

---

RAPHAELLA CORREIA DA COSTA

Atividade de extratos de plantas do Cerrado em  
*Leishmania (Leishmania) amazonensis* e fungos patogênicos humanos:  
isolamento de metabólitos secundários de *Connarus suberosus*

BRASÍLIA, 2013



Universidade de Brasília  
Faculdade de Ciências da Saúde  
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

RAPHAELLA CORREIA DA COSTA

Atividade de extratos de plantas do Cerrado em  
*Leishmania (Leishmania) amazonensis* e fungos patogênicos humanos:  
isolamento de metabólitos secundários de *Connarus suberosus*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação  
em Ciências da Saúde, da Universidade de Brasília, para  
a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Laila Salmen Espindola

BRASÍLIA, 2013

---

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos que estiveram ao meu lado ao longo dessa caminhada,  
especialmente minha família, meu noivo e minhas amigas.

*Para se alcançar uma grande conquista é preciso acreditar que ela possa ser  
alcançada e muito, muito trabalho.*

---

## AGRADECIMENTOS

A elaboração deste trabalho não teria sido possível sem a colaboração, estímulo e empenho de diversas pessoas. Agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente para que eu alcançasse essa meta.

A Deus, que em todos os momentos me deu forças para continuar em frente. Obrigada Senhor, por estar sempre ao meu lado.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Laila Salmen Espindola, pelo apoio, orientação, paciência, confiança e dedicação. Muito obrigada pela grande oportunidade de entrar no mundo fascinante da pesquisa.

Ao Prof. Dr. José Elias de Paula/UnB, pela importante participação na coleta e identificação do material botânico.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria do Rosário Rodrigues Silva/UFG, pela colaboração com o fornecimento dos fungos patogênicos humanos.

Ao Prof. Dr. Gustavo Romero/UnB, pela importante parceria com o trabalho em *Leishmania*.

Ao Prof. Dr. Raimundo Braz-Filho/UFRRJ, Prof. Dr. Edilberto Rocha Silveira/UFC, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Renata Mendonça Araújo/UFRN e Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes/USP pela fundamental contribuição no estudo químico do trabalho.

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mariana Laundry Mesquita, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lorena Carneiro Albernaz e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sílvia Ribeiro de Souza, pelo apoio ao longo do trabalho, com sugestões valiosas, conselhos e ensinamentos. Muito obrigada!

---

A toda equipe do Laboratório de Farmacognosia, pelo apoio e companheirismo durante esses anos de trabalho, especialmente minha parceira, dupla dinâmica, Danda, que de uma forma essencial contribuiu para que eu conseguisse elaborar e concluir o trabalho. Obrigada amiga querida, por me ajudar tanto nessa longa caminhada, pela sua amizade, companheirismo e por ser minha força nos momentos de fraqueza. Agradeço pelas suas sugestões, ideias e pelas muitas risadas que demos juntas.

Às minhas queridas mãe e avó, Teresa Christina e Neuza, obrigada por estarem sempre presentes, incentivando e me dando força nos momentos mais difíceis. Sem o apoio de vocês e a formação que tive desde a infância eu não teria chegado até aqui.

Ao meu anjo, Thiago, pela paciência nos momentos de sufoco, pelo apoio em todas as etapas sempre com uma palavra de carinho e principalmente por acreditar em mim. Amo muito você!

Aos meus queridos familiares, pelo carinho, compreensão nas minhas ausências e torcida constante pelo meu sucesso.

Às minhas amigas Lívia, Pri, Paty e Buia, pelo apoio nos momentos de estresse e celebração nos momentos de vitória, pelas conversas descontraídas e muitas gargalhadas. Obrigada por estarem sempre presentes na minha vida.

Muito obrigada!

---

## RESUMO

Leishmaniose e infecções fúngicas são doenças que apresentam um grande impacto na saúde pública mundial. Vários tratamentos têm sido desenvolvidos para essas doenças ao longo dos anos, porém ainda existe a necessidade na busca de medicamentos alternativos, que apresentem maior eficácia, menor toxicidade e maior acesso econômico. Uma fonte interessante na pesquisa de novos compostos são os metabólitos secundários de plantas. Neste trabalho foi realizada uma triagem de extratos pertencentes a três espécies de plantas do Cerrado: *Connarus suberosus* Planch. (Connaraceae), *Neea theifera* Oerst. (Nyctaginaceae) e *Myrcia linearifolia* Cambess. (Myrtaceae) em *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, leveduras e dermatófitos. Os extratos de *Connarus suberosus* apresentaram os melhores resultados nos micro-organismos testados, sendo que essa atividade ainda não havia sido relatada na literatura. O extrato acetato de etila da casca da raiz foi selecionado para o fracionamento químico resultando no isolamento de uma mistura de dois compostos não relatados previamente na literatura: *N*-amino-3-pentadecil-pirrolidina-3-en-2,5-diona (**1**), nomeado suberonona A e *N*-amino-3-heptadecil-pirrolidina-3-en-2,5-diona (**2**) nomeado suberonona B; em conjunto com os compostos conhecidos: uma mistura de  $\beta$ -sitosterol (**3**) e estigmasterol (**4**); ácido oleico (**5**); e geranylgeraniol (**6**). A mistura **1** e **2** demonstrou valor de CIM de 15,62  $\mu\text{g/mL}$  em *Candida albicans* ATCC 10231.

Palavras-chave: Cerrado, *Connarus suberosus*, *Neea theifera*, *Myrcia linearifolia*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Candida*, *Trichophyton*, suberononas.

---

## ABSTRACT

Leishmaniasis and fungal infections are diseases which have a significant impact on worldwide public health. Treatments of these diseases have developed greatly over time, therefore the necessity to discover alternative medicines which are less toxic, have greater efficacy and are more economically accessible. An interesting avenue for research is plant secondary metabolites. This work conducted a screening of Cerrado species extracts: *Connarus suberosus* Planch. (Connaraceae), *Neea theifera* Oerst. (Nyctaginaceae) and *Myrcia linearifolia* Cambess. (Myrtaceae) against *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, dermatophytes and yeasts. *Connarus suberosus* extracts presented the most promising results against the aforementioned micro-organisms, which has not been described in the literature. The root bark ethyl acetate extract was selected for chemical fractionation resulting in a mixture of two previously unreported compounds: *N*-amine-3-pentadecyl-1*H*-pyrrole-2,5-dione (**1**), named as suberonone A and *N*-amine-3-heptadecyl-1*H*-pyrrole-2,5-dione (**2**) named as suberonone B; together with the known compounds: a mixture of  $\beta$ -sitosterol (**3**) and stigmasterol (**4**); oleic acid (**5**); and geranylgeraniol (**6**). The **1** and **2** mixture demonstrated a MIC of 15.62  $\mu\text{g/mL}$  against *Candida albicans* ATCC 10231.

Keywords: Brazilian Cerrado, *Connarus suberosus*, *Neea theifera*, *Myrcia linearifolia*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Candida*, *Trichophyton*, suberonones.

---

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> <i>Leishmania</i> ssp. - forma promastigota (a) e forma amastigota (b).....	19
<b>Figura 2:</b> Inseto vetor <i>Lutzomyia longipalpis</i> .....	19
<b>Figura 3:</b> Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> ssp.....	21
<b>Figura 4a:</b> Estrutura química de medicamentos utilizados no tratamento de leishmaniose.....	25
<b>Figura 4b:</b> Estrutura química de medicamentos utilizados no tratamento de infecções fúngicas.....	31
<b>Figura 5:</b> Os 25 hotspots no mundo.....	34
<b>Figura 6:</b> <i>Connarus suberosus</i> Planch., Connaraceae – Árvore (à direita) - detalhe casca do caule com a presença característica do <b>suber</b> , que inspirou a nomeação da espécie (à esquerda - acima) e folha - superfícies adaxial e abaxial (à esquerda - abaixo).....	35
<b>Figura 7:</b> <i>Neea theifera</i> Oerst. Nyctaginaceae. Arbusto (à esquerda), gema axilar (à direita, acima), ramo em desenvolvimento (à direita, abaixo).....	38
<b>Figura 8:</b> <i>Myrcia linearifolia</i> Cambess., Myrtaceae. Partes aéreas (a) e raiz (b).....	40
<b>Figura 9:</b> Momento da coleta - <i>Connarus suberosus</i> Planch. (Connaraceae) e dessecação das diferentes partes da planta (acima), moinho de facas e madeira do caule e da raiz pulverizados (abaixo).....	43
<b>Figura 10:</b> Processo de extração por maceração (acima). Recuperação da solução extrativa por filtração, concentração em rotaevaporador e extratos brutos (abaixo)....	45
<b>Figura 11:</b> Viabilidade dos parasitos pelo método MTT com leitura da absorbância em espectrofotômetro a 570 nm.....	49
<b>Figura 12:</b> Fungos patogênicos humanos do Laboratório de Farmacognosia.....	50
<b>Figura 13:</b> Inóculo de leveduras em três níveis de turbidez.....	51

---

<b>Figura 14:</b> Teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM) – microdiluição com pipeta multicanal (a) e incubação das placas em estufa a 35 °C (b).....	52
<b>Figura 15:</b> Porcentagem de extratos brutos ativos (CIM ≤ 125 µg/mL) nos fungos testados. <i>Neea theifera</i> (em verde); <i>Myrcia linearifolia</i> (em vermelho) e <i>Conarus suberosus</i> (em azul).....	65
<b>Figura 16:</b> Fracionamento do extrato acetato de etila da casca da raiz de <i>C. suberosus</i> .....	67
<b>Figura 17:</b> Estrutura química proposta para <b>R1</b> e <b>R1'</b> , denominados <b>suberonona A</b> e <b>suberonona B</b> .....	72
<b>Figura 18:</b> Espectro de absorção na região do infravermelho de <b>R1</b> e <b>R1'</b> .....	74
<b>Figura 19:</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H de <b>R1</b> e <b>R1'</b> (500 MHz, C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N).....	75
<b>Figura 20:</b> Espectro de RMN <sup>13</sup> C-CPD e APT de <b>R1</b> e <b>R1'</b> (125 MHz, C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N).....	76
<b>Figura 21:</b> Espectro de RMN bidimensional de correlação homonuclear <sup>1</sup> H, <sup>1</sup> H – COSY de <b>R1</b> e <b>R1'</b> .....	77
<b>Figura 22:</b> Expansão do espectro de RMN bidimensional de correlação homonuclear <sup>1</sup> H, <sup>1</sup> H – COSY de <b>R1</b> e <b>R1'</b> .....	78
<b>Figura 23:</b> Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C – HSQC de <b>R1</b> e <b>R1'</b> .....	79
<b>Figura 24:</b> Expansão do espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C – HSQC de <b>R1</b> e <b>R1'</b> .....	80
<b>Figura 25:</b> Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C – HMBC de <b>R1</b> e <b>R1'</b> .....	81
<b>Figura 26:</b> Estrutura química proposta para <b>R1</b> e <b>R1'</b> , com valores de massa obtidos no espectro ESI-TOF.....	82
<b>Figura 27:</b> Espectro de massa de alta resolução ESI-MS (erro de 16 ppm) em modo negativo [M-H] <sup>-</sup> de <b>R1</b> e <b>R1'</b> .....	82
<b>Figura 28:</b> Espectro de massa de alta resolução (ESI-TOF) de <b>R1</b> e <b>R1'</b> .....	83

---

<b>Figura 29:</b> Estrutura molecular dos esteróides $\beta$ -sitosterol ( <b>a</b> ) ( <b>R2</b> ) e estigmasterol ( <b>b</b> ) ( <b>R2'</b> ).....	84
<b>Figura 30:</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ de <b>R2</b> (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	85
<b>Figura 31:</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ de <b>R2</b> e <b>R2'</b> (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ).....	86
<b>Figura 32:</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ -CPD e $^{13}\text{C}$ -DEPT 135 $^\circ$ de <b>R2</b> e <b>R2'</b> (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	87
<b>Figura 33:</b> Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ – HSQC de <b>R2</b> e <b>R2'</b> .....	88
<b>Figura 34:</b> Estrutura do composto geranilgeraniol ( <b>R5</b> ).....	90
<b>Figura 35:</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ de <b>R5</b> (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	91
<b>Figura 36:</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ de <b>R5</b> (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ).....	92
<b>Figura 37:</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ -DEPT 135 $^\circ$ de <b>R5</b> (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	93
<b>Figura 38:</b> Espectro de RMN bidimensional de correlação homonuclear $^1\text{H}$ , $^1\text{H}$ – COSY de <b>R5</b> .....	94
<b>Figura 39:</b> Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ – HSQC de <b>R5</b> .....	95
<b>Figura 40:</b> Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ – HMBC de <b>R5</b> .....	96
<b>Figura 41:</b> Estrutura química do ácido oléico - <b>R13</b> , com dados de RMN $^{13}\text{C}$ .....	97
<b>Figura 42:</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ de <b>R13</b> (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	98
<b>Figura 43:</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ -BB e $^{13}\text{C}$ -DEPT 135 $^\circ$ de <b>R13</b> . (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ )....	99
<b>Figura 44:</b> Espectro de RMN bidimensional de correlação homonuclear $^1\text{H}$ , $^1\text{H}$ – COSY de <b>R13</b> .....	100
<b>Figura 45:</b> Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ – HSQC de <b>R13</b> .....	101
<b>Figura 46:</b> Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ – HMBC de <b>R13</b> .....	102

---

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Principais espécies de <i>Leishmania</i> dermatrópicas do continente americano causadoras do comprometimento humano.....	18
<b>Tabela 2:</b> Espécies de plantas coletadas no bioma Cerrado.....	58
<b>Tabela 3:</b> Triagem dos extratos brutos em formas promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> em uma concentração de 100 µg/mL.....	59
<b>Tabela 4:</b> Determinação do $CI_{50}$ (µg/mL) dos extratos de <i>Conarus suberosus</i> em formas promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> .....	60
<b>Tabela 5:</b> Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM - µg/mL) dos extratos de <i>C. suberosus</i> , <i>M. linearifolia</i> e <i>N. theifera</i> em leveduras (cepas de <i>Candida</i> ) e fungos filamentosos (cepas de <i>Trichophyton</i> ).....	61
<b>Tabela 6:</b> Fracionamento do extrato acetato de etila da casca da raiz de <i>C. suberosus</i> em cromatografia em coluna de sílica, com rendimento de 70,84%.....	68
<b>Tabela 7:</b> Fracionamento do Grupo 2 oriundo do extrato acetato de etila da casca da raiz de <i>C. suberosus</i> em cromatografia em coluna de sílica, com rendimento de 42,56%.....	69
<b>Tabela 8:</b> Fracionamento do Grupo 6 oriundo do extrato acetato de etila da casca da raiz de <i>C. suberosus</i> em cromatografia em coluna de sílica, com rendimento de 83,62%.....	70
<b>Tabela 9:</b> Fracionamento do Grupo 15 oriundo do extrato acetato de etila da casca da raiz de <i>C. suberosus</i> em cromatografia em coluna de sephadex, com rendimento de 87,99%.....	71
<b>Tabela 10:</b> Correlações HSQC e HMBC de <b>R1</b> e <b>R1'</b> .....	74

---

## LISTA DE ABREVIÇÕES

$\mu\text{L}$  - microlitro

$\mu\text{g}$  – micrograma

ae – acetato de etila

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CR – casca da raiz

$\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$  – piridina deuterada

CCD – Cromatografia em camada delgada

$\text{CD}_3\text{OD}$  – metanol deuterado

$\text{CDCl}_3$  – clorofórmio deuterado

$\text{cm}^{-1}$  – unidade de infravermelho

$\text{CO}_2$ - ácido carbônico

COSY - espectroscopia de correlação (*correlated spectroscopy*)

d – dubleto

dd - duplo dubleto

DMSO – Dimetilsulfóxido

e – etanol

ESI-TOF-MS - Espectrometria de massas com ionização por eletrospray e tempo de voo (*electrospray ionization time of flight mass spectrometry*)

f – folha

g – grama

h – hexano

h – hora

$\text{H}_2\text{O}$  - água

HMBC - *heteronuclear multiple bond coherence*

HR-ESI-MS – Espectrometria de massas de alta resolução com ionização por eletrospray (*high resolution electrospray ionization mass spectrometry*)

HSQC - *heteronuclear single-quantum coherence*

---

Hz - hertz

Cl<sub>50</sub> – Concentração inibitória de 50% do efeito leishmanicida

IR: Infravermelho

J – constante de acoplamento

KBr – Brometo de potássio

LTA – Leishmaniose Tegumentar Americana

m – multiplete

MC – madeira do caule

*m/z* – relação massa/carga

MeCN - Acetonitrila

MeOH - Metanol

mg - miligrama

MHz - megahertz

min - minuto

mL - mililitro

mm – milímetro

MR – madeira da raiz

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

nm - nanômetro

°C - celsius

ODS – Octadecilsilano

PA – partes aéreas

PBS – solução tampão fosfato

ppm – parte por milhão

R – raiz

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

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

RMN <sup>13</sup>C DEPT 135° - Ressonância Magnética Nuclear de carbono 13 – Intensificação da Distorção por Transferência de Polarização

---

RMN  $^{13}\text{C}$ -CPD - Ressonância Magnética Nuclear de carbono-13 – Desacoplamento com Pulso Composto

RMN  $^1\text{H}$  – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

rpm – rotação por minuto

s - singleto

$\text{Sb}^{3+}$  - antimônio trivalente

$\text{Sb}^{5+}$  - antimônio pentavalente

SFB - soro fetal bovino inativado

SVS – Secretaria de Vigilância em Saúde

t - tripleto

TMS - tetrametilsilano

UnB – Universidade de Brasília

UV - Ultravioleta

$\delta$  – deslocamento químico

---

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
1.1. Leishmaniose .....	17
1.1.1. Agente etiológico.....	18
1.1.2. Vetor .....	19
1.1.3. Hospedeiros e reservatórios.....	20
1.1.4. Ciclo biológico .....	20
1.1.5. Manifestações clínicas .....	21
1.1.6. Tratamento.....	23
1.2. Fungos .....	26
1.2.1. Infecções fúngicas.....	26
1.2.2. Tratamento.....	28
1.2.3. Resistência.....	32
1.2.4. Alternativas terapêuticas .....	32
1.3. Cerrado .....	33
1.3.1. <i>Conarus suberosus</i> .....	35
1.3.1.1. Descrição botânica.....	36
1.3.1.2. Utilização .....	36
1.3.1.3. Estudos fitoquímicos .....	37
1.3.2. <i>Neea theifera</i> .....	38
1.3.2.1. Descrição botânica.....	38
1.3.2.2. Utilização .....	39
1.3.2.3. Estudos fitoquímicos .....	39
1.3.3. <i>Myrcia linearifolia</i> .....	40
1.3.3.1. Descrição botânica.....	40
1.3.3.2. Estudos fitoquímicos e biológicos .....	40
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>42</b>
2.1. Objetivo Geral .....	42
2.2. Objetivos Específicos .....	42

---

<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>43</b>
3.1. Coleta do material vegetal.....	43
3.2. Preparação dos extratos brutos.....	44
3.3. Testes biológicos.....	45
3.3.1. Método de avaliação da atividade antileishmania.....	45
3.3.1.1. Preparo das amostras e do controle positivo.....	45
3.3.1.2. Preparo do meio de cultura de <i>L. (L.) amazonensis</i> .....	46
3.3.1.3. Cultura de formas promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> .....	46
3.3.1.4. Triagem da atividade de extratos brutos de plantas.....	46
3.3.1.5. Avaliação dos resultados.....	47
3.3.1.6. Determinação de CI <sub>50</sub> .....	48
3.3.1.7. Avaliação dos resultados.....	48
3.3.2. Método de avaliação da atividade antifúngica.....	49
3.3.2.1. Preparo das amostras e dos controles.....	50
3.3.2.2. Preparo do meio RPMI 1640 para o teste de microdiluição.....	50
3.3.2.3. Inóculo de leveduras.....	51
3.3.2.4. Inóculo de fungos filamentosos.....	51
3.3.2.5. Teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	52
3.3.2.6. Purificação e identificação das substâncias isoladas.....	53
3.4. Métodos de cromatografia.....	53
3.4.1. Coluna líquida a pressão atmosférica.....	53
3.4.2. Cromatografia em camada delgada.....	53
3.4.3. Cromatografia em camada delgada preparativa.....	54
3.5. Métodos Espectrométricos.....	54
3.5.1. Espectroscopia na Região do Infravermelho (IV).....	54
3.5.2. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN <sup>1</sup> H) e de Carbono-13 (RMN <sup>13</sup> C).....	54
3.5.3. Espectrometria de massa.....	56
3.6. Determinação do Ponto de Fusão (pf).....	57
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>58</b>
4.1. Fracionamento químico.....	66

---

4.1.1. Mistura dos compostos R1 e R1' .....	72
4.1.2. Mistura dos compostos R2 e R2' .....	84
4.1.3. Composto R5 .....	90
4.1.4. Composto R13 .....	97
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>103</b>
<b>6. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>104</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>105</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Leishmaniose

Leishmaniose é uma doença infecciosa causada por parasitos do gênero *Leishmania*, que apresenta grande impacto na saúde pública mundial. Aproximadamente 350 milhões de pessoas estão em risco de infecção no mundo. A incidência anual da doença é de 2 milhões de casos, dos quais 500.000 são de leishmaniose visceral e 1.500.000 são de leishmaniose cutânea, com 70.000 mortes a cada ano (RICHARD *et al.*, 2010).

A leishmaniose está incluída no grupo de doenças tropicais negligenciadas (MCCALL *et al.*, 2013; SEIFERT, 2011) e foi identificada como uma das seis maiores doenças tropicais, sendo endêmica em várias regiões tropicais e subtropicais no mundo (PATHAK *et al.*, 2011).

A leishmaniose cutânea é endêmica em mais de 70 países, e 90% dos casos ocorrem nos seguintes países: Afeganistão, Algéria, Brasil, Paquistão, Peru, Arábia Saudita e Síria. Já a leishmaniose visceral ocorre em 65 países, sendo a maioria dos casos em áreas pobres de cinco países: Bangladesh, Índia, Nepal, Sudão e Brasil. (TIUMAN *et al.*, 2011).

Um problema alarmante é a emergência da leishmaniose como infecção oportunística em pacientes infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV). Esses pacientes apresentam uma resposta baixa à quimioterapia sistêmica e altas taxas de recaídas. Tais casos requerem um manejo mais agressivo para assegurar o controle da doença e evitar futuras recaídas (AMEEN, 2010).

Dessa forma, a leishmaniose representa um significativo fardo global e um grande desafio para a descoberta de novos medicamentos (TIUMAN *et al.*, 2011).

### 1.1.1. Agente etiológico

O agente etiológico da leishmaniose é um protozoário pertencente à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e subgêneros *Leishmania* ou *Viannia*, que incluem aproximadamente 20 espécies. No Novo Mundo, são reconhecidas onze espécies dermatóricas de *Leishmania* causadoras de doença humana, listadas na Tabela 1 (SVS/MS, 2006; VIEIRA *et al.*, 2007).

**Tabela 1:** Principais espécies de *Leishmania* dermatóricas do continente americano causadoras do comprometimento humano.

<b>Subgênero <i>Viannia</i> (Lainson &amp; Shaw, 1972)</b>	<b>Acometimento clínico no homem</b>	<b>Distribuição geográfica</b>
<i>Leishmania</i> (V.) <i>braziliensis</i> (Vianna, 1911)	Lesões cutâneas e mucosas	Da América Central ao norte da Argentina
<i>Leishmania</i> (V.) <i>peruviana</i> (Velez, 1913)	Predominantemente lesões cutâneas	Vales elevados interandinos e encosta oeste dos Andes
<i>Leishmania</i> (V.) <i>guyanensis</i> (Floch, 1954)	Predominantemente lesões cutâneas	Calha norte da Bacia Amazônica, Guianas e países do noroeste sul-americano
<i>Leishmania</i> (V.) <i>panamensis</i> (Lainson & Shaw, 1972)	Predominantemente lesões cutâneas	América Central e costa pacífica da América do Sul
<i>Leishmania</i> (V.) <i>lainsoni</i> (Silveira <i>et al.</i> , 1987)	Rara ocorrência, provocando lesões cutâneas	Norte do Estado do Pará
<i>Leishmania</i> (V.) <i>naiffi</i> (Lainson <i>et al.</i> , 1990)	Rara ocorrência, provocando lesões cutâneas	Região Amazônica
<i>Leishmania</i> (V.) <i>shawi</i> (Shaw <i>et al.</i> , 1991)	Rara ocorrência, provocando lesões cutâneas	Região Amazônica
<b>Subgênero <i>Leishmania</i> (Sařlanova, 1982)</b>	<b>Acometimento clínico no homem</b>	<b>Distribuição geográfica</b>
<i>Leishmania</i> (L.) <i>mexicana</i> (Biagi, 1953)	Lesões cutâneas e, eventualmente, cutâneo-difusas	México e América Central
<i>Leishmania</i> (L.) <i>amazonensis</i> (Lainson & Shaw, 1972)	Lesões cutâneas e, eventualmente, cutâneo-difusas	América Central e regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste do Brasil
<i>Leishmania</i> (L.) <i>venezuelensis</i> (Bonfante-Garrido, 1980)	Lesões cutâneas	Venezuela
<i>Leishmania</i> (L.) <i>pifanoi</i> (Medina & Romero, 1959)	Lesões cutâneas e, eventualmente, cutâneo-difusas	Venezuela

Fonte: Adaptada de Marzochi, Schubach & Marzochi (1999).

A *Leishmania* é um parasito intracelular obrigatório das células do sistema fagocítico mononuclear, com duas formas principais: uma flagelada ou promastigota (Figura 1a), encontrada no tubo digestivo do inseto vetor, e outra aflagelada ou

amastigota (Figura 1b), observada nos tecidos dos hospedeiros vertebrados (SVS/MS, 2007).



**Figura 1:** *Leishmania* ssp. - forma promastigota (a) e forma amastigota (b). Fonte: Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana - SVS/MS, 2007.

### 1.1.2. Vetor

Espécies de *Leishmania* do Velho Mundo são transmitidas por insetos do gênero *Phlebotomus*, que são endêmicos na África, Ásia, Oriente Médio e Mediterrâneo. As espécies do Novo Mundo são transmitidas por insetos do gênero *Lutzomyia* (Figura 2), que são endêmicos do Texas até a América do Sul. Os insetos são conhecidos popularmente, dependendo da localização geográfica, como mosquito palha, tatuquira, birigui, entre outros (MITROPOULOS *et al.*, 2010).



**Figura 2:** Inseto vetor *Lutzomyia longipalpis*. Fonte: REITHINGER *et al.*, 2007.

### 1.1.3. Hospedeiros e reservatórios

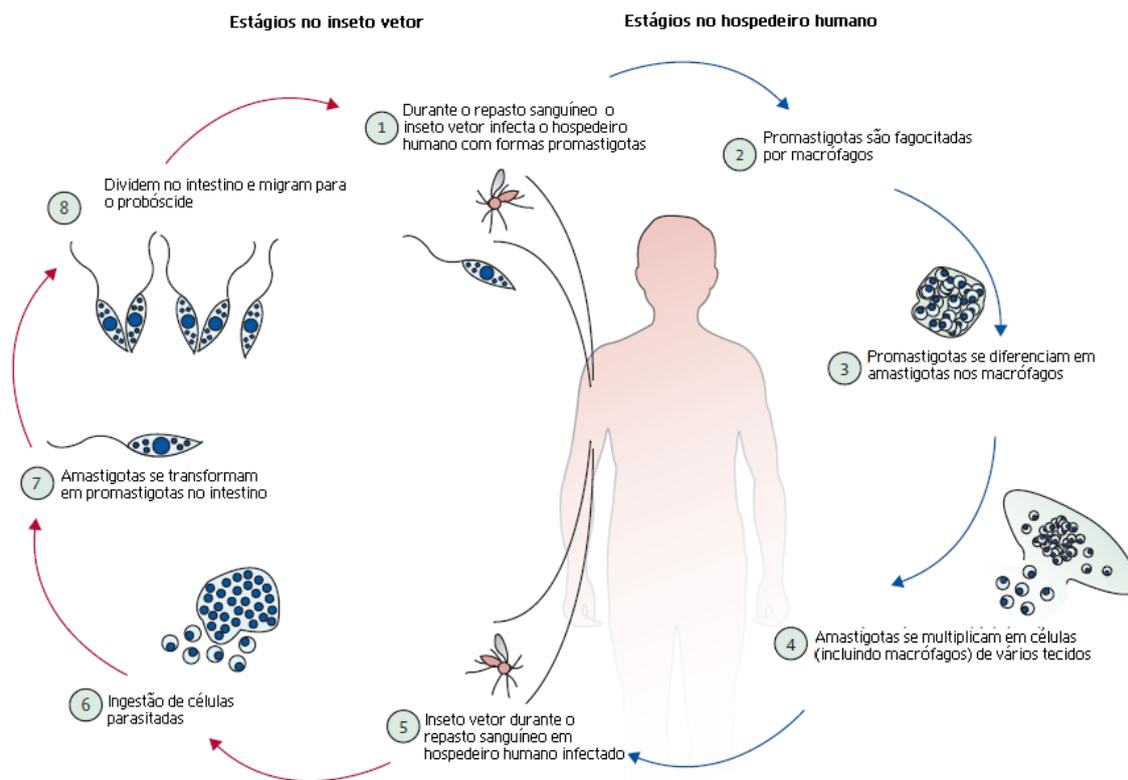
A interação do reservatório com o parasito é considerada um sistema complexo, já que é multifatorial, imprevisível e dinâmica, formando uma unidade biológica que pode estar em constante mudança em função das alterações do meio ambiente. São considerados reservatórios da leishmaniose as espécies de animais que possibilitam a circulação de leishmanias na natureza dentro de um recorte de tempo e espaço (SVS/MS, 2007).

Infecções por *Leishmania* foram descritas em várias espécies de animais silvestres, sinantrópicos e domésticos como canídeos, felídeos e equídeos (SVS/MS, 2007). Os cães são considerados os principais reservatórios em muitas das áreas endêmicas, enquanto em outras regiões as pessoas são o principal reservatório para infecções humanas (SHUKLA *et al.*, 2010).

### 1.1.4. Ciclo biológico

A leishmaniose é transmitida pela picada de flebotomíneos fêmeas infectadas com o parasito, durante o repasto sanguíneo. Nos flebotomíneos as leishmanias vivem no meio extracelular, na luz do trato digestivo. As formas amastigotas, ingeridas durante o repasto sanguíneo, se diferenciam em formas promastigotas, morfológica e bioquimicamente distintas das amastigotas, sendo posteriormente inoculadas na pele dos hospedeiros vertebrados durante um segundo repasto sanguíneo (MCCALL *et al.*, 2013; CROFT *et al.*, 2006) (Figura 3).

