

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Lara Soares Aleixo de Carvalho

**Identificação por ultrafiltração acoplada à CLUE-EM de ligantes enzimáticos de
apirase a partir de fontes naturais e avaliação da sua atividade
esquistossomicida *in vitro* e *in vivo***

Juiz de Fora

2020

Lara Soares Aleixo de Carvalho

Identificação por ultrafiltração acoplada à CLUE-EM de ligantes enzimáticos de apirase a partir de fontes naturais e avaliação da sua atividade esquistossomicida *in vitro* e *in vivo*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, área de concentração: Química Orgânica, da Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutora em Química.

Orientador: Prof. Dr. Ademar Alves da Silva Filho

Juiz de Fora

2020

Lara Soares Aleixo de Carvalho

**IDENTIFICAÇÃO POR ULTRAFILTRAÇÃO ACOPLADA À CLUE-EM DE
LIGANTES ENZIMÁTICOS DE APIRASE A PARTIR DE FONTES NATURAIS E
AVALIAÇÃO DA SUA ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA *IN VITRO* E *IN VIVO***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, área de concentração: Química Orgânica, da Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutora em Química.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Ademar Alves da Silva Filho - Orientador
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dra. Mara Rubia Costa Couri
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dr. Marcone Augusto Leal de Oliveira
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dr. Josué de Moraes
Universidade de Guarulhos

Dr. Sergio Ricardo Ambrosio
Universidade de Franca

*Dedico esta Tese de Doutorado aos meus amados pais Jorge e Maria e,
ao meu irmão Thiago, pela incansável insistência em me darem o
melhor que podiam. Esse trabalho é fruto do amor de vocês e das suas
inúmeras privações para que eu tivesse uma educação de qualidade.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu querido marido Victor, por todo amor e incentivo para concretizar esse sonho. Por ser fonte de inspiração e sempre me mostrar, da maneira mais doce, o que realmente importa na vida!!!

À minha pequena Luísa, já tão querida e amada, por trazer um sentimento especial nessa reta final e me ensinar a incrível arte de conciliar todas as coisas!!! Ahh e por sempre me lembrar, com seus “chutinhos”, a hora de descansar!!!

Aos meus queridos sogros, Angela e Geraldo, por estarem sempre presentes e serem fonte de alegria nos momentos de descanso!!!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ademar, por me receber em seu laboratório e me dar a oportunidade de descobrir o mundo da ciência. Nestes 10 anos de convivência dividimos muitas experiências, boas conversas e muitos conselhos!!! Não tenho como agradecer pelas inúmeras oportunidades de crescimento e por insistir incansavelmente na busca pelo meu melhor. A nossa parceria vai, além disso, em ideias, princípios e busca constante de crescimento!!! Qualquer agradecimento não será capaz de descrever meu sentimento de profunda gratidão e amizade.

À família NIPPAN pelo convívio e amizade, e principalmente aos alunos de Iniciação Científica, Lauriene, Ismael e Mirella, pela grande ajuda durante todo este trabalho. Este laboratório é um lugar onde realizamos muitas experiências, inclusive aquelas de convivência. Levarei comigo um pouquinho de cada um que passou por aqui e muitas lembranças de momentos divertidos, festivos e também os organizativos!!!!

Um agradecimento especial à Lorena que desde sua chegada foi uma grande amiga, mas que nos últimos meses nosso laço de amizade foi ainda mais intensificado. Muito obrigada pela sua generosidade em ajudar nos meus experimentos e pelo grande carinho que tem por nós!!!

À Carolina Gasparetto, pela ajuda constante na CentralBio e também pela amizade e inúmeras conversas prazerosas!!!

Às amigas da Química Orgânica, Karine, Ju, Rafa, Isa e Camille, pelas trocas de ideias sobre química orgânica, pela ajuda nas difíceis disciplinas da química e pelas boas risadas na companhia de vocês!!!

Aos funcionários do Horto da Faculdade de Farmácia, Éder e Jesus, pela coleta do material vegetal.

À Prof. Priscila por toda ajuda nos experimentos enzimáticos.

Ao Prof. Dr. Jorge Willian, por toda ajuda e paciência com as análises de CLAE. Em especial à Aline, grande parceira de experimentos, seja de dia ou de noite, dia útil ou feriado. Muito obrigada!!!

Ao Dr. Humberto de Mello Brandão, da EMBRAPA Gado de Leite, por disponibilizar o equipamento de CLUE-EM. Em especial à Michelle por nos ajudar a operá-lo e pela troca de experiências.

Aos professores do Doutorado em Química pelos grandes ensinamentos passados.

À CAPES pela bolsa concedida.

À FAPEMIG (Processo: PPM 00296-16) pelo apoio financeiro deste projeto.

A todas as pessoas que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho.

À Deus por ter colocado essas pessoas tão especiais na minha vida que me proporcionaram evolução!!!

“É na riqueza e força do espírito, onde encontramos as soluções. Assim, o homem deixa de estar encurvado, de estar doente e de estar morto, porque o homem interior não se curva jamais, nem adoece, nem morre.

Quando se sente essa força interior é que se descobre o homem verdadeiro, não o homem das perguntas, mas aquele das respostas”

Jorge Angel Livraga Rizzi

RESUMO

O presente trabalho descreve a identificação de ligantes naturais da enzima apirase de batata, os quais podem ser potenciais substâncias esquistossomicidas, por meio da ultrafiltração (UF) acoplada à CLUE-ESI-QTOF-EM. Avaliou-se também a atividade esquistossomicida *in vitro* e *in vivo* de extratos vegetais selecionados e substâncias isoladas. Primeiramente, a cardamonina, substância com atividade esquistossomicida *in vitro* e com potencial de inibição da atividade das ATP difosfohidrolases, foi avaliada frente à sua atividade esquistossomicida *in vivo* e utilizada para selecionar as condições de incubação para a técnica de UF. Em seguida alguns extratos produzidos foram incubados com a apirase de batata e submetidos à UF acoplada a CLUE-ESI-QTOF-EM. Os picos cromatográficos dos ligantes da apirase foram selecionados para posterior fracionamento dos extratos vegetais e isolamento e purificação destas substâncias ligantes. As substâncias isoladas foram avaliadas frente à enzima apirase de batata e em ensaios esquistossomicidas *in vitro* e *in vivo*. Os resultados deste estudo demonstram que a cardamonina possui capacidade de se ligar e inibir a atividade enzimática da apirase de batata, apresentando IC₅₀ de 49 µM. Além disso, em modelo murino, a cardamonina (400mg/kg) foi capaz de reduzir em 46,81% o número total de vermes recuperados e 62,44% o número de ovos imaturos. Como resultado dos ensaios de UF acoplada à CLUE-ESI-QTOF-EM, o *screening* de amostras para seleção de potenciais ligantes e inibidores da enzima apirase de batata resultou na seleção de 3 extratos vegetais das espécies *Ruta graveolens* L. (Rutaceae), *Acmella oleracea* L. (Asteraceae) e *Centela erecta* L. (Apiaceae). Destes extratos isolaram-se os ligantes arborinina, espilantol e asiaticosídeo, respectivamente. Em relação à atividade enzimática, quando avaliados a 25 µM, a arborinina, o espilantol e o asiaticosídeo foram capazes de inibir a enzima em 31,32%, 77,29% e 33,23%, respectivamente. No estudo esquistossomicida *in vitro* a fração Rg-F4, oriunda do extrato de *R. graveolens*, e o extrato de *A. oleracea*, causaram a morte de todos os parasitos após 24h e 48h de incubação. O extrato de *C. erecta* (100 µg/mL) causou a morte somente dos vermes machos, enquanto as fêmeas tiveram apenas pequena redução da atividade motora, após 24h de incubação, sendo todos os parasitos mortos após 48 h de incubação. O espilantol (100 µM) causou a morte de todos os parasitos após 24 h de incubação. Já o asiaticosídeo (400mg/kg), quando avaliado

no ensaio esquistossomicida *in vivo*, foi capaz de reduzir em 65,43% o número de vermes recuperados e, em 67,87% o número de ovos por grama de fezes. Os resultados obtidos neste estudo com a cardamonina sugerem que a apirase pode ser utilizada como molécula alvo em estudos de triagem para encontrar ligantes e possíveis inibidores das ATP difosfohidrolases de *S. mansoni*, a partir de extratos vegetais. Além disso, torna-se importante estudos adicionais para a investigação da atividade esquistossomicida *in vivo* da arborinina e do espilantol.

Palavras-chave: Ultrafiltração. CLUE-ESI-QTOF-EM. Apirase. Produtos Naturais. Esquistossomose.

ABSTRACT

The present work describes the identification of natural potato apyrase ligands, which may be potential schistosomicidal substances, through the ultrafiltration (UF) coupled with CLUE-ESI-QTOF-EM. In addition, *in vitro* and *in vivo* schistosomicidal activity of selected plant extracts and isolated substances were evaluated. Firstly, cardamonin, a substance with *in vitro* schistosomicidal and with potential to inhibit the activity of ATP diphosphohydrolases, was evaluated in the *in vivo* schistosomicidal assay and used to select the incubation conditions for the UF technique. Then some extracts produced were incubated with potato apyrase and submitted to UF coupled with CLUE-ESI-QTOF-EM. The chromatographic peaks of the ligands of apyrase were selected for further fractionation of the plant extracts and isolation and purification of these ligand substances. The isolated substances were evaluated in the potato apyrase inhibition activities assays, as well as *in vitro* and *in vivo* schistosomicidal assays. The results this study showed that the cardamonin binds and inhibits the potato apyrase enzymatic activity, with IC_{50} of 49 μ M. In addition, in a mouse model of schistosomiasis, cardamonin (400mg/kg) was able to reduce the total number of worms recovered in 46.81% and the number of immature eggs in 62.44%. As a result of the UF coupled with CLUE-ESI-QTOF-EM, the screening of samples for the selection of potential ligands and inhibitors of the potato apyrase enzyme resulted in the selection of 3 plant extracts of the species *Ruta graveolens* L. (Rutaceae), *Acmella oleracea* L. (Asteraceae) and *Centela erecta* L. (Apiaceae). From these extracts we isolate the ligands arborinine, spilanthal and asiaticoside, respectively. Regarding the enzymatic activity, when evaluated at 25 μ M, arborinine, spilanthal and asiaticoside, were able to inhibit the enzyme by 31.32%, 77.29% and 33.23%, respectively. In the *in vitro* schistosomicidal assay, the Rg-F4 fraction from *R. graveolens* extract and the *A. oleracea* extract caused the death of all parasites after 24h and 48h of incubation. *C. erecta* extract (100 μ g/mL) caused only the death of male worms, while females had only a small reduction in motor activity after 24h of incubation, and all parasites were killed after 48h of incubation. Spilanthal (100 μ M) caused the death all parasites after 24h of incubation. Asiaticoside (400mg/kg), when evaluated in the *in vivo* schistosomicide assay, was able to reduce in 65.43% the number of worms recovered and and 67.87% the number of eggs per gram of feces. The results obtained in this study with cardamonin suggest that apyrase may be used

as a target molecule in screening studies to find *S. mansoni* ATP diphosphohydrolases ligands and possible inhibitors, from herbal extracts. In addition, further studies to investigate are important to investigate the *in vivo* schistosomicidal activity of arborinine and spilanthol.

Keywords: Ultrafiltration. CLUE-ESI-QTOF-EM. Apyrase. Natural Products. Schistosomiasis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-	As quatro famílias das ectonucleotidases.....	25
Figura 2-	Catabolismo exógeno do ATP nos vermes de <i>S. mansoni</i>	31
Figura 3-	Estrutura química da tapsigargina.....	33
Figura 4-	Microscopia eletrônica de varredura de vermes macho e fêmea de <i>S. mansoni</i>	36
Figura 5-	Ciclo biológico da espécie <i>S. mansoni</i>	37
Figura 6-	Estrutura química do enantiômero <i>R</i> do Praziquantel.....	38
Figura 7-	Exemplos de substâncias naturais com atividade antiparasitária...	39
Figura 8-	Exemplos de substâncias naturais com atividade inibitória das ATP difosfohidrolases.....	41
Figura 9-	Fluxograma do fracionamento do extrato bruto diclorometânico das partes aéreas de <i>P. aduncum</i> L. (Pa).....	51
Figura 10-	Cromatograma em CLUE-ESI-QTOF-EM do extrato de <i>P. aduncum</i> L. evidenciando a cardamonina.....	58
Figura 11-	Espectro de massas em ESI-QTOF da cardamonina.....	59
Figura 12-	Estrutura química da cardamonina.....	61
Figura 13-	Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD ; 500 MHz) para a cardamonina.	62
Figura 14-	Seções expandidas entre δ 8,0 - 7,4; 6,15 - 5,85 do espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 500 MHz) da cardamonina.....	62
Figura 15-	Inibição da atividade enzimática da apirase de <i>S. tuberosum</i> pela cardamonina.....	64
Figura 16-	Efeitos do tratamento por vial com cardamonina na recuperação dos parasitos dos animais infectados com <i>S. mansoni</i>	71
Figura 17-	Efeitos nos estágios de desenvolvimento dos ovos (a) e na quantidade de ovos por grama de fezes (b) após tratamento com cardamonina por via oral.....	74
Figura 18-	Efeitos do tratamento por via oral com cardamonina sobre o peso relativo de fígados e baços dos animais com esquistossomose.....	76
Figura 19-	Filtro contendo a membrana de ultrafiltração.....	80
Figura 20-	Esquema geral da ultrafiltração acoplada à espectrometria de massas com base na análise de fração não ligada (FNL) e da fração ligada (FLA).....	81
Figura 21-	Esquema geral de uma fonte de ionização por eletrospray.....	84

Figura 22-	Representação do ensaio de ligação entre cardamonina ou extratos vegetais e apirase através da ultrafiltração.....	92
Figura 23-	Diagrama geral do procedimento de retirada de polifenóis.....	93
Figura 24-	Cromatograma do ultrafiltrado resultante da incubação da cardamonina com (a) e sem enzima (b).....	98
Figura 25-	Percentual de ligação da cardamonina-enzima em diferentes concentrações de apirase.....	99
Figura 26-	Percentual de ligação da cardamonina-enzima em diferentes tempos de incubação.....	100
Figura 27-	Cromatograma em CLUE-ESI-QTOF-EM (modo positivo) do extrato bruto de <i>R. graveolens</i> (a), do ultrafiltrado incubado com enzima (b) e branco (c).....	103
Figura 28-	Cromatograma em CLUE-EM-QqQ em modo positivo do extrato bruto de <i>R. graveolens</i> (a), do ultrafiltrado incubado sem enzima (b).....	104
Figura 29-	Espectro de massas do composto no tempo de retenção de 6,72 minutos obtido por EM/EM-QTOF em modo positivo.....	105
Figura 30-	Estrutura química da arborinina.....	106
Figura 31-	Cromatograma em CLUE-ESI-QTOF-EM (modo positivo) do extrato bruto de <i>A. oleracea</i> (a), do ultrafiltrado incubado com enzima (b) e branco (c).....	108
Figura 32-	Cromatograma em CLUE-EM-QqQ em modo positivo do extrato bruto de <i>A. oleracea</i> (a), do ultrafiltrado incubado sem enzima (b).....	109
Figura 33-	Espectro de massas do composto no tempo de retenção de 7,86 minutos obtido por EM/EM-QTOF em modo positivo.....	110
Figura 34-	(a) Mecanismo de formação do cátion radicalar. (b) Mecanismo de formação do cátion ciclopropeno.....	111
Figura 35-	Estrutura química do espilantol.....	112
Figura 36-	Cromatograma em CLUE-ESI-QTOF-EM (modo negativo) do extrato bruto de <i>C. erecta</i> (a), do ultrafiltrado incubado com enzima (b) e branco (c).....	113
Figura 37-	Cromatograma em CLUE-EM-QqQ em modo negativo do extrato bruto de <i>C. erecta</i> (a), do ultrafiltrado incubado sem enzima (b)....	114
Figura 38-	Espectro de massas do composto no tempo de retenção de 4,99 minutos obtido por EM/EM-QTOF em modo negativo.....	115
Figura 39-	Espectro de massas do asiaticosídeo obtido por EM/EM-QqQ em modo negativo.....	116
Figura 40-	Estrutura química do asiaticosídeo.....	117

Figura 41-	Folhas (A) e flores (B) de <i>R. graveolens</i>	120
Figura 42-	Alguns flavonoides identificados em <i>R. graveolens</i>	121
Figura 43-	Algumas cumarinas identificados em <i>R. graveolens</i>	122
Figura 44-	Alguns alcaloides identificados em <i>R. graveolens</i>	123
Figura 45-	Núcleo acridônico.....	123
Figura 46-	Fluxograma do fracionamento do extrato bruto etanólico das partes aéreas de <i>R. graveolens</i> (Rg).....	130
Figura 47-	Cromatograma em CLUE-ESI-QTOF-EM do extrato bruto de <i>R. graveolens</i>	134
Figura 48-	Estruturas químicas dos compostos identificados no extrato bruto de <i>R. graveolens</i> por CLUE-ESI-QTOF-EM.....	136
Figura 49-	Fragmentação de furanocumarinas preniladas. A chalepensina foi utilizada como modelo.....	139
Figura 50-	Estruturas químicas do psoraleno (RgF2. 30-35) e bergapteno (RgF2. 61-72).....	141
Figura 51-	Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 ; 500 MHz) da substância RgF2. 30-35.....	142
Figura 52-	Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 ; 500 MHz) da substância RgF2. 61-72.....	143
Figura 53-	Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 ; 500 MHz) da substância RgF4 pico2.....	146
Figura 54-	Estruturas químicas da kokusaginina (RgF4 pico2) e arborinina (RgF4 pico4. 61-72).....	147
Figura 55-	Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 ; 500 MHz) da substância RgF4 pico4.....	148
Figura 56-	Seção expandida entre $\delta 8,6 - 7,2$ do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 ; 500 MHz) da substância RgF4 pico4.....	149
Figura 57-	Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 125 MHz) da substância RgF4 pico4.....	149
Figura 58-	Inibição da atividade enzimática da apirase de <i>S. tuberosum</i> pela arborinina.....	154
Figura 59-	<i>Acmella oleracea</i> (L.) R. K. Jansen.....	169
Figura 60-	Estrutura do grupo funcional das alquilamidas.....	162
Figura 61-	Algumas alquilamidas descritas na literatura.....	163
Figura 62-	Fluxograma do fracionamento do extrato bruto clorofórmico das flores de <i>A. olearacea</i> (Ao-FI).....	168

Figura 63-	Cromatograma em CLUE-ESI-QTOF-EM (modo positivo) do extrato bruto de <i>A. oleracea</i>	171
Figura 64-	Estruturas químicas dos compostos identificados no extrato bruto de <i>A. oleracea</i> por CLUE-ESI-QTOF-EM.....	172
Figura 65-	Fragmentos característicos da porção amina das alquilamidas.....	174
Figura 66-	Perda de fragmentos característicos e formação do íon acílio nas alquilamidas.....	174
Figura 67-	Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 ; 500 MHz) da substância Ao-FI-9/4.....	178
Figura 68-	Seções expandidas entre 6,8-6,0; 5,8-5,2; 3,2-1,8 e 1,0-0,75 do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 ; 500MHz) da substância AoFI9/4.	179
Figura 69-	Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 125 MHz) da substância Ao-FI-9.....	179
Figura 70-	Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 125 MHz) da substância Ao-FI-9. Expansão dos sinais.....	180
Figura 71-	Inibição da atividade enzimática da apirase de <i>S. tuberosum</i> pelo espilantol.....	183
Figura 72-	<i>Centella erecta</i> (L.f.) Fern.....	189
Figura 73-	Algumas saponinas triterpênicas e suas agliconas identificadas em <i>C. erecta</i>	190
Figura 74-	Fluxograma geral do procedimento de partição líquido-líquido do extrato bruto etanólico das partes aéreas de <i>C. erecta</i> (Ce).....	196
Figura 75-	Fluxograma do fracionamento da fração butanólica do extrato bruto etanólico das partes aéreas de <i>C. erecta</i> (Ce-B).....	197
Figura 76-	Cromatograma em CLUE-ESI-QTOF-EM (modo negativo) do extrato bruto de <i>C. erecta</i>	201
Figura 77-	Estruturas químicas dos compostos identificados no extrato bruto de <i>C. erecta</i> por CLUE-ESI-QTOF-EM.....	202
Figura 78-	Espectro de RMN de ^1H (D_3COD ; 500 MHz) para substância Ce-B40.....	204
Figura 79-	Espectro de RMN de ^{13}C (D_3COD ; 125 MHz) para substância Ce-B40.....	204
Figura 80-	Inibição da atividade enzimática da apirase de <i>S. tuberosum</i> pelo asiaticosídeo.....	209
Figura 81-	Recuperação de vermes após tratamento com asiaticosídeo por via oral.....	214
Figura 82-	Efeitos nos estágios de desenvolvimento dos ovos (a) e na quantidade de ovos por grama de fezes (b) após tratamento com asiaticosídeo por via oral.....	217
Figura 83-	Efeito do tratamento por via oral com asiaticosídeo sobre o peso relativo de fígados e baços dos animais com esquistossomose.....	218

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Gradiente utilizado durante a análise por CLUE-ESI-QTOF-EM.....	47
Tabela 2-	Disposição dos animais nos grupos experimentais e respectivos tratamentos via oral.....	55
Tabela 3-	Fragmentos gerados pela cardamonina no modo positivo e negativo.....	60
Tabela 4-	Dados do espectro de RMN de ^1H (CD_3OD ; 500 MHz) para a cardamonina.....	63
Tabela 5-	Resultados dos estudos de <i>docking</i> molecular da cardamonina com SmATPDase 1, SmATPDase 2 e apirase.....	68
Tabela 6-	Resultados de predição de toxicidade da cardamonina, utilizando os programas SwissADME (SA) e Molinspiration (MI).....	68
Tabela 7-	Efeitos do tratamento por via oral com cardamonina na recuperação dos parasitos dos animais infectados com <i>S. mansoni</i>	71
Tabela 8-	Efeitos do tratamento por via oral com cardamonina na oviposição dos animais infectados com <i>S. mansoni</i>	74
Tabela 9-	Gradiente de eluição em CLAE.....	91
Tabela 10-	Gradiente de eluição em CLAE.....	91
Tabela 11-	Dados de coleta das espécies vegetais.....	94
Tabela 12-	Substâncias identificadas no extrato bruto de <i>R. graveolens</i> e dados de massas e fragmentos encontrados comparados com a literatura.....	134
Tabela 13-	Dados dos espectros de RMN de ^1H (CDCl_3 ; 500 MHz) para as substâncias RgF2. 30-35 e RgF2. 61-72.....	144
Tabela 14-	Dados dos espectros de RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 125 MHz) para as substâncias RgF2. 30-35 e RgF2. 61-72.....	144
Tabela 15-	Dados do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 ; 500 MHz) para substância RgF4 pico2.....	146
Tabela 16-	Dados do espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 125 MHz) para substância RgF4 pico2.....	147
Tabela 17-	Dados do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 ; 500 MHz) para substância RgF4 pico4.....	150
Tabela 18-	Dados do espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 125 MHz) para substância RgF4 pico4.....	150
Tabela 19-	Atividade esquistossomicida <i>in vitro</i> do extrato de <i>R. graveolens</i> sobre os vermes adultos de <i>S. mansoni</i>	152

Tabela 20-	Resultados dos estudos de <i>docking</i> molecular da arborinina com SmATPDase 1, SmATPDase 2 e apirase.....	157
Tabela 21-	Resultados de predição de toxicidade da arborinina, utilizando os programas SwissADME (SA) e Molinspiration (MI).....	157
Tabela 22-	Dados cromatográficos e do espectro de massas das substâncias identificadas no extrato bruto de <i>A. oleracea</i>	171
Tabela 23-	Dados do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 ; 500 MHz) para substância Ao-FI-9/4.....	180
Tabela 24-	Dados do espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 125 MHz) para substância Ao-FI-9/4.....	180
Tabela 25-	Atividade esquistossomicida <i>in vitro</i> do extrato de <i>A. oleracea</i> (Ao-FI) sobre os vermes adultos de <i>S. mansoni</i>	182
Tabela 26-	Resultados dos estudos de <i>docking</i> molecular do espilantol com SmATPDase 1, SmATPDase 2 e apirase.....	186
Tabela 27-	Resultados de predição de toxicidade do espilantol, utilizando os programas SwissADME (SA) e Molinspiration (MI).....	186
Tabela 28-	Disposição dos animais nos grupos experimentais e respectivos tratamentos via oral.....	199
Tabela 29-	Dados cromatográficos e do espectro de massas das substâncias identificadas no extrato bruto de <i>C. erecta</i>	201
Tabela 30-	Dados do espectro de RMN de ^1H (D_3COD ; 500 MHz) para substância Ce-B40.....	205
Tabela 31-	Dados do espectro de RMN de ^{13}C (D_3COD ; 125 MHz) para substância Ce-B40.....	205
Tabela 32-	Atividade esquistossomicida <i>in vitro</i> do extrato de <i>C. erecta</i> (Ce) e do asiaticosídeo sobre os vermes adultos de <i>S. mansoni</i>	207
Tabela 33-	Resultados dos estudos de <i>docking</i> molecular do asiaticosídeo com SmATPDase 1, SmATPDase 2 e apirase.....	212
Tabela 34-	Resultados de predição de toxicidade do asiaticosídeo, utilizando os programas SwissADME (SA) e Molinspiration (MI)...	212
Tabela 35-	Efeitos do tratamento por via oral com asiaticosídeo na recuperação dos parasitos dos animais infectados com <i>S. mansoni</i>	214
Tabela 36-	Efeitos do tratamento por via oral com asiaticosídeo na oviposição dos animais infectados com <i>S. mansoni</i>	217

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACRs	Regiões conservadas de aminoácidos
ADMET	Absorção, distribuição, metabolização, excreção e toxicidade
ADP	Difosfato de adenosina
AMP	Monofosfato de adenosina
Ao-FI	Extrato bruto clorofórmico das flores de <i>A. olearacea</i>
APCI	Ionização química a pressão atmosférica
APPI	Ionização por fótons a pressão atmosférica
APs	Fosfatases alcalinas
ATP	Trifosfato de adenosina
BVDV	Vírus da diarreia viral bovina
CC	Cromatografia em coluna clássica
CCD	Cromatografia em camada delgada
CD ₃ OD	Metanol deuterado
Ce	Extrato bruto etanólico das partes aéreas de <i>C. erecta</i>
Ce-A	Fração em acetato de etila das partes aéreas de <i>C. erecta</i>
Ce-B	Fração butanólica das partes aéreas de <i>C. erecta</i>
Ce-H	Fração hexânica das partes aéreas de <i>C. erecta</i>
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CG	Cromatografia em fase gasosa
CI	Ionização química
cKI	Constante de inibição
CLAE-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos
CLUE-EM	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada a espectrometria de massas
CLV	Cromatografia líquida à vácuo
CMC	Carboximetilcelulose
DENV	Vírus da dengue
DIC	Dissociação induzida por colisão
DMT	Département de Médecine Traditionnelle
EI	Impacto eletrônico
E-5'NT	5' ecto-nucleotidases

E-NPPs	Ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterases
E-NTPDases	Nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases
ESI	Electrospray
FLA	Fração ligada ao alvo
FNL	Fração não ligada ao alvo
HCMV	Citomegalovírus humano
HCV	Vírus da hepatite C
HFV	Vírus da febre hemorrágica
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HSV	Herpes simplex
INRSP	Institut National de Recherche em Santé Publique
LaFaCE	Laboratório de Farmacologia Clínica e Experimental
LogP	Coeficiente de partição
MeOH	Metanol
MMP-1	Enzima metaloproteinase de matriz
<i>m/z</i>	massa/carga
NF	Nanofiltração
NIPPAN	Núcleo de Identificação e Pesquisa em Princípios Ativos Naturais
NPDN	Núcleo de Pesquisa em Doenças Negligenciadas
Nrotb	Número de bandas rotáveis
OI	Osmose inversa
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPG	Ovos por grama
Pa	Extrato bruto diclorometânico das partes aéreas de <i>P. aduncum</i>
PBS	Tampão fosfato salina
PI	Fosfato inorgânico
PLA	Fosfolipase A
PZQ	Praziquantel
Q	Quadrupolo
QqQ	Triplo quadrupolo
Q-TOF	Quadrupolo-tempo de voo
Rg	Extrato bruto etanólico das partes aéreas de <i>R. graveolens</i>
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RO5	Regra dos Cinco” de Lipinski

rpm	Rotações por minuto
TMS	Tetrametilsilano
TOF	Tempo de voo
TPSA	Área de superfície polar
UDP	Difosfato de uridina
UF	Ultrafiltração
UF-EM	Ultrafiltração acoplada à espectrometria de massas
UTP	Trifosfato de uridina
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1	CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	24
2	CARACTERÍSTICAS E IMPORTÂNCIA DAS NTPDases.....	25
2.1	FAMÍLIA DA NTPDases.....	25
2.2	NTPDases EM MAMÍFEROS.....	26
2.3	APIRASES EM PLANTAS.....	27
2.4	ATP DIFOSFOHIDROLASES, NTPases OU ATPDases EM PARASITOS.....	28
2.5	ATP DIFOSFOHIDROLASES DE <i>S. mansoni</i> E SUA HOMOLOGIA COM A APIRASE DE BATATA.....	29
3	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA FRENTE À APIRASE DE BATATA E ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA <i>IN VIVO</i> DA CARDAMONINA.....	35
3.1	ESQUISTOSSOMOSE.....	35
3.2	PRODUTOS NATURAIS COM ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA.....	39
3.3	PRODUTOS NATURAIS COMO INIBIDORES DAS ATP DIFOSFOHIDROLASES.....	40
3.4	CARDAMONINA E SUA POTENCIAL ATIVIDADE FRENTE ÀS ATP DIFOSFOHIDROLASES E APIRASE.....	42
3.5	OBJETIVOS.....	44
3.6	MATERIAL E MÉTODOS.....	45
3.6.1	Obtenção do extrato bruto de <i>Piper aduncum</i> L. (Piperaceae)...	46
3.6.2	Identificação química da cardamonina no extrato de <i>P. aduncum</i> por CLUE-ESI-QTOF-EM.....	47
3.6.3	Isolamento da cardamonina.....	48
3.6.4	Identificação da cardamonina.....	48
3.6.5	Ensaio de inibição da atividade enzimática da apirase de batata pela cardamonina.....	49
3.6.5.1	<i>Obtenção e purificação da apirase de batata.....</i>	49
3.6.5.2	<i>Ensaio de inibição da atividade enzimática.....</i>	52
3.6.6	Estudos de <i>docking</i> molecular.....	52
3.6.7	Avaliação da atividade esquistossomicida <i>in vivo</i> da cardamonina.....	53
3.6.7.1	<i>Animais utilizados e manutenção do ciclo evolutivo do <i>S. mansoni</i>..</i>	53
3.6.7.2	<i>Preparo da amostra para ensaio <i>in vivo</i>.....</i>	54
3.6.7.3	<i>Grupos experimentais para o tratamento.....</i>	54
3.6.7.4	<i>Recuperação dos vermes adultos de <i>S. mansoni</i>.....</i>	55
3.6.7.5	<i>Oograma.....</i>	55
3.6.7.6	<i>Peso hepático e esplênico.....</i>	55
3.6.7.7	<i>Análises estatísticas.....</i>	56
3.7	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
3.7.1	Identificação da cardamonina no extrato de <i>P. aduncum</i> por	

	CLUE-ESI-QTOF-EM.....	57
3.7.2	Isolamento e identificação estrutural por RMN da cardamonina.....	61
3.7.3	Ensaio de inibição da atividade enzimática da apirase de batata pela cardamonina.....	63
3.7.4	Estudos de <i>docking</i> molecular.....	65
3.7.5	Ensaio esquistossomicida <i>in vivo</i>.....	69
3.7.5.1	<i>Recuperação de vermes.....</i>	69
3.7.5.2	<i>Análise de oograma.....</i>	72
3.7.5.3	<i>Análise do peso médio dos fígados e baços dos animais após tratamento.....</i>	75
3.8	CONCLUSÃO.....	78
4	ULTRAFILTRAÇÃO ACOPLADA A CLUE-ESI-QTOF-EM PARA SELEÇÃO DE LIGANTES NATURAIS DA ENZIMA APIRASE.....	79
4.1	ULTRAFILTRAÇÃO COMO TÉCNICA DE SELEÇÃO DE MOLÉCULAS LIGANTES DE ALVOS TERAPÊUTICOS.....	79
4.2	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA ACOPLADA A DETECTOR DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CLUE-EM).....	82
4.3	OBJETIVOS.....	87
4.4	MATERIAL E MÉTODOS.....	88
4.4.1	Ultrafiltração acoplada às técnicas espectroscópicas.....	89
4.4.1.1	<i>Desenvolvimento e realização da ultrafiltração para avaliação das condições de incubação com a apirase de batata.....</i>	89
4.4.1.2	<i>Screening para seleção de potenciais ligantes em extratos vegetais por meio da ultrafiltração acoplada a CLUE-EM.....</i>	93
4.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	96
4.5.1	Desenvolvimento e realização da ultrafiltração para avaliação das condições de incubação com a enzima apirase de batata..	96
4.5.2	Screening de seleção de potenciais ligantes da apirase presentes em extratos vegetais através da ultrafiltração acoplada a CLUE-EM.....	111
4.5.2.1	<i>Ensaio de ultrafiltração e identificação de ligantes presentes em <i>Ruta graveolens</i>.....</i>	102
4.5.2.2	<i>Ensaio de ultrafiltração e identificação de ligantes presentes em <i>Acmella oleracea</i>.....</i>	106
4.5.2.3	<i>Ensaio de ultrafiltração e identificação de ligantes presentes em <i>Centela erecta</i>.....</i>	112
4.6	CONCLUSÃO.....	118
5	CARACTERIZAÇÃO POR CLUE-ESI-QTOF-EM DO EXTRATO BRUTO DE <i>Ruta graveolens</i> (RUTACEAE) E AVALIAÇÃO DA SUA ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA <i>IN VITRO</i> FRENTE À VERMES ADULTOS DE <i>S. mansoni</i>.....	119
5.1	<i>Ruta graveolens</i>	119
5.2	ALCALOIDES ACRIDÔNICOS E A ARBORININA.....	123

5.3	OBJETIVOS.....	126
5.4	MATERIAL E MÉTODOS.....	127
5.4.1	Análise por CLUE-ESI-QTOF-EM.....	127
5.4.2	Fracionamento cromatográfico e isolamento da arborinina e outros metabólitos.....	128
5.4.3	Ensaio esquistossomicida <i>in vitro</i>	131
5.4.4	Ensaio de inibição da atividade enzimática da apirase de batata pela arborinina.....	132
5.4.5	Estudos de <i>docking</i> molecular.....	132
5.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	133
5.5.1	Caracterização química do extrato bruto etanólico das partes aéreas de <i>R. graveolens</i> por CLUE-ESI-QTOF-EM.....	133
5.5.2	Isolamento e identificação estrutural das substâncias isoladas do extrato de <i>R. graveolens</i>	140
5.5.2.1	Identificação das substâncias RgF2. 30-35 e RgF2. 61-72.....	140
5.5.2.2	Identificação da substância RgF4 pico2.....	145
5.5.2.3	Identificação da substância RgF4 pico4.....	147
5.5.3	Avaliação da atividade esquistossomicida <i>in vitro</i> do extrato de <i>R. graveolens</i> e da arborinina frente à vermes adultos de <i>S. mansoni</i>	150
5.5.4	Ensaio de inibição da atividade enzimática da apirase de batata pela arborinina.....	153
5.5.5	Estudos de <i>docking</i> molecular.....	154
5.6	CONCLUSÃO.....	158
6	CARACTERIZAÇÃO POR CLUE-ESI-QTOF-EM DO EXTRATO BRUTO DE <i>Acmella oleracea</i> (ASTERACEAE) E AVALIAÇÃO DA SUA ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA <i>IN VITRO</i> FRENTE À VERMES ADULTOS DE <i>S. mansoni</i>.....	159
6.1	<i>Acmella oleracea</i> (L.) R.K. Jansen.....	159
6.2	ALQUILAMIDAS E ESPILANTOL.....	161
6.3	OBJETIVOS.....	165
6.4	MATERIAL E MÉTODOS.....	166
6.4.1	Análise por CLUE-ESI-QTOF-EM.....	166
6.4.2	Fracionamento cromatográfico e isolamento do espilantol.....	166
6.4.3	Ensaio esquistossomicida <i>in vitro</i>	168
6.4.4	Ensaio de inibição da atividade enzimática da apirase de batata pelo espilantol.....	169
6.4.5	Estudos de <i>docking</i> molecular.....	169
6.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	170
6.5.1	Caracterização química do extrato bruto clorofórmico das flores de <i>A. oleracea</i> por CLUE-ESI-QTOF-EM.....	170
6.5.2	Isolamento e identificação estrutural da substância isolada do extrato de <i>A. oleracea</i>	177

6.5.3	Avaliação da atividade esquistossomicida <i>in vitro</i> do extrato de <i>A. oleracea</i> e do espilantol frente à vermes adultos de <i>S. mansoni</i>	181
6.5.4	Ensaio de inibição da atividade enzimática da apirase de batata pelo espilantol.....	183
6.5.5	Estudos de <i>docking</i> molecular.....	184
6.6	CONCLUSÃO.....	187
7	CARACTERIZAÇÃO POR CLUE-ESI-QTOF-EM DO EXTRATO BRUTO DE <i>Centella erecta</i> (APIACEAE) E AVALIAÇÃO DA SUA ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA FRENTE À VERMES ADULTOS DE <i>S. mansoni</i>	188
7.1	<i>Centella erecta</i>	188
7.2	SAPONINAS TRITERPÊNICAS E O ASIATICOSÍDEO.....	190
7.3	OBJETIVOS.....	193
7.4	MATERIAL E MÉTODOS.....	194
7.4.1	Análise por CLUE-ESI-QTOF-EM.....	194
7.4.2	Fracionamento cromatográfico e isolamento do asiaticosídeo..	194
7.4.3	Ensaio esquistossomicida <i>in vitro</i>	197
7.4.4	Ensaio de inibição da atividade enzimática da apirase de batata pelo asiaticosídeo.....	198
7.4.5	Estudos de <i>docking</i> molecular.....	198
7.4.6	Ensaio esquistossomicida <i>in vivo</i>	198
7.4.6.1	Análises estatísticas.....	199
7.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	200
7.5.1	Caracterização química do extrato bruto etanólico das partes aéreas de <i>C. erecta</i> por CLUE-ESI-QTOF-EM.....	200
7.5.2	Isolamento e identificação estrutural da substância isolada do extrato de <i>C. erecta</i>	202
7.5.3	Avaliação da atividade esquistossomicida <i>in vitro</i> do extrato de <i>C. erecta</i> e do asiaticosídeo frente à vermes adultos de <i>S. mansoni</i>	206
7.5.4	Ensaio de inibição da atividade enzimática da apirase de batata pelo asiaticosídeo.....	208
7.5.5	Estudos de <i>docking</i> molecular.....	209
7.5.6	Ensaio esquistossomicida <i>in vivo</i>	213
7.5.6.1	Recuperação de vermes.....	213
7.5.6.2	Análise do oograma.....	215
7.5.6.3	Análise do peso médio dos fígados e baços dos animais após tratamento.....	218
7.6	CONCLUSÃO.....	220
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS	221
	REFERÊNCIAS	223

1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

O presente trabalho está estruturado em seis capítulos. No primeiro capítulo estão descritos as características e importância de uma família de enzimas conhecidas como NTPDases, especialmente as enzimas ATP difosfohidrolases presentes em *Schistosoma mansoni*. O capítulo 2 se dedica a investigar a influência da cardamonina na atividade enzimática da apirase de batata, assim como a sua atividade esquistossomicida *in vivo*. Tendo em vista que há evidências científicas da atividade esquistossomicida *in vitro* da cardamonina, assim como atividade inibitória das ATP difosfohidrolases de *S. mansoni*, investigou-se se haveria também inibição da apirase de batata (enzima homóloga das ATP difosfohidrolases) e atividade esquistossomicida *in vivo* da cardamonina.

Considerando os resultados obtidos no capítulo anterior, no capítulo 3 descreve-se a utilização da cardamonina para padronizar alguns parâmetros da técnica de ultrafiltração acoplada à cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLUE-EM), e assim utilizar essa técnica para seleção de ligantes naturais da apirase de batata. Como resultado selecionou-se 3 extratos vegetais, os quais apresentaram ligantes da apirase de batata e, portanto, potenciais substâncias esquistossomicidas.

Os capítulos 4, 5 e 6 foram destinados a cada extrato vegetal selecionado anteriormente. Nestes capítulos estão descritos a caracterização química por CLUE-ESI-QTOF-EM de cada extrato vegetal, bem como o processo de fracionamento cromatográfico para isolamento e identificação estrutural das substâncias ligantes da enzima apirase de batata. Ensaio enzimático frente à apirase de batata para cada substância foi realizado e também investigou-se a atividade esquistossomicida *in vitro* e *in vivo* destas substâncias.

2 CARACTERÍSTICAS E IMPORTÂNCIA DAS NTPDases

As NTPDases são uma família de enzimas que possuem importante papel na controle de diversas funções biológicas em vários organismos (De CARVALHO et al., 2019a).

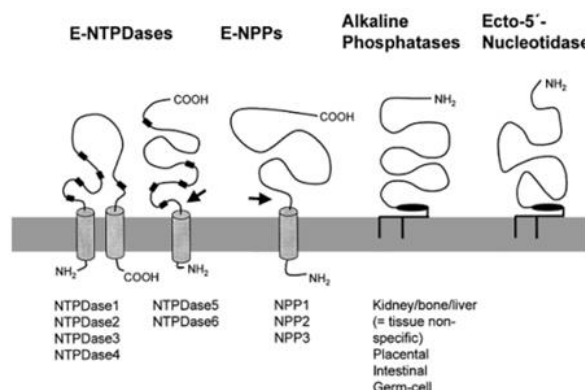
Dessa forma, esse capítulo se dedica a descrever as características e importância dessa família de enzima, com enfoque nas enzimas presentes em *Schistosoma mansoni*, conhecidas como ATP difosfohidrolases.

2.1 FAMÍLIA DA NTPDases

Nucleotídeos extracelulares como trifosfato de adenosina (ATP), difosfato de adenosina (ADP), trifosfato de uridina (UTP) e difosfato de uridina (UDP), podem atuar em uma variedade de receptores de nucleotídeos, chamados receptores P2, os quais são controlados por enzimas conhecidas como ectonucleotidases (DOU et al., 2018). As ectonucleotidases compreendem um grupo de famílias de enzimas que participam da hidrólise extracelular de nucleotídeos, podendo estar localizadas na superfície celular, solúveis no meio intersticial ou nos fluidos corporais (KNOWLES et al., 2011).

As ectonucleotidases são divididas em quatro famílias (Figura 1): as nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases (NTPDases), as ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiasterases (E-NPPs), as fosfatases alcalinas (APs) e as 5' ectonucleotidases (E-5'NT), possuindo ampla distribuição tecidual (Al-RASHIDA et al., 2014; KNOWLES et al., 2011).

Figura 1 - As quatro famílias das ectonucleotidases



Fonte: Adaptado de ZIMMERMAN et al. (2001).

Em relação à família das NTPDases (EC 3.6.1.5), estas são enzimas nucleotídeo-específicas e hidrolisam nucleotídeo di- e trifosfatados (ADP e ATP) em nucleosídeo monofosfatados como produto final da hidrólise. Além disso, sua atividade catalítica é dependente de concentrações milimolares de íons divalentes como cálcio e magnésio (ZIMMERMANN et al., 2012).

Diferentes isoformas de NTPDases foram localizadas e caracterizadas em uma variada gama de organismos e, todos os membros dessa família de proteínas, apresentam em sua estrutura cinco regiões comuns, chamadas regiões conservadas de aminoácidos (ACRs), as quais conferem a este grupo de enzimas uma identidade estando envolvidas na atividade catalítica da enzima (FARIA-PINTO et al., 2004; FARIA-PINTO et al., 2008; HANDA, GUIDOTTI, 1996; VASCONCELOS et al., 1996). Essa família diferencia-se das outras fosfohidrolases por possuírem elevada atividade, ampla especificidade de substrato, extensa exigência de cátion bivalente e serem insensíveis aos inibidores clássicos de outras ATPases do tipo F, P e V (HANDA, GUIDOTTI, 1996).

Em relação à nomenclatura, essa família de proteínas não possui uma uniformidade aceita para todos os membros que a compõem, os quais são classificados pela ordem de descoberta e pelas propriedades catalíticas (ROBSON et al., 2006; VASCONCELOS et al., 2009). Podem ser denominadas NTPDases em mamíferos, ATP difosfohidrolases, NTPases ou ATPDases em parasitos e apirases em plantas (HANDA, GUIDOTTI, 1996; KNOWLES, 2011; VASCONCELOS et al., 2009).

2.2 NTPDases EM MAMÍFEROS

Em células de mamíferos, as NTPDases compreendem oito isoformas, que se diferenciam na localização celular e especificidade do substrato (BAQI, 2015). Quatro das NTPDases são tipicamente localizadas na superfície celular com um sítio catalítico extracelular [NTPDase1 (CD39), NTPDase2 (CD39L1), NTPDase3 (CD39L3) e NTPDase8 (CD39L4)] (BAQI, 2015; KNOWLES et al., 2011). Por outro lado, as isoformas NTPDases 4, 5, 6 e 7 estão localizadas no meio intracelular, sendo que as NTPDases 5 e 6 também apresentam formas secretadas (KNOWLES et al., 2011; ROBSON et al., 2006).

Em relação à especificidade do substrato, todas essas enzimas hidrolisam nucleotídeos trifosfatados, incluindo o ATP e UTP, porém as taxas de hidrólise dos nucleosídeos difosfatados variam consideravelmente entre os subtipos (ROBSON et al., 2006). A NTPDase 1 hidrolisa tri e difosfatos de adenosina em monofosfato, e a hidrólise de ATP a AMP (monofosfato de adenosina) pela NTPDase 1 prossegue com acúmulo mínimo de ADP transitório. No entanto, embora a NTPDase 2 também tenha uma forte preferência pelo ATP, a hidrólise do ATP ao AMP ocorre com acúmulo de quantidades significativas de ADP. NTPDase 3 e 8 são funcionais intermediários entre NTPDase 1 e 2, mostrando uma preferência de 2 a 3 vezes para trifosfatos de nucleosídeos. E as NTPDase 4, 5, 6 e 7 estão principalmente associadas a organelas intracelulares e hidrolisam preferencialmente nucleosídeos tri- e difosfatos baseados em não adenosina (Al-RASHIDA et al., 2014; BAQI, 2015).

As NTPDases desempenham um papel importante no controle de funções biológicas, como tromborregulação, manutenção do tônus vascular, neurogênese, neurotransmissão e regulação das funções celulares imunes de muitos tipos de células, incluindo células dendríticas, linfócitos, neutrófilos, monócitos, e macrófagos (DIAS et al., 2017). Dentre essas isoformas, a mais amplamente estudada é a NTPDase 1, também conhecida como CD39. Esta enzima foi o primeiro membro de NTPDase clonado e sequenciado em mamíferos e foi caracterizada como um marcador de ativação de linfócitos, expressado em células *natural killer*, monócitos, células dendríticas, e subtipos de células T ativadas, possuindo amplo papel na resposta imune celular (ZIMMERMANN et al., 2012).

2.3 APIRASES EM PLANTAS

Nas plantas, as NTPDases conhecidas como apirases têm sido identificadas em várias espécies, incluindo as espécies de *Pisum sativum* (HSIEH et al., 1996), *Solanum tuberosum* (HANDA, GUIDOTTI, 1996), *Arabidopsis thaliana* (ROBERTS et al., 1999) e *Dolichos biflorus* (ETZLER et al., 1999). Estudos mostram que nas plantas as apirases podem ser uma proteína citosólica, nuclear ou associada à membrana, exibindo vários papéis funcionais, como resposta a estímulos táteis, nutrição com fosfato, germinação do pólen, biossíntese de amido e nodulação radicular (HANDA, GUIDOTTI, 1996; KETTLUN et al., 2005; STEINEBRUNNER et al., 2000).

A apirase de batata (*S. tuberosum*) foi o primeiro membro da família das E-NTPDases purificada (TRAVERSO-CORI et al., 1965). Além disso, teve seu gene clonado e os aminoácidos da região N-terminal sequenciados (HANDA, GUIDOTTI, 1996; VASCONCELOS et al., 1996). A clonagem desses genes e a análise de sua sequência permitiu a descoberta das cinco ACRs e mostrou a homologia dessa enzima com outras proteínas similares de protozoários, plantas, leveduras e a CD39 humana (FARIA-PINTO et al., 2004; KNOWLES, 2011; VASCONCELOS et al., 2009).

Dessa forma, a apirase de batata possui alto potencial como ferramenta em estudos de monitoramento da atividade ATPásica, ADPásica e ensaios de inibição enzimática *in vitro*. Também possui grande utilidade em ensaios *in vivo*, como avaliação de ativação plaquetária e processos inflamatórios através da ativação de receptores purinérgicos específicos (VASCONCELOS et al., 2009).

2.4 ATP DIFOSFOHIDROLASES, NTPases OU ATPDases EM PARASITOS

As ATP difosfohidrolases também têm sido caracterizadas em várias espécies de parasitos, incluindo *Toxoplasma gondii*, *Leishmania* sp, *Entamoeba* sp, *Trichomonas* sp, *Crithidia* sp, *Giardia* sp, *Trypanosoma* sp, *Taenia* sp e *Schistosoma mansoni* (BERMUDES et al., 1994; COIMBRA et al., 2002; De AGUIAR et al., 2001; Dos PASSOS LEMOS et al., 2002; GUEVARA-FLORES et al., 2008; SANSOM et al., 2007; SANSOM et al., 2008; VASCONCELOS et al., 1993).

Trabalho recentemente publicado pelo nosso grupo de pesquisa aborda de forma mais abrangente os principais aspectos da localização e função dessas enzimas em vários parasitos, além de reunir vários dados científicos a respeito das recentes descobertas de inibidores naturais e sintéticos das ATP difosfohidrolases em parasitos (De CARVALHO et al., 2019a).

Em relação à importância das ATP difosfohidrolases para os parasitos, estudos evidenciam que essas enzimas atuam como um mecanismo de proteção contra o organismo do hospedeiro em condições que envolvem o ATP ou ADP, como, por exemplo, as respostas imunes e ativação plaquetária (BHARDWAJ, SKELLY, 2009; COIMBRA et al., 2002; DA'DARA et al., 2014; DA'DARA, BHARDWAJ, SKELLY, 2014; VASCONCELOS et al., 1996).

Além de atuarem como um mecanismo de defesa, vários trabalhos sugerem que a atividade das ATP difosfohidrolases em parasitos também se relaciona com a infectividade e virulência. Essa hipótese foi claramente evidenciada em estudos com *T. gondii* e *T. cruzi* (BISAGGIO et al., 2003; NAAKAR et al., 1999; SANTOS et al., 2009). Naakar e colaboradores (1999) mostraram que a redução da expressão das ATP difosfohidrolases inibe a proliferação *in vitro* de *T. gondii* (NAAKAR et al., 1999). De maneira semelhante, Santos e colaboradores (2009) verificaram que inibidores das ATP difosfohidrolases foram capazes de prejudicar a infectividade *in vitro* dos tripomastigotas de *T. cruzi* (SANTOS et al., 2009). E em outro estudo observou-se que a atividade das ATP difosfohidrolases de *T. cruzi* é cerca de 20 vezes maior em tripomastigotas, formas infecciosas, quando comparadas com epimastigotas não infecciosas (BISAGGIO et al., 2003).

Estudo recentemente publicado investigou os efeitos do isetionato de pentamidina na atividade fosfohidrolítica do homogeneizado de promastigotas de *L. infantum* e na enzima NTPDase1, isolada desta preparação. Essa substância antileishmanial, na concentração de 100 μ M, promoveu redução de 60% da atividade fosfohidrolítica do preparado de promastigotas e, ainda, na concentração de 10 μ M, inibiu 74% e 35% das atividades ATPase e ADPase, respectivamente, da enzima isolada (NTPDase1) (MAIA et al., 2019).

Diante desse cenário, as ATP difosfohidrolases têm sido consideradas alvos terapêuticos importantes para o desenvolvimento de novos medicamentos antiparasitários (ALEIXO DE CARVALHO et al., 2015; CASTRO et al., 2015; HAYAT et al., 2019; MAIA et al., 2019; VIJAYAMAHANTESH, VIJAYALAXMI, 2019).

Entre os parasitos em que a ATP difosfohidrolase possui grande importância, destaca-se o *Schistosoma mansoni*. Neste sentido, estudos têm demonstrado a semelhança estrutural entre as ATP difosfohidrolases de *S. mansoni* e a apirase de batata (FARIA-PINTO et al., 2008; MAIA et al., 2011).

2.5 ATP DIFOSFOHIDROLASES DE *S. mansoni* E SUA HOMOLOGIA COM A APIRASE DE BATATA

A esquistossomose, causada por parasitos do gênero *Schistosoma*, é uma Doença Negligenciada que afeta milhões de pessoas no mundo, principalmente no Brasil. A doença é endêmica em 78 países, infectando mais de 200 milhões de

indivíduos, com um número estimado de 700 milhões de pessoas em risco de infecção (WHO, 2019). Caracterizada clinicamente por dor abdominal, diarreia, hipertensão portal, anemia e fibrose hepática e intestinal crônica (GRYSEELS et al., 2006).

O *Schistosoma mansoni*, um dos principais causadores da esquistossomose, pertence à classe Trematoda e família Schistosomatidae, apresentando-se como vermes delgados e dioicos que se alimentam do sangue do hospedeiro, chegando a consumir até 300 mil hemácias por hora. No corpo do hospedeiro, esses parasitos são geralmente encontrados acasalados, estando a fêmea alocada no canal ginecóforo do macho, podendo ser habitualmente encontrados nos vasos mesentéricos, no sistema porta e, ainda, nos pulmões, baço, pâncreas e bexiga (GRYSEELS, STRICKLAND, 2012; SILVA, 2018; SOUZA et al., 2011). O *S. mansoni* possui vários mecanismos que interferem no funcionamento normal do sistema imunológico do hospedeiro a fim de favorecer sua sobrevivência por vários anos na vasculatura mesentérica humana (GRYSEELS et al., 2006; VASCONCELOS et al., 1996).

Neste sentido, vários estudos sugerem que as ATP difosfohidrolases estão envolvidas neste escape do sistema imunológico do hospedeiro (BHARDWAJ, SKELLY, 2009; DA'DARA et al., 2014; DA'DARA, BHARDWAJ, SKELLY, 2014; De MARCO et al., 2003; FARIA-PINTO et al., 2004; VASCONCELOS et al., 1996). As ATP difosfohidrolases de *S. mansoni* (EC 3.6.1.5), também conhecidas como apirases ou SmATPDases, são ecto-enzimas localizadas na superfície tegumentar externa de *S. mansoni*, que hidrolizam uma variedade de nucleosídeos tri- e difosfatados aos correspondentes nucleosídeos monofosfatados (BHARDWAJ, SKELLY, 2009; DA'DARA et al., 2014; DA'DARA, BHARDWAJ, SKELLY, 2014; De MARCO et al., 2003; VASCONCELOS et al., 1996).

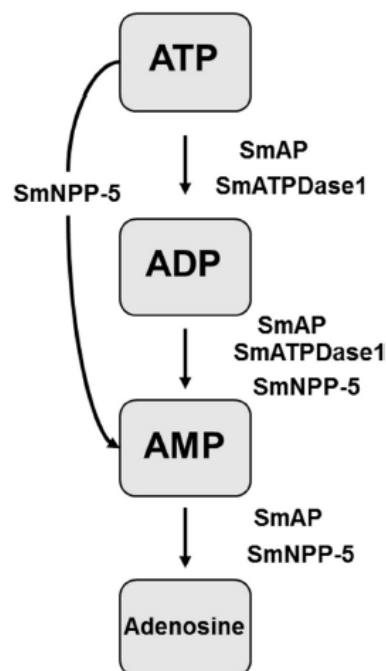
Estas proteínas têm sido envolvidas em diversos processos bioquímicos do parasito, os quais incluem a participação de ATP e ADP e estão diretamente relacionados à habilidade do parasito em escapar da resposta imune do hospedeiro, garantindo a mobilidade do parasito dentro dos vasos sanguíneos e sua sobrevivência, durante longos períodos, dentro do hospedeiro (DA'DARA, BHARDWAJ, SKELLY, 2014; FARIA-PINTO et al., 2004).

Além disso, como os vermes adultos de *S. mansoni* são incapazes de sintetizar purinas, a hidrólise de ATP pelas ATP difosfohidrolases auxilia na

sobrevivência do verme, uma vez que garante nucleotídeos para a síntese de ácidos nucléicos do parasito (DA'DARA, BHARDWAJ, SKELLY, 2014). Ainda, os vermes ao percorrerem os vasos sanguíneos, provocam estresse local, desencadeando uma série de respostas imunológicas no hospedeiro, iniciadas pela liberação de ATP, o que desencadeia uma agregação plaquetária, a qual é um empecilho à sobrevivência do parasito. Assim, a lise de ATP e ADP pelas ATP difosfohidrolases de *S. mansoni* pode estar relacionada com inibição da resposta imune do hospedeiro sobre os parasitos, uma vez que os subprodutos dessa lise (AMP) não provocam a agregação plaquetária em torno dos mesmos (DA'DARA et al., 2014).

Em *S. mansoni*, duas enzimas ATP difosfohidrolases diferentes foram descritas, a SmATPDase1, localizada na superfície do tegumento e a SmATPDase2, localizada na estrutura interna do sincício. A SmATPDase1 é responsável pela quebra de ATP em ADP e ADP em AMP. Os parasitos machos possuem um nível relativamente elevado de expressão de SmATPDase1, o que pode ser explicado como um mecanismo para ajudar a manter um ambiente anti-inflamatório e antitrombótico em torno dele e, conseqüentemente, em torno do parceiro feminino devido à presença constante deste último no canal ginecóforo (DA'DARA et al., 2014).

Figura 2 - Catabolismo exógeno do ATP nos vermes de *S. mansoni*.



Fonte: Adaptado de DA'DARA et al. (2014).

Desta forma, a inibição das ATP difosfohidrolases de *S. mansoni* é considerada uma nova e importante estratégia terapêutica no tratamento da esquistossomose (DA'DARA et al., 2014).

Contudo, a obtenção destas enzimas, ATP difosfohidrolases, a partir do tegumento de *S. mansoni*, através de técnicas de isolamento, é bastante complexa e crítica, tendo em vista a necessidade de grande quantidade de vermes e também de animais de experimentação. Além disso, há o fato destas enzimas serem proteínas de membrana e, assim, possuírem baixo rendimento durante os processos de obtenção a partir dos parasitos (FARIA-PINTO et al., 2008).

Assim, a possibilidade de se utilizar proteínas homólogas, de obtenção mais simples e com rendimentos maiores, pode ser uma alternativa para selecionar moléculas com afinidade para SmATPDases. Neste sentido, vários trabalhos têm demonstrado a homologia entre as ATP difosfohidrolases de *S. mansoni* (SmATPDase 1 e 2) e a apirase de batata (ATPase de batata) (FARIA-PINTO et al., 2004; FARIA-PINTO et al., 2008; MAIA et al., 2011; VASCONCELOS et al., 1996).

Nestes trabalhos a homologia entre as ATP difosfohidrolases de *S. mansoni* e a apirase de batata tem sido evidenciada por meio de ensaios de imunoreatividade cruzada, ensaios de imunoprecipitação e microscopia confocal e fluorescência e, ainda com anticorpos contra isoformas da apirase da batata (*S. tuberosum*) (FARIA-PINTO et al., 2004; FARIA-PINTO et al., 2008; PENIDO et al., 2007; VASCONCELOS et al., 1996). Além disso, estudos de modelagem computacional comparativa entre a apirase de batata e ATP difosfohidrolases de *S. mansoni* mostraram que ambas apresentam domínios ricos em epítomos para reconhecimento de células B e que a apirase da batata apresenta homologia estrutural entre as isoformas 1 e 2 de *S. mansoni* (FARIA-PINTO et al., 2008).

Paralelamente, foi realizado um estudo comparativo *in silico* entre as sequências de aminoácidos dos domínios B de NTPDases de plantas e de diversos organismos de linhagens filogeneticamente distintas, e foram detectados altos índices de identidade e similaridade entre eles (MAIA et al., 2011). O percentual de identidade entre a apirase e a SmATPDase1 é de 28,57% e entre a apirase e a SmATPDase2 é de 25,23% (BLAST®). Segundo Filho e Alencastro (2003) quando há um grau de identidade, entre as estruturas primárias das proteínas comparadas, igual ou superior a cerca de 25%, existe grande probabilidade de que estas

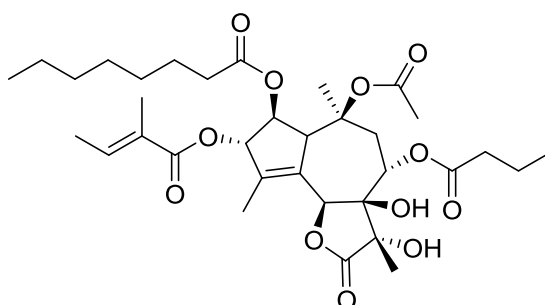
proteínas tenham estruturas tridimensionais semelhantes e, ainda pode-se construir um modelo para a proteína-problema (FILHO, ALENCASTRO, 2003).

A literatura descreve ainda que algumas substâncias esquistossomicidas foram capazes de promover tanto a inibição da atividade hidrolítica da apirase de batata, quanto das isoformas presentes no tegumento do verme adulto. Estes resultados também mostraram uma similaridade de sítios ativos entre a apirase da batata e as isoformas de ATP difosfohidrolases de *S. mansoni* (PENIDO et al., 2007).

Todos estes trabalhos sugerem fortemente que o domínio B da apirase de plantas (como a apirase de batata) e das NTPDases de parasitos (como SmATPDase1 e 2 de *S. mansoni*), membros da mesma família de proteínas, foi conservado evolutivamente, tendo como possível função a imunomodulação da resposta imune de hospedeiros contra a infecção parasitária (FARIA-PINTO et al., 2004; FARIA-PINTO et al., 2008; MAIA et al., 2011; VASCONCELOS et al., 2009).

Considerando as enzimas ATP difosfohidrolases de *S. mansoni* como alvo terapêutico e os produtos naturais como fonte de descoberta de novos fármacos esquistossomicidas, alguns trabalhos têm demonstrado a inibição desta enzima por substâncias de origem natural. Neste contexto, Martins e colaboradores (2000) demonstraram que a tapsigargina, uma lactona sesquiterpênica, possui inibição máxima (~75%) da atividade ATPásica a 300 μM (MARTINS et al., 2000).

Figura 3 - Estrutura química da tapsigargina.



Tapsigargina

Fonte: Elaborado pela própria autora.

Através de estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa pode-se evidenciar que algumas substâncias naturais foram capazes de promover a inibição da atividade hidrolítica de ATPases de *S. mansoni* (ALEIXO DE CARVALHO et al.,

2015; CASTRO et al., 2015). A licoflavona A, uma flavona isolada a partir das raízes de *Glycyrrhiza inflata* (Fabaceae), apresentou resultados significativos de inibição tanto da atividade SmATPásica (IC_{50} = 23,78 μ M), quanto da SmADPásica (IC_{50} = 31,50 μ M) (ALEIXO DE CARVALHO et al., 2015). Outro inibidor natural encontrado para a enzima foi a cardamonina, uma chalcona isolada das inflorescências de *Piper aduncum* (Piperaceae). Em estudos *in vitro* da inibição da atividade ATPásica, utilizando homogenato de vermes adultos de *S. mansoni*, evidenciaram que a cardamonina foi capaz de inibir a atividade SmATPásica de forma eficiente, com IC_{50} de 23,54 μ M (CASTRO et al., 2015).

Assim, com base nesses estudos que evidenciam a homologia entre a apirase e as ATP difosfohidrolases, o presente trabalho propõe a possibilidade de utilizar a apirase de batata em ensaios de triagem a fim de selecionar possíveis inibidores das SmATPDases de *S. mansoni* a partir de amostras complexas como extratos vegetais. Tendo em vista a importância da descoberta desses novos inibidores das SmATPDases, tecnologias que possam ampliar a interação entre a química e a farmacologia podem também ser de grande sucesso neste processo de descobrimento. Entre as técnicas que podem ser empregadas para a identificação de novas substâncias naturais ativas, está a Ultrafiltração (UF), a qual pode ser acoplada a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) e/ou a Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada a espectrometria de massas (CLUE-EM).

3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA FRENTE À APIRASE DE BATATA E ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA *IN VIVO* DA CARDAMONINA

Tendo em vista que há evidências científicas da atividade esquistossomicida *in vitro* da cardamonina, assim como atividade inibitória das ATP difosfohidrolases de *S. mansoni*, este capítulo se destinou à investigação da influência da cardamonina na atividade enzimática da apirase de batata (enzima homóloga das ATP difosfohidrolases), assim como a sua atividade esquistossomicida *in vivo*.

3.1 ESQUISTOSSOMOSE

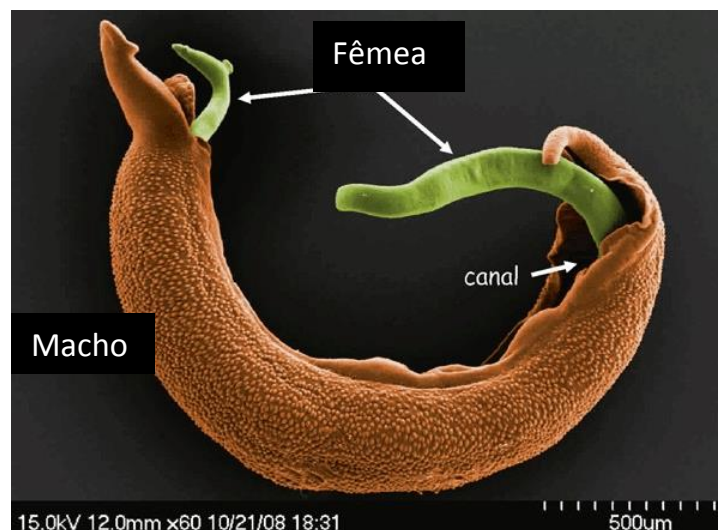
A esquistossomose, conhecida popularmente como barriga d'água, é uma doença crônica causada pelo trematódeo digenético do gênero *Schistosoma* (Schistosomatidae). Entre as espécies de *Schistosoma* que podem infectar o ser humano, como *S. mansoni*; *S. japonicum*; *S. mekongi*; *S. haematobium* e *S. intercalatum*, somente a espécie *S. mansoni* se adaptou no Brasil, provavelmente devido à presença de moluscos do gênero *Biomphalaria*, os quais atuam como hospedeiros intermediários (SANOGO et al., 2018).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a esquistossomose afeta, em todo o mundo, cerca de 200 milhões de pessoas, sendo que aproximadamente 20 milhões tem consequências severas da doença (WHO, 2019). A ocorrência desta doença é típica de países pobres ou em desenvolvimento, os quais contam com recursos reduzidos para investimento em saneamento básico (MCMANUS et al., 2018). Esta parasitose está distribuída em 78 países dos continentes africano, asiático e americano e cerca de 700 milhões de pessoas estão expostas ao risco de contrair uma das esquistossomoses (GBD, 2015; WHO, 2019).

No Brasil, a área endêmica abrange 19 estados (especialmente o Estado de Minas Gerais), com aproximadamente 42 milhões de habitantes expostos à contaminação. Em 2017, foram registrados um total 4.498 casos confirmados e notificados de esquistossomose, sendo 2.907 casos na região sudeste e 1.371 casos na região nordeste (BRASIL, 2017). Em Minas Gerais, a esquistossomose tem ocorrência em 517 dos 853 municípios, sendo a região Leste do estado com maior número de casos da doença (BRASIL, 2011).

O *S. mansoni* adulto é um helminto delgado e longo, que possui como característica primordial o marcado dimorfismo sexual (Figura 4) (SANOGO et al., 2018). Os machos são menores (cerca de 1 cm), esbranquiçados e apresentam tegumento recoberto por minúsculos espinhos e tubérculos. Enquanto as fêmeas são maiores (1,5 cm), mais escuras e com tegumento liso. No sentido longitudinal dos corpos dos machos existem duas dobras laterais que formam uma cavidade central chamada de canal ginecóforo, cuja finalidade é albergar e fecundar as fêmeas (PEREIRA et al., 2013). No corpo do hospedeiro, esses parasitos são geralmente encontrados acasalados nos vasos mesentéricos, no sistema porta-hepático (GRYSEELS, STRICKLAND, 2012).

Figura 4 - Microscopia eletrônica de varredura de vermes macho e fêmea de *S. mansoni*.



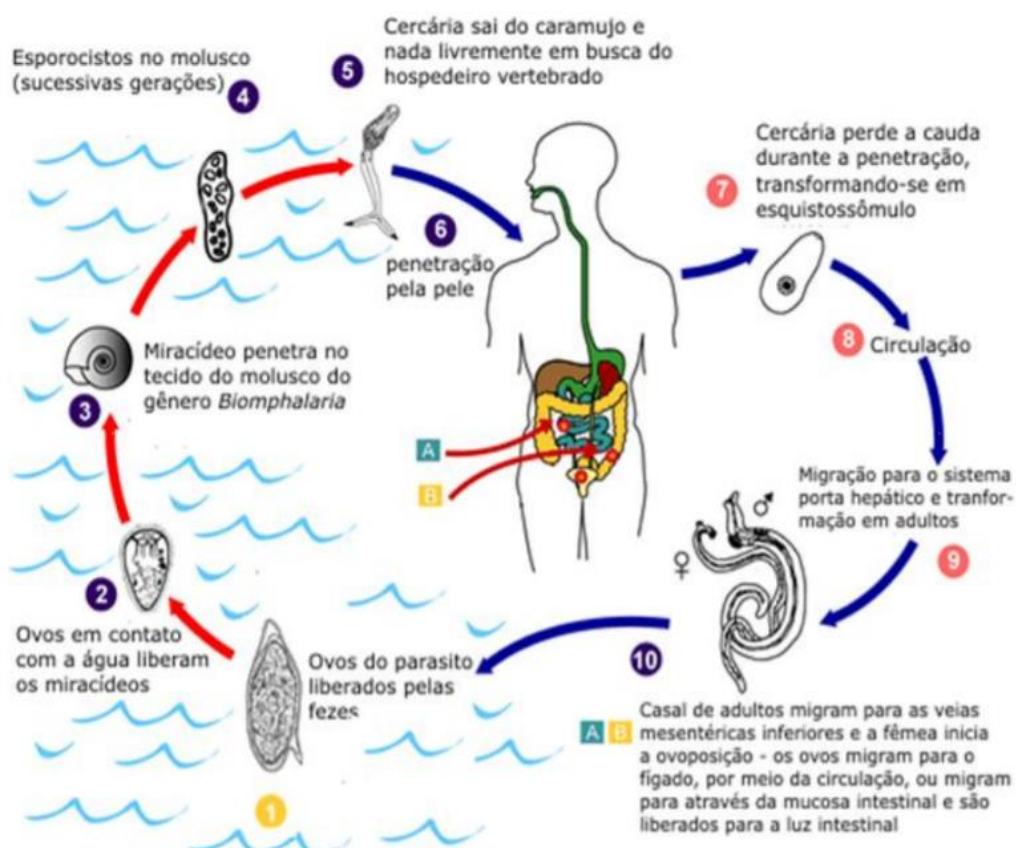
Fonte: Adaptado de CHEVILLON et al. (2012).

O *Schistosoma* possui ciclo de vida heteroxênico, alternando entre as fases sexuadas e assexuadas, e tendo a necessidade de mais de um hospedeiro para que o ciclo se complete. É, no hospedeiro definitivo, que o parasito alcança sua forma adulta, ocorrendo a cópula, em que a fêmea será então fecundada. Após a fecundação, as fêmeas migram contra a corrente sanguínea e iniciam a postura dos ovos na submucosa da parede intestinal do hospedeiro. Em aproximadamente seis dias, os ovos tornam-se maduros, contendo a larva miracídio já formada. Em até 20 dias, chegam à luz intestinal, podendo ser eliminados pelo hospedeiro através do bolo fecal que, ao alcançarem a água doce de rios, podem contaminar o ambiente. Condições ideais, como altas temperaturas, luminosidade e boa oxigenação das

águas, facilitam a eclosão da larva miracídio dos ovos que irão infectar os caramujos (COLLEY et al., 2014; GRYSEELS et al., 2006; GRYSEELS, STRICKLAND, 2012).

No interior dos caramujos, as larvas transformam-se em esporocistos primários que, ao se multiplicarem através da poliembrionia, dão origem às cercárias por reprodução assexuada após 3 a 5 semanas (GRYSEELS, STRICKLAND, 2012). As cercárias liberam-se dos caramujos e penetram ativamente na pele do ser humano (hospedeiro definitivo) durante o contato com águas contaminadas. Uma vez no sistema porta hepático, desenvolvem-se em machos e fêmeas, amadurecem, acasalam-se e migram para veias mesentéricas inferiores, onde ocorrerá a oviposição. Os primeiros ovos serão eliminados pelo hospedeiro definitivo 40 dias após a infecção (Figura 5), completando, assim, o ciclo do parasito (COLLEY et al., 2014; GRYSEELS et al., 2006; GRYSEELS, STRICKLAND, 2012).

Figura 5 - Ciclo biológico da espécie *S. mansoni*.



Fonte: Adaptado de CVE (2005).

