sintetizados por indústrias farmacêuticas (**Tabela 1**). Apesar desse baixo índice e diante da rica biodiversidade brasileira, destacamos o grande potencial dos produtos naturais ainda não explorados nesta área, além de demonstrar a falta de interesse das indústrias farmacêuticas em investimentos e desenvolvimento de novos fármacos direcionados para doenças negligenciadas.

Tabela 1. Fármacos inspirados em produtos naturais (origem em produtos naturais não modificados (n), derivado de um produto natural com modificações (semissíntese - dn) ou por síntese total com farmacóforo baseado em um produto natural (s)).

Classe	Quantidade por Fonte			Exemplo de Fármacos
	Produto Natural (n)	Derivado Natural (dn)	Síntese (s)	
Antibiótico	11	78	1	Meropenem (dn), Tazobactam (dn), Cefepima (dn)
Anticâncer	18	43	13	Vincristina(n), Vimblastina(n), Paclitaxel(n)
Antidiabético	1	8	1	Acarbose(dn)
Antifúngico	-	3	-	Caspofungina (dn), Micafungina (dn)
Antiviral	-	6	26	Lamivudina(s), Abacavir(s), Tenofovir(s)
Antiparasitário	2	7	3	Cloroquina(s), Ivermectina(n)

Adaptado de NEWMAN & CRAGG (2020).

As plantas possuem uma ampla variedade de metabólitos secundários bioativos, sendo que na literatura já estão descritas diversas classes de metabólitos secundários como alcaloides, terpenoides, flavonoides, cumarinas, fenilpropanoides, poliacetilenos, xantonas, quinonas, esteroides, lignanas e taninos (BEKONO et al., 2020; NAVEED et al., 2020). Estes metabólitos vêm influenciando e impactando na descoberta e desenvolvimento de novos fármacos e candidatos (VILLARREAL-IBARRA et al., 2015; CHANG et al., 2017; TIRLONI et al., 2017; CHEN et al., 2020).

1.3.1. Produtos naturais como fonte promissora de novos antiparasitários

Diversos estudos mostram o alto potencial de produtos naturais para a busca de bioativos contra doenças parasitárias (CORTES et al., 2020; GERVAZONI et al., 2020; ADNAN et al., 2021; SAKYI et al., 2021; GOURI et al., 2022). De acordo com levantamento

de agentes terapêuticos aprovados em todo mundo para uso clínico no período de 1981 a 2019, 60% dos antiparasitários são produtos naturais ou inspirados nestes (NEWMAN & CRAGG, 2020). Uma grande variedade de classes de metabólitos secundários como, por exemplo, alcaloides, terpenoides e compostos fenólicos foram isolados e se mostraram promissores como antiparasitário (CORTES et al., 2020; GERVAZONI et al., 2020; ADNAN et al., 2021; SAKYI et al., 2021; GOURI et al., 2022).

Em uma recente revisão realizada por Gouri e colaboradores (2020), diferentes espécies vegetais foram descritas como alvos de estudos para a busca de substâncias com atividade antileishmania promissora. Algumas dessas substâncias encontram-se sumarizadas na **tabela 2**.

A **tabela 2** sumariza dados relativos as atividades de vários produtos naturais contra parasitos de importância clínica. Enzimas como sintetases e redutases são importantes para o metabolismo de protozoário do gênero *Leishmania*. Os principais resultados mostram que quatro compostos, tomatina, conessina, uvaol e betulina, possuem valores de IC₅₀ variando de 11,23 a 18,02 µM contra as enzimas tripanotiona redutase e tripanotiona sintetase. Além disso, os inibidores da topoisomerase I e II como a camptotecina, nirantina e ácido dihidrobetulínico, além de dois flavonoides quercetina e luteolina mostraram-se promissores para atividade antileishmania. A tabela também ilustra vários compostos derivados de plantas que demonstraram inibir alvos específicos de medicamentos envolvidos na biologia do parasita, como inibidores de quinases, mitocondrial e da helicase, sendo que este último, o carvacrol (monoterpeno) e a vanilina (aldeído fenólico) apresentaram resultados promissores com IC₅₀ de 0,29-0,6 e 0,1-0,18 µM para as formas promastigotas e amastigotas, respectivamente.

Tabela 2. Plantas medicinais e seus compostos bioativos

Alvo	Planta de origem	Agente Anti- <i>leishmania</i>	Classe dos compostos	IC ₅₀ Valores dos componentes (<i>In Vitro</i>)		% de inibição (<i>In vivo</i>)	Tipo de <i>Leishmania</i> spp.	Referência
				Promastigota (µm)	Amastigota (µm)			
	<i>Camptotheca acuminata</i>	Camptotecina	Alcaloide	1,12	0,03	-	<i>L. infantum</i>	BALAN et al., 2013
Inibidores de topoisomerase	<i>Phyllanthus amarus</i>	Nirantina	Lignana	10	25	Camundongos BALB (5 mg/kg/dia) 77% de redução da carga parasitária do fígado e 76% de redução da carga parasitária esplênica	<i>L. donovani</i>	CHOWDHURY. et al., 2012
	<i>Bacopa monniera</i>	Ácido dihidrobetulinico	Triterpeno	2,6	4,1	-	<i>L. donovani</i>	GANGULY. et al., 2009

Inibidores de topoisomerase II	<i>Fagopyrum esculentum</i>	Quercetina	Flavonoide	45,5	10,5	Hamsters (14 mg/kg) reduziram a carga parasitária do baço em 80%	<i>L. donovani</i>	MITTRA et al., 2000
	<i>Vitex negro</i>	Luteolina	Flavonoide	12,5	3,12	Hamsters (3,5 mg/kg) reduziram a carga parasitária esplênica em 90%		
Inibidores de tripanotona	<i>Solanum spp.</i>	Tomatina	Glicoalcaloide	18,02 ± 0,35	-	-	<i>L. tropica</i>	SAUDAGAR et al., 2011
	<i>Holarrhena spp</i>	Conessina	Alcaloide	13,42 ± 0,75	-	-		
	<i>Olea europaea</i>	Uvaol	Triterpeno	11,23 ± 0,48	-	-		
	<i>Betula spp</i>	Betulina		11,71 ± 0,56	-	-		
Inibidor da pteridina redutase 1	<i>Piper longum</i>	Piperina		3,15	1,1	-	<i>L. donovani</i>	RAJ et al., 2020

Inibidores de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs)	<i>Glycine max</i>	Genisteína	Isoflavonoide	9,9	-	-	<i>L. donovani</i>	RAJ et al., 2019
	<i>Passiflora caerulea</i>	Crisina	Flavonoide	13	-	-		
Inibidor da proteína quinase C (PKC)	<i>Withania somnifera</i>	Witaferina A	Esteróide	12,5	9,5	-	<i>L. donovani</i>	SHARMA et al., 2009
	<i>Tribulus terrestris</i>	Harmalina	Alcaloide	116,8	1,16	-	<i>L. infantum</i>	SMIRLIS et al., 2014
Inibidores mitocondrial	<i>Berberis aristata</i>	Berberina	Alcaloide	7,1	-	No hamster, a carga parasitária foi reduzida em 48 e 60% em níveis de dose de 50 e 100 mg/kg/dia, respectivamente	<i>L. donovani</i>	SAHA et al., 2009
	<i>Matricaria camomila</i>	α -bisabolol	Sesquiterpeno	22,6 $\pm$ 1,6	25,2 $\pm$ 2,9	-	<i>L. tropica</i>	CORPAS-LOPÉS et al., 2016
					33,7 $\pm$ 8,1		<i>L. major</i>	
Inibidor da helicase	-	Vanilina	Derivado fenólico	0,6	0,1	-	<i>L. donovani</i>	PANDEY et al., 2019
	-	Carvacrol	Monoterpeno	0,29	0,18	-		

Adaptado de GOURI et al., 2022

Assim sendo, os produtos naturais podem contribuir com o desenvolvimento de novas estratégias de tratamentos para diversas patologias, incluindo a leishmaniose, podendo também servir como inspiração para fármacos sintéticos (CORTES et al., 2020; GERVAZONI et al., 2020; ADNAN et al., 2021; SAKYI et al., 2021; GOURI et al., 2022). Desta maneira, destacamos aqui a importância da ampliação de pesquisas em busca de novos candidatos a fármacos a partir de produtos naturais, uma vez que estes tem demonstrado um elevado potencial para o desenvolvimento desses novos candidatos a fármacos e busca de substâncias bioativas (ELISABETSKY 2003; ALBUQUERQUE et al., 2006; CALIXTO, 2019; GERVAZONI et al., 2020; SAKYI et al., 2021; GOURI et al., 2022).

1.3.2. Produtos naturais como fonte promissora de novos antibióticos

As plantas são conhecidas há séculos por sua capacidade de produzir compostos com propriedades antimicrobianas, como resultado de seu metabolismo secundário (LIU et al., 2017; SALEHI et al., 2019 ALIBI et al., 2021). Estudos realizados em diferentes países, incluindo Brasil, Cuba, Índia e México, têm se dedicado a investigar a atividade antimicrobiana de substâncias extraídas de plantas nativas. Esses países possuem uma rica tradição no uso de plantas medicinais como fonte de compostos antibacterianos e antifúngicos (TRENTIN et al., 2011; TARIQ et al., 2019; RAHIMPOUR et al., 2021; MARTINEZ et al., 2022; RODRIGUES-FERREIRA et al., 2022).

Stan e colaboradores (2021) descreveram que os últimos promissores compostos naturais usados no combate às bactérias incluem, por exemplo, substâncias de extratos vegetais, óleos essenciais, pequenos peptídeos antimicrobianos de origem animal e bacteriocinas. Além disso, diversas classes de produtos naturais tem sido alvos para a busca de compostos antibacterianos como triterpenoides, alcaloides, fenóis e flavonoides (STAN et al., 2021). Deste modo, programas de triagem podem encontrar compostos promissores para o desenvolvimento de novos antibióticos produzidas a partir de plantas medicinais (AHMAD & BEG, 2000; DUARTE, 2006; TRENTIN et al., 2011; FERREIRA et al., 2020).

A curcumina, um polifenol comum em açafrão (*Curcuma longa*), possui uma ampla gama de propriedades biológicas e farmacológicas já descritas. Dentre essas atividades, está sua ação contra vários patógenos de importância clínica como *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA), na qual a curcumina apresentou CIM de 125-250 µg/mL. Além disso, a curcumina também apresentou efeito sinérgico com vários antibióticos (oxacilina, ampicilina, ciprofloxacina, gentamicina, amicacina, polimixina B e norfloxacina) contra MRSA,

apresentando melhor resultado para a oxacilina, sendo observada uma redução da contagem bacteriana abaixo do limite detectável (MUN et al., 2013).

A atividade antibacteriana sinérgica entre os óleos essenciais de coentro (*Coriandrum sativum*) e cominho (*Cuminum cyminum*) também foram descritos para a atividade antibacteriana. As análises químicas dessas amostras revelaram a presença de linalol e ácido *p*-cumárico nos óleos das sementes de coentro e cominho, respectivamente, sendo que essas substâncias foram determinadas como antibacterianas e com ação sinérgica (BAG & CHATTOPADHYAY, 2015).

Os óleos essenciais extraídos de *Origanum vulgare* (orégano) possuem propriedades antimicrobianas. Suas propriedades bioativas e a composição desse óleo essencial podem variar dependendo da área geográfica, espécie ou época de coleta. A propriedade antibacteriana do óleo essencial de orégano foi correlacionada a terpenoides e sua ação sobre a membrana celular das bactérias (SIMIRGIOTIS et al., 2020).

O carvacrol e o timol são os compostos aromáticos e voláteis também presentes no óleo essencial de orégano e são descritos como componentes importantes para suas propriedades antimicrobianas. Estes compostos correspondem a 75% da composição relativa do óleo essencial de orégano e são particularmente atraentes para atuarem nas estruturas da membrana celular das bactérias devido à sua natureza lipofílica. Além disso, esses compostos possuem capacidade de dissolver a membrana externa das bactérias e liberar os componentes lipopolissacarídeos, o que aumenta a permeabilidade da adenosina trifosfato na membrana citoplasmática e, conseqüentemente, altera a permeabilidade passiva da membrana bacteriana (SIMIRGIOTIS et al., 2020).

A avaliação de 45 extratos aquosos obtidos de plantas brasileiras da região Caatinga contra *S. epidermidis* apresentaram resultados promissores na inibição da formação de biofilme. Os extratos aquosos da casca do caule de *Commiphora leptophloeos* (Burseraceae) e dos frutos de *Senna macranthera* (Fabaceae) inibiram a formação de biofilme em 32,7% e 43,3% na concentração de 0,4 mg/mL, respectivamente. As análises químicas dos extratos ativos exibiram a presença de polifenóis, cumarinas, esteroides e terpenos (TRENTIN et al., 2011).

Os extratos aquosos de *M. urundeuva*, *Sideroxylon obtusifolium* e *Croton blanchetianus* demonstraram atividade bactericida contra bactérias gram-positivas *Listeria monocytogenes* e *S. aureus* em concentração inibitória mínima variando de 0,5 a 2,0 mg/mL (FERREIRA et al., 2020). O extrato metanólico do rizoma de *Simaba ferruginea* demonstrou ação antibacteriana contra *S. aureus* (CIM = 12,5 µg/mL) e *E. coli* (CIM = 25 µg/mL). O alcaloide cantin-6-ona foi isolado deste extrato e apresentou potente atividade fungicida *in vitro* contra espécies

cl clinicamente importantes *Aspergillus niger* e *C. albicans* em intervalos de CFM variando de 3,12 a 25 µg/mL (GAZONI et al., 2018).

A partir do extrato metanol e água 7:3 (v/v) de *Lavandula coronopifolia*, foram anotados 46 compostos incluindo, flavonoides e seus glicosídeos e biflavonoides. Esse extrato apresentou inibição da formação de biofilme de 17 a 38% em diferentes valores de CIM (0,5–0,125 mg/mL) de *P. aeruginosa*. (EMAM et al, 2021).

O biflavonoide da 4''-O-metilagatisflavona, isolado a partir do extrato metanólico das folhas de *Campylospermum flavum* (Ochnaceae), apresentou zonas de inibição de 8, 25, 22 e 21 mm para *S. aureus*, *C. albicans*, *B. subtilis* e *E. coli*, respectivamente, em teste de difusão em ágar (LIKHITWITAYAWUID et al., 2005). O dímero de flavona 3"-epidipisina, isolado das partes aéreas de *Ormocarpum trichocarpum*, também apresentou potencial antibacteriano contra *S. aureus* com valores de IC₅₀ de 4,0 µM (CHUKWUJEKWU et al., 2012).

A partir de *Garcinia travancorica*, o biflavonoide glicosilado fukugisideo foi isolado e apresentou inibição 79 a 96% da formação do biofilme de *Streptococcus pyogenes* (NANDU et al., 2018).

O extrato acetado de etila de *Selaginella covoluta* apresentou atividade antibacteriana contra cepas *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *E. coli*, *S. enterica*, *Serratia marcescens*, *Shigella flexneri* e *S. aureus* com MIC na faixa de 0,39-1,56 mg/mL. No entanto, os resultados foram mais promissores para *E. faecalis*, *E. coli* e *S. marcescens* com valores de MIC de 0,39 mg/mL para essa fração acetato de etila (MACÊDO et al., 2018).

As selaginellinas, isoladas do extrato acetato de etila da espécie *Selaginella pulvinata*, apresentaram atividades antifúngica e antibacteriana. As substâncias selaginellinas: selaginellina, selaginella A e selaginellina B apresentaram atividade contra *S. aureus* com IC₅₀ de 4,9, 1,2 e 1,2 µg /mL respectivamente, e contra *C. albicans* a selaginellina teve destaque com IC₅₀ de 3,1 µg /mL (CAO et al, 2010).

Desta maneira, os apontamentos apresentados aqui demonstram o potencial da aplicação de diferentes espécies para a busca e determinação de novos agentes contra bactérias patogênicas. Entretanto, apesar de alguns estudos indicarem o potencial antibacteriano das espécies do gênero *Selaginella*, até o presente momento escassos estudos quanto ao potencial antibacteriano e antibiofilme foram publicados, incluindo a *Selaginella. sellowii* que é o alvo de estudo aqui neste trabalho.

1.4. Gênero *Selaginella*

O gênero *Selaginella*, pertencente à família Selaginellaceae, é constituído por 700 espécies com distribuição cosmopolita, sendo licofitas que constituem um grupo monofilético e recebem grande destaque devido ao elevado poder de adaptação a diferentes ambientes (BANKS, 2009). Embora mais abundante em regiões tropicais, as espécies de *Selaginella* também ocorrerem regiões desérticas como, por exemplo, *Selaginella lepidophylla* e *Selaginella sartorii*), bem como em regiões montanhosas e frias (tundra e círculo ártico), como as espécies *Selaginella selaginoides* e *Selaginella rupestris* (TRYON & TRYON, 1982; JUDD, et al., 1999).

No Brasil, há a ocorrência de 46 espécies de *Selaginella* (ALSTON et al., 1981; STAFFORD, 1991; DE SÁ et al., 2012), sendo que 31 dessas espécies ocorrem na Bacia Amazônica (TRYON & TRYON, 1982) e 6 espécies podem ser encontradas no Pantanal (*Selaginella sellowii*, *Selaginella sulcata*, *Selaginella marginata*, *Selaginella chiquitana*, *Selaginella erythropus* e *Selaginella convoluta*) (ASSIS & LABIAK, 2008).

1.4.1. Propriedades químicas e medicinais do gênero *Selaginella*

Os estudos químicos de espécies de *Selaginella* descrevem a ocorrência de diferentes classes de metabólitos como selaginelinas, flavonoides, biflavonoides, saponinas esteroidais, lignanas, alcaloides e compostos fenólicos de baixo peso molecular (LIN et al., 1994; SETYAWAN, 2011; CHIKMAWATI et al., 1994; WANG et al., 2009; SETYAWAN, 2011; CHIKMAWATI et al., 2012; WANG et al., 2012; 2009; LI et al., 2020; CHANDRAN et al., CHANDRAN et al., 2014; ADNAN et al., 2014; LI et al., 2020; ADNAN et al., 2021; GOOSSENS et al., 2021), conforme pode ser observado no gráfico ilustrado na **Figura 4**. Este gráfico foi construído a partir de levantamentos bibliográficos realizados no banco de dados *Chemical Abstract*.

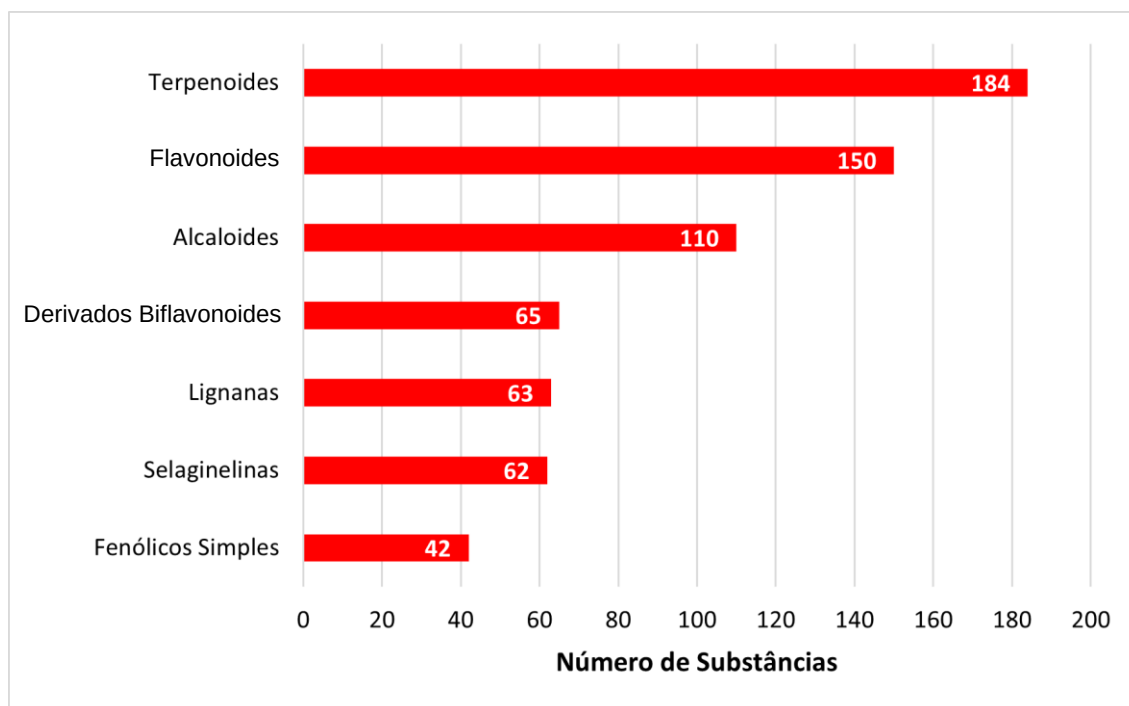


Figura 4. Ocorrência dos metabólitos secundários identificados em estudos fitoquímicos realizados com espécies do gênero *Selaginella*. Levantamento bibliográfico realizado no banco de dados *Chemical Abstract* até o ano de 2023.

Dentre os metabólitos secundários presentes no gênero *Selaginella*, os biflavonoides e as selaginellinas são considerados os mais importantes. Os biflavonoides são produzidos a partir de dímeros de unidades flavonas e/ou flavanonas apresentando geralmente um padrão de oxigenação em C-5, C-7 e C-4' (**Figura 5 e 6**) (ZHANG et al., 2011; WANG et al., 2015). Essa dimerização entre as unidades flavonoidicas pode ser através de ligações do tipo éter (C-O-C) ou carbono-carbono (C-C) (WANG et al., 2015; ZHANG et al., 2011), como os biflavonoides dos tipos hinokiflavona (C-O-C) (**Figura 5**) e amentoflavona (C-C) (**Figura 6**).

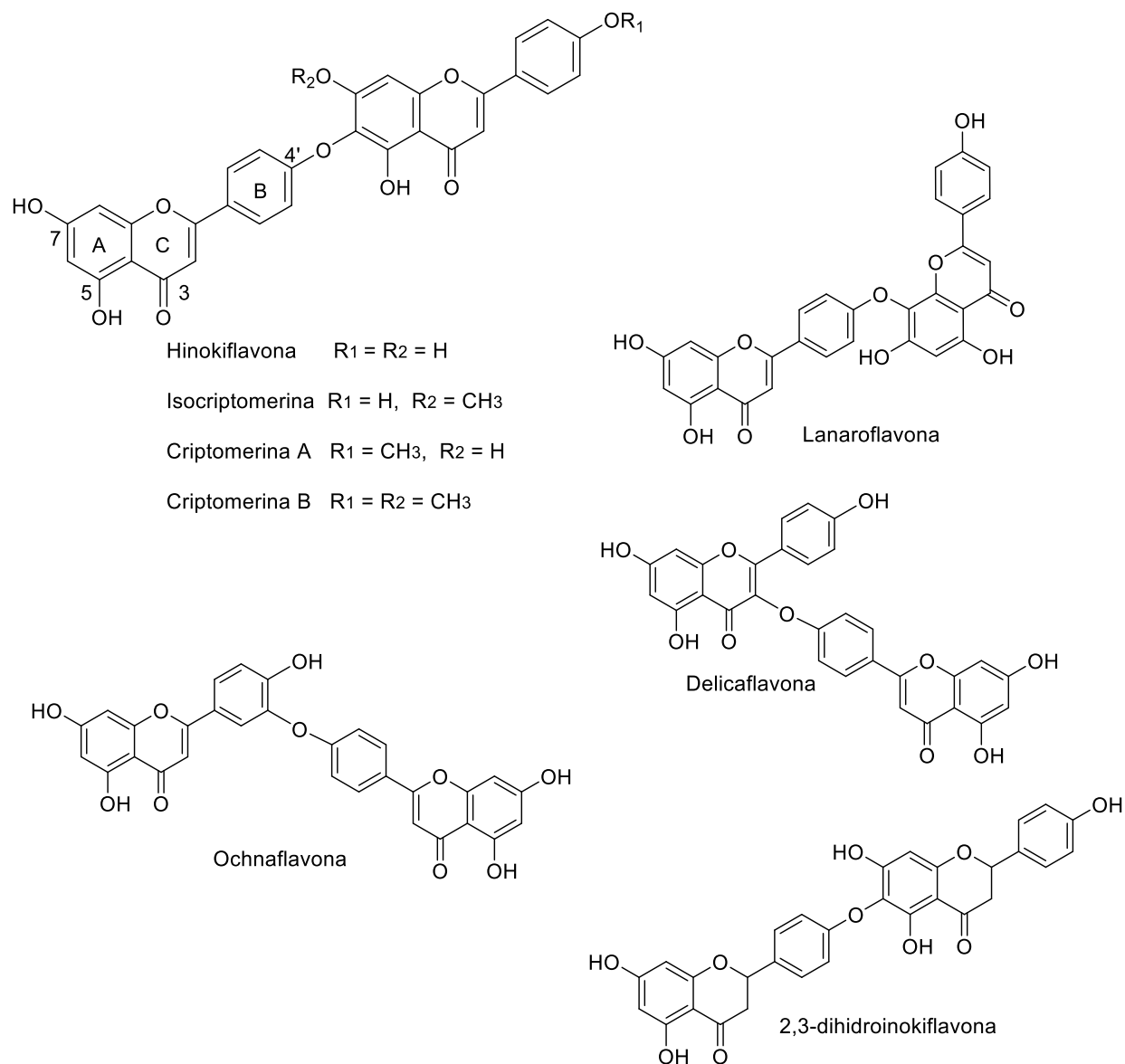


Figura 5. Biflavanoides com ligações do tipo C-O-C isolados de espécies do gênero *Selaginella*.

