



**Trabalho de Conclusão de Curso
do Bacharelado em Química**

Isolamento e caracterização de neolignanas das folhas da *Nectandra leucantha* Nees & Mart. (Lauraceae) com atividade antiparasitária

Nome: Poliana dos Santos Mendonça
Orientador: Prof. Dr. João Henrique Ghilardi Lago

Santo André –SP

2018

POLIANA DOS SANTOS MENDONCA

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NEOLIGNANAS DAS FOLHAS
DA *Nectandra leucantha* NEES & MART. (LAURACEAE) COM ATIVIDADE
ANTIPARASITÁRIA.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como exigência para obtenção do grau de Bacharel em Química, ao Centro de Ciências Naturais e Humanas da Universidade Federal do ABC – Santo André

Orientador: Prof. Dr. João Henrique Ghilardi Lago

Santo André – SP

2018

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do ABC
Elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da UFABC
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

dos Santos Mendonca, Poliana

Isolamento e caracterização de neolignanas das folhas da *Nectandra leucantha* Nees & Mart. (Lauraceae) com atividade antiparasitária / Poliana dos Santos Mendonca. — 2018.

38 fls.

Orientador: João Henrique Ghilardi Lago

Trabalho de Conclusão de Curso — Universidade Federal do ABC, Bacharelado em Química, Santo André, 2018.

1. Lignóides. 2. *Nectandra leucantha*. 3. quimioterápico. 4. *L. infantum*. 5. Leishmaniose. I. Ghilardi Lago, João Henrique. II. Bacharelado em Química, 2018. III. Título.

Poliana dos Santos Mendonça

Isolamento e caracterização de neolignanas das folhas da *Nectandra leucantha* Nees & Mart. (Lauraceae) com atividade antiparasitária

Monografia apresentada ao curso do Bacharelado em Química do Centro de Ciências Naturais e Humanas da Universidade Federal do ABC, como requisito à conclusão do curso.

Aprovada em 15 de agosto de 2018

Banca Examinadora



Prof. Dr. Fernando Heering Bartoloni
Examinador UFABC



Profa. Dra. Juliana Marchi
Examinadora UFABC



Prof. Dr. João Henrique Ghilardi Lago
Orientador

Santo André – SP
2018

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, quero agradecer à minha mãe, Rosangela, que sempre acreditou e fez o impossível por mim, sem a sua fé e o seu incentivo não teria chegado ao final desta etapa.

Agradeço imensamente também à minha irmã, Camila, por ser sempre tão solícita e a melhor amiga que alguém poderia ter e por ter me dado dois sobrinhos maravilhosos, Cauã e Ana Clara.

Ao meu namorado Antonio, que há quatro anos me acompanha nesta jornada e que com seu jeito espontâneo e engraçado me faz rir nas horas difíceis e me faz lembrar que de alguma forma tudo irá ficar bem.

Ao professor João Lago, agradeço a confiança e a oportunidade de aprendizado nessa área tão maravilhosa que é a de produtos naturais.

À Fernanda, muitíssimo obrigada por ter tido paciência em todo esse percurso do meu TCC e me iniciado na “arte” dos produtos naturais e que mesmo à distância continuou me ajudando muito.

Aos meus companheiros e companheiras do lab 407-3, Geane, Eric, Vinícius, Ivanildo, Nathalia, Aline, Kaio, Thiago, Rodrigo, Bruna e Henrique que fizeram esse final de jornada ficar mais leve e divertido.

Às minhas companheiras de quatro patas Mili (em memória) e Ary que fazem a minha vida ficar mais fofa.

E finalmente, e não menos importante, minha amada (às vezes nem tanto) UFABC por ter me proporcionado um incrível crescimento pessoal, e me dado condições para conseguir terminar a graduação em Química.

RESUMO

A Leishmaniose é uma doença parasitária negligenciada considerada um problema de saúde e está atrelada a fatores socioeconômicos que atingem as pessoas que vivem principalmente nos países em desenvolvimento. Estima-se que ocorra anualmente 700 000 a 1 milhão de novos casos e 20.000 a 30.000 mortes relacionadas a leishmaniose. Além disso, os fármacos existentes para o tratamento dessa doença como a Glucantime e o Pentostam (este último proibido no Brasil), são considerados insatisfatórios por apresentarem vários efeitos colaterais e ineficácia no tratamento dependendo do estágio do parasito. Diante da atuação limitada desses fármacos, faz-se necessária a busca de novos quimioterápicos para o tratamento da leishmaniose. Nesse contexto, neste trabalho foram isolados dois compostos da classe das neolignanas, o metildesidrodieugenol B (I) e desidrodieugenol B (II) a partir das folhas da espécie vegetal *Nectandra leucantha*, cuja ação antileishmania frente a formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania (L.) infantum* foi avaliada *in vitro*. Estes compostos foram isolados através de técnicas cromatográficas e identificados através de ressonância magnética nuclear (RMN). Os ensaios biológicos indicaram atividade do composto I, com valor de CE₅₀ de 57,9 µM, para as formas amastigotas do parasita, sendo que o composto II se mostrou inativo. Assim, os resultados obtidos permitem inferir que o composto I pode ser utilizado como protótipo molecular para o desenvolvimento de novas e mais ativas substâncias a partir de modificações estruturais nesse metabólito.

Palavras-Chave: Leishmaniose, lignóides, *Nectandra leucantha*, *Leishmania infantum*, quimioterápico.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a neglected parasitic disease considered a health problem linked to socioeconomic factors, affecting people mainly in from the developing countries. Every year, there are about 700,000 to 1 million new cases, of which 20,000 to 30,000 leishmaniasis related lead to deaths occur every year. In addition, existing drugs for treatment of this disease, such as Glucantime and Pentostam (this last banned in Brazil), are considered unsatisfactory because for presenting several side effects and inefficacy in the treatment, depending on the stage of the parasite. Due to limited performance of these drugs, searching for new chemotherapeutics to treat leishmaniasis is necessary. In this context, this work was isolate the compounds of the neolignans class, methyldehidrodieugenol B (I) dehidrodieugenol B (II) from leaves of the plant species *Nectandra leucantha* for *in vitro* evaluation of antileishmania activity against *Leishmania (L). infantum*. These compounds were isolated by the extraction and chromatographic techniques and identified by nuclear magnetic resonance (RMN). Bioassay indicated activity of compound I, with EC₅₀ value of 57.9 µM, for parasite amastigote forms, and compound II showed no activity for any tested parasite forms parasite (amastigotes and promastigotes). Thereby the obtained results allow to infer that the compound I can be used to molecular prototype for the development of new and more active substances from structural modifications in this metabolite.

Keywords; chemotherapeutic ,Leishmaniasis, lignoids, *Nectandra leucantha*, *Leishmania infantum*

Sumário

1. INTRODUÇÃO	9
1.3 Produtos Naturais.....	9
1.2 Leishmaniose	10
1.3 Família Lauraceae.....	14
1.3.1 Gênero <i>Nectandra</i>	14
2. OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo Geral	17
2.2 Objetivos específicos	17
3. MATERIAIS	17
3.1 Equipamentos	17
3.2 Materiais	18
3.2.1 Solventes.....	18
3.2.2 Materiais cromatográficos	18
3.2.3 Material Vegetal.....	18
4. PROCEDIMENTOS	18
4.1 Obtenção dos extratos e fases de partição.	18
4.2 Fracionamento cromatográfico.	19
4.3 Ensaio Biológico.....	21
5.3.1 Parasitas	21
5.3.2 Células de mamíferos	21
4.3.3 Determinação do potencial frente a <i>L. (L.) infantum</i> - promastigotas	21
4.3.4 Determinação da atividade frente <i>L. (L.) infantum</i> - amastigotas intracelulares.....	22
4.3.5 Determinação da citotoxicidade contra células de mamíferos.....	22
4.3.6 Análise estatística.....	22
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
5.1 Identificação estrutural dos compostos I e II.	23

5.3 Ensaio Biológico.....	27
6. CONCLUSÕES	28
REFERÊNCIAS	29
ANEXOS	31

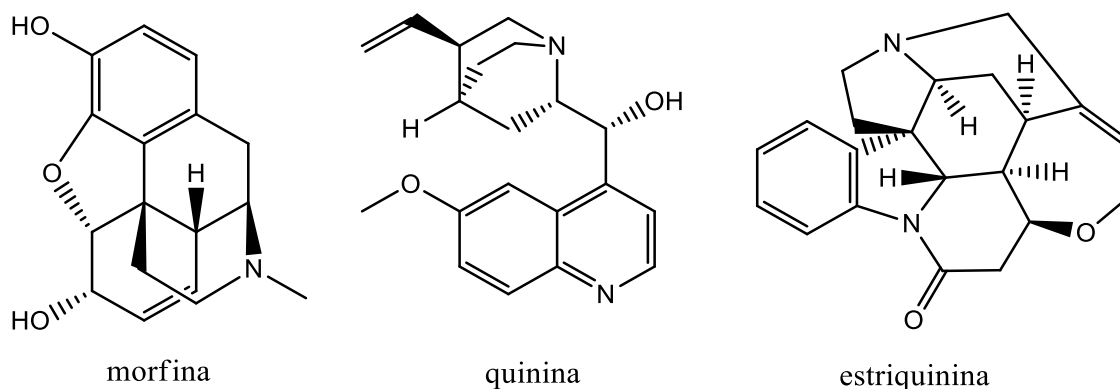
1.INTRODUÇÃO

1.3 Produtos Naturais

Produtos naturais são utilizados desde cerca 1550 a.C como descrito no Papiro de Ébers, pergaminho egípcio que possui cerca de 700 receitas sobre como tratar diversos problemas de saúde através de drogas de natureza animal, vegetal ou mineral (ENCYCLOPAEDIA, 2009; ARGENTA et al., 2011). Outro registro do uso de produtos naturais são os escritos de Hipócrates, considerado o pai da medicina moderna, que datam da Grécia Antiga, chamado *Natura medicatrix*. Já as culturas americanas, como Inca, Asteca, Maya, Olmeça e Tolteca utilizavam a quina, a ipecacuanha, a coca e muitas outras drogas de origem vegetal com valor terapêutico que continuam a ser utilizadas até os dias atuais (ARGENTA et al., 2011).

Apesar do uso dos produtos naturais ser de longa data, foi somente no século XIX que os primeiros compostos responsáveis por atividades biológicas conhecidas foram isolados e identificados. Dentre estes compostos estão alguns alcalóides como a morfina extraída da *Papaver somniferum*, a estricnina extraída da *Strychnos nux 9ratís* e a quinina extraída da casca de *Cinchona pubescens* (figura 1) (SAXENA et al., 2011).

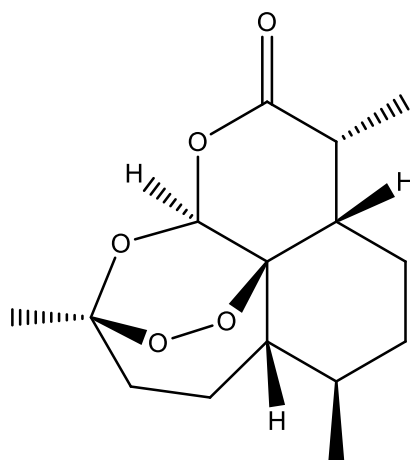
Figura 1. Exemplos de alcalóides



Fonte: autoria própria

Recentemente, a descoberta do composto responsável pela atividade antimalárica, isolado da *Artemisia annua* e denominada artemisinina (figura 2), resultou no prêmio Nobel para a pesquisadora Youyou Tu no ano de 2015 (SU & MILLER, 2015).

Figura 2. Estrutura da Artemisinina.



