



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Universidade Federal de Catalão
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química

**PROSPECÇÃO QUÍMICA DE PLANTAS DO CERRADO E SUA INFLUÊNCIA
NA ATIVIDADE LEISHMANICIDA**

LÉIA DA COSTA MENDES

Catalão - GO
2021

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

Léia da Costa Mendes

3. Título do trabalho

PROSPECÇÃO QUÍMICA DE PLANTAS DO CERRADO E SUA INFLUÊNCIA NA ATIVIDADE LEISHMANICIDA

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

Concorda com a liberação total do documento [X] 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.



Documento assinado eletronicamente por **Lorena Ramos Freitas De Sousa, Professor do Magistério Superior**, em 01/07/2021, às 17:09, 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 **LEIA DA COSTA MENDES, Discente**, em 01/07/2021, às 22:22, 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 **2179938** e o código CRC **CCA2AC02**.

LÉIA DA COSTA MENDES

**PROSPECÇÃO QUÍMICA DE PLANTAS DO CERRADO E SUA INFLUÊNCIA NA ATIVIDADE
LEISHMANICIDA**

Dissertação de mestrado apresentado ao programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal Catalão, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE EM QUÍMICA.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Lorena Ramos Freitas de Sousa

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

MENDES, LÉIA DA COSTA
PROSPECÇÃO QUÍMICA DE PLANTAS DO CERRADO E SUA
INFLUÊNCIA NA ATIVIDADE LEISHMANICIDA / LÉIA DA COSTA
MENDES. - 2021.
148, CXLVIII f.

Orientadora: Profa. Dra. LORENA RAMOS FREITAS DE SOUSA.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Catalão, Instituto
de Química, Catalão, Programa de Pós-Graduação em Química,
Catalão, 2021.

Bibliografia. Anexos.

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

1. Arginase. 2. Inibidores enzimáticos. 3. Leishmaniose. I. SOUSA,
LORENA RAMOS FREITAS DE, orient. II. Título.

CDU 66.0

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Ata nº 10 da sessão de Defesa de Dissertação de Léia da Costa Mendes, que confere o título de Mestre em Química, no Programa de Pós-Graduação em Química da UFG - Regional Catalão

Aos dezoito dias do mês de junho de dois mil e vinte e um, a partir das 14:00 horas, por videoconferência, realizou-se a sessão pública de Defesa de Dissertação intitulada “ANÁLISE DOPERFIL METABOLÔMICO DE PLANTAS DO CERRADO E SUA INFLUÊNCIA NA ATIVIDADE INIBITÓRIA DA ARGINASE DE *Leishmania amazonensis*” na área de concentração em Química. Os trabalhos foram instalados pela Orientadora, Professora Doutora Lorena Ramos Freitas de Sousa (UAEQ/UFG-RC) com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Doutor Emerson Finco Marques (USP), membro titular externo; Professora Doutora Elaine Rosechrer Carbonero (UAEQ/UFG-RC), membro titular interno, cujas participações ocorreram por meio de videoconferência. Durante a arguição os membros da banca fizeram sugestões de alterações e da reestruturação do trabalho final para melhor organização e linearidade dos resultados encontrados. 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.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA

PROSPECÇÃO QUÍMICA DE PLANTAS DO CERRADO E SUA INFLUÊNCIA NA ATIVIDADE LEISHMANICIDA



Documento assinado eletronicamente por **Lorena Ramos Freitas De Sousa, Professor do Magistério Superior**, em 18/06/2021, às 18:18, 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 18/06/2021, às 18:22, 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 **Emerson Finco Marques, Usuário Externo**, em 29/06/2021, às 14:19, 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 2133935 e o código CRC 19DA5FD9.

Dedico este trabalho...

A Deus por sempre estar ao meu lado.

*A minha orientadora pelos ensinamentos e
orientação.*

Ao meu esposo pelo apoio e companheirismo.

*Aos amigos e familiares que estiveram presentes
direta ou indiretamente na busca desse sonho.*

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Lorena Ramos Freitas de Sousa, pela orientação e ensinamentos transmitidos com muito profissionalismo. Muito obrigada pela paciência, apoio, amizade, confiança e carinho. Aprendi muito com você!

*À Prof.^a Dr.^a Dulce Helena F. de Souza, da Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR) por nos ceder a enzima arginase de *L. amazonensis* para a realização dos ensaios enzimáticos.*

À Profa. Dr.^a Quezia Bezerra Cass, da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) pelas análises por CLUE-IES-QqTOF-EM/EM.

*À Prof.^a Dr.^a Izabela M. Dourado Bastos, da Universidade de Brasília (UNB) pela realização dos ensaios in vitro em *L. infantum*.*

Ao Prof. Dr. Christian Kersten, de Johannes Gutenberg Universität Mainz- Alemanha, pela realização dos estudos de modelagem molecular.

Ao Laboratório de Multiusuário do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia – UFU, pela realização dos experimentos de RMN.

Aos professores do Instituto de Química da Universidade Federal de Catalão (UFCAT), em especial à Prof.^a Dr.^a Elaine Rosechrer Carbonero, por ceder extratos de fungos para avaliação na enzima arginase, e pela convivência e apoio no laboratório. À Prof.^a Dr.^a Richele Priscila Severino pelas suas contribuições nesse trabalho e o Prof. Dr. Alberthmeiry Teixeira de Figueiredo, por permitir o uso do espectrofotômetro.

Ao Geraldo Gonçalves de Sousa Neto, pela contribuição na execução deste trabalho, e pela amizade.

À Tainara da Fonseca Rosa, minha companheira de bancada, pela amizade.

A todos os meus colegas do Laboratório de Bioquímica e Química Orgânica (LaBiOrg) da UFCAT, pelos momentos de descontração, de estudo e de troca de conhecimentos.

À minha família e meus amigos em especial ao meu esposo, pelo apoio, amor, carinho, compreensão e orações.

A Deus pela minha vida e por sempre me dar forças para superar todas as dificuldades.

À CAPES pela concessão da bolsa.

Aos órgãos de fomento CAPES e CNPQ pelo suporte financeiro.

“A verdadeira coragem é ir atrás de seus sonhos mesmo quando todos dizem que ele é impossível”. [Cora Coralina]

RESUMO

A busca de inibidores de arginase, uma metaloenzima de *Leishmania* sp. tem sido uma alternativa para interferir nas vias metabólicas que envolvem esta enzima essencial para o desenvolvimento do protozoário das leishmanioses, que é um grave problema de saúde pública mundial. Inibidores de arginase de *Leishmania amazonensis* (La_{ARG}) oriundo de Produtos Naturais (PNs) têm sido encontrados, tais como os metabólitos de plantas. Entretanto, diversas classes de metabólitos secundários de plantas ainda não foram investigadas frente à La_{ARG} . Diante desses fatores, foi realizado uma triagem *in vitro* de extratos de plantas frente à La_{ARG} e ao protozoário de *Leishmania*. Os extratos etanólicos que apresentaram atividade inibitória significativa superiores à 70%, avaliados a 25 $\mu\text{g/mL}$, foram das plantas *Drimys brasiliensis*, *Tabebuia ochracea*, *Erythroxylum suberosum* e *Qualea grandiflora*. Para a espécie *Q. grandiflora*, além da atividade inibitória da arginase, foi investigado a variação metabólica das cascas do caule de espécimes coletadas em diferentes localidades, do Cerrado de Goiás (Catalão-GO) e do Cerrado paulista (São Carlos-SP) e sobre a influência do estresse abiótico, queimada. Dentre os extratos etanólicos avaliados apenas o das folhas de *T. ochracea* tiveram inibição efetiva das formas promastigotas de *Leishmania infantum* com 87,41% de inibição (concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$). A prospecção química dos extratos ativos das cascas do caule e folhas de *D. brasiliensis* e das frações de acetato de etila das flores e das cascas do caule de *Q. grandiflora* foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (para *Q. grandiflora*), Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplado a Espectrometria de Massas de Alta Resolução e por experimentos de Ressonância Magnética Nuclear para ambas as espécies. Através da análise dos espectros de massas usando bases de dados de diferentes bibliotecas e com a utilização de *molecular networking* (GNPS) identificou-se 12 compostos da espécie *D. brasiliensis* pertencentes as classes dos flavonoides, ácidos hidroxicinâmicos, aldeído e ácido dihidroxibenzóico. O estudo de modelagem molecular também foi realizado com alguns compostos previamente identificados em *D. brasiliensis* e *E. suberosum* e com os 12 compostos identificados de *D. brasiliensis* neste trabalho. Na *Q. grandiflora* de Goiás (QgCcEcA-GO) foram encontrados 9 compostos e após a influência das queimadas (QgCcEqA) 12 compostos, dentre estes, ácido elágico, ácido gálico, galotaninos, elagitaninos e flavonoides. Das flores foram caracterizados 19 compostos pertencentes a classe dos flavonoides, galotaninos, derivados de ácido elágico, ácidos carboxílicos e

hidroxicinâmico. A docagem molecular revelou que a afinidade desses compostos naturais foi menor quando comparada com a do inibidor (*R*)-2-amino-6-borono-2-[1-(3,4-diclorobenzil)piperidin-4-il] ácido hexanóico (*score* -32,95 kJ/mol), composto com estrutura análoga ao substrato natural (L-arginina) da arginase, e nenhum dos produtos naturais avaliados apresentaram interações com o íon Mn^{2+} no sítio catalítico da enzima. Os compostos com melhores afinidades observadas pelos valores de scores foram o alcaloide (**110**) de *E. suberosum* com interações similares ao inibidor competitivo ABHDP (-16,91 kJ/mol) e o ácido dihidroxibenzóico (**5C**) de *D. brasiliensis* (-13,64 KJ/mol).

Palavras chave: Arginase, Inibidores enzimáticos, Leishmaniose.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 – Fármacos utilizados no tratamento das leishmanioses.....	3
FIGURA 1.2 - Reação enzimática catalisada pela arginase.....	4
FIGURA 1.3 - Via metabólica do substrato de L-arginina	4
FIGURA 1.4 - Estruturas de compostos inibidores de arginase de <i>L. amazonensis</i>	8
FIGURA 1.5 - Estruturas químicas de alguns dos compostos identificados no gênero <i>Drimys</i>	9
FIGURA 1.6 - Compostos isolados das folhas e raízes de <i>D. brasiliensis</i>	10
FIGURA 1.7 - Compostos isolados das cascas da espécie <i>D. brasiliensis</i>	11
.	
FIGURA 1.8 - Compostos identificados em óleos essenciais das folhas e cascas da espécie <i>D. brasiliensis</i>	11
FIGURA 1.9 - Metabólitos secundários identificados de diferentes espécies de <i>Qualea</i>	12
FIGURA 1.10 - Estruturas químicas dos flavonoides glicosilados e terpenos isolados das folhas de <i>Q. grandiflora</i>	14
FIGURA 1.11 - Estruturas químicas identificadas da casca do caule de <i>Q. grandiflora</i> ...	15
FIGURA 1.12 – Estruturas químicas identificadas em extratos da casca do caule e fruto de <i>Q. grandiflora</i>	18
FIGURA 1.13 – Metabólitos secundários que apresentaram variações relatadas na literatura após a ação do fogo.....	22

FIGURA 1.14 - Metabólitos secundários que apresentaram variações relatadas na literatura pela ação da temperatura	23
FIGURA 1.15 - Metabólitos secundários que apresentaram variações relatadas na literatura pela diferença de latitude.....	24
FIGURA 1.16 - Metabólitos secundários que apresentaram variações relatadas na literatura por diferentes tipos de solo.....	24
FIGURA 1.17 – Esquema de construção de Redes moleculares a partir do alinhamento de espectros EM/EM.....	25
FIGURA 3.1 - <i>Q. grandiflora</i> coletadas no cerrado da UFSCar.....	31
FIGURA 3.2 - <i>Q. grandiflora</i> coletadas no cerrado de Goiás.....	32
FIGURA 3.3 - Cascas do caule de <i>Q. grandiflora</i> do Cerrado goiano coletadas de espécimes queimadas e não queimadas na mesma região.....	33
FIGURA 3.4 - Cascas do caule de <i>Q. grandiflora</i> queimadas e não queimadas coletadas no cerrado goiano.....	34
FIGURA 4.1- Triagem dos extratos de espécies provenientes do cerrado frente às enzimas arginase e urease.....	43
FIGURA 4.2- Alcalóides identificados na fração clorofórmica das folhas de <i>E. suberosum</i>	44
FIGURA 4.3- Triagem do extrato etanólico das folhas (ESFE) e da fração diclorometano da espécie <i>E. suberosum</i> frente às enzimas arginase e urease.....	44
FIGURA 4.4 - Triagem dos extratos e frações das cascas do caule de <i>Q. grandiflora</i> frente às enzimas arginase e urease.....	46

FIGURA 4.5 - Triagem das frações da espécie <i>Q. grandiflora</i> frente às enzimas arginase e urease.....	47
FIGURA 5.1 - Espectro de RMN de ¹ H com ampliação das regiões δ 5.5 a 7.5 e δ 2.8 a 5.5 para o extrato etanólico da casca do caule de <i>Drimys brasiliensis</i> (DBCcE) (400MHZ, DMSO-d6)	48
FIGURA 5.2 - Espectro de RMN de ¹ H com ampliação da região δ 5.9 a 7.3 do espectro de RMN de ¹ H para o extrato DBFE. (400MHZ, DMSO-d6)	49
FIGURA 5.3 - Espectro de RMN ¹ H das frações. A. controle (QgCcEcA) e B. queimada (QgCcEqA).....	50
FIGURA 5.4- Espectro de RMN ¹ H das frações QgCcEcA e QgCcEA SP.....	51
FIGURA 5.5- Espectro de RMN ¹ H das frações obtidas do extrato etanólico das flores de <i>Q. grandiflora</i>	52
FIGURA 6.1 - Espectro gerado após a análise por CLAE-DAD para as frações QgCcEcA e QgCcEqA	53
FIGURA 6.2 - Cromatogramas dos padrões sobrepostos às frações de acetato de etila da planta controle (QgCcEcA) e queimada (QgCcEqA).....	55
FIGURA 6.3 - Espectro das frações QgCcEcA e QgCcEA SP.....	56
FIGURA 6.4 - Espectros do padrão de ácido elágico e fração QgCcEA SP sobrepostos.....	57
FIGURA 7.1 - Proposta de fragmentação do dímero de flavan-3-ol (procianidina) (4C).....	60

FIGURA 7.2 - Proposta de fragmentação da quercetina- <i>O</i> -ramnosídeo (1F)	60
FIGURA 7.3 - Proposta de fragmentação da quercetina- <i>O</i> -hexosídeo (2F)	61
FIGURA 7.4 - Proposta de fragmentação da taxifolina (4F)	62
FIGURA 7.5 - Proposta de fragmentação da astilbina (6C)	62
FIGURA 7.6 - Proposta de fragmentação do 3- <i>O</i> -ácido cafeoilquínico (2C).....	64
FIGURA 7.7 - Proposta de fragmentação de ácido coumaroilquínico (5F)	64
FIGURA 7.8 - Estruturas dos metabólitos identificados no extrato DBCcE.....	65
FIGURA 7.9 - Estruturas dos metabólitos identificados no extrato DBFE.....	66
FIGURA 7.10 - Proposta de fragmentação do ácido metilelágico- <i>O</i> - hexopiranosídeo (2QQ) e (2QC)	69
FIGURA 7.11 - Proposta de fragmentação de pedunculagina (5QC) e (5QQ)	70
FIGURA 7.12 - Metabólitos secundários identificados na fração de acetato etila das Cascas do caule da espécie <i>Q. grandiflora</i> coletada no cerrado de Goiás antes da queimada	71
FIGURA 7.13 - Metabólitos secundários identificados na fração acetato de etila das cascas do caule da espécie <i>Q. grandiflora</i> coletada no cerrado de Goiás após influência da queimada.....	72
FIGURA 7.14 - Proposta de fragmentação de digaloil-hexose (10QFI)	77
FIGURA 7.15 - Metabólitos secundários identificados na fração de acetato de etila das flores de <i>Q. grandiflora</i>	78

FIGURA 8.1 - Rede molecular gerada para os extratos da casca do caule e folhas de <i>D. brasiliensis</i>	82
FIGURA 8.2 - Cluster FLA com os espectros da literatura fornecido pela biblioteca e espectral do GNPS e espectro experimental para os flavonoides anotados e identificados.....	84
FIGURA 8.3 - Cluster AC. HID com os espectros da literatura fornecido pela biblioteca espectral do GNPS e espectro experimental para os ácidos hidroxicinâmicos anotados e identificados.....	85
Figura 8.4 - Cluster AC. FEN. com os espectros da literatura e espectro experimental para o composto anotado e identificado.....	87
FIGURA 8.5 - Rede molecular ampliada com nodos destacados para os 3 compostos identificados.....	88
FIGURA 9.1 - Estrutura cristalográfica do complexo trimérico <i>Lm</i> _{ARG} -ABH, arginase de <i>Leishmania mexicana</i> com o análogo do substrato (ácido 2-(S)-amino-6-boronohexanóico) PDB-ID 5HJA.....	90
FIGURA 9.2 - (a) Alinhamento entre a estrutura cristalográfica (ligante apresentado com átomos na cor amarelo), código PDB-ID 5HJA e a redocagem com o complexo ligante <i>Lm</i> _{ARG} -ABH _{DP} (ABH _{DP} , apresentado com átomos em azul) (b) Estrutura química do ligante (ABH _{DP}).	91
FIGURA 9.3 - Compostos utilizados nos estudos de modelagem molecular.....	92
FIGURA 9.4 - Imagem da docagem molecular do composto 110	93

LISTA DE TABELAS E FLUXOGRAMAS

TABELA 1.1- Inibição da arginase recombinante de <i>L. amazonensis</i> por PNs.....	6
TABELA 1.2- Compostos identificados em extratos da casca do caule e fruto de <i>Q. grandiflora</i>	15
TABELA 1.3 - Espécies de plantas avaliadas frente à <i>La</i> _{ARG}	19
TABELA 3.1- Programação do método MET-OTM 2	36
TABELA 4.1 - Quantidade de massa obtida das frações após procedimento de partição líquido-líquido.....	41
TABELA 7.1 - Metabólitos secundários identificados nos extratos DBCcE e DBFE.....	67
TABELA 7.2 - Metabólitos secundários identificados na fração de acetato de etila das cascas do caule da espécie <i>Q. grandiflora</i> coletada no cerrado de Goiás antes e após influência da queimada.....	73
TABELA 7.3 - Metabólitos secundários identificados na fração de acetato de etila das flores de <i>Q. grandiflora</i>	79
TABELA 9.1 - Valores de energia de interação obtidos por docagem molecular com moléculas identificadas em <i>D. brasiliensis</i> por CLUE-EM/EM.....	94
TABELA 10.1 - Percentual de inibição das formas promastigotas de <i>L. infantum</i> por extratos etanólicos provenientes de plantas do cerrado.....	95
FLUXOGRAMA 3.1 – Partição líquido-líquido dos extratos QgCcEc, QgCcEq e QgCcE SP.....	34
FLUXOGRAMA 3.2 – Partição líquido-líquido do extrato QgFIE.....	35

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	microgramas
µM	micromolar
°C	Graus Celsius
ARG	Arginase
CHES	Ácido 2- (ciclohexilamino) etanosulfônico
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DMSO	Dimetilsulfóxido
E:I:S	enzima-inibidor-substrato
GNPS	Global Natural Products Social Molecular <i>Networking</i>
¹ H RMN	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
IC ₅₀	Potência inibitória
kDa	Quilodalton
Ki	Constante de afinidade do inibidor
Km	Quilômetro
mg	miligramas
MHz	Mega hertz
mL	mililitros
mM	milimolar
PNs	Produtos naturais
PAs	Poliaminas
pH	potencial Hidrogeniônico
SBF	Soro bovino fetal
TRIS	2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol
RDA	Retro-Diels-Alder

Sumário

RESUMO	IV
1 – INTRODUÇÃO	1
1.1 - Leishmaniose	1
1.2 - Enzima Arginase de <i>Leishmania amazonensis</i>	3
1.3 - Produtos Naturais Inibidores de Arginase	5
1.3.1- O Gênero <i>Drimys</i>	8
1.3.2 - A espécie <i>Drimys brasiliensis</i>	10
1.3.3 – O Gênero <i>Qualea</i>	12
1.3.4 - A espécie <i>Qualea grandiflora</i>	13
1.3.5 – Extratos Vegetais Investigados frente à <i>La_{ARG}</i>	18
1.3.6 - Influência da queimada, temperatura e geoclima local na produção de metabólitos secundários.....	21
1.3.7 - Plataforma GNPS (Global Natural Products Social Molecular Networking)	24
1.3.8 – Estudo <i>in silico</i> em busca de inibidores enzimáticos	26
2 – OBJETIVOS	27
2.1 - Objetivo Geral.....	27
2.2 - Objetivos Específicos	27
3 - PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	28
3.1- Materiais	28
3.1.1 – Solventes.....	29
3.1.2 - Padrões utilizados	29
3.2 – Equipamentos	29
3.3 – Coleta, Identificação do Material Biológico.....	30
3.4 - Obtenção dos extratos e frações de <i>Qualea grandiflora</i>	33
3.5 - Condições experimentais para as análises por CLAE-DAD	35
3.6- Condições Experimentais para as Análises por CLUE-IES-QqTOF-EM/EM	36
3.7- Geração de redes moleculares através do GNPS	37
3.8 - Análise por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio	37
3.9 - Avaliação de Inibição de Formas Promastigotas de <i>L. infantum</i> com Extratos Vegetais	38
3.10 – Ensaio de Inibição Enzimática da Arginase de <i>Leishmania amazonensis</i>	38
3.11 - Estudos de Modelagem Molecular.....	40

4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES	41
4.1 - Rendimento dos extratos obtidos	41
4.2 - Inibição enzimática da La_{ARG} por extratos etanólicos e frações de plantas do cerrado	42
5 - Perfil químico dos extratos de extratos e frações por RMN de 1H	48
5.1 - <i>Drimys brasiliensis</i>	48
5.2 - <i>Q. grandiflora</i>	49
6- Resultados das análises por CLAE-DAD	52
7 - Identificação de metabólitos secundários por CLUE-IES-QqTOF-EM/EM	57
7.1- Metabólitos secundários de <i>D. brasiliensis</i>	57
7.1.1 - Flavonoides	59
7.1.2 – Ácidos hidroxicinâmicos	63
7.1.3 - Benzaldeído e ácido hidroxibenzóico	65
7.2 - Metabólitos secundários da espécie <i>Q. grandiflora</i>	68
7.2.1 - Casca do caule	68
7.2.2 - Flores	75
8 – Identificação dos metabólitos secundários através das redes moleculares	81
8.1 - Flavonoides identificados pelas redes moleculares – Cluster FLA	83
8.2 - Ácidos hidroxinâmicos identificados pelas redes moleculares – Cluster AC. HID	85
8.3 – Ácido benzóico identificado pelas redes moleculares – Cluster AC. FEN.	86
8.4 – Outras substâncias identificadas pelas redes moleculares	87
9 - Modelagem molecular	88
9.1 - Modelo da enzima utilizada para a triagem virtual	88
9.2 - Triagem virtual de compostos selecionados e identificados por CLUE-IES-QqTOF-EM/EM utilizando a enzima arginase (Lm_{ARG})	91
10 - Avaliação dos extratos de plantas frente às formas promastigotas de <i>L. infantum</i>	94
11 – CONSIDERAÇÕES FINAIS	97
12 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99
13 – ANEXO	118

NOTA NAS TESES/DISSERTAÇÕES

Os Programas de Pós-Graduação *stricto sensu* em funcionamento na Universidade Federal de Catalão (UFCAT), em virtude de procedimentos técnicos relacionados à CAPES, continuam provisoriamente vinculados à Universidade Federal de Goiás (UFG), por isso, todos os elementos pré-textuais do trabalho apresentado estão identificados como Universidade Federal de Goiás/Universidade Federal de Catalão em implantação, em função da migração da BDTD ter ocorrido a partir de 16 de agosto de 2021, assim como pelo fato das pesquisas e produtos serem realizados na UFCAT.

1 – INTRODUÇÃO

1.1 - Leishmaniose

A leishmaniose é uma doença zoonótica que acomete o homem e é causada por protozoários de diferentes espécies de *Leishmania* (*L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. tropica*, *L. guyanensis*, *L. cruzi*, entre outras). O protozoário é transmitido pela fêmea do flebotomíneo hematófago (“mosquito-palha” ou “birigui”) infectado pela forma promastigota (WHO, 2021), que nos mamíferos, dentro dos macrófagos, se transformam em formas amastigotas, multiplicando-se e causando a lise celular. Assim, outros macrófagos são infectados (BVSMS, 2017).

Há três tipos de leishmaniose, a tegumentar ou cutânea que apresentam sintomas tais como, feridas na pele e a longo prazo, feridas nas mucosas (nariz, garganta e boca), a mucocutânea que afeta o nariz, a boca e a garganta levando a destruição total ou parcial desses tecidos e a leishmaniose visceral (“Calazar” ou “barriga d’água”) que é uma doença sistêmica, podendo agredir além da pele e mucosas vários órgãos internos, especialmente o fígado, o baço e a medula óssea (BVSMS, 2017; TANAKA et al, 2007; WHO, 2018).

No Brasil são reportados anualmente 3.000 casos de leishmaniose visceral, um dos casos mais graves da doença, principalmente nas regiões norte e nordeste (MARZOCCHI, 2016). Mundialmente, a taxa de mortalidade da leishmaniose visceral é bastante elevada, sendo estimado que anualmente ocorram dentre 26.000 a 65.000 mortes, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) (WHO, 2021).

O tratamento da leishmaniose é feito com os antimoniais, estibogluconato de sódio (Pentostan®) e o antimoniato-*N*-metil glucamina (Glucantime®) geralmente, por via endovenosa (BVSMS, 2017; LÓPEZ, 2010). O mecanismo de ação desses fármacos ainda não está completamente elucidado, pois, envolve diversos aspectos do metabolismo do parasito, mas segundo SINGH e colaboradores (2012), atuam inibindo a glicólise e realizando alterações metabólicas (CARVALHO et al., 2015). A anfotericina B, o miltefosine e a paramomicina são antibióticos usados no tratamento da leishmaniose, os quais apresentam menor toxicidade quando comparados aos antimoniais, porém têm menor eficácia. A anfotericina B (Fungizone®), um dos fármacos utilizados como tratamento alternativo, atua interagindo ao ergosterol da membrana celular, causando alterações na permeabilidade da membrana, assim, íons deixam a célula resultando na

morte da mesma. O miltefosine, atua pelo estímulo da cascata das caspases induzindo a apoptose e a morte do parasito (BASTOS et al, 2016; SILVA-LÓPEZ, 2010; SOARES-BEZERRA, et al, 2004). A paromomicina tem como mecanismo de ação a inibição da síntese proteica, e a interferência na atividade mitocondrial e na capacidade de captação de precursores de macromoléculas (BASTOS et al, 2016; SILVA-LÓPEZ, 2010; SOARES-BEZERRA et al, 2004).

A pentamidina (Lomidine®) pode agir no genoma do parasito, dificultando o processo de replicação e transcrição mitocondrial. Além disso, o mecanismo de ação desse fármaco também pode estar associado à inibição de recaptura de poliaminas (PAs) através da inibição de uma enzima envolvida na biossíntese da espermidina, a S-adenosilmetionina descarboxilase, impedindo a síntese de moléculas essenciais para a manutenção da vida do parasito (BASTOS et al., 2016; SILVA-LÓPEZ, 2010; SOARES-BEZERRA et al, 2004) (Figura 1.1).

Em vista dos desafios apresentados em relação as terapias medicamentosas existentes, tais como, elevada toxicidade, baixa eficácia, resistência do parasito aos medicamentos faz-se necessário o investimento em pesquisa por novos fármacos com diferentes vias de intervenção (BVSMS, 2014; LÓPEZ, 2010; ROJO et al., 2015).

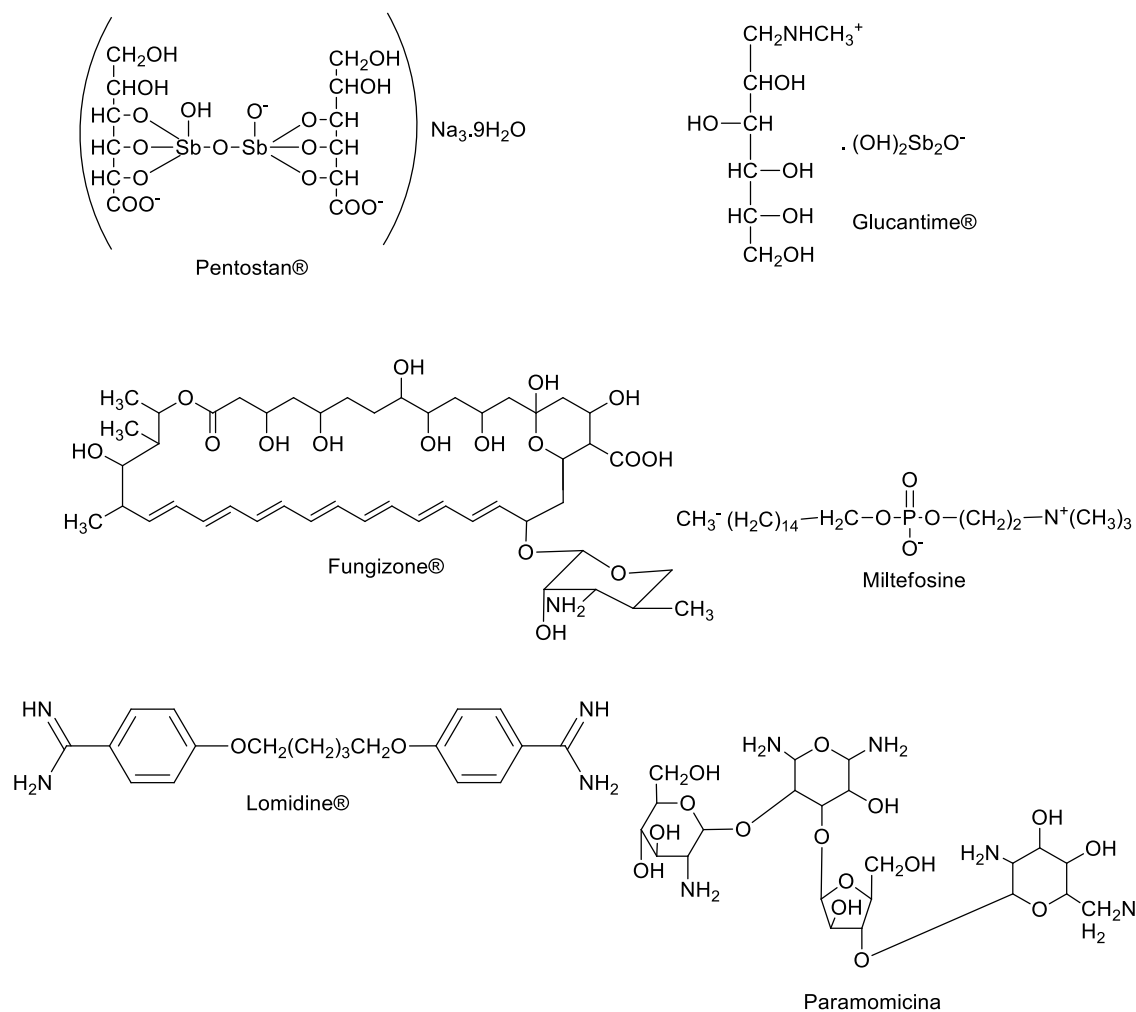


FIGURA 1.1- Fármacos utilizados no tratamento das leishmanioses

1.2 - Enzima Arginase de *Leishmania amazonensis*

A arginase (ARG) é uma metaloenzima com um centro de manganês (Mn^{2+}) que catalisa a hidrólise de L-arginina em L-ornitina e ureia (Figura 1.2) (ANDRÉ et al., 2011; da SILVA et al., 2008; INIESTA et al., 2001). A inibição desta enzima leva a intervenção da produção de poliaminas, moléculas essenciais para o desenvolvimento do protozoário de leishmania (da SILVA, 2010; FURTADO, 2014). O parasito de *Leishmania* não produz o aminoácido L-arginina sendo dependente do hospedeiro para sua síntese protéica e de PAs (BALAÑA-FOUCE et al., 2012; da SILVA, 2010; MCCONVILLE 2016).

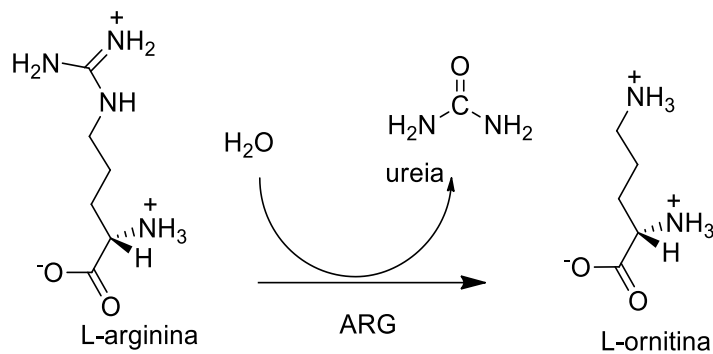


FIGURA 1.2 - Reação enzimática catalisada pela arginase

O uso em comum do substrato L-arginina pela enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) regula a atividade da iNOS em macrófagos. A atividade da iNOS leva à síntese de óxido nítrico (NO) e outras espécies reativas de oxigênio mediante a oxidação do aminoácido L-arginina, sendo, essa enzima de extrema importância na defesa do macrófago. Em estudos com *Leishmania major*, foi demonstrado que a inibição da arginase levou a um aumento das espécies reativas de oxigênio e conseqüentemente a morte dos protozoários (Figura 1.3) (BALAÑA-FOUCE et al., 2012; COLOTTI, ILARI, 2011).

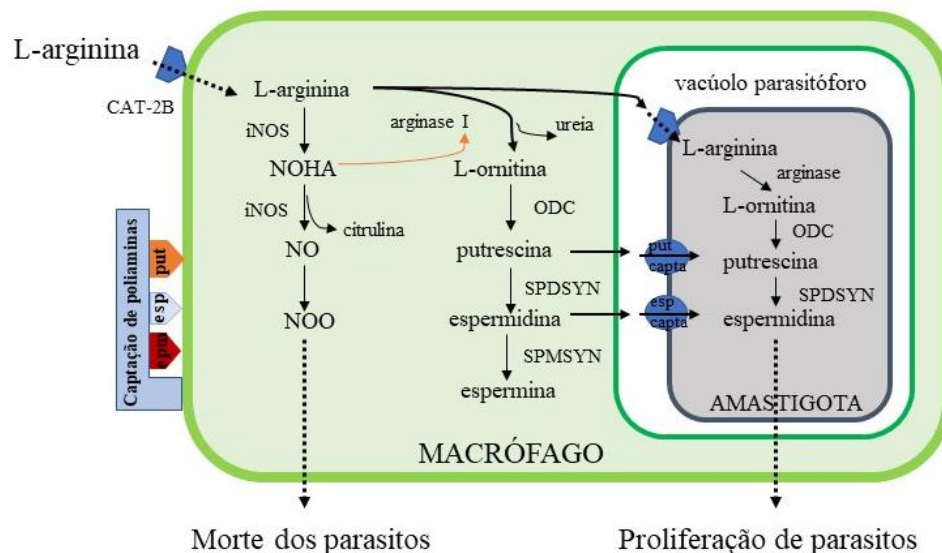


FIGURA 1.3 - Via metabólica do substrato de L-arginina (adaptado de Balaña-Fouce et al., 2012).

Estudos realizados por ROBERTS e colaboradores, 2004, com parasitos mutantes de *Leishmania mexicana* revelaram que a estrutura cristalina da arginase de *Leishmania mexicana* e *Leishmania amazonensis* são similares, com diferença em apenas dois aminoácidos próximos ao terminal COOH (V306D e C308R), o que tornam essas estruturas 99,4% idênticas. A sequência geral de aminoácidos da arginase de *L. mexicana* (Lm_{ARG}) e arginase humana I e II, também foram determinadas, através do alinhamento pareado das proteínas apresentando uma identidade de 38,5% e 32,6%, respectivamente. Com a difração de raio-X da Lm_{ARG} possibilitou o conhecimento das interações da estrutura cristalina desta enzima e revelou propriedades importantes sobre as interações com inibidores, como, as três regiões que se diferem das estruturas terciárias entre a enzima humana e do parasito que correspondem aos segmentos V230 da enzima Lm_{ARG} . (D'ANTÔNIO et al., 2013; HAI, CHRISTIANSON, 2016; ROBERTS et al., 2004). Dessa maneira, a inibição da proteína arginase é considerada uma abordagem promissora para o tratamento da leishmaniose, pois apresenta resposta microbicida através de sua inibição e as diferenças estruturais entre a enzima humana e a enzima do parasito podem ser exploradas na busca de inibidores seletivos.

1.3 - Produtos Naturais Inibidores de Arginase

Há milhares de anos, as plantas vêm sendo utilizadas como fonte de medicamentos, compondo a base da medicina tradicional para tratamento, cura e prevenção de doenças (JUNIOR et al., 2005; TEIXEIRA, 2014). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) 11% dos fármacos considerados essenciais são oriundos de plantas. O Brasil é um país que se destaca devido a sua rica biodiversidade apresentando cerca de 20% das espécies vegetais do planeta (ASSIS et al., 2015).

A busca por novos quimioterápicos com propriedades leishmanicida a partir de plantas vem aumentando, devido às suas propriedades medicinais. Dentre os PNs avaliados quanto a atividade inibitória comprovada frente ao protozoário de *Leishmania*, encontram-se os alcaloides, chalconas, flavonoides, terpenos, dentre outros (CRUZ, 2009; SILVA, OLIVEIRA, 2017).

O processo das reações enzimáticas em uma catálise pode ser interrompido ou diminuído através de moléculas que atuam com inibidores enzimáticos. Na literatura, há relatos de PNs inibidores de arginase de *L. amazonensis* (La_{ARG}) tais como, flavonoides,

derivados de ácido galoilquínico, verbascosídeo e derivados de ácido cinâmico. As potências inibitórias apresentadas para os flavonoides e galoilquínicos, tiveram valores IC_{50} entre 0,13 e 12,2 μM e caracterizados como inibidores não-competitivos (de SOUSA et al., 2014 a; de SOUSA et al., 2014 b). Alguns dos flavonoides que apresentaram inibição em La_{ARG} , tais como, luteolina, quercetina e a quercitrina também apresentam atividade frente ao protozoário de *Leishmania* (LUCON JUNIOR, 2016; MUZITANO et al., 2006).

O verbascosídeo é um inibidor competitivo de La_{ARG} com IC_{50} de 19 μM (MAQUIAVELI et al, 2016). Recentemente, macromoléculas da classe dos carboidratos foram avaliadas frente à La_{ARG} e uma fucogalactana foi isolada do cogumelo medicinal *Agrocybe aegerita*, apresentando potencial inibitório em La_{ARG} com IC_{50} de $5,82 \pm 0,57$ μM e mecanismo de inibição do tipo competitivo (MOTOSHIMA et al, 2018).

Na Tabela 1.1 estão apresentados os compostos oriundos de PNs inibidores de La_{ARG} , reportados na literatura, com seus respectivos valores de IC_{50} e a espécie da planta das quais foram isolados e na Figura 1.4 estão apresentadas algumas de suas estruturas.

TABELA 1.1: Inibição da arginase recombinante de *L. amazonensis* por PNs.

Produtos naturais	Fonte	IC_{50}	Referência
Ácido clorogênico	<i>Cecropia pachystachya</i>	n.d.	Cruz et al., 2013
	a.c. (Sigma-Aldrich)	8,3 Mm	da Silva et al, 2019 a
Isovitexina	<i>Cecropia pachystachya</i>	n.d.	Cruz et al., 2013
	a.c. (Sigma-Aldrich)	n.d.	Manjolin et al., 2013
(+)-Catequina	<i>Cecropia pachystachya</i>	n.d.	Cruz et al., 2013
	a.c. (Sigma-Aldrich)	0,77 μM	dos Reis et al., 2013
	<i>Byrsonima coccolobifolia</i>	1,70 μM	de Sousa et al., 2014 b
(-)-Epicatequina	<i>Cecropia pachystachya</i>	n.d.	Cruz et al., 2013
	a.c. (Sigma-Aldrich)	1,8 μM	dos Reis et al., 2013
	<i>Byrsonima coccolobifolia</i>	1,6 μM	de Sousa et al., 2014 b
Isoquercitrina	<i>Cecropia pachystachya</i>	n.d.	Cruz et al., 2013
	a.c. (Sigma-Aldrich)	3,8 μM	Manjolin et al., 2013
	<i>Byrsonima coccolobifolia</i>	2,0 μM	de Sousa et al., 2014 b
Quercetina	a.c. (Sigma-Aldrich)	4,3 μM	da Silva et al., 2012 b
	a.c. (Sigma-Aldrich)	4,9 μM	da Silva et al., 2019 b
	<i>Byrsonima coccolobifolia</i>	4,0 μM	de Sousa et al., 2014 b
	a.c. (Sigma-Aldrich)	n.d.	Manjolin et al., 2013
Quercetrina	a.c. (Sigma-Aldrich)	10 μM	da Silva et al., 2012 b
	a.c. (Sigma-Aldrich)	n.d.	Manjolin et al., 2013
	<i>Byrsonima coccolobifolia</i>	12,2 μM .	de Sousa et al., 2014 b
Orientina	<i>Cecropia pachystachya</i>	7 $\mu\text{g/mL}$	Cruz et al., 2013
	a.c. (Sigma-Aldrich)	16 Mm	Manjolin et al., 2013
Kaempferol	a.c. (Sigma-Aldrich)	~ 50 μM	Manjolin et al., 2013
	<i>Byrsonima coccolobifolia</i>	55 μM	de Sousa et al., 2014 b

Ácido gálico	a.c. (Sigma-Aldrich)	2,2 µM	dos Reis et al., 2013
	<i>Byrsonima coccolobifolia</i>	0,13 µmol L ⁻¹	de Sousa et al., 2014 a
(-)-Epicatequina-3-galato	a.c. (Sigma-Aldrich)	3,8 µM	dos Reis et al., 2013
Miricetina		2,1 µM	
Miricetina 3-O-raminosídeo		2,4 µM	
Catequina 3-O-α-raminopiranosídeo		35,1 µM	
Mearnsetina	<i>Byrsonima coccolobifolia</i>	88,1 µM	de Sousa et al., 2014 b
Heptametoxiflavona		127,9 µM	
Tamarixetina 3-O-α-raminosídeo		223,5 µM	
(+)-Syringaresinol		13,7 µM	
Trigonostemone		16,6 µM	
Ácido cafeico		1,5 µM	
Ácido rosmarínico	a.c. (Sigma-Aldrich)	2,1 µM	da Silva et al., 2019 a
Ácido criptoclorogênico		11 µM	
Isoverbascosídeo	a.c. (PhytoLab)	2,3 µM	da Silva et al., 2019 a
Fucogalactana	<i>Agrocybe aegerita</i>	5,82 µM	Motoshima et al., 2018
Ácido 5-O-galoilquinico		0,44 µmol L ⁻¹	
Ácido 3,4,5-tri-O-galoilquinico	<i>Byrsonima coccolobifolia</i>	0,46 µmol L ⁻¹	de Sousa et al., 2014 a
Ácido 5-O-(3-metilgaloil)-quinico		0,49 µmol L ⁻¹	
Verbascosídeo	a.c. (PhytoLab)	n.d.	da Silva et al., 2019 a
	a.c. (PhytoLab)	19 µM	Maquiaveli et al., 2016
Ramnetina		5,5 µM	
Rutina		10,4 µM	
Avicularina		5,6 µM	
Guajaverina	a.c. (PhytoLab)	6,9 µM	da Silva et al., 2019 b
Hiperosídeo		5,1 µM	
Quercetina-3-O-glucuronídeo		8,2 µM	
Taxifolina		1,6 µM	

*a.c. adquirido comercialmente; *n.d. não determinado

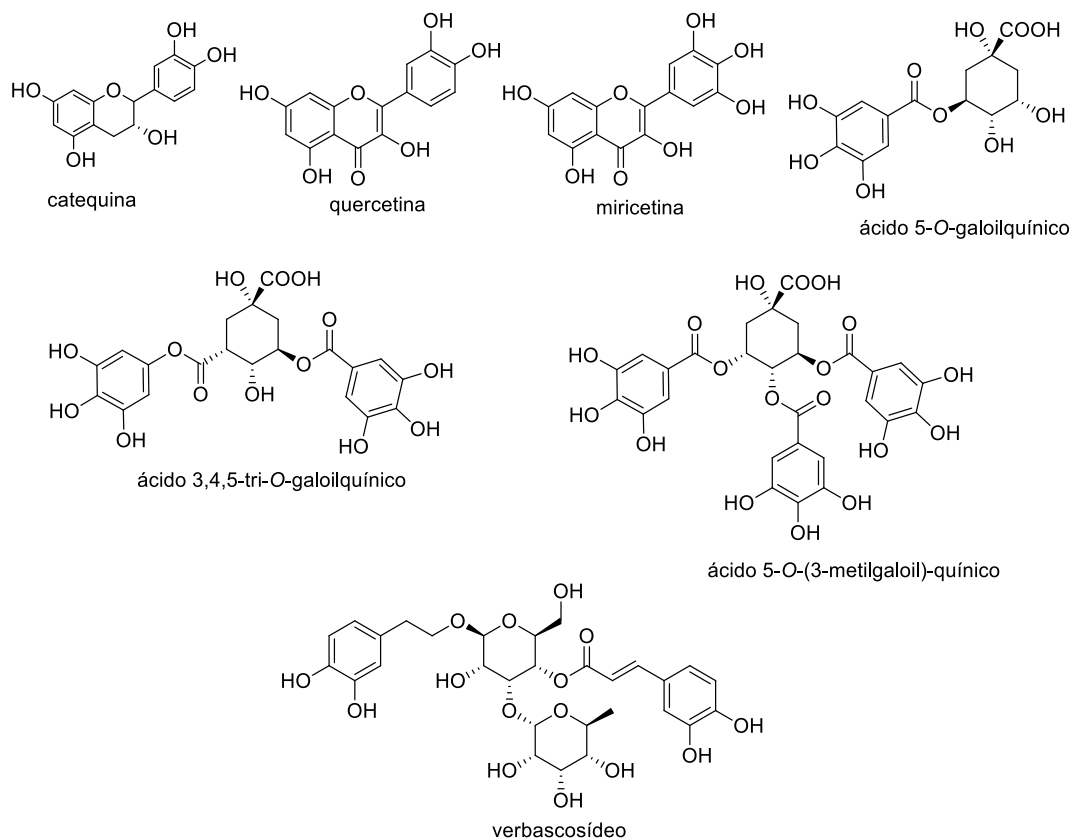


FIGURA 1.4 - Estruturas de compostos inibidores de arginase de *L. amazonensis*

1.3.1- O Gênero *Drimys*

O gênero *Drimys* pertence à família Winteraceae, a qual é constituída por cinco gêneros com cerca de 60 espécies predominante ao longo das Américas do Sul e Central, Madagascar e Austrália. O gênero *Drimys* é composto de 6 espécies dentre elas encontram-se *Drimys winteri*, *D. granadensis*, *D. brasiliensis* e *D. angustifolia*. As duas últimas espécies são encontradas no Brasil, principalmente em regiões de climas moderados (GOMES et al, 2013; HERTZOG et al, 2016).

As espécies desse gênero são utilizadas pela população como analgésicos e anti-inflamatórios, dentre outros usos na medicina tradicional brasileira, sendo também utilizadas por muito tempo, como substituto da quinina em tratamentos contra a malária. (HERTZOG et al, 2016).

Diferentes classes de substâncias são relatadas nesse gênero, dentre elas estão os sesquiterpenos drimanos, flavonoides, aromadendranos e lignanas (CECHINEL-FILHO et al., 1998; JANSEN, GROOT, 2004; LIMBERGER et al., 2007). Existem alguns

trabalhos que relatam sobre as composições químicas das cascas do caule e das folhas deste gênero, como a investigação dos compostos presentes nos óleos essenciais das folhas de *D. angustifolia* e *D. brasiliensis* que traz a comparação dos voláteis destas espécies, descrevendo a presença de monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanoides (GOMES et al., 2013, LAGO et al., 2010, LIMBERGER et al., 2007).

Na espécie *D. winteri*, os compostos safrol (1), drimenol, poligodial, 3- β -acetoxidrimenina (2), criptomeridiol (3), cirsimaritina (4), quercetina (5), astilbina (6) e quercitrina (7) foram detectados nas folhas (MUÑOS-CONCHA et al., 2007; SIERRA; LOPES; CORTÉS, 1986), enquanto que nas cascas foram encontradas as substâncias astilbina (6), dendocarbina A (8), drimenol, drimendiol (9), isodrimenina (10), isodrimeninol, mukaadial (11), poligodial, taxifolina (12), 1- β -(*p*-metoxicinamil)-poligodial (CECHINEL-FILHO et al., 1998; MALHEIROS et al., 2001; MUÑOS-CONCHA et al., 2007; PAZ et al., 2015, ZAPATA et al, 2009) (Figura 1.5). Os compostos γ -curcumeno (13), α -pineno, 4-terpineol e mirceno (14) também foram identificados em óleos essenciais das cascas dessa espécie (MONSÁLVEZ et al., 2010; ZAPATA, SMAGGHE, 2010).

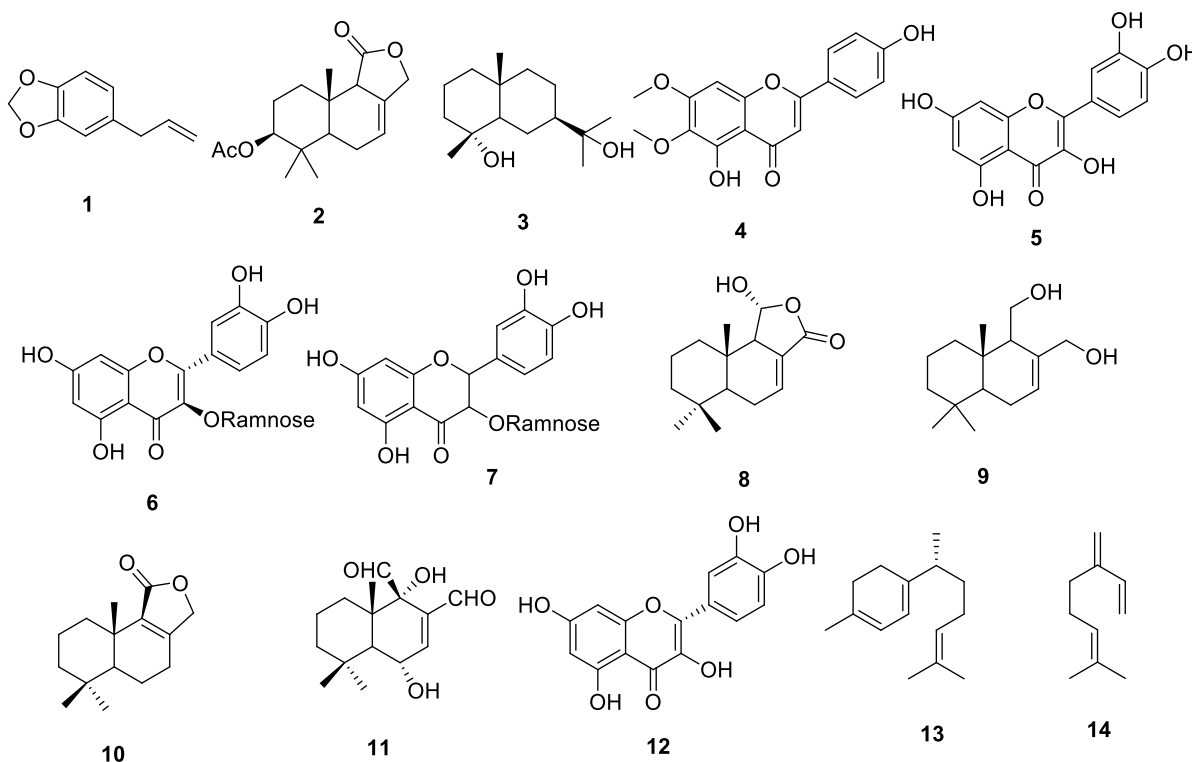


FIGURA 1.5: Estruturas químicas de alguns dos compostos identificados no gênero *Drimys*.

1.3.2 - A espécie *Drimys brasiliensis*

Drimys brasiliensis Miers (Winteraceae) é uma planta tipicamente brasileira popularmente conhecida como "casca-de-anta", distribuída principalmente na Caatinga, Cerrado, Floresta Atlântica e na Amazônia. É utilizada na medicina popular para o tratamento de inflamações, diarreias, febres, asma e bronquite (BARROSA et al., 2016; CLAUDINO et al., 2013; GOMES et al., 2013).