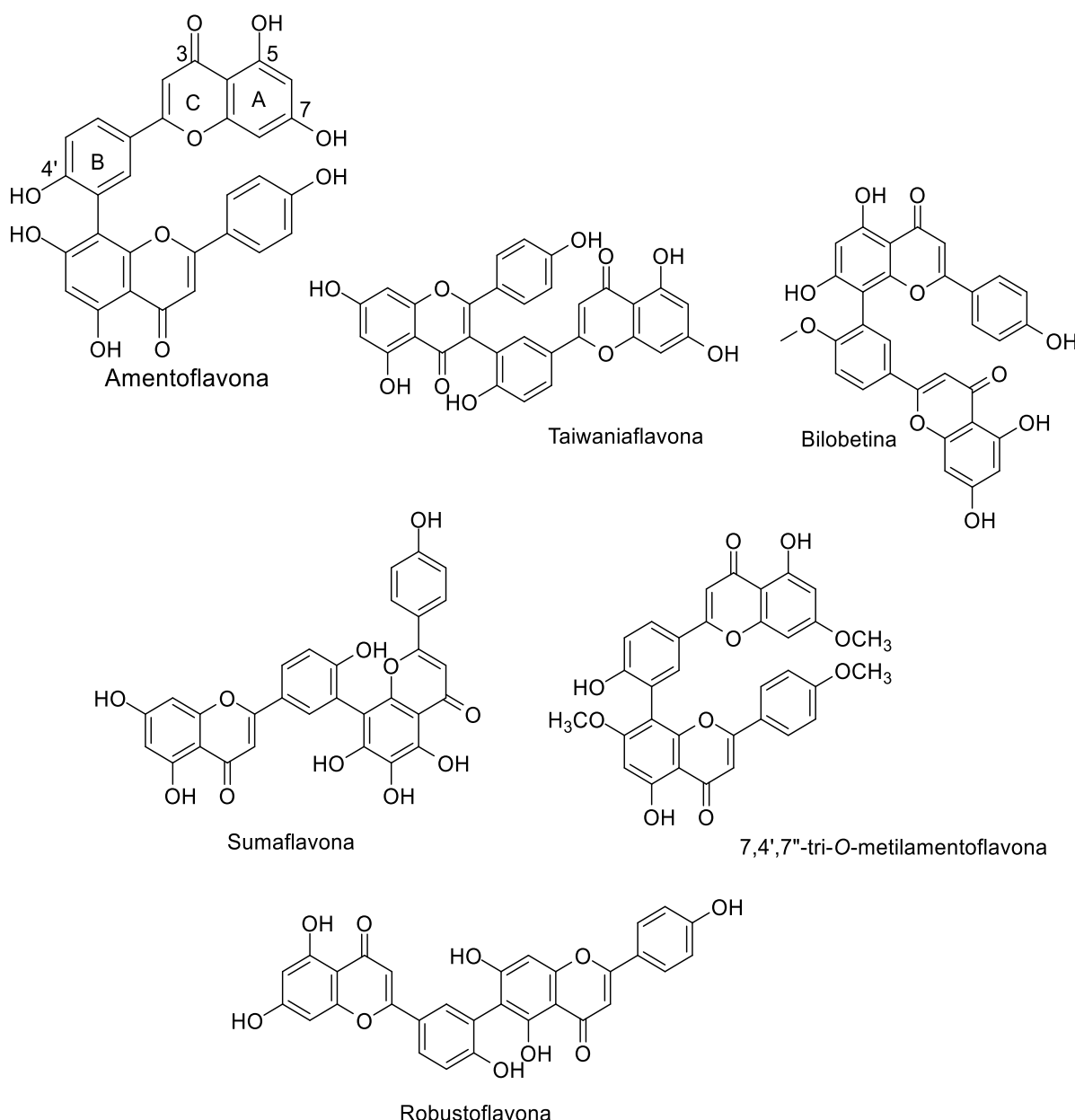


Figura 6. Biflavonoides com ligações do tipo C-C isolados de espécies do gênero *Selaginella*.

Os flavonoides dimerizados, conhecidos como biflavonoides, são restritos na natureza, podendo ser encontrados em frutos, vegetais e demais partes de plantas especializadas como, por exemplo, em *Ginkgo biloba*. Esta espécie é utilizada na terapêutica como um fitoterápico amplamente utilizado em diferentes países e em sua composição química constam biflavonoides e terpenos. Entre as propriedades medicinais de *G. biloba* se destacam o melhoramento do fluxo sanguíneo periférico e central, a redução de vaso-espasmos, redução da viscosidade do plasma, atividade antioxidante, inibição dos fatores de ativação de plaquetas e da apoptose (THIAGARAJAN et al., YOU et al., 2013).

Uma ampla variedade de espécies de *Selaginella* tem sido utilizada pela população de forma empírica para problemas respiratórios, infecções em geral, problemas digestivos, antiespasmódico e analgésico (GONTIJO et al., 2017; ADNAN et al., 2021). Na medicina popular, espécies como *Selaginella bryopteris*, *Selaginella doederleinii*, *Selaginella labordei*, *Selaginella moellendorffii*, *Selaginella sinensis*, *Selaginella tamariscina* são empregadas nos tratamentos de gonorreia, icterícia, hepatite, câncer, inflamação e sangramento (GONTIJO et al., 2017). A partir destas espécies, alguns biflavonoides já foram isolados (KUNERT et al., 2008; CHANDRAN et al., 2014; RIZK et al., 2014; LI et al., 2020; ADNAN et al., 2021; GOOSSENS et al., 2021).

O gênero *Selaginella* tem sido objeto de muitos estudos científicos devido à presença de compostos bioativos. Vários desses estudos têm descrito atividades biológicas de extratos e compostos isolados como antioxidante, anticâncer, animetastática, antiparasitária, antibacteriana, antifúngica, anti-inflamatória, antidiabética, antiviral e outras (MA et al., 2001; KUNERT et al., 2008; NALLAIYAN & DORAISWAMY, 2011; ZHENG et al., 2011; WANG et al., 2012; RIZK et al., 2014; VERMA et al., 2015; WANG, et al., 2015; GANG et al., 2017; PASWAN et al., 2017).

Os extratos hidroetanólicos enriquecidos com flavonoides e biflavonoides de *S. tamariscina* apresentaram atividade antidiabética *in vivo* em ratos. O aumento dos níveis séricos de insulina e HDL, e diminuição dos níveis séricos de triglicerídeos, colesterol total, ácidos graxos livres e LDL, foram observados com as doses de 100, 200 e 400mg/kg a partir do tratamento com o extrato de *S. tamariscina* por oito semanas, aproximando os valores de lipídios e lipoproteínas da faixa normal, e, portanto, indicando atividades hipolipidêmicas significativas em ratos diabéticos (ZHENG et al., 2011).

A partir de uma fração acetato de etila de *S. bryopteris* foram isolados doze biflavonoides derivados da amentoflavona e hinokiflavona, os quais foram avaliados *in vitro* contra *Plasmodium falciparum*, *Leishmania donovani*, *Trypanosoma brucei rhodesiense* e *Trypanosoma cruzi*. Os melhores resultados foram observados para *L. donovani* com IC₅₀ entre 1,6 a 4,7 µM e para *P. falciparum* com IC₅₀ entre 0,26 a 4,5µM. O biflavonoide 2,3-dihidronokiflavona (**Figura 5**) apresentou potente atividade contra *L. donovani* com IC₅₀ de 1,6 µM, enquanto 7,4',7"-tri-O-metilamentoflavona (**Figura 6**) exibiu atividade contra *P. falciparum* com IC₅₀ de 0,26 µM (KUNERT et al., 2008).

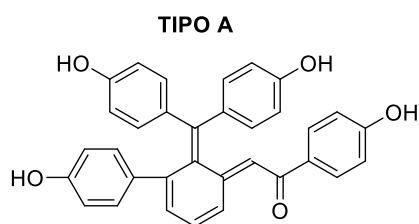
O extrato acetato de etila de *S. doederleinii* apresentou em sua composição quatro tipos de biflavonoides do tipo C-C (IC3'-IIC8'', IC3'-IIC6'' e IC3'-IIC3'') e C-O. Um total de vinte biflavonoides foram anotados, sendo que oito deles foram descritos pela primeira vez na espécie

S. doederleinii. Este extrato apresentou citotoxicidade contra as linhagens de células cancerígenas de pulmão LLC e melanoma murino B16 com valores de IC₅₀ de 36,29 e 95,65 g/mL, bem como inibição do crescimento do tumor em camundongos machos C57BL/6 (YAO et al., 2017). O extrato hidroetanólico provenientes *S. tamariscina* também apresentou citotoxicidade contra células cancerígenas pulmonar com potencial metastático inibindo 44,01% da viabilidade celular na concentração de 50 µg/mL. A partir desse extrato, foram isolados e anotados dois biflavonoides sumaflavona e amentoflavona (YANG et al, 2006).

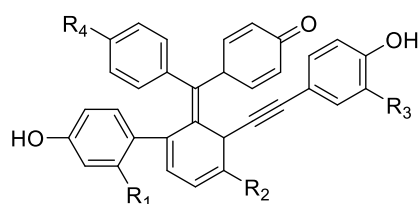
A amentoflavona (**Figura 6**), um biflavonoide isolado de *S. sinensis* e de outras espécies de *Selaginella*, apresentou atividade antiviral contra o vírus sincicial respiratório com IC₅₀ de 5,5 µg/mL (MA et al., 2001). O extrato de *S. tamariscina* também apresentou atividade antifúngica com IC₅₀ de 10µM de um derivado biflavonoide do tipo C-C (amentoflavona) (**Figura 6**) isolado proveniente de um extrato acetato de etila, induzindo apoptose em células de *Candida albicans* (HWANG et al., 2012).

As selaginelininas é um grupo de pigmentos de ocorrência restrita no gênero *Selaginella*, (LI et al., 2020). Possuem uma estrutura ímpar por possuir esqueletos polifenólicos únicos com uma ligação carbono espiro e ligações acetilênicas, apresentando um ou mais grupos funcionais, como amina, carbonila e hidroxila, podendo estar envolvidos em uma variedade de reações químicas, incluindo reações redox e interações com proteínas e outras moléculas biológicas (CHENG et al, 2008; CAO et al, 2010; ZHU et al., 2019; LI et al, 2020).

Existem vários tipos de selaginelininas, as quais são classificadas em quatro grupos: tipo A, B, C e D e denominadas selaginelininas de A a Z, (**Figura 7**) (WANG et al., 2009; ZHU et al., 2019; LI et al., 2020). Estes metabólitos têm revelado ações protetivas das células neuronais e atividades citotóxicas contra adenocarcinomas gástrico, pulmonar, colo uterino e cistodenocarcinoma ovariano com valores de IC₅₀ entre 6 e 9 µM (ZHANG et al., 2012). Além dessas atividades, as selaginelininas também apresentam atividades antimicrobianas, antivirais e antifúngica (LI et al., 2020; ZHU et al., 2017).



Selaginellina G



Selaginellina A: R₁ = H, R₂ = H, R₃ = H, R₄ = OH

Selaginellina B: R₁ = H, R₂ = CH₃, R₃ = H, R₄ = OH

Selaginellina C: R₁ = OH, R₂ = , R₃ = H, R₄ = OH

Selaginellina D: R₁ = H, R₂ = CH₂OH, R₃ = H, R₄ = OCH₂CH₃

Selaginellina E: R₁ = H, R₂ = CH(CH₂OCH₃)₂, R₃ = H, R₄ = OH

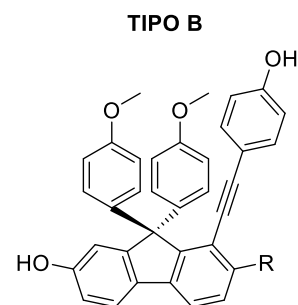
Selaginellina F: R₁ = H, R₂ = H₂CO--COOH, R₃ = H, R₄ = OH

Selaginellina I: R₁ = OH, R₂ = CH₂OH, R₃ = H, R₄ = OH

Selaginellina J: R₁ = H, R₂ = CH₂OH, R₃ = H, R₄ = OH

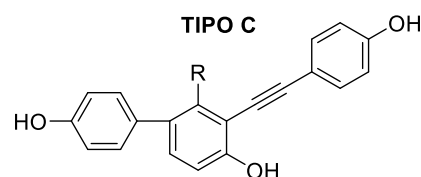
Selaginellina M: R₁ = H, R₂ = H₂C-, R₃ = H, R₄ = OH

Selaginellina N: R₁ = H, R₂ = H, R₃ = H, R₄ = OCH₃



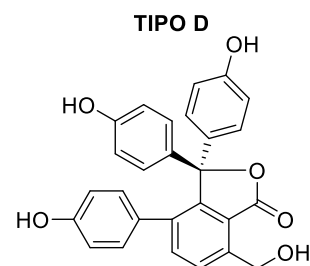
Selaginpulvilina K: R = CHO

Selaginpulvilina L: R = H



Selaginellina K: R = CHO

Selaginellina L: R = CH₃



Selaginellina H

Figura 7. Estruturas químicas de selaginellinas isoladas a partir de espécies de *Selaginella*.

Segundo Zhu et al 2016, as selaginellinas também apresentam atividade antiviral contra hepatite B, suprimindo acentuadamente a produção de HbsAg e HBeAg em células HepG2.2.15 com valores de IC₅₀ de 0,026 e 0,032 µg /mL, respectivamente.

Outro grupo de grande importância no gênero *Selaginella* são os alcaloides, uma classe de metabólitos secundários estruturalmente diversificada e de grande potencial farmacológico (KAM & LIEW, 2002; CHIKMAWATI et al., 2012; ALMEIDA et al., 2013). Os alcaloides derivados de *N*-metiltiramina hordenina, como hordenina-*O*- α -ramnopiranosídeo, *N*-metiltiramina-*O*- α -ramnopiranosídeo, hordenina-*O*-[(6-*O*-cinnamoil)-*O*- β -glucopiranosil]- α -

ramnopiranosídeo e hordenina-*O*-[(6-*O*-*p*-coumaroil)-*O*- β -glucopiranosil]- α -ramnopiranosídeo foram isolados de *S. doederleinii* (**Figura 8**) (WENG & NOEL, 2013).

Os alcalóides do tipo hidroxicinamoil poliamina também são descritos em *Selaginella* como os alcalóides isolados de *Selaginella moellendorffii* a paucina e paucina 3'- β -*D*-glicopiranosídeo, os quais também já foram encontrados em espécies de *Nicotiana* e são descritos como metabólitos de resposta ao estresse bióticos e/ou abióticos (**Figura 8**) (MIZUKASI et al., 1971; ONKOKESUNG et al., 2011).

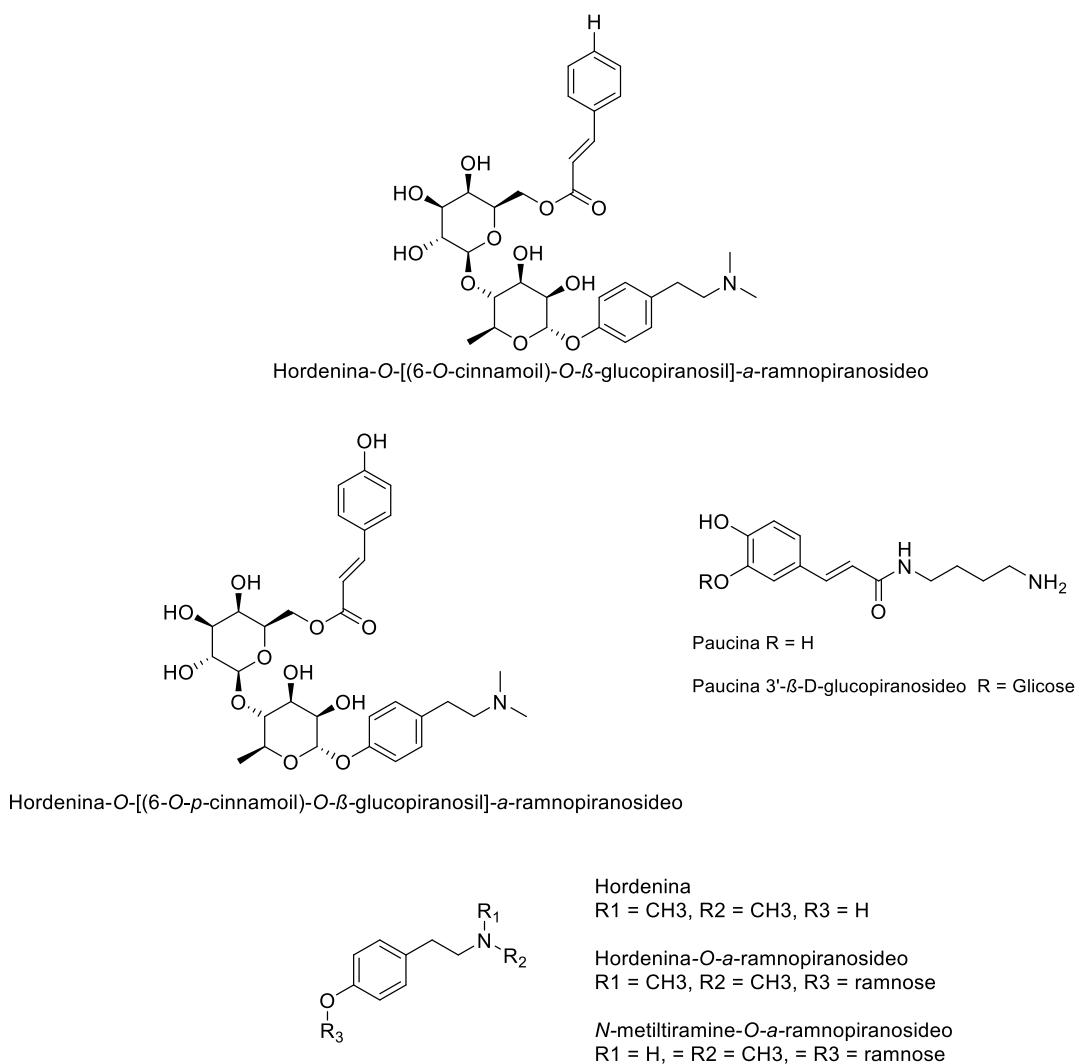


Figura 8. Estruturas químicas de alcalóides isolados a partir de espécies de *Selaginella*.

Além dos metabólitos descritos aqui, as lignanas também têm sido relatadas em espécies de *Selaginella*. Esta classe apresenta atividades biológicas já descritas como antimicrobiana, antitumoral, anti-hepatotóxica, antioxidante, antituberculosa, antiviral e inseticida (FAN et al., 2023; ADNAN et al., 2021; ALMEIDA et al., 2013). As lignanas (-)-lirioresinol A, (-)-lirioresinol B e (+)-wilkstromol, por exemplo, foram identificadas a partir de

S. doederleinii (**Figura 9**), enquanto (+)-siringaresinol, tamariscinosídeo B, tamariscinosídeo C foram descritos em *S. tamariscina* (**Figura 9**) (BI et al., 2004).

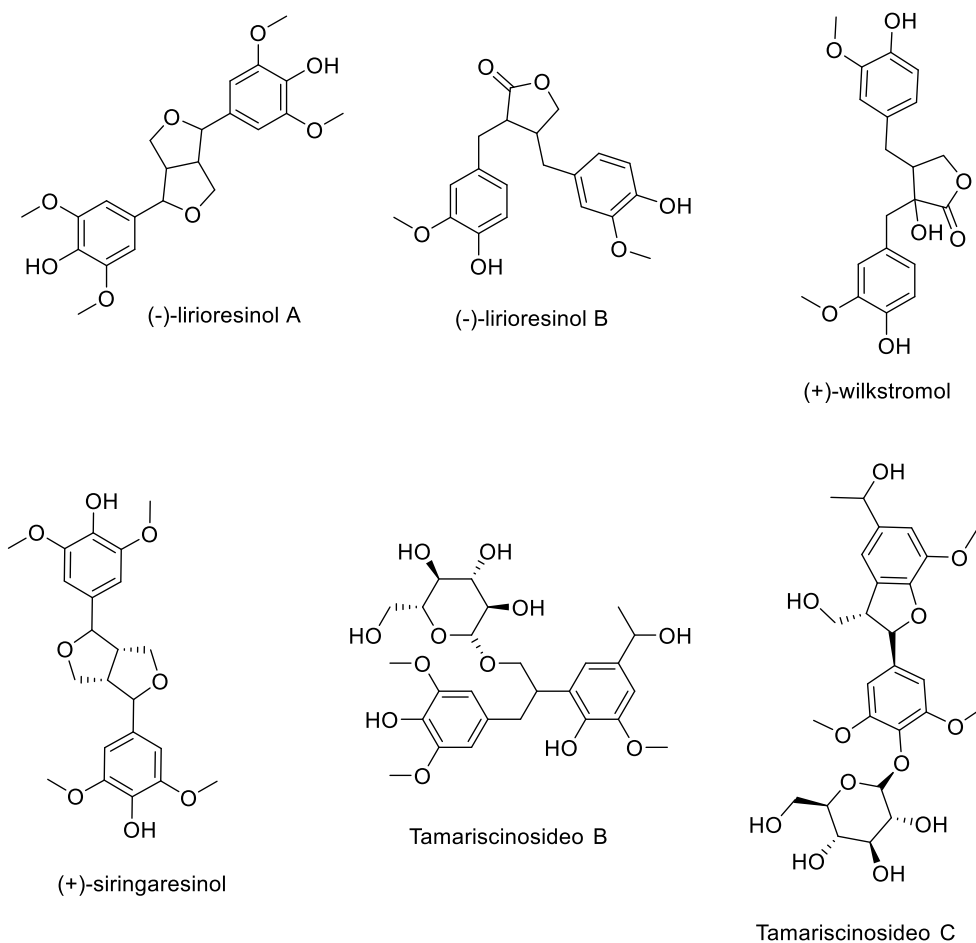


Figura 9. Estruturas químicas de lignanas isoladas a partir de espécies de *Selaginella*

Os terpenoides também fazem parte dos compostos já descritos no gênero *Selaginella*. Esta grande classe de compostos serve como importantes moduladores de interações entre espécies, incluindo atração de polinizadores e dispersores de sementes, bem como defesas químicas contra patógenos e herbívoros (DUDAREVA et al., 2004). Esses compostos são conhecidos por possuir propriedades biológicas como antibacteriana, antimalárica, anti-inflamatória, antiviral, anticancerígena e inibição da síntese do colesterol (ALMEIDA et al., 2013). A partir de espécies de *Selaginella* foram descritos compostos da classe dos monoterpenos, sequeiterpenos, diterpenos, triterpenos e esteroides como, por exmplo, os metabólitos linalol, (+)-(3S)-nerolidol, (-)- β -elemeno, giberelina A4, miltiradiene, difosfato de *ent*-copalil, β -sitosterol, β -daucosterina e ácido glicirretínico (WENG & NOEL, 2013) (**Figura 10**).

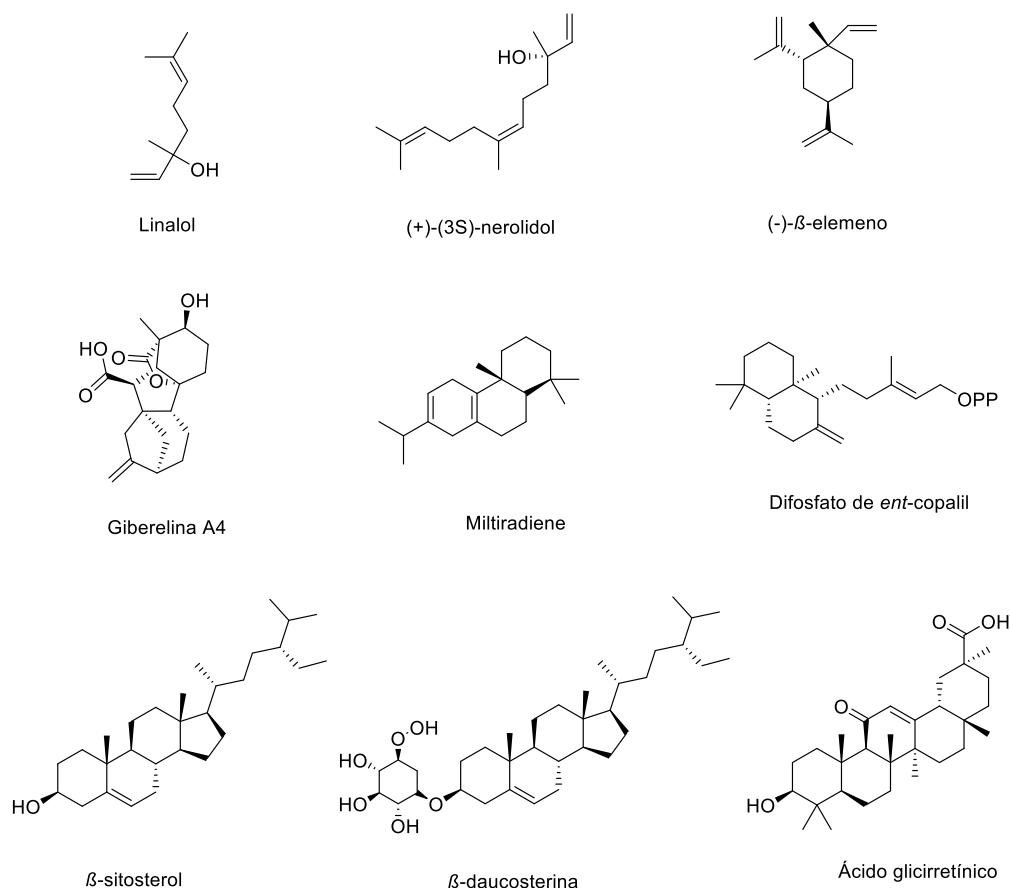


Figura 10. Estruturas químicas de terpenóides isoladas a partir de espécies de *Selaginella*

O extrato obtido em acetona de *S. bryopteris* demonstrou atividade antibacteriana contra diversas cepas, tanto gram-positivas quanto gram-negativas, incluindo *E. coli*, *S. aureus*, *E. faecalis* e *K. pneumoniae*. Neste estudo, seis substâncias foram isoladas, incluindo dois biflavonoides (heveaflavona e amentoflavona), uma lignana, dois esteroides e ácido vanílico. Esta última substância juntamente com o esteroide β -sitosterol β -D-glicosilado apresentaram a melhor eficácia contra cepas bacterianas (MIC 0,625 e 0,312 mg/mL), enquanto as substâncias β -sitosterol, heveaflavona e ácido vanílico foram os mais ativos contra as cepas fúngicas *Candida. albicans*, *Candida. tropicalis* e *Candida. krusei*, apresentando MIC de 0,312 e 0,625 mg/mL (VERMA, et al., 2015).

Os levantamentos apresentados aqui ressaltam imenso valor do gênero *Selaginella* devido à presença de grande número de compostos químicos e amplo espectro de atividades biológicas, evidenciando a importância de pesquisas que venham contribuir e ampliar com o conhecimento sobre os membros deste gênero.

1.5. *Selaginella sellowii* Hieron

A espécie *Selaginella sellowii* Hieron (**Figura 11**), pertencente à família Selaginellaceae, tem ocorrência no México, Cuba, Colômbia, Venezuela, Equador, Peru, Uruguai, Argentina, Paraguai, Bolívia e Brasil (ASSIS & LABIAK, 2008). Esta espécie pode ser encontrada em diversas regiões e biomas do Brasil devido a seu alto grau de adaptação e ocorre, principalmente, na Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica e Pantanal. Trata-se de uma espécie terrícola, epífita ou rupícola referente ao grupo das licófitas (HIRAI & PRADO, 2000; REFLORA, 2023).

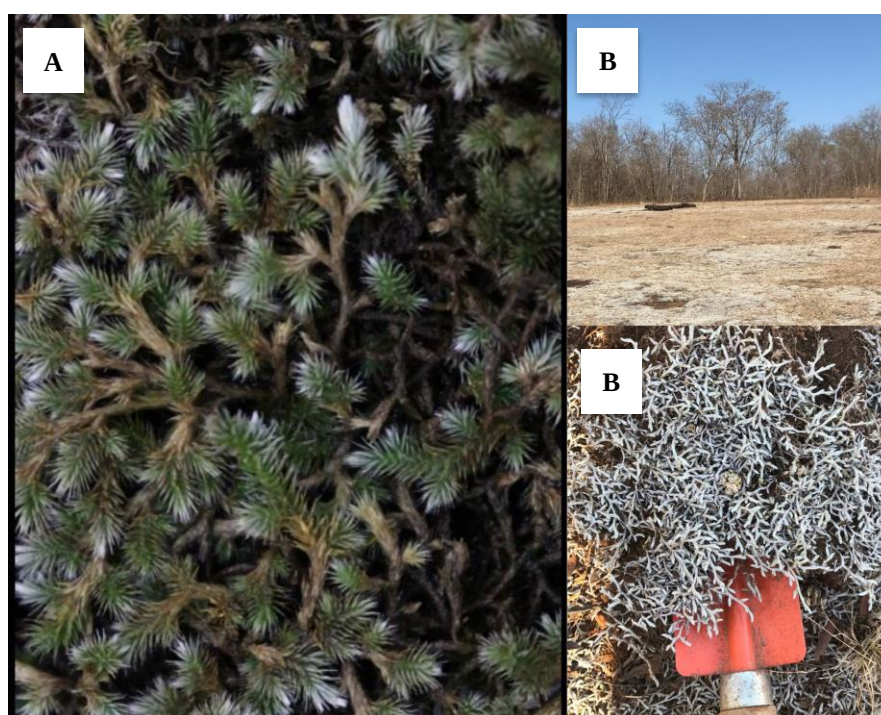


Figura 11. *Selaginella sellowii*. A: Reidratada B: Área da coleta em época de seca.