Fonte: autoria própria

Dessa forma, é inegável, a importância dos produtos naturais como fonte promissora de compostos quimiofarmacológico especialmente no que tange a atividade antiparasitária, tais como a esquistossomose, Doença de Chagas e leishmaniose, responsáveis por altas taxas de morbidade e mortalidade principalmente em países em desenvolvimento, sendo consideradas doenças tropicais negligenciadas (WHO,2018).

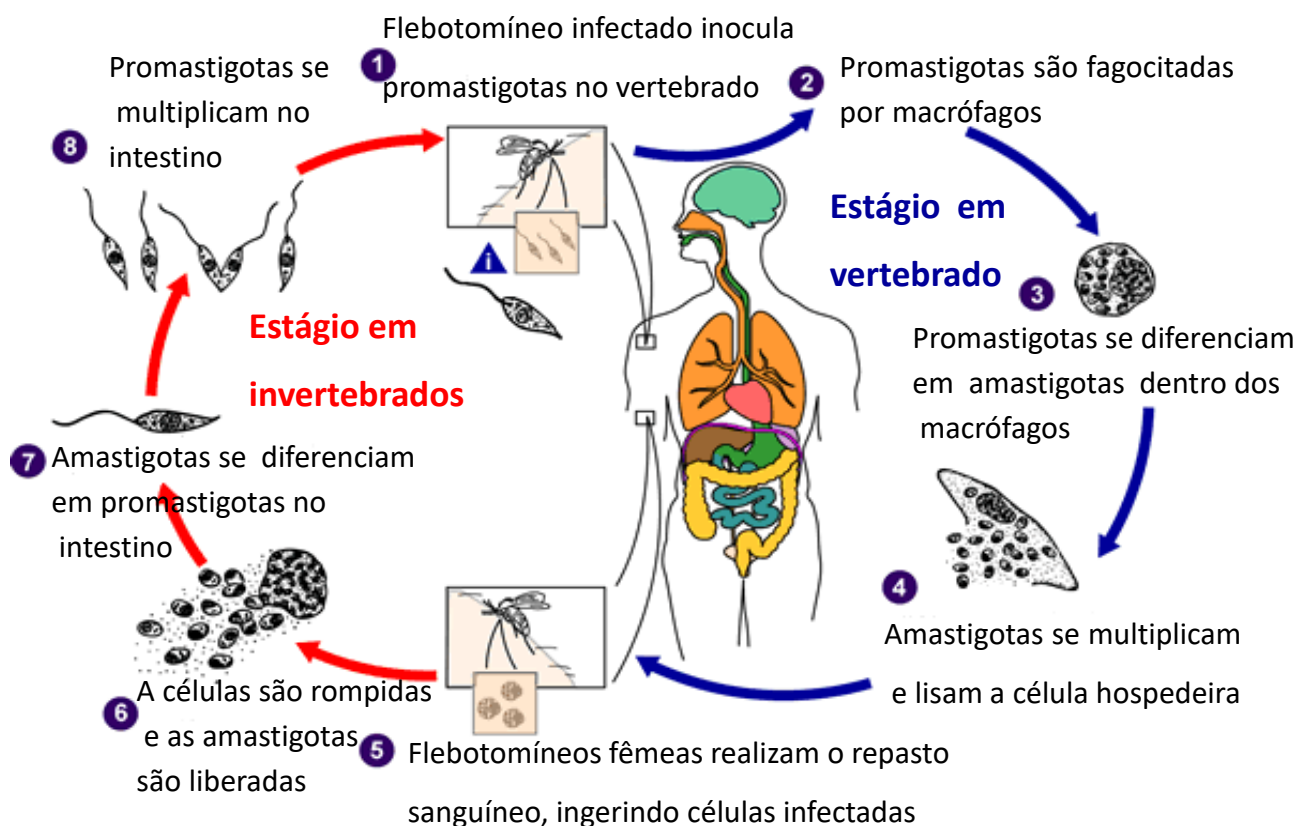
1.2 Leishmaniose

A Leishmaniose é uma doença parasitária causada por protozoários do gênero *Leishmania*. Existem mais de 20 espécies desse parasita (por exemplo: *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis*, *L. donovani* e *L. infantum*) e sua transmissão ocorre através da picada da fêmea dos hematófagos pertencentes aos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia*. Estima-se que ocorram, anualmente, 700 000 a 1 milhão de novos casos e 20.000 a 30.000 mortes relacionadas à leishmaniose (RATH et al., 2003; WHO, 2018).

O ciclo da *Leishmania* spp nos vertebrados (figura 3), se inicia com a fêmea do flebotomíneo, também conhecida como mosquito palha (inseto pequeno, de cor amarelada que pertence ao mesmo grupo das moscas, mosquitos, borrachudos e maruins) infectada com o parasita. Durante o repasto sanguíneo, a fêmea transmite a *Leishmania* spp na forma de promastigotas ao vertebrado através do local da picada (1). Estas formas então são interiorizadas por macrófagos teciduais (2) e outros tipos de células mononucleares fagocíticas e transformam-se em amastigotas (3). Dentro do macrófago também iniciam o

processo de multiplicação através de simples divisão celular que ocasiona a lise da célula e liberação dos parasitas (4). Os macrófagos parasitados com as formas amastigotas são ingeridos pela fêmea do flebotomíneo durante o repasto sanguíneo, estes macrófagos então são rompidos dentro do estômago do inseto (5 e 6). As amastigotas através de divisão binária se modificam em promastigotas (7) e migram para o intestino da fêmea do mosquito palha que continuam se multiplicando (8) (CDC, 2013).

Figura 3. Ciclo de vida *Leishmania* spp.



Fonte: Adaptado de Centers for Disease Control and Prevention – CDC (2013)

A epidemiologia da Leishmaniose depende das características das espécies de parasitas, das características ecológicas e dos locais de transmissão e pode se manifestar de três diferentes formas (WHO, 2018):

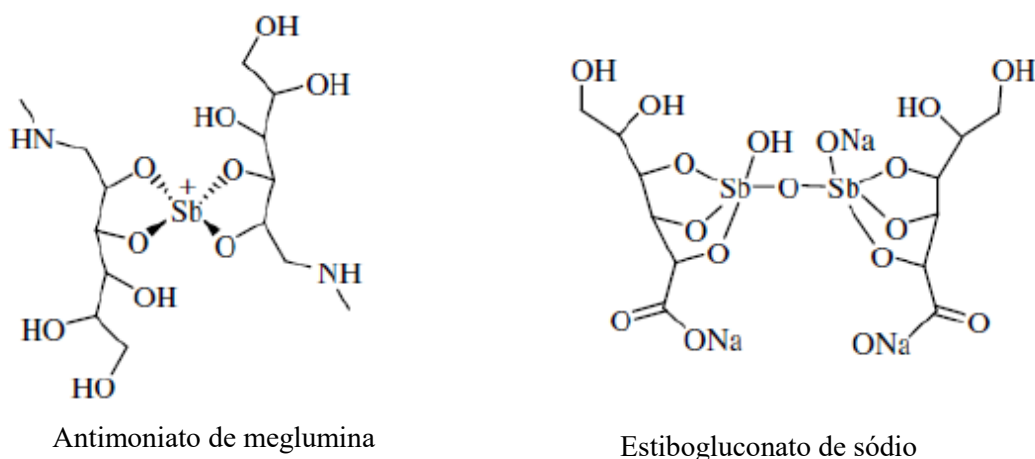
Leishmaniose visceral: caracterizada por crises irregulares de febre, perda de peso, aumento do baço e do fígado e anemia e sem tratamento é fatal em mais de 95% dos casos;

Leishmaniose cutânea: forma mais comum de leishmaniose, causa lesões cutâneas principalmente úlceras, em partes expostas do corpo, deixando cicatrizes e incapacidades graves em toda a vida;

Leishmaniose mucocutânea: ocasiona na destruição parcial ou total das membranas mucosas do nariz, boca e garganta.

O tratamento das leishmanioses ocorre através de fármacos antimoniais pentavalentes, como por exemplo o antimoniato de meglumina (Glucantime®) e estibogluconato de sódio (Pentostam®), figura 4, ambos fármacos de primeira escolha sendo o Pentostam não utilizado no Brasil (CARVALHO et al., 2015).

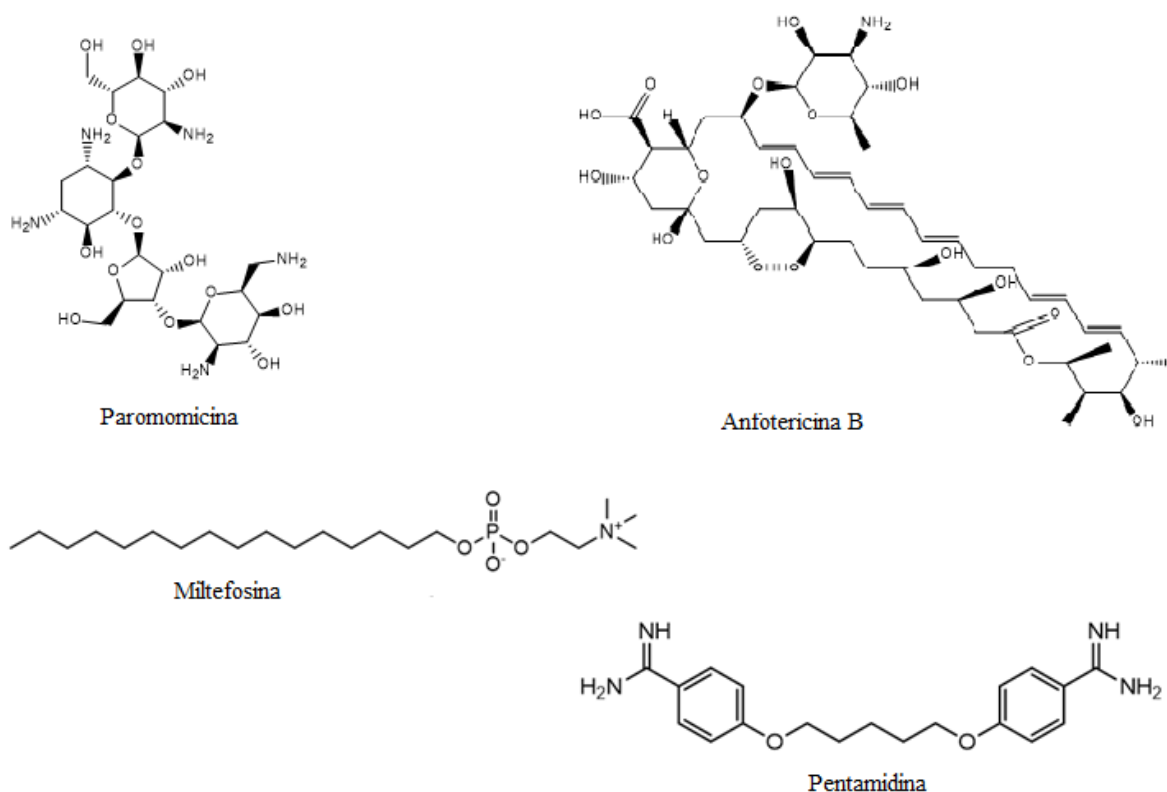
Figura 4. Estruturas dos fármacos de primeira escolha para o tratamento da leishmaniose.



Fonte: Carvalho et al. (2015).

O tratamento também ocorre através de fármacos de segunda escolha (figura 5) como é o caso da paromomicina, anfotericina B, a miltefosina, e a pentamidina. Nesse ponto é importante salientar que tais compostos se constituem em fármacos reposicionados para o tratamento das leishmanioses, visto que, a anfotericina B foi inicialmente utilizada no tratamento de câncer enquanto que a paramomicina utilizada como antibiótico (GRECCO, 2015; SUNDAR& SINGH, 2018).

Figura 5. Fármacos de segunda escolha para o tratamento da leishmaniose.



