UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

JOÃO FRANCISCO LUCON JUNIOR

Estudo da atividade inibitória de extratos vegetais, flavonoides e derivados do ácido cafeico sobre a enzima arginase de *Leishmania* (*Leishmania) amazonensis*

Versão corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo pelo programa de Pós-Graduação em Biociência Animal para obtenção de Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Bioagentes patogênicos

Orientador: Prof. Dr. Edson Roberto da Silva

Pirassununga/SP

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Serviço de Biblioteca e Informação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo

Lucon Junior, João Francisco

L941i Estudo da atividade inibitória de extratos vegetais, flavonoides e derivados do ácido cafeico sobre a enzima arginase de *Leishmania* (*Leishmania) amazonensis /* João Francisco Lucon Junior; orientador Edson Roberto da Silva. –- Pirassununga, 2016.

98 f.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos Universidade de São Paulo.

1. arginase 2. ácido cafeico 3. flavonoides 4. leishmaniose 5. produtos naturais. I. da Silva, Edson Roberto, orient. II. Título.

Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte - o autor

DEDICATÓRIA

À minha companheira Patrícia pelo pleno apoio em todos os momentos, principalmente nos de incerteza, sempre presentes na vida de quem tenta trilhar novos caminhos.

Aos meus pais João Francisco e Maria do Carmo, que dignamente me apresentaram os valores da família, da honestidade e da persistência.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Edson, o meu reconhecimento pela oportunidade de realizar este trabalho.

Aos colegas de trabalho Júlio, Marcelo, Amanda e Lindsay, que são exemplos de ética e competência profissional, o meu muito obrigado.

A realização desse trabalho só foi possível com o ajuda de diversos colaboradores. Aos funcionários do Herbário da ESALQ-USP, ao Professor Reinaldo e ao aluno Thiago de Souza Leal do Departamento de Biologia Vegetal da UNESP -Rio Claro, a professora Mariza Pires de Melo e a especialista de laboratório Silvana Pugine do Laboratório de Química Biológica da FZEA-USP, a Professora Carmem Sílvia Fávaro Trindade e ao especialista de laboratório Marcelo Thomazini do Laboratório de Produtos Funcionais da FZEA-USP que direta ou indiretamente contribuíram das mais variadas maneiras, o meu reconhecimento e gratidão.

“Gosto de ser gente porque, inacabado, sei que sou um ser condicionado mas, consciente do inacabamento, sei que posso ir mais além dele. Esta é a diferença profunda entre o ser condicionado e o ser determinado.”

Paulo Freire

Resumo

Causada por protozoários do gênero *Leishmania*, a leishmaniose é uma doença infecciosa que afeta milhões de pessoas em todos os continentes. São grandes os desafios no tratamento da leishmaniose porque os fármacos atualmente disponíveis apresentam alta toxicidade, efeitos colaterais, alto custo e resistência parasitária. Sendo assim, faz-se necessário o desenvolvimento de novas drogas para o tratamento da doença de maneira mais eficiente. A investigação de novas alternativas terapêuticas, novos alvos bioquímicos, em particular a arginase em de *Leishmania (L) amazonensis*, é considerada um alvo interessante na busca de novos compostos leishmanicidas. A via bioquímica em que está envolvida a arginase é fundamental para a manutenção do ciclo de vida do parasito, sendo responsável pela hidrólise de L-arginina em L-ornitina em mamíferos. Muitos compostos oriundos de produtos naturais tem sido relatados como inibidores da arginase de *L. (L.) amazonensis* e a presença de grupos hidroxila em suas estruturas mostraram ser importantes na atividade inibidora da enzima. O objetivo desse trabaho estudar a interação bioquímica entre a enzima arginase de *L. (L.) amazonensis*, extratos vegetais, flavonoides e derivados do ácido cafeico. O extrato acetônico de folhas de *Qualea grandiflora* apresentou maior capacidade inibitória da arginase (IC_{50} = 1,7 ± 01 µg/mL) dentre os extratos analisados. Dentre os flavonoides, o composto mais potente foi a taxifolina (IC_{50} = 1,7 ± 0,2 µM). O verbascosídeo foi o derivado do ácido cafeico com maior potencial de inibição da arginase (IC_{50} = 0,5 ± 0,2 µM). As estruturas desses compostos podem servir como referência no desenvolvimento de novas drogas para o controle da leishmaniose, que tenham como alvo a arginase.

Palavras-chave: arginase, ácido cafeico, flavonoides, leishmaniose, produtos naturais.

Abstract

Caused by protozoa of the genus *Leishmania*, leishmaniosis is an infectious disease that affects millions of people on all continents. The currently available drugs are highly toxic, expensive, have side effects and parasitic resistance and for these reasons there is a need of developing new drugs to more effective treatment of the disease. The research of new therapeutic alternatives, new biochemical targets, in particular the arginase of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* is considered an interesting target in the search for new compounds leishmanicidal. The biochemistry of arginase pathway is essential for the survival of the parasite, is also responsible for hydrolysis of L- arginine to L- ornithine in mammals. Many compounds from natural products has been reported as inhibitors of arginase *L. (L.) amazonensis*, and the presence of hydroxyl groups in their structures shown to be important for inhibitory activity of the enzyme. This work studies the biochemical interaction between the arginase enzyme, plant extracts, flavonoids and derivatives of caffeic acid. The acetone extract of Qualea grandiflora leaves showed higher inhibitory capacity of arginase (IC_{50} = 1.7 ± 01 µg/mL) from the analyzed extracts. Among the flavonoids, the most potent compound was taxifolin (IC_{50} = 1.7 ± 0.2 µM). The verbascosideo was the derivative of caffeic acid with greater potential for arginase inhibition (IC_{50} = 0.5 ± 0.2 µM) The structures of these compounds can serve as a reference in developing new drugs for the control of leishmaniosis, which target arginase.

Keywords : arginase , caffeic acid, flavonoids , leishmaniosis, natural products.

Lista de ilustrações

Figura 1 - Ciclo de vida do parasito 15
Figura 2 - Distribuição de casos de leishmaniose visceral no mundo..... 18
Figura 3 - Distribuição de casos de leishmaniose cutânea no mundo..... 20
Figura 4 - Metabolismo da L-arginina pelas vias enzimáticas de arginase e iNOS..... 26
Figura 5 - Mapa da área de Cerrado no campus da FZEA/USP..... 49
Figura 6 - *A. coriacea* - **A** - Extrato, **B** – BUF, **C** – AAF por CLAE-DAD (280 nm) 53
Figura 7 - *B. crassifolia* - **A** - Extrato, **B** – BUF, **C** – AAF por CLAE-DAD (280 nm) 54
Figura 8 - Padrão de orientina por CLAE-DAD (280 nm) 55
Figura 9 - *C. brasiliense* - **A** - Extrato, **B** – BUF, **C** – AAF por CLAE-DAD (280 nm) 56
Figura 10 - *C. pachystachya* - **A** - Extrato, **B** – BUF, **C** – AAF por CLAE-DAD (280 nm). 57
Figura 11 -. *H. obovatus* - **A** - Extrato, **B** – BUF, **C** – AAF por CLAE-DAD (280 nm) 59
Figura 12 - *Q. grandiflora* - **A** - Extrato, **B** – BUF, **C** – AAF por CLAE-DAD (280 nm) 60
Figura 13 - Curvas dose – resposta da ARG-L pelos extratos e frações de *A. coriacea*, *B. crassifolia* e *C. brasiliense* 61
Figura 14 - Curvas dose – resposta da ARG-L pelos extratos e frações de *C. pachystachya*, *H. obovatus* e *Q. grandiflora*..... 62
Figura 15 - Curvas dose – resposta da ARG-L pelos flavonoides: avicularina, guaiaverina, rutina, hiperosideo, quercetina 3 glucoronideo e rhamnetina..... 67
Figura 16 - Curvas dose – resposta da ARG-L pelos flavonoides: quercetina, luteolina 7 glucosideo, taxifolina e eriodictiol..... 68
Figura 17 – Valores médios da IC_{50} da arginase de L. (L.) amazonensis na presença de flavonoides..... 72
Figura 18 - Mecanismos de inibição da arginase por avicularina, guaiaverina, rutina, hyperosideo..... 73
Figura 19 - Mecanismos de inibição da arginase por quercetina 7-glucoronideo, rhamnetina, luteolina 7 glucosideo e taxifolina 74
Figura 20 - Mecanismos de inibição da arginase por eriodictiol e quercetina 75
Figura 21 - Curvas dose – resposta da ARG-L pelos extratos e frações de ácido cryptoclorogênico, verbascosideo e isoverbascosideo..... 75
Figura 22 – Valores médios da IC_{50} da arginase de *L*. (*L*.) *amazonensis* na presença dos derivados do ácido cafeico..... 77
Figura 23 - Mecanismos de inibição da arginase pelos derivados do ácido cafeico..... 78

Lista de tabelas

Tabela 1 – Posição geográfica dos exemplares coletados 50
Tabela 2 - Determinação de flavonoides, compostos fenólicos e DPPH..... 51
Tabela 1 - Determinação da IC50 da arginase com extratos vegetais e suas frações..... 63
Tabela 4 - Triagem de flavonoides 65
Tabela 5 - Triagem dos derivados do ácido cafeico..... 66
Tabela 6 - Flavonoides, IC_{50}, Ki e modelo de inibição..... 69
Tabela 7 – Derivados do ácido cafeico, IC_{50}, Ki e modelo de inibição..... 76

Lista de equações

Equação 1 – Índice de varredura 45

Lista de abreviaturas e siglas

µg	micrograma
ARG-L	arginase de *L. (L.) amazonensis*
CGEN	Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
CHES	2-(cyclohexylamino) ethanesulfonic acid
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
DAD	arranjo de diodos
EA	extrato acetônico
EA-AQ	extrato acetônico fase aquosa
EA-BUF	extrato acetônico fase butanólica
ELISA	Enzyme-like immunosorbent assay
eNOS	óxido nítrico sintase endotelial
FAD^+	flavina adenina dinucleotídeo
FMN	flavina mononucleotídeo
g	grama
GPS	global position system
IFI	imunofluorescência indireta
iNOS	óxido nítrico sintase induzida
LC	Leishmaniose cutânea
LV	Leishmaniose visceral
mg	miligramas
min	minuto
nm	nanômetros
nNOS	óxido nítrico sintase neuronal
NO	óxido nítrico
NOS	óxido nítrico sintase
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde
PAs	síntese de poliaminas
PCR	reação em cadeira de polimerase
pH	potencial hidrogeniônico
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação

Sumário

Lista de ilustrações 7
Lista de tabelas 8
Lista de equações 9
Lista de abreviaturas e siglas 10
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 13
1.1. O gênero *Leishmania* 13
1.2. As leishmanioses 16
1.3. A ocorrência da doença no mundo e no Brasil 17
1.4. Diagnóstico da doença 21
1.5. Fármacos utilizados no tratamento das leishmanioses 21
1.6. Metabolismo de L-arginina em *Leishmania* 24
1.7. Arginase e óxido nítrico sintetase em mamíferos 26
1.8. A relação entre a arginase e a família Trypanosomatidae 28
1.9. Produtos naturais e doenças parasitárias 30
2. ESPÉCIES VEGETAIS COM ATIVIDADE ANTI-PARASITÁRIA 31
2.1. *Annona coriacea* 31
2.2. *Byrsonima crassifolia* 31
2.3. *Caryocar brasiliense* 33
2.4. *Cecropia pachystachya* 34
2.5. *Himatanthus obovatus* 36
2.6. *Qualea grandiflora* 37
3. FLAVONOIDES E ÁCIDOS ORGÂNICOS NO CONTROLE DO PARASITA 38
4. OBJETIVOS 41
4.1. Objetivos gerais 41
4.2. Objetivos específicos 41
5.1. Compostos 42
5.2. Coleta e identificação do material botânico 42
5.3. Preparação dos extratos brutos e frações 43
5.4. Determinação do perfil cromatográfico dos extratos e frações 44
5.5. Determinação de compostos fenólicos 44

5.6. Determinação de flavonoides totais 45
5.7. Determinação de atividade antioxidante 45
5.8. Triagem e determinação da IC_{50} 46
5.9. Determinação de Ki, Ki' e mecanismo de inibição 47
5.10. Análise estatística 48
6 . RESULTADOS 49
6.1. Coleta de material 49
6.2. Determinação de compostos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante 50
6.3. Análise dos extratos brutos e frações por CLAE 51
6.4. Determinação a IC_{50} dos extratos vegetais e frações 61
6.6. Determinação das IC_{50}, Ki, e modelo de inibição. 66
7. DISCUSSÃO 79
8. CONCLUSÕES 83
9. PERSPECTIVAS 84
10. REFERÊNCIAS 85

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. O gênero *Leishmania*

Doenças infecto-parasitárias, como as leishmanioses, causadas por diversas espécies pertencentes ao gênero *Leishmania*, são responsáveis por grandes prejuízos a civilização há séculos (GONTIJO; CARVALHO, 2003).

Relatos históricos da civilização pré-inca no Peru e Equador, datadas do primeiro século d.C., evidenciam através de representações de lesões de pele e deformidades, a ocorrência da forma cutânea e muco-cutânea da doença no Novo Mundo. Alguns manuscritos dos séculos XV e XVI oriundos da civilização inca pós-invasão espanhola evidenciam úlceras na pele em trabalhadores rurais sazonais, após seu regresso à região da Cordilheira dos Andes (WHO, 2016).

Doenças que causavam desfiguração do nariz e boca eram conhecidas nesse período da história como “lepra-branca” em virtude das características similares entre as lesões. A leishmaniose era conhecida no oriente pelo termo kala azar, que significa “febre negra”, definida posteriormente como leishmaniose (WHO, 2016).

Entretanto, a primeira descrição detalhada da doença foi realizada por médico Alexander Russel em 1756, em um paciente de origem turca. No século XX, a partir de esfregaços do baço de pacientes que vieram a óbito pela doença, Leishman identificou alguns organismos, os quais classificou como tripanossomos (ROSS, 1903).

Em 1903, Donovan descreveu esses organismos como inéditos, que foram posteriormente denominados: *Leishmania donovani* (Ross, 1903). Sendo assim descrito pela primeira vez o gênero *Leishmania* (WHO, 2016) um novo organismo responsável pela doença.

O primeiro relato da doença no Brasil ocorreu em 1885, descrito por Alexandre Cerqueira na Bahia, ao identificar a enfermidade e ao suspeitar do papel dos flebotomíneos como transmissores (GONTIJO; CARVALHO, 2003). Em 1909, Lindenberg, Carini e Paranhos, a partir de observações independentes, evidenciaram a presença do parasito em lesões de pacientes no Brasil e Gaspar Vianna em 1911

sugeriu denominar o agente específico da leishmaniose tegumentar americana no Brasil como *Leishmania braziliensis* (RATH et al., 2003).

Atualmente, o gênero *Leishmania*, classificado na ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, apresenta mais de 30 espécies, das quais aproximadamente 20 causam doenças em seres humanos, conhecidas popularmente como leishmanioses (FOGANHOLI, 2011).

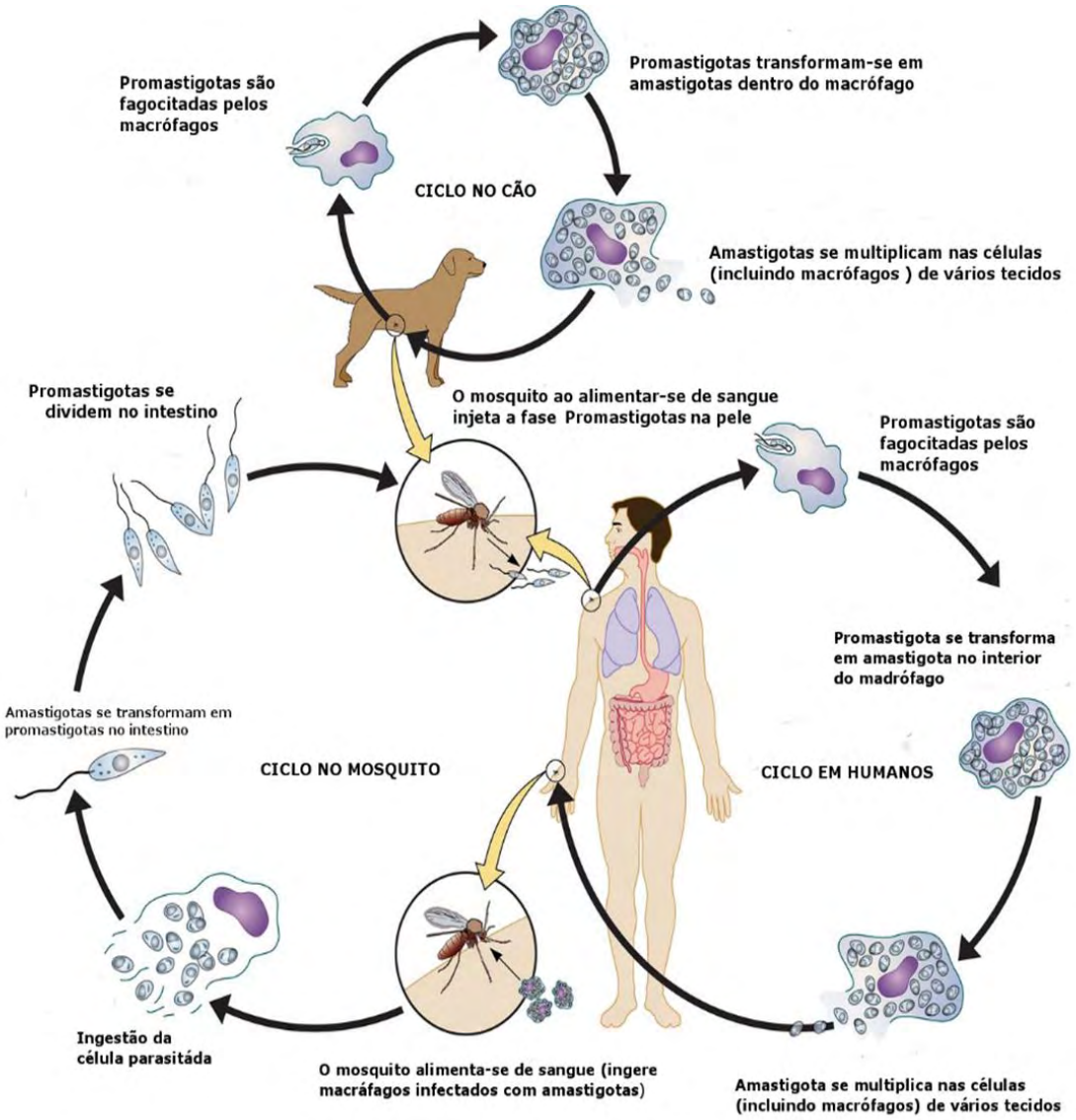
Os parasitos do gênero *Leishmania* apresentam um ciclo de vida digenético, intercalando sua vida entre hospedeiros vertebrados e insetos vetores. Esses vetores são encarregados pela transmissão dos parasitas de um mamífero a outro. Nos hospedeiros mamíferos, os parasitos se transformam na fase amastigota, que se multiplica no interior das células do sistema monocítico fagocitário (REY, 2002).

Na fase amastigota, os parasitos apresentam morfologia celular arredondada de 1,5 a 3,0 µm de largura, com flagelo muito reduzido, e são encontrados nos fagolisossomos dos macrófagos após serem fagocitados. Os parasitos se multiplicam no interior dos macrófagos por divisão binária e após a ruptura da membrana celular são liberados para serem novamente fagocitados por outros macrófagos (GONTIJO; CARVALHO, 2003).

A transmissão de todas as espécies do gênero acontece pela picada de fêmeas infectadas de dípteros de 2 a 3 mm de comprimento, pertencentes a família *Psychodidae*, sub-família *Phlebotominae*, dos gêneros *Lutzomyia* e *Phlebotomus*. Nos flebotomíneos os parasitos habitam o meio extracelular, na luz do trato digestivo onde as formas amastigotas, ingeridas durante o repasto sanguíneo realizado pelo mosquito, se diferenciam em formas flageladas, bioquímica e morfologicamente diferenciadas das amastigotas, denominadas promastigotas (KILLICK-KENDRICK et al., 1977; KILLICK-KENDRICK; RIOUX, 1991; WALTERS, 1993) com dimensões de 1,5 µm de largura e 20 µm de *comprimento* (REY, 2002).

Ao atingirem um grande número no intestino do hospedeiro, os parasitos se diferenciam em formas metacíclicas infectivas, com grande agilidade, corpo esquio e flagelo alongado, e passam a habitar as porções anteriores do estômago e ventrículo do mosquito. Na próxima alimentação do mosquito, a rejeição do material aspirado assegura a inoculação das formas infectantes em um novo hospedeiro, reiniciando o ciclo de vida do parasito (REY, 2002) ao serem inoculados na pele dos mamíferos (Figura 1).

Figura 1 - Ciclo de vida do parasito



Fonte: Esch; Petersen, 2013 – Figura modificada.

A doença é determinada a partir de lesões na pele onde ocorreu a picada do mosquito e inoculação das promastigotas infectantes, para todas as espécies de *Leishmania* causadoras da enfermidade. Na maioria das vezes, a lesão inicial é única. Entretanto, eventualmente podem ocorrer múltiplas picadas as quais ocasionam várias lesões (MARZOCHI; MARZOCHI, 1994).

1.2. As leishmanioses

A enfermidade pode apresentar manifestações clínicas e epidemiológicas diversas, que são dependentes da espécie de *Leishmania* e da relação parasita – hospedeiro (Saraiva et al., 1989). A doença foi dividida em cinco grupos principais, causada por diferentes espécies (ASHFORD, 2000):

- Leishmaniose cutânea (LC): inicialmente apresenta-se como um ferimento duradouro da picada do mosquito, e progressivamente ocorre o aumento nas lesões com formação de um granuloma no interior da lesão envolvendo a movimentação de leucócitos responsáveis pelo isolamento na área infectada, geralmente ocasionando gangrena do tecido. Essa forma da doença é frequentemente causada por *Leishmania* (*Leishmania*) *tropica*, *Leishmania* (*Leishmania*) *major*, *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis* entre outras (REY, 2002);

- Leishmaniose mucocutânea: inicia-se com a lesão da picada do mosquito e posteriormente apresentam-se lesões metastáticas nas mucosas da boca, nariz e, fortuitamente, laringe e faringe. A propagação acontece por via hematogênica e as úlceras evoluem em extensão e profundidade, ocasionando perfuração do palato ou septo e inflamação das partes moles adjacentes. Essa forma da doença é causada geralmente pela *L*. (*V.*) *braziliensis* (REY, 2002);

- Leishmaniose cutânea difusa: as lesões são nodulares e espalham-se por todo o corpo, ocorre tardiamente em pacientes tratados de leishmaniose visceral e está associada as espécies *Leishmania* (*Leishmania*) *mexicana*, *L*. (*L*) *amazonensis* e *Leishmania* (*Leishmania*) *pifanoi (*REY, 2002)*;*

- Leishmaniose visceral (LV) ou calazar: é uma zoonose caracterizada pelo envolvimento sistêmico que afeta a saúde da população em virtude da sua grande variação epidemiológica, altas taxas de letalidade em pacientes não tratados (BARATA, 2005). Começa com uma lesão no local da picada do mosquito, entretanto os parasitas apresentam tropismo em relação ao sistema fagocitário mononuclear alojando-se no fígado, baço, medula óssea e tecidos linfoides, causando mau funcionamento desses órgãos e consequentemente levando o doente a morte se não tratada. Essa vertente da doença é causada pelas espécies *Leishmania* (*Leishmania*) *donovani* e *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* (REY, 2002)*;*

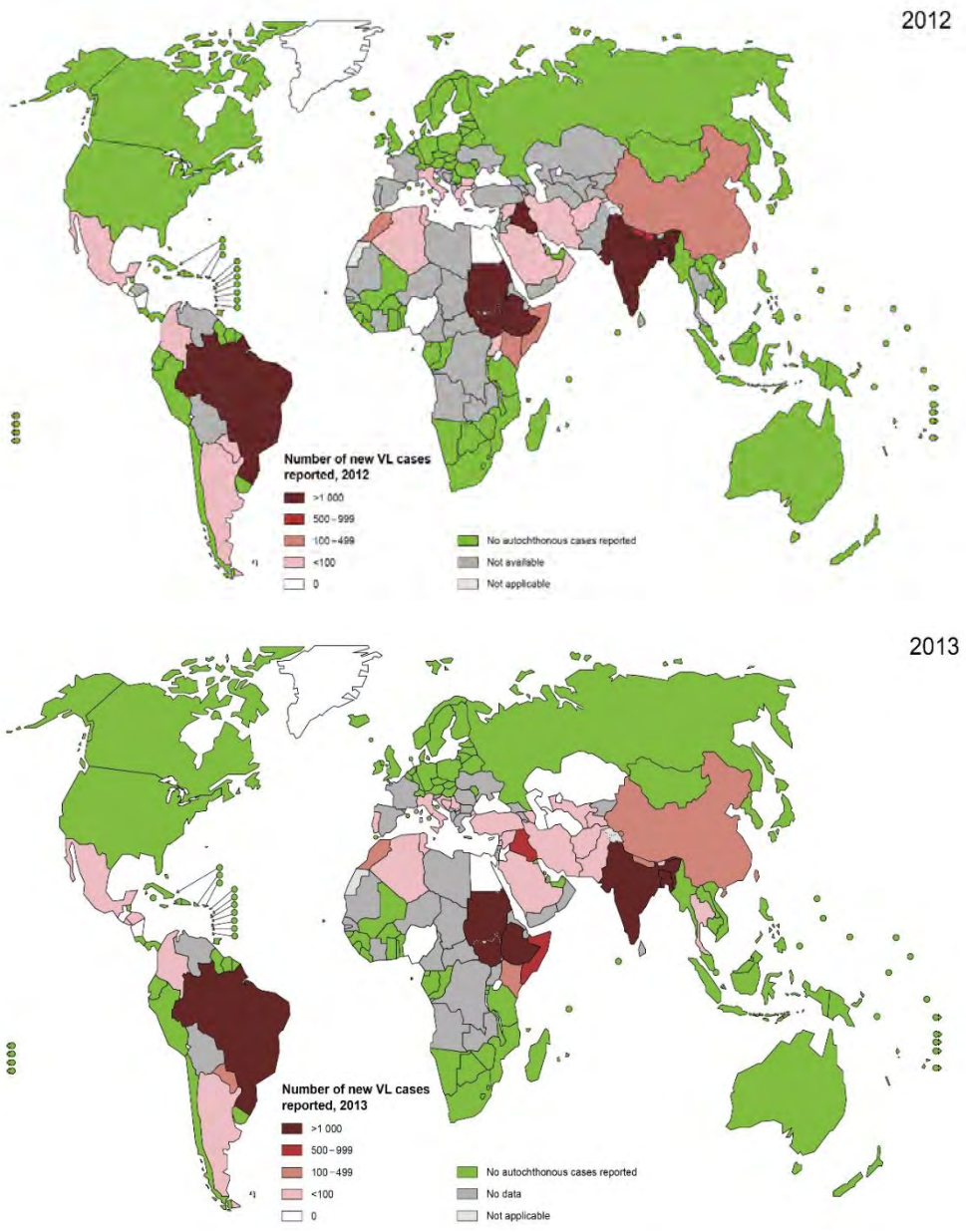
- Leishmaniose pós - calazar: sequela causada pela leishmaniose visceral, pode se manifestar após 2 anos da cura, pelo aparecimento de feridas na pele, causada pela espécie *Leishmania* (*Leishmania*) *donovani* (REY, 2002).

