



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ALLINE DE MATOS RIBEIRO

“PROSPECÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO LEISHMANICIDA DAS FLORES DE
Pterodon pubescens”

Catalão – GO

2020



UFG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
UNIDADE ACADÊMICA ESPECIAL DE QUÍMICA

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação Tese

2. Nome completo do autor

Aline de Matos Ribeiro

3. Título do trabalho

"PROSPECÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO LEISHMANICIDA DAS FLORES DE *Pterodon pubescens*"

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

- a) consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);
- b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.

O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.

Termo de Ciência e de Autorização (TECA) UAEQ-RC 1696222 SEI 23070.047623/2020-70 / pg. 1



Documento assinado eletronicamente por **Lorena Ramos Freitas De Sousa, Professor do Magistério Superior**, em 23/11/2020, às 14:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **ALLINE DE MATOS RIBEIRO, Discente**, em 23/11/2020, às 15:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1696222** e o código CRC **837F3541**.

ALLINE DE MATOS RIBEIRO

**“PROSPECÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO LEISHMANICIDA DAS FLORES DE
Pterodon pubescens”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Goiás, para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Lorena Ramos
Freitas de Sousa

Co-orientadora: Profa. Dra. Adriane da
Silveira Gomes

Catalão – GO

2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Ribeiro, Aline de Matos
"PROSPECÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO LEISHMANICIDA DAS FLORES DE *Pterodon pubescens*". [manuscrito] / Aline de Matos Ribeiro. - 2020.
xi, 106 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Lorena Ramos Freitas de Sousa; co orientadora Dra. Adriane da Silveira Gomes.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Unidade Acadêmica Especial de Física e Química, Catalão, Programa de Pós Graduação em Química, Catalão, 2020.

Bibliografia.
Inclui siglas, abreviaturas, símbolos, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. leishmaniose. 2. arginase. 3. galato de etila. 4. *Pterodon pubescens*. I. de Sousa, Lorena Ramos Freitas, orient. II. Título.

CDU 54



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
UNIDADE ACADÊMICA ESPECIAL DE QUÍMICA
ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Ata nº 06 da sessão de Defesa de Dissertação de Alline de Matos Ribeiro, que confere o título de Mestre(a) em Química, no Programa de Pós-Graduação em Química da UFG - Regional Catalão

Ao/s vinte e três dias do mês de outubro de dois mil e vinte, a partir da(s) 14:00 horas, por videoconferência, realizou-se a sessão pública de Defesa de Dissertação intitulada "PROSPECÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO INIBITÓRIA ENZIMÁTICA DAS FLORES DE *Pterodon pubescens*" na área de concentração em Química. Os trabalhos foram instalados pelo(a) Orientador(a), Professor(a) Doutor(a) Lorena Ramos Freitas de Sousa (UAEQ/UFG-RC) com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Professor(a) Doutor(a) Suelem Demuner Ramalho (UFOB), membro titular externo; Professor(a) Doutor(a) Elaine Rosechrer Carbonero (UAEQ/UFG-RC), membro titular interno e Coorientador(a) Professor(a) Doutor(a) Adriane da Silveira Gomes (IFG-Campus Iporá) cujas participações ocorreram por meio de videoconferência. Durante a arguição os membros da banca fizeram sugestão de alteração do título do trabalho para "PROSPECÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO LEISHMANICIDA DAS FLORES DE *Pterodon pubescens*", foram sugeridas alterações e complementações no trabalho final. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Dissertação, tendo sido a candidata aprovada pelos seus membros. Proclamados os resultados pela Professora Doutora Lorena Ramos Freitas de Sousa, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, ao(s) vinte e três dias do mês de outubro de dois mil e vinte.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA

"PROSPECÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO LEISHMANICIDA DAS FLORES DE *Pterodon pubescens*"



Documento assinado eletronicamente por **Lorena Ramos Freitas De Sousa, Professor do Magistério Superior**, em 23/10/2020, às 18:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Suelem Demuner Ramalho, Usuário Externo**, em 23/10/2020, às 18:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **ADRIANE DA SILVEIRA GOMES, Usuário Externo**, em 23/10/2020, às 19:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Elaine Rosechrer Carbonero, Professora do Magistério Superior**, em 23/10/2020, às 20:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1635609** e o código CRC **C9C2F96D**.

Dedico este trabalho...

As duas mulheres da minha vida: Mamãe e Vovó, que nunca mediram esforços para que pudesse realizar todos os meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Aos órgãos de fomento, FAPEG, CNPQ e CAPES pelo suporte financeiro para a realização deste trabalho.

À Universidade Federal de Catalão e ao Programa de Pós-Graduação em Química, por todo apoio durante a realização desse trabalho.

Ao Instituto Federal Goiano – Campus Iporá, pela parceria na realização dos experimentos.

À Profa. Dra. *Lorena R. de Freitas Sousa*, pela paciência, incentivo, orientação, acolhimento e confiança depositada em mim nessa empreitada. Seu comprometimento e amor pela ciência me inspira a ser uma profissional melhor a cada dia.

À Profa. Dra. *Elaine Carbonero*, pela convivência, troca de experiências e apoio nessa jornada.

À Profa. Dra. *Richele P. Severino*, pela compreensão, reflexões sobre o ensino, incentivos e troca de experiências.

À Profa. Dra. *Adriane da Silveira Gomes*, por todos esses anos de amizade, pelas orientações e incentivos ao longo dessa jornada acadêmica. Afinal, são 9 anos de convivência e admiração. Aprendo todos os dias com sua perseverança e serei eternamente grata.

À Profa. Dra. *Lílian Sibelle Campos Bernardes*, pelas palavras de conforto em tempos de tormenta e pelo apoio durante a realização deste trabalho.

À Profa. Dra. *Thaís Moraes Arantes*, pela amizade, incentivos, conhecimentos e confiança que depositou em mim durante a minha trajetória acadêmica.

À Profa. Dra. *Quézia B. Cass* da Universidade Federal de São Carlos, pela parceria na realização dos experimentos de Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplado à Espectrometria de Massas de Alta Resolução.

À Profa. Dra. *Dulce Helena F. de Souza* da Universidade Federal de São Carlos, por conceder a enzima arginase para a realização desse trabalho.

À Profa. Dra. *Izabela M. Dourado Bastos* da Universidade de Brasília, pela parceria na realização dos ensaios *in vitro* em *L. infantum*.

Ao Prof. Dr. *Hélder Nagai Consolaro* Unidade Acadêmica Especial de Biotecnologia – UFCAT, pela identificação da espécie *Pterodon pubescens*.

Ao Laboratório multiusuário do Instituto de Química da UFU, pela realização dos experimentos de Ressonância Magnética Nuclear.

Ao meu grupo de pesquisa em especial à Léia, Tainara e Thaís pela troca de experiências e apoio na realização deste trabalho.

Aos amigos da UFCAT e do LABIOrg, em especial à Dayane e Marcos. Sem o apoio, carinho e amizade de vocês eu não teria conseguido chegar até aqui. Serei eternamente grata a vocês, guardarei na lembrança os momentos de estudo e descontração.

À minha família, em especial à Dona Andréia e Dona Telma, que com todo o amor do mundo e sem medir esforços sempre me acompanharam em todas as minhas aventuras. Sem vocês eu não conseguiria alcançar meus objetivos! Obrigada pelos momentos de carinho, alegria e incentivo. A vocês, eu devo o mundo e sou eternamente grata pelas duas em minha vida.

A todos não mencionados, meu muito obrigado por fazerem parte da minha vida.

“Calma, que tudo na vida passa”.

Dona Telma.

RESUMO

A espécie *Pterodon pubescens* (Fabaceae) é uma planta conhecida como “sucupira-branca” e suas folhas e frutos são utilizados na medicina popular para o tratamento de doenças respiratórias. Em trabalhos anteriores, as investigações químicas das folhas desta espécie permitiram a identificação de sesquiterpenos, flavonoides, esteroides e diterpenos e também revelou potencial atividade leishmanicida. A leishmaniose é uma doença infecciosa que acomete milhões de pessoas no mundo e os fármacos que são utilizados no tratamento apresentam diversos efeitos colaterais, alta toxicidade e resistência parasitária. Tendo em vista que não há estudos das flores *P. pubescens* e a importância de se identificar novos agentes leishmanicidas, este trabalho visou contribuir com o conhecimento químico e biológico desta espécie. O perfil químico das flores de *P. pubescens* foi determinado utilizando técnicas analíticas hífenadas de CLUE-ESI-QqTOF-EM/EM e CG-EM, e espectroscopia de RMN de ¹H, confirmando a presença de metabólitos secundários das classes dos flavonoides e terpenos. O estudo da fração acetato de etila levou ao isolamento do composto fenólico galato de etila (I), o qual foi originado a partir da acetilação do ácido gálico. A partir do extrato etanólico e das frações acetato de etila (EPpEA), hexânica (EPpEH) e hidroalcolica (EPpEHi) das flores de *P. pubescens* foi possível identificar por CLUE-ESI-QqTOF-EM/EM seis flavonoides, um sesquiterpeno e um diterpeno e por CG-EM foi possível identificar treze sesquiterpenos. Particularmente, foram feitas triagens *in vitro* no parasito e em arginase de *Leishmania amazonensis* (ARG), enzima envolvida no ciclo de vida do parasito utilizando o extrato etanólico e as frações EPpEA, EPpEH e EPpEHi. A avaliação do extrato etanólico e frações frente a enzima ARG de *L. amazonensis* apresentou taxa de inibição entre 67% e 82%. Nas frações ativas EPpEA e EPpEHi foram identificados vários flavonoides (ácido gálico, quercetina-O-dihexosídeo, quercetina-O-hexosídeo, flavan-3-ol, quercetina, luteolina e kaempferol) que podem estar relacionados às atividades inibitórias encontradas, pois são descritos na literatura como inibidores de ARG. Na avaliação frente ao protozoário de *Leishmania infantum* os extratos e frações não inibiram o parasito de forma representativa. Os resultados obtidos são relevantes para o conhecimento da espécie estudada, a qual não havia até o momento, dentro do nosso conhecimento, nenhum estudo das flores de sucupira branca.

Palavras-chave: leishmaniose, arginase, galato de etila, *Pterodon pubescens*.

ABSTRACT

The species *Pterodon pubescens* (Fabaceae) is a plant known as “sucupira-branca” and its leaves and fruits are used in folk medicine to treat respiratory diseases. In previous works, chemical investigations of the leaves of this species allowed the identification of sesquiterpenes, flavonoids, steroids and diterpenes and also revealed potential leishmanicidal activity. Leishmaniasis is an infectious disease that affects millions of people worldwide and the drugs that are used in the treatment have several side effects, high toxicity and parasitic resistance. Bearing in mind that there are no studies of *P. pubescens* flowers and the importance of identifying new leishmanicidal agents, this work aimed to contribute to the chemical and biological knowledge of this species. The chemical profile of *P. pubescens* flowers was determined using hyphenated analytical techniques of UPLC-ESI-QqTOF-EM / EM and GC-MS, and ¹H NMR spectroscopy, confirming the presence of secondary metabolites from the flavonoid and terpene classes. The study of the ethyl acetate fraction led to the isolation of the phenolic compound ethyl gallate (**I**), which originated from the acetylation of gallic acid. From the ethanolic extract and the ethyl acetate (EPpEA), hexane (EPpEH) and hydroalcoholic (EPpEHi) fractions of *P. pubescens* flowers it was possible to identify six flavonoids, a sesquiterpene and a diterpene by UPLC-ESI QqTOF-MS/MS and by GC-MS it was possible to identify thirteen sesquiterpenes. In particular, in vitro screenings were carried out on the parasite and *Leishmania amazonensis* arginase (ARG), an enzyme involved in the parasite's life cycle using the ethanolic extract and the EPpEA, EPpEH and EPpEHi fractions. The evaluation of the ethanolic extract and fractions against the *L. amazonensis* ARG enzyme showed an inhibition rate between 67% and 82%. In the active fractions EPpEA and EPpEHi several flavonoids (gallic acid, quercetin-O-dihexoside, quercetin-O-hexoside, flavan-3-ol, quercetin, luteolin and kaempferol) and were identified that may be related to the inhibitory activities found, as they are described in the literature as inhibitors of ARG. In the evaluation against the *Leishmania infantum* protozoan, the extracts and fractions did not significantly inhibit the parasite. The results obtained are relevant for the knowledge of the studied species, which until now, within our knowledge, there has been no study of white sucupira flowers.

Keywords: leishmaniasis, arginase, ethyl gallate, *Pterodon pubescens*.

LISTA DE FLUXOGRAMAS

FLUXOGRAMA 3.1 – Esquema do fracionamento da fração acetato de etila (EPpEA).....	48
FLUXOGRAMA 3.2 – Esquema do fracionamento de EPpEA 2	49
FLUXOGRAMA 3.3 – Esquema do fracionamento de EPpEA 3.	50
FLUXOGRAMA 3.4 – Esquema das etapas do ensaio enzimático frente a enzima arginase.	53

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 – Estruturas químicas de PNs bioativos	18
FIGURA 1.2 – Estruturas químicas de produtos naturais utilizados como medicamentos.....	20
FIGURA 1.3 – Mapa demonstrativo dos biomas encontrados no Brasil	21
FIGURA 1.4 – Exemplos de terpenos bioativos	23
FIGURA 1.5 – Diferenças estruturais dos flavonoides	24
FIGURA 1.6 – Exemplos de flavonoides bioativos	24
FIGURA 1.7 – Exemplos de compostos da classe dos flavonoides e seus derivados que possuem atividades antiparasitárias.....	25
FIGURA 1.8 – Metabólitos secundários isolados do gênero <i>Pterodon</i>	27
FIGURA 1.9 – Estruturas químicas dos metabólitos secundários identificados nas folhas de <i>P. pubescens</i>	29
FIGURA 1.10 – Estruturas químicas dos metabólitos secundários identificados nos frutos de <i>P. pubescens</i>	31
FIGURA 1.11 – Estruturas químicas dos metabólitos secundários identificados na casca do caule de <i>P. pubescens</i>	33
FIGURA 1.12 – Ciclo de vida do parasito de <i>Leishmania</i> spp.	34
FIGURA 1.13 – Medicamentos utilizados no tratamento contra a leishmaniose	35
FIGURA 1.14 – Estruturas químicas dos medicamentos alternativos para o tratamento da leishmaniose	36
FIGURA 1.15 – Exemplos de compostos que apresentaram atividade inibitória enzimática frente a ARG.....	40
FIGURA 1.16 – Exemplos de compostos que apresentaram atividade inibitória enzimática frente ao parasito de <i>L. infantum</i>	43
FIGURA 4.1 – Espectros de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz) das frações da espécie <i>P. pubescens</i>	56
FIGURA 4.2 – Estrutura química do galato de etila (I)	58
FIGURA 4.3 – Espectro de RMN de ^1H do galato de etila (I) (CD_3COCD_3 , 400 MHz).	59
FIGURA 4.4 – Espectro de EM/EM-IES-(+) em alta resolução do composto identificado como ácido gálico.....	60
FIGURA 4.5 – Cromatogramas obtidos por CLUE-ES-QqTOF-EM/EM para EPpE, EPpEA e EPpEH _i	61
FIGURA 4.6 – Estruturas químicas dos flavonoides identificados em EPpE.....	62
FIGURA 4.7 – Espectro de EM/EM-IES-(+) em alta resolução do composto (1E), identificado como quercetina-O-dihexosídeo.....	63

FIGURA 4.8 – Proposta de fragmentação da quercetina-O-dihexosídeo (1E) analisado por EM/EM-IES-(+)	63
FIGURA 4.9 – Espectro de EM/EM-IES-(+) em alta resolução do composto (2E), identificado como quercetina-O-hexosídeo	64
FIGURA 4.10 – Espectro de EM/EM-IES-(+) em alta resolução do composto (3E), identificado como catequina ou epicatequina	64
FIGURA 4.11 – Proposta de fragmentação da catequina ou epicatequina (3E) analisado por EM/EM-IES-(+)	65
FIGURA 4.12 – Espectro de EM/EM-IES-(+) em alta resolução do composto (4E), identificado como quercetina	65
FIGURA 4.13 – Espectros de EM/EM-IES-(+) em alta resolução dos compostos identificados na fração EPpEA	69
FIGURA 4.14 – Espectro de EM/EM-IES-(+) em alta resolução dos compostos (5A e 5A'), identificados como luteolina/kaempferol	70
FIGURA 4.15 – Espectro de EM/EM-IES-(+) em alta resolução do composto (6A), identificado como espatulenol	70
FIGURA 4.16 – Proposta de fragmentação do espatulenol (6A) analisado por EM/EM-IES-(+)	71
FIGURA 4.17 – Espectro de EM/EM-IES-(+) em alta resolução do composto (7A), identificado como 6 α ,7 β -diacetoxivouacapan-14 β -oato	71
FIGURA 4.18 – Proposta de fragmentação do 6 α ,7 β -diacetoxivouacapan-14 β -oato (7A) analisado por EM/EM-IES-(+)	72
FIGURA 4.19 – Espectros de EM/EM-IES-(+) em alta resolução dos compostos identificados na fração EPpEH	72
FIGURA 4.20 – Cromatograma obtido para a fração EPpEH	75
FIGURA 4.21 – Sesquiterpenos identificados na espécie <i>P. pubescens</i>	76
FIGURA 4.22 – Espectro de massas do composto β -cadineno (9H) (70 eV) do pico com t_R 17,663	78
FIGURA 4.23 – Proposta de fragmentação do composto β -cadineno (9H) por EM-IE	78
FIGURA 4.24 – Espectro de massas do composto α -cadinol (11H) (70 eV) do pico com t_R 20,706	78
FIGURA 4.25 – Proposta de fragmentação do composto α -cadinol (11H) por EM-IE	79
FIGURA 4.26 – Etapas reacionais do ensaio com a arginase (ARG)	80
FIGURA 4.27 – Taxa de inibição da enzima arginase do extrato etanólico e das frações de <i>P. pubescens</i>	81
FIGURA 4.28 – Taxa de inibição do protozoário <i>L. infantum</i> com o extrato etanólico e as frações de <i>P. pubescens</i>	82

FIGURA 4.29 – Diterpenóide com esqueleto vouacapano (6 α -acetoxi-7 β -hidroxivouacapan-17 β -oato de metila).....	83
FIGURA 4.30 – Inibidores de <i>L. infantum</i>	84

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1 – Relação das espécies e sinónimas do género <i>Pterodon</i>	26
TABELA 1.2 – Compostos identificados nas folhas de <i>P. pubescens</i>	29
TABELA 1.3 – Compostos identificados nos frutos de <i>P. pubescens</i>	31
TABELA 1.4 – Compostos identificados na casca do caule de <i>P. pubescens</i>	32
TABELA 3.1 – Condição cromatográfica utilizada no estudo da fração de EPpEA	48
TABELA 3.2 – Condições cromatográficas utilizadas no estudo da fração de EPpEA 2....	49
TABELA 3.3 – Condições cromatográficas utilizadas no estudo da fração de EPpEA 3....	50
TABELA 4.1 – Massas e rendimentos das frações obtidas a partir do extrato etanólico bruto das flores de <i>P. pubescens</i>	55
TABELA 4.2 – Dados de RMN de ¹ H para o galato de etila (I)	59
TABELA 4.3 – Compostos identificados por CLUE-EM/EM-IES-(+) da fração EPpEA de <i>P. pubescens</i>	67
TABELA 4.4 – Compostos identificados por CLUE-EM/EM-IES-(+) da fração EPpEH _i de <i>P. pubescens</i>	74
TABELA 4.5 – Compostos identificados por CG-EM da fração EPpEH.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

%	porcentagem
δ_H	deslocamento químico de hidrogênio em ppm
α -	configuração glicosídica do tipo alfa
°C	graus Celsius
CC	cromatografia em coluna aberta
CCD	cromatografia em camada delgada
CD ₃ COCD ₃	acetona deuterada
CG-EM	cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
CLUE-EM	cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas
DMSO	dimetilsulfóxido
DMSO-d ₆	dimetilsulfóxido deuterado
EPpE	extrato etanólico bruto
EPpEA	fração acetato de etila
EPpEH	fração hexânica
EPpEH _i	fração hidroalcoólica
EM	espectrometria de massas
EM ²	espectrometria de massas
ESI	<i>electrospray ionization</i>
eV	elétron-volt
F.E.	fase estacionária
F.M.	fase móvel
h	altura da fase estacionária
Hz	hertz
IC ₅₀	concentração mínima da amostra, necessária para inibir 50% da atividade celular
IE	impacto de elétrons
<i>J</i>	constante de acoplamento
<i>m/z</i>	razão massa/carga
µg	micro gramas
MHz	mega-hertz
min	minutos
mL	mililitro
µM	micro molar
nm	nanômetro
ppm	parte por milhão
<i>q</i>	quarteto

Qq	quadropolo
RDA	Retro-Diels-Alder
RMN	ressonância magnética nuclear
RMN de ^1H	ressonância magnética nuclear de hidrogênio (prótons)
<i>s</i>	singleto
SFB	soro fetal bovino
<i>t</i>	tripleto
t_R	tempo de retenção
TOF	tempo de voo
UV	ultravioleta
φ	diâmetro da coluna cromatográfica

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FLUXOGRAMAS	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS	viii
1. INTRODUÇÃO	18
1.1 Produtos naturais bioativos e plantas medicinais	18
1.2 Cerrado.....	20
1.3 Metabólitos secundários.....	22
1.4 Gênero <i>Pterodon</i>	26
1.5 <i>Pterodon pubescens</i> Benth.....	28
1.6 Leishmaniose	33
1.6.1 Arginase de <i>Leishmania amazonensis</i>	37
1.6.2 <i>Leishmania infantum</i>	42
2. OBJETIVOS	44
2.1 Objetivo Geral.....	44
2.2 Objetivos Específicos.....	44
3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	45
3.1 Materiais	45
3.1.1 Solventes	45
3.1.2 Fases estacionárias	45
3.1.3 Reveladores	45
3.1.4 Equipamentos	45
3.1.5 Reagentes usados nos ensaios biológicos	46
3.2 Metodologia	47
3.2.1 Coleta e identificação do material botânico	47
3.2.2 Processos de extração e partição líquido-líquido	47
3.2.3 Análises por RMN de ¹ H	47
3.2.4 Fracionamento da fração de acetato de etila (EPpEA).....	48
3.2.5 Refracionamento cromatográfico das subfrações EPpEA 2 e EPpEA 3.....	48
3.2.6 Análises por CLUE-ESI-QqTOF-EM/EM.....	51
3.2.7 Análise por CG-EM	51

3.2.8 Ensaio enzimático frente à arginase	52
3.2.9 Ensaio <i>in vitro</i> em <i>Leishmania infantum</i>	54
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	55
4.1 Rendimento das partições líquido-líquido do extrato etanólico	55
4.2 Composição química das frações EPpEA, EPpEH e EPpEH _i por RMN de ¹ H	55
4.2.1 Determinação estrutural dos compostos isolados das flores de <i>P. pubescens</i>	57
4.3 Prospecção química dos extratos da espécie <i>P. pubescens</i>	59
4.3.1 Caracterização dos metabólitos secundários: EPpE, EPpEA e EPpEH _i por CLUE-ESI-QqTOF-EM/EM	60
4.4 Identificação dos metabólitos por CG-EM	74
4.5 Ensaio enzimático para o extrato etanólico (EPpE) e para as frações (EPpEH, EPpEA e EPpEH _i)	78
4.6 Ensaio <i>in vitro</i> no protozoário para o extrato etanólico e para as frações EPpEH e EPpEA	81
5. CONCLUSÃO	84
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85

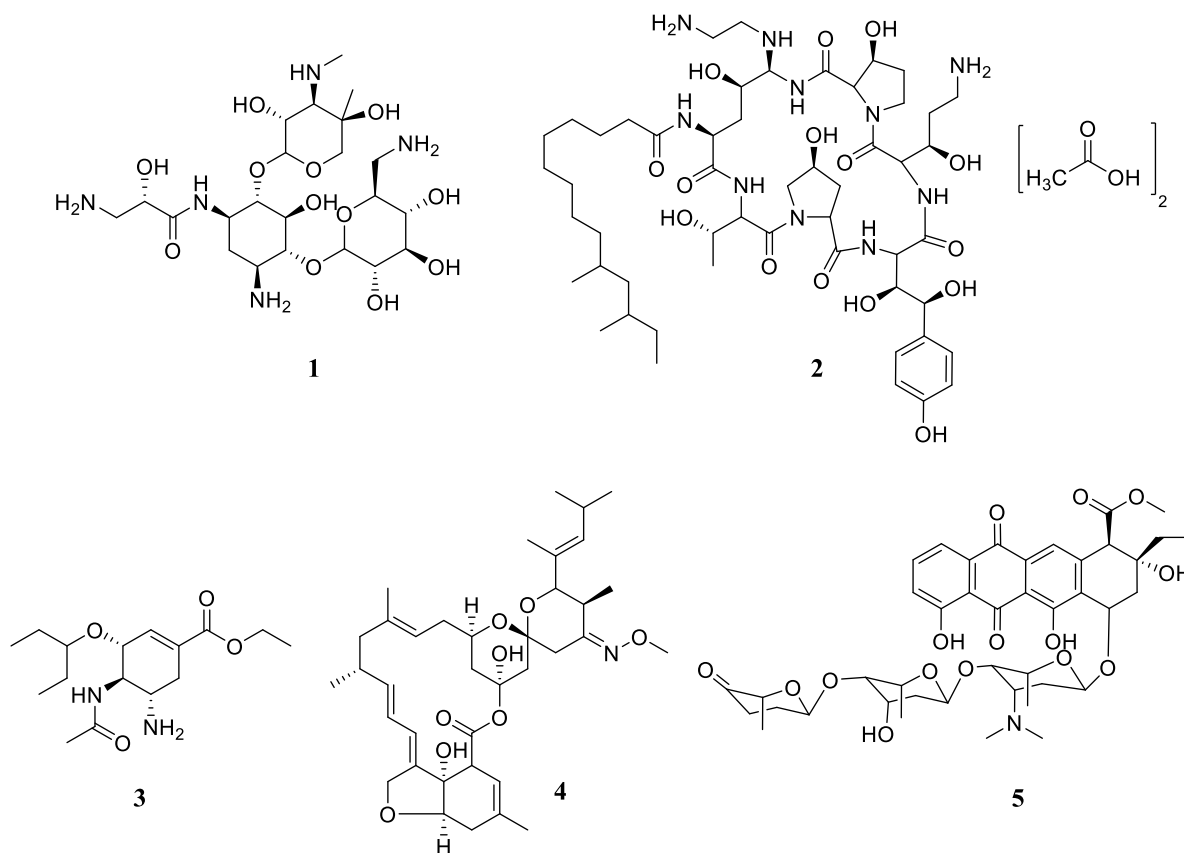
1. INTRODUÇÃO

1.1 Produtos naturais bioativos e plantas medicinais

Os Produtos Naturais (PNs) são compostos bioativos que podem ser isolados de plantas, microrganismos e animais marinhos (KHALIL et al., 2016). Muitos destes compostos apresentam efeitos terapêuticos e estão descritos na literatura. Estima-se que cerca de 30% dos medicamentos são derivados de PNs (DUTRA et al., 2016).

Newman e Cragg (2020) relataram o isolamento de 356 compostos derivados de produtos naturais (FIGURA 1.1) que foram avaliados e apresentaram diferentes atividades, dentre estas podem ser exemplificadas: antibacteriana (isepamicina (**1**)), antifúngica (casposfungina (**2**)), antiviral (oseltamivir (**3**)), antiparasitária (moxidectina(**4**)) e anticancerígena (aclerubicina (**5**)).

FIGURA 1.1 – Estruturas químicas de PNs bioativos.



Compostos: isepamicina (**1**), casposfungina (**2**), oseltamivir (**3**), moxidectina (**4**), aclarubicina (**5**).

Os PNs oriundos de plantas possuem uma grande importância do ponto de vista químico e são na maioria das vezes, utilizados como material de partida para produção de novos medicamentos sejam eles naturais ou sintéticos (PENTO-ROL & BORASCHI, 2016).

Por definição, plantas medicinais, são plantas manuseadas pelo homem ou animal, que apresentam alguma ação terapêutica (ALMASSY JUNIOR et al., 2005). Algumas espécies medicinais, para muitas regiões pobres do país, apresentam-se como fundamental recurso terapêutico, sendo utilizadas no tratamento e cura de algumas enfermidades (ZHANG et al., 2013).

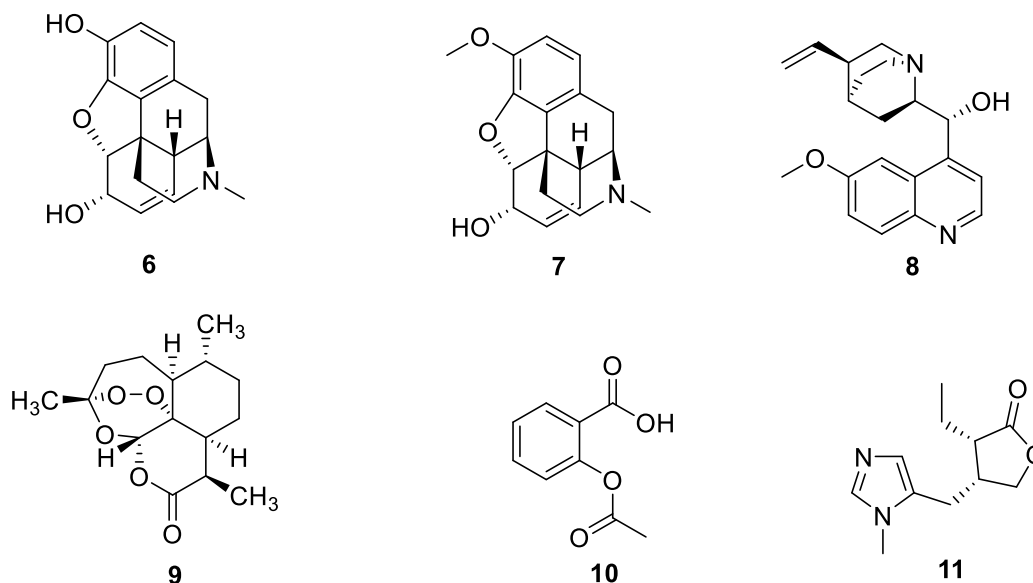
No que refere-se a abundância vegetal, o Brasil é considerado um dos países que possui a maior biodiversidade vegetal com a estimativa de 45.000 espécies (DUTRA et al., 2016). Essa variedade florística está dividida em seis biomas: Amazônia, Caatinga, Cerrado, Pampa, Mata Atlântica e Pantanal.

Diversos estudos colaboraram para a descoberta de medicamentos a partir de plantas medicinais (FIGURA 1.2), como o exemplo da morfina (**6**) isolada em 1806 pelo farmacêutico Friedrich Wilhelm através da planta conhecida cientificamente como *Papaver somniferum* L. (DUTRA et al., 2016; SOUZA et al., 2011). Em 1824, Pierre-Jean Robiquet isolou o composto chamado codeína (**7**) de *P. somniferum* L., sendo utilizado no tratamento da dor.

Outros compostos contribuíram para o tratamento de diversas doenças. A quinina (**8**) e a artemisinina (**9**) que foram isoladas das espécies *Cinchona* sp. e *Artemisia annua*, as quais são utilizadas no tratamento contra a malária (LÜLLMANN et al., 2017). A salicina foi inicialmente extraída da casca dos salgueiros da família *Salicaceae* sendo a base para síntese do ácido acetilsalicílico (aspirina, **10**), provavelmente o medicamento mais antigo e mais utilizado no tratamento de doenças inflamatórias (MONTINARI et al., 2018).

Outro exemplo, é a pilocarpina (**11**), isolada da espécie *Pilocarpus*, árvore nativa do Brasil. Esse composto é utilizado para aliviar sintomas de boca seca, causados pelo tratamento com radioterapia e no tratamento de glaucomas, reduzindo significativamente a pressão intraocular (SAWAYA et al., 2015).

FIGURA 1.2 – Estruturas químicas de produtos naturais utilizados como medicamentos.



Compostos: morfina (6), codeína (7), quinina (8), artemisinina (9), aspirina (10), pilocarpina (11).

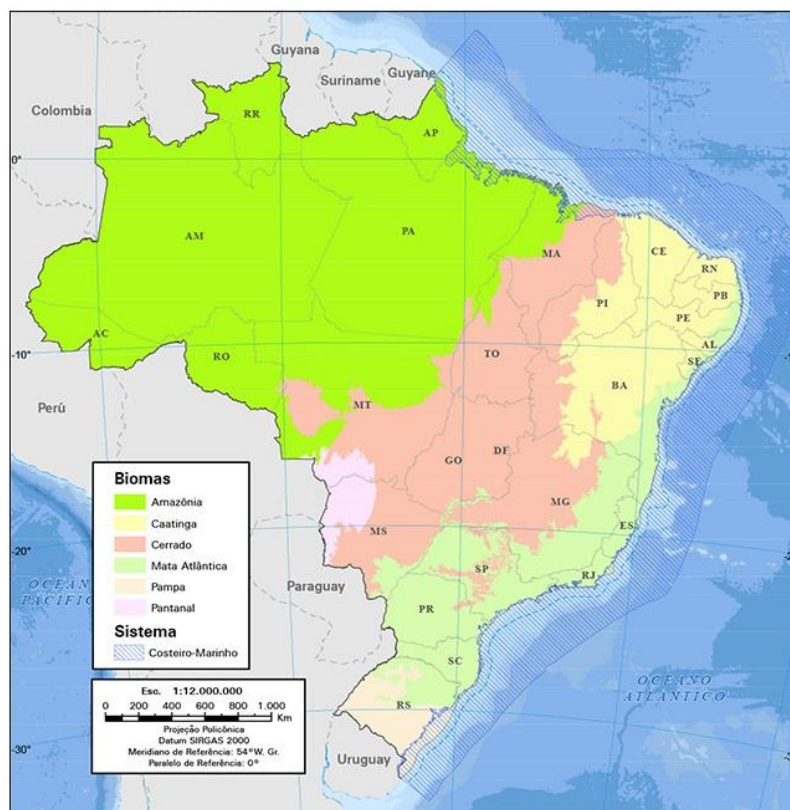
Diante da abundância de compostos químicos que o Brasil dispõe, o Cerrado é responsável por grande parte da biodiversidade no que corresponde a fauna e a flora brasileira (NIERO et al., 2003; RABELING et al., 2019).

