

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA- UNB**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**CURSO DE FARMÁCIA**

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO FLAVONÓIDE LEISHMANICIDA DE  
CONNARACEAE**

**Estudante:** Laís da Silva Moraes – 13/0012271

**Orientadora:** Prof. Dra. Lorena Carneiro Albernaz

**Coorientadora:** MSc. Renata Garcia Dusi

Brasília

2018

LAÍS DA SILVA MORAIS

13/0012271

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE FLAVONÓIDE LEISHMANICIDA DE  
CONNARACEAE**

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Farmácia da Universidade de Brasília, como requisito parcial de obtenção do Título de Bacharel em Farmácia.

**Orientadora:** Prof. Dra. Lorena C. Albernaz

**Coorientadora:** MSc. Renata Garcia Dusi

Brasília

2018

Dedico aos meus pais, Ivan e Adriana, ao meu  
irmão, Igor, e a minha companheira, Bruna, por  
estarem comigo sempre.

### **FOLHA DE APROVAÇÃO**

Laís da Silva Morais

### **ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE FLAVONÓIDE LEISHMANICIDA DE CONNARACEAE**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade de Brasília como  
requisito parcial para obtenção de grau Farmacêutico.

Profª Drª Lorena Carneiro Albernaz

### **AGRADECIMENTOS**

À Deus, aos meus orixás e aos espíritos de luz por sempre estarem ao meu lado.

À minha família, por todos os ensinamentos, e por nunca me deixarem desistir.

À minha companheira, Bruna, e a sua família, que agora também é minha, por todo carinho, respeito e estímulo para continuar.

À minha Mam's, ao Luci e a Fatimílica por todo apoio nos momentos em que mais precisei.

À Nayara, minha irmã, por estar sempre ao meu lado.

Aos meus amigos, Bia, Eduardo e Renata, pela caminhada juntos.

À minha orientadora Profª Drª Lorena Carneiro Albernaz, minha mãe na ciência pelos ensinamentos, paciência, confiança, apoio nos dias difíceis e ser uma inspiração.

À minha coorientadora, e amiga Msc. Renata Garcia Dusi, por me estimular na vida acadêmica e pessoal a ser uma pessoa melhor a cada dia, pelos ensinamentos, tempo dedicado, paciência e também por ser uma inspiração.

À Profª Drª Laila Salmen Espindola, pela sua dedicação a vida profissional, por ser exemplo e pelo reconhecimento ao meu trabalho.

À Maristela, minha parceira de laboratório, por me ajudar durante o projeto e por me apoiar em todos os momentos.

Ao Daniel, que apesar de sua passagem rápida contribuiu para o meu crescimento profissional.

À Sophia, por sempre estar disposta a me ajudar, principalmente nessa reta final, em que estamos juntas.

À toda equipe do Laboratório de Farmacognosia UnB, pela convivência e apoio diários.

Muito obrigada.

## RESUMO

A leishmaniose é uma doença causada por parasitas do gênero *Leishmania* spp., que pode apresentar quadros clínicos distintos como feridas, deformações mucosas, ou quadros severos que levam a hepatomegalia. O Brasil é o país com maior número de casos de leishmaniose cutânea, e um dos de maior incidência de leishmaniose visceral nas Américas. A resistência, toxicidade, custo e a administração parenteral da maioria dos tratamentos atuais estimulam a busca por novos tratamentos. Dentro desse contexto, uma alternativa para o tratamento da leishmaniose é a pesquisa de substâncias ativas extraídas de produtos naturais. O Cerrado brasileiro é detentor de uma vasta biodiversidade vegetal podendo servir de fonte para a busca de novas moléculas de interesse terapêutico. Esse estudo teve como objetivo investigar a atividade de 9 diferentes extratos de espécie de Connaraceae isolar compostos ativos através de fracionamento bioguiado em formas promastigota de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. O extrato Arbo0346 apresentou  $CI_{50}$  de 14  $\mu\text{g/mL}$ , e seu fracionamento resultou no isolamento de Arbo18A004I que apresentou  $CI_{50}$  de 38  $\mu\text{M}$ . O índice de seletividade calculado com a  $CC_{50}$  de macrófagos J774, foi aproximadamente 1, que é considerado baixo. Apesar disso, a presença de diferentes grupos orgânicos na molécula e a diferença que existe entre as formas promastigotas e amastigotas, fazem com que o Arbo18A004I possa ser ativo na forma intracelular em concentrações não tóxicas. As modificações estruturais presentes na molécula conferem características que contribuem para a facilidade da criação de formulações, possibilitando um tratamento menos invasivo e mais eficiente.

**Palavras chave:** *Leishmania amazonensis*, Connaraceae, flavonoide, Cerrado, leishmaniose.

## ABSTRACT

Leishmaniasis is a disease caused by *Leishmania* spp. parasites, which present distinct clinical conditions such as wounds, mucosal deformations, or severe conditions leading to hepatomegaly. Brazil is the country with the highest number of cases of cutaneous leishmaniasis, and one of the highest incidence of visceral disease in the Americas. The resistance, toxicity, price and the intravenous administration of the current treatments stimulate the search for new treatments. This study aimed to investigate the activity of 9 different extracts of Connaraceae species, and to isolate active compounds through bioguided fractionation through *Leishmania (Leishmania) amazonensis* promastigote tests. The extract Arbo 0346 showed an  $IC_{50}$  of 14  $\mu\text{g/mL}$ , and its fractionation resulted in the isolation of a Arbo18A004I, that presented an  $IC_{50}$  of 39  $\mu\text{M}$ . Its selectivity index calculated with  $CC_{50}$  of J774 macrophages was approximately 1, which is considered a toxic compound. Nevertheless, the presence of different organic groups in the molecule and the difference in the activity of known compounds in the distinct forms of the parasite qualify Arbo18A004I to be active in amastigote forms in non-toxic concentrations. The structure modifications of the molecule confer characteristics that may ease the creation of formulations, allowing a less invasive and more efficient treatment.