Fonte: Próprio autor

A espécie *S. sellowii* apresenta uma elevada capacidade de tolerância à dessecação, permitindo a esta espécie resistir a períodos muito longos no estado dessecado. Essa tolerância à dessecação também envolve a capacidade de se recuperar da perda completa de água (**Figura 11**) (OLIVER et al., 2000; ALEJO-JACUINDE et al., 2020). Alguns estudos indicam que a alta concentração de biflavonoides e flavonoides contribuem para evitar a oxidação neste processo de dessecação, bem como os altos níveis de polióis e carboidratos solúveis que são sugeridos estarem envolvidos no processo de dessecação e reidratação (PAMPUROVA et al., 2014; ZHANG et al., 2016; OLIVEIRA & MORAES, 2015).

Além de *S. sellowii*, a espécie *Selaginella bryoptes* também possui capacidade de sobreviver a longos períodos de seca. Ambas desenvolveram mecanismos bioquímicos que

alteram a biossíntese de seus metabólitos primários e secundários durante o estado de dessecação (YOBI et al., 2013; ALEJO-JACUINDE et al., 2020). Outros mecanismos também observados foram o aumento nos canais de membrana e aumento do número de genes responsáveis pela formação da parede celular e etapas da fotossíntese, os quais contribuem no processo de resistência ao estresse hídrico (THOMSON et al., 1997., ANDERBERG et al., 2012; PLANCOT et al., 2019; ALEJO-JACUINDE et al., 2020; CHEN et al., 2020).

Apesar de ter informações químicas descritas para o gênero *Selaginella*, convém destacar a escassez desses estudos sobre a composição química e propriedades biológicas de *S. sellowii*. Apenas três artigos foram publicados com dados químicos e atividades biológicas de *S. sellowii*, sendo que estes têm como alvo suas propriedades contra o parasita *L. amazonensis* com foco principal na atividade do biflavonoide amentoflavona (RIZK et al., 2014; QUEIROZ et al., 2016; RIZK et al., 2022).

Rizk e colaboradores (2014 e 2022), estudaram a espécie *Selaginella sellowii*, em relação à sua composição química. Diferentes extratos a partir dessa espécie foram obtidos utilizando os solventes acetato de etila, metanol e água de suas partes aéreas. Subsequentemente, esses extratos foram analisados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao espectrômetro de massas (CLAE-DAD-EM) e a partir de *S. sellowii* derivados de fenilpropanoides de alto peso molecular foram sugeridos em sua composição, porém a completa caracterização estrutural desses derivados não foi possível uma vez que esses não haviam sido descritos na literatura e nem mesmo seus padrões de fragmentação. Além desses componentes, os biflavonoides amentoflavona e robustaflavona (**Figura 7**) também foram identificados e isolados. Esses biflavonoides apresentaram potente atividade contra amastigotas de *L. amazonensis*, bem como o extrato hidroetanólico da espécie *S. sellowii* exibindo uma IC₅₀ de 20,2 µM.

Os biflavonoides amentoflavona e robustaflavona apresentaram atividade antileishmaniana contra *L. amazonensis* para formas amastigotas intracelulares com valores de IC₅₀ de 0,1 e 2,8 µM, respectivamente. Entretanto, ainda não há dados biológicos sobre os derivados fenilpropanoicos presentes em *S. sellowii* (RIZK et al., 2014; QUEIROZ et al., 2016), os quais são os alvos de estudo neste trabalho.

Adicionalmente, Queiroz e colaboradores (2016) realizaram um estudo fitoquímico de *S. sellowii* a partir de seu extrato polar. Este extrato apresentou atividade antileishmaniana (*L. (L.) amazonensis*) quando administrado por via oral e intralesional em camundongos e exibiu inibição de 99,2% (50 mg/kg/dia × 20, via oral) da carga parasitária nas patas infectadas, sendo

sugerida uma ação sinérgica entre os compostos das classes biflavonoides e fenilpropanoides glicosilados de alto peso molecular presentes no extrato. Portanto, os dados apresentados aqui ressaltam a necessidade de continuação e ampliação dos estudos com a espécie *S. sellowii*. Além disso, os apontamentos aqui descritos demonstram que o proposto neste trabalho é promissor, não somente pelo fato de caracterização estrutural de compostos ainda não reportados na literatura (derivados fenilpropanoides de alto peso molecular), mas também pelo ineditismo em se estudar as propriedades biológicas desses compostos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Caracterizar os extratos de *Selaginella sellowii* e avaliar suas atividades antileishmania, antibacteriana e antibiofilme.

2.2 Objetivos Específicos

- Otimizar a extração de *S. sellowii* para a obtenção de extratos enriquecidos em com biflavonoides e derivados de fenilpropanoides;
- Analisar a composição dos extratos de *S. sellowii* por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos e espectrômetro de massas (CLAE-DAD-EM).
- Anotar os constituintes presentes nos extratos de *S. sellowii* a partir dos dados de CLAE-DAD-EM;
- Isolar os derivados fenilpropanoides e caracterizar suas estruturas através de técnicas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e espectrometria de massas (EM);
- Avaliar a atividade *in vitro* anti-*Leishmania amazonensis* dos extratos de *S. sellowii*;
- Avaliar a atividade antibacteriana e antibiofilme *in vitro* dos extratos utilizando *S. aureus*

3. REFERÊNCIAS

- ADNAN, M; et. al. Evidence-Based Medicinal Potential and Possible Role of *Selaginella* in the Prevention of Modern Chronic Diseases: Ethnopharmacological and Ethnobotanical Perspective. **Records of natural products**, p. 330-355, 2021.
- AHMAD I.; BEG A.Z. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. **Journal Ethnopharmacology**, v. 74, n. 2, p.113-23, 2000.
- ALBUQUERQUE, U. P. DE., HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 678–689, 2006.
- ALEJO-JACUINDE, G. et al. Comparative transcriptome analysis suggests convergent evolution of desiccation tolerance in *Selaginella* species. **BMC Plant Biology**, v. 20, p. 468, 2020.
- ALIBI, S.; CRESPO, D.; NAVAS, J. Plant-Derivatives Small Molecules with Antibacterial Activity. **Antibiotics**, v. 10, n. 3, p. 231, 2021.
- ALLISON, D.; et al. Synthesis and antimicrobial studies of novel derivatives of 4-(4-formyl-3-phenyl-1H-pyrazol-1-yl) benzoic acid as potent anti-Acinetobacter baumannii agents. **Bioorganic & Medical Chemistry Letters**, v. 27, n. 3, p. 387-392, 2017.
- ALMEIDA, J. R. G.; et al. Phytochemistry of the genus *Selaginella* (Selaginellaceae). **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 7, p. 1858-1868, 2013.
- ALSTON, A.H.G.; JERMY, A.C.; RANKIN, J.M. The genus *Selaginella* in tropical South America. Bulletin of the British Museum (Natural History), **Botany**, v. 9, n. 4, p.233-330, 1981.
- ANDERBERG, H. I.; KJELLBOM, P.; JOHANSON, U. Annotation of *Selaginella moellendorffii* Major Intrinsic Proteins and the Evolution of the Protein Family in Terrestrial Plants. **Front Plant Science**, v. 3, art. 33, 2012.
- ASSIS, E.L.M.; LABIAK, P.H. Lycophyta da borda oeste do Pantanal, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 23, p. 703-712, 2008.
- BAG, A.; CHATTOPADHYAY, R. R. Evaluation of synergistic antibacterial and antioxidant efficacy of essential oils of spices and herbs in combination. **PloS One**, v. 10, n. 7, p. e0131321, 2015.
- BALAN, R. et al. Gimatecan and other camptothecin derivatives poison *Leishmania* DNA-topoisomerase IB leading to a strong leishmanicidal effect. **Biochemical Pharmacology**, n. 85, p. 1433-1440, 2013.
- BANKS J. A. *Selaginella* and 400 million years of separation. **Annual Review of Plant Biology**, v. 60, p. 223-238, 2009.

BASANO, S.; A. CAMARGO, L. M. A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira Epidemiologia**, v. 7, p. 328-337, 2004.

BASTOS, M. M. B., N.; HOELZ, L. V. B.; DE OLIVEIRA, A. P. Quimioterapia Antileishmania: Uma Revisão da Literatura. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 6, p. 2072-2104, 2016.

BEKONO, B. D. et al, The potential of anti-malarial compounds derived from African medicinal plants: a review of pharmacological evaluations from 2013 to 2019. **Malaria Journal**, v. 19, p. 183, 2020.

BERMAN, J. D. Chemoterapy for leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy and future strategies. **Reviews of Infectious Diseases.**, v.10, p. 560-586, 1988.

BERMAN, J.D.; WADDELL, D.; HANSON, B.D. Biochemical mechanisms of the leishmanial activity of sodium stibogluconate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 27, p.916-920, 1985.

BI, Y. F.; et al. Isolation and structural identification of chemical constituents from *Selaginella tamariscina* (Beauv.) **Spring. Yao Xue Xue Bao**, v. 39, p. 41–45, 2004.

BRASIL, Ministério da Saúde. Guia de Vigilância em Saúde. **Biblioteca Virtual em Saúde**, 2022; 5ª edição. Disponível em: <<https://dive.sc.gov.br/phocadownload/guia-vigilancia/2022/GV5-5edicao-04-05-2022.pdf>>. Acesso em: 08 de junho de 2023.

BRASIL^a, Ministério da Saúde – MS. Secretária de Vigilância em Saúde. Situação epidemiológica da Leishmaniose Tegumentar, 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/lt/arquivos/lt-graficos-e-mapas.pdf> Acesso em: 08 de junho de 2023.

BRASIL^b, Ministério da Saúde – MS. Secretária de Vigilância em Saúde. Situação epidemiológica da Leishmaniose Visceral, 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/leishmaniose-visceral/arquivos/lv-graficos-e-mapas.pdf> Acesso em: 08 de junho de 2023.

BRASIL, Ministério da Saúde. Manual de Vigilância de Leishmaniose Tegumentar Americana. **Biblioteca Virtual em Saúde**, 2017; 1ª edição. Disponível em: <https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf>. Acesso em: 08 de junho de 2023.

BRASIL, Ministério da Saúde. Manual de vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. **Biblioteca Virtual em Saúde**, 2014; 1ª edição. Disponível em: <https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_visceral_1edicao.pdf> . Acesso em: 08 de junho de 2023.

BRUHN, J. G.; RIVIER, L. Ethnopharmacology – A journal, a definition and a society. **Journal of Ethnopharmacology**, vol. 242, 2019.

CALIXTO, J. B. The role of natural products in modern drug discovery. **Anais Da Academia Brasileira De Ciências**, v. 91, e20190105, 2019.

- CANTAS, L., et al. A brief multi-disciplinary review on antimicrobial resistance in medicine and its linkage to the global environmental microbiota. **Frontiers in Microbiology**, v. 4(96), 2013.
- CAO, Y.; et al. Antimicrobial selaginellin derivatives from *Selaginella pulvinata*. **Bioorganic & Medical Chemistry Letters**, v. 20, n. 8, p. 2456-2460, 2010.
- CASCIOFERRO S.; et. al. Therapeutic strategies to counteract antibiotic resistance in MRSA biofilm-associated infections. **ChemMedChem**, v. 16, p. 65-80, 2021.
- CHANDRAN, G.; MURALIDHARA. Insights on the Neuromodulatory Propensity of *Selaginella* (Sanjeevani) and its Potential Pharmacological Applications. **CNS & Neurological Disorders - Drug Targets**, v. 13, p. 82-85, 2014.
- CHANG, N.; ET AL. Indigenous Uses and Pharmacological Activity of Traditional Medicinal Plants in Mount Taibai, China. **Hindawi**, vol. 2017, p. 1-11, 2017
- CHEN, L.; et al. Gardenia jasminoides Ellis: Ethnopharmacology, phytochemistry, and pharmacological and industrial applications of an important traditional Chinese medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, vol. 257, 2020.
- CHEN, P.; JUNG, N. U.; GIAROLA, V.; BARTELS, D. The dynamic responses of cell walls in resurrection plants during dehydration and rehydration. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 1698, 2020.
- CHENG, T.; et al. A facile high-throughput model of surface-independent *Staphylococcus aureus* biofilms by spontaneous aggregation. **mSphere**, v. 6(2), p. 1-14, 2021.
- CHENG, X. L. et al. Selaginellin A and B, two novel natural pigments isolated from *Selaginella tamariscina*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 56, n. 7, p. 982-984, jul. 2008.
- CHIKMAWATI, T.; et al. Phytochemical composition of *Selaginella* sp. from Java Island Indonesia. **Makara Journal of Science**; v. 16, p. 129-133, 2012.
- CHOWDHURY, S. et al. The lignan niranthin poisons *Leishmania donovani* topoisomerase IB and favours a Th1 immune response in mice. **EMBO Molecular Medicine**, v. 4, p. 1126-1143, 2012.
- CHUKWUJEKWU, J. C.; et al. J. Antiplasmodial and antibacterial activity of compounds isolated from *Ormocarpum trichocarpum*. **Planta Med**, v. 78, n. 17, p. 1857-1860, 2012.
- CORPAS-LÓPEZ, V.; et al. The sesquiterpene (–)- α -bisabolol is active against the causative agents of Old World cutaneous leishmaniasis through the induction of mitochondrial-dependent apoptosis. **Apoptosis**, v. 21, p. 1071-1081, 2016.
- CORTES, S. et al. Potential of the natural products against leishmaniasis in Old World - a review of in-vitro studies. **Pathogens and Global Health**, v. 114, p. 1-13, 2020.
- CUSSOLIM; P. A. Mecanismos de Resistência do *Staphylococcus Aureus* a Antibióticos. **Revista Faculdades do Saber**, v. 06(12), p. 831-843, 2021.

- DE SÁ, P. G. Antinociceptive effect of ethanolic extract of *Selaginella convoluta* in mice. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v. 12, p.187-193, 2012.
- DESBOROUGH M.J.R.; KEELING D.M. The aspirin story - from willow to wonder drug. **Br British Journal of Haematol**, v. 177, n. 5, p. 674-683, 2017.
- DESMOND, P.; et al. Linking composition of extracellular polymeric substances (EPS) to the physical structure and hydraulic resistance of membrane biofilms. **Water Research**, v. 132, p. 211-221, 2018.
- DIAS, D. A.; URBAN S.; ROESSNER U. A historical overview of natural products in drug discovery. **Metabolites**, p. 303-360, 2012.
- DORVAL, M. E. M. C.; et al. Ocorrência de leishmaniose tegumentar americana no Estado do Mato Grosso do Sul associada à infecção por *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, p. 39, p. 43-46, 2006.
- DUARTE, M. C. T. Atividade Antimicrobiana de Plantas Medicinais e Aromáticas Utilizadas no Brasil. **MultiCiência**, v. 7, n. 1, p. 1-16, 2006.
- DUDAREVA, N.; PICHERSKY, E.; GERSHENZON, J. Biochemistry of plant volatiles. **Plant Physiology**; v. 135, n. 4, p. 1893-1902, 2004.
- ECONOMOU, V., GOUSIA, P. Agriculture and food animals as a source of antimicrobial-resistant bacteria. **Infect Drug Resist.**, v. 8 (49), 2015.
- ELISABETSKY, E. Etnofarmacologia. **Ciência e Cultura**, vol. 55, n. 5, p. 35-36, 2003.
- EMAM, M. et al. Phytochemical Profiling of *Lavandula coronopifolia* Poir. Aerial Parts Extract and Its Larvicidal, Antibacterial, and Antibiofilm Activity Against *Pseudomonas aeruginosa*. **Molecules**, v. 26, n. 6, p. 1710, 2021.
- EU, Relatório Especial: Atuação contra a resistência antimicrobiana: apesar dos progressos no setor animal, está ameaça para a saúde continua a ser um desafio para a UE. **Curia Rationum – Tribunal de Contas Europeu**, p. 1- 58, 2019. Disponível em: <https://www.eca.europa.eu/Lists/ECADocuments/SR19_21/SR_Antimicrobial_resistance_PT.pdf>. Acesso em: 08 de junho de 2023.
- FAN, D.; et al. Lignans from the genus *Piper* L. and their pharmacological activities: An updated review. **Fitoterapia**, v. 165, p. 105403, 2023.
- FERREIRA, M. J. G.; et al. Evaluation of medicinal plants as potential food antimicrobial additives. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 5, p. e153953295, 2020.
- GANGULY, A. et al. Mutational studies reveal lysine 352 on the large subunit is indispensable for catalytic activity of bi-subunit topoisomerase I from *Leishmania donovani*. **Molecular & Biochemical Parasitology**, n. 165, p. 57-66, 2009.
- GAZONI, V. F. et al. Assessment of toxicity and differential antimicrobial activity of methanol extract of rhizome of *Simaba ferruginea* A. St.-Hil. and its isolate canthin-6-one. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 22, n. 3, p. 122-134, 2018.

GERVAZONI, L. F. O.; et al. Use of Natural Products in Leishmaniasis Chemotherapy: An Overview. **Frontiers in Chemistry**, vol. 8, p. 1-43, 2020.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. American cutaneous leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, p. 71-80, 2003.

GONTIJO, V. S.; et al. Leishmanicidal, antiproteolytic and antioxidante evaluation of natural biflavonoids isolated from *Garcinia brasiliensis* and their semisynthetic derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, p. 613- 623, 2012.

GONTIJO, V. S.; SANTOS, M. H.; VIEGAS JR., C. Biological and Chemical Aspects of Natural Biflavonoids from Plants: A Brief Review. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 834-862, 2017.

GOOSSENS, J. F.; GOOSSENS, L.; BAILLY, C. Hinokiflavone and Related C–O–C-Type Biflavonoids as Anti-cancer Compounds: Properties and Mechanism of Action. **Natural Products and Bioprospecting**, v. 11, p. 365-377, 2021.

GOURI, V.; et al. Evaluation of target-specific natural compounds for drug discovery against Leishmaniasis. **Parasitology International**, vol. 91, 2022.

GREENE, C.; et al. Evaluation of the ability of *Acinetobacter baumannii* to form biofilms on six different biomedical relevant surfaces. **Letters in Applied Microbiology**, v. 63 (4), p. 233-239, 2016.

HIRAI, R. Y.; PRADO, J. Selaginellaceae Willk. no Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 23, n. 3, p. 313-339, 2000.

HWANG I.; et al. Amentoflavone Stimulates Mitochondrial Dysfunction and Induces Apoptotic Cell Death in *Candida albicans*. **Mycopathologia**, v. 173, p. 207-218, 2012.

JEAN-PIERRE V; et al., Biofilm Formation by *Staphylococcus aureus* in the Specific Context of Cystic Fibrosis. **International Journal of Molecular Sciences** , v. 24, n. 1, p. 597, 2022.

JUDD, W. S.; et al. A Phylogenetic Approach. **Plant Systematics**. ed. 4, 1999.

KAM, P. C.; LIEW, A. Traditional Chinese herbal medicine and anaesthesia. **Anaesthesia**, v. 57, p. 1083-1089, 2002.

KHAN J.; et al. Challenges of antibiotic resistance biofilms and potential combating strategies: a review. **3 Biotech**, v. 11, n. 4, p.169, 2021.

KRAKER, DE MEA; STEWARDSON AJ; HARBARTH S. Will 10 million people die a year due to antimicrobial resistance by 2050? **PLoS Medicine**, v. 13, 2016.

KUNERT, O.; et al. Antiplasmodial and leishmanicidal activity of biflavonoids from Indian *Selaginella bryopteris*. **Phytochemistry Letters**, v. 1, publ. 4, p. 171–174, 2008.

LI, W.; TANG, G.; YIN S. Selaginellins from the genus *Selaginella*: isolation, structure, biological activity, and synthesis. **Natural Product Reports**; v. 38, p. 822-842, 2020.

- LIKHIKWITAYAWUID, K.; KAEWAMATAWONG, R.; RUANGRUNGSI, N. Mono- and biflavonoids of *Ochna integerrima*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 33, n. 5, p. 527-536, 2005.
- LIMA, E. B. D. et al. Tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 82, p. 111-124, 2007.
- LIN, R. C. S.; et al. Phenolic constituents of *Selaginella doederleinii*. **Planta Medica (Germany)**, v. 60, n. 2, p. 188-190, 1994.
- LIU, Q.; et al. Antibacterial and antifungal activities of spices. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 6, p. 1283, 2017.
- MA, S.; et al. Antiviral Amentoflavone from *Selaginella sinensis*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 24, p. 311-312, 2001.
- MACÊDO, L. A. R. et al. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities and evaluation of cytotoxicity of the fractions obtained from *Selaginella convoluta* (Arn.) Spring (Selaginellaceae). **Biotechnology Equipment**, v. 32, p. 506-512, 2018.
- MAHMOUDIAN-SANI, M. R.; et al. Ginkgo biloba in the treatment of tinnitus: An updated literature review. **Journal International Tinnitus**, vol. 21, p. 58-62, 2017.
- MARTÍNEZ-ALVA JE; et al. In Vitro Analysis of Extracts of Plant Used in Mexican Traditional Medicine, Which Are Useful to Combat *Clostridioides difficile* Infection. **Pathogens**, v. 11, n. 7, p. 774, 2022.
- MCGWIRE, B. S.; SATOSKAR, A. R. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. **Quarterly Journal of Medicine**, p. HCT116, 2013.
- MITTRA, B. et al. Luteolin, an abundant dietary component is a potent antileishmanial agent that acts by inducing topoisomerase II-mediated kinetoplast DNA cleavage leading to apoptosis. **Molecular Medicine**, v. 6, p. 527-541, 2000.
- MIZUKASI, S.; et al. Coumaroylputrescine, caffeoylputrescine and feruloylputrescine from callus tissue culture of *Nicotiana tabacum*. **Phytochemistry**, v. 10, p. 1347-1350, 1971.
- MOHAMMAD & THOMSON. The role of Normal flora in emergence and spread of antimicrobial resistance. **Research Review International Journal of Multidisciplinary**, v. 4, publ. 5, 2019.
- MONGE-MAILLO, B.; LÓPEZ-VÉLEZ, R. Therapeutic options for old world cutaneous leishmaniasis and new world cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Drugs**, v. 73, n. 17, p. 1889-920, Nov 2013.
- MUN, S. et al. Synergistic antibacterial effect of curcumin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Phytomedicine**, v. 20, n. 8-9, p. 714-718, 2013.
- MURRAY; et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. **The Lancet**, v. 399, p. 629-655, 2022.

- NAVEED, M.; et al. A Review of Medicinal Plants in Cardiovascular Disorders: Benefits and Risks. **The American Journal of Chinese Medicine**, v. 48, p. 259-286, 2020
- 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, n. 3, p. 770-803, 2020.
- O'NEILL J. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. **London: Review on Antimicrobial Resistance**, 2016.
- OLIVEIRA, A. A. Q.; MORAES, M. G. Dehydration and rehydration in *Selaginella sellowii* Hieron. aerial parts, a desiccation tolerant species. **Boletim Museu de Biologia Mello Leitão**, v. 37, n. 4, p.393-403. Outubro-Dezembro de 2015. Disponível em:<http://boletim.sambio.org.br/pdf/37_4.pdf>. Acesso em: 08 de junho de 2023.
- OLIVER, M. J.; TUBA, Z.; MISHLER, B. D. The evolution of vegetative desiccation tolerance in land plants. **Plant Ecology**, v. 151, n. 1, p. 85-100, 2000.
- OMS, 2021 Antibacterial agents in clinical and preclinical development: an overview and analysis. **Organização Mundial da Saúde**, 2021. Disponível em: <<https://www.who.int/publications/i/item/9789240047655>>. Acesso em: 08 de junho de 2023.
- ONKOKESUNG, N.; et al. MYB8 controls inducible phenolamide levels by activating three novel hydroxycinnamoyl- coenzyme A:polyamine transferases in *Nicotiana attenuata*. **Plant Physiology**, v. 158, p. 389-407, 2011.
- ONU. No Time To Wait: Securing The Future From Drug-Resistant Infections. **Interagency Coordination Group on Antimicrobial Resistance**, p. 1-25, 2019.
- OPAS, Leishmanioses. **Organização Pan Americana de Saúde**, 2023 Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/topicos/leishmaniose>>. Acesso em: 08 de junho de 2023.
- OTTO, M. Staphylococcal Biofilms. **Microbiology Spectrum**, v. 6, n. 4, p. 1-17, 2018.
- PAHO, Atlas interativo de leishmaniose nas Américas: aspectos clínicos e diagnósticos diferenciais. **Pan American Health Organization - PAHO**, 2021. Disponível em: <<https://iris.paho.org/handle/10665.2/54129>>. Acesso em: 08 de junho de 2023.
- PAHO, Leishmanioses: Informe Epidemiológico das Américas, n. 11 (Dezembro 2022). **Pan American Health Organization – PAHO**, 2022 Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/documentos/leishmanioses-informe-epidemiologico-das-americas-no-11-dezembro-2022>>. Acesso em: 08 de junho de 2023.
- PANDEY, S. C.; et al. Evaluation of antileishmanial potential of computationally screened compounds targeting DEAD-box RNA helicase of *Leishmania donovani*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 121, p. 480-487, 2019.
- PAMPUROVA, S.; VAN DIJCK, P. The desiccation tolerant secrets of *Selaginella lepidophylla*: what we have learned so far? **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 80, p. 285-290, 2014.

- PASWAN, S. K. et al. The Indian Magical Herb 'Sanjeevni' (*Selaginella bryopteris* L.) - A Promising Anti-inflammatory Phytomedicine for the Treatment of Patients with Inflammatory Skin Diseases. **Journal of Pharmacopuncture**, v. 20, n. 2, p. 93-99, 2017.
- PLANCOT, B., et al. Desiccation tolerance in plants: Structural characterization of the cell wall hemicellulosic polysaccharides in three *Selaginella* species. **Carbohydrate Polymers**, v. 208, p. 180-190, 2019.
- PONTE-SUCRE, A. et al. Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis. **A 21st century challenge, PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, 2017.
- QUEIROZ, D. P. S.; et al. In vivo antileishmanial activity and chemical profile of polar extract from *Selaginella sellowii*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, p. 147-154, 2016.
- QUEIROZ, D. P. S., et al. In vivo antileishmanial activity and chemical profile of polar extract from *Selaginella sellowii*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 3, p. 147-154, 2016.
- RAHIMPOUR, Y. et al. The Genus *Ferulago*: A Review on Ethnopharmacology, Phytochemistry, and Pharmacology. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 20, n. 4, p. 352-377, 2021.
- RAJ, S. et al. Biochemical characterization and chemical validation of *Leishmania* MAP Kinase-3 as a potential drug target. **Scientific Reports**, v. 9, p. 1-11, 2019.
- RAJ, S. et al. An overview of biochemically characterized drug targets in metabolic pathways of *Leishmania* parasite. **Parasitology**, v. 119, n. 7, p. 2025-2037, 2020.
- RATH, S.; et al. Tempone, A. G. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Química Nova**, v.26, n.4, p.550-555, 2003
- RAWSON, T.M. et al. Bacterial and Fungal Coinfection in Individuals with Coronavirus: A Rapid Review to Support COVID-19 Antimicrobial Prescribing. **Clinical Infectious Diseases**, v. 71, p. 2459-2468, 2020.
- REFLORA: FLORA E FUNGO DO BRASIL: *Selaginella sellowii* Hieron, 2023. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/ConsultaPublicaUC/ResultadoDaConsultaNovaConsulta.do#CondicaoTaxonCP>. Acesso em: 17 de maio de 2023.
- RIZK, Y. S.; et al. In vitro activity of the hydroethanolic extract and biflavonoids isolated from *Selaginella sellowii* on *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109.8, p. 1050-1056, 2014.
- RIZK, Y. S.; et. al. Amentoflavone isolated from *Selaginella sellowii* Hieron induces mitochondrial dysfunction in *Leishmania amazonensis* promastigotes. **Parasitology International**, v. 86, p.1383-5769, 2022.
- RODRÍGUEZ-FERREIRO AO, et al. LC-MS Characterization and Biological Activities of Cuban Cultivars of *Plectranthus neochilus* Schltr. **Plants (Basel)**, v. 11, n. 1, p. 134, 2022.
- SAHA, P.; et al. Berberine chloride causes a caspase-independent, apoptotic-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. **Free Radical Research**, v. 43, p. 1101-1110, 2009.