1.3. A ocorrência da doença no mundo e no Brasil

A Organização Mundial da Saúde (OMS) calcula que em todo o mundo existam 12 milhões de casos de leishmaniose com 60 mil mortos/ano e que 350 milhões de pessoas vivam em situação de risco de contrair a doença em 88 países. Embora sejam declarados oficialmente 600 mil novos casos/ano, acredita-se que o número de casos supere 1,5 milhão/ano. A doença é um problema de saúde pública mundial, sendo a segunda infecção mais importante causada por protozoários, ficando atrás apenas da malária (WHO, 2016).

Em 2010, a incidência mundial estimada da doença foi de 300 mil novos casos com 50 mil mortes (DE OLIVEIRA et al., 2010). Segundo a OMS, em 2012 os países que apresentaram maior incidência da leishmaniose visceral foram Brasil, Índia, Bangladesh, Iraque, Etiópia, Sudão e Uganda. Já em 2013 foram estimados 300.000 casos de leishmaniose visceral, sendo responsáveis pela morte de 20.000 pessoas em todo o mundo, observando-se um aumento nos casos de LV na China e Somália (Figura 2) (WHO, 2016).

Figura 2 - Distribuição de casos de leishmaniose visceral no mundo em 2012 e 2013



Fonte: WHO, 2016

A combinação da enfermidade com a desnutrição, o diagnóstico demorado da doença e a presença de complicações, como infecções causadas por bactérias e hemorragias, colaboram para que haja um aumento na mortalidade (COURA-VITAL et al., 2014; WERNECK et al., 2003).

A doença tem sido combatida adotando três ações básicas: o tratamento dos casos humanos, a eutanásia de animais soropositivos e o combate dos vetores, realizado com inseticidas nos domicílios em áreas endêmicas (Brasil, 2006). O sucesso nos procedimentos contra as doenças endêmicas provém, sobretudo, da

disponibilidade de recursos financeiros e impreterivelmente da compreensão das atribuições e atitudes da população em relação aos problemas importantes para que haja entendimento e participação efetiva nas medidas preventivas como: educação e participação da população no controle da doença (LUZ, 2005).

Mesmo estabelecendo protocolos específicos para o tratamento de pacientes graves no Brasil, os índices de mortalidade pela LV permanecem elevados (BRAZIL, 2011). Com o objetivo de reduzir esses índices, o Ministério da Saúde estabeleceu regras específicas pelo Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral.

As diretrizes estabelecidas abrangem o diagnóstico precoce da doença, tratamento de casos humanos, controle de vetores, triagem sorológica, eutanásia sanitária de animais infectados e educação para a saúde (BRASIL, 2006). Segundo essas diretrizes, todos os casos suspeitos e confirmados deverão ser informados às autoridades sanitárias e registrados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN).

O SINAN tem como objetivo registrar informações coletadas pelos sistemas de vigilância epidemiológica municipais, estaduais e federal e após o tratamento desses dados, contribuir com informações sobre a morbidade e mortalidade em todo o país causada pela doença. Essas informações contribuem para a consolidação de dados da Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) e a OMS (ALVAR et al., 2012).

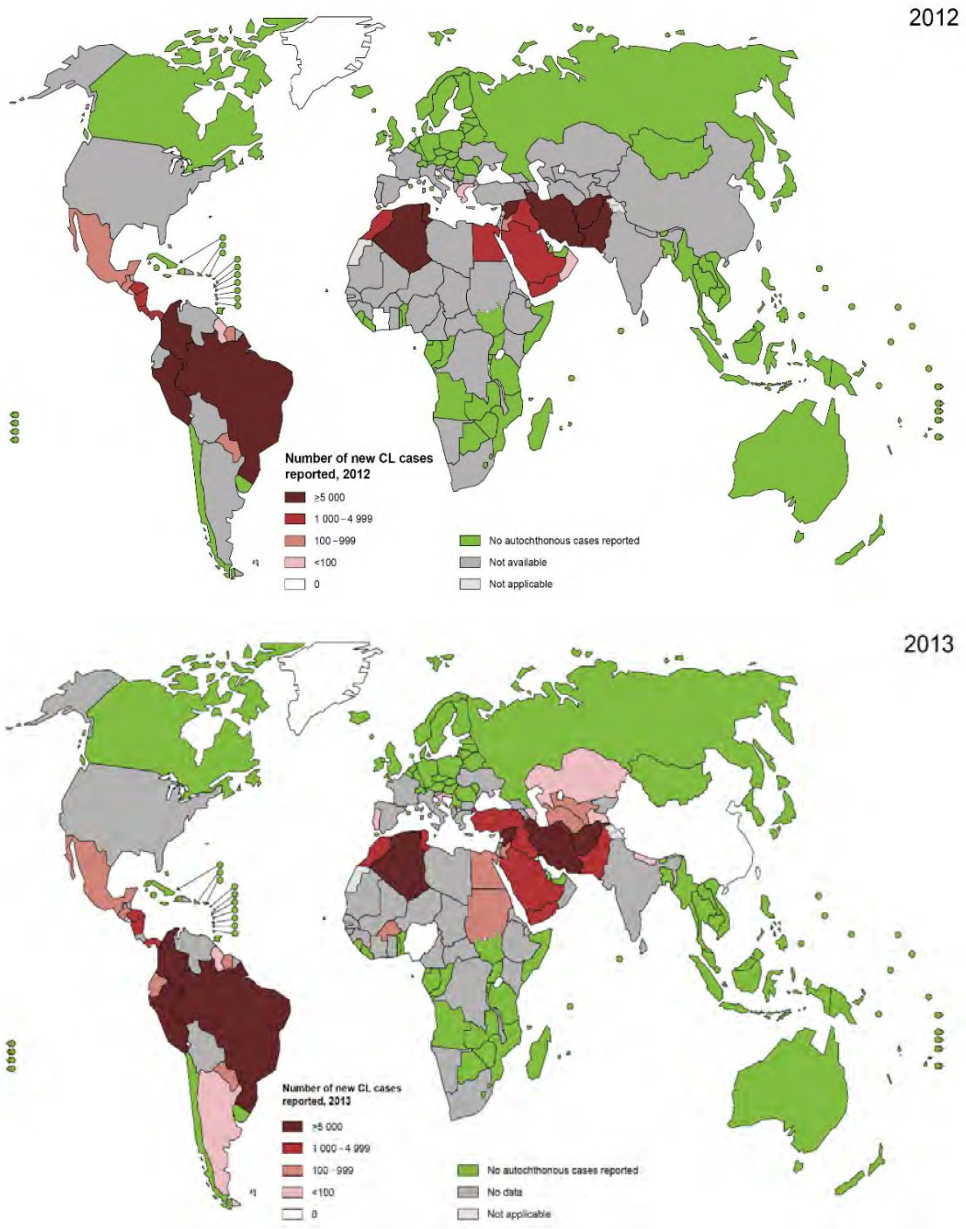
O número de casos de leishmaniose cutânea (LC) em todo o planeta é de aproximadamente 1 milhão de pessoas nos últimos cinco anos e aproximadamente 310 milhões de pessoas encontram-se em situação de risco, podendo contrair a doença. Segundo a OMS, em 2012, Brasil, Peru, Colômbia, Argélia, Tunísia, Síria, Irã, Afeganistão e Paquistão apresentaram maior incidência de casos de leishmaniose cutânea no mundo. Em 2013, apenas no Paquistão houve uma redução no número de casos (Figura 3) (WHO, 2016).

No Brasil, os principais causadores da doença são as espécies *L. (L.) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) brasiliensis***,** que apresentam ocorrência em todo o país (MARZOCHI & MARZOCHI, 1994). Na década de 80, no Brasil, o número de novos casos de leishmaniose cutânea informados foi 3 mil, entretanto, em 1995, o número de casos informados foi de aproximadamente 36 mil (BRASIL., 2007).

O aumento no número de casos da doença no Brasil, que se limitava a áreas rurais e a pequenas localidades urbanas, nas últimas décadas atingiu grandes centros urbanos indicando a dispersão da doença em todo o território nacional. Essa

afirmação se fundamenta em notificações de 26 estados da federação com aproximadamente 40 mil casos confirmados da doença entre 2001 e 2011, com média anual de 3.616 novos casos, uma taxa de incidência de 2 casos por 100 mil habitantes, com taxa de mortalidade de 6,5% nesse período (BARATA, 2005).

Figura 3 - Distribuição de casos de leishmaniose cutânea no mundo em 2012 e 2013



Fonte: WHO, 2016

1.4. Diagnóstico da doença

A identificação da doença é realizada considerando o histórico do paciente, exame dermatológico e a positividade de, pelo menos, dois exames específicos. A análise de amastigotas deve ser realizada a partir de esfregaço, cultura para *Leishmania*, análise histopatológica dos ferimentos, reconhecimento de *Leishmania* utilizando reação em cadeia de polimerase (PCR) e anticorpos monoclonais (SAMPAIO et al., 2009).

As técnicas para determinação de anticorpos circulantes geralmente utilizados no diagnóstico são: imunofluorescência indireta (IFI), ensaios imunoenzimicos como ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) e immunoblotting, além de ensaios de aglutinação direta e citometria de fluxo (TANNUS, 2007).

O diagnóstico da doença também pode ser realizado a partir de hemograma e dosagem de proteínas, porque, dependendo da manifestação clínica da doença, pode ocorrer a redução no número total de hemácias, leucopenia com linfocitose relativa e plaquetopenia, assim como alteração na relação albumina/globulina (RATH et al., 2003).

1.5. Fármacos utilizados no tratamento das leishmanioses

A utilização de compostos a base de antimônio na medicina, como por exemplo o tártaro emético, é conhecida desde os tempos antigos. Embora considerados eficazes na antiguidade, os compostos a base de antimônio apresentavam efeitos tóxicos e graves efeitos colaterais como: efeitos cardiotóxicos e problemas gastrointestinais. Os antimoniais trivalentes, gradativamente, foram substituídos por compostos estibiados pentavalentes.

O desenvolvimento do primeiro composto baseado em antimônio pentavalente, denominado ureia estibamina, ocorreu na década de 20 do século passado. Em 1936, Schmidt introduziu ao tratamento da doença o composto gluconato de antimônio (V)

sódico, comercialmente denominado como Solustibosan® (Bayer) ou Pentostam® (Glaxo Wellcome) (RATH, et al., 2003).

Na década de 40, um medicamento alternativo foi desenvolvido na França, o antimoniato de N-metil glucamina, comercialmente conhecido como Glucantime® (Rhône-Poulenc-Rohrer) ou antimoniato de meglumina. Estudos no Quênia sobre a viabilidade de comercialização do medicamento gluconato de antimônio (V) sódico a custos mais baixos mostraram que o fármaco genérico era viável e possibilitaria o tratamento de maior número de pacientes com leishmaniose visceral na África (MOORE et al., 2001).

O medicamento a base de antimônio no Brasil, para o tratamento da leishmaniose, é o antimoniato de metilglucamina, sendo responsável pela regressão rápida das manifestações clínicas e hematológicas, assim como eliminação do parasito, sendo extremamente eficaz nos casos de leishmaniose visceral, cutânea e mucocutânea. A OMS indica que as doses de medicamentos à base de antimônio não ultrapassem 20 mg/kg/dia em virtude de sua toxicidade, podendo causar mialgias, alterações hepáticas, nefrites, distúrbios gastrointestinais, cardíacos e respiratórios dores abdominais e alterações cardiológicas (RATH et al., 2003).

Os tratamentos descontínuos da doença provocaram o aumento nas formas resistentes do parasito (BALANA-FOUCE, 1998). A absorção do antimoniato de metilglucamina é rápida e sua excreção pelos rins é praticamente total em aproximadamente 48h e, por esse motivo, as doses precisam ser elevadas e contínuas. (RATH et al., 2003).

Embora o antimoniato de metilglucamina seja utilizado por mais de meio século no tratamento da doença, sua estrutura e composição, igualmente ao gluconato de antimônio (V) sódico, ainda permanecem indeterminadas. Segundo Roberts; McMurray e Rainey (1998) a razão molar antimônio:N-metil-D-glucamina é 1:1,37 e várias espécies complexas entre N-metil-glucamina e antimônio coexistem em solução. Foram observados oligômeros, sendo a maior massa molar detectada de 507 uma.

Entretanto, não são apenas os antimoniais as drogas utilizadas no tratamento das leishmanioses. Outros fármacos se destacam como a anfotericina B, pentamidina, paromomicina e o miltefosina (RATH, et al., 2003).

A descoberta da ação quimioterápica dos compostos do grupo das diamidas, do qual é integrante a pentamidina, foi completamente ocasional. A pentamidina

também é eficaz no tratamento de tripanossomíase gambiense ou rodesiana (DOUA, 1996).

Comercialmente conhecida como Lomidina®, a pentamidina é um medicamento controlado e fornecido apenas pelos serviços de saúde oficiais nos Estados Unidos. Nos casos de leishmaniose visceral (*L. donovani*), o tratamento realizado utilizando o medicamento apresentou resultados satisfatórios (12 a 15 doses). A pentamidina é uma substância especialmente conveniente em casos que não respondem aos antimoniais, ou para doentes que apresentem sensibilidade a essas drogas. A pentamidina apresenta alta toxicidade e pode causar: hipoglicemia, hipotensão, alterações cardiológicas e nefrotoxicidade (BALANA-FOUCE et al., 1998).

A anfotericina B é um antifúngico indicado para o tratamento da manifestação mucocutânea americana da doença, entretanto não é considerado um fármaco de primeira escolha. Essa droga age em lipossomas carregadores sendo absorvida pelo sistema reticulo-endotelial onde o parasito habita, e é pouco absorvido pelos rins (RATH et al., 2003).

Estudos iniciais demonstram que o Ambisome™ é consideravelmente menos tóxico quando comparado a anfotericina B e que provou ser eficaz no tratamento das leishmanioses cutânea e mucocutânea, sendo utilizado em pacientes nos quais os antimoniais não apresentaram os resultados desejados. Entretanto, apresenta efeitos colaterais como redução nos níveis de potássio e magnésio no organismo e problemas renais (RATH et al., 2003).

Uma outra opção terapêutica é o alopurinol, que apresenta baixa toxicidade e sua administração é oral, entretanto, em alguns casos, a droga não apresentou a eficácia esperada. Outro medicamento utilizado no tratamento da doença que tem apresentado atividade antiparasitária é a paromomicina, também conhecida como aminosidine, um antibiótico amino-glicosilado. Esse fármaco tem sido utilizado na Índia no controle de leishmaniose visceral, já que os antimoniais não se apresentam muito efetivos e consequentemente as taxas de mortalidade têm sido crescentes. (MARTINEZ; MARR, 1992).

1.6. Metabolismo de L-arginina em *Leishmania*

A L-arginina é um aminoácido não somente precursor da síntese de proteínas, mas também da síntese de óxido nítrico (NO), ureia, ornitina, citrulina, creatina, agmatina, glutamato, prolina e poliaminas (WU; MORRIS, 1998).

Foi isolada inicialmente de sementes de lúpulos em 1886 por Schulze e Steiger, e em seguida foi identificada como um componente protéico em animais (WU; MORRIS, 1998). Em 1897, os pesquisadores Schulze e Winterstein determinaram a estrutura da L-arginina pelo processo de hidrólise alcalina, que resulta na liberação de ornitina e ureia e, posteriormente, em 1910 sua síntese foi descrita a partir de benzoilornitina, por Sorensen (WU; MORRIS, 1998).

Kossel e Dakin identificaram no fígado de animais a enzima responsável pela hidrólise de arginina em ornitina e ureia, conhecida como arginase. Entretanto, foi a descoberta do ciclo da ureia, por Krebs e Henseleit em 1932 (KREBS, 1980), que esclareceu a real importância da arginina em imprescindíveis vias metabólicas e fisiológicas (WU; MORRIS, 1998).

Sendo assim, uma das enzimas envolvidas na síntese de L-arginina é a arginase, uma metaloenzima que utiliza esse aminoácido como substrato na produção de L-ornitina e ureia (RECZKOWSKI; ASH, 1992). A arginase também pode regular a disponibilidade de arginina nas células em que é expressa (WU; MORRIS, 1998), sendo a L- ornitina um dos produtos dessa via e também um precursor da síntese de poliaminas (PAs). Por esses motivos, a arginase é uma enzima primordial para a regulação da síntese de PAs (WU; MORRIS, 1998).

Holtta e Pohjanpelto (1982) observaram que, geralmente, a atividade da arginase ocorre juntamente com a ornitina descarboxilase e que células deficientes de arginase não se desenvolvem em meio de cultura isento de soro, se não houver adição de ornitina ou PAs ao meio.

A arginase em mamíferos é codificada por dois genes que produzem dois tipos de enzima, I e II, que são equivalentes em suas propriedades enzímicas. Entretanto, ambas são diferentes em sua localização celular, distribuição tecidual, regulação de expressão e reatividade imunológica (GRODY; DIZIKES; CEDERBAUM, 1987; JENKINSON; GRODY; CEDERBAUM, 1996).

A enzima tipo I, citosólica, é encontrada abundantemente no fígado como componente do ciclo da ureia. A arginase do tipo II, é mitocondrial, é expressa no cérebro, intestino delgado, rins, glândulas mamárias e macrófagos (WU ; MORRIS, 1998).

Os organismos da família *Trypanosomatidae* apresentam algumas particularidades em relação à atividade das enzimas que atuam no ciclo da ureia (KREBS, 1980). A arginase é uma das enzimas que faz parte do ciclo da ureia em animais ureotélicos, cuja atividade também se encontra em alguns trypanossomídeos, entre eles os do gênero *Leishmania*. A princípio, a arginase foi associada aos processos metabólicos de conversão arginina-ornitina-citrulina (CAMARGO et al., 1992).

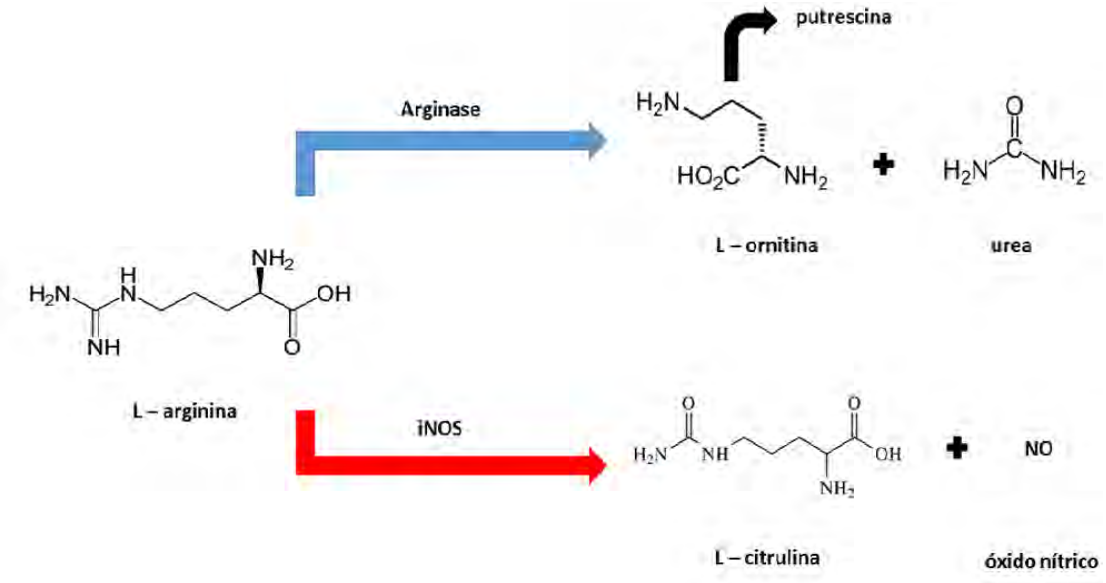
Além de precursora da síntese de nitrato e nitrito em mamíferos (HIBBS; TAINTOR; VAVRIN; 1987) a arginina também regula simultaneamente a produção de óxido nítrico, que é fator de relaxamento derivado do endotélio (PALMER; ASHTON; MONCADA, 1988).

Atualmente se tem conhecimento de que variados tipos celulares utilizam arginina na síntese de óxido nítrico e que esse fato é importante para a adesão de plaquetas e leucócitos, neurotransmissão, vasodilatação e resposta imune (BREDT; SNYDER, 1994; MONCADA; HIGGS, 1995).

Foram descritas três isoenzimas de óxido nítrico sintase (NOS), codificadas por genes distintos: NOS neuronal (nNOS, tipo I); NOS induzida (iNOS, tipo II) e NOS endotelial (eNOS, tipo III). Entretanto, os animais geralmente expressam nNOS e eNOS em níveis baixos e em tecidos variados. Essas isoenzimas sofrem regulação pelo complexo Ca^{2+}/calmodulina; e a iNOS não é expressa normalmente na maioria das células, mas bastante induzida por endotoxinas e citosinas inflamatórias em macrófagos (WU; MORRIS, 1998).

A indução de arginase II causa a diminuição da produção de NO, a qual compromete a função de defesa exercida pelo macrófago, ou seja, a enzima arginase é fundamental na regulação da atividade de iNOS em macrófagos e na articulação da concentração de L-arginina (WANG et al.,1995). Também foi observado que ao utilizar um inibidor de arginase, N^{ω}-hydroxyl-L-arginina, houve diminuição na capacidade de *L.* (*L.*) *major* em estabelecer infecções em macrófagos (INIESTA; GOMEZ-NIETO; CORRALIZA, 2001).

Figura 4 – Metabolismo da L-arginina pelas vias enzimáticas de arginase e iNOS



A função do óxido nítrico parece ser biologicamente fundamental para o parasito, porque existe uma relação direta entre a quantidade de NO produzido e a quantidade de formas metacíclicas infectivas em cultura de promastigotas de *L.* (*L.*) *amazonensis*. Sendo assim, existe uma associação dessa via com a diferenciação e capacidade infectante desses parasitos.

1.7. Arginase e óxido nítrico sintetase em mamíferos

Enzima integrante do ciclo da ureia, a arginase encontra-se expressa em alguns tripanossomídeos, como os do gênero *Leishmania (*ALBINA, et al., 1993*)* e, a priori, sua função estava ligada aos processos metabólicos que envolviam a interconversão arginina-ornitina-citrulina (SILVA, 2010).

Entretanto, a arginase hepática é crucial para o ciclo da ureia, via metabólica fundamental para a eliminação de amônia, substância de alta toxicidade oriunda da degradação de proteínas (HERZFELD; RAPER, 1976). O ciclo da ureia nos tecidos é incompleto e a enzima é responsável pela regulação da concentração de L-arginina e L-ornitina (YIP; KNOX, 1972).

A enzima necessita de um conjunto binuclear de manganês para que seja capaz de hidrolisar a L-arginina em L-ornitina e ureia. Embora suas isoformas sejam

diferentes em sua distribuição nos tecidos, localização na célula e funções metabólicas, cada uma utiliza o mecanismo metal-ativador para que a catálise ocorra (CHRISTIANSON, 2005). Outro fator preponderante para a atividade catalítica da enzima é o pH, fato evidenciado com a obtenção de diferentes curvas de pH com íons metálicos Mn^{2+} e Co^{2+} (MOHAMED, 1950).

A arginase hepática (AI) ou do tipo I é uma enzima encontrada predominantemente no citosol do hepatócito, a qual atua no ciclo da ureia. A arginase tipo II (AII) de mamíferos é extra-hepática e encontra-se na matriz mitocondrial de outras células, incluindo macrófagos (COLLELUORI; MORRIS; ASH; 2001).

A arginase tipo II apresenta maior distribuição nos tecidos e apresenta um papel fundamental no metabolismo da L-arginina, uma vez que está diretamente relacionada a produção de L-ornitina, um precursor da síntese de poliaminas (LI et al., 2001).

A óxido nítrico sintetase (NOS), uma hemoproteína do tipo P-450, possui em sua estrutura uma flavina mononucleotídeo (FMN) e uma flavina adenina dinucleotídeo (FAD^{+}) e sua estabilidade é decorrente da presença da tetrahidrobiopterina. A NOS tem como produto principal o óxido nítrico, produzido de maneira endógena a partir da L-arginina nas células sistema nervoso central, músculo liso cardíaco e células endoteliais (STRYER, 1996).

O óxido nítrico endógeno atua em diversos sistemas causando: vasodilatação, ativação da guanil ciclase e, por consequência, interfere na concentração de cálcio; redução na aderência e agregação de plaquetas, efeitos no sistema não adrenérgico não colinérgico, controle nervoso das funções estomacais, defesa do hospedeiro e efeitos citotóxicos como danos neurológicos (RANG, 2004).

Os macrófagos murinos também têm a biossíntese do NO regulada pela atividade da arginase I que é coordenada com a atividade da NOS, a qual modula a citotoxicidade dependendo da concentração de NO (CORRALIZA et al., 1995; DAGHIGH; FUKUTO; ASH; 1994). A ativação da NOS em macrófagos é capaz de produzir óxido nítrico suficiente para promover morte celular por apoptose (ALBINA et al., 1993).

Estudos mostram que os macrófagos utilizam a via metabólica da L-arginina para influenciar na resposta imunológica contra patógenos, parasitos e tumores. A co-indução de arginase extra-hepática e NOS a partir do mesmo estímulo, a identificação da enzima por supressores de NOS e os componentes responsáveis pela co-

regulação da expressão de ambos sustentam a tese de que a arginase seja fundamental para a regulação da NOS por meio da regulação das concentrações de L-arginina (MILLS et al., 1992; WANG et al., 1995).

Entretanto, outras pesquisas demonstram que, ao modificar a concentração da arginase tipo I, é possível afetar a síntese de poliaminas sem interferir na síntese de óxido nítrico. A expressão da arginase tipo I em macrófagos murinos ativados não foi um fator determinante na indução da síntese do óxido nítrico, embora tenha sido um fator limitante na síntese de espermidina e putrescina (KEPKA-LENHART et al., 2000).

1.8. A relação entre a arginase e a família Trypanosomatidae

Os produtos da degradação dos aminoácidos na forma de amônia e de ureia em ácido úrico são pouco tóxicos. A eliminação do ácido úrico e da ureia necessitam de menor quantidade de água quando comparadas à eliminação de amônia, sendo assim, a eliminação de amônia na forma de ureia seria uma adaptação à baixa disponibilidade de água.

O ciclo da ureia em tripanosomatídeos apresenta diferentes enzimas, que formam um complexo sistema responsável pela interconversão L-arginina-citrulina-ornitina. A ação do conjunto de enzimas, a necessidade de L-arginina, citrulina ou ornitina exógenas, a avaliação dos derivados da eliminação e a carência de enzimas mediadoras da formação de ornitina a partir do ácido glutâmico indicam que as funções primordiais do ciclo da ureia em tripanosomatídeos sejam a síntese de L-arginina e principalmente a formação de L-ornitina (YOSHIDA ; CAMARGO, 1978; CAMARGO, 1978).