Os parasitos são então internalizados por macrófagos no fígado, baço e medula óssea, e assumem a forma amastigota. Ocorre em seguida a multiplicação das formas amastigotas por divisão binária, dentro de vacúolos parasitóforos, até o rompimento das células e a liberação desses parasitos, que serão fagocitados por outros macrófagos e células do sistema fagocítico mononuclear. Dessa forma, os parasitos se disseminam pelo organismo do hospedeiro, levando à formação das lesões características da doença (ANTINORI, 2008) (Figura 3).



**Figura 3:** Ciclo de vida de *Leishmania* ssp. Fonte: Adaptado de REITHINGER *et al.*, 2007.

### 1.1.5. Manifestações clínicas

No Novo Mundo a leishmaniose é dividida em dois tipos principais: Leishmaniose Visceral Americana (LVA) e Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) (DE OLIVEIRA *et al.*, 2013; ALVES, 2009). A LVA, também conhecida como calazar, é a forma mais severa da doença, na qual os parasitos migram para órgãos vitais. As suas principais características são febre prolongada, hepatoesplenomegalia, hipergamaglobulinemia e pancitopenia, sendo que os pacientes acometidos ficam extremamente debilitados, podendo ir a óbito se não forem tratados (TIUMAN *et al.*, 2011).

A LTA engloba um amplo espectro de manifestações clínicas, variando desde pequenos nódulos cutâneos até a destruição do tecido mucoso (REITHINGER *et al.*,

2007). O tempo de desenvolvimento das lesões epiteliais varia de semanas a meses. Inicialmente pode ocorrer eritema não específico com endurecimento podendo progredir para lesões papulares. Também pode ocorrer o desenvolvimento de nódulos, os quais podem ulcerar em alguns casos. A leishmaniose mucocutânea pode envolver a mucosa nasal e bucal, causando uma inflamação considerável com risco de necrose e destruição da cartilagem. Já a leishmaniose cutânea difusa é rara e produz placas infiltradas e múltiplas nodulações não ulceradas recobrimo grandes extensões cutâneas (AMEEN, 2010).

As manifestações clínicas de leishmaniose dependem de vários fatores incluindo as espécies de *Leishmania* envolvidas, o número de parasitos inoculados, o sítio de inoculação, além do estado nutricional e da resposta imune do hospedeiro (MITROPOULOS *et al.*, 2010).

A forma mais comum é a leishmaniose cutânea localizada (LC), que é causada com maior frequência pelas espécies *Leishmania major* e *Leishmania tropica* no Velho Mundo e *Leishmania braziliensis*, *Leishmania mexicana*, *Leishmania amazonensis* e espécies relacionadas no Novo Mundo. Embora para LC ocorra cura espontânea em vários casos, a taxa de recuperação varia dependendo da espécie envolvida e pode demorar meses ou até anos para a cura completa (TIUMAN *et al.*, 2011).

### 1.1.6. Tratamento

O tratamento clássico de leishmaniose é feito pela administração de medicamentos tóxicos e pouco tolerados. Os antimoniais pentavalentes – antimoniato de meglumina (Glucantime<sup>®</sup>) (Figura 4a) e estibogluconato de sódio (Pentostam<sup>®</sup>) – apesar de terem sido desenvolvidos em 1945, ainda são a primeira linha de tratamento para leishmaniose visceral e cutânea na maior parte do mundo (TIUMAN *et al.*, 2011).

Os antimoniais pentavalentes são aceitos como pró-fármacos, cuja atividade biológica requer redução para a forma trivalente. O sítio de redução e o mecanismo de ação ainda não foram completamente elucidados. Alguns estudos apontaram para a inibição do metabolismo e da biossíntese macromolecular. Antimoniais trivalentes mostraram recentemente interferir no metabolismo do tiol em *L. donovani*, com vários efeitos no metabolismo da glutatona e da tripanotona (SEIFERT, 2011).

Os efeitos adversos de antimoniatos pentavalentes incluem artralgia, mialgia, náuseas, vômitos, dor abdominal, febre, fraqueza, cefaléia, hepatite com aumento de transaminases e fosfatase alcalina, insuficiência renal aguda, pancreatite e cardiotoxicidade (ALMEIDA *et al.*, 2010).

A falha terapêutica dos antimoniatos é um problema bem conhecido, sendo a resistência dos parasitos uma das principais causas. Outros fatores determinantes são relacionados ao hospedeiro (desnutrição ou imunossupressão), ao medicamento (formulação ou lote de fabricação) e às espécies de *Leishmania* (VERGNES *et al.*, 2011).

Anfotericina B e pentamidina (Figura 4a) são a segunda linha de tratamento para a leishmaniose, em casos de contraindicação, intolerância ou resistência aos antimoniais, embora necessitem de longos cursos de administração parenteral. O tratamento com anfotericina B requer hospitalização e monitoramento constante dos pacientes. Os efeitos adversos que podem ocorrer incluem hipocalcemia, nefrotoxicidade e miocardite. Já a anfotericina B lipossomal é muito mais segura que a

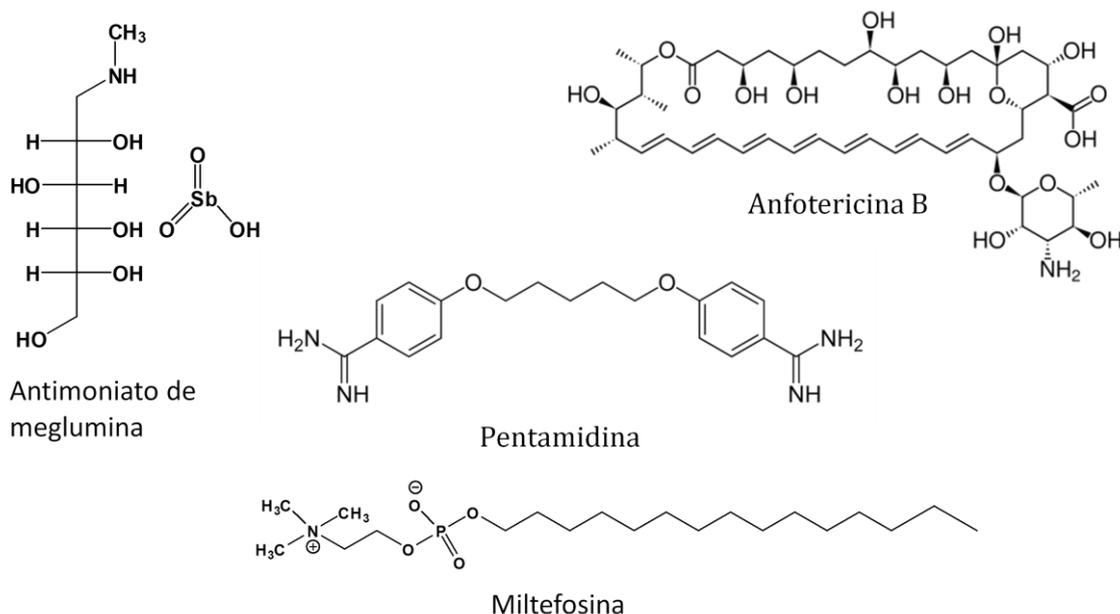
anfotericina B desoxicolato e também altamente eficaz. No entanto o alto custo limita a sua utilização em regiões endêmicas de leishmaniose. A seletividade de anfotericina B em *Leishmania* ocorre em função de sua maior afinidade por esteróis substituídos, que é o tipo predominante nas membranas de *Leishmania*, em relação ao colesterol, predominante em células de mamíferos. A interação com as membranas leva à formação de canais transmembrana e poros aquosos, o que altera a sua permeabilidade (SEIFERT, 2011).

Pentamidina é uma diamidina aromática, que interfere com o transporte de aminoácidos, compete com poliaminas pelos ácidos nucleicos e pode também preferencialmente ligar-se ao DNA do cinetoplasto. A segurança em relação ao seu uso é uma grande preocupação. Os efeitos adversos imediatos incluem hipotensão, náuseas, vômitos e síncope. Além disso, já são bem conhecidos os efeitos sistêmicos no metabolismo da glicose tais como hipoglicemia, e o efeito diabetogênico, em fase mais tardia, atingindo 5% dos casos. A alteração mais frequente, entretanto, é a renal, chegando a 23% (OLIVEIRA *et al.*, 2011; DE PAULA *et al.* 2003).

Miltefosina (Figura 4a) é um medicamento promissor, introduzido recentemente para o tratamento de leishmaniose visceral no Velho Mundo. O seu uso para o tratamento de LTA ainda está sendo investigado (OLIVEIRA *et al.*, 2011). A miltefosina é um alquilfosfolípídeo, que foi desenvolvido como um agente antineoplásico oral e posteriormente foi aplicado ao tratamento de leishmaniose, se tornando o primeiro tratamento oral para a doença em alguns países. É utilizado no tratamento de leishmaniose cutânea e visceral, incluindo infecções resistentes a antimoniais (MITROPOULOS *et al.*, 2010). Os principais efeitos adversos são relacionados à sua administração oral, afetando o trato gastrointestinal, além da elevação dos níveis de aminotransferase e creatino-fosfoquinase. A miltefosina também apresenta um potencial teratogênico, não podendo ser administrada em gestantes (TIUMAN *et al.*, 2011).

Paramomicina é o único aminoglicosídeo com atividade clinicamente significativa em *Leishmania*. Tanto a forma visceral quanto a forma cutânea podem ser tratadas com esse antibiótico, mas devido à má absorção pela via oral, foram desenvolvidas formulações parenterais e tópicas para leishmaniose visceral e cutânea respectivamente (TIUMAN *et al.*, 2011). O tratamento tópico oferece a vantagem da facilidade da administração e apresenta menos efeitos adversos em comparação com o tratamento sistêmico. Em relação aos efeitos adversos, ototoxicidade e nefrotoxicidade são comuns nessa classe de medicamentos, porém a frequência dessas reações é baixa em doses terapêuticas para leishmaniose. Estudos prévios de mecanismo de ação em espécies de *Leishmania* mostraram uma despolarização da membrana mitocondrial e disfunção de ribossomos (SEIFERT, 2011).

O tratamento de leishmaniose já apresentou muitos progressos ao longo do tempo. Porém, apesar desses avanços ainda é clara a necessidade de se buscar medicamentos alternativos menos tóxicos, mais eficazes e mais acessíveis economicamente. As plantas são uma potencial fonte de moléculas líderes (TIUMAN *et al.*, 2011; SAHA *et al.*, 2011).



**Figura 4a:** Estrutura química de medicamentos utilizados no tratamento de leishmaniose. Fonte: TIUMAN *et al.*, 2011.

## 1.2. Fungos

Fungos são micro-organismos presentes no solo, na água, nos vegetais, no ar, nos animais, no homem e em detritos em geral. São seres heterotróficos e eucarióticos que apresentam parede celular. Os fungos podem ser divididos estruturalmente em leveduras e filamentosos. As leveduras são seres unicelulares, que apresentam formato esférico ou oval e se reproduzem por divisão binária ou brotamento. Já os fungos filamentosos apresentam várias células em disposição contínua na forma tubular. O desenvolvimento desses fungos ocorre a partir de estruturas de frutificação que dão origem ao túbulo germinativo, formando as hifas (TORTORA *et al.*, 2002).

Os fungos apresentam uma grande importância na natureza, sendo fundamentais no processo de decomposição de matéria orgânica, além de serem muito úteis para os seres humanos. Há muitos anos os fungos são utilizados como fonte direta de alimentação, no caso de cogumelos e trufas, e na fermentação de vários produtos alimentares, como o vinho e a cerveja. Porém alguns fungos apresentam potencial patogênico para o ser humano (TORTORA *et al.*, 2002).

### 1.2.1. Infecções fúngicas

As infecções fúngicas, também conhecidas como micoses, são atualmente um problema alarmante para a saúde pública mundial e têm apresentado um aumento drástico em sua incidência nas últimas duas décadas. Esse aumento está relacionado ao número crescente de casos de imunodeficiência relacionados à Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), câncer, diabetes, fibrose cística, transplante de órgãos, dentre outros (MINNEBRUGGEN *et al.*, 2010).

Essas infecções são causadas por dois tipos de micro-organismos: patógenos primários e oportunistas. Os patógenos primários são naturalmente capazes de estabelecer infecção em uma população saudável. Já os patógenos oportunistas são micro-organismos comensais de indivíduos saudáveis e são capazes de desenvolver

uma infecção quando o hospedeiro está imunossuprimido (VANDEPUTTE *et al.*, 2012).

Os fungos patogênicos podem ser divididos em dois grupos principais: fungos filamentosos e leveduras. A maioria dos patógenos primários são fungos filamentosos, enquanto que a maioria dos patógenos oportunistas são leveduras. Outra forma de se classificar as infecções fúngicas é em relação ao tecido afetado. Seguindo esse critério, as micoses são classificadas em superficiais, cutâneas, mucosas e sistêmicas (VANDEPUTTE *et al.*, 2012).

As micoses superficiais, como a pitíriase versicolor, são limitadas à parte mais externa da pele e do cabelo. Essas infecções são causadas com mais frequência pelas espécies *Malassezia globosa* e *M. furfur* (CRESPO-ERCHIGA *et al.*, 2008).

As micoses cutâneas e subcutâneas são causadas por fungos filamentosos e afetam as estruturas queratinizadas do corpo. Os principais gêneros envolvidos são *Trichophyton*, *Epidermophyton* e *Microsporum* (THOMAS *et al.*, 2010).

As infecções da mucosa são causadas principalmente por leveduras oportunistas, especialmente aquelas pertencentes ao gênero *Candida*. As candidíases vaginal, esofaríngea, orofaríngea e do trato urinário ocorrem com frequência em pacientes imunocomprometidos. Já as infecções oculares são causadas na maioria dos casos por espécies de *Fusarium* ou *Aspergillus* (TSAI *et al.*, 2013; DIAMOND, 1991).

As micoses sistêmicas são muito comuns em pacientes imunocomprometidos e são associadas a uma elevada taxa de mortalidade. Os sintomas apresentados variam desde uma simples febre até o quadro de choque séptico. Os principais patógenos são *Histoplasma*, *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Mucor*, *Rhizopus* e *Coccidioidomyces* (VANDEPUTTE *et al.*, 2012; DIAMOND, 1991).

### 1.2.2. Tratamento

O tratamento de infecções fúngicas sistêmicas ainda é bastante limitado, apesar da extensa pesquisa na busca por novas estratégias terapêuticas. Atualmente estão sendo utilizadas na prática clínica quatro classes de agentes antifúngicos para essas infecções: fluoropirimidinas, polienos, azóis e equinocandinas. Outras classes como morfolinas e alilaminas são utilizadas apenas como agentes tópicos, devido à baixa eficácia, ou efeitos adversos severos quando administradas de forma sistêmica (VANDEPUTTE *et al.*, 2012).

As fluoropirimidinas, 5-fluorocitosina (5-FC) e 5-fluorouracil (5-FU) são análogos sintéticos do nucleotídeo citosina. A 5-fluorocitosina (Figura 4b) foi sintetizada na década de 1950 como um agente antitumoral e posteriormente foi descoberto seu potencial antifúngico. Ela apresenta um amplo espectro de ação, sendo ativa em espécies de *Candida*, *Cryptococcus*, *Phialophora*, *Cladosporium* e *Aspergillus*. O mecanismo de ação consiste na conversão de 5-FC em 5-FU pela enzima citosina deaminase, que por sua vez é convertida em vários metabólitos e dentre seus efeitos, esta substância inibe a enzima timidilato sintetase, prejudicando a síntese de DNA, e incorpora-se ao RNA, interferindo, assim, no processamento da síntese protéica. Os efeitos adversos são geralmente insignificantes, porém existem efeitos severos como hepatotoxicidade e lesões na medula óssea. Apesar de apresentar várias vantagens farmacológicas, o uso de 5-fluorocitosina na clínica vem decaindo devido à resistência dos patógenos. Dessa forma, esse medicamento é raramente utilizado como monoterapia, sendo usado em combinação com outros agentes antifúngicos. A 5-fluorocitosina é também ativa em *Leishmania* ssp. (VERMES *et al.*, 2000; STILLER *et al.*, 1983).

A classe de polienos apresenta várias moléculas com atividade antifúngica, sendo a maioria delas produzidas pela actinobactéria do gênero *Streptomyces*. Porém são utilizadas na clínica apenas três substâncias: anfotericina B (Figura 4b), nistatina e natamicina. O alvo dessa classe é o ergosterol, principal componente das membranas

fúngicas. Sua estrutura anfífilica permite que eles se liguem à bicamada lipídica e formem poros, o que promove uma desestabilização da membrana e a consequente lise celular (VANDEPUTTE *et al.*, 2012).

Os azóis são a classe mais comumente empregada na prática clínica. São moléculas cíclicas que podem ser divididas em dois grupos: imidazóis, que possuem dois átomos de nitrogênio no anel azol; e triazóis, que apresentam três átomos de nitrogênio no anel azol. O mecanismo de ação consiste na inibição de enzimas que participam das etapas finais da biossíntese do ergosterol. A principal enzima inibida é a lanosterol-14- $\alpha$ -desmetilase, uma enzima microsômica do citocromo P-450 (CYP51) (MAERTENS *et al.*, 2004). Em 1981 o Food and Drug Administration (FDA) aprovou o uso do cetoconazol, pertencente ao grupo dos imidazóis, que foi utilizado por muitos anos como o único antifúngico disponível para o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas (BRASS *et al.*, 1982).

Já o fluconazol (Figura 4b), pertencente ao grupo triazol, se tornou disponível para uso na clínica em 1990. Esse medicamento apresenta várias vantagens em relação aos imidazóis, como maior hidrossolubilidade para administração pela via intravenosa, absorção quase completa no trato gastrointestinal e capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica. O fluconazol apresenta amplo espectro de atividade, sendo indicado para o tratamento de candidíase superficial, cutânea e disseminada, meningite criptocócica e coccidiomicose. Porém, devido à prescrição excessiva desse medicamento pelos médicos, houve um aumento na resistência da classe de azóis (VANDEPUTTE *et al.*, 2012).

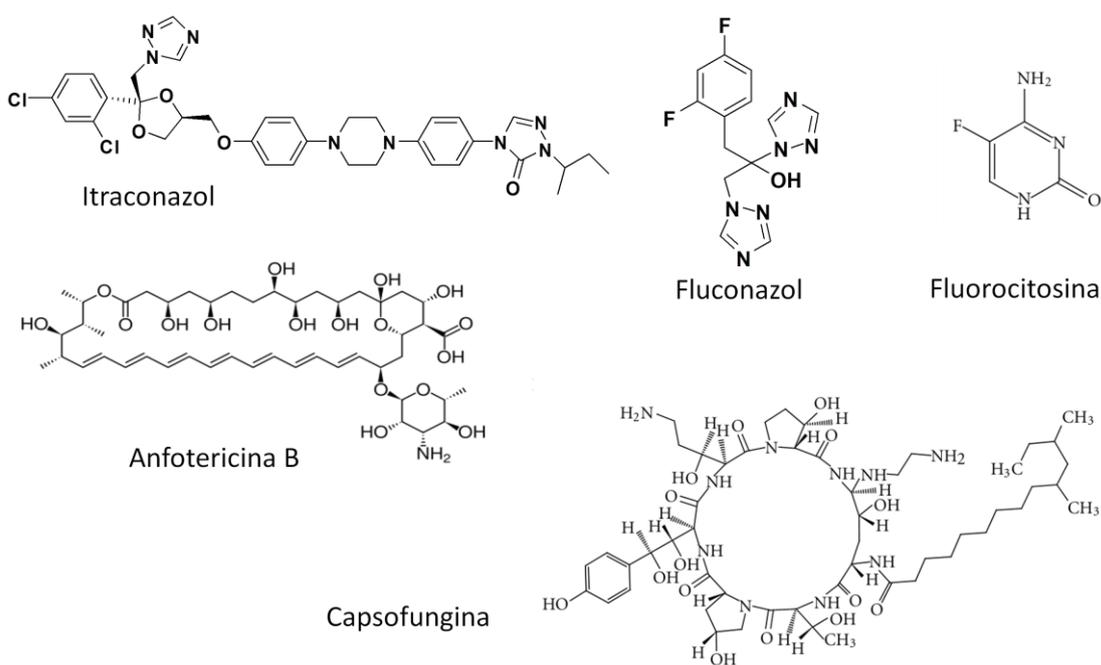
Posteriormente, em 1992, foi aprovado pelo FDA o uso do itraconazol (Figura 4b), que apresenta maior espectro de ação que o fluconazol. O itraconazol substituiu o uso do cetoconazol para o tratamento de histoplasmose, blastomicose e paracoccidioomicose, por apresentar menor toxicidade. Além disso, diferentemente do fluconazol, também é utilizado para o tratamento de infecções causadas por espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Sporothrix*. No entanto, o itraconazol é hidrofóbico

e mais tóxico que o fluconazol. Assim, o itraconazol é indicado principalmente para o tratamento de onicomicose, infecções superficiais e em alguns casos de aspergilose sistêmica. Apesar dos grandes avanços, fluconazol e itraconazol apresentam algumas desvantagens em seu uso, como a emergência da resistência dos parasitos, as interações medicamentosas e a falta de efetividade em patógenos emergentes, como *Scedosporium*, *Fusarium* e *Mucorales* (BOOGAERTS *et al.*, 2001).

A nova geração dos triazóis, voriconazol e posaconazol apresenta um amplo espectro de atividade, sendo ativa em *Candida*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Scedosporium*, *Acremonium*, *Trichosporon*, *Cryptococcus neoformans* e em dermatófitos. Apesar de a nova geração ser mais efetiva em *Candida* e *Aspergillus*, as interações medicamentosas são semelhantes às observadas para o fluconazol e itraconazol. Além disso, alguns isolados clínicos resistentes aos triazóis clássicos apresentam resistência cruzada com a nova geração (VANDEPUTTE *et al.*, 2012).

As equinocandinas são a única classe recente de antifúngicos disponível para combater infecções invasivas nos últimos 15 anos, sendo que três moléculas foram aprovadas para uso: capsosungina (Figura 4b), micafungina e anidulafungina. Equinocandinas são derivados sintéticos de lipopeptídeos, que são naturalmente produzidos por várias espécies de fungos. O mecanismo de ação dessa classe consiste na inibição não competitiva da enzima  $\beta(1-3)$ -glucan-sintase, que catalisa a polimerização de uridina-difosfato-glicose em  $\beta(1-3)$ -glucan, um dos componentes estruturais responsável pela manutenção da integridade e rigidez da parede celular. A inibição dessa enzima leva à desestabilização da parede celular, resultando em lise da célula fúngica. As equinocandinas são pouco absorvidas no trato gastrointestinal devido à sua elevada massa molecular e, portanto, são utilizadas apenas pela via intravenosa. Além disso, essa classe apresenta amplo espectro de ação, baixa toxicidade e uma degradação lenta, o que permite que seja administrada apenas por uma injeção ao dia. Diferentemente de outros agentes antifúngicos, as interações medicamentosas são raras (DENNING, 2002; STONE *et al.*, 2002).

A capsosfungina é indicada para o tratamento de candidemia e candidíase invasiva, para profilaxia de infecções fúngicas e para o tratamento de aspergilose invasiva, quando itraconazol, voriconazol e anfotericina B são inefetivos. A micafungina é usada para o tratamento de candidemia e particularmente indicada para a profilaxia em pacientes que receberam transplante de medula óssea. Já a anidulafungina não tem indicações específicas, mas sua principal vantagem é a degradação lenta, e seu uso em pacientes com insuficiência hepática ou renal (VANDEPUTTE *et al.*, 2012; STONE *et al.*, 2002).



**Figura 4b:** Estrutura química de medicamentos utilizados no tratamento de infecções fúngicas. Fonte: VANDEPUTTE *et al.*, 2012.

### 1.2.3. Resistência

A resistência à terapia antifúngica apresenta crescimento acelerado. O teste de susceptibilidade antifúngica *in vitro* é padronizado internacionalmente e tem se tornado essencial na prática clínica. A utilização dessa ferramenta, associada à caracterização molecular de mecanismos de resistência possibilita a otimização da terapia antifúngica (PFALLER, 2012).

A resistência antifúngica pode ser classificada como microbiológica ou clínica. A resistência microbiológica ocorre quando o patógeno é inibido por uma concentração maior do agente antimicrobiano em comparação com cepas selvagens. A resistência clínica ocorre quando o patógeno é inibido por uma concentração antimicrobiana maior do que a dose considerada normal e está associada com a falha terapêutica (PFALLER, 2012).

Os principais mecanismos de resistência dos fungos são a redução da concentração do fármaco na célula fúngica, através do aumento de seu efluxo, redução da afinidade do fármaco pelo seu alvo e modificações no metabolismo que antagonizem o efeito do fármaco (VANDEPUTTE *et al.*, 2012).

### 1.2.4. Alternativas terapêuticas

Os tratamentos antifúngicos atualmente disponíveis são limitados, especialmente no caso de infecções sistêmicas. Além disso, não ocorreram avanços significativos nas terapias desenvolvidas recentemente, o que ressalta a necessidade de investigar tratamentos alternativos com moléculas novas e mais efetivas. Uma fonte interessante para essa pesquisa são os compostos provenientes de fontes naturais, como plantas e micro-organismos (VANDEPUTTE *et al.*, 2012).

Os produtos naturais e seus derivados são historicamente uma importante fonte de agentes terapêuticos para o tratamento de doenças infecciosas. Aproximadamente 80% dos antibióticos utilizados na clínica são derivados de produtos naturais, também conhecidos como metabólitos secundários. Esses produtos

consistem em um reservatório privilegiado de moléculas selecionadas para a interação com uma variedade de alvos biológicos no meio ambiente, que fornecem uma vantagem para o organismo que as produzem (ROEMER *et al.*, 2011). Os metabólitos secundários são essenciais para permitir a sobrevivência frente à competição interespecies, além de fornecer mecanismos de defesa e facilitar o processo reprodutivo (VAISHNAV *et al.*, 2010).

A importância das plantas medicinais como fonte de novos agentes antimicrobianos é bastante consolidada. É estimado que 20.000 espécies de diferentes famílias sejam utilizadas com finalidade terapêutica. Metabólitos secundários produzidos por plantas possibilitaram o desenvolvimento de inúmeros medicamentos (KUETE *et al.*, 2010).

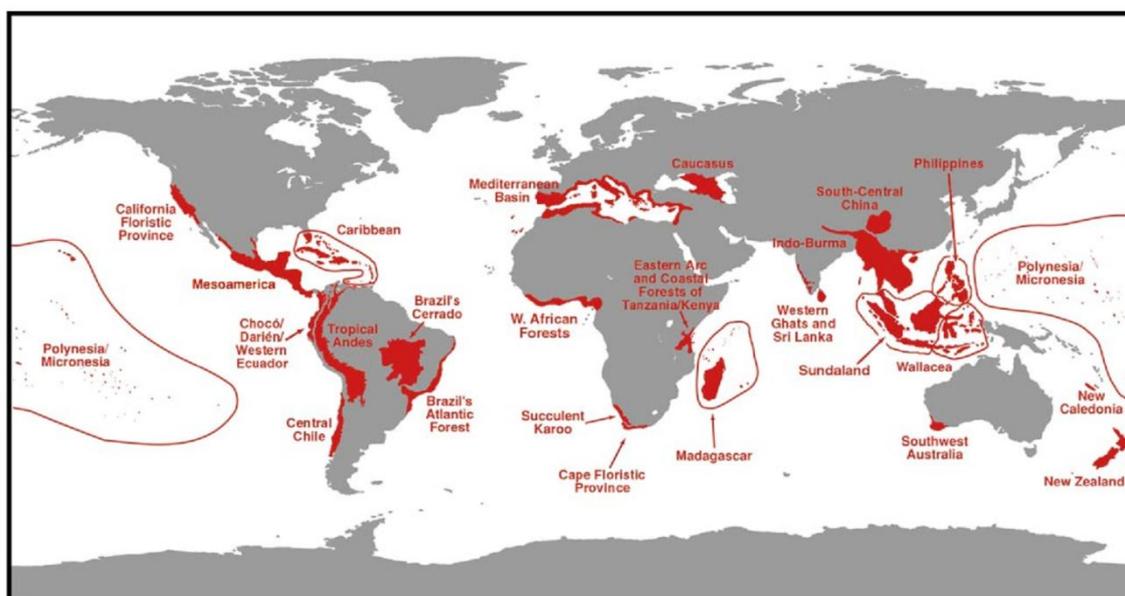
### **1.3. Cerrado**

O Cerrado é o segundo maior bioma brasileiro, depois da Amazônia, ocupando cerca de 23% do território nacional, com aproximadamente dois milhões de quilômetros quadrados. O clima é estacional, onde há um período chuvoso, seguido por um período seco. A precipitação média anual é de 1.500 mm e as temperaturas são geralmente amenas ao longo do ano, variando entre 18 °C e 28 °C (KLINK & MACHADO, 2005; BRANNSTROM *et al.*, 2008).

A arquitetura do Cerrado é particular, ostentando árvores de troncos tortuosos e ramos retorcidos, cobertos por casca espessa e com folhas grossas. Os estudos comprovam que essa característica não está relacionada à falta de água, pois no Cerrado se encontra uma grande e densa rede hídrica, mas sim aos fatores edáficos, como o desequilíbrio no teor de micronutrientes, a exemplo do alumínio (BUSTAMANTE *et al.*, 2012; BRANNSTROM *et al.*, 2008). Essas condições não são favoráveis para a agricultura, e para que ocorra o cultivo agrícola, é necessária a utilização de fertilizantes e calcário, que prejudicam a reestruturação da vegetação nativa (BUSTAMANTE *et al.*, 2012; RODRIGUES *et al.*, 2007).

A produção de metabólitos secundários pelas plantas do Cerrado é influenciada por vários fatores, como sazonalidade, temperatura, altitude, disponibilidade de recursos hídricos e ataque de patógenos (DA SILVA *et al.*, 2010; GOBBO-NETO & LOPES, 2007). Dessa forma, essas condições geram uma grande diversidade química no Cerrado e o torna uma fonte interessante de pesquisa, que pode permitir a descoberta e o desenvolvimento de novos fármacos.

Porém, apesar do Cerrado ser considerado um dos biomas mais ricos do planeta e uma das 25 regiões de maior biodiversidade, é também uma das mais ameaçadas da Terra, sendo apontado como um *hotspot* de biodiversidade (Figura 5), devido à expansão da atividade agropecuária pressionando as áreas remanescentes (RANGEL *et al.*, 2007; KLINK & MACHADO, 2005; MYERS *et al.*, 2000).