Fonte: autoria própria

Apesar da existência de medicamentos para o tratamento das leishmanioses os efeitos colaterais causados por estes fármacos muitas vezes fazem com que o tratamento seja interrompido. Por exemplo, apesar do antimoniato de metilglucamina ser rapidamente absorvido pelo organismo, praticamente 90% do antimônio é excretado nas primeiras 48 horas pelos rins, isso faz com que seja necessária a administração de doses elevadas do fármaco em regime contínuo e isto ocasiona efeitos colaterais como nefrites, distúrbios cardiovasculares, gastrointestinais e respiratórios. Já os antimoniais pentavalentes, além de destruir o parasita acabam por levar o paciente, muitas vezes, ao óbito. Em outros casos, quando o paciente consegue chegar ao final do tratamento o antimônio ainda pode ser detectado no cabelo do paciente após um ano do término do tratamento (RATH et al., 2003; GRECCO, 2015).

Diante desses diversos efeitos colaterais é necessário o desenvolvimento de fármacos mais eficientes na eliminação do parasita e menos tóxicos ao paciente. Segundo o Ministério do Meio Ambiente, o Brasil tem a maior biodiversidade do planeta e consequentemente uma grande quimiodiversidade. Tal perfil favorece a pesquisa de novos fármacos a partir desta diversidade oferecida pelos produtos naturais e o torna de grande importância na busca de tratamentos para a leishmaniose (MMA,2018).Dentre as famílias de grande potencial

quimiofarmacológico existentes na flora brasileira, destaca-se a Lauraceae na qual a espécie selecionada para o desenvolvimento deste trabalho, *Nectandra leucantha*, pertence.

1.3 Família Lauraceae

A família Lauraceae é um dos maiores grupos das Angiospermas sendo encontrada nas florestas tropicais e subtropicais do sudeste da Ásia, América central e América do Sul. No Brasil existem cerca de 68 gêneros (ex. *Licaria*, *Mezilaurus*, *Nectandra*, *Ocotea*, *Persea*) e 2900 espécies (COSTA-SILVA et al., 2015).

Essa família é importante economicamente devido ao seu uso na culinária, fabricação de papel, carpintaria, construção e indústria química, como por exemplo o uso culinário do fruto da *Persea gratissima* L. conhecido popularmente como abacate. Adicionalmente algumas espécies desta família são utilizadas na medicina popular como o uso das folhas da *Ocotea aciphylla* (Nees) Mez como tônico e estomáquico, enquanto que a casca é utilizada como anti-reumática. Além desta, as folhas de *Nectandra salicifolia* que possui atividade antirreumática, digestiva e diurética (MARQUEZ et al, 2001).

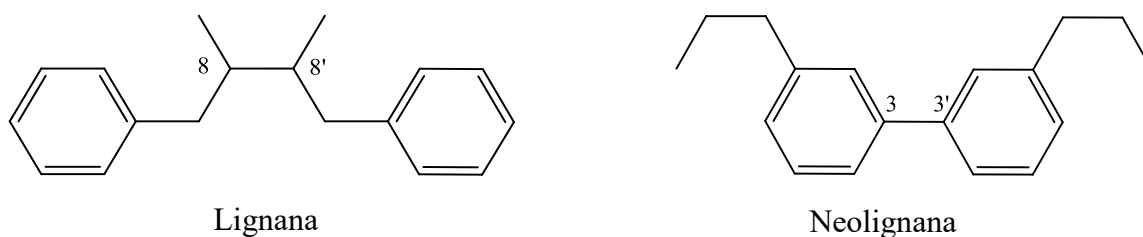
1.3.1 Gênero *Nectandra*

O gênero *Nectandra*, é formado por cerca de 120 espécies, são utilizadas popularmente devido a atividades biológicas especialmente como digestiva, diurética e antirreumática. Algumas destas atividades comprovadas cientificamente como é o caso da *Nectandra salicifolia* (Kunth) Nees em que estudos do extrato alcoólico demonstraram, atividade antimalárica, antifúngica e como relaxante muscular e da *Nectandra pichurim* (Kunth) Mez que apresentou propriedades contra cólicas e problemas gástricos (FERRAZ, 2015).

Fitoquimicamente o gênero *Nectandra* foi descrita ocorrência de diversas substâncias como por exemplo, derivados fenólicos, diterpenos, esteroides, alcalóides, lignanas e neolignanas (GRECCO et al., 2016).

Segundo a IUPAC lignanas são compostos formados por duas unidade fenilpropanóide, C_6C_3 , que se ligam através dos carbonos β - β' (carbono 8-8') da cadeia lateral (Figura 6). Caso as duas unidades de C_6C_3 se liguem através de outra posição diferente dos carbonos β - β' esta então é classificada como neolignana (MOSS, 2000).

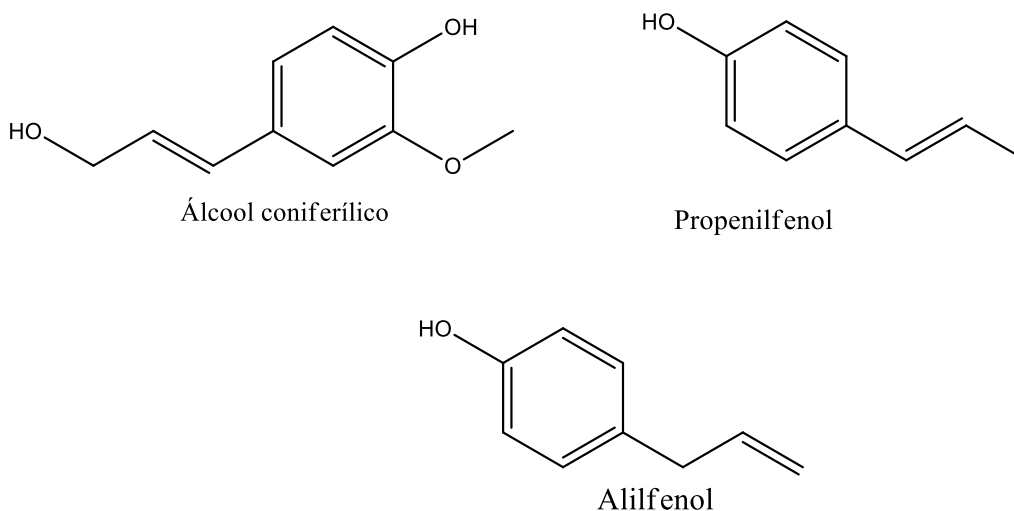
Figura 6. Estruturas de lignanas e neolignanas.



Fonte: autoria própria

Outra definição de lignanas e neolignanas, que é a adotada neste trabalho, foi proposta por Otto R. Gottlieb em 1978, e está relacionada com seu precursor biossintético. Dessa forma, lignanas são definidas como substâncias diméricas formadas através do precursor álcool coniferílico enquanto que as neolignanas são dímeros formados a partir dos precursores alil/propenilfenóis, representados na figura 7, (GRECCO et al., 2016).

Figura 7. Precursores biossintéticos álcool coniferílico e alil/ propenilfenóis

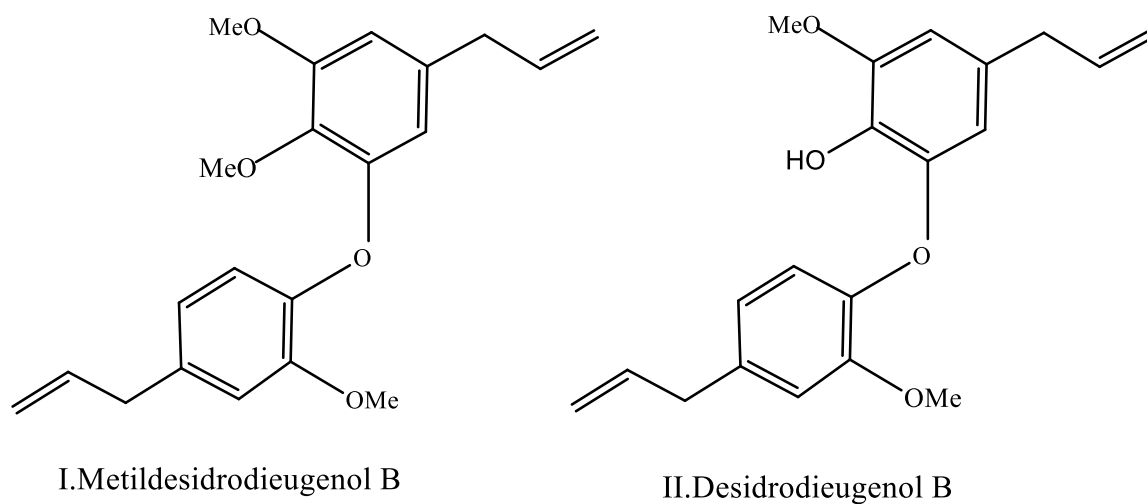


Fonte: autoria própria

As lignanas são importantes para o funcionamento das plantas e demonstram benefícios para a saúde humana. No vegetal impedem a invasão e proliferação de fungos ou bactérias enquanto que no ser humano tem-se indícios de que reduzam a incidência de câncer de próstata e de mama (SOUZA et al., 2012). Nos trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa foram isoladas importantes neolignanas da *Nectandra leucantha*

metildesidrodieugenol B e desidrodieugenol B (figura 8).

Figura 8. Neolignanas isoladas das folhas da *Nectandra leucantha*



Fonte: autoria própria

Essas neolignanas apresentaram atividades citotóxica (melanoma), bem como atividade antichagásica (GRECCO et al., 2017; SOUSA et al., 2017), tornando-se de grande interesse em estudos quimiofarmacológicos. Frente a esses resultados, tais compostos devem ser investigados no que tange outras atividades biológicas, como por exemplo, a atividade antileishmania.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Isolar e caracterizar as neolignanas metildesidrodieugenol B (I) e desidrodieugenol B (II) dos extratos das folhas de *Nectandra leucantha*, para avaliação da atividade antileishmania *in vitro*.

2.2 Objetivos específicos

- Obter o extrato metanólico a partir das folhas da *Nectandra leucantha*, seguido de obtenção da fase de partição em hexano;
- Isolar os compostos metildesidrodieugenol B (I) e desidrodieugenol B (II) através de técnicas cromatográficas.
- Identificar as estruturas químicas dos compostos isolados através de ressonância magnética.
- Realizar ensaio de atividade biológica dos compostos frente às formas amastigotas e promastigotas de *Leishmania (L) infantum*.

3. MATERIAIS

3.1 Equipamentos

A eliminação dos solventes dos extratos e frações foi realizada em evaporador rotativo da marca Büchi modelo R-215 munido de controlador de vácuo modelo V-850 e bomba de diafragma modelo V-710.

As revelações das placas de sílica nos ensaios de Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC) foram realizadas em câmara escura da marca Spence com transluminador UV em comprimentos de onda de 254 e 365 nm.

Os resultados de ressonância magnética nuclear (RMN), foram registrados em espectrômetro Bruker Ultrashield 300 Avance III operando a 300 e 75 MHz para os núcleos de ^1H e de ^{13}C respectivamente.

3.2 Materiais

3.2.1 Solventes

Foram utilizados os seguintes solventes de pureza analítica; hexano, metanol, acetato de etila, diclorometano para os processos de extração, purificação. Para o processo de identificação dos compostos através da RMN foi utilizado clorofórmio deuterado (CDCl_3) com TMS (Tetrametilsilano) como padrão interno.

3.2.2 Materiais cromatográficos

Para a coluna cromatográfica (CC) gravitacional foi utilizada sílica gel 60 (partículas de 63-210 μm – Merck). Na cromatografia em camada delgada analítica e CCDC comparativa (CCDC) foram utilizadas cromatofolhas comerciais de sílica gel 60, em suporte de alumínio - ALUGRAM® RP-2, com indicador fluoresceína (F254), dimensões de 20×20 cm, 0,10 mm da marca Macherey-Nagel.