**Keywords:** *Leishmania amazonensis*, Connaraceae, flavonoid, Brazilian Cerrado biome, leishmaniosis.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Manifestações clínicas de leishmaniose. a. leishmaniose cutânea. b. leishmaniose mucocutânea e c. leishmaniose visceral (Adaptado de: CDC, 2018; Fiocruz 1997).....	3
<b>Figura 2.</b> Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> ssp. (Fonte: CDC, 2018. Adaptado) .....	4
<b>Figura 3.</b> Estrutura do antimoniato de n-metilglucamina. ....	4
<b>Figura 4.</b> Estrutura da Anfotericina B.....	5
<b>Figura 5.</b> Estrutura da Pentamidina .....	5
<b>Figura 6.</b> Estruturas da a. paromomicina e de b. miltefosina.....	6
<b>Figura 7.</b> Formas promastigota de <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> (MHOM/PH8/BR).....	11
<b>Figura 8.</b> Fotomicrografia da cultura de macrófagos J774A.1 em meio de cultura (aumento 400x).....	12
<b>Figura 9.</b> Placa de 96 poços após a reação colorimétrica da Resazurina .....	13
<b>Figura 10.</b> A. Pré frações obtidas do pré-fracionamento com SPE-diol; B. Cromatografia em Camada Delgada (CCD) das cinco pré-frações realizada após o fracionamento. ....	15
<b>Figura 11.</b> Coluna de Sílica Gel da fração ativa.....	15
<b>Figura 12 .</b> CCD das frações obtidas da coluna de Sílica. ....	16
<b>Figura 13.</b> A: Coluna de Sephadex e B:CCD de suas frações unidas.....	17
<b>Figura 14.</b> Gráfico das atividades dos extratos testados nas concentrações 100 µg/mL e 50 µg/mL, respectivamente. * Valores com p<0,05 quando comparados com o controle negativo. ....	18
<b>Figura 15.</b> Curva dose resposta de Arbo0346 suas frações.....	20
<b>Figura 16.</b> Atividade leishmanicida das frações recolhidas da coluna de sílica a 100 µg/mL. * valores de p<0,05 quando comparado ao controle.....	22
<b>Figura 17.</b> Fluxograma de isolamento .....	23
<b>Figura 18.</b> Estrutura química proposta para Arbo18A004I.....	24
<b>Figura 19.</b> Espectro de Infravermelho de Arbo18A004I.....	24
<b>Figura 20.</b> Espectro de massas de Arbo18A004I .....	25
<b>Figura 21.</b> Espectro de <sup>1</sup> H (600 MHz; CDCl <sub>3</sub> ) de Arbo18A004I .....	26

<b>Figura 22.</b> Espectro de $^{13}\text{C}$ (150 MHz; $\text{CDCl}_3$ ) de Arbo18A004I .....	27
<b>Figura 23.</b> Espectro de HSQC editado (600 MHz; $\text{CDCl}_3$ ) de Arbo18A004I .....	27
<b>Figura 24.</b> Espectro COSY (600 MHz; $\text{CDCl}_3$ ) de Arbo18A004I .....	28
<b>Figura 25.</b> Espectro HMBC (600 MHz; $\text{CDCl}_3$ ) de Arbo18A004I .....	29
<b>Figura 26.</b> Espectro de TOCSY (600MHz; $\text{CDCl}_3$ ) dos hidrogênios 5,2 em azul e 5,26 em vermelho .....	29
<b>Figura 27.</b> Espectros de NOESY (600MHz; $\text{CDCl}_3$ ), próton 5,2 em azul e 5,26 em vermelho .....	30
<b>Figura 28.</b> Curva dose - resposta de Arbo18A004I (GraphPrism 7) .....	32

#### LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Extratos preparados. ....	9
<b>Tabela 2.</b> Frações SPE- diol.....	13
<b>Tabela 4.</b> Rendimento e $\text{Cl}_{50}$ do extrato e suas frações em SPE- diol.....	16
<b>Tabela 5.</b> Frações da coluna de sílica.....	18
<b>Tabela 6 .</b> Frações obtidas da coluna de Sephadex LH-20, massa (mg) e rendimento (%). .....	20
<b>Tabela 7.</b> Dados espectrais de Arbo18A004I ( $\text{CDCl}_3$ ; $^1\text{H}$ 600 MHz; $^{13}\text{C}$ 150 MHz), incluindo resultados de experimentos 2D (COSY, HMBC, HSQC).....	27

**Tabela 8.** Atividade biológica de Arbo18A004I e da anfotericina B em *Leishmania amazonensis* e macrófago J774.A1. ....29

#### LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\mu\text{L}$  - microlitro

$\mu\text{g}$  – micrograma

CCD – Cromatografia em camada delgada

$\text{CDCl}_3$  – clorofórmio deuterado

CEGEN/IBAMA – Conselho de Gestão do Patrimônio Genético/ Instituto Brasileiro  
do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