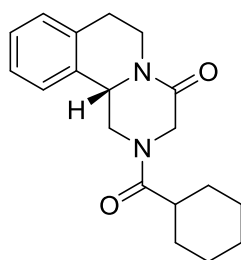
Uma característica marcante dos vermes adultos de *S. mansoni* é o tegumento que lhe serve de revestimento, nutrição, evasão imune, modulação,

excreção, osmorregulação, recepção sensorial e transdução de sinais (MORAES, 2012). Devido à importância do tegumento, pesquisadores tem se dedicado ao estudo proteômico da superfície tegumentar dos parasitos adultos e como descrito no capítulo 1, vários estudos demonstram a purificação e caracterização da enzima ATP difosfohidrolase, presente na superfície externa do tegumento de *S. mansoni* (DA'DARA et al., 2014; De MARCO et al., 2003; VASCONCELOS et al., 1996).

Tendo em vista a importância do ADP no processo de ativação plaquetária, tem sido proposto que a enzima ATP difosfohidrolase poderia participar do mecanismo de escape do parasito à resposta do hospedeiro mediante clivagem do ATP ou ADP, os quais poderiam ser liberados por plaquetas ativadas ou linfócitos T citotóxicos (FARIA-PINTO et al., 2004, FARIA-PINTO et al., 2008).

Em relação ao tratamento desta parasitose, o Praziquantel (PZQ) é o único fármaco utilizado atualmente no controle da esquistossomose em todo o mundo. É comercializado na forma racêmica, mas somente o enantiômero *R* é a forma ativa (Figura 6). O PZQ é seguro, acessível e eficaz contra a espécie de *S. mansoni*. No entanto, seu uso generalizado para tratamento em massa aumentou a possibilidade da seleção de parasitos resistentes ao PZQ. Além disso, esse fármaco não possui ação sobre os estágios larvários desse parasita e, portanto, é incapaz de fornecer a eliminação total da infecção ou prevenir a re-infecção (CIOLI et al., 2014; LAGO et al., 2018).

Figura 6 - Estrutura química do enantiômero *R* do Praziquantel.



(*R*) - Praziquantel

Fonte: Elaborado pela própria autora.

Neste contexto, há enorme necessidade de desenvolvimento de pesquisas para a descoberta de novos e efetivos fármacos para cura da esquistossomose. Assim, aliado à confirmação da existência de linhagens de *Schistosoma* resistentes

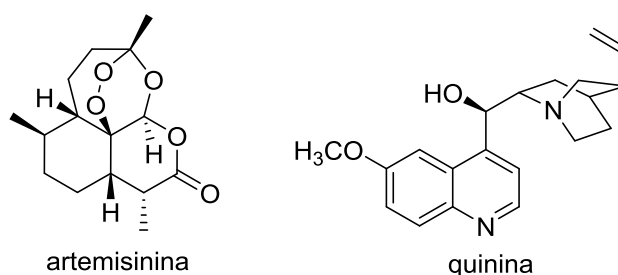
(CIOLI et al., 2014) ao agente esquistossomicida supracitado, juntamente com a importância da enzima ATP difosfohidrolase (ALEIXO DE CARVALHO et al., 2015; BHARDWAJ, SKELLY, 2009; CASTRO et al., 2015; DA'DARA et al., 2014; DA'DARA, BHARDWAJ, SKELLY, 2014; VASCONCELOS et al., 1996), a descoberta de inibidores das ATP difosfohidrolases de *S. mansoni* pode contribuir para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da esquistossomose, sendo a inibição dessa classe de enzimas um dos possíveis mecanismos de ação das substâncias esquistossomicidas.

3.2 PRODUTOS NATURAIS COM ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA

O uso de extratos de plantas para o tratamento de algumas doenças parasitárias humanas e veterinárias tem sido descrito desde tempos antigos. Desde então, têm sido investigadas a composição química e a atividade biológica de muitas plantas, na tentativa de se descobrir preparações vegetais ou substâncias ativas naturais que possam ser utilizadas no desenvolvimento de novos fármacos antiparasitários (DE CARVALHO et al., 2017; DE CASTRO et al., 2013). Como exemplo, temos a artemisinina (Figura 7), uma lactona sesquiterpênica encontrada em *Artemisia annua* L. (Asteraceae), com atividade antimalárica. Outro exemplo de substância isolada de plantas que possui atividade antiparasitária é a quinina (Figura 7) (ABDIN et al., 2003; De CARVALHO et al., 2017).

Segundo Lago e colaboradores (2018), no início dos anos 80 os produtos naturais com atividade esquistossomicida começaram a ser explorados e, desde então, tem havido um interesse crescente da comunidade científica em relação à pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos esquistossomicidas (LAGO et al., 2018).

Figura 7 - Exemplos de substâncias naturais com atividade antiparasitária.



Fonte: Adaptado De CARVALHO et al. (2017).

A maioria dos trabalhos descritos sobre a atividade esquistossomicida de preparações brutas de vegetais é focada em estudos de triagem *in vitro* frente a diferentes estágios de vida do *Schistosoma*, principalmente cercárias, esquistossômulos e vermes adultos. Vários trabalhos, evidenciando a atividade de extratos brutos e preparações vegetais, de diferentes espécies de plantas, tem sido avaliados frente ao *Schistosoma* (De ALMEIDA et al., 2016; De CARVALHO et al., 2017; DE CASTRO et al., 2013; DIAS et al., 2017; GODINHO et al., 2014).

Nos últimos anos, nosso grupo de pesquisa também tem se dedicado a avaliar vários produtos naturais, como extratos vegetais e óleos essenciais, frente ao *S. mansoni*. Como exemplo, podemos citar os estudos *in vitro* com *Artemisia absinthium* L., *Tanacetum* sp, *Glycyrrhiza inflata* Bat., *Piper aduncum* L. e *Arctium lappa* L. (ALEIXO de CARVALHO et al., 2015; CASTRO et al., 2015; De ALMEIDA et al., 2016; De SOUZA et al., 2017; DIAS et al., 2017; GODINHO et al., 2014).

Além disso, alguns desses potenciais extratos vegetais que apresentaram atividade esquistossomicida, foram submetidos ao fracionamento cromatográfico no intuito de isolar e identificar as substâncias ativas promissoras presentes nestes extratos (De ALMEIDA et al., 2016; DIAS et al., 2017; GODINHO et al., 2014; MELO et al., 2015).

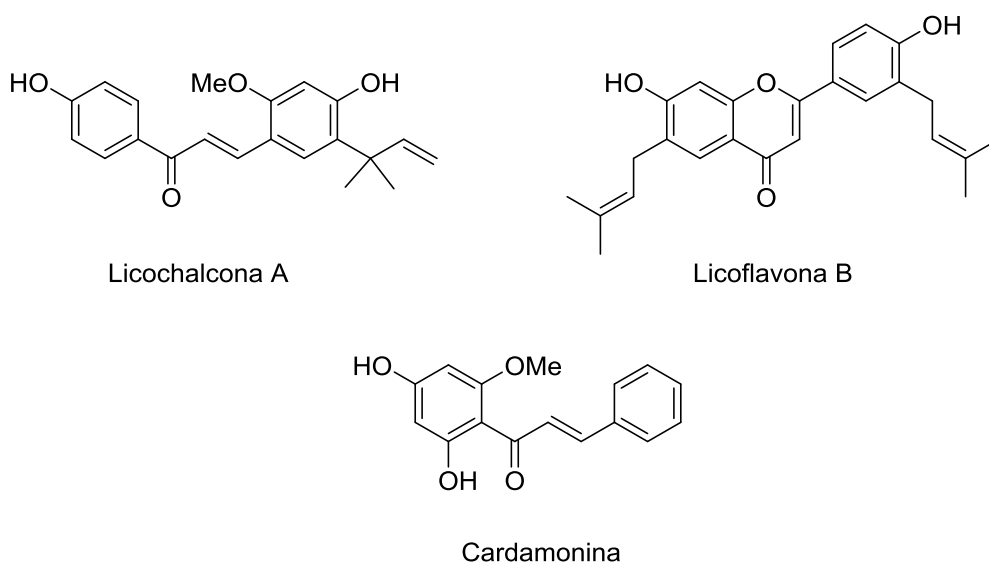
3.3 PRODUTOS NATURAIS COMO INIBIDORES DAS ATP DIFOSFOHIDROLASES

Dos vários extratos vegetais submetidos ao processo de fracionamento cromatográfico cabe destacar o extrato de *G. inflata*, do qual isolou-se duas substâncias com expressiva atividade esquistossomicida *in vitro*. A licochalcona A (Figura 8) foi capaz de matar vermes fêmeas e machos, após 24 h, com IC₅₀ de 9,12 e 9,52 µM, respectivamente. Além disso, essa substância reduziu o número total de ovos, afetando seu desenvolvimento, e provocou mudanças drásticas no tegumento de vermes adultos de *S. mansoni*, além de alteração mitocondrial e condensação de cromatina (De SOUZA et al., 2017).

De maneira semelhante, a licoflavona B (Figura 8) (25 a 100 µM), também isolada das raízes de *G. inflata*, causou 100% de mortalidade dos vermes adultos de *S. mansoni*, assim como redução da oviposição e alterações tegumentares (ALEIXO de CARVALHO et al., 2015).

Outro extrato vegetal que merece destaque é o de *P. aduncum* L, do qual, através de fracionamento bioguiado, levou à identificação da cardamonina como substância ativa (CASTRO et al., 2015). A cardamonina (Figura 8) (25, 50 e 100 μ M) causou 100% de mortalidade, alterações tegumentares, redução da oviposição e alteração da atividade motora de todos os vermes adultos de *S. mansoni*, sem afetar as células dos mamíferos. A microscopia confocal de varredura a laser mostrou também alterações morfológicas tegumentares e no número de tubérculos de vermes de *S. mansoni* de maneira dependente da dose (CASTRO et al., 2015).

Figura 8 - Exemplos de substâncias naturais com atividade inibitória das ATP difosfohidrolases.



Fonte: Elaborado pela própria autora.

A partir desses resultados, nosso grupo de pesquisa também investigou o possível mecanismo de ação de algumas substâncias ativas, com o objetivo de encontrar novos alvos terapêuticos que podem ser explorados para o desenvolvimento de novos fármacos esquistossomicidas. Dentre esses alvos estão as ATP difosfohidrolases de *S. mansoni* (ALEIXO de CARVALHO et al., 2015; CASTRO et al., 2015; PEREIRA et al., 2018).

Em relação a licoflavona B e a cardamonina, ambas foram submetidas a estudos *in vitro* da inibição da atividade ATPásica, utilizando homogenato de vermes adultos de *S. mansoni*. A licoflavona B apresentou resultados significativos de inibição tanto da atividade SmATPásica (IC_{50} = 23,78 μ M), quanto da SmADPásica (IC_{50} = 31,50 μ M) (ALEIXO de CARVALHO et al., 2015).

A cardamonina também se mostrou bastante eficiente, com IC₅₀ de 23,54 µM (CASTRO *et al.*, 2015). Além disso, estudos de acoplamento molecular revelaram que a cardamonina interage com a ligação de nucleotídeos da SmATPDase 1, sendo a natureza das interações SmATPDase 1-cardamonina, principalmente por ligações hidrofóbicas e de hidrogênio (CASTRO *et al.*, 2015).

Esses estudos sugerem que a atividade esquistossomicida dessas substâncias, em especial a cardamonina, pode estar relacionada à inibição enzimática das enzimas ATP difosfohidrolases de *S. mansoni*.

3.4 CARDAMONINA E SUA POTENCIAL ATIVIDADE FRENTE ÀS ATP DIFOSFOHIDROLASES E APIRASE

Como descrito anteriormente, vários trabalhos têm demonstrado a homologia entre as ATP difosfohidrolases de *S. mansoni* (SmATPDase 1 e 2) e a apirase de batata (FARIA-PINTO *et al.*, 2004; FARIA-PINTO *et al.*, 2008; MAIA *et al.*, 2011; VASCONCELOS *et al.*, 1996). Além disso, há relatos na literatura de substâncias esquistossomicidas que promoveram inibição da atividade hidrolítica da apirase de batata e também das isoformas presentes no tegumento do verme adulto de *S. mansoni* (PENIDO *et al.*, 2007).

A cardamonina, substância com atividade esquistossomicida *in vitro* evidenciada, demonstrou potencial inibitório das ATP difosfohidrolases de *S. mansoni*, porém sua atividade inibitória da enzima apirase ainda não foi avaliada (CASTRO *et al.*, 2015).

Considerando o alto potencial da utilização da apirase de batata como ferramenta em estudos de monitoramento da atividade ATPásica, ADPásica e ensaios de inibição enzimática *in vitro*, bem como sua homologia com diversas enzimas parasitárias, inclusive as enzimas de *S. mansoni*, torna-se importante a avaliação da atividade de inibição enzimática da apirase de batata pela cardamonina.

Muitos esforços têm sido feitos no sentido de evidenciar a homologia existente entre a apirase de batata e as ATPs difosfohidrolases, porém não há relatos na literatura demonstrando que substâncias com atividade inibitória dessas enzimas apresentam também atividade esquistossomicida *in vivo*.

Dessa forma, tendo em vista o potencial esquistossomicida da cardamonina, essa substância foi selecionada para realização deste presente estudo, já que além do carácter inédito da avaliação da atividade esquistossomicida *in vivo* dessa substância, o conhecimento do seu potencial inibitório de enzimas presentes no tegumento de *S. mansoni* podem servir de parâmetro para encontrar novas substâncias esquistossomicidas, utilizando para isso a apirase de batata, a qual possui homologia com as ATP difosfohidrolases de *S. mansoni*.

3.5 OBJETIVOS

O presente capítulo teve como objetivo geral avaliar a atividade enzimática frente à apirase de batata e atividade esquistossomicida *in vivo* da cardamonina.

Para esses propósitos, os objetivos específicos foram:

- Obter o extrato bruto diclorometânico das partes aéreas de *Piper aduncum*;
- Realizar o isolamento, purificação e identificação da cardamonina à partir do extrato bruto de *P. aduncum*;
- Avaliar a atividade enzimática da enzima apirase de batata frente à cardamonina;
- Realizar estudos de *docking* molecular da cardamonina frente à apirase de batata e às ATP difosfohidrolases de *S. mansoni*;
- Avaliar a atividade esquistossomicida *in vivo* da cardamonina.

3.6 MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos deste capítulo foram realizados nos laboratórios: Núcleo de Identificação e Pesquisa em Princípios Ativos Naturais (NIPPAN) da Universidade Federal de Juiz de Fora, CentralBio da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora, Departamento de Ciência da Computação - Programa de Pós-Graduação em Modelagem Molecular da Universidade Federal de Juiz de Fora, Departamento de Química da Universidade Federal de Juiz de Fora, Laboratório de Estudo de Estrutura e Função de Proteína do Instituto de Ciências Biológicas da UFJF e laboratório Núcleo de Pesquisa em Doenças Negligenciadas (NPDN) - Universidade de Guarulhos, São Paulo, SP.

Para execução dos métodos foram utilizados os seguintes equipamentos:

NIPPAN

- Balança analítica: marca Marte, modelo BL320H;
- Balança analítica: marca Marte, modelo AY220;
- Bomba a vácuo: marca Primatec, modelo 132;
- Rotaevaporador: marca Buchi, modelo RII;
- Bomba a vácuo: marca Buchi, modelo V-700;
- Banho ultratermostático: marca Cientec, modelo CT-281-28;
- Estufa com circulação e renovação de ar: marca Solab, modelo SL102;
- Coluna de vidro para cromatografia à vácuo de 10 cm de diâmetro, contendo placa de 2,5 cm de espessura.

CentralBio

- Ultrassom: marca Sanders Medical, modelo Soniclean 2;
- Microcentrífuga: marca Kasvi;
- Bomba a vácuo: marca Gast, modelo DOA-P704-AA;
- Cromatógrafo de fase líquida de ultra eficiência de bomba quaternária com injetor automático: marca Waters, modelo Acquity CLUE H-Class; Detector de espectrometria de massas com analisador de massas do tipo quadrupolo acoplado a “*time of flight*” marca Waters, modelo Xevo G2-S.

Departamento de Química da UFJF

- RMN Brucker Avance III, 500 MHz;

Foram utilizados solventes de grau P.A. das marcas Vetec, Cromato Produtos Químicos LTDA, Quimis, Isofar e Alphatec.

Para a realização de cromatografia em camada delgada (CCD) utilizaram-se cromatoplasacas de sílica gel 60 GF254 (Merck). A revelação dessas foi obtida por meio de irradiação no ultravioleta (UV) (254 e 366 nm), bem como do revelador químico, solução de anisaldeído sulfúrico.

Para a realização de cromatografia líquida de pressão reduzida, conhecida como cromatografia líquida à vácuo (CLV), foram utilizadas como adsorventes sílica 60H: sílica 70-230 mesh, na proporção de 3:1 (m/m), além de bomba a vácuo e coluna de vidro com 10 cm de diâmetro e 30 cm de altura, possuindo placa sinterizada.

Para cromatografia líquida de ultra eficiência, foi utilizada coluna analítica de fase reversa (Acquity BEH C₁₈; 2,1 x 100 mm; 1,7 µm), na presença de pré-coluna (Acquity BEH C₁₈; 2,1 x 5 mm; 1,7 µm).

Para a obtenção dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ¹H utilizou-se metanol deuterado (CD₃OD) da marca Cambridge Isotope Laboratories.

3.6.1 Obtenção do extrato bruto de *Piper aduncum* L. (Piperaceae)

As partes aéreas de *P. aduncum* foram coletadas no horto da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora em julho de 2016. A exsiccata encontra-se depositada no Herbário Leopoldo Krieger (CESJ) do Instituto de Ciências Biológicas da UFJF, sob o número de tombo CESJ 59018.

Após a coleta e separação dos órgãos vegetais, estes foram secos e estabilizados em estufa de ar quente e circulante a 40°C. Em seguida, o material obtido foi triturado com auxílio de moinho de facas para obtenção dos pós. Os pós obtidos (870 g) foram submetidos ao processo de maceração, em temperatura ambiente, utilizando diclorometano como líquido extrator. As soluções diclorometânicas obtidas foram filtradas e, em seguida, transferidas para balões de fundo redondo e concentradas com auxílio de rotaevaporador à temperatura de 40°C. Os extratos obtidos foram transferidos para frascos previamente pesados fornecendo 65,0 g de extrato bruto diclorometânico das partes aéreas de *P. aduncum* (Pa).

3.6.2 Identificação química da cardamonina no extrato de *P. aduncum* por CLUE-ESI-QTOF-EM

Para análise da composição química do extrato obtido e verificação da presença da cardamonina, foi realizada a análise por CLUE-ESI-QTOF-EM.

Foram pesados em torno de 2 mg do extrato e foram adicionados 1 mL de metanol (MeOH) LC-MS para solubilizar e posterior análise. A amostra foi centrifugada em microcentrífuga por 5 min a 10.000 rpm. Após essa etapa, o sobrenadante foi coletado e filtrado em unidade filtrante de poro 0,22 μm e em seguida injetada no equipamento.

Para separação dos componentes da amostra, foi usado o sistema de CLUE com uma coluna Waters Acquity CLUE BEH C_{18} 2,1mm x 100 mm, 1,7 μm . A eluição foi feita por gradiente com fluxo linear de 400 $\mu\text{L}/\text{min}$ e como solvente A foi utilizada a água purificada (filtração Milli-Q) com 0,1 % de ácido fórmico e como fase móvel B a acetonitrila (grau cromatográfico), sendo o volume de injeção de 0,15 μL . Os valores do gradiente estão descritos na tabela 1 abaixo:

Tabela 1 - Gradiente utilizado durante a análise por CLUE-ESI-QTOF-EM.

Tempo (min)	Fluxo (mL/min)	%A	%B
Inicial	0,4	95	5
2	0,4	95	5
14	0,4	2	98
16	0,4	2	98
20	0,4	95	5

Fonte: Elaborado pela própria autora.

Foi usado o espectrômetro de massas da marca XEVO G2- ESI-Q-TOF híbrido, contendo dois analisadores, um quadrupolo e um por tempo de voo (TOF) de alta resolução. As condições de ESI-EM foram realizadas em modo negativo e positivo com as seguintes especificações: voltagem no cone de 40V, capilar de 3 kV, a temperatura de dessolvatação foi de 450 °C, fluxo do gás nitrogênio de 50 L/hr,

energia inicial de colisão foi de 6V para geração do íon precursor. Para as análises EM/EM, foi estabelecido a taxa de variação de m/z entre 100 – 1000, a energia de colisão em EM/EM foi feita em modo rampa variando de 15-30 eV. Para garantir a precisão da massa e reprodutibilidade, leucina encefalina foi utilizado como o *lock mass* de referência.

A identificação da cardamonina presente no extrato bruto de *P. aduncum* foi realizado por EM/EM-QTOF. Os espectros de massas obtidos foram comparados com dados disponíveis nas bases de dados MassBank of North America (<http://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/>), PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), e ChemSpider (<http://www.chemspider.com/>) para identificação da cardamonina, além das literaturas CARVALHO et al., 2012; HE et al., 2009; JAISWAL et al., 2015.

3.6.3 Isolamento da cardamonina

Com o propósito de isolamento da cardamonina presente no Pa, 65,0 g deste extrato foram submetidos à CLV de 10 cm de diâmetro por 15 cm de altura e empacotada com mistura de sílicas (750 g de sílica 40-63 μm e 250 g de sílica 70-230 μm), seguindo adaptações da metodologia utilizada por Castro e colaboradores (2015). Utilizou-se como fases móveis hexano e, mistura de hexano: acetato de etila eluídas em grau crescente de polaridade, sendo coletadas 7 subfrações de aproximadamente 700 mL cada.

Durante a eluição, todas as frações foram analisadas e acompanhadas por CCD (hexano:acetato de etila 6:4 v/v) usando como reagente revelador o anisaldeído sulfúrico. Após eluição da CLV, um precipitado amarelo foi obtido na fração 6. Este precipitado foi analisado por CLUE-ESI-QTOF-EM e RMN de ^1H , confirmando a estrutura química do mesmo como sendo a cardamonina. O resumo do processo de isolamento da cardamonina encontra-se na Figura 9.

3.6.4 Identificação da cardamonina

A amostra obtida anteriormente foi analisada por RMN de ^1H (500MHz), utilizando espectrômetro de RMN BRUKER AVANCE III, localizado no Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas (ICE) da UFJF e operado a 500 MHz. O solvente utilizado foi o CD_3OD para o composto e tetrametilsilano (TMS) como

referência interna. Os dados obtidos foram tratados no programa MestReNova e comparados com dados obtidos na literatura. Além disso, a identificação da substância foi realizada também por espectrometria de massas em modo positivo e negativo de análise utilizando o mesmo equipamento e nas mesmas condições mencionadas anteriormente no item 3.6.2.

3.6.5 Ensaio de inibição da atividade enzimática da apirase de batata pela cardamonina

O ensaio de atividade enzimática foi realizado no Departamento de Bioquímica do Instituto de Ciências Biológicas da UFJF, sob a colaboração da Profa. Dra. Priscila de Faria Pinto, de acordo com métodos previamente descritos (DETONI et al., 2012; MAIA et al., 2019; TAUSSKY, SHORR, 1953).

3.6.5.1 Obtenção e purificação da apirase de batata

Inicialmente, obteve-se a apirase de batata com o objetivo de utilizá-la nos ensaios enzimáticos e também na técnica de ultrafiltração para seleção de possíveis ligantes e inibidores das ATP difosfohidrolases de *S. mansoni*.

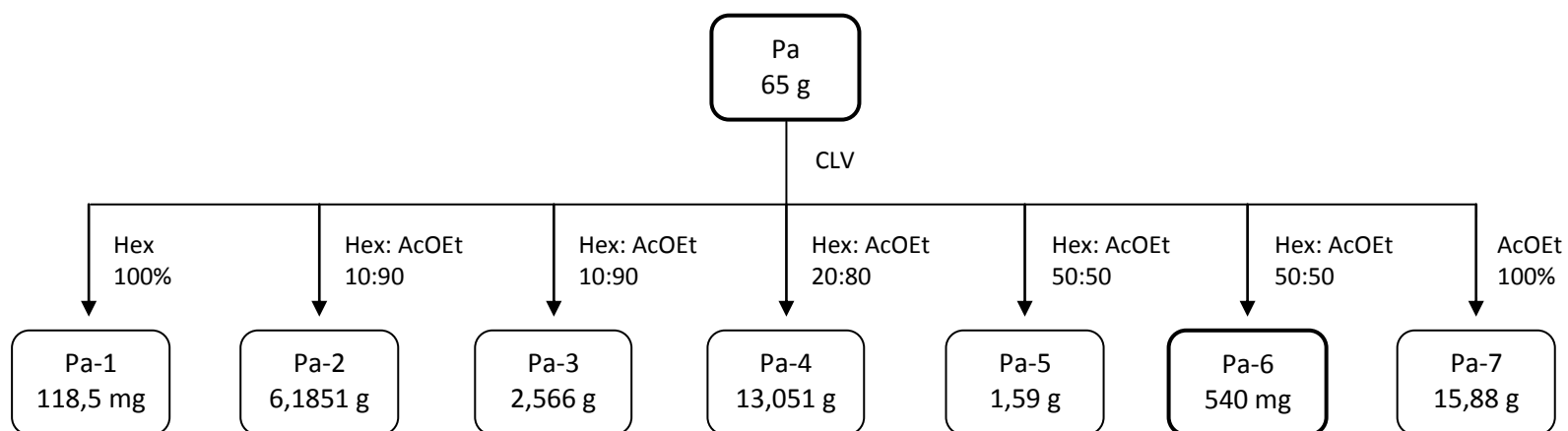
A purificação da apirase de batata (*S. tuberosum*), de origem comercial, foi realizada de acordo com os métodos previamente descritos (FARIA-PINTO et al., 2004; FARIA-PINTO et al., 2008).

Em resumo, 5Kg de batatas, da variedade Desirée, foram obtidas em um supermercado local e, em seguida, descascadas e trituradas em liquidificador, com adição de ácido tioglicólico 10 mM para inibição da ação das tirosinases. A mistura foi filtrada, com auxílio de gase, para remoção do amido. Em seguida, a solução de proteínas foi precipitada por adição lenta e, sob agitação, de sulfato de amônio até obter 40% de saturação. O precipitado foi descartado e ao sobrenadante adicionou-se uma quantidade de sulfato de amônio necessária para atingir 70% de saturação. Nesta etapa, o precipitado foi guardado e ressuspenso em ácido tioglicólico a 10 mM. Este procedimento foi repetido 3 vezes. Cada centrifugação foi realizada a 8.000 rpm por 15 min, sob refrigeração. A amostra obtida pelo processo de precipitação com sulfato de amônio foi aplicada em coluna de filtração em gel (Sephadex G-25 e Sephadex G-100) e, como etapa final, foi aplicada em coluna de

troca iônica carboximetilcelulose (CMC), seguida de diálise. Os picos das proteínas extraídas das colunas foram determinados pela medida de densidade óptica a 280 nm, e a identificação das atividades ATPásica e ADPásica pelo Método de Taussky, Shorr (1953).

A avaliação do rendimento da purificação foi verificada ao longo do processo através de dosagem de proteínas (LOWRY et al., 1951), atividade enzimática, eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% e 0,1% de dodecil sulfato de sódio (LAEMMLI, 1970), seguida de coloração pelo azul de Comassie e pela prata.

Figura 9 - Fluxograma do fracionamento do extrato bruto diclorometânico das partes aéreas de *P. aduncum* L. (Pa).



Fonte: Elaborado pela própria autora.

3.6.5.2 Ensaio de inibição da atividade enzimática

Neste ensaio de atividade enzimática, 0,0006µg de apirase de batata foi adicionada ao meio de reação contendo 50µL de tampão succinato 50 mM pH 6,5, 25µL da cardamonina e 166,4µL de água deionizada, totalizando um volume de 250µL. Os tubos foram incubados durante 10 minutos em banho-maria a 37°C para estabilização do sistema e a reação foi disparada com a adição de 7,5µL de ATP 0,1M. Após 10 minutos a reação foi interrompida pela adição de 250µL de HCl 0,1N. A quantidade de fosfato inorgânico (Pi) liberado foi determinada pela adição de 500µL de reagente de cor e procedeu-se a medida da densidade óptica em 660nm.

As concentrações finais de cardamonina testadas após adição ao meio de reação foram: 100µM, 50µM, 25µM, 12,5µM.

Para cada experimento foi realizada uma atividade enzimática basal e uma atividade controle DMSO. A partir deste valor, os dados de atividade enzimática residual foram calculados através da análise do percentual de redução da atividade em relação à atividade controle.

Os tratamentos estatísticos foram realizados com auxílio do software GraphPad InStat 7.0. A análise entre grupos foi realizada pela análise de quartis, de variância (ANOVA) e as diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo teste T-Student. Valores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3.6.6 Estudos de *docking* molecular

Os estudos de *docking* molecular foram realizados no Departamento da Ciência da Computação da Universidade Federal de Juiz de Fora, sob a colaboração da Prof. Dra. Priscila Vanessa Zabala Capriles Goliatt.

A cardamonina foi submetida a estudos de *docking* molecular com o modelo 3D da SmATPDase 1, SmATPDase 2 e apirase, utilizando o programa AutoDock Vina (TROTT; OLSON, 2009). Os resultados obtidos foram classificados de acordo com os scores, valores de cKI (constante de inibição) e as interações proteína-ligante.

Análises de absorção, distribuição, metabolização, excreção e toxicidade *in silico* (ADMET) foram realizados nos programas SwissADME (<http://www.swissadme.ch>) e Molinspiration (<http://www.molinspiration.com/cgi->

bin/properties), avaliando a biodisponibilidade oral teórica da cardamonina, pela “Regra dos Cinco” de Lipinski e o número de bandas rotáveis (LIPINSKI et al., 2001). Os arquivos em formato “smiles” dos compostos submetidos a análise ADMET foram desenhados com o uso do programa ChemSketch versão 11.0 (ACD, 2015), e submetidos ao programa SwissADME e Molinspiration.

3.6.7 Avaliação da atividade esquistossomícida *in vivo* da cardamonina

Considerando o potencial de inibição da cardamonina frente às ATP difosfohidrolases juntamente com sua atividade esquistossomícida *in vitro* já evidenciada (CASTRO et al., 2015), esta substância foi avaliada no modelo esquistossomícida *in vivo*, sendo administrada por via oral. Os ensaios *in vivo* foram realizados no Núcleo de Doenças Negligenciadas da Universidade de Guarulhos, sob a colaboração e responsabilidade do Prof. Dr. Josué de Moraes, utilizando como base metodologias previamente publicadas (DE MORAES et al., 2014; PEREIRA et al., 2018; SILVA et al., 2017). Os animais foram liberados através da comissão de ética de uso de animais, CEUA 031/2017.

3.6.7.1 Animais utilizados e manutenção do ciclo evolutivo do *S. mansoni*

A linhagem de *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 utilizada neste trabalho foi a BH (Belo Horizonte, MG), mantido no laboratório Núcleo de Pesquisa em Doenças Negligenciadas - Universidade de Guarulhos, São Paulo, SP. Os parasitos foram mantidos em caramujos *Biomphalaria glabrata* Say, 1818 (hospedeiro intermediário) e em camundongos Swiss como hospedeiros definitivos. Os caramujos são procedentes de Barreiro de Baixo (Belo Horizonte, MG, Brasil), mantidos em aquários de polietileno (55 x 22 x 17 cm) com cerca de 20 litros de água desclorada, temperatura de 24 °C, alimentados com alface fresca.

Os camundongos Swiss foram mantidos em caixas de polipropileno (40 x 34 x 16 cm) com tampa metálica e alimentados com ração e água *ad libitum*. Esses roedores eram recém desmamados, fêmeas, com massa de aproximadamente 20 g e 21 dias de idade. Os animais foram acomodados em maravalha com duas trocas semanais.

Ovos foram recolhidos de um macerado hepático, de camundongos previamente infectados, para posterior reinfecção de caramujos (PELLEGRINO, KATZ, 1968). Após 30 a 40 dias de infecção, os caramujos foram expostos à água decolorada e luz artificial por 2 a 3 horas, para a liberação de cercárias. As cercárias foram concentradas para a infecção dos camundongos (PELLEGRINO, KATZ, 1968). Os camundongos Swiss foram infectados por meio de injeção subcutânea (seringa de 1 mL) com cerca de 100 cercárias. Após 49 dias de infecção os animais foram sacrificados em câmara de CO₂ e perfundidos (os animais foram seccionados longitudinalmente na região ventral) com meio RPMI 1640 (Roswell Memorial Park Institute, Vitrocell, Campinas, SP, Brasil) com L-glutamina, vermelho de fenol e heparina sódica 5 UI/mL (Liquemine®, Roche, São Paulo, SP, Brasil), através do sistema porta hepático (a veia porta foi seccionada e com auxílio de uma agulha acoplada em bomba peristáltica) para a recuperação dos vermes adultos de *S. mansoni*.

O ciclo de vida do parasito foi mantido e os vermes e ovos foram recuperados de acordo com as metodologias já descritas na literatura (PELLEGRINO, KATZ, 1968; SMITHERS, TERRY, 1965).

3.6.7.2Preparo da amostra para ensaio in vivo

A cardamonina foi solubilizada em etanol e diluída em tampão fosfato salina (PBS) na concentração final de 100 mg/mL e os animais foram tratados com cardamonina por via oral na concentração de 400 mg/kg de animal.

3.6.7.3Grupos experimentais para o tratamento

Para a realização dos tratamentos, camundongos fêmeas da linhagem Swiss, pesando em média 20 g, foram infectados (injeção subcutânea) com 80 cercárias/animal. Os animais foram divididos em 2 grupos distintos (Tabela 2) contendo 5 animais cada. Como controle negativo, foi utilizado um grupo de animais não tratados (somente PBS pH 7,2 e etanol). O outro grupo de animais foi tratado com cardamonina na concentração de 400 mg/kg de animal. O início do tratamento ocorreu 49 dias após a infecção e todos os grupos foram tratados com 100 µL por

via oral através de gavagem. Duas semanas após o tratamento os animais foram eutanasiados.

Tabela 2 - Disposição dos animais nos grupos experimentais e respectivos tratamentos via oral.

Grupo	Tratamento	Dose	Número de doses
1	Controle	-	1
2	Cardamonina	400,0 mg/kg	1

Fonte: Elaborado pela própria autora.

3.6.7.4 Recuperação dos vermes adultos de *S. mansoni*

Após duas semanas de tratamento, os animais foram eutanasiados e submetidos à perfusão do sistema porta-hepático de acordo com Pellegrino e Siqueira (1956). Os vermes recuperados de cada animal foram colocados, imediatamente, em placa de Petri separadamente, contendo solução salina NaCl 0,9%, e quantificados e identificados segundo o sexo e vermes acasalados.

3.6.7.5 Oograma

Para avaliar o efeito do tratamento da cardamonina sobre a oviposição de *S. mansoni*, os ovos foram recolhidos da junção íleo secal e fezes após eutanásia dos animais, para contagem e análises morfológicas. Foram realizadas a contagem do número de ovos maduros, imaturos e mortos (classificados pelo estágio de desenvolvimento dos ovos) e, ainda, a contagem de ovos por grama (OPG) de fezes (KATZ, CHAVES, PELLEGRINO, 1972).

3.6.7.6 Peso hepático e esplênico

Após eutanásia e perfusão, o fígado e baço de cada animal submetido ao tratamento com cardamonina, bem como, daqueles pertencentes ao grupo controle não tratado, foram removidos e seus pesos determinados.

3.6.7.7 Análises estatísticas

Os tratamentos estatísticos foram realizados com auxílio do software GraphPad InStat 7.0. A análise entre grupos foi realizada pela análise de quartis, de variância (ANOVA) e as diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo teste T-Student. Valores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Os dados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão.

3.7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.7.1 Identificação da cardamonina no extrato de *P. aduncum* por CLUE-ESI-QTOF-EM

Após processo de maceração das partes aéreas de *P. aduncum*, obteve-se o extrato diclorometânico das partes aéreas de *P. aduncum*, o qual foi submetido a análise em CLUE-ESI-QTOF-EM. Após análise, foi possível observar no extrato a presença de uma substância com a mesma massa molecular e o mesmo perfil de fragmentação no espectro de massas da cardamonina.

Na Figura 10 estão representados os cromatogramas em CLUE-ESI-QTOF-EM do extrato Pa em modo positivo (Figura 10a) e no modo negativo (Figura 10b). Pode-se observar, no tempo de retenção de 7,12 (modo positivo e modo negativo), a presença de uma substância que apresentou a mesma massa molecular da cardamonina (espectro não mostrado). Conforme descrito no item 3.6.3 essa substância foi isolada do extrato Pa e, após isolamento, esta substância foi novamente submetida à análise em CLUE-ESI-QTOF-EM. Para análise do perfil de fragmentação da substância, o espectro de massas foi gerado (Figura 11), e observaram-se os íons moleculares com massa carga (m/z) 271,1666 $[M+H]^+$ e 269,1054 $[M-H]^-$ para os modos positivos (+) e negativos (-), respectivamente.

No modo negativo observa-se a formação dos principais fragmentos 254,0810 $[M-H-CH_3]^-$ e 226,0864 $[M-H-CH_2-CO]^-$ atribuídos à perda do grupo metila, seguido de perda de monóxido de carbono. Já no modo positivo, observa-se como fragmento principal o íon de m/z 167,0849, correspondente a perda de $C_6H_5-CH=CH$. Todos os outros fragmentos foram comparados com os dados previamente publicados na literatura (CARVALHO et al., 2012; HE et al., 2009; JAISWAL et al., 2015) e estão ilustrados em mais detalhes na Tabela 3.

Figura 10 - Cromatograma em CLUE-ESI-QTOF-EM do extrato de *P. aduncum* L. evidenciando a cardamonina.

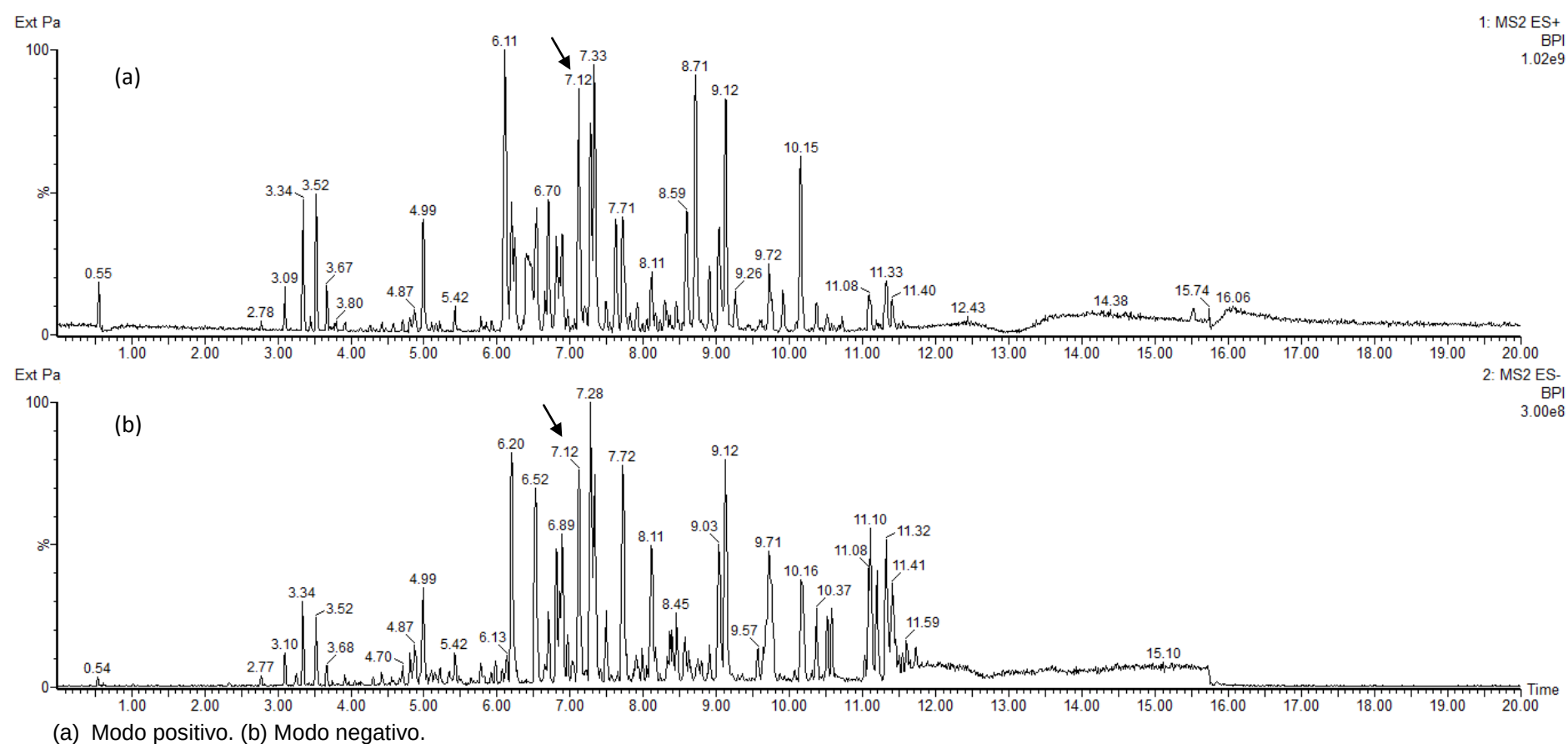
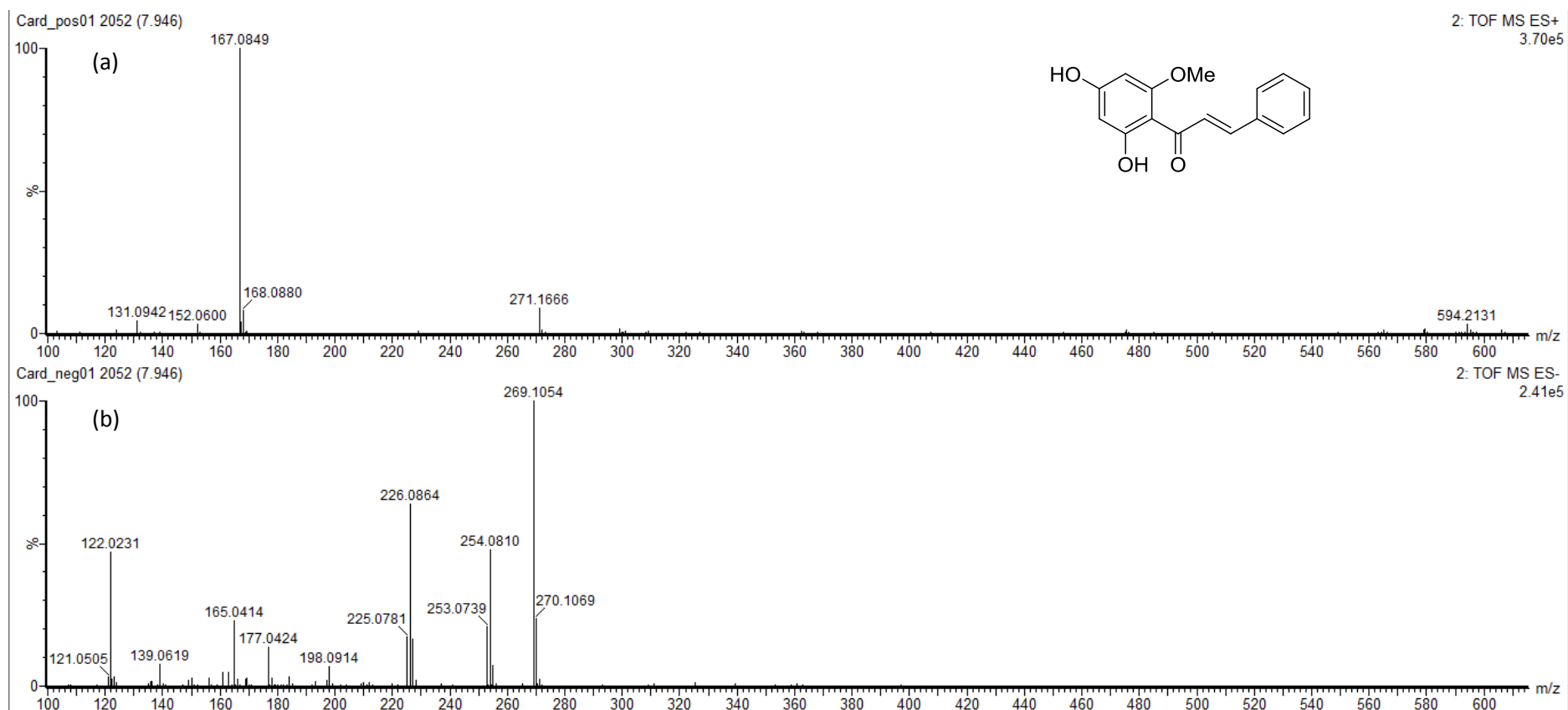


Figura 11 - Espectro de massas em ESI-QTOF da cardamonina.

(a) ESI(+)-EM. (b) ESI(-)-EM.

Fonte: Elaborado pela própria autora.

Tabela 3 - Fragmentos gerados pela cardamonina no modo positivo e negativo

Substância	TR (min)	m/z experimental $[M+H]^+$ e fragmentos via EM/EM	m/z experimental $[M+H]^-$ e fragmentos via EM/EM	Fórmula molecular
Cardamonina	7,12	167,0849; 152,0600; 131,0942	254,0810; 226,0864; 198,0914; 177,0424; 165,0414; 139,0619; 122,0231	C ₁₆ H ₁₄ O ₄

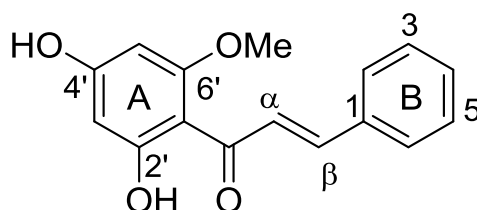
Fonte: Elaborado pela própria autora.

3.7.2 Isolamento e identificação estrutural por RMN da cardamonina

Como descrito anteriormente, 65 g do extrato Pa foi submetido à CLV e como resultado desse fracionamento obteve-se 540 mg de cardamonina.

A cardamonina teve sua estrutura química também identificada com base na análise dos dados de RMN de ^1H e comparação com os dados encontrados na literatura. Na Figura 12 está representada sua estrutura química.

Figura 12 - Estrutura química da cardamonina.



Fonte: Elaborado pela própria autora.

A análise do espectro de RMN de ^1H , evidencia a presença de dois dupletos em δ 7,71 e 7,94, integrados para 1 hidrogênio cada (Figura 13 e 14). Os sinais são compatíveis com os hidrogênios olefínicos H_α e H_β carbonílicos, característicos da estrutura das chalconas (XIAO et al., 2011). Além disso, por meio do valor da constante de acoplamento, $J_{\alpha-\beta} = 15,6$ Hz, entre estes hidrogênios, pode-se inferir que esta chalcona possui configuração *trans* (PAVIA et al., 2010).

Pode-se observar também a presença de dois dupletos em δ 5,95 e em δ 6,02 ppm, integrados para 1 hidrogênio cada (Figura 13 e 14), os quais foram atribuídos aos hidrogênios $\text{H}_{5'}$ e $\text{H}_{3'}$. Ainda pela análise do espectro de RMN de ^1H , podemos inferir que o anel aromático A é tetrassubstituído, devido a presença de apenas 2 hidrogênios (PAVIA et al., 2010).

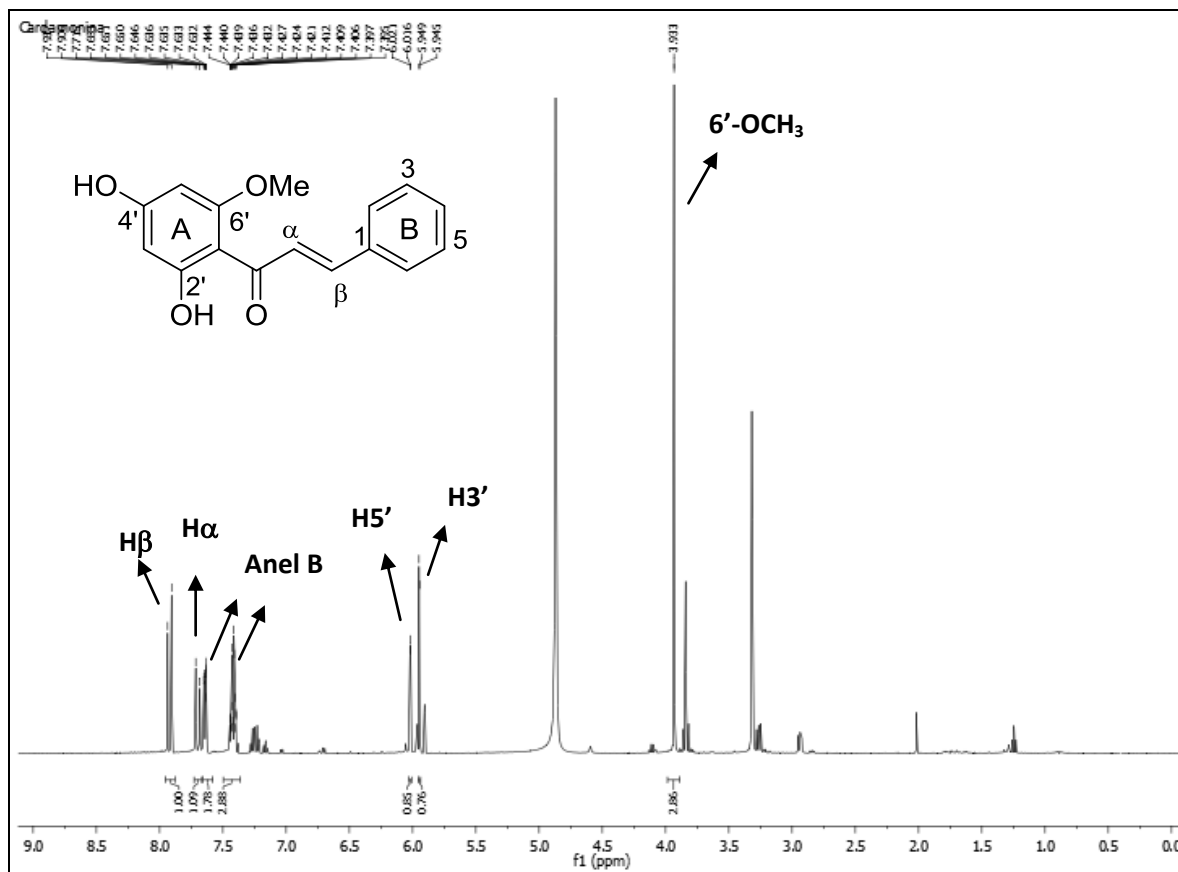
Finalmente, a presença de um simpleto em δ 3,95 ppm, integrado para 3 hidrogênios, evidencia a presença de uma metoxila na molécula.

As atribuições dos demais sinais, hidrogênios aromáticos do anel B, podem ser observadas na Tabela 4.

Assim, a comparação dos dados de RMN de ^1H obtidos com aqueles previamente publicados na literatura (PING et al., 2018), sugerem que esta

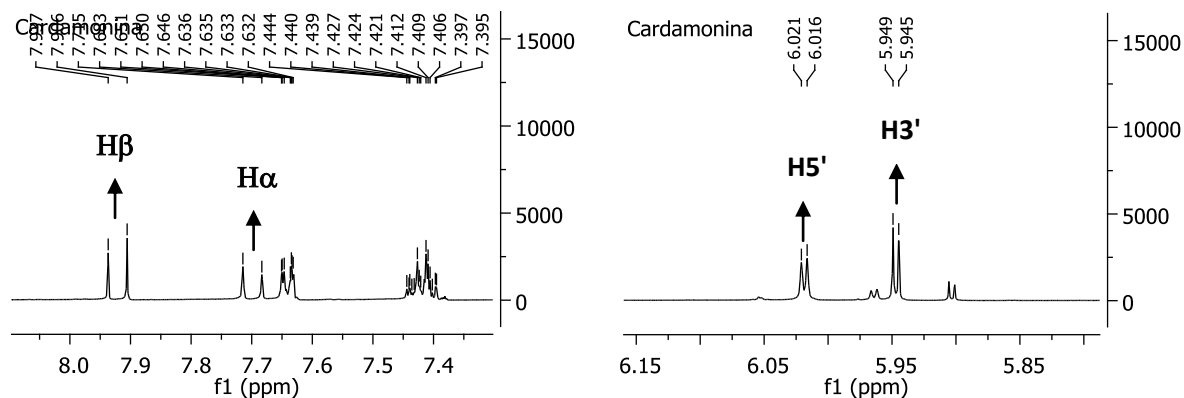
substância seja a 2',4'-dihidroxi-6'-metoxi-chalcona, cardamonina, representada na Figura 12.

Figura 13 - Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD ; 500 MHz) para a cardamonina.



Fonte: Elaborado pela própria autora.

Figura 14 - Seções expandidas entre δ 8,0 - 7,4; 6,15 - 5,85 do espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 500 MHz) da cardamonina.



Fonte: Elaborado pela própria autora.

Tabela 4 - Dados do espectro de RMN de ^1H (CD_3OD ; 500 MHz) para a cardamonina.

Cardamonina		
Hidrogênio	Cardamonina	PING et al., 2018 (b)
	δ (ppm)	
α	7,71 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 15,6 Hz)	7,80 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 15,5 Hz)
β	7,94 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 15,6 Hz)	7,92 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 15,5 Hz)
6'-OCH ₃	3,93 (1H, <i>s</i>)	3,85 (1H, <i>s</i>)
3'	5,95 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,2 Hz)	5,98 (1H, <i>s</i>)
5'	6,02 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,2 Hz)	6,12 (1H, <i>s</i>)
Anel B	7,64 e 7,42 (5H, <i>m</i>)	7,62 (2H, <i>d</i>) e 7,46 (3H, <i>m</i>)

(a) 500 MHz, CD_3OD ; (b) CDCl_3

Fonte: Elaborado pela própria autora.

3.7.3 Ensaio de inibição da atividade enzimática da apirase de batata pela cardamonina

Conforme descrito no item 2 deste trabalho, várias pesquisas têm demonstrado a homologia entre a apirase de batata e as ATP difosfohidrolases de *S. mansoni* (FARIA-PINTO et al., 2004; VASCONCELOS et al., 1996). Além disso, a literatura evidencia que algumas substâncias esquistossomicidas foram capazes de promover tanto a inibição da atividade hidrolítica da apirase de batata, quanto das isoformas presentes no tegumento do verme adulto. Estes resultados também mostraram uma similaridade de sítios ativos entre a apirase da batata e as isoformas de ATP difosfohidrolases de *S. mansoni* (PENIDO et al., 2007).

Em trabalhos publicados pelo nosso grupo de pesquisa está relatado o potencial inibitório de algumas substâncias, em especial a cardamonina, frente às enzimas presentes no tegumento de *S. mansoni* (ALEIXO de CARVALHO et al., 2015; CASTRO et al., 2015). Através destes pode-se observar que as atividades esquistossomicidas dessas substâncias podem estar relacionadas à inibição das ATP difosfohidrolases de *S. mansoni*.

Portanto, considerando a importância da descoberta de substâncias inibidoras das ATP difosfohidrolases de *S. mansoni* e a dificuldade de obtenção destas enzimas a partir do tegumento dos parasitos, a apirase de batata pode ser uma alternativa para selecionar moléculas com afinidade para SmATPDases.

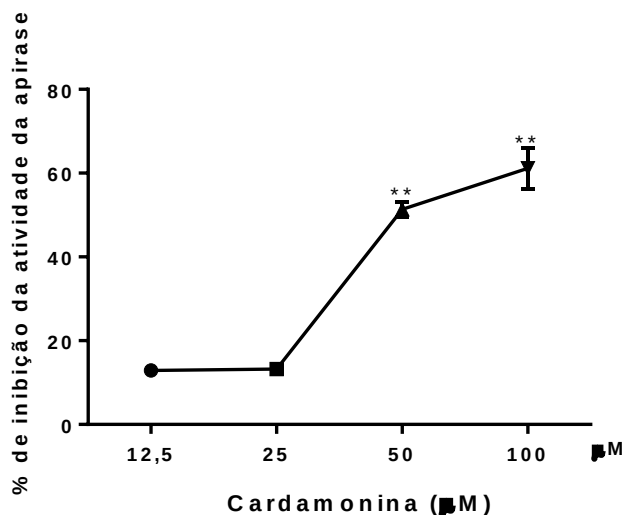
Dessa forma, no presente trabalho investigou-se a atividade inibitória da cardamonina frente à apirase de batata, partindo do conhecimento de que essa substância inibe as ATP difosfohidrolases de *S. mansoni* (CASTRO et al., 2015).

Como pode-se observar na Figura 15, a cardamonina foi capaz de diminuir a atividade enzimática da apirase de batata. Na menor concentração testada de cardamonina (12,5 μ M) a inibição da enzima foi em torno de 12% e o percentual inibitório aumentou até promover cerca de 60% de inibição na concentração de 100 μ M. Neste experimento, a cardamonina apresentou IC₅₀ de 49 μ M.

Esses dados são consistentes com os da literatura, uma vez que a cardamonina também inibiu as ATP difosfohidrolases, porém com IC₅₀ menor, de 23,54 μ M (CASTRO et al., 2015).

No trabalho de Penido e colaboradores (2007) algumas substâncias promoveram tanto a inibição da atividade hidrolítica da apirase de batata, quanto das isoformas presentes no tegumento do verme adulto de *S. mansoni*. Uma dessas substâncias avaliadas apresentou 28% de inibição da atividade das ATP difosfohidrolases de *S. mansoni* e 26% de inibição da apirase de batata (PENIDO et al., 2007). Porém, apesar da porcentagem de inibição serem próximas nas duas enzimas, a concentração da substância foi 10 vezes maior no ensaio enzimático com a apirase.

Figura 15 - Inibição da atividade enzimática da apirase de *S. tuberosum* pela cardamonina.



** Diferença significativa quando comparado com o controle negativo ($p < 0,001$).

Fonte: Elaborado pela própria autora.

Segundo Vasconcelos e colaboradores (2009), a apirase de batata possui alto potencial como ferramenta em estudos de monitoramento da atividade

ATPásica, ADPásica e, ensaios de inibição enzimática *in vitro*, podendo, portanto, ser utilizada para encontrar inibidores de NTPDases (MAIA et al., 2019; PENIDO et al., 2007; VASCONCELOS et al., 2009).

Apesar disso, até o momento, nenhum inibidor potente e seletivo de NTPDase foi descrito na literatura. Dessa forma, a busca por inibidores específicos e potentes das NTPDases se torna desejável, especialmente os inibidores das ATP difosfohidrolases de *S. mansoni*, os quais podem vir a ser promissores fármacos esquistossomicidas.

3.7.4 Estudos de *docking* molecular

Tendo em vista a alta homologia existente entre as NTPDases de diferentes espécies, inclusive as ATP difosfohidrolases de *S. mansoni*, e a presença das cinco ACRs, torna-se possível explorar as análises *in silico* com o intuito de caracterizar novas regiões que possam servir como alvos farmacológicos para essas proteínas, e também encontrar possíveis ligantes e inibidores enzimáticos (FARANI, 2016).

Portanto, de acordo com os resultados experimentais apresentados no presente trabalho, nos quais evidenciamos que a cardamonina inibe a apirase de batata, e em relatos anteriores os quais demonstram que essa substância também inibe as ATP difosfohidrolases de *S. mansoni* (CASTRO et al., 2015), estudos de modelagem computacional também foram realizados com a finalidade de verificar a capacidade de ligação da cardamonina nessas enzimas.

Docking molecular é uma metodologia baseada na predição do modo de interação entre um ligante e uma proteína de estrutura tridimensional conhecida (MORRIS; LIM-WILBY, 2008). Como resultados obtém-se a energia livre de ligação entre o encaixe proteína-ligante, a qual é capaz de prever a força de associação ou afinidade de ligação entre duas moléculas, através das forças intermoleculares do tipo dipolo-dipolo. Desse modo, a classificação de melhor orientação de encaixe pode ser dada pela menor quantidade de energia utilizada, uma vez que demonstra que não é necessário um grande gasto energético para que ocorra a ligação (KITCHEN et al., 2004).

Nos estudos de *docking* molecular utilizando o software AutoDock Vina 1.1.2 (Maio 11, 2011) do presente trabalho, foram levados em consideração para análise: valor de afinidade (Kcal/mol) e as interações moleculares entre os compostos

submetidos e os resíduos flexíveis da proteína, conforme mostrado na Tabela 5. Nesta tabela, estão descritos os resultados da cardamonina submetida ao *docking* molecular com a proteína SmATPDase1, SmATPDase2, ambas de *S. mansoni* e apirase da batata.

A cardamonina apresentou valores negativos de energia (afinidade) com todas as proteínas avaliadas, sugerindo que as interações (ponte de hidrogênio e dipolo-induzido) entre o sítio ativo e o composto podem ocorrer de forma espontânea. Além disso, verifica-se que os valores de K_i calculados foram 3,18 μM para SmATPDase 1 e 1,37 μM para SmATPDase 2 e apirase, evidenciando assim, que seria necessário uma menor concentração dessa molécula para inibir o sítio ativo da SmATPDase 2 e apirase.

Complementando os resultados foi avaliada a toxicidade *in silico* da cardamonina. Assim, essas análises abrangem parâmetros, como absorção, distribuição, metabolismo e excreção, têm se tornado crucial no planejamento racional de fármacos, uma vez que suas predições são simples, de alto rendimento e baixo custo (WANG et al., 2015).

No presente trabalho, a cardamonina e o fármaco de escolha para tratamento da esquistossomose, Praziquantel, foram submetidos aos estudos de toxicidade, a fim de comparação. Conforme descrito anteriormente, estes estudos foram realizados nos programas SwissADME e Molinspiration e a biodisponibilidade oral teórica dos ligantes foram determinadas pela “Regra dos Cinco” de Lipinski (RO5) e pelo número de bandas rotáveis (nrotb).

De acordo com a “Regra dos Cinco” de Lipinski, para que um composto tenha boa disponibilidade oral, ele precisa atender a pelo menos três dos seguintes parâmetros: LogP (coeficiente de partição) menor ou igual a 5,00; Massa molar menor ou igual a 500 g/mol; área de superfície polar (TPSA) menor ou igual a 140 $\text{\AA}^2$; não mais que 5 doadores de hidrogênio (soma de OH e NH na molécula) e no máximo 10 grupos aceptores de ligação de hidrogênio (soma de átomos de N e O) (LIPINSKI et al., 2001).

A análise de TPSA é a soma das superfícies polares de uma molécula, geralmente átomos de oxigênio, nitrogênio e hidrogênio ligado. Através desta análise, é possível prever as propriedades de transporte passivo do fármaco, seja

através do intestino ou pela barreira hematoencefálica (ERTL; ROHDE; SELZER, 2000).

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 6, a cardamonina ao ser comparada com o fármaco de escolha Praziquantel, apresenta boa disponibilidade oral e um perfil de baixo risco de citotoxicidade, pois não demonstrou violação a nenhum dos parâmetros de RO5.

Além desses parâmetros, também foi analisado, em ambos os programas, o número de bandas rotáveis presentes na estrutura química do composto, o qual corresponde ao número de ligações simples presentes ligadas a um átomo não terminal. Quanto maior o número de nrotb, maior será a flexibilidade do composto e, portanto, maior será a sua interação com o sítio ativo da enzima estudada (VEBER et al., 2002). Estudos demonstram que valores de TPSA $\leq 140 \text{ \AA}^2$ e nrotb ≤ 10 , facilitam a transposição de barreiras e, portanto, possuem grande possibilidade de boa biodisponibilidade oral (BORGES, 2018). Como pode-se observar na Tabela 6, a cardamonina apresentou nrotb igual a 4 e TPSA igual a 66,76, os quais estão de acordo com os valores esperados para que o composto seja seguro e apresente boa disponibilidade oral quanto ao seu uso terapêutico (BORGES, 2018; VEBER et al., 2002).

Tabela 5 - Resultados dos estudos de *docking* molecular da cardamonina com SmATPDase 1, SmATPDase 2 e apirase.

Receptor	AutoDock Vina (Kcal/mol)	K _i calculado (μM)	Interações (AutoDock Vina)
SmATPDase 1	-7,5	3,1800	GLU201, SER81, THR82 E SER83
SmATPDase 2	-8,0	1,3675	ARG51, ASP44, THR122, GLU164, SER47 E THR48
Apirase	-8,0	1,3675	TYR315, THR30, ASP26, GLU145, THR102 E SER29

Fonte: Elaborado pela própria autora.

Tabela 6 - Resultados de predição de toxicidade da cardamonina, utilizando os programas SwissADME (SA) e Molinspiration (MI).

Amostra	Doador de ligação de hidrogênio	Aceptor de ligação de hidrogênio	nrotb	Massa molar (g/mol)		LogP		TPSA	
	MI/SA	MI/SA	MI/SA	MI	SA	MI	SA	MI	SA
Praziquantel	0	4	1	312,41	312,41	2,74	3,01	40,62	40,62
Cardamonina	2	4	4	270,28	270,28	3,23	1,78	66,76	66,76

Fonte: Elaborado pela própria autora.

3.7.5 Ensaio esquistossomicida *in vivo*

Vários extratos vegetais e substâncias de origem natural e sintética têm sido recentemente avaliados quanto às suas atividades esquistossomicidas frente ao *S. mansoni* (ALEIXO de CARVALHO et al., 2015; CASTRO et al., 2015; PEREIRA et al., 2018). Dentre estes extratos vegetais, destaca-se o extrato das partes aéreas de *P. aduncum* (Piperaceae), o qual apresentou expressiva atividade esquistossomicida *in vitro* frente à vermes adultos de *S. mansoni*. Além disso, neste mesmo trabalho evidenciou-se o potencial esquistossomicida *in vitro* e de inibição de ATP difosfolases de *S. mansoni* da cardamonina, a qual foi obtida do extrato de *P. aduncum* por meio de fracionamento cromatográfico bio guiado (CASTRO et al., 2015).

No entanto, para a cardamonina, somente os ensaios esquistossomicidas *in vitro* haviam sido realizados anteriormente. Neste sentido, há de se considerar que os ensaios *in vivo* permitem que a atividade da molécula seja avaliada perante a complexidade do metabolismo de um organismo vivo, diferentemente do que ocorre em testes *in vitro*, onde as condições ambientais podem ser moldadas e, por isso, muitas vezes servem como modelo de triagem na seleção de moléculas que podem vir a ser fármacos em potencial (ALEIXO de CARVALHO et al., 2015; CASTRO et al., 2015; DIAS et al., 2017).

Dessa forma, considerando os resultados do presente trabalho, bem como os resultados previamente publicados que evidenciam o potencial de inibição das ATP difosfolases, estudos em modelo murino foram realizados, no sentido de avaliar a atividade esquistossomicida *in vivo* da cardamonina quando administrada por via oral.

3.7.5.1 Recuperação de vermes

Em modelo murino, a perfusão dos animais consiste em uma ferramenta útil para avaliar a redução da parasitemia promovida por uma substância em teste, além do efeito da mesma sobre o deslocamento hepático dos vermes como indício de uma boa atividade esquistossomicida (FELICISSIMO, 2014).

Primeiramente, importante destacar que o delineamento experimental deste estudo, incluindo dose e o esquema terapêutico, foram elaborados com base em

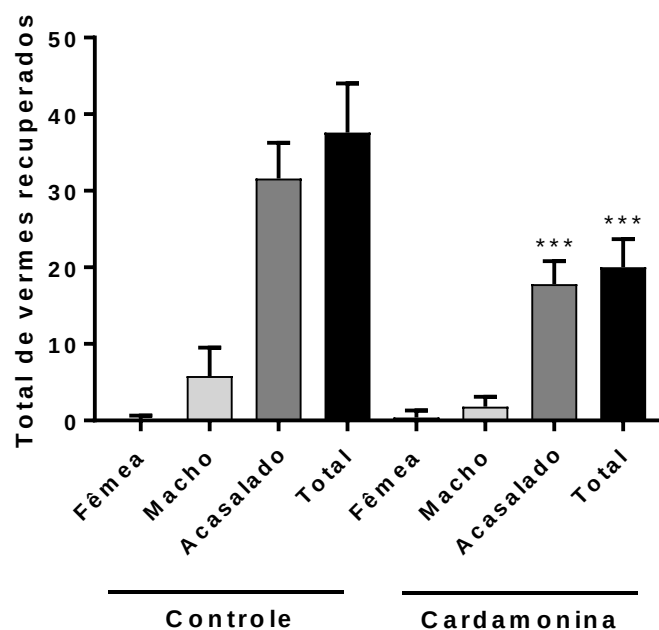
literatura especializada (SILVA et al., 2017), bem como em trabalhos recentemente publicados pelo nosso grupo de pesquisa (PEREIRA et al., 2018).

A análise dos dados obtidos em nosso estudo evidencia que o número total de vermes recuperados no sistema porta-hepático foi alterado no grupo tratado com cardamonina em comparação com o grupo não tratado. A análise estatística mostrou diferença significativa na recuperação de vermes acasalados e no total de vermes recuperados ($p < 0,0001$). Observa-se que no grupo não tratado o número de vermes acasalados (machos + fêmeas) foi de $31,6 \pm 4,18$, enquanto no grupo tratado com cardamonina este número foi de $17,8 \pm 2,71$ (Figura 16, Tabela 7). Em relação a recuperação do número de vermes totais, o grupo controle (sem tratamento) apresentou número total de vermes de $37,6 \pm 5,75$, enquanto o número total de vermes recuperados dos animais que receberam o tratamento com cardamonina (400 mg/kg) foi de $20,0 \pm 3,28$ (Tabela 7), apresentando a cardamonina a capacidade de reduzir em 46,81% a carga total de vermes (Figura 16, Tabela 7).

Além disso, pode-se observar na Tabela 7 que a maioria dos vermes recuperados estavam acasalados. Contudo, avaliando a recuperação de vermes machos e fêmeas separadamente, apesar de não haver significância estatística entre o grupo tratado e não tratado, observa-se efeito da cardamonina na separação dos vermes, uma vez que foi evidenciada diminuição da recuperação dos vermes machos ($1,8 \pm 1,16$) e aumento do número de vermes fêmeas ($0,4 \pm 0,8$) quando comparado ao grupo controle ($5,8 \pm 3,31$; $0,2 \pm 0,4$, respectivamente).

A comparação com outros resultados de estudos esquistossomicidas *in vivo* frente à vermes adultos de *S. mansoni*, previamente publicados (GUIMARÃES et al., 2018; LAGO et al., 2018; PEREIRA et al., 2018; SILVA et al., 2017) os quais mostram atividade *in vivo*, entre 31% e 70% para outros compostos naturais, indica uma boa atividade esquistossomicida *in vivo* para a cardamonina. Resultados similares foram encontrados para epiisopilosina, alcaloide encontrado no jaborandi, o qual demonstrou uma redução no número total de vermes em torno de 57% quando avaliado na dose única de 400 mg/kg (GUIMARÃES et al., 2018). Outro estudo, realizado com chalconas sintéticas, evidenciou uma redução em torno de 32% do número total de vermes recuperados após o tratamento com dose única de 400 mg/kg (PEREIRA et al., 2018).

Figura 16 - Efeitos do tratamento por via oral com cardamonina na recuperação dos parasitos dos animais infectados com *S. mansoni*.



*** Diferença significativa quando comparado com grupo controle sem tratamento ($p < 0,0001$).

Fonte: Elaborado pela própria autora.

Tabela 7 - Efeitos do tratamento por via oral com cardamonina na recuperação dos parasitos dos animais infectados com *S. mansoni*.

	Sem tratamento	Cardamonina (400 mg/kg)
Média de vermes machos $\pm$ desvio padrão	5,8 $\pm$ 3,31	1,8 $\pm$ 1,16
Média de vermes fêmeas $\pm$ desvio padrão	0,2 $\pm$ 0,4	0,4 $\pm$ 0,8
Média de vermes machos e fêmeas $\pm$ desvio padrão	31,6 $\pm$ 4,18	17,8 $\pm$ 2,71
Média de vermes $\pm$ desvio padrão	37,6 $\pm$ 5,75	20,0 $\pm$ 3,28
% de redução de vermes	-	46,81

Fonte: Elaborado pela própria autora.

A redução de vermes recuperados (machos ou fêmeas) de camundongos tratados é relatada, por diversos autores, como um parâmetro confiável, seguro e de forte evidência da eficácia de um medicamento (SULEIMAN et al., 2004; UTZINGER et al., 2002). Segundo Harder e colaboradores (2002), a morte dos vermes adultos, em virtude do tratamento realizado com possíveis fármacos anti *S. mansoni*, pode

ser atribuída a distúrbios metabólicos, bem como a destruição mecânica e muscular dos vermes após a exposição aos fármacos (HARDER et al., 2002).

Além disso, o presente estudo demonstrou que a porcentagem de vermes machos recuperados após o tratamento com cardamonina foi significativamente menor que a porcentagem de vermes fêmeas. Esse fato demonstra que os machos de *S. mansoni* foram mais sensíveis aos tratamentos realizados com a cardamonina.

O tegumento é a interface entre o meio e o parasito, desempenhando funções vitais para o verme, como a absorção de nutrientes, excreção, proteção contra o sistema imunológico do hospedeiro. Ainda, o tegumento apresenta proteínas reparadoras de danos, além de ser seletivo para absorção de fármacos e lipídeos. Além disso, diversos trabalhos têm demonstrado a importância das enzimas ATP difosfohidrolases de *S. mansoni*, presentes no tegumento de vermes adultos, para a sobrevivência destes, durante longos períodos, dentro do hospedeiro (DA'DARA, BHARDWAJ, SKELLY, 2014, FARIA-PINTO et al., 2004). Dessa maneira, tegumento de *S. mansoni* é considerado importante alvo farmacológico para novos fármacos esquistossomicidas (BERTÃO et al., 2012; SILVA et al., 2017).