3.2.3 Material Vegetal

As folhas de *N. leucantha* foram coletados com o auxílio do botânico Euder G. A. Martins (CEPEMA-USP) no dia 29 de março de 2014. O espécime de estudo está localizado no Parque Ecológico do Perequê na cidade de Cubatão/SP. Todo o material coletado foi fotografado e imediatamente prensado no campo, recebendo o número do coletor EM 357. Uma exsiccata foi depositada na coleção do Herbário SPF do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

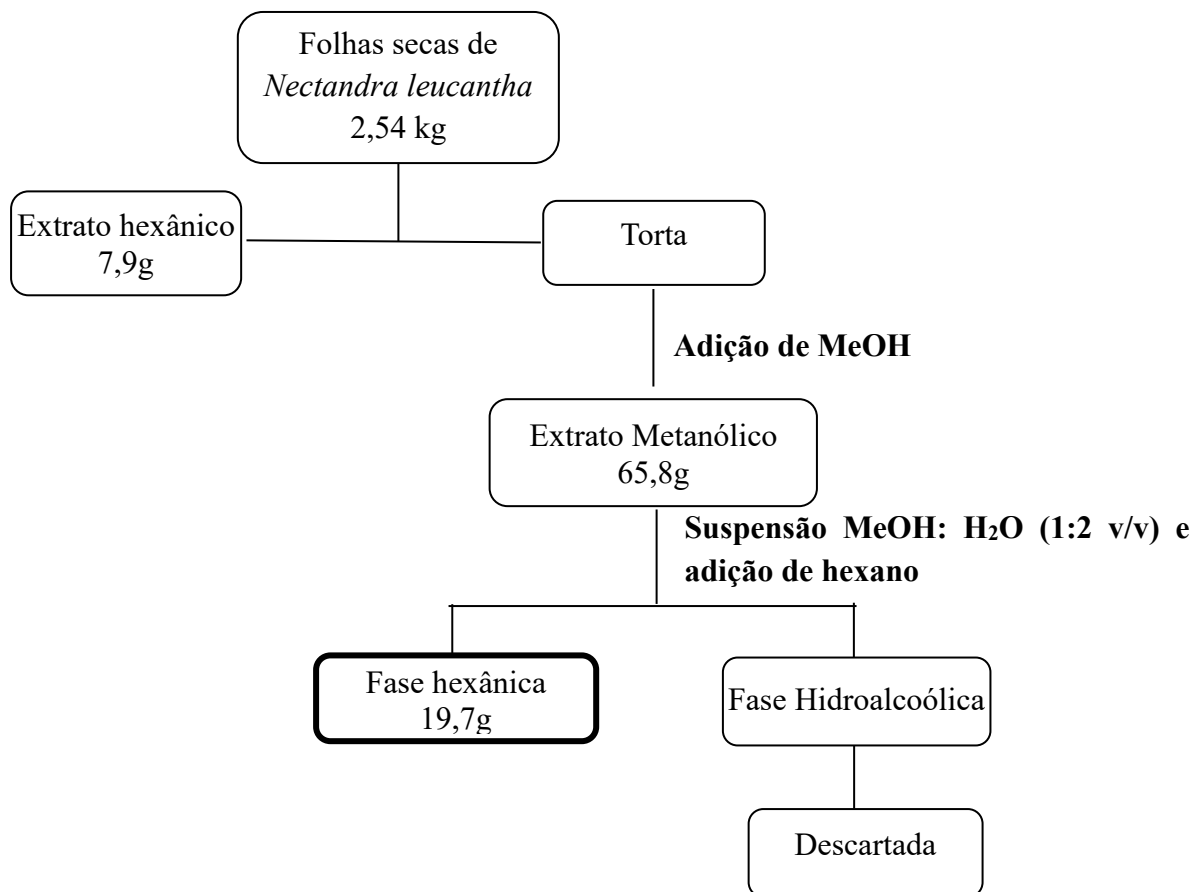
4. PROCEDIMENTOS

4.1 Obtenção dos extratos e fases de partição.

Aproximadamente 2,54 kg de folhas de *N. leucantha* após serem secadas a temperatura ambiente e moídas, foram submetidas à extração a frio com hexano (10 x 100 mL) obtendo-se 7,9 g de extrato hexânico e a torta após rotoevaporação. A torta obtida foi submetida a extração com metanol (10 x 100 mL) resultando em 65,8 g de extrato metanólico após rotoevaporação. O extrato metanólico foi ressuspenso em MeOH:H₂O (1:2 v/v) e submetido a partição líquido-líquido com hexano, (figura 10). Após evaporação do solvente foram obtidos 19,7 g de fase hexânica do extrato metanólico. O processo de obtenção dos

extratos e fases de partição está exemplificado no fluxograma abaixo (figura 9).

Figura 9. Obtenção e partição do extrato metanólico



Fonte: Própria autora

4.2 Fracionamento cromatográfico.

Parte da fase hexânica do extrato metanólico (aproximadamente 5,0 g) foi submetida a separação por sílica gel (250 g) utilizando-se como fase móvel gradiente de solventes iniciando com hexano: acetato de etila na proporção de 9:1 até 1:9 seguida de metanol puro. Essa separação forneceu 135 frações que foram, em seguida, levadas ao rotaevaporador para eliminação do solvente.

O perfil das frações foi analisado através de cromatografia em camada delgada comparativa (sistema de solvente hexano: acetato de etila 7:3, determinados anteriormente através de cromatografia de camada delgada analítica) e agrupados por similaridade em 16 grupos, após revelação sob luz UV (Tabela 1). Estes grupos foram identificados com a sigla NLFH (*Nectandra leucantha* fase hexânica).

Tabela 1 – Grupos de frações, frações e massas de material obtido após fracionamento do extrato hexânico de *N. leucantha*.

Grupos	Frações	Massa (mg)
NLFH 1	1 a 3	204,7
NLFH 2	4 a 6	170,8
NLFH 3	7 a 9	193,1
NLFH 4	10 a 12	889,5
NLFH 5	13 a 16	47,5
NLFH 6	17 a 23	242,9
NLFH 7	24 a 42	1528,7
NLFH 8	43 a 59	199,2
NLFH 9	60 a 69	129,7
NLFH 10	70 a 89	236,4
NLFH 11	90 a 94	101,5
NLFH 12	95	148,7
NLFH 13	96 a 98	102,6
NLFH 14	99 a 13	158,5
NLFH 15	114 a 132	443,8
NLFH 16	133 a 135	96,6

A análise de RMN de ^1H foi realizada para todos os grupos de fracionamento a fim de se determinar em qual grupo estavam presentes os compostos I e II. Assim, foi possível verificar que os grupos NLFH4 (889,5 mg) e NLFH7 (1528,7 mg) eram constituídos pelas neolignanais I e II, respectivamente.

4.3 Ensaio Biológico

Os ensaios biológicos foram realizados no Centro de Parasitologia e Micologia do Instituto Adolfo Lutz em colaboração com o pesquisador Dr. André G. Tempone.

5.3.1 Parasitas

Promastigotas isoladas de *Leishmania (L.) infantum* (MHOM / BR / 1972 / LD), parasita causador da Leishmaniose visceral, foram mantidas em meio M-199 suplementado com 10% de soro de bezerro e 0,25% de hemina a 24°C. *L. (L.) infantum* (MHOM / BR / 1972 / LD) foram mantidos em hamsters (*Mesocricetus auratus*). Os amastigotas foram colhidos dos baços de hamsters infectados por centrifugação diferencial (STAUBER et al., 1958).

5.3.2 Células de mamíferos

Macrófagos peritoneais foram coletados das cavidades peritoneais de fêmeas de camundongos BALB/c, através de lavagem com meio RPMI-1640, sem indicador de pH (vermelho de fenol), suplementado com 10% de soro fetal bovino. Células de macaco Rhesus (LLC-MK2) foram mantidas em meio RPMI-1640, sem vermelho de fenol e suplementadas com 10% de soro bovino fetal a 37°C em incubadora umidificada com CO₂ a 5%. Células murinas conjuntivas (clone NCTC L-929, ATCC) e LLC-MK2 foram mantidas em RPMI-1640 suplementado com 10% de FBS a 37 ° C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ (CORRÊA et al., 2011).

4.3.3 Determinação do potencial frente a *L. (L.) infantum* - promastigotas

Para determinar o potencial de concentração efetiva de 50% (valor CE₅₀) contra promastigotas de *L. (L.) infantum*, os compostos I e II foram dissolvidos em metanol, posteriormente diluídos com M-199 e adicionados em poços com promastigotas em quantidades de 1x10⁶ promastigotas/poço, em placas com 96 poços. A diluição dos compostos foi realizada de maneira seriada, com concentração inicial de 200 µg /mL. Como controle foram utilizados a miltefosina (1,5 µg /mL), fármaco padrão para o tratamento da Leishmaniose, e metanol, sendo a análise realizada em duplicata.

A placa foi incubada por 24 horas a 24°C e a viabilidade de promastigotas foi determinada através de suas atividades mitocondriais, utilizando ensaio colorimétrico com MTT – brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio) (TADA et al., 1986)

4.3.4 Determinação da atividade frente *L. (L.) infantum* - amastigotas intracelulares

Para determinar a concentração efetiva de 50% (valor CE_{50}), peritoneais de camundongos foram coletados da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c, esses macrófagos foram semeados a 1×10^5 / poço por 24h em uma lâmina de 16 poços (Nunc - Thermo) . Os amastigotas em uma proporção de 1:10 de macrófagos para amastigotas por 24h a 37°C. Os compostos testados foram incubados com macrófagos infectados durante 96 h. A miltefosina também foi usada como padrão de controle. Posteriormente, as células foram fixadas com metanol, coradas com Giemsa e observadas em microscópio óptico.

A carga parasitária foi determinada através da razão entre quantidade de macrófagos infectados e o número médio de amastigotas por macrófago (calculado a cada 500 macrófagos) índice parasitário (IP) . Os compostos I e II foram testados com concentrações máximas de 100 μg / mL para os compostos I - II e 240 μg / mL para miltefosina. Cada ponto foi testado em duplicata (YARDLEY, 2010).

4.3.5 Determinação da citotoxicidade contra células de mamíferos

Para determinar a concentração citotóxica de 50% (CC_{50}), as células NCTC-clone 929 (6×10^4 células / poço) foram semeadas a 4×10^4 células por poço em microplacas de 96 poços e incubadas com as neolignanas isoladas por 48h a 37°C em 5 % em incubadora de CO_2 . O índice de seletividade (IE) foi determinado usando a seguinte relação: CC_{50} contra macrófagos / CE_{50} contra amastigotas. A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio MTT como descrito anteriormente (TADA et al., 1986).

4.3.6 Análise estatística

Os dados obtidos representam a média e o desvio padrão de amostras duplicadas de dois ensaios independentes. Os valores de CE_{50} foram calculados usando curvas sigmoide dose-resposta no software GraphPad Prism 5.0, e os intervalos de confiança de 95% estão indicados entre parênteses na Tabela 4. O teste de Mann – Whitney foi utilizado para teste de significância (valor de P).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

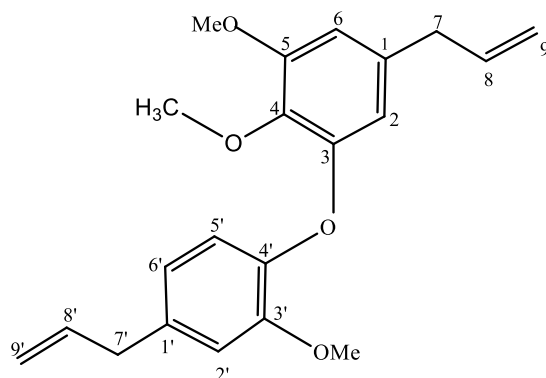
5.1 Identificação estrutural dos compostos I e II.

