

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Obtenção de iridoides de espécies nativas da flora do Rio Grande do Sul,
modificações estruturais, determinação da atividade anti-*Leishmania*
amazonensis in vitro e modelagem molecular**

MARIA HELENA VENDRUSCOLO

PORTO ALEGRE, 2017

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Obtenção de iridoides de espécies nativas da flora do Rio Grande do Sul,
modificações estruturais, determinação da atividade anti-*Leishmania
amazonensis in vitro* e modelagem molecular**

**Dissertação apresentada por Maria Helena Vendruscolo
para obtenção do GRAU DE MESTRE em Ciências
Farmacêuticas**

Orientador: Profa. Dra. Gilsane Lino von Poser

Porto Alegre, 2017

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 24.03.2017, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dr. Miriam Anders Apel
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Sérgio Augusto de Loreto Bordignon
Centro Universitário La Salle

Profa. Dr. Vera Lucia Eifler-Lima
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Vendruscolo, Maria Helena

Obtenção de iridoides de espécies nativas da flora do Rio Grande do Sul, modificações estruturais, determinação da atividade anti-Leishmania amazonensis in vitro e modelagem molecular / Maria Helena Vendruscolo. -- 2017.
136 f.

Orientadora: Gilsane Lino von Poser.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. Iridoides. 2. isolamento de iridoides. 3. modificações estruturais. 4. anti-Leishmania amazonensis in vitro. 5. modelagem molecular. I. von Poser, Gilsane Lino, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

A DEUS por me conceder força, coragem, amor e determinação para concretizar meus sonhos e objetivos de vida.

A Professora Gilsane, carinhosamente “Gil”, por ter me inserido na área da pesquisa ao me aceitar como estagiária e posteriormente como mestranda no laboratório, mas principalmente em acreditar no meu potencial quando muitas vezes eu estava incrédula. A disponibilidade e disposição em compartilhar seu conhecimento em todas as etapas da pesquisa. Além de orientadora, fostes conselheira, confidente, amiga e uma referência de profissional. Obrigada por acreditar em mim, estar ao lado e ser a voz da razão!

A Faculdade de Farmácia e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul por me receber e apoiar a minha participação no mestrado.

Ao Laboratório de Síntese Orgânica Medicinal, Laboratório de Fitoquímica e Síntese Orgânica e Central Analítica da Faculdade de Farmácia e do Instituto de Química da UFRGS; e ao Laboratório de Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA) que disponibilizaram materiais e equipamentos para a realização dos experimentos práticos utilizados na elaboração desta dissertação.

Aos professores do PPGCF que contribuíram para minha formação. A meus colegas e amigos de mestrado pela troca de experiências e conhecimento.

Ao CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, órgão que financiou a bolsa de estudos para o desenvolvimento deste trabalho.

A todos os colegas que fizeram e fazem parte do Laboratório 504, Maikon, Gabriela Alerico, Jéssica, Bruna, Letícia, Isabel, Aline, Henrique, Gabriela Meirelles, Janaína, Bianca, Maria Luísa, Ariane, Caroll e Angélica pelo apoio, convivência, troca de

experiências, conhecimento e descontração. Principalmente a Gabriela pelo apoio, carinho e compartilhar suas experiências na área da pesquisa.

À minha querida bolsista Maria Luísa pela dedicação, entusiasmo, apoio, carinho, responsabilidade e incentivo em todos os momentos desta pesquisa.

À todos os meus amigos, mas especialmente as colegas e amigas da graduação, Marília, Micheli, Thais, Mariana e Angélica por todo o incentivo e carinho.

À professora e amiga Ana Cristina Stein pelo carinho, amizade, companheirismo e por ter me apresentado a professora Gilsane.

À querida amiga e confidente Angélica por compartilhando todos os momentos desta jornada, me incentivando, aconselhando e apoiando.

Ao meu noivo Pedro, por estar ao meu lado ao longo desta jornada, sempre me apoiando e acreditando em mim. Obrigada pela amizade, paciência, companheirismo e amor. Obrigada por ter feito parte da concretização deste trabalho.

Aos meus queridos pais, Matheus e Maria de Lourdes, agradeço por sempre ter me mostrado a importância do estudo, que tudo pode nos ser tirado, menos o conhecimento. Agradeço a minha mãe por sempre acreditar na minha capacidade, me apoiar, me dar força, incentivar e possibilitar que meu sonho se concretizasse. Obrigada pelo seu amor incondicional e ser a melhor parte de mim.

Aos meus irmãos (Márcio e Marcelo), cunhadas (Giana e Renata) e sobrinhos (Juliara, Matheus e Joana), por serem meu porto seguro e meu refúgio de amor, carinho, incentivo, compreensão, alegria e sabedoria. Obrigada por fazerem o meu sonho o nosso sonho! Obrigada por possibilitarem meu sonho.

À todos os meus familiares, especialmente a minha prima Letícia pelos conselhos, carinho e por fazer parte da minha vida.

Cada pessoa deve trabalhar para o seu aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo, participar da responsabilidade coletiva por toda a humanidade.

Marie Curie

RESUMO

Iridoides são metabólitos secundários provenientes de angiospermas eudicotiledôneas, presentes principalmente em espécies das ordens Gentianales e Lamiales. Os iridoides dividem-se em carbocíclicos e seco-iridoides, ocorrendo comumente na forma glicosilada. Estes compostos são marcadores taxonômicos em algumas famílias vegetais e apresentam diversas atividades biológicas tais como cardiovascular, neuroprotetora e anti-*Leishmania*. Diante da importância dos iridoides, este trabalho teve como finalidade a prospecção química destes metabólitos em espécies nativas do Rio Grande do Sul, bem como a semissíntese de análogos e a investigação da atividade anti-*Leishmania* através de ensaios *in vitro* e modelagem molecular. Os compostos isolados foram identificados através de métodos espectroscópicos e os resultados comparados aos descritos na literatura. A partir de *Escallonia bifida* e *Escallonia megapotamica* (Escalloniaceae) foram isolados asperulosídeo, desacetilasperulosídeo, geniposídeo, ácido geniposídico e dafilosídeo, sendo que o asperulosídeo foi convertido em asperulosídeo tetraacetilado por meio de semissíntese. De *Angelonia integerrima* (Scrophulariaceae) foram obtidos galiridosídeo e antirrídeo. Nos experimentos *in vitro* para atividade anti-*Leishmania*, asperulosídeo, galiridosídeo, geniposídeo, ipolamida e teveridosídeo, nas concentrações 5-100 µM, não demonstraram inibição frente às formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*. O estudo de modelagem molecular destes iridoides e daqueles descritos na literatura com atividade anti-*Leishmania* propôs um modelo farmacofórico que demonstrou que as diferenças estruturais não são responsáveis pela inatividade das moléculas isoladas neste trabalho. A perspectiva é realizar ensaios enzimáticos de tripanotona redutase, bem com *docking* molecular e estudos de dinâmica molecular para investigar as interações entre grupamentos farmacofóricos das moléculas isoladas e o sítio de ligação de tripanotona redutase.

Palavras-chave: Iridoides; *Leishmania*; modelagem molecular; farmacofórico.

ABSTRACT

Iridoids are secondary metabolites of eudicotyledonous angiosperms, present mainly in species of the orders Gentianales and Lamiales. The iridoids are divided into carbocyclic and *seco*-iridoids, occurring commonly in the glycosylated form. These compounds are taxonomic markers in some families of plants and have shown cardiovascular, neuroprotective and anti-*Leishmania* activities. In view of the importance of iridoids, this work aimed to the chemical prospection of these metabolites of native species of Rio Grande do Sul, as well as semi-synthesis of analogues and to investigate the anti-*Leishmania* activity through *in vitro* assays and molecular modeling. The isolated compounds were identified by spectroscopic methods and the results compared to those described in literature. From *Escallonia bifida* and *Escallonia megapotamica* (Escalloniaceae) asperuloside, deacetylasperuloside, geniposide, geniposidic acid and daphyloside were isolated, being asperuloside developed in asperuloside tetraacetylated by means of semi-synthesis. From *Angelonia integerrima* (Scrophulariaceae) galiridoside and antirride were obtained. In the *in vitro* experiments for anti-*Leishmania* activity, asperuloside, galiridoside, geniposideo, ipolamiide and theveridoside in concentrations 5-100 μM , did not demonstrate inhibition in promastigote form of *Leishmania amazonensis*. The molecular modeling study of these iridoids and those described in the literature with anti-*Leishmania* activity proposed a pharmacophoric model that demonstrated that the structures are not responsible by the inactivity of the molecules isolated in this work. The prospect is to carry out enzymatic assays of trypanothione reductase as well as molecular docking and molecular dynamics studies to investigate the interactions between pharmacophoric grouping of the isolated molecules and the trypanothione reductase binding site.

Keywords: Iridoids; *Leishmania*; molecular modeling; pharmacophore.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1. Iridoides.....	21
2.2. Classificação e biossíntese.....	23
2.3. Atividades biológicas relacionadas para iridoides.....	26
2.4. Atividade anti- <i>Leishmania</i>	26
3. OBJETIVOS	29
3.1. Objetivo geral	30
3.2. Objetivos específicos.....	31
4. CAPÍTULO 1 - ISOLAMENTO DE IRIDOIDES DE ESPÉCIES DE <i>Escallonia</i>	33
4.1. Introdução	35
4.2. Objetivos	36
4.3. Materiais e métodos	36
4.3.1. <i>Material vegetal</i>	36
4.3.2. <i>Extração do material vegetal e tratamento preliminar</i>	37
4.3.3. <i>Fracionamento dos extratos, isolamento e purificação</i>	37
4.3.4. <i>Identificação dos constituintes isolados</i>	40
4.4. Obtenção de derivados de asperulosídeo.....	42
4.4.1. <i>Asperulosídeo tetraacetilado</i>	43
4.4.2. <i>Reação de bromação do asperulosídeo tetraacetilado</i>	44
4.5. Resultados e discussão.....	45
4.5.1. <i>Isolamento de iridoides de E. bifida e E. megapotamica</i>	45
4.5.2. <i>Obtenção de derivados de asperulosídeo</i>	51
5. CAPÍTULO 2 - ISOLAMENTO DE IRIDOIDES DE <i>Angelonia integerrima</i> Spreng.	53
5.1. Introdução	55
5.2. Objetivos	56
5.3. Materiais e métodos	56
5.3.1. <i>Material vegetal</i>	56
5.3.2. <i>Extração do material vegetal e tratamento preliminar</i>	56
5.3.3. <i>Fracionamento dos extratos, isolamento e purificação</i>	56
5.3.4. <i>Elucidação estrutural dos compostos isolados</i>	57
5.4. Resultados e discussão.....	58
6. CAPÍTULO 3 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI- <i>Leishmania</i> DE IRIDOIDES	61

6.1. Introdução.....	63
6.2. Objetivo geral	66
6.2.1. <i>Objetivos específicos</i>	66
6.3. <i>Parte experimental e resultados</i>	67
MANUSCRITO 1 - In vitro and in silico activity of iridoids against <i>Leishmania amazonensis</i>	69
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	99
8. REFERÊNCIAS	103
ANEXOS: DADOS ESPECTROSCÓPICOS E ESPECTROMÉTRICOS DE IRIDOIDES ISOLADOS DE <i>Escallonia bifida</i> , <i>Escallonia megapotamica</i> E <i>Angelonia integerrima</i> E ANÁLOGOS DE SEMISSÍNTESE.....	115

1. INTRODUÇÃO

O uso de recursos naturais pelas civilizações antigas era uma das únicas alternativas do homem para a prevenção, tratamento e cura de doenças (ALVIM et al., 2006; FIRMO et al., 2011). As práticas médicas realizadas na antiguidade empregavam plantas na forma de unguentos, chás, tinturas e demais preparados para as mais diversas enfermidades (RATES, 2001; CAVALCANTE et al., 2010).

O uso das plantas medicinais é uma prática efetiva pela população, estando atrelado à condição socioeconômica das comunidades de baixa renda, a sua disponibilidade, baixos efeitos colaterais, baixa toxicidade e baixo custo comparado aos medicamentos sintéticos (ALVIM et al., 2006; BESSA et al., 2013).

Em tempos mais modernos, os produtos naturais são a fonte mais importante para o desenvolvimento de novos fármacos, sendo que 30% dos fármacos disponíveis são de origem natural, onde as plantas representam cerca de 25% dos medicamentos prescritos e destes, 80% são produtos naturais modificados ou fármacos semissintéticos. Na terapia oncológica, por exemplo, 60% dos medicamentos são derivados de plantas (RATES, 2001; SACCARO-JÚNIOR, 2011; OLIVEIRA et al., 2012; DUTRA et al., 2016). As modificações estruturais têm como finalidade modular as propriedades biológicas de produtos isolados, solucionar problemas relacionados a toxicidade e às características físico-químicas dos compostos (OLIVEIRA et al., 2012).

Desta forma, o desenvolvimento de fármacos inovadores visa minimizar os efeitos adversos e atingir o alvo de maneira mais efetiva. Para tal, utilizam-se métodos quimioinformáticos para compreender, investigar e prever a atividade farmacológica contra alvos biológicos (BUREAU, et al., 2002; DROR, et al., 2009; YANG, 2010). Os métodos computacionais utilizados na descoberta de fármacos são o desenho de fármaco baseados em estrutura (SBDD) e o desenho de fármaco baseado em ligantes (LBDD) buscando estabelecer um modelo de farmacóforo (MACALINO, et al. 2015).

O farmacóforo é um conjunto de características químicas e físicas de um ou mais grupos funcionais de uma molécula responsável pela atividade farmacológica. Os farmacóforos podem ser grupos aromáticos, hidrofóbicos, aceptores e doadores de ligação de hidrogênio, cátions e ânions que devem ter afinidade com a enzima alvo, possibilitando, desta maneira, a identificação de novos ligantes e o planejamento de fármacos sintéticos (BUREAU, et al., 2002; DROR, et al., 2009; YANG, 2010).

Terpenoides constituem uma vasta classe de produtos naturais com diversas atividades biológicas tais como sedativa, ansiolítica, antinociceptiva, anti-inflamatória, antifúngica, entre outras, e são classificados em mono, sesqui, di, tri, tetra e politerpenoides. (WANG et al., 2005; SCHRÖDER et al., 2016).

Iridoides são um grupo particular de monoterpenoides encontrados em uma ampla variedade de plantas, geralmente restritos às angiospermas eudicotiledôneas. Essas moléculas possuem em sua estrutura base um ciclopentano-[C]-pirano, que pode servir como ponto de partida para síntese de moléculas inspiradas nesses metabólitos (WANG et al., 2005; SCHRÖDER et al., 2016).

Estes compostos fazem parte da composição química de muitas plantas medicinais empregadas popularmente e possuem diversas atividades tais como neuroprotetora, cardiovascular, antibacteriana, entre outras (HOUGHTON et al., 2003; DINDA et al., 2007; SINGH et al., 2008; KHANAL et al., 2010; HOU et al., 2014; KHANAL et al., 2014).

Diante disso, o estudo se justifica devido à importância dos iridoides, como classe de produtos naturais dotada de relevantes atividades farmacológicas e a possibilidade de obtenção de novas moléculas para o tratamento de diversas doenças.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Iridoides

Iridoides são metabólitos secundários isolados de diferentes grupos de plantas, geralmente restritos às angiospermas eudicotiledôneas, encontrados de forma abundante em vegetais pertencentes à ordem Gentianales e Lamiales (EL-NAGGAR & BEAL, 1980; BIANCO, 1994; von POSER et al., 1997; von POSER et al., 1998; DINDA, 2007; MARTIN et al., 2007).

Nos vegetais, estes compostos apresentam a função de defesa contra predadores, sendo considerados dissuasórios alimentares devido ao intenso sabor amargo (EL-NAGGAR & BEAL, 1980; BIANCO, 1994; von POSER et al., 1997; von POSER et al., 1998; DINDA, 2007; MARTIN et al., 2007). O nome iridoide é derivado dos compostos iridomirmecina, iridolactona e iridodial (figura 1), que foram isolados de algumas espécies de *Iridomyrmex*, formigas que secretam estas substâncias como forma de defesa (EL-NAGGAR, 1980; BIANCO, 1994; von POSER et al., 1997; von POSER et al., 1998; DINDA, 2007; MARTIN et al., 2007).

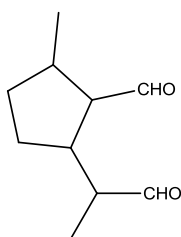
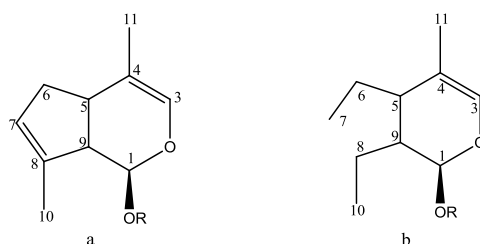


FIGURA 1 – Iridodial – produto natural isolado de *Iridomyrmex* sp., que origina a denominação iridooides.

Iridoides são derivados monoterpênicos, ocorrendo comumente na forma glicosilada e podem ser divididos em carbocíclicos e *seco*-iridooides (figura 2) (BIANCO, 1994; NANGIA et al., 1997; SAMPAIO-SANTOS & KAPLAN, 2001; DINDA et al., 2007).

FIGURA 2 – Iridoide carbocíclico (a) e seco-iridoide (b).



Iridoïdes carbocíclicos possuem em sua estrutura básica um sistema ciclopentano-[C]-pirano, podendo ser metilados nas posições 4 e 8. No C-1 os substituintes podem ser O, OH ou OCH₃ (PLOVIER et al., 1971; BIANCO, 1994; NANGIA et al., 1997; SAMPAIO-SANTOS & KAPLAN, 2001; DINDA et al., 2007). Estes tipos de iridoïdes normalmente apresentam uma ligação dupla entre os carbonos 3-4. Aucubina e angelosídeo são exemplos de compostos que não possuem substituintes no C-4; outros, como asperulosídeo, ipolamiida e geniposídeo, possuem substituintes no C-4. O anel ciclopentano pode possuir ligação dupla entre os carbonos 6-7, 7-8 ou um epóxido entre 7-8. Randiosídeo, teviridosídeo e catalpol são exemplos de compostos com estes substituintes (PLOVIER et al., 1971; BIANCO, 1994; NANGIA et al., 1997; DINDA et al., 2007).

Seco-iridoïdes são baseados na estrutura 7,8-secociclopentano[C]-pirano, sendo derivados da loganina (um intermediário da rota biossintética dos iridoïdes), que por clivagem oxidativa forma a secolagonina (estrutura geral dos seco-iridoïdes) (DINDA et al., 2007). O esqueleto base sofre diversas modificações secundárias como epoxidação, oxidação, hidroxilação e esterificação dos grupos hidroxila levando a formação de um grupo de compostos que constituem os seco-iridoïdes (DINDA et al., 2007). A maioria destes compostos é glicosilada. Swerosídeo, oloosídeo e oleuropeína são exemplos de seco-iridoïdes (PLOVIER et al., 1971; BIANCO, 1994; NANGIA et al., 1997; DINDA et al., 2007).

Diversas plantas medicinais tais como *Plantago major*, *Gardenia jasminoides* e *Lantana camara*, possuem iridoïdes em sua composição química, sendo estes compostos provavelmente os responsáveis pelas atividades farmacológicas (OHKUBO et al., 2004; KHANAL et al., 2010; JOYNER, 2011).

Iridoides são compostos relativamente instáveis, podendo sofrer degradação nas mais variadas fases pós-colheita, ou seja, secagem, processamento, armazenamento e extração (WEI & WEN, 2014). Diante disso, alguns fatores críticos tais como temperatura e pH ácido devem ser observados durante a extração e isolamento para que não ocorra degradação (WEI & WEN, 2014).

2.2. Classificação e biossíntese

Iridoides são biossintetizados a partir de duas principais rotas. A estrutura geral dos iridoides carbocíclicos consiste no sistema ciclopentano-[C]-pirano, metilado nas posições 4 e 8, denominado esqueleto iridano. A partir dele, os seco-iridoides se formam através da clivagem oxidativa da ligação entre os carbonos 7 e 8 do anel ciclopentano, os quais compõe a estrutura dos alcaloides indólicos monoterpênicos. Esses dois grandes grupos de iridoides são formados a partir dos precursores iridodial (1) e *epi*-iridodial (2). No que se refere a quimiosistemática, estes compostos têm um importante papel como marcadores taxonômicos em nível de gênero e subgênero nas famílias Lamiaceae, Verbenaceae, Scrophulariaceae, Plantaginaceae, entre várias outras (BIANCO, 1994; NANGIA et al., 1997; SAMPAIO-SANTOS & KAPLAN, 2001; DINDA et al., 2007).

É possível observar na figura 3 uma representação esquemática da biossíntese dos iridoides. De acordo com a rota I, a formação do iridoide, inicia a partir do geraniol (3) pelo derivado 10-hidroxi-geraniol (4), pela via iridodial (1) e iridotrial (5), sendo que neste ocorre oxidação no C-11 para a fase da carbonila originando a aglicona do ácido desoxilogânico (6). A glicosilação deste composto produz o ácido desoxilogânico (7). Os compostos biossintetizados por esta via nunca eliminam o C-11 (JESEN, 1991; SAMPAIO-SANTOS & KAPLAN, 2001).

A rota II envolve a biossíntese da série 8-*epi*, iridoides com estereoquímica onde C-10 possui conformação α , ou seja, 8 α . Esta rota está subdividida em rota IIa e rota IIb. A rota IIa inicia com 10-hidroxi-geraniol e segue pela via *epi*-iridodial (2) e

via *epi*-iridotrial (8), sendo que posteriormente ocorre a oxidação do C-11 originando a aglicona do ácido *epi*-desoxilogânico (9). A glicosilação deste ácido gera ácido *epi*-desoxilogânico (10) – precursor dos iridoídes com estereoquímica 8 α . A rota IIb é idêntica até *epi*-iridotrial (8), onde ocorre a glicosilação (11), e posteriormente verifica-se a oxidação do C-11 para a fase carboxila. A descaboxilação do C-4 ocorre constantemente na rota IIa, no entanto o mesmo não acontece na rota IIb (JESEN, 1991; SAMPAIO-SANTOS & KAPLAN, 2001).

Na rota III encontram-se poucos produtos que ocorrem como agliconas sendo formados provavelmente pelo envolvimento do 10-hidroxicitronelol (12) e iridodial (JESEN, 1991).

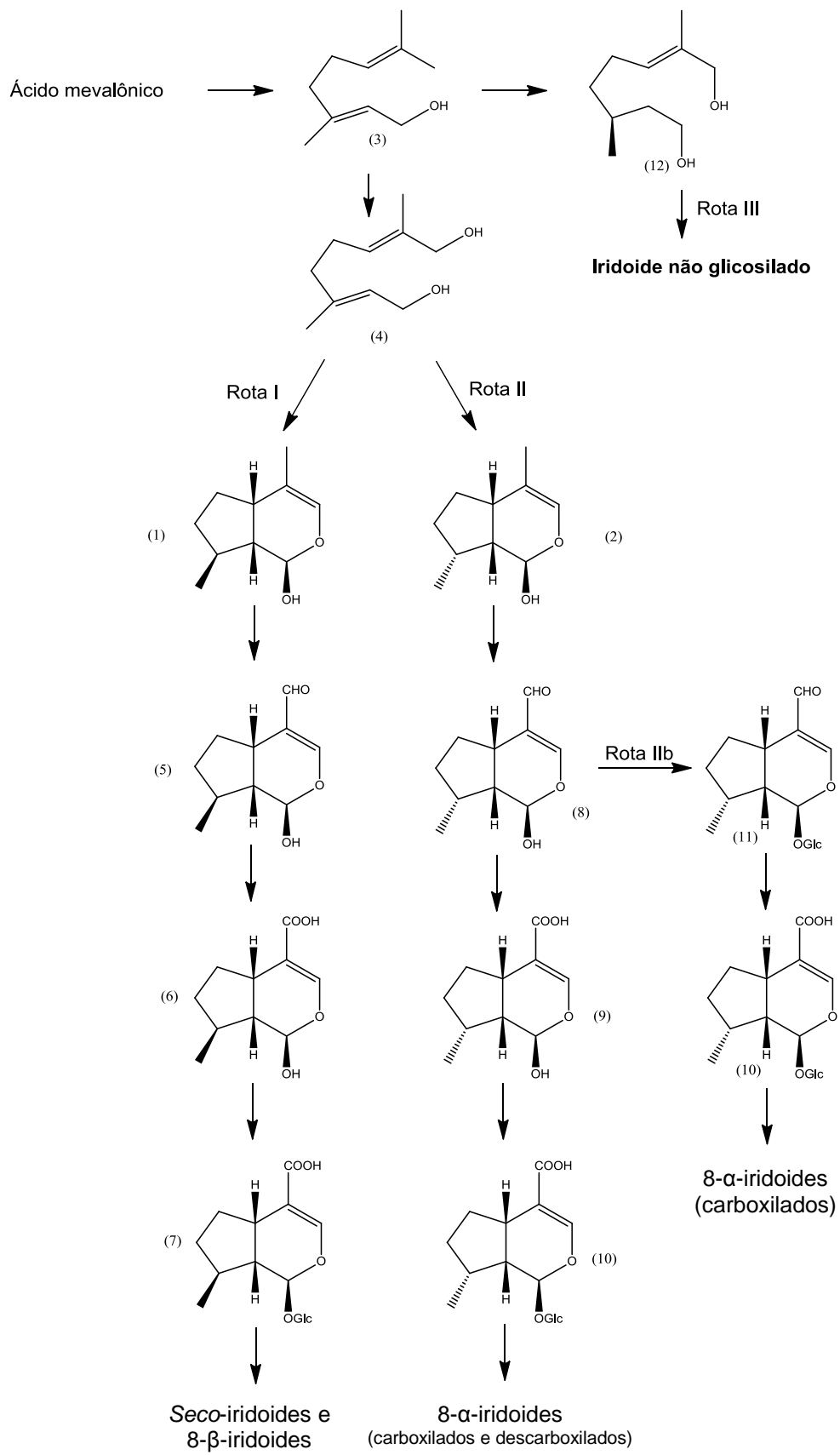


FIGURA 3 – Rotas biosintéticas dos iridoides.

2.3. Atividades biológicas relacionadas para iridoides

Diversas plantas medicinais que possuem iridoides em sua composição química são utilizadas popularmente como tônicos amargos, sedativos, antipiréticos, para desordens da pele e como hipotensores. Substâncias isoladas vêm demonstrando diversas atividades como cardiovascular, anti-hepatotóxica, colerética, hipoglicemiante, hipolipemiante, anti-inflamatória, antioxidante, antiespasmódica, antitumoral, antialérgica, moluscicida, antiviral, antifúngica, antibacteriana, imunomoduladora e purgativa (DINDA, 2007; TUNDIS, 2008). No entanto, as atividades mais citadas são neuroprotetora (CHEN, et al., 2015; WANG et al., 2015) e anti-*Leishmania* (CASTILLO et al., 2007; AMOA-BOSOMPEM et al. 2016).

2.4. Atividade anti-*Leishmania*

A leishmaniose é uma das principais doenças parasitárias negligenciadas que acomete os países subtropicais em desenvolvimento. Estima-se que milhões de novos casos de leishmaniose ocorram anualmente em todo o mundo. No Brasil há uma alta prevalência desta doença (BRASIL, 2016a, b).

Os agentes etiológicos da leishmaniose são protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania*, sendo relatados mundialmente mais de 20 espécies que estão envolvidas na forma visceral, cutânea e mucocutânea da doença (ALEXANDER et al., 1999; AKOPYANTS et al., 2009). O protozoário se apresenta nas formas promastigotas (extracelular) e amastigotas (intracelular) (PEARSON & SOUZA, 1996; SOLBACH & LASKAY, 2000).

O tratamento para leishmaniose utiliza os antimoniais pentavalentes, como *N*-metil-glucamina, como fármacos de primeira escolha, indicados para a terapia de todas as formas desta doença (WHO, 2010; MCGWIRE & SATOSKAR, 2014; BRASIL, 2016c). Estes medicamentos possuem variações na resposta clínica, baixa

eficácia devido à resistência do parasito e reações adversas graves (BRASIL, 2016c). Diante disso, torna-se necessário o desenvolvimento de novos medicamentos mais eficazes e que permitam maior adesão dos pacientes. Muitos produtos naturais têm sido investigados com esse intuito e há vários relatos na literatura acerca da atividade de diferentes iridoides contra a leishmaniose (ABDEL-MAGEED et al., 2012; ATAY et al., 2016; AMOA-BOSOMPEM et al., 2016)

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Considerando-se o importante papel dos iridoides como classe de produtos naturais dotada de relevantes atividades em espécies nativas da flora Rio Grande do Sul, o objetivo geral desta dissertação foi a prospecção química destes metabólitos, bem como a semissíntese de derivados, a investigação da atividade anti-*Leishmania* e o desenvolvimento de um modelo farmacofórico.

3.2. Objetivos específicos

- Isolar, purificar e elucidar estruturalmente os iridoides presentes nas frações das espécies alvo;
- Sintetizar análogos de iridoides naturais com modificações estruturais no esqueleto;
- Avaliar a atividade anti-*Leishmania* dos iridoides isolados contra formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*;
- Estabelecer um modelo farmacofórico para identificar ligantes presentes nos iridoides com potencial atividade anti-*Leishmania* utilizando a técnica de modelagem molecular.

Para melhor apresentação dos dados obtidos, o trabalho está dividido em 3 capítulos.

Capítulo 1: Isolamento de iridoides de espécies de *Escallonia*

Capítulo 2: Isolamento de iridoides de *Angelonia integerrima* Spreng.

Capítulo 3: Avaliação da atividade anti-*Leishmania* de iridoides

4. CAPITULO 1 - ISOLAMENTO DE IRIDOIDES DE ESPÉCIES DE
Escallonia

4.1. Introdução

Em 1829, Robert Brown criou a família Escalloniaceae, incluindo três gêneros: *Escallonia*, *Anopterus*, *Labillardiere* e *Itea* (DUMORTIER, 1829). Escalloniaceae R. Br. tem sua distribuição pantropical, não tendo representantes autóctones na África. A família ocorre mais frequentemente na América Central, América do Sul, Ilhas Reunião, Filipinas, Austrália, Nova Caledônia e Nova Zelândia (SLEUMER, 1968 apud FRITSCH & CERVI, 2011, p. 208; SOUZA & LORENZI, 2008). *Escallonia* é o maior gênero desta família, reunindo 39 espécies exclusivas da América do Sul e da América Central (SLEUMER, 1968 apud FRITSCH & CERVI, 2011, p. 208; SOUZA & LORENZI, 2008). No território sul-americano o gênero está distribuído de forma abundante no Chile, Argentina, Bolívia, Peru, Equador, Colômbia, Venezuela, Uruguai, Paraguai e Brasil (DUMORTIER, 1829; SOUZA & LORENZI, 2008).

A família Escalloniaceae está representada no Brasil somente pelo gênero *Escallonia*, com nove espécies e duas variedades (SLEUMER, 1968 apud FRITSCH & CERVI, 2011, p. 208; SOUZA & LORENZI, 2008). Estas plantas são arbustos ou arvoretas que crescem nas margens de florestas e áreas abertas, principalmente nas regiões de maior altitude e mais frias da região sul e sudeste do país (SLEUMER, 1968 apud FRITSCH & CERVI, 2011, p. 208; KLEIN & REITZ, 1985; SOUZA & LORENZI, 2008). No Rio Grande do Sul, o gênero foi estudado por M. S. Marchioretto em 1992, que reconheceu quatro espécies para o estado, *Escallonia bifida* Link & Otto, *Escallonia chorophylla* Cham. & Schltld., *Escallonia megapotamica* Spreng. e *Escallonia petrophylla* Rambo & Sleumer (MARCHIORETTO, 1992; SOUZA; LORENZI, 2008; KLEIN & REITZ, 1985). *Escallonia bifida* Link & Otto e *Escallonia megapotamica* Spreng são plantas ornamentais cultivadas em parques e jardins (FRITSCH, 2011; KLEIN & REITZ, 1985; SOUZA & LORENZI, 2008).

Tomassini et al. (1993), em seus estudos fitoquímicos, relataram o isolamento de iridoides nas espécies chilenas *Escallonia rnyrtoidea*, *E. illinita*, *E. alpina* e *E. pulverulenta*, sendo que o iridoide asperulosídeo foi encontrado em todas as espécies

citadas, enquanto que dafilosídeo e geniposídeo foram obtidos de *E. illinita* e *E. myrtoidea*, respectivamente.