**Figura 5:** Os 25 hotspots no mundo. Fonte: MYERS *et al.*, 2000.

Dessa forma é importante que se minimizem os impactos da ação humana e que seja otimizada a utilização dos recursos para a conservação das áreas mais ameaçadas (BUSTAMANTE *et al.*, 2012; RANGEL *et al.*, 2007). A identificação de moléculas líderes em plantas do Cerrado tem grande potencial biotecnológico, sendo um modelo de desenvolvimento científico, econômico, social e ambiental.

### 1.3.1. *Connarus suberosus*

A espécie do Cerrado, *Connarus suberosus* Planch., Connaraceae (Figura 6) é conhecida popularmente por cabelo-de-negro, galinha-choca ou pau-ferro (SALOMÃO *et al.*, 2003; LORENZI, 2002).



**Figura 6:** *Connarus suberosus* Planch., Connaraceae – Árvore (à direita) - detalhe casca do caule com a presença característica do **suber**, que inspirou a nomeação da espécie (à esquerda - acima) e folha - superfícies adaxial e abaxial (à esquerda - abaixo).

### 1.3.1.1. Descrição botânica

*Connarus suberosus* Planch. é uma planta decídua, heliófita, seletiva xerófita, secundária, característica e exclusiva dos cerrados e campos cerrados secos do Brasil Central. Distribui-se no Planalto Central, desde os estados da Bahia, Piauí, Maranhão, Pará, Mato Grosso do Sul e Paraná (MATHEUS *et al.*, 2009). *C. suberosus* é uma das espécies mais frequentes da flora lenhosa do cerrado sensu lato, ocorrendo em 75% dos levantamentos florísticos em dez estados brasileiros (RATTER *et al.*, 2001).

A árvore atinge 4 a 7 metros de altura, e tem uma copa alongada com tronco tortuoso e bastante suberoso. As folhas compostas imparipinadas, dispostas de forma alterna espiralada, apresentam pilosidade densa e coloração ferrugínea quando jovens. Os folíolos são alternos e de consistência coriácea. Floresce nos meses de agosto a outubro e os frutos amadurecem de novembro a fevereiro, e suas flores são apícolas. O fruto tem formato pontiagudo, e quando maduro fica avermelhado e abre. As sementes são pretas e cobertas por arilo alaranjado (LORENZI, 2002).

### 1.3.1.2. Utilização

Aquino *et al.* (2007), ao estudarem espécies vegetais de uso múltiplo em reservas legais do Cerrado destacaram as características e importância dessa espécie para ser utilizada como atrativo para fauna e para fins artesanais (MATHEUS *et al.*, 2009).

A madeira é leve, macia, medianamente resistente e pouco durável, usada localmente para carpintaria, serviços de torno, marcenaria e lenha. Já a casca é utilizada com valor medicinal contra a diarreia e quando grossa e suberosa é usada na exploração de cortiça. Suas flores atraem abelhas e seus frutos alimentam muitos pássaros. Além disso, essa planta apresenta potencial para uso ornamental (LORENZI, 2002; CORRÊA, 1984).

### 1.3.1.3. Estudos fitoquímicos

A fitoquímica da espécie *Connarus suberosus* ainda não foi descrita na literatura, apenas identificada a presença dos grupos químicos saponinas e taninos (WORTHLEY *et al.*, 1969). Em relação ao gênero *Connarus*, foram isoladas as moléculas rapanona, bergenina e (-)leucopelargonidina da raiz de *Connarus monocarpus* (AIYAR *et al.*, 1964). Foram isolados também alcalóides das folhas de *Connarus ferruginens* (ASANO *et al.*, 2005) e das folhas e frutos de *Connarus paniculatus* (LE *et al.*, 2005), além de glicosídeos do caule de *Connarus microphyllus* (HE *et al.*, 2006).

### 1.3.2. *Neea theifera*

A espécie do Cerrado, *Neea theifera* Oerst., Nyctaginaceae (Figura 7) é conhecida popularmente por capa-rosa-do-campo (FURLAN, 1996).



**Figura 7:** *Neea theifera* Oerst. Nyctaginaceae. Arbusto (à esquerda), gema axilar (à direita, acima), ramo em desenvolvimento (à direita, abaixo).

#### 1.3.2.1. Descrição botânica

*Neea theifera* Oerst. é classificada como arbusto ou árvore pequena, podendo atingir até 4 metros de altura. É uma planta dióica, que apresenta casca suberosa e ramos cilíndricos rugosos, revestidos de epiderme pardacenta. Suas folhas são simples, subopostas ou alternas, sésseis ou curto-pecioladas, oblongas, arredondadas no ápice e cordiformes na base, com até 10 cm de comprimento e 5 cm de largura, glabras. As flores são unissexuadas, sésseis, dispostas em panículas eretas com

ramificação divaricada. O fruto é tipo núcula, pequeno, oblongo-ovóide, de cor amarela (CORRÊA, 1984).

*Neea theifera* apresenta ampla distribuição geográfica e sua ocorrência é predominantemente em regiões de Cerrado (FURLAN *et al.*, 2008).

#### **1.3.2.2. Utilização**

Estudos etnofarmacológicos de *Neea theifera* evidenciaram atividade em diarreia, enterocolite e enterorragia (CORRÊA, 1984). As folhas são utilizadas na medicina tradicional para o tratamento de diarreias. Outros estudos indicam a utilização da espécie no tratamento de afecções gástricas (ELVIN-LEWIS & LEWIS, 1983).

#### **1.3.2.3. Estudos fitoquímicos**

A investigação fitoquímica das folhas de *Neea theifera* realizada por RINALDO *et al.* (2007) permitiu o isolamento e identificação de uma flavona inédita, luteolina-7-O-[2"-O-(5"-O-feruloil)- $\beta$ -D-apiofuranosil]- $\beta$ -D-glucopiranosídeo e dos compostos conhecidos vitexina, isovitexina, iso-orientina, orientina, vicenina-2, crisoeriol, apigenina e luteolina.

### 1.3.3. *Myrcia linearifolia*

A espécie do Cerrado, *Myrcia linearifolia* Cambess., Myrtaceae (Figura 8) é conhecida popularmente por ratanhia ou araçazinho (CORRÊA, 1984).



**Figura 8:** *Myrcia linearifolia* Cambess., Myrtaceae. Partes aéreas (à esquerda) e raiz (à direita).

#### 1.3.3.1. Descrição botânica

*Myrcia linearifolia* é classificada como subarbusto; apresenta ápice do caule pubérulo; folhas sésseis, lineares, agudas, opacas, pubérulas, 8-20 mm de comprimento, 1-1,75 mm de largura; pedúnculos axilares unifloros, pubérulos; cálice de 4 mm de comprimento, lanoso, pelos brancacentos, lobos ovais; 5 pétalas o dobro do tamanho dos lobos do cálice, arredondada, côncava, pelúcida-pontuada, externamente lanosa, internamente glabra; estames pouco mais compridos que as pétalas, anteras basifixas, oval-arredondadas; ovário bilocular biovulado (CORRÊA, 1984).

#### 1.3.3.2. Estudos fitoquímicos e biológicos

Na literatura não há relatos de estudos fitoquímicos com a espécie *Myrcia linearifolia*, porém já foram isoladas moléculas do gênero *Myrcia*. Os óleos essenciais das espécies *M. richardiana*, *M. arborescens*, *M. selloi*, *M. oligantha*, *M. rostrata*, *M. lajeana*, *M. obtecta*, *M. pubipetala* e *M. hatschbachii* foram analisados por

LIMBERGER *et al.*, 2004, que identificaram 67 compostos. Os óleos essenciais eram ricos em sesquiterpenos cíclicos, dentre eles  $\beta$ -cariofileno, germacreno D, biciclogermacreno,  $\delta$ -cadineno, espatulenol, globulol e  $\alpha$ -cadinol.

CERQUEIRA *et al.* (2007) extraíram e analisaram os óleos essenciais das folhas, flores e frutos de *Myrcia myrtifolia*, identificando 28 componentes, sendo o  $\alpha$ -pineno majoritário. A atividade do óleo essencial das folhas foi avaliada em bactérias, leveduras e fungos filamentosos, sendo ativo em *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus*, *Microsporum canis* e *Trichophyton rubrum*.

Em outro estudo com a espécie *Myrcia multiflora*, YOSHIKAWA *et al.* (1998) isolaram e elucidaram as flavononas myrciacitrina I e II a partir da fração acetato de etila do extrato metanólico da planta. Posteriormente o mesmo grupo isolou as flavononas myrciacitrina III, IV e V, que demonstraram forte atividade inibitória sobre a aldose redutase, o que está relacionado a uma atividade antidiabética (MATSUDA *et al.*, 2002).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

Investigar o potencial químico e biológico de extratos de plantas do Cerrado - *Connarus suberosus* Planch., *Neea theifera* Oerst. e *Myrcia linearifolia* Cambess. - em *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e fungos patogênicos humanos.

### 2.2. Objetivos Específicos

- Realizar a triagem dos extratos de *Connarus suberosus* Planch. (Connaraceae), *Neea theifera* Oerst. (Nyctaginaceae) e *Myrcia linearifolia* Cambess. (Myrtaceae) em formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*
- Determinar  $CI_{50}$  (concentração que inibe 50%) dos extratos ativos em formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*
- Determinar os valores de CIM (Concentração Inibitória Mínima) dos extratos em fungos dermatófitos e leveduras
- Selecionar um extrato ativo para o fracionamento químico, visando o isolamento de compostos ativos
- Elucidar as estruturas moleculares isoladas
- Determinar a atividade biológica dos compostos isolados

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Coleta do material vegetal

As espécies vegetais *Connarus suberosus* Planch. (Connaraceae), *Neea theifera* Oerst. (Nyctaginaceae) e *Myrcia linearifolia* Cambess. (Myrtaceae) foram coletadas em 2010, na área da Lagoa Formosa/Planaltina-DF, Latitude sul 15° 27' 34,2"; Longitude sul 47° 92' 3,3"; Altitude 1.071 metros, em parceria com o botânico Prof. Dr. José Elias de Paula/UnB. As respectivas exsicatas foram depositadas no Herbário da Universidade de Brasília (UB/UnB) para assegurar a autenticidade das espécies coletadas.

Os órgãos vegetais foram separados (casca e madeira do caule e da raiz e folhas), dessecados, estabilizados e pulverizados utilizando um moinho de facas.



**Figura 9:** Momento da coleta - *Connarus suberosus* Planch. (Connaraceae) e dessecação das diferentes partes da planta (acima), moinho de facas e madeira do caule e da raiz pulverizados (abaixo).

### 3.2. Preparação dos extratos brutos

O material vegetal pulverizado foi pesado e submetido a extrações por maceração com solventes de diferentes polaridades: hexano, acetato de etila e etanol. Durante a fase de maceração, quando a massa do órgão pulverizado no quantitativo de 300 g não era possível de ser alcançada para as três polaridades do estudo, foi dada prioridade de preparo dos extratos em acetato de etila. Nos casos em que havia material vegetal em quantidade suficiente para preparação de extratos em mais de uma polaridade utilizou-se como segunda opção o hexano, e como terceira opção o etanol.

As soluções extrativas foram recuperadas por filtração e concentradas a pressão reduzida em rotaevaporador a 40 °C. Os extratos vegetais obtidos foram depositados no Banco de Extratos de Plantas do Bioma Cerrado do Laboratório de Farmacognosia/UnB, à -20 °C. O acesso ao patrimônio genético é autorizado sob o N° 06/2012 de acordo com a Resolução CGEN N° 35, após análise vinculada às informações e termos do processo 02000.002272/2006-73. A Figura 10 ilustra o processo de obtenção do extrato bruto.



**Figura 10:** Processo de extração por maceração (acima). Recuperação da solução extrativa por filtração, concentração em rotaevaporador e extratos brutos (abaixo).

### 3.3. Testes biológicos

#### 3.3.1. Método de avaliação da atividade antileishmania

##### 3.3.1.1. Preparo das amostras e do controle positivo

Para todos os testes *in vitro* em *Leishmania (Leishmania) amazonensis* os extratos foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 10 mg/mL e concentração final de DMSO inferior a 1% (v/v).

O controle positivo utilizado para os testes foi anfotericina B, que foi diluída em DMSO na concentração de 1600 µg/mL. Após a completa dissolução, foi feita a filtração em filtro Millipore 0,22 µm e armazenamento a -20 °C pelo período máximo de três meses.

### 3.3.1.2. Preparo do meio de cultura de *L. (L.) amazonensis*

O meio utilizado para a cultura e testes biológicos foi o meio líquido Schneider da Sigma<sup>®</sup>. Esse meio foi suplementado com 20% de soro fetal bovino e 0,25% de gentamicina para posteriormente ser filtrado em capela de fluxo laminar utilizando o sistema de filtração a vácuo com membrana de 0,22 µm. O armazenamento foi a 4 °C.

### 3.3.1.3. Cultura de formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*

As formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* cepa (L(L)a)-MHOM/BR/PH8 foram mantidas em camundongos isogênicos da linhagem C57Bl/6, no Biotério da Faculdade de Ciências da Saúde/Medicina da Universidade de Brasília. Os parasitos foram obtidos a partir da aspiração do sangue após inoculação de solução salina 0,9% na pata traseira infectada dos animais. Posteriormente os parasitos foram cultivados em meio sólido McNeal, Novy e Nicolle (meio NNN) a 22 °C por uma semana e em seguida foram transferidos para o meio Schneider Sigma<sup>®</sup> contendo 20% de soro fetal bovino e gentamicina (pH 7,2 a 22 °C). Após a replicação do parasito no meio foi feita a contagem do número de promastigotas por meio de uma câmara de Neubauer e foi utilizada a concentração de 10<sup>5</sup> promastigotas/mL para os testes *in vitro*.

### 3.3.1.4. Triagem da atividade de extratos brutos de plantas

Inicialmente foi realizada uma triagem dos extratos vegetais para verificar a viabilidade celular do parasito em placas de 96 poços de fundo chato. Os extratos foram diluídos na proporção de 1:3 em meio Schneider (solução em DMSO: meio de cultura), obtendo-se uma concentração final de 2,5 mg/mL. Em cada poço foi adicionado 100 µL de meio Schneider, 8 µL de extrato diluído em meio de cultura e 10<sup>5</sup> formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Em seguida foi adicionado meio Schneider para completar o volume de 200 µL por poço e a concentração final do extrato foi de 100 µg/mL. A placa foi incubada por 48 horas a 22 °C e foi feita a análise da viabilidade em microscópio invertido.

### 3.3.1.5. Avaliação dos resultados

O teste foi realizado em triplicata e a análise dos resultados foi determinada utilizando um microscópio invertido. A avaliação do movimento dos parasitos foi estimada segundo adaptação descrita por WENIGER *et al.* (2001) e os critérios da análise foram registrados conforme tabela abaixo:

<b>0</b>	100% dos parasitos em movimento	Extrato inativo
<b>+</b>	50% dos parasitos em movimento	Extrato pouco ativo
<b>++</b>	< 50% dos parasitos em movimento	Extrato ativo
<b>+++</b>	100% dos parasitos sem movimento	Extrato muito ativo

Nesse trabalho, os extratos muito ativos (+++) foram selecionados para a determinação do  $CI_{50}$ .

### 3.3.1.6. Determinação de $CI_{50}$

Para o cálculo do índice de concentração inibitória de 50% dos parasitos ( $CI_{50}$ ) a solução estoque dos extratos (10 mg/mL) foi diluída em meio Schneider na proporção 1:1. Em uma placa de 96 poços foram adicionados, em cada poço da 1ª fileira, 192  $\mu$ L de meio de cultura estéril e 8  $\mu$ L dos extratos diluídos no meio, totalizando 200  $\mu$ L. Nos demais poços foram adicionados 100  $\mu$ L de meio Schneider. Com auxílio de uma pipeta multicanal ajustada para 100  $\mu$ L foi feita a diluição seriada até a penúltima fileira, desprezando-se ao final os 100  $\mu$ L restantes. Em seguida, uma suspensão de  $10^5$  formas promastigotas foi acrescentada, e o volume final do poço completado para 200  $\mu$ L. Dessa forma a concentração final dos extratos na placa variou de 100  $\mu$ g/mL (1ª fileira) a 1,56  $\mu$ g/mL (penúltima fileira). O controle positivo utilizado para os testes foi anfotericina B, cuja concentração final na placa variou de 16  $\mu$ g/mL a 0,25  $\mu$ g/mL. A última fileira foi destinada ao controle de esterilidade (100  $\mu$ L de meio Schneider) e ao controle negativo (suspensão de  $10^5$  promastigotas em meio Schneider).

A placa foi incubada por 48 horas a 22 °C e posteriormente foi feita a análise da viabilidade dos parasitos utilizando o método MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide).

### 3.3.1.7. Avaliação dos resultados

Após o período de incubação, foi feita a análise da viabilidade dos parasitos pelo método colorimétrico e enzimático do MTT. A análise é baseada na capacidade das células metabolicamente ativas reduzirem o sal MTT, de cor amarela, ao produto formazan, de coloração violácea (MOSMANN, 1983). Para a avaliação, 20  $\mu$ L de uma solução de MTT de 5 mg/mL foram adicionados a todos os poços e a placa foi novamente incubada por 4 h a 22 °C, protegida da luz. Em seguida, foram adicionados 50  $\mu$ L de DMSO para a liberação dos cristais de formazan. A absorbância foi lida em

espectrofotômetro (Figura 11) a 570 nm para quantificação da metabolização do agente colorimétrico. Estes experimentos foram realizados em triplicata, permitindo a determinação do  $CI_{50}$  pelo programa Prisma GraphPad.



**Figura 11:** Viabilidade dos parasitos pelo método MTT com leitura da absorbância em espectrofotômetro a 570 nm.

### 3.3.2. Método de avaliação da atividade antifúngica

A concentração inibitória mínima (CIM) de cada extrato ou composto vegetal foi determinada em leveduras: *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *Candida glabrata* LMGO 44; e em dermatófitos: *Trichophyton mentagrophytes* LMGO 09, *Trichophyton rubrum* LMGO 06 e *Trichophyton tonsurus* LMGO 45 (Figura 12) usando técnicas de microdiluição, estabelecida nos protocolos do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) sendo o protocolo M27-A2 para leveduras e M38-A para fungos filamentosos. Cepas LMGO (Laboratório de Micologia de Goiás) correspondem a isolados clínicos de pacientes do Hospital da Universidade Federal de Goiás.



**Figura 12:** Fungos patogênicos humanos do Laboratório de Farmacognosia.

### 3.3.2.1. Preparo das amostras e dos controles

Para o teste de microdiluição, os extratos foram diluídos em DMSO a 100 mg/mL. Os controles positivos (obtidos da Sigma<sup>®</sup>) utilizados foram itraconazol e anfotericina B para leveduras e dermatófitos, e fluconazol apenas para leveduras. O itraconazol e a anfotericina B foram diluídos em DMSO na concentração de 1600 µg/mL, enquanto o fluconazol foi diluído em água deionizada, na concentração de 6400 µg/mL. Após a completa dissolução, os controles foram filtrados em filtro Millipore 0,22 µm e armazenados a -20 °C pelo período máximo de três meses.

### 3.3.2.2. Preparo do meio RPMI 1640 para o teste de microdiluição

O meio de cultura utilizado foi o RPMI 1640 com vermelho de fenol sem bicarbonato de sódio. O meio em pó (10,4 g) foi reconstituído em água destilada em quantidade suficiente para produzir um litro de meio. Após isso, foi feito o tamponamento com ácido 3-[N-morfolino]-propoanossulfônico (MOPS) 0,165 M (6,9 g em 200 mL de água deionizada) até alcançar pH 7.

O meio produzido foi filtrado em sistema de filtração à vácuo utilizando membrana de 0,22 µm na capela de fluxo laminar. Para o controle de esterilidade três

alíquotas de 3 mL do meio foram armazenadas em estufa a 37 °C por 5 dias. Após esse período, foi feita a análise da turbidez, e constatando meio límpido este era liberado para uso.

### 3.3.2.3. Inóculo de leveduras

Para a realização do teste de CIM foi feito o repique das leveduras 48 horas antes do teste. No dia do teste foi feita a transferência de uma pequena alíquota da levedura para um tubo de ensaio contendo solução salina estéril 0,85%, até que se atingisse o grau de turbidez 0,5 na escala de McFarland, indicado pela seta na Figura 13. Após isso, foi feita a diluição em meio RPMI em duas etapas. A primeira etapa corresponde ao preparo de uma solução 1:100 (suspensão salina: meio RPMI). A segunda etapa consiste em uma diluição 1:20, obtendo-se o inóculo utilizado no teste. A concentração final de células varia de  $1-5 \times 10^3$  células/mL.



**Figura 13:** Inóculo de leveduras em três níveis de turbidez.

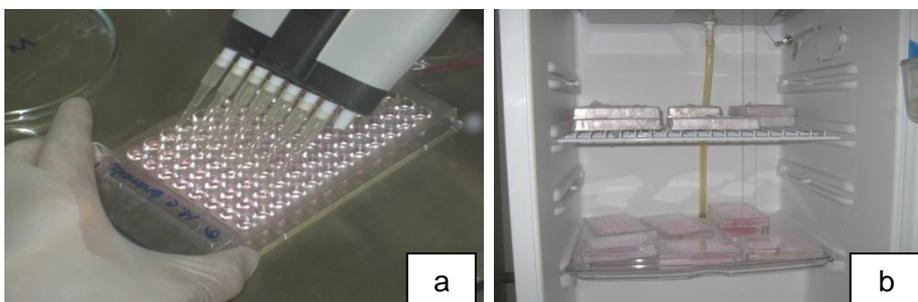
### 3.3.2.4. Inóculo de fungos filamentosos

O repique dos fungos filamentosos foi feito cinco dias antes do teste de CIM. No dia do teste a solução salina 0,85% foi transferida para o tubo de ensaio contendo o fungo e, com auxílio de uma alça de platina, foi feita uma raspagem até que fosse alcançada a turbidez 0,5 na escala McFarland. Em seguida foi feita uma diluição em meio RPMI na proporção de 1:50 (suspensão salina: meio RPMI). A concentração final do inóculo utilizado foi de  $2-4 \times 10^4$  células/mL.

### 3.3.2.5. Teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM)

O teste de microdiluição foi realizado em placa estéril de 96 poços de fundo arredondado. Inicialmente 100  $\mu\text{L}$  de meio RPMI foram adicionados em todos os poços. Posteriormente foram adicionados 96  $\mu\text{L}$  de meio RPMI e 4  $\mu\text{L}$  dos extratos na 1ª fileira em duplicata e foi feita a diluição seriada (Figura 14a). Após isso, foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  do inóculo preparado, completando o volume final para 200  $\mu\text{L}$  por poço. Assim, a concentração final do extrato na 1ª diluição foi de 1000  $\mu\text{g/mL}$ . A concentração dos controles positivos na 1ª diluição do teste foi de 16  $\mu\text{g/mL}$  para o itraconazol e a anfotericina B; e de 64  $\mu\text{g/mL}$  para o fluconazol. A penúltima fileira da placa corresponde ao controle de crescimento, e contém apenas meio RPMI e fungo. Já a última fileira da placa corresponde ao controle de esterilidade e contém apenas o meio RPMI. Após o término do teste, as placas foram embaladas em filme PVC e incubadas em estufa a 35 °C (Figura 14b), por 48 horas no caso de leveduras, e por 5 dias no caso de fungos filamentosos.

A leitura do resultado é feita visualmente, observando o crescimento do fungo no poço. O primeiro poço no qual não se observa crescimento fúngico é considerado o valor de CIM. Caso ocorra a inibição do crescimento do fungo em todos os poços é realizado um novo teste a partir de uma concentração menor da substância.



**Figura 14:** Teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM) – microdiluição com pipeta multicanal (a) e incubação das placas em estufa a 35 °C (b).

### **3.3.2.6. Purificação e identificação das substâncias isoladas**

Um dos extratos estudados foi selecionado para o fracionamento químico devido a características como atividade biológica, rendimento, quantidade e polaridade. O fracionamento foi realizado por meio de técnicas de cromatografia e os compostos isolados tiveram sua estrutura elucidada por Ressonância Magnética Nuclear ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , COSY, HSQC, HMBC), infravermelho e espectrometria de massa.

## **3.4. Métodos de cromatografia**

### **3.4.1. Coluna líquida a pressão atmosférica**

Na cromatografia de adsorção foi empregada a sílica gel 60 (230-400 mesh). O comprimento e diâmetro das colunas variaram de acordo com a quantidade da amostra a ser fracionada. A quantidade de sílica utilizada foi 60 vezes maior que a quantidade de extrato a ser fracionado. Os eluentes utilizados foram hexano, diclorometano, acetato de etila, metanol, ácido acético e água puros ou combinados em gradientes de polaridade crescente. O processo de separação foi monitorado por cromatografia em camada delgada (CCD).

Foi feita também cromatografia em coluna de sephadex LH-20 para a separação de amostras de elevada polaridade. Para esse tipo de coluna os eluentes utilizados foram metanol puro e metanol:ácido acético (97:3).

### **3.4.2. Cromatografia em camada delgada**

Para esse procedimento foram utilizadas placas de sílica gel 60 F254 (Merck®). As placas foram observadas sob lâmpada UV a 254 e 365 nm. Para a revelação das placas de CCD foi utilizado o revelador universal vanilina sulfúrica (solução etanólica de ácido sulfúrico 5% e solução etanólica de vanilina 1%). Após a eluição da placa, ela foi pulverizada com a solução e posteriormente aquecida com auxílio de um soprador térmico.

### **3.4.3. Cromatografia em camada delgada preparativa**

A cromatografia em camada delgada preparativa foi feita utilizando-se o mesmo princípio da cromatografia analítica. A diferença existente é que as áreas de sílica nas quais os compostos estavam presentes foram recuperadas da placa após a eluição.

A amostra foi solubilizada e depositada sobre a placa com auxílio de um capilar. A placa foi colocada em uma cuba saturada com o sistema eluente e após a eluição foi seca e examinada sob a luz UV. Parte dessa placa foi revelada com vanilina sulfúrica e foi feita uma delimitação das áreas onde os compostos estavam presentes. Após isso, a sílica foi recuperada com auxílio de uma espátula e dissolvida com solvente adequado. Em seguida foi feita a filtração para a remoção da sílica e concentração sob pressão reduzida em rotaevaporador.

## **3.5. Métodos Espectrométricos**

### **3.5.1. Espectroscopia na Região do Infravermelho (IV)**

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos em Espectrômetro Perkin Elmer, modelo FT-IR Spectrum 1000, utilizando pastilhas de KBr para análise das amostras.

### **3.5.2. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN $^1\text{H}$ ) e de Carbono-13 (RMN $^{13}\text{C}$ )**

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ) e Carbono-13 (RMN  $^{13}\text{C}$ ), uni e bidimensionais, foram obtidos em espectrômetros Bruker, modelo Avance DPX-300 e/ou modelo Avance DRX-500.

O espectrômetro Bruker Avance DRX-300, equipado com sonda de detecção inversa de 5 mm e magneto de 7,0 T, foi operado nas frequências de 300,13 e 75,47 MHz para hidrogênio e carbono, respectivamente. Nos experimentos realizados no aparelho Bruker Avance DRX-500, foram aplicadas frequências de 500,13 MHz ( $^1\text{H}$ ) e

125,75 MHz ( $^{13}\text{C}$ ), sob um campo magnético de 11,7 T. O tipo de sonda variou conforme o tipo de técnica: sonda dual de 5 mm com detecção direta (experimentos unidimensionais) e sonda multinuclear de 5 mm com detecção inversa (experimentos bidimensionais).

As amostras foram dissolvidas em alíquotas de 0,6 mL de solvente deuterado: clorofórmio ( $\text{CDCl}_3$ ), metanol ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ), acetona ( $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ) ou piridina ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ), comercializados pelas companhias ACROS, Cambridge Isotope Laboratories, Merck ou Aldrich.

Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e referenciados, no caso dos espectros de Hidrogênio, pelos picos dos hidrogênios pertencentes às moléculas residuais não-deuteradas dos solventes deuterados utilizados: clorofórmio ( $\delta$  7,27), metanol ( $\delta$  3,31) e piridina ( $\delta$  8,74; 7,58; 7,22). Nos espectros de carbono-13, os deslocamentos químicos foram referenciados pelos picos centrais dos carbonos-13 dos solventes: benzeno ( $\delta$  128,39), clorofórmio ( $\delta$  77,23), dimetilsulfóxido ( $\delta$  39,50), metanol ( $\delta$  49,17), piridina ( $\delta$  150,35; 135,91; 123,87) e acetona ( $\delta$  206,68 e 29,92).

As multiplicidades dos sinais de hidrogênio nos espectros de RMN  $^1\text{H}$  foram indicadas segundo a convenção: s (simpleto), d (duplete), t (tripleto), m (multiplete).

Nos experimentos unidimensionais de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  foram estabelecidos os seguintes valores para os parâmetros de aquisição, respectivamente: larguras espectrais de 24 e 260 ppm, intervalo para relaxação de 1 s e largura de pulso de  $90^\circ$  de 9,60  $\mu\text{s}$  (0 dB) e 10,90  $\mu\text{s}$  (-3 dB) para  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , respectivamente. Para todos os experimentos unidimensionais foram utilizados 65356 pontos para a aquisição e 32768 para o processamento, enquanto para os experimentos bidimensionais foram utilizados 2048 x 256 pontos para a matriz de dados de aquisição e 2048 x 1024 pontos para o processamento. Predição linear para o processamento 2D, utilizando 80 coeficientes, foi usada quando necessária. O número de transientes variou de 8, para

$^1\text{H}$ , a 16384, para  $^{13}\text{C}$ , para os experimentos unidimensionais, e  $2^n$  ( $n \geq 2$ ) para bidimensionais, dependendo do experimento e quantidade de amostra disponível.

Os microprogramas utilizados para a aquisição dos dados foram:  $^1\text{H}$  (zg),  $^{13}\text{C}$ -CPD (zpgg),  $^{13}\text{C}$ -DEPT 135° (dept135), gs-COSY (cosygp), gs-HSQC (hsqcgpph) e gs-HMBC (hmbclpndqf).

A técnica DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer), com ângulos de nutação de 135°, CH e CH<sub>3</sub> com amplitudes em oposição aos CH<sub>2</sub>, e 90°, somente CH, foi utilizada na determinação do padrão de hidrogenação dos carbonos em RMN  $^{13}\text{C}$ , descrito segundo a convenção: C (carbono não-hidrogenado), CH (carbono metínico), CH<sub>2</sub> (carbono metilênico ou metilidênico) e CH<sub>3</sub> (carbono metílico). Os carbonos não-hidrogenados foram caracterizados pela subtração do espectro DEPT 135 do espectro BB.