O espectro de RMN de ^1H (δ , 300 MHz, CDCl_3) para o composto I (Anexo, Espectro 1 - página 31) apresentou dois dupletos em δ_{H} 6,47 ($J = 1,7$ Hz; H-2) e 6,26 (com $J = 1,7$ Hz; H-6) referentes a hidrogênios em anel aromático tetrassubstituído e sinais em δ_{H} 6,68 (dd, $J = 8,1$ e $2,2$ Hz; H-6'), δ_{H} 6,79 (d, $J = 2,2$ Hz; H-2') e δ_{H} 6,81 (d, $J = 8,0$ Hz; H-5') referentes a hidrogênio de anel aromático trissubstituído. Além disso foram observados dois dupletos em δ_{H} 3,22 ($J = 6,6$ Hz; H-7) e em δ_{H} 3,36 ($J = 6,7$ Hz; H-7') e dois multipletos em δ_{H} 5,00 e δ_{H} 5,80 referentes aos hidrogênios H-9, H-9', H-8 e H-8' da cadeia alílica. Foram também observados dois simpletos referente a três grupos metoxílicos em δ_{H} em 3,82 (5-OMe) e em δ_{H} 3,86 (4-OMe e 3'OMe).

O espectro de RMN de ^{13}C (δ , 75 MHz, CDCl_3) do composto I (Anexo, Espectro 4, página 34) apresentou sinais em δ_{C} 56,1 (C-3' OMe), δ_{C} 56,2 (C-5 OMe) e 61,1 (C-4 OMe) referentes às três metoxilas, além de sinais em δ_{C} 138,2 (C-4), δ_{C} 150,7 (C-5) e 153,6 (C-3) atribuídos aos carbonos aromáticos ligados às mesmas. Além destes, foram observados outros nove sinais relativos aos carbonos aromáticos, sendo cinco ligados a hidrogênios δ_{C} 111,6 (C-6), δ_{C} 107,9 (C-2), δ_{C} 113,3 (C-2'), δ_{C} 120,9 (C-6') e δ_{C} 119,6 (C-5'), dois ligados ao grupamento alílico em δ_{C} 135,7 (C-1) e 136,2 (C-1') e dois ligados a oxigênio em δ_{C} 144,3 (C-3) e 150,7 (C-4'). Foram também observados seis sinais referentes aos grupamentos alílicos em δ_{C} 40,1 e 40,2 referentes à dois carbonos metilênicos (C-7 e C-7'), em δ_{C} 116,0 e 116,04 (C-9 e C-9') relativos à dois carbonos metilênicos olefínicos terminais, além de sinais relativos à dois carbonos sp^2 em δ_{C} 137,5 e 137,2 (C-8 e C-8').

Desta forma, a comparação dos dados espectrais obtidos com aqueles descritos na literatura (COSTA-SILVA et al., 2015), tabela 2, permitiram inferir a estrutura molecular de I como sendo do metildesidrodieugenol B (figura 10).

Figura 10. Estrutura do composto I.

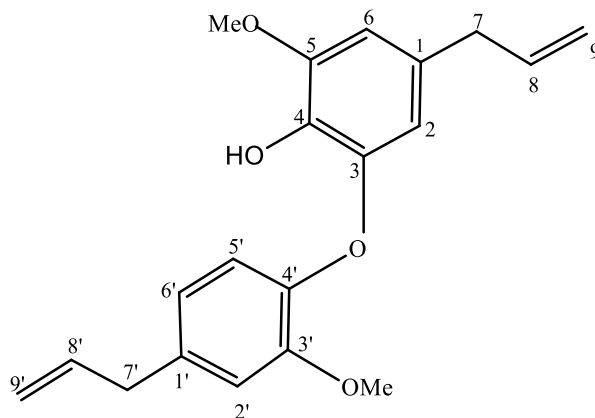


Metildesidrodieugenol B

Fonte: Própria autora

O RMN de ^1H do composto II (Anexo, Espectro 5, página 36), mostrou sinais muito similares aqueles observados no espectro do composto I, sendo a diferença principal a ausência do sinal da metoxila em δ_{H} 3,82. Desta forma, sugere-se que o composto II apresenta duas metoxilas na estrutura molecular, como pode ser confirmado pela análise das integrais dos sinais em δ_{H} 3,89 e δ_{H} 3,86 correspondendo a três hidrogênios cada. Comparando-se os sinais no espectro de ^{13}C do composto II (Anexo, Espectro 8, página 38) pode-se verificar que os sinais são muito similares entre si, sendo a diferença o sinal em δ_{C} 61,1 referente a grupo metoxílico impedido estericamente presente no espectro de ^{13}C do composto I e ausente no espectro do composto II. Desta forma, a estrutura de II foi definida como sendo a do desidrodieugenol B (figura 11), após comparação com dados descritos na literatura (tabela 3).

Figura 11. Estrutura do composto II.



Desidrodieugenol B

Fonte: Própria autora

Tabela 2 – Deslocamentos químicos e constante de acoplamentos de RMN de ^1H e ^{13}C do metildesidrodieugenol B (composto I) em 300 MHz e 75 MHz respectivamente.

Posição	δ_{C} literatura	δ_{C} Composto I	δ_{H} (mult.; J /Hz) literatura	δ_{H} (mult.; J /Hz) Composto I
1	131,0	135,7		-
2	107,3	107,9	6,49 (d; 1,8)	6,47 (d; 1,7)
3	144,4	144,3		-
4	135,2	138,2		-
5	147,8	150,7		-
6	111,8	111,6	6,40 (d; 1,8)	6,26(d; 1,7)
7	40,0	40,1	3,24 (d; 6,6)	3,22 (d; 6,6)
8	137,2	137,5	5,92 (m)	5,80 (m)
9	115,7	116,0	5,06 (m)	5,00 (m)
1'	136,4	136,2		-
2'	112,9	113,3	6,79 (d; 2,0)	6,79 (d, 2,2)
3'	150,4	153,7	-	-
4'	144,2	150,7	-	-
5'	119,5	119,6	6,89 (d;8,1)	6,81 (d; 8,0)
6'	120,8	120,9	6,70 (dd, 8,1 e 2,0)	6,67 (dd; 8,0 e 2,2)
7'	39,9	40,2	3,36 (d; 6,6)	3,35 (d; 6,6)
8'	137,4	137,2	5,92 (m)	5,80 (m)
9'	116,0	116,0	5,06 (m)	5,00 (m)
4-OMe	61,0	61,1	3,87 (s)	3,86 (s)
5-OMe	56,2	56,1	3,89 (s)	3,82 (s)
3'-OMe	55,9	56,1	3,86 (s)	3,86 (s)

Tabela 3 – Deslocamentos químicos e constante de acoplamentos de RMN de ^1H e ^{13}C do desidrodieugenol B (composto II) em 300 MHz e 75 MHz respectivamente.

Posição	δ_{C} literatura	δ_{C} Composto II	δ_{H} (mult.; J /Hz) literatura	δ_{H} (mult.; J /Hz) Composto II
1	131,0	131,2		-
2	107,3	107,4	6,49 (d; 1,8)	6,49 (d; 1,7)
3	144,4	144,5		-
4	135,2	135,2		-
5	147,8	147,9		-
6	111,8	111,9	6,40 (d; 1,8)	6,39 (d; 1,7)
7	40,0	40,1	3,24 (d; 6,6)	3,23 (d; 6,6)
8	137,2	137,4	5,92 (m)	5,84 (m)
9	115,7	115,8	5,06 (m)	4,99 (m)
1'	136,4	136,5		-
2'	112,9	113,0	6,79 (d; 2,0)	6,79 (d; 1,9)
3'	150,4	150,9	-	-
4'	144,2	144,3	-	-
5'	119,5	119,6	6,89 (d;8,1)	6,87 (d; 8,1)
6'	120,8	120,9	6,70 (dd, 8,1 e 2,0)	6,71 (dd; 8,1 e 1,9)
7'	39,9	40,0	3,36 (d; 6,6)	3,35 (d; 6,6)
8'	137,4	137,5	5,92 (m)	5,84 (m)
9'	116,0	116,1	5,06 (m)	4,99 (m)
4-OH	61,0	-	-	-
5-OMe	56,2	56,3	3,89 (s)	3,89 (s)
3'-OMe	55,9	56,1	3,86 (s)	3,86 (s)

5.3 Ensaio Biológico

Os compostos I (metildesidrodieugenol) e II (desidrodieugenol) foram avaliados quanto ao seu potencial antileishmania *in vitro* frente as formas amastigotas e promastigotas de *L. (L.) infantum*. Além disso, a toxicidade desse composto (CC₅₀) foi determinada frente a células NCTC. Desta forma o índice de seletividade (IS) foi determinado através do quociente entre CC₅₀ / CE₅₀ e os valores comparados com o controle positivo (miltefosina).

Tabela 4. Atividade anti-Leishmania (*L.*) *infantum* formas promastigotas e amastigotas) e citotoxicidade de mamíferos dos compostos I e II de *Nectandra leucantha*

Composto	CE ₅₀ (μM) 95% IC		CC ₅₀ (μM) 95% IC	
	<i>Leishmania (L.) infantum</i>		NCTC	IS
	Amastigota	Promastigota		
	57,9			
I	(47,8 – 70,2)	> 100	> 200	> 3,4
II	> 100	> 100	> 200	-
miltefosina	16,9 (11,6 – 18,6)	16,4 (15,5 – 17,5)	122, 0	7,2

CE₅₀ – 50% concentração efetiva, CC₅₀ – 50% concentração citotóxica, IS – índice de seletividade, 95% IC – 95% Intervalo de confiança,

A partir dos resultados obtidos pode-se observar que o composto I apresentou potencial contra as formas amastigotas de *L. (L.) infantum*, com valor de CE₅₀ de 57,9 μM, enquanto o composto II se mostrou inativo para as formas amastigotas e promastigotas do parasita (CE₅₀>100 μM).

Com relação ao índice de seletividade, o composto I apresentou um índice de seletividade menor que o apresentado pelo fármaco padrão (miltefosina). Entretanto, é importante salientar que o mesmo demonstrou uma menor toxicidade (CC₅₀) frente as células de mamífero, quando comparado com a miltefosina; o mesmo foi observado para o composto

II que, apesar de ser inativo para as formas amastigota e promastigotas, também apresentou baixa citotoxicidade frente a células de mamíferos.

6. CONCLUSÕES

Através deste trabalho, foi possível isolar os compostos metildesidrodieugenol B e desidrodieugenol B das folhas da *Nectandra leucantha* por meio de técnicas cromatográficas, realizar a identificação por técnica espectroscópica (ressonância magnética nuclear) e por comparação com os dados da literatura. O potencial antileishmania foi determinado através de ensaio biológico frente a *L.(L) infantum* sendo o composto metildesidrodieugenol B, ativo para a forma amastigota do parasita e o desidrodieugenol B não mostrou atividade, sugerindo dessa forma que as diferenças entre os resultados da atividade biológica, se devem a presença/ausência do grupo metoxílico na estrutura das neolignanas isoladas. Portanto, como perspectivas futuras é interessante realizar modificações estruturais nas neolignanas isoladas afim de avaliar como estas modificações se relacionam com a atividade antileishmania. Dessa forma esse trabalho contribuiu para o estudo do potencial fitoquímico existente no Brasil e para a pesquisa de novas drogas para o tratamento de doenças que não possuem tratamento adequado, como é o caso da leishmaniose.

REFERÊNCIAS

ARGENTA, S. C et al.; **Plantas medicinais: cultura popular versus ciência**. Vivências, v.7, n.12: páginas 51- 60, 2011.