Atividades biológicas já foram reportadas em estudos com essa espécie, sendo observadas atividades antitumoral (CLAUDINO, 2011), anti-inflamatória (LAGO et al., 2010; MALHEIROS et al., 2005), antimicrobiana (SILVEIRA et al., 2012) e leishmanicida (CLAUDINO et al., 2013). Estudos fitoquímicos, relataram que os sesquiterpenos presentes em extratos das cascas do caule podem estar associados à atividade inibitória *in vitro* contra os promastigotas de *L. amazonensis* e *L. brasiliensis* (CLAUDINO et al., 2013).

A literatura reporta estudos químico das folhas, cascas do caule e raízes de *D. brasiliensis*. MALHEIROS e colaboradores (2001) isolou das folhas uma mistura de α e β cubebina (**15**). ANESE e colaboradores (2015) isolaram das raízes os compostos: poligodial (**16**), acetal poligodial (**17**), dendocarbina L (**18**) e fuegina (**19**) (ANESE et al., 2015, MALHEIROS et al., 2001). Partes aéreas dessa espécie também foram estudadas por VICHNEWSKI e colaboradores (1986), onde os mesmos conseguiram isolar os compostos confertifolina (**20**), 1- β -(*p*-cumaroiloxi)-poligodial (**21**) e 1 β -*p*-cumaroiloxivaldiviolide (**22**) (Figura 1.6).

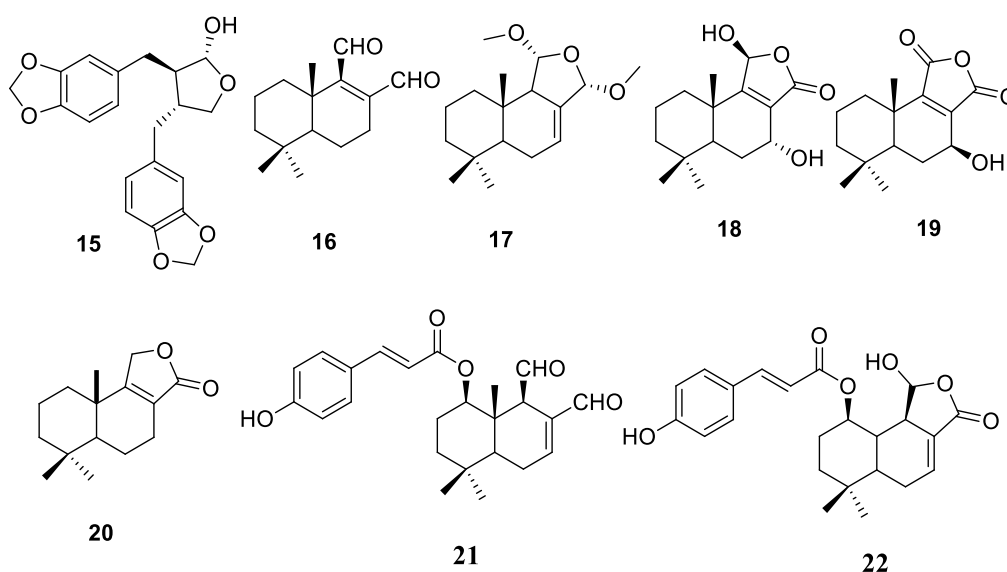


FIGURA 1.6: Compostos isolados das folhas e raízes de *D. brasiliensis*

A partir das cascas de *D. brasiliensis* foram isolados os compostos ácido poligonal (**23**), drimanial (**24**), drimenol (**25**), espatulenol (**26**), fuegina (**19**), hinoquinina (**27**), isodrimeninol (**28**), 1-β-(*p*-cumaroiloxi)-poligodial (**21**), 1-β-(*p*-metoxicinamil)-poligodial, poligodial (**16**), 1-β-*O-p*-metoxi-*E*-cinamil-5α-ceto-11α-enol-albicanol (**29**) e o isômero 1-β-*O-p*-metoxi-*E*-cinamil-5α-ceto-11-β-enol-albicanol, 1-β-*O-p*-metoxi-*E*-cinamil-isodrimeninol (**30**), 1-β-*O-p*-metoxi-*E*-cinamil-5α-hidroxi-isodrimeninol, 1-β-*O*-(*p*-metoxi-*E*-cinamil)-6α-hidroxipoligodial (**31**), além de ácidos graxos e glicérides (Figura 1.7) (CLAUDINO, 2011; FRATONI et al., 2016; MALHEIROS et al., 2005).

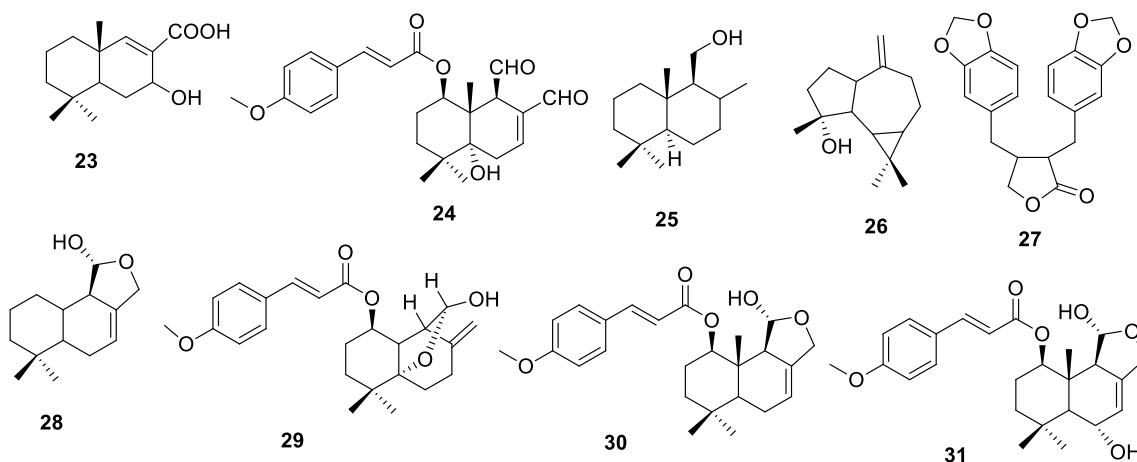


FIGURA 1.7: Compostos isolados das cascas da espécie *D. brasiliensis*

Nos óleos essenciais das folhas da espécie *D. brasiliensis* foram reportados a presença dos compostos biciclogermaceno (**32**), sabineno (**33**), terpinen-4-ol (**34**), ciccolorenona (**35**), miristicina (**36**), *t*-muurolol, α-cedreno e drimenol (**25**) (GOMES et al., 2013, LAGO et al., 2010, LIMBERGER et al., 2007). Já em óleos das cascas foram encontrados majoritariamente os compostos α-pineno (**37**), biciclogermaceno, espatulenol (**26**), α-terpineol, terpinoleno e β-pineno (Figura 1.8) (LAGO et al., 2010; LIMBERGER et al., 2007).

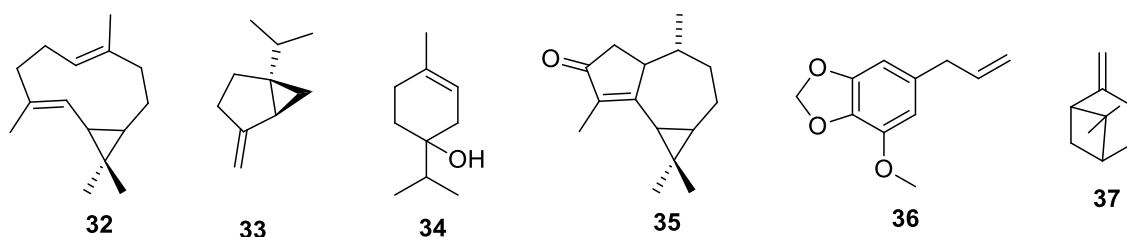


FIGURA 1.8: Compostos identificados em óleos essenciais das folhas e cascas da espécie *D. brasiliensis*.

1.3.3 – O Gênero *Qualea*

O gênero *Qualea* é composto por 45 espécies, dentre elas estão a *Qualea grandiflora* Mart. e *Qualea multiflora* Mart. as quais apresentam em grande ocorrência no Cerrado brasileiro (NETO et al., 2011). Várias espécies deste gênero são utilizadas pela medicina popular para o tratamento de diarreia com sangue, sarnas, problemas intestinais e no fígado, amebíase, infecções microbianas, tratamento de feridas na pele, processos inflamatórios, dor gástrica, infecções cutâneas, dermatoses e febre (FRANCZAK et al, 2019; MESQUITA et al, 2015; SOUZA et al, 2016).

Na literatura estão retratados vários estudos com diferentes espécies desse gênero, onde são comprovadas algumas atividades biológicas como ação gastroprotetora apresentada pelo extrato etanólico do caule e da folha de *Q. parviflora*, ação antimicrobiana do extrato etanólico de *Q. paraensis* frente ao *Streptococcus sanguinis*, atividade antibacteriana moderada dos extratos de *Q. parviflora* frente as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, além da atividade antimalárica *in vivo* dos extratos de *Q. paraensis* (FRANCZAK et al, 2019; MELO et al, 2018)

Os metabólitos secundários identificados no gênero *Qualea* são: triterpenos (lupano, oleano e ursano), esteroides, flavonoides (flavanonas, flavonas, diidroflavonol), chalconas e ácido elágico e derivados (Figura 1.9) (MESQUITA et al, 2015; NETO et al., 2011).

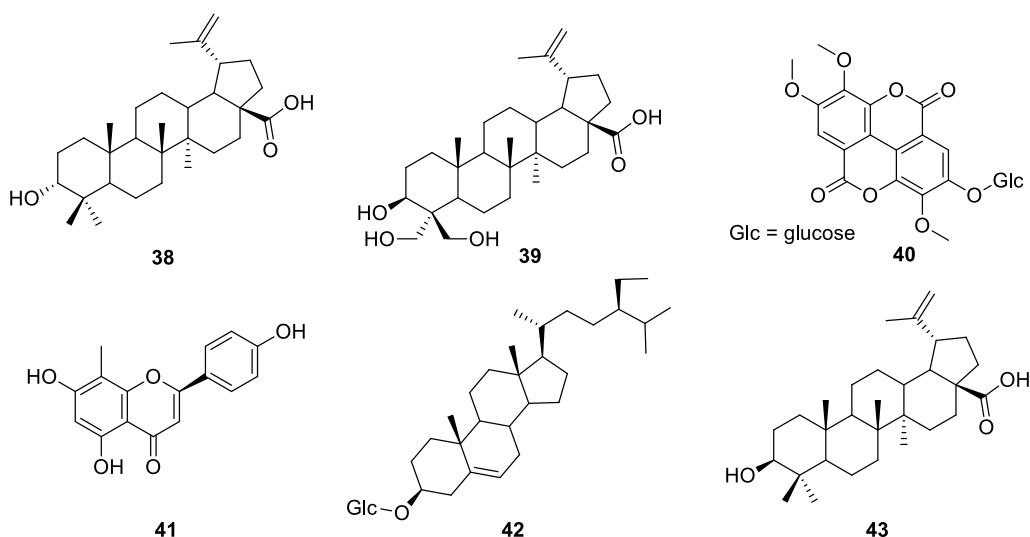


FIGURA 1.9. Metabólitos secundários identificados de diferentes espécies de *Qualea*. Ácido betulínico (38); bellericaside B (39); ácido 3,3',4-tri-*O*-metilelágico-4'-*O*- β -D-glucopiranosídeo (40); (2R)-5,7,4'-trihidroxi-8-metilflavanona (41); 3-*O*- β -D-glucopiranosil- β -sitosterol (42); Betulina (43)

1.3.4 - A espécie *Qualea grandiflora*

Qualea grandiflora Mart. é uma planta que pode ser encontrada no cerrado, cerradão e matas de galeria. Popularmente é conhecida como pau-terra, pau-terra-do-cerrado, pau-terra do campo, ariavá, pau-terra-da-folha-larga, entre outros. Na medicina popular faz-se uso das cascas, folhas e frutos. As cascas são utilizadas principalmente, na forma de infusão, para o tratamento de doenças inflamatórias, bem com, para limpeza externas de úlceras e feridas. As folhas são utilizadas como infusão ou decocção para tratamento de cólicas intestinais, diarreia com sangue e contra ameoba. (AYRES et al., 2008; KHALIL et al., 2006).

Estudos apresentaram que os extratos etanólicos de folhas e cascas do caule da espécie *Q. grandiflora* possuem várias atividades biológicas. O extrato das folhas apresentou ações antioxidantes, analgésicas, ação antibacteriana, depressora do sistema nervoso central e potencial anticonvulsivante frente ao *Staphylococcus epidermidis*. O extrato da casca contém ações antiulcerogênica e antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Pseudomonas aeruginosa*. (AYRES et al., 2008). Na pesquisa desenvolvida por Cordeiro et al., (2017), extratos de acetato de etila das folhas de *Q. grandiflora* apontaram intermediária atividade tripanocida ($IC_{50} < 28 \mu\text{g mL}^{-1}$) e antiplasmódica ($IC_{50} < 100 \mu\text{g mL}^{-1}$) em ensaios *in vitro*.

Recentemente foi avaliado a atividade antiplasmódica do fruto e casca do caule de *Q. grandiflora*. Os extratos polares de ambos apresentaram atividade antiplasmódica promissora *in vitro* contra *P. falciparum* com valores de IC_{50} entre 1,2 e 4,2 ng.mL^{-1} , respectivamente. A avaliação de citotoxicidade também foi realizada e se mostrou baixa contra células hepáticas humanas ($IC_{50\text{HepG2}} \geq 400 \text{ng.mL}^{-1}$), com índices de seletividades favoráveis ($SI \geq 322$ e ≥ 96 , respectivamente). O extrato etanólico do fruto foi selecionado para estudos *in vivo*, onde manifestou eficácia significativa à 100 mg kg^{-1} em camundongos infectados com malária *P. berghei* com 100% de redução na parasitemia no 5º dia após a infecção (NETO et al., 2020).

Em folhas dessa espécie foram isolados os flavonoides glicosilados: kanferol-3-*O*- α -L-(4''-*E*-*p*-cumaroil)-raminosídeo (44) e kanferol-3-*O*- α -L-(4''-*Z*-*p*-cumaroil)-raminosídeo (45), e os terpenos lupeol (46), esqualeno (47), α -amirina (48), fitol (49), β -amirina (50), sisterol (51), sitostenona (52), ácido ursólico (53) e o ácido oleanólico

(54) (Figura 1.10) (AYRES et al., 2008). Nas cascas do caule foram identificados as flavanonas: 3', 4', 5', 5,6,7-hexa-hidroxi-8-metilflavanona (55); 8-metil-naringenina (56); 3'-7-dimetoxi-8-metil-4'-5-7-tri-hidroxiflavanona (57), o composto: Bis-(4,6-dimetoxi-2-hidroxi-3-metilfenil)-metanona (58), derivados de ácido elágico: ácido 3,3'-di-*O*-metilelágico-4-*O*- β -D-glicopiranosideo (59); ácido 3-*O*-metilelágico-4'-*O*- α -L-ramnopiranosideo (60); ácido 3,3', 4-tri-*O*-metilelágico-4'-*O*- β -D-glicopiranosideo (61); ácido 3,3'-di-*O*-metilelágico(62) e os compostos: ácido gálico (63), pirogalol (64), catecol (65) e β -sitosterol (66), (Figura 1.11) (CORRÊA et al., 1975; NASSER, 2008; NETO et al., 2011, 2013; ROCHA, SILVA, PANIZZA, 1980).

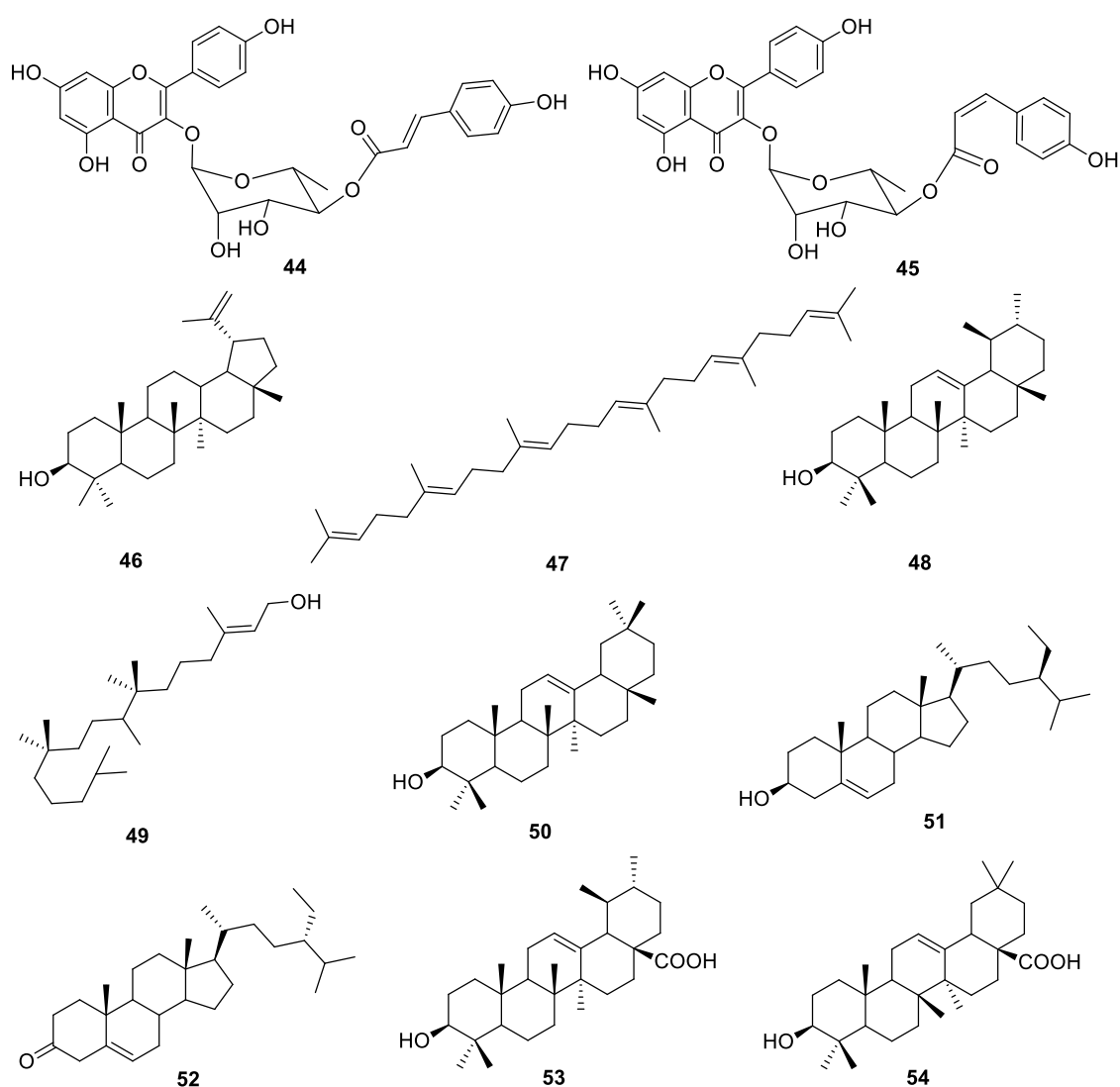


FIGURA 1.10. Estruturas químicas dos flavonoides glicosilados e terpenos isolados das folhas de *Q. grandiflora*

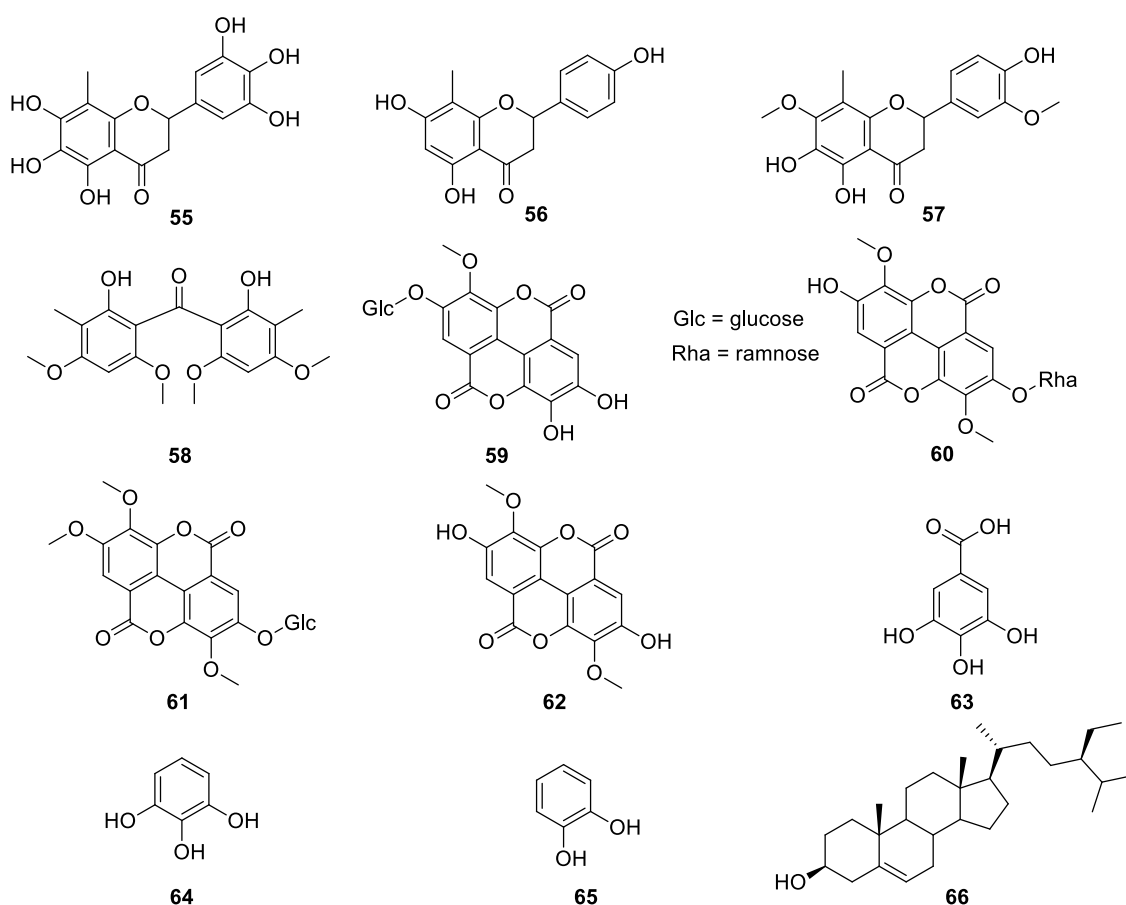


FIGURA 1.11. Estruturas químicas identificadas da casca do caule de *Q. grandiflora*

Em estudos recentes realizados pelo nosso grupo de pesquisas, com extratos da casca do caule e frutos de *Q. grandiflora*, foram identificados compostos das classes dos elagitaninos, galotaninos, ácido carboxílico e flavonoides, conforme apresentado na Tabela 1.2 e na Figura 1.12 (NETO et al., 2020).

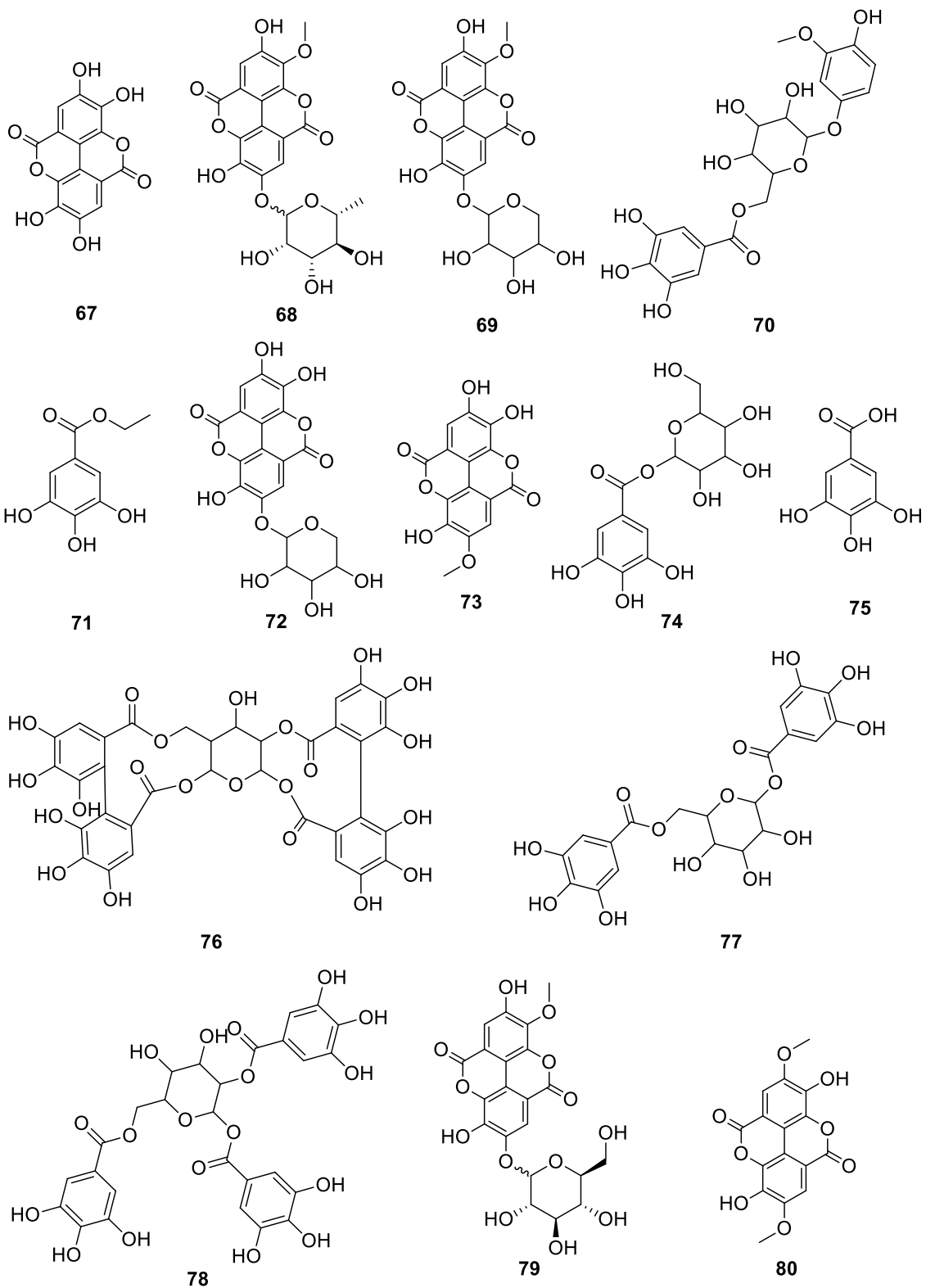
TABELA 1.2: Compostos identificados em extratos da casca do caule e fruto de *Q. grandiflora*

Compostos	Nome	F. M
67 _c	ácido elágico	C ₁₄ H ₆ O ₈
68 _{c, Fr}	ácido metil elágico- <i>O</i> -ramnopiranosil	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂
69 _{c, Fr}	ácido metil elágico- <i>O</i> -pentopiranosídeo	C ₂₀ H ₁₆ O ₁₂

70_c	metoxi-hidroxifenol- <i>O</i> -galoil-hexosídeo	$C_{20}H_{22}O_{12}$
71_c	galato de etila	$C_9H_{10}O_5$
72_c	ácido elágico pentopiranosídeo	$C_{19}H_{14}O_{12}$
73_c	ácido metil elágico	$C_{15}H_8O_8$
74_{c, Fr}	galoil-hexose	$C_{13}H_{16}O_{10}$
75_c	ácido gálico	$C_7H_6O_5$
76_c	Pedunculagina	$C_{34}H_{24}O_{22}$
77_c	digaloil-hexose	$C_{20}H_{20}O_{14}$
78_c	trigaloil-hexose	$C_{27}H_{24}O_{18}$
79_c	ácido metilelágico - <i>O</i> -glucopiranosídeo	$C_{21}H_{18}O_{13}$
80_{Fr}	ácido dimetil elágico	$C_{16}H_{10}O_8$
81_{Fr}	isorhamnetina acetil-hexosídeo	$C_{24}H_{24}O_{13}$
82_{Fr}	HHDP-hexose	$C_{20}H_{18}O_{14}$
83_{Fr}	ácido tri- <i>O</i> -metil elágico	$C_{17}H_{12}O_8$
84_{Fr}	dilactona do ácido vanoleico	$C_{21}H_{10}O_{13}$
85_{Fr}	apigenina- <i>O</i> -hexoside	$C_{21}H_{20}O_{10}$
86_{Fr}	HHDP galoil hexose	$C_{27}H_{22}O_{18}$
87_{Fr}	di- <i>O</i> -galoil-lactonizado valoneoil-hexosídeo	$C_{41}H_{28}O_{26}$
88_{Fr}	di- <i>O</i> -galoil-HHDP-hexose	$C_{34}H_{26}O_{22}$

C: Identificado na casca do caule de *Q. grandiflora*

Fr: Identificado no fruto de *Q. grandiflora*



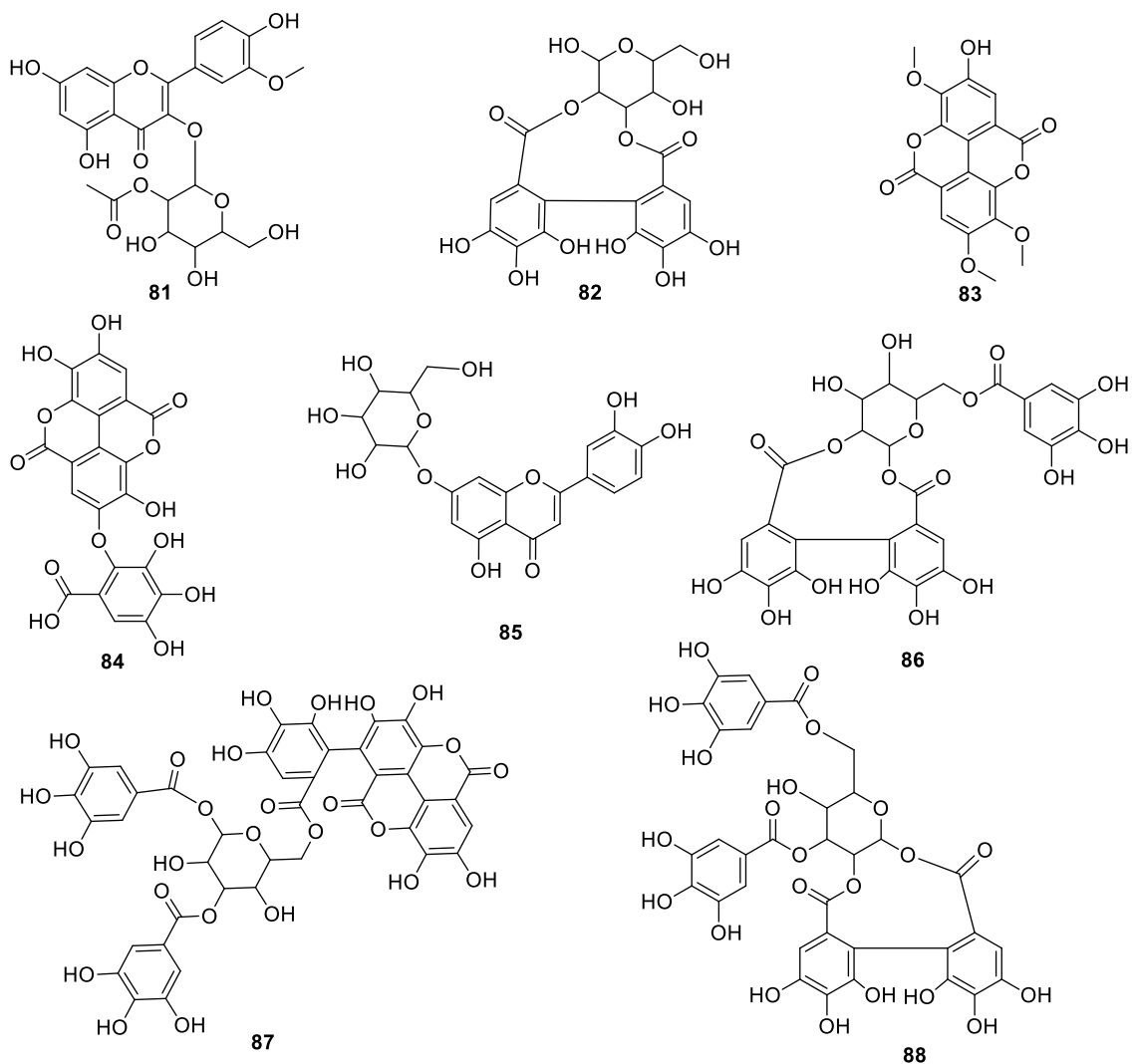


FIGURA 1.12 – Estruturas químicas identificadas em extratos da casca do caule e fruto de *Q. grandiflora*

1.3.5 – Extratos Vegetais Investigados frente à *La*_{ARG}

Diversas amostras foram avaliadas frente à *La*_{ARG}, dentre as quais, extratos etanólicos de diferentes espécies de plantas. As informações das espécies de plantas provenientes do Cerrado que foram selecionadas para a realização da triagem enzimática encontram-se na Tabela 1.3 a seguir:

TABELA 1.3: Espécies de plantas avaliadas frente à *La*_{ARG}.

Espécie	Família	Uso medicinal/popular	Atividade biológica	Metabólitos secundários identificados no gênero	Referências
<i>Dalbergia miscolobium</i>	Fabaceae	Tratamento de doenças cardiovasculares, câncer, diabetes, dor reumática, dentre outros.	Antimicrobiana, anticancerígena, antioxidante, anti-inflamatória, analgésica entre outras.	fenóis, arilbenzofuranos, quinonas e derivados sesquiterpênicos	KAENNAKAM et al., 2017 NGUYEN et al., 2018 NINH THE S., 2017
<i>Drimys brasiliensis</i>	Winteraceae	Tratamento de inflamações, diarreias, febres, asma e bronquite.	Antialérgica, antitripanosoma, leishmanicida, antibacteriana, antinociceptiva, atividade inibitória <i>in vitro</i> contra formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> e <i>L. brasiliensis</i> .	sesquiterpenos drimanos, flavonoides e lignanas	BARROSA, 2016 CLAUDINO et al., 2013 JANSEN & GROOT, 2004 LIMBERGER et al., 2007
<i>Erythroxylum suberosum</i>	Erythroxylaceae	Tratamento anti reumatismo, anestésico e para indigestão.	Antioxidante, anticancerígena, anti-inflamatória e antibacteriana.	alcaloides, flavonoides, taninos, terpenos e fenilpropanoides	BARROS et al., 2017 BROCK et al., 2005 MACEDO et al., 2016 NASCIMENTO et al., 2012
<i>Jatropha molíssima</i>	Euphorbiaceae	Tratamento contra picada de cobra, larvicida, antioxidante e antibacteriano.	Antibacteriana, antioxidante, larvicida contra <i>Aedes aegypti</i> e propriedade coadjuvante no tratamento de picadas da cobra.	saponinas, taninos, flavonoides e xantonas	DIAS et al., 2019
<i>Myrcia língua</i>	Myrtaceae	Tratamento de diarreia, diabetes e disenteria.	Espécie promissora para inibidores da catepsina B.	flavonas, acetofenonas, flavonóis, β -amirina, eucaliptina	RAMALHO et al., 2015 STEFANELLO et al., 2011 TAKAO et al., 2014 GOTTLIEB et al., 1971

<i>Pterodon pubescens</i>	Leguminosae-Papilionoideae	Tratamento de doenças inflamatórias.	As folhas atuam no controle do crescimento do parasito em macrófagos infectados com <i>L. amazonensis</i> e as sementes possuem propriedades antirreumática, analgésica, anti-inflamatória e antimicrobiana	taninos, flavonas, esteroides, triterpenos e xantonas	ARRAIS-SILVA et al., 2014 MENNA-BARRETO et al., 2008
<i>Qualea grandiflora</i>	Vochysiaceae	Tratamento de infecções, feridas na pele, asma, congestão pulmonar, dor gástrica, dermatoses e febre.	Atividades antioxidante, analgésica, antibacteriana, tripanocida e antiplasmódica	triterpenos, esteroides, flavonoides, chalconas, ácido elágico e derivados	NETO et al., 2011 MELO et al., 2018 NETO et al., 2020
<i>Tabebuia ochracea</i>	Bignoniaceae	Usada como antimalárico e como curativo para úlceras.	Antitumoral, anti-inflamatória, antibacteriana, antifúngica e antimalárica.	quinonas, lignanas, iridoides, glicosídeos fenólicos, saponinas, cumarinas, ácidos benzoicos, naftoquinonas	VIEIRA et al., 2016 ZHANG et al., 2016 YAMASHITA et al., 2009 PERÉZ, DIÁZ, MEDINA, 2008 ZANI, De OLIVEIRA, De OLIVIERA, 1991
<i>Vochysia tucanorum</i>	Vochysiaceae	Tratamento de distúrbios gástricos e inflamações, como asma, congestão pulmonar ou feridas na pele.	As folhas dessa espécie possuem ação gastroprotetora contra distúrbios gástricos	flavonoides, triterpenoides pentacíclicos, misturas de ácido ursólico e derivados de ácido oleanólico.	CORRÊA et al., 2018 GOMES et al., 2009
<i>Memora axillaris</i>	Bignoniaceae	Tratamento de úlceras externas, feridas, dores abdominais e sarna (gênero)	Atividade antinociceptiva e antiinflamatória (gênero)	alantoína, benzaldeído e 1-octen-3-ol (gênero)	FLORENTINO et al., 2016 TRESVENZOL et al., 2010

1.3.6 - Influência da queimada, temperatura e geoclima local na produção de metabólitos secundários

A queimada é um evento natural que ocorre em diversas regiões do mundo, porém sua extensão e frequência vem sendo modificada por ações humana. O fogo desempenha um papel significativo sobre uma grande variedade de espécies, podendo influenciar e moldar o ecossistema, facilitando ou dificultando a germinação de algumas espécies. Evidências de incêndios são mais pronunciadas através da invasão de gramíneas e plantas rasteiras (MORESCHI et al, 2019).

O fogo também atua como fator de estresse e pode levar a uma alteração na produção de metabólitos secundários. Em estudos realizados por Alonso e colaboradores, (2002), foi relatado um aumento na produção de taninos condensados, ácido *p*-hidroxibenzóico (**89**), ácido siríngico (**90**), polifenóis e ácido gálico (**91**) livre em copas da espécie *Pinus pinaster* de 20 dias a dois meses após o incêndio. Observou-se, no tronco da espécie, que houve um aumento na produção de ácido gálico esterificado e reduções de ácido *p*-cumárico (**92**) e ácido ferúlico (**93**), sendo o último precursor para a biossíntese do álcool coniferílico, principal componente da lignina utilizada para reparar tecidos danificados (Figura 1.13). Os autores, Valor, Ormeño e Casals (2017) observaram nas suas pesquisas, o aumento da concentração de mono e diterpeno no período de 24 h após a queima da coroa das espécies *Pinus halepensis* e *Pinus sylvestris*. Já Cannac e seus colaboradores (2011) notaram um aumento de 1,5 vezes no conteúdo total de flavonoides e de kaempferol (**94**) três meses após a queima das agulhas da espécie *Pinus laricio*.

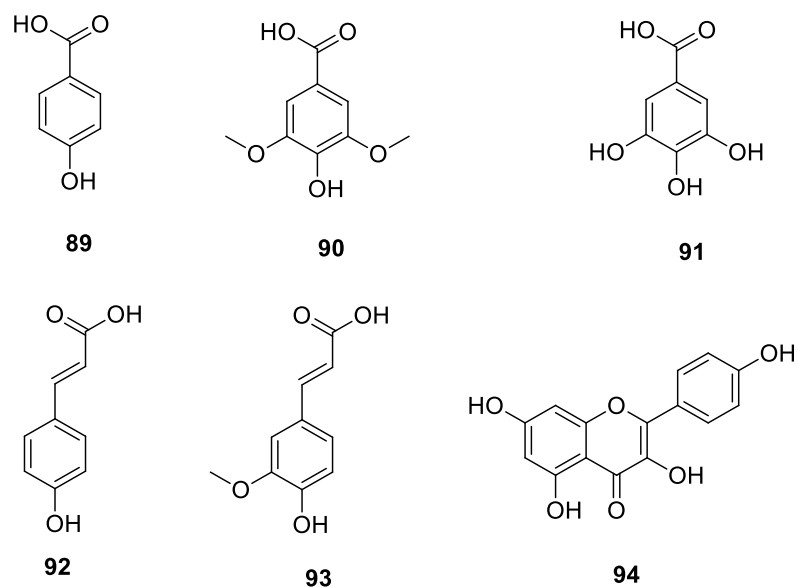


FIGURA 1.13. Metabólitos secundários que apresentaram variações relatadas na literatura após a ação do fogo

Além do fogo, outro fator a ser levado em consideração durante o processo de queimada é a variação de temperatura. A temperatura também é capaz de atuar como um estresse abiótico, causando alterações na produção de metabólitos secundários dos organismos vegetais. UDDIN (2019) detectou um aumento na produção de genisteína (**95**), daidzeína (**96**) e genistina (**97**), em raízes de soja (*Glycine max*) após serem tratadas por 24 horas em baixas temperaturas, o aumento da genistina observado foi de 310%. Yang e colaboradores (2018) relataram que o aumento da temperatura resultou na elevação da quantidade de compostos fenólicos (delfinidina-3-*O*-glucosídeo (**98**), delfinidina-3-*O*-rutinosídeo (**99**) e miricetina-3-*O*-glucosídeo (**100**) em cultivares da espécie *Ribes nigrum* (Figura 1.14). Este também mostra que, em altas temperaturas (35 °C) algumas espécies como *Petunia híbrido*, *Citrus sinensis*, *Rosa hybrida*, *Vitis vinífera* e *Cabernet sauvignon*, apresentaram redução na produção de antocianinas, e que o aumento na biossíntese era induzido a baixas temperaturas.

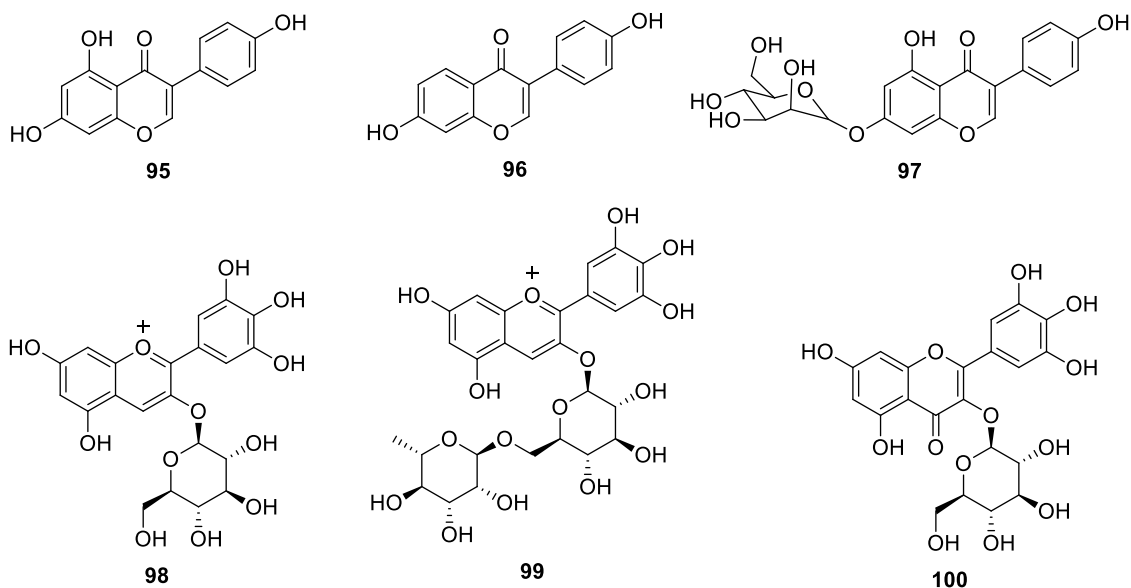


FIGURA 1.14. Metabólitos secundários que apresentaram variações relacionadas na literatura pela ação da temperatura

A localização geográfica onde a planta se encontra, também podem influenciar no conteúdo de metabólitos secundários (GOBBO-NETO, LOPES, 2007). Quando a localização se difere, há distinção nas coordenadas geográficas bem como, diferenças de condições climáticas e tipo de solo. A diferença de altitude, por exemplo, ocasiona alterações de conteúdo de uma determinada substância durante o período de crescimento (ZIDORN, STUPPNER, 2001).

Estudos realizados a partir da espécie *Pinus sylvestris* evidenciaram que diferenças de latitude tiveram ação na produção de flavonoides, onde, as agulhas coletadas das árvores com origem de latitudes mais altas apresentaram níveis de taxifolina 3'-*O*-glucosídeo (**101**), quercetina (**102**), taxifolina (**103**) e flavonoides totais mais baixos (Figura 1.15) (OLESZEK et al., 2002).

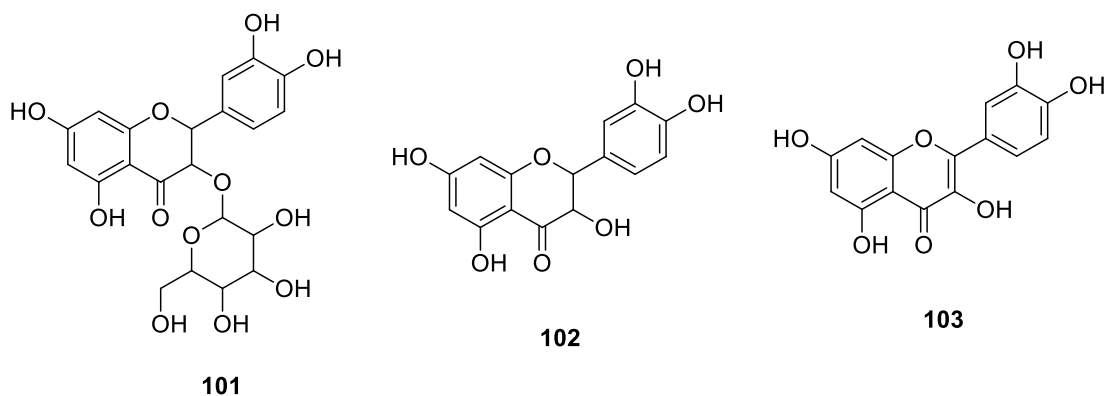


FIGURA 1.15. Metabolitos secundários que apresentaram variações relacionadas na literatura pela diferença de latitude

Outro estudo que também deixa evidente a influência do tipo de solo sobre a produção de metabólitos secundários, foi realizado por Ghasemzadeh e colaboradores, 2015, onde mostram variações na concentração de compostos presentes nos extratos das flores da espécie *Etilingera elatior* coletadas em três locais diferentes na Malásia, sendo o ácido clorogênico (**104**) e a luteolina (**105**) (Figura 1.16) os compostos que apresentaram maiores variações nas concentrações dos extratos avaliados.

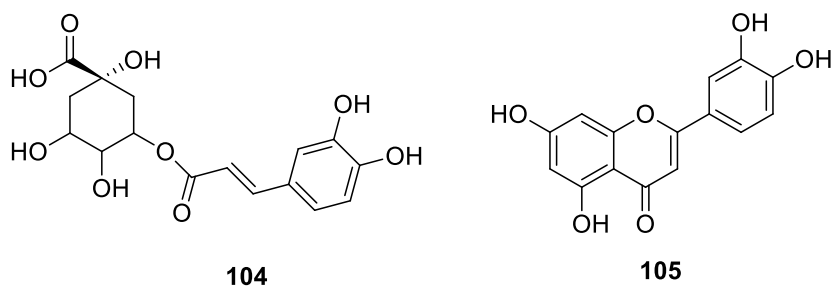


FIGURA 1.16. Metabolitos secundários que apresentaram variações relacionadas na literatura por diferentes tipos de solo

1.3.7 - Plataforma GNPS (Global Natural Products Social Molecular Networking)

A plataforma online, Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS) surgiu em 2012. Através desta plataforma é possível organizar e classificar inúmeros espectros de EM/EM de diferentes fontes. Assim, a capacidade de desrepliação voltada para a identificação de novas estruturas e análogos foi potencializada, devido à possibilidade de compartilhamento desses dados (PAULO et al., 2019; WANG et al, 2016).

As redes moleculares são formadas a partir do alinhamento de espectros EM/EM entre si, onde o espectro é representado pelo nodo, conforme mostra o esquema de construção de redes moleculares a seguir, para a identificação hipotética da molécula de surfactina C14 (Figura 1.17). A linha que conecta os nodos “Edge” é definida pela pontuação de cosseno modificado (podendo variar de 0 (totalmente diferente) a 1 (completamente idêntico) e é atribuída a cada combinação, dessa forma é possível descrever a similaridade de dois espectros EM² (ARON et al., 2020; WANG et al., 2016).

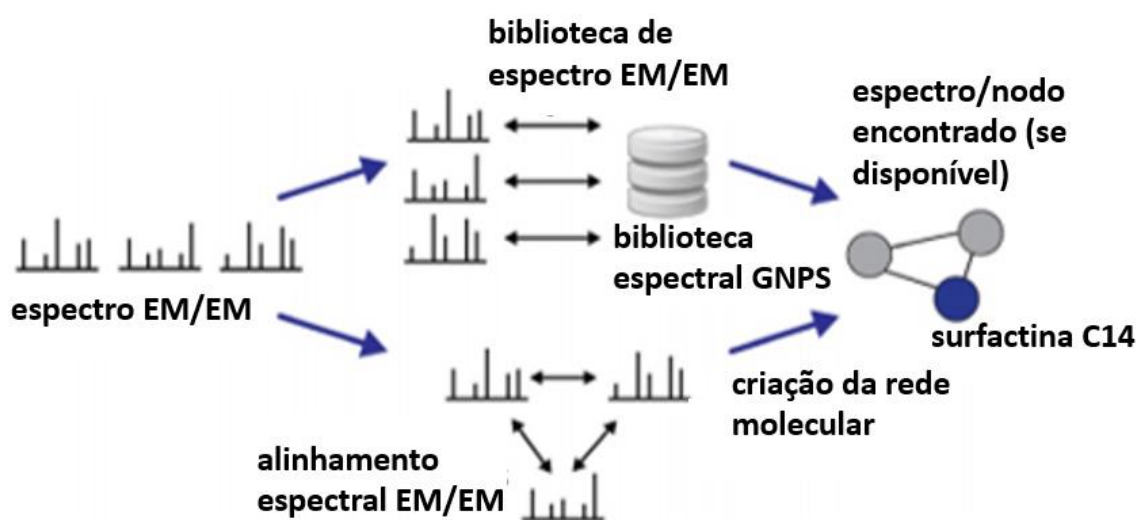


FIGURA 1.17- Esquema de construção de Redes moleculares a partir do alinhamento de espectros EM/EM. Fonte: Adaptado de WANG et al., 2016.

O GNPS permite analisar, armazenar e compartilhar um conjunto de dados (espectros EM²) e compará-lo com os dados disponíveis publicamente (WANG et al., 2016). As moléculas dos espectros de EM², são anotadas de acordo com os dados espectrais da biblioteca, onde são atribuídos pontuação de cosseno com base na sua similaridade (ARON et al., 2020). O percentual de moléculas anotadas através dessa rede molecular é uma média de 5-6%, as demais moléculas não são anotadas. Estas moléculas que não são anotadas não necessariamente são desconhecidas, pode ser apenas pela ausência dos espectros de referência nos bancos de dados da biblioteca do GNPS para a comparação (ARON et al., 2020).

Os dados de espectrometria de massas usados no GNPS, são armazenados no *Mass Spectrometry Interactive Virtual Environment* (MassIVE), o qual foi desenvolvido para facilitar o compartilhamento desses dados. O GNPS-MassIVE possui mais de mil

conjunto de dados metabólicos disponíveis ao público. Além disso, de acordo com Aron e colaboradores, 2020, o GNPS conta com 221.083 espectros de referência de EM² registrados nas bibliotecas gerada para GNPS, da comunidade GNPS e de terceiros, como por exemplo, MassBank (ARON et al., 2020; QUINN et al., 2017). A rede molecular GNPS tem sido utilizada em diferentes finalidades, como por exemplo: na identificação de compostos relacionados a medicamentos que podem ser desenvolvidos como novas terapias, identificação de produtos naturais desconhecidos, dentre outros (QUINN et al., 2017).