- SAKYI, P.; et al. The Search for Putative Hits in Combating Leishmaniasis: The Contributions of Natural Products Over the Last Decade. **Natural Products and Bioprospecting**, p. 489-544, 2021.
- SALEHI, B. et al. Piper Species: A Comprehensive Review on Their Phytochemistry, Biological Activities and Applications. **Molecules**, v. 24, n. 7, p. 1364, 2019.
- SAMPAIO, R. N. R.; LUCAS, I. C.; TAKAMI, H. L. Inefficacy of the association N-methyl glucamine and topical miltefosine in the treatment of experimental cutaneous leishmaniasis by *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 13, p. 598-606, 2007.
- SAUDAGAR, P.; DUBEY, V.K. Cloning, expression, characterization and inhibition studies on trypanothione synthetase, a drug target enzyme, from *Leishmania donovani*. **Acta Biochimica Polonica**, v. 58, n. 4, p. 1113-1122, 2011.
- SAUER, K.; et al. The biofilm life cycle: Expanding the conceptual model of biofilm formation. **Nature Reviews Microbiology**, v. 20(10), p. 608-620, 2022.
- SETYAWAN, A. D. Review: Natural products from Genus *Selaginella* (Selaginellaceae). **Nusantara Bioscience**, v. 3, 2011.
- SHARMA, U.; VELPANDIAN, T. Evaluation of anti-leishmanial activity of selected Indian plants known to have antimicrobial properties. **Parasitology Research**, v. 105, n. 5, p. 1287-1293, 2009.
- SHARMA, U.; VIPRA, A.; CHANNABASAPPA, S. Phage-derived lysins as potential agents for eradicating biofilms and persisters. **Drug Discovery Today**, v. 23, n. 4, p. 848-856, 2018.
- SHOJI, M. M.; CHEN, A. F. Biofilms in Periprosthetic Joint Infections: A Review of Diagnostic Modalities, Current Treatments, and Future Directions. **Journal of Knee Surgery**, v. 33, n. 2, p. 119-131, 2020.
- SILVA, K.C.D., LINCOPAN, N. Epidemiologia das betalactamases de espectro estendido no Brasil: impacto clínico e implicações para o agronegócio. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 48, p. 91-99, 2012.
- SILVER, L. L. Challenges of Antibacterial Discovery. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 1, p. 71-109, 2011.
- SIMIRGIOTIS, M. J. et al. Antioxidant and antibacterial capacities of *Origanum vulgare* L. essential oil from the arid Andean Region of Chile and its chemical characterization by GC-MS. **Metabolites**, v. 10, n. 10, p. 414, 2020.
- SMIRLIS, D.; BOTELHO, M.; SOARES, P. Selection of molecular targets for drug development against trypanosomatids. **Subcellular Biochemistry**, v. 74, p. 43-76, 2014.
- SOBRINHO, F. C. B.; ALMEIDA, A. L. S.; MONTEIRO, J. M. Estudo etnofarmacológico sobre *Lafoensia replicata* Pohl. No leste do Maranhão, Brasil: uma promissora espécie para bioprospecção. **Desenvolvimento e Meio Ambiente**. V. 39. 2016.

STAFFORD, P.J. Selaginellaceae. **Review of Palaeobotany and Palynology**, v. 69, p.1-22, 1991.

STAN D.; et al. Natural Compounds With Antimicrobial and Antiviral Effect and Nanocarriers Used for Their Transportation. **Frontiers in Pharmacology**, v. 6; n. 12, p. e723233, 2021.

STONE, S.; et al. Cheminformatic analysis of natural product-based drugs and chemical probes. **Natural Products Reports**, v. 39, n. 1, p. 20-32, 2022.

SULTAN, I. et al. Antibiotics, Resistome and Resistance Mechanisms: A Bacterial Perspective. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 2066, 2018.

TARIQ, S.; et al., A comprehensive review of the antibacterial, antifungal and antiviral potential of essential oils and their chemical constituents against drugresistant microbial pathogens. **Microbial Pathogenesis**, v. 139, p. e103580, 2019.

TAYLOR, D. M.; WERNEKE, U. Ethnopharmacology. **Nordic Journal of Psychiatry**, vol. 72, p. S30-S32, 2019.

THIAGARAJAN, G.; et al. Molecular and cellular assessment of Ginkgo biloba extract as a possible ophthalmic drug. **Experimental Eye Research**, v. 75, p. 421-30, 2002.

THOMSON, W. W.; PLATT, K. A. Conservation of cell order in desiccated mesophyll of *Selaginella lepidophylla* ([Hook and Grev.] spring). **Annals of Botany**, v. 79, p. 439-447, 1997.

TIRLONI, C. A. S.; et al. Ethnopharmacological investigations of the cardio-renal properties of a native species from the region of Pantanal, state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, vol. 206, p. 125-134, 2017.

TRENTIN, D. S.; GIORDANI, R. B.; MACEDO, A. J. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. **Revista Liberato**, v. 14, n. 22, p. 113-238, 2013.

TRENTIN, D. S.; et al. Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, p. 327-335, 2011.

TRYON, R. M & TRYON, A.F. Ferns and Allied Plants: with Special Reference to Tropical America. ed:1 **New York: Springer Verlag**, 1982.

VALVERDE, Ricardo. Doenças Negligenciadas. **Fiocruz**, 2013. Disponível em: <<https://agencia.fiocruz.br/doencas-negligenciadas>>. Acesso em: 19 de outubro de 2022.

VENTOLA, C. L. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. **Pharmacy and Therapeutics**, v. 40, p. 277–283, 2015.

VERDEROSA, A. D.; TOTSICA, M.; FAIRFULL-SMITH K. E. Bacterial biofilm eradication agents: a current review. **Front Chem**, v. 7, p. 824, 2019.

- VERMA, M. et al. Antimicrobial activity of phytochemicals isolated from *Selaginella bryopteris*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 51, p. 341-345, 2015.
- VESTBY, L.K.; et. al. Bacterial biofilm and its role in the pathogenesis of disease. **Antibiotics**, p. 9-59, 2020.
- VILLARREAL-IBARRA, E. et al. Evaluación etnofarmacológica de plantas con propiedades hipoglucémicas usadas en la medicina tradicional del sureste de México. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, vol. 14, p. 99-112, 2015.
- WANG, G.; YAO, S.; ZHANG, X-X.; SONG, H. Rapid Screening and Structural Characterization of Antioxidants from the Extract of *Selaginella doederleinii* Hieron with DPPH-UPLC-Q-TOF/MS Method. **International Journal of Analytical Chemistry**, Article ID 849769, p. 1-9, 2015
- WANG, Y-H.; et al. Pyrrolidinoindoline alkaloids from *Selaginella moellendorffii*. **Journal of Natural Products**, v. 72, p. 1151-1154, 2009.
- WENG, J. K.; NOEL, J. P. Chemodiversity in *Selaginella*: a reference system for parallel and convergent metabolic evolution in terrestrial plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, art. 119, p. 1-17, 2013.
- WHO, Leishmaniasis. **World Health Organization - WHO**, 2023. Disponível em: <<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>>. Acesso em: 08 de junho de 2023.
- WHO/PAHO. Plan of Action to Strengthen the Surveillance and Control of Leishmaniasis in the Americas 2017-2022. **World Health Organization – WHO / Pan American Health Organization – PAHO**. Disponível em: <<https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/34147/PlanactionLeish20172022-eng.pdf?sequence=5&isAllowed=y>> Acesso em: 08 de junho de 2023.
- WOLFMEIER, H. et al. New Perspectives in Biofilm Eradication. **ACS Infectious Diseases**, v. 4, n. 2, p. 93-106, 2018.
- YANG, S. F.; et al. Antimetastatic activities of *Selaginella tamariscina* (Beauv.) on lung cancer cells *in vitro* and *in vivo*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, p. 483-489, 2006.
- YAO, H.; et al. Analysis of the Total Biflavonoids Extract from *Selaginella doederleinii* by HPLC-QTOF-MS and Its *In Vitro* and *In Vivo* Anticancer Effects. **Molecules**, v. 22, n. 325, p. 1-17, 2017.
- YOBI, A., et al. Metabolomic Profiling in *Selaginella lepidophylla* at Various Hydration States Provides New Insights into the Mechanistic Basis of Desiccation Tolerance. **Molecular Plant**, v. 6, n. 2, p. 369-385, 2013.
- YOU, O. K.; et al. Ginkgetin induces apoptosis via activation of caspase and inhibition of survival genes in PC-3 prostate cancer cells. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, p. 2692–2695, 2013.

- ZACCHINO, S. A.; et al. Hybrid combinations containing natural products and antimicrobial drugs that interfere with bacterial and fungal biofilms. **Phytomedicine**, v. 37, p. 14-26, 2017.
- ZHAO X.; YU Z.; DING T. Quorum-sensing regulation of antimicrobial resistance in bacteria. **Microorganisms**, v. 8, n. 3, p. 425, 2020.
- ZHANG, G. G. et al. Isolation and cytotoxic activity of selaginellin derivatives and biflavonoids from *Selaginella tamariscina*. **Planta Med**, v. 78, n. 4, p. 390-392, 2012.
- ZHANG, J. et al., Characterization and profiling of phenolic amides from Cortex Lycii by ultra-high performance liquid chromatography coupled with LTQ-Orbitrap mass spectrometry, **Anal Bioanal Chem**, v. 407, n. 2, p. 581-595, 2015.
- ZHANG, Q.; SONG, X.; BARTELS, D. Enzymes and Metabolites in Carbohydrate Metabolism of Desiccation Tolerant Plants. **Proteomes**, v. 4, n. 4, p. 40, 2016.
- ZHANG, W. F.; et al. Inhibitory effect of selaginellin on high glucoseinduced apoptosis in differentiated PC12 cells: role of NADPH oxidase and LOX-1. **European Journal of Pharmacology**, v. 694, p. 60-68, 2012.
- ZHANG, YX.; et al. Structural characterization and identification of biflavones in *Selaginella tamariscina* by liquid chromatography-diode-array detection/electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Rapid Commun Mass Spectrom**. v. 25, p. 2173-2186, 2011.
- ZHAO, A. et al.; Understanding bacterial biofilms: From definition to treatment strategies. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 13, p. 1137947, 2023.
- ZHENG X. K.; et al. Anti-diabetic activity and potential mechanism of total flavonoids of *Selaginella tamariscina* (Beauv.) Spring in rats induced by high fat diet and low dose STZ. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, p. 662-668, 2011.
- ZHU, B.; et al. A New Selaginellin from *Selaginella moellendorffii* Inhibits Hepatitis B Virus Gene Expression and Replication. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 52, p. 624-627, 2016.
- ZHU, Q. F. et al.; A biomimetic semisynthesis enables structural elucidation of selaginellin U: a tautomeric cyclic alkynylphenol from *Selaginella tamariscina*. **Royal Society Open Science**, v. 4, n. 7, p. 170352, 2017.
- ZHU, Q. F. et al.; Isolation, Structural Assignment of Isoselagintamarlin A from *Selaginella tamariscina* and Its Biomimetic Synthesis. **Natural Products and Bioprospecting**, v. 9, p. 69-74, 2019.

New phenylpropanoid acid derivatives from *Selaginella sellowii* Hieron. (Selaginellaceae) and antileishmanial, antibacterial and antibiofilm activities

Izadora Bonfim^a, Luciana M. Ravaglia^b, Júlio M. de Almeida^a, Lia C. S. Medeiros^c, Alda M. T. Ferreira^d, Vitória E. Rodrigues^e, Danielle Trentin^e, Carlos A. Carollo^a, Denise B. Silva^{a,*}

^a *Laboratório de Produtos Naturais e Espectrometria de Massas (LaPNEM), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição (FACFAN), Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, MS, Brazil.*

^b *Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear (LabRMN), Instituto de Química (INQUI), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, MS, Brazil.*

^c *Laboratory of Parasitology, Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz): Ciencia e tecnologia em saúde, Curitiba, PR, Brazil.*

^d *Laboratory of Immunology, Molecular Biology and Bioassays (INBio). Federal University of Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, MS, Brazil.*

^e *Department of Basic Health Sciences, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.*

** Corresponding author: Laboratório de Produtos Naturais e Espectrometria de Massas (LaPNEM), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição (FACFAN), Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Av. Costa e Silva, s/nº, 79070-900, Campo Grande, MS, Brazil. Tel.: +55 (67) 3345-7366.*

E-mail address: denise.brentan@ufms.br (D.B. Silva).

ABSTRACT

Different species of the genus *Selaginella* have shown potential against resistant bacterial strains, the species *Selaginella sellowii* is a species resistant to desiccation and its extracts have been described with biflavonoids and phenylpropanoids derivatives, which have revealed promising activities against *Leishmania amazonensis*. Here, we developed a method to obtain two enriched fractions composed by biflavonoids and phenylpropanoid derivatives, aiming to comprehend a possible role of these different components for the antileishmanial activities, as well as evaluating its antibacterial and antibiofilm potentials. The extracts were obtained by accelerated solvent extraction (ASE) with subsequent solvents and increasing the polarities of them. Thus, the extracts were obtained with ethyl acetate and methanol 1:1 v/v (SsAcMe) and ethanol and water 7:3 v/v (SsEtH). SsEtH_FrMe were subjected to liquid-liquid extraction and its ethyl acetate fractions (SsEtH_FrAc) and hydromethanolic (SsEtH_FrMe) presented mainly bioflavonoids and phenylpropanoid derivatives in the composition, respectively. The SsAcMe extract and the fraction SsEtH_FrDC showed better antileishmanial activity with IC₅₀ of 78.8 and 34.1 µg/mL. SsAcMe and SsEt_FrAc revealed better results for the inhibition of biofilm formation without affecting bacterial growth. The samples were analyzed by LC-DAD and LC-DAD-MS. The biflavonoids amentoflavone (**14**), robustaflavone (**15**), and robustaflavone methyl ether (**16**) were annotated mainly from SsEtH_FrAc. From SsEtH_FrMe, glycosylated phenylpropanoid derivatives were annotated, including tri-*O*-hexosyl caffeic acid (**1**), hexa-*O*-hexosyl tetra-caffeic acid (**2**, **4**, **9**, **11**, **12**), hexa-*O*-hexosyl di-caffeic acid (**3**), tetra-*O*-hexosyl di-caffeic acid (**5**, **7**), hepta-*O*-hexosyl tetra-caffeic acid (**6**, **8**), penta-*O*-hexosyl tri-caffeic acid (**10**) and tri-*O*-hexosyl tetra-caffeic acid (**13**). The compounds **6**, **7**, **8**, **9** and **10** were isolated by reversed phase HPLC semipreparative and structurally characterized by NMR. The substance **9** was characterized as the new glycosylated phenylpropanoid derivative Bis-1''-*O*-caffeoyl(1''→4)-β-gluco/galacpyranosyl(9→2''')-α-gluco/galactopyranosyl(1'''→3''')-caffeoyl-(2'''→9')-β-gluco/galactopyranosyde.

Keywords: Phenylpropanoid, *Leishmania*, biflavonoid, caffeic acid, antibacterial, antibiofilm.

INTRODUCTION

Natural products are a great source of new biologically active compounds and new drug candidates¹. However, for neglected diseases there is still a dearth of treatment and new candidates for them. In this scenario, surveillance and control of leishmaniasis remain a challenge, which makes them a constant public health problem worldwide, especially in the underdeveloped countries, such as Brazil that concentrates more than 97% of visceral leishmaniasis (VL) cases in the American continent and is among the countries with the highest number of cases of cutaneous leishmaniasis (CL)^{2,3,4}. The available tools capable of acting in the reduction of cases and deaths caused by leishmaniasis are limited and inefficient that highlights the requirement of new drugs to treat this disease^{2,3,5,6}. People living in precarious situations are the most affected for leishmaniasis, since they do not have adequate infrastructure and are more prone to risk factors such as malnutrition, low immunity, and few financial resources^{2,3}.

Throughout history, pentavalent antimonials have been used as the first treatment option, they have shown several side effects. There alternatively is the use of amphotericin B and pentamidine to treat leishmaniosis, but they also show serious side effects and high toxicity. Therefore, to date, the existing chemotherapy against this disease has serious limitations, such as low effectiveness, high toxicity and high costs^{7, 8, 9, 10, 11, 12}. Besides, the increase of parasite resistance rates has been reported in various regions of the planet, reinforcing the requirement of new drugs⁶. Thus, it is urgent to expand research for new agents to treat leishmaniosis and, in this context, natural products and their derivatives are a great source for research of bioactive compounds and development of new drugs¹.

The discovery of antibiotics revolutionized medicine, enabling the treatment of bacterial infections and increasing the life expectancy of humans. However, the excessive and inappropriate use of these drugs has led to the development of bacterial resistance, which is

considered a serious public health problem worldwide¹³⁻¹⁸. According to the 2021 World Health Organization, antibiotic resistance is one of the most significant threats to global health and with the potential to make common infections uncontrollable. It is estimated that, if this scenario continues to increase, by 2050 there could be 10 million annual deaths related to antimicrobial resistant infections and with a cost of about US\$ 100 trillion^{14, 18, 19}.

Bacterial resistance to antibiotics has been largely related to the formation of biofilms and approximately 80% of infections are associated with bacterial biofilms that increase the costs for treatment and these treatments become less accessible²⁰⁻²³.

The search for new antibacterial therapies capable of combating bacteria and their biofilms becomes essential due to the severity of bacterial infections, bacterial resistance to antibiotics, and the drop in the number of new antibacterial drugs launched on the market¹³. The search for new antibiotics from natural products has been intensified, since the most antibiotics currently used in therapeutic are natural products or their derivatives, such as penicillin and erythromycin^{1, 24}.

The genus *Selaginella*, belongs to the family Selaginellaceae, is composed by 700 species¹⁵ with cosmopolitan distribution, which are more abundant in tropical regions, but they also occur in desert regions²⁸⁻²⁹. Some *Selaginella* species show a high power of adaptation to different stressful environments²⁷⁻²⁹. In Brazil, 46 species have been reported, which are found 6 species in the biome Pantanal, while 31 species occur in biome Amazon²⁸⁻³¹. Several phytochemical studies from the species *Selaginella* reported different metabolites, including flavonoids and biflavonoids, steroidal saponins, lignans, alkaloids and glycosylated phenylpropanoids³²⁻³⁴. In addition, extracts from *Selaginella* species have shown biological properties, such as antiplasmodial, leishmanicidal, antiviral, antifungal, antitumor, and antidiabetic^{25,35-38}.

Selaginella sellowii Hieron. is distributed across Mexico, Cuba, Colombia, Venezuela, Ecuador, Peru, Uruguay, Argentina, Paraguay, Bolivia, and Brazil ³⁹. It thrives in various regions and biomes in Brazil, including Caatinga, Cerrado, Atlantic Forest, and Pantanal, showcasing its remarkable adaptability ⁴⁰⁻⁴¹. As a terrestrial, epiphytic, or rupicolous lycophyte, *S. sellowii* possesses a notable ability to tolerate desiccation, enabling it to endure prolonged periods in a dried state. Additionally, this species can recover from complete water loss ⁴²⁻⁴⁴. Studies suggest that the high concentration of biflavonoid and flavonoid glycosylated derivatives can contribute to preventing oxidation during desiccation, while the presence of sugars and glycosylated substances can play a crucial role in the rehydration process ⁴⁵⁻⁴⁶.

The biflavonoids amentoflavone and robustoflavone were isolated from *S. sellowii* and revealed IC₅₀ of 0.1 μ M and 2.8 μ M, respectively, against the intracellular amastigotes of *Leishmania amazonensis*²⁵. In addition, amentoflavone induces mitochondrial dysfunction to kill *L. amazonensis*²⁶. Although there are chemical and biological studies from *Selaginella* in the literature, these data from *S. sellowii* and other species of *Selaginella* are still underexplored. Therefore, it is evident the importance of research that will contribute and expand the knowledge about members of the genus *Selaginella*.

Here, we aimed to perform a wide chemical characterization from *S. sellowii*, to isolate and to characterize the unpublished phenylpropanoid derivatives, besides we aimed to evaluate their anti-leishmanial, antibacterial, and antibiofilm properties.

EXPERIMENTAL SECTION

General Experimental Procedures

UV spectra were recorded either by HPLC high performance liquid chromatography coupled to diode array detection model SPD-M20A (Shimadzu). The NMR experiments were performed on a Avance Neo 500 Bruker spectrometer (11,75T) operating at 500 MHz for the

^1H frequency, using D_2O as solvent and TMSP (3-(trimethylsilyl) propionic-2,2,3,3- d_4 acid sodium salt) as internal standard reference at 0.00 ppm. NMR spectra (^1H - ^1H COSY, ^1H - ^1H TOCSY, ^1H - ^{13}C HSQC, ^1H - ^{13}C HMBC and Jres) were acquired and processed with default lab parameters. Coupling constants (J) were expressed in Hertz (Hz). ESI-QTOF MS data were obtained on a mass spectrometer with electrospray ionization and analyzers quadrupole and time-of-flight (MicrOTOF III, Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA), which was also coupled to a chromatography UFLC 20AD (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) and a diode array detector (DAD). A chromatography column Kinetex C-18 (Phenomenex, 2.6 μm , 150 x 2.1 mm) was used for the LC-DAD-MS analyses. Analytical and semipreparative HPLC were performed on an equipment LC-20AD (Shimadzu) coupled to a diode array detector SPD-M20A (Shimadzu). The column C18 (Shim-pack Prep-ODS, 5 μm , 20 mm x 25 cm, Shimadzu) were applied to isolate the phenylpropanoids. The HPLC-grade solvents used for chromatography analyses were methanol (J.T. Baker) and acetonitrile (J.T. Baker), as well as ultrapure water.

Plant material and collection area

S. sellowii was collected in June 2009 in the city of Campo Grande, Mato Grosso do Sul. The botanical identification was previously performed by Dr. Arnildo Pott and Msc. Vali Joana Pott from the Federal University of Mato Grosso do Sul (UFMS), and a voucher was deposited on GCMS herbarium of UFMS. This study is registered in the National System of Genetic Heritage (SisGen) under number 27218 (license CGEN/MMA 010273/2013-1).

The whole plant (root and aerial parts) was dried in a circulation air oven, and the dried material was powdered by knife mill and submitted for extraction.

Extraction and fractionated procedures

The extraction was optimized by accelerated solvent extractor (ASE 150 DionexTM[®]). The extraction was performed with subsequent solvents to obtain the extracts: (1) hexane and dichloromethane 8:2 (SsHxDC), (2) ethyl acetate and methanol 1:1 (SsAcMe), and (3) ethanol and water 7:3 (SsEtH). For these extractions, the parameters were static extraction cycle of 5 min, wash volume of 80%, pressure 1,500 psi, purge of 60 sec, and temperature of 100°C. The extracts were concentrated in a rotary evaporator under reduced pressure and lyophilized to obtain the extracts SsHxDC, SsAcMe, and SsEtH with the yields 2%, 39.5%, and 6.6%, respectively. Subsequently, SsAcMe and SsEtH were partitioned by liquid-liquid extraction to obtain the fractions with dichloromethane (frDC), ethyl acetate (frAc), and hydromethanol (frMe) from both crude extracts. The fractions SsAcMe_frDC, SsAcMe_frAc, SsAcMe_frMe, SsEtH_FrDC, SsEtH_FrAc and SsEtH_FrMe were obtained with the yields of 20, 38.5, 25.7, 6.6, 4.5, and 22%, respectively.

Isolation of phenylpropanoid derivatives procedures

The fraction SsEtH _FrMe was further purified by semipreparative-reversed phase HPLC. This fraction was selected, due to the higher ion intensities of the peaks relative to phenylpropanoid derivatives. The analyses were performed on an equipment LC-20AD (Shimadzu) coupled to a diode array detector SPD-M20A (Shimadzu). A Shimadzu C18 Shim-pack ODS (H) KIT (25 cm x 4.6 mm d.i., 5 µm) column was used and the mobile phase was composed by ultrapure water (A) and acetonitrile (B) both acidified with 0.01% (v/v) trifluoroacetic (TFA). For the semipreparative analysis, a flow rate of 9 mL/min was applied and the following gradient profile was used: 0-40 min – 5-15% of B, 40-55 min – 15% of B, 55-80 min – 15-20% of B, 80-90 min – 20-30% of B, 90-105 min – 30-100% of B, and 105-118 min – 100% of B. From this analysis, it was isolated seven new glycosylated

phenylpropanoid derivatives of high molecular weight that are **18** (5.3mg), **19** (8.46mg), **20** (6.52mg), **21** (5.74mg), **23** (5.17mg), **24** (4.12mg), **26** (3.52mg) (**Figure S1, Supplementary Material**).

Chemical analyses by LC-DAD-MS and LC-DAD

Crude extracts and their fractions were solubilized in water deionized and methanol (7:3, v/v) (2 mg/mL⁻¹), and 2 µL was injected into the LC-DAD-MS system. The analyses were monitored at 240-800 nm and acquired in negative and positive ion modes (m/z 120-1200). The MS/MS spectra were acquired by automatic method using a collision energy 45 to 65 V. A chromatography column Kinetex C-18 (Phenomenex, 2.6 µm, 150 x 2.1 mm) was used for the analyses and the mobile phase was composed by acetonitrile (B) and water (A), both acidified with 0.1% (v/v) formic acid, and the gradient profile applied was the following: 0-2 min – 3% of B, 2-25 min – 3-25% of B, 25-40 min – 25-80% of B, and 40-43 min – 80% of B. Nitrogen was used as nebulizing (4 Bar), drying (9 mL/min), and collision gas in the mass spectrometer, which was applied the capillary voltage of 2500 kV. The raw data were processed by Data Analysis software version 4.2 (Bruker). The molecular formula was determined based on the accurate mass considering errors up ± 5 ppm and mSigma below 30.

For the LC-DAD analyses, the equipment used was described in the previous item. The mobile phase was composed by ultrapure water (A) and acetonitrile (B) both acidified with 0.01% (v/v) formic acid). The chromatography column was an ACE C18 analytical column (25cm x 4.6mm i.d., 5µm). The gradient elution profile was 0-25 min – 5-15% of B, 25-50 min – 15-100% of B.

