

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**ARGINASE: DA IMOBILIZAÇÃO À MODULAÇÃO DE ENSAIOS DE
AFINIDADE EM COLEÇÕES DE PRODUTOS NATURAIS**

Romário Pereira da Costa*

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE EM QUÍMICA, área de concentração: QUÍMICA ORGÂNICA.

Orientadora: Quezia Bezerra Cass

Coorientadora: Richele Priscila Severino

***Bolsista CAPES**

São Carlos – SP

2019



Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Romário Pereira da Costa, realizada em 17/05/2019:

Profa. Dra. Quezia Bezerra Cass
UFSCar

Profa. Dra. Lorena Ramos Freitas de Sousa
UFG-Catalão

Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira
UFSCar

DEDICATÓRIA

Em memória de minha mãe, Apécida Pereira de Souza, com amor

EPÍGRAFE

“Quem deseja ver o arco-íris, precisa aprender a gostar da chuva.”
Paulo Coelho

AGRADECIMENTO

Agradeço a minha orientadora profa. Dra. Quezia Bezerra Cass pelas valiosas discussões, confiança e orientações que tornaram possível a conclusão deste trabalho. Agradeço também a minha coorientadora profa. Dra. Richele Priscila Severino pela ajuda prestada na realização deste trabalho, e por ter incentivado a minha vinda para São Carlos.

Aos meus pais, Valdeson e Aparecida e, aos meus irmãos Ronaldo, Gabriela e Fernanda, aqueles que incondicionalmente sempre me apoiaram e fizeram o possível para que eu alcançasse esta conquista. Amo todos vocês.

As profas. Dra. Regina Oliveira, Dra. Dulce Souza e Dra. Lorena Ramos, pelas colaborações e disposições em me ajudar.

Aos meus amigos do Separare, DQ-UFSCar e DQ-UFG por me aturarem em todos momentos bons e ruins que passamos, vocês são demais.

Aos meus amigos e demais familiares por todo carinho, apoio moral, convívio e incentivos.

As agências de fomento CAPES, CNPq e FAPESP.

Ao Centro de excelência para pesquisa em química sustentável (CERSusChem).

Agradeço a Deus, por ter me dado forças para chegar até aqui.

LISTA DE ABREVIATURAS

DAD	Arranjo de diodos
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EC	Espermina sintase
ESI	ionização electrospray
FDA	Food and Drug Administration
FPLC	Cromatografia líquida da proteína rápida
Fs	Função de comparação de coluna
HRMS	Espectrometria de massas de alta resolução
HRMS	<i>High resolution mass spectrometry</i>
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
IPTG	Isopropil- β -D-galactosídeo
LB	Luria Bertani
LC	Cromatografia líquida
LC-HRMS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas de alta resolução
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas
LC-NRM	Cromatografia líquida acoplada à ressonância magnética nuclear
MB	Partículas magnéticas
MB-al	Partículas magnéticas contendo um alvo imobilizado
MB-Arg	Arginase imobilizada em partículas magnéticas ativa
MB-ArgC	Arginase imobilizada em partículas magnéticas inativa (controle)
MeOH	Metanol
MS	Espectrometria de massas
NASs	Novas substâncias bioativas
NMR	Ressonância magnética nuclear
NO	Espécies reativas de oxigênio
ODC	Ornitina descarboxilase
PN	Produtos naturais
QqTOF	Sistemas híbridos do tipo quadrupolo combinado com tempo de voo
R13F	Extrato etanólico das folhas de <i>Byrsonima coccolobifolia</i>
R24R	Extrato etanólico das raízes de <i>Tabebuia ochracea</i>

SOB	Caldo super ideal
SPDSYN	Espermidina sintase
SPE	Extração em fase sólida
Tampão A	Tampão formiato de amônio 20 mM, pH 9,5
Tampão X	Tris-HCl 20 mM pH 7,05

LISTAS DE FIGURAS

FIGURA 1. 1 . Exemplos de fármacos derivados de plantas e fungos, princípio ativo e utilidade clínica.....	3
FIGURA 1. 2. Medicamentos aprovados pelo FDA no período de 1981–2014; total de 1562 fármacos. Adaptado de Newman & Cragg ¹¹	4
FIGURA 1. 3. Ilustração do ensaio de ligand fishing. Etapa 1: incubação, etapa 2: limpeza das MB-al, etapa 3: extração dos ligantes, e por último a análise dos ligantes. Adaptado ¹⁵	10
FIGURA 1. 4. Esquema da reação enzimática entre a arginase e L-arginina produzindo ureia e L-ornitina.....	12
FIGURA 1. 5. Rota bioquímica do metabolismo de arginina no hospedeiro e no parasito. A arginina desempenha um papel fundamental na ativação do sistema de defesa do hospedeiro e na sobrevivência do parasito durante a infecção. Adaptado ⁸⁵	13
FIGURA 1. 6. Ciclo de vida do protozoário causador da Leishmaniose: da propagação ao desenvolvimento da doença. Adaptado ^{94,95}	14
FIGURA 1. 7. Endemicidade da Leishmaniose visceral no mundo no ano de 2016. ⁹⁹	16
FIGURA 1. 8. Endemicidade da Leishmaniose cutânea no mundo no ano de 2016. ⁹⁹	16
FIGURA 4. 1. Etapas realizadas.	35
FIGURA 4. 2. Gráfico referente a triagem dos extratos. T. ochrace (R24R); folhas (R13F), caule (R13C) e raízes (R13R) de <i>B. coccolobifolia</i> ; folhas (R7F) e caule (R7C) de <i>Diospyros burchellii</i> ; folhas de <i>Pouteria ramiflora</i> (R3F); raízes de <i>Tocoyena formosa</i> (R23R); raízes de <i>Kielmeyera coriacea</i> (R16R); caule de <i>Davilla elliptica</i> (R8C); folhas de <i>Tecoma stans</i> (TS1FL); folhas de <i>Hancornia speciosa</i> (R28F).	36
FIGURA 4. 3. Comparação do Fs das colunas selecionadas. Ambas apresentam valores de Fs > 10. Todas as colunas seguiram as seguintes especificações: 2,1x100mm, 2,7 µm.....	37
FIGURA 4. 4. Cromatogramas obtidos na etapa 1. A – R13F. Condição cromatográfica: colunas triadas, vazão 0,4 mL/min, modo eluição gradiente de 5 a	

100% v/v de ACN/H ₂ O em 20 minutos, ambas acidificadas com 0,1% de ácido fórmico, temperatura de 40 °C, e monitoradas a 254 nm.....	38
FIGURA 4. 5. Gráfico do número de bandas cromatográficas por extrato versus coluna.....	38
FIGURA 4. 6. Cromatogramas de pico de base (BPC) obtidos por LC-HRMS em ambos os modos de ionização oriundos da etapa 3 para R13F. Condição cromatografica: coluna Ascentis Express C18 (2,1x100mm) 2,7 µm, modo gradiente de eluição variando de 5 a 20% de B em 14 min, 20 a 60% de B em 5 min, 60 a 100% de B em 1 min e mantido por mais 1 min, empregando como fase móvel água acidificada com 0,1% ácido fórmico (A) e acetonitrila (B); vazão de 0,4 mL/min; temperatura de 40° C.	39
FIGURA 4. 7. Cromatogramas de pico de base (BPC) obtidos por LC-HRMS em ambos os modos de ionização oriundos da etapa 3 para R24R. Condições cromatograficas: coluna Ascentis Express C18 (2,1x100mm) 2,7 µm, modo gradiente de eluição variando de 5 a 100% de B em 20 min, e empregando como fase móvel água acidificada com 0,1% ácido fórmico (A) e acetonitrila (B); vazão de 0,4 mL/min; temperatura de 40° C.....	40
FIGURA 4. 8. Cromatograma referente a etapa de purificação realizada no FPLC Äkta. Condição cromatográfica: Coluna QFF Hi-Trap equilibrada com Tampão A por 10 min e gradiente de eluição de 0 a 100 % de NaCl [1 mol/L] em 20 min, vazão de 1 mL/min.	41
FIGURA 4. 9. Cromatogramas de íons extraídos de m/z 133,0971 [ornitina + H] ⁺ , correspondente ao ensaio atividade catalítica das frações 16 e 17 cv. Condição cromatográfica: coluna Acquity HSS T3 (1.8µm, 2.1x100mm), vazão 0,2 mL/min, modo eluição isocrático ACN: H ₂ O (1:99, v/v) ambas acidificadas com 0,1% de ácido fórmico, temperatura de 40 °C, injeção de 1 µL.	42
FIGURA 4. 10. Gel SDS-PAGE da purificação da arginase. Em 1 após a indução, 2 antes da indução, 3 sobrenadante do lisado celular, 4 precipitados do lisado celular, 5 lavagens da coluna de níquel, 6 lavagens da coluna de níquel com imidazol 5 mM, 7 lavagens da coluna de níquel com imidazol 300 mM, 8 e 9 frações ativas (16 e 17) após purificação na coluna QFF, MM marcador de massa molecular. A marcação molecular corresponde a arginase.	43
FIGURA 4. 11. Reações envolvidas no método indireto de análise da atividade catalítica.	44