1.2 Cerrado

O bioma Cerrado, denominado de savana brasileira possui cerca de 2 milhões de km² de todo o território nacional, constituindo o segundo maior bioma, atrás apenas da floresta Amazônica (REIS & SCHMIELE, 2019). Ele está localizado principalmente na região central do Brasil (FIGURA 1.3) abrangendo os seguintes estados Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Tocantins, Goiás, Minas Gerais, Bahia, Maranhão, Piauí, São Paulo, Distrito Federal, Pará e Roraima (SOARES et al., 2017).

Sua vegetação está sob forte influência da sazonalidade (estações do ano) no qual existem diferentes fitofisionomias (campos, Cerrado *stricto sensu*, cerradão, matas de galeria, campo sujo e campo limpo) caracterizadas pela sua flora com aspectos peculiares que coexistem em um mesmo espaço (ABREU et al., 2011). A vegetação encontrada nesse bioma é variada devido a complexa interação de diferentes fatores, como o clima, o solo, profundidade do lençol freático e as queimadas (CASSINO et al., 2015).

FIGURA 1.3 – Mapa demonstrativo dos biomas encontrados no Brasil.



Fonte: IBGE 2019.

Sua flora é extremamente abundante e seus frutos por exemplo, possuem características intrínsecas de alta qualidade nutricional, sendo consumidos e procurados por comunidades e pesquisadores (MORZELLE et al., 2015). Algumas plantas do bioma Cerrado são utilizadas na alimentação e possui propriedades medicinais como o pequi (*Caryocar brasiliense*), rico em compostos fenólicos que são responsáveis pela capacidade antioxidante reduzindo os radicais livres.

A mangaba (*Hancornia speciosa*) possui um alto teor de flavonoides e taninos, compostos responsáveis pela ação anti-inflamatória (ASSUMPÇÃO et al., 2014; MARINHO et al., 2011). A mama-cadela (*Brosimum gaudichaudii*) possui compostos em quantidades consideráveis de ácido ascórbico e compostos fenólicos que apresentaram atividades antioxidantes, propriedades antimicrobianas, sendo utilizada no tratamento do vitiligo (GOULART et al., 2017).

As flores encontradas nesse bioma também têm sido investigadas quanto as suas propriedades químicas e biológicas. As flores do cipó-de-São João (*Pyrostegia venusta*) possuem compostos como esteroides e ácidos graxos responsáveis pela ação antimicrobiana,

anti-inflamatória e antioxidante (ROY et al., 2012). O óleo das flores da espécie *Hyptis passerina* Mart. revelou propriedades antibacterianas devido a presença de monoterpenos e sesquiterpenos (ZELLNER et al., 2009). As flores da espécie *Solanum lycocarpum* (fruto-do-lobo) apresentaram em sua composição química os compostos fenólicos, flavonoides e esteroides os quais demonstraram atividades anti-inflamatória, hepatoprotetora e gastroprotetora (MARTINS et al., 2015a).

A caracterização de compostos químicos em plantas do Cerrado é de grande relevância para a busca de substâncias que atuem como modificadores de resposta biológica como propriedades antimicrobianas, anticarcinogênicas, antioxidantes, etc. Infelizmente, muitas espécies de plantas foram extintas devido as queimadas, ao desmatamento para construção de pastos, eliminando a oportunidade de descobertas de novos compostos químicos. Diante desses fatos apresentados, o Cerrado possui uma grande importância no âmbito cultural e científico (RABELING et al., 2019; STRASSBURG et al., 2017).

No que consiste a variedade de compostos, alguns princípios ativos encontrados em plantas medicinais são formados pelo metabolismo secundário. Esses compostos são responsáveis pela atuação no mecanismo de defesa das plantas e na polinização, sendo constantes alvos de estudos na área de PNs, por possuírem atividades biológicas frente a diversas doenças (SANTOS et al., 2017).

1.3 Metabólitos secundários

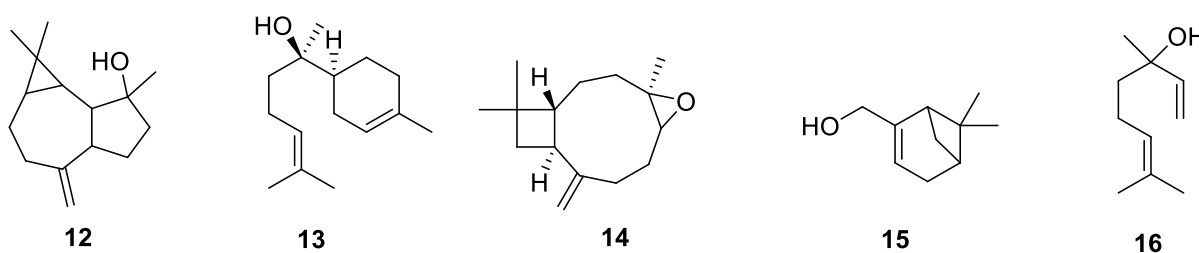
As pesquisas que envolvem os compostos químicos sintetizados pelas plantas vêm sendo desenvolvidas ao longo dos tempos e como consequência esses compostos estão sendo utilizados como agentes terapêuticos (FOWLER, 2006). Os metabólitos podem ser divididos em metabólitos primários, que compreendem os compostos essenciais a sobrevivência da planta, sendo eles: carboidratos, lipídios, proteínas e ácidos nucleicos (DIXON, 2001; SIMÕES et al., 2010).

A síntese de metabólitos secundários nas plantas pode ser influenciada por fatores como temperatura, disponibilidade de água e nutrientes, altitude, poluição, radiação ultravioleta, etc. (GOBBO-NETO & LOPES, 2007). Sua síntese acontece através de rotas biossintéticas em organelas diferentes na célula vegetal. Por exemplo, os terpenos são originados a partir da condensação de unidades de isopreno através das vias do acetato-mevalonato e do metileritritol

fosfato (MPE) e os flavonoides são produzidos a partir das vias do acetato e do ácido chiquímico (DEWICK, 2002).

Os terpenos são conhecidos como compostos terpenoides e formam um vasto grupo estruturalmente diversificado. São formados pela condensação de unidades isoprênicas de cinco carbonos (C_5), os quais são subdivididos em: hemiterpenos (C_5), monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}), diterpenos (C_{20}), triterpenos (C_{30}) e carotenoides (C_{40}) (ZHOU & PICHERSKY, 2020). De modo geral, os terpenoides (FIGURA 1.4) possuem atividades leishmanicida (espatulenol (**12**) e α -bisabolol (**13**)), antioxidante (óxido de cariofileno (**14**)), antibacteriana (mirtenol (**15**)) e antifúngica (linalol (**16**)) (BAJALAN et al., 2017; BOSQUIROLI et al., 2015; MORALES-YUSTE et al., 2010; SILVA et al., 2017).

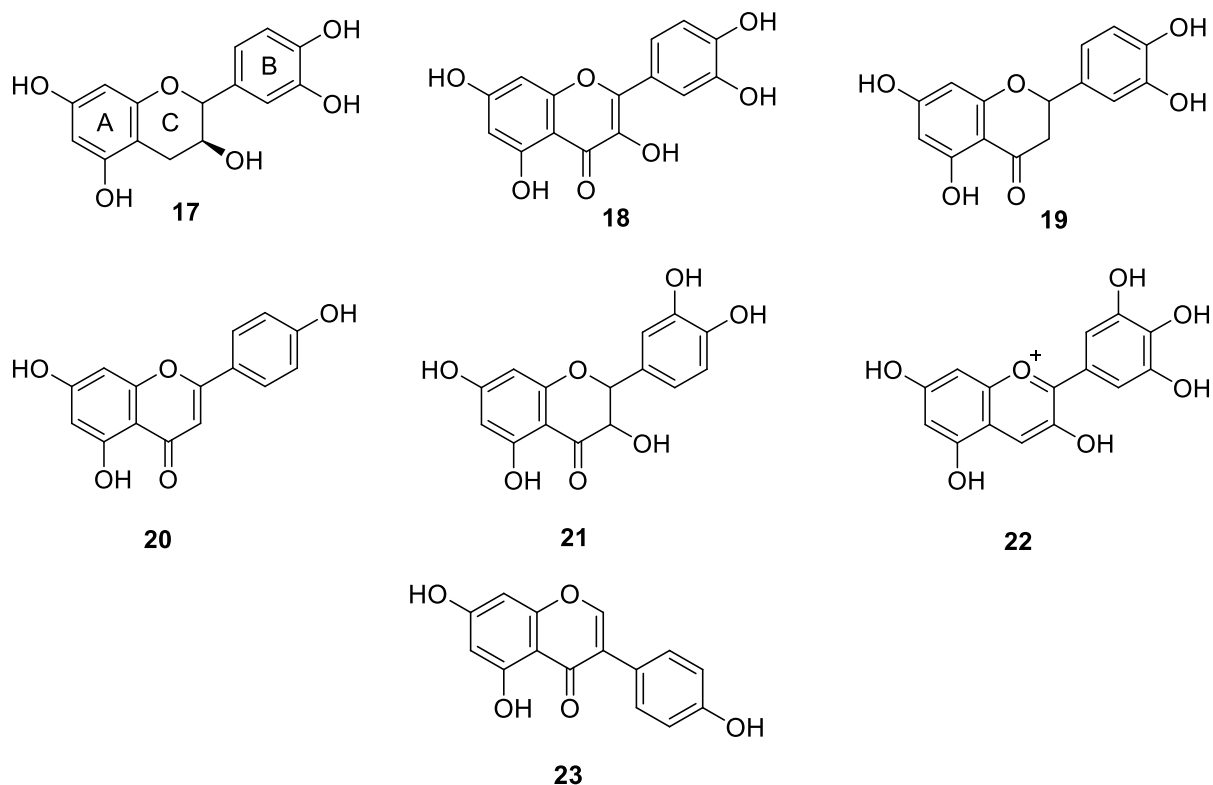
FIGURA 1.4 – Exemplos de terpenos bioativos.



Compostos: espatulenol (**12**), α -bisabolol (**13**), óxido de cariofileno (**14**), mirtenol (**15**), linalol (**16**).

Os flavonoides constituem um amplo grupo químico que está inserido aos compostos fenólicos encontrando-se abundantemente nas plantas. Eles estão presentes na forma de pigmentos vegetais e fazem parte da defesa e atração de polinizadores nas plantas (SIMÕES et al., 2010). A característica química principal de um flavonoide é a presença de $C_6-C_3-C_6$, nos quais consistem em dois anéis aromáticos (A e B) unidos por um anel heterocíclico oxigenado (C). Flavonoides (FIGURA 1.5) que apresentam substituições no anel A e B originam diferentes compostos flavanol (catequina (**17**)), flavonol (quercetina (**18**)), flavanona (eriodictiol (**19**)), flavona (apigenina (**20**)), flavanonol (taxiofilina (**21**)), antocianina (delfinidina (**22**)) e isoflavonoide (genisteína (**23**)) (SANTOS & RODRIGUES, 2017).

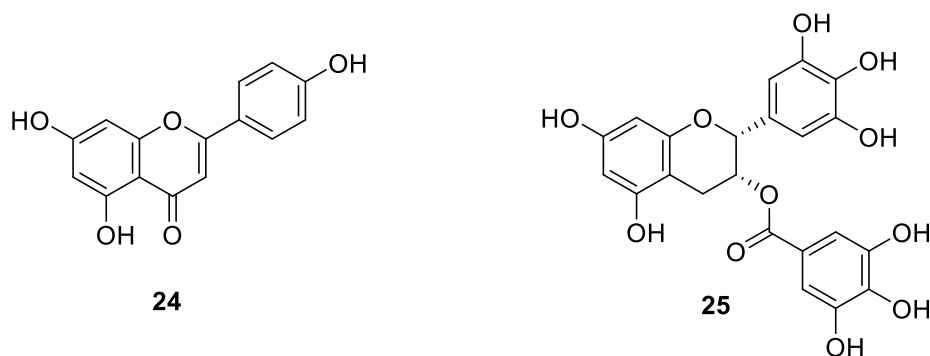
FIGURA 1.5- Diferenças estruturais dos flavonoides.



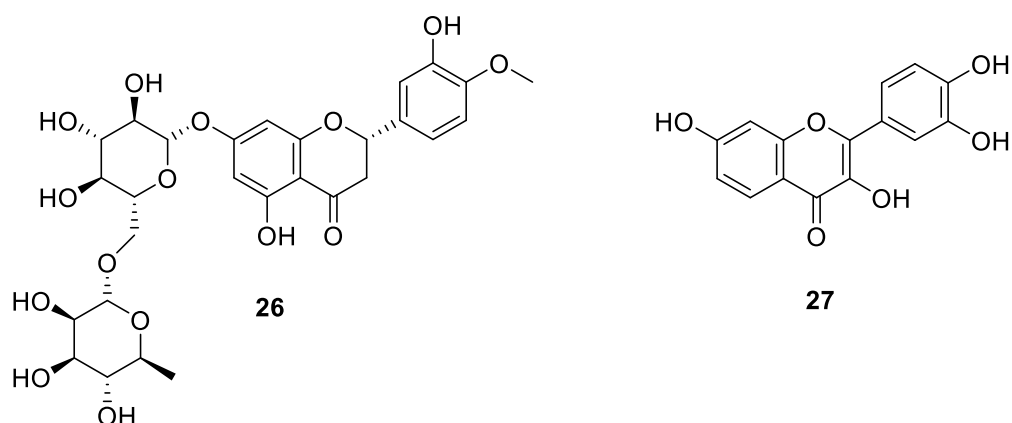
Compostos: catequina (17), quercetina (18), eriodictiol (19), apigenina (20), taxiofilina (21), delphinidina (22), genisteína (23).

De acordo com a literatura, os flavonoides (FIGURA 1.6) apresentam atividades biológicas, como antioxidante (apigenina (24)) (WANG et al., 2020), anti-inflamatória (epigallocatequina-3-galato (25)) (SPAGNUOLO et al., 2018), antialérgica (hesperidina (26)) (SHI et al., 2018) e antimicrobiana (fisetina (27)) (GÓRNIK et al., 2019).

FIGURA 1.6 – Exemplos de flavonoides bioativos.



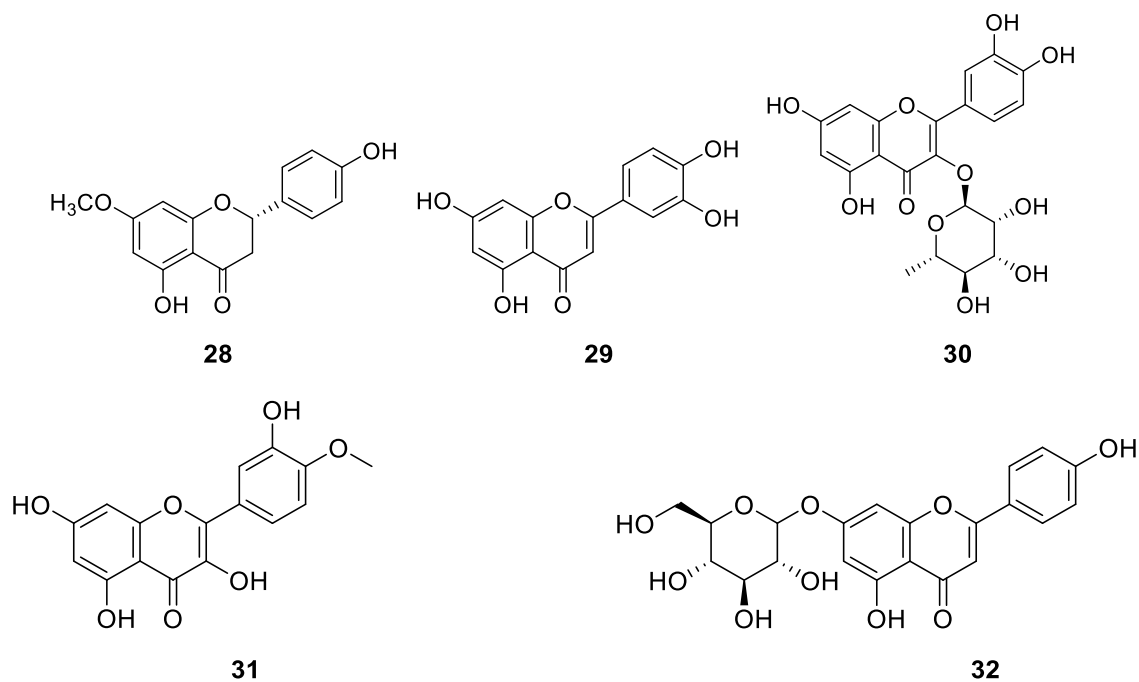
Continuação FIGURA 1.6.



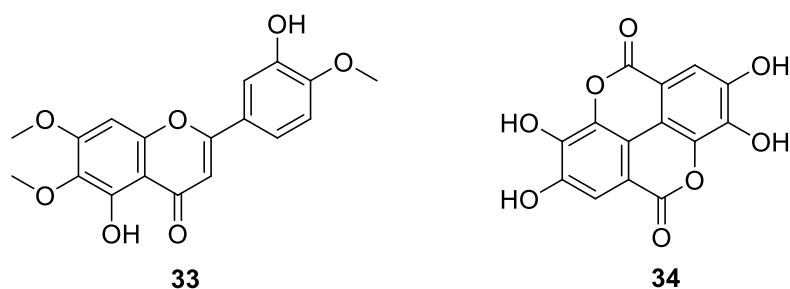
Compostos: apigenina (**24**), epigallocatequina-3-galato (**25**), hesperidina (**26**), fisetina (**27**).

Há relatos na literatura de compostos da classe dos flavonoides e seus derivados (FIGURA 1.7), que possuem atividades leishmanicida (**28** sakuranetina, **29** luteolina, **30** quercitrina) (CHANDRASEKAR et al., 2018; RIBEIRO et al., 2015; ZEOUK et al., 2020) e antiparasitária (**31**: tamarixetina, **32**: apigenina-7-*O*-glucosídeo, **33**: eupatorina, **34**: ácido elágico) (FIGURA 1.7) (ABUGRI et al., 2019; BEER et al., 2016; NETO et al., 2020; RIBEIRO et al., 2015).

FIGURA 1.7 – Exemplos de compostos da classe dos flavonoides e seus derivados que possuem atividades antiparasitárias.



Continuação FIGURA1.7.



Compostos: sakuranetina (28), luteolina (29), quercitrina (30), tamarixetina (31), apigenina-7-*O*-glucosídeo (32), eupatorina (33), ácido elágico (34).

1.4 Gênero *Pterodon*

Alguns trabalhos descrevem o gênero *Pterodon*, pertencente a família Fabaceae, possuindo quatro espécies de árvores aromáticas nativas do Brasil, ou seja, *Pterodon abruptus* Benth., *Pterodon apparicioi* Pedersoli, *Pterodon pubescens* Benth. e *Pterodon polygalaefflorus* Benth. (SANTOS et al., 2016). No entanto, de acordo com a base de dados “The Plant List” o gênero *Pterodon* (TABELA 1.1) compreende em duas espécies e apresentam algumas sinonímias, listadas a seguir (GSPC, 2020).

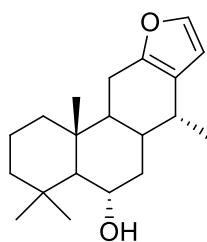
TABELA 1.1 – Relação das espécies e sinonímias do gênero *Pterodon*.

Espécies	Sinonímias
<i>Pterodon abruptus</i> (Moric.) Benth.	<i>P. apparicioi</i> Pedersoli
	<i>P. polygalaefflorus</i> (Benth.)
<i>Pterodon emarginatus</i> Vogel	<i>P. polygaliflorus</i> (Benth.) Benth.
	<i>P. pubescens</i> (Benth.) Benth.

As árvores desse gênero são conhecidas popularmente como “sucupira”, “faveira”, “sucupira-branca” ou “sucupira-lisa” e podem ser encontradas no Brasil em biomas como Cerrado, Caatinga e na floresta semidecidual da bacia do Paraná, abrangendo vários estados dentre eles o estado de Goiás (BARREIRA et al., 2002; LORENZI, 1998).

Esse gênero possui árvores, medindo entre 6 a 18 m, e sua madeira é utilizada em construções civil devido a sua alta durabilidade, mesmo estando em contato com a umidade e

Continuação FIGURA 1.8.



37

Compostos: 14,15-epoxigeranilgeraniol (**35**), geranilgeraniol (**36**), 6 α -hidroxivouacapano (**37**).

1.5 *Pterodon pubescens* Benth

A espécie *Pterodon pubescens* pertencente à família Fabaceae, nativa do Cerrado, é encontrada na região centro-oeste do Brasil, sendo uma planta medicinal utilizada para o tratamento de doenças inflamatórias (LORENZI, 2009). Em 1862, essa espécie foi classificada como *P. pubescens* por Bentham, mas posteriormente Vogel relatou que *P. pubescens* e *P. emarginatus* era de fato a mesma espécie.

Essa espécie faz parte de um grupo de plantas, popularmente conhecidas como “sucupira branca” ou “faveira” encontrada nos Estados de Minas Gerais, São Paulo, Goiás e Mato Grosso do Sul. Essa espécie floresce entre os meses de abril e maio e podem frutificar em diferentes épocas do ano, mais comumente nos meses de junho e agosto (MASCARO et al., 2004). É amplamente utilizada no reflorestamento, a fim de recuperar áreas desmatadas.

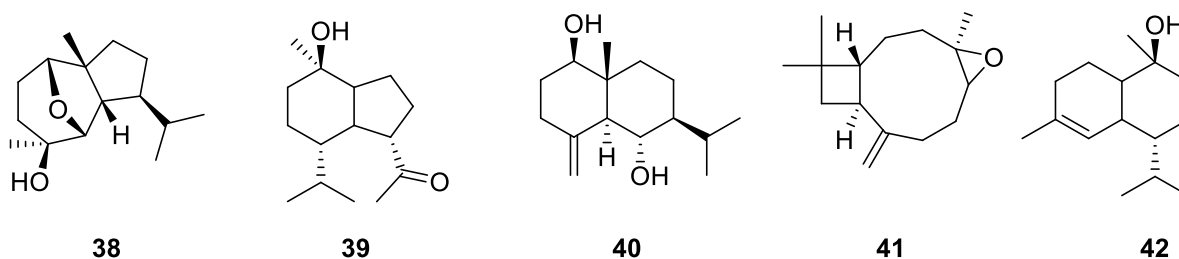
Seus frutos na forma de vagens caem e se espalham facilmente por longas distâncias devido ao seu formato circular (MASCARO et al., 2004). Sua madeira é resistente sendo utilizada na construção civil e a casca é amplamente utilizada em infusões e suas raízes e sementes são comercializadas devido a ampla atividade farmacológica (EVANGELISTA et al., 2007).

Estudos dos extratos etanólicos das folhas de *P. pubescens* em macrófagos infectados com *L. amazonensis* revelaram a capacidade do controle de crescimento do parasito tornando-se atrativo na busca de agentes leishmanicidas (ARRAIS- SILVA et al., 2014).

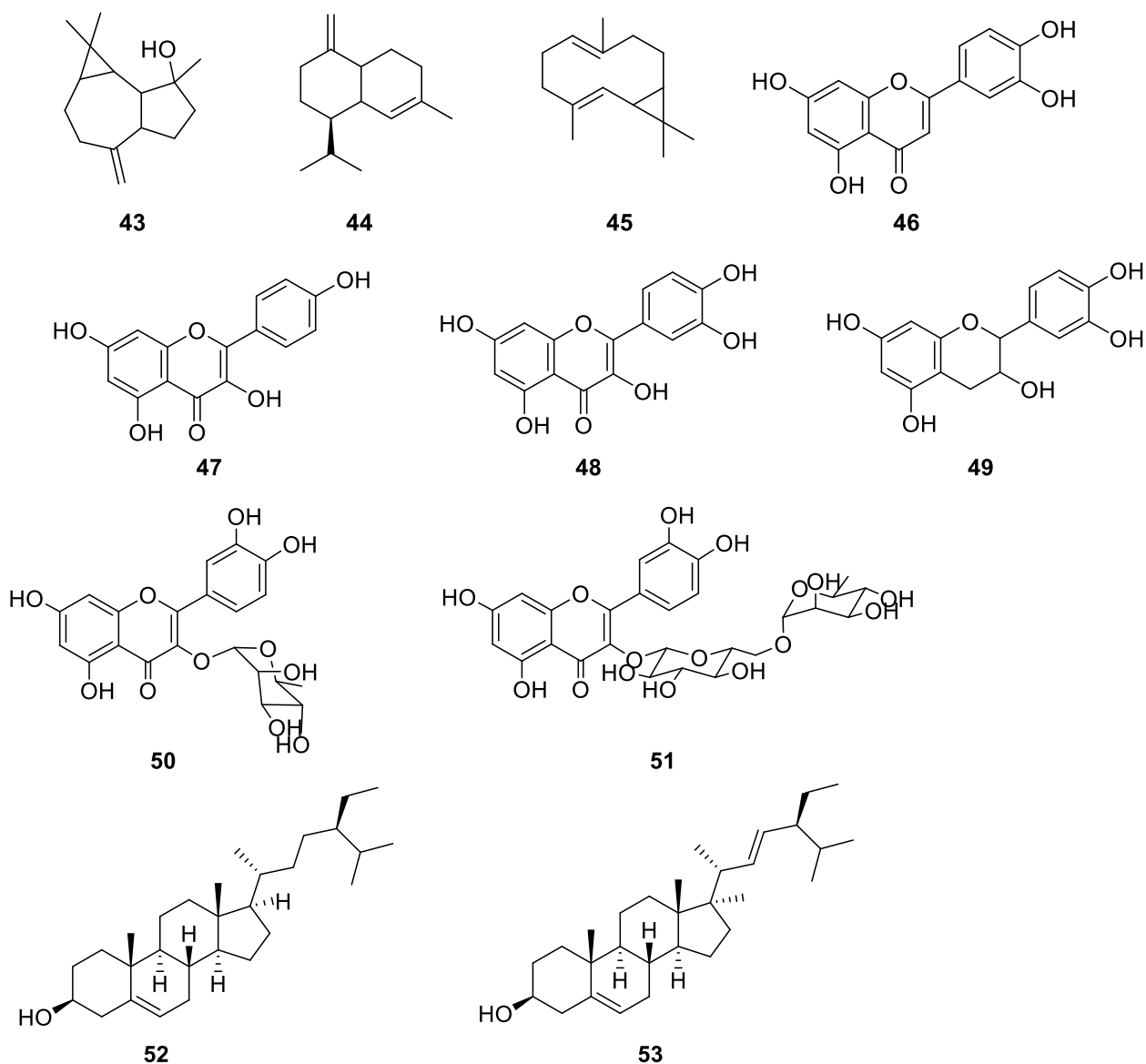
Estudos fitoquímicos anteriores das folhas de *P. pubescens* (TABELA 1.2 e FIGURA 1.9) foram identificados os compostos sesquiterpenos (**38-45**), flavonoides (**46-51**), esteroides (**52-53**) (MIRANDA et al., 2014; SANTOS et al., 2010) conforme a tabela abaixo.

TABELA 1.2 - Compostos identificados nas folhas de *P. pubescens*.

Compostos	Nome dos compostos	Fórmula molecular	Referências
38	2β,6β-epóxi-5β-hidróxi-isodaucano	C ₁₅ H ₂₆ O ₂	MIRANDA et al., 2014
39	oplopanona	C ₁₅ H ₂₆ O ₂	MIRANDA et al., 2014
40	1β,6α-diidroxi-4-eudesmeno	C ₁₅ H ₂₆ O ₂	MIRANDA et al., 2014
41	óxido de cariofileno	C ₁₅ H ₂₄ O	MIRANDA et al., 2014
42	α-cadinol	C ₁₅ H ₂₆ O	MIRANDA et al., 2014
43	espatulenol	C ₁₅ H ₂₄ O	MIRANDA et al., 2014
44	muuroleno	C ₁₅ H ₂₄	SANTOS et al., 2010
45	biciclogermacreno	C ₁₅ H ₂₄	SANTOS et al., 2010
46	luteolina	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	MIRANDA et al., 2014
47	kaempferol	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	MIRANDA et al., 2014
48	quercetina	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	MIRANDA et al., 2014
49	(+)-catequina	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	MIRANDA et al., 2014
50	quercetina-3-O-α-L-raminopiranosídeo	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	MIRANDA et al., 2014
51	rutina	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	MIRANDA et al., 2014
52	β-sitosterol	C ₂₉ H ₅₀ O	SANTOS et al., 2010
53	estigmasterol	C ₂₉ H ₄₈ O	SANTOS et al., 2010

FIGURA 1.9 - Estruturas químicas dos metabólitos secundários identificados nas folhas de *P. pubescens*.

Continuação FIGURA 1.9.

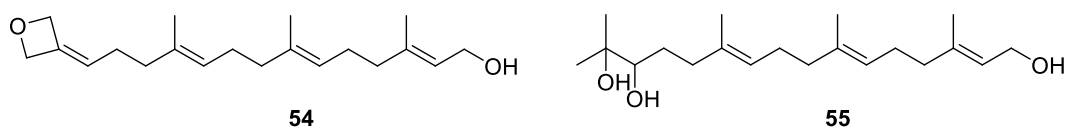


Compostos: 2 β ,6 β -epóxi-5 β -hidróxi-isodaucano (**38**), oplopanona (**39**), 1 β ,6 α -diidróxi-4-eudesmeno (**40**), óxido de cariofileno (**41**), α -cadinol (**42**), espatulenol (**43**), muuroleno (**44**), biclogermacreno (**45**), luteolina (**46**), kaempferol (**47**), quercetina (**48**), (+)-catequina (**49**), quercetina-3-*O*- α -*L*-raminopiranosídeo (**50**), rutina (**51**), β -sitosterol (**52**), estigmasterol (**53**).

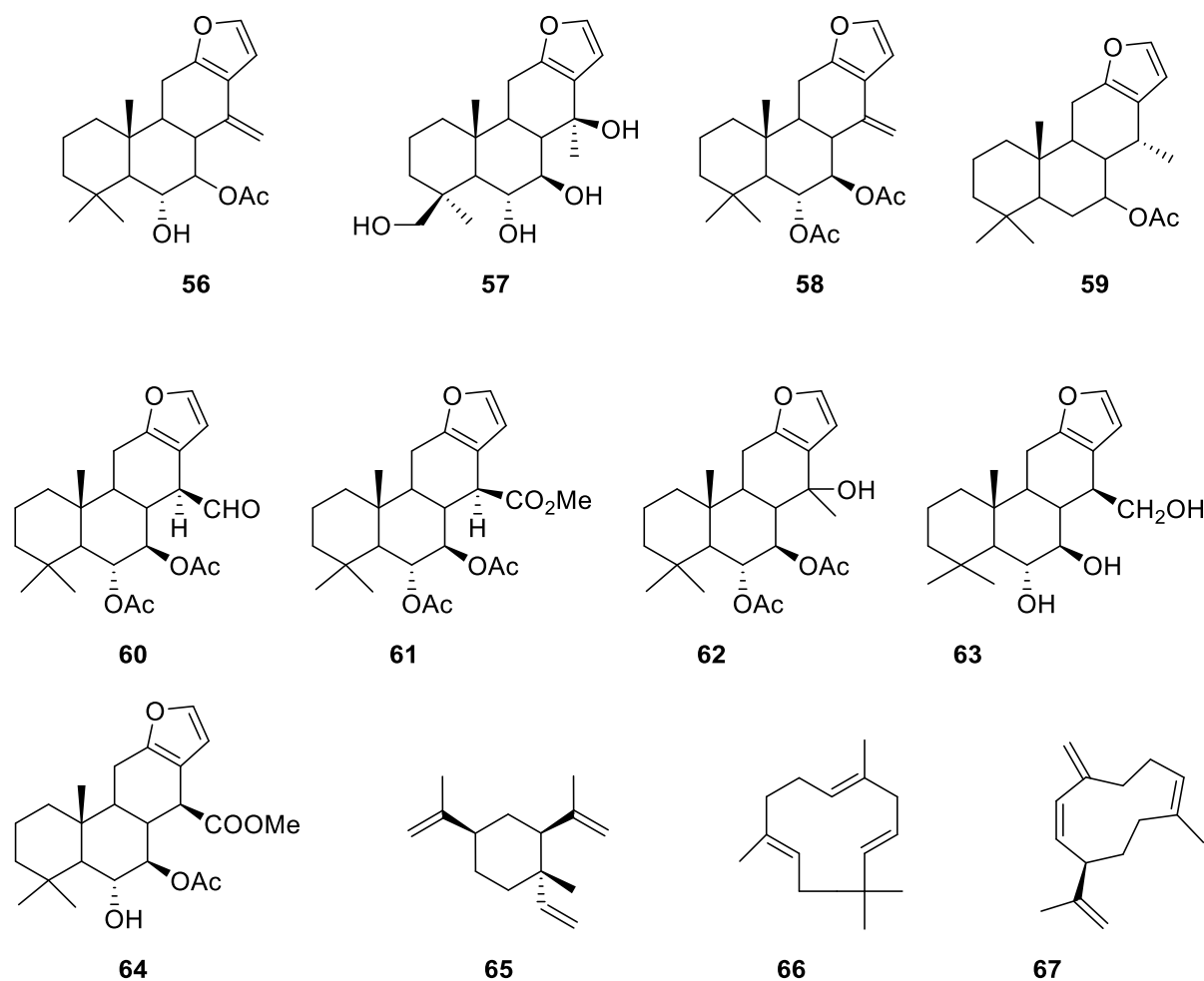
Foram identificados nos frutos os compostos diterpenos (**54-55**), diterpenos de esqueleto vouacapânico (**56-64**), sesquiterpenos (**65-67**) (TABELA 1.3 e FIGURA 1.10) (FASCIO et al., 1970; MARTINS et al., 2015b; PINTO et al., 2013; SANTOS et al., 2010; SPINDOLA et al., 2009; VIEIRA et al., 2008).

TABELA 1.3 - Compostos identificados nos frutos de *P. pubescens*.

