



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA,  
BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO**

**ESTUDO FITOQUÍMICO E FARMACOLÓGICO DA CASCA DO  
CAULE DE *Manilkara rufula***

**ANNY CAROLINNY TIGRE ALMEIDA CHAVES**

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



**ANNY CAROLINNY TIGRE ALMEIDA CHAVES**

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

**ESTUDO FITOQUÍMICO E FARMACOLÓGICO DA CASCA DO  
CAULE DE *Manilkara rufula***



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, para obtenção do título de Mestre em Genética, Biodiversidade e Conservação.

Orientador: Prof Dr Raphael Ferreira Queiroz.  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Vanderlucia Fonseca de Paula



**Jequié-BA  
2017**

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Chaves, Anny Carolinny Tigre Almeida.

C438 Estudo fitoquímico e farmacológico da casca do caule de *Manilkara rufula*/Anny Carolinny Tigre Almeida Chaves.- Jequié, UESB, 2017.  
103 f: il.; 30cm. (Anexos)

Dissertação (Programa de Pós-graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação), UESB, 2017.

1. *Manilkara rufula* (maçaranduba) – Atividade antioxidante (investigação) 2. *Manilkara rufula* (maçaranduba) – Leishmanicida (estudo) 3. *Manilkara rufula* (maçaranduba) – Leishmanicida (análises de dados) 4. *Manilkara rufula* (maçaranduba) – Tripanocida 5. *Manilkara rufula* (maçaranduba) - Antitumoral 6. *Manilkara rufula* (maçaranduba) - Antibacteriano  
I Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia . II. Título.

CDD - 577.34

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



**ANNY CAROLINNY TIGRE ALMEIDA CHAVES**

**ESTUDO FITOQUÍMICO E FARMACOLÓGICO DA CASCA DO  
CAULE DE *Manilkara rufula***

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

**Prof Dr Raphael Ferreira Queiroz (Orientador)**

**Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia**

---

**Profa Dra Regiane Yatsuda**

**Instituto Multidisciplinar de Saúde - Universidade Federal da Bahia**

---

**Profa Dra Mariluze Peixoto Cruz**

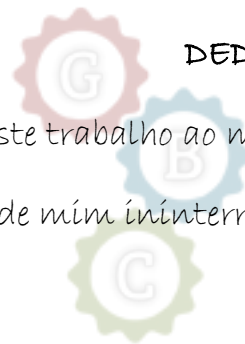
**Instituto Multidisciplinar de Saúde - Universidade Federal da Bahia**



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu **Senhor**,  
Aquele que cuida de mim ininterruptamente!

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



## Agradecimentos

Ao amado da minha alma, **Senhor Jesus**, por conceder-me mais uma vitória em minha vida!

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

A minha mãe, **Márcia Tigre**, por todo apoio, incentivo, amor, torcida, sonhos abdicados em favor dos meus, enfim, por ser a melhor mãe do mundo!

A minha irmã, **Vanessa Tigre**, por ser a minha companheira em todos os momentos e por estar presente em todas as etapas do meu mestrado. Te amo, minha irmã/amiga!

Ao meu pai **Zelito Chaves**, minha vovó **Nazinha**, meu vovô **Arnaldo** (na memória e no meu coração) e aos meus tios (as), primos (as), padrinho **Denilson** e madrinha **Carla** eu agradeço pelas orações e pela presença maravilhosa e aconchegante. Amo vocês do mais profundo do meu coração!

A todas as minhas amigas, em especial, **Leia, Sara, Debora, Lorena Jaíne e Formíga, Jessica Ribeiro, Lílian, Wísla, Daniela** e as minhas Luluzinhas **Fan, May, Jessíkita e Day** e ao meu eterno GG + 1 (**Inocêncio, Lucas, Maria, Suéllyn, Tamíles e Tuany**) - sou eternamente grata, pois mesmo com toda a distância nos reconhecemos amigos em todas as situações.

Aos meus amigos/irmãos **Tiago Paím, Lucas Nascimento e Willian Silva** por dedicarem-se em me fazer tanto bem. Vocês não imaginam o quanto são especiais para mim!

As minhas companheiras de república **Mí, Neíve e Nai**. Ao lado de vocês o fardo tornou-se mais leve. Obrigada por tanto cuidado!

Agradeço também ao meu orientador, **prof. Dr. Raphael**, por tantos ensinamentos e dedicação durante esse processo.



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



## Aos Colaboradores

Imprescindíveis no desenvolvimento deste trabalho agradeço à:

- Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB);
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo ao Pesquisador do Estado da Bahia (FAPESB) pela bolsa e apoio financeiro para realização da pesquisa, respectivamente;
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro;
- Programa de Pós Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação (PPQGBC):
  - Prof<sup>a</sup> **Guadalupe, a Marcio, a Gerivaldo** e a equipe do **Herbário** da UESB;
  - Prof<sup>a</sup> **Vanderlúcia, a Lauro** e a equipe do **Laboratório de Produtos Naturais** da UESB;
    - **Danielba, Michele, Marina e Camila**;
    - Prof. **Edson, a Lindsay** e a equipe da **USP - Pirassununga**;
    - **Albert** e equipe da **USP/São Paulo**;
    - Prof. **Djalma** e a equipe do **Laboratório de Cromatografia** da UESB;
  - Prof<sup>a</sup>. **Milena, Vinicius, Tanira** e a equipe do **Centro de Biotecnologia e Terapia Celular do Hospital São Rafael (CBTC)**;
  - **Dr. Daniel Bezerra** e equipe da **Fiocruz/Salvador**.

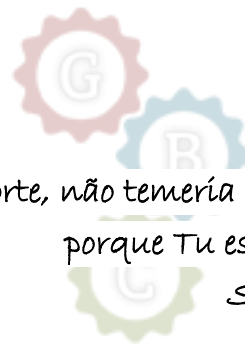
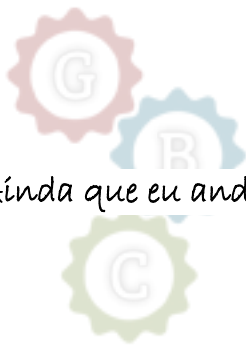


Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

Ainda que eu andasse pelo vale da sombra da morte, não temeria mal algum,  
porque Tu estás comigo.  
*Salmos 23:4*



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação





## RESUMO

A família Sapotaceae possui atividades farmacológicas que estão relacionadas à presença de diferentes metabólitos secundários, além de possuir ampla distribuição na região do semiárido. *Manilkara rufula*, também conhecida como “maçaranduba”, pertence a essa família, no entanto, estudos sobre sua atividade farmacológica e composição química são ainda incipientes. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi investigar as propriedades farmacológicas e o perfil fitoquímico preliminar de extratos e frações do caule de *M. rufula*. Após coleta e identificação da planta, extrato etanólico e frações foram preparados. A atividade antioxidante foi determinada pelos métodos de captura dos radicais •DPPH e ABTS•<sup>+</sup> e inibição da oxidação do β-caroteno. Em seguida, as concentrações inibitórias mínima e bactericida mínima foram estimadas pelo método de microdiluição em caldo contra as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*. As amostras foram também investigadas quanto à citotoxicidade e aos potenciais antioxidante e citoprotetor em cultura de macrófagos. A atividade antiproliferativa foi avaliada sobre linhagens tumorais HepG2 (carcinoma hepatocelular humano) e HL-60 (leucemia promielocítica humana). Em seguida, determinou-se efeitos das amostras sobre a atividade *in vitro* da arginase de *Leishmania amazonensis* e na sobrevivência de formas amastigotas de *L. amazonensis* e *T. cruzi*. O perfil fitoquímico foi determinado por alguns métodos qualitativos de fitoquímica clássica, espectroscopia de infravermelho, LC-MS/MS e CG-MS. Os dados foram analisados por ANOVA e Dunnet como pós-teste e a correlação entre as atividades antioxidante, leishmanicida e tripanocida com os compostos fenólicos foi determinada pela correlação de Pearson, com significância de 5%. As amostras apresentaram propriedades antioxidantes, bactericida, leishmanicida, tripanocida e antitumoral e sem características tóxicas sobre células normais. A inibição da peroxidação e a atividade tripanocida foram associadas com a concentração de fenólicos nas amostras. A triagem fitoquímica inicial indicou a presença de triterpenos na fração hexânica. Em seguida, a análise de infravermelho demonstrou a presença de grupos químicos como glicosídeos, anéis aromáticos, terpenos e ésteres graxos nas frações, enquanto que por LC-MS/MS e CG-MS detectou-se dímeros e trímeros de proantocianidinas, catequina e variados terpenos. Em conclusão, este trabalho descreveu pela primeira vez as propriedades farmacológicas da casca do caule de *M. rufula* e alguns de seus constituintes químicos, além de valorar componentes da biodiversidade baiana.

**Palavras-Chave:** *Manilkara rufula*. Antibacteriano. Antioxidante. Antitumoral. Leishmanicida. Tripanocida.





## ABSTRACT

Sapotaceae family has pharmacological activities that are related to the presence of distinct secondary metabolites beyond to have a wide distribution in semiarid region. *Manilkara rufula*, popularly known as “maçaranduba”, belongs to this Family but studies on its pharmacological activities and chemical composition are still incipient. Therefore, the objective of this work was to investigate the pharmacological proprieties and the preliminary chemical profile of extracts and fractions from *M. rufula* stem. After collection and identification of the plant, ethanolic extract and fractions were prepared. The antioxidant activity was determined by scavenging of •DPPH and ABTS<sup>•+</sup> radicals, and  $\beta$ -carotene/linoleic acid system. Following, the minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration were estimated by broth microdilution method against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*. The samples were also investigated for cytotoxicity and potential antioxidant and cytoprotector in macrophage culture. The antiproliferative activity was evaluated on tumoral lines HepG2 (human hepatocellular carcinoma) and HL-60 (human promyelocytic leukemia). Afterwards, the effects of the samples on the in vitro activity of the arginase of *Leishmania amazonensis* and on survival of the amastigote forms of *L. amazonensis* and *Trypanosoma cruzi* were determined. The phytochemical profile was determined by some qualitative methods of classical phytochemistry, infrared spectroscopy, LC-MS/MS and CG/MS. Data were analyzed by ANOVA and Dunnet as a post-test and the correlation between antioxidant, leishmanicidal and trypanocidal activities with phenolic compounds was determined by Pearson correlation, with significance of 5%. The samples presented antioxidant, bactericidal, leishmanicidal, trypanocidal and antitumor properties and without toxic characteristics on normal cells. The inhibition of peroxidation and trypanocidal activity were associated to phenolic content into samples. The initial phytochemical screening indicated the presence of triterpenes in the hexane fraction. Infrared analysis showed the presence of chemical groups such as glycosides, aromatic rings, terpenes and fatty esters in the fractions, whereas by LC-MS/MS and CG/MS, proanthocyanidins dimer and trimer, catechin and terpenes. In conclusion, this work described for the first time the pharmacological properties of *M. rufula* and some of its chemical constituents. In addition, it has contributed to knowledge on Bahia biodiversity.

**Keywords:** *Manilkara rufula*. Anti-bacterial. Antioxidant. Antitumoral. Leishmanicide. Trypanocidal.



## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Ciclo biológico de *T. cruzi*. Fonte: Neves, 2005.

**Figura 2.** Morfologia da *Leishmania*. A) Amastigota, B) Promastigota, C) Paramastigota. Fonte: Neves, 2005.

**Figura 3.** Ciclo biológico de *Leishmania*. Fonte: Neves, 2005.

**Figura 4.** Excicata da planta *M. Rufula*.

**Figura 5.** Atividade citoprotetora (A) e antioxidante (B) do extrato e frações de *M. rufula* sobre monócitos de THP1.

**Figura 6.** Espectro do infravermelho do extrato e frações do caule de *M. rufula*.

**Figura S1.** Espectro do infravermelho do extrato etanólico da casca do caule de *M. rufula*.

**Figura S2.** Espectro do infravermelho da fração acetato de etila da casca do caule de *M. rufula*.

**Figura S3.** Espectro do infravermelho da fração hidroalcolólica da casca do caule de *M. rufula*.

**Figura S4.** Espectro do infravermelho da fração hexânica da casca do caule de *M. rufula*.

**Figura S5.** Espectro do infravermelho da fração metanólica da casca do caule de *M. rufula*.

**Figura S6.** Espectro de massas da fração acetato de etila. Em (A) encontra-se os íons majoritários encontrados na FAEMR em 14,4 min. O painel (B) demonstra os fragmentos do íon 577 enquanto o painel (C) os fragmentos do íon 865.

**Figura S7.** Espectro de massas da fração acetato de etila. Em (A) encontra-se os íons majoritários encontrados na FAEMR em 15,5 min. O painel (B) demonstra os fragmentos do íon 865 enquanto o painel (C) os fragmentos do íon 289.

**Figura S8.** Espectro de massas da fração acetato de etila. Em (A) encontra-se os íons majoritários encontrados na FAEMR em 18,1 min. O painel (B) demonstra os fragmentos do íon 577 enquanto o painel (C) os fragmentos do íon 833.

**Figura S9.** Espectro de massas da fração acetato de etila. Em (A) encontra-se os íons majoritários encontrados na FAEMR em 26,4 min. O painel (B) demonstra os fragmentos do íon 367 enquanto o painel (C) os fragmentos do íon 659.

**Figura S10.** Espectro de massas da fração acetato de etila. Em (A) encontra-se os íons majoritários encontrados na FAEMR em 38,4 min. O painel (B) demonstra os fragmentos do íon 487 enquanto o painel (C) os fragmentos do íon 555.

**Figura S11.** Espectro de massas da hidroalcolólica. Em (A) encontra-se os íons majoritários encontrados na FHAMR em 2,7 min. O painel (B) demonstra os fragmentos do íon 664 enquanto o painel (C) os fragmentos do íon 680.

**Figura S12.** Espectro de massas da fração hidroalcóolica. Em (A) encontra-se os íons majoritários encontrados na FHAMR em 3,9 min. O painel (B) demonstra os fragmentos do íon 341 enquanto o painel (C) os fragmentos do íon 387.

**Figura S13.** Espectro de massas da fração hidroalcóolica. Em (A) encontra-se os íons majoritários encontrados na FHAMR em 4,4 min. O painel (B) demonstra os fragmentos do íon 317 enquanto o painel (C) os fragmentos do íon 635.

**Figura S14.** Espectro de massas da fração hidroalcóolica. Em (A) encontra-se os íons majoritários encontrados na FHAMR em 14,4 min. O painel (B) demonstra os fragmentos do íon 577 enquanto o painel (C) os fragmentos do íon 865.

**Figura S15.** Espectro de massas da fração hidroalcóolica. Em (A) encontra-se os íons majoritários encontrados na FHAMR em 15,7 min. O painel (B) demonstra os fragmentos do íon 865 enquanto o painel (C) os fragmentos do íon 849.

**Figura S16.** Espectro de massas da fração hidroalcóolica. Em (A) encontra-se os íons majoritários encontrados na FHAMR em 25,5 min. O painel (B) demonstra os fragmentos do íon 367 enquanto o painel (C) os fragmentos do íon 757.

**Figura S17.** Espectro de massas da fração hidroalcóolica. Em (A) encontra-se os íons majoritários encontrados na FHAMR em 26,2 min. O painel (B) demonstra os fragmentos do íon 367 enquanto o painel (C) os fragmentos do íon 757.

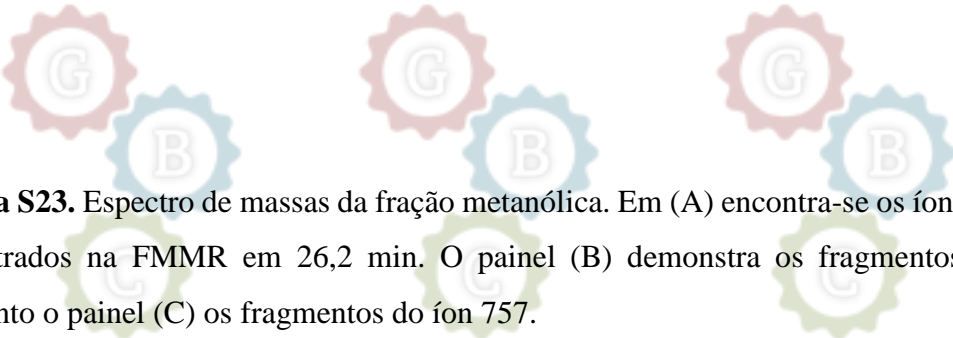
**Figura S18.** Espectro de massas da fração metanólica. Em (A) encontra-se os íons majoritários encontrados na FMMR em 3,8 min. O painel (B) demonstra os fragmentos do íon 431 enquanto o painel (C) os fragmentos do íon 341.

**Figura S19.** Espectro de massas da fração metanólica. Em (A) encontra-se os íons majoritários encontrados na FMMR em 4,4 min. O painel (B) demonstra os fragmentos do íon 317 enquanto o painel (C) os fragmentos do íon 635.

**Figura S20.** Espectro de massas da fração metanólica. Em (A) encontra-se os íons majoritários encontrados na FMMR em 14,5 min. O painel (B) demonstra os fragmentos do íon 577 enquanto o painel (C) os fragmentos do íon 865.

**Figura S21.** Espectro de massas da fração metanólica. Em (A) encontra-se os íons majoritários encontrados na FMMR em 15,8 min. O painel (B) demonstra os fragmentos do íon 865 enquanto o painel (C) os fragmentos do íon 720.

**Figura S22.** Espectro de massas da fração metanólica. Em (A) encontra-se os íons majoritários encontrados na FMMR em 25,4 min. O painel (B) demonstra os fragmentos do íon 367 enquanto o painel (C) os fragmentos do íon 757.



**Figura S23.** Espectro de massas da fração metanólica. Em (A) encontra-se os íons majoritários encontrados na FMMR em 26,2 min. O painel (B) demonstra os fragmentos do íon 367 enquanto o painel (C) os fragmentos do íon 757.

**Figura S24.** Cromatograma da fração hexânica. Estrutura do composto olean-12-en-3-ona com similaridade de 92% de acordo com NIST, versão 14.

**Figura S25.** Cromatograma da fração hexânica. Estrutura do composto lanosta-8,24-dien-3-ona com similaridade de 76% de acordo com NIST, versão 14.

**Figura S26.** Cromatograma da fração hexânica. Estrutura do composto lupenona com similaridade de 89% de acordo com NIST, versão 14.

**Figura S27.** Cromatograma da fração hexânica. Estrutura do composto lupeol acetato com similaridade de 87% de acordo com NIST, versão 14.

**Figura S28.** Cromatograma da fração hexânica. Estrutura do composto ciclolanostan-3-ol com similaridade de 85% de acordo com NIST, versão 14.

**Figura S29.** Cromatograma da fração hexânica. Estrutura do composto cis-3,14-clerodadien-13-ol com similaridade de 79% de acordo com NIST, versão 14.



## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Concentração de fenólicos e atividade antioxidante do extrato e frações do caule de *M. rufula*

**Tabela 2.** Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) do extrato e frações do caule de *M. rufula*

**Tabela 3.** Inibição da enzima arginase de *L. amazonensis* por extrato e frações do caule de *M. rufula*

**Tabela 4.** Efeito do extratos e frações do caule de *M. rufula* sobre as formas amastigotas de *L. amazonensis* e da cepa Y de *T. cruzi*.

**Tabela 5.** Análise de Infravermelho do extrato e frações do caule de *M. rufula*


**Tabela 6.** Tempos de retenção e fragmentos dos principais íons encontrados no cauele de *M. rufula* por LC-MS/MS no modo negativo.

**Tabela S1.** Tempos de Retenção, MS e fragmentos dos íons adicionais do caule de *M. rufula* por LC-MS/MS no modo negativo.



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ABTS - 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico);
- CIM – Concentração Inibitória Mínima;
- CBM – Concentração Bactericida Mínima;
- CHES – Ácido 2-(ciclohexilamino) etanossulfônico;
- CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais;
- DMSO – Dimetilsulfóxido;
- DCFH-DA – Diacetato de 2', 7'-diclorofluoresceína;
- DMEM – Meio Eagle modificado por Dulbecco;
- DPPH - 1,1-difenil-2-picrilhidrazila;
- ESI – Ionização por eletroscopia;
- EAG – Equivalentes de ácido gálico;
- EEMR – Extrato etanólico do caule de *M. rufula*;
- FAEMR – Fração acetato de etila do caule de *M. rufula*;
- FHAMR – Fração Hidroalcóolica do caule de *M. rufula*;
- FHMR – Fração Hexânica do caule de *M. rufula*;
- FMMR – Fração Metanólica do caule de *M. rufula*;
- Fiocruz – Fundação Osvaldo Cruz;
- LC-MS/MS – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplado a Espectrometria de Massas em tandem;
- HUESB – Herbário da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia;
- HepG2 – Célula de carcinoma hepatocelular humano;
- HL-60 – Célula de leucemia promielocítica humana;
- LV – Leishmaniose Visceral;
- LC – Leishmaniose Canina;
- LTA – Leishmaniose Tegumentar Americana;
- MHz – Megahertz;
- MTT – 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo difeniltetrazólio;
- NP-PEG – difenilboriloxietilamina a 1% em metanol, seguida de solução de polietilenoglicol 4000 a 5% em etanol;
- OMS – Organização Mundial de Saúde;
- PMA – Forbol-12-miristato-13-acetato;
- PCR – Reação em cadeia de polimerase;



PBS – Tampão fosfato salino;

RPMI 1640 – Meio desenvolvido por Roswell Park Memorial Institute;

RIFI – Técnica de imunofluorescência;

SINAN – Sistema de Informação de Agravos de Notificação;

THP-1 – Monócitos de leucemia humana;

UFC – Unidade Formadora de Colônia;

UV – Luz ultravioleta.



Programa de Pós-Graduação em

Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em

Genética, Biodiversidade e Conservação





## LISTA DE SÍMBOLOS

- – Símbolo indicativo de radical;
- $\lambda$  – Comprimento de onda;
- $m/z$  – Razão massa carga;
- $\nu$  – Frequência;
- $sp^3$  – Hibridização do Carbono;
- $\delta$  – Deslocamento químico;

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	20
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	22
2.1 FAMÍLIA SAPOTACEAE.....	22
2.2 GÊNERO <i>Manilkara</i> .....	22
2.3 <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	23
2.4 Leishmaniose.....	27
2.4.1 Novos alvos terapêuticos.....	34
2.5 Infecções Bacterianas.....	36
2.6 ESTRESSE REDOX E DOENÇAS RELACIONADAS.....	37
2.7 Câncer.....	40
3. OBJETIVOS.....	42
3.1 OBJETIVO GERAL.....	42
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	42
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	43
4.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA.....	43
4.2 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS.....	43
4.2.1 Obtenção dos extratos brutos.....	43
4.2.2 Obtenção das frações.....	44
4.3 QUANTIFICAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS.....	44
4.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	44
4.5 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR.....	45
4.6 ATIVIDADE CITOPROTETORA.....	46
4.7 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM MODELO CELULAR.....	46
4.8 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA.....	46
4.9 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE EM LINHAGENS DE CÉLULAS TUMORAIS <i>in vitro</i> .....	47
4.10 INIBIÇÃO DA ARGINASE DE <i>Leishmania</i> .....	47
4.11 ATIVIDADE LEISHMANICIDA EM AMASTIGOTAS DE <i>L. amazonensis</i> .....	48
4.12 ATIVIDADE ANTI- <i>T. cruzi</i> EM AMASTIGOTAS DA CEPA Y DE <i>T. cruzi</i> .....	48

4.13 ESTUDO FITOQUÍMICO QUALITATIVO.....	49
4.14 ESPECTROSCOPIA POR INFRAVERMELHO.....	49
4.15 LC-MS/MS.....	50
4.16 CG-MS.....	50
4.17 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	50
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
6. CONCLUSÕES.....	52
Referências Bibliográficas.....	65
Anexos.....	80



## 1 INTRODUÇÃO


As plantas constituem uma fonte potencial para a descoberta de novos fármacos, visto existe um grande número de substâncias produzidas pelas diversas espécies. O uso de plantas na busca pelo tratamento de enfermidades que acometiam a população é relatado desde os primórdios da humanidade e com o passar dos séculos. O aprimoramento dos estudos e técnicas contribuiu para que os produtos naturais, além de fornecerem a matéria-prima para a produção de fármacos também permitissem a elaboração de medicamentos a partir de protótipos naturais (Gadelha et al., 2013).

Desse modo, os estudos cresceram exponencialmente nos últimos anos principalmente devido a diversidade de espécies vegetais e o baixo custo associado a terapêutica com plantas (Pinto et al., 2002; de Medeiros et al., 2013). No Brasil, já foram descritas 46.097 espécies de plantas, agrupadas em 236 famílias, sendo que a região Nordeste abriga 650 espécies usadas como medicinais, todavia, grande parte dessas plantas ainda não foi explorada quanto ao potencial biológico (Agra et al., 2008; Forzza et al., 2015).

A família Sapotaceae possui aproximadamente 50 gêneros e 1000 espécies arbóreas e arbustivas, produtoras de látex, ecologicamente importantes por sua área de ocupação. Além disso, algumas espécies da família são empregadas na medicina popular, na ornamentação e na alimentação de animais (Kuera et al., 2002; Araújo Neto, 2009). Apesar de não ser endêmica no Brasil, essas plantas já foram encontradas em todo território nacional, totalizando 12 gêneros, 232 espécies e 27 subespécies, de acordo com o Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro (Lista de Espécies da Flora do Brasil, 2015).

A literatura reporta à família Sapotaceae atividades antibacteriana e antifúngica (Kudi et al., 1999; Ogunwande et al., 2001), antiviral (Khurana, 1972), antitumoral (Suffness et al., 1988), anti-parasitária (malária e doença de chagas) (Nwude & Ebong, 1980; Bhat et al., 1990; Muelas-Serrano et al., 2000), analgésica e antipirética (Gill & Akinwumi, 1986), anti-inflamatória e antihiperlipidêmica (Desmarchelier et al., 1999; Pereira et al., 2004; Falcão et al., 2005), antiespasmolítica, anticonvulsivante e depressora do sistema nervoso central (Barbosa-Filho et al., 2005; Montenegro et al., 2006; Silva et al., 2009), sendo que grande parte destas atividades estão relacionadas com a presença de alcaloides (Ata & Fejir, 1975), flavonoides (Mathew & Lakshminayana, 1969; Maranz et al., 2003), terpenoides (Montenegro, 2005) e fenilpropanoides (Wong Yang et al., 1999).

O gênero *Manilkara*, pertencente à família Sapotaceae, possui 19 espécies no Brasil, distribuindo-se na mata atlântica, restinga, tabuleiro costeiro, caatinga, cerrado e Floresta



Amazônica. Na região Nordeste, 12 espécies já foram confirmadas em distintos ecossistemas. Além disso, o gênero é detentor de inúmeras propriedades farmacológicas como anti-inflamatória, antiparasitária, antitumoral, antibacteriana e antioxidante, as quais estão relacionadas à presença de variados metabólitos secundários, como flavonoides, ácidos fenólicos, saponinas e triterpenos (Gomes et al., 2010; Almeida et al., 2009; Eibond et al., 2004; Ma et al., 2003).

Dentre as espécies pertencentes ao gênero destaca-se a *M. rufula*, conhecida popularmente como “maçaranduba”. Trata-se de uma árvore com 5 a 10 metros de altura e muito utilizada na área madeireira, no entanto, sem qualquer descrição no uso popular como planta medicinal. Além disso, estudos sobre a atividade farmacológica e composição química dessa planta são ainda incipientes, de forma que apenas um estudo recente descreve a atividade tricomonocida de alguns compostos isolados do caule de *M. rufula* (Vieira et al., 2016).

Dessa forma, esta pesquisa teve por objetivo determinar a atividade antioxidante, bactericida, leishmanicida, tripanocida e antiproliferativa além do perfil fitoquímico preliminar do caule de *M. rufula*, uma planta até então pouco estudada, de forma a contribuir com a descoberta de moléculas bioativas, principalmente de espécies presentes no semiárido baiano.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 FAMÍLIA SAPOTACEAE

A família Sapotaceae possui aproximadamente 50 gêneros e 1000 espécies arbóreas e arbustivas, produtoras de látex, ecologicamente importantes por sua área de ocupação e por seus frutos como fonte de alimento para os animais, além da sua utilização na medicina popular e na ornamentação (Hutchinson, 1959; Lawrence, 1966; Pennington, 1968; Barbosa et al., 1977; Barbosa et al., 1977; Barroso, 1978; Ricardi, 1992; Ricardi, 1992; Cabrera, 1992; Gentry, 1993; Ribeiro, 1999; Judd et al., 1999; Marchiori, 2000; Lima Filho et al., 2001; Joly, 2002; Kuera et al., 2002; Neto, 2009). Embora não seja uma família endêmica no Brasil, suas ocorrências estão confirmadas no Norte, Nordeste, Centro-oeste, Sudeste e Sul do país em 12 gêneros, 232 espécies e 27 subespécies, de acordo com o Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro (Lista de Espécies da Flora do Brasil, 2015).

As plantas dessa família são lenhosas com folhas alternas, raramente opostas, simples, normalmente sem estípulas e com margem inteira. Além disso, possuem inflorescência cimosa, flores pouco vistosas, unissexuadas ou bissexuadas, actinomorfas, estirpes em número igual ou duplo ao das pétalas (Neto, 2009). As flores são pequenas, com tons de creme, amarela ou esverdeada, podendo as espécies serem hermafroditas (*Manilkara*, *Pradosia* e maioria das espécies de *Sideroxylon*) ou unissexuais (especialmente *Pouteria* e *Chrysophyllum*), com plantas frequentemente dioicas e ocasionalmente monoicas (Pennington, 1990).

Dentre as propriedades farmacológicas de espécies de Sapotaceae, destaca-se as atividades antibacteriana e antifúngica (Kudi et al., 1999; Ogunwande et al., 2001), antiviral (Khurana, 1972), antitumoral (Suffness et al., 1988), antiparasitária (malária e doença de chagas) (Bhat et al., 1990; Nwude & Ebong, 1980; Muelas-Serrano et al., 2000), analgésica e antipirética (Gill & Akinwumi, 1986), anti-inflamatória e antihiperlipidêmica (Desmarchelier et al., 1999; Pereira et al., 2004; Falcão et al., 2005), antiespasmolítica, anticonvulsivante e depressora do sistema nervoso central (Barbosa-Filho et al., 2005; Montenegro et al., 2006; Silva et al., 2009). De maneira geral, essas propriedades foram associadas com a presença de alcaloides (Ata & Fejir, 1975), flavonoides (Mathew e Lakshminayana, 1969; Maranz et al., 2003), terpenoides (Montenegro, 2005) e fenilpropanoides (Wong Yang et al., 1999).

### 2.2 GÊNERO *Manilkara*

O gênero *Manilkara* é o quarto maior gênero da família Sapotaceae e contém só no Brasil 50 gêneros e 800 espécies, tendo maior representatividade em áreas de Mata Atlântica e restinga com hábitos arbóreo e arbustivo (Andrade-Lima, 1957; Reitz, 1968; Pennington, 1990; Judd et al., 1999; Ferreira, 2000; Montenegro et al., 2006). É um gênero com grande potencial econômico devido à qualidade da madeira e do látex (Pennington, 1990). Suas madeiras são muito utilizadas para diversos fins, pois são muito resistentes ao contato com o solo, prestando-se notavelmente às construções civil pesada e leve, embarcações, torneados, chapas e instrumentos musicais (IBDF, 1988). Além disso, apresentam alta densidade e uma grande resistência ao ataque de fungos e cupins (Gomes, 1998).

A espécie *M. rufula*, vulgarmente conhecida como “maçaranduba”, é uma árvore com 5 a 10 m de altura, com látex branco, ramos acinzentados, poucas lenticelas e cicatriz do pecíolo plano-convexo. As folhas são simples, alternas, distribuídas ao longo do ramo, raro no ápice do ramo, com pecíolo canaliculado e o fruto é oblongo-elipsoide, vermelho/marrom e com semente obovoide a elipsoide. A espécie ocorre em áreas de caatinga, cerrado e na transição caatinga-cerrado, sendo presente nos estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Piauí e Sergipe, na divisa entre os estados de Tocantins, Bahia e Rio Grande do Norte, apresentando-se na categoria de baixo risco de extinção (baixo risco/quase ameaçada) (IUCN, 2001; Almeida Jr., 2011). No que tange a atividade farmacológica, existe apenas um estudo na literatura que descreve a atividade tricomonocida devido ao acetato de  $\beta$ -amirina, acetato de lupeol e caproato de  $\alpha$ - e  $\beta$ -amirina isolados da planta (Vieira et al., 2016).

### 2.3 *Trypanosoma cruzi*

O parasito *T. cruzi*, agente causal da doença de Chagas, foi descoberto em 1909, por Carlos Chagas, pesquisador da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), que ao examinar o sangue de uma criança febril, de dois anos de idade, identificou o protozoário (Gilber, 2007; Rey, 2008). Até aquele momento, a doença estava restrita aos pequenos mamíferos das matas e campos da América, desde a Patagônia até o Sul dos Estados Unidos. No entanto, com a chegada do homem e os processos de colonização, os desequilíbrios ecológicos provocados pelo desmatamento e queimadas fizeram com que os barbeiros ficassem desalojados, os quais passaram a invadir as habitações dos lavradores e colonos. Dessa forma, a doença alcançou o homem e os mamíferos domésticos (Oliveira, 2010).

Atualmente, a doença de Chagas possui alta prevalência e elevada taxa de morbimortalidade, que lhe confere grande importância médico-sanitária, especialmente no

nível de populações campesianas e marginais das áreas endêmicas. Trata-se ainda de uma parasitose que está vinculada ao sub-desenvolvimento sócio-cultural e econômico, estando estritamente correlacionadas com as más condições de moradia. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, existem 10 milhões de pessoas infectadas com o *T. cruzi* em todo o mundo, mais de 25 milhões de pessoas estão em risco de doença e, em 2008, esta doença matou mais de 10.000 pessoas (OMS, 2010). Ressalta-se que apenas no período de 2000 a 2011, foram registrados 1.252 casos de doença de Chagas aguda no Brasil, sendo que 70% destes foram por transmissão oral, 7% por transmissão vetorial e 22% dos casos não teve a forma de transmissão identificada (Ministério da Saúde, 2012).