Como citado anteriormente, os produtos naturais são fontes importantes para o desenvolvimento de novos fármacos. A semissíntese pode ser considerada uma ferramenta que promove modificações estruturais com a finalidade de modular as propriedades biológicas de produtos naturais isolados, à toxicidade e ao perfil farmacocinético deficiente (OLIVEIRA et al., 2012). Nesse contexto, a semissíntese a partir de iridoídeos isolados da flora do Rio Grande do Sul se propõe a introduzir elementos de variabilidade funcional (grupos funcionais e substituintes) com a finalidade de desenvolver moléculas visando, futuramente, o desenvolvimento de novos fármacos.

4.2. Objetivos

Considerando-se a ausência de relatos na literatura sobre a prospecção química dos metabólitos de *E. bifida* e *E. megapotamica*, os objetivos desta etapa do trabalho foram o isolamento e identificação dos compostos bem como a modificação estrutural do iridoídeo majoritário obtido destes vegetais.

4.3. Materiais e métodos

4.3.1. Material vegetal

Partes aéreas (folhas e ramos) de *E. megapotamica* foram coletados no município de Jaquirana (latitude 28° 53' 06" sul e longitude 50° 21' 28" oeste), Rio Grande do Sul, Brasil. Partes aéreas de *E. bifida* (folhas e ramos) foram coletado no município de Taquara (latitude 29° 38' 32" sul e 50° 47' 44"), Rio Grande do Sul, Brasil. As espécies foram identificadas pelo botânico Dr. Sérgio A. de L. Bordignon (UNILASALLE, RS, BRASIL) e exsiccatas foram depositadas no Herbário do

Departamento de Botânica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ICN-UFRGS).

4.3.2. *Extração do material vegetal e tratamento preliminar*

O material vegetal seco e moído, folhas (319 g) e caules (219 g) de *E. megapotamica*, e folhas (522 g) e caules (248 g) de *E. bifida* foi submetido à maceração com etanol 99,3 ° GL por 24 horas (5 vezes o volume em relação a massa de planta em gramas). Em seguida, os extratos foram concentrados em rota vapor (40 – 60 °C).

4.3.3. *Fracionamento dos extratos, isolamento e purificação*

Para a remoção das clorofilas e outros compostos apolares do extrato etanólico das folhas e caules da *E. megapotamica* e *E. bifida*, os mesmos foram retomados em água destilada para solubilizar e submetidos a extração líquido-líquido com éter etílico (1:2 v/v) em um funil de separação. As frações aquosas foram evaporadas em rota vapor (60 °C).

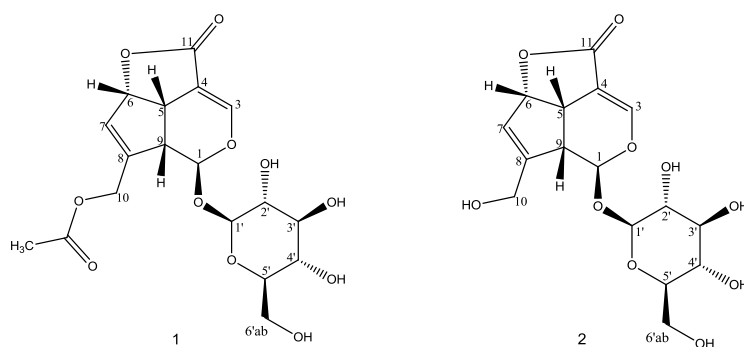
Com a finalidade de remover compostos fenólicos glicosilados que ocorrem concomitantemente aos iridoides presentes no extrato, as frações aquosas dos caules e das folhas de *E. megapotamica* (24 g e 4,5 g) e das folhas de *E. bifida* (18 g) foram retomadas em metanol, submetidas a partição com óxido de alumínio 90 ativo neutro (70 – 230 mesh; Al₂O₃ = 24 g, 4,5g e 18 g, respectivamente) por três vezes, filtradas e, posteriormente, concentradas em rota vapor (60 °C).

Uma alíquota da fração aquosa alumina (7 g) de folhas *E. bifida* foi submetida ao fracionamento por cromatografia em coluna sob gel de sílica (Acros Organics; 0,060 – 0,200 mm) (C1EBF) e sistema gradiente composto por diclorometano:metanol (100:0 → 0:100) como fase móvel, resultando em 20 frações.

As frações foram monitoradas por cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando fase estacionária - gel de sílica GF₂₅₄ e fase móvel - diclorometano:metanol

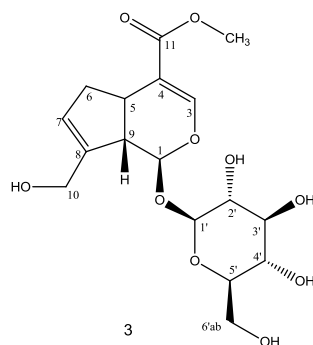
80:20. Os cromatogramas foram observados com a utilização de luz ultravioleta $\lambda = 254 \text{ nm}$ e 365 nm , e para revelação, foram utilizados os reagentes cromogênicos anisaldeído-sulfúrico e vanilina sulfúrica seguidos de aquecimento a $100 \text{ }^\circ\text{C}$.

As frações 4 a 9 (diclorometano: metanol 95:5 \rightarrow 90:10) apresentaram-se como um precipitado majoritário (2,8 g = 40%), **composto 1**. As frações 10 a 12 (0,95 g = 13%) revelaram um outro metabólito, o **composto 2**. Na sequência, as frações 4 a 9 foram submetidas a sucessivas lavagens (partição sólido-líquido) com diclorometano e metanol e posterior recristalização até obtenção de um precipitado branco que se apresentou como uma única mancha na CCD.



Na tentativa de purificar as frações 10 a 12 (C1EBF), estas foram reunidas e submetidas a outras duas cromatografias em coluna (Fase móvel = diclorometano:metanol, 100:0 \rightarrow 80:20). O composto de interesse foi eluído com o sistema diclorometano:metanol (100:0 \rightarrow 97:3) e foi denominado **composto 2**.

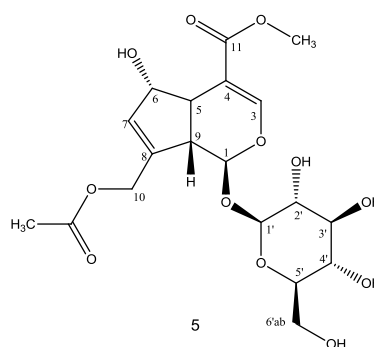
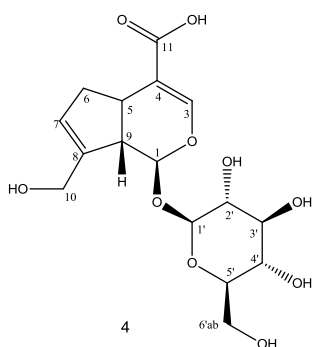
Uma alíquota da fração aquosa alumina (1 g) de *E. megapotamica* folhas foi submetida a um fracionamento em coluna sob gel de sílica (C1EMF) como fase estacionária e sistema gradiente composto por diclorometano:metanol (100:0 \rightarrow 80:20), resultando em 23 frações. As frações 6 a 8 apresentaram uma substância com perfil cromatográfico semelhante ao do **composto 1**, enquanto que as frações 9 a 13 continham o **composto 3**.



A fim de isolar os compostos majoritários da fração aquosa alumina de *E. megapotamica* caules, a amostra (11 g) foi submetida a um fracionamento em coluna sob gel de sílica (C1EMC) como fase estacionária e sistema gradiente composto por diclorometano:metanol (100:0 → 0:100). Ao todo, 27 frações foram obtidas (7 g = 31%). A partir do sistema diclorometano:metanol 100:0 foram obtidas onze frações contendo o composto majoritário (frações 8 a 18). As frações obtidas nesta coluna passaram pelo processo de cristalização com diclorometano:metanol (9:1). A fração insolúvel (precipitado) resultou 527 mg.

Posteriormente, parte do precipitado (272 mg) foi purificada através de cromatografia em coluna de gel de sílica (C2EMC) e sistema diclorometano:metanol (100:0 → 0:100). Ao todo foram obtidas 20 frações. As frações 3 e 4 obtidas com o sistema diclorometano:metanol 100:0 → 95:5, demonstraram a presença de uma mancha na CCD semelhante a do **composto 1** da C1EBF.

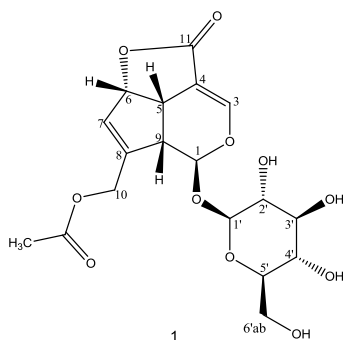
As frações 8 a 12 (60 mg) foram reunidas e submetidas a sucessivas cromatografias em colunas, seguindo as mesmas condições de fase estacionária e fase móvel acima citada levando ao isolamento dos **compostos 4 e 5**.



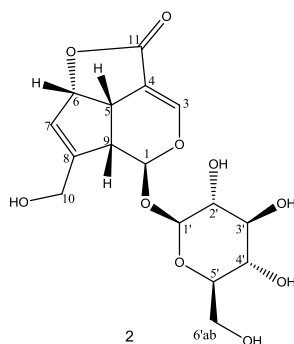
4.3.4. Identificação dos constituintes isolados

Para a elucidação das estruturas foram utilizados espectrofotômetro Perkin Elmer Spectrum BX FT-IR para registrar os espectros de absorção na região do infravermelho (IV). As Análises de espectrometria de massas de alta resolução foram realizadas no modo íon positivo, detector tempo de voo quadrupolar e ionização eletrospray (ESI-Q-TOF-MS-MS Premier, Waters, Milford, MA, EUA) e (Q-TOF-ESI, Bruker Impact II) A elucidação estrutural dos constituintes isolados foi realizada através de ressonância magnética nuclear (RMN Varian MR 400) de ^1H 400 MHz e ^{13}C 100 MHz, tendo como referência o sinal do solvente deuterado utilizado. Os deslocamentos químicos (δ) foram registrado em ppm e os solventes deuterados utilizados foram CD_3O e D_2O . O ponto de fusão foi estabelecido num determinador de ponto de fusão a seco (Fisatom) de fase quente e não foi corrigido. Os dados dos espectros de RMN dos compostos isolados, apresentados a seguir, foram comparados com dados citados na literatura (EL-NAGGAR & BEAL, 1980; TOMASSINI et al., 1993; DEMIREZER et al., 2006; MOURA et al., 2006; LIANG et al., 2014).

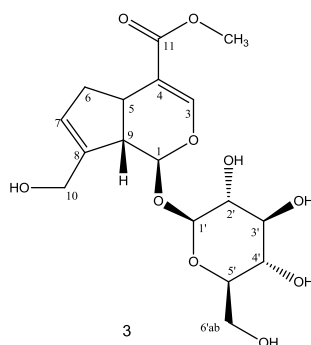
Composto 1: RMN ^1H 400 MHz (D_2O), δ : 7,25 (d, H-3), 5,90 (d, H-1), 5,67 (m, H-7), 5,51 (m, H-6), 4,72 (dd, H-10), 4,63 (d, H-10), 4,58 (d, H-1'), 3,87 (d, H-6a'), 3,84 (d, H-6b'), 3,63 (d, H-5), 3,34 (d, H-5'), 3,29 (m, H-9), 3,25 (dd, H-3'), 3,20 (d, H-4'), 3,14 (dd, H-2'), 2,02 (s, H-10 OCH_3). RMN ^{13}C 100 MHz (D_2O), ppm: 91,89 (C-1); 148,91 (C-3); 104,76 (C-4); 36,03 (C-5); 84,93 (C-6); 127,47 (C-7); 142,85 (C-8); 43,82 (C-9); 60,55 (C-10); 170,90 (C-11); 171,19 (COCH_3); 19,31 (COCH_3); 98,56 (C-1'); 73,19 (C-2'); 76,91 (C-3'); 70,14 (C-4'); 76,41 (C-5'); 61,37 (C-6').



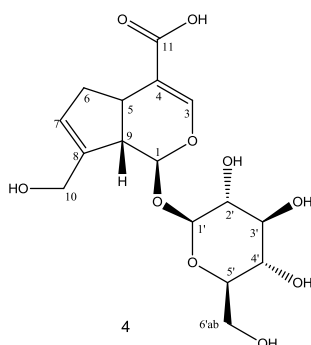
Composto 2: RMN ^1H 400 MHz (D_2O), δ : 5,88 (s, H-1), 7,23 (s, H-3), 3,67 (s, H-5), 5,57 (s, H-6), 5,50 (d, H-7), 3,28 (s, H-9), 4,12 (s, H-10), 4,52 (s, H-10), 4,61 (d, H-1'), 3,18 (d, H-2'), 3,59 (m, H-3'), 3,21 (m, H-4'), 3,67 (s, H-5'), 4,06 (d, H-6'), 3,82 (m, H-6'). RMN ^{13}C 100 MHz (D_2O), ppm: 91,86 (C-1); 148,86 (C-3); 105,63 (C-4); 36,03 (C-5); 85,28 (C-6); 124,29 (C-7); 148,38 (C-8); 43,53 (C-9); 58,67 (C-10); 171,27 (C-11); 98,42 (C-1'); 73,20 (C-2'); 76,43 (C-3'); 70,14 (C-4'); 76,96 (C-5'); 61,34 (C-6').



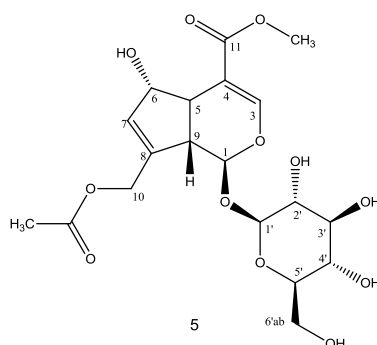
Composto 3: RMN ^1H 400 MHz (D_2O), δ : 5,21 (d, H-1), 7,51 (s, H-3), 3,16 (q, H-5), 2,78 (dd, H-6), 5,84 (s, H-7), 4,24 (dt, H-10), 3,88 (d, H-10), 3,72 (OCH_3), 4,45 ppm (t, H-1'). RMN ^{13}C 100 MHz (D_2O), ppm: 97,24 (C-1); 154,54 (C-3); 111,46 (C-4); 45,63 (C-5); 38,02 (C-6); 128,95 (C-7); 141,36 (C-8); 51,78 (C-9); 59,77 (C-10); 170,02 (C-11); 34,28 (C-12); 98,88 (C-1'); 72,74 (C-2'); 76,18 (C-3'); 69,42 (C-4'); 75,64 (C-5'); 62,48 (C-6').



Composto 4: RMN ^1H 400 MHz (D_2O), δ : 5,13 (d, H-1), 7,40 (s, H-3), 3,19 (dd, H-5), 2,67 (dt, H-6), 5,70 (s, H-7), 3,06 (m, H-9), 4,15 (dt, H-10), 3,95 (m, H-10), 4,48 ppm (d, H-1'). RMN ^{13}C 100 MHz (D_2O), ppm: 97,99 (C-1); 152,69 (C-3); 111,63 (C-4); 34,08 (C-5); 37,93 (C-6); 129,00 (C-7); 141,18 (C-8); 45,68 (C-9); 59,68 (C-10); 171,39 (C-11); 101,41 (C-1'); 77,34 (C-2'); 75,56 (C-3'); 69,60 (C-4'); 76,12 (C-5'); 60,50 (C-6').



Composto 5: RMN ^1H 400 MHz (D_2O), δ : 5,58 (dd, H-1), 7,28 (d, H-3), 3,16 (m, H-5), 5,70 (s, H-6), 5,86 (d, H-7), 2,06 (m, H-9), 3,22 (s, H-12), 1,99 (s, OCH_3). RMN ^{13}C 100 MHz (D_2O), ppm: 98,93 (C-1); 155,06 (C-3); 106,62 (C-4); 43,37 (C-5); 75,43 (C-6); 131,03 (C-7); 149,89 (C-8); 44,50 (C-9); 61,46 (C-10); 169,80 (C-11); 31,89 (C-12); 173,43 (COCH_3); 20,18 (COCH_3); 164,48 (COOCH_3); 56,95 (COOCH_3); 98,37 (C-1'); 72,51 (C-2'); 76,29 (C-3'); 69,54 (C-4'); 75,70 (C-5'); 60,66 (C-6').



4.4. Obtenção de derivados de asperulosídeo

Tendo como base as moléculas de iridoídes isoladas de espécies nativas do Rio Grande do Sul, a síntese dos derivados destes compostos levará em consideração os diferentes elementos de variação estrutural podendo considerar como abordagem a introdução de cadeia lipofílica na hidroxila da lactona; substituição do éster metílico do grupo por outros grupos alquilo ou de outros grupos funcionais no lugar de éster como um aldeído, cetona, amida; introdução de éteres no local do álcool livre ou alteração do estado de oxidação do álcool; ou a introdução de vários substituintes na dupla ligação do ciclopentano da molécula do iridoíde (Figura 4).

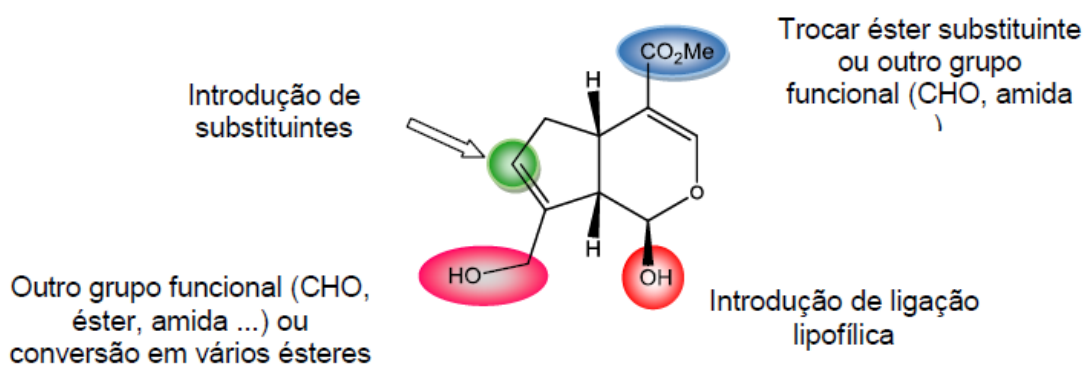


FIGURA 4 – Variações estruturais previstas para os análogos de iridoídes.

O produto de partida selecionado para realização das reações de semissíntese foi o asperulosídeo (**1**), isolado de *E. bifida* e *E. megapotamica*, por ser abundante e possuir estrutura química favorável às modificações propostas.

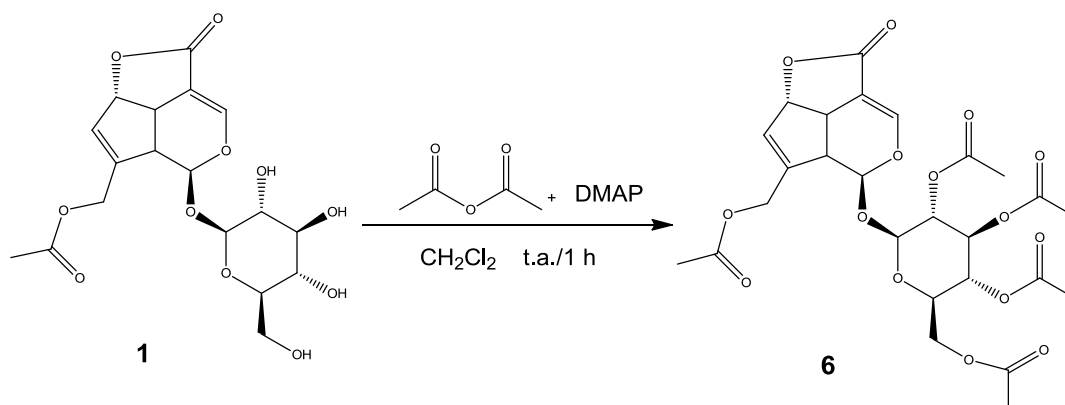
A derivatização do do iridoíde **1** ocorreu no Laboratório de Fitoquímica e Síntese Orgânica da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com supervisão da Professora Dr^a Simone Cristina Baggio Gnoatto.

4.4.1. Asperulosídeo tetraacetilado

Para a reação de acetilação do asperulosídeo (**1**) (50 mg – 0,121 mmol), o composto foi dissolvido, com agitação, em diclorometano (5 mL) à temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se 12 equivalentes de anidrido acético (0,137 mL – 1,452 mmol) e 8 equivalentes de 4-dimetilaminopiridina (122,17 mg – 1 mmol). A

reação permaneceu sob agitação por 1 hora em temperatura ambiente ($\pm 25\text{ }^{\circ}\text{C}$) e monitorada a cada 15 minutos por CCD; fase estacionária - gel de sílica GF₂₅₄, fase móvel - CH₂Cl₂:CH₃OH 98:2 e visualização em luz UV seguida de revelação com anisaldeído sulfúrico. O solvente da mistura reacional foi evaporado ($\pm 40\text{ }^{\circ}\text{C}$) formando um resíduo (0,320 g) que foi analisado por CCD nas mesmas condições mencionadas anteriormente. Posteriormente o produto foi submetido a cromatografia em coluna de gel sílica e fase móvel diclorometano:metanol (100:0 \rightarrow 99:1). As frações isoladas da reação de acetilação das hidroxilas da porção glicosilada levaram a formação do composto **6** (Esquema 1), com um rendimento de 35% (0,060 g). PM asperulosídeo: 414,17 g/mol - PM asperulosídeo tetraacetilado: 582,51g/mol.

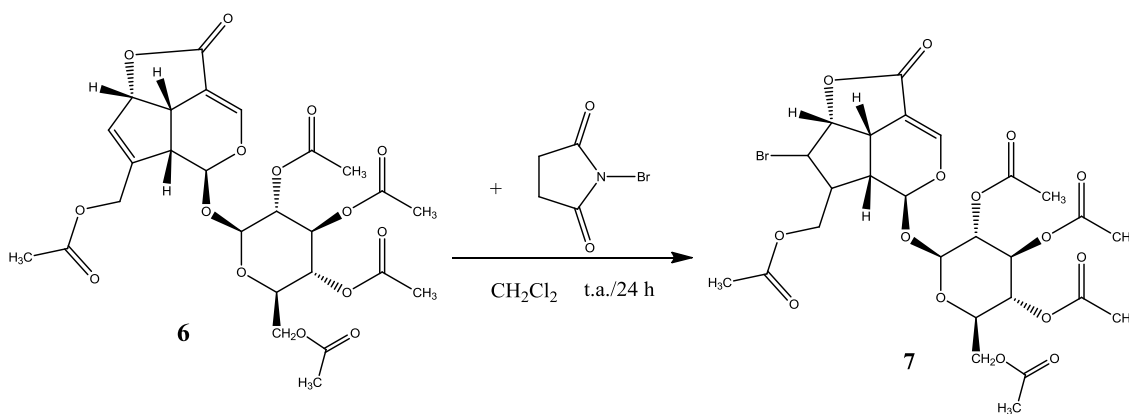
Composto **6**: RMN ¹H 400 MHz (CDCl₃), δ : 7,19 (d, H-3); 5,66 (d, H-1); 3,46 (td, H-5); 5,47 (d, H-6); 5,73 (s, H-7); 3,22 (d, H-9); 4,66 (d, H-10); 4,59 (d, H-10); 4,88 (d, H-1'); 4,98 (m, H-2'); 5,21 (t, H-3'); 5,07 (t, H-4'); 3,76 (m, H-5'); 4,29 (dd, H-6a'); 4,14 (dd, H-6b'), 2,08; 2,06; 2,01; 1,98; 1,97 (s, OCH₃). RMN ¹³C 100 MHz (CDCl₃), ppm: 91,48 (C-1); 147,67 (C-3); 105,38 (C-4); 35,99 (C-5); 83,96 (C-6); 128,85 (C-7); 141,28 (C-8); 43,31 (C-9); 60,38 (C-10); 170,53 (C-11); 67,96; 70,37; 72,09; 169,40; 170,21 (COCH₃); 20,56; 20,69; 20,73; 170,03; 169,30 (COCH₃); 95,87 (C-1'); 72,28 (C-2'); 77,07 (C-3'); 70,39 (C-4'); 76,75 (C-5'); 61,55 (C-6').



Esquema 1 – Reação de acetilação do **6**.

4.4.2. Reação de bromação do asperulosídeo tetraacetilado

A mistura de éster acetil de **6** (50 mg – 0,0858 mmol) e *N*-bromosuccinimida (91,66 mg – 0,515 mmol) em diclorometano (5 mL) foi agitada durante 24 h à temperatura ambiente. As etapas da reação foram monitoradas por CCD em sílica gel e CH₂Cl₂:CH₃OH (98:2) como eluente. O precipitado foi filtrado e concentrado formando um resíduo (0,107 g). O produto obtido apresentou um aspecto viscoso branco, que foi fracionado em cromatografia em coluna de gel sílica e diclorometano:metanol (100:0 → 99,5:5) como fase móvel, resultando no composto **7** (esquema 2) (SUN et al., 1998). O rendimento obtido foi de 21% (0,032 g). PM **6**: 582,51 g/mol. PM **7**: 662,41 g/mol.



Esquema 2 – Reação de bromação de **7**.

4.5. Resultados e discussão

4.5.1. Isolamento de iridoides de *E. bifida* e *E. megapotamica*

O extrato etanólico de *E. megapotamica* apresentou rendimento de 29%, para folhas e 15% para os caules. O rendimento de *E. bifida* foi de 16%, e 14%, para folhas e caules, respectivamente.

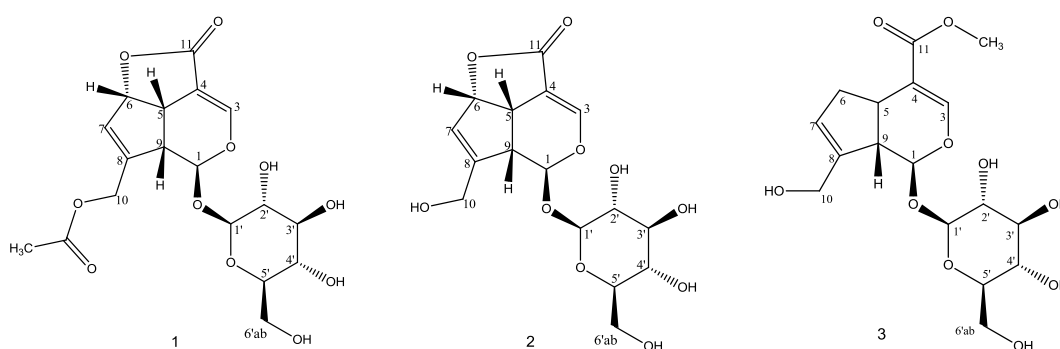
As frações aquosas forneceram rendimento de 60% e 72%, para folhas e caules de *E. megapotamica*, respectivamente. Para *E. bifida*, os rendimentos foram de 66% e 62%, para folhas e caules, respectivamente. Estes rendimentos estão

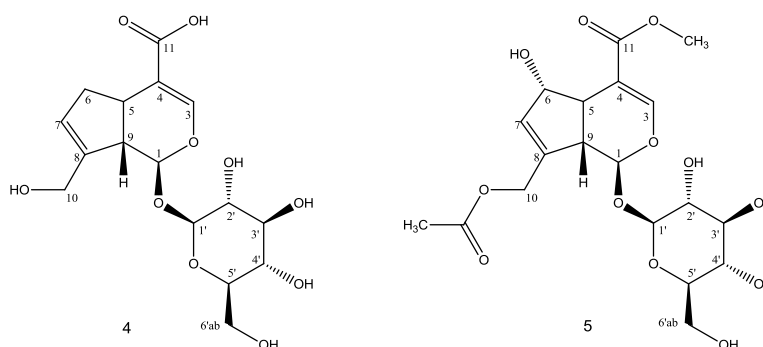
expressos em relação a massa do extrato. Os rendimentos das frações aquosa alumina da *E. megapotamica* caules e folhas, em relação à massa da fração aquosa, foram de 57% e 65%, respectivamente.

O rendimento da fração aquosa alumina de *E. bifida* foi de 57% em relação à massa da fração aquosa. O fracionamento da alíquota da fração aquosa alumina de *E. bifida* folhas resultou no isolamento dos **compostos 1** e **2** obtendo-se rendimentos de 2 g (33%) e 53 mg (7%), respectivamente.

O fracionamento de *E. megapotamica* folhas resultou no isolamento do **composto 1** (73 mg = 7,3%) e do **composto 3** (62 mg = 6%). A fração aquosa alumina de *E. megapotamica* caules, após sucessivas cromatografias em colunas, resultaram no isolamento do **composto 1** (251 mg = 2,3%), **compostos 4** (10 mg = 0,09%) e **5** (12 mg = 0,11%).

O fracionamento dos extratos etanólicos resultou no isolamento dos iridoides glicosilados asperulosídeo (**1**), desacetilasperulosídeo (**2**), geniposídeo (**3**), ácido geniposídico (**4**) e dafilosídeo (**5**). A elucidação estrutural dos constituintes isolados de *E. bifida* e *E. megapotamica* foi realizada através da IV, EM e RMN de ^1H e ^{13}C .





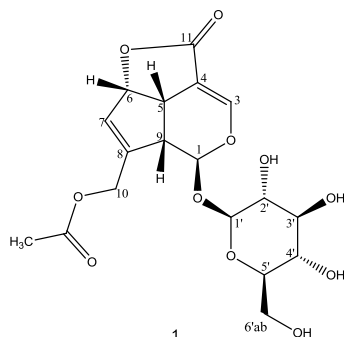
Asperulosídeo (**1**): sólido amorfo branco. A elucidação estrutural deste composto isolado foi realizada através de EM e RMN de ^1H e ^{13}C . O espectro de massas de alta resolução mostrou um fragmento em 437,1065 m/z, correspondendo ao pico do íon molecular mais sódio $[\text{M}+\text{Na}]^+$, compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$ do asperulosídeo. Em seus estudos com iridoides, flavonoides e iridoides de *Galium verum* subsp. *verum*, Demirezer et al. (2005), também verificaram a presença do fragmento do asperulosídeo no espectro de massas em 437 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

O espectro de infravermelho (IV) apresentou bandas de absorção características de grupos hidroxila ($3306,03\text{ cm}^{-1}$) e éster carboxílico ($1737,27\text{ cm}^{-1}$) e de lactona α,β insaturada ($1697,28$ e $1659,10\text{ cm}^{-1}$). Os dados são compatíveis com aqueles citados na literatura por Moura e colaboradores (2006), que isolaram asperulosídeo de *Galianthe brasiliensis* (Spreng.) E.L. Cabral & Bacigalupo.

Os dados espectroscópicos de RMN ^1H mostram a presença de sinais característicos de um esqueleto iridoidal em δ_{H} 7,25 ppm e δ_{H} 5,90 ppm, correspondendo ao H-3 e H-1, respectivamente. No espectro de RMN ^{13}C os sinais em δ_{C} 148,91 ppm do C-3 e δ_{C} 91,89 ppm do C-1.

Pode-se observar o sinal de δ_{C} 142,85 ppm do C-8 insaturado ligado ao CH_2OAc em $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ 4,63 ppm (d, H-10)/60,55 ppm (C-10) e 2,02 ppm (s)/19,31 ppm, respectivamente. O sinal que corresponde ao carbono carboxílico da lactona (C-11) encontra-se em δ_{C} 170,90 ppm (DEMÍREZER et al., 2005; MOURA et al., 2006). Portanto, a comparação dos resultados de RMN ^1H e ^{13}C da substância isolada com

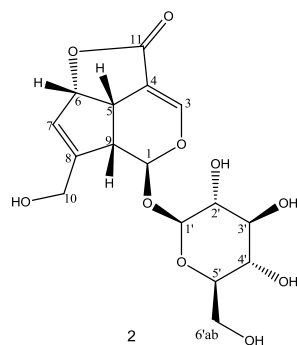
os dados descritos na literatura permitiram a caracterização da estrutura como sendo o asperulosídeo.