Culture of *Leishmania amazonensis*

Promastigote forms of *L. amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8) was maintained in m199 medium supplemented with 10% FBS, 10U/mL of penicillin and 10 µg/mL of streptomycin, at 25°C, with weekly increments. All assays with the promastigote forms were carried out with parasites in the exponential growth phase. The amastigote forms were obtained from cultures of differentiated macrophages of the THP-1 strain (ATCC TIB-202). For this purpose, THP-1 cells were kept at 37°C in a humid incubator with a 5% CO₂ atmosphere in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FBS and 50 µg/mL of gentamicin. Cultures were maintained through weekly passages until a population density of 1x10⁶ cells/mL is reached. For differentiation into macrophages, THP-1 cells were cultured in the presence of phorbol myristate acetate (PMA) at 100 nM. After 48 hours of incubation, the cells were washed with warm medium and incubated for 48 hours. The medium will be changed, and the cells will be incubated for another 24 hours before infection with the promastigote forms of *L. amazonensis*. Infection index was carried out with promastigotes in the stationary phase of growth, and THP-1-derived macrophage cultures were added at a ratio of 50:1 promastigote per macrophages. After 4 hours, the non-internalized parasites were washed with RPMI 1640 medium, and the infected cultures were incubated at 37°C in a humid atmosphere with 5% CO₂ to obtain the amastigote forms.

Biological activity against amastigotes of *Leishmania amazonensis*.

Biological activity evaluations against amastigote forms of *L. amazonensis* were performed only with the most promising samples against promastigote forms and with reduced cytotoxicity against macrophages derived from THP-1 cells. Assays were performed in technical quintuplicate, in 96-well plates and initial inoculum of 2.5x10⁴ infected macrophages per well. After treatment, the cells were fixed in methanol and stained with Nile red and Hoechst

for automatic counting in the Operetta CLS High Content Analysis System equipment ⁴⁷. The IC₅₀ calculation was performed from the infectivity indices ⁴⁸.

Cytotoxic Activity

The cytotoxicity assays against *L. amazonensis* amastigotas were performed from extracts and fractions of *S. sellowii* and were also applied *L. amazonensis* macrophages derived from THP-1 cells (ATCC TIB-202) which will be seeded in 96-well plates (2x10⁴ cells/well) in RPMI medium, being supplemented with 10% FBS and kept at 37°C, in a CO₂ atmosphere. After 24 h, the cells were incubated with different concentrations of the active samples for 24h. The evaluation of cytotoxic activity was determined by the MTT colorimetric assay⁵⁸. The CC₅₀ values were calculated from the average inhibition percentage, in relation to the untreated control, and obtained through technical triplicate. The CC₅₀ values were also used to calculate the selectivity index.

Bacterial strains and culture conditions

Bacterial strains *S. aureus* ATCC 25904 (Newman) and specific culture techniques were used to carry out this study. Fixed concentrations with an optical density at 600 nm (OD₆₀₀) of 0.150, equivalent to approximately 3 × 10⁸ colony forming units per milliliter (CFU/mL) were added to Mueller-Hinton agar (MH) medium, which were incubated at 37°C for 24 hours. These suspensions were prepared in a sterile 0.9% NaCl solution.

Bacterial growth and biofilm formation evaluations

To evaluate the antimicrobial activity of the extracts and fractions, a stock solution and serial dilutions will be previously prepared in sterile 96-well polystyrene microplates (Costar Corning 3599, USA)²⁴. *S. sellowii* extracts and fractions were tested at final concentrations of

0.1 and 0.5 mg/mL. The negative control received vehicle (2% DMSO), and the positive control received vancomycin 8 µg/mL instead of sample. After a period of 24 hours, the culture plates were placed in an incubator with a constant temperature of 37°C. To evaluate bacterial growth, the difference between absorbance readings at OD600 nm was measured, comparing the initial value with the value obtained after 24 hours of incubation. For comparison purposes, the vehicle control was 100% bacterial growth. For the evaluation of biofilm formation, the crystal violet test was used in microtiter plates with 96 wells. The incubation period at 60°C was 24 hours. To account for 100% biofilm formation, the extracts will be replaced by 2% DMSO. Values above 100% will represent the stimulation of biofilm formation compared to the untreated antibiofilm sample. Inhibition of biofilm formation was determined by absorbance at 570 nm²⁴.

RESULTS AND DISCUSSION

Obtention of enriched fraction in glycosylated phenylpropanoid derivatives

The extracts from *S. sellowii* were initially obtained by accelerated solvent extractor (ASE 150 Dionex™[®]). The optimized extraction method resulted in the crude extracts: SsHxDC, SsAcMe, and SsEtH. The ASE extraction is a modern technique that applies solvents at high temperature (above to boiling point of solvents, e.g. 100°C) with nitrogen atmosphere and high pressures, resulting in extracts with higher yields and reproducibility. The control of parameters is fundamental for the efficiency and selectivity of extraction method, such as pressure, temperature, extraction cycles, and solvent composition, since these parameters influence the extraction process and efficiency⁴⁸. Beyond reproducibility and high efficiency, ASE also exhibits reduced time extraction, and lower consumption of solvent extraction compared to conventional methods⁴⁹⁻⁵¹. The inert gas applied in the extraction process (nitrogen) prevents a possible loss of material by degradation reactions (e.g. oxidation) of the analytes⁴⁹.

Extraction using ASE was applied to obtain extracts from *S. sellowii*, where the removal of lipophilic compounds was performed through extraction with SsHxDC and, subsequently, a polar extract (SsEtH) was obtained. This hydroethanolic extract revealed phenylpropanoids and biflavonoids in its composition, but the phenylpropanoids were putatively annotated. Additionally, this hydroethanolic extract showed activity against amastigotes of *L. amazonensis* at IC₅₀ 20.2 µg/mL²⁵.

Thus, here we optimized the extraction by ASE and fractionation from *S. sellowii* to obtain enriched fractions in biflavonoids and phenylpropanoid derivatives to investigate the role of these components for the antileishmanial activity and to facilitate the isolation and purification of the new phenylpropanoid derivatives. For this purpose, different extractor

solvent compositions were applied, which were selected based on the physicochemical characteristics of the compounds of interest. Initially, the extraction method applied a mixture with hexane and dichloromethane to remove the most nonpolar substances, such as fatty acids and waxes. Subsequently, the polarity of the extractor solvent was increased to obtain the constituents distributed according to their polarities. To monitor this process, the extracts were analyzed by LC-DAD to determine their chemical profile of extracts, since biflavonoids and phenylpropanoid derivatives showed characteristic UV spectra⁵², as illustrated in **Figure 1**.

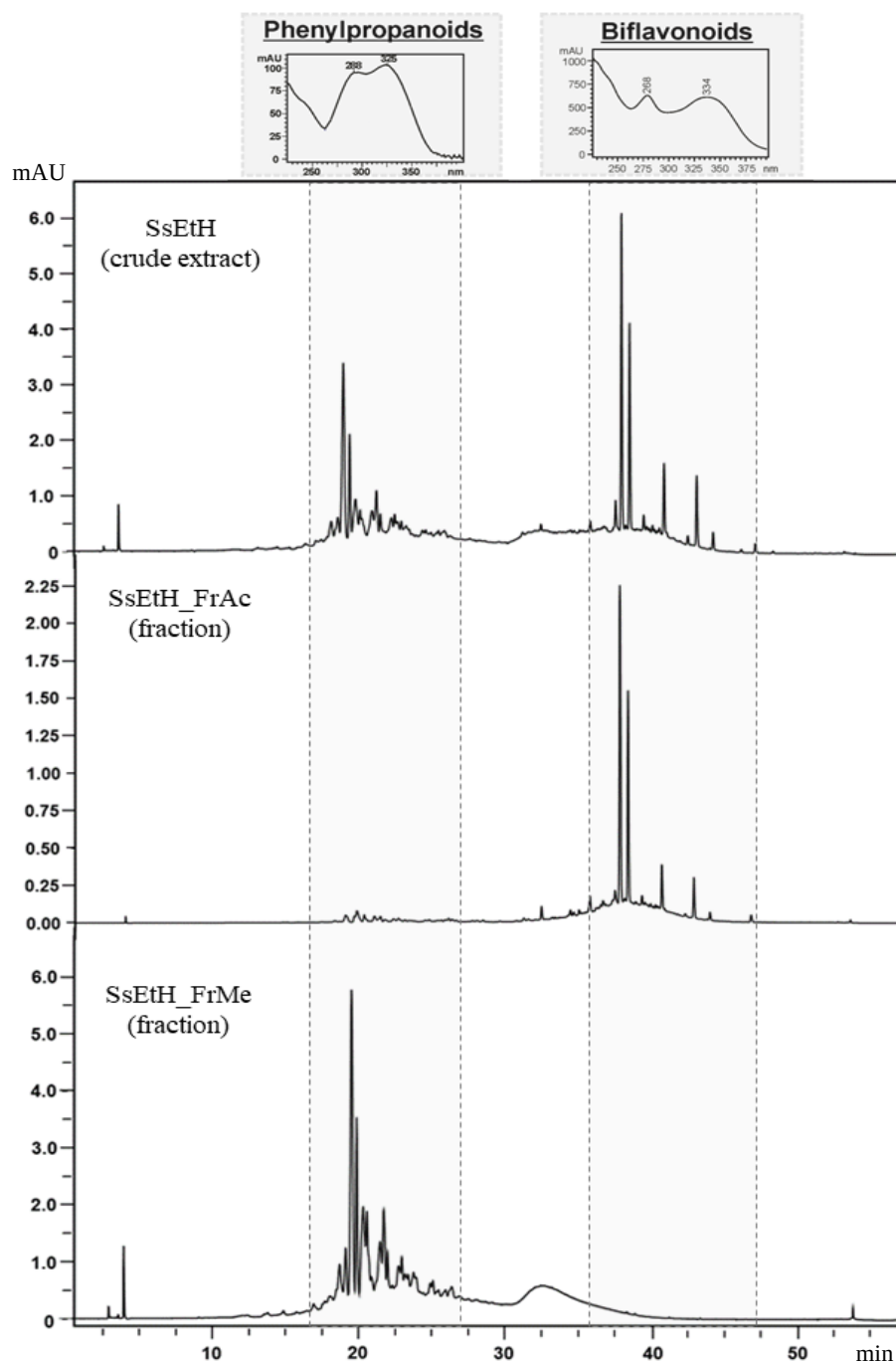


Figure 1. Chromatographic profile at 325 nm from the extract SsEtH and its fractions SsEtH_FrAc and SsEtH_FrMe of *Selaginella sellowii*. The ultraviolet spectra (240-400 nm) of bioflavonoids and phenylpropanoid derivatives were highlighted.

The SsEtH extract showed similar intensity of peaks relative to biflavonoids and phenylpropanoids derivatives, while the fractions SsEtH_FrAc revealed chromatographic peaks more intense for biflavonoids and SsEtH_FrMe for phenylpropanoid derivatives (**Figure 1**).

These results demonstrate the method was efficient and selective to enrich the fractions with the interest compounds.

Annotation of the constituents by LC-DAD-MS

The fraction SsEtH_frMe was analyzed by LC-DAD-MS to annotate its constituents and to select target compounds for the isolation procedures. So, we annotated 13 phenylpropanoid derivatives and 3 biflavonoids by LC-DAD-MS data from fraction SsEtH_frMe (**Table 1, Figure 2**). The annotation of compounds was performed according to the spectral data of UV, accurate MS, and fragmentation pattern compared to data published in the literature.

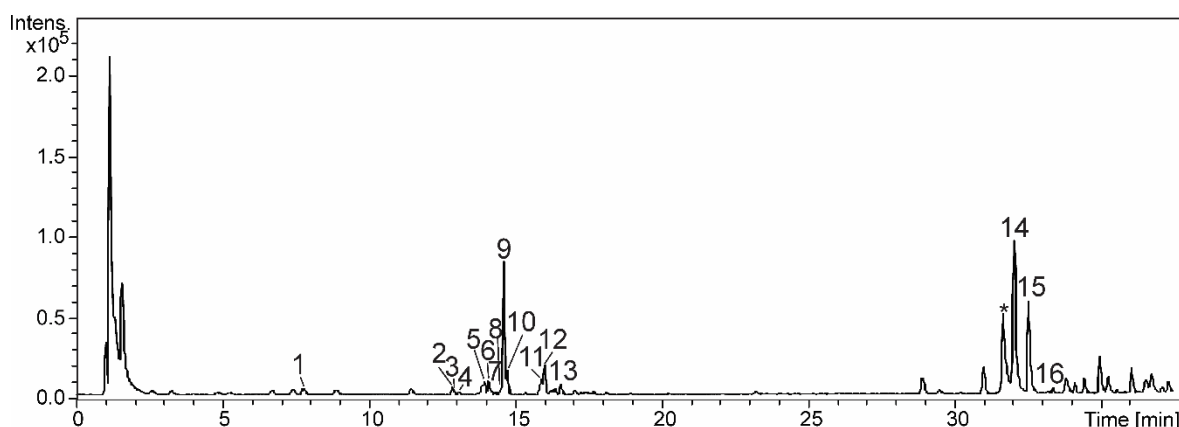


Figure 2. Base peak chromatogram (negative ion mode) from the fraction SsEtH_frMe.

Compounds **1-13** revealed two absorption bands at ≈ 299 and 325 nm, which are compatible to the chromophore of caffeic acid ⁵². The compound **1** showed an intense ion at m/z 665.1935 $[M-H]^-$ relative to molecular formula $C_{27}H_{38}O_{19}$. From this deprotonated ion, the fragment ions m/z 503.1388 ($C_{21}H_{27}O_{14}^-$) and 323.0762 ($C_{15}H_{15}O_8^-$) were observed and they were yielded from losses of one and two hexoses with subsequent loss of a water molecule. In addition, the fragment ion at m/z 179.0356 is relative to caffeic acid ($C_9H_8O_4$), while the ion at m/z 161.0242 is yielded after the loss of a H_2O molecule (18 u) from caffeic acid.

Compounds **2**, **4**, **9**, and **11-12** revealed double charged ions at m/z 818 $[M-2H]^{-2}$ in negative ion mode, which are compatible to the molecular formula $C_{72}H_{86}O_{43}$. They revealed a similar fragmentation pattern observed for metabolite **1**, such as the product ions at m/z 737, 656, and 575 that are yielded from consecutive losses of caffeoyl and/or hexosyl losses). Therefore, the compounds **2**, **4**, **9** and **11-12** were annotated as hexa-*O*-hexosyl tetra-caffeic acid.

Table 1. Annotated compounds from *S. sellowii* by LC-DAD-MS

Peak	RT (min)	Compound	UV (nm)	MF	Positive ion mode (<i>m/z</i>)		Negative ion mode (<i>m/z</i>)	
					[M+H] ⁺	MS/MS	[M-H] ⁻	MS/MS
1	7.8	tri- <i>O</i> -hexosyl caffeic acid	294, 321	C ₂₇ H ₃₈ O ₁₉	-	-	665.1930	503, 323, 179, 161
2	12.9	hexa- <i>O</i> -hexosyl tetra-caffeic acid	290, 324	C ₇₂ H ₈₆ O ₄₃	-	-	818.2212 ⁻²	737, 656, 575, 405, 243, 161
3	13.0	hexa- <i>O</i> -hexosyl di-caffeic acid	294, 324	C ₅₄ H ₇₄ O ₃₇	-	-	656.1821 ⁻²	575, 494, 243, 179, 161
4	13.2	hexa- <i>O</i> -hexosyl tetra-caffeic acid	288, 324	C ₇₂ H ₈₆ O ₄₃	-	-	818.2212 ⁻²	737, 656, 575, 405, 243, 161
5	14.0	tetra- <i>O</i> -hexosyl di-caffeic acid	299, 329	C ₄₂ H ₅₄ O ₂₇	991.2922	829, 667, 487, 325, 163	989.2768	827, 665, 503, 179, 161
6	14.2	hepta- <i>O</i> -hexosyl tetra-caffeic acid	299, 321	C ₇₈ H ₉₆ O ₄₈	-	-	899.2498 ⁻²	818, 737, 656, 575, 405, 179, 161
7	14.2	tetra- <i>O</i> -hexosyl di-caffeic acid	299, 321	C ₄₂ H ₅₄ O ₂₇	-	-	494.1364 ⁻²	413, 332, 179, 161
8	14.5	hepta- <i>O</i> -hexosyl tetra-caffeic acid	299, 320	C ₇₈ H ₉₆ O ₄₈	-	-	899.2488 ⁻²	818, 737, 656, 575
9	14.6	hexa- <i>O</i> -hexosyl tetra-caffeic acid	288, 324	C ₇₂ H ₈₆ O ₄₃	-	-	818.2202 ⁻²	737, 656, 575, 179, 161
10	14.7	penta- <i>O</i> -hexosyl tri-caffeic acid	299, 325	C ₅₇ H ₇₀ O ₃₅	-	-	656.1807 ⁻²	575, 494, 413, 161
11	15.9	hexa- <i>O</i> -hexosyl tetra-caffeic acid	299, 325	C ₇₂ H ₈₆ O ₄₃	-	-	818.2212 ⁻²	737, 656, 575, 405, 243, 161
12	16.0	hexa- <i>O</i> -hexosyl tetra-caffeic acid	298, 321	C ₇₂ H ₈₆ O ₄₃	-	-	818.2218 ⁻²	737, 656, 575, 405, 243, 161
13	16.5	tri- <i>O</i> -hexosyl tetra-caffeic acid	300, 323	C ₆₆ H ₇₆ O ₃₈	-	-	737.1959 ⁻²	656, 575, 494, 161
14	32.3	Amentoflavone	269, 338	C ₃₀ H ₁₈ O ₁₀	539.0973	497, 403, 377, 347, 335, 283, 153, 121	-	-
15	32.8	Robustaflavone	269, 340	C ₃₀ H ₁₈ O ₁₀	539.0973	521, 465, 387, 283, 270, 153, 121	-	-
16	33.5	Robustaflavone methyl ether	270, 340	C ₃₁ H ₂₀ O ₁₀	-	-	551.1004	519, 451, 389, 374

RT: retention time; MF: molecular formula; ⁻²: [M-2H]⁻²

In the MS, the compound **3** presented the double charge ions at m/z 656.1821 $[M-2H]^{-2}$ relative to molecular formula $C_{54}H_{74}O_{37}$, while the metabolites **5** and **6** revealed the ions m/z 989.2768 $[M-H]^{-}$ and 494.1364 $[M-2H]^{-2}$ and they suggested the molecular formula $C_{42}H_{54}O_{27}$. The peaks **6** and **8** showed an intense double charge ion at m/z 889.2498/889.2488, indicating the molecular formula $C_{78}H_{96}O_{48}$. The subsequent losses of hexosyl and caffeoyl groups were also observed for all these phenylpropanoid derivatives, such as the fragment ions at m/z 575 and 494 for compound **3** and m/z 827, 665 and 503 for compound **5**. They also revealed the fragment ions at m/z 179 [Caffeic acid- H] $^{-}$ and 161 [Caffeic acid- $H-H_2O$] $^{-}$, confirming the caffeoyl groups in their structures as described previously here. Thus, these phenylpropanoids were annotated as hexa-*O*-hexosyl di-caffeic acid (**3**), tetra-*O*-hexosyl di-caffeic acid (**5** and **7**), and hepta-*O*-hexosyl tetra-caffeic acid (**6** and **8**).

Beyond phenylpropanoid derivatives, three biflavonoids were also annotated from the fraction SsEtH_frMe fraction, which were already described from *S. sellowii*. These biflavonoids were identified mainly by comparison of retention times and spectral data (UV, MS, and MS/MS) reported in the literature for our research group^{25, 36-37, 53}. The peaks **14-16** showed two absorption bands at the wavelength $\approx$ 265 and 338 nm that are characteristic of flavone chromophores^{25, 54, 56, 57}. The metabolites **14-15** and **16** showed intense ions at m/z 539.0973 $[M+H]^{+}$ and 551.1004 $[M-H]^{-}$ that confirmed the molecular formula $C_{30}H_{19}O_{10}$ and $C_{31}H_{20}O_{10}$. The fragment ions observed for **14**, **15** and **16** were compatible to biflavonoids amentoflavone, robustaflavone and robustaflavone methyl ether, respectively^{25, 36-37, 59, 56, 57}. Compound **14** showed fragments at m/z 497, 403, 377, 347, 335, 283, 153 and 121 that are characteristic for amentoflavone^{37,59}, while the compound **15** presented the fragment ions at m/z 521, 465, 387, 283, 270, 153 and 121 that is compatible to the biflavonoid robustaflavone, similarly to the observed for **16**^{37,59}.

Biflavonoids have been described from different species of *Selaginella* and these components have shown biological properties such as anti-cancer, anti-inflammatory and antimicrobial²⁵. Twelve biflavonoids from amentoflavone and hinokiflavone derivatives were isolated from the ethyl acetate fraction of *S. bryopteris*, and eleven of these compounds were evaluated *in vitro* against *Plasmodium falciparum*, *Leishmania donovani*, *Trypanosoma bruceirhodesiense* and *Trypanosoma cruzi*. The compounds 2,3-dihydroinocyflavone and 7,7,4-tri-*O*-methylmentoflavone showed higher activity against *L. donovani* with IC₅₀ of 1.6 μM and *P. falciparum* (IC₅₀ of 0.26 μM), respectively³⁵. Amentoflavone and robustaflavone were also isolated from *S. tamariscina*, showing inhibition of xanthine oxidase, an important enzyme that triggers uric acid⁵⁵. In addition, amentoflavone and robustaflavone, isolated from *S. sellowii*, showed IC₅₀ of 0.2 and 2.8 μM against amastigotes of *L. infantum*²⁵.

Although the biflavonoids are promising as antileishmanial compounds, the activity of phenylpropanoid derivatives and their role for the biological properties from *S. sellowii* extracts are underexplored yet.

Structural characterization of the isolated phenylpropanoids

The phenylpropanoid **9** (*m/z* 818.2202 [M-2H]⁻², C₇₂H₈₆O₄₃), isolated by semi-preparative LC-DAD (**Figure S1 and S2, Supplementary Material**), was structurally characterized by NMR and HR-ESI MS. The chemical shifts of ¹H and ¹³C NMR spectra were listed and summarized in **Table 1**. Beyond the unidimensional techniques, bidimensional analysis by HMBC, HSQC, COSY, J-Resolved, and TOCSY contour maps were also applied to assist the structural elucidation of the isolated phenylpropanoid, since it is a complex structure.

The HR-ESIMS spectra of substance **9** revealed an intense ion at *m/z* 818.2205 [M-2H]⁻², which is compatible to the molecular formula C₇₂H₈₆O₄₃, and its UV spectra was similar

with the chromophore of caffeic acid (≈ 299 and 325 nm)⁵². Its fragmentation profile was the same described for compound **9** (**Table 1**).

NMR data confirmed that the substance **9** is symmetric, as observed from the integration of all signals in the ^1H NMR, (**Figure S3, Supplementary Material**), and comparing its molecular formula $\text{C}_{72}\text{H}_{86}\text{O}_{43}$ (**Figure 3**). ^1H NMR spectrum of compound **9** (**Table 2, Figure S3, Supplementary Material**) exhibited signals at 6.90-6.80 ppm and the integration was correspondent to 12 aromatic hydrogens. Four doublets at δ 7.47 (H-7), 7.35 (H-7'), 6.19 (H-8), and 6.12 (H-8') were observed, which are relative to two olefinic hydrogens for each signal, and they exhibited coupling constants of 15.8 Hz, indicating the *trans* configuration (**Table 2**). From COSY experiment (**Figure S4-5, Supplementary Material**), the correlation of hydrogen δ 7.47 with δ 6.19 was observed, as well as the signal δ 7.35 with δ 6.12, and they correlated with the chemical shifts at δ 149.3, 117.9, 150.6 and 116.2 in the HSQC spectra, respectively (**Figure S6, Supplementary Material**). These chemical shifts suggested a α,β -unsaturated carbonyl group, as described for caffeic acid⁶⁰, since they are deshielded for the positions C-7/C-7'. Additionally, these olefinic hydrogens correlated to δ 170.7 (C-9) and 170.9 (C-9') of carbonyl groups in HMBC (**Figure S7 -9, Supplementary Material**). To determine the chemical shifts of each caffeic acid unit, the correlations observed in HMBC spectrum were essential and they were attributed for the **A1** and **A2** units, as described in **Table 2 (Figure S7 Supplementary Material)**.

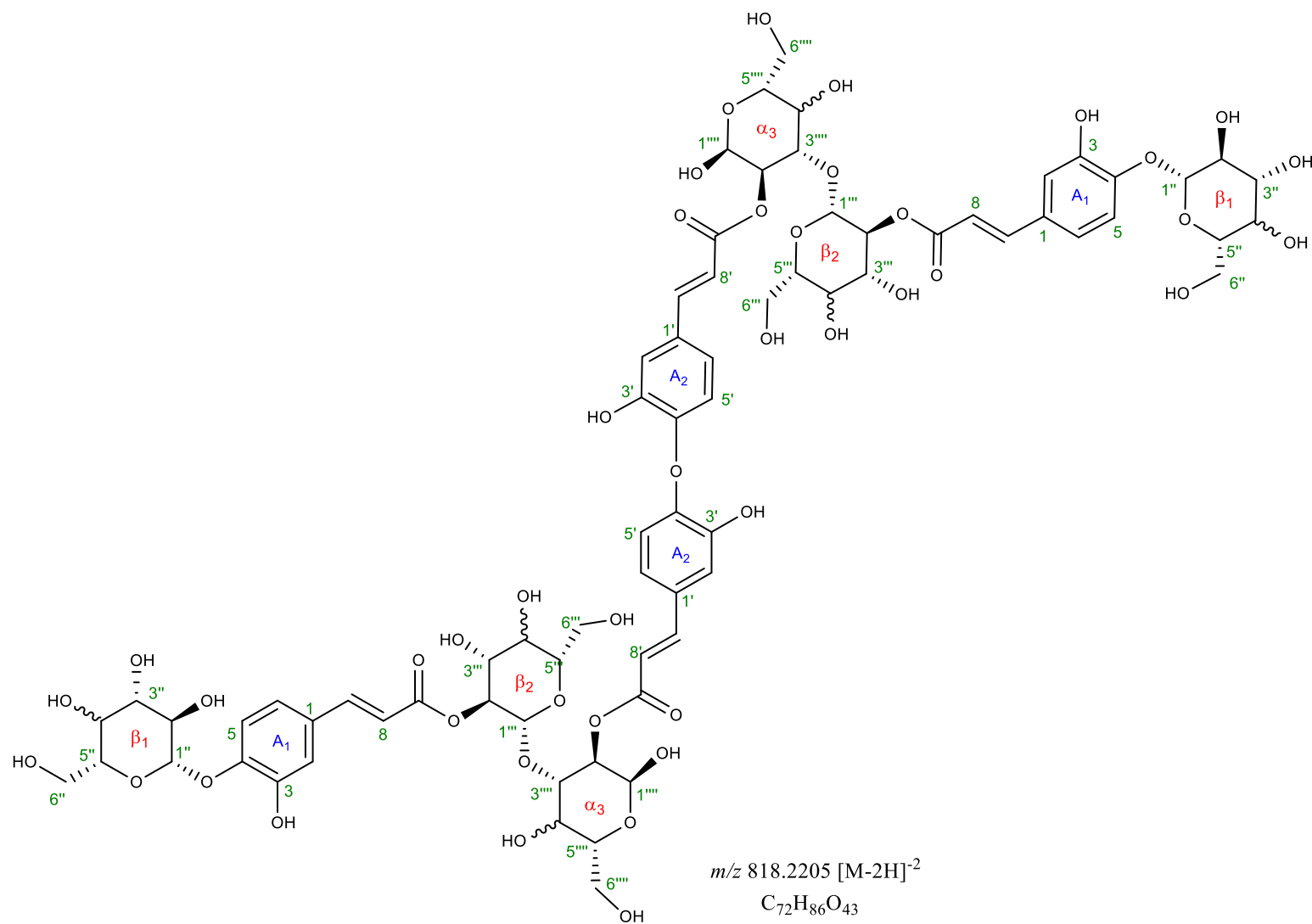


Figure 3. Chemical structure of the phenylpropanoid **9**

The aromatic hydrogens were observed at δ 6.90-6.83 that corroborated and trisubstituted aromatic ring (**Figure S3, Supplementary Material**). These hydrogens are connected to carbons at δ 125.9, 125.2, 119.1 and 118.1, as observed in the HSQC contour map (**Figure S6, Supplementary Material**). In addition, the carbons at δ 149.7 and 148.0 of unit **A1** and δ 150.5 and 147.4 of unit **A2**, attributed for each unit from correlation in HMBC (**Figure S7-8, Supplementary Material**), confirmed the hydroxyl substituents of catechol type, similarly to the observed for caffeic acid. However, the chemical shift at δ 150.5 confirmed the position for linked a caffeic acid unit symmetrically, since it was lightly deshielded (**Figure S7, Supplementary Material**).