O parasito *T. cruzi* pode ser transmitido por insetos da ordem Hemiptera, família Reduviidae, subfamília Triatominae, a qual possui 120 espécies descritas, entre elas *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* e *Triatoma dimidiata*, conhecidas popularmente como barbeiros, chupões, finhões, chupanças, bicudos e procotós. Uma vez contaminados, os triatomídeos invadem as casas e peridomicílios vindo dos ecótopos silvestres próximos, podendo facilmente dispersar os parasitos de *T. cruzi* e propagar a doença de Chagas (Neves, 2005).

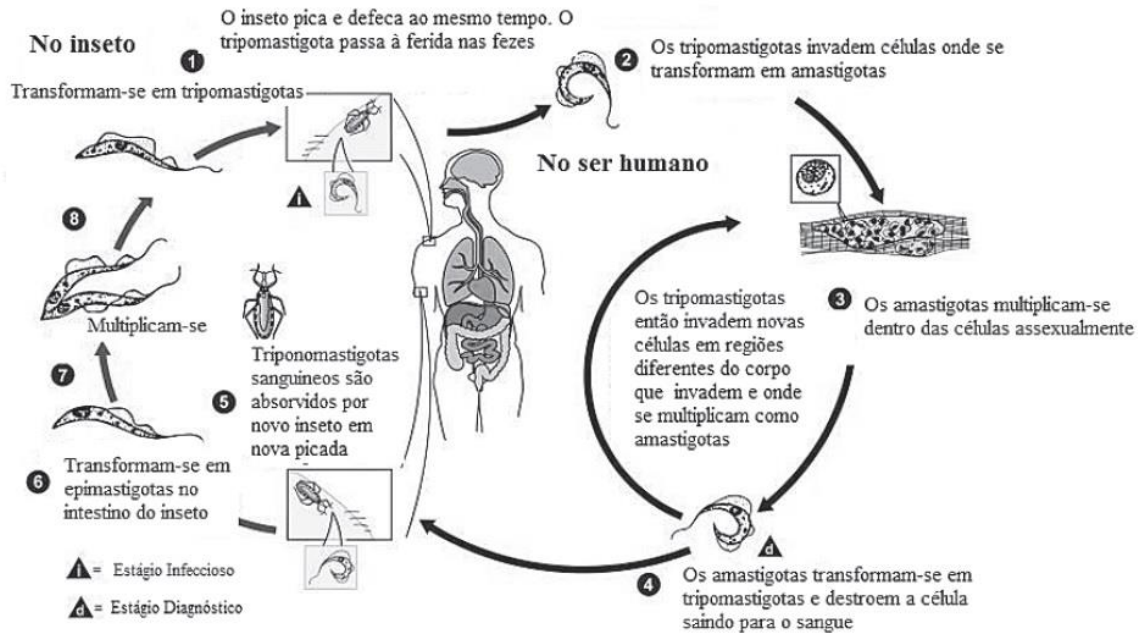
Dessa forma, a doença de Chagas pode ser transmitida por algumas vias como vetorial, transfusional e congênita. A transmissão vetorial acontece pelo contato do homem com as excretas contaminadas do inseto vetor, sendo responsável por 80 a 90% dos casos de chagásicos. Já a transmissão transfusional está relacionada com as transfusões de sangue e da migração rural urbana, que ampliou o risco de chagásicos como doadores de sangue, estando relacionado 8 a 18% dos casos. Enfim, a transmissão gestacional que pode ocorrer a partir do terceiro mês de gestação, incidindo em especial do terceiro ao quinto mês, sendo responsável por até 2% dos casos (Dias, 1997).

O ciclo de vida do protozoário envolve a passagem obrigatória do parasito pelos mamíferos e triatomíneos. No sangue dos vertebrados, o *T. cruzi* se apresenta sob a forma de tripomastigota e, nos tecidos, na forma de amastigotas. Nos insetos vetores, ocorre um ciclo com a transformação dos tripomastigotas sanguíneos em epimastigotas, que depois se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos, que são as formas infectantes acumuladas nas fezes do inseto (Coura e Castro, 2002).

Sendo assim, o ciclo se inicia com a penetração da tripomastigota em uma célula com a posterior transformação do parasito para a forma amastigota. Por conseguinte, as amastigotas de *T. cruzi* multiplicam-se ativamente por divisão binária dentro da célula, ocasionando no rompimento da célula parasitada e na liberação de tripomastigotas. As formas tripomastigotas no sangue circulante podem penetrar em novas células ou serem ingeridas pelo triatomíneo.



Quando no estômago do triatomíneo, a forma tripomastigota transforma-se em epimastigota e após multiplicar-se por divisão binária, esta transforma-se em forma tripomastigota metacíclica no reto do inseto, sendo liberadas nas fezes do triatomíneo e tornando-se aptas a penetrar em células do hospedeiro mamífero, conforme pode ser visualizado na Figura 1 (Neves, 2005).



**Figura 1.** Ciclo biológico de *T. cruzi*. Fonte: Neves, 2005.

A infecção chagásica pode se apresentar na fase aguda ou na fase crônica. A fase aguda é caracterizada por alta parasitemia e apresenta diversas manifestações clínicas, como adenomegalia, hepatoesplenomegalia, alteração bipalpebral unilateral (sinal de Romaña), miocardite e meningoencefalite, podendo levar a mortalidade em até 10% dos casos graves, principalmente por meningoencefalite, sendo que, esta manifestação clínica é quase sempre fatal nos menores de dois anos de idade (Chagas, 1916; Coura, 2003). Após um período de 10 a 15 anos, aproximadamente 40 a 50% dos pacientes podem evoluir para os três tipos principais de doença crônica: forma cardíaca, digestiva ou mista. A forma cardíaca é caracterizada por miocardite crônica, insuficiência cardíaca e eventualmente morte súbita, por arritmia cardíaca. A forma digestiva é caracterizada pelo aumento do esôfago e do cólon e a forma mista é caracterizada pela presença da forma cardíaca e digestiva, simultaneamente (revisto por Coura, 2003).

Dessa forma, com a determinação do ciclo do parasito e das principais manifestações clínicas, o objetivo principal do tratamento da doença de Chagas é basicamente a erradicação da infecção e a prevenção do aparecimento de lesões em órgãos ou do agravamento de lesões

presentes (Oliveira et al., 2008). Os medicamentos utilizados atualmente para o tratamento desta parasitose incluem o benzonidazol (único utilizado no Brasil) e o nifurtimox, os quais possuem diversas limitações como a toxicidade e reduzida atividade antiparasitária na forma crônica da doença (Urbina & Docampo, 2003; Ministério da Saúde, 2014). Tais fármacos são recomendados para os casos agudos, pois atingem um índice de cura superior a 80%, quando administrados nessa fase. Por outro lado, na fase crônica esses fármacos apresentam apenas 8 a 30% de taxa de cura (Oliveira et al, 2008).

O nifurtimox (3-metil-4 (5'-nitrofurfurilidenamino)-tetraidro (1,4) tiazina-1-1-dióxido) é utilizado no tratamento da doença de Chagas, pois age inibindo o desenvolvimento intracelular do parasito, atuando contra as formas sanguíneas e teciduais. É administrado oralmente, sob forma de comprimido, por três meses, sendo mais bem tolerado por pacientes jovens (Cimerman, 2008; Markell et al, 2003; Neves et al, 2005; Rey, 2008). Além disso, o nifurtimox assim como outros nitrocompostos apresenta efeitos tóxicos como estomatite, anorexia, diarreia, náuseas, dermatites, polineurites, discrasias sanguínea e alterações estruturais no tecido cardíaco (Katzung, 2001; Bartel et al., 2007).

O benzonidazol é uma droga nitroheterocíclica (N-benzil-2-nitroimidazole-1-acetamida) introduzido na terapêutica da doença em 1967. É considerado mais efetivo que o nifurtimox e possui uma consistente capacidade antiprotozoária na eliminação dos parasitas sob as formas sanguíneas e teciduais quando administrado por dois meses na fase aguda, no entanto, apresenta moderada toxicidade (Bezerra et al., 2012; Oliveira et al, 2008). Além disso, apesar de o benzonidazol ter sido capaz de prevenir o desenvolvimento de cardiopatia chagásica crônica severa, ele não elimina os parasitos completamente, conforme relatado num estudo realizado *in vivo* em camundongos e humanos na fase crônica da infecção (Garcia et al., 2005; Viotti et al. 2006).

No Brasil, o benzonidazol é a única droga atualmente disponível para o tratamento da tripanossomíase americana (Pontes et al, 2010). Já o nifurtimox, existente na América Central, pode ser utilizado como alternativa em casos não satisfatórios como a intolerância ao benzonidazol (Brasil, 2005). O tratamento em crianças ou nos acometidos com a forma crônica indeterminada ou formas cardíacas ou digestivas brandas é recomendado com o objetivo de diminuir o curso evolutivo da doença, diminuir a possibilidade de transmissão do parasito e principalmente a cura da infecção (Brasil, 2009).

Em razão das características físico-químicas e farmacológicas dos fármacos benzonidazol e nifurtimox, diversas pesquisas vêm sendo desenvolvidas na busca por novas alternativas terapêuticas (Soares-Sobrinho et al., 2007; Oliveira et al., 2008; Soeiro et al., 2009).

Embora muitos compostos com atividade tripanocida tenham sido testados durante as últimas décadas, apenas o alopurinol e um limitado número de azoles, como intraconazol, fluconazol e cetoconazol, foram testados com limitados resultados em ensaios clínicos (Soeiro et al., 2009). Além disso, novos derivados triazólicos (posaconazol, ravuconazol, TAK-187) recentemente foram promissores tanto em animais quanto em seres humanos (Urbina, 2010). Contudo, esta situação reflete os baixos investimentos feitos nesta área, principalmente pela indústria farmacêutica (Soeiro et al., 2009). O quadro tem se agravado ainda mais porque, em virtude da redução da incidência, o interesse político e os orçamentos operacionais têm decrescido (Schofield et al., 2006).

## 2.4 LEISHMANIOSE

A leishmaniose é uma antropozoonose que se destaca como um problema de saúde pública mundial, especialmente nas populações mais pobres. Trata-se de uma das doenças tropicais mais negligenciadas e representa um complexo de doenças com extenso espectro clínico e variedade epidemiológica, compreendendo três formas clínicas: visceral (LV), cutânea (LC) e mucocutânea (LMC) (Santin et al., 2009; Ministério da Saúde, 2010; Alvar et al., 2012). Os aspectos clínicos supracitados dependem da espécie de *Leishmania* causadora da infecção e do estado imune do hospedeiro humano (Silveira et al., 2004).

Trata-se de uma doença endêmica em 88 países, onde mais de 12 milhões de pessoas em todo o mundo estão infectadas e 350 milhões de pessoas estão expostas ao risco de infecção pela doença. Atualmente, a cada ano, a estimativa mundial é de 1,3 milhões de novos casos com o número de óbitos entre 20.000 a 30.000 pessoas. Deste total, aproximadamente 200 a 400 mil novos casos são de LV e 0,7 a 1,3 milhões compreendem a leishmaniose tegumentar americana (LTA) (OMS, 2012; WHO, 2014). Grande parte dos casos de LV no mundo ocorrem em apenas seis países: Índia, Bangladesh, Sudão, Sudão do Sul, Brasil e Etiópia. Já a LC é mais amplamente distribuída, sendo que cerca de um terço dos casos ocorrem nas Américas, na bacia do Mediterrâneo e na Ásia ocidental e Central (Ministério da Saúde, 2010; Alvar et al., 2012).

No Brasil são reconhecidas sete espécies de *Leishmania* causadoras de infecção humana, destacando-se *L. (L.) amazonensis*, *L.(V.) guyanensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L.(V.) lainsoni*, *L.(V.) naiffi*, *L.(V.) lindenberg* e *L.(V.) shawi*. Os vetores dos parasitas são mosquitos das espécies *Lutzomia longipalpis* e *Lutzimia cruzi* (Lainson, 2010; Splytides et al., 2011; Ministério da Saúde, 2013), sendo que a maior parte dos casos de LC no Brasil tem como agente etiológico a *L. braziliensis*. A infecção por essa espécie pode se manifestar sob a forma cutânea

localizada, com evolução crônica. Uma outra espécie de elevada prevalência entre os agentes causais de LC no Brasil é a *L. amazonensis*, que é responsável por casos de leishmaniose cutânea e difusa, sendo esta de ocorrência rara (Rezende-Soares et al., 2010).

Além disso, no Brasil os casos mais incidentes são LTA e LV, sendo que só em 2015 foram confirmados no território nacional cerca de 20 mil casos de LTA e 3 mil casos de LV (Brasil, 2016). Nesse mesmo ano, na Bahia foram detectados 2.351 e 348 novos casos de LTA e LV, respectivamente (Brasil, 2016). No município de Jequié, localizado na região sudoeste da Bahia, foram confirmados neste mesmo ano, 65 casos de LTA e 11 casos de LV, porém acredita-se que esses números sejam maiores devido à subnotificação (SINAN, 2016).

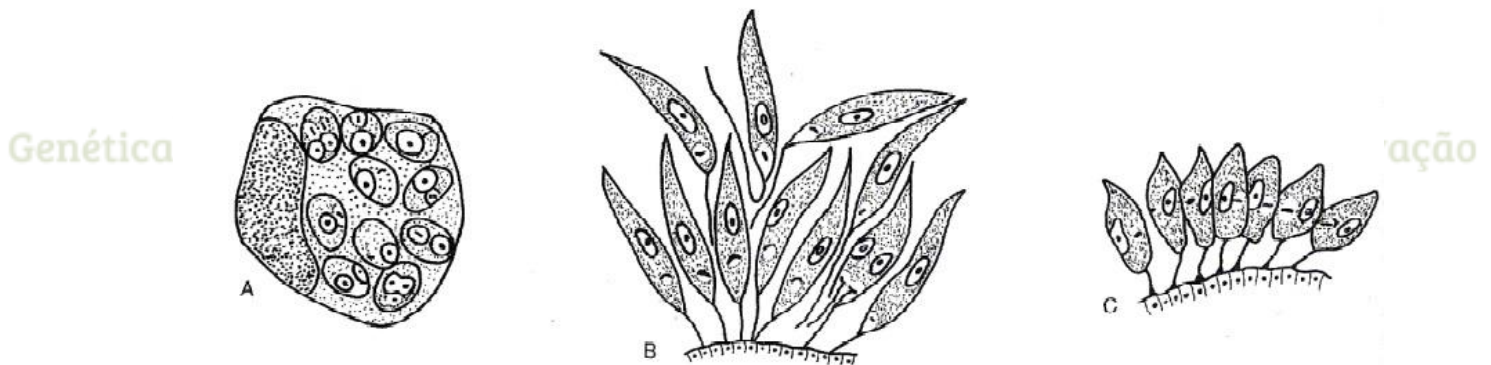
De acordo com o Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana (2007), os três padrões epidemiológicos característicos da LTA existentes no Brasil são silvestre, ocupacional e rural/periurbano. No padrão silvestre, a transmissão ao ser humano é eventual e ocorre quando este adentra em área de vegetação primária. O padrão ocupacional está associado à exploração desordenada de floresta e derrubada de matas para construções de estradas, instalação de povoados, desenvolvimento de atividades agropecuárias e ecoturismo. Já o padrão rural e periurbano relaciona-se ao processo migratório e à ocupação de áreas urbanas associadas a matas secundárias ou residuais.

A LV, embora vista historicamente como uma doença essencialmente rural, sofreu um processo gradual de transformação no seu padrão de transmissão nas últimas décadas, deixando sua característica essencialmente silvestre e de ambientes rurais para tornar-se predominantemente urbana, sobretudo por conta das alterações socioambientais, que incluem o desmatamento e o fluxo migratório para a periferia de centros urbanos (Brasil, 2006; Botelho e Natal, 2009; Cerbino et al., 2009; Góes et al., 2012).

O gênero *Leishmania* possui espécies de protozoários unicelulares, que possuem ciclo biológico heteroxênico, no qual os parasitos desenvolvem-se em dois hospedeiros distintos e apresentam-se sob duas formas de desenvolvimento, que são a forma promastigota, que se encontra no trato digestivo do hospedeiro invertebrado e a forma amastigota, parasito intracelular encontrado no hospedeiro vertebrado (Alcolea et al., 2010; Duarte, 2010; Wenzel et al., 2011; Carlsen et al., 2013).

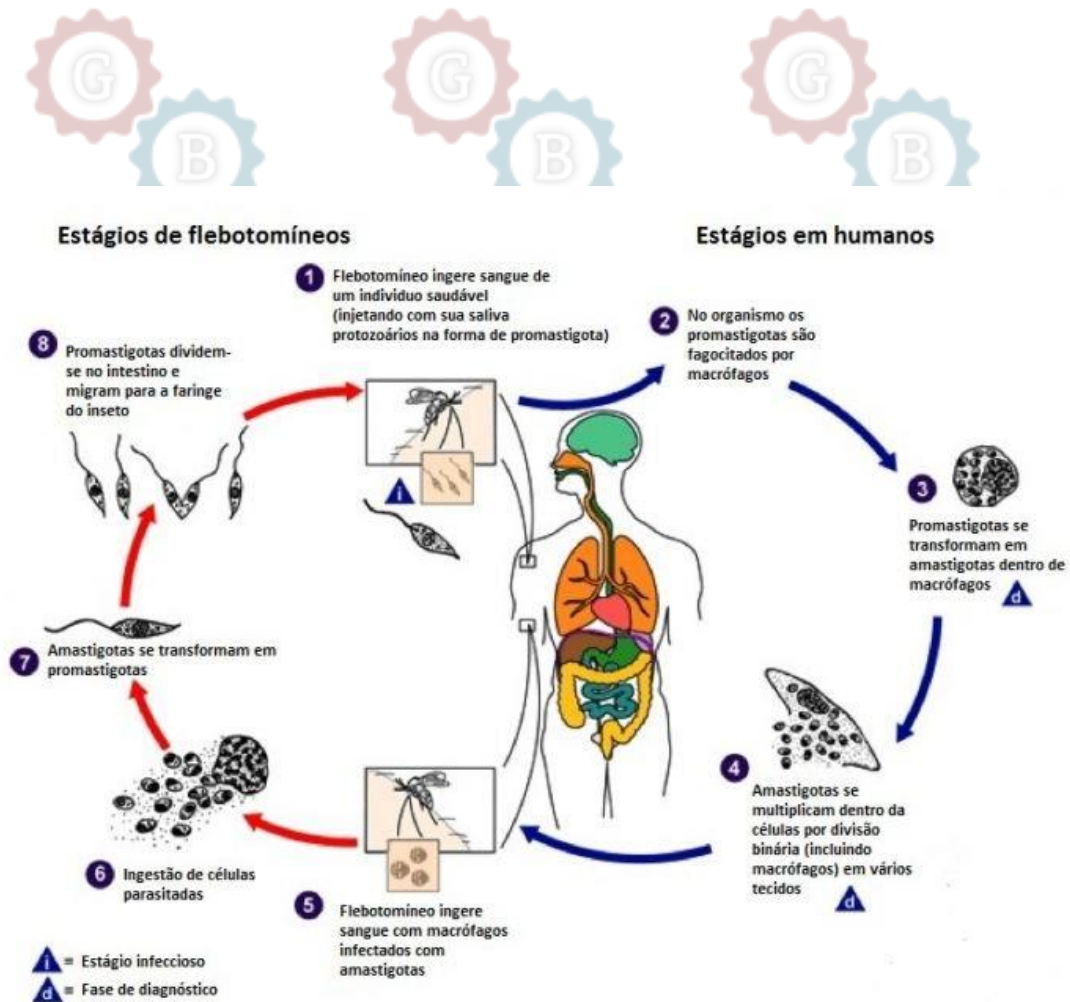
As formas amastigotas não possuem flagelo, são arredondadas, medem de 3 a 6  $\mu\text{m}$  de diâmetro e multiplicam-se por divisão simples dentro dos vacúolos dos macrófagos, enquanto que as formas promastigotas possuem formato losangular, medem de 10 a 15  $\mu\text{m}$  de comprimento e apresentam flagelo longo, o qual mede de 15 a 28  $\mu\text{m}$  de comprimento. No trato digestivo dos flebotomos, as promastigotas passam por estágios denominados de promastigota

metacíclico e paramastigota (Badaró & Duarte, 2009). A morfologia da *Leishmania* pode ser visualizada na figura abaixo.



**Figura 2.** Morfologia da *Leishmania*. A) Amastigota, B) Promastigota, C) Paramastigota. Fonte: Neves, 2005.

A infecção por *Leishmania* é iniciada quando promastigotas metacíclicas são depositados na pele do hospedeiro, por meio da picada da fêmea infectada de dípteros da subfamília Phlebotominae (Araujo et al., 2014; Carlsen et al., 2013). Em macrófagos, as promastigotas se convertem em amastigotas, que se multiplicam por divisão binária, rompendo a célula hospedeira e infectando outras células fagocíticas (Russell, 1995). O ciclo termina quando o flebotomíneo realiza o repasto no animal infectado e adquire as formas amastigotas nos macrófagos e/ou parasitos livres, onde sofrem diferenciação para promastigotas no intestino do inseto (Figura 3) (Chang, 1983; Desjardins, 1995; Neves et al., 2000; Peters et al., 2008).



**Figura 3.** Ciclo biológico de *Leishmania*. Fonte: Neves, 2005.

As manifestações clínicas da leishmaniose dependem da espécie envolvida e do estado imunológico do indivíduo infectado. Por conta da diversidade de manifestações clínicas e epidemiológicas desta doença em diferentes regiões, ela é dividida em 5 grupos principais: LC, LMC, LC Difusa, LV, Leishmaniose pós-calazar (Ashford, 2000; Ministério da Saúde, 2007; Carvalho et al., 1994; Costa et al., 1986; Turetz et al., 2002).

A LC é caracterizada pela presença de lesões ulceradas, de formato arredondado, com bordas elevadas e bem delimitadas e de coloração avermelhada. Essas lesões são inicialmente formadas como uma mácula, pápula ou nódulo no local da inoculação pela picada de inseto, evoluindo em tamanho e profundidade, podendo estar recobertas por secreção serosa ou seropurulenta, por conta da colonização por bactérias e leveduras. Além disso, a úlcera típica é indolor, comumente é limitada a poucas lesões e é restrita à derme, acometendo frequentemente áreas expostas como membros e pavilhões auriculares (Marsden e Jones, 1985; Carvalho et al., 1994; Bacellar et al., 2002; Silveira et al., 2004; Desjeux, 2004; Ministério da Saúde, 2007; Teixeira et al., 2013).

A forma mucocutânea da leishmaniose é causada pela migração do protozoário ou de seus antígenos da região de penetração na pele para as mucosas nasal, orofaringe, palatos,

lábios, língua, laringe, traqueia, podendo raramente atingir as conjuntivas oculares, ânus e mucosas de órgãos genitais (Ministério da Saúde, 2013). A LMC é secundária à lesão cutânea com início insidioso e com poucos sintomas, resultando em lesões destrutivas envolvendo mucosa e cartilagens, que pode gerar no paciente dificuldades para respirar, falar e alimentar, além de complicações respiratórias por infecções secundárias, que se não tratadas poderão levar ao óbito (Reis & Contijo, 2011). A LCM acomete com mais frequência pessoas do sexo masculino e faixas etárias mais elevadas do que a LC. No Brasil, seu agente etiológico é a *L.(V.) braziliensis*, com raros casos atribuídos as espécie *L. (L.) amazonensis* e *L.(V.) guyanensis* (Ministério da Saúde, 2013).

A LC difusa ou disseminada, tipo de leishmaniose cutânea, é caracterizada pelo aparecimento de inúmeras lesões, que podem ser pequenas ulcerações eritematosas, pápulas, tubérculos ou nódulos, e que acometem várias partes do corpo, envolvendo frequentemente a face e o tronco. Essa forma da doença é definida por apresentar aproximadamente dez lesões, espalhadas por duas ou mais áreas do corpo. Manifestações sistêmicas como febre, mal-estar geral, dores musculares, emagrecimento, anorexia, entre outras são comuns nessa forma da doença (Machado et al., 2011; Turetz et al., 2002; Ministério da Saúde, 2007; Ministério da Saúde, 2005).

A LV ou calazar passou um processo migratório de áreas rurais para os centros urbanos. No Brasil, este tipo de parasitose é causada pela *L. chagasi*, e quando não tratada tem taxa de letalidade de até 98%. Os principais sintomas apresentados pelos portadores de LV são febre irregular e de longa duração, perda de peso, hepatoesplenomegalia, pancitopenia, hipergamaglobulinemia, hipoalbuminemia, entre outros (Góes et al., 2012; Alvarenga et al., 2010; Botelho & Natal, 2009; Cerbino et al., 2009). Existe também a leishmaniose pós-calazar que se trata de uma seqüela da leishmaniose visceral, que pode aparecer em até dois anos após a cura desta e que manifesta-se como feridas na pele (da Silva, 2010).

Quanto ao tratamento para esta parasitose, os compostos antimoniais se destacam na terapêutica. Estes tiveram sua eficácia comprovada na terapêutica da LTA em 1912, quando Gaspar de Oliveira Vianna observou a resposta terapêutica do tártaro emético. Em 1915, na Itália, sua eficácia foi comprovada também no tratamento de calazar. No entanto, devido aos efeitos tóxicos e graves efeitos colaterais indesejáveis obtidos por meio da utilização do tártaro emético, estes foram substituídos por compostos estibiados pentavalentes (Rath et al., 2003). Estes são os fármacos de primeira escolha há mais de 70 anos, sendo comercializado como antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime) e estibogluconato de sódio (Pentostam) (de

Lima et al., 2007; Basano e Camargo, 2004; Ministério da Saúde, 1998; Gontijo & Carvalho, 2003; Marsden, 1985).

O mecanismo de ação destas drogas ainda é desconhecido. No entanto, estudos mostram que a inibição das quinases através da inibição do ciclo do ácido cítrico e da glicólise, a ativação e posterior conversão dos antimoniais para a forma trivalente (SbIII) e o estímulo do macrófago explicam a ação leishmanicida destes fármacos (Koff e Rosen, 1994; de Lima et al., 2007). Os antimoniais pentavalentes são administrados por via parenteral e, quando adentram no macrófago, convertem-se em antimoniais trivalentes, que são mais tóxicos não apenas para o parasita como para o hospedeiro (Frezard et al., 2001; Pereira et al., 2011).

A dose de meglumina indicada pelo Ministério da Saúde para tratamento de LC é entre 10 e 20 mg/Kg/peso ao dia, por um período de 20 dias, com possibilidade de repetição após 90 dias de tratamento, caso as lesões permaneçam, sendo que este segundo ciclo tem a duração de 30 dias. Um estudo randomizado realizado nos EUA com militares com LT, causado por diversas espécies de *Leishmania*, avaliou a eficácia do Glucantime quando utilizado por 10 e 20 dias. Os resultados mostraram que não houve diferença na eficácia do tratamento mesmo por um período maior de tratamento e que efeitos colaterais como mialgia ocorria em ambos os períodos de tratamento (Gontijo & Carvalho, 2003; Ministério da Saúde, 2000; Wortmann et al., 2002).

Apesar de representarem o fármaco de primeira escolha para o tratamento da leishmaniose, os antimoniais pentavalentes apresentam desvantagens. Dentre elas destacam-se a dificuldade de administração, o alto custo e efeitos adversos como artralgia, pancreatite, disfunção gastrointestinal, dores musculares difusas, enrijecimento das articulações, arritmias, pancitopenia, insuficiência renal, cardiotoxicidade e aumento sérico das enzimas hepáticas (Sundar & Olliaro, 2007). Diante disso, a anfotericina B, a pentamidina, o miltefosine e a paramomicina têm sido utilizadas nos casos em que ocorre resistência aos fármacos antimoniais, apesar de não apresentarem a mesma eficácia terapêutica que estes (da Silva-López, 2010).

A anfotericina B e a pentamidina constituem os fármacos de segunda escolha para o tratamento da leishmaniose, apesar de representarem tratamentos por longos períodos de administração parenteral (Amato et al., 2008; Lima et al., 2007). A anfotericina B é um antibiótico macrolídeo poliênico descoberto em 1956 por Gold e colaboradores. Trata-se de um fármaco que ao interagir com o ergosterol das membranas celulares, promove a formação de poros e, conseqüentemente, altera a permeabilidade e o balanço iônico celular, desencadeando na morte (Roberts, 2003; Bray et al., 2003; Tracy & Webster, 2001). Ela é um fármaco que



possui elevado custo e toxicidade renal, além de requerer hospitalização para sua administração intravenosa, que deve ser cuidadosa e lenta (Machado-Pinto et al., 2002; Roberts et al., 2003).

A fim de se diminuir os efeitos tóxicos e melhorar as características farmacocinéticas foram desenvolvidas formulações lipídicas de anfotericina B (Gangneux et al., 1996; Yardley e Croft, 1997; Torchilin, 2005). A formulação lipossomal unilamelar AmBisome, o complexo lipídico Abelcet e a dispersão coloidal Amphocil são eficazes em tratar leishmaniose (Tiuman et al., 2011). Estudos mostraram que AmBisome e Amphocil são mais eficazes em tratar *L. donovani* do que Abelcet. No entanto, em relação a espécie *L. major*, esse fármaco não mostrou atividade, enquanto que AmBisome e Amphocil reduziram significativamente o tamanho das lesões (Yardley & Croft, 2000). Essas formulações são incorporadas pelos macrófagos infectados, com menor ação sobre o colesterol das células do hospedeiro, o que aumenta sua eficácia e tolerabilidade (Roberts, 2003).

A pentamidina, comercializada sob o nome de Lomidina, apresenta atividade bactericida, antiviral, antifúngica, antitumoral, tripanocida e leishmanicida. Esse fármaco é utilizado no tratamento da leishmaniose desde 1939, sendo utilizado até hoje nos casos em que os pacientes não respondem aos antimoniais pentavalentes ou quando necessita-se de menos efeitos colaterais. O local de ação da pentamidina ainda é desconhecido, mas acredita-se que o fármaco se acumule na mitocôndria causando um desequilíbrio energético no protozoário (Werbovets, 2006; Coelho et al., 2007; Bourreau et al., 2009). Os efeitos adversos mais observados a partir da administração de pentamidina são mialgia, dor local, náuseas, cefaleia, hipotensão, taquicardia e hiperglicemia (Rath et al., 2003).

A OMS recomenda a dose de 4 mg/kg de pentamidina, por via endovenosa, três vezes por semana. Um estudo comparativo da eficácia de pentamidina nessa dose, três vezes ao dia, durante uma semana, por injeção intramuscular e a n-metilglucamina (20 mg/kg/dia) por vinte dias por infusão intravenosa, mostrou que ambos os tratamentos apresentaram eficácia similar, sendo que no primeiro esquema terapêutico houve vantagens devido ao menor tempo de tratamento e toxicidade cardíaca (Paula et al., 2003).

O miltefosine é o fármaco leishmanicida mais recente, sendo o primeiro tratamento oral eficaz contra LV e inclusive recomendado como primeira escolha no tratameto de LV na infância (Bhattacharya et al., 2004). Trata-se de um agente antineoplásico que possui atividade direta sobre as formas promastigostas e também sobre as amastigotas de *Leishmania*, devido ao seu efeito sobre os macrófagos e/ou sobre a resposta imune decorrente da ativação de linfócitos T (Kuhlencord et al., 1992). Esse fármaco inibe a síntese de RNA em 96%, de DNA em 73% e de proteínas em 84% nos parasitos (Azzouz et al., 2005).

#### 2.4.1 Novos alvos terapêuticos

Adicionalmente, um estudo mostrou que o miltefosine atua a nível do hospedeiro ao estimular a expressão da enzima óxido nítrico-sintetase induzível, que catalisa a geração de óxido nítrico, o qual na presença de superóxido, também produzido no ambiente inflamatório celular, forma o potente oxidante peroxinitrito capaz de oxidar as biomoléculas do parasita dentro do fagolisossomo (Wadhone et al., 2009). Os efeitos adversos mais comuns do miltefosine são vômitos, diarreia, aumento das transaminases hepáticas, uremia e creatininemia (Fischer et al., 2001; Oliveira et al., 2011).

Os fármacos disponíveis para o tratamento da leishmaniose apresentam problemas como a toxicidade e resistência do parasita (Ullman et al., 1989; Grögl et al., 1992; Lira et al., 1999), o que limita a utilização e eficácia deles. Além disso, os fármacos disponíveis são utilizados apenas por administração parenteral, o que contribui com a baixa adesão ao tratamento. Dessa forma, é muito importante a colaboração do paciente no sentido de permitir que o tratamento seja realizado da forma mais correta possível (Amato, 1998).

Inúmeras substâncias já foram testadas como quimioterápicos leishmanicidas, sendo que a maior parte delas estão direcionadas à inibição de vias metabólicas vitais e específicas do parasita. Assim, para a utilização de novos quimioterápicos em humanos, faz-se necessária prévia avaliação desses compostos *in vitro* e *in vivo* (Soares-Bezerra et al., 2004). As enzimas proteases e purinas nucleotídeos, e as vias do ergosterol, do óxido nítrico sintase, da fumarato hidratase e das poliaminas são reconhecidamente importantes para sobrevivência e manutenção do parasito no hospedeiro (Mottram et al., 2004; Castilho, 2004; Sabino, 2012).