Nos organismos da família Trypanosomatidae, a presença das enzimas do ciclo da ureia varia entre os gêneros. Os organismos pertencentes ao gênero *Crithidia* dispõem das enzimas arginase, arginino-succinato liase e citrulinase; diferentemente dos organismos pertencentes ao gênero *Leptomonas,* que apresentam arginase e citrulinase. Os organismos pertencentes ao gênero *Herpetomonas* têm disponíveis as enzimas ornitinacarbamiltransferase e citrulinase; já os organismos do gênero *Leishmania* apresentam apenas uma enzima: a arginase. A produção de ornitina pode originar-se da catálise da L-arginina pela arginase ou pelo sistema L-arginina-

deiminase/citrulina hidrolase ou ser diretamente produzida pela hidrólise da citrulina. A partir da ornitina ou citrulina pode ocorrer a síntese de L-arginina via onitina-carbamiltransferase e arginino-succinato sintetase/liase. Essas variações de vias metabólicas mostram que esses organismos apresentam alternativas diversas para a síntese de L-arginina e ornitina (ROBERTS et al., 2004).

A síntese de poliaminas é fundamental para o crescimento dos parasitos do gênero *Leishmania* e para a infecção do hospedeiro. Parasitos em fase promastigota de *L.* (*L.*) *donovani* 'knockout' do gene da ornitina descarboxilase, enzima atuante na síntese de poliaminas, não foram capazes de se desenvolver em meio de cultura deficiente de poliaminas, onde houve depleção rápida de tripanotiona e putrescina. Entretanto, os níveis de espermidina permaneceram inalterados, o que indica que a via da tripanotiona restabeleceu os níveis de espermidina. Os níveis de putrescina, espermidina e tripanotiona foram normalizados com a adição de putrescina (JIANG et al., 1999; ROBERTS et al., 2004).

Os recursos defensivos contrários aos parasitas do gênero *Leishmania* sofrem intervenção da N^{ω}-hidroxi-L-arginina (LOHA), um inibidor fisiológico da enzima arginase, produzido pela NOS II, que pode regular a infecção celular de *L.* (*L.*) *major* e *L.* (*L.*) *infantum* (INIESTA; GOMEZ-NIETO; CORRALIZA, 2001).

Promastigotas de *L. mexicana* apresentam capacidade de expressar somente a arginase, enzima fundamental na síntese de poliaminas. Entretanto, parasitos 'knockout' do gene da enzima arginase não foram capazes de produzir ornitina e apresentaram dependência de ornitina e poliaminas. Por ser fundamental para o desenvolvimento do parasito, a arginase apresenta-se como um alvo terapêutico potencial para o desenvolvimento de novas drogas para o tratamento da doença (ROBERTS et al., 2004).

Com a elucidação da sequência completa do gene da enzima arginase de *L*. (*L.*) *amazonensis*, foram encontradas diferenças entre o sítio ativo da enzima do parasito e de mamíferos. Em virtude dessa diferença, a determinação do protocolo para expressão do gene da enzima de *L*. (*L.*) *amazonensis* com parâmetros bioquímicos determinados permite a busca de inibidores seletivos para a enzima do parasito, sendo fundamental para o desenvolvimento de quimioterápicos para o tratamento da doença, tendo como alvo terapêutico a arginase (DA SILVA et al., 2002; DA SILVA et al., 2008).

1.9. Produtos naturais e doenças parasitárias

A utilização de plantas medicinais no controle e tratamento de doenças que afetam a humanidade data desde os tempos pré-históricos e, mesmo após milhares de anos, os compostos utilizados atualmente têm origem vegetal (DE CARVALHO; FERREIRA, 2001). Nos últimos 30 anos, 52% das novas drogas descobertas tem relação direta e indireta com os produtos naturais (NEWMAN; CRAGG, 2007).

O consumo de fitoterápicos pela população mundial cresce consideravelmente a cada ano. No início do século XXI, o mercado farmacêutico voltado para os produtos naturais movimentou 22 bilhões de dólares no momento em que 65% da população mundial consumia algum tipo de fitoterápico (PINTO et al., 2002).

Responsável por 20% da biodiversidade do planeta, o Brasil, país de clima tropical, proporciona às espécies vegetais um rendimento na produção de constituintes químicos 60 a 80% superior às plantas de áreas de clima temperado (DI STASI et al., 2002).

As companhias farmacêuticas rapidamente entenderam que a tecnologia disponível não é suficiente para concorrer com a natureza na formulação de compostos com potencial farmacológico. Por esse motivo, optaram por desenhar novas drogas a partir de moléculas oriundas de produtos naturais (SANT’ANA, 2002).

2. ESPÉCIES VEGETAIS COM ATIVIDADE ANTI-PARASITÁRIA

2.1. *Annona coriacea*

A. coriacea, popularmente conhecida como araticum, é utilizada na medicina popular brasileira no tratamento de várias doenças como: úlceras, furúnculos, cefaleias, nevralgias e estomatites (SOUSA et al., 2011).

O óleo volátil de *A. coriacea* apresentou atividade leishmanicida e tripanomicida (SIQUEIRA et al., 2011) e o extrato etanólico, produzido com cachaça, obtido a partir desta espécie, apresentou atividade contra a forma promastigota de *L. (L.) amazonensis* (IC_{50} = 175 µg/mL) e não apresentou toxicidade contra eritrócitos humanos (IC_{50} = 34,33 µg/mL). O extrato hidroalcoólico de folhas de araticum apresentou atividade contra *Candida albicans* e *Candida parapsilosis* (DE TOLEDO et al., 2011).

Os extratos das folhas obtidos com metanol, butanol e acetato de etila apresentaram propriedades analgésicas e anti-inflamatórias, que explicam sua utilização na medicina popular (DE SOUSA et al., 2012; SOUSA; DEL-VECHIO-VIEIRA; KAPLAN, 2007).

Os extratos de sementes de *A. coriacea* foram capazes de interromper o desenvolvimento de ninfas e adultos do inseto vetor da doença de Chagas (CARNEIRO et al., 2013).

2.2. *Byrsonima crassifolia*

B. crassifolia é uma árvore tropical, vulgarmente conhecida no Brasil como murici, distribuída amplamente por toda a América Latina e Central. As sementes de suas frutas são utilizadas pelo povo mexicano desde os tempos pré-hispânicos como um anti-inflamatório (MUNIZ-RAMIREZ et al., 2014). Os índios Mire (Oxaca, México) utilizam a casca dessa espécie no tratamento de doenças (GEISS et al., 1995) e

existem relatos de que a espécie tem sido utilizada na medicina tradicional para o tratamento de algumas doenças mentais (MUNIZ-RAMIREZ et al., 2014).

Também conhecida como “nanchi” pelos mexicanos, a *B. crassifolia* tem sido usada como fonte de alimento e também como portadora de propriedades medicinais contra infecções bacterianas em humanos, como por exemplo a disenteria bacilar (PIO-LEON et al., 2013).

Foram isolados e identificados 22 compostos presentes em folhas de *B. crassiflólia* em extrato metanólico dos quais seis eram triterpenos (betulinaldeído, betulina, ácido betulínico, lupeol, ácido oleanólico e ursenaldeído), dois esteróis (beta-sitosterol e seu glicosídeo), seis polifenóis (catequina, epicatequina, guaijaverina, hiperina, quercetina e gaiato de metila), quatro ácidos aminados comuns (alanina, ácido aspártico, prolina e valina) e dois aminoácidos não protéicos (ácido pipecólico e ácido 5-hidroxipipecolico). Testes biológicos mostraram que cinco destes compostos (betulina, ácido betulínico, hiperina, quercetina e ursenaldeido) demonstraram atividade espasmogênica em ratos, e três isolados (hiperina, ácido pipecólico e ácido 5-hidroxipipecólico) apresentaram antagonismo não competitivo de serotonina (BEJAR et al., 1995).

O extrato de raízes obtido com acetato de etila apresentou atividade contra *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* Typttimurum*, Shigella flexneri, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epididermis, Streptococcus pneumoniae* e *Micrococcus luteus* (MARTINEZ-VAZQUEZ et al., 1999).

Os extratos obtidos com éter de petróleo, clorofórmio e metanol das folhas foram testados em ratos com dermatite. Esses extratos reduziram a dermatite em orelha de camundongos. O extrato obtido com clorofórmio apresentou a maior atividade, podendo ser considerado fonte de princípios anti-inflamatórios (MALDINI et al., 2009).

Os extratos obtidos com hexano, clorofórmio e metanol de frutos e sementes de *B. crassifolia* possuem propriedades anti-hiperglicêmicas significativas após 4 horas de ingestão oral única. Os extratos obtidos com hexano e clorofórmio de frutos e sementes aumentaram os níveis de superóxido dismutase, glutationas, catalase, glicogênio hepático, glicose-6-fosfatase e os níveis de insulina no plasma. Também diminuíram a glucoquinase e mostraram atividade significativa inibitória contra agentes de formação de produtos de glicação com valores de IC_{50} que variam 94,3 -

138,7 µg/mL. Portanto, a espécie *B. crassifolia* pode ser considerada portadora de compostos potencialmente anti-diabéticos (PEREZ-GUTIERREZ et al., 2010).

Embora o composto principal do extrato metanólico de *B. crassifolia* seja a quercetina 3-O-xilosido (12 mg/kg), outros flavonoides, tais como a rutina (4,4 mg/kg), a quercetina (1,4 mg/kg) e hesperidina (0,7 mg/kg) podem estar envolvidos nos efeitos antidepressivos. Pesquisas demonstram que o extrato metanólico padronizado em de *B. crassifolia* possui efeitos potenciais do tipo antidepressivo em camundongos e pode ser considerado relativamente seguro, não causando mortes de ratos quando administrado oralmente a 2000 mg/kg (HERRERA-RUIZ et al., 2011).

O extrato hexanólico de sementes de murici apresentou atividade anti-inflamatória significativa em modelos agudos e crônicos com a contribuição parcial de ações inibitórias de algumas respostas inflamatórias (MUNIZ-RAMIREZ et al., 2014).

2.3. *Caryocar brasiliense*

Conhecido popularmente como pequi, é uma espécie típica do Cerrado brasileiro, famosa pela utilização de seu fruto na culinária regional e também porque é utilizada na medicina popular para o tratamento de várias doenças. (MIRANDA-VILELA et al., 2009).

O fruto do pequi contém carotenos, retinóis, vitamina C e polifenóis, compostos que apresentam propriedades antioxidantes, que previnem a formação excessiva de radicais livres e modulam a genotoxicidade de agentes físicos e químicos no corpo. No entanto, em concentrações elevadas, estes compostos podem ter efeitos mutagênicos e recombinogênicos porque podem atuar como pró-oxidantes (CASTRO et al., 2008).

O extrato aquoso do fruto apresentou atividade contra clastogênese induzida pela ciclofosfamida. Os ensaios foram realizados utilizando camundongos e a atividade do extrato é decorrente do efeito antioxidante dos compostos presentes na droga vegetal (KHOURI et al., 2007). A análise do extrato do fruto demonstrou a presença de compostos como o ácido gálico, ácido cafeico, quercetina e quercetina-3-O-arabinose, possíveis responsáveis por sua atividade antioxidante (ROESLER et al., 2008).

Pesquisas mostraram que o óleo do fruto, rico em ácido oleico e ácido palmítico, apresenta atividade anti-inflamatória e capacidade de redução do colesterol total em pessoas com idade superior a 45 anos. Os resultados mostraram uma tendência geral na queda da pressão arterial, o que sugere que o óleo de pequi pode ter um efeito hipotensor (GASPAR et al., 2010; MIRANDA-VILELA et al., 2009).

Os extratos das raízes e do caule, obtidos com metanol, foram testados a fim de certificar seu potencial herbicida. Ambos extratos apresentaram potencial herbicida, mas o extrato das raízes apresentou melhores resultados. A fração hexanólica e as subfrações 8, 11 e 13 (extraídas a partir de etilo / metanol 7: 3), também apresentaram inibição. Foram reconhecidos na fração hexanólica e subfrações 8, 11 e 13 alguns metabólitos secundários como alcalóides, cumarinas voláteis, flavonoides e taninos condensados, respectivamente. Todos os extratos contêm saponinas (REZENDE; TERRONES; REZENDE, 2011).

Um dos principais problemas enfrentados na criação de ovinos tem sido o aumento de populações resistentes a anti-helmínticos. Em busca de alternativas, uma possível opção seria o extrato aquoso da casca de pequi, o qual foi avaliado como inibidor do desenvolvimento larval, inibidor de eclosão dos ovos. A capacidade inibitória de eclosão dos ovos ocorreu em concentrações entre 1,5 e 7,5 mg/mL (NOGUEIRA et al., 2012).

Para a inibição do desenvolvimento das larvas, o extrato aquoso demonstrou capacidade anti-helmíntica significativa (LC_{90} = 53,19 mg/mL). Em estudos *in vivo*, na primeira e segunda semanas após tratamento com o extrato, a eficácia anti-helmíntica foi de 32,2% e 33%, respectivamente (NOGUEIRA et al., 2012).

2.4. *Cecropia pachystachya*

Também conhecida como embaúba, pertencente à família Urticaceae, típica de margens de florestas, cresce rapidamente e é abundante em todo o Brasil (HERNANDEZ-TERRONES et al., 2007). Utilizada na medicina popular, a embaúba é conhecida pela atividade expectorante e antiasmática, proporcionada por compostos presentes em suas folhas e sua casca (HIKAWCZUK et al., 1998).

Na Argentina é conhecida como “ambay” e cresce nas florestas neotropicais e em regiões montanhosas de clima temperado. Suas folhas são utilizadas nos países da América do Sul como promotor de alívio da tosse e asma (CONSOLINI; MIGLIORI, 2005) e como sedativo (CONSOLINI et al., 2006).

Compostos como o sitosterol, alfa-amirina, alfa-hidroxi-alfa-amirina, ursólico, ácido oleanólico e pomólico foram isolados e identificados a partir de extratos de cascas e folhas da espécie, cujo extrato de n-hexano apresentou efeito anti-inflamatório (HIKAWCZUK et al., 1998). Amostras de embaúba originárias do estado de Minas Gerais apresentaram vários compostos nas cascas, raízes e caule, que foram identificados por cromatografia gasosa como: geranilacetona, ácido láurico, ácido palmítico e alcanos de cadeia longa octadecanal na casca; geranilacetona, farnesol, farnesilacetona, octadecanal, ácido palmítico e alcanos de cadeia longa na raiz; e geranilacetona, ácido palmítico e alcenos de cadeia longa na madeira (HERNANDEZ-TERRONES et al., 2007).

O extrato de folhas de *C. pachystachya* obtido pela extração com diclorometano e ácido pomólico isolado, quando foram ministrados a edemas de ratos induzidos por carragenina, causaram redução da lesão (SCHINELLA et al., 2008). Estudos demonstraram que os compostos presentes nos extratos das folhas de embaúba possuem efeitos hipoglicemiantes (ARAGÃO et al., 2010) e anti-inflamatórios (ARAGÃO et al., 2013).

Extratos etanólicos de cascas, raízes e folhas de embaúba apresentaram atividade antimalárica. O fracionamento dos extratos etanólicos resultaram na caracterização do ácido turmenico, responsável pela inibição do crescimento do parasita (UCHOA et al., 2010).

O extrato etanólico de *C. pachystachya* foi testado em *Leishmania amazonensis in vitro* e os compostos bioativos, orientina e isovitexina, presentes no extrato são responsáveis pela redução do crescimento do parasita, alterando o K-DNA mitocondrial e inibindo a enzima arginase (CRUZ et al., 2013).

Compostos presentes no extrato aquoso de *C. pachystachya* como o ácido clorogênico, isoorientina, orientina, isovitexina, vitexina e rutina foram identificados como inibidores para *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532 e *Escherichia coli* pSB403 (BRANGO-VANEGAS et al., 2014).

2.5. *Himatanthus obovatus*

Conhecido também como janaúba na medicina popular, apresenta grande variedade de uso no tratamento de doenças como: inflamações uterinas, gastrites, uso veterinário, uso em emplastros, fortificante, complemento alimentar e até tratamento de câncer (LINHARES, 2010).

As espécies do gênero *Himatanthus* são árvores de galhos lenhosos e apresentam crescimento simpodial do tronco, com um ou vários ramos laterais de expansão em sua porção distal, nos quais haverá uma reorientação para a porção vertical, se tornando uma nova unidade de tronco. Essa forma de crescimento é chamada “Morelo de Koriba” " (HALLÉ et al 1978; BELL, 1991 *apud* SPINA, 2004).

O gênero *Himatanthus* apresenta em sua totalidade nove espécies conhecidas, sendo uma espécie na América Central (Panamá) e oito espécies na América do Sul. As espécies de *Himatanthus* que ocorrem em solo brasileiro estão distribuídas na região norte, na região centro oeste em áreas de Cerrado, no Nordeste em áreas de Caatinga e Cerrado, e na região litorânea em áreas de Mata Atlântica (FERREIRA, 2006; SPINA, 2004).

No Brasil, há ocorrência das espécies do gênero *H. obovatus* nos Estados do Amazonas, Acre, Amapá, Rondônia, Roraima, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Tocantins, Pará, Maranhão, Piauí, Ceará, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Paraíba, Sergipe, Alagoas, Bahia, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo. (FERREIRA, 2006; LARROSA, 2005).

Pesquisas recentes mostraram que a presença da espécie *H. obovatus* deve ser considerada mais ampla, já que se encontra distribuída no Brasil e na Bolívia, ocorrendo primordialmente em biomas de Cerrado, cerradão e campo sujo na região Norte (Pará e Rondônia); no Nordeste, ocorre no Maranhão, Piauí, Alagoas e Bahia; no Centro-Oeste, em Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Goiás, e no Sudeste, em Minas Gerais e São Paulo (SPINA, 2004).

O extrato etanólico de folhas, produzido com cachaça apresentou atividade contra a forma promastigota de *L. (L.) amazonensis* (IC_{50} = 800 µg/mL) (DE TOLEDO et al., 2011).

2.6. *Qualea grandiflora*

Q. grandiflora é uma planta típica do Cerrado, conhecida como pau-terra-da-folha-grande, pau-terra-do-Cerrado ou ariavá, e muito utilizada na medicina popular brasileira no tratamento de várias doenças (SANTOS et al., 2011). A infusão dos frutos é usada no tratamento de asma e a infusão das cascas para limpeza externa de úlceras e feridas e, também, contra inflamações (SOUSA et al., 2007).

O extrato hidroalcoólico e frações de *Qualea grandiflora* apresentaram ação sobre o sistema nervoso central de camundongos e também efeito potencialmente analgésico e anti convulsivo (GASPI et al., 2006).

O extrato hidroalcoólico das folhas apresenta em sua composição: catequina (COSTA et al. 2008), terpenos, esteroides, saponinas, compostos fenólicos e taninos e a administração desse extrato via oral apresentou atividade anti-úlcera. (HIRUMA-LIMA et al. 2006).

O consumo de chás preparados com folhas de *Q. grandiflora* são utilizados pela população no tratamento de várias doenças. Entretanto, estudos apontam que os compostos presentes podem causar mutações, devido a presença de compostos capazes de produzir espécies reativas de oxigênio (ROS) que podem causar danos ao DNA (SANTOS et al., 2011).

Do extrato etanólico das folhas de *Q. grandiflora*, foram isolados e identificados o canferol-3-*O*-α-L-(4"-*E*-*p*-cumaroil)-raminosideo, canferol-3-*O*-α-L-(4"-*Z*-*p* cumaroil)-raminosideo, esqualeno, fitol, lupeolα-amirina,β-amirina, sitosterol, sitostenona, ácidos ursólico e oleanólico e 3-*O*-β-D-glicopiranosídeo do sitosterol (COSTA AYRES et al. 2008; NETO, SIQUITELLi et al. 2013). O extrato etanólico, produzido com cachaça, obtido a partir desta espécie apresentou atividade contra a forma promastigota de *L. (L.) amazonensis* (IC_{50} = 700 µg/mL) segundo De Toledo (2011).

3. FLAVONOIDES E ÁCIDOS ORGÂNICOS NO CONTROLE DO PARASITA

Os flavonoides são metabólitos secundários presentes em espécies vegetais e a maioria das estruturas desses compostos tem como base estrutural o flavonoide quercetina (LI et al., 2015). Estão divididos em subclasses como os flavonols, flavonas, flavononas, isoflavonas, antocioninas e flavonois (HOLLMAN et al., 1997). Os flavonois estão presentes em vinhos e frutas vermelhas, as flavanonas em alimentos cítricos; as flavonas estão presentes em especiarias de folhas verdes, as isoflavonas são encontradas nos derivados de soja, as antocianinas em bagas, sendo que os flavonois estão presentes em praticamente todos os alimentos (FORMICA; REGELSON, 1995).

O papel dos flavonoides transcende a presença nos alimentos, porque muitos desses compostos apresentam atividade anti-viral, são carcinostáticos, antioxidantes, inibidores enzimímicos (carboxilase ornitina, proteína quinase, calmodulina), promotores de vasodilatação e desagregação de plaquetas e também podem servir como material de partida para programas de desenvolvimento de fármacos (FORMICA; REGELSON, 1995).

Os flavonoides são amplamente consumidos pela população mundial a partir de alimentos e bebidas. A rutina é encontrada em produtos derivados de espécies vegetais utilizadas em todo o mundo e apresenta atividades farmacológicas consideráveis que incluem: potencial antioxidante, anti-inflamatório, antidiabético, antiadipogênico e neuroprotetor, sendo que atualmente 130 medicamentos registrados apresentam rutina em suas formulações (CHUA, 2013).

Um importante representante da subclasse flavonol, a quercetina, tem recebido grande atenção entre os pesquisadores. A substância apresenta atividade antioxidante de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), a partir da eliminação de radicais livres e a capacidade quelante de íons de metais de transição. Em virtude dessas características, pode auxiliar na prevenção de algumas doenças como: aterosclerose e inflamações crônicas (MUROTA ; TERAO, 2003).

Análises de biodisponibilidade de quercetina apresentam resultados contraditórios no que se refere a absorção de compostos glucosilados ser maior do que a absorção de compostos agliconados, em virtude da ação dos transportadores

de glucose. Entretanto, outro estudo demostra que a quercetina-4'-O-β-glucósido foi absorvida de forma mais eficaz do que a quercetina-3-O-β-glucósido por ser mais lipofílica do que os outros glucósidos, ou seja: a absorção das quercetinas depende da variedade e da posição dos grupos de açucar anexos (BOUKTAIB; ATMANI; ROLANDO, 2002).

A quercetrina (quercetina 3-O-α-L- ramnopiranosídeo) é um dos constituíntes do extratoa aquoso *Kalanchoe pinnata* e pesquisas demonstram que a substância apresenta ação em parasitas do gênero *Leishmania* na fase amastigota. O composto apresentou considerável potencial leishmanicida ($IC_{50} \approx 1$ µg / mL) com um perfil de baixa toxicidade (MUZITANO et al., 2006).

Os flavonoides quercetina, quercetrina e isoquercetrina demonstraram potencial de inibição enzimática da ARG-L na seguintes concentrações: 3,8 µM, 4,3 µM e 10 µM respectivamente. A quercetina apresentou um modelo de inibição misto, enquanto a quercetrina e isoquercetrina são inibidores competitivos para ARG-L. (DA SILVA; MAQUIAVELI; MAGALHÃES, 2012)

Os flavonoides luteolina e quercetina apresentaram potencial de inibiçao no crescimento de promastigotas e amastigotas de *L. donovani in vitro* causando a inibição da sintese de DNA em promastigotas e linearização da topoisomerase-II. Os valores de IC_{50} de luteolina e quercetina foram de 12,5 µM e 45,5 µM, respectivamente, responsáveis pela interrupção do ciclo celular em promastigotas, levando a apoptose (MITTRA et al., 2000).

A análise do potencial de inibição da ARG – L com os flavonoides apigenina, isoxitexina e vitexina demonstrou que a concentração do inibidor de 125 µM ocorre 50% de inibição da atividade da enzima. Nessa mesma concentração, a galangina e quercetina apresentaram inibição da enzima entre 50-70%. Os compostos fisetina, luteolina, quercetina e 7-8-dohydroxyflavone apresentaram inibição enzimática maior que 80% (MANJOLIN, et al., 2013).

Extraída do chá verde, a epigalocatequina-3-galato (EGCG) também apresenta atividade leishmanicida. A EGCG (IC_{50} =3,8 µM) (+) – catequina (IC_{50} = 0,8 µM)e a (2)-epgalocatequina (IC_{50} =1,8 µM) apresentaram inibição da atividade da ARG-L e em virtude dos baixas concentrações necessárias para inibição da enzima, esses flavonoides podem ser utilizados de maneira suplementar no tratamento da leishmaniose (DOS REIS, et al., 2013).

Isolados a partir do extrato de acetato de etila da *Byrsonima coccolobifolia*, os ácidos galoilquínicos são compostos que apresentaram atividade leishmanicida. Compostos fenólicos, como o ácido gálico, demonstraram ser uma nova alternativa de inibidores não-competitivos em arginase (ARG) de *Leishmania amazonensis* (K_i entre de 0,10 a 0,68 µmol L^{-1}) (DE SOUSA et al., 2014).

Embora o ácido quínico não demonstre inibição significativa em ARG-L, ficou demonstrando que a unidade galoila apresenta características importantes que permitem a interação enzima-inibidor. A inibição potente do ácido gálico frente à arginase pode ser uma indicação para o entendimento da resposta imune previamente observada em *Leishmania donovani*, uma vez que a atividade enzímica está associada à diminuição dos níveis de óxido nítrico no processo de infecção por *Leishmania* (DE SOUSA et al., 2014).

Outro ácido que apresentou potencial de inibição enzímica da ARG-L foi o ácido gálico (IC_{50} = 2,2 µM) e constante de dissociação K_i e K_i' =7.2 ± 1.4 µM, estabelecendo modelo de inibição não competitivo para esse composto. A presença do grupo galoila na estrutura do ácido gálico apresenta características importantes que permitem a interação enzima-inibidor (DOS REIS et al., 2013). Não diferente dos ácidos, para os flavonoides a presença do grupo catecol apresenta características importantes que permitem a interação enzima-inibidor (MANJOLIN et al., 2013).