Compostos	Nome dos compostos	Fórmula molecular	Referências
54	16,17-epoxigeranilgeraniol	C ₂₀ H ₃₂ O ₂	FASCIO et al., 1970
55	14,15-diidroxí-14,15-diidrogeranilgeraniol	C ₂₀ H ₃₆ O ₃	FASCIO et al., 1970
56	6 α -hidroxí-7 β -acetoxivoucapano-14(17)-eno	C ₂₂ H ₃₀ O ₄	PINTO et al., 2013
57	vouacapano-6 α ,7 β ,14 β ,19-tetraol	C ₂₀ H ₃₀ O ₅	VIEIRA et al., 2008
58	6 α ,7 β -diacetoxivouacapano	C ₂₄ H ₃₂ O ₅	MARTINS et al., 2015b
59	7 β -acetoxivouacapano	C ₂₂ H ₃₂ O ₃	SPINDOLA et al., 2009
60	6 α ,7 β -diacetoxivouacapano-14 β -al	C ₂₄ H ₃₂ O ₆	FASCIO et al., 1970
61	6 α ,7 β -diacetoxivouacapano-14 β -oato	C ₂₅ H ₃₄ O ₇	FASCIO et al., 1970
62	6 α ,7 β -diacetoxi-12,16-diidro-16-oxovinhatícoato de metila	C ₂₄ H ₃₄ O ₆	FASCIO et al., 1970
63	6 α ,7 β -diidrovouacapano-17 β -metileno-ol	C ₂₀ H ₃₀ O ₄	SPINDOLA et al., 2009
64	6 α -acetoxi-7 β hidroxivouacapano-17 β -oato de metila	C ₂₃ H ₃₂ O ₆	SERVAT et al., 2012
65	β -elemeno	C ₁₅ H ₂₄	SANTOS et al., 2010
66	α - humuleno	C ₁₆ H ₂₆	SANTOS et al., 2010
67	germacreno-D	C ₁₅ H ₂₂	PINTO et al., 2013

FIGURA 1.10 - Estruturas químicas dos metabólitos secundários identificados nos frutos de *P. pubescens*.

Continuação FIGURA 1.10.



Compostos: 16,17-epoxigeranilgeraniol (**54**), 14,15-diidroxi-14,15-diidrogeranilgeraniol (**55**), 6 α -hidroxi-7 β -acetoxivouacap-14(17)-eno (**56**), vouacapano-6 α ,7 β ,14 β ,19-tetraol (**57**), 6 α ,7 β -diacetoxivouacapano (**58**), 7 β -acetoxivouacapano (**59**), 6 α ,7 β -diacetoxivouacapan-14 β -al (**60**), 6 α ,7 β -diacetoxivouacapan-14 β -oato (**61**), 6 α ,7 β -diacetoxi-12,16-diidro-16-oxovinhaticoato de metila (**62**), 6 α ,7 β -diidro vouacapano-17 β -metileno-ol (**63**), 6 α -acetoxi-7 β hidroxivouacapan-17 β -oato de metila (**64**), β -elemeno (**65**), α -humuleno (**66**), germacreno-D (**67**).

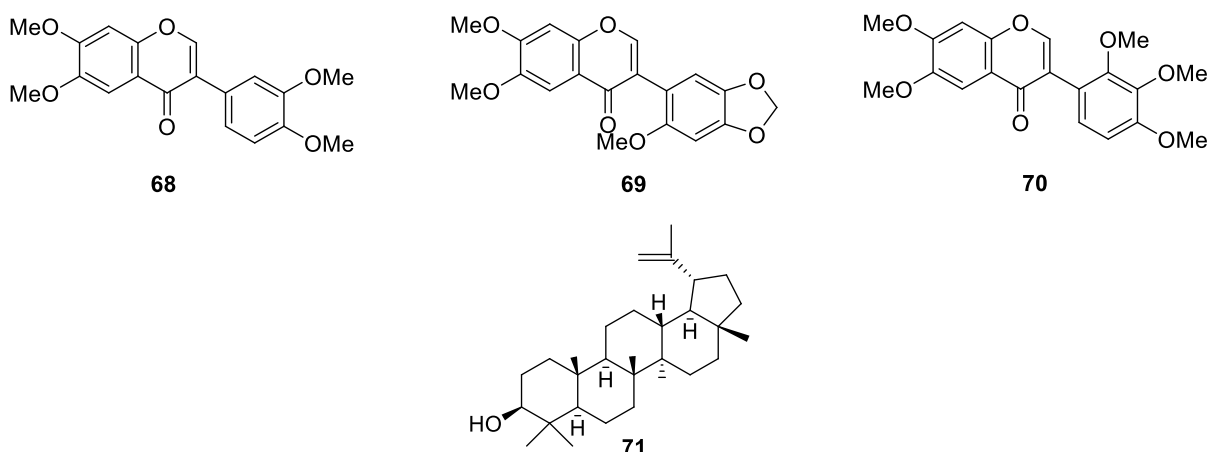
Os trabalhos de investigação química da casca do caule permitiram identificar os compostos isoflavonas (**68-70**) e triterpeno (**71**) (TABELA 1.4 e FIGURA 1.11) (BRAZ FILHO et al., 1971; HERNÁNDEZ-TERRONES et al., 2007).

TABELA 1.4 - Compostos identificados na casca do caule de *P. pubescens*.

Compostos	Nome dos compostos	Fórmula molecular	Referências
68	3',4',6,7-tetrametoxiisoflavona	C ₁₉ H ₁₈ O ₆	MARQUES et al., 1998
69	2',6,7-trimetoxi-4',5'-metilendioxiiisoflavona	C ₁₉ H ₁₆ O ₇	BRAZ FILHO et al., 1971

Continuação TABELA 1.4.

70	2',3',4',6,7- penta- metoxiisoflavona	C ₂₀ H ₂₀ O ₇	BRAZ FILHO et al., 1971
71	lupeol	C ₃₀ H ₅₀ O	MORAES et al., 2012

FIGURA 1.11 - Estruturas químicas dos metabólitos secundários identificados na casca do caule de *P. pubescens*.

Compostos: 3',4',6,7-tetrametoxiisoflavona (**68**), 2',6,7-trimetoxi-4',5'-metilenodioxiiisoflavona (**69**), 2',3',4',6,7-penta-metoxiisoflavona (**70**), lupeol (**71**).

Tendo em vista que diversas espécies da flora do Cerrado se encontram em extinção ou ainda não foram estudadas, é necessário investigar propriedades químicas e biológicas com a finalidade de conhecer a funcionalidade dos PNs frente a diversas doenças com destaque para leishmaniose. A relevância deste trabalho dá-se pelo fato de que até o presente momento não há estudos que relatam dos compostos químicos nas flores de *P. pubescens*, bem com a sua atividade biológica frente a *L. infantum* e *L. amazonensis*.

1.6 Leishmaniose

A leishmaniose é considerada uma das doenças mais negligenciadas no que se refere a pesquisa (FREITAS-JUNIOR et al., 2012; JHINGRAN et al., 2008; KAYE & SCOTT, 2011). É uma doença infecciosa tropical, zoonótica de transmissão vetorial, que se dá através do mosquito flebotomíneo (Psychodidae) conhecido como “mosquito-palha” ou “cangalhinha” (LESSA et al., 2007; SANTOS et al., 2016; VERMELHO et al., 2014), com ocorrência em todo

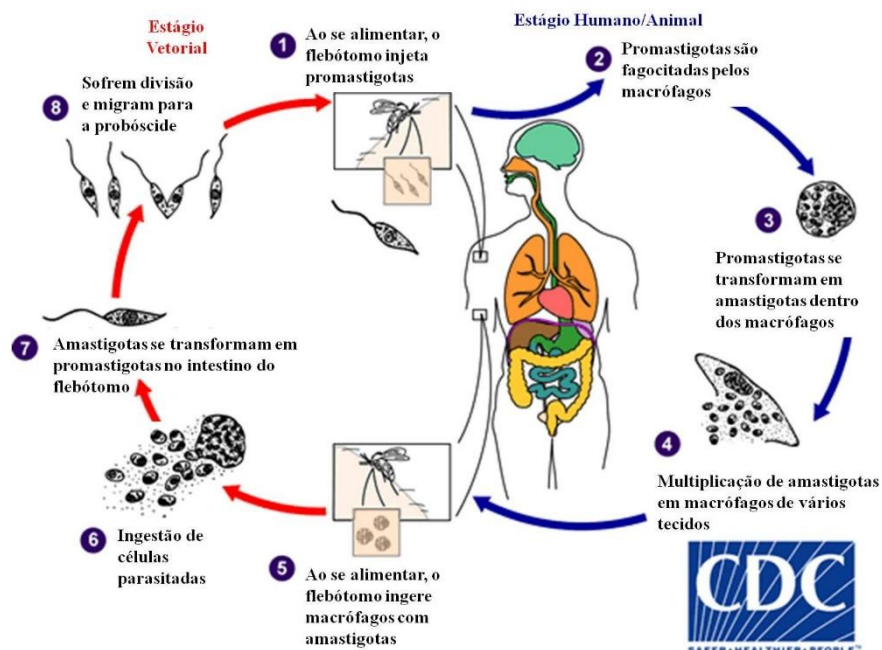
o mundo, incluindo países desde a Ásia até a América. Segundo a OMS (Organização Mundial da Saúde) em 2020, houve um aumento de 95% de pessoas que foram infectadas pelas principais formas de leishmaniose em diversos países incluindo o Brasil (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2020).

O gênero *Leishmania* é constituído por protozoários tripanossomatídeos (ordem Kinetoplastida) que abrange mais de vinte espécies. A leishmaniose é transmitida pela picada de insetos fêmeas hematófagas e em seres humanos essa doença pode manifestar-se das principais formas visceral, cutânea e mucocutânea (BURZA et al., 2018; MARÍN et al., 2015).

A forma tegumentar apresenta lesões cutâneas ulcerativas e inflamação mucosa. A visceral, também conhecida como leishmaniose calazar, apresenta lesões nas vísceras possuindo evolução crônica de acometimento sistêmico, dependendo da espécie do parasita e a resposta imune do hospedeiro (ORYAN, 2015; REITHINGER et al., 2007; ROGERS, 2012; SANTOS et al., 2016).

O parasito, em seu ciclo de desenvolvimento (FIGURA 1.12) manifesta-se de duas formas evolutivas, a amastigota (intracelular) que se encontra nos vacúolos digestivos (ou fagolisossomos) e a promastigota (flagelado, extracelular) localizado dentro do intestino do mosquito (BATES, 2008; HOMMEL, 1999).

FIGURA 1.12 – Ciclo de vida do parasito de *Leishmania* spp.



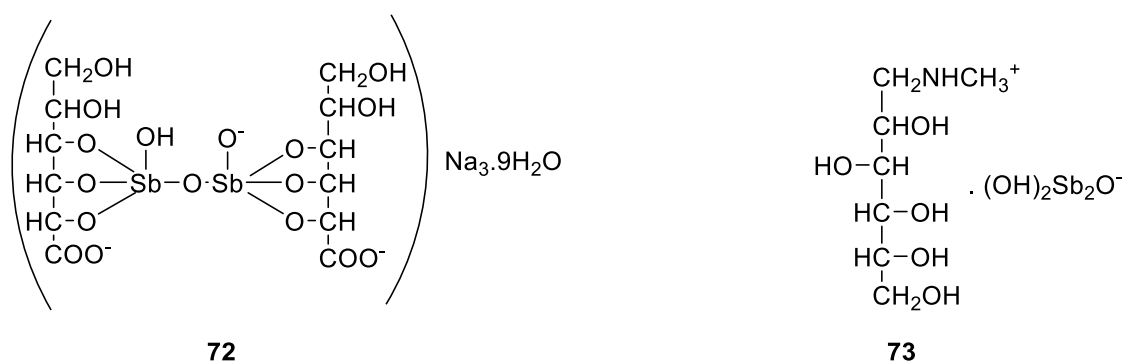
Fonte: Adaptado de STEBUT e colaboradores, 2015.

Quando vetores infectados se alimentam, eles injetam os promastigotas no hospedeiro (etapa 1) que posteriormente serão fagocitados pelas células do hospedeiro (etapa 2) sendo transformados em amastigotas (etapa 3), que se multiplicarão em vários órgãos do hospedeiro (etapa 4).

Quando o hospedeiro se encontra infectado e novos vetores se alimentam (etapa 5), eles ingerem as células com amastigotas (etapa 6), que se transformarão em promastigotas no intestino dos vetores (etapa 7), migrando para o estômago para que se multipliquem e após essa multiplicação se deslocarão para a probóscide (bico de sucção do vetor) (etapa 8), tornando os vetores aptos para se propagarem a doença em vários hospedeiros (FIGURA 1.12).

O tratamento dessa enfermidade em vários países dá-se pela quimioterapia utilizando medicamentos conhecidos como antimoniais pentavalentes (FIGURA 1.13) (*N*-metilglucamina, conhecido como glucantime[®] (72) e estiboglucanato de sódio, conhecido como pentostam[®] (73) (BASTOS et al., 2016; RATH et al., 2003). Contudo, devido a alta toxicidade o medicamento pentostam[®] não é utilizado no Brasil como medicamento para as diferentes formas de *Leishmania* ssp (VELTRI, 2019).

FIGURA 1.13 – Medicamentos utilizados no tratamento contra a leishmaniose.



Medicamentos: glucantime[®] (72), pentostam[®] (73).

Os antimoniais pentavalentes são utilizados como medicamentos de primeira escolha no tratamento da Leishmaniose (MCGWIRE & SATOSKAR, 2013; TEMPONE et al., 2011; WERBOVETZ et al., 1992). Há relatos na literatura que indicam que esses antimoniais pentavalentes atuam nas formas amastigotas eliminando assim esses protozoários. Contudo, esses fármacos apresentam uma alta toxicidade podendo desencadear insuficiência cardíaca, hepática e nefrótica (MACHADO et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2011).

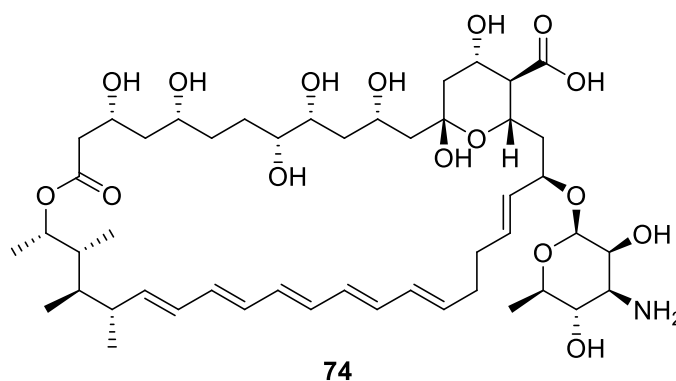
Medicamentos de segunda escolha, como a anfotericina B (fungizone[®]) (**74**) (FIGURA 1.14) que é um antifúngico, têm sido recomendados quando não há resposta aos fármacos antimoniais ou na impossibilidade de seu uso. O mecanismo de ação da anfotericina B está associada a ligação dos esteróis preferencialmente com o ergosterol (LOISEAU & BORIES, 2006; MCGWIRE & SATOSKAR, 2013). Apesar da sua eficiência esse medicamento apresenta grandes limitações devido a sua toxicidade. Variações lipídicas como a anfotericina B lipossomal (ambisome[®]) é considerada efetiva e possui uma toxicidade menor (MCGWIRE & SATOSKAR, 2013; TEMPONE et al., 2011).

A pentamidina (**75**) (antibiótico) (FIGURA 1.14) seria a terceira escolha no tratamento da leishmaniose (ALMEIDA & SANTOS, 2011). O mecanismo de ação deste fármaco está associado na biossíntese de macromoléculas como DNA, RNA, fosfolipídeos e proteínas (MCGWIRE & SATOSKAR, 2013). Esse medicamento apresenta uma toxicidade elevada podendo desencadear problemas relacionados a hipoglicemia e nefrotoxicidade (NACHER et al., 2001).

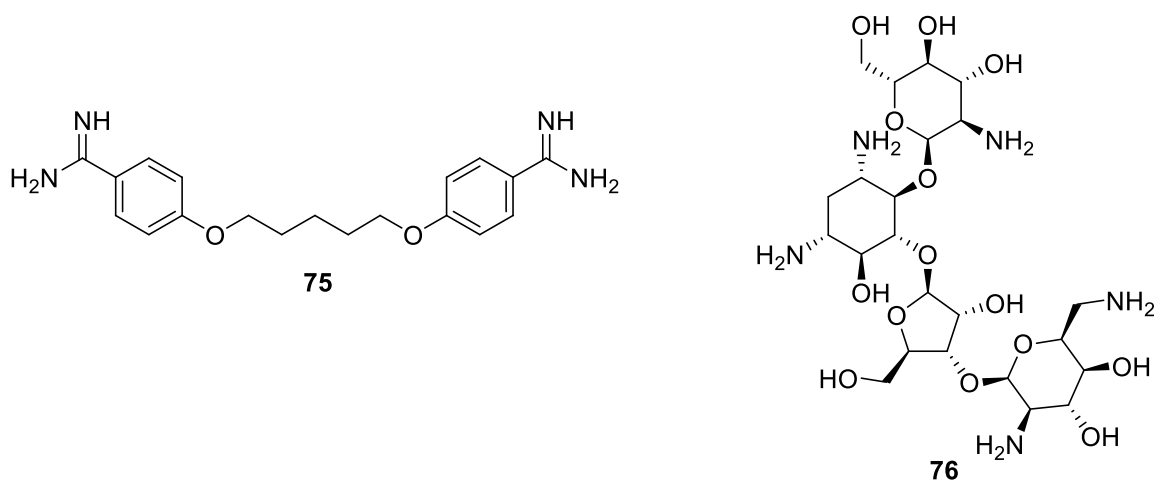
Diferentemente dos antimoniais pentavalentes utilizados no tratamento da leishmaniose, a paromomicina (**76**) (FIGURA 1.14) é um antibiótico extraído de culturas do *Streptomyces rimosus var. paromomicinus*, o qual é equivalente a aminosidina produzida pelas bactérias *Streptomyces chrestomyceticus* (FERNÁNDEZ et al., 2011). O mecanismo de ação deste fármaco funciona bloqueando a síntese de proteínas (MCGWIRE & SATOSKAR, 2013).

Outros medicamentos como a miltefosina e o fluconazol foram aprovados para o tratamento da leishmaniose (FORTIN et al., 2014). Como descrito anteriormente os medicamentos utilizados no tratamento da leishmaniose apresentam diversos efeitos colaterais nos indivíduos infectados prejudicando a cura da doença.

FIGURA 1.14- Estruturas químicas dos medicamentos alternativos para o tratamento da leishmaniose.



Continuação FIGURA 1.14.



Medicamentos: anfotericina B (74), pentamidina (75), paromomicina (76).

A OMS tem incentivado a investigação farmacológica de plantas medicinais para o tratamento de doenças como a leishmaniose (OLIVEIRA et al., 2011). Vários estudos apontam que as plantas medicinais possuem um grande potencial biológico, trazendo uma variedade de substâncias que podem oferecer novos inibidores a fim de combater esse tipo de enfermidade.

1.6.1 Arginase de *Leishmania amazonensis*

A investigações de novos inibidores para as diversas formas de leishmanioses dá-se através da enzima arginase (ARG). ARG é uma metaloenzima, a qual é reponsável por catalisar a hidrólise da L-arginina em L-ornitina e ureia (da SILVA et al., 2018; MORETTO et al., 2019). Ela está presente em vários órgãos de mamíferos principalmente do fígado, mas pode ser encontrada em animais uricotélicos (aves e répteis), plantas, bactérias e protozoários. A arginase em mamíferos tem sido caracterizada como a enzima final pertencente ao ciclo da ureia, uma via metabólica importante para a remoção de amônia no organismo (THERNIER et al., 2015). A L-arginina é um aminoácido precursor das proteínas, síntese de óxido nítrico (NO), ureia, citrulina, creatinina, agmatina, ornitina, glutamato e prolina (WU & MORRIS, 1997). A atividade enzimática da ARG vem sendo alvo de estudos, pois implica na regulação de NO, prevendo a disponibilidade de arginina que está associada aos processos citotóxicos

nos mecanismos imunológicos de proteção contra doenças infecciosas, como é o caso da leishmaniose (da SILVA et al., 2002; NATHAN, 1995).

No gênero *Leishmania*, a ornitina, precursora da espermidina e tripanotona, protege o parasito do estresse oxidativo produzidos pelo sistema de defesa do hospedeiro (BOCEDI et al., 2010; FAIRLAMB & CERAMI, 1992; GIRARD-THERNIER et al., 2015). A ausência da L-arginina em *Leishmania* torna este parasito totalmente dependente do hospedeiro para a síntese de proteínas e poliaminas essenciais para a sua sobrevivência (BALAÑA-FOUCE et al., 2012; MCCONVILLE, 2016).

Estudos elucidaram a sequência completa da enzima arginase de *Leishmania amazonensis* e encontraram diferenças estruturais da enzima do parasito e do hospedeiro (da SILVA et al., 2002; da SILVA et al., 2018). A sequência de aminoácidos deduzidos por Da Silva e colaboradores (2002) revelaram um alto nível de resíduos conservados no sítio ativo da enzima, apresentando uma similaridade de 58% da ARG de *Leishmania amazonensis* com a ARG humana tipo I (hepática) e 54% de similaridade com a ARG humana tipo II (extra-hepática).

A busca por novos inibidores da enzima ARG, derivados de PNs, cresce a cada dia. Esses inibidores enzimáticos são compostos que suprimem ou auxiliam a diminuir a infecção parasitária em uma catálise. Os inibidores reversíveis subdividem principalmente em inibidores competitivos, incompetitivos e não-competitivos (NELSON & COX, 2014).

Sua inibição pode ser identificada através do IC₅₀, que é a concentração onde inibe 50% da atividade catalítica da enzima (MAQUIAVELI et al., 2016). Existem vários trabalhos que descrevem compostos oriundos de plantas e fungos com atividade inibitória enzimática da ARG de *L. amazonensis*.

Metabólitos secundários da classe dos flavonoides quercitrina (**77**), quercetina (**78**), luteolina (**79**) já foram relatados com alto potencial de inibição da ARG (FIGURA 1.15) (da SILVA et al., 2012; de SOUSA et al., 2014b, MITTRA et al., 2000; MUZITANO et al., 2006).

Cruz e colaboradores (2013) isolaram alguns flavonoides da espécie *Cecropia pachystachya* e verificaram que o composto orientina (**80**) (FIGURA 1.15) possui inibição satisfatória com valor de IC₅₀ de 16 µM indicando ser um inibidor da ARG.

O estudo de Manjolin e colaboradores (2013) descreve que os flavonoides (FIGURA 1.15), galangina (**81**) e quercetina (**78**) exibiram inibição da enzima ARG entre 50-70% e os compostos fisetina (**82**), luteolina (**79**) e 7,8-dihydroxiflavona (**83**) apresentaram inibição entre 80-87%.

Os polifenóis possuem propriedades químicas e biológicas que contribuem para o desenvolvimento e a saúde do homem. Levando em conta essa informação, o composto conhecido como EGCG (epigallocatequina-3-galato) (**84**) (FIGURA 1.15) apresentou atividade inibitória (IC_{50} de 3,8 μ M) frente a ARG. Este estudo relatou também que os compostos (+)-catequina (**85**) e (-)-epigallocatequina (**86**) (FIGURA 1.15) exibiram potências inibitórias de IC_{50} 0,8 μ M e 1,8 μ M respectivamente, apresentando significativa atividade enzimática (dos REIS et al., 2013). Estudos de correlação entre a estrutura destes flavonoides e a atividade inibitória enzimática em arginase foram realizados posteriormente confirmando a importância do grupo catecol (anel B) para a interação com a ARG e inibição da sua atividade catalítica (de SOUSA et al., 2014b).

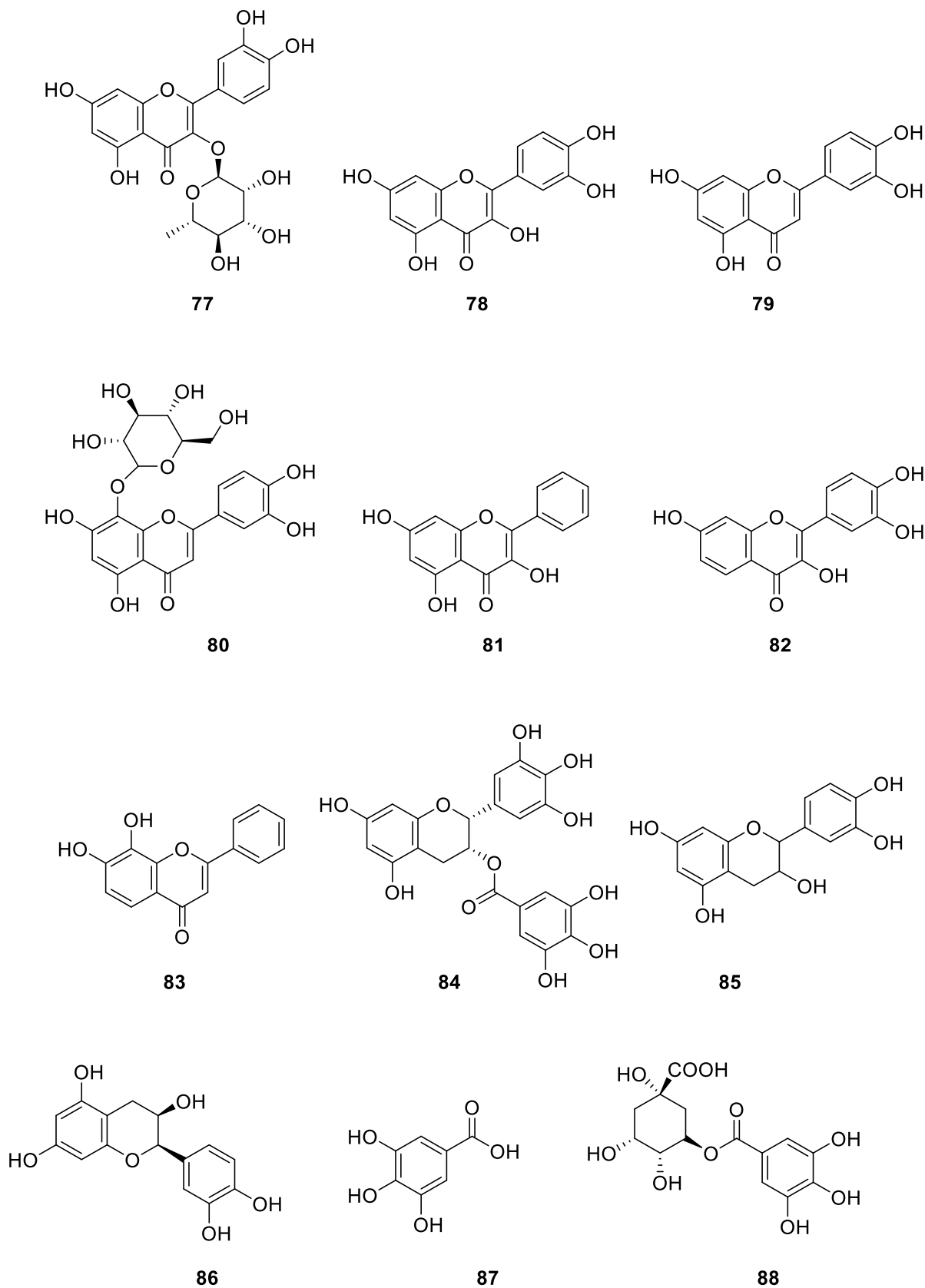
De Sousa e colaboradores (2014a) isolaram seis compostos derivados de ácidos galoilquínicos da espécie *Byrsonima coccolobifolia*. A pesquisa destaca o ácido gálico (**87**) (FIGURA 1.15) como composto inibidor (IC_{50} 0,13 μ M) frente a ARG. Em continuação, os compostos ácido 5-*O*-galoilquínico (**88**), ácido 3,4,5-tri-*O*-galoilquínico (**89**), ácido 5-*O*-(3-metilgaloil) quínico (**90**) e ácido 3,5-di-*O*-galoilquínico (**91**) (FIGURA 1.15) apresentaram potências inibitórias com valores de IC_{50} entre 0,31 e 0,49 μ M que apresentam características importantes onde permitem a interação enzima-inibidor devido o grupo galoil (de SOUSA et al., 2014a).

Foi relatado por Maquiaveli e colaboradores (2016) que o composto verbascosídeo (**92**) (glicosídeo feniletanóide) (FIGURA 1.15) possui atividade contra a *L. amazonensis* apresentando potência inibitória significativa (IC_{50} de 19 μ M) que atuou como inibidor competitivo frente a ARG.

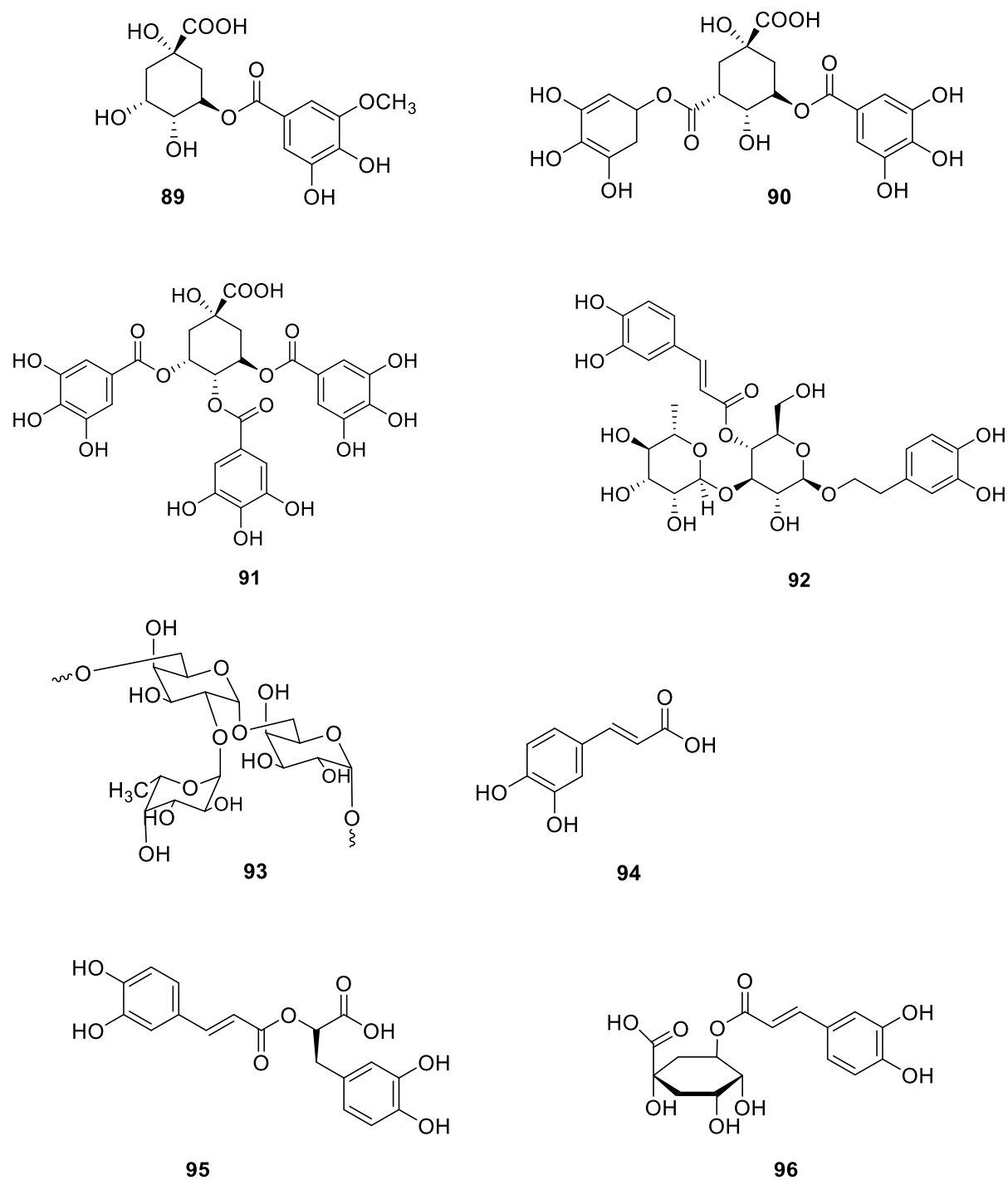
Isolado a partir da espécie *Agrocybe aegerita*, o polissacarídeo fucogalactana (**93**) (FIGURA 1.15) apresentou potência inibitória significativa com valor de IC_{50} de 5,8 μ M. Foi relatado pela primeira vez a atividade inibitória competitiva frente a enzima ARG desse biopolímero o que incentiva a busca de novos inibidores derivados de polissacarídeos (MOTOSHIMA et al., 2018).

Compostos derivados de ácido cinâmico apresentaram potências inibitórias significativas frente a enzima ARG. Da Silva e colaboradores (2019) relataram que os compostos rosmarínico (**94**), clorogênico (**95**), ácido criptoclorogênico (**96**), isoverbascosídeo e verbascosídeo (FIGURA 1.15) exibiram atividade inibitória enzimática (IC_{50} entre 1,5 e 11) competitiva e não-competitiva frente a ARG.

FIGURA 1.15- Exemplos de compostos que apresentaram atividade inibitória enzimática frente a ARG.



Continuação FIGURA 1.15.



Compostos: quercitrina (77), quercetina (78), luteolina (79), orientina (80), galangina (81), fisetina (82), 7,8-dihydroxiflavona (83), epigalocatequina-3-galato (84), (+)-catequina (85), (-)-epigalocatequina (86), ácido gálico (87), ácido 5-*O*-galoilquínico (88), ácido 3,4,5-tri-*O*-galoilquínico (89), ácido 5-*O*-(3-metilgaloil)quínico (90), ácido 3,5-di-*O*-galoilquínico (91), verbascosídeo (92), fucogalactana (93), rosmarínico (94), clorogênico (95), ácido criptoclorogênico (96).

O estudo da ARG e seu mecanismo torna-se relevante, pois uma vez que os inibidores da ARG diminuem a capacidade de infecção da leishmania pode ser alvo de novos medicamentos para o tratamento dessa enfermidade.