Apesar do mecanismo de ação esquistossomicida da cardamonina ainda não estar esclarecido, é possível sugerir algumas possibilidades de ação, considerando os resultados obtidos e aqueles previamente publicados. Pesquisas realizadas pelo nosso grupo de pesquisa têm relacionado a atividade esquistossomicida, evidenciada para algumas substâncias, com a inibição da atividade enzimática das ATP difosfohidrolases de *S. mansoni* (ALEIXO de CARVALHO et al., 2015; CASTRO et al., 2015). No trabalho de Castro e colaboradores (2015), a cardamonina apresentou expressiva atividade esquistossomicida *in vitro* e IC₅₀ de 23,54 µM na inibição das ATP difosfohidrolases de *S. mansoni*. Dessa forma, um dos possíveis mecanismos de ação da cardamonina, para sua atividade esquistossomicida, pode estar relacionado à inibição da atividade enzimática das ATP difosfohidrolases de *S. mansoni*.

3.7.5.2 Análise de oograma

Além da quantificação de vermes recuperados, o presente trabalho também levou em consideração alguns critérios sugeridos por Pellegrino e Katz (1968), como o número de ovos retidos no tecido intestinal (oograma) e os volumes médios do

fígado e do baço. Segundo esses autores, tais critérios são fundamentais para avaliação da atividade esquistossomicida de um potencial fármaco.

Dessa forma, a análise quantitativa dos ovos foi realizada (Figuras 17), levando-se em consideração o número de OPG de fezes e a presença de ovos maduros, imaturos e mortos. Neste sentido, é importante considerar que o parâmetro de ovos imaturos é de grande interesse, pois a redução desses significa que não há oviposição recente por parte dos parasitos (DE MORAES, 2011).

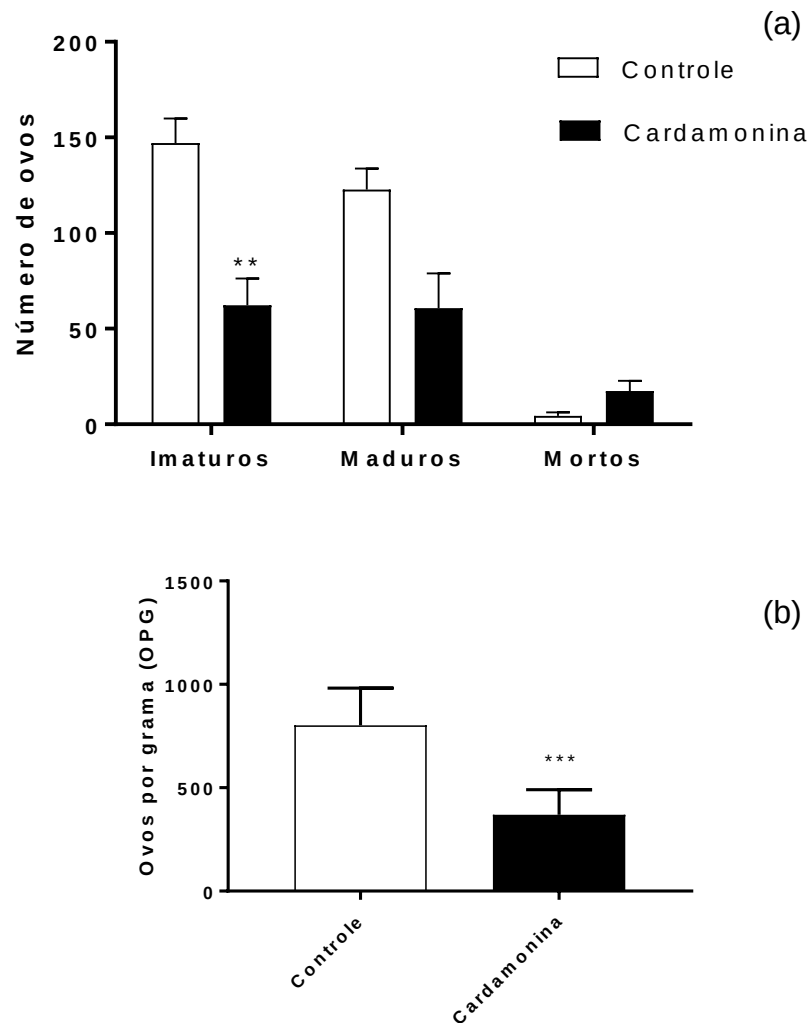
Como pode-se observar na Figura 17 e Tabela 8, a cardamonina causou diminuição no número de OPG de fezes, bem como alteração no padrão de oviposição. Assim, observa-se redução de 54% no OPG de fezes no grupo tratado com cardamonina (Figura 17b, Tabela 8).

Em relação ao padrão de oviposição, observa-se que o número de ovos maduros não apresentou diferença significativa em comparação com o controle negativo. Porém, o tratamento com cardamonina foi capaz de reduzir significativamente em $62,44\% \pm 16,9$ o número de ovos imaturos quando comparado ao controle ($p < 0,001$) (Figura 17a, Tabela 8). Além disso, houve ainda aumento do número de ovos mortos, o qual alcançou $17,4 \pm 10,61$ no grupo tratado, enquanto no grupo controle foi de apenas $4,4 \pm 3,72$ (Figura 17a).

Como descrito anteriormente, o oograma consiste em um dos parâmetros mais relevantes para demonstrar a eficácia de um composto esquistossomicida ou para sugerir o surgimento de um novo fármaco esquistossomicida (DE MORAES, et al., 2014; PEREIRA et al., 2018). Nesse sentido, a oviposição está diretamente relacionada à incapacidade da fêmea em realizá-la ou, ainda, a inabilidade ao acasalamento dos parasitos. Além disso, as principais lesões causadas pelo *S. mansoni* ao organismo são decorrentes da presença de ovos nos tecidos do hospedeiro, desencadeando reações inflamatórias e na formação dos granulomas (GRYSEELS et al., 2006; KLAVER et al., 2015).

Assim, a literatura revela que imediatamente após a postura, os ovos mantêm-se imaturos por aproximadamente 6 dias (1° a 4° estádios). A partir daí atingem a maturidade e são eliminados juntamente com as fezes ou morrem (tornam-se inviáveis) em aproximadamente 12 dias. A postura mais acentuada acontece do 45° ao 72° dia pós-infecção (SOARES, 2016).

Figura 17 - Efeitos nos estágios de desenvolvimento dos ovos (a) e na quantidade de ovos por grama de fezes (b) após tratamento com cardamonina por via oral.



** Diferença significativa quando comparado com grupo controle sem tratamento ($p < 0,001$).

*** Diferença significativa quando comparado com grupo controle sem tratamento ($p < 0,0001$).

Fonte: Elaborado pela própria autora.

Tabela 8 - Efeitos do tratamento por via oral com cardamonina na oviposição dos animais infectados com *S. mansoni*.

Grupo	Tratamento	% de redução Ovos Imaturos	% de redução OPG
Cardamonina	400 mg/Kg	62,44	54,00

Fonte: Elaborado pela própria autora.

No presente trabalho, observou-se que a cardamonina foi capaz de reduzir o número de OPG de fezes, além de causar diminuição no número de ovos maduros e

imaturos, bem como aumento no número de ovos mortos no oograma dos animais tratados. Resultados semelhantes foram observados para outra substância natural, o nerolidol. Em relação ao padrão de oviposição, o tratamento com dose única de nerolidol (400 mg/kg) resultou em 84,6% de redução do ovos imaturos, além de causar um aumento significativo no número de ovos mortos (SILVA et al., 2017).

Os resultados relacionados ao tratamento com cardamonina sugerem que, provavelmente, não ocorreu oviposição recente do parasito no hospedeiro e que essa substância possa atuar também sobre os parasitos fêmeas de *S. mansoni*, interferindo em sua oviposição.

3.7.5.3 Análise do peso médio dos fígados e baços dos animais após tratamento

Na esquistossomose as principais intercorrências clínicas são consequência das formações granulomatosas que circundam os ovos de *S. mansoni*, os quais são depositados nos tecidos do hospedeiro, principalmente no fígado e baço. Nestes casos, os ovos maduros do *S. mansoni*, depositados nos tecidos do hospedeiro, contêm miracídeos em seu interior que liberam antígenos essenciais à formação da resposta inflamatória granulomatosa aguda. Além disso, as citocinas mediadoras da resposta inflamatória estimulam a produção de colágeno e a fibrogênese, resultando na produção de tecido fibroso que culmina com a cicatrização do granuloma (McMANUS et al., 2018).

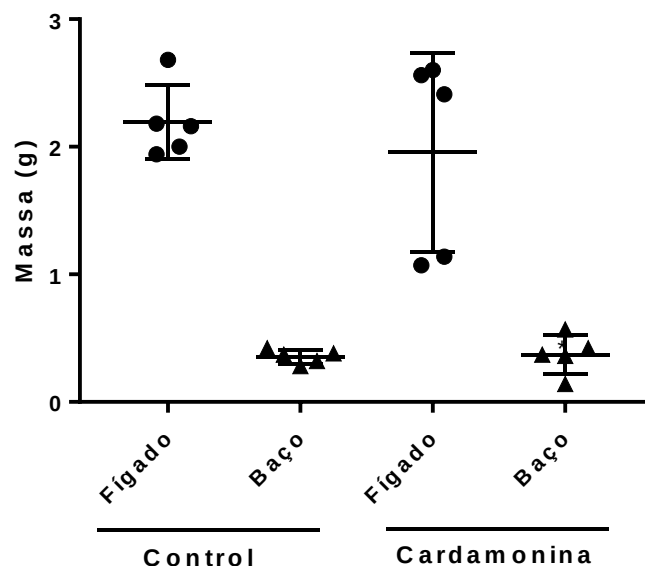
A deposição desse tecido fibroso na matriz extracelular pode causar graves danos ao hospedeiro, como a fibrose periportal associada à perda da elasticidade e bloqueio da luz dos vasos, resultando no aumento da pressão portal (hipertensão portal) (McMANUS et al., 2018). Todos esses fatores, inclusive a hipertensão portal, pode levar à esplenomegalia, ascite, varizes gastroesofágicas e sangramentos gastrointestinais, sendo este responsável pelo aumento das taxas de morbidade e mortalidade entre os hospedeiros dessa verminose (GRYSEELS et al., 2006). Dessa forma, substâncias com potencial resolutivo desses processos podem auxiliar na redução da morbidade da doença.

No presente trabalho, após eutanásia, os fígados e baços dos animais tratados e não tratados foram retirados e pesados imediatamente. A média dos pesos foi então avaliada com o intuito de investigar o potencial de redução destes

pela cardamonina. Como demonstrado na Figura 18, não se observa redução estatisticamente significativa nos pesos desses órgãos entre o grupo tratado com cardamonina e o controle negativo.

Sabendo-se da capacidade de uma substância em abrandar a oviposição, espera-se que a mesma, conseqüentemente, possa interferir no número de formações granulomatosas, já que o ovo e seus antígenos são indispensáveis para que haja a formação do granuloma esquistossomótico (McMANUS et al., 2018). Apesar dos nossos resultados demonstrarem que a cardamonina interfere na oviposição, não foi observada redução no peso dos fígados e baços dos animais tratados. Uma possível explicação é a cardamonina ter demonstrado ação mais significativa na redução de ovos imaturos, uma vez que não houve redução significativa dos ovos maduros, os quais são os que efetivamente se depositam nestes órgãos e geram as formações granulomatosas.

Figura 18 - Efeitos do tratamento por via oral com cardamonina sobre o peso relativo de fígados e baços dos animais com esquistossomose.



Os pontos e triângulos representam os dados de animais individuais, barras na horizontal representam a média de cada grupo.

Fonte: Elaborado pela própria autora.

Diante do exposto, a análise dos resultados *in vivo* aqui apresentados demonstraram eficácia no tratamento com cardamonina (400 mg/kg), a qual foi

capaz de reduzir consideravelmente a carga parasitária dos animais tratados (Figura 16), e de diminuir significativamente o número de ovos imaturos, além de evidenciar maior efeito sobre os vermes machos de *S. mansoni*.

Tendo em vista os dados previamente publicados da atividade esquistossomicida *in vitro* da cardamonina, juntamente com os resultados de atividade esquistossomicida *in vivo* aqui apresentados, podemos sugerir que a cardamonina talvez possa exercer essa atividade biológica também pela inibição enzimática das ATP difosfohidrolases de *S. mansoni* (CASTRO et al., 2015). A possibilidade de inibição destas enzimas pela cardamonina já foi relatada na literatura, sendo que os resultados de *docking* molecular obtidos neste trabalho corroboram com esta proposta de mecanismo de ação. Além disso, foi evidenciado que a cardamonina também pode se ligar e inibir a atividade da apirase de batata.

Assim, tendo em vista a atividade esquistossomicida *in vitro* e *in vivo* da cardamonina e sua capacidade de se ligar e inibir tanto as ATP difosfohidrolases de *S. mansoni* quanto a apirase de batata, essa substância foi utilizada para determinar as condições ideais de incubação com apirase de batata nos ensaios de ultrafiltração acoplada a CLUE-ESI-QTOF-EM com o intuito de selecionar e identificar ligantes e potenciais compostos esquistossomicidas.

3.8 CONCLUSÃO

O trabalho apresentado neste capítulo visou avaliar a atividade enzimática da cardamonina frente à apirase de batata e compará-la à atividade, já descrita na literatura, frente às ATP difosfohidrolases de *S. mansoni*. Além disso, o presente estudo relata pela primeira vez a atividade esquistossomicida *in vivo* da cardamonina.

Em relação à sua capacidade de inibição da atividade enzimática, a cardamonina foi capaz de inibir a atividade da apirase numa concentração maior quando comparada à sua capacidade de inibição das ATP difosfohidrolases de *S. mansoni*. O estudo de *docking* molecular evidenciou que a cardamonina apresenta resultados satisfatórios de energia, *K_i* calculado e interação com resíduos de interesse nas enzimas, podendo se ligar aos sítios ativos das SmATPases 1, SmATPases 2 e apirase.

Já os estudos de avaliação da atividade esquistossomicida *in vivo* demonstraram que o tratamento oral com cardamonina é capaz de reduzir significativamente a carga parasitária, o número de ovos e o OPG em animais infectados com *S. mansoni*.

Finalmente, os resultados obtidos neste estudo, aliados aos já alcançados pelo nosso grupo de pesquisa, mostram o potencial esquistossomicida de chalconas. Além disso, sugere-se que a apirase de batata possa ser utilizada em estudos de triagem para a identificação de ligantes enzimáticos com potencial de inibição frente às ATP difosfohidrolases de *S. mansoni*.

4 ULTRAFILTRAÇÃO ACOPLADA A CLUE-ESI-QTOF-EM PARA SELEÇÃO DE LIGANTES NATURAIS DA ENZIMA APIRASE

Considerando os resultados apresentados no capítulo anterior, o presente capítulo descreve-se a utilização da cardamonina para padronizar alguns parâmetros da técnica de ultrafiltração acoplada à cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLUE-EM), e assim utilizar essa técnica para seleção de ligantes naturais da apirase de batata.

4.1 ULTRAFILTRAÇÃO COMO TÉCNICA DE SELEÇÃO DE MOLÉCULAS LIGANTES DE ALVOS TERAPÊUTICOS

A ultrafiltração (UF) foi desenvolvida pela primeira vez em 1981 como um método alternativo para determinações clínicas de substâncias ligadas às proteínas do soro, tendo em vista a baixa sensibilidade de alguns métodos para determinar pequenas quantidades de frações livres (WHITLAM, BROWN, 1981).

A UF é uma operação unitária, na qual o solvente e alguns solutos em uma solução são removidos seletivamente por uma membrana semipermeável. As membranas de UF, em comparação com as membranas de osmose inversa (OI) e nanofiltração (NF), apresentam porosidade maior e retêm somente macromoléculas (como proteínas ou coloides), que possuem baixa pressão osmótica. Solutos menores são transportados através da membrana com os solventes (FELLOWS, 2006).

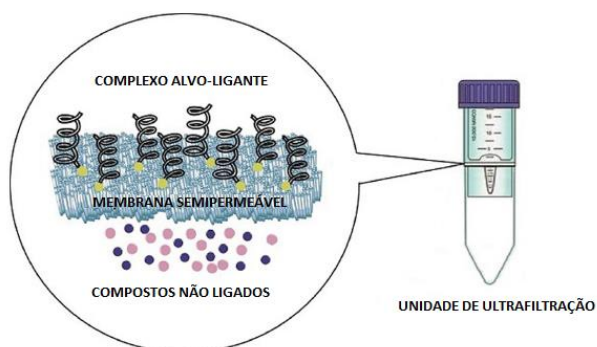
Considerando que a afinidade de ligação de uma substância a um alvo terapêutico relevante é determinante para a eficácia biológica dessa substância, pesquisas foram direcionadas para desenvolver técnicas que pudessem avaliar essa possível ligação. Diante desse cenário, no final dos anos 90, a ultrafiltração foi introduzida, pela primeira vez, na descoberta de medicamentos orientados a alvos específicos (VAN BREEMEN et al., 1997; WIEBOLDT, ZWEIGENBAUM, HENION, 1997).

No trabalho de Van Breemen e colaboradores (1997), a técnica de ultrafiltração foi acoplada à espectrometria de massas com a finalidade de facilitar a identificação das substâncias que se ligaram com afinidade ao alvo terapêutico. Esse grupo de pesquisa desenvolveu uma unidade de operação especializada, que

consistia em uma câmara de ultrafiltração, acoplada a um espectrômetro de massas, que permitia que o analito com atividade de ligação ao alvo fosse detectado após a interação com um alvo macromolecular na câmara. Esta unidade de operação foi chamada de espectrometria de massas por ultrafiltração pulsada (JOHNSON, NIKOLIC, VAN BREEMEN, 2002). Embora esse equipamento não tenha sido adotado fora do laboratório de Van Breemen, o princípio da espectrometria de massas por ultrafiltração pulsada forneceu informações valiosas e serviu de inspiração para o desenvolvimento de nova plataforma de ultrafiltração por afinidade (WEI et al., 2016).

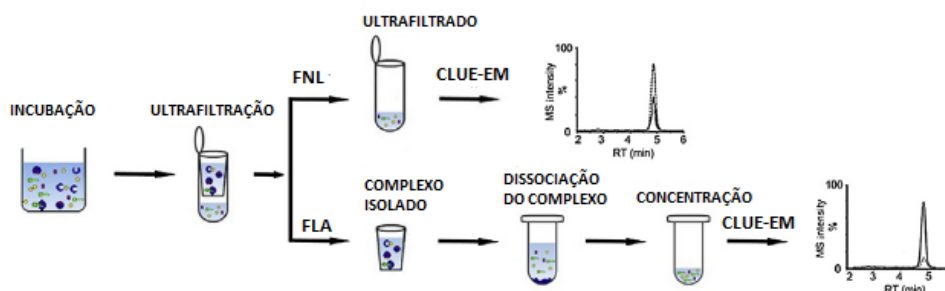
Dessa forma, surge então a espectrometria de massas por ultrafiltração off-line ou tradicional, também conhecida como ultrafiltração acoplada à espectrometria de massas (UF-EM). Essa técnica consiste na incubação do analito com um alvo terapêutico, e a solução resultante é removida por um filtro cutoff contendo uma membrana de ultrafiltração (Figura 19). Essa separação resulta em duas partes, a fração ligada ao alvo (FLA) e a fração não ligada ao alvo (FNL). Em seguida, essas frações são analisadas por espectrometria de massas, na qual a análise da fração ligada é usada para identificar diretamente as substâncias ligantes do alvo (após procedimento de dissociação do complexo, por meio da adição de solventes orgânicos ou mudança de pH). Já a análise das frações não ligadas é um ensaio indireto das substâncias não ligadas que passaram através da membrana (Figura 20) (WEI et al., 2016).

Figura 19 - Filtro contendo a membrana de ultrafiltração.



Fonte: Adaptado de WEI et al. (2016).

Figura 20 - Esquema geral da ultrafiltração acoplada à espectrometria de massas com base na análise de fração não ligada (FNL) e da fração ligada (FLA).



Fonte: Adaptado de WEI et al. (2016).

Esta técnica simples tem sido utilizada de maneira rápida e eficiente na seleção de novas substâncias em ensaios de interações entre proteínas e ligantes (LIU et al., 2017; MULABAGAL E CALDERÓN, 2010). Estudos recentes (LIU et al., 2017; WU et al., 2016; YANG et al., 2018) demonstram que a UF acoplada às técnicas cromatográficas (como a CLAE-DAD e CLUE-EM) pode ser uma metodologia eficiente para selecionar potenciais ligantes enzimáticos a partir de misturas complexas, como extratos vegetais, visando principalmente o isolamento de ligantes que possam interagir e/ou inibir seletivamente as proteínas-alvo utilizadas (LIU et al., 2017; YANG et al., 2012). Portanto, a aplicação da UF-EM na descoberta de potenciais substâncias a partir de produtos naturais evita o isolamento desnecessário de compostos inativos e direciona o isolamento dos compostos ligantes, potencialmente ativos, de extratos vegetais.

Diante disso, vários estudos com produtos naturais têm sido realizados empregando a UF-EM para identificar inibidores de diversas enzimas, como a tirosinase (YANG et al., 2012), a quinona redutase-2 (CHOI et al., 2011), a glucosidase (WU et al., 2016), a xantina oxidase (SONG et al., 2014), a fosfodiesterase (LIU et al., 2017) e a acetilcolinesterase (YANG et al., 2018).

Yang e colaboradores (2012) adaptaram a técnica de UF-EM para rastrear e caracterizar inibidores de tirosinase presentes nas folhas de *Morus alba*. Neste trabalho, após a otimização das condições de ligação à incubação, foram realizados dois ensaios usando tirosinase ativa e tirosinase desnaturada, no intuito de selecionar os potenciais inibidores. Os ultrafiltrados resultantes da ultrafiltração foram analisados por cromatografia líquida acoplada a detector de fotoarranjo diodo e por espectrometria de massas. As áreas dos picos, de cada substância, obtidos

nos dois cromatogramas resultantes da incubação do extrato com enzimas ativa e enzima desnaturada, foram cuidadosamente comparados. Como resultado, doze compostos com atividade de ligação à tirosinase foram identificados no extrato de folhas de *Morus alba* (YANG et al., 2012).

Outro trabalho que merece destaque é o desenvolvido por Munigunti, Mulabagal e Calderón (2011), no qual aplica-se a UF e a UF-EM para avaliar a afinidade de ligação de inúmeros compostos naturais e sintéticos às enzimas presentes no *Plasmodium falciparum* (MUNIGUNTI, MULABAGAL E CALDERÓN, 2011).

Contudo, apesar do crescente número de publicações, nas quais utiliza-se a UF-EM para selecionar moléculas ligantes de diversos alvos terapêuticos, há poucos relatos investigando o potencial de ligação das substâncias naturais às importantes enzimas presentes em parasitos.

4.2 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA ACOPLADA A DETECTOR DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CLUE-EM)

As técnicas cromatográficas de análise constituem técnicas de separação físico-química de substâncias presentes em matrizes complexas, como fluidos biológicos e produtos naturais. Sua introdução no meio científico deu-se em 1906 pelo botânico russo Mikhail Semyonovich Tswett, o qual empregou uma coluna de vidro preenchida com carbonato de cálcio e usou éter de petróleo para separar clorofilas e xantofilas de plantas. Desde então a cromatografia tem sido largamente empregada em todo o mundo (GANZERA, STURM, 2018; LANÇAS, 2009; LÓPEZ-RUIZ, ROMERO-GONZÁLEZ, FRENICH, 2019).

Dentre as técnicas cromatográficas, a cromatografia líquida de alta eficiência teve avanço considerável ao longo dos últimos anos. Nesta técnica o solvente, também chamado de fase móvel ou eluente, é bombeado em direção à coluna, onde está a fase estacionária sólida. Juntamente com o eluente, é introduzida a amostra, que tem suas substâncias separadas e direcionadas a um detector, o qual gera um sinal em função do tempo, denominado cromatograma (LANÇAS, 2009). Tais avanços são decorrentes da capacidade da CLAE em utilizar pequenas colunas com recheios especialmente preparados para eluição com fases móveis a altas pressões.

Além disso, destaque especial deve ser dado para as rápidas análises qualitativas e quantitativas, com elevada resolução, eficiência e sensibilidade (PORTO, 2014).

O avanço mais recente nas separações cromatográficas foi a CLUE. Esta técnica permite o uso de fases estacionárias com partículas menores que 2 μm , gera pressões mais elevadas (que podem ser superiores aos 14000 psi) e menor consumo de solventes, aumentando assim a resolução e diminuindo o tempo das análises (MALDANER; JARDIM, 2012; PORTO, 2014; TOFOLLI et al., 2019). Aliado a estes métodos de separação surgem as técnicas hifenadas, nas quais há um acoplamento entre um sistema de separação cromatográfico a um detector espectroscópico ou espectrométrico, visando a obtenção de informações estruturais das substâncias analisadas (CROTTI et al., 2006).

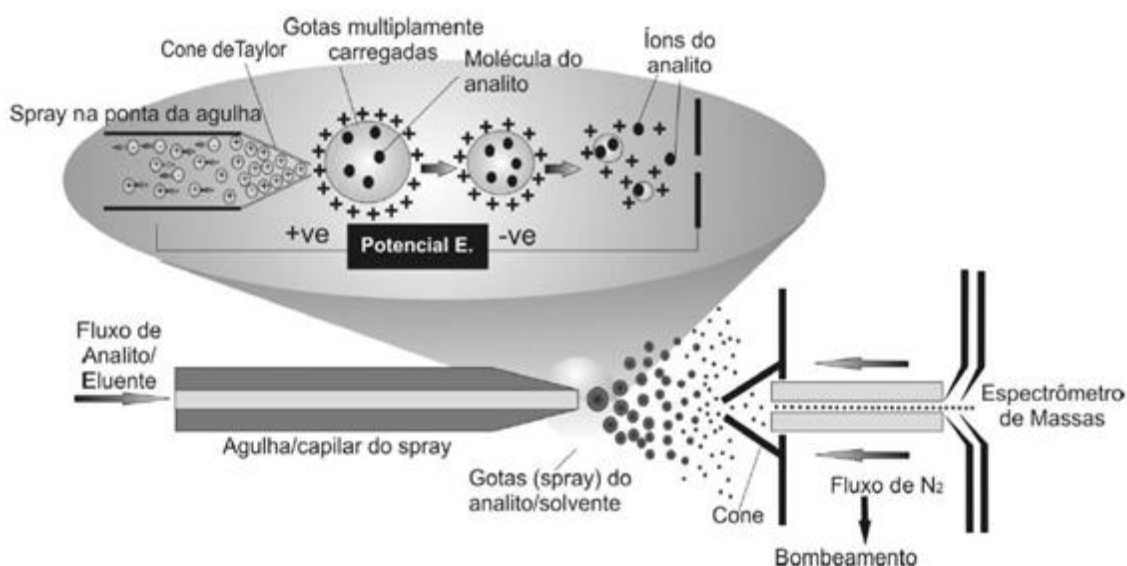
Dentre as técnicas hifenadas, o acoplamento de detectores de espectrometria de massas à cromatografia líquida certamente foi um grande avanço em relação à identificação e, principalmente, confirmação da identidade de substâncias em uma amostra analisada por cromatografia. Atualmente, o seu uso em análises quali e quantitativas ganha a cada dia mais espaço (LÓPEZ-RUIZ, ROMERO-GONZÁLEZ, FRENICH, 2019; RODRIGUEZ-ALLER et al., 2012; VU et al., 2014; XIE et al., 2012).

A espectrometria de massas consiste na capacidade de converter moléculas neutras em íons na forma gasosa e separá-los de acordo com a sua razão massa/carga (m/z), utilizando para isso campos eletromagnéticos. Essencialmente, o equipamento é composto por uma fonte de ionização, um analisador de massas e um detector. As fontes de ionização do tipo impacto eletrônico (EI) e ionização química (CI) são tipos de fontes que operam a pressões muito baixas (vácuo), sendo principalmente utilizadas quando o detector é acoplado a cromatografia em fase gasosa (CG). Já em cromatografia líquida, devido à diferença no estado físico da fase móvel utilizada, as fontes de ionização empregadas atuam à pressão atmosférica e não só realizam a ionização da amostra, como também facilitam o processo de transferência da amostra que sai da coluna para a fase gasosa, no espectrômetro de massas. As fontes de ionização mais utilizadas nesse caso são electrospray (ESI), ionização química a pressão atmosférica (APCI) e ionização por fótons a pressão atmosférica (APPI). Como resultado, é obtido um gráfico, denominado espectro de massas, em que o eixo y representa a intensidade do sinal dos íons e no eixo x é representada a razão m/z (ASZYK et al., 2018; LANÇAS, 2009; RODRIGUEZ-ALLER et al., 2012).

Ao acoplar um equipamento de cromatografia líquida a um detector de EM, com fonte de ionização do tipo ESI, uma substância que foi separada das demais substâncias da amostra na cromatografia está solubilizada na fase móvel e passa através de um capilar, à pressão atmosférica, mantido a alta voltagem. Na saída deste capilar são formadas gotículas (spray) carregadas, que sofrem dessolvatação ao se deslocarem em sentido contrário ao posicionamento de eletrodos carregados. Essa dessolvatação é acompanhada por um fluxo contínuo de gás (em geral N_2) e o tamanho das gotículas vai reduzindo até que ocorra uma força de repulsão muito grande capaz de gerar a chamada “explosão coulômbica”, que produz a ionização. Os íons então fluem para o espectrômetro de massas, atraídos por força eletrostática e pelo vácuo, que está presente, neste caso, após a ionização (ASZYK et al., 2018; DIAS, 2018; DINIZ, 2011). Esse tipo de ionização está ilustrado na Figura 21.

De maneira geral, a ionização propriamente dita ocorre em solução, no interior do capilar, por meio de reações ácido-base, nas quais os íons gerados individualmente são moléculas protonadas ($[M+H]^+$) ou desprotonadas ($[M-H]^-$) (DIAS, 2018).

Figura 21 - Esquema geral de uma fonte de ionização por eletrospray.



Fonte: Adaptado de DIAS (2018).

Após a fonte de ionização, os espectrômetros de massas possuem os chamados analisadores de massas, cuja função é separar, ou resolver os íons

formados na fonte de ionização de acordo com razão m/z . Existem vários tipos de analisadores, que vão se diferenciar em função de suas características de construção, operação, benefícios e limitações. O analisador de massas do tipo quadrupolo (Q) é um dos mais utilizados e é composto por 4 hastes metálicas, onde os pares opostos são conectados por campo elétrico, sendo também aplicada uma combinação de corrente contínua e radiofrequência. Os íons passam pelo quadrupolo a velocidade constante e somente os íons que apresentarem determinada m/z que esteja em ressonância com o campo aplicado irão atravessar o quadrupolo e serão detectados (LANÇAS et al., 2009; RODRIGUEZ-ALLER et al., 2012).

Outro tipo de analisador de massas existente é o “*time of flight*”, ou tempo de voo (TOF). A separação das massas em um TOF se baseia nas diferentes velocidades obtidas pelos íons com diferentes valores de m/z após terem sido acelerados por um mesmo impulso. Ou seja, neste analisador, os íons são acelerados a altas velocidades em um longo tubo por um campo elétrico, assumindo diferenças velocidades decorrentes das diferenças de suas m/z e, dessa forma, é medido o “tempo de voo” de cada um dentro do espectrômetro de massas (ASZYK et al., 2018; LANÇAS et al., 2009; RODRIGUEZ-ALLER et al., 2012).

Após a passagem pelo analisador de massas, os íons chegam finalmente ao detector, onde é registrada a carga induzida ou a corrente produzida quando um íon atravessa uma superfície, gerando um espectro de massas (LANÇAS, 2009).

Com o maior uso da técnica de espectrometria de massas, foram criados diversos bancos de dados em todo o mundo com dados relativos ao *fingerpint* de fragmentação de cada composto. Isso é possível, pois cada composto possui sua própria característica de fragmentação, baseado em sua estrutura (DIAS, 2018; NICULAU et al., 2016; RODRIGUEZ-ALLER et al., 2012).

Como descrito anteriormente, o ESI é considerado um método de ionização brando, ou seja, produz íons com baixo conteúdo de energia interna, sendo adequada para a determinação da massa molecular e fórmula molecular. Portanto, a obtenção de informações estruturais é dificultada pela pouca ou nenhuma fragmentação observada nos espectros de massas obtidos por ESI. Como resolução dessa limitação, surgem os detectores de massas acoplados entre si. Essa junção de dois ou mais analisadores é conhecida como espectrometria de massas do tipo tandem ou EM-EM (DIAS, 2018).

Esta técnica consiste na seleção, em um primeiro estágio de EM, de um íon de razão m/z específica (chamado de “íon precursor”) gerado na fonte de ESI. Este íon é então ativado para fragmentação e os íons fragmentos formados são analisados em um segundo estágio de EM (LANÇAS, 2009, NICULAU et al., 2016). Exemplos de analisadores de massas utilizados na espectrometria de massas do tipo tandem são o triplo quadrupolo (QqQ) e o quadrupolo-tempo de voo (Q-TOF), ambos utilizados no presente trabalho.

O analisador de massas QqQ é um espectrômetro constituído por três quadrupolos em série, sendo que o segundo quadrupolo, ao invés de separar m/z (como o primeiro e o terceiro), funciona como uma câmara de colisão, na qual ocorre a fragmentação dos íons selecionados no primeiro quadrupolo. Esta fragmentação geralmente é conduzida por dissociação induzida por colisão (DIC) com um gás inerte de elevada energia (geralmente Ar, He ou N₂) (LANÇAS, 2009). Já no Q-TOF, o último quadrupolo do triplo quadrupolo é substituído por um analisador do tipo TOF, ortogonalmente ao segundo quadrupolo. Este tipo de detector detecta todos os íons que entram no tubo em um determinado tempo específico, ao invés de fazer uma varredura sequencial de m/z , como aconteceria no triplo quadrupolo (LANÇAS, 2009; XIE et al., 2012).

Atualmente, a CLUE-EM tem sido extensamente empregada em vários campos, especialmente na área da fitoquímica, na qual tem como principal vantagem poupar tempo na análise dos constituintes de extratos vegetais, uma vez que permite a identificação de inúmeros compostos em uma única análise (CROTTI, 2006; GANZERA, STURM, 2018; NICULAU et al., 2016; RODRIGUEZ-ALLER et al., 2012).

Dessa forma, considerando a aplicabilidade da técnica de UF acoplada à LC-EM na seleção de novas substâncias em ensaios de interações entre proteínas e ligantes, no presente trabalho identificou-se ligantes naturais da enzima apirase, os quais podem ser potenciais substâncias esquistossomicidas. Cabe ainda destacar o carácter inédito da utilização da ultrafiltração acoplada à CLUE-ESI-QTOF-EM na seleção de ligantes enzimáticos de apirase, a partir de extratos vegetais.

4.3 OBJETIVOS

Considerando o potencial esquistossomicida de inibidores de ATPDases, o objetivo geral do trabalho apresentado neste capítulo foi a identificação de ligantes enzimáticos de apirase de batata, por meio da ultrafiltração acoplada à CLUE-ESI-QTOF-EM, a partir de extratos vegetais.

Para esses propósitos, os objetivos específicos foram:

- Selecionar as condições de incubação para a técnica de ultrafiltração, incluindo concentração de apirase de batata e tempo de incubação, utilizando a cardamonina como ligante conhecido da apirase e das ATP difosfohidrolases;
- Preparar diferentes extratos brutos a partir de espécies vegetais selecionadas;
- Realizar os experimentos de seleção de extratos e de substâncias ligantes à apirase de batata utilizando ultrafiltração acoplada à CLUE-EM;
- Obter e analisar os perfis cromatográficos em CLUE-EM dos extratos produzidos e de seus ultrafiltrados.

4.4 MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos deste capítulo foram realizados nos laboratórios: NIPPAN da Universidade Federal de Juiz de Fora, CentralBio da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora, Laboratório de Farmacologia Clínica e Experimental (LaFaCE) da Universidade Federal de Juiz de Fora e Laboratório de Nanotecnologia – Unidade EMBRAPA Gado de Leite.

Para execução dos métodos foram utilizados os seguintes equipamentos:

NIPPAN

- Balança analítica: marca Marte, modelo BL320H;
- Balança analítica: marca Marte, modelo AY220;

CentralBio

- Ultrassom: marca Sanders Medical, modelo Soniclean 2;
- Microcentrífuga: marca Kasvi;
- Bomba a vácuo: marca Gast, modelo DOA-P704-AA;
- Cromatógrafo de fase líquida de alta eficiência (HPLC Waters) composto por duas bombas (modelo 1525), injetor automático (modelo 2707) e detector de arranjo de diodos PDA (modelo 2998).
- Cromatógrafo de fase líquida de ultra eficiência de bomba quaternária com injetor automático: marca Waters, modelo Acquity CLUE H-Class; Detector de espectrometria de massas com analisador de massas do tipo quadrupolo acoplado a “*time of flight*” marca Waters, modelo Xevo G2-S.

LaFaCE

- Cromatógrafo de fase líquida de alta eficiência (HPLC Waters) composto por duas bombas (modelo 1525), injetor automático (modelo 2707) e detector de ultravioleta/visível (UV/Vis) 2489 duplo canal (Waters).

Laboratório de Nanotecnologia – EMBRAPA.

- Cromatógrafo de fase líquida de ultra eficiência de bomba quaternária com injetor automático: marca Waters, modelo Acquity UPLC; Detector de espectrometria de massas com analisador de massas do tipo triplo quadrupolo marca Waters, modelo Xevo TQS.

Para CLAE foram utilizadas as seguintes colunas: coluna analítica de fase reversa (Sun Fire™ C₁₈; 4,6 x 250 mm; 5 µm), na presença de pré-coluna (Sun

FireTM C₁₈; 4,6 x 20 mm; 5 µm), e coluna analítica de fase reversa (Phenomenex C₁₈; 4,6 x 150 mm; 5 µm). A aquisição de dados e controle foi feita pelo *software* Empower 3 Waters Corporation.

Para CLUE foram utilizadas as seguintes colunas: coluna analítica de fase reversa (Acquity BEH C₁₈; 2,1 x 100 mm; 1,7 µm), na presença de pré-coluna (Acquity BEH C₁₈; 2,1 x 5 mm; 1,7 µm). A aquisição de dados e controle foi feita pelo *software* MassLynx.

4.4.1 Ultrafiltração acoplada às técnicas espectroscópicas

Com o intuito de utilizar a técnica de ultrafiltração acoplada a CLUE-ESI-QTOF-EM para selecionar potenciais extratos vegetais que possuem ligantes da apirase de batata e possivelmente das enzimas ATP difosfohidrolases de *S. mansoni*, a cardamonina (um inibidor conhecido dessas enzimas), foi utilizada para avaliar e determinar as condições ideais de incubação desse experimento, com base em metodologias descritas para a ultrafiltração acoplada a CLUE-EM (LI et al., 2019; LIU et al., 2017; YANG et al., 2012).

Para isso, incubou-se a apirase de batata e a cardamonina em diferentes condições de incubação.

4.4.1.1 Desenvolvimento e realização da ultrafiltração para avaliação das condições de incubação com a apirase de batata

Inicialmente avaliou-se a influência da concentração da enzima apirase de batata na porcentagem de ligação da cardamonina. Para isso, a cardamonina, na concentração de 400 µM, foi incubada com três concentrações diferentes de apirase (6, 18 e 24 µg/mL) por 120 min em um volume final de 400 µL. As análises foram realizadas em duplicatas para cada concentração.

Em seguida, avaliou-se a influência do tempo de incubação entre a cardamonina e a apirase de batata no grau de ligação. Assim, para determinar o tempo apropriado de incubação, a amostra, na concentração de 400 µM, foi incubada nos tempos de 40, 80 e 120 min com 24 µg/mL de apirase em um volume final de 400 µL. As análises foram realizadas em duplicatas para cada tempo de incubação.

Em todos os experimentos de avaliação da concentração da enzima e de tempo de incubação, a cardamonina foi incubada sem enzima para determinação da ligação não específica. Na Figura 22 estão representadas as etapas do processo de incubação e ultrafiltração. Inicialmente a cardamonina foi incubada com e sem enzima. Após essa etapa de incubação, cada amostra foi filtrada em filtro de membrana de ultrafiltração com cut-off de 10 kDa, através da centrifugação (10.000 rpm) por 20 minutos à 4 °C, com o intuito de que o complexo proteína-ligante (apirase + metabólito) ficasse retido, enquanto as substâncias não ligadas à enzima fossem descartadas no ultrafiltrado. O ultraconcentrado retido na membrana (formado pelo complexo apirase + metabólito) foi lavado por três vezes com 400 µL de tampão fosfato e centrifugado (10.000 rpm) por 20 minutos à 4°C. Em seguida, adicionou-se 800 µL de metanol grau CLAE para que as substâncias ligadas à proteína (apirase) fossem dissociadas do complexo ligante-proteína. Essa mistura permaneceu em contato por 20 minutos. Logo após, o ultraconcentrado contendo metanol, foi centrifugado (10.000 rpm) por 20 minutos à 4 °C. Os ultrafiltrados obtidos de cada amostra, contendo metanol e os metabólitos ligantes, foram analisados por CLAE-DAD com o objetivo de determinar o grau de ligação da cardamonina nestas condições avaliadas. A porcentagem de ligação da cardamonina com a enzima foi calculada pela equação (YANG et al., 2012):

$$\% \text{ de ligação} = \frac{Aa - Ab}{Aa} \times 100$$

Onde *Aa* e *Ab* são as áreas dos picos da cardamonina interagindo com a enzima e sem a enzima, respectivamente, nos cromatogramas de CLAE.

As análises em CLAE foram realizadas na CentralBio sob a colaboração da Técnica Carolina Miranda Gasparetto; e no Laboratório de Farmacologia Clínica e Experimental, sob a colaboração e responsabilidade do Prof. Dr. Jorge Willian Nascimento e a aluna de doutorado Aline Corrêa Ribeiro.

Os ultrafiltrados obtidos foram inicialmente secos através de banho-maria a 40°C ± 5°C e gás nitrogênio, por aproximadamente 2 horas. Em seguida, o soluto foi ressuspenso em 300 µL de metanol grau HPLC, centrifugado em microcentrífuga por 5 minutos a 10.000 rpm e o sobrenadante filtrado em unidade filtrante de poro 0,45 µm. O volume de injeção foi 30 µL de cada amostra.

Em um primeiro momento as análises em CLAE foram realizadas na CentralBio, utilizando uma coluna de fase reversa Sun Fire™ C₁₈ (4,6 mm x 250 mm, 5µm), fluxo de 1mL/min, e a temperatura da coluna foi mantida a 40°C. A partir da varredura (190 – 400 nm) foi selecionado o comprimento de onda de 345 nm para leitura, sendo que o gradiente de eluição consistiu de fase binária composta de água (acidificada com 1% de ácido acético glacial) e metanol, de acordo com a tabela 9:

Tabela 9 - Gradiente de eluição em CLAE

Tempo (min)	Fluxo (mL/min)	%H₂O	%MeOH
Inicial	1.00	60.0	40.0
40.00	1.00	0.0	100
45.00	1.00	0.0	100
46.00	1.00	60.0	40.0
60.00	1.00	60.0	40.0

Fonte: Elaborado pela própria autora.

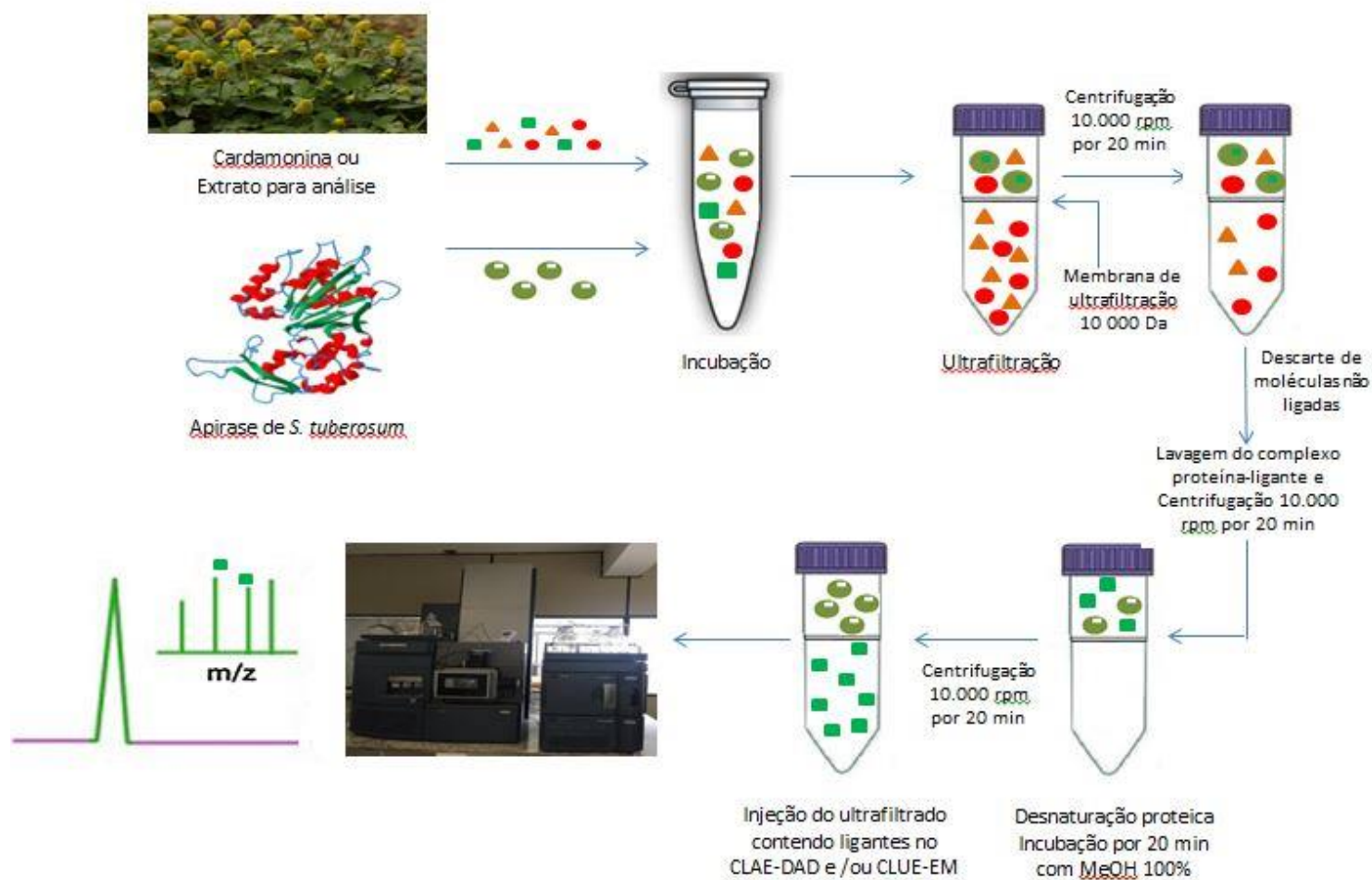
Devido a não disponibilidade do para uso do equipamento acima, algumas análises foram realizadas no Laboratório de Farmacologia Clínica e Experimental, utilizando uma coluna de fase reversa Phenomenex C₁₈ (4,6 mm x 250 mm, 5µm), fluxo de 1mL/min, e a temperatura da coluna foi mantida a 40°C. O comprimento de onda de 345 nm foi selecionado para leitura e o gradiente de eluição consistiu de fase binária composta de água (acidificada com 1% de ácido acético glacial) e metanol como mostra a Tabela 10:

Tabela 10 - Gradiente de eluição em CLAE

Tempo (min)	Fluxo (mL/min)	%H₂O	%MeOH
Inicial	1.00	50.0	50.0
5.00	1.00	0.0	100.0
20.00	1.00	0.0	100.0
30.00	1.00	0.0	100.0
36.00	1.00	50.0	50.0

Fonte: Elaborado pela própria autora.

Figura 22 - Representação do ensaio de ligação entre cardamonina ou extratos vegetais e apirase através da ultrafiltração.



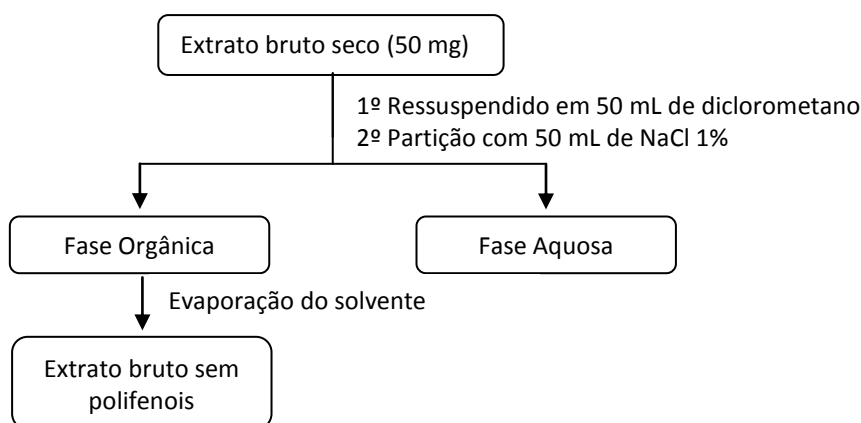
Fonte: Elaborado pela própria autora.

4.4.1.2 Screening para seleção de potenciais ligantes em extratos vegetais por meio da ultrafiltração acoplada a CLUE-EM

O *screening* das amostras foi realizado através da técnica de ultrafiltração acoplada a CLUE-EM, com base nos métodos previamente descritos (LI et al., 2019; LIU et al., 2017; YANG et al., 2012) e nos resultados obtidos neste trabalho através da avaliação das condições de incubação entre apirase e cardamonina.

Inicialmente, diferentes espécies vegetais (Tabela 11) foram selecionadas levando em consideração seu potencial antiparasitário e perfil de metabólitos produzidos (COCK, SELESHO, VUUREN, 2019; MWANGI et al., 2010; SPELMAN ET AL., 2011). Essas plantas foram coletadas no horto da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF, no período de abril a julho de 2016. Após a coleta e separação dos órgãos vegetais, estes foram secos e estabilizados em estufa de ar quente e circulante a 40°C. Em seguida, os materiais obtidos foram triturados com auxílio de moinho de facas para obtenção dos pós. Os pós obtidos foram submetidos à maceração, em temperatura ambiente, utilizando-se mistura de etanol: água 9:1 (v/v) como líquido extrator. As soluções hidroalcoólicas obtidas de cada material vegetal foram filtradas e evaporadas em rotaevaporador, obtendo-se os extratos hidroalcoólicos brutos destes materiais. Com o intuito de retirar substâncias polifenólicas, como os taninos, os quais podem ser ligantes enzimáticos inespecíficos, os extratos hidroalcoólicos brutos passaram por processo de partição com solução de NaCl 1% (MELO, SANTOS, 2001), conforme Figura 23.

Figura 23- Diagrama geral do procedimento de retirada de polifenóis.



Fonte: Elaborado pela própria autora.

Tabela 11 - Dados de coleta das espécies vegetais.

Nome Científico	Nome Popular	Partes	Nº exsicata
<i>Achyrocline satureioides</i>	Macela do campo	Folhas	a
		Flores	
<i>Acmella oleracea</i>	Jambú	Folhas	CESJ 47480
		Flores	
<i>Brugmansia suaveolens</i>	Trombeteira	Folhas	a
		Flores	
<i>Centella erecta</i>	Centela	Folhas	CESJ 65907
<i>Cordia verbenacea</i>	Erva baleeira	Folhas	CESJ 47480
		Raízes	
<i>Curcuma longa</i>	Açafrão	Folhas	a
		Raízes	
<i>Justicia pectoralis</i>	Chambá	Folhas	a
		Raízes	
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Alecrim da horta	Folhas	CESJ 48253
		Ramos	
<i>Ruta graveolens</i>	Arruda	Folhas	CESJ 70472
		Caule	

^a Aguardando confirmação da identificação

Fonte: Elaborado pela própria autora.

Em seguida, 40 µL de cada extrato vegetal (40 mg/mL) foi incubado com 15 µL de apirase (24 µg/mL) por 120 min à temperatura ambiente em um volume final de 400 µL. Depois da incubação, cada mistura (extrato + apirase) foi submetida a ultrafiltração conforme descrito no item 4.4.1.1 deste capítulo. Os extratos também foram submetidos a esse mesmo processo, porém sem a presença da enzima. Por fim, obtiveram-se os perfis cromatográficos por CLUE-ESI-QTOF-EM dos extratos brutos vegetais produzidos e seus respectivos ultrafiltrados.

Inicialmente a aquisição dessas análises foram realizadas na CentralBio, através de um CLUE acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução com fonte ESI e analisador tipo Q-TOF (XEVO G2- S QTOF). As condições cromatográficas e de ESI-EM estão descritas no item 3.6.2 deste trabalho.

Em decorrência da não disponibilidade para uso deste equipamento, análises complementares foram realizadas no Laboratório de Nanotecnologia – EMBRAPA, sob a colaboração e responsabilidade do Prof. Dr. Humberto de Mello Brandão e a técnica Michelle Daiane de Almeida Loures.

Essas análises foram realizadas somente para amostras correspondentes à incubação do extrato sem enzima. Para separação dos componentes da amostra, foi

usado o sistema CLUE nas mesmas condições anteriores. Foi usado o espectrômetro de massas do modelo XEVO TQS micro, contendo analisador de massas do tipo triplo quadrupolo. As condições de ESI-EM foram realizadas em modo negativo e positivo com as seguintes especificações: voltagem no cone de 40V, capilar de 3 kV, a temperatura de dessolvatação foi de 500 °C, fluxo do gás nitrogênio de 50 L/hr, energia inicial de colisão foi de 3V para geração do íon precursor. Para as análises EM/EM, foi selecionado a m/z do composto de interesse, nestes casos a energia de colisão foi de 20eV.

4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.5.1 Desenvolvimento e realização da ultrafiltração para avaliação das condições de incubação com a enzima apirase de batata

Os procedimentos convencionais para a descoberta de novos compostos de origem vegetal com atividades biológicas ou atividade inibitória de determinada enzima incluem fracionamento bioguiado, isolamento, purificação e identificação estrutural. Esses procedimentos consomem muito tempo além de intensivo trabalho. Diante desse cenário, novos e rápidos métodos para *screening* de compostos bioativos de misturas complexas, como extratos vegetais, tem se tornado necessário (WEI et al., 2016).

A UF acoplada com técnicas de separação e/ou identificação, como CLAE-DAD e CLUE-EM tem sido descrita como uma poderosa ferramenta para selecionar potenciais ligantes enzimáticos. Várias pesquisas têm relatado a descoberta de potenciais compostos ativos através da utilização desta técnica (CHOI et al., 2011; LIU et al., 2017; SONG et al., 2014; WU et al., 2016; YANG et al., 2012; YANG et al., 2018).

O *screening* de amostras para seleção de potenciais ligantes e inibidores de determinada enzima, utilizando a técnica de ultrafiltração, se baseia em três etapas: incubação, ultrafiltração e caracterização.

No presente trabalho, inicialmente determinou-se as condições ideais de incubação entre a cardamonina e enzima de modo que a técnica de ultrafiltração possa ser utilizada para detectar possíveis ligantes das enzimas ATP difosfohidrolases em amostras complexas.

O processo de incubação permite que a amostra entre em contato com a enzima e, portanto, alguns parâmetros devem ser avaliados para otimizar esse processo. Dessa forma, o estudo das condições de incubação entre a cardamonina e a apirase de batata, utilizando a técnica de ultrafiltração, foi realizado com base nos métodos previamente descritos (LIU et al., 2017; YANG et al., 2012), com algumas modificações.

De maneira semelhante, Yang e colaboradores (2012) determinaram a concentração da enzima e o tempo de incubação necessários para utilizar a técnica de UF-EM, a fim de encontrar inibidores da enzima tirosinase a partir de extrato de

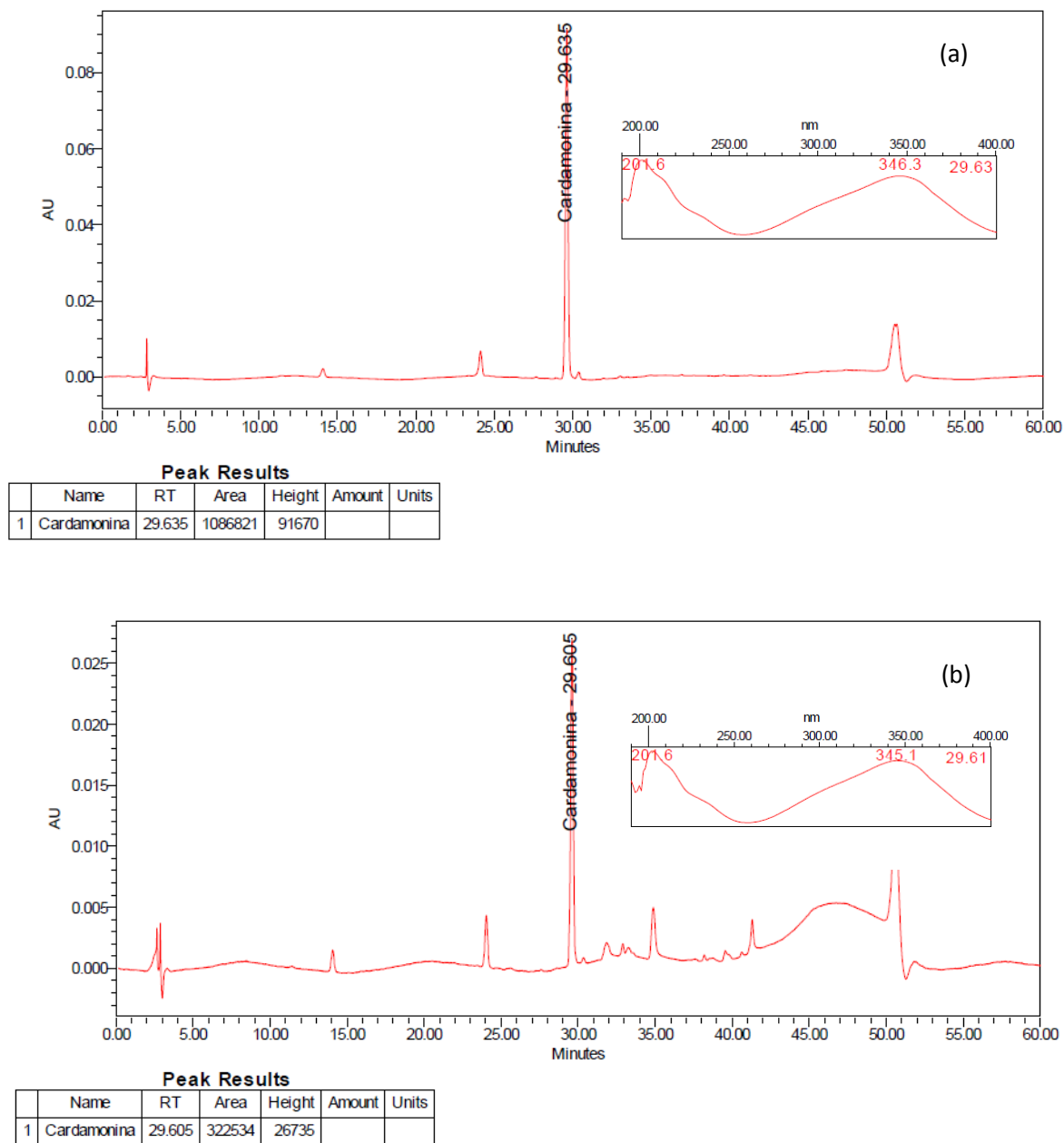
M. alba. Neste trabalho, incubou-se 5 mg/mL de extrato com 53nM de enzima por 30 minutos (YANG et al., 2012). Já no trabalho de LI et al., 2019 as condições de incubação foram determinadas utilizando um inibidor conhecido da enzima (LI et al., 2019).

Inicialmente, investigou-se a influência da concentração da enzima apirase na porcentagem de ligação da cardamonina. Para isso, a cardamonina (400 μ M), foi incubada com a apirase de batata nas concentrações de 6, 18 e 24 μ g/mL. Como controle negativo, a cardamonina (400 μ M) foi incubada sem a presença de enzima com o intuito de descontar uma possível ligação da amostra no aparato. Após a ultrafiltração, os ultrafiltrados foram analisados por CLAE-DAD e as respectivas áreas dos picos foram utilizadas para calcular a porcentagem de ligação. Na Figura 24 estão representados os cromatogramas obtidos da ultrafiltração entre cardamonina e apirase de batata (24 μ g/mL) (Fig. 24a) e cardamonina incubada sem enzima (Fig. 24b).

Como pode-se observar na Figura 25, o aumento da concentração da enzima influencia no aumento da porcentagem de ligação da cardamonina, de modo que as porcentagens de ligação da cardamonina-enzima foram bem menores ao incubar a amostra com 6 μ g/mL e 18 μ g/mL de apirase, aproximadamente 2% e 15%, respectivamente. Enquanto que na incubação de cardamonina com 24 μ g/mL de enzima, a porcentagem de ligação chega a 79%. Uma possibilidade desse aumento de ligação poderia ser que, em alta concentração de enzima, quase todo o ligante adicionado está ligado aos locais de ligação da enzima.

Estudos anteriores relatam que, por exemplo, em amostras complexas, a quantidade insuficiente de enzimas durante a incubação pode resultar em baixas porcentagens de ligação ou até mesmo reduzir o número de compostos ligantes devido à competição entre os ligantes (JOHNSON, NIKOLIC, VAN BREEMEN, 2002). Portanto, o excesso de enzima se torna necessário para garantir a detecção de todos os potenciais ligantes (YANG et al., 2012).

Figura 24 - Cromatograma do ultrafiltrado resultante da incubação da cardamonina com (a) e sem enzima (b).

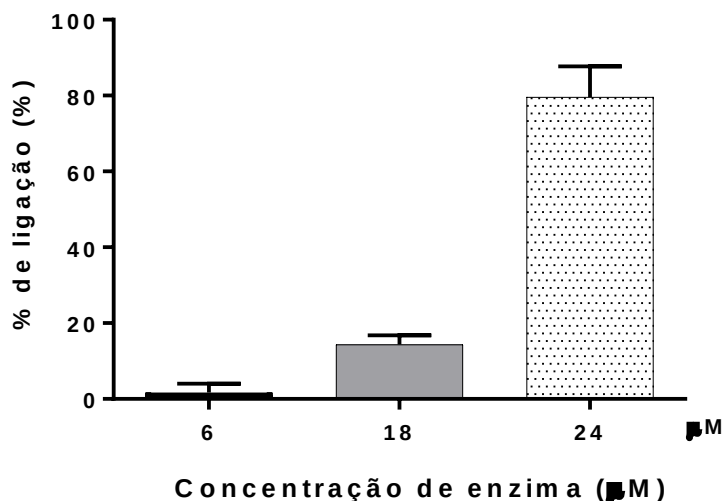


(a) Ultrafiltrado obtido da incubação da cardamonina com apirase de batata (24 μ M).

(b) Ultrafiltrado obtido da incubação da cardamonina sem enzima.

Fonte: Elaborado pela própria autora.

Figura 25 - Percentual de ligação da cardamonina-enzima em diferentes concentrações de apirase.



Fonte: Elaborado pela própria autora.

Além da verificação da influência da concentração da enzima, o tempo de incubação da amostra-enzima também foi avaliado.

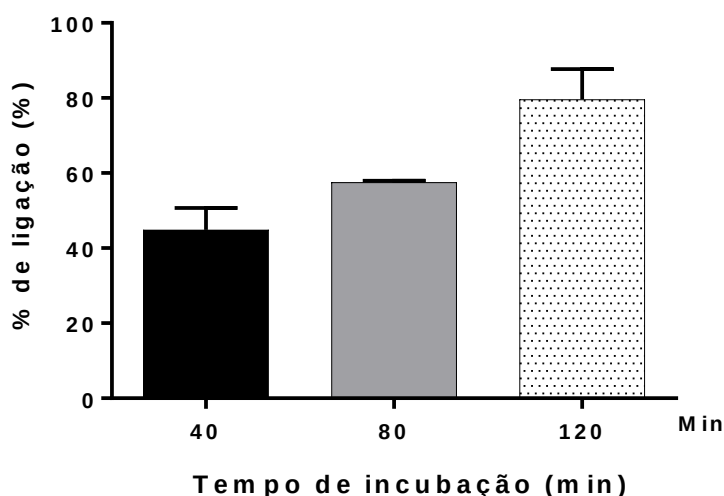
Determinada a concentração ideal de enzima, a cardamonina foi incubada com 24 μg/mL de apirase nos tempos de 40, 80 e 120 min. De maneira semelhante ao experimento anterior, também utilizou-se um controle negativo, no qual a cardamonina foi incubada sem a presença de apirase de batata com o intuito de descontar uma possível ligação da amostra no aparato. Após a ultrafiltração, os ultrafiltrados foram analisados por CLAE-DAD e as respectivas áreas dos picos foram utilizadas para calcular a porcentagem de ligação.

Neste experimento observa-se que a porcentagem de ligação do ligante aumenta de maneira tempo-dependente (Figura 26). Ao incubar a cardamonina com a apirase de batata por 40 minutos a porcentagem de ligação é de aproximadamente 44%. O aumento desse tempo de incubação para 80 minutos observa-se também um aumento na porcentagem de ligação para aproximadamente 57%. E por fim, um tempo de incubação de 120 minutos acarreta em uma porcentagem de ligação de 79%.

Estudos anteriores demonstram a importância do tempo de incubação na detecção de possíveis ligantes (LIU et al., 2017; YANG et al., 2012). De maneira semelhante à concentração da enzima, tempos de incubação relativamente rápidos pode não determinar a presença de ligantes na amostra. Tempo de incubação

prolongados também são necessários de forma que todos os possíveis ligantes possam encontrar a enzima e se ligarem. Portanto, é necessário um período suficiente de incubação de forma que os ligantes possam alcançar a enzima e tenham um período suficiente de tempo para alcançar o equilíbrio ligante-enzima (YANG et al., 2012).

Figura 26 - Percentual de ligação da cardamonina-enzima em diferentes tempos de incubação.



Fonte: Elaborado pela própria autora.

Com base nestes resultados apresentados, foi possível determinar a concentração de apirase de batata e o tempo de incubação entre as amostras e a enzima, para que se possa utilizar a técnica de ultrafiltração acoplada a CLUE-EM na determinação de possíveis ligantes da enzima apirase de batata a partir de amostras complexas.

Além disso, evidenciamos que a cardamonina é capaz de se ligar (ensaio de ultrafiltração de cardamonina com apirase) e inibir (ensaio de inibição enzimática) a apirase de batata, portanto propomos a utilização dessa enzima nos subsequentes ensaios de ultrafiltração com o objetivo de selecionar extratos vegetais que apresentem ligantes da apirase de batata, os quais, possivelmente, serão também ligantes e inibidores das ATP difosfohidrolases de *S. mansoni*.

4.5.2 Screening de seleção de potenciais ligantes da apirase presentes em extratos vegetais através da ultrafiltração acoplada a CLUE-EM

Com o intuito de investigar a presença de ligantes da enzima apirase de batata em extratos vegetais, 9 espécies de plantas foram selecionadas com base na disponibilidade das mesmas no horto da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF e levando em consideração seu potencial antiparasitário e perfil de metabólitos produzidos.

A partir dessas espécies vegetais, produziram-se 17 tipos diferentes de extratos brutos vegetais (descrito no item 4.4.1.2), os quais foram submetidos à incubação com a apirase de batata e subsequente processo de ultrafiltração acoplada à CLUE-EM. A concentração de apirase de batata e o tempo de incubação das amostras com a enzima foram determinados através dos experimentos realizados com cardamonina e apirase de batata descritos no item 4.5.1. Detalhes do processo de ultrafiltração também estão descritos no item 4.4.1.2.

A técnica de UF combinada com cromatografia líquida e espectrometria de massas é uma ferramenta poderosa para descobrir compostos biologicamente ativos em misturas complexas, como os extratos vegetais (LIU et al., 2017). Vários estudos têm relatado a descoberta de potenciais inibidores enzimáticos através da UF (LIU et al., 2012; LIU et al., 2017; MULABAGAL, CALDERON, 2010; YANG et al., 2012). Alguns exemplos incluem a triagem de ligantes potenciais para neuramidase, tirosinase e glutathione redutase (LIU et al., 2012; MULABAGAL, CALDERON, 2010; YANG et al., 2012). Até o momento, não há relatos da utilização dessa técnica para a seleção de ligantes das enzimas apirase e ATP difosfohidrolases de *S. mansoni*.

Dentre as amostras avaliadas através da ultrafiltração acoplada a CLUE-EM selecionou-se 3 extratos brutos de três espécies vegetais distintas, as quais apresentaram ligantes da apirase de batata. São elas *Acmella oleracea* L., *Ruta graveolens* L. e *Centela erecta* L.f.

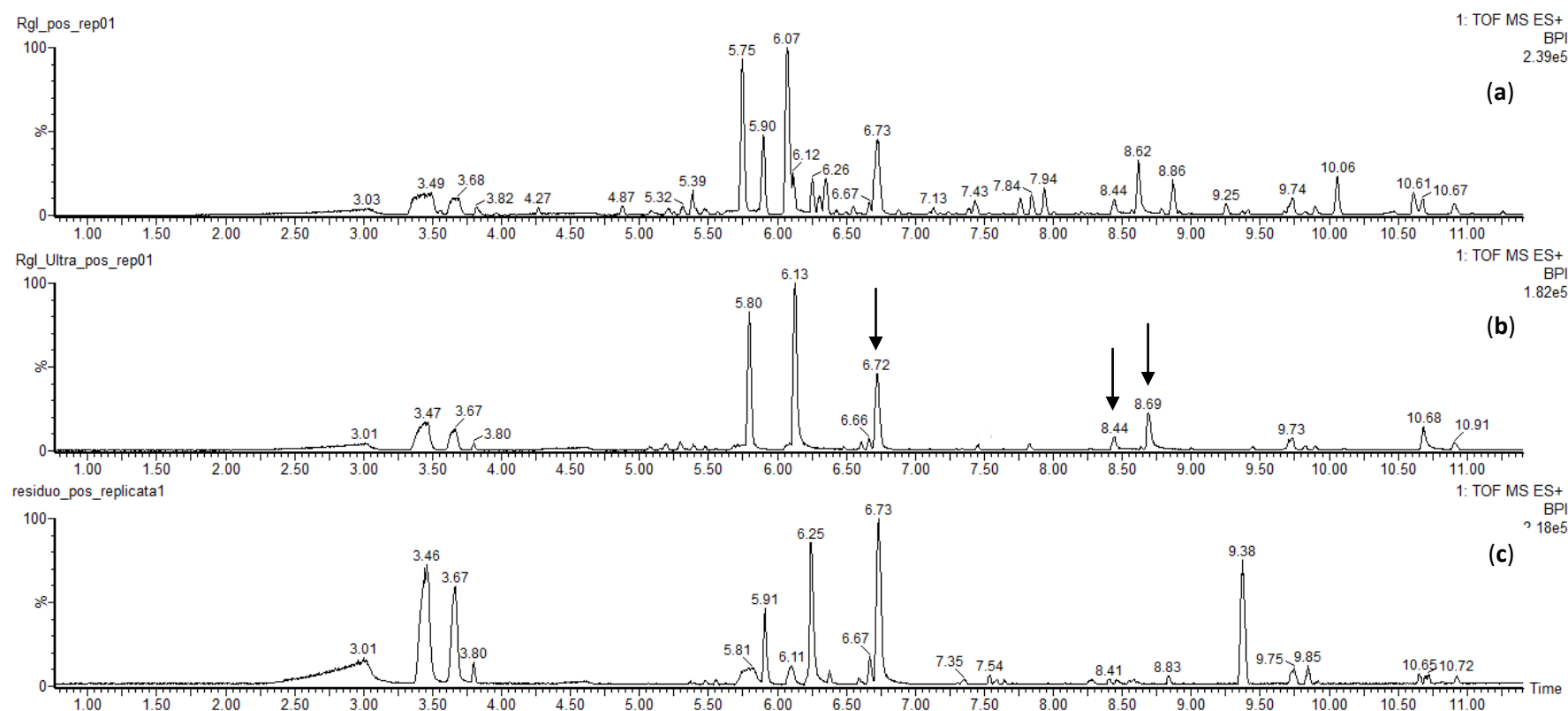
4.5.2.1 Ensaio de ultrafiltração e identificação de ligantes presentes em *Ruta graveolens*

Em relação ao ensaio de UF, o extrato bruto de *R. graveolens*, após avaliado no ensaio de UF, também apresentou ligantes da enzima apirase de batata, como mostrado no cromatograma do ultrafiltrado realizado em CLUE-EM (Figura 27). Cabe destaque a presença do ligante no tempo de retenção de 6,72 minutos.

Além disso, a nova UF realizada incubando o extrato bruto de *R. graveolens* sem a presença da enzima permitiu verificar a baixa concentração do principal ligante ($T_r = 5,94$) neste ultrafiltrado (Figura 28), cerca de 1000 vezes menor em comparação ao extrato bruto. Dessa forma, também é possível sugerir que este composto está se ligando, durante a incubação e ultrafiltração, à enzima apirase de batata.

Experimentos de EM/EM foram realizados para determinar a estrutura química do principal ligante e direcionar seu posterior isolamento. A análise do espectro de massas (Figura 29), realizado em modo positivo, permitiu propor que o ligante trata-se do alcaloide acridônico conhecido como arborinina (Figura 30), baseado no íon molecular m/z 286,1070, assim como no padrão de fragmentação semelhante aos dados previamente publicados (De CARVALHO et al., 2019b; NARDIN et al., 2018).