1.3.8 – Estudo *in silico* em busca de inibidores enzimáticos

Para a indústria farmacêutica moderna a descoberta de novos fármacos é desafiadora e requer altos investimentos na área de pesquisa e desenvolvimento. Mediante a este cenário, novas estratégias têm sido adotadas com o objetivo de ampliar a eficiência desse processo tendo como princípio as inovações científicas, tecnológicas e empresariais (FERREIRA et al., 2011).

No planejamento de um fármaco, algumas estratégias têm sido exploradas para identificação de novas moléculas bioativas (também conhecidas como *Hits*), dentre essas estratégias, se destacam as triagens biológica ou virtual (FERREIRA et al., 2011). Um dos obstáculos enfrentados durante o planejamento e otimização de compostos é a conformação da substância bioativa que pode ser obtida através da análise de estruturas cristalográficas, de RMN ou modelagem por homologia. Estudos empregando a modelagem molecular, uma das principais estratégias utilizadas, permitem que modelos de interação molecular sejam gerados, possibilitando a identificação conformacional bioativa da molécula ligante (GUIDO et al., 2010; KITCHEN et al., 2004).

Ferramentas computacionais são amplamente empregadas em pesquisas, auxiliando no mapeamento de novos candidatos reduzindo o tempo de pesquisa, bem como os custos. Dentre essas, está a abordagem *in silico*, que além das vantagens mencionadas possibilita também reprodutibilidade e exatidão. Estudos *in silico* assume pesquisas de propriedades farmacodinâmicas, farmacocinéticas e toxicológicas de compostos candidatos a fármacos por meio de métodos computacionais, visando fornecer uma representação tridimensional (COCCO et al., 2020; SANT'ANNA, 2002).

Esse tipo de estudo também conhecido como *docking* ou docagem/modelagem molecular, consiste no acoplamento da conformação bioativa de um ligante de acordo com suas interações intermoleculares com os resíduos de aminoácidos do sítio de ligação de uma macromolécula (proteínas, enzimas e DNA), seguido de avaliação (pontuação) e classificação do modo de ligação proposto de acordo com as conformações e orientações geradas para cada molécula (FERREIRA et al., 2011; GUIDO et al., 2010).

Baseado na importância da utilização da modelagem molecular, alguns compostos foram avaliados por essa técnica computacional, com o intuito de verificar a afinidade entre as moléculas selecionadas e a enzima arginase de *Leishmania mexicana*.

2 – OBJETIVOS

2.1 - Objetivo Geral

O objetivo geral desse trabalho foi realizar uma triagem de diferentes espécies de plantas frente à arginase de *L. amazonensis* *in vitro* e *in silico* e em ensaios *in vitro* frente ao protozoário de *Leishmania* em busca de novos compostos com atividade leishmanicida.

2.2 - Objetivos Específicos

1. Realizar triagem *in vitro* de extratos e frações para a avaliação da atividade inibitória da enzima *LaARG*.
2. Avaliar extratos etanólicos das espécies *Drimys brasiliensis*, *Dalbergia miscolobium*, *Erythroxylum suberosum*, *Jatropha molíssima*, *Memora axillaris*, *Myrcia língua*, *Qualea grandiflora*, *Tabebuia ochracea* e *Vochysia tucanorum* frente à *Leishmania infantum* *in vitro*.
3. Fazer partição líquido-líquido dos extratos etanólicos de plantas que apresentarem inibição superior à 60% em *LaARG*.
4. Fazer a prospecção química através de técnicas CLUE-IES-QqTOF-EM/EM e RMN de ¹H para os extratos e frações mais ativas para identificação dos compostos presentes;

5. Fazer a triagem *in silico* dos compostos identificados nos extratos da espécie *Drimys brasiliensis* e dos compostos identificados anteriormente nas frações diclorometano de *Erythroxylum suberosum* com o intuito de encontrar possíveis inibidores através de docagem molecular.
6. Realizar experimentos de CLAE-DAD, CLUE-EM/EM e RMN de ^1H para a análise e identificação dos metabólitos secundários das flores de *Qualea grandiflora* Mart., pela primeira vez investigada.
7. Realizar experimentos de CLAE-DAD, CLUE-EM/EM e RMN de ^1H para a análise e identificação dos metabólitos secundários das cascas do caule de *Q. grandiflora* coletadas no Cerrado de Goiás após a ocorrência da queimada;
8. Fazer a comparação entre os metabólitos identificados e em relação a atividade inibitória enzimática das cascas do caule da planta coletada no Cerrado de Goiás e da planta coletada no Cerrado paulista (em relação a espécime de São Carlos-SP, NETO et al., 2020);
9. Fazer comparação da produção de metabólitos secundários identificados da planta coletada na mesma região, antes e após a queimada e em relação a atividade inibitória enzimática.

3 - PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1- Materiais

- Água ultrapurificada pelo sistema MILLI-Q Direct.
- Enzima L_{ARG} (MM = 36,3 kDa) recombinante em *Escherichia coli*, expressa e purificada, cedida pela Prof.^a Dr.^a Dulce Helena F. de Souza da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos, SP.
- Kit Ureia (Bio Clin, Brasil) composto por: ureia padrão (70 mg/dL); solução enzimática (urease a 10.000 UI e tampão fosfato 100 mmol/L, pH 6,8); tampão estoque (tampão fosfato 100 mmol/L (pH 7,5), nitroprussiato de sódio 5 mmol/L, salicilato de sódio 300 mmol/L); e oxidante estoque (hidróxido de sódio 1,5 mol/L e hipoclorito de sódio 10 mmol/L);
- Solução Tampão de CHES (Sigma-Aldrich), 50 mM, pH=9,6.

- Solução tampão Tris-HCl (Sigma-Aldrich), 20 mM, pH= 7,05 com 0,3% de Triton X-100 e 10% de glicerol para ressuspensão da enzima ARG.
- Soluções de HCl e NaOH foram preparadas em concentração de 1 M para o ajuste do pH dos tampões e do substrato L-arginina.
- Substrato da ARG, solução de L-arginina (Sigma-Aldrich), 0,25 M, pH=9,6.

3.1.1 – Solventes

- Solventes grau P.A.: metanol, acetato de etila, acetona, hexano e diclorometano de variadas marcas.
- Solventes grau HPLC: acetonitrila e ácido fórmico marca Panreac, Tedia J. T. Baker.
- Solvente deuterados para RMN de ^1H : dimetilsulfóxido- d_6 , Sigma-Aldrich e clorofórmio deuterado CDCl_3

13.1.2 - Padrões utilizados

- Padrões: miricetina, kaempferol, quercetina-glucosídeo e quercetina, marca Sigma-Aldrich.
- Padrão: luteolina 7-glucosídeo, marca Fluka
- ❖ Padrão: isoquercetina, marca HWI ANALYTIK GMBH
- ❖ Padrões não comerciais: ácido elágico, ácido galico, amentoflavona, catequina e epicatequina.

3.2 – Equipamentos

- Estufa (Nova Ética)
- Espectrofotômetro Ultravioleta e Visível (Ocean Optics MINI-2-GS)
- Coluna SPE-R33230B-06P SILICYCLE_{inc.} SiliaPrepTM C18, 500 mg:6 mL
- Manifold (MSE Inc.)
- Sonicador (BRANSON 2510)
- Balança analítica (SHIMADZU)
- Sistema Milli-Q Direct

- Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) – Equipamento da marca Bruker, modelo *acender* (400 MHz) (Laboratório Multiusuário do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia – UFU).
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE) – Equipamento da marca Agilent, modelo Infinity II 1260, bomba quaternária, equipado com detector DAD, injetor manual e software OpenLab.
- Cromatógrafo Líquido de Ultra Eficiência (CLUE) – Equipamento da marca Agilent, modelo *Infinity* II 1260, bomba binária, equipado com detector QqToF Impact HD (Bruker Daltonics GmbH) e fonte de ionização ESI, injetor manual e software DataAnalysis (Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar).

3.3 – Coleta, Identificação do Material Biológico

As folhas, galhos e raízes das espécies coletadas no Cerrado da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) na cidade de São Carlos-SP (*Dalbergia miscolobium*, *Drimys brasiliensis*, *Erythroxylum suberosum*, *Memora axillaris*, *Myrcia língua*; *Tabebuia ochracea*, *Vochysia tucanorum*, *Qualea grandiflora* e *Bauhinia hollophyla*), foram identificadas pela Prof^a. Dr^a. Maria Inês Salgueiro Lima, sendo as exsicatas depositadas no Herbário do Departamento de Botânica (HUFSCar) da Universidade Federal de São Carlos, Brasil. As flores da espécie *Qualea grandiflora* foram coletadas no Cerrado no município de Catalão – GO, Brasil e foram identificadas pelo Prof. Dr. Helder N. Consolaro, sendo as exsicatas depositadas no herbário da Universidade de Brasília (UnB). Os extratos etanólicos das cascas e folhas de *D. brasiliensis* e flores de *Q. grandiflora* (Voucher da espécie de São Carlos/SP: 8854; Voucher da espécie de Catalão/GOUB 217075) foram selecionadas para realização do perfil químico.

As cascas do caule de *Q. grandiflora* foram coletadas em outubro de 2015 no Cerrado nas dependências da Universidade Federal de São Carlos - UFSCar, no município de São Carlos – SP (rodovia Washington Luís Km 235). No Cerrado da cidade de Catalão-GO (18°09'02.7"S 47°57'14.2"W) foram coletadas as flores (data: 13/12/2018) e as cascas do caule (15/07/2019) de *Q. grandiflora*, sendo as cascas coletadas de espécimes sem sofrer a influência das queimadas e de espécimes que sofreram queimadas nesta mesma região.



Fotos: Thiago Sousa

FIGURA 3.1. *Q. grandiflora* coletadas no Cerrado da UFSCar.





Foto: Thiago Sousa

FIGURA 3.2. Flores de *Q. grandiflora* coletadas no Cerrado de Goiás.





FIGURA 3.3. Cascas do caule de *Q. grandiflora* do Cerrado goiano coletadas de espécimes queimadas e não queimadas na mesma região.

3.4 - Obtenção dos extratos e frações de *Qualea grandiflora*

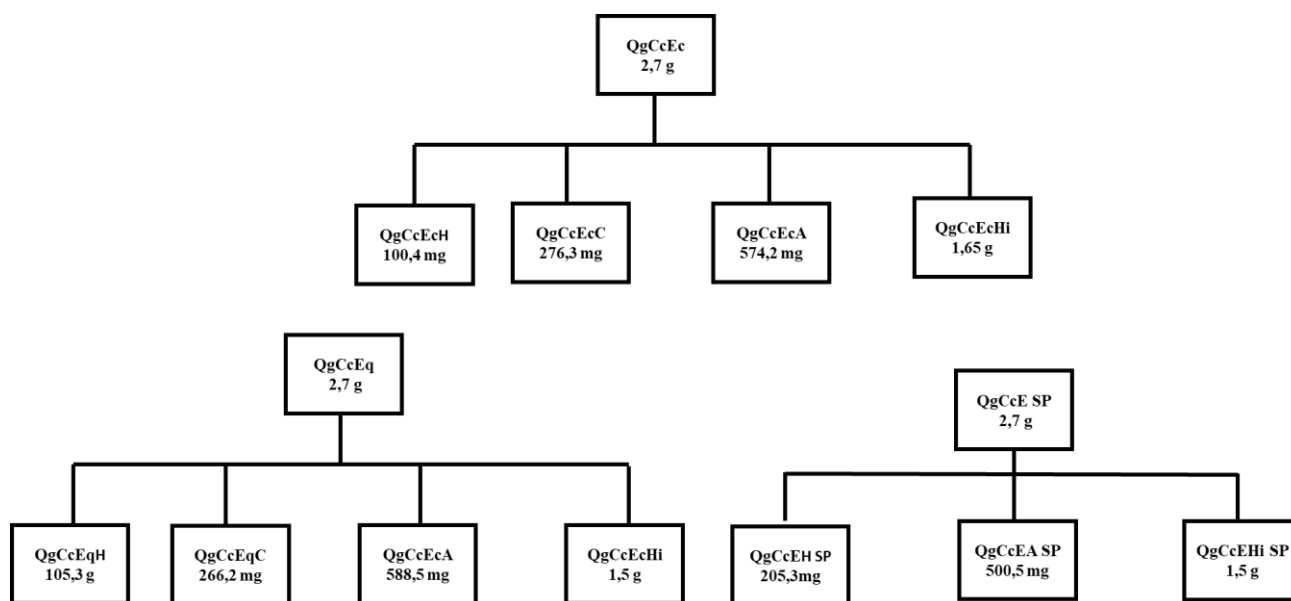
As cascas foram secas em estufa, a 40 °C e trituradas em moinho de facas, logo após foram submetidas à maceração utilizando-se etanol. O material foi filtrado com auxílio de filtro a vácuo a cada sete dias, sendo repetido por quatro vezes. As flores foram submetidas diretamente ao processo de maceração. Após a maceração o solvente filtrado foi evaporado a 50°C utilizando evaporador rotativo, obtendo assim os extratos etanólicos das flores (QgFIE) e das cascas do caule do cerrado de São Paulo (QgCcE SP) e do cerrado goiano (QgCcEc e QgCcEq).

Os extratos etanólicos das cascas do caule obtidos foram submetidos a partição líquido-líquido a fim de diminuir a complexidade química separando em diferentes polaridades. Para esse processo foram utilizados 2,7 g dos extratos de casca do caule controle (QgCcEc), queimada (QgCcEq) e de São Paulo (QgCcE SP), e após solubilizadas individualmente em 50 mL de uma mistura etanol/água (1:3) v/v e submetidos a sucessivas extrações com hexano (50 mL), clorofórmio (50 mL) e acetato de etila (50 mL), sendo realizadas em triplicata. Os extratos obtidos foram evaporados em evaporador rotativo, obtendo-se as seguintes frações: hexânicas (QgCcEcH, QgCcEqH e QgCcEH SP), clorofórmico (QgCcEcC e QgCcEqC), de acetato de etila (QgCcEcA, QgCcEqA e QgCcEA SP) e hidroalcoólica (QgCcEqHi, QgCcEcHi e QgCcEHi SP) (Fluxograma 3.1). O clorofórmio foi usado no processo de extração das

cascas do caule da planta do Cerrado de Goiás devido a baixa extração obtida usando o solvente hexano, de forma a tentar extrair mais compostos de baixa polaridade.



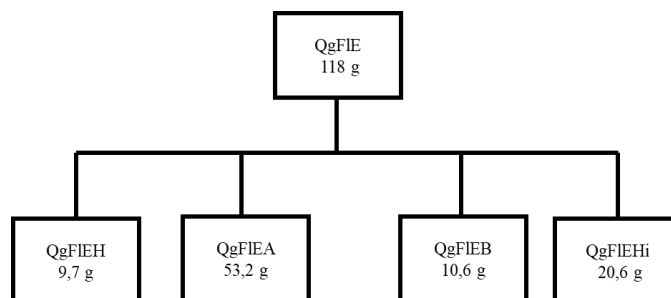
FIGURA 3.4. Cascas do caule de *Q. grandiflora* queimadas e não queimadas coletadas no cerrado goiano



FLUXOGRAMA 3.1 – Partição líquido-líquido dos extratos QgCcEc, QgCcEq e QgCcE SP

O extrato etanólico de flores também foi submetido ao processo de partição líquido-líquido, onde, 118 g do extrato etanólico foi solubilizado em 250 mL de uma mistura etanol/água (1:3) v/v e submetidas as sucessivas extrações com hexano (200 mL), acetato de etila (200 mL) e n-butanol (200 mL), todas realizadas em triplicata. Os extratos obtidos tiveram seus solventes evaporados em rotaevaporador, obtendo-se as seguintes

frações: hexânicas (QgFIEH), acetato de etila (QgFIEA), butanólica (QgFIEB) e hidroalcoólica (QgFIEHi) (Fluxograma 3.2).



FLUXOGRAMA 3.2 – Partição líquido-líquido do extrato QgFIE

3.5 - Condições experimentais para as análises por CLAE-DAD

Nas análises em cromatografia líquida de alta eficiência, as amostras foram preparadas utilizando filtro de membrana 0,45 μm PFE (Millex) a concentração de 1 mg/mL, solubilizados em água/metanol (80:20, v/v), as quais foram injetados 1 μL destas frações. O equipamento utilizado para a realização do perfil químico por CLAE-DAD da Agilent Technologies com a coluna fenil-hexil Agilent Zorbax Eclipse PLUS 18 (5 μm , h=150 x Φ =4,6 mm) equipada.

O método usado consistiu em eluição no modo reverso, com a fase móvel no modo gradiente usando água (Solvente A) e acetonitrila (solvente B) (0,1% de ácido fórmico) e usando o fluxo de 0,5 mL.min⁻¹ (Tabela 3.1), por um tempo de 40 minutos e monitorada nos comprimentos de onda de UV de 217, 220, 240, 254 e 365 nm. Na condição inicial de 95% de (A) e 5% de (B) foi mantida isocrática por 3 minutos, seguindo da inclinação de 70% (A) e 30% (B) por 27 minutos. A inclinação usando 100% (B) foi obtida em 5 minutos. Após 5 minutos de 100% (B), o gradiente foi retornado para 5% acetonitrila (B) de forma a condicionar a coluna para a próxima análise.

TABELA 3.1: Programação do método MET-OTM 2

Tempo [min]	△	A [%]	B [%]	C [%]	D [%]	Fluxo [ml/min]	Limite de Pressão Máxima [bar]
0,00		95,0	0,0	0,0	5,0	0,500	400,00
3,00		95,0	0,0	0,0	5,0	0,500	400,00
30,00		70,0	0,0	0,0	30,0	0,500	400,00
35,00		0,0	0,0	0,0	100,0	0,500	400,00
40,00		0,0	0,0	0,0	100,0	0,500	400,00
41,00		95,0	0,0	0,0	5,0	0,500	400,00
47,00		95,0	0,0	0,0	5,0	0,500	400,00

3.6- Condições Experimentais para as Análises por CLUE-IES-QqTOF-EM/EM

Os extratos e as frações ativas foram pesados e preparados em soluções de 1 mg/mL solubilizados em água/metanol (80:20, v/v). As análises dos extratos de *D. brasiliensis* e do extrato e frações das flores de *Q. grandiflora* foram realizadas utilizando coluna Acquity UPLC[®] BEH C18 (1,7 μ m, h=50 \times Φ = 0,21 cm) e as análises dos extratos e frações das cascas do caule de *Q. grandiflora* foram realizadas usando uma coluna Cortecstm C18+ (2,7 μ m; h=10 x Φ = 0,21 cm). As fases móveis utilizadas foram: 0,1% v/v de ácido fórmico (A) e 0,1% v/v de ácido fórmico em acetonitrila (B). O perfil do gradiente exploratório foi variando de 5-100% do solvente B por 20 min. A vazão utilizada foi de 0,20 mL/min, com a temperatura do forno de 40°C.

Os parâmetros utilizados para a fonte de ionização de espectrometria de massa foram: nebulizador 3,0 bar; vazão do gás de secagem, 8,0 L min⁻¹; temperatura de secagem 180°C; tensão do End Plate e capilar de 500 V e 4500 V; e varredura completa de EM intervalo, *m/z* 80-1000. A aquisição foi obtida em modo EM/EM (número de precursores: 3) em experimentos com energia de colisão de 20, 25, 30, 35 e 40 eV para todos os *m/z* intervalo analisado. As condições utilizadas no experimento estão detalhadamente descritas por NETO e colaboradores (2020).

Foram realizados experimentos de íons totais e de íons produtos (auto - EM/EM) nos dois modos de ionização para encontrar as melhores condições para fragmentação e ionização dos compostos. Os *softwares* DataAnalysis 4.0 e Bruker Smart Formula (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) e as bases de dados do *software CompoundCrawler* juntamente com os dados na literatura foram utilizados como ferramentas para a identificação dos compostos.

3.7- Geração de redes moleculares através do GNPS

Os dados espectrais EM/EM, obtidos com experimentos realizados por CLUE-IES-QqTOF-EM/EM foram convertidos para o formato mzML através do software Data Analysis[®], conforme é solicitado pela plataforma GNPS (WANG et al., 2016). Posteriormente, esses dados foram compactados através do programa WinSCP cliente FTP e depois carregados no fluxo de trabalho online (<https://ccms-ucsd.github.io/GNPSDocumentation/>), disponível no site GNPS (<http://gnps.ucsd.edu>). Os parâmetros utilizados para a construção da rede molecular otimizados foram: A tolerância de massa do íon precursor foi fixada em 0,02 Da com tolerância de fragmento de íon EM/EM de 0,02 Da. Para a rede criada, as bordas foram filtradas para ter uma pontuação de cosseno acima de 0,7 e com mais de 6 picos correspondentes. Além disso, as bordas entre dois nós eram mantidas na rede se, e somente se, cada um dos nós aparecesse nos respectivos 10 nós mais semelhantes. O tamanho máximo de uma família molecular foi definido como 100, e as bordas de pontuação mais baixas foram removidas das famílias moleculares até que o tamanho estivesse abaixo desse limite. Os espectros na rede foram então pesquisados nas bibliotecas espectrais do GNPS. Os dados gerados pela rede molecular foram importados e visualizados na plataforma Cytoscape Versão 3.8.2.

3.8 - Análise por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

Os extratos etanólicos mais ativos em *La*_{ARG}, folhas de *Drimys brasiliensis* (DBFE), cascas do caule de *Drimys brasiliensis* (DBCcE) e frações obtidas dos extratos etanólicos de *Qualea grandiflora* (das cascas e flores) tiveram seus perfis químicos analisados por RMN de ¹H. As amostras foram preparadas usando 10 mg de cada extrato ou fração e foram solubilizadas usando CDCl₃ (fração QgFIEH) e DMSO-d₆ (extratos: DBFE, DBCcE; frações: QgFIEA, QgFIEB, QgFIEHi, QgCcEcA, QgCcEqA, QgCcEA SP). A análise foi realizada no Laboratório Multiusuário do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia – UFU, Uberlândia, MG.

3.9 - Avaliação de Inibição de Formas Promastigotas de *L. infantum* com Extratos Vegetais

Os ensaios *in vitro* em *L. infantum* foram realizados no Laboratório de Interação Patógeno-Hospedeiro na UNB (Universidade de Brasília - DF) em parceria com a Prof.^a Dr.^a Izabela M. Dourado Bastos. As formas promastigotas de *L. infantum* foram cultivadas em meio Schneider suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) inativado e 100 µg/mL de gentamicina a 28 °C. Foram coletadas em fase intermediária de crescimento (cultura de 3 dias) para a triagem. O parasito foi obtido da Fiocruz-COLPROT (Coleção de Protozoários da Fiocruz).

Os extratos secos das espécies *D. brasilensis* (casca do caule e folhas), *D. miscolobium* (casca do caule e folhas), *E. suberosum* (casca do caule e folhas), *J. molíssima*, *M. axillaris* (casca do caule, folhas e raiz), *M. língua* (casca do caule), *T. ochracea* (casca do caule e folhas), *V.tucanorum* (casca do caule e folhas) (5 mg) foram solubilizados com DMSO (dimetilsulfóxido) em banho ultrassônico, resultando em uma concentração final nos testes de 1% e a concentração final dos extratos quando transferida para a placa de cultura celular de 96 poços foi de 100 µg/mL. Em seguida, 150 µL (2 x 10⁶ parasitos/mL) de *L. infantum* foram resuspendidos nas placas e incubados por 48 h a 28 °C. Depois desse período, foram adicionados 20 µL de solução de rezazurina a uma concentração final de 2 mM em todos os poços e incubadas por um período de 4 horas à 37 °C. Decorrido o tempo, as placas foram levadas ao equipamento Molecular Devices SpectraMax M5 Plate Reader para realização da leitura (fluorescência), à 570 nm_{ex} / 595 nm_{em}.

Esse experimento *in vitro* foi realizado em triplicata e repetido duas vezes independentemente. Foram preparados um controle negativo em DMSO 1% e um controle positivo usando o fármaco anfotericina B nas concentrações de 19,56 a 312,5 ng/mL (ANDRADE et al., 2016).

3.10 – Ensaio de Inibição Enzimática da Arginase de *Leishmania amazonensis*

O ensaio enzimático foi realizado com base na medida da atividade da arginase, determinada pela leitura espectrofotométrica da absorbância do sal azul de indofenol (Método modificado de Berthelot) (FAWCETT, SCOTT, 1960).

O sal azul de indofenol é formado através de três reações acopladas. Na primeira reação o substrato L-arginina é hidrolisado pela enzima arginase em L-ornitina e ureia. Na segunda reação a ureia é hidrolisada pela urease e forma amônia e dióxido de carbono. Em meio alcalino e na presença de um catalisador inorgânico, a amônia reage com salicilato e hipoclorito de sódio formando o sal de coloração verde.

Uma curva padrão de ureia foi realizada para a calibração do experimento. As concentrações de ureia utilizadas para a preparação da curva foram: 0,75; 1,75; 2,50; 4,08; 5,83; 8,18 e 9,16 mM. Para a realização da mesma foram pipetados 20 µL de ureia (substrato da urease) e 1000 µL da SA, e mantido sob incubação por 10 minutos a 37°C. Posteriormente, foram adicionados 1000 µL da SB e incubados nas mesmas condições reacionais. A curva foi realizada em duplicata. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 600 nm.

As amostras foram preparadas através de diluições em 2% de DMSO/Água para triagem dos extratos e frações em concentração de 25 µg/mL e compostos (sintéticos ou isolados de plantas) à 50 µM.

A reação foi iniciada quando 5 µL do inibidor (extrato, fração ou composto puro) foi adicionado a reação enzimática (29 µL de H₂O Milli-Q + 5,0 µL de solução tampão CHES (50 mM, pH=9,6) + 1,0 µL de enzima arginase (0,5 µM), incubando à 37 °C por 10 min. Depois foi adicionado no meio reacional 10 µL do substrato L-arginina (50 mM em pH = 9,6), que foi incubado por 10 min a 37 °C, tendo um volume final de 50 µL da mistura reacional.

A reação da catálise da ureia ocorre sequencialmente com a adição de 1000 µL da SA (Tampão Fosfato 100 mmol/L pH 6,8; Salicilato de Sódio 300 mmol/L; Nitroprussiato de Sódio 5 mmol/L; Urease 10.000 UI) em 20 µL da reação enzimática da *La*_{ARG} (E:I:S) que foi incubado a 37 °C por 10 min. Decorrido o tempo de incubação, foi adicionado 1000 µL da SB (hipoclorito sódico 10 mmol/L; hidróxido de sódio 1,5 mol/L) e novamente incubado à 37 °C por 10 min.

As medidas de absorvância foram realizadas em espectrofotômetro a 600 nm, sendo calculado o percentual de inibição com base nos dados obtidos, onde os valores de absorvância foram convertidos em concentração de produto reacional (azul de indofenol) e taxa reacional (velocidade), utilizando a equação da reta obtida a partir da regressão linear da curva padrão de ureia. Os cálculos de inibição enzimática foram feitos em comparação com o controle negativo (V_o), usando a equação a seguir:

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

- V_i = velocidade de reação na presença do inibidor.
- V_o = velocidade de reação na ausência do inibidor.

Os compostos que apresentaram inibição foram avaliados no ensaio desacoplado em relação à enzima urease para confirmar se a inibição encontrada era referente ao alvo molecular de interesse. No ensaio desacoplado frente à urease foram usadas as mesmas condições reacionais descritas acima, onde 20 μ L de solução contendo a amostra a ser analisada (possível inibidor) e o substrato de ureia (0,7 mg/mL) são submetidos a incubação com a SA e SB.

Os extratos que apresentaram um percentual de inibição frente à arginase, superior a 60%, foram selecionados para determinação dos valores de IC_{50} . Os extratos da espécie de *D. brasiliensis* selecionados foram preparados e avaliados nas concentrações entre 150 μ g/mL e 1 μ g/mL para as folhas (DBFE) e entre 200 μ g/mL e 0,5 μ g/mL para as cascas do caule (DBCcE). Os dados foram tratados utilizando a equação não-linear (**Eq. 1**), através do programa GraFit® 5.0.13. Os ensaios foram realizados em duplicada e repetidos em experimentos individuais.

$$y = \frac{Range}{1 + \left(\frac{x}{IC_{50}}\right)^s} + Background \quad \text{Eq.1}$$

3.11 - Estudos de Modelagem Molecular

Os estudos de modelagem molecular foram realizados pelo Dr. Christian Kersten em colaboração com a Prof.^a Dr.^a Tanja Schirmeister do Instituto de Farmácia e Bioquímica de Johannes Gutenberg Universität Mainz, Alemanha.

O ensaio computacional foi realizado com o intuito de auxiliar com base nos valores de energia de interação a afinidade dessas moléculas em relação à proteína ARG. Esta análise *in silico* com ARG foi realizada com os compostos identificados anteriormente nas espécies de *D. brasiliensis* (**16-31** e **116-120**) e *E. suberosum* (**106-115**) e também dos compostos (**5F**, **5C**, **2C** e **3F**, **3C**) que foram identificados neste trabalho da análise dos extratos ativos de *D. brasiliensis* por técnicas de RMN de ¹H e CLUE-IES-QqTOF-EM/EM.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 - Rendimento dos extratos obtidos

As massas obtidas de flores frescas e das cascas do caule secas e moídas de *Q. grandiflora* (Cerrado de Goiás) controle (não queimadas) (c) e queimadas (q) foram 746, 168 e 177 gramas, respectivamente. O rendimento foi calculado apenas para o extrato etanólico obtido das flores, pois os extratos etanólicos obtidos das cascas do caule não foram referentes a todo o processo de extração com etanol. A quantidade de 2,7g de extratos bruto etanólico das cascas do caule foram obtidas, controle (QgCcEc), e queimada (QgCcEq) para a realização da partição líquido-líquido e análise por CL-EM, não sendo necessário a obtenção de grande quantidade de material de partida para a realização das análises de identificação e ensaios enzimáticos.

Das flores foi feito todo o processo de extração, tendo em vista que seria necessária uma maior quantidade de material de extrato etanólico para estudo fitoquímico e isolamento dos compostos, trabalho que poderá ser realizado futuramente. Partindo de 746 g de flores frescas foi obtido 118 g de extrato bruto etanólico (QgFIE), tendo então um rendimento de 15,8% deste processo de extração com etanol.

TABELA 4.1: Quantidade de massa obtida das frações após procedimento de partição líquido-líquido. Rendimentos calculados a partir dos extratos brutos.

EXTRATO ETANÓLICO (g)	FRAÇÕES	MASSA DAS FRAÇÕES (g) e (mg)*	RENDIMENTO (%)
QgFIE = 118	QgFIEH	9,7	8,2
	QgFIEA	53,2	45,1
	QgFIEB	10,6	9
	QgFIEHi	20,6	17,4
QgCcEc = 2,7	QgCcEcH	100,4*	3,7
	QgCcEcC	276,3*	10,2
	QgCcEcA	574,2*	21,3
	QgCcEcHi	1,65	61,1

	QgCcEqH	105,3*	3,9
	QgCcEqC	266,2*	9,9
QgCcEq = 2,7	QgCcEqA	588,5*	21,8
	QgCcEqHi	1,5	55,6
	QgCcEH SP	205,3*	7,6
	QgCcEA SP	500,5*	18,5
QgCcE SP = 2,7	QgCcEHi SP	1,5	55,6

Legenda: *Qualea grandiflora* (Qg); extrato (E); São Paulo (SP); cascas do caule (Cc); flores (Fl); controle (c); queimada (q); hexano (H); clorofórmio (C); acetato de etila (A); hidroalcolico (Hi).

4.2 - Inibição enzimática da *La_{ARG}* por extratos etanólicos e frações de plantas do cerrado

Os produtos naturais são uma fonte inestimável de inspirações de novas moléculas bioativas. A utilização de plantas medicinais para tratamento, cura e prevenção de doenças, é empregada pela humanidade há muito tempo (JUNIOR, PINTO, MACIEL, 2005; VIEGAS, BOLZANI, BARREIRO, 2006).

As espécies provenientes do Cerrado se apresentam como uma fonte promissora na busca de inibidores enzimáticos, pois são pouco exploradas no ponto de vista científico, tornando assim uma motivação para o desenvolvimento de pesquisas nesta área (RAMALHO, 2015).

Sendo assim, foram selecionados extratos de plantas do Cerrado para realizar triagem frente à enzima *La_{ARG}*, com o intuito de encontrar inibidores de diferentes classes de metabólitos secundários ainda não avaliados em relação a esta enzima. Os extratos selecionados pertencem a diferentes gêneros. Os mesmos foram avaliados através do método espectrofotométrico ($\lambda = 600 \text{ nm}$) em ARG e urease.

Analisando o percentual de inibição dos extratos etanólicos (Figura 4.1) frente à enzima *La_{ARG}* pode-se observar que estes apresentaram valores de inibições satisfatórios da atividade enzimática, ou seja, superiores a 60%, exceto as espécies: *M. língua* (cascas do caule), *M. axillaris* (folhas e raiz), *T. ochracea* (cascas do caule) e *V. tucanorum* (cascas do caule e folhas).

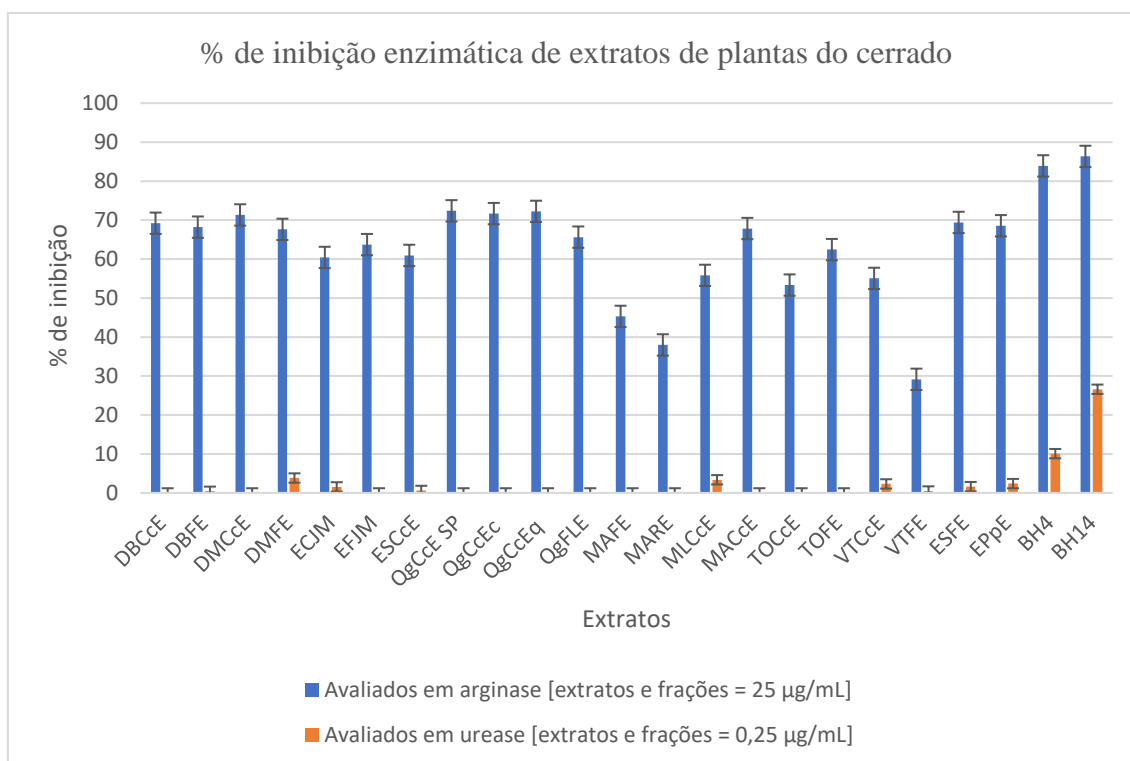


FIGURA 4.1. Triagem dos extratos de espécies provenientes do cerrado frente às enzimas arginase (cor azul) (extratos = 25µg/mL); urease (cor laranja) (extratos = 0,25µg/mL). Extrato etanólico (E); Casca do caule (Cc); folha (F); flor (FL); raiz (R); controle (c); queimada (q); São Carlos (SP); *B. holophylla* (BH); *D. brasiliensis* (DB); *D. miscolobium* (DM); *E. suberosum* (ES); *J. mollissima* (JM); *M. axillaris* (MA); *M. lingua* (ML); *Q. grandiflora* (Qg); *T. ochracea* (TO); *V. tucanorum* (VT).

Em relação ao ensaio desacoplado (ensaio em urease), o qual foi realizado nas mesmas condições reacionais do ensaio contendo ambas as enzimas, as espécies tiveram inibição em urease com valores inferiores a 10%, exceto pela espécie *B. holophylla* que apresentou 26,6% de inibição para esta enzima.

Mediante os resultados encontrados, a espécie *D. brasiliensis* foi selecionada para a realização da prospecção química, tendo em vista que nesta espécie ambos os extratos (cascas do caule e folhas) apresentaram inibição frente à *La*_{ARG} (DBCcE = 69,2% e DBFE = 68,2%), espécie a qual, os extratos da casca haviam apresentado atividade leishmanicida previamente (CLAUDINO et al, 2013). Além disso, a classe de compostos sesquiterpenos drimaniais presente nesta espécie ainda não foi investigada em *La*_{ARG}.

Outra espécie que também apresentou um resultado de inibição bem expressivo, além de exibir em sua composição química classes de metabólitos

secundários que ainda não foram avaliados em La_{ARG} , tais como os alcaloides tropânicos, foi a espécie *E. suberosum* (BARROS et al, 2017). A fração de diclorometano (CH_2Cl_2) das folhas dessa espécie, foi cedida pela Prof.^a Dr.^a Richele P. Severino, da qual foram identificados anteriormente por NASCIMENTO, 2014 os alcaloides tropacocaína e nortropacocaína (Figura 4.2 e 4.3).

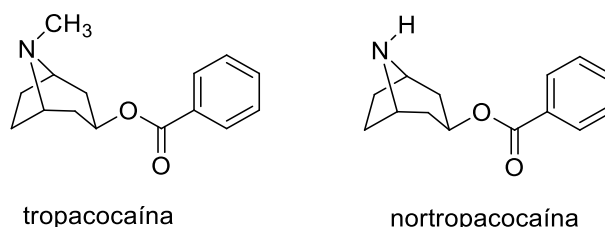


FIGURA 4.2. Alcaloides identificados na fração clorofórmica das folhas de *E. suberosum*

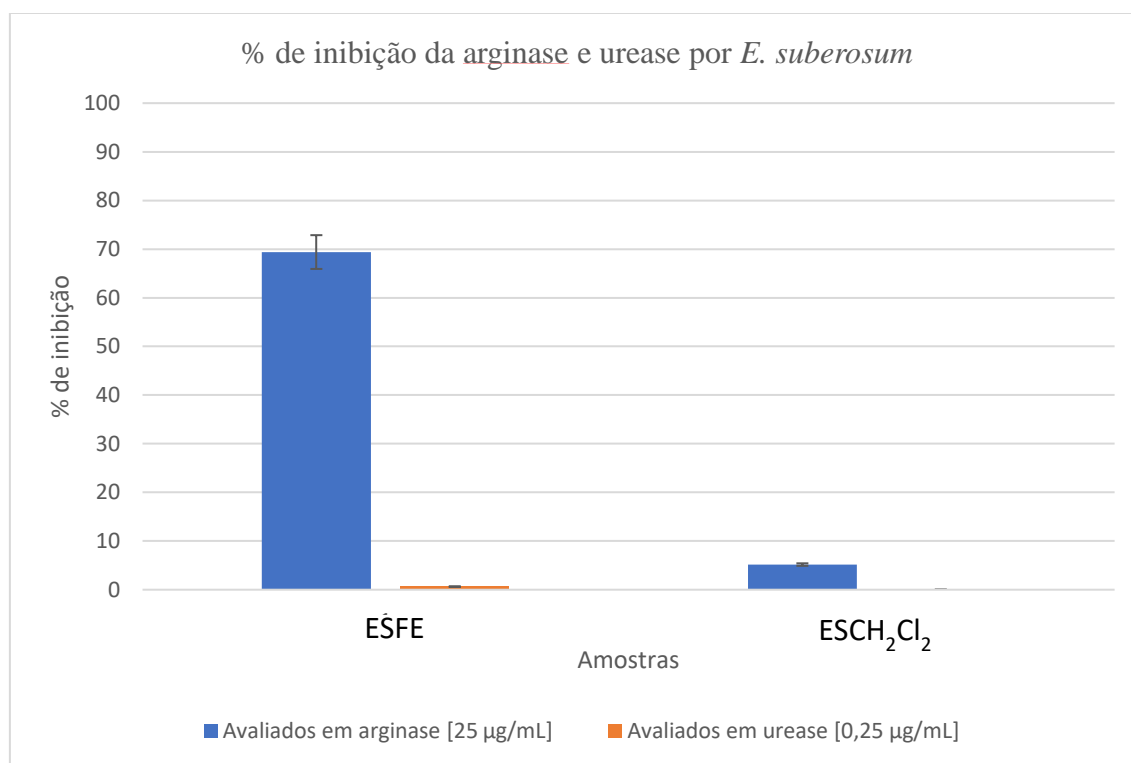


FIGURA 4.3. Triagem do extrato etanólico das folhas (ESFE) e da fração diclorometano ($ESCH_2Cl_2$) da espécie *E. suberosum* frente às enzimas arginase (extrato e fração avaliados à 25 µg/mL) e urease (extrato e fração avaliados à 0,25 µg/mL).

Através dos valores de inibição obtidos (Figura 4.3), pode-se verificar que a fração CH_2Cl_2 de *E. suberosum* apresentou um valor inferior ao extrato etanólico frente à ARG. Essa diferença apresentada, pode ser explicada através da presença das moléculas

contidas no extrato etanólico antes do fracionamento, como a presença de flavonoides no extrato etanólico de *E. suberosum* que são conhecidos por serem inibidores de arginase, tais como quercetina, hiperina-3-*O*-monoglicosídeo e isoquercitrina (NASCIMENTO, 2014) que estariam ausentes na fração diclorometânica.

Os extratos das flores da espécie *Q. grandiflora* coletada em Catalão (antes da queimada) e das cascas do caule da espécime coletada em Catalão Goiás (antes e após a queimada) e da espécime coletada em São Carlos apresentaram inibição frente à **La**ARG (QgFLE = 65,63%, QgCcEc = 71,67%, QgCcEq= 71,67% e QgCcE SP = 72,38%). Por ser uma planta medicinal com várias atividades biológicas citadas na literatura, como, atividade antibacteriana, antiulcerogênica, antioxidante, analgésica (AYRES et al., 2008), antiplasmódica (CORDEIRO et al., 2017, NETO, et al., 2020), tripanocida (CORDEIRO et al., 2017) e possuir classes identificadas em seu gênero e espécie que ainda não foram avaliados frente a enzima arginase de *L. amazonensis*, como os elagitaninos, a espécie *Q. grandiflora* também foi selecionada para a prospecção química.

Outro fator analisado com a *Q. grandiflora* foi a influência da queimada (comparação entre a *Qualea* queimada e a não queimada) e localidade da planta (diferença de clima, temperatura e propriedades do solo) pela comparação entre a mesma espécie de *Qualea* coletada em Goiás e em São Paulo sobre a atividade da arginase, levando em consideração que esses fatores abióticos podem ocasionar alterações na atividade biológica devido as alterações da composição química e/ou variações de quantidades de determinados metabólitos secundários.

Os extratos e as frações obtidas por partição líquido-líquido das cascas do caule do cerrado de Catalão-GO antes e após a queimada e do cerrado paulista, assim como das flores dessa espécie foram avaliados. Os resultados da triagem estão apresentados a seguir:

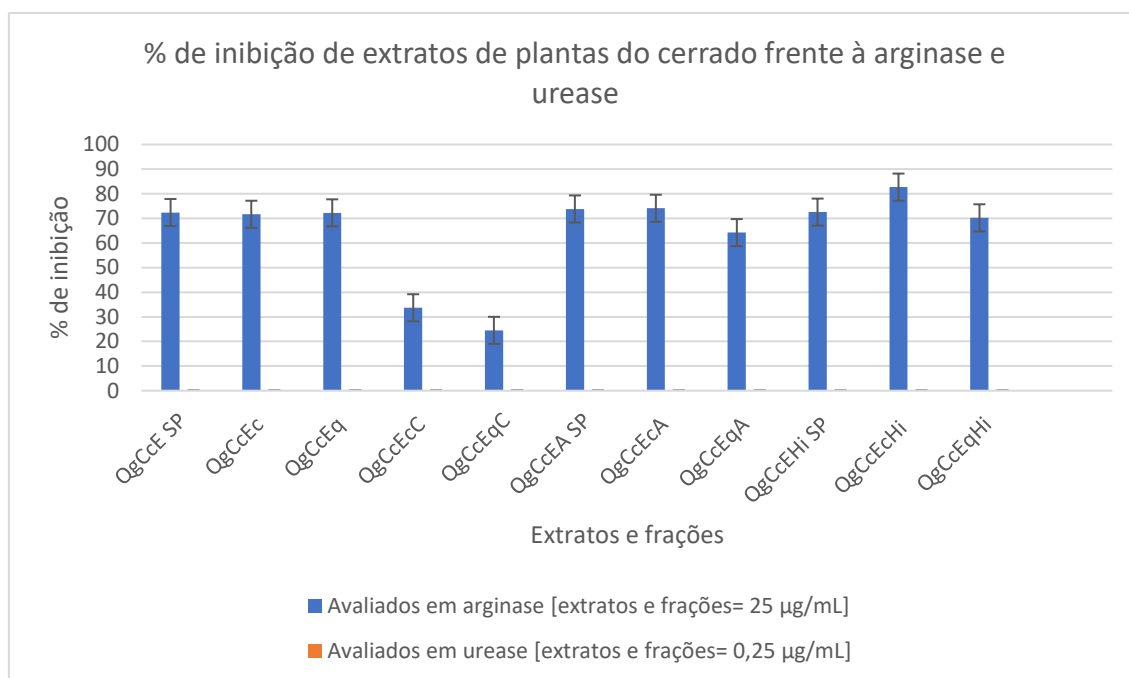


FIGURA 4.4. Triagem dos extratos e frações das cascas do caule de *Q. grandiflora* frente às enzimas arginase (cor azul) (extratos = 25µg/mL) e urease (cor laranja) (extratos = 0,25µg/mL). *Q. grandiflora* (Qg); casca do caule (Cc); Catalão controle (c); Catalão queimada (Cq); São Carlos (SP); Fração acetato (A); Fração Clorofórmio (C); Fração Hidroalcoólica (Hi)

Observando os percentuais de inibição obtidos através da avaliação em La_{ARG} pelos extratos etanólicos (QgCcE SP, QgCcEc e QgCcEq) das cascas do caule da espécie *Q. grandiflora* (Figura 4.4), pode-se observar inibições em torno de 70%, sendo assim, não houve variação da atividade inibitória enzimática.

Após a partição líquido-líquido dos extratos avaliados, as frações obtidas de acetato de etila (QgCcEASP, QgCcEcA, QgCcEqA) e a hidroalcoólica (QgCcEHi SP, QgCcEcHi e QgCcEqHi), continuaram a apresentar valores de inibições satisfatórios, com inibições semelhantes, exceto as frações de clorofórmio (QgCcEcC e QgCcEqC) que foram avaliadas, cujas frações apolares reduziram significativamente o percentual de inibição, apresentando inibições inferiores à 35% em La_{ARG} . As frações hexânicas não foram avaliadas devido não terem sido solúveis em 2% de DMSO:água. Em relação ao ensaio desacoplado (ensaio em urease), os extratos e frações não apresentaram nenhuma inibição em urease, evidenciando assim que os percentuais de inibições observadas estão relacionados à enzima arginase. A inibição da arginase pelos extratos etanólicos e pelas frações acetato de etila e hidroalcoólica podem ser explicadas pela presença de metabólitos secundários que se destacam em trabalhos anteriores como potentes inibidores da atividade enzimática da arginase, tais como, catequina, epicatequina,

kaempferol, ácido gálico e epigallocatequina, que possuem potência inibitória IC_{50} 1,70 μ M; 1,6 μ M ;55 μ M 0,13 μ M; 3,8 μ M, respectivamente (CRUZ et al., 2013; de SOUSA et al., 2014 b); dos REIS et al., 2013; MANJOLIN et al., 2013). Assim, a presença destes compostos poderia contribuir para atividade inibitória em arginase encontrada nas cascas do caule para essa espécie.

Até o presente momento não há relatos de estudos com as flores dessa espécie, o que nos motivou a avaliar também as frações obtidas (acetato de etila QgFIEA, butanólica QgFIEB e fração hidroalcoólica QgFIEHi) em ensaio enzimático *in vitro* (Figura 4.5)

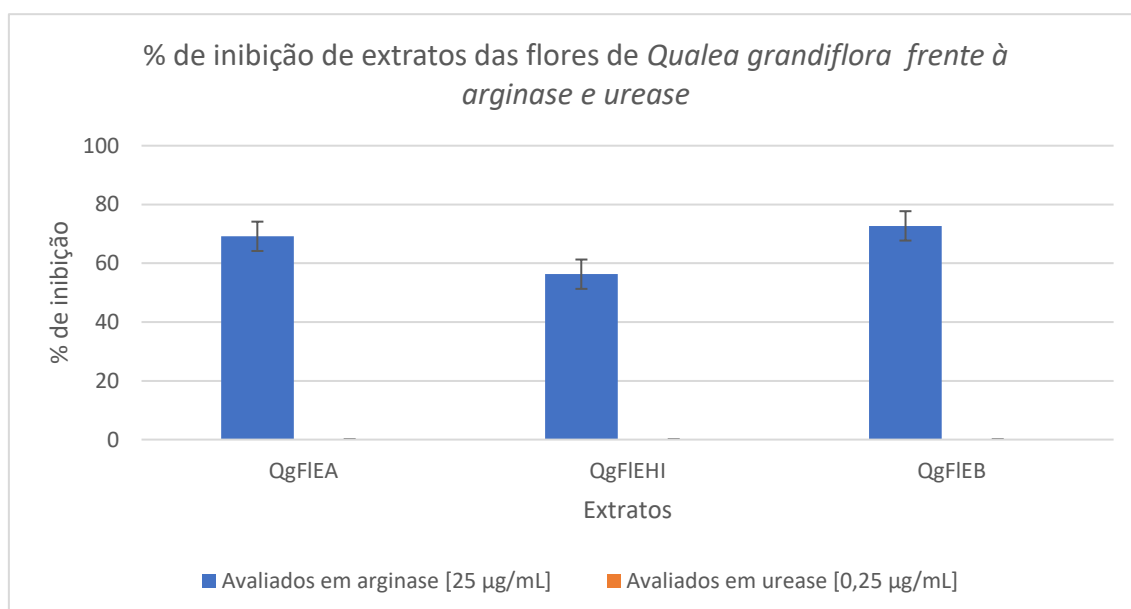


FIGURA 4.5. Triagem das frações da espécie *Q. grandiflora* frente às enzimas arginase (frações avaliadas à 25 μ g/mL) e urease (frações avaliadas à 0,25 μ g/mL e 2,5 μ g/mL). *Q. grandiflora* (Qg); Flores (FIE); Fração acetato (A); Fração Butanólica (B) Fração Hexânica (H); Fração Hidroalcoólica (Hi)

Através da triagem foi possível observar que as frações das flores de *Q. grandiflora* apresentaram inibições expressivas frente à arginase e não apresentaram inibição em urease, quando avaliadas nas mesmas condições reacionais. Estudos realizados anteriormente pelo nosso grupo de pesquisas, com extratos da casca do caule e frutos dessa espécie, permitiu a identificação de compostos das classes dos elagitaninos, galotaninos, ácido carboxílico e flavonoides (NETO et al., 2020).

5 - Perfil químico dos extratos de extratos e frações por RMN de ^1H

5.1 - *Drimys brasiliensis*

Os espectros de RMN de ^1H realizados para os extratos etanólicos da casca de caule (DBCcE; Figura 5.1) e das folhas (DBFE; Figura 5.2) de *D. brasiliensis* sugerem a presença de ácidos graxos, pois apresentam sinais em campo alto δ 0,8-1,5 que é característico de hidrogênios de grupos metilas terminais. Além disso, sinais em campo baixo δ 10,0-12,0 característico de hidrogênios -COOH também são apresentados (Figuras 5.1 e 5.2, respectivamente). A presença de ácidos graxos já foi relatada anteriormente nessa espécie (CLAUDINO, 2011).