As proteases de *Leishmania* (cisteíno-proteases, pepstatina, 1,10 fenantrolina, antipaína, leupeptina, TLCK) participam de inúmeros processos nos parasitas em geral, que incluem a invasão ao hospedeiro, identificação dos aminoácidos como fonte nutricional ou síntese proteica, metabolismo de proteínas ou peptídeos biologicamente ativos, diferenciação, evasão ao sistema imune do hospedeiro e resistência do parasita à terapia medicamentosa (McKerrow et al., 2006). Dentre essas, as cisteíno-proteases de *Leishmania* estão presentes em grandes quantidades nos lisossomos de amastigotas, embora também sejam encontradas em outros compartimentos intracelulares (Ueda-Nakamura et al., 2001). Estas enzimas foram consideradas alvos quimioterápicos muito atrativos para tratamento das leishmanioses, pois desempenham importantes funções na *Leishmania* como virulência, conservação da viabilidade e da morfologia do parasito, invasão do sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro e a modulação de sua resposta imune (Mottram et al., 2004; Selzer et al., 1999). Contudo, a inibição

de proteases também tem sido relacionada com a toxicidade em células hospedeiras, o que limitou os estudos posteriores (Silva-López, 2010).

Os purino nucleotídeos podem ser sintetizados nos mamíferos, a partir de duas vias, a síntese *de novo* e a via de recuperação (Castilho, 2004). Os protozoários são seres auxotróficos para purino-nucleotídeos, ou seja, eles não produzem estes compostos que são cruciais para a sua sobrevivência. Por essa razão, cada parasita possui um conjunto específico de enzimas que os permitem utilizar as purinas pré-formadas pelo hospedeiro (Berens et. al., 1995; Hassan et. al., 1986). No caso do gênero *Leishmania*, existem três enzimas capazes de converter purinas e 5-fosforibosil-1-pirofosfato (PRPP) em nucleosídeo-5-monofosfato e pirofosfato: adenina-fosforibosiltransferase (APRT), hipoxantina-guanina-fosforibosiltransferase (HGPRT) e xantina-fosforibosiltransferase (XPRT). Assim, a utilização dessa via metabólica como alvo terapêutico depende da caracterização das três PRTases envolvidas (Castilho, 2004).

O ergosterol é um esteroide análogo ao colesterol, que está presente em concentrações relativamente altas apenas na membrana plasmática da *Leishmania*. A síntese desse lipídeo envolve a desmetilação do C-14 do lanosterol, por meio de uma isoenzima do complexo citocromo P-450, a CYP51 (Aoyama, 2005). Os parasitas do gênero *Leishmania* sintetizam esteroides específicos e indispensáveis para o crescimento e viabilidade celular. No entanto, existem algumas enzimas que são indispensáveis à síntese do ergosterol, que podem ser inibidas ou reguladas por fármacos, como os compostos azólicos cetoconazol e itraconazol. Entretanto, a resposta clínica frente ao tratamento com essa classe de fármacos depende do tipo de *Leishmania* (Soares-Bezerra, 2004).

A fumarato hidratase (FH) é uma enzima responsável por inibir o ciclo TCA, interferindo assim na via metabólica de síntese de nucleotídeos de pirimidina (Feliciano et al., 2006). Ela constitui um alvo promissor na estratégia de planejamento de substâncias com atividade antileishmania, pois sua inibição afeta o balanço redox em mitocôndrias da *Leishmania*. Além disso, a nitrosação de proteínas de *L. infantum* é essencial para a infecção e diferenciação do parasita, sugerindo que esta enzima exerce um papel essencial no desenvolvimento do parasita (Sabino, 2012). Dessa forma, a inibição dessas reações é uma alternativa terapêutica viável para a inibição do parasita.

A via das poliaminas se constitui uma via enzimática importante em *Leishmania* porque desempenham um papel crucial na proliferação, diferenciação e síntese de macromoléculas na *Leishmania* (Birkholtz et al., 2011). A arginase é uma metaloenzima que catalisa a hidrólise da L-arginina a L-ornitina e uréia, sendo que a ornitina é precursor de compostos da via das poliaminas incluindo a espermidina (Silva & Floeter-Winter, 2014). A espermidina é substrato

da enzima tripanotona sintetase que condensa este composto com glutatona gerando a tripanotona. A tripanotona é utilizada pela enzima tripanotona redutase na redução radicais livres e oxidantes produzidos na mitocôndria do parasita e pelos macrófagos do hospedeiro (Fairlamb & Cerami, 1992; Bocedi et al., 2010). O nocaute do gene da arginase em *Leishmania* ou a inibição química da enzima demonstrou que ela é crucial para a sobrevivência do parasita (Roberts et al., 2004), sendo um alvo em potencial para o tratamento de leishmanioses e ainda pouco explorado (Manjolin et al., 2013).

## 2.5 INFECÇÕES BACTERIANAS

As doenças infecciosas constituem um problema de saúde pública, pois o tratamento tem se tornado cada vez mais difícil devido ao aumento dos casos de resistência bacteriana, além dos custos para o sistema público de saúde, que também aumentaram (Casadeval, 1996; Sampaio et al., 2013). Atualmente, alguns desses microorganismos como *Staphylococcus aureus* meticilina-resistente, *S. aureus* vancomicina-resistente, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* têm sido associados à alta letalidade e altos custos de tratamento, onerando os sistemas de saúde (Demain & Sanchez, 2009; Nishaminy, 2006).

O surgimento e a disseminação de microorganismos resistentes aos antibióticos convencionais promoveram a busca por novos fármacos com atividade antibacteriana (Mendes et al., 2011; Ferronato et al., 2007). Atualmente, as taxas de infecções por bactérias Gram-negativas resistentes à maioria dos antimicrobianos utilizados comumente na prática clínica aumentaram com grande rapidez, restringindo cada vez mais as opções terapêuticas. Associado a esse fato, a indústria farmacêutica não desenvolveu nos últimos anos novos antimicrobianos com mecanismos de ação diferentes, para os quais as bactérias ainda não tenham desenvolvido mecanismo de resistência (Guimarães et al., 2010).

Diversas espécies de plantas têm demonstrado potencial antimicrobiano ou mesmo conterem substâncias capazes de modular a ação dos antibióticos (Matias et al., 2010). De fato, estudos com extratos, frações e compostos isolados de Sapotaceae, Piperaceae, Euforbiaceae, Convolvulaceae, Verbenaceae, Myrtaceae, Lauraceae, Rutaceae, Cucurbitaceae, dentre outras, já foram investigadas nesse sentido (Matias et al., 2010; Lôbo et al., 2010; Castro, 2010; Sousa et al., 2011; Mendes et al., 2011; Leandro et al., 2013).

De acordo com alguns autores, taninos e flavonoides podem conferir atividade antimicrobiana a uma determinada planta (Scalbert, 1991; Harbone, 2000; Veluri et al., 2004; Bylka et al., 2004). Uma pesquisa realizada por Matias et al. (2010) mostrou que compostos

como taninos, flavonoides e terpenos presentes nas plantas *Croton campestris* A., *Ocimum gratissimum* L. e *Cordia Verbenaceae* DC demonstraram atividade antibacteriana. Aliado a isso, um trabalho realizado por Leandro et al. (2013) mostrou que o extrato hexânico do caule da planta *Sideroxylon obtusifolium* (Sapotaceae) mostraram atividade contra cepas bacterianas multirresistentes e que o extrato metanólico em associação com a amicacina mostrou efeito modulatório contra as cepas de *P. aeruginosa*. Pesquisas realizadas no ano de 1993 já mostravam que mono e sesquiterpenos, principais componentes dos óleos essenciais, e as proantocianidinas e leucoantocianidinas também eram ativos contra bactérias (Ahamd et al., 1993).

A capacidade dos produtos naturais em atuar sinergisticamente com os antibacterianos clássicos pode ser devido a capacidade dos metabólitos secundários de plantas em reverter a resistência microbiana quando elimina plasmídios ou inibe a bomba de efluxo. (Coutinho et al., 2009; Coutinho et al., 2010; Matias et al., 2010b). Além disso, os agentes que perturbam a parede celular ou a membrana celular ou interferem com enzimas bacterianas essenciais são potencialmente bactericidas enquanto os agentes que inibem a função dos ribossomos e a síntese de proteínas tendem a ser bacteriostáticos (French, 2006).

A CIM de um agente para um dado organismo é a concentração mais baixa do composto necessário para inibir o crescimento de um inóculo da bactéria. O CBM é a concentração mínima do composto que mata o inóculo e pode ser determinada pela inoculação da bactéria pré-tratada com o produto-teste em meio de ágar sem antibióticos. A CBM é a quantidade mínima de antibiótico que resulta numa diminuição  $\geq 99,9\%$  no inóculo inicial dentro de 24 h num teste padrão. Um agente é geralmente considerado como bactericida se o CBM não é mais do que quatro vezes o CIM e considerado como bacteriostático se o CMB for quarenta vezes maior que o CIM (French et al., 2006). No entanto, uma informação importante é que os testes de CBM estão sujeitas a variações técnicas e têm limitações (Pankey e Sabath, 2004; Pfaller et al., 2004; Levison, 2004). As determinações de CBM são normalmente realizadas contra culturas em fase de crescimento logarítmico. Em infecções clínicas, por exemplo, os organismos podem crescer mais lentamente e nestas condições a atividade bactericida de alguns agentes pode ser reduzida ou perdida (Kim e Anthony, 1981; Eng et al., 1991).

## 2.6 ESTRESSE REDOX E DOENÇAS RELACIONADAS

Os radicais livres são compostos químicos produzidos a partir de inúmeros processos metabólicos e apresentam elétrons desemparelhados no último orbital eletrônico (Souza et al., 2007) como, por exemplo, os radicais hidroxil ( $\text{HO}^\bullet$ ), peroxil ( $\text{ROO}^\bullet$ ) e o ânion superóxido ( $\text{O}_2^\bullet$ ). Já os oxidantes são quaisquer espécies capazes de abstrair elétrons de outra molécula de forma a provocar a oxidação da mesma, como o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), ácido hipocloroso ( $\text{HOCl}$ ) e peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ). De forma geral, tanto os radicais livres quanto os oxidantes são genericamente chamadas de espécies reativas de oxigênio (ROS), independentemente de suas características químicas e reatividade (Halliwell, 2007; Augusto, 2006).

A geração de ROS é caracterizada por um processo contínuo e fisiológico em sistemas biológicos, cuja taxa produção, em proporções adequadas, possibilita a geração de ATP, fertilização do óvulo, ativação de diversos genes e participação em mecanismos de defesa durante a resposta imunológica. No entanto, a produção excessiva dessas espécies pode causar dano irreversível às biomoléculas e eventualmente levar às doenças degenerativas, câncer, doenças cardiovasculares, catarata, imunossupressão, disfunções cerebrais e mesmo envelhecimento (Shami e Moreira, 2004; Atoui et al., 2005; Banerjee et al., 2005; Barreiros et al., 2006; Shukla et al., 2009; Santos et al., 2010).

Os antioxidantes são substâncias que previnem ou retardam a oxidação de moléculas ao inibirem a iniciação ou a propagação da reação de oxidação em cadeia. A geração de radicais livres, fisiológica ou não, é equilibrada pela ação dos antioxidantes endógenos e exógenos (Ouet al., 2002). Os endógenos, ou seja, aqueles produzidos pelo próprio organismo, são classificados em enzimáticos (superóxido dismutase citoplasmática e mitocondrial, catalase, glutathione peroxidase, glutathione redutase) e não enzimáticos (glutathione, ácido lipóico, albumina, ubiquinona, metalotioneínas, transferrina, ceruloplasmina). Já os exógenos ou dietéticos são adquiridos por meio da ingestão alimentar (ácido ascórbico, tocoferol, carotenóides, compostos fenólicos, zinco, cobre, selênio e magnésio). Estes antioxidantes conjuntamente promovem reciclagem e reações de regeneração que otimizam a proteção contra os radicais livres. As plantas são ricas em metabólitos secundários, constituindo uma fonte rica de antioxidantes (Shahidi e Ho, 2007; Halliwell, 2007).

Os flavonoides, taninos e outras substâncias fenólicas possuem atividade antioxidante ao atuarem como sequestradores de radicais livres, agentes redutores, citoprotetores, inibidores de enzimas, como quelantes de metais, reparadores de danos moleculares ou mesmo indutores da expressão de genes citoprotetores (Velioglu et al., 1998; Wang e Lin, 2000; Quettier-Deleu et al., 2000; Bianchi e Antunes, 1999; Cerqueira et al., 2007). Alimentos como frutas, verduras

e legumes também contêm agentes antioxidantes, tais como as vitaminas C, E e A, a clorofilina, carotenoides, curcumina e outros que são capazes de restringir a propagação das reações em cadeia e as lesões induzidas pelos radicais livres e oxidantes (Stavric, 1994; Fotsis et al., 1997; Pool-Zobel et al., 1997). De acordo com Sánchez-Moreno (2002), existem inúmeros métodos para avaliar a atividade antioxidante *in vitro* de substâncias biologicamente ativas. As metodologias mais comuns para se determinar a atividade antioxidante de modo prático, rápido e sensível são as que envolvem o uso de um radical cromóforo que simula as espécies reativas de oxigênio, que incluem  $\bullet$ DPPH e  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  (Arnao et al., 2000).

O radical livre  $\bullet$ DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazila) é um cromóforo estável, com um pico de absorção no comprimento de onda de 517 nm, em meio etanólico, apresentando coloração violeta intensa (Blois; 1958; Arnao et al., 2000). Quando este radical sofre redução pelos componentes presentes na solução teste, observa-se mudança da coloração da solução original de violeta intensa para amarela, proporcional à concentração da substância com potencial antioxidante presente, em conformidade com as leis de Lambert e Beer, podendo ser medida espectrometricamente a 517 nm (Blois, 1958). Essa metodologia é limitada pelo fato de em concentrações únicas de antioxidantes não podem ser quantificadas com DPPH. Além disso, as reações de DPPH são altamente sensíveis ao ambiente reacional, visto que o solvente utilizado liga átomos de H, inibindo sua ligação ao antioxidante (Schaich & Xie, 2015).

Outro método utilizado para medir a atividade antioxidante é o da captura do radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico –  $\text{ABTS}^{\bullet+}$ ), que pode ser gerado através de uma reação química, eletroquímica ou enzimática. Com essa metodologia, pode-se medir a atividade de compostos de natureza hidrofílica e lipofílica (Kuskoski et al, 2005). Na presença de antioxidantes doadores de hidrogênio, mede-se a diminuição da formação deste radical por espectrofotometria (Silva et al, 1999). Esse radical pode reagir de forma enérgica com compostos doadores de hidrogênio, como compostos fenólicos, sendo convertido em ABTS, incolor. O resultado da determinação da capacidade antioxidante equivalente ao trolox é dependente do tempo de incubação e da taxa da amostra quantificada (Evans et al, 1996). Esta dependência somada a pouca seletividade do radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  na reação com átomos doadores de hidrogênio constituem a limitação desse método (Campos, 1997).

O método de co-oxidação do  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico também tem sido amplamente utilizado para avaliar a atividade antioxidante de substâncias de extratos vegetais, frutas e bebidas. Este sistema permite avaliar a capacidade de uma determinada substância prevenir a oxidação do  $\beta$ -caroteno, protegendo-o dos radicais livres gerados durante a peroxidação do

ácido linoleico. A reação pode ser monitorada espectrofotometricamente pela perda da coloração do  $\beta$ -caroteno em 470 nm por um tempo total de 2 h. Neste método, o Tween-40 é utilizado como emulsificante e ajuda a dissolver completamente a mistura  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico em clorofórmio que, após total remoção do solvente, é dissolvida em água previamente saturada com oxigênio atmosférico. O resultado pode ser comparado com padrões sintéticos, como BHA, BHT e trolox, ou naturais, como ácido gálico ou quercetina (David et al., 2010).

## 2.7 CÂNCER

O câncer é um conjunto de doenças caracterizadas pelo crescimento descontrolado de células anormais, capazes de se espalharem e invadir tecidos e órgãos vizinhos. A proliferação excessiva dessas células provoca a formação de tumores, os quais exercem efeitos lesivos no indivíduo (INCA, 2011; American Cancer Society, 2013). O processo de malignização ocorre mediante a transformação de proto-oncogenes, que normalmente atuam no controle da divisão celular, apoptose e diferenciação celular, em oncogenes, que são capazes de promover modificações que determinam o caráter de malignidade às células neoplásicas (Rang et al., 2012).

O câncer é uma doença com elevado índice de mortalidade, que atinge anualmente milhões de pessoas em todo o mundo e estes números aumentam progressivamente. O tratamento do câncer envolve três abordagens terapêuticas, que são a quimioterapia, a radioterapia e a excisão cirúrgica, além de outras modalidades como imunoterapia e hormonioterapia, podendo ser combinados ou não (INCA, 2011). No entanto, embora tenha ocorrido progresso na terapia, muitos tumores ainda são de difícil remissão (Riva et al., 2012). Diante disso, a descoberta de fármacos antineoplásicos de fácil administração e com poucos ou efeitos colaterais é uma das principais metas buscadas pelos pesquisadores da área (Costa-Lotufo et al., 2010).

Sendo assim, as plantas são consideradas como uma fonte efetiva de compostos antitumorais. Os alcaloides da vinca, vinblastina e vincristina, por exemplo, são referências no desenvolvimento de medicamentos anticancerígenos. O paclitaxel (Taxol®), isolado da *Taxus brevifolia* Nutt. (Taxaceae), possui ação efetiva contra o câncer de mama, de ovário e de pulmão. O camptotecina isolado da *Camptotheca acuminata* Decne (Nyssaceae), apesar de entrar em desuso por causa da toxicidade apresentada na bexiga, contribuiu para o



desenvolvimento do topotecano, utilizado no tratamento do câncer do pulmão e de ovário, e irinotecano no câncer de colo-retal (Cragg & Newman, 2005).

Um dos biomas brasileiros cuja triagem de compostos de plantas endêmicas que tem apresentado elevado número de moléculas ativas contra o câncer é a caatinga. Estudos têm relatado atividade citotóxica significativa de diversas espécies utilizadas pela medicina popular dessa região, como *Tabebuia avellandae* que foi o primeiro extrato com atividade antitumoral comprovada experimentalmente (Moraes et al., 1997; Pessoa et al., 2006). Além disso, a família Sapotaceae também foi descrita como detentora de atividade antitumoral, conforme apontado por Fernandes et al. (2013), que mostraram que o triterpeno beta-amirina isolado de *M. subsericea* foi citotóxico contra células de tumor ovariano.



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

Genética, Biodiversidade e Conservação

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Determinar a atividade farmacológica e a composição fitoquímica preliminar de extrato e frações do caule de *Manilkara rufula*;

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar o extrato etanólico do caule de *M. rufula* e fracioná-lo por cromatografia em coluna;
- Determinar a concentração de fenólicos no extrato e frações do caule de *M. rufula*;
- Avaliar a capacidade antioxidante de *M. rufula* pelas metodologias *in vitro* de captação dos radicais livres \*DPPH, ABTS\*<sup>+</sup> e sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico;
- Avaliar a atividade antioxidante e citoprotetora de *M. rufula* em modelo celular;
- Avaliar a atividade antiproliferativa do extrato etanólico do caule de *M. rufula* sob linhagens tumorais *in vitro*;
- Avaliar a atividade antibacteriana de *M. rufula* sobre as bactérias *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *E. coli* e *P. mirabilis*;
- Avaliar o efeito do extrato e frações de *M. rufula* sobre a atividade *in vitro* da enzima arginase de *L. amazonensis*;
- Investigar a atividade leishmanicida e tripanocida de extrato e frações de *M. rufula* sobre macrófagos infectados por *L. amazonensis* e *T. cruzi*;
- Determinar o perfil fitoquímico preliminar de *M. rufula* por métodos qualitativos de fitoquímica clássica, espectroscopia de infravermelho, LC-MS/MS e CG-MS.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA

As cascas dos caules da planta *M. rufula* foram coletadas no município de Maracás (13°26'27"S 40°25'51"O), no estado da Bahia, Brasil, no mês de julho de 2015. A planta foi enviada para identificação botânica e uma excisada da planta foi depositada no Herbário da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (HUESB) sob o código 12.455, a fim de garantir a autenticidade da planta coletada (Figura 4). A coleta foi aprovada pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético sob número 010557/2015-6.



**Figura 4.** Excisada da planta *M. rufula*.

### 4.2 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

#### 4.2.1 Obtenção dos extratos brutos

As cascas dos caules foram secas em estufa com circulação de ar a 40°C. Em seguida, elas foram fragmentadas manualmente e submetidos à exaustiva extração, à frio, por maceração

com álcool etílico a 95% (PA, Synth). As soluções extrativas foram recuperadas por filtração e concentradas em rotaevaporador a 40°C e pressão reduzida. Esse procedimento foi realizado por três vezes. O extrato bruto etanólico (EEMR) obtido da casca do caule da planta *M. rufula* (2,7 Kg), correspondeu a 23,3% em massa das cascas dos caules secos.

#### 4.2.2 Obtenção das frações

EEMR (50 g) foi solubilizado em metanol e submetido ao fracionamento em coluna de sílica gel para obtenção das frações hexânica (FHMR), acetato de etila (FAEMR), metanólica (FMMR) e hidroalcolólica (FHAMR) (Kuroshima et al., 2002; Silva et al. 2014). O rendimento das frações foram 21,0, 20,7, 45,1 e 6,3%, respectivamente. Os solventes foram adquiridos da Synth.

#### 4.3 QUANTIFICAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS

A concentração total de compostos redutores, incluindo fenólicos, presentes nas amostras foi determinada pelo ensaio espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu (Singleton et al. 1992). Extrato e frações foram diluídos nos respectivos solventes para uma concentração final de 1 mg/mL. Uma alíquota de 125 µL de extrato e frações foi misturada com 125 µL do reagente de Folin-Ciocalteu e 1 mL de água destilada. Após 3 min, 125 µL da solução saturada de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> foi adicionada e a mistura reacional foi incubada por 30 min a 37°C. Ao final da incubação, a absorbância da amostra foi medida no espectrofotômetro a 750 nm. Uma curva padrão de ácido gálico (0,5 a 25 µg) foi construída para quantificação dos fenólicos totais nas amostras ( $y = 0,066x + 0,0651$ ,  $R^2 = 0,9805$ ), os quais foram expressos em µg equivalentes de ácido gálico por miligramas de amostra (µg EAG/mg).

#### 4.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A atividade antioxidante do extrato e frações da casca do caule de *M. rufula* foi avaliada utilizando os métodos de sequestro do •DPPH, de redução do radical ABTS•<sup>+</sup> e do sistema β-caroteno/ácido linoleico.

No ensaio de •DPPH, as amostras (1,25 a 150 µg/mL) foram incubadas com uma solução etanólica de •DPPH (70 µM) num volume final de 2 mL. Após 20 min a 25 °C, a absorbância

da solução foi medida em 517 nm (Brand-Wiliams et al. 1995, Duarte-Almeida et al. 2006). Na metodologia do ABTS<sup>•+</sup>, inicialmente foi preparado o cátion radical do ABTS<sup>•+</sup> por meio da reação da solução de ABTS (7 mM) com persulfato de potássio (2,45 mM) durante 16 h à temperatura ambiente e protegido da luz. A solução ABTS<sup>•+</sup> estoque foi diluída com etanol para absorvância de 0,7 a 734 nm e incubada com as amostras (1,25 a 150 µg/mL) em um volume final de 2 mL. A absorvância foi medida a 734 nm após 7 min de reação (Re et al. 1999, Rufino et al., 2007). Em ambos experimentos, os valores foram expressos como a concentração da amostra necessária para reduzir 50% dos radicais livres (IC<sub>50</sub>), após ajuste hiperbólico dos dados.

No ensaio de co-oxidação do β-caroteno/ácido linoleico, preparou-se inicialmente uma emulsão contendo 50 µL de ácido linoleico, 530 µL de Tween 40, 10 µL da solução β-caroteno (20 mg/mL) e 1 mL de clorofórmio. Após homogeneização, o clorofórmio foi rotaevaporado e água destilada aerada foi adicionada à mistura até uma absorvância inicial de 0,65 a 470 nm. As amostras (1,25 a 150 µg/mL) foram misturadas a 1,5 mL da solução sistema β-caroteno/ácido linoleico e incubadas a 50°C. A absorvância (λ = 470 nm) da mistura reacional foi determinada imediatamente e após 2 h de incubação (Marco 1968, Miller, 1971). Os resultados expressos como IC<sub>50</sub> foi determinado após ajuste hiperbólico dos dados.

Ácido gálico foi utilizado como controle positivo nos testes de •DPPH e ABTS<sup>•+</sup>, enquanto trolox no ensaio de peroxidação lipídica.

#### 4.5 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR

As células THP-1 (monócitos de leucemia humana) foram cultivadas em meio RPMI-1640 com 10% de soro fetal bovino (Interlab), penicilina (100 U/mL, Sigma-Aldrich), estreptomicina (100 µg/mL, Sigma-Aldrich) e β-mercaptoetanol (0,05 mM, Sigma-Aldrich) a 37°C em atmosfera de CO<sub>2</sub> (5%). Os monócitos de THP-1 (2x10<sup>6</sup>/mL) diferenciaram-se em macrófagos com suplementação do meio com forbol-12-miristato-13-acetato (PMA, 5 ng/mL, Sigma-Aldrich) e incubados durante 2 dias a 37°C sob CO<sub>2</sub> (5%). As células aderidas foram coletadas por tripsinização (Park et al. 2007).

A viabilidade celular foi determinada pelo método de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo difeniltetrazólio (MTT, Sigma-Aldrich), que permite avaliar a atividade mitocondrial em células viáveis (Hansen et al. 1989). As células (1x10<sup>5</sup>/poço) foram transferidas para placas de 96 poços e pré-incubadas com as amostras de *M. rufula* (10, 50 e 100 µg/mL) a 37°C durante

24 h. O MTT foi adicionado (0,25 mg/mL) ao meio e as células foram incubadas a 37°C e após 3 h, foi medida a absorbância em leitor de microplacas a 570 nm. A atividade metabólica residual das células foi calculada como porcentagem em relação ao controle negativo. Triton X-100 (1%, Sigma-Aldrich) foi utilizado como controle positivo.

#### 4.6 ATIVIDADE CITOPROTETORA

Os macrófagos derivados de THP-1 ( $1 \times 10^5$ /poço) foram transferidos para uma placa de 96 poços e pré-incubados a 37°C com extrato e frações de *M. rufula* (50 µg/mL). Após 24 h, as células foram lavadas duas vezes em tampão de fosfato salino (PBS, Sigma-Aldrich). O meio foi trocado e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mM) foi adicionado. Após incubação por 18 h a 37°C, a viabilidade celular residual foi determinada pelo método do MTT. Etanol (5%) e tempol (10 µM) foram utilizados como controles negativo e positivo, respectivamente. A atividade metabólica residual foi calculada conforme acima. (Hansen et al. 1989, Pereira et al. 2017).

#### 4.7 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM MODELO CELULAR

Os macrófagos derivados de THP-1 ( $1 \times 10^5$ /poço) foram plaqueados e pré-incubados com extrato e frações da casca do caule de *M. rufula* (50 µg/mL) por 24 h e re-incubados com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mM) por 30 min. Em seguida, as células foram lavadas com PBS e incubadas com diacetato de 2', 7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA, 10 µM, Sigma-Aldrich) por 1 h a 37 °C no escuro. As células foram lavadas novamente com PBS para retirar o excesso de DCFH-DA extracelular. A oxidação de DCFH foi monitorada por fluorescência ( $\lambda_{ex} = 485$  nm;  $\lambda_{em} = 520$  nm) em um leitor de microplacas, sendo que o sinal de fluorescência indica o estado redox intracelular. Etanol (5%) e tempol (10 µM) como controles negativo e positivo, respectivamente (Pereira et al. 2017).

#### 4.8 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Bactericida Mínima (CBM) do extrato e frações da casca do caule de *M. rufula* frente as bactérias *S. aureus* ATCC 29213, *K. pneumoniae* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* ATCC 25922 e *P. mirabilis* ATCC 17407 foram determinados pelo método de microdiluição em caldo (CLSI 2006, Santos et al. 2017).

Após expansão das bactérias em caldo nutriente (Difco) por 24 h a 37 °C, elas foram diluídas em caldo nutriente para  $10^5$  UFC/mL e incubadas com as amostras (25, 50, 100, 250, 500 e 1000 µg/mL) por 24 h a 37 °C. Após esse período, resazurina (0,01%) foi adicionada à suspensão e o CIM foi determinado como sendo a menor concentração onde não houve crescimento bacteriano após 1 h, indicado pela coloração azul.

Para determinação do CBM, antes da adição da resazurina, 10 µL da suspensão bacteriana pré-incubada com o extrato ou frações foram inoculados por estriamento em placas contendo ágar Müller Hinton (Difco). O CBM foi definido como sendo a concentração a partir do CIM onde não houve crescimento de alguma colônia de bactéria após 24 h a 37 °C.

#### **4.9 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE EM LINHAGENS DE CÉLULAS TUMORAIS *in vitro***

As células tumorais utilizadas foram HepG2 (carcinoma hepatocelular humano) e HL-60 (leucemia promielocítica humana), doadas pelo Hospital A.C. Camargo, São Paulo, SP, Brasil. As células foram cultivadas no meio RPMI 1640 suplementados com 10% de soro bovino fetal, sendo mantidas em atmosfera de CO<sub>2</sub> (5%) a 37°C.

Em seguida, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços ( $0,3 \times 10^6$  células/mL para HL-60 e  $0,7 \times 10^5$  células/mL para HepG2) e após 24 h, as amostras solubilizadas em DMSO (50µg/mL, Synth) foram adicionados em cada poço e incubadas por 72 h. Quatro horas antes do final do período de incubação, a resazurina (0,312 mg/mL, Sigma-Aldrich) foi adicionada a cada poço e as absorbâncias foram mensuradas nos comprimentos de onda de 570 nm (reduzido) e 595 nm (oxidado) utilizando um leitor de placa (Ahmed et al. 1994, Rodrigues et al. 2015). Doxorrubicina (5 µg/mL) e DMSO foram utilizados como controles positivo e negativo, respectivamente. Os resultados foram expressos como Porcentagem de inibição da proliferação celular em linhagens de células tumorais.

#### **4.10 INIBIÇÃO DA ARGINASE DE *Leishmania***

O gene da enzima arginase de *L. amazonensis* foi clonado em vetor para expressão no organismo heterólogo *E. coli* [BL21(DE3)pLysS] a fim de possibilitar a produção e purificação da enzima em larga escala (Silva et al. 2008).

O extrato e as frações de *M. rufula* (3,13 a 100 µg/mL) foram incubados com a arginase de *L. amazonensis* em tampão CHES (ácido 2-(ciclohexilamino)etanossulfônico, 50 mM) e L-

arginina (50 mM) pH 9,5 por 15 min a 37 °C. A enzima converte arginina em L-ornitina e ureia. A ureia residual foi quantificada utilizando kit comercial (Labtest) baseado no ensaio colorimétrico enzimático de Berthelot (Fawcett & Scott 1960, Manjolin et al. 2013). Quercetina (50 µM) foi utilizada como controle positivo. Os resultados também foram expressos como IC<sub>50</sub>, após ajuste hiperbólico dos dados.

#### 4.11 ATIVIDADE LEISHMANICIDA EM AMASTIGOTAS DE *L. amazonensis*

Inicialmente, tioglicolato (3%) foi injetado na cavidade peritoneal de camundongos BALB/c para induzir inflamação e migração dos macrófagos para a região. Após 4 dias, os macrófagos foram coletados da cavidade peritoneal dos animais e o cultivo de macrófagos foi realizado conforme Gomes et al. (2003). Este procedimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA do Instituto Gonçalo Muniz/Fiocruz) sob o número 1126.

Resumidamente, as células foram recuperadas da cavidade peritoneal pela injeção de salina estéril, centrifugadas a 1500 rpm por 10 min a 4°C e ressuspensas em meio DMEM (Sigma-Aldrich). Após contagem em câmara de Neubauer, a cultura de macrófagos foi adicionada em placas de 96 poços (5x10<sup>4</sup>/poço) em meio DMEM e, após 16 h a 37°C sob atmosfera de CO<sub>2</sub> (5%), os poços foram lavados três vezes com salina para remover células não aderidas. Em seguida, os macrófagos foram incubados com promastigotas (2x10<sup>6</sup>/mL) de *L. amazonensis*. Após 48 h, as formas promastigotas que infectaram os macrófagos se diferenciaram em amastigotas.

Os macrófagos infectados foram incubados com extrato e frações (20 µg/mL) em meio DMEM por 72 h a 37°C. Os poços foram então lavados com solução salina, fixados com solução paraformaldeído 4% e corados com Draq5 (4 µM, Biostatus, Reino Unido), corante utilizado para marcar o DNA celular. Em seguida, a quantidade de amastigotas e macrófagos em cada poço foi contada no microscópio confocal Operetta High-Content Imaging System (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, EUA). Anfotericina B (1 µM) foi empregado como controle positivo (Chaves et al. 2009). O índice de infectividade do parasita foi determinado pela multiplicação do número médio de amastigotas por célula pela porcentagem de infecção. Em seguida, calculou-se a inibição desse índice em porcentagem.

#### 4.12 ATIVIDADE ANTI-*T. cruzi* EM AMASTIGOTAS DA CEPA Y DE *T. cruzi*



Os macrófagos murinos aderidos em placa ( $6 \times 10^3$ /poço) foram infectados com tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi* ( $6 \times 10^4$  tripomastigotas/poço) por 24 h. Em seguida, os poços foram lavados três vezes com salina estéril e células foram incubadas com o extrato e as frações (100  $\mu\text{g/mL}$ ) por 72 h a  $37^\circ\text{C}$  sob atmosfera de  $\text{CO}_2$  (5%) em meio DMEM. Os poços foram então lavados com solução salina, fixados com solução paraformaldeído 4% e corados com Draq5 (4  $\mu\text{M}$ , Biostatus, Reino Unido). A quantificação de amastigotas e macrófagos foi realizada no microscópio confocal Operetta High-Content Imaging System (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, EUA) e os dados foram expressos como acima. Benzonidazol (5  $\mu\text{M}$ ) foi utilizado como controle positivo (Bastos 2013).