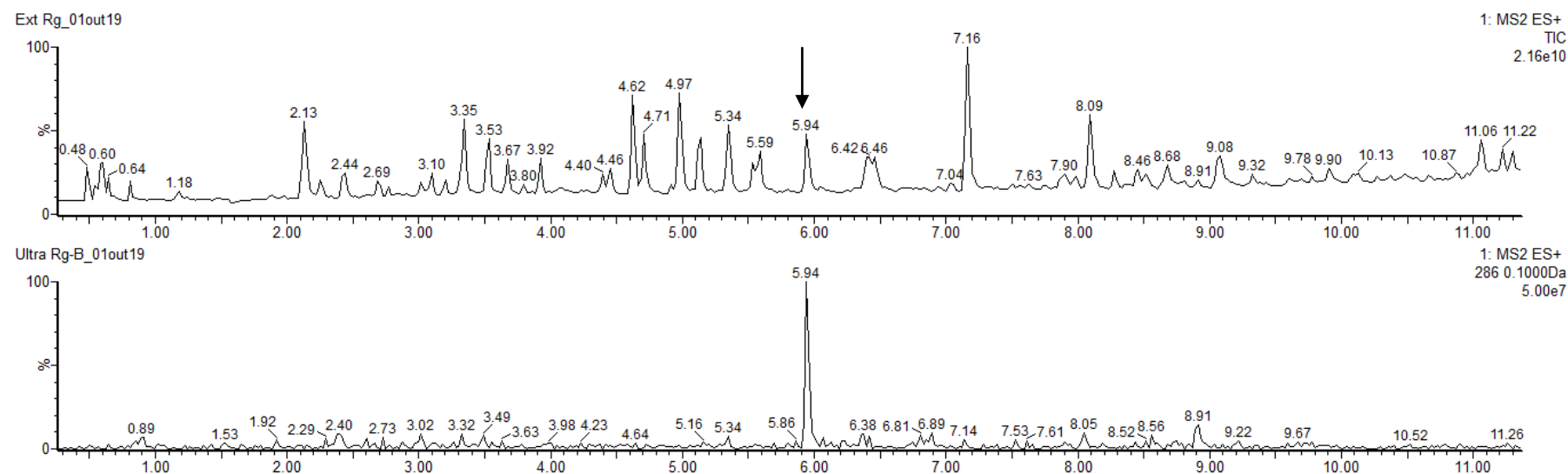
Figura 27 - Cromatograma em CLUE-ESI-QTOF-EM (modo positivo) do extrato bruto de *R. graveolens* (a), do ultrafiltrado incubado com enzima (b) e branco (c).



(a) Extrato bruto etanólico das partes aéreas de *R. graveolens*; (b) Ultrafiltrado de *R. graveolens*; (c) Ultrafiltrado do branco (solvente utilizado na análise). As setas indicam as substâncias ligantes da enzima apirase.

Fonte: Elaborado pela própria autora.

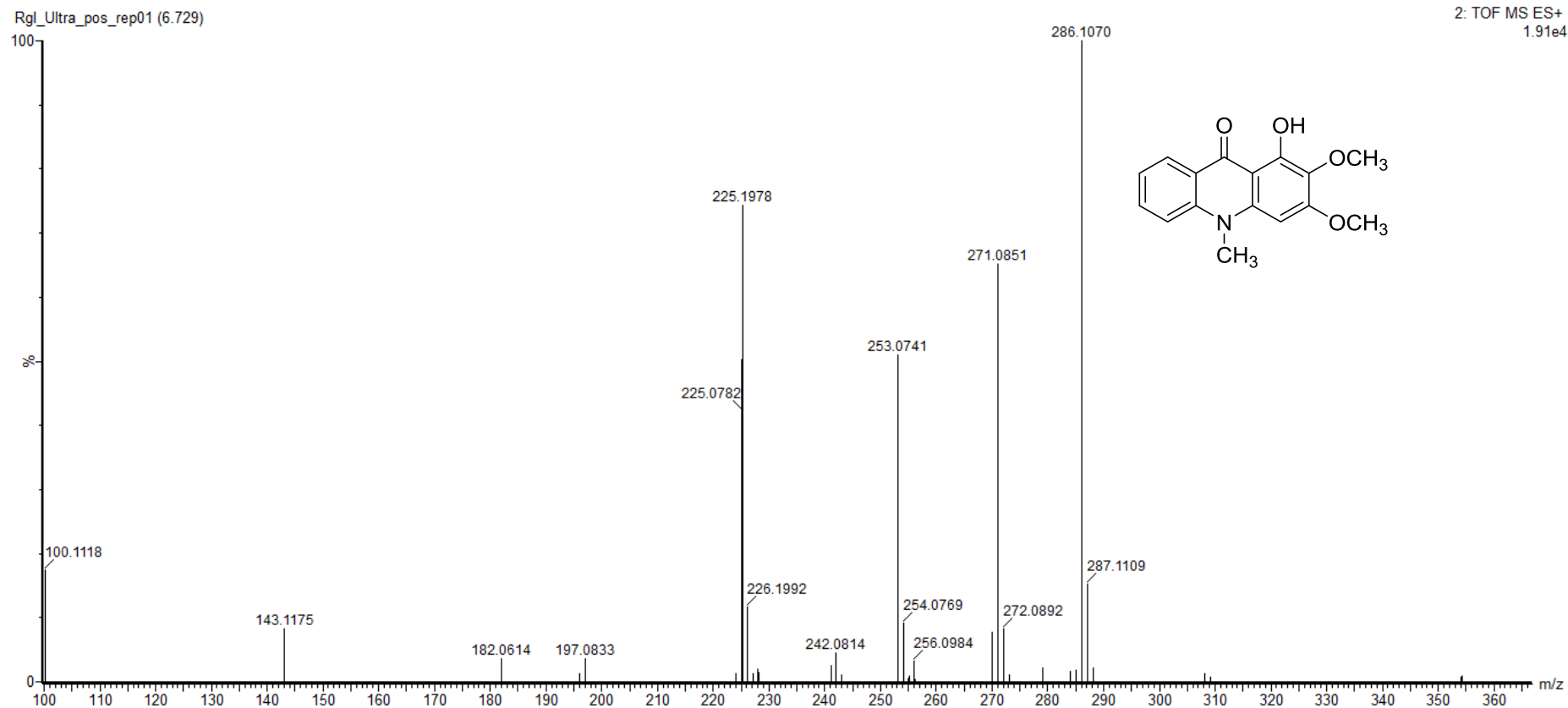
Figura 28 - Cromatograma em CLUE-EM-QqQ em modo positivo do extrato bruto de *R. graveolens* (a), do ultrafiltrado incubado sem enzima (b).



(a) Extrato bruto etanólico das partes aéreas de *R. graveolens*; (b) Ultrafiltrado de *R. graveolens* incubado sem enzima. A seta indica o principal ligante da enzima apirase presente no extrato.

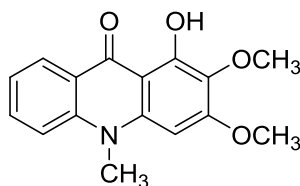
Fonte: Elaborado pela própria autora.

Figura 29 - Espectro de massas do composto no tempo de retenção de 6,72 minutos obtido por EM/EM-QTOF em modo positivo.



Fonte: Elaborado pela própria autora.

Figura 30 - Estrutura química da arborinina.



Fonte: Elaborado pela própria autora.

4.5.2.2 Ensaio de ultrafiltração e identificação de ligantes presentes em *Acmella oleracea*

De forma semelhante ao extrato de *R. graveolens*, o extrato bruto de *A. oleracea*, foi incubado com apirase de batata e, em seguida, filtrado em membrana de ultrafiltração. Posteriormente, este extrato e seu respectivo ultrafiltrado (obtido pela técnica de UF) foi analisado por CLAE-DAD (dados não mostrados) e CLUE-EM. Analisando os resultados obtidos e evidenciados pelos cromatogramas de CLUE-EM (Figura 31) é possível observar a presença de ligantes da apirase no ultrafiltrado, com destaque para o ligante identificado no tempo de retenção de 7,86 minutos.

Posteriormente, uma nova ultrafiltração foi realizada, na qual o extrato bruto de *A. oleracea* passou pelos mesmos procedimentos, porém sem a presença da enzima. Estes novos experimentos tiveram a finalidade de verificar se o principal ligante estava se ligando de fato à enzima ou ao aparato de UF. Assim o extrato bruto e seu respectivo ultrafiltrado foram analisados por CLUE-EM com analisador de massas do tipo triplo quadrupolo. Analisando os resultados obtidos e mostrados pelo cromatograma de CLUE-EM (Figura 32) é possível verificar a presença do ligante no $T_r = 7,05$ min (identificado pela análise do espectro de massas, descrito a seguir) no extrato bruto de *A. oleracea*, e a baixa concentração deste no ultrafiltrado em questão. Esses resultados nos permitem sugerir que este composto está se ligando, durante a incubação e ultrafiltração, à enzima apirase de batata.

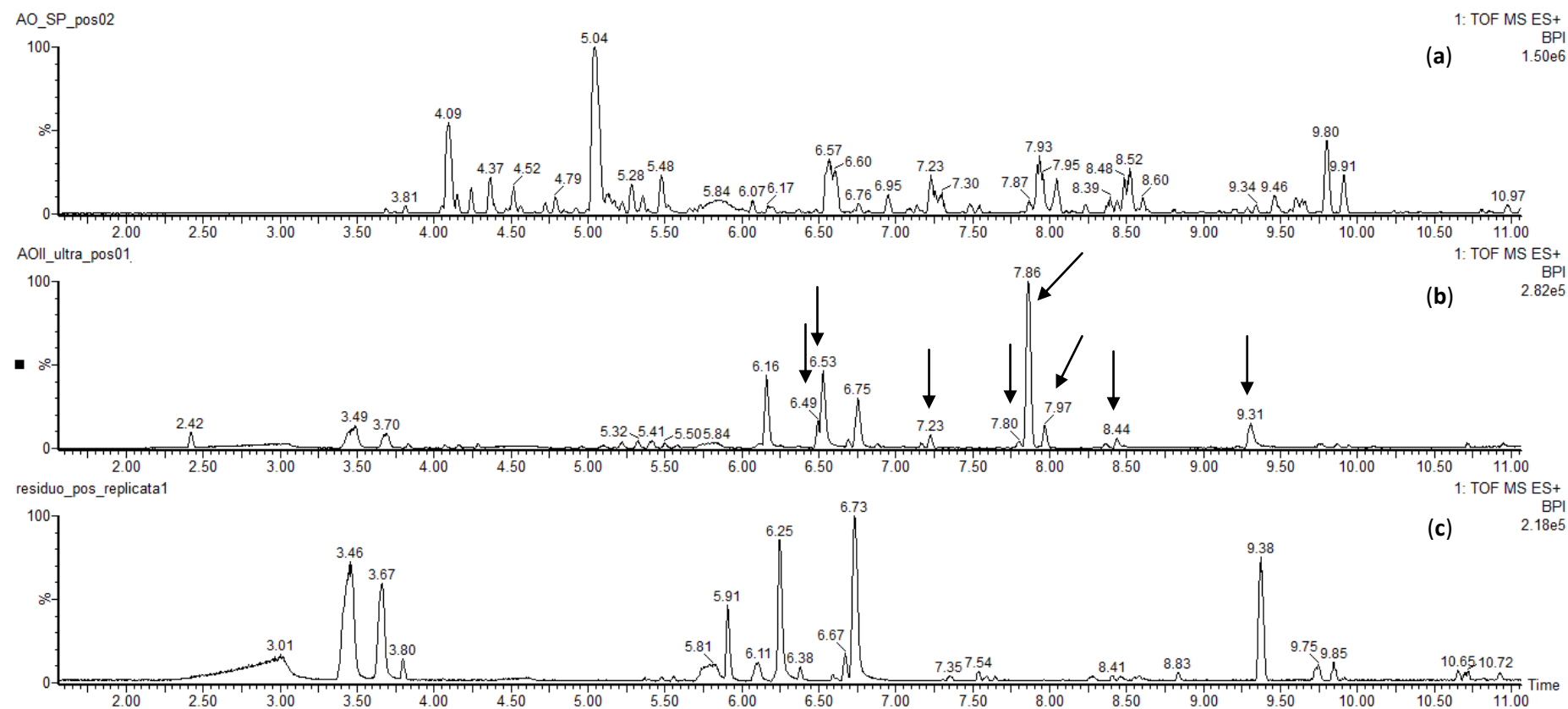
Com o intuito de identificar estruturalmente o principal ligante para seu posterior isolamento, experimentos de EM/EM foram realizados. O espectro de massas, realizado em modo positivo, do ligante no tempo de retenção de 7,86 minutos (ligante identificado no ensaio de UF), mostra o pico do íon molecular em $m/z = 222,1840$, sugerindo a fórmula molecular $C_{14}H_{24}NO$. Através do experimento

de EM/EM foi possível identificar os principais fragmentos m/z 141,1148 e m/z 126,0919 (Figura 33).

Segundo Hiserodt e colaboradores (2004), amidas insaturadas (2*E*, 6*Z*), sob baixa energia de colisão, formam dois fragmentos característicos. Um deles é formado através de uma clivagem homolítica gerando um cátion radical (Figura 34 a). E o outro íon formado é o cátion ciclopropeno (Figura 34 b), o qual passa pela formação inicial de um bicíclico intermediário seguido da perda de um alceno. Nestes dois casos, os cátions gerados são estabilizados por ressonância. Estes mecanismos de fragmentação propostos para a formação dos íons fragmentos de m/z 141 e m/z 126 estão representados na Figura 34.

Dessa forma, os principais fragmentos encontrados são consistentes com a fragmentação proposta por Hiserodt *et al.*, 2004 para a estrutura do epilantol. Além disso, outros fragmentos observados foram m/z 166,1256 (perda do resíduo isobutílica, m/z 56), m/z 149,0968 referente ao íon acílio, e os fragmentos m/z 123,1179 e m/z 121,1025 resultantes da perda de CO da molécula do íon acílio (BOONEN *et al.*, 2012). Esses dados comparados com os presentes na literatura permitiram propor que esta substância trata-se da substância (2*E*,6*Z*,8*E*)-*N*-isobutil-2,6,8-decatrienamida, conhecida como epilantol (Figura 35) (BOONEN *et al.*, 2010; HISERODT *et al.*, 2004).

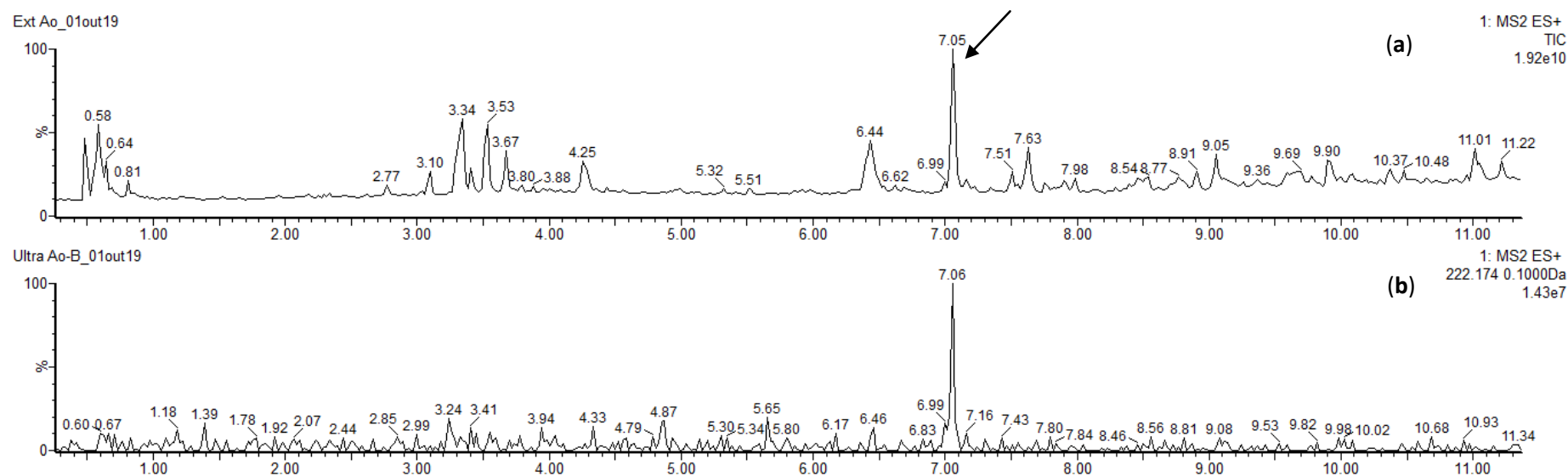
Figura 31 - Cromatograma em CLUE-ESI-QTOF-EM (modo positivo) do extrato bruto de *A. oleracea* (a), do ultrafiltrado incubado com enzima (b) e branco (c).



(a) Extrato bruto clorofórmico das flores de *A. oleracea*; (b) Ultrafiltrado de *A. oleracea*; (c) Ultrafiltrado do branco (solvente utilizado na análise). As setas indicam as substâncias ligantes da enzima apirase.

Fonte: Elaborado pela própria autora.

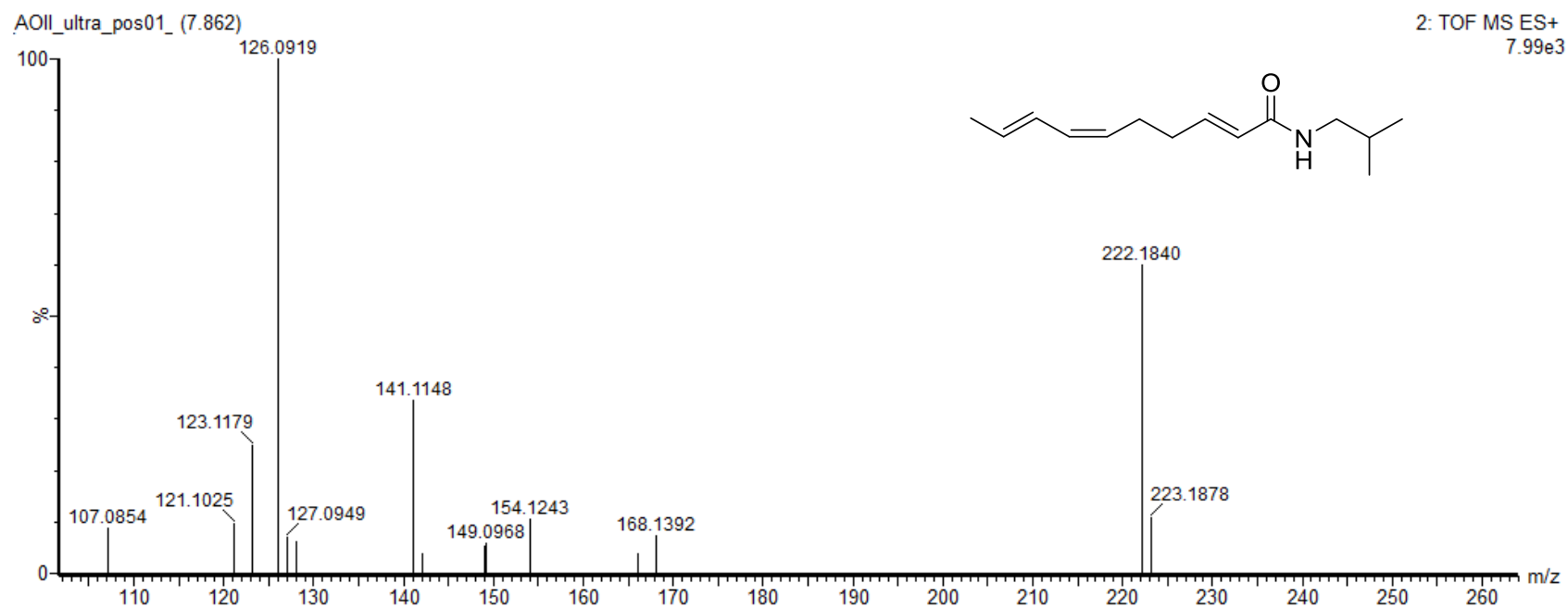
Figura 32 - Cromatograma em CLUE-EM-QqQ em modo positivo do extrato bruto de *A. oleracea* (a), do ultrafiltrado incubado sem enzima (b).



(a) Extrato bruto clorofórmico das flores de *A. oleracea*; (b) Ultrafiltrado de *A. oleracea* incubado sem enzima. A seta indica o principal ligante da enzima apirase presente no extrato.

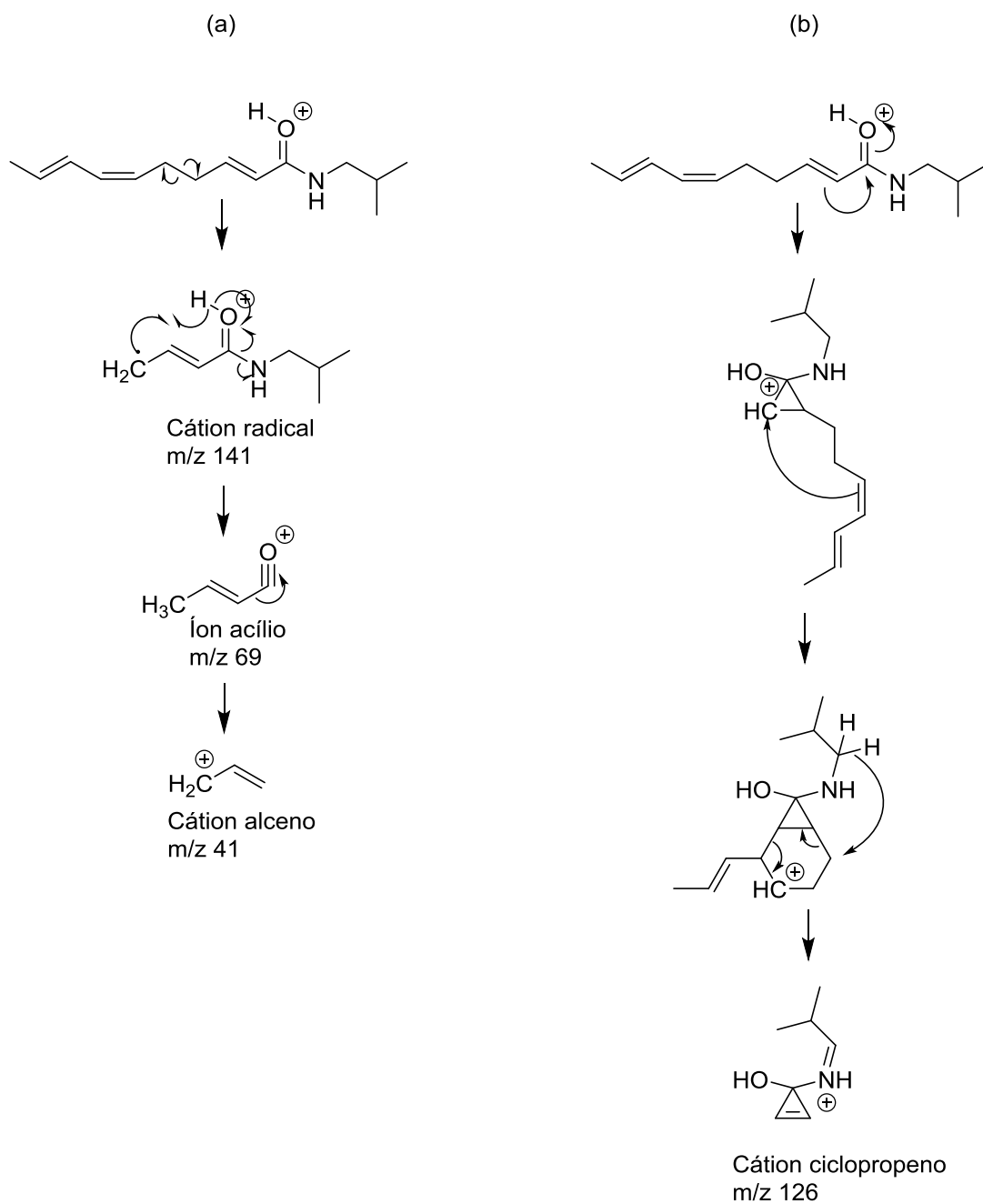
Fonte: Elaborado pela própria autora.

Figura 33 - Espectro de massas do composto no tempo de retenção de 7,86 minutos obtido por EM/EM-QToF em modo positivo.



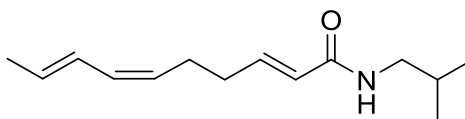
Fonte: Elaborado pela própria autora.

Figura 34 - (a) Mecanismo de formação do cátion radicalar. (b) Mecanismo de formação do cátion ciclopropeno.



Fonte: Adaptado de HISERODT et al. (2004).

Figura 35 - Estrutura química do espilantol.



Fonte: Elaborado pela própria autora.

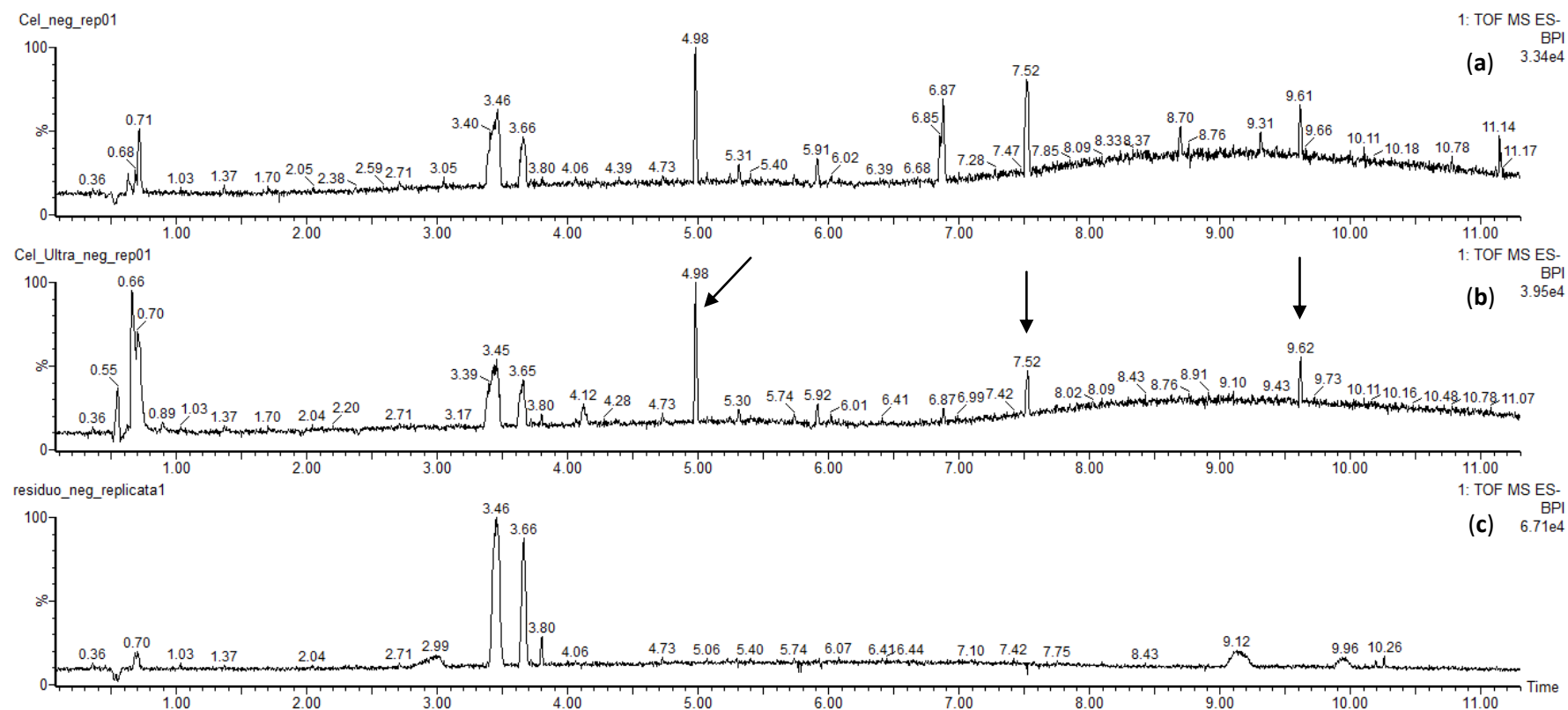
4.5.2.3 Ensaio de ultrafiltração e identificação de ligantes presentes em *Centella erecta*

E por fim, o extrato bruto de *C. erecta*, também avaliado no ensaio de UF, apresentou ligantes da enzima apirase de batata, como mostrado no cromatograma do ultrafiltrado realizado em CLUE-EM (Figura 36). Cabe destaque a presença do ligante no tempo de retenção de 4,98 minutos. Na Figura 37 observa-se a baixa concentração deste ligante quando o extrato foi incubado sem a presença da enzima, seguido da ultrafiltração.

Na análise do espectro de massas (Figura 38), realizado em modo negativo, do principal ligante ($T_r = 4,98$ min) foi possível observar o íon molecular de massa semelhante à substância conhecida como asiaticosídeo. No entanto, seu perfil de fragmentação foi caracterizado pela formação de aduto com o íon cloreto. Neste caso, observa-se um sinal correspondente à massa do asiaticosídeo m/z 957,5045 $[M-H]^-$, e um sinal de maior intensidade, m/z 993,4827, o que indica uma possível ligação do fragmento ao íon cloreto (34,9694), logo 958,5173 (massa exata do asiaticosídeo) + 34,9694 = 993,4831.

Um melhor perfil de fragmentação foi observado no modo EM/EM, no qual selecionou-se o íon de m/z 958 para posterior fragmentação (Figura 39). Os principais íons gerados a partir do íon precursor foram m/z 487,3571 $[M-H-2Glc-Rha]^-$ e 469,2375 $[M-H-2Glc-Rha-H_2O]^-$, os quais estão de acordo com a literatura (LONG et al., 2012; ZACARIA et al., 2019). Esses dados nos permitiram propor que a substância trata-se do asiaticosídeo (Figura 40).

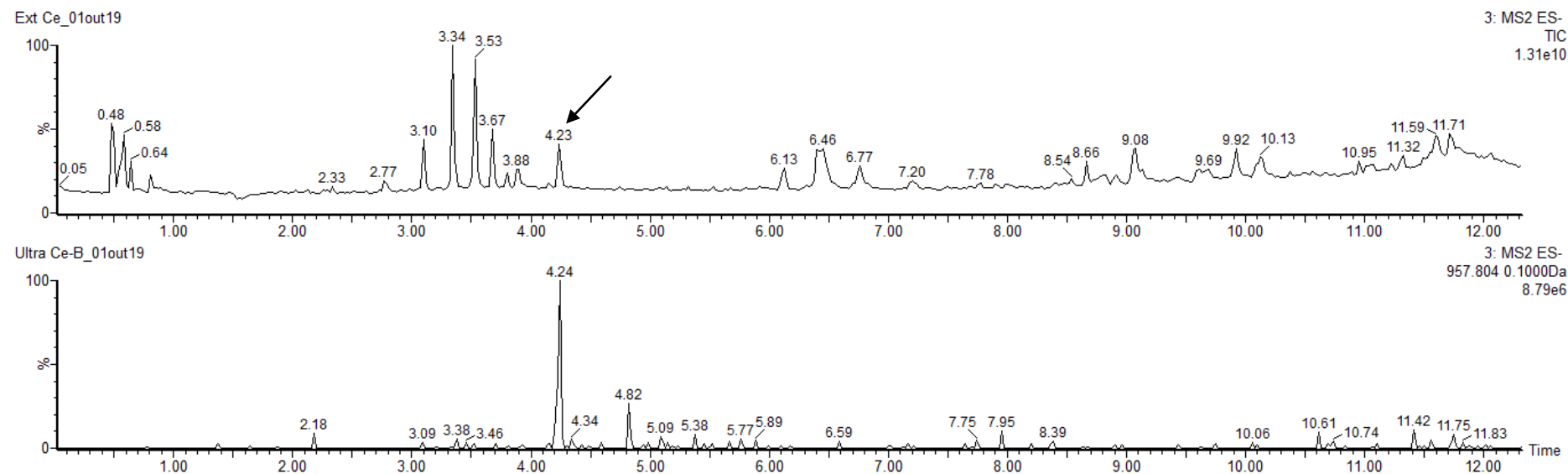
Figura 36 - Cromatograma em CLUE-ESI-QTOF-EM (modo negativo) do extrato bruto de *C. erecta* (a), do ultrafiltrado incubado com enzima (b) e branco (c).



(a) Extrato bruto etanólico das partes aéreas de *C. erecta*; (b) Ultrafiltrado de *C. erecta*; (c) Ultrafiltrado do branco (solvente utilizado na análise). As setas indicam as substâncias ligantes da enzima apirase.

Fonte: Elaborado pela própria autora.

Figura 37 - Cromatograma em CLUE-EM-QqQ em modo negativo do extrato bruto de *C. erecta* (a), do ultrafiltrado incubado sem enzima (b).

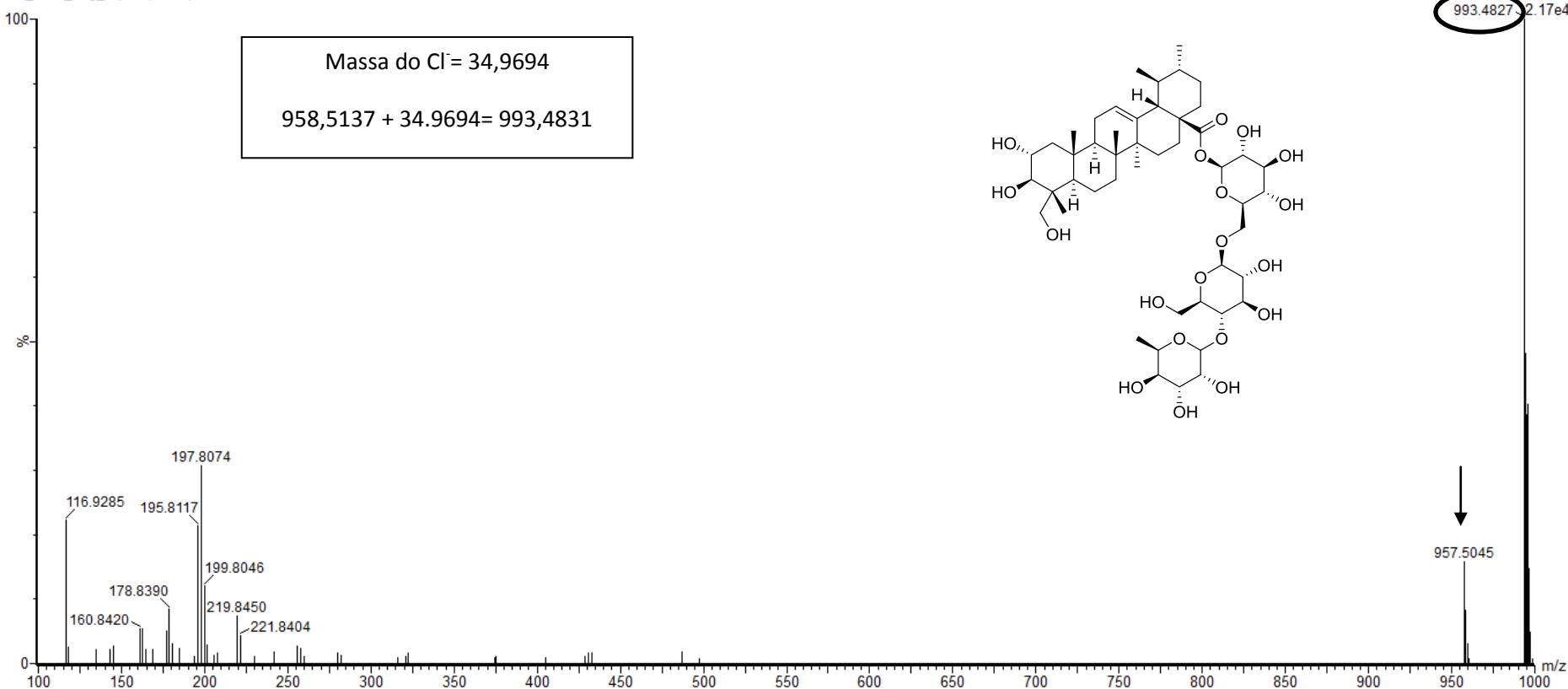


(a) Extrato bruto etanólico das partes aéreas de *C. erecta*; (b) Ultrafiltrado de *C. erecta* incubado sem enzima. A seta indica o principal ligante da enzima apirase presente no extrato.

Fonte: Elaborado pela própria autora.

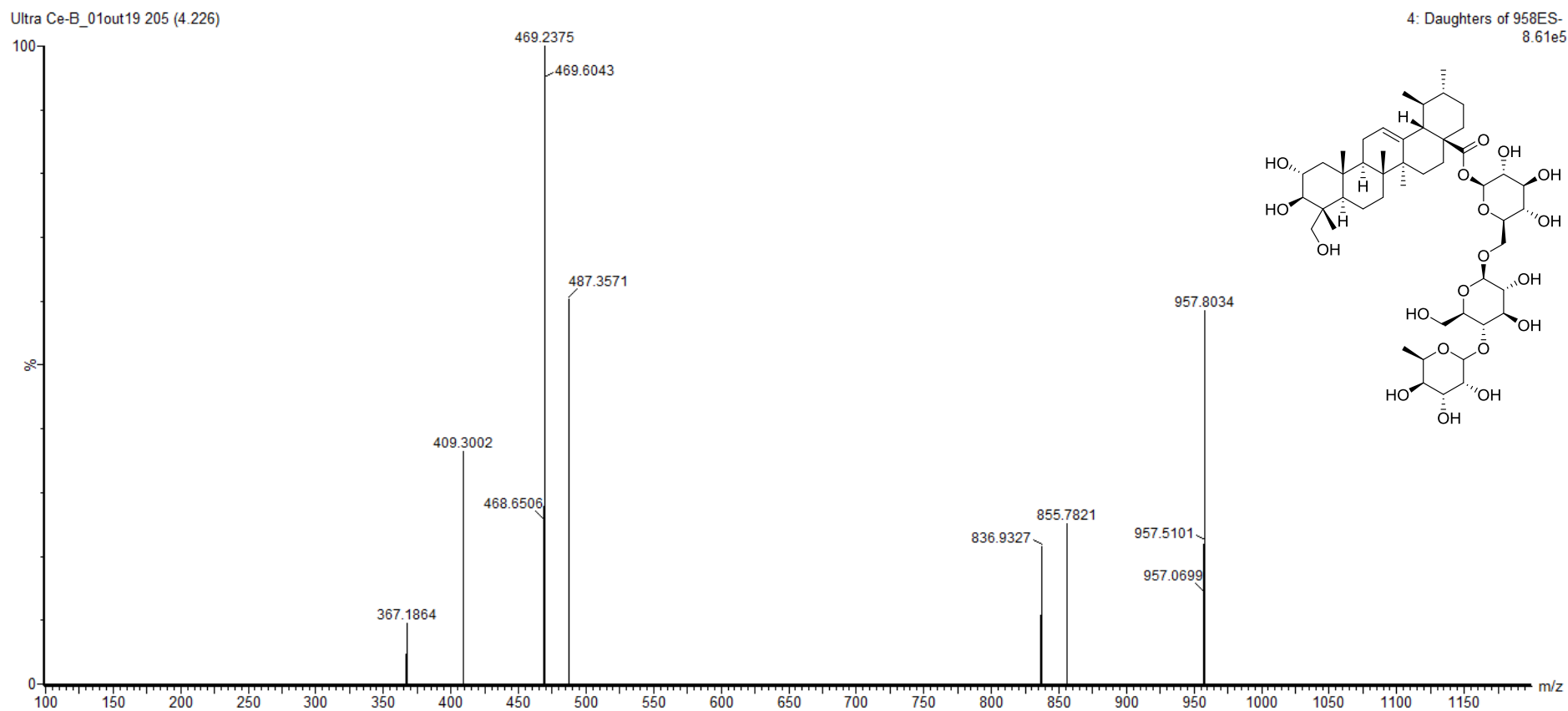
Figura 38 - Espectro de massas do composto no tempo de retenção de 4,99 minutos obtido por EM/EM-QToF em modo negativo.

Cel_Ultra_neg_rep01 (4.991)

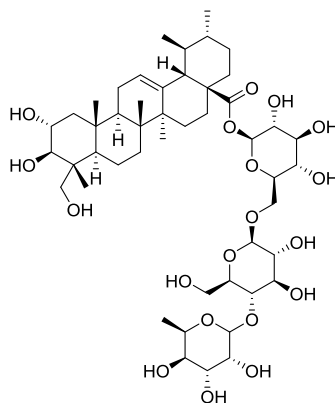


Fonte: Elaborado pela própria autora.

Figura 39 - Espectro de massas do asiaticosídeo obtido por EM/EM-QqQ em modo negativo.



Fonte: Elaborado pela própria autora.

Figura 40 - Estrutura química do asiaticosídeo.

Fonte: Elaborado pela própria autora.

A caracterização química de cada extrato, o fracionamento e isolamento dos ligantes identificados através da UF acoplada à CLUE-EM são descritos nos capítulos a seguir, assim como a confirmação das estruturas químicas desses ligantes através da RMN de Hidrogênio e Carbono. Além disso, investigou-se a capacidade de inibição enzimática da apirase de batata pelos ligantes isolados, os quais também foram submetidos aos estudos de *docking* molecular nas SmATPases e apirase. E por fim, extratos brutos e seus respectivos ligantes isolados foram avaliados quanto à atividade esquistossomicida *in vitro* frente à vermes adultos de *S. mansoni* e um ligante foi selecionado para avaliação da sua atividade esquistossomicida *in vivo*. Os resultados de todos esses experimentos estão descritos a seguir, individualizado por planta em cada capítulo.

4.6 CONCLUSÃO

O trabalho apresentado neste capítulo visou identificar, através da UF acoplada à CLUE-EM, ligantes enzimáticos de apirase a partir de misturas complexas, extratos brutos vegetais.

Dessa forma, as condições de incubação do ensaio de UF entre amostra e enzima foram determinadas, através da utilização da cardamonina como ligante da apirase de batata e das ATP difosfohidrolases de *S. mansoni*. Assim, selecionou-se a concentração da apirase de batata e o tempo de incubação para os testes posteriores.

Diferentes extratos brutos foram preparados e avaliados nos ensaios de UF acoplada à CLUE-EM. A análise desses dados permitiu selecionar 3 extratos promissores, os quais apresentaram ligantes da enzima apirase de batata, são eles: *R. graveolens*, *A. oleracea*, *C. erecta*. As estruturas químicas destes ligantes foram determinadas através dos dados de espectrometria de massas.

Assim, sugere-se que a técnica de UF acoplada à CLUE-ESI-QTOF-EM pode ser utilizada como uma ferramenta de *screening* para selecionar extratos vegetais com potenciais ligantes enzimáticos da apirase de batata, os quais podem ainda ser identificados estruturalmente e direcionar os procedimentos de fracionamento e isolamento dos mesmos.

5 CARACTERIZAÇÃO POR CLUE-ESI-QTOF-EM DO EXTRATO BRUTO DE *Ruta graveolens* (RUTACEAE) E AVALIAÇÃO DA SUA ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA *IN VITRO* FRENTE À VERMES ADULTOS DE *S. mansoni*

O presente capítulo se destina à caracterização química por CLUE-ESI-QTOF-EM do extrato bruto de *R. graveolens*, bem como o processo de fracionamento cromatográfico para isolamento e identificação estrutural das substâncias ligantes da enzima apirase de batata selecionados através da técnica de UF acoplada à CLUE-EM. Além disso, investigou-se a capacidade de inibição enzimática da apirase de batata pelos ligantes isolados, os quais também foram submetidos aos estudos de *docking* molecular nas SmATPases e apirase. E ainda investigou-se a atividade esquistossomicida *in vitro* frente à vermes adultos de *S. mansoni* do extrato bruto e do ligante isolado.

5.1 *Ruta graveolens*

A família Rutaceae possui mais de 1600 espécies diferentes de arbustos e árvores de pequeno porte, distribuídas em cerca de 150 gêneros, principalmente em países de climas tropicais, subtropicais e temperados. Dentre os gêneros dessa família, cita-se como os mais importantes os gêneros *Ruta*, *Esenbeckia* e *Cusparia*, os quais incluem espécies medicinais (BRASIL, 2015).

Do ponto de vista químico, a família Rutaceae possui grande diversidade de metabólitos, como alcaloides, cumarinas, lignanas, flavonoides e terpenos. Muitos desses compostos possuem variadas atividades biológicas, de grande importância farmacológica, despertando o interesse na investigação fitoquímica desta família (ASGARPANA, KHOSHKAM, 2012). No Brasil estão descritas cerca de 200 espécies de 33 gêneros diferentes, sendo a espécie mais conhecida *R. graveolens* L. (BRASIL, 2015; MALIK et al., 2016).

A *R. graveolens* é conhecida popularmente como arruda, ruta, arruda-fedorenta, ruta-de-cheiro-forte, arruda-doméstica e arruda-dos-jardins. O termo “ruta” é derivado do grego e significa libertar, relacionado à capacidade de “limpeza de maus fluidos” (BRASIL, 2015; LEMOS, 2015).

É uma planta nativa da região da Europa com aproximadamente 1,5 metros de altura. Suas folhas são longas com folíolos de cor verde-acinzentada a azulada. Os ramos são ramificados e herbáceos e com o passar do tempo se tornam lenhosos na base. Além disso, apresenta flores com coloração amarelo-esverdeada, hermafroditas com pétalas livres entre si (BRASIL, 2015; MALIK et al., 2016) (Figura 41).

Suas propriedades foram reconhecidas por grandes autores gregos e romanos, tais como Hipócrates, Dioscórides e Plínio. Na medicina tradicional e popular é utilizada pelo homem, desde muito tempo, em rituais de proteção, principalmente em crianças contra o mal olhado, desordens menstruais, inflamações na pele, câimbras, dor de ouvido e dente (MALIK et al., 2016). Atualmente é usada no tratamento de várias doenças como vitiligo, psoríase, infecções de bexiga e rins, inflamações e parasitoses. Na homeopatia, *R. graveolens* é utilizada para tratamento de dor profunda e reumatismo, além da fadiga ocular, distúrbios gástricos, rigidez na nuca, tonturas e dores de cabeça (BRASIL, 2015; MALIK et al., 2016). Além disso, esta espécie está listada na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS), o que demonstra a grande importância das pesquisas ligadas a sua composição química e atividades biológicas (BRASIL, 2018).

Figura 41 - Folhas (A) e flores (B) de *R. graveolens*.



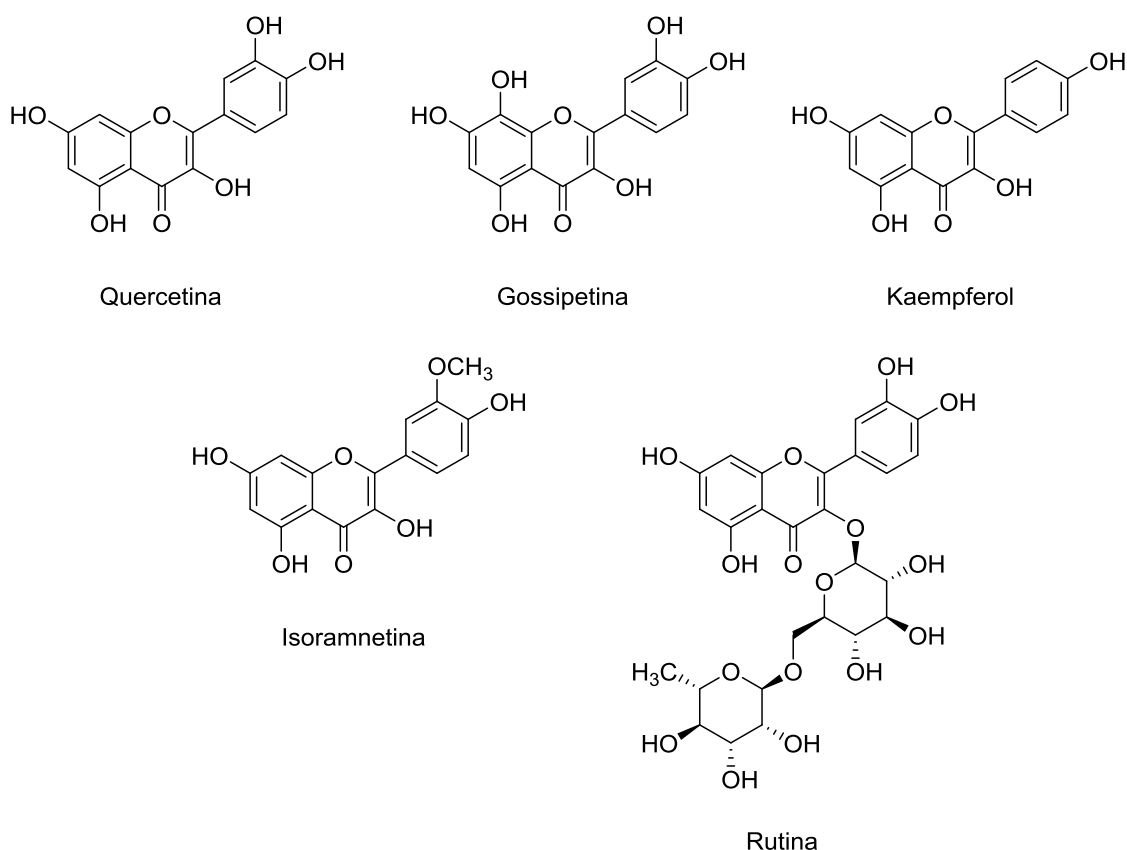
Fonte: Adaptado de BRASIL (2015).

Diante desse cenário, várias pesquisas têm investigado e relatado os efeitos anti-helmíntico, febrífuga, emenagoga, espasmolítica, fotossensibilizante, cicatrizante, anti-inflamatória, antirreumática e antiulcerogênica (ASGARPANAH,

KHOSHKAM, 2012). Sendo mencionada em farmacopeias de 28 países, seu uso medicinal se destaca devido à presença de seus metabólitos, principalmente flavonoides, cumarinas e alcaloides, os quais estão concentrados nas partes aéreas da planta (MALIK et al., 2016).

Os flavonoides são responsáveis pela coloração amarela das flores, e destacam-se a rutina, quercetina, gossipetina, kaempferol e isoramnetina (Figura 42). A rutina, um dos constituintes mais conhecidos de *R. graveolens*, possui a capacidade de aumentar a resistência dos capilares sanguíneos, evitando a ruptura destes e, conseqüentemente, as hemorroidas. Essa substância também já foi descrita com propriedade antioxidante, anticâncer e anti-inflamatória (ASGARPAHAH, KHOSHKAM, 2012; LEMOS, 2015; MALIK et al., 2016).

Figura 42 - Alguns flavonoides identificados em *R. graveolens*.

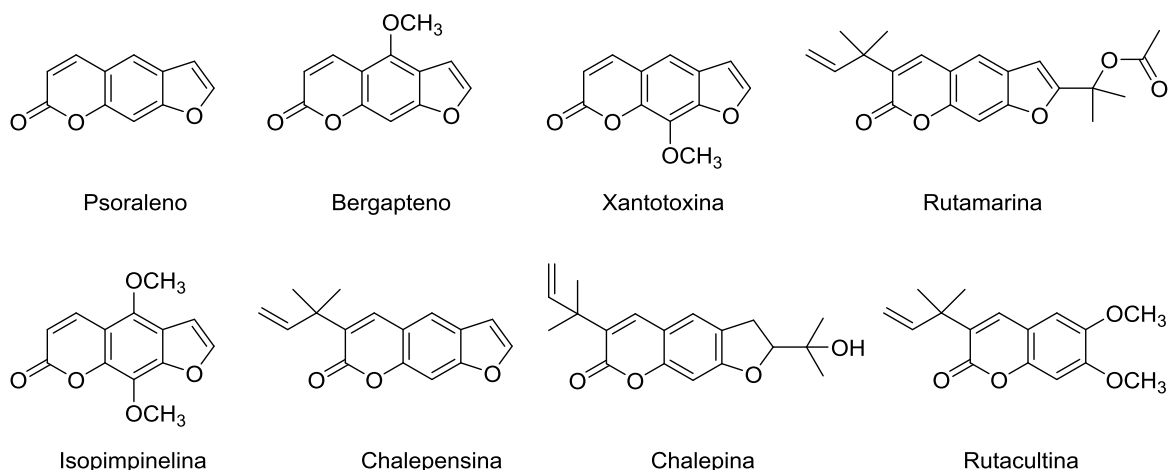


Fonte: Elaborado pela própria autora.

Já entre as cumarinas, mais de 40 compostos dessa classe já foram isolados e identificados nesta planta. Entre eles destacam-se o bergapteno, psoraleno, xantotoxina, rutamarina, isopimpinellina, chalepensina, rutacultina e chalepina

(Figura 43). As cumarinas e furanocumarinas são usadas no tratamento de doenças dermatológicas, como psoríase e vitiligo, por apresentarem propriedades fotoreativas, e também, são utilizadas no tratamento sintomático de doenças neurológicas, particularmente escleroses múltiplas (KOSTOVA et al., 1999; MALIK et al., 2016; SAMPAIO, 2012).

Figura 43 - Algumas cumarinas identificados em *R. graveolens*.

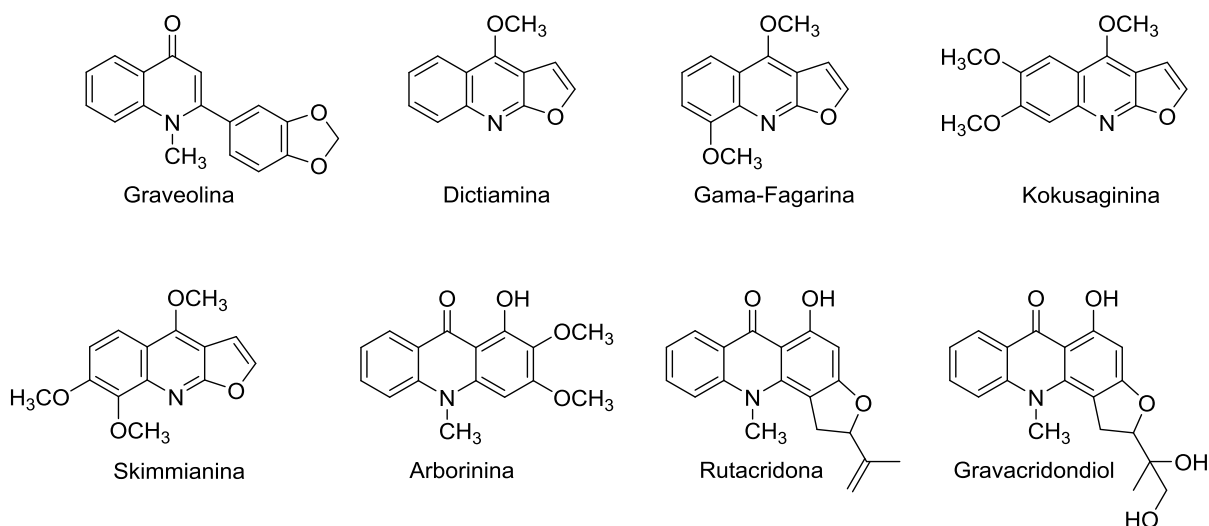


Fonte: Elaborado pela própria autora.

Os alcaloides são descritos em três grupos, quinolínicos (como a graveolina), furanoquinolínicos (como a skimmianina, γ -fagarina, kokusaginina e dictamina) e acridônicos (como a arborinina, rutacridona e gravacridondiol) (Figura 44). Estudos demonstram que os alcaloides, presentes na arruda, apresentam diversas atividades, dentre elas destacam-se a atividade antiparasitária contra *P. falciparum* e *T. cruzi*, bem como a atividade antimicrobiana e antitumoral (ASGARPANA, KHOSHKAM, 2012; MALIK et al., 2016; SAMPAIO, 2012).

Dentre os alcaloides acridônicos, a arborinina é o composto mais comumente encontrado nas partes aéreas dessa planta, enquanto a rutacridona e gravacridondiol são encontrados nas raízes (BURGA, 2005).

Figura 44 - Alguns alcaloides identificados em *R. graveolens*.

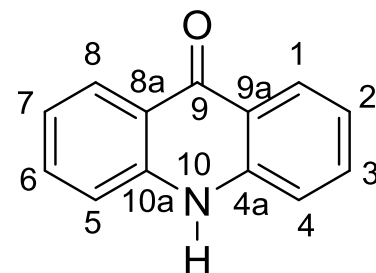


Fonte: Elaborado pela própria autora.

5.2 ALCALOIDES ACRIDÔNICOS E A ARBORININA

Alcaloides acridônicos possuem um núcleo aromático heterocíclico que contém um grupo carbonila e um grupo amino secundário na posição 9 e 10, respectivamente (Figura 45).

Figura 45 - Núcleo acridônico.



Fonte: Elaborado pela própria autora.

Alcaloides acridônicos, também denominados acridonas, são uma classe de metabólitos restritos apenas à família Rutaceae (BURGA, 2005). Diversos relatos na literatura evidenciam algumas atividades biológicas dessa classe de substâncias, como atividade antitumoral, antiviral e antiparasitária (AHUA et al., 2004; KAWAIL et al., 1999; SEPULVEDA et al., 2013; WAFFO et al., 2007).

Assim, por exemplo, algumas acridonas obtidas das raízes de plantas da família Rutaceae têm demonstrado efeito indutor de diferenciação de células HL-60, linhagem derivada de leucemia promielocítica humana, característica de leucemia mielóide aguda. O mecanismo de ação sugerido para esta atividade é a interação das acridonas com o DNA, por intercalação (KAWALL et al., 1999; KUMAR, SHARMA, PRASAD, 2018).

Em relação à atividade antiviral, vários alcaloides acridônicos mostraram ação inibitória frente a diferentes tipos de vírus, como vírus do herpes simplex (HSV), citomegalovírus humano (HCMV), vírus da imunodeficiência humana (HIV), vírus da diarreia viral bovina (BVDV), vírus da hepatite C (HCV), vírus da dengue (DENV) e vírus da febre hemorrágica (HFV) (KUMAR, SHARMA, PRASAD, 2018; SEPULVEDA et al., 2013).

A atividade antiparasitária também tem sido extensivamente investigada para alcaloides acridônicos frente ao *Plasmodium* sp, *Leishmania* sp e *Trypanosoma* sp (ASTELBAUER et al., 2011; DOS SANTOS et al., 2009; LACROIX et al., 2011; MURIITHI et al., 2002). Como exemplo, nos trabalhos de AHUA e colaboradores (2004) e WAFFO e colaboradores (2007), onze alcaloides acridônicos foram isolados de *Salvia glutinosa* e avaliados quanto à atividade *in vitro* frente ao *P. falciparum* sensível à cloroquina, *T. brucei rhodesiense* e *L. donovani*. Nove desses compostos apresentaram valores de IC₅₀ variando de 0,3 a 11,6 µM contra *P. falciparum*. E um pequeno número de compostos mostrou-se ativo contra os outros parasitos avaliados (AHUA et al., 2004; WAFFO et al., 2007).

Dentre os alcaloides acridônicos de origem natural, a arborinina, encontrada principalmente nas partes aéreas de *R. graveolens*, tem mostrado significativa atividade antiparasitária (ALBARICI, 2006; MALEBO et al., 2009; MWANGI et al., 2010).

No estudo realizado por MWANGI e colaboradores (2010), a arborinina foi ativa frente ao *P. falciparum*, apresentando IC₅₀ de 1,61 µg/mL (MWANGI et al., 2010). Além disso, a arborinina também apresentou atividade frente às formas amastigotas de *L. donovani*, com IC₅₀ de 5,20 µg/mL (MWANGI et al., 2010). Estudos demonstram ainda a atividade antiparasitária da arborinina frente às espécies de *T. cruzi* e *T. brucei rhodesiense* (ALBARICI, 2006; MALEBO et al., 2009; MWANGI et al., 2010).

Em relação ao mecanismo de ação, trabalhos têm relacionado a atividade antiparasitária da arborinina e outros alcaloides, com a capacidade de interação com alvos enzimáticos, principalmente enzimas presentes em *Leishmania* sp (OGUNGBE, NG, SETZER, 2013).

5.3 OBJETIVOS

O objetivo geral do trabalho descrito no presente capítulo foi a caracterização química dos constituintes de *R. graveolens*, o isolamento dos metabólitos e avaliação da atividade esquistosomicida *in vitro* do extrato e substância isolada frente à vermes adultos de *S. mansoni*.

Para esses propósitos, os objetivos específicos foram:

- Caracterizar quimicamente o extrato bruto etanólico das partes aéreas de *R. graveolens* por meio de CLUE-ESI-QTOF-EM;
- Realizar o isolamento, a purificação e identificação da arborinina, a qual foi anteriormente identificada como ligante da apirase de batata;
- Avaliar a atividade esquistosomicida *in vitro* do extrato bruto e da arborinina frente à vermes adultos de *S. mansoni*;
- Avaliar a atividade enzimática da apirase de batata frente à arborinina;
- Realizar estudos de *docking* molecular da arborinina frente à apirase de batata e as ATP difosfohidrolases de *S. mansoni*.

5.4 MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos deste trabalho foram realizados nos laboratórios: NIPPAN da Universidade Federal de Juiz de Fora, CentralBio da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora, Departamento de Química da Universidade Federal de Juiz de Fora, NPDN - Universidade de Guarulhos, São Paulo, SP e no Departamento de Ciência da Computação - Programa de Pós-Graduação em Modelagem Molecular da Universidade Federal de Juiz de Fora.

Para execução dos métodos foram utilizados os mesmos equipamentos descritos no item 3.6 deste trabalho.

Foram utilizados solventes de grau P.A., das marcas Vetec, Cromato Produtos Químicos LTDA, Quemis, Isofar e Alphatec. Para realização do processo de CLAE foram utilizados água ultrapura e metanol grau CLAE da marca J. T. Baker. Para a realização de CCD, foram utilizadas cromatoplasas de sílica gel 60 GF254 (Merck). A revelação das mesmas foi obtida através de irradiação no UV (254 e 366 nm), bem como de revelador químico, solução de anisaldeído, seguida de aquecimento.

Para a realização de CLV e cromatografia em coluna clássica (CC) foram utilizadas como adsorventes sílica gel 40-63 μm .

Para CLAE foram utilizadas coluna analítica de fase reversa (SunFire C₁₈; 4,6 x 250 mm; 5 μm), na presença de pré-coluna (SunFire C₁₈; 4,6 x 20 mm; 5 μm) e coluna semipreparativa de fase reversa (SunFire C₁₈, 10 x 250 mm, 5 μm), na presença de pré-coluna (SunFire C₁₈ 10 x 20 mm, 5 μm).

Para CLUE foi utilizada coluna analítica de fase reversa (Acquity BEH C₁₈; 2,1 x 100 mm; 1,7 μm), na presença de pré-coluna (Acquity BEH C₁₈; 2,1 x 5 mm; 1,7 μm).

Para a obtenção dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C foi utilizado clorofórmio deuterado da marca Cambridge Isotope Laboratories.

5.4.1 Análise por CLUE-ESI-QTOF-EM

Os extratos vegetais selecionados a partir da técnica de UF acoplada a CLUE-EM foram analisados por um CLUE acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução com fonte ESI e analisador tipo Q-TOF (XEVO G2- S QTOF). As condições cromatográficas e de ESI-EM foram as mesmas citadas no item 3.6.2.

A identificação das substâncias presentes no extrato bruto de *R. graveolens* foi realizada por EM/EM-QTOF. Os espectros de massas obtidos foram comparados com dados disponíveis nas bases de dados MassBank of North America (<http://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/>), PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), e ChemSpider (<http://www.chemspider.com/>) para identificação das substâncias, além das literaturas CUTHBERTSON et al., 2013; De CARVALHO, et al., 2019; KACEN et al., 2015; LING et al., 2016; XU et al., 2018; YANG et al., 2016.

5.4.2 Fracionamento cromatográfico e isolamento da arborinina e outros metabólitos

O material vegetal de *R. graveolens* foi novamente coletado em janeiro de 2017 para produção de maior quantidade do extrato das partes aéreas de *R. graveolens*. A exsicata do vegetal foi depositada no Herbário Leopoldo Krieger – CESJ, da UFJF, sob número de tombo 70472.

Este material vegetal passou pelos mesmos processos de secagem e trituração descritos no item 3.6.1 deste trabalho e resultou em 650 g de pó, o qual foi submetido à maceração em etanol. As soluções etanólicas obtidas foram filtradas e, em seguida, transferidas para balões de fundo redondo e concentradas com auxílio de rotaevaporador à temperatura de 40°C. Os extratos obtidos foram transferidos para frascos previamente pesados fornecendo 30,0 g de extrato bruto etanólico das partes aéreas de *R. graveolens* (Rg).

Com o propósito de separação inicial dos constituintes presentes no Rg e isolamento da substância identificada como ligante no ensaio de ultrafiltração, 22,0 g deste extrato foi submetido à CLV de 10 cm de diâmetro por 15 cm de altura e empacotada com 400g de sílica gel (40-63 µm). Utilizou-se como fase móvel hexano, clorofórmio e acetato de etila eluídos em grau crescente de polaridade, sendo coletadas 5 subfrações de aproximadamente 600 mL cada.

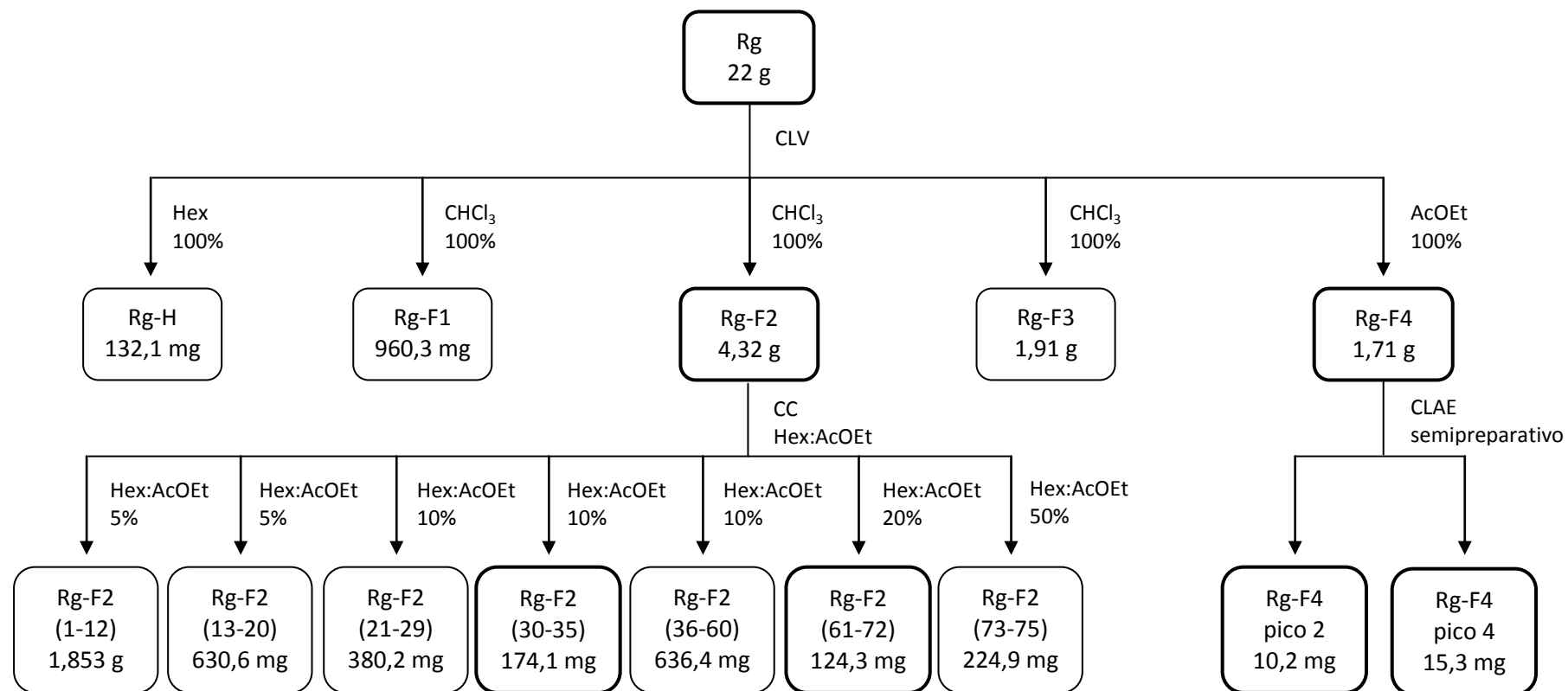
Essas subfrações obtidas foram analisadas por CLAE-DAD utilizando as condições cromatográficas descritas no item 4.4.1.1 deste trabalho. A partir dessa

análise, as subfrações Rg-F2 e Rg-F4 foram selecionadas para prosseguir com o procedimento de isolamento das substâncias.

A subfração RgF-2 (4,32 g) foi submetida à CC de 4 cm de diâmetro por 20 cm de altura e empacotada com 130g de sílica gel (40-63 μm), utilizando como fase móvel a mistura de hexano:acetato de etila em grau crescente de polaridade. Coletou-se 75 subfrações de aproximadamente 50 mL, as quais foram reunidas em 7 subfrações de acordo com as semelhanças cromatográficas observadas pela CCD. Este fracionamento resultou no isolamento de duas substâncias, RgF2. 30-35 (174,1 mg) e RgF2. 61-72 (124,3 mg), posteriormente identificadas por meio de análises de RMN de ^1H e ^{13}C .

A subfração RgF-4, a qual apresentava o ligante, foi processada em CLAE semipreparativo. Inicialmente, selecionou-se o melhor sistema isocrático de separação em CLAE analítico. Os sistemas avaliados foram de 60% de MeOH em água (acidificada com 0,1% de ácido acético) e 50% de MeOH em água (acidificada com 0,1% de ácido acético). A subfração Rg-F4 foi então submetida à CLAE semipreparativa de fase reversa C_{18} , utilizando eluição isocrática MeOH 50% em água com 0,1% de ácido acético, fluxo de 5 mL/min e volume de injeção variando de 50 a 450 μL . Foram realizadas 39 injeções. Este procedimento resultou no isolamento de duas substâncias, Rg-F4 pico2 (10,2 mg) e Rg-F4 pico 4 (15,3 mg), as quais tiveram suas estruturas químicas identificadas por meio de análises de RMN de ^1H e ^{13}C . O processo de fracionamento do extrato bruto etanólico das partes aéreas de *R. graveolens* e isolamento das substâncias estão resumidos na Figura 46.

Figura 46 - Fluxograma do fracionamento do extrato bruto etanólico das partes aéreas de *R. graveolens* (Rg).



Fonte: Elaborado pela própria autora.

5.4.3 Ensaio esquistossomicida *in vitro*

Os ensaios *in vitro* foram efetuados no Núcleo de Enteroparasitos do Instituto Adolfo Lutz, sob a colaboração e supervisão do Prof. Dr. Josué de Moraes. Todos os ensaios foram submetidos e aprovados pelo CEUA número 031/2017.

A linhagem de *S. mansoni* e a manutenção do ciclo evolutivo de *S. mansoni* estão descritos nos item 3.6.7.1 deste trabalho.

As amostras foram solubilizadas e diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO, Merck) e meio RPMI 1640 de forma a obter as concentrações de 100 a 1,56 µg/mL, para os extratos, e 50 µM para a substância isolada, sendo que a concentração final de DMSO não foi superior a 0,5 %. O PZQ (2 µM) foi utilizado como controle positivo.

Para a realização dos ensaios esquistossomicidas *in vitro*, inicialmente, os vermes foram lavados com meio RPMI 1640 contendo penicilina 200 UI/mL (Vitrocell, Campinas, SP, Brasil) e estreptomicina 200 µg/mL (Vitrocell, Campinas, SP, Brasil), em placa de Petri de polietileno estéril (90 mm x 15 mm). Posteriormente, os parasitos foram transferidos para placas de cultura de células com 24 poços contendo 1 casal por poço em 2 mL do meio RPMI 1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino (Vitrocell, Campinas, SP, Brasil) e tamponado com HEPES 25 mM (Sigma-Aldrich).

Em seguida, as amostras foram adicionadas e os parasitos foram incubados em estufa (Thermo Scientific 8000 WJ, CA, EUA) a 37°C e atmosfera de CO₂ a 5%. Utilizou-se um grupo controle negativo (casais de parasitos cultivados somente em meio RPMI 1640 ou meio RPMI 1640 com DMSO a 0,5%) e um grupo controle positivo (PZQ a 2 µM) (CASTRO et al., 2015; De MORAES et al., 2013a; De MORAES et al., 2013b).

Os casais de vermes adultos foram monitorados por 72 horas, diariamente, com auxílio de estereomicroscópio. A mortalidade dos parasitos foi avaliada pela ausência de movimentos por 2 minutos. Além disso, também foi avaliada a redução da atividade motora, classificado em moderada e significativa (De MORAES et al., 2011a; De MORAES et al., 2011b).

5.4.4 Ensaio de inibição da atividade enzimática da apirase de batata pela arborinina

O ensaio de atividade enzimática foi realizado no NIPPAN, de acordo com métodos previamente descritos com modificações (DETONI et al., 2012; MAIA et al., 2019; TAUSSKY, SHORR, 1953).

Neste ensaio de atividade enzimática, 8,5 μL de apirase de batata (0,00001 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ no poço) foram adicionados ao meio de reação contendo 50 μL de tampão succinato 50 mM pH 6,5, 25 a 100 μM de arborinina e água deionizada suficiente para totalizar um volume de 100 μL . Em seguida, a placa de 96 poços foi incubada durante 20 minutos em banho-maria à 37°C para estabilização do sistema e a reação foi disparada com a adição de 10 μL de ATP 1mM. Após 10 minutos a reação foi interrompida pela adição de 100 μL de HCl 0,1N. O doseamento de fosfato inorgânico (Pi) liberado foi determinado através da utilização do *Phosphate Assay Kit* – MAK 308. Para isso, compararam-se as densidades ópticas obtidas em 620 nm com uma curva padrão de fosfato, variando as concentrações de 0 a 40 μM .