Os extratos DBCcE e DBFE exibiram uma grande quantidade de sinais em deslocamento químico entre δ 3,0 e 5,0 que são típicos de unidades glicosídicas indicando a presença de compostos glicosilados. É possível verificar também a presença de sinais peculiares de hidrogênios de compostos aromáticos entre δ 6,5 e 8,0 sugerindo a presença de flavonoides. Os sinais característicos de aldeído também foram observados em δ 9,0-10,0.

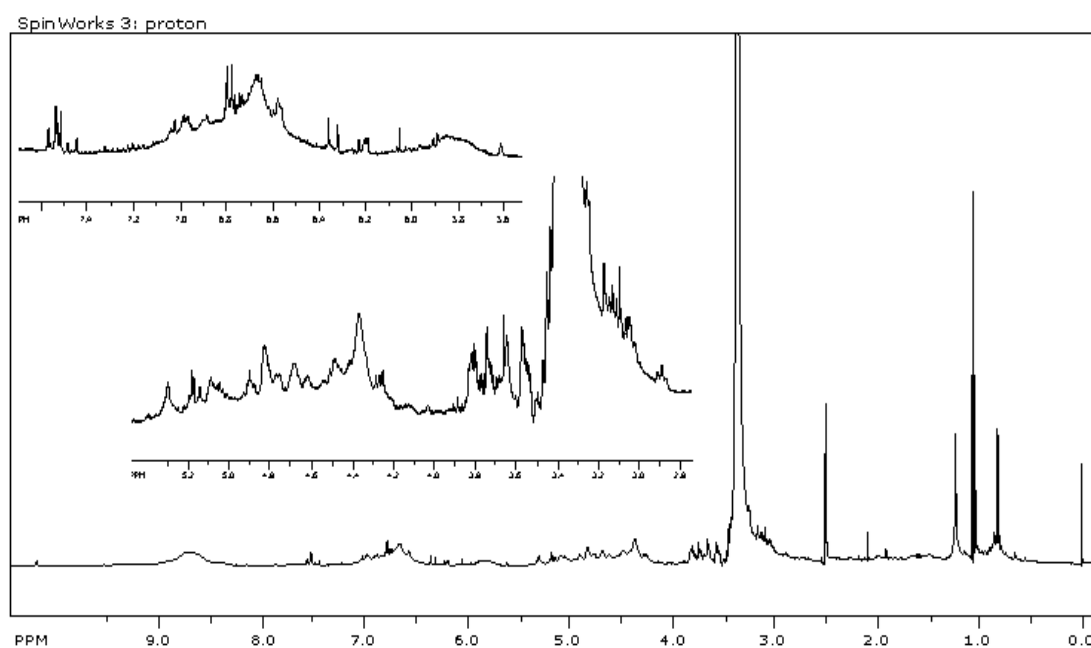


FIGURA 5.1 – Espectro de RMN de ^1H com ampliação das regiões δ 5.5 a 7.5 e δ 2.8 a 5.5 para o extrato etanólico da casca do caule de *Drimys brasiliensis* (DBCcE) (400MHz, DMSO- d_6).

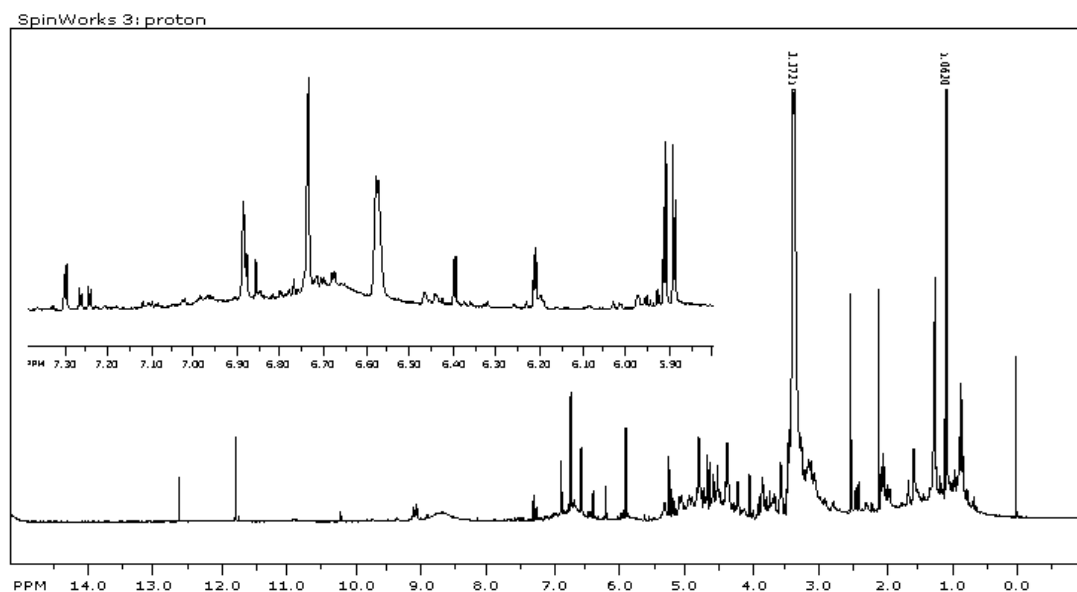


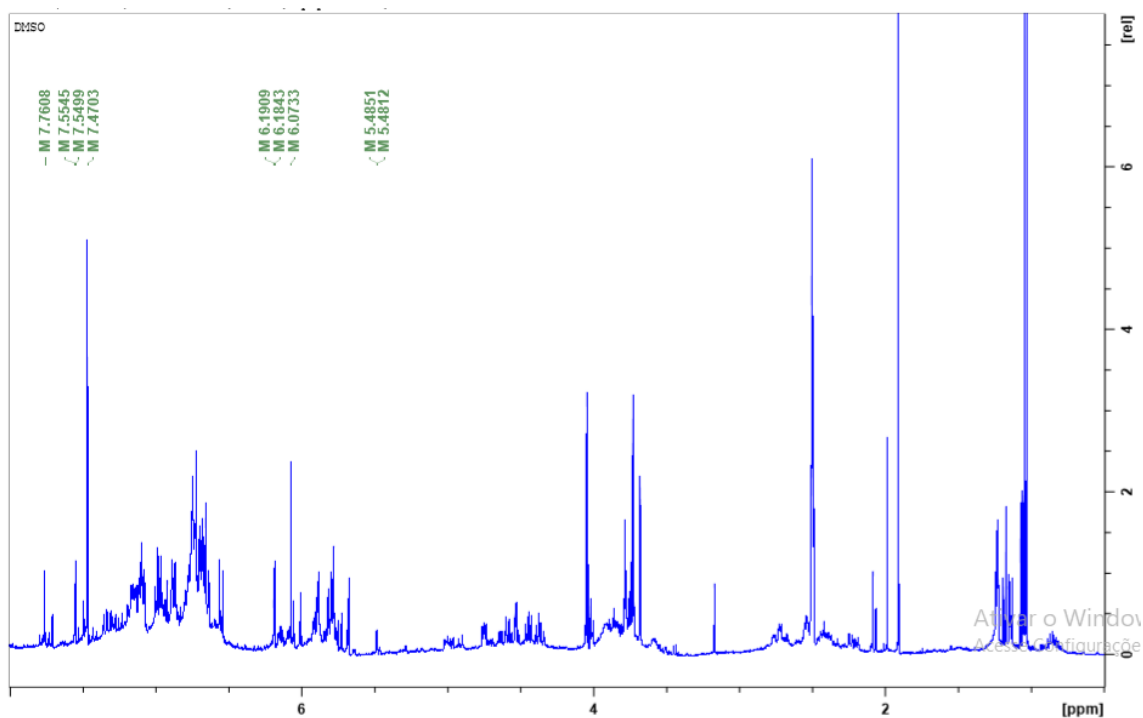
FIGURA 5.2 - Espectro de RMN de ^1H com ampliação da região δ 5.9 a 7.3 do espectro de RMN de ^1H para o extrato DBFE. (400MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

5.2 - *Q. grandiflora*

O RMN ^1H foi realizado com o objetivo de observar diferenças nos sinais ou deslocamentos químicos nos espectros das frações QgCcEcA, QgCcEqA e QgCcEA SP, a fim de comprovar a influência da região e da queimada na produção de metabolitos secundários.

Com os resultados obtidos para as frações A: QgCcEcA e B: QgCcEqA (Figura 5.3), notou-se a presença alguns sinais distintos nos espectros de RMN ^1H , sinais com variações das intensidades e variações em alguns valores de deslocamento químico. Os sinais em δ 7,76 e 5,48 foram observados em maior intensidade para a fração QgCcEcA e o sinal em δ 0,59 na QgCcEqA. Observou-se também, sinais com variações de deslocamentos químicos, em δ 7,55; 7,47; 6,19; 6,07 para a fração QgCcEcA e sinais δ 7,57; 7,49; 6,21 e 6,09, para a fração QgCcEqA. Estes resultados evidenciaram a influência da queimada na produção de metabolitos secundários nesta espécie de *Qualea*.

A



B

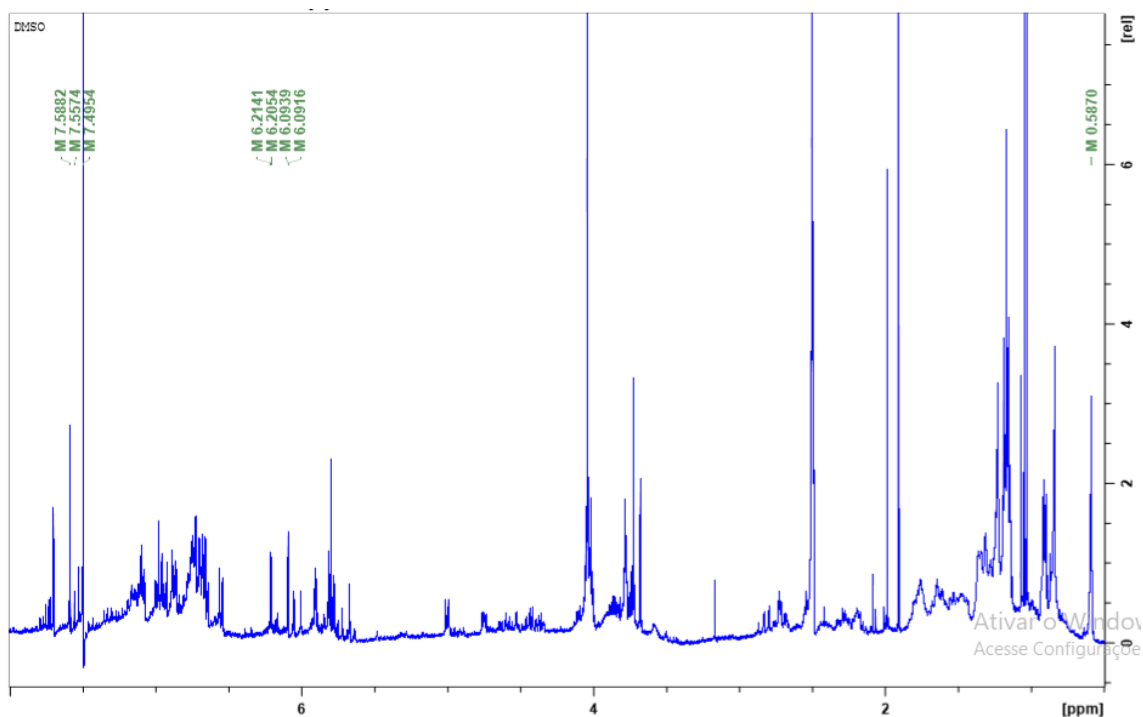


FIGURA 5.3. Espectro de RMN ^1H das frações. A. controle (QgCcEcA) e B.queimada (QgCcEqA)

Comparando os espectros das frações QgCcEcA e QgCcEA SP (Figura 5.4), observou-se sinais bem mais distintos na região de δ 5-8 ppm referentes a sinais de

hidrogênios ligados a carbono sp^3 aromáticos e não aromáticos. Na região de δ 3-5 e 1-3, verificou-se a presença de sinais diferentes, sendo estes provenientes de hidrogênios carbinólicos e hidrogênios de metila, metino e metileno, respectivamente. Estes resultados apontam a influência das diferentes condições (solo, clima, índice pluviométrico, etc) das duas regiões na produção de metabolitos secundários.

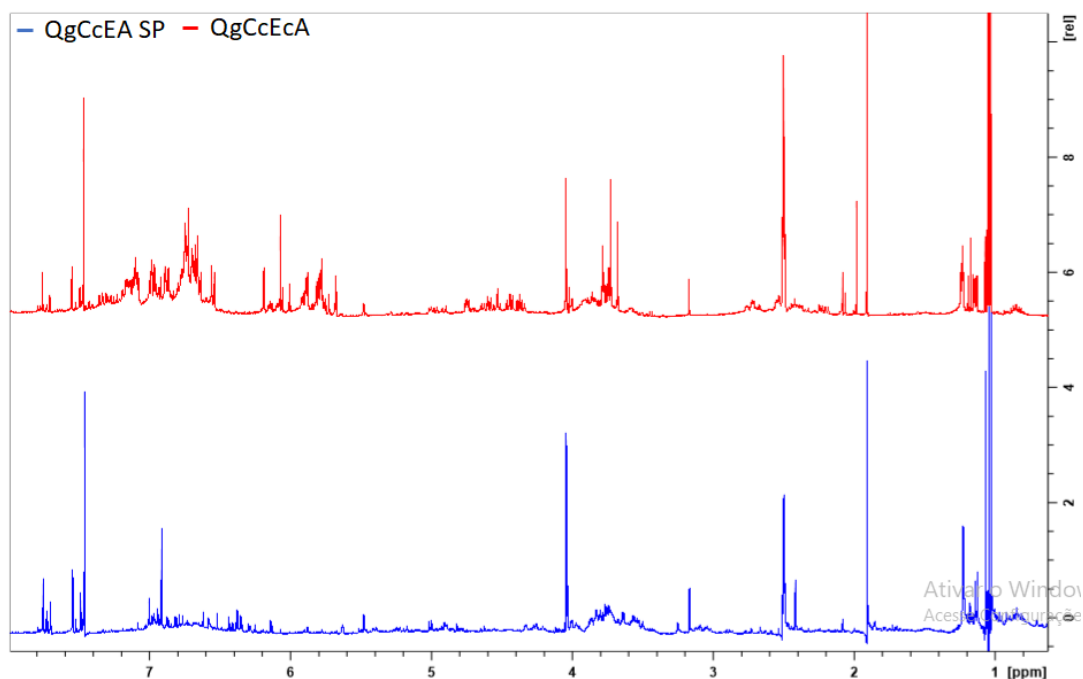


FIGURA 5.4. Espectro de RMN ^1H das frações QgCcEcA e QgCcEA SP

Espectros de RMN de ^1H também foram realizados para as frações das flores, onde os espectros de QgFIEA e QgFIEB apresentaram a presença de compostos fenólicos, pois contém sinais em campo baixo δ 6,0-8,0 que são característicos de hidrogênios aromáticos (Figura 5.5). Para as frações QgFIEB e QgFIEHi foi apresentado uma maior quantidade de sinais em deslocamento químico entre δ 3 e 4,5 que são característicos de unidades glicosídicas indicando assim, a existência de compostos glicosilados comuns no gênero *Qualea* (MESQUITA et al, 2015; NETO et al., 2011).

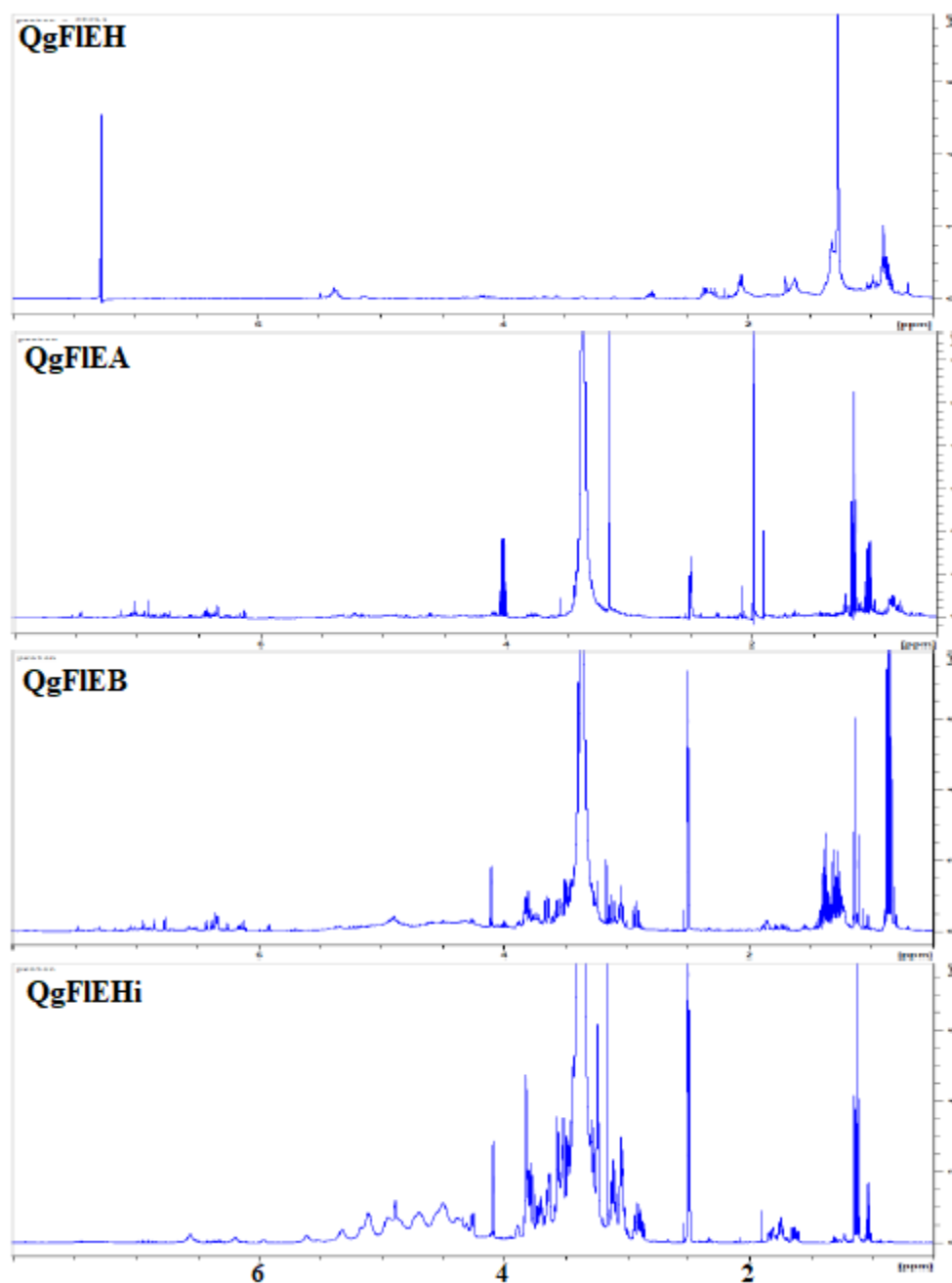


FIGURA 5.5. Espectro de RMN ¹H das frações obtidas do extrato etanólico das flores de *Q. grandiflora*

6- Resultados das análises por CLAE-DAD

As análises através de CLAE-DAD das frações QcCcEcA, QgCcEqA e QgCcEA SP, foram realizadas com o intuito de verificar a influência da queimada (comparação entre a *Qualea* queimada e a não queimada) e da diferença de clima, temperatura e

propriedades do solo (comparação entre a *Qualea* de Goiás e de São Paulo) na produção de metabólitos secundários. Todas as condições experimentais foram similares para a análise das amostras para a comparação dos resultados.

Através dos espectros obtidos para as frações QgCcEcA e QgCcEqA (Figura 6.1), observou-se que houve diminuição nas intensidades dos sinais com TR de 25; 30,6-31,6 e 35,4-38,6 min após a *Qualea* ser queimada, evidenciando assim, a influência deste efeito abiótico na produção de metabólitos secundários. Além disso, notou-se um aumento na produção de alguns compostos, já que a intensidade dos sinais com TR de 26,4; 28,9 e 30 min foram maiores após o processo de queimada.

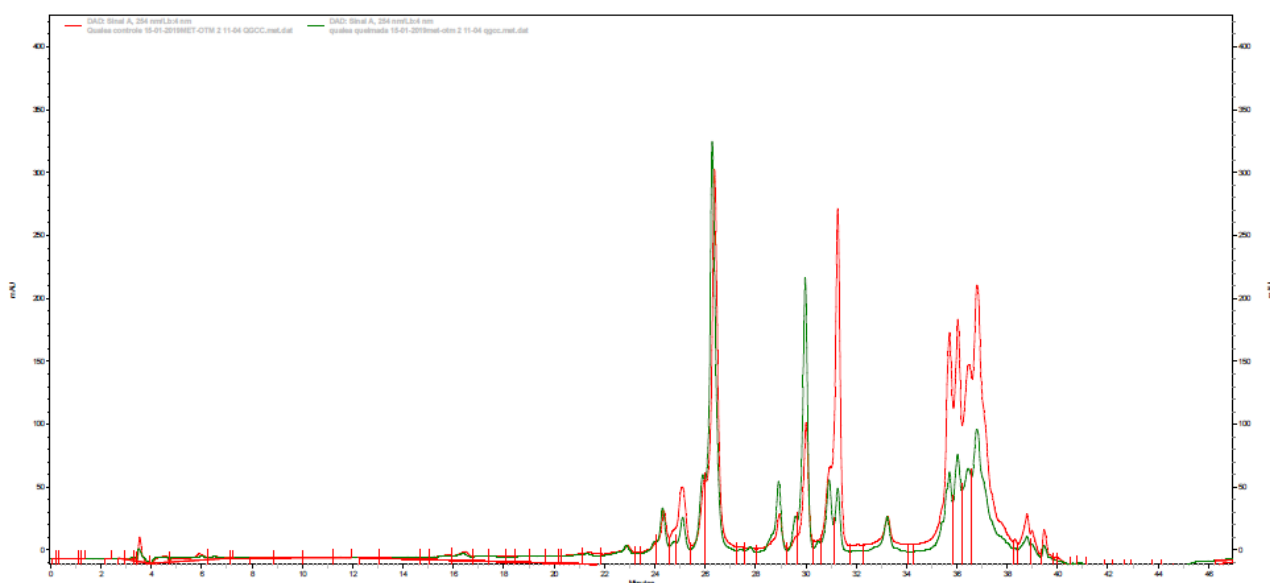
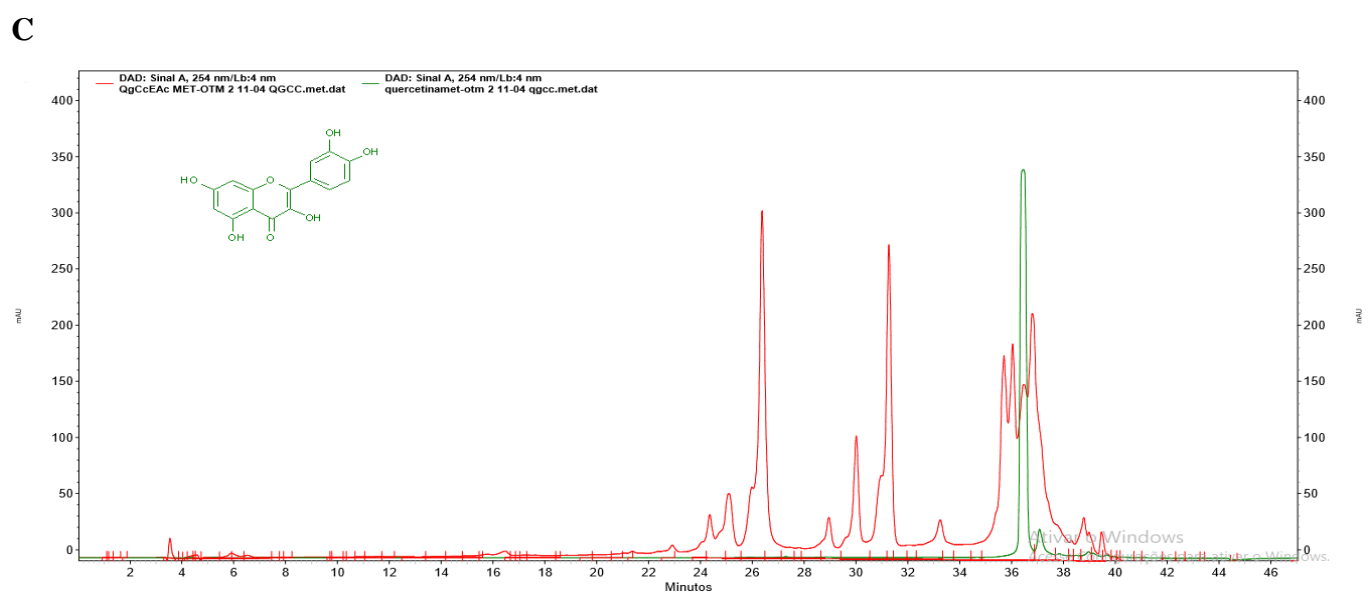
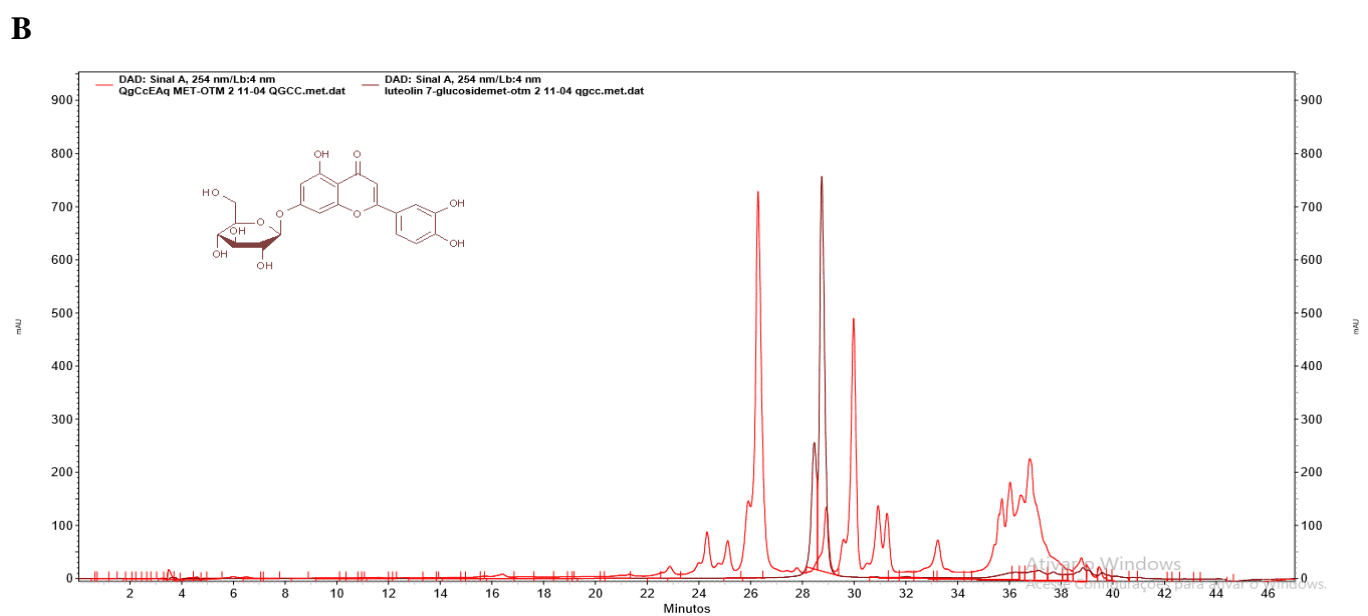
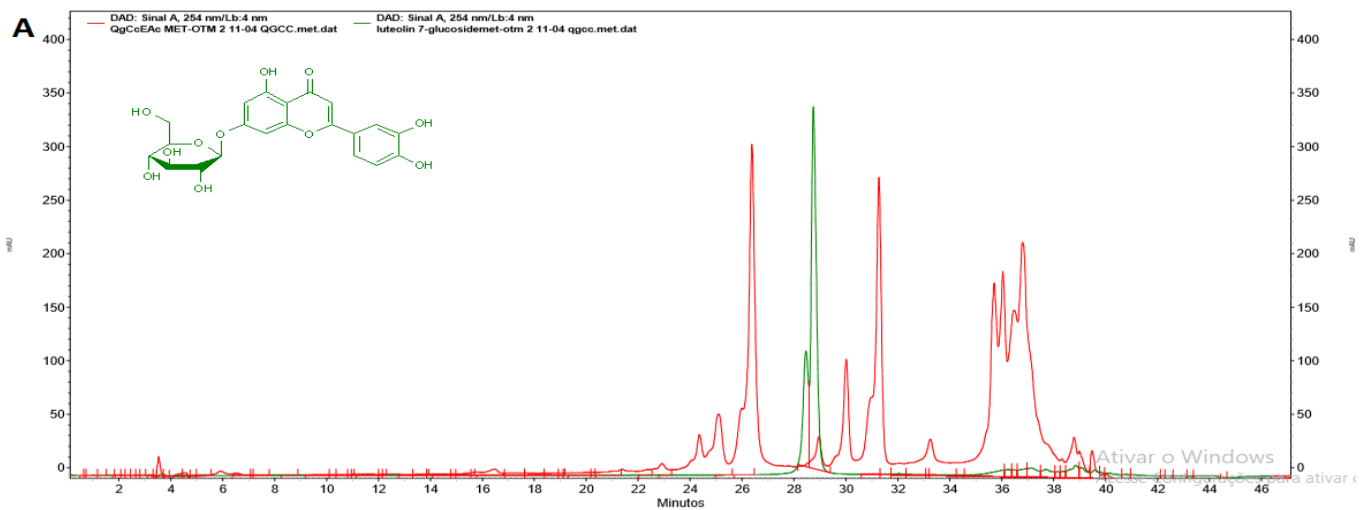


FIGURA 6.1. Espectro gerado após a análise por CLAE-DAD para as frações QgCcEcA (vermelho) e QgCcEqA (verde).

No intuito de identificar alguns desses compostos foram injetados padrões de miricetina, kaempferol, quercetina-glucosídeo, quercetina, luteolina-7-glucosídeo, isoquercetina, ácido elágico, amentoflavona, catequina e epicatequina. Comparando o tempo de retenção dos padrões com as amostras, através das bandas no cromatograma foi possível indicar a presença dos compostos: luteolina-7-glucosídeo (TR= 28,8 min), quercetina (TR= 36,5 min) e amentoflavona (TR= 36,9 min) nas frações de QgCcEcA e QgCcEqA (Figura 6.2). Esses resultados deixam evidente a diminuição na biossíntese de quercetina e amentoflavona, assim como o aumento na produção de luteolina-7-glucosídeo, após a queimada.



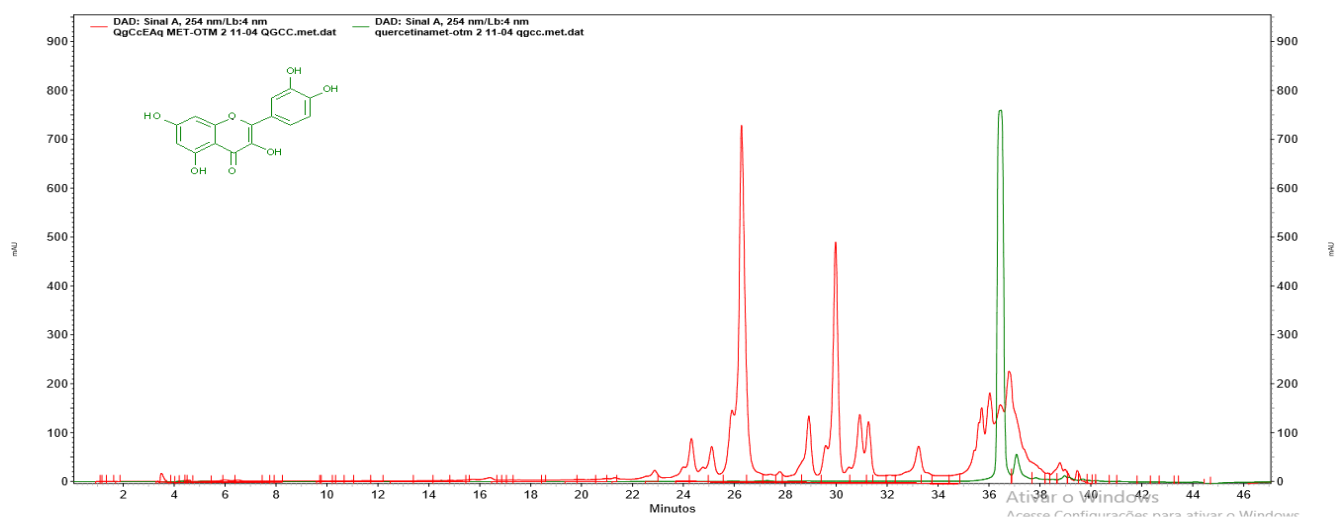
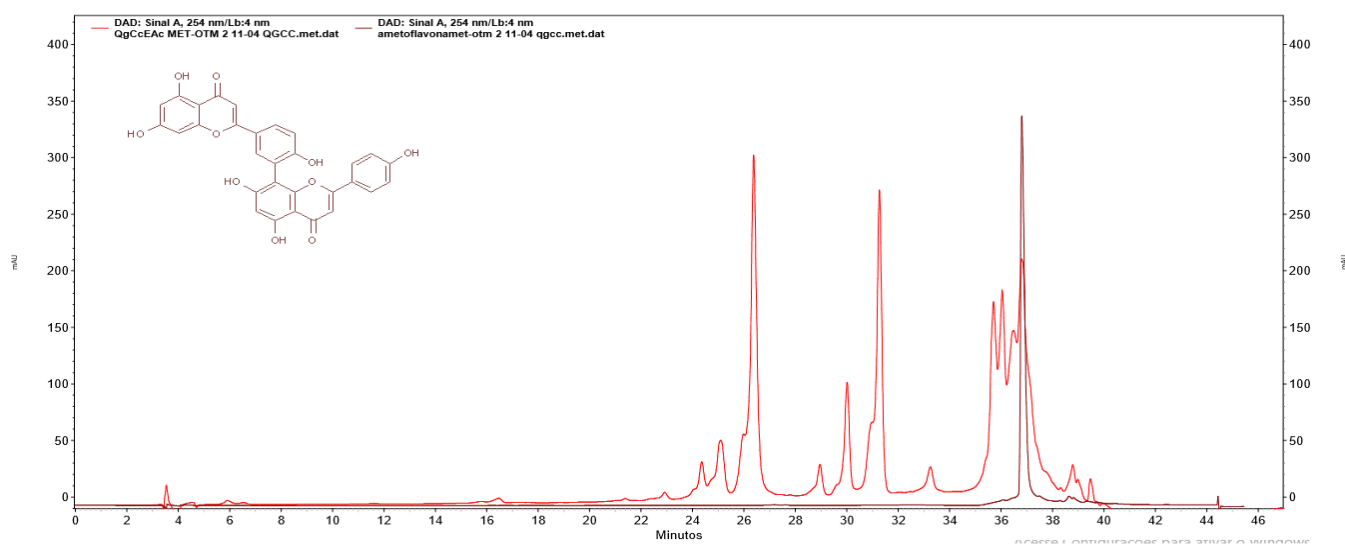
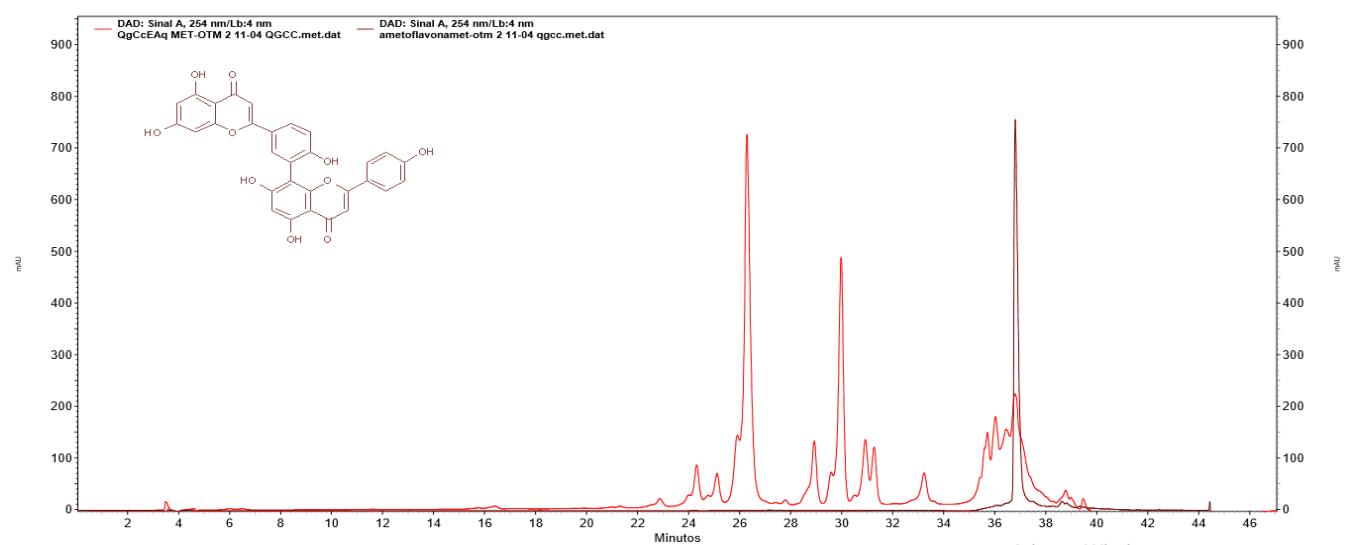
D**E****F**

FIGURA 6.2. Cromatogramas dos padrões sobrepostos às frações de acetato de etila da

planta controle (QgCcEcA) e queimada (QgCcEqA). **A** (luteolina 7-glucosídeo e QgCcEAc), **B** (luteolina 7-glucosídeo e QgCcEAq), **C** (quercetina e QgCcEAc), **D** (quercetina e QgCcEAq), **E** (amentoflavona e QgCcEAc), **F** (amentoflavona e QgCcEAc).

Comparando os cromatogramas obtidos para as frações de acetato de etila do Cerrado de Goiás (QgCcEcA) e paulista (QgCcEA SP) (Figura 6.3), foi observado a presença de compostos distintos devido aos sinais com diferentes tempos de retenção. As bandas com TR em 3,2; 21,4-22,4; 23,7; 25,5; 27,3; 28,4; 29,5; 30,4 e 32,6 foram observadas apenas na fração QgCcEA SP, estando ausentes na QgCcEcA. Os padrões também foram comparados com as bandas do cromatograma da fração QgCcEA SP, porém somente o ácido elágico foi identificado presente na amostra (Figura 6.4). Os resultados apresentados possuem semelhanças com os estudos de Oleszek et al., 2002, os quais correlacionam a produção de metabólitos com as diferenças das latitudes. Assim, plantas localizadas em regiões de latitudes menores (espécime coletada em Catalão-GO, latitude: latitude 18° 9' 57"; espécime coletada em São Carlos-SP, latitude: 22°30') contem níveis mais altos de flavonoides.

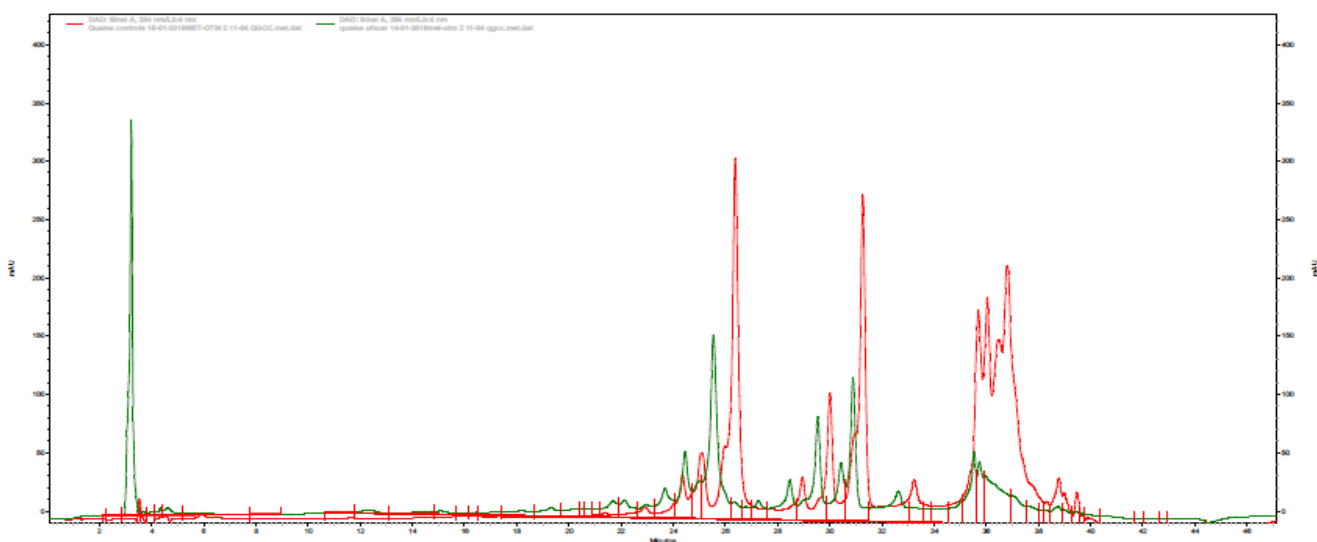


FIGURA 6.3. Espectro das frações QgCcEcA (vermelho) e QgCcEA SP (verde).

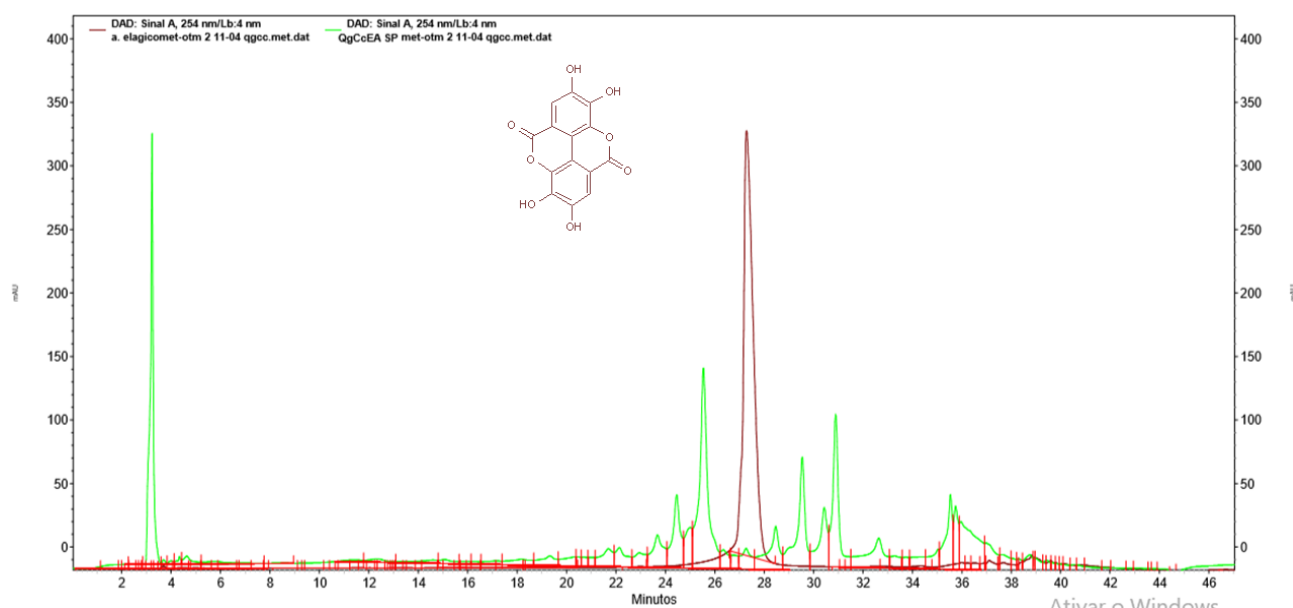


FIGURA 6.4. Espectros do padrão de ácido elágico e fração QgCcEA SP sobrepostos

7 - Identificação de metabólitos secundários por CLUE-IES-QqTOF-EM/EM

7.1- Metabólitos secundários de *D. brasiliensis*

CLUE-IES-QqTOF-EM/EM é uma técnica que permite a identificação de substâncias, que são oriundas de misturas complexas, como extratos de Produtos Naturais (PNs), por combinação de cromatografia líquida de ultra eficiência com espectrometria de massas de alta resolução (HENKE, KELLEHER, 2016; STYLOS et al., 2017). Outra vantagem de usar a espectrometria de massas para identificação, é a grande sensibilidade que essa técnica possui, tendo a capacidade de identificar compostos que se encontram em baixas concentrações, como os compostos minoritários que poderiam ser responsáveis pela atividade biológica (PAUL et al., 2010).

Neste trabalho a utilização desta técnica hifenada permitiu a identificação dos metabólitos presentes nos extratos ativos das cascas do caule e das folhas da espécie *D. brasiliensis*. As análises foram realizadas utilizando as condições cromatográficas otimizadas por NETO e colaboradores (2020) nos dois modos de ionização, porém os melhores resultados foram obtidos no modo negativo $[M - H]^-$. Os compostos presentes nas amostras foram identificados comparando os íons fragmentos, EM^2 (m/z) obtidos pelos experimentos, com os dados presentes na biblioteca do software *CompoundCrawler* (<https://massbank.eu/>; <http://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/>; <https://metlin.scripps.edu>)

(ALLARD et al., 2017; NETO et al., 2020). Além do software, a literatura também foi utilizada para comparação da massa molecular exata e dos padrões de fragmentação obtidos no espectro de íon produto. O método foi selecionado com precisão de até 5 ppm para todos os compostos.

A análise dos extratos possibilitou a identificação de seis compostos presentes nas folhas e seis nas cascas do caule de *D. brasiliensis*. Os compostos identificados foram caracterizados como compostos fenólicos da classe dos flavonoides, derivados de ácidos hidroxicinâmicos, aldeído e um derivado de ácido benzóico. Três dos compostos identificados ainda não foram avaliados *in vitro* em *La*_{ARG}, sendo estes o hidroxibenzaldeído o ácido coumariolquínico e o ácido gentísico, sendo que estes dois ácidos apresentam atividade leishmanicida (MONZOTE et al., 2016).

Os compostos que possuem um ou mais anéis aromáticos mono ou poli hidroxilados, são caracterizados fenólicos. Esses compostos, geralmente estão envolvidos na defesa das plantas. Os flavonoides pertencem a um dos seis subgrupos, de um grande grupo de constituintes de polifenóis vegetais, os quais também são responsáveis pela coloração. A classe dos flavonoides inclui vários compostos encontrados na natureza e compreende várias subclasses como os flavonois, flavonas, flavanonas, flavanois, antocianidinas, isoflavonas, diidroflavonois e chalconas. Além dos flavonoides, os fenólicos vegetais incluem ácidos fenólicos, taninos e os menos comuns estilbenos e lignanas (DAI, MUMPER, 2010; PEREZ-VIZCAINO, DUARTE, SANTOS-BUELGA, 2012). São várias as atividades farmacológicas relatadas por esses metabólitos secundários. Estudos revelam que os flavonoides possuem atividade leishmanicida (LUCON JUNIOR, 2016; MUZITANO et al., 2006) e atuam como inibidores de *La*_{ARG} (CRUZ et al., 2013; da SILVA et al., 2012 b); da SILVA et al., 2019 b); dos REIS et al., 2013; de SOUSA et al., 2014 b); MANJOLIN et al., 2013), apresentam potencial antioxidante, anti-inflamatório, antiadipogênico (CHUA, 2013) e podem exercer proteção contra efeitos de algumas doenças, como doenças cardiovasculares, diabetes tipo II, câncer e distúrbios neurodegenerativos como Parkinson (GONZÁLEZ-PARAMÁS, et al., 2019).

Os compostos identificados por CLUE-IES-QqTOF-EM/EM, se encontram parcialmente caracterizados, levando em consideração as diferenças estereoquímicas e os isômeros. A Tabela 7.1 evidencia o tempo de retenção, íons moleculares desprotonados, fórmulas moleculares e íons fragmentos dos compostos presentes nesses extratos.

7.1.1 - Flavonoides

Foram identificados 7 flavonoides (**1C**, **5C**, **6C**, **1F**, **2F**, **4F**, **6F**) nos extratos etanólicos da casca do caule (DBCcE) e das folhas (DBFE) da espécie *D. brasiliensis*. A presença dos flavonoides foi verificada principalmente pelos íons apresentados com m/z 300, 151 e 125. Todos os valores de m/z dos íons e íons produtos dos compostos identificados em ambos extratos DBCcE e DBFE estão organizados na Tabela 7.1.

O composto **1C**, identificado como catequina ou epi-catequina no extrato DBCcE, apresentou um pico referente ao íon $[M - H]^-$ com m/z 289,0722 ($C_{15}H_{14}O_6$), com íons fragmentos característicos em m/z 245,0826 e 203,0712 observando a perda de um grupo $-CH_2CHOH^-$, $[M - 44]^-$ (Pérez-Magariño et al., 1999). Foi observado também, um íon com m/z 125,0247 que é característico de uma reação de Retro-Diels-Alder (RDA) no anel C desse flavan-3-ol.

Já o composto **4C** (DBCcE) apresentou no espectro o íon $[M - H]^-$ com m/z 577,1355 ($C_{30}H_{26}O_{12}$) referente ao pico do íon molecular do dímero de flavan-3-ol. Os íons fragmentos de maiores intensidades apresentados no EM² foram: m/z 577,1355, 425,0884, 289,0719, 125,0254 que é similar ao descrito anteriormente (DÍAZ-DE-CERIO et al., 2016). As procianidinas são constituídas através de unidades de catequina e epicatequina que liberam cianidina após clivagem. Na série tipo B possuem apenas ligações interflavânicas covalentes entre o carbono 4 de uma unidade e o carbono 8, ou ainda com o carbono 6 da outra unidade (CHEYNIER, 2005). O fragmento em m/z 425,0884 pode ser explicado por uma reação RDA, pela quebra de ligação C-C do terceiro anel (C) do flavonoide. O fragmento em m/z 289,0719 apontou a liberação de flavan-3-ol $[M - H - 288]^-$ proveniente da clivagem homolítica da ligação covalente entre C4-C6 ou C4-C8, entre as duas unidades. O pico exibido em m/z de 125,0254 está relacionado à perda de um radical $-C_9H_8O_3$ de 164,0465 Da. A proposta de fragmentação da estrutura da procianidina do tipo B está representada na Figura 7.1.

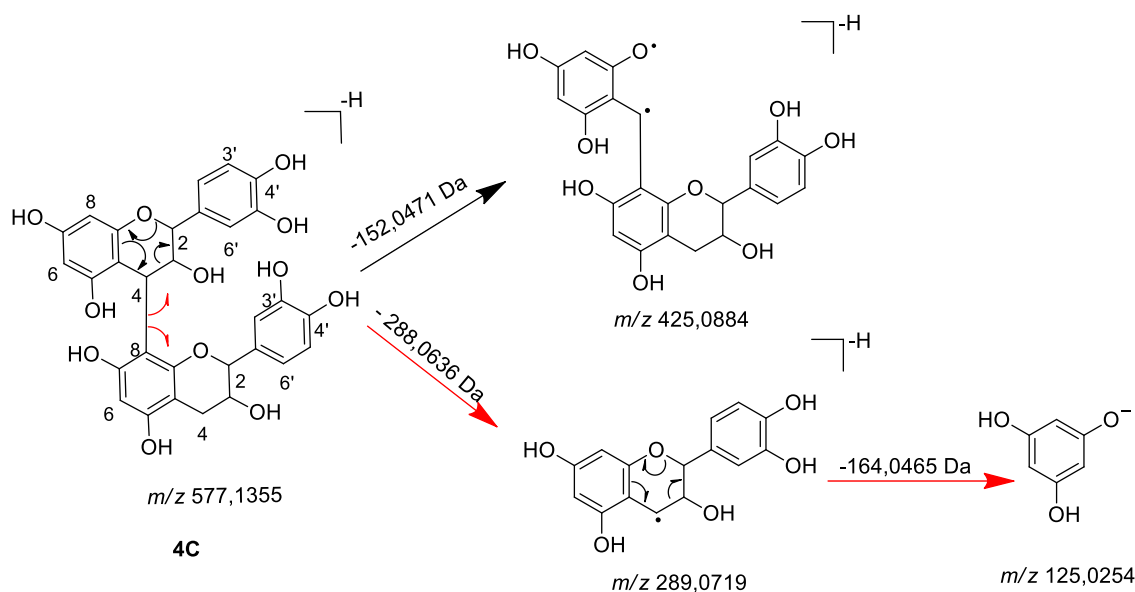


FIGURA 7.1. Proposta de fragmentação do dímero de flavan-3-ol (prociandina) (**4C**) (adaptado de SANTANA, 2018).