CENTER FOR DISEASE CONTROL PREVENTION, 2013
< <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html> > Acessado em 10 de Julho de 2018.

CORRÊA, D.S et al.; **Anti-leishmanial and anti-trypanosomal potential of polygodial isolated from stem barks of *Drimys brasiliensis* Miers (Winteraceae)**. Parasitology Research, v.109, n.1, páginas 231-236, 2011

COSTA-SILVA, T.A. et al.; **Immunomodulatory and Antileishmanial Activity of henylpropanoid Dimers Isolated from *Nectandra leucantha***. Journal of Natural Products, v.78, páginas 653–657, 2015.

ENCYCLOPAEDIA. "Britannica Academic, Encyclopædia Britannica, 7 Aug. 2009. Disponível em;
<academic-eb-britannica.ez42.periodicos.capes.gov.br/levels/collegiate/article/Ebers-papyrus/31856> Acessado em 17 de Maio de 2018.

FERRAZ, E.O. Composição química e atividade biológica de espécies de *Nectandra* e *Stevia Rebaudiana*. 2015.79f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade do Estado de São Paulo, Botucatu.

GRECCO, S; Prospecção Químico-Farmacológica de *Nectandra leucantha* (Lauraceae) – Seleção de moléculas com atividade antiparasitária. 2016.289 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia Química) – Universidade Federal do ABC, Santo André.

GRECCO et al.; **Update: biological and chemical aspects of *Nectandra* genus (Lauraceae)**. Tetrahedron: Asymmetry, v.27, n.162, páginas 793–810, 2016.

GRECCO et al; **Neolignans from leaves of *Nectandra leucantha* (Lauraceae) display in vitro antitrypanosomal activity via plasma membrane and mitochondrial damages**. Chemico-Biological Interactions, v.277, páginas 55-61, 2017.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE
<<http://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-brasileira> > Acessado em 15 de Julho de 2018.

MOSS, G.P.; **Nomenclature of Lignans and Neolignans** . Pure and Applied Chemistry. v.72, n.8, páginas 1493–1523, 2000.

RATH, S.et. al.; **Antimoniais empregados no tratamento da Leishmaniose: Estado da arte**. Química Nova, v. 26, n. 4: páginas 550-555, 2003

SAXENA, M. et al. Phytochemistry of Medicinal **Plants**. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 1 n. 6 páginas 168-182, 2013.

SOUSA, F.S et al.; **Neolignans isolated from *Nectandra leucantha* induce apoptosis in melanoma cells by disturbance in mitochondrial integrity and redox homeostasis**. *Journal Phytochemistry*, v.140, páginas 108-117,2017.

SOUZA, V. A et al.; **Atividade Antichagásica de Lignanas e Neolignanas**. *Revista virtual de Química*, v.4, n.3, páginas 197-207,2012.

STAUBER,L.A; Franchino E.M; Grun, J.; **An 8-day method or screening compounds against *Leishmania donovani* in the Golden Hamster**. *J Protozool*. 1958;5:269-73.

SU, X.Z.; MILLER, L H.; **The discovery of artemisinin and Nobel Prize in Physiology or Medicine**. *HHS Public Access*, v.58, n.11, páginas 1175–1179,2015.

SUNDAR, S.;SINGH, B. **Emerging therapeutic targets for treatment of leishmaniasis**. *Journal Expert Opinion on Therapeutic Targets*, v.22, n.6, páginas 467-486, 2018.

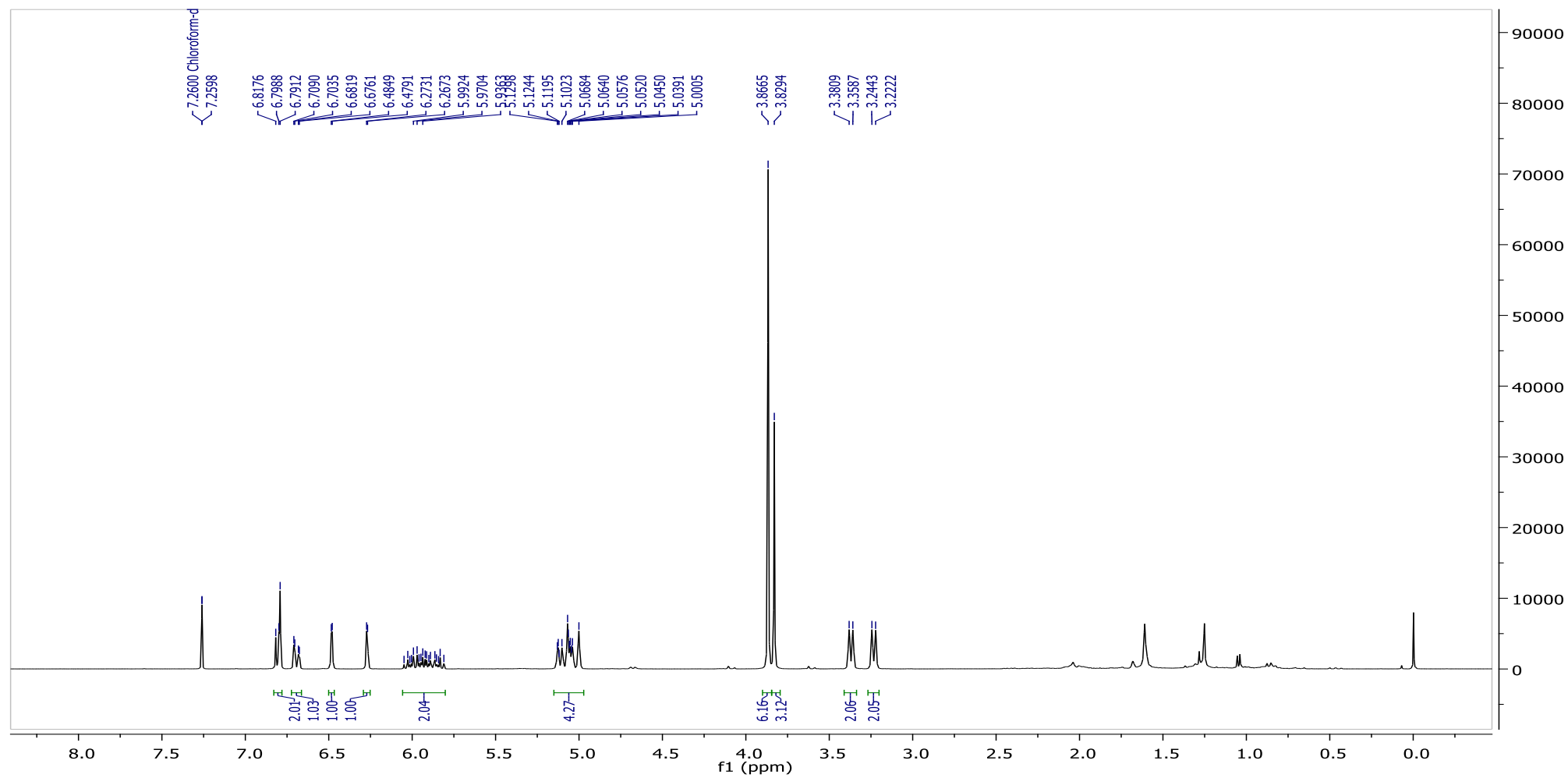
TADA, H et al.; An improved colorimetric assay for interleukin 2. *Journal Immunological Methods* v.93, n.2, páginas 157–165, 1986.

WHO,2018 <<http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>> Acessado em 20 de Maio de 2018.

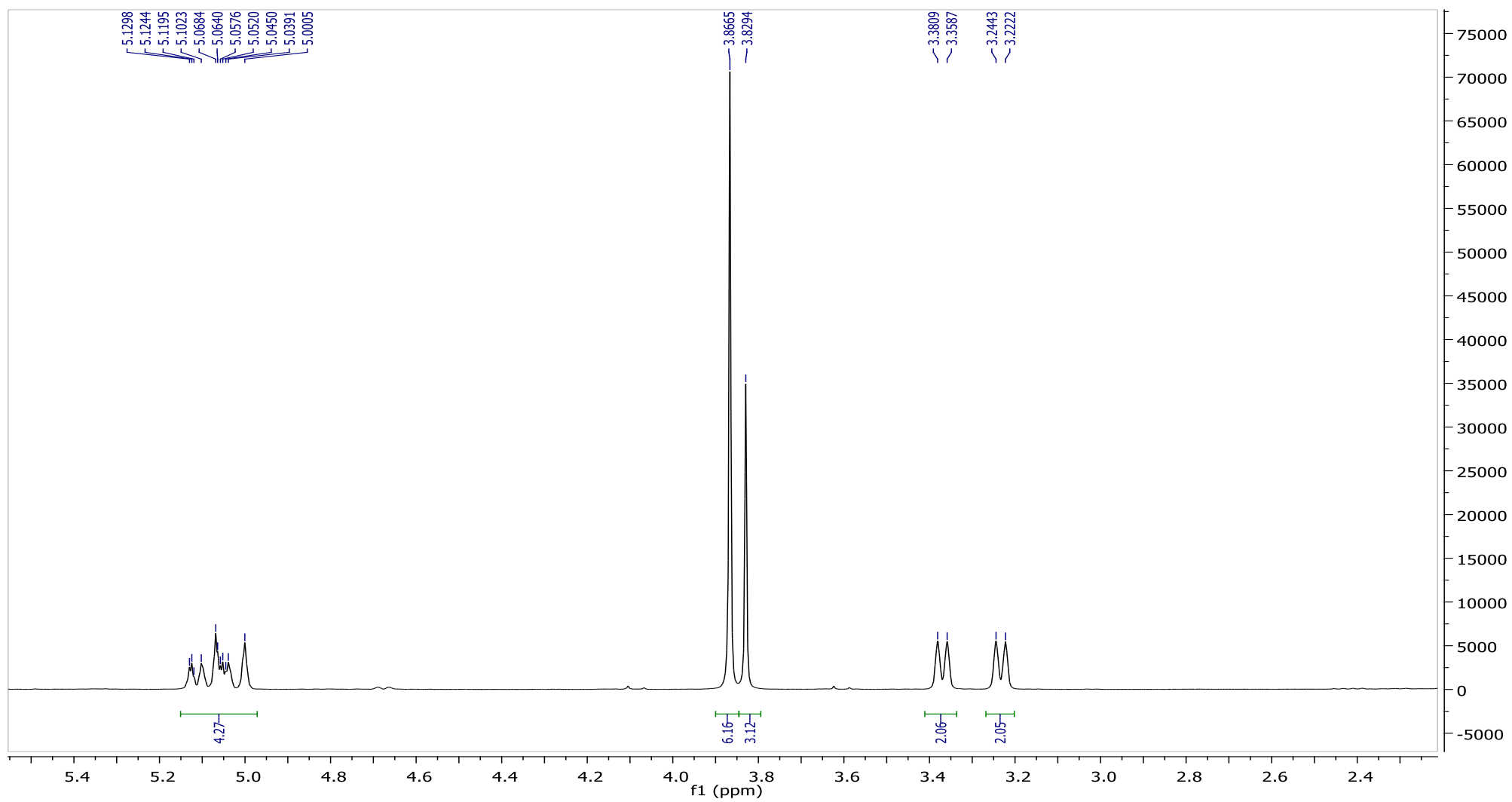
WHO,2018 <<http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>> Acessado em 20 de Maio de 2018.

YARDLEY, V.; GAMARRO, F.; CROFT, SL.; **Antileishmanial and antitrypanosomal activities of the 8-aminoquinoline tafenoquine**. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.54, n.12, páginas 5356 - 5358, 2010.