Para cada experimento foi realizada uma atividade enzimática basal e uma atividade controle DMSO. A partir deste valor, os dados de atividade enzimática residual foram calculados através da análise do percentual de redução da atividade em relação à atividade controle.

Os tratamentos estatísticos foram realizados com auxílio do software GraphPad InStat 7.0. A análise entre grupos foi realizada pela análise de quartis, de variância (ANOVA) e as diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo teste T-Student. Valores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5.4.5 Estudos de *docking* molecular

Os estudos de *docking* molecular foram realizados no Departamento da Ciência da Computação da Universidade Federal de Juiz de Fora, sob a colaboração e responsabilidade da Prof. Dra. Priscila Vanessa Zabala Capriles Goliatt, conforme descrito no item 3.6.6 deste trabalho.

5.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.5.1 Caracterização química do extrato bruto etanólico das partes aéreas de *R. graveolens* por CLUE-ESI-QTOF-EM

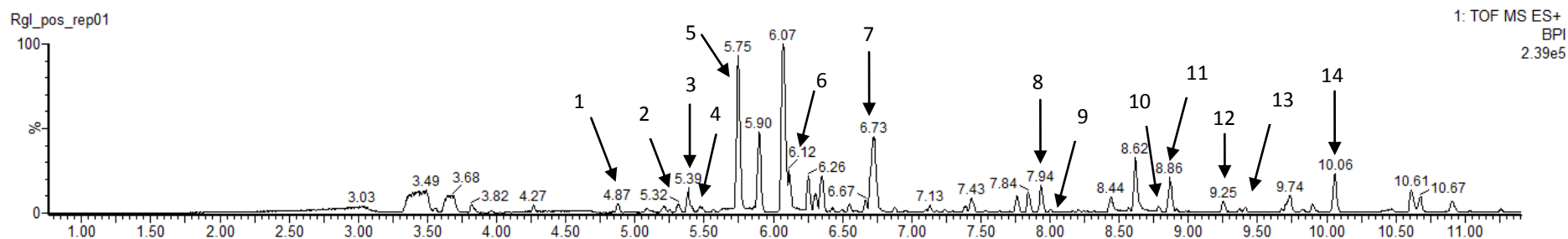
A identificação das substâncias presentes no extrato de *R. graveolens* foi realizada através das análises dos dados obtidos pela espectrometria de massas. Além dos espectros de EM observados e dos dados obtidos pela análise QTOF-EM, as principais ferramentas para identificação de compostos foram a interpretação dos espectros observados de QTOF-EM em comparação com os encontrados na literatura e em vários bancos de dados online (CUTHBERTSON et al., 2013; De CARVALHO, et al., 2019; KACEN et al., 2015; LING et al., 2016; MassBank; XU et al., 2018; YANG et al., 2016).

Além disso, alguns compostos foram isolados e tiveram sua estrutura química confirmada através das análises dos espectros de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C e também pela comparação com a literatura. Para auxiliar na identificação, foi realizado um levantamento das principais classes de substâncias já identificadas na espécie, gênero ou família de *R. graveolens*.

A análise dos resultados obtidos em CLUE-ESI-QTOF-EM do extrato bruto de *R. graveolens* (Figura 47) permitiram realizar a identificação de quatorze substâncias. A Tabela 12 mostra o tempo de retenção de cada substância identificada, bem como informações obtidas do espectro de massas. As estruturas químicas das substâncias identificadas no extrato estão representadas na Figura 48.

Através da análise desses dados obtidos experimentalmente foi possível identificar alguns alcaloides, dentre eles os de núcleo arilquinolínico, furanoquinolínico, acridônico e alquilquinolínicos.

Sabe-se que os alcaloides constituem um vasto grupo de metabólitos secundários com grande diversidade estrutural, devido aos diversos caminhos biossintéticos que podem seguir. De maneira geral e resumida, os alcaloides são uma classe de substâncias de carácter básico encontrado principalmente em plantas, contendo em sua fórmula, basicamente nitrogênio, oxigênio, hidrogênio e carbono (YANG et al., 2016).

Figura 47 - Cromatograma em CLUE-ESI-QTOF-EM do extrato bruto de *R. graveolens*.

Fonte: Elaborado pela própria autora.

Tabela 12 - Substâncias identificadas no extrato bruto de *R. graveolens* e dados de massas e fragmentos encontrados comparados com a literatura.

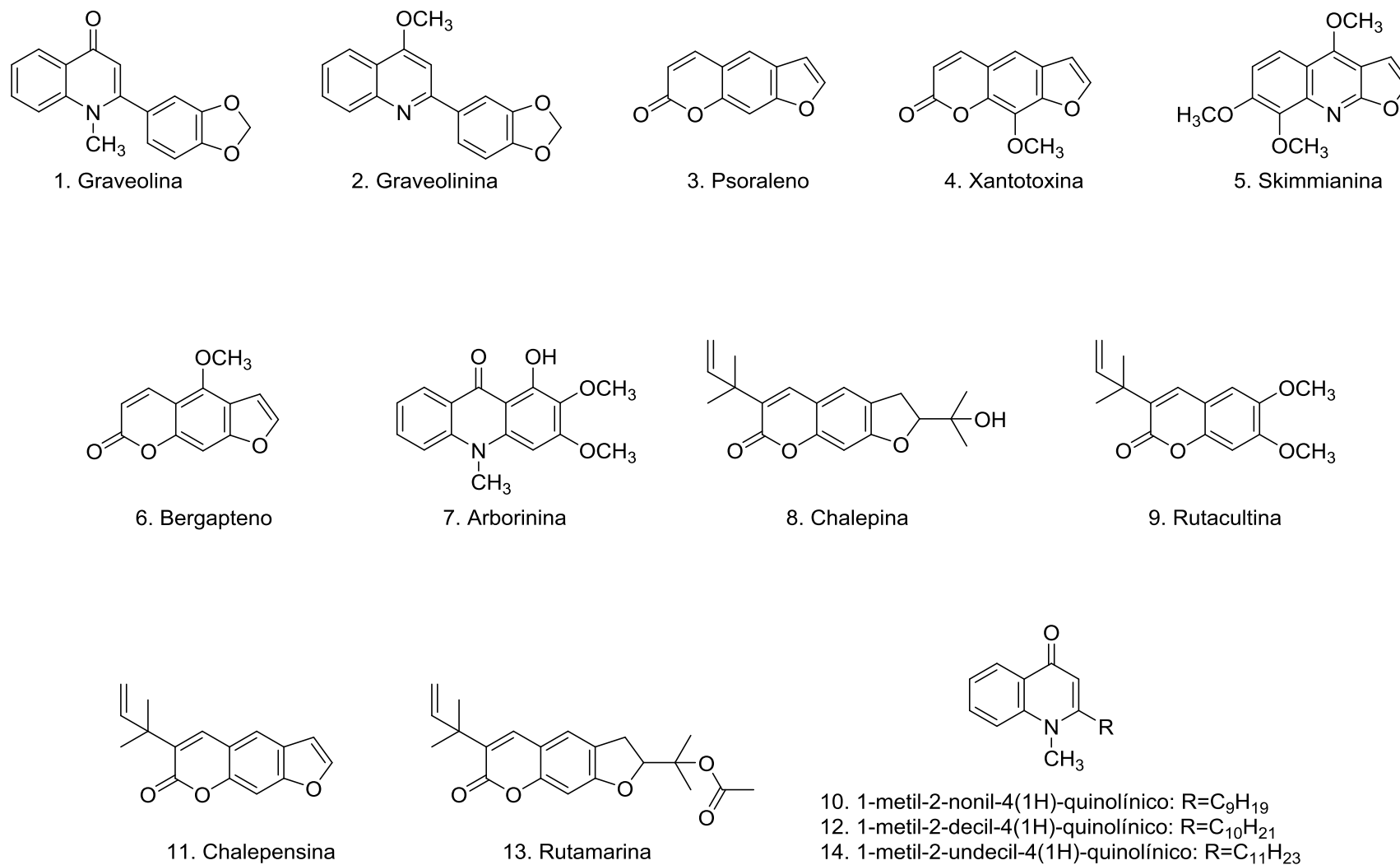
Pico	Composto	T _R (min)	m/z [M+H]	Fragmentos	Literatura ^a
1	Graveolina	4,87	280,0962	265,0717; 237,0768; 207,0654	265; 250; 237; 222; 207
2	Graveolinina	5,36	280,0962	265,0717; 250,0862; 222,0900	265; 250; 222
3	Psoraleno	5,48	187,0374	143,0544; 131,0500; 115,0515	159; 143; 131; 115
4	Xantotoxina	5,68	217,0484	202,0240; 174,0309; 161,0594; 146,0341	202; 174; 161; 146; 118
5	Skimmianina	5,75	260,0886	245,0661; 230,0430; 216,0615; 202,0472; 199,0583	245; 230; 227; 216; 202; 199; 184; 156
6	Bergapteno	6,11	217,0454	202,0211; 174,0282; 146,0316; 118,0391	202; 174; 146; 118
7	Arborinina	6,71	286,1064	271,0844; 253,0732; 244,1687; 225,0770; 197,0848; 182,0599	271; 243; 199
8	Chalepina	7,94	315,1586	273,1148; 259,0970; 255,1037; 241,0889; 223,0753; 213,0903; 201,0573	273; 259; 255; 241
9	Rutacultina	8,26	275,1223	233,0766; 219,0593; 190,0593; 175,0358; 147,0390	233; 219; 191; 174; 147

10	1-metil-2-nonil-4(1H)-quinolínico	8,77	286,2171	186,0907; 173,0827	261; 217; 186; 173; 144; 102
11	Chalepensina	8,86	255,0939	213,0515; 199,0329; 185,0573; 171,0416; 157,0624; 141,0645	213; 199; 185; 171; 157; 155
12	1-metil-2-decil-4(1H)-quinolínico	9,23	300,2355	186,0907; 173,0827	257; 228; 186; 173; 159
13	Rutamarina	9,42	357,1557	315,1187; 297,1399; 255,0939; 241,0762; 223,0692; 198,0620; 178,0705	315; 297; 255; 241; 223; 212
14	1-metil-2-undecil-4(1H)-quinolínico	10,06	314,2481	186,0907; 173,0827	186; 173; 144; 132

^a CUTHBERTSON et al., 2013; De CARVALHO, et al., 2019; KACEN et al., 2015; LING et al., 2016; MassBank; XU et al., 2018; YANG et al., 2016.

Fonte: Elaborado pela própria autora.

Figura 48 - Estruturas químicas dos compostos identificados no extrato bruto de *R. graveolens* por CLUE-ESI-QTOF-EM.



Fonte: Elaborado pela própria autora.

Na família Rutaceae ocorrem cinco tipos diferentes de alcaloides que são classificados segundo sua biossíntese em derivados da fenilalanina/tirosina, derivados do triptofano, derivados do ácido antranílico, da histidina e derivados de origem desconhecida. No entanto, as plantas pertencentes à família Rutaceae produzem, em quase sua totalidade, alcaloides derivados do ácido antranílico: 2-quinolona, 4-quinolona, alquilquinolínicos, furanoquinolínicos e acridônicos (SAMPAIO, 2012).

Os alcaloides arilquinolínicos identificados neste trabalho foram a graveolina e graveolinina (compostos 1 e 2, Figura 48). A análise dos dados de massas revelam que os picos 1 (4,87 min) e 2 (5,36 min) são isômeros, apresentando a mesma fórmula molecular ($C_{17}H_{13}NO_3$), mas com diferentes padrões de fragmentação no EM/EM. Observa-se que o íon molecular (m/z 280,0962) sofre inicialmente, em ambas moléculas, uma perda de CH_3 , produzindo fragmentos de íons com m/z de 265,0717 $[M-CH_3]^+$. Em relação ao pico 1 é possível observar uma perda de CO, resultando em m/z de 237,0768 $[M-CH_3-CO]^+$. E por fim, a perda de formaldeído pode levar a formação do fragmento de m/z 207,0654 $[M-CH_2O]^+$. Com base na comparação desses dados obtidos experimentalmente com os dados de fragmentação da literatura sugere-se que o composto 1 trata-se da graveolina (composto 1, Figura 48) (De CARVALHO et al., 2019b; KACEM et al., 2015; O'DONNELL et al., 2006). De maneira semelhante, o pico 2 mostrou uma perda de um grupo metoxil OCH_3 , produzindo fragmentos de m/z de 250,0862 $[M-OCH_3]^+$, sugerindo que o composto 2 pode ser a graveolinina (composto 2, Figura 48) (De CARVALHO et al., 2019b; KACEM et al., 2015; O'DONNELL et al., 2006).

Outro alcaloide identificado foi a skimmianina, de núcleo furanoquinolínico, (composto 5, Figura 48). O composto 5 (t_R = 5,75) mostrou um íon molecular m/z 260,0886 e íons fragmentos m/z 245,0661 $[M-CH_3]^+$ and 230,0430 $[M-CH_3-CH_3]^+$ no modo EM/EM, sugerindo perdas consecutivas de 15 u, as quais podem ser devido à perda de grupos metilas dos grupos metoxilas. Além disso, observaram-se íons fragmentos m/z 216,0615 $[M-CH_3-CO]^+$ e 199,0583 $[M-CH_3-H_2O-CO]^+$. O íon molecular e o padrão de fragmentação são similares aos descritos na literatura (CUTHBERTSON et al., 2013; De CARVALHO et al., 2019b; O'DONNELL et al., 2006).

De maneira similar, foi proposto que o pico 7 (t_R = 6,71) trata-se do alcaloide acridônico conhecido como arborinina (composto 7, Figura 48), baseado no íon

molecular m/z 286,1064, assim como no padrão de fragmentação semelhante aos dados previamente publicados (De CARVALHO et al., 2019b; KACEM et al., 2015).

Em relação aos alcaloides alquilquinolínicos, verificou-se a presença de 3 compostos, sendo eles a 1-metil-2-nonil-4(1H)-quinolínico; 1-metil-2-decil-4(1H)-quinolínico e 1-metil-2-undecil-4(1H)-quinolínico (compostos 10, 12 e 14, Figura 48).

De acordo com a literatura, o rearranjo de McLafferty ocorre em alcaloides quinolínicos, formando sistemas conjugados estáveis com íons fragmentos de m/z 186 e m/z 173 (ZHAO et al., 2015). Dessa forma, íons fragmentos m/z 186 e 173 foram usados para identificar os alcaloides quinolona 10, 12 e 14 (Figura 48), que diferem apenas no número de carbonos da cadeia lateral. Em seguida, comparando os dados do espectro de massas com a literatura (YANG et al., 2016), os picos 10 (m/z 286,2171), 12 (m/z 300,2355) e 14 (m/z 314,2481) foram identificados, respectivamente, como os alcaloides 1-metil-2-nonil-4(1H)-quinolínico, 1-metil-2-decil-4(1H)-quinolínico e 1-metil-2-undecil-4(1H)-quinolínico. Todos esses alcaloides (10, 12 e 14) foram previamente identificados em *R. graveolens* (KOSTOVA et al., 1999).

Outra principal classe de metabólitos encontrada em *R. graveolens* são as cumarinas, sendo que várias já foram isoladas dessa espécie, tais como: umbeliferona, chalepensina, bergapteno, chalepina, psoraleno, xantotoxina, dentre outras (MALIK et al., 2016). As cumarinas têm origem biossintética no ácido *p*-hidroxi-cinâmico, o qual após várias modificações pode formar as furanocumarinas, caracterizadas por um anel furano fundido a benzopirano-2-ona (MALIK et al., 2016; SAMPAIO, 2012).

Neste trabalho foi possível identificar a presença de uma cumarina e 6 furanocumarinas no extrato bruto de *R. graveolens*. A cumarina identificada neste trabalho foi a rutacultina (composto 9, Figura 48) e as furanocumarinas identificadas foram psoraleno, xantotoxina, bergapteno, chalepina, chalepensina e rutamarina, (compostos 3, 4, 6, 8, 11, e 13, Figura 48), respectivamente.

A discussão da identificação por espectrometria de massas dessas substâncias no presente trabalho se dividirá no perfil de fragmentação observado nas cumarinas e furacumarinas não preniladas e preniladas.

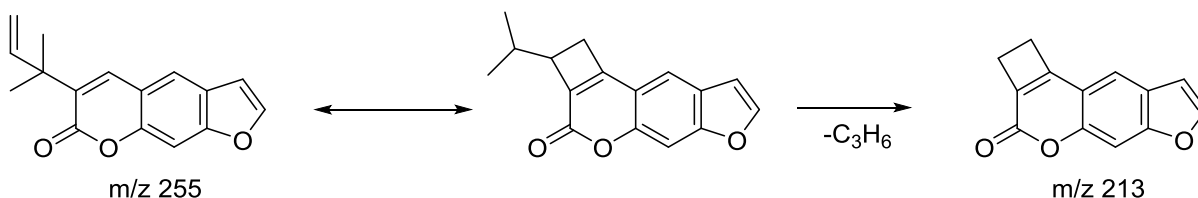
Em relação às análises de dados de massas, observou-se que o espectro de massas do composto 3 (5,48 min) apresentou um íon m/z 187,0374 $[M+H]^+$, com a fórmula molecular $C_{17}H_{13}NO_3$, e com fragmentos principais do íon precursor m/z

187,0374, os íons m/z de 143,0544; 131,0500 e 115,0515, atribuídos às sucessivas perdas de monóxido de carbono e dióxido de carbono. Através da análise do perfil de fragmentação do composto 3 e a comparação com os dados da literatura foi possível sugerir se tratar da substância conhecida como psoraleno (composto 3, Figura 48) (XU et al., 2018; YANG et al., 2017; ZHAO et al., 2016).

No modo positivo, os compostos 4 e 6 produziram o mesmo íon molecular m/z 217,0484 e 217,0454, respectivamente. Além disso, os mesmos íons fragmentos m/z 202 $[M-CH_3]^+$, 174 $[M-CH_3-CO]^+$ e 146 $[M-CO_2-CO]^+$, os quais foram gerados pela perda inicial de um grupo metila seguido da perda de monóxido de carbono e dióxido de carbono. A comparação destes dados juntamente com os dados da literatura, permitiu propor que os compostos 4 e 6 podem ser xantotoxina e bergapteno (composto 4 e 6, Figura 48) (TANG et al., 2014; XU et al., 2018).

Já o perfil de fragmentação de cumarinas e furacumarinas preniladas tem sido descrita por alguns pesquisadores, os quais sugerem uma ciclização da prenila com um carbono adjacente do anel pirano e subsequente perda de C_3H_6 no EM/EM (Figura 49).

Figura 49 - Fragmentação de furanocumarinas preniladas. A chalepentina foi utilizada como modelo.



Fonte: Adaptado de CONCANNON et al. (2000).

Dessa forma, íons fragmentos resultantes desta ciclização e subsequente perda foram usados para identificar as cumarinas e furacumarinas preniladas 8, 9, 11 e 13 (Figura 48).

A cumarina prenilada identificada como rutacultina (composto 9, Figura 48) apresentou íon molecular m/z 275,1223 e através do experimento de fragmentação EM/EM foi possível observar o íon fragmentos m/z 233,0766 (perda C_3H_6) e também o íon fragmento m/z 219,0593 resultante da perda de 2 moléculas de monóxido de carbono.

De maneira semelhante, o composto 8 (Figura 48) identificado como chalepina apresentou íon molecular m/z 315,1586 e íons fragmentos m/z 273,1148 (perda C_3H_6), m/z 259,0970 (perda de $2CO$) e ainda o íon fragmento m/z 255,1037 $[M-(CH_3)_2COH]^+$.

Na análise de dados do espectro de massas do composto 11, chalepensina (composto 11, Figura 48), observou-se o íon molecular m/z 255,0939 e íons fragmentos m/z 213,0515 (perda C_3H_6) e m/z 199,0329 (perda de $2CO$).

E por fim, o composto 13, identificado como rutamarina (composto 13, Figura 48) apresentou íon molecular m/z 357,1557 e íons fragmentos de m/z 315,1187 resultante da ciclização e perda de C_3H_6 e de m/z 297,1399 $[CH_3COOH]$.

Com base nos padrões de fragmentação dessas substâncias, juntamente com dados previamente publicados sugere-se que estes compostos sejam chalepina, rutacultina, chalepensina e rutamarina (composto 8, 9, 11 e 13, Figura 48) (De CARVALHO et al., 2019b; KACEM et al., 2015; QUINTANILLA-LICEA et al., 2014; UENG et al., 2011; WAHYUNI et al., 2014).

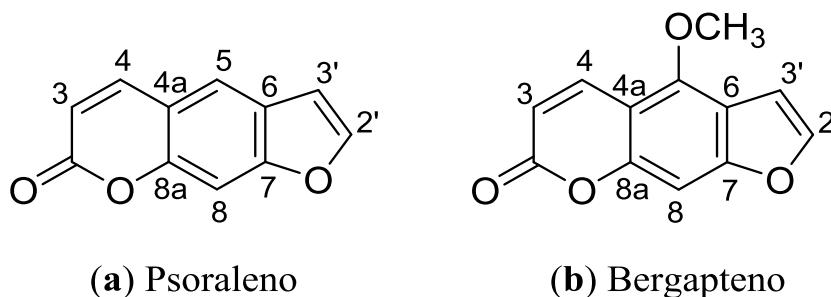
5.5.2 Isolamento e identificação estrutural das substâncias isoladas do extrato de *R. graveolens*

Como descrito no anterior, o extrato bruto de *R. graveolens* apresentou, no ensaio de UF acoplada à CLUE-EM, alguns ligantes da enzima apirase de batata. Com o intuito de isolar um ou mais ligantes, este extrato foi submetido a procedimentos de fracionamento. Dessa forma, após a produção do extrato bruto etanólico das partes aéreas de *R. graveolens*, e sucessivos processos cromatográficos, isolaram-se 4 substâncias, dentre elas cumarinas e alcaloides. Cabe destacar que a arborinina (ligante identificado por CLUE-ESI-QTOF-EM no ensaio de ultrafiltração) foi uma das substâncias isoladas.

5.5.2.1 Identificação das substâncias RgF2. 30-35 e RgF2. 61-72

As furanocumarinas RgF2. 30-35 e RgF2. 61-72, após isolamento, tiveram suas estruturas identificadas com base na análise dos dados de RMN de 1H e ^{13}C e comparação com os dados encontrados na literatura. Na Figura 50 estão representadas suas estruturas químicas.

Figura 50 - Estruturas químicas do psoraleno (RgF2. 30-35) e bergapteno (RgF2. 61-72).



Fonte: Elaborado pela própria autora.

Os espectros de RMN de ^1H (Figura 51 e 52) apresentaram sinais típicos do esqueleto cumarínico, com dupletos característicos de hidrogênios do anel lactônico em δ 6,38 ($J = 9,6$ Hz, 1H, d , H3) e em δ 7,80 ($J = 9,6$ Hz, 1H, d , H4) para a substância RgF2. 30-35; em δ 6,27 ($J = 9,8$ Hz, 1H, d , H3) e em δ 8,15 ($J = 9,8$ Hz, 1H, d , H4), para a substância RgF2. 61-72. Outros sinais observados são pertencentes aos anéis furânicos dissustituídos em δ 7,69 ($J = 2,1$ Hz, 1H, d , H2') e em δ 6,83 (1H, m , H3') para a substância RgF2. 30-35; em δ 7,59 ($J = 2,4$ Hz, 1H, d , H2') e em δ 7,02 (1H, m , H3') para a substância RgF2. 61-72. Todos os sinais referentes aos hidrogênios observados estão na Tabela 13.

Para a substância RgF2. 30-35, observam-se dois simpletos com deslocamento químico em δ 7,68 e em δ 7,48, integrados para 1 hidrogênio cada, referentes aos hidrogênios aromáticos H5 e H8, respectivamente.

Para a substância RgF2. 61-72 o espectro de RMN de ^1H apresenta apenas um simpleto em δ 7,13, integrado para 1 hidrogênio, o qual foi associado ao hidrogênio H8. Além disso, observou-se um sinal em δ 4,27 (3H, s) que é relativo à metoxila da estrutura.

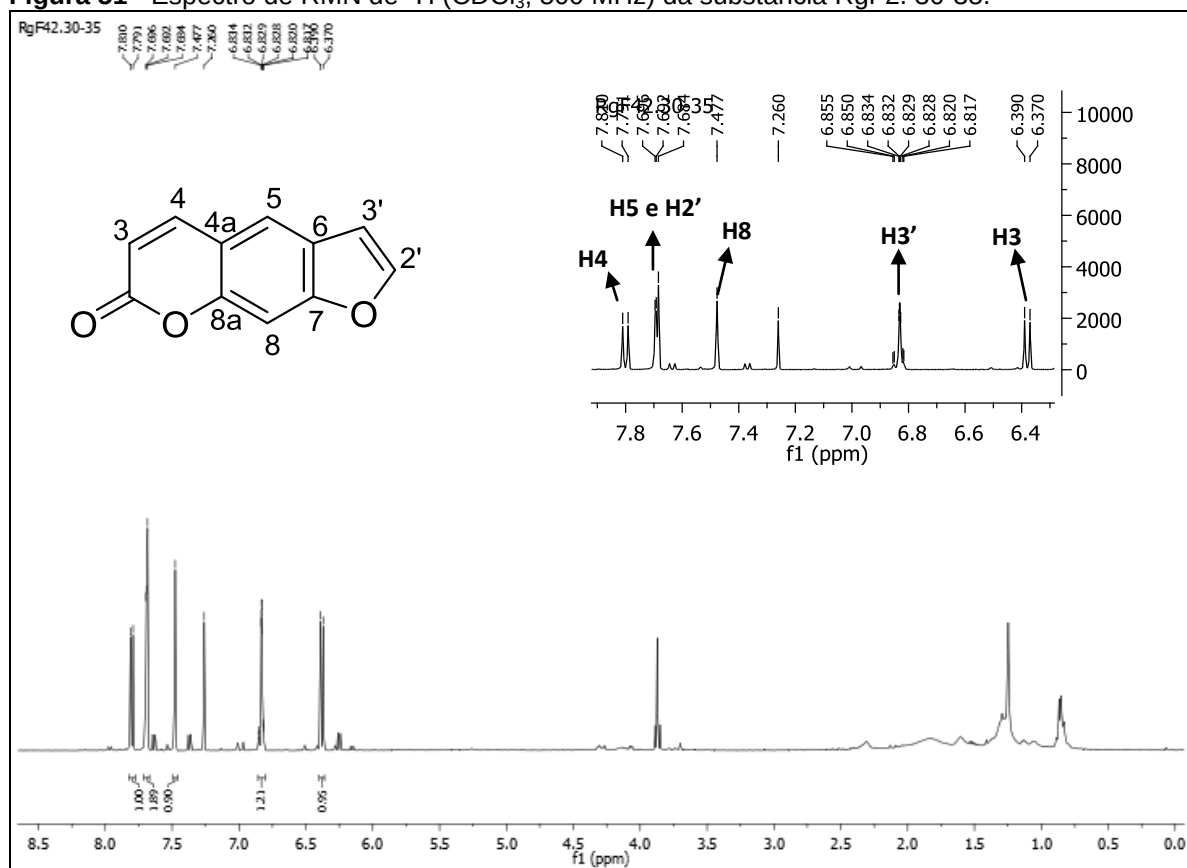
Segundo SAMPAIO (2012), nos espectros de RMN de ^1H de cumarinas que possuem substituintes oxigenados na posição C5, os hidrogênios H4 apresentam-se desblindados, com valores de deslocamento químico em torno de δ 8,00, devido ao efeito anisotrópico da ligação C-O na posição 5. Dessa forma, o sinal do H4 encontra-se mais desblindado, em torno de δ 8,15 no espectro da substância RgF2. 61-72, indicando que a posição C5 pode estar substituída (SAMPAlO, 2012).

Segundo MURRAY, JORGE (1984), um método simples para diferenciação entre furanocumarinas lineares e angulares é o deslocamento químico do sinal do grupo metoxila. Assim, os grupos metoxilas que apresentam sinais que absorvem

acima de δ 4,15 indicam furanocumarinas lineares, enquanto as que absorvem abaixo de δ 4,15 caracterizam furanocumarinas angulares. Assim, como o sinal da metoxila se mostra mais desblindado (δ 4,27), podemos sugerir que essa cumarina seja linear (MURRAY, JORGE, 1984).

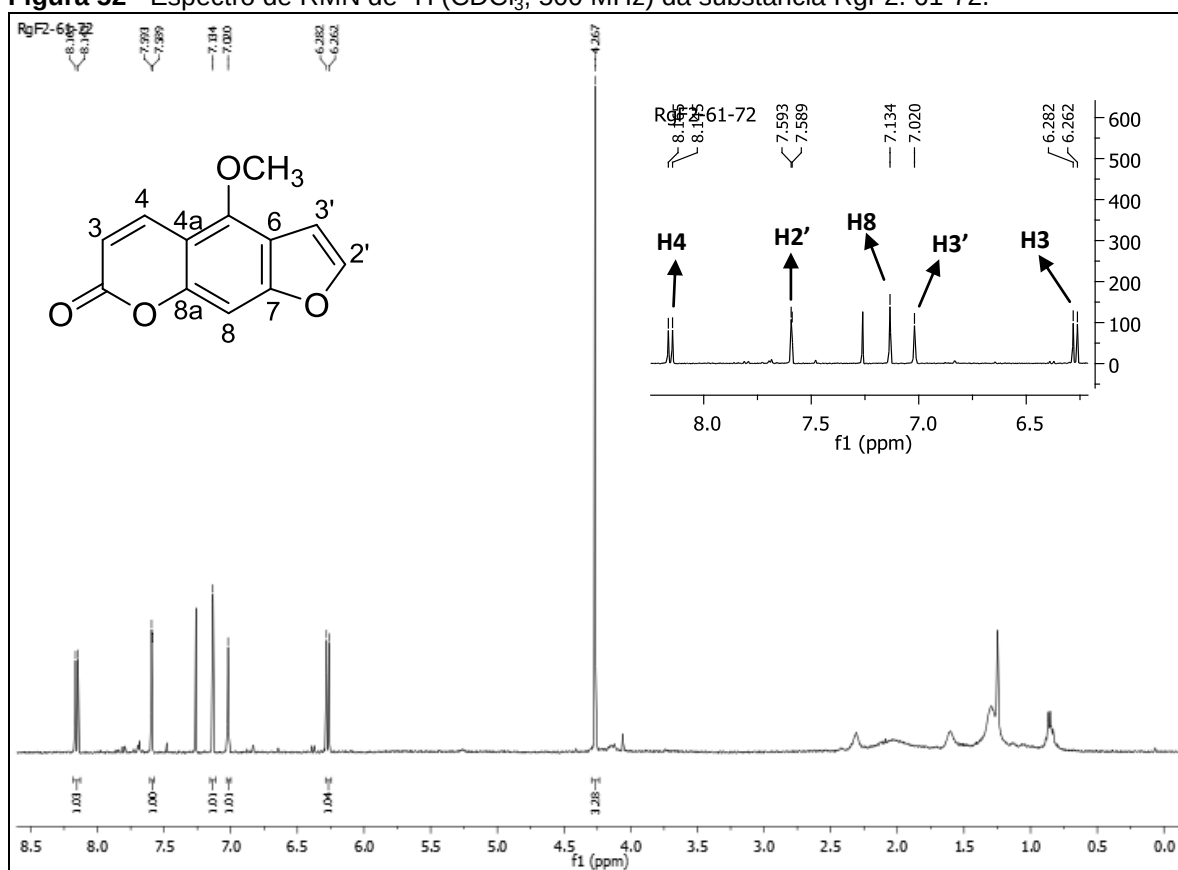
Os dados de RMN de ^1H associado aos dados de RMN de ^{13}C (Tabela 14), comparados com os dados encontrados na literatura (NGADJUI et al., 1998; MASSUDA et al., 1998; SAMPAIO, 2012), permitiram propor que a substância RgF2. 30-35 trata-se do Psoraleno (Figura 50a) e a substância RgF2. 61-72 trata-se do Bergapteno (Figura 50b).

Figura 51 - Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 ; 500 MHz) da substância RgF2. 30-35.



Fonte: Elaborado pela própria autora.

Figura 52 - Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 ; 500 MHz) da substância RgF2. 61-72.



Fonte: Elaborado pela própria autora.

Tabela 13 - Dados dos espectros de RMN de ^1H (CDCl_3 ; 500 MHz) para as substâncias RgF2. 30-35 e RgF2. 61-72.

Psoraleno (RgF2. 30-35)			Bergapteno (RgF2. 61-72)	
Hidrogênios	RgF2. 30-35 (a)	NGADJUI et al., 1998 (b)	RgF2. 61-72 (a)	MASSUDA et al., 1998 (b)
δ (ppm)				
3	6,38 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 9,6 Hz)	6,39 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 9,8 Hz)	6,27 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 9,8 Hz)	6,26 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 9,8 Hz)
4	7,80 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 9,6 Hz)	7,81 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 9,8 Hz)	8,15 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 9,8 Hz)	8,15 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 9,8 Hz)
5	7,68 (1H, <i>s</i>)	7,70 (1H, <i>s</i>)	-	-
8	7,48 (1H, <i>s</i>)	7,49 (1H, <i>s</i>)	7,13 (1H, <i>s</i>)	7,12 (1H, <i>s</i>)
2'	7,69 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,1 Hz)	7,70 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,3 Hz)	7,59 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,4 Hz)	7,59 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,5 Hz)
3'	6,83 (1H, <i>m</i>)	6,84 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 0,8 e 2,2 Hz)	7,02 (1H, <i>m</i>)	7,02 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,5 Hz)
5-OMe	-	-	4,27 (3H, <i>s</i>)	4,27 (3H, <i>s</i>)

(a) 500 MHz, CDCl_3 ; (b) 300 MHz, CDCl_3

Fonte: Elaborado pela própria autora.

Tabela 14 - Dados dos espectros de RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 125 MHz) para as substâncias RgF2. 30-35 e RgF2. 61-72.

Psoraleno (RgF2. 30-35)			Bergapteno (RgF2. 61-72)	
Carbono	RgF2. 30-35 (a)	SAMPAIO, 2012 (b)	RgF2. 61-72 (a)	SAMPAIO, 2012 (b)
δ (ppm)				
2	161,2	161,3	161,4	161,2
3	114,8	115,0	112,6	112,6
4	144,2	144,5	139,4	139,2
4a	115,6	115,7	149,7	149,6
5	120,0	120,1	106,5	106,5
6	125,0	125,2	112,8	112,8
7	156,6	156,7	158,5	158,4
8	100,0	100,2	94,0	93,9
8^a	152,2	152,4	152,8	152,8
2'	147,1	147,2	144,9	144,8
3'	106,5	106,7	106,1	105,0
5-OMe	-	-	60,2	60,1

(a) 125 MHz, CDCl_3 ; (b) 50 MHz, CDCl_3

Fonte: Elaborado pela própria autora.

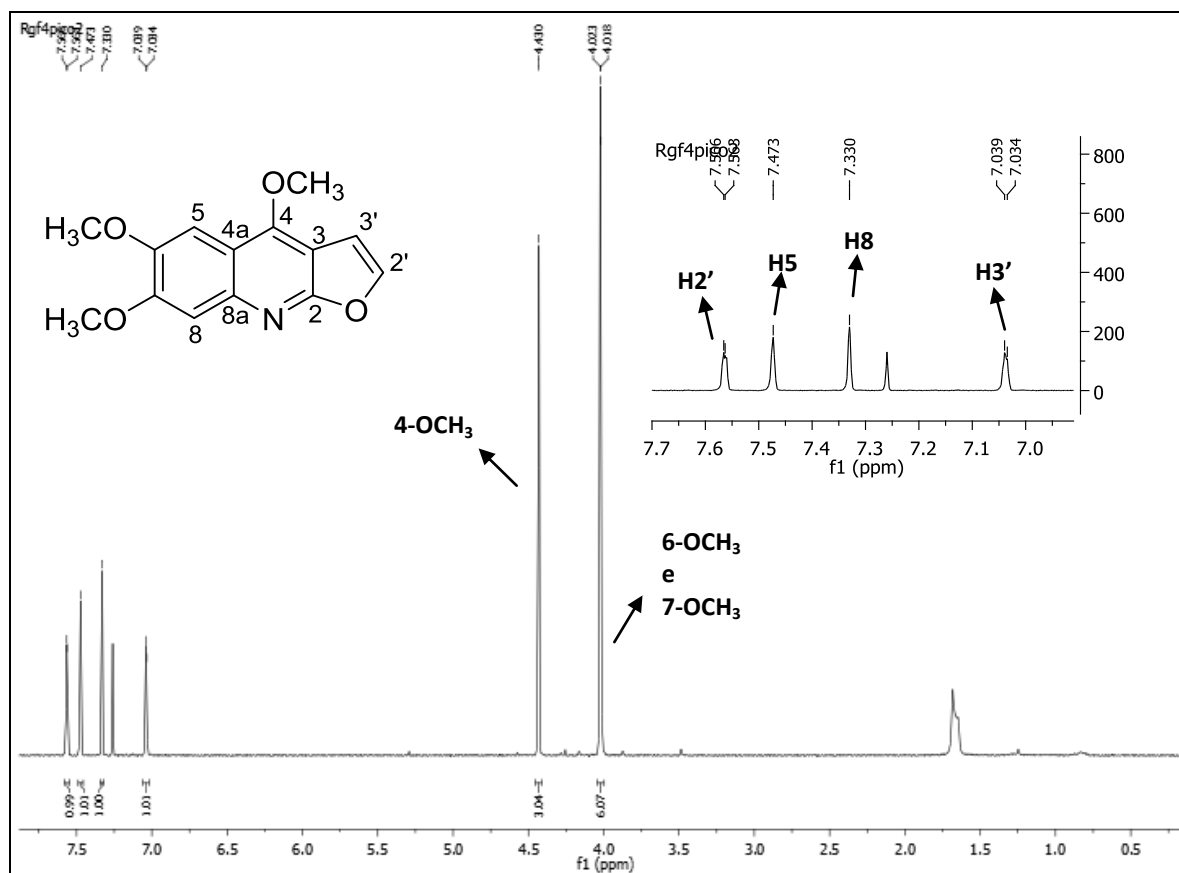
5.5.2.2 Identificação da substância RgF4 pico2

Alcaloides furanoquinolínicos apresentam características bastante peculiares em seus espectros de RMN de ^1H facilitando sua caracterização: um simpleto em aproximadamente δ 4,4, relativo à metoxila em C4, e dois dupletos ($J = 2,8$ Hz) próximo a δ 7,65 e δ 7,10 referentes aos hidrogênios furânicos H2' e H3' (SIMOTE, 2006).

O espectro de RMN de ^1H (Figura 53) da substância RgF4 pico2 apresentou um sinal com deslocamento químico em δ 4,43 (3H, s), relativo aos hidrogênios metoxílicos em C4 e dois dupletos com deslocamento químico em δ 7,56 ($J = 1,3$ Hz, 1H) e em δ 7,03 ($J = 2,5$ Hz, 1H), referentes aos hidrogênios H2' e H3', respectivamente.

Outros sinais observados aparecem na região aromática, em δ 7,47 (1H, s) e em δ 7,33 (1H, s), os quais foram atribuídos aos hidrogênios H5 e H8, respectivamente. Foram observados também, dois simpletos sobrepostos com deslocamento químico em δ 4,02 (6H, s), referentes aos grupos metoxilas C6 e C7.

No espectro de RMN de ^{13}C , foram observados 14 sinais, sendo três atribuídos às metoxilas em δ 59,0, δ 56,2 e δ 56,1. Todos os sinais referentes aos hidrogênios e carbonos observados estão descritos nas Tabelas 15 e 16. Estes dados, comparados com os da literatura (PUSSET et al., 1991) permitiram propor que a substância RgF4 pico2 trata-se de um alcaloide, conhecido como Kokusaginina (Figura 54a).

Figura 53 - Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 ; 500 MHz) da substância RgF4 pico2.

Fonte: Elaborado pela própria autora.

Tabela 15 - Dados do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 ; 500 MHz) para substância RgF4 pico2.

Kokusaginina (RgF4 pico 2)		
Hidrogênio	RgF4 pico 2 (a)	PUSSET, 1991 (b)
	δ (ppm)	
2'	7,56 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 1,3 Hz)	7,52 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,7 Hz)
3'	7,03 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,5 Hz)	6,97 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,7 Hz)
5	7,47 (1H, <i>s</i>)	7,41 (1H, <i>s</i>)
8	7,33 (1H, <i>s</i>)	7,31 (1H, <i>s</i>)
4-OMe	4,43 (3H, <i>s</i>)	4,37 (3H, <i>s</i>)
6-OMe	4,02 (3H, <i>s</i>)	4,00 (3H, <i>s</i>)
7-OMe	4,02 (3H, <i>s</i>)	4,02 (3H, <i>s</i>)

(a) 500 MHz, CDCl_3 ; (b) CDCl_3

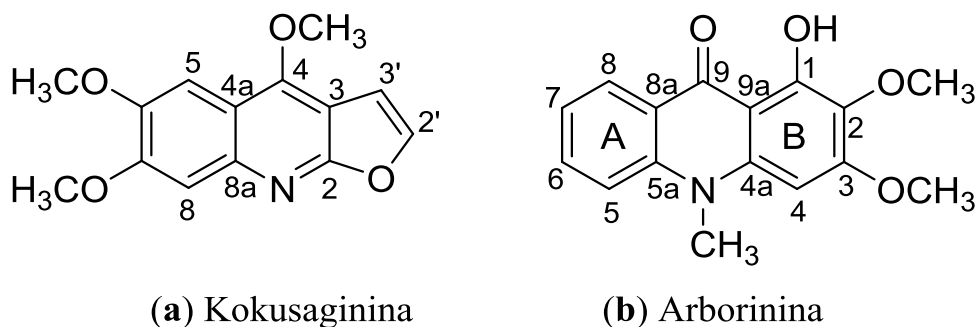
Fonte: Elaborado pela própria autora.

Tabela 16 - Dados do espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 125 MHz) para substância RgF4 pico2.

Kokusaginina (RgF4 pico 2)		
Carbono	RgF4 pico 2 (a)	PUSSET, 1991 (b)
δ (ppm)		
2	163,2	163,1
3	102,4	102,3
4	155,7	155,6
4a	113,1	113,1
5	100,4	100,4
6	147,9	147,9
7	152,7	152,8
8	106,9	106,7
8a	142,7	142,7
2'	142,6	142,4
3'	104,7	104,5
4-OMe	59,0	58,8
6-OMe	56,1	56,0
7-OMe	56,2	56,0

(a) 125 MHz, CDCl_3 ; (b) CDCl_3

Fonte: Elaborado pela própria autora.

Figura 54: Estruturas químicas da kokusaginina (RgF4 pico2) e arborinina (RgF4 pico4. 61-72).

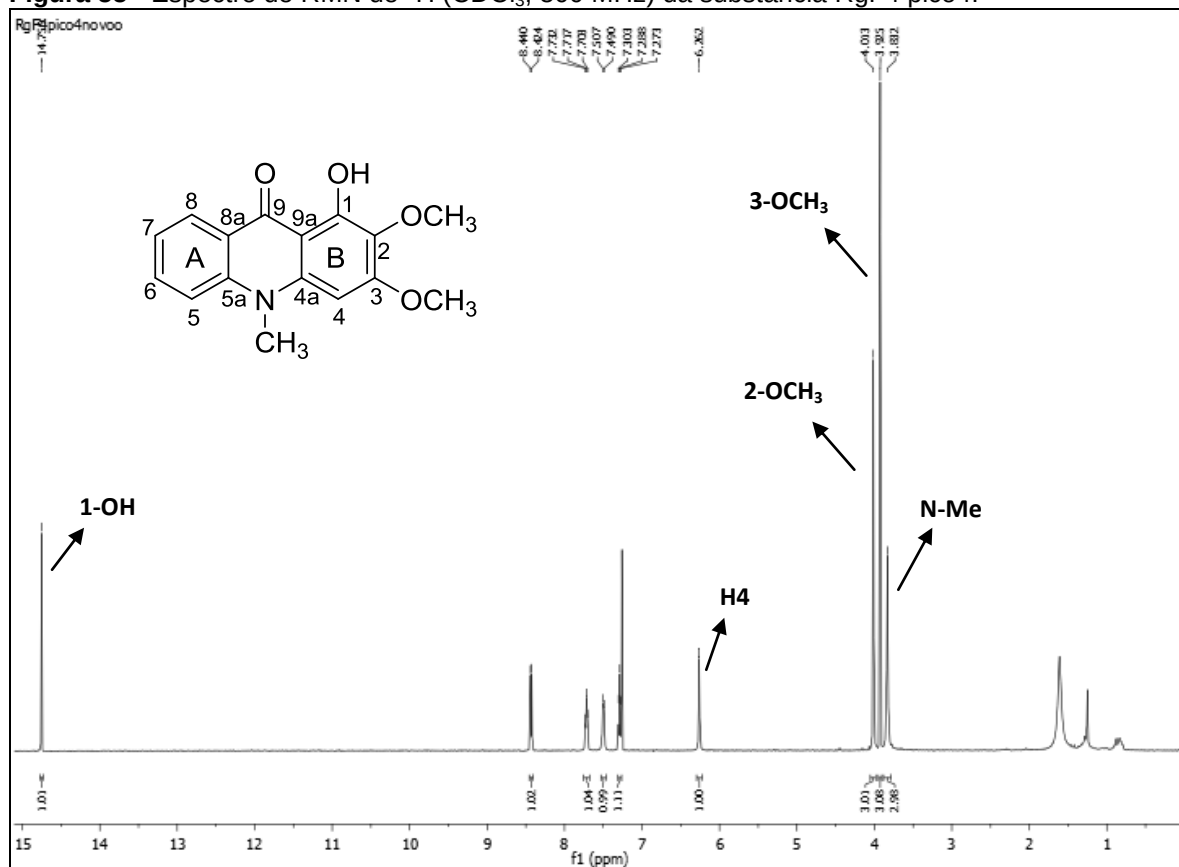
Fonte: Elaborado pela própria autora.

5.5.2.3 Identificação da substância RgF4 pico4

O espectro de RMN de ^1H da substância RgF4 pico 4 também apresentou sinais característicos na região de hidrogênios aromáticos em: δ 7,50 ($J = 8,3$ Hz, 1H, d); δ 7,72 ($J = 7,5$ Hz, 1H, t); δ 7,29 ($J = 7,4$ Hz, 1H, t) e δ 8,43 ($J = 7,9$ Hz, 1H, d). Esses sinais foram atribuídos aos hidrogênios do anel A, referentes aos hidrogênios H5, H6, H7 e H8 (Figura 55 e 56). A partir das multiplicidades e constantes de acoplamento observadas, pode-se concluir sobre o perfil de substituição e de acoplamento do anel A. Neste, observa-se o acoplamento em orto de H5 com H6, H6 com H7 e H7 com H8.

Além disso, outro sinal observado na região de hidrogênios aromáticos é o sinal com deslocamento químico em δ 6,26 (1H, s) referente ao H4. Foi possível observar ainda sinais com deslocamento químicos em δ 3,83 (3H, s); δ 3,93 (3H, s) e δ 4,01 (3H, s), os quais foram associados a grupos metilas ligados a heteroátomos (N ou O) (Figura 55).

Figura 55 - Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 ; 500 MHz) da substância RgF4 pico4.

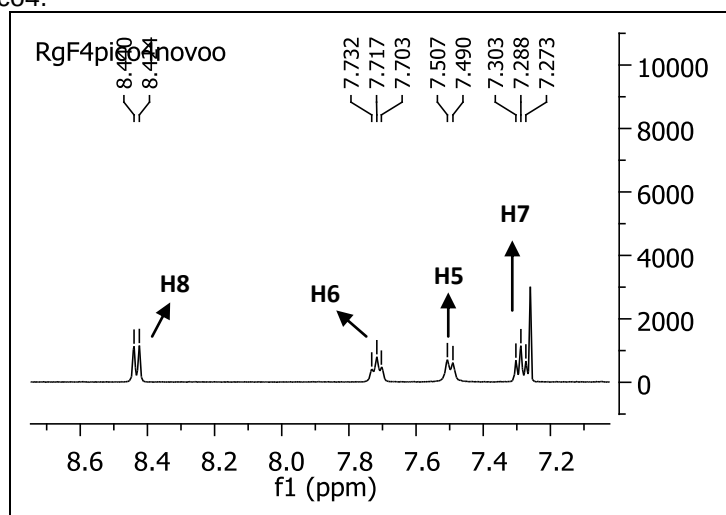


Fonte: Elaborado pela própria autora.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 57) da substância RgF4 pico 4 apresentou 16 sinais de carbono, dentre eles: o sinal em δ 180,9, referente à carbonila da posição C9, o sinal em δ 34,3, atribuído aos hidrogênios metílicos N-Me; os sinais em δ 60,9 e δ 56,1 relativos aos hidrogênios metoxílicos O-Me nas posições 2 e 3, respectivamente. Todos os outros sinais foram atribuídos aos demais carbonos aromáticos. Com a análise dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C , e a comparação com os dados da literatura (HAQUE et al., 2013; MAFEZOLI, 2002), foi possível propor que a substância RgF4 pico4 trata-se de um alcaloide acridônico, conhecido

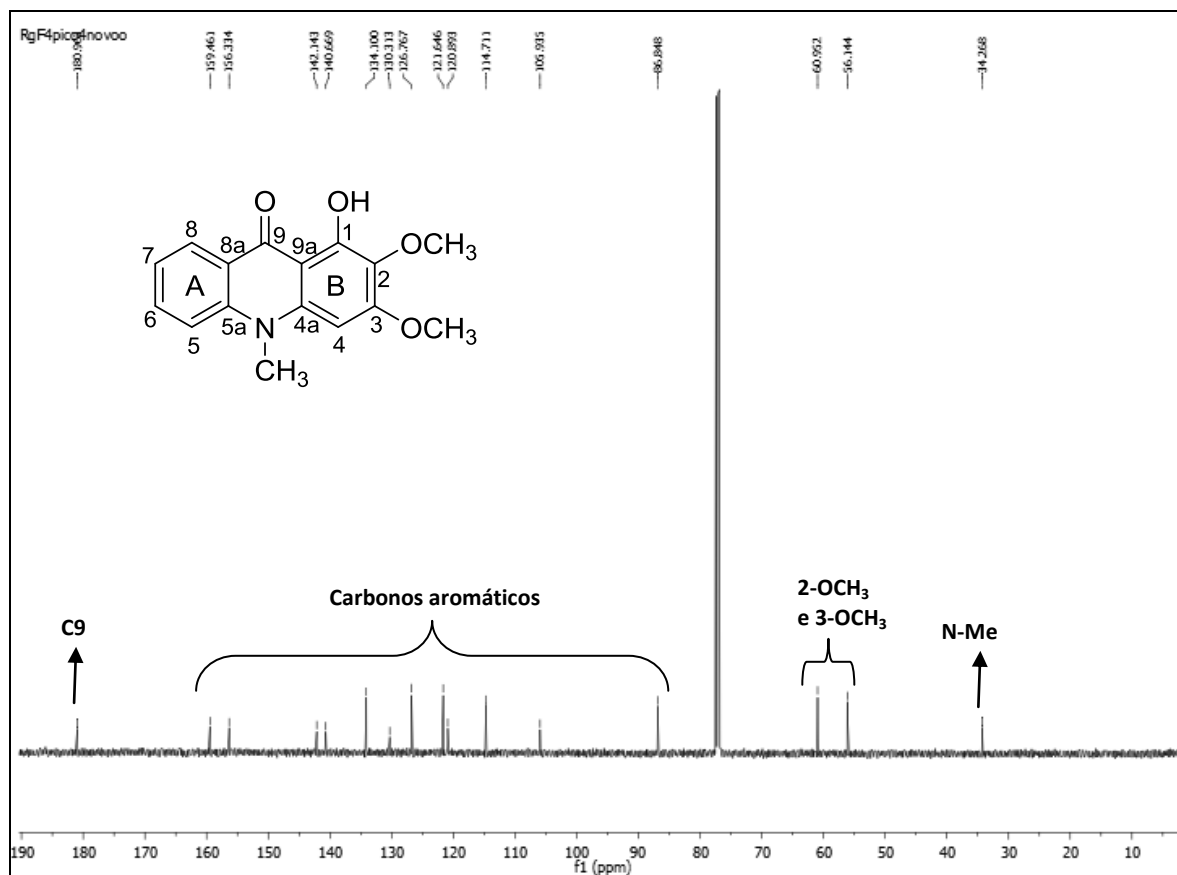
como arborinina (Figura 54b). Todos os sinais referentes aos hidrogênios e carbonos observados estão na Tabela 17 e 18.

Figura 56 - Seção expandida entre δ 8,6 – 7,2 do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 ; 500 MHz) da substância RgF4 pico4.



Fonte: Elaborado pela própria autora.

Figura 57 - Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 125 MHz) da substância RgF4 pico4.



Fonte: Elaborado pela própria autora.

Tabela 17 - Dados do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 ; 500 MHz) para substância RgF4 pico4.

Arborinina (RgF4 pico 4)		
Hidrogênio	RgF4 pico 4 (a)	HAQUE et al., 2013 (b)
	δ (ppm)	
1	14,7	
4	6,26 (1H, s)	6,29 (1H, s)
5	7,50 (1H, d, $J = 8,3$ Hz)	7,51 (1H, d, $J = 8,8$ Hz)
6	7,72 (1H, t, $J = 7,5$ Hz)	7,72 (1H, ddd, $J = 7,2$ Hz)
7	7,29 (1H, t, $J = 7,4$ Hz)	7,30 (1H, t, $J = 7,4$ Hz)
8	8,43 (1H, d, $J = 7,9$ Hz)	8,47 (1H, dd, $J = 6,4$ Hz)
N-Me	3,83 (3H, s)	3,85 (3H, s)
3-OMe	3,93 (3H, s)	3,93 (3H, s)
2-OMe	4,01 (3H, s)	4,02 (3H, s)

(a) 500 MHz, CDCl_3 ; (b) 400 MHz, CDCl_3

Fonte: Elaborado pela própria autora.

Tabela 18 - Dados do espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 125 MHz) para substância RgF4 pico4.

Arborinina (RgF4pico 4)		
Carbono	RgF4 pico 4 (a)	MAFEZOLI, 2002 (b)
	δ (ppm)	
1	156,3	155,7
2	130,3	129,9
3	159,5	159,1
4	86,8	86,7
5	114,7	114,5
6	134,1	133,7
7	121,6	121,2
8	126,8	126,0
9	180,9	180,4
4 ^a	140,7	140,1
9 ^a	105,9	105,3
8 ^a	120,9	120,3
5 ^a	142,1	141,6
N-Me	34,3	33,8
2-OMe	60,9	60,6
3-OMe	56,1	55,8

(a) 125 MHz, CDCl_3 ; (b) 50 MHz, CDCl_3

Fonte: Elaborado pela própria autora.

5.5.3 Avaliação da atividade esquistossomicida *in vitro* do extrato de *R. graveolens* e da arborinina frente à vermes adultos de *S. mansoni*

Como descrito anteriormente, por meio do ensaio de UF, selecionaram-se os extratos vegetais que apresentaram ligantes da enzima apirase, a qual apresenta homologia com as ATP difosfohidrolases de *S. mansoni*. Dessa forma, avaliou-se a atividade *in vitro* desses extratos frente à vermes adultos de *S. mansoni*.

Utilizou-se como controle negativo o meio RPMI 1640 e DMSO a 0,5% em meio RPMI 1640, com a finalidade de comprovar que o meio de cultura e o solvente utilizado para diluição do extrato e das substâncias não exercem efeitos sobre os vermes testados. De fato, nenhum efeito relacionado à morte ou à atividade motora, foi observado para os controles negativos nos experimentos realizados. O PZQ, controle positivo utilizado, promoveu a morte de todos os vermes em 24 h de incubação, na concentração de 2 μ M (Tabela 19).

Em relação ao extrato de *R. graveolens*, este apresentou atividade esquistossomicida *in vitro*. Como pode-se observar na Tabela 19, a fração Rg-F4 causou a morte de todos os vermes após 24 h de incubação, nas concentrações de 100 e 50 μ g/mL. Além disso, verifica-se a morte de todos os vermes machos, após 24 h de incubação com a fração Rg-F4, (6,25 μ g/mL) e, após 72 h de incubação, ocorre a morte das fêmeas, nesta mesma concentração. As outras frações, oriundas dos processos cromatográficos do extrato de *R. graveolens*, também foram avaliadas, porém não apresentaram atividade esquistossomicida relevante (dados não mostrados).

A arborinina também foi avaliada quanto a sua atividade esquistossomicida *in vitro* frente à vermes adultos de *S. mansoni*. Na concentração testada (50 μ M) a arborinina não apresentou atividade esquistossomicida.

A atividade antiparasitária de extratos de *R. graveolens* tem sido relacionada aos alcaloides presentes nestes extratos. No trabalho de MWANGI e colaboradores (2010), alguns alcaloides foram avaliados frente à diversos parasitos. A arborinina apresentou atividade antiparasitária frente ao *P. falciparum*, *T. brucei rhodesiense*, *L. donovani* e *T. cruzi* com IC₅₀ de 1,61 μ g/mL; 23,52 μ g/mL; 5,20 μ g/mL e maior que 30 μ g/mL, respectivamente (MWANGI et al., 2010). Outro estudo avaliou, por meio de *docking* molecular, a ligação de vários alcaloides com alvos proteicos de *Leishmania*. Neste caso, arborinina apresentou notável acoplamento com o alvo proteico LmajMetRS de *L. donovani* (OGUNGBE, NG, SETZER, 2013).

Apesar da literatura relatar a atividade antiparasitária da arborinina, o presente trabalho evidenciou que essa substância não apresenta atividade esquistossomicida *in vitro* frente à vermes adultos de *S. mansoni* na concentração testada.

Tabela 19 - Atividade esquistossomícida *in vitro* do extrato de *R. graveolens* sobre os vermes adultos de *S. mansoni*.

Grupos	Tempo de incubação (h)	Mortalidade (%) ^a		Redução da atividade motora (%) ^a			
				Leve		Significativa	
		M	F	M	F	M	F
Controle ^b	24	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0
DMSO 0,5% ^c	24	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0
PZQ	24	100	100	0	0	100	100
2 µM	48	100	100	0	0	100	100
	72	100	100	0	0	100	100
Rg ^d	24	0	0	100	100	0	0
100 µg/mL	48	100	100	0	0	100	100
	72	100	100	0	0	100	100
50 µg/mL	24	0	0	100	100	0	0
	48	0	0	100	100	0	0
	72	100	100	0	0	100	100
25 µg/mL	24	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0
Rg-F4 ^e	24	100	100	0	0	100	100
100 µg/mL	48	100	100	0	0	100	100
	72	100	100	0	0	100	100
50 µg/mL	24	100	100	0	0	100	100
	48	100	100	0	0	100	100
	72	100	100	0	0	100	100
25 µg/mL	24	100	40	0	0	100	100
	48	100	100	0	0	100	100
	72	100	100	0	0	100	100
12,5 µg/mL	24	100	0	0	0	100	100
	48	100	60	0	0	100	100
	72	100	100	0	0	100	100
6,25 µg/mL	24	100	0	0	0	100	100
	48	100	0	0	0	100	100
	72	100	100	0	0	100	100
3,125 µg/mL	24	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0
	72	20	0	100	100	0	0
1,56 µg/mL	24	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0
Arborinina	24	0	0	0	0	0	0
50 µM	48	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0

^a Porcentagem em relação a 20 vermes. ^b Meio RPMI. ^c DMSO em meio RPMI. ^d Extrato bruto etanólico das partes aéreas de *R. graveolens*. ^e Subfração Rg-F4.

5.5.4 Ensaio de inibição da atividade enzimática da apirase de batata pela arborinina

Tendo em vista que a arborinina se apresentou como um ligante da apirase no ensaio de UF, investigou-se a atividade inibitória *in vitro* dessa substância frente à apirase de batata.

Como pode-se observar na Figura 58, a arborinina foi capaz de diminuir a atividade enzimática da apirase de batata, principalmente na concentração de 100 μ M. Nas menores concentrações testadas de arborinina (25 e 50 μ M) a inibição da enzima foi de 31,32 e 33,06%. Já na concentração de 100 μ M a inibição chegou a 50% da atividade enzimática.

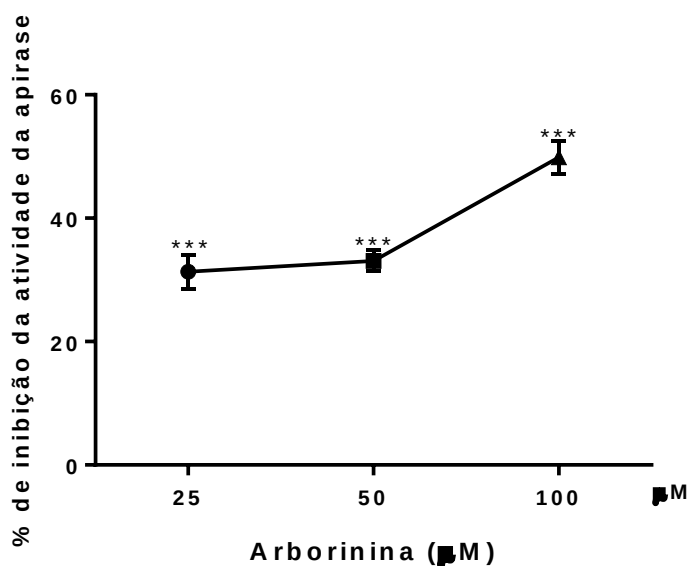
Estudos demonstram o potencial de inibição enzimática apresentado por extratos de *R. graveolens* frente a diferentes enzimas. STAFFORD e colaboradores (2007) evidenciaram significativa habilidade de inibição da enzima monoaminoxidase pelos extratos aquoso, etanólico e acetato de etila das folhas de *R. graveolens*. Em outro estudo o extrato hexânico dessa planta promoveu potente inibição das enzimas acetilcolinesterase e butirilcolinesterase (WSZELAKI, KUCIUN, KISS, 2010).

Na literatura também há relatos dos efeitos inibitórios enzimáticos promovidos por alcaloides acridônicos. Cabe destacar a inibição dessa classe de substâncias na enzima DYRKIA1, enzima envolvida em doenças neurodegenerativas, e também a inibição da atividade da acetilcolinesterase pela arborinina (MICHAEL, 2017).

Além disso, como descrito anteriormente, a arborinina apresenta ligação com outras enzimas, como alvos enzimáticos presentes em *Leishmania* sp (OGUNGBE, NG, SETZER, 2013).

Para complementar essa proposta, estudos de modelagem computacional também foram realizados com a finalidade de verificar a capacidade de ligação da arborinina na apirase e também em outras enzimas.

Figura 58 - Inibição da atividade enzimática da apirase de *S. tuberosum* pela arborinina.



*** Diferença significativa quando comparado com o controle negativo ($p < 0,0001$).

Fonte: Elaborado pela própria autora.

5.5.5 Estudos de *docking* molecular

Nos estudos de *docking* molecular do presente trabalho utilizou-se o software AutoDock Vina 1.1.2 (Maio 11, 2011) levando em consideração para análise o valor de afinidade (Kcal/mol) e as interações moleculares entre os compostos submetidos e os resíduos flexíveis da proteína, conforme mostrado na Tabela 20. Nesta tabela, estão descritos os resultados da arborinina submetida ao *docking* molecular com a proteína SmATPDase1, SmATPDase2, ambas de *S. mansoni* e apirase da batata.

Nestes estudos de *docking* molecular, a arborinina apresentou valores negativos de energia (afinidade) com todas as proteínas avaliadas, sugerindo que as interações (ponte de hidrogênio e dipolo-induzido) entre o sítio ativo e o composto podem ocorrer de forma espontânea. Além disso, verifica-se que os valores de K_i calculados foram 1,37 µM para SmATPDase 1; 0,25 µM para SmATPDase 2 e 0,82 µM para apirase, evidenciando assim, que a menor concentração dessa molécula inibiria o sítio ativo da SmATPDase 2 (Tabela 20).

Em 2008, foram descritos dois modelos catalíticos para as NTPDases. Um deles, utilizaram a NTPDase 2 proveniente de *Rattus norvegicus* para a criação do modelo, o qual se baseia no ataque nucleofílico de uma molécula de água no grupo fosfato terminal (γ -fosfato) de um análogo de ATP, por meio de um processo de

hidrólise. A água nucleofílica responsável pelo ataque é ativada pelo resíduo GLU165, que devido a sua proximidade com a água catalítica e posicionamento, facilita a transferência de elétrons. Outros resíduos também influenciam o posicionamento da água nucleofílica, como ALA123 e SER206 (ZEBISCH, STRATER, 2008).

Outro modelo foi o proposto por KOZAKIEWICZ e colaboradores (2008). Neste modelo utiliza-se a NTPDase 1 proveniente da apirase de batata, e sugere-se que o resíduo SER54 posicionado próximo aos fosfatos γ do ATP, seria responsável pelo posicionamento do ATP no sítio ativo; e o resíduo THR55 posicionado próximo aos fosfatos β do ATP, auxilia na conversão de ATP em AMP ativando a água catalítica. Outros resíduos também são citados como importantes no mecanismo de ação, como o THR127 e GLU170 (KOZAKIEWICZ et al., 2008).

No presente trabalho, os resíduos GLU201, LYS279, SER81, THR82, LYS85, TYR397, ASP78, THR154, SER54, THR55, THR127 e GLU170 são compatíveis com os dois modelos apresentados acima. Dessa forma, observa-se que a arborinina apresentou interações envolvendo os resíduos GLU201 e THR82, considerados importantes para que ocorra a inibição da enzima (Tabela 20).

Nas análises *in silico* da toxicidade, a arborinina e o fármaco de escolha para tratamento da esquistossomose, Praziquantel, foram avaliados. Conforme descrito anteriormente, estes estudos foram realizados nos programas SwissADME e Molinspiration e a biodisponibilidade oral teórica dos ligantes foram determinadas pela RO5 e pelo nrotb.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 21, a arborinina ao ser comparada com o Praziquantel, apresenta boa disponibilidade oral e um perfil de baixo risco de citotoxicidade, pois não demonstrou violação a nenhum dos parâmetros de RO5. Além disso, a arborinina apresentou nrotb igual a 2 e TPSA igual a 60,70, os quais estão de acordo com os valores esperados para que o composto seja seguro e apresente boa disponibilidade oral quanto ao seu uso terapêutico (BORGES, 2018; VEBER et al., 2002).

No presente trabalho evidenciamos que a arborinina é capaz de se ligar e inibir a enzima apirase. Além disso, os estudos de *docking* molecular sugerem que a arborinina se liga aos resíduos dos sítios ativos da apirase, SmATPase 1 e 2, em concentrações bem pequenas. Dessa forma, esperava-se que esta substância

apresentasse atividade esquistossomicida. Porém este efeito não foi observado no ensaio esquistossomicida *in vitro*, na concentração avaliada.

É possível que essa atividade esquistossomicida seja visualizada em ensaios esquistossomicidas *in vivo*, já que há uma relação importante entre as ATP difosfohidrolases de *S. mansoni* e sua sobrevivência no organismo do hospedeiro.

Tabela 20 - Resultados dos estudos de *docking* molecular da arborinina com SmATPDase 1, SmATPDase 2 e apirase.

Receptor	AutoDock Vina (Kcal/mol)	K _i calculado (μM)	Interações (AutoDock Vina)
SmATPDase 1	-8,0	1,3675	GLU201, THR82
SmATPDase 2	-9,0	0,2529	ARG51, GLU164
Apirase	-8,3	0,8241	GLU145

Fonte: Elaborado pela própria autora.

Tabela 21 - Resultados de predição de toxicidade da arborinina, utilizando os programas SwissADME (SA) e Molinspiration (MI).

Amostra	Doador de ligação de hidrogênio	Aceptor de ligação de hidrogênio	nrotb	Massa molar (g/mol)		LogP		TPSA	
	MI/SA	MI/SA	MI/SA	MI	SA	MI	SA	MI	SA
Praziquantel	0	4	1	312,41	312,41	2,74	3,01	40,62	40,62
Arborinina	1	4	2	285,29	285,29	2,22	2,68	66,70	60,69

Fonte: Elaborado pela própria autora.

5.6 CONCLUSÃO

No presente capítulo, alcaloides e cumarinas presentes no extrato bruto etanólico das partes aéreas de *R. graveolens* foram identificadas por CLUE-ESI-QTOF-EM. O fracionamento cromatográfico desse extrato resultou no isolamento de 4 substâncias, dentre as quais a arborinina, alcaloide acridônico identificado como ligante da apirase.

Em relação às atividades biológicas, a arborinina apresentou inibição enzimática da atividade da apirase e os estudos de *docking* molecular sugerem que esta substância também possui capacidade de inibir outras enzimas, como SmATPase 1 e 2, ambas de *S. mansoni*. Dessa forma, a atividade esquistossomicida *in vitro*, tanto do extrato quanto da arborinina foram investigadas. Apesar do extrato bruto etanólico das partes aéreas de *R. graveolens* apresentar atividade esquistossomicida, corroborando com o potencial antiparasitário desta espécie, não foi observado, neste mesmo ensaio, atividade esquistossomicida para a arborinina na concentração avaliada.

Apesar disso, torna-se importante a investigação da atividade esquistossomicida *in vivo* da arborinina, pois a mesma apresentou potencial de inibição enzimática de enzima que se assemelha às enzimas do tegumento de *S. mansoni*. Dessa forma, estudos adicionais devem ser realizados com esta substância a fim de conhecer suas atividades biológicas e os possíveis mecanismos de ação.

6 CARACTERIZAÇÃO POR CLUE-ESI-QTOF-EM DO EXTRATO BRUTO DE *Acmella oleracea* (ASTERACEAE) E AVALIAÇÃO DA SUA ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA *IN VITRO* FRENTE À VERMES ADULTOS DE *S. mansoni*

O presente capítulo se destina à caracterização química por CLUE-ESI-QTOF-EM do extrato bruto de *A. oleracea*, bem como o processo de fracionamento cromatográfico para isolamento e identificação estrutural das substâncias ligantes da enzima apirase de batata selecionados através da técnica de UF acoplada à CLUE-EM. Além disso, investigou-se a capacidade de inibição enzimática da apirase de batata pelo ligante isolado, o qual também foi submetido aos estudos de *docking* molecular nas SmATPases e apirase. E ainda investigou-se a atividade esquistossomicida *in vitro* frente à vermes adultos de *S. mansoni* do extrato bruto e do ligante isolado.

6.1 *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen

Acmella oleracea é uma planta herbácea nativa da Região Norte do Brasil e pertencente à família Asteraceae. Popularmente conhecida como jambu, apresenta como sinônimos *Spilanthes acmella* L. var *oleracea* Clarke, *Spilanthes oleracea* (L.) e *Spilanthes acmella* (L.) Murr. (RONDANELLI et al., 2020).

A família Asteraceae, anteriormente denominada Compositae, é considerada como uma das maiores famílias de plantas, compreendendo cerca de 1.600 gêneros e 24.000 espécies, amplamente distribuídas pelo mundo, com exceção da Antártida, sendo encontradas principalmente em formações campestres. No Brasil, existem aproximadamente 2.000 espécies e 300 gêneros, as quais abrangem regiões tropicais, subtropicais e temperadas (CHRIST, ZÁCHIA, 2016). Entre os gêneros presentes na família Asteraceae, está o gênero *Acmella*.

Acmella é um gênero de ervas anuais e perenes, amplamente distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais ao redor do mundo, sendo atualmente conhecidas cerca de 30 espécies (MONDIN et al., 2015). Mondin e colaboradores (2015) listaram as espécies de *Acmella* presentes no Brasil, reconhecendo 16 distribuídas pelo território brasileiro. Na Amazônia brasileira há cinco espécies

pertencentes a este gênero, dentre elas está a espécie *A. oleracea* (L.) R.K. Jansen (MODIN et al., 2015; PINHEIRO, 2016).

A espécie *A. oleracea*, é uma planta nativa da Amazônia, conhecida popularmente como jambu, agrião bravo, ou agrião do Pará, amplamente utilizada na culinária local, em pratos típicos regionais, como o tacacá e o pato no tucupi (BARBOSA et al., 2016; FAVORETO, GILBERT, 2010; NASCIMENTO et al., 2013). É uma planta herbácea anual, perene, de 20-40 cm de altura, semi-ereta ou quase rasteira, com inflorescências compostas de flores amarelas (Figura 59) (FAVORETO, GILBERT, 2010).

Na medicina popular, é empregada para o tratamento de anemia, tuberculose, resfriados, problemas estomacais, doenças da boca e garganta, além de ser usada para tratar dores de dente, pois proporciona uma sensação anestésica local quando suas inflorescências e folhas são mastigadas (FAVORETO, GILBERT, 2010; NASCIMENTO et al., 2013; RONDANELLI et al., 2020).

Figura 59 - *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen.



Fonte: Adaptado de RONDANELLI et al. (2020).

Além disso, os extratos de *Acmella* também são efetivos contra parasitos da malária. Esta espécie é uma das três plantas do “Malarial-5®”, formulação tradicional utilizada no Mali para o tratamento da malária (SILVEIRA, 2017). O Malarial-5® foi inicialmente formulado pelo Professor Mamadou Koumaré, inspirado em uma

fórmula utilizada pela sua família e, nos dias atuais, é produzido como um medicamento padronizado pelo *Département de Médecine Traditionnelle* (DMT) do *Institut National de Recherche en Santé Publique* (INRSP) do Mali. Esta formulação é vendida na forma de pó, em sachês de 10 g, que deve ser aquecido em água para a obtenção de uma decocção (WILLCOX, BODEKER, 2004).

Várias pesquisas já demonstraram as propriedades medicinais da *A. oleracea* como anestésico e antipirético (CHAKRABORTY et al., 2010; LEY et al., 2006), anti-inflamatório e analgésico (CHAKRABORTY et al., 2004; WU et al., 2008), diurético e emagrecedora (DUBEY et al., 2013; EKANEM et al., 2007) e acaricida (CASTRO et al., 2014). Essas atividades biológicas têm sido, na sua grande maioria, atribuídas à presença de alquilamidas, especialmente o espilantol (BARBOSA et al., 2016; NASCIMENTO et al., 2013; PRACHAYASITTIKUL et al., 2013; SINGH et al., 2012; RONDANELLI et al., 2020).