CC<sub>50</sub> – concentração citotóxica para 50% das células

CI<sub>50</sub> – Concentração inibitória de 50%

CO<sub>2</sub> - ácido carbônico

COSY - espectroscopia de correlação (correlated spectroscopy)

d – dubleto

dd - duplo dubleto

DMSO – Dimetilsulfóxido

g – grama

h – hora

HMBC - heteronuclear multiple bond coherence

HSQC - heteronuclear single-quantum coherence

Hz - hertz

IR – Infravermelho

IS – Índice de Seletividade =  $CC_{50}/CI_{50}$

J – constante de acoplamento

m – multiplete

m/z – relação massa/carga

mg - miligrama

MHz - megahertz

mL - mililitro

MTT - brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

nm - nanômetro

°C - graus celsius

STF – solução tampão fosfato

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

RMN <sup>13</sup>C - Ressonância Magnética Nuclear de carbono treze

RMN <sup>1</sup>H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

bs – broad singlet

s – singleto  
m - multipletto  
SFB - soro fetal bovino inativado  
SPE – extração em fase sólida/ Solid Phase Extraction  
dt – dubleto de triplete  
qd – quarteto de dubleto  
ddd – dubleto de dubleto de dubleto  
UnB – Universidade de Brasília  
δ – deslocamento químico  
TOCSY - Total Correlated Spectroscopy  
NOESY - Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy

## SUMÁRIO

RESUMO .....	5
ABSTRACT.....	6
LISTA DE FIGURAS .....	7
LISTA DE TABELAS.....	8
SUMÁRIO .....	11
1. INTRODUÇÃO.....	14
1. LEISHMANIOSE.....	14

Figura 1. Manifestações clínicas de leishmaniose. a. leishmaniose cutânea. b. leishmaniose mucocutânea e c. leishmaniose visceral (Adaptado de: CDC, 2018; Fiocruz 1997).	16
2. CICLO BIOLÓGICO DA <i>Leishmania</i> spp.	16
Figura 2. Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> spp. (Fonte: CDC, 2018. Adaptado)	17
3. TRATAMENTO ATUAL	17
Figura 3. Estrutura do antimoniato de n-metilglucamina.	17
Figura 4. Estrutura da Anfotericina B.	18
Figura 5. Estrutura da Pentamidina.	18
Figura 6. Estruturas da a. paromomicina e de b. miltefosina.	19
4. CONNARACEAE	20
2. OBJETIVOS	20
2.1. OBJETIVO GERAL	20
2.2. OBJETIVOS ESPÉCIFICOS	21
3. MÉTODOS	21
3.1. PRODUÇÃO DE EXTRATOS	21
Tabela 1. Extratos preparados.	22
3.2. CULTIVO DE CÉLULAS	22
3.2.1. CULTURA CELULAR DE <i>Leishmania</i> ( <i>Leishmania</i> ) <i>amazonensis</i>	22
Figura 8. Formas promastigota de <i>Leishmania</i> ( <i>Leishmania</i> ) <i>amazonensis</i> (MHOM/PH8/BR).	22
3.2.2. CULTURA DE MÁCRÓFAGOS J774A.1	23
Figura 9. Fotomicrografia da cultura de macrófagos J774A.1 em meio de cultura (aumento 400x).	23
3.3. TESTE IN VITRO EM FORMAS PROMASTIGOTAS DE <i>Leishmania</i> ( <i>Leishmania</i> ) <i>amazonensis</i>	23
Figura 10. Placa de 96 poços após a reação colorimétrica da Resazurina	24
3.4. TESTE DE CITOTOXICIDADE	24
3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	25
3.6. FRACIONAMENTO BIOGUIADO	25
Tabela 2. Frações obtidas no pré-fracionamento.	25
Figura 11. Figura 11. A. Pré frações obtidas do pré-fracionamento com SPE-diol; B. Cromatografia em Camada Delgada (CCD) das cinco pré-frações realizada após o fracionamento.	26
Figura 12. Coluna de Sílica Gel da fração ativa.	26
Figura 13. CCD das frações obtidas da coluna de Sílica.	27
Figura 14. A: Coluna de Sephadex e B: CCD de suas frações unidas	27



## **1. INTRODUÇÃO**

Cerca de um bilhão de pessoas no mundo vivem em locais com elevado número de casos de leishmaniose e correm risco de infecção, principalmente na África e América Latina. A parasitose está associada a baixa qualidade de vida, à falta de saneamento básico, facilitando o desenvolvimento e o contato com o vetor. Essas características fazem com que a leishmaniose seja classificada pela Organização Mundial da Saúde como uma doença negligenciada. A prevenção da doença depende da melhoria das condições socioeconômicas, sanitárias, que por sua vez, necessitam de ações governamentais, frequentemente ineficientes e omissas nos países subdesenvolvidos.

A leishmaniose pode levar ao óbito e à comorbidades como cicatrizes permanentes que levam a estigmatização dos doentes. Os tratamentos utilizados atualmente são geralmente aplicados por via parenteral, longos, de alto custo, tóxicos, com efeitos colaterais significantes, e alguns ainda precisam de estudos mais consistentes. A abrangência da doença, a dificuldade dos tratamentos atuais e a biodiversidade do Cerrado motivam a busca por novas substâncias ativas.