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivos gerais

Avaliar a inibição da enzima arginase de *L. (L.) amazonensis in vitro* utilizando extratos vegetais de folhas de *A. coriacea*, *B. crassifolia*, *C. brasiliense*, *C. pachystachya*, *H. obovatus* e *Q. grandiflora*;

Avaliar a inibição da enzima arginase de *L. (L.) amazonensis in vitro* utilizando flavonoides e derivados do ácido cafeico

4.2. Objetivos específicos

Extrair metabólitos secundários das drogas vegetais obtidas a partir de folhas de *A. coriacea*, *B. virgilioides, B. crassifolia*, *C. brasiliense*, *C. pachystachya*, *H. obovatus* e *Q. grandiflora*;

Fracionar os extratos de *A. coriacea*, *B. virgilioides, B. crassifolia*, *C. brasiliense*, *C. pachystachya*, *H. obovatus* e *Q. grandiflora* com butanol;

Determinar o perfil cromatográfico das substâncias bioativas presentes nos extratos vegetais por cromatografia líquida de alta performance (CLAE);

Quantificar flavonoides dos extratos vegetais;

Quantificar compostos fenólicos dos extratos vegetais;

Determinar a capacidade antioxidante dos extratos vegetais;

Determinar a IC_{50} dos extratos vegetais e frações sobre a arginase de *L*. (*L*.) *amazonensis;*

Determinar a IC_{50} dos flavonoides e derivados do ácido cafeico sobre a arginase de *L*. (*L*.) *amazonensis;*

Determinar o mecanismo de inibição dos flavonoides e derivados do ácido cafeico sobre a arginase de *L*. (*L*.) *amazonensis*

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Compostos

Apigenina 7 glucosideo, apiina avicularina, ácido cryptoclorogênico, crisina, eriodictiol, fraxina, guaiaverina, hesperidina, hyperosideo, isoschaftosideo, kaempferol 3 glucosideo, luteolina 7 glucosideo, mirecetina, miricetrina, morina, naringenina, quercetina 3 glucuronideo, rhamnetina, rhoifolina, rutina, schaftosideo, spiraeosideo, taxifolina, tilirosideo, verbascosideo e isoverbascosideo, adquiridos junto à Phytolab (Vestenbergsgreuth – Alemanha); quercetina, L-arginina, CHES (2-(cyclohexylamino) ethanesulfonic acid), propanona, acetonitrila, ácido fórmico (Sigma-Aldrich). Os reagentes para quantificação de ureia utilizados são kits comerciais, produzidos pela empresa Quibasa (Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil).

5.2. Coleta e identificação do material botânico

As folhas de *A. coriacea*, *B. virgilioides, B. crassifolia*, *C. brasiliense*, *C. pachystachya*, *H. obovatus* e *Q. grandiflora* foram coletadas no Campus da Universidade de São Paulo na cidade de Pirassununga. A licença ambiental de acesso ao patrimônio genético foi obtida do Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN) - Autorização nº 010719/2012-1. As exsicatas de identificação foram depositadas no herbário da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiróz da Universidade de São Paulo, instituição fiel depositária do CGEN (Conselho de Gestão do Patrimônio Genético).

5.3. Preparação dos extratos brutos e frações

O preparo e o fracionamento dos extratos foi realizado adaptando a metodologia segundo Toledo (2011), que utilizou como solvente a água ardente de cana de açúcar.

As folhas das espécies escolhidas foram coletadas, lavadas em água corrente e depois rinsadas com água destilada. O material sofreu processo de secagem a temperatura ambiente e, em seguida, sofreu novo processo de secagem em estufa a 42ºC até obter-se massa constante. O material seco foi moído em moinho tipo Wyllie. O solvente utilizado para obtenção dos extratos brutos foi a acetona, porque esse solvente possibilita a extração de uma maior variedade de compostos.

Os compostos foram extraídos misturando as folhas moídas aos solventes acetona e água (7:3), permanecendo em repouso por 48 horas em temperatura ambiente. Os extratos passaram por filtração e o solvente orgânico foi extraído utilizando um rotaevaporador a 45ºC a pressão reduzida ($p \leq 600$ mmHg).

Foram adicionados aos extratos 350 mL de água destilada durante o período de extração da acetona. Após a completa extração da acetona, o conteúdo obtido foi submetido a centrifugação a 4500 x *g* por 10 minutos. Após a centrifugação, o precipitado formado no fundo do tubo foi descartado e o sobrenadante foi reservado.

A extração de lipídeos foi realizada utilizando 300 mL de hexano adicionados gradualmente em frações de 100 mL, em funil de separação. A fase aquosa obtida foi exposta a rotoevaporação para eliminação de hexano a 45ºC sob pressão reduzida ($p \leq 600$ mmHg) e adição do mesmo volume de água. Após a extração completa do hexano, a solução recuperada foi congelada em tubos plásticos de 50 mL para posterior liofilização.

O fracionamento dos extratos foi realizado a partir de um processo de partição líquido-líquido, utilizando butanol. A solução água e butanol permite que os compostos presentes nos extratos sejam separados pela afinidade que têm com cada solvente.

A etapa de fracionamento foi realizada utilizando um grama de extrato liofilizado dissolvido em 200 mL de água. Após total solubilização do extrato liofilizado, foram adicionados gradualmente 300 mL de butanol em frações de 100 mL, em funil de separação. As soluções obtidas, butanólica (EA-BUF) e aquosa (EA-AQ), foram

submetidas a rotoevaporação para remoção do butanol a 60ºC sob pressão reduzida ($p \leq 600$ mmHg) e adição de 200 mL de água.

As soluções obtidas após a etapa de fracionamento com butanol (EA-BUF e a EA-AQ) foram congeladas em tubos plásticos de 50 mL e posteriormente liofilizadas.

5.4. Determinação do perfil cromatográfico dos extratos e frações

A caracterização dos constituintes ativos dos extratos das plantas foi realizada por cromatografia líquida de alto desempenho (CLAE) em matriz de fase reversa utilizando coluna (25 cm x 4,6 mm altura diâmetro) contendo RP-amida (Ascentis-Supelco, Sigma-Aldrich). As amostras foram preparadas em 0,085% de ácido ortofosfórico e 10% de acetonitrila e foi injetada na coluna com fluxo de 1 mL/minuto e os constituintes foram eluídos pelo gradiente linear de 10 a 35% de acetonitrila-água contendo 0,085% de ácido ortofosfórico em 30 minutos. Variações destas condições de eluição foram adaptadas para aperfeiçoar a separação dos constituintes químicos das plantas. As cromatografias foram monitoradas a 210 nm ou 280 nm e foram realizadas utilizando um cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu-Prominence, composto de bomba quaternária LC-20AD, desgaseificador DGU 20-A5, coluna de RP-amida, arranjo de diodos SPD-M20A e software LC Solution versão 1.25 na Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo em Campus de Pirassununga

5.5. Determinação de compostos fenólicos

O método utilizado na determinação de compostos fenólicos foi baseado no reativo de Folin-Ciocalteu (FOLIN, 1927; SINGLETON, 1965). Foram adicionados 100 µL de cada amostra (extrato e frações na concentração de 0,1 mg/mL) a 500 µL reagente de Folin-Ciocalteau. Passados 3 minutos, foram adicionados 400 µL de solução de Na_2CO_3 (75 g/L) e transcorridos 30 minutos a temperatura ambiente a absorbância das reações foi medida a 765 nm utilizando espectrofotômetro (Hitachi

2810). Uma solução de etanol 1% sem a presença da amostra foi utilizada como branco. Os compostos fenólicos foram quantificados por uma curva padrão de ácido gálico. As análises foram efetuadas em duplicata em três experimentos independentes.

5.6. Determinação de flavonoides totais

Para a determinação de flavonoides nos extratos e frações alíquotas de 50 µL com concentração igual a 1,0 mg/mL foram misturadas a 1150 µL de etanol e 50 µL de solução de $AlCl_3$ (20 mg/mL). A solução conservou-se em repouso durante 40 minutos a temperatura ambiente e a medida da absorbância foi realizada a 415 nm utilizando espectrofotômetro (Hitachi 2810). A quantidade de flavonoides foi realizada utilizando uma curva padrão obtida de quercetina (MILIAUSKAS, 2004). As análises foram efetuadas em duplicata em três experimentos independentes.

5.7. Determinação de atividade antioxidante

Os extratos foram dissolvidos em metanol e preparados em oito tubos em concentrações diferentes. Cada tubo continha 1800 µL de solução DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila, 72 µM), metanol (110 µL) e amostra (0 à 90 µL) e permaneceram incubados por 3 horas a 25ºC, na ausência de luz. A curva padrão foi determinada usando reagente Trolox e a leitura da absorbância (A) foi realizada a 515 nm (A515). Foram calculadas as médias dos valores obtidos e a partir delas, foram obtidos os índices de varredura (IV), conforme a fórmula, onde ADPPH é a absorbância do DPPH inicial; AAmostra é a absorbância das amostras.

Equação 1- Índice de varredura

$$IV = \left(\frac{(ADPPH - AAmostra)}{ADPPH}\right)100$$

A partir dos dados obtidos, foi plotado um gráfico de regressão linear e foi calculada a EC_{50} (BRAND-WILIAMS, 1995; RUFINO, 2007). As análises foram efetuadas em duplicata em três experimentos independentes.

5.8. Triagem e determinação da IC_{50}

A arginase recombinante de *L. (L.) amazonensis* foi expressa e purificada segundo protocolo descrito por da Silva (2012). A triagem dos extratos, frações e compostos quanto a sua capacidade de inibição da arginase de *L. (L.) amazonensis* foi realizada usando concentração de 100 µM para cada inibidor.

As reações foram realizadas em tampão CHES 50 mM, pH 9,5. Uma mistura, Mix1, contendo L-arginina (pH 9,5) com duas vezes a concentração desejada, e uma segunda mistura, Mix2, contendo enzima (3.000 unidades) diluída em tampão CHES 125 mM (pH 9,5) . A reação foi preparada misturando 50 uL de Mix1, 10 µL de inibidor e 40 µL de Mix2, seguido de incubação imediata em banho maria durante 15 minutos a 37ºC.

A quantificação de ureia produzida foi realizada por ensaio colorimétrico enzímico de Berthelot (Fawcett; Scott, 1960) usando reagentes comerciais. De maneira resumida, a atividade da enzima foi interrompida transferindo 10 µL da mistura (Mix1 + Mix2) para 750 µL de Reagente R1 (tampão fostato 20 mM, pH 7, contendo 60 mM de salicilato, 1 mM de nitroprussiato de sódio 1 mM e > 500 UI de ureiase). Essa mistura foi incubada a 37ºC durante 5 minutos, e transcorrido o tempo foram adicionados 750 µL do reagente R2 (hipoclorito de sódio 10 mM e hidroxido de sódio 150 mM) e as amostras foram incubadas posteriormente durante 5 minutos a 37ºC (MANJOLIN et al., 2013).

Foi utilizado um espectrofotêmetro (Hitachi 2810U) para a determinação das absorbâncias a 600 nm. Os controle negativos e positivos foram realizados sob as mesmas condições na ausência de inibidor e os experimentos foram realizados em 3 experimentos independentes em duplicata.

A determinação da IC_{50} da atividade da enzima foi realizada variando a concentração de inibidor com fator de diluição de 1:10. Os experimentos foram realizados em triplicata em pelo menos três experimentos independentes ($R^2 \geq 0,95$).

As diferentes concentrações dos inibidores foram obtidas a partir de diluição seriada do composto em água ou solvente indicado pelo fabricante.

As reações foram realizadas em tampão CHES 50 mM, pH 9,5, contendo concentrações diferentes de L-arginina 50 mM a pH 9,5. As amostras foram incubadas em banho maria a 37°C durante 15 min, e a ureia formada foi analisada como descrito acima . A determinação da IC_{50} foi realizada utilizado um modelo matemático sigmoidal (log IC_{50}) utilizando o software Graphpad 6.0.

5.9. Determinação de Ki, Ki' e mecanismo de inibição

As reações foram realizadas em tampão CHES 50 mM, pH 9,5, contendo concentrações diferentes de L-arginina (50, 75 e 100 mM) a pH 9,5. Os inibidores foram usados em três diferentes concentrações próximas a IC_{50}. Os substratos e inibidores foram obtidos em diferentes concentrações por diluição em série. Uma mistura, Mix1, contendo L-arginina (pH 9,5) com duas vezes a concentração desejada, e uma segunda mistura, Mix2, contendo enzima (3.000 unidades) diluída em tampão CHES 125 mM a pH 9,5. A reação foi preparada misturando 50 uL de Mix1, 10 µL de inibidor e 40 µL de Mix2, seguido de incubação imediata em banho maria durante 15 minutos a 37ºC.

A quantificação de ureia produzida foi realizada por ensaio colorimétrico enzímicos de Berthelot (FAWCETT & SCOTT, 1960) usando reagentes comercias. Em sintese, a atividade da enzima foi interrompida transferindo-se 10 µL da mistura (Mix1 + Mix2) para 750 µL de Reagente R1 (tampão fostato 20 mM, pH 7, contendo 60 mM de salicilato, 1 mM de nitroprussiato de sódio 1 mM e > 500 UI de ureiase). Essa mistura foi incubada a 37ºC durante 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 750 µL do reagente R2 (hipoclorito de sódio 10 mM e hidroxido de sódio 150 mM), e as amostras foram incubadas posteriormente durante 5 minutos a 37ºC (MANJOLIN et al., 2013). As amostras quando não estavam incubadas a 37ºC, foram mantidas em banho de gelo a 4ºC.

Foi utilizado um espectrofotômetro (Hitachi 2810U) para a determinação das absorbâncias a 600 nm. Os controle negativos e positivos foram realizados sob as

mesmas condições na ausência de inibidor. Os experimentos foram realizados em 3 experimentos independentes em duplicata.

A constante K_i foi determinada para inibidores que apresentaram modelos de inibição competitivo ou misto, e K_i' foi estabelecida para inibidores que apresentaram modelos de inibição não competivo ou misto (CORNISH-BOWDEN, 1974). As constantes foram determinadas calculando x para os pontos de intersecção entre as duas linhas, obtidos por regressão linear. Para a inibição não-competitiva, y = 0 foi utilizado para a equação para encontrar os valores das constantes de K_i e K_i '.

5.10. Análise estatística

A análise estatística foi realizada por análise de variância aplicando-se teste de Tukey utilizando-se o software gratuito R versão 3.2 (Departamento de Estatística da Universidade de Auckland – Nova Zelândia). As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

6 . RESULTADOS

6.1. Coleta de material

As plantas foram coletadas numa faixa de cerrado dentro do campus da Universidade de São Paulo na cidade de Pirassununga, indicado segundo mapa da área figura 5.

Figura 5 - Mapa da área de Cerrado no campus da FZEA/USP

Os exemplares de *A. coriacea*, *B. crassifolia*, *C. brasiliense*, *C. pachystachya*, *H. obovatus* e *Q. grandiflora* selecionados para realização da coleta encontram-se segundo os dados geográficos de GPS (GLOBAL POSITIONING SYSTEM), informados na tabela 1.

Tabela 1 – Posição geográfica dos exemplares coletados.

ESPÉCIE	NOME POPULAR	LATITUDE	LONGITUDE	VOUCHER
A. coriacea	araticum	21°56'26.14"S	47°28'27.05"O	132687
B. crassifolia	murici	21°56'18.69"S	47°28'29.95"O	132688
C. brasiliense	pequi	21°56'23.06"S	47°28'28.12"O	132689
C. pachystachya	embaúba	21°94'63.95"S	47°46'8440"O	132690
H. obovatus	pau de leite	21°56'15.38"S	47°28'31.18"O	132692
Q. grandiflora	pau terra	21°56'17.63"S	47°28'29.01"O	132693

6.2. Determinação de compostos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante

Os resultados obtidos na determinação da quantidade de compostos fenólicos e flavonoides nos extratos brutos e a determinação da capacidade antioxidante dos extratos brutos são apresentados na tabela 2.

Tabela 2 - Determinação de flavonoides, compostos fenólicos e DPPH.

Extrato bruto	Flavonoides (mg/g)	Composto fenólicos (mg/g)	DPPH (mg/g)
A. coriacea	16,00	214,05	477,09
B. crassifolia	14,42	590,48	958,37
C. brasiliense	15,06	384,70	638,85
C. pachystachya	32,35	394,09	839,37
H. obovatus	18,29	346,60	883,10
Q. grandiflora	7,10	572,07	1004,20

Flavonoides = mg/g extrato = mg equiv Quercetina/g de extrato seco; Compostos fenólicos = mg/g amostra***= mg equiv. Ácido Gálico/g de extrato seco e DPPH = mg equiv trolox/ g extrato seco

6.3. Análise dos extratos brutos e frações por CLAE

A análise dos extratos vegetais por CLAE foi realizada com gradiente de composição da fase móvel acidificada em virtude do vasto número de compostos presentes em cada espécie analisada, evidenciada pelo expressivo número de picos presentes nos espectros.

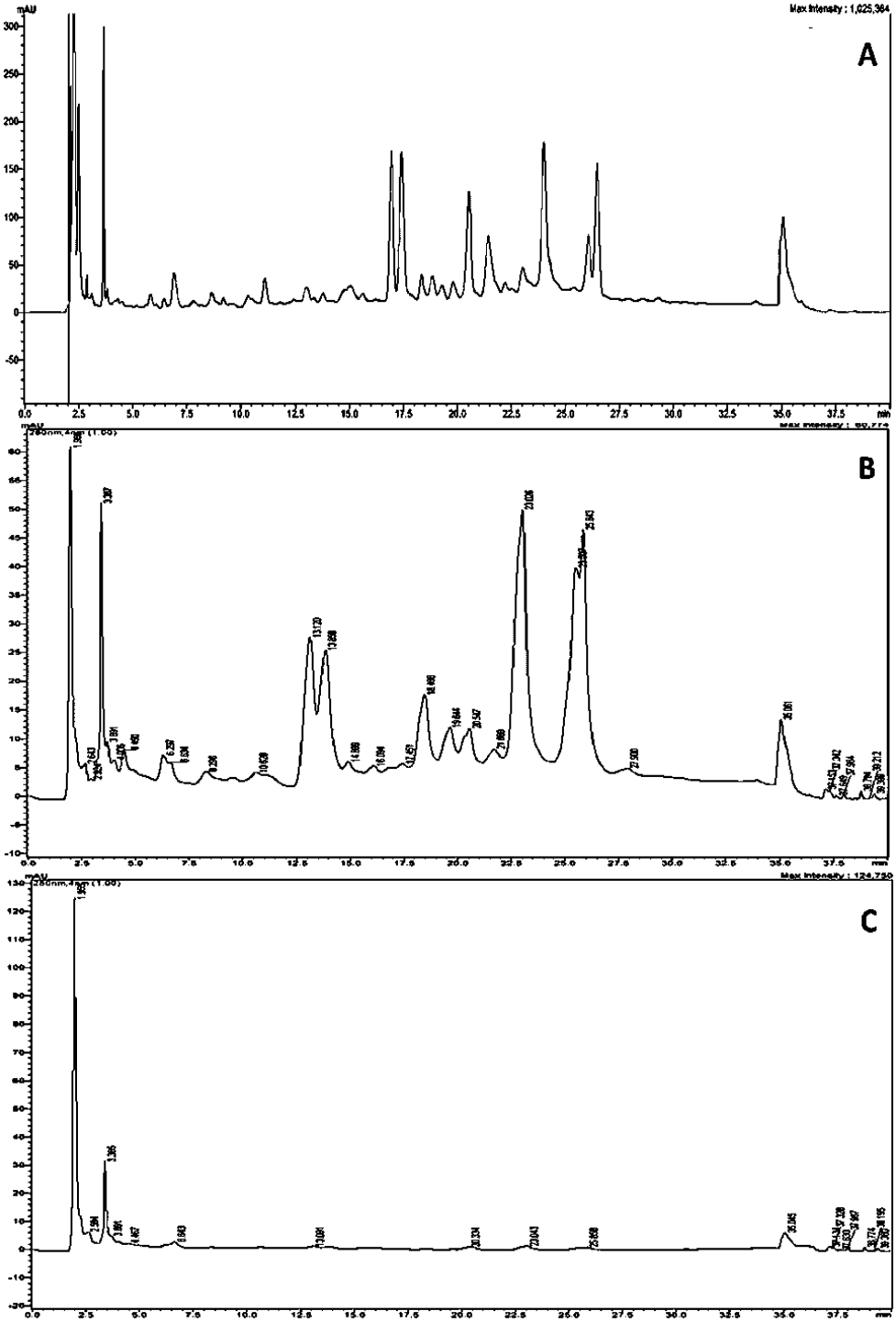
Os cromatogramas dos extratos brutos foram submetidos à análise e estão apresentados nas figuras 6,7,9,10,11 e 12. A similaridade entre os perfis cromatográficos para os diferentes extratos e suas frações foi avaliada por comparação dos tempos de retenção dos sinais cromatográficos observados e de seus espectros de absorção (280 nm).

A análise comparativa do perfil cromatográfico dos extratos de folhas, bem como de suas frações, demonstrou que o fracionamento contribuiu significativamente em alguns casos na separação dos compostos em virtude da diferença de polaridade. A diferença entre os perfis da fase aquosa (EA-AQ) e da fase butanólica (EA-BUF)

demonstram que houve uma separação de compostos em decorrência da afinidade com butanol.

Na análise do extrato obtido a partir de folhas de *A. coriacea* verifica-se a presença de flavonoides entre 10 e 28 minutos (Figura 6-A). O fracionamento do extrato bruto de *A. coriacea* apresentou boa eficiência no sentido de separar compostos com polaridades distintas, haja visto que a fase aquosa (Figura 6-C) apresentou uma redução no número de picos.

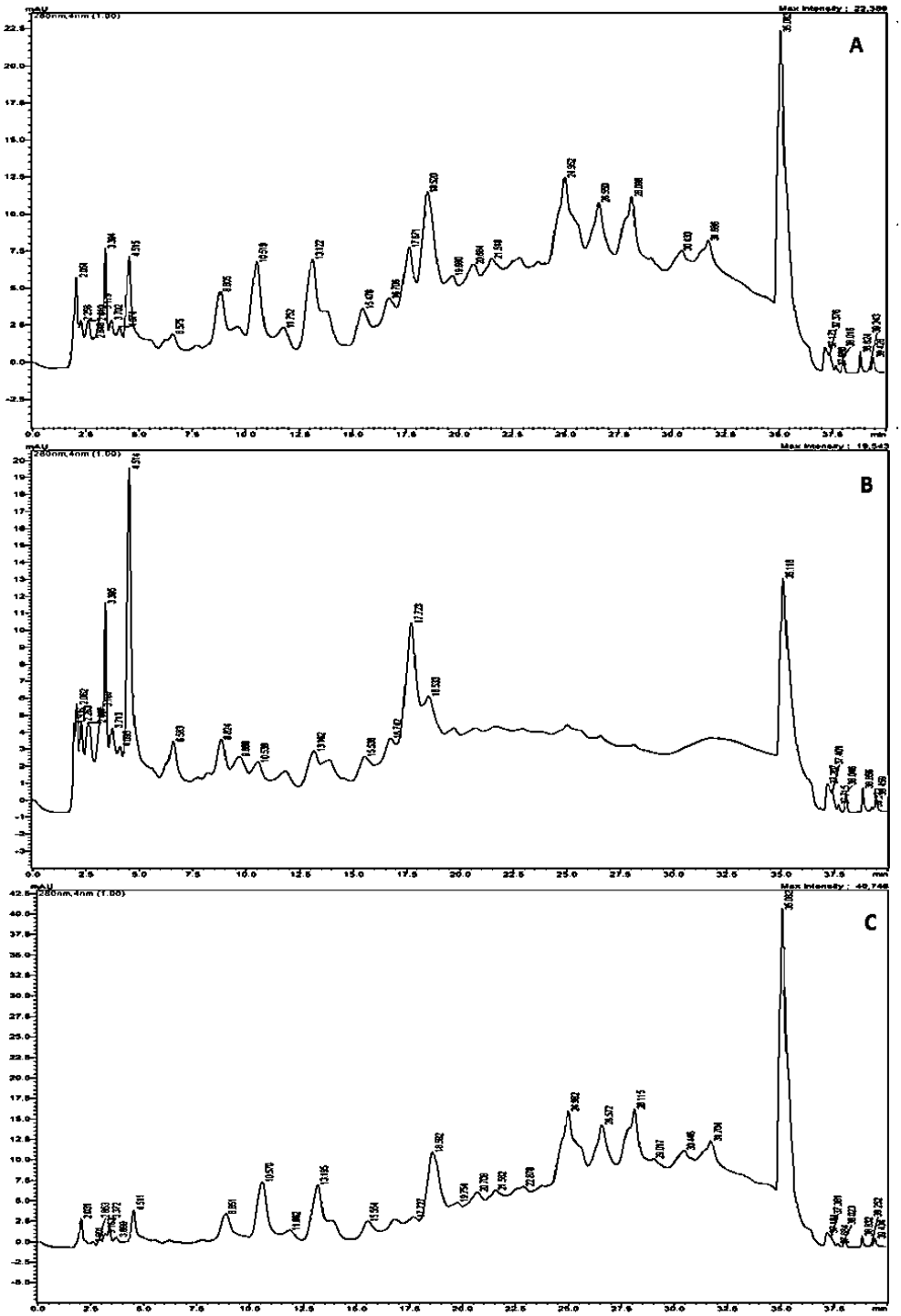
Figura 6 - *A. coriacea* - **A** - Extrato, **B** – EA-BUF, **C** – EA-AQ por CLAE-DAD (280 nm)



O fracionamento do extrato (Figura 7-A) do *B. crassifolia* demonstra que os compostos presentes na fração butanólica (Figura 7-B) apresentam menor afinidade pela coluna, deixando a coluna até 20 min. A fração aquosa (Figura 7-C) demonstra que em sua composição estão presentes os compostos com maior afinidade pela

coluna RP-amida, sendo assim, há a necessidade do aumento da concentração de acetonitrila e maior tempo para detecção dos compostos.

Figura 7 - *B. crassifolia* - **A** - Extrato, **B** – EA-BUF, **C** – EA-AQ por CLAE-DAD (280 nm)



Os cromatogramas do extrato de folhas de *C. brasiliense* são apresentados na Figura 9, separadamente. A fração aquosa (Figura 9-C) apresenta muitos picos que representam uma grande variedade de compostos presentes na mistura. Entretanto no cromatograma da fase butanólica (Figura 9-B) há um pico predominante aos 17.6 min.

Nas mesmas condições cromatográficas, o padrão de orientina (Figura 8) foi analisado e apresentou tempo de retenção de 17.8 minutos, o que nos leva a acreditar que a orientina seja o constituinte principal da fração butanólica do extrato de folhas de pequi (Figura 9-B).