#### 4.13 ESTUDO FITOQUÍMICO QUALITATIVO

Extrato e frações da casca do caule da planta *M. rufula* foram analisadas por cromatografia em camada delgada para identificação qualitativa de alcaloides e flavonoides, com reveladores específicos para cada classe. As amostras foram previamente solubilizadas em metanol, com exceção da fração hexânica, que foi solubilizada em clorofórmio. Em seguida, foram aplicadas em placas preparadas com sílica gel (fase estacionária) e eluídas em cuba de vidro contendo uma mistura acetato de etila:metanol (8:2, Synth). As placas foram observadas sob luz UV 254 nm e 365 nm e, em seguida, elas foram aspergidas com os reagentes NP-PEG (difetilboriloxietilamina a 1% em metanol, seguida de solução de polietilenoglicol 4000 a 5% em etanol) e Dragendorff para revelação de flavonoides e alcaloides, respectivamente (Wagner & Bladt, 2009).

A presença de triterpenos foi avaliada pelo método Liebermann-Burchard. Dessa forma, cerca de 2 mg do extrato e frações foram diluídos em 2 mL de clorofórmio (Synth). Em seguida, foi adicionado 4 mL de anidrido acético (Synth) e 4 gotas de ácido sulfúrico (PA, Synth). A presença de triterpenos é indicada pela mudança da cor azul para verde (Matos 1997).

#### 4.14 ESPECTROSCOPIA POR INFRAVERMELHO

As análises de infravermelho foram realizadas utilizando o espectrofotômetro Perkin Elmer modelo Spectrum Two ATR-FTIR, com acessório de refletância total atenuada horizontal empregando um cristal de seleneto de zinco. Os espectros foram obtidos por meio do espalhamento da amostra sobre a superfície do cristal de ATR. A cada análise, a cela foi

limpa com acetona (PA, Synth). Todos os espectros foram obtidos na região de 4000 a 500  $\text{cm}^{-1}$ , com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$  e 32 varreduras (Ruschel et al. 2014).

#### 4.15 LC-MS/MS

As análises cromatográficas das amostras foram realizadas na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (USP) utilizando um cromatógrafo UPLC da Shimadzu acoplado com um espectrômetro de massa da Amazon Speed ETD, com uma fonte de ionização por eletrospray (ESI) no modo negativo. A coluna utilizada foi Phenomenex Luna C-18 (250x4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) e as fases móveis foram água/ácido fórmico 0,1% (fase A) e acetonitrila/ácido fórmico 0,1% (fase B). O fluxo utilizado foi de 1 mL/min com um gradiente linear a partir de 0% de B e aumentando até 100% de B em 60 min, antes de se manter por 5 min, e depois retornando para as condições iniciais em 5 min com reequilíbrio da coluna por mais 5 min. A temperatura do forno foi 40°C. As condições ESI foram: capilar = 4500 V, gás de secagem = 7 L/min, pressão do nebulizador = 27 psi, temperatura de dessolvatação = 300°C, temperatura da fonte = 300°C, com aquisição de dados entre  $m/z$  50 e 1000. Os constituintes das amostras da casca do caule de *M. rufula* foram identificados pela comparação dos seus valores  $m/z$  e padrões de fragmentação com a literatura.

#### 4.16 CG-MS

A fração hexânica da casca do caule de *M. rufula* foi submetida as análise de CG-MS, em aparelho QP2020 da marca Shimadzu, usando coluna capilar de sílica fundida Rtx-5MS (difenil dimetil polisiloxano) de 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno, espessura do filme de 0,25  $\mu\text{m}$  e hélio como gás de arraste.

A temperatura do injetor foi de 280 °C com temperatura inicial de 60 °C por 1 min, aumentando de 60 °C a 280°C na razão de 10 °C/min, permanecendo nessa temperatura por 20 min. A temperatura final permaneceu em 280 °C por 43 min. A temperatura do detector e da interfacedo sistema foram de 280 °C. A identificação dos compostos foi realizada por meio da comparação dos espectros de massas das amostras com aqueles existentes no NIST versão 14.

#### 4.17 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão amostral de três experimentos independentes. Em seguida, foram analisados por ANOVA de uma via e Dunnet como pós-teste, utilizando o programa GRAPHPAD Prisma (5.0), com nível de significância de 5%. A correlação entre a atividade antioxidante, tripanocida e leishmanicida e o teor de fenólicos foram determinadas pelo teste de correlação de Pearson ( $p < 0,05$ ).

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As espécies do gênero *Manilkara* são conhecidas por conterem flavonoides, ácidos fenólicos, saponinas e triterpenos, os quais são associados com as propriedades farmacológicas, incluindo anti-inflamatória, antiparasitária, antitumoral, antibacteriana e antioxidante (Eskander et al., 2014; Eibond et al., 2004; Ma et al., 2003). Dentre os diferentes metabólitos, os compostos fenólicos são importantes devido ao potencial antioxidante inerente à molécula, sendo capazes de reduzir o dano ao tecido do hospedeiro durante o processo inflamatório e/ou oxidativo, característico de diversas doenças crônicas, como câncer, artrite, diabetes, aterosclerose, dentre outras (Sathyaprabha et al., 2011; Fernandes, 2010).

Por esse motivo, a concentração de fenólicos no extrato e frações da casca do caule de *M. rufula* foi determinada (Tabela 1). A fração FAEMR apresentou a maior concentração de fenólicos nas amostras (143,04  $\mu\text{g}$  EAG/mg), enquanto que a FHMR a menor concentração desses compostos (29,2  $\mu\text{g}$  EAG/mg), conforme esperado. A concentração de fenólicos encontrada aqui é bem mais alta que àquela descrita por Parikh e Patel (2016) no extrato metanólico do fruto de *M. hexandra* (8,1  $\mu\text{g}$  EAG/mg).

Em seguida, extratos e frações de *M. rufula* foram avaliados por três métodos antioxidantes distintos: sequestro dos radicais livres  $\bullet\text{DPPH}$  e  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  e inibição da peroxidação lipídica. Todas as amostras foram capazes de desativar os radicais  $\bullet\text{DPPH}$  e  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  e inibir a oxidação do  $\beta$ -caroteno pelos radicais de lipídeo (Tabela 1). A fração FMMR foi a mais potente em reduzir o radical  $\bullet\text{DPPH}$  ( $\text{IC}_{50} = 3,05 \mu\text{g/mL}$ ) comparado ao padrão de ácido gálico. Por sua vez, também foi a fração mais efetiva em inibir o decaimento do  $\beta$ -caroteno, sendo cerca de 20 vezes mais potente que o padrão trolox. No caso do método do  $\text{ABTS}^{\bullet+}$ , a fração hexânica inesperadamente reduziu o radical com  $\text{IC}_{50}$  de 0,12  $\mu\text{g/mL}$ , mas reagiu com  $\bullet\text{DPPH}$  em concentrações mais altas ( $\text{IC}_{50} = 59,70 \mu\text{g/mL}$ ). Apesar de não existirem estudos demonstrando a atividade antioxidante de *M. rufula*, investigações com *Sideroxylon obtusifolium*, da mesma família que *M. rufula*, demonstraram que o extrato etanólico dessa planta reduziu o radical  $\bullet\text{DPPH}$  com  $\text{IC}_{50}$  de 9,5  $\mu\text{g/mL}$  (Leite et al., 2015).

**Tabela 1.** Concentração de fenólicos e atividade antioxidante do extrato e frações do caule de *M. rufula*.

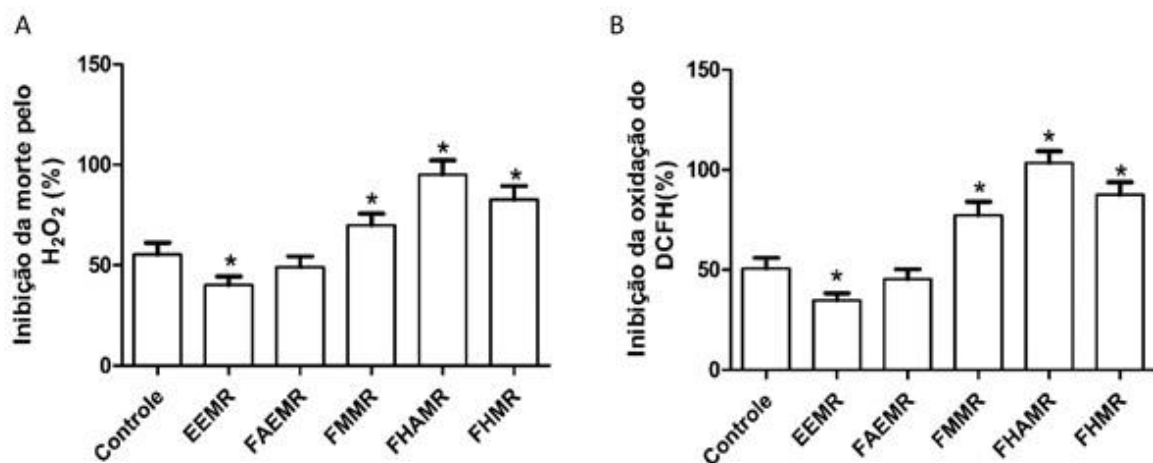
Amostra	Fenólicos totais ( $\mu\text{g EAG/mg}$ )	DPPH <sup>•</sup> IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )	ABTS <sup>•+</sup> IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )	$\beta$ -caroteno/ácido linoleico IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )
EEMR	42,56 $\pm$ 0,07	11,36 $\pm$ 1,02*	1,68 $\pm$ 0,04*	18,85 $\pm$ 1,20
FAEMR	143,04 $\pm$ 1,28	3,30 $\pm$ 0,02	0,87 $\pm$ 0,03	23,94 $\pm$ 1,04
FHAMR	112,06 $\pm$ 0,53	3,11 $\pm$ 0,04	1,72 $\pm$ 0,02*	29,19 $\pm$ 1,20
FMMR	96,95 $\pm$ 0,39	3,05 $\pm$ 0,01	1,67 $\pm$ 0,03*	1,08 $\pm$ 0,03*
FHMR	29,20 $\pm$ 0,33	59,70 $\pm$ 1,04*	0,12 $\pm$ 0,01*	15,97 $\pm$ 1,25
Ácido Gálico	-	1,45 $\pm$ 0,01	1,08 $\pm$ 0,04	-
Trolox	-	-	-	21,29 $\pm$ 1,99

EEMR: Extrato etanólico da casca do caule de *M. rufula*. FAEMR: Fração acetato de etila da casca do caule de *M. rufula*. FHAMR: Fração hidroalcoólica da casca do caule de *M. rufula*. FMMR: Fração metanólica da casca do caule de *M. rufula*. FHMR: Fração hexânica da casca do caule de *M. rufula*. Os valores expressos dos métodos antioxidantes referem-se a valores de IC<sub>50</sub>. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão (n=3). \*p<0,05, quando comparados com ácido gálico (<sup>•</sup>DPPH e ABTS<sup>•+</sup>) e trolox ( $\beta$ -caroteno/ácido linoleico) por ANOVA e pós teste de Dunnett.

Na comparação entre o teor de compostos redutores, entre eles os fenólicos, com a atividade antioxidante demonstrou-se que os resultados nos ensaios do <sup>•</sup>DPPH e ABTS<sup>•+</sup> não se correlacionam com a concentração desses na amostra (r=0,643 e p = 0,241 e r=0,645 e p = 0,239, respectivamente). Por outro lado, houve correlação entre esses compostos e o ensaio da co-oxidação do  $\beta$ -caroteno (r=-0,929 e p=0,022), o que indica aparentemente que os compostos fenólicos são importantes em reduzir a peroxidação lipídica do  $\beta$ -caroteno.

Adicionalmente, o extrato e as frações (50  $\mu\text{g/mL}$ ) da casca do caule de *M. rufula* foram eficazes em proteger as células THP-1 diferenciados em macrófagos contra a apoptose induzida pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> após incubação por 24 h (Figura 1A). Extrato e frações de *M. rufula* provavelmente contêm moléculas com atividade citoprotetora, particularmente a fração hidroalcoólica que protegeu as células em aproximadamente 95%. Em adição a isso, a inibição da oxidação intracelular do DCFH mediada pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nessas células expostas ao extrato e frações da planta (50  $\mu\text{g/mL}$ ) também foi maior para a fração hidroalcoólica (103%) (Figura 1B). Tempol (10

$\mu\text{M}$ ), um antioxidante bem reconhecido (Soule et al., 2007), reduziu a morte mediada por  $\text{H}_2\text{O}_2$  e o estresse redox intracelular em aproximadamente 50%. Provavelmente, o EEMR apresentou atividade citoprotetora e antioxidante em modelo celular inferior às frações devido a menor permeabilidade dos fitoquímicos através da membrana do macrófago. Um estudo recente com *Synsepalum dulcificum*, da família Sapotaceae, mostrou que o ácido oleoico, triterpeno natural presente nas espécies da família, também apresentou atividade citoprotetora ao induzir a expressão de enzimas antioxidantes via ativação do sistema Nrf2-Keap1 (Wang et al., 2010), fato que pode explicar os efeitos mediados pela *M. rufula* em nosso modelo.



**Figura 5.** Atividade citoprotetora (A) e antioxidante (B) do extrato e frações de *M. rufula* sobre monócitos de THP1. Extrato etanólico da casca do caule de *M. rufula* (EEMR), fração acetato de etila da casca do caule de *M. rufula* (FAEMR), fração hidroalcoólica da casca do caule de *M. rufula* (FHAMR), fração metanólica da casca do caule de *M. rufula* (FMMR) e fração hexânica da casca do caule de *M. rufula* (FHMR), na concentração de  $50 \mu\text{g/mL}$ , foram pré-incubados com células THP-1 por 24 h. As atividades citoprotetora (A) e antioxidante (B) foram determinadas conforme seção Material e métodos. A concentração de tempol (controle positivo) utilizada foi  $10 \mu\text{M}$  em ambos ensaios. \* $p < 0,05$ , quando comparados com controle por ANOVA e pós teste de Dunnett.

Importante salientar que mesmo sob concentrações de até  $100 \mu\text{g/mL}$  de extrato ou fração do caule de *M. rufula*, os macrófagos derivados de THP-1 permaneceram viáveis ( $> 90\%$ ). Na literatura, a fração acetato de etila da planta *Pouteria venosa*, da mesma família que a *M. rufula*, não apresentou toxicidade sobre macrófagos da linhagem J774 na concentração de  $200 \mu\text{g/mL}$  (Santos et al., 2015), que está de acordo com nossos resultados.

As doenças infecciosas são um grande problema de saúde pública, pois o tratamento tem se tornado cada vez mais difícil devido ao aumento dos casos de resistência bacteriana, ao passo que os custos para o sistema público de saúde também oneraram (Casadeval, 1996; Sampaio et al., 2013). Dentre os agentes causadores de infecções, destacam-se as bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e algumas enterobactérias como *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus* sp. por serem relacionadas com infecções nosocomiais graves e de elevada letalidade (Figueiredo et al., 2007; Santos et al., 2007; Von Baum & Marre, 2005). O uso de plantas medicinais pode ser considerado como alternativa ao tratamento de infecções causadas por esses microrganismos, como tem mostrado o resultado de pesquisas com diferentes espécies do gênero *Manilkara* (Nair & Chanda, 2008; Kothari & Seshadri, 2010).

Neste estudo, maior parte das frações da casca do caule de *M. rufula* mostraram algum potencial antibacteriano contra as cepas de bactérias gram positiva (*S. aureus*) e gram negativas (*P. mirabilis*, *P. aeruginosa*, *E. coli* e *K. pneumoniae*) testadas (Tabela 2). EEMR e FHMR não apresentaram qualquer atividade antibacteriana frente as bactérias testadas na concentração de até 1 mg/mL. De acordo com Holletz et al. (2002), EEMR pode ser então considerado inativo. FAEMR mostrou-se ativa contra *K. pneumoniae* (CIM=100 µg/mL e CBM=500 µg/mL), *S. aureus* (CIM=CBM=500 µg/mL) e *E. coli* (CIM=CBM=500 µg/mL). Por outro lado, FMMR agiu similarmente sobre *K. pneumoniae* e *E. coli* (CIM=CBM=50 µg/mL), sendo que essa fração foi a que apresentou menor CIM além de perfil bactericida (CBM/CIM≤4) (French et al., 2006).

**Tabela 2.** Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) do extrato e frações do caule de *M. rufula*.

Bactéria	EEMR		FAEMR		FHAMR		FMMR		FHEMR	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
<i>S. aureus</i>	a	a	500	500	a	a	a	a	a	a
<i>K. pneumoniae</i>	a	a	100	500	a	a	50	50	a	a
<i>P. aeruginosa</i>	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
<i>E. coli</i>	a	a	500	500	a	a	50	50	a	a
<i>P. mirabilis</i>	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a

EEMR: Extrato etanólico da casca do caule de *M. rufula*. FAEMR: Fração acetato de etila da casca do caule de *M. rufula*. FHAMR: Fração hidroalcoólica da casca do caule de *M. rufula*. FMEMR: Fração metanólica da casca do caule de *M. rufula*. FHEMR: Fração hexânica da casca do caule de *M. rufula*. (a): valores  $\geq 1000 \mu\text{g/mL}$ .

Uma pesquisa anterior realizada com o extrato metanólico de *M. rufula* demonstrou que essa planta foi bastante ineficaz contra *S. aureus*, *E. coli* e *K. pneumoniae* (CIM de 3,12 e 12,5 mg/mL, respectivamente) (de Souza, 2015). Em outro estudo Santos et al. (2015) demonstraram que o extrato etanólico do caule da planta *P. venosa* reduziu o crescimento bacteriano de *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *P. mirabilis* (CIM de 500, 1000 e 1000  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente). Em paralelo, a fração acetato de etila dessa planta foi a mais ativa e apresentou com CIM de 125  $\mu\text{g/mL}$  contra todas as bactérias. Embora no presente estudo a atividade antibacteriana de *M. rufula* não tenha sido inicialmente associada aos fenólicos, uma pesquisa com *Bumelia sartorum* (Sapotaceae) mostrou que a fração acetato de etila inibiu o crescimento de todas as bactérias testadas (CIM=256-512  $\mu\text{g/mL}$ ) devido ao alto teor de compostos dessa natureza (Ruela et al., 2011).

Estudos científicos e etnofarmacológicos também reportam o uso de plantas da família Sapotaceae no tratamento do câncer (Bhaumik et al., 2014; Khalek et al., 2015). Em consequência disso, a atividade antiproliferativa do extrato etanólico de *M. rufula* sobre células tumorais HepG2 (carcinoma hepatocelular humano) e HL-60 (leucemia promielocítica humana) foi investigada. O extrato na concentração de 50  $\mu\text{g/mL}$  apresentou baixa atividade antiproliferativa sobre ambas linhagens (14,2 e 17,9%, respectivamente), quando comparado com a doxorrubicina (90,3 e 95,0%, respectivamente). Dessa forma, as frações não foram



testadas, pois apenas extratos com atividade moderada (>70%) sobre a inibição da proliferação celular justifica estudos com frações, além de ser um método oneroso (Suffness & Pezzuto, 1990; Rodrigues et al., 2017).

A família Sapotaceae também contém espécies de plantas com relatos de atividade antiprotozoários, incluindo *Trypanosoma*, *Plasmodium* e *Trichomonas vaginalis* (Innocente et al., 2014; Silva et al., 2013; Vieira et al., 2016). Dentre os alvos possíveis em tripanossomatídeos, destaca-se a arginase. Trata-se de uma enzima que catalisa a hidrólise da L-arginina para L-ornitina e ureia em tripanossomatídeos como *Leishmania* sp. e *T. brucei*, mas não em *T. cruzi*, como também em mamíferos. A ornitina é um precursor da via das poliaminas e, portanto, envolvida em mecanismos relacionados à proliferação e sobrevivência celular, constituindo-se em um alvo importante para o tratamento de parasitoses como a leishmaniose (Silva et al., 2011; Birkholtz et al., 2011; Cruz, 2013).

Por esse motivo, extrato e frações de *M. rufula* foram também avaliados quanto a capacidade de inibir a enzima arginase de *Leishmania amazonensis*. O extrato etanólico e a fração acetato de etila apresentaram os menores valores de IC<sub>50</sub> (15,7 e 15,6 µg/mL, respectivamente) (Tabela 3). A quercetina foi empregada como padrão e inibiu a enzima com IC<sub>50</sub> de 1,0 µg/mL. Um estudo que objetivou relacionar a estrutura-atividade anti-arginase de flavonoides e seus análogos mostrou que a catequina, epicatequina e vitexina apresentavam IC<sub>50</sub> maior que 30 µg/mL e a quercetrina mostrou IC<sub>50</sub> de 17,7 µg/mL. Note-se que nossos resultados com frações foram inclusive melhores do que aqueles com os flavonoides isolados, o que sugere que o metabólito ativo deve estar solubilizado na fração e, possivelmente, em altas concentrações.

**Tabela 3.** Inibição da enzima arginase de *L. amazonensis* por extrato e frações do caule de *M. rufula*.

Amostra	IC <sub>50</sub> (µg/mL)
EEMR	15,7±1,0*
FAEMR	15,6±1,1*
FHAMR	29,4±1,4*
FMMR	26,1±1,2*
FHMR	>100,0*
Quercetina	1,0±0,1

EEMR: Extrato etanólico da casca do caule de *M. rufula*. FAEMR: Fração acetato de etila da casca do caule de *M. rufula*. FHAMR: Fração hidroalcolica da casca do caule de *M. rufula*. FMMR: Fração metanólica da casca do caule de *M. rufula*. FHMR: Fração hexânica da casca do caule de *M. rufula*. Os valores representam a média ± desvio padrão (n=3). \*p<0,05, quando comparados com quercetina por ANOVA e pós teste de Dunnett.

No caso de macrófagos infectados com amastigotas de *L. amazonensis*, o extrato etanólico e a fração hexânica reduziram menos sutilmente o índice de infectividade do parasita (4,10 e 6,9%, respectivamente) (Tabela 4). Por outro lado, FMMR, FHAMR e FAEMR reduziram mais acentuadamente a infectividade das amastigotas de *L. amazonensis* (21,4, 24,4 e 19,5%, respectivamente), o que nos leva a inferir que essas frações devem agir sobre outros alvos associados com a sobrevivência de *L. amazonensis* (Singh et al., 2012). O fato de EEMR ter inibido a arginase *in vitro*, mas não reduzir a infectividade de *Leishmania* em modelo celular, pode ser decorrente a menor permeabilidade dos fitoquímicos através das membranas ou ao metabolismo desses compostos pelo parasita/macrófago (Silva et al., 2012). Além do mais, não houve associação entre o efeito observado sobre amastigotas de *L. amazonensis* com a concentração de fenólicos nas amostras (r=0,862 e p=0,060), o que sugere que outros compostos devem ser responsáveis pela atividade leishmanicida.

Em seguida, extrato e frações de *M. rufula* foram também avaliados quanto ao potencial tripanocida *in vitro*. Os macrófagos infectados com a cepa Y de *T. cruzi* e tratados com FAEMR, FMMR, FHAMR e FHMR tiveram o índice de infectividade reduzido em 78,1; 53,9; 54,9; e 10,5%, respectivamente (Tabela 4). EEMR não reduziu a infecção por *T. cruzi*, pois possivelmente os componentes ativos estão diluídos no extrato bruto e foram concentrados apenas após fracionamento. Nesse caso, o teste da correlação entre a concentração de fenólicos

nas amostras com a atividade tripanocida indicou que esses compostos são potencialmente responsáveis pela morte das amastigotas de *T. cruzi* ( $r=0,972$  e  $p = 0,006$ ).

**Tabela 4.** Efeito do extratos e frações do caule de *M. rufula* sobre as formas amastigotas de *L. amazonensis* e da cepa Y de *T. cruzi*.

Amostra	Inibição (%)	
	<i>L. amazonensis</i>	<i>T. cruzi</i>
<b>EEMR</b>	4,1 0,1-8,1	-
<b>FAEMR</b>	19,5 18,5-20,4	78,1 76,2-77,6
<b>FMMR</b>	21,4 21,0-21,7	53,9 46,9-60,2
<b>FHAMR</b>	24,4 17,7-31,0	54,9 51,3-60,7
<b>FHMR</b>	6,9 4,6-9,1	10,5 6,8-13,0

EEMR: Extrato etanólico da casca do caule de *M. rufula*. FAEMR: Fração acetato de etila da casca do caule de *M. rufula*. FHAMR: Fração hidroalcolólica da casca do caule de *M. rufula*. FMMR: Fração metanólica da casca do caule de *M. rufula*. FHMR: Fração hexânica da casca do caule de *M. rufula*. (-): sem inibição. Os valores representam a média e os valores das replicatas do experimento. Os dados foram expressos em função da redução do índice de infectividade do parasita. A concentração da amostra foi de 20 e 100 µg/mL para os ensaios com *L. amazonensis* e *T. cruzi*, respectivamente.

Na literatura não há estudos específicos sobre as atividades leishmanicida e tripanocida de *M. rufula*. Todavia, há um estudo que demonstrou o efeito tricomonocida do extrato diclorometano das folhas e galhos desta planta (Vieira et al., 2016). O extrato aquoso das folhas

de *P. ramiflora* (Sapotaceae) foi capaz de matar as formas promastigostas de *L. amazonensis* *in vitro* (Silva e Castilhos, 2015). Cruz et al. (2010), descobriram que a orietina, um glicosídeo flavonoide, presente na folha de *Cecropia pachystachya* (Cecropiaceae) alterava o DNA mitocondrial de *L. amazonensis* além de inibir a arginase, reduzindo a proliferação do parasita. Além disso, os triterpenoides isolados do extrato diclorometano do pericarpo de frutos de *Omphalocarpum procerum* (Sapotaceae) levaram a morte de *T. cruzi*, *L. donovani*, *P. falciparum* e *T. brucei rhodesiense* em diferentes modelos celulares (Ngamgwe et al., 2014).

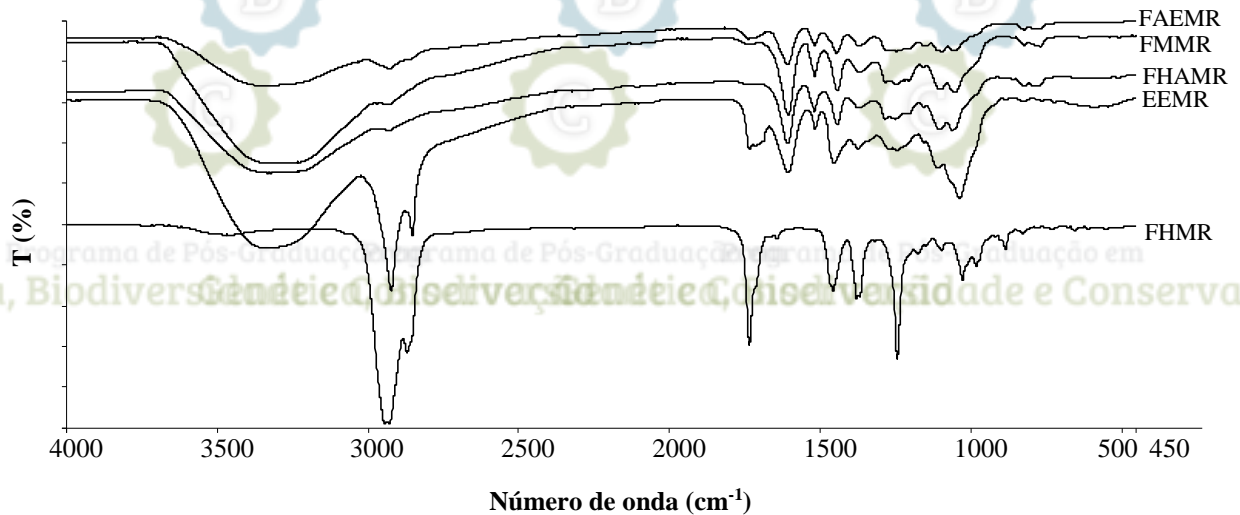
Em seguida, o perfil fitoquímico da casca do caule de *M. rufula* foi inicialmente analisado quanto à presença de triterpenos, alcaloides e flavonoides por alguns métodos de fitoquímica clássica. Os testes não demonstraram a presença desses compostos nas amostras, exceto para FHMR, cujo ensaio qualitativo de Liebermann-Burchard sugeriu a presença de triterpenos. Reconhecendo as limitações desses métodos (Simões et al., 1999), extrato e frações da planta foram também analisados por infravermelho com objetivo de identificar quais grupos funcionais estavam presentes e correlacioná-los com grupos comuns à família Sapotaceae, seguido da análise de LC-MS/MS.

O espectro no IV (Tabela 5 e Figura 6) da fração FHMR apresentou um perfil de compostos ricos em grupamentos  $\text{CH}_3$  e  $\text{CH}_2$  que juntamente com bandas  $\text{C}=\text{O}$  e  $\text{C}-\text{O}$  de ésteres indicam a presença de ésteres graxos e/ou terpenos, compostos comuns em frações de baixa polaridade de extratos de plantas. A análise de infravermelho não permite a distinção entre os grupos supracitados, todavia, considerando-se a análise qualitativa, pode-se afirmar que FHMR possui triterpenos. Já na fração FAEMR foi verificado uma diminuição relativa da intensidade das bandas relacionadas a ésteres graxos. Em contrapartida, verificou-se uma intensa banda de grupos  $\text{O}-\text{H}$  presentes em fenóis ou álcoois, além da presença de inúmeras bandas de ligação  $\text{C}-\text{O}$  na região de  $1020$  a  $1200\text{ cm}^{-1}$ , o que indica a presença de grupos glicosídicos. Já a análise dos espectros permitiu concluir que o perfil químico dos constituintes presentes na fração FHMR foi similar aos constituintes da fração FMHR, sendo observado uma banda intensa referente a grupos  $\text{O}-\text{H}$ , o que é condizente com a maior polaridade dessas frações, mas ausência de compostos com grupamentos  $\text{C}=\text{O}$  de ésteres e cetonas. Além disso, verificou-se que ambas frações possuíam grande número de bandas de estiramento de  $\text{C}-\text{O}$ , indicando a presença de grupos glicosídicos, além de uma banda de carbonila conjugada a anéis aromáticos, comuns em classes de compostos como flavonas ou ácidos aromáticos (Barbosa, 2013).

**Tabela 5.** Análise de Infravermelho do extrato e frações do caule de *M. rufula*.

Nº de Onda (cm <sup>-1</sup> )	Grupo Funcional	EEMR	FAEMR	FHAMR	FHMR	FMMR
3328,8	vO-H (Alcool ou Fenol)	XXX	XXX	XXX	-	XXX
3000-2800	vC <sub>sp3</sub> -H	XXX	XX	XX	XXX	XX
1733,9	vC=O (ester)	X	X	-	XX	-
1606,3	vC=O conjugado com aromático	XX	XX	XXX	-	XX
1516	vC=C (alqueno ou anel aromático)	X	X	X	-	X
1440 – 1480	δCH <sub>2</sub>	X	XX	XX	XX	XX
1370 – 1390	δCH <sub>3</sub>	X	-	X	XX	X
1243,3	vC-O (fenol)	X	XX	X	XX	X
1020 – 1200	vC-O (álcool)	XX	XX	XX	X	XX
700 – 850	C-H (anel aromático)	-	X	X	-	X

EEMR: Extrato etanólico da casca do caule de *M. rufula*. FAEMR: Fração acetato de etila da casca do caule de *M. rufula*. FHAMR: Fração hidroalcolica da casca do caule de *M. rufula*. FMEMR: Fração metanólica da casca do caule de *M. rufula*. FHMR: Fração hexânica da casca do caule de *M. rufula*. (-): Ausência de banda no espectro. (X): Pequena intensidade da banda no espectro. (XX): Média intensidade da banda no espectro. (XXX): Alta intensidade da banda no espectro.



**Figura 6.** Espectro do infravermelho de extrato e frações da casca do caule de *M. rufula*. EEMR: Extrato etanólico da casca do caule de *M. rufula*. FAEMR: Fração acetato de etila da casca do caule de *M. rufula*. FHAMR: Fração hidroalcolólica da casca do caule de *M. rufula*. FMMR: Fração metanólica da casca do caule de *M. rufula*. FHMR: Fração hexânica da casca do caule de *M. rufula*.

Em seguida, as frações da casca do caule de *M. rufula* foram analisadas por espectrometria de massa com ionização negativa (Tabelas 6 e S1 e Figuras suplementares). Os espectros que originaram essas Tabelas estão representados nas Figuras S1-18. Os íons com  $m/z$  577 e 865 foram encontrados nas frações FAEMR e FHAMR. A comparação desses valores de  $m/z$  e seus respectivos fragmentos com a literatura indicaram a presença de dímeros de proantocianidinas (Bystrom et al., 2008; Kajdzanoska et al., 2010). Trímeros de proantocianidina ( $m/z$  865,28 e 865,33) também foram potencialmente encontrados nas frações FAEMR e FHAMR (Bystrom et al., 2008; Kajdzanoska et al., 2010). Adicionalmente, os íons 289 e 577 sugeriram a presença de subtipos de proantocianidinas como catequina nas frações FAEMR e FHAMR, enquanto que o íon 341 possivelmente tratou-se do glicosídeo caffeoil glicose presente na fração FMMR (Bastos et al., 2007; Chen et al., 2012). Estudos anteriores com *M. zapota* e *M. rufula* isolaram diversos tipos de proantocianidinas, o que está de acordo com os achados deste trabalho (Wang et al., 2012; Vieira, 2015).

As frações FAEMR, FHAMR e FMMR apresentaram os íons 757 e 367 (Tabela S1), cuja fragmentação não permitiu a identificação do composto em potencial, no entanto, a literatura sugere-os como quercetina-3-O-triglicosídeo (Lin & Harnly, 2007) e ácido feruloilquinico (Bastos et al., 2007), respectivamente. Adicionalmente, não foram propostas a natureza de diversos outros íons e respectivos fragmentos, o que demonstra a importância de estudos posteriores no intuito de isolar e identificar fidedignamente esses compostos.

**Tabela 6.** Tempos de retenção e fragmentos dos principais íons encontrados na casca do caule de *M. rufula* por LC-MS/MS no modo negativo.