O composto **1F** ($C_{21}H_{20}O_{11}$), identificado no extrato DBFE, apresentou um pico do íon molecular com relação m/z de 447,0942, o espectro EM² demonstrou a perda de 146,0585 Da, referente a perda de uma unidade hexose (ramnose ou fucose), originando o íon em m/z 301,0357 (aglicona). Posteriormente foi obtido o íon m/z 151,0040, referente à fragmentação RDA da aglicona, sendo identificado como quercetina-*O*-hexosídeo (LI et al., 2018). Nas folhas de *D. winteri* (SIERRA; LOPES; CORTÉS, 1986) e na espécie *D. brasiliensis* já foi isolado e caracterizado a quercitrina (quercetina-3-*O*-ramnosídeo) (MECCHI et al., 2013), sendo uma sugestão que a hexose seja uma unidade de ramnose.

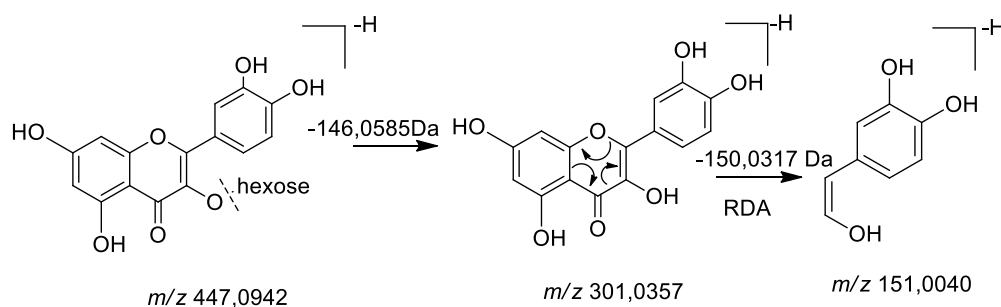


FIGURA 7.2. Proposta de fragmentação da quercetina-*O*-ramnosídeo (**1F**) (adaptado de SANTANA, 2018).

O composto **2F** (DBFE), apresentou o pico do íon molecular $[M - H]^-$ em m/z 463,0891 ($C_{21}H_{20}O_{12}$), o espectro EM^2 demonstrou a perda de 163,0619 Da, referente a um fragmento hexosídico (glucose, galactose ou manose), originando o íon em m/z 300,0272. Os íons com m/z 179,0569, 151,0032 e 125,8730 foram originados, referente à fragmentação por uma reação do tipo RDA do anel C, sendo identificado como quercetina-*O*-hexosídeo (ESCOBAR-AVELLO et al., 2019).

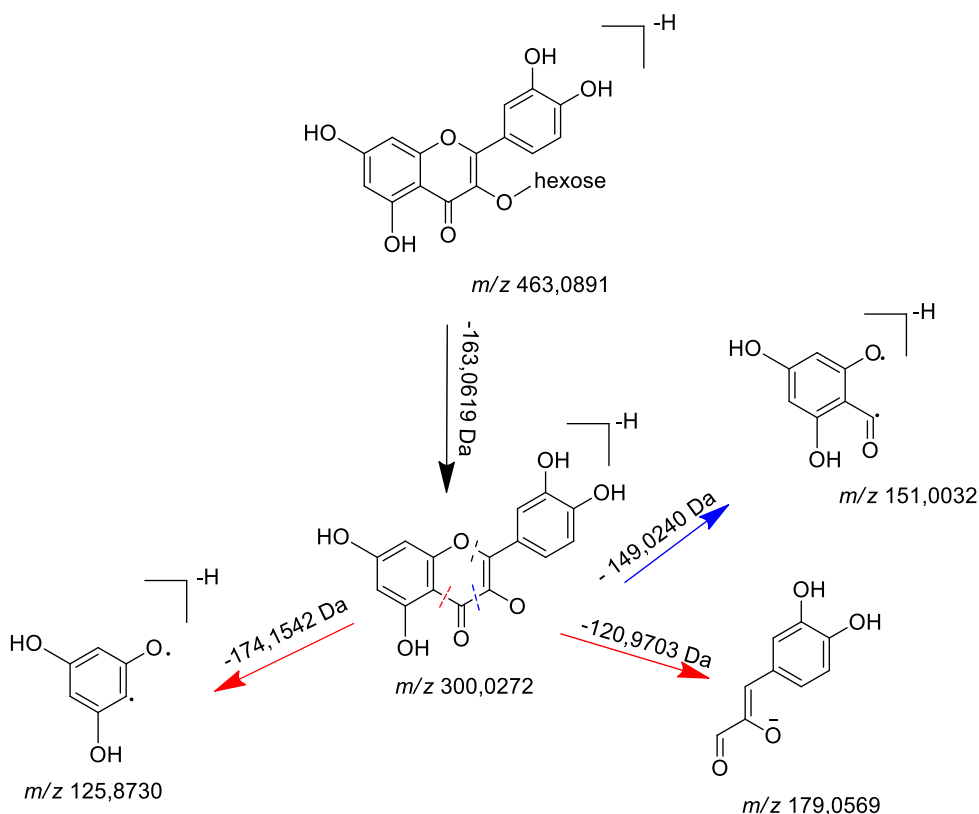


FIGURA 7.3. Proposta de fragmentação da quercetina-*O*-hexosídeo (**2F**).

O composto **4F**, identificado como taxifolina, apresentou um pico do íon molecular em m/z 303,0518 ($C_{15}H_{12}O_7$) característico dessa substância. O espectro EM^2 apontou a perda de 18,0142 Da, referente a uma molécula de H_2O , gerando um íon em m/z 285,0376. Outros íons foram observados devido a clivagem do anel C em m/z 179,0005 e 125,0251 (YANG et al., 2016).

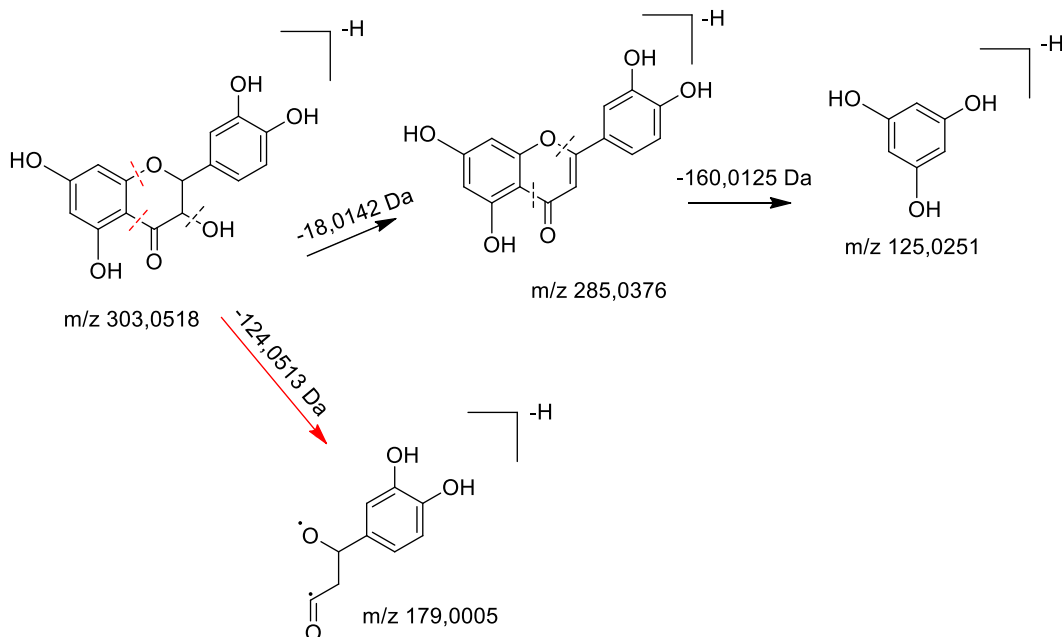


FIGURA 7.4. Proposta de fragmentação da taxifolina (4F).

Os flavonoides **6C** e **6F** apresentaram picos de íons moleculares com m/z 449,1107 e 449,1093 ($C_{21}H_{22}O_{11}$), respectivamente referente ao composto astilbina. O espectro de EM² do composto **6C** exibiu íons fragmentos de m/z 285,0415 e 151,0043, onde o íon m/z 285,0415 foi gerado pela perda 164,0692 Da, referente a perda de uma molécula de ramnose e água. O íon em m/z 151,0043 foi gerado após uma clivagem RDA (ESCOBAR-AVELLO, et al., 2019). A astilbina já foi isolada e caracterizada em *D. brasiliensis* (MECCHI et al., 2013).

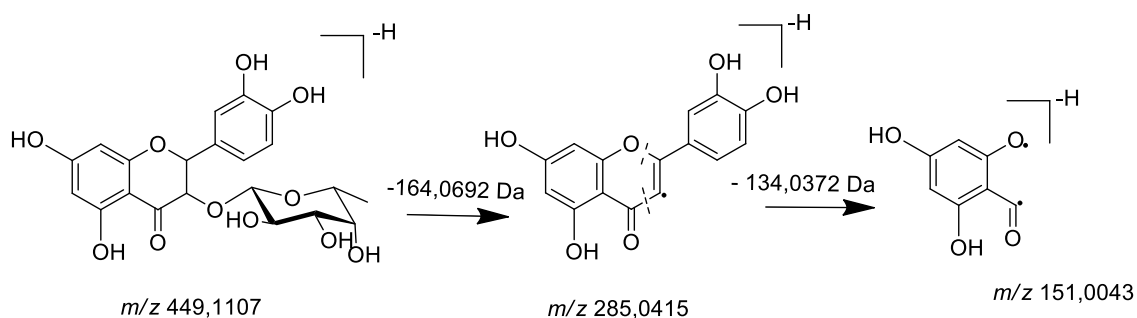


FIGURA 7.5. Proposta de fragmentação da astilbina (6C).

Trabalhos anteriores trazem os flavonoides como inibidores potentes da atividade enzimática da arginase. Os compostos identificados quercetina-*O*-hexosídeo, quercetina-*O*-ramnosídeo, taxifolina, catequina, epicatequina possuem potência inibitória IC₅₀ 5,1 μ M; 12,2 μ M; 1,6 μ M; 1,70 μ M; 1,60 μ M, respectivamente (CRUZ et al., 2013; da

SILVA et al., 2012 b); da SILVA et al., 2019 b); de SOUSA et al., 2014 b); dos REIS et al., 2013; MANJOLIN et al., 2013). Sendo assim, a presença destes compostos poderia contribuir para atividade inibitória encontrada no extrato de *D. brasiliensis*.

7.1.2 – Ácidos hidroxicinâmicos

Ambos os compostos, **2C** e **3F**, apresentaram a mesma fórmula molecular com os íons com m/z 353,0883 e 353,0885, respectivamente ($C_{16}H_{18}H_9$). Os íons produtos foram observados com m/z 191,0566, 179,0353, 135,0454 e m/z 191,0570, 179,0356, 135,0456 para os compostos **2C** e **3F** respectivamente. Em ambos os compostos é possível ver a perda da unidade cafeoil $[M - 162]^-$, e os íons de m/z 179,0353 e 179,0356 são referentes à perda do ácido quínico. Foi observado também um íon fragmento com m/z 135,0454 obtido da descarboxilação da unidade cafeoil $[M - 44]^-$, levando a identificação do ácido hidroxicinâmico (ácido cafeoilquínico).

De acordo com Clifford et al., 2003 é possível apontar a diferença dos ácidos clorogênico e neoclorogênico, os quais possuem grupos acila ligados em posições diferentes 3-OH e 5-OH, respectivamente, através do padrão de fragmentação, da diferença de intensidade do íon m/z 179 (49% no ácido clorogênico e 5% no neoclorogênico) e da presença do fragmento m/z 161 encontrado somente no espectro de massas do ácido neoclorogênico (CLIFFORD et al., 2003). Sendo assim os compostos **2C** e **3F** identificados como ácido 3-*O*-cafeoilquínico ou ácido clorogênico. O composto ácido clorogênico apresenta potência inibitória IC_{50} de 8.3 μ M em arginase de *L. amazonensis* (DA SILVA et al., 2019 a)). A presença desse composto pode ter colaborado para a atividade inibitória encontrada no extrato das folhas de *D. brasiliensis*.

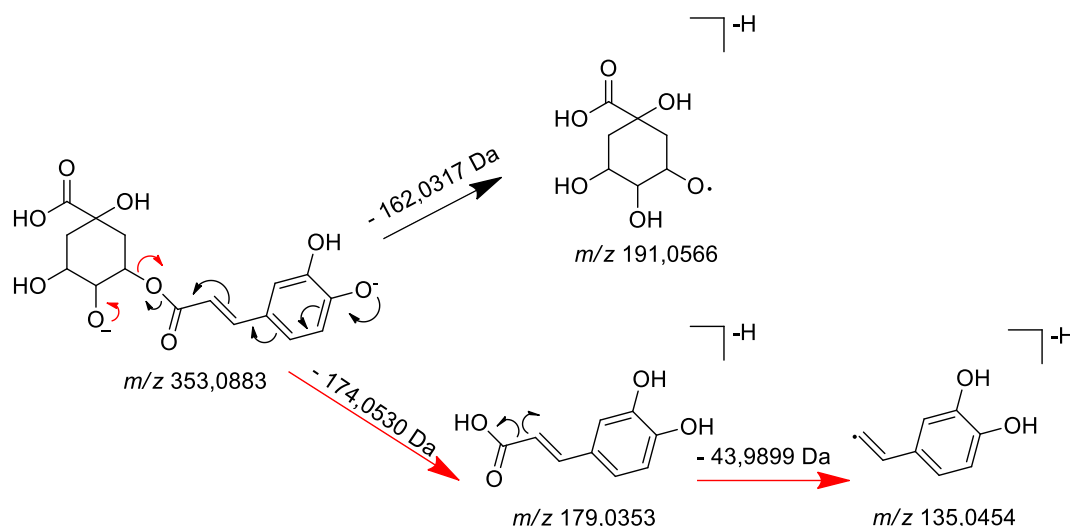


FIGURA 7.6. Proposta de fragmentação do 3-O-ácido cafeoilquínico (**2C**) (adaptado de FANG, YU, PRIOR, 2002).

O composto **5F**, apresentou o íon do pico molecular em m/z 337,0931 ($C_{16}H_{18}O_8$) com fragmentações com íons m/z 191,0568 referente à perda da unidade coumaroil e m/z 163,0404 relacionado à perda do ácido quínico. Outro íon apresentado em m/z 119,0505 confere a unidade coumaroil a perda de CO_2 . O íon fragmento com m/z 163,0404 é característico de derivados do ácido cinâmico, estabelecendo a presença de um coumaroil na estrutura, assim a substância foi identificada como ácido coumaroilquínico (FANG, YU, PRIOR, 2002).

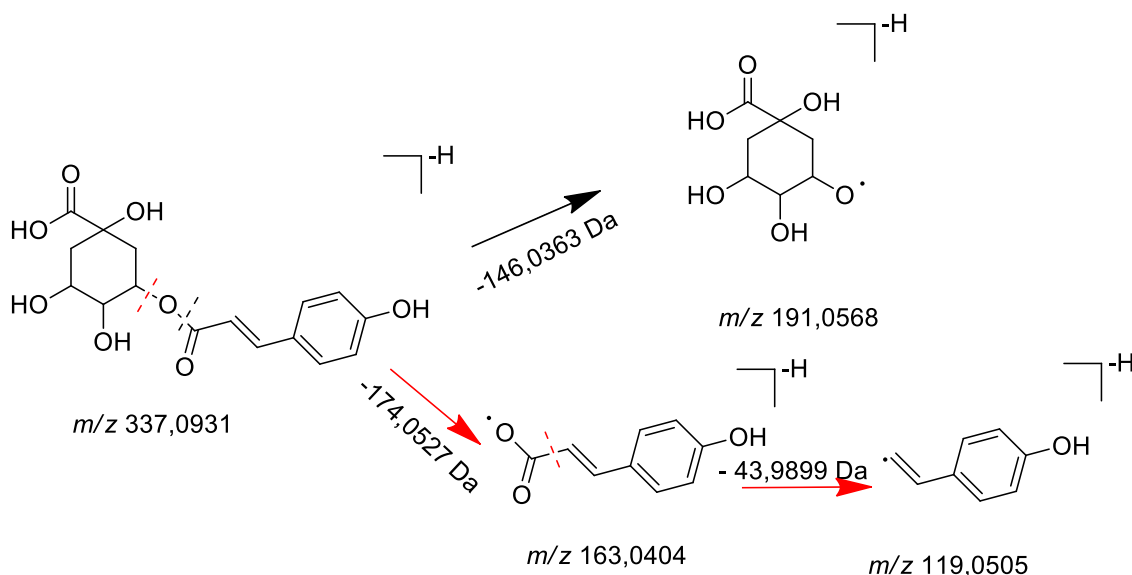


FIGURA 7.7. Proposta de fragmentação do ácido coumaroilquínico (**5F**) (adaptado de SANTANA, 2018).

7.1.3 - Benzaldeído e ácido hidroxibenzóico

O composto **3C** apresentou um pico do íon molecular com m/z 121,0298 ($C_7H_6O_2$) e o espectro EM^2 exibiu um íon fragmento com m/z 92,0270 referente à perda um radical CHO, $[M-29]^-$ característico dos aldeídos, sendo identificado como hidroxibenzaldeído. Como esse composto possui 3 isômeros, onde a hidroxila pode estar nas posições 2, 3 ou 4, não é possível afirmar em qual delas a hidroxila se encontra, dessa forma, a estrutura química dessa substância com a hidroxila na posição 2 é apenas representativa.

O composto **5C** exibiu um pico do íon molecular com m/z 153,0198 e um íon fragmento com m/z 109,0301 proveniente da perda de um grupo CO_2 , 43,9897 Da, típico dos ácidos carboxílicos. O composto foi identificado como ácido di-hidroxibenzóico. A estrutura representativa desse composto é o isômero 2,5-di-hidroxibenzóico (ácido gentísico), visto que são possíveis mais três isômeros para essa substância, com as hidroxilas nas posições: 3 e 4; 2 e 3; 2 e 6. O ácido gálico (de Sousa et al., 2014) apresentou inibição significativa em La_{ARG} ($IC_{50} = 0,13 \mu M$), porém o benzaldeído e o ácido gentísico ainda não foram avaliados em La_{ARG} .

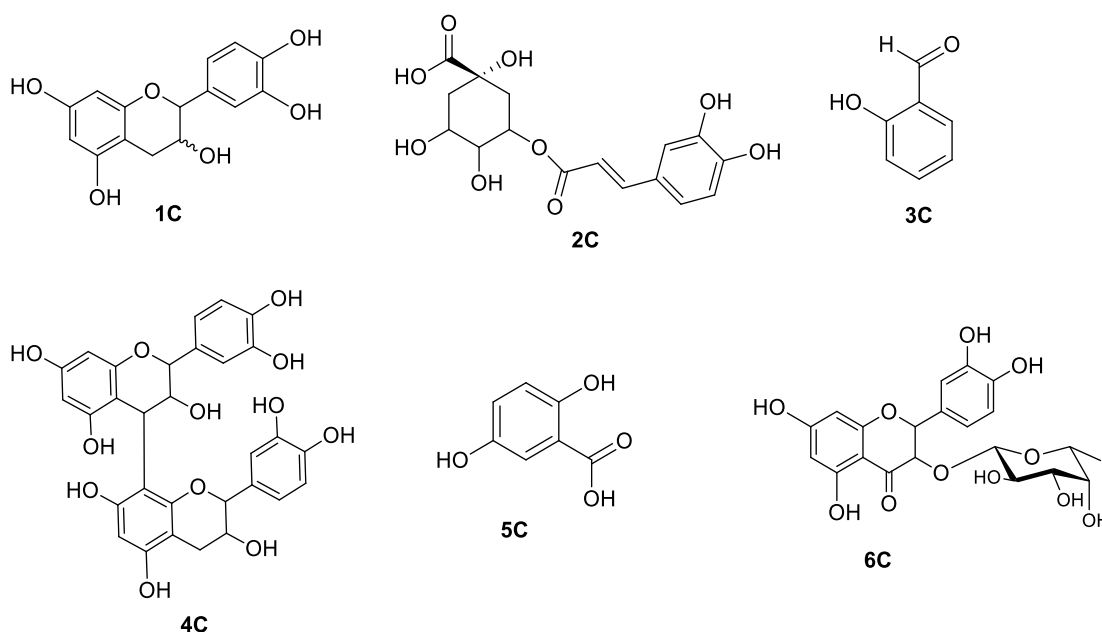


FIGURA 7.8. Estruturas dos metabólitos identificados no extrato DBCcE.

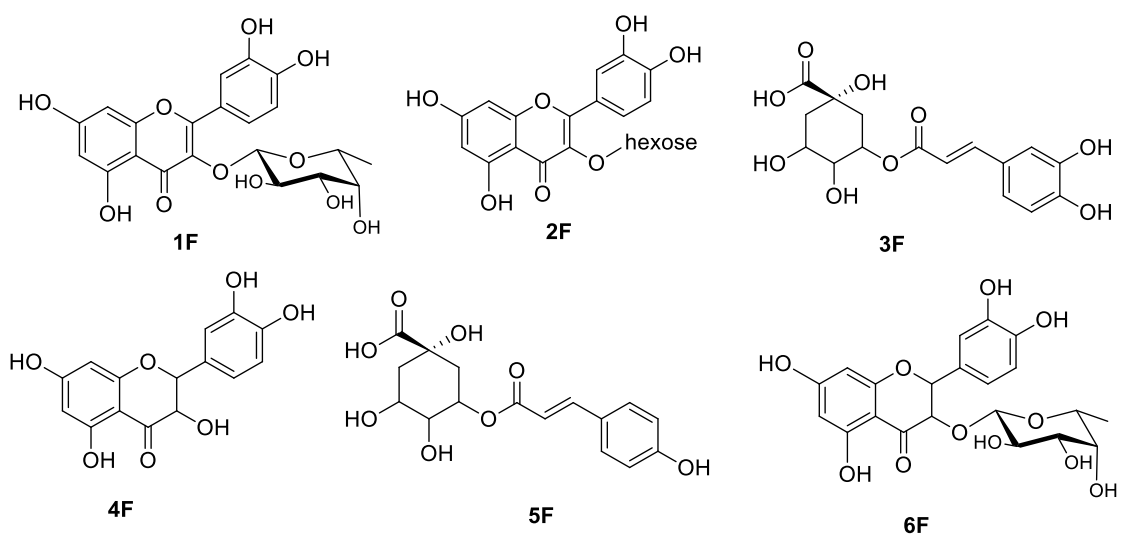


FIGURA 7.9. Estruturas dos metabólitos identificados no extrato DBFE.

TABELA 7.1: Metabólitos secundários identificados nos extratos DBCcE e DBFE.

Comp.	RT (min)	Fórmula molecular	[M – H] ⁻ (Teor.)	[M – H] ⁻ (Exp.)	Erro (ppm)	EM/EM	Nome	Referência
1C	2.89	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	289,0718	289,0722	-1.7	245,0823; 203,0712; 125,0247	catequina ou epicatequina	DÍAZ-DE-CERIO et al., 2016
2C	11.40	C ₁₆ H ₁₈ H ₉	353,0878	353,0883	-1.5	191,0566; 179,0353; 135,0454	3- <i>O</i> -ácido cafeoilquínico	CLIFFORD et al., 2003
3C	3.59	C ₇ H ₆ O ₂	121,0295	121,0298	-2.6	92,0270	hidroxibenzaldeído	FARRAG et al., 2019
4C	2.61	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	577,1367	577,1355	-2.0	425,0884; 289,0719; 125,0254	Procianidina	DÍAZ-DE-CERIO et al., 2016
5C	2.04	C ₇ H ₅ O ₄	153,0193	153,0198	-3.1	109,0301	ácido di-hidroxibenzóico	RODRÍGUEZ PERES et al., 2018
6C	5.18	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	449,1089	449,1107	-3.9	285,0415; 151,0043	Astilbina	ESCOBAR-AVELLO et al., 2019
1F	5.25	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	447,0933	447,0942	-2.0	301,0357; 151,0040	quercetina- <i>O</i> -ramnosídeo	DÍAZ-DE-CERIO et al., 2016
2F	6.31	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	463,0882	463,0891	-1,9	300,0272; 179,0569; 151,0032; 125,8730	quercetina- <i>O</i> -hexosídeo	DÍAZ-DE-CERIO et al., 2016
3F	2.99	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353,0878	353,0885	-1,9	191,0570; 179,0356; 135,0456	3- <i>O</i> -ácido cafeoilquínico	CLIFFORD et al., 2003
4F	4.88	C ₁₅ H ₁₂ O ₇	303,0510	303,0518	-3,0	285,0376; 179,0005; 125,0251	Taxifolina	YANG et al., 2016
5F	2.97	C ₁₆ H ₁₈ O ₈	337,0929	337,0931	-0,7	191,0568; 163,0404; 119,0505	ácido coumaroil-quínico	CLIFFORD et al., 2003
6F	4.94	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	449,1089	449,1093	-0.8	285,0410; 151,0041	Astilbina	ESCOBAR-AVELLO et al., 2019

7.2 - Metabólitos secundários da espécie *Q. grandiflora*

Experimentos por CLUE-IES-QqTOF-EM/EM das frações polares dos extratos de QcCcEcA, QgCcEqA e QgCcEA SP, foram realizadas com o intuito de identificar os compostos presentes nas diferentes amostras e assim verificar as similaridades e diferenças em relação a influência da queimada e da diferença regional das espécimes coletadas.

Os dados EM/EM no modo negativo $[M - H]^-$ foram analisados para identificação dos compostos usando as bibliotecas de triagem do programa *CompoundCrawler* e comparando com a literatura. Os compostos identificados por EM/EM estão parcialmente caracterizados, levando em consideração as diferenças estereoquímicas e isômeros.

7.2.1 - Casca do caule

Através do perfil químico dos extratos polares das cascas do caule de *Q. grandiflora* do Cerrado de Catalão antes (QgCcEcA) e depois de sofrer queimada (QgCcEqA) foram identificados 21 compostos (Tabela 7.2).

O ácido elágico foi identificado em ambas as frações QgCcEcA e QgCcEqA. **1QC** e **1QQ** apresentaram picos do íon molecular $[M - H]^-$ em m/z 300.9984 e 300.9983, respectivamente, referente a fórmula molecular $C_{14}H_6O_8$. Os íons fragmentos apresentados no espectro EM² para ambos os compostos são equivalentes aos íons relatados anteriormente para identificação desse composto (GU et al., 2013; SINGH et al., 2016).

Foram identificados 4 compostos derivados de ácido elágico comumente encontrados em ambos extratos QgCcEcA (**2QC**, **3QC**, **4QC** e **7QC**) e QgCcEqA (**2QQ**, **3QQ**, **4QQ** e **9QQ**) e apenas um derivado de ácido elágico encontrado apenas na queimada, o composto **10QQ**.

Os compostos **2QC** e **2QQ** apresentaram picos do íon molecular em m/z 447.0572 e 447.0565, respectivamente, e perdas de 132.0425 e 15.034 Da para o composto **2QC** e, 132.0415 e 15.0239 Da para o composto **2QQ**, relativo a uma pentose e uma metila, respectivamente, sendo proposto o ácido metilelágico-*O*-pentopiranosídeo (Figura 7.10) (SINGH et al., 2016). Através dos picos dos íons moleculares dos compostos **3QC**, **4QC**,

3QQ e **4QQ** juntamente com a presença de picos de íons com valores de m/z entre 299.9910 e 300.9982, íons estes que, designam a presença de ácido elágico na estrutura, foi possível identificar **3QC** e **3QQ** como ácido elágico-pentopiranosídeo e **4QC** e **4QQ** como ácido metilelágico. Os compostos **7QC** e **9QQ** exibiram picos de íon molecular em m/z 477.0689 e 477.0682 com perdas de 162.0539 e 162.0537 Da, respectivamente, referente a uma hexose e foram identificados como ácido metil-elágico-*O*-hexopiranosídeo (WU et al., 2008). O composto **10QQ** apresentou pico do íon molecular com m/z 343.0460, e o seu espectro EM² apontou a perda três grupos metilas, 15.0230, 15.0233 e 15.0241 Da, sendo identificado como tri-*O*-metilelágico (BAI et al., 2008).

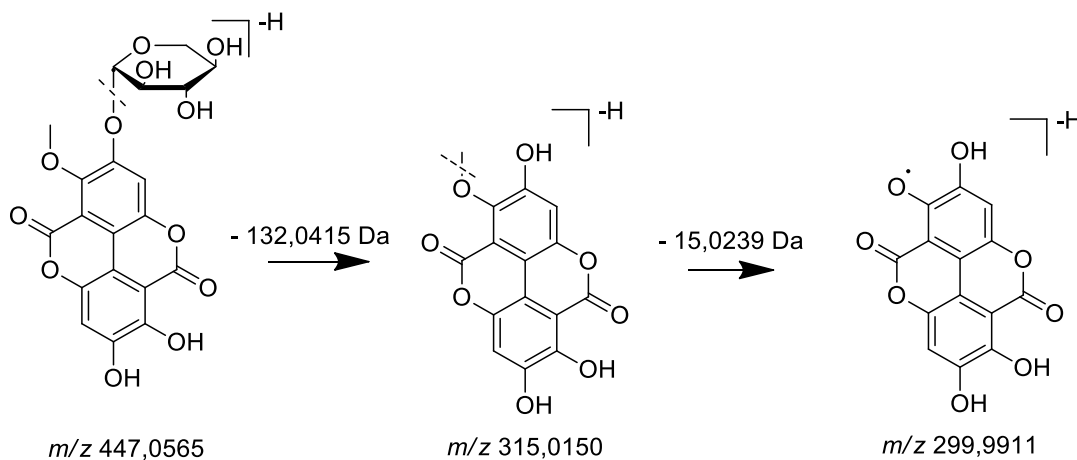


FIGURA 7.10. Proposta de fragmentação do ácido metilelágico-*O*-hexopiranosídeo (**2QQ**) e (**2QC**) (adaptado de NETO et al, 2020).

Os compostos, **6QC** e **7QQ**, foram identificados como ácido gálico, pela presença dos picos do íon molecular em m/z 169.0151 e 169.0148, respectivamente, e espectro EM² com perdas de 43.9898 e 43.9896 Da, referente a perda de hidrogênio e CO₂, gerando íons produtos com m/z 125.0253 e 125.0253, respectivamente. Juntamente com o ácido gálico foi identificado os galotaninos, **5QC** e **5QQ**, com os picos dos íons moleculares em 783.0739 e 783.0661 e com íons produtos em m/z 481.0580; 300.9996; 275.0203 e m/z 481.0634; 300.9987; 275.0202, respectivamente, sendo identificados como pedunculagina (Figura 7.11). Com base em dados da literatura também foi possível identificar o composto **6QQ**, (C₂₀H₁₈O₁₄) que apresentou pico do íon com m/z 481.06474 e perda de 180.0667 Da, referente a unidade de hexose, identificado com HHDP-hexose e presente apenas na fração QgCcEqA (SINGH et al., 2016).

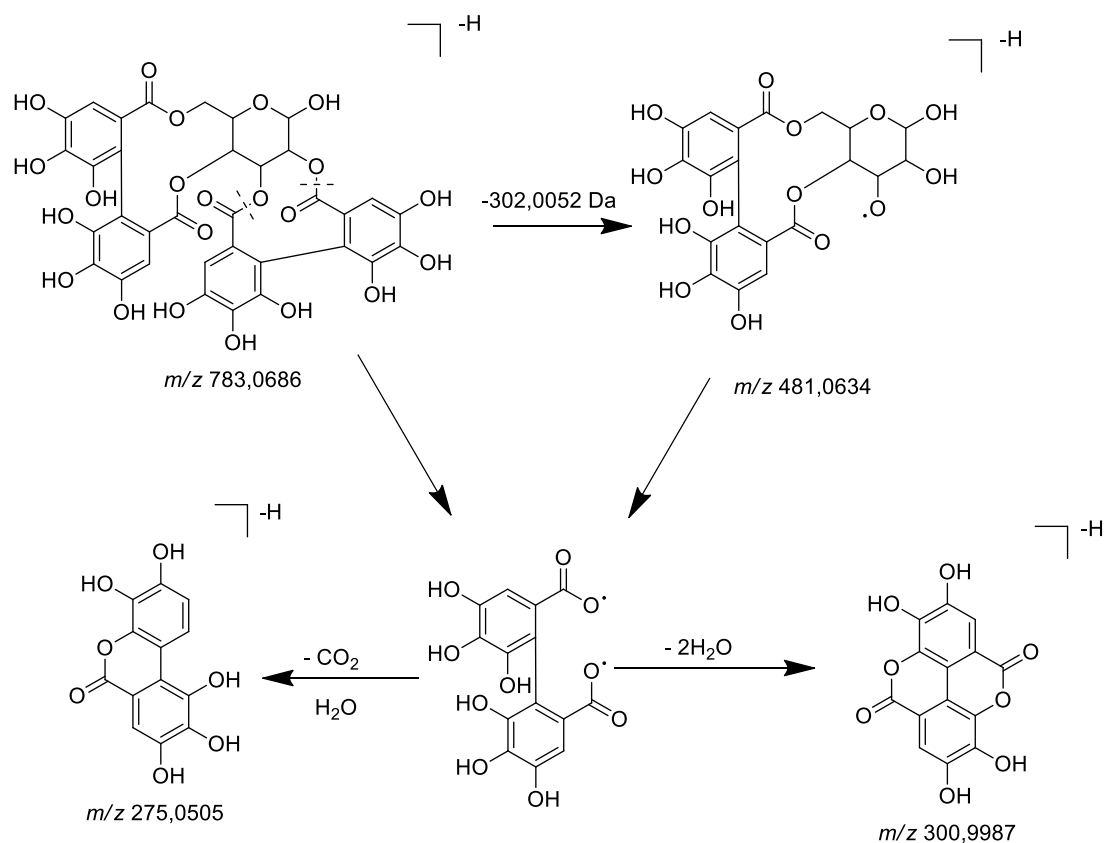


FIGURA 7.11. Proposta de fragmentação de pedunculagina (**5QC**) e (**5QQ**).

Os flavonoides foram encontrados comumente em ambas as frações, QgCcEcA (**8QC** e **9QC**) e QgCcEq (**11QQ** e **12QQ**), exceto o flavonoide **8QQ** apenas identificado na QgCcEq. O flavonoide **8QC** e **11QQ** foram identificados como flavan-3-ol sendo a catequina ou epi-catequina, através dos picos de íon molecular m/z 289.0719 e 289.0726, respectivamente juntamente com os íons produtos. Os compostos **9QC** e **12QQ** com picos do íon molecular em m/z 285.0404 e 285.0405, respectivamente juntamente com os íons produtos (m/z 241.0511; 151.0051 e 241.0510; 151.0046, respectivamente) são característicos do flavonoide kaempferol. O composto **8QQ** encontrado apenas na planta queimada, foi identificado como galocatequina ou epigalocatequina pelos íons característicos deste composto (m/z 305.0665; 287.0545; 261.0413; 247.0206; 125.0254) comparados a literatura (LEE et al., 2005).

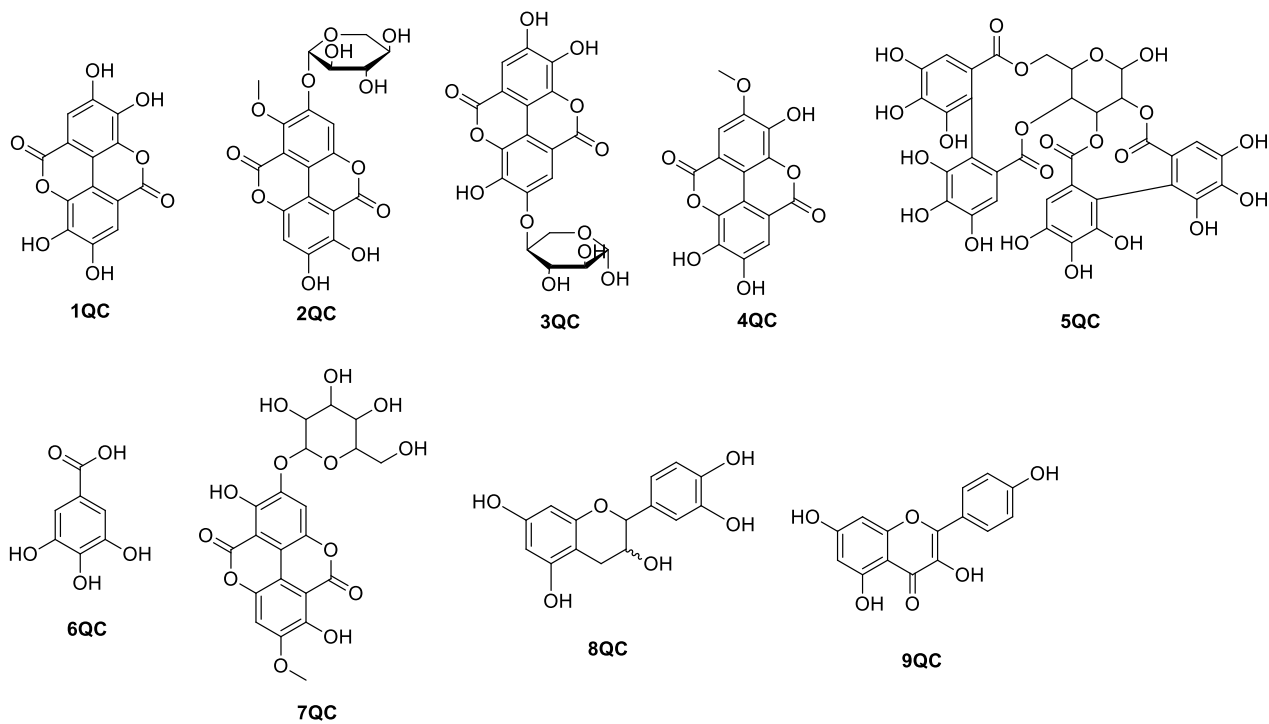


FIGURA 7.12. Metabólitos secundários identificados na fração de acetato de etila das Cascas do caule de *Q. grandiflora* coletada no cerrado de Goiás antes da queimada.

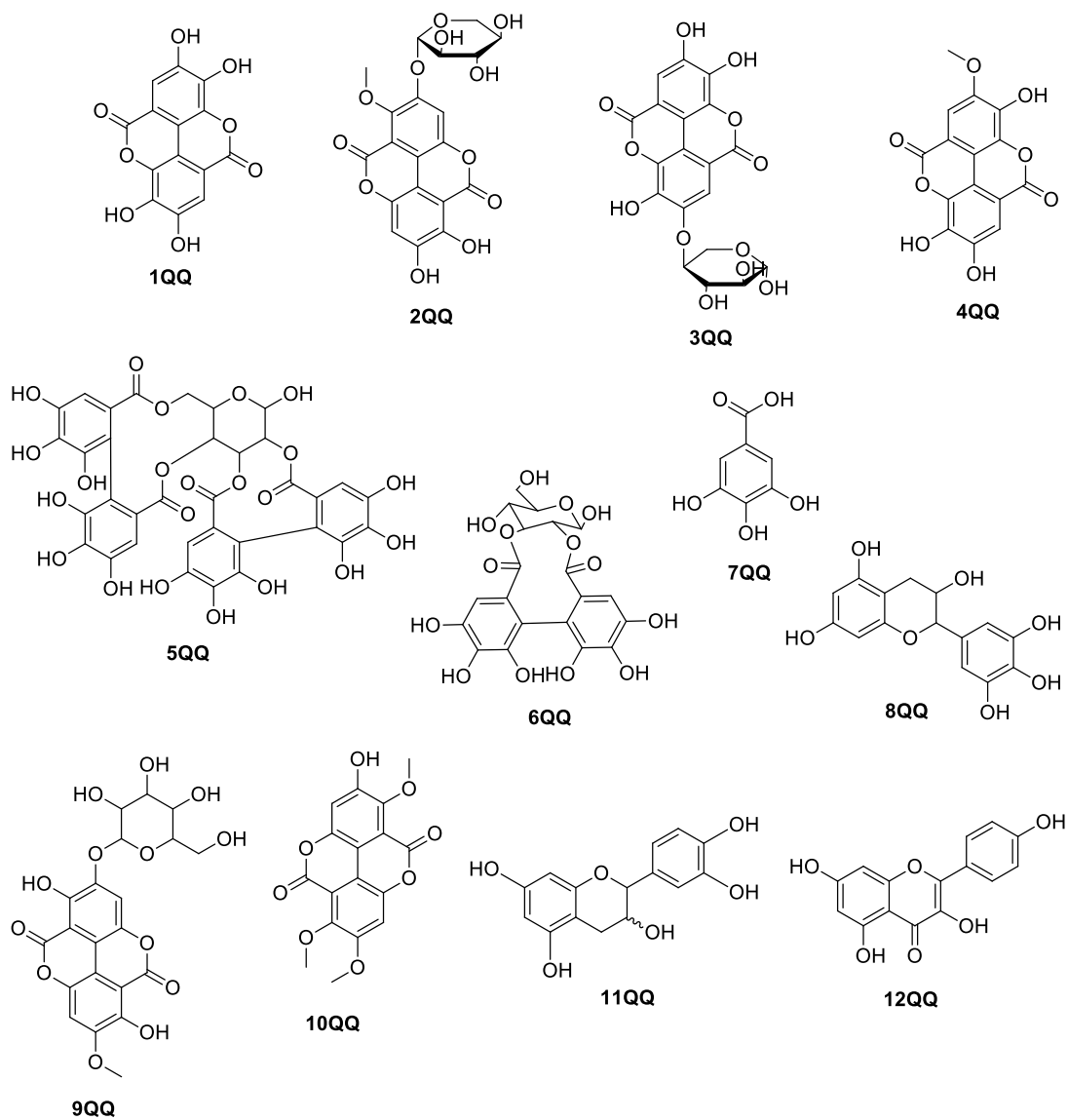


FIGURA 7.13. Metabólitos secundários identificados na fração de acetato de etila das Cascas do caule da espécie *Q. grandiflora* coletada no cerrado de Goiás após influência da queimada.

TABELA 7.2: Metabólitos secundários identificados na fração de acetato de etila das cascas do caule da espécie *Q. grandiflora* coletada no cerrado de Goiás antes e após influência da queimada

Comp.	RT (min)	Fórmula molecular	[M – H] ⁻ (Teor.)	[M – H] ⁻ (Exp.)	Erro (ppm)	EM/EM	Nome	Referência
1QC	22.02	C ₁₄ H ₆ O ₈	300,9990	300,9984	1.9	283,9963; 273,0037; 257,0090; 245,0091; 229,0145; 201,0193; 185,0245; 173,0245; 157,0293; 145,0300; 129,0354	ácido elágico	GU et al., 2013
2QC	6.13	C ₂₀ H ₁₆ O ₁₂	447,0569	447,0572	-0.6	315,0148; 299,9914	ácido metilelágico- <i>O</i> -pentopiranosídeo	SINGH et al., 2016
3QC	5.21	C ₁₉ H ₁₄ O ₁₂	433,0412	433,0402	2,5	300,9982;	ácido elágico-pentopiranosídeo	LEE et al., 2005
4QC	22.00	C ₁₅ H ₈ O ₈	315,0146	315,0147	-0.1	299,9914	ácido metilelágico	SINGH et al., 2016
5QC	3.52	C ₃₄ H ₂₄ O ₂₂	783,0686	783,0739	-6.7	481,0580; 300,9996; 275,0203	pedunculagina	SINGH et al., 2016
6QC	4.17	C ₇ H ₆ O ₅	169,0142	169,0151	-4.9	125,0253	ácido gálico	LEE et al., 2005
7QC	5.50	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₃	477,0675	477,0689	-3.0	315,0150	ácido metilelágico- <i>O</i> -hexopiranosídeo	WU et al., 2008
8QC	4.55	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	289,0718	289,0719	-0.5	247,0253; 205,0508; 125,0255	catequina ou epicatequina	DÍAZ-DE-CERIO, et al., 2016
9QC	9.04	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	285,0405	285,0404	0.2	241,0510; 151,0046	Kaempferol	FARRAG, et al., 2019
1QQ	19.44	C ₁₄ H ₆ O ₈	300,9990	300,9983	2.4	283,9959; 273,0029; 257,0095; 245,0091; 229,0140; 201,0143; 185,0244; 173,0248; 157,0297; 145,0301; 129,0349	ácido elágico	GU et al., 2013
2QQ	6.17	C ₂₀ H ₁₆ O ₁₂	447,0569	447,0565	0.9	315,0150; 299,9911	ácido metilelágico- <i>O</i> -pentopiranosídeo	SINGH et al., 2016
3QQ	5.22	C ₁₉ H ₁₄ O ₁₂	433,0412	433,0406	1,6	299,9910	ácido elágico-pentopiranosídeo	LEE et al., 2005

4QQ	14.86	C ₁₅ H ₈ O ₈	315,0146	315,015	-1.3	299,9915	ácido metilelágico	SINGH et al., 2016
5QQ	3.46	C ₃₄ H ₂₄ O ₂₂	783,0686	783,0661	3.2	48,0634; 300,9987; 275,0202	pedunculagina	SINGH et al., 2016
6QQ	3.92	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₄	481,0624	481,0647	-4.8	300,9980	HHDP-hexose	SINGH et al., 2016
7QQ	3.54	C ₇ H ₆ O ₅	169,0142	169,0148	-3.2	125,0252	ácido gálico	LEE et al., 2005
8QQ	5.14	C ₁₅ H ₁₄ O ₇	305,0667	305,0665	0.7	287,0545; 261,0413; 247,0206; 125,0254	epigalocatequina ou galocatequina	LEE et al., 2005
9QQ	5.46	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₃	477,0675	477,0682	-1.6	315,0145	ácido metilelágico- <i>O</i> - hexopiranosídeo	WU et al., 2008
10QQ	9.83	C ₁₇ H ₁₂ O ₈	343,059	343,046	-0.2	328,0232; 312,9997; 297,9756	tri- <i>O</i> -metilelágico	BAI, et al., 2008
11QQ	4.55	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	289,0718	289,0726	-2.8	247,0252; 203,0718; 151,0407; 125,0249	catequina ou epi-catequina	DIÁZ-DE-CERIO, et al., 2016
12QQ	9.02	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	285,0405	285,0405	-0.1	241,0511; 151,0051	Kaempferol	FARRAG, et al. 2019

Foi possível observar através da identificação dos compostos por EM/EM, quando comparados (*Q. grandiflora* queimada e a não queimada) que houve alteração na produção de metabólitos secundários após a planta sofrer com o fator de estresse causado pelo fogo e temperatura. Os compostos identificados para ambas as frações foram: ácido elágico (**1QC; 1QQ**), ácido metilelágico-O-pentopiranosídeo (**2QC; 2QQ**), ácido elágico-pentopiranosídeo (**3QC; 3QQ**), ácido metilelágico (**4QC; 4QQ**), pedunculagina (**5QC; 5QQ**), ácido gálico (**6QC; 7QQ**), ácido metilelágico-O-hexopiranosídeo (**7QC; 9QQ**), catequina ou epicatequina (**8QC; 11QQ**) e kaempferol (**9QC; 12QQ**).

Os compostos, HHDP-hexose (**6QQ**), epigallocatequina ou galocatequina (**8QQ**) e tri-O-metilelágico (**10QQ**) foram identificados somente depois da espécie sofrer queimada. Estudos anteriores relacionando o fogo como fator de estresse com outras espécies de plantas, também foi observado aumento na produção de compostos incluindo as classes dos taninos e de flavonoides. (ALONSO et al., 2002; CANNAC et al., 2019).

Comparando a diferença de clima, temperatura e propriedades do solo, da *Q. grandiflora* de Goiás e de São Carlos, foram identificados 9 e 13 compostos, respectivamente. Dentre esses compostos observou-se apenas quatro compostos em comum para as frações das cascas coletadas no Cerrado de São Carlos-SP (QgCcEA SP) (identificados anteriormente por NETO et al., 2020) (Tabela 1.2 e Figura 1.12 p. 15-18) e no Cerrado de Catalão-GO (Figura 7.12) (QgCcEcA), sendo estes identificados como: ácido elágico, ácido metilelágico, pedunculagina e ácido gálico. Na fração QgCcEA SP foram identificados apenas elagitaninos e galotaninos e na fração QgCcEcA além dessas classes, foram identificados também vários flavonoides. Os resultados obtidos apresentam comportamentos relacionados com diferenças de latitudes quanto a localidade da planta, pois de acordo com estudos de Oleszek et al., 2002, plantas que se originam de latitude mais baixas contêm níveis mais altos de flavonoides.

7.2.2 - Flores

Através da investigação química das flores de *Q. grandiflora* foi possível identificar 19 compostos na fração de acetato de etila das flores de *Q. grandiflora* (QgFIEA) de várias classes químicas, incluindo galotaninos, derivados do ácido elágico,

flavonoides, ácido carboxílico e hidroxicinâmico (Figura 7.15 e Tabela 7.3). É a primeira vez que as flores desta espécie são investigadas.

Os derivados de ácido elágico (**4QFI**, **13QFI** e **18QFI**) foram identificados na fração de acetato de etila das flores. Os compostos **4QFI** e **13QFI** apresentaram picos do íon molecular em m/z 329,0315 e 343,0464, respectivamente, e perdas consecutiva variando de 15,024 a 15,0226 Da pertencentes a grupos CH_3 , identificados como ácido dimetil elágico e ácido trimetil elágico. Já o composto **18QFI** exibiu um pico do íon molecular em m/z 461,0734, e foi observado a perda de 146,057 Da relacionado a uma hexose. A ramnose foi sugerida para a porção hexose, uma vez que o composto ácido metil elágico ramnosídeo já foi isolado e caracterizado por EM e RMN anteriormente na casca do caule de *Q. grandiflora* (NETO et al., 2011).

Foram identificados nesta fração 7 galotaninos (**1QFI**, **2QFI**, **3QFI**, **7QFI**, **8QFI**, **9QFI** e **10QFI**) juntamente com o ácido gálico (**11QFI**). O ácido gálico foi identificado através do seu pico do íon molecular em m/z 169,0152 ($\text{C}_7\text{H}_5\text{O}_5$), que forneceu o íon produto m/z 125,0252 através da perda de CO_2 , 43,99 Da (SINGH et al., 2016). Os derivados de galotaninos (**2QFI**, **3QFI**, **7QFI**, **10QFI** e **19QFI**) com íons em m/z 331,0689 ($\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{O}_{10}$); m/z 183,0309 ($\text{C}_8\text{H}_7\text{O}_5$); m/z 197,0465 ($\text{C}_9\text{H}_9\text{O}_5$); m/z 483,0796 ($\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{O}_{14}$) e m/z 787,1018 ($\text{C}_{34}\text{H}_{38}\text{O}_{22}$) respectivamente, produziram íons produtos entre m/z 168,0070 e m/z 170,0204 que é referente a presença de uma unidade galoil. Para o composto **10QFI**, observou-se a perda de 152,011 Da (unidade galoil) (Figura 14.14). O composto **2QFI** evidenciou a perda de uma unidade hexose também, com um valor de 162,0532 Da. Os compostos **3QFI** e **7QFI** apresentaram perdas de unidades alquila, com valores de 15,0239 Da e 28,0316 Da, referentes a um grupo metil e etil. De acordo com a via de fragmentação os compostos **2QFI**, **3QFI**, **7QFI** e **10QFI**, foram identificados como sendo galoil-hexose, galato de metila, galato de etila e digaloil hexose, respectivamente. A presença dos compostos nas flores, quercetina-*O*-hexosídeo, kaempferol, ácido gálico e miricetina-hexosídeo, podem ter colaborado com a atividade inibitória encontrada na fração, pois são inibidores de arginase conhecidos com potência inibitória entre IC_{50} 52,2 μM e 55 μM (CRUZ et al., 2013; de SOUSA et al., 2014 b); dos REIS et al., 2013; MANJOLIN et al., 2013).

