



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus de São José do Rio Preto

GABRIELA MIGLIATTI PAYÃO

Estudo fitoquímico dos frutos de *Pterogyne nitens*

São José do Rio Preto

2021

GABRIELA MIGLIATTI PAYÃO

Estudo fitoquímico dos frutos de *Pterogyne nitens*

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Química Ambiental, junto ao Conselho de Curso de Química, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof. Dr. Luis Octávio Regasini

Coorientadora: Doutoranda Letícia Ribeiro de Assis

São José do Rio Preto

2021

P343e	Payão, Gabriela Migliatti Estudo fitoquímico dos frutos de <i>Pterogyne nitens</i> / Gabriela Migliatti Payão. -- São José do Rio Preto, 2022 47 p. : il., tabs., fotos Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Química) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto Orientador: Luis Octávio Regasini Coorientadora: Letícia Ribeiro de Assis 1. <i>Pterogyne nitens</i>. 2. pteroginidina. 3. alcaloides. 4. guanidinas. 5. afzelina. I. Título.
-------	--

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

GABRIELA MIGLIATTI PAYÃO

Estudo fitoquímico dos frutos de *Pterogyne nitens*

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Química Ambiental, junto ao Conselho de Curso de Química, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

São José do Rio Preto, 04 de fevereiro de 2021

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Luis Octavio Regasini

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP

Prof. Dra. Daniela Sampaio Silveira

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP

Prof. Dra. Fátima Pereira de Souza

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP

São José do Rio Preto

10 de fevereiro de 2021

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, João e Valéria, por todo amor, incentivo e respeito. Para vocês todo meu amor e admiração.

Aos meus avós Wilson e Mercedes, que com muito carinho sempre me cuidaram.

Às minhas tias Alessandra e Andréia, dois gigantes corações.

Ao meu companheiro Gustavo por toda amizade, força, paciência e coragem.

Aos meus amigos da Turma 015 que trouxeram tanta alegria à graduação.

Ao meu orientador Luís pela oportunidade e incentivo. Reconheço e admiro sua dedicação e sabedoria, que muitos ainda possam ter a enriquecedora experiência de ser seu aluno.

À minha coorientadora Letícia Ribeiro de Assis por todo auxílio e paciência. É uma honra tê-la em meu caminho.

Ao auxílio de todos do Laboratório de Antibióticos e Quimioterápicos (LAQ).

Aos colaboradores deste trabalho.

Aos amigos que encontrei no Instituto Céu de Capella por todo acolhimento.

Aos sentimentos por semearem sentido à vida.

À natureza, que em sua divindade nos permite a vida e o viver.

À Deus.

RESUMO

A espécie arbórea *Pterogyne nitens* Tulasne (Fabaceae-Caesalpinioideae) tem demonstrado, através de diversos estudos, uma ampla série de substâncias bioativas como, por exemplo, flavonoides, terpenos, ácidos fenólicos e alcaloides guanidínicos. A partir dos frutos de *P. nitens*, foram preparados três diferentes extratos, o extrato hexânico (EHF), o acetônico (EAcF) e o etanólico (EEtF), sendo este, o alvo para continuidade do estudo cromatográfico. A purificação do extrato etanólico através de métodos cromatográficos forneceu duas substâncias isoladas: pteroginidina (**6**) e afzelina (**18**), as quais foram confirmadas através da análise de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono Treze – RMN para ^1H e ^{13}C . Foi investigada a atividade antiparasitária *in vitro* contra *Schistosoma mansoni* linhagem LE dos três extratos por meio de testes de redução da viabilidade dos vermes adultos. A avaliação *in vitro* consistiu na observação de alterações fenotípicas classificadas em uma escala de viabilidade após períodos de 24, 48 e 72h de incubação com cada extrato. Os resultados foram expressos em porcentagem de redução da viabilidade. Nenhum dos três extratos demonstrou redução significativa da viabilidade. Os extratos também tiveram sua atividade tripanocida determinada contra *Trypanosoma cruzi* através do ensaio colorimétrico com MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina]. Os resultados foram expressos em porcentagem de morte de *T. cruzi*. Todos os extratos foram classificados como não ativos devido à ausência de morte do parasito.

PALAVRAS-CHAVE: *Pterogyne nitens*, pteroginidina, alcaloides, guanidinas.

ABSTRACT

The tree species *Pterogyne nitens* Tulasne (Fabaceae-Caesalpinioideae) has demonstrated, through several studies, a wide range of bioactive substances such as flavonoids, terpenes, phenolic acids and guanidine alkaloids. From the fruits of *P. nitens*, three different extracts were prepared, hexanic (EHF), acetone (EAcF) and ethanolic (EEtF), this being the target for further study. The purification of the ethanolic extract using chromatographic methods provided three isolated substances: pterogynidine (**6**) e afzelin (**18**), which were confirmed by ^1H and ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance (NMR). The *in vitro* antiparasitic activity against *Schistosoma mansoni* lineage LE was investigated for the three extracts using the adult worms viability reduction test. The *in vitro* evaluation consisted of observing phenotypic changes classified in a viability scale after periods of 24, 48 and 72 hours of incubation with each extract. The results were expressed as a percentage of reduced viability. None of the three extracts showed a significant reduction in viability. The extracts were also tested for trypanocidal activity against *Trypanosoma cruzi* through the colorimetric assay with MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]. The results were expressed as a percentage of *T. cruzi* death. Both extracts were classified as non-active due to the absence of parasite death.

KEYWORDS: *Pterogyne nitens*, pterogynidine, alkaloid, guanidine.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Indivíduo de *Pterogyne nitens* utilizado para a coleta dos frutos.

Figura 2. Frutos (órgão reprodutivos) de *Pterogyne nitens*.

Figura 3. Estrutura química de três alcaloides historicamente conhecidos: cafeína (1), morfina (2) e quinina (3).

Figura 4. Estrutura química do núcleo guanidínico (4).

Figura 4. Estrutura química do núcleo guanidínico (4) e dos alcaloides guanidínicos pteroginina (5), pteroginidina (6), nitensidinas A-C (7-9).

Figura 5. Estrutura química do alcaloide guanidínico pteroginidina (6).

Figura 6. Estrutura química do núcleo básico de flavonoides (10).

Figura 7. Estruturas químicas dos flavonoides: acacetina (11), amentoflavona (12), buteina (13), hesperidina (14), quercetina (15) e rutina (16).

Figura 8. Estrutura química do flavonoide afzelina (18).

Figura 9. Esquema - reparação dos extratos.

Figura 10. Cromatoplasmas das frações flavonoidicas e alcaloídicas reveladas com Anisaldeído Sulfúrico.

Figura 11. Cromatoplasmas das frações alcaloídicas reveladas com reagente de Dragendorff.

Figura 12. Estrutura química do alcaloide guanidínicos, pteroginidina (6).

Figura 13. Estrutura química do flavonoide afzelina (18).

Figura 14. Gráfico de Redução da Viabilidade dos vermes adultos de *Schistosoma mansoni* (LE) após incubação com amostra (EEtF). (Realizados 2 ensaios independentes nas concentrações de 12,5 a 200 µg/mL durante 24 e 48 horas. Dados expressos em média ± desvio padrão).

Figura 15. Gráfico de redução da viabilidade dos vermes adultos de *Schistosoma mansoni* (LE) após incubação com amostra (EAcF). (Realizados 2 ensaios independentes nas concentrações de 12,5 a 200 µg/mL durante 24 e 48 horas. Dados expressos em média ± desvio padrão).

Figura 16. Gráfico de redução da **viabilidade dos vermes adultos de *Schistosoma mansoni* (LE) após incubação com amostra (EHF)**. (Realizados 2 ensaios independentes nas concentrações de 12,5 a 200 µg/mL durante 24 e 48 horas. Dados expressos em média ± desvio padrão).

Figura 17. Reação de redução do MTT (19) a formazan (20).

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Rendimento estimado dos extratos

Tabela 02. Colunas EEtF [(CPG, LH-20, Sephadex®) (150 x 5 cm)]

Tabela 03. Colunas de purificação.

Tabela 04. Comparação entre os sinais de RMN ^1H e ^{13}C obtidos para a pteroginidina (**6**) (Figura 12) com os sinais encontrados na literatura.

Tabela 05. Comparação entre os sinais de RMN ^1H e ^{13}C obtidos com os sinais encontrados para a afzelina (**18**) na literatura.

Tabela 06. Porcentagem de redução da viabilidade de vermes adultos de *Schistosoma mansoni* (LE) após incubação com o EEtF.

Tabela 07. Porcentagem de redução da viabilidade de vermes adultos de *Schistosoma mansoni* (LE) após incubação com o EAcF.

Tabela 08. Porcentagem de redução da viabilidade de vermes adultos de *Schistosoma mansoni* (LE) após incubação com o EHF.

Tabela 09. Porcentagem de morte de *T. cruzi* para cada amostra.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AG	Alcaloide guanidínico
CCD	Cromatografia Camada Delgada
CCDA	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
CD₃COCD₃	dimetil-sulfóxido deuterado
CHCl₃	Clorofórmio
DTN	Doenças Tropicais Negligenciadas
DMSO	Dimetil-sulfóxido
DMSO_d / DMSO-<i>d</i>₆	Dimetil-sulfóxido deuterado
EAcF	Extrato Acetônico do Fruto
EEtF	Extrato Etanólico do Fruto
EEtF-C1	1ª Coluna de Cromatografia de Permeação em Gel de alíquota do EEtF
EEtF-C2	2ª Coluna de Cromatografia de Permeação em Gel de alíquota do EEtF
EEtF-C3	3ª Coluna de Cromatografia de Permeação em Gel de alíquota do EEtF
EEtF-C4	4ª Coluna de Cromatografia de Permeação em Gel de alíquota do EEtF
EEtF-P2	Cromatografia em Coluna de Fase Normal (Sílica Gel) da fração 32-37 (EEtF-C4)
EEtF-P3	Cromatografia em Coluna de Fase Normal (Sílica Gel) da fração 43-56 (EEtF-C3)
EHF	Extrato Hexânico do Fruto
H	Hidrogênio
IUPAC	Union of Pure and Applied Chemistry
LE	Luíz Evangelista
LLC-MK2	Células renais de túbulos proximais de macaco
MeOH	Metanol
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
MPO	Mieloperoxidase
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
<i>P. nitens</i>	<i>Pterogyne nitens</i>
<i>p. e.</i>	<i>Por exemplo</i>
PBS	Tampão fosfato-salino (Phosphate-buffered saline)
pH	Potencial hidrogeniônico
PZQ	Praziquantel
Rf	Fator de retenção
RV	Redução de viabilidade
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RPMI	ROSWELL PARK MEMORIAL INSTITUTE (meio de cultura de células humanas e de outros animais)
SDS	Dodecil sulfato de sódio
<i>S. mansoni</i>	<i>Schistosoma mansoni</i>
<i>sp.</i>	Espécie
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
w/v	weight/volume

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
±	Mais ou menos
α	Alfa
β	Beta
δ	Deslocamento químico
°C	Grau Celsius
μg	Micrograma
μm	Micrometro
¹³C	Carbono treze
cm	Centímetro
g	Gramas
h	Horas
IC₅₀	Índice de citotoxicidade para 50% dos indivíduos
<i>J</i>	Constante de acoplamento
Hz	Hertz
L	Litros
M	Molaridade
Mg	Miligrama
mL	Mililitros
nm	Nanômetros
ppm	Parte por milhão

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	11
1.1	Alcaloides guanidínicos.....	12
1.1.1	Pteroginidina	13
1.2	Flavonoides.....	14
1.2.1	Afzelina.....	15
1.3	Doenças Tropicais Negligenciadas.....	16
1.3.1	<i>Schistosoma mansoni</i>	17
1.3.2	<i>Trypanosoma cruzi</i>	18
2.	OBJETIVOS.....	19
3.	PARTE EXPERIMENTAL.....	20
3.1	Coleta do material botânico.....	20
3.2	Material vegetal e produção de extratos.....	20
3.3	Isolamento.....	21
3.4	Identificação.....	24
3.5	Ensaio biológico.....	24
3.5.1	Avaliação da atividade dos extratos e substância de <i>P. nitens</i> contra <i>Schistosoma mansoni</i> linhagem LE <i>in vitro</i>	24
3.5.2	Avaliação da atividade dos extratos e substâncias de <i>P. nitens</i> contra <i>Trypanosoma cruzi</i> <i>in vitro</i>	25
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
4.1	Substâncias isoladas.....	26
4.1.1	Pteroginidina	26
4.1.2	Afzelina.....	27
4.2	Ensaio biológico.....	29
4.2.1	Atividade contra <i>Schistosoma mansoni</i> linhagem LE <i>in vitro</i>	29
4.2.2	Atividade contra <i>Trypanosoma cruzi</i> <i>in vitro</i>	33
5.	CONCLUSÃO.....	35
6.	BIBLIOGRAFIA.....	36
7.	MATERIAL SUPLEMENTAR.....	42

1. INTRODUÇÃO

Durante muito tempo as plantas foram o principal recurso utilizado como forma de medicamento pelas civilizações. O vasto universo vegetal resultou em diversos descritos sobre preparações de ervas que foram repassados entre as gerações. Com a chegada dos avanços químicos e tecnológicos, como as técnicas de isolamento, por exemplo, as possibilidades de estudos de uma mesma planta foram ampliadas. (PEREIRA, 2012) (SÁ, 2008)

A planta *Pterogyne nitens* Tulasne (Leguminosae – Caesalpinioideae) (figuras 1 e 2), popularmente conhecida como “amendoinzeiro”, “amendoim bravo”, “madeira nova”, “cocal”, etc., é uma espécie arbórea de porte médio nativa da América do Sul e utilizada em grande extensão do território brasileiro para a arborização de ruas e áreas verdes devido à beleza de suas flores e folhas, o rápido crescimento e a baixa exigência em fertilidade. (LACERDA et al., 2011) (LIMA, 2020)

Figura 1. Indivíduo de *Pterogyne nitens* utilizado para a coleta dos frutos.

Figura 2. Frutos (órgão reprodutivos) de *Pterogyne nitens*.



Fonte: Autor (2021);



Fonte: Autor (2021).