Os experimentos bidimensionais de correlação homonuclear (COSY) e heteronuclear (HSQC, HSQC e HMBC), realizados no aparelho Bruker Avance DRX-500, foram efetuados em sonda multinuclear de 5 mm, com detecção inversa, empregando-se gradiente de campo, posicionado no eixo z e magnitude de 10 A. Os valores de  $J$  utilizados para os experimentos pertinentes foram  $^1J_{\text{H,C}} = 145$ ,  $^nJ_{\text{H,C}} = 7$ , onde  $n \geq 2$ .

### 3.5.3. Espectrometria de massa

Os dados de espectros de massa de alta resolução (HR-ESI-MS) foram obtidos em espectrômetro Bruker Ultrotof e Microtof. Foi realizada ionização por *eletrospray* utilizando analisador de tempo de voo (ESI-TOF-MS). A análise foi feita em modo negativo e positivo.

### **3.6. Determinação do Ponto de Fusão (pf)**

Os pontos de fusão, não corrigidos, foram determinados em equipamento da Mettler Toledo, composto por uma placa aquecedora FP82HT e uma unidade de processamento FP90, a uma taxa de aquecimento de 2 C/min.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na primeira etapa do trabalho foram preparados 10 extratos de *Connarus suberosus* Planch. (Connaraceae), 7 extratos de *Neea theifera* Oerst. (Nyctaginaceae) e 3 extratos de *Myrcia linearifolia* Cambess. (Myrtaceae). Essas plantas foram selecionadas como objeto de estudo por apresentarem poucos relatos na literatura. As partes das plantas utilizadas foram madeira e casca da raiz, madeira e casca do caule, folhas e partes aéreas e os solventes usados para a extração foram hexano, acetato de etila e etanol, totalizando 20 extratos. A Tabela 2 lista os extratos brutos obtidos das três espécies do Cerrado:

**Tabela 2:** Espécies de plantas coletadas no bioma Cerrado.

Família Espécie	Parte da planta, solvente	Peso do extrato (g)	Rendimento (%)	Número de Herbário
<b>Connaraceae</b> <i>Connarus suberosus</i> Planch.	MR, h	1,66	0,55	(UB) 3820
	MR, ae	13,90	4,63	
	MR, e	35,42	11,81	
	CR, h	2,17	0,63	
	CR, ae	15,42	5,14	
	CR, e	28,44	9,48	
	MC, h	2,30	0,77	
	MC, ae	13,24	4,41	
	MC, e	32,43	10,81	
	F, ae	5,00	3,45	
<b>Myrtaceae</b> <i>Myrcia linearifolia</i> Cambess.	R, h	0,27	0,11	(UB) 3817
	R, ae	3,55	1,42	
	PA, ae	3,10	3,45	
<b>Nyctaginaceae</b> <i>Neea theifera</i> Oerst.	MR, h	1,04	0,35	(UB) 3821
	MR, ae	1,94	0,65	
	MR, e	5,25	1,75	
	CR, ae	0,63	0,81	
	MC, h	1,2	0,4	
	MC, ae	1,62	0,53	
F, ae	7,97	7,24		

Partes da planta - MR: madeira da raiz; CR: casca da raiz; MC: madeira do caule; F: folha; R: raiz (madeira + casca); PA: partes aéreas. Solventes - h: hexano; ae: acetato de etila; e: etanol.

Os extratos obtidos foram então submetidos a uma triagem em formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* na concentração de 100 µg/mL (Tabela 3). Os

extratos considerados muito ativos (+++) foram selecionados para o cálculo do índice de concentração inibitória de 50% dos parasitos ( $CI_{50}$ ).

**Tabela 3:** Triagem dos extratos brutos em formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* em uma concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$ .

Espécie	Extrato		Atividade 100 $\mu\text{g/mL}$
	Parte da planta	Solvente	
<i>C. suberosus</i>	MR	h	+++
	MR	ae	+++
	MR	e	0
	CR	h	+++
	CR	ae	+++
	CR	e	0
	MC	h	+++
	MC	ae	+++
	MC	e	0
	F	ae	0
<i>M. linearifolia</i>	R	h	0
	R	ae	0
	PA	ae	+
<i>N. theifera</i>	MR	h	0
	MR	ae	0
	MR	e	0
	CR	ae	0
	MC	h	0
	MC	ae	0
	F	ae	0

Partes da planta - MR: madeira da raiz; CR: casca da raiz; MC: madeira do caule; F: folha; R: raiz (madeira + casca); PA: partes aéreas. Solventes - h: hexano; ae: acetato de etila; e: etanol. Atividade - 0: inativo; +: pouco ativo; ++: ativo; +++: muito ativo.

Segundo o critério adotado, foram selecionados seis extratos para o teste de diluição seriada - determinação da  $CI_{50}$  - utilizando o método MTT para a leitura dos resultados, sendo todos da espécie *C. suberosus*. As espécies *M. linearifolia* e *N. theifera* não apresentaram atividade em *L. (L.) amazonensis*. Dos extratos selecionados para o cálculo da  $CI_{50}$ , todos eram hexânicos ou acetato de etila; e madeira do caule, madeira da raiz ou casca da raiz. Os extratos etanólicos e o extrato

acetato de etila da folha não apresentaram atividade antileishmania. Os valores de  $CI_{50}$  podem ser observados na Tabela 4.

**Tabela 4:** Determinação do  $CI_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) dos extratos de *Connarus suberosus* em formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*.

Espécie	Extrato		$CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
	Parte da planta	Solvente	
<i>C. suberosus</i>	MR	h	30,36
	MR	ae	64,08
	CR	h	27,57
	CR	ae	94,00
	MC	h	50,91
	MC	ae	68,29
Anfotericina B	-	-	0,067

Partes da planta - MR: madeira da raiz; CR: casca da raiz; MC: madeira do caule. Solventes - h: hexano; ae: acetato de etila.

Os valores de  $CI_{50}$  variaram de 27,57  $\mu\text{g/mL}$  a 94,00  $\mu\text{g/mL}$ , sendo que os extratos hexânicos apresentaram melhor atividade, com os menores valores de  $CI_{50}$ , porém nenhum foi comparável à  $CI_{50}$  de anfotericina B (0,067  $\mu\text{g/mL}$ ). A atividade antileishmania de *C. suberosus* ainda não havia sido descrita na literatura.

Após a avaliação da atividade dos extratos em formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, foi feita a investigação em fungos patogênicos humanos. Os extratos foram testados em leveduras: *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *Candida glabrata* LMGO 44; e em dermatófitos: *Trichophyton mentagrophytes* LMGO 09, *Trichophyton rubrum* LMGO 06 e *Trichophyton tonsurans* LMGO 45. Os valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM –  $\mu\text{g/mL}$ ) podem ser observados na Tabela 5.

**Tabela 5:** Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM - µg/mL) dos extratos de *C. suberosus*, *M. linearifolia* e *N. theifera* em leveduras (cepas de *Candida*) e fungos filamentosos (cepas de *Trichophyton*). ATCC: American Type Culture Collection. LMGO: isolados clínicos de pacientes.

Espécie	Extrato		<i>C. albicans</i> ATCC 10231 CIM (µg/mL)	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019 CIM (µg/mL)	<i>C. glabrata</i> LMGO 44 CIM (µg/mL)	<i>T. mentagrophytes</i> LMGO 09 CIM (µg/mL)	<i>T. rubrum</i> LMGO 06 CIM (µg/mL)	<i>T. tonsurus</i> LMGO 45 CIM (µg/mL)
	Parte da planta	Solvente						
<i>C. suberosus</i>	MR	h	3,9	1,95	>1000	125	500	>1000
	MR	ae	0,49	0,49	15,62	7,81	31,25	31,25
	MR	e	0,49	0,49	7,81	7,81	31,25	31,25
	CR	h	1,95	1,95	250	31,25	500	>1000
	CR	ae	1,95	1,95	125	31,25	31,25	31,25
	CR	e	0,24	0,24	7,81	7,81	31,25	31,25
	MC	h	3,9	7,81	500	62,5	500	>1000
	MC	ae	0,24	0,49	62,5	15,62	31,25	31,25
	MC	e	0,24	62,5	15,62	7,81	31,25	31,25
	F	ae	0,49	0,98	62,5	7,81	31,25	31,25
<i>M. linearifolia</i>	R	h	125	250	>1000	125	125	125
	R	ae	31,25	31,25	62,5	62,5	62,5	250
	PA	ae	31,25	31,25	125	125	125	250
<i>N. theifera</i>	MR	h	500	>1000	>1000	>1000	250	250
	MR	ae	>1000	>1000	>1000	>1000	250	500
	MR	e	>1000	>1000	>1000	500	250	500
	CR	ae	31,25	31,25	250	125	500	250
	MC	h	0,122	62,5	15,62	>1000	250	500
	MC	ae	250	125	>1000	>1000	500	250
	F	ae	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
Itraconazol	-	-	0,125	0,0625	0,125	0,25	0,125	0,25
Fluconazol	-	-	1	0,5	4	-	-	-
Anfotericina B	-	-	4	4	16	-	-	-

Partes da planta - MR: madeira da raiz; CR: casca da raiz; MC: madeira do caule; F: folha; R: raiz (madeira + casca); PA: partes aéreas. Solventes - h: hexano; ae: acetato de etila; e: etanol, (-): não testado.

O teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM) permite avaliar a atividade antifúngica em termos quantitativos, porém não há consenso na literatura sobre qual o valor de CIM é adequado para considerar um extrato promissor. Nesse trabalho foi estabelecido como critério valor de CIM  $\leq 125 \mu\text{g/mL}$  para um extrato muito ativo. Extratos com valor de CIM maiores que  $125 \mu\text{g/mL}$  e menores que  $1000 \mu\text{g/mL}$  foram considerados ativos, enquanto extratos com valor de CIM  $\geq 1000 \mu\text{g/mL}$  foram considerados inativos.

Em relação à polaridade dos extratos testados 30% eram hexânicos, 50% acetato de etila e 20% etanólicos. Dessa forma, foi priorizada a extração de compostos de polaridade intermediária e apolares devido ao histórico de atividades em micro-organismos patogênicos detectada pelo grupo de pesquisa deste estudo, sobretudo em protozoários, além de um maior interesse e experiência para o fracionamento desses extratos. Em relação à parte da planta testada, 60% eram da raiz, 25% do caule e 15% da folha.

O cálculo de CIM demonstrou que 80% (16) dos extratos testados foram muito ativos, com valor de CIM inferior a  $125 \mu\text{g/mL}$ , em pelo menos um dos fungos testados. Já os extratos hexânico, acetato de etila e etanólico da madeira da raiz de *N. theifera* foram considerados ativos (15%) enquanto o extrato acetato de etila da folha de *N. theifera* não apresentou atividade antifúngica em nenhum dos fungos testados (5%).

Dos extratos considerados muito ativos em pelo menos uma espécie de fungo, 31,25% eram hexânicos, 50% acetato de etila e 18,75% etanólicos. Esse perfil também foi encontrado no trabalho de Duraipandiyam e Ignacimuthu (2011), no qual foi verificado que os extratos acetato de etila promoveram uma inibição no crescimento de uma maior quantidade de fungos, quando comparado com extratos hexânicos e metanólicos. Em relação à parte da planta utilizada, 56,25% dos extratos muito ativos eram da raiz, 31,25% do caule e 12,5% da folha. Geralmente a raiz e o caule, sobretudo suas cascas, estão sob a ação direta do estresse provocado por fatores

externos, como ataques de fungos, bactérias, insetos, ação do fogo, desequilíbrio no teor de micronutrientes, a exemplo do alumínio, e em resposta produzem metabólitos secundários de defesa.

Os extratos acetato de etila da madeira e casca da raiz, madeira do caule e folha; e os extratos etanólicos da madeira e casca da raiz e, madeira do caule de *C. suberosus* apresentaram um perfil amplo de atividade, tanto em leveduras quanto em dermatófitos, com valores de CIM  $\leq 125$   $\mu\text{g/mL}$  para todos os fungos testados.

Alguns extratos apresentaram uma atividade antifúngica semelhante ou superior aos controles positivos. Isso pode ser observado para o extrato hexânico da madeira do caule de *N. theifera*, que foi mais ativo que o itraconazol (CIM = 0,125  $\mu\text{g/mL}$ ) e para os extratos acetato de etila e etanólico da madeira da raiz, etanólico da casca da raiz, acetato de etila e etanólico da madeira do caule e acetato de etila da folha de *C. suberosus*, que foram mais ativos que o fluconazol (CIM = 1  $\mu\text{g/mL}$ ) em *C. albicans* ATCC 10231. Já os extratos hexânico da madeira da raiz, hexânico e acetato de etila da casca da raiz e hexânico da madeira do caule de *C. suberosus*, além dos anteriormente citados, apresentaram atividade semelhante ou superior à anfotericina B (CIM = 4  $\mu\text{g/mL}$ ) em *C. albicans* ATCC 10231. Em relação à levedura *C. parapsilosis* ATCC 22019, os extratos acetato de etila e etanólico da madeira da raiz, etanólico da casca da raiz e acetato de etila da madeira do caule de *C. suberosus* apresentaram uma atividade semelhante ou superior ao fluconazol (CIM = 0,5  $\mu\text{g/mL}$ ). Já os extratos hexânico da madeira da raiz, hexânico e acetato de etila da casca da raiz de *C. suberosus*, além dos previamente mencionados, apresentaram atividade superior a da anfotericina B (CIM = 4  $\mu\text{g/mL}$ ). Em relação à espécie *C. glabrata*, os extratos acetato de etila e etanólico da madeira da raiz, etanólico da casca da raiz e etanólico da madeira do caule apresentaram atividade superior a da anfotericina B (CIM = 16  $\mu\text{g/mL}$ )

Os extratos da espécie *C. suberosus* apresentaram uma importante atividade antifúngica, principalmente em leveduras, com valores de CIM variando de 0,24 a 3,9

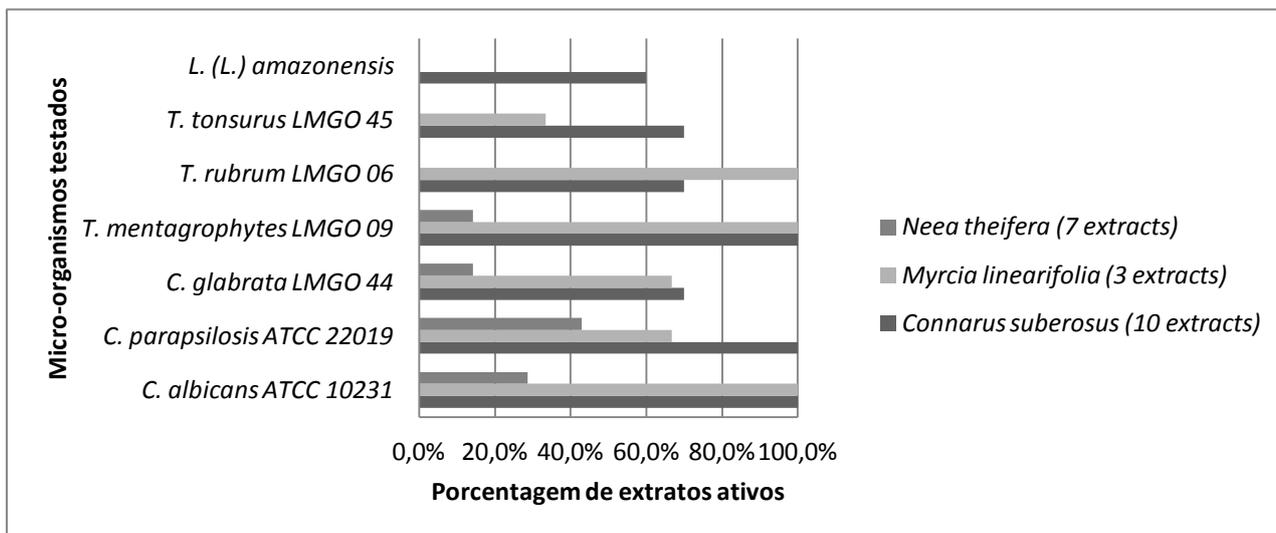
$\mu\text{g/mL}$  em *C. albicans* ATCC 10231 e 0,24 a 62,5  $\mu\text{g/mL}$  em *C. parapsilosis* ATCC 22019, sendo portanto 100% dos extratos considerados muito ativos em ambas as espécies (Tabela 6). Em relação à *C. glabrata* LMGO 44, dos 10 extratos testados, 70% foram considerados muito ativos, com CIM variando de 7,81 a 62,5  $\mu\text{g/mL}$ , sendo que os extratos hexânicos da casca da raiz e da madeira do caule foram considerados ativos, enquanto o extrato hexânico da madeira da raiz foi inativo. Esse resultado deve ser destacado, considerando ser um isolado clínico de uma espécie de *Candida* que vem apresentando resistência a vários agentes antifúngicos (KROGH-MADSEN *et al.*, 2006). Os extratos de *C. suberosus* também apresentaram atividade em fungos filamentosos, principalmente em *T. mentagrophytes* LMGO 09, no qual 100% dos extratos foram muito ativos, com valores de CIM variando de 7,81 a 125  $\mu\text{g/mL}$ . 70% dos extratos foram considerados muito ativos em *T. rubrum* LMGO 06, onde o CIM variou de 31,25 a 500  $\mu\text{g/mL}$ ; e em *T. tonsurus* LMGO 45, onde apenas os extratos hexânicos da casca da raiz e da madeira do caule não apresentaram atividade, sendo que os demais apresentaram valor de CIM de 31,25  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 15). A atividade antifúngica de *C. suberosus* ainda não havia sido relatada na literatura.

Os valores de CIM dos extratos de *M. linearifolia* (3) variaram de 31,25 a 250  $\mu\text{g/mL}$  para todos os fungos testados, com exceção do extrato hexânico da raiz, que não foi ativo em *C. glabrata* LMGO 44, com valor de CIM superior a 1000  $\mu\text{g/mL}$ .

A espécie *N. theifera* apresentou os resultados menos expressivos. Dos 7 extratos testados, 42,86% foram considerados muito ativos em *C. parapsilosis* ATCC 22019 com valor de CIM variando de 31,25 a 125  $\mu\text{g/mL}$ , enquanto os demais foram inativos (Figura 15). Em *C. albicans* 28,57% dos extratos foram considerados muito ativos, sendo que o extrato hexânico da madeira do caule apresentou valor de CIM de 0,122  $\mu\text{g/mL}$ . Em *C. glabrata* LMGO 44 o extrato hexânico da madeira do caule foi muito ativo, com valor de CIM 15,62  $\mu\text{g/mL}$ , o extrato acetato de etila da casca da raiz foi ativo, enquanto os restantes foram inativos. Em relação aos fungos filamentosos, o extrato acetato de etila da casca da raiz foi muito ativo e o extrato etanólico da

madeira da raiz foi ativo em *T. mentagrophytes* LMGO 09, sendo que os demais extratos não apresentaram atividade nessa espécie de fungo. Já em *T. rubrum* LMGO 06 e *T. tonsurus* LMGO 45, apenas o extrato acetato de etila da folha de *N. theifera* não foi ativo, sendo que os restantes foram considerados ativos em ambas as espécies.

Todos os extratos que tiveram o  $CI_{50}$  determinado em *L.(L.) amazonensis* (Tabela 4) também foram muito ativos em pelo menos três espécies dos fungos testados (Tabela 5). Essa atividade em ambos os tipos de micro-organismos é interessante na pesquisa de compostos líderes no tratamento destas infecções. A anfotericina B apresenta esse perfil de atividade biológica, sendo utilizada tanto no tratamento de infecções sistêmicas em pacientes imunocomprometidos causadas por leveduras, além de ser a segunda linha de tratamento de leishmaniose (REYNOLDS, 2009; SUNDAR *et al.*, 2010).

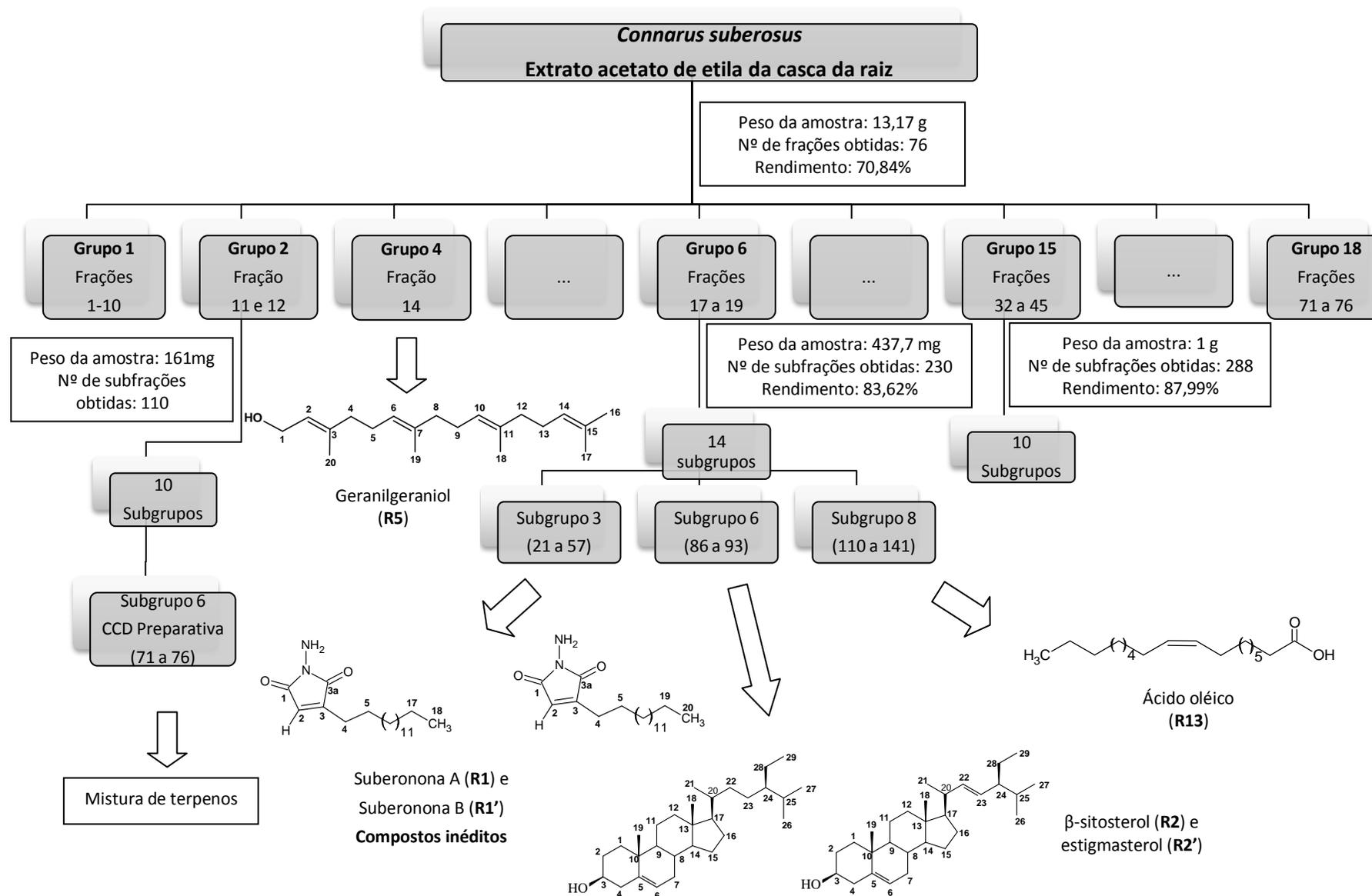


**Figura 15:** Porcentagem de extratos brutos ativos nos fungos testados ( $CIM \leq 125 \mu\text{g/mL}$ ) e em *L. (L.) amazonensis* ( $CI_{50} \leq 100 \mu\text{g/mL}$ ). *Neea theifera* (em cinza escuro); *Myrcia linearifolia* (em cinza claro) e *Connarus suberosus* (em preto). Em parênteses: total de extratos brutos produzidos a partir de cada espécie vegetal. *T.*: *Trichophyton*; *C.*: *Candida*. Cepas ATCC: American Type Culture Collection. LMGO: isolados clínicos de pacientes.

#### 4.1. Fracionamento químico

Considerando os critérios atividade biológica, rendimento, quantidade e polaridade foi feita a seleção do extrato acetato de etila da casca da raiz de *C. suberosus* para o fracionamento químico. Dessa forma, 13,17 g do extrato foram submetidos ao fracionamento em cromatografia em coluna aberta de sílica. Foram obtidas 76 frações, que foram reunidas em 18 grupos (Tabela 6) após análise comparativa em cromatografia em camada delgada (CCD). O rendimento dos grupos obtidos foi de 70,84%, sendo que o grupo 16 apresentou o maior rendimento (22,09%). Segue abaixo o fluxograma do fracionamento do extrato. (Figura 16).

Figura 16: Fracionamento do extrato acetato de etila da casca da raiz de *C. suberosus*.



**Tabela 6:** Fracionamento do extrato acetato de etila da casca da raiz de *C. suberosus* em cromatografia em coluna de sílica, com rendimento de 70,84%.

Grupo	Fração	Eluente	Peso (mg)
1	1 a 10	Hexano/Acetato (90:10)	8,20
2	11 e 12	Hexano/Acetato (80:20)	161,00
3	13	Hexano/Acetato (70:30)	20,00
4	14	Hexano/Acetato (70:30)	1,11
5	15 e 16	Hexano/Acetato (60:40)	119,00
6	17 a 19	Hexano/Acetato (40:60)	437,70
7	20	Hexano/Acetato (40:60)	163,60
8	21	Hexano/Acetato (30:70)	42,50
9	22	Hexano/Acetato (30:70)	30,70
10	23	Hexano/Acetato (20:80)	38,30
11	24 a 26	Hexano/Acetato (10:90)	146,60
12	27	Acetato 100%	237,50
13	28 e 29	Acetato/Metanol (99,9/0,1)	599,60
14	30 e 31	Acetato/Metanol (99,8/0,2)	799,45
15	32 a 45	Acetato/Metanol (97/3)	2.665,30
16	46 a 69	Metanol/Ácido acético (99/1)	2.909,60
17	70	Metanol/Ácido acético (97/3)	70,89
18	71 a 76	Metanol/Ácido acético (95/5)	879,00

O grupo 4 foi recuperado e nomeado **R5** e identificado como sendo o **geranilgeraniol**.

Posteriormente foi feita a análise do perfil de cada grupo em CCD e os grupos 2, 6 e 15 foram selecionados para continuidade do fracionamento, por apresentarem maior possibilidade de isolamento, com bandas melhor definidas e mais espaçadas.

O fracionamento do grupo 2 (161 mg) gerou 110 subfrações que foram reunidas em 10 subgrupos (Tabela 7), conforme análise em CCD. O rendimento da coluna foi de 42,56%, o que indica que houve uma perda considerável ao longo do procedimento. Foi feita uma CCD preparativa do subgrupo 6, e uma banda de coloração azul foi recuperada. Foi possível visualizar por meio da análise dos espectros de RMN que se tratava de uma mistura de terpenos.

**Tabela 7:** Fracionamento do Grupo 2 oriundo do extrato acetato de etila da casca da raiz de *C. suberosus* em cromatografia em coluna de sílica, com rendimento de 42,56%.

Subgrupo	Subfração	Eluente	Peso (mg)
1	1 a 6	Ciclo 100%	3,50
2	7 a 14	Ciclo 100%	1,70
3	15 a 49	Ciclo/Acetato (99:1)	2,80
4	50 a 55	Ciclo/Acetato (99:1)	1,90
5	56 a 70	Ciclo/Acetato (99:1)	6,30
6	71 a 76	Ciclo/Acetato (99:1)	3,50
7	77 a 85	Ciclo/Acetato (98:2)	5,60
8	86 a 89	Ciclo/Acetato (98:2)	3,80
9	90 a 98	Ciclo/Acetato (95:5)	23,90
10	99 a 110	Metanol 100%	15,1

O fracionamento do grupo 6 (437,7 mg) gerou 230 subfrações, que foram reunidas em 14 subgrupos (Tabela 8), de acordo com o perfil em CCD. O rendimento da coluna foi de 83,62%. O subgrupo 3 nomeado **R1** e **R1'** foi amplamente caracterizado e denominado pelo nosso grupo como uma mistura de **suberonona A** e **suberonona B**, respectivamente, e correspondem a compostos não relatados previamente na literatura. O subgrupo 6 nomeado **R2** e **R2'** foi identificado como uma mistura de  **$\beta$ -sitosterol** e **estigmasterol**, respectivamente. E o subgrupo 8 nomeado **R13** foi identificado como **ácido oléico**.

**Tabela 8:** Fracionamento do Grupo 6 oriundo do extrato acetato de etila da casca da raiz de *C. suberosus* em cromatografia em coluna de sílica, com rendimento de 83,62%

Subgrupo	Subfração	Eluente	Peso (mg)
1	1 a 4	Hexano/Dicloro (60:40)	2,50
2	5 a 20	Hexano/Dicloro (60:40)	26,40
3	21 a 57	Hexano/Dicloro (60:40)	46,09
4	58 a 71	Hexano/Dicloro (50:50)	15,00
5	72 a 85	Hexano/Dicloro (40:60)	34,40
6	86 a 93	Hexano/Dicloro (30:70)	42,70
7	94 a 109	Dicloro 100%	25,00
8	110 a 141	Dicloro/Metanol (80:20)	17,00
9	142 a 147	Dicloro/Metanol (80:20)	7,00
10	148 a 151	Dicloro/Metanol (60:40)	107,8
11	152 a 165	Dicloro/Metanol (60:40)	17,1
12	166 a 181	Dicloro/Metanol (40:60)	16,5
13	182 a 210	Metanol 100%	7,4
14	211 a 230	Metanol/Água (95:5)	1,10

Já o fracionamento do grupo 15 (1000 mg) gerou 288 subfrações, que foram reunidas em 10 subgrupos (Tabela 9), após análise do perfil em CCD. O rendimento da coluna foi de 87,99%. Porém, devido à elevada polaridade do referido grupo, não foi possível o isolamento de nenhuma substância, considerando que os subgrupos apresentavam uma considerável quantidade de impurezas.