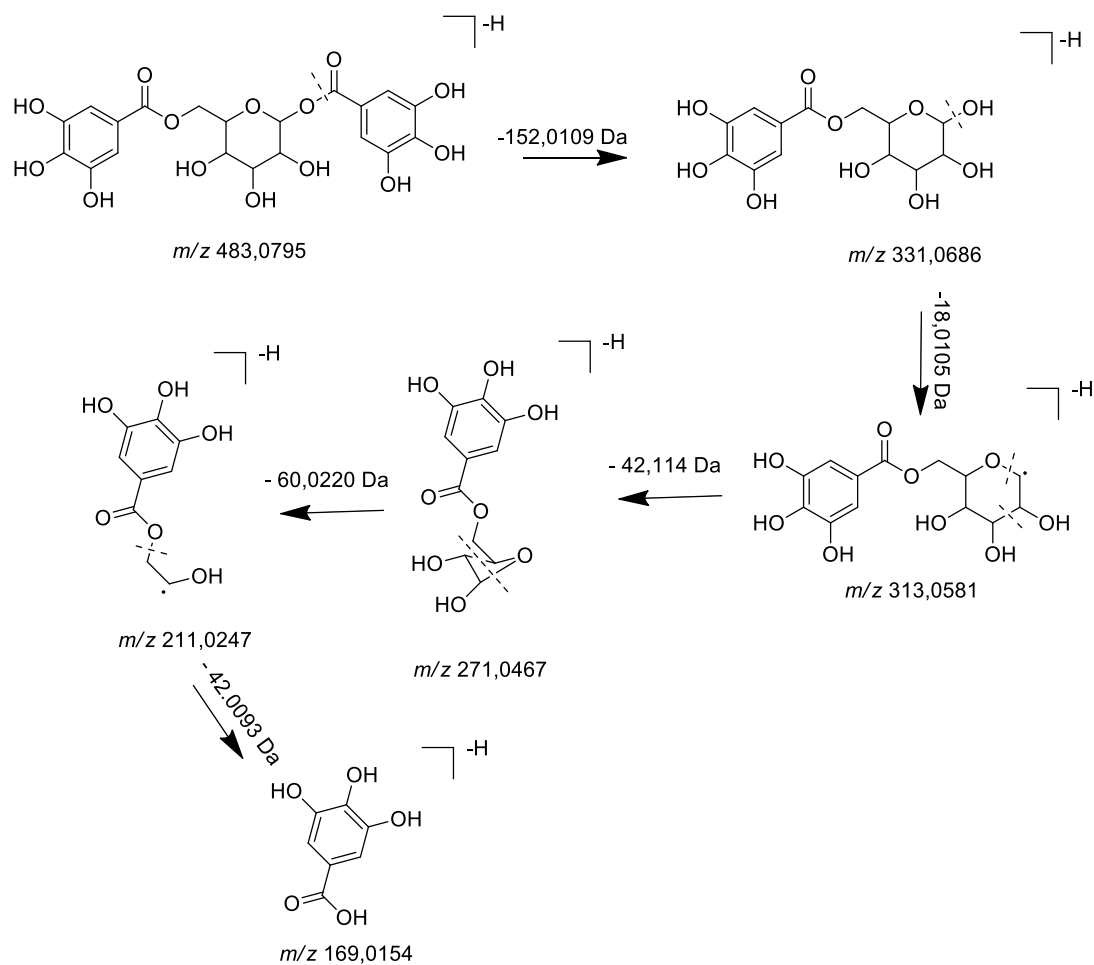


FIGURA 7.14. Proposta de fragmentação de digaloil-hexose (**10QFI**)

Os flavonoides **5QFI**, **12QFI**, **15QFI** e **16QFI**, o composto brevifolincarboxilato de metila (**6QFI**), o ácido quínico (**17QFI**) e o ácido málico (**17QFI**), também foram identificados com base em dados da literatura (MUCCILLI et al., 2017; SINGH et al., 2016).

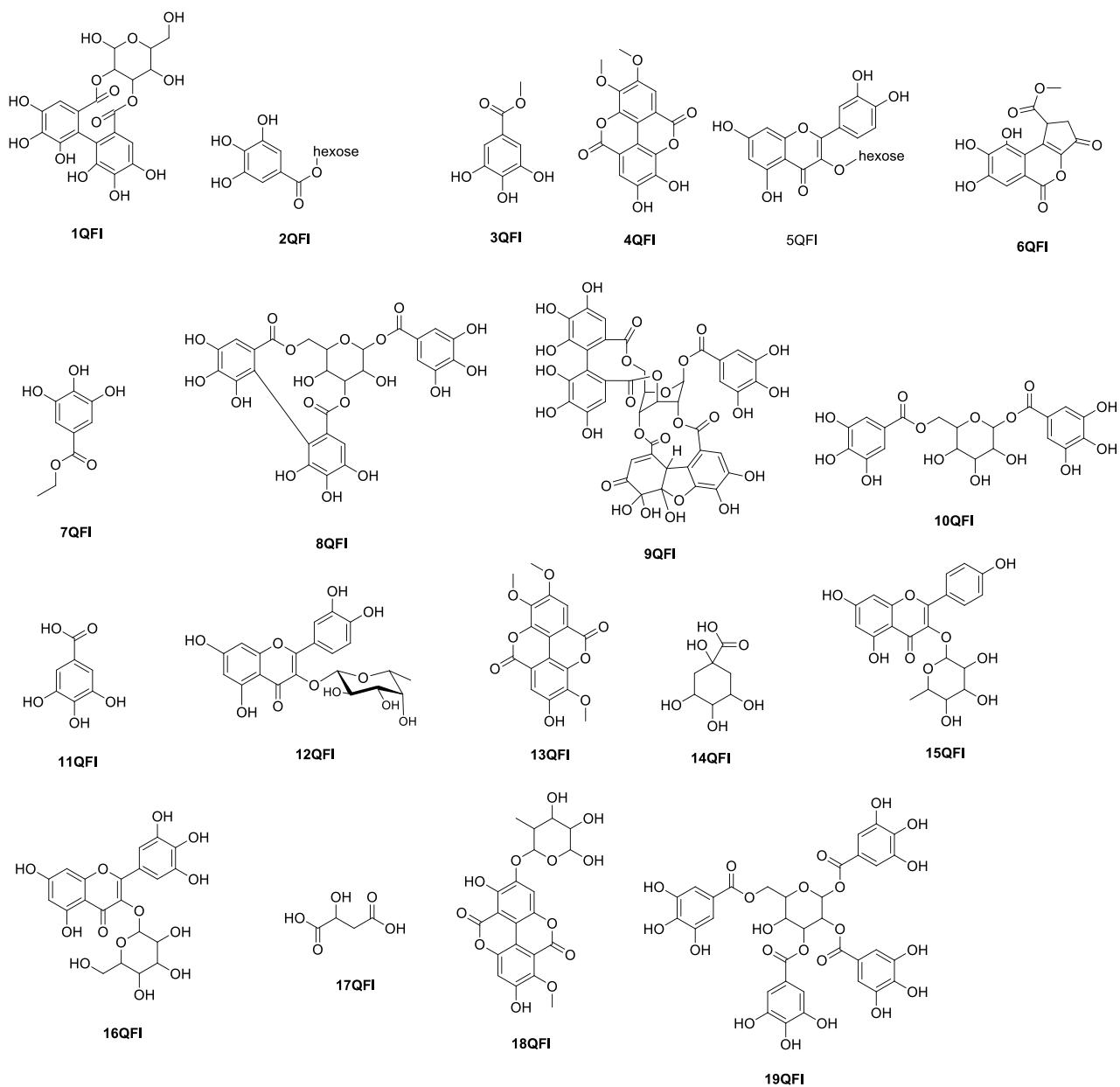


FIGURA 7.15. Metabólitos secundários identificados na fração de acetato de etila das flores de *Q. grandiflora*

TABELA 7.3: Metabólitos secundários identificados na fração de acetato de etila das flores de *Q. grandiflora*

Comp.	RT (min)	Fórmula molecular	[M – H] ⁻ (Teor.)	[M – H] ⁻ (Exp.)	Erro (ppm)	EM/EM	Nome	Referência
1QFI	0.8	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₄	481,0624	481,0643	-4.9	301,0008; 275,0202	HHDP-hexose	MUCCILLI et al., 2017
2QFI	0.9	C ₁₃ H ₁₅ H ₁₀	331,0671	331,0689	-5.0	271,0480; 211,0259; 169,0157; 151,0040; 112,9865; 89,0252	galoil hexose	SINGH et al., 2016
3QFI	4.5	C ₈ H ₇ O ₅	183,0299	183,0309	-4.2	168,0070; 124,0171	galato de metila	SINGH et al., 2016
4QFI	7.9	C ₁₆ H ₉ O ₈	329,0303	329,0315	-3.6	314,0075; 298,9845	ácido dimetil elágico	KUMAR et al., 2015
5QFI	5.0	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂	463,0882	463,0894	-2.8	300,0287	quercetina- <i>O</i> -hexosídeo	KUMAR et al., 2015
6QFI	3.3	C ₁₄ H ₉ O ₈	305,0803	305,0308	-3.6	273,0052; 245,0072; 217,0148	brevifolincarboxilato de metila	KUMAR et al., 2015
7QFI	4.6	C ₉ H ₉ O ₅	197,0455	197,0465	-4.7	169,0149; 140,0119; 124,0170	galato de etila	SINGH et al., 2016
8QFI	3.1	C ₂₇ H ₂₁ O ₁₈	633,0733	633,0754	-2.6	465,0688; 463,0552; 300,9997; 275,0278; 169,0157	Corilagina	KUMAR et al., 2015
9QFI	3.7	C ₄₁ H ₂₇ O ₂₇	951,0745	951,0777	-2.4	933,0665; 300,9978	geranina	KUMAR et al., 2015
10QFI	2.1	C ₂₀ H ₁₉ O ₁₄	483,0780	483,0796	-3.1	331,0686; 313,0581; 271,0467; 211,0247; 169,0154	digaloil-hexose	SINGH et al., 2016
11QFI	1.3	C ₇ H ₅ O ₅	169,0142	169,0155	-5,9	125,0252	ácido gálico	SINGH et al., 2016
12QFI	5.6	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁	447,0933	447,0950	-2.9	301,0347	quercetina- <i>O</i> -ramnosídeo	DÍAZ-DE-CERIO et al., 2016
13QFI	8.7	C ₁₇ H ₁₁ O ₈	343,0459	343,0464	-3.6	328,0238; 312,9998	ácido trimetil elágico	KUMAR et al., 2015
14QFI	0.7	C ₇ H ₁₂ O ₆	191,0561	191,0574	-6.2	146,8983; 127,0404; 109,0295; 102,9482; 85,0298	ácido quínico	KUMAR et al., 2015
15QFI	6.3	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	431,0985	431,0997	2.3	285,0413	Kaemferol- <i>O</i> -hexosídeo	KUMAR et al., 2015

16QFI	4.5	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₃	479,0831	479,0834	-3.0	316,0222; 275,0214	mericetina-hexosídeo	FRANCO et al., 2019
17QFI	0.9	C ₄ H ₅ O ₅	133,0142	133,0150	-5.6	115,0047; 71,0154	ácido málico	FRANCO et al., 2019
18QFI	5.8	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	461,0725	461,0734	-2.4	315,0155; 169,0156	ácido metilelágico-hexosídeo	FRANCO et al., 2019
19QFI	4.7	C ₃₄ H ₂₈ O ₂₂	787,0999	787,1018	-0.5	617,0812	tetragaloil hexose	MUCCILLI et al., 2017

8 – Identificação dos metabólitos secundários através das redes moleculares

Os extratos das cascas do caule e das folhas da espécie *D. brasiliensis* foram analisadas por CLUE-IES-QqTOF-EM/EM. Conforme discutido anteriormente, compostos presentes nas amostras foram identificados comparando os íons produtos de EM² (m/z) obtidos pelos experimentos no modo negativo $[M - H]^-$, através de dados presentes na biblioteca do software *CompoundCrawler* e comparando aos dados da literatura. A análise de dados de espectrometria de massas também foi feita utilizando *molecular networking* através da plataforma GNPS.

A plataforma GNPS foi utilizada para a geração de redes moleculares e identificação de outros metabólitos secundários, dessa forma, ampliando o conhecimento químico da espécie em estudo. Essa plataforma é online, possui acesso livre e conta com uma ampla biblioteca de conjuntos de dados espectrais que regularmente são reanalisados. O conjunto de dados são conhecidos como “dados vivos” e podem ser compartilhados por membros da comunidade científica, além de possibilitar uma análise automatizada das redes moleculares e dados de EM/EM (WANG et al., 2016).

Os dados de EM/EM obtidos através dos experimentos de CL-EM foram organizados como redes moleculares para mapear o espaço espectral dos extratos de *D. brasiliensis*. As redes moleculares foram construídas conforme descrito anteriormente (p.40). O valor mínimo de cosseno de 0.7 foi definido para o agrupamento dos espectros. A rede molecular gerada (Figura 8.1) é composta por 212 nodos no modo negativo $[M - H]^-$, sendo que, 82 desses nodos estão conectados e distribuídos em 18 clusters. O nodo é representado por gráfico de pizza em 2 cores: vermelho e azul, para extratos das cascas do caule e folhas, respectivamente. Essa *networking* apresentou três tipos diferentes de clusters: os que envolve um maior número de nodos aglomerados, outros com números menores de nodos ligados, e os clusters sem correspondência espectral.

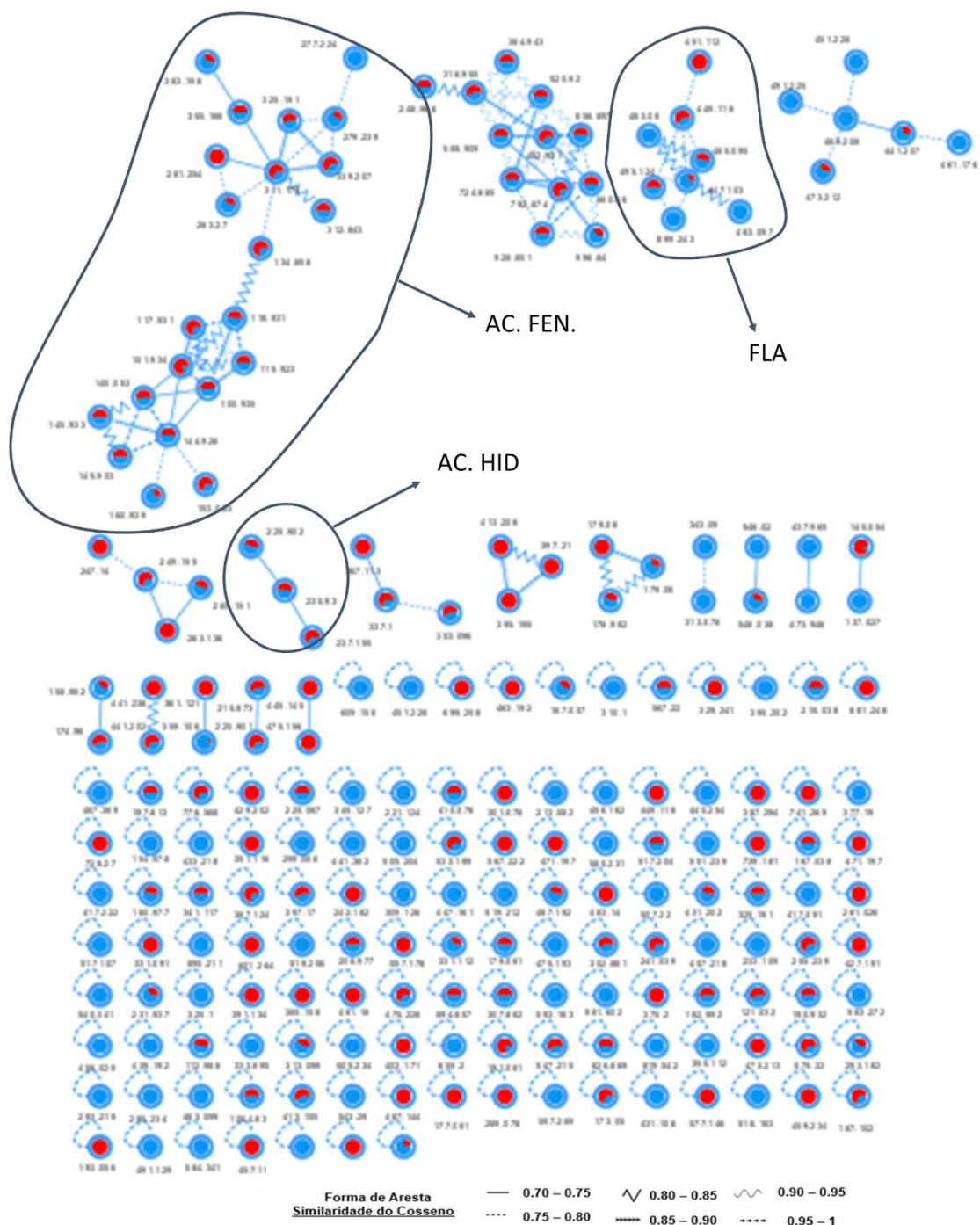


FIGURA 8.1. Rede molecular gerada para os extratos da casca do caule e folhas de *D. brasiliensis*. A cor em vermelho representa os compostos das cascas do caule e a cor azul, os compostos das folhas.

Com o intuito de facilitar a localização do nodo no *molecular networking* e a discussão dos dados, os clusters contendo nodos anotados foram nomeados de acordo com a classe química dos metabólitos identificados. Os compostos anotados foram

identificados como compostos fenólicos da classe dos flavonoides e derivados de ácidos hidroxicinâmicos. Para o cluster (FLA) foi identificado compostos da classe dos flavonoides, para o cluster (AC. HID) derivados de ácidos hidroxicinâmicos e para o cluster (AC. FEN.) ácido benzóico, conforme demonstrado na Figura 8.1.

Através dessa rede molecular gerada foi possível detectar a partir da anotação, alguns dos compostos anteriormente identificados pela análise de dados das bibliotecas contidas no *CompoundCrawler* (tabela 7.1) sendo esses compostos: quercetina-*O*-ramnosídeo (**1F**), quercetina-*O*-hexosídeo (**2F**), ácido clorogênico (**2C** e **3F**), ácido coumaroilquinico (**5F**) e o ácido di-hidroxibenzóico (**5C**). Os compostos: hidroxibenzaldeído (**3C**), catequina ou epi-catequina (**1C**), a astilbina (**6F** e **6C**) e procianidina (**4C**) que também foram identificados anteriormente não foram anotados pela biblioteca espectral do GNPS mas estão representados como nodos nas redes moleculares fornecidas pela plataforma.

Os dados utilizados para a geração das redes de interações moleculares estão disponíveis em:
<https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=dd76b77161ca47b4a4d44e0000392103>

8.1 - Flavonoides identificados pelas redes moleculares – Cluster FLA

Como explicado anteriormente, os cluster foram nomeados para melhor localização dos mesmos no mapa de redes moleculares. O cluster FLA (Figura 8.2) foi formado por 8 nodos, e dentre esses nodos foram anotados 2 pela plataforma, os flavonoides foram identificados como: quercetina-*O*-ramnosídeo (**1F**) (m/z 447.103) e quercetina-*O*-hexosídeo (**2F**) (m/z 463.907).

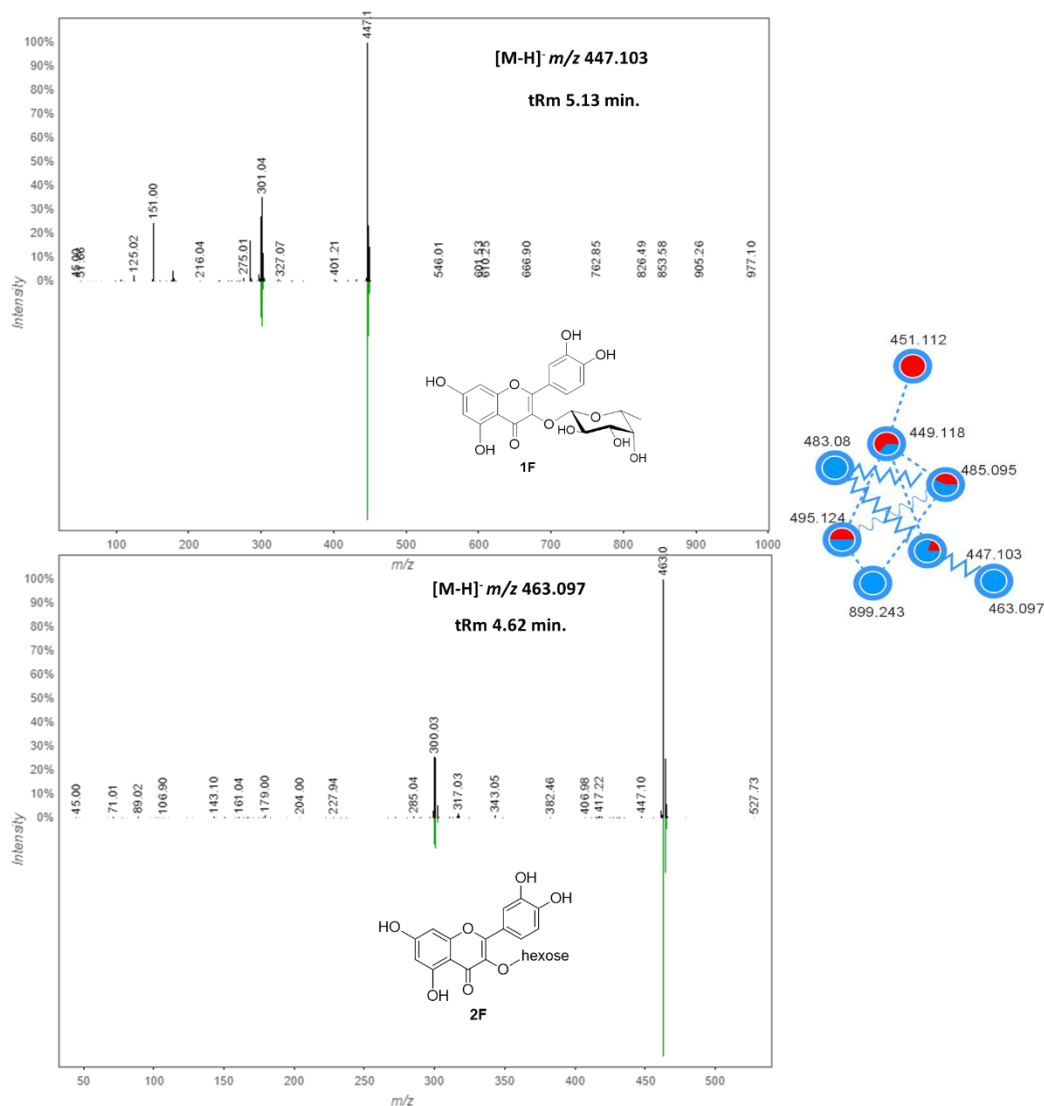


FIGURA 8.2. Cluster FLA com os espectros da literatura fornecido pela biblioteca espectral do GNPS (cor verde) e espectro experimental (cor preto) para os flavonoides anotados e identificados.

Ambos os compostos anotados, foram identificados anteriormente no DBFE através dos outros bancos de dados (tópico 7.1) e confirmado através da literatura. Entretanto, pela análise de redes moleculares podemos observar que o metabólito secundário de m/z 447.103 também foi anotado para o extrato DBCcE (nodo: cor vermelho DBCcE e cor azul: DBFE), só que, em menor abundância, com tempo de retenção médio (t_{Rm}) de 5.13 min, com valor de cosseno 0.83. Na análise do *molecular networking*, os principais íons produtos para as moléculas (**1F**) e (**2F**) foram os picos em m/z 301.04 e 300.03, característicos dessas substâncias (DÍAZ-DE-CERIO et al., 2016).

A astilbina não foi anotada pela plataforma GNPS, mas foi identificada usando os dados presentes na biblioteca do software *CompoundCrawler* e comparando com os dados da literatura. O nodo com m/z 449,118 desta rede molecular pode ser correspondente a astilbina.

8.2 - Ácidos hidroxinâmicos identificados pelas redes moleculares – Cluster AC. HID

O cluster nomeado como AC. HID foi formado por 3 nodos, sendo 2 deles anotados pela plataforma (Figura 8.3). Esses metabólitos foram identificados como: ácido clorogênico (m/z 353.096) (**2C** e **3F**) e ácido coumaroilquínico (m/z 337.1) (**5F**).

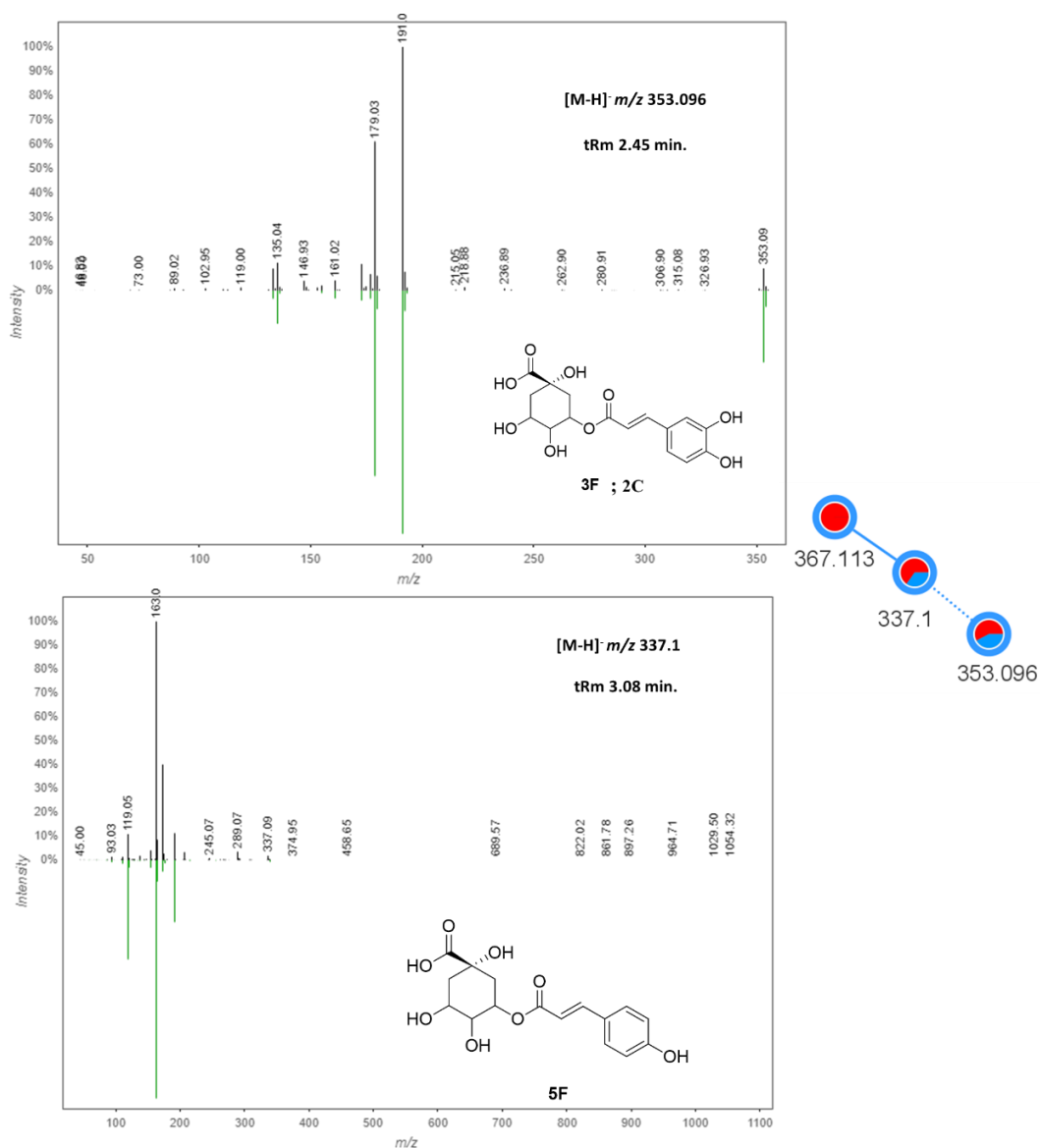


FIGURA 8.3. - Cluster AC. HID com os espectros da literatura fornecido pela biblioteca

espectral do GNPS (cor verde) e espectro experimental (cor preto) para os ácidos hidroxicinâmicos anotados e identificados.

Através da análise de dados das bibliotecas contidas no *CompoundCrawler*, o ácido clorogênico (**2C** e **3F**) (m/z 353.096), foi identificado em ambos os extratos etanólicos de *D. brasiliensis*, casca do caule e folhas, assim como na análise do *molecular networking*. Os íons produtos observados condizem com identificados na análise anterior onde é possível visualizar a perda da unidade cafeoil $[M - 162]^-$, e o íon de m/z 179.03 referente à perda do ácido quínico, além do íon fragmento com m/z 135.04 obtido da descarboxilação da unidade cafeoil (CLIFFORD et al., 2003).

O composto ácido coumaroilquinico (**5F**) pela análise de dados realizada anteriormente, foi identificado apenas no extrato DBFE. No *molecular networking* essa substância foi anotada para os dois extratos (DBFE e DBCcE) apresentando o íon do pico molecular em m/z 337.100 com fragmentações em m/z 191.06 referente à perda da unidade coumaroil e m/z 163.04 relacionado à perda do ácido quínico. Outro íon apresentado em m/z 119.05 confere a unidade coumaroil a perda de CO_2 (FANG, YU, PRIOR, 2002).

8.3 – Ácido benzóico identificado pelas redes moleculares – Cluster AC. FEN.

Outro cluster que também teve nodo anotado pela plataforma foi o AC. FEN. (Figura 8.4), sendo o mesmo constituído por 22 nodos, e dentre esses, 1 foi anotado pela plataforma. O composto foi identificado como: di-hidroxibenzóico (**5C**) (m/z 153.023).

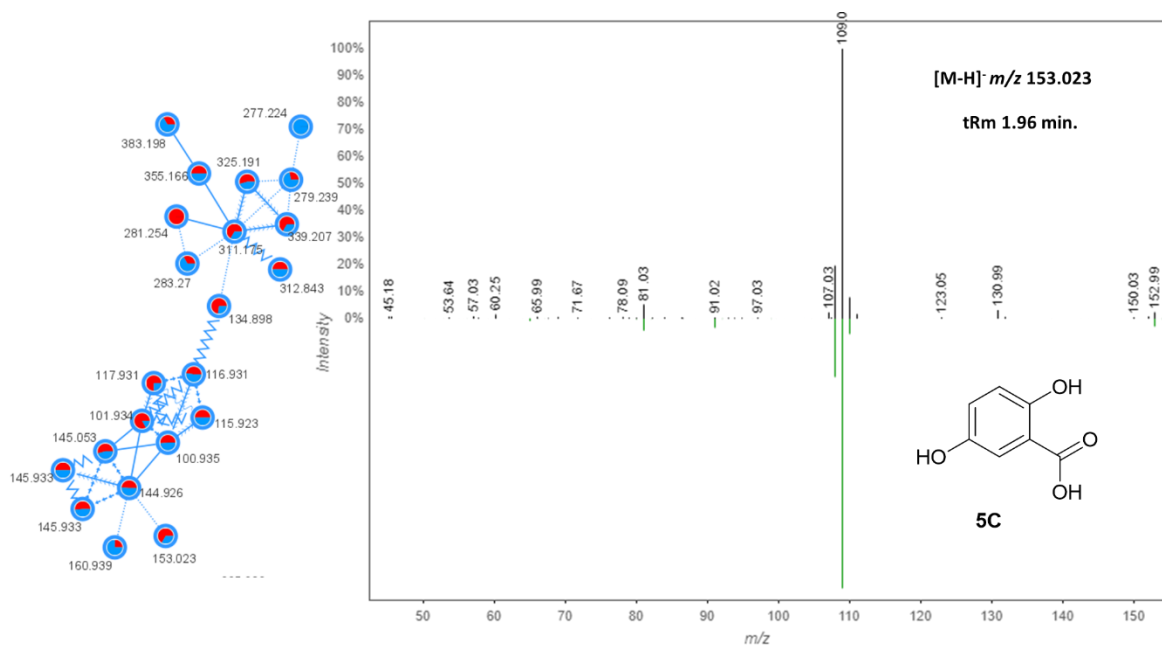


FIGURA 8.4 - Cluster AC. FEN. com os espectros da literatura (cor verde) e espectro experimental (cor preto) para o composto anotado e identificado.

Esse composto anotado, também foi identificado pela análise do EM² do DBCcE usando os bancos de dados e confirmando pela comparação com a literatura. Através da análise de redes moleculares, o metabólito secundário de m/z 153.023 também foi anotado para o extrato DBFE (nodo: cor azul e cor vermelha), mostrando que este composto está presente tanto no caule quanto nas folhas. O tempo de retenção médio (t_{Rm}) foi de 1.96 min e o valor de cosseno 0.90. Na análise do *molecular networking* pode-se observar o íon fragmento principal com m/z 109.03 proveniente da perda de um grupo CO₂, típico de ácidos carboxílicos (RODRÍGUEZ PERES et al., 2018).

8.4 – Outras substâncias identificadas pelas redes moleculares

Apesar de não terem sido anotados pela biblioteca espectral do GNPS, três nodos (destacados na Figura 8.4) foram gerados apresentando picos de íons moleculares com íons fragmentos correspondentes as substâncias já identificadas pela análise de dados realizada anteriormente (tópico 7.1).

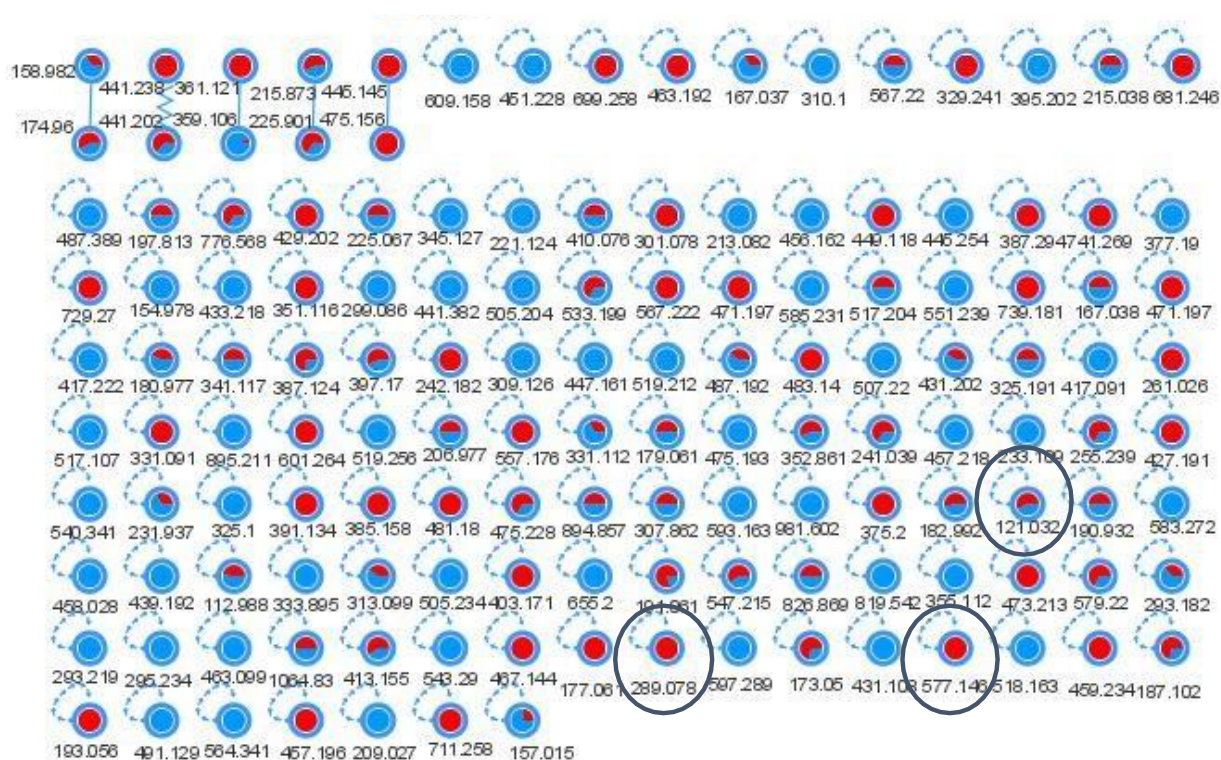


FIGURA 8.5. Rede molecular ampliada com nodos destacados para os 3 compostos identificados.

Os picos dos íons moleculares apresentados nesses clusters foram em m/z $[M - H]^-$ 121.032; 289.078; 577.146. O cluster com pico do íon molecular em m/z $[M - H]^-$ 121.032 apresentou t_{Rm} de 2.8 min e um íon fragmento com m/z 92.03 similar ao íon observado para o hidroxibenzaldeído (FARRAG et al., 2019). Para o cluster com m/z $[M - H]^-$ 289.078 foram apresentados íons fragmentos em m/z 203.06, 245.05 e 125.03, com t_{Rm} de 2.83 min, sendo correspondente a catequina ou epi-catequina (DÍAZ-DE-CERIO et al., 2016). Por último, o cluster de m/z $[M - H]^-$ 577.146, com t_{Rm} de 2.53 min e íons produto característico em m/z 425.09, 289.07 e 125.03 equivalentes aos íons observados para a procianidina (DÍAZ-DE-CERIO et al., 2016). Os espectros de fragmentação desses 3 nodos estão disponíveis no anexo deste trabalho.

9 - Modelagem molecular

9.1 - Modelo da enzima utilizada para a triagem virtual

A modelagem molecular tem como objetivo identificar moléculas pequenas com

elevado potencial de interagirem com proteínas alvo. Conhecida também, como triagem virtual tornou-se um componente essencial que auxilia na busca por novas moléculas biologicamente ativas. O processo de acoplamento consiste em prever a orientação do ligante com a conformação no sítio de ligação alvo (sítio ativo ou alostérico), seguido de avaliação (pontuação) que é a afinidade pela proteína alvo e classificação do modo proposto de ligação (FERREIRA et al., 2011; GUIDO et al., 2008).

Para os estudos de docagem, foi utilizado a estrutura cristalográfica com código PDB-ID 5HJA, referente à enzima arginase obtida de *Leishmania mexicana* em complexo com o inibidor análogo do substrato (L-arginina), o aminoácido borônico α,α -disubstituído (ácido 2-(S)-amino-6-borono-hexanóico) (complexo *Lm*ARG-ABH) (Figura 9.1), descrito por (D'ANTONIO et al., 2013; HAI E CHRISTIANSON, 2016) que compartilha mais de 90% de identidade de sequência com a arginase *L. amazonensis*, sendo assim um ótimo modelo de homologia com alta identidade.

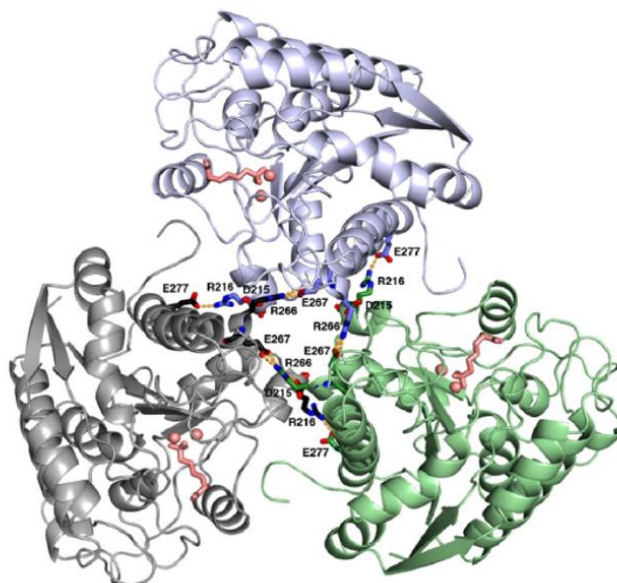


FIGURA 9.1. Estrutura cristalográfica do complexo trimérico *LmARG*-ABH, arginase de *Leishmania mexicana* com o análogo do substrato (ácido 2-(*S*)-amino-6-boronohexanóico) PDB-ID 5HJA (fonte: RCSB PDB). Os monômeros estão em cor cinza, azul e verde; os íons Mn^{2+} e ABH estão em cor rosa em cada monômero. A estrutura trimérica é estabilizada pelos clusteres (*salt link cluster* SLC- α , SLC- β e SLC- γ) cujas interações estão representadas em tracejado laranja. Quando comparado a arginase I humana os resíduos de aminoácido no sítio catalítico são conservados, mas o SLC- β de *LmARG* não é conservado devido a falta de um resíduo de arginina tendo mais ligações de hidrogênio entre os links. O link SLC- γ é ausente em arginase I humana, tendo uma interação intramolecular doadora de ligação de hidrogênio específica de *LmARG*.

O ligante utilizado como referência nesse estudo foi o (*R*)-2-amino-6-borono-2-[1-(3,4-diclorobenzil)piperidin-4-il] ácido hexanóico (ABH_{DP}) ligante da estrutura cristalográfica de *LmARG* do trabalho de Hai e Christianson, 2016, cuja atividade inibitória experimental do ABH_{DP} apresentou $IC_{50} = 1,7 \pm 0,4 \mu M$ e $K_i = 1,1 \pm 0,3 \mu M$. A validação deste modelo de docagem foi realizada pela redocagem dessa enzima *LmARG*- ABH_{DP} (RMSD de $1,7 \text{ \AA}$, $-32,95 \text{ KJ/mol}$ com ABH_{DP}) usando os outros ligantes conhecidos (ROC AUC 0,95) avaliando a estrutura com melhor posição obtida em relação a estrutura cristalográfica. O valor de RMSD (root-mean-square deviation) corresponde à distância média entre os átomos dos complexos proteína-ligante sobrepostos.

A utilização de várias estruturas para docagem (complexos proteína-ligante) é uma estratégia que considera a flexibilidade da enzima. Durante a docagem é avaliado o

acoplamento dos ligantes, ou seja, as suas interações intermoleculares com os resíduos de aminoácidos do sítio de ligação da enzima alvo (Ferreira et al., 2011). As várias conformações e orientações geradas para cada molécula levam a uma função de pontuação (*scoring function*), que podem ser obtidas de funções físico-químicas (cálculos de interações eletrostáticas e van der Waals), funções experimentais (termos entálpicos e entrópicos da enzima-ligante) ou funções estatísticas (estruturas de complexos conhecidos avaliando ângulos, distâncias, etc.) (FERREIRA et al., 2011; GUIDO et al., 2008).

A Figura 9.2 mostra o complexo do ligante e a proteína utilizada no ensaio de redocagem, alinhado a estrutura cristalográfica. Através do alinhamento é possível observar no modelo farmacofórico as interações dos resíduos do sítio catalítico com a molécula ligante. As principais características são: uma parte de aminoácidos, um *linker* alifático ou aromático e um grupo para complexar com os íons catalíticos Mn^{2+} . Referência de pontuação da afinidade -32,95 kJ/mol (*score* obtido do complexo Lm_{ARG} - ABH_{DP}), PDB ID 5HJA.

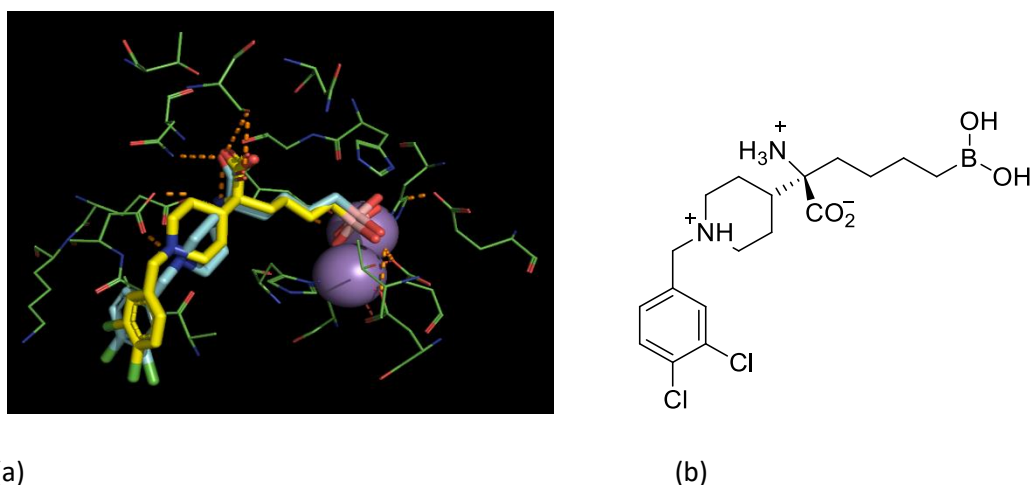


FIGURA 9.2. (a) Alinhamento entre a estrutura cristalográfica (ligante apresentado com átomos na cor amarelo), código PDB-ID 5HJA e a redocagem com o complexo ligante Lm_{ARG} - ABH_{DP} (ABH_{DP} , apresentado com átomos em azul) (b) Estrutura química do ligante (ABH_{DP}).

9.2 - Triagem virtual de compostos selecionados e identificados por CLUE-IES-QqTOF-EM/EM utilizando a enzima arginase (Lm_{ARG})

Algumas moléculas que foram identificadas em estudos anteriores das espécies *D. brasiliensis* e *E. suberosum*, foram selecionadas para a triagem virtual. É a primeira vez que as classes de metabólitos secundários selecionadas, alcaloide e sesquiterpeno, são investigadas em estudo *in silico* em ARG. Na figura abaixo estão apresentados alguns dos 26 compostos que foram avaliados, juntamente com os compostos **16**, **18**, **20**, **21**, **22**, **23**, **24**, **26**, **29** e **30** (introdução, páginas 10 e 11).

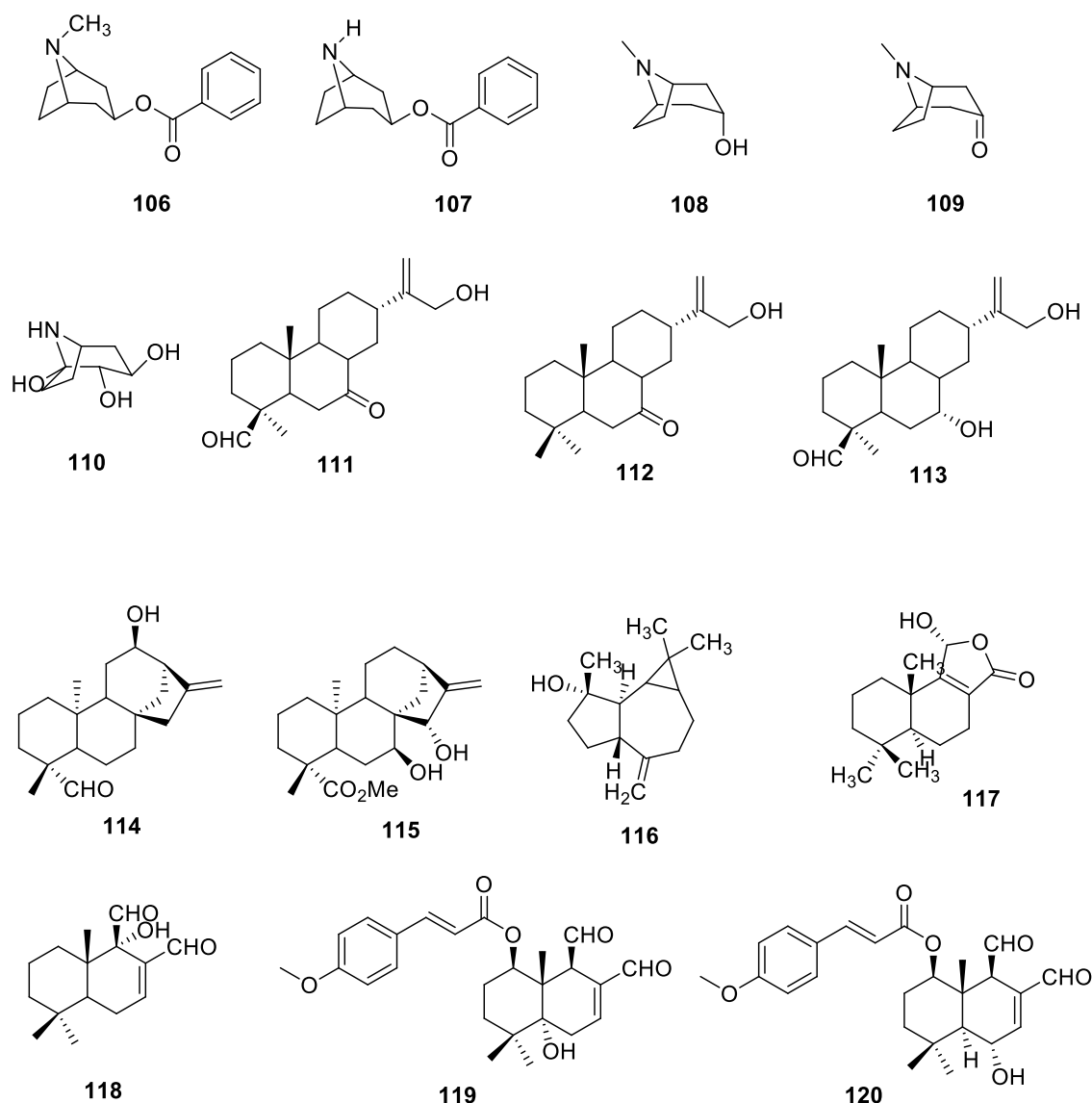


FIGURA 9.3. Compostos utilizados nos estudos de modelagem molecular. Os compostos **16-30** e **116-120** são da espécie *D. brasiliensis* e os compostos **106-115** foram identificados na espécie *E. suberosum*.

De acordo com a docagem molecular destes compostos avaliados, quando comparado ao inibidor ABH_{DP} presente na forma cocristalizada (*Lm*_{ARG}-ABH_{DP}), todos

os compostos apresentaram afinidade inferior à enzima arginase e nenhum deles ligou-se de forma específica e não houve interações com o íon Mn^{2+} . O composto **110** com *score* -16,91 kJ/mol foi o melhor resultado obtido, tendo uma parte da molécula com interações similares as interações encontradas no inibidor ABH_{DP}. O alcaloide **110** é um poliidroxi alcaloide com esqueleto nortropano e é o primeiro relato de um alcaloide como possível ligante de arginase de *Leishmania*.

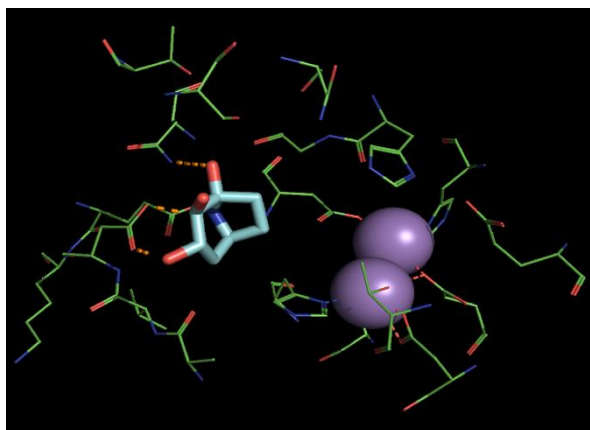
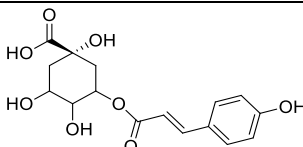
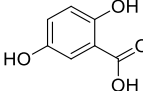
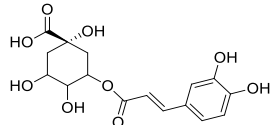
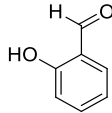
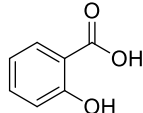


FIGURA 9.4. Imagem da docagem com o composto **110**.

Também foram selecionadas para o ensaio computacional algumas das moléculas de *D. brasiliensis* identificadas do extrato etanólico por CLUE-EM/EM neste trabalho, o ácido coumaroilquínico (**5F**), ácido di-hidroxibenzóico (**5C**), ácido clorogênico (**2C** e **3F**) e hidroxibenzaldeído (**3C**). O ácido salicílico (**121**) possui similaridade com os compostos **3C** e **5C** sendo incluído no estudo de docagem.

O estudo de modelagem molecular dos compostos identificados do extrato ativo de *D. brasiliensis* revelou que a afinidade desses compostos naturais foi menor quando comparada com a do inibidor ABH_{DP} (-32,95 kJ/mol), o qual apresenta a estrutura análoga ao substrato natural (L-arginina) da arginase (Tabela 9.1). Nenhum dos PNs avaliados apresentaram interações com o íon Mn^{2+} . Dentre os PNs, os ácidos salicílico (**121**) e di-hidroxibenzóico (**5C**) foram as moléculas que apresentaram melhores valores de *score* (kJ/mol), com -15,74 e -13,64 KJ/mol, respectivamente, ou seja, os compostos com melhor afinidade com a *Lm*_{ARG}.

TABELA 9.1: Valores de energia de interação obtidos por docagem molecular com moléculas identificadas em *D. brasiliensis* por CLUE-EM/EM.

Estrutura	Composto	Score (kJ/mol)
	5F	-13,45
	5C	-13,64
	2C e 3F	-11,94
	3C	-9,95
	12I	-15,74

*incluído nesse estudo pois possui similaridade com os compostos **3C** e **5C**

O ácido clorogênico (**2C** e **3F**) foi avaliado *in vitro* em um trabalho recente de da SILVA e colaboradores 2019 a) e é um inibidor competitivo de La_{ARG} com $IC_{50} = 8,3 \pm 0,2 \mu M$, $K_i = 5 \pm 1 \mu M$.