Além de seu potencial ornamental, a crescente quantidade de estudos sobre a espécie tem demonstrado uma quantidade exuberante de compostos bioativos, entre eles, alcaloides guanidínicos, flavonoides, ácidos fenólicos, esteroides e terpenos. (REGASINI, 2008a) (LIMA, 2020) (REGASINI; FERNANDES et al., 2008b)

Em estudos realizados no nordeste da Argentina com comunidades indígenas Mbya-Guarani foi descrita a utilização das cascas de caule de “yvi-raró”, nome local para a *P. nitens*,

em preparações aquosas como tratamento de infecções parasitárias por *Ascaris lumbricoides*, ou “tacho”, como é denominada a parasitose na comunidade guarani. (CRIVOS et al., 2007)

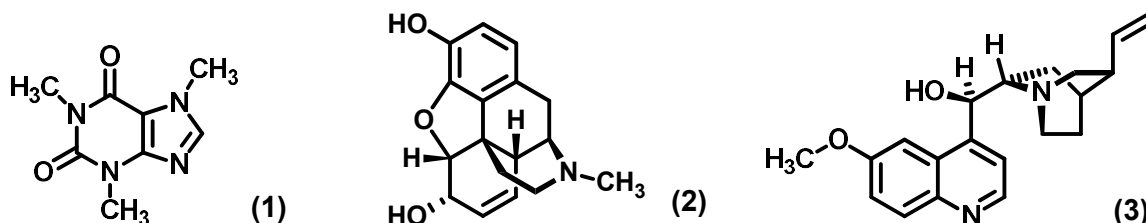
Um levantamento bibliográfico de (LIMA, 2020), no qual foram contemplados 36 trabalhos realizados com extratos e substâncias de *Pterogyne nitens*, apresentou em 54% dos trabalhos analisados a utilização de folhas e/ou caules da planta como objeto de estudo, já as partes como flores e frutos que possuem maior dificuldade de coleta, tanto por acesso físico (altura da planta) quanto por acesso temporal (sazonalidade), compõem apenas 20% dos estudos.

1.1 Alcaloides guanidínicos

Os alcaloides compõem um grupo de substâncias com mais de 20.000 estruturas atualmente conhecidas, a grande variedade dificulta sua definição, ainda sim, uma definição que pode ser considerada abrangente às suas singularidades é a proposta pela IUPAC: “Os alcaloides são compostos nitrogenados básicos (geralmente heterocíclicos) que ocorrem principalmente no Reino Plantae (mas não se exclui os que são de origem animal). Aminoácidos, peptídeos, nucleotídeos, ácidos nucleicos, amino açúcares e antibióticos normalmente não são considerados alcaloides. Por extensão, certos compostos neutros biogeneticamente relacionados aos alcaloides básicos estão incluídos na classificação como alcaloides.” (NIC et al., 2012) (VEPOORTE; COQUEIRO, 2005)

Descobertas de diversas e intensas ações farmacológicas são responsáveis pelo grande interesse no estudo dos alcaloides. Historicamente muitos membros desse grupo tiveram suas propriedades notadas tanto econômica, quanto medicinalmente. Alguns exemplos de alcaloides que se tornaram amplamente conhecidos são a cafeína (1), a morfina (2) e a quinina (3) (Figura 3). A cafeína (1), encontrada principalmente nas sementes de *Coffea sp.* e nas folhas de *Camellia sinensis*, é presente em bebidas de grande popularidade como o café, o chá verde e a coca-cola. (KUREK et al., 2019) (PELLETIER, 1983) (MARIA et al., 2006)

Figura 3. Estrutura química de três alcaloides historicamente conhecidos: cafeína (1), morfina (2) e quinina (3).



Fonte: autor.

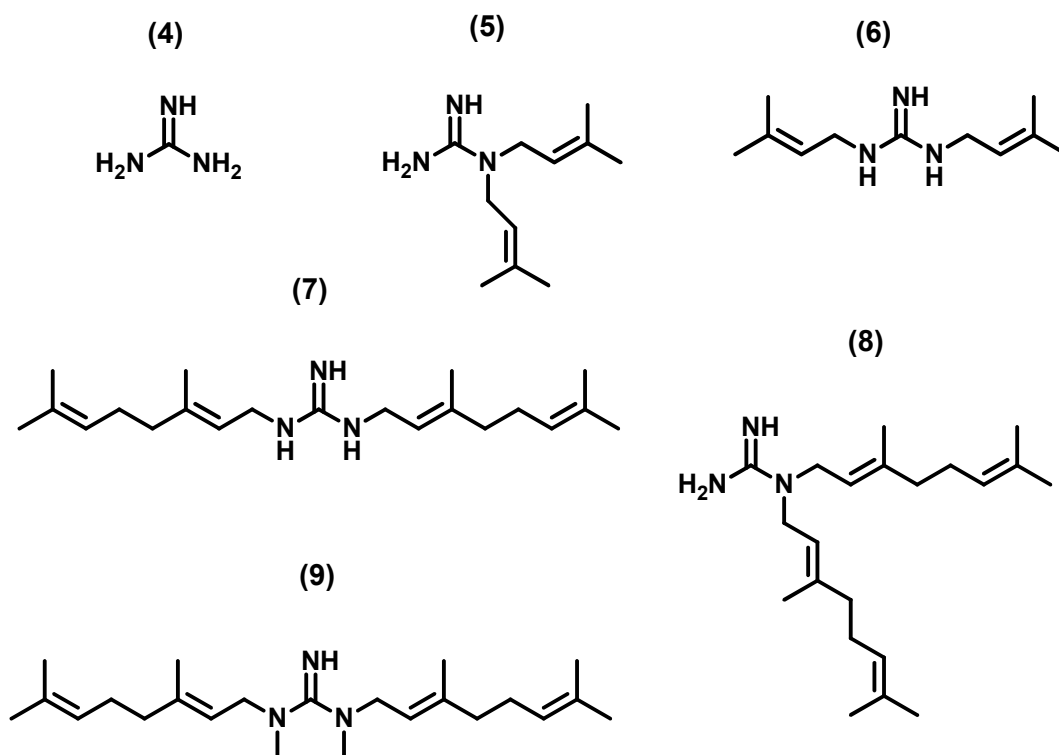
A morfina (2), o primeiro alcaloide a ser isolado da papoula do ópio (*Papaver somniferum*) em 1804 na sua forma cristalina, é utilizada com ressalvas, devido suas propriedades viciantes, para alívio de dores severas. (DUARTE et al., 2005). A quinina (3), extraída de *Cinchona sp.*, tem conhecida atividade antimalárica (KUREK et al., 2019) e ganhou recente repercussão devido um estudo de docking molecular que predizia um possível bloqueio de infecção do vírus Sars-Cov-2. (LESTARI et al., 2020)

Os alcaloides guanidínicos (AG) possuem como característica comum a presença do núcleo guanidínico (4) (Figura 4), podendo este ser cíclico ou acíclico. As atividades

anticancerígena (DYSHLOVOY et al., 2020a) (DYSHLOVOY et al., 2020b), antiparasitária (MARTINS et al., 2016), antimalárica (GROS et al., 2015), antibacteriana (COQUEIRO et al., 2014), entre outras, são bem estabelecidas na literatura para essa classe de compostos.

O primeiro alcaloide guanidínico de *P. nitens*, a pteroginina (5) (Figura 4), foi relatado em 1969 no primeiro estudo realizado com a planta, dois anos depois foi isolado seu isômero constitucional, a pteroginidina (6) (Corral & Petruccelli, 1969) (Corral & Petruccelli, 1971). Somente em 1995 que um estudo, no qual três outros AG, nitensidina A-C (7 - 9) (Figura 4) foram isolados, descreveu a primeira bioatividade para os alcaloides guanídicos de *P. nitens*, sendo ela, citotoxicidade seletiva a linhagem mutante de *Saccharomyces cerevisiae* (BOLZANI et al., 1995).

Figura 4. Estrutura química do núcleo guanidínico (4) e dos alcaloides guanidínicos pteroginina (5), pteroginidina (6), nitensidinas A-C (7-9).



Fonte: Autor.

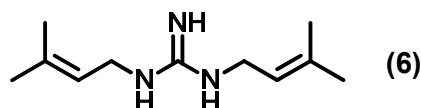
1.1.1 Pteroginidina (6)

O alcaloide guanidínico-terpênico, pteroginidina (6) (Figura 5), formado por duas unidades isoprenílicas substituídas em um núcleo guanidínicos, foi isolado pela primeira vez a partir de caules de *Pterogyne nitens* em 1971, contudo, estudos posteriores evidenciaram sua presença em plantas do gênero *Alchornea* (CALVO et al., 2007) (MAVAR-MANGA et al., 2008).

A pteroginidina, possui variadas atividades biológicas, tais como, bactericida (COQUEIRO et al., 2014), inibidora do crescimento de células mamárias cancerígenas

(DUARTE et al., 2010), apoptótica (LOPES et al., 2009), anti-inflamatória (MAVAR-MANGA et al., 2008), gastroprotetora (CALVO et al., 2007), citotóxica contra osteoclastos (TAJIMA et al., 2015) e inibitória de mieloperoxidase (MPO) (REGASINI et al., 2008b). Em vista disso, é plausível considerar a pteroginidina com um potencial promissor para o desenvolvimento de compostos análogos com foco em diferentes usos terapêuticos.

Figura 5. Estrutura química do alcaloide guanidídico pteroginidina (6).



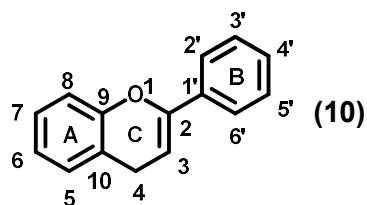
Fonte: autor.

1.2 Flavonoides

Os metabólitos secundários, flavonoides, são compostos fenólicos extensamente distribuídos no reino vegetal. Muitos flavonoides apresentam coloração intensa, principalmente em tons amarelos, essa observação foi responsável por seu nome, uma vez que “flavo”, do latim, significa “amarelo”. (VILA, 2006) (POZZOBON, 2011)

A estrutura básica dos flavonoides consiste em um núcleo polifenólico (10) (Figura 6) composto por 15 átomos de carbonos organizados em três anéis, sendo dois, anéis de benzeno (A e B). As diversas possibilidades de modificação (adição, redução, glicosilação, amidação, hidroxilação etc.) na biossíntese do núcleo polifenólico é responsável por mais de 8000 variações de flavonoides já descritas na literatura (VILA, 2006) (FLAMBÓ, 2013)

Figura 6. Estrutura química do núcleo básico de flavonoides (10).

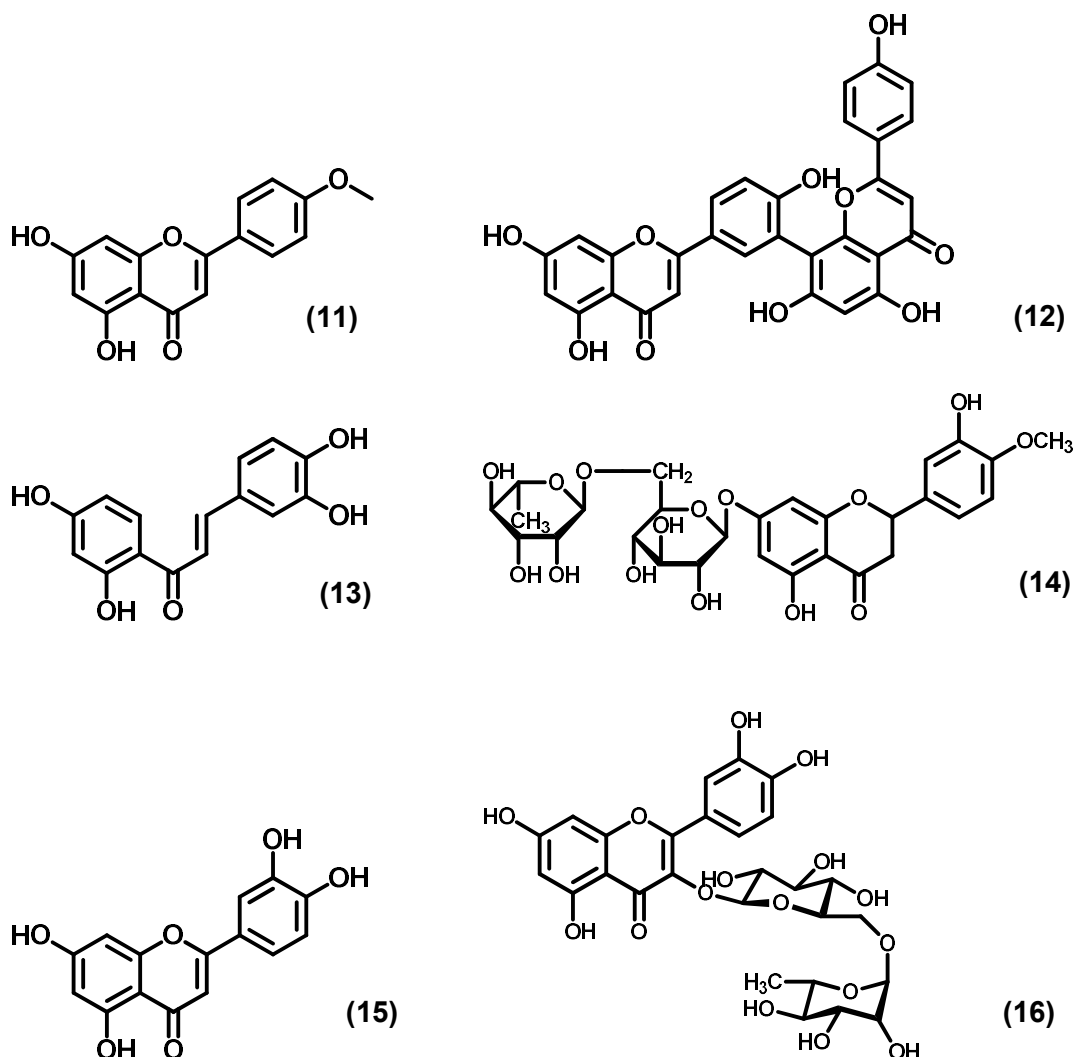


Fonte: Autor.

A biossíntese de flavonoides não ocorre no metabolismo humano, no entanto, estudos relataram que essa classe de substância atua na prevenção de doenças e na manutenção da saúde humana. (FLAMBÓ, 2013) (PANCHE et al., 2016).

Em uma revisão bibliográfica realizada por (SANTOS; RODRIGUES, 2017), as atividades antiviral, anti-inflamatória, antioxidante, antitumoral e antimicrobiana foram atribuídas a seis de flavonoides (Figura 7) incluídos em um universo de 8000 flavonoides: acacetina (11), amentoflavona (12), buteina (13), hesperidina (14), quercetina (15) e rutina (16). Em notoriedade as atividades apresentadas, é possível salientar a importância de pesquisas, na detecção e caracterização dos flavonoides, que permitem conhecer com maior acuidade seus mecanismos de ação.