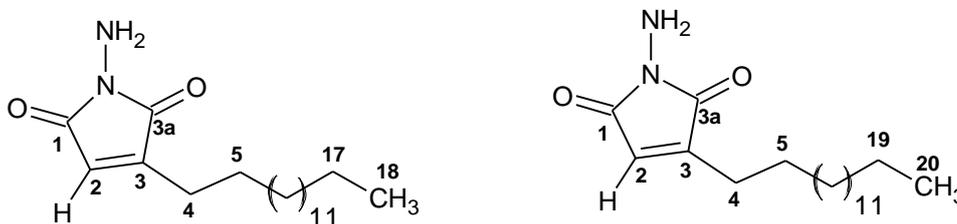
**Tabela 9:** Fracionamento do Grupo 15 oriundo do extrato acetato de etila da casca da raiz de *C. suberosus* em cromatografia em coluna de sephadex, com rendimento de 87,99%.

Subgrupo	Subfração	Eluente	Peso (mg)
1	1 a 7	Metanol 100%	1,70
2	8 a 20	Metanol 100%	14,10
3	21 a 38	Metanol 100%	29,10
4	39 a 51	Metanol 100%	56,10
5	51 a 62	Metanol 100%	35,20
6	63 a 65	Metanol 100%	14,00
7	66 a 88	Metanol 100%	126,00
8	89 a 135	Metanol 100%	305,00
9	136 a 279	Metanol/Ácido acético (97:3)	230,00
10	280 a 288	Metanol/Ácido acético (97:3)	68,7

#### 4.1.1. Mistura dos compostos R1 e R1'

O fracionamento do grupo 6 oriundo do extrato acetato de etila da casca da raiz de *Conarus suberosus* levou à obtenção de um sólido cristalino de cor alaranjada, que foi inicialmente denominado **R1**. A amostra isolada foi submetida a análises espectrométricas para a sua identificação.

A interpretação conjunta dos dados permitiu visualizar a presença de uma mistura de dois compostos, sendo o composto majoritário denominado **R1** e o composto minoritário denominado **R1'**. Estes compostos foram respectivamente nomeados pelo nosso grupo de pesquisa por suberonona A e suberonona B, com as nomenclaturas sistemáticas *N*-amino-3-pentadecil-pirrolidina-3-en-2,5-diona (**R1**) e *N*-amino-3-heptadecil-pirrolidina-3-en-2,5-diona (**R1'**) (Figura 17). A fórmula molecular estabelecida foi  $C_{19}H_{34}N_2O_2$  (**R1**) e  $C_{21}H_{38}N_2O_2$  (**R1'**). Os compostos **R1** e **R1'** ainda não haviam sido descritos na literatura.



**Figura 17:** Estruturas químicas de **suberonona A (R1)** (à esquerda) e **suberonona B R1'** (à direita).

O espectro de RMN  $^1H$  (500 MHz,  $C_5D_5N$ , Figura 19, p. 75) de **R1** apresentou um sinal de hidrogênio ligado a carbono  $sp^2$  em  $\delta$  6,26 ( $H_3$ , s) e um sinal de H ligado a carbono  $\alpha$  a carbono  $sp^2$  em  $\delta$  2,82 ( $H_5$ , t,  $J = 7,5$  Hz) e sinais entre  $\delta$  1,8 e 0,7 característicos de cadeia hidrocarbônica longa.

O espectro de RMN  $^{13}C$ -BB (125 MHz,  $C_5D_5N$ , Figura 20, p. 76) de **R1** mostrou 13 linhas espectrais, dos quais oito sinais ( $\delta$  23,74; 29,34; 30,60; 30,43; 30,07; 32,60; 23,40 e 14,75) foram condizentes com a presença de uma cadeia hidrocarbônica

longa, ligada a carbono  $sp^2$ . Foram observados ainda sinais em  $\delta$  118,8 e 105,0 característico de ligação dupla trissubstituída e sinais de carbonos carbonílicos em  $\delta$  174,0 e 171,5.

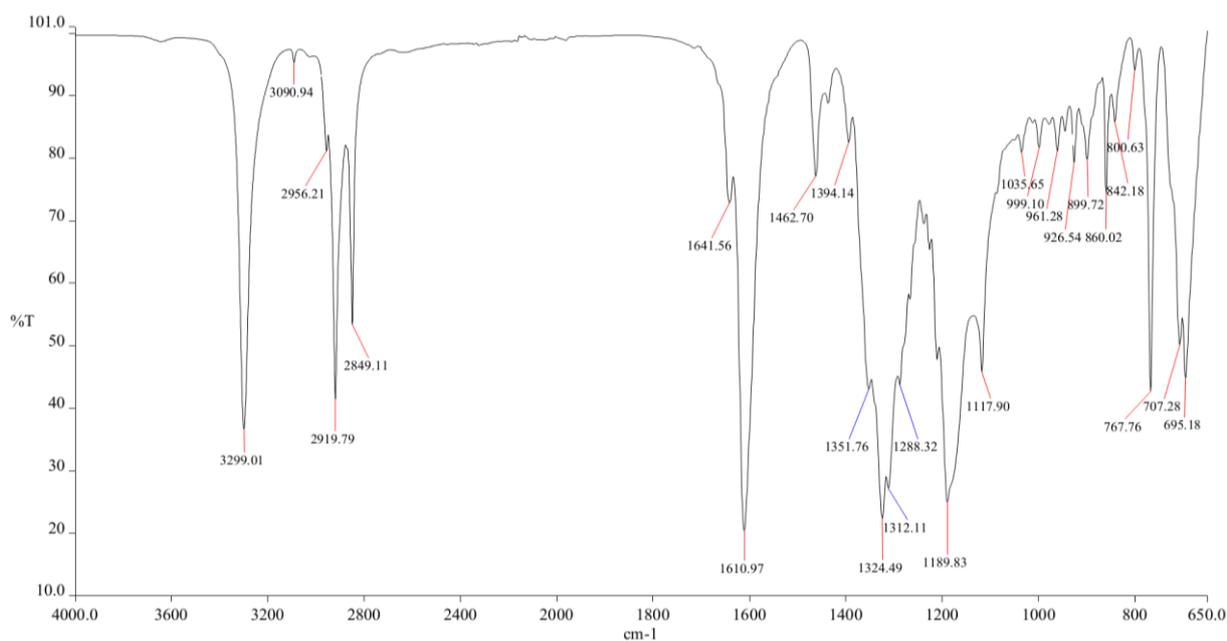
A análise do espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear a uma ligação ( $^1H$ ,  $^{13}C$  – HSQC) (Figura 23, p. 79) corroborou com o padrão de hidrogenação proposto para cada carbono (Tabela 10, p. 74).

O espectro de RMN-HMBC (Figura 25, p. 81) ratificou a estrutura elucidada à medida que revelou importantes acoplamentos a longa distância. Dentre eles, o acoplamento a três ligações ( $^3J_{CH}$ ) entre os hidrogênios metilênicos 2H-5 ( $\delta$  2,82) com a carbonila C-4a ( $\delta$  171,5) e os acoplamentos do hidrogênio olefínico H-3 ( $\delta$  6,26) a três ligações ( $^3J_{CH}$ ) com os carbonos C-1 ( $\delta$  175,0), C-4a ( $\delta$  171,5) e C-5 ( $\delta$  23,7).

As fórmulas moleculares  $C_{19}H_{34}N_2O_2$  (**R1**) e  $C_{21}H_{38}N_2O_2$  (**R1'**) foram obtidas a partir do íon quasi-molecular (Figura 26, p. 82),  $[M-H]$  com  $m/z$  345.2028 (**R1**)  $[M + Na]^+$  e  $m/z$  373.2344 (**R1'**)  $[M + Na]^+$  no espectro de massa de alta resolução (EM-IE, Figura 27, p. 82), correspondente a um Índice de Deficiência de Hidrogênio igual a 4. Esta informação associada à análise dos espectros de RMN indicou a estrutura de um anel pirrolidina-3-en-2,5-diona com duas carbonilas conjugadas com uma ligação dupla, e esta ligada a uma cadeia hidrocarbônica longa.

**Tabela 10:** Correlações HSQC e HMBC de **R1** e **R1'**.

Posição	HSQC		HMBC	
	$\delta_C$	$\delta_H$	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$
<b>C</b>				
2	173.95	-	H-3	
5	118,78	-	2H-1'	
4	171.54	-		H-2; 2H-1'
<b>CH</b>				
3	104.95	6.26 (s)		
<b>CH<sub>2</sub></b>				
1'	23.74	2.82 (t, 7.5)		
2'	29.34	1.75 (m)	2H-1'	
3'	30.60	1.44 (m)		
4'	30.43	1.33 (m)		
5'-12'/	30.43 - 30.07	1.26 - 1.24		
5'-14'				
13'/15'	32.60	1.24		3H-15'/3H-17'
14'/16'	23.40	1.26	3H-15'/3H-17'	
<b>CH<sub>3</sub></b>				
15'/17'	14.75	0.81 (t, 6.2)	2H-14'/2H-16'	2H-13'/2H-15'

**Figura 18:** Espectro de absorção na região do infravermelho de **R1** e **R1'**.

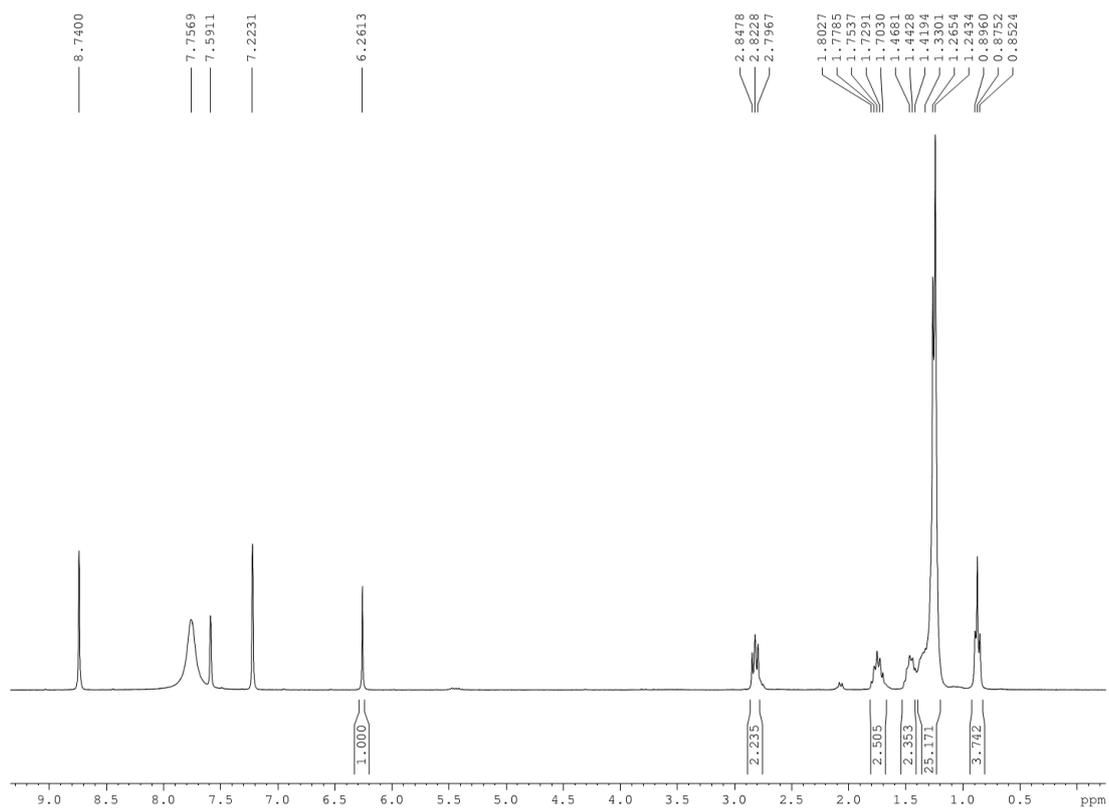
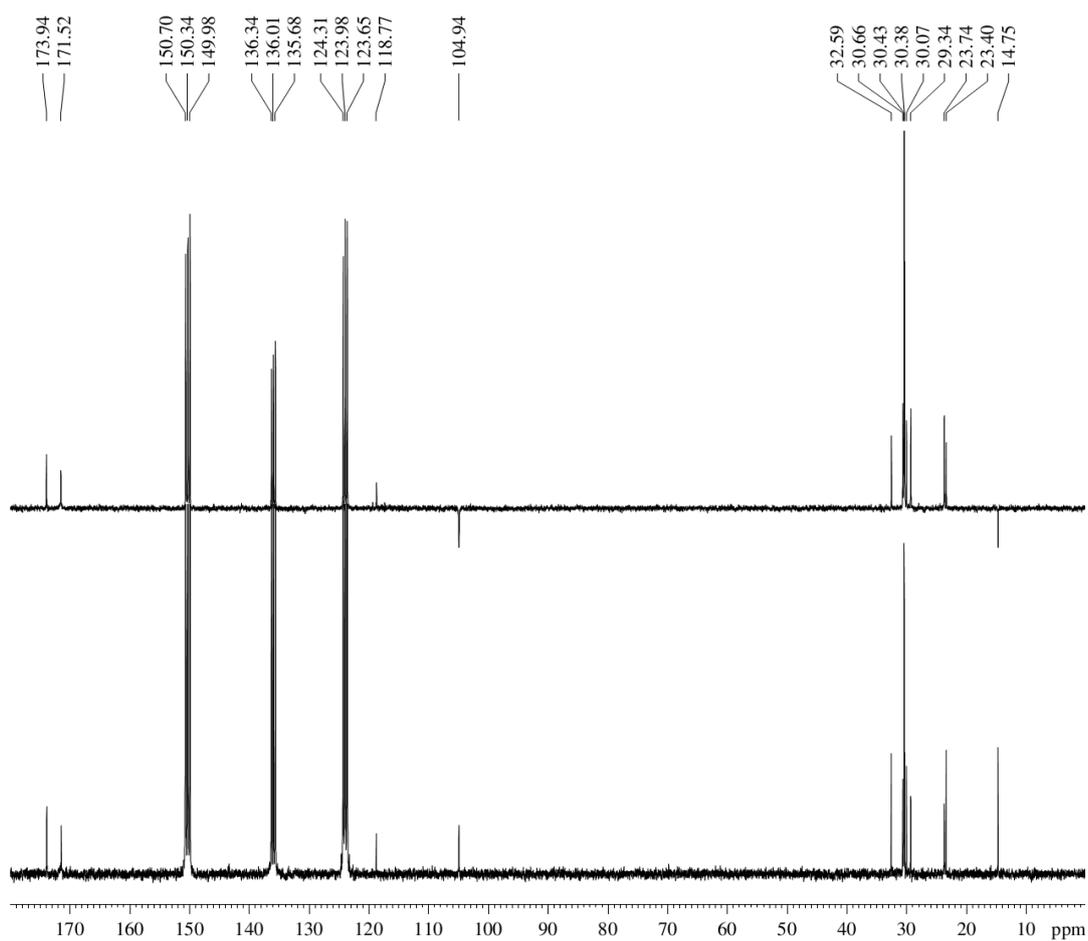
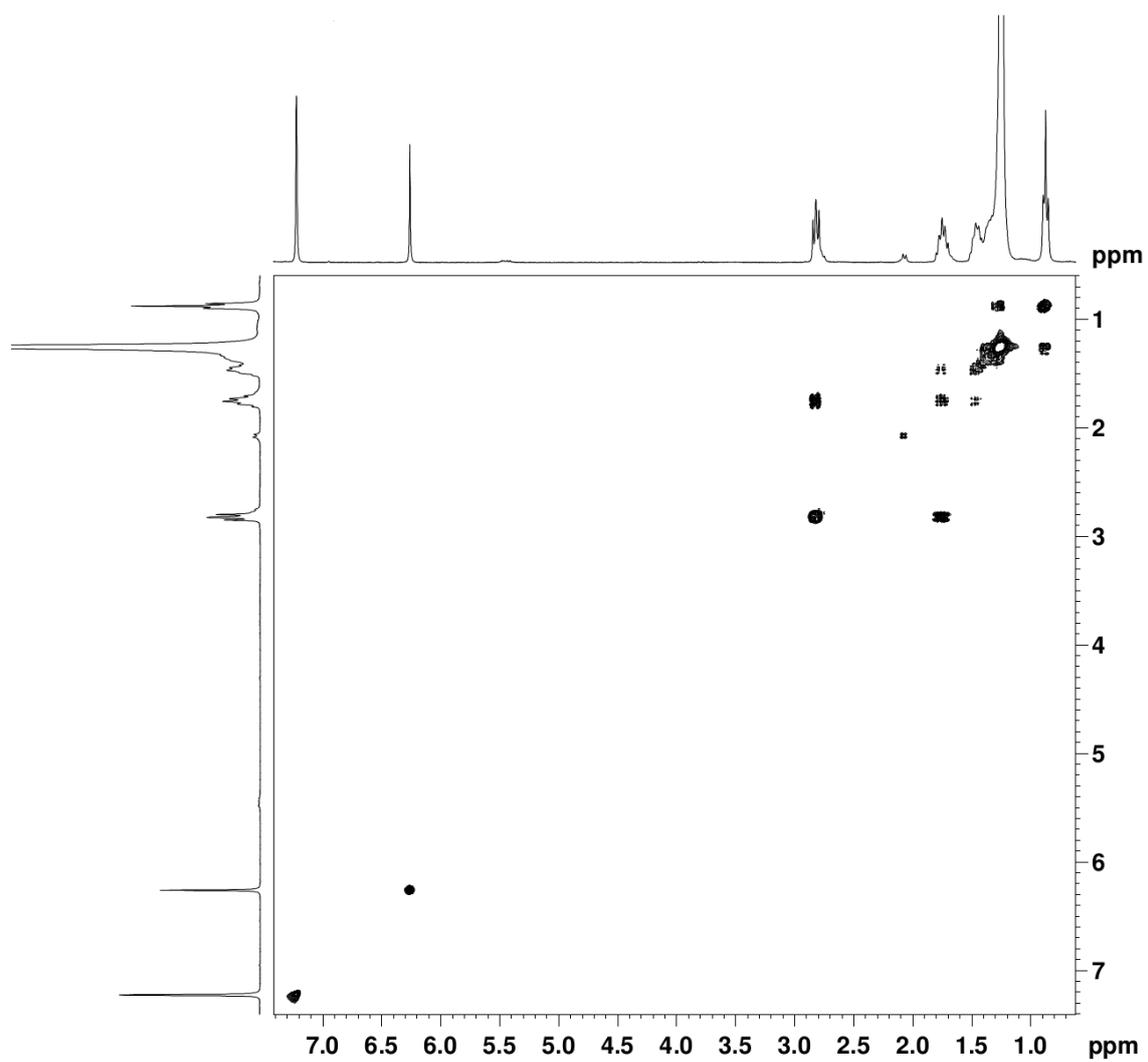


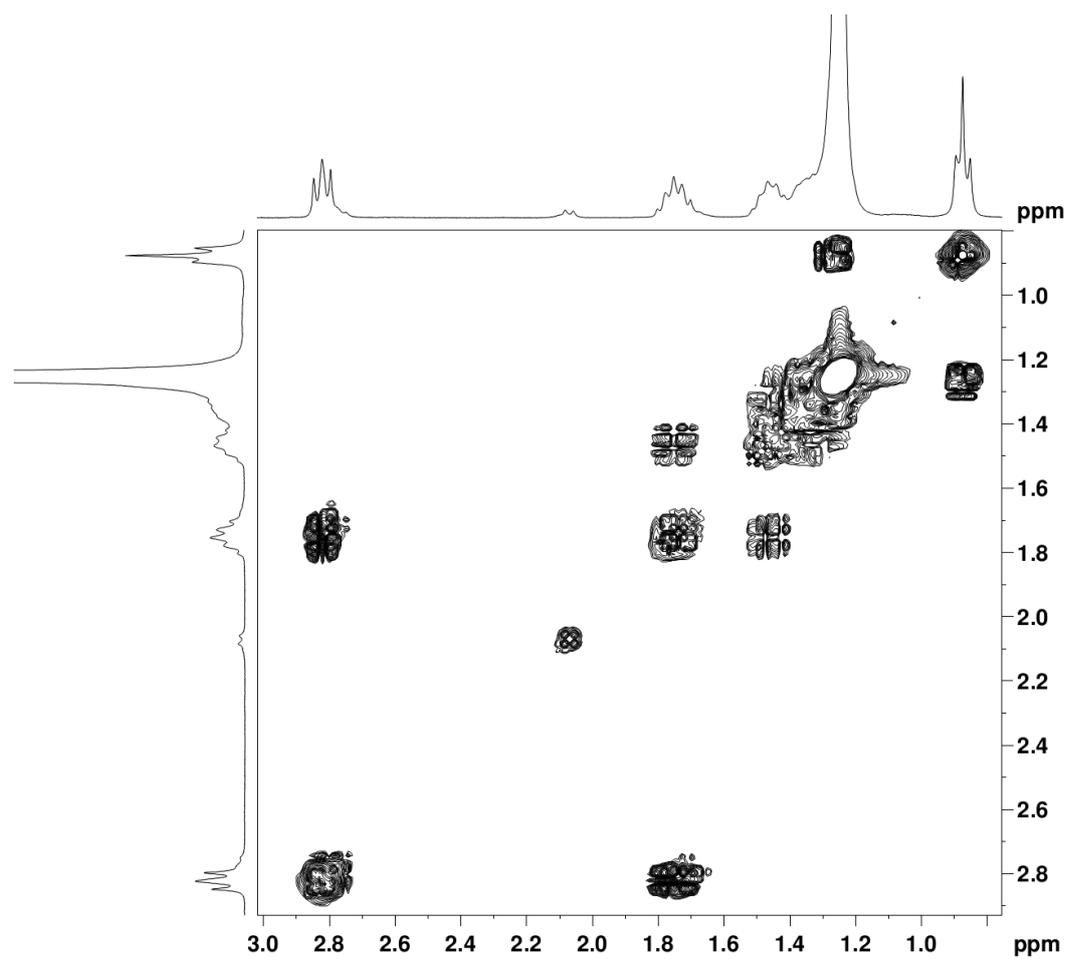
Figura 19: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de R1 e R1' (500 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ).



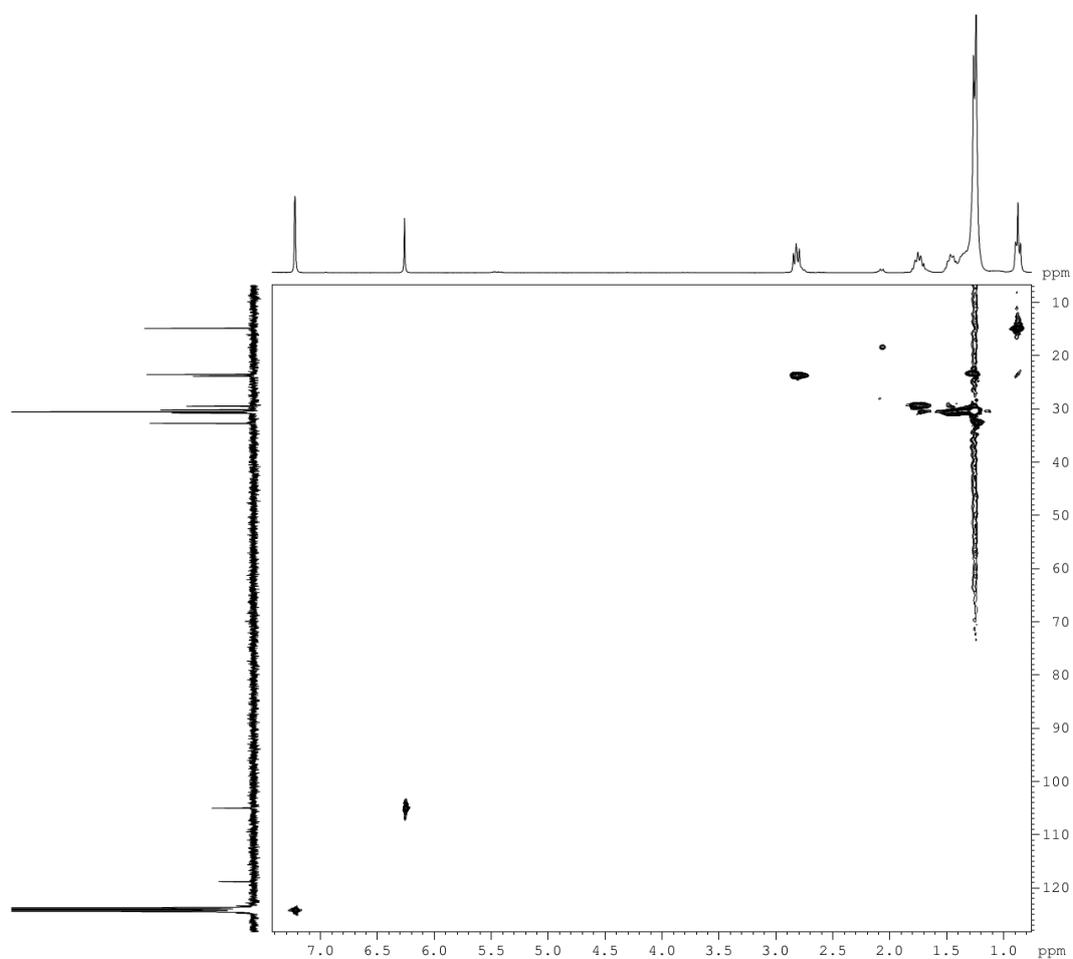
**Figura 20:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -CPD e APT de **R1** e **R1'** (125 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ).



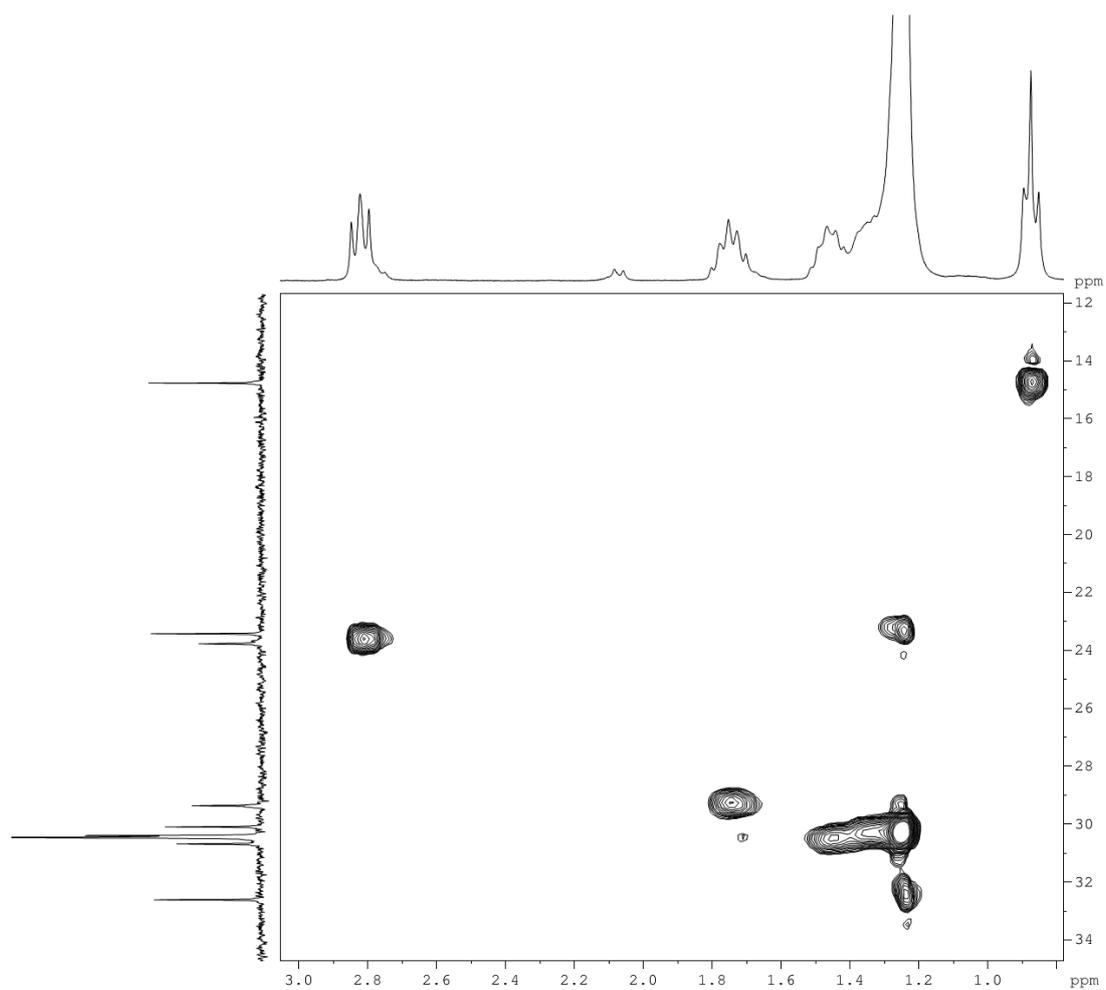
**Figura 21:** Espectro de RMN bidimensional de correlação homonuclear  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$  – COSY de R1 e R1'.



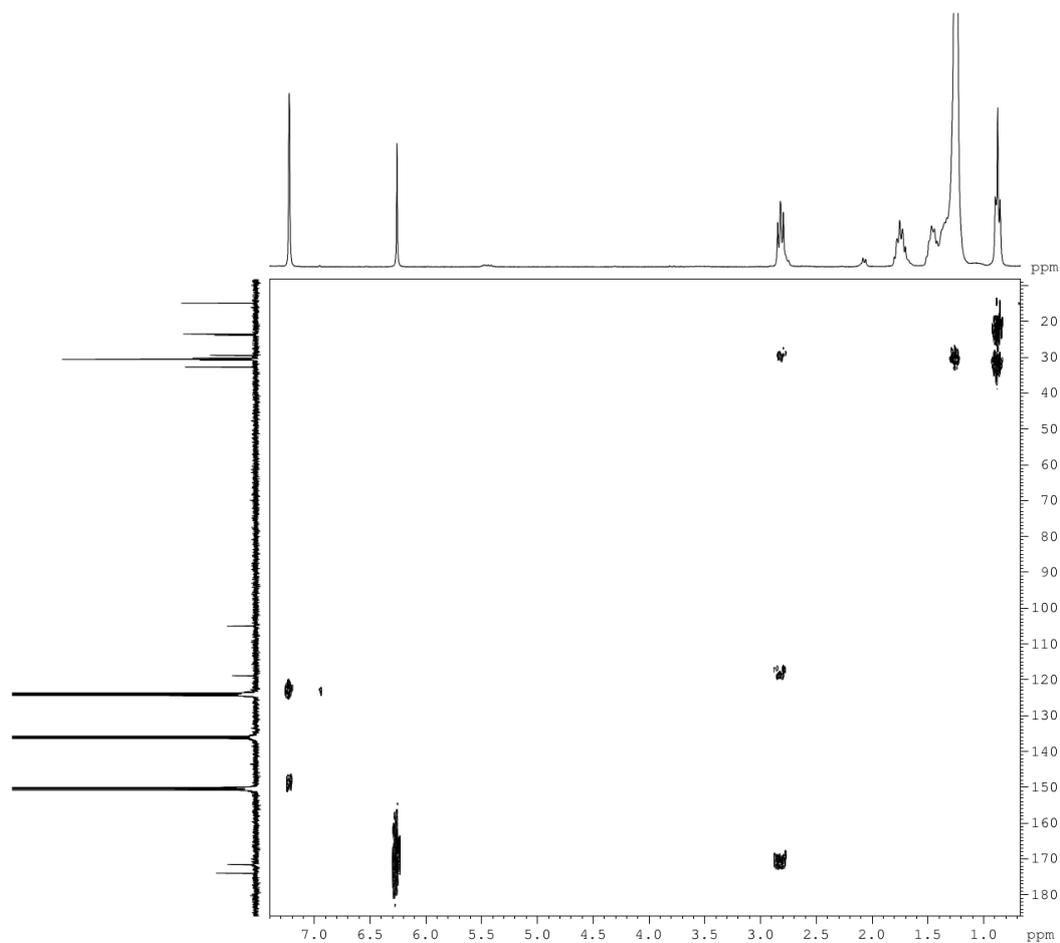
**Figura 22:** Expansão do espectro de RMN bidimensional de correlação homonuclear  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$  – COSY de R1 e R1'.