1.6.2 *Leishmania infantum*

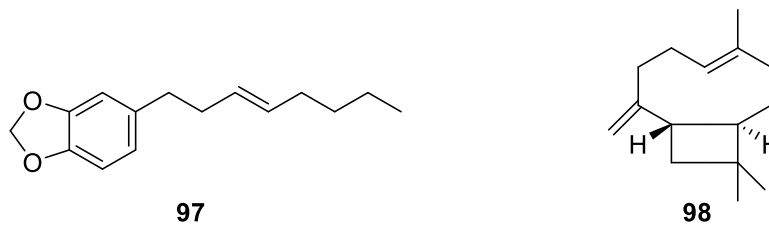
A leishmaniose visceral (LV) conhecida como calazar, também é uma das doenças tropicais negligenciadas causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. Ela manifesta-se nos países como: Brasil, África Oriental e Índia com estimativa de 50.000 a 90.000 novos casos de LV anualmente no mundo. Em 2018, mais de 95% dos novos casos reportados a OMS ocorreram em 10 países incluindo o Brasil (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2020).

Em 1908, Nicolle e Comte, identificaram na Tunísia crianças infectadas com uma espécie diferente de *Leishmania* ssp., sendo posteriormente nomeada de *L. infantum*. Durante diversas pesquisas e com os avanços moleculares, Maurício e colaboradores (1999) afirmaram que não é possível diferenciar a *L. chagasi* da *L. infantum*, pela análise de DNA dos protozoários o que levou a *L. infantum* ser nomeada de *L. infantum chagasi* (STEVERDING, 2017).

No Brasil, a *Leishmania infantum chagasi* é o principal agente etiológico da LV que é transmitida pelo flebotomíneo da espécie *Lutzomyia longipalpis* e está associada no acometimento de crianças, indivíduos imunocomprometidos e em cães (COSTA et al., 2015). Como descrito anteriormente, o tratamento para as diversas formas de leishmaniose depende, na maioria das vezes, dos antimoniais pentavalentes (Pentostan® e Glucantime®) (SINGH et al., 2016).

A grande dificuldade em desenvolver novos medicamentos ou até mesmo uma vacina humana eficiente contra esse parasito está relacionada a complexidade da resposta imune do hospedeiro e as espécies de *Leishmania* (ALMEIDA et al., 2018). Diante do exposto, Varela (2017) isolaram da espécie *Piper malacophyllum* um composto (**97**) que apresentou atividade inibitória enzimática (IC₅₀ de 32 a 83 µM) satisfatória contra o parasito de *L. infantum* (FIGURA 1.16). Essid et al. (2015) avaliaram alguns terpenos presentes na espécie *Ferula communis* e o composto da classe dos sesquiterpenos (**98**) apresentou taxa inibitória promissora (IC₅₀ 1,06 µM) frente ao parasito de *L. infantum* (FIGURA 1.16).

FIGURA 1.16- Exemplos de compostos que apresentaram atividade inibitória enzimática frente ao parasito de *L. infantum*.



2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O trabalho visa contribuir com o estudo químico de *P. pubescens* e com a avaliação dos extratos e frações frente a enzima arginase e o parasito de *Leishmania* spp.

2.2. Objetivos Específicos

- Preparar o extrato etanólico das flores coletadas no Cerrado;
- Fazer a partição líquido-líquido para obtenção das frações de diferentes polaridades;
- Realizar o estudo químico das frações obtidas para isolamento e caracterização dos compostos utilizando as técnicas CLUE-ESI-QqTOF-EM/EM e CG-EM;
- Avaliar o extrato e as frações frente à arginase de *Leishmania amazonensis* e frente ao parasito *Leishmania infantum*.

3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 Materiais

3.1.1. Solventes

- Solventes grau P.A.: acetato de etila, hexano, etanol e metanol (Dinâmica, Synth e Vetec).
- Solventes grau CLAE: acetonitrila e ácido fórmico (Panreac, Tedia J.T. Baker e Sigma-Aldrich).
- Solventes deuterados para a obtenção do espectro de RMN: acetona- d_6 e DMSO- d_6 (dimetilsulfóxido) (Sigma-Aldrich e Merck).

3.1.2. Fases estacionárias

- Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência: coluna Cortecstm C18 (2,7 μm ; 10 x 0,21 cm).
- Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM): coluna capilar HP-5MS (30 m x 250 μm e filme 0,25 μm).
- Cromatografia em coluna aberta (CC): sílica gel comum (70-230 *mesh*, sílica comum) e sílica gel (230-400 *mesh*, sílica flash) marca Machery-Nagel.
- Cromatografia em camada delgada (CCD): placas de alumina sílica gel 60 (20 x 20 cm) com F254, ($\varphi = 0,2$ mm) da marca Fluka.

3.1.3. Reveladores

- Solução de vanilina em ácido sulfúrico preparada a partir de: 15 g de vanilina dissolvidas em solução contendo 250 mL de etanol e 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado.
- Câmara de luz ultravioleta com irradiação de luz no comprimento de onda de 254 nm e 365 nm.

3.1.4. Equipamentos

- Balança analítica: OHAUS AR2140.

- Evaporador Rotativo: Marca Fisatom, modelo 801, com banho de aquecimento Fisatom, modelo 550 e bomba a vácuo da marca VACUUBRAND + GO KG, modelo ME-1C.
- Liofilizador: Labconco, modelo FreeZone 4.5.
- Cromatógrafo Líquido de Ultra Eficiência (CLUE): sistema analítico da marca Agilent, modelo *Infinity* II 1260, bomba binária, equipado com detector QqTOF Impact HD (Bruker Daltonics GmbH) e fonte de ionização ESI (Bruker Daltonics, Bremen, Germany), injetor manual e *software* DataAnalysis. Os experimentos foram realizados em colaboração com a Profa. Dra. Quezia Bezerra Cass da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, São Carlos - SP.
- Cromatógrafo Gasoso acoplado ao Espectrômetro de Massas (CG-EM): marca Agilent, modelo 7820 A – Séries MSD 5975, equipado com coluna HP-5MS (e ionização por impacto eletrônico (70 eV).
- Espectrofotômetro Ocean Optics MINI-2-GS, usado para medições do ensaio a 600 nm.
- Sistema Milli-Q Direct.
- Ressonância Magnética Nuclear (RMN): marca Bruker, modelo Avance III HD (9,2 TESLA) operando na frequência de 400 MHz para o núcleo de ^1H . Os experimentos foram realizados no Laboratório multiusuário do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia – MG.

3.1.5. Reagentes usados nos ensaios biológicos

Reagentes usados para o ensaio enzimático em arginase:

- A enzima arginase recombinante em *Escherichia coli* foi cedida pela Profa. Dr.^a Dulce Helena F. de Souza da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos, SP;
- Kit de ureia enzimática da Bioclin (Solução 1: Tampão fosfato 100 mmol/L pH 6,8; Salicilato sódico 300 mmol/L; Nitroprussiato de sódio 5 mmol/L; enzima urease (10.000 IU)); solução 2 (hipoclorito sódico 10 mmol/L; hidróxido de sódio 1,5 mol/L);
- Tampão Tris-HCl (Sigma) para ressuspensão da enzima ARG (20 mM, pH 7,05 com 0,3% de Triton X-100 e 10% de glicerol);
- Solução Tampão de CHES (Sigma-Aldrich), 50 mM, pH=9,6.
- Substrato da ARG, solução de L-arginina (Sigma-Aldrich), 0,25 M, pH=9,6.
- Os ensaios *in vitro* em *Leishmania infantum* foram realizados em parceria com a Profa. Dra. Izabela M. Dourado Bastos da Universidade de Brasília (UNB), Brasília, DF;

- Meio Schneider – solução nutritiva (mistura de sais enriquecida com aminoácidos e vitaminas);
- Soro Fetal Bovino (SFB) – 10%;
- Gentamicina (100 µL);
- Anfotericina B (312,5 à 19,56 ng/mL);
- DMSO – dimetilsulfóxido;
- Solução de resazurina (20 µL).

3.2 METODOLOGIA

3.2.1. Coleta e identificação do material botânico

As flores de *P. pubescens* foram coletadas no Cerrado de Catalão-GO em agosto de 2016 e identificadas com a colaboração do Prof. Dr. Hélder Nagai Consolaro (Unidade Acadêmica Especial de Biotecnologia – UFCAT, sendo sua exsicata armazenada no herbário da UnB (Universidade de Brasília) pela identificação UB 217074.

3.2.2. Processos de extração e partição líquido-líquido

O extrato etanólico das flores de *P. pubescens* (EPpE) foi preparado utilizando 397 g de flores frescas e 500 mL de álcool etílico, realizando extrações a cada três dias, a temperatura ambiente, sendo repetido o procedimento por quatro vezes. Após a extração o material foi filtrado e concentrado em evaporador rotativo a 40 °C.

Em seguida, 41,6 g de EPpE foi solubilizado em 200 mL de etanol/água (1:3) e submetido a extração líquido-líquido, utilizando 200 mL de solventes de diferentes polaridades (hexano e acetato de etila) em triplicata. Os solventes foram evaporados utilizando o rotaevaporador (40 °C), obtendo-se as frações hexano (EPpEH), acetato de etila (EPpEA) e hidroalcóolica (EPpEHi).

3.2.3. Análises por RMN de ¹H

As frações EpPEA, EPpEH e EppEHi (em DMSO-*d*₆) e o composto isolado (**I**) (em CD₃COCD₃-*d*₆) foram analisados por RMN de ¹H (400 MHz). Os experimentos foram realizados no Laboratório Multiusuário do Instituto de Química da UFU.

3.2.4. Fracionamento de EPpEA

A fração EPpEA foi submetida a cromatografia em coluna (CC) utilizando como fase estacionária sílica comum (70-230 *mesh*) e como sistema de eluição gradiente os solventes: hexano 100%, hexano/acetato de etila (1:1), acetato de etila 100%, acetato de etila/metanol (1:1) e metanol 100%. As condições cromatográficas estão detalhadas na TABELA 3.1. Posteriormente, as frações foram analisadas em CCD e reveladas com inspeção em câmara UV (254 e 365 nm) em solução de vanilina (FLUXOGRAMA 3.1).

FLUXOGRAMA 3.1 – Esquema do refracionamento da fração acetato de etila (EPpEA).

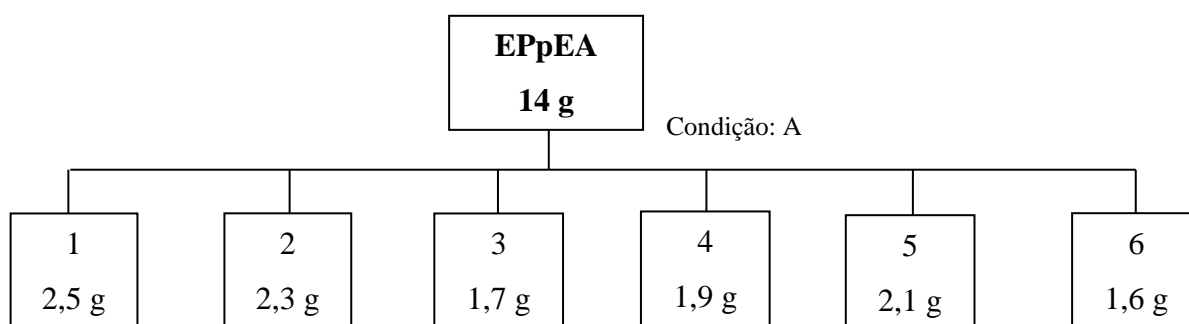


TABELA 3.1 – Condição cromatográfica utilizada no estudo da fração de EPpEA.

Condição	F. E	h (cm)	ϕ (cm)	Sistema eluente
A	Sílica gel (70-230 mesh)	12 cm	5,1 cm	Gradiente: Hex 100%; Hex/AcOEt (1:1); AcOEt 100%; AcOEt/MeOH (1:1); MeOH 100%

F. E = fase estacionária; h = altura da F. E; ϕ = diâmetro da coluna cromatográfica.

3.2.5. Refracionamento cromatográfico das subfrações EPpEA 2 e EPpEA 3

As subfrações EPpEA 2 (FLUXOGRAMA 3.2) e EPpEA 3 (FLUXOGRAMA 3.3) foram submetidas a CC utilizando como fase estacionária sílica comum e os sistemas de eluição estão descritos nas TABELAS 3.2 e 3.3. Posteriormente, as refrações foram analisadas em CCD e reveladas com inspeção em câmara UV (254 e 365 nm) em solução de vanilina.

Após o refracionamento das amostras e as análises da CCD descritas anteriormente, a subfração EPpEA 2.5 e 3.2 com as suas respectivas massas (0,05 g e 0,08 g) foram submetidas

a CC e o composto **I** foi isolado em ambas (FLUXOGRAMA 3.2 e 3.3). Os sistemas cromatográficos das subfrações 2.5 e 3.2 estão descritos nas TABELAS 3.2 e 3.3.

FLUXOGRAMA 3.2 – Esquema de fracionamento de EPpEA 2.

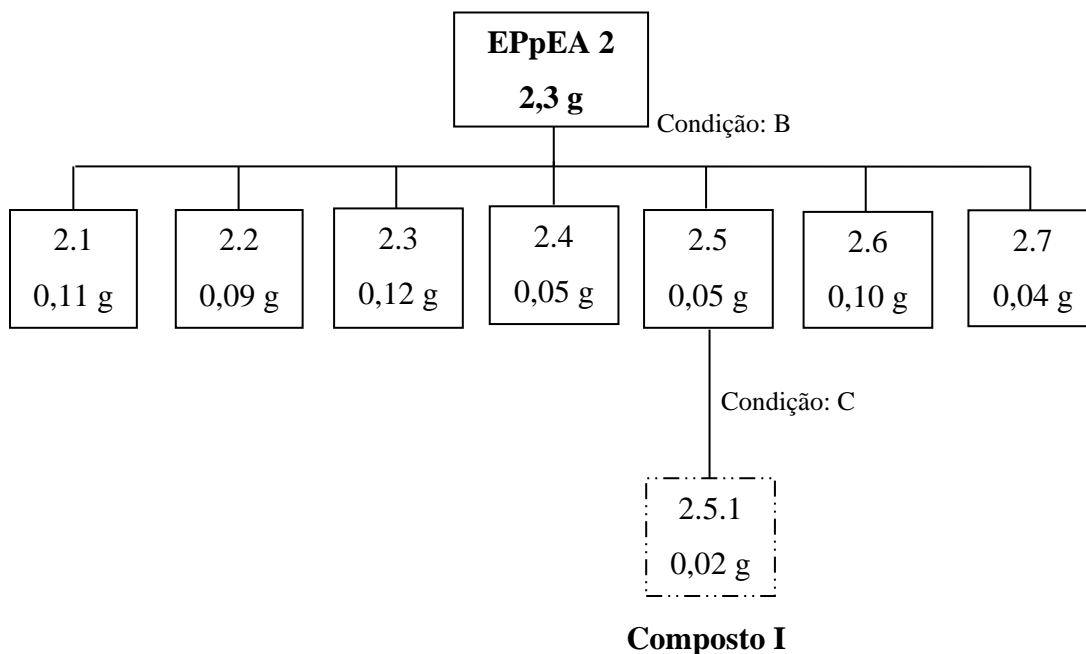


TABELA 3.2 – Condições cromatográficas utilizadas no estudo da fração de EPpEA 2.

Condição	F. E	h (cm)	φ (cm)	Sistema eluente
B	Sílica gel (70-230 mesh)	19 cm	3,5 cm	Gradiente: Hex/AcOEt (1:1); Hex/AcOEt (1:4); AcOEt 100%; AcOEt/MeOH (4:1); AcOEt/MeOH (1:1); MeOH 100%
C	Sílica flash (230-400 mesh)	25 cm	2,2 cm	Gradiente: Hex/AcOEt (3:2); Hex/AcOEt (1:1); Hex/AcOEt (2:3); Hex/AcOEt (1:4); AcOEt 100%; AcOEt/MeOH (1:1); MeOH 100%

F. E = fase estacionária; h = altura da F. E; φ = diâmetro da coluna cromatográfica.

FLUXOGRAMA 3.3 – Esquema de fracionamento de EPpEA 3.

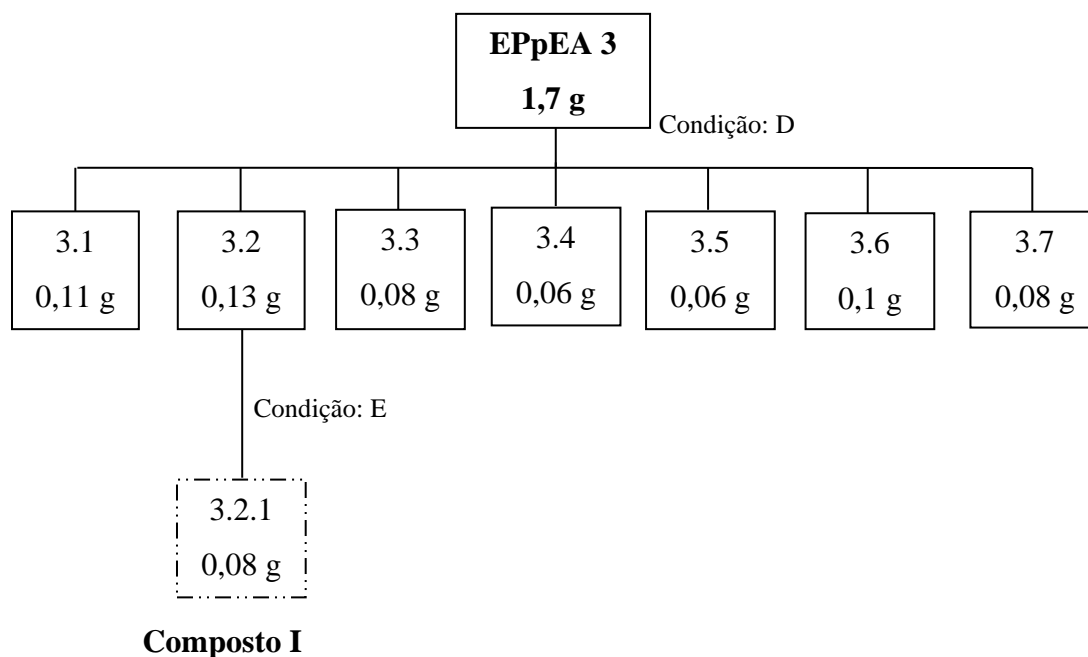


TABELA 3.3 – Condições cromatográficas utilizadas no estudo da fração EPpEA 3.

Condição	F. E	h (cm)	φ (cm)	Sistema eluente
D	Sílica gel(70-230 mesh)	20 cm	3,5 cm	Gradiente: Hex/AcOEt (1:4); AcOEt 100%; AcOEt/ MeOH (4:1); AcOEt/ MeOH (1:1); AcOEt/ MeOH (2:3); MeOH 100%
E	Sílica flash (230-400 mesh)	22 cm	2,2 cm	Gradiente: Hex/AcOEt (1:1); Hex/AcOEt (2:3); Hex/AcOEt (1:4); AcOEt 100%; AcOEt/ MeOH (1:1); MeOH 100%

F. E = fase estacionária; h = altura da F. E; φ = diâmetro da coluna cromatográfica.

Com a realização dos fracionamentos, as amostras que apresentaram maior grau de pureza de acordo com a verificação da CCD, foram analisadas e caracterizadas por RMN de ^1H . Desta partição (EPpEA), foram fracionadas as amostras 2.4; 2.6; 3.4; 3.5e 3.6; contudo, ao analisar a CCD e os espectros de RMN de ^1H não foi possível caracterizar os compostos, pois tratava-se de mistura.

3.2.6. Análises por CLUE-ESI-QqTOF-EM/EM

As análises do extrato etanólico e das frações EPpEA e EPpEHi de *P. pubescens* por CLUE-ESI-QqTOF-EM/EM foram realizadas em colaboração com a Profa. Dra. Quezia Bezerra Cass da Universidade Federal de São Carlos.

Para o experimento, utilizou-se um sistema CLUE (agilent 120 Infinity Kioto, Japão) que possui duas bombas LC-20AD, com válvula solenoide de quatro linhas, autoinjeter SIL-20^a com alça de amostragem de 500 µL, degaseificador DGU-20^a5, forno CTO-20A e controladora CBM 20A. As análises foram efetuadas utilizando uma coluna Cortecstm C18 de núcleo fundido (2,7 µm; 10 x 0,21 cm) com detector de UV (254 e 365 nm). As fases móveis utilizadas foram: misturas de solventes A - água/ácido fórmico (99,9:0,1 v/v) e B - acetonitrila/ácido fórmico (99,9:0,1 v/v). O perfil do gradiente exploratório foi variando de 5 - 100% do solvente B por 25 min. A coluna foi submetida a limpeza com 100% de B por 2 min e recondicionada nas condições iniciais por 3 min. A vazão utilizada foi de 0,40 mL/min, com uma temperatura de forno da coluna de 40° C (NETO et al., 2020).

Foi injetado 1µL do extrato etanólico bruto (EPpE) e das frações EPpEA e EPpEHi a 1 mg/mL, solubilizados em água/metanol (80:20 v/v). O sistema analítico está acoplado ao espectrômetro de massa QqTOF Impact HD (Bruker Daltonic GmbH, Alemanha) equipado com fonte de ionização ESI. Foram realizados experimentos de íons totais e íons produtos (auto-MS/MS) nos dois modos de ionização positivo e negativo em uma faixa de massas de 80 a 1000 Da. Após a verificação dos espectros de massas obtidos neste experimento foi escolhido o modo de ionização positivo para a análise dos resultados. As condições da fonte de ionização foram: nebulizador 3,0 bar, vazão do gás de secagem 8,0 L.min⁻¹, temperatura de secagem de 180° C, tensão do End Plate e capilar de 500 V e 4500 V. O processamento dos dados foi realizado com o software *Data Analysis* (Bruker Daltonics GmbH, Alemanha) e as pesquisas nas bases de dados foram realizadas utilizando o *software CompoundCrawler*.

3.2.7. Análise por CG-EM

A fração EPpEH foi analisada por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas utilizando coluna capilar HP-5MS (30 m x 250 µm e filme 0,25 µm) com os seguintes parâmetros: 50 °C por 2 min, elevando-se a temperatura a 70°C a uma taxa de 4°C/min, sendo finalmente elevada a 300°C a uma taxa de 40°C/min e mantida até o final da corrida com um

tempo total de 36 min. O gás de arraste utilizado para essa análise foi o hélio a uma vazão de 1 mL/min em modo *splitless*. O volume da injeção foi de 1 μ L. A programação de temperatura foi: 250 °C para o injetor, 280 °C para a interface e o detector foi mantido a 250 °C na linha de transferência, com ionização por impacto de elétrons (IE) a 70 eV, trabalhando com uma faixa de massas de 50 - 500 *m/z*.

A identificação dos compostos presentes na fração EPpEH foi realizada através do cálculo do índice de *Kovats* (*IK*) e, posteriormente, foi comparado aos seus respectivos espectros de massas da literatura, dos padrões comerciais e com os dados disponíveis na biblioteca do equipamento (NIST/EPA/NIH). O *IK* foi calculado por meio da relação dos tempos de retenção (LRI) de uma mistura de *n*-alcanos (C₈-C₃₀) com os tempos de retenção obtidos nos cromatogramas, utilizando o software *RetenSoft* (ADAMS, 2007).

3.2.8. Ensaio enzimático frente à arginase

O ensaio enzimático é baseado no método acoplado envolvendo duas enzimas, a arginase e a urease. A arginase catalisa a hidrólise de L-arginina em L-ornitina e ureia. A urease catalisa a hidrólise da ureia e as reações subsequentes levam a formação do sal azul de indofenol. A concentração deste produto reacional é medida a 600 nm em espectrofotômetro, sendo assim determinada a atividade enzimática da arginase (de SOUSA et al., 2014a; MOTOSHIMA et al., 2018).

Inicialmente, foi feita uma curva padrão de ureia para a conversão das medidas das amostras em absorbância em concentração de produto. Foram utilizados 20 μ L de substrato (ureia padrão: 0,75 à 9,16 mM), que foram adicionados a solução contendo urease e 1000 μ L da Solução I [tampão fosfato a 50 mM (pH 6,8); EDTA a 2mM; Salicilato sódico a 60 mM; Nitroprussiato de sódio 3,2 mM; azida sódica 0,01% (p/v); Azida sódica 0,095% (p/v) e a enzima urease]. As soluções foram homogeneizadas e incubadas à 37 °C por 10 minutos. Então, 1000 μ L da Solução II foram acrescentados (solução de hipoclorito de sódio a 140 mM; hidróxido de sódio a 150 mM) incubando nas mesmas condições. Após a incubação foi feita a leitura das absorbâncias em espectrofotômetro à 600 nm.

O extrato e as frações foram diluídos em DMSO 2% para avaliação frente a arginase na concentração de 25 μ g/mL. Um volume de 5 μ L das soluções do extrato e das frações foram adicionados à solução enzimática (CHES 50 mM (pH=9,6) e arginase 0,5 μ M), homogeneizadas

e incubadas à 37 °C por 10 min. Em seguida, acrescentou-se 10 µL de substrato (L-arginina, 50 mM), incubando à 37 °C por 10 min, levando a formação da primeira etapa reacional.

A segunda etapa reacional acontece inserindo a enzima urease (kit Ureia – Bioclin, Brasil) em que a catálise da enzima permite a determinação da atividade da ARG por meio da medição da absorbância da formação do azul de indofenol. Foram pipetados 20 µL da primeira etapa reacional que consiste na reação enzimática em ARG e, posteriormente foram adicionados 1000 µL da Solução I, sendo incubado à 37 °C por 10 min.

Em seguida, foram adicionados a reação 1000 µL da Solução II, incubado à 37 °C por 10 min (FIGURA 3.1). A leitura foi realizada pelo espectrofotômetro a 600 nm. Um controle negativo (DMSO 2%) e um controle positivo (quercetina 100 µM) foram preparados nas mesmas condições descritas anteriormente. O percentual de inibição foi determinado usando a equação abaixo. O ensaio desacoplado envolvendo apenas a enzima urease foi realizado para confirmar a inibição em arginase usando 5 µL das soluções do extrato e das frações. A metodologia utilizada para essa confirmação é a mesma descrita anteriormente para a curva de ureia enzimática.

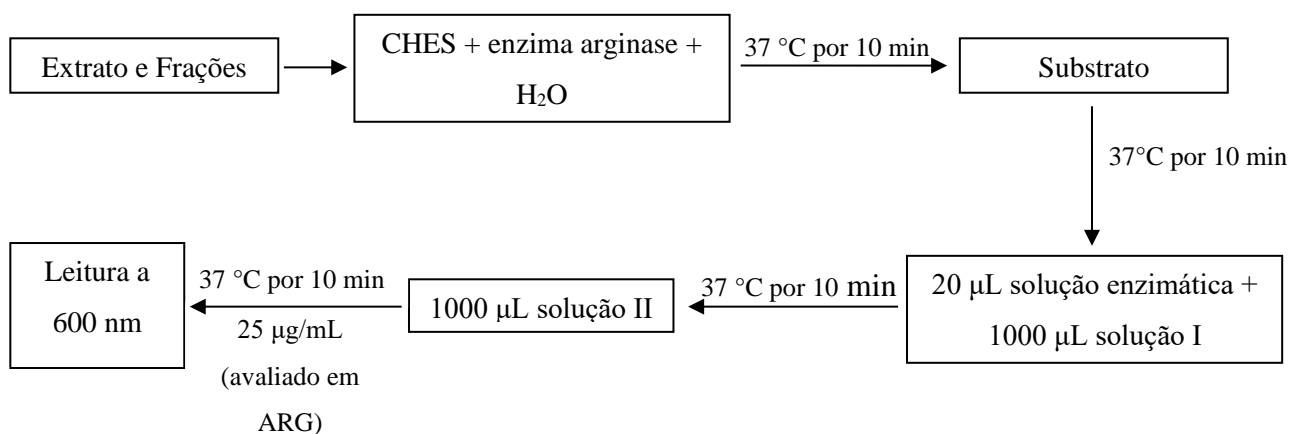
$$\% \text{Inibição} = 100 \times (1 - V_i/V_o)$$

Vi: velocidade de reação observada na presença de inibidor;

Vo: velocidade de reação observada na ausência do inibidor (velocidade de controle).

Sendo a velocidade a razão entre a concentração e o tempo reacional ([azul de indofenol]/tempo).

FLUXOGRAMA 3.4- Esquema das etapas do ensaio enzimático frente a enzima arginase



3.2.9. Ensaio *in vitro* em *Leishmania infantum*

As formas promastigotas de *L. infantum* foram cultivadas a 28 °C em meio Schneider (mistura de sais minerais, aminoácidos e vitaminas essenciais para o desenvolvimento do parasito) suplementado com Soro Fetal Bovino inativado (SFB – 10%) e 100 µg/mL de gentamicina. A cepa do parasito foi obtida na Fiocruz-COLPROT (Coleção de Protozoários da Fiocruz). Para a verificação do potencial biológico do extrato etanólico (EPpE) e das frações EPpEA e EPpEH, os promastigotas foram coletados na fase intermediária de crescimento (cultura de 3 dias).

O extrato e as frações (5 mg) foram solubilizados em DMSO utilizando banho ultrassônico, resultando em uma concentração final de 100 µg/mL. Estas soluções foram transferidas para a placa de cultura celular de 96 poços e a concentração final da triagem foi de 1%. Posteriormente, 150 µL de culturas (2×10^6 parasitas/mL) de *L. infantum* foram ressuspensas e adicionadas as placas e incubadas por 48 h à 28 °C.

Após o período de incubação, foram adicionados 20 µL da solução de resazurina com concentração final de 2 mM em todos os poços que, posteriormente, foram incubadas por mais 4 h à 37 °C. Após esse período, foi realizada a medição da fluorescência (570 nm_{ex}/595 nm_{em}) no leitor Molecular Devices SpectraMax M5 Plate Reader.

Este experimento foi realizado em triplicata e repetido por 2 vezes. O controle negativo e positivo utilizado para esse experimento foi o DMSO (1%) e a anfotericina B (312,5 a 19,56 ng/mL), respectivamente (ANDRADE et al., 2016).

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Rendimento das partições líquido-líquido do extrato etanólico

O extrato etanólico bruto foi preparado a partir de 397 g de flores frescas da espécie *P. pubescens*, que após a maceração e concentração do mesmo foram obtidos 41,6 g (rendimento de 10,5%).

Posteriormente, o extrato etanólico bruto foi solubilizado em uma mistura hidroalcoólica (etanol/água 1:3) e foi submetido a partição líquido-líquido utilizando os solventes hexano e acetato de etila. As massas e os rendimentos das frações obtidas por este processo estão descritos na TABELA 4.1.

TABELA 4.1 – Massas e rendimentos das frações obtidas a partir do extrato etanólico bruto das flores de *P. pubescens*.

Frações	Massa (g)	Rendimento (%)
EPpEH	15,4	37,0
EPpEA	16,4	39,4
EPpEHi	9,8	23,5

EPpEH – Fração Hexânica; EPpEA – Fração de Acetato de Etila e EPpEHi – Fração Hidroalcoólica.

O extrato etanólico e as frações obtidas foram analisados por técnicas como CLUE-ESI-QqTOF-EM/EM, RMN de ^1H e CG-EM a fim de identificar os compostos presentes nas flores de *P. pubescens*. Além da avaliação química, uma alíquota do extrato e das frações foram submetidas aos ensaios biológicos *in vitro* frente a arginase de *L. amazonensis* e ao protozoário de *L. infantum*.

4.2 Composição Química das Frações EPpA, EPpEH e EPpEHi por RMN de ^1H

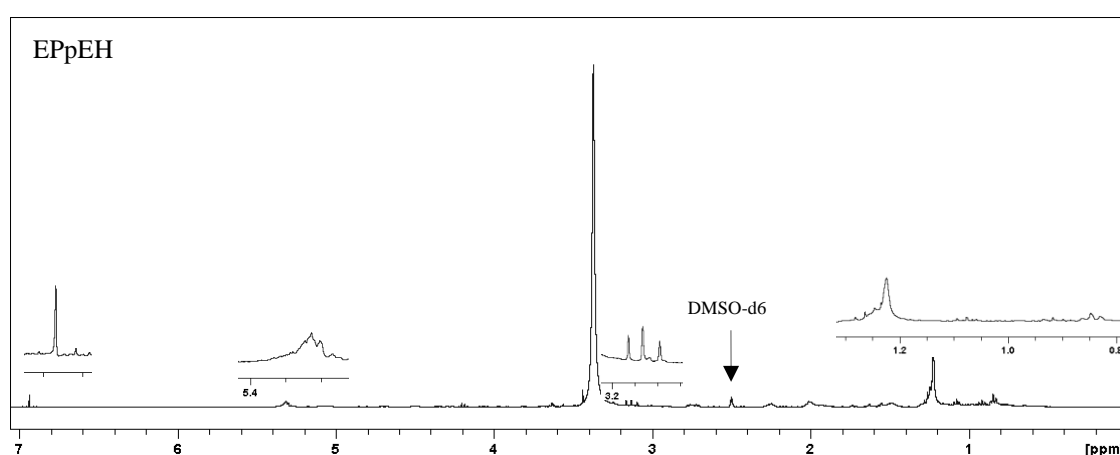
Os espectros de RMN de ^1H obtidos para as frações EPpEH, EPpEA e EPpEHi foram analisados e comparados com a literatura. As informações referentes aos compostos caracterizados para o gênero *Pterodon* foram relevantes para aferir dados da composição

química presentes nas frações (PIMENTA et al., 2006; SPINDOLA et al., 2009). Os espectros de RMN de ^1H das frações confirmam a presença de compostos fenólicos e terpenoides (FIGURA 4.1), característicos do gênero *Pterodon*. Foi observado no espectro de RMN da fração EPpEH (FIGURA 4.1) os sinais característicos de hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos (δ_{H} 0,4 - 3,1); hidrogênios aromáticos (δ_{H} 7,0) e hidrogênios olefínicos (δ_{H} 5,0 - 5,5) que indicam a presença de terpenos, compostos presentes na espécie *P. pubescens* (SPINDOLA et al., 2009). Juntamente com os experimentos de CG-EM foi possível identificar diversos terpenos presentes nesta fração.