Figura 7. Estruturas químicas dos flavonoides: acacetina (11), amentoflavona (12), buteina (13), hesperidina (14), quercetina (15) e rutina (16).



Fonte: Autor.

1.2.1 Afzelina (18)

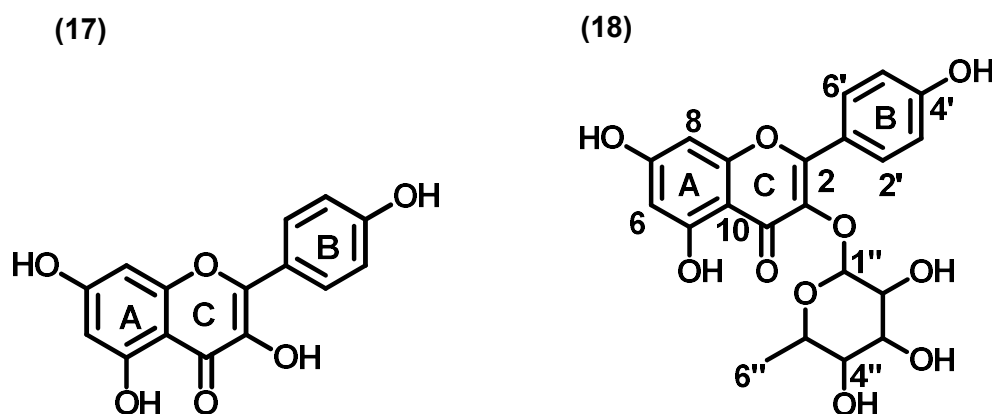
O kaempferol (17) (Figura 8), tem como característica a presença de hidroxilas nos carbonos 3, 5, 7 e 4' e uma carbonila cíclica insaturada no carbono 4 no núcleo básico dos flavonoides (11) (Figura 7). A presença de grupos hidroxilas pode favorecer a ligação com unidades de açúcares, proporcionando a obtenção de uma variedade de análogos do kaempferol. Um desses análogos, o kaempferol-3-ramnosídeo, é conhecido como afzelina (18) (Figura 8).

A afzelina (18) é um flavonoide natural composto por um ramnosídeo ligado através de uma ligação *O*-glicosídica ao núcleo kaempferol na posição 3. Este flavonoide está presente em diferentes espécies vegetais, como por exemplo: *Prunus tomentosa* (KIM et al., 2008), *Bauhinia forficata* (CECHINEL-ZANCHET et al., 2020), *Zingiber zerumbet* (MURATA et al., 2017), *Schima wallichii* (DIANTINI et al., 2012), *Cornus macrophylla* (LEE et al., 2014) e *Thesium chinense* (KIM, 2019).

A ampla distribuição de (18) no reino vegetal, que varia entre espécies consideradas comestíveis e medicinais, proporcionou a possibilidade de estudos sobre esse flavonoide em plantas originárias de diversos países, sendo assim, em contramão à muitas moléculas cujos potenciais não foram descobertos dada a carência de estudos, a afzelina conta com uma variedade de atividades biológicas relatadas.

Algumas dessas atividades são: ação diurética prolongada e poupadora de potássio, redutora da produção de ROS e nitrito em homogenato de rim, redutora da formação de cristais de oxalato de cálcio na urina, protetora renal (CECHINEL-ZANCHET et al., 2020), anti-colinesterase (MURATA et al., 2017), inibitória da proliferação de células de câncer de mama (DIANTINI et al., 2012), antibacteriana contra *Pseudomonas aeruginosa* (LEE et al., 2014), anti-inflamatória e antioxidante em células de queratinócitos expostas à material particulado (KIM, 2019).

Figura 8. Estrutura química dos flavonoides: kaempferol (17) e afzelina (18).



Fonte: Autor.

1.3 Doenças tropicais negligenciadas

As doenças tropicais negligenciadas (DTN) são um conjunto de doenças endêmicas infecciosas que incidem nas regiões consideradas subdesenvolvidas como partes da África, América Latina, Leste do Mediterrâneo, Sudeste da Ásia e Oeste do pacífico. Estima-se que 500 mil a 1 milhão de mortes por ano sejam causadas pelo conjunto de DTN. (DIAS, 2013)

Devido à carência de serviços básicos de água, higiene, saneamento básico, habitação adequada, serviços de saúde e educação, as doenças se propagam com maior facilidade entre as pessoas em situação de vulnerabilidade econômica. Além disso, quadros de deficiências nutricionais como anemia e desnutrição, comuns em zonas de carência econômica, estão associados ao agravamento das DNT para suas formas crônicas. (VALVERDE, 2013)

A origem social-econômica das doenças é o que as tornam negligenciadas, pois a necessidade de tratamentos de baixo custo inibe o interesse das indústrias farmacêuticas no financiamento de pesquisas para o desenvolvimento de fármacos nessa área. A consequência do desinteressante perante essas patologias, são opções terapêuticas limitadas e regadas de problemas como baixa eficácia e elevada toxicidade, como se não bastasse, o surgimento de

cepas resistentes aos tratamentos disponíveis torna-se cada vez mais frequentes. Posto isso, é notória a urgência em pesquisas que busquem melhorar o panorama das DTN. (DIAS, 2013) (ROSÁRIO, 2017)

1.3.1 *Schistosoma mansoni* – Esquistossomose

A esquistossomose, conhecida popularmente como “barriga d’água” e “doença do caramujo” é uma doença infecto parasitária causada pelo trematódeo *Schistosoma mansoni*. O parasito possui em seu ciclo biológico caramujos de água doce do gênero *Biomphalaria* como seu hospedeiro intermediário e o homem como seu hospedeiro definitivo.

Segundo dados de (ROCHA, 2016), em 2016 foi constatada a presença de aproximadamente 200 milhões de pessoas estão infectadas e 779 milhões sob risco de infecção pelo *Schistosoma mansoni* em todo mundo. O Brasil é o país com maior quantidade de casos da doença, entre os anos de 2010 e 2012 foram relatadas 1.464 mortes por esquistossomose. (Ministério da Saúde, 2014)

O ciclo evolutivo do *Schistosoma mansoni* é composto pelas formas evolutivas: verme adulto (macho e fêmea), ovo, miracídio, esporocistos, cercaria e esquistossômulo. A doença é adquirida pelo homem através da penetração ativa da cercaria na pele quando em contato com águas contaminadas, as cercárias desenvolvem-se para esquistossômulo após a infecção do hospedeiro definitivo. O esquistossômulo migra via corrente sanguínea e linfática e alojam-se principalmente em vasos sanguíneos do fígado e do intestino, onde evoluem para a forma adulta.

Os parasitos depositam seus ovos nos vasos portais mesentéricos, e principalmente, nas vênulas da parede do intestino. Os ovos são liberados através das fezes do hospedeiro e eclodem para a forma miracídio quando atingem o ambiente aquático, neste ambiente encontra-se seu hospedeiro intermediário. Ao penetrar as partes moles do hospedeiro intermediário, o miracídio perde algumas estruturas, as células remanescentes passam por um processo complexo de alterações morfológicas que compreende a forma de esporocistos. Os esporocistos depois de maduros se transformam em cercárias, reiniciando o ciclo de vida do parasito. (ROCHA, 2016)

Clinicamente a doença pode ser classificada em fase inicial e fase tardia, embora muitas pessoas permaneçam assintomáticas, dependendo da intensidade da infecção e das condições de saúde do indivíduo. A fase inicial, referente à penetração das cercárias, corresponde a uma dermatite/alergia na região. A fase tardia ou forma crônica, inicia-se a partir dos 6 meses após a infecção e caracteriza-se por manifestações clínicas de natureza hepatointestinal (diarréias e nodulações/fibrose hepática), somente hepática (fibrose e nódulos, sem diarréia), hepatoesplênica compensada (hipertensão portal, causando varizes no esôfago, dores abdominais atípicas, crescimento do baço e hemorragia) e hepatoesplênica descompensada (diminuição acentuada do estado funcional hepático, surtos hemorrágicos e isquemia hepática). (ROCHA, 2016) (GOMES et al., 2016)

O tratamento da esquistossomose consiste na administração de medicamentos específicos, atualmente os fármacos praziquantel e o xamniquina são utilizados para o tratamento de crianças e adultos, no entanto já foram relatados casos de baixa tolerabilidade desses medicamentos por crianças e indícios de cepas de parasitos resistentes. Estes relatos demonstram limitações no tratamento da esquistossomose, sendo assim, a busca por novos fármacos capazes de auxiliarem no tratamento evidencia-se necessária. (ROCHA, 2016) (FUNDAÇÃO FIO CRUZ, 2020)

1.3.2 *Trypanosoma cruzi* – Doença de Chagas

O *Trypanosoma cruzi*, uma das espécies de protozoário pertencentes ao gênero *Trypanosoma*, é o agente etiológico responsável pela doença de Chagas (DC). A doença é transmitida através de triatomíneos que atuam como vetores. Dados de 2016 estimaram no mundo cerca de 6-8 milhões de pessoas infectadas e 65-100 milhões de pessoas em risco de infecção, sendo os países da América Latina os mais afetados. (ÁLVAREZ-HERNÁNDEZ et al. 2016)

O ciclo biológico básico do *T. cruzi*, consiste em 3 formas evolutivas, tripomastigotas, amastigotas e epimastigotas. A forma tripomastigota, é sua forma infecciosa para os hospedeiros vertebrados, a forma amastigota é a forma na qual o parasito é encontrado no interior das células de hospedeiro celular, nessa forma ele é capaz de se multiplicar por fissão binária.

Quando na forma epimastigota o parasito também é capaz de se multiplicar por fissão binária, nesta forma a presença de flagelos lhe confere intensa mobilidade, possibilitando então, a ancoragem ao epitélio do colón no trato gastrointestinal dos vetores, onde após um período de multiplicação, retornam a forma tripomastigota. (COSTA et al, 2013) (ÁLVAREZ-HERNÁNDEZ et al. 2016) (PINHEIRO et al. 2017)

A transmissão da doença de chagas ocorre por diferentes métodos: via oral (ingestão de alimentos contaminados), vetorial, por via transfusional (transusão de sangue), transplantar (transplante de órgãos), transmissão congênita (transplacentária ou contato com sangue da mãe durante o parto) e por acidentes laboratoriais. A via vetorial, correspondente à 80% dos casos de infecção, dá-se quando o triatomíneo defeca após picar o humano, pois o incomodo gerado pela picada leva o humano a coçar o local, propiciando a penetração dos tripanossomos presentes nas excreções do vetor. (ÁLVAREZ-HERNÁNDEZ et al. 2016) (PINHEIRO et al. 2017)

A doença de chagas pode apresentar duas fases clínicas distintas, a fase aguda e a fase crônica, sendo que a fase aguda pode desenvolver-se para fase crônica em pacientes imunodeprimidos. Na fase aguda sintomática podem surgir edemas nas pálpebras e nódulos em qualquer região do corpo. A fase crônica sintomática se caracteriza por cardiopatia grave gerada por mudanças anatômicas no miocárdio e no tubo digestivo. (COSTA et al, 2013) (ÁLVAREZ-HERNÁNDEZ et al. 2016)

Para o combate da doença de chagas o principal caminho encontra-se na melhoria das condições habitacionais, como saneamento básico e cuidados com higiene local, que diminuam a incidência de focos de criação do vetor. O combate ao vetor impacta diretamente em todas as vias de transmissão, contudo, o controle de qualidade dos serviços de hemoterapia também se faz necessário. (PINHEIRO et al. 2017) (COSTA et al, 2013)

2. OBJETIVOS

- I. Preparar extratos hexânicos, acetônicos e etanólicos dos frutos de *P. nitens*;
- II. Isolar e identificar alcaloides e flavonoides dos extratos etanólicos de *P. nitens*;
- III. Avaliar o potencial farmacológico dos extratos e das substâncias buscando a descoberta de agentes antiparasitários contra *Schistosoma mansoni* e *Trypanosoma cruzi*.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Coleta do material botânico

A coleta, de aproximadamente 920g, do material vegetal foi realizada no Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE), São José do Rio Preto – SP, Brasil (20°47'02,00''S, 49°21'35,57''W), no dia 17 de maio de 2018, sob orientação do Prof. Dr. Luis Octávio Regasini, que possui um extenso histórico de estudos com a planta *Pterogyne nitens* Tulasne (Fabaceae – Caesalpinioideae). (REGASINI, 2008a) (REGASINI et al., 2008b) (REGASINI et al., 2009) (TAJIMA et al., 2013) (LOPES et al, 2009) (FERREIRA et al., 2009) (COQUEIRO et al, 2014).

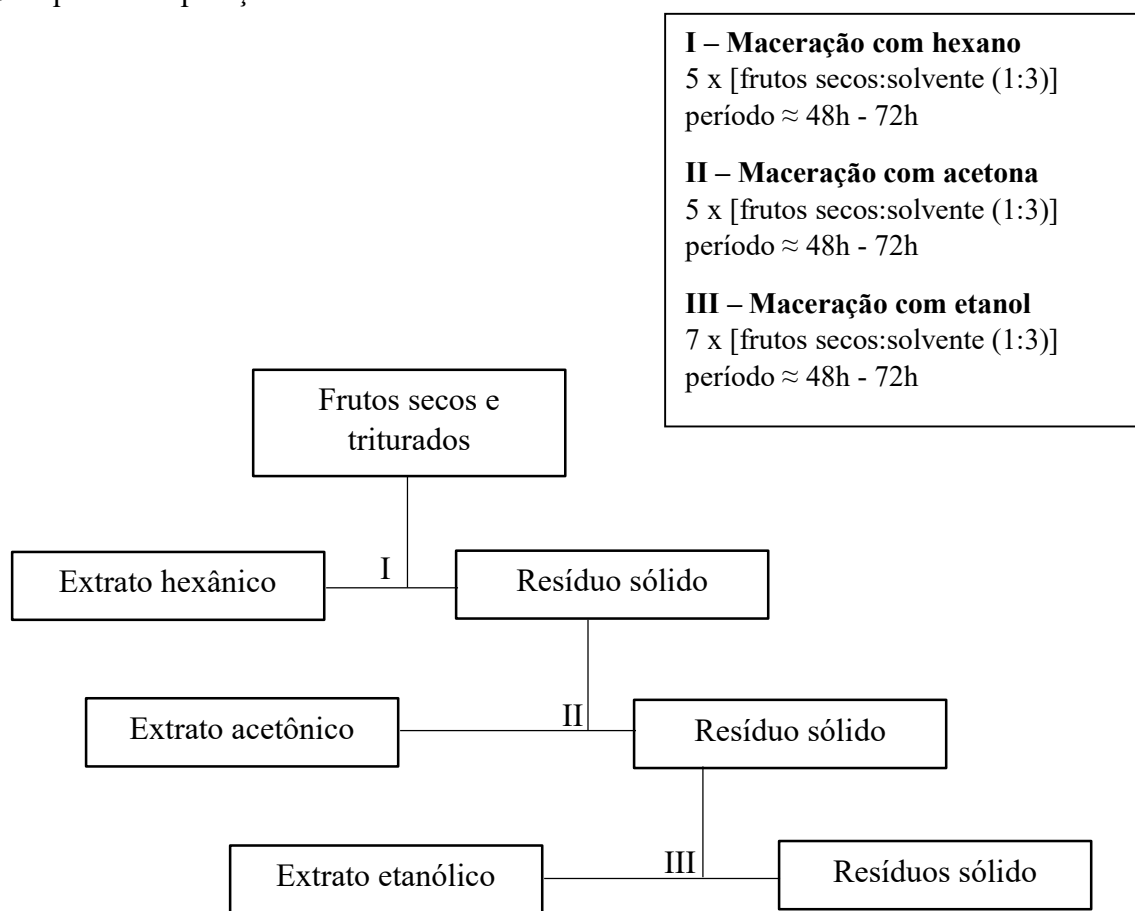
Uma exsicata (HISA 10291) foi depositada no Herbário de Ilha Solteira (HISA). O número de acesso à biodiversidade brasileira A85B7D5 foi registrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado.