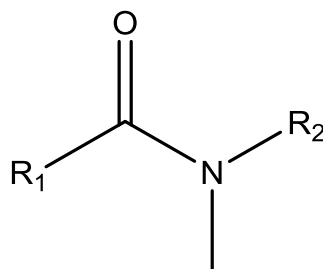
6.2 ALQUILAMIDAS E ESPILANTOL

Estudos fitoquímicos relatam diversos compostos já identificados nos extratos de diferentes partes de *A. oleracea*, tais como cumarinas (como a escopoletina), triterpenóides, óleos essenciais e terpenos (como o limoneno e β -cariofileno), polissacarídeos (ramnogalacturonana), fitoesteróis (stigmasterol e β -sitosterol) e compostos fenólicos (ácido vanílico, ácido *trans*-ferúlico e ácido *trans*-isoferulico). Mas considera-se que as principais substâncias ativas presentes na *A. oleracea* são as alquilamidas (NASCIMENTO et al., 2013; PRACHAYASITTIKUL et al., 2013; RONDANELLI et al., 2020; SINGH et al., 2012).

As alquilamidas ou alcanidas são uma classe de alcaloides especiais, constituídos pela união de um ácido graxo com oito a dezoito átomos carbonos e um grupo amino, formando assim uma função amida, como demonstrado na Figura 60 (RAHMAN, 2014).

Dependendo do tipo de ligações que apresentam na cadeia carbônica originada do ácido graxo, as alcanidas são divididas em dois grupos principais: alcanidas olefínicas que possuem ligações duplas (como por exemplo o espilantol) e alcanidas acetilênicas com pelo menos uma ligação tripla (como por exemplo a (7Z)-N-isobutil-7-tridecadieno-10,12-dienamida) (RAHMAN, 2014).

Figura 60 - Estrutura do grupo funcional das alquilamidas.



Fonte: Adaptado de RAHMAN (2014).

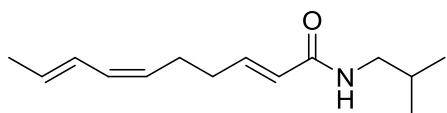
No que diz respeito ao gênero *Acmella*, vários estudos já demonstraram a presença de alquilamidas, as quais podem conter uma porção isobutilamina, 2-metilbutilamina e feniletilamina (BAE et al., 2007; BOONEN et al., 2010; SHARMA et al., 2011). Na Figura 61 estão representadas algumas alquilamidas encontradas nas espécies de *Acmella*.

Dentre estas alquilamidas, a isobutilamida (2*E*,6*Z*,8*E*)-*N*-isobutil-2,6,8-decatrienamida, usualmente conhecida como espilantol ou afinina, é a substância ativa encontrada abundantemente nos capítulos florais de *A. oleracea* (RONDANELLI et al., 2020).

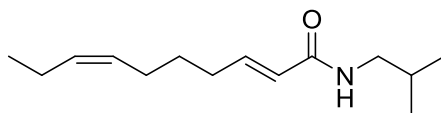
O espilantol (Figura 61) foi obtido pela primeira vez, a partir das flores de *A. oleracea* por Gerber, em 1903 (RAMSEWAK et al., 1999) e caracterizado como um óleo viscoso, ardente, de tonalidade amarela pálida à amarela clara (BARBOSA et al., 2016).

Devido à diversidade de suas propriedades químicas e aplicações medicinais, o extrato de *A. oleracea* e o espilantol vêm despertando crescente interesse comercial por parte de indústrias farmacêuticas. Várias patentes já foram registradas quanto à utilização do espilantol, assim como o extrato bruto da planta e suas aplicações. Estas patentes envolvem fórmulas de produtos para indústrias de higiene, cosméticos e alimentos (BARBOSA et al., 2016; RONDANELLI et al., 2020; SILVEIRA, SANDJO, BIAVATTI, 2018).

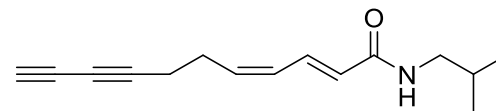
Figura 61 - Algumas alquilamidas descritas na literatura.



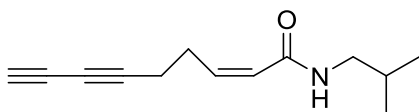
(2E,6Z,8E)-N-isobutil-2,6,8-decatrienamida



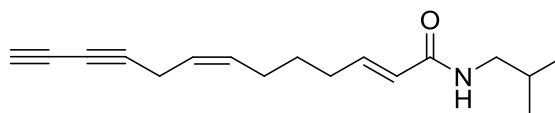
(2E,7Z)-N-isobutil-2,7-decadienamida



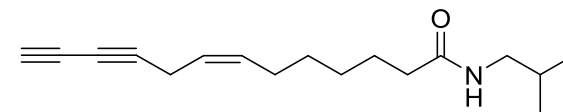
(2E,4Z)-N-isobutil-2,4-undecadieno-8,10-dienamida



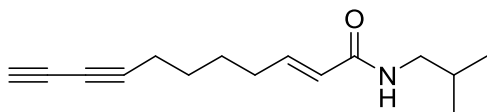
(2Z)-N-isobutil-2-noneno-6,8-dienamida



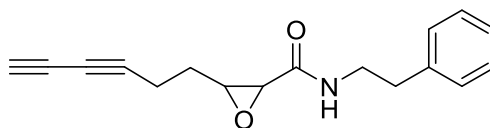
(2E,7Z)-N-isobutil-2,7-tridecadieno-10,12-dienamida



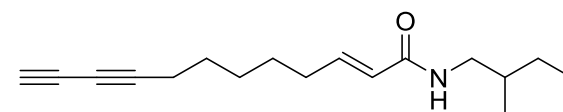
(7Z)-N-isobutil-7-tridecadieno-10,12-dienamida



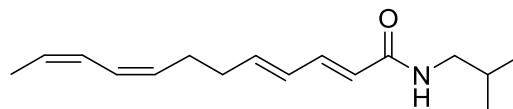
(2E)-N-isobutil-2-undeceno-8,10-dienamida



N-fenetil-2,3-epoxi-6,8-nonadienamida



(2E)-N-(2-metilbutil)-2-undeceno-8,10-dienamida



(2E,4E,8Z,10Z)-N-isobutil-dodeca-2,4,8,10-tetraenamida

Fonte: Elaborado pela própria autora.

Como exemplo, diversas formulações têm sido comercializadas para a estética humana, devido ao suposto “efeito botox” ao reduzir as rugas nas áreas aplicadas e sem a necessidade de injeções. Tanto no Brasil quanto no exterior, é possível encontrar formulações que prometem reduzir em até 80% as rugas na face (ARTARIA et al., 2011). A empresa francesa Gattefossé® (GATTEFOSSÉ, 2015) e a brasileira Natura® (NATURA, 2017) comercializam produtos com este mesmo objetivo.

Além disso, várias atividades farmacológicas já foram atribuídas ao espilantol, como o efeito anestésico e de formigamento sobre a língua, sendo utilizado nas afecções da boca e garganta, assim como tratamento de dores de dente (RONDANELLI et al., 2020; SILVEIRA, SANDJO, BIAVATTI, 2018).

As atividades antifúngica e bacteriostática do espilantol também foram avaliadas. Esta substância inibiu 100% do crescimento dos fungos *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotium cepivorum*, *Phytophthora infestans* e *Rhizoctonia solani*, além das bactérias *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Saccharomyces cerevisiae* em concentrações inferiores a 25 µg/mL (MOLINA-TORRES et al., 2004).

O espilantol também se mostrou útil como inseticida. Ele apresentou atividade contra larvas de *Aedes aegyptii*, que podem transmitir os vírus causadores da dengue, chikungunya, zika e febre amarela a uma concentração de 12,5 mg/mL. Além disso, o espilantol também se mostrou tóxico aos mosquitos *Anopheles* transmissores da malária (RAMSEWAK et al., 1999).

Adicionalmente, o espilantol mostrou-se ativo contra o parasita causador da malária, o *Plasmodium falciparum*, com IC₅₀ de 16,5 µg/mL e 16,3 µg/mL frente às cepas PFB e K1 (resistente à cloroquina), respectivamente (SPELMAN et al., 2011). Em outro estudo, o extrato bruto metanólico das flores de *A. oleracea* e algumas alquilamidas isoladas, também apresentaram atividade antiplasmodial (MBEUNKUI et al., 2011).

Apesar da diversidade de aplicações do extrato de *A. oleracea* e seus metabólitos, em especial o espilantol, cabe ressaltar que ainda não há trabalhos publicados descrevendo a atividade esquistossomicida deste extrato e desta alquilamida frente à vermes adultos de *S. mansoni*, tornando relevante essas avaliações.

6.3 OBJETIVOS

O objetivo geral do trabalho descrito no presente capítulo foi a caracterização química dos constituintes de *A. oleracea*, o isolamento dos metabólitos e avaliação da atividade esquistossomicida *in vitro* do extrato e substância isolada frente à vermes adultos de *S. mansoni*.

Para esses propósitos, os objetivos específicos foram:

- Caracterizar quimicamente o extrato bruto clorofórmico das flores de *A. oleracea* por meio de CLUE-ESI-QTOF-EM;
- Realizar o isolamento, purificação e identificação do espilantol, a qual foi anteriormente identificada como ligante da apirase de batata;
- Avaliar a atividade esquistossomicida *in vitro* do extrato bruto e do espilantol frente à vermes adultos de *S. mansoni*;
- Avaliar a atividade enzimática da apirase de batata frente ao espilantol;
- Realizar estudos de *docking* molecular do espilantol frente à apirase de batata e as ATP difosfohidrolases de *S. mansoni*.

6.4 MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos deste trabalho foram realizados nos laboratórios: NIPPAN da Universidade Federal de Juiz de Fora, CentralBio da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora, Departamento de Química da Universidade Federal de Juiz de Fora, NPDN - Universidade de Guarulhos, São Paulo, SP e no Departamento de Ciência da Computação - Programa de Pós-Graduação em Modelagem Molecular da Universidade Federal de Juiz de Fora.

Para execução dos métodos foram utilizados os mesmos equipamentos descritos no item 3.6 deste trabalho.

Os solventes, a CCD, a CLUE e os espectros de RMN estão descritos no item 5.4 e 5.4.1.

Para a realização da CC foram utilizadas como adsorventes sílica gel 40-63 μm , alumina neutra ativa (classe I) 63-200 μm .

6.4.1 Análise por CLUE-ESI-QTOF-EM

As condições cromatográficas e de ESI-EM foram as mesmas citadas no item 3.6.2.

A identificação das substâncias presentes no extrato bruto de *A. oleracea* foi realizada por EM/EM-QTOF. Os espectros de massas obtidos foram comparados com dados disponíveis nas bases de dados MassBank of North America (<http://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/>), PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), e ChemSpider (<http://www.chemspider.com/>) para identificação das substâncias, além das literaturas BAE, 2007; BOONEN et al., 2010; HISERODT et al., 2004; SHARMA et al., 2011; SILVEIRA et al., 2016.

6.4.2 Fracionamento cromatográfico e isolamento do espilantol

Com o intuito de produzir maior quantidade de extrato das flores *A. oleracea* para isolamento dos constituintes, o material vegetal foi coletado novamente em novembro de 2017. A exsicata do vegetal foi depositada no Herbário Leopoldo Krieger – CESJ, da UFJF, sob número de tombo 47480.

Esse material vegetal passou pelos mesmos processos de secagem e trituração descritos no item 3.6.1 deste trabalho. Este procedimento resultou em 33,863 g de pó, o qual foi submetido à maceração em clorofórmio. As soluções clorofórmicas obtidas foram filtradas e, em seguida, transferidas para balões de fundo redondo e concentradas com auxílio de rotaevaporador à temperatura de 40°C. Os extratos obtidos foram transferidos para frascos previamente pesados fornecendo 3,641 g de extrato bruto clorofórmico das flores de *A. olearacea* (Ao-FI).

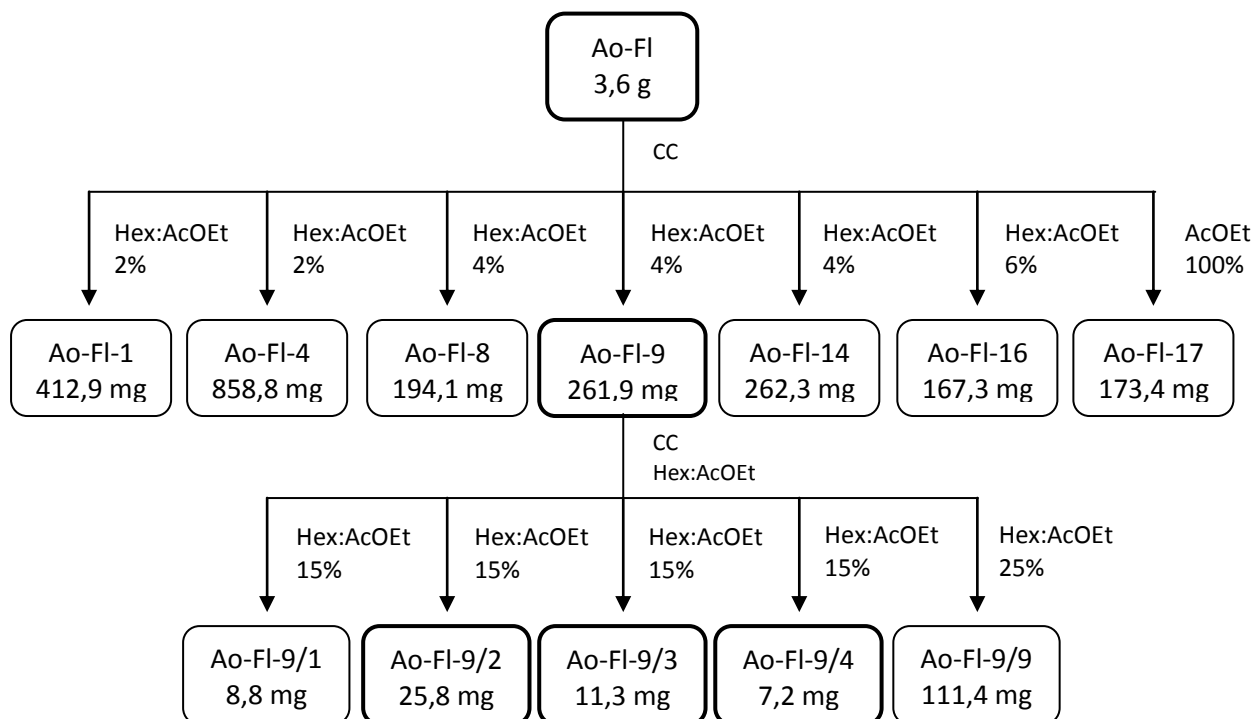
Com o propósito de separação inicial dos constituintes presentes no Ao-FI, 3,6 g deste extrato foi submetido à CC de 4 cm de diâmetro por 17 cm de altura e empacotada com 100g de sílica gel (40-63 µm). Utilizou-se como fase móvel a mistura de hexano:acetato de etila em grau crescente de polaridade, sendo coletadas 42 frações de aproximadamente 50 mL, as quais foram reunidas em 7 subfrações de acordo com as semelhanças cromatográficas observadas pela CCD.

A presença da substância de interesse nas subfrações obtidas foi investigada através da RMN de ^1H . A partir dessa análise, a subfração Ao-FI-9 (261,9 mg) foi selecionada para prosseguir com o fracionamento. Dessa forma, esta subfração foi submetida à CC de 2 cm de diâmetro e 15 cm de altura, empacotada com 60 g de alumina neutra ativa (classe I) 0,063-0,200 mm. A fase móvel utilizada foi a mistura de hexano:acetato de etila em grau crescente de polaridade, sendo coletadas 20 subfrações de aproximadamente 50 mL, as quais foram reunidas em 5 subfrações de acordo com as semelhanças cromatográficas observadas pela CCD.

Realizou-se a CCD das subfrações obtidas da CC da subfração Ao-FI-9, utilizando como sistema eluente, hexano:acetato de etila (1:1 v/v), e revelando em luz UV no comprimento de onda de 254nm e, posteriormente, em anisaldeído. De acordo com a análise do perfil cromatográfico das subfrações resultantes, observou-se que as subfrações Ao-FI-9/2, Ao-FI-9/3 e Ao-FI-9/4 apresentavam como uma única mancha na CCD. Assim, estas subfrações foram avaliadas em RMN de ^1H e ^{13}C para a determinação da estrutura química.

O processo de fracionamento do extrato bruto clorofórmico das flores de *A. olearacea* e isolamento da substância estão resumidos na Figura 62.

Figura 62 - Fluxograma do fracionamento do extrato bruto clorofórmico das flores de *A. olearacea* (Ao-Fl).



Fonte: Elaborado pela própria autora.

6.4.3 Ensaio esquistossomicida *in vitro*

Os ensaios *in vitro* foram efetuados no Núcleo de Enteroparasitos do Instituto Adolfo Lutz, sob a colaboração e supervisão do Prof. Dr. Josué de Moraes. Todos os ensaios foram submetidos e aprovados pelo CEUA número 031/2017. Os procedimentos deste ensaio estão descritos no item 5.4.3 deste trabalho.

As amostras foram solubilizadas e diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO, Merck) e meio RPMI 1640 de forma a obter as concentrações de 200, 100, 50 e 25 µg/mL, para o extrato, 100 e 50 µM para a substância isolada (espilantol), sendo que a concentração final de DMSO não foi superior a 0,5 %. O PZQ (2 µM) foi utilizado como controle positivo.

6.4.4 Ensaio de inibição da atividade enzimática da apirase de batata pelo espilantol

O ensaio de atividade enzimática foi realizado no NIPPAN, de acordo com métodos previamente descritos com modificações (DETONI et al., 2012; MAIA et al., 2019; TAUSKY, SHORR, 1953). A descrição do método utilizado está descrito no item 5.4.4 deste trabalho.

As concentrações de espilantol testadas foram: 100; 50; 25 μ M.

Os tratamentos estatísticos foram realizados com auxílio do software GraphPad InStat 7.0. A análise entre grupos foi realizada pela análise de quartis, de variância (ANOVA) e as diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo teste T-Student. Valores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

6.4.5 Estudos de *docking* molecular

Os estudos de *docking* molecular foram realizados no Departamento da Ciência da Computação da Universidade Federal de Juiz de Fora, sob a colaboração e responsabilidade da Prof. Dra. Priscila Vanessa Zabala Capriles Goliatt, conforme descrito no item 3.6.6 deste trabalho.

6.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

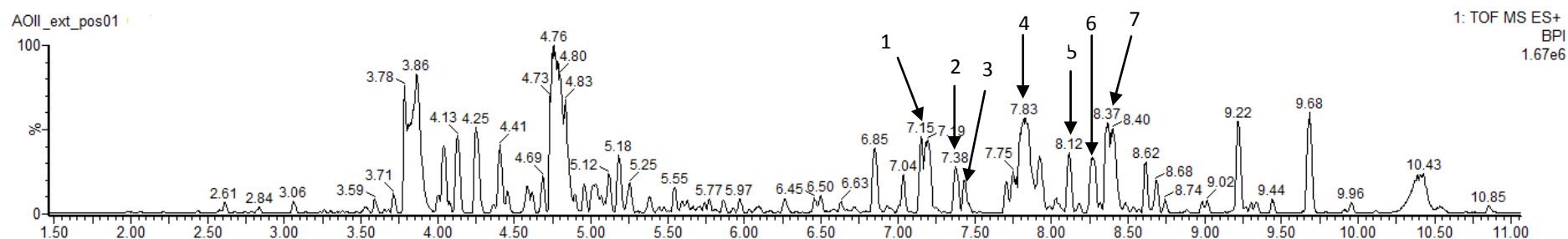
6.5.1 Caracterização química do extrato bruto clorofórmico das flores de *A. oleracea* por CLUE-ESI-QTOF-EM

De maneira semelhante ao descrito no capítulo anterior, as substâncias presentes no extrato de *A. oleracea* foram caracterizadas a partir das análises dos dados de espectrometria de massas e perfil de fragmentação em comparação com os encontrados na literatura (BAE, 2007; BOONEN et al., 2010; HISERODT et al., 2004; SHARMA et al., 2011; SILVEIRA et al., 2016).

Além disso, a alquilamida conhecida como espilantol foi isolada e teve sua estrutura química confirmada através das análises dos espectros de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C .

Dessa forma, os resultados da análise, no presente trabalho, em CLUE-ESI-QTOF-EM sugerem a presença de sete alquilamidas no extrato bruto de *A. oleracea* (Tabela 22 e Figura 63), sendo cinco *N*-isobutilamidas, uma 2-butilmetilamida e uma 2-feniletilamida (Figura 64). A Tabela 22 mostra o tempo de retenção de cada alquilamida identificada, informações de fragmentação e, ainda seu íon precursor, obtidos no modo positivo.

Em virtude dos diversos trabalhos de prospeção fitoquímica, muito se conhece sobre a constituição química de *A. oleracea*. Estes estudos revelam que a planta possui cumarinas, terpenos, compostos fenólicos e, principalmente, alquilamidas (NASCIMENTO et al., 2013; PRACHAYASITTIKUL et al., 2013; RONDANELLI et al., 2020; SINGH et al., 2012). Dentre as alquilamidas, o espilantol é o constituinte mais abundante nas flores de *A. oleracea* e tem sido relacionado com diversas atividades biológicas da planta (BARBOSA et al., 2016).

Figura 63 - Cromatograma em CLUE-ESI-QTOF-EM (modo positivo) do extrato bruto de *A. oleracea*.

Fonte: Elaborado pela própria autora.

Tabela 22 - Dados cromatográficos e do espectro de massas das substâncias identificadas no extrato bruto de *A. oleracea*.

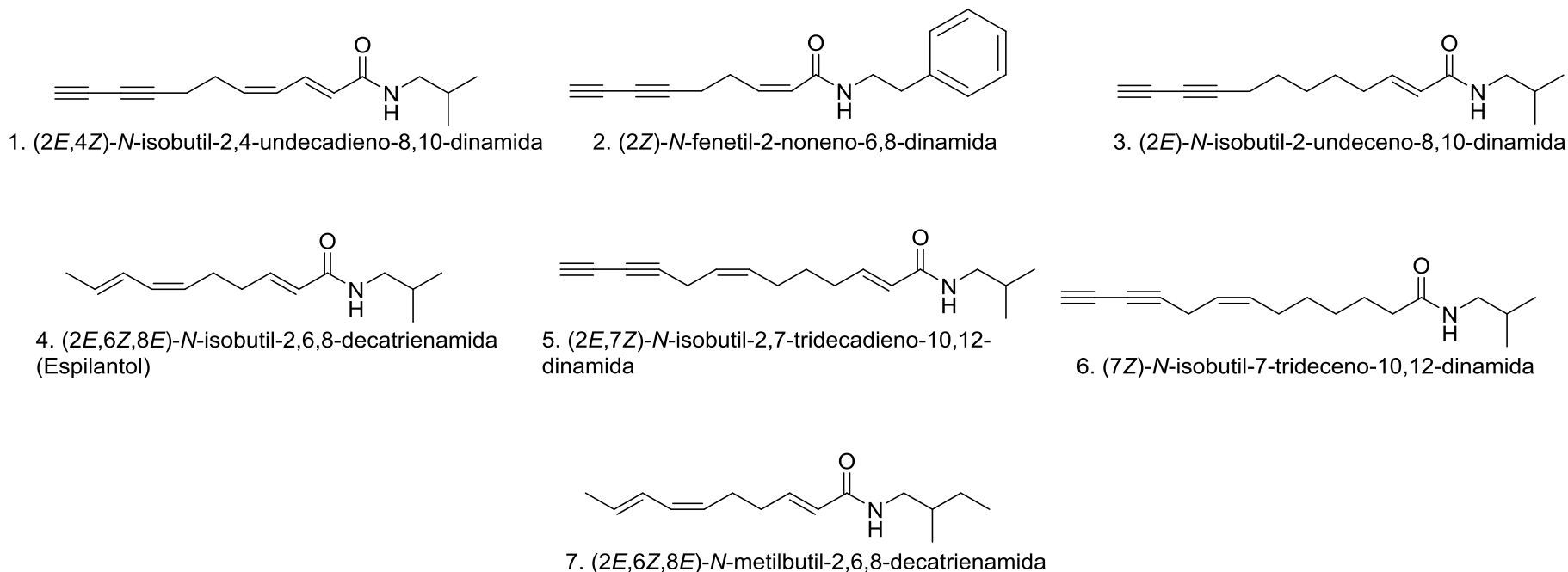
Pico	Substâncias identificadas	T _R (min)	m/z [M+H]	Fragmentos principais	Literatura ^a
1	(2E,4Z)-N-isobutil-2,4-undecadieno-8,10-dinamida	7,23	230,1591	174,0310; 157,1050; 131,0868; 129,0730	222; 188; 174; 157; 146; 131;129; 91
2	(2Z)-N-fenetil-2-noneno-6,8-dinamida	7,42	252,1428	147,0738; 132,0835; 105,0709; 103,0556	196;173; 147; 131; 105; 103; 79
3	(2E)-N-isobutil-2-undeceno-8,10-dinamida	7,47	232,1761	176,1116; 159,0851; 133,1041; 131,0887	204; 176; 159; 133; 131; 105; 91
4	(2E,6Z,8E)-N-isobutil-2,6,8-decatrienamida (espilantol)	7,86	222,1840	166,1256; 149,0968; 141,1148; 126,0919; 123,1179; 121,1025	166; 149; 123; 121;81
5	(2E,7Z)-N-isobutil-2,7-tridecadieno-10,12-dinamida	8,15	258,1927	202,1277; 185,1010; 159,1200; 157,1040; 117,0720; 115,0561; 105,0717	230; 202; 185; 157; 131; 117; 105; 101; 99; 91; 73; 56
6	(7Z)-N-isobutil-7-trideceno-10,12-dinamida	8,31	260,2088	204,1442; 187,1528; 159,1206; 105,0721	246; 204; 176; 159; 133; 105; 91

7	(2E,6Z,8E)-N-metilbutil-2,6,8-decatrienamida	8,44	236,2075	165,0913; 149,0999; 141,1169; 126,0943; 123,1195; 121,1039	166; 149; 123; 121; 81
---	--	------	----------	---	---------------------------

^a BAE, 2007; BOONEN et al., 2010; HISERODT et al., 2004; SHARMA et al., 2011; SILVEIRA et al., 2016.

Fonte: Elaborado pela própria autora.

Figura 64 - Estruturas químicas dos compostos identificados no extrato bruto de *A. oleracea* por CLUE-ESI-QTOF-EM.



Fonte: Elaborado pela própria autora.

As alquilamidas ou alcanidas são formadas a partir da reação de condensação química de um ácido carboxílico de cadeia média a grande (cadeia carbônica com 10 a 18 carbonos) com uma amina. Segundo Barbosa e colaboradores (2016), as alquilamidas manifestam-se em poucos grupos de plantas, dos quais os mais importantes estão presentes nas famílias Asteraceae.

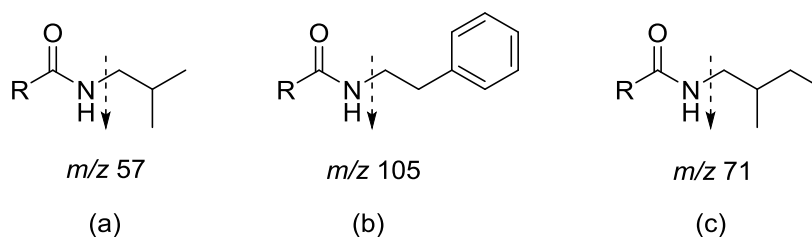
A CLUE-ESI-QTOF-EM tem sido considerada uma excelente técnica para uma ampla análise de alquilamidas em diversos extratos vegetais. A identificação de substâncias dessa classe se baseia no tempo de retenção, nos valores de m/z do íon molecular protonado, e principalmente, na análise dos fragmentos formados a partir da ativação dos íons através da dissociação induzida por colisão (BAE, 2007; BOONEN et al., 2010; HISERODT et al., 2004; SHARMA et al., 2011; SILVEIRA et al., 2016).

Segundo Hiserodt e colaboradores (2004), amidas insaturadas (2E, 6Z), sob baixa energia de colisão, formam dois fragmentos característicos. Um deles é formado através de uma clivagem homolítica gerando um cátion radical. E o outro íon formado é o cátion ciclopropeno, o qual passa pela formação inicial de um bicíclico intermediário seguido da perda de um alceno. Nestes dois casos, os cátions gerados são estabilizados por ressonância. Estes mecanismos de fragmentação propostos para a formação dos íons fragmentos de m/z 141 e m/z 126 estão descritos anteriormente no item 4.5.2.2 e representados na Figura 30.

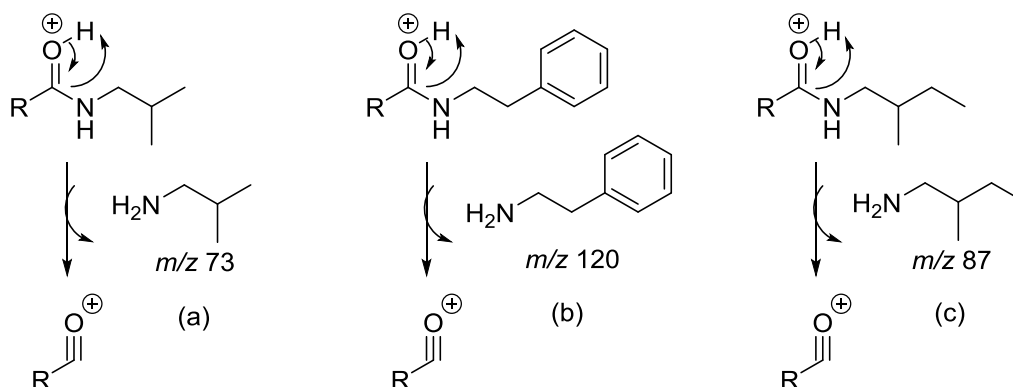
Além desses dois mecanismos, as alquilamidas também apresentam outros padrões característicos de fragmentação. Um deles é a formação de íons fragmentos dependendo do grupamento da porção amina, podendo ser resultante da perda de um resíduo isobutila (a); feniletila (b) e metilbutila (c) (Figura 65) (BOONEN et al., 2012).

Outra fragmentação frequentemente observada nas alquilamidas é a formação do íon acílio, sendo este resultado da quebra da ligação amida (Figura 66) (BOONEN et al., 2012).

Dessa forma, através da comparação dos íons moleculares e padrões de fragmentação EM/EM do extrato bruto de *A. oleracea*, com valores da literatura, foi possível identificar 7 alquilamidas.

Figura 65 - Fragmentos característicos da porção amina das alquilamidas.

Fonte: Adaptado de BOONEN et al. (2012).

Figura 66 - Perda de fragmentos característicos e formação do íon acílio nas alquilamidas.

Fonte: Adaptado de BOONEN et al. (2012).

Em relação às alquilamidas do tipo *N*-isobutilamidas, foram identificadas neste trabalho as seguintes substâncias: (2*E*,4*Z*)-*N*-isobutil-2,4-undecadieno-8,10-dinamida; (2*E*)-*N*-isobutil-2-undeceno-8,10-dinamida; (2*E*,6*Z*,8*E*)-*N*-isobutil-2,6,8-decatrienamida (espilantol); (2*E*,7*Z*)-*N*-isobutil-2,7-tridecadieno-10,12-dinamida e (7*Z*)-*N*-isobutil-7-trideceno-10,12-dinamida (compostos 1, 3, 4, 5 e 6, respectivamente, Figura 64).

O espectro de massas do composto 1 apresentou íon molecular com a massa m/z 230,1591 $[M+H]^+$ e o íon fragmento m/z 174,0310 o qual sugere a perda da porção isobutila (perda de m/z 56) (Figura 65), caracterizando essa alquilamida como do tipo *N*-isobutilamida. Além disso, foi observado o íon fragmento m/z 157,1050, que pode ser atribuído ao íon acílio, referente ao resíduo ácido resultante da clivagem da ligação amida. Segundo Boonen e colaboradores (2012), um fragmento frequentemente formado nas alquilamidas do tipo *N*-isobutilamidas é o íon acílio, o qual ocorre através da perda de um grupo de m/z 73 (Figura 66). E por fim, a perda de CO do íon acílio, resulta nos íons fragmentos m/z 129,0730 e m/z 131,0868. Dessa forma, com base na comparação desses dados obtidos

experimentalmente com os dados de fragmentação da literatura sugere-se que o composto 1 pode-se tratar da (2*E*,4*Z*)-*N*-isobutil-2,4-undecadieno-8,10-dinamida (composto 1, Figura 64) (BOONEN et al., 2010; HISERODT et al., 2004; SHARMA et al., 2011).

A análise do espectro de massas do pico 3 apresentou íon molecular m/z 232,1761 $[M+H]^+$ e íon fragmento m/z 176,1116, típico da perda do resíduo isobutila (perda de m/z 56) (Figura 65). Além disso, observa-se o íon fragmento m/z 159,0851 (íon acílio) (Figura 66), resíduo ácido resultado da clivagem da ligação amida, que após a perda de CO, originou os íons fragmentos m/z 131,0887 e m/z 133,1041. Estes dados sugerem que o composto 3 trata-se da (2*E*)-*N*-isobutil-2-undeceno-8,10-dinamida (composto 3, Figura 64) (BOONEN et al., 2010; HISERODT et al., 2004).

O espectro de massas, realizado em modo positivo, do composto 4 (ligante identificado no ensaio de ultrafiltração), mostra o pico do íon molecular em m/z = 222,1840, sugerindo a fórmula molecular $C_{14}H_{24}NO$. Através do experimento de EM/EM foi possível identificar os fragmentos m/z 141,1148 (cátion radicalar) e m/z 126,0919 (cátion ciclopenteno) (Figura 30), consistentes com a fragmentação proposta por Hiserodt e colaboradores (2004) para a estrutura do espilantol. Além disso, outros fragmentos observados foram m/z 166,1256 (perda do resíduo isobutila, m/z 56) (Figura 65), m/z 149,0968 referente ao íon acílio (Figura 66), e os fragmentos m/z 123,1179 e m/z 121,1025 resultantes da perda de CO da molécula do íon acílio. Esses dados comparados com os presentes na literatura permitiram propor que esta substância trata-se da substância (2*E*,6*Z*,8*E*)-*N*-isobutil-2,6,8-decatrienamida, conhecida como espilantol (composto 4, Figura 64) (BOONEN et al., 2010; HISERODT et al., 2004).

De maneira semelhante às outras isobutilamidas, os compostos 5 e 6 também apresentaram fragmentos correspondentes a perda do resíduo isobutila (perda de m/z 56) (Figura 65), fragmentos relacionados à formação do íon acílio (perda de m/z 73) (Figura 66) e fragmentos da perda de CO da molécula do íon acílio (perda de m/z 99 e 101). Dessa forma, através da comparação dos íons moleculares formados e os padrões de fragmentação EM/EM desses compostos, foi possível propor que o composto 5 trata-se da substância (2*E*,7*Z*)-*N*-isobutil-2,7-tridecadieno-10,12-dinamida (composto 5, Figura 64) e o composto 6 da (7*Z*)-*N*-isobutil-7-trideceno-

10,12-dinamida (composto 6, Figura 64) (BAE, 2007; BOONEN et al., 2010; SHARMA et al., 2011).

Outras alquilamidas encontradas no extrato bruto de *A. oleracea* foram as do tipo 2-feniletilamida e 2-butilmetilamida.

Em relação às alquilamidas do tipo feniletilamida, alguns autores demonstraram fragmentação característica da perda do grupamento da porção amina, neste caso a perda do grupamento feniletila (m/z 105) (Figura 65) (BOONEN et al., 2012). O composto 2 apresentou íon molecular m/z 252,1428 e através do experimento de fragmentação EM/EM foi possível observar o íon de pico base m/z 105,0709, consistente com o grupamento feniletila. Além disso, o fragmento m/z 147,0738 é típico da perda do resíduo feniletila (perda m/z 105). E por fim, segundo Boonen e colaboradores (2010), as alquilamidas do tipo 2-feniletilamidas também se fragmentam formando o íon acílio, através da perda de um grupo de m/z 120 (Figura 66), o qual perde CO, resultando no íon fragmento m/z 103. O espectro de massas do composto 2 evidencia a formação do fragmento de m/z 132,0835 (íon acílio) e o fragmento m/z 103,0556. Dessa forma, sugere-se que o composto 2 trata-se da substância (2Z)-N-fenetil-2-noneno-6,8-dinamida (composto 2, Figura 64) (BOONEN et al., 2010; SHARMA et al., 2011; SILVEIRA et al., 2016).

O composto 7 apresentou íon molecular m/z 236,2075 e fragmento 165,0913 resultante da perda do grupamento metilbutila (perda m/z 71), caracterizando essa substância como um alquilamida do tipo metilbutilamida (Figura 65) (BOONEN et al., 2012). Observa-se ainda o fragmento m/z 149,0999 referente ao íon acílio (perda m/z 87) (Figura 66), e os fragmentos m/z 123,1195 e m/z 121,1039, correspondentes à perda de CO do íon acílio. Além disso, o espectro de massas evidencia os fragmentos m/z 126,0943 (cátion ciclopropeno) e m/z 141,1169 (cátion radical), característicos das alquilamidas olefínicas, já discutidos anteriormente como para o espilantol (Figura 30) (HISERODT et al., 2004). As análises desses dados juntamente com a comparação dos dados encontrados na literatura foi possível propor que o composto 7 trata-se da substância (2E,6Z,8E)-N-metilbutil-2,6,8-decatrienamida (composto 7, Figura 64) (BOONEN et al., 2010; HISERODT et al., 2004; SHARMA et al., 2011).

6.5.2 Isolamento e identificação estrutural da substância isolada do extrato de *A. oleracea*

O extrato bruto *A. oleracea* apresentou, no ensaio de ultrafiltração acoplada à EM, descrito no item 4.5.2.2 deste trabalho, alguns ligantes da enzima apirase. Dentre estes, o ligante identificado como espilantol foi isolado do extrato de *A. oleracea* e, em seguida, identificado por meio de técnicas espectroscópicas. Para este isolamento, o extrato bruto clorofórmico das flores de *A. oleracea* foi submetido ao fracionamento em CC, utilizando sílica gel e alumina neutra como fases estacionárias. Após estes procedimentos foram obtidas 44,3 mg de espilantol.

O espilantol teve sua estrutura química identificada com base na análise dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C e comparação com os dados encontrados na literatura.

Segundo Nakatani, Nagashima (1992), no RMN de ^1H , alquilamidas do tipo isobutilamida apresentam sinais característicos de hidrogênios desta porção isobutilamida em δ 3,15 (2H, *dd*, H1'); δ 1,78 (1H, *m*, H2') e δ 0,93 (6H, *d*, H3' e H4').

Pela análise do espectro de RMN de ^1H (Figura 67 e 68) da substância Ao-FI-9/4 pode-se observar a presença de um tripleto em δ 3,14 ($J = 6,5$ Hz, 2H), referente aos hidrogênios metilênicos H1'; um multiplete entre δ 1,83 - 1,75, atribuído ao hidrogênio metínico H2'; e um duplete em δ 0,92 (6H) referente aos hidrogênios metílicos H3' e H4'. Além disso, observa-se a ocorrência de um simpleto largo em δ 5,49 (1H), atribuído ao hidrogênio do grupo amino. Esses sinais indicam, portanto, a presença de um grupo isobutilamida.

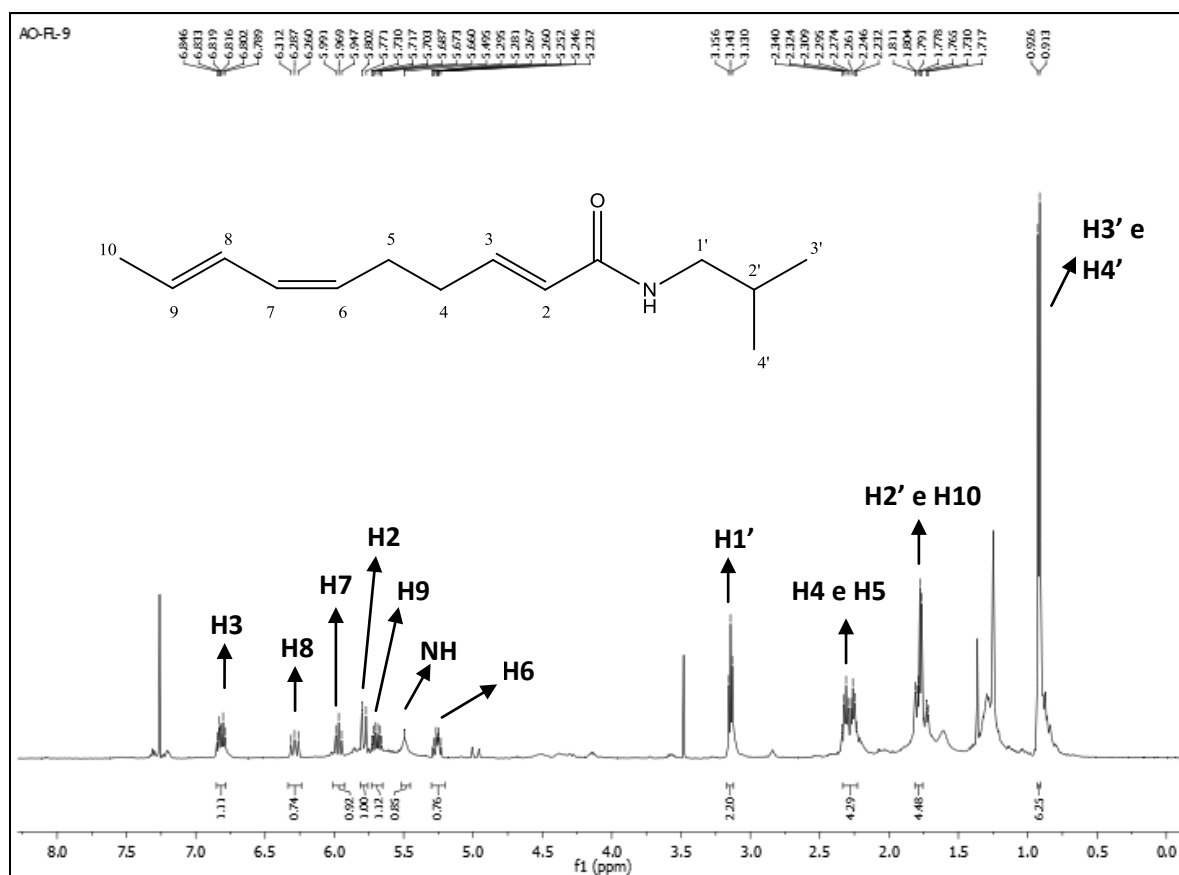
Já os sinais observados em δ 5,79 ($J = 15$ Hz, 1H, *d*) e δ 6,82 (1H, *m*) foram atribuídos aos hidrogênios olefínicos α e β da ligação dupla conjugada com o grupo carbonílico, H2 e H3, respectivamente. Os sinais dos outros hidrogênios olefínicos presentes nesta molécula são observados no deslocamento químicos δ 5,26 (1H, *m*) e δ 5,97 ($J = 11$ Hz, 1H, *t*), referentes aos hidrogênios H6 e H7, respectivamente. E por fim em δ 6,29 ($J = 15$ Hz, 1H, *t*) e δ 5,70 (1H, *m*) atribuídos aos hidrogênios H8 e H9 (Figura 67 e 68). Outros sinais referentes aos hidrogênios observados estão na Tabela 23.

Já o espectro de RMN de ^{13}C (Figura 69 e 70) da substância Ao-FI-9/4 apresentou 13 sinais de carbono. Destes, os sinais em δ 46,99 (C1'); δ 20,26 (C2'); δ 18,45 (C3' e C4') confirmam a presença do grupo isobutilamida. Além disso,

observa-se um sinal em δ 166,13, o qual foi atribuído ao carbono carbonílico C1. As atribuições dos demais carbonos podem ser observadas na Tabela 24.

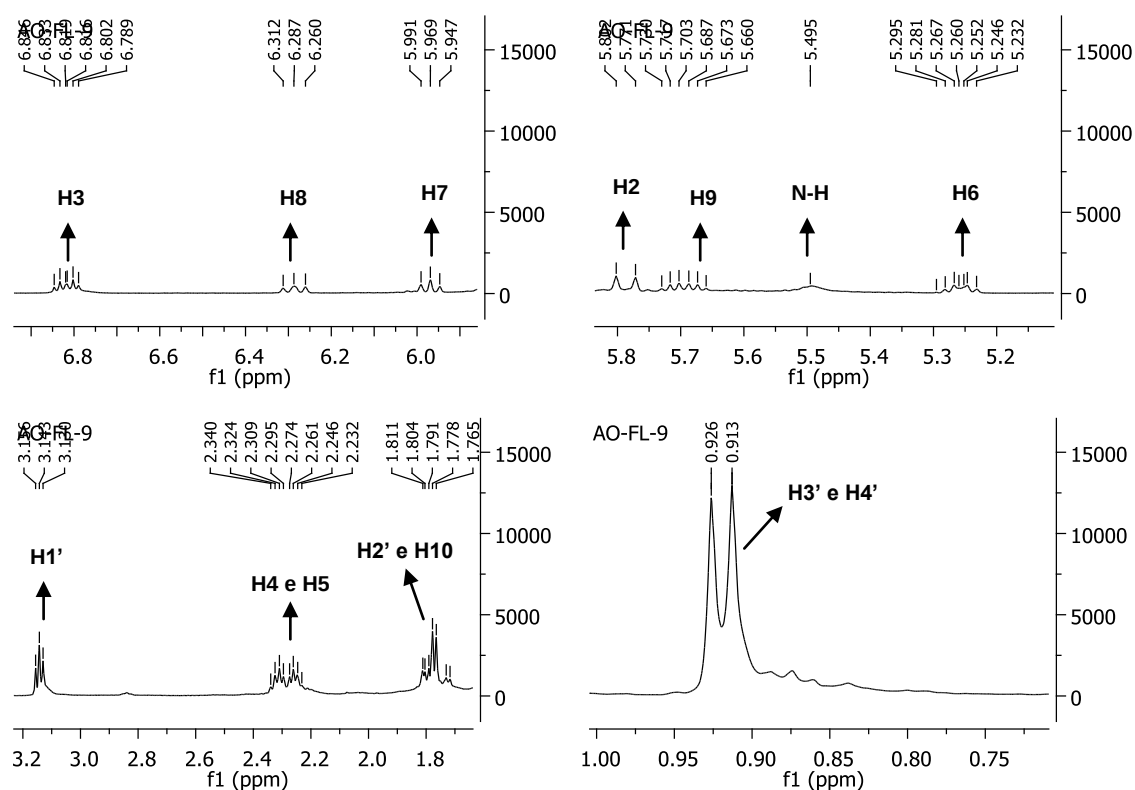
Deste modo, a análise conjunta dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C , bem como a comparação com os dados da literatura (BAE, 2007; NAKATANI, NAGASHIMA, 1992), permitem propor a estrutura da substância Ao-FI-9/4 como sendo a *N*-alquilamida conhecida como espilantol.

Figura 67 - Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 ; 500 MHz) da substância Ao-FI-9/4.



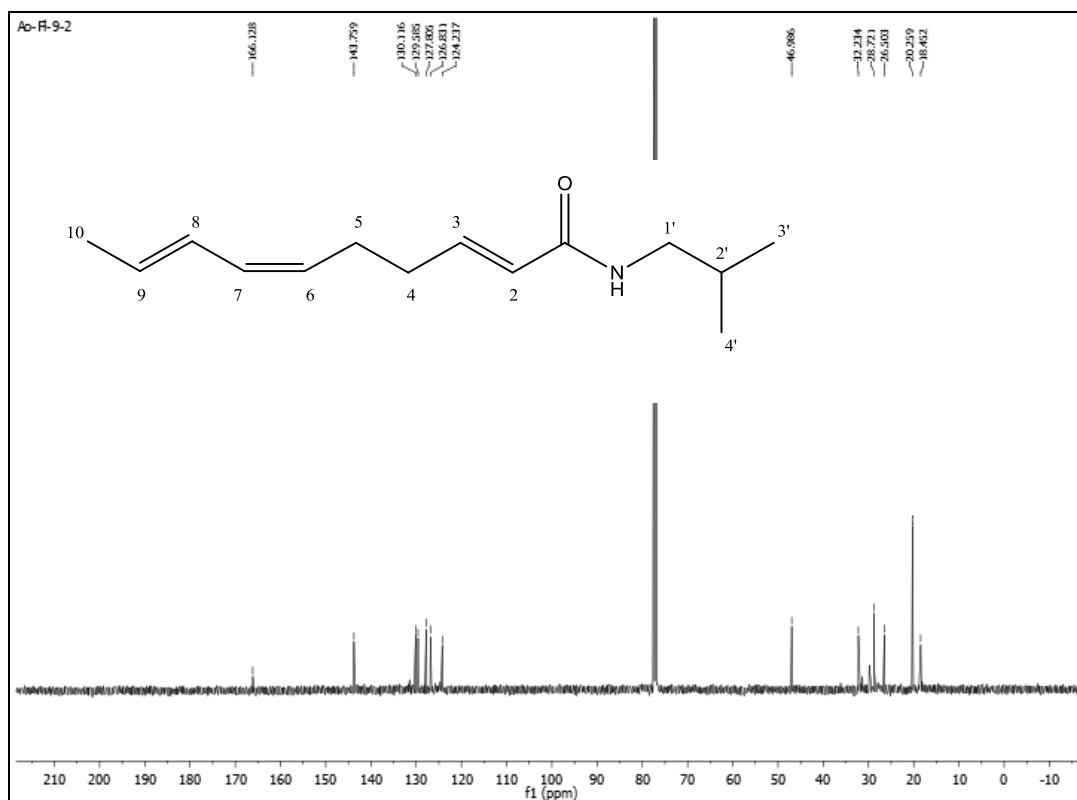
Fonte: Elaborado pela própria autora.

Figura 68 - Seções expandidas entre δ 6,8 – 6,0; δ 5,8 – 5,2; δ 3,2-1,8 e δ 1,0 - 0,75 do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 ; 500 MHz) da substância Ao-FI-9/4.

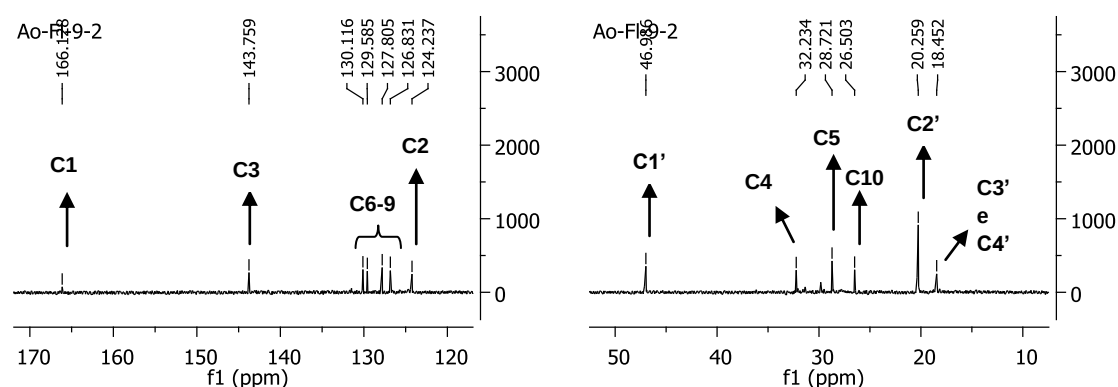


Fonte: Elaborado pela própria autora.

Figura 69 - Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 125 MHz) da substância Ao-FI-9.



Fonte: Elaborado pela própria autora.

Figura 70 - Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 125 MHz) da substância Ao-FI-9. Expansão dos sinais.

Fonte: Elaborado pela própria autora.

Tabela 23 - Dados do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 ; 500 MHz) para substância Ao-FI-9/4.

Espilantol (Ao-FI-9)		
Hidrogênio	Ao-FI-9/4 (a)	BAE, 2007 (b)
δ (ppm)		
2	5,79 (1H, <i>d</i> , $J=15$ Hz)	5,77 (1H, <i>d</i> , $J=15$ Hz)
3	6,82 (1H, <i>m</i>)	6,82 (1H, <i>dt</i> , $J=15$ Hz)
4 e 5	2,27 (4H, <i>m</i>)	2,29 (4H, <i>m</i>)
6	5,26 (1H, <i>m</i>)	5,26 (1H, <i>dt</i> , $J=11$ Hz)
7	5,97 (1H, <i>t</i> , $J=11$ Hz)	5,97 (1H, <i>dd</i> , $J=11$ Hz)
8	6,29 (1H, <i>t</i> , $J=15$ Hz)	6,28 (1H, <i>dd</i> , $J=15$ Hz)
9	5,70 (1H, <i>m</i>)	5,69 (1H, <i>dq</i> , $J=15$ Hz)
10	1,79 (4H, <i>m</i>)	1,77 (3H, <i>d</i>)
N-H	5,49 (s)	5,45 (s)
1'	3,14 (2H, <i>t</i> , $J=6,5$ Hz)	3,14 (2H, <i>dd</i>)
2'	1,79 (4H, <i>m</i>)	1,77 (1H, <i>m</i>)
3' e 4'	0,92 (6H, <i>d</i>)	0,92 (6H, <i>d</i>)

(a) 500 MHz, CDCl_3 ; (b) 500 MHz, CDCl_3

Fonte: Elaborado pela própria autora.

Tabela 24 - Dados do espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 125 MHz) para substância Ao-FI-9/4.

Espilantol (Ao-FI-9)		
Carbono	Ao-FI-9/4 (a)	BAE, 2007 (b)
δ (ppm)		
1	166,13	166,06
2	124,24	124,13
3	143,76	143,78
4	32,23	32,19
5	28,72	28,68
6-9	126,83 / 127,81 / 129,59 / 130,12	126,77 / 127,79 / 129,52 / 130,10
10	26,50	26,44
1'	46,99	46,92
2'	20,26	20,22
3' e 4'	18,45	18,44

(a) 125 MHz, CDCl_3 ; (b) 125 MHz, CDCl_3

Fonte: Elaborado pela própria autora.

6.5.3 Avaliação da atividade esquistossomicida *in vitro* do extrato de *A. oleracea* e do espilantol frente à vermes adultos de *S. mansoni*

Como descrito anteriormente, alguns extratos vegetais foram selecionados para investigação da atividade esquistossomicida. Dentre eles, o extrato de *A. oleracea* e a substância espilantol foram avaliados quanto à atividade esquistossomicida *in vitro* frente à vermes adultos de *S. mansoni*.

Apesar dos inúmeros relatos na literatura do potencial esquistossomicida de diferentes espécies de plantas, ainda não há estudos desta atividade para o extrato bruto de *A. oleracea* ou para a alquilamida, espilantol.

Em relação ao extrato de *A. oleracea*, como mostrado na Tabela 25, após 48 h de incubação, 100% dos vermes adultos foram mortos na presença do Ao-FI (200, 100 e 50 µg/mL), bem como todos os parasitos apresentaram redução significativa do movimento.

Considerando a atividade esquistossomicida do extrato bruto das flores de *A. oleracea*, bem como o ensaio de ultrafiltração realizado, no qual o espilantol foi identificado como ligante da enzima apirase de batata, esta substância também foi avaliada frente à vermes adultos de *S. mansoni*.

Como se pode observar na Tabela 25, o espilantol (100 µM) foi capaz de reduzir significativamente a atividade motora de todos os vermes machos e fêmeas, e, além disso, causou a morte de 100% dos vermes adultos após 24 h de incubação. Já na concentração de 50 µM, observa-se apenas leve redução da atividade motora em 30% dos vermes após 24 h de incubação com espilantol. E nesta mesma concentração, observa-se que 30% de vermes são mortos após 48 h de incubação, aumentando essa taxa para 60% após 72 h de incubação (Tabela 25).

Em relação às atividades biológicas de *A. oleracea* e seus metabólitos frente a outros parasitos, Spelman e colaboradores (2011) observaram que o espilantol, obtido desta planta, apresentou IC₅₀ de 16,5 µg/mL frente ao *P. falciparum* (linhagem PFB) e IC₅₀ de 5,8 µg/mL para a cepa K1 (*falciparum* resistente à cloroquina). Além disso, em concentrações relativamente baixas, o espilantol (5 mg/kg) e o extrato aquoso de *A. oleracea* (50 mg/kg) reduziram a parasitemia em 59% e 53% em camundongos infectados com *P. yoelii* (SPELMAN et al., 2011).

Em outro estudo, alquilamidas isoladas de *A. oleracea* também apresentaram atividade frente às cepas de *P. falciparum*. Dentre as substâncias testadas o

espilantol foi o mais potente, o qual apresentou IC₅₀ de 26,43 µg/mL (MBEUNKUI et al., 2011).

Apesar do mecanismo de ação para a atividade antiparasitária ainda não ter sido esclarecido, estes autores sugerem que esta atividade, observada nos extratos de *Acmella*, pode ser devido ao efeito sinérgico das alquilamidas presentes. Além disso, a atividade imunológica de algumas alquilamidas estruturalmente semelhantes ao epilantol na modulação de citocinas, poderiam estar contribuindo para a redução da parasitemia (MBEUNKUI et al., 2011; SPELMAN et al., 2011).

Tabela 25 - Atividade esquistossomicida *in vitro* do extrato de *A. oleracea* (Ao-FI) sobre os vermes adultos de *S. mansoni*.

Grupos	Tempo de incubação (h)	Mortalidade (%) ^a		Redução da atividade motora (%) ^a			
				Leve		Significativa	
		M	F	M	F	M	F
Controle ^b	24	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0
DMSO 0,5% ^c	24	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0
PZQ 2 µM	24	100	100	0	0	100	100
	48	100	100	0	0	100	100
	72	100	100	0	0	100	100
Ao-FI ^d 200 µg/mL	24	0	0	100	100	0	0
	48	100	100	0	0	100	100
	72	100	100	0	0	100	100
100 µg/mL	24	0	0	100	100	0	0
	48	100	100	0	0	100	100
	72	100	100	0	0	100	100
50 µg/mL	24	0	0	0	0	100	100
	48	100	100	0	0	100	100
	72	100	100	0	0	100	100
25 µg/mL	24	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0
Epilantol 100 µM	24	100	100	0	0	100	100
	48	100	100	0	0	100	100
	72	100	100	0	0	100	100
50 µM	24	0	0	30	30	0	0
	48	30	30	0	0	30	30
	72	60	60	0	0	60	100

^a Porcentagem em relação a 20 vermes. ^b Meio RPMI. ^c DMSO em meio RPMI. ^d Extrato bruto clorofórmico das flores de *A. oleracea*.

Fonte: Elaborado pela própria autora.

6.5.4 Ensaio de inibição da atividade enzimática da apirase de batata pelo espilantol

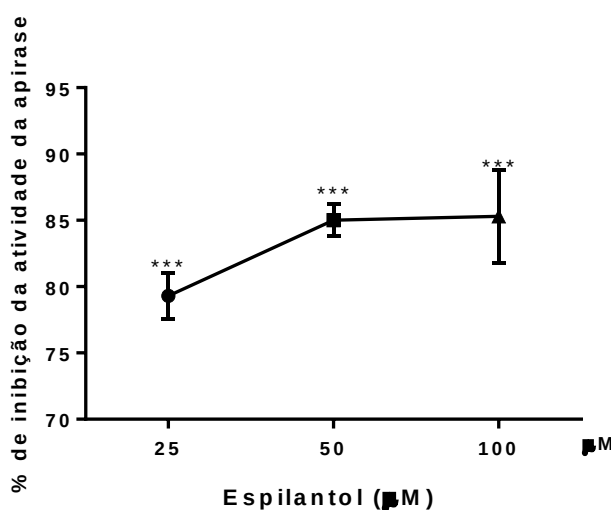
Tendo em vista que o espilantol se apresentou como um ligante da apirase de batata no ensaio de UF, e também apresentou atividade esquistossomicida *in vitro* frente à vermes adultos de *S. mansoni*, investigou-se a atividade inibitória *in vitro* dessa substância frente à apirase de batata.

Como pode-se observar na Figura 71, o espilantol foi capaz de diminuir a atividade enzimática da apirase de batata em todas as concentrações testadas (25 a 100 μ M). Na menor concentração testada de espilantol (25 μ M) a inibição da enzima foi em média 77,29%. Enquanto que nas maiores concentrações a inibição foi em média de 84,43 e 85,3%.

Na literatura há relatos da inibição de outra enzima pelo espilantol. No estudo conduzido por Barbosa e colaboradores (2016) avaliou-se o efeito do extrato de *A. oleracea* na enzima tirosinase. Neste caso a fração diclorometânica de *A. oleracea* (contendo aproximadamente 100% de espilantol) inibiu significativamente a atividade enzimática da tirosinase, com $IC_{50} = 0,50$ mM (BARBOSA et al., 2016).

Para complementar essa proposta, estudos de modelagem computacional também foram realizados com a finalidade de verificar a capacidade de ligação do espilantol na apirase de batata e também em outras enzimas.

Figura 71 - Inibição da atividade enzimática da apirase de *S. tuberosum* pelo espilantol.



*** Diferença significativa quando comparado com o controle negativo ($p < 0,0001$).

Fonte: Elaborado pela própria autora.

6.5.5 Estudos de *docking* molecular

Nos estudos de *docking* molecular do presente trabalho utilizou-se o software AutoDock Vina 1.1.2 (Maio 11, 2011) levando em consideração para análise o valor de afinidade (Kcal/mol) e as interações moleculares entre os compostos submetidos e os resíduos flexíveis da proteína, conforme mostrado na Tabela 26. Nesta tabela, estão descritos os resultados do espilantol submetido ao *docking* molecular com a proteína SmATPDase1, SmATPDase2, ambas de *S. mansoni* e apirase da batata.

Como pode-se observar na Tabela 26, o espilantol apresentou valores negativos de energia (afinidade) com todas as proteínas avaliadas, sugerindo que as interações (ponte de hidrogênio e dipolo-induzido) entre o sítio ativo e o composto podem ocorrer de forma espontânea. Além disso, o espilantol apresentou interações envolvendo os resíduos GLU201 e THR82, considerados importantes para que ocorra a inibição da enzima.

As concentrações estimadas de espilantol para inibição das enzimas são de 66,35 μ M para SmATPDase 1, 92,99 μ M para SmATPDase 2 e 130,33 μ M para apirase.

Nas análises *in silico* da toxicidade, o espilantol apresentou boa disponibilidade oral e um perfil de baixo risco de citotoxicidade, pois não demonstrou violação a nenhum dos parâmetros de RO5. Além disso, o espilantol apresentou *nro*tb igual a 7 e TPSA igual a 29,10, os quais estão de acordo com os valores esperados para que o composto seja seguro e apresente boa disponibilidade oral quanto ao seu uso terapêutico (Tabela 27) (BORGES, 2018; VEBER et al., 2002).

O perfil farmacocinético de algumas alquilamidas têm sido investigado por diversos autores. Nestes trabalhos, após o uso oral dessa classe de substância, verifica-se rápida absorção oral com C_{max} variando entre 10 e 40 min e tempo de eliminação de 1,5-5,0 h, indicando que as alquilamidas apresentam um boa biodisponibilidade oral (GUIOTTO et al., 2008; MATTHIAS et al., 2007; WOELKART, BAUER, 2007; WOELKART et al., 2008). Além disso, o espilantol também apresenta bom perfil farmacocinético, atingindo a circulação sistêmica após absorção intestinal e apresentando também capacidade de permeação da barreira hematoencefálica com significativo efluxo da mesma (VERYSER et al., 2016).

Apesar dos resultados apresentados nos estudos de *docking* molecular sugerirem uma inibição enzimática em concentrações acima de 66 μM , verificamos no ensaio de inibição enzimática *in vitro* da apirase que o espilantol foi capaz de inibi-la em concentrações inferiores (25 μM).

Tabela 26 - Resultados dos estudos de *docking* molecular do espilantol com SmATPDase 1, SmATPDase 2 e apirase.

Receptor	AutoDock Vina (Kcal/mol)	K _i calculado (μM)	Interações (AutoDock Vina)
SmATPDase 1	-5,7	66,35	GLU201, THR82
SmATPDase 2	-5,5	92,99	-
Apirase	-5,3	130,33	THR30, GLU145, SER29, ARG33

Fonte: Elaborado pela própria autora.

Tabela 27 - Resultados de predição de toxicidade do espilantol, utilizando os programas SwissADME (SA) e Molinspiration (MI).

Amostra	Doador de ligação de hidrogênio	Aceptor de ligação de hidrogênio	nrotb	Massa molar (g/mol)		LogP		TPSA	
	MI/SA	MI/SA	MI/SA	MI	SA	MI	SA	MI	SA
Praziquantel	0	4	1	312,41	312,41	2,74	3,01	40,62	40,62
Espilantol	1	1	7	221,34	221,34	3,49	3,55	29,10	29,10

Fonte: Elaborado pela própria autora.

6.6 CONCLUSÃO

No presente capítulo, o extrato bruto clorofórmico das flores de *A. oleracea* teve algumas das suas alquilamidas identificadas por espectrometria de massas e, o espilantol, identificado como ligante da apirase de batata, foi isolado desse extrato por cromatografia em coluna clássica.

O extrato bruto clorofórmico das flores de *A. oleracea* e o espilantol apresentaram atividade esquistossomicida *in vitro*, corroborando com o potencial antiparasitário desta espécie e também das substâncias pertencentes à classe de alquilamidas.

Além disso, o espilantol apresentou expressiva inibição enzimática da atividade da apirase de batata e os estudos de *docking* molecular sugerem que esta substância também tem capacidade de inibir outras enzimas, como SmATPase 1 e 2, ambas de *S. mansoni*.

Finalmente, a análise dos dados obtidos permitem sugerir que o espilantol pode exercer seu efeito esquistossomicida *in vitro* através da inibição de enzimas essenciais para o parasita, como as ATPdifosfohidrolases. No entanto, estudos adicionais devem ser realizados com esta alquilamida, a fim de conhecer os mecanismos de ação desta substância sobre os vermes adultos de *S. mansoni*.

7 CARACTERIZAÇÃO POR CLUE-ESI-QTOF-EM DO EXTRATO BRUTO DE *Centella erecta* (APIACEAE) E AVALIAÇÃO DA SUA ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA FRENTE À VERMES ADULTOS DE *S. mansoni*

O presente capítulo se destina à caracterização química por CLUE-ESI-QTOF-EM do extrato bruto de *C. erecta*, bem como o processo de fracionamento cromatográfico para isolamento e identificação estrutural das substâncias ligantes da enzima apirase de batata selecionados através da técnica de UF acoplada à CLUE-EM. Além disso, investigou-se a capacidade de inibição enzimática da apirase de batata pelo ligante isolado, o qual também foi submetido aos estudos de *docking* molecular nas SmATPases e apirase. E ainda investigou-se a atividade esquistossomicida *in vitro* frente à vermes adultos de *S. mansoni* do extrato bruto e *in vivo* do ligante isolado.

7.1 *Centella erecta*

A família Apiaceae é composta por plantas normalmente aromáticas e de caule oco. É considerada uma das maiores famílias de Angiospermas, incluindo aproximadamente 400 gêneros e 4000 espécies. No Brasil, ocorrem 8 gêneros e cerca de 100 espécies, sendo cultivadas como condimentares e alimentícias, como é o caso da cenoura (*Daucus carota* L.), o aipo (*Anethum graveolens* L.), o funcho (*Foeniculum vulgare* Mill.), a erva doce (*Pinpinella anisum* L.) e a salsa (*Petroselinum crispum* Mill. Nylman ex A. W. Hill) (TOMCHINSKY, MING, 2019).

O gênero de *Centella* L. compreende mais de 40 espécies (ALGAHTANI et al., 2017; RUMALLA et al., 2010). A maioria dessas espécies caracteriza-se por plantas perenes de porte herbáceo, que crescem em lugares úmidos e sombreados, formando sobre o solo um tapete semelhante a um gramado. São endêmicas da África do Sul e várias espécies também são indígenas das regiões tropicais e subtropicais da Ásia, África, América do Norte e do Sul (ALGAHTANI et al., 2017).

Dentre as espécies desse gênero destaca-se a *Centella asiatica* (L.) Urb. e a *C. erecta* (L.f.) Fern.

C. asiatica é a espécie mais conhecida deste gênero e tem sido amplamente cultivada na China, Ásia, Índia, Sri Lanka e África. É muito utilizada na medicina ayurvédica para tratamento de problemas de memória e doenças de pele, como

cicatrização de feridas, queimaduras, hanseníase, lúpus (RUMALLA et al., 2010). As principais atividades biológicas de *C. asiatica* têm sido atribuídas ao seu conteúdo de saponinas triterpênicas e suas agliconas, especialmente ao asiaticosídeo, madecasosídeo, ácido asiático e ácido madecásico. Compostos fenólicos e flavonoides encontrados nesta planta também têm demonstrado potencial antitumoral, anti-inflamatório, efeito neuroprotetor e relacionados ao estresse oxidativo (BYLKA et al., 2014; ORHAN, 2012).

C. erecta (Figura 72), outra espécie desse gênero, é geralmente encontrada na América do Sul e em regiões do Leste e Sul da América do Norte. Segundo o Departamento de Recursos Naturais de Maryland a espécie *C. erecta* está ameaçada de extinção no estado de Maryland (HOGAN, BELTON, 2016).

Figura 72 - *Centella erecta* (L.f.) Fern.



Fonte: Adaptado de ALGAHTANI et al. (2017).

Em contraste com *C. asiatica*, que tem sido amplamente estudada, os constituintes químicos de *C. erecta* ainda são pouco investigados. Além disso, esta espécie é facilmente confundida com a *C. asiatica* (RUMALLA et al., 2010).

Dentre os poucos estudos que há na literatura, Rumalla e colaboradores (2010) relataram o isolamento de 19 compostos das folhas de *C. erecta*, além de elucidarem um novo glicosídeo triterpênico nesta espécie.

Outros trabalhos têm identificado as saponinas triterpênicas (asiaticosídeo e madecasosídeo) e suas agliconas (ácido asiático e ácido madecásico) tanto em *C. asiatica* quanto em *C. erecta* (RAFAMANTANANA et al., 2009; RUMALLA et al., 2010). Mais recentemente, essas substâncias foram quantificadas nestas duas espécies, e verificou-se que nas amostras de *C. erecta* havia um menor conteúdo de

saponinas totais e sapogeninas em comparação com a *C. asiatica* (ALGAHTANI et al., 2017).

7.2 SAPONINAS TRITERPÊNICAS E O ASIATICOSÍDEO

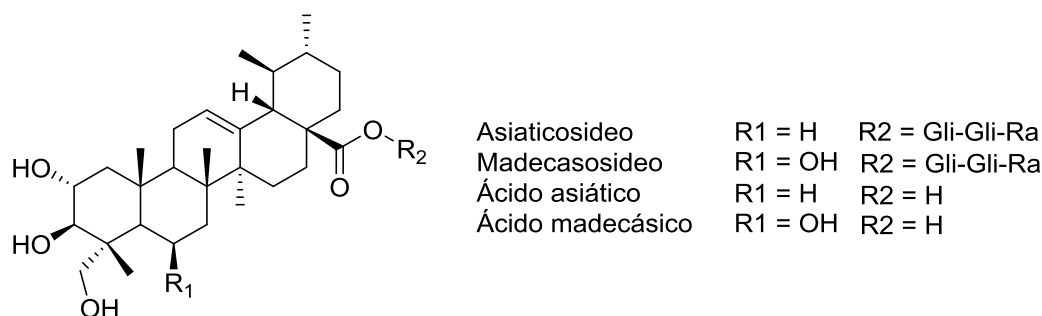
As saponinas são frequentemente subdivididas em duas classes principais, triterpênicas e esteroidais, ambas derivadas do precursor óxido de esqualeno, com 30 átomos de carbono (C_{30}). A diferença entre estas duas classes é que as saponinas esteroidais possuem o núcleo aglicônico esteroidal com 3 grupos metila a menos (C_{27}), enquanto as saponinas triterpênicas se mantêm com 30 átomos de carbono (CAVALCANTI, 2015).

As saponinas possuem uma parte com característica lipofílica (triterpeno ou esteroide) e outra hidrofílica (açúcares). Esse tipo de estrutura determina a propriedade de redução da tensão superficial da água, sua ação detergente e emulsificante. Em solução aquosa, forma espuma persistente e abundante (CAVALCANTE, 2015).

As saponinas esteroidais são encontradas nas famílias Liliaceae, Dioscoreaceae e Agavaceae. Já as saponinas triterpênicas são mais abundantes na natureza e encontram-se mais difundidas nas famílias Primulaceae, Sapotaceae, Caryophyllaceae e Apiaceae (PODOLAK et al., 2010).

Na *C. erecta* (Apiaceae) verifica-se a presença de algumas saponinas triterpênicas ativas, como o asiaticosídeo, o madecasosídeo, e suas agliconas como o ácido asiático e o ácido madecásico (RUMALLA et al., 2010) (Figura 73).

Figura 73 - Algumas saponinas triterpênicas e suas agliconas identificadas em *C. erecta*.



Fonte: Elaborado pela própria autora.

Essas e outras saponinas encontradas nas espécies de *Centella* são utilizadas principalmente para a cicatrização de feridas e tratamento da insuficiência venosa. Elas também são usadas pela indústria cosmética em cremes anti-envelhecimento e antioxidantes (AZERAD, 2016).

Dentre as moléculas ativas presentes em extratos de *Centella*, destaca-se o asiaticosídeo, o qual é um éster do ácido asiático com duas moléculas de glicose e uma molécula de ramnose, e foi isolado pela primeira vez por Bontems (1941), tendo sua elucidação estrutural por RMN e espectrometria de massas realizada por Luo e Chin (1981).