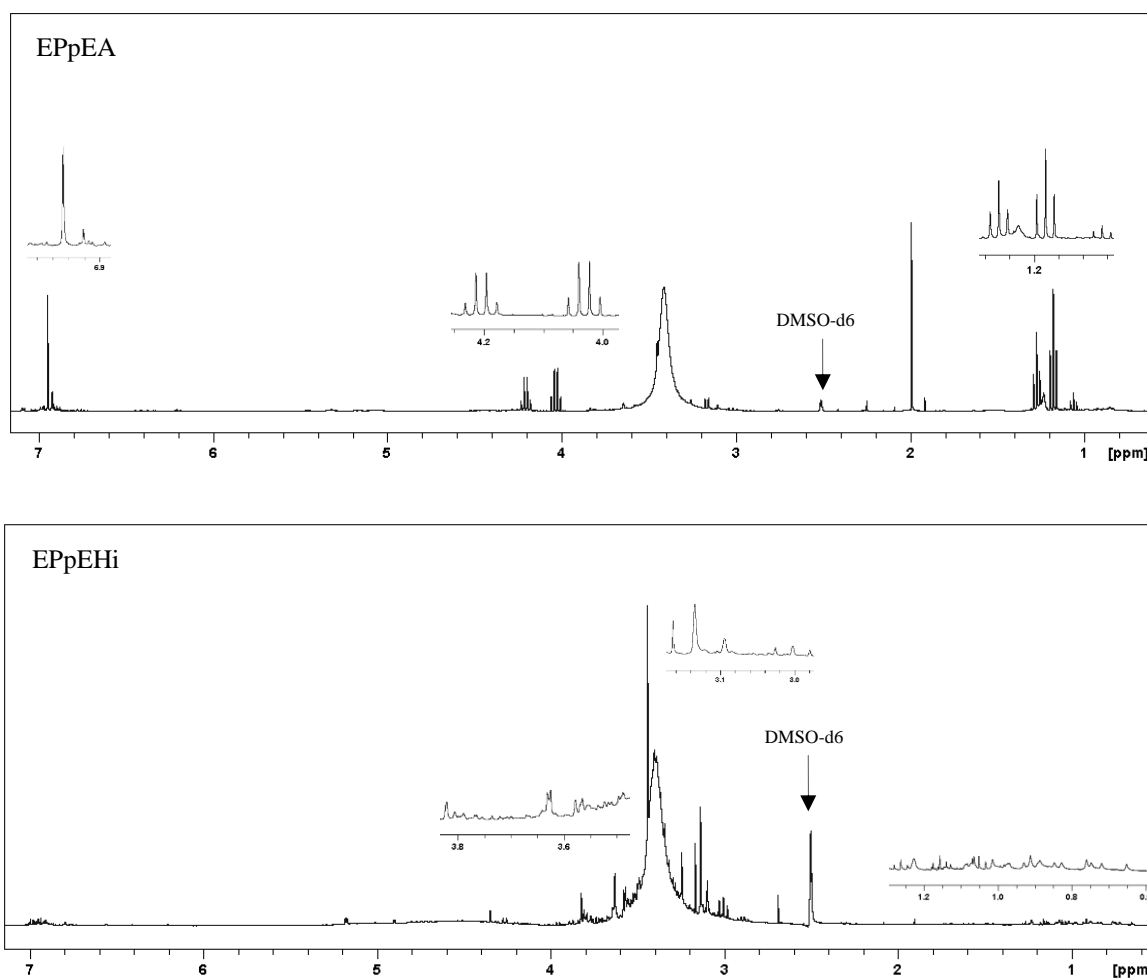
O RMN da fração EPpEA (FIGURA 4.1) apresentou sinais referentes a compostos terpênicos já relatados para o gênero (PIMENTA et al., 2006), como os sinais de hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos (δ_{H} 0,5 - 3,1), e hidrogênios característicos de sesquiterpenos e triterpenos (δ_{H} 3,9 - 4,3 e δ_{H} 6,1 - 7,6) (MARTINS et al., 2015b; MIRANDA et al., 2014; SANTOS et al., 2010).

Por fim, o RMN da fração EPpEHi (FIGURA 4.1) apresentou sinais característicos de compostos fenólicos. Os sinais em região de desblindagem (δ_{H} 6,0 - 9,6) sugerem a presença de hidrogênios aromáticos; os sinais de hidrogênios carbinólicos característico de unidades glicosídicas (δ_{H} 3,5 - 4,5), além dos hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos (δ_{H} 0,7 - 3,0). Esses sinais sugerem a presença de flavonoides glicosilados, já descritos no gênero (MIRANDA et al., 2014).

FIGURA 4.1 – Espectros de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz) das frações da espécie *P. pubescens*.



Continuação FIGURA 4.1.



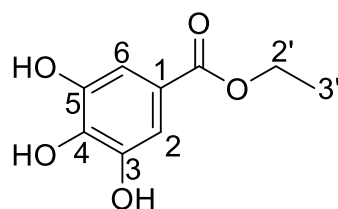
Os experimentos de espectrometria de massas de alta resolução realizados pela técnica hifenada de CLUE-EM/EM foram essenciais para a identificação destes compostos, pois foi possível confirmar a presença de diversos flavonoides agliconas e flavonoides glicosilados, bem como dos terpenos.

4.2.1. Determinação estrutural dos compostos isolados das flores de *P. pubescens*.

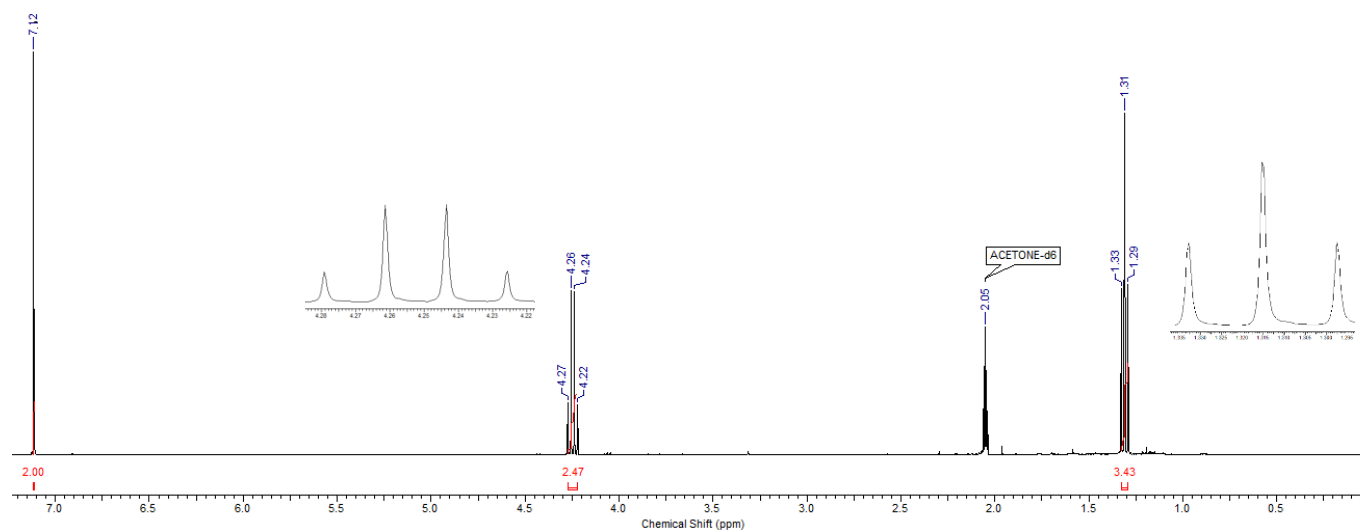
Os procedimentos cromatográficos para o EPpEA permitiram o isolamento de dois compostos (subfrações 2.5.1 e 3.2.1), ambos como um sólido amarelo (0,02 g e 0,08 g, respectivamente). Estes compostos foram identificados como galato de etila (**I**) (etil 3,4,5-trihidroxibenzoato) através da análise dos espectros de RMN de ¹H e pela comparação com a literatura (GALVÃO et al., 2017).

O galato de etila (FIGURA 4.2) é um composto fenólico derivado da molécula de ácido gálico, sob a forma de éster etílico. De maneira geral, os derivados de ácido gálico e seus ésteres têm demonstrado várias propriedades farmacológicas como antioxidante, anti-inflamatória (YANG et al., 2015), antimicrobiana (SARJIT et al., 2015), anticancerígena (PAOLINI et al., 2015) e antiparasitária (NETO et al., 2020). Nos ensaios enzimáticos o ácido gálico e seus derivados apresentaram IC_{50} 0,13 a 0,49 frente a enzima arginase de *L. amazonensis* (De Sousa et al., 2014a).

FIGURA 4.2 – Estrutura química do galato de etila (I).



A análise do espectro de RMN de 1H (FIGURA 4.3 e TABELA 4.2) da subfração 2.5.1 mostrou um singlete integrando para 2 hidrogênios em δ_H 7,12 ppm, característico de hidrogênios aromáticos quimicamente e magneticamente semelhantes. O sinal em δ_H 4,26 ppm é um quarteto integrando para 2 hidrogênios (q, $J = 7,1$ Hz) sugerindo a presença de um éster devido ao deslocamento químico de um grupo metilênico ligado diretamente a um oxigênio. O sinal em δ_H 1,31 ppm (t, $J = 7,1$ Hz) integrando para 3 hidrogênios refere-se ao grupamento metila, cuja multicplidade de tripleto confirma o acoplamento com o grupo metileno. Assim, a análise deste espectro possibilitou a caracterização do galato de etila (I).

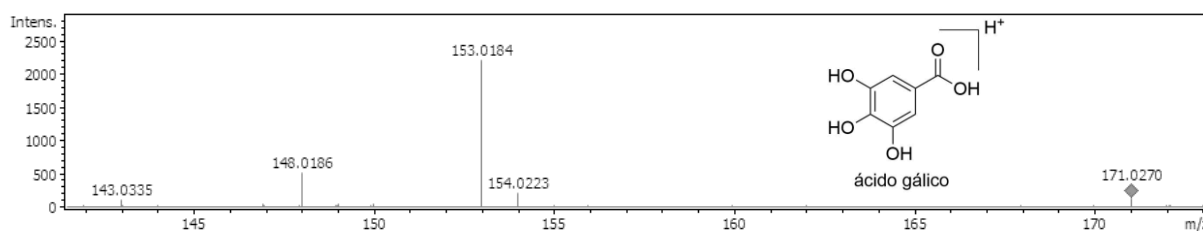
FIGURA 4.3 – Espectro de RMN de ^1H do galato de etila (**I**) (CD_3COCD_3 , 400 MHz).TABELA 4.2 – Dados de RMN de ^1H para o galato de etila (**I**).

H	δ_{H} (ppm) – I ^a (CD_3COCD_3 , 400 MHz)	δ_{H} (ppm) – I ^b (CD_3COCD_3 , 400 MHz)	δ_{H} (ppm) (CD_3OD , 400 MHz) GALVÃO et al., 2017
H-2, H-6	7,12 (2H, s)	7,11 (2H, s)	7,03 (2H, s)
H-2'	4,26 (2H, q, $J = 7,1$ Hz)	4,25 (2H, q, $J = 7,1$ Hz)	4,26 (2H, q, $J = 7,1$ Hz)
H-3'	1,31 (3H, t, $J = 7,1$ Hz)	1,31 (3H, t, $J = 7,1$ Hz)	1,33 (3H, t, $J = 7,1$ Hz)

^a: subfração 2.5.1; ^b: subfração 3.2.1

Após a elucidação estrutural do galato de etila (**I**), foi analisado a fração EPpEA utilizando a técnica de CLUE-ESI-QqTOF-EM/EM a fim de confirmar a presença deste composto na mesma através da análise dos íons produtos obtidos pelo espectro de massas de alta resolução (MOURA et al., 2011). Após a investigação, não foi possível observar a presença do galato de etila na fração EPpEA porém foi observado a presença do ácido gálico nesta fração conforme apresentado no espectro de massas obtido para este composto (FIGURA 4.4).

FIGURA 4.4 - Espectro de EM/EM-IES-(+) em alta resolução do composto identificado como ácido gálico.



Sugere-se que o composto galato de etila (**I**) foi originado durante o processo de extração líquido-líquido do extrato etanólico com o solvente acetato de etila que ocorreu a acetilação do ácido gálico (MARTINS, 2017). Vários compostos fenólicos com potência inibitória enzimática já foram relatados na literatura, como é o caso do ácido gálico, catequina, quercetina, luteolina, kaempferol e outros (da SILVA et al., 2012; de SOUSA et al., 2014a; MANJOLIN et al., 2013; MITTRA et al., 2000; MUZITANO et al., 2006).

4.3 Prospecção Química do Extrato e das Frações da Espécie *P. pubescens*

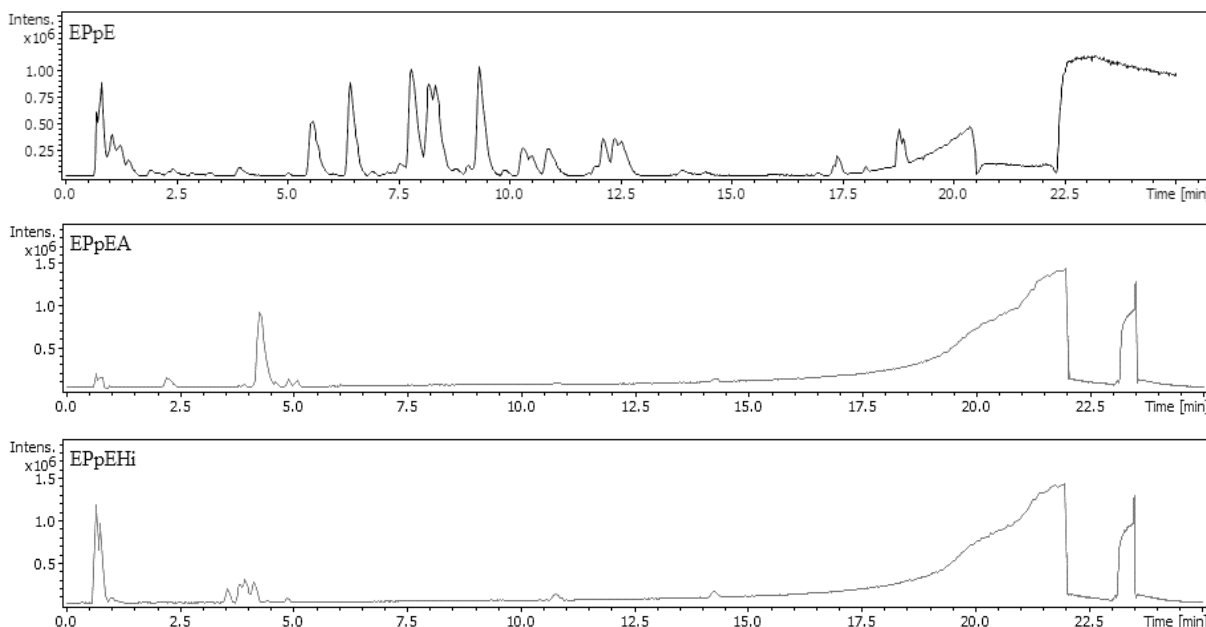
Através de experimentos, utilizando técnicas como CLUE-ESI-QqTOF-EM/EM, CG-EM e RMN de ¹H, foi possível traçar um perfil químico, que permitiu comparar e sugerir a presença de compostos presentes nas flores de *P. pubescens*, pertencentes a classe dos flavonoides e terpenos. Como descrito anteriormente, foi possível elucidar pela técnica de RMN de ¹H o composto **I** (galato de etila). Através do CLUE-EM/EM foi possível identificar 8 compostos a partir do extrato e das frações EPpEA e EPpEHi, sendo 6 flavonoides (**1E** a **4E**; **1A** a **5A'** e **1Hi** a **5Hi'**), 1 sesquiterpeno (**7A**) e 1 diterpeno (**8A**). Pela análise do CG-EM foi possível identificar 13 sesquiterpenos (**1H** à **13H**) a partir da fração EPpEH.

4.3.1. Caracterização dos metabólitos secundários presentes no extrato EPpE e nas frações EPpEA e EPpEHi por CLUE-IES-QqTOF-EM/EM

O uso da técnica de cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE) em conjunto com analisadores de massas de alta resolução, permite separações cromatográficas mais rápidas e eficientes e a identificação de PNs em amostras complexas. É importante ressaltar que essa técnica possui uma alta sensibilidade, sendo capaz de obter bandas mais estreitas e com melhor resolução (BELTRÁN et al., 2009). A escolha deste método dá-se pela sua eficiência e agilidade, combinando um método de separação com uma técnica de identificação estrutural sendo útil na desreplicação dos compostos presentes no extrato etanólico bruto e nas frações da espécie *P. pubescens*.

Os compostos presentes em EPpE, EPpEA e EPpEHi foram identificados através das análises dos cromatogramas (FIGURA 4.5) e pela comparação dos íons fragmentos (m/z) obtidos através de EM/EM-IES-(+), comparados com dados presentes na biblioteca do software *CompoundCrawler* e, também, na literatura.

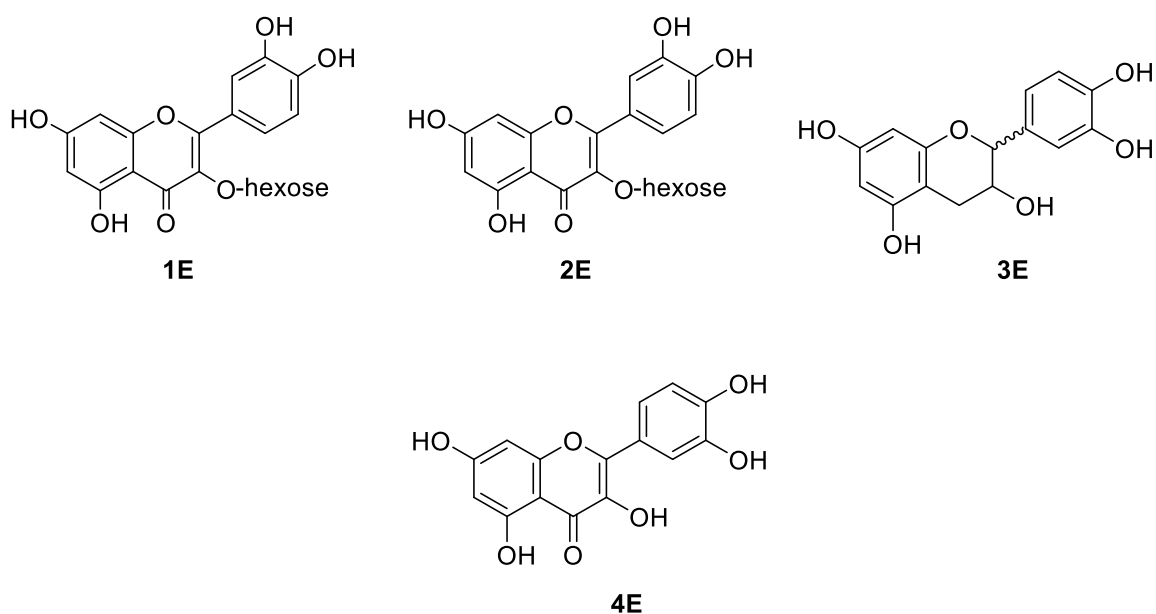
FIGURA 4.5 - Cromatogramas obtidos por CLUE-ESI-QqTOF-EM/EM para EPpE, EPpEA e EPpEHi.



Este método exibiu uma precisão de até 5 ppm para todos os compostos encontrados, os quais pertencem a classe dos flavonoides e terpenos que já foram identificados para a

espécie *P. pubescens* (MIRANDA et al., 2014). A imprecisão destes compostos compete, principalmente, as diferenças estereoquímicas e isoméricas. Na FIGURA 4.6 estão apresentados os compostos da classe dos flavonoides encontrados no extrato etanólico bruto (EPpE), em que foram identificados flavonols glicosilados (**1E** e **2E**), um flavanol (**3E**) e flavonol aglicona (**4E**).

FIGURA 4.6 - Estruturas químicas dos flavonoides identificados em EPpE.



O composto (**1E**), identificado no t_R 10,61 min, apresentou o pico do íon molecular em m/z 611,1597 $[M + H]^+$ (quercetina-O-dihexosídeo) ($C_{27}H_{30}O_{16}$, MM = 610,1534 g/mol). Esse composto foi identificado como rutina anteriormente nas folhas de *P. pubescens*, e juntamente, com os dados de espectrometria de massas foi sugerido a sua presença nas flores desta espécie (MIRANDA et al., 2014). No espectro EM^2 (FIGURA 4.7), a fragmentação do íon em m/z 611,1597 originou o íon produto em m/z 593,1492 após a perda de 18,0100 Da, referente a uma molécula de água. Ainda foi observada a perda de 308,1103 Da, relativa ao dissacarídeo presente nesse composto, originando o íon de m/z 303,0494 que pertence à aglicona quercetina. Também, foi possível observar um íon derivado da fragmentação da aglicona de m/z 153,0174, que é resultante da abertura do anel C do flavonoide por uma retro-Diels-Alder (RDA), conforme proposta de fragmentação (FIGURA 4.8) (MOURA et al., 2011).

FIGURA 4.7 - Espectro de EM/EM-IES (+) em alta resolução do composto (**1E**), identificado como quercetina-O-dihexosídeo.

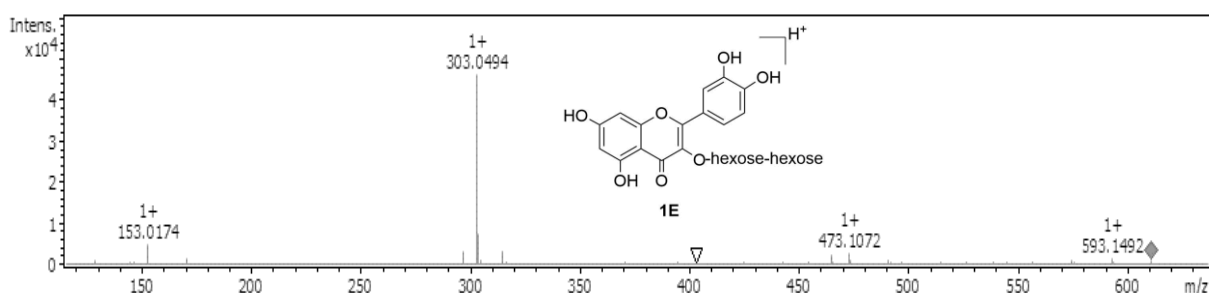
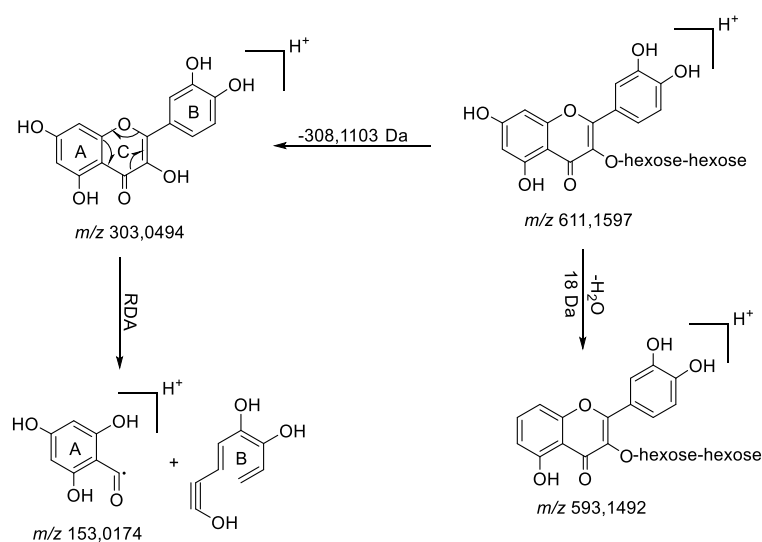
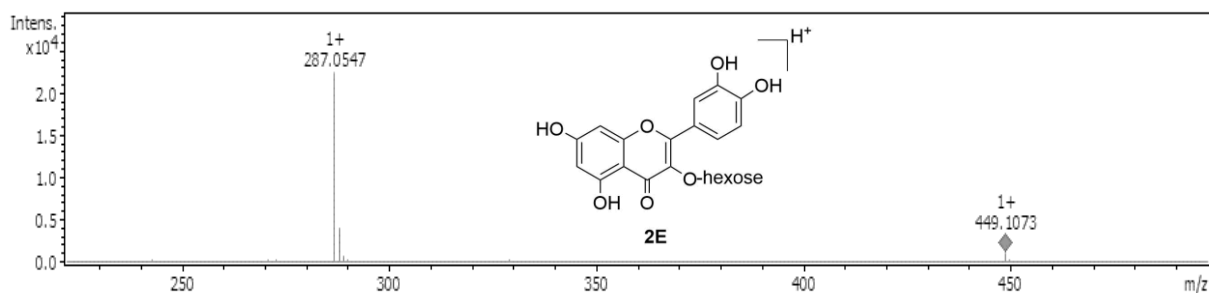


FIGURA 4.8 - Proposta de fragmentações da quercetina-O-dihexosídeo (**1E**) analisado por EM/EM-IES (+).



O composto **2E** identificado como quercetina-O-hexosídeo ($C_{21}H_{20}O_{11}$, $MM = 448,1006$ g/mol), o qual já foi identificado nas folhas da espécie *P. pubescens* (MIRANDA et al., 2014). O espectro de massas (FIGURA 4.9) apresentou o pico do íon molecular em m/z 449,1074 $[M + H]^+$ e a fragmentação característica dá-se pela perda da unidade hexosídica (ISWALDI et al., 2012).

FIGURA 4.9 - Espectro de EM/EM-IES (+) em alta resolução do composto (**2E**), identificado como quercetina-O-hexosídeo.



O espectro EM² do composto **3E** (FIGURA 4.10), identificado como catequina ou epicatequina (C₁₅H₁₄O₆, MM = 290,0790 g/mol), devido a sua estereoquímica, apresentou o sinal do íon molecular em m/z 291,0865 [M + H]⁺. De acordo com a fragmentação apresentada pelo espectro EM² (FIGURA 4.11), foram originados os fragmentos de razão m/z 273,0754 que é referente a perda de uma unidade de água (18,0111 Da). Conforme as fragmentações observadas, sugere-se a abertura do anel C que originou o fragmento m/z 165,0539 pela clivagem heterocíclica (FLAMINI, 2013). No fragmento de razão m/z 147,0432 foi observada uma segunda perda de água (18,0100 Da) derivada da fragmentação anterior. Por fim, é possível observar o pico de razão m/z 139,0383 que é característico da abertura do anel C pela reação de Retro-Diels-Alder (HEMINGWAY & KARCHESY, 1989), em que há clivagens homolíticas (FIGURA 4.11).

FIGURA 4.10 - Espectro de EM/EM-IES (+) em alta resolução do composto (**3E**), identificado como catequina ou epicatequina.

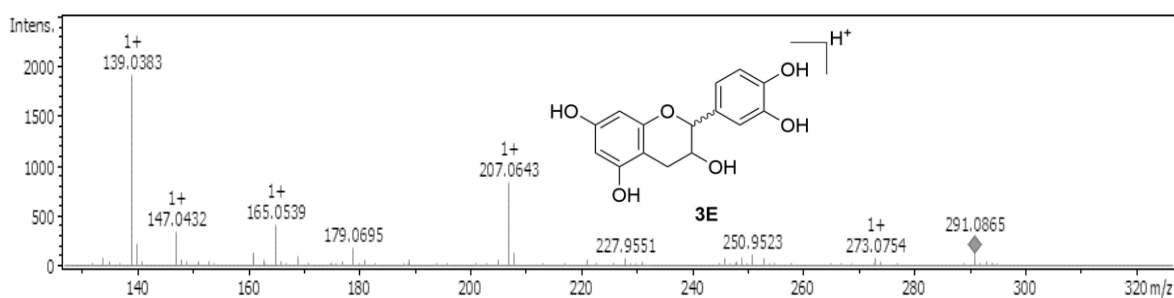
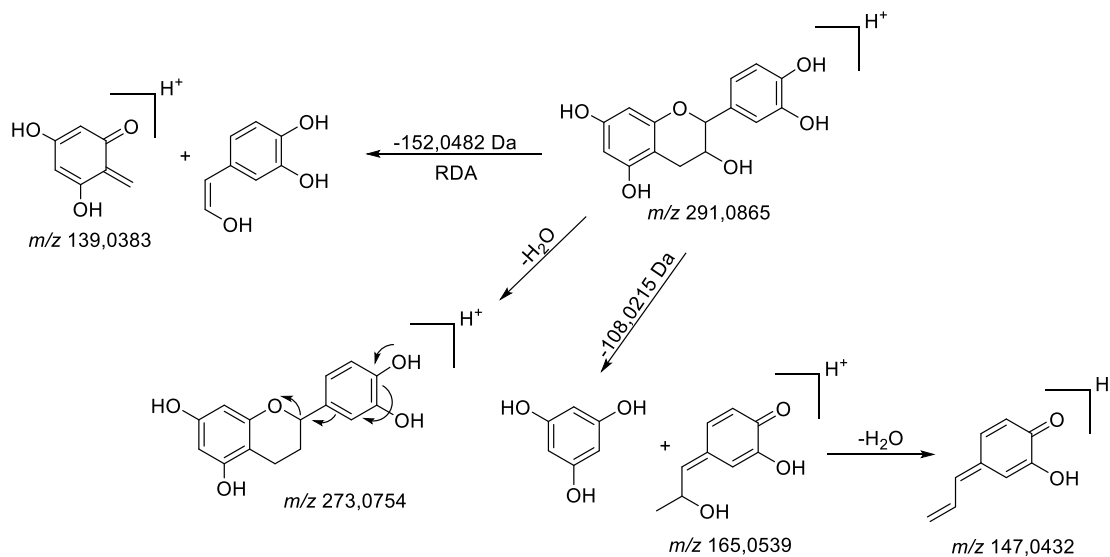
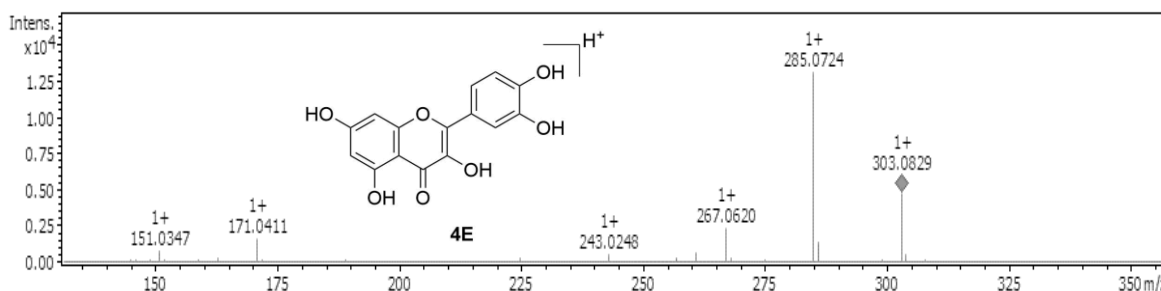


FIGURA 4.11 - Proposta de fragmentações da catequina ou epicatequina (**3E**) analisado por EM/EM-IES (+).



O composto **4E** ($C_{15}H_{10}O_7$, MM = 302,0427 g/mol), apresentou o pico do íon molecular em m/z 303,0829 $[M + H]^+$ e os íons fragmentos obtidos em EM² em m/z 285,0724 ($-H_2O$); 267,0620 ($-H_2O$); 243,0248; 171,0411; 151,0347 (abertura do anel C por Retro-Diels-Alder) os quais são característicos do flavonoide quercetina (FIGURA 4.12) (MIRANDA et al., 2014; SCIGELOVA et al., 2011).

FIGURA 4.12 - Espectro de EM/EM-IES (+) em alta resolução do composto (**4E**), identificado como quercetina.



As análises das frações EPpEA (TABELA 4.3) e EPpEH_i (TABELA 4.4) possibilitaram a caracterização de 15 compostos presentes nas flores de *P. pubescens*, sendo que quatro deles já haviam sido identificados pela análise do extrato etanólico bruto.

Os picos dos íons moleculares identificados na fração EPpEA $[M + H]^+$ em m/z 611,1612; 449,1081, 291,0839 e 303,0499, são referentes aos compostos identificados no EPpE (**1E** - **4E**) descritos anteriormente, sendo a quercetina-O-dihexosídeo (**1A**) (t_R 10,4 min), quercetina-O-hexosídeo (**2A**) (t_R 5,2 min), catequina ou epicatequina (**3A**) (t_R 2,9

min) e quercetina (**4A**) (t_R 15,5 min), respectivamente. Na FIGURA 4.13 estão apresentados os espectros EM² obtidos para estes compostos, com seus respectivos íons produtos (TABELA 4.3). Os compostos identificados nas frações EPpEA e EPpEHi foram metabólitos secundários das classes dos flavonoides e terpenos.

A fração EPpEA apresentou oito compostos que já haviam sido relatados na literatura presentes nas folhas (MIRANDA et al., 2014) e nas sementes do gênero (ALVES et al., 2013). Foi identificado um composto com esqueleto vouacapânico característico do gênero *Pterodon* (FASCIO et al., 1970). Os compostos identificados nesta fração estão apresentados na TABELA 4.3 e para alguns deles foi realizada a proposta de fragmentação.