FIGURA 4. 12. Cromatograma de íon extraído correspondente a [ornitina+H] ⁺ 133,0971. Condição cromatográfica: coluna Acquity HSS T3 (1.8um, 2.1x100mm), vazão 0,2 mL/min, modo eluição isocrático ACN:H ₂ O (1:99, v/v) ambas acidificadas com 0,1% de ácido fórmico, temperatura de 40 °C.	45
FIGURA 4. 13. Representação esquemática do mecanismo de reação entre o glutaraldeído e o grupo amino das partículas.....	46
FIGURA 4. 14. Esquema para o preparo das MB-Arg.	47
FIGURA 4. 16. Estrutura química do tampão Tris-HCl.....	48
FIGURA 4. 17. Sobreposição dos Cromatogramas de íons extraídos [ornitina + H] ⁺ , correspondente ao ensaio atividade catalítica da arginase antes (azul) após (marrom) da diálise. Condição cromatográfica: coluna Acquity HSS T3 (1.8um, 2.1x100mm), vazão 0,2 mL/min, modo eluição isocrático ACN: H ₂ O (1:99, v/v) ambas acidificadas com 0,1% de ácido fórmico, temperatura de 40 °C, injeção de 1 µL.	48
FIGURA 4. 18. Cromatograma de íons extraídos [ornitina + H] ⁺ , correspondente ao ensaio atividade catalítica da arginase após a imobilização. Condição cromatográfica: coluna Acquity HSS T3 (1.8um, 2.1x100mm), vazão 0,2 mL/min, modo eluição isocrático ACN: H ₂ O (1:99, v/v) ambas acidificadas com 0,1% de ácido fórmico, temperatura de 40 °C, injeção de 1 µL.	49
FIGURA 4. 19. Esquema referente as etapas do ensaio de ligand fishing.....	50
FIGURA 4. 20. Viabilidade da arginase na presença de MeOH.....	51
FIGURA 4. 21. Ligantes de referência utilizados.....	51
FIGURA 4. 22. Perfil cromatográfico dos ligantes com afinidade conhecida [Acquity HSS T3 (100 x 2.1 mm; 1.8 µm); A: H ₂ O (0,1% de Ac. fórmico), B: ACN; eluição gradiente: 0 – 1 min (15 – 20% B); 1 – 8 min (20 – 52% B); 8,01 – 9 min (52 – 100%), vazão 0,2 mL/min]. (I) Catequina, (II) epicatequina e (III) 7-amino-4-metilcumarina ambos preparados na concentração de 20 µM. Volume de injeção 1 µL.	52
FIGURA 4. 23. Influências do tempo de carregamento.....	54
FIGURA 4. 24. Fotografia das etapas do ensaio de ligand fishing (descrito em 3.15). Fonte: o autor.	54
FIGURA 4. 25. Razões de afinidades para cada ligante.	56
FIGURA 4. 26. Proposta de fragmentação para a catequina/epicatequina de [M-H] ⁻ 289,0707. Adaptado ¹³⁸	57

FIGURA 4. 27. Nomenclatura das fragmentações dos flavonoides. Adaptado ¹³⁶	58
FIGURA 4. 28. Ligantes identificados no extrato etanólico das folhas <i>B. coccolobifolia</i> . Os valores entre parênteses referem-se a razão de afinidade.	61
FIGURA 4. 29. Razões de afinidades para cada ligante.	66

LISTAS DE TABELAS

TABELA 1.1 - Levantamento bibliográfico do emprego do ensaio Ligand fishing na descoberta de ligantes oriundos de produtos naturais (o levantamento foi realizado usando a palavra-chave “ligand fishing” no pubmed).....	8
TABELA 1. 2. Valores de IC ₅₀ e porcentagens de inibição para os compostos oriundos de produtos naturais que foram avaliados frente a enzima recombinante de <i>L. amazonenses</i>	17
TABELA 4. 1. Concentrações de proteínas totais realizados por Bradford. A relação entre a absorbância vs concentração foi realizada com uma curva analítica previamente preparada com BSA, seguindo o mesmo procedimento, e o coeficiente de determinação (R ²) foi de 0,996.	43
TABELA 4. 2. Valores de área obtidos para os ensaios de bioconjugação.....	53
TABELA 4. 3. Resultados do ensaio de ligand fishing para o extrato R13F.	55
TABELA 4. 4. Compostos e dados do LC-HRMS dos ligantes identificados (2, 3 e 9) e inferidos (1, 4-8) do extrato etanólico das folhas de <i>B. coccolobifolia</i>	60
TABELA 4. 5. Resultados do ensaio de fishing para o extrato R24R.....	63

RESUMO

ARGINASE: DA IMOBILIZAÇÃO À MODULAÇÃO DE ENSAIOS DE AFINIDADE EM COLEÇÕES DE PRODUTOS NATURAIS Desde a antiguidade plantas são usadas para remediar uma dada patologia, e são frequentemente alvos, pois exibem propriedades biológicas de interesse para a descoberta de novos medicamentos. Infelizmente, a triagem de produtos naturais para compostos biologicamente ativos é trabalhosa, demorada e dispendiosa. Assim, novos modelos de triagem baseado em afinidade têm sido desenvolvidos com proteínas imobilizadas e foi o objetivo desse trabalho. Este trabalho consistiu na imobilização da arginase em partículas magnéticas (Arg-MBs) para triagem em matrizes de produtos naturais. A modulação do ensaio foi feita inicialmente para os compostos: catequina e epicatequina (reportados como inibidores de arginase) e como controle negativo (não inibidor da enzima), o aciclovir. Para os ensaios, dois extratos etanólicos foram selecionados: *Byrsonima coccolobifolia* (Malpighiaceae) e *Tabebuia ochracea* (Bignoniaceae). Do extrato das folhas de *Byrsonima coccolobifolia* (Malpighiaceae) 12 ligantes foram identificados, sendo 9 destes inferidos por LC-HRMS. No extrato de raízes de *Tabebuia ochracea* (Bignoniaceae) dezenove ligantes foram retidos. Para caracterização esses compostos deverão ser isolados em escala multimiligramas. O número de ligantes identificados nos dois extratos etanólicos demonstrou o potencial do ensaio de afinidade desenvolvido. O desenvolvimento dos ensaios, resultados e os estudos para elucidação estrutural dos ligantes identificados serão detalhadamente discutidos nessa dissertação.

ABSTRACT

ARGINASE: FROM THE IMMOBILIZATION TO MODULATION OF AFFINITY ASSAY IN COLLECTIONS OF NATURAL PRODUCTS. The use of natural products from plants dates from antiquity and they are often targets as they exhibit biological properties of interest for new drug discovery. Unfortunately screening natural products for biologically active compounds, is laborious, time consuming and Costly. To meet this end, new affinity assay model based on the use immobilized protein have developed and it was the objective of this work. This work consisted of the immobilization of arginase on to magnetic beads (Arg-MBs) for screening of natural products extracts. The modulation of the assay was initially carried out for the compounds: catechin and epicatechin (reported as arginase inhibitors) and as negative control (not inhibitor), acyclovir. For the assays, two ethanolic extracts were selected: *Byrsonima coccolobifolia* (Malpighiaceae) and *Tabebuia ochracea* (Bignoniaceae). From the leaves extract of *Byrsonima coccolobifolia* (Malpighiaceae) 12 ligands were identified, and 9 of these characterized by LC-HRMS. While from crude ethanolic roots extract of *Tabebuia ochracea* (Bignoniaceae) nineteen ligands were fished out. For chemical elucidation, these compounds need to be isolated in milligram scale. The number of ligands identified in the two ethanolic extracts showed the potential of the affinity assay developed. The development of the assays, results and studies for structural elucidation of the ligands identified will be discussed in detail in this dissertation.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	X
LISTAS DE FIGURAS	VII
LISTAS DE TABELAS	XI
RESUMO	XII
ABSTRACT	XIII
1. Fundamentação teórica	2
1.1 A biodiversidade brasileira e a fonte de novos protótipos	2
1.2 O interesse em produtos naturais	2
1.3 Abordagens no descobrimento de novas substâncias bioativas (NASs).....	4
1.3.1 Abordagens baseadas em bioafinidades.....	5
1.3.2 <i>Ligand fishing</i>	7
1.4 Enzimas como alvo biológico	11
1.5 Arginase alvo validado para o tratamento de Leishmaniose	11
1.5.1 Leishmaniose	14
1.5.2 Inibidores de arginase de <i>Leishmania</i> ssp. oriundos de produtos naturais	17
2. Objetivo	20
3. Materiais e Métodos	22
3.1 Reagentes e Equipamentos	23
3.2 Otimização das condições de ionização.....	24
3.3 Avaliação da atividade enzimática por LC-HRMS	24
3.4 Ensaio de atividade enzimática – método direto	25
3.5 Expressão da arginase de <i>Leishmania amazonensis</i>	25
3.6 Purificação da arginase de <i>L. amazonensis</i>	25
3.7 Diálise.....	26
3.8 Preparo das MB-Arg.....	27
3.9 Prova de conceito.....	28
3.10 Obtenção dos extratos	29
3.11 Triagem biológica dos extratos frente a arginase.....	30
3.12 Triagem e desenvolvimento de métodos cromatográficos dos extratos – LC-PDA.....	30