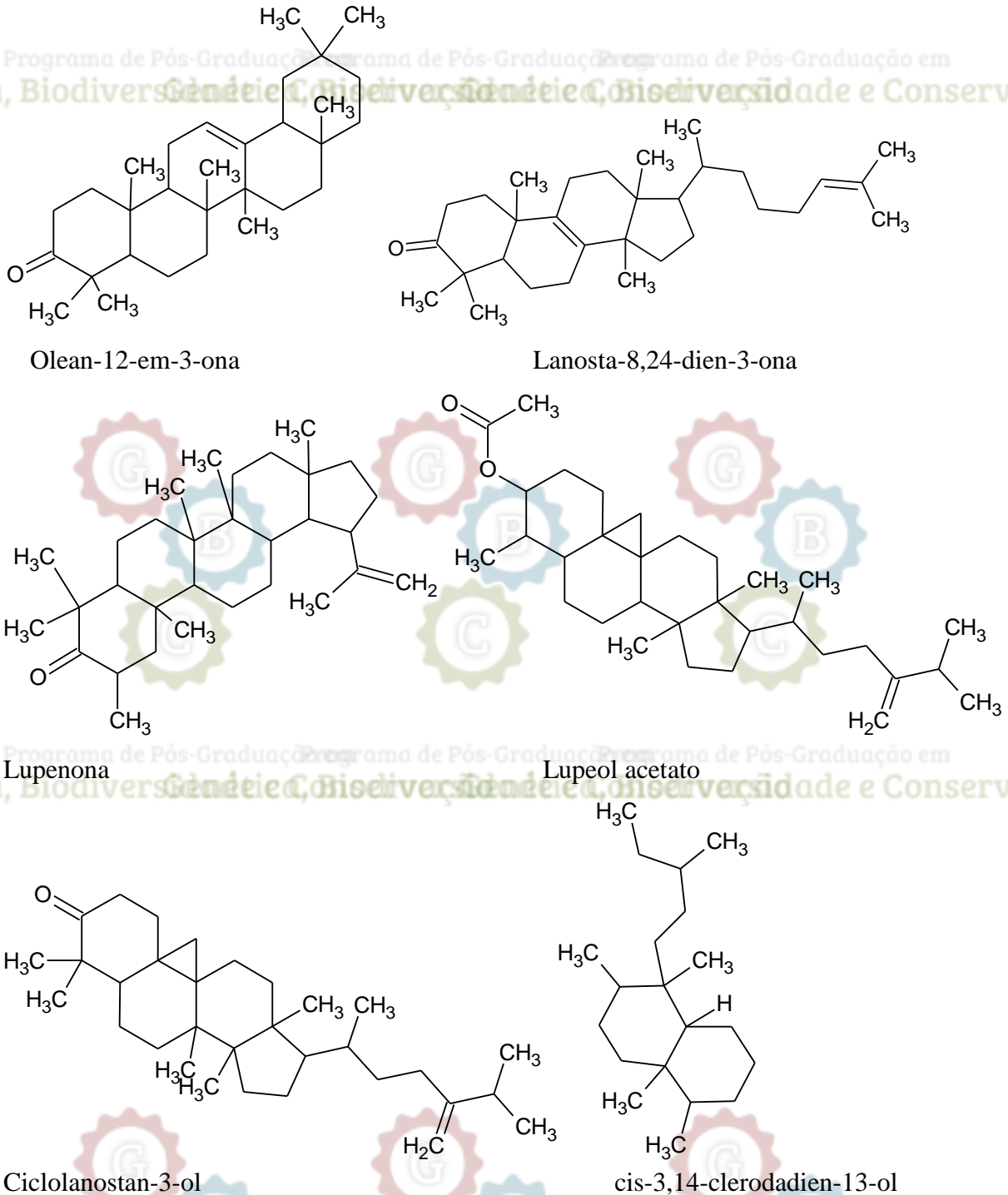
Amostra	Tempo de Retenção (min)	[M-H] <sup>-</sup>	Fragmentos	Compostos
<b>FAEMR</b>	14,4	577	289; 425	Dímero de Proantocianidina
	15,5	865	287;695;739	Trímero de Proantocianidina
	15,5	289	205; 245	Catequina
	18,1	577	289;425	Dímero de Proantocianidina
<b>FHAMR</b>	14,4	577	289;425	Dímero de Proantocianidina
	15,7	865	695;739	Trímero de Proantocianidina
<b>FMMR</b>	3,8	341	179	Caffeoil glicose

EEMR: Extrato etanólico da casca do caule de *M. rufula*. FAEMR: Fração acetato de etila da casca do caule de *M. rufula*. FHAMR: Fração hidroalcolólica da casca do caule de *M. rufula*. FMEMR: Fração metanólica da casca do caule de *M. rufula*. FHEMR: Fração hexânica da casca do caule de *M. rufula*. Os íons e seus respectivos fragmentos foram retirados das figuras S1-18, que se encontram em anexo.

Finalmente, a fração FHMR foi analisada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, sendo possível identificar os compostos olean-12-en-3-ona, lanosta-8,24-dien-3-ona, lupenona, lupeol acetato, ciclolanostan-3-ol, cis-3,14-clerodadien-13-ol, através da comparação com a biblioteca NIST, com similaridade de 92, 76, 89, 87, 85 e 79%, respectivamente. A estrutura química destes compostos encontra-se na Figura 7 e os cromatogramas obtidos estão representados nas Figuras S24-29.

Com base nesses resultados preliminares, as atividades farmacológicas descritas para *M. rufula* podem ser explicadas pela presença das proantocianidinas e terpenos, pois estes são amplamente conhecidos na literatura por apresentarem atividades biológicas como anti-inflamatória, anticâncer, antibacteriana, antifúngica, antiviral, antiparasitária e inibição da agregação plaquetária (Deans e Ritchie, 1987; Uedo et al., 1999; Dorman e Deans, 2000;

Fokialikis et al., 2006; Augustin et al., 2011; Wang et al., 2012; Trentin et al., 2013). Contudo, isso só poderá ser afirmado após isolamento dos metabólitos de *M. rufula*.



**Figura 7.** Estrutura química dos compostos encontrados na fração hexânica da casca do caule de *M. rufula* por CG-MS.



## 6. CONCLUSÕES

A literatura reporta à família Sapotaceae a ocorrência de triterpenos, alcaloides, flavonoides, benzenoides, fenilpropanoides, naftoquinonas, óleos essenciais, saponinas e taninos, inclusive em espécies do gênero *Manilkara* (Ma et al., 2003; Eibond et al., 2004; Silva, 2007, Hussain et al., 2007; Eskander et al., 2014). Dessa forma, os dados preliminares sobre a composição química do caule de *M. rufula* condizem com o que é esperado para a literatura, muito embora investigações futuras voltadas ao isolamento dos metabólitos de *M. rufula* são imprescindíveis para uma caracterização fidedigna do perfil químico da planta.

Neste estudo nós demonstramos, pela primeira vez, que o caule de *M. rufula* possui propriedades antioxidante, antibacteriana, antitumoral, leishmanicida e tripanocida, sem características de toxicidade sobre macrófagos de cultura humanos, o que indica o potencial terapêutico da planta para tratamento de desordens inflamatórias, oxidativas e infecciosas. O estudo fitoquímico preliminar indicou a presença principalmente de triterpenos, grupos glicosídicos, anéis aromáticos e ésteres graxos. Além disso, foi possível sugerir a presença de dímeros e trímeros de proantocianidinas e catequina por LC-MS/MS, além de seis diferentes terpenos identificados por CG-MS. Assim, *M. rufula* é uma fonte promissora de moléculas com propriedades terapêuticas, o que encoraja estudos futuros de isolamento. Adicionalmente, este estudo contribuiu com a valoração da biodiversidade local ainda pouca explorada.

## Referências

AGRA, MF.; SILVA, KN.; BASÍLIO, IJLD.; FREITAS, PF.; BARBOSA-FILHO, JM. 2008. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol. 3, p. 472-508.

AHMED, SA.; GOGAL, RM.; WALSH, JE. 1994. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes an alternative to [3H] thymidine incorporation assay. *Jornal Immunology Methods*, vol. 170, p. 211-224.

ALVAR, J.; IVAN, DV.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JEAN, J.; DEN BOER, M. 2012. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence the WHO Leishmaniasis Control Team *PLoS ONE*, vol. 7, p. 12.

ALVARENGA, DG.; ESCALDA, PM.; COSTA, AS.; MONREAL, MT. 2010. Leishmaniose visceral: estudo retrospectivo de fatores associados à letalidade. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, vol. 43, p. 194-197.

American Cancer Society. *The History of Cancer*, 2012. Disponível em: <http://www.cancer.org>. Acesso feito em 16 de fevereiro de 2017.

ARAÚJO NETO, V. 2009. Study of the antinociceptive, anti-inflammatory and antioxidante activities of *Sideroxylon obtusifolium* (Sapotaceae). Sergipe: UFS, Dissertação de Mestrado em Biotecnologia. 61 p.

ARNAO, MB.; CANO A.; COSTA, M. 2000. A method to measure antioxidant activity in organic media: application to lipophilic vitamins. *Redox Rep*, vol. 5, p. 365-370.

ASHFORD, RW. 2000. "The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses." *Int Journal Parasitol*, vol. 30, p. 1269-1281.

BACELLAR, O.; SCHRIEFER, A.; MACHADO, P.; RIBEIRO, JA.; DUTRA, WO.; GOLLOB, KJ.; CARVALHO, EM. 2002. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infect. Immun.*, vol. 70, p. 6734-6740.

BASTOS, TM. 2013. Avaliação da atividade Anti-Trypanosoma cruzi de nitrosilo/nitro complexos de rutênio em modelos experimentais in vitro e in vivo. Feira de Santana: Universidade Estadual de Feira de Santana. Dissertação de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. p. 73.

BASTOS, DHM.; SALDANHA, LA.; CATHARINO, RR.; SAWAYA, ACHF.; CUNHA, IBS.; CARVALHO PO.; EBERLIN, MN. 2007. Phenolic Antioxidants Identified by ESI-MS from Yerba Maté (*Ilex paraguariensis*) and Green Tea (*Camelia sinensis*) Extracts. *Molecules*, vol. 12, p. 423-432.

- BARBOSA-FILHO, JM.; VASCONCELOS, THC.; ALENCAR, AA.; BATISTA, LM.; OLIVEIRA, RAG.; GUEDES, DN.; FALCÃO, HS.; MOURA, MD.; DINIZ, MFFM.; MODESTO-FILHO, J. 2005. Plants and their active constituents from South, Central and North America with hypoglycemic activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol. 15, p. 392-413.
- BADARÓ, R.; DUARTE, MIS. 2009. *Leishmaniose visceral (calazar)*. In: Veronesi R, Focaccia R. *Tratado de infectologia 4ªed*. Editora Atheneu, São Paulo, p.1707-1736.
- BARBOSA, LCA. 2013. Espectroscopia no Infravermelho na caracterização de compostos orgânicos. Editora UFV, Viçosa, vol. 1, n.1, p. 189.
- BASANO, SA.; CAMARGO, LMA. 2004. Leishmaniose tegumentar Americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. *Revista Brasileira de Epidemiologia.*, vol. 7, p. 328-337.
- BHAT, RB.; ETERJERE, EO.; OLADIPO, VT. 1990. Ethnobotanical studies from Central Nigeria. *Econ Bot*, vol. 44, p. 382-390.
- BHAUMIK, A.; KUMAR, MU.; KHAN, KA.; SRINIVAS, C. 2014. The Bioactive Compounds Obtained from the Fruit-Seeds of *Madhuca longifolia* (L) Act as Potential Anticancer Agents. *Sch. J. App. Med. Sci.*, vol. 4, p.1235-1238.
- BIRKHOLTZ, LM.; WILLIAMS, M.; NIEMAND, J.; LOUW, AI.; PERSSON, L.; HEBY, O. 2011. Polyamine homeostasis as a drug target in pathogenic protozoa: peculiarities and possibilities. *Biochemical Journal*, vol. 2, p. 229–244.
- BLOIS, MS 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*, vol. 181, p. 1199-1200.
- BOTELHO, ACA.; NATAL, D. 2009. Primeira descrição epidemiológica da leishmaniose visceral em Campo Grande, Estado de Mato Grosso do Sul. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, vol. 42, p. 503-508.
- BRAND-WILIAMS, W.; CUVELIER, ME.; BERSET, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Sci Technol Int*, vol. 28, p. 25-30.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Editora do Ministério da Saúde; 2006.
- BRASIL. Ministério da Saúde. (2007). Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasília, Editora do Ministério da Saúde.
- BRASIL. Ministério da Saúde/Serviço de Vigilância Sanitária. Sistema Nacional de Agravos e Notificações. Taxa de incidência leishmaniose tegumentar americana. 2012. Disponível em:

<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?idb2012/d0204.def>. Acesso em: 05 de maio de 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde/Serviço de Vigilância Sanitária. Sistema Nacional de Agravos e Notificações. Taxa de incidência leishmaniose tegumentar americana. 2012. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?idb2012/d0205.def>. Acesso em: 05 de maio de 2015.

BYSTROM, LM.; LEWIS, BA.; BROWN, DL.; RODRIGUEZ, E.; OBENDORF, RL. 2008. Characterization of phenolics by LC-UV/vis, LC-MS/MS and sugars by GC in *Melicoccus bijugatus* Jacq. 'Montgomery' fruits. Food Chem, vol. 111, p. 1017–1024.

CHEN, H.; INBARAJ, BS.; CHEN, B. 2012. Determination of Phenolic Acids and Flavonoids in *Taraxacum formosanum* Kitam by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Coupled with a Post-Column Derivatization Technique. Int J Mol Sci., vol. 13, p. 260–285.

CASADEVALL, A. 1996. Antibody-based therapies for emerging infectious diseases. Emerg Infect Dis, vol. 3, p. 200-208.

CARVALHO, EM.; BARRAL, A.; COSTA, JM.; BITTENCOURT, A.; MARSDEN, P. 1994. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. Acta. Tropical, vol. 4, p. 315-25.

CERQUEIRA, FM.; MEDEIROS, MH.; AUGUSTO, O. 2007. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. Química Nova, vol. 30, no. 2, p. 441-449.

CERBINO NETO, J.; WERNECK, GL.; COSTA, CH. 2009. Fatores associados à incidência da leishmaniose visceral em área urbana: um estudo ecológico em Teresina, Piauí, Brasil. Cad Saude Publica, vol. 25, p. 1543-1551.

CHAVES, SP.; TORRES-SANTOS, EC.; MARQUES, C.; FIGLIUOLO, VR.; PERSECHINI, PM.; COUTINHO-SILVA, R.; ROSSI-BERGMANN B. 2009. Modulation of P2X(7) purinergic receptor in macrophages by *Leishmania amazonensis* and its role in parasite elimination. Microbes Infect, vol. 11, p. 842-849.

CIMERMAN, B.; CEMERMAN, S. 2008. Parasitologia Humana e seus Fundamentos Gerais. 2 ed. São Paulo: editora Atheneu, p. 81-112.

Clinical and Laboratory Standards Institute: Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard. 2006, CLSI, Wayne, PA, USA, CLSI document M07-A7, 7.

COURA, JR.. & CASTRO, SL. 2002. A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, vol. 97, p. 3.

COSTA, JM.; MARSDEN, PD.; LLANOS-CUENTAS, EA.; NETTO, EM.; CARVALHO, EM.; BARRAL, A.; et al. 1986. Disseminated cutaneous leishmaniasis in a field clinic in Bahia, Brazil: a report of eight cases. *The journal of tropical medicine and hygiene*. vol. 6, p. 319-323.

COSTA-LOTUFO, LV.; MONTENEGRO, RC.; ALVES, APNN.; MADEIRA, SVF.; PESSOA, C.; MORAES, MEA.; MORAES, MOA. 2010. Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. *Revista Virtual de Química*, vol. 2, no. 1, p. 47-58.

CRAGG, GM.; NEWMAN, DJ. 2005. Plants as a source of anti-cancer agentes. *Journal of Ethnopharmacology*, vol.100, p.72-79.

CRUZ, EM.; SILVA, ER.; MAQUIAVELI, CC.; ALVES, ESS.; LUCON JR, JF.; REIS, MBG.; TOLEDO, CEM.; CRUZ, FG.; VANNIER-SANTOS, MA. 2013. Leishmanicidal activity of *Cecropia pachystachya* flavonoids: Arginase inhibition and altered mitochondrial DNA arrangement *Phytochemistry*, vol. 89, p. 71–77.

CRAGG, GM.; NEWMAN, DJ. 2005. Plants as a Source of Anti-Cancer Agents. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 100, p. 72-79.

DA SILVA, ER et al. 2008. “Biochemical and Biophysical properties of a highly active recombinant arginase from *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and subcellular localization of native enzyme.” *Mol Biochem Parasitol*, vol. 2, p. 104-111.

DA SILVA, MLF. 2010. Relação entre a localização celular da enzima arginase de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e seu papel na infecção de macrófagos murinos. São Paulo: Universidade de São Paulo. Tese de Doutorado em Biociências. p. 143.

DEANS, CG & RITCHIE G. 1987. Antibacterial properties of plant essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 5, p. 165-180.

DESMARCHELIER, C.; ROMAO, RL.; COUSSIO, J.; CICCIA G. 1999. Antioxidant and free radical scavenging activities in extracts from medicinal trees used in the ‘Caatinga’ region in Northeastern Brazil. *J Ethnopharmacol*, vol. 67, p.69-77.

DESJEUX, P. 2004. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious diseases*, vol. 27, p. 305-318.

DIAS, JPC. & COURA, JR. 1997. *Clínica e Terapêutica de Doença de Chagas*, Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, p.11-62.

DORMAN, HJD & DEANS CG. 2000. Antimicrobial agentes from plants: antibacterial acitivity of plant volatily oils. *Journal of Applied Microbiology*, vol. 88, p. 308-316.

- DUARTE, IL. 2010. Aspectos ambientais e sociais envolvidos na transmissão da *L. chagasi* no município de Parnamirim/RN. Natal/RN. Dissertação de mestrado em Ciências da Saúde.
- DUARTE-ALMEIDA, JM.; NOVOA, AV.; LINARES, AF.; LAJOLO, FM.; GENOVESE, MI. 2006. Antioxidant Activity of Phenolics Compounds From Sugar Cane (*Saccharum officinarum* L.) Juice. *Plant Food Hum Nutr.*, vol. 6, p.187.
- EIBOND, LS. et al. 2004. Anthocyanin antioxidants from edible fruits. *Food Chemistry.*, 84:23.
- ENG, RH.; PADBERG, FT.; SMITH, SM.; et al. 1991. Bactericidal effects of antibiotics on slowly growing and nongrowing bacteria, *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 35, p.1824-1828.
- ESKANDER, JY.; HAGGAG, EG.; EL-GINDI, MR.; MOHAMED, MM. 2014. A novel saponin from *Manilkara hexandra* seeds and anti-inflammatory activity. *Med Chem Res*, vol. 23, p. 717–724.
- FAWCETT, JK.; & SCOTT, JE. 1960. A rapid and precise method for the determination of urea. *J Clin Pathol*, vol. 13, p. 156-159.
- FALCÃO, HS.; LIMA, IO.; SANTOS, VL.; DANTAS, HF.; DINIZ, MFFM.; BARBOSA-FILHO, JM.; BATISTA, LM. 2005. Review of the plants with anti-inflammatory activity studied in Brazil. *Rev Bras Farmacogn*, vol. 15, p. 381-391.
- FERNANDES, CP.; CORRÊA, AL.; LOBO, JFR.; CAMEL, OP.; DE ALMEIDA, FB.; CASTRO, ES.; SOUZA, KFCS.; BURTH, P.; AMORIM, LMF.; SANTOS, MG.; FERREIRA, JLP.; FALCÃO, DQ.; CARVALHO, JCT.; ROCHA, L. 2013. Triterpene Esters and Biological Activities from Edible Fruits of *Manilkara subsericea* (Mart.) Dubard, Sapotaceae. *BioMed Research International*, vol.1 , p.7.
- FERNANDES, ASF. 2010. Propriedades nutricionais, nutracêuticas e antioxidantes de espécies silvestres condimentares utilizadas na gastronomia tradicional do nordeste transmontano. Bragança-SP. Dissertação de Mestrado em Qualidade e Segurança Alimentar. p. 63.
- FIGUEIREDO, EAP. et al. 2007. *Pseudomonas Aeruginosa*: Frequência de Resistência a Múltiplos Fármacos e Resistência Cruzada entre Antimicrobianos no Recife/PE. *Rev Bras Terapia Intensiva* 19:421-427.
- FOKIALAKIS, N; KALPOUTZAKIS, E; TEKWANI, BL; SKALTSOUNIS, AL; DUKE, SO. Antileishmanial activity of natural diterpenes from *Cistus* sp. and semisynthetic derivatives thereof. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, vol. 29, p. 1775-1778.
- FORZZA, RC.; CARVALHO JR, A.; ANDRADE, ACS.; FRANCO, L.; NADRUZ, M.; TAMAIO, N.; FONSECA-KRUEL, VS. 2015. Herbário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro (RB). *UNISANTA Bioscience*, vol. 6, p.393-398.

FOTSIS, T. et al. 1997. Flavonoids, dietary-derived inhibitors of cell proliferation and in vitro angiogenesis. *Cancer Research*, Baltimore, vol.57, no.14, p.2916-2921.

FRENCH, GL. 2006. Bactericidal agents in the treatment of MRSA infections- the potential role of daptomycin. *J Antimicrob Chemother*, vol. 58, p.1107-1117.

GADELHA, CS; PINTO JUNIOR, VM; BEZERRA, KKS; PEREIRA, BBM; MARACAJÁ PB. Estudo bibliográfico sobre o uso de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil. *Revista Verde*, vol. 8, no. 5, p. 208 - 212, 2013.

GUIMARÃES, DO.; MOMESSO, LS.; PUPO, MT. 2010. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Química Nova*, vol. 33, no. 3, p. 667-679.

GILBER, SR. 2007. Reação em cadeia da polimerase em comparação com o teste de imunofluorescência indireta (IFI) e ELISA (enzimaimunoensaio) no diagnóstico para a doença de Chagas. Curitiba: Universidade Federal do Paraná. Dissertação de Mestrado em Processos biotecnológicos. p. 125.

GILL, LS. & AKINWUMI C. 1986. Nigerian folk medicine: practices and beliefs of the undo people. *J Ethnopharmacol*, vol. 18, p. 259-266.

GONTIJO, B.; de CARVALHO, ML. 2003. Leishmaniose Tegumentar Americana. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, vol. 36, p. 71-80.

GOMES, IG et al. 2003. Differential properties of CBA/J mononuclear phagocytes recovered from an inflammatory site and probed with two different species of *Leishmania*. *Microbes and Infection*, vol. 5, p. 251-260.

GÓES, MAO.; MELO, CM.; JERALDO, VLS. 2012. Série temporal da leishmaniose visceral em Aracaju, estado de Sergipe, Brasil (1999 a 2008). *Revista Brasileira de Epidemiologia*, vol. 15, p. 298-300.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, JMC. 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine*. New York: Oxford University Press Inc.

HANSEN, MB.; NIELSEN, SE.; BERG, K. 1989. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J Immunol Methods*, vol. 119, p. 203-210.

HUSSAIN, H et al. 2007. Lapachol: An overview. Department of Chemistry, University of Paderborn, Paderborn, Germany. *Archive for Organic Chemistry*, vol 2, p.145-171.

INCA, Brasil. 2011. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Coordenação

de Prevenção e Vigilância de Câncer. Estimativas 2012: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, p.26.

INNOCENTE, AM.; VIEIRA, PB.; FRASSON, AP.; CASANOVA, BB.; GOSMANN, G.; GNOATTO, SC.; TASCA, T. 2014. Anti-Trichomonas vaginalis activity from triterpenoid derivatives. Parasitology Research, vol. 113, p. 2933-2940.

KAJZANOSKA, M.; GJAMOVISK, V.; STEFOVA, M. HPLC-DAD-ESI-MSn 2010. Identification of phenolic compounds in cultivated strawberries from macedônia. Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering, vol. 29, no. 2, p. 181–194.

KHALEK, MA.; KHATUN, Z.; HABIB, MS.; KARIM, MR. 2015. Antitumor activity of Manilkara zapota (L.) fruits against Ehrlich ascites carcinoma in mice. Biologia, vol. 61, p.145–152.

KIM, KS.; ANTHONY, BF. 1981. Importance of bacterial growth phase in determining minimal bactericidal concentrations of penicillin and methicillin, Antimicrob Agents Chemother, vol. 19, p. 1075-1077.

KOTHARI, V. & SESHADRI S. 2010. In vitro antibacterial activity in seed extracts of *Manilkara zapota*, *Anona squamosa*, and *Tamarindus indica*. Biol. Res., vol. 43, p.165-168.

KUROSHIMA, KN. et al.. 2002. Estudos químicos e farmacológicos das plantas *Virola oleifera* e *Hyeronima alchrneoides*. Florianópolis: Universidade Estadual de Santa Catarina. Tese de Doutorado em Química. p.104.

KUDI, A.; UMOH, J.; EDUVIE, L.; GEFU, J. 1999. Screening of some Nigerian medicinal plants for antibacterial activity. J Ethnopharmacol, vol. 67, p. 225-228.

KUERA, NYM.; LOPEZ, JA.; LITTLE JR., EL.; RITZ, GF.; ROMBOLD, JS.; HAHN, WJ. 2002. Arboles Comues Del Paraguay. Cuerpo de Paz, Colección e Intercambio de Información, vol. 2, p.458.

LAINSON, R. 2010. Espécies neotropicais de *Leishmania*: uma breve revisão histórica sobre sua descoberta, ecologia e taxonomia. Ver Pan-Amaz Saude, vol. 1, p.13-32.

LEITE, NS.; LIMA, AP.; ARAÚJO-NETO, V.; ESTEVAM, CS.; PANTALEÃO, SM.; CAMARGO, EA.; FERNANDES, RPM.; COSTA, SKP.; MUSCARÁ, MN.; THOMAZZI, SM. 2015. Avaliação das atividades cicatrizante, anti-inflamatória tópica e antioxidante do extrato etanólico da *Sideroxylon obtusifolium* (quixabeira). Rev. Bras. Pl. Med., vol. 17, p.164-170.

LEVISON, ME. 2004. Pharmacodynamics of antimicrobial drugs, Infect Dis Clin North Am, vol. 18, p. 451-65.



MA, J.; LUO, X.; PROTIVA, P.; YANG, H.; MA, C.; BASILE, MI.; WEINSTINE, B.; KENNELLY, EJ. 2003. Bioactive novel polyphenols from the fruit of *Manilkara zapota*. J Nat Prod, vol. 66, p. 983–986.

MANJOLIN, LC.; DA SILVA, ER.; REIS, MBG.; MAQUIAVELI, CC.; SANTOS-FILHO, AO. 2013. Dietary flavonoids fisetin, luteolin and their derived compounds inhibit arginase, a central enzyme in *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. Food Chemistry, vol. 141, p.:2253-2262.

MARKELL, VOGEL.; JOHN, KROTOSKI. Parasitologia médica. 8 ed. Rio de Janeiro: editora Guanabara Koogan. 2003. p.126-136.

MARSDEN, PD. 1985. Pentavalent antimonials: old drugs for new diseases. Revista. Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, vol. 18, p. 187-198.

MARCO, GJ. 1968. A rapid method for evaluation of antioxidants. J Am Oil Chem Soc, vol. 45, p. 594-598.

MACHADO, PR.; ROSA, MEA.; COSTA, D.; MIGNAC, M.; SILVA, JS.; SCHRIEFER, A.; et al. 2011. Reappraisal of the immunopathogenesis of disseminated leishmaniasis: in situ and systemic immune response. Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene, vol. 105, p. 438-444.

MATOS, FJ. 1997. Introdução à fitoquímica experimental. 2.ed. Fortaleza: Edições UFC; 141p.

MEDEIROS, PM.; LADIO, AH.; ALBUQUERQUE, UP. 2013. Patterns of medicinal plant use by inhabitants of Brazilian urban and rural areas: A macroscale investigation based on available literature. J Ethnopharmacol, vol. 150, p. 729–746.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2ª Edição atualizada; 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana, 2ªed. atual. 3ª reimpr. - Brasília, 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana / Ministério da Saúde, 89 Secretaria de Vigilância em Saúde. – 2. ed. atual. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2010.

MILLER, HE. 1971. A simplified method for the evaluation of antioxidant. J Am Oil Chem Soc, vol. 48, p.91.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – 2. ed. atual. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2ª Edição atualizada; 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana, 2ªed. atual. 3ª reimpr. - Brasília, 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Guia de vigilância epidemiológica. 6ª Edição; 2005.

MORAES MO.; FONTELES, MC.; MORAES, MEA. 1997. Screening for anticancer activity of plants from the Northeast of Brazil. *Fitoterapia* LXVIII, n.3, p.235-239.

MONTENEGRO, LHM et al. 2006. Terpenoides e avaliação do potencial antimalárico, larvicida, anti-radicalar e anticolinesterásico de *Pouteria venosa* (Sapotaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol. 16, p.611-617.

MUELAS-SERRANO, S.; NOGAL, J.; MARTINEZ-DIAZ, R.; ESCARIO, J.; MARTINEZ-FERNANDEZ, A. GOMES-BARRIO, A. 2000. *In vitro* screening plant extracts on *Trypanosoma cruzi* and *Trichomonas vaginalis*. *J Ethnopharmacol*, vol. 71, p. 101-107.

NAIR, R. & CHANDA, S. 2008. Antimicrobial Activity of *Terminalia catappa*, *Manilkara zapota* and *Piper betel* Leaf Extract. *Indian J Pharm Sci*, vol. 3, p.390–393.

NEVES, DP.; MELO, AL.; LINARDI, PM.; VITOR, RWA. *Parasitologia Humana*. 11 ed. São Paulo: editora Atheneu. 2005. p. 85-108.

NGAMGWE, RF.; YANKAM, R.; CHOUNA, JR.; LANZ, C.; FURRER, J.; SCHURCH, S. 2014. Procerenone: a Fatty Acid Triterpenoide from the Fruit Pericarp of *Omphalocarpum procerum* (Sapotaceae). *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, vol. 4, p. 1425-1430.

NWUDE, N. & EBONG OO. 1980. Some plants used in the treatment of leprosy in Africa. *Leprosy Ver*, vol. 51, p.11-18.

OGUNWANDE, I.; BELLO, M.; OLAWIRE, O.; MUILI, K. 2001. Phytochemical and antimicrobial studies on *Butyrospermum paradoxum*. *Fitoterapia*, vol. 72, p. 54-56.

OLIVEIRA, MF.; NAGÃO-DIAS, AT.; PONTES, VMO.; SOUZA, JAS.; COELHO, HLL.; COELHO, ICB. 2008. Tratamento etiológico da doença de Chagas no Brasil. *Revista de Patologia Tropical*. vol. 37, no 3, p. 2009-2228.

OMS – Organização Mundial de Saúde: *Leishmania/HIV co-infecção sudoeste da Europa 1990-1998*, WHO/LEISH/2000.42. Geneva: World Health Organization, 2012.

PANKEY, GA.; SABATH, LD. Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of Gram-positive bacterial infections, *Clin Infect Dis*, 2004, vol. 38, p. 864-870.

PARICK, B. & PATEL, VH. 2016. Quantification of phenolic compounds and antioxidant capacity of an underutilized Indian fruit: Rayan [*Manilkara hexandra* (Roxb.) Dubard]. Food Sci. Hum. Wellness.

PARK, EK.; JUNG, HS.; YANG, HI.; YOO, MC.; KIM, C.; KIM, KS. 2007. Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli. Inflamm Res, vol. 1, p. 45-50.

PESSOA, C.; COSTA-LOTUFO, LV.; LEYVA, A.; MORAES, MEA.; MORAES, MO. 2006. Anticancer potencial of Northeast Brazilian Plants. In: Khan MTH, Ather A. Lead Molecules from Natural Products, Elsevier, 15p.

PEREIRA, RC.; OLIVEIRA, MTR.; LEMOS, GCS. 2004. Plantas utilizadas como medicinais no município de Campos de Goytacazes–RJ. Revista Brasileira de Farmacognosia, vol. 14, p. 37-40.

PEREIRA, JR.; QUEIROZ, RF.; SIQUEIRA, EA.; VIDAL, CB.; SANTANA, AEG.; SILVA, DM.; AFFONSO, PRAM. 2017. Evaluation of cytogenotoxicity, antioxidant and hypoglycemic activities of isolate compounds from *Mansoa hirsuta* D.C. (Bignoniaceae). An Acad Bras Cien (Impresso) (No prelo).

PFALLER, MA.; SHEEHAN, DJ.; REX, JH. 2004. Determination of fungicidal activities against yeasts and molds: lessons learned from bactericidal testing and the need for standardization, Clin Microbiol Rev, vol. 17, p. 268-80.

PINTO, AC.; SILVA, DHS.; BOLZANI, VS.; LOPES, NP.; EPIFÂNIO, RA. 2002. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. Quím. Nova, vol. 25, p. 45.

POOL-ZOBEL, BL., BUB, A., MÜLLER, H., WOLLOWSKI, I., RECHKEMMER, G. 1997. Consumption of vegetables reduces genetic damage in humans: first results of a human intervention trial with carotenoid-rich foods. Carcinogenesis, vol.18, no. 9, p.1847-1850.

RANG, HP.; DALE, MM.; RITTER, JM.; FLOWER, RJ.; HENDERSON, J. Farmacologia. 7 ed., Elsevier, 2012.

RATH, S. et al. 2003. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. Química Nova, vol. 26, p. 550-553.

REY, L. Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais. 4 ed. Rio de Janeiro: editora Guanabara koogan. 2008. p. 295-343.

REIS, AB. & GONTIJO, CMF; 2011. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: NEVES, F.P. et al. Parasitologia Humana, 12º ed. São Paulo. Editora Atheneu, vol. 8, p. 49-65.