Several signals were observed in the 5.30-3.00 ppm region, compatible to typical oxymethine and oxymethylene hydrogens of sugars ⁶¹. In the ¹H NMR spectrum of **9**, three hydrogens were observed at δ 5.28 (*d*, *J* = 4.0 Hz), 5.01 (*d*, *J* = 7.2 Hz) and 4.09 (*d*, *J* = 7.2 Hz), which are consistent to anomeric hydrogens (**Figure S10-11, Supplementary Material**). These hydrogens are relative to the carbon atoms at δ 104.6 (C-1'''), 103.3 (C-1''), and 92.9 (C-1'''), respectively. For each sugar, 6 carbons were observed and attributed from the data in the HMBC and TOCSY, and so the sugars in the isolated phenylpropanoid are hexoses (**Figure S7-8, Supplementary Material**). The glycosidic bond can be classified as α or β depending on the position of the hydroxyl in the anomeric position, where α is in axial and β in equatorial, that impacts in the values of coupling constants (*J*) of the hydrogens referring to the anomeric. The values of coupling constants of 7-8 Hz range indicates β configuration and 3-4 Hz range indicates α configuration for the pyranoses ⁶¹. Therefore, the anomeric hydrogen at δ 5.28 (*d*) with *J* of 4.0 Hz confirmed the sugar configuration of α (**α 3**), while the other hydrogens with *J* of 7.2 Hz (δ 5.01 *d* and 4.09 *d*) are β (**β 1, β 2**) (**Figure S10-11, Supplementary Material**). Furthermore, H-2''' of hexose **α 3** revealed as a doublet at δ 4.72 with *J* of 9.0 and 4.0 Hz

indicating H_{eq} - H_{ax} coupling between the H-2''' and H-1''' and confirmed the hydroxyl in the axial position (**Figure S10-11, Supplementary Material**).

The HMBC spectrum of **9** revealed correlations between anomeric hydrogen at δ 4.09 (H-1''') and 3.74 (H-1''') with the carbon at δ 86.0 (C-3''') and 104.6 (C-1''') respectively, which confirms the connection between the β 2 and α 3 hexoses on carbons C-1''' and C-3''' (**Figure S7 and S12-13, Supplementary Material**). It also was possible to observe in HMBC the correlation between hydrogen at δ 4.71 (H-2''') and the carbon at δ 170.7 (C-9). In addition to this important correlation, the anomeric H-1'' at δ 5.02 (β 1) correlates with carbon δ 149.7 (C-4) of caffeic acid unit **A1** (**Figure S7-8, Supplementary Material**). Therefore, the observation of both correlations confirmed that caffeic acid (**A1**) is linked to two hexoses at C-2''' (β 2) and C-1'' (β 1) (**Figure S7-8, Supplementary Material**). For the second caffeic acid unit (**A2**), only one ester-type bond with hexose α 3 is observed through the correlation of H2''' (δ 4.72) with the carbon at δ 170.9 (C9') (**Figure S7-8, Supplementary Material**). Therefore, for the phenylpropanoid **9** **A1** is linked to hexose β 1 and hexose β 2, while **A2** is linked to hexose α 3, and these O-glycosidic type bonds were confirmed by chemical shifts observed in the ^{13}C NMR spectrum (**Figure S7, Supplementary Material**).

^{13}C NMR spectra of compound **9**, in addition to containing the signals relating to the six O-hexose carbons for every three anomeric hydrogen atoms (β 1, β 2 and α 3), also revealed another 18 carbons relating to the skeleton of two caffeic acids (**A1** and **A2**), and in both, the ^{13}C NMR spectra revealed four olefinic carbons, two carbonyl carbons and 12 aromatic carbons (**Figure S7, S14-15 Supplementary Material**). The correlation between the ^{13}C and ^1H NMR spectra with the suggested groups in each region of the hydrogen spectrum have been summarized in **table 2**.

Table 2. NMR spectral data (D₂O, 500 MHz) from phenylpropanoid **9**.

Position	Unit	δ_{H} (<i>J</i> in Hz)	¹³ C		COSY	TOCSY	HMBC
			δ_{C}	C			
1		-	131.8	C	-	-	-
2		6.87 ^a <i>m</i>	117.9	CH	-	-	C-1 (131.8), C-3 (148.0), C-4 (149.7), C-6 (125.2), C-7 (149.3)
3		-	148.0	C	-	-	-
4		-	149.7	C	-	-	-
5	A1	6.90 ^a <i>m</i>	119.1	CH	-	-	C-1' (129.2), (C-4' / C-7') (150.5 / 150.6), C-3' (147.4), C-2' (117.7)
6		6.83 ^a <i>m</i>	125.2	CH	-	-	C-1 (131.8), C-2 (117.9), C-3 (148.0), C-7 (149.3)
7		7.47 <i>d</i> (15.8)	149.3	CH	H-8 (6.19)	H-8 (6.19)	C-9 (170.7), C-8 (117.9), C-1 (131.8), C-6 (125.2)
8		6.19 <i>d</i> (15.8)	117.9	CH	H-7 (7.47)	H-7 (7.47)	C-2''' (76.7), C-9 (170.7), C-7 (149.3), C-1 (131.8)
9		-	170.7	C	-	-	-
1'		-	129.2	C	-	-	-
2'		6.85 ^a <i>m</i>	117.7	CH	-	-	C-1' (129,2), C-6' (125,9), C-3' (147,4), (C-4' / C-7') (150,5 / 150,6)
3'	A2	-	147.4	C	-	-	-
4'		-	150.5	C	-	-	-
5'		6.83 ^a <i>m</i>	118.1	CH	-	-	C-1 (131.8), C-2 (117.9), C-3 (148.0), C-7 (149.3)

6'		6.90 ^a <i>m</i>	125.9	CH	-	-	C-1' (129.2), (C-4' / C-7') (150.5 / 150.6), C-3' (147.4), C-2' (117.7)
7'		7.35 <i>d</i> (15.8)	150.6	CH	H-8' (6.12)	H-8' (6.12)	C-9' (170.9), C-8' (116.2), C-2' (117.7), C-3' (147.4), C-1' (129.2), C-6' (125.9)
8'		6.12 <i>d</i> (15.8)	116.2	CH	H-7' (7.35)	H-7' (7.35)	C-2'''' (74.6), C-9' (170.9), (C-7' / C-4') (150.6 / 150.5), C-1'(129.2), C-6' (125.9)
9'		-	170.9	C	-	-	-
1"		5.02 <i>d</i> (7.2)	103.3	CH	H-2" (3.69)	(H-2", H-3", H-4") (3.69/ 3.65 / 3.66), H-5" (3.54), H-6" (3.80), H-6" (3.96)	C-2" (78.3), C-3" (79.0), C-4 (149.7)
2"		3.69 <i>m</i>	78.3	CH	-	-	-
3"	β1	*3.65 ^a <i>m</i>	79.0	CH	-	-	-
4"		*3.66 ^a <i>m</i>	75.7	CH	-	-	-
5"		*3.54 ^a <i>m</i>	72.3	CH	-	-	-
6"		3.80, 3.96 <i>m</i>	63.4	CH ₂	H-6" (3.80)	H-1" (5.02), H-2"/H-3"/H-4" (3.69/3.65/3.66), H-5" (3.54), H-6" (3.80)	C-2" (78.3), C-3" (79.0), C-5" (72.3), C-6" (63.4)
1'''		4.09 <i>d</i> (7.2)	104.6	CH	H-2''' (4.71)	H-4''' (3.47), H-5''' (3.06), H-3''' (3.56), H-2''' (4.71)	C-3'''' (86.0)
2'''	β2	4.71 <i>dd</i> (9.8, 7.2)	76.7	CH	H-1''' (4.09), H-3''' (3.56)	H-1''' (4.09), H-4''' (3.47), H-5''' (3.06)	C-9 (170.7), C-3'''' (86.0), C-4'''' (70.4), C-1''' (104.6), C-2''' (76.7), C-3''' (76.4)
3'''		3.56 ^a <i>m</i>	76.4	CH	H-2''' (4.71), H-4''' (3.47)	-	-

4'''		3.47 ^a <i>m</i>	71.9	CH	-	H-1''' (4.09), H-2''' (4.71), H-5''' (3.06), H-6''' (3.67 e 3.78), H-1''' (4.09), H-2''' (4.71), H-3''' (3.56), H-4''' (3.47), H-6''' (3.67 / 3.78)	-
5'''		3.06 <i>m</i>	78.7	CH	H-6''' (3.67 / 3.78)		C-1''' (104.6), C-3''' (76.4), C-4''' (71.9), C-6''' (63.1)
6'''		3.67 ^a <i>m</i>	63.1	CH ₂	-	-	-
		3.78 ^a <i>m</i>			-	-	-
1''''		5.28 <i>d</i> (4.0)	92.9	CH	H-2'''' (4.72)	H-2'''' (4.72), H-3'''' (3.74), H-5'''' (3.39), H-4''''/H-6'''' (3.56 / 3.57)	(C-2'''' / C-5''') (74.6 / 74.5), C-3'''' (86.0)
2''''		4.72 <i>dd</i> (9.0, 4.0)	74.6	CH	H-1'''' (5.28), H-3'''' (3.74)	H-3'''' (3.74), H-4'''' (3.56), H-5'''' (3.39)	C-9' (170.9), C-3'''' (86.0), C-4'''' (70.4), C-1''' (104.6), C-2''' (76.7), C-3''' (76.4)
3''''	α3	3.74 <i>t</i> (9.0)	86.0	CH	H-2'''' (4.72), H-4'''' (3.56)	H-1'''' (5.28), H-2'''' (4.72), H-5'''' (3.39), H-6'''' (3.57 e 3.56)	C-1''' (104.6), (C-2'''' / C-5''') (74.6 / 75.5), C-4'''' (70.4), C-6'''' (62.6)
4''''		3.56 ^a <i>m</i>	70.4	CH	-	-	-
5''''		3.39 ^a <i>m</i>	74.5	CH	H-4'''' (3.56)	H-1'''' (5.28), H-2'''' (4.72), H-3'''' (3.74), H-6'''' (3.57 / 3.6)	C-1'''' (92.9), C-3'''' (86.0), C-4'''' (70.4)
6''''		3.57 ^a <i>m</i>	62.6	CH ₂	-	-	-
		3.78 ^a <i>m</i>			-	-	-

^a:overlapped signal

The fragmentation and mass data obtained by HPLC-DAD-EM with double charged ions at m/z 818 $[M-2H]^{-2}$ in negative ion mode were essential for confirming the molecular formula $C_{72}H_{86}O_{43}$ and elucidating the structure. The data revealed losses of seis hexoses and four caffeic acids, indicating a symmetric structure. Thus, the NMR data corroborated the findings. Therefore, from all the analyzes of the spectroscopic data (uni- and two-dimensional) and spectrometric it was verified that **9** is the Bis-1''-O-caffeoyl(1''→4)- β -gluco/galacpyranosyl(9→2''')- α -gluco/galactopyranosyl(1'''→3''')-caffeoyl-(2'''→9')- β -gluco/galactopyranosyde being an unprecedented structure (**Figure 3**).

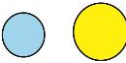
Antileishmanial, antibacterial, and antibiofilm activities

The antileishmanial properties of the extracts (SsAcMe and SsEtH) and fractions (SsEtH _FrDC, SsEtH _FrAc, and SsEtH _FrMe) from *S. sellowii* were evaluated against amastigota forms of *L. amazonensis* (**Table 3**).

The extracts SsAcMe and SsEtH revealed IC_{50} of 78.8 and 137.8 $\mu\text{g/mL}$, respectively, against *L. amazonensis* amastigotes. These findings suggest that the antileishmanial activities are not attributed to phenylpropanoid derivatives, as an increase in the concentration of phenylpropanoids in SsEtH negatively impacted the activity. For the fractions, SsEtH _FrDC presented the best result with IC_{50} of 34.1 $\mu\text{g/mL}$, which is a fraction enriched in biflavonoids. These results are in agreement with previous studies of this class of compounds, which have only been observed in the species *S. sellowii* so far. An orally administered hydroethanolic extract showed antileishmanial activity of 99.2% parasite suppression, and intralesional administration resulted in 98.5% parasite suppression³⁶. Additionally, the biflavonoids amentoflavone and robustaflavone from *S. sellowii* showed activities against *L. amazonensis* intracellular amastigote forms, exhibiting IC_{50} values of 0.1 and 2.8 μM , respectively²⁵.

Therefore, the activity directly on the amastigota forms of the parasite is not directly related to the glycosylated phenylpropanoid derivatives.

Table 3. Antileishmanial activities from extracts and fractions of *S. sellowii*. (Blue = phenylpropanoid derivatives, yellow= biflavonoids. The size of circles represents the peak intensities for these secondary metabolites)

	Extracts/fractions	IC ₅₀ (µg/mL)	Compounds
Extracts	SsAcMe	78.8	
	SsEtH	137.8	
Fractions	SsEtH_FrDC	34.1	
	SsEtH_FrAc	87.37	
	SsEtH_FrMe	>150.0	

The SsAcMe extract inhibited approximately 90% and 70% of the biofilm formation at 0.5 and 0.1 mg/mL concentrations, respectively, and it did not present activity in the bacterial growth. The SsEtH extract, at concentration of 0.5 mg/mL, inhibited about 55% of the biofilm formation without impacting in the bacterial growth. Therefore, SsEtH extract showed lower antibiofilm activity compared to SsAcMe.

The SsEtH_FrAc fraction inhibited approximately 75% of the biofilm formation at 0.1 mg/mL, but did not show an increment for activity at the highest concentration evaluated. The SsEtH_FrDC fraction inhibited approximately 70% of biofilm formation at a concentration of 0.5 mg/mL, but a classical antibiotic activity was observed.

The results showed that the SsEtH extract and the SsEtH_FrAc fraction were more effective to inhibit the biofilm formation at a concentration of 0.1 mg/mL. Therefore, there was

an improvement in the antibiofilm activity with the increase in the concentration of biflavonoid, which we can suggest an important role of these compounds for this activity.

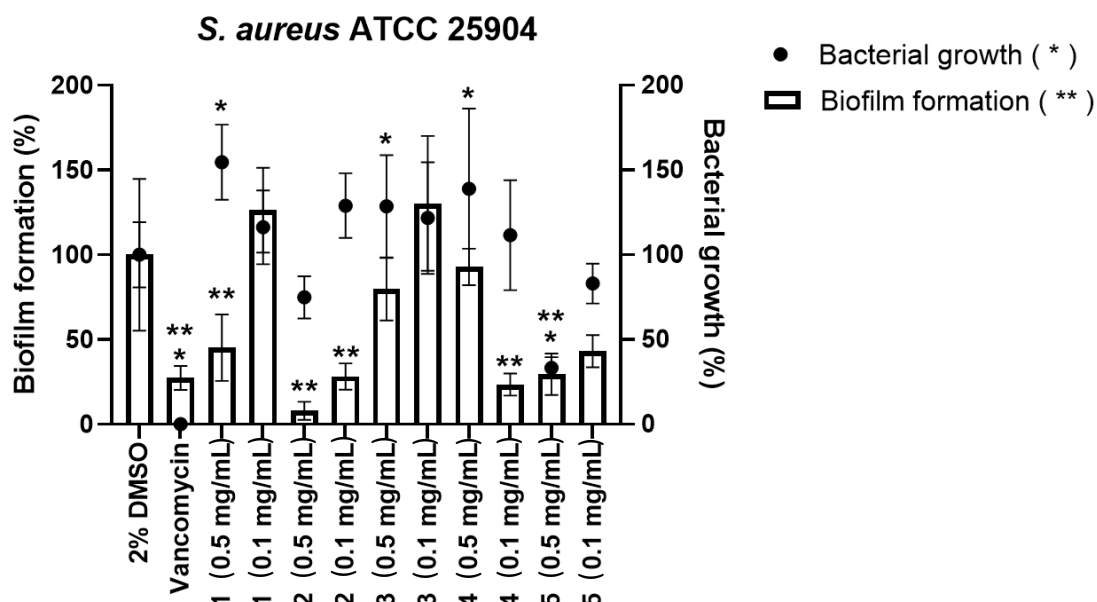


Figure 4. Effect of extracts (1-SsEtH and 2-SsAcMe) and fractions (3- SsEtH_FrMe, 4- SsEtH_FrAc, and 5-SsEtH_FrDC) on the *S. aureus* growth and biofilm formation at concentrations of 0.5 and 0.1 mg/mL (* $p \leq 0.01$, Student's t-test).

CONCLUSIONS

In summary, seven new phenylpropanoids of high molecular weight were isolated from the SsEtH_FrMe fractions, and until now one of them was structurally characterized as Bis-1''-O-caffeoyl(1''→4)- β -gluco/galacpyranosyl(9→2''')- α -gluco/galactopyranosyl(1'''→3''')-caffeoyl-(2'''→9')- β -gluco/galactopyranosyde. The SsEtH_FrMe and SsEtH_FrAc fractions enriched with phenylpropanoid derivatives and biflavonoid derivatives, respectively, enabled a better understanding of the participation of these chemical classes for the antileishmanial, antibacterial and antibiofilm activities, considering that biflavonoid derivatives play an important role in these biological activities directly in the parasite and in the inhibition formation of *S. aureus* strains.

Acknowledgments

The authors are thankful to UFMS (Universidade Federal de Mato Grosso do Sul), INAU (Instituto Nacional de Áreas Úmidas), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, process number 313047/2020-0), FUNDECT (Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul – process number 71/000.491/2021), and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

Declarations

Conflict of Interest

All authors declare that they have no conflict of interest.

Author's Contributions

CAC and DBS conceived and designed research. IB conducted experiments, analyzed the chemical and biological data. JMA, LCSM and AMTF carried out in vitro antileishmania biological assays. VER and DT performed in vitro antibacterial and antibiofilm biological assays. LMR obtained the data by NMR and contributed to the analyzes of the data. IB and DBS wrote the manuscript. All authors read and approved the manuscript.

REFERENCES

1. Newman, D. J.; Cragg, G. M. *J. Nat. Prod.*, **2020**, Vol. 83, p. 770-803.
2. Brasil, Ministério da Saúde. Guia de Vigilância em Saúde. **Biblioteca Virtual em Saúde**, 2022; 5ª edição. Disponível em: <<https://dive.sc.gov.br/phocadownload/guia-vigilancia/2022/GV5-5edicao-04-05-2022.pdf>>. Acesso em: 08 de junho de 2023.
3. Pan American Health Organization - PAHO, Leishmanioses: Informe Epidemiológico das Américas, n. 10 (Dezembro 2021). **Pan American Health Organization – PAHO**, 2022 Disponível em: < <https://www.paho.org/pt/documentos/leishmanioses-informe-epidemiologico-das-americas-no-11-dezembro-2022>>. Acesso em: 08 de junho de 2023.
4. Mattos, C. B. et al. *Int. J. Nanomedicine*, **2015**; Vol. 10, p 5529-5542.
5. Monge-Milles, B.; López-Vélez, R. *Drugs*, **2013**; Vol. 73, p 1889-920.
6. Ponte-Sucré, A. et al. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **2017**; Vol. 11, p. e0006052.
7. Bastos, M. M. B., N.; Hoelz, L. V. B.; De Oliveira, A. P. *Rev. Virtual Quim.*, **2016**; Vol. 9, p 2072-2104.
8. Lima, E. B. D. et al. *An. Bras. Dermatol.*, **2007**; Vol. 82, p. 111-124.
9. Sampaio, R. N. R.; Lucas, I. C.; Takami, H. L. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.*, **2007**; Vol. 13, p 598-606.
10. Berman, J.D.; Waddell, D.; Hanson, B.D. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1985**; Vol. 27, p 916-920.
11. Berman, J.D. *Rev. Infect. Dis.*, **1988**; Vol.10, p 560-586.
12. Oliveira, L. F.; et al. *Acta Trop*, **2011**; Vol. 118; p. 87-96.
13. WHO, 2021 Antibacterial agents in clinical and preclinical development: an overview and analysis. Organização Mundial da Saúde, 2021. Disponível em: < <https://www.who.int/publications/i/item/9789240047655>>. Acesso em: 08 de junho de 2023.
14. Murray; et al. *Lancet.*, **2022**; Vol. 399, p. 629-655.
15. ONU. No Time To Wait: Securing The Future From Drug-Resistant Infections. **Interagency Coordination Group on Antimicrobial Resistance**, p. 1-25, 2019.
16. EU, Relatório Especial: Atuação contra a resistência antimicrobiana: apesar dos progressos no setor animal, está ameaça para a saúde continua a ser um desafio para a UE. **Curia Rationum – Tribunal de Contas Europeu**, p. 1- 58, 2019. Disponível em: < https://www.eca.europa.eu/Lists/ECADocuments/SR19_21/SR_Antimicrobial_resistance_PT.pdf>. Acesso em: 08 de junho de 2023.

17. Mohamad, A. B; Thomson, S. *Res. Rev. Int. J. Multidiscip.*, **2019**; Vol. 4.
18. O’neill, J. *London: Review on Antimicrobial Resistance*, **2016**.
19. Kraker, D. M; Stewardson. A. J; Harbarth, S. *PLoS Med*, **2016**; Vol. 13.
20. Desmond, P.; et. al. *Wat. Res*, **2018**; Vol. 132, p. 211-221.
21. Sharma, U; Vipra, A; Channabasappa, S. *Drug Discov. Today*, **2018**; Vol. 23, p. 848-856.
22. Alisson, D.; et. al. *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, **2017**; Vol. 27, p. 387-392.
23. Trentin, D. S.; Giordani, R. B.; Macedo, A. J., *Revista Liberato*, **2013**; Vol. 14, p. 113-238.
24. Trentin, D. S.; et. al. *J. Ethnopharmacol.*, **2011**; Vol. 137, p. 327-335.
25. Rizk, Y. S.; et. al. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **2014**; Vol. 109(8), p 1050-1056.
26. Rizk, Y. S.; et. al. *Parasitol. Int.*, **2022**; Vol. 86, p 1383-5769.
27. Tryon, R. M & Tryon, A.F. *Am. Fern J.*, **1982**; Vol. 73, p 94-95.
28. Stafford, P.J. *Rev. Palaeobot. Palynol.*, **1991**; Vol. 69, p 1-22.
29. Jermy, A. C. Reed, Mem. Sc. Brot., **1966**; Vol. 18, p 1-287.
30. Alston, A.H.G.; Jermy, A.C.; Rankin, J.M. *Botan*, **1981**; Vol .9, n. 4, p 233-330.
31. Assis, E.L.M.; Labiak, P.H. *Acta Bot. Bras.*, **2008**; Vol. 23, p 703-712.
32. Setyawan, A. D. *Nus Biosci*, **2011**; Vol. 3.
33. Wang, Y-H.;et. al. *J. Nat. Prod.*, **2009**; Vol. 72, p 1151-1154.
34. Lin, R. C. S., A.L.; Seguin, E.; Tillequin, F.; et al. *Planta Med. (Germany)*, **1994**; Vol. 60, p. 188–190.
35. Kunert, O; et al. *Phytochem Lett*, **2008**; Vol. 1, p 171–174.
36. Queiroz, D. P. D. S. et al. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **2016**; Vol. 111, p 147-154.
37. Wang, G.; YAO, S.; Zhang, X-X.; Song, H. *Int. J. Anal. Chem.*, **2015**, p 9.
38. Nguyen, P-H.; Zhao, B-T.; Ali, M. Y.; Choi, J-S.; Rhyu, D-Y.; Min, B-S.; Woo, M-H. *J. Nat. Prod.*, **2015**; Vol. 78, p 34–42.
39. Assis, E. L. M; Labiak, P. H., *Act. Bot. Bras.*, **2008**; Vol. 23, p 703-712.

40. Reflora: Flora E Fungo Do Brasil: *Selaginella sellowii* Hieron, 2023. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/ConsultaPublicaUC/ResultadoDaConsultaNovaConsulta.do#CondicaoTaxonCP>. Acesso em: 17 de maio de 2023.
41. Hirai, R. Y.; Prado, J., *Rev. Bras. Bot.*, **2000**; Vol. 23, p. 313-339.
42. Oliveira, A. A.; Moraes, M. G., *Boletim Museu de Biologia Mello Leitão*, **2015**; Vol. 37, p. 393-403.
43. Oliver, M. J.; Tuba, Z.; Mishler, B. D., *Plant Ecology*, **2000**; Vol. 151, p. 85-100.
44. Alejo-Jacuinde, G. et al. *BMC Plant Bio.*, **2020**; Vol. 20, p. 468.
45. Pampurova, S.; Van Dijck, P., *Plant Phys. Biochem.*, **2014**; Vol. 80, p. 285-290.
46. Zhang, Q.; Song, X.; Bartels, D., *Proteomes*, **2016**; Vol. 4, p. 40.
47. Tirado, T. C.; et al. *Acta Trop*, **2020**; Vol. 209, p. 105540.
48. Ceole, L. F.; et al. *Future Med Chem*, **2018**; Vol. 10, n. 4, p. 391-408.
49. Mustafa, A., & Turner, C. *Anal. Chim. Acta.*, **2011**; Vol. 703, p 8-18.
50. Romanik, G., et al. *Biochem. Biophys. Methods*, **2007**; Vol 70, p 253-261.
51. Li, D., et al. *Molecules*, **2017**; Vol 22, p 586.
52. Silverstein RM, Webster FX, Kiemle DJ **2007**; 7th ed., LTC, Rio de Janeiro, p. 490.
53. Zhang YX, et al. **2011**. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* Vol. 25, p. 2173-2186.
54. Mabry TJ, Markham KR, Thomas MB **1970**. *Springer*, New York, p. 354.
55. Wang, J., et al. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2014**; Vol. 406, p. 7379-7387.
56. Zheng, et al., *Asian Journal of Traditional Medicines*, **2007**; Vol. 2, n. 3, p. 92-97.
57. Lin et al., *J. Nat. Prod.*, **2000**, Vol. 63, n. 5, p. 627-630.
58. Almeida J. M.; Nunes, F. O.; Ceole, L. F.; et al. *PLoS ONE*, **2021**; Vol. 16, n. 1, p. e0245882.
59. Zhang J. et al. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2015**; Vol. 407, n. 2, p. 581-595.
60. Park H. J. *Arch Pharm Res.* **2010**; Vol. 33, n. 11, p. 1703-1720.
61. Agrawal P. K. *Phytochemistry*, **1992**; Vol. 31, p. 3307-3330.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

New phenylpropanoid acid derivatives from *Selaginella sellowii* Hieron. (Selaginellaceae) and antileishmanial, antibacterial and antibiofilm activities

Izadora Bonfim^a, Luciana M. Ravaglia^b, Júlio M. de Almeida^a, Lia C. S. Medeiros^c, Alda M. T. Ferreira^d, Vitória E. Rodrigues^e, Danielle Trentin^e, Carlos A. Carollo^a, Denise B. Silva^{a,*}

^a *Laboratório de Produtos Naturais e Espectrometria de Massas (LaPNEM), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição (FACFAN), Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, MS, Brazil.*

^b *Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear (LabRMN), Instituto de Química (INQUI), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, MS, Brazil.*

^c *Laboratory of Parasitology, Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz): Ciencia e tecnologia em saúde, Curitiba, PR, Brazil.*

^d *Laboratory of Immunology, Molecular Biology and Bioassays (INBio). Federal University of Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, MS, Brazil.*

^e *Department of Basic Health Sciences, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.*

** Corresponding author: Laboratório de Produtos Naturais e Espectrometria de Massas (LaPNEM), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição (FACFAN), Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Av. Costa e Silva, s/nº, 79070-900, Campo Grande, MS, Brazil. Tel.: +55 (67) 3345-7366.*

E-mail address: denise.brentan@ufms.br (D.B. Silva).