3.13 Desenvolvimento dos métodos cromatográficos por LC-QqTOF para os extratos.....	31
3.14 Viabilidade enzimática na presença de MeOH.....	32
3.15 Ensaio de <i>ligand fishing</i>	32
4. Resultados e discussão.....	34
4.1 Desenvolvimento de métodos para as análises dos extratos.....	35
4.2 Expressão e purificação da arginase	41
4.3 Monitoramento da atividade catalítica da arginase por LC-HRMS.....	44
4.4 Imobilização da enzima arginase em partículas magnéticas (MB-arg)	46
4.5 Ensaio de <i>ligand fishing</i> (bioconjugação)	49
4.5.1 Prova de conceito usando as MB-Arg.....	51
4.5.2 Ensaio de <i>ligand fishing</i> no extrato das folhas de <i>B. coccolobifolia</i>	53
4.5.3 Ensaio de <i>ligand fishing</i> no extrato das raízes de <i>Tabebuia ochracea</i>	62
5. Conclusão.....	69
Referências.....	71
Anexo	87

Fundamentação teórica

1. Fundamentação teórica

1.1. A biodiversidade brasileira e a fonte de novos *hits*

O Brasil tem a flora mais rica do mundo, sendo detentor de aproximadamente 20% da flora mundial.¹ A importância sobre a biodiversidade do Brasil teve início logo após colonização ocorrida no século XV. Um dos registros que evidencia o interesse pelas plantas está descrito no “Tratado Descritivo do Brasil” escrito por Gabriel Soares de Sousa em 1587, onde o autor menciona os produtos naturais utilizados pelos povos indígenas como “as árvores e as ervas da virtude.”^{2,3}

O Brasil possui uma vasta biodiversidade de espécies vegetais, a qual abriga uma grande diversidade química de moléculas, representada por milhares de metabólitos secundários pertencentes a diversas classes.³ No entanto, devido ao ritmo acelerado com que a flora vem sendo destruída por ações antropogênicas, essa diversidade molecular está ameaçada, fazendo com que muitas espécies sejam extintas sem ao menos serem exploradas do ponto de vista químico e biológico. Assim, informações valiosas estão sendo perdidas juntamente com inúmeros produtos naturais de classes distintas e esqueletos estruturais completamente desconhecidos, muitos dos quais poderiam servir de modelos para o desenvolvimento de novos fármacos.⁴

1.2. O interesse em produtos naturais

Desde os primórdios a civilização humana utiliza produtos naturais como fonte terapêutica, e com o passar dos séculos, os produtos naturais passaram a representar uma ferramenta promissora para a descoberta de novas substâncias bioativas. Os extratos de produtos naturais possuem uma diversidade de moléculas arquitetônicas e estereoquimicamente complexas,⁵⁻⁷ e essa diversidade química se origina a partir das diferentes interações entre o organismo e seu habitat, por exemplo, fatores ambientais, estresse, defesa e necessidade de reprodução, sendo essas moléculas conhecidas como metabólitos secundários.^{6,8}

Inúmeras áreas terapêuticas se beneficiam com as diferentes classes dos metabólitos secundários de plantas, que são capazes de interagir com muitos alvos específicos dentro e fora das células, e de fato há muitos anos têm sido fundamental na descoberta e desenvolvimento de novos medicamentos.^{6,8}

O avanço científico permitiu o isolamento, bem como a elucidação estrutural de metabólitos secundários, e com isso foi possível realizar a formulação de compostos ativos presentes em extratos de produtos naturais. Com isso uma série de compostos oriundos desta matriz estão disponíveis em sua forma pura como substâncias medicamentosas (figura 1.1).⁹

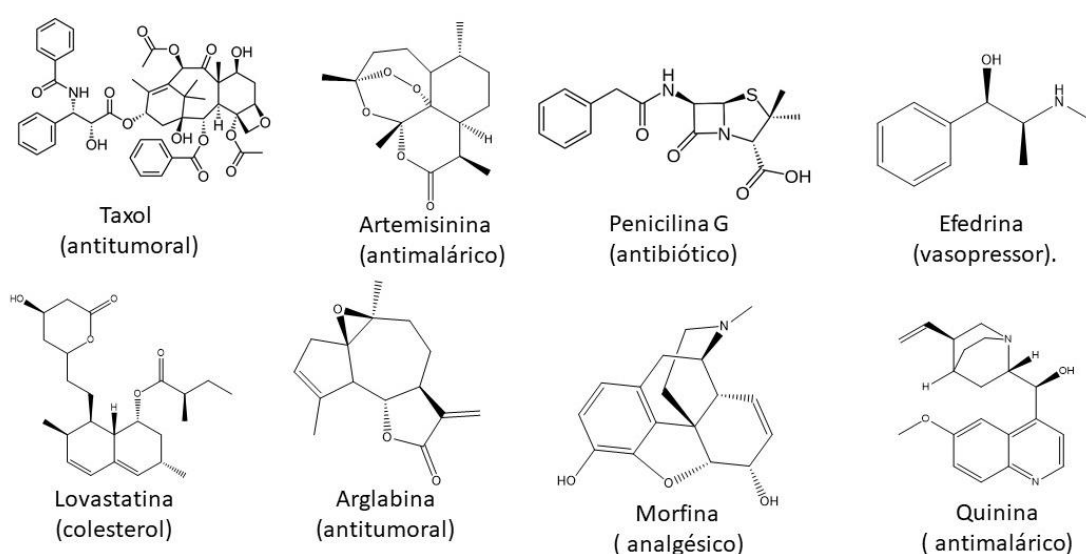


FIGURA 1. 1 . Exemplos de fármacos derivados de plantas e fungos, princípio ativo e utilidade clínica.

Quando analisamos os percentuais das entidades químicas aprovadas pelo FDA (do inglês, *Food and Drug Administration*) no período de janeiro de 1981 a dezembro de 2014, verifica-se que os produtos naturais (PNs) contribuíram com mais de 50% das descobertas dos fármacos (figura 1.2).¹⁰

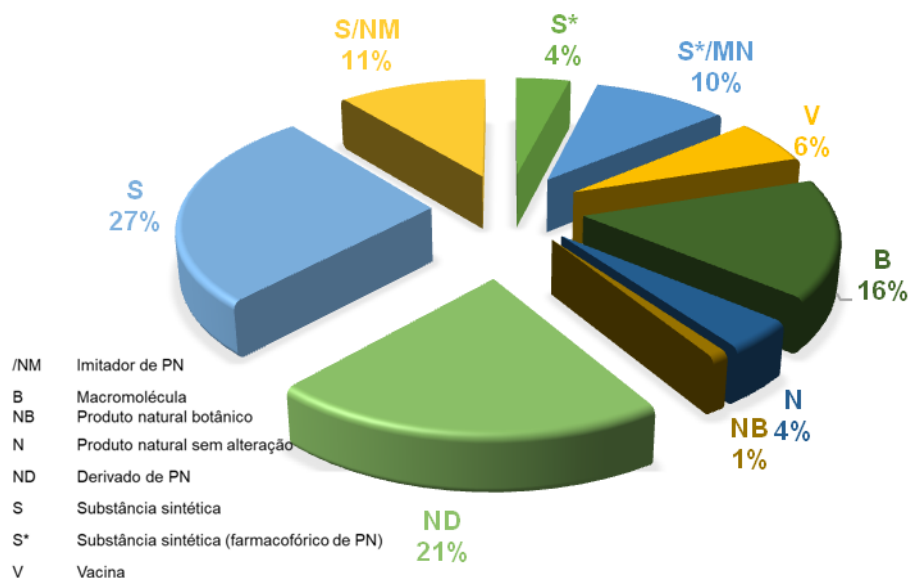


FIGURA 1. 2. Medicamentos aprovados pelo FDA no período de 1981–2014; total de 1562 fármacos. Adaptado de Newman & Cragg¹⁰

A busca por novos compostos com potencial biológico tem crescido a cada ano, isso porque as pesquisas estão voltadas para a descobertas de fármacos mais eficazes e de baixo efeito colateral.¹¹ Os PN como mencionados, tem ganhado um papel de destaque na busca desses compostos, uma vez que as plantas possuem uma diversidade química extremamente funcionalizadas, complexas e incomuns.^{12,13}

Contudo deve-se considerar que encontrar novas substâncias bioativas em extratos de PN é uma tarefa laboriosa, demorada e dispendiosa. Além disso, as diferenças de concentração entre diferentes metabólitos secundários proporcionam problemas adicionais. E esses problemas resultaram no desenvolvimento de novas abordagens analíticas de alto rendimento, possibilitando a identificação de compostos com o efeito biológico desejado.¹⁴

1.3. Abordagens no descobrimento de novas substâncias bioativas (NASs)

O método mais clássico no descobrimento de NASs em matrizes de produtos naturais, constitui inicialmente na obtenção dos extratos brutos, bem como a avaliação inicial do potencial biológico deste extrato frente a um alvo selecionado. A partir dos resultados inicia-se a purificação na busca dos compostos que exibiram

atividade biológica na avaliação inicial do extrato. As desvantagens deste método são: (I) grandes quantidades de material vegetal; (II) uso excessivo de solventes que na maioria das vezes são tóxicos; (III) isolamento de substâncias em quantidades inferiores para a caracterização química e avaliação biológica, e ademais se o estudo não for bioguiado pode levar ao isolamento de substâncias sem atividade biológica.¹⁴⁻¹⁶