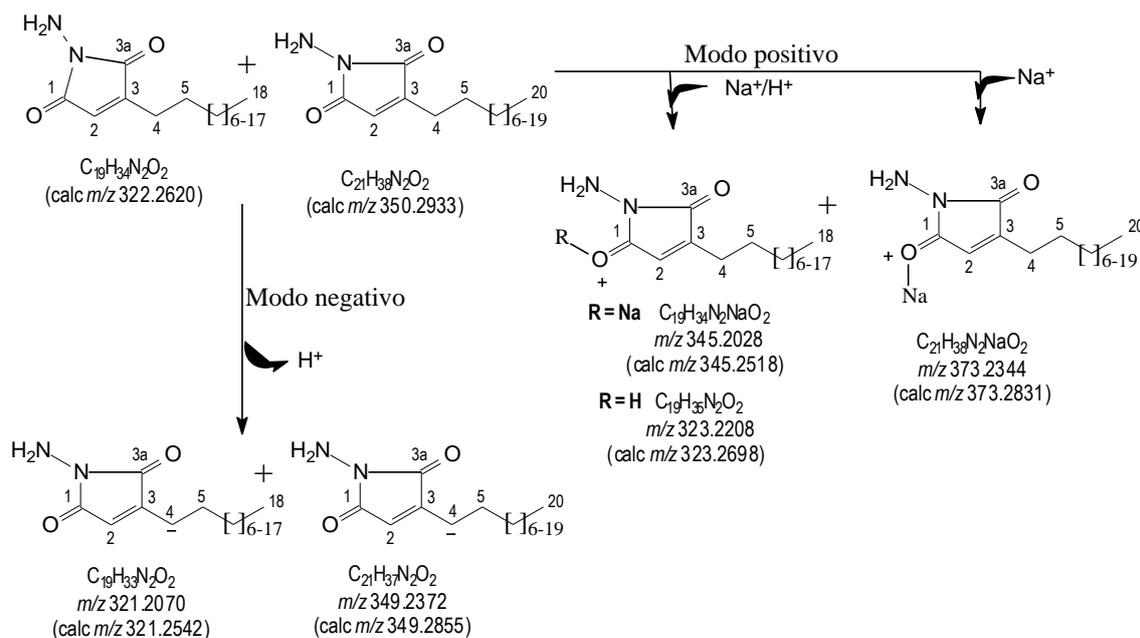
**Figura 23:** Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  – HSQC de R1 e R1'.



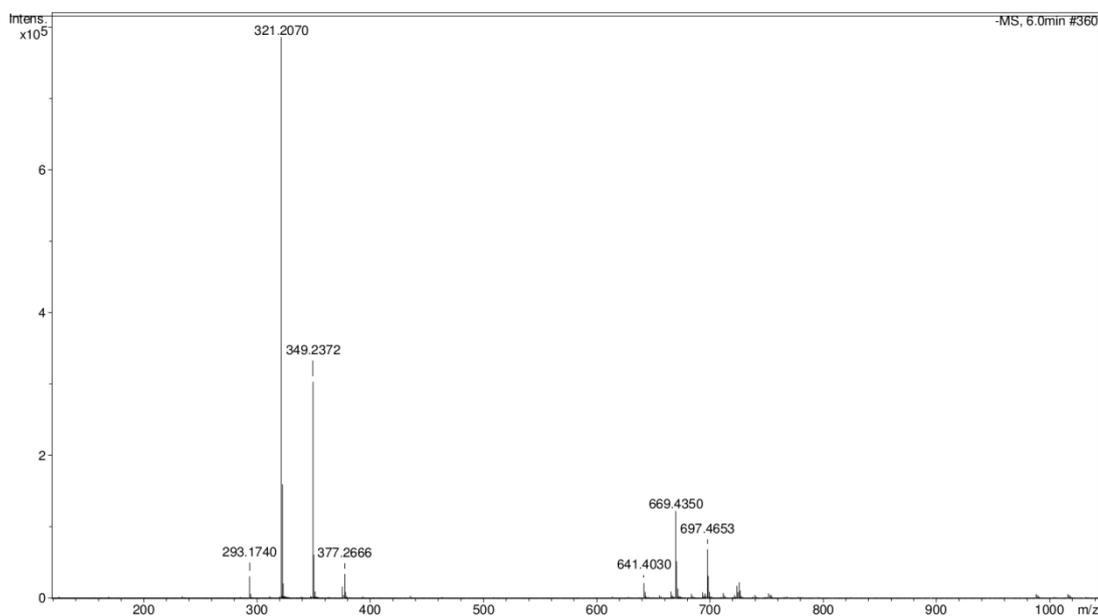
**Figura 24:** Expansão do espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  – HSQC de **R1** e **R1'**.



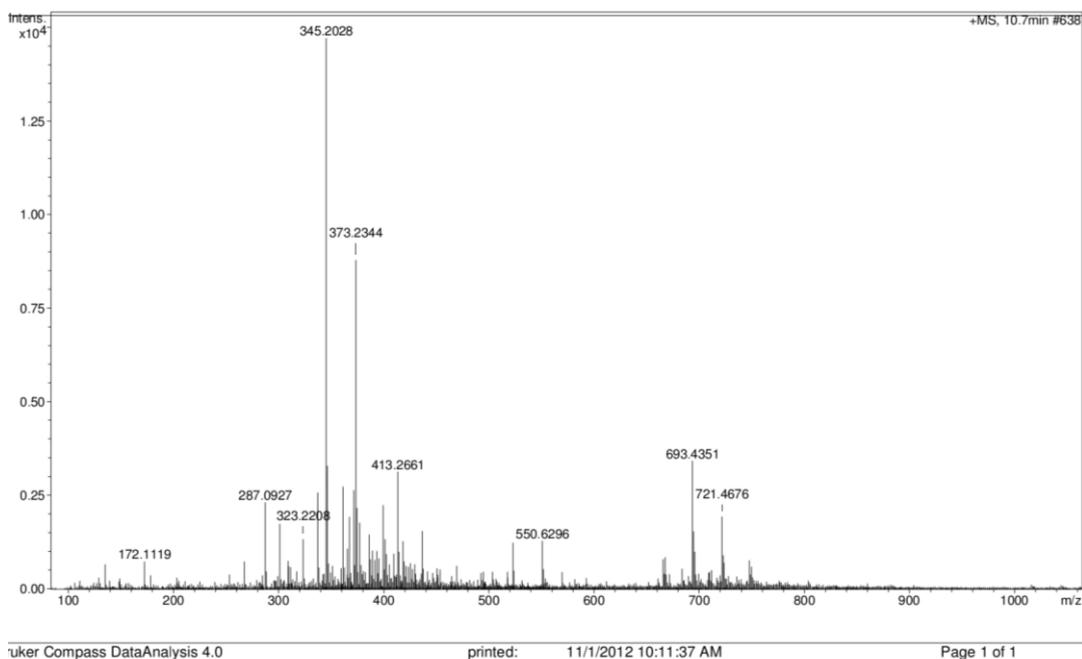
**Figura 25:** Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  – HMBC de R1 e R1'.



**Figura 26:** Mecanismo de ionização proposto para a formação dos íons para justificar os principais picos observados no ESI-HRMS (modo positivo e modo negativo), de R1 e R1'.



**Figura 27:** Espectro de massa de alta resolução ESI-MS (erro de 16 ppm) em modo negativo  $[M-H]^-$  de R1 e R1'.



**Figura 28:** Espectro de massa de alta resolução (ESI-TOF) de **R1** e **R1'**.

A mistura suberonona A (**R1**) e suberonona B (**R1'**) foi testada em *L. (L.) amazonensis*, porém foi considerada inativa, com valor de  $CI_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$ . Foi feita também a avaliação da atividade antifúngica de **R1** e **R1'** nas leveduras *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *Candida glabrata* LMGO 44. A mistura **R1** e **R1'** foi considerada muito ativa em *Candida albicans* ATCC 10231, com valor de CIM de  $15,62 \mu\text{g/mL}$ , e em *Candida parapsilosis* ATCC 22019, com CIM de  $125 \mu\text{g/mL}$ . Já em *Candida glabrata* LMGO 44, o composto foi considerado ativo, com valor de CIM de  $250 \mu\text{g/mL}$ . A mistura **R1** e **R1'** demonstrou menor atividade biológica, em comparação com o extrato bruto.

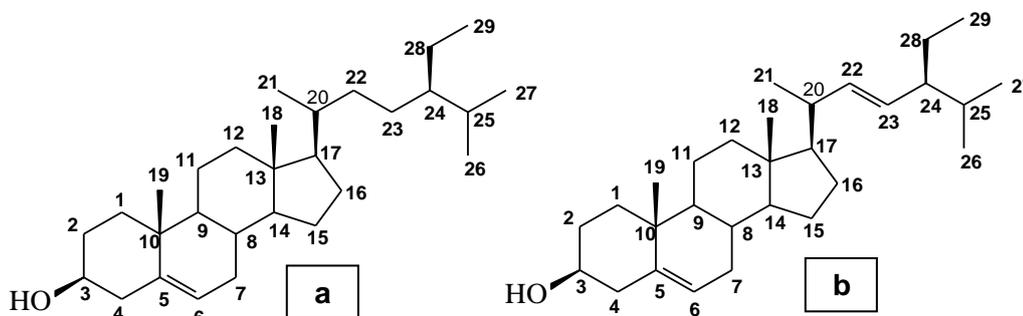
#### 4.1.2. Mistura dos compostos R2 e R2'

O fracionamento do grupo 6 do extrato acetato de etila da casca da raiz de *Conarus suberosus* levou à obtenção de um sólido cristalino de cor cinza, que foi inicialmente denominado **R2**.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 30, p. 85), obtido em  $\text{CDCl}_3$ , apresentou sinais entre  $\delta$  2,5-0,5 característicos da presença de esqueleto de terpeno ou esteróide. A presença de sinais referentes a uma ligação dupla na cadeia lateral entre os átomos de C-22 e C-23 (H-22 e H-23,  $\delta$  5,03 e  $\delta$  5,12 respectivamente), sugeriu a existência de uma mistura de fitoesteróis.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -BB (Figura 32, p. 87) apresentou mais de 40 linhas espectrais, confirmando a existência de uma mistura. Quatro linhas espectrais foram relacionadas a carbonos  $\text{sp}^2$  em  $\delta$ 121,9 e  $\delta$ 141,0 mais intensas e  $\delta$ 129,5 e  $\delta$ 138,5 menos intensas, características da mistura dos fitoesteróis  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol.

Sugere-se então, com base nos dados escritos acima e por comparação dos dados espectroscópicos (RMN  $^{13}\text{C}$ ) obtidos com os da literatura (GOAD, 1991), que a amostra é constituído pela mistura dos fitoesteróis com fórmula molecular  $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}$  e  $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}$ , denominados respectivamente **R2** e **R2'**, correspondentes às estruturas abaixo (Figura 29), conhecidas como  $\beta$ -sitosterol (**R2**) e estigmasterol (**R2'**).



**Figura 29:** Estrutura molecular dos esteróides  $\beta$ -sitosterol (**R2**) (a) e estigmasterol (**R2'**) (b).

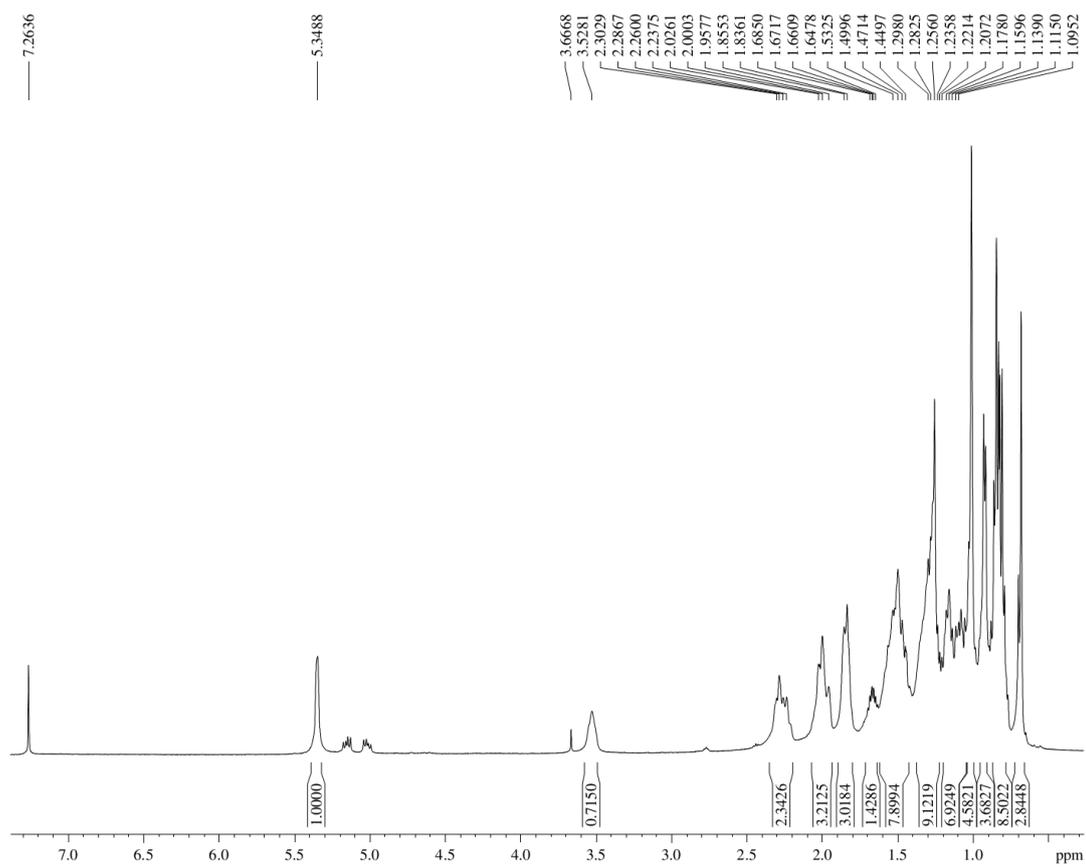


Figura 30: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **R2** e **R2'** (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

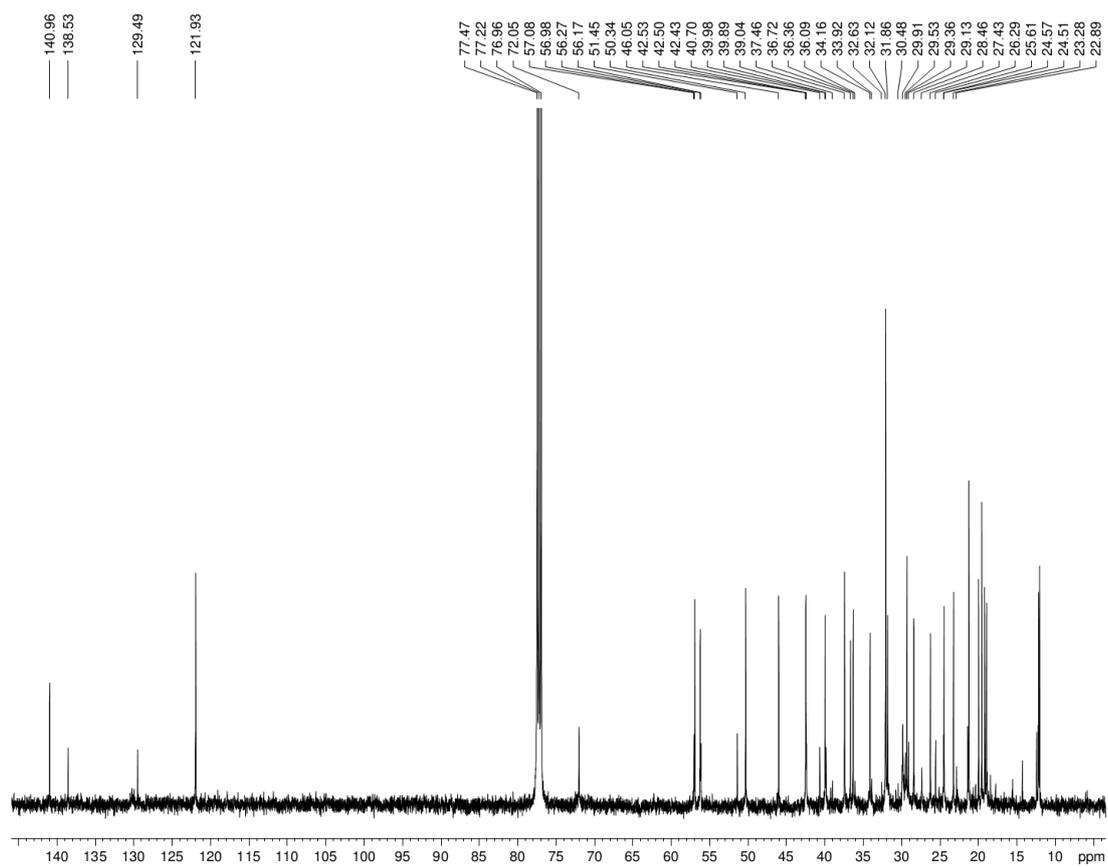


Figura 31: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de R2 e R2' (125 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ).

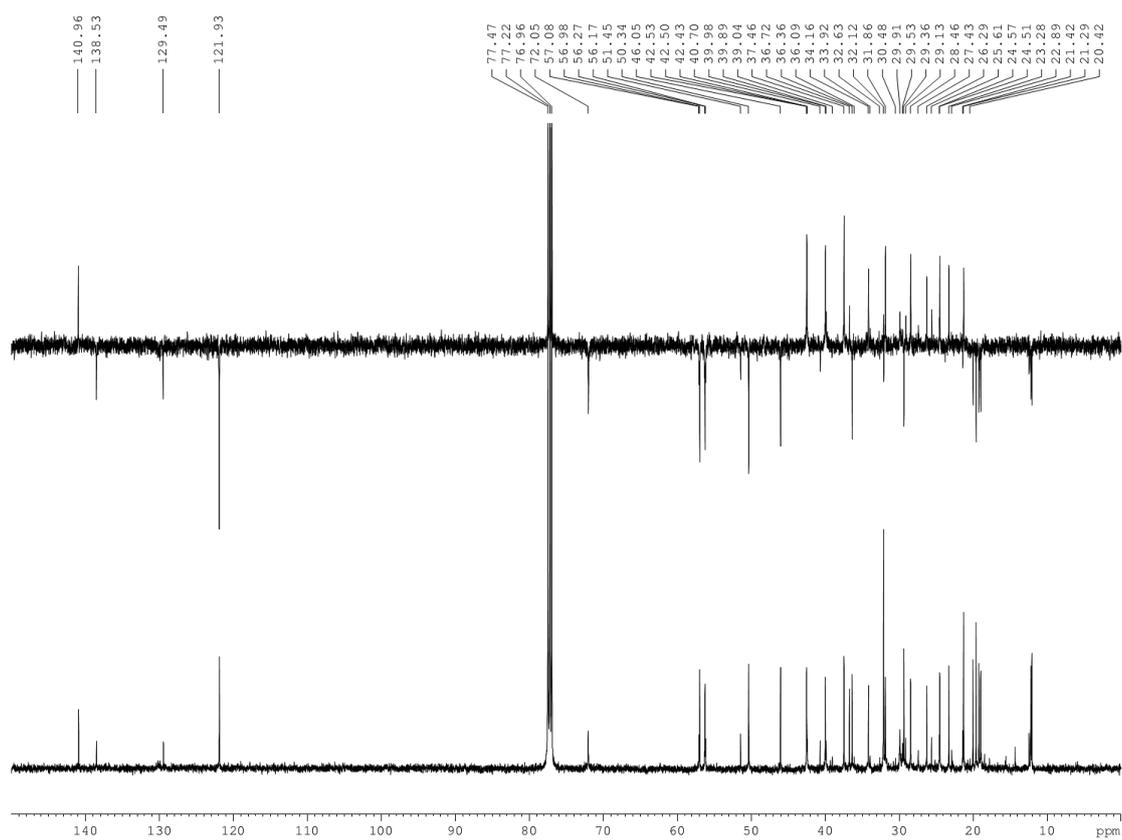
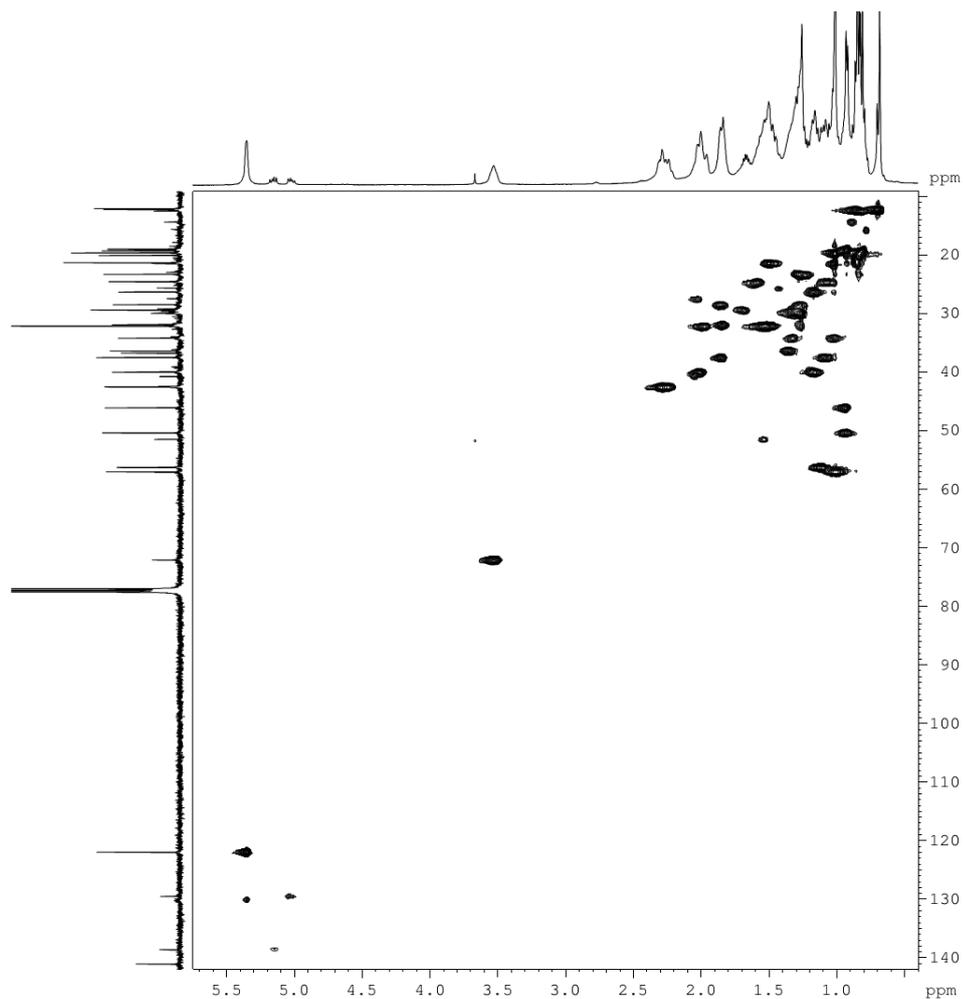


Figura 32: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -CPD e  $^{13}\text{C}$ -DEPT  $135^\circ$  de R2 e R2' (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



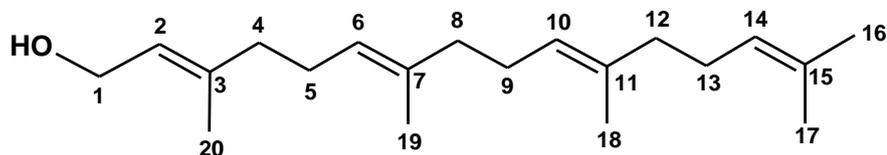
**Figura 33:** Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  – HSQC de R2 e R2'.

No estudo de LEE e colaboradores (2007), o derivado glicosídico de  $\beta$ -sitosterol - denominado daucosterol demonstrou atividade antifúngica *in vivo* contra a *Candida albicans*, ao proteger camundongos BALB/c de candidíase disseminada induzida. Foi demonstrada também na literatura atividade antileishmania de  $\beta$ -sitosterol em promastigotas de *L. (L.) chagasi* (ALBERNAZ *et al.*, 2011). Outras atividades descritas são antiolesterol (LEUSCH & ANMACLATCHY, 2003), antiasmática (YUK *et al.*, 2007), antioxidante (HIDALGO *et al.*, 2009), anti-inflamatória (SUNTAR *et al.*, 2012) e anticâncer (AWAD *et al.*, 2007).

Em relação ao estigmasterol também já foram relatadas atividades anticolesterol (LAW, 2000), antimicrobiana, anti-inflamatória e anticâncer (AWAD & FINK, 2000).

### 4.1.3. Composto R5

O fracionamento do extrato acetato de etila da casca da raiz de *Conarus suberosus* permitiu o isolamento de um composto, presente no grupo 4, de cor amarelada, denominado **R5**, que foi identificado como geranilgeraniol (Figura 34).



**Figura 34:** Estrutura do composto geranilgeraniol (**R5**).

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , Figura 35, p. 91) apresentou um sinal em  $\delta$  5,12 (H-2, H-6, H-10, H-14, t,  $J = 6,1$ ) referente a quatro hidrogênios olefínicos; um singleto em  $\delta$  1,60 integrado para 12 hidrogênios (H-17, H-18, H-19, H-20) e outro em  $\delta$  1,69 (3H-16, s) referentes a 5 grupamentos metila; sinais de hidrogênios metilênicos em  $\delta$  2,00 (2H-4, 2H-8 e 2H-12, m) e 2,07 (2H-5, 2H-9 e 2H-13, m) e ainda um sinal de hidrogênio metilênico oxigenado em  $\delta$  3,99 (2H-1, d,  $J = 6,9$ ), sugerindo a estrutura de um fragmento geranil fundido a um geraniol em sequência.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -CPD (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , Figura 36, p. 92) mostrou 20 sinais compatíveis com a estrutura do composto geranilgeraniol, como sugerido no espectro de RMN  $^1\text{H}$ . O sinal de carbono  $\text{sp}^3$  oxigenado em  $\delta$  61,36 C-1, com amplitude negativa no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT 135 $^\circ$  (Figura 37, p. 93), ratificou os dados obtidos, que foram confirmados pela comparação destes dados com os descritos na literatura para este composto (RADETICH, 2002).