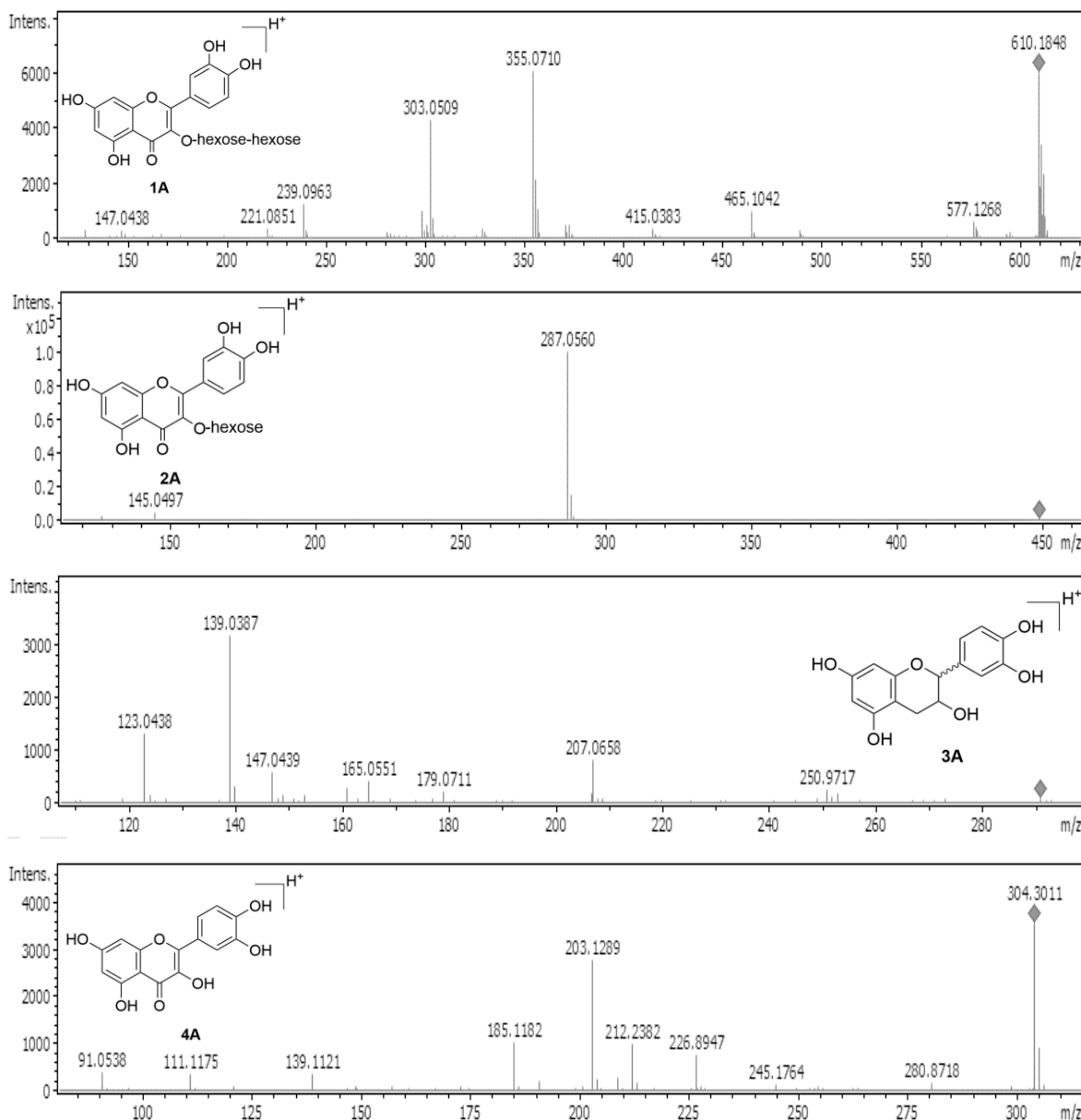
TABELA 4.3 - Compostos identificados por CLUE-EM/EM-IES-(+) da fração EPpEA de *P. pubescens*.

Número	Composto	t_R (min)	m/z		Erro Experimental (ppm)	Fórmula Molecular	Referência
			experimental [M + H] ⁺	EM ² íons			
1A	quercetina-O- dihexosídeo	10,4	611,1612	577,1268; 465,1042; 415,0383; 355,0710; 303,0509; 239,0963; 221,0851; 147,0438	-0,8	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	MOURA et al., 2011
2A	quercetina-O- hexosídeo	5,2	449,1081	287,0560; 145,0497	-1,5	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	ISWALDI et al., 2012
3A	catequina ou epicatequina	2,9	291,0839	250,9717; 207,0658; 179,0711; 165,0551; 147,0439; 139,0387; 123,0438	-2,3	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	FLAMINI, 2013
4A	quercetina	15,5	303,0499	280,8718; 245,1764; 226,8947; 212,2382; 203,1289; 185,1182; 139,1121; 111,1175; 91,0538	-2,9	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	SCIGELOVA et al., 2011
5A e 5A'	luteolina/kaempferol	5,1	287,5023	203,1284; 106,0864	-2,9	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	MARCH & MIAO, 2004

Continuação TABELA 4.3.

6A	espatulenol	6,3	221,1905	203,9389; 177,0551; 163,0371; 145,0290	-4,3	C ₁₅ H ₂₄ O	BOLZAN, 2007.
7A	6 α ,7 β - diacetoxivouacapan- 14 β -oato	11,8	447,3444	104,1962; 387,2183; 341,1758; 327,1959; 313,1815; 299,1649; 281,1552; 253,1599; 225,0918; 203,1284; 167,0347; 149,0237; 99,1173; 85,1013	-1,9	C ₂₅ H ₃₄ O ₇	CABRAL et al., 2012

FIGURA 4.13 - Espectros de EM/EM-IES (+) em alta resolução dos compostos identificados na fração EPpEA.

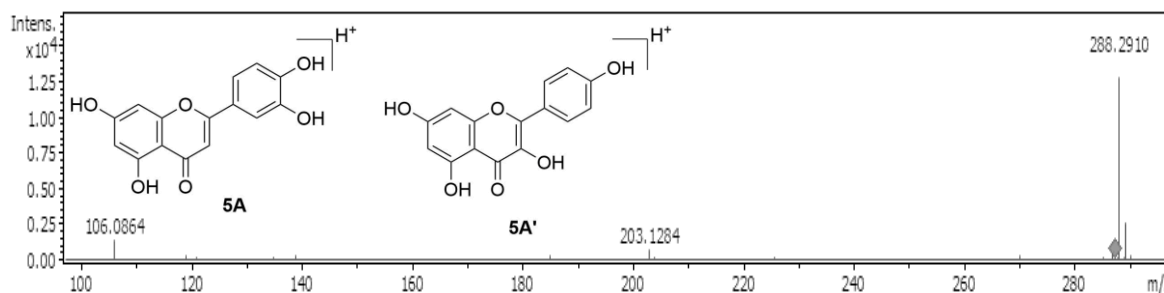


Compostos - **1A**: quercetina-O-dihexosídeo; **2A**: quercetina-O-hexosídeo; **3A**: catequina ou epicatequina; **4A**: quercetina.

O espectro EM² (FIGURA 4.14) dos compostos **5A** e **5A'** identificados respectivamente como luteolina (C₁₅H₁₀O₆, MM = 286,0477 g/mol) e kaempferol (C₁₅H₁₀O₆, MM = 286,0477 g/mol), apresentou o pico do íon molecular em m/z 287,5023 [M + H]⁺ e seus íons fragmentos em m/z 203,1284 e 106,0864 [M + H]⁺. A fragmentação característica do kaempferol é devido a abertura do anel C, em que há a perda de uma unidade C₂H₂O, com posterior reorganização estrutural do anel C que se funde com o anel B. O anel B perde outra unidade C₂H₂O formando o fragmento característico m/z 203,1284

$[M + H]^+$ (MA et al., 1997; MARCH & MIAO, 2004). Este composto também já foi identificado anteriormente nas folhas da espécie *P. pubescens* (MIRANDA et al., 2014).

FIGURA 4.14 - Espectro de EM/EM-IES (+) em alta resolução dos compostos (**5A e 5A'**) identificados como luteolina/kaempferol.



O composto **6A** (t_R 6,3 min) com pico do íon molecular em m/z 221,1905 $[M + H]^+$ foi identificado como espatulenol ($C_{15}H_{24}O$, MM = 220,1827 g/mol), (FIGURA 4.15). A proposta de fragmentação (FIGURA 4.16) a partir do pico de m/z 221,1905 e seus íons fragmentos no espectro EM², dá-se pelo fragmento gerado m/z 203,9389, o qual sofre a perda de 17,2516 Da, referente a uma hidroxila. Sugere-se que o fragmento m/z 163,0371 foi gerado a partir da perda de C_3H_4 (40,9018 Da). Também foi realizada outra proposta de fragmentação que a partir do pico do íon molecular m/z 221,1905, que sofre clivagem homolítica e perde C_3H_7 gerando o pico em m/z 177,0551 (BOLZAN, 2007). Este composto foi encontrado nas folhas e sementes do gênero *Pterodon* (MIRANDA et al., 2014).

FIGURA 4.15 - Espectro de EM/EM-IES (+) em alta resolução do composto (**6A**), identificado como espatulenol.

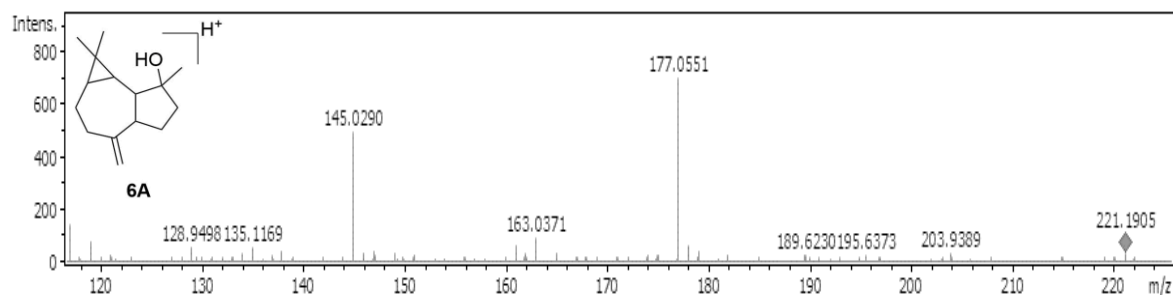
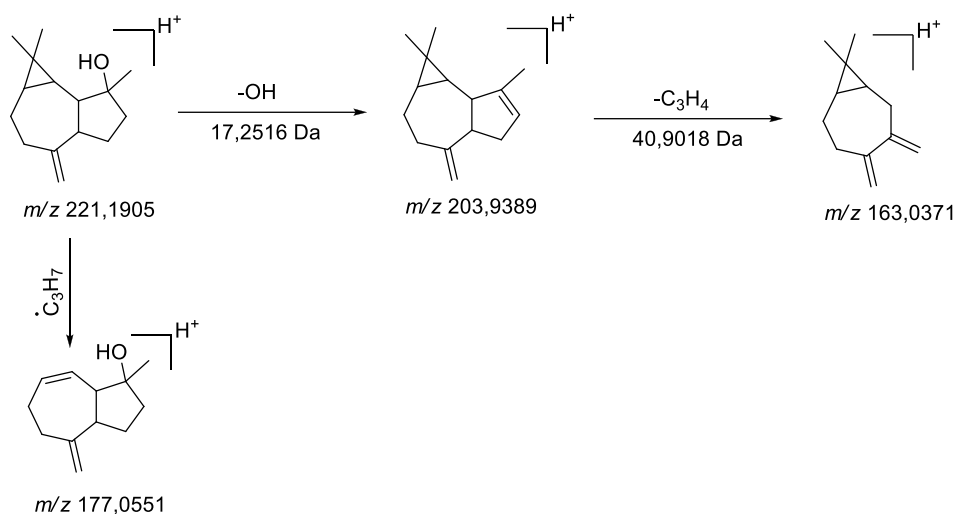


FIGURA 4.16 - Proposta de fragmentações do espatulenol (**6A**) analisado por EM/EM-IES (+).

O espectro EM² do composto **7A** (FIGURA 4.17), identificado como 6 α ,7 β -diacetoxivouacapan-14 β -oato (C₂₅H₃₄O₇, 446,2305 g/mol), apresentou o íon molecular em m/z 447,3444 [M + H]⁺. De acordo com a fragmentação apresentada pelo espectro EM², foi originado os fragmentos de razão m/z 387,2183 que é referente a perda de uma unidade acetoxi (60,1261 Da) pela clivagem homolítica. De acordo com as fragmentações (FIGURA 4.18) sugere-se outra perda de unidade acetoxi (60,0224 Da) devido a uma segunda clivagem homolítica, gerando o fragmento m/z 327,1959 (CABRAL et al., 2012). O diterpeno **7A** foi identificado anteriormente nas sementes de *P. pubescens* juntamente com uma série de diterpenos com este esqueleto vouacapânico, característico do gênero *Pterodon* (CABRAL et al., 2012).

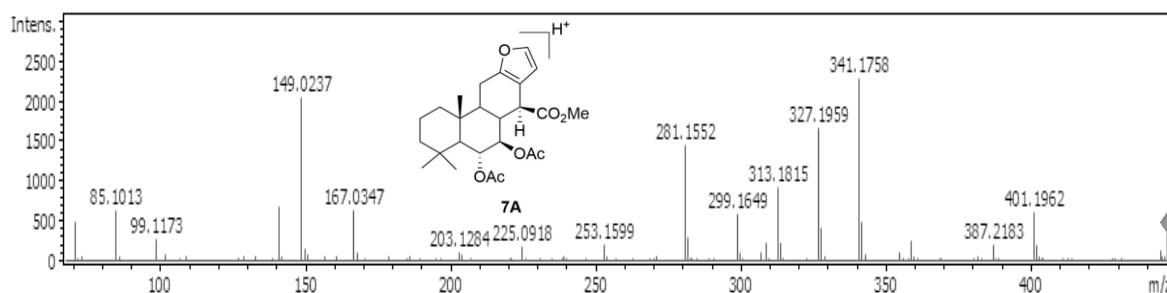
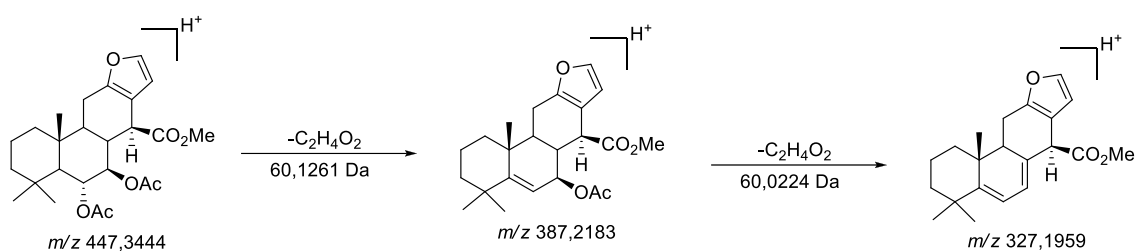
FIGURA 4.17 - Espectro de EM/EM-IES (+) em alta resolução do composto (**7A**), identificado como 6 α ,7 β -diacetoxivouacapan-14 β -oato.

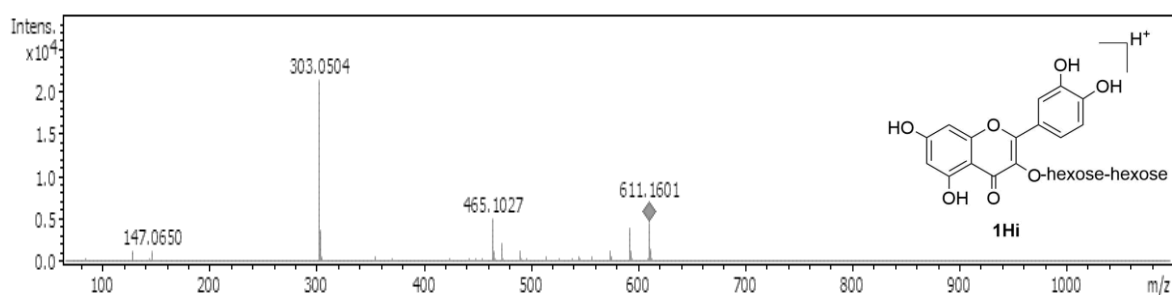
FIGURA 4.18 - Proposta de fragmentações do 6 α ,7 β -diacetoxivouacapan-14 β -oato (**7A**) analisado por EM/EM-IES (+).



Na fração EPpEHi foram identificados sete compostos (TABELA 4.4), os quais foram relatados para as cascas do caule de *Pterodon emarginatus* (HERNÁNDEZ-TERRONES et al., 2007) e as folhas de *Pterodon pubescens* (MIRANDA et al., 2014).

Os picos dos íons moleculares observados para a fração EPpEHi $[M + H]^+$ em m/z 611,1601; 449,10893; 291,0869; 303,0538 e 287,1005 (FIGURA 4.19) são referentes aos compostos identificados no extrato EPpE (**1E** - **4E**) e na fração EPpEA (**1A** - **5A**), descritos anteriormente, sendo a quercetina-O-dihexosídeo (**1Hi**) (t_R 10,8 min), quercetina-O-hexosídeo (**2Hi**) (t_R 5,1 min), catequina ou epicatequina (**3Hi**) (t_R 2,5 min), quercetina (**4Hi**) (t_R 14,3 min) e luteolina/kaempferol (**5Hi** e **5Hi'**) (t_R 5,2 min), respectivamente. A identificação destes compostos nestas frações pode ser justificada pela alta sensibilidade do método de espectrometria de massas de alta resolução, que mesmo em mínimas quantidades é possível a detecção dos compostos.

FIGURA 4.19 - Espectros de EM/EM-IES (+), em alta resolução, dos compostos identificados na fração EPpEHi.



Continuação FIGURA 4.19.

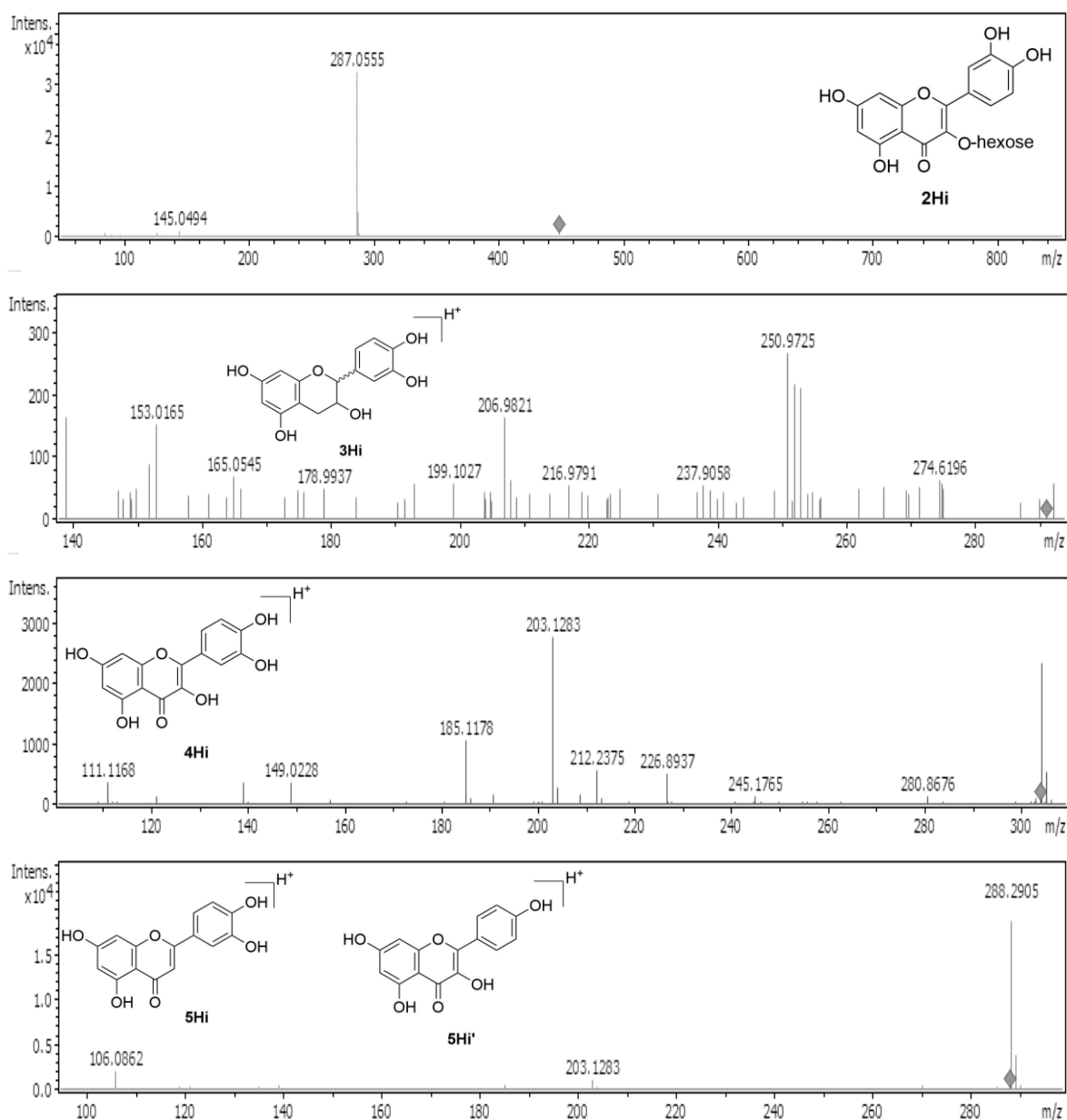


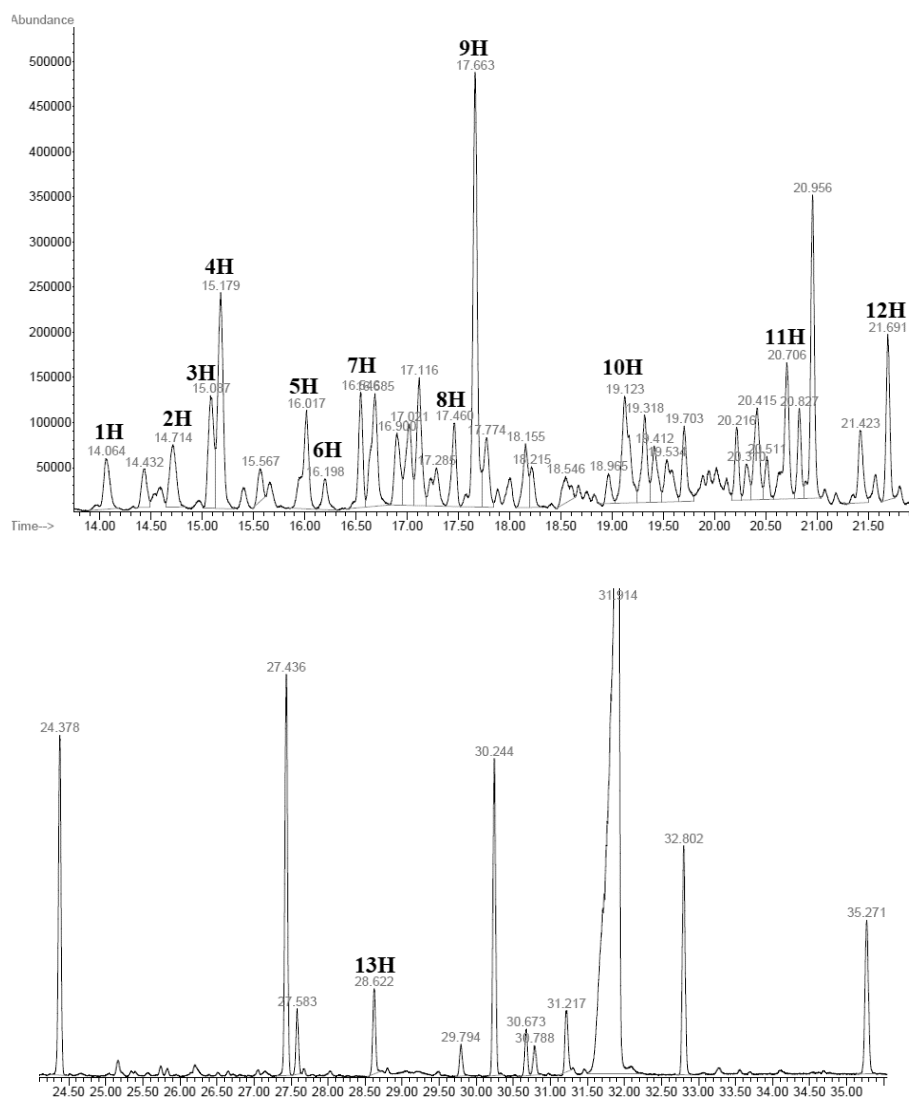
TABELA 4.4 - Compostos identificadas por CLUE-EM/EM-IES-(+) da fração EPpEHi de *P. pubescens*.

Número	Composto	t_R (min)	m/z		Erro Experimental (ppm)	Fórmula Molecular	Referência
			experimental [M + H] ⁺	EM ² íons			
1Hi	quercetina- <i>O</i> - dihexosídeo	10,8	611,1601	465,1027; 303,0504; 147,0650	1,1	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	DOSHI et al., 2016
2Hi	quercetina- <i>O</i> - hexosídeo	5,1	449,1093	287,0555; 145,0494	0,2	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	ISWALDI et al., 2012
3Hi	catequina ou epicatequina	2,5	291,0869	274,6196; 250,9725; 237,9058; 216,9791; 206,9821; 199,1027; 178,9937; 165,0545; 153,0165	-2,6	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	FLAMINI, 2013
4Hi	quercetina	14,3	303,0538	280,8676; 245,1765; 226,8937; 212,2375; 203,1283; 185,1178; 149,0228; 111,1168;	-1,6	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	SCIGELOVA et al., 2011
5Hi e 5Hi'	luteolina / kaempferol	5,2	287,1005	203,1283; 106,0862	-1,2	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	MARCH & MIAO, 2004

4.4 Identificação dos Metabólitos Secundários por CG-EM

Os compostos presentes na fração hexânica foram identificados através da técnica de CG-EM, comparando os dados dos espectros de massas com a literatura e realizando o cálculo do índice de Kovats (*IK*) contidos na fração hexânica. O índice de Kovats descreve o comportamento de retenção do composto comparativamente ao de uma mistura de alcanos (de diferentes números de carbono (C₈-C₃₀) (JANZANTTI et al., 2003). Os valores do *IK* obtidos foram comparados com os valores encontrados na literatura para a coluna HP-5MS. Ao final da corrida cromatográfica, foi obtido o cromatograma (FIGURA 4.20) que sugere a presença de metabólitos secundários da classe dos terpenos.

FIGURA 4.20 - Cromatograma obtido para a fração EPpEH.



Condições: Coluna (30 m × 250 mm × 0,25 μm), gradiente: 50-300 °C (°C/min., 36 min.); V_{inj.} = 1,0 μL, fluxo: 1 mL/min., gás de arraste: He e detector EM-IE.

Os compostos presentes nesta fração correspondem aos sesquiterpenos (TABELA 4.5) e foram identificados nas sementes (**1H**, **3H** - **4H**, **6H**, **8H** - **9H**) (NUCCI et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2016; SOUSA et al., 2018;) e nas folhas (**5H**, **7H**, **10H** - **11H**) (MIRANDA et al., 2014; SANTOS et al., 2010) de *P. pubescens*.

Através da análise cromatográfica e dos espectros de massas, foram identificados 13 compostos (FIGURA 4.21) da classe dos terpenos dos quais 10 (**1H**, **3H** - **11H**) já haviam sido descritos para *P. pubescens* (MIRANDA et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2016; SANTOS et al., 2010). Os valores de IK foram calculados e comparados com dados da biblioteca NIST e com a literatura (ADAMS, 2007) (TABELA 4.6).

FIGURA 4.21 – Sesquiterpenos identificados na espécie *P. pubescens*.

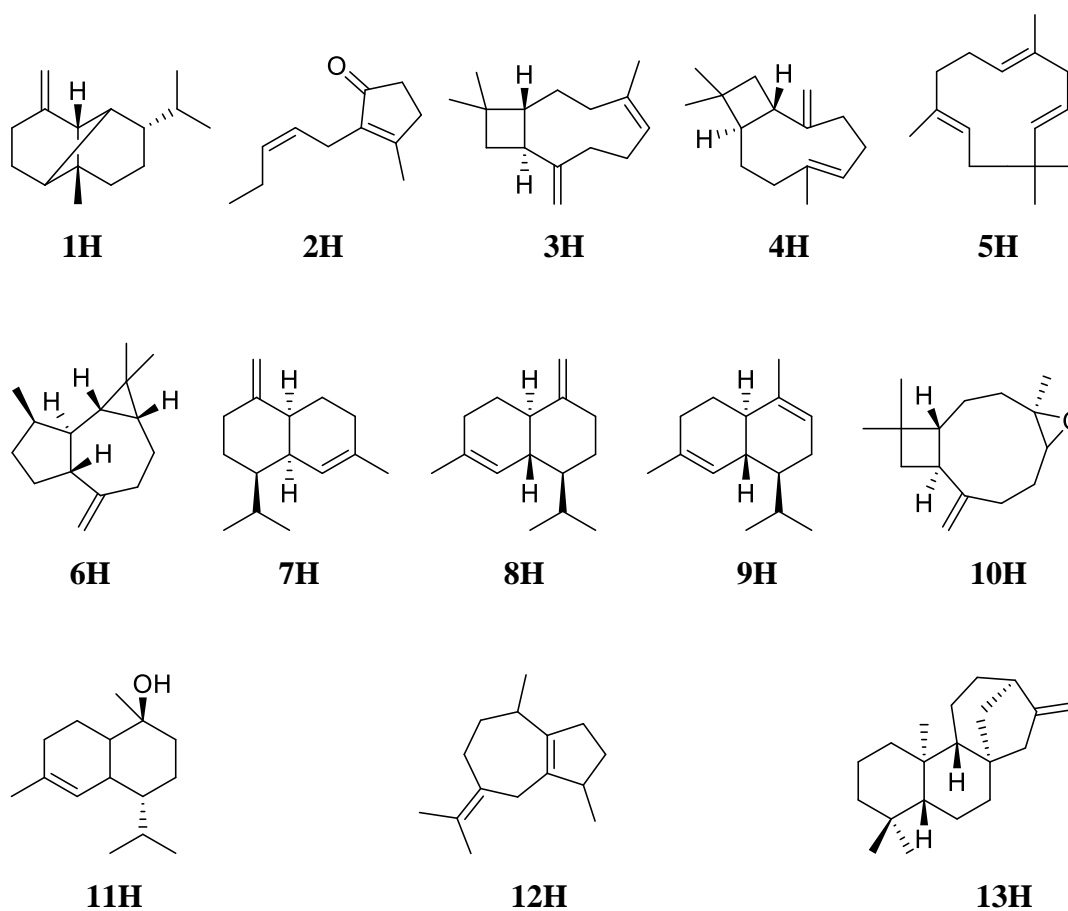


TABELA 4.5 - Compostos identificados por CG-EM da fração EPpEH.

Número	Compostos	t_R (min)	IK ^a	IK ^b	IK ^c	Fórmula Molecular	m/z
1H	β -copaeno	14,064	1368	1372	-	C ₁₅ H ₂₄ O	204,1
2H	(z)-jasmone	14,714	1393	1390	-	C ₁₁ H ₁₆ O	164,1
3H	isocariofileno	15,087	1408	1411	-	C ₁₅ H ₂₄ O	204,1
4H	β -cariofileno	15,179	1412	1410	1417	C ₁₅ H ₂₄ O	204,1
5H	α -humuleno	16,017	1447	1447	1452	C ₁₅ H ₂₄ O	204,1
6H	aromadendreno	16,198	1454	1439	1440	C ₁₅ H ₂₄ O	204,1
7H	γ -muroleno	16,560	1470	1471	1470	C ₁₅ H ₂₄ O	204,1
8H	γ -cadineno	17,456	1500	1508	-	C ₁₅ H ₂₄ O	204,1
9H	β -cadineno	17,663	1516	1518	-	C ₁₅ H ₂₄ O	204,1
10H	óxido de cariofileno	19,123	1577	1574	1578	C ₁₅ H ₂₄ O	220,1
11H	α -cadinol	20,706	1649	1654	1650	C ₁₅ H ₂₆ O	222,1
12H	β -guaieno	21,691	1695	-	1691	C ₁₅ H ₂₄ O	204,1
13H	(-)-kaureno	28,622	2020	2034	-	C ₂₀ H ₃₂	272,1

Tr: Tempo de retenção; IK^a: Índice de Kovats experimental; IK^b: Índice de Kovats Literatura (ADAMS, 2007); IK^c: Índice de Kovats Biblioteca NIST.

Após a identificação dos compostos químicos, foi sugerido algumas propostas de fragmentações através ds espectros de massas obtidos por impacto eletrônico (70 eV) para os compostos β -cadineno (FIGURA 4.22 e 4.23) e para o α -cadinol (FIGURA 4.24 e 4.25) os quais apresentaram uma melhor fragmentação (BENEDICT et al., 1995; SILVA, 2001).

FIGURA 4.22 – Espectro de massas do composto β -cadineno (**9H**) (70 eV) (t_R 17,663).

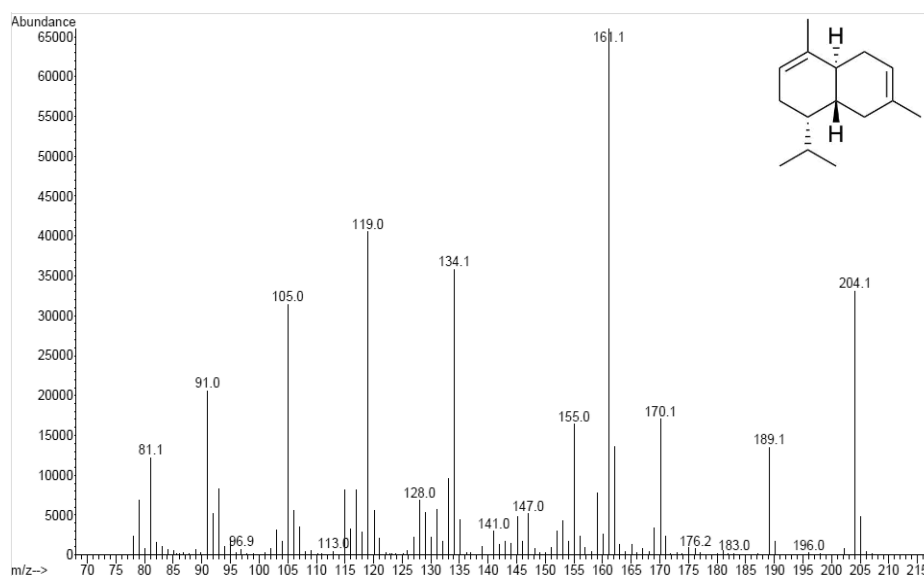


FIGURA 4.23 - Proposta de fragmentação do composto β -cadineno (**9H**) por EM-IE.

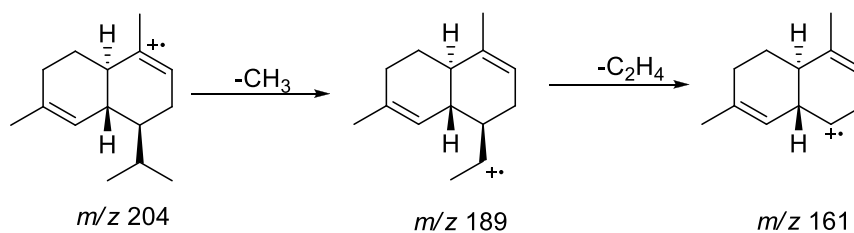


FIGURA 4.24 – Espectro de massas do composto α -cadinol (**11H**) (70 eV) (t_R 20,706).