3.2 Material vegetal e produção dos extratos

O esquema representado na figura 9 ilustra o processo para obtenção dos extratos dos frutos de *P nitens*. Os frutos coletados foram secos à temperatura ambiente e triturados utilizando um moinho de facas. O material triturado foi dividido igualmente em três porções de aproximadamente 300 g recipientes de vidro com volume de 3L cada. Para a produção dos extratos, os recipientes foram preenchidos com 2,3 L do solvente respectivo ao extrato, seguindo a proporção 1:3 (folhas secas:solvente) de altura.

Após o período entre 48h-72h sob agitação esporádica os extratos dos frutos foram filtrados e a solução resultante concentrada sob pressão reduzida em um evaporador rotativo digital. Este processo foi repetido 5 vezes para os extratos hexânico (EHF) e acetônico (EAcF) e 7 vezes para o extrato etanólico (EEtF). Os extratos concentrados obtidos do processo de maceração foram reunidos e tiveram seus rendimentos calculado (Tabela 1).

Figura 9. Esquema - reparação dos extratos.



Fonte: Autor.

Tabela 01. Rendimento estimado dos extratos

Massa dos frutos secos (g)	Tipo de extrato	Código	Massa dos extratos obtidos (g) (rendimento, %) ^a
920	hexânico	EHF	30,0 (3,26)
	acetônico	EAcF	26,9 (2,92)
	etanólico	EEtF	27,2 (2,96)

a- Os rendimentos foram calculados em função da massa de frutos secos e moídos.

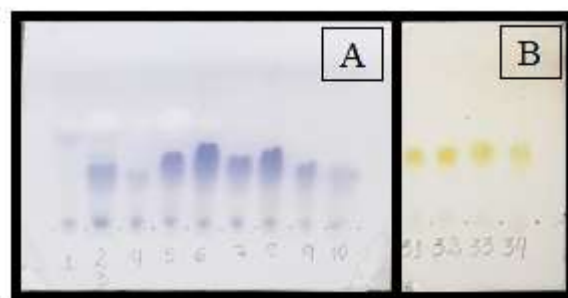
Em uma tentativa de solubilizar o extrato etanólico com etanol para efetuar uma transferência de frasco, foi observada a formação de um precipitado esbranquiçado [(EEtF (ppt))], uma alíquota deste precipitado foi coletada para testes posteriores.

3.3 Isolamento

Quatro alíquotas do EEtF foram submetidas à Cromatografia de Permeação em Gel (CPG, LH-20, Sephadex®) (150 x 5 cm) e eluídas com etanol (Tabela 2). As frações de interesse foram identificadas por análise de Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA) reveladas nos comprimentos de onda 254 e 365 nm e com o revelador químico

anisaldeído sulfúrico. Foram denominadas frações flavonoidicas aquelas que apresentaram coloração amarela (Figura 10) e frações alcaloidicas aquelas que apresentaram coloração roxa (Figura 10) após tratamento da cromatoplaça com anisaldeído sulfúrico. Além disso, as CCD das frações alcaloidicas foram reveladas com reagente de Dragendorff, apresentando coloração laranja (Figura 11).

Figura 10. Cromatoplaças das frações flavonoidicas e alcaloídicas reveladas com Anisaldeído Sulfúrico. [(A) Coloração referente às frações alcaloidicas; (B) Coloração referente às frações flavonoidicas.]



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 11. Cromatoplaças das frações alcaloídicas reveladas com reagente de Dragendorff.



Fonte: Arquivo pessoal.

Tabela 02. Colunas EEtF [(CPG, LH-20, Sephadex®) (150 x 5 cm)]

Código da coluna	Massa EEtF (g)	Nº das frações alcaloídicas [massa (mg)]	Nº das frações flavonoidicas [massa (mg)]
EEtF-C1	1	08-09 ^b [12,3]	31-36 [13,3]
		10 [2,9]	37-46 [29,4]
		11-13 [3,9]	
EEtF-C2	1		35-39 [12,5]
			40-44 [19,1]
		14-16 [57,8]	45-58 [61,8]
			59-63 [40,0]
EEtF-C3	1	14-21 [93,3]	43-56 ^c [64,2]
		22-33 [178,6]	
EEtF-C4	4	09-12 [138,9]	
		13-14 [124,2]	
		15-16 [110,7]	32-37 ^c [101,7]
		17-19 [72,0]	38-45 [128,9]
		20-31 [588,9]	

^b Foi realizada a análise por Ressonâncias Magnética Nuclear (RMN) ¹H e/ou ¹³C

^c As frações foram selecionadas para a continuidade do trabalho.

As frações selecionadas (^c, tabela 2) foram purificadas através da Cromatografia em Coluna de Fase Normal (CC-FN). Para maior efetividade da técnica aplicada, a proporção dos solventes para composição da fase móvel foi estudada utilizando-se CCD. Neste estudo visou-se obter um perfil em CCDA no qual fosse observado maior diferença de fatores de retenção (Rf) entre o composto de interesse e produtos minoritários.

Tabela 03. Colunas de purificação.

Código da coluna	Dimensões da Coluna (cm)	Fase estacionária / Fase móvel	Fração purificada	Massa (mg)
EEtF-P2	(25 x 5)	Sílica gel / CHCl ₃ :MeOH (8:2)	32-37 (EEtF-C4)	101,7
EEtF-P3			43-56 (EEtF-C3)	64,2

Todo o processo de purificação foi acompanhado através de análises por CCDA reveladas com o reagente Anisaldeído. As frações consideradas puras foram selecionadas para a Identificação (subitem 3.4).

3.4 Identificação

Visando a identificação de suas estruturas, efetuou-se a coleta de amostras com massa entre 3 e 9 mg, das frações 5-6 e 9 da coluna EEtF-P3 classificadas como puras, para análise Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio Um. Com o mesmo intuito, foi também coletado aproximadamente 9 mg de cada fração considerada pura (44-48 e 49-55) da coluna EEtF-P2 e da fração 8-9 (EEtF-C1) para a realização das análises de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio Um e Ressonância Magnética Nuclear de Carbono Treze. Ambas as amostras coletadas foram solubilizadas em DMSO_d [dimetil-sulfóxido deuterado (CD₃COCD₃)]

As estruturas foram identificadas após a análise dos espectros obtidos confrontando seus valores com os dados da literatura. (REGASINI, 2008a)

3.5 Ensaios Biológicos

3.5.1 Avaliação da atividade dos extratos e substâncias de *P. nitens* contra *Schistosoma mansoni* linhagem LE *in vitro*.

Uma amostra de cada extrato foi enviada para o Laboratório de Pesquisa em Parasitologia (LAPPA) na Universidade de Franca.

Para o ensaio, uma placa de cultura de 24 poços foi preparada com a adição de 2 mL de meio RPMI 1640 (Inlab, Campinas, São Paulo) tamponado com HEPES 20μM, pH 7,5 e suplementado com penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 μg/mL) (Gibco) e 10% de soro bovino fetal (Gibco) em cada poço. Em seguida transferiu-se 2 casais de vermes adultos de *Schistosoma mansoni* linhagem Luíz Evangelista (LE) para cada poço e efetuou-se a incubação em atmosfera umidificante a 37°C na presença de 5% de CO₂ por 24 horas.

Para cada extrato o procedimento seguido foi sua solubilização em dimetil-sulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich) e a respectiva aplicação nas concentrações de 12,5, 25, 50, 100 e 200 μg/mL. Como controles foram utilizados Praziquantel (PZQ) (Sigma-Aldrich) previamente solubilizado em DMSO e adicionado na concentração 1,6 μM (controle positivo), meio RPMI 1640 suplementado mais 0,5% de DMSO (controle solvente) e apenas meio RPMI 1640 suplementado (controle negativo). Cada concentração foi aplicada em 4 poços, resultando em um n amostral de 16 vermes (8 casais) para cada concentração.

Os casais de vermes adultos foram visualmente analisados por meio de um microscópio invertido (Microscópio Primo Vert, Carl Zeiss) (4 – 10x) após os períodos de 24, 48 e 72h. A análise consistiu na observação e classificação de alterações fenotípicas de acordo com uma escala de viabilidade de parasitos (0-3) sendo: 3 para vermes normais, fixados na placa com bons movimentos; 2 para vermes com movimentos lentos; 1 para vermes movimento severamente reduzido, com ou sem alterações no tegumento e o valor 0 para vermes mortos ou com ausência de movimentos após dois minutos de análise (RAMIREZ et al. 2007).

3.5.2 Avaliação da atividade dos extratos e substâncias de *P. nitens* contra *Trypanosoma cruzi* *in vitro*

O precipitado [EEtF (ppt)], assim como amostras dos extratos EEtF, EAeF e EHF foram encaminhados para o Centro de Parasitologia e Micologia do Instituto Adolfo Lutz a fim de avaliar uma possível atividade contra *Trypanosoma cruzi*.

Para o ensaio, realizado em parceria com o Prof^o Dr. André Gustavo Tempone, de acordo com (MORAIS; COSTA-SILVA; TEMPONE et al, 2014) (PINTO; TEMPONE, 2012), as amostras foram dissolvidas e diluídas em meio RPMI-1640, suplementado com 2% de soro fetal bovino em uma microplaca de 96 poços.

Formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*, obtidas de células LLC-MK2, foram contadas com auxílio de um hemocitômetro e semeadas na microplaca à uma concentração de 1×10^6 /poço. Após esse procedimento, as amostras foram incubadas por 24h à 37 °C em estufa de CO₂ (5%). A viabilidade dos tripomastigotas foi verificada através de ensaio colorimétrico utilizando-se MTT. (MOSMANN, 1983)

Para o ensaio, foi adicionado 20 µL/poço de MTT 5 mg/mL dissolvido em uma solução tampão fosfato-salina (PBS), e esterilizado através de uma membrana com porosidade de 0,22 µm, em seguida, efetuou-se uma incubação, nas mesmas condições anteriores, por 4h.

O Formazan foi extraído utilizando 10% de dodecil sulfato de sódio (SDS). A densidade óptica foi determinada com o auxílio de um leitor de placas espectrofotométrico a 570 nm. Os controles negativos (100% de viabilidade) empregues foram tripomastigotas incubados sem compostos ou DMSO e para o branco, poços sem células. Como controle positivo (100% de morte), foi utilizado benznidazol, e como controle negativo ausência de fármaco e DMSO. Foram consideradas ativas as amostras que resultaram na morte de 50% dos indivíduos para concentração utilizada (300µg/mL).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Substâncias isoladas

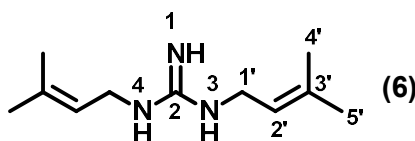
As frações selecionadas (°, tabela 02) foram purificadas através da Cromatografia em Coluna de Fase Normal (CC-FN). Nesta técnica as substâncias presentes na amostra interagem com a fase estacionária (sílica gel) de acordo com suas polaridades, o tempo de retenção do soluto na coluna aumenta à medida que sua polaridade aumenta. A fase móvel, ou eluente, tem como função deslocar os solutos coluna abaixo. Os solventes, ou eluentes, mais polares (Metanol p.e.) competem com as substâncias pelos sítios de adsorção da sílica, facilitando a dessorção, os solventes menos polares, como hexano e clorofórmio, carregam as moléculas mais apolares, no entanto, não facilitam a dessorção. (NETO; SILVA; NUNES, 2003) (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006)

Das frações flavonoídicas isoladas nas colunas de CC-FN (tabela 3) e enviadas para RMN ^1H e/ou ^{13}C , após a interpretação e comparação dos espectros com dados da literatura, ambas as frações foram identificadas como o flavonoide Afzelina. Além do flavonoide isolado das colunas EEtF-P2 e EEtF-P3, o alcaloide pteroginidina, isolado na coluna EEtF-C1 também foi identificado através da comparação dos seus espectros.

4.1.1 Pteroginidina

Os deslocamentos químicos (δ) encontrados para a fração 8-9 (EEtF-C1) estão de acordo com os sinais obtido por Regasini (2008a), tanto para a análise de RMN ^1H (ANEXO 1, p. 43), quanto para a análise de RMN ^{13}C (ANEXO 2, p. 43), os valores estão apresentados na tabela 04. Com base nesses valores, é possível inferir que a substância isolada é o alcaloide guanidínico pteroginidina (6) (Figura 12). No entanto, além dos sinais característicos da pteroginidina, é possível observar no espectro de hidrogênio um singleto em δH 8,32, com baixo valor de integração (0,16), e no espectro de carbono a presença de dois sinais a mais (δ 40,81 e 79,63 ppm), esses sinais indicam a provável presença de alguma substância traço não identificada.

Figura 12. Estrutura química do alcaloide guanidínicos, pteroginidina (6).



Fonte: Autor.