Desacetilasperulosídeo (**2**): sólido castanho amorfo. Analisando os espectros de RMN ^1H e ^{13}C verifica-se que os deslocamentos químicos do esqueleto iridoidal são semelhantes aos do asperulosídeo. Os dados demonstram a presença de singletos em δ_{H} 7,23 ppm relacionado ao H-3, e em δ_{H} 5,88 ppm correspondente ao H-1. Observa-se no espectro de ^{13}C um sinal em δ_{C} 58,71 ppm correspondendo ao C-10 está ligado um grupo OH, o que diferencia do grupo acetila do asperulosídeo. O grupamento hidroxila conferiu um deslocamento químico nos demais carbonos do esqueleto iridoidal. O carbono carboxílico da lactona (C-11) apresentou um sinal em δ_{C} 171,27.

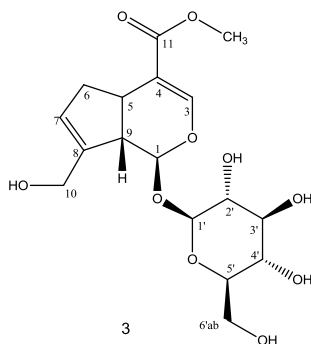
Os sinais de ^1H entre δ_{H} 3,10 - 3,90 ppm juntamente com o sinal em δ_{H} 4,58 ppm do asperulosídeo e δ_{H} 4,61 ppm do desacetilasperulosídeo sugerem que as moléculas possuem uma β -D-glicose.

A comparação dos dados dos espectros de ^1H e ^{13}C do asperulosídeo e desacetilasperulosídeo isolados anteriormente de outras plantas, como *Pentas lanceolata* (Forssk.) Deflers (Caprini, 2007), *Galianthe brasiliensis* (Moura et al., 2006), entre outros, mostrou que os compostos são compatíveis.



Geniposídeo (**3**): sólido castanho amorfo. O espectro de RMN ^1H mostrou um singlete em δ_{H} 7,51 ppm correlacionado com δ_{C} 152,54 ppm que corresponde ao C-3, juntamente com o duplete em δ_{H} 5,21 ppm do H-1 que corresponde ao sinal em δ_{C} 97,24 ppm do C-1 sugerem a presença do esqueleto iridoidal. Os dados são compatíveis com aqueles publicados por Liang et. al. (2014), para geniposídeo isolado de *Gardenia jasminoides* J. Ellis.

Os dados espectroscópicos de RMN ^{13}C demonstram o sinal em δ_{C} 141,36 ppm do C-8 insaturado relacionado aos sinais deslocados em δ_{H} 3,88 ppm e 4,24 ppm devido a presença do grupamento hidroxila juntamente com o sinal em δ_{C} 59,77 ppm que correspondem ao C-10. Os sinais de ^{13}C δ_{C} 170,02 ppm corresponde ao éster (C-11) correlacionado ao sinal deslocado para campo maior em δ_{H} 3,54 ppm pela presença do oxigênio, juntamente com o sinal δ_{C} 51,78 ppm que corresponde ao OCH_3 . Esses dados corroboram aqueles apresentados por Liang e colaboradores (2006, 2014), para geniposídeo de *Gardenia jasminoides* Ellis.

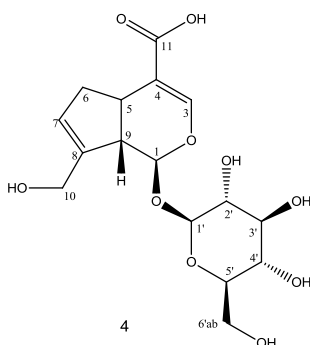


Ácido geniposídico (**4**): sólido castanho amorfo. Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C demonstraram que os deslocamentos de sinais semelhantes aos do geniposídeo, no entanto observa-se que em C-11 está ligado um grupamento OH, o que diferencia do

grupo metila do geniposídeo. Os dados dos espectros de RMN ^1H mostraram um singlete em δ_{H} 7,40 ppm (H-3) correlacionado com δ_{C} 152,69 ppm (C-3), um duplete em δ_{H} 5,13 ppm (H-1) juntamente com δ_{C} 97,99 ppm (C-1).

Os sinais de RMN ^{13}C apresentam um singlete em δ_{H} 5,7 ppm (H-7) relacionado ao sinal δ_{C} 129 ppm (C-7); um duplo-duplo duplete em δ_{H} 1,99 ppm juntamente com um duplo duplete em δ_{H} 2,67 ppm corresponde ao H-6 que está correlacionado com δ_{C} 37,93 ppm (C-6). Os sinais de duplo duplete em δ_{H} 3,19 ppm juntamente com um multiplete em δ_{H} 3,06 correspondem ao C-5 e C-9, respectivamente. A configuração *cis* destes carbonos é comum em todos os iridoídeos que possuem a estrutura base carbocíclica. O carbono do ácido carboxílico (C-11) apresentou um sinal em δ_{C} 171,39.

A presença de uma β -D-glicose é indicada pelos sinais entre δ_{H} 3,20 – 4,00 ppm juntamente com o sinal em $\delta_{\text{H}} \pm 4,45$ ppm (H-1') no geniposídeo e no ácido geniposídico.



Dafilosídeo (**5**): sólido castanho amorfo. Os dados dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C são semelhantes aqueles descritos por Takeda et al. (2002), Güvenalp et al. (2006), e El-Naggar & Beal (1980). Os sinais de RMN apresentam um duplete com deslocamento em δ_{H} 7,28 ppm do H-3 relacionado com δ_{C} 155,06 ppm do C-3; um duplo duplete em δ_{H} 5,58 do H-1 juntamente com δ_{C} 98,93 ppm do C-1; um duplete em δ_{H} 5,86 do H-7 correlacionado com δ_{C} 131,03 ppm (C-7); o sinal em δ_{H} 5,7 ppm conferido ao H-6 juntamente com o δ_{C} 75,43 ppm do C-6.

O anel bicíclico do ciclopentano-[C]-pirano *cis* H-5/H-9 demonstram um sinal de multiplete em δ_H 3,16 ppm do H-5 está correlacionado com δ_C 43,37 ppm do C-5; e um multiplete em δ_H 1,96 ppm do H-9 juntamente com δ_C 48,52 ppm do C-9.

Os dados de RMN apresentam um singlete em δ_H 1,99 ppm do COCH₃ correlacionado com os sinais δ_C 173,43 ppm e δ_C 20,18 ppm do COCH₃, respectivamente. O sinal do singlete em δ_H 3,22 ppm refere-se ao COOCH₃ relacionado com os sinais δ_C 164,48 ppm e δ_C 56,95 ppm do COOCH₃, respectivamente. Além disso, os sinais entre δ_H 3,00 – 4,00 ppm sugerem a presença de uma β -D-glicose, sendo que o sinal do H-1' está sobreposto ao sinal do D₂O.

4.5.2. Obtenção de derivados de asperulosídeo

Os resultados das reações de acetilação da porção glicosilada de **1** e de bromação de **1a** foram monitorados por CCD analítica, sendo que a placa foi observada a luz visível e com auxílio de luz ultravioleta 254 nm e 365 nm, e para revelação da placa foi utilizado o reagente cromogênico vanilina sulfúrica seguido de aquecimento.

A reação de acetilação da porção glicosilada do **1** e sua purificação foram bem-sucedidas. Visualizou-se a marcha na CCD do produto **1** e **6** e foram submetidas a análises de espectroscopia de IV, MS e RMN de ¹H 400 MHz e ¹³C 100 MHz e correlações (COSY e HMBC) (CD₃O). Espectro de massas (Q-TOF-ESI) de **6** (C₂₆H₃₀O₁₅), apresentou o pico do íon molecular [M+H+Na]⁺ obtido com ionização de 15 eV (massa calculada = 605,1483 u.m.a.; massa experimental = 605,1477 u.m.a.)

Analisando a CCD da reação de bromação verificou-se a formação de vários produtos. Assim, a mistura resultante foi submetida a cromatografia em coluna de gel sílica para o isolamento e identificação dos compostos formados. Para a elucidação estrutural dos produtos sintetizados foram realizadas até o momento análises de espectroscopia de IV e RMN de ¹H 400 MHz e ¹³C 100 MHz e correlações (COSY e HMBC).

Os dados obtidos no espectro de RMN de ^1H do composto **1** indicam um iridoide glicosilado devido a presença de sinais característicos entre δ 3,20 e 3,92 – 4,67 ppm referentes a presença de uma β -D-glicose. O composto **6** obtido por semissíntese não apresentou os sinais característicos de RMN de ^1H de OH de β -D-glicose (δ 3,20 e 3,92 – 4,67 ppm), e apresentou um simpleto em δ 3,09 ppm e um simpleto largo em δ 2,05 ppm indicando que a unidade de açúcar foi acetilada com sucesso.

O espectro na região do infravermelho (IV) de **1** apresentou bandas de absorção típicas de grupos hidroxila ($3400\text{-}3300\text{ cm}^{-1}$) e éster carbonila (1737 cm^{-1}) além de uma lactona α,β insaturada (1697 e 1659 cm^{-1}). O IV de **6** não apresentou bandas de absorção típicas de grupos hidroxila (3361 cm^{-1}) e exibiu duas bandas de absorção de éster de carbonila ($1757,05$ e $1732,50\text{ cm}^{-1}$). Assim, é possível verificar que a reação de acetilação do grupamento OH da porção glicosilada da molécula foi bem-sucedida.

No RMN de ^1H do composto **7** os sinais de acetilação na região de δ_{H} 3,09 - 2,05 ppm, presentes no composto **6** desapareceram, bem como os sinais característicos da estrutura base dos iridoídes descrito anteriormente, sugerindo que houve uma degradação do produto de partida. Diante disso, a metodologia da reação de bromação deverá ser revisada para o aperfeiçoamento.

5. CAPÍTULO 2 - ISOLAMENTO DE IRIDOIDES DE *Angelonia integerrima* Spreng.

5.1. Introdução

O gênero *Angelonia* Bonpl. tradicionalmente pertencia à família Scrophulariaceae. Estudos filogenéticos atuais a realocaram para a família Plantaginaceae (MÔRO et al., 2001; MARTINS et al., 2013). Este gênero consiste em aproximadamente 30 espécies distribuídas por toda a região neotropical, desde o México e até o Brasil.

Cerca de 18 espécies de *Angelonia* são encontradas no Brasil, ocorrendo em áreas de caatinga, cerrado ou campo rupestre (SOUZA & GIULIETTI, 2009; MARTINS et al., 2013; SOUZA, 2015). Estas plantas são ervas ou subarbustos, raramente arbustos, sendo que algumas são medicinais e utilizadas na ornamentação (von POSER et al., 1997; MÔRO et al., 2001; SOUZA & GIULIETTI, 2009; MARTINS et al., 2013).

Angelonia integerrima Spreng., conhecida popularmente como Caracol-do-campo ou violeta-de-petrópolis, ocorre no Mato Grosso, Região Sul do Brasil, Paraguai e Argentina. Esta espécie de *Angelonia* é muito frequente nos campos naturais do sul do Brasil (BARRINGER, 1981; SOUZA & GIULIETTI, 2009).

Estudos prévios realizados com *Angelonia integerrima* levaram ao isolamento de nove iridoídeos glicosilados: galiridosídeo, harpagídeo, ajujol, 6-hidroxi-antirrídeo, antirrídeo, daunosídeo, aucubina, stegiosídeo II e angelosídeo (von POSER, 1997).

Kooiman (1970), realizou um amplo estudo sobre a ocorrência de iridoídeos glicosilados em *Scrophulariaceae*. Dentre as espécies investigadas estão *A. grandiflora* Pennell var. *pulchra* Pennell e *Angelonia grandiflora* C. Morr., sendo identificado aucubosídeo nas folhas da *A. grandiflora* Pennell e o mesmo composto nas sementes da *A. grandiflora* C. Morr.

5.2. Objetivos

Nessa etapa do trabalho objetivou-se o isolamento dos metabólitos majoritários em *Angelonia integerrima* Spreng. visando ensaios biológicos.

5.3. Materiais e métodos

5.3.1. Material vegetal

Partes aéreas de *Angelonia integerrima* foram coletadas no município de Santo Antônio da Patrulha (latitude 29° 49' 03" sul e longitude 50° 31' 11" oeste), Rio Grande do Sul, Brasil. O material testemunha foi identificado pelo botânico Dr. Sérgio A. de L. Bordignon (UNILASALLE, RS, BRASIL) e a exsicata foi depositada no Herbário do Departamento de Botânica da UFRGS.

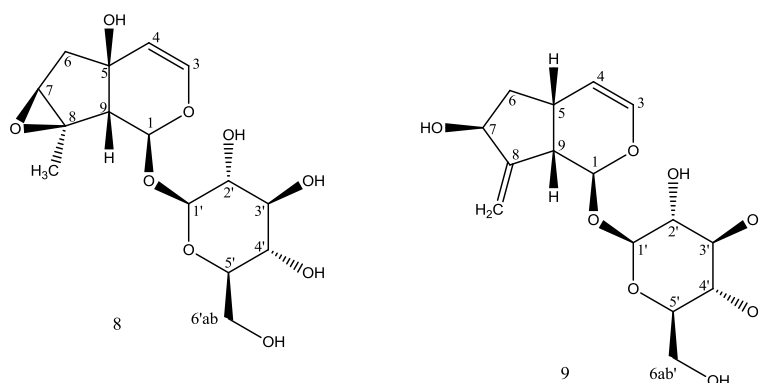
5.3.2. Extração do material vegetal e tratamento preliminar

Partes aéreas foram secas em temperatura ambiente e moídas (270 g) de *A. integerrima* foram submetidas à maceração exaustiva com etanol 99,3 ° GL em ciclos de 24 horas. Em seguida, os extratos foram concentrados em rota vapor (40 – 60 °C).

5.3.3. Fracionamento dos extratos, isolamento e purificação

A extração líquido-líquido éter etílico (1:2 v/v) foi realizada conforme descrito no isolamento de iridoides das espécies de *Escallonia bifida* e *Escallonia megapotamica*. Na partição com óxido de alumínio 90 ativo neutro (70 – 230 mesh; Al₂O₃ = 5 g) foi utilizada uma alíquota da fração aquosa (20 g), sendo que o restante do experimento foi realizado conforme descrito anteriormente.

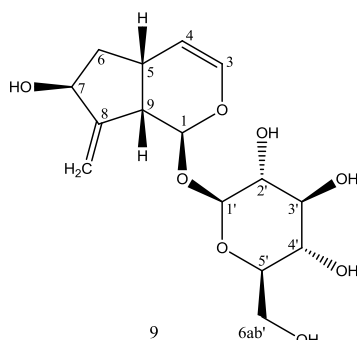
A fim de isolar o composto majoritário da fração aquosa alumina, uma amostra (14 g) foi submetida a um fracionamento em coluna de gel de sílica 60 (Acros Organics; 0,060 – 0,200 mm) (C1Al) como fase estacionária e sistema gradiente composto por diclorometano:metanol (100:0 → 0:100). Ao todo, 32 frações foram obtidas, sendo que a partir do sistema diclorometano:metanol 90:10 foram obtidas dez frações contendo o composto majoritário (frações 8 a 17). As frações obtidas desta coluna passaram por outras cromatografias em coluna (mesmas condições de fase estacionária e fase móvel acima citadas) levando ao isolamento do **composto 8**, como componente majoritário, e do **composto 9** (minoritário).



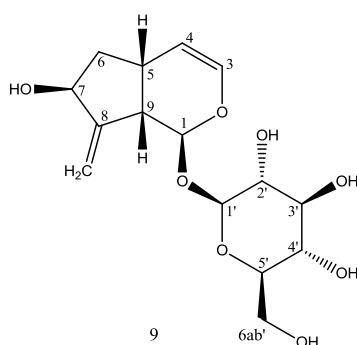
5.3.4. Elucidação estrutural dos compostos isolados

Os compostos isolados foram solubilizados em óxido de deutério deuterado e submetidos à análise espectroscópica. Os dados dos espectros de RMN dos compostos isolados foram comparados àqueles da literatura (von POSER et al., 1997).

Composto 8: RMN ¹H 400 MHz (D₂O), δ: 6,32 (d, H-3); 5,39 (d, H-1); 4,96 (dd, H-4); 3,84 (dd, H-7); 3,80-3,20 (β-D-glicose); 2,34 (d, H-9); 2, 13 (dd, H-6); 2,04 (d, H-6); 1,43 (s, H-10). RMN ¹³C 100 MHz (D₂O), ppm: 92,49 (C-1); 140,52 (C-3); 108,36 (C-4); 75,39 (C-5); 42,51 (C-6); 64,34 (C-7); 67,42 (C-8); 52,67 (C-9); 16,21 (C-10); 98,36 (C-1'); 72,57 (C-2'); 76,22 (C-3'); 72,02 (C-4'); 75,56 (C-5'); 62,45 (C-6').



Composto 9: RMN ^1H 400 MHz (D_2O), δ : 6,11 (dd, H-3); 5,47 (d, H-1); 5,25 (dt, H-10); 4,79 (dd, H-4); 4,00-3,00 (β -D-glicose); 3,22 (m, H-7); 3,01 (d, $J = 6.2$ Hz, H-9); 1,96 (m, H-6) 1,65 (m, H-6) 4,55 (d, H-1'). RMN ^{13}C 100 MHz (D_2O), ppm: 95,02 (C-1); 138,80 (C-3); 107,61 (C-4); 28,07 (C-5); 38,40 (C-6); 74,11 (C-7); 151,49 (C-8); 43,39 (C-9); 110,95 (C-10); 98,16 (C-1'); 72,72 (C-2'); 76,21 (C-3'); 69,59 (C-4'); 75,58 (C-5'); 60,69 (C-6').



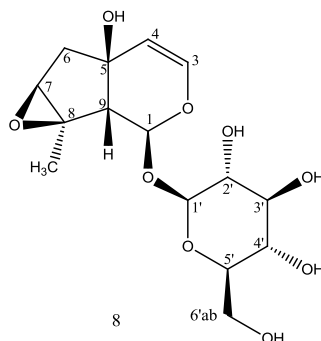
5.4. Resultados e discussão

O extrato etanólico de *A. integerrima* apresentou rendimento de 83 g (31%), a fração aquosa foi de 70 g (84%), sendo que o rendimento da fração aquosa alumina foi de 14 g (71%), em relação à alíquota utilizada da fração aquosa.

O fracionamento da alíquota da fração aquosa alumina de *A. integerrima* resultou no isolamento dos iridoides glicosilados galiridosídeo (**8**), com rendimento de 4 g (29%) e antirrídeo (**9**), que apresentou um rendimento de 85 mg (0,6%). A elucidação estrutural dos constituintes isolados de *A. integerrima* foi realizada através de RMN de ^1H e ^{13}C .

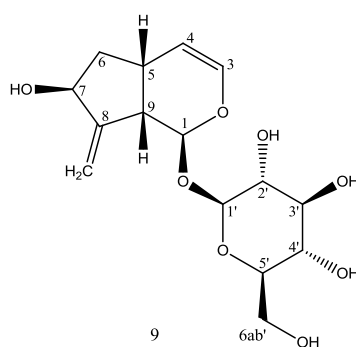
Galiridosídeo (**8**): sólido castanho amorfo. O espectro de RMN ^1H mostrou os sinais do esqueleto básico de iridoídeos, onde podemos verificar a presença de dois prótons que aparecem como um duplete a δ_{H} 6,32 ppm e um duplo duplete a δ_{H} 4,96 ppm, correspondendo ao H-3 e H-4, juntamente com o sinal em δ_{C} 140,52 ppm e δ_{C} 108,36 ppm do C-3 e C-4, respectivamente. A presença de dois duplete nas regiões de δ 5,39 ppm do H-1 correlacionado com δ_{C} 92,49 ppm do C-1 e δ 2,34 ppm do H-9 relacionado com δ_{C} 52,67 ppm do C-9. Os dados dos RMNs foram compatíveis com aqueles publicados por von Poser et al. (1997) e El-Naggar & Beal (1980).

O sinal δ_{H} 1,45 ppm, singleto, é atribuído a um grupo metila (H-10) juntamente com o sinal em δ_{C} 16,21 ppm do C-10. Os prótons H-6 ocorrem como duplete a δ_{H} 2,04 ppm e duplo duplete a δ_{H} 2,13 ppm que estão correlacionados do sinal de C-6 em δ_{C} 42,51 ppm. O sinal a δ_{H} 3,84 ppm do H-7, se apresenta como um duplo duplete juntamente com o sinal em δ_{C} 64,34 ppm do C-7. Além disso, os sinais entre δ_{H} 3,20 - 3,80 ppm sugerem a presença de uma β -D-glicose.



Antirrídeo (**9**): sólido castanho amorfo. Os dados dos espectros de RMN (^1H 400 MHz e ^{13}C 100 MHz, D₂O) corroboram com os descritos na literatura no que se refere a uma estrutura de iridoídeo. Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C mostram a presença do duplo duplete a δ_{H} 6,11 ppm correspondendo ao H-3 e δ_{C} 138,80 ppm do C-3, este sinal se correlaciona com do duplo duplete a δ_{H} 4,79 ppm do H-4 (e δ_{C} 107,61 ppm do C-4 e este se relaciona com um multiplete relacionado ao sinal do H-5 em δ_{H} 2,78 ppm (H-5) e δ_{C} 28,07 ppm do C-5. Os dados são compatíveis com os relatados por EL-SAGGAR & BEAL, 1980; von POSER et al., 1997 e CHERIET et al., 2016.

O sinal δ_H 3,01 ppm se apresenta como um duplete juntamente com o sinal δ_C 43,39 ppm caracterizando o C-9. Os sinais de duplete a δ_H 5,47 ppm está relacionado ao H-1 e δ_C 95,02 ppm são atribuídos a C-1. Os dois prótons relacionados a H-10_a e H-10_b se apresentam como duplo triplete a δ_H 5,25 ppm e δ_C 100,95 ppm corresponde a C-10. A presença de um duplete a δ_H 4,55 ppm corresponde ao H-7 juntamente com δ_C 74,11 ppm estão relacionados ao C-7.



Angelonia integerrima mostrou ser uma fonte abundante de compostos da classe dos iridoides, sendo que as partes aéreas fornecem majoritariamente o galiridosídeo em rendimento de 1,48% em relação massa de planta, o que é muito atraente para estudos biológicos.

**6. CAPÍTULO 3 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-*Leishmania* DE
IRIDOIDES**

6.1. Introdução

A leishmaniose é considerada uma doença tropical negligenciada que atinge países em desenvolvimento, acometendo milhões de novos indivíduos a cada ano. Segundo o Ministério da Saúde, em 2015 foram registrados 19.395 casos de leishmaniose tegumentar e 3.289 casos de leishmaniose visceral (BRASIL, 2016a, b).

A leishmaniose é uma doença parasitária causada por protozoários do gênero *Leishmania*. Este gênero possui mais de 20 espécies identificadas no mundo e estão relacionadas a diferentes manifestações clínicas da doença (ALEXANDER et al., 1999; AKOPYANTS et al., 2009).

O protozoário se manifesta nas formas morfológicas promastigota (possui flagelo, é extracelular e detectado nos vetores invertebrados) e amastigota (sem flagelo, é detectado no interior de células fagocíticas (PEARSON & SOUZA, 1996; SOLBACH & LASKAY, 2000). Os vetores da leishmaniose são insetos fêmeas, denominadas flebotomíneos, pertencentes aos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia* (conhecido popularmente como mosquito palha, tatuquira, entre outros). O ciclo biológico destes parasitos no hospedeiro invertebrado possui as mesmas características (BRASIL, 2007).

Formas promastigotas inoculam no local da picada infectando os fagócitos e se transformando em formas amastigotas. Posteriormente, inicia-se o processo de replicação até o rompimento da célula com liberação dos parasitas que irão infectar outros fagócitos por meio de novos macrófagos (GRIMALDI JR & TESH, 1993; BATES, 2006; MUKBEL et al., 2016). A fêmea flebotomíneo ingere a forma amastigota do protozoário em um novo repasto sanguíneo. As amastigotas que se encontram no hospedeiro estão livres na circulação ou no macrófago, seguindo em direção ao intestino onde se transformam em promastigotas metacíclicos completando o ciclo de infecção (CHANG & CHAUDHURI, 1990; ROGERS et al., 2004; NEUBER, 2008; DE

MOURA et al., 2010). O ciclo evolutivo biológico da leishmaniose está demonstrado na figura 5.

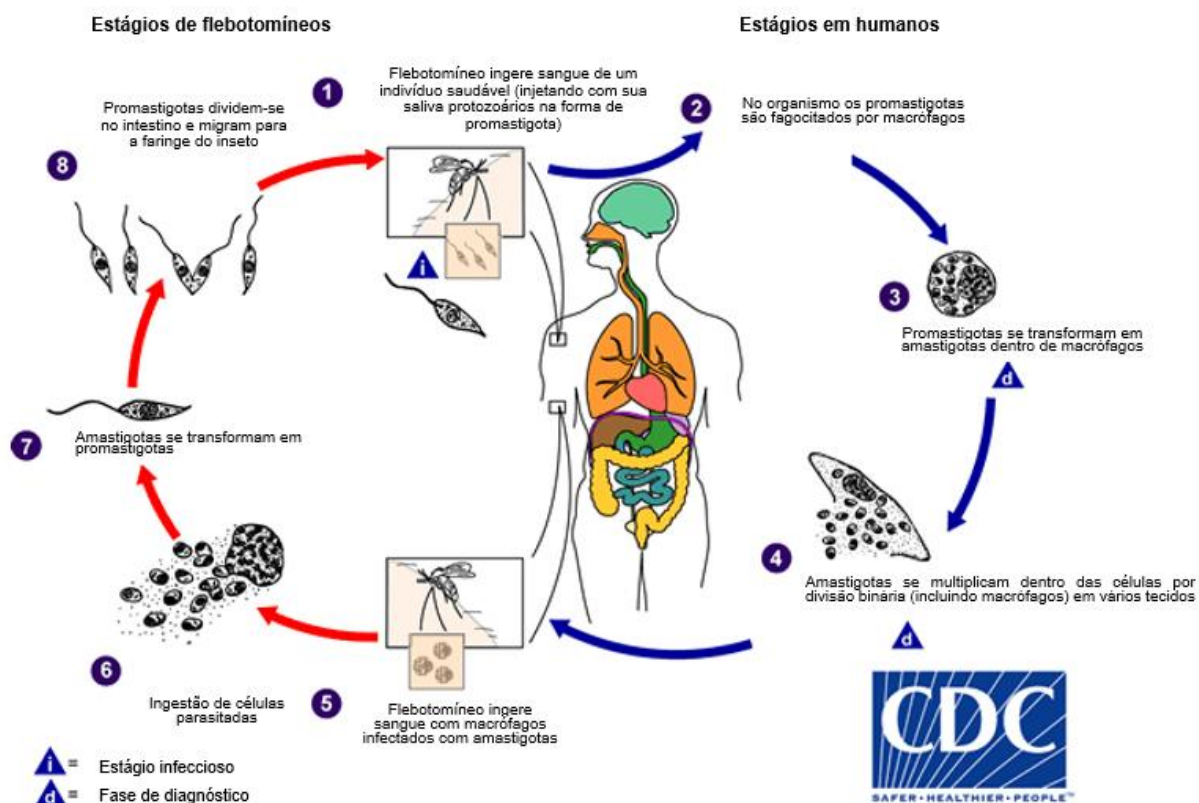


FIGURA 5 – Ciclo evolutivo biológico da *Leishmania* sp. (CDC, 2017).

Os sintomas e manifestações clínicas da leishmaniose estão diretamente relacionados com o tipo da doença, podendo causar graves infecções cutâneas e em órgãos internos (MCGWIRE & SATOSKAR, 2014).

Nos seres humanos a doença ocorre de duas principais formas, determinada pela espécie do parasita e susceptibilidade genética do hospedeiro. Uma das formas é a leishmaniose tegumentar ou cutânea causada pelas espécies de *Leishmania major*, *L. tropica*, *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. guyanensis*, *L. panamensis* e *L. braziliensis*, causando lesões cutâneas e mucosas (GOTO & LINDOSO, 2012; MCGWIRE & SATOSKAR, 2014; BRASIL, 2014; BRASIL, 2016c). A outra forma é a leishmaniose visceral ou calazar ocasionada pelas espécies *Leishmania donovani*, *L.*

infantum (também conhecida como *L. chagasi*) e *L. tropica*, sendo uma doença sistêmica que afeta órgãos como fígado, baço e medula óssea (GOTO & LINDOSO, 2012; MCGWIRE & SATOSKAR, 2014; BRASIL, 2014; BRASIL, 2016c).

O controle efetivo da leishmaniose é dificultado devido ao acesso restrito ao diagnóstico e aos medicamentos e também pela baixa adesão ao tratamento. Os medicamentos para esta doença são relativamente eficazes, porém apresentam toxicidade elevada, efeitos adversos severos e resistência dos parasitas. O tratamento deve levar em consideração a forma clínica da doença, o hospedeiro e o parasito, sendo que o critério de cura é clínico e o acompanhamento pós-tratamento deve ser mensal (WHO, 2010; MCGWIRE & SATOSKAR, 2014; BRASIL, 2016c).

Os fármacos de primeira escolha indicados para o tratamento de todas as formas clínicas da leishmaniose, de acordo com o Ministério da Saúde, são antimonial pentavalente como *N*-metil glucamina, anfotericina B lipossomal e desoxicolato de anfotericina B (MCGWIRE & SATOSKAR, 2014; BRASIL, 2014; BRASIL, 2016C).

A *N*-metil glucamina é administrada pela via parenteral, endovenosa ou intramuscular, podendo ocorrer efeitos adversos como mialgia, anorexia, náuseas, vômitos, dor abdominal, pancreatite, cefaleia, insuficiência renal aguda, entre outros (MCGWIRE & SATOSKAR, 2014; BRASIL, 2014; BRASIL, 2016C). A anfotericina B lipossomal é administrada pela via endovenosa e os efeitos adversos mais comuns são febre, cefaleia, náuseas, vômitos, tremores, calafrios, flebites e dor lombar (MCGWIRE & SATOSKAR, 2014; BRASIL, 2014; BRASIL, 2016C). A desoxicolato de anfotericina B também é administrada pela via endovenosa e os efeitos adversos mais frequentes são febre, cefaleia, náuseas, vômitos, anorexia, insuficiência renal, alterações cardíacas, entre outros (MCGWIRE & SATOSKAR, 2014; BRASIL, 2014; BRASIL, 2016c).

Os efeitos adversos tóxicos, imunossupressão aguda e resistência parasitária causados pelos medicamentos tradicionais podem representar ameaça para o tratamento da leishmaniose. Diante disso, a pesquisa de estruturas moleculares

provenientes de produtos naturais é uma estratégia para o desenvolvimento de novos fármacos para esta doença.

Muitos iridoides foram testados para atividade anti-*Leishmania*, dentre eles podem ser citados picroliv, uma mistura padronizada de iridoides obtida de raízes de *Picrorhiza kurroa*; plumericina e isoplumericina (*Himatanthus sucuuba* e *Plumeria bicolor*); ixosídeo (*Tecoma mollis*); aucubina, melampirosídeo, mussaenosídeo, ácido mussaenosídico, 8-*epi*-loganina (*Melampyrum gryense* L.); arbortristosídeo A, B, C e 6- β -hidroxiloganina (*Nyctanthes arbortristis*); catalpol, 6-O-metil-catalpol, aucubina, 6-O- α -L-ramnopranosil-aucubina, 6-O- β -D-xilopiranosil-aucubina, ajugol, ajugosídeo, 3,4-di-hidro-metil-catalpol, scrolepidosídeo, ningpogenina (*Scrophularia lepidota*); harpagídeo e 8-O-acetil-harpagídeo (*Ajuga laxmannii*) e moludidina, ML-2-3 e ML-F52 (*Morinda lucida*) (MITTAL et al., 1990; CASTILLO et al., 2007 e SHARMA et al., 2011; ABDEL-MAGEED et al., 2012; KIRMIZIBEKMEZ et al., 2011; TANDON et al., 1991; TASDEMIR et al., 2005; ATAY et al., 2016; AMOA-BOSOMPEM et al., 2016).

6.2. Objetivo geral

Avaliar a ação anti-*Leishmania* de iridoides sobre *Leishmania amazonensis* *in vitro* e estabelecer um modelo farmacofórico através da modelagem molecular.