Figura 8 - Padrão de orientina por CLAE-DAD (280 nm)

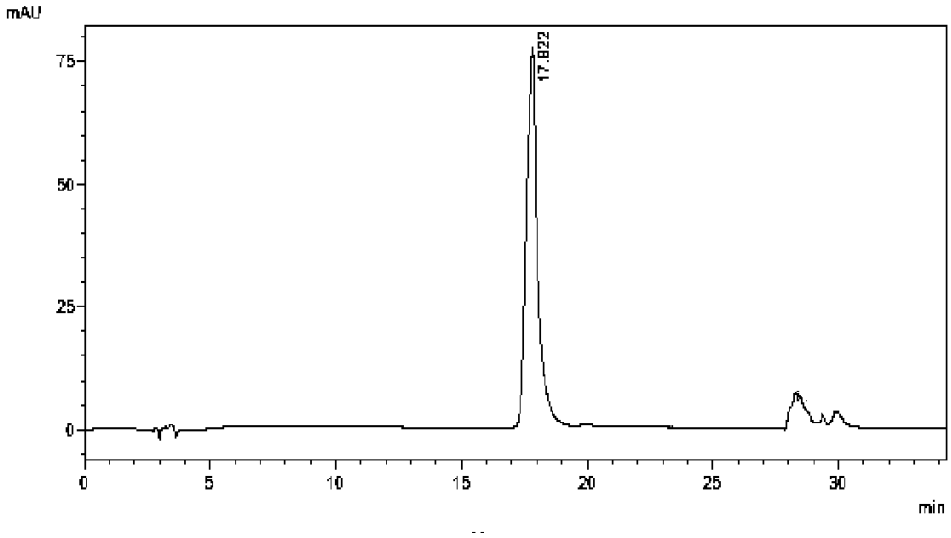
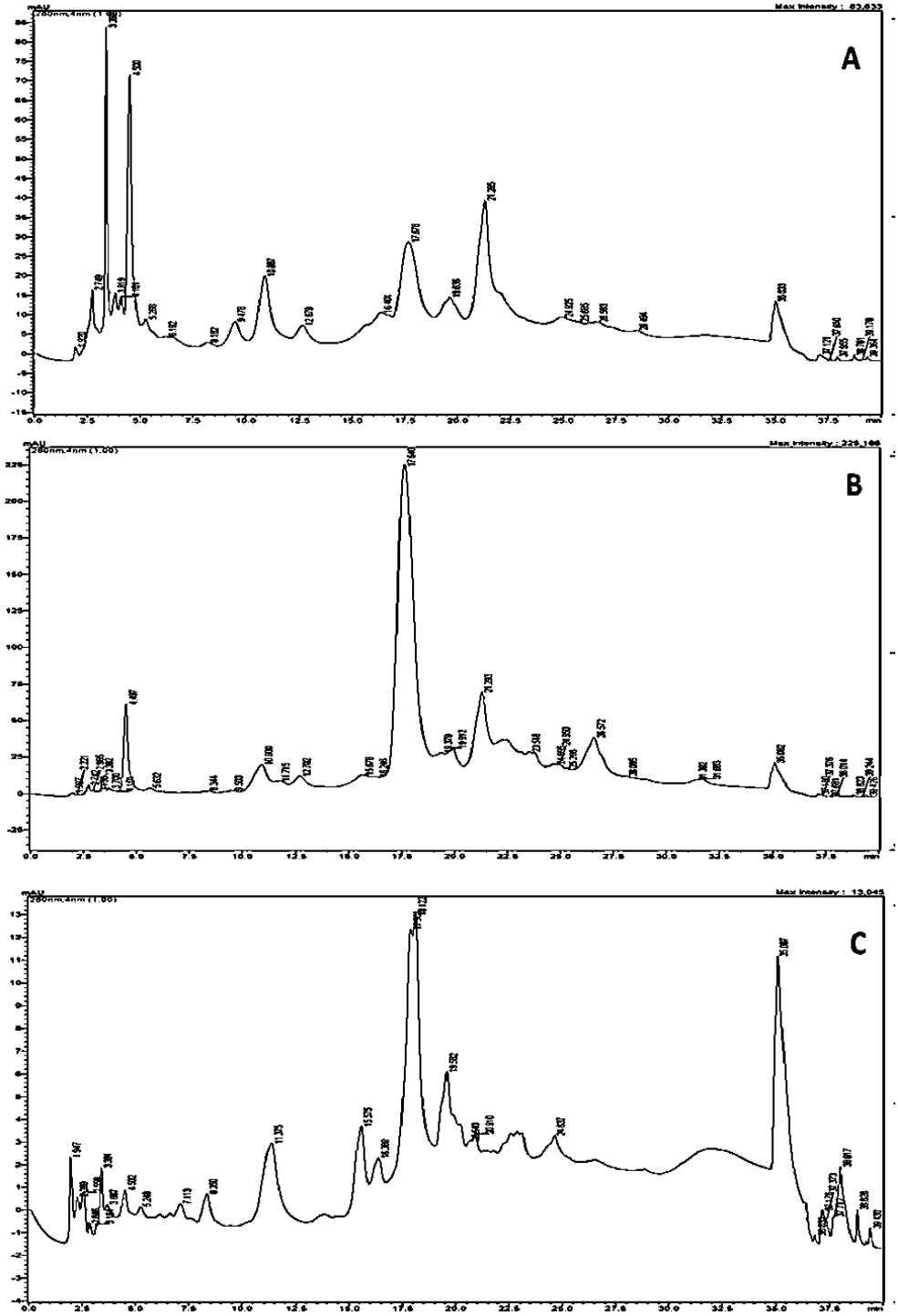


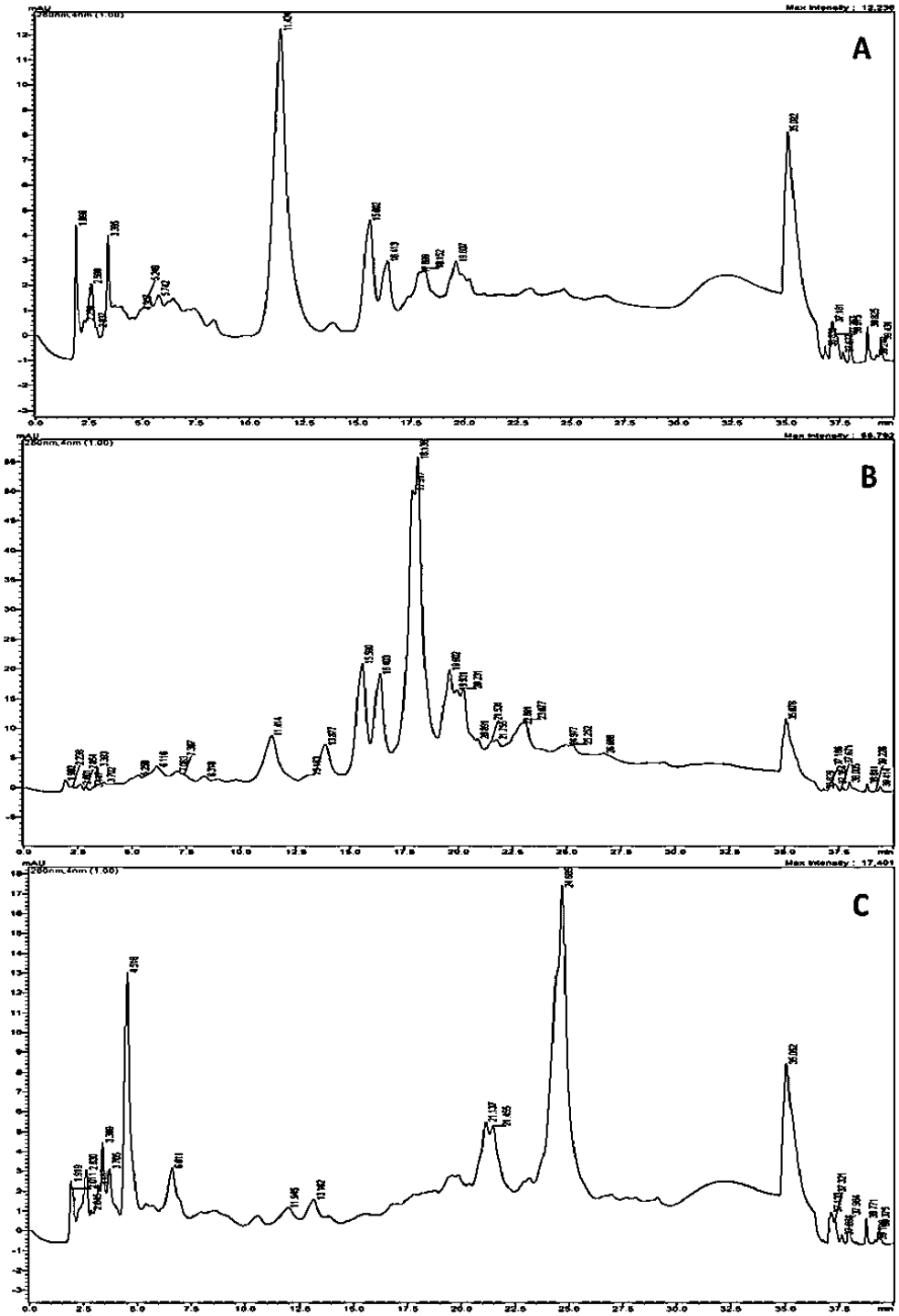
Figura 9 - *C. brasiliense* - **A** - Extrato, **B** – EA-BUF, **C** – EA-AQ por CLAE-DAD (280 nm)



Os cromatogramas dos extratos da espécie de *C. pachystachya* são apresentados na Figura 10 separadamente, extrato (Figura 10-A), fração butanólica (Figura 10-B) e fração aquosa (Figura 10-C) com muitos picos que representam substâncias presentes no extrato e nas frações. A análise do cromatograma da fração

butanólica (Figura 10-B) aos 18.3 minutos e da fração aquosa (Figura 10-C) apresentou pico majoritário aos 24.8 min.

Figura 10 - *C. pachystachya* - **A** - Extrato, **B** – EA-BUF, **C** – EA-AQ por CLAE-DAD (280 nm)



A análise cromatográfica do extrato acetônico de *H. obovatus* (Figura 11 – A) demonstra a presença de um pico majoritário aos 25.3 minutos. Esse mesmo pico é detectado aos 25 minutos no cromatograma da fração butanólica (Figura 11–B) e mostra-se predominante nessa fração. A fração aquosa (Figura 11–C) apresenta picos variados, típicos de uma mistura de compostos, entretanto, o pico predominante na fração butanólica apresenta baixa intensidade na fração aquosa.

Os cromatogramas dos extratos e frações da espécie de *Q. grandiflora*, são apresentados na Figura 12 separadamente, extrato (Figura 12-A), fração butanólica (Figura 12-B) e fração aquosa (Figura 12-C) e apresentam picos em variados tempos de retenção. Os cromatogramas da fração butanólica e da fração aquosa sugerem que o fracionamento com butanol não foi eficiente nesse caso, porque em nenhuma das frações apresenta-se um pico majoritário ou com alta definição.

Figura 11 -. *H. obovatus* - **A** - Extrato, **B** – EA-BUF, **C** – EA-AQ por CLAE-DAD (280 nm)

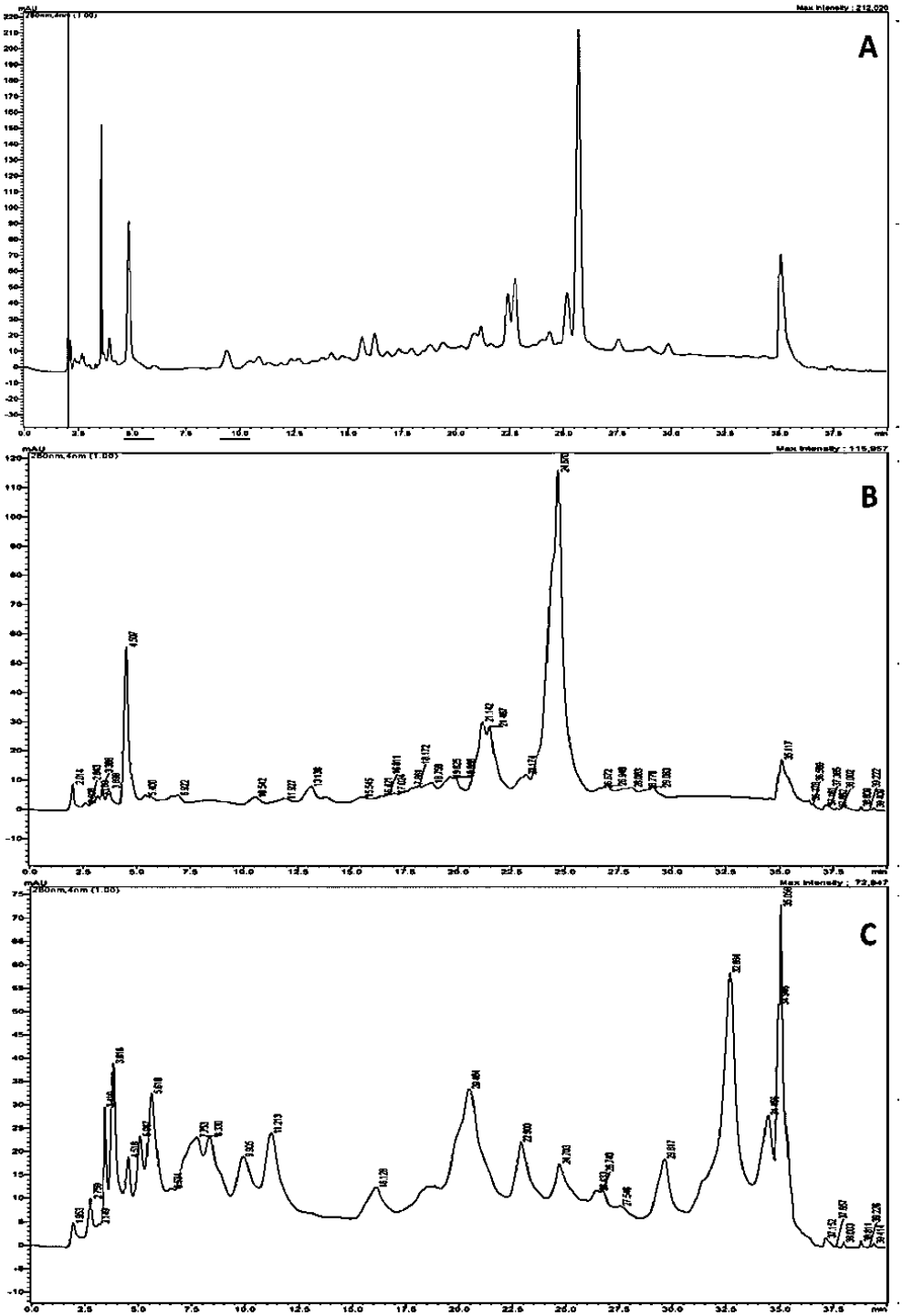
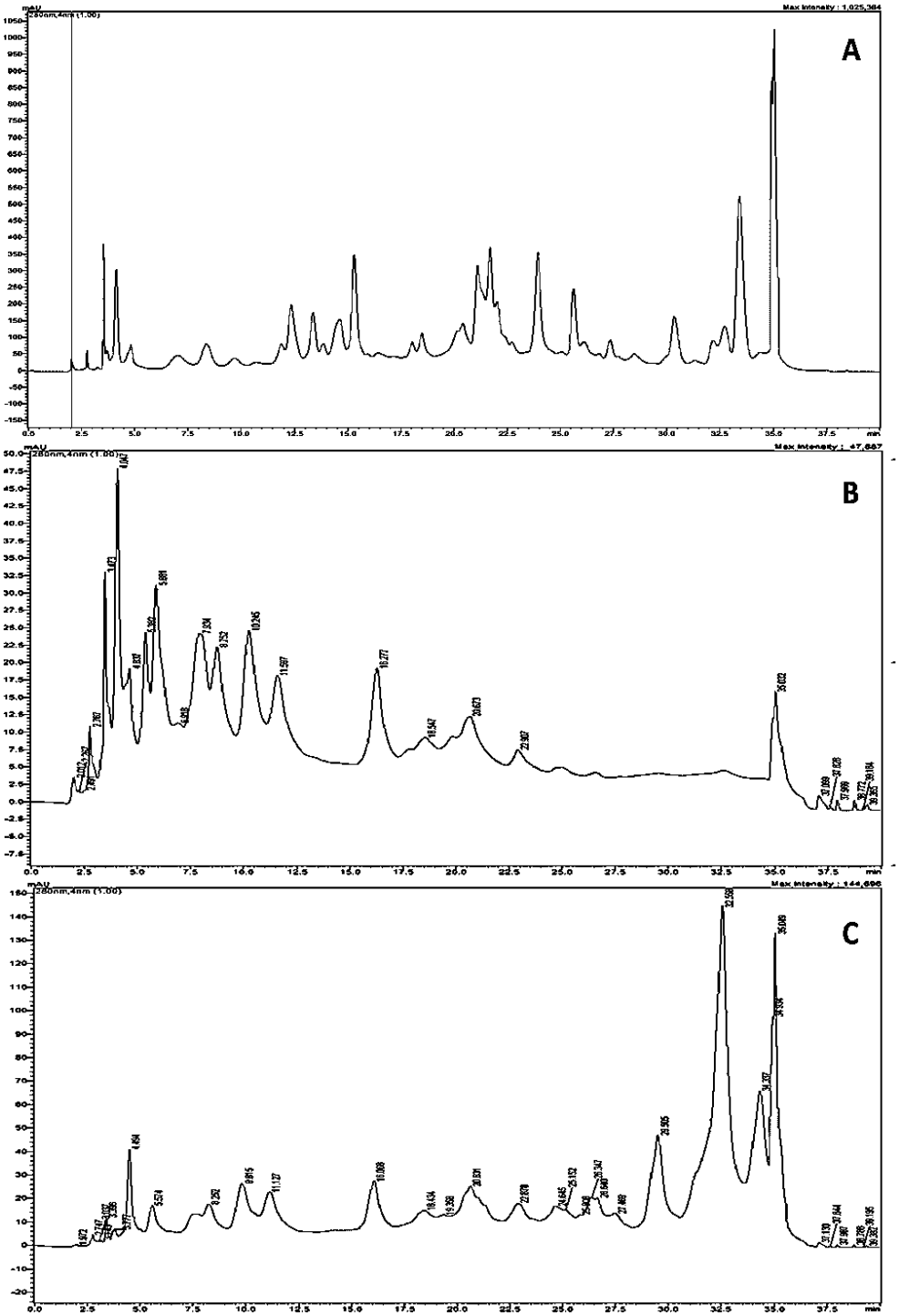


Figura 12 - *Q. grandiflora* - **A** - Extrato, **B** – EA-BUF, **C** – EA-AQ por CLAE-DAD (280 nm)



6.4. Determinação a IC_{50} dos extratos vegetais e frações

A determinação da IC_{50} da enzima arginase de *L*. (*L*) *amazonensis* foi realizada utilizando os extratos vegetais e suas frações EA-BUF e EA-AQ das seis espécies coletadas. As curvas dose – resposta de inibição da ARG-L pelos extratos e frações são apresentadas nas figuras 13 e 14 e os resultados de IC_{50} são apresentados na tabela 3.

Figura 13 - Curvas dose – resposta da ARG-L pelos extratos e frações de *A. coriacea*, *B. crassifolia* e *C. brasiliense* (regressão não linear dos gráficos apresenta $r^2 > 0,97$).

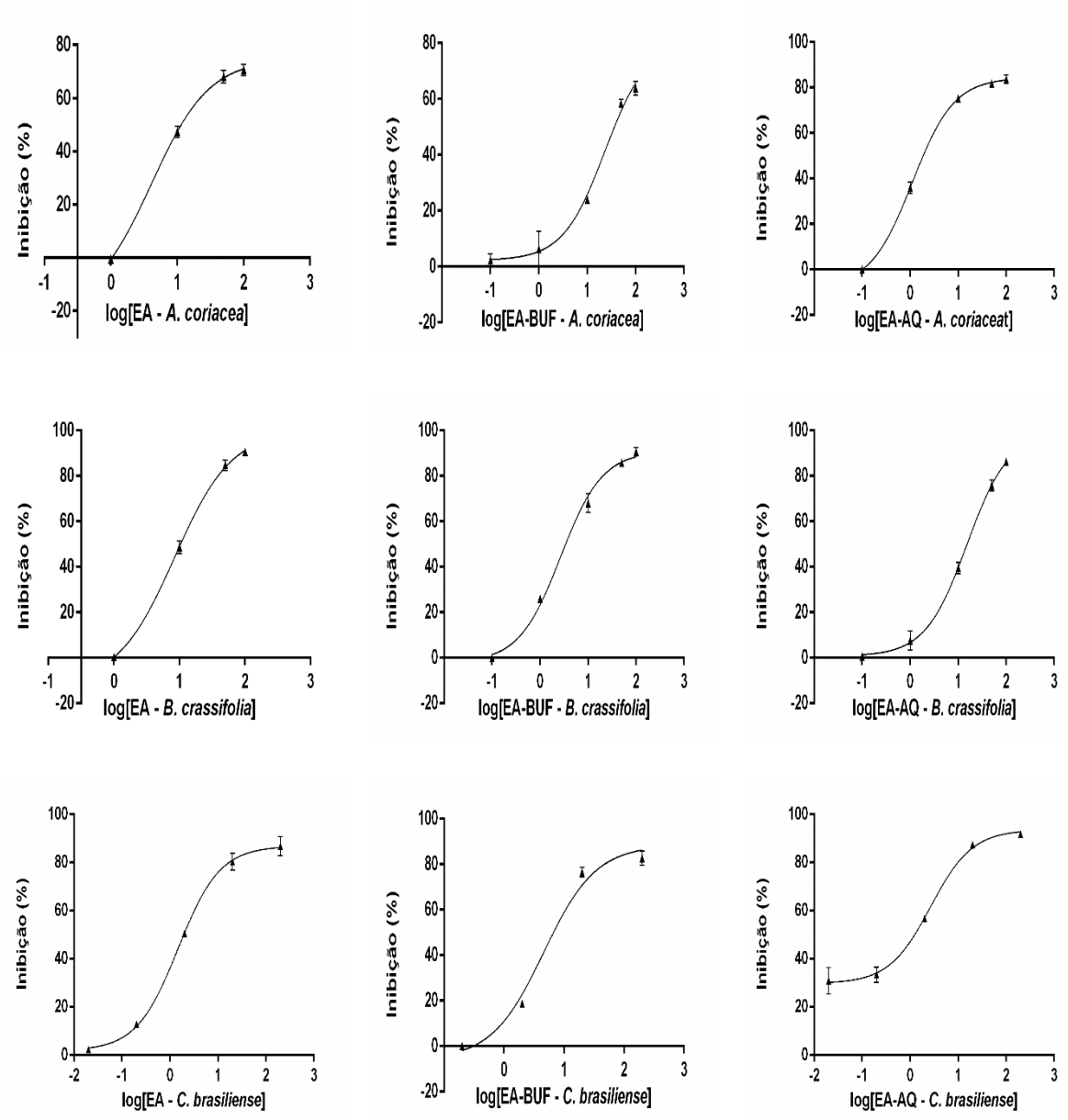


Figura 14 - Curvas dose – resposta da ARG-L pelos extratos e frações de *C. pachystachya*, *H. obovatus* e *Q. granfilora* (regressão não linear dos gráficos apresenta $r^2 > 0,97$).

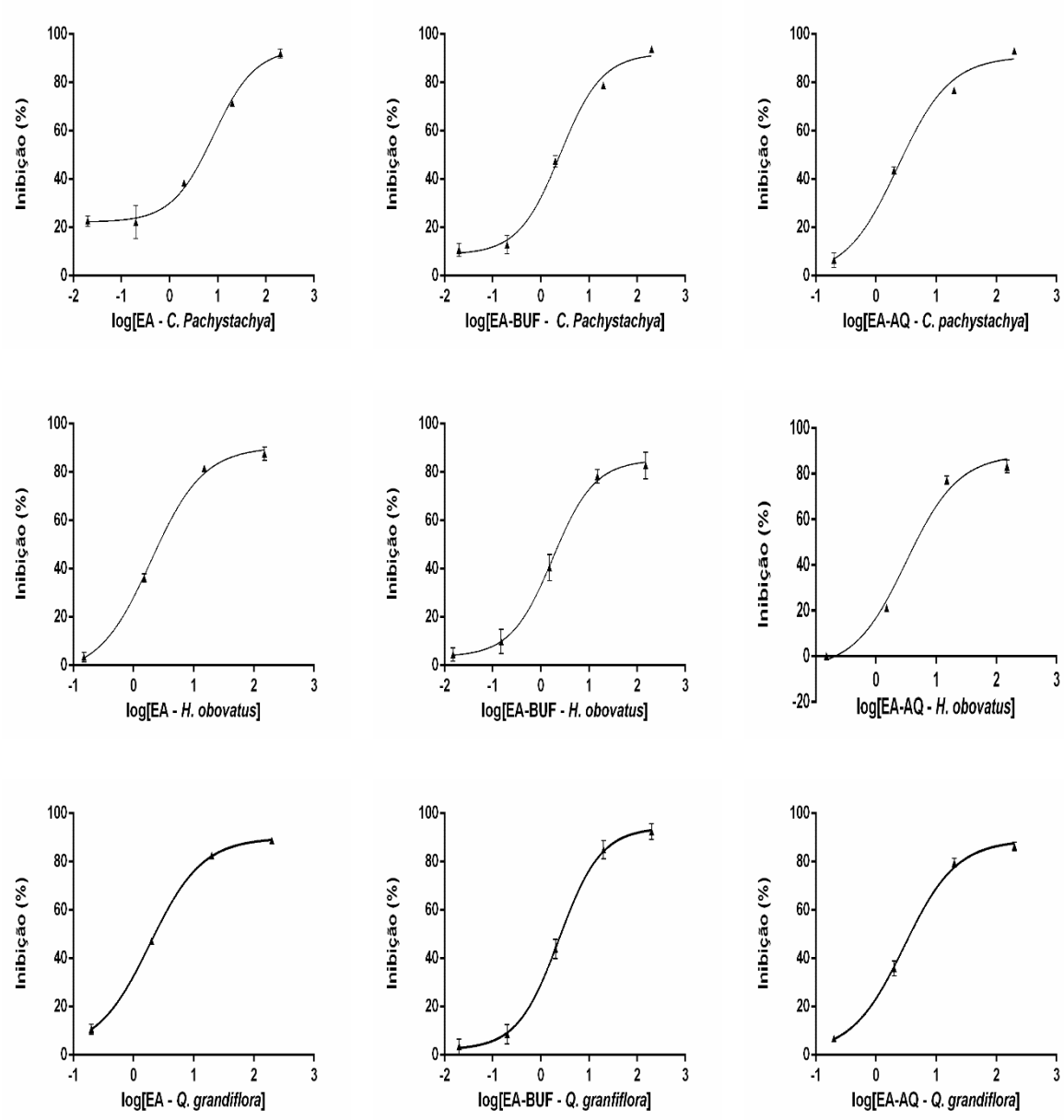


Tabela 3 - Determinação da IC_{50} da arginase com extratos vegetais e suas frações.

Extrato / Fração	**IC_{50} ± SE (µg/mL)**
A. coriacea	19,2 ± 3,2
EA-BUF *A. coriacea*	41,5 ± 3,1
EA-AQ *A. coriacea*	2,8 ± 1,3
Byrsonima crassifolia	11,6 ± 0,6
EA-BUF *Byrsonima crassifolia*	3,7 ± 0,6
EA-AQ *Byrsonima crassifolia*	16,4 ± 1,2
C. brasiliense	2,0 ± 0,3
EA-BUF *C. brasiliense*	4,1 ± 0,7
EA-AQ *C. brasiliense*	4,0 ± 0,1
C. pachystachya	6,2 ± 0,2
EA-BUF *C. pachystachya*	3,7 ± 1,3
EA-AQ *C. pachystachya*	6,5 ± 4,0
H. obovatus	3,0 ± 0,3
EA-BUF *H. Obovatus*	4,5 ± 0,9
EA-AQ *H. obovatus*	2,9 ± 1,6
Q. grandiflora	1,7 ± 01
EA-BUF *Q. grandiflora*	2,4 ± 0,1
EA-AQ *Q. grandiflora*	2,6 ± 0,2

Os dados apresentados representam as médias dos experimentos ± erro da média

O extrato de folhas de *A. coriacea* apresentou o maior valor para IC_{50} da arginase (19,2 µg/mL), assim como demonstrou menor capacidade redutora entre os extratos (477,09 mg/g) e menor concentração de compostos fenólicos (214,05 mg/g).