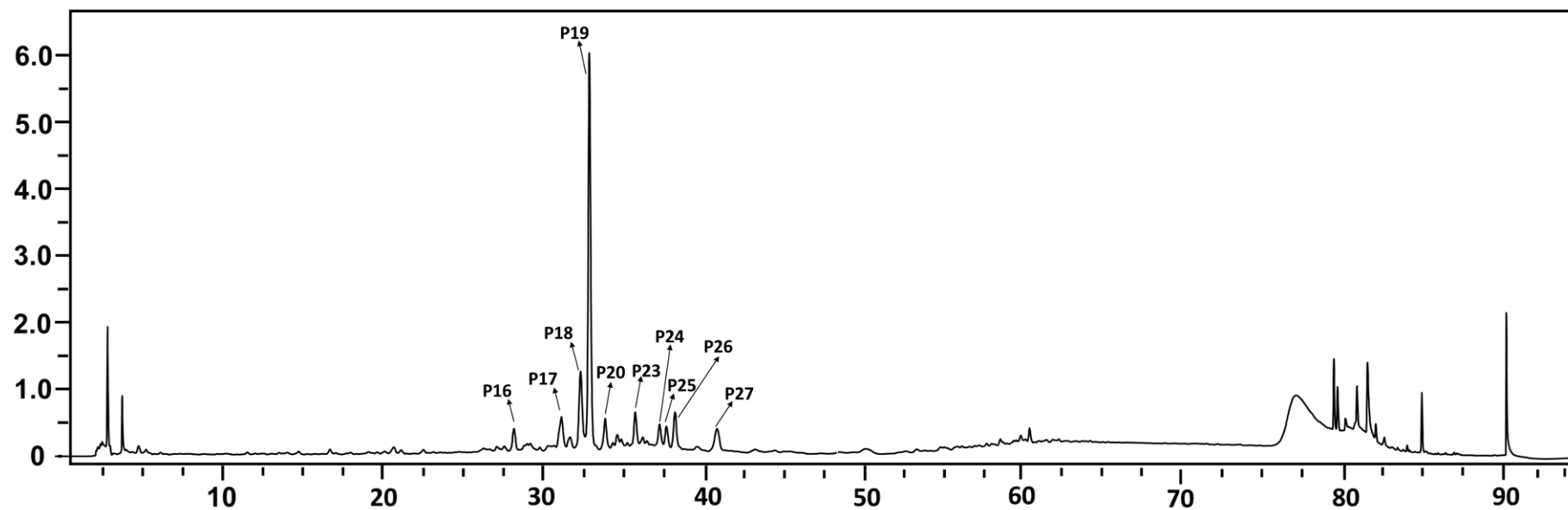


Figure S1. Chromatogram at 270 nm of SsEtH_frMe fraction from SsEtH extract of the *S. sellowii* by semipreparative LC-DAD.

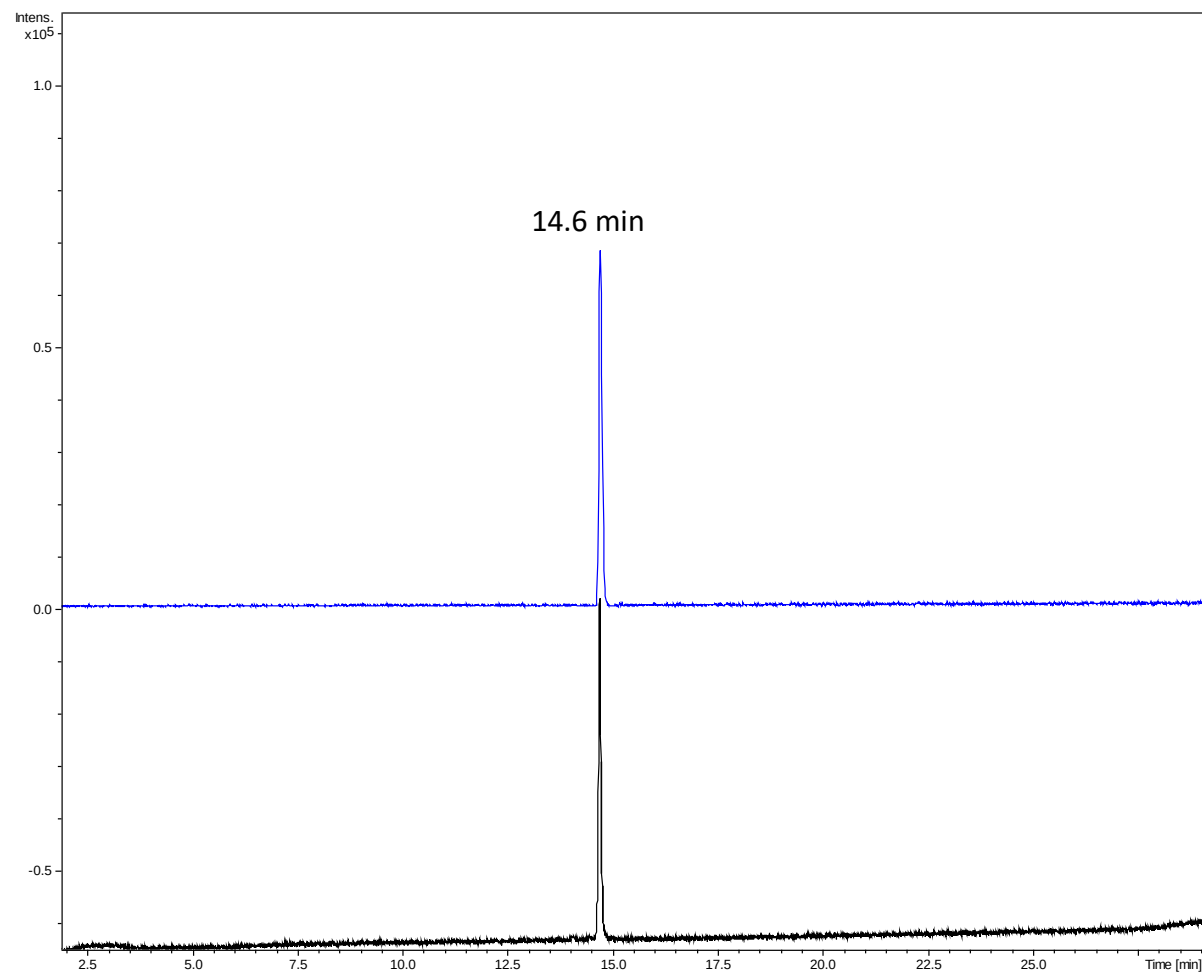


Figure S2. Base peak chromatogram (**black**) and at 210-800 nm (**blue**) of peak **P19** obtained by semipreparative LC-DAD-MS (negative ion mode) analyses. This peak is relative to compound **9** (**table 1**) at m/z 818.2202 $[M-2H]^{-2}$ ($C_{72}H_{86}O_{43}$).

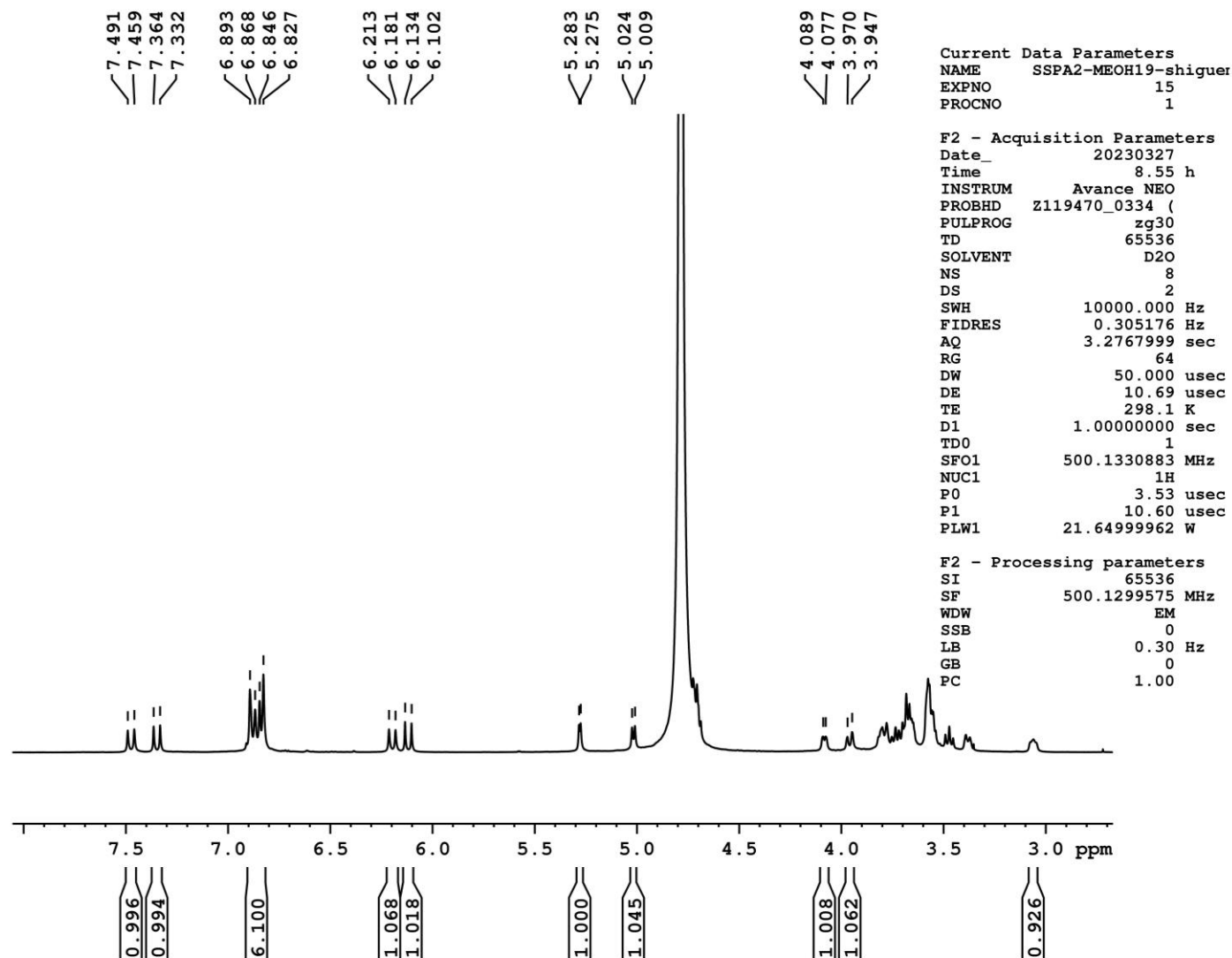


Figure S3. ^1H NMR (D_2O , 500 MHz) of the isolated phenylpropanoid **9**.

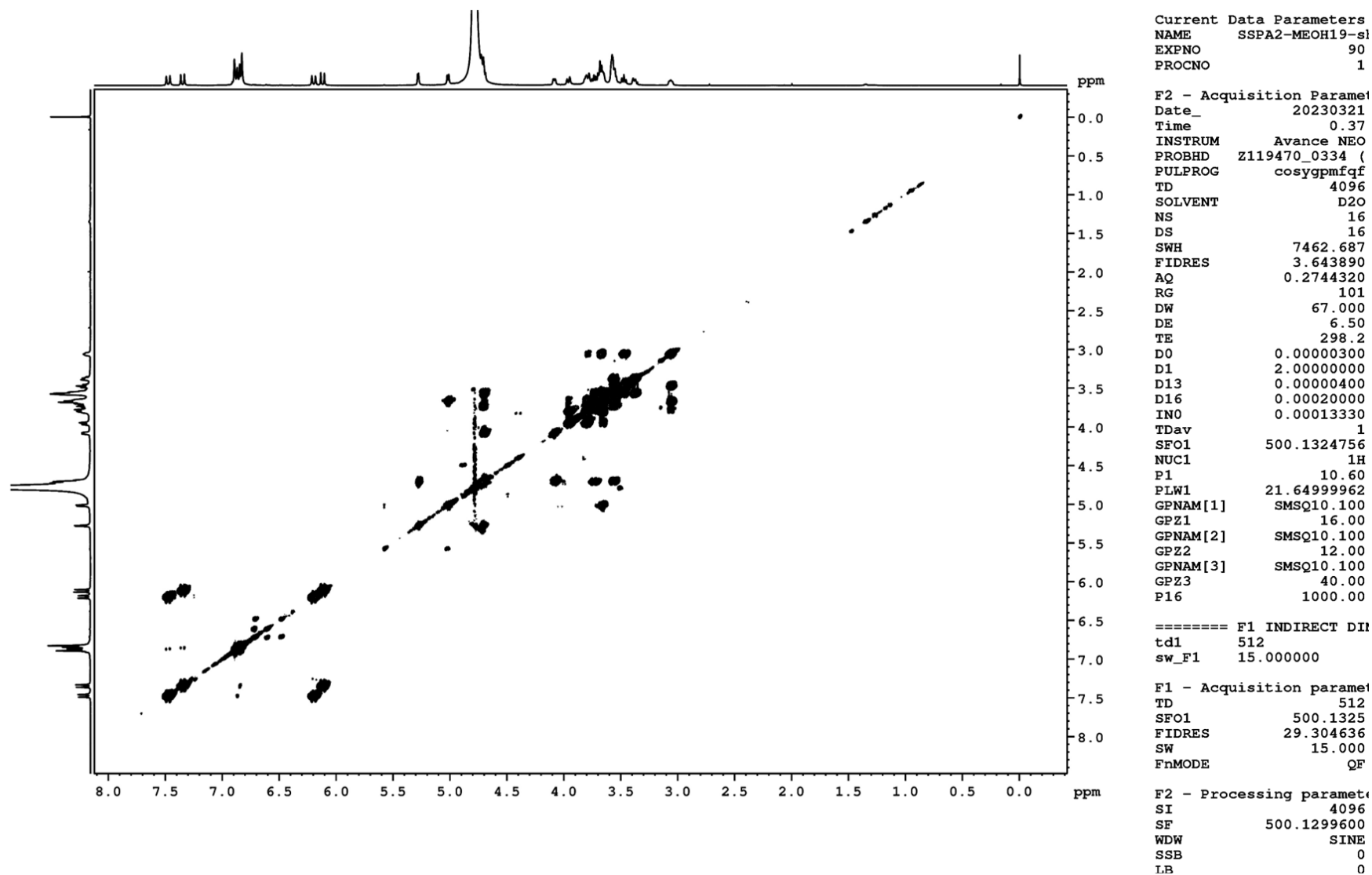


Figure S4. Correlation observed in the ^1H - ^1H COSY NMR spectra, contour map of the phenylpropapoid **9** (D_2O , 500MHz for ^1H).

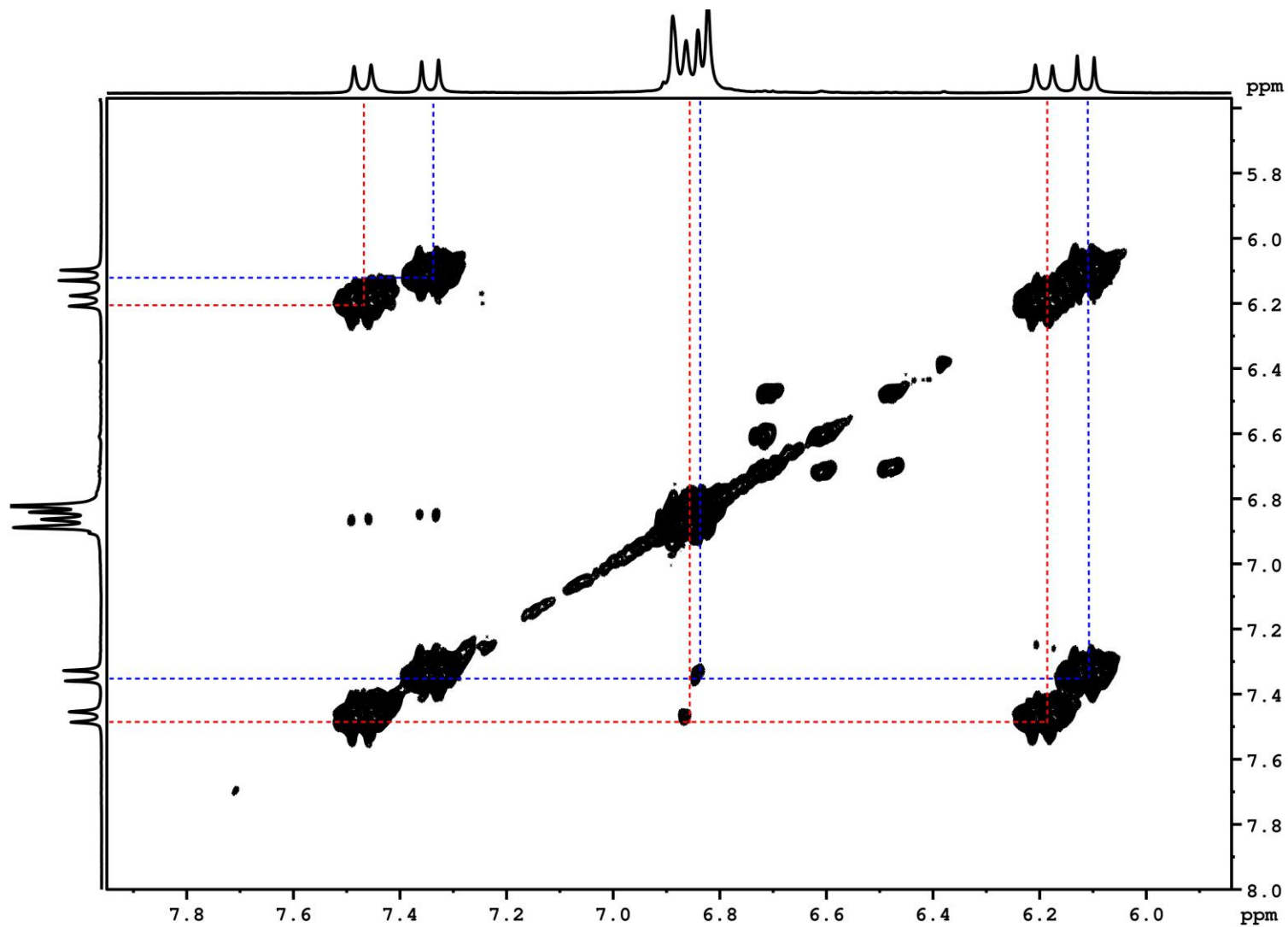


Figure S5. Expanded COSY contour map of the phenylpropapoid **9** (D₂O, 500MHz for ¹H). Highlight for the hydrogens in the region 6.12 to 7.47 ppm.

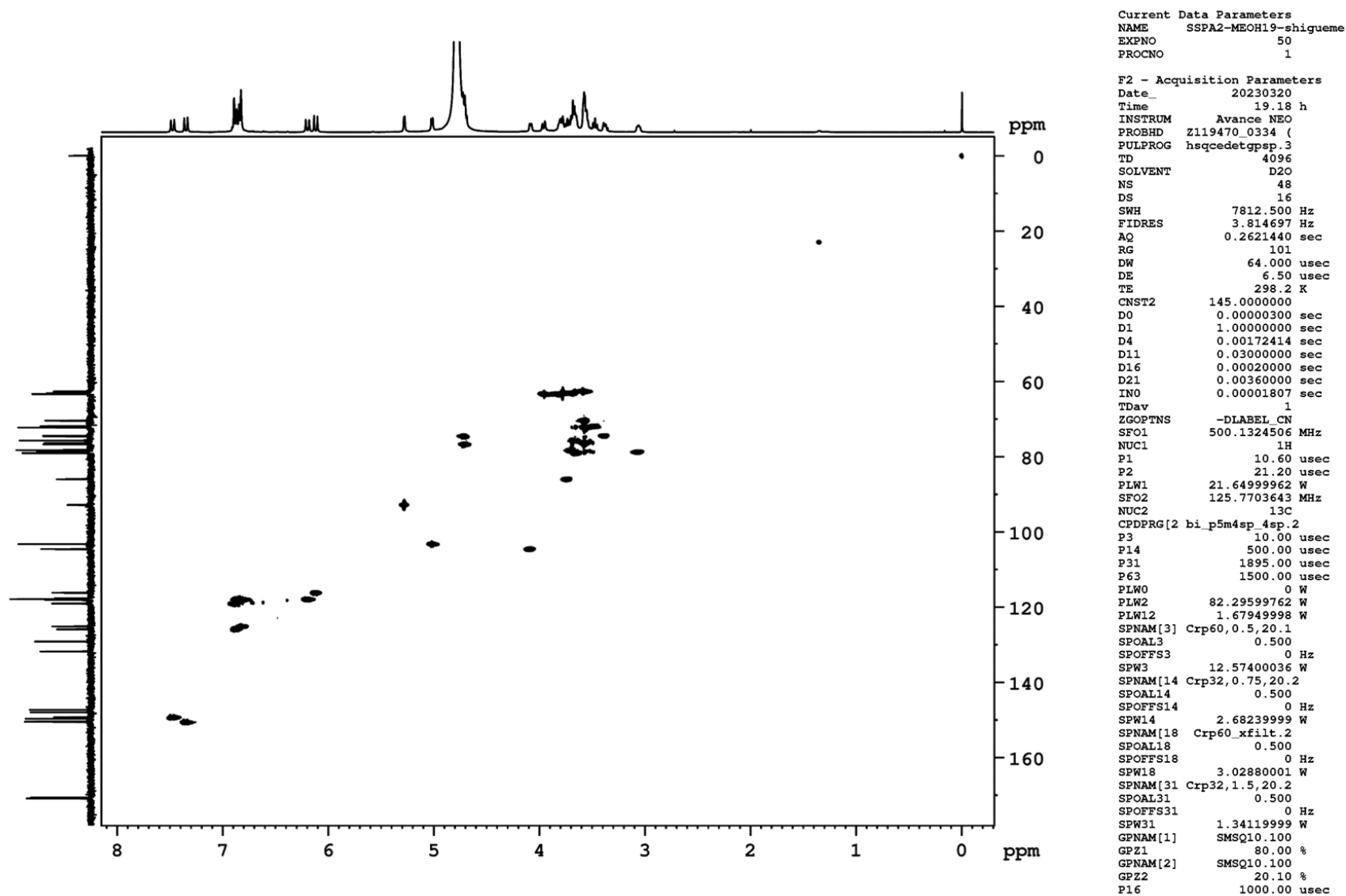


Figure S6. Correlation observed in the ^1H - ^{13}C HSQC contour map of the phenylpropapoid **9** (D_2O , 500MHz for ^1H).

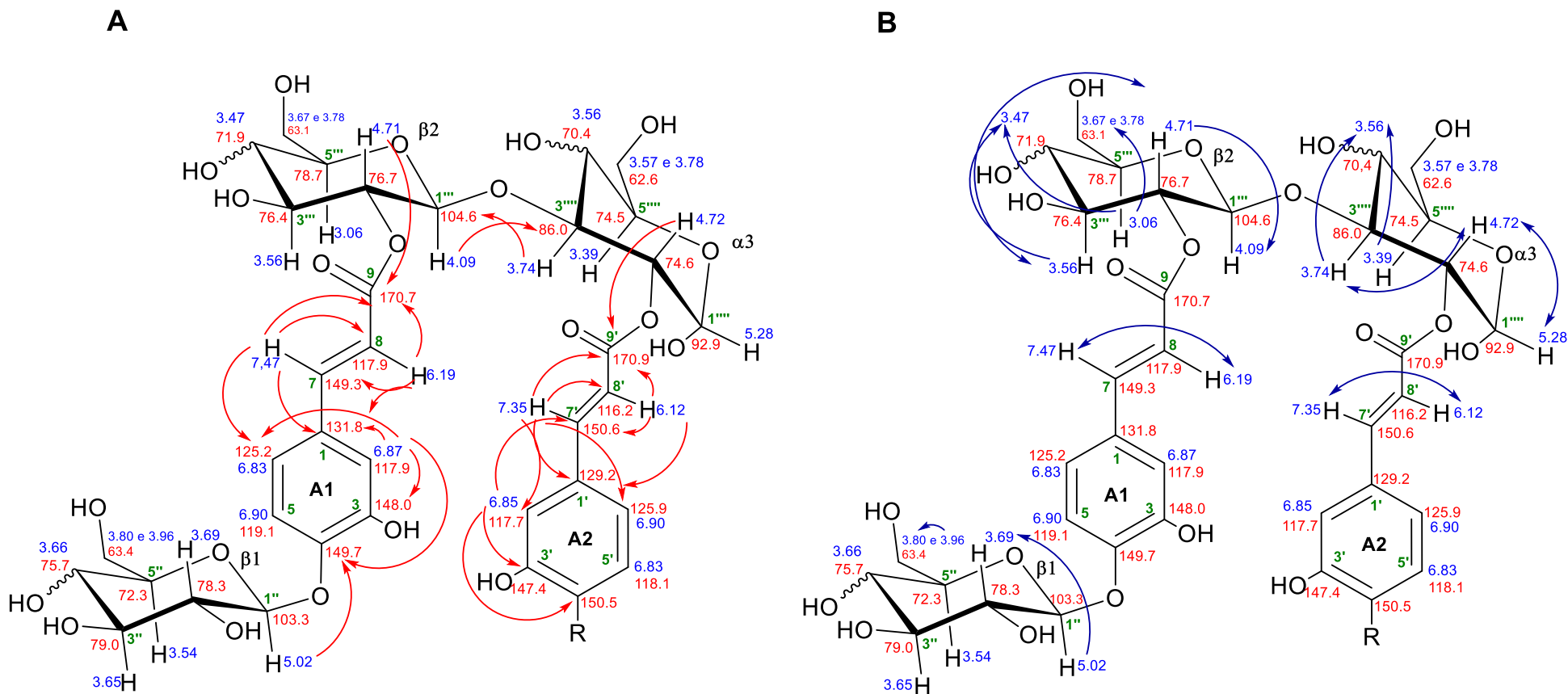


Figure S7. A: Main correlations obtained between hydrogen and carbon in the HMBC spectrum of the compound **9**.
B: Main correlations obtained between hydrogens in the COSY spectrum of the compound **9**.