6.2.1. Objetivos específicos

- Investigar a ação anti-*Leishmania* de asperulosídeo e geniposídeo, isolados de *Escallonia megapotamica* Spreng L. (Escalloniaceae), galiridosídeo, isolado de *Angelonia integerrima* Spreng. (Plantaginaceae) e ipolamida e teveridosídeo, disponíveis no laboratório de Farmacognosia e isolados previamente de *Amphilophium crucigerum* (L.) L.G. Lohmann (Bignoniaceae Juss.) frente promastigotas de *L. amazonensis*;
- Determinar um modelo farmacofórico de compostos isolados e dos descritos na literatura por meio de modelagem molecular.

6.3. *Parte experimental e resultados*

Os métodos utilizados nesta etapa do trabalho bem como os resultados e a discussão dos mesmos estão apresentados no artigo científico intitulado “*In vitro* and *in silico* activity of iridoids against *Leishmania amazonensis*”, a ser submetido ao periódico *Parasitology Research*.

**MANUSCRITO 1 - In vitro and in silico activity of iridoids against
*Leishmania amazonensis***

In vitro* and *in silico* activity of iridoids against *Leishmania amazonensis

Maria Helena Vendruscolo^a, Gustavo Machado das Neves ^a, Luciano Porto Kagami^a, Luiz Carlos Rodrigues Junior^b, Maria Luísa Nunes Diehl^a, Simone Cristina Baggio Gnoatto^a, Sérgio Augusto de Loreto Bordignon^c, Pedro Roosevelt Torres Romão^b, Vera Lucia Eifler Lima^a, Gilsane Lino von Poser^{a*}

^a Post-graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Ipiranga, 2752, 1^o andar, Porto Alegre/RS, 90610000, Brazil.

^b Laboratory of Immunology, Post-Graduate Program in Health Sciences, Department of Basic Health Sciences, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA), R. Sarmento Leite, 245, Porto Alegre/RS, 90050170, Brazil

^c Post-Graduate Program in Environmental Impact Assessment, La Salle University Center (UNILASALLE), Av. Victor Barreto, 2288, Canoas/RS, 92010000, Brazil.

*Corresponding author: **Gilsane Lino von Poser**: gilsane.von@ufrgs.br

ABSTRACT

Leishmaniasis is an infectious disease caused by *Leishmania*, a protozoa parasite. This disease reaches millions of people annually around the world. The treatment of leishmaniasis takes into account the clinical form of the disease, the host and the parasite. However, restricted access to diagnosis and medication and low adherence makes it difficult to control the disease. Thus, more efficient drugs are need and natural products can be a good alternative. Iridoids are natural products with leishmanicidal activity reported in the literature. Therefore, these compounds can be exploited for the development of anti-*Leishmania* drugs. In this study, the *in vitro* activity of five isolated iridoids, asperuloside and geniposide from *Escalonia bifida*, galiridoside from *Angelonia integerrima* and theveridoside and ipolamiide from *Amphilophium crucigerum*, were investigated against promastigotes form of *Leishmania amazonensis*. Molecular modeling studies of these iridoids and those cited in the literature as active against *Leishmania* spp. were performed. The physicochemical parameters predicted for the isolated iridoids did not show differences compared to those described in the literature. The SAR and the pharmacophoric model confirmed the importance of maintaining the cyclopentane[C]pyran ring of the iridoid, of oxygen-linked substituents at the C1 and C6 positions and of bulky substituents attached to the iridoid ring to present leishmanicidal activity.

Keywords: Iridoids; *Leishmania*; leishmanicidal activity; molecular modeling; pharmacophore.

Introduction

Leishmaniasis, a neglected tropical disease classified as visceral or kala-azar (VL), cutaneous (CL) and mucocutaneous leishmaniasis (MCL), is caused by protozoan of the genus *Leishmania*, which is transmitted to humans by *Leishmania*-infected phlebotomine sand flies. In fact, more than 20 species of *Leishmania* can cause human infections. Leishmaniasis affects millions of people in the world, being considered endemic in 98 countries on five continents (Alvar et al., 2012). It was reported that approximately 0.2 to 0.4 million new cases of VL and 0.7 to 1.2 million new cases of CL emerge worldwide each year (Alvar et al., 2012). Brazil and other few countries accounts for 70-75% of the global estimated CL incidence and more than 90% cases of VL (Alvar et al., 2012). VL cases are potentially fatal, but most human deaths are not recorded and the case-fatality rate is around 10% and 20% with 20.000 to 40.000 deaths per year, even under chemotherapy (Alvar et al 2012, Ready, 2014).

Chemotherapeutic drugs such as liposomal amphotericin B, *N*-methyl glucamine antimoniate and pentamidine isothionate have been used for the treatment of the diseases. Nevertheless, occurrence of drug-resistant strains along with the serious adverse effects of these drugs points to the need for novel safe and efficient leishmanicidal agents (Ministério da Saúde, 2014; WHO, 2016).

Medicinal plants have been considered as a promising source for the development of new drugs. Among the natural products with leishmanicidal activity, it is possible to highlight the iridoids, heterocyclic compounds present in many medicinal plants usually in the glycosidic form. In fact, several studies point out the activity of iridoids against *Leishmania* species. Exemples are plumericin, isoplumericin, aucubin, melampyroside, mussaenoside, mussaenosidic acid, 8-epi-loganin, arbortristoside a, b and c, 6- β -hydroxyloganin, harpagide, 8-*O*-acetylharpagide and picroliv, a standardized mixture of iridoid glycosides from *Picrorhiza kurrooa* (Tandon et al., 1991; Mittal et al., 1998; Castillo et al., 2007; Sharma et al., 2011; Kirmizibekmez et al., 2011; Atay et al., 2016).

The chemoinformatic methods (a.k.a. *in silico* methods) have being developed faster and faster nowadays mostly due to the increasing on the computational capacity

of computers and clusters, allied to advances on organic synthesis, biochemistry and molecular biology. Such development on those areas allows the scientists ways to understand, analyze and predict the pharmacological activity against a biological target (e.g. enzymes, receptors) (Schuster and Wolber, 2010). These methods may also offer a way to understand the results from the experimental assays and they even help the scientists to propose hypothesis and to predict the interaction between a molecule and the target's binding site (Rahim, 2010). The *in silico* methods combined with the experimental methods may help the discovery of new chemical entities targeting neglected diseases as leishmaniasis (Adibpour et al., 2012; Kaur et al., 2011a; Pomel et al., 2012; Kaur et al., 2011b; Gangwar et al., 2012).

Traditionally, computational methods used in drug discovery may be classified in two major groups: a) Structure-based drug design (SBDD) and b) Ligand-based drug design (LBDD). The SBDD approach relies on the structural information from protein, obtained from experimental techniques (crystallography or NMR) or built-up by homology modeling, in order to proceed to further studies (e.g. structure-based pharmacophore, molecular docking, molecular dynamics, virtual screening). On the other hand, the LBDD approach is used when the structural information from the protein is lacking, thus it depends on the ligands and their common features responsible for the activity (e.g. similarity search, ligand-based pharmacophore modeling and quantitative structure-activity relationship (QSAR) (Macalino et al., 2015).

The ligand-based pharmacophore modeling assumes the IUPAC definition for pharmacophore as “the ensemble of steric and electronic features that is necessary to ensure the optimal supra-molecular interactions with a specific biological target structure and to trigger (or to block) its biological response” (Wermuth et al., 1998; Kaserer et al., 2015). According to this concept, a hypothetical ligand contains a fair number of abstract features disposed on a tridimensional space, which interact with the receptor. Those abstract features are evaluated on the type of interaction (i.e. hydrophobic, hydrogen bonds, charged interactions, metal interaction or aromatic interactions) rather than the functional group (e.g. ketones, esters, carboxylic acids) (Kaserer et al., 2015).

The aim of this study were investigate the *in vitro* anti-*Leishmania* activity of some iridoids isolated from some plants native of south of Brazil and to compare *in silico* with the results found in the literature for the same class of heterocycles.

Materials and methods

Plant material – Aerial parts of *Escallonia bifida* Link & Otto (Escalloniaceae), *Angelonia integerrima* Spreng (Plantaginaceae) and *Amphilophium crucigerum* (L.) L.G. Lohamn (syn. *Pithecoctenium crucigerum*) (Bignoniaceae) were collected in Rio Grande do Sul, Brazil. The species were identified by botanist Dr. Sérgio Augusto de Loreto Bordignon (UNILASALE, RS, Brazil).

Iridoids extraction and isolation – The dried plant material was macerated with ethanol (99.5 GL) in 24 h cycles, until exhaustion. The pooled extracts were filtered and concentrated in vacuum and submitted to column chromatography (silica gel 60 Acros Organics; 0.060 - 0.200 mm) affording asperuloside (**1**) and geniposide (**2**) from *Escallonia bifida*, galiridoside (**3**) from *Angelonia integerrima* and theveridoside (**4**) and ipolamiide (**5**) from *Amphilophium crucigerum* (Fig. 1). The compounds were identified based on spectroscopic data (^1H and ^{13}C NMR).

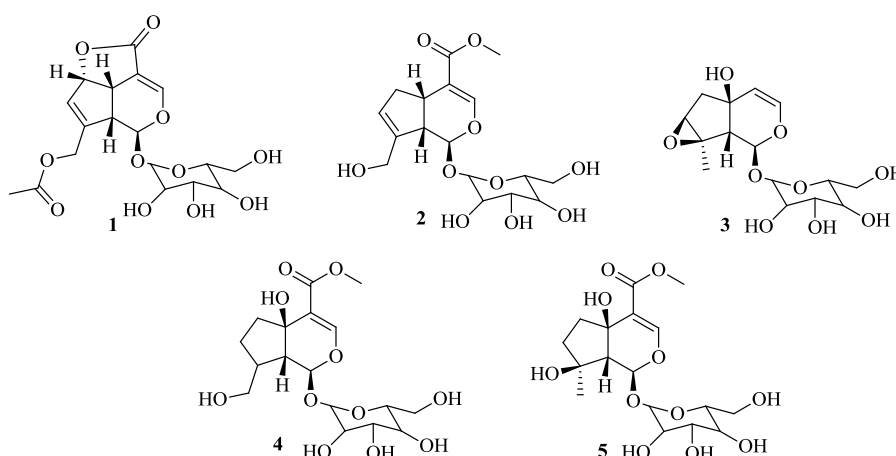


Fig. 1: Iridoides tested *in vitro* for anti-*Leishmania* activity promastigote forms.

***In vitro* leishmanicidal activity**

Leishmania (L.) amazonensis culture – *Leishmania amazonensis* promastigotes (MHOM/BR/73/M2269) were grown in M199 medium containing 40 mM of 4-(2-hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid sodium salt (HEPES), 0.1 mM adenine, 7.7 mM of hemin, 10% fetal bovine serum (FBS), 50 U/mL penicillin and 50 µg/mL streptomycin. Cultures were incubated at 26 °C, and cells were kept at densities ranging between 5×10^5 and 3×10^7 parasites/mL. (Romão et al., 2006).

Determination of leishmanicidal activity in vitro – Promastigote forms of *L. amazonensis* (3×10^6 /well) were distributed in 96-well plates and incubated with M199 (control), iridoids compounds (asperuloside, galiridoside, geniposide, ipolamiide and theveridoside) at concentration of 100 µM or with amphotericin B (Sigma, USA) at 4 µg/mL used as standard antileishmanial drug (100% mortality). Cell viability was determined after 48 h of incubation by counting the viable parasites using a haemocytometer.

Statistical analysis – The statistical analysis was determined by one-way ANOVA followed by Bonferroni's test. The analyses were performed with GraphPad Software and values of $p < 0.05$ were considered significant. All experiments were performed at least three times and in quadruplicate.

Computational methods

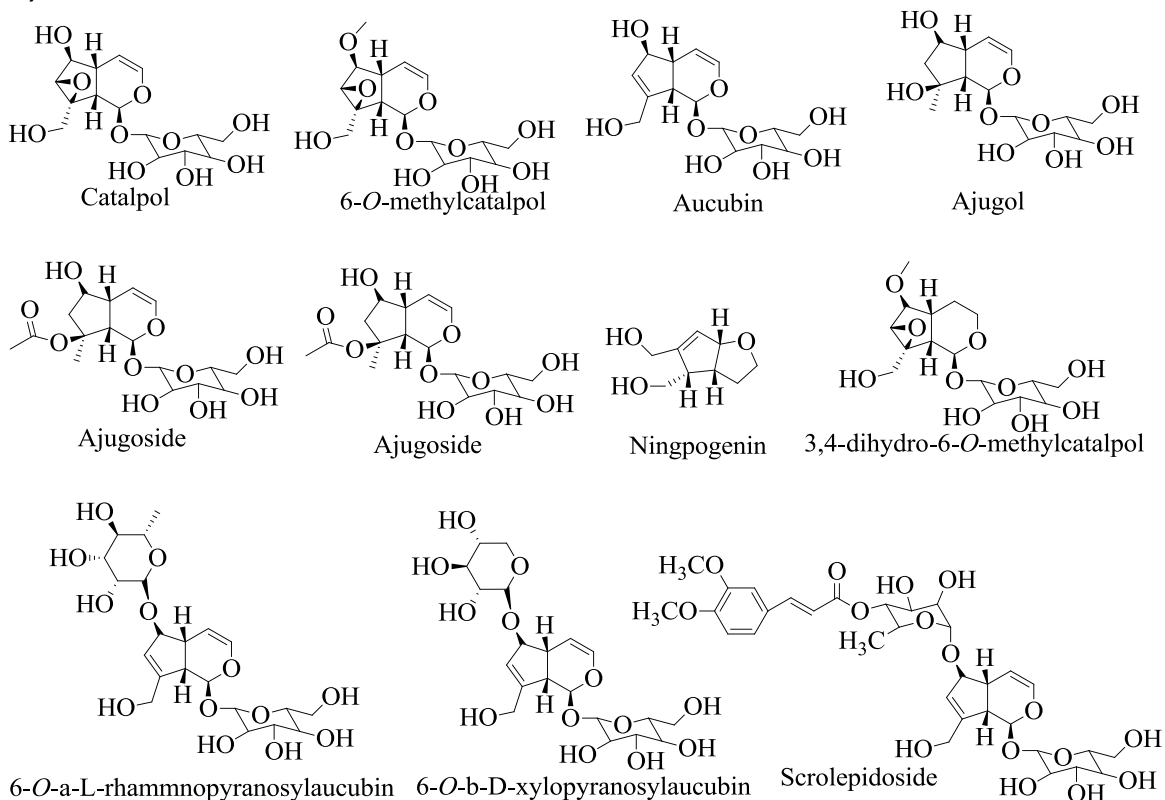
Molecules sketching and minimization procedures – The analyzed molecules were first separated in two groups: 1) Extracted molecules 1-5; 2) Molecules from literature (Fig. 2). The molecules were first drawn and minimized in CORINA webserver (Sadowski et al., 1994) and, lately, they were minimized using the semi-empiric method PM6 in Spartan'14 V.1.1.4 (Wavefunction, 2014) in order to obtain tridimensional structures with bond lengths and angles chemically appropriate.

Physicochemical parameters analysis – The physicochemical properties of the analyzed molecules were achieved by using the software Volsurf⁺ (Cruciani et al.,

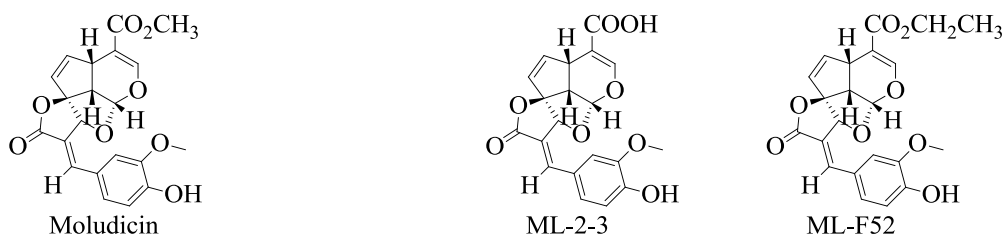
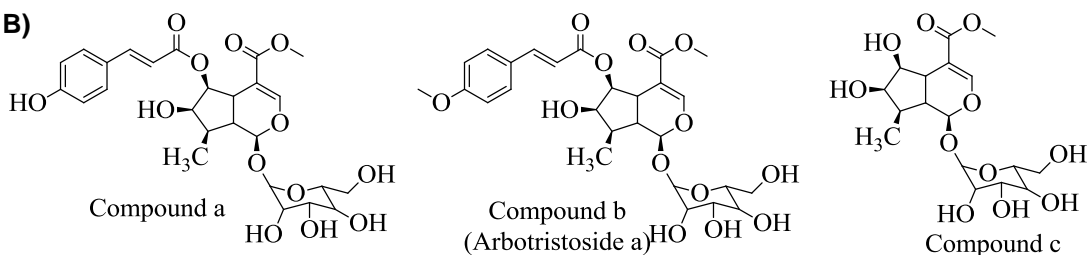
2000) and the Swissadme web server (Daina. et al., 2017) to determine physicochemical similarities among the structures. The parameters analyzed in Volsurf+ include: a) Molecular Volume (V); b) Molecular Weight (MW); c) Flexibility (Flex); d) LogP – Octanol/Water (LogP); e) Polar Superficial Area (PSA); f) Hydrophobic Superficial Area (HAS). The parameters considered in Swissadme web server include: g) Number of rotational bonds (RBOND); h) Number of hydrogen bond acceptors (HACC); i) Number of hydrogen bond donors (HDON); j) Solubility (SOL).

Construction of a Pharmacophore Hypothesis – The molecules tested against the axenic amastigotes forms from *Leishmania donovani* and from *Leishmania amazonensis* were obtained from literature (Tasdemir et al., 2005; Shukla et al., 2012; Castillo et al., 2007; Kirmizibekmez et al., 2004) and they were individually analyzed in order to compare to the extracted molecules from group 1 and to build a simple Structure Activity Relationship (SAR) model. The pharmacophore hypothesis was built through the alignment of 10 structures from literature by THESEUS (Theobald et al., 2006) alignment algorithm available in YASARA demo version (Krieger et al., 2014) and the pharmacophoric features were set manually using the Discovery Studio Visualizer 4.0 (ACCELRYS 2013). The following structures were used on the alignment: compound A, compound B, compound C, catapol, 3,4-dihydro-methylcatapol, ajugoside, ajugol, 6-O- β -D-xylopyranosylaucubin, aucubin, 6-O-methylcatapol.

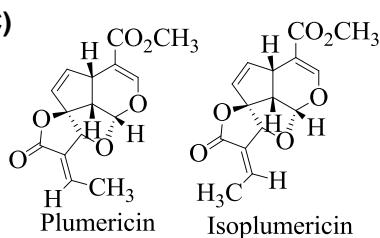
A)



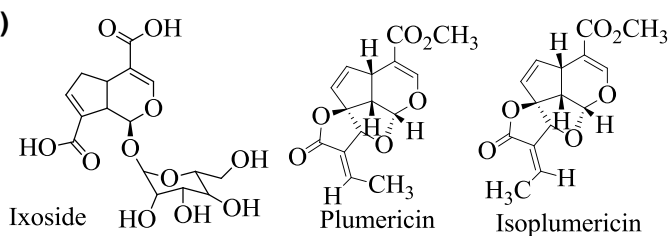
B)



C)



D)



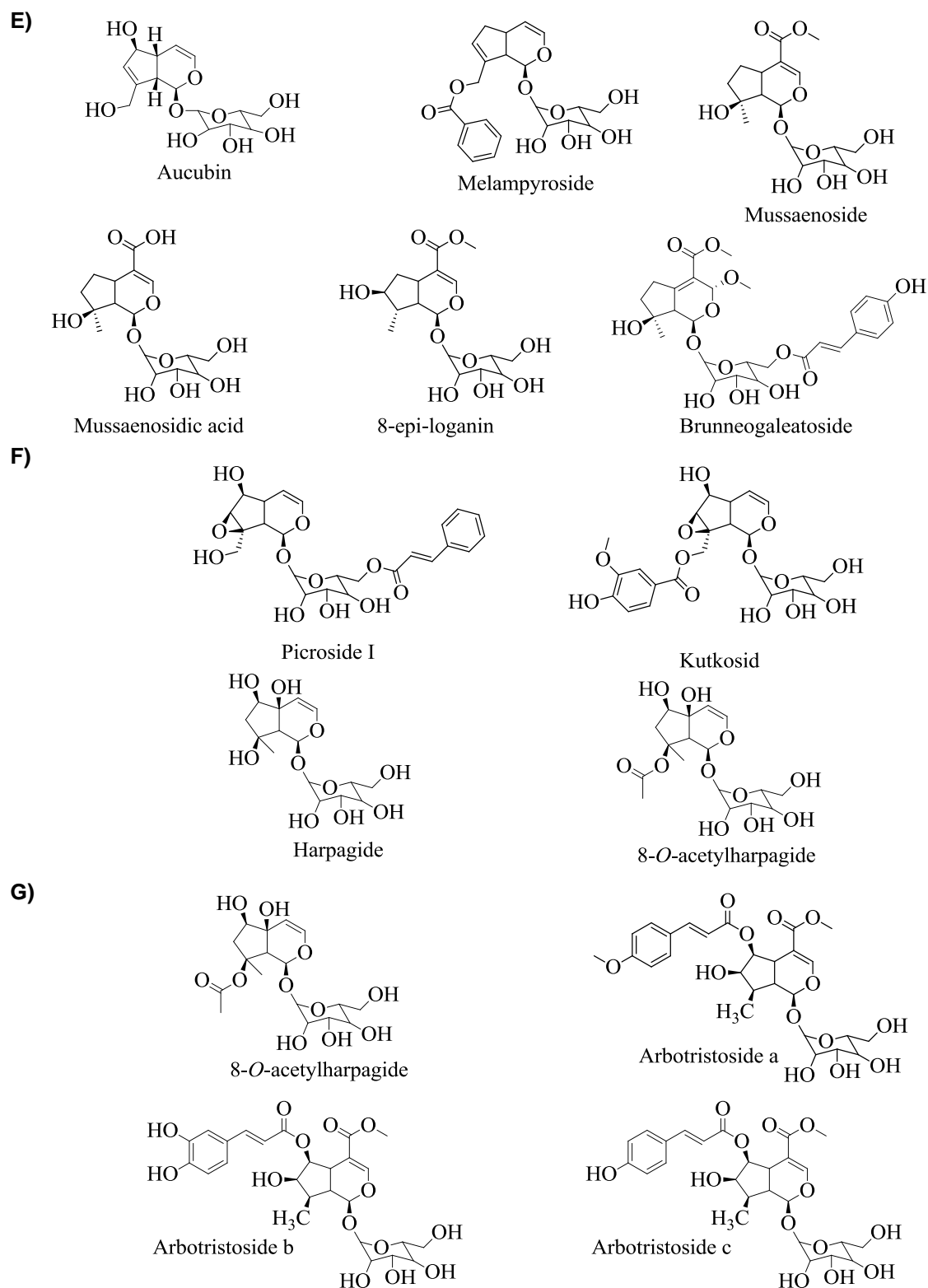


Fig. 2: Iridoids described in the literature with anti-*Leishmania* activity. Active iridoids cited by: A) Tasdemir et al., 2005. B) Shukla et al., 2012. C) Castillo et al., 2007. D) Abdel-Mageed et al., 2012 E) Kirmizibekmez et al., 2004. F) Mittal et al., 1998. G) Tandon et al., 1991

Results

In vitro leishmanicidal activity

Five iridoids, asperuloside **1** and geniposide **2** from *Escollonia bifida*, galiridoside **3** from *Angelonia integerrima* and theveridoside **4** and ipolamiide **5** from *Amphilophium crucigerum*, were isolated and purified with good yields. Then, the anti-*Leishmania* activity was tested in quadruplicate with concentrations of 5-100 μM of **1-5** using the promastigote forms of *Leishmania amazonensis* through incubation for 48 hours. To corroborate the results of the experiment was repeated under the same conditions and only at the highest concentration of 100 μM (Fig. 3).

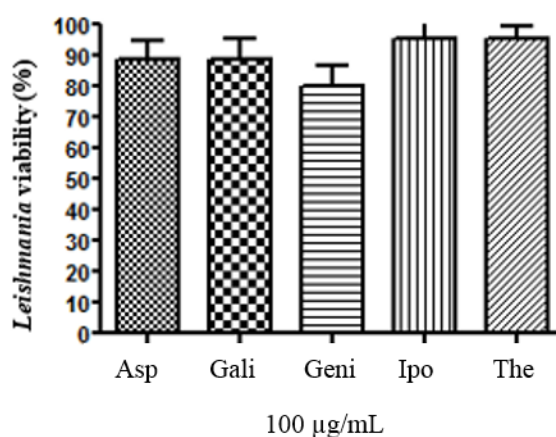


Fig. 3: Anti-*Leishmania* activity of isolated iridoids 1-5 on promastigote forms of *L. amazonensis*. Promastigote forms of *L. amazonensis* (2×10^6) were incubated at concentration of 100 μM of asperuloside (Asp), galiridoside (Gali), geniposide (Geni), ipolamiide (Ipo) and theveridoside (The), for 48 h at 26 °C. The viability was defined by counting the viable parasites using a haemocytometer, comparing with the control group (*Leishmania* plus M199).

Physicochemical parameters analysis – The analysis of the results of the physicochemical parameters obtained by Volsurf⁺ (Cruciani et al., 2000) and the Swissadme web server (Daina et al., 2017) indicates high variety of values for the main descriptors, according to the data showed at Table I. Generally, the active iridoids related at the literature showed the following values for the descriptors: a) Molecular

Volume (V) between 601 and 1337.5 Å³; b) Molecular Weight (MW) between 170.21 and 682.67 u; c) Flexibility (FLEX) between 0.283 and 363.08; d) Log P Octanol/Water (LogP) between -4.779 and 0.0879; e) Polar Superficial Area (PSA) between 76.56 and 252.32; f) Hydrophobic Superficial Area (HSA) between 234.98 and 664.12; g) Number of rotational bonds (RBOND) between 2 and 12; h) Number of hydrogen bond acceptors (HACC) between 6 and 16; i) Number of hydrogen bond donors (HDON) between 0 and 8; j) Solubility (SOL) between soluble and highly soluble.

TABLE I

Physicochemical descriptors of isolated iridoids and the literature.

Compound	V	MW	FLEX	LogP	PSA	HSA	RBOND	HACC	HDON	SOL	IC ₅₀ (μM)
Isoplumericin	601.125	290.268	0.283008	-0.402	76.56	343.796	2	6	0	Soluble	0.28 ^a
Plumericin	601	290.268	0.28747	-0.402	76.56	342.199	2	6	0	Soluble	0.21 ^a
ML-F52	837.5	412.389	0.987289	0.879	108.22	470.731	5	8	1	Soluble	3.38 ^c
Moludicin	799.125	398.363	0.826578	0.411	108.22	440.749	4	8	1	Soluble	4.24 ^c
Harpagide	660.625	364.345	0.981294	-3.325	178.1	266.306	3	10	7	Highly soluble	5.49 ^b
Compound A	1044.88	552.524	234.511	-0.752	210.47	467.726	9	13	6	Soluble	7.26 ^b
Compound B	1110.38	566.551	235.305	-0.26	201.67	551.578	10	13	5	Soluble	7.63 ^b
Brunneogaleatoside	1102.5	566.551	345.094	0.58	203.87	532.718	10	13	5	Soluble	8.30 ^b
Scrolepidoside	1337.5	682.666	363.084	-1.591	252.32	664.121	12	16	7	Soluble	8.94 ^b
Compound C	748.5	406.382	138.515	-3.123	184.17	325.254	5	11	6	Very soluble	9.00 ^b
8-O-acetylharpagide	738.375	406.382	120.411	-2.755	184.17	303.732	5	11	6	Very soluble	16.98 ^b
6-O-β-D- xylopyranosylaucubin	871.875	478.444	211.806	-4.779	223.39	381.075	6	13	8	Highly soluble	17.77 ^b
Ajugol	658.125	348.346	136.313	-2.559	157.87	296.21	3	9	6	Very soluble	20.67 ^b
Ajugoside	740.5	390.382	15.597	-1.989	163.94	343.059	5	10	5	Very soluble	21.77 ^b
6-O-methylcatalpol	714.375	376.356	135.609	-3.308	162.7	337.506	5	10	5	Very soluble	22.05 ^b
Catalpol	667	362.329	14.683	-3.757	170.4	302.556	4	10	6	Highly soluble	28.70 ^b
Aucubin	644.25	346.33	114.091	-3.454	157.87	294.835	4	9	6	Highly soluble	31.47 ^b

3.4-dihydromethylcatalpol	707.625	378.371	119.844	-3.54	163.8	311.974	5	10	5	Very soluble	33.57 ^b
6- β -hydroxyloganin	751.625	406.382	142.643	-3.123	184.17	329.03	5	11	6	Very soluble	73.82 ^b
8-epi-loganin	740.125	390.382	140.313	-2.122	163.94	333.902	5	10	5	Very soluble	105.28 ^b
Melampyroside	873.5	434.436	245.686	0.853	143.71	435.616	7	9	4	Soluble	121.30 ^b
6-O- α -L- rhamnopyranosylaucubin	899.875	492.471	184.766	-4.196	223.39	388.15	6	13	8	Highly soluble	> 203.06 ^b
Mussaenoside	751.25	390.382	160.561	-2.056	163.94	354.386	5	10	5	Very soluble	>230.54 ^b
Mussaenosidic acid	702.625	376.356	148.234	-2.146	174.94	303.387	4	10	6	Very soluble	234.08 ^b
Ningpogenin	391.125	170.206	0.3207	-0.385	52.99	234.978	2	3	2	Very soluble	> 587.51 ^b
Picoside I	946.625	492.472	359.792	-0.943	176.47	454.553	8	11	5	Very soluble	
Kutkosid	947	512.461	298.743	-1.762	208.13	414.214	8	13	6	Very soluble	
Ixoside	683.125	388.323	135.903	-2.153	192.01	268.221	5	11	6	Very soluble	ND
ML-2-3	749.5	384.336	0.717486	0.321	119.22	392.92	3	8	2	Soluble	ND
Theveridoside	757.75	404.366	133.631	-3.096	184.17	342.825	6	11	6	Very soluble	ND
Ipolamiide	761.25	406.382	156.272	-2.822	184.17	340.256	5	11	6	Very soluble	ND
Geniposide	750	388.366	177.023	-2.33	163.94	363.731	6	10	5	Very soluble	ND
Galiridoside	655	346.33	119.704	-2.334	150.17	307.828	3	9	5	Very soluble	ND
Asperuloside	780	414.361	193.534	-3.383	170.01	368.819	6	11	4	Very soluble	ND

^a Axenic amastigotes of *Leishmania amazonensis*

^b Axenic amastigotes of *Leishmania donovani*

^c Promastigotes of *Leishmania hertigi*

Construction of a Pharmacophore Hypothesis

The investigation of the iridoids from literature allowed the evaluation of the most important features for the maintenance or for the increase of activity against *Leishmania* axenic amastigote forms. This simple SAR study showed that the activity is mainly related to the existence of a substituent linked to the oxygen atom at the position 6 of the iridoid ring, as well as the maintenance of the 9 atoms scaffold.

Consequently, a simple SAR model was built considering those interactions and it is depicted at Fig. 4. This model is going to be compared to a pharmacophore model built according the material and method session.

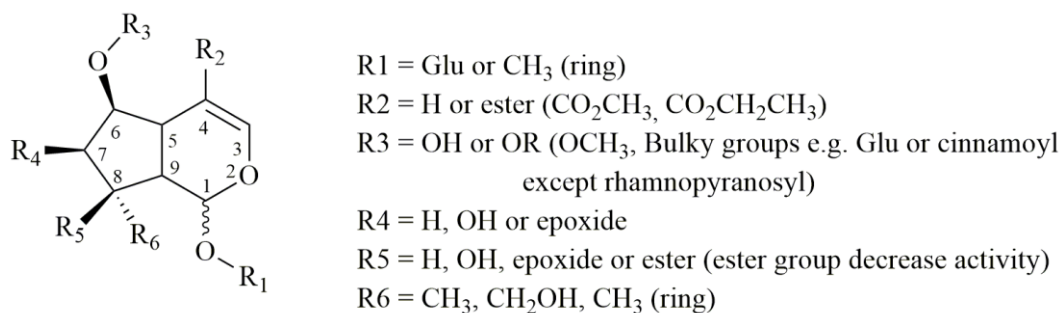


Fig. 4: Structure Activity Relationship of the iridoids found in the literature.