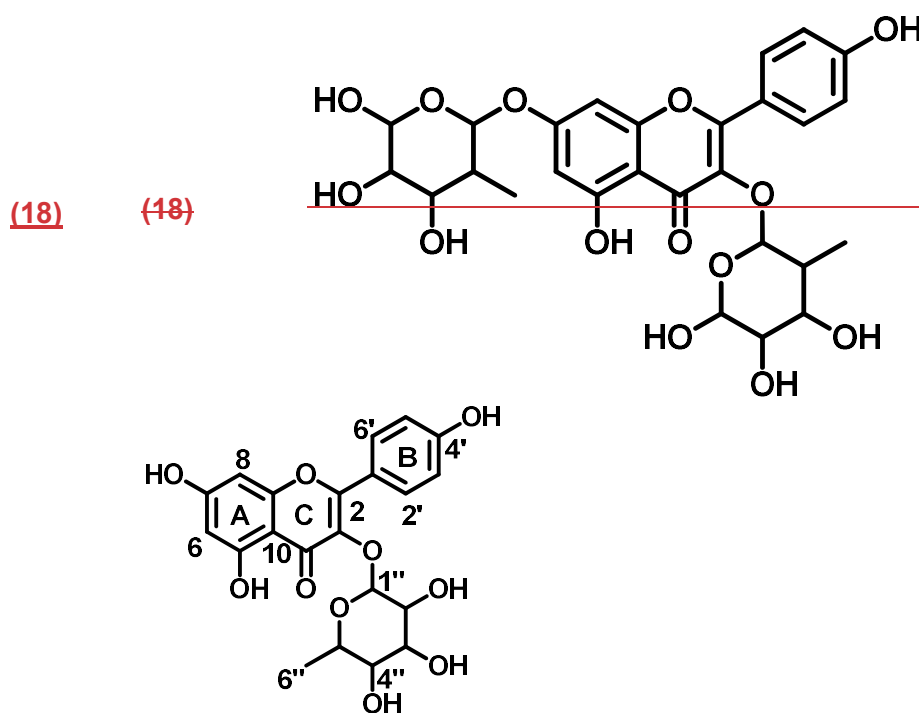
Tabela 04. Comparação entre os sinais de RMN ^1H e ^{13}C obtidos para a pteroginidina (6) (Figura 12), fração 8–9 (EetF-C1) (ANEXOS 1 e 2, p. 43), com os sinais encontrados na literatura.

Posição	Sinais obtidos		Sinais da literatura ^x	
	δ_{H} ; mult., J (Hz)	δ_{C}	δ_{H} ; mult., J (Hz)	δ_{C}
1	7,20, sl	-	7,2; sl	-
2	-	157,3	-	156,9
3 e 4	7,70, s	-	7,72; t; 6,5	-
1'	3,71, t, 5,24	39,2	3,70; t; 6,5	38,7
2'	5,19, t, 6,78	119,5	-	119
3'	-	136,7	1,63; s	136,0
4'	1,64, s	25,7	1,69; s	17,7
5'	1,71, s	18,3	1,69; s	25,1

^x (REGASINI, 2008a)

4.1.2 Afzelina (18)

Figura 13. Estrutura química do flavonoide Afzelina (18).



Fonte: Autor.

Tabela 05. Comparação entre os sinais de RMN ^1H e ^{13}C obtidos com os sinais encontrados para a afzelina na literatura.

Posição	Sinais obtidos		Sinais da literatura	
	δ_{C}	δ_{H} ; mult., J (Hz)	δ_{C}	δ_{H} ; mult., J (Hz)
2	157,0	-	157,3	-
3	134,6	-	134,3	-
4	178,1	-	177,8	-
5	160,4	-	161,3	-
6	99,24	6,20; d; 2,0	98,8	6,19; d; 2,0
7	164,9	-	164,3	-
8	94,2	6,40; d; 2,0	93,8	6,40; d; 2,0
9	157,7	-	156,6	-
10	104,5	-	104,2	-
1'	121,0	-	120,6	-
2' e 6'	131,1	7,75; d; 8,8	130,7	7,73; d; 9,0
3' e 5'	115,8	6,92; d; 8,8	115,5	6,9; d; 9,0
4'	161,7	-	160,0	-
1''	102,2	5,29; d; 1,2	101,8	5,27; d; 2,0
2''	70,8	3,47; dd, 3,0 e 9,1	70,4	3,47; m
3''	70,5	3,97–3,98, m	70,1	3,96; m
4''	71,6	3,14, t, 9,1	71,2	no
5''	71,1	3,06–3,15, m	70,7	3,09; m
6''	17,91	0,8, d, 6,0	17,5	0,77; d; 5,5

Nos espectros de RMN ^1H (ANEXOS 3 e 5, p. 44–45), relativos às frações flavonoídicas 44-48 e 49-55 da coluna (EEtF-P2) e 9 da coluna (EEtF-P3), foram observados dois dupletos com deslocamento químico (δ_{H}) de 6,21 e 6,41 ppm constante de acoplamento (J) de 2,0 Hz que indicam um sistema de substituição 5,7 no anel aromático A do núcleo flavona, os quais foram atribuídos aos hidrogênios 6 e 8.

Foram identificados outros dois dupletos, ambos integrando para dois hidrogênios, sendo um em 6,92 ppm, atribuídos aos hidrogênios 3' e 5', e o segundo em δ_{H} 7,75 ppm, atribuídos aos hidrogênios 2' e 6' do anel B, apresentando $J = 8,8$ Hz. O singlete em δ_{H} 12,6 e os singletos largos em δ_{H} 10,3 e 9,5 foram atribuídos aos hidrogênios das hidroxilas fenólica 5,7 e 4', respectivamente.

Pode-se inferir por meio de análise de espectros da literatura, que o núcleo flavona está ligado a uma unidade de açúcar, por meio de uma ligação *O*-glicosídica, essa constatação é relativa aos multipletos na região de δ_{H} 3,0 a 4,0 ppm designados aos hidrogênios carbinólicos, e aos hidrogênios anoméricos na região entre δ_{H} 4,0 e 5,0 ppm. O duplete na região em 5,30 ($J = 1,22$ Hz) com integração de 1 e o dubleto em 0,80 ppm ($J = 6,0$ Hz), indicam a presença de uma unidade α -hexose (REGASINI, 2008a).

O espectro de carbono da fração 44–48 (EEtF-P2) resultou em 19 sinais (ANEXO 4, p. 44). Os sinais em δ 156,97, 134,3, e 178,14 foram atribuídos aos carbonos 2, 3 e 4, respectivamente, confirmando a obtenção do anel C flavonoidico. Os sinais de maiores amplitudes em δ_{C} 115,85 e 131,06 foram atribuídos aos pares de carbonos C-2'/C-6' e C-3'/C-5', respectivamente. Dessa forma, a presença de um dubleto em δ_{H} 0,8 ($J = 6,0$ Hz) e do sinal

atribuído a um carbono metílico em δ_c 17,9, sugerem que esta hexose seja referente a uma ramnose.

Como elucidado na Tabela 05 de comparação dos sinais obtidos, com os sinais descritos por (REGASINI, 2008a), trata-se do flavonoide afzelina.

4.2 Ensaios biológicos

Com base nos estudos de (CRIVOS, 2007) que apresentou a utilização das cascas de caule do amendoim bravo no tratamento de uma parasitose, e nos estudos de (LIMA, 2020) que identificou potente atividade anti-helmíntica *in vitro* de extratos etanólicos de folhas e frutos de *P. nitens* contra *Haemonchus contortus* e *Trichostrongylus colubriformis*, foi motivada a busca por uma possível atividade antiparasitária dos frutos contra *Schistosoma mansoni* (subitem 4.2.1) e *Trypanosoma cruzi*. (subitem 4.2.2).

4.2.1 Atividade dos extratos EEtF, EAcf e EHF contra *Schistosoma mansoni* linhagem LE *in vitro*

Os resultados dos ensaios dos extratos EEtF, EAcf e EHF contra *Schistosoma mansoni* LE foram expressos em redução da viabilidade dos vermes adultos após incubação com amostra nas concentrações de 12,5, 25, 50, 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$ de cada extrato individualmente. Os valores obtidos foram organizados nos gráficos das Figuras 15–17 e nas tabelas 06–08.

O extrato etanólico (Tabela 06) foi o único que expressou valores maiores do que $0,00 \pm 0,00$ para todas as concentrações entre 25 e 200 $\mu\text{g/mL}$. A redução de viabilidade (RV) de 4,16% do EEtF (Tabela 06) para todos os períodos de incubação à concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$ foi aproximadamente 75% menor do que a RV de 10,67% resultantes dos testes com 100 $\mu\text{g/mL}$, esse decréscimo indica uma não proporcionalidade entre concentração e atividade.

Figura 14. Gráfico de Redução da Viabilidade dos vermes adultos de *Schistosoma mansoni* (LE) após incubação com amostra (EEtF). (Realizados 2 ensaios independentes nas concentrações de 12,5 a 200 µg/mL durante 24 e 48 horas. Dados expressos em média ± desvio padrão).

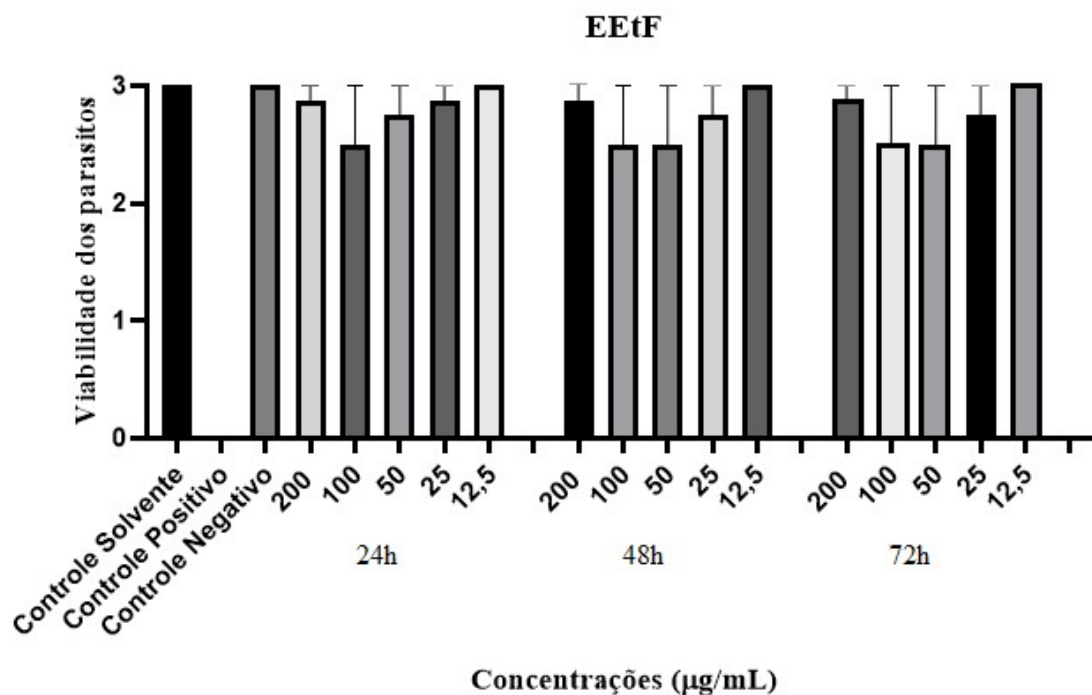


Tabela 06. Porcentagem de redução da viabilidade de vermes adultos de *Schistosoma mansoni* (LE) após incubação com o EEtF.

	% redução		
	24h	48h	72h
Controle Negativo ^e	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
Controle Positivo ^f	100,00±0,00	100,00±0,00	100,00±0,00
200 µg/mL	4,16±4,16	4,16±4,16	4,16±4,16
100 µg/mL	16,67±10,91	16,67±10,91	16,67±10,91
50 µg/mL	8,33±8,33	16,67±10,91	16,67±10,91
25 µg/mL	4,16±4,16	8,33±8,33	8,33±8,33
12,5 µg/mL	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00

^eControle negativo: meio RPMI 1640 + 0,5% de DMSO

^fControle positivo: meio RPMI 1640 + 1,56 µM de PZQ

O extrato acetônico (EAcF) (Tabela 07) expressou uma porcentagem de inibição de $6,06 \pm 4,18$ para a concentração $12,5 \mu\text{g/mL}$ após os períodos de 48 e 72h horas de incubação, singularmente aos demais extratos (Tabelas 06 e 08), os quais não expressaram valor diferente de $0,00 \pm 0,00$ nesta concentração. No entanto, o EAcF (Tabela 07) expressou o valor $0,00 \pm 0,00$ para todos os períodos de incubação na concentração de $50 \mu\text{g/mL}$, demonstrando uma não proporcionalidade entre a concentração e sua atividade.

Para a concentração de $200 \mu\text{g/mL}$ após 72h de incubação, o EAcF (Tabela 07) demonstrou 21,05% de redução da viabilidade, sendo esta, a maior porcentagem obtida entre todos os demais resultados, incluindo as variações de tempo e concentração. Contudo, ainda que este seja o maior valor obtido, o mesmo é insuficiente para classificar o extrato como ativo.

Figura 15. Gráfico de redução da viabilidade dos vermes adultos de *Schistosoma mansoni* (LE) após incubação com amostra (EAcF). (Realizados 2 ensaios independentes nas concentrações de 12,5 a $200 \mu\text{g/mL}$ durante 24 e 48 horas. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão).

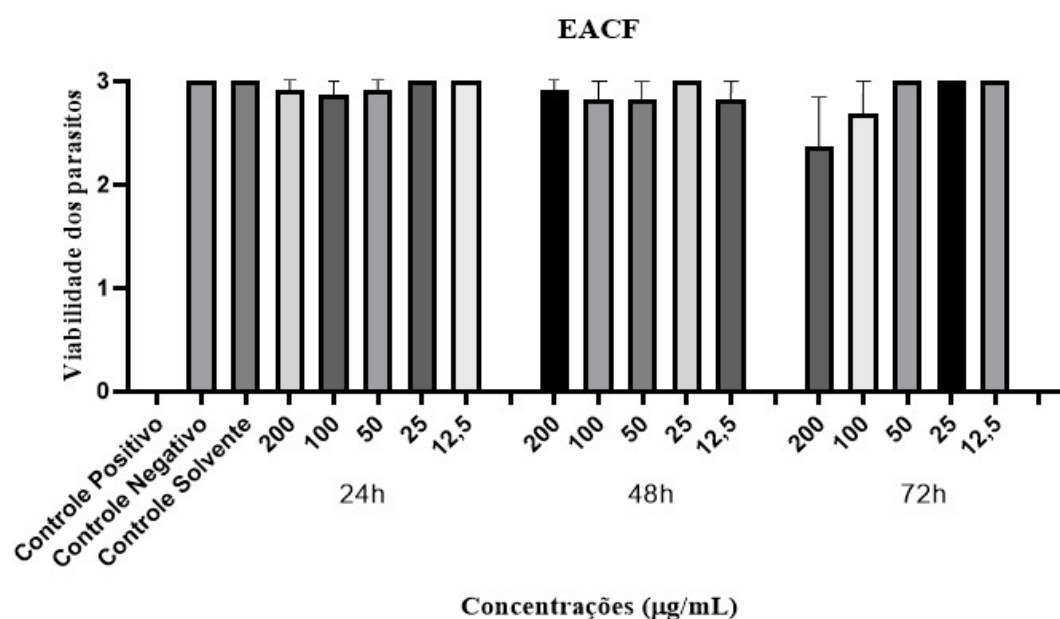


Tabela 07. Porcentagem de redução da viabilidade de vermes adultos de *Schistosoma mansoni* (LE) após incubação com o EAcF.