Dentro deste contexto, a técnica de desreplicação de extratos vegetais tem se mostrado uma abordagem eficiente na identificação total ou parcial de substâncias bioativas já conhecidas. Além do mais, previne o reisolamento, minimiza o consumo de amostra e solvente, além de acelerar o estágio de descoberta de novas substâncias inéditas com o potencial biológico desconhecido.^{15,17,18}

Os métodos utilizados para desreplicação evoluem paralelamente com os avanços tecnológicos em cromatografia, espectrometria e espectroscopia, tanto em termos de instrumentação, quanto na facilidade de interpretação de dados com auxílio de bibliotecas virtuais gratuitas.¹⁹⁻²²

Algumas medidas devem ser tomadas minuciosamente para o estudo de desreplicação, entre elas: (i) detalhada revisão bibliográfica dos metabólitos secundários já isolados, abrangendo dados da espécie estudada, gênero e em alguns casos a família; (ii) modo de extração, pois com ele é possível extrair majoritariamente uma dada classe; (iii) fracionamento e/ou *clean up*, pois possibilita a remoção de interferentes, por exemplo, açúcares, graxas, clorofila e etc.¹⁹

A desreplicação usualmente envolve a utilização de técnicas hífenadas como a cromatografia líquida (LC) acoplada aos detectores de arranjo de diodos (DAD), espectrometria de massas (MS) e ressonância magnética nuclear (NMR). O uso destas técnicas acopladas têm impulsionado a elucidação tanto de compostos conhecidos quanto desconhecidos.¹⁹

1.3.1. Abordagens baseadas em bioafinidades

Outras abordagens que vem se destacando nos últimos anos, constituem-se no uso de um alvo biológico imobilizado em diferentes suportes que auxiliam na identificação rápida de NASs, e são uma alternativa para o estudo de fracionamento bioguiado.^{14,23}

De modo geral, o mecanismo pelo qual leva a retenção dos analitos nestas abordagens, é baseada nas interações reversíveis específicas, como por exemplo, a interação de uma enzima com seu substrato. Se o composto retido pelo alvo imobilizado possuir apenas interação fraca ou moderada com o alvo imobilizado, a sua remoção pode ser realizada alterando o pH ou tampão. No entanto, se o composto apresentar interação forte é necessário usar condições mais drásticas para romper o vínculo alvo-analito, por exemplo, o uso de altas porcentagens de solventes orgânicos, o que pode ocasionar a desnaturação irreversível do alvo imobilizado. Após extração ou eluição, os analitos retidos podem ser analisados de modo *on-line* ou *off-line* (a depender da abordagem utilizada).^{14,24,25}

Os alvos imobilizados ou agentes de ligações podem ser uma sequência de DNA, RNA, anticorpos, receptores, membranas, enzimas, proteínas, corantes biomiméticos, substrato/inibidor ou qualquer outro alvo que se deseja estudar. A primeira vez que se fez uso de um alvo imobilizado foi em 1910 por Starkenstein para purificar a α -amilase usando amido insolúvel.²⁶

As abordagens mais comuns que utilizam alvos imobilizados são: (1) cromatografia de afinidade de membrana celular,²⁷⁻³⁰ (2) cromatografia de bioafinidade,³¹⁻³⁵ (3) ultra-filtração,³⁶⁻³⁸ e (4) *ligand fishing*,^{24,39-42} (5) nanotubos⁴³ e (6) zeolita⁴⁴. E o mecanismo envolvido nessas abordagens se baseia na afinidade dos compostos presentes na matriz pelo alvo imobilizado, possibilitando a extração/caracterização química do ligante.^{14,45} As belezas das abordagens de bioafinidade é reuso dos alvos imobilizados e extração menos laboriosa(s) do(s) composto(s).

Deste modo, as abordagens envolvendo bioafinidade torna-se promissoras para a triagem de novos candidatos a fármacos, pois as interações que ocorrem entre o analito e o agente imobilizado são as mesmas interações que ocorrem no organismo humano, por exemplo, ligações de hidrogênio, interações de Van der Waals e eletrostáticas, demonstrando assim grandes vantagens como um artifício de triagem de alta produtividade (do inglês, *high-throughput screening*).^{46,47}

Dentre essas abordagens, a *Ligand fishing*, tem sido aplicada com sucesso na triagem de compostos biologicamente ativos presentes em extratos de produtos naturais.⁴⁵

1.3.1.1 *Ligand fishing*

As técnicas de triagem envolvendo alvos imobilizados têm sido uma alternativa de sucesso para o fracionamento clássico bioguiado.^{48,49} A possibilidade de imobilização de diversos alvos biológicos e as poderosas ferramentas analíticas de última geração, possibilitou o desenvolvimento do ensaio de bioconjugação ou “pesca de ligantes” (do inglês, *ligand fishing*).

E este ensaio surgiu como uma abordagem apropriada e eficiente para identificar/isolar ligantes em misturas complexas. Inicialmente foi aplicado para triar possíveis ligantes em extratos de tecidos,^{50,51} e atualmente vem sendo empregados para identificar ligantes em extratos ou frações de produtos naturais (tabela 1.1). A imobilização do alvo pode ocorrer em diferentes suportes, como por exemplo, nanotubos de TiO₂,⁴³ fibras ocas,⁵² partículas magnéticas,²⁴ membras de ultrafiltração,⁵³ membras de diálise,⁵⁴ óxido de grafeno,⁵⁵ entre outros.

TABELA 1.1 - Levantamento bibliográfico do emprego do ensaio *Ligand fishing* na descoberta de ligantes oriundos de produtos naturais (o levantamento foi realizado usando a palavra-chave “*ligand fishing*” no pubmed).

Alvo imobilizado / doença relacionada	Material vegetal	Pescados	Referência
Monoamina oxidase A / depressão	Tubérculos de <i>Corydalis</i> Rhizome	tetrahydrocolumbamina, protopina, jatrorrhizina, glaucina, tetrahidropalmatina, palmatina e dehidrocoridalina	47
Monoamina oxidase B / doenças neurodegenerativas	Flores de <i>Lonicera japonica</i>	ácido isoclorogênico A e ácido isoclorogênico C	57
Neuraminidase / influenza	Flores de <i>Flos Lonicerae</i>	cynaroside, luteolina, ácido 3,5- <i>O</i> -dicafeoilquínico e ácido 3,4- <i>O</i> -dicafeoilquínico	58
Acetilcolinesterase / doença de Alzheimer e inseticidas	Flores de <i>Lippia gracilis</i>	eriodictiol 2'- <i>O</i> -glucosídeo ou eriodictiol 3'- <i>O</i> -glucosídeo	24
α -glucosidase / diabetes tipo 2	Cascas da raiz de <i>Morus alba</i>	sanggenona G, sanggenona O, sanggenol A e sanggenol G	59
Proteína de choque térmico 90 (Hsp 90) / Câncer	Rizomas de <i>Curcuma longa</i>	<i>bis</i> -demetoxicurcumina, demetoxicurcumina, curcumina, isoprocurcumenol, ar-turmerona, germacrona e 6 compostos não foram elucidados	60
α -glucosidase / diabetes tipo 2	Folhas de <i>Eugenia catharinae</i>	<i>miricetina</i> -3- <i>O</i> - α -L-ramnopiranosídeo, <i>miricetina</i> , <i>quercetina</i> e <i>kaempferol</i>	42
Lipase pancreática / doenças cardiovasculares, diabetes e obesidade	Chá de oloong	(-)-epigalocatequina-3-galato, (-)-galocatequina-3-galato e (-)-epicatequina-3-galato	61
Ciclooxigenase-2 / inflamação	Chá verde	(-)-galocatequina, (-)-epigalocatequina, (-)-epicatequina, (-)-epigalocatequina-3-galato, (-)-galocatequina-3-galato, (-)-epigalocatequina-3-(3''- <i>O</i> -metil)-galato, (-)-epicatequina-3-galato, (-)-epicatequina-3-(3''- <i>O</i> -metil)-galato	62

Continuação da tabela 1.1

Alvo imobilizado / doença relacionada	Material vegetal	Pescados	Referência
Lipase pancreática / doenças cardiovasculares, diabetes e obesidade.	Folhas de <i>Nelumbo nucifera</i>	quercetina-3-O-β-d-arabinopiranosil-(1→2)-β-D-galactopiranosídeo e quercetina-3-O-β-D-glucoronídeo	63
α-amilase / diabetes e obesidade	Folhas de <i>Garcinia xanthochymus</i>	gb2a glicosilado, gb2a e fukugetina	64
Ciclo-oxigenase-1 / inflamação	Rizomas de <i>Curcuma longa</i>	<i>bis</i> -demetoxicurcumina, demetoxicurcumina, curcumina e 1-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-7-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-(1 <i>E</i> ,6 <i>E</i>)-1,6-heptadieno-3,5-diona)	65
Histona desacetilase-SIRT6 / distúrbios metabólicos	Sementes de <i>Trigonella foenum-graecum</i>	orientina e outros 14 compostos que não foram elucidados	66
Albumina sérica bovina	Frutos de <i>Polygonum orientale</i>	5,7-triidroxicromeno, taxifolina, N- <i>cis</i> -paprazina, N- <i>cis</i> -moupinamida, N- <i>trans</i> -paprazina, N- <i>trans</i> -moupinamida e um composto não identificado	67
Albumina sérica humana	<i>Dioscorea panthica</i> e <i>Dioscorea nipponica</i> *	progenina II, progenina III, dioscina, gracilina, protodiscina, protográcilina e 5 compostos que não foram identificados	68–70
Glutaciona transferases (GSTS) / homeostase redox na planta	Folhas de <i>Nicotiana benthamiana</i>	rutina, kaempferol-3-O-rutinosídeo, aromadendrina, ácido clorogênico e mais 12 compostos que não foram identificados	71