The alignment made with the THESEUS (Theobald et al., 2006) algorithm through the YASARA (Krieger et al., 2014) free version limited the construction of the pharmacophoric model in 10 iridoids. The acceptance criteria for the molecules inputted were: a) Show an IC₅₀ lower than 40 μM; b) Show resemblance to the extracted iridoids in order to avoid mismatches. The alignment was analyzed thoroughly and a pharmacophore model was obtained manually by using DSV 4.0 (ACCELRYS 2013) (Fig. 5 and 6).

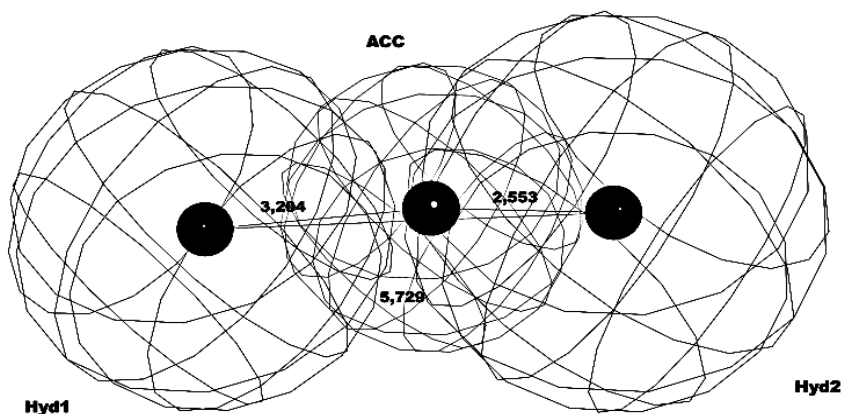


Fig. 5: Proposed pharmacophore model obtained from the selected iridoids from the literature.

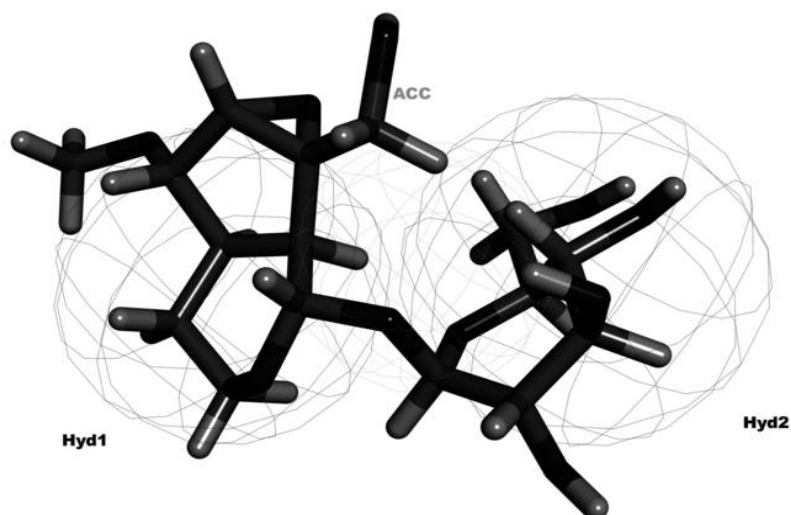


Fig. 6: Analysis for the ligand 3,4-dihydro-methylcatalpol at the pharmacophoric model.

According to the alignment obtained by THESEUS (Theobald et al., 2006), it was possible to obtain a pharmacophore model from the consensus alignment among the ligands. The pharmacophore model bore 3 features: two hydrophobic features (HYD1 and HYD2, distant 5.729 Å from each other) corresponding to the iridoid and pyran (glucose) rings respectively, which it is linked to C1 from iridoid ring and a hydrogen bond acceptor feature corresponding to the oxygens at the position 2 (O2) from iridoid ring and at the pyran ring, the feature is distant 3.204 Å from HYD1 feature and 2.553 Å from HYD2 feature.

Discussion

The compounds **1-5** were chosen for anti-*Leishmania* activity assays due to their plentifulness on the species *Escallonia bifida*, *Angelonia integerrima* and *Amphilophium crucigerum*. Moreover, this class of molecules was selected for the reason that there are several studies considering the activity of iridoids against different species of *Leishmania*.

The result of the anti-*Leishmania* activity showed that the compounds (**1-5**) tested presented less than 20% of inhibition on promastigotes and geniposide **3** was the most active with 19% of viability reduction. As predicted, amphotericin B showed high activity against the promastigote forms of *L. amazonensis*, IC₅₀ 0.13 μM (data not shown in the graph of the fig. 3).

Considering that several iridoids described in literature (Table II) have shown activity against species of *Leishmania* and that the compounds isolated in this study demonstrated a low inhibition profile, molecular modeling studies were carried out to analyze and compare physicochemical parameters and to propose a pharmacophoric hypothesis for the compounds.

The iridoids **1-5** obtained in this study showed some chemical characteristics related to those iridoids found in the literature. According to these results, it was not possible to identify a visible difference among the molecules and their activity through the analysis of the physicochemical descriptors obtained.

TABLE II

Iridoids described in the literature with leishmanicidal activity.

Plant	Iridoid	Concentration	Species	Form	Experiment	Result	Reference
<i>Ajuga laxmannii</i> (Murray Benth.)	Harpagide 8-O- acetylharpagide	90 – 0.123 mg/mL.	<i>L. donovani</i>	Amastigotes	<i>In vitro</i> IC ₅₀ 72 h	Harpagide: 2.0 µg/mL 8-O-acetylharpagide: 6,9 µg/mL	Mittal et al., 1998
<i>Himatanthus sucuuba</i> (Spruce ex Müll. Arg.) Woodson	Plumericin Isoplumericin	NA	<i>L. amazonensis</i>	Axenic amastigotes	<i>In vitro</i> IC ₅₀ 48 h	Plumericin: 0.21 µM Isoplumericin: 0.28 µM	Castillo et al., 2007
<i>Melampyrum arvense</i> L.	Aucubin Melampyroside Mussaenoside Mussaenosidic acid 8-epi-loganin	90 – 0.123 µg/mL	<i>L. donovani</i>	Axenic amastigotes	<i>In vitro</i> IC ₅₀ 72 h	Aucubin: > 90 µg/mL Melampyroside: 52.7 µg/mL Mussaenoside: > 90 µg/mL mussaenosidic acid: 88.1 µg/mL 8-epi-loganin: 41.1 µg/mL	Kirmizibek mez et al., 2011
<i>Morinda lucida</i> Benth.	Molucidin ML-2-3 ML-F52	50 – 0.78 µM	<i>L. hertigi</i>	Promastigotes	<i>In vitro</i> IC ₅₀ – 48 h MIC – 96 h	Molucidin: IC ₅₀ : 4.24 µM MIC: 4.167 µM ML-F52: IC ₅₀ : 3.38 µM	Shukla et al., 2012

						MIC: 2.60 μ M	
						ML-2-3: ND	
<i>Nyctanthes arbortristis</i> L.	Compound A Compound B (Arbortristoside A) Compound C	0, 1, 2, 4, 10, 20, 50, 100 μ M	<i>L. donovani</i>	Promastigotes Axenic amastigotes	<i>In vitro</i> IC ₅₀ 48 h	Promastigotes Compound A: 3.264 \pm 0.05 μ M Compound B: 3.504 \pm 0.04 μ M Compound C: 5.016 \pm 0.05 μ M	Shukla et al., 2012
						Amastigotes Compound A: 7.26 \pm 0.05 μ M Compound B: 7.63 \pm 0.05 μ M Compound C: 9.00 \pm 0.03 μ M	
<i>Nyctanthes arbortristis</i> L.	Arbortristoside A Arbortristoside B Arbortristoside C 6- β -hydroxyloganin	Arbortristoside A – 30-100 μ g/mL Arbortristoside B – 30-60 μ g/mL Arbortristoside C – 30-60 μ g/mL	<i>L. donovani</i>	Amastigotes	<i>In vivo</i> hamster (amastigote s/100 cell nuclei) <i>In vitro</i> : % inhibition of	Inhibition post treatment (%) <i>in vivo</i> Day 7 Arbortristoside A: 18.23% Arbortristoside B: NI Arbortristoside C: NI 6- β -hydroxyloganin: 30.81%	Tandon et al., 1991

6-β-
hydroxyloganin –
30 – 60 µg/mL

post-
treatment Day 28
amastigote Arbortristoside A: 79.68 ±
s/amastigot 21.68%
es control Arbortristoside B: NI
 Arbortristoside C: -
 6-β-hydroxyloganin: -

In vitro

Arbortristoside A –
30 µg/mL: 45.83 ± 7.21%
100 µg/mL: 64.58 ± 3.60%
Arbortristoside B –
30 µg/mL: 25.12 ± 7.11%
60 µg/mL: 47.34 ± 9.12%
Arbortristoside C –
30 µg/mL: 67.43 ± 4.02%
60 µg/mL: toxic
6-β-hydroxyloganin –
30 µg/mL: 65.77 ± 4.56%
60 µg/mL: toxic

<i>Nyctanthes arbortristis</i> L.	Compound A Compound B Compound C	5, 10, 20 μ M	<i>L. infantum</i>	Enzyme trypanothione reductase	<i>In vitro</i> IC ₅₀	Compound A: 2.29 \pm 0.03 μ M Compound B: 2.65 \pm 0.05 μ M Compound C: 4.74 \pm 0.05 μ M	Shukla et al., 2011
<i>Phlomis brunneogaleata</i> Hub.-Mor.	Brunneogaleatoside	90 – 0.123 μ g/mL	<i>L. donovani</i>	Axenic amastigotes	<i>In vitro</i> IC ₅₀ 72 h	Brunneogaleatoside: 4.7 μ g/mL	Kırmızıbe kmez et al., 2004
<i>Picrorhiza kurroa</i> Royle ex Benth.	Picroliv (picroside I and kutkoside)	12.5 mg/kg	<i>L. donovani</i>	Amastigotes	<i>In vivo</i> amastigote s/100 cell nuclei 25 days	7 days: 51.0 \pm 14.4 21 days: 65.0 \pm 10.49	Mittal et al., 1998
<i>Plumeria bicolor</i> Ruiz & Pav.	Plumericin Isoplumericin	Plumericin: 15 μ M Isoplumericin: 15 μ M	<i>L. donovani</i>	Promastigotes Amastigotes	<i>In vitro</i> IC ₅₀ 48 h	Plumericin Promastigote: 3.17 \pm 0.12 μ M Amastigote: 1.41 \pm 0.03 μ M Isoplumericin Promastigote: 7.2 \pm 0.08 μ M Amastigote: 4.1 \pm 0.02 μ M	Abdel-Mageed et al., 2012
<i>Scrophularia lepidota</i> Boiss.	Catalpol 6-O-methyl-catalpol Aucubin	90 – 0.123 μ g/mL	<i>L. donovani</i>	Axenic amastigotes	<i>In vitro</i> IC ₅₀ 72 h	Catalpol – 10.4 μ g/mL 6-O-methyl-catalpol – 8.3 μ g/mL Aucubin – 10.9 μ g/mL 6-O- α -L-rhamnopyranosyl-aucubin - > 100	Tasdemir et al., 2005

	6-O- α -L-rhamnopyranosylaucubin					6-O- β -D-xylopyranosylaucubin – 8.5 μ g/mL	
	6-O- β -D-xylopyranosylaucubin					Ajugol – 7.2 μ g/mL	
	Ajugol					Ajugoside – 8.5 μ g/mL	
	Ajugoside					3,4-dyhydro-methyl-catalpol – 12.7 μ g/mL	
	3,4-dyhydro-methyl-catalpol					Scrolepidoside – 6.1 μ g/mL	
	Scrolepidoside					Ningpogenin - > 100	
	ningpogenin						
<i>Tecoma mollis</i> Kunth	Ixoside	50 – 3.1 μ g/mL	<i>L. donovani</i>	Promastigotes	<i>In vitro</i> IC ₅₀ 48 h	<i>L. donovani</i> % inhibition.: 13 IC ₅₀ (μ g/mL): ND IC ₉₀ (μ g/mL): ND	Abdel- Mageed et al., 2012

The investigation of the iridoids from literature allowed the evaluation of the most important features for the maintenance or for the increase of activity against *Leishmania* axenic amastigote forms. This simple SAR study showed that:

1. The existence of a methoxyl group (6-O-methylcatalpol) or a bulky group linked to an oxygen atom (compound A, compound B and scrolepodoside) at the position 6 of the iridoid ring increased substantially the activity (catalpol: 28.70 μM ; 6-O-methylcatalpol: 22.05 μM ; compound B: 7.63 μM and ixoside: not determined > 206.02 μM);
2. The maintenance of the double bond at the position 3,4 of the iridoid ring showed an improvement in the activity (3,4-dihydromethylcatalpol 33.56 μM and 6-O-methylcatalpol 22.05 μM);
3. The epoxidation of the double bond at the position 7,8 of the iridoid ring led to a discrete increase in the activity (aucubin: 31.47 μM and catalpol: 28.70 μM);
4. The epoxide opening and the alcohol elimination at position 8 with the maintenance of the hydroxyl group out of the plane and the methyl group inside the plane led to an increase in the activity (catalpol 28.70 μM and ajugol 20.67 μM).

A similar SAR study was conducted by Vaidya et al. (2013), using 10 iridoids and secoiridoid glycosides, which were docked in glycogen phosphorylase-a (GP_a) enzyme (PDBID: 1LWO) at pyridoxal phosphate (PLP) binding site through Docking Server in order to investigate the binding mode and the respective binding energy from those compounds. The binding energy obtained through docking was then used to build a SAR model for GP_a, which indicates among other features that the double bond at position 3, 4 is important for activity maintenance against GP_a (Vaidya et al., 2013).

It should be noted that according to the proposed pharmacophore model the extracted iridoids **1-5** exhibited a low activity profile against *L. amazonensis*. This observation may be due to the absence of a substituent containing an oxygen atom linked to the C6 on the iridoid ring. The majority of the iridoids related in the literature that displayed a good activity against *Leishmania* bore an oxygen linked to the C6 on the iridoid ring, except the tetracyclic iridoids

(plumericin, isoplumericin, moludicin and ML-F52) and the activity may be increased especially when the oxygen was linked to a bulky substituent (cinnamoyl and xylopyranosyl groups). Furthermore, a study conducted by Almeida-Souza and coworkers (2016a) observed a reduction in the lesion sizes and in the parasitic loads in infected mice with *L. amazonensis* when they were treated with *Morinda citrifolia* L. (Noni) extract, which contains asperulosidic acid and deacetylasperulosidic acid as constituents (besides rutin and nonioside C and B), which contain a hydroxyl group linked to the C6 of the iridoid ring as result of the opening of the ring.

It was not observed any difference among **1-5** and the molecules related in the literature considering the physicochemical parameters analyzed. The SAR study jointly with the proposed pharmacophore model revealed the importance of the maintenance of the iridoid ring (cyclopentane[C]pyran) as well as the presence of the substituents linked to oxygens atoms at positions C1 and C6 for the purpose to have activity towards *Leishmania*. Additionally, it may be observed that the molecules **1-5** do not contain bulky substituents attached to the iridoid ring differently from some structures reported in the literature (e.g. arbortristoside a, plumericin, kutkosid, brunneogaleatoside), which bear those substituents and showed activity against the parasite.

Ideally the identification of a validated target that is crucial for the parasite survival would improve the computer based method through the combination of SBDD and LBDD approaches. One important target that called our attention was the trypanothione reductase (TR) found in trypanosomatids including the *Leishmania* genus. The TR is an enzyme responsible for the maintenance of the redox balance acting through the reduction of trypanothione and combating the reactive oxygen species (ROS) formation in the parasites (Beig et al., 2014; Shukla et al., 2011). Shukla and coworkers have already demonstrated the inhibition capacity of TR from *Leishmania infantum* by three iridoids glucosides (compounds A, B and C), which were characterized as competitive inhibitors of TR and the compounds showed IC_{50} of 2.29 ± 0.03 , 2.65 ± 0.05 and 4.74 ± 0.05 μ M respectively (Shukla et al., 2011). A further perspective would include the TR inhibition assay with the extracted iridoids as well as a molecular docking and

molecular dynamics studies to verify the interactions between the ligands and the TR binding site.

Also it may be important to ponder that some authors have emphasized that the initial screening tests against promastigote forms may not be considered alone as significant for assure the pharmacologic action against leishmaniasis. Thus, it would be necessary to investigate the activity against intracellular amastigote forms (Almeida-Souza et al., 2016b).

Conflict of interest

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgments

The authors would like to thank National Counsel of Technological and Scientific Development (CNPq), Coordination of Improvement of Higher Level Personnel (CAPES) and National Institute of Science and Technology for Pharmaceutical Innovation/ National Counsel of Technological and Scientific Development (INCT-IF/CNPq) for the financial support.

References

- Adibpour N, Rahim F, Rezaeei S, Ebrahimi A (2012) *In silico* designing selective inhibitor of drugs, medicinal plants compounds and experimental ligands for pteridine reductase targeting visceral leishmaniasis. *Afr. J. Microbiol. Res.* 6(5):917-926. doi: 10.5897/AJMR11.738.
- Abdel-Mageed WM, Backheet EY, Khalifa AA, Ibraheim ZZ, Ross SA (2012) Antiparasitic antioxidant phenylpropanoids and iridoid glycosides from *Tecoma mollis*. *Fitoterapia* 83:500–507. doi: 10.1016/j.fitote.2011.12.025.

ACCELRY'S - Discovery studio modeling environment (2013) 4.0 ed. San Diego, California: Accelrys Software Inc

Almeida-Souza F, Cardoso FO, Souza BVCS, Valle TZ (2016) *Morinda citrifolia* Linn. Reduces Parasite Load and Modulates Cytokines and Extracellular Matrix Proteins in C57BL/6 Mice Infected with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. PLOS Negl. Trop. Dis. 10(8):1-17. doi: 10.1371/journal.pntd.0004900.

Almeida-Souza F, Souza CSF, Taniwaki NN (2016) *Morinda citrifolia* Linn. fruit (Noni) juice induces an increase in NO production and death of *Leishmania amazonensis* amastigotes in peritoneal macrophages from BALB/c. Nitric Oxide 58:51-58. doi: 10.1016/j.niox.2016.06.004.

Atay I, Kirmizibekmez H, Kaiser M, Akaydin G, Yesilada E, Tasdemir D (2016) Evaluation of in vitro antiprotozoal activity of *Ajuga laxmannii* and its secondary metabolites. Pharm. Biol 54(9):1808–1814. doi: 10.3109/13880209.2015.1129542.

Beig M, Oellien F, Garoff L, Noack S, Krauth-Siegel RL, Selzer PM (2014) Trypanothione Reductase: A target protein for a combined in vitro and *in silico* screening approach. PLoS Negl Trop Dis. 9(6):1-19. doi: 10.1371/journal.pntd.0003773.

Castillo D, Arevalo J, Herrera F, Ruiz C, Rojas R, Rengifo E, Vaisberg A, Lock O, Lemesre J-L, Gornitzka H, Sauvain M (2007) Spirolactone iridoids might be responsible for the antileishmanial activity of a Peruvian traditional remedy made with *Himatanthus sucuuba* (Apocynaceae). J. Ethnopharmacol 112:410-414. doi: 10.1016/j.jep.2007.03.025.

Cruciani G, Pastor M, Guba W (2000) VolSurf: a new tool for the pharmacokinetic optimization of lead compounds. Eur. J. Pharm. Sci 11 (Suppl 2): S29–S39. [http://dx.doi.org/10.1016/S0928-0987\(00\)00162-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0928-0987(00)00162-7).

Daina A, Michielin O, Zoete V (2017) SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. Sci. Rep. <http://www.swissadme.ch>. Accessed 23 Dec 2016

Gangwar S, Baig MS, Shah P, Biswas S, Batra S, Siddiqi MI (2012) Identification of novel inhibitors of dipeptidylcarboxypeptidase of *Leishmania donovani* via ligand-based virtual screening and biological evaluation. Chem Biol Drug Des 79(2):149–156. doi: 10.1111/j.1747-0285.2011.01262.x.

Kaur J, Kumar P, Tyagi S, Pathak R, Batra S, Singh P (2011a) *In silico* screening, structure-activity relationship, and biologics evaluation of selective

pteridine reductase inhibitors targeting visceral leishmaniasis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55(2):659–666. doi: 10.1128/AAC.00436-10.

Kaur J, Tiwari R, Kumar A, Singh N (2011b) Bioinformatic analysis of *Leishmania donovani* long-chain fatty acid-CoA ligase as a novel drug target. *Mol Biol Int* 2011:1-14. doi:10.4061/2011/278051.

Kaserer T, Beck KR, Akram M, Odermatt A, Schuster D (2015) Pharmacophore models and pharmacophore-based virtual screening: Concepts and applications exemplified on hydroxysteroid dehydrogenases. *Molecules* 20:22799-22832. doi: 10.3390/molecules201219880.

Kirmizibekmez H, Çalış I, Perozzo R, Brun R, Dönmez AA, Linden A, Rüedi P, Tasdemir D (2004) Inhibiting Activities of the secondary metabolites of *Phlomis brunneogaleata* against parasitic protozoa and plasmodial enoyl-ACP Reductase, a crucial enzyme in fatty acid biosynthesis. *Planta Med* 70:711-717. doi: 10.1055/s-2004-827200.

Kirmizibekmez H, Atay I, Kaiser M, Brun R, Cartagena MM, Néstor M, Carballeira NM, Yesilada E, Tasdemir D (2011) Antiprotozoal activity of *Melampyrum arvense* and its metabolites. *Phytother Res.* 25:142–146. doi: 10.1002/ptr.3233.

Krieger E, Vriend G (2014) YASARA View – molecular graphics for all devices – from smartphones to workstations. *Bioinformatics* 30(20):2981-2982 <http://www.yasara.org/sciencenews.htm>. Accessed 23 Dec 2016

Macalino SJY, Gosu V, Hong S, Choi S (2015) Role of computer-aided drug design in modern drug discovery. *Arch Pharm Res.* 38:1686-1701. doi: 10.1007/s12272-015-0640-5.

Ministério da Saúde (2014) Orientações para uso racional do medicamento anfotericina B lipossomal utilizado para tratamento de pacientes com as leishmanioses. <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/727-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/leishmaniose-visceral-lv/l1-leishmaniose-visceral-lv/14190-orientacoes-para-uso-racional-do-medicamento-anfotericina-b-lipossomal>. Accessed 16 Jan 16 2017

Mittal N, Gupta N, Goyal N, Roy U, Rastogi AK (1998) Protective effect of picroliv from *Picrorhiza kurroa* against *Leishmania donovani* infections in *Mesocricetus auratus*. *Life Sciences* 63(20):1823-1834. doi: 10.1016/S0024-3205(98)00456-1.

Pomel S, Rodrigo J, Hendra F, Cave C, Loiseau PM (2012) *In silico* analysis of a therapeutic target in *Leishmania infantum*: the guanosine-diphospho-D-

mannose pyrophosphorylase. *Parasite* 19(1): 63–70. doi: 10.1051/parasite/2012191063.

Postigo JA (2010) Leishmaniasis in the World Health Organization Eastern Mediterranean Region. *Int J Antimicrob Agents* 36(Suppl. 1):S62–S65. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2010.06.023.

Rahim F (2010) An *in silico* development of selective inhibitor for histamine receptors. *Biotechnology* 9:157–163. doi: 10.3923/biotech.2010.157.163.

Romão PRT, Tovar J, Fonseca SG, Moraes RH, Cruz AK, Hothersall JS, Noronha-Dutra AA, Ferreira SH, Cunha FQ (2006) Glutathione and the redox control system trypanothione/trypanothione reductase are involved in the protection of *Leishmania* spp. against nitrosothiol-induced cytotoxicity. *Braz J Med Biol Res* 39(3):355-363. doi: 10.1590/S0100-879X2006000300006.

Sadowski J, Gasteiger J, Klebe G (1994) Comparison of automatic three-dimensional model builders using 639 X-Ray structures. *J. Chem. Inf. Comp. Sci.* 34:1000-1008. doi: 10.1021/ci00020a039.

Schuster D, Wolber G (2010) Identification of bioactive natural products by pharmacophore-based virtual screening. *Curr Pharm Des* 16:1666-1681. doi: 10.2174/138161210791164072.

Sharma U, Singh D, Kumar P, Dobhal MP, Singh, S (2011) Antiparasitic activity of plumericin & isoplumericin isolated from *Plumeria bicolor* against *Leishmania donovani*. *Indian J Med Res* 135(5):709-716. doi: 10.4103/0971-5916.91005.

Shukla AK, Patra S, Dubey VK (2012) Iridoid glucosides from *Nyctanthes arborescens* result in increased reactive oxygen species and cellular redox homeostasis imbalance in *Leishmania* parasite. *Eur J Med Chem* 54:49-58. doi: 10.1016/j.ejmech.2012.04.034.

Shukla AN, Patra S, Dubey VK (2011) Deciphering molecular mechanism underlying antileishmanial activity of *Nyctanthes arborescens*, an Indian medicinal plant. *J Ethnopharmacol* 134:996-998. doi: 10.1016/j.jep.2011.01.044.

Tandon JS, Srivastava V, Guru, PY (1991) Iridoids: A new class of leishmanicidal agents from *Nyctanthes arborescens*. *J Nat Prod* 54(4): 1102-1104. doi: 10.1021/np50076a030

- Tasdemir D, Güner N, Perozzo R, Brun R, Dönmez AA, Çaliş I, Rüedi P (2005) Anti-protozoal and plasmodial FabI enzyme inhibiting metabolites of *Scrophularia lepidota* roots. *Phytochemistry* 66:355-362. doi: 10.1016/j.phytochem.2004.11.013.
- Theobald DL, Wuttke DS (2006) THESEUS: maximum likelihood superpositioning and analysis of macromolecular structures. *Bioinformatics* 22:2171-2172. doi: 10.1093/bioinformatics/btl332.
- Vaidya HB, Ahmed AA, Goyal RK, Cheema SK (2013) Glycogen phosphorylase-a is a common target from anti-diabetic effect of iridoid and secoiridoid glycosides. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 16(4):530-540. doi: 10.18433/J3FS4F.
- WAVEFUNCTION (2014) WAVEFUNCTION Spartan'14. 1.1.4 ed. San Diego, California
- Wermuth G, Ganellin CR, Lindberg P, Mitscher LA (1998) Glossary of terms used in medicinal chemistry (IUPAC recommendations 1998). *Pure Appl. Chem.* 70(5):1129–1143. doi: 10.1351/pac199870051129.
- World Health Organization (2017) Media Centre. Leishmaniasis. Fact sheet. Updated September 2016. Geneva: World Health Organization (WHO). Available: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>>. Accessed 02 March 2017

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O gênero *Escallonia* é o maior da família *Escalloniaceae* reunindo 39 espécies ao longo da América do Sul e da América Central. No Brasil ocorrem nove espécies desse gênero (SLEUMER, 1968 apud FRITSCH & CERVI, 2011, p. 208; KLEIN & REITZ, 1985; SOUZA & LORENZI, 2008). O gênero *Angelonia* (Plantaginaceae) compreende 30 espécies difundida por toda a América Latina, sendo que no Brasil foram encontradas 18 espécies (MARTINS et al., 2013; SOUZA, 2015).

Estudos fitoquímicos têm sido realizados com estes gêneros por se revelarem fontes abundantes em metabólitos secundários, especialmente iridoides glicosilados (TOMASSINI et al., 1993; von POSER et al., 1997)

A ocorrência de iridoides glicosilados nas espécies de *Escallonia bifida* e *Escallonia megapotamica* não havia sido relatada em estudos anteriores. Outras espécies do gênero, *E. myrtoidea*, *E. illinita*, *E. alpina* e *E. pulverulenta* foram previamente estudadas mostrando a presença de iridoides. A espécie *Angelonia integerrima* foi estudada anteriormente, revelando ser uma rica fonte de iridoides de diferentes estruturas, sendo um deles, o galiridosídeo, obtido em rendimentos elevados (2,28% em relação ao extrato da massa de planta seca) (von Poser et al., 1997). Sendo assim, este composto se mostra interessante para estudos biológicos, pois pode facilmente ser obtido.

O método de isolamento por cromatografia em coluna de gel de sílica possibilitou a identificação de cinco iridoides glicosilados carbocíclicos em *E. bifida* e *E. megapotamica*. Asperulosídeo demonstrou ser o composto mais abundante destas espécies. Assim, este foi selecionado para as reações de semissíntese. Num primeiro momento foi obtido o derivado tetraacetilado, o qual subsequentemente foi submetido a diversas reações para obter análogos. Entretanto, as tentativas não produziram resultados satisfatórios, ocorrendo degradação da molécula (Capítulo 1).

No isolamento de compostos a partir de *Angelonia integerrima* foi possível isolar e identificar dois iridoides, sendo o galiridosídeo o composto majoritário e abundante que corresponde a 1,48% em relação a massa da planta (Capítulo 2).

Diversos compostos da classe dos iridoides têm mostrado uma ampla gama de propriedades farmacológicas, destacando atividades cardiovascular, anti-inflamatória, antifúngica, neuroprotetora e anti-*Leishmania*. Os resultados representados no capítulo 3 mostram que os iridoides asperulosídeo, geniposídeo, galiridosídeo, ipolamida e teveridosídeo não apresentaram atividade *in vitro* contra a forma promastigota de *Leishmaniose amazonensis*. Frente a estes resultados, estabeleceu-se um modelo farmacofórico através de estudo de modelagem molecular dos iridoides testados *in vitro* e dos descritos na literatura, com atividade leishmanicida. Os resultados não mostraram haver discrepâncias entre as estruturas das moléculas que justifiquem a inatividade dos compostos testados *in vitro* neste estudo. Torna-se necessário realizar um estudo enzimático utilizando tripanotona redutase, estudos de *docking* molecular e dinâmica molecular para averiguar as interações dos grupos farmacofóricos das moléculas com os ligantes da enzima.

O presente estudo apresenta as espécies nativas da flora do Rio Grande do Sul de *Escallonia bifida* e *Escallonia megapotamica* e *Angelonia integerrima* como fontes abundantes de iridoides glicosilados que podem ser utilizados em experimentos farmacológicos.

8. REFERÊNCIAS

ABDEL-MAGEED, W.M.; BACKHEET, E.Y.; KHALIFA, A.A.; IBRAHEIM, Z.Z.; ROSS, S.A. Antiparasitic antioxidant phenylpropanoids and iridoid glycosides from *Tecoma mollis*. *Fitoterapia*, v. 83, p. 500–507, 2012.

AKOPYANTS, N.S.; KIMBLIN, N.; SECUNDINO, N.; PATRICK, R.; PETERS, N.; LAWYER, P.; DOBSON, D.E.; BEVERLEY, S.M.; SACKS, D.L. Demonstration of genetic exchange during cyclical development of *Leishmania* in the sand fly vector. *Science*, v. 324, n. 5924, p. 265–268, 2009.

ALEXANDER, J.; SATOSKAR, A.R.; RUSSEL, D.G. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. *Journal of Cell Science*, v. 112, n.18, p. 2993-3002, 1999.

ALVIM, N.A.T.; FERREIRA, M.A.; CABRAL, I.E.; ALMEIDA FILHO, A.J. O uso de plantas medicinais como recurso terapêutico: das influências da formação profissional às implicações éticas e legais de sua aplicabilidade como extensão da prática de cuidar realizada pela enfermeira. *Revista Latino-Americana de Enfermagem*, v. 14, n. 3, 2006.

AMOA-BOSOMPEM, M.; OHASHI, M.; MOSORE, M.-T.; AGYAPONG, J.; TUNG, N.H.; KWOFIE, K.D.; AYERTEY, F.; OWUSU, K.B.-A.; TUFFOUR, I.; ATCHOGLLO, P.; DJAMEH, G.I.; AZERIGYIK, F.A.; BOTCHIE, S.K.; ANYAN, W.K.; APPIAH-OPONG, R.; TAKUHIRO UTO, T.; MORINAGA, O.; APPIAH, A.A.; AYI, I.; SHOYAMA, Y.; BOAKYE, D.A.; OHTA, N. In vitro anti-*Leishmania* activity of tetracyclic iridoids from *Morinda lucida* Benth. *Tropical Medicine and Health*, v. 44, p. 1-5, 2016.