### **1. LEISHMANIOSE**

A leishmaniose é uma doença causada por parasitas do gênero *Leishmania* spp. transmitida por insetos vetores durante o repasto sanguíneo. Atualmente são conhecidas mais de 20 espécies capazes de causar a doença em seres humanos. É endêmica em países da África e da América Latina, sendo alguns fatores de risco, as condições sanitárias precárias e moradias inadequadas que facilitam a propagação do vetor. Está geralmente associada a população de baixa renda, e tem prevalência em regiões tropicais e subtropicais. Todas essas características fazem com que a parasitose seja classificada como uma Doença Negligenciada pela Organização Mundial da Saúde (WHO 2018).

A doença apresenta principalmente duas formas clínicas, cutânea e visceral. A forma cutânea, é a mais prevalente. Só no Brasil, em 2016 foram registrados um total de 12,6 mil casos, o que representou um quarto de todos os registros para esse ano nas Américas (OPAS 2018). No mundo, a cada ano registra-se cerca de 700 mil casos (WHO 2018).

A leishmaniose tegumentar causa lesões ulceradas de borda elevada que mesmo com o tratamento adequado demoram a cicatrizar (Figura 1a). Essas lesões são comuns em regiões visíveis do corpo que levam a estigmatização do paciente. A espécie *Leishmania (Leishmania) amazonensis* é conhecida por causar a forma cutânea e tem grande importância clínica pois é capaz de causar a forma difusa da doença, que geram nódulos que são de difícil tratamento. Outra evolução da forma cutânea é conhecida como leishmaniose mucocutânea (Figura 1b) e pode levar a deformação e a perda da função nasal e bucal (CDC 2018a; Bezerra-Souza et al. 2016).

Em relação a forma visceral da leishmaniose são registrados cerca de 50 mil casos por ano no mundo (WHO 2018). Entre os anos de 2013 a 2016 mais de 90% dos casos registrados nas Américas ocorreram no Brasil, sendo que a incidência ficou entre as três maiores nesses anos (OPAS 2018). A forma visceral é caracterizada por manifestações como a hepatomegalia, esplenomegalia, febre irregular e perda de peso (Figura 1c). Quando não tratada, 95% dos casos evoluem para óbito. É comumente causada pelas espécies *L. donovani* e *L. infantum* (WHO 2018; CDC 2018a).

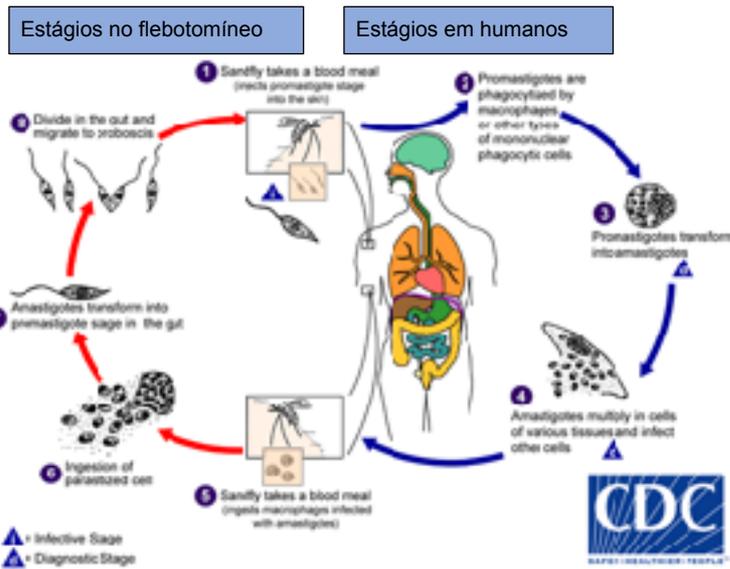


**Figura 1.** Manifestações clínicas de leishmaniose. a. leishmaniose cutânea. b. leishmaniose mucocutânea e c. leishmaniose visceral (Adaptado de: CDC, 2018; Fiocruz 1997).

## **2. CICLO BIOLÓGICO DA *Leishmania* spp.**

As *Leishmania* spp. são parasitas heteróxeos, portanto, necessitam de um vetor e um hospedeiro definitivo para completar seu ciclo de vida. Flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* sp., principalmente a espécie *Lutzomyia longipalpis*, conhecida popularmente como “mosquito palha”, são considerados os principais vetores da doença nas Américas (Neves D. P., 2004).

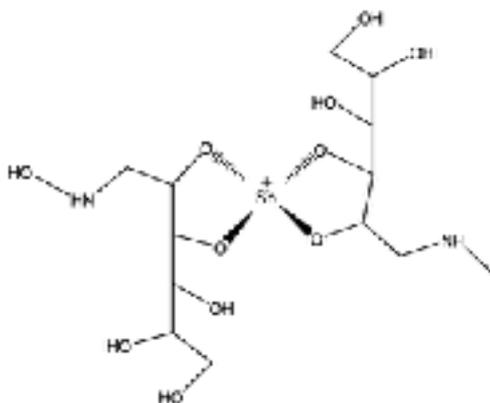
As formas promastigotas infectantes de *Leishmania* spp., presentes no intestino do inseto, migram para a probóscide e são transmitidas para mamíferos durante o repasto sanguíneo. Ao entrar na corrente sanguínea do hospedeiro, o parasita é fagocitado por células mononucleadas, especialmente macrófagos, e adquire uma forma arredondada com flagelo internalizado denominada amastigota. O parasito então se multiplica até promover lise celular, causando a infecção de outros macrófagos. Durante o repasto sanguíneo do flebotomíneo em um hospedeiro infectado, são ingeridas células contendo o parasita, que se transformam em formas infectantes novamente, possibilitando nova transmissão da doença (Figura 2) (CDC 2017).