*não cita a parte da planta que foi estudada

O uso de partículas magnéticas como suporte de imobilização possibilita a separação rápida das MB do meio reacional por magnetismo, além do mais apresenta baixa porosidade e alta estabilidade mecânica.⁷² Nesta técnica, as partículas magnéticas são usualmente derivadas ou revestidas com grupos funcionais apropriados para à imobilização de um alvo (MB-al) e, são imersas diretamente na solução contendo o extrato (etapa 1) e qualquer composto que possuir afinidade com o alvo imobilizado são retidos, enquanto os não ligantes permanecem no sobrenadante, então as MB-al são extraídas da solução com auxílio de um separador magnético. Após a separação das MB-al é realizado o procedimento de limpeza (etapa 2) e na sequência é realizado o procedimento de extração dos ligantes (etapa 4). A etapa seguinte é a de análise, que geralmente utiliza a combinação da LC com a MS, ou LC-NMR que permite a detecção e caracterização estrutural dos *hits* (figura 1.3).^{14,23,24}

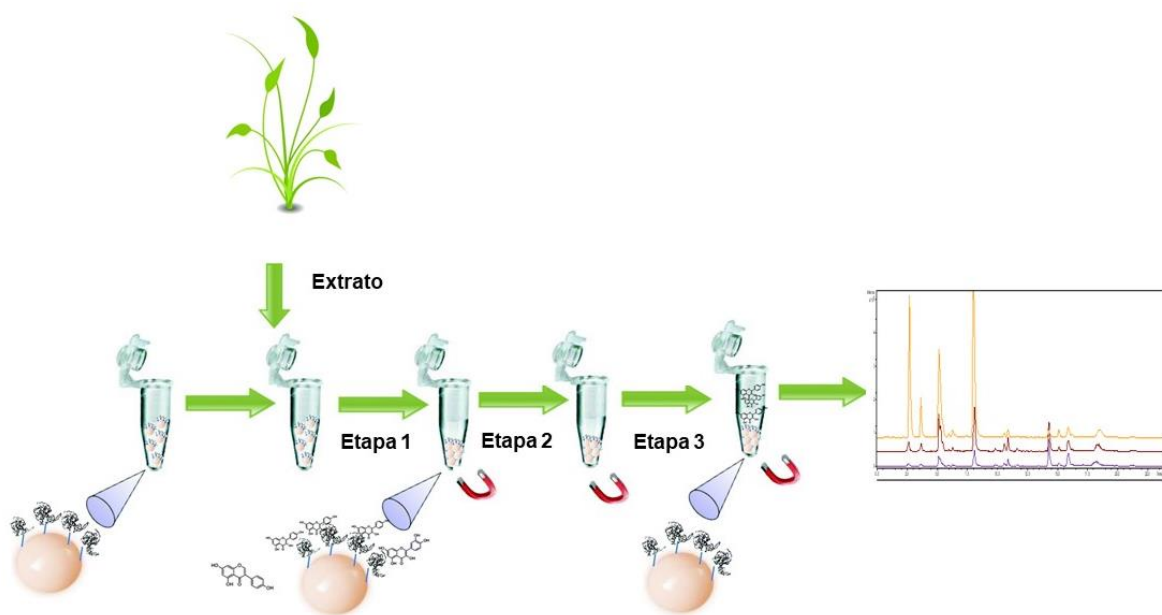


FIGURA 1. 3. Ilustração do ensaio de *ligand fishing*. Etapa 1: incubação, etapa 2: limpeza das MB-al, etapa 3: extração dos ligantes, e por último a análise dos ligantes. Adaptado¹⁴

Uma das maiores vantagens do uso de MB-al é a sua alta seletividade, que permite a identificação de ligantes em baixas concentrações e ligantes de baixa afinidade, ambos que não são identificados pelo uso de abordagens convencionais. Ademais, minimiza o trabalho laborioso e dispendioso de isolamento, evita o uso de solventes orgânicos em grandes volumes e dependendo da condição utilizada na etapa de extração do ligante, as MB-al podem ser reutilizadas.¹⁴

1.4. Enzimas como alvo biológico

As enzimas são catalisadores biológicos e estão envolvidas em diversos processos fundamentais para sobrevivência dos organismos vivos, porém o seu mau funcionamento pode acarretar danos graves.⁷³ Como por exemplo, a enzima conversora de angiotensina 1 em angiotensina 2 exerce um papel essencial na regulação da pressão arterial, e o seu mau funcionamento ocasiona o aumento da pressão arterial que eleva o risco de acidente vascular cerebral.⁷⁴ Justamente por este motivo as enzimas são alvos biológicos importantes para o desenvolvimento de novos fármacos,⁷⁵ os quais poderão atuar como inibidores quando há a necessidade de retardar da atividade enzimática, ou como ativadores quando a enzima apresenta atividade inferior ao desejado. Muitas doenças são causadas pela disfunção ou expressão desregulada de enzimas. Em outros casos, a inibição de enzimas que participam de vias importantes para a sobrevivência/replicação dos patógenos (bactérias, fungos e vírus) é uma ferramenta útil para a quimioterapia.^{73,76}

1.5. Arginase alvo validado para o tratamento de Leishmaniose

A arginase (EC 3.5.3.1) é uma metaloenzima trimérica, com um centro binuclear de manganês (II) por unidade, o qual é responsável pela atividade máxima catalítica da enzima.⁷⁷ Duas arginases são descritas em mamíferos: a arginase I, majoritariamente encontrada no fígado, mas também no sistema imunológico, sendo esta responsável no ciclo da ureia pela desintoxicação da amônia, catalisando a conversão de L-arginina em L-ornitina e ureia como exemplificado no esquema da figura 1.4; a arginase II, é uma enzima amplamente distribuída nas mitocôndrias de vários tecidos envolvidos na síntese de prolina, glutamato e creatina, que originam outras macromoléculas e pequenas moléculas.^{78,79} A arginase também é encontrada em alguns Tripanosomatídeos como a *Leishmania*.⁷⁷

A porcentagem de identidade entre a arginase humana e a do parasita (*L. mexicana*) é de apenas 40%, tornando esse alvo valioso para a descoberta de novos fármacos para a leishmaniose.⁸⁰ Além do mais, a enzima do parasita têm dois aminoácidos próximos ao sítio catalítico os quais não são comuns à enzima

humana, gerando assim diferentes estruturas. Isso possibilita que o inibidor específico de uma enzima não iniba a outra, de tal modo, que não vá interferir no papel crucial da arginase humana na desintoxicação no fígado, podendo assim ser desenvolvido um fármaco eficiente e de poucos efeitos colaterais.⁷⁷

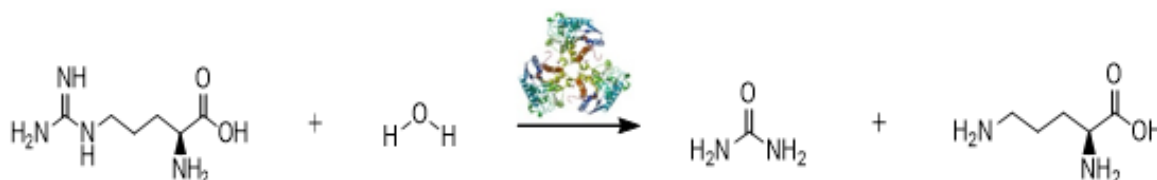


FIGURA 1. 4. Esquema da reação enzimática entre a arginase e L-arginina produzindo ureia e L-ornitina.

A *Leishmania* é auxotrófica para muitos aminoácidos, incluindo L-arginina que é responsável pela a sua replicação e crescimento. A fim de suprir a necessidade deste aminoácido o parasito desenvolveu um mecanismo para absorvê-lo de fontes exógenas, por meio de carregadores específicos de aminoácidos.^{81,82}

Quando a arginase catalisa a reação usando a L-arginina como substrato, o aminoácido formado sofre uma reação de descarboxilação por meio da catálise da ornitina descarboxilase (ODC, EC 4.1.1.17) levando a formação da putrescina,⁸³ uma diamina que sofre uma nova reação por meio da espermidina sintase (SPDSYN, EC 2.5.1.16) e espermina sintase (EC 2.5.1.22, SpmS) produzindo espermidina e espermina, sendo interação destes metabólitos com o DNA e proteínas essenciais para a manutenção e regulagem da proliferação celular (figura 1.5).^{84,85}

A *Leishmania* spp é um caso de Tripanosomatídeos em que é encontrada a arginase e que quando entra em contato com o corpo do hospedeiro sofre fagocitose pela ação dos macrófagos, sendo direcionados para o vacúolo digestivo que se funde com os lisossomos gerando os fagolissomos. Os fagolissomos possuem três mecanismos de defesa contra os patógenos fagocitado, sendo um deles a produção de ROS (espécies reativas de oxigênio). Porém, os mecanismos de defesa dos fagolissomos não são eficientes contra os parasitas da *Leishmania*,^{84,86} tornando o meio propício para sobrevivência do parasita, que estimula a cascata de reação citada na figura 1.5 produzindo assim espermidina e espermina que leva a proliferação parasitária.⁸⁴