ATAY, I.; KIRMIZIBEKMEZ, H.; KAISER, M.; AKAYDIN, G.; YESILADA, E.; TASDEMIR, D. Evaluation of in vitro antiprotozoal activity of *Ajuga laxmannii* and its secondary metabolites. *Pharmaceutical Biology*, v. 54, n. 9, p. 1808–1814, 2016.

BARRINGER, K.A. A taxonomic revision of *Angelonia* (Scrophulariaceae). *University of Connecticut*, 182 p., 1981.

BATES, P.A. Housekeeping by *Leishmania*. *Trends in Parasitology*, v. 22, p.447-448, 2006.

BESSA, N.G.F.de; BORGES, J.C.M.; BESERRA, F.P.; CARVALHO, R.H.A.; PEREIRA, M.A.B.; FAGUNDES, R.; CAMPOS, S.L.; RIBEIRO, L.U.; QUIRINO, M.S.; CHAGAS JUNIOR, A.F.; ALVES, A. Prospecção fitoquímica preliminar de plantas nativas do cerrado de uso popular medicinal pela comunidade rural do assentamento vale verde – Tocantins. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v.15, n.4, supl.I, p.692-707, 2013.

BIANCO, A. Recent developments in iridoids chemistry. *Pure & Applied Chemistry*, v. 66, n. 10-11, p. 2335-2338, 1994.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. *Editora do Ministério da Saúde*. 2. ed., 2007. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_2ed.pdf>. Acesso em: 29 jan. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Ministério da Saúde, 1. ed., 120 p., 2014. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_visceral_1edicao.pdf>. Acesso em: 01 fev. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Casos confirmados de Leishmaniose Visceral, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2015. *Brasília: Ministério da Saúde*, 2016a. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/novembro/08/LV-Casos.pdf>>. Acesso em 23 jan. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Casos de Leishmaniose Tegumentar Americana, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2015. *Brasília: Ministério da Saúde*, 2016b. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/novembro/07/LT-Casos.pdf>>. Acesso em 23 jan.2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. Guia de Vigilância em Saúde. *Ministério da Saúde*, 1. ed. Atual, 773 p., 2016c. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/novembro/18/Guia-LT-2016.pdf>>. Acesso em 02 fev. 2017.

BUREAU, R.; DAVEU, C.; LEMAITRE, S.P.; DAUPHIN, F.; LANDELLE, H.; LANCELOT, J.C.; RAULT, S. Molecular design based on 3D-pharmacophore. Application to 5-HT₄ receptor. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, v. 42, n. 4, p 962-967, 2002.

CAPRINI, G.P. Metabolômica de plantas: análise fitoquímica de *Pentas lanceolata*, estudos com culturas celulares e experimentos iniciais de biossíntese com precursores marcados utilizando uma espécie de *Mentha* como sistema modelo. *Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF*, 202 p., 2007.

CAVALCANTE, A.L.F.A. *Plantas Medicinais e Saúde Bucal no SUS: Estudo Etnobotânico e de fatores de risco para interação medicamentosa*. 2010. 210f.

Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Centro de Ciências da Saúde – Universidade Federal da Paraíba, João, 2010.

CASTILLO, D.; AREVALO, J.; HERRERA, F.; RUIZ, C.; ROJAS, R.; RENGIFO, E.; VAISBERG, A.; LOCKB, O.; LEMERSE, J.L.; GORNITZKA, H.; SAUVAIN, M. Spirolactone iridoids might be responsible for the antileishmanial activity of a Peruvian traditional remedy made with *Himatanthus sucuuba* (Apocynaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, v. 112, p. 410–414, 2007.

CDC. Center for Disease Control and Prevention. *Leishmaniasis*. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>>. Acesso em: 03 fev. 2017.

CHANG, K.; CHAUDHURI, G. Molecular determinants of *Leishmania* virulence, *Annual Review of Microbiology*, v. 44, p. 499-529, 1990.

CHEN, Y.; ZHANG, Y.; LI, L.; HÖLSCHER, C. Neuroprotective effects of geniposide in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *European Journal of Pharmacology* v. 768, p. 21-27, 2015.

CHERIET, T.; YOUCEF-ALI, M.; CHAOUICHE, M. A.; MANCINI, I.; CHAOUICHE, N. K.; SEGHIRI, R.; MEKKIOU, R.; BOUAMZA, O.; BENAYACHE, S.; BENAYACHE, F. Phytochemical and antimicrobial screening of *Linaria reflexa* Desf. *Journal of Materials and Environmental Science*, v. 7, p. 3410-3414, 2016.

DEMÍREZER, L.Ö.; GÜRBÜZ, F.; GÜVENALP, Z.; STRÖCH, K.; ZEECK, A. Iridoids, flavonoids and monoterpene glycosides from *Galium verum* subsp. *verum*. *Turkish Journal of Chemistry*, n. 30, p. 525-534, 2005.

DE MOURA, T.R.; OLIVEIRA, F.; RODRIGUES, G.C.; CARNEIRO, M.W.; FUKUTANI, K.F.; NOVAIS, F.O.; MIRANDA, J.C.; BARRAL-NETTO, M.; BRODSKY, C.; BARRAL, A.; DE OLIVEIRA, C.I. Immunity to *Lutzomyia intermedia* saliva modulates the inflammatory environment induced by *Leishmania braziliensis*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 4, n. 6, p. 712, 2010.

DINDA, B.; DEBNATH, S.; HARIGAYA, Y. Naturally occurring iridoids. A review, part 1 and 2. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, v. 55, n. 2, p. 159-222, 2007.

DUMORTIER, B.C.J. Analyse des familles des plantes, avec l'indication des principaux genres qui s'y rattachent. *Tournay: Imprimerie de J. Casterman Ainé*. 106 p., 1829.

DROR, O.; SCHNEIDAN-DUHOVNY, D.; INBAR, Y.; NUSSINOV, R.; WOLFSON, H.J. Novel approach for efficient pharmacophore-based virtual

screening: method and applications. *Journal of Chemical Information and Modeling*, v. 49, n.10, p. 2333-2343, 2009.

DUTRA, R.C.; CAMPOS, M.M.; SANTOS, A.R.S.; CALIXTO, J.B. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. *Pharmacological Research*, v. 112, p. 4–29, 2016.

EL-NAGGAR, L.J.; BEAL, J.L. Iridoids. A review. *Journal of Natural Products*, v. 43, n. 6, p. 649-707, 1980.

FIRMO, W.C.A.; MENEZES, V.J.M.; PASSOS, C.E.C; DIAS, C.N.; ALVES, L.P.L; DIAS, I.C.L.; NETO, M.S.; OLEA, R.S.G. Contexto Histórico, Uso Popular e Concepção Científica sobre Plantas Medicinais. *Caderno de Pesquisa*, v. 18, n. especial, 2011.

FRITSCH, M.; CERVI, A.C. O gênero *Escallonia* Mutis ex Linnaeus filius (*Escalloniaceae*) no estado do Paraná, Brasil. *Fontqueria*, v. 56, n. 24, p. 207-226, 2011.

GOTO, H.; LINDOSO, J.A.L. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Infectious Disease Clinics of North America*, v. 26, p. 293-307, 2012.

GRIMALDI, G., J.R.; TESH, R.B. Leishmaniasis of the new world: current concepts and implications for future research. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 6, p. 230-250, 1993.

GÜVENALP, Z.; KILIÇ, N.; KAZAZ, C.; KAYA, Y.; DEMÍREZER, Ö. Chemical Constituents of *Galium tortumense*. *Turkish Journal of Chemistry*, v. 30, p. 515-523, 2006.

HOUGHTON, P.J.; MENSAH, A. BRAHAM Y.; IESSA, N.; HONG, L. Y. Terpenoids in *Buddleja*: relevance to chemosystematics, chemical ecology and biological activity. *Phytochemical Analysis*, v. 64, p. 385–393, 2003.

HOU, S.-X.; ZHU, W.-J.; PANG, M.-Q.; JEFFRY, J.; ZHOU, L.-L. Protective effect of iridoid glycosides from *Paederia scandens* (LOUR) MERRILL (*Rubiaceae*) on uric acid nephropathy rats induced by yeast and potassium oxonate. *Food and Chemical Toxicology*, v. 64, p. 57–64, 2014.

JENSEN, S.R. Plant iridoids, their biosynthesis and distribution in angiosperms. *Proceedings of the Phytochemical Society of Europe*, v. 31, p. 133-158, 1991.

JOYNER, P.M.; CICHEWICZ, R.H. Bringing natural products into the fold – exploring the therapeutic lead potential of secondary metabolites for the

treatment of protein-misfolding-related neurodegenerative diseases. *Natural Product Reports*, v. 28, p. 26-47, 2011.

KHANAL, T.; KIM, H. G.; DO, M. T.; CHOI, J. H.; CHUNG, Y. C.; KIM, H. S.; PARK, Y.J.; JEONG, T. C.; JEONG, H. G. Genipin induces cyclooxygenase-2 expression via NADPH oxidase, MAPKs, AP-1, and NF- κ B in RAW 264.7 cells. *Food and Chemical Toxicology*, v. 64, p. 126–134, 2010.

KHANAL, T.; KIM, G.H.; DO, M.T.; CHOI, J.H.; CHUNG, Y.C.; KIM, H.S.; PARK, Y.-J.; JEONG, T.; JEONG, H.G. Genipin induces cyclooxygenase-2 expression via NADPH oxidase, MAPKs, AP-1, and NF- κ B in RAW 264.7 cells. *Food and Chemical Toxicology*, v. 64, p. 126–134, 2014.

KIRMIZIBEKMEZ, H.; ATAY, I.; KAISER, M.; BRUN, R.; CARTAGENA, M.M.; Néstor M. CARBALLEIRA, N.M.; YESILADA, E.; TASDEMIR, D. Antiprotozoal activity of *Melampyrum arvense* and its metabolites. *Phytotherapy Research*, v. 25, p. 142–146, 2011.

KLEIN, R.M.; REITZ, R. Saxifragaceas. *Flora Illustrada Catarinense*, p. 4-31. 1985.

KOOIMAN, P. The occurrence of iridoid glycosides in the *Scrophulariaceae*. *Acta Botanica Neerlandica*, v. 19, n.3, 1970.

LIANG, Z.; YANG, M.; XU, X.; XIE, Z.; HUANG, J.; LI, X.; YANG, D. Isolation and purification of geniposide, crocin-1, and geniposidic acid from the fruit of *Gardenia jasminoides* Ellis by high-speed counter-current chromatography. *Separation Science and Technology*, v. 49, p. 1427-1433, 2014.

LEE, P.; LEE, J.; CHOI, S.Y.; LEE, S.E.; LEE, S.; SON, D. Geniposide from *Gardenia jasminoides* attenuates neuronal cell death in oxygen and glucose deprivation-exposed rat hippocampal slice culture. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v. 29, n. 1, p. 174-176, 2006.

MACALINO, S.J.Y.; GOSU, V.; HONG, S.; CHOI, S. Role of computer-aided drug design in modern drug discovery. *Archives of Pharmacal Research*, v. 38, p. 1686-1701, 2015.

MARCHIORETTO, M.S. O gênero *Escallonia* Mutis ex Linnaeus filius (Saxifragaceæ) no Rio Grande do Sul. *Pesquisas*, v. 43, p. 223-250, 1992.

MARTIN, F.; HAY, A.-E.; CORNO, L.; GUPTA, M. P.; HOSTETTMAN, K. Iridoid glycosides from the stems of *Pithecoctenium crucigerum* (Bignoniaceae). *Phytochemistry*, v. 68, n. 9, p. 1307–1311, 2007.

MARTINS, A.C.; AGUIAR, A.J.C.; SANTOS, I.A. Interaction between oil-collecting bees and seven species of Plantaginaceae. *Flora – Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, v. 208, n.7, p. 401-411, 2013.

MCGWIRE, B.S.; SATOSKAR, A. R. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. *QJM: An International Journal of Medicine*, v. 107, p. 7-14, 2014.

MITTAL, N.; GUPTA, N.; GOYAL, N.; ROY, U.; RASTOGI, A.K. Protective effect of picroliv from *Picrorhiza kurroa* against *Leishmania donovani* infections in *Mesocricetus auratus*. *Life Sciences*, v. 63, n. 20, p. 1823-1834, 1990.

MÔRO, F.V.; PINTO, A.C.R.; SANTOS, J.M.; DAMIAO, C.F.A Scanning electron microscopy study of the seed and post-seminal development in *Angelonia salicariifolia* Bonpl. (Scrophulariaceae). *Annals of Botany*, v. 88, n. 3, p. 499-506, 2001.

MOURA, V. M.; SANTOS, D. P.; SANTIN, S. M. O.; CARVALHO, J. E.; FOGGIO, M. A. Constituintes químicos de *Galianthe brasiliensis* (RUBIACEAE). *Química Nova*, v. 29, n. 3, p. 452–455, 2006.

MUKBEL, R.M.; KHASHARMEH, R.H.; HIJJAWI, N.S.; KHALIFEH, M.S.; HATMAL, M.M.; MCDOWELL, M.A. Human immune response to salivary proteins of wild-caught *Phlebotomus papatasi*. *Parasitology Research*, p. 1-11, 2016.

NANGIA, A.; PRASUNA, G.; RAO, P.B. Synthesis of cyclopenta[C]pyran skeleton of iridoid lactones. *Tetrahedron*, v. 53, n. 43, p. 14507-14545, 1997.

NEUBER, H. Leishmaniasis. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, v.6, p.754-765, 2008.

OHKUBO, T.; YAMAZAKI, M.; YOSHIDA, A.; CHIBA, K.; MOHRI, T. Detection of genipin/geniposide-target molecules by a geniposide overlay method using anti-geniposide antibody. *Journal of Health Science*, v. 50, n. 2, p. 193-196, 2004.

OLIVEIRA, M.H.; INNOCENTE, A.M.; PEREIRA, A.G.; DIAS, D.O.; OLIVEIRA, E.G.; BARRETO, F.; FREITAS, F.A.; MEIRELLES, G.C.; SILVA, G.N.S.; MACHADO, J.C.; BIDONE, J.; ANDRADE, J.M.M.; SCHIWINGEL, L.; MÜLLER, L.G.; PINTO, P.S.; BERNARDI, R.M.; KAISER, S.; SOUZA, T.T.; GNOATO, S.C.B. Semissíntese: uma solução para problemas farmacológicos de produtos naturais. *Revista Eletrônica de Farmácia*. v. IX, n. 1, p. 62-88, 2012.

PEARSON, R.D.; SOUSA, A.Q. Clinical spectrum of Leishmaniasis. *Clinical Infectious Diseases*, v. 22, n. 1, p. 1-13, 1996.

PLOUVIER, V.; FAVRE-BONVIN, J. Les iridoïdes et séco-iridoïdes: Répartition, structure, propriétés, biosynthèse. *Phytochemistry*. v.10, 1697-1722 1971.

RATES, S.M.K. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino de farmacognosia. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 11, n. 2, p. 57-69, 2001.

ROGERS, M.E.; ILG, T.; NIKOLAEV, A.V.; FERGUNSON, M.A.; BATES, P.A. Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. *Nature*, v. 430, n. 6998, p. 463-467, 2004.

SACCARO-JÚNIOR, N.L. A regulamentação de acesso a recursos genéticos e repartição de benefícios: disputas dentro e fora do Brasil. *Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada*, 2011.

SAMPAIO-SANTOS, A.M.I.; KAPLAN, M.A. Biosynthesis significance of iridoids in chemosystematics. *Journal of Brazilian Chemical Society*, v. 12, n. 2, p. 144-153, 2001.

SCHRÖDER, P.; BAUER, J.O.; STROHMANN, C.; KUMAR K.; WALDMANN, H. Synthesis of an iridoid-inspired compound collection and discovery of autophagy inhibitors. *The Journal of Organic Chemistry*, v. 81, n. 21, p. 10242-10255, 2016.

SINGH, A.; MALHOTRA, S.; SUBBAN, R. Anti-inflammatory and analgesic agents from Indian medicinal plants. *International Journal of Integrative Biology*, v. 3, p. 57-72, 2008.

SHARMA, U.; SINGH, D.; KUMAR, P.; DOBHAL, M.P.; SINGH, S. Antiparasitic activity of plumericin & isoplumericin isolated from *Plumeria bicolor* against *Leishmania donovani*. *Indian Journal of Medical Research*, v. 135, n. 5, p. 709-716, 2011.

SLEUMER, H.O. Die Gattung *Escallonia* (Saxifragaceæ). Verh. Kon. Akad. Wetensch., Afd. Naturk., 1968 apud FRITSCH, M.; CERVI, A.C. O gênero *Escallonia* Mutis ex Linnaeus filius (Escalloniaceæ) no estado do Paraná, Brasil. *Fontqueria* v. 56, n. 24, p. 207-226, 2011.

SOLBACH, W.; LASKAY, T. The host response to *Leishmania* infection. *Advances in Immunology*, v. 74, p. 275-317, 2000.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. Botânica Sistemática: Guia Ilustrado para Identificação das Famílias de Angiospermas da Flora Brasileira. *Nova Odessa: Instituto Plantarum*, 2.ed., 2008.

SOUZA, V.C.; GIULIETTI, A.M. Levantamento das espécies de Scrophulariaceae *sensu lato* nativas do Brasil. *Pesquisas, Botânica*, N. 60, P.7-288, 2009.

SOUZA, V.C.; HASSEMER, G. *Plantaginaceae* in lista de espécies da flora do Brasil. *Jardim Botânico do Rio de Janeiro*. 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB12876>>. Acesso em: 30 dez. 2016.

SUN, I.; WANG, H.; KASHIWADA, Y.; SHEN, J.; COSENTINO, L.M.; CHEN, C.; YANG L.; LEE, K. Anti-Aids agents. 34. Synthesis and structure-activity relationships of betulin derivatives as anti-HIV agents. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 41, n. 23, p. 4648-4657, 1998.

TAKEDA, Y.; SHIMIDZU, H.; MIZUNO, K.; INOUCHI, S.; MASUDA, T.; HIRATA, E.; SHINZATO, T.; ARAMOTO, M.; OTSUKA, H. An Iridoid glucoside dimer and a non-glycosidic iridoid from the leaves of *Lasianthus wallichii*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, v. 50, n. 10, p. 1395-1397, 2002.

TASDEMIR, D.; GÜNER, N.D.; PEROZZO, R.; BRUN, R.; DÖNMEZ, A.A.; ÇALIS, I.; RÜEDI, P. Anti-protozoal and plasmodial FabI enzyme inhibiting metabolites of *Scrophularia lepidota* roots. *Phytochemistry*, v. 66, p. 355–362, 2005.

TOMASSINI, L.; FODDAI, S.; NICOLETTI, M.; GIUFFRA, S.E.; GARCIA, M.R.; BRAVOS, F.H. Iridoid glycosides from *Escallonia* species. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 21, n. 5, p. 621-623, 1993.

TANDON, J.S.; SRIVASTAVA, V.; GURU, P.Y. Iridoids: A new class of leishmanicidal agents from *Nyctanthes arbortristis*. *Journal of Natural Products*, v. 54, n. 4, pp. 1102-1 104, 1991.

TUNDIS, R.; LOIZZO, M.R.; MENICHINI, F.; STATTI, G.A.; MENICHINI, F. Biological and pharmacological activities of iridoids: recent developments. *Medicinal Chemistry*, v.8, n. 4, p. 399-420, 2008.

von POSER, G.L.; DAMTOFT, S.; SCHRIPSEMA, J.; HENRIQUES, A.T.; JENSEN, S.R. Iridoid glucosides from *Angelonia integerrima*. *Phytochemistry*, v. 46, p. 371-373, 1997.

von POSER, G.L.; SCHRIPSEMA, J.; OLSEN, C.E.; HENRIQUES, A.T.; JENSEN, S.R. 2'-Apiosylgardoside, na iridoid glucoside from *Verbenoxylum reitzii*. *Phytochemistry*, v. 49, n. 5, p. 1471-1473, 1998.

WANG, G.; TANG, W.; BIDIGARE, R.R. Terpenoids as therapeutic drugs and pharmaceutical agents. *Humana Press*, p. 197-227, 2005.

WANG, R.; YANG, J.; PENG, L.; ZHAO, J.; MU, N.; HUANG, J.; LAZAROVICI, P.; CHEN, H.; ZHENG, W. Gardenamide a attenuated cell apoptosis induced by serum deprivation insult via the ERK1/2 and PI3K/AKT signaling pathways. *Neuroscience*, v. 286, p. 242–250, 2015.

WEI, G.; WEN, X. Characteristics and kinetics of catalpol degradation and the effect of its degradation products on free radical scavenging. *Pharmacognosy Magazine*, v. 10, 2014.

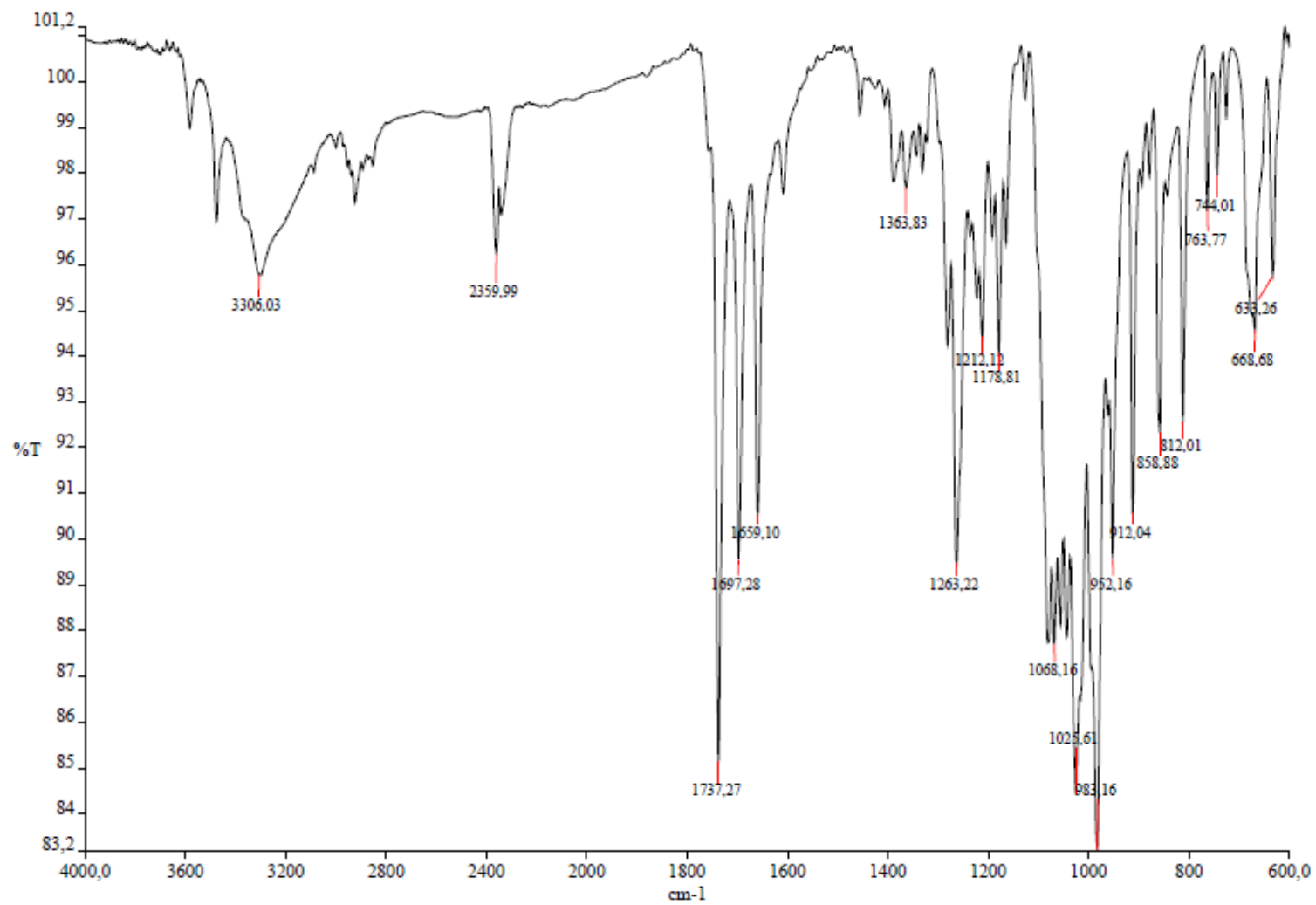
World Health Organization. Control of the leishmaniasis. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22–26 March 2010a. Geneva: World Health Organization; 2010. (WHO technical report series no. 949). Disponível em:

<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44412/1/WHO_TRS_949_eng.pdf>.

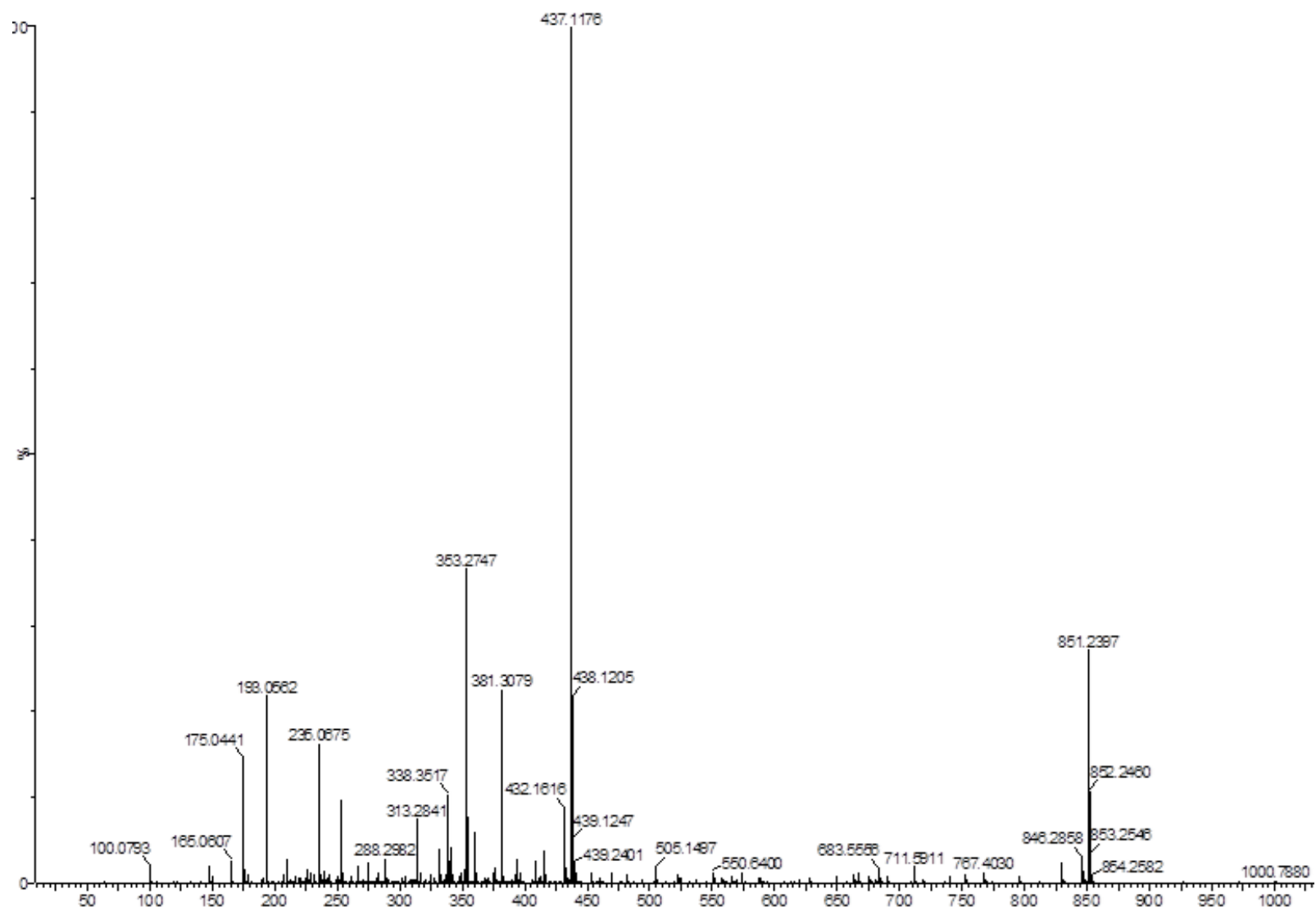
Acesso em 23 jan. 2017.

YANG, S.Y. Pharmacophore modeling and applications in drug discovery: challenges and recent advances. *Drug Discovery Today*, v. 15, n. 11-12, p. 444-450, 2010.