**Figura 2.** Ciclo biológico de *Leishmania* ssp. (Fonte: CDC, 2018. Adaptado)

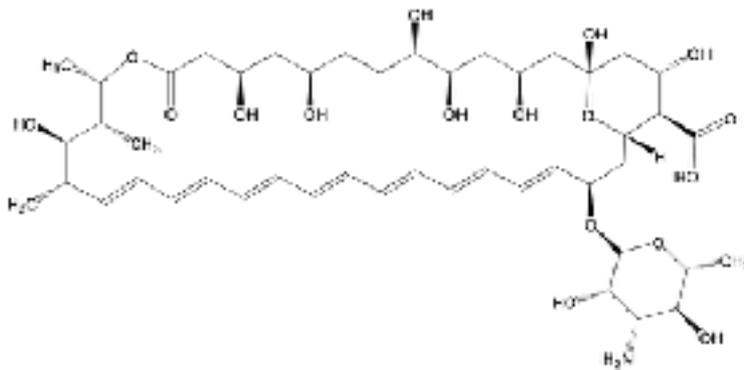
### 3. TRATAMENTO ATUAL

Atualmente o tratamento de escolha para a leishmaniose no Brasil são os antimoniais pentavalentes, principalmente o antimoniato de n-metilglucamina (Figura 3). Esse medicamento atua nas formas amastigotas interferindo no metabolismo dos parasitas, que impossibilita sua sobrevivência. Os antimoniais pentavalentes são administrados de forma endovenosa, o tratamento é longo podendo causar, principalmente, efeitos cardiotoxicos (Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana 2010).



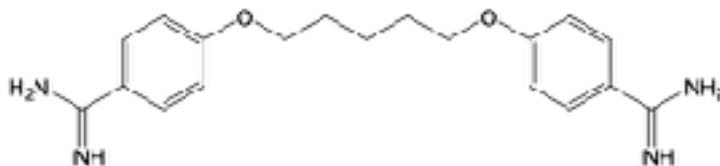
**Figura 3.** Estrutura do antimoniato de n-metilglucamina.

O tratamento de segunda escolha é a anfotericina B (Figura 4), um polieno, que é utilizado nos casos de ineficiência do antimoniato ou restrição ao seu uso. Apresenta maior seletividade devido a interferência que promove na síntese do episterol, precursor da síntese de membrana do parasita. Além do alto custo, a via de administração também é a endovenosa, podendo causar efeitos colaterais como febre e insuficiência renal (Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana 2010).



**Figura 4.** Estrutura da Anfotericina B.

As pentamidinas (Figura 5) são utilizadas como outra opção para o tratamento da leishmaniose. O mecanismo de ação desse medicamento não é totalmente conhecido, além disso, a aplicação no paciente pode levar a abscessos no local, ou até mesmo *diabetes mellitus* quando utilizado em doses mais altas. Isso porque as pentamidinas alteram o metabolismo da glicose de maneira inespecífica, o que pode ocasionar hipoglicemia, seguida de hiperglicemia nos pacientes (Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana, 2010).

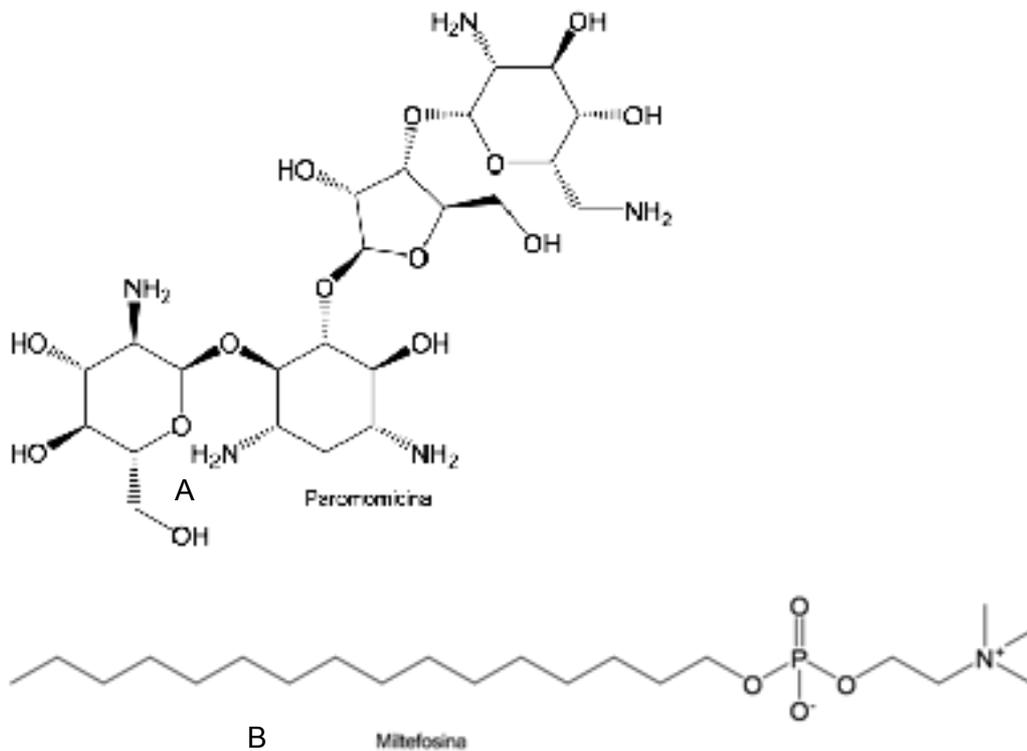


**Figura 5.** Estrutura da Pentamidina

A miltefosina (Figura 6b), um alquilfosfolípídeo desenhado como antineoplásico, e a paromomicina (Figura 6a), um antibiótico aminoglicosídeo,