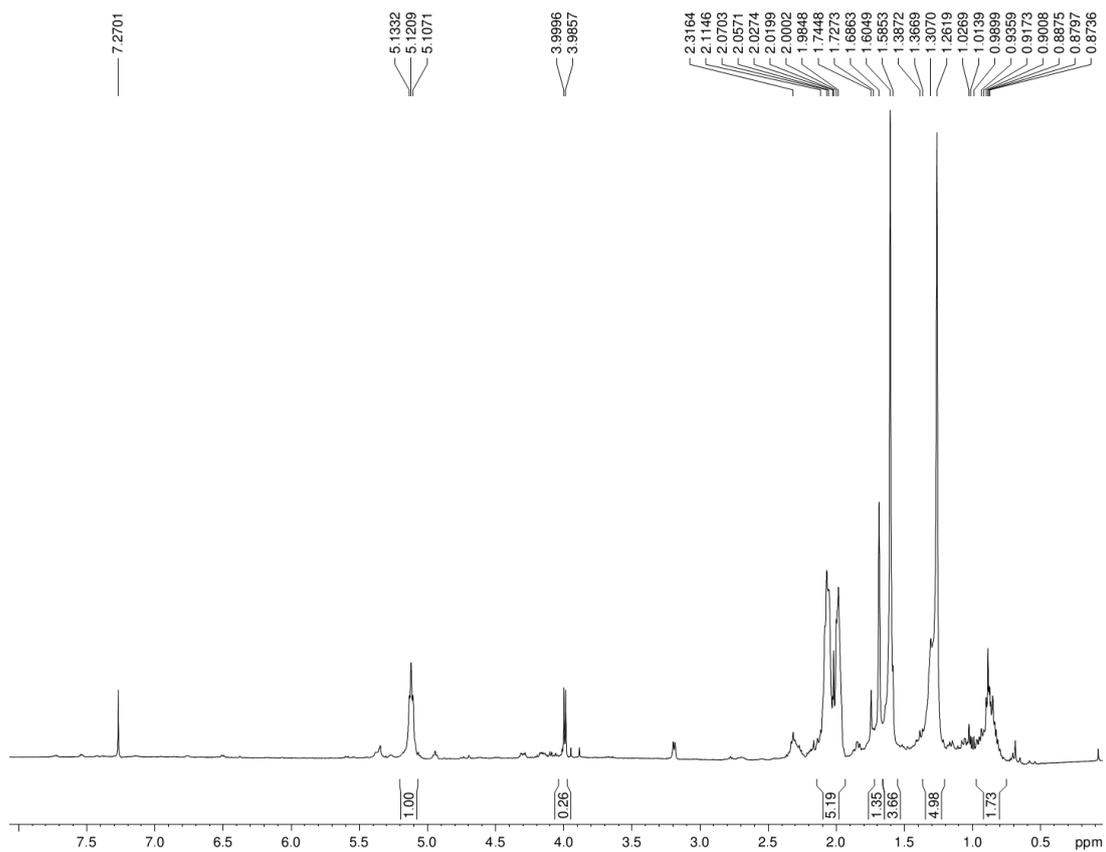
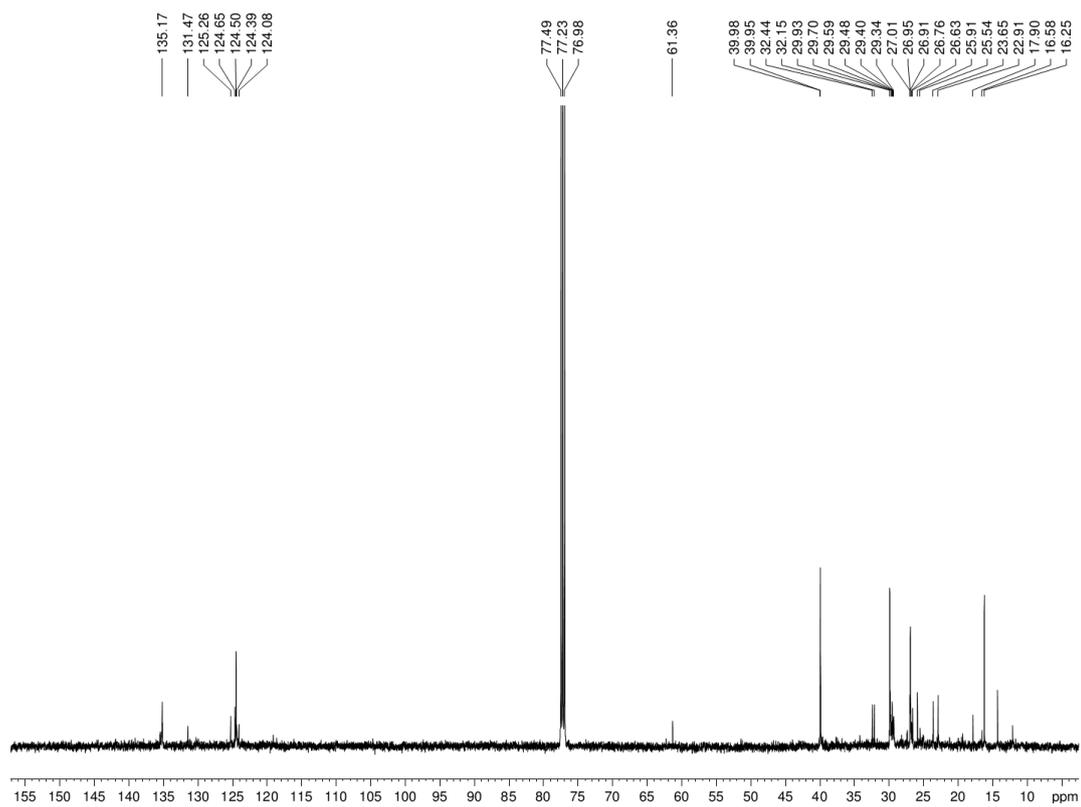


Figura 35: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de R5 (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



**Figura 36:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de R5 (125 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ).

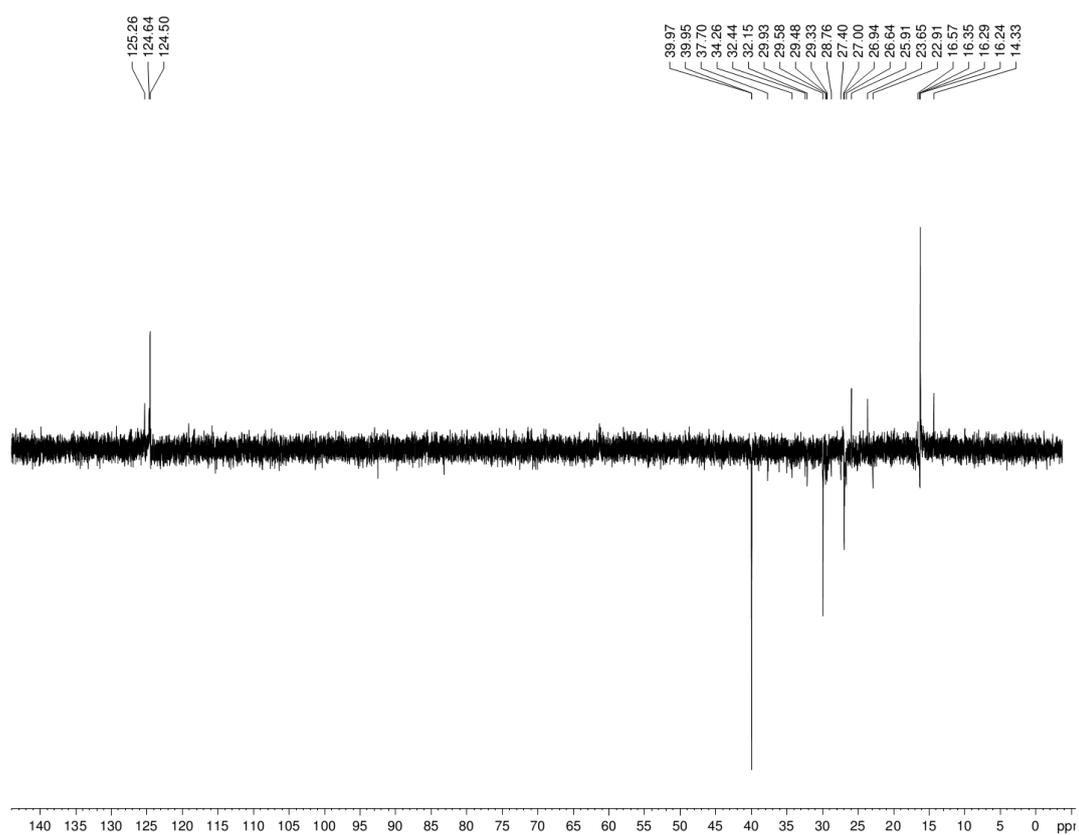
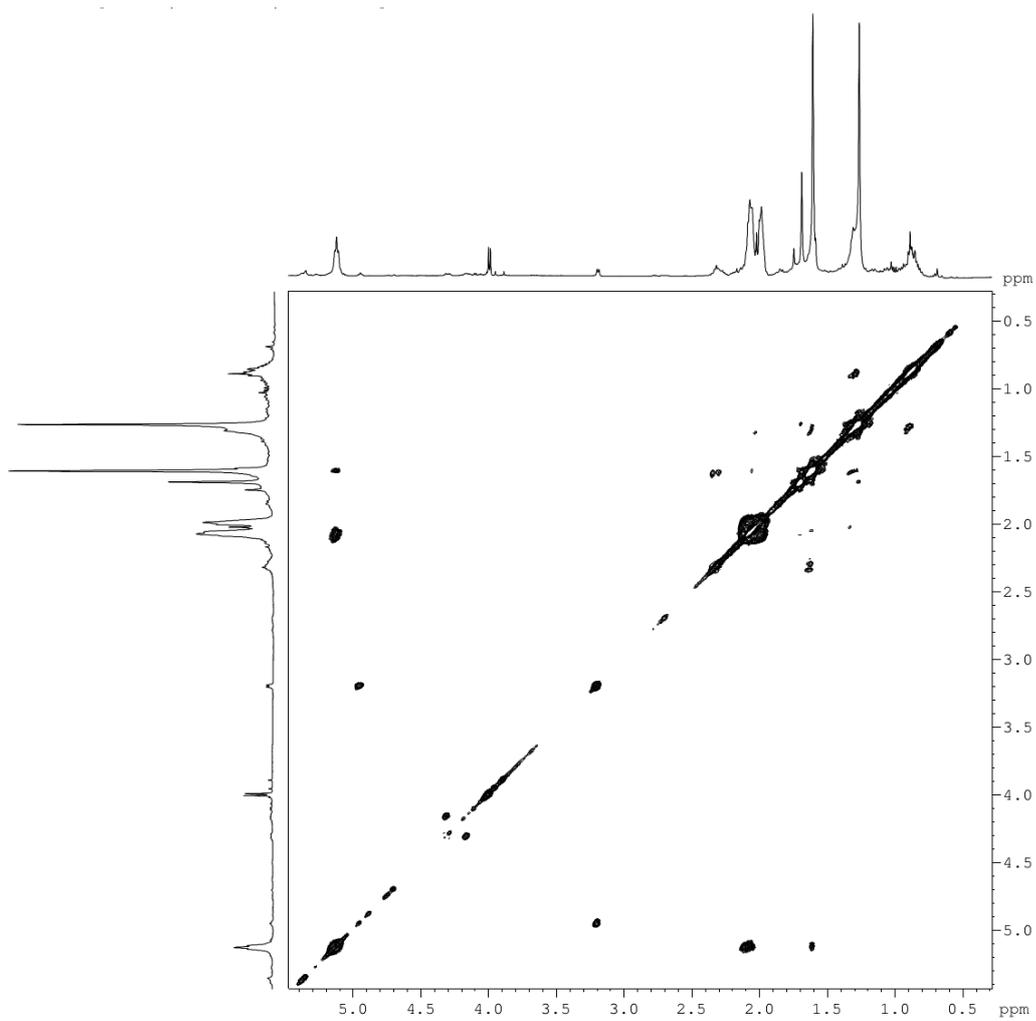
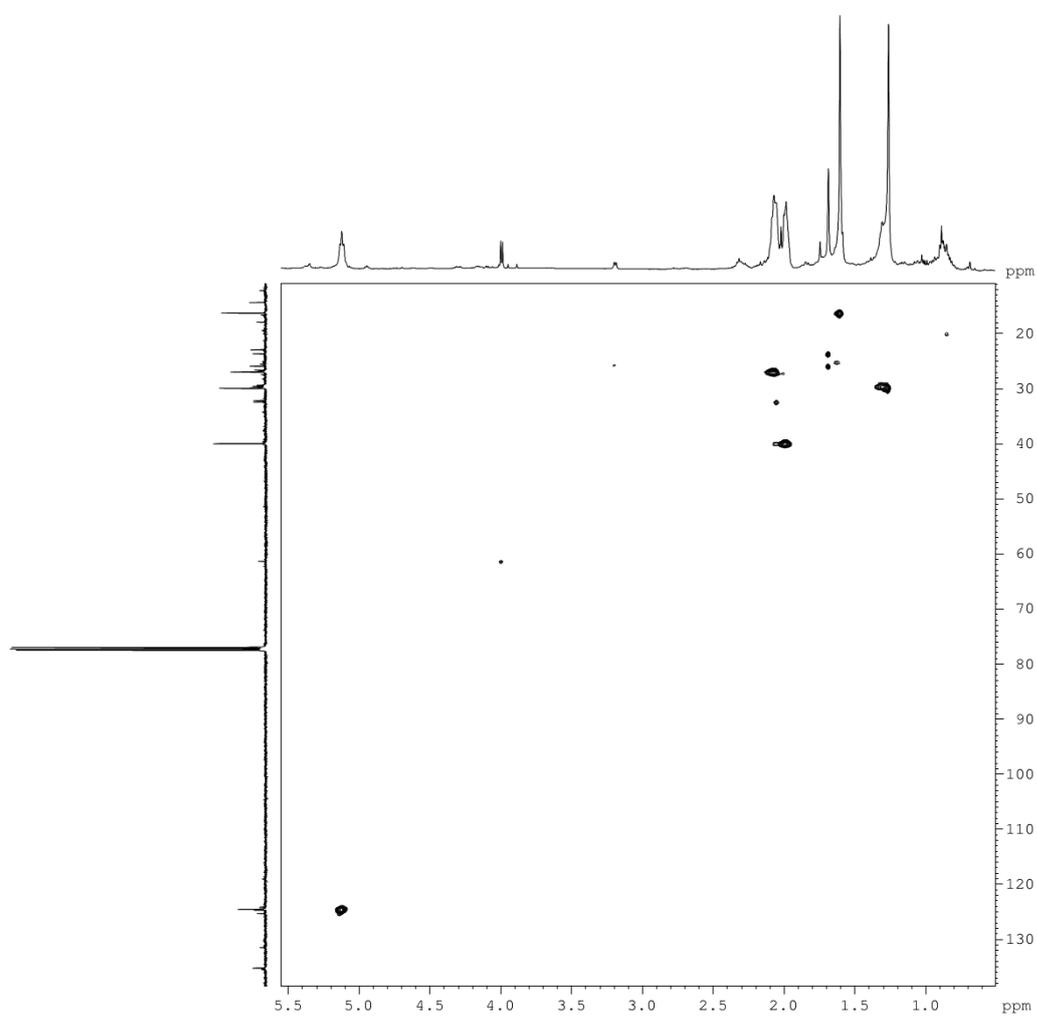


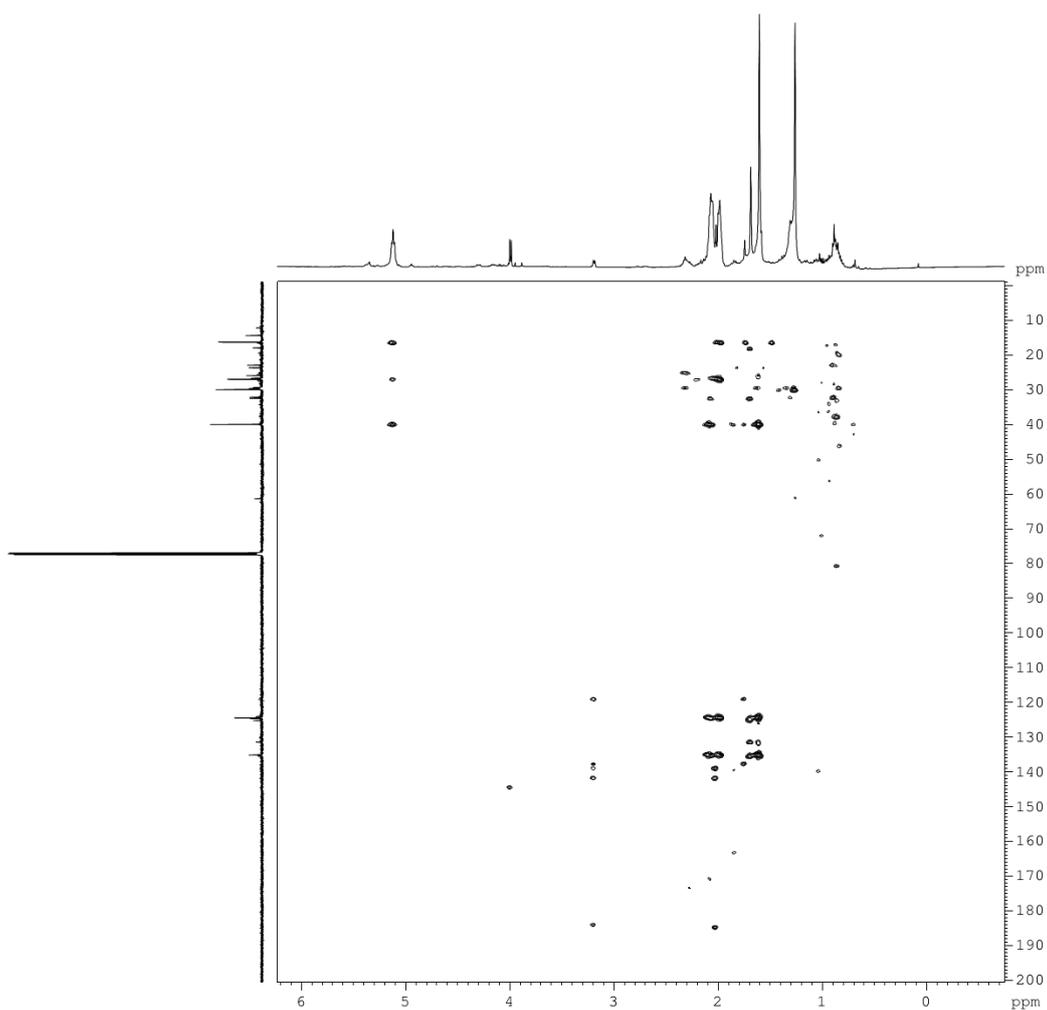
Figura 37: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT 135 $^\circ$  de R5 (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



**Figura 38:** Espectro de RMN bidimensional de correlação homonuclear  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$  – COSY de R5.



**Figura 39:** Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  – HSQC de R5.

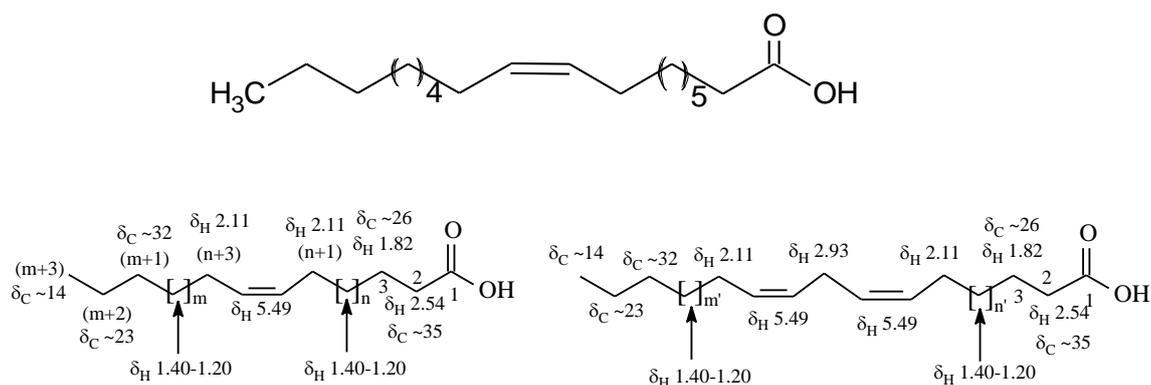


**Figura 40:** Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  – HMBC de **R5**.

No estudo de VIK e colaboradores (2007) foi demonstrado que o geraniolgeraniol (**R5**) apresenta potente e seletiva atividade em *Mycobacterium tuberculosis*, com CIM de 1,56  $\mu\text{g/mL}$ .

#### 4.1.4. Composto R13

O fracionamento do grupo 6 oriundo do extrato acetato de etila da casca da raiz de *Connarus suberosus* também levou à obtenção do composto denominado **R13**. Após a análise dos dados de RMN e comparação com dados da literatura (BATCHELOR *et al.*, 1974) foi identificado como sendo o ácido oléico.



**Figura 41:** Estrutura química do ácido oléico (**R13**) com os dados de RMN  $^{13}\text{C}$ .

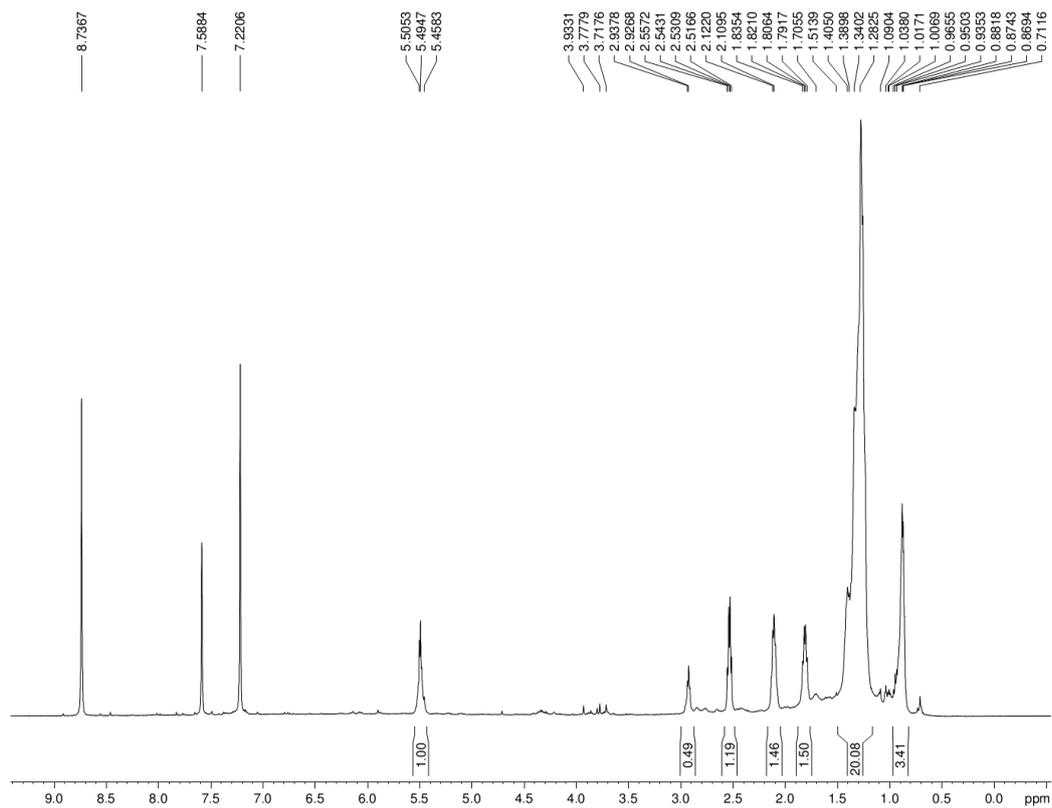
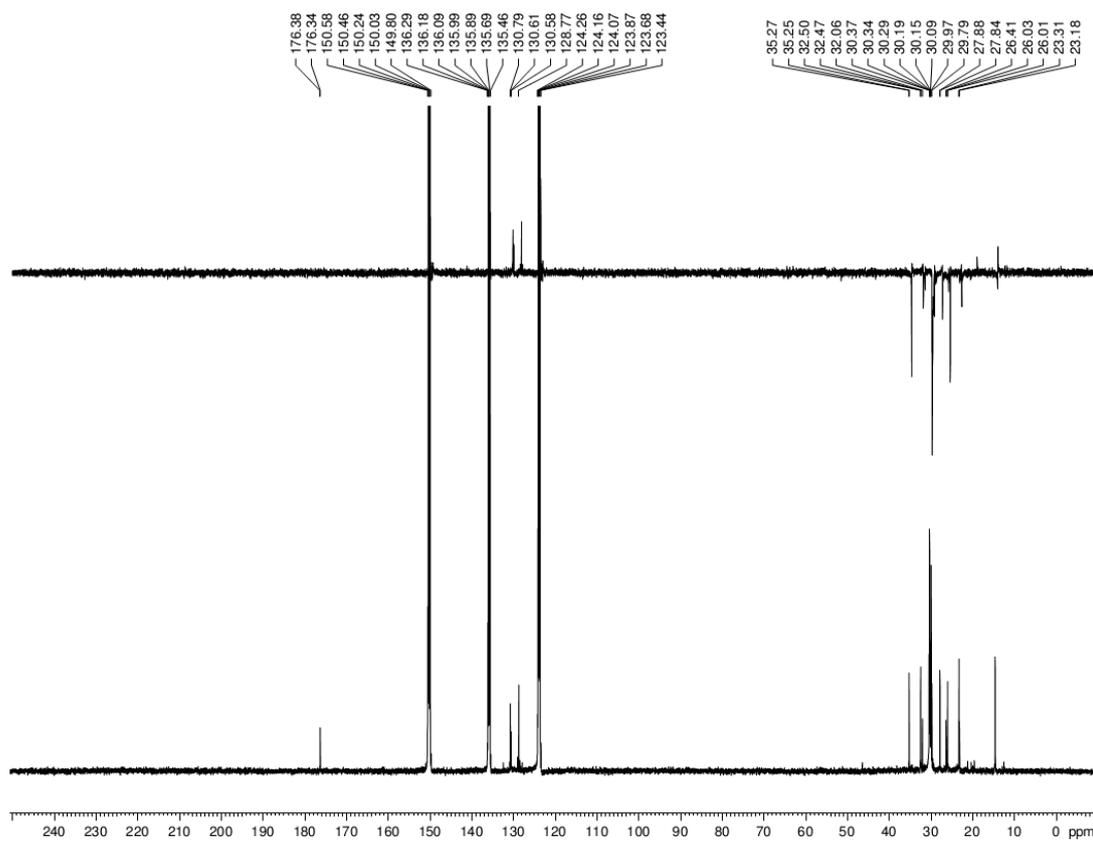
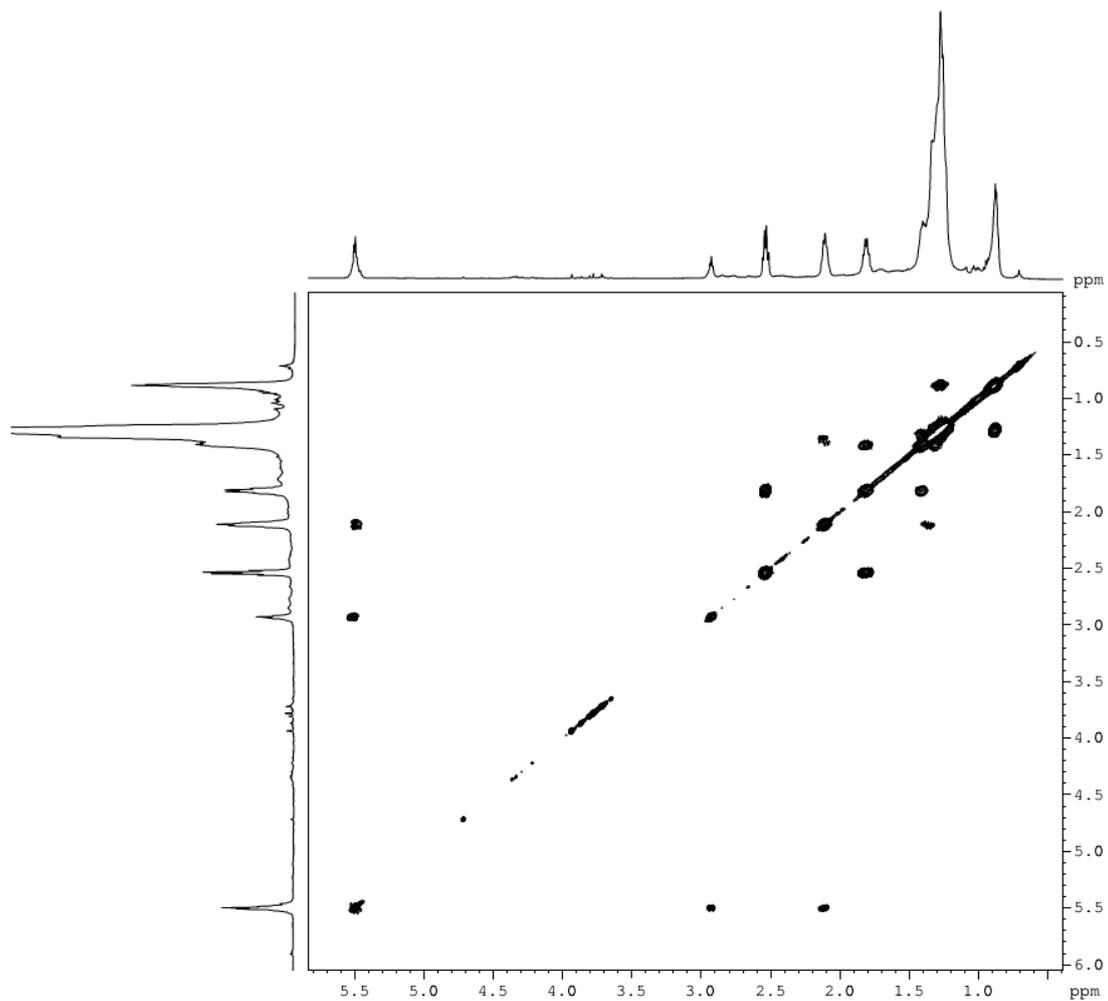


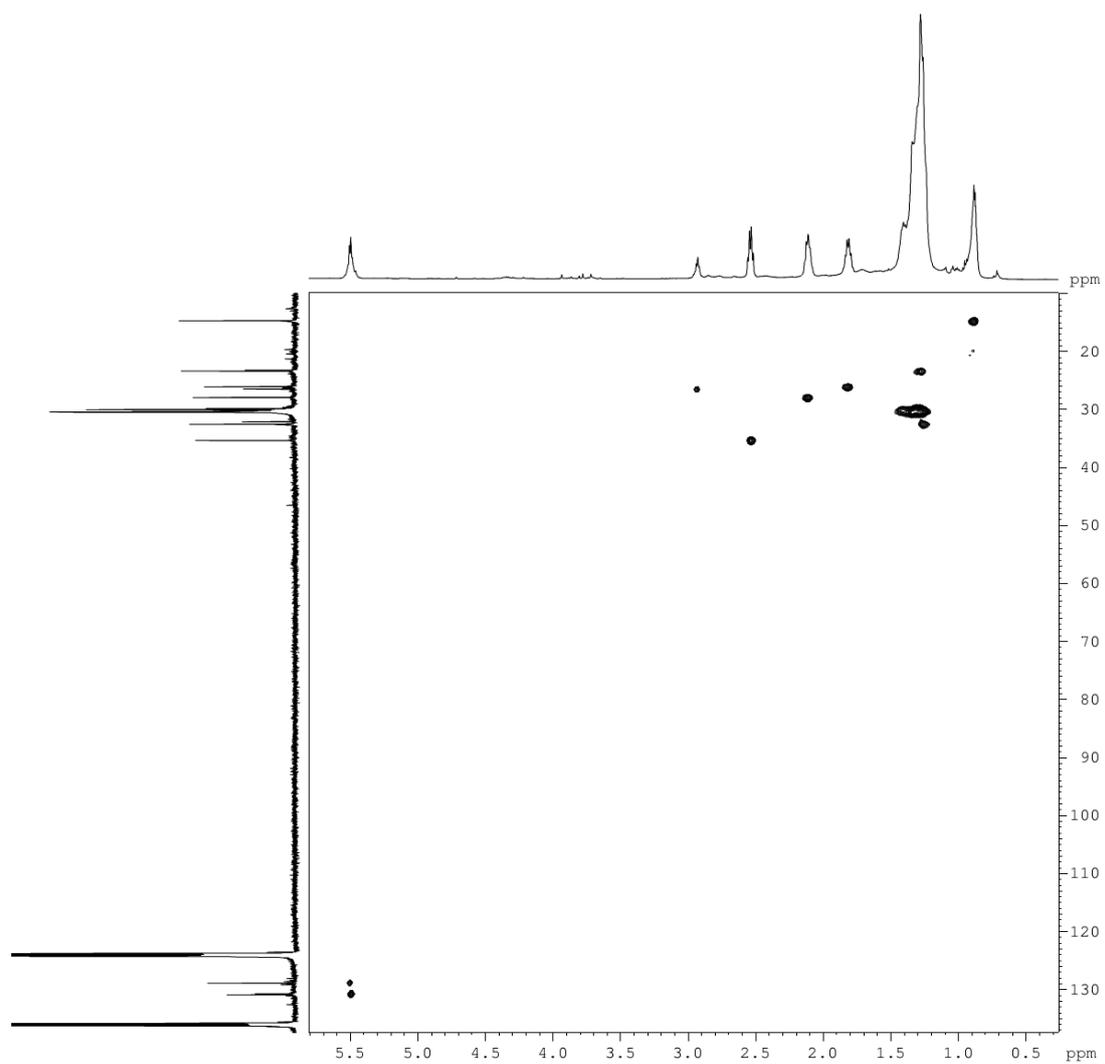
Figura 42: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de R13 (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



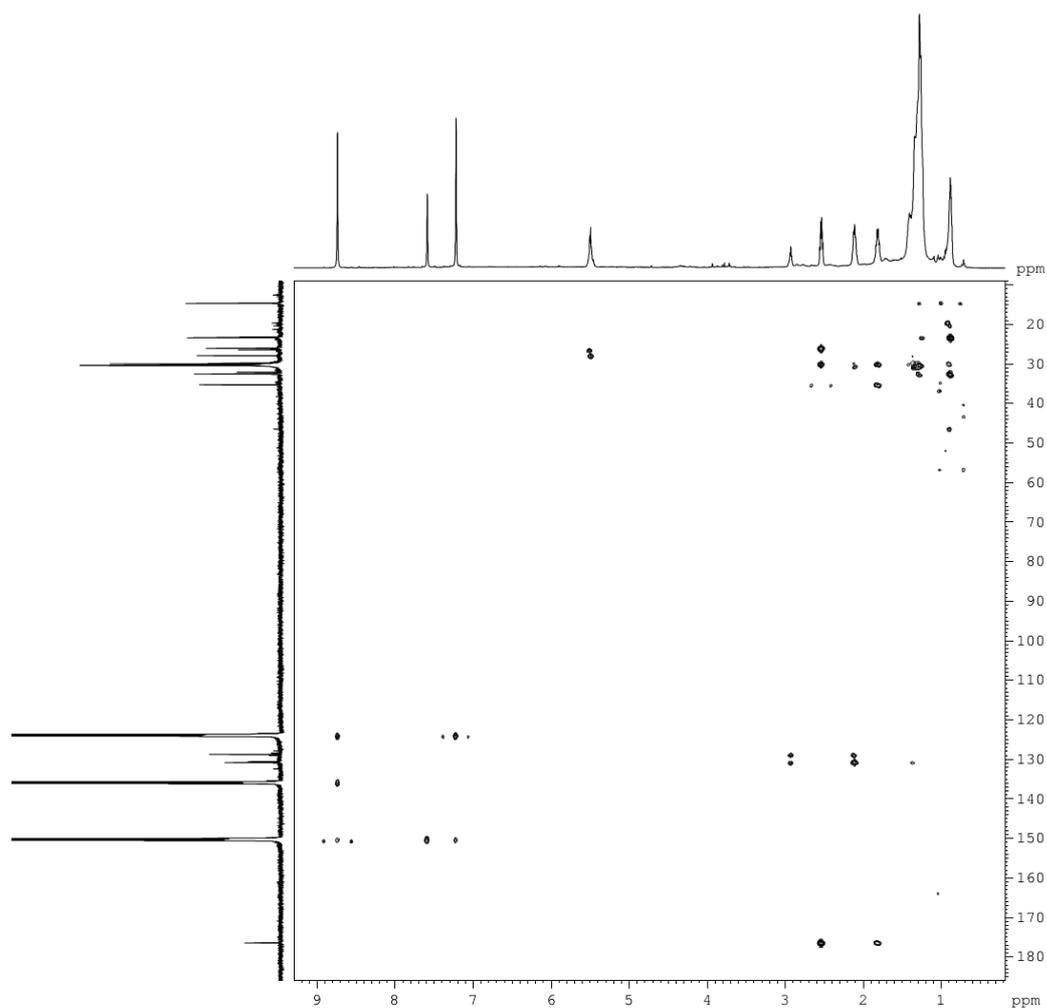
**Figura 43:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -BB e  $^{13}\text{C}$ -DEPT 135° de R13 (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



**Figura 44:** Espectro de RMN bidimensional de correlação homonuclear  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$  – COSY de **R13**.