REZENDE-SOARES, FA.; CARVALHO-CAMPOS, C.; MARQUES, MJ.; PORCINO, GN.; GIAROLA, NLL.; COSTA, BLS.; TAUNAY-RODRIGUES, A.; FARIA-PINTO, P.; SOUZA,

MA.; DINIZ, VA.; CORTE-REAL, S.; JULIANO, MA.; JULIANO, L.; VASCONCELOS, EG. 2010. Cytochemical localization of ATP diphosphohydrolase from *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes and identification of an antigenic and catalytically active isoform. *Parasitology (London. Print)*, vol. 137, p. 773-783.

RIVA, D.; BARISON, A.; STEFANELLO, M. E. A.; POLIQUESI, C. B.; RUIZ, A. L. T. G.; CARVALHO, J. E.; SALVADOR, M. J. 2012. Estudo químico de *Sinningia allagophylla* guiado por testes de atividade antiproliferativa. *Química Nova*, vol. 35, no. 5, p. 974-977.

ROBERTA, RE.; PELEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. 1999. Antioxidant activity applying and improved ABTS radical cation de colorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 26, p. 1231-1237.

RODRIGUES, AC.; BOMFIM, LM.; NEVES, SP.; MENEZES, LRA.; DIAS, RB.; SOARES, MB.; PRATA, APN.; ROCHA, CAG.; COSTA, EV.; BEZERRA DP. 2015. Antitumor properties of the essential oil from the leaves of *Duguetia gardneriana*. *Planta Med*, vol. 81, p. 798-803.

RUFINO, MSM.; ALVES, RE.; BRITO, ES.; MORAIS, SM.; SAMPAIO, CG.; JIMÉNEZ, JP.; CALIXTO, FDS. 2007. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS+. Comunicado Técnico 128. Embrapa, Fortaleza.

RUSCHEL, CFC.; HUANG, CT.; SAMIOS, D.; FERRÃO, MF. 2014. Análise exploratória aplicada a espectros de reflexão total atenuada no infravermelho com transformada de fourier (atr-ftir) de blendas de biodiesel/diesel. *Quim. Nova*, vol. 37, p. 810-815.

RUELA, HS.; LEAL, ICR.; ALMEIDA, MRA.; SANTOS, KRN.; WESSJOHANN, LA.; KUSTER, RM. 2011. Antibacterial and antioxidant activities and acute toxicity of *Bumelia sartorum* Mart., Sapotaceae, a Brazilian medicinal plant. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol. 21, p.1.

Sapotaceae in Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB217>>. Acesso em 07 de Novembro de 2016.

SANTIN, MR.; DOS SANTOS, AO.; NAKAMURA, CV.; DIAS FILHO, BP.; FERREIRA, IC.; UEDA-NAKAMURA, T. 2009. In vitro activity of the essential oil of *Cymbopogon citratus* and its major component (citral) on *Leishmania amazonensis*. *Parasitol Res*, vol. 105, p. 1489-1496.

SATHYAPRABHA, G.; KUMARAVEL, S.; PANNEERSELVAM, A. 2011. Bioactive Compounds Identification of *Pleurotus platypus* and *Pleurotus eous* by GC-MS. *Adv. Appl. Sci. Res.*, vol. 6, p. 51-54.

SANTOS, RFEP.; SILVA, ISM.; VERÍSSIMO, RCSS.; LÚCIO, IML.; CAMPESATTO, EA.; CONSERVA, LM.; BASTOS, MLA. 2015. Estudo do potencial antimicrobiano e citotóxico da espécie *Pouteria venosa* (Sapotaceae). *Rev. Bras. Pl. Med.*, vol. 17, p. 367-373.

SANTOS, AL et al. 2007. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. *Journal Bras Patol Med Lab*, vol. 43, p. 413-423.

SANTOS, TLA.; QUEIROZ, RF.; SAWAYA, ACHF.; LOPEZ, BG.; SOARES, MBP.; BEZERRA, DP.; RODRIGUES, ACBC.; PAULA, VF.; WALDSCHMIDT, AM. 2017. *Melipona mondury* produces a geopropolis with antioxidant, antibacterial and antiproliferative activities. *Anais da Academia Brasileira de Ciências (Impresso) (No prelo)*.

Sampaio, CPL.; Dias, IM.; Faria, FM.; Oliveira, MVM. 2013. Principais bactérias causadoras de infecção hospitalar. *Rev Dig Buenos Aires*, vol. 10, p. 182.

SCHOFIELD, CJ.; DIAS, JCP. 1999. The Southern Cone programme against Chagas' disease. *Advances in Parasitology*, vol. 42, p. 1-25.

SCHAICH KM.; TIAN X.; XIE J. 2015. Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays. *Journal of functional foods*, vol. 14, p. 111–125.

SHASHIDI, F. & HO, C. 2007. Antioxidant Measurement and Applications: An Overview. In: Shahidi, F. e Ho, C. *Antioxidant Measurement and Applications*. American Chemical Society, 956p.

SINGLETON, VL.; ORTHOFER, R.; LAMUELA, RM. 1992. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods enzyme*, vol. 299, p.152-178.

SILVA, CAM. et al. 2009. Genus *Pouteria*: Chemistry and biological activity. *Rev Bras Farmacogn*, vol. 19, p. 501-509.

SILVA, CV.; BOMFIM, FCC.; DOS SANTOS, MAV.; VELOZO, ES. 2014. Estudo fitoquímico e avaliação in vitro da atividade anti-Trypanosoma cruzi cepa Y de *Pilocarpus spicatus* St. Hil. (Rutaceae). *Rev. Bras. Pl. Med.*, vol. 4, p. 812-818.

SINAN. Casos notificados e confirmados de Leishmaniose Tegumentar. 2014. Disponível em: <http://www1.saude.ba.gov.br/dis/sinan.html>. Acesso em: 05 de maio de 2015.

SILVA, GN.; MARIA, NR.; SCHUCK, DC.; CRUZ, LN.; DE MORAES, MS.; NAKABASHI, M.; GRAEBIN, C.; GOSMANN, G.; GARCIA, CR.; GNOATTO, SC. 2013. Two series of

new semisynthetic triterpene derivatives: differences in antimalarial activity, cytotoxicity and mechanism of action. *Malaria Journal*, p. 1289.

SILVA, NSL.; CASTILHOS, P. 2015. Efeito de dez plantas do cerrado brasileiro sobre a viabilidade de promastigotas de *Leishmania amazonensis*. *Sinergia*, vol. 16, p. 269-274.

SILVA, CAM. 2007. Contribuição ao estudo químico e biológico de *Pouteria gardnerii* (Mart. & Miq.) Baehni (Sapotaceae). Brasília: Universidade de Brasília. Dissertação de Mestrado em Ciências da Saúde. p. 197.

SILVA, ER.; MAQUIAVELI, CC.; MAGALHÃES PP. 2012. The leishmanicidal flavonols quercetin and quercitrin target *Leishmania (Leishmania) amazonensis* arginase. *Experimental Parasitology* 130:183-188.

SINGH, N.; KUMAR, M.; SINGH, RK. 2012. Leishmaniasis: current status of available drugs and new potential drug targets. *Asian Pac J Trop Med.*, vol. 6, p. 485-497.

SILVEIRA, FT.; LAINSON, R.; CORBETT, CE. 2004. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil – A review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 99, p. 239-251.

SIMÕES OMC.; SCHENKEL RP.; GOSMANN G.; MELLO PCJ.; MENTZ AL.;

PETROVICK PR. *Farmacognosia da planta medicamento*. Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 1999.

SOEIRO, M. N. C.; CASTRO, S. L.; 2009. Trypanosoma cruzi targets for new chemotherapeutic approaches. *Expert. Opinion*, vol. 13, p. 105.

SOULE, BP.; HYODO, F.; MATSUMOTO, K.; SIMONE, NL.; COOK, JA.; KRISHNA, MC.; MITCHELL, JB. 2007. The chemistry and biology of nitroxide compounds, *Free Rad. Bio. Med.*, vol. 42, p. 1632-1650.

STAVRIC, B. 1994. Antimutagens and anticarcinogens in foods. *Food Chemical Toxicology*, Oxford, vol. 32, no.1, p.79-90.

SUNDAR, S. & RAI, M. 2002. Laboratory diagnosis of visceral Leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol*, vol. 9, p. 951-958.

SUFFNESS, M. & PEZZUTO, JM. 1990. Assays related to cancer drug discovery. In: Hostettmann, Keditor. *Methods in Plant Biochemistry: Assays for Bioactivity*. Academic Press: London, p.71-133.

SUDHAKAR, S.; & SINGH, RP. 2008. In Vitro Methods of Assay of Antioxidants: An Overview *Food Reviews International*, vol. 24, p. 392 – 415.

TEIXEIRA, DE.; BECHIMOL, M.; RODRIGUES, JCF.; CREPALDI, PH.; PIMENTA, PFP.; DE SOUZA, W. 2013. Atlas didático: Ciclo de vida da Leishmania. Fundação CECIERJ, Consórcio CEDERJ, Rio de Janeiro, 1 ed.

TURETZ, ML.; MACHADO, PR.; KO, AI.; ALVES, F.; BITTENCOURT, A.; ALMEIDA, PR.; et al. 2002. Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in 32 northeastern Brazil. The journal of infectious diseases, vol. 186, p. 1829-1834.

UEDO, N.; TATSUTA, M.; IISHI, H.; BABA, M; SAKAI, N; YANO, H; OTANIA, T. Inhibition by D-limonene of gastric carcinogenesis induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in wistar rats. Cancer Letters, vol. 137, p. 131-136.

VANNIER-SANTOS, MA.; MENEZES, D.; OLIVEIRA, MF.; DE MELLO, FG. 2008. The putrescine analogue 1,4-diamino-2-butanone affects polyamine synthesis, transport, ultrastructure and intracellular survival in *Leishmania amazonensis* Microbiology, vol. 154, p. 3104–3111.

VIEIRA, PB.; SILVA, NLF.; SILVA, GNF.; SILVA, DB.; LOPES, NP.; GNOATTO, SCV.; SILVA, MV.; MACEDO, AJ.; BATISDA, J.; TASCIA, T. 2016. Caatinga plants: Natural and semi-synthetic compounds potentially active against *Trichomonas vaginalis*. Bioorg. Med. Chem. Lett., vol. 26, p. 2229-2236.

VON BAUM, H. & MARRE, R. 2005. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and therapeutic implications. Internat. Journ. of Med. Microb., vol. 295, p. 503-511.

WANG, X.; LIU, R.; YE, X.; HAY C. 2010. Antioxidant activities of oleanolic acid in vitro: Possible role of Nrf2 and MAP kinases. Chemico-biological interactions, vol. 3, p. 328-37.

WANG, H.; LIU, T.; SONG, L.; HUANG, D. 2012. Profiles and  $\alpha$ -amylase inhibition activity of proanthocyanidins in unripe *Manilkara zapota* (chiku). J Agric Food Chem., vol. 28, p. 3098-3104.

WAGNER, H.; BLAD, S. 2009. Plant Drug Analysis: a thin layer chromatography atlas. 2 ed. (reprint). Springer, p. 197.

WHO. World Health Organization Leishmaniasis. Disponível em: <<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>. Acesso feito em: 27 de julho de 2014.

## ANEXOS – Figuras e Tabelas Suplementares

**Tabela S1.** Tempos de Retenção, MS e fragmentos dos íons adicionais do caule de *M. rufula* por LC-MS/MS no modo negativo.

Amostra	Tempo de Retenção (min)	[M-H] <sup>-</sup>	Fragmentos (m/z)
FAEMR	14,4	577	289; 425; 559;
		865	287; 451; 575; 695; 739; 847.
	15,3	289	205; 245; 289;
		579	289.
	15,5	289	145;
		865	287; 407; 577; 695; 739; 847.
	18,1	577	289; 425; 559;
		833	271; 543.
	25,6	366	259; 287; 366
		757	287; 366.
	26,4	367	259; 287;
		659	507.
35,1	503	421; 485;	
	549	503	
38,4	487	425; 469;	
	555	487	
FHAMR	2,7	664	574;
		680	462.
	3,9	341	119; 178;
		387	341.
	4,4	317	224; 316;



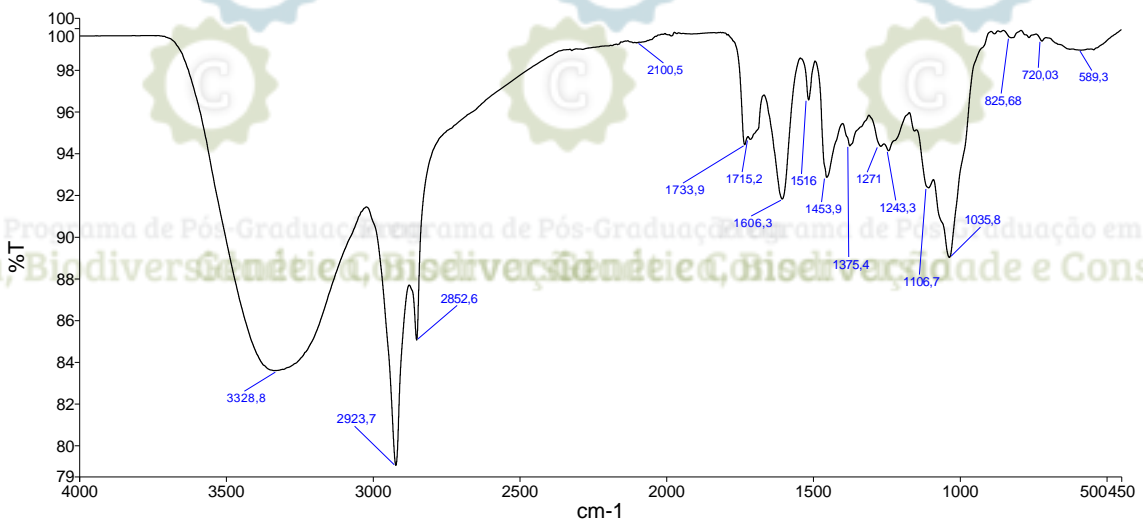


Genética,

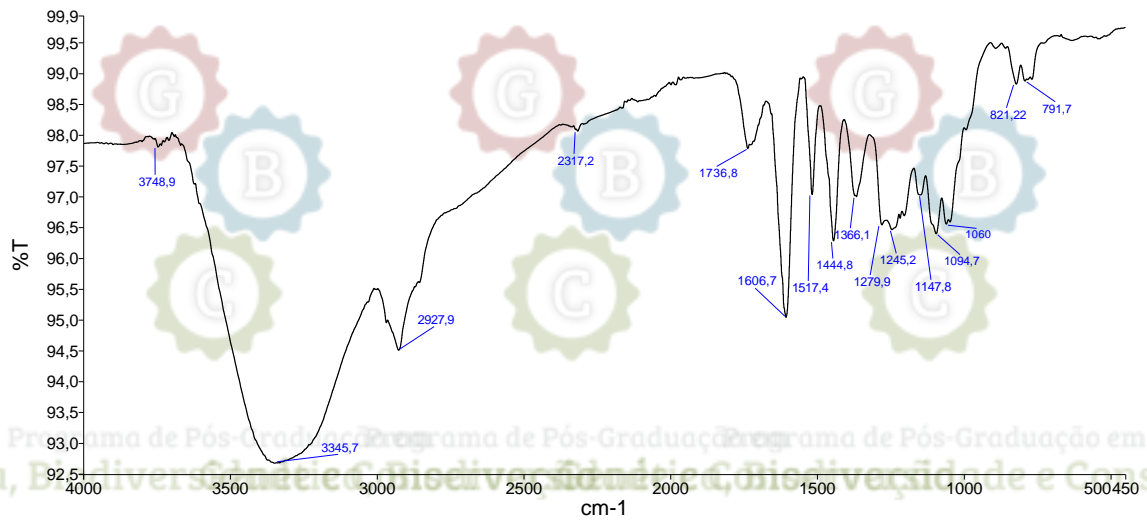
ração

		635	317.
	14,4	577	289; 425; 559; 633; 739; 863
		865	244; 287; 407; 587; 695; 788,80; 847,17.
	15,7	849	287; 408; 559; 679; 723;
		865	261; 287; 406; 451; 476; 577; 695; 739; 781; 848.
	25,5	367	259; 287; 366;
		757	259; 287; 366; 735.
	26,2	367	259; 287; 367;
		757	287; 388; 677; 727.
<b>FMMR</b>	3,8	341	119; 179; 341;
		431	341; 415.
	4,4	317	224; 316;
		635	316; 489.
	14,4	577	245; 288; 425; 491; 559; 739; 866.
		865	287; 426; 576; 713; 847.
	15,7	720	490; 575; 693; 785; 847;
		865	451; 543; 577; 695; 739; 821; 847.
	25,3	367	287; 366;
		757	287; 366; 688.
	26,1	367	259; 287; 366;
		757	287; 366; 734.
<b>FHMR</b>	54,2	455	408,26; 455,33;

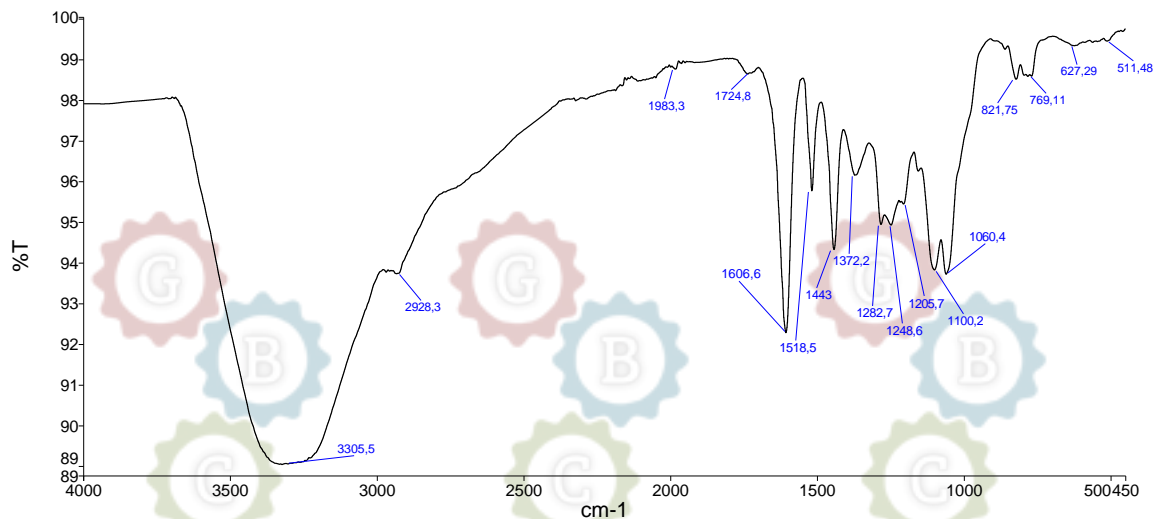
EEMR: Extrato etanólico do caule de *M. rufula*. FAEMR: Fração acetato de etila do caule de *M. rufula*. FHAMR: Fração hidroalcoólica do caule de *M. rufula*. FMMR: Fração metanólica do caule de *M. rufula*. FHMR: Fração hexânica do caule de *M. rufula*.



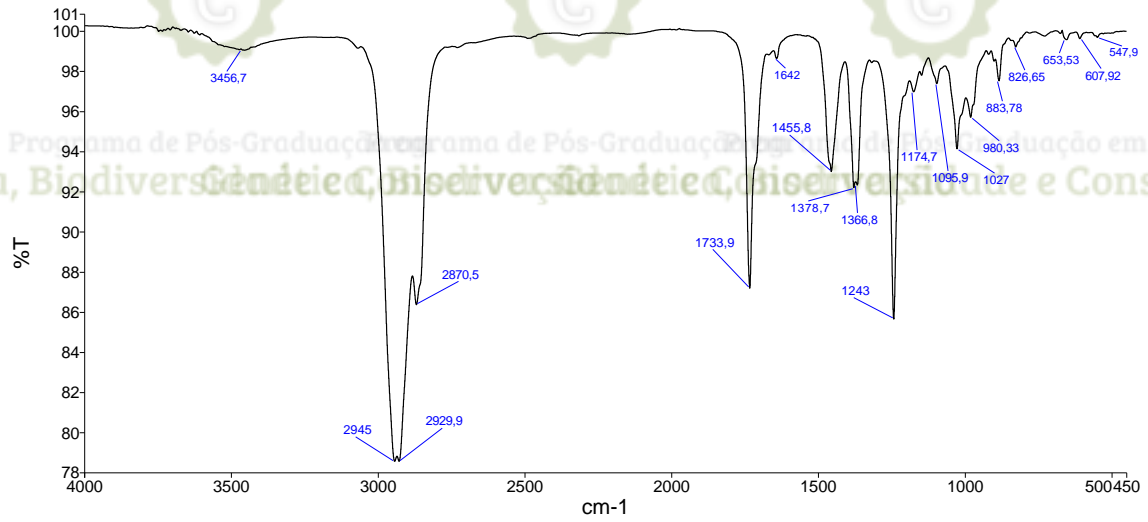
**Figura S1.** Espectro do infravermelho do extrato etanólico da casca do caule de *M. rufula*.



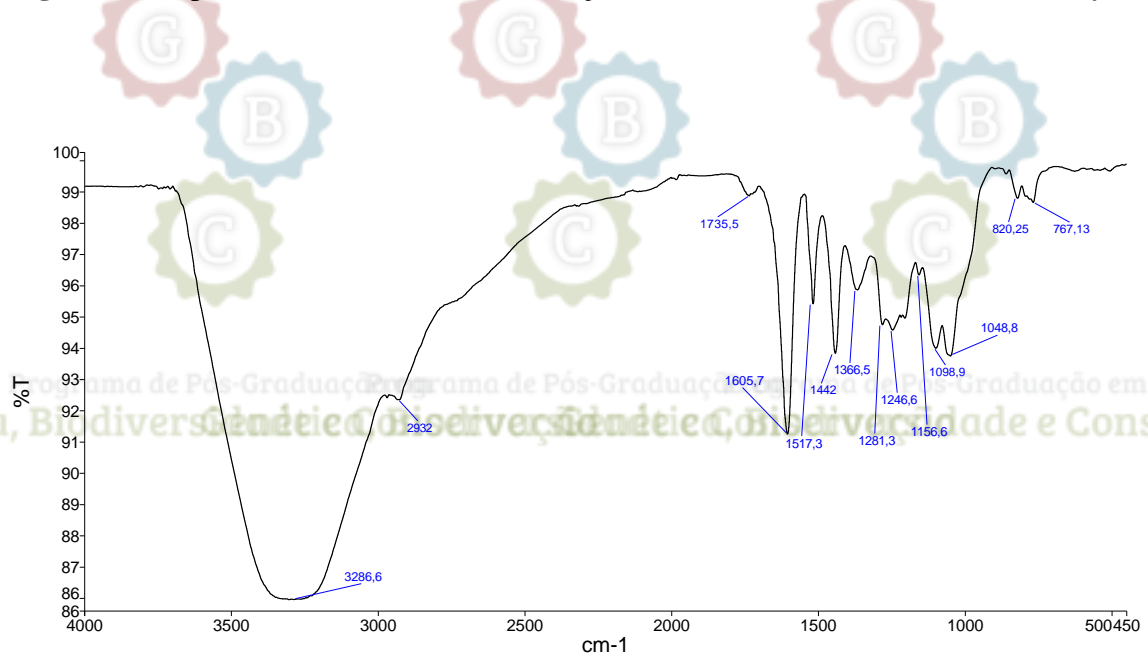
**Figura S2.** Espectro do infravermelho da fração acetato de etila da casca do caule de *M. rufula*.



**Figura S3.** Espectro do infravermelho da fração hidroalcolólica da casca do caule de *M. rufula*.

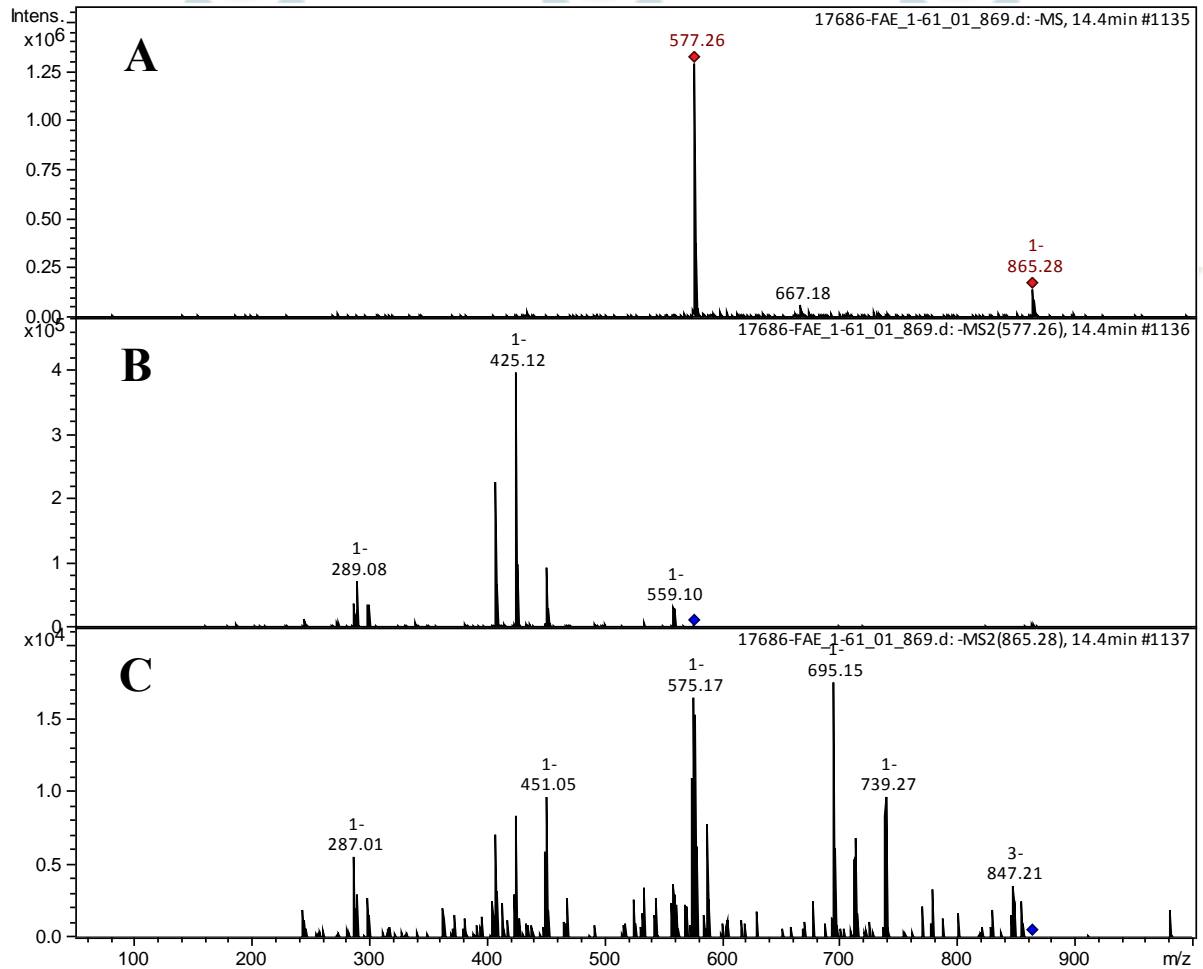


**Figura S4.** Espectro do infravermelho da fração hexânica da casca do caule de *M. rufula*.

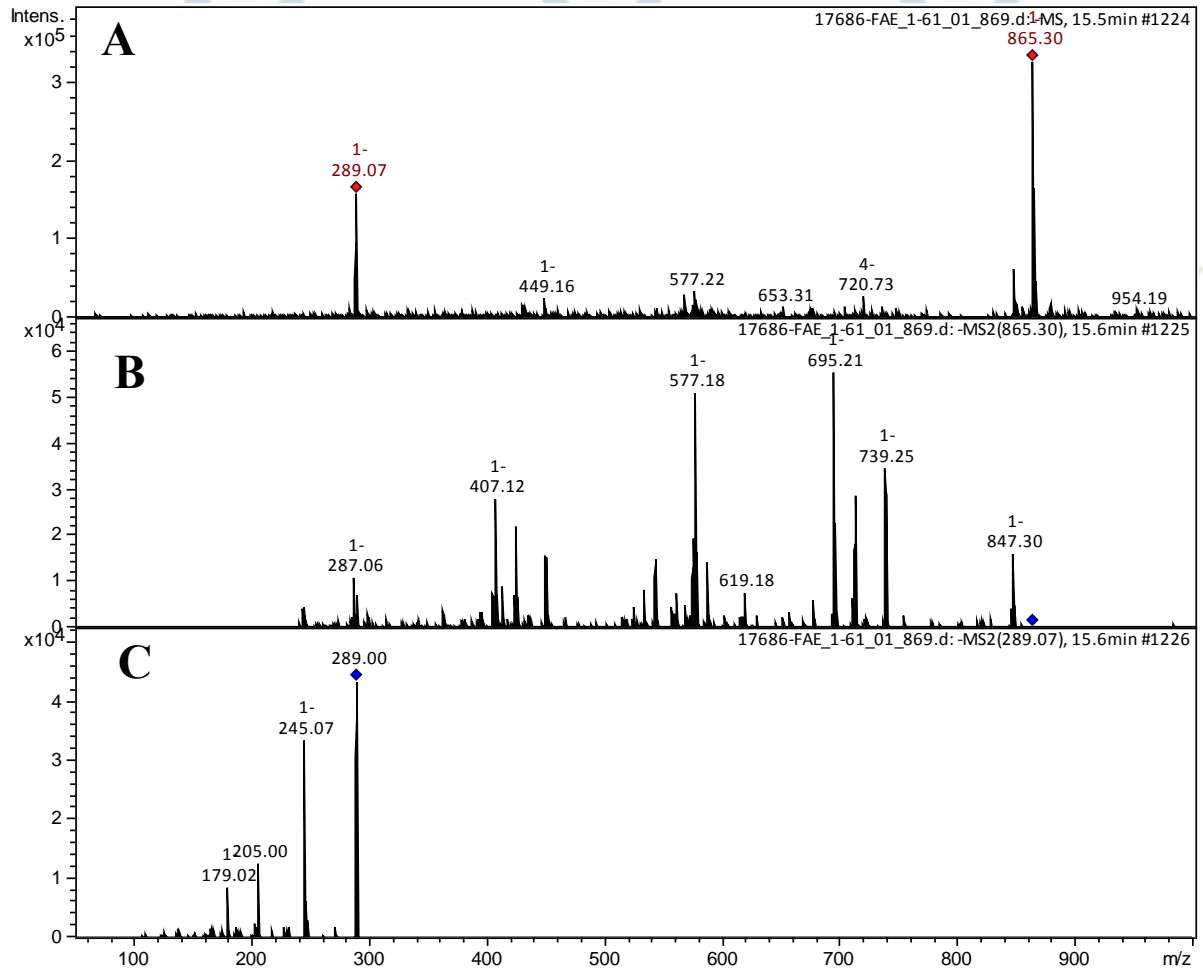


**Figura S5.** Espectro do infravermelho da fração metanólica da casca do caule de *M. rufula*.

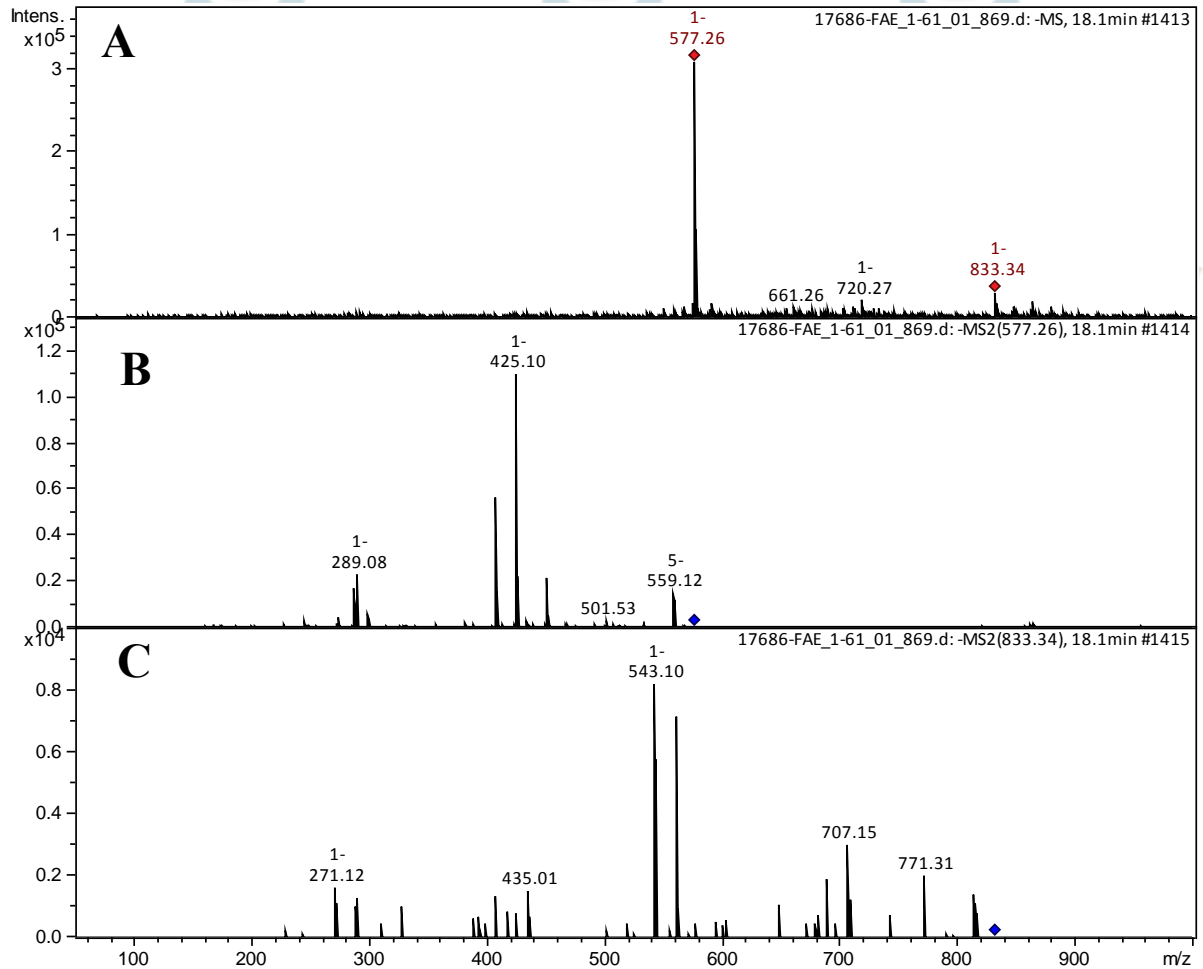




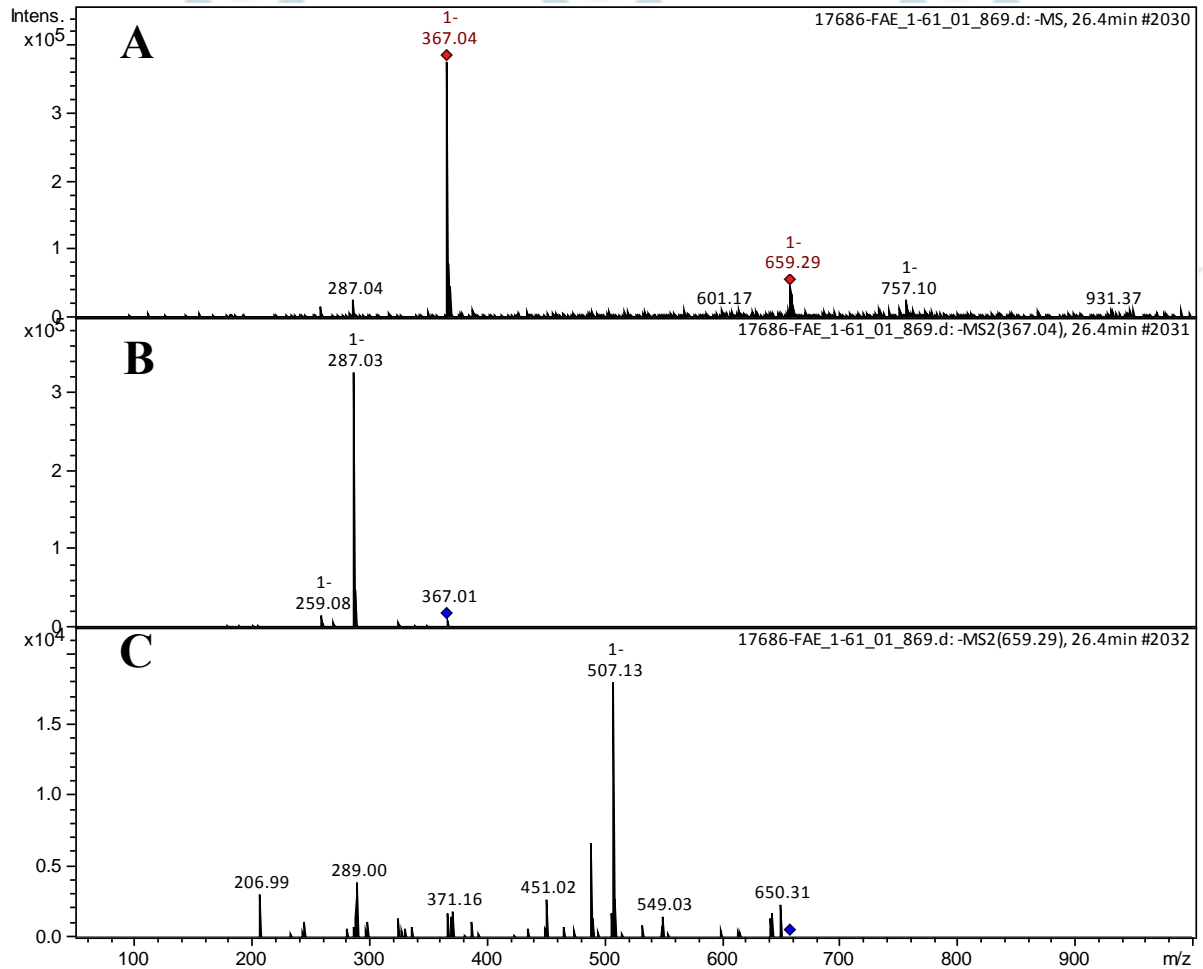
**Figura S6.** Espectro de massas da fração acetato de etila. Em (A) encontra-se os íons majoritários encontrados na FAEMR em 14,4 min. O painel (B) demonstra os fragmentos do íon 577 enquanto o painel (C) os fragmentos do íon 865.