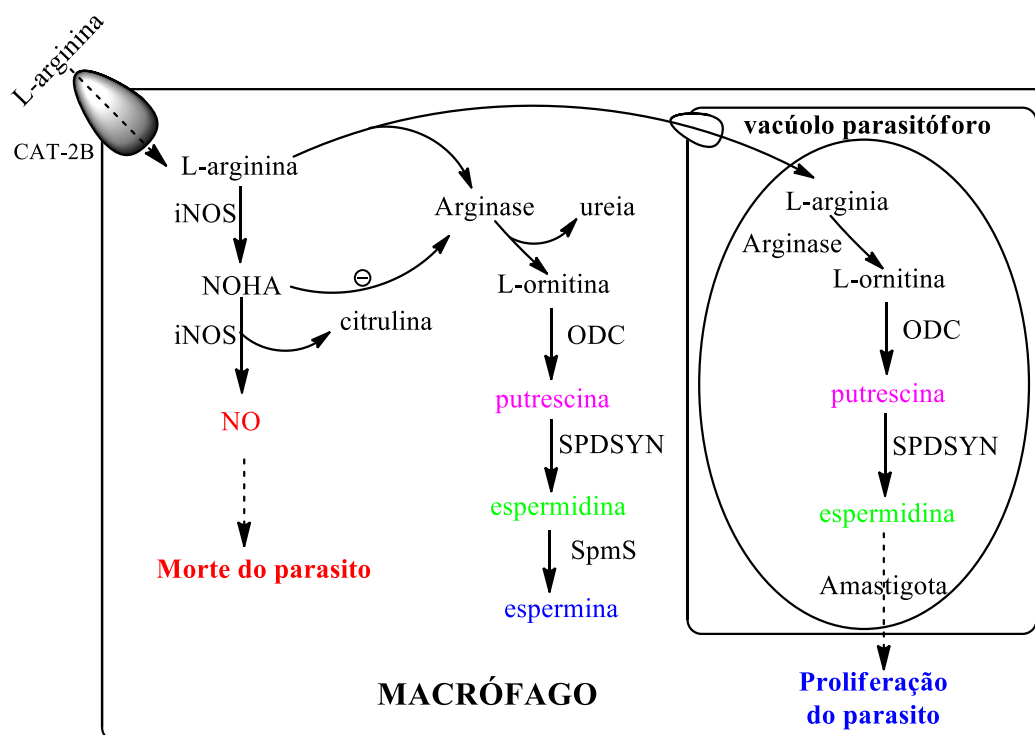


FIGURA 1. 5. Rota bioquímica do metabolismo de arginina no hospedeiro e no parasita. A arginina desempenha um papel fundamental na ativação do sistema de defesa do hospedeiro e na sobrevivência do parasito durante a infecção. Adaptado⁸⁵

O aminoácido L-arginina é também substrato da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), devido a este motivo ocorre uma competição entre arginase e a iNOS pela L-arginina, ambas essas enzimas no hospedeiro. A iNOS é responsável pela produção ROS, que atuam contra o crescimento do parasita e aumenta a sua vulnerabilidade ao estresse oxidativo.^{77,87} A arginina quando participa da produção de ROS traz um resultado benéfico para o organismo humano, pois a produção de ROS é importante na defesa contra invasores celulares, tumores e ainda em lesões vasculares.^{86,88}

A competição entre o arginase humana e iNOS leva a diminuição da L-arginina no meio extracelular, porém o parasita apresenta carregadores eficientes para o meio intracelular, o que acarreta na diminuição da arginina para iNOS, assim diminuindo a produção das ROS que atuam na defesa do organismo frente a parasita.^{77,88}

A inibição da arginase do parasita em macrófagos infectados demonstrou efeito terapêutico por elevar a produção de ROS, sendo esta uma importante resposta microbicida dessas células, o que levou a diminuição da

capacidade de *L. major* estabelecer a infecção.⁸⁹ Estas evidências indicam que a arginase é uma alvo para quimioterapia de leishmanioses.⁹⁰

1.5.1 Leishmaniose

Leishmaniose é listada como uma doença negligenciada, ou seja, pertencente a um grupo de diversas doenças transmissíveis que predominam em condições tropicais e subtropicais, afetando majoritariamente as economias em desenvolvimento.⁹¹ É transmitida ao homem, e a outras espécies de mamíferos a partir da picada dos mosquitos fêmeas pertencentes aos gêneros *Phlebotomus* ou *Lutzomyia*, conhecidos popularmente no Brasil como mosquito palha. A transmissão para hospedeiro ocorre na forma promastigotas (flagelados) que se transformam em amastigotas (aflagelados) que podem se multiplicar dentro dos fagocitossomos da célula infectada, por divisão binária até que a célula infectada fique repleta do parasita e se rompe, liberando esses parasitas que vão invadir novas células (figura 1.6). A leishmaniose é causada pelo protozoário do gênero *Leishmania*, sendo que das 30 espécies que infectam os mamíferos, 21 infectam os seres humanos.^{92,93}

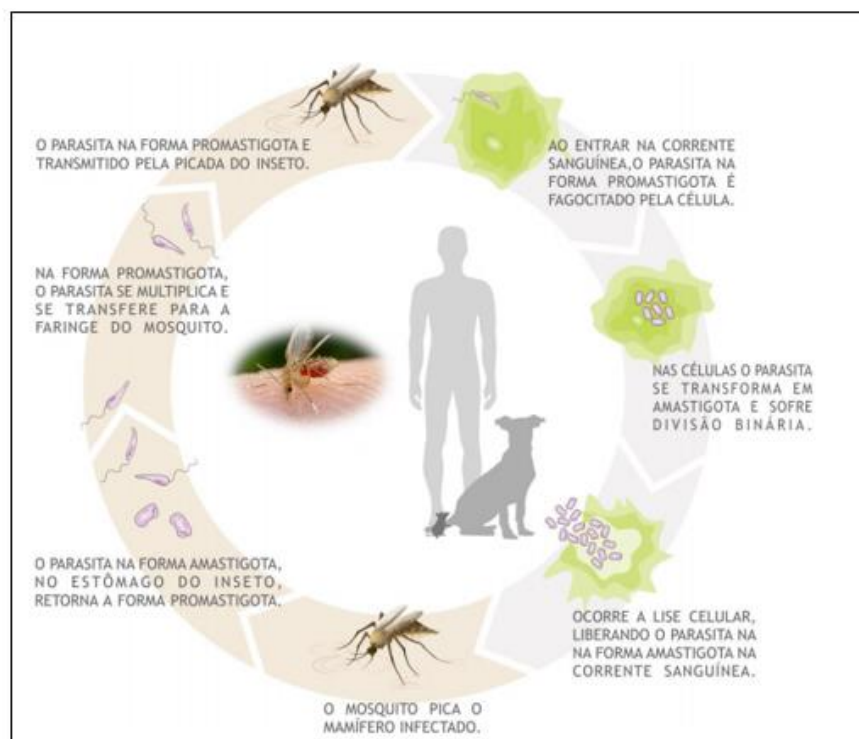


FIGURA 1. 6. Ciclo de vida do protozoário causador da Leishmaniose: da propagação ao desenvolvimento da doença. Adaptado ^{94,95}

A manifestação clínica da doença está sujeita a complexidade da interação entre o sistema imunológico do hospedeiro e o tipo de protozoário, existem três tipos principais de manifestação clínicas da doença: (i) leishmaniose visceral, causada por *Leishmania donovani*, *L. chagasi* e *L. infantum*, e se caracterizada por febre alta, baixa contagem de glóbulos vermelhos e aumento do baço e do fígado que leva à morte se não tratada (figura 1.7a); (ii) leishmaniose cutânea que é causada por *L. major* e outras espécies parasitas, e se manifesta através de úlceras cutâneas que podem cicatrizar espontaneamente, muitas vezes deixando cicatrizes desfigurantes; (iii) leishmaniose mucocutânea, que se apresenta como úlceras da pele, boca e nariz.⁹³

Essa enfermidade está difundida entre os continentes, preferencialmente nas regiões tropicais e subtropicais. De acordo organização mundial da saúde, um total de 350 milhões de pessoas são fatores de risco dessa doença, mais de 20 mil pessoas são mortas por leishmaniose visceral e cerca de 1,6 milhões de casos ocorrem anualmente em mais de 98 países (Figura 1.7 e 1.8).⁹⁶⁻⁹⁸ Em 2017, 94% dos casos relatados à OMS ocorreram em sete países: Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão.⁹⁹