Em relação às atividades biológicas do asiaticosídeo, há relatos na literatura demonstrando a ação desta substância na cicatrização de úlcera gástrica (CHENG et al., 2004), no tratamento da hanseníase e de certos tipos de tuberculose (NABI et al., 2019). Além disso, essa substância é capaz de inibir a atividade proliferativa de queloides e cicatrizes hipertróficas, regulando a proliferação de fibroblastos e a síntese de colágeno (LEE et al., 2012; LU et al., 2004). E ainda, sendo usado no combate à lipodistrofia ginoide, por exercer atividade anti-inflamatória e de regulação da microcirculação (BYLKA et al., 2013), justificando a sua utilização em produtos cosméticos.

O asiaticosídeo também tem sido avaliado quanto a sua atividade antileishmanial *in vitro* e *in vivo*. Estudo realizado demonstra que o asiaticosídeo foi capaz de inibir efetivamente a replicação *in vitro* do parasito (*L. donovani*) dentro dos macrófagos, sendo essa inibição concentração e tempo dependentes, atingindo 98% de inibição com 25 mg/L de asiaticosídeo após 36 h de tratamento. Verificou-se ainda que o asiaticosídeo demonstrou atividade leishmanicida contra as formas amastigotas intracelulares através indução da produção de TNF- α via óxido nítrico (BHAUMIK et al., 2012).

Além disso, a atividade antileishmanial *in vivo* do asiaticosídeo (1 a 10 mg/kg/dia) também foi investigada em camundongos infectados com *L. donovani*. Como resultado, o tratamento com asiaticosídeo (5 mg/kg/dia) resultou na quase completa eliminação da carga parasitária do fígado e do baço dos animais infectados (BHAUMIK et al., 2012). Os autores sugerem que o mecanismo de ação do asiaticosídeo se relaciona com uma troca de resposta Th2 para Th1

acompanhada da indução de TNF- α via óxido nítrico, sendo todos esses elementos importantes para uma efetiva atividade antileishmanial (BHAUMIK et al., 2012).

Apesar das diversas atividades biológicas das espécies de *Centella*, bem como as saponinas, especialmente o asiaticosídeo, não há relatos na literatura investigando o potencial esquistossomicida desses extratos e da saponina pura.

7.3 OBJETIVOS

O objetivo geral do trabalho descrito no presente capítulo foi a caracterização química dos constituintes de *C. erecta*, bem como o isolamento dos metabólitos e a avaliação da atividade esquistossomicida *in vitro* do extrato e substância isolada frente à vermes adultos de *S. mansoni*.

Para esses propósitos, os objetivos específicos foram:

- Caracterizar quimicamente o extrato bruto etanólico das partes aéreas de *C. erecta* por meio de CLUE-ESI-QTOF-EM;
- Realizar o isolamento, purificação e identificação do asiaticosídeo, o qual foi anteriormente identificado como ligante da apirase de batata;
- Avaliar a atividade esquistossomicida *in vitro* do extrato bruto e do asiaticosídeo frente à vermes adultos de *S. mansoni*;
- Avaliar a atividade enzimática da apirase de batata frente ao asiaticosídeo;
- Realizar estudos de *docking* molecular do asiaticosídeo frente à apirase de batata e as ATP difosfohidrolases de *S. mansoni*.
- Avaliar a atividade esquistossomicida *in vivo* do asiaticosídeo frente ao *S. mansoni*.

7.4 MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos deste trabalho foram realizados nos laboratórios: NIPPAN da Universidade Federal de Juiz de Fora, CentralBio da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora, Departamento de Química da Universidade Federal de Juiz de Fora, NPDN - Universidade de Guarulhos, São Paulo, SP e no Departamento de Ciência da Computação - Programa de Pós-Graduação em Modelagem Molecular da Universidade Federal de Juiz de Fora.

Para execução dos métodos foram utilizados os mesmos equipamentos descritos no item 3.6 deste trabalho.

Os solventes, a CCD, a CLUE e os espectros de RMN estão descritos no item 5.4 e 5.4.1. deste trabalho.

Para a realização de cromatografia em coluna foi utilizado como adsorvente sephadex LH-20.

7.4.1 Análise por CLUE-ESI-QTOF-EM

As condições cromatográficas e de ESI-EM foram as mesmas citadas no item 3.6.2.

A identificação das substâncias presentes no extrato bruto de *C. erecta* foi realizada por EM/EM-QTOF. Os espectros de massas obtidos foram comparados com dados disponíveis na base de dados MassBank of North America (<http://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/>), para identificação das substâncias, além das literaturas LONG et al., 2012; ZACARIA et al., 2019.

7.4.2 Fracionamento cromatográfico e isolamento do asiaticosídeo

Com o mesmo objetivo descrito anteriormente para os outros extratos, as partes aéreas de *C. erecta* foram coletadas novamente em janeiro de 2018. A exsiccata do vegetal foi depositada no Herbário Leopoldo Krieger – CESJ, da UFJF, sob número de tombo 65907.

Este material vegetal passou pelos mesmos processos de secagem e trituração descritos no item 3.6.1 deste trabalho e resultou em 580 g de pó, o qual foi submetido à maceração em etanol. As soluções etanólicas obtidas foram filtradas e,

em seguida, transferidas para balões de fundo redondo e concentradas com auxílio de rotaevaporador à temperatura de 40°C. Os extratos obtidos foram transferidos para frascos previamente pesados fornecendo 26,5 g de extrato bruto etanólico das partes aéreas de *C. erecta* (Ce).

O extrato etanólico das partes aéreas de *C. erecta* foi inicialmente submetido às partições líquido-líquido com solventes orgânicos de diferentes polaridades, com a finalidade de separação inicial dos constituintes do extrato e obtenção de uma fração rica em saponinas, por meio da diferença de solubilidade de cada composto nas fases, conforme descrito a seguir.

Cada 1 g do extrato foi ressuspendido em 10 mL da mistura de metanol-água (9:1 v/v). Assim, esta suspensão foi transferida para funil de separação e extraída com hexano por processo de partição líquido-líquido. A partição foi realizada até a clarificação das soluções hexânicas finais. Após adição de sulfato de sódio anidro para eliminação da água, as soluções hexânicas foram filtradas para um balão de fundo redondo e concentradas em rotaevaporador, sob pressão reduzida à 40 °C, sendo em seguida transferidas para frasco previamente pesado e denominada fração hexânica das partes aéreas de *C. erecta* (Ce-H) (1,2 g).

A suspensão hidrometanólica restante foi rotaevaporada até a eliminação do metanol e, em seguida, adicionada de água destilada e particionada 3 vezes com acetato de etila. Às soluções de acetato de etila obtidas foi adicionado sulfato de sódio anidro para eliminação da água e, estas soluções foram filtradas para um balão de fundo redondo e concentradas em rotaevaporador sob pressão reduzida à 40 °C, sendo em seguida transferidas para frasco previamente pesado e denominada fração em acetato de etila das partes aéreas de *C. erecta* (Ce-A) (5,5 g).

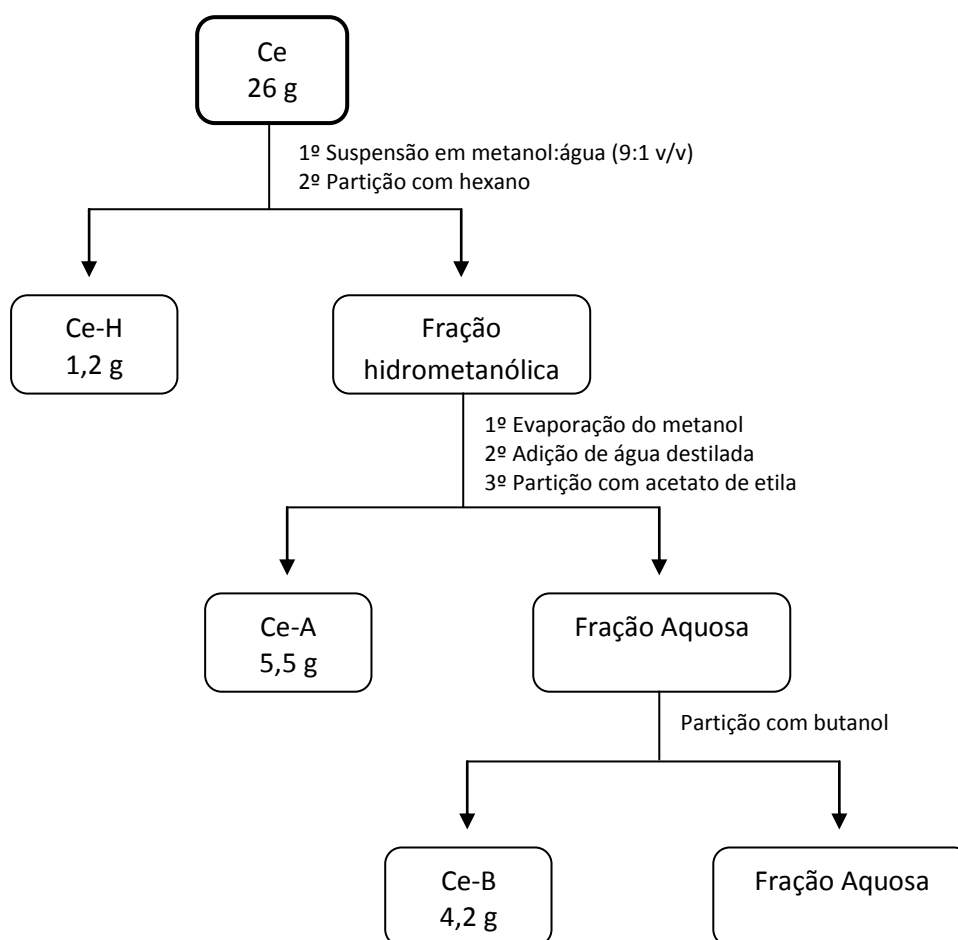
A solução aquosa remanescente foi particionada em butanol. Após adição de sulfato de sódio anidro e filtração, estas soluções em butanol foram transferidas, progressivamente, para um balão de fundo redondo, sendo concentradas em rotaevaporador sob pressão reduzida à 40 °C. Após transferência para frasco previamente pesado, foi denominada fração butanólica das partes aéreas de *C. erecta* (Ce-B) (4,2 g). A fração aquosa restante foi descartada.

O processo de fracionamento por partição líquido-líquido do extrato bruto e as massas obtidas estão resumidos na Figura 74.

No intuito de isolar o constituinte de interesse, 1,0 g da fração Ce-B foi submetida à cromatografia em coluna utilizando uma coluna de vidro de 2 cm de diâmetro preenchida com sephadex LH-20, resultado em 35 cm de comprimento da fase estacionária. Utilizou-se como fase móvel metanol puro, sendo coletadas 80 frações de aproximadamente 10 mL, as quais foram reunidas em 7 subfrações de acordo com as semelhanças cromatográficas observadas pela CCD.

A subfração Ce-B40 apresentou um precipitado, o qual foi lavado com metanol e o sobrenadante transferido para outro frasco. De acordo com a análise do perfil cromatográfico desta subfração, após este procedimento, observou-se que a mesma apresentava como uma única mancha na CCD. Assim, esta subfração foi avaliada em RMN de ^1H e ^{13}C para a determinação da estrutura química.

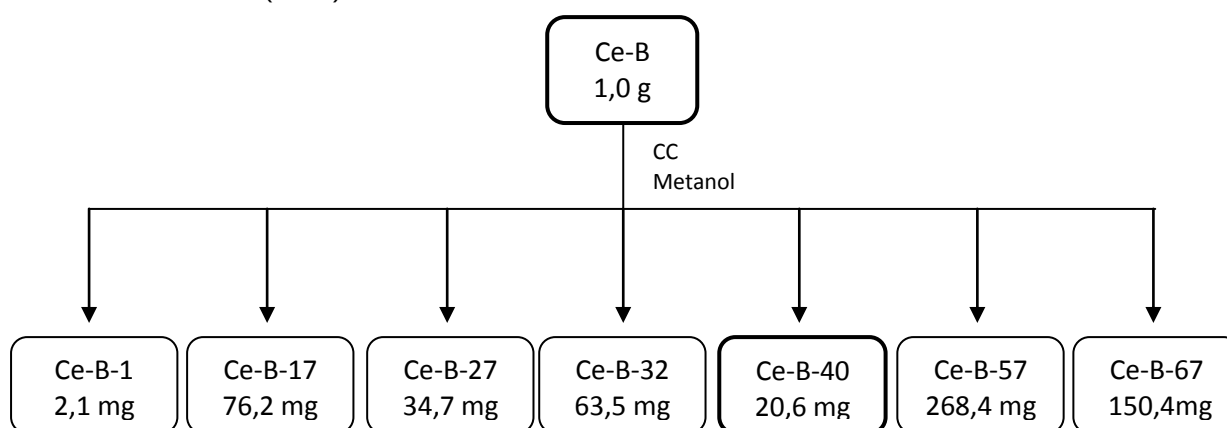
Figura 74 - Fluxograma geral do procedimento de partição líquido-líquido do extrato bruto etanólico das partes aéreas de *C. erecta* (Ce).



Fonte: Elaborado pela própria autora.

Este mesmo processo de fracionamento foi aplicado ao restante da fração Ce-B, resultando no isolamento de uma massa total de 84 mg da substância, posteriormente identificada. O processo de fracionamento do extrato bruto etanólico das partes aéreas de *C. erecta* e isolamento da substância estão resumidos na Figura 75.

Figura 75 - Fluxograma do fracionamento da fração butanólica do extrato bruto etanólico das partes aéreas de *C. erecta* (Ce-B).



Fonte: Elaborado pela própria autora.

7.4.3 Ensaio esquistossomicida *in vitro*

Os ensaios *in vitro* foram efetuados no Núcleo de Enteroparasitos do Instituto Adolfo Lutz, sob a colaboração e supervisão do Prof. Dr. Josué de Moraes. Todos os ensaios foram submetidos e aprovados pelo CEUA número 031/2017. Os procedimentos deste ensaio estão descritos no item 5.4.3 deste trabalho.

As amostras foram solubilizadas e diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO, Merck) e meio RPMI 1640 de forma a obter as concentrações de 100, 50 e 25 µg/mL, para o extrato, 50 µM para a substância isolada, sendo que a concentração final de DMSO não foi superior a 0,5 %. O PZQ (2 µM) foi utilizado como controle positivo.

7.4.4 Ensaio de inibição da atividade enzimática da apirase de batata pelo asiaticosídeo

O ensaio de atividade enzimática foi realizado no NIPPAN, de acordo com métodos previamente descritos com modificações (DETONI et al., 2012; MAIA et al., 2019; TAUSSKY, SHORR, 1953). A descrição do método utilizado está descrito no item 5.4.4 deste trabalho.

As concentrações de asiaticosídeo testadas foram: 100; 50; 25 μ M.

Os tratamentos estatísticos foram realizados com auxílio do software GraphPad InStat 7.0. A análise entre grupos foi realizada pela análise de quartis, de variância (ANOVA) e as diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo teste T-Student. Valores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

7.4.5 Estudos de *docking* molecular

Os estudos de *docking* molecular foram realizados no Departamento da Ciência da Computação da Universidade Federal de Juiz de Fora, sob a colaboração e responsabilidade da Prof. Dra. Priscila Vanessa Zabala Capriles Goliatt, conforme descrito no item 3.6.6 deste trabalho.

7.4.6 Ensaio esquistossomicida *in vivo*

O ensaio esquistossomicida *in vivo* foi realizado no Núcleo de Doenças Negligenciadas da Universidade de Guarulhos, sob a colaboração e responsabilidade do Prof. Dr. Josué de Moraes, utilizando como base metodologias previamente publicadas (MORAES et al., 2014; PEREIRA et al., 2018; SILVA et al., 2017). Os animais foram liberados através da comissão de ética de uso de animais, CEUA número 031/2017.

A linhagem de *S. mansoni* e a manutenção do ciclo evolutivo de *S. mansoni* estão descritos nos item 3.6.7.1 deste trabalho.

O asiaticosídeo foi solubilizado em etanol e diluído em PBS na concentração final de 100 mg/mL e os animais foram tratados com asiaticosídeo na dose única de 400 mg/kg de animal.

Para a realização dos tratamentos, os camundongos fêmeas da linhagem Swiss, pesando em média 20 g, foram infectados (injeção subcutânea) com 100 cercárias/animal. Os animais foram divididos em 2 grupos distintos (Tabela 28) contendo 5 animais cada. Como controle negativo, foi utilizado um grupo de animais não tratados (somente PBS e etanol). O outro grupo de animais foi tratado com asiaticosídeo na dose de 400 mg/kg de animal. O início do tratamento ocorreu 49 dias após a infecção e todos os grupos foram tratados em dose única de 100 µL por via oral através de gavagem. Duas semanas após o tratamento os animais foram eutanasiados.

Tabela 28 - Disposição dos animais nos grupos experimentais e respectivos tratamentos via oral.

Grupo	Tratamento	Dose	Número de doses
1	Controle	-	1
2	Asiaticosídeo	400,0 mg/kg	1

Fonte: Elaborado pela própria autora.

Análises do número de vermes adultos de *S. mansoni* recuperados, contagem do número de ovos maduros, imaturos, mortos e contagem de ovos por grama de fezes, peso hepático e esplênico foram realizados conforme descritos nos itens 3.6.7.4; 3.6.7.5 e 3.6.7.6 deste trabalho.

7.4.6.1 Análises estatísticas

Os tratamentos estatísticos foram realizados com auxílio do software GraphPad InStat 7.0. A análise entre grupos foi realizada pela análise de quartis, de variância (ANOVA) e as diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo teste T-Student. Valores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Os dados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão.

7.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.5.1 Caracterização química do extrato bruto etanólico das partes aéreas de *C. erecta* por CLUE-ESI-QTOF-EM

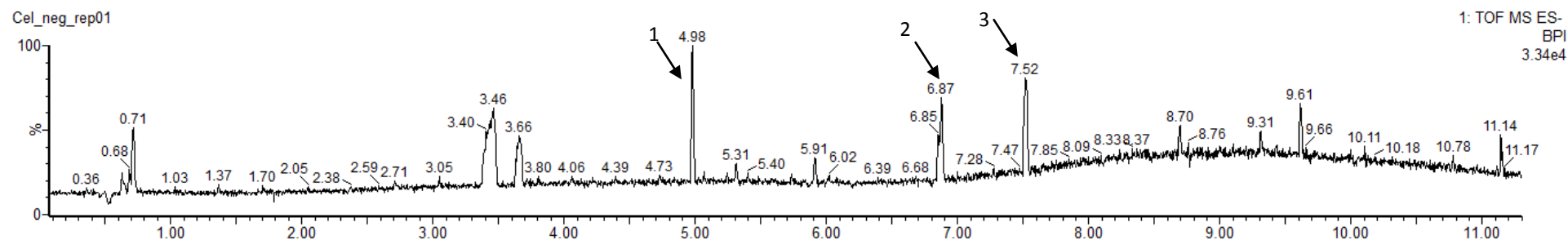
A identificação estrutural das substâncias presentes nos extratos de *C. erecta* foi realizada a partir dos dados de espectrometria de massas e comparação com os dados encontrados na literatura e em bancos de dados online (LONG et al., 2012; MassBank; ZACARIA et al., 2019). Além disso, o asiaticosídeo foi isolado e sua estrutura química confirmada através das análises dos espectros de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C e também pela comparação com a literatura.

Há relatos na literatura que as saponinas triterpênicas (asiaticosídeo e madecassosídeo) e suas agliconas (ácido asiático e ácido madecássico) são os constituintes mais abundantes encontrados na *C. erecta* (GRAY et al., 2018; ZACARIA et al., 2019).

No presente trabalho, os resultados da análise dos dados obtidos em CLUE-ESI-QTOF-EM sugerem a presença da saponina triterpênica asiaticosídeo e das agliconas, ácido asiático e ácido madecássico (Tabela 29 e Figura 76). A Tabela 29 mostra o tempo de retenção de cada substância identificada, informações de fragmentação e, ainda seu íon precursor, obtidos no modo negativo.

Como descrito anteriormente, a estrutura do asiaticosídeo (Figura 77) foi atribuída ao pico de tempo de retenção igual a 4,98 min, no qual observa-se um íon m/z 993,4827, correspondente à formação de aducto com o íon cloreto e m/z 957,5045 $[\text{M}-\text{H}]^-$, correspondente à massa do asiaticosídeo. Além disso, verificam-se como principais fragmentos os íons m/z 487,3400 $[\text{M}-\text{H}-2\text{Glc}-\text{Rha}]^-$ e 469,1537 $[\text{M}-\text{H}-2\text{Glc}-\text{Rha}-\text{H}_2\text{O}]^-$, os quais estão de acordo com a literatura (LONG et al., 2012; ZACARIA et al., 2019).

As agliconas, ácido madecássico e ácido asiático (Figura 77), foram detectadas nos tempos de retenção, 6,87 e 7,52 min, respectivamente. O ácido madecássico apresentou íon m/z 503,3387 $[\text{M}-\text{H}]^-$, e o ácido asiático apresentou um íon m/z 487,3445 $[\text{M}-\text{H}]^-$, os quais também estão de acordo com a literatura (LONG et al., 2012; ZACARIA et al., 2019).

Figura 76 - Cromatograma em CLUE-ESI-QTOF-EM (modo negativo) do extrato bruto de *C. erecta*.

Fonte: Elaborado pela própria autora.

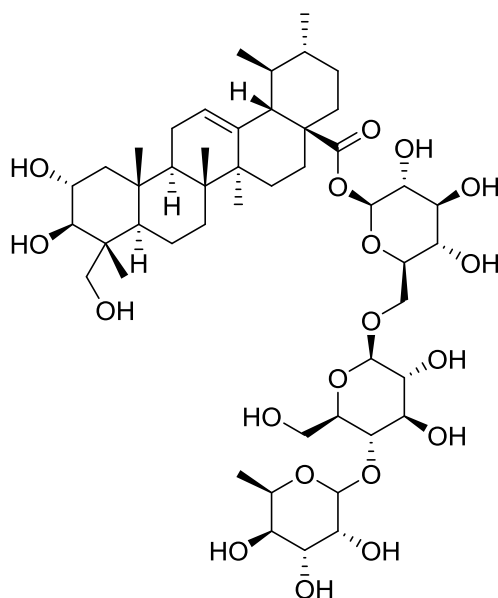
Tabela 29 - Dados cromatográficos e do espectro de massas das substâncias identificadas no extrato bruto de *C. erecta*.

Pico	Substâncias identificadas	T _R (min)	m/z [M-H]	Fragmentos principais	Literatura ^a
1	Asiaticosídeo	4,98	993,4827	957,5045; 487,3400; 469,1537; 162,8393; 160,8240; 116,9285	957; 487; 469; 367
2	Ácido Madecásico	6,87	503,3387	325,1851; 178,8417; 162,8393; 160,8420; 116,9285	503
3	Ácido Asiático	7,52	487,3445	441,2468; 325,1851; 178,8417; 162,8419; 160,8420; 116,9285	487

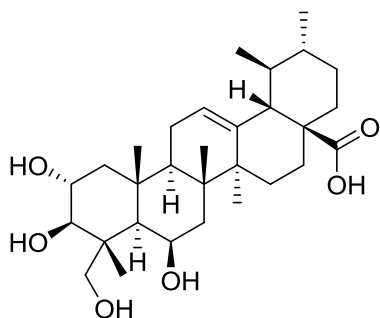
^a LONG et al., 2012; MassBank.; ZACARIA et al., 2019

Fonte: Elaborado pela própria autora.

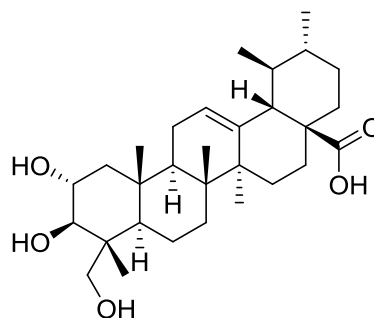
Figura 77 - Estruturas químicas dos compostos identificados no extrato bruto de *C. erecta* por CLUE-ESI-QTOF-EM.



1. Asiaticosideo



2. Ácido madecásico



3. Ácido asiático

Fonte: Elaborado pela própria autora.

7.5.2 Isolamento e identificação estrutural da substância isolada do extrato de *C. erecta*

Como descrito anteriormente, o extrato bruto *C. erecta* apresentou, no ensaio de UF acoplada à EM, alguns ligantes da enzima apirase de batata. Dentre estes, o ligante identificado como asiaticosídeo foi isolado do extrato de *C. erecta* e, em seguida, identificado por meio de técnicas espectroscópicas. Para este isolamento, o extrato bruto *C. erecta* foi submetido ao processo de partição líquido-líquido e em

seguida ao processo de fracionamento em cromatografia coluna, utilizando sephadex LH-20. Como resultado, obteve-se o 84 mg de asiaticosídeo.

O asiaticosídeo teve sua estrutura química identificada com base na análise dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C e comparação com os dados encontrados na literatura.

A análise do espectro de RMN de ^1H (Figura 78) mostrou sinais para dois esqueletos glucopiranosila, observados devido à presença de dois dupletos em δ 5,31 ($J = 8,1$ Hz, 1H) e em δ 4,39 ($J = 7,9$ Hz, 1H), referentes aos hidrogênios H1' e H1'', respectivamente, e sinal referente ao esqueleto raminopiranosila, com um duplete em δ 1,27 ($J = 6,2$ Hz, 3H), correspondente aos hidrogênios H6'''. Esses dados estão de acordo com a literatura (LEAL, 2006).

Além disso, outros sinais observados e compatíveis com a literatura para a estrutura do asiaticosídeo estão na Tabela 30 (LEAL, 2006).

Já o espectro de RMN de ^{13}C (Figura 79) da substância Ce-B40 apresentou 45 sinais de carbono, sendo 7 metílicos, 11 metilênicos, 21 metínicos e 3 carbonos não hydrogenados. Os 2 outros sinais de carbonos tiveram o mesmo deslocamento químico do solvente utilizado na análise.

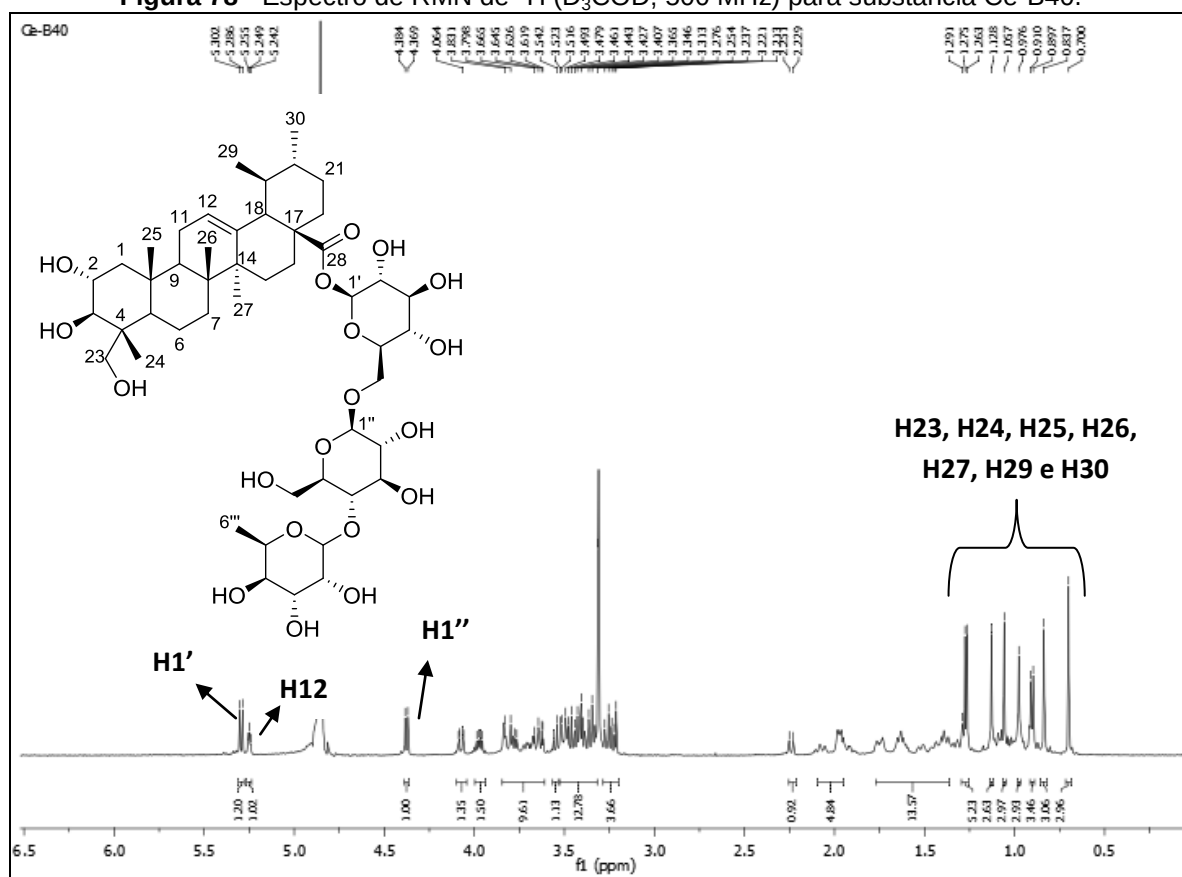
Destes, os sinais em δ 178,0 (C28) e δ 139,3 (C13) confirmam a presença do carbono do éster carbonílico e do carbono olefínico, respectivamente. As atribuições dos demais carbonos podem ser observadas na Tabela 31.

Deste modo, a análise conjunta dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C , bem como a comparação com os dados da literatura (LEAL, 2006), permitem propor a estrutura da substância Ce-B40 como sendo a saponina triterpênica conhecida como asiaticosídeo.

Após isolamento do asiaticosídeo e identificação estrutural do mesmo por RMN, a análise complementar de espectrometria de massas foi realizada para confirmação da sua estrutura.

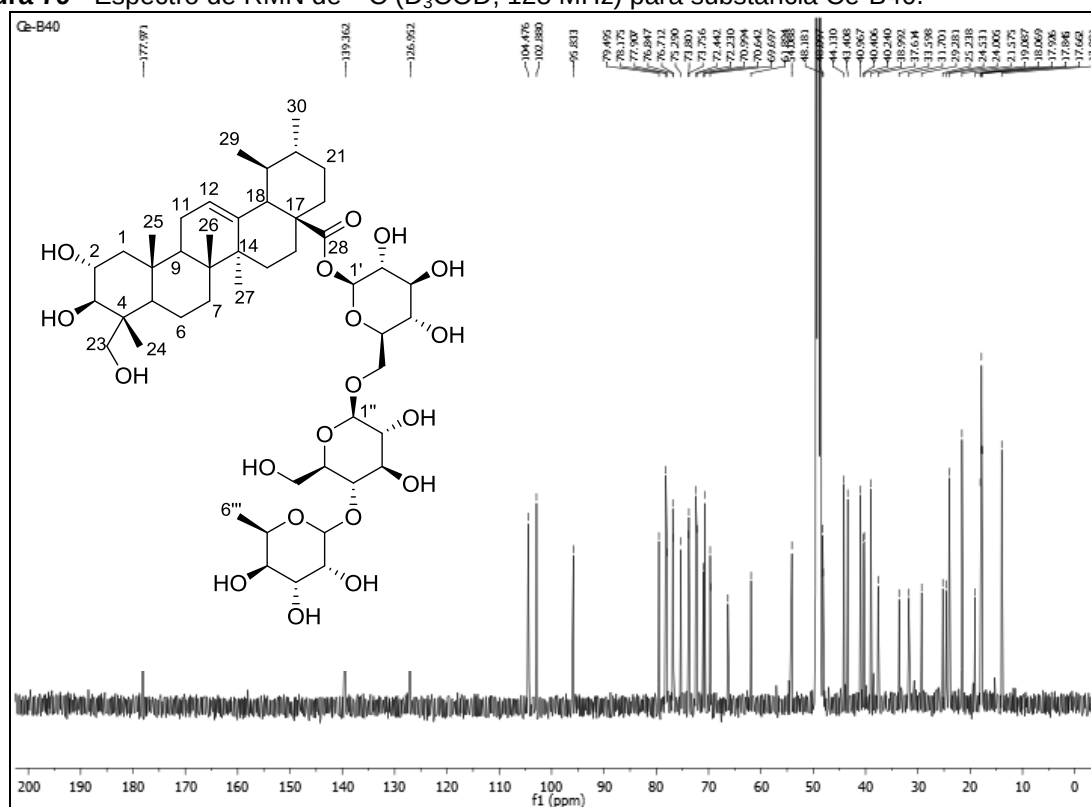
Neste caso, o composto isolado foi submetido às mesmas condições de análise do extrato bruto, descrito anteriormente. Os resultados obtidos confirmaram se tratar do asiaticosídeo, uma vez que esses dados demonstraram a mesma massa molecular e perfil de fragmentação condizentes com os dados encontrados na literatura para essa substância (dados não mostrados).

Figura 78 - Espectro de RMN de ^1H (D_3COD ; 500 MHz) para substância Ce-B40.



Fonte: Elaborado pela própria autora.

Figura 79 - Espectro de RMN de ^{13}C (D_3COD ; 125 MHz) para substância Ce-B40.



Fonte: Elaborado pela própria autora.

Tabela 30 - Dados do espectro de RMN de ^1H (D_3COD ; 500 MHz) para substância Ce-B40.

Asiaticosídeo (Ce-B40)		
Hidrogênio	Ce-B40 (a)	LEAL, 2006 (b)
	δ (ppm)	
3	3,57 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> =9 Hz)	3,57 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> =11,3 Hz)
6	-	4,86 (2H, <i>m</i>)
12	5,26 (1H, <i>t</i> , <i>J</i> =3,4 Hz)	5,24 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> =3,4 e 3,7 Hz)
18	2,25 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> =10,9 Hz)	2,23 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> =11,3 Hz)
23,24, 25,26 e 27	1,30; 0,71; 1,07; 0,85; 1,14 (<i>s</i>)	1,28; 0,69; 1,05; 0,83; 1,12 (<i>s</i>)
29	0,92 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> =6,5 Hz)	0,89 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> =6,2 Hz)
30	0,99 (3H, <i>s</i>)	0,97 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> =6,9 Hz)
1'	5,31 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> =8,1 Hz)	5,29 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> =8,1 Hz)
1''	4,39 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> =7,9 Hz)	4,37 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> =7,9 Hz)
6'''	1,27 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> =6,2 Hz)	1,27 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> =6,3 Hz)

(a) 500 MHz, D_3COD ; (b) 400 MHz, D_3COD

Fonte: Elaborado pela própria autora.

Tabela 31 - Dados do espectro de RMN de ^{13}C (D_3COD ; 125 MHz) para substância Ce-B40.

Asiaticosídeo (Ce-B40)		
Carbono	Ce-B40 (a)	LEAL, 2006 (b)
	δ (ppm)	
1	48,1	46,5
2	66,3	68,9
3	79,5	80,5
4	44,2	42,7
5	-	49,2
6	19,1	18,5
7	33,6	32,8
8	40,9	39,7
9	48,2	47,6
10	38,9	38,3
11	24,0	23,3
12	126,9	125,4
13	139,3	138,4
14	43,4	42,3
15	29,3	28,2
16	25,2	24,4
17	-	48,2
18	54,1	53,0
19	40,4	39,2
20	40,2	39,0
21	31,7	30,8
22	37,6	36,8
23	69,7	70,4
24	13,9	13,0
25	17,6	17,1
26	17,8	17,2
27	24,5	23,9
28	178,0	178,2
29	17,9	17,3
30	21,6	21,3
Glucose'		
1'	96,8	95,8
2'	73,7	73,7

3'	77,9	77,9
4'	70,6	70,6
5'	78,2	78,1
6'	69,7	69,6
Glucose''		
1''	104,5	104,5
2''	76,7	76,7
3''	76,9	76,9
4''	72,4	72,3
5''	75,3	75,3
6''	61,9	61,9
Ramnose		
1'''	102,9	102,9
2'''		79,5
3'''	72,2	72,2
4'''	73,8	73,8
5'''	71,0	70,9
6'''	18,0	17,9

(a) 125 MHz, D₃COD; (b) 100 MHz, D₃COD

Fonte: Elaborado pela própria autora.

7.5.3 Avaliação da atividade esquistossomicida *in vitro* do extrato de *C. erecta* e do asiaticosídeo frente à vermes adultos de *S. mansoni*

O extrato de *C. erecta* e a substância asiaticosídeo foram avaliados quanto a atividade esquistossomicida *in vitro* frente à vermes adultos de *S. mansoni*.

Em relação ao extrato de *C. erecta*, como mostrado na Tabela 32, na maior concentração testada (100 µg/mL) observa-se, nas primeiras 24 h de incubação, uma diferença de ação desse extrato em vermes machos e fêmeas, sendo que somente os vermes machos foram mortos, enquanto as fêmeas tiveram apenas uma pequena redução da atividade motora. Já após 48 h de incubação, todos os vermes adultos (machos e fêmeas) foram mortos na presença do extrato (100 µg/mL), bem como todos os parasitos apresentaram redução significativa do movimento.

Em concentrações menores (50 e 25 µg/mL) a morte de todos os vermes foi observada após 72 h de incubação, sendo observada uma leve redução da atividade motora após 24 h, quando incubado com 50 µg/mL do extrato, e após 48 h com 25 µg/mL do mesmo extrato.

Considerando a atividade esquistossomicida do extrato bruto das partes aéreas de *C. erecta*, bem como o ensaio de ultrafiltração realizado, no qual o asiaticosídeo foi identificado como ligante da enzima apirase, esta substância

também foi avaliada frente à vermes adultos de *S. mansoni*. Porém, o asiaticosídeo, na concentração avaliada (50 μ M) não apresentou atividade esquistossomicida.

Tabela 32 - Atividade esquistossomicida *in vitro* do extrato de *C. erecta* (Ce) e do asiaticosídeo sobre os vermes adultos de *S. mansoni*.

Grupos	Tempo de incubação (h)	Mortalidade (%) ^a		Redução da atividade motora (%) ^a			
				Leve		Significativa	
		M	F	M	F	M	F
Controle ^b	24	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0
DMSO 0,5% ^c	24	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0
PZQ	24	100	100	0	0	100	100
2 μ M	48	100	100	0	0	100	100
	72	100	100	0	0	100	100
Ce ^d	24	100	0	0	100	100	0
	48	100	100	0	0	100	100
	72	100	100	0	0	100	100
100 μ g/mL	24	0	0	100	100	0	0
	48	0	0	100	100	0	0
	72	100	100	0	0	100	100
50 μ g/mL	24	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	100	100	0	0
	72	100	100	0	0	100	100
25 μ g/mL	24	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	100	100	0	0
	72	100	100	0	0	100	100
Asiaticosídeo	24	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0

^a Porcentagem em relação a 20 vermes. ^b Meio RPMI. ^c DMSO em meio RPMI. ^d Extrato bruto etanólico das partes aéreas de *C. erecta*.

Fonte: Elaborado pela própria autora.

Na literatura há poucos relatos sobre as atividades antiparasitárias de extratos de *Centella* e dentre os existentes, a espécie mais estudada é a *C. asiatica*. Alguns desses trabalhos demonstram a atividade antiparasitária dos extratos de *C. asiatica* frente à *P. falciparum* e *L. donovani* (BHAUMIK et al., 2012; CLARKSON et al., 2004; COCK, SELESHO, VUUREN, 2019).

No estudo de CLARKSON e colaboradores (2004), investigou-se a atividade antiplasmodial de 134 espécies vegetais e as amostras que apresentaram IC₅₀ menor que 10 μ g/mL foram classificadas como extratos promissores. Dentre as

amostras avaliadas o extrato hidrometanólico das folhas de *C. asiatica* apresentaram $IC_{50} = 8,3 \mu\text{g/mL}$ (CLARKSON et al., 2004; COCK, SELESHO, VUUREN, 2019).

Além disso, como descrito anteriormente, o asiaticosídeo apresentou atividade antileishmanial frente à *L. donovani*. Neste estudo, os efeitos do asiaticosídeo foram investigados nas formas amastigotas de *L. donovani*, e esta substância apresentou $IC_{50} = 0,109 \text{ nM}$ para as cepas de macrófagos peritoneais AG83, GE1F8R e $IC_{50} = 0,104 \text{ nM}$ para as cepas de macrófagos peritoneais K39 (BHAUMIK et al., 2012).

Apesar desses relatos, não há estudos investigando o potencial esquistossomicida da espécie de *C. erecta* e nem do asiaticosídeo.

7.5.4 Ensaio de inibição da atividade enzimática da apirase de batata pelo asiaticosídeo

Tendo em vista que o asiaticosídeo se apresentou como um ligante da apirase no ensaio de ultrafiltração, investigou-se a atividade inibitória *in vitro* dessa substância frente à apirase de batata.

Como pode-se observar na Figura 80, ocorreu uma inibição da atividade enzimática da apirase de batata em todas as concentrações testadas de asiaticosídeo (25, 50 e 100 μM), sendo que na menor concentração testada de asiaticosídeo (25 μM) a inibição da enzima foi em média 33,23%. Enquanto que nas maiores concentrações a inibição foi em média de 43,14 e 40,61%.

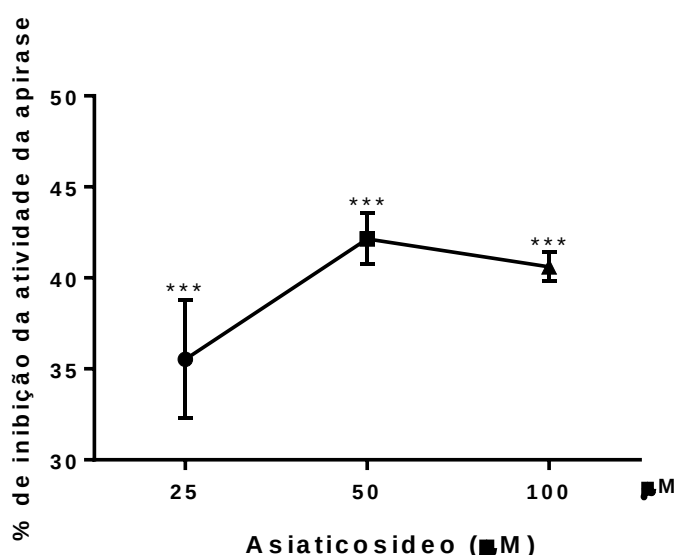
Apesar da literatura não descrever a atividade inibitória do asiaticosídeo frente à enzima apirase e ATP difosfohidrolases de *S. mansoni*, estudos têm mostrado que o extrato de *C. asiatica* e o asiaticosídeo inibem outras enzimas. No trabalho de Nema e colaboradores (2013), o extrato de *C. asiatica* e o asiaticosídeo inibiram as enzimas hialuronidase ($IC_{50} = 27,00 \pm 0,43$ e $18,63 \pm 0,33 \mu\text{g/mL}$) e elastase ($IC_{50} = 29,15 \pm 0,31$ e $19,45 \pm 0,25 \mu\text{g/mL}$), respectivamente, e também a enzima metaloproteinase de matriz (MMP-1). Todas essas enzimas se relacionam com o envelhecimento da pele, sendo que a inibição destas pode ser uma terapia eficaz no tratamento de rugas e danos celulares (NEMA et al., 2013).

Outro estudo relaciona a redução do conteúdo de melanina dentro dos melanócitos, ocasionado por extrato de *C. asiatica*, à ação inibitória da enzima tirosinase pelo asiaticosídeo (KWON et al., 2014).

Por fim, o asiaticosídeo também inibiu a isoformas da enzima fosfolipase A (PLA), a qual está relacionada com diversas doenças neurodegenerativas e psicose. Neste trabalho, o asiaticosídeo inibiu de maneira dose-dependente a atividade das PLA em amostras cerebelares de ratos (SILVA, 2008).

Para complementar essa proposta, estudos de modelagem computacional também foram realizados com a finalidade de verificar a capacidade de ligação do asiaticosídeo na apirase e também em outras enzimas.

Figura 80 - Inibição da atividade enzimática da apirase de *S. tuberosum* pelo asiaticosídeo.



*** Diferença significativa quando comparado com o controle negativo ($p < 0,0001$).

Fonte: Elaborado pela própria autora.

7.5.5 Estudos de *docking* molecular

Conforme mostrado na Tabela 33, o asiaticosídeo se liga aos sítios ativos de todas as enzimas avaliadas, SmATPDase1, SmATPDase2 e apirase, com valores negativos de energia (afinidade), sugerindo que estas ligações ocorrem de maneira espontânea. Além disso, o asiaticosídeo apresentou interações envolvendo os resíduos GLU201, SER81 e THR82, considerados importantes para que ocorra a inibição da enzima.

As concentrações estimadas de asiaticosídeo para inibição das enzimas são de 0,05 μM para SmATPDase 1 e apirase, e 0,005 μM para SmATPDase 2.

Nas análises *in silico* da toxicidade, o asiaticosídeo ultrapassou o número de violações permitidas pela regra dos 5 de Lipinski, com violações nos parâmetros de TPSA, número de aceptores/receptores de ligação de hidrogênio e massa molecular, demonstrando problemas quanto a biodisponibilidade do fármaco no organismo e sua citotoxicidade oral (Tabela 34).

Segundo o Verber e colaboradores (2002), quanto maior o nrotb presentes na estrutura química de uma substância, maior será sua flexibilidade e, portanto, maior será sua interação com o sítio ativo da enzima avaliada. No caso do asiaticosídeo, o nrotb apresentado é igual a 10, demonstrando uma grande interação com as enzimas.

Apesar dos resultados apresentados nos estudos *in silico* da toxicidade sugerirem que o asiaticosídeo apresenta citotoxicidade oral e baixa biodisponibilidade, os resultados obtidos no *docking* molecular sugerem que esta substância apresenta um alto potencial de inibição, uma vez que a inibição enzimática ocorreria em concentrações bem baixas, a partir de 0,05 μM , com fortes interações entre o sítio ativo das enzimas e a substância, especialmente com os resíduos importantes para tal inibição.

De acordo com os usos tradicionais, extratos de *Centella* são utilizados para diversas atividades terapêuticas com toxicidade mínima (JAMIL et al., 2007). Além disso, alguns trabalhos têm sido realizados investigando o perfil farmacocinético de algumas dessas preparações (ANUKUNWITHAYA et al., 2017; HENGJUMRUT et al., 2018; KHEMAWOOT et al., 2018).

No estudo, recentemente publicado, Khemawoot e colaboradores (2018) avaliaram o perfil farmacocinético de um extrato de *C. asiatica* padronizado em comparação com uma mistura de asiaticosídeo e madecasosídeo. Como resultado observou-se que todos os animais apresentaram boa tolerabilidade após administração via oral e intravenosa das amostras. Além disso, não foram observadas alterações significativas na aparência física ou nos marcadores de rim e fígado, indicando um bom perfil de segurança tanto do extrato quanto da mistura de asiaticosídeo e madecasosídeo (KHEMAWOOT et al., 2018).

Dessa forma, considerando os trabalhos já publicados, os quais demonstram que o asiaticosídeo apresenta boa biodisponibilidade oral e baixa toxicidade, e os resultados apresentados no presente trabalho, os quais sugerem uma possível inibição enzimática das ATPs difosfohidrolases de *S. mansoni*, nós investigamos a atividade esquistossomicida *in vivo* do asiaticosídeo.

O asiaticosídeo também foi escolhido para essa investigação, ao invés das outras substâncias apresentadas como potenciais neste trabalho, como arborinina e espilantol, em virtude da sua maior obtenção em quantidade de massa, a qual seria necessária para o ensaio esquistossomicida *in vivo*.

Tabela 33 - Resultados dos estudos de *docking* molecular do asiaticosídeo com SmATPDase 1, SmATPDase 2 e apirase.

Receptor	AutoDock Vina (Kcal/mol)	K _i calculado (μM)	Interações (AutoDock Vina)
SmATPDase 1	-10,0	0,05	TYR397, LYS279, GLU201, THR82, SER81
SmATPDase 2	-11,3	0,005	GLU164, THR48
Apirase	-9,9	0,05	GLU145, THR30

Fonte: Elaborado pela própria autora.

Tabela 34 - Resultados de predição de toxicidade do asiaticosídeo, utilizando os programas SwissADME (SA) e Molinspiration (MI).

Amostra	Doador de ligação de hidrogênio	Aceptor de ligação de hidrogênio	nroth	Massa molar (g/mol)		LogP		TPSA	
	MI/SA	MI/SA	MI/SA	MI	SA	MI	SA	MI	SA
Praziquantel	0	4	1	312,41	312,41	2,74	3,01	40,62	40,62
Asiaticosídeo	12	19	10	959,12	959,12	0,37	2,50	315,21	315,21

Fonte: Elaborado pela própria autora.

7.5.6 Ensaio esquistossomicida *in vivo*

Os grupos experimentais formados nesse trabalho, assim como a dose e o esquema de tratamento utilizados nesse trabalho foram elaborados com base em trabalhos recentemente publicados pelo nosso grupo de pesquisa (PEREIRA et al., 2018).

7.5.6.1 Recuperação de vermes

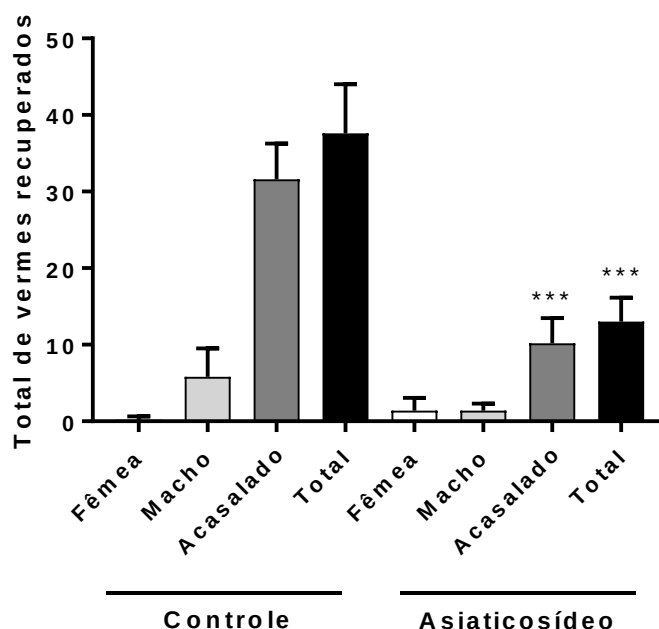
Neste estudo, observou-se que o total de vermes recuperados no sistema porta-hepático foi alterado no grupo tratado com asiaticosídeo em comparação com o grupo não tratado. A análise dos resultados mostrou diferença significativa na recuperação de vermes acasalados e no total de vermes recuperados ($p < 0,0001$). Observa-se que no grupo não tratado o número de vermes acasalados (machos + fêmeas) foi de $31,6 \pm 4,18$, enquanto no grupo tratado com asiaticosídeo este número foi de $10,2 \pm 2,93$ (Figura 81, Tabela 35). Em relação à recuperação total de vermes, o grupo sem tratamento apresentou número total de vermes de $37,6 \pm 5,75$, enquanto o número total de vermes recuperados dos animais que receberam o tratamento com asiaticosídeo (400 mg/kg) foi de $13,0 \pm 2,83$ (Tabela 35), tendo este grupo uma redução de 65,43% da carga total de vermes (Figura 81, Tabela 35).

Portanto, pode-se observar na Tabela 35 que a maioria dos vermes recuperados estavam acasalados, e apesar de não haver significância estatística na recuperação de vermes machos e fêmeas separadamente entre o grupo tratado e não tratado, verifica-se o efeito do asiaticosídeo na separação dos vermes, evidenciada na diminuição da recuperação dos vermes machos ($1,4 \pm 0,8$) e aumento do número de vermes fêmeas ($1,4 \pm 1,5$) comparado com o controle negativo ($5,8 \pm 3,31$; $0,2 \pm 0,4$, respectivamente). Esses dados foram semelhantes aos obtidos com o tratamento com cardamonina (resultados apresentados no item 3.7.5.1 deste trabalho).

Em comparação com os próprios resultados obtidos neste mesmo trabalho em relação aos estudos esquistossomicidas *in vivo*, observa-se que o asiaticosídeo apresentou uma maior redução no número total de vermes, sendo a redução de 65,43%, enquanto outra substância avaliada, a cardamonina, reduziu 46,81%.

Dessa forma, nossos resultados indicam uma boa atividade esquistossomicida para o asiaticosídeo.

Figura 81 - Recuperação de vermes após tratamento com asiaticosídeo por via oral.



*** Diferença significativa quando comparado com grupo controle sem tratamento ($p < 0,0001$).

Fonte: Elaborado pela própria autora.

Tabela 35 - Efeitos do tratamento por via oral com asiaticosídeo na recuperação dos parasitos dos animais infectados com *S. mansoni*.

	Sem tratamento	Asiaticosídeo (400 mg/kg)
Média de vermes machos $\pm$ desvio padrão	5,8 $\pm$ 3,31	1,4 $\pm$ 0,8
Média de vermes fêmeas $\pm$ desvio padrão	0,2 $\pm$ 0,4	1,4 $\pm$ 1,5
Média de vermes machos e fêmeas $\pm$ desvio padrão	31,6 $\pm$ 4,18	10,2 $\pm$ 2,93
Média de vermes $\pm$ desvio padrão	37,6 $\pm$ 5,75	13,0 $\pm$ 2,83
% de redução de vermes	-	65,43

Fonte: Elaborado pela própria autora.

Existem poucos relatos na literatura em relação à atividade esquistossomicida *in vitro* e *in vivo* de saponinas. Porém pode-se citar o trabalho de Melek e colaboradores (2012), no qual o fracionamento bioquímico de extratos obtidos de

organismos marinhos, *Actinopyga echinites* e *Holothuria polii*, levou ao isolamento de duas saponinas que apresentaram altos níveis de atividade esquistossomicida *in vitro* (MELEK et al., 2012). Além disso, em um estudo zoofarmacológico em chimpanzés, saponinas esteroidais e suas agliconas, isoladas de *Vernonia amygdalina* (Asteraceae) foram avaliadas quanto a sua atividade *in vitro* e *in vivo* contra *S. japonicum* (JISAKA et al., 1992).

Nossos resultados demonstram que o tratamento com asiaticosídeo reduziu a recuperação do número de vermes machos, sugerindo que os machos de *S. mansoni* foram mais sensíveis a este tratamento em comparação com as fêmeas. E também apresentou uma redução significativa na recuperação dos vermes acasalados.

Como descrito anteriormente, o tegumento é a interface entre o meio e o parasito, e desempenha funções vitais para o verme, como a absorção de nutrientes, excreção, proteção contra o sistema imunológico do hospedeiro. Como a fêmea se aloja no canal ginecofórico do macho, o tegumento do macho é a parte que está exposta e em contato com o meio. Além disso, no tegumento, principalmente do macho, encontra-se algumas proteínas, como as ATP difosfohidrolases, as quais são importantes para a sobrevivência desses vermes dentro do hospedeiro (DA'DARA, BHARDWAJ, SKELLY, 2014; FARIA-PINTO et al., 2004).

Dessa maneira, tal estrutura é considerada importante alvo farmacológico para novas drogas esquistossomicidas (BERTÃO et al., 2012; SILVA et al., 2017). E com base nos resultados apresentados neste trabalho, em que o asiaticosídeo inibe a apirase, a qual apresenta similaridade com as ATPases de *S. mansoni*, e possui potencial inibitório das SmATPase 1 e 2, nos estudos de *docking* molecular, pode-se sugerir que a atividade esquistossomicida *in vivo* pode estar relacionada à inibição destas enzimas pela substância avaliada.

7.5.6.2 Análise de oograma

Além da quantificação de vermes recuperados, o presente trabalho também levou em consideração alguns critérios sugeridos por Pellegrino e Katz (1968), como o número de ovos retidos no tecido intestinal (oograma) e o volume médio do fígado

e baço. Segundo esses autores, tais critérios são fundamentais para avaliação da atividade esquistossomicida de um novo fármaco.

Em relação ao oograma, autores descrevem que este parâmetro é um dos quais pode-se utilizar para demonstrar a eficácia de uma droga esquistossomicida, ou para sugerir o surgimento de um novo fármaco esquistossomicida (DE MORAES, et al., 2014; PEREIRA et al., 2018). Pois a oviposição está diretamente relacionada com o acasalamento dos parasitos ou com a incapacidade da fêmea em realizá-la. Além disso, as principais lesões causadas pelo *S. mansoni* ao organismo parasitado são decorrentes da presença dos ovos nos tecidos do hospedeiro, desencadeando reações inflamatórias e a formação dos granulomas (GRYSEELS et al., 2006; KLAVER et al., 2015).

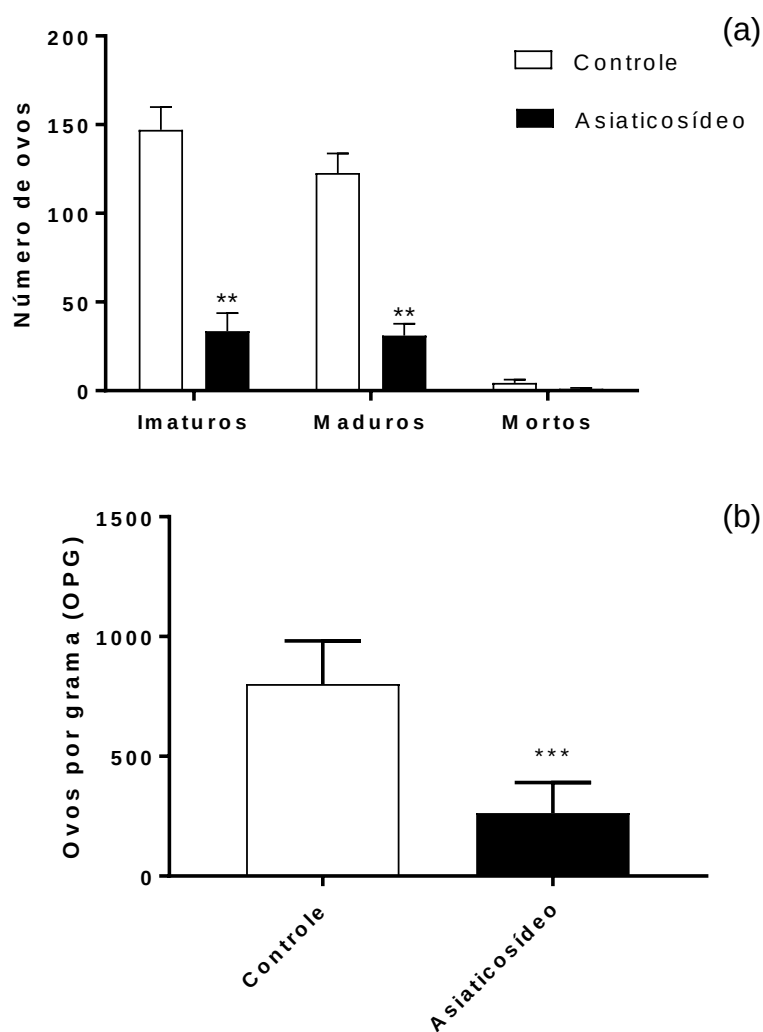
Dessa forma, no presente trabalho, uma análise quantitativa dos ovos foi realizada (Figuras 82), levando-se em consideração o número de OPG de fezes e presença de ovos maduros, imaturos e mortos.

Observa-se, na Figura 82b e Tabela 36, que o asiaticosídeo foi capaz de reduzir em 67,86% o número de OPG de fezes. Além disso, foram observadas alterações no oograma dos animais tratados, havendo uma diminuição no número de ovos maduros e imaturos (Figura 82a, Tabela 36).

Em relação aos ovos maduros, o asiaticosídeo causou redução significativa em comparação com o controle negativo ($p < 0,001$). Além disso, o número de ovos imaturos apresentou 71,53% de redução significativa quando comparado com o controle negativo ($p < 0,001$) (Figura 82a, Tabela 36). Resultados semelhantes foram encontrados no trabalho de Pereira e colaboradores (2018), no qual uma aurona diminuiu em 87,7% o número de ovos imaturos e reduziu significativamente o número de ovos maduros.

Considerando o parâmetro de ovos imaturos como de grande interesse, pois a redução desses significa que não houve oviposição recente por parte dos parasitos (DE MORAES, 2011), e os achados sobre a produção de ovos no presente trabalho, é possível que a diminuição na carga de ovos tenha sido uma consequência da redução da carga de vermes. Além disso, a redução da oviposição e a alteração no padrão do oograma também podem ser devido a um possível efeito do asiaticosídeo no sistema reprodutivo dos parasitos fêmeas. Portanto, essa hipótese deve ser avaliada posteriormente, considerando principalmente possíveis danos nos ovários dos parasitos fêmeas e nas glândulas vitelinas.

Figura 82 - Efeitos nos estágios de desenvolvimento dos ovos (a) e na quantidade de ovos por grama de fezes (b) após tratamento com asiaticosídeo por via oral.



** Diferença significativa quando comparado com grupo controle sem tratamento ($p < 0,001$).

*** Diferença significativa quando comparado com grupo controle sem tratamento ($p < 0,0001$).

Fonte: Elaborado pela própria autora.

Tabela 36 - Efeitos do tratamento por via oral com asiaticosídeo na oviposição dos animais infectados com *S. mansoni*.

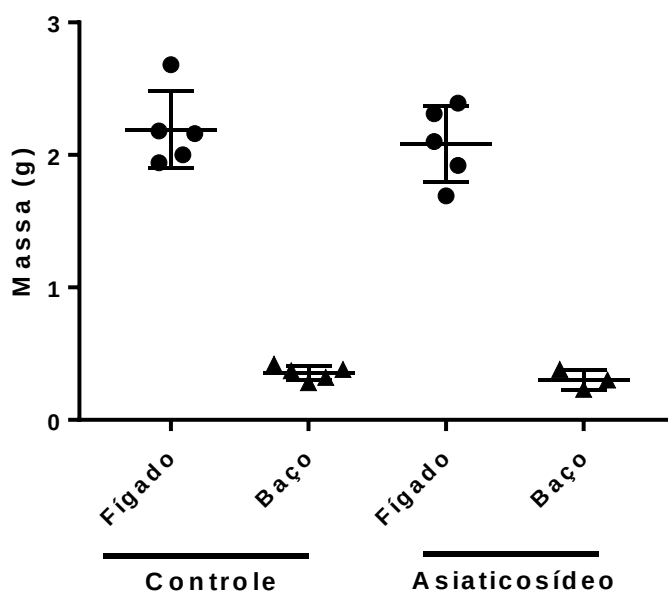
Grupo	Tratamento	% de redução Ovos Imaturos	% de redução OPG
Asiaticosídeo	400 mg/Kg	71,53	67,87

Fonte: Elaborado pela própria autora.

7.5.6.3 Análise do peso médio dos fígados e baços dos animais após tratamento

No presente trabalho, após eutanásia, os fígados e baços dos animais tratados e não tratados foram retirados e pesados imediatamente. A média dos pesos foi então avaliada com o intuito de investigar o potencial de redução deste quadro pelo asiaticosídeo. Como demonstrado na Figura 83, não se observa uma redução estatisticamente significativa nas massas desses órgãos entre o grupo tratado e o controle negativo.

Figura 83 - Efeito do tratamento por via oral com asiaticosídeo sobre o peso relativo de fígados e baços dos animais com esquistossomose.



Os pontos e triângulos representam os dados de animais individuais, barras na horizontal representam a média de cada grupo.

Fonte: Elaborado pela própria autora.

Diante do exposto, os resultados aqui apresentados demonstraram eficácia no tratamento realizado com asiaticosídeo, na concentração de 400 mg/kg, reduzindo consideravelmente a carga parasitária dos grupos tratados conforme mostrado na Figura 81, além de evidenciar uma maior susceptibilidade dos vermes machos de *S. mansoni* e diminuir consideravelmente o número de ovos maduros e imaturos.

Destaca-se ainda que não há relatos na literatura investigando a atividade esquistossomicida do asiaticosídeo, apenas demonstrando sua atividade antiparasitária frente a espécies de *Leishmania* (BHAUMIK et al., 2012).

No trabalho de Bhaumik e colaboradores (2012), o asiaticosídeo apresentou atividade antileishmanial *in vitro* e *in vivo*. Nos estudos *in vivo*, o asiaticosídeo foi administrado oralmente, nas concentrações de 1 a 10 mg/kg/dia, em camundongos infectados com *L. donovani*, apresentando expressiva redução da carga parasitária do fígado e do baço dos animais infectados (tratados com 5 mg/kg/dia de asiaticosídeo) (BHAUMIK et al., 2012). Esses autores sugerem que o mecanismo de ação do asiaticosídeo se relaciona com seus efeitos imunomodulatórios. Ainda, segundo esses autores, a presença da ramnose como açúcar terminal na estrutura do asiaticosídeo é capaz de ativar macrófagos, levando à indução de TNF- α , citocina importante para o controle da infecção com *L. donovani* (BHAUMIK et al., 2012).

Assim, considerando a atividade antiparasitária frente à *L. donovani* e a inibição de várias enzimas, como hialuronidase, elastase, MMP-1 e tirosinase, pelo asiaticosídeo, esperava-se que essa substância apresentasse atividade esquistossomicida e inibição enzimática de enzimas importantes para o *Schistosoma*. De fato, a atividade esquistossomicida *in vivo* foi evidenciada para o asiaticosídeo, e também sugerimos, pelos estudos de *docking* molecular, que o mesmo pode inibir as SmATPases de *Schistosoma*, sendo que a atividade esquistossomicida possa ocorrer também por meio da inibição enzimática das ATP difosfohidrolases de *S. mansoni*.

7.6 CONCLUSÃO

No presente capítulo, o extrato bruto etanólico das partes aéreas de *C. erecta* foi submetido a processos cromatográficos resultando no isolamento do asiaticosídeo, identificado como ligante da apirase.

O extrato bruto de *Centella* apresentou atividade esquistossomicida *in vitro* frente à vermes adultos de *S. mansoni*, porém o mesmo não foi observado para o asiaticosídeo.

Em relação à atividade enzimática do asiaticosídeo, este apresentou inibição enzimática da atividade da apirase e os estudos de *docking* molecular sugerem que esta substância também possua capacidade de inibir outras enzimas, como SmATPase 1 e 2, ambas de *S. mansoni*. Dessa forma, investigou-se sua atividade esquistossomicida *in vivo*, sendo o primeiro relato da investigação dessa atividade para o asiaticosídeo.

O asiaticosídeo, no ensaio esquistossomicida *in vivo*, demonstrou ser capaz de reduzir o número de vermes recuperados e reduzir o número de ovos e o OPG nos animais tratados. A análise dos resultados apresentados neste capítulo sugere que o asiaticosídeo possa exercer seu efeito esquistossomicida *in vivo* por meio da inibição das ATP difosfohidrolases. No entanto, estudos adicionais devem ser realizados com esta saponina, a fim de conhecer melhor os mecanismos de ação desta substância sobre os vermes adultos de *S. mansoni*.

Além disso, os resultados obtidos no presente trabalho, aliados aos já alcançados pelo nosso grupo de pesquisa, sugerem que a apirase pode ser utilizada como molécula alvo em estudos de triagem para encontrar ligantes e possíveis inibidores das ATP difosfohidrolases de *S. mansoni*, a partir de amostras complexas, como os extratos vegetais.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho visou identificar por da UF acoplada à CLUE-EM ligantes enzimáticos da apirase de batata a partir de fontes naturais e também avaliar a atividade esquistossomicida *in vitro* e *in vivo* de extratos vegetais e substâncias isoladas.

Inicialmente, considerando a importância das ATP difosfohidrolases de *S. mansoni* e sua homologia com a apirase de batata, investigou-se a possibilidade de uma substância com evidenciada atividade inibitória das ATP difosfohidrolases de *S. mansoni* também apresentar inibição enzimática da apirase de batata. Além disso, verificou-se a relação desses potenciais inibitórios para tais enzimas com a atividade esquistossomicida *in vivo*. Portanto, a cardamonina, com evidenciada atividade enzimática inibitória das ATP difosfohidrolases de *S. mansoni* e atividade esquistossomicida *in vitro*, foi instrumento de estudo no presente trabalho. Assim, neste estudo relata pela primeira vez a atividade esquistossomicida *in vivo* da cardamonina e sua atividade inibitória da apirase de batata. Além disso, sugere que a apirase de batata possa ser utilizada em estudos de triagem para a identificação de ligantes enzimáticos com potencial de inibição frente às ATP difosfohidrolases de *S. mansoni*.

Tendo em vista estes resultados iniciais obtidos, utilizou-se, pela primeira vez, a técnica de UF acoplada à CLUE-EM para seleção de ligantes enzimáticos de apirase de batata a partir de extratos brutos vegetais. Como resultado selecionou-se 3 extratos promissores (*R. graveolens*, *A. oleracea*, *C. erecta*) e alguns dos ligantes identificados foram isolados, como o epilantol, a arborinina e o asiaticosídeo. A atividade enzimática e esquistossomicida *in vitro* dessas substâncias foram investigadas.

Todas as 3 substâncias apresentaram inibição enzimática da atividade da apirase de batata e estudos de *docking* molecular sugerem que elas também possuem capacidade de inibir outras enzimas, como SmATPase 1 e 2, ambas de *S. mansoni*. O epilantol apresentou atividade esquistossomicida *in vitro*, porém o mesmo não foi observado para a arborinina e o asiaticosídeo, os quais não demonstraram atividade esquistossomicida *in vitro* na concentração testada (50 μ M).

Adicionalmente, investigou-se, pela primeira vez, a atividade esquistossomicida *in vivo* do asiaticosídeo e sugere-se que essa substância possa exercer seu efeito esquistossomicida *in vivo* por meio da inibição das ATP difosfohidrolases. Estudos adicionais devem ser realizados com esta saponina, a fim de conhecer melhor seus mecanismos de ação sobre os vermes adultos de *S. mansoni*. A investigação da atividade esquistossomicida *in vivo* da arborinina e do espilantol também devem ser realizadas, já que pode existir uma relação entre o efeito esquistossomicida *in vivo* e a inibição das ATP difosfohidrolases. Além disso, torna-se importante a investigação da atividade enzimática inibitória, dessas substâncias, frente às ATP difosfohidrolase de *S. mansoni*, assim como em outros apirases com aplicabilidade terapêutica.

Por fim, o presente trabalho sugere que a apirase de batata possa ser utilizada como molécula alvo na seleção de ligantes e possíveis inibidores das ATP difosfohidrolases de *S. mansoni*, possibilitando a identificação de potenciais substâncias esquistossomicidas a partir de extratos vegetais. E ainda que essa seleção de ligantes enzimáticos possa ser por meio da técnica de UF acoplada à CLUE-ESI-QTOF-EM.

Em relação à produção bibliográfica diretamente relacionada ao trabalho, foram publicados, até o momento, um artigo completo em periódico internacional (De CARVALHO et al., 2019b), um capítulo de livro (De CARVALHO et al., 2017), um artigo de revisão (De CARVALHO et al., 2019a). Além disso, um capítulo de livro (A review of recent patents and natural products in clinical trial to treat Schistosomiasis) foi submetido e aguardamos parecer dos revisores.

REFERÊNCIAS

- ABDIN, M. Z.; ISRAR, M.; REHMAN, R. U.; JAIN, S. K. Artemisinin, a novel antimalarial drug: biochemical and molecular approaches for enhanced production. **Planta Medica**, n. 69, n. 4, p. 289–299, 2003.
- AHUA, K. M.; IOSET, J. R.; RANSIJN, A.; MAUËL, J.; MAVI, S.; HOSTETTMANN, K. Antileishmanial and antifungal acridone derivatives from the roots of *Thamnosma rhodesica*. **Phytochemistry**, v. 65, n. 7, p. 963–968, 2004.
- ALBARICI, T. R. **Estudo fitoquímico de *Rauia* sp e *Conchocarpus macrophyllus* (Rutaceae) e avaliação da atividade antiparasitária de extratos e substâncias isoladas**. 2006. Tese (Doutorado em Ciências), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2006.
- ALEIXO DE CARVALHO, L.S.; GERALDO, R. B.; DE MORAES, J.; SILVA PINTO, P. L.; DE FARIA PINTO, P.; PEREIRA, DOS S., JR.; DA SILVA FILHO, A. A. Schistosomicidal activity and docking of *Schistosoma mansoni* ATPDase 1 with licoflavone B isolated from *Glycyrrhiza inflata* (Fabaceae). **Experimental Parasitology**, v. 159, p. 207–214, 2015.
- ALGAHTANI, A.; CHO, J. L.; WONG, K. H.; LI, K. M.; RAZMOVSKI-NAUMOVSKI, V.; LI, G. Q. Differentiation of Three *Centella* Species in Australia as Inferred from Morphological Characteristics, ISSR Molecular Fingerprinting and Phytochemical Composition. **Frontiers in Plant Sciences**, v. 8, n. 1980, 2017.
- AL-RASHIDA, M.; IQBAL, J. Therapeutic Potentials of Ecto-Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase, Ecto-Nucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase, Ecto-5'-Nucleotidase, and Alkaline Phosphatase Inhibitors. **Medicinal Research Reviews**, v. 34, n. 4, p. 703–743, 2014.
- ANUKUNWITHAYA, T.; TANTISIRA, M. H.; TANTISIRA, B.; KHEMAWOOT, P. Pharmacokinetics of a standardized extract of *Centella asiatica* ECa 233 in rats. **Planta Medica**, v. 83, n. 8, p. 710–717, 2017.
- ARTARIA, C.; MARAALDI, G.; BONFIGLI, A.; RIGANO, L.; APPENDINO, G. Lifting properties of the alkamide fraction from the fruit husks of *Zanthoxylum bungeanum*. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 33, n. 4, p. 328–333, 2011.
- ASGARPANA, J.; KHOSHKAM, R. Phytochemistry and pharmacological properties of *Ruta graveolens* L. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, n. 23, p. 3942–3949, 2012.
- ASTELBAUER, F.; OBWALLER, A.; RANINGER, A.; BREM, B.; GREGER, H.; DUCHÊNE, M.; WERNSDORFER, W.; WALOCHNIK, J. Anti-leishmanial activity of plant-derived acridones, flavaglines, and sulfur-containing amides. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, v. 11, n. 7, p. 793–798, 2011.