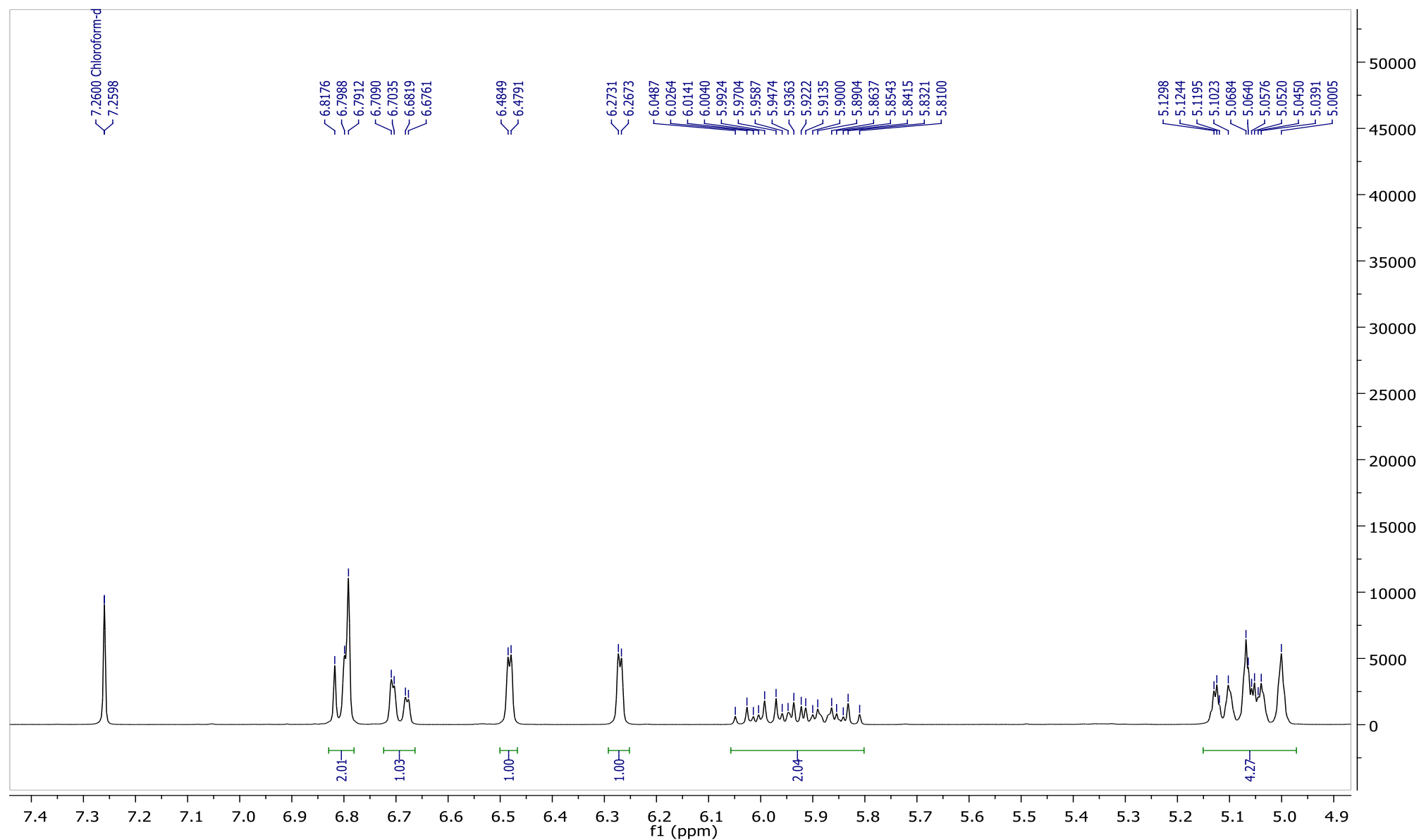
ANEXOS



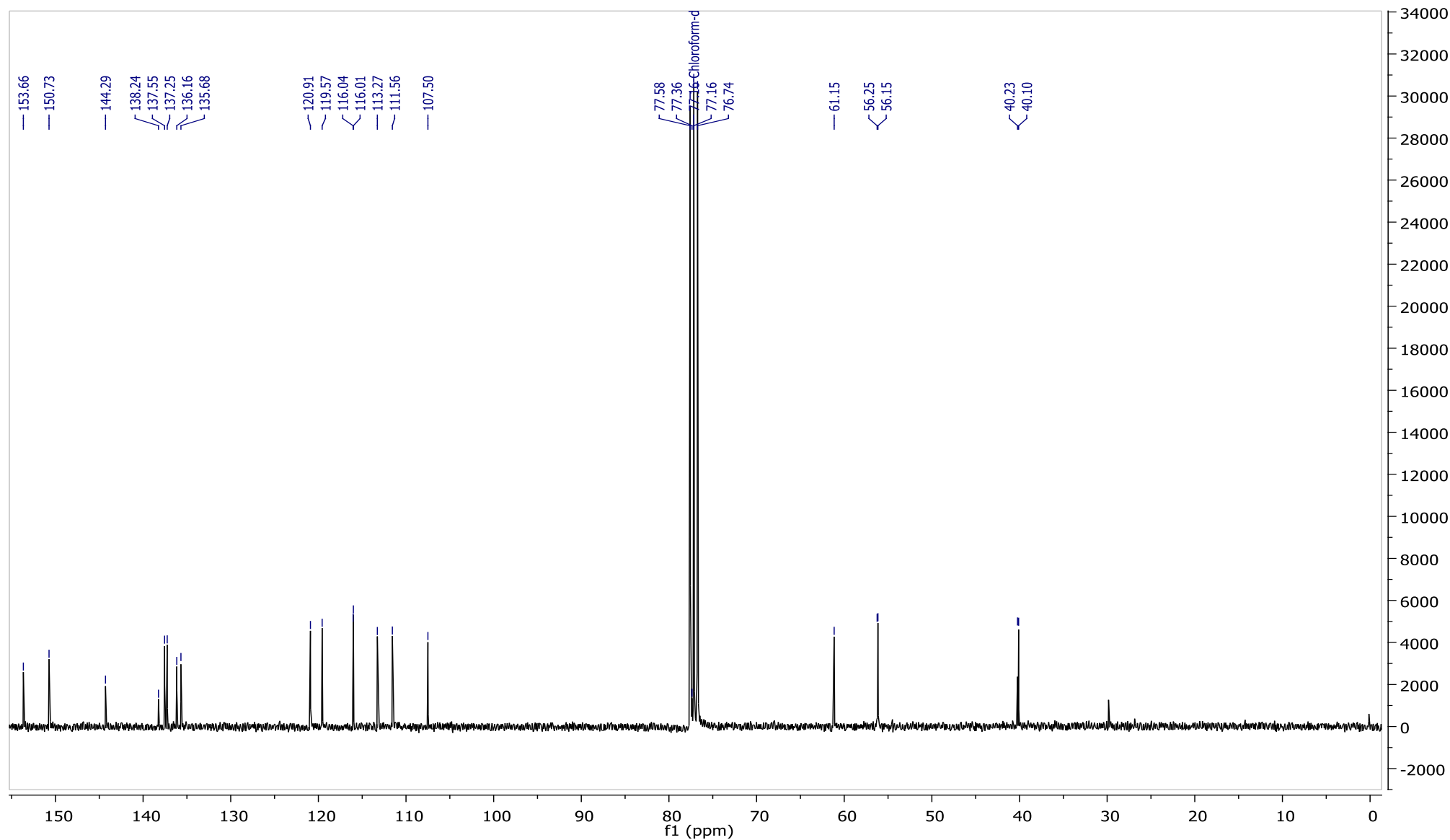
Espectro 1. Espectro de RMN de ^1H do composto **I** (δ , CDCl_3 , 300 MHz)



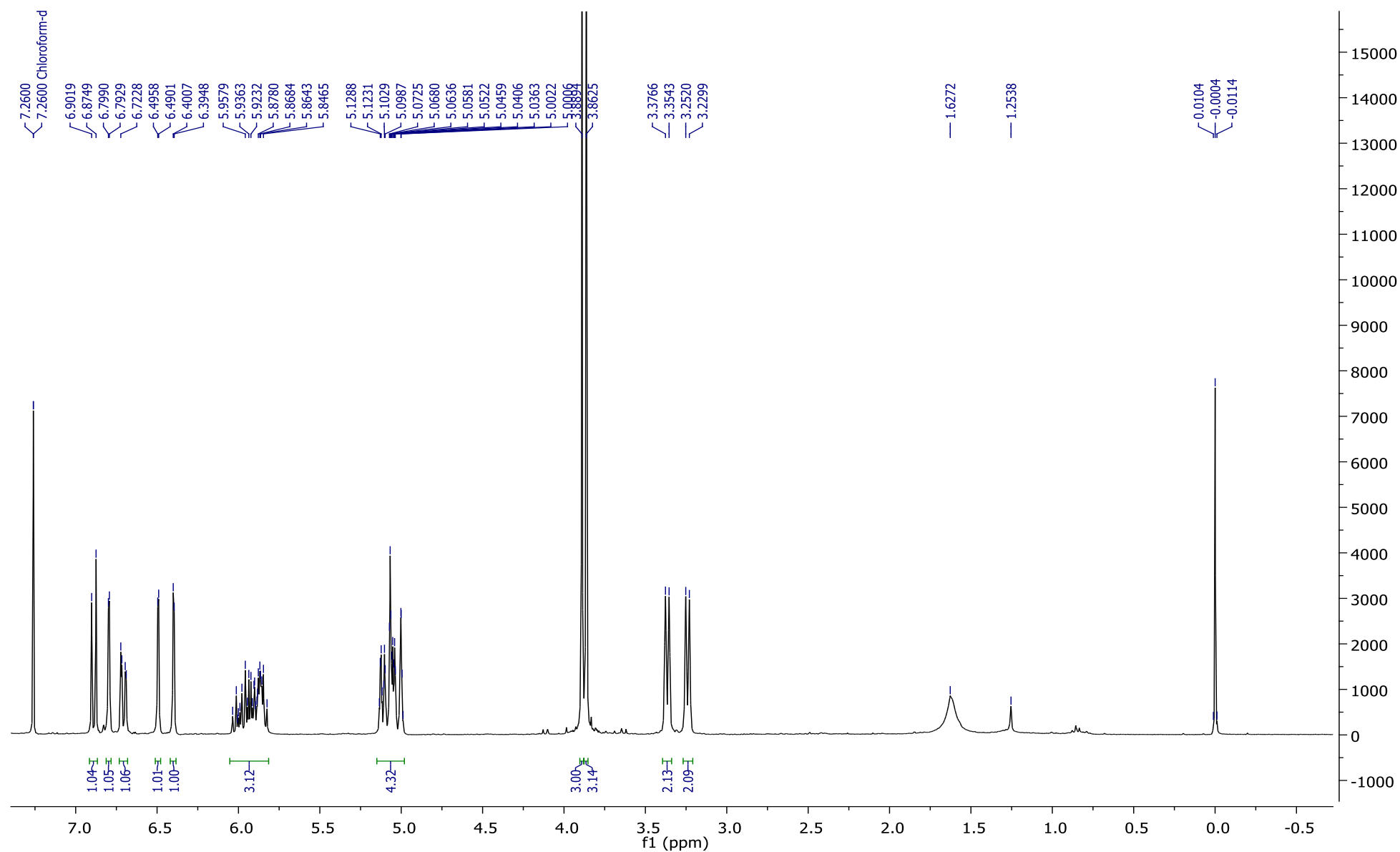
Espectro 2. Ampliação de RMN de ^1H do composto **I** (δ CDCl_3 , 300 MHz)