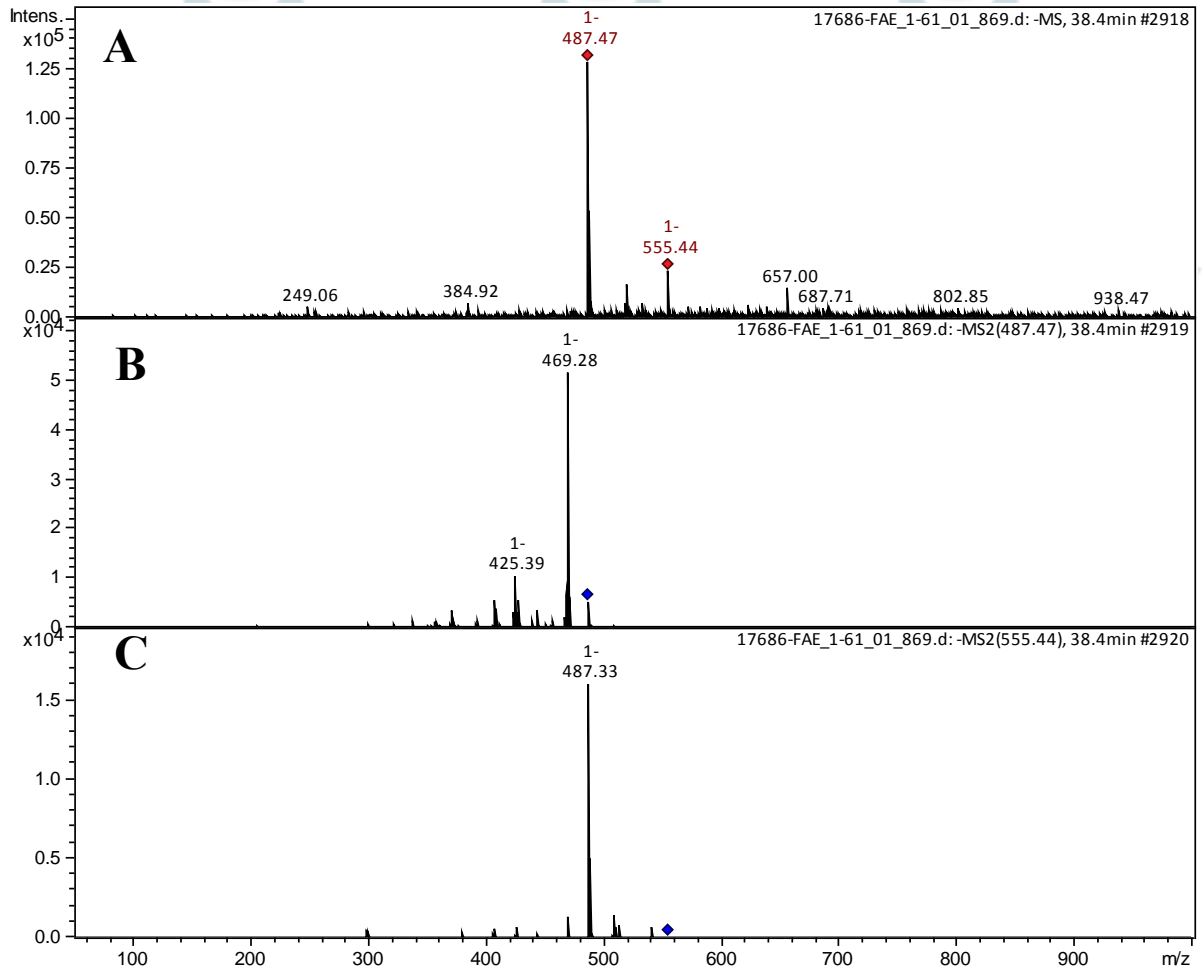
**Figura S7.** Espectro de massas da fração acetato de etila. Em (A) encontra-se os íons majoritários encontrados na FAEMR em 15,5 min. O painel (B) demonstra os fragmentos do íon 865 enquanto o painel (C) os fragmentos do íon 289.



**Figura S8.** Espectro de massas da fração acetato de etila. Em (A) encontra-se os íons majoritários encontrados na FAEMR em 18,1 min. O painel (B) demonstra os fragmentos do íon 577 enquanto o painel (C) os fragmentos do íon 833.

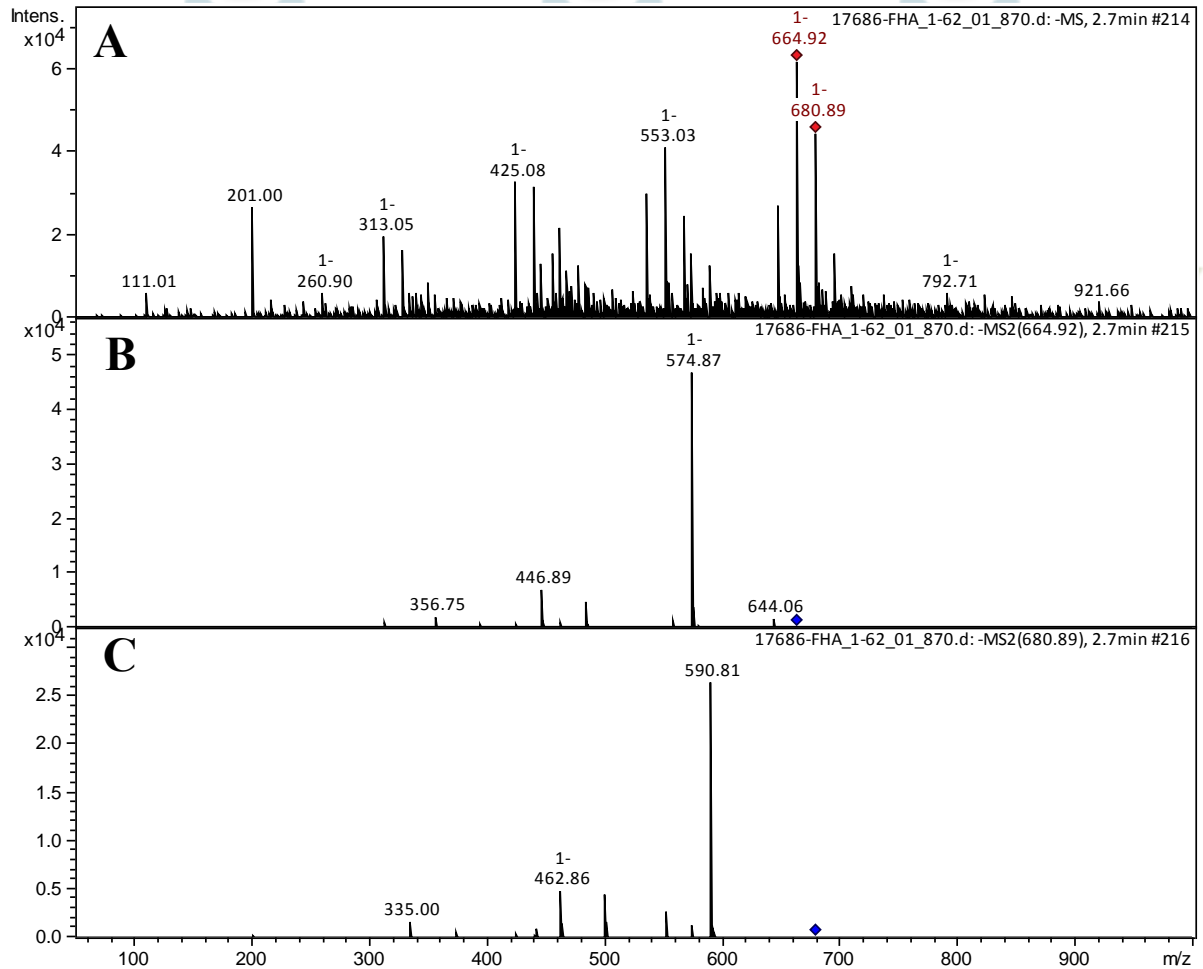


**Figura S9.** Espectro de massas da fração acetato de etila. Em (A) encontra-se os íons majoritários encontrados na FAEMR em 26,4 min. O painel (B) demonstra os fragmentos do íon 367 enquanto o painel (C) os fragmentos do íon 659.

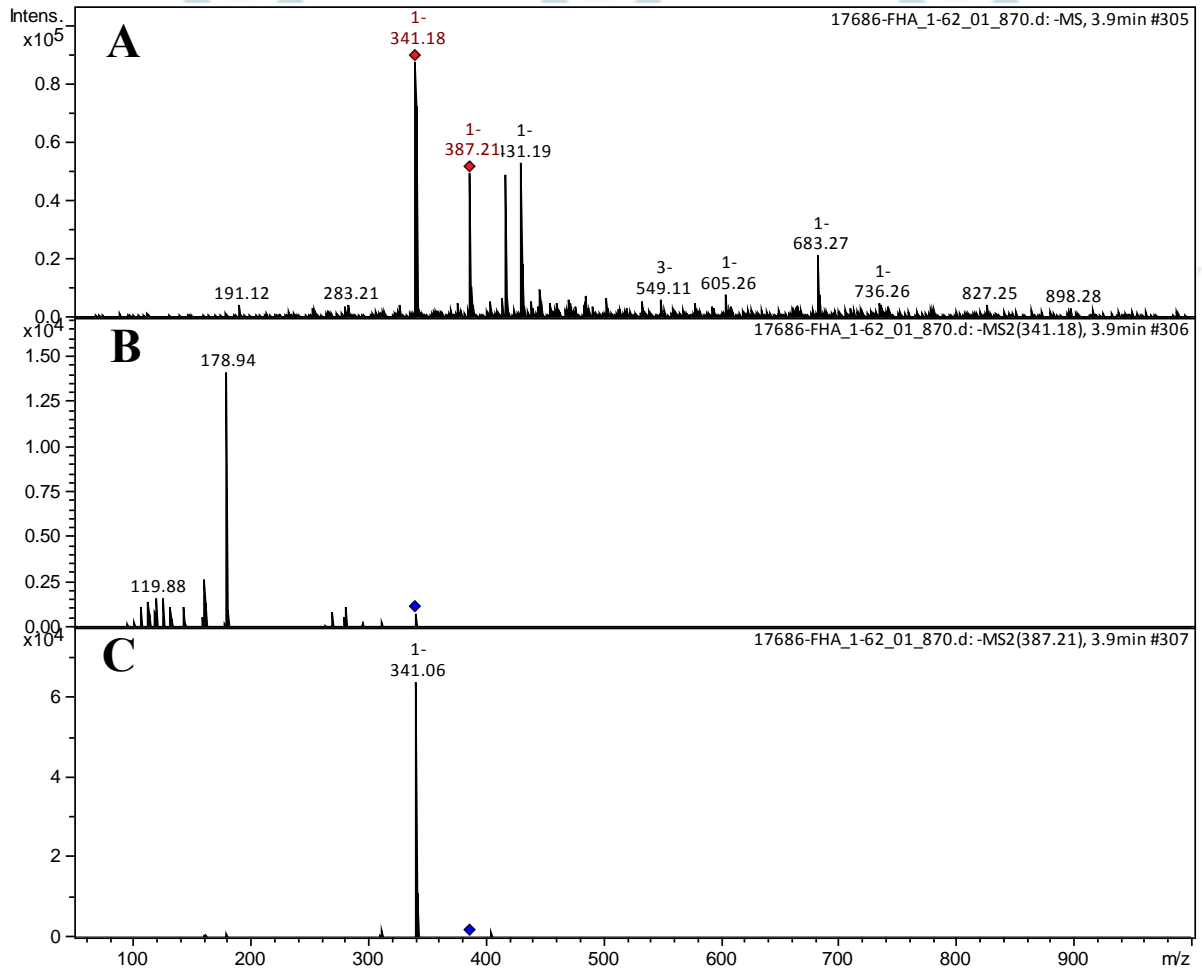


**Figura S10.** Espectro de massas da fração acetato de etila. Em (A) encontra-se os íons majoritários encontrados na FAEMR em 38,4 min. O painel (B) demonstra os fragmentos do íon 487 enquanto o painel (C) os fragmentos do íon 555.

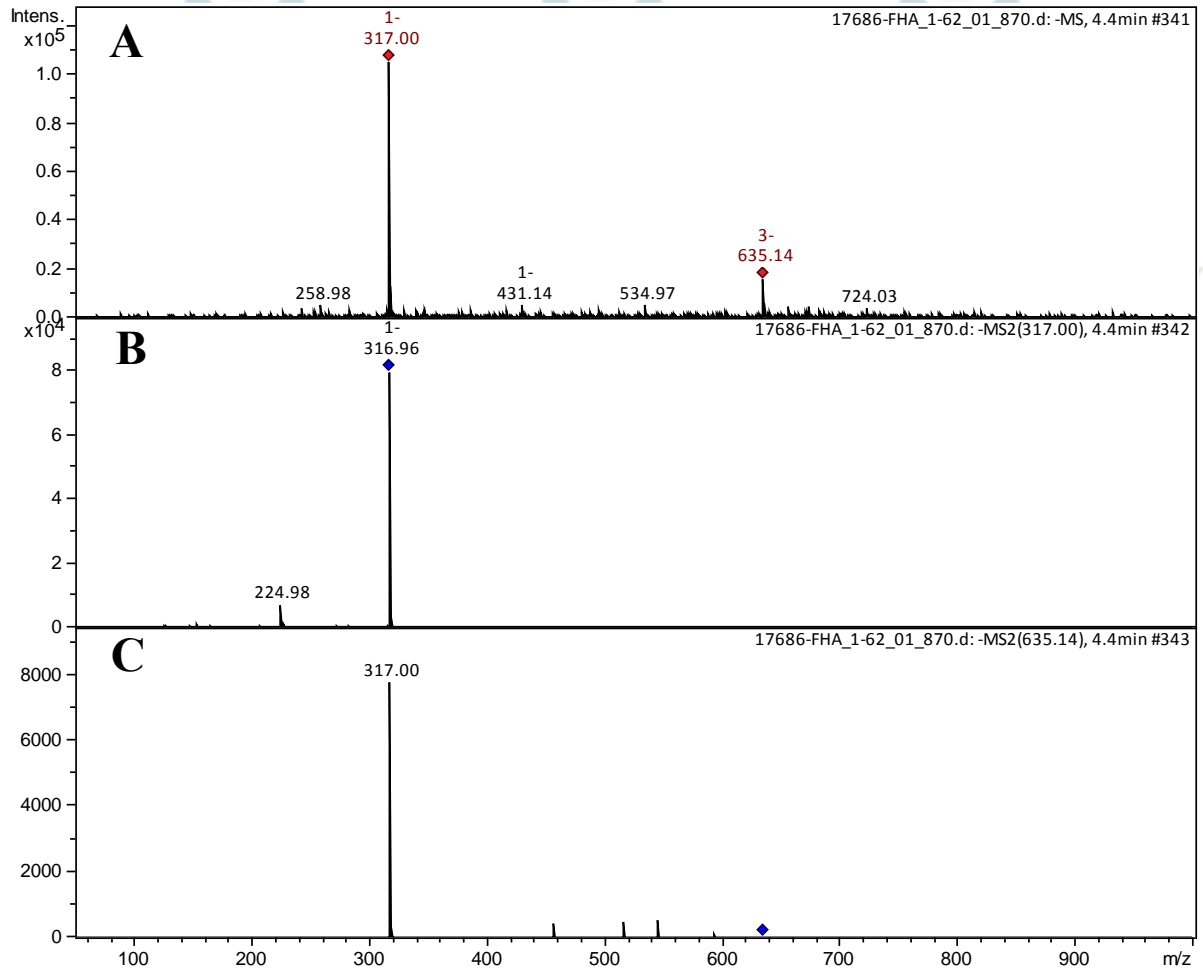




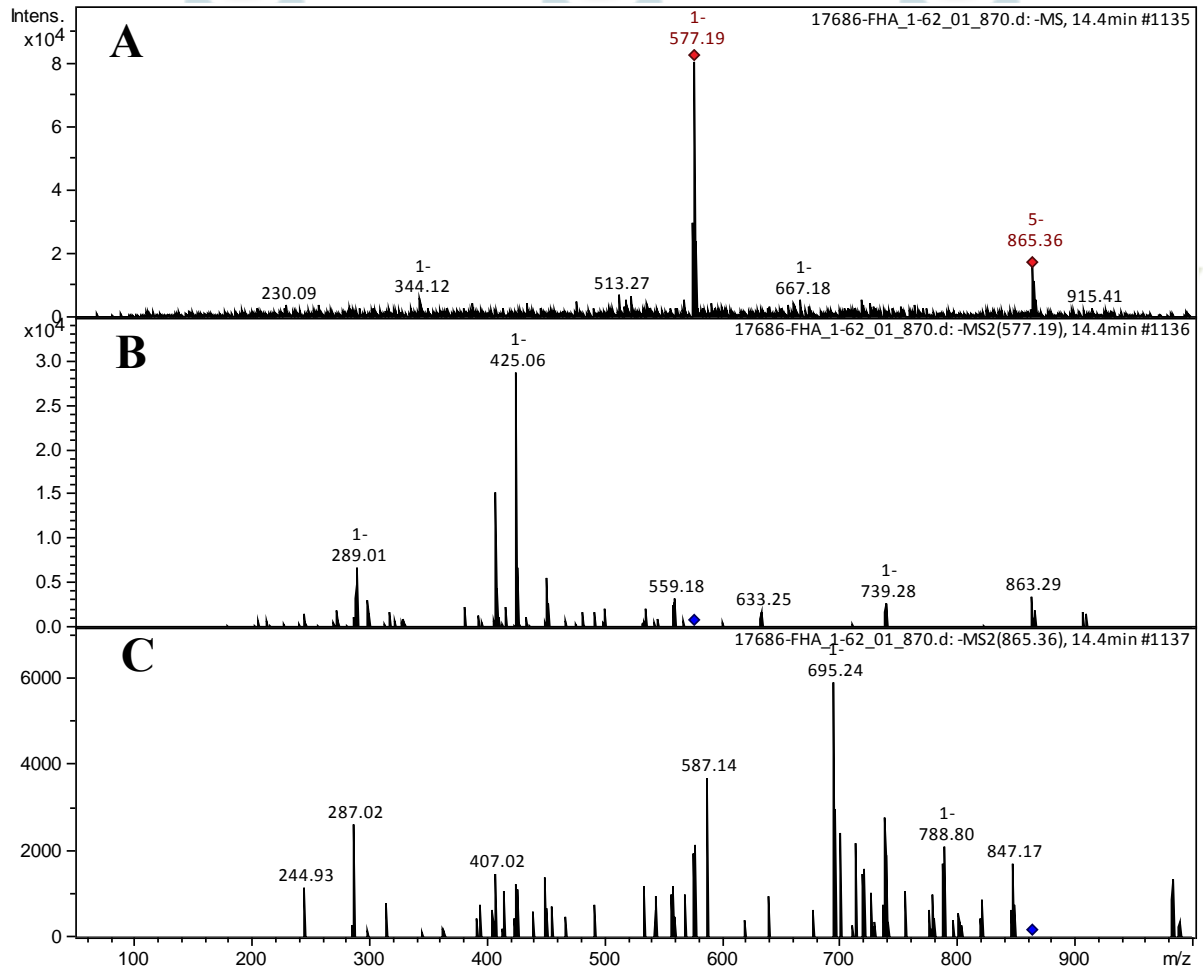
**Figura S11.** Espectro de massas da fração hidroalcolica. Em (A) encontra-se os íons majoritários encontrados na FHAMR em 2,7 min. O painel (B) demonstra os fragmentos do íon 664 enquanto o painel (C) os fragmentos do íon 680.



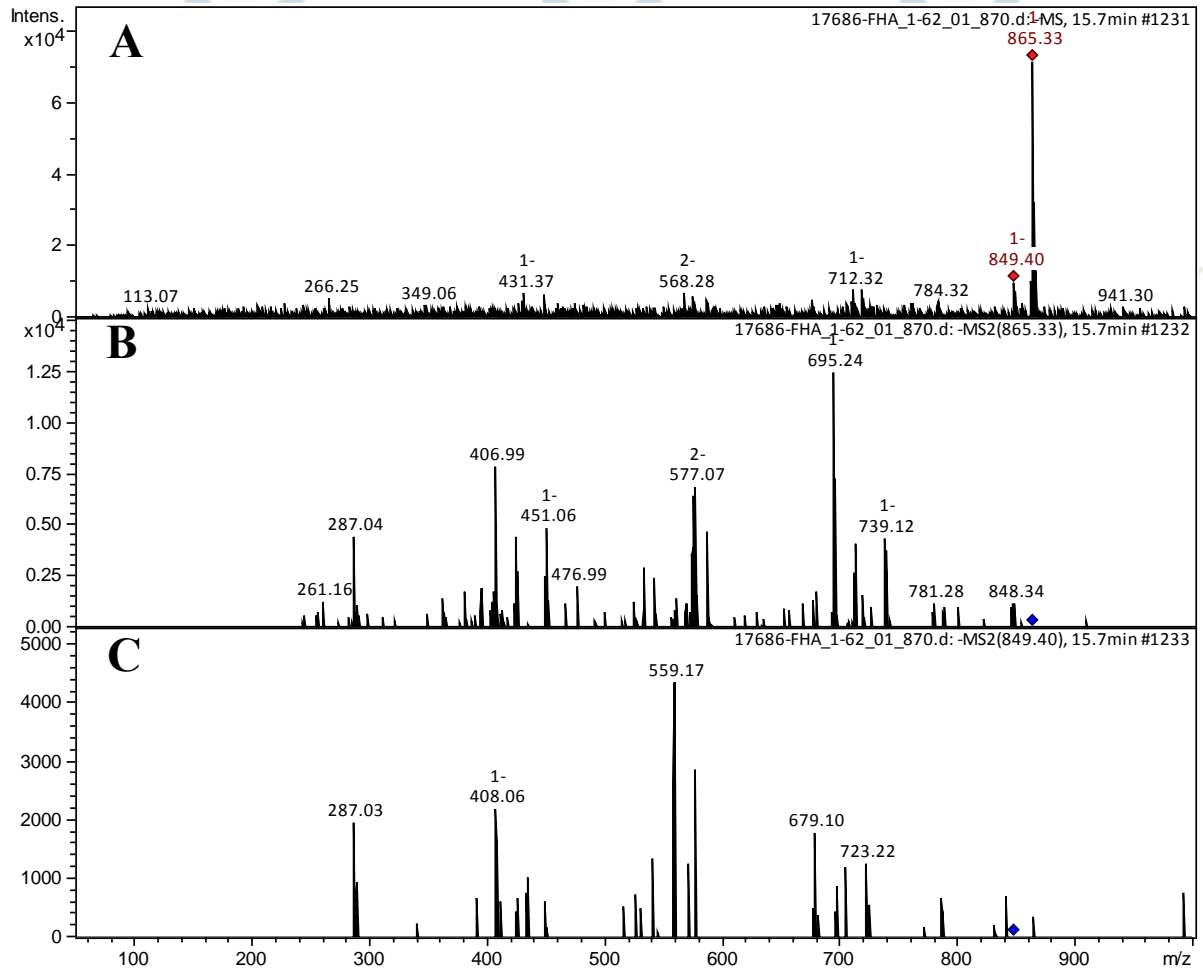
**Figura S12.** Espectro de massas da fração hidroalcolica. Em (A) encontra-se os íons majoritários encontrados na FHAMR em 3,9 min. O painel (B) demonstra os fragmentos do íon 341 enquanto o painel (C) os fragmentos do íon 387.



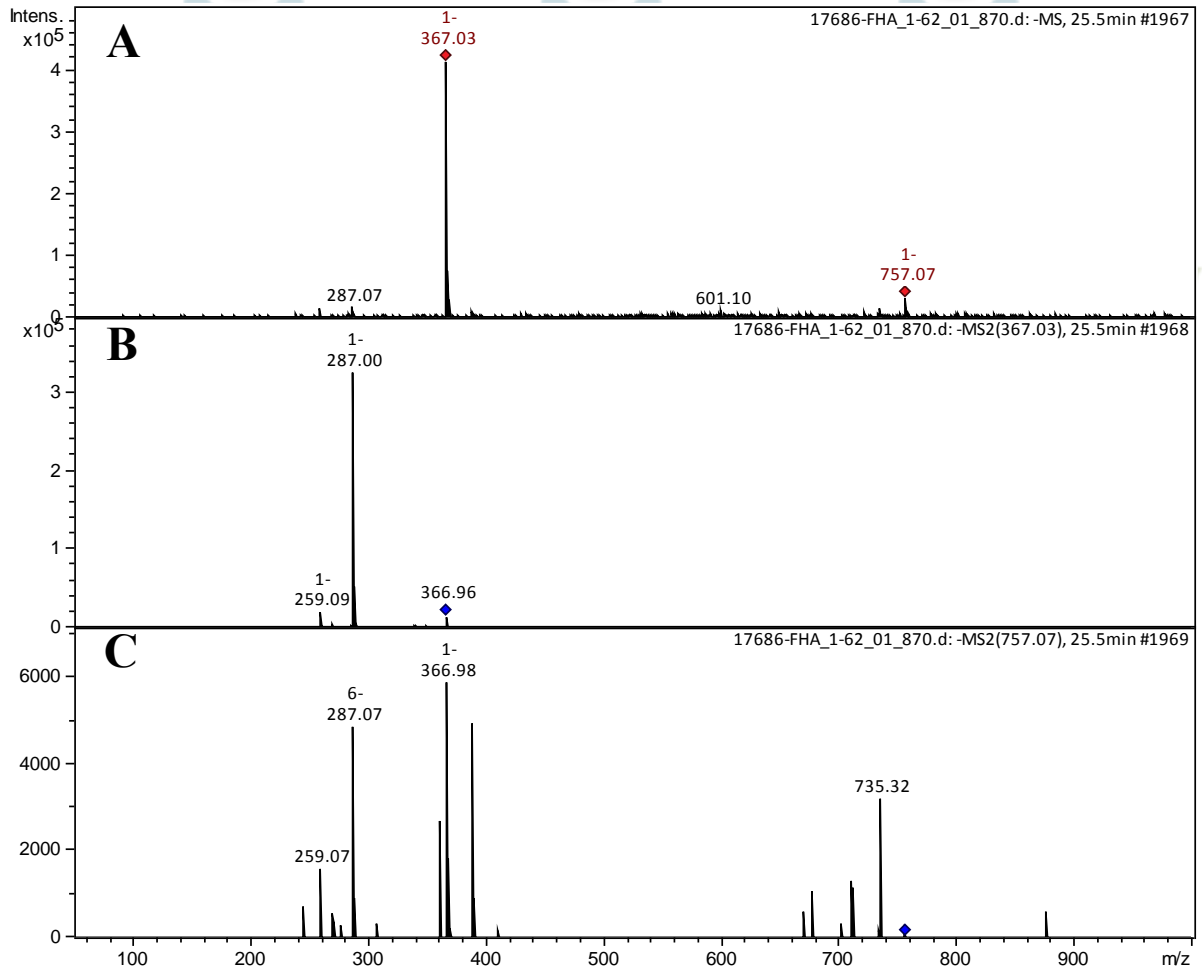
**Figura S13.** Espectro de massas da fração hidroalcolica. Em (A) encontra-se os íons majoritários encontrados na FHAMR em 4,4 min. O painel (B) demonstra os fragmentos do íon 317 enquanto o painel (C) os fragmentos do íon 635.



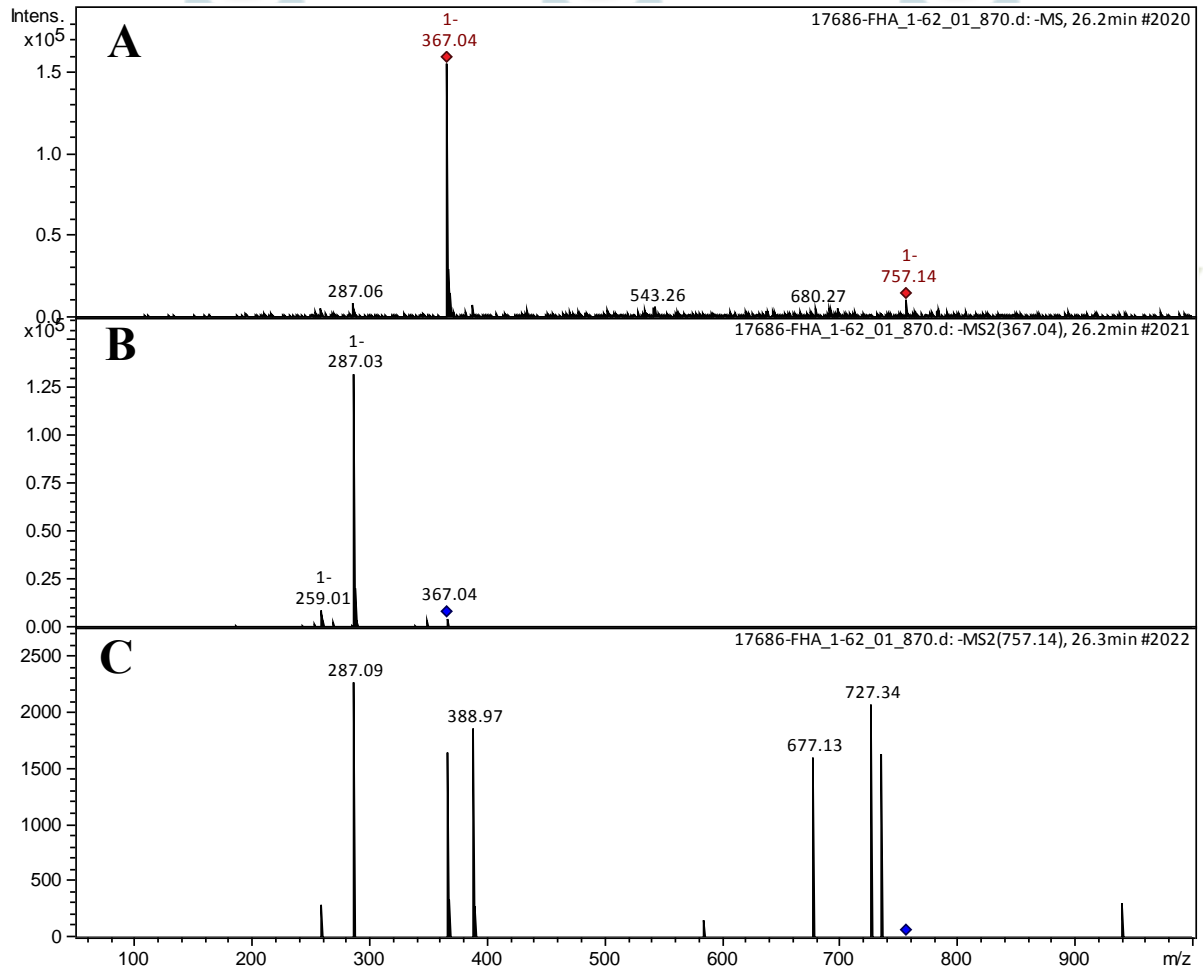
**Figura S14.** Espectro de massas da fração hidroalcolica. Em (A) encontra-se os íons majoritários encontrados na FHAMR em 14,4 min. O painel (B) demonstra os fragmentos do íon 577 enquanto o painel (C) os fragmentos do íon 865.