10 - Avaliação dos extratos de plantas frente às formas promastigotas de *L. infantum*

Na literatura é possível encontrar diversos trabalhos com diferentes classes de metabólitos secundários de plantas que apresentam atividade leishmanicida, *in vitro*, sobre as formas promastigotas e amastigotas de diferentes espécies de *Leishmania*.

Nesse estudo foram avaliados 16 extratos etanólicos provenientes de diferentes espécies de plantas e essa avaliação mostrou que apenas um desses extratos, o das folhas

de *T. ochracea* apresentou inibição do crescimento das formas promastigotas de *L. infantum* de maneira significativa, com valor de inibição superior a 50% na concentração de 100 µg/mL, como mostra a Tabela 10.1. Para os demais extratos, as inibições variaram entre 33% e -6%.

TABELA 10.1: Percentual de inibição das formas promastigotas de *L. infantum* por extratos etanólicos provenientes de plantas do cerrado

Nome científico	Parte da planta	<i>L. infantum</i> [Inibição (%) ± DP]
<i>Drimys brasiliensis</i>	Caule	18,05±10,91
	Folhas	11,90±13,72
<i>Dalbergia miscolobium</i>	Caule	32,97±0,82
	Folhas	18,57±3,30
<i>Erythroxylum suberosum</i>	Caule	5,71±0,00
	Folhas	18,24±4,07
<i>Jatropha mollissima</i>	Caule	11,43±4,95
	Folhas	14,63±0,59
<i>Memora axillaris</i>	Caule	5,71±8,57
	Folhas	25,91±2,10
	Raíz	-2,86±8,57
<i>Myrcia lingua</i>	Caule	14,72±11,07
<i>Tabebuia ochraceae</i>	Caule	-5,71±4,95
	Folhas	87,41±1,09
<i>Vochysia tucanorum</i>	Caule	23,10±2,50
	Folhas	27,12±7,36

*Inibição (%) ± DP: Percentual de inibição dos parasitos ± desvio padrão. Controle negativo: DMSO (1%) e controle positivo anfotericina B (312,5 a 19,56 ng/mL).

Como é possível observar, o extrato das folhas de *T. ochracea* ocasionou 87,4% de inibição no crescimento das formas promastigotas de *L. infantum* na concentração de 100 µg/mL.

A quinona é uma das classes predominante na família Bignoniaceae (da SILVA, et al, 2012 a). Além disso, diversos trabalhos descrevem a presença de naftoquinonas presente nesse gênero e furanonaftoquinonas nessa espécie (PERÉZ, DIÁZ, MEDINA, 2008; ZANI, DE OLIVEIRA, DE OLIVIERA 1991). As classes das naftoquinonas (ARAÚJO et al., 2019; MALERICH et al., 2013; MENDONÇA et al., 2018); lactonas sesquiterpênicas (WULSTEN et al, 2017); flavonoides (RAMÍREZ-MACÍAS et al.,

2012); sesquiterpenos (ACEBEY, et al., 2010) e xantonas (HAY, et al, 2008) estão dentre as classes de metabólitos, que possuem atividade contra as formas amastigotas e promastigotas de *Leishmania infantum*. Como relatado por Araújo e seus colaboradores (2019), o composto lapachol, uma naftoquinona comumente encontrado no gênero *Tabebuia* e na família Bignoniaceae apresentou atividade anti-*Leishmania* em promastigotas de *L. amazonensis* ($IC_{50} = 79,84 \pm 9,10 \mu M$, $SI = 42,65$) e *L. infantum* ($IC_{50} = 135,79 \pm 33,04 \mu M$, $SI = 25,08$), além de índices de seletividade favoráveis (SI). O SI é determinado a partir da razão de (concentração de citotoxicidade) CC_{50}/IC_{50} , (concentração inibitória). As amostras com valor $SI > 20$ são consideradas eficazes e seletivas para *L. amazonensis* e *L. infantum*.

Dessa maneira, pode-se levar em consideração a presença dessa classe de composto como sendo uma das responsáveis pelo valor da inibição contra as formas promastigotas, pelo extrato das folhas dessa espécie. Um fator interessante é que esse extrato também apresentou um resultado bem expressivo em La_{ARG} .

11 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através da triagem *in vitro* realizada foi possível encontrar algumas espécies de plantas que apresentaram inibição significativa frente à ARG de *L. amazonensis*, tais como a *Q. grandiflora*, *D. brasiliensis*, *T. ochracea* e *E. suberosum*. Dentre as espécies avaliadas frente ao protozoário de *L. infantum* apenas a *T. ochracea* reduziu o crescimento dos protozoários de forma evidente.

O fracionamento do extrato ativo da planta *E. suberosum*, fração diclorometano levou a perda da atividade inibitória que poderia ser explicada pelo efeito sinérgico dos compostos presentes nos extratos. Na *E. suberosum* a diminuição da atividade na fração poderia ser devido à ausência dos flavonoides presentes no extrato etanólico.

Os extratos ativos (cascas do caule e folhas) da espécie *D. brasiliensis* foram selecionados para a prospecção química e os resultados da análise por CLUE-EM/EM permitiram identificar 12 compostos dentre os quais alguns flavonoides, ácidos hidroxicinâmicos, um aldeído e um ácido carboxílico. A presença de flavonoides e do ácido clorogênico em ambos os extratos ativos das cascas e folhas de *D. brasiliensis* (DBCcE e DBFE) poderia justificar a atividade inibitória encontrada nestes extratos em vista que estes compostos são inibidores de arginase.

Através da plataforma GNPS foi possível confirmar a presença dos compostos identificados através da base de dados do *software CompoundCrawler* nos extratos ativos (cascas do caule e folhas) da espécie *D. brasiliensis*, sendo possível observar o agrupamento e a conexão dos espectros de acordo com suas famílias moleculares e perfil de fragmentação, com valores de cosseno acima 0.7. O *molecular networking* permitiu agrupar e identificar compostos comumente encontrados nas cascas do caule e nas folhas desta planta importante para a análise dos resultados biológicos relacionados ao perfil químico.

O estudo *in silico* foi realizado em arginase para diversos compostos identificados anteriormente e identificados pelos dados de EM/EM analisados neste trabalho para as espécies de *D. brasiliensis* e *E. suberosum*. O resultado da docagem molecular revelou que o alcaloide **55** de *E. suberosum* apresentou interações similares ao inibidor competitivo ABH_{DP} (-32,95 kJ/mol) com *score* -16,91 kJ/mol. O ácido di-hidroxibenzóico (**5C**) de *D. brasiliensis* foi a molécula com melhor afinidade (-13,64 KJ/mol).

Após a partição líquido-líquido dos extratos da casca de *Q. grandiflora* avaliados em arginase, as frações de acetato de etila e hidroalcóolica continuaram apresentando valores satisfatórios, com exceção das frações de clorofórmio que apresentou atividades reduzidas. Já o fracionamento do extrato etanólico das flores de *Q. grandiflora* levaram a um aumento da atividade inibitória observado principalmente nas frações polares.

Em avaliação de influência da queimada e da localidade com cascas de caule da espécie *Q. grandiflora* por análises de CLAE-DAD, pode-se observar indícios da presença de luteolina 7-glucosídeo, quercetina e amentoflavona nas frações de QgCcEcA e QgCcEqA com alterações na biossíntese desses compostos após a queimada. Para a fração QgCcEA SP foi notado somente a presença do ácido elágico.

Mediante a análise por CLUE-EM/EM com as cascas de *Q. grandiflora* foram identificados 21 compostos, dentre esses, 9 antes da queimada e 12 após a queimada, sendo, ácido elágico e derivados, galotaninos, além de flavonoides. Não houve alteração em relação a atividade inibitória enzimática encontrada para espécimes coletadas em diferentes regiões geográficas, ou sobre a influência das queimadas. Entretanto, algumas diferenças no perfil químico foram observadas em relação aos compostos identificados nas frações.

Nas flores 19 compostos foram identificados, pertencentes a classe dos flavonoides, galotaninos, derivados de ácido elágico, ácidos carboxílicos e hidroxicinâmico. A presença de flavonoides e do ácido gálico nas frações avaliadas poderia justificar a atividade inibitória encontrada nestes extratos, tendo em vista que estes compostos são inibidores de arginase.

12 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACEBEY, L.; JULLIAN, V.; SERENO, D; CHEVALLEY, S.; ESTEVEZ, Y.; MOULIS, C.; BECK, S.; VALENTIN, A.; GIMENEZ, A.; SAUVAI, M. “Anti-Leishmanial lindenane sesquiterpenes from *Hedyosmum angustifolium*” *Planta Med.* v.76, p.365–368, 2010.

ALLARD PM, GENTA-JOUVE G, WOLFENDER JL. “Deep metabolome annotation in natural products research: towards a virtuous cycle in metabolite identification”. *Curr. Opin. Chem. Biol.* v.36, p.40-49, 2017.

ALONSO, M.; ROZADOS, M. J.; VEGA, J. A.; PÉREZ-GOROSTIAGA, P.; CUIÑAS, P.; FONTÚRBEL, M. T.; FERNÁNDEZ, C. “Biochemical responses of *Pinus pinaster* trees to fire-induced trunk girdling and crown scorch: secondary metabolites and pigments as needle chemical indicators”. *J. of chem. Ecology* v.28, p.687-700, 2002.

ANDRADE, M. A.; AZEVEDO, C. S.; MOTTA, F. N.; dos SANTOS, M. L.; SILVA, C. L.; de SANTANA, J. M.; BASTOS, I. M. D. “Essential oils: in vitro activity against *Leishmania amazonensis*, cytotoxicity and chemical composition” *BMC Complem. and Alternative Medicine* v.16, n. 444 p.1-8, 2016

ANDRÉ, C.; HERLEM, G.; GHARBI, T.; GUILLAUME, Y. C. “A new arginase enzymatic reactor: development and application for the research of plant-derived inhibitors.” *J. Pharm. Biomed. Anal.* v.55, p. 48–53, 2011.

ANESE, S.; JATOBÁ, L. J.; GRISI, P. U.; GUALTIERI, S. C. J., SANTOS, M. F. C.; BERLINCK, R. G. S. “Bioherbicidal activity of drimane sesquiterpenes from *Drimys brasiliensis* Miers roots”. *Ind. Crops and Prod.*, v. 74, p. 28–35, 2015.

ARAÚJO, I. A. C.; de PAULA, R. C.; ALVES, C. L.; FARIA, K. F.; de OLIVEIRA, M. M.; MENDES, G. G.; DIAS, E. M. F. A.; RIBEIRO, R. R.; de OLIVEIRA, A. B.; da SILVA, S. M. “Efficacy of lapachol on treatment of cutaneous and visceral leishmaniasis” *Exp. Parasitology* v. 199, p. 67–73, 2019.

ARON, A. T.; GENTRY, E. C.; [...] DORRESTEIN, P. C. “Reproducible molecular networking of untargeted mass spectrometry data using GNPS” *Nature Prot.* v.15, p. 1954-1001, 2020.

ARRAIS-SILVA, W.W.; NUNES, P.S.G; CARVALHO, J.D.1; BRUNE, M.W.; ARRAIS-LIMA, C.; BATALINI “Preliminary phytochemical and antileishmanial studies of the ethanolic extracts of *Pterodon pudescens*”. *Rev. Bras. Pl. Med.*, v.16, n.3, p.561-565, 2014.

ASSIS, M. A.; MORELLI-AMARAL, V. F.; PIMENTA, F. “Grupos de pesquisa e sua produção científica sobre plantas medicinais: um estudo exploratório no Estado do Rio de Janeiro” *Rev. Fitos*, v. 9, p. 45-54, 2015.

AYRES, M.C.C.A.; ESCÓRCIO, S.P.; DA COSTA, D.A.; CHAVES, M.H.; VIEIRA JÚNIOR, G.M.; CAVALHEIRO, A.J. “Chemical constituents from leaves of the *Qualea grandiflora* attribution of the NMR data of two diastereoisomeric acylated flavonoid glycosids”. *Quím. Nova* v.31, p.1481-1484, 2008.

BALAÑA-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” *Mol. Biochem. Parasitol*, v. 81, p.85–93, 2012.

BARROS, C.; IVELONE, M.; LEITE, B. H. M.; LEITE, C. F. M.; FAGG, C. W.; GOMES, S. M.; RESCK, I. S.; FONSECA-BAZZO, Y. M.; MAGALHAES, P. O.; DAMARIS, S. “Chemical composition and antioxidant activity of extracts from *Erythroxylum suberosum* A. St. Hil. Leaves”. *J. of Applied Pharmac. Sc.* v. 7, p. 88–94, 2017.

BAI, N.; HE, K.; ROLLER, M.; ZHENG, B.; CHEN, X.; SHAO, Z.; PENG, T.; ZHENG, Q. “Active compounds from *Lagerstroemia speciosa*, insulin-like glucose uptake stimulatory/inhibitory and adipocyte differentiation-inhibitory activities in 3T3-L1 cells”. *J. Agric. Food Chem.* 56: 11668-11674, 2008.

BARROSA, K. H., MECCHI, M. C., RANDO, D. G., FERREIRA, A. J. S., SARTORELLI, P., VALLE, M.M. R., BORDIN, S., CAPERUTO, L.C., LAGO, J. H. G.,

LELLIS-SANTOS, C., “Polygodial, a sesquiterpene isolated from *Drimys brasiliensis* (Winteraceae), triggers glucocorticoid-like effects on pancreatic b-cells”. *Chem. Bio. Inter.* v. 258, p. 245-256, 2016.

BASTOS, M. M.; BOECHAT, N.; HOELZ, L. V. B.; DE OLIVEIRA, A. P. “Quimioterapia Antileishmania: Uma Revisão da Literatura”. *Rev. Virt. Quim.*, v.8 n.6, p. 2072-2104, 2016.

BROCK, A.; BIERI, S.; CHRISTEN, P.; DRÄGER, B. “Calystegines in wild cultivated *Erythroxylum* species”. *Phytochem.* v. 66, p. 1231-1240, 2005.

BVSMS. Biblioteca Virtual em Saúde Ministério da saúde. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_viscerai_1edicao.pdf. Acesso em 24/03/2019

BVSMS. Biblioteca Virtual em Saúde Ministério da saúde. Práticas integrativas complementares. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/praticas_integrativas_complementares_plantas_medicinais_cab31.pdf. Acesso em 24/03/2019

CANNAC, M.; FERRAT, L.; BARBONI, T.; CHIARAMONTI, N.; MORANDINI, F.; PASQUALINI, V. “Identification of flavonoids in *Pinus Laricio* needles and changes occurring after prescribed burning”. *Chemoecology* v.21, p.9-17, 2011.

CARVALHO, A. S.; DUARTE, S. L.; COSTA, J. C. S.; BOECHAT, N. “Um novo processo para a obtenção do Antimoniato de Meglumina, visando a produção do medicamento genérico”. *Rev. Virt. Quim.*, v. 7 n. 2, p. 684-696, 2015.

CECHINEL-FILHO, V.; SCHLEMPER, V.; SANTOS, A. R. S.; PINHEIRO, T. R.; YUNES, R. A.; MENDES, G. L.; CALIXTO, J. B.; MONACHE, F. D. “Isolation and identification of active compounds from *Drimys winteri* barks”. *J. of Ethnopharm.* v. 62, p. 223–227, 1998.

CHEYNIER, V. “Polyphenols in foods are more complex than often thought ” *The Am. J. of Clin. Nut.*, v. 81, n. 1, p.223S–229S, 2005.

CHUA, L. S. “A review on plant-based rutin extraction methods and its pharmacological activities” *J. of Ethnopharm.* v. 150, n.12, p. 805-817, 2013.

CLAUDINO, V. D. Estudo fitoquímico e avaliação do potencial antiparasitário e antitumoral do extrato clorofórmico e de substâncias isoladas de *Drimys brasiliensis* Miers. 2011. 131 f. Dissertação (Mestrado) – Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2011.

CLAUDINO, V. D.; DA SILVA, K. C.; FILHO, V. C.; YUNES, R. A.; MONACHE, F. D.; GIMÉNEZ, A.; SALAMANCA, E.; GUTIERREZ-YAPU, D.; MALHEIROS, A. “Drimanes from *Drimys brasiliensis* with leishmanicidal and antimalarial activity” *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.108, n.2 p.140-144, 2013.

CLIFFORD, M. N.; JOHNSTON, K. L.; KNIGHT, S.; KUHNERT, N. “Hierarchical scheme for LC-MSⁿ identification of chlorogenic acids”. *J. Agric. Food Chem*, v.51, p.2900-2911, 2003.

COCCO, D. R.; DE SOUZA, M. R.; ALARCON, S. P.; KURITA, V. R. “Uso de métodos computacionais para análise farmacológica e toxicológica do velutin”. *J. of Med. and Health Prom.*, v.5, n.2, p.88-99, 2020.

COLOTTI, G.; ILARI, A. “Polyamine metabolismo in Leishmania: from arginine to trypanothione” *Amino Acids*, v. 40, p.269-285, 2011.

CORDEIRO, T. M.; BORGHETTI, F.; OLIVEIRA, S. C. C.; BASTOS, I. M. D.; SANTANA, J. M.; GRELLIER, P.; CHAMEAU, S. “Brazilian cerrado *Qualea grandiflora* Mart. leaves exhibit antiplasmodial and trypanocidal activities *In Vitro*”. *Pharmac. Magazine* v.13, p.668-672, 2017.

CORRÊA, D. B.; BIRCHAL E.; AGUIAR, J. E. V.; GOTTLIEB, O. R. “Ellagic acids from Vochysiaceae”. *Phytochem.*v.14, p.1138–1139, 1975.

CORRÊA, M. F. P.; VENTURA, T. L. B.; MUZITANO, M. F.; DA CRUZ, E. A.; BERGONZIE, M. C.; BILIA, A. R.; ROSSI-BERGMANN, B.; COSTA, S. S.

“Suppressive effects of *Vochysia divergens* aqueous leaf extract and its 5-methoxyflavone on murine macrophages and lymphocytes” *J. of Ethnopharm.* v. 221, p. 77–85, 2018.

CRUZ, E. M. Inibição da arginase de *Leishmania* por frações do extrato etanólico de *Cecropia pachystachya*, Salvador, Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2009. Dissertação de Mestrado, 75 p.

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”. *Phytochem.*, v. 89, p. 71-77, 2013.

D’ANTONIO, E. L.; ULLMAN, B.; ROBERTS, S.C.; DIXIT, U. G.; WILSON, M. E.; HAI, Y; CHRISTIANSON, D. W. “Crystal structure of arginase from *Leishmania mexicana* and implications for the inhibition of polyamine biosynthesis in parasitic infections”. *Arch.s of Biochem. and Bioph.* v.535, p. 163–176, 2013.

DA SILVA; A. M. P.; DE PAIVA, S. R.; FIGUEIREDO, M. R.; KAPLAN, M. A. C. “Atividade Biológica de Naftoquinonas de Espécies de *Bignoniaceae*” *Rev. Fitos* v. 7, n.4 p. 207-215, 2012. a)

DA SILVA, E. R.; BROGI, S.; GRILLO, A.; CAMPIANI, G.; GEMMA, S.; VEIRA, P. C.; MAQUIAVELI, C. C.; “Cinnamic acids derived compounds with antileishmanial activity target *Leishmania amazonensis* arginase” *Chem Biol Drug Des.* v.93, p.139–146, 2019. a)

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

DA SILVA, E. R.; DA SILVA, M. F.; 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 amazonensis* and subcellular localization of native enzyme” *Mol. Biochem. Parasitol.* v. 159, p. 104–111, 2008.

DA SILVA, E. R., MAQUIAVELI, C. C. MAGALHÃES, P. P. “The leishmanicidal flavonols quercetin and quercitrin target *Leishmania (Leishmania) amazonensis* arginase”. *Exper. Parasitol.*, v.130, p.183–188, 2012. b)

DA SILVA, M. F. L. Relação entre a localização celular da enzima arginase de *Leishmania amazonenses* e seu papel na infecção de macrófagos murinos, São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, 2010. Tese de Doutorado, 158 p.

DAI, J.; MUMPER, R. J. “Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties”. *Mol.*, v.10, n. 15, p.7313–7352, 2010.

DE SOUSA, L. R. F.; RAMALHO, S. D.; 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. “Leishmanicidal galloylquinic acids are noncompetitive inhibitors of arginase” *J. Braz. Chem. Soc.* v. 25, p. 1832–1838, 2014. a)

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” *J. Nat. Prod.* v.77, p. 392-396, 2014. b)

DIAS, W.L.F.; JUNIOR, E. P. V.; DE OLIVEIRA, M. D. A.; BARBOSA, Y.L.P.; SILVA, J. N.; JÚNIOR, J. S. C.; DE ALMEIDA, P. M.; MARTINS, F. A. “Cytogenotoxic effect, phytochemical screening and antioxidant potential of *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill leaves”. *S. African J. of Botany* v.123, p.30–35, 2019.

DÍAZ-DE-CERIO, E.; GÓMEZ-CARAVACA, A. M.; VERARDO, V.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A.; SEGURA-CARRETERO, A. “Determination of guava (*Psidium guajava* L.) leaf phenolic compounds using HPLC-DAD-QTOF-MS” *J. of Funct. Foods.* v. 22 p. 376–388, 2016.

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.

ESCOBAR-AVELLO, D.; LOZANO-CASTELLÓN, J.; MARDONES, C.; PÉREZ, A. J.; SAÉZ, V.; RIQUELME, S.; BAER, D. V.; VALLVERDÚ-QUERALT, A. “Phenolic Profile of Grape Canes: Novel Compounds Identified by LC-ESI-LTQ-Orbitrap- MS”. *Mol.*, v. 24, n. 3763, p. 1-21, 2019.

FANG, N.; YU, S.; PRIOR, R. L. “LC/MS/MS Characterization of Phenolic Constituents in Dried Plums”, *J. Agric. Food Chem.* v. 50, p. 3579–3585, 2002.

FARRAG, A. R. H.; ABDALLAH, H.M. I.; KHATTAB, A. R.; ELSHAMY, A. I.; GENDY, A. EN. G. E.; MOHAMED, T. A.; FARAG, M. A.; EFFERTH, T.; HEGAZYG, ME. F. “Antiulcer activity of *Cyperus alternifolius* in relation to its UPLC-MS metabolite fingerprint: A mechanistic study” *Phytomed.* v.62, n.152970, p. 1-14, 2019.

FAWCETT, J. K.; SCOTT, J. E. “A rapid and precise method for the determination of urea” *J. Clin. Pathol.*, v. 13, p. 156–159, 1960.

FRANCO, R. R.; JUSTINO, A. B.; MARTINS, M.M.; SILVA, C.G.; CAMPANA, P.R.V.; LOPES, J.C.D.; DE ALMEIDA, V.L.; ESPINDOLA, F.S. “Phytoscreening of Vochysiaceae species: Molecular identification by HPLCESI-MS/MS and evaluating of their antioxidant activity and inhibitory potential against human α -amylase and protein glycation” *Bioorganic Chem.* v.91 n.103122, p. 1-11, 2019.

FRANCZAK, D. D.; CARRETO, R.; SANTANA, V. T. P.; SOUZA, G. S. “Antibacterial Activity of Ethanol Extracts from Stem and leaf of *Qualea parviflora* Mart. (Pau-terra)”. *Uniciênc.s* v.23, p.43-47, 2019.

FERREIRA, R. S.; OLIVA, G.; E ANDRICOPULO, A. D. “Integração das técnicas de triagem virtual e triagem biológica automatizada em alta escala: oportunidades e desafios em P&D de fármacos” *Quim. Nova*, v. 34, n. 10, p.1770-1778, 2011.

FLORENTINO, I. F.; SILVA, D. P. B.; GALDINO, P. M.; LINO, R. C.; MARTINS, J. L. R.; SILVA, D. M.; DE PAULA, R. J.; TRESVENZOL, L. M. F.; COSTA, E. A. “Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Memora nodosa* and allantoin in mice”. *J. of Ethnopharm.* v.186, p.298–304, 2016.

FRATONI, E.; CLAUDINO, V. D.; YUNES, R. A.; FRANCHI JR, G. C.; NOWILL, A. E.; CECHINEL FILHO, V.; DELLE MONACHE, F.; MALHEIROS, A. “Further drimane sesquiterpenes from *Drimys brasiliensis* stem barks with cytotoxic potential. Naunyn-Schmiedeberg's” *Archiv. of Pharm.*, v. 389, p. 791–797, 2016.

FURTADO, R. R. Detecção da atividade e imunolocalização da enzima óxido nítrico sintase em *Leishmania amazonensis* (*viannia*) *brasiliensis*. Belém (PA), Programa de Pós Graduação em Neurociências e Biologia Celular (PPNBC) - UFPA, 2014. Dissertação de mestrado, 52 p.

GHASEMZADEH, A.; JAAFAR, H. Z. E.; RAHMAT, A.; ASHKANI, S. “Secondary metabolites constituents and antioxidant, anticancer and antibacterial activities of *Etilingera elatior* (Jack) R.M.Sm grown in different locations of Malaysia” *Complem. and Altern. Medicine* v.15, n.335 p. 1-10, 2015.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. “Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários” *Quim. Nova*, v. 30, n. 2, p.374-381, 2007.

GOMES, M. R. F.; SCHUH, R. S. JACQUES, A. L. B.; DORNELES, G. G.; MONTANHA, J.; ROEHE, P. M. BORDIGNON, S.; DALLEGRAVE, E.; LEAL, M. B.; LIMBERGER, R. P. “Biological assessment (antiviral and antioxidant) and acute toxicity of essential oils from *Drimys angustifolia* and *D. brasiliensis*” *Braz. J. of Pharm.* v.23, n. 2, p.284-290, 2013.

GOMES, R. C.; BONAMIN, F.; DARIN, D.; SEITO, L. N.; DI STASI, L. C.; DOKKEDAL, A. L.; VILEGAS, W.; ALBA REGINA BRITO, M. S.; HIRUMA-LIMA, C. A. “Antioxidative action of methanolic extract and buthanolic fraction of *Vochysia tucanorum* Mart. in the gastroprotection” *J. of Ethnopharm.*, v.121, p. 466–471, 2009.

GONZÁLEZ-PARAMÁS, A. M.; AYUDA-DURÁN, B.; MARTÍNEZ, S.; GONZÁLEZ-MANZANO, S.; SANTOS-BUELGA, C. “The Mechanisms Behind the Biological Activity of Flavonoids”. *Curr. Med. Chem.* v. 26, n. 39, p. 6976-6990, 2019.

GOTTLIEB, O. R.; SILVA, M. L.; MAIA, J. G. S. “Eucalyptin from *Eugenia* and *Myrcia* species”. *Phytochem.*, v. 11, n. 3 p. 1185, 1971.

GU, D.; YANG, Y.; BAKRI, M.; CHEN, Q.; XIN, X.; AISA, H.A. A LC/QTOF-MS/MS Application to Investigate Chemical Compositions in a Fraction with Protein Tyrosine Phosphatase 1B Inhibitory Activity from *Rosa rugosa* Flowers. *Phytochem. Anal* 24: 661-670, 2013.

GUIDO, R. C. V.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. “Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas”. *Estud. av.* v. 24 n.70, p. 81-98, 2010.

GUIDO, R. V. C.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. “Virtual Screening and Its Integration with Modern Drug Design Technologies” *Curr. Med. Chem.*, v.15, p.37-46, 2008. HAI, Y.; CHRISTIANSON, D. W. “Crystal structures of *Leishmania mexicana* arginase complexed with α,α -disubstituted boronic amino-acid inhibitors”. *Acta Cryst.* v.72, p. 300–306, 2008.

HAY, A. E.; MERZA, J.; LANDREAU, A.; LITAUDON, M.; PAGNIEZ, F.; PAPE, P. L.; RICHOMME, P. “Antileishmanial polyphenols from *Garcinia vieillardii*”. *Fitoter.* v. 79, p. 42–46, 2008.

HENKE MT, KELLEHER NL. “Modern mass spectrometry for synthetic biology and structure-based discovery of natural products”. *Nat. Prod. Rep.* v.33, p. 942-950, 2016.

HERTZOG, A; PELLEGRINI, M. O.O.; SANTOS-SILVA, F.; “Winteraceae do Rio Grande do Sul, Brasil”. *Rod.* v.67 n.1 p. 251-260, 2016.

INIESTA, B. V.; GÓMEZ-NIETO, L. C.; CORRALIZA, I. “The inhibition of arginase by *N*^ω-Hydroxy-L-Arginine controls the growth of *Leishmania* inside macrophages” *J. Exp. Med.*, v.193, p. 777-783, 2001.

JANSEN, B. J. M.; GROOT, A. “The occurrence and biological activity of drimane sesquiterpenoids”. *Nat. Prod. Reports*, v. 8, n. 3, p. 309-318, 2004.

JUNIOR, V. F. V.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M “PLANTAS MEDICINAIS: CURA SEGURA?” *Quim. Nova*, v. 28, n.3, p.519-528, 2005.

KAENNAKAM, S.; SIRIPONG, P.; TIP-PYANG, S “Citotoxicidade de dois novos isoflavanos das raízes de *Dalbergia velutina*” *J. Nat. Med.*, v. 71, p. 310-314, 2017.

KHALIL, N. M.; PETACCI, F.; LEITE, R. R. S.; SILVA, E.; SOUZA, G. F. DE.; OLIVEIRA, R. E. L. DE.; COSTA, F.; ROCHA, V. A.; MENDONÇA FILHO, C. V. “Antioxidant activity of *Vochysia discolor* Mart. flowers. *Acta Farmacéutica Bonaerense*” v.25, p.564-566, 2006.

KITCHEN, D. B.; DECORNE, H.; FURR, J. R.; BAJORATH, J. “Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications”. *Nat. Ver. Drug Discov.* v.3, p. 935-949, 2004.

KUMAR, S. CHANDRA, P.; BAJPAI, V.; SINGH, A.; SRIVASTAVA, M.; MISHRA, D. K.; KUMAR, B. “Rapid qualitative and quantitative analysis of bioactive compounds from *Phyllanthus amarus* using LC/MS/MS techniques” *Ind. Crops and prod.* n.69, p. 143-152, 2015.

LAGO, J. H. G.; CARVALHO, L. A. C.; SILVA, F. S. da.; TAYOMA, D. de O.; FÁVERO, O. D.; RAMOFF, P. “Chemical composition and anti- inflammatory evaluation of essential oils from leaves and stem barks from *Drimys brasiliensis* Miers (Winteraceae)”. *J. of the Braz. Chem. Soc.*, n. 9, v. 21, p. 1760-1765, 2010.

LEE, J.H.; JOHNSON, J.V.; TALCOTT, S.T. Identification of Ellagic Acid Conjugates and other Polyphenolics in Muscadine Grapes by HPLC-ESI-MS. *J. Agric. Food Chem.* 53: 6003-6010, 2005.

LI, J.; JIANG, K.; WANG, L.J.; YING, G.; WANG, J.; WANG, Y.; JIN, Y.B.; LI, Q.; WANG, T.J. “HPLC-MS/MS determination of flavonoids in *Gleditsia spina* for its quality assessment”. v. 41, n. 8, p. 1752–1763, 2018.

LIMBERGER, R. P., SCOPEL, M., SOBRAL, M, HENRIQUES, A. T. “Comparative analysis of volatiles from *Drimys brasiliensis* Miers and *D. angustifolia* Miers (Winteraceae) from Southern Brazil”. *Bioch. System. and Ecology*, v.35 p.130-137, 2007.

LÓPEZ, R. E. S. “Proteases de *Leishmania*: novos alvos para o desenvolvimento racional de fármacos” *Quim. Nova*, v. 33, p. 1541-1548, 2010.

LUCON JUNIOR, J. F. “Estudo da atividade inibitória de extratos vegetais, flavonoides e derivados do ácido cafeico sobre a enzima arginase de *Leishmania amazonenses*”, Pirassunanga, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de São Paulo, 2016. Tese de Doutorado, 98p.

MACEDO, T. B. C.; ELIAS, S. T.; TORRES, H. M.; YAMAMOTO-SILVA, F. P.; SILVEIRA, D.; MAGALHÃES, P. O.; LOFRANO-PORTO, A.; GUERRA, E. N. S.; SILVA, M. A. G. “Cytotoxic Effect of *Erythroxylum suberosum* Combined with Radiotherapy in Head and Neck Cancer Cell Lines” *Braz. Dent. J.*, v.27, n.1 p.108-112, 2016.

MALERICH, J. P.; LI, J.; JODER, D.; VIERIA, E. L. M.; KEESEN, T. S. L.; VAIDYANATHAN, R.; GOLLOB, K. J.; TANGA, M. J. “Antileishmanial activity of natural product-like naphthoquinones”. *Drug Develop. Res.* v.74, p. 237–241, 2013.

MALHEIROS, A.; CECHINEL-FILHO, V.; SCHMITT, C. B.; YUNES, R. A.; ESCALANTE, A.; SVETAZ, L.; ZACCHINO, S.; DELLE MONACHE, F. “Antifungal activity of drimano sesquiterpenes from *Drimys brasiliensis* using bioassay-guided fractionation”. *J. of Pharm. & Pharmac. Sciences*, v. 8, n. 2, p. 335-339, 2005.

MALHEIROS, A.; FILHO, V.C.; SCHMITT, C. B.; SANTOS, A. R. S.; SCHEIDT, C.; CALIXTO, J. B.; MONACHE, F. D.; YUNES, R. A. “A sesquiterpene drimane with antinociceptive activity from *Drimys winteri* bark” *Phytochem.* v.57, p. 103-107, 2001.

MANJOLIN, L.C.; DOS REIS, M.B.; MAQUIAVELI, C DO 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* infection” *Food Chem.*, v.141 n.3, p. 2253-2262, 2013.

MAQUIAVELI, C. C.; LUCON-JÚNIOR, J. F.; BROGI, S.; CAMPANI, G.; GEMMA, S.; VIEIRA, P. C.; SILVA, E. R. “Verbascoside inhibits promastigote growth and arginase activity of *Leishmania amazonensis*” v.79, p. 1459-63, 2016.

MARZOCCHI, M. C. DE A. “Visceral leishmaniasis in Southern Rio de Janeiro State and the risk of propagation to São Paulo State, Brasil.” *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* v.4, p. 147–149, 2016.

MCCONVILLE, M. J. “Metabolic Crosstalk between *Leishmania* and the Macrophage Host. Trends” *Parasitol.* v.32, p. 666-8, 2016.

MECCHI, M. C.; LAGO, J. H. G. “Chemical constituents derived from *Drimys brasiliensis* Miers (Winteraceae)” *Nat. Prod. Research*, v.27, p.1927–1929, 2013.

MELO, J. A.; AROUCHA, K. M. M.; SANTOS, L. P. M.; MORAES, C. M.; TAKAHASHI, J. A.; OLIVEIRA, A. C.; CONDÉ, T. M.; NASCIMENTO, F. C “Evaluation of Extracts of *Qualea paraensis* Ducke for their Antimicrobial, Toxic and Anticholinesterase Activities”. *Int. J. of Pharm. Sc. and Drug Res.* v.10, n.4, p. 288-292, 2018.

MENNA-BARRETO, R. F. S.; LARANJA, G. A. T.; SILVA, M. C. C.; COELHO, M. G. P.; PAES, M. C.; OLIVEIRA, M. M.; DE CASTRO, S. L. “Anti-Trypanosoma cruzi activity of *Pterodon pubescens* seed oil: geranylgeraniol as the major bioactive component”. *Parasitology Research*, v. 103, n. 1, p. 111–117, 2008.

MENDONÇA, D. V. C.; LAGE, D. P.; CALIXTO, S. L.; OTTONI, F. M.; TAVARES, G. S. V.; LUDOLF, F.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M. A.; SCHNEIDER, M. S.; DUARTE, M. C.; TAVARES, C.A. P., ALVES, R. J. A.; COIMBRA, E. S. COELHO, E. A. F. “Antileishmanial activity of a naphthoquinone derivate against promastigote and amastigote stages of *Leishmania infantum* and *Leishmania amazonensis* and its mechanism of action against *L. amazonensis* species”. *Parasitol. Res.* v.117, p. 391–403, 2018.

MESQUITA, M. L.; LEÃO, W. L.; FERREIRA, M. R. A.; PAULA, J. E.; ESPINDOLA, L. S.; SOARES, L. A. L. “Reversed-phase-liquid chromatography method for separation and quantification of gallic acid from hydroalcoholic extracts of *Qualea grandiflora* and *Qualea parviflora*”. *Pharmac. Mag.* v.11, p.316-321, 2015.

MONSÁLVEZ, M.; ZAPATA, N.; VARGAS, M.; BERTI, M.; BITTNER, M.; HERNÁNDEZ, V. “Antifungal effects of n-hexane extract and essential oil of bark *Drimys winteri* against Take-All disease”. *Ind. Crops and Prod.*, v. 31, p. 239–244, 2010.

MONZOTE, L.; CÓRDOVA, W. H. P.; GARCÍA, M.; PIÑÓN, A.; SETZER, W. N. “In-vitro and *in-vivo* Activities of Phenolic Compounds Against Cutaneous Leishmaniasis”. *Rec. Nat. Prod.* v. 10, n. 3, p. 269-276, 2016.

MORESCHI, E. G.; FUNES, G; ZEBALLOS, S. R.; TECCO, P. A. “Post-burning germination responses of woody invaders in a fire-prone ecosystem”. *Aust. Ecol.* v.44, p.1163-1173, 2019.

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” *Carb. Polymers* v. 201, p. 532-538, 2018.

MUCCILLI, V.; CARDULLO, N.; SPATAFORA, C.; CUNSOLO, V.; TRINGALI, C. “ α -Glucosidase inhibition and antioxidant activity of an oenological commercial tannin. Extraction, fractionation and analysis by HPLC/ESI-MS/MS and ^1H NMR” *Food Chemistry* n.215, p. 50–60, 2017.

MUÑOZ-CONCHA, D.; VOGEL, H.; YUNES, R.; RAZMILIC, I.; BRESCIANI, L.; MALHEIROS, A. “Presence of polygodial and drimenol in *Drimys* populations from Chile”. *Biochem. Syst. and Ecol.*, n. 35, p. 434-438, 2007.

MUZITANO, M. F.; et al. “Quercitrin: an antileishmanial flavonoid glycoside from *Kalanchoe pinnata*.” *Planta Medica.* v.72, p. 81-93, 2006.

NASSER, A. L. M.; CARLIB, C. B. A.; RODRIGUESA, C. M.; MAIAB. D. C. G.; CARLOS, I. Z.; EBERLINE, M. N.; HIRUMA-LIMAD, C.; VILEGAS, W. “Identification of Ellagic Acid Derivatives in Methanolic Extracts from *Qualea* Species”. *Zeits. für Naturf.* v.63, p.794-800, 2008.

NASCIMENTO, C. J. VIOLANTE, I. M. P.; GARCEZ, W. S.; POTT, A.; GARCEZ, F. R. “Biologically active abietane and ent-kaurane diterpenoids and other constituents from *Erythroxyllum suberosum*”. *Phytochem. Letters*, v. 5, n. 2, p. 401-406, 2012.

NASCIMENTO, M. N. G. “ESTUDO QUÍMICO DE *Erythroxyllum suberosum* (ERYTHROXYLACEAE) FRENTE ÀS CATEPSINAS K, L e V”, Programa De Pós-Graduação Em Química, Universidade Federal De Goiás, Regional Catalão, 2014. Dissertação de mestrado, 104p.

NETO, F. C. PILON, A. C.; SILVA, D. H.; DA SILVA BOLZANI, V.; CASTROGAMBOA, I. “Vochysiaceae: secondary metabolites, ethnopharmacology and pharmacological potential”. *Phytochem. Rev.* v.10, p. 413-429, 2011.

NETO, F. C.; SIQUITELLI, C. D.; PILON, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; CASTRO-GAMBA, I. “Dereplication of Phenolic Derivatives of *Qualea grandiflora* and *Qualea cordata* (Vochysiaceae) using Liquid Chromatography coupled with ESI-QToF-MS/MS”. *J. of the Braz. Chem. Soc.* v.24, p.758-764, 2013.

NETO, G. S. G.; COSTA, R. P.; ZANINI, C. L.; AGUIAR, A. C. C.; DE SOUZA, J. O.; DE SOUZA, G. E.; SEVERINO, R. P.; CASS, Q. B.; CRUZ, F. C.; OLIVA, G.; GUIDO, R. V. C.; DE SOUSA, L. R. F. “Chemical prospection of *Qualea grandiflora* mart. fruit and stem extracts and their *in vitro* and *in vivo* antiplasmodial activity” *J. Braz. Chem. Soc.*, vol. 00, n. 00, p.1-10, 2020.

NGUYEN, V. B.; WANG, S.; NHAN, N. T.; NGUYEN, T. H.; NGUYEN, N. P. D.; NGHI, D. H.; CUONG, N. M. “New Records of Potent In-Vitro Antidiabetic Properties of *Dalbergia tonkinensis* Heartwood and the Bioactivity-Guided Isolation of Active Compounds” *Molecules*, v. 23, n. 1589, p. 1-12, 2018.

NINH THE S. “A Review on the Medicinal Plant *Dalbergia odorifera* Species: Phytochemistry and Biological Activity” *Hindawi*, v. 2017, p. 1-27, 2017.

OLESZEK, W.; STOCHMAL, A.; KAROLEWSKI, P.; SIMONET, A. M.; MACIAS, F. A.; TAVA, A. “Flavonoids from *Pinus sylvestris* needles and their variation in trees of

different origin grown for nearly a century at the same área” *Biochem. System. and Ecology* v.30 p.1011–1022, 2002.

PAUL SM, MYTELKA DS; DUNWIDDIE CT; PERSINGER CC; MUNOS BH; LINDBORG SR; SCHACHT AL. “How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry’s grand challenge”. *Nat Rev Drug Discov.* v.9, n. 3:203–214, 2010.

PAULO, B. S.; SIGRIST, R.; DE OLIVEIRA, L. G. “Avanços recentes em biossíntese combinatória de policetídeos: perspectivas e desafios” *Quim. Nova*, Vol. 42, No. 1, 71-83, 2019.

PAZ, C.; BURGOS, V.; SUAREZ, S.; BAGGIO, R. A. “Monoclinic form of dendocarbin A: a borderline case of one-dimensional isostructural polymorphism”. *Acta Crystallog.*, v. 71, p. 294–297, 2015.

PÉREZ, H.; DÍAZ, F.; MEDINA, J. D. “Chemical Investigation and in vitro Antimalarial Activity of *Tabebuia ochracea* ssp. *Neochrysantha*”, *Intern. J. of Pharm.* v.35, n.4, p.227-231, 2008.

PÉREZ-MAGARIÑO, S., REVILLA, I.; GONZÁLEZ-SANJOSÉ, M.; BELTRÁN, S. “Various applications of liquid chromatography–mass spectrometry to the analysis of phenolic compounds”. *J. of Chrom.* v. A, n. 847, p. 75–81, 1999.

PEREZ-VIZCAINO, F.; DUARTE, J.; SANTOS-BUELGA, C. “The flavonoid paradox: conjugation and deconjugation as key steps for the biological activity of flavonoids”. *J. of the Sc. of Food and Agric.*, v. 92, n. 9, p. 1822–1825, 2012.

QUINN, R. A.; NOTHIAS, LF.; VINING, O. MEEHAN, M.; ESQUENAZI, E.; DORRESTEIN, P. C. “Molecular Networking As a Drug Discovery, Drug Metabolism, and Precision Medicine Strat” v. 38, n. 2, p. 143-154, 2017.

RAMALHO, S. D. “Busca por inibidores de catepsinas em plantas do cerrado paulista e avaliação da proteólise tumoral *in vitro*” Centro de ciências exatas e de tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, 2015. Tese de doutorado, 179p.

RAMALHO, S. D.; de SOUSA, L. R. F.; BURGER, M. C. M.; LIMA, M. I. S.; da SILVA, M. F. G. F.; FERNANDES J. B.; VIEIRA, P. C. “Evaluation of flavonols and derivatives as human cathepsin B inhibitor” *Nat. Prod. Research*, v.29, p. 2212-2214, 2015.

RAMÍREZ-MACÍAS, I.; MARÍN, C.; DÍAZ, J. G.; ROSALES, M. J.; GUTIÉRRES-SÁNCHEZ, R.; SÁNCHEZ-MORENO, M. “Leishmanicidal activity of nine novel flavonóids from *Delphinium staphisagria*”. *The Scientif. World Journ.* v. 2012, p. 1-10, 2012.

ROCHA, A. B.; SILVA, J. B.; PANIZZA, S. “Substâncias tânicas da casca de *Qualea grandiflora* Martius (Vochysiaceae)”. *Rev. Ciênc. Farm.* v.2, p.109-114, 1980.

ROBERTS, S. C.; TANCER, M. J.; POLINSKY, M. R.; GIBSON, K. M.; HEBY, O. ULLMAN, B. “Metabolism and Bioenergetics: Arginase Plays a Pivotal Role in Polyamine Precursor Metabolism in *Leishmania*: CHARACTERIZATION OF GENE DELETION MUTANTS” *J. Biol. Chem.* v. 279, n. 22, p. 23668–23678, 2004.

RODRÍGUEZ-PÉREZ, C.; GÓMEZ-CARAVACA, A. M.; GUERRA-HERNÁNDEZ, E.; CERRETANI, L.; GARCÍA-VILLANOVA, B.; VERARDO, V. “Comprehensive metabolite profiling of *Solanum tuberosum* L. (potato) leaves by HPLC-ESI-QTOF-MS”. *Food Res. Intern.* v.112, p.390-399, 2018.

ROJO, D.; CANUTO, G. A. B.; CASTILHO-MARTINS, E. A.; TAVARES, M. F. M.; BARBAS, C.; LÓPEZ-GONZÁLVEZ, A.; RIVAS, L. “A multiplatform metabolomic approach to the basis of antimonial action and resistance in *Leishmania infantum*” *PLOS ONE*, 10: e0130675, 2015.

SANTANA, G. S. Caracterização química bioguiada pela atividade antioxidante de *Erythroxylum mucronatum* Benth. 2018. 80 f. Dissertação (Mestrado) – Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas - Universidade Federal de Sergipe, Aracaju, 2018.

SANT'ANNA CMR. "Glossário de termos usados no planejamento de fármacos. (Recomendações da IUPAC para 1997)". *Quim. Nova*, v.25, n.3, p.505-12, 2002.

SIERRA, J. R.; LÓPEZ, J. T.; CORTÉS, M. J. "(-)-3 β -acetoxydrimenin from the leaves of *Drimys winteri*". *Phytochem.* v. 25, n. 1, p. 253-254, 1986.

SILVA, T. F.; OLIVEIRA, A. B. "Plantas leishmanicidas da Amazônia Brasileira: uma revisão". *Rev. F. Eletr.*, v. 10, p. 339-363, 2017.

SILVA-LÓPEZ, R. E. "Proteases de *Leishmania*: novos alvos para o desenvolvimento racional de fármacos". *Quim. Nova*, v. 33, n. 7, p. 1541-1548, 2010.

SILVEIRA, A. C. O.; CLAUDINO, V. D.; YUNES, R. A.; CECHINEL-FILHO, V.; MALHEIROS, A.; CORDOVA, C. M. M.; BELLA CRUZ, A. "Antibacterial activity and toxicity of *Drimys brasiliensis*". *Latin Amer. J. of Pharm.* n. 7, v. 31, p. 935-940, 2012.

SINGH, A.; BAJPAI, V.; KUMAR, S.; SHARMA, K. R.; KUMAR, B. Profiling of Gallic and Ellagic Acid Derivatives in Different Plant Parts of *Terminalia arjuna* by HPLC-ESI-QTOF-MS/MS. *Natural Product Communications* 11: .239-244, 2016.

SINGH, N.; KUMAR, M.; SINGH, R, K. "Leishmaniasis: Current status of available drugs and new potential drug Targets". *Asian Pacific J. of Trop. Med.* v.5 p. 485-497, 2012.

SOARES-BEZERRA, R. J.; LEON, L.; GENESTRA, M. "Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos". *Rev. Bras. de Ciênc. Farm.*, v. 40, n. 2, p. 139-149, 2004.

STEFANELLO, M. E. A.; PASCOAL, A.C.R.F.; SALVADOR, M. J. "Essential oils from Neotropical Myrtaceae: chemical diversity and biological properties. *Chem. & Biodiv.*". v. 8, n. 1, p. 73-94, 2011.

STYLOS E.; CHATZIATHANASIADOU MV.; SYRIOPOULOU A.; TZAKOS AG. "Liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) based bioavailability determination of the major classes of phytochemicals". *J. Chromatogr. B* v.1047, p.15-38, 2017.

TAKAO, L. K.; IMATOMIB, M.; GUALTIERI, S. C. J. “Antioxidant activity and phenolic content of leaf infusions of Myrtaceae species from Cerrado (Brazilian Savanna)” *Braz. J. Biol.*, v. 75, n. 4, p. 948-952, 2015.

TANAKA, A, K; GORIN, P.A.G; TAKAHASHI, H.K; STRAUS, A.H. “Role of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* amastigote glycosphingolipids in macrophage infectivity” *Braz. J. of Med. and Biol. Res.*, v.40, p. 799-806, 2007.

TEIXEIRA, R. D. B. L. “Plantas Medicinais na Atenção Primária à Saúde: Nossos Profissionais estão Preparados?” *Rev. de APS*, v. 17, 2014.

TRESVENZOL, L. M. F.; PAULA, J. R.; FERRI, P. H.; OLIVEIRA, F. N. M. “Composition and Chemical Variability in the Essential Oil from Leaves of *Memora nodosa* (Silva Manso) Miers”. *J. of Essen. Oil Res.*, v.22, n.3, p.237–240, 2010.

UDDIN, M. “Environmental Factors on Secondary Metabolism of Medicinal Plants”. *Acta Scient. Pharm. Sciences* v.3, p.34-46, 2019.

VALOR, T.; ORMEÑO, E.; CASALS, P. “Temporal effects of prescribed burning on terpene production in Mediterranean *Pines*”. *Tree Physiol.* v.37, p.1622-1636, 2017.

VIEGAS, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. “Os Produtos naturais e a química medicinal moderna”. *Quim. Nova*, v. 29, n.2, p.326-337, 2006.

VIEIRA, C. R.; WEBER, O. L. S.; SCARAMUZZA, J. F. “Omissão de macronutrientes no crescimento inicial de *Tabebuia ochraceae*” *Ambiência*, v.12, n.4, p.869-883, 2016.

VICHNEWSKI, W.; KULANTHAIVEL, P.; HERZ, W. “Drimane derivates from *Drimys brasiliensis*”. *Phytochem.*, v. 25, n. 6, p. 1476-1479, 1986.

WANG, M.; CARVER, J. J.; PHELAN, V. V; et al. “Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking”. *Nature Biotech.*, v. 34, n. 8, p. 828–837, 2016.

WHO. World Health Organization. Leishmaniasis. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>>. Acesso em: 28/05/2021.

WU, S.H.; CHEN, Y.W.; YANG, L.Y.; LI, S.L.; LI, Z.Y. A new ellagic acid glycoside from *Paeonia delavayi*. *Fitoterapia* 79: 474-475, 2008.

WULSTEN, I. F.; COSTA-SILVA, T. A.; MESQUITA, J. T.; LIMA, M. L.; GALUPPO, M. K.; TANIWAKI, N. N.; BORBOREMA, S. E. T.; da COSTA, F. B.; SCHMIDT, T. J.; TEMPONE, A. G. "Investigation of the anti-*leishmania* (*Leishmania*) *infantum* activity of some natural sesquiterpene lactones" *Molecules* v.22, n.685, p. 1-12, 2017.

YAMASHITA, M.; KANEKO, M.; TOKUD, H., NISHIMURA, K.; KUMEDA, Y.; LIDA, A. "Synthesis and evaluation of bioactive naphthoquinones from the Brazilian medicinal plant, *Tabebuia avellanedae*" *Bioorg. & Med. Chem.*, v.17, p.6286–6291, 2009.

YANG, L.; WEN, K.; RUAN, X.; ZHAO, Y.; WEI, F.; WANG, Q. "Response of Plant Secondary Metabolites to Environmental Factors". *Mol.* v.23, p.762-799, 2018.

YANG, P.; XU, F.; LI, HF.; WANG, Y.; LI, FC. SHANG, MY.; LIU, GX.; WANG, X.; CAI, SQ. "Detection of 191 Taxifolin Metabolites and Their Distribution in Rats Using HPLC-ESI-IT-TOF-MSn" *Mol.* v. 21, n. 1209; p. 1-26, 2016.