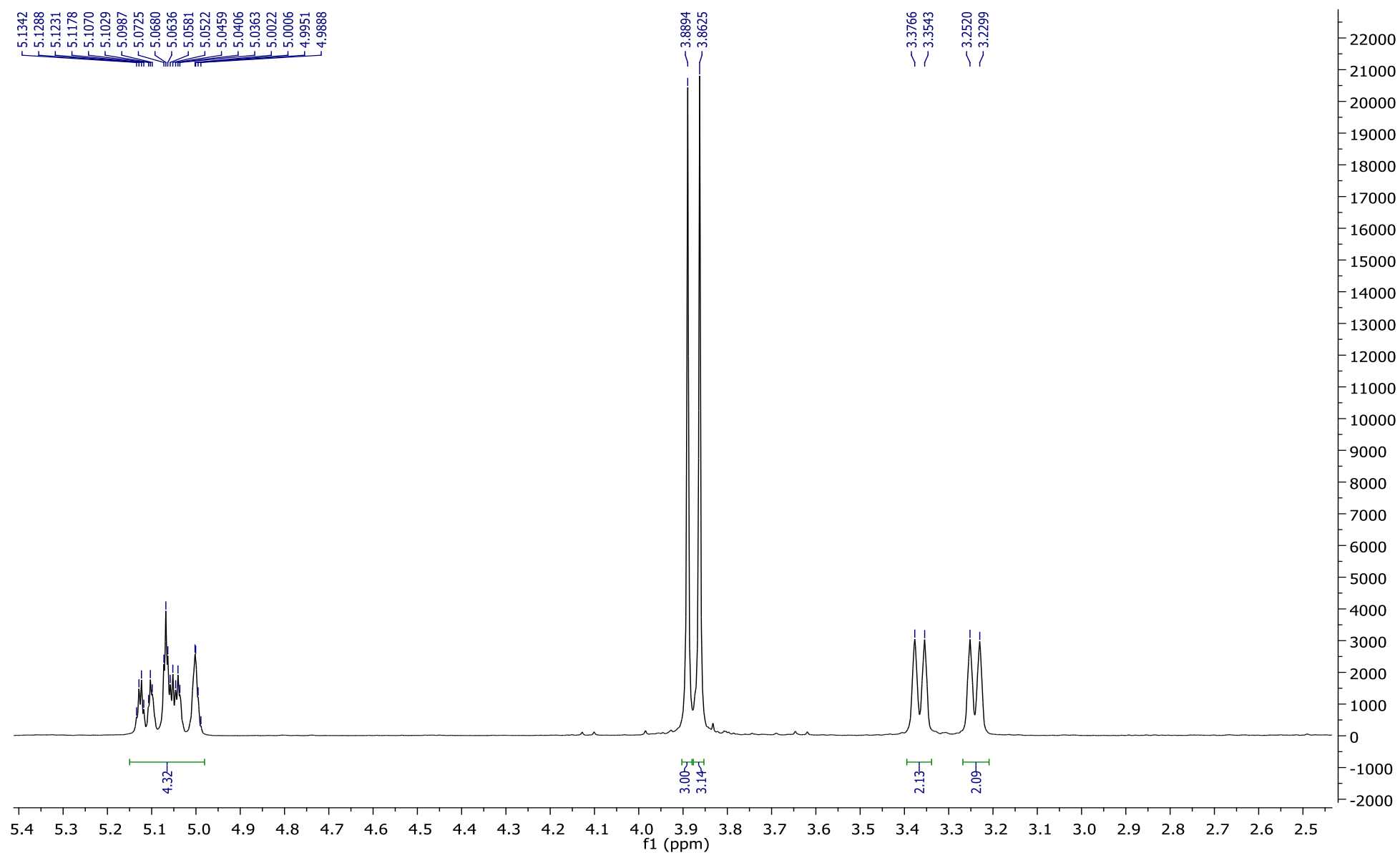
Espectro 3. Ampliação do espectro de RMN de ^1H do composto **I** (CDCl_3 , 300 MHz)



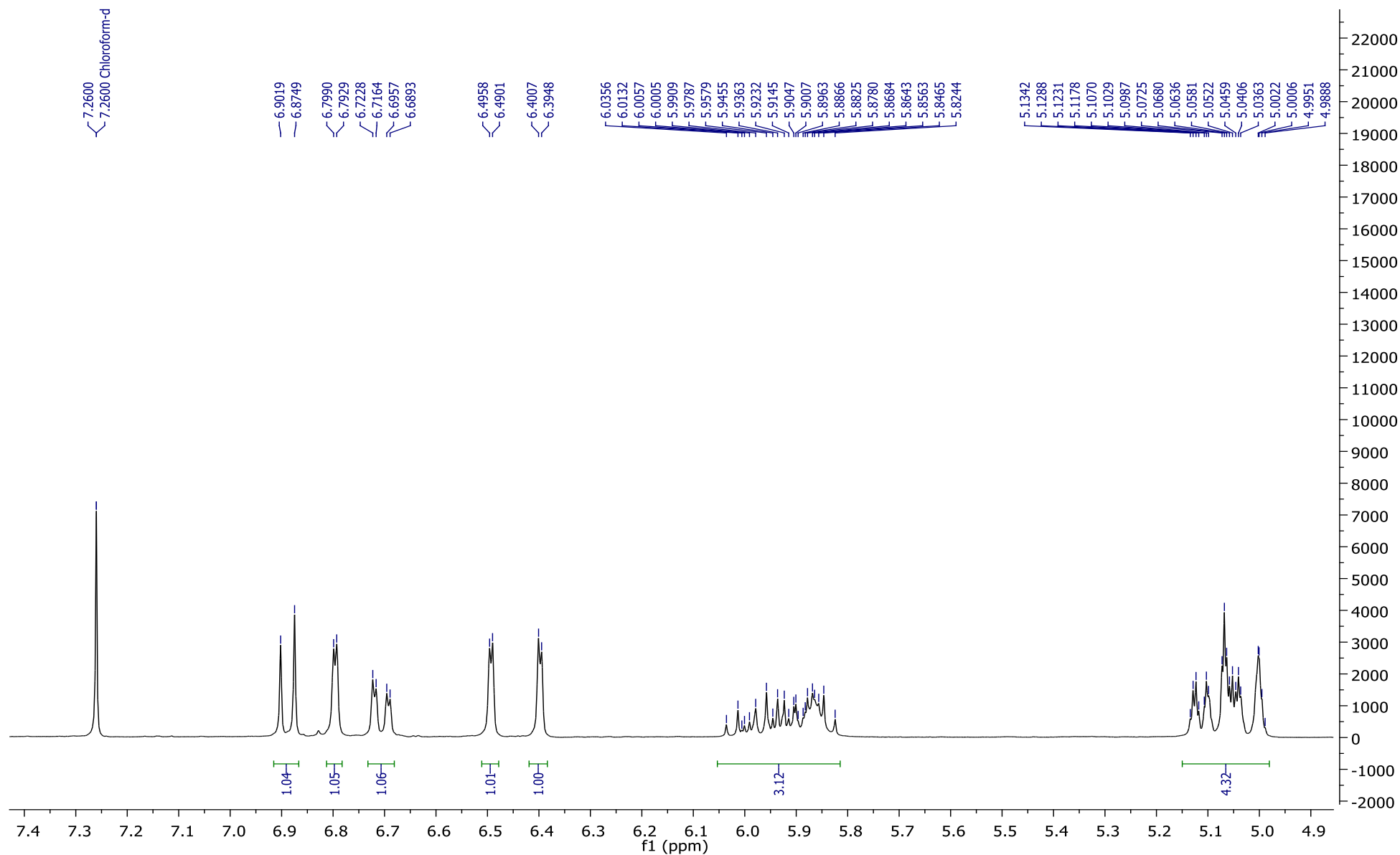
Espectro 4. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **I** (δ , CDCl_3 , 75 MHz)



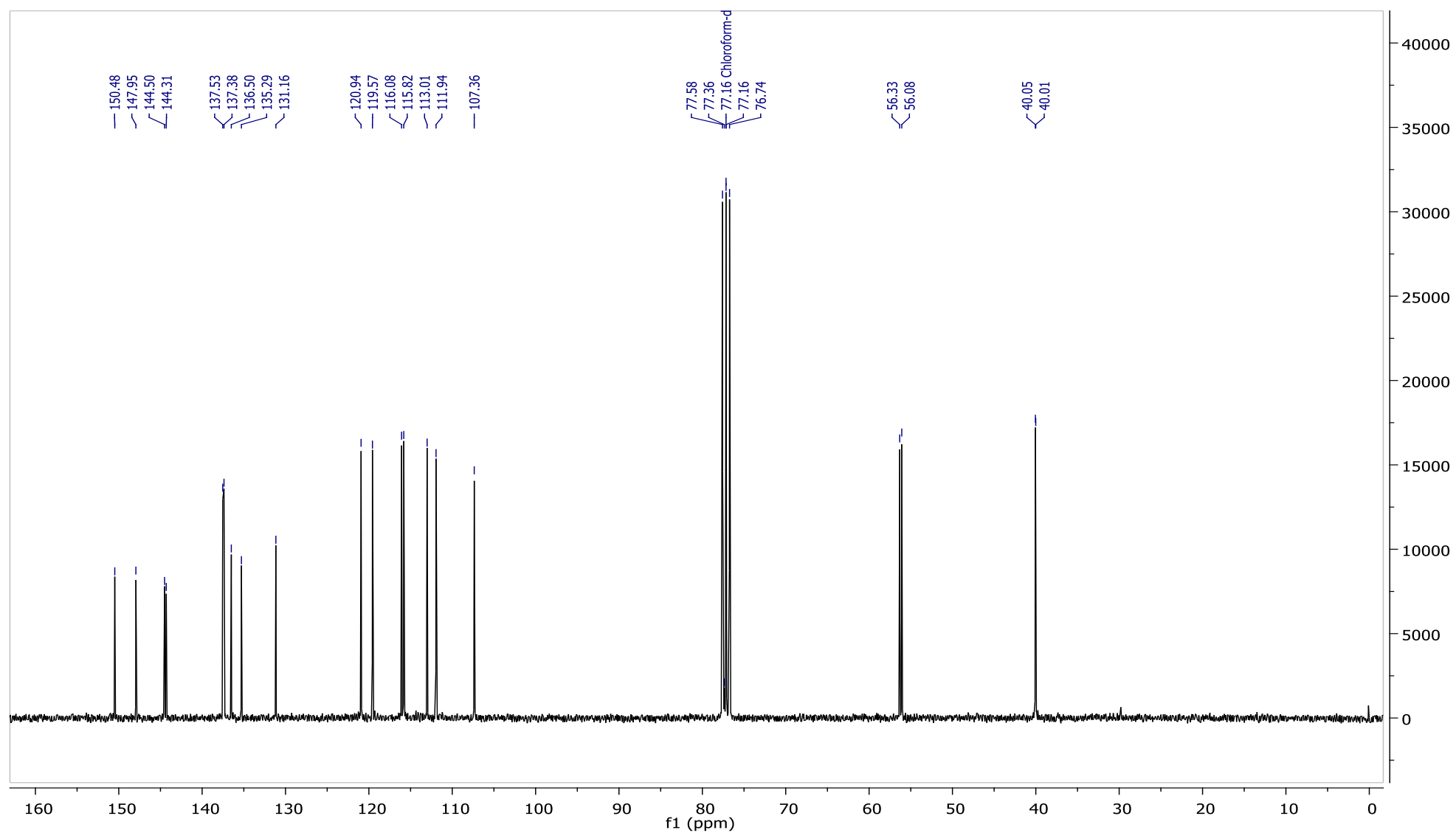
Espectro 5. Espectro de RMN de ^1H do composto **II** (δ, CDCl_3 , 300 MHz)



Espectro 6. Ampliação espectro de RMN de ^1H do composto **II** (δ, CDCl_3 , 300 MHz)



Espectro 7. Ampliação espectro de RMN de ^1H do composto **II** (δ, CDCl_3 , 300 MHz)



Espectro 8. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **II** (δ , CDCl_3 , 75 MHz)