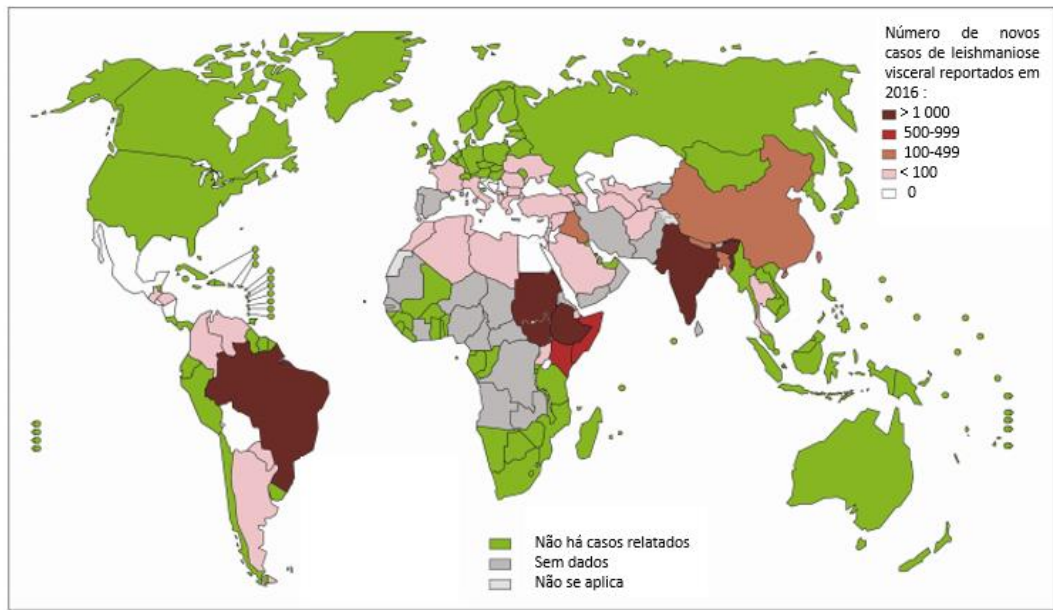


FIGURA 1. 7. Endemicidade da Leishmaniose visceral no mundo no ano de 2016.⁹⁹

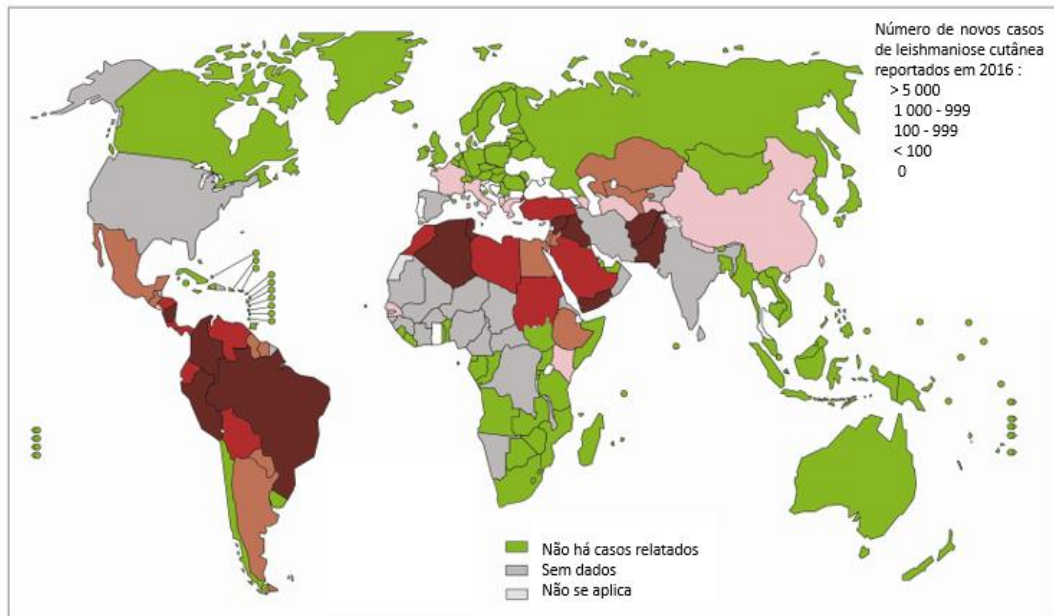


FIGURA 1. 8. Endemicidade da Leishmaniose cutânea no mundo no ano de 2016.⁹⁹

O tratamento atual para a leishmaniose inclui principalmente antimoniais pentavalentes desenvolvidos na década de 1940,¹⁰⁰ anfotericina B um fármaco isolado do fungo *Streptomyces noclosus*,¹⁰¹ miltefosina e paromomicina um antibiótico isolado de *S. restomuceticus*.^{102,103} Todos os compostos pertencem a diversas classes e atuam através de diferentes modos de ação.¹⁰⁴

As opções de tratamento para a leishmaniose podem ser designadas como não confiáveis, devido a vários inconvenientes associados aos efeitos colaterais dos fármacos, não adesão ao tratamento e a resistência do protozoário, onde os antimoniais pentavalentes quando metabolizados geram espécies tóxicas,^{105,106} a anfotericina B também exibe alta toxicidade para os rins e hematotoxicidade.¹⁰⁷⁻¹⁰⁹ A miltefosina é considerada teratogênica.¹¹⁰ A paromomicina só pode ser administrada por via parenteral ou local, pois apresenta baixa absorção oral.¹¹¹

1.5.2 Inibidores de arginase de *Leishmania* ssp. oriundos de produtos naturais

Dado a importância da química de produtos naturais no descobrimento de fármacos, diversos autores têm testado vários compostos em arginase na busca de novos agentes leishmanicidas (tabela 1.2). Dentre os produtos naturais que têm sido testados na busca por ação antiparasitária, destacam-se os flavonoides aglicana e glicosilados, polifenóis, lignanas, derivados galoliquínicos e verbascosídeos.¹¹²⁻¹¹⁵

TABELA 1. 2. Valores de IC₅₀ e porcentagens de inibição para os metabolitos secundários oriundos de produtos naturais que foram avaliados frente a enzima recombinante de *L. amazonensis*.

	Compostos	IC50 (µM)	% de inibição	Referência
1	Ácido cafeico	1,5	-	112
2	Ácido rosmarínico	2,1	-	
3	Ácido clorogênico	8,3	-	
4	Ácido cripto-clorogênico	11	-	
5	Isoverbascosídeo	2,3	-	

Continua

Continuação da tabela 1.2

	Compostos	IC50 (µM)	% de inibição	Referência
6	Verbascosídeo	19	-	116
7	Isovitexina	-	14% (20 µM)	117
8	(+)-Catequina	1,7	-	113
9	(-)-Epicatequina	1,6	-	
10	Isoquercetrina	2,0	-	
11	Quercetina	4,0	-	
12	Quercetrina	12,2	-	
13	Kaempferol	55	-	
14	Ácido gálico	2,2	-	
15	Miricetrina	2,1	-	
16	Myricetin 3-O-α-rhamnosídeo	2,4	-	
17	Catequina-3-O-α-rhamnosídeo	35,1	-	
18	Mearnsetina	88,1	-	
19	Heptametoxiflavona	127,9	-	
20	Tamarixetina 3-O-α-L-rhamnosídeo	223,5	-	
21	(+)-Siringaresinol	13,7	-	
22	Trigonostemone	16,6	-	
23	Orientina	16	-	118
24	(-)-Epicatequina-3-galato	3,8	-	119
25	Fisetina	1,4	-	118
26	Isoorientina	9,0	-	
27	Luteolina	9,0	-	
28	7,8-Diidroflavona	12	-	
29	Galangina	100	-	
30	Apigenina	-	< 50% (125 µM)	
31	Vitexina	-	< 50% (125 µM)	
32	Ácido quínico	147,48	-	114
33	Ácido 3-O-galoilquínico	0,13	-	
34	Ácido 3-O-(3"-O-metil)galoilquínico	0,44	-	
35	Ácido 3,5-O-digaloilquínico	0,49	-	
36	Ácido 3,4,5-O-trigaloilquínico	0,31	-	

Devido a importância da química de produtos naturais em produzir diversas estruturas químicas e a necessidade de desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de Leishmaniose, este trabalho buscou o desenvolvimento de um novo modelo para a triagem de ligantes utilizando a arginase imobilizada em partículas magnéticas. Esta abordagem permitirá a identificação de compostos diretamente do extrato sem a necessidade de fracionamentos.

2. Objetivo

2. Objetivo

Imobilização da arginase de *L. amazonensis* em partículas magnéticas e modulação de ensaios de *ligand fishing* em extratos de plantas do cerrado brasileiro.

3. Materiais e Métodos

3. Materiais e Métodos

3.1 Reagentes e Equipamentos

Os solventes orgânicos utilizados foram grau LC-UV (PANREAC, J. T. BAKER, Honeywell), e degaseificados em ultrassom BRANSON 1510. LC. A água utilizada na composição das fases móveis e preparação de soluções foi obtida em um sistema Milli-Q® Direct 8. As pesagens foram realizadas em balança analítica (AND®, modelo HR 200), com precisão de 0,1 mg. Para o preparo de soluções, os volumes dos diluentes e reagentes foram pipetados com micropipetas Gilson® e Eppendorf®. No procedimento de preparo de amostras os solventes utilizados foram grau HPLC. As medidas de pH foram realizadas utilizando um pHmetro, GEHAKA, modelo PG1800, com precisão de $\pm 0,01$ unidades de pH, conectado a um eletrodo de vidro combinado Ag/AgCl. A calibração do pHmetro foi realizada com soluções tampão pH 4,00, 7,00 e 10,0 (GEHAKA). As amostras foram centrifugadas utilizando uma centrífuga da marca Eppendorf 5415R. Os padrões utilizados neste trabalho foram adquiridos na Sigma- Aldrich.

A homogeneização das amostras foi efetuada em um *vortex* PHOENIX modelo AP56. O banho-maria utilizado foi um Banho Dubnoff, Nova Ética®.