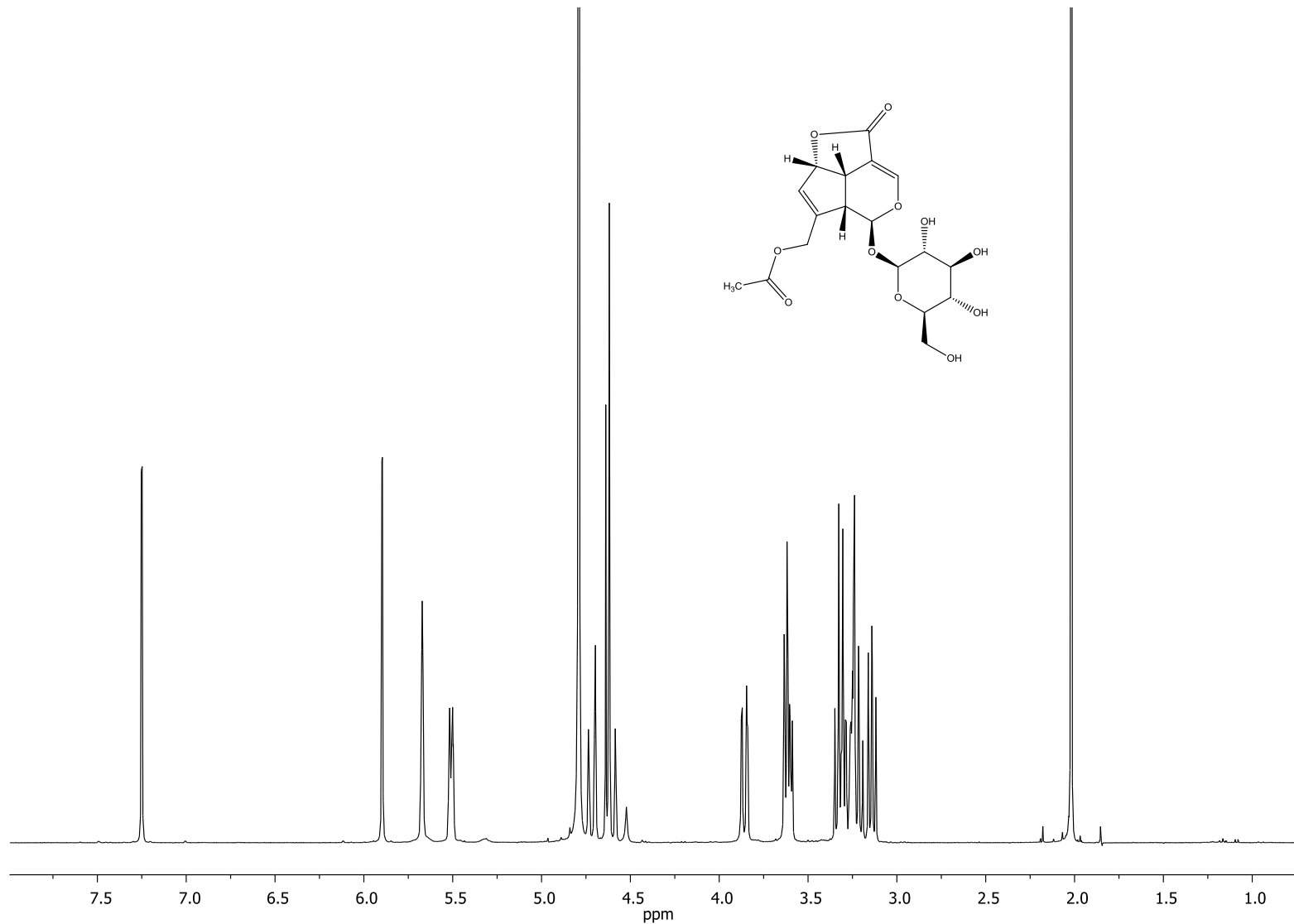
**ANEXOS: DADOS ESPECTROSCÓPICOS E
ESPECTROMÉTRICOS DE IRIDOIDES ISOLADOS DE *Escallonia*
bifida, *Escallonia megapotamica* E *Angelonia integerrima* E
ANÁLOGOS DE SEMISSÍNTESE.**



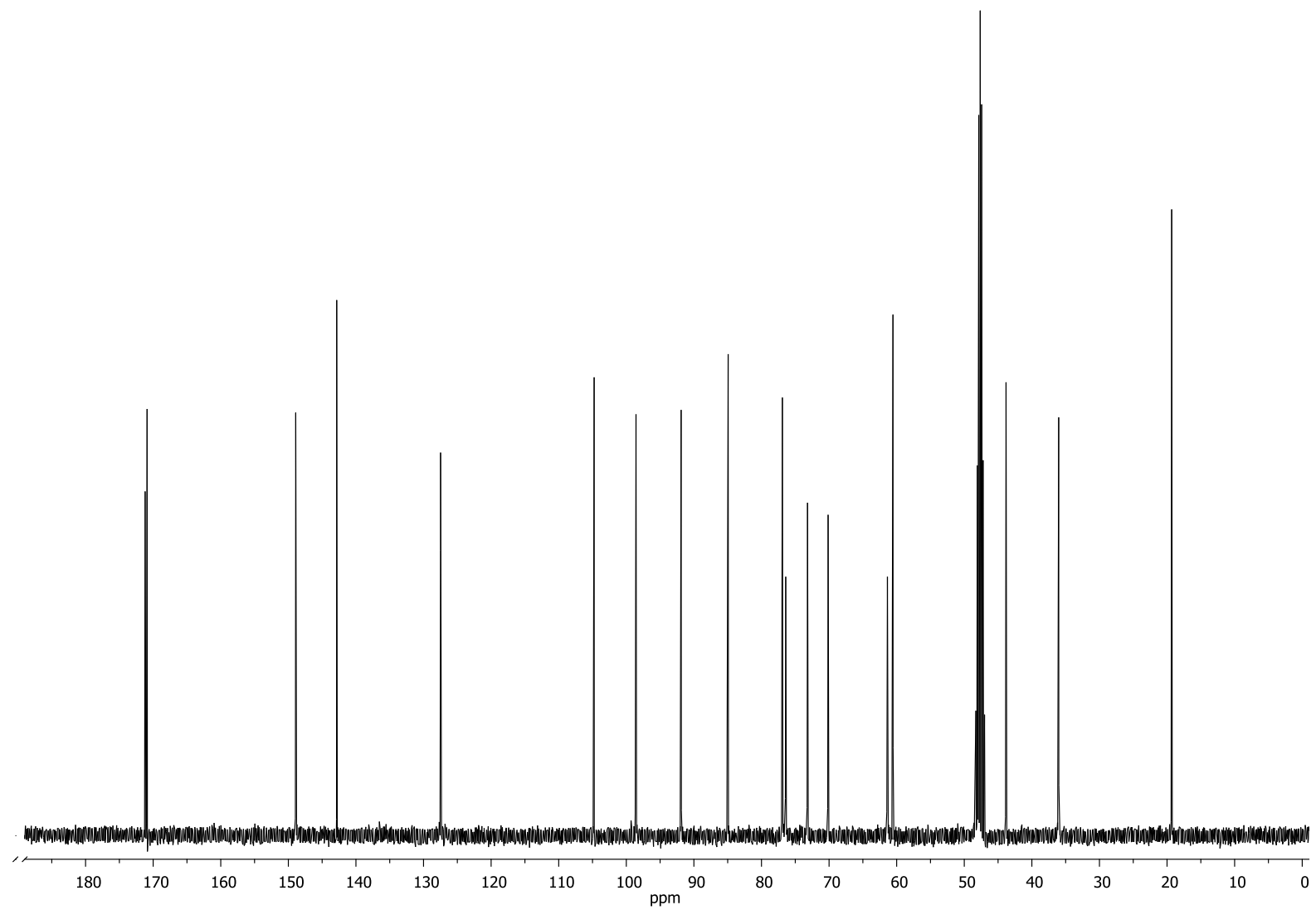
Espectro de Infravermelho de asperulosídeo (1)



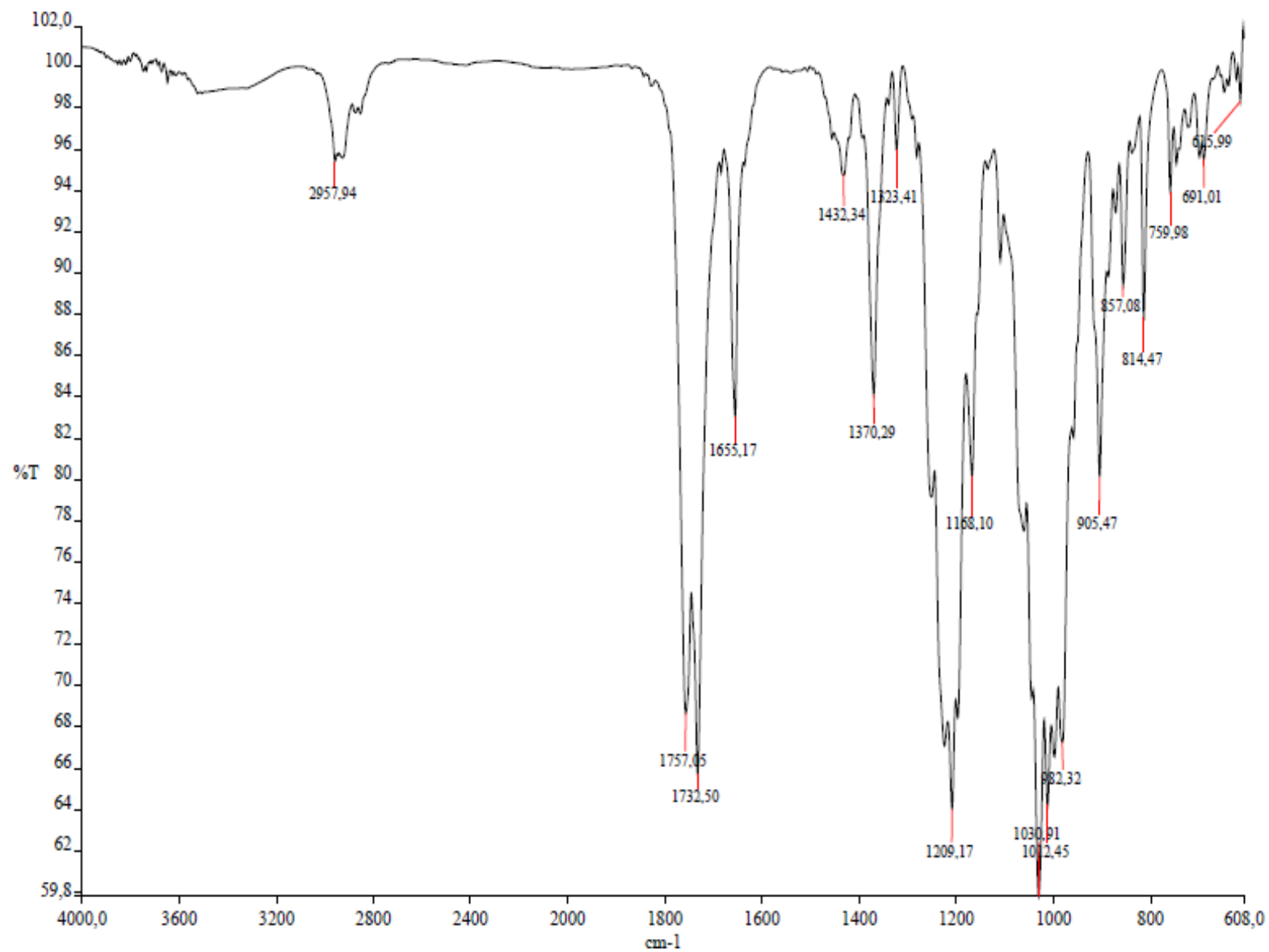
Espectro de massas do asperulosídeo (1)



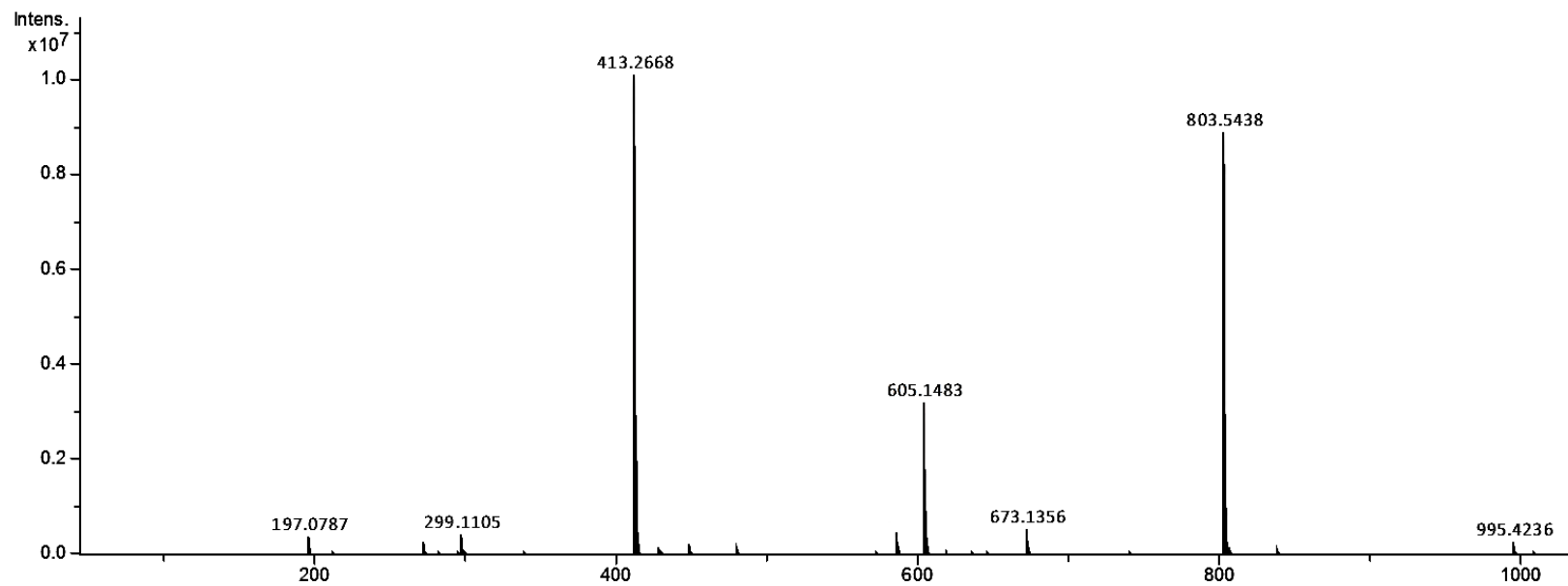
Espectro de RMN ¹H (400 MHz) de asperulosídeo (D₂O) (1)



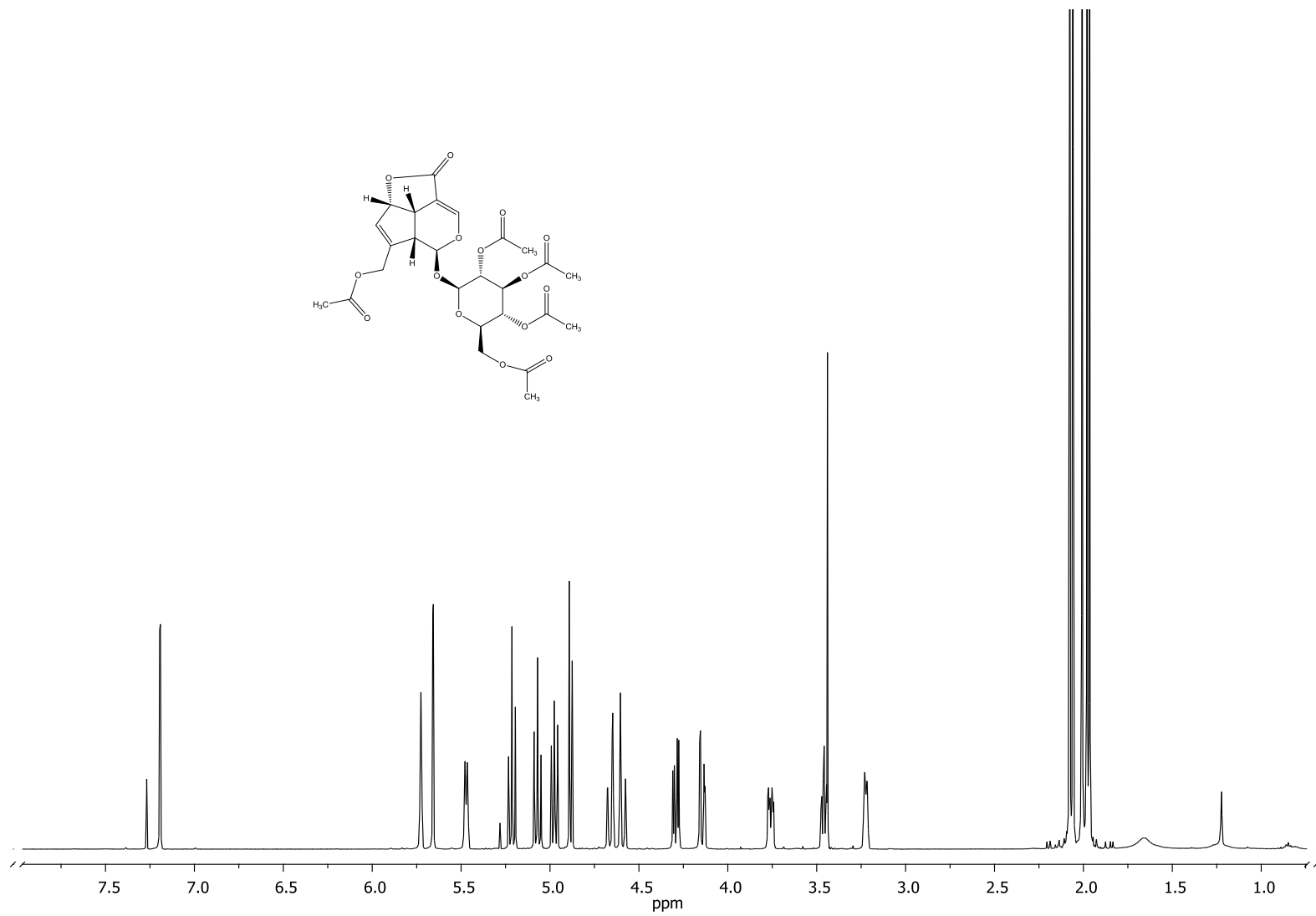
Espectro de RMN ¹³C (100 MHz) de asperulosídeo (D₂O) (1)



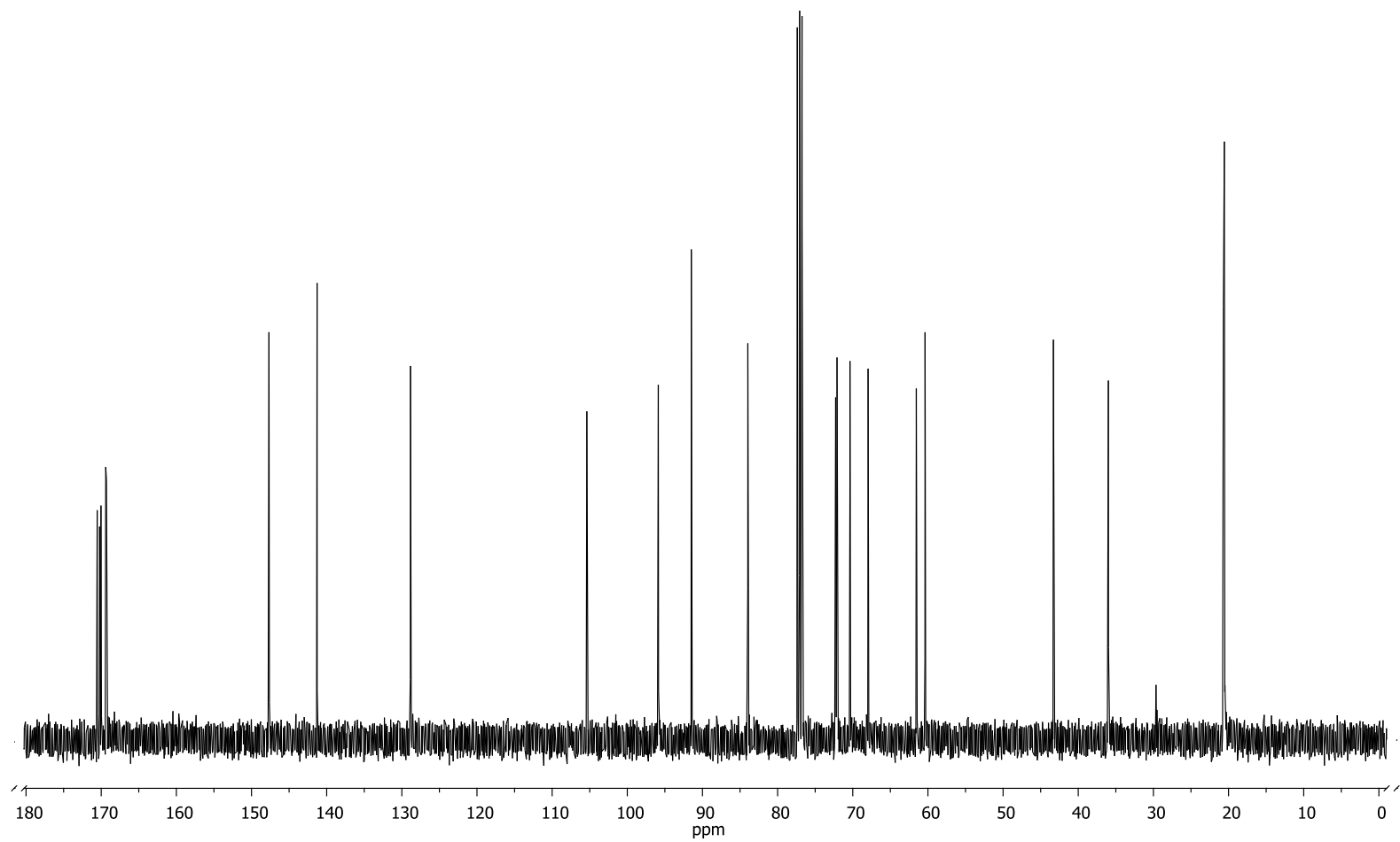
Espectro de Infravermelho de asperulosídeo tetraacetilado (6)



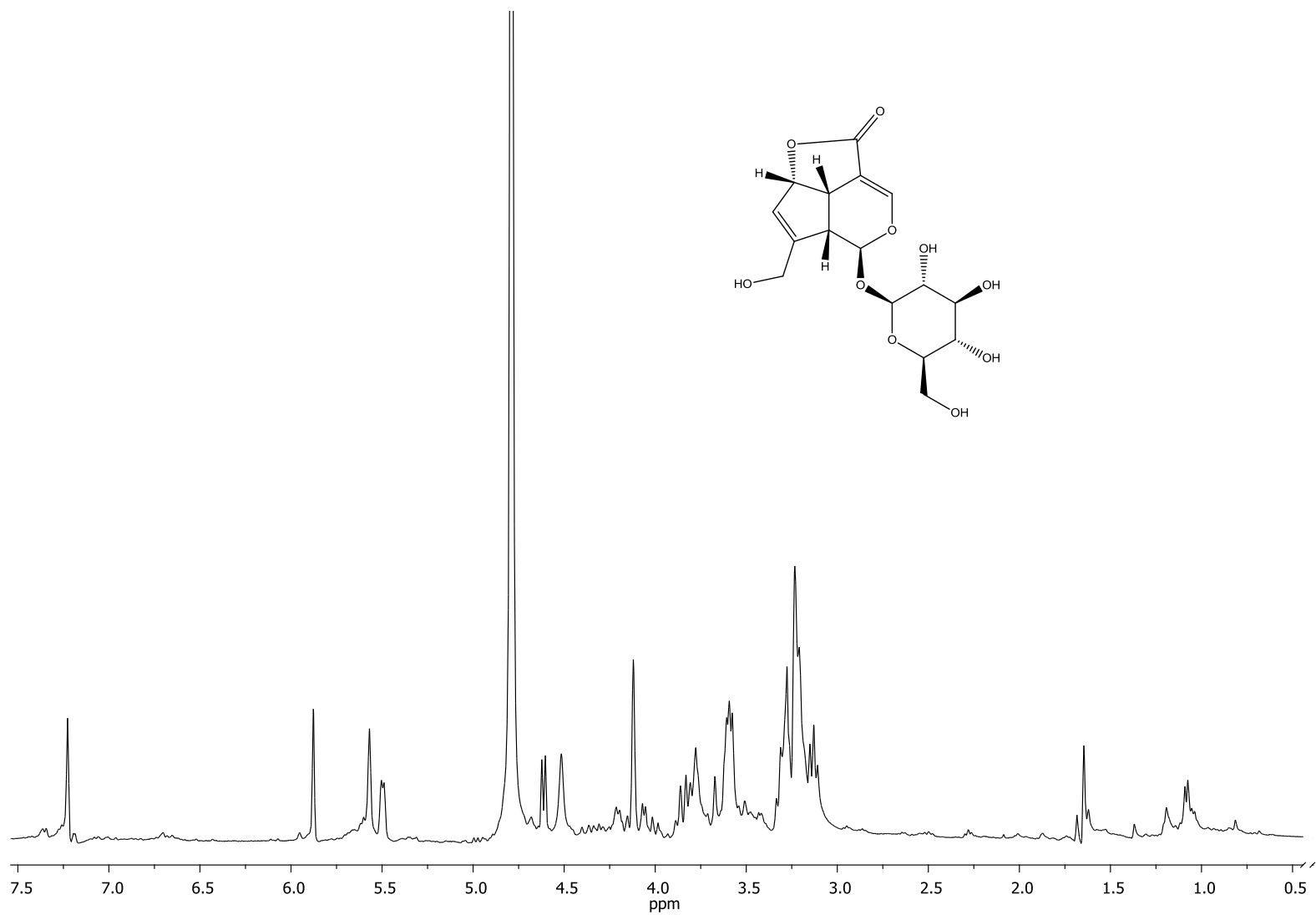
Espectro de massas do asperulosídeo tetraacetilado (6)



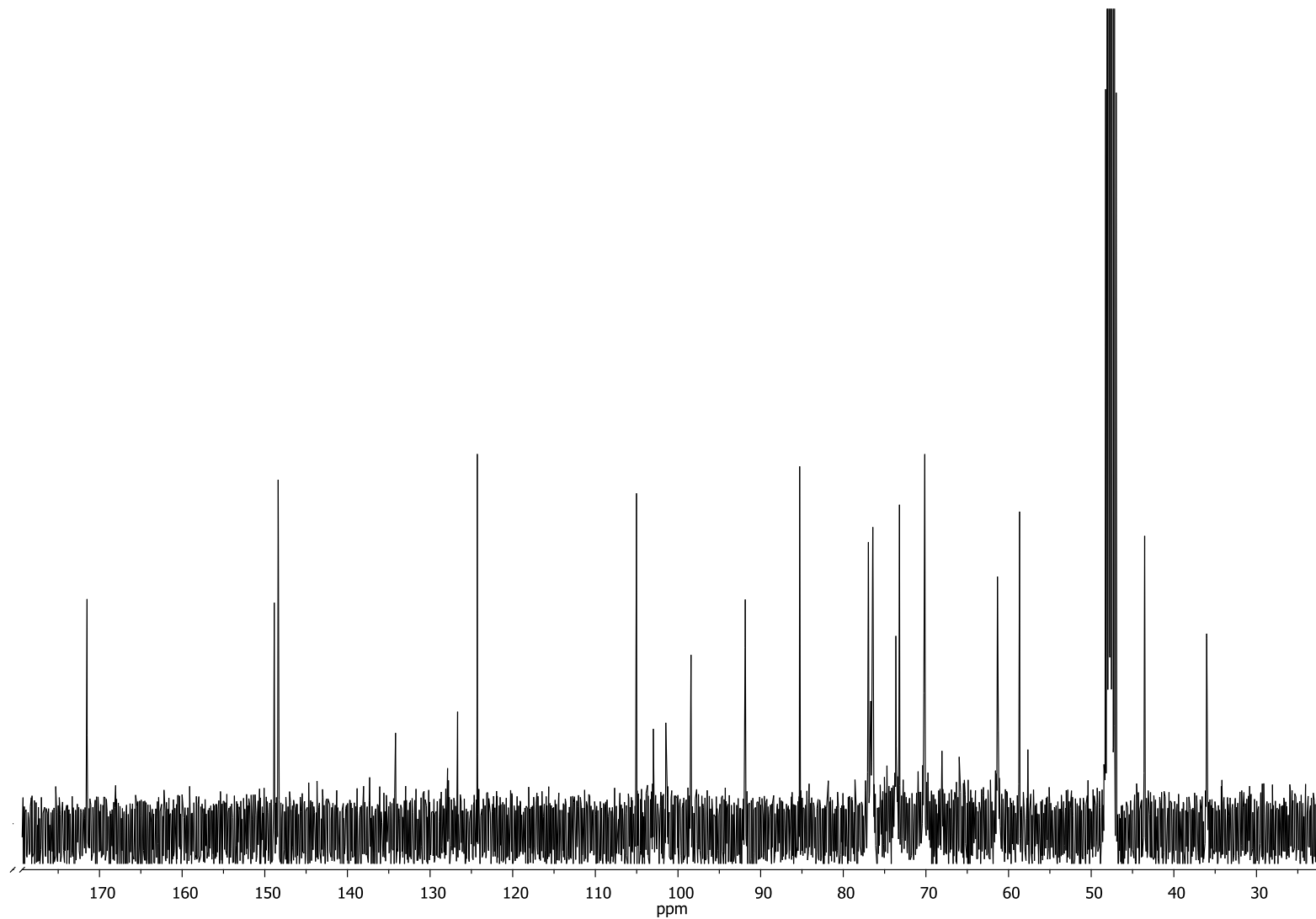
Espectro de RMN ¹H (400 MHz) de asperulosídeo tetraacetilado (CD₃O) (6)



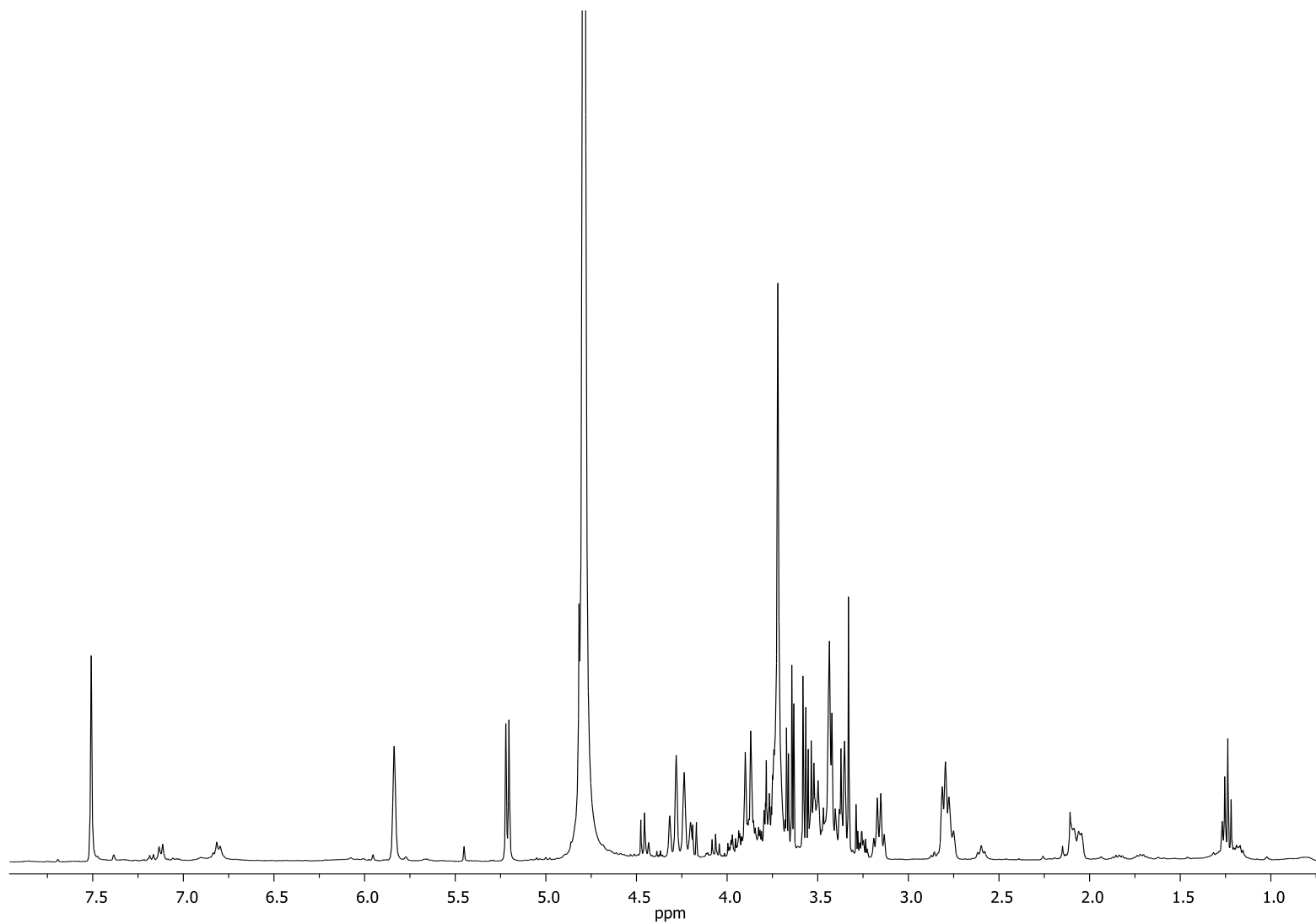
Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz) de asperulosídeo tetraacetilado (CD_3O) (6)



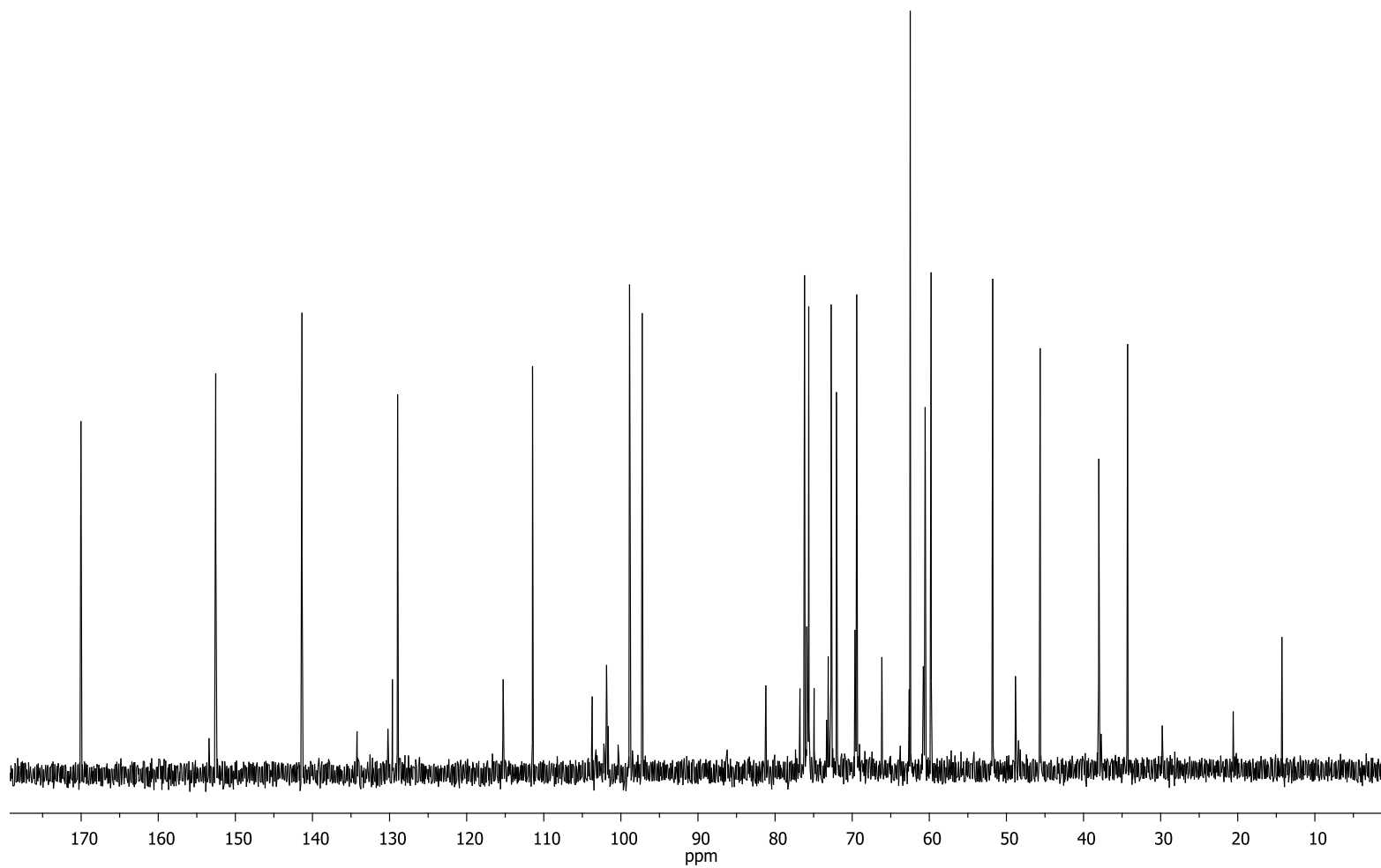
Espectro de RMN ^1H (400 MHz) de desacetilasperulosídeo (D_2O) (2)