	% redução		
	24h	48h	72h
Controle Negativo ^e	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
Controle Positivo ^f	100,00±0,00	100,00±0,00	100,00±0,00
200 µg/mL	3,30±2,09	3,30±2,09	21,05±3,79
100 µg/mL	4,54±2,49	6,06±2,80	10,53±3,65
50 µg/mL	3,30±2,09	6,06±4,18	6,06±4,18
25 µg/mL	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
12,5 µg/mL	0,00±0,00	6,06±4,18	6,06±4,18

^eControle negativo: meio RPMI 1640 + 0,5% de DMSO

^fControle positivo: meio RPMI 1640 + 1,56 µM de PZQ

Para os testes efetuados nas concentrações de 12,5–100 µg/mL, o extrato hexânico do fruto (EHF) (Tabela 08), expressou 0% de redução da viabilidade, sendo o menor resultado entre os três extratos estudados.

Figura 16. Gráfico de redução da **viabilidade dos vermes adultos de *Schistosoma mansoni* (LE) após incubação com amostra (EHF)**. (Realizados 2 ensaios independentes nas concentrações de 12,5 a 200 µg/mL durante 24 e 48 horas. Dados expressos em média ± desvio padrão).

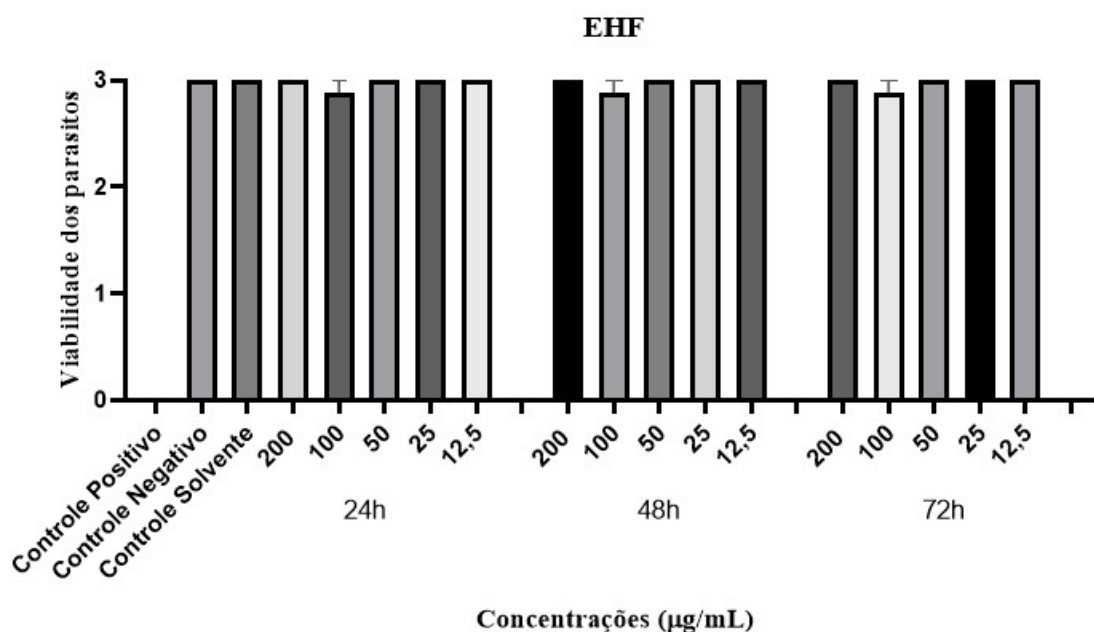


Tabela 08. Porcentagem de redução da viabilidade de vermes adultos de *Schistosoma mansoni* (LE) após incubação com o EHF.

	% redução		
	24h	48h	72h
Controle Negativo ^e	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
Controle Positivo ^f	100,00±0,00	100,00±0,00	100,00±0,00
200 µg/mL	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
100 µg/mL	3,70±3,70	3,70±3,70	3,70±3,70
50 µg/mL	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
25 µg/mL	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
12,5 µg/mL	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00

^eControle negativo: meio RPMI 1640 + 0,5% de DMSO

^fControle positivo: meio RPMI 1640 + 1,56 µM de PZQ

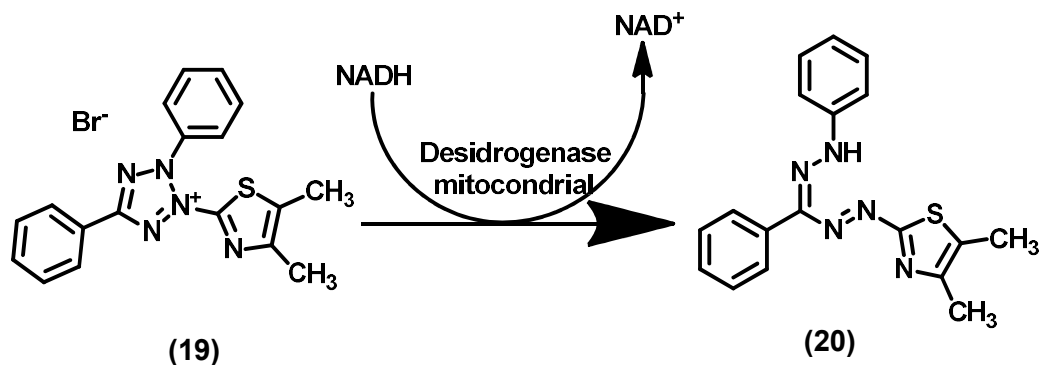
Os valores nas Tabelas 6–8 representam em porcentagem as médias dos valores obtidos através da classificação visual dos vermes com base na escala de 0–3, na qual os valores 3 e 2 significam respectivamente vermes normais, fixados na placa com bons movimentos e vermes com movimentos lentos. Os gráficos das Figuras 14–16, demonstram que nenhum extrato obteve o parâmetro viabilidade dos parasitos menor que 2, sendo assim, os extratos testados foram inativos, posto que não houve morte de parasitos.

4.2.2 Atividade contra *Trypanosoma cruzi in vitro*

O precipitado obtido do EEtF [EEtF (ppt)] e os extratos EEtF, EAcF e EHF tiveram sua atividade antiparasitária avaliada contra *T. cruzi in vitro* utilizando o método de MTT. O método do ensaio colorimétrico realizado com MTT consiste na quantificação do dano causado pelo composto testado ao metabolismo celular. A quantificação foi realizada por meio da avaliação da atividade de enzimas desidrogenases mitocondriais, pois, a viabilidade das mitocôndrias incide diretamente na viabilidade celular.

As enzimas desidrogenases promovem a reação de redução do MTT (**19**), um sal de coloração amarelada e solúvel em água, a formazan (**20**), um sal de coloração roxa e insolúvel em água (Figura 17) (MAGALHÃES; THÁ; LEME, 2018), desta forma, considera-se que a mudança de coloração atesta a viabilidade celular e, portanto, inatividade dos compostos testados.

Figura 17. Reação de redução do MTT (19) a formazan (20)



Fonte: Autor.

Os resultados do ensaio biológico de atividade contra *Trypanosoma cruzi* foram expressos em porcentagem (%) de morte de *T. cruzi*. Os valores obtidos, demonstrados na tabela 10, evidenciam que nenhum dos extratos testados foi capaz de reduzir a quantidade de parasitos vivos, sendo considerados inativos.

Tabela 17. Tabela 8. Porcentagem de morte de *T. cruzi* para o precipitado (EEtF-ppt) e para os extratos EHF, EAcF, EEtF.

Código da amostra	Massa da amostra (mg)	% morte de <i>T. cruzi</i>
EHF	15,1	0
EAcF	3,5	0
EEtF (ppt)	4,9	0
EEtF	5,7	0

Valores para interpretação:

0%- Não houve morte do parasito na concentração testada = Não ativo;

50%- Morte de aproximadamente 50% na concentração testada = Moderadamente ativo;

100% - Morte de 100% dos parasitos = Ativo.

5. CONCLUSÃO

O estudo fitoquímico dos frutos de *Pterogyne nitens* resultou na produção de três extratos: extrato hexânico (EHF), extrato acetônico (EAcF) e extrato etanólico (EEtF). Após etapas de isolamento e identificação, dois metabólitos secundário foram isolados a partir do extrato etanólico.

Entre os dois metabólitos, foi obtido um alcaloide guanidínicos, identificado como pteroginidina (**6**), e o flavonoide, identificado como afzelina (**18**). Mais análises são necessárias para caracterização dos compostos isolados, pois ainda que as interpretações corroborem com os resultados obtidos, é importante descartar a possível identificação de isômeros.

Os três extratos foram enviados para ensaios biológicos em busca de atividade antiparasitária contra *Schistosoma mansoni* LE e *Trypanosoma cruzi*, além dos extratos, um precipitado obtido do extrato etanólico também foi encaminhado para ensaio biológico contra *Trypanosoma cruzi*. Em ambos os ensaios não foi verificada morte de parasitos, de tal modo, os compostos testados foram considerados inativos tanto para o teste com *Schistosoma mansoni*, quanto para o ensaio com *Trypanosoma cruzi*.

6. BILIOGRAFIA

- ÁLVARES-HERNÁNDEZ, D. A.; FRANYUTI-KELLY, G. A.; DIÁS-LÓPES-SILVA, R. **Chagas disease: current perspectives on a forgotten disease.** Revista Médica del Hospital General de México, 2016.
- ALONSO-CASTRO, A. J.; ORTIZ-SÁNCHEZ, E.; GARCÍA-REGALADO, A. et al. **Kaempferitrin induces apoptosis via intrinsic pathway in HeLa cells and exerts antitumor effects.** Journal of Ethnopharmacology, 145, 476-489, 2013.
- ÁNGELES-LÓPEZ, G. E.; GONZÁLEZ-TRUJANO, M. E.; RODRÍGUEZ, R. et al. **Gastrointestinal activity of *Justicia spicigera* Schltdl. In experimental models.** Natural Products Research., 1-5, 2019.
- AURICCHIO, M. T.; BACCHI, E. M. **Folhas de *Eugenia uniflora* L. (pitanga): Revisão.** Rev.Inst. Adolfo Lutz, 62(1): 55 - 61 ,2003.
- BOLZANI, V. S.; GUNATILAKA, A. A. L.; KINGSTON, D. G. I. **BIOACTIVE GUANIDINE ALKALOIDS FROM *PTEROGUNE NITENS*.** Journal of Natural Products, Vol. 58, No. 11, pp. 1683-1688, 1995.
- CALIXTO, J.B. **Biodiversidade como fonte de medicamentos.** Ciência e Cultura, v. 55, n. 3, p. 37-9, 2003.
- CALVO, T. E.; LIMA, Z. P.; SILVA, J. S. et al. **Constituents and Antiulcer Effect of *Alchornea glandulosa*: Activation of Cell Proliferation in Gastric Mucosa during the Healing Process.** Biol. Pharm. Bull, 30(3): 451-459, 2007.
- CECHINEL-ZANCHETT, C. C.; MARIANO, L. N. B.; BOING, T. et al. **Diuretic and Renal Protective Effect of Kaempferol-3-*O*-Alpha-L-rhamnoside (Afzelin) in Normotensive and Hypertensive Rats.** Journal of Natural Products, 83, 1980 – 1989, 2020.
- CHU, CC.; CHEN, SY.; CHYAU, CC. et al. **Anticancer activity and mediation of apoptosis in hepatoma carcinoma cells induced by djulis and its bioactive compounds.** Journal of Functional Foods, 75, 2020.
- COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia.** Campinas: Editora da UNICAMP, 2006. 452p.
- COQUEIRO, A.; REGASINI, L. O.; STAPLETON, P.; BOLZANI V. S.; GIBBONS S. **In Vitro Antibacterial Activity of Prenylated Guanidine Alkaloids from *Pterogyne nitens* and Synthetic Analogues.** Journal of Natural Products, 77, 1972-1975, 2014.
- CORRAL, R.A.; ORAZI, O.O.; PETRUCCELLI, M.F. **A new guanidine alkaloid.** Experientia, v. 25, p. 1020–1021, 1969.
- CORRAL, R.A.; ORAZI, O.O.; PETRUCCELLI, M.F. **Guanidine alkaloids of *Pterogyne nitens*.** J. Chem. Soc., Chem. Commun., v. 556, p. 178–183, 1971.
- COSTA, M.; TAVARES, V.; AQUINO, M. V.; MOREIRA, D. **DOENÇA DE CHAGAS: UMA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.** REFACER, v. 2, n. 1, 2013.