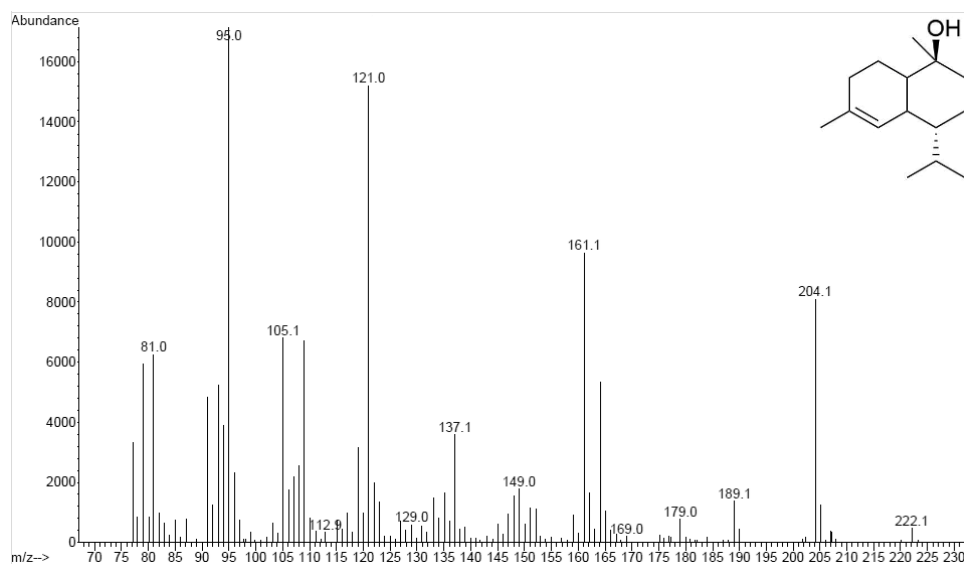
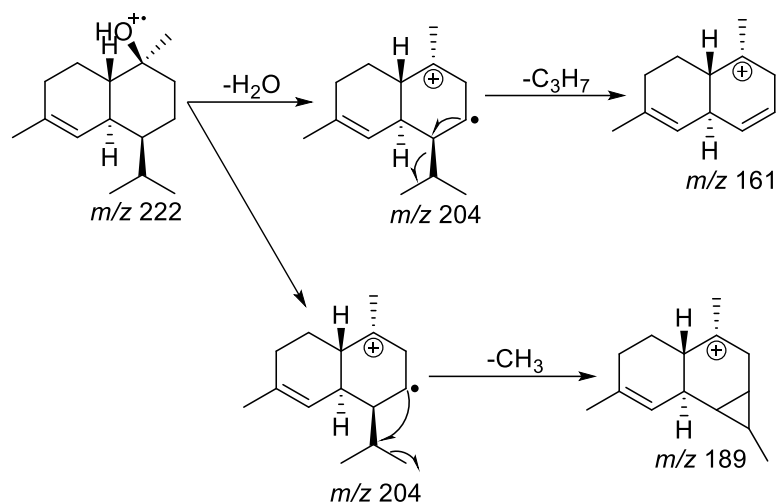


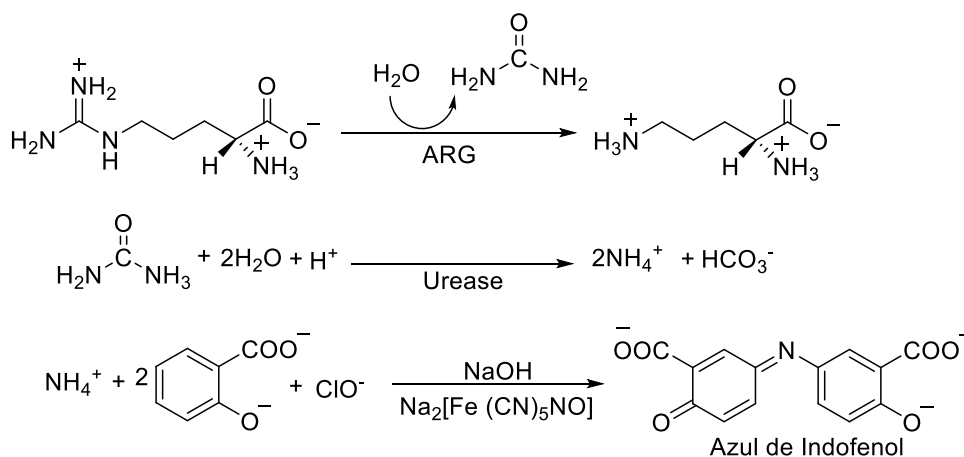
FIGURA 4.25 - Proposta de fragmentação do composto α -cadinol (**11H**) por EM-IE.

4.5 Ensaio Enzimático para o Extrato Etanólico (EPpE) e para as Frações EPpEH, EPpEA e EPpEHi

O ensaio enzimático foi baseado no Método de Berthelot (1859), que ao misturar amônia, fenol e hipoclorito observa-se uma coloração azul, devido à formação do complexo azul de indofenol (SEARLE, 1984). A determinação de compostos nitrogenados dá-se pela formação do azul de indofenol decorrente da reação da amônia com compostos fenólicos na presença de um agente oxidante por um catalisador inorgânico (nitroprussiato de sódio) em meio alcalino. A reação original de Berthelot utiliza o fenol como reagente, no entanto, devido à sua alta toxicidade essa reação vem sofrendo modificações no intuito de substituir o fenol por outros reagentes, como o salicilato de sódio (BOLLETER et al., 1961).

A atividade enzimática da arginase (ARG) é determinada indiretamente pela absorvância do produto reacional azul de indofenol (FIGURA 4.26). A reação parte do substrato de L-arginina que é hidrolisada em L-orninita e ureia, utilizando como catalisador a enzima ARG. Na sequência, a ureia é hidrolisada, tendo como catalisador a enzima urease formando uma espécie nitrogenada (NH_4^+), que em meio alcalino com a presença do nitroprussiato de sódio reage com o salicilato e hipoclorito de sódio, formando um sal de coloração verde relativo ao azul de indofenol (BORGES et al., 2009; de SOUSA et al., 2014a).

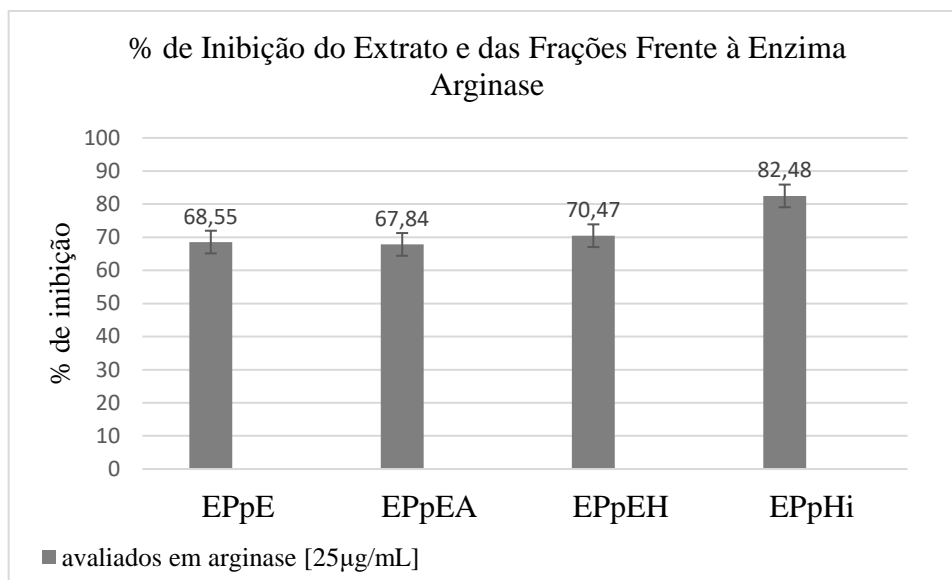
FIGURA 4.26 - Etapas reacionais do ensaio com a arginase (ARG).



A busca por novos inibidores para a leishmaniose derivados de plantas medicinais vem sendo alvo de estudos, tendo em vista novos compostos que possam apresentar uma menor toxicidade em relação ao tratamento já existente com os antimoniais pentavalentes. O uso de um alvo molecular diferente dos medicamentos utilizados tem em vista o problema da resistência do parasito que estes medicamentos têm apresentado (MONTEIRO et al., 2017).

Diversas espécies do gênero *Pterodon* têm apresentado atividade antiparasitária (BARRETO et al., 2008; DUTRA et al., 2009a; OLIVEIRA, 2014; 2017), dentre as quais, as folhas de *P. pubescens* apresentou atividade leishmanicida (ARRAIS-SILVA et al., 2014). Tendo em vista que as flores não foram investigadas do ponto de vista químico e biológico o extrato etanólico (EPpE) e as frações EPpEH, EPpEA e EPpEHi foram analisadas frente ao ensaio enzimático da enzima arginase a uma concentração de 25 µg/mL a fim de avaliar o percentual de inibição (FIGURA 4.27).

FIGURA 4.27 – Taxa de inibição da enzima arginase do extrato etanólico e das frações de *P. pubescens*.



O extrato etanólico bruto (EPpE) e as frações EPpEH, EPpEA e EPpEH_i apresentaram uma taxa de inibição entre 67% e 82% para a arginase. A maior inibição foi observada para o extrato hidroalcolóico que teve um pequeno aumento da atividade comparado ao extrato etanólico. Considerando os compostos identificados nas frações de acetato de etila e hidroalcolóica, esta atividade inibitória pode estar relacionada ao ácido gálico, o qual já foi relatado na literatura como inibidor da ARG apresentando IC₅₀ de 0,13 µM (de SOUSA et al., 2014a). Ainda, os resultados da atividade enzimática podem estar relacionados aos flavonoides identificados quercetina-*O*-dihexosídeo, quercetina-*O*-hexosídeo, catequina ou epicatequina, quercetina e luteolina/kaempferol.

Estes compostos já foram descritos na literatura e possuem um alto potencial inibitório frente a enzima ARG (da SILVA et al., 2012; MUZITANO et al., 2006). De Sousa et al (2014b) relataram que os compostos catequina ou epicatequina apresentaram inibição enzimática com IC₅₀ de 1,6 a 2,0 µM e essa inibição pode estar relacionada as características estruturais desses compostos. O composto quercetina-*O*-dihexosídeo sugerido como rutina, já isolado de *P. pubescens*, apresentou potencial inibitório IC₅₀ 10,4 µM frente a ARG (da Silva et al., 2019).

A atividade inibitória enzimática da luteolina frente a ARG (IC₅₀ de 9 µM) já foi relatada na literatura (MANJOLIN et al., 2013). Os compostos luteolina e quercetina foram utilizados

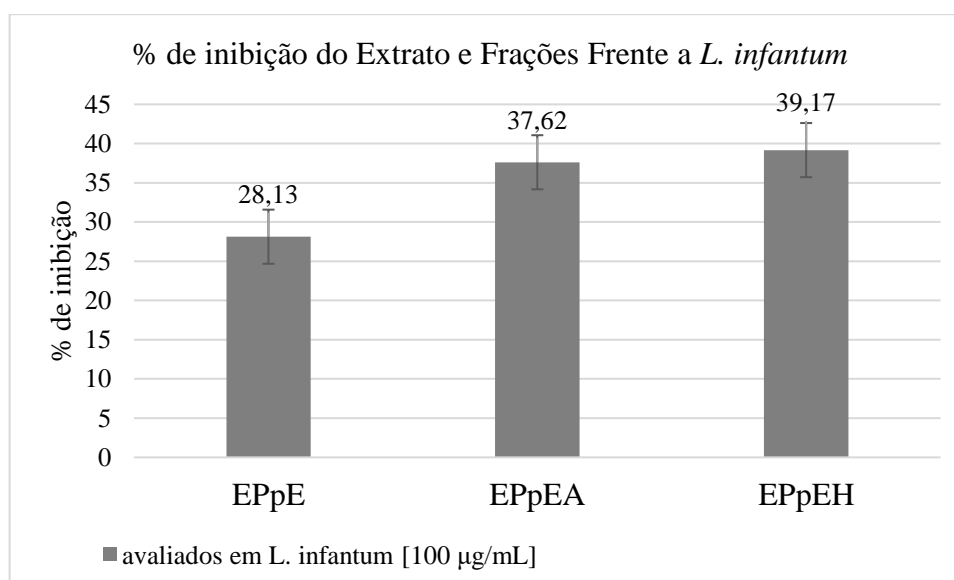
em camundongos infectados com *L. major* e os dados indicaram que a porcentagem de mortalidade nos camundongos que receberam a luteolina e quercetina foi menor em comparação com o grupo controle (antimoniato de meglumina) (HAMIDIZADEH et al., 2020).

O ensaio desacoplado foi realizado nas mesmas condições do ensaio acoplado para confirmação das atividades inibitórias de EPpE, EPpEA, EPpEH e EPpEHi frente a ARG. Os resultados do ensaio em urease contendo ambas enzimas (urease e ARG) não foram representativos, resultando em inibições entre 2% e 4% para o extrato e frações.

4.6 Ensaios *in vitro* no Protozoário *L. infantum* com o Extrato Etanólico (EPpE) e as Frações EPpEH e EPpEA de *P. pubescens*.

O extrato etanólico (EPpE) e as frações EPpEH e EPpEA foram analisados frente ao protozoário *L. infantum* a uma concentração de 100 µg/mL. Os resultados da atividade inibitória (FIGURA 4.28) neste ensaio não foram significativos, quando comparado aos resultados do ensaio em ARG, exibindo um percentual de inibição entre 28% a 39%.

FIGURA 4.28 – Taxa de inibição do protozoário *L. infantum* com o extrato etanólico e as frações de *P. pubescens*.

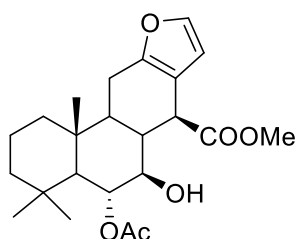


A maior atividade enzimática observada frente a enzima ARG pode estar relacionada ao perfil proteômico entre as espécies *L. amazonensis* e *L. infantum*, onde foi observada maior

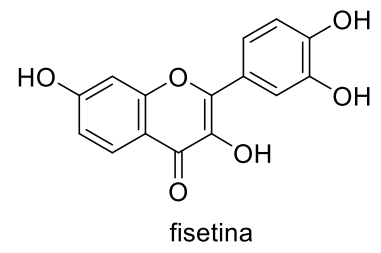
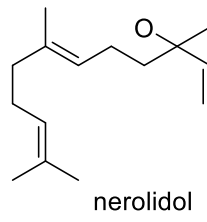
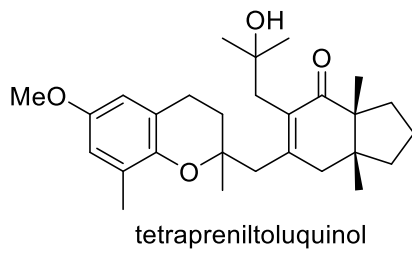
concentração da enzima ARG em *L. amazonensis* do que em *L. infantum* (LIMA, 2017). Dessa forma, pode-se sugerir que os resultados apresentados no ensaio enzimático frente a enzima ARG foram satisfatórios pois, a enzima foi disponibilizada isoladamente, enquanto a ARG de *L. infantum* se encontra dentro do parasito. Diante de tais fatos o extrato e as frações utilizadas para o ensaio *in vitro* no protozoário de *L. infantum* pode não ter alcançado a ARG do parasito devido a compartimentalização da ARG no mesmo (SANTANA, 2019).

Os compostos identificados previamente, apresentam diversas atividades biológicas já descritas na literatura. Os diterpenos vouacapanos, por exemplo, possuem atividades biológicas como anticâncer, antioxidante, antimicrobiano e antiparasitária (DUTRA et al., 2008; HOSCHEID & CARDOSO, 2015; OLIVEIRA et al., 2014; TOLEDO et al., 2011). Oliveira et al (2017) testaram a atividade leishmanicida do composto diterpenóide com esqueleto vouacapano, 6 α -acetoxi-7 β -hidroxivouacapan-17 β -oato de metila (FIGURA 4.29) contra promastigotas de *L. amazonensis* e *L. brasiliensis* o qual apresentou potencial inibitório IC₅₀ de 74,16 nmol/mL.

FIGURA 4.29 – Diterpenoide com esqueleto vouacapano (6 α -acetoxi-7 β -hidroxivouacapan-17 β -oato de metila)



Os flavonoides também são compostos bem conhecidos na literatura pela sua atividade antiparasitária (da SILVA et al., 2012, 2014, 2019; dos REIS et al., 2013; MANJOLIN et al., 2013). Outros compostos foram investigados quanto a sua atividade enzimática frente ao promastigota de *L. infantum* como por exemplo, o tetrapreniltoluquinol que apresentou IC₅₀ de 44,9 μ M (SOUSA et al., 2017). Estudo indicaram que o terpenóides nerolidol apresentou potência inibitória IC₅₀ 75,10 μ M frente a *L. infantum chagasi* (ARRUDA et al., 2005). Há relatos que o flavonoide fisetina é um potente inibidor (IC₅₀ 0,28) frente aos promastigotas de *L. infantum* (ADINEHBEIGI et al., 2017).

FIGURA 4.30 – Inibidores de *L. infantum*.

5. CONCLUSÃO

A partir do perfil químico das flores, foi possível observar a presença de compostos fenólicos, terpenos e flavonoides que em sua maioria são encontrados no gênero *Pterodon*. Através do extrato etanólico e das frações EPpEA, EPpEH e EPpEHi de *P. pubescens* foi possível identificar por CLUE-ESI-QqTOF-EM/EM e CG-EM 21 compostos pertencentes as classes dos flavonoides e terpenos, sendo a maioria destes já reportados para este gênero e espécie. Dentre os compostos identificados, cabe ressaltar que neste estudo foi isolado o composto fenólico galato de etila (**I**), o qual foi formado pela acetilação do ácido gálico presente na fração de acetato de etila.

Pela técnica CLUE-ESI-QqTOF-EM/EM foram identificados quatro compostos no extrato etanólico, todos pertencentes à classe dos flavonoides (**1E a 4E**), que, posteriormente, também foram encontrados nas frações acetato de etila (**1A a 4A**) e hidroalcolólica (**1Hi a 4Hi**). Ainda, foi possível identificar nestas frações outros dois flavonoides **5A e 5A'** (idênticos aos **5Hi e 5Hi'**) e dois terpenos **6A** (sesquiterpeno) e **7A** (diterpeno), sendo o esqueleto do diterpeno característico para compostos presentes no gênero *Pterodon*. Através da técnica de CG-EM foi possível identificar 13 sesquiterpenos (**1H a 13H**).

Nos ensaios biológicos, a avaliação do extrato etanólico e das frações EPpEH, EPpEHi e EPpEA frente a enzima ARG de *L. amazonensis* apresentou taxa de inibição entre 67 a 82%. Já a avaliação dos extratos e frações frente ao protozoário *L. infantum* não foram representativos (28 a 39%). Os resultados obtidos neste trabalho são relevantes para o conhecimento da espécie, visto que não há estudos químicos e biológicos para as flores de *P. pubescens*.

6. REFERÊNCIAS

ABREU, R. C. R.; ASSIS, G. B.; FRISON, S.; AGUIRRE, A.; DURIGAN, G. Can native vegetation recover after slash pine cultivation in the Brazilian Savanna. *Forest Ecology and Management*, v. 262, p. 1452-1459, 2011.

ABUGRI, D. A.; JAYNES, J. M.; WITOLA, W. H. Anti-Toxoplasma activity of *Sorghum bicolor* derived lipophilic fractions. *BMC Research Notes*, v. 12, p. 1-7, 2019.

ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. 4^a ed. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, 2007. 804p.

ADINEHBEIGI, K.; RAZI JALALI, M. H.; SHAHRIARI, A.; BAHRAMI, S. In vitro antileishmanial activity of fisetin flavonoid via inhibition of glutathione biosynthesis and arginase activity in *Leishmania infantum*. *Pathogens and Global Health*, v. 111, p.176-185, 2017.

ALMASSY JUNIOR, A. A.; LOPES, R. C.; ARMOND, C.; SILVA, F.; CASALI, V. W. D. Folhas de chá – Plantas Medicinais na Terapêutica Humana. 1^a ed. Viçosa: UFV, 2005.

ALMEIDA, O. L. S.; SANTOS, J. B. Avanços no tratamento da leishmaniose tegumentar do novo mundo nos últimos dez anos: uma revisão sistemática da literatura. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 86, n. 3, p. 497-506, 2011.

ALVES, S. F.; BORGES, L. L.; DE PAULA, J. A. M.; VIEIRA, R. F.; FERRI, P. H; COUTO, R. O.; PAULA, J. R.; BARA, M. T. F. Chemical variability of the essential oils from fruits of *Pterodon emarginatus* in the Brazilian Cerrado. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 23, p. 224-229, 2013.

ANDRADE, M. A.; AZEVEDO, C. S.; MOTTA, F. N.; SANTOS, M. L.; SILVA, C. L.; SANTANA, J. M.; BASTOS, I. M. D. Essential oils: in vitro activity against *Leishmania amazonensis*, cytotoxicity and chemical composition. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v. 16, p. 1-8, 2016.

ARRAIS-SILVA, W. W.; NUNES, P. S. G.; CARVALHO, J. D.; BRUNE, M. W.; ARRAIS-LIMA, C.; BATALINI C. Preliminary phytochemical and antileishmanial studies of the

ethanolic extracts of *Pterodon pubescens*. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 16, n. 3, p. 561-565, 2014.

ARRUDA, D. C.; D'ALEXANDRI, F. L.; KATZIN, A. M.; ULIANA, S. R. B. Antileishmanial Activity of the Terpene Nerolidol. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 49, p. 1679–1687, 2005.

ASSUMPCÃO, C. F.; BACHIEGA, P.; MORZELLE, M. C.; NELSON, D. L.; NDIAYE, E. A.; RIOS, A. O.; SOUZA, E. C. Characterization, antioxidant potential and cytotoxic study of mangaba fruits. *Ciência Rural*, v. 44, n. 7, p. 1297-1303, 2014.

BAJALAN, I.; ROUZBAHANI, R.; GHASEMI, A. P.; MAGGI, F. Antioxidant and antibacterial activities of the essential oils obtained from seven Iranian populations of *Rosmarinus officinalis*. *Industrial Crops and Products*, v. 107, p. 305-311, 2017.

BALANÑA-FOUCE, R.; CALVO-ÁLVAREZ, E.; ÁLVAREZ-VELILLA, R.; PRADA, C. F.; PÉREZ-PERTEJO, Y.; REGUERA, R. M. Role of trypanosomatid's arginase in polyamine biosynthesis and pathogenesis. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 18, p. 85-93, 2012.

BARREIRA, S.; SCOLFORO, J. R. S.; BOTELHO, S. A.; De MELLO, J. M. Estudo da estrutura da regeneração natural e da vegetação adulta de um Cerrado sensu stricto para fins de manejo florestal. *Scientia Forestalis*, Piracicaba, n. 61, p. 64-78, 2002.

BARRETO, R. F. M.; LARANJA, G. A. T.; SILVA, M. C. C.; COELHO, M. G. P.; PAES, M. C.; OLIVEIRA, M. M.; CASTRO, S. L. Anti-trypanosoma cruzi activity of *Pterodon pubescens* seed oil: geranylgeraniol as the major bioactive component. *Parasitology Research*, v. 103, p. 111-117, 2008.

BASTOS, M. M.; BOECHAT, N.; HOELZ, L. V. B.; DE OLIVEIRA, A. P. Quimioterapia antileishmania: uma revisão da literatura. *Revista Virtual Química*, v. 8, n. 6, p. 2072-2104, 2016.

BATES P. A. Leishmania sand fly interaction: progress and challenges. *Current Opinion in Microbiology*, v. 11, p. 340-344, 2008.

BEER, M. F.; FRANK, F. M.; ELSO, O. G.; BIVONA, A. E.; CERNY, N.; GIBERTI, G.; MALCHIODI, E. L.; MARTINO, V. S.; ALONSO, M. R.; SÜLSEN, V. P.; INES, S. C. Trypanocidal and leishmanicidal activities of flavonoids isolated from *Stevia satureiifolia* var. *satueiifolia*. *Pharmaceutical Biology*, v. 54, p. 2188-2195, 2016.

BELTRÁN, E.; IBÁÑEZ, M.; SANCHO, J. V.; HERNÁNDEZ, F. Determination of mycotoxins in different food commodities by ultra-high-pressure liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, v. 23, p. 1801-1809, 2009.

BENEDICT, C.; ALCHANATI, I.; HARVEY, P. J.; LIU, J.; STIPANOVIC, R. D.; BELL, A. A. The enzymatic formation of δ -cadinene from farnesyl diphosphate in extracts of cotton. *Phytochemistry*, v. 39, p. 327-331, 1995.

BOCEDI, A.; DAWOOD, K. F.; FABRINI, R.; FEDERICI, G.; GRADONI, L.; PEDERSEN, J. Z.; RICCI, G. Trypanothione efficiently intercepts nitric oxide as a harmless iron complex in trypanosomatid parasites. *The FASEB Journal*, v. 24, p. 1035-1042, 2010.

BOLLETER, W. T.; BUSHMAN, C. J.; TIDWELL, P. W. Spectrophotometric determination of ammonia as indophenol. *Analytical Chemistry*, v. 33, p. 592-594, 1961.

BOLZAN, A. A. *Dissertação de mestrado: Constituintes de Senecio platensis* Arech. isolamento, elucidação estrutural e avaliação da atividade antibacteriana, 2007.

BORGES, S.; ACEVEDO, M. S. M. S. F.; KORN, M. Sistema multicomutado de análise em fluxo para determinação de amônio e monoclорamina em águas residuais e produtos de desinfecção. *Química Nova*, v. 32, n. 5, p. 1175-1179, 2009.

BOSQUIROLI, L. S. S.; DEMARQUE, D. P.; RIZK, Y. S.; CUNHA, M. C.; MARQUES, M. C. S.; MATOS, M. F. C.; KADRI, M. C. T.; CAROLLO, C. A.; ARRUDA, C. C. P. *In vitro* anti-*Leishmania infantum* activity of essential oil from *Piper angustifolium*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 25, p. 124-128, 2015.

BRAZ FILHO, R.; GOTTLIEB, O. R.; ASSUMPCÃO, R. M. V. The isoflavones of *Pterodon pubescens*. *Phytochemistry*, v. 10, p. 2835-2836, 1971.

BRUNING, M. C. R.; MOSEGUI, G. B. G.; VIANA, C. M. M. A utilização da fitoterapia e de plantas medicinais em unidades básicas de saúde nos municípios de Cascavel e Foz do Iguaçu-Paraná: a visão dos profissionais de saúde. *Ciência & Saúde Coletiva*, v. 17, n. 10, p. 2.675-2.685, 2012.

BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. *Lancet*, v. 15, p. 951-970, 2018.

CABRAL, E. C.; SEVART, L.; SPINDOLA, H. M.; COELHO, M. B.; SOUSA, I. M. O.; QUEIROZ, N. C. A.; FOGGIO, M. A.; EBERLIN, M. N.; RIVEROS, J. M. *Pterodon pubescens* Oil: characterisation, certification of origin and quality control via mass spectrometry fingerprinting analysis. *Phytochemical Analysis*, v. 24, p. 184-192, 2012.

CARVALHO, J. C. T.; SERTIE, J. A. A.; BARBOSA, M. V. J.; PATRÍCIO, K. C. M.; CAPUTO, L. R. G.; SARTI, S. J.; FERREIRA, L. P.; BASTOS, J. K. Anti-inflammatory activity of the crude extract from the fruits of *Pterodon emarginatus* Vog. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 64, p. 127-133, 1998.

CARVALHO, J. C. T. Sucupira, *Pterodon emarginatus*: Fitoterápicos anti-inflamatórios – aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. Ribeirão Preto: Tecmed, 2004. p.1-383.

CASSINO, R. F.; MARTINHO, C. T.; SILVA, S. Modern pollen spectra of the Cerrado vegetation in two national parks of Central Brazil, and implications for interpreting fossil pollen records. *Review of Palaeobotany and Palynology*, v. 223, p. 71-86, 2015.

CHANDRASEKAR, R.; SUBASISH, D.; SIVAGAMI, B.; JAYASREE, P.; NIRANJAN, B. M. Therapeutic efficacy of flavonoids and terpenoids an ongoing herbal therapy in the treatment of Leishmaniasis. *Natural Products: An Indian Journal*, v. 14, p. 1-22, 2018.

COELHO, L. P.; REIS, P. A.; DE CASTRO, F. L.; GAYER, C. R. M.; LOPES, S. C.; SILVA, M. C. S.; SABINO, K. C. C.; TODESCHINI, A. R.; COELHO, M. G. P. Antinociceptive properties of ethanolic extract and fractions of *Pterodon pubescens* Benth. Seeds. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 98, p. 109-116, 2005.

COSTA, A. P.; COSTA, F. B.; SOARES, H. S.; RAMIREZ, D. G.; DE CARVALHO ARAÚJO, A.; DA SILVA FERREIRA, J. I. G.; TONHOSOLO, R.; DIAS, R. A.; GENNARI,

S. M.; MARCILI, A. Environmental factors and ecosystems associated with canine visceral leishmaniasis in northeastern Brazil. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, v. 15, p. 765-774, 2015.

CRUZ, E. D.; DA SILVA, E. R.; MAQUIAVELI, C. D.; ALVES, E. S.; LUCON, J. F.; DE TOLEDO, C. E.; VANNIER-SANTOOS, M. A. Leishmanicidal activity of *Cecropia pachystachya* flavonoids: arginase inhibition and altered mitochondrial DNA arrangement. *Phytochemistry*, v. 89, p. 71-77, 2013.

DA SILVA, E. R.; CASTILHO, T. M.; PIOKER, F. C.; TOMICH de Paula Silva, C. H.; FLOETER-WINTER, L. M. Genomic organisation and transcription characterisation of the gene encoding *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* arginase and its protein structure prediction. *International Journal for Parasitology*, v. 32, p. 727-737, 2002.

DA SILVA, E. R.; SILVA, M. F. L.; FISCHER, H.; MORTARA, R. A.; MAYER, M. G.; FRAMESQUI, K.; SILBER, A. M.; FLOETER-WINTER, L. M. Biochemical and biophysical properties of a highly active recombinant arginase from *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* and subcellular localization of native enzyme. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 159, p. 104-111, 2008.

DA SILVA, M. F. L.; ZAMPIERI, R. A.; MUXEL, S. M.; BEVERLEY, S. M.; FLOETER-WINTER, L. M. *Leishmania amazonensis* arginase compartmentalization in the glycosome is important for parasite infectivity. *PLoS ONE*, v. 7, p. 1-12, 2012.

DA SILVA, E. R.; BROGI, S.; GRILLO, A.; CAMPANI, G.; GEMMA, S.; VIEIRA, P. C.; Do CARMO MAQUIAVELI, C. Cinnamic acids derived compounds with antileishmanial activity target *Leishmania amazonensis* arginase. *Chemical Biology & Drug Design*, v. 93, p. 139-146, 2018.

DA SILVA, E. R.; BROGI, S.; LUCON-JÚNIOR, J.F. CAMPANI, G.; GEMMA, S.; MAQUIAVELI, C. C. Dietary polyphenols rutin, taxifolin and quercetin related compounds target *Leishmania amazonensis* arginase. *Food Function*, v. 10, p. 3172-3180, 2019.

DE SOUSA, L. R. F.; RAMALHO, S. D.; FERNANDES, J. B.; DA SILVA, M.F.das G. F., IEMMA, M. R. C.; CORRÊA, C. J.; DE SOUZA, D. H. F.; LIMA, M. I. S.; VIEIRA, P. C.

Leishmanicidal galloylquinic acids are noncompetitive inhibitors of arginase. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 25, n. 10, p. 1832-1838, 2014a.

DE SOUSA, L. R. F.; RAMALHO, S. D.; BURGER, M. C. M.; NEBO, L.; FERNANDES, J. B.; DA SILVA, M. F. G. F.; IEMMA, M. R. C.; CORRÊA, C. J.; DE SOUZA, D. H. F.; LIMA, M. I. S.; VIEIRA, P. C. Isolation of arginase inhibitors from the bioactivity-guided fractionation of *Byrsonima coccolobifolia* leaves and stems. *Journal of Natural Products*, v. 77, p. 392-396, 2014b.

DEWICK, P. M. Medicinal natural products: a biosynthetic approach. 2a ed. John Wiley & Sons. England. 2002. p. 232.

DIXON, R. A. Natural products and plant disease resistance. *Nature*, v. 411, p. 843-847, 2001.

DOS REIS, M. B. G.; MANJOLIN, L. C.; MAQUIAVELI, C. C.; SANTOS-FILHO, O. A.; DA SILVA, E. R. Inhibition of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* and rat arginases by green tea EGCG, (+)-catechin and (2)-epicatechin: a comparative structural analysis of enzyme-inhibitor interactions. *Plos one*, v. 8, n. 11, p. 1-9, 2013.

DOSHI, G. M.; NALAWADE, V. V.; MUKADAM, A. S.; CHASKAR, P. K.; ZINE, S. P.; SOMANI, R. R.; UNE, H. D. Elucidation of flavonoids from *Carissa congesta*, *Polyalthia longifolia*, and *Benincasa hispida* plant extracts by hyphenated technique of liquid chromatography-mass spectroscopy. *Pharmacognosy Research*, v. 8, p. 281-286, 2016.

DUTRA, R. C.; LEITE, M. N.; BARBOSA, N. R. Quantification of phenolic constituents and antioxidant activity of *Pterodon emarginatus* Vogel seeds. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 9, p. 606-614, 2008.

DUTRA, R. C.; BRAGA, F. G.; COIMBRA, E. S.; SILVA, A. D.; BARBOSA, N. R. Atividade antimicrobiana e leishmanicida das sementes de *Pterodon emarginatus* Vogel. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 19, p. 429-435, 2009a.

DUTRA, R. C.; FAVA, M. B.; ALVES, C. C. S.; FERREIRA, A. P.; BARBOSA, N. R. Antiulcerogenic and antiinflammatory activities of the essential oil from *Pterodon emarginatus* seeds. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 61, p. 243-250, 2009b.

DUTRA, R. C.; CAMPOS, M. M.; SANTOS, A. R.; CALIXTO, J. B. Medicinal plants in Brazil: pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. *Pharmacological Research*, v. 112, p. 4-29, 2016.