apresentaram atividade leishmanicida e estão sendo utilizados em alguns lugares (Agrawal and Singh 2006; Sundar et al. 2009). A miltefosina foi o primeiro antileishmania com administração oral, e é um inibidor dez vezes mais seletivo para a enzima fosfotidiletanolamina N-metil –transferase do parasita, que atua na síntese de membrana celular (Pinto-Martinez et al. 2017).

A paromomicina não tem o mecanismo de ação leishmanicida bem estabelecido, mas assim como as pentamidinas alteram o metabolismo do parasita, provavelmente afetando o mecanismo de respiração celular na mitocôndria. Formas promastigotas e amastigotas intracelulares de *L.donovani* resistentes a esse medicamento. A droga é utilizada por via oral ou tópica e seu principal efeito colateral é a nefrotoxicidade (McCarthy, Wortmann, e Kirchhoff 2015).



**Figura 6.** Estruturas da a. paromomicina e de b. miltefosina

## **4. CONNARACEAE**

A família botânica Connaraceae é composta por espécies encontradas nas regiões tropicais, que podem ser arbustos, árvores ou trepadeiras. No Brasil, a família é composta por 5 gêneros e cerca de 70 espécies, que estão presentes também no Cerrado. *Bernardinia*, *Cnestidium*, *Connarus*, *Pseudoconnarus* e *Rourea* são os gêneros mais comuns da família e também são os presentes no Brasil (Flora do Brasil 2018).

Atividades antiparasitária de espécies da família já foram descritas em diferentes alvos. O extrato diclorometânico do caule de *Rourea minor* apresentou  $CI_{50}$  de 5  $\mu\text{g/mL}$  em *Plasmodium falciparum*, e a administração de extrato etanólico da folha de *Byrsocarpus coccinius* foi capaz de reduzir a densidade de *Plasmodium berghei* em camundongos com administração oral a 100, 200, 400 mg/kg (Akpan et al. 2012; He et al. 2006). Além disso, a espécie *Rourea induta* é utilizada no tratamento contra malária na medicina tradicional (Kalegari et al. 2014)

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1.OBJETIVO GERAL**

Determinar a atividade de espécie de Connaraceae em *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e isolar as substâncias leishmanicidas.

## **2.2.OBJETIVOS ESPÉCIFICOS**

- Avaliar a atividade leishmanicida de extratos de espécie de Connaraceae;
- Isolar substâncias ativas presentes no extrato ativo selecionado por técnicas cromatográficas;
- Identificar as substâncias isoladas;
- Determinar o  $CI_{50}$  do extrato escolhido e das substâncias isoladas em formas promastigota de *L. amazonensis*;
- Determinar citotoxicidade do extrato e de substâncias isoladas em macrófagos J774.A1

## **3. MÉTODOS**

### **3.1.PRODUÇÃO DE EXTRATOS**

A espécie foi coletada e identificada pelo botânico Prof. José Elias de Paula. Uma exsicata foi depositada no Herbário da Universidade de Brasília.

Os órgãos vegetais, casca do caule, madeira do caule, casca da raiz, madeira da raiz e folhas (Tabela1) foram separados e expostos a temperatura ambiente à sombra para secagem. Após a pulverização, os órgãos foram macerados por quatro vezes, com diferentes solventes. As soluções extrativas recuperadas foram

concentradas sob pressão em evaporador rotativo a 40 °C. O solvente residual foi evaporado com ar quente, e os extratos mantidos sob refrigeração a -20 °C. Os extratos fazem parte do “Banco de Extratos de Plantas do Bioma Cerrado”, autorizado pelo CGEN/IBAMA (n. 06/2012 – processo n. 02000.002272/2006-73).

**Tabela 1.** Extratos preparados.

Espécie de Connaraceae	Parte da planta, solvente
	MC (ae;h) CC (ae) MR (h;ae;e) CR (ae;h) F (ae)

Partes da planta - MC: madeira do caule CC: casca do caule MR: madeira da raiz CR: casca da raiz F: folha. Solvente – ae: acetato de etila h: hexano e: etanol.

### 3.2.CULTIVO DE CÉLULAS

#### 3.2.1. CULTURA CELULAR DE *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

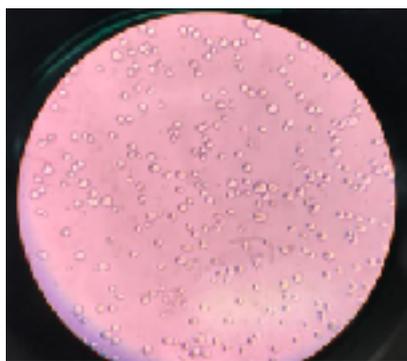
Formas promastigotas de *L. amazonensis* (MHOM/BR/PH8) foram doadas pelo Laboratório de Interação Patógeno-Hospedeiro da Universidade de Brasília (LIPH/UnB). As células foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Sigma®), suplementadas com 20% de Soro fetal bovino (Gibco®), gentamicina 25 mg/L e mantidas em incubadora B.O.D (Bio-Oxygen Demand) a 28° C (Figura 8).