Para análises dos extratos foi utilizado o sistema UHPLC Agilent 1290 *Infinity II* (Agilent Technologies) composto por uma bomba binária (G7120A – *High speed Pump*), autoinjeter e compartimento de colunas (G7129B – *1290 Vialsampler*) e detector de ultravioleta de comprimento de onda variável (G7114B – modelo 1260 *Infinity II* – VWD, acoplado ao espectrômetro de massas de alta resolução do tipo QqTOF (*Bruker Daltonics - Impact*, Rheinstetten, Alemanha) equipado com fonte ESI (*electrospray*). A aquisição e processamento dos dados foi realizada utilizando o software Data Analysis® (*Bruker Daltonics GmbH*).

O sistema utilizado para triagem de colunas foi o UHPLC (modelo Nexera®, Shimadzu) composto por duas bombas quaternárias LC-30AD, degaseificador DGU-20A5R, autoinjeter SIL-30AC, detector de arranjo de diodos SPD-M30A, forno CTO-20AC, válvula seletora para a comutação de colunas de 6 portas, sistema *Method Scouting Solution*® para desenvolvimento da sequência de

análise, com todas as unidades controladas através de uma interface CBM 20A. Os cromatogramas gravados e processados pelo software LabSolutions®.

Para purificação da arginase foi utilizado um cromatógrafo líquido de proteínas rápida (FPLC) ÄKTA FPLC, composto por um detector de UV UPC 900, uma bomba P- 920, um coletor de fração FRAC-920, sendo os cromatogramas registrados através de um software UNICORN na versão 3.2.

3.2 Otimização das condições de ionização

Para a avaliação da atividade enzimática foi desenvolvido um método espectrométrico utilizando o ESI-QqTOF para analisar a ionização do produto advindo da reação enzimática em estudo. Para tal, preparou-se uma solução aquosa contendo sem 100 ng/mL de ornitina e 0,1% de ácido fórmico. Com auxílio de uma bomba-seringa com vazão de 3 µL/min foi realizada a infusão no espectrômetro de massas. A otimização dos parâmetros de ionização foi realizada no modo positivo de ionização, tendo a intensidade do íon de m/z 133,0971 como parâmetro. As condições de ionização otimizadas foram: nebulizador 3 bar, energia do quadrupolo 1 eV, vazão do gás de secagem 8 L/min (N₂), tempo de transferência de 80 µs e pré-pulso de 8,0 µs, temperatura do gás de secagem 180 °C, tensão do *End Plate* e capilar de 500 V e 4500 V, respectivamente.

3.3 Avaliação da atividade enzimática por LC-HRMS

Para a avaliação da atividade enzimática foi configurado um sistema de LC-HRMS, onde as condições de ionização para o íon interesse já estavam estabelecidas (descritas no 3.2). O método cromatográfico desenvolvido constitui de uma coluna Acquity HSS T3 (1.8 µm, 2.1 x 100 mm). Fase móvel ACN:H₂O ambos acidificados com 0,1% de ácido fórmico. A eluição foi realizada no modo isocrático utilizando uma proporção de 1:99 v/v a uma vazão de 0,2 mL/min, com injeção de 1 µL da amostra. A calibração do MS foi realizada com uma solução de formiato de sódio 1 mM com massas de referências de 100-1000, após a corrida cromatográfica os dados de MS foram recalibrados com o mesmo calibrante na mesma faixa de massa.

3.4 Ensaio de atividade enzimática – método direto

A um tubo de microcentrifugação de 1,5 mL foi adicionado 10 µL de uma solução de arginase [0,48 mg/mL] e 5 µL de uma solução 50 mM de L-arginina preparada em 20 mM formiato de amônio, pH 9,50 (tampão A). O volume da reação foi ajustado para 100 µL com o tampão de atividade e mantida a 37 °C por 10 minutos. Após esse tempo, foi adicionado 100 µL de etanol gelado (-18 °C) e a mistura reacional centrifugada a 10000 g por 10 minutos a 4 °C. Para injeção, 5 µL do sobrenadante foram diluídos com 995 µL de água ultrapura e 1 µL dessa solução foram injetados no sistema de LC-HRMS em acordo com condições descritas no item 3.2 e 3.3. O sinal do produto formado (ornitina) foi monitorado em *m/z* 133,0971.

3.5 Expressão da arginase de *Leishmania amazonensis*

Foi preparado um pré-inóculo de uma colônia de *E. coli* de linhagem BL21 (DE3) pLysS transformada com o plasmídeo pRSET-ARG,¹¹³ em 20 mL de meio de cultura LB (Luria Bertani), suplementado com 100 µg/mL de ampicilina e 35 µg/mL de clorafenicol. A cultura permaneceu sob agitação por 16 horas a 37 °C. Após esse período, diluiu-se o conteúdo em 500 mL de meio SOB, suplementado com ampicilina 100 µg/mL e clorafenicol 35 µg/mL, mantendo-se novamente sob agitação a 37 °C até obter uma densidade óptica de 600 nm de aproximadamente 0.7 (DO₆₀₀ = 0.7). Assim, foi adicionado 500 µL de uma solução 1 molar de indutor IPTG (*Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside*) e 100 µL de uma solução 1 molar de MnSO₄, deixando a cultura sob agitação a 30 °C durante 20 horas. Posteriormente, a cultura foi centrifugada a 10000 g a 4 °C por 10 minutos.

3.6 Purificação da arginase de *L. amazonensis*

Os processos de expressão e purificação da arginase foram acompanhados por eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE).¹²⁰ As células correspondentes a aproximadamente 166 mL de meio de cultura, foram

ressuspendidas em 30 mL de 20 mM tris-HCl pH 7,05 (tampão X)) acrescido de 0,3% de triton-X 100, sendo lisadas por sonicação (6 pulsos de 10 segundos cada, com intervalos de 15 segundos e amplitude de 20%). Após a lise, centrifugou-se o lisado 10000 g a 4 °C por 20 minutos. Alíquotas das fases foram retiradas para posterior análise. Como planejado, para a obtenção da arginase em alto grau de pureza foi necessária a realização de duas etapas cromatográficas, sendo uma delas na coluna de níquel Ni-NTA Sepharose (QIAGEN), seguida da cromatografia de troca aniônica em coluna QFF Hi-Trap (GE Healthcare), utilizando o cromatógrafo ÄKTA FPLC (GE Healthcare). Os procedimentos estão descritos abaixo.

O sobrenadante obtido (fração solúvel) foi purificado por cromatografia de afinidade em uma coluna de níquel de 1 mL. Após aplicação do sobrenadante à coluna, esta foi lavada com 10 mL do tampão X, seguido por aplicação de 5 volumes de tampão X contendo MnSO₄ 2 mM. A eluição das proteínas ocorreu por duas eluições 4 mL do tampão X acrescido com imidazol, primeiramente na concentração de 5 mM, e a seguir, na concentração de 300 mM.

As frações eluídas foram aplicadas em uma coluna de troca aniônica QFF de 1 mL na vazão de 1 mL/min. A coluna foi equilibrada com 10 mL do tampão X e, como eluente, foi utilizado um gradiente de 0 a 100% do tampão X contendo 1 M de NaCl. As frações eluídas foram avaliadas por eletroforese e atividade (descrito em 3.4), e as que continham a arginase foram reunidas. A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford através de kit para ensaio de proteínas (BioRad) e albumina sérica bovina como padrão.¹²¹

3.7 Diálise

Um volume de 500 µL de uma solução enzimática na concentração de 0,48 mg/mL (em Tris-HCl, 20 mM, pH 7,05) foi dialisado para o tampão formiato de amônio 20 mM pH 7,05. O procedimento foi realizado com auxílio de uma membrana de mini diálise MINI Slide-A-Lyzer™ (corte de 20 kDa). Os 500 µL foram colocados sobre a membrana e aproximadamente 45 mL de formiato de amônio foram adicionados em um tubo Falcon de 50 mL, posteriormente a membrana foi submersa nesse tampão por 10 minutos, sob agitação (agitador magnético) e a 4 °C. Após 10 minutos a solução do tubo falcon foi descartada e o procedimento foi repetido por

mais 5 vezes. Ao final foi realizado o teste de atividade catalítica da enzima como descrito no item 3.4.

3.8 Preparo das MB-Arg

A arginase de *L. amazonensis* produzida foi imobilizada em partículas magnéticas (MB) através da reação do tipo base de Schiff, baseada em um protocolo de imobilização estabelecido no nosso grupo,²⁴ 30 mg de partículas magnéticas foram transferidas para um tubo de microcentrifugação e lavadas três vezes com 1,0 mL de tampão formiato de amônio [20 mM, pH 7,05]. Com auxílio de um separador magnético, o sobrenadante foi descartado e as partículas foram resuspendidas em 1,0 mL de tampão formiato de amônio [20 mM, pH 7,05] contendo 5% glutaraldeído e mantidas sob agitação a 4 °C por 3 horas. Após a separação magnética, as partículas foram novamente lavadas por três vezes com 1,0 mL de tampão formiato de amônio [20 mM, pH 7,05], seguido da adição de 0,31 mg de arginase em 1 mL de formiato de amônio [20 mM, pH 7,05]. A reação foi mantida por 16 horas a 4 °C sob agitação 20 rpm. O sobrenadante foi recolhido e as partículas lavadas três vezes com formiato de amônio [20 mM, pH 7,05] e armazenadas na mesma solução a 4 °C. O