- CRIVOS, M.; MARTINEZ, M. R.; POCHETTINO, M. L.; REMORINI, C. SY, A.; TEVES, L. **Pathways as “signatures in landscape”: Towards an ethnography of mobility among the Mbya-Guarani (Northeastern Argentina).** J Ethnobiol Ethnomed 3: 2, 2007.
- DIANTINI, A.; SUBARNAS, A.; LESTARI, K. et al. ***Schima wallichii* Korth. Inhibits MCF-7 breast cancer cell proliferation through activation of the caspase cascade pathway.** ONCOLOGY LETTERS, 3: 1069 – 1072, 2012.
- DUARTE, D. F. **Uma Breve História do Ópio e dos Opióides.** Rev. Bras Anestesiol 55: 1: 135 -146, 2005.
- DUARTE, R. A.; MELLO, E. R.; ARAKI, C. et al. **Alkaloids extracted from *Pterogyne nitens* induce apoptosis in malignant breast cell line.** Tumor Biol, 31:513-522, 2010.
- DYSHLOVOY, S. A.; KUDRYASHOVA, E. K.; KAUNE, M. et al. **Urupocidin C: a new marine guanidine alkaloid wich selectively kills prostate cancer cells via mitochondria targeting.** Nature research – Scientific Reports, 10(1):9764, 2020a.
- DYSHLOVOY, S. A.; KAUNE, M.; HAUSCHILD, J. et al. **Marine alkaloid monanchoxymycalin C: a new specific activator of JNK1/2 kinase with anticancer properties.** Nature research – Scientific Reports, 10:13178, 2020b.
- FERREIRA, F. G.; REGASINI, L. O.; OLIVEIRA, A. M.; et al. **Avaliação de mutagenicidade e antimutagenicidade de diferentes frações de *Pterogyne nitens* (Leguminosae), utilizando ensaio de micronúcleo em *Tradescantia pallida*.** Brazilian Journal of Pharmacognosy, p. 61-67, 2009.
- FLAMBÓ, D. F. A. L. P. **Atividades Biológicas dos Flavonoides: Atividade Antimicrobiana.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2013.
- FUNDAÇÃO FIO CRUZ. **Medicamento brasileiro para tratamento da esquistossomose foi aprovado nos EUA.** Fiocruz Pernambuco, 2020.
- GOMES, A. C. L.; GALINDO, J. M.; LIMA, N. N.; SILVA, E. V. G. **Prevalence and worm burden of Schistosomiasis mansoni before and after collective treatment in Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco, Brazil.** Epidemiol. Serv. Saúde, Brasília, 2016
- GONZÁLEZ-TRUJANO, M. E.; DOMÍNGUEZ, F.; PÉREZ-ORTEGA, G. et al. ***Justicia spicigera* Schltdl. And kaempferitrin as potential anticonvulsant natural products.** Biomed Pharmacother, 92:240-248, 2017.
- GROS, E.; AL-MOURABIT, A.; MARTIN, M. T. et al. **Netamine H – N, Tricyclic Alkaloids from the Marine Sponge *Biemna laboutei* and Their Antimalarial Activity.** Journal of Natural Products, 12(11):1725-1733, 2015.
- GUSEINOV, M. D.; BOBKOVA, N. V.; SVISTUNOV, A. A.; TARASOV, V. V.; BOKOV, D. O.; SERGUNOVA, E. V.; KOVALEVA, T. Y. **Flavonoids in *Passiflora incarnata* L. Dry Extract of Russian Origin.** Pharmacognosy Journal, V. 11, Issue 5, 2019.

HELENA, A. L. **SÍNTESE DE BIS-METOXICHALCONAS SIMÉTRICAS CONTRA *Trypanosoma cruzi***. Monografia (Química), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2020.

HUBER, L. S. **FLAVONOIDES: IDENTIFICAÇÃO DE FONTES BRASILEIRAS E INVESTIGAÇÃO DOS FATORES RESPONSÁVEIS PELAS VARIAÇÕES NA COMPOSIÇÃO**. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

JORGE, A. P.; HORST, H.; SOUSA, E. et al. **Insulinomimetic effects of kaempferitrin on glycaemia and on ¹⁴C-glucose uptake in rat soleus muscle**. *Chemico-Biological Interactions*, vol. 149, p. 89-96, 2004.

JUÁREZ-VÁSQUEZ, M. del C.; ALONSO-CASTRO, A. J.; GARCÍA-CARRANCÁ, A. **Kaempferitrin induces immunostimulatory effects in vitro**. *Journal of Ethnopharmacology*, 148, 337-340, 2013.

KOWTI, R.; MAJUMDER, P.; HARSHITCHA, H. S. et al. **Hibiscus herbs – a comprehensive botanical, chemical and biological overview**. *World Journal of Advanced Research and Reviews*, 07(03), 291-303, 2020.

KIM, J. H.; KIM, M.; KIM, J. M. et al. **Afzelin suppresses proinflammatory responses in particulate matter-exposed human keratinocytes**. *INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE*, 43: 2516 – 2522, 2019.

KIM, S. K.; KIM, H. J.; CHOI, S. E. et al. **Anti-oxidative and Inhibitory Activities on Nitric Oxide (NO) and Prostaglandin E₂ (COX-2) Production of Flavonoids from Seeds of *Prunus tomentosa* Thunberg**. *Archives of Pharmacal Research*, Vol. 31, No. 4, 424 – 428, 2008.

KUREK, J. **Alkaloids – Their Importance in Nature and Human Life**. IntechOpen, 2019.

LEE, S. Y.; SO, Y.J.; SHIN, M. S. et al. **Antibacterial Effects of Afzelin Isolated from *Cornus macrophylla* on *Pseudomonas aeruginosa*, A Leading Cause of Illness in Immunocompromised Individual**. *Molecules*, 19, 3173 – 3180, 2014.

LACERDA, R. M. A.; FILHO, J. A. L.; SANTOS, R. V. **INDICAÇÃO DE ESPÉCIES DE PORTE ARBÓREO PARA A ARBORIZAÇÃO URBANA NO SEMI-ÁRIDO PARAIBANO** REVSBAU, Piracicaba, v. 6, n. 1, p. 51-58, 2011.

LESTARI, K et al.: **Molecular Docking of Quinine, Chloroquine and Hydroxychloroquine to Angiotensin Converting Enzyme 2 (ACE2)**. *Journal of Advanced Pharmacy Education & Research*, Vol. 10, 2020.

Receptor for Discovering New Potential COVID-19 Antidote

LIMA, C. S. **Avaliação de extratos e substâncias de *Pterogyne nitens* Tul. (Fabaceae) contra nematoides de interesse veterinário**. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 151f, 2020.

LIMA, C. S. et al. **Anti-Candida and anti-Cryptococcus evaluation of 15 non-alkaloidal compounds from *Pterogyne nitens***. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, v. 6, n. 10, p. 841-845. 2016

- LOPES, F. C. M.; ROCHA, A.; PIRRACO, A. et al. **Anti-angiogenic effects of pterogynidine alkaloid isolated from *Alchornea glandulosa*. *BMC Complement Altern Med* 9, 15 (2009)**
- MACHADO, A.C.; OLIVEIRA, R.C. **Medicamentos Fitoterápicos na odontologia: evidências e perspectivas sobre o uso da aroeira-do-sertão (*Myracrodruon urundeuva* Allemão)** Rev. Bras. Pl. Med., Campinas, v.16, n.2, p.283-289, 2014
- MAGALHÃES, W. L. E.; THÁ, E. L.; LEME, D. M. **Método de determinação de concentrações não citotóxicas para avaliação da capacidade protetora da lignina contra danos ao DNA.** Comunicado Técnico 427 – Embrapa, Colombo. 2018
- MARIA, C. A. B. de; MOREIRA, R. F. A. **CAFEÍNA: REVISÃO SOBRE MÉTODOS DE ANÁLISE** Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.
- MARTINS, L. F.; MESQUITA, J. T.; PINTO, E. G. et al. **Analogues of Marine Guanidine Alkaloids are in Vitro Effective against *Trypanosoma cruzi* and Selectively Eliminate *Leishmania* (L.) infantum Intracellular Amastigotes.** Journal of Natural Products, 79(9):2202-10, 2016.
- MAVAR-MANGA, H.; CHAPON, D.; HOET, S.; BLOCK, S.; PAUW-GILLET, M. C.; QUENTIN-LECLERCQ, J. ***N1, N2, N3*-Trisisopentenyl Guanidine and *N1,N2*-Diisopentenyl Guanidine, Two Cytotoxic Alkaloids from *Alchornea cordifolia* (Schumach. & Thonn.) Müll. Arg. (Euphorbiaceae) Root Barks.** Natural Product Communications, Vol. 1, No 12, 1097-1100, 2006.
- MAVAR-MANGA, H.; HADDAD, M.; PIETERS, L.; BACCELLI, C.; PENGE, A.; QUENTIN-LECLERCQ, J. **Anti-inflammatory compounds from leaves and root bark of *Alchornea cordifolia* (Schumach. & Thoon.) Müll. Arg.** Journal of Ethnopharmacology, 115, 25-29, 2008.
- Ministério da Saúde. **Vigilância da Esquistossomose Mansonii: diretrizes técnicas /** Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – 4. ed. – Brasília, 2014.
- MORAIS, T. G.; COSTA-SILVA, T. A.; TEMPONE, A. G; et al. **Antiparasitic Activity of Natural and Semi-Synthetic Tirucallane Triterpenoids from *Schinus terebithifolius* (Anacardiaceae): Structure/Activity Relationships.** *Molecules*, 19, 5761-5776, 2014.
- MOSMANN, T. **Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays.** Journal of Immunological Methods, 55-63, 65 (1983).
- MURATA, K.; ISHIDA, Y.; NISHIO, A. et al. **Screening of Spice Extracts Possesing Anti-Acetylcholinesterase Activity and Active Principles of Bitter Ginger, Rhizome of *Zingiber zerumbet*.** Natural Product Communications, Vol. 12. No. 7, 1053 – 1056, 2017.
- NETO, F. R. A.; SILVA, D.; NUNES, S. C. **CROMATOGRAFIA: Princípios básicos e Técnicas afins.** Rio de Janeiro: Editora Interciência Ltda., 2003.
- NIC, M.; JIRÁT, J.; KOSATA, B.; JENKINS, A.; MCNAUGHT, A. **IUPAC Compedium of Chemical Terminology (Gold Book) version 2.3.2,** 2012.

- PANCHE, A. N.; DIWAN, A. D.; CHANDRA, S. R. **Flavonoids: an overview**. Journal of Nutritional Science, 5: e47, 2016
- PELLETIER, S. W. **The Nature and Definition of an Alkaloid**. Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives, Vol. I New York, pp. 1-31, 1983.
- PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. **Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes**. Journal of Biotechnology and Biodiversity, v. 3, n. 4, p. 145-152, Nov. 2012.
- PINHEIRO, E.; BRUM-SOARES, L.; REIS, R.; CUBIDES, JC. **Chagas disease: review of needs, neglect, and obstacles to treatment access in Latin America**. Rev Soc Bras Med Trop, 50(3):296-300, 2017.
- PINTO, E. G; TEMPONE, A. G. **Isolamento, caracterização e atividade anti-*Leishmani chagasi* e anti-*Trypanosoma cruzi* de compostos bioativos de venenos de anfíbios brasileiros**. Dissertação (Mestrado em ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.
- POZZOBON, A. M. **EIMOLOGIA E ABREVIATURA DE TERMOS MÉDICOS**. Editora Univates, 381 p., 2011.
- RAMOS-HERNÁNDEZ, R. R.; SÁNCHEZ-MEDINA, A.; BRAVO-ESPINOZA, I. et al. **BIOLOGICAL ACTIVITIES OF KAEMPFERITRIN – A SHORT REVIEW**. Pharmacology Online, vol. 3, 79-90, 2017.
- RAMIREZ, B.; BICKLE, Q. YOUSIF, F. et al. **Schistosomes: challenges in compound screening**) Expert opinion on drug discovery. VL 2. 2007.
- REGASINI, L. O. **Estudo químico de *Pterogyne nitens* (caesalpinioideae), síntese e potencial farmacológico de alcaloides guanidínicos e análogos**. Tese (Doutorado em Química Orgânica) – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 232f., 2008a.
- REGASINI, L. O.; FERNANDES, D. C.; CASTRO-GAMBOA, I. SILVA, D. H. S.; FURLAN, M.; BOLZANI, V. S. **CONSTITUINTES QUÍMICOS DAS FLORES DE *Pterogyne nitens* (CAESALPINIOIDEAE)** Quim. Nova, Vol. 31, No. 4, 802-806, 2008b.
- REGASINI, L. O. et al. **Cytotoxic Guanidine Alkaloids from *Pterogyne nitens***. Journal of Natural Products, v. 72, n. 3, p. 473–476, 2009.
- ROCHA, T. J. M. **Aspectos epidemiológicos e distribuição dos casos de infecção pelo *Schistosoma mansoni* em municípios do Estado de Alagoas, Brasil**. Ver Pan-Amaz Saúde, 2016
- SÁ, A. P. C. S. **Potencial antioxidante e aspectos químicos e físicos das frações comestíveis (polpa e cascas) e sementes de Jamelão (*Syzygium cumini*, L. Skeels)**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2008.
- SANTOS, D. S.; RODRIGUES, M. M. F. **Atividades farmacológicas dos flavonoides: um estudo de revisão**. Estação Científica (UNIFAP), Macapá, v. 7, n. 3, p. 29-35, 2017.
- SOUZA, W. M. **ESTUDO QUÍMICO E DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS ALCALÓIDES INDÓLICOS DE *Himatanthus lancifolius* (Muell. Arg.) Woodson, APOCYNACEAE – (Agoniada)**. Tese (doutorado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Paraná, 2008.

TAJIMA, Y.; MURASE, H; SATAKE, K et al. **Nitensidine A, a guanidine alkaloid from *Pterogyne nitens*, induces osteoclastic cell death.** Cytotechnology, 2013.

TOSTES, J. B. F.; SIANI, A. C.; MONTEIRO, S. S. et al. **Seasonal flavonoid profile and kaempferitrin content in the leaf extracts of *Bauhinia forficata* subspecies *forficata* from two locations in southeastern Brazil.** American Journal of Plant Sciences, vol. 10, p. 208-220, 2019.

VERPOORTE, R.; COQUEIRO, A. **Encyclopedia of Analytical Science.** Elsevier Ltd. 2 ed., p. 56-61, 2005

VILA, F. C. **Identificação dos flavonoides com atividade antioxidante da cana-de-açúcar.** Dissertação (Mestrado em Química Analítica), Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

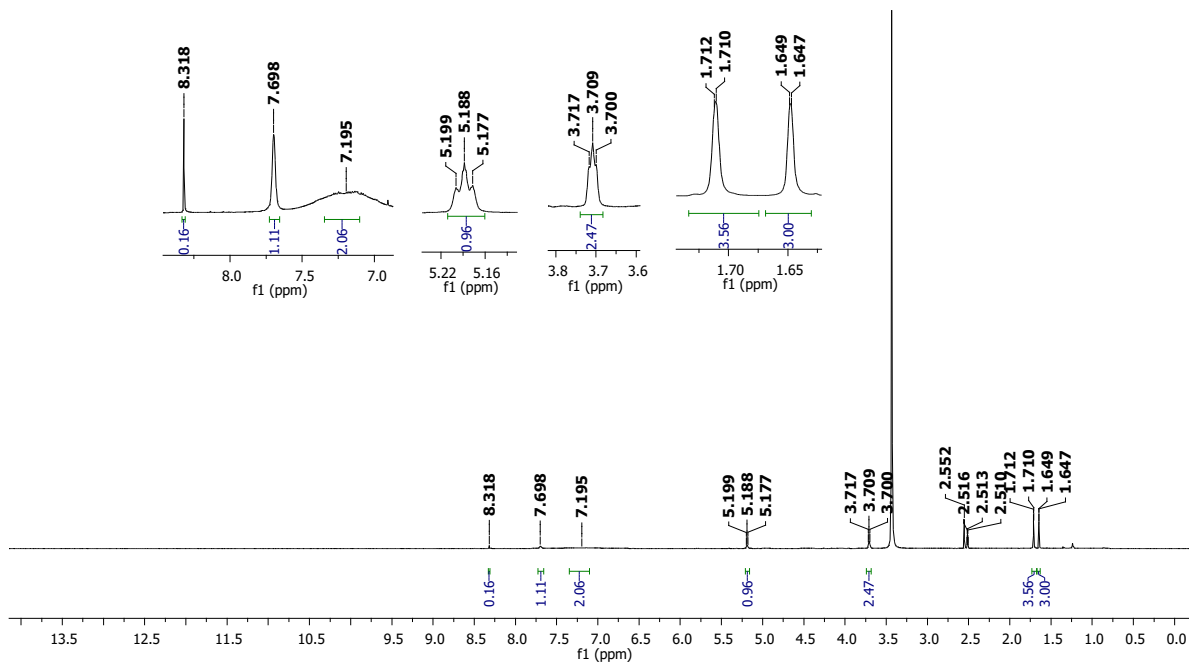
VIZZOTTO, M.; KROLOW, A. C.; WEBER, G. E. B. **Metabólitos Secundários Encontrados em Plantas e sua Importância.** Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 16 p. – (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 316). 2010

WANG, J.; ZHAO, Q. **Kaempferitrin inhibits proliferation, induces apoptosis, and ameliorates inflammation in human rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes.** Phytotherapy Research, 33:1726-1735, 2019.