ASZYK, J.; BYLIŃSKI, H.; NAMIEŚNIK, J.; WASIK, A. Main strategies, analytical trends and challenges in LC-MS and ambient mass spectrometry-based metabolomics. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 108, p. 278-295, 2018.

AZERAD, R. Chemical structures, production and enzymatic transformations of sapogenins and saponins from *Centella asiatica* (L.) Urban. **Fitoterapia**, v. 114, p. 168-187, 2016.

BAE, S.S. **A HPLC/ESI-MS Method Developed and Validated to Evaluate the Quantity, Identity, and Stability of the Alkylamides in Ethanolic Extracts of *Spilanthes acmella***. Universidade da Carolina do Norte, Greensboro, 2007.

BAQI, Y. Ecto-nucleotidase inhibitors: recent developments in drug discovery. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 1, p. 21-33, 2015.

BARBOSA, A. L.; SILVA, K. C. B.; DE OLIVEIRA, M. C. C.; CARVALHO, M. G.; SRUR, A. U. O. S. Effects of *Acmella oleracea* methanolic extract and fractions on the tyrosinase enzyme. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n. 3, p. 321-325, 2016.

BERMUDES, D.; PECK, K. R.; AFIFI, M. A.; BECKERS, C. J.; JOINER, K. A. Tandemly repeated genes encode nucleoside triphosphate hydrolase isoforms secreted into the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 46, p. 29252-20260, 1994.

BERMUDES, D.; PECK, K. R.; AFIFI, M. A.; BECKERS, C. J.; JOINER, K. A. Tandemly repeated genes encode nucleoside triphosphate hydrolase isoforms secreted into the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 46, p. 29252-20260, 1994.

BERTÃO, H. G.; DA SILVA, R. A. R.; PADILHA, R. J. R.; ALBUQUERQUE, M. C. P. A.; RÁDIS-BAPTISTA, G. Ultrastructural analysis of miltefosine-induced surfasse membrane damage in adult *Schistosoma mansoni* BH strain worms. **Parasitology Research**, v. 110, n. 6, p. 2465-2473, 2012.

BHARDWAJ, R.; SKELLY, P. J. Purinergic Signaling and Immune Modulation at the Schistosome Surface? **Trends Parasitology**, v. 25, n. 6, p. 256–260, 2009.

BHAUMIK, S. K.; PAUL, J.; NASIKAR, K.; KARMAKAR, S.; DE, T. Asiaticoside induces tumour-necrosis-factor- α -mediated nitric oxide production to cure experimental visceral leishmaniasis caused by antimony-susceptible and -resistant *Leishmania donovani* strains. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, p. 910-920, 2012.

BISAGGIO, D. F. R.; PERES-SAMPAIO, C. E.; MEYER-FERNANDES, J. R.; SOUTO-PADRÓN, T. Ecto-ATPase Activity on the Surface of *Trypanosoma cruzi* and Its Possible Role in the Parasite-Host Cell Interaction. **Parasitology Research**, v. 91, n. 4, p. 273–282, 2003.

BLAST® Disponível em : <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>>. Acesso em: 20 dez 2019.

BONTEMS, J.E. A new heteroside, asiaticoside, isolated from *Hydrocotyle asiatica* L. (Umbelliferae). **Bulletin Science Pharmacology**, v.. 49, p. 186–191, 1941.

BOONEN, J.; BAERT, B.; BURVENICH, C.; BLONDEEL, P.; DE SAEGER, S.; DE SPIEGELEER, B. LC–MS profiling of *N*-alkylamides in *Spilanthes acmella* extract and the transmucosal behaviour of its main bio-active spilanthol. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 53, n. 3, p.243-249, 2010.

BOONEN, J.; SHARMA, V.; DIXIT, V. K.; BURVENICH, C.; DE SPIEGELLER, B. LC-MS *N*-alkylamide profiling of an ethanolic *Anacyclus pyrethrum* root extract. **Planta Medica**, v. 78, n. 16, p. 1787-1795, 2012.

BORGES, N. H. P. B. **Análise *in silico* das propriedades farmacológicas e toxicológicas dos organosselênios e ensaios *in vitro* de atividades antibacteriana e moduladora da resistência a drogas em *Staphylococcus aureus***. 2018. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos), Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Esquistossomose: Situação epidemiológica – Dados. Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan. Brasília, DF, 2017. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/esquistobr.def>>. Acesso em: 15/04/2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância da Saúde. Sistema nacional de vigilância em saúde: relatório de situação: Minas Gerais, 5 ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2011.

BRASIL. **MONOGRAFIA DA ESPÉCIE *Ruta graveolens* L. (Arruda)**. Ministério da Saúde, 2015.

BRASIL. **Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (Rennisus)**. Disponível em: <<http://portalms.saude.gov.br/acoes-e-programas/programa-nacional-de-plantas-medicinais-e-fitoterapicos-ppnmpf/politica-e-programa-nacional-de-plantas-medicinais-e-fitoterapicos/plantas-medicinais-de-interesse-ao-sus-renisus>>. Acesso em: 5 nov. 2019.

BURGA, L. N. **Methyltransferases from *Ruta graveolens* L.: Molecular Biology and Biochemistry**. 2005. Dissertação, Universidade Philipps Marburg, Marburg, 2005.

BYLKA, W.; ZNAJDEK-AWIZEN, P.; STUDZINSKA-SROKA, E.; BRZEZINSKA, M. *Centella asiatica* in cosmetology. **Postepy Dermatologii i Alergologii**, v. 30, n. 1, p. 46-9, 2013.

BYLKA, W.; ZNAJDEK-AWIZEN, P.; STUDZINSKA-SROKA, E.; DANCZAK-PAZDROWSKA, A.; BRZEZINSKA, M. *Centella asiatica* in dermatology: an Overview. **Phytotherapy Research**, v. 28, n. 8, p. 1117–1124, 2014.

CARVALHO, A. M.; GONÇALVES, L. M.; VALENTE, I. M.; RODRIGUES, J. A.; BARROS, A. A. Analysis of cardamonin by square wave voltammetry. **Phytochemical Analysis**, v. 23, n. 4, p. 396-399, 2012.

CASTRO, C.C.B.; COSTA, P. S.; LAKTIN, G. T.; DE CARVALHO, P. H.; GERALDO, R. B.; DE MORAES, J.; PINTO, P. L.; COURI, M. R.; PINTO, P. F.; DA SILVA FILHO, A. A. Cardamonin, a schistosomicidal chalcone from *Piper aduncum* L. (Piperaceae) that inhibits *Schistosoma mansoni* ATP diphosphohydrolase. **Phytomedicine**, v. 22, n. 10, p. 921-928, 2015.

CASTRO, K. N. C.; LIMA, D. F.; VASCONCELOS, L. C.; LEITE, J. R. S. A.; SANTOS, R. C.; PAZ NETO, A. A.; COSTA-JÚNIOR, L. M. Acaricide activity *in vitro* of *Acmella oleracea* against *Rhipicephalus microplus*. **Parasitology Research**, v. 113, n. 10, p. 3697-3701, 2014.

CAVALCANTI, G. V. L. **Estudo fitoquímico e análise biológica/farmacológica de *Bredemeyera floribunda* Wild.** 2015. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2015.

CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DE SÃO PAULO. Divisão de doenças de transmissão hídrica e alimentar: dados estatísticos. São Paulo: CVE, 2005.

CHAKRABORTY, A.; DEVI, R. K. B.; RITA, S.; SHARATCHANDRA, K. H.; SINGH, T. I. Preliminary studies on antiinflammatory and analgesic activities of *Spilanthes acmella* in experimental animal models. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 36, n. 3, p. 148-150, 2004.

CHAKRABORTY, A.; DEVI, R. K. B.; SANJEBAM, R.; KHUMBONG, S.; THOKCHOM, I. S. Preliminary studies on local anesthetic and antipyretic activities of *Spilanthes acmella* Murr. in experimental animals models. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 42, n. 5, p. 277-279, 2010.

ChemSpider. Disponível em: <<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.557026.html>>. Acesso em: 2 out. 2019.

ChemSpider. Disponível em: <<http://www.chemspider.com>>. Acesso em: 20 nov. 2019.

CHENG, C. L.; GUO, J. S.; LUK, J.; KOO, M. W. The healing effects of *Centella* extract and asiaticoside on acetic acid induced gastric ulcers in rats. **Life Sciences**, v. 74, n. 18, p. 2237-2249, 2004.

CHEVILLON, C.; DE MEEÛS, T.; MCCOY, K.D. Population genetics and molecular epidemiology of infectious diseases. In: **New Frontiers of Molecular Epidemiology of Infectious Diseases**. Springer, Dordrecht, p. 45-76, 2012.

CHRIST A.L.; ZÁCHIA R.A. Lista florística das Asteraceae do Campo de Instrução de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, com observações de habitats preferenciais. **Revista brasileira de Biociências**, v. 14, n. 4, p. 250-256, 2016.

CHOI, Y.; JERMIHOV, K.; NAM, S. J.; STURDY, M.; MALONEY, K.; QIU, X.; CHADWICK, L. R.; MAIN, M.; CHEN, S. N.; MESECAR, A. D.; FARNSWORTH, N. R.; PAULI, G. F.; FENICAL, W.; PEZZUTO, J. M.; VAN BREEMEN, R. B. Screening natural products for inhibitors of quinone reductase-2 using ultrafiltration LC–MS. **Analytical Chemistry**, v. 83, p. 1048–1052, 2011.

CIOLI, D.; PICA-MATTOCCIA, L.; BASSO, A.; GUIDI, A. Schistosomiasis control: praziquantel forever? **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 195, n. 1, p. 23–29, 2014.

CLARKSON, C.; MAHARAJ, V. J.; CROUCH, N. R.; GRACE, O. M.; PILLAY, P.; MATSABISA, M. G.; BHAGWANDIN, N.; SMITH, P. J.; FOLB, P. I. *In vitro* antiplasmodial activity of medicinal plants native to or naturalised in South Africa. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 92, n. 2-3, p. 177-191, 2004.

COCK, I. E.; SELESHO, M. I.; VAN VUUREN, S. F. A review of the traditional use of southern African medicinal plants for the treatment of malaria. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 245, 2019.

COIMBRA, E. S.; GONÇALVES DA COSTA, S. C.; CORTE-REAL, S.; FREITAS, F. G. R.; DURÃO, A.; SOUZA, C. S. F.; SILVA SANTOS, M. I.; VASCONCELOS, E. G. Characterization and cytochemical localization of na ATP diphosphohydrolase from *Leishmania amazonenses* promastigote. **Parasitology**, v. 124, p. 137-143, 2002.

COLLEY, D. G.; BUSTINDUY, A. L.; SECOR, W. E.; KING, C. H. Human schistosomiasis. **Lancet**, v. 383, n. 9936, p. 2253-2264, 2014.

CONCANNON, S.; RAMACHANDRAN, V. N.; SMYTH, F. A study of the electrospray ionisation and ion trap fragmentation of hemiterpenoid and dimeric coumarin derivatives. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 14, p. 2260-2270, 2000.

CROTTI, A. E. M.; CAROLO, C. A.; GOBBO-NETO, L.; SANTOS, M. D.; GATES, P. J.; LOPES, N. P. LC-hyphenated techniques: uses in the structural elucidation of low and high-molecular weight compounds. In: TAFT, C.A. **Modern Biotechnology in Medicinal Chemistry and Industry**. Kerala, Índia: Research Signpost, p. 99-141, 2006.

CUTHBERTSON, D. J.; JOHNSON, S. R.; PILJAC-ZEGARAC, J.; KAPPEL, J.; SCHAFER, S.; WUST, M.; KETCHUM, R. E. B.; CROTEAU, R. B.; MARQUES, J. V.; DAVIN, L. B.; LEWIS, N. G.; ROLF, M.; KUTCHAN, T. M.; SOEJARTO, D. D.; LANGE, B. M. Accurate mass–time tag library for LC/MS-based metabolite profiling of medicinal plants. **Phytochemistry**, v. 91, p. 187-197, 2013.

DA'DARA, A.A.; BHARDWAJ, R.; ALI, Y. B.; SKELLY, P. J. Schistosome tegumental ecto-apyrase (SmATPDase1) degrades exogenous pro-inflammatory and pro-thrombotic nucleotides. **PeerJ**, v. 18, n. 2, p. 1-24, 2014.

DA'DARA, A.A.; BHARDWAJ, R.; SKELLY, P.J. Schistosome apyrase SmATPDase1, but not SmATPDase2, hydrolyses exogenous ATP and ADP. **Purinergic Signalling**, v. 10, n. 4, p. 573-580, 2014.

DE AGUIAR MATOS, J. A.; BORGES, F. P.; TASCA, T.; BOGO, M. R.; DE CARLI, G. A.; DA GRAÇA FAUTH, M.; DIAS, R. D.; BONAN, C. D. Characterisation of an ATP Diphosphohydrolase (Apyrase, EC 3.6.1.5) Activity in *Trichomonas vaginalis*. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 8, p. 770-775, 2001.

DE ALMEIDA, L. M. S.; DE CARVALHO, L. S. A.; GAZOLLA, M. C.; PINTO, P. L. S.; SILVA, M. P. N.; MORAES, J.; DA SILVA FILHO, A. A. Flavonoids and sesquiterpene lactones from *Artemisia absinthium* and *Tanacetum parthenium* against *Schistosoma mansoni* worms. **Evidence Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016, p. 1-9, 2016.

DE CARVALHO, L. S. A.; JUNIOR, I. J. A.; JUNQUEIRA, L. R.; SILVA, L. M.; RIANI, L. R.; DE FARIA PINTO, P.; DA SILVA FILHO, A. A. ATP-Diphosphohydrolases in Parasites: Localization, Functions and Recent Developments in Drug Discovery. **Current Protein & Peptide Science**, v. 20, p. 1, 2019a.

DE CARVALHO, L. S. A.; PINTO, P. F.; NASCIMENTO, M. A.; DA SILVA FILHO, A. A.; Produtos naturais como fonte de novos fármacos. In: FONTES, A. P. S.; COSTA, L. A. S.; HYARIC, M. L.; DINIZ, R. **Química de substâncias bioativas: obtenção, planejamento e análise**. Editora UFJF, 59-96, 2017.

DE CARVALHO, L. S. A.; QUEIROZ, L. S.; JUNIOR, I. J. A.; ALMEIDA, A. C.; COIMBRA, E. S.; FARIA PINTO, P.; DA SILVA, M. P. N.; DE MORAES, J.; DA SILVA FILHO, A. A. *In Vitro* Schistosomicidal Activity of the Alkaloid-Rich Fraction from *Ruta graveolens* L. (Rutaceae) and Its Characterization by UPLC-QTOF-MS. **Evidence Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2019, 2019b.

DE CASTRO, C. C. B.; DIAS, M. M.; REZENDE, T. P.; MAGALHÃES, L. G.; DA SILVA FILHO, A. A.; Natural Products with Activity Against *Schistosoma* Species. In: Rai, M. K.; Kon, K. V. **Fighting Multidrug Resistance with Herbal Extracts, Essential Oils and their Components**. Academic Press, San Diego, 109-134, 2013.

DE MARCO, R.; KOWALTOWSKI, A. T.; MORTARA, R. A.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S. Molecular characterization and immuno-localization of *Schistosoma mansoni* ATP-diphosphohydrolase. **Biochemical Biophysical Research Communications**, v. 307, n. 4, p. 831-838, 2003.

DE MORAES, J.; ALMEIDA, A.A.C.; BRITO, M.R.M.; MARQUES, T.H.; LIMA, T.C.; SOUSA, D.P.; NAKANO, E.; MENDONÇA, R.Z.; FREITAS, R.M. Anthelmintic activity of the natural compound (+)-limonene epoxide against *Schistosoma mansoni*. **Planta Medica**, v. 79, n. 3–4, p. 253–258, 2013a.

DE MORAES, J.; DE OLIVEIRA, R. N.; COSTA, J. P.; JUNIOR, A. L.; DE SOUSA, D. P.; FREITAS, R. M.; ALLEGRETI, S. M.; PINTO, P. L. Phytol, a diterpene alcohol from chlorophyll, as a drug against neglected tropical disease *Schistosomiasis mansoni*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 1, 2014.

DE MORAES, J. **Efeito *in vitro* de extratos e compostos naturais em *Schistosoma mansoni***. 2011. Tese (Doutorado em Biotecnologia), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

DE MORAES, J.; KEISER, K.; INGRAM, K.; NASCIMENTO, C.; YAMAGUCHI, L.F.; BITTENCOUT, C.R.; BEMQUERER, M.P.; LEITE, J.R.; KATO, M.J.; NAKANO, E. *In vitro* synergistic interaction between amide piplartine and antimicrobial peptide dermaseptin against *Schistosoma mansoni* schistosomula and adult worms. **Current Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 2, p. 301-309, 2013b.

DE MORAES, J.; NASCIMENTO, C.; LOPES, P. O.; NAKANO, E.; YAMAGUCHI, L. F.; KAWANO, T. *Schistosoma mansoni*: *In vitro* schistosomicidal activity of piplartine. **Experimental Parasitology**, v. 127, n. 2, p. 357-364, 2011b.

DE MORAES, J.; NASCIMENTO, C.; MIURA, L. M.; NAKANO, E.; KAWANO, T. Evaluation of the *in vitro* activity of dermaseptin 01, a cationic antimicrobial peptide, against *Schistosoma mansoni*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 8, n. 3, p. 548-558, 2011a.

DETONI, M. L.; FARIA-PINTO, P.; QUELLIS, L. R.; RUST, N. M.; TAVARES, L. S.; SANTOS, M. O.; ISAIAS, R. M. S.; SANTOS, J. C.; FERNANDES, W.; SOARES, G. L. G.; VASCONCELOS, E. G. Galls from *Calliandra brevipes* BENTH (Fabaceae : Mimosoidae): evidence of apyrase activity contribution in a plant–insect interaction. **Australian Journal of Botany**, v. 60, p. 559–567, 2012.

DIAS, H. J. **Síntese e estudos sobre a fragmentação de compostos benzofurânicos empregando espectrometria de massas sequencial com ionização por electrospray**. 2018. Tese (Doutorado em Ciências), Universidade de São Paulo, 2018.

DIAS, M.M.; ZUZA, O.; RIANI, L. R.; DE FARIA PINTO, P.; PINTO, P. L. S.; SILVA, M. P.; DE MORAES, J.; ATAÍDE, A. C. Z.; DE OLIVEIRA SILVA, F.; CECÍLIO, A. B.; DA SILVA FILHO, A. A. *In vitro* schistosomicidal and antiviral activities of *Arctium lappa* L. (Asteraceae) against *Schistosoma mansoni* and *Herpes simplex virus-1*. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 94, p. 489-498, 2017.

DINIZ, M. E. R. **Uso da técnica de espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS) para o estudo do mecanismo de reações orgânicas e avaliação do perfil de fragmentação de bis-hidroxiiminas aromáticas**. 2011. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Federal de Minas Gerais, 2011.

DOS PASSOS LEMOS, A.; ACACIA DE SÁ PINHEIRO, A.; BERRÊDO-PINHO, M.; FONSECA DE SOUZA, A. L.; MOTTA, M. M.; DE SOUZA, W.; MEYER-FERNANDES, J. R. Ectonucleotide Diphosphohydrolase Activity in *Crithidia deanei*. **Parasitology Research**, v. 88, n. 10, p. 905-911, 2002.

DOS SANTOS, D. A. P.; VIEIRA, P. C.; DA SILVA, F. G. F.; FERNANDAS, J. B.; RATTRAY, L.; CROFT, S. L. Antiparasitic activity of acridone alkaloids from *Swinglea glutinosa* Merr. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 4, p. 644–651, 2009.

DOU, L.; CHEN, Y. F.; COWAN, P. J.; CHEN, X.P. Extracellular ATP Signaling and Clinical Relevance. **Clinical Immunology**, v. 188, p. 67-73, 2018.

DUBEY, S.; MAITY, S.; SINGH, M.; SARAF, S. A.; SAHA, S. Phytochemistry, pharmacology and toxicology of *Spilanthes acmella*: a review. **Advances in Pharmacological Sciences**, v. 2013, p. 1-9, 2013.

EKANEM, A. P.; WANG, M.; SIMOM, J. E.; MORENO, D. A. Antiobesity properties of two African plants (*Fromomum meleguetta* and *Spilanthes acmella*) by pancreatic lipase inhibition. **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 12, p. 1253-1255, 2007.

ERTL, P.; ROHDE, B.; SELZER, P. Fast Calculation of Molecular Polar Surface Area as a Sum of Fragment-Based Contributions and Its Application to the Prediction of Drug Transport Properties. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, n. 20, p. 3714-3717, 2000

ETZLER, M. E.; KALSI, G.; EWING, N. N.; ROBERTS, N. J.; DAY, R. B.; MURPHY, J. B. A nod factor binding lectin with apyrase activity from legume roots. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 10, p. 5856–5861, 1999.

FARANI, P. S. G. **Caracterização da ATP difosfohidrolase de *Solanum tuberosum* como ferramenta biotecnológica no estudo de NTPDases**. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2016.

FARIA-PINTO, P.; MEIRELLES, M. N.; LENZI, H. L.; MOTA, E. M.; PENIDO, M. L.; COELHO, P. M.; VASCONCELOS E. G. ATP diphosphohydrolase from *Schistosoma mansoni* egg: characterization of a new antigen. **Parasitology**, v. 129, p. 51–57, 2004.

FARIA-PINTO, P.; REZENDE-SOARES, F. A.; MOLICA, A. M.; MONTESANO, M. A.; MARQUES, M. J.; ROCHA, M. O.; GOMES, J. A.; ENK, M. J. CORREA-OLIVEIRA, R.; COELHO, P. M.; NETO, S. M.; FRANCO, O. L.; VASCONCELOS, E. G. Mapping of the conserved antigenic domains shared between potato apyrase and parasite ATP diphosphohydrolases: potential application in human parasitic diseases. **Parasitology**, v. 135, n. 8, p. 943-953, 2008.

FAVORETO, R.; GILBERT, B. *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen (Asteraceae) – Jambu. **Revista Fitos**, v. 5, 2010.

FELICISSIMO, J. M. **Avaliação do potencial da licochalcona A na terapia da esquistossomose *in vitro* e em modelo murino**. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal de Juiz de Fora, 2014.

FELLOWS, P. J. **Tecnologia do processamento de alimentos: princípios e práticas**. 2. ed. Trad. F. C. Oliveira et al. Porto Alegre: Artmed, 602p, 2006.

FILHO, O. A. S.; ALENCASTRO, R. B. Modelagem de proteínas por homologia. **Química Nova**, v. 26, n. 2, p. 253-259, 2003.

GANZERA, M.; STURM, S. Recent advances on HPLC/MS in medicinal plant analysis-An update covering 2011-2016. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 147, p. 211–233, 2018.

GATTEFOSSÉ. 2015. Disponível em: <<http://personalcare.gattefosse.us/introducing-gatuline-expression-af/>>. Acesso em: 18 Dez 2019.

GBD 2015 DALYs, HALE Collaborators. Global, regional, and national disability-adjusted life-years (DALYs) for 315 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE), 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. **Lancet**, v. 388, n. 10053, p. 1603–1658, 2016.

GODINHO, L. S.; ALEIXO DE CARVALHO, L. S.; BARBOSA DE CASTRO, C. C.; DIAS, M. M.; PINTO, P. F.; CROTTI, A. E.; PINTO, P. L.; DE MORAES, J.; DA SILVA FILHO, A. A. Anthelmintic activity of crude extract and essential oil of *Tanacetum vulgare* (Asteraceae) against adult worms of *Schistosoma mansoni*. **Scientific World Journal**, v. 2014, 2014.

GRAY, N. E.; MAGANA, A. A.; LAK, P.; WRIGHT, K. M.; QUINN, J.; STEVENS, J. F.; MAIER, C. S.; SOUMYANATH, A. *Centella asiatica*: phytochemistry and mechanisms of neuroprotection and cognitive enhancement. **Phytochemistry Reviews**, v. 17, n. 1, p. 161-194, 2018.

GRYSEELS, B.; POLMAN K.; CLERINX, J.; KESTENS, L. Human schistosomiasis. **Lancet**, v. 368, p. 1106–1118, 2006.

GRYSEELS, B.; STRICKLAND, T. Schistosomiasis. In: MAGILL, A.J.; RYAN, E.T.; SOLOMON, T.; HILL, D.R. **Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Disease**. 9ª edição. China: Elsevier, p. 867-883, 2012.

GUEVARA-FLORES, A.; OLVERA-SÁNCHEZ, S.; GÓMEZ-CONCHA, C.; JUÁREZ, O.; ESPARZA-PERUSQUÍA, M.; PARDO, J. P.; MENDOZA-HERNÁNDEZ, G.; MARTÍNEZ, F.; FLORES-HERRERA, O. 5'-P-Fluorosulfonyl Benzoyl Adenosine Inhibits an Ecto-ATP-Diphosphohydrolase in the Tegument Surface of *Taenia crassiceps* Cysticerci. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 162, n. 2, p. 123-133, 2008.

GUIMARÃES, M. A.; DE OLIVEIRA, R. N.; DE ALMEIDA, R. L.; MAFUD, A. C.; SARKIS, A. L. V.; GANASSIN, R.; DA SILVA, M. P.; ROQUINI, D. B.; VERAS, L. M.; SAWADA, T. C. H.; ROPKE, C. D.; MUEHLMANN, L. A.; JOANITTI, G. A.; KUCKELHAUS, S. A. S.; ALLEGRETTI, S. M.; MASCARENHAS, Y. P.; DE

MORAES, J.; LEITE, J. R. S. A. Epiisopilosine alkaloid has activity against *Schistosoma mansoni* in mice without acute toxicity. **Plos One**, v. 13, n. 5, 2018.

GUIOTTO, P.; WOELKART, K.; GRABNAR, I.; VOINOVICH, D.; PERISSUTTI, B.; INVERNIZZI, S.; GRANZOTTO, M.; BAUER, R. Pharmacokinetics and immunomodulatory effects of phytotherapeutic lozenges (bonbons) with *Echinacea purpurea* extract. **Phytomedicine**, v. 15, p. 547–554, 2008.

HANDA, M.; GUIDOTTI, G. Purification and cloning of a soluble ATP-diphosphohydrolase (apyrase) from potato tubers (*Solanum tuberosum*). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 218, n. 3, p. 916–923.

HAQUE, M.M.; BEGUM, S.; SOHRAB, M. H.; AHSAN, M.; HASAN, C. M.; AHMED, N.; HAQUE, R. Secondary metabolites from the stem of *Ravenia spectabilis* Lindl. **Pharmacognosy Magazine**, v. 9, n. 33, p. 76–80, 2013.

HARDER, A. Chemotherapeutic approaches to schistosomes: current knowledge and outlook. **Parasitology Research**, v.88, p. 395–397, 2002.

HAYAT, K.; AFZAL, S.; SAEED, A.; MURTAZA, A.; RAHMAN, S. U.; KHAN, K. M.; SAEED, A.; ZAIB, S.; LECKA, J.; SEVIGNY, J.; IQBAL, J.; HASSAN, A. Investigation of new quinoline derivatives as promising inhibitors of NTPDases: Synthesis, SAR analysis and molecular docking studies. **Bioorganic Chemistry**, v. 87, p. 218–226, 2019.

HE, Y.; YANG, L.; LIU, Y.; ZHANG, J.; TANG, J.; SU, J.; LI, Y.; WANG, C.; YANG, L.; WANG, Z. Characterization of cardamonin metabolism by P450 in different species via HPLC-ESI-ion trap and UPLC-ESI-quadrupole mass spectrometry. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 30, p. 1462–1470, 2009.

HENGJUMRUT, P.; ANUKUNWITHAYA, T.; TANTISIRA, M. H.; TANTISIRA, B.; KHEMAWOOT, P. Comparative pharmacokinetics between madecassoside and asiaticoside presented in a standardised extract of *Centella asiatica*, ECa 233 and their respective pure compound given separately in rats. **Xenobiotica**, v. 48, p. 18–27, 2018.

HISERODT, R.D.; POPE, B. M.; COSSETTE, M.; DEWIS, M. L. Proposed mechanisms for the fragmentation of doubly allylic alkenamides (tingle compounds) by low energy collisional activation in a triple quadrupole mass spectrometer. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 15, n. 10, p. 1462–1470, 2004.

HOGAN, L.; BELTON, M. List of Rare, Threatened, and Endangered Plants of Maryland. **Maryland Natural Heritage Program**, The Maryland Department of Natural Resources, 580 Taylor Avenue, Annapolis, MD, 2016.

HSIEH, H. L.; TONG, C. G.; THOMAS, C.; ROUX, S. Light-modulated abundance of an mRNA encoding a calmodulin-regulated, chromatin-associated NTPase in pea. **Plant Molecular Biology**, v. 30, n. 1, p. 135–147, 1996.

JAISWAL, S.; SHARMA, A.; SHUKLA, M.; LAL, J. Gender-related pharmacokinetics and bioavailability of a novel anticancer chalcone, cardamonin, in rats determined by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 986-987, p. 23-30, 2015.

JAMIL, S. S.; NIZAMI, Q.; SALAM, M. *Centella asiatica* (Linn.) Urban: A review. **Indian Journal of Natural Products and Resources**, v. 6, n. 2, p. 158–170, 2007.

JISAKA, M.; KAWANAKA, M.; SUGIYAMA, H.; TAKEGAWA, K.; HUFFMAN, M. A.; OHIGASHI, H.; KOSHIMIZU, Z. Antischistosomal activities of sesquiterpene lactones and steroid glucosides from *Vernonia amygdalina*, possibly used by wild chimpanzees against parasite-related diseases. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 56, n. 5, p. 845-846, 1992.

JOHNSON, B. M.; NIKOLIC, D.; VAN BREEMEN, R. B. Applications of pulsed ultrafiltration-mass spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 21, p. 76–86, 2002.

KACEN, M.; KACEM, I.; SIMON, G.; MANSOUR, A. B.; CHAABOUNI, S.; ELFEKI, A.; BOUAZIZ, M. Phytochemicals and biological activities of *Ruta chalepensis* L. growing in Tunisia. **Food Bioscience**, v. 12, p. 73-83, 2015.

KATZ, M.; CHAVES, A.; PELLEGRINO, J. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in *Schistosomiasis mansoni*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 14, n. 6, p. 397-400, 1972.

KAWAIL, S.; TOMONO, Y.; KATASE, E.; OGAWA, K.; YANO, M.; TAKEMURA, Y.; JU-ICHI, M.; ITO, C.; FURUKAWA, H. Acridones as inducers of HL-60 cell differentiation. **Leukemia Research**, v. 23, p. 263-269, 1999.

KETTLUN, A. M.; ESPINOSA, V.; GARCIA, L.; VALENZUELA, M. A. Potato tuber isoamylases: substrate specificity, affinity labeling, and proteolytic susceptibility. **Phytochemistry**, v. 66, n. 9, p. 975-982, 2005.

KHEMAWOOT, P.; HENGJUMRUT, P.; ANUKUNWITHAYA, T.; CHANG, L. C.; WONGWIWATTHANANUKIT, S.; TANTISIRA, M. H. Comparison of the Pharmacokinetic Profiles of a Standardized Extract of *Centella asiatica* and A Mixture of Madecassoside and Asiaticoside in Rats. **Planta Med Int Open**, v. 5, p. 39–47, 2018.

KITCHEN, D. B.; DECORNEZ, H.; FURR, J. R.; BAJORATH, J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 11, p. 935-949, 2004.

KLAVER, E. J.; KUIJK, L. M.; LINDHORST, T. K.; CUMMINGS, R. D.; VAN, D. I. E. I. *Schistosoma mansoni* soluble egg antigens induce expression of the negative regulators SOCS1 and SHP1 in human dendritic cells via interaction with the mannose receptor. **PLoS One**, v. 10, n. 4, 2015.

KNOWLES, A. F. The GDA1_CD39 superfamily: NTPDases with diverse functions. **Purinergic Signalling**, v. 7, n. 1, p. 21-45, 2011.

KOSTOVA, I.; IVANOVA, A.; MIKHOVA, B.; KLAIBER, I. Alkaloids and coumarins from *Ruta graveolens*. **Monatshefte fur Chemie**, v. 130, n. 5, p. 703–707, 1999.

KOZAKIEWICZ, A.; NEUMANN, P.; BANACH, M.; KOMOSYNSKI, M.; WOJTCZAK, A. Modeling studies of potato nucleoside triphosphate diphosphohydrolase ntpdase1: an insight into the catalytic mechanism. **Acta Biochimica Polonica**, v. 55, n. 1, p. 141–150, 2008.

KUMAR, R.; SHARMA, S.; PRASAD, D. Acridones: A Relatively Lesser Explored Heterocycle for Multifactorial Diseases. **Key Heterocycle Cores for Designing Multitargeting Molecules**, p. 53-132, 2018.

KWON, K. J.; BAE, S.; KIM, K.; AN, I. S.; AHN, K. J.; AN, S.; CHA, H. J. Asiaticoside, a component of *Centella asiatica*, inhibits melanogenesis in B16F10 mouse melanoma. **Molecular Medicine Reports**, v. 10, n. 1, p. 503-507, 2014.

LACROIX, D.; PRADO, S.; KAMOGA, D.; KASENENE, J.; BODO, B. Structure and *in vitro* antiparasitic activity of constituents of *Citropsis articulata* root bark. **Journal of Natural Products**, v. 74, p. 2286–2289, 2011.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophages T4. **Nature**, n. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LAGO, E.M.; XAVIER, R. P.; TEIXEIRA, T. R.; SILVA, L. M.; DA SILVA FILHO, A. A.; DE MORAES, J. Antischistosomal agents: state of art and perspectives. **Future Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 1, p. 89-120, 2018.

LANÇAS, F. M. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: finalmente “compatíveis”? **Scientia Chromatographica**, v. 1, n. 2, p. 35-61, 2009.

LEAL, C. P. S. **Isolamento e quantificação de marcadores químicos de *Centella asiatica* L. e *Cynara scolymus***. 2006. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

LEE, J. H.; KIM, H. L.; LEE, M. H.; YOU, K. E.; KWON, B. J.; SEO, H. J.; PARK, J. C. Asiaticoside enhances normal human skin cell migration, attachment and growth in vitro wound healing model. **Phytomedicine**, v. 19, n. 13, p. 1223-1227, 2012.

LEMOES, S. D. C. **Desenvolvimento e produção de metabólitos de arruda (*Ruta graveolens* L.) exposta a substratos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo**. 2015. Tese (doutorado em ciências), Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

LEY, J. P.; KRAMMER, G.; LOOFT, J.; REINDERS, G.; BERTRAM, H. J. Structure activity relationships of trigeminal effects for artificial and naturally occurring alkanides related to spilanthol. **Flavour Science: Recent Advances and Trends**, v. 43, p. 21-24, 2006.

LI, L.; KONG, J.; YAO, C. H.; LIU, X. F.; LIU, J. H. Rapid identification of urokinase plasminogen activator inhibitors from Traditional Chinese Medicines based on ultrafiltration, LC-MS and in silico docking. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 164, p. 241-248, 2019.

LING, Y.; HU, P.; ZHANG, L.; JIN, H.; CHEN, J.; TAO, Z.; HUANG, L.; REN, R. Identification and Structural Characterization of Acylgluconic Acids, Flavonol Glycosides, Limonoids and Alkaloids from the Fruits of *Evodia rutaecarpa* by High Performance Liquid Chromatography Coupled to Electrospray Ionization and Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry. **Journal of Chromatographic Science**, 2016.

LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B. W.; FEENEY, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings 1PII of original article. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 46, n. 1-3, p. 3-26, 2001.

LIU, S.; YAN, J.; XING, J.; SONG, F.; LIU, Z.; LIU, S. Characterization of compounds and potential neuraminidase inhibitors from the n-butanol extract of *Compound Indigowoad Root Granule* using ultrafiltration and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 59, p. 96-101, 2012.

LIU, Z.; LIN, Z.; CHEN, S.; WANG, L.; XIAN, S. Rapid Screening of Potential Phosphodiesterase Inhibitors from the Roots of *Ilex pubescens* Hook. et Arn. Using a Combination of Ultrafiltration and LC–MS. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, V. 2017, 2017.

LONG, H. S.; STANDER, M. A.; VAN WYK, B. E. Notes on the occurrence and significance of triterpenoids (asiaticoside and related compounds) and caffeoylquinic acids in *Centella* species. **South African Journal of Botany**, v. 82, p. 53-59, 2012.

LOPEZ-RUIZ, R.; ROMERO-GONZALEZ, R.; FRENICH, A. G. Ultrahigh-pressure liquid chromatography-mass spectrometry: An overview of the last decade. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 118, p. 170-181, 2019.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

LU, L. YING, K.; WEI, S.; FANG, Y.; LIU, Y.; LIN, H.; MA, L.; MAO, Y. Asiaticoside induction for cell-cycle progression, proliferation and collagen synthesis in human dermal fibroblasts. **International Journal of Dermatology**, v. 43, n. 11, p. 801-807, 2004.

LUO, S. Q.; CHIN, H. F. Isolation and identification of madecassoside from *Centella asiatica*. **Zhongcaoyao**, v. 12, p. 5–6, 1981.

MAFEZOLI, J. **Atividade tripanocida e antimicrobiana de plantas da família Rutaceae**. 2002. Tese (Doutorado em Química), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2002.

MAIA, A. C.; DETONI, M. L.; PORCINO, G. N.; SOARES, T. V.; DO NASCIMENTO GUSMAO, M. A.; FESSEL, M. R.; MARQUES, M. J.; SOUZA, M. A.; COELHO, P. M.; ESTANISLAU, J. A.; DA COSTA ROCHA, M. O.; DE OLIVEIRA SANTOS, M.; FARIA-PINTO, P.; VASCONCELOS, E. G. Occurrence of a conserved domain in ATP diphosphohydrolases from pathogenic organisms associated to antigenicity in human parasitic diseases. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 35, n. 10, p. 1059-1067, 2011.

MAIA, A. C. R. G.; PORCINO, G. N.; DETONI, M. L.; QUELLIS, L. R.; EMÍDIO, N. B.; MARCONATO, D. G.; MESSIAS, W. F.; SOLDATI, L.L.; FARIA-PINTO, P.; CAPRILES, P. V. S. Z.; COIMBRA, E. S.; MARQUES, M. J.; VASCONCELOS, E. G. *Leishmania infantum* amastigote nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (NTPDase1): Its inhibition as a new insight into mode of action of pentamidine. **Experimental Parasitology**, v. 200, p. 1-6, 2019.

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. UHPLC – Uma abordagem atual: desenvolvimentos e desafios recentes. **Scientia Chromatographica**, v. 4, n. 3, p. 197-207, 2012.

MALEBO, H. M.; TANJA, W.; CAL, M.; SWALEH, S. A. M.; OMOLO, M. O.; HASSANALI, A. Anti-plasmodial, anti-trypanosomal, anti-leishmanial and cytotoxicity activity of selected Tanzanian medicinal plants. **Tanzania Journal of Health Research**, v. 11, n. 4, p. 226-234, 2009.

MALIK, S.; MORAES, D. F. C.; AMARAL, F. M. M.; RIBEIRO, M. N. S. *Ruta graveolens*: Phytochemistry, Pharmacology, and Biotechnology. In: JHA, S. (Ed.). **Transgenesis and Secondary Metabolism**. Springer, Cham, 2016. p. 177–204.

MARTINS, S. M.; TORRES, C. R.; FERREIRA, S. T. Inhibition of the ecto-ATP diphosphohydrolase of *Schistosoma mansoni* by thapsigargin. **Bioscience Reports**, v. 20, n. 5, p. 369-381, 2000.

MASSBANK. Disponível em: <<https://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/spectra/display/CCMSLIB00000848351>>. Acesso em: 2 out. 2019.

MASSBANK. Disponível em: <<https://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/>>. Acesso em: 20 nov. 2019.

MASSUDA, T.; TAKASUGI, M.; ANETAI, M. Psoralen and other linear furanocoumarins as phytoalexins in *Glehnia littoralis*. **Phytochemistry**, v. 47, n. 1, p. 13-16, 1998.

MATTHIAS, A.; ADDISON, R. S.; AGNEW, L. L.; BONE, K. M.; WATSON, K.; LEHMANN, R. P. Comparison of Echinacea alkylamide pharmacokinetics between liquid and tablet preparations. **Phytotherapy**, v. 14, p. 587–590, 2007.

MBEUNKUI, F.; GRACE, M.H.; LATEGAN, C.; SMITH, P.J.; RASKIN, I.; LILA, M.A. Isolation and identification of antiplasmodial *N*-alkylamides from *Spilanthes acmella* flowers using centrifugal partition chromatography and ESI-IT-TOF-MS. **Journal of Chromatography B**, v. 879, n. 21, p.1886-1892, 2011.

McMANUS, D. P.; DUNNE, D. W.; SACKO, M.; UTZINGER, J.; VENNERVALD, B. J.; ZHOU, X. N. Schistosomiasis. **Nature Reviews. Disease Primers**, v. 4, n. 1, 2018.

MELEK, F. R.; TADROS, M. M.; YOUSIF, F.; SELIM, M. A.; HASSAN, M. H. Screening of marine extracts for schistosomicidal activity *in vitro*. Isolation of the triterpene glycosides echinosides A and B with potential activity from the Sea Cucumbers *Actinopyga echinites* and *Holothuria polii*. **Pharmaceutical Biology**, v. 50, n. 4, p 490-496, 2012.

MELO, N. I.; MANTOVANI, A. L.; DE OLIVEIRA, P. F.; GROppo, M.; FILHO, A. A.; RODRIGUEX, V.; CUNHA, W. R. TAVARES, D. C. MAGALHÃES, L. G.; CROTTII, A. E. Antischistosomal and cytotoxic effects of the essential oil of *Tetradenia riparia* (Lamiaceae). **Natural Product Communications**, v.10, p. 1627-1630, 2015.

MICHAEL, J.P. Chapter One - Acridone Alkaloids. **The Alkaloids: Chemistry and Biology**, v. 78, p. 1-108, 2017.

MOLINA-TORRES, J. SALAZAR-CABRERA, C. J.; ARMENTA-SALINAS, C.; RAMIREZ-CHAVEZ, E. Fungistatic and Bacteriostatic Activities of Alkamides from *Heliopsis longipes* Roots: Affinin and Reduced Amides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 15, p. 4700-4704, 2004.

MONDIN, C.A.; MAGENTA, M.A.G.; NAKAJIMA, J.N.; SILVA, G.A.R. 2015 *Acmella* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB15913>>. Acesso em: 18 Dez. 2019.

MORAES J. Antischistosomal natural compounds: present challenges for new drug screens. In: RODRIGUEZ-MORALES, A J. **Current Topics in Tropical Medicine**. InTech. Rijeka: p. 333-358, 2012.

MORRIS, G. M.; LIM-WILBY, M. Molecular Docking. **Methods in Molecular Biology**, v. 443, p.365-382, 2008.

MULABAGAL, V.; CALDERÓN, A. I. Development of binding assays to screen ligands for *Plasmodium falciparum* thioredoxin and glutathione reductases by ultrafiltration and liquid chromatography/mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 878, p. 987–993, 2010.

MUNIGUNTI, R.; MULABAGAL, V.; CALDERON, A. I. Screening of natural compounds for ligands to PfTrxR by ultrafiltration and LC–MS based binding assay. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 55, p. 265–271, 2011.

MURIITHI, M. W.; ABRAHAM, W. R.; ADDAE-KYEREME, J.; SCOWEN, I.; CROFT, S. L.; GITU, P. M.; KENDRICK, H.; NJAGI, E. N.; WRIGHT, C. W. Isolation and *in vitro* antiplasmodial activities of alkaloids from *Teclea trichocarpa*: *in vivo* antimalarial activity and x-ray crystal structure of normelicopicine. **Journal of Natural Products**, v. 65, p. 956–959, 2002.

MURRAY, R.D.H.; JORGE, Z. D. A simple method for differentiating between angular and linear 5-methoxyfuranocoumarins. **Phytochemistry**, v. 23, n. 3, p. 697-699, 1984.

MWANGI, E. S. K.; KERIKO, J. M.; MACHOCHO, A. K.; WANYONYI, A. W.; MALEBO, H. M.; CHHABRA, S. C.; TARUS, P. K. Anti-protozoal activity and cytotoxicity of metabolites from leaves of *Teclea trichocarpa*. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, n. 9, p.726-731, 2010.

NABI, B.; REHMAN, S.; BABOOTA, S.; ALI, J. Natural antileprotic agents: a boon for the management of leprosy. **Discovery and Development of Therapeutics from Natural Products Against Neglected Tropical Diseases Natural Product Drug Discovery**, Pages 351-372, 2019.

NAKAAR, V.; SAMUEL, B. U.; NGO, E. O.; JOINER, K. A. Targeted Reduction of Nucleoside Triphosphate Hydrolase by Antisense RNA Inhibits *Toxoplasma gondii* Proliferation. **The Journal of Biology Chemistry**, v. 274, n. 8, p. 5083–5087, 1999.

NAKATANI, N.; NAGASHIMA, M. Pungent Alkamides from *Spilanthes acmella* L. var. *oleracea* Clarke. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 56, n. 5, p. 759-762, 1992.

NARDIN, T.; PIASENTIER, E.; BARNABA, C.; LARCHER, R. Alkaloid profiling of herbal drugs using high resolution mass spectrometry. **Drug Testing and Analysis**, v. 10, n. 3, p. 423–448, 2018.

NASCIMENTO, A.M.; DE SOUZA, L.M.; BAGGIO, C.H.; DE P. WERNER, M.F.; MARIA-FERREIRA, D.; DA SILVA, L.M.; SASSAKI, G.L.; GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M.; CIPRIANI, T.R. Gastroprotective effect and structure of a rhamnogalacturonan from *Acmella oleracea*. **Phytochemistry**, v. 85, p. 137-142, 2013.

NATURA. 2017. Disponível em: <<http://www.natura.com.br/chronos/antissinais>>. Acesso em: 1 Dez 2019.

NEMA, N. K.; MAITY, N.; SARKAR, B. K.; MUKHERJEE, P. K. Matrix metalloproteinase, hyaluronidase and elastase inhibitory potential of standardized extract of *Centella asiatica*. **Pharmaceutical Biology**, v. 51, n. 9, p.1182-1187, 2013.

NGADJUI, B.T.; DONGO, E.; HAPPI, E. N.; BEZABIH, M.; ABEGAZ, B. M. Prenilated flavones and phenylpropanoid derivate from roots of *Dorstenia psilurus*. **Phytochemistry**, v. 48, n. 4, p. 733-737, 1998.

NICULAU, E. S.; de FREITAS, S. D. L.; de SÁ, I. C. G.; FERNANDES, J. B.; da SILVA, M. F. G. F. Análise Quantitativa de Produtos Naturais em Plantas por CL-EM. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 1, p. 204–230, 2016.

O'DONNELL, F.; RAMACHANDRAN, V. N.; SMYTH, W. F.; HACK, C. J.; PATTON, E. A study of the analytical behaviour of selected synthetic and naturally occurring quinolines using electrospray ionisation ion trap mass spectrometry, liquid chromatography and gas chromatography and the construction of an appropriate database for quinoline characterization. **Analytica Chimica Acta**, v. 572, p. 63–76, 2006.

OGUNGBE, I. V.; NG, J. D.; SETZER, W. N. Interactions of antiparasitic alkaloids with *Leishmania* protein targets: a molecular docking analysis. **Future Medicinal Chemistry**, v. 5, n. 15, p. 1777-1799, 2013.

ORHAN, I. E. *Centella asiatica* (L.) Urban: from traditional medicine to modern medicine with neuroprotective potential. **Evidence Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, 2012.

PAVIA, D.L.; KRIZ, G.S.; LAMPMAN, G.M. **Introdução À Espectroscopia** - Tradução da 4ª Edição Norte-americana. São Paulo: Cengage Learning, 2010.

PELLEGRINO, J.; KATZ, N. Experimental chemotherapy of *Schistosomiasis mansoni*. **Advances in Parasitology**, v. 6, p. 223-290, 1968.

PELLEGRINO, J.; SIQUEIRA, A. F. Técnica de perfusão para colheita de *Schistosoma mansoni* em cobaias experimentais infectadas. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, v. 8, p. 589-597, 1956.

PENIDO, L. O. M.; RESENDE, D. M.; VIANELLO, M. A.; HUMBERTO DA SILVEIRA BORDIN, F.; JACINTO, A. A.; DIAS, W. D.; MONTESANO, M. A.; NELSON, D. L.; MARCOS ZECH COELHO, P.; VASCONCELOS, E. G. A new series of schistosomicide drugs, the alkylaminoalkanethiosulfuric acids, partially inhibit the activity of *Schistosoma mansoni* ATP diphosphohydrolase. **European Journal Pharmacology**, v. 570, n. 1-3, p. 10-17, 2007.

PEREIRA, A. S.; CAVALCANTI, N.L.; NASCIMENTO, G.A.; NASCIMENTO-SILVA, J. L.; PADILHA, R.J.; VIEGAS, L. F.; ALVES, L. C.; LIMA-FILHO, J. L.; CHAVES, M. E. Morphological and morphometric study of cercariae and adult worms of *Schistosoma mansoni* (SLM strain) isolated from infected mice. **Parasitology Research**, v. 112, n. 3, p. 1087-1096, 2013.

PEREIRA, V. R. D.; JUNIOR, I. J. A.; DA SILVEIRA, L. S.; GERALDO, R. B.; DE F PINTO, P.; TEIXEIRA, F. S.; SALVADORI, M. C.; SILVA, M. P.; ALVES, L. A.; CAPRILES, P. V. S. Z.; DAS C ALMEIDA, A.; COIMBRA, E. S.; PINTO, P. L. S.; COURI, M. R. C.; DE MORAES, J.; DA SILVA FILHO, A. A. *In Vitro and in Vivo* Antischistosomal Activities of Chalcones. **Chemistry and Biodiversity**, v. 15, n. 12, 2018.

PING, C. P.; MOHAMAD, T. A. S. T.; AKHTAR, M. N.; PERIMAL, E. K.; AKIRA, A.; ALI, D. A. I.; SULAIMAN, M. R. Antinociceptive Effects of Cardamonin in Mice: Possible Involvement of TRPV₁, Glutamate, and Opioid Receptors. **Molecules**, v. 23, n. 9, p. 1-14, 2018.

PINHEIRO, M. T. **Avaliação fitoquímica e da atividade antioxidante, citotóxica, inseticida e repelente de extratos vegetais das folhas de *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen, *Acmella ciliata* (Kunth.) Cass e *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray (ASTERACEAE) contra *Aedes aegypti*.** 2016. Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia). Universidade Federal do Amapá, Macapá, 2016.

PODOLAK, I.; GALANTY, A.; SOBOLEWSKA, D. Saponins as cytotoxic agents: a review. **Phytochemistry Reviews**, v. 9, p. 425–474, 2010.

PORTO, H. S. M. **HPLC versus UPLC: avaliação de aspetos críticos à transferência e validação de métodos analíticos.** Universidade de Coimbra, 2014.

PRACHAYASITTIKUL, V.; PRACHAYASITTIKUL, S.; RUCHIRAWAT, S.; PRACHAYASITTIKUL, V. High therapeutic potential of *Spilanthes acmella*: A review. **Excli Journal**, v. 12, p. 291-312, 2013.

PubChem. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cardamonin>>. Acesso em: 2 out. 2019.

PubChem. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 20 nov. 2019.

PUSSET, J.; LOPEZ, J. L.; PAIS, M.; NEIRABEYEH, M. A.; VEILLON, J. M. Isolation and 2D NMR Studies of Alkaloids from *Comptonella sessilifoliola*. **Planta Medica**, v. 57, n. 2, p. 153-155, 1991.

QUINTANILLA-LICEA, R.; MATA-CÁRDENAS, B. D.; VARGAS-VILLARREAL, J.; BAZALDÚA-RODRÍGUEZ, A. F.; KAVIMNGELES-HERNÁNDEZ, I.; GARZA-GONZÁLEZ, J. N.; HERNÁNDEZ-GARCÍA, M. E. Antiprotozoal activity against *Entamoeba histolytica* of plants used in northeast Mexican traditional medicine. Bioactive compounds from *Lippia graveolens* and *Ruta chalepensis*. **Molecules**, v. 19, n. 12, p. 21044-21065, 2014.

RAFAMANTANANA, M. H.; ROZET, E.; RAOELISON, G. E.; CHEUK, K.; RATSIMAMANGA, S. U.; HUBERT, P.; QUETIN-LECLERCQ, J. An improved HPLC-UV method for the simultaneous quantification of triterpenic glycosides and

aglycones in leaves of *Centella asiatica* (L.) Urb (Apiaceae). **Journal of Chromatography B**, v. 877, p. 2396–2402, 2009.

RAHMAN, ATTA-UR. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 43. Elsevier, Oxford, Englad., 2014.

RAMSEWAK, R. S.; ERICKSON, A. J.; NAIR, M. G. Bioactive *N*-isobutylamides from the flower buds of *Spilanthes acmella*. **Phytochemistry**, v. 51, n. 6, p. 729-732, 1999.

ROBERTS, N.J.; BRIGHAM, J.; WU, B.; MURPHY, J. B.; VOLPIN, H.; PHILLIPS, D. A.; ETZLER, M.E. A Nod factor-binding lectin is a member of a distinct class of apyrases that may be unique to the legumes. **Molecular and General Genetics**, v. 262, n. 2, p. 261–267, 1999.

ROBSON, S. C.; SEVIGNY, J.; ZIMMERMANN, H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. **Purinergic Signalling**, v. 2, n. 2, p. 409-430, 2006.

RODRIGUEZ-ALLER, M.; GURNY, R.; VEUTHEY, J.-L.; GUILLARME, D. Coupling ultra high-pressure liquid chromatography with mass spectrometry: constraints and possible applications. **Journal of Chromatography A**, v. 1292, p. 2-18, 2012.

RONDANELLI, M.; FOSSARI, F.; VECCHIO, V.; BRASCHI, V.; RIVA, A.; ALLEGRI, P.; PETRANGOLINI, G.; LANELLO, G.; FALIVA, M. A.; PERONI, G.; NICHETTI, M.; GASPARRI, C.; SPADACCINI, D.; INFANTINO, V.; MUSTAFA, S.; ALALWAN, T.; PERNA, S. *Acmella oleracea* for pain management. **Fitoterapia**, v. 140, 2020.

RUMALLA, C. S.; ALI, Z.; WEERASOORIYA, A. D.; SMILLIE, T. J.; KHAN, I. A. A new triterpene glycoside from *Centella erecta*. **Fitoterapia**, v. 81, n. 7, p. 751-754, 2010.

SAMPAIO, O. M. **Estudo de metabólitos secundários de *Ruta graveolens* como inibidores da fotossíntese**. 2012. Tese (Doutorado em Química), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2012.

SANOGO, B.; YUAN, D.; ZENG, X.; ZHANG, Y.; WU, Z. Diversity and Compatibility of Human Schistosomes and Their Intermediate Snail Hosts. **Trends Parasitology**, v. 34, n. 6, p. 493-510, 2018.

SANSOM, F. M.; NEWTON, H. J.; CRISIS, S.; CIANCOTTO, N. P.; COWAN, P. J.; D'APICE, A. J.; HARTLAND, E. L. A bacterial ecto-triphosphate diphosphohydrolase similar to human CD39 is essential for intracellular multiplication of *Legionella pneumophila*. **Cellular Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 1922-1935, 2007.

SANSOM, F. M.; RIEDMAIER, P.; NEWTON, H. J.; DUNSTONE, M. A.; MULLER, C. E.; STEPHAN, H.; BYRES, E.; BEDDOE, T.; ROSSJOHN, J.; COWAN, P. J.; D'APICE, A. J.; ROBSON, S. C.; HARTLAND, E. L. Enzymatic properties of an ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase from *Legionella pneumophila*: substrate

specificity and requirement for virulence. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 19, p. 12909-12918, 2008.

SANTOS, R. F.; PÔSSA, M. A. S.; BASTOS, M. S.; GUEDES, P. M. M.; ALMEIDA, M. R.; DEMARCO, R.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; BAHIA, M. T.; FIETTO, J. L. R. Influence of Ecto-Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase Activity on *Trypanosoma cruzi* Infectivity and Virulence. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 3, e387, 2009.

SEPULVEDA, C. S.; FASCIO, M. L.; GARCIA, C. C.; ACCORSO, N. B. D.; DAMONATE, E. B. Acridones as antiviral agents: synthesis, chemicals and biological properties. **Current Medicinal Chemistry**, v. 20, p. 2402–2414, 2013.

SHARMA, V.; BOONEN, J.; CHAUHAN, N.S.; THAKUR, M.; DE SPIEGELLER, B.; DIXIT, V.K. *Spilanthes acmella* ethanolic flower extract: LC–MS alkylamide profiling and its effects on sexual behavior in male rats. **Phytomedicine**, v. 18, n. 13, p.1161-1169, 2011.

SILVA, F. P. **Caracterização Fitoquímica e Atividades Biológicas de *Centella asiatica* (L) Urban**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas), Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2008.

SILVA, L. M. **Atividade esquistossomocida de substâncias naturais em nanopartículas lipídicas sólidas**. 2018. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2018.

SILVA, M. P.; DE OLIVEIRA, R. N.; MENGARDA, A. C.; ROQUINI, D. B.; ALLEGRETTI, S. M.; SALVADORI, M. C.; TEIXEIRA, F. S.; DE SOUSA, D. P.; PINTO, P. L. S.; DA SILVA FILHO, A. A.; DE MORAES, J. Antiparasitic activity of nerolidol in a mouse model of schistosomiasis. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 50, n. 3, p. 467-472, 2017.

SILVEIRA, N. **Investigação fitoquímica e farmacológica das alcanidas de *Acmella ciliata* (H. B. K.) Cassini (ASTERACEAE)**. 2017. Tese (Doutorado em Farmácia). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.

SILVEIRA, N. SAAR, J.; SANTOS, A. D.; BARISON, A.; SANDJO, L. P.; KAISER, M.; SCHMIDT, T. J.; BIAVATTI, M. W. A New Alkamide with an Endoperoxide Structure from *Acmella ciliata* (Asteraceae) and Its *in Vitro* Antiplasmodial Activity. **Molecules**, v. 21, n. 6, p. 765, 2016.

SILVEIRA, N.; SANDJO, L. P.; BIAVATTI, M. W. Spilanthol-containing products: A patent review (1996–2016). **Trends in Food Science & Technology**, v. 74, p. 107-111, 2018.

SIMOTE, S.Y. **Estudo fitoquímico de *Helietta puberula* (Rutaceae), *Simarouba versicolor* (Simaroubaceae) e busca de um processo de microencapsulação de compostos ativos, visando o controle de formigas cortadeiras**. 2006. Tese (Doutorado em Química), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2006.

SINGH, M.; CHATURVED, R. Screening and quantification of an antiseptic alkylamide, spilanthol from *in vitro* cell and tissue cultures of *Spilanthes acmella* Murr. **Industrial Crops and Products**, v. 36, n. 1, p. 321-328, 2012.

SMITHERS, S.R; TERRY, R.J. The infection of Laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of the adult worms. **Parasitology**, v. 55, n. 4, p. 695-700, 1965.

SOARES, R. N. **Avaliação da atividade do complexo de inclusão da βlapachona em ciclodextrina frente ao *Schistosoma mansoni***. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2016.

SONG, H. P.; ZHANG, H.; FU, Y.; MO, H. Y.; ZHANG, M.; CHEN, J.; LI, P. Screening for selective inhibitors of xanthine oxidase from flos chrysanthemum using ultrafiltration LC–MS combined with enzyme channel blocking. **Journal of Chromatography B**, v. 961, p. 56–61, 2014.

SOUZA, F. P. C.; VITORINO, R. R.; COSTA, A. P.; JUNIOR, F. C. F.; SANTANA, L. A.; GOMES, A. P. Esquistossomose mansônica: aspectos gerais, imunologia, patogênese e história natural. **Revista Brasileira Clínica Médica**, v. 9, n. 4, p. 300-307, 2011.

SOUZA, R. L.; GONÇALVES, U. O.; BADOCCO, F. R.; DE SOUZA GALVÃO, L.; SANTOS, R. A. D.; DE CARVALHO, P. H. D.; DE CARVALHO, L. S. A.; DA SILVA FILHO, A. A.; VENEZIANI, R. C. S.; RODRIGUES, V.; AMBRÓSIO, S. R.; MAGALHÃES, L. G. Licochalcone A induces morphological and biochemical alterations in *Schistosoma mansoni* adult worms. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 96, p. 64-71, 2017.

SPELMAN, K.; DEPOIX, D.; MCCRAY, M.; MOURAY, E.; GRELLIER, P. The traditional medicine *Spilanthes acmella*, and the alkylamides spilanthol and undeca-2E-ene-8,10-diynoic acid isobutylamide, demonstrate *in vitro* and *in vivo* anti-malarial activity. **Phytotherapy Research**, v. 25, n. 7, p.1098-1101, 2011.

STAFFORD, G. I.; PEDERSEN, P. D.; JÄGER, A. K.; VAN STADEN, J. Monoamine oxidase inhibition by southern African traditional medicinal plants. *South African Journal of Botany*, v. 73, n. 3, p. 384-390, 2007.

STEINEBRUNNER, I.; JETER, C.; SONG, C.; ROUX, S. J. Molecular and Biochemical Comparison of Two Different Apyrases from *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 38, n. 12, p. 913-922, 2000.

SULEIMAN, M. I.; A/KARIM, E. I.; IBRAHIM, K. E. E.; AHMED, B. M.; SAEED, A. E. M.; HAMID, A. E. M. E. Photo-thermal stability of praziquantel. **Saudi Pharmaceutocal Journal**, v. 12, p. 157-162, 2004.

TANG, D. Q.; ZHENG, X. X.; CHEN, X.; YANG, D. Z.; DU, Q. Quantitative and qualitative analysis of common peaks in chemical fingerprint of Yuanhu Zhitong tablet by HPLC-DAD–MS/MS. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 4, n. 2, p. 96-106, 2014.

TAUSSKY, H.M.; SHORR, E. A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus. The **Journal of Biological Chemistry**, v. 202, p. 675-685, 1953.

TOFOLLI, A. L.; MACIEL, E. V. S.; NAZARIO, C. E. D.; LANÇAS, F. M. Liquid Chromatography, Packed Capillary. WORSFOLD, P. **Enycl.Anal. Sci.** (3 Ed.), Elsevier, NY, p. 182-191, 2019.

TOMCHINSKY, B.; MING, L. C. As plantas comestíveis no Brasil dos séculos XVI e XVII segundo relatos de época. **Rodriguésia**, v. 70, 2019.

TRAVERSO-CORI, A.; CHAIMOVICH, H.; CORI, O. Kinetic studies and properties of potato apyrase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 109, p. 173-184, 1965.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, v.1, n.1, p. 456-461, 2009.

UENG, Y. F.; CHEN, C. C.; CHUNG, Y. T.; LIU, T. Y.; CHANG, Y. P.; LO, W. S.; MURAYAMA, N.; YAMAZAKI, H.; SOUČEK, P.; CHAU, G. Y.; CHI, C. W.; CHEN, R. M.; LI, D. T. Mechanism-based inhibition of cytochrome P450 (CYP)2A6 by cholepinin in recombinant systems, in human liver microsomes and in mice *in vivo*. **British Journal of Pharmacology**, v. 163, n. 6, p. 1250-1262, 2011.

UTZINGER, J.; CHOLLET, J.; TU, Z. W.; XIAO, S. H.; TANNER, M. Comparative study of the effects of artemether and artesunate on juvenile and adult *Schistosoma mansoni* in experimentally infected mice. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, p. 318-323, 2002.

VAN BREEMEN, R. B.; HUANG, C. R.; NIKOLIC, D.; WOODBURY, C. P.; ZHAO, Y. Z.; VENTON, D. L. Pulsed ultrafiltration mass spectrometry: a new method for screening combinatorial libraries, **Analytical Chemistry**, v. 69, p. 2159–2164, 1997.

VASCONCELOS, E. G.; FARIA-PINTO, P.; REZENDE-SOARES, F. A.; PENIDO, M. L. O.; COSTA, S. C. G.; COELHO, P. M. Z. Potato Apyrase: A New Tool for Parasitic Disease Research. **Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 1-9, 2009.

VASCONCELOS, E.G.; FERREIRA, S. T.; CARVALHO, T. M.; SOUZA, W.; KETTLUN, A. M.; MANCILLA, M.; VALENZUELA, M. A.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S. Partial purification and immunohistochemical localization of ATP diphosphohydrolase from *Schistosoma mansoni*. Immunological cross-reactivities with potato apyrase and *Toxoplasma gondii* nucleoside triphosphate hydrolase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 36, p. 22139–22145, 1996.

VASCONCELOS, E. G.; NASCIMENTO, P. S.; MEIRELLES, M. N.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; FERREIRA, S. T. Characterization and localization of an ATP-

diphosphohydrolase on the external surface of the tegument of *Schistosoma mansoni*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 58, n. 2, p. 205-214, 1993.

VEBER, D. F.; JOHNSON, S. R.; CHENG, H. Y.; SMITH, B. R.; WARD, K. W.; KOPPLE, K. D. Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 12, p. 2615-2623, 2002.

VERYSER, L.; TAEVERNIER, L.; JOSHI, T.; TATKE, P.; WYNENDAELE, E.; BRACKE, N.; STALMANS, S.; PEREMANS, K.; BURVENICH, C.; RISSEEUW, M.; DE SPIEGELEER, B. Mucosal and blood-brain barrier transport kinetics of the plant N-alkylamide spilanthol using *in vitro* and *in vivo* models, **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 16, n. 177, p. 1–12, 2016.

VIJAYAMAHANTES, VIJAYALAXMI. Tinkering with targeting nucleotide signaling for control of intracellular *Leishmania* parasites. **Cytokine**, v. 119, p. 129-143, 2019.

VU, D. H.; KOSTER, R. A.; BOLHUIS, M. S.; GREIJNDANUS, B.; ALTENA, R. V.; NGUYEN, D. H.; BROUWERS, J. R. B. J.; UGES, D. R. A.; ALFFENAAR, J. W. C. Simultaneous determination of rifampicin, clarithromycin and their metabolites in dried blood spots using LC-MS/MS. **Talanta**, v. 121, p. 9-17, 2014.

WAFFO, A. F.; COOMBES, P. H.; CROUCH, N. R.; MULHOLLAND, D. A.; EL AMIN, S. M.; SMITH, P. J. Acridone and furoquinoline alkaloids from *Teclea gerrardii* (rutaceae: Toddalioideae) of southern Africa. **Phytochemistry**, v. 68, n. 5, p. 663–667, 2007.

WAHYUNI, T. S.; WIDYAWARUYANTI, A.; LUSIDA, M. I.; FUAD, A.; SOETJIPTO; FUCHINO, H.; KAWAHARA, N.; HAYASHI, Y.; AOKI, C.; HOTTA, H. Inhibition of hepatitis C virus replication by chalepin and pseudane IX isolated from *Ruta angustifolia* leaves. **Fitoterapia**, v. 99, p. 276-283. 2014.

WANG, Y.; XING, J.; XU, Y.; ZHOU, N.; PENG, J.; XIONG, Z.; LIU, X.; LUO, X.; LUO, C.; CHEN, K.; ZHENG, M.; JIANG, H. In silico ADME/T modelling for rational drug design. **Quarterly Reviews of Biophysics**, v. 48, n. 4, p. 488-515, 2015.

WEI, H.; ZHANG, X.; TIAN, X.; WU, G. Pharmaceutical applications of affinity-ultrafiltration mass spectrometry: Recent advances and future prospects. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 131, p. 444-453, 2016.

WHITLAM, J. B.; BROWN, K. F. Ultrafiltration in serum protein binding determinations. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 70, p. 146–150, 1981.

WIEBOLDT, R.; ZWEIGENBAUM, J.; HENION, J. Immunoaffinity ultrafiltration withion spray HPLC/MS for screening small-molecule libraries. **Analytical Chemistry**, v. 69, p. 1683–1691, 1997.

WILLCOX, M. L.; BODEKER, G. Traditional herbal medicines for malaria. **BMJ : British Medical Journal**, v. 329, n. 7475, p. 1156-1159, 2004.

WOELKART, K.; BAUER, R. The role of alkamides as an active principle of *Echinacea*. **Planta Medica**, v. 73, p. 615–623, 2007.

WOELKART, K.; DITTRICH, P.; BEUBLER, E.; PINL, F.; SCHOOP, R.; SUTER, A.; BAUER, R. Pharmacokinetics of the main alkamides after administration of three different *Echinacea purpurea* preparations in humans. **Planta Medica**, v. 74, p. 651–656, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Schistosomiasis. 2019. Disponível em: <<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/schistosomiasis>>. Acesso em: 12 nov. 2019.

WSZELAKI, N.; KUCIUN, A.; KISS, A. K. Screening of traditional European herbal medicines for acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity. **Acta Pharmaceutica**, v. 60, p. 119–128, 2010.

WU, B.; SONG, H. P.; ZHOU, X.; LIU, X. G.; GAO, W.; DONG, X.; LI, H. J.; LI, P.; YANG, H. Screening of minor bioactive compounds from herbal medicines by in silico docking and the trace peak exposure methods. **Journal of Chromatography. A**, v. 1436, p. 91–99, 2016.

WU, L. C.; FAN, N. C.; LIN, M. H.; CHU, I. R.; HUANG, S. J.; HU, C. Y.; HAN, S. Y. Anti-inflammatory effect of spilanthol from *Spilanthes acmella* on murine macrophage by down-regulating LPS-induced inflammatory mediators. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 7, p. 2341–2349, 2008.

XIAO, X.; SI, X.; TONG, X.; LI, G. Preparation of flavonoids and diarylheptanoids from *Alpinia katsumadai* Hayata by microwave-assisted extraction and high-speed counter-current chromatography. **Separation and Purification Technology**, v. 81, n. 3, p. 265–269, 2011.

XIE, C.; ZHONG, D.; YU, K.; CHEN, X.; Recent advances in metabolite identification and quantitative bioanalysis by LC-Q-TOF MS. **Bioanalysis**, v. 4, n. 8, p. 937–959, 2012.

XU, Y.; CAI, H.; CAO, G.; DUAN, Y.; PEI, K.; TU, S.; ZHOU, J.; XIE, L.; SUN, D.; ZHAO, J.; LIU, J.; WANG, X.; SHEN, L. Profiling and analysis of multiple constituents in Baizhu Shaoyao San before and after processing by stir-frying using UHPLC/Q-TOF-MS/MS coupled with multivariate statistical analysis. **Journal of Chromatography B**, v. 1083, p. 110–123, 2018.

YANG, A.; CHEN, J.; MA, Y.; WANG, L.; FAN, Y.; HE, X. Studies on the metabolites difference of psoralen/isopsoralen in human and six mammalian liver *microsomes in vitro* by UHPLC-MS/MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 2017.

YANG, S.; TIAN, M.; YUAN, L.; DENG, H.; WANG, L.; LI, A.; HOU, Z.; LI, Y.; ZHANG, Y. Analysis of *E. rutaecarpa* Alkaloids Constituents *In Vitro* and *In Vivo* by UPLC-Q-TOF-MS Combined with Diagnostic Fragment. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 2016, 2016.

YANG, Y.; LIANG, X.; JIN, P.; LI, N.; ZHANG, Q.; YAN, W.; ZHANG, H.; SUN, J. Screening and determination for potential acetylcholinesterase inhibitory constituents from ginseng stem–leaf saponins using ultrafiltration (UF)-LC-ESI-MS².

Phytochemical Analysis, v. 30, n. 1, p. 26-33, 2018.

YANG, Z.; ZHANG, Y.; SUN, L.; WANG, Y.; GAO, X.; CHENG, Y. An ultrafiltration high-performance liquid chromatography coupled with diode array detector and mass spectrometry approach for screening and characterising tyrosinase inhibitors from mulberry leaves. **Analytica Chimica Acta**, v. 719, p. 87–95, 2012.

ZACARIA, F.; IBRAHIM, W. N. W.; ISMAIL, I. S.; AHMAD, H.; MANSHOOR, N.; ISMAIL, N.; ZAINA, Z.; SHAARI, K. LCMS/MS Metabolite Profiling and Analysis of Acute Toxicity Effect of the Ethanolic Extract of *Centella asiatica* on Zebrafish Model. **Science and Tecnology**, v. 27, n. 2, p. 971-989, 2019.

ZEBISCH, M.; STRÄTER, N. Structural insight into signal conversion and inactivation by ntpdase2 in purinergic signaling. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 19, p. 6882–6887, 2008.

ZHAO, A. H.; ZHANG, Y. B.; YANG, X. W. Simultaneous determination and pharmacokinetics of sixteen *Angelicae dahurica* coumarins *in vivo* by LC-ESI-MS/MS following oral delivery in rats. **Phytomedicine**, v. 23, p. 1029–1036, 2016.

ZHAO, N.; LI, Z. L.; LI, D. H.; SUN, D. T.; BAI, J.; PEI, Y. H.; JING, Y. K.; HUA, H. M. Quinolone and indole alkaloids from the fruits of *Evodia rutaecarpa* and their cytotoxicity against two human cancer cell lines. **Phytochemistry**, v. 109, p. 133-139, 2015.

ZIMMERMANN, H. Ectonucleotidases: Some recent developments and a note on nomenclature. **Drug Development Research**, v. 52, n. 1-2, p. 44-56, 2001.

ZIMMERMANN, H.; ZEBISCH, M.; STRATER, N. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. **Purinergic Signalling**, v. 8, n. 3, p. 437-502, 2012.