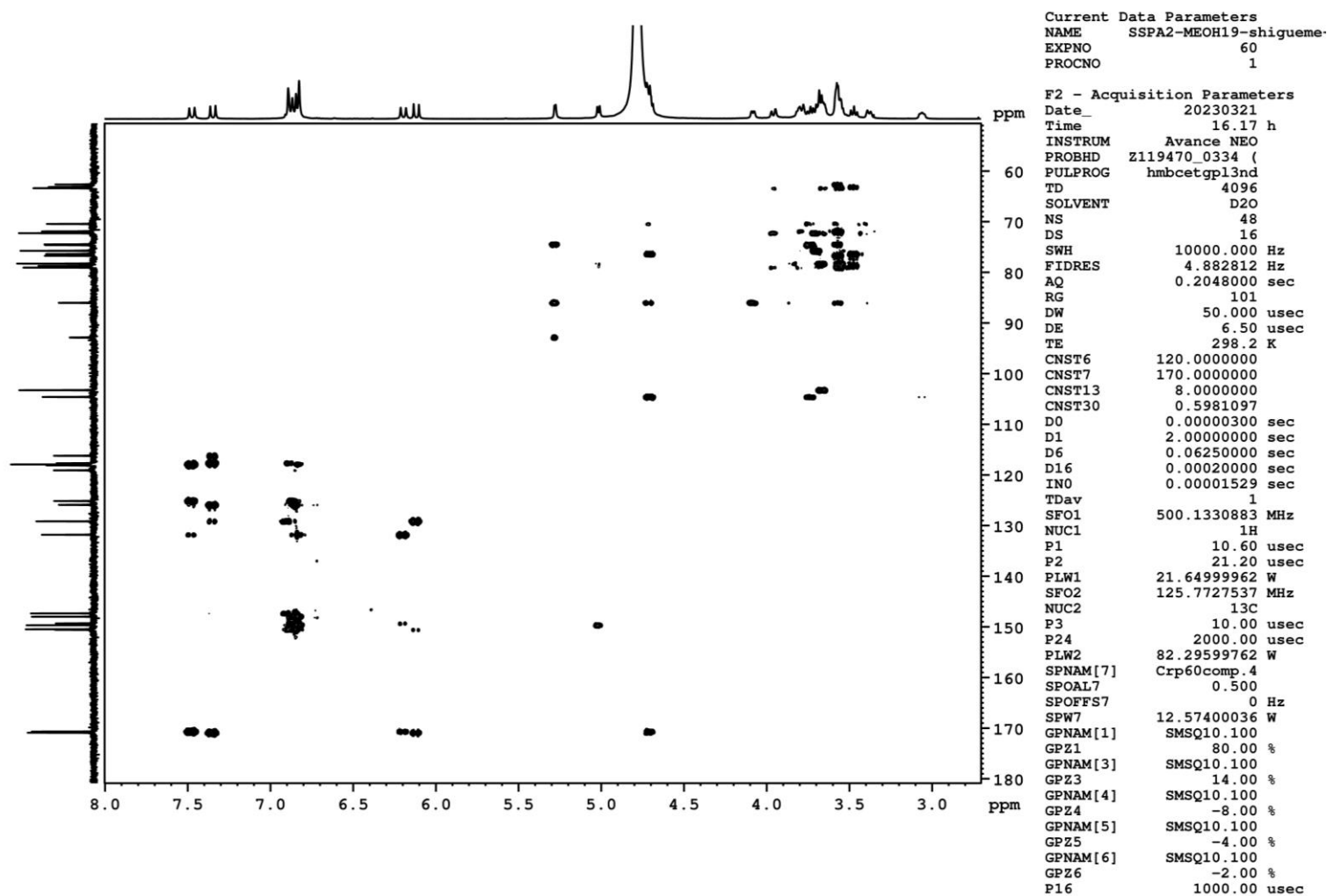


Figure S8. Correlation observed in the ^1H - ^{13}C HMBC contour map of the phenylpropapoid **9** (D_2O , 500MHz for ^1H). Highlight for the hydrogens in the region 2.50 to 8.00 ppm.

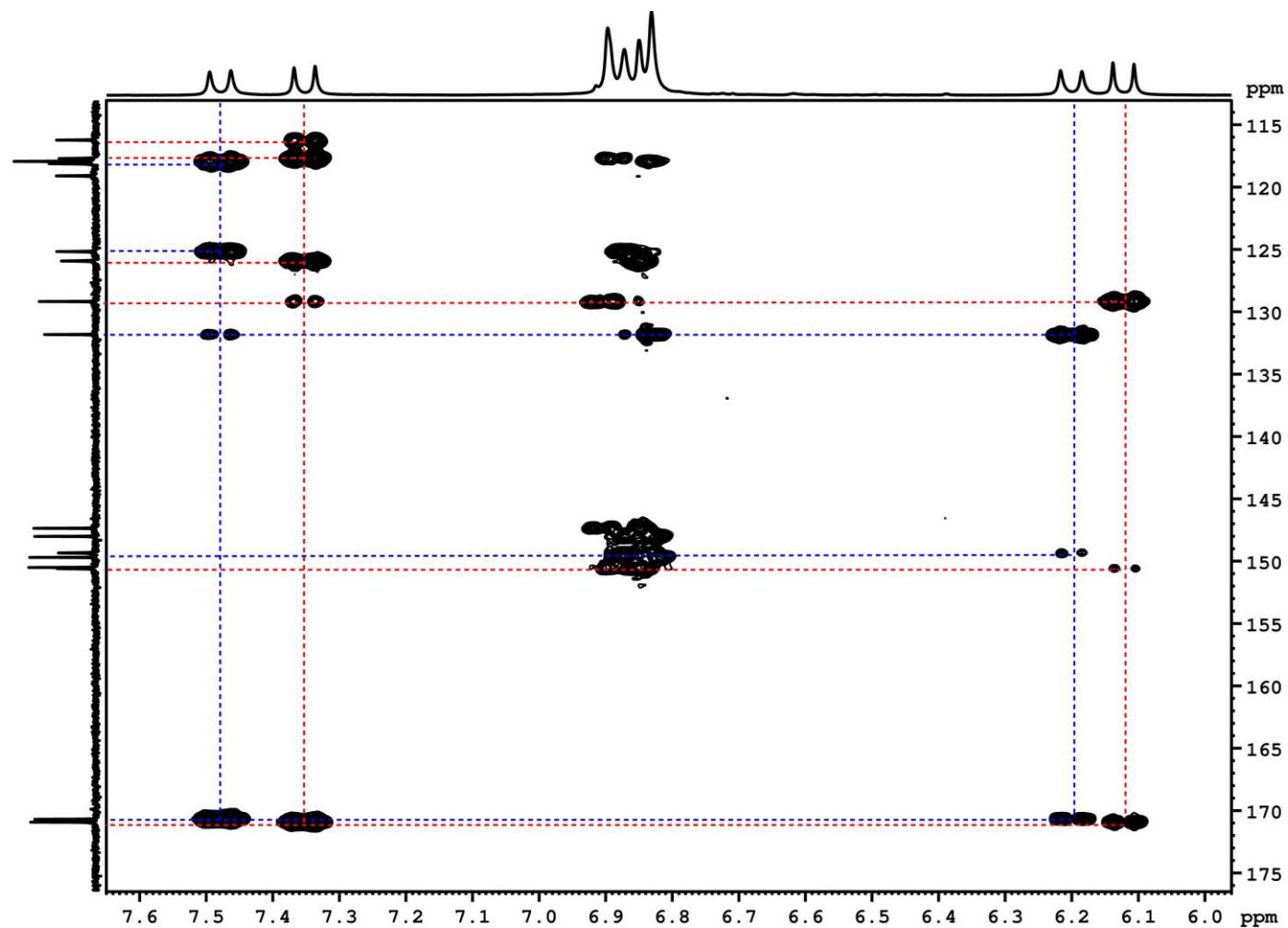


Figure S9. Expanded HMBC contour map of the phenylpropapoid **9** (D₂O, 500MHz for ¹H). Highlight for the hydrogens in the region 6.12 to 7.47 ppm.
Red: bonds correspondent to caffeic acid **A1**; **Blue:** bonds correspondent to caffeic acid **A2**.

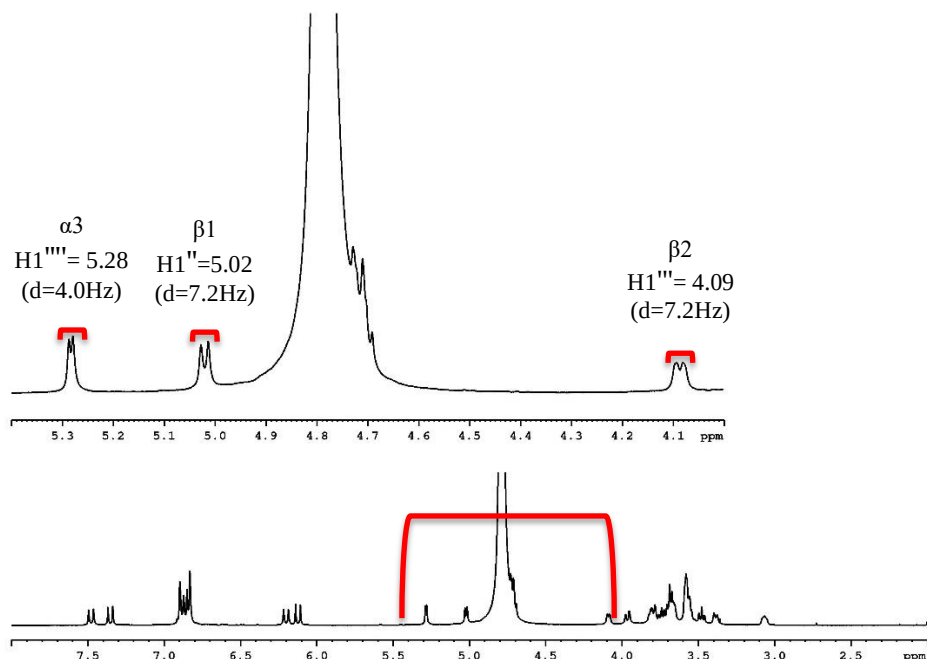


Figure S10. ^1H NMR (D_2O , 500 MHz) of the isolated phenylpropanoid **9**. Highlight for the hydrogens in the region 4.09 to 5.39 ppm.

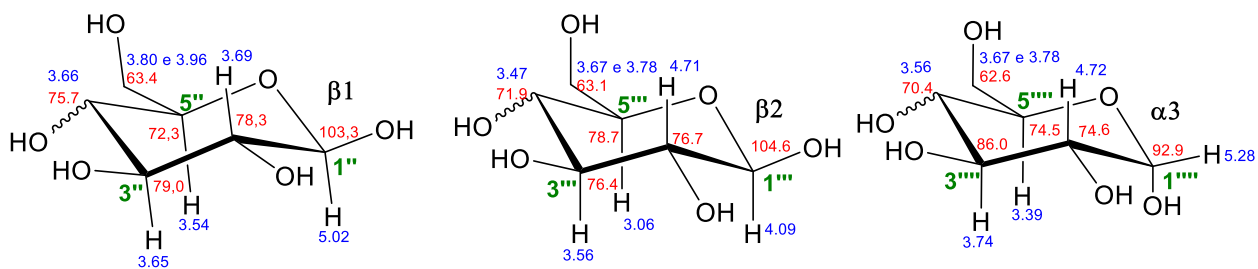


Figure S11. Structure of the sugars α/β glucopyranose and galactopyranose

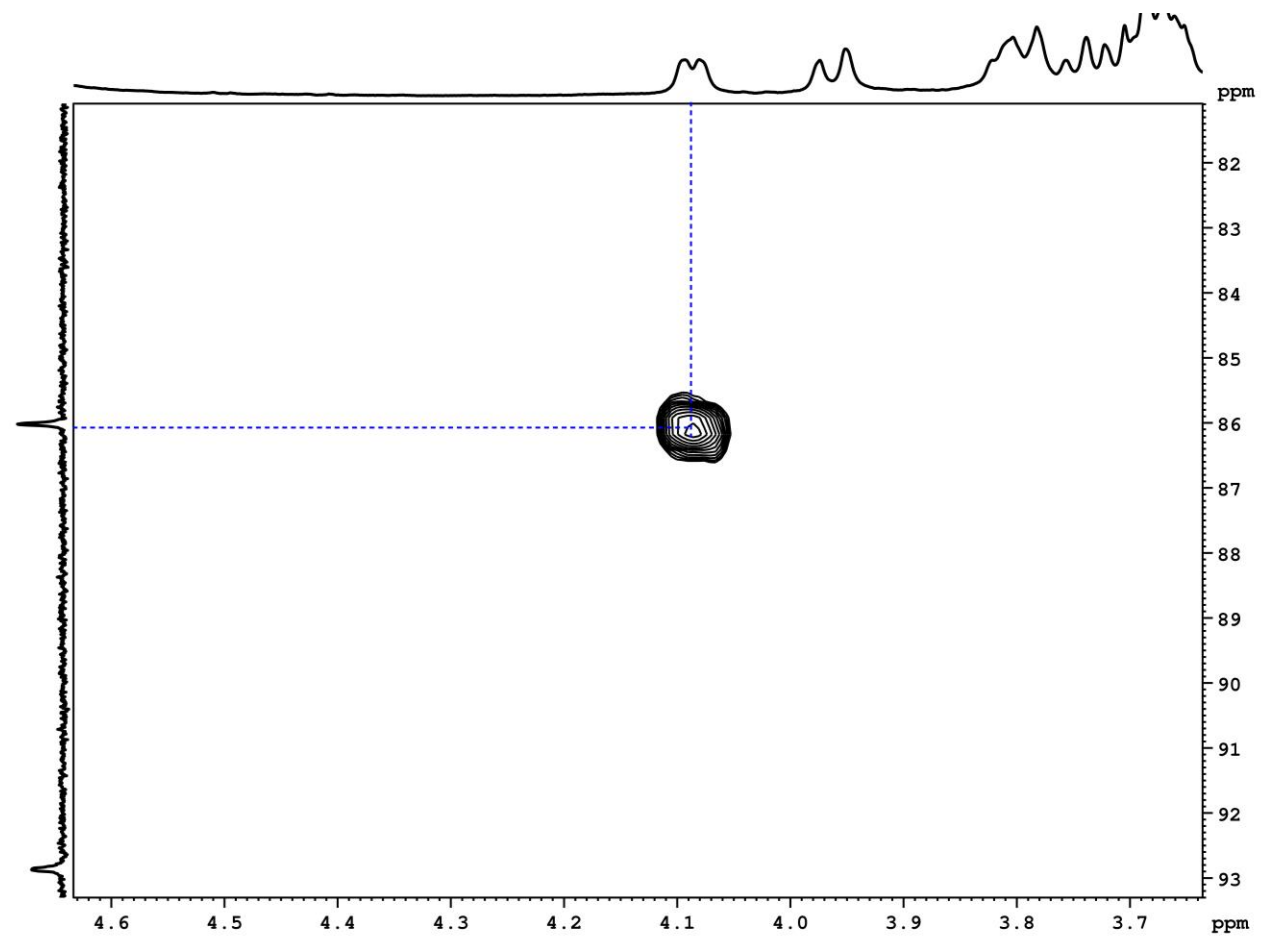


Figure S12. Expanded HMBC contour map of the phenylpropapoid **9** (D_2O , 500MHz for ^1H). Highlight for the hydrogen 3.74 ppm

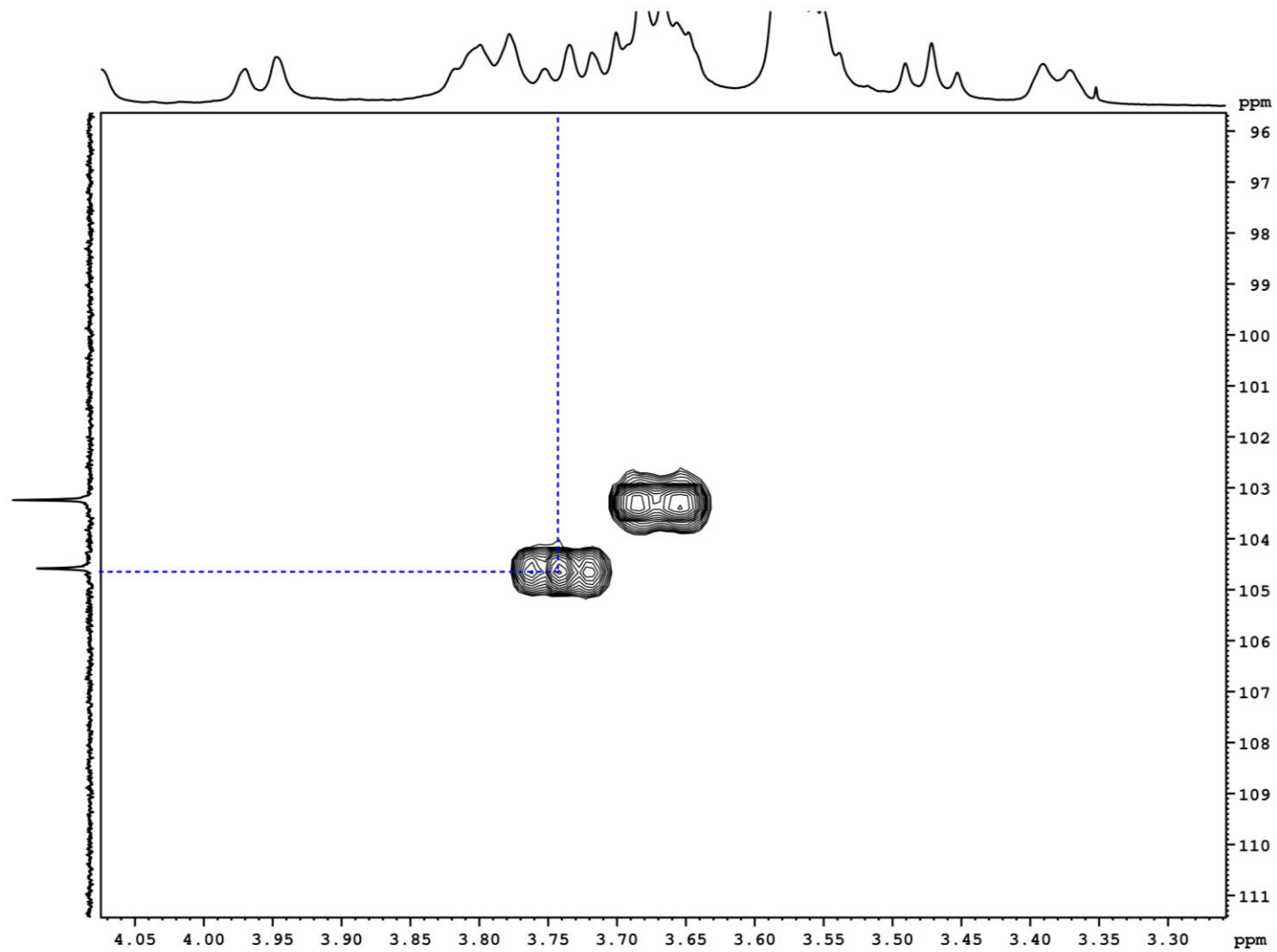


Figure S13. Expanded HMBC contour map of the phenylpropapoid **9** (D₂O, 500MHz for ¹H). Highlight for the hydrogen 4.09 ppm

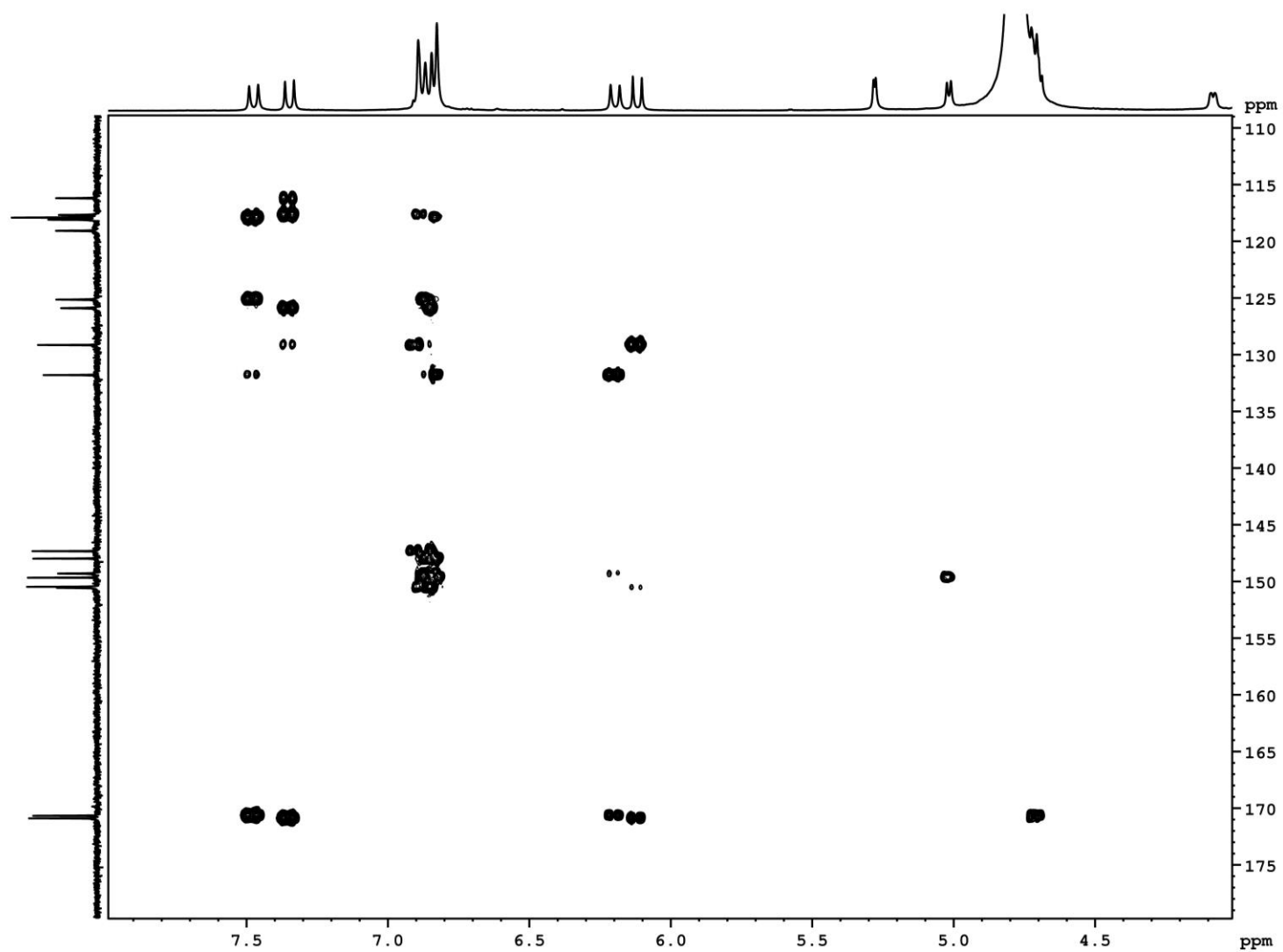


Figure S14. Correlation observed in the ^1H - ^{13}C HMBC contour map of the phenylpropapoid **9** (D_2O , 500MHz for ^1H). Highlight for the hydrogens in the region 4.00 to 8.00 ppm and carbon 110.0 to 175.0 ppm

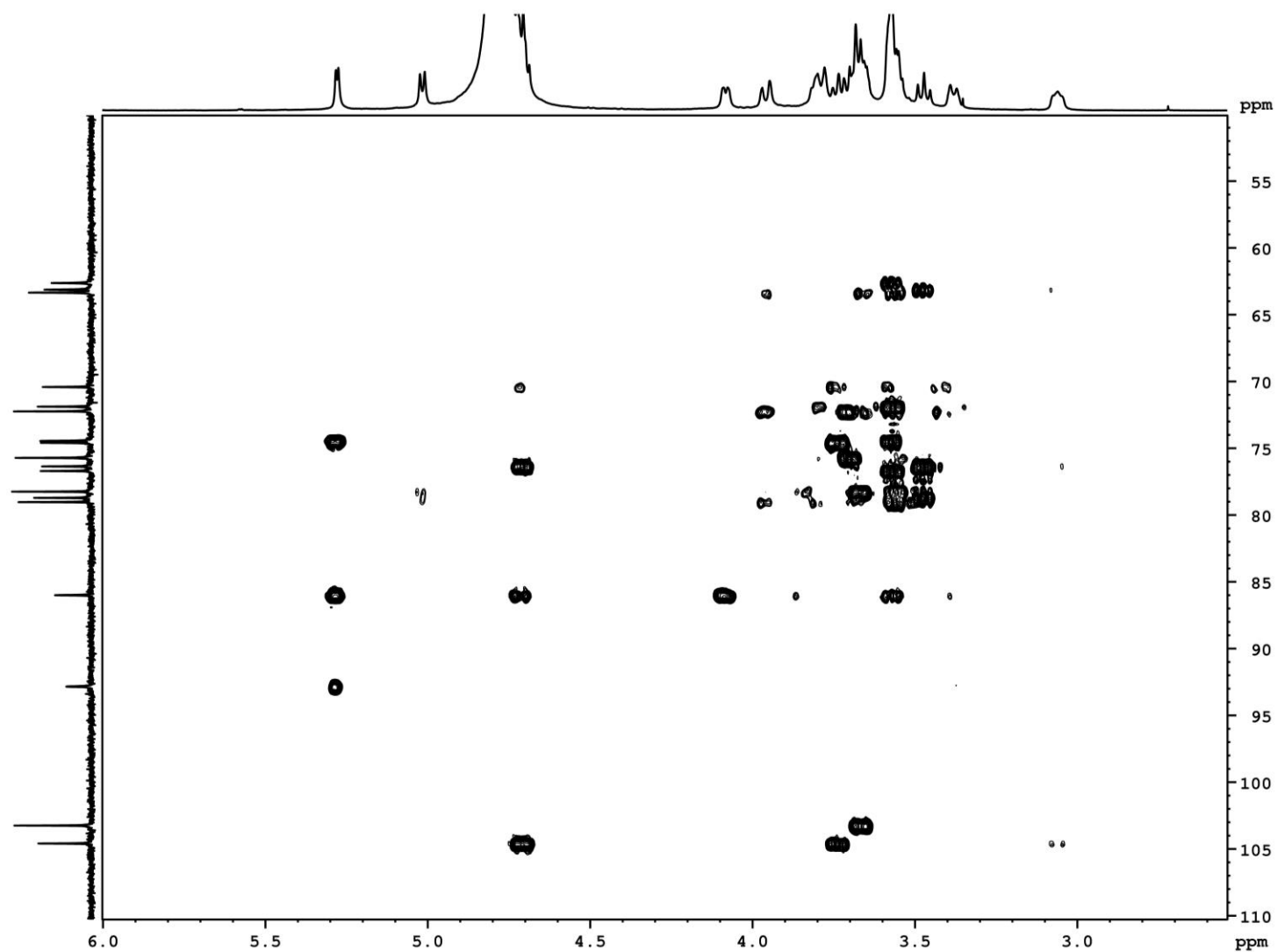


Figure S15. Correlation observed in the ^1H - ^{13}C HMBC contour map of the phenylpropapoid **9** (D_2O , 500MHz for ^1H). Highlight for the hydrogens in the region 2.00 to 6.00 ppm and carbon 54.0 to 110.0 ppm