O extrato de *Q. grandiflora* apresentou o menor valor para IC_{50} da enzima (1,7 µg/mL) demonstrando maior potencial de inibição entre os extratos analisados, assim como a maior capacidade antioxidante entre os extratos analisados (1004,20 mg/g).

A fase butanólica dos extratos de *A. coriacea*, *H. obovatus*, *Q. grandiflora* apresentaram valores de IC_{50} maiores quando comparados os extratos. A fração butanólica do extrato de folhas *A. coriacea* mostrou a metade da capacidade de inibição da enzima, entretanto a fração aquosa do extrato demonstra aumento considerável da capacidade inibitória da ARG-L em aproximadamente 7 vezes.

A fração butanólica do extrato de *B. crassifolia*, embora os cromatogramas não apresentem picos majoritários nessa fração, demonstrou potencial de inibição da 3,7 vezes mais potente que o extrato bruto sobre ARG-L e 4,5 vezes mais potente que a fração aquosa.

A presença de compostos no cromatograma do extrato de *C. brasiliense* e da fração aquosa fica evidente pelo número de picos presentes. Entretanto, a análise cromatográfica da fração butanólica do extrato de *C. brasiliense* demonstra a presença de um pico majoritário aos 17.6 minutos e capacidade inibitória da ARG-L significativa (IC_{50} = 4 µg/mL).

A inibição da arginase não apresentou grande variação entre o extrato e a fração aquosa de *C. pachystachya*. A fração butanólica do extrato de folhas e embaúba demonstrou aumento no potencial de inibição da ARG-L.

A análise da fração butanólica do extrato de folhas de *H. obovatus* por CLAE demonstrou a presença de um pico majoritário aos 24.6 minutos e IC_{50} da arginase igual à 4,5 µg/mL. A análise cromatográfica da fase aquosa desse extrato apresenta picos de menor intensidade em tempos variados e IC_{50} para a enzima igual à 2,9 µg/mL.

A fração butanólica e a fração aquosa do extrato de folhas de *Q. grandiflora* demonstram maior potencial de inibição da arginase, 2,4 e 2,6 µg/mL respectivamente, dentre a frações analisadas. Quando comparados às frações obtidas a partir dos extratos analisados nesse trabalho, foram as frações que apresentam o maior potencial de inibição da enzima arginase de *L.* (*L*) *amazonensis.*

7.5. Triagem dos inibidores de ARG-L

Com o objetivo de buscar novos inibidores para arginase de *L.* (*L*) *amazonensis,* foi realizada a triagem de 27 compostos isolados de plantas: 24 flavonoides e 3 derivados do ácido cafeico.

Dentre os flavonoides, apenas nove compostos foram considerados inibidores potenciais da arginase, porque apresentaram inibição da atividade enzimática maior que 70% a 100 µM (Tabela 4).

Tabela 4 - Triagem de flavonoides.

Nº	Composto	Concentração (uM)	Inibição (%)
	Flavonoides		
1	Schaftosideo	1000	0,000
2	Isoschaftosideo	1000	0,000
3	Hesperidina	1000	0,000
4	Tilirosideo	1000	0,000
5	Naringina	1000	0,000
6	Mirecetina	1000	84 ± 1
7	Rhoifolina	1000	0,000
8	Miricitrina	1000	89 ± 1
9	Morina	1000	23 ± 2
10	Kaempferol 3 glucosideo	1000	6 ± 1
11	Fraxina	1000	15 ± 8
12	Apiina	1000	29 ± 2
13	Taxifolina	100	88 ± 6
14	Luteolina 7 glucosideo	100	72 ± 2
15	Hiperosideo	100	84 ± 2
16	Crisina	250	5 ± 4
17	Guaijaverina	100	83 ± 2
18	Quercetina 3 glucoronideo	100	80 ± 2
19	Rutina	100	73 ±1
20	Rhamnetina	100	86 ± 2
21	Spiraeosideo	100	20 ± 1
22	Eriodctiol	100	85 ± 1
23	Avicularina	100	87 ± 2
24	Apigenina 7 glucosideo	100	9 ± 5

Quercetina é um inibidor misto utilizado como controle positivo; os dados apresentados representam as médias dos experimentos ± erro da média

Também foi realizada triagem com 3 derivados do ácido cafeico, a fim de encontrar novos inibidores para ARG-L. Dentre os compostos analisados, todos apresentaram inibição da enzima maior que 70% a 100 µM (Tabela 5).

Tabela 5 - Triagem dos derivados do ácido cafeico .

Nº	Composto	Concentração (uM)	Inibição (%)
01	Ácido cryptoclorogênico	100	78 ± 2
02	Verbascosideo	100	90 ± 1
03	Isoverbascosideo	100	82 ± 4

Quercetina é um inibidor misto utilizado como controle positivo; os dados apresentados representam as médias dos experimentos ± erro da média

Após a triagem, foram selecionados 12 compostos que atingiram os parâmetros estabelecidos para serem considerados inibidores potencias da ARG-L.

6.6. Determinação das IC_{50}, Ki, e modelo de inibição.

Após a triagem, a determinação da IC_{50}, Ki e modelo de inibição foi determinado. Dentre os flavonoides, a taxifolina apresentou a maior capacidade inibitória da enzima (IC_{50} = 1,5 µM) e a luteolina 7 glucosideo apresentou a menor capacidade inibitória (IC_{50} = 20 µM). A quercetina foi utilizada como referência para determinação da IC_{50} e modelo de inibição dos compostos analisados sobre ARG-L (DA SILVA et al., 2012). As curvas dose – resposta de inibição da ARG-L pelos flavonoides são apresentadas nas figuras 15 e 16**.** Os valores encontrados para IC_{50}, K_i, K_i' e os modelos de inibição são apresentados na tabela 6.

Figura 15 - Curvas dose – resposta da ARG-L pelos flavonoides: avicularina, guaiaverina, rutina, hiperosideo, quercetina 3 glucoronideo e rhamnetina (regressão não linear dos gráficos apresenta $r^2 > 0,97$).

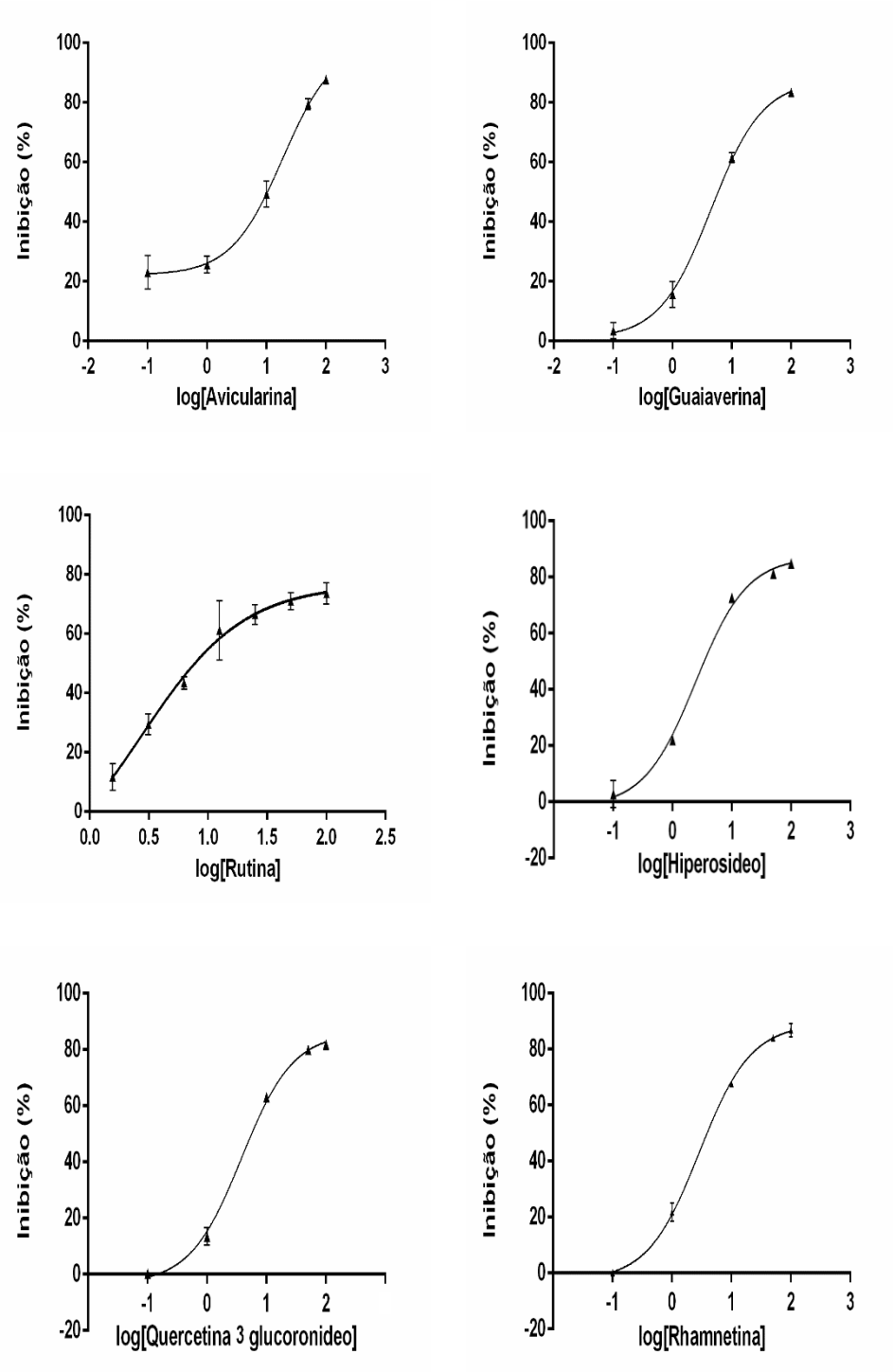


Figura 16 - Curvas dose – resposta da ARG-L pelos flavonoides: quercetina, luteolina 7 glucosideo, taxifolina e eriodictiol (regressão não linear dos gráficos apresenta $r^2 > 0,97$).

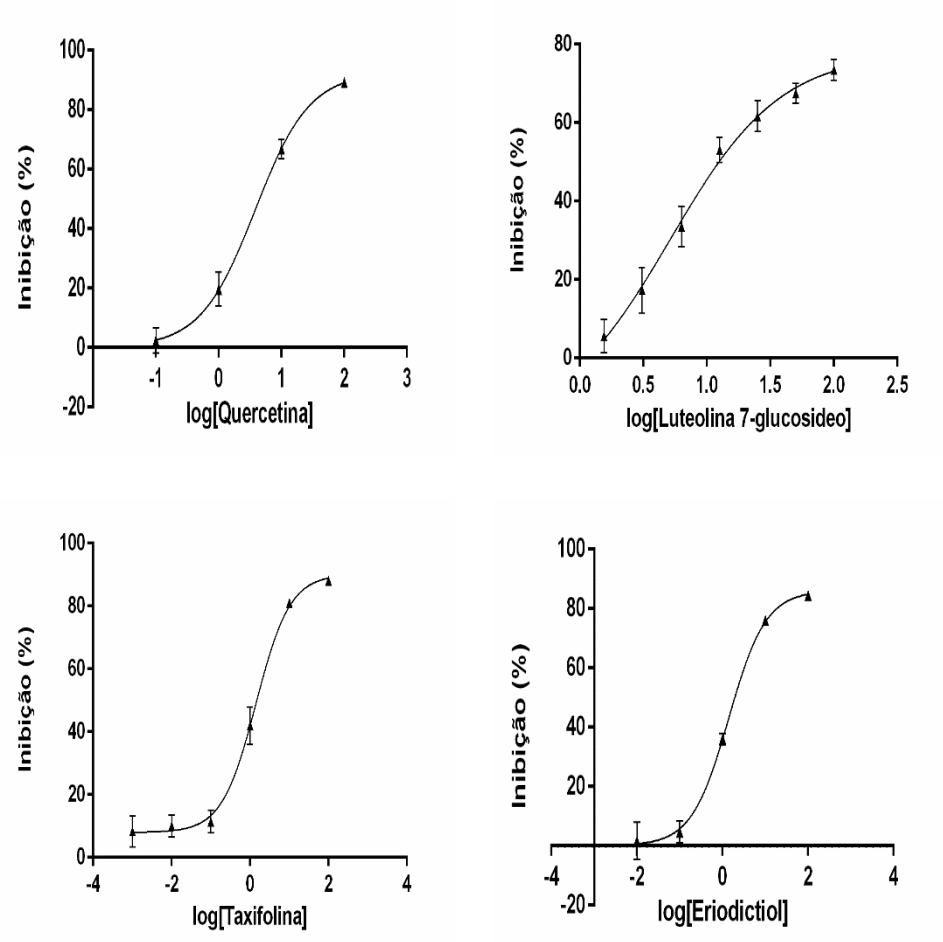
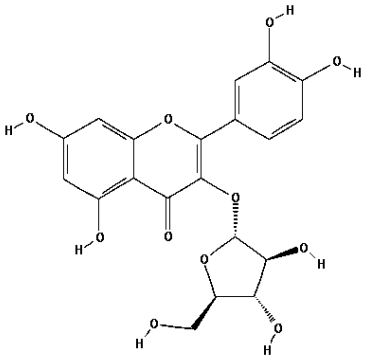
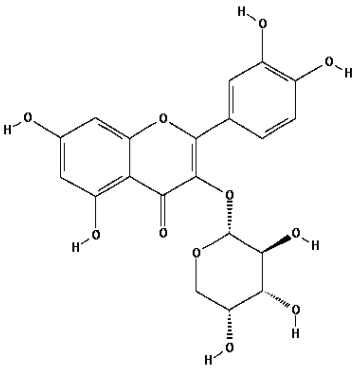
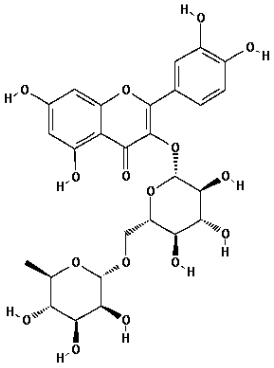
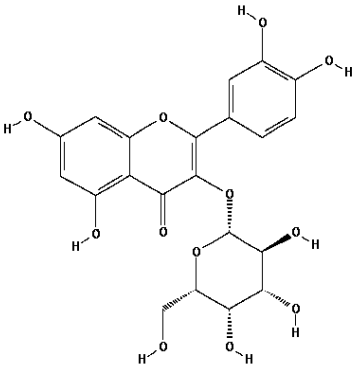
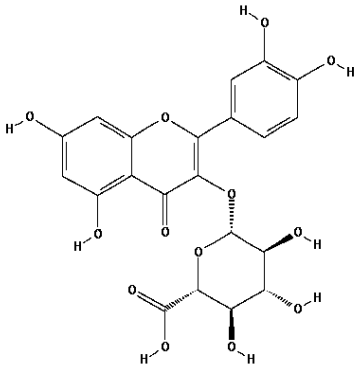
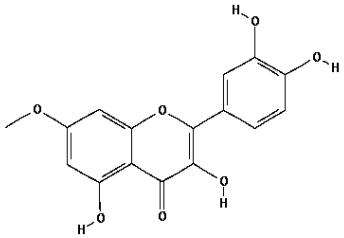
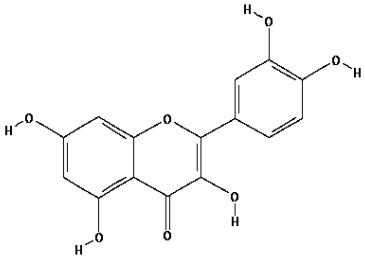
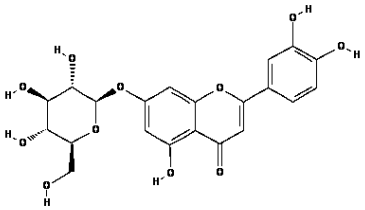


Tabela 6 - Flavonoides, IC_{50}, Ki, Ki' e modelo de inibição.

Inibidor	IC_{50} (µM)	K_i (µM)	Modelo de inibição	Estrutura
Avicularina [c]	6,0 ± 1,5	4,8 ± 0,9	Competitivo	
Guaiaverina [b]	6,9 ± 0,4	4,2 ± 0,5	Competitivo	
Rutina [b]	10 ± 2,0	12,7 ± 0,4	Competitivo	
Hyperosideo [c]	4,4 ± 0.3	2,7 ± 0,5	Competitivo	

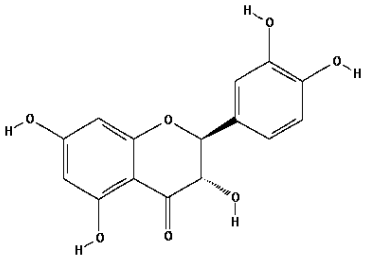
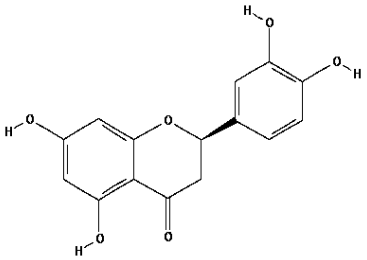
Continua

Tabela 6 - Flavonoides, IC_{50}, Ki, Ki' e modelo de inibição.

Quercetina 3 glucoronideo [b,c]	8 ± 1	4,7 ± 0,4	Competitivo	
Rhamnetina [c]	5,4 ± 0,9	3,8 ± 1,6 10 ± 4**	Misto	
Quercetina [c]	5,4 ± 1,4	4,8 ± 1 12 ± 0,9**	Misto	
Luteolina 7 glucosideo [a]	20 ± 2	24 ± 2	Não Competitivo	

Continuação

Tabela 6 - Flavonoides, IC_{50}, Ki, Ki' e modelo de inibição.

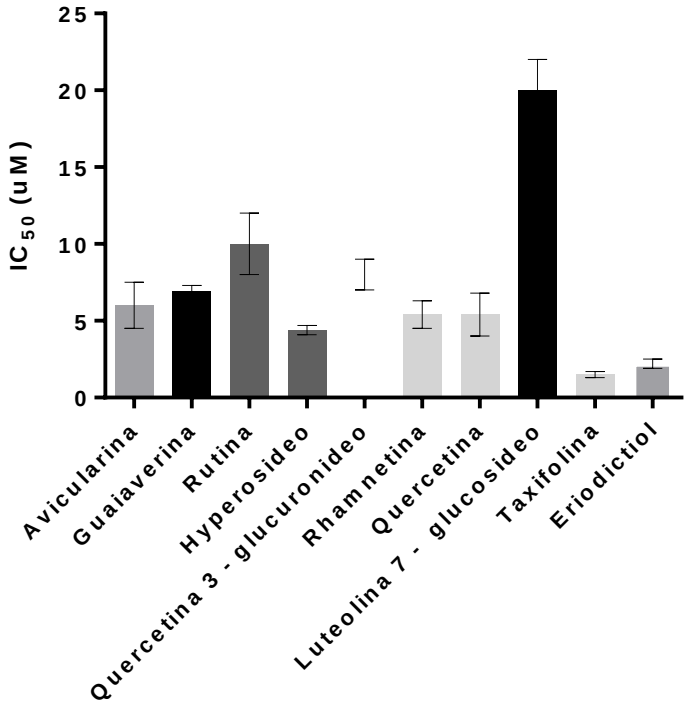
(+) – Taxifolina [d]	1,5 ± 0,2	0,9 ± 0,2	Competitivo	
Eriodictiol [d]	2,2 ± 0,3	2,2 ± 0,1	Competitivo	

Conclusão

Quercetina é um inibidor misto utilizado como controle positivo; os dados apresentados representam as médias dos experimentos ± erro da média; a IC_{50} dos compostos com mesma letra não possuem diferença estatística significativa com intervalo de confiança de 95% pelo teste Tukey.

Os valores médios das IC_{50} encontradas utilizando os flavonoides como inibidores de ARG-L estão apresentados graficamente na figura 17.

Figura 17 – Valores médios da IC_{50} da arginase de *L*. (*L*.) *amazonensis* na presença de flavonoides.

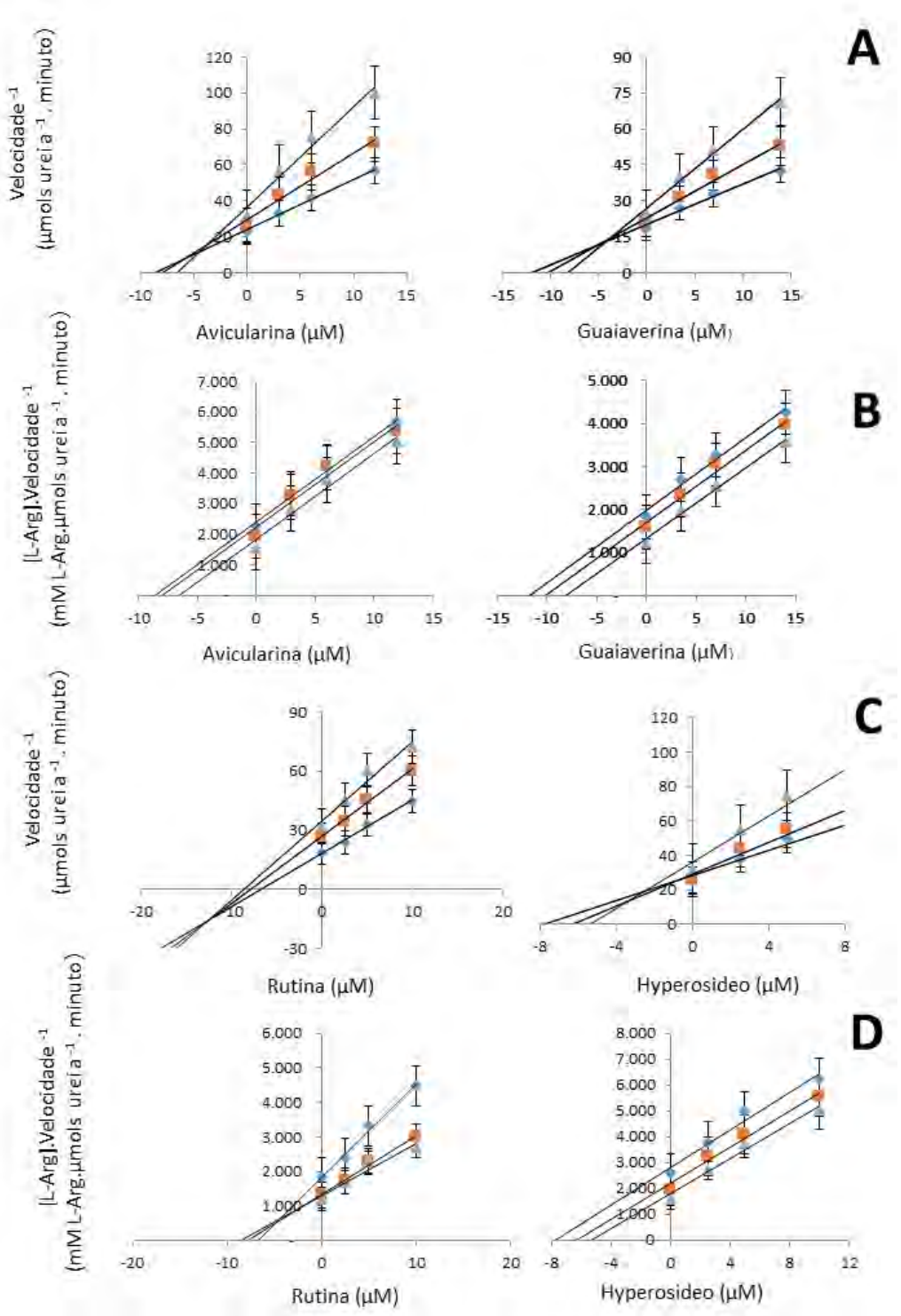


Os dados apresentados representam as médias dos experimentos ± erro da média.

As constantes Ki e Ki' estão relacionadas ao equilíbrio estabelecido entre a enzima (E) e o substrato (S), na presença de ibinidor (I). A constante de inibição Ki está relacionada a constante de dissociação do complexo EI, enquanto o Ki' remete a dissociação EIS (CORNISH-BOWDEN, 1974). Os valores dessas constantes de inibição Ki e Ki' são dados pelos pontos de intersecção das linhas nos gráficos de Dixon e Cornish-Bowden.

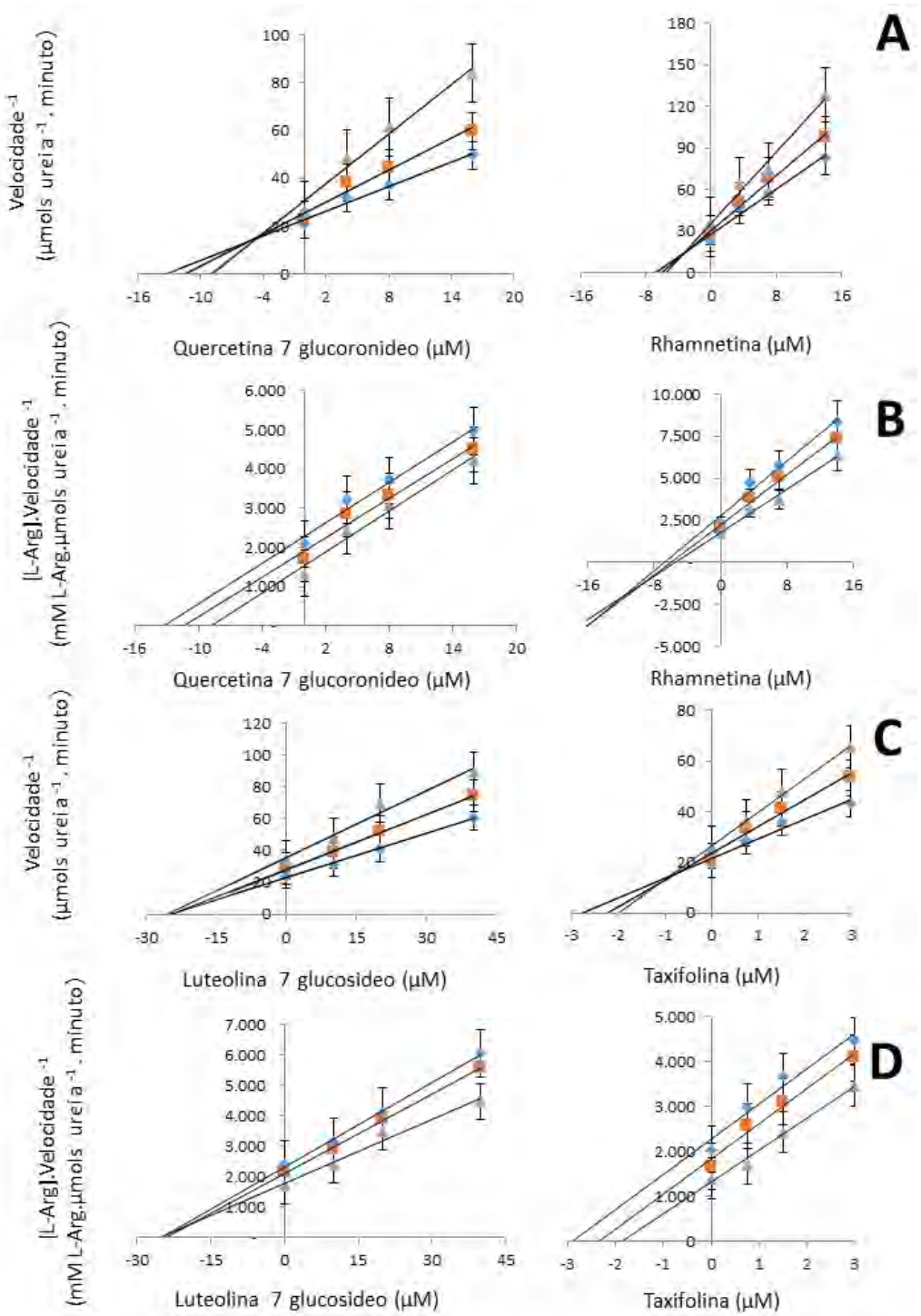
Segundo esses gráficos, os compostos avicularina, guaiaverina, rutina, hyperosideo, quercetina 7 glucoronideo, taxifolina e eriodictiol demonstraram ser inibidores competitivos e a rhamnetina é um inibidor misto. Para a luteolina 7glucosideo, a constantes de dissociação Ki e Ki' não diferiram; considera-se um inibidor não-competitivo.