ZANI, C. L.; DE OLIVEIRA, A. B.; DE OLIVIERA, G. G. "Furanonaphthoquinones from *Tabebuia ochracea*" *Phytochem.*, v. 30, n. 7, p 2379-2381, 1991.

ZAPATA, N.; BUDIA, F.; VIÑUELA, E.; MEDINA, P. "Antifeedant and growth inhibitory effects of extracts and drimanes of *Drimys winteri* stem bark against *Spodoptera littoralis* (Lep., Noctuidae)". *Ind. Crops and Prod.* v. 30, p. 119–125, 2009.

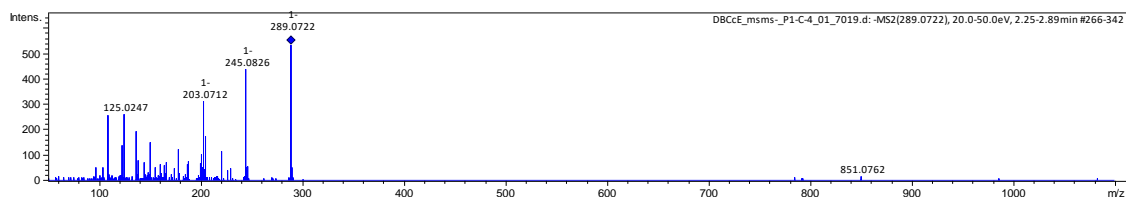
ZAPATA, N.; SMAGGHE, G. "Repellency and toxicity of essential oils from the leaves and bark of *Laurelia sempervirens* and *Drimys winteri* against *Tribolium castaneum*". *Ind. Crops and Prod.* v. 32, p. 405–410, 2010.

ZHANG, L.; HASEGAWA, I.; OHTA, T. "Anti-inflammatory cyclopentene derivatives from the inner bark of *Tabebuia avellanedae*" *Fitoterapia*, v.109, p. 217–223, 2016.

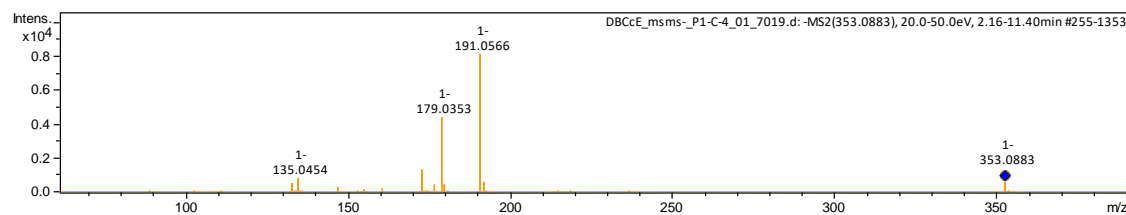
ZIDORN, C.; STUPPNER, H. "Evaluation of Chemosystematic Characters in the Genus *Leontodon* (Asteraceae)" *Taxon*, v. 50, n. 1, p. 115-133, 2001.

13 – ANEXO

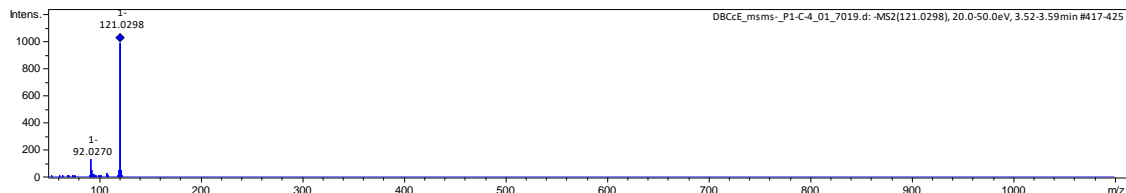
Espectro 1C



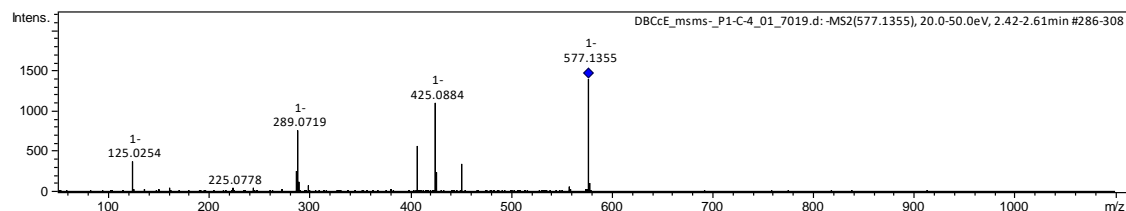
Espectro 2C



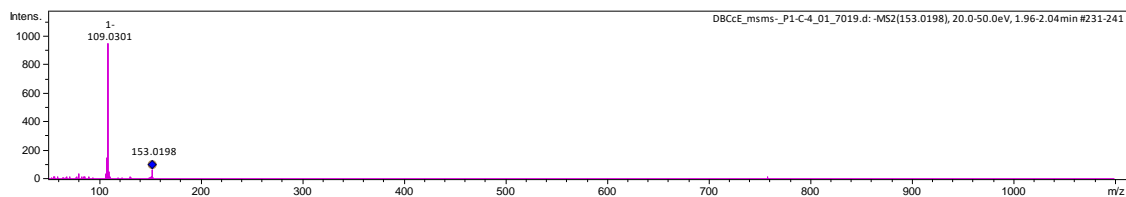
Espectro 3C



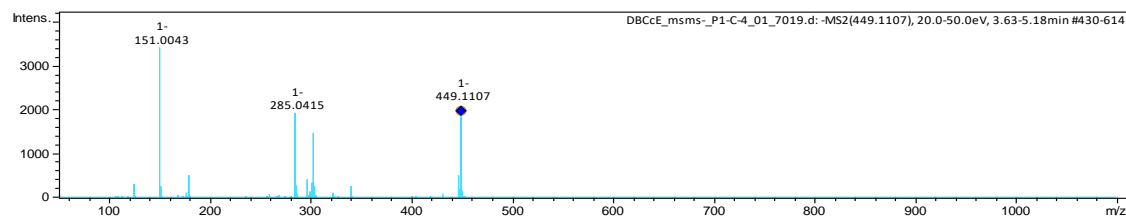
Espectro 4C



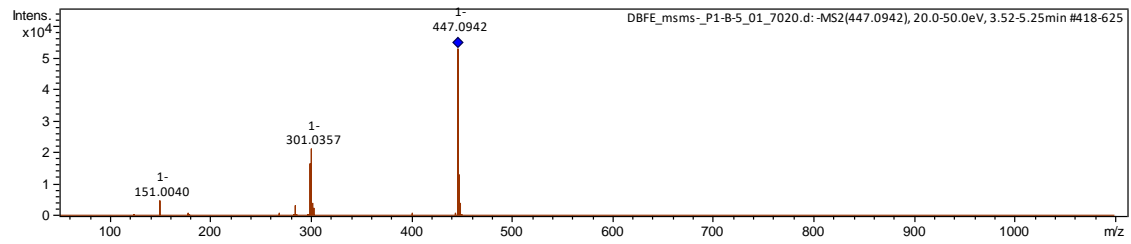
Espectro 5C



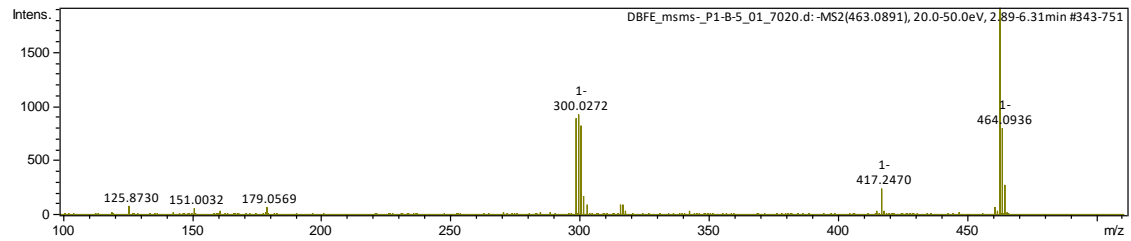
Espectro 6C



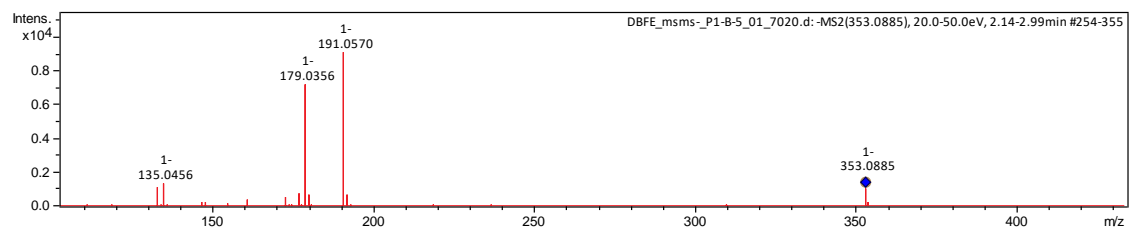
Espectro 1F



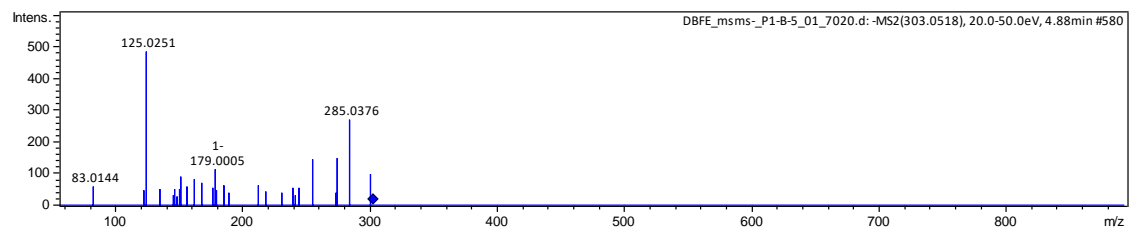
Espectro 2F



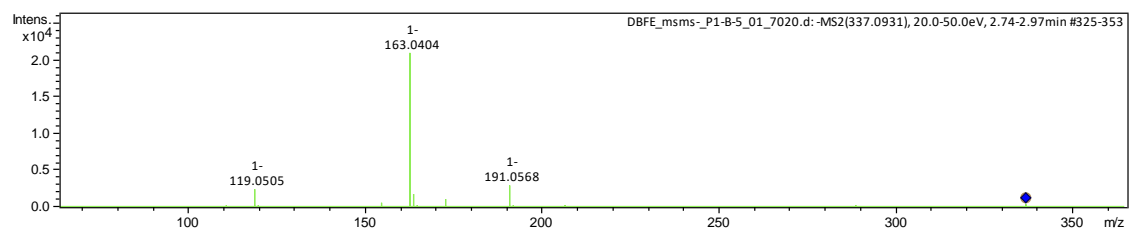
Espectro 3F



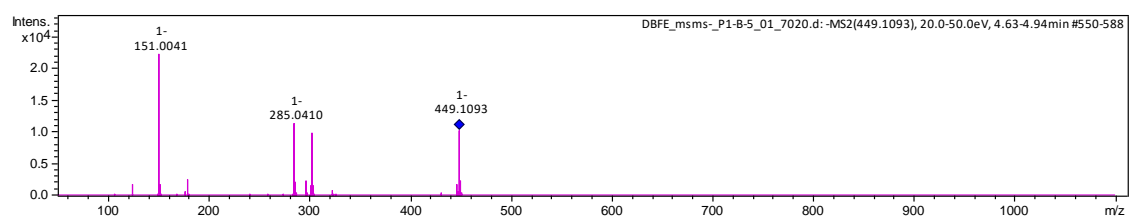
Espectro 4F



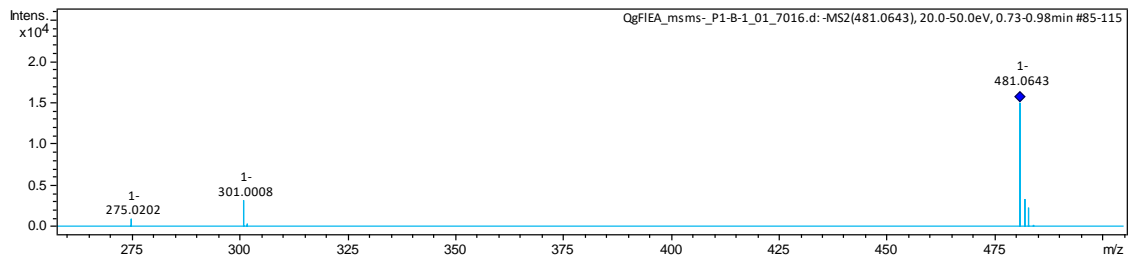
Espectro 5F



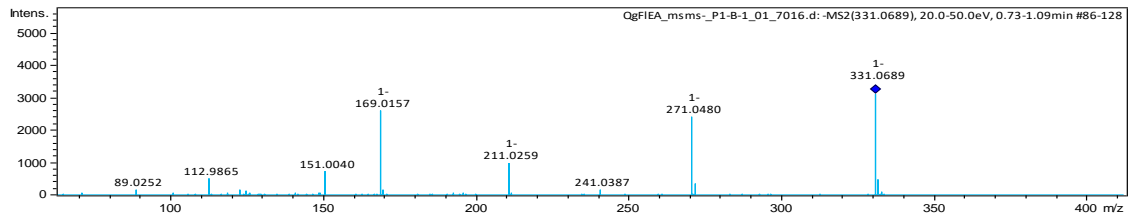
Espectro 6F



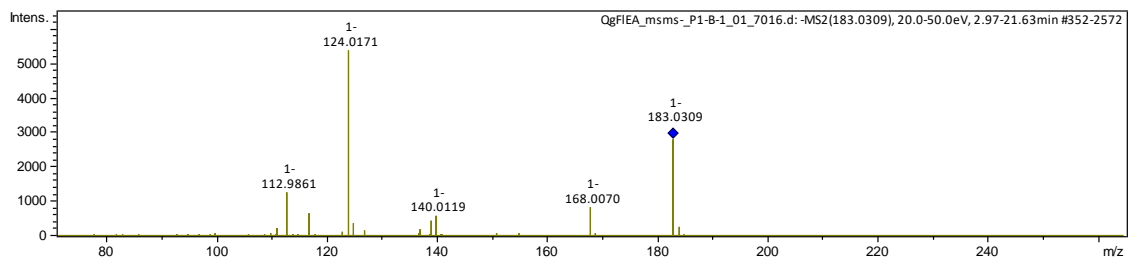
Espectro 1QFI



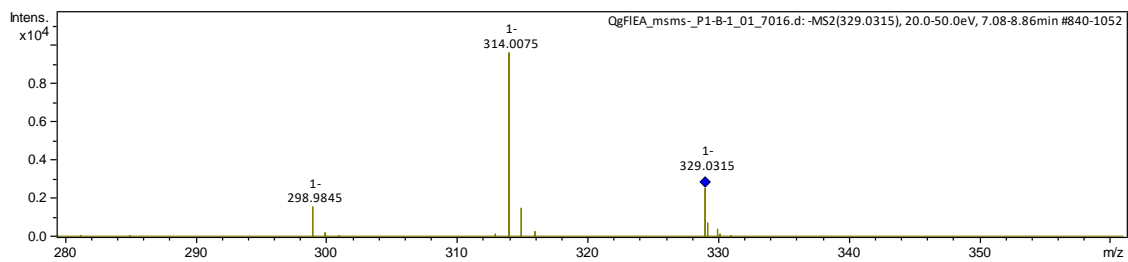
Espectro 2QFI



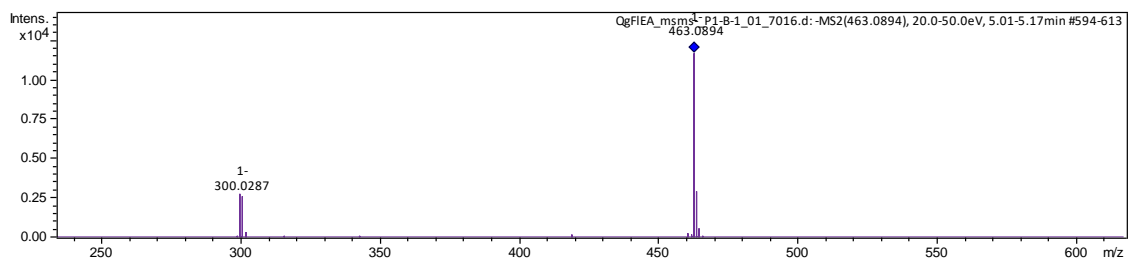
Espectro 3QFI



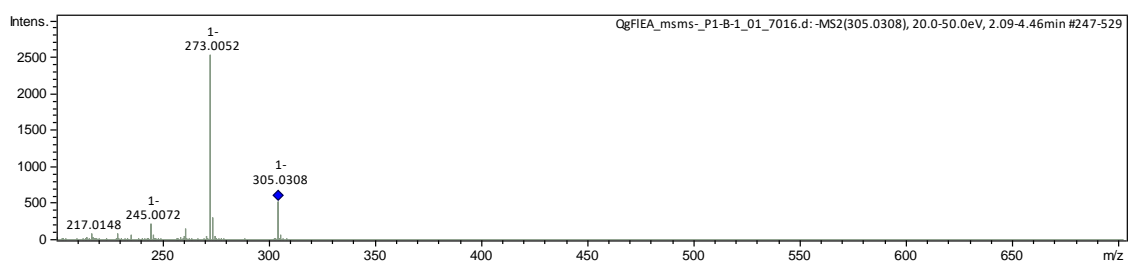
Espectro 4QFI



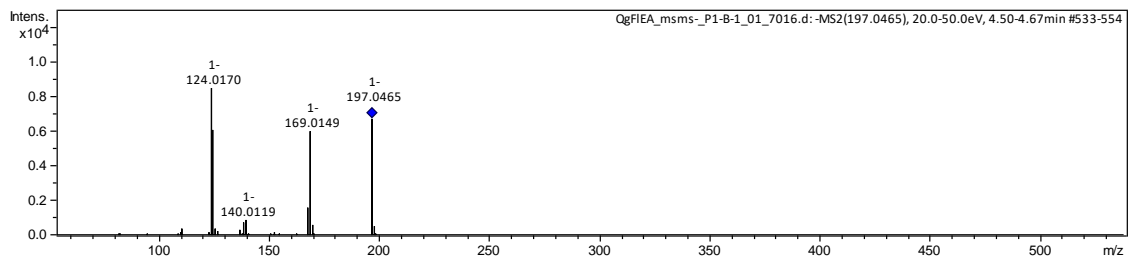
Espectro 5QFI



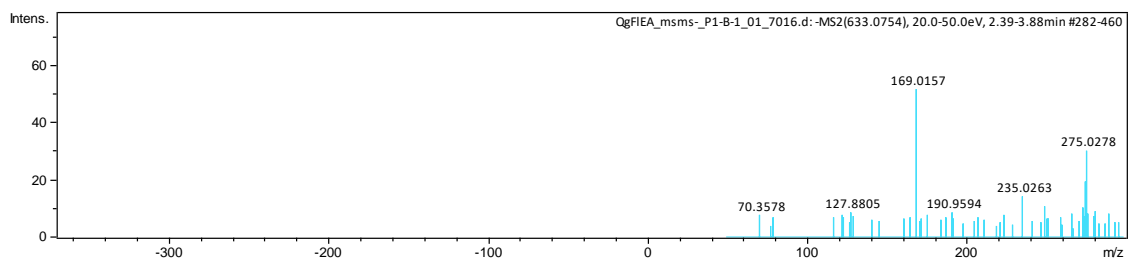
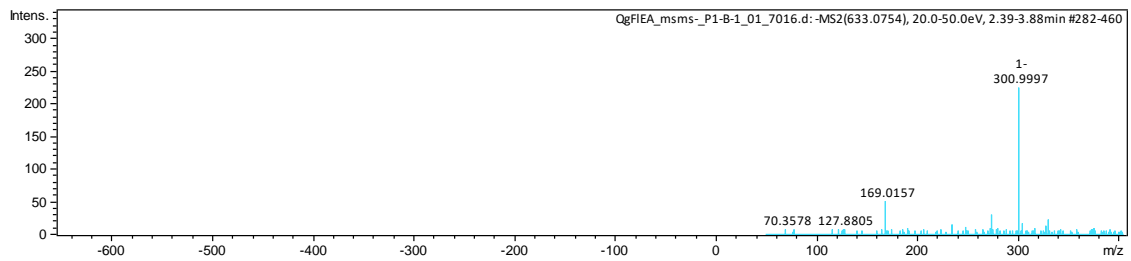
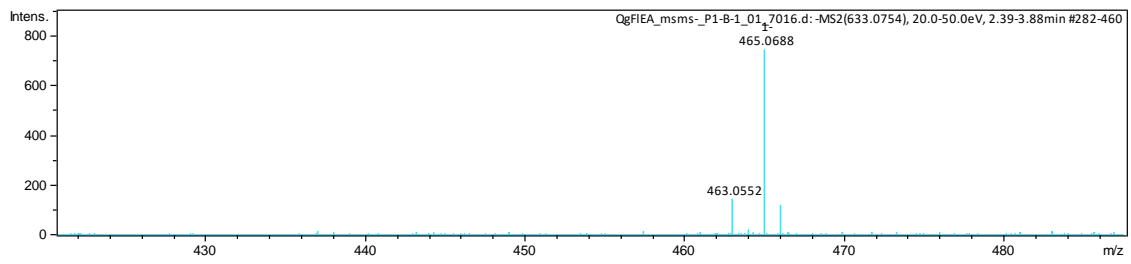
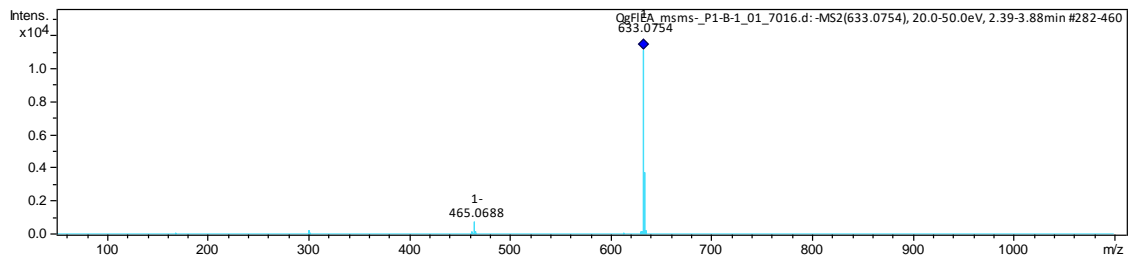
Espectro 6QFI



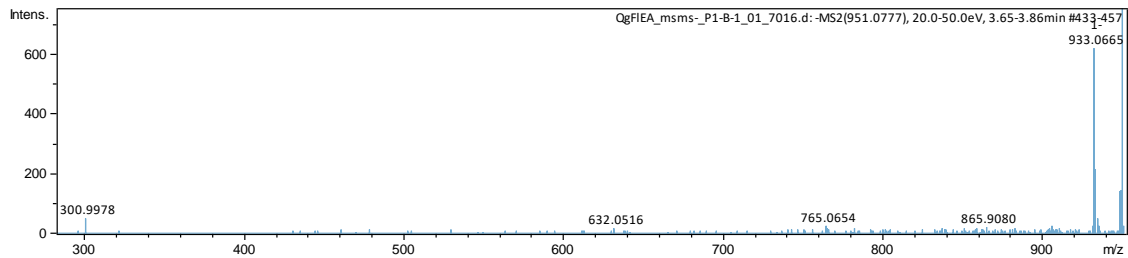
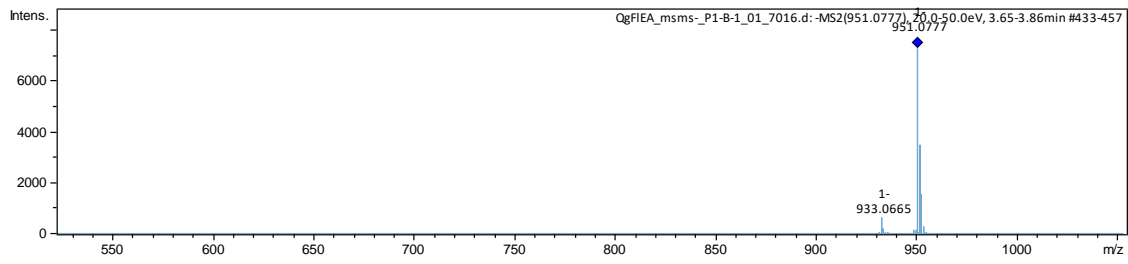
Espectro 7QFI



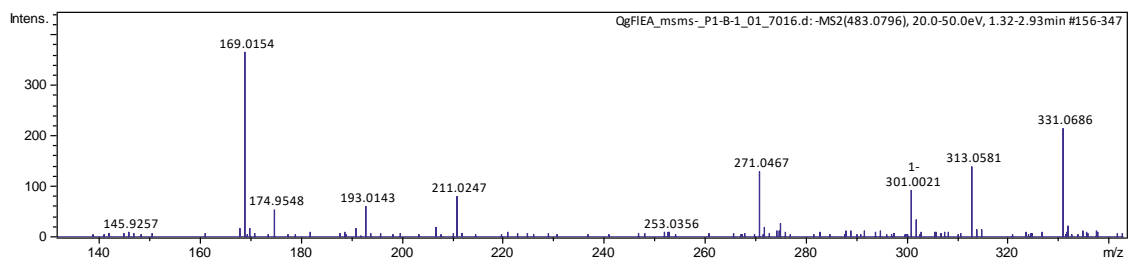
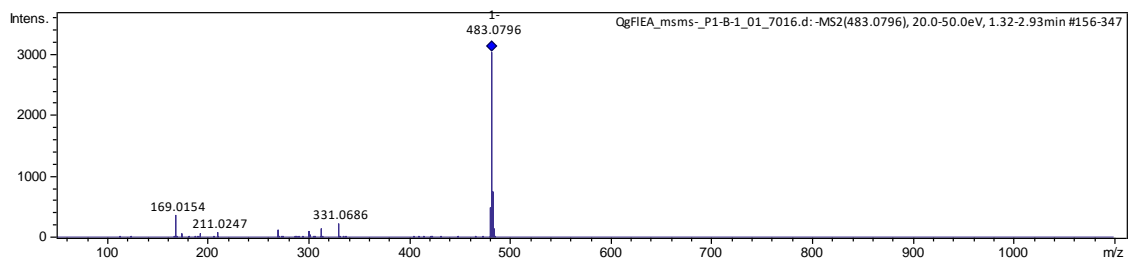
Espectro 8QFI



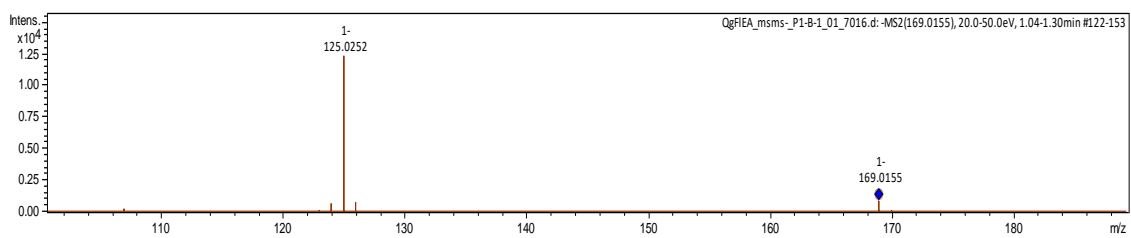
Espectro 9QFI



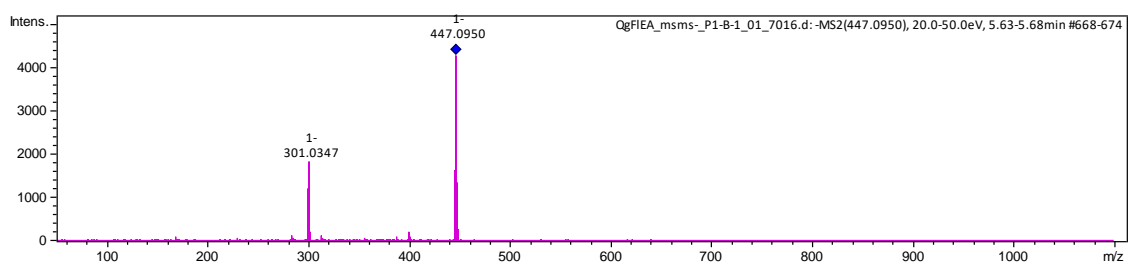
Espectro 10QFI



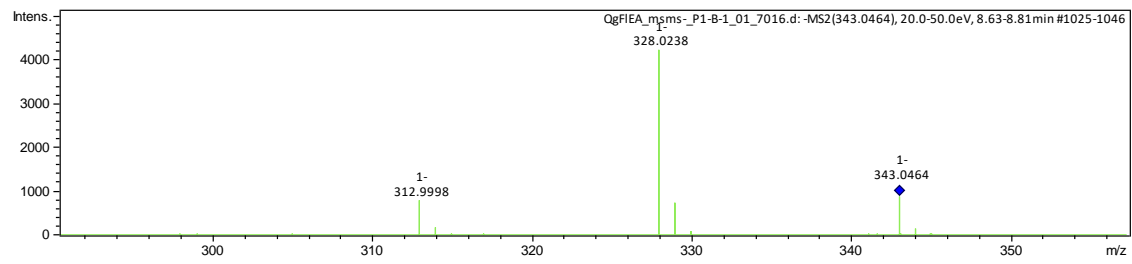
Espectro 11QFI



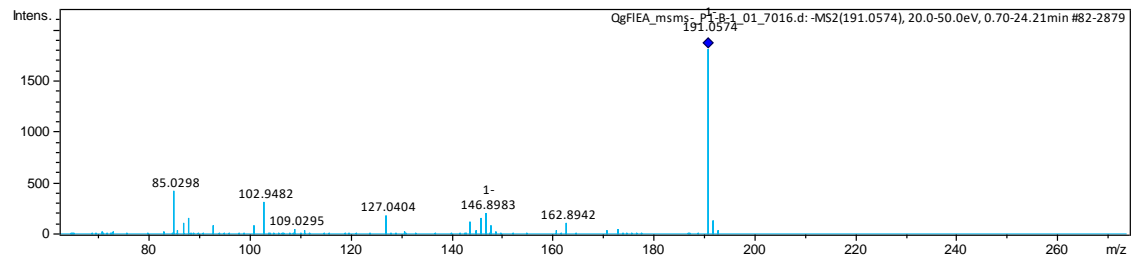
Espectro 12QFI



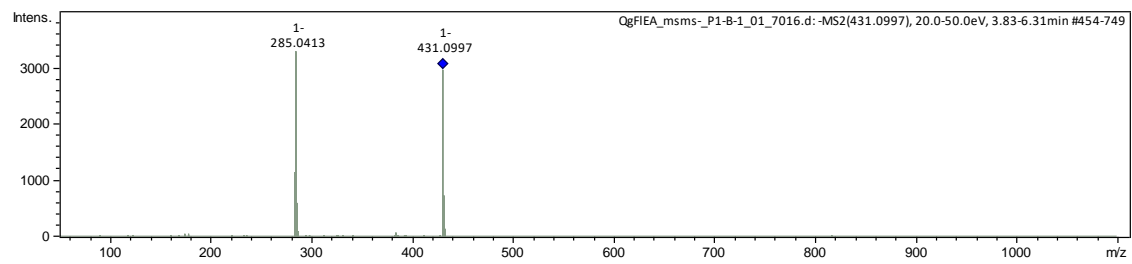
Espectro 13QFI



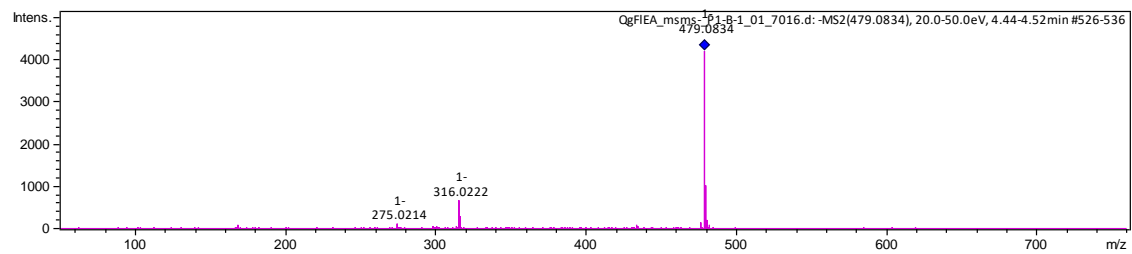
Espectro 14QFI



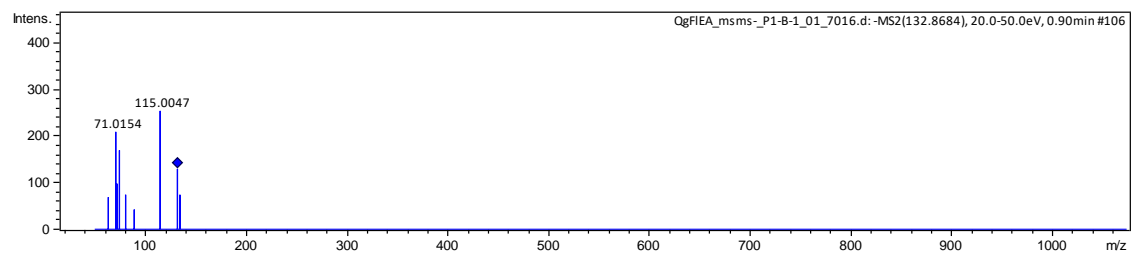
Espectro 15QFI



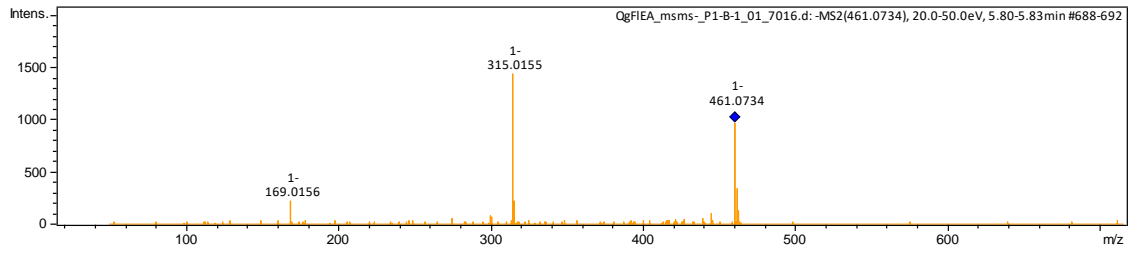
Espectro 16QFI



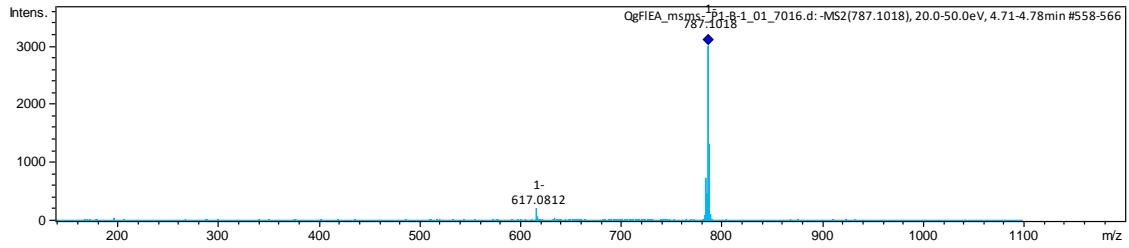
Espectro 17QFI



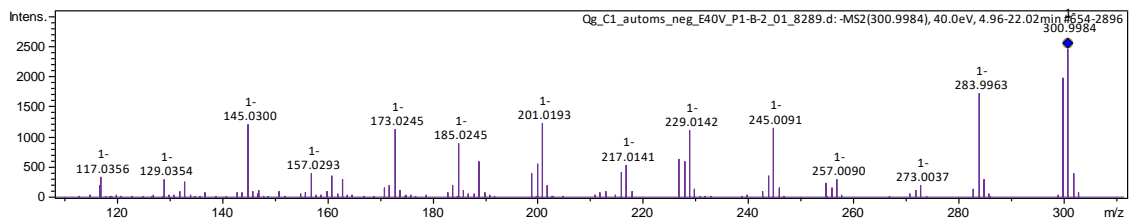
Espectro 18QFI



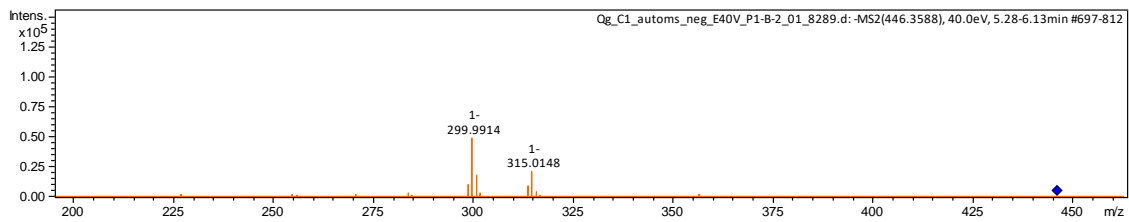
Espectro 19QFI



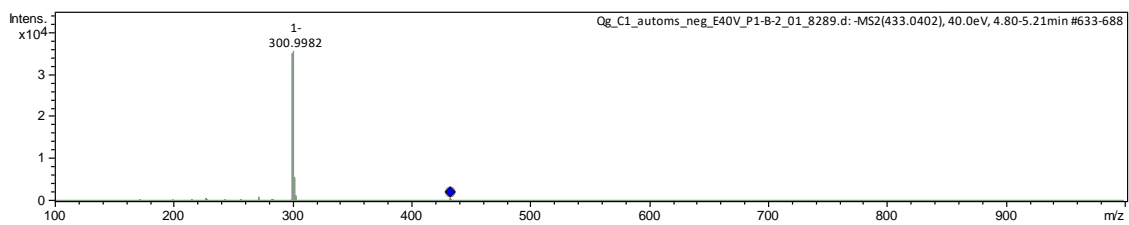
Espectro 1QC



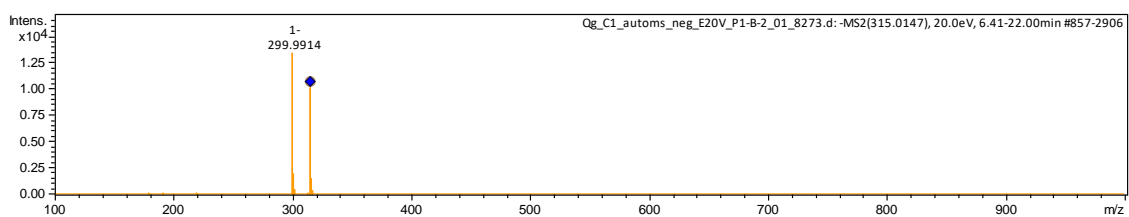
Espectro 2QC



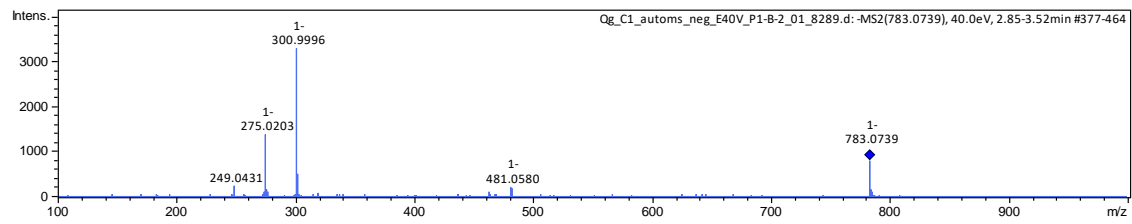
Espectro 3QC



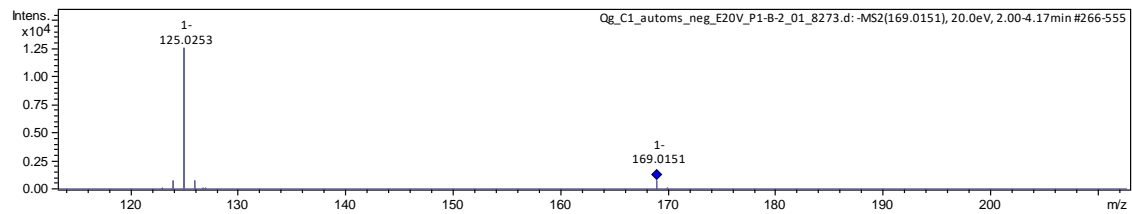
Espectro 4QC



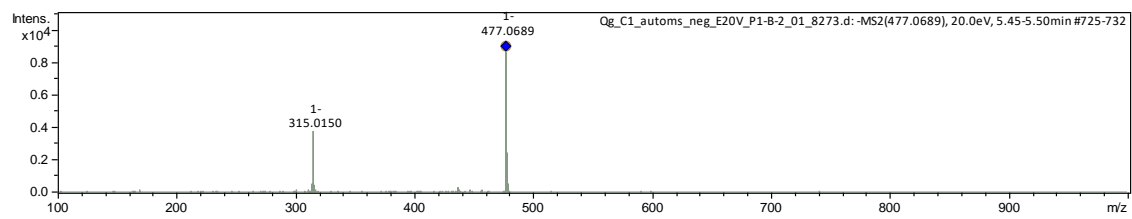
Espectro 5QC



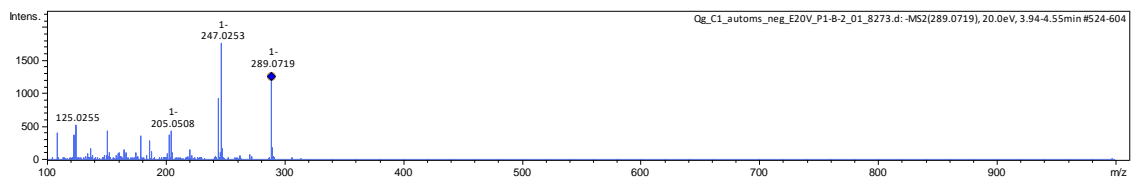
Espectro 6QC



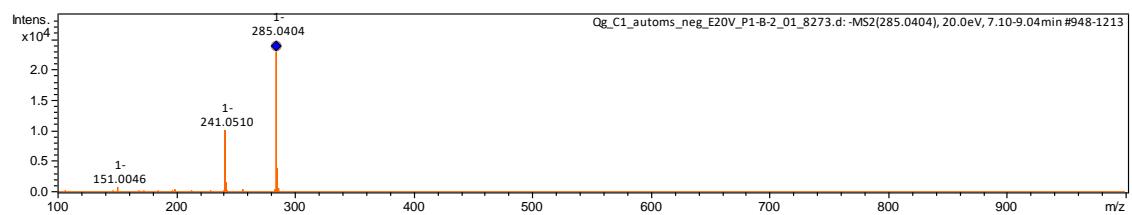
Espectro 7QC



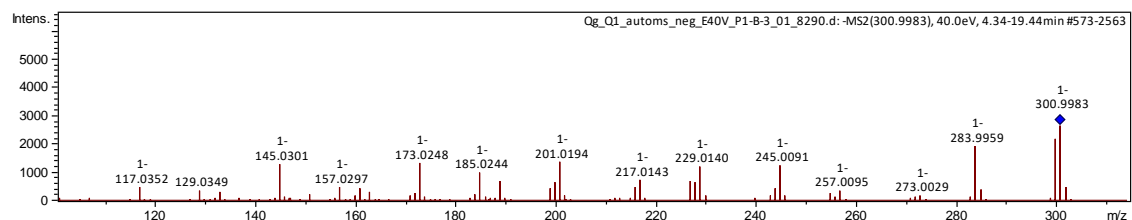
Espectro 8QC



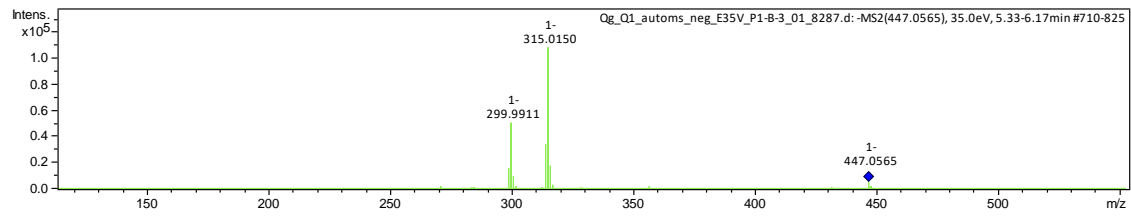
Espectro 9QC



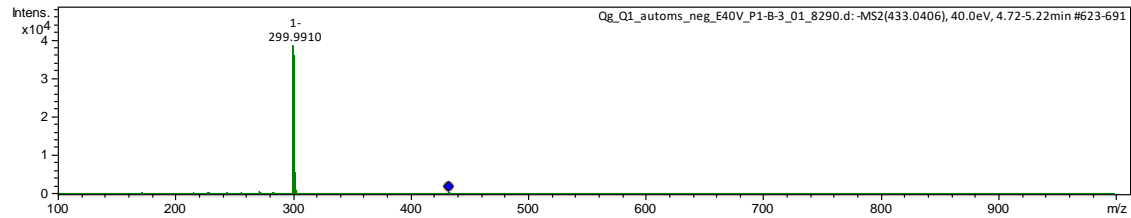
Espectro 1QQ



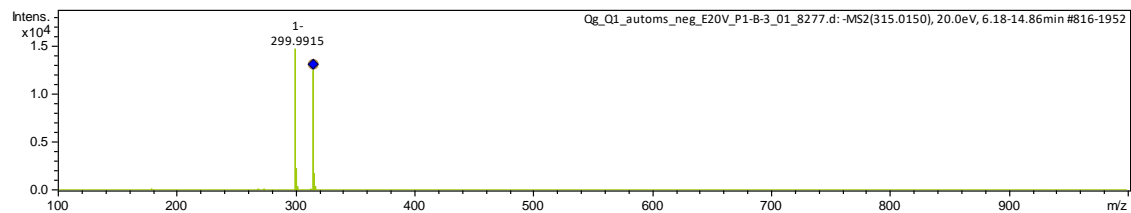
Espectro 2QQ



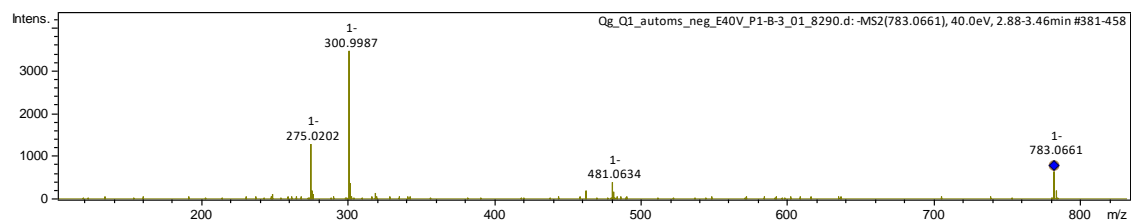
Espectro 3QQ



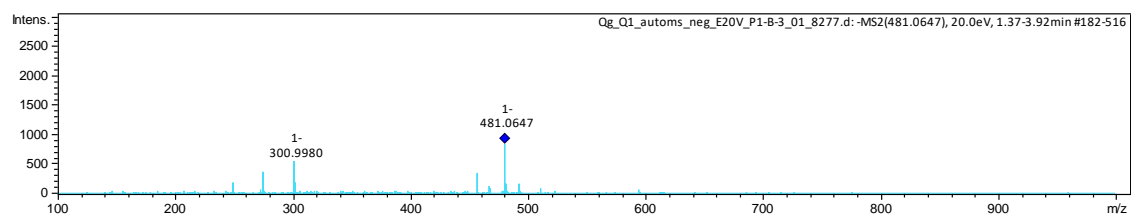
Espectro 4QQ



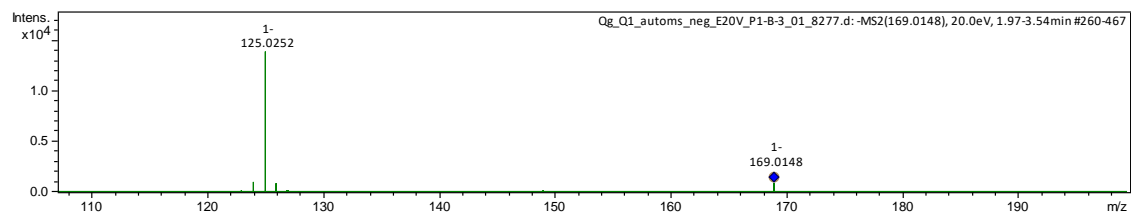
Espectro 5QQ



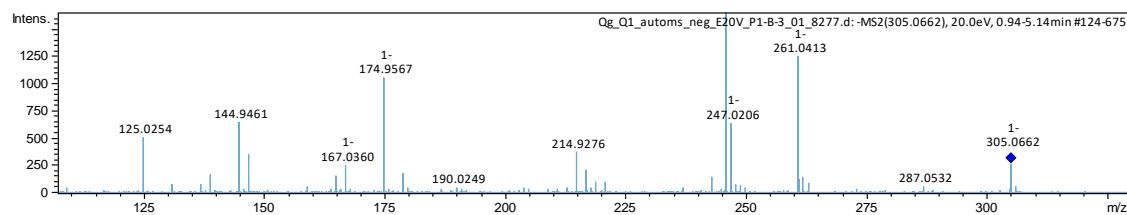
Espectro 6QQ



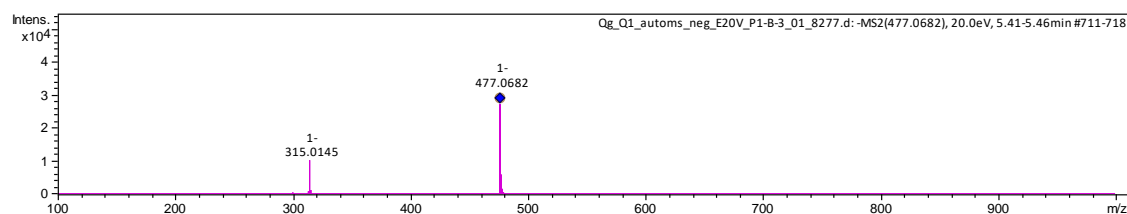
Espectro 7QQ



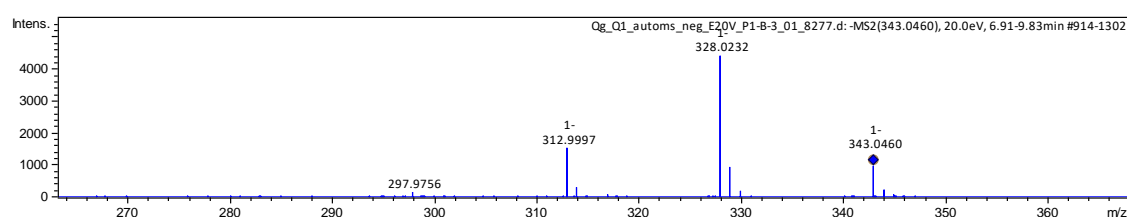
Espectro 8QQ



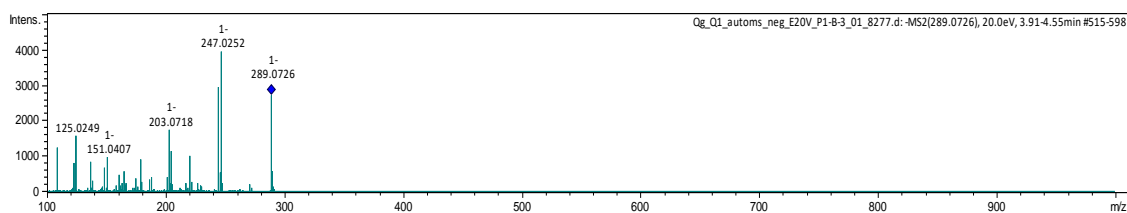
Espectro 9QQ



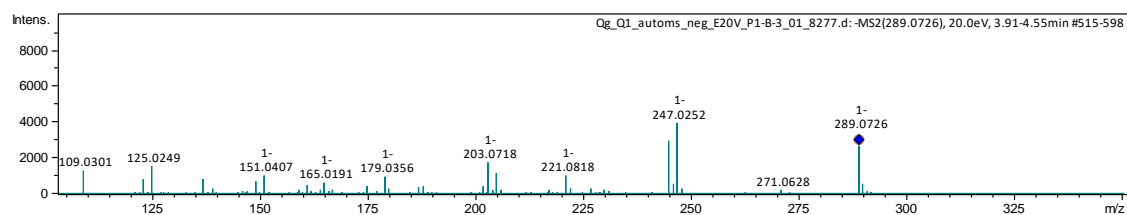
Espectro 10QQ



Espectro 11QQ



Espectro 12QQ



GNPS

Espectro de fragmentação: $[M - H]^-$ 121.032 (hidroxialdeído)