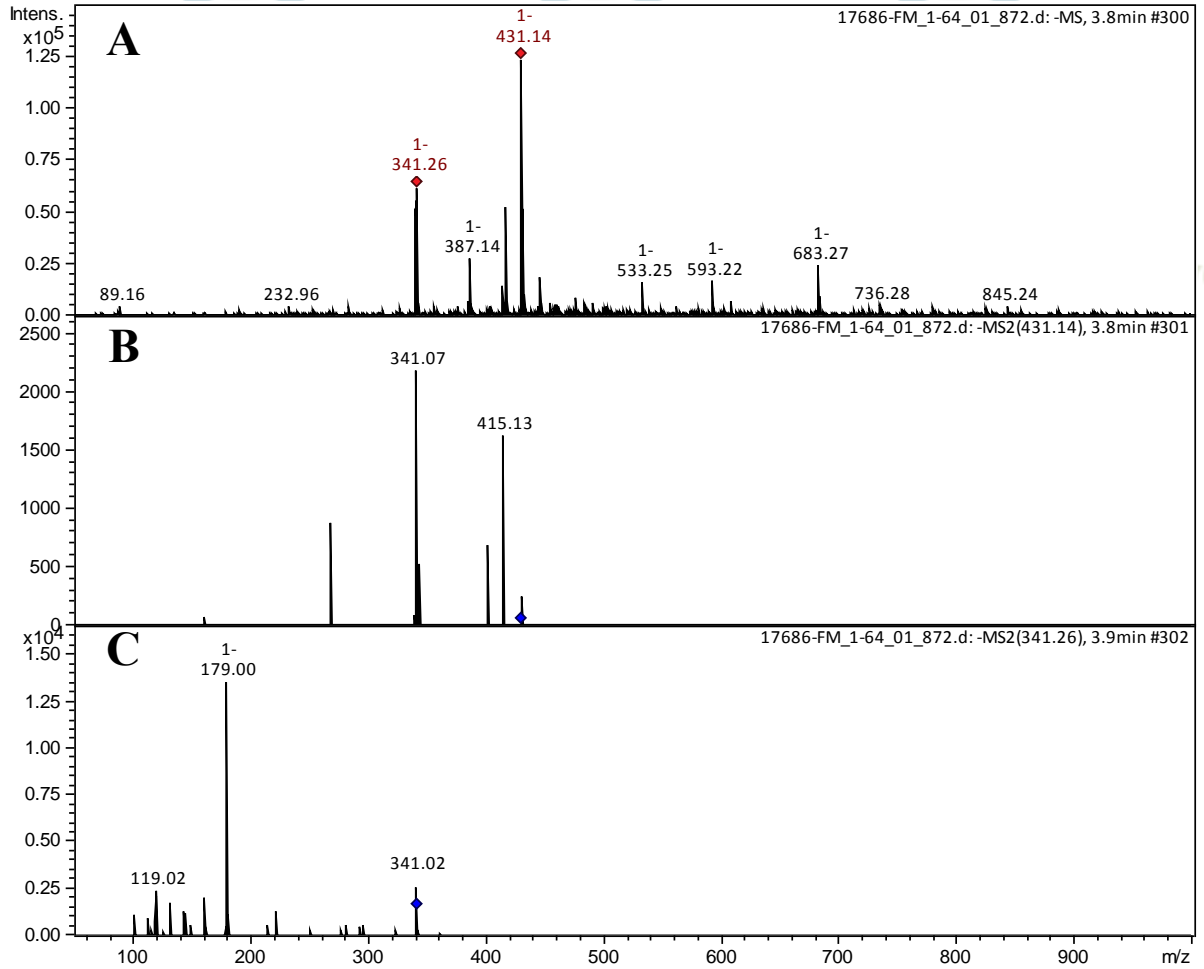
**Figura S15.** Espectro de massas da fração hidroalcolica. Em (A) encontra-se os íons majoritários encontrados na FHAMR em 15,7 min. O painel (B) demonstra os fragmentos do íon 865 enquanto o painel (C) os fragmentos do íon 849.



**Figura S16.** Espectro de massas da fração hidroalcolica. Em (A) encontra-se os íons majoritários encontrados na FHAMR em 25,5 min. O painel (B) demonstra os fragmentos do íon 367 enquanto o painel (C) os fragmentos do íon 757.

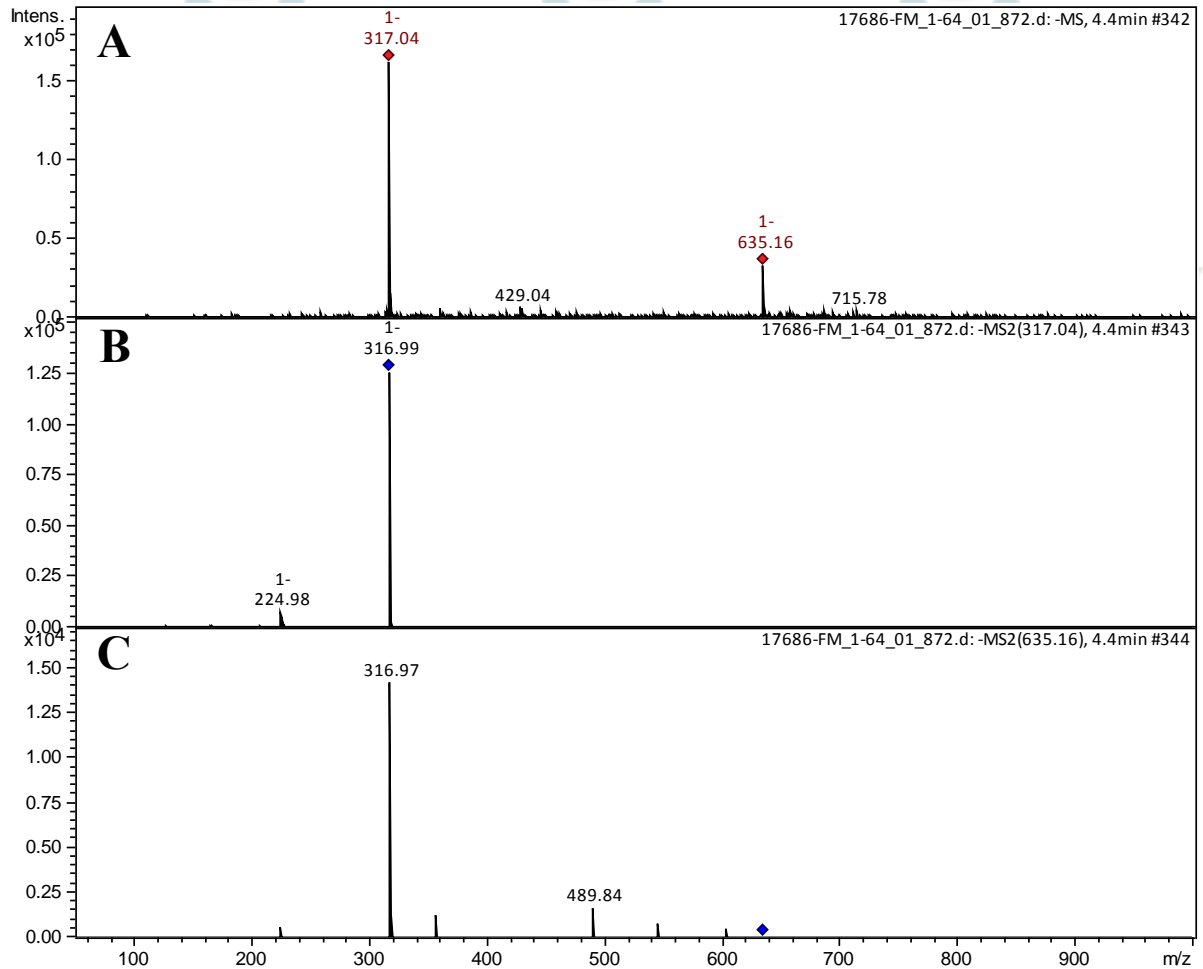


**Figura S17.** Espectro de massas da fração hidroalcolica. Em (A) encontra-se os íons majoritários encontrados na FHAMR em 26,2 min. O painel (B) demonstra os fragmentos do íon 367 enquanto o painel (C) os fragmentos do íon 757.

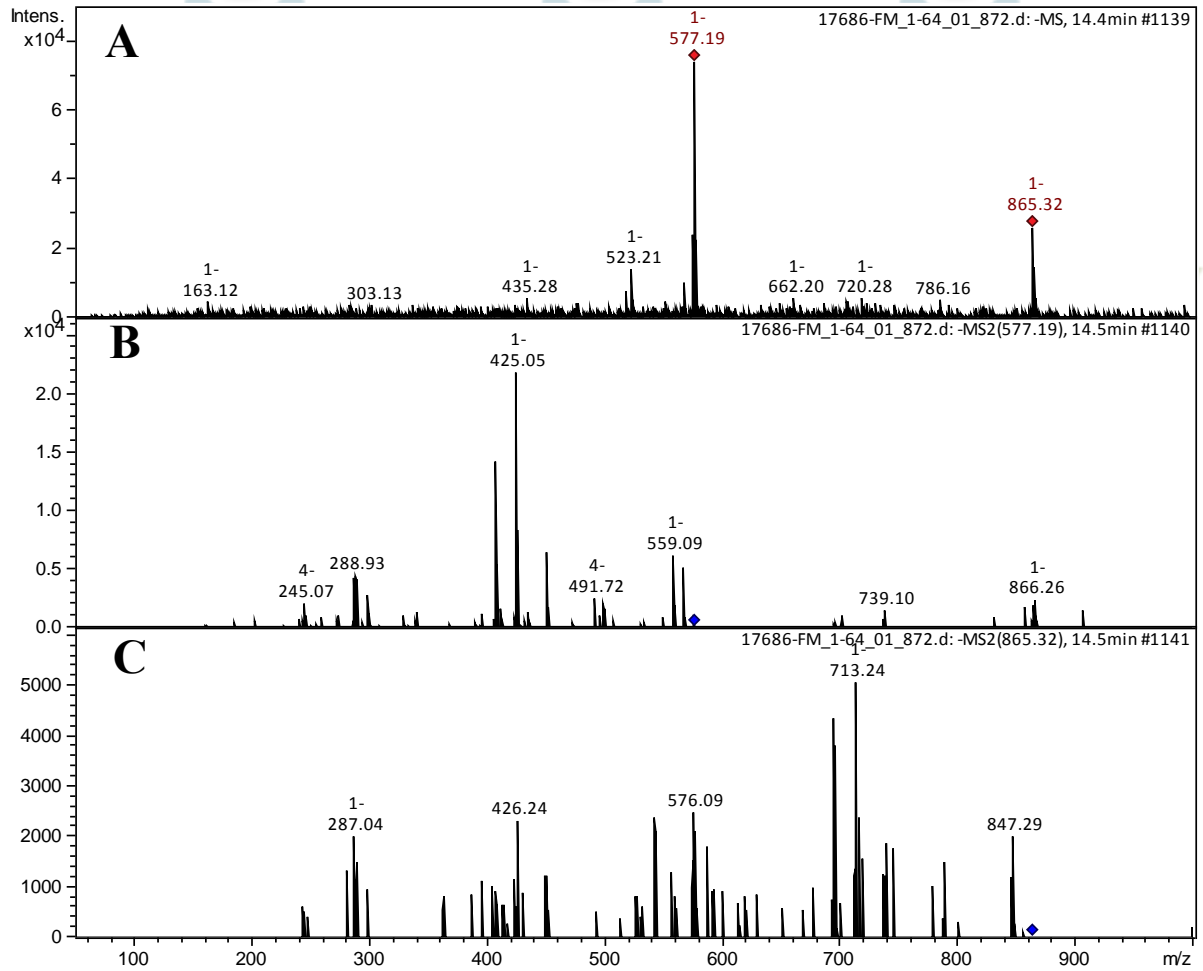


**Figura S18.** Espectro de massas da fração metanólica. Em (A) encontra-se os íons majoritários encontrados na FMMR em 3,8 min. O painel (B) demonstra os fragmentos do íon 431 enquanto o painel (C) os fragmentos do íon 341.

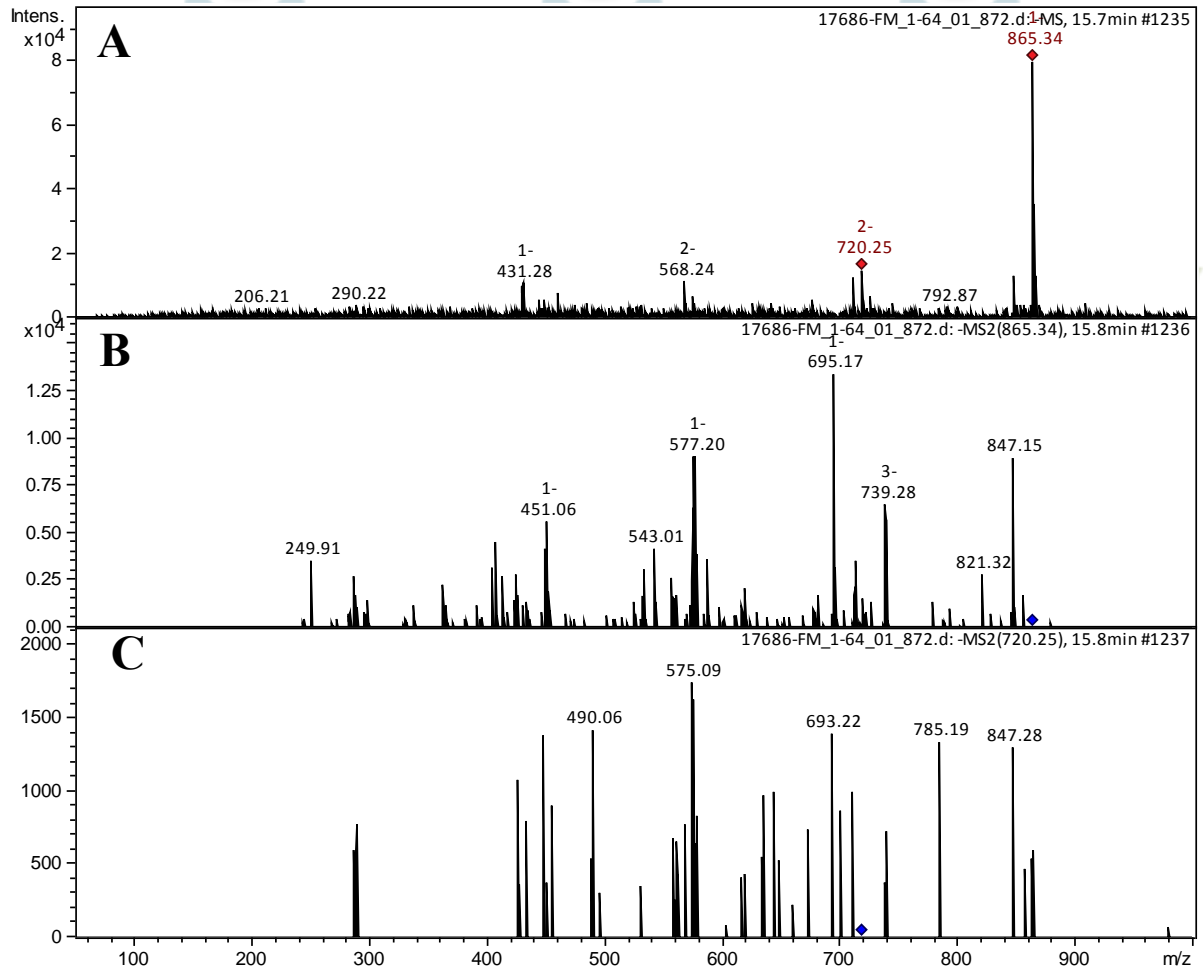




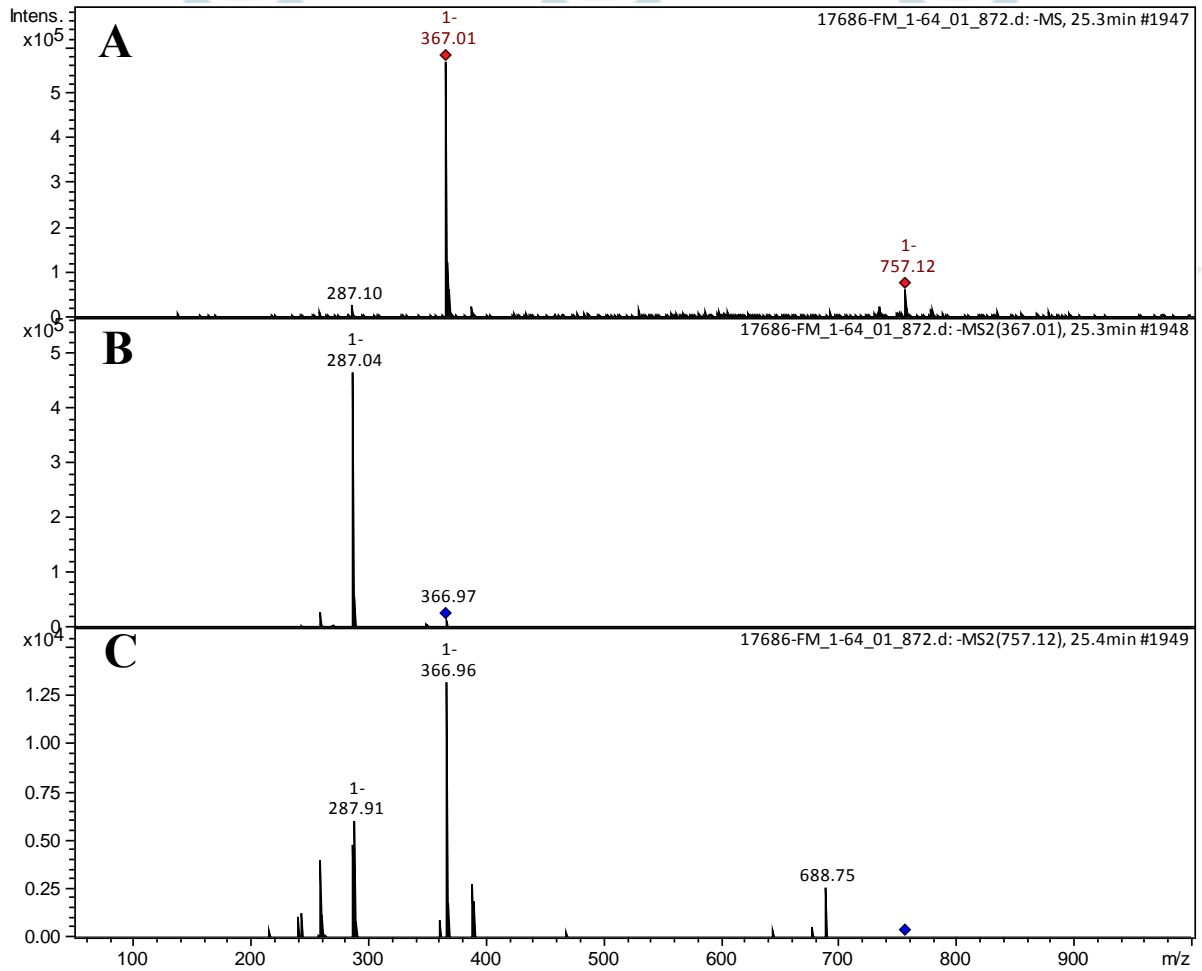
**Figura S19.** Espectro de massas da fração metanólica. Em (A) encontra-se os íons majoritários encontrados na FMMR em 4,4 min. O painel (B) demonstra os fragmentos do íon 317 enquanto o painel (C) os fragmentos do íon 635.



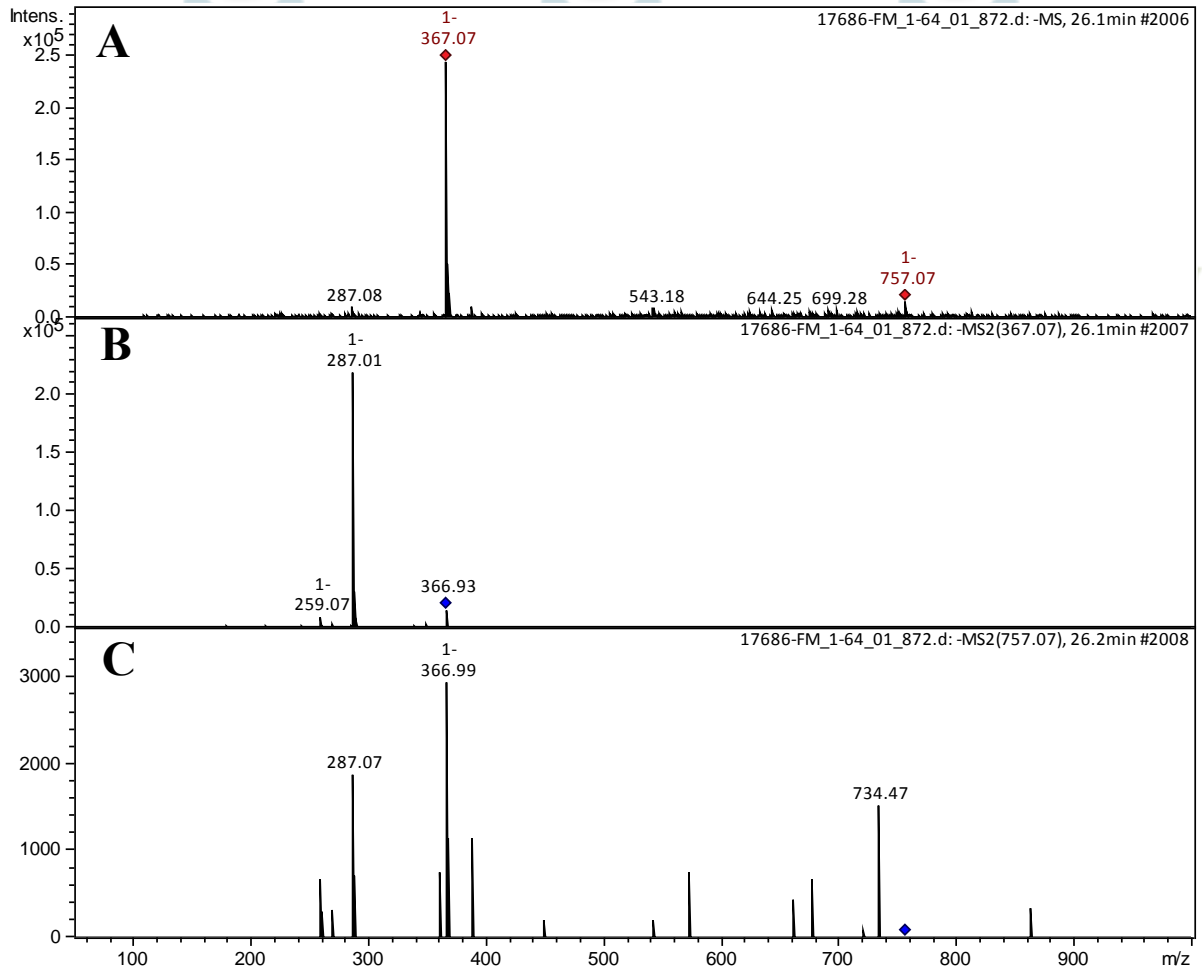
**Figura S20.** Espectro de massas da fração metanólica. Em (A) encontra-se os íons majoritários encontrados na FMMR em 14,5 min. O painel (B) demonstra os fragmentos do íon 577 enquanto o painel (C) os fragmentos do íon 865.



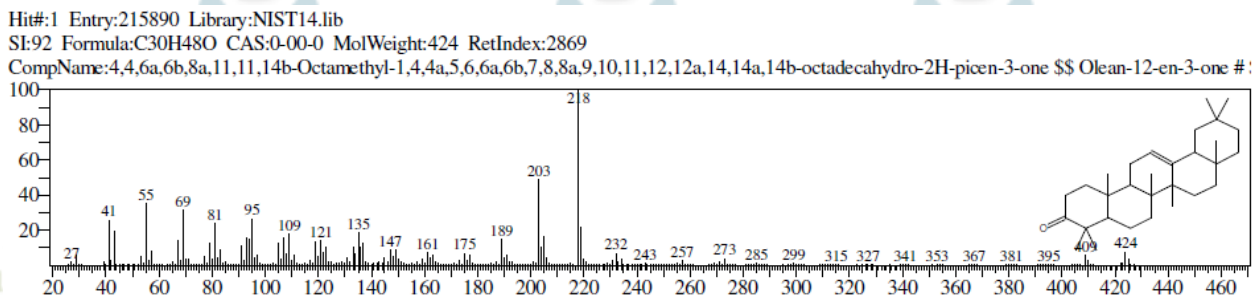
**Figura S21.** Espectro de massas da fração metanólica. Em (A) encontra-se os íons majoritários encontrados na FMMR em 15,8 min. O painel (B) demonstra os fragmentos do íon 865 enquanto o painel (C) os fragmentos do íon 720.



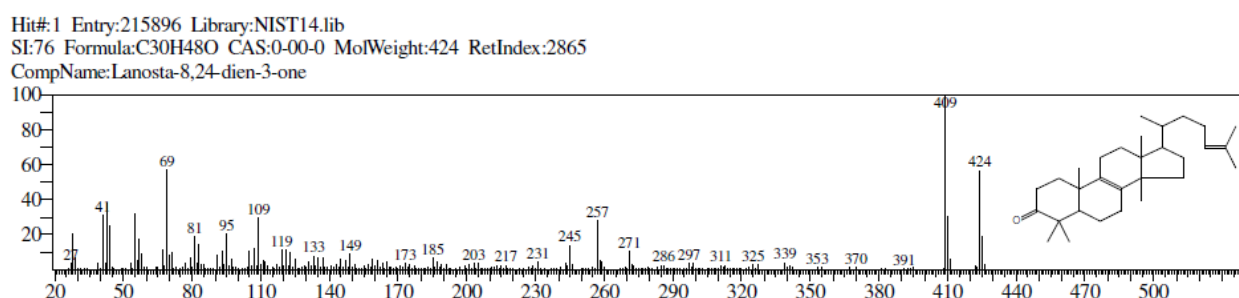
**Figura S22.** Espectro de massas da fração metanólica. Em (A) encontra-se os íons majoritários encontrados na FMMR em 25,4 min. O painel (B) demonstra os fragmentos do íon 367 enquanto o painel (C) os fragmentos do íon 757.



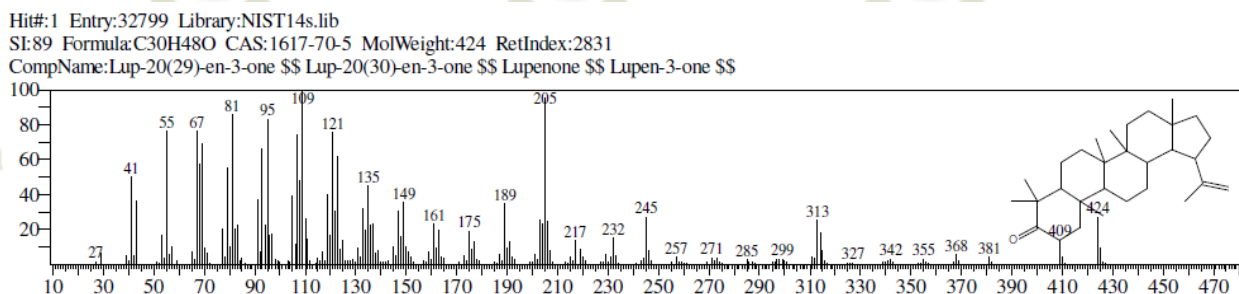
**Figura S23.** Espectro de massas da fração metanólica. Em (A) encontra-se os íons majoritários encontrados na FMMR em 26,2 min. O painel (B) demonstra os fragmentos do íon 367 enquanto o painel (C) os fragmentos do íon 757.



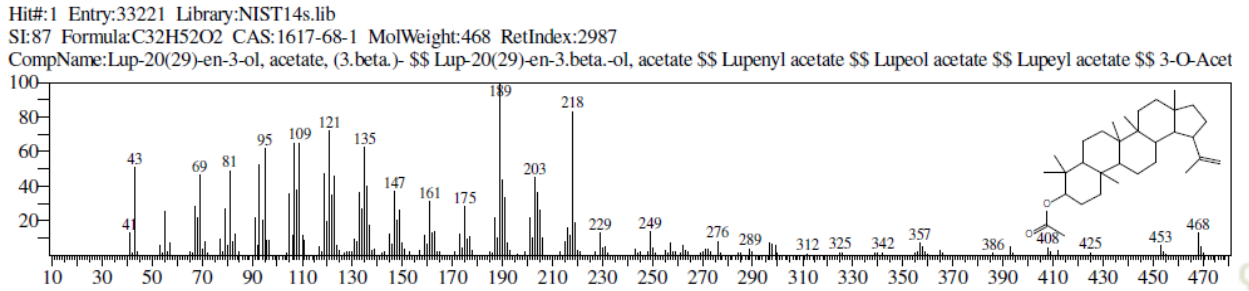
**Figura S24.** Cromatograma da fração hexânica. Estrutura do composto olean-12-em-3-ona com similaridade de 92% de acordo com NIST, versão 14.



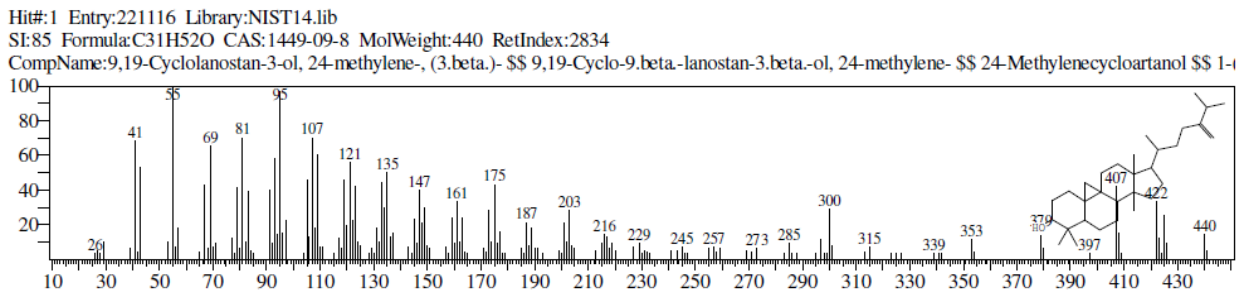
**Figura S25.** Cromatograma da fração hexânica. Estrutura do composto lanosta-8,24-dien-3-ona com similaridade de 76% de acordo com NIST, versão 14.



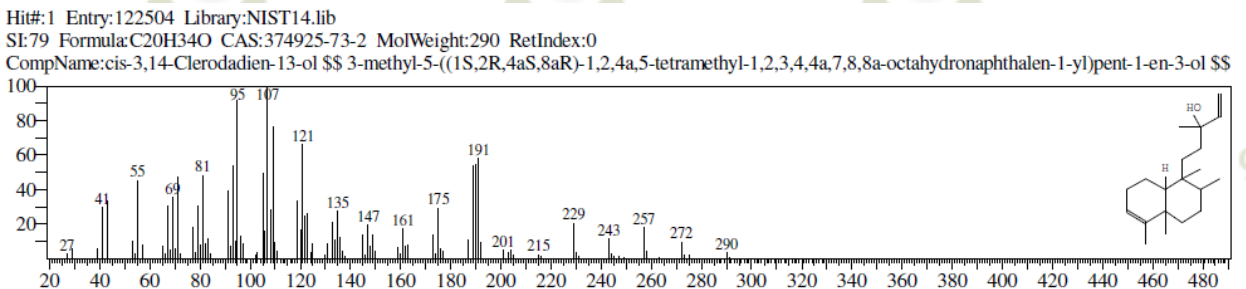
**Figura S26.** Cromatograma da fração hexânica. Estrutura do composto lupenona com similaridade de 89% de acordo com NIST, versão 14.



**Figura S27.** Cromatograma da fração hexânica. Estrutura do composto lupeol acetato com similaridade de 87% de acordo com NIST, versão 14.



**Figura S28.** Cromatograma da fração hexânica. Estrutura do composto ciclolanostan-3-ol com similaridade de 85% de acordo com NIST, versão 14.



**Figura S29.** Cromatograma da fração hexânica. Estrutura do composto cis-3,14-clerodadien-13-ol com similaridade de 79% de acordo com NIST, versão 14.