Figura 18 - Mecanismos de inibição da arginase por avicularina, guaiaverina, rutina, hyperosideo - Gráfico de Dixon (A e C), gráfico de Cornish-Bowden (B e D).



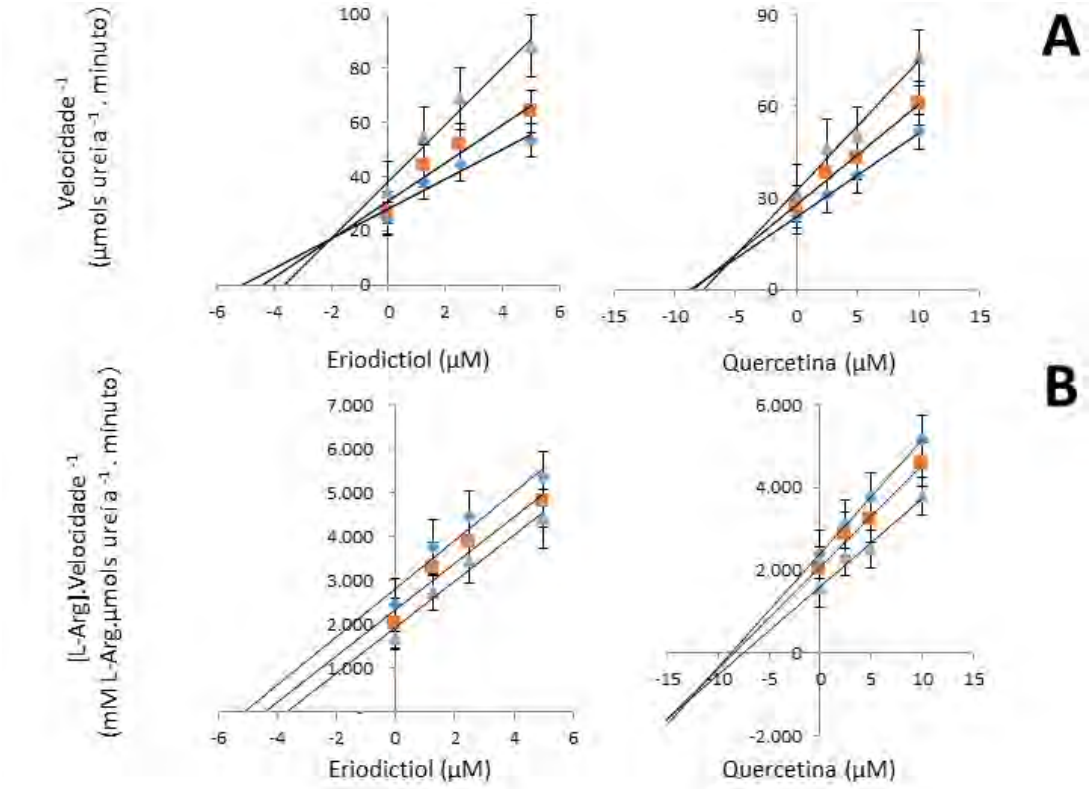
Concentração de L-arginina utilizada: 100 mM (♦) , 75 mM (■) , 50 mM (▲)

Figura 19 - Mecanismos de inibição da arginase por quercetina 7 glucoronideo, rhamnetina, luteolina 7 glucosideo e taxifolina - Gráfico de Dixon (A e C), gráfico de Cornish-Bowden (B e D).



Concentração de L-arginina utilizada: 100 mM (♦) , 75 mM (■) , 50 mM (▲)

Figura 20 - Mecanismos de inibição da arginase por eriodictiol e quercetina - Gráfico de Dixon (A), gráfico de Cornish-Bowden (B).



Concentração de L-arginina utilizada: 100 mM (♦), 75 mM (■) , 50 mM (▲)

As curvas dose – resposta de inibição da ARG-L pelos derivados do ácido cafeico são apresentadas na figura 21 e os resultados obtidos para IC_{50}, K_i e os modelos de inibição são apresentados na tabela 7.

Figura 21 - Curvas dose – resposta da ARG-L pelos extratos e frações de ácido cryptoclorogênico, verbascosideo e isoverbascosideo (A regressão não linear dos gráficos apresenta $r^2 > 0,97$).

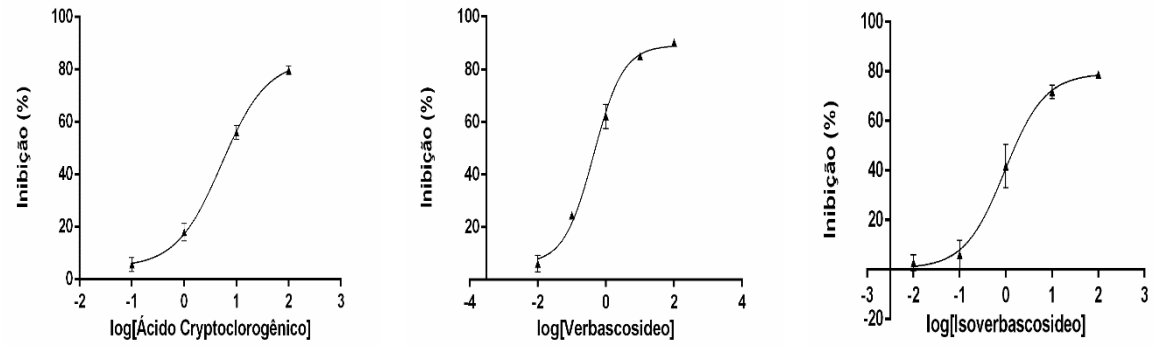
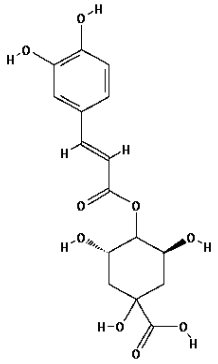
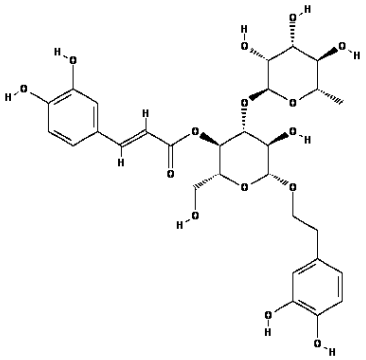
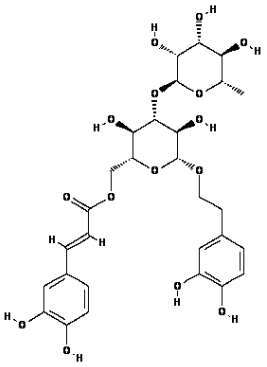


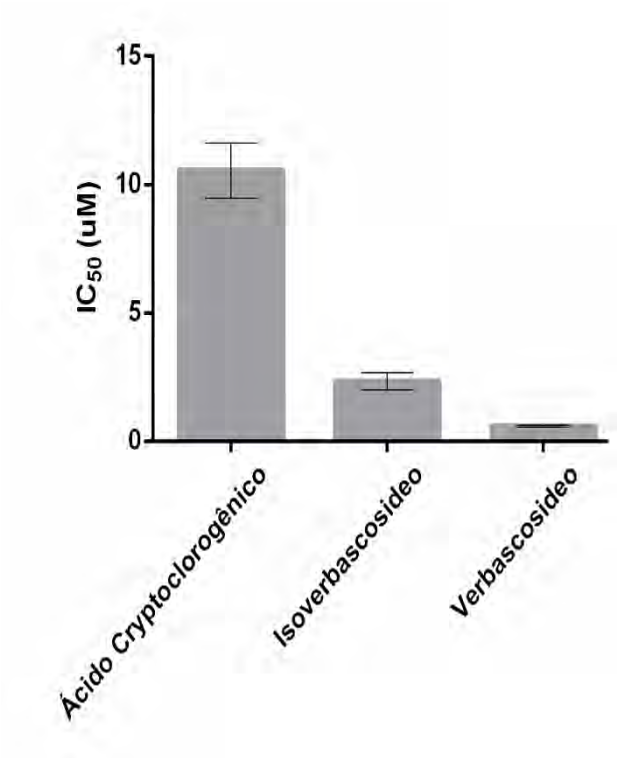
Tabela 7- Derivados do ácido cafeico, IC_{50}, Ki e modelo de inibição.

Inibidor	IC_{50} (µM)	K_i	Modelo de inibição	Estrutura
Ácido cryptoclorogênico [a]	10,1 ± 3	12 ± 0,1	Não competitivo	
Verbascosideo [b]	0,5 ± 0,2	0,6 ± 0,1	Competitivo	
Isoverbascosideo [b]	0,9 ± 0,1	1,0 ± 0,1	Não Competitivo	

Quercetina é um inibidor misto utilizado como controle positivo; os dados apresentados representam as médias dos experimentos ± erro da média; a IC_{50} dos compostos com mesma letra não possuem diferença estatística significativa com intervalo de confiança de 95% pelo teste de Tukey.

Os valores médios das IC_{50} obtidas para os compostos derivados do ácido cafeico estão representados graficamente na figura 22.

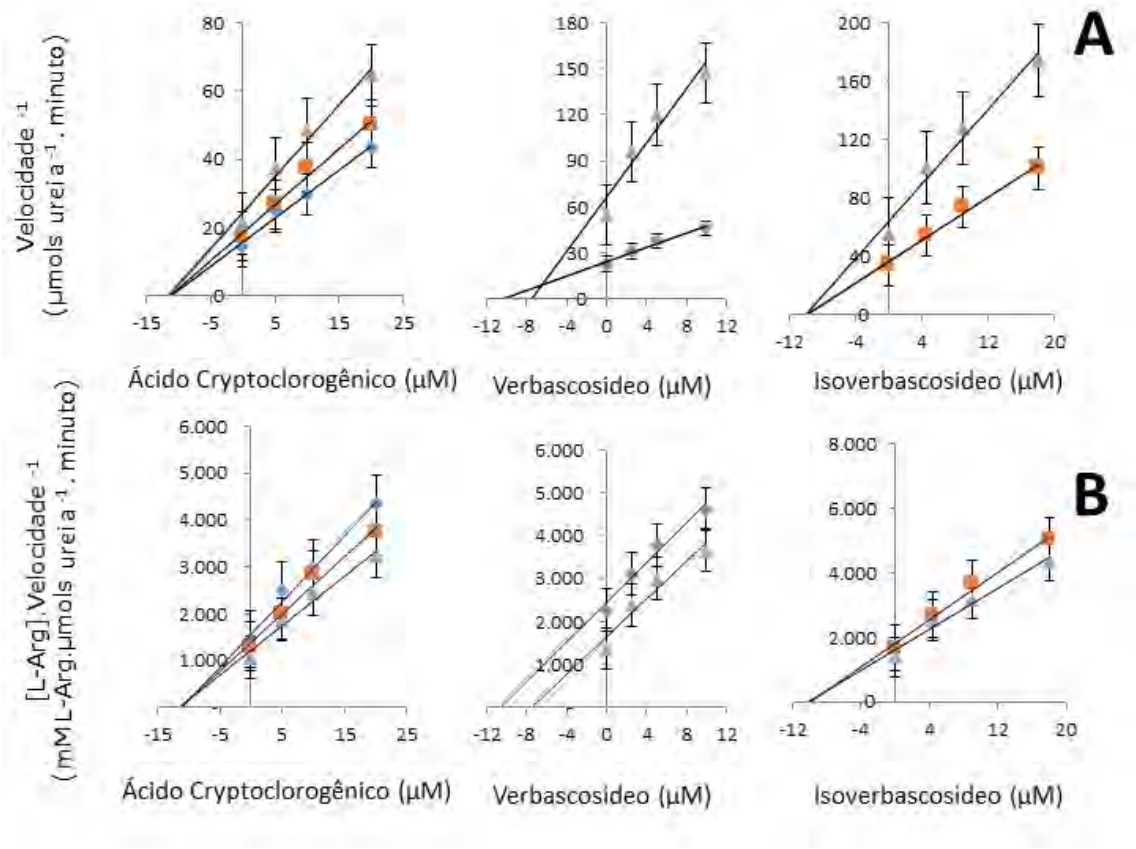
Figura 22 – Valores médios da IC_{50} da arginase de *L*. (*L*.) *amazonensis* na presença dos derivados do ácido cafeico.



Os dados apresentados representam as médias dos experimentos ± erro da média.

Os modelos de inibição enzimática dos ácidos orgânicos sobre ARG-L, segundo os gráficos de Cornish-Bowdem e Dixon, são apresentados na figura 23.

Figura 23 - Mecanismos de inibição da arginase pelos derivados do ácido cafeico - Gráfico de Dixon (A), gráfico de Cornish-Bowden (B).



Concentração de L-arginina utilizada: 100 mM (♦), 75 mM (■) , 50 mM (▲).

Dentre os derivados do ácido cafeico, o verbascosideo apresenta maior capacidade inibitória sobre a enzima (IC_{50} = 0,5 µM),o isoverbascosideo apresentou a menor capacidade inibitória (IC_{50} = 0,9 µM) e o ácido cryptoclorogênico (IC_{50} = 10,4 µM)

Os dados obtidos utilizando o verbascosideo o caracterizam como um inibidor competitivo porque a intersecção entre os pontos no gráfico de Dixon encontra-se no segundo quadrante e linhas paralelas no gráfico de Cornish-Bowdem, enquanto o isoverbascosideo, a constantes de dissociação Ki e Ki 'não diferiram; logo, considera-se um inibidor não-competitivo (Figura 23).

7. DISCUSSÃO

Compreender a relação entre o parasita e o hospedeiro é primordial para estabelecer estratégias no tratamento da leishmaniose. A via responsável pela síntese de poliaminas tem sido explorada no desenvolvimento de drogas contra parasitas dos gêneros *Trypanossoma* e *Leishmania*. Ao impedir a síntese de PA, pode haver stress oxidativo nas células dos parasitas em decorrência da deficiência na produção de tripanotiona (COLOTTI & ILARI, 2010). Em *Leishmania* a arginase é a primeira enzima na via das poliaminas e seu bloqueio pode levar ao stress oxidativo e promover o controle da infecção (BIRKHOLTZ et al., 2011; COLOTTI AND ILARI, 2010).

Mesmo apresentando potencial inibitório semelhante, os extratos e suas frações apresentam perfis cromatográficos distintos, o que demonstra a presença de compostos diferentes em cada extrato ou fração.

Segundo Cruz (2013), a orientina apresenta IC_{50} igual a 16 uM sobre ARG-L. O BUF obtido a partir do fracionamento do extrato de folhas de *C. brasiliense* apresentou IC_{50} = 4,1 µg/mL e a análise do cromatograma nos mostra um pico majoritário aos 17.6 minutos.

Sob as mesmas condições cromatográficas a análise da orientina foi realizada e o tempo de retenção foi de 17.8 minutos. Sendo assim, acreditamos que o pico majoritário seja o composto orientina e que esse contribua significativamente para a inibição da ARG-L por essa fração.

Os compostos naturais: rutina, hyperosideo, rhamnetina, luteolina 7 glucosideo, taxifolina, eriodictiol e ácido cafeico apresentam potencial contra amastigotas de *L.* (*L*) *donovani* (TASDEMIR et. al., 2006). Esses 7 compostos também demonstraram capacidade de inibição como inibidores de ARG-L.

A taxifolina [(2*R*,3*R*)- 3,3’,4,5,7-pentahidroxiflavona)] apresentou o maior potencial de inibição da ARG-L dentre as substâncias analisadas, sendo 30% mais potente do que o eriodictiol [(S)3’,4’,7,7-tetrahidroxiflavona], segundo composto com maior potencial inibitório sobre ARG-L. A comparação entre as estruturas desses compostos demonstra que a presença do grupo hidroxila na posição 3 colabora consideravelmente na capacidade inibitória da enzima.

A ausência da instauração na posição 2 e a ausência do grupo hidroxila na posição 3 conferiram ao eriodictiol uma maior capacidade de inibição quando

comparado a quercetina, que apresenta insaturação na posição 2. Essa constatação demonstra que não somente a ausência do grupo hidroxila na posição 3, mas também a ausência de instauração na posição 2, contribuem para o maior potencial de inibição da taxifolina.

A presença do grupo arabinofuranosideo na posição 3 no composto avicularina (quercetina 3-O-α-L-arabinofuranosideo) foi responsável pela redução na capacidade de inibir a ARG-L, quando comparada com a quercetina, que apresenta um grupo hidroxila na posição 3. O composto guaiaverina (quercetina-3-O-arabinopyranosideo) apresenta na posição 3 o grupo arabinopiranosideo e sua presença também causou redução na capacidade de inibição quando comparada a quercetina.

A quercetrina (quercetina 3-*O*-α-$_L$-rhamnopiranosideo), além de apresentar atividade em amastigotas de *L.* (*L*) *amazonensis* (IC_{50} = 2 µM) e baixa toxicidade (MUZITANO et al., 2006), também apresenta potencial inibitório da ARG-L inibição com IC_{50} = 10 µM (DA SILVA et al., 2012). A presença do grupo arabinopiranosideo na guaiaverina demonstrou reduzir a capacidade de inibição da ARG-L quando comparado a quercetrina.

O hiperosideo (quercetina 3 galactosideo) apresenta na posição 3 o radical galactosideo, que possuiu 4 radicais hidroxila em sua estrutura. Dentre as quercetinas analisadas, o hiperosideo apresentou o maior potencial de inibição, apresentando também maior potencial de inibição da ARG-L quando comparado a quercetrina e a quercetina.

A rutina (quercetina 3-O-rutinosideo) apresentou menor capacidade inibitória quando comparada a quercetina. Diferentemente da quercetina, que apresenta um grupo hidroxila na posição 3, a rutina nessa posição apresenta um grupo rutinosideo, provável responsável pela redução da atividade inibitória da ARG-L.

A quercetina 3 glucoronideo também apresentou menor potencial de inibição quando comparado uma quercetina. A comparação das estruturas desses flavonoides demonstra que a presença do grupo glucoronideo na posição 3 contribui para a redução na inibição da ARG-L.

A substituição do grupo hidroxila na posição 7 no eriodictiol pelo grupo glucosideo, origina a luteolina 7 glucosideo. A comparação das estruturas desses flavonoides demonstra que a presença do grupo glicosideo na posição 7 colabora consideravelmente para a redução da inibição da ARG-L e a ausência do grupo hidroxila na posição 3 também pode corroborar, já que está ausente na luteolina 7

glucosideo e eriodictiol, mas presente na posição 3 na taxifolina, composto que apresentou maior potencial de inibição da arginase dentre os flavonoides analisados.

A rhamnetina apresenta na posição 7 apresenta um grupo metil-éter, grupo esse que diferencia esse composto da quercetina. Embora haja essa diferença estrutural, os valores de inibição bem como o modelo de inibição são similares para ambos compostos.

A quercetina apresenta modelo de inibição misto em relação a arginase (DA SILVA et al., 2012). A substituição do grupo hidroxila na posição 3 da quercetina pelos grupos arabinofuranosideo, rutinosideo, galactosideo e glucoronideo demonstra que a mudança na estrutura dos compostos estabeleceu modelo de inibição competitivo em todos os casos analisados.

A presença do grupo metil-éter na posição 7, no composto rhamnetina, não foi capaz de interferir significativamente no potencial de inibição da enzima e também não foi capaz modificar o modelo de inibição misto apresentado pela quercetina. Entretanto, a presença do grupo glicosideo na posição 7 influenciou significativamente na capacidade de inibição da ARG-L, assim como no modelo de inibição, misto para a quercetina e não competitivo para a luteolina 7 glucosideo.

A ausência da hidroxila na posição 3 no eriodictiol foi capaz de influenciar no potencial de inibição da arginase quando comparado a taxifolina. Entretanto, não foi suficiente para que ambos os compostos apresentassem modelos de inibição diferentes, pois ambos se apresentam como inibidores competitivos.

A inibição da ARG-L aumenta com a hidroxilação nas posições 3,4 e 7, como demonstrado por Manjolim et al. (2013): galangina (IC_{50} = 100 µM), kaempferol (IC_{50} = 50 µM) e quercetina (IC_{50} = 4,3 µM). Entretanto, a ausência da instauração no carbono 2 conferiu à taxifolina maior potencial de inibição quando comparado quercetina, demonstrando que a instauração no carbono 2 altera significativamente a inibição da ARG-L.

Compostos fenólicos, como os ácidos galoilquinícos, demonstraram ser inibidores não-competitivos potentes da arginase de *Leishmania amazonensis* apresentando K_i variando de 0,10 a 0,68 µmol L^{-1}. O ácido quínico não demonstra potencial significativo de inibição da ARL-L, revelando que o grupo galoila apresenta particularidades fundamentais na interação ARG-L-inibidor (DE SOUSA et al., 2014). O ácido gálico demonstrou atividade contra *L. donovani* amastigotas (EC_{50} = 4,4

µg/mL) (DE SOUSA et al., 2014) e também atividade inibitória sobre ARL-L (IC_{50} = 2,2 µg/mL) com modelo de inibição não competitivo (DOS REIS et al., 2013).

Os ácidos tras-cinamico, orto-cumarico, meta-cumarico, para-cumarico, cafeico, hidrocafeico e ferrulico, apresentam atividade contra *L. donovani* e *Trypanosoma cruzi* (TASDEMIR et al., 2006).

Dentre os ácidos analisados, o ácido trans-cafeico apresentou o maior potencial de inibição da ARG-L (IC_{50} = 1,1 µg/mL). A presença de dois grupos catecol na estrutura do ácido rosmarínico (IC_{50} = 2,2 µg/mL) contribui significativamente na redução da capacidade de inibição da ARG-L. Embora haja diferença estrutural, o modelo de inibição para ambas as substâncias é competitivo.

A presença do radical ácido carboxílico na posição 3 no ácido clorogênico e dos radicais hidroxila nas posições 5 e 6 demonstram influenciar significativamente na capacidade de inibição da ARG-L pelo composto, haja vista que o ácido cryptoclorogênico apresentou menor capacidade inibitória quando comparado ao ácido clorogênico, o qual apresenta na posição 4 o radical ácido carboxílico e radicais hidroxila nas posições 1 e 6. O modelo de inibição apresentado pelo ácido clorogênico e pelo ácido cryptoclorogênico são competitivos e não competitivos respectivamente.

Conhecido popularmente como verbascosídeo ou acteosídeo, apresenta propriedades biológicas como a atividade antioxidante, anti-inflamatória, fotoprotetora e quelante (OLIVEIRA, MIGUEL, KALEGARI, MIGUEL, & MOREIRA, 2014).

Os derivados do ácido cafeico, verbascosideo e isoverbascosideo, apresentaram o maior potencial de inibição da arginase (0,5 e 0,9 µg/mL) dentre os compostos analisados. O verbascosideo apresenta na posição 4 o grupo cafeil-glucopiranosideo e o isoverbascosideo contém o mesmo grupo na posição 5. O verbascosideo e o isoverbascosideo demonstraram modelo de inibição competitivo e não competitivo respectivamente.

A mudança na posição desse grupo cafeil-glucopiranosideo influenciou significativamente o potencial de inibição do composto e modificou o mecanismo de inibição da ARG-L.

8. CONCLUSÕES

Dentre os extratos de plantas e frações analisados, os melhores resultados foram obtidos com os de *Q. grandiflora;*

A análise cromatográfica do BUF de *C. brasiliense* demonstra a presença de um pico majoritário aos 17.6 minutos, possivelmente o composto orientina, que contribuiu significativamente na capacidade inibitória da ARG-L;

Dentre os flavonoides analisados, a taxifolina apresentou o maior potencial de inibição da arginase;

A ausência do grupo hidroxila na posição 3 na taxifolina contribuiu significativamente para o aumento da capacidade de inibição da ARG-L;

A presença dos grupos arabinofuranosideo, rutinosideo, galactosideo e glucoronideo na posição 3 não contribuiu significativamente no aumento da potência dos inibidores;

Dentre os derivados do ácido cafeico, o composto o verbascosideo apresentou maior potencial de inibição em ARG-L;

As estruturas desses compostos podem servir como referência no desenvolvimento de novas drogas para o controle da leishmaniose, que tenham como alvo a inibição da arginase.

9. PERSPECTIVAS

Análise da atividade dos flavonoides sobre as fases amastigota e promastigota em cultura;

Análise da atividade dos ácidos orgânicos sobre as fases amastigota e promastigota em cultura;

Análise da atividade dos extratos e frações sobre as fases amastigota e promastigota em cultura;

Isolamento e caracterização dos compostos presentes nos extratos e frações.

10. REFERÊNCIAS

ALBINA, J. E. et al. Nitric oxide-mediated apoptosis in murine peritoneal macrophages. **Journal of Immunology ,** v. 150, n. 11, p. 5080-5, Jun 1 1993

ALVAR, J. et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLoS ONE,** v. 7, n. 5, p. e35671, 2012.

ARAGAO, D. M. et al. Anti-inflammatory, antinociceptive and cytotoxic effects of the methanol extract of Cecropia pachystachya Trecul. **Phytotherapy Research,** v. 27, n. 6, p. 926-30, Jun 2013

ARAGÃO, D. M. O. et al. Hypoglycemic effects of Cecropia pachystachya in normal and alloxan-induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology,** v. 128, n. 3, p. 629-633, 4/21/ 2010.

ASHFORD, R. W. The leishmaniases as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal for Parasitology,** v. 30, n. 12-13, p. 1269-1281, Nov 2000.