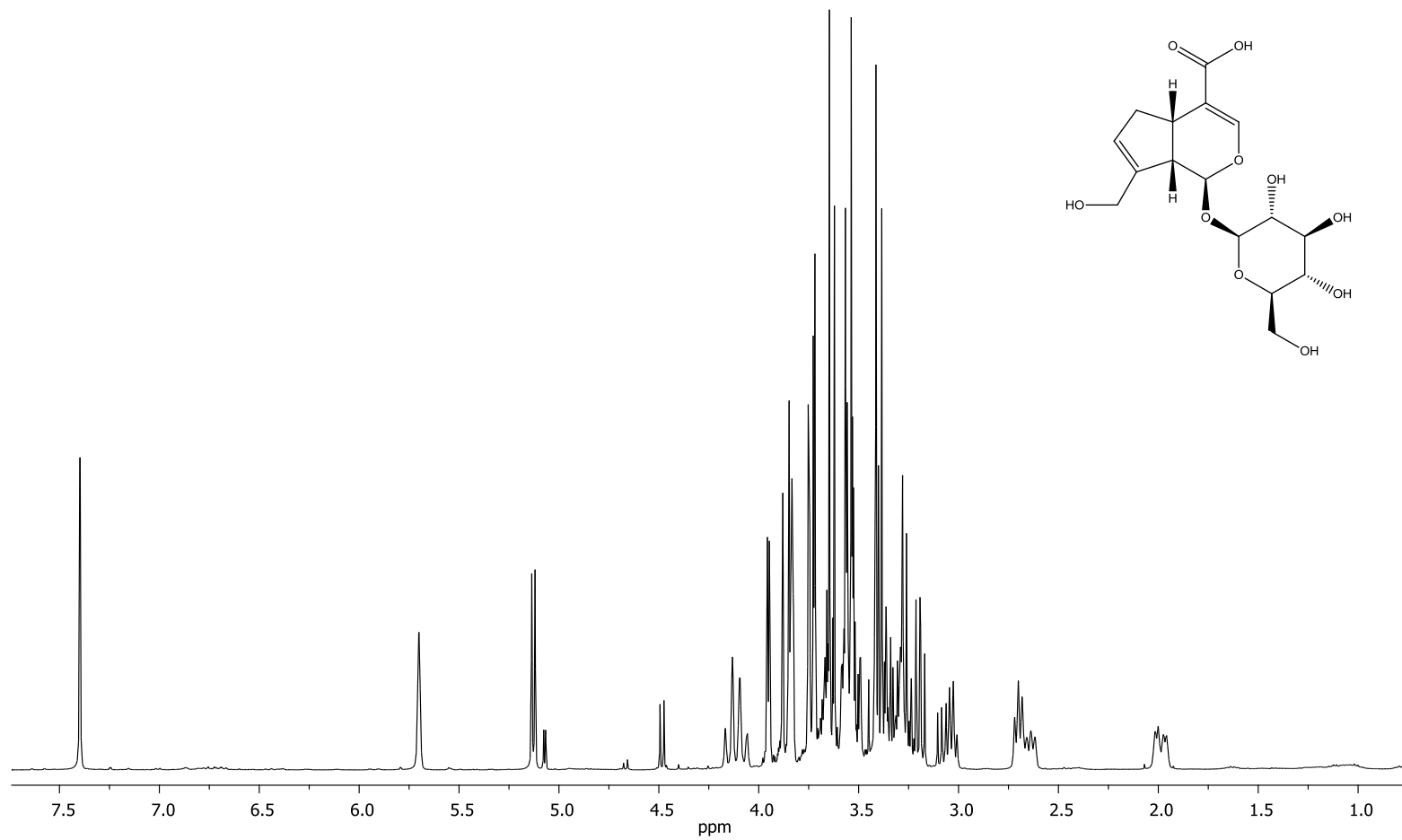
Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz) de desacetilasperulosídeo (D_2O) (2)
126



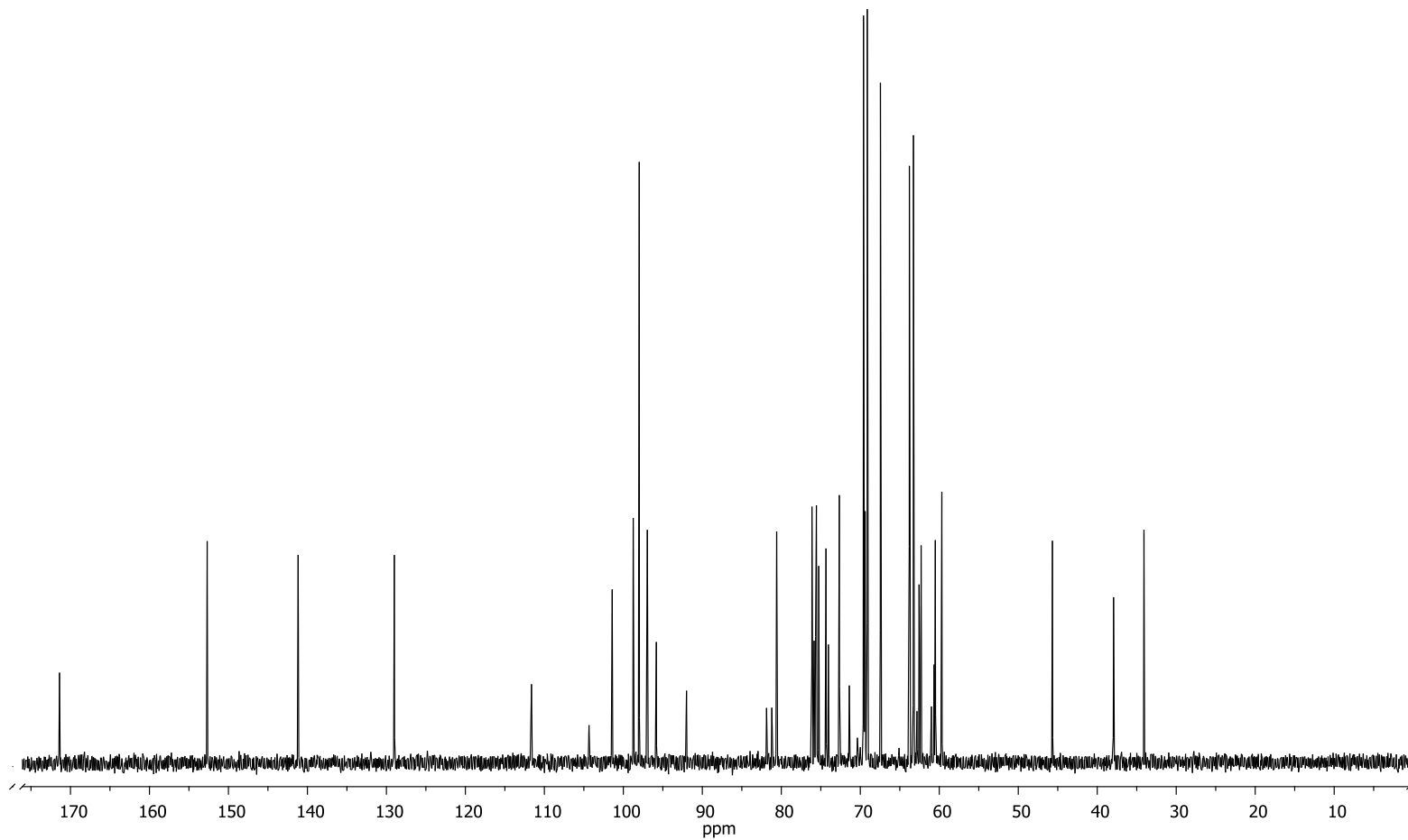
Espectro de RMN ^1H (400 MHz) de geniposídeo (D_2O) (**3**)



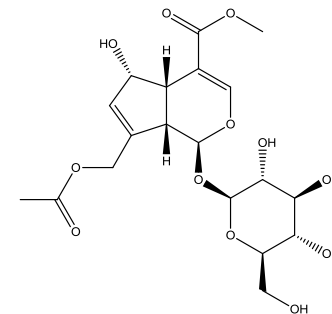
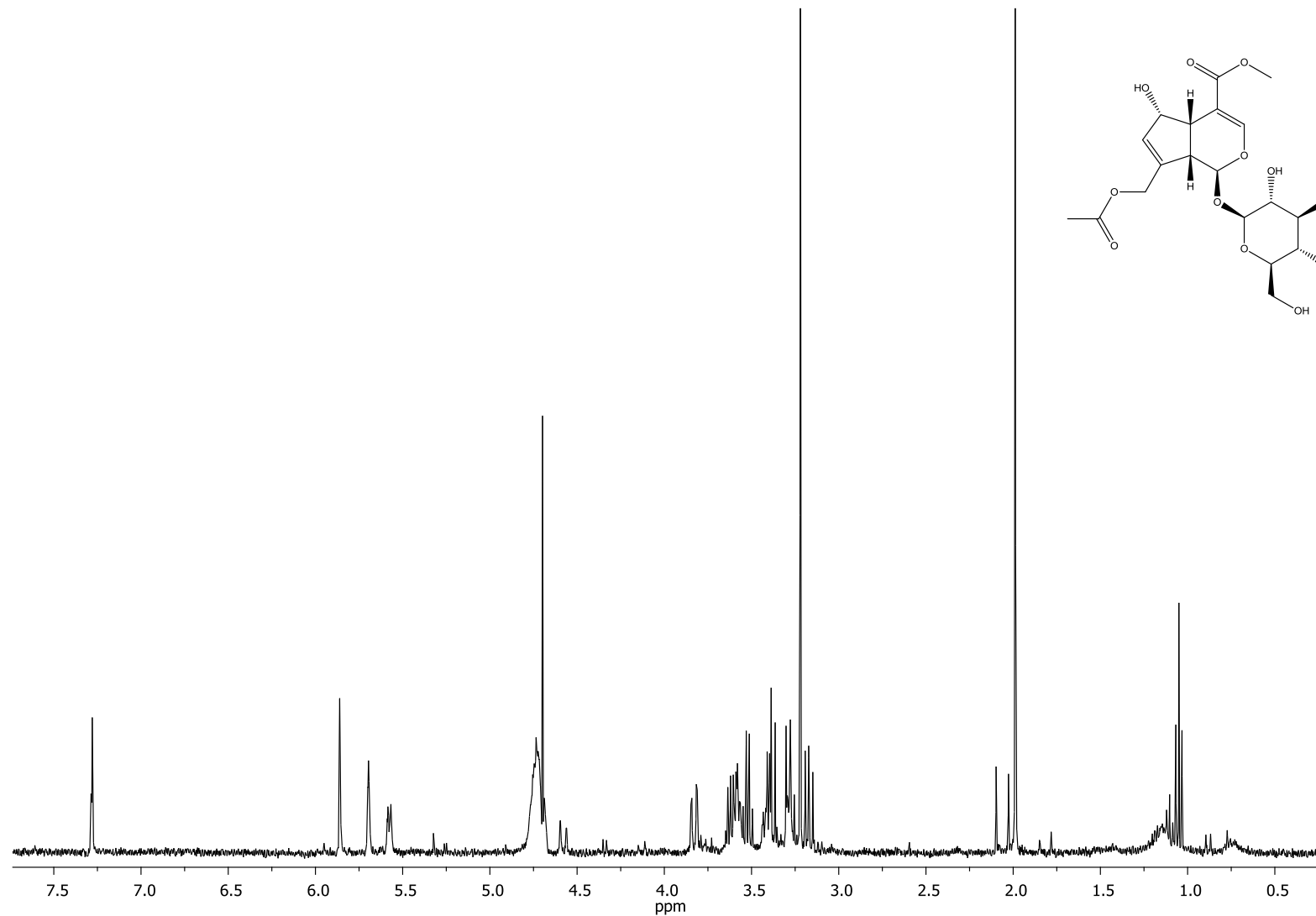
Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz) de geniposídeo (D_2O) (3)



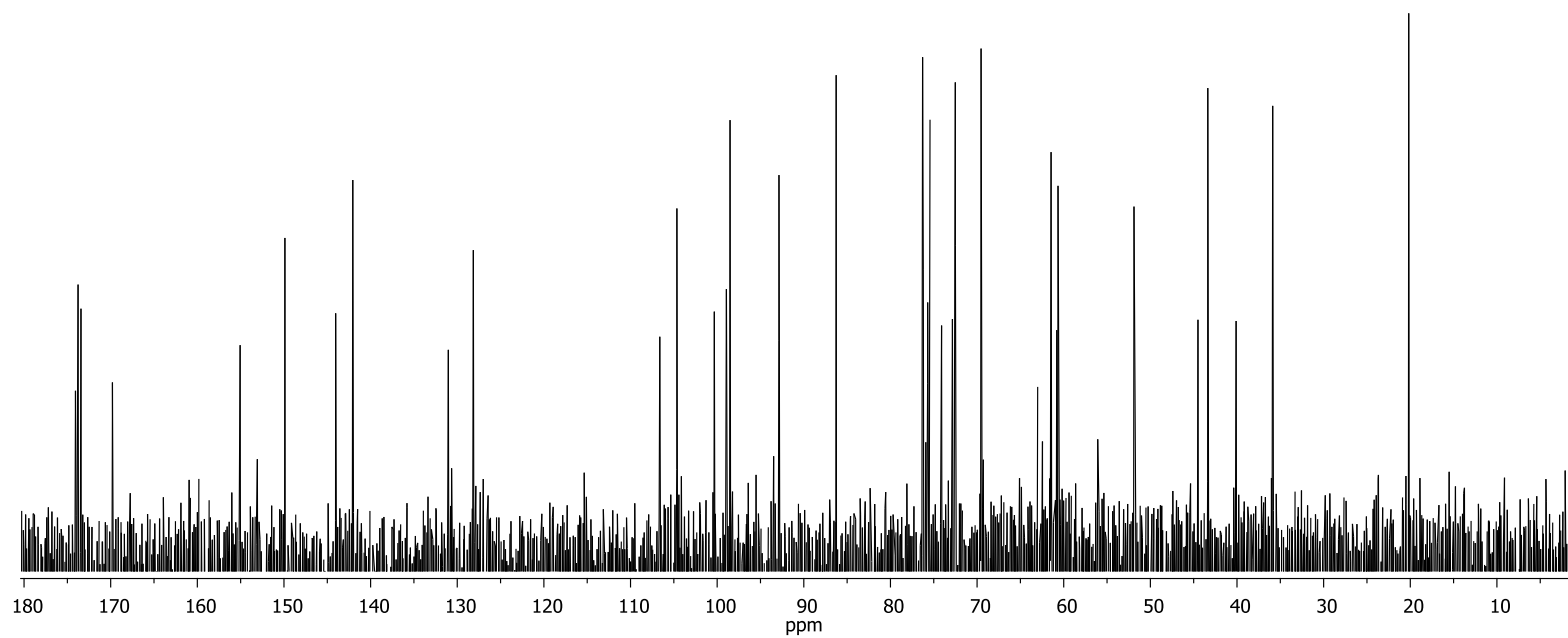
Espectro de RMN ^1H (400 MHz) de ácido geniposídico (D_2O) (4)



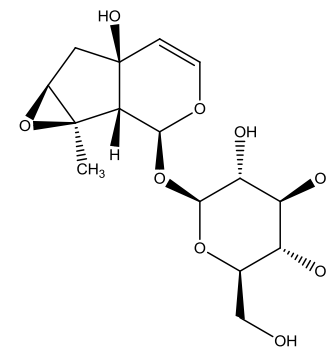
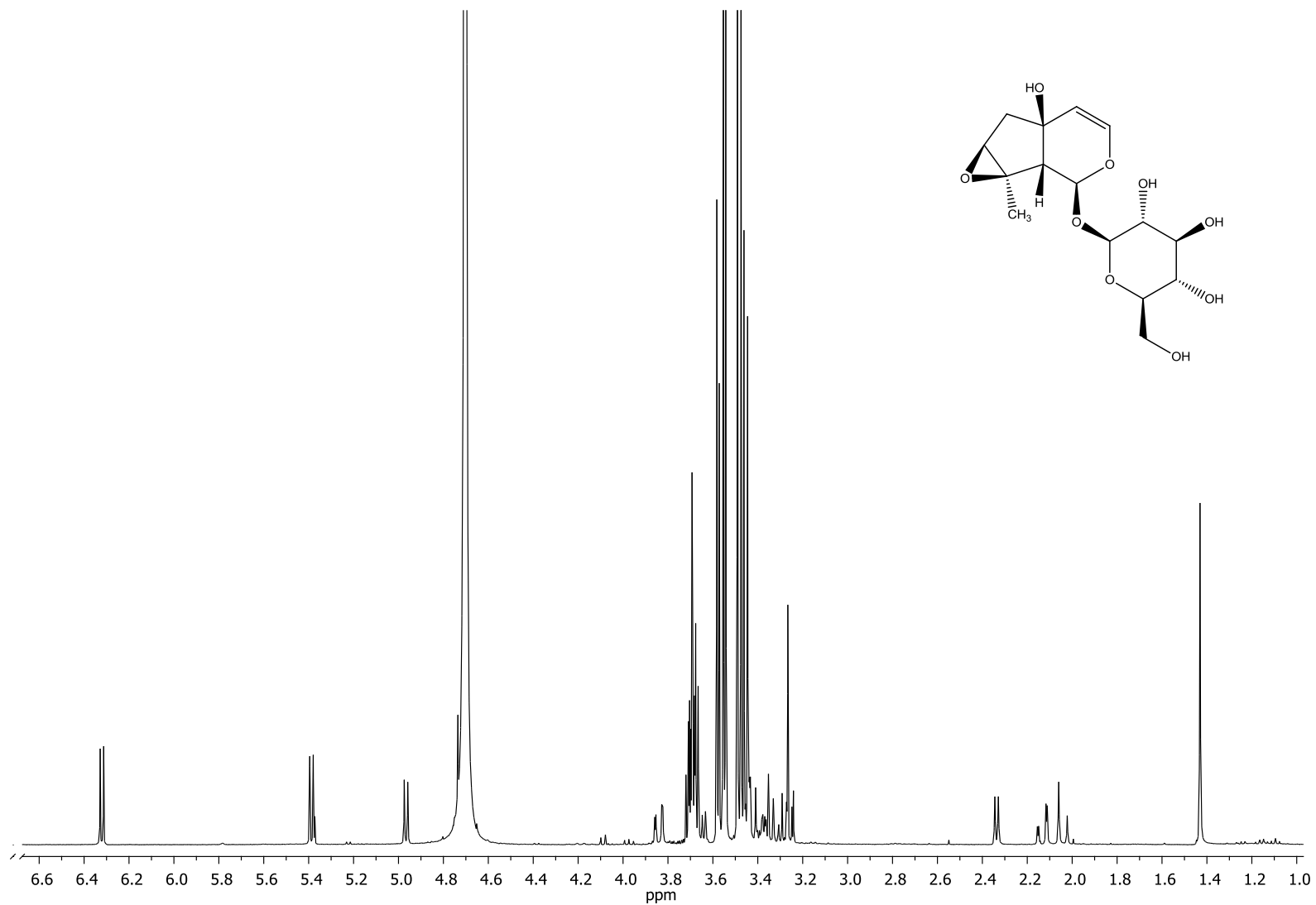
Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz) de ácido geniposídico (D_2O) (4)



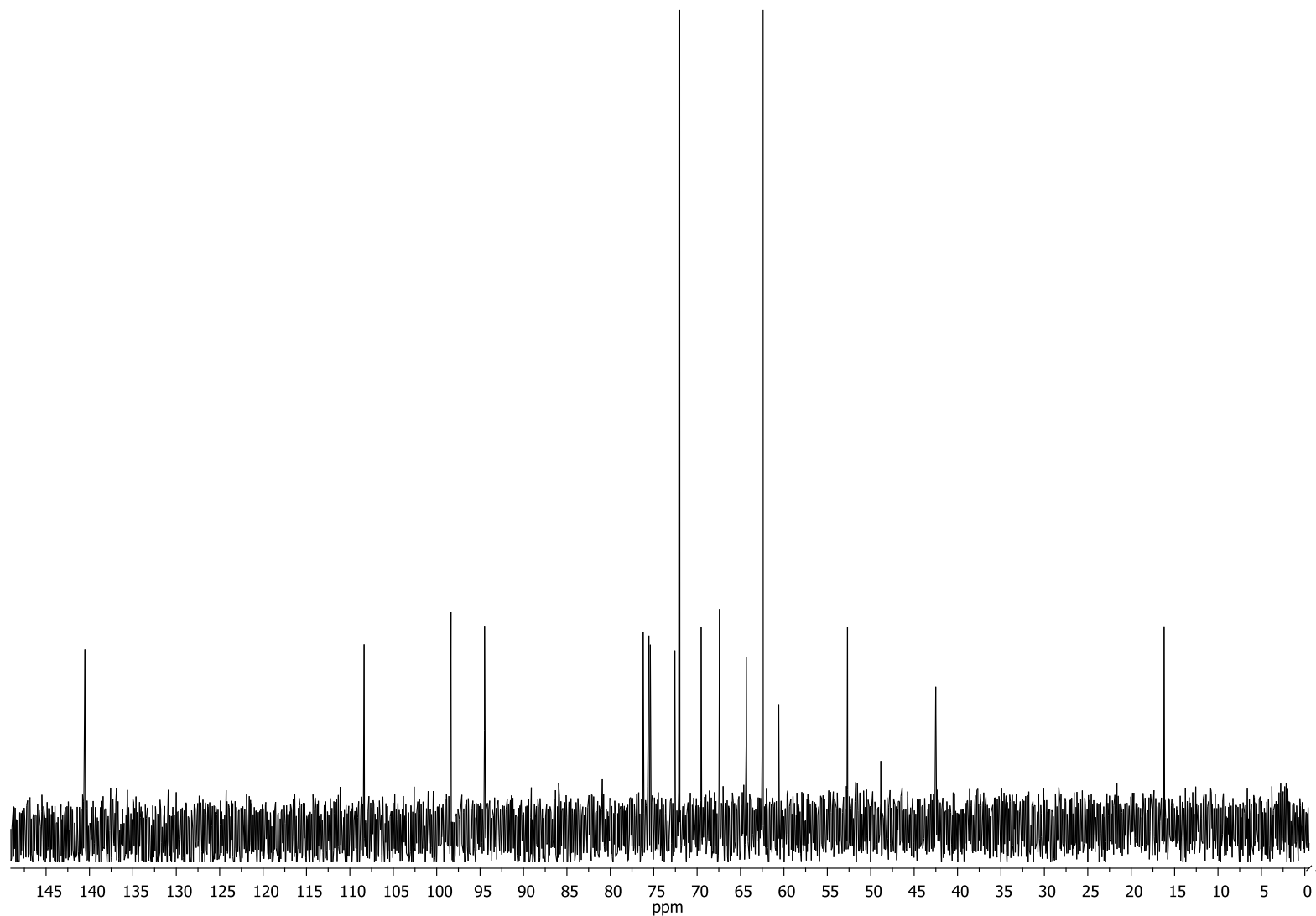
Espectro de RMN ^1H (400 MHz) de dafilosídeo (D_2O) (5)



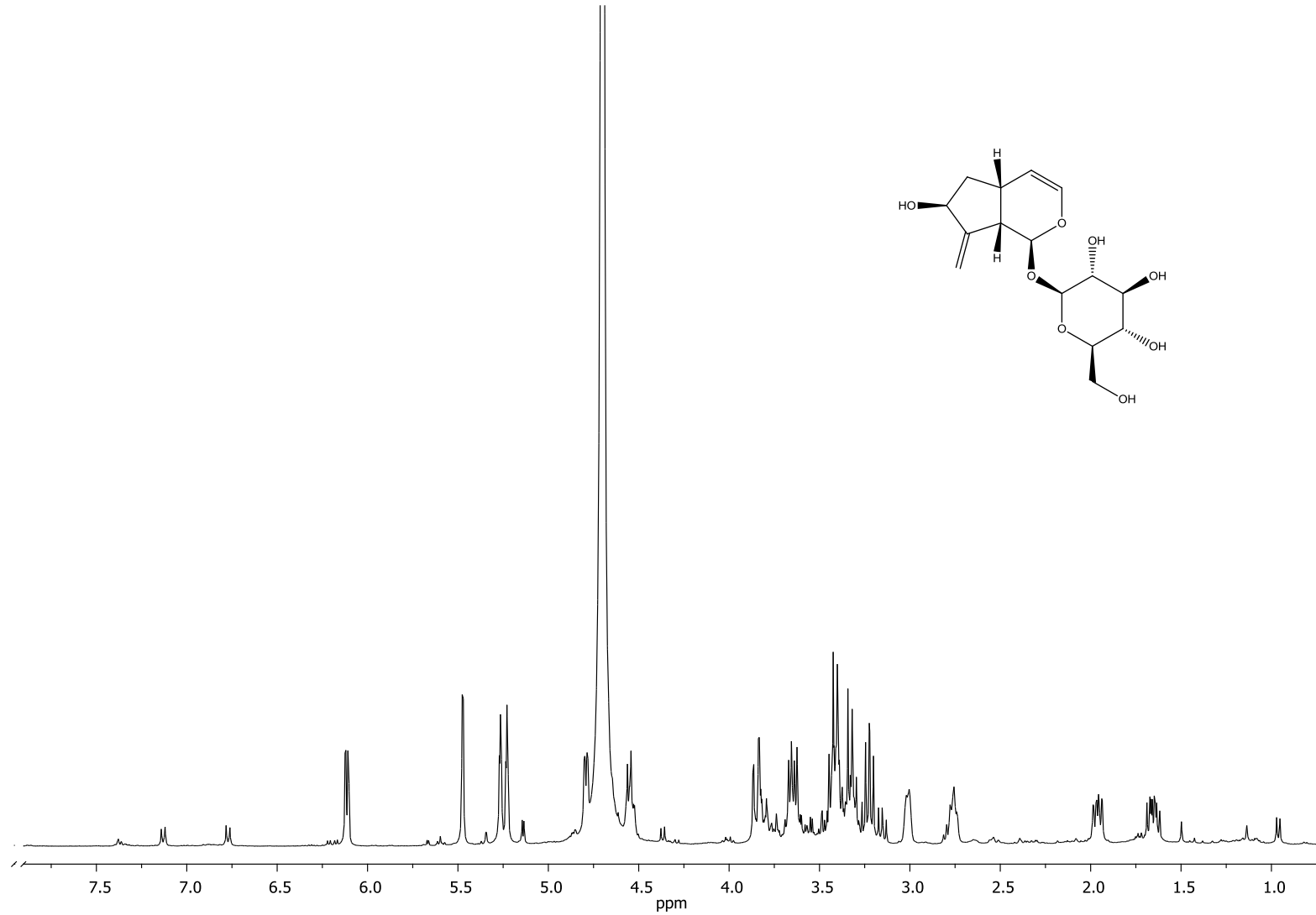
Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz) de dafilosídeo (D_2O) (5)



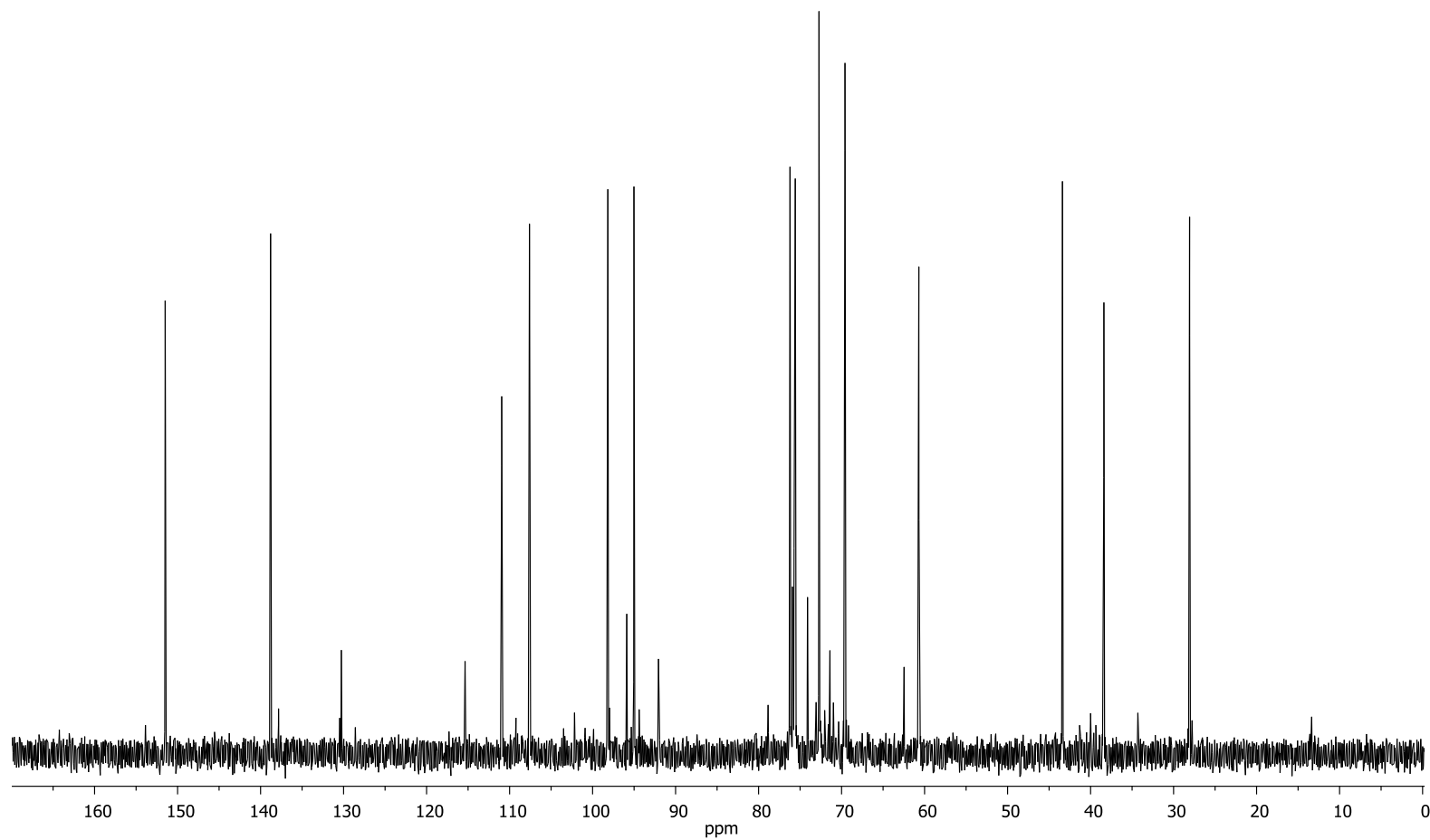
Espectro de RMN ¹H (400 MHz) de galiridosídeo (D₂O) (8)



Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz) de galiridosídeo (D_2O) (8)



Espectro de RMN ^1H (400 MHz) de antirrídeo (D_2O) (9)



Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz) de antirríoico (D_2O) (9)
136