7. MATERIAL SUPLEMENTAR

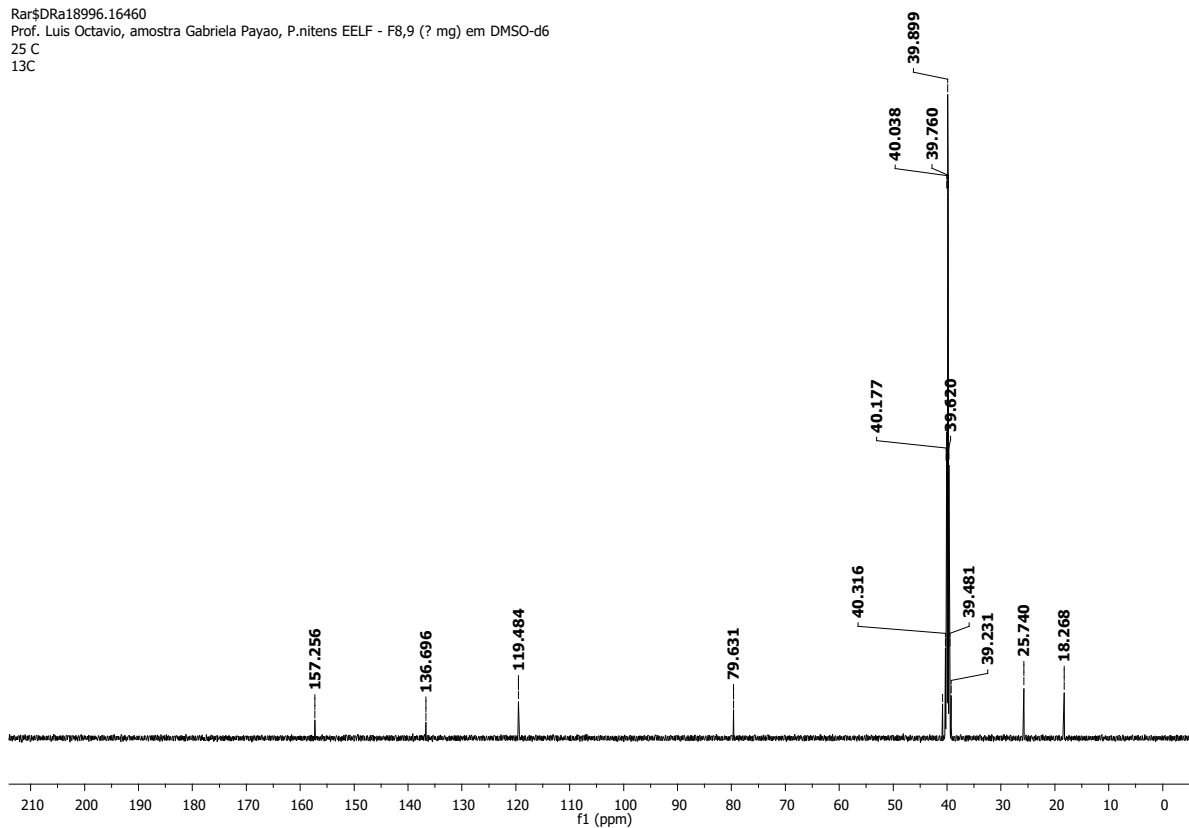
ANEXO 1. Espectro de RMN de ^1H da pteroginidina (6) (600 MHz, DMSO- d_6)

20190625_LuisOctavio_1H_Gabriela
Prof. Luis Octavio, amostra Gabriela Payao, P.nitens EELF - F8,9 (? mg) em DMSO- d_6
25 C



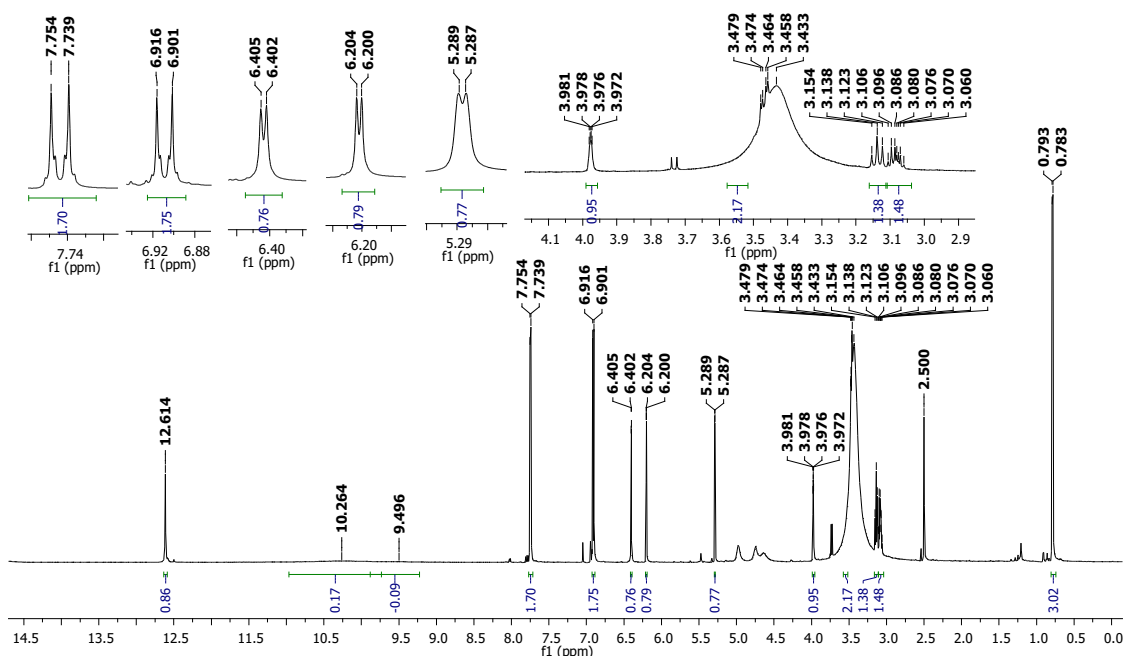
ANEXO 2. Espectro de RMN de ^{13}C da pteroginidina (6) (150 MHz, DMSO- d_6)

Rar\$DRa18996.16460
Prof. Luis Octavio, amostra Gabriela Payao, P.nitens EELF - F8,9 (? mg) em DMSO- d_6
25 C
 ^{13}C



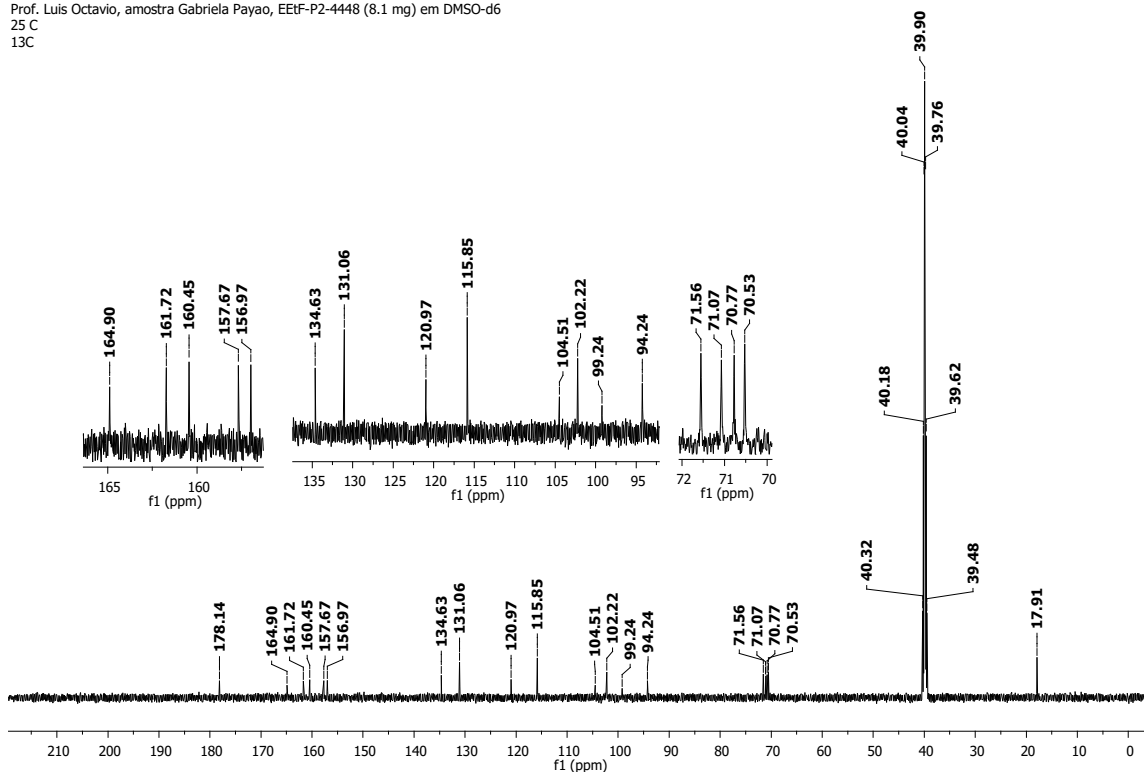
ANEXO 3. Espectro de RMN de ^1H , EEtF-P2 (44–48), afzelina (**18**) (600 MHz, DMSO- d_6)

20200316_LuisOctavio_1H_GabrielaPayao
Prof. Luis Octavio, amostra Gabriela Payao, EEtF-P2-4448 (8.1 mg) em DMSO- d_6
25 C



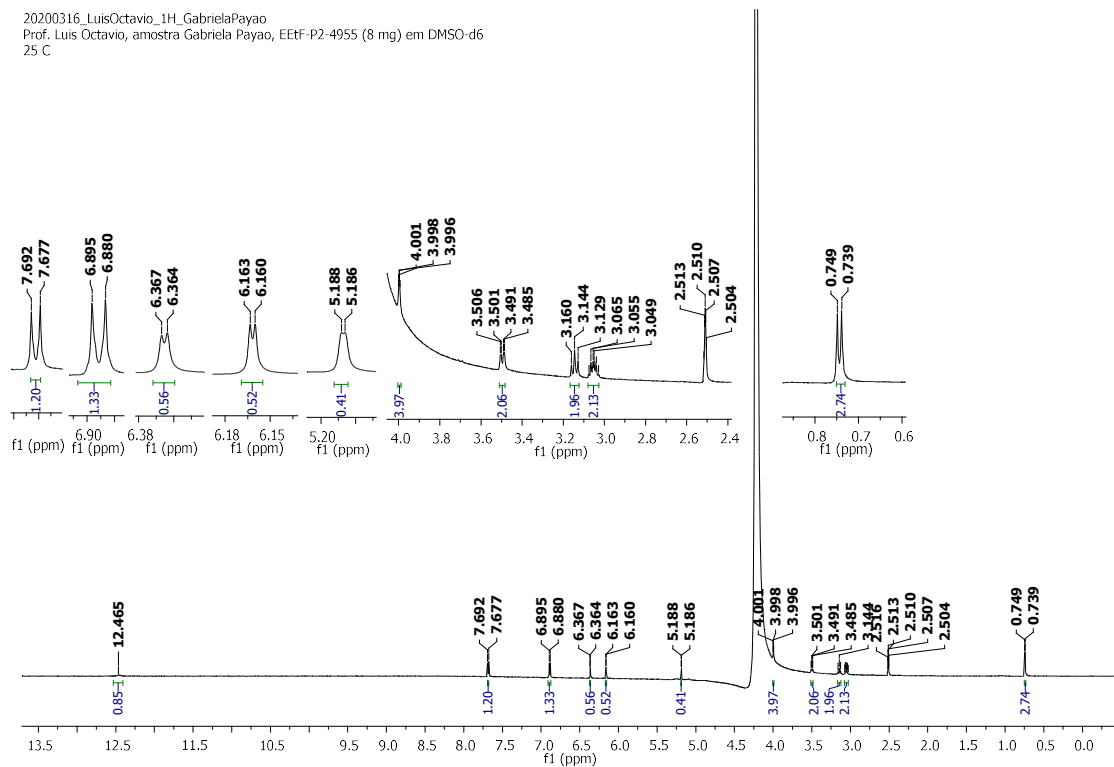
ANEXO 4. Espectro de RMN de ^{13}C , EEtF-P2 (44–48), afzelina (**18**) (150 MHz, DMSO- d_6)

20200316_LuisOctavio_13C_GabrielaPayao
Prof. Luis Octavio, amostra Gabriela Payao, EEtF-P2-4448 (8.1 mg) em DMSO- d_6
25 C
 ^{13}C



ANEXO 5. Espectro de RMN de ^1H , EEtF-P2 (49–55), afzelina (**18**) (600 MHz, DMSO- d_6).

20200316_LuisOctavio_1H_GabrielaPayao
 Prof. Luis Octavio, amostra Gabriela Payao, EEtF-P2-4955 (8 mg) em DMSO-d₆
 25 C



ANEXO 6. Espectro de RMN de ¹H, EEtF-P3 (9), afzelina (18) (600 MHz, DMSO--d₆).

20200316_LuisOctavio_1H_GabrielaPayao
 Prof. Luis Octavio, amostra Gabriela Payao, EEtF-P3-9 (3 mg) em DMSO-d₆
 25 C