**Figura 8.** Formas promastigota de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (MHOM/PH8/BR).

### 3.2.2. CULTURA DE MÁCRÓFAGOS J774A.1

Células J774A.1 (Sigma ®) foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose, Sigma®) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (Gibco®), MEM 1% (Minimum Essential Medium Eagle - Non-essential Amino Acid Solution 100×, Sigma®) e gentamicina 25 mg/L com pH ajustado para 7,2. A cultura foi mantida a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> (Figura 9).



**Figura 9.** Fotomicrografia da cultura de macrófagos J774A.1 em meio de cultura (aumento 400x).

### 3.3. TESTE IN VITRO EM FORMAS PROMASTIGOTAS DE *Leishmania*

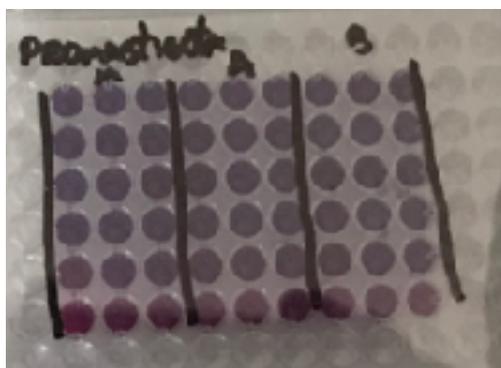
#### *(Leishmania) amazonensis*

As formas promastigotas de *L. amazonensis*, foram cultivadas até a fase estacionária (quarto dia). Os parasitos foram contados em uma câmera de contagem (Fuchs – Rosental). Em placas de 96 poços, foram adicionados o meio RPMI, as amostras solubilizadas em DMSO (dimetilsulfóxido [ $\leq$  2%]) em diferentes concentrações (100 a 3,125  $\mu$ g/mL) e 10<sup>6</sup> parasitos/poço. Os controles positivos e negativos foram a anfotericina B (11 mM a 343 nM) e meio com DMSO, respectivamente.

As placas permaneceram em incubadora B.O.D a 28° C por 20 horas. Após esse período foram adicionados 20  $\mu$ L de Resazurina (Sigma ®) 1,5mM solubilizada em STF, e novamente foram colocadas na B.O.D por mais três horas e meia. 20  $\mu$ L de SDS (10%) foram adicionados para a lise celular, e após trinta minutos foi realizada a

leitura em leitor de placas (Biochrom Asys UVM 340 Scanning Microplate Reader) a 570 nm e a 595 nm.

A viabilidade celular foi calculada de acordo Silva et al. (2017) (Figura10). A leitura é realizada em dois comprimentos de onda pois a resazurina é absorvida também no comprimento em que seu sub-produto, a resofurina. Sendo assim, um controle com meio e outro com meio mais resazurina foram feitos. Uma razão das absorbâncias da rezasurina é calculada, e levada em consideração no cálculo de viabilidade, de modo que a absorbância somente da resofurina seja levado em consideração.



**Figura 10.** Placa de 96 poços após a reação colorimétrica da Resazurina

### 3.4. TESTE DE CITOTOXICIDADE

As células de macrófagos J774A.1 foram contadas em câmara de contagem celular (Fuchs- Rosenthal) com uma solução de Azul de Tripán (0,2%) para verificação das células viáveis. As células foram aderidas em placas de 96 poços em uma concentração  $8 \times 10^3$  células/poço por 24 horas a  $37^\circ\text{C}$  e 5%  $\text{CO}_2$ . Após a adesão, o meio foi substituído pelas amostras solubilizadas em DMSO ( $\leq 2\%$ ) e DMEM (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a 3,125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Após 20 horas as amostras foram retiradas e adicionou-se 200  $\mu\text{L}$  de MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) (Sigma ®) a 5 mg/mL solubilizado em STF e voltaram para incubadora por mais três horas e meia. A solução foi retirada dos poços e adicionados 200  $\mu\text{L}$  de SDS (10%) para a lise celular. As placas foram lidas após trinta minutos em leitor de placas (Biochrom Asys UVM 340 Scanning Microplate Reader) a 570 nm (Tempone et al. 2004).

### 3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O cálculo do  $CI_{50}$  (concentração inibitória de 50% dos alvos biológicos testados) foi calculado por regressão não linear, os resultados foram expressos pela média  $\pm$  o desvio padrão determinado a partir de triplicata de três experimentos independentes. As análises foram feitas em software GraphPadPrism 7.0

### 3.6. FRACIONAMENTO BIOGUIADO

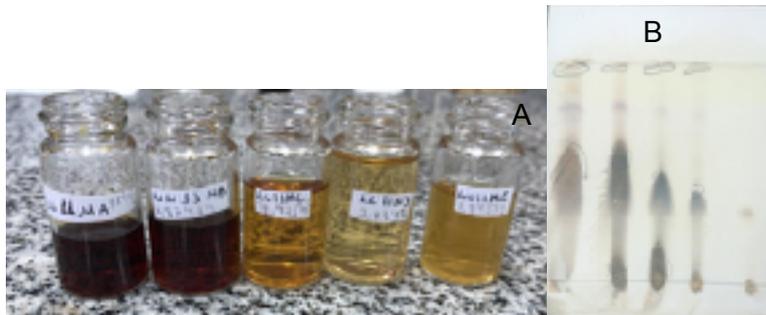
Levando em consideração a atividade leishmanicida, o extrato Arbo0346 foi selecionado para fracionamento bioguiado. O extrato foi pré-fracionado com sistema a vácuo em 12 cartuchos SPE-diol (extração em fase sólida, do inglês Solid Phase Extraction) contendo 2 g de fase estacionária (Spe-ed DIO, Applied Separations).