EVANGELISTA, G. L.; DE SOUZA, A. N. C.; SANTOS, C. F.; CARDOSO, J. H. L.; LOPES, E. A. B.; DOS SANTOS, M. V.; LAHLOU, S.; MAGALHÃES, P. J. C. Essential oil of *Pterodon polygalaeflorus* inhibits electromechanical coupling on rat isolated trachea. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 109, p. 515-522, 2007.

ESSID, R.; RAHALI, F. Z.; MSAADA, K.; SGHAIR, I.; HAMMAMI, M.; BOURATBINE, A.; AOUN, K.; LIMAM, F. Antileishmanial and cytotoxic potential of essential oils from medicinal plants in Northern Tunisia. *Industrial Crops and Products*, v. 77, p. 795-802, 2015.

FAIRLAMB, A. H.; CERAMI, A. Metabolism and functions of trypanothione in the kinetoplastida. *Annual Review of Microbiology*, v. 46, p. 695-729, 1992.

FASCIO, M.; GILBERT, B.; MORS, W.B.; NISHIDA, T. Two new diterpenes from *Pterodon pubescens*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 42, p. 97-101, 1970.

FERNÁNDEZ, M. M.; MALCHIODI, E. L.; ALGRANATI, I. D. Differential effects of paromomycin on ribosomes of *Leishmania mexicana* and mammalian cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.55, p. 86-93, 2011.

FLAMINI, R. Recent applications of mass spectrometry in the study of grape and wine polyphenols. *ISRN Spectroscopy*, v. 2013, p. 1-45, 2013.

FORTIN, A.; CARIDHA, D. P.; LEED, S.; NGUNDAM, F.; SENA, J.; BOSSCHAERTS, T.; PARRIOTT, S.; HICKMAN, M. R.; HUDSON, T. H.; GROGL, M. Direct comparison of the efficacy and safety of oral treatments with oleylphosphocholine (OIPC) and miltefosine in a mouse model of *L. major* cutaneous leishmaniasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 8, p. 1-7, 2014.

FOWLER, M. Plants, medicines and man. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. v. 86, p. 1797-1804, 2006.

FREITAS-JUNIOR, L. H.; CHATELAIN, E.; KIM, H. A.; SIQUEIRA-NETO, J. L. Visceral leishmaniasis treatment: what do we have, what do we need and how to deliver it? *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, v. 2, p. 11-19, 2012.

GALVÃO, D. C.; MORAES, C. T.; BORGES, B. J. P. CARDOSO, W. C.; ANDRADE, J. P.; TAKAHASHI, P. M.; VIEIRA, P. C.; BORGES, W. S. Secondary metabolites from *Pachystroma longifolium* (Nees) I. M. Johnst (Euphorbiaceae) and evaluation of its extracts as cathepsins inhibitors. *Journal of the Chilean Chemical Society*, v. 62, p. 3602-3604, 2017.

GARCÍA, A. A.; CARRIL, E. P. U. Metabolismo secundario de Plantas. *Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal*, v. 2, n. 3, p. 119-145, 2009.

GIRARD-THERNIER, C.; PHAM, T. N.; DEMOUGEOT, C. The promise of plant-derived substances as inhibitors of arginase. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, v. 15, p. 798-808, 2015.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Medicinal plants: factors of influence on the content of secondary metabolites. *Química Nova*, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GÓRNIAK, I.; BARTOSZEWSKI, R.; KRÓLICZEWSKI, J. Comprehensive review of antimicrobial activities of plant flavonoids. *Phytochemistry Reviews*, v. 18, p. 241-272, 2019.

GOULART, P. S.; ARAÚJO, D. R.; SILVA, B. O.; VILELA, P. B.; ALVES, A. D.; SANTOS, A. L. V. Mamacadela: a cura do vitiligo está no Cerrado. *Revista Eletrônica Interdisciplinar*, v. 1, p. 271-278, 2017.

GRANDI, T. S. M.; TRINDADE, J. A.; PINTO, M. J. F.; FERREIRA, L. L.; CATELLA, A. C. Plantas medicinais de Minas Gerais, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, v. 3, p. 185-224, 1989.

GSPC, The Plant List Version 1.1, Global Strategy Plant Conservation, <http://www.theplantlist.org>, 2020.

HAMIDIZADEH, N.; ASGARI, Q.; HATAM, G. R.; The evaluation of quercetin and luteolin efficacy on cutaneous leishmaniasis in mice infected with *Leishmania major*. *Journal of Pharmaceutical Negative Results*, v. 8, p. 43-48, 2020.

HEMINGWAY, R. W.; KARCHESY, J. J. Chemistry and significance of condensed tannins. *Plenum Press*. New York and London, p. 1-545, 1989.

HERNÁNDEZ-TERRONES, M. G.; MORAIS, S. A. L.; FERREIRA, S.; SANTOS, D. Q.; NASCIMENTO, E. A.; CHANG, R. Phytochemistry and allelopathic study of *Pterodon emarginatus* stem extract. *Planta Daninha*, v. 25, n. 4, p. 755-762, 2007.

HOMMEL, M. Visceral leishmaniasis: biology of the parasite. *Journal of Infection*, v. 39, p. 101-111, 1999.

HOSCHEID, J.; REINAS, A.; CORTEZ, D. A. G.; DA COSTA, W. F.; CARDOSO, M. L. C. Determination by GC-MS-SIM of furanoditerpenes in *Pterodon pubescens* Benth.: development and validation. *Talanta*, v. 100, p. 372-376, 2012.

HOSCHEID, J.; CARDOSO, M. L. C. Sucupira as a potential plant for arthritis treatment and other diseases. *Arthritis*, v. 61, p. 1-12, 2015.

ISWALDI, I.; GÓMEZ-CARAVACA, A. M.; ARRÁEZ-ROMÁN, D.; UBEROS, J.; LARDÓN, M.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. Characterization by high-performance liquid chromatography with diode-array detection coupled to time-of-flight mass spectrometry of the phenolic fraction in a cranberry syrup used to prevent urinary tract diseases, together with a study of its antibacterial activity. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 58, p. 34-41, 2012.

JANZANTTI, N. S.; FRANCO, M. R. B.; WOSIACKI, G. Efeito do processamento na composição de voláteis de suco clarificado de maçã Fuji. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, n. 3, v. 23, p. 523-528, 2003.

JHINGRAN, A.; CHATTERJEE, M.; MADHUBALA, R. Leishmaniasis: epidemiological trends and diagnosis. *Leishmania: after the Genome*. 1ª ed. *Caister Academic*, Seattle, p.1-306, 2008.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nature Reviews Microbiology*, v. 9, p. 604-615, 2011.

KHALIL, A. A.; DIAB, M. M. S.; MOUDGIL, K. D. The 4th Euro-Mediterranean Conference of Natural Products and Drug Discovery: Back to Mother Nature (BioNat-IV). *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 11, p. 297-300, 2016.

LEÃO, D. P.; FRANCA, A. S.; OLIVEIRA, L. S.; BASTOS, R.; COIMBRA, M. A. Physicochemical characterization, antioxidant capacity, total phenolic and proanthocyanidin content of flours prepared from pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) fruit by-products. *Food Chemistry*, v. 225, p. 146-153, 2017.

LESSA, M. M.; LESSA, H. A.; CASTRO, T. W.; OLIVEIRA, A.; SCHERIFER, A.; MACHADO, P.; CARVALHO, E. M. Mucosal leishmaniasis: epidemiological and clinical aspects. *Revista Brasileira Otorrinolaringologia*, v. 73, n. 6, p. 843-847, 2007.

LIMA, B. S. S. Identificação de proteínas imunogênicas e diferencialmente abundantes em *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *L. (Viannia) braziliensis* e *L. infantum*. *Tese de doutorado* - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2017.

LOBANOVSKA, M.; PILLA, G. Penicillin's Discovery and Antibiotic Resistance: Lessons for the Future? *Yale Journal of Biology and Medicine*, v. 29, p. 135-145, 2017.

LOISEAU, P. M.; BORIES, C. Mechanisms of drug action and drug resistance in *Leishmania* as basis for therapeutic target identification and design of antileishmanial modulators. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, v. 6, n. 5, p. 539-550, 2006.

LORENZI, H. Árvores Brasileiras. Instituto Plantarum, Nova Odessa, Brasil, p. 1-384, 1998.

LORENZI, H. Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil. Instituto Plantarum, São Paulo, 3^a ed., v. 2. p. 1-384, 2002.

LORENZI, H. Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil. Instituto Plantarum, São Paulo, 4^a edição, p. 1-384, 2009.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. Plantas Medicinais no Brasil Nativas e Exótica. Instituto Plantarum, Nova Odessa, 2^a edição, p. 1-512, 2008.

MA, Y. L.; LI, Q. M.; VAN DEN HEUVEL, H.; CLAEYS, M. Characterization of flavone and flavonol aglycones by collision-induced dissociation tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, v. 11, p. 1357-1364, 1997.

MACHADO, P. A.; HILÁRIO, F. F.; CARVALHO, L. O.; SILVEIRA, M. L. T.; ALVES, R. B.; FREITAS, R. P.; COIMBRA, E. S. Effect of 3-alkylpyridine marine alkaloid analogues in *Leishmania* species related to American cutaneous leishmaniasis. *Chemical Biology & Drug Design*, v. 80, p. 745-751, 2012.

MANJOLIN, L. C.; DOS REIS, M. B.; MAQUIAVELI, C. C.; SANTOS-FILHO, O. A.; DA SILVA, E. R. Dietary flavonoids fisetin, luteolin and their derived compounds inhibit arginase, a central enzyme in *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Food Chemistry*, v. 141, p. 2253-2262, 2013.

MAQUIAVELI, C. C.; LUCON-JÚNIOR, J. F.; BROGI, S.; CAMPIANI, G.; GEMMA, S.; VIEIRA, P. C.; SILVA, E. R. Verbascoside inhibits promastigote growth and arginase activity of *Leishmania amazonensis*. *Journal of Natural Products*, v. 79, n. 5, p. 1459-1463, 2016.

MARCH, R. E.; MIAO, X. S. A fragmentation study of kaempferol using electrospray quadrupole time-of-flight mass spectrometry at high mass resolution. *International Journal of Mass Spectrometry*, v. 231, p. 157-167, 2004.

MARÍN, C.; RAMÍREZ-MACÍAS, I.; ROSALES, M. J.; MURO, B.; REVIRIEGO, F.; NAVARRO, P.; ARÁN, V. J.; SÁNCHEZ-MORENO, M. In vitro leishmanicidal activity of 1,3-disubstituted 5- nitroindazoles. *Acta Tropica*, v. 148, p. 170-178 2015.

MARINHO, D. G.; ALVIANO, D. S.; MATHEUS, M. E.; ALVIANO, C. S.; FERNANDES, P. D. The latex obtained from *Hancornia speciosa* Gomes possesses anti-inflammatory activity. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 135, p. 530-537, 2011.

MARTINS, J. L. R.; RODRIGUES, O. R. L.; DE SOUSA, F. B.; FAJEMIROYE, J. O.; GALDINO, P. M.; FLORENTINO, I. F.; COSTA, E. A. Medicinal species with gastroprotective activity found in the Brazilian Cerrado. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, v. 29, p. 238-251, 2015a.

MARTINS, C. N.; MARTINS, D. F.; NASCIMENTO, L. F.; VENZKE, D.; OLIVEIRA, A. S.; FREDERICO, M. J. S.; SILVA, F. R. M. B.; BRIGHENTE, I. M. C.; PIZZOLATTI, M. G.; SANTOS, A. R. S. Ameliorative potential of standardized fruit extract of *Pterodon pubescens* Benth on neuropathic pain in mice: evidence for the mechanism of action. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 175, p. 273-286, 2015b.

MARTINS, C. M. Prospecção fitoquímica e caracterização dos compostos bioativos *Inga laurina* (Sw.) Willd (FABACEAE). *Tese de doutorado*. Curso de química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2017.

MARQUES, D. D.; MACHADO, M. I. L.; CARVALHO, M. G.; MELEIRA, L. A. C.; R. BRAZ-FILHO. Isoflavonoids and triterpenoids isolated from *Pterodon polygalaeflorus*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 9, n. 3, p. 295-301, 1998.

MASCARO, U.C.P.; TEIXEIRA, D.F.; GILBERT, B. Avaliação da sustentabilidade da coleta de frutos de sucupira branca (*Pterodon emarginatus* Vog.) após queda espontânea. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 7, p. 131-138, 2004.

MAURICIO, I. L.; HOWARD, M. K.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. *Parasitology*, v. 119, p. 237-246, 1999.

MCCONVILLE, M. J. Metabolic crosstalk between *Leishmania* and the macrophage host. *Trends in Parasitology*, v. 32, p. 666-668, 2016.

MCGWIRE, B. S.; SATOSKAR, A. R. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. *QJM.*, v. 107, p. 7-14, 2013.

MITTRA, B.; SAHA, A.; CHOWDHURY, A. R.; PAL, C.; MANDAL, S.; MUKHOPADHYAY, S.; BANDYOPADHYAY, S.; MAJUMDER, H. K. Luteolin, an abundant dietary component is a potent anti-leishmanial agent that acts by inducing topoisomerase II-mediated kinetoplast DNA cleavage leading to apoptosis. *Molecular Medicine*, v. 6, p. 527-541, 2000.

MIRANDA, M. L. D.; GARCEZ, F. R.; ABOT, A. R.; GARCEZ, W. S. Sesquiterpenos e outros constituintes das folhas de *Pterodon pubescens* Benth (Leguminosae). *Quim. Nova*, v. 37, n. 3, p. 473-476, 2014.

MONTEIRO, L. M.; LÖBENBERG, R.; FERREIRA, E. I.; COTRIM, P. C.; KANASHIRO, E.; ROCHA, M.; CHIN, C. M.; BOU-CHACRA, N. Targeting *Leishmania amazonensis* amastigotes through macrophage internalisation of a hydroxymethylnitrofurazone nanostructured polymeric system. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 50, p. 88-92, 2017.

MONTINARI, M. R.; MINELLI, S.; CATERINA, R. The first 3500 years of aspirin history from its roots – A concise summary. *Vascular Pharmacology*, v. 113, p. 1-8, 2019.

MORAES, W. F.; GALDINO, P. M.; NASCIMENTO, M. V. M.; VANDERLINDE, F. A.; BARA, M. T. F.; COSTA, E. A.; PAULA, J. R. Triterpenes involved in the anti-inflammatory effect of ethanolic extract of *Pterodon emarginatus* Vogel stem bark. *Journal of Natural Medicines*, v. 66, p. 202-207, 2012.

MORALES-YUSTE, M.; MORILLAS-MÁRQUEZ, F.; MARTIN-SANCHEZ, J.; VALERO-LÓPEZ, A.; NAVARRO-MOLL, M. C. Activity of (-) α -bisabolol against *Leishmania infantum* promastigotes. *International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, v. 17, p. 279-281, 2010.

MORETTO, J.; GIRARD, C.; DEMOUGEOT, C. The role of arginase in aging: a systematic review. *Experimental Gerontology*, n. 116, p. 54-73, 2019.

MORS, W. B.; FILHO, M. F. S.; MONTEIRO, H. J.; GILBERT, B.; E PELLEGRINO, J. Chemoprophylactic agent in schistosomiasis: 14,15-epoxygeranylgeraniol. *Science*, v. 157, n. 3791, p. 950-951, 1967.

MORZELLE, M. C.; BACHIEGA, P.; SOUZA, E. C.; VILAS BOAS, E. V. B.; LAMOUNIER, M. L. Caracterização química e física de frutos de curriola, gabirola e murici provenientes do Cerrado brasileiro. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 37, n. 1, p. 96-103, 2015.

MOURA, A. C. S.; VILEGAS, W.; SANTOS, L. C. Identificação de alguns constituintes químicos de *Indigofera hirsuta* Linn. (Fabaceae) por CLAE-IES-EM (TOF) e avaliação da atividade antirradicalar. *Química Nova*, v. 34, n. 7, p. 1136-1140, 2011.

MOTOSHIMA, R. A.; ROSA, T. F.; MENDES, L. C.; DA SILVA, E. V.; VIANA, S. R. F.; AMARAL, B. S.; DE SOUZA, D. H.F.; LIÃO, L. M.; SILVA, M. L. C.; DE SOUSA, L. R. F.;

CARBONERO, E. R. Inhibition of *Leishmania amazonensis* arginase by fucogalactan isolated from *Agrocybe aegerita* mushroom. *Carbohydrate Polymers*, v. 201, p. 532-538, 2018.

MUZITANO, M. F.; CRUZ, E. A.; DE ALMEIDA, A. P.; DA SILVA, S. A.; KAISER, C. R.; GUETTE, C.; BERGMANN, B. R.; COSTA, S. S. Quercitrin: an antileishmanial flavonoid glycoside from *Kalanchoe pinnata*. *Planta Medica*, v. 72, p. 81-83, 2006.

NACHER, M.; CARME, B.; SAINTE MARIE, D.; COUPPIE, P.; CLYTI, E.; GUIBERT, P.; PRADINAUD, R. Influence of clinical presentation on the efficacy of a short course of pentamidine in the treatment of cutaneous leishmaniasis in French Guiana. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, v. 95, p. 331-336, 2001.

NATHAN, C. Natural resistance and nitric oxide. *Cell*, v. 82, p. 873-876, 1995.

NELSON, DAVID L.; COX, MICHAEL M. Princípios de bioquímica de Lehninger. New York: Freeman and Company. 2014, 6. ed. 200-210 p.

NETO, G. S. G.; COSTA, R. P.; ZANINI, C. L.; AGUIAR, A. C. C.; SOUZA, J. O.; SOUZA, G. E.; SEVERINO, R. P.; CASS, Q. B.; CFRUZ, F. C.; OLIVA, G.; GUIDO, R. V. C.; SOUSA, L. R. F. Chemical Prospection of *Qualea grandiflora* Mart. Fruit and Stem Extracts and Their *in vitro* and *in vivo* Antiplasmodial Activity. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 31, n. 7, p. 1475-1484, 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, p. 770-803, 2020.

NICOLLE, C.; COMTE, C. Origine canine du kala-azar. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, v. 1, p. 299-301, 1908.

NIERO, R.; MALHEIROS, A.; BITTENCOURT, C.M.S.; BIAVATTI, M.W.; LEITE, S.N.; FILHO, V.C. Aspectos químicos e biológicos de plantas medicinais e considerações sobre fitoterápicos IN: CIÊNCIAS FARMACEUTICAS: Contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos. Editora Univali, Itajaí, p. 11-56, 2003.

NUCCI, C.; MARTINS, L. M.; STRAMOSK, J.; BRETHANHA, L. C.; PIZZOLATTI, M. G.; SANTOS, A. R. S.; MARTINS, D. F. Oleaginous extract from the fruits *Pterodon pubescens*

Benth induces antinociception in animal models of acute and chronic pain. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 143, p. 170-178, 2012.

OLIVEIRA, L. F.; SCHUBACH, A. O.; MARTINS, M. M.; PASSOS, S. L.; OLIVEIRA, R. V.; MARZOCHI, M. C.; ANDRANDE, C. A. Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the new world. *Acta Tropica*, v. 118, n. 2, p. 87-96, 2011.

OLIVEIRA, L. A. R. Isolamento, quantificação e avaliação das atividades leishmanicida e tripanocida de furanoditerpenos do oleorresina de *Pterodon* spp. Vogel (Fabaceae). Goiânia. *Dissertação de Mestrado*, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Goiás, p.120, 2014.

OLIVEIRA, A. E. M. F. M.; DUARTE, J. L.; AMADO, J. R. R.; CRUZ, R. A. S.; ROCHA, C. F.; SOUTO, R. N. P.; FERREIRA, R. M. A.; SANTOS, K.; CONCEIÇÃO, E. C.; OLIVEIRA, L. A. R.; KELECOM, A.; FERNANDES, C. P.; CARVALHO, J. C. T. Development of a larvicidal nanoemulsion with *Pterodon emarginatus* Vogel oil. *PLOS ONE*, v. 11, p. 1-16, 2016.

OLIVEIRA, L. A. R., OLIVEIRA, G. A. R., LEMES, G. F., ROMÃO, W., VAZ, B. G., ALBUQUERQUE, S., GONÇALEZ, C., LIÃO, L. M., BARA, M. T. F. Isolation and structural characterization of two new furanoditerpenes from *Pterodon emarginatus* (Fabaceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 28, n. 10, p. 1911-1916, 2017.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Leishmaniasis. Disponível em: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. Acesso em: 18 agosto 2020.

ORYAN, A. Plant-derived compounds in treatment of leishmaniasis. *Iranian Journal of Veterinary Research*, v. 16, p. 1-19, 2015.

PAOLINI, A.; CURTI, V.; PASI, F.; MAZZINI, G.; NANO, R.; CAPELLI, E. Gallic acid exerts a protective or an anti-proliferative effect on glioma T98G cells via dose-dependent epigenetic regulation mediated by miRNAs. *International Journal of Oncology*, v. 46, p. 1491-1497, 2015.

PENTO-ROL, E.; BORASCHI, D. Chapter 11 – Natural Products: Immuno Rebalancing Therapeutic Approaches. *Immune Rebalancing The Future of Immunosuppression*, p. 229-249, 2016.

PESSÔA, P. A. P. Avaliação das propriedades do óleo de buriti (*Mauritia flexuosa* L.) e sua aplicação em creme vegetal. *Tese de doutorado*. Curso de Engenharia e Ciência de Alimentos, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2017.

PIMENTA, A. T. A., SANTIAGO, G. M. P., ARRIAGA, A. M. C., MENEZES, G. H. A., BEZERRA, S. B. Estudo fitoquímico e avaliação da atividade larvicida de *Pterodon polygalaeflorus* Benth. (Leguminosae) sobre *Aedes aegypti*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 16, p. 501-505, 2006.

PINTO, F. A.; VIGLIANO, M. V.; LEAL, N. R. F.; SILVA, G. P.; MARQUES, P. R.; VELOZO, L. S. M.; SABINO, K. C. C.; COELHO, M. G. P. Phytochemical and pharmacological analysis of *Pterodon polygalaeflorus* extracts. *Pharmacology online*, v. 3, p. 56-70, 2013.

RABELING, S. C.; LIM, J. L.; TIDON, R.; NEFF, J. L.; SIMPSON, B. B.; PAWAR, S. Seasonal variation of a plant-pollinator network in the Brazilian Cerrado: Implications for community structure and robustness. *PLoS ONE*, v. 14, p. 1-22, 2019.

RATH, S.; TRIVELIN, L. A.; IMBRUNITO, T. R.; TOMAZELA, D. M.; DE JESÚS, M. N.; MARZAL, P. C. Antimonials employed in the treatment of leishmaniasis: the state of the art. *Quimica Nova*, v. 26, n. 4, p. 550-555, 2003.

REIS, A. F.; SCHMIELE, M. Characteristics and potentialities of Savanna fruits in the food industry. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 22, p. 1-12, 2019.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J. C.; LOUZIR, H.; PIRMEZ, C.; ALEXANDER, B.; BROOKER, S. Cutaneous leishmaniasis. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 7, p. 581-596, 2007.

RIBEIRO, T. G.; NASCIMENTO, A. M.; HENRIQUES, B. O.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M. A.; FRANCA, J. R.; DUARTE, M. C.; LAGE, P. S.; ANDRADE, P. H. R.; LAGE, D. P.; RODRIGUES, L. B.; COSTA, L. E.; MARTINS, V. T.; FARACO, A. A. G.; COELHO, E. A.

F.; CASTILHO, R. O. Antileishmanial activity of standardized fractions of *Stryphnodendron obovatum* (Barbatimão) extract and constituent compounds. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 165, p. 238-242, 2015.

ROGERS, M. E. The role of leishmania proteophosphoglycans in sand fly transmission and infection of the mammalian host. *Frontiers in Microbiology*, v. 3, p. 1-13, 2012.

ROY, P.; AMDEKAR, S.; KUMAR, A.; SINGH, R.; SHARMA, P.; SINGH, V. In vivo antioxidative property, antimicrobial and wound healing activity of flower extracts of *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl) Miers. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 140, p. 186-192, 2012.

SANGENITO, L. S.; DA SILVA, V. S.; D'AVILA-LEVY, C. M.; BRANQUINHA, M. H.; SOUZA, A. L. S.; DE OLIVEIRA, S. S. C. Leishmaniasis and chagas disease-neglected tropical diseases: treatment updates. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, v. 19, p. 174-177, 2019.

SANTANA, B. B. E. Estudo comparativo da arginase em *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *L. (Viannia) braziliensis* e *L. (L.) infantum*. Tese de doutorado – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2019.

SANTOS, A. P.; ZATTA, D. T.; MORAES, W. F.; BARA, M. T. F.; FERRI, P. H.; SILVA, M. R. R.; PAULA, J. R. Composição química, atividade antimicrobiana do óleo essencial e ocorrência de esteroides nas folhas de *Pterodon emarginatus* Vogel, Fabaceae. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 20, n. 6, p. 891-896, 2010.

SANTOS, E. S.; GARCIA, F. P.; OUTUKI, P. M.; HOSCHEID, J.; GOES, P. R. N.; FILHO, L. C.; NAKAMURA, C. V.; CARDOSO, M. L. C. Optimization of extraction method and evaluation of antileishmanial activity of oil and nanoemulsions of *Pterodon pubescens* benth. fruit extracts. *Experimental Parasitology*, v. 170, p. 252-260, 2016.

SANTOS, D. S.; RODRIGUES, M. M. F. Atividades farmacológicas dos flavonoides: um estudo de revisão. *Estação Científica (UNIFAP)*, v. 7, n. 3, p. 29-35, 2017.

SARJIT, A.; WANG, Y.; DYKES, G. A. Antimicrobial activity of gallic acid against thermophilic *Campylobacter* is strain specific and associated with a loss of calcium ions. *Food Microbiology*, v. 46, p. 227-233, 2015.

SAWAYA, A. C. H. F.; COSTA, Y. D.; MAZZAFERA, P. Unraveling the Biosynthesis of Pilocarpine in *Pilocarpus microphyllus*. *Natural Product Communications*, v. 10, p. 721-724, 2015.

SCIGELOVA, M.; HORNSHAW, M.; GIANNAKOPULOS, A.; MAKAROV, A. Fourier transform mass spectrometry. *Molecular & Cellular Proteomics*, v. 10, p. 1-19, 2011.

SEARLE, P. L. The Berthelot or indophenol reaction and its use in the analytical chemistry of nitrogen. *Analyst*, v. 109, p. 549-598, 1984.

SERVAT, L.; SPINDOLA, H.M.; QUEIROZ, DE C.A.M; MAIOCHI, C.A.; SOUSA, I.M.O; RODRIGUES, R.A.F.; RUIZ, A.L.T.G.; TINTI, S.V.; CARVALHO, J.E.; FOGLIO, M.A. Estabilidade de microcápsulas produzidas com vouacapanos isolados das sementes de *Pterodon pubescens*, in: *Anais da 33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*. Águas de Lindóia, 2012.

SHI, X.; NIU, L.; ZHAO, L.; WANG, B.; JIN, Y.; LI, X. The antiallergic activity of flavonoids extracted from *Citri Reticulatae* Pericarpium. *Journal of Food Processing and Preservation*, v. 42, p. 1-7, 2018.

SILVA, T. F.; OLIVEIRA, A. B. Plantas leishmanicidas da Amazônia Brasileira: uma revisão. *Revista Fitos Eletrônica*, v. 10, n. 3, p. 339-363, 2017.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia: Da planta ao medicamento*. 6. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Universidade/ Universidade Federal do Rio Grande do Sul/ Da Universidade Federal de Santa Catarina, p. 1-1102, 2010.

SOARES, L. V.; MELO, R.; OLIVEIRA, W. S.; SOUZA, P. M.; SCHMIELE, M. Brazilian Cerrado fruits and their potential use in bakery products. In H. Lewis (Ed.), *Bread: Consumption, cultural significance and health effects* (Cap. 5, p. 125-160). New York: Nova Publisher.

SOUSA, C. B.; GANGADHAR, K. N.; MORAIS, T. R.; CONSERVA, G. A. A.; VIZETTO-DUARTE, C.; PEREIRA, H.; LAURENTI, M. D.; CAMPINO, L.; LEVY, D.; UEMI, M.; BARREIRA, L.; CUSTÓDIO, L.; PASSERO, L. F. D.; LAGO, F. H.; VARELA, J.

Antileishmanial activity of meroditerpenoids from the macroalgae *Cystoseira baccata*. *Experimental Parasitology*, v. 174, p. 1–9, 2017.

SOUZA, G. H. B.; MELLO, J. C. P.; LOPES, N. P. Farmacognosia: coletânea científica. Ouro Preto: editora, UFOP, 2011.

SPAGNUOLO, C.; MOCCIA, S.; RUSSO, G. L. Anti-inflammatory effects of flavonoids in neurodegenerative disorders. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 153, p. 105-115, 2018.

SPINDOLA, H. M.; CARVALHO, J. E.; RUIZ, A. L. T. G.; RODRIGUES, R. A. F.; DENNY, C.; SOUSA, I. M. O.; TAMASHIRO, J. Y.; FOGLIO, M. A. Furanoditerpenes from *Pterodon pubescens* Benth with selective in vitro anticancer activity for prostate cell line. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 20, n. 3, p. 569-575, 2009.

STEBUT, E.V. Leishmaniasis. *Journal of the German Society of Dermatology*. v. 13, p. 191-201, 2015.

STEVERDING, D. The history of leishmaniasis. *Parasites & Vectors*, v. 10, p. 1-10, 2017.

STRASSBURG, B.; BROOKS, T.; FELTRAN-BARBIERI, R.; IRIBARREM, A.; CROUZEILLES, R.; LOYOLA, R.; LATAWIEC, A.; OLIVEIRA FILHO, F. J.; MATTOS, C. S.; SCARANO, F.; FILHO, B.; BALMFORD, A. Moment of truth for the Cerrado hotspot. *Nature Ecology and Evolution*. v. 1, p. 1-3, 2017.

TEMPONE, A. G.; OLIVEIRA, M. C.; BERLINCK, R. G. Current approaches to discover marine antileishmanial natural products. *Planta Medica*, v. 77, p. 572-585, 2011.

THERNIER, C. G.; PHAM, T. N.; DEMOUGEOT, C. The promise of plant-derived substances as inhibitors of arginase. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, v. 15, p. 798-808, 2015.

TOLEDO, C. E. M.; BRITTA, E. A.; CEOLE, L. F.; SILVA, E. R.; MELLO, J. C. P.; DIAS FILHO, B. P.; NAKAMURA, C. V.; NAKAMURA, T. U. Antimicrobial and cytotoxic activities of medicinal plants of the Brazilian Cerrado using Brazilian cachaça as extractor liquid. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 133, p. 420-425, 2011.

VARELA, M. T.; LIMA, M. L.; GALUPPO, M. K.; TEMPONE, A. G.; DE OLIVEIRA, A.; LAGO, J. H. G.; FERNANDES, J. P. S. New alkenyl derivative from *Piper malacophyllum* and analogues: antiparasitic activity against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania infantum*. *Chemical Biology & Drug Design*, v. 90, p. 1007-1011, 2017.

VELTRI, E. P. P. Desenvolvimento de uma estratégia para a prospecção de fármacos inibidores da enzima esterol 24-C-metiltransferase (ERG6) de *Leishmania* spp. *Dissertação de mestrado* – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2019.

VERMELHO, A. B.; SUPURAN, C. T.; CARDOSO, V.; MENEZES, D.; DE ANDRADE SILVA, J. R.; FERREIRA, J. L. P.; AMARAL, A. C. F.; RODRIGUES, I. A. Leishmaniasis: possible new strategies for treatment. In: Claborn, D. (Ed.), *Leishmaniasis trends in Epidemiology, Diagnosis and Treatment*, 2014.

VIEIRA, C. R.; MARQUES, M. F.; SOARES, P. R.; MATUDA, L.; DE OLIVEIRA, C. M. A.; KATO, L.; DA SILVA, C. C.; GUILLO, L. A. Antiproliferative activity of *Pterodon pubescens* Benth. seed oil and its active principle on human melanoma cells. *International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, v. 15, p. 528-532, 2008.

VIEIRA, R. F.; CAMILLO, J.; CORADIN, L. Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro: região Centro-Oeste. *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-Livro científico*, 2016.

WANG, X.; DING, G.; LIU, B.; WANG, Q. Flavonoids and antioxidant activity of rare and endangered fern: *Isoetes sinensis*. *PLOS ONE*, v. 15, p. 1-12, 2020.

WERBOVETZ, K. A.; LEHNERT, E. K.; MACDONALD, T. L.; PEARSON, R. D. Cytotoxicity of acridine compounds for *Leishmania* promastigotes in vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 36, n. 2, p. 495-497, 1992.

WU, G.; MORRIS, S. M. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochemical Journal*, v. 336, p. 1-17. 1998.

YANG, Y. H.; WANG, Z.; ZHENG, J.; WANG, R. Protective effects of gallic acid against spinal cord injury-induced oxidative stress. *Molecular Medicine Reports*, v. 12, p.3017-3024, 2015.

ZELLNER, B. D.; AMORIM, A. C. L.; MIRANDA, A. L. P.; ALVES, R. J. V.; BARBOSA, J. P.; COSTA, G. L. da; REZENDE, C. M. Screening of the Odour Activity and Bioactivity of the Essential Oils of Leaves and Flowers of *Hyptis passerina* Mart. from the Brazilian Cerrado. *Journal of the Brazilian Chemistry Society*, v. 20, p. 322-332, 2009.

ZEOUK, I.; SIFAOU, I.; LÓPEZ-ARENCIBIA, A.; REYER-BATLLE, M.; BETHENCOURT-ESTRELLA, C. J.; BAZZOCHI, I. G.; BEKHTI, K.; LORENZO-MORALES, J.; JIMÉNEZ, I. A.; PIÑERO, J. E. Sesquiterpenoids and flavonoids from *Inula viscosa* induce programmed cell death in kinetoplastids. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 130, p. 1-15, 2020.

ZHANG, A.; SUN, H.; WANG, X. Recent advances in natural products from plants for treatment of liver diseases. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 63, p. 570-577, 2013.

ZHOU, F.; PICHERSKY, E. The complete functional characterisation of the terpene synthase family in tomato. *New Phytologist*, v. 226, p. 1341-1360, 2020.