**Figura 45:** Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  – HSQC de **R13**.



**Figura 46:** Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  – HMBC de **R13**.

O ácido oléico apresenta várias atividades biológicas descritas na literatura, como antibacteriana (SOHN *et al.*, 2013), anticâncer (FONTANA *et al.*, 2013), anti-inflamatória (BORNIQUEL *et al.*, 2010) e antiaterogênica (NICOLOSI *et al.*, 2004).

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos permitiram conhecer a atividade de 20 extratos de plantas do bioma Cerrado, produzidos a partir das espécies *Connarus suberosus*, *Myrcia linearifolia* e *Neea theifera*, em formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, leveduras do gênero *Candida* e dermatófitos do gênero *Trichophyton*. Os extratos de *Connarus suberosus* apresentaram os melhores resultados nos micro-organismos, sendo o extrato acetato de etila da casca da raiz selecionado para o fracionamento químico.

O fracionamento resultou no isolamento da mistura suberonona A (**R1**) e suberonona B (**R1'**), que correspondem a compostos não relatados previamente na literatura; em conjunto com os compostos conhecidos: uma mistura de  $\beta$ -sitosterol (**R2**) e estigmasterol (**R2'**); geranilgeraniol (**R5**) e ácido oléico (**R13**).

A mistura suberonona A (**R1**) e B (**R1'**) foi testada em *L. (L.) amazonensis*, porém foi considerada inativa, com valor de  $CI_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$ . Foi feita também a avaliação da atividade antifúngica de **R1** e **R1'** nas leveduras *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *Candida glabrata* LMGO 44. A mistura foi considerada muito ativa em *Candida albicans* ATCC 10231, com CIM de  $15,62 \mu\text{g/mL}$ , e em *Candida parapsilosis* ATCC 22019, com CIM de  $125 \mu\text{g/mL}$ . Já em *Candida glabrata* LMGO 44, o composto foi considerado ativo, com CIM de  $250 \mu\text{g/mL}$ .

O conjunto de resultados evidencia a atividade antileishmania e antifúngica da espécie *Connarus suberosus* e, portanto, ressalta a importância da preservação do patrimônio vegetal do Cerrado.

## 6. PERSPECTIVAS

- Continuar o estudo químico da espécie *Connarus suberosus*
- Avaliar a atividade da mistura **R1** e **R1'** em formas amastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e em dermatófitos
- Analisar a toxicidade de **R1** e **R1'** em linhagens de células de mamíferos
- Avaliar a atividade dos outros compostos isolados em promastigotas e amastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, em leveduras e dermatófitos
- Realizar o estudo químico da espécie *Myrcia linearifolia*

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIYAR, S. N.; JAIN M. K.; KRISHNAMURTI, M.; SESHADRI, T. R. Chemical components of the roots of *Connarus monocarpus*. **Phytochemistry**, 3(2): 335-339, 1964.
- ALBERNAZ, L.C.; DEVILLE, A.; DUBOST, L.; DE PAULA, J. E.; BODO, B.; GRELLIER, P.; ESPINDOLA, L. S.; MAMBU, L. Spiranthenones A and B, tetraprenylated phloroglucinol derivatives from the leaves of *Spiranthera odoratissima*. **Planta Medica**, 78:1-6, 2011.
- ALMEIDA, O. L. S.; SANTOS, J. B. Avanços no tratamento da leishmaniose tegumentar do novo mundo nos últimos dez anos: uma revisão sistemática. da literatura. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, 86(3):497-506, 2011.
- ALVES, W. A. Leishmaniose visceral americana: situação atual no Brasil Leishmaniasis: current situation in Brazil. **Bepa**, 6(71):25-29, 2009.
- AMEEN, M. Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. **Clinical and Experimental Dermatology**, 35: 699–705, 2010.
- ANTINORI, S.; CASCIO, A.; PARRAVICINI, C.; BIANCHI, R.; CORBELLINO, M. Leishmaniasis among organ transplant recipients. **Lancet Infectious Diseases**, 8: 191-199, 2008.
- AQUINO, F.G.; WALTER, B.M.T. & RIBEIRO, J.F. Dinâmica de populações de espécies lenhosas de Cerrado, Balsas, Maranhão. **Revista Árvore**, 31(5): 793-803, 2007.
- ASANO, N.; YAMAUCHI, T.; KAGAMIFUCHI, K.; SHIMIZU, N.; TAKAHASHI, S.; TAKATSUKA, H.; IKEDA, K.; KIZU, H.; CHUAKUL, W.; KETTAWAN, A.; OKAMOTO, T. Iminosugar-Producing Thai Medicinal Plants. **Journal of Natural Products**, 68: 1238-1242, 2005.
- ASSCHE, T. V.; DESCHACHT, M.; DA LUZ, R. A. I.; MAES, L.; COS, P. Leishmania–macrophage interactions: Insights into the redox biology. **Free Radical Biology & Medicine**, 51: 337–351, 2011.

AWAD, A. B.; CHINNAM, M.; FINK, C.S.; BRADFORD, P.G.  $\beta$ -sitosterol activates Fas signaling in human breast cancer cells. **Phytomedicine**, 14: 747–754, 2007.

AWAD, A. B. & FINK, C. S. Phytosterols as anticancer dietary components: evidence and mechanism of action. **Journal of Nutrition**, 130: 2127–2130, 2000.

BATCHELOR, J. G., CUSHLEY R. J., PRESTEGARD J. H. Carbon-13 Fourier transform nuclear magnetic resonance. VIII. Role of steric and electric field effects in fatty acid spectra. **Journal of Organic Chemistry**, 39(12): 1698-1705, 1974.

BOOGAERTS, M. A.; MAERTENS, J.; VAN DER GEEST, R. Pharmacokinetics and safety of a 7 day administration of intra-venous itraconazole followed by a 14 day administration of itraconazole oral solution in patients with hematologic malignancy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 45(3): 981-985, 2001.

BORNIQUEL, S.; JANSSON, E. Å.; COLE, M. P.; FREEMAN, B. A.; LUNDBERG, J.O. Nitrated oleic acid up-regulates PPAR $\gamma$  and attenuates experimental inflammatory bowel disease. **Free Radical Biology & Medicine**, 48: 499–505, 2010.

BRANNSTROM, C.; JEPSON, W.; FILIPPI, A. M.; REDO, D.; XU, Z.; GANESH, S. Land change in the Brazilian Savanna (Cerrado), 1986-2002: Comparative analysis and implications for land-use policy. **Land Use Policy** 25: 579-595, 2008.

BRASILIA. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Brasília. 2ª edição. 182 p. 2007.

BRASÍLIA. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Atlas de Leishmaniose Tegumentar Americana (Diagnóstico Clínico e Diferencial)**. 1ª edição. 138 p. 2006.

BRASÍLIA. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**, 2ª edição. 179 p. 2007.

BRASS C.; GALGIANI, J. N.; BLASCHKE, T. F. Disposition of ketoconazole, an oral antifungal, in humans. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 21(1): 151-158, 1982.

BUSTAMANTE, M. M. C.; NARDOTO, G. B.; PINTO, A. S.; RESENDE, J. C. F., TAKAHASHI, F. S. C.; VIEIRA, L. C. G. Potential impacts of climate change on biogeochemical functioning of Cerrado ecosystems. **Braz. Journal of Biology**, 72(3): 655-671, 2012.

CHANDRASEKAR, P. Management of invasive fungal infections: a role for polyenes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 66: 457–465, 2011.

CLSI-Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved standard. Document M27-A2, NCCLS, Pennsylvania 17: 1-39, 2002.

CORRÊA, M. P. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Ministério da Agricultura. Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal. Rio de Janeiro, Imprensa Nacional, 1984.

CRESPO-ERCHIGA, V.; GÓMEZ-MOYANO, E.; CRESPO, M. Pityriasis Versicolor and the Yeasts of Genus *Malassezia*. **Actas Dermosifiliogr**, 99:764-71, 2008.

CROFT, S. L.; SEIFERT, K.; YARDLEY, V. Current scenario of drug development for leishmaniasis. **Indian Journal of Medical Research**, 123(3): 399-410, 2006.

DA SILVA, N. L. A.; MIRANDA, F. A. A.; DA CONCEIÇÃO, G. M. Triagem Fitoquímica de Plantas de Cerrado, da Área de Proteção Ambiental Municipal do Inhamum, Caxias, Maranhão. **Scientia Plena**, 6(2): 1-17, 2010.

DE CERQUEIRA, M. D.; SOUZA-NETA, L. C.; PASSOS, M. G. V. M.; LIMA, E. O.; ROQUE, N. F.; MARTINS, D.; GUEDES, M. L. S.; CRUZ, F. G. Seasonal Variation and Antimicrobial Activity of *Myrcia myrtifolia* Essential Oils. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 18(5): 998-1003, 2007.

DE OLIVEIRA, A. P.; DE CASTRO, M. C. A. B.; DE ALMEIDA, A. F.; SOUZA, M. A., de OLIVEIRA, B. C.; REIS, L. C.; GOTO, H., DE BRITO, M. E. F.; CELESTE, B. J.; MARTINS-FILHO, O. A.; PEREIRA, V. R. A. Comparison of flow cytometry and indirect immunofluorescence assay in the diagnosis and cure criterion after therapy of American tegumentary leishmaniasis by anti-live *Leishmania (Viannia) braziliensis* immunoglobulin G. **Journal of Immunological Methods**, 387: 245-253, 2013.

DE PAULA CD, SAMPAIO JH, CARDOSO DR, SAMPAIO RN. A comparative study between the efficiency of pentamidine isothionate given in three doses for one week and N-methylglucamine in a dose of 20mgSbV/day for 20 days to treat cutaneous leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop* 2003; 36: 365–71 (in Portuguese).

DENNING, D. W. Echinocandins: a new class of antifungal. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 49(6): 889-891, 2002.

DIAMOND, R. D. The growing problem of mycoses in patients infected with the human immunodeficiency virus. **Reviews of Infectious Diseases**, 13(3): 480-486, 1991.

DIAS, B. F. S. Cerrados: Uma caracterização. In: Dias BF de S, Ed. Alternativas de desenvolvimento dos cerrados: manejo e conservação dos recursos naturais renováveis. Brasília, DF, Brazil: FUNATURA, 1992.

DURAIPIANDIYAN, V.; IGNACIMUTHU, S. Antifungal activity of traditional medicinal plants from Tamil Nadu, India. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, S204-S215, 2011.

DURIGAN, G.; BAITELLO, J. B.; FRANCO, G. A. D. C.; DE SIQUEIRA, M. F. Plantas do Cerrado Paulista : Imagens de uma Paisagem Ameaçada, Páginas & Letras Editora e Gráfica: São Paulo, 2004.

ELVIN-LEWIS, M.; LEWIS, W. H. The dental use of plants in Amazonia. **Odontostomatologie Tropicale**, 6(4): 178-187, 1983.

FONTANA, A.; SPOLAORE, B.; DE LAURETO, P. P. The biological activities of protein/oleic acid complexes reside in the fatty acid. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1834: 1125–1143, 2013.

FURLAN, A. A Tribo Pisonieae Meisner (Nyctaginaceae) no Brasil. 359 p, 1996. Tese (Doutorado em Ciências na área de Botânica) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.

FURLAN, A.; UDULUTSCH, R. G.; DIAS, P. Flora da serra do cipó, Minas Gerais: Nyctaginaceae. **Bol. Bot. Univ**, São Paulo 26(1): 51-59, 2008.

GOAD, L.J. Methods in plant Biochemistry. Liverpool: Copyright© Academic Press Limited, 1991.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova** 30 (2) 374-381, 2007.

HE , Z.; MA, C., TAN, G. T.; SYDARA, K.; TAMEZ, P.; SOUTHAVONG.; B.; BOUAMANIVONG, S.; SOEJARTO, D. D.; PEZZUTO, J. M.; FONG, H. H. S.; ZHANG, H. Rourinoside and rouremin, antimalarial constituents from *Rourea minor*. **Phytochemistry**, 67: 1378–1384, 2006.

HIDALGO, F. J.; LEÓN, M. M.; ZAMORA, R. Effect of  $\beta$ -sitosterol in the antioxidative activity of oxidized lipid–amine reaction products. **Food Research International**, 42: 1215–1222, 2009.

HONDA, P. A.; FERREIRA, I. C. P.; CORTEZ, D. A. G.; AMADO, C. A. B.; SILVEIRA, T. G. V.; BRENZAN, M. A.; LONARDON, M.V.C. Efficacy of components from leaves of *Calophyllum brasiliense* against *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Phytomedicine**, 17: 333–338, 2010.

IANAS, V.; MATTHIAS, K. R.; KLOTZ, S. A. Role of posaconazole in the treatment of oropharyngeal candidiasis. **Infection and Drug Resistance**, 3: 45–51, 2010.

KLEPSE, M. The value of amphotericin B in the treatment of invasive fungal infections. **Journal of Critical Care**, 26: 225.e1–225.e10, 2011.

KLINK & MACHADO. A conservação do Cerrado brasileiro. **Megadiversidade**, 1(1): 147-155, 2005.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. A conservação do Cerrado brasileiro. **Megadiversidade** 1 (1): 147-155, 2005.

KROGH-MADSEN, M.; ARENDRUP, M. C.; HESLET, L.; KNUDSEN, J. D. Amphotericin B and Caspofungin Resistance in *Candida glabrata* Isolates Recovered from a Critically Ill Patient. **Clinical Infectious Diseases**, 42: 938–944, 2006.

KUETE, V. Potential of Cameroonian Plants and Derived Products against Microbial Infections: A Review. **Planta Medica** 76: 1479–1491, 2010.

LAW, M. Plant sterol and stanol margarines and health. **British Medical Journal**, 30: 861–864, 2000.

LE, P. M.; MARTIN, M. T.; VAN HUNG, N.; GUENARD, D.; SEVENET, T.; PLATZER, N. NMR study of quinolizidine alkaloids: relative configurations, conformations. **Magnetic Resonance In Chemistry**, 43 (4): 283-293, 2005.

LEE, J.H.; LEE, J. Y.; PARK, J. H.; JUNG, H. S.; KIM, J. S.; KANG, S. S.; KIM, Y. S.; HAN, Y. Immunoregulatory activity by daucosterol, a  $\beta$ -sitosterol glycoside, induces protective Th1 immune response against disseminated Candidiasis in mice. **Vaccine**, 25: 3834–3840, 2007.

LEUSCH , F. D. L. & AND MACLATCHY, D. L. In vivo implants of  $\beta$ -sitosterol cause reductions of reactive cholesterol pools in mitochondria isolated from gonads of male goldfish (*Carassius auratus*). **General and Comparative Endocrinology**, 134: 255–263, 2003.

LIMBERGER, R. P.; SOBRAL, M.; HENRIQUES, A. T. Óleos voláteis de espécies de *Myrcia* nativas do Rio Grande do Sul. **Química Nova**, 27(6): 916-919, 2004.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum, 2002. v. 2, 368 p.

MAERTENS, J. A., History of the development of azole deriva-tives. **Clinical Microbiology and Infection**, 10: 1-10, 2004.

MATHEUS, M. T.; BACELAR, M.; DE SOUZA, S. A.; LOPES, J. C. Morfologia de frutos, sementes e desenvolvimento pós-seminal de cabelo-de-negro - *Connarus suberosus* Planch. (Connaraceae). **Cerne, Lavras**, 15 (4): 407-412, 2009.

MATSUDA, H.; NISHIDA, N.; YOSHIKAWA M. Antidiabetic principles of natural medicines. V. Aldose-reductase inhibitors from *Myrcia multiflora* DC. (2): Structures of myrcycitrins III, IV, and V. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, 50: 429–431, 2002.

MCCALL, L.; ZHANG, W.; RANASINGHE, S.; MATLASHEWSKI, G. Leishmanization revisited: Immunization with a naturally attenuated cutaneous *Leishmania donovani* isolate from Sri Lanka protects against visceral leishmaniasis. **Vaccine**, 31: 1420-1425, 2013.

MINNEBRUGGEN, G. V.; FRANÇOIS, I. E. J. A.; CAMMUE, B. P. A.; THEVISSSEN, K.; VROOME, V.; BORGERS, M.; SHROOT, B. A General Overview on Past, Present and Future Antimycotics. **The Open Mycology Journal**, 4: 22-32, 2010.

MITROPOULOS, P.; KONIDAS, P.; DURKIN-KONIDAS, M. New World cutaneous leishmaniasis: Updated review of current and future diagnosis and treatment. **Journal of the American Academy of Dermatology's**, 63: 309-322, 2010.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, 65: 55-63, 1983.

MYERS, NORMAN; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; DA FONSECA, G. A. B.; KEN, JENNIFER. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, 403(2): 853-858, 2000.

NGURE, P. K.; TONUI, W. K.; INGONGA, J.; MUTAI, C.; KIGONDU, E.; NG'ANG'A, Z.; RUKUNGA, G.; KIMUTAI, A. In vitro antileishmanial activity of extracts of *Warburgia ugandensis* (Canellaceae), a Kenyan medicinal plant. **Journal of Medicinal Plants Research**, 3(2): 61-66, 2009.

NICOLOSI, R. J.; WOOLFREY, B.; WILSON, T. A.; SCOLLIN, P.; HANDELMAN, G.; FISHER, R. Decreased aortic early atherosclerosis and associated risk factors in hypercholesterolemic hamsters fed a high- or mid-oleic acid oil compared to a high-linoleic acid oil. **Journal of Nutritional Biochemistry**, 15: 540–547, 2004.

OLIVEIRA, L. F.; SCHUBACH, A. O.; MARTINS, M. M.; PASSOS, S. L.; OLIVEIRA, R. V.; MARZOCHIA, M. C.; ANDRADE, C. A. Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. **Acta Tropica**, 118: 87–96, 2011.

PATHAK D.; YADAVA M., SIDDIQUI N.; KUSHAWAH S. Antileishmanial Agents: An Updated Review. **Der Pharma Chemica**, 3(1): 239-249, 2011.

PFALLER, M. A. Antifungal Drug Resistance: Mechanisms, Epidemiology, and Consequences for Treatment. **The American Journal of Medicine** 125: S3–S13, 2012.

POUND, M. W.; TOWNSEND M. L.; DIMONDI, V.; WILSON, D.; DREW, R. H. Overview of treatment options for invasive fungal infections. **Medical Mycology**, 49: 561-580, 2011.

RADETICH, B. A Study of Oligoprenyl Coupling Reactions with Allylic Stannanes **Organic Letters**, 4(20): P3463-3464, 2002.

RANGEL, T. F. L. V. B.; BINIB, L. M.; DINIZ-FILHO, J. A. F.; PINTO, M. P.; CARVALHO, P.; BASTOS, R. P. Human development and biodiversity conservation in Brazilian Cerrado. **Applied Geography**, 27: 14-27, 2007.

RATTER, J. A.; RIBEIRO, J. F.; BRIDGEWATER, S. The Brazilian Cerrado vegetation and threats to its biodiversity. **Annals of Botany**, 80: 223-230, 1997.

RATTER, J.A.; BRIDGEWATER, S. & RIBEIRO, J.F. Espécies lenhosas da fitofisionomia cerrado sentido amplo em 170 localidades do bioma Cerrado. **Boletim do Herbário Ezechias Paulo Heringer**, 7: 5-112, 2001.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J.; LOUZIR, H.; PIRMEZ, C.; ALEXANDER, B. S. Cutaneous leishmaniasis. **Lancet Infectious Diseases**, 7: 581–96, 2007.

REYNOLDS, T.B. Strategies for acquiring the phospholipid metabolite inositol in pathogenic bacteria, fungi and protozoa: making it and taking it. **Microbiology**, 155(5): 1386-1396, 2009.

RICHARD J. V.; WERBOVETZ, K. A. New antileishmanial candidates and lead compounds. **Current Opinion in Chemical Biology**, 14:447–455, 2010.

RINALDO, D., RODRIGUES, C.M., RODRIGUES, J., SANNOMIYA, M., SANTOS, L.C., VILEGAS, W. New Flavone from the Leaves of *Neea theifera* (Nyctaginaceae). **Sociedade Brasileira de Química**, 18: 1132-1135, 2007.

RODRIGUES, G. B.; MALTONI, K. L.; CASSIOLATO, A. M. R. Dinâmica da regeneração do subsolo de áreas degradadas dentro do bioma Cerrado. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental** 11 (1): 73-80, 2007.

ROEMER, T.; XU, D.; SINGH, S. B.; PARISH, C. A.; HARRIS, G.; WANG, H.; DAVIES, J. E.; AND BILLS, G. F. Confronting the Challenges of Natural Product-Based Antifungal Discovery. **Chemistry & Biology** 18: 148-164, 2011.

SAFDAR, A.; MA, J.; SALIBA, F.; Dupont, B.; WINGARD, J. R.; HACHEM, R. Y.; MATTIUZZI, G. N.; CHANDRASEKAR, P. H.; KONTOYIANNIS, D. P.; ROLSTON, K. V.; WALSH, T. J.; CHAMPLIN, R. E.; RAAD, I. I. Drug-Induced Nephrotoxicity Caused by Amphotericin B Lipid Complex and Liposomal Amphotericin B. **Medicine**, 89 (4): 236-244, 2010.

SAHA, P., MUKHOPADHYAY, D., CHATTERJEE, M. Immunomodulation by chemotherapeutic agents against Leishmaniasis. **International Immunopharmacology** 11: 1668–1679, 2011.

SALOMÃO, A.N. *et al.* (Org). Germinação de sementes e produção de mudas do Cerrado. Rede de Sementes do Cerrado, Brasília. 96 p, 2003.

SEIFERT, K. Structures, Targets and Recent Approaches in Anti-Leishmanial Drug Discovery and Development. **The Open Medicinal Chemistry Journal**, 5: 31-39, 2011.

SHUKLA, A. K.; SING, B. K.; PATRA, S. ; DUBEY, V. K. Rational Approaches for Drug Designing Against Leishmaniasis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 160:2208–2218, 2010.

SOHN, H. R.; BAEK, K. Y.; HOU, C. T.; KIM, H. R. Antibacterial activity of 7,10-dihydroxy-8(E)-octadecenoic acid against food-borne pathogenic bacteria. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 2: 85–87, 2013.

STILLER, R. L.; BENNETT, J. E.; SCHOLER, H. J. Correlation of in vitro susceptibility test results with in vivo response: flucytosine therapy in a systemic candidiasis model. **The Journal of Infectious Diseases**, 147(6): 1070-1077, 1983.

STONE, E. A.; FUNG, H. B.; KIRSCHENBAUM, H. L. Caspofungin: an echinocandin antifungal agent. **Clinical Therapeutics**, 24(3): 351-377, 2002.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J.; AGARWAL, D.; RAI, M.; MURRAY, H. W. M. D. Single-dose liposomal amphotericin B for visceral leishmaniasis in India. **New England Journal of Medicine**, 362(6), 2010.

SUNTAR, I.; AKKOL, E. K.; KELES, HIKMET; YESILADA, E.; SARKER, S. D.; BAYKAL, T. Comparative evaluation of traditional prescriptions from *Cichorium intybus* L. for wound healing: Stepwise isolation of an active component by in vivo bioassay and its mode of activity. **Journal of Ethnopharmacology**, 143: 299–309, 2012.

THOMAS, J.; JACOBSON, G. A.; NARKOWICZ, C. K.; PETERSON, G. M.; BURNET, H.; SHARPE, C. Toenail onychomycosis: an important global disease burden. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, 35(5): 497–519, 2010.

TIUMAN, T. S.; SANTOS, A. O.; UEDA-NAKAMURA, T.; FILHO, B. P. D.; NAKAMURA C. V. Recent advances in leishmaniasis treatment. **International Journal of Infectious Diseases**, 15: e525–e532, 2011.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Microbiologia. 6ª ed. Editora Artmed, Rio de Janeiro, 2002.

TSAI, P-W; CHEN, Y-T; HSU, P-C; LAN, C-Y. Study of *Candida albicans* and its interactions with the host: A mini review. *BioMedicine*, 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomed.2012.12.004>.

VAISHNAV, P.; DEMAIN, A. L. Unexpected applications of secondary metabolites. **Biotechnology Advances** 29: 223–229, 2010.

VANDEPUTTE, P.; FERRARI, S.; COSTE, A.T. Antifungal Resistance and New Strategies to Control Fungal Infections. **International Journal of Microbiology**, 1-26, 2012.

VERMES, A.; GUCHELAAR, H. J.; and DANKERT, J. Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharma-cokinetics, toxicity and drug interactions. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 46(2): 171-179, 2000.

VIEIRA, M. L.; JACOBINA, R. R; SOARES, N. M. Casos de leishmaniose em pacientes atendidos nos centros de saúde e hospitais de Jacobina – BA no período de 2000 a 2004. **Revista Baiana de Saúde Pública**, 31: 102-114, 2007.

VIK, A.; JAMES, A.; GUNDERSEN, L. L. Screening of terpenes and derivatives for antimycobacterial activity; identification of geranylgeraniol and geranylgeranyl acetate as potent inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* in vitro. **Planta medica**, 73(13): 1410–2, 2007.

WENIGER, B.; ROBLEDO, S.; ARANGO, G. J.; DEHARO, E.; ARAGON, R.; MUNOZ, V.; CALLAPA, J.; LOBSTEIN, A.; ANTON, R. Antiprotozoal activities of Colombian plants. **Journal of Ethnopharmacology**, 78: 193-200, 2001.

WORTHLEY, E. G.; SCHOTT, C. D. Biologically active compounds in some flowering plants. **Life Sciences**, 8(1): 225-238, 1969.

YOSHIKAWA, M.; SHIMADA, H.; NISHIDA, N.; LI Y.; TOGUCHIDA, I.; MATSUDA, H. Antidiabetic principles of natural medicines. II. Aldose reductase and  $\alpha$ -glucosidase inhibitors from Brazilian natural medicine, the leaves of *Myrcia multiflora* DC. (*Myrtaceae*): structures of myrciacitrins I and II and myrciaphenones A and B. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, 46: 113–119, 1998.

YUK, J. E.; WOO, J. S.; YUN, C. Y.; LEE, J. S.; KIM, J. H.; SONG, G. Y.; YANG, E. J.; HUR, I. K.; KIM, I. S. Effects of lactose- $\beta$ -sitosterol and  $\beta$ -sitosterol on ovalbumin-induced lung inflammation in actively sensitized mice. **International Immunopharmacology**, 7: 1517–1527, 2007.