O extrato, 1,80 g, foi solubilizado em aproximadamente 19,2 mL de diclorometano e metanol na proporção de 1:1, sendo adicionados 1,6 mL da solução em cada cartucho. Após o depósito do extrato, os cartuchos permaneceram na capela química *overnight*, para completa evaporação dos solventes. Cada cartucho, foi fracionado sequencialmente com 6 mL dos sistemas eluentes gerando 5 pré-frações (Tabela 2) (Espindola et al. 2018).

**Tabela 2.** Frações obtidas no pré-fracionamento.

Fração
Arbo18A001A
Arbo18A001B
Arbo18A001C
Arbo18A001D
Arbo18A001E

As pré-frações do extrato (Figura 11a) também foram testadas nas formas promastigotas de *L. amazonensis*. A fração com maior atividade de maior rendimento foi selecionada para prosseguimento do fracionamento em coluna de sílica.

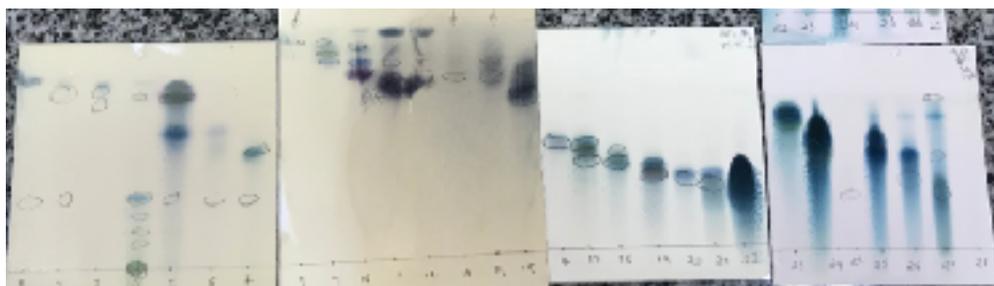


**Figura 11.** Figura 11. A. Pré frações obtidas do pré-fracionamento com SPE-diol; B. Cromatografia em Camada Delgada (CCD) das cinco pré-frações realizada após o fracionamento.

Foram realizadas cromatografias de camada delgada (CCD) para escolha do melhor sistema eluente para prosseguir com o fracionamento em coluna aberta da fração. Foi então feita uma coluna aberta de sílica gel 60 (0,04mm – 0,063mm) (230 – 400 mesh), com 1,08 g da fração selecionada (Figura 12), e um gradiente hexano:acetato de etila:metanol. Foram coletados 337 tubos, monitorados por CCD para reunir os tubos com perfil cromatográfico semelhante (Figura 13).

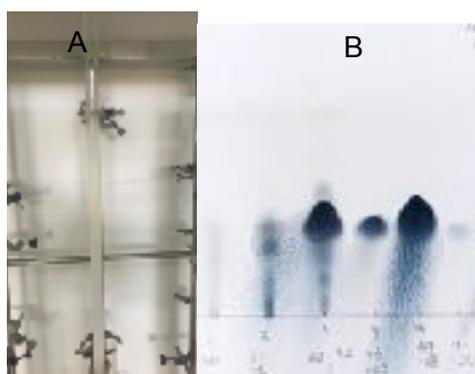


**Figura 12.** Coluna de Sílica Gel da fração ativa.



**Figura 13 .** CCD das frações obtidas da coluna de Sílica.

A fração com maior rendimento e as frações próximas a ela foram testadas em formas promastigota de *L. amazonensis* a uma concentração de 100 µg/mL. A amostra mais ativa (200,4 mg) foi submetida ao fracionamento com coluna de fase estacionária Sephadex LH-20(Sigma®) e fase móvel Diclorometano: Metanol, 1:1 (Figura 14a). Foram coletados 120 tubos, reunidos de acordo com o perfil cromatográfico em CCD (Figura 14b).



**Figura 14.** A: Coluna de Sephadex e B:CCD de suas frações unidas

### 3.7.ANÁLISE QUÍMICA

As análises por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram realizadas em aparelho Bruker Avance III 600 MHz ( $H^1$ , COSY, HMBC, HSQC, TOCSY) e em RMN de 300 MHz Varian Magneto Oxford YH300 Console Mercury Plus 300 ( $^{13}C$ ). O Espectrômetro AB Sciex TripleTOF5600+ foi utilizado para análise de massas por infusão direta, espectro de infravermelho foi realizado em aparelho de Infravermelho com transformada de Fourier- Varian 640. Todas as análises foram realizadas na Central Analítica do Instituto de Química da UnB (CAIQ/UnB).

As informações referentes aos resultados estão sob sigilo tendo em vista futura publicação do Laboratório de Farmacognosia da Universidade de Brasília.