BARATA RA, S. J. et al. Aspectos da ecologia e do comportamento de flebotomíneos em área endêmica de leishmaniose visceral. **Sociedade Brasileira de Medicina Tropical,** v. 39, p. 421-425, 2005

BEJAR, E. et al. Constituents of Byrsonima crassifolia and their Spasmogenic Activity. **International Journal of Pharmacognosy,** v. 33, n. 1, p. 25-32, 1995

BIRKHOLTZ, L. M. et al. Polyamine homoeostasis as a drug target in pathogenic protozoa: peculiarities and possibilities. **Biochemical Journal**, v. 438, n. 2, p. 229-44, Sep 1 2011

BOUKTAIB, M.; ATMANI, A.; ROLANDO, C. Regio- and stereoselective synthesis of the major metabolite of quercetin, quercetin-3-O-β-d-glucuronide. **Tetrahedron Letters**, 43(35), 6263-6266, 2002.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology,** v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995

BRANGO-VANEGAS, J. et al. Glycosylflavonoids from Cecropia pachystachya Trecul are quorum sensing inhibitors. **Phytomedicine,** v. 21, n. 5, p. 670-5, Apr 15 2014

Brasil, Ministério da Saúde,Secretaria de Vigilância Epidemiológica em Saúde. Departamento de Vigilância (2006). **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**,Brasília, 2006.

Brasil, Ministério da Saúde,Secretaria de Vigilância Epidemiológica em Saúde. **Manual de Vigilância e Leishmaniose Tegumentar Americana**, 2ª edição. Brasília, 2007.

Brazil, Ministry of Health. **Visceral leishmaniasis: clinical recommendations for lethality reduction**. (pp. 78). Brasília:, 2011.

BREDT, D. S.; SNYDER, S. H. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. **Annu Reviews Biochemical,** v. 63, p. 175-95, 1994.

CAMARGO, E. P. et al. Ribosomal DNA restriction analysis and synthetic oligonucleotide probing in the identification of genera of lower trypanosomatids. **Journal of Parasitolo,** v. 78, gy, n. 1, p. 40-8, Feb 1992.

CAMARGO, E. P. C., J.A.; MORAES, G.; FIGUEIREDO, E.N. T. . Trypanosoma spp., Leishmania spp. and Leptomonas spp.: enzymes of ornithine-arginine metabolism. **Experimental Parasitology**, v. 46, n. 2, p. 141-144, 1978.

CARNEIRO, A.P., PEREIRA, M.J.B., GALBIATI, C., Biocide activity of Annona coriacea seeds extract on Rhodnius neglectus (Hemiptera: Reduviidae). **Revista de Biologia Tropical** 61, 419-427, 2013.

CASTRO, A. J. et al. Recombinogenic effects of the aqueous extract of pulp from pequi fruit (Caryocar brasiliense) on somatic cells of Drosophila melanogaster. **Geneticss and Molecular Research,** v. 7, n. 4, p. 1375-83, 2008.

CHRISTIANSON, D. W. Arginase: Structure, Mechanism, and Physiological Role in Male and Female Sexual Arousal. **Accounts of Chemical Research,** v. 38, n. 3, p. 191-201, 2005/03/01 2005

CHUA, L. S. A review on plant-based rutin extraction methods and its pharmacological activities. **Journal of Ethnopharmacology,** v. 150, n. 3, p. 805-817, Dec 12 2013

COLLELUORI, D. M.; MORRIS, S. M., JR.; ASH, D. E. Expression, purification, and characterization of human type II arginase. **Archives of Biochemistry and Biophysics,** v. 389, n. 1, p. 135-43, May 1 2001.

COLOTTI, G.; ILARI, A. Polyamine metabolism in Leishmania: from arginine to trypanothione. **Amino Acids,** v. 40, n. 2, p. 269-85, Feb 2011.

CONSOLINI, A. E. et al. Cardiotonic and sedative effects of Cecropia pachystachya Mart. (ambay) on isolated rat hearts and conscious mice. **Journal of Ethnopharmacology,** v. 106, n. 1, p. 90-96, Jun 15 2006.

CONSOLINI, A. E.; MIGLIORI, G. N. Cardiovascular effects of the South American medicinal plant Cecropia pachystachya (ambay) on rats. **Journal of Ethnopharmacology,** v. 96, n. 3, p. 417-422, Jan 15 2005.

CORNISH-BOWDEN, A. A simple graphical method for determining the inhibition constants of mixed, uncompetitive and non-competitive inhibitors. **Biochemical Journal,** v. 137, n. 1, p. 143-4, Jan 1974.

CORRALIZA, I. M. et al. Arginase induction by suppressors of nitric oxide synthesis (IL-4, IL-10 and PGE2) in murine bone-marrow-derived macrophages. **Biochemical and Biophysical Research Communications,** v. 206, n. 2, p. 667-73, Jan 17 1995.

COSTA AYRES, M. C., et al. Chemical constituents from leaves of the Qualea grandiflora: Attribution of the NMR data of two diastereoisomeric acylated flavonoid glycosids. **Quimica Nova** 31(6): 1481-1484, 2008.

COSTA, E. S. et al. Antimicrobial activity of some medicinal plants of the Cerrado, Brazil. **Phytotherapy Research,** v. 22, n. 5, p. 705-707, 2008.

COURA-VITAL, W. et al. Prognostic factors and scoring system for death from visceral leishmaniasis: an historical cohort study in Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases,** v. 8, n. 12, p. e3374, Dec 2014.

CRUZ, E. D. et al. Leishmanicidal activity of Cecropia pachystachya flavonoids: Arginase inhibition and altered mitochondrial DNA arrangement. **Phytochemistry,** v. 89, p. 71-77, May 2013.

DA SILVA, E. R. et al. Genomic organisation and transcription characterisation of the gene encoding Leishmania (Leishmania) amazonensis arginase and its protein structure prediction. **International Journal for Parasitology,** v. 32, n. 6, p. 727-737, Jun 2002.

DA SILVA, E. R. et al. Biochemical and biophysical properties of a highly active recombinant arginase from Leishmania (Leishmania) amazonensis and subcellular localization of native enzyme. **Moecular andl Biochemical Parasitology,** v. 159, n. 2, p. 104-11, Jun 2008

DA SILVA, E. R.; MAQUIAVELI, C. D.; MAGALHAES, P. P. The leishmanicidal flavonols quercetin and quercitrin target Leishmania (Leishmania) amazonensis arginase. **Experimental Parasitology,** v. 130, n. 3, p. 183-188, Mar 2012

DAGHIGH, F.; FUKUTO, J. M.; ASH, D. E. Inhibition of rat liver arginase by an intermediate in NO biosynthesis, NG-hydroxy-L-arginine: implications for the regulation of nitric oxide biosynthesis by arginase. **Biochemical and Biophysical Research Communications,** v. 202, n. 1, p. 174-80, Jul 15 1994.

DE CARVALHO, P. B.; FERREIRA, E. I. Leishmaniasis phytotherapy. Nature's leadership against an ancient disease. **Fitoterapia,** v. 72, n. 6, p. 599-618, Aug 2001.

DE OLIVEIRA, J. M. et al. Mortality due to visceral leishmaniasis: clinical and laboratory characteristics. **Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical,** v. 43, n. 2, p. 188-193, Mar-Apr 2010.

DE SOUSA, L. R. F. et al. Leishmanicidal Galloylquinic Acids are Noncompetitive Inhibitors of Arginase. **Journal of the Brazilian Chemical Society,** v. 25, n. 10, p. 1832-+, Oct 2014..

DE SOUSA, O. V. et al. Pharmacological effects of two polar fractions from Annona coriacea Mart in animal models. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 6, n. 13, p. 948-955, Apr 2012.

DE TOLEDO, C. E. M. et al. Antimicrobial and cytotoxic activities of medicinal plants of the Brazilian cerrado, using Brazilian cachaça as extractor liquid. **Journal of Ethnopharmacology,** v. 133, n. 2, p. 420-425, 1/27/ 2011.

DI STASI, L. C. et al. Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. **Fitoterapia,** v. 73, n. 1, p. 69-91, Feb 2002.

DOS REIS, M. B. G. et al. Inhibition of Leishmania (Leishmania) amazonensis and Rat Arginases by Green Tea EGCG, (+)-Catechin and (2)-Epicatechin: A Comparative Structural Analysis of Enzyme-Inhibitor Interactions. **Plos One,** v. 8, n. 11, Nov 8 2013

DOUA, F. et al. The efficacy of pentamidine in the treatment of early-late stage Trypanosoma brucei gambiense trypanosomiasis. **The American of Tropical Medicine and Hygiene,** v. 55, n. 6, p. 586-8, Dec 1996.

ESCH, K. J.; PETERSEN, C. A. Transmission and Epidemiology of Zoonotic Protozoal Diseases of Companion Animals. **Clinical Microbiology Reviews**, 1752 N St., N.W., Washington, DC**,** v. 26, n. 1, p. 58-85, 2013.

FAWCETT, J. K.; SCOTT, J. E. A rapid and precise method for the determination of ureia. **Clinical Microbiology Reviews,** v. 13, p. 156-9, Mar 1960.

FERREIRA, C. D. **Aspectos morfoanatômicos, bioquímicos e genéticos de *Himatanthus sucuuba Wood*., em ambiente de várzea e de terra firme da bacia Amazônica** pp, 90 (Doutorado). Programa Integrado de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais. , UFAM/INPA,, Manaus, 2006.

FOGANHOLI, Josiane Nobre; ZAPPA, Vanessa. **Importância Da Leishmaniose Na Saúde Pública**. Revista Científica Eletrônica De Medicina Veterinária 17,2011.

FOLIN, O., CIOCALTEU, V. . On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. **Journal of Biological Chemistry,** v. 73, p. 627-650, 1927.

FORMICA, J. V.; REGELSON, W. Review of the biology of Quercetin and related bioflavonoids. **Food Chemical Toxicology**, v. 33, n. 12, p. 1061-80, Dec 1995.

GASPAR, A. T. et al. Haemonchus contortus: in vivo anthelmintic activity of Eugenia dysenterica DC. and Caryocar brasiliense Cambess leaves in sheep. **Planta Medica,** v. 76, n. 12, p. 1356-1356, Aug 2010.

GASPI, F. O. G. et al. Pharmacological activities investigation of crude extracts and fractions from Qualea grandiflora Mart. **Journal of Ethnopharmacology,** v. 107, n. 1, p. 19-24, Aug 11 2006.

GEISS, F. et al. Proanthocyanidins with (+)-epicatechin units from Byrsonima crassifolia bark. **Phytochemistry,** v. 39, n. 3, p. 635-643, 1995/06/01 1995..

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. D. L. R. D. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical,** v. 36, p. 71-80, 2003.

GRODY, W. W.; DIZIKES, G. J.; CEDERBAUM, S. D. Human arginase isozymes. **Isozymes Curr Top Biol Med Res,** v. 13, p. 181-214, 1987.

HERNANDEZ-TERRONES, M. G. et al. Allelophatic action of Cecropia pachystachya extracts on the growth of guinea grass of (Panicum maximum). **Planta Daninha,** v. 25, n. 4, p. 763-769, Oct-Dec 2007.

HERRERA-RUIZ, M. et al.. Antidepressant effect and pharmacological evaluation of standardized extract of flavonoids from Byrsonima crassifolia. **Phytomedicine,** v. 18, n. 14, p. 1255-1261, Nov 15 2011.

HERZFELD, A.; RAPER, S. M. The heterogeneity of arginases in rat tissues. **Biochemical Journal,** v. 153, n. 2, p. 469-78, Feb 1 1976.

HIBBS, J. B., JR.; TAINTOR, R. R.; VAVRIN, Z. Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. **Science,** v. 235, n. 4787, p. 473-6, Jan 23 1987.

HIKAWCZUK, V. J.,Saad, J. R.,Guardia, T.;Juarez, A.;Giordano, O. S l. Anti-inflammatory activity of compounds isolated from Cecropia pachystachya. **Anales De La Asociacion Quimica Argentina,** v. 86, n. 3-6, p. 167-170, May-Dec 1998.

HIRUMA-LIMA, C. A., et al. Qualea grandiflora, a Brazilian "Cerrado medicinal plant presents an important antiulcer activity. **Journal of Ethnopharmacology** 104(1-2): 207-214,2006.

HOLLMAN, P. C. et al. Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. **FEBS Letters**, . 418, n. 1-2, p. 152-6, Nov 24 1997.

HOLTTA, E.; POHJANPELTO, P. Polyamine dependence of Chinese hamster ovary cells in serum-free culture is due to deficient arginase activity. **Biochimica et Biophysica Acta,** v. 721, n. 4, p. 321-7, Dec 30 1982.

INIESTA, V.; GOMEZ-NIETO, L. C.; CORRALIZA, I. The inhibition of arginase by N(omega)-hydroxy-l-arginine controls the growth of Leishmania inside macrophages. **Journal of Experimental Medicine,** v. 193, n. 6, p. 777-84, Mar 19 2001.

JENKINSON, C. P.; GRODY, W. W.; CEDERBAUM, S. D. Comparative properties of arginases. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B – Biochemistry and Molecular Biology,** v. 114, n. 1, p. 107-32, May 1996.

JIANG, Y. Q. et al. Ornithine decarboxylase gene deletion mutants of Leishmania donovani. **Journal of Biological Chemistry,** v. 274, n. 6, p. 3781-3788, Feb 5 1999.

KEPKA-LENHART, D. et al. Arginase I: a limiting factor for nitric oxide and polyamine synthesis by activated macrophages? **American Journal of Physiology,** v. 279, n. 6, p. R2237-42, Dec 2000.

KHOURI, J. et al. Anticlastogenic potential and antioxidant effects of an aqueous extract of pulp from the pequi tree (Caryocar brasiliense Camb). **Genetics and Molecular Biology,** v. 30, n. 2, p. 442-448, 2007.

KILLICK KENDRICK, R.; RIOUX, J. A. Intravectorial cycle of Leishmania in sandflies. **Annales de Parasitologie Humaine ét Comparée,** v. 66 Suppl 1, p. 71-4, 1991.

KILLICK-KENDRICK, R. et al. Leishmania in Phlebotomid Sandflies. IV. The Transmission of Leishmania mexicana amazonensis to Hamsters by the Bite of Experimentally Infected Lutzomyia longipalpis. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences,** v. 196, n. 1122, p. 105-115, 1977-02-11 00:00:00 1977.

KREBS H. A; HENSELEIT,K.; Studies on ureia formation in the animal organism, **Hoppe-Seyler's Zeitschrift fur Physiologische Chemie**, vol. 210, pp. 33–66, 1932.

LARROSA, C. R. R. D., M.R. . Contribuição ao estudo anatômico do caule de Himatanthus sucuuba (Spuce ex Müll. Arg.). Woodson, Apocynaceae. . **Revista Brasileira de Farmacognosia,**, p. 110-114, 2005.

LI, H. et al. Regulatory role of arginase I and II in nitric oxide, polyamine, and proline syntheses in endothelial cells. **American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism,** v. 280, n. 1, p. E75-82, Jan 2001.

LI, Z. et al. Simultaneous quantification of hyperin, REYnoutrin and guaijaverin in mice plasma by LC-MS/MS: application to a pharmacokinetic study. **Biomedical Chromatography**, v. 30, n. 7, p. 1124-1130, 2016.

LIMA-LANDMAN, M.T.R., et al. Antihypertensive effect of a standardized aqueous extract of Cecropia glaziovii Sneth in rats: An in vivo approach to the hypotensive mechanism. **Phytomedicine** 14, 314-320, 2007.

LINHARES, J. F. P. L., . . **Sustentabilidade sócio-ambiental da extração de janaúba (Himatanthus Willd. Ex Schult.) no município de Alcântara**. pp 116 (Doutorado em Sustentabilidade de Ecossistemas.). Departamento de Oceanografia e limnologia. Universidade Federal do Maranhão. São Luis., UFMA, MA, Brasil. São Luis, 2010.

LUZ ZMP, S. V., RABELLO. A. Evaluation of a pamphlet on visceral leishmaniasis as a tool for providing disease information to healthcare professionals and laypersons. . **Carderno de Saúde Pública**, v. 21, p. 608-621, 2005.

MALDINI, M. et al. Screening of the topical anti-inflammatory activity of the bark of Acacia cornigera Willdenow, Byrsonima crassifolia Kunth, Sweetia panamensis Yakovlev and the leaves of Sphagneticola trilobata Hitchcock. **Journal of Ethnopharmacology,** v. 122, n. 3, p. 430-3, Apr 21 2009.

MANJOLIN, L. C. et al. Dietary flavonoids fisetin, luteolin and their derived compounds inhibit arginase, a central enzyme in Leishmania (Leishmania) amazonensis infection. **Food Chemistry**, v. 141, n. 3, p. 2253-2262, Dec 1 2013.

MARTINEZ, S.; MARR, J. J. Allopurinol in the Treatment of American Cutaneous Leishmaniasis. **New England Journal of Medicine**, v. 326, n. 11, p. 741-744, 1992.

MARTíNEZ-VÁZQUEZ, M. et al. Antimicrobial activity of Byrsonima crassifolia (L.) H.B.K. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 66, n. 1, p. 79-82, 7// 1999.

MARZOCHI, M. C. D. A.; MARZOCHI, K. B. F. Tegumentary and visceral leishmaniases in Brazil: emerging anthropozoonosis and possibilities for their control. **Cadernos de Saúde Pública,** v. 10, p. S359-S375, 1994.

MILIAUSKAS, G. V., P. R.; VAN BEEK, T.A.;. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plans extracts. **Food Chemistry,** v. 85, p. 231-237, 2004.

MILLS, C. D. et al. Macrophage arginine metabolism and the inhibition or stimulation of cancer. **Journal of Immunology,** v. 149, n. 8, p. 2709-14, Oct 15 1992.

MIRANDA-VILELA, A. L. et al. Pequi fruit (Caryocar brasiliense Camb.) pulp oil reduces exercise-induced inflammatory markers and blood pressure of male and female runners. **Nutrition Research,** v. 29, n. 12, p. 850-8, Dec 2009.

MITTRA, B. et al. Luteolin, an abundant dietary component is a potent anti-leishmanial agent that acts by inducing topoisomerase II-mediated kinetoplast DNA cleavage leading to apoptosis. **Molecular Medicine,** v. 6, n. 6, p. 527-541, Jun 2000.

MOHAMED, M. S. Evidence for the presence of two enzymes with arginase activity. **Acta Chemica Scandinavica,** v. 4, p. 990-992, 1950.

MONCADA, S.; HIGGS, E. A. Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. **FASEB Journal,** v. 9, n. 13, p. 1319-30, Oct 1995.

MOORE, E. et al. Comparison of generic and proprietary sodium stibogluconate for the treatment of visceral leishmaniasis in Kenya. **Bull World Health Organization,** v. 79, n. 5, p. 388-93, 2001.

MUNIZ-RAMIREZ, A. et al. Antimicrobial activities of diterpene labdane from seeds of Byrsonima crassifolia. Boletin Latinoamericano Y Del Caribe De Plantas Medicinales Y Aromaticas, v. 13, n. 1, p. 31-37, Jan 2014..

MUROTA, K., TERAO, J. (2003). Antioxidative flavonoid quercetin: implication of its intestinal absorption and metabolism. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, *417*(1), 12-17, 2003.

MUZITANO, M. F. et al. Quercitrin: an antileishmanial flavonoid glycoside from Kalanchoe pinnata. **Planta Medica**. 72, n. 1, p. 81-3, Jan 2006

NETO, F. C., et al. Dereplication of Phenolic Derivatives of Qualea grandiflora and Qualea cordata (Vochysiaceae) using Liquid Chromatography coupled with ESI-QToF-MS/MS. **Journal of the Brazilian** Chemical Society 24(5): 758, 2013.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products,** v. 70, n. 3, p. 461-477, Mar 2007.

NOGUEIRA, F. A. et al. In vitro and in vivo efficacy of aqueous extract of Caryocar brasiliense Camb. to control gastrointestinal nematodes in sheep. **Parasitology Research,** v. 111, n. 1, p. 325-30, Jul 2012..

OLIVEIRA, D. M. S. D. et al. Isolamento do verbacosídeo e validação de método analítico para padronização do extrato bruto das partes aéreas de Buddleja stachyoides Cham. & Schltdl. (Scrophulariaceae). **Química Nova,** v. 37, p. 344-348, 2014.

PALMER, R. M.; ASHTON, D. S.; MONCADA, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. **Nature,** v. 333, n. 6174, p. 664-6, Jun 16 1988.

PEREZ-GUTIERREZ, R. M. et al. Antihyperglycemic, antihyperlipidemic and antiglycation effects of Byrsonima crassifolia fruit and seed in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. **Plant Foods for Human Nutrition,** v. 65, n. 4, p. 350-7, Dec 2010.

PINTO, A. C. et al. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova,** v. 25, p. 45-61, 2002.

PIO-LEON, J. F. et al. Antibacterial activity of extracts obtained from the nanchi (*Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth), arrayan (*Psidium sartorianum* (O. Berg) Nied.) and ayale (*Crescentia alata Kunth*) fruits. **Boletin Latinoamericano Y Del Caribe De Plantas Medicinales Y Aromaticas,** v. 12, n. 4, p. 356-364, Jul 2013.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M F. **Rang and Dale - Farmacologia** (G. Koogan Ed. 5ª ed.). Rio de Janeiro, 2004

RATH, S. et al. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Química Nova,** v. 26, p. 550-555, 2003.

RECZKOWSKI, R. S.; ASH, D. E. Epr Evidence for Binuclear Mn(Ii) Centers in Rat-Liver Arginase. **Journal of the American Chemical Society,** v. 114, n. 27, p. 10992-10994, Dec 30 1992.

REY, Luis. **Bases da Parasitologia Médica** (2 ed.). Rio de Janeiro,2002.

REZENDE, A. L. et al. Characterization of the Major Nutritional Components of Caryocar Brasiliense Fruit Pulp by Nmr Spectroscopy. **Quimica Nova,** v. 32, n. 9, p. 2310-2313, 2009.

REZENDE, G. A. A.; TERRONES, M. G. H.; REZENDE, D. M. L. C. Study Allelopathic Effects of Methanol Extracts of Root and Stem of Caryocar Brasiliense Camb. (Pequi). **Bioscience Journal,** v. 27, n. 3, p. 460-472, May-Jun 2011.

ROBERTS, S. C. et al. Arginase plays a pivotal role in polyamine precursor metabolism in Leishmania. Characterization of gene deletion mutants. **Jounal of Biological Chemistry,** v. 279, n. 22, p. 23668-78, May 28 2004.

ROBERTS, W. L.; MCMURRAY, W. J.; RAINEY, P. M. Characterization of the antimonial antileishmanial agent meglumine antimonate (glucantime). **Antimicrobial Agents and Chemotherapy,a** v. 42, n. 5, p. 1076-82, May 1998.

ROESLER, R. et al. Antioxidant activity of Caryocar brasiliense (pequi) and characterization of components by electrospray ionization mass spectrometry. **Food Chemistry,** v. 110, n. 3, p. 711-717, 10/1/ 2008..

ROSS, R. NOTE ON THE BODIES RECENTLY DESCRIBED BY LEISHMAN AND DONOVAN. **British Medical Journal,** v. 2, n. 2237, p. 1261-1262, 1903.

RUFINO, M. S. M. A., R. E. et al.Metodologia científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical DPPH. **Comunicado Técnico Embrapa**, 2007.

SAMPAIO, Raimunda Nonata Ribeiro et al . Estudo da transmissão da leishmaniose tegumentar americana no Distrito Federal.**Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba ,v. 42,n. 6,p. 686-690,Dec. 2009 .

SANT'ANA, P.J.P.Bioprospecção no Brasil – Contribuições para uma gestão ética. (Editora Paralelo Vol. 15). Brasília, 2002.

SANTOS, F. V. et al. Genotoxicity of polar and apolar extracts obtained from Qualea multiflora and Qualea grandiflora. **Journal of Ethnopharmacology,** v. 138, n. 1, p. 105-110, 10/31/ 2011.

SARAVIA, N. G. et al. The Relationship of Leishmania braziliensis Subspecies and Immune Response to Disease Expression in New World Leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases,** v. 159, n. 4, p. 725-735, April 1, 1989 1989.

SCHINELLA, G. et al. Anti-inflammatory and apoptotic activities of pomolic acid isolated from Cecropia pachystachya. **Planta Médica**, v. 74, n. 3, p. 215-20, Feb 2008.

Silva, Maria Fernanda Laranjeira da. **Relação entre a localização celular da enzima arginase em Leishmania (Leishmania amazonensis) e seu papel na infecção de macrófagos murinos**. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

SINGLETON, V. L. R. J., J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdicphosphotungtic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture,** v. 16, p. 114-158, 1965.

SIQUEIRA, C. A. T. et al. Chemical constituents of the volatile oil from leaves of Annona coriacea and in vitro antiprotozoal activity. **Revista Brasileira De Farmacognosia-Brazilian Journal of Pharmacognosy,** v. 21, n. 1, p. 33-40, Jan-Feb 2011

SOUSA, O. V. et al. Pharmacological Effects of the Hexane and Dichloromethane Fractions from Annona coriacea Mart. (Annonaceae) Leaves. **Latin American Journal of Pharmacy,** v. 30, n. 5, p. 868-873, Jun 2011.

SOUSA, O. V.; DEL-VECHIO-VIEIRA, G.; KAPLAN, M. A. C. Analgesic and anti-inflammatory properties of Annona coriacea Mart. (Annonaceae) leaves methanol extract. **Latin American Journal of Pharmacy,** v. 26, n. 6, p. 872-877, Nov-Dec 2007.

SPINA, A. P. **Estudos taxonômico, micro-morfológico e filogenético do gênero Himatanthus Willd. ex Schult. (Apocynaceae: Rauvolfioideae - Plumerieae).** pp. 191 (Doutorado). Pós-graduação em Ciências Biológicas. Departamento de Botânica, UNICAMP - Universidade Estadual de Campinas. Campinas, Campinas, 2004.

STRYER, L., Bioquímica, 4 Edition. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1996.

TANNUS, M. M. Reatividade Sorológica De Cães Frente A antígenos de três espécies de Leishmania. **Horizonte Científico,** v. 1, n. 1, 2007.

TASDEMIR, D. et al. Antitrypanosomal and Antileishmanial Activities of Flavonoids and Their Analogues: In Vitro, In Vivo, Structure-Activity Relationship, and Quantitative Structure-Activity Relationship Studies. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy,** v. 50, n. 4, p. 1352-1364, April 1, 2006.

UCHOA, V.T., Antimalarial Activity of Compounds and Mixed Fractions of Cecropia pachystachya. **Drug Development Research** 71, 82-91, 2010.

WALTERS, L. L. Leishmania differentiation in natural and unnatural sand fly hosts. **Journal of Eukaryotic Microbiology,** v. 40, n. 2, p. 196-206, Mar-Apr 1993.

WANG, W. W. et al. Co-induction of arginase and nitric oxide synthase in murine macrophages activated by lipopolysaccharide. **Biochemical and Biophysical Research Communications,** v. 210, n. 3, p. 1009-16, May 25 1995.

WERNECK, G. L. et al. Prognostic factors for death from visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil. **Infection,** v. 31, n. 3, p. 174-7, Jun 2003.

WHO, World Health Organization - Leishmaniasis. Burden of disease. http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/ . Retrieved 01/06/2016.

WU, G.; MORRIS, S. M. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. **Biochemical Journal,** v. 336, n. Pt 1, p. 1-17, 1998.

YIP, M. C.; KNOX, W. E. Function of arginase in lactating mammary gland. **Biochemical Journal,** v. 127, n. 5, p. 893-9, May 1972.

YOSHIDA, N.; CAMARGO, E. P. Ureotelism and Ammonotelism in Trypanosomatids. **Journal of Bacteriology,** v. 136, n. 3, p. 1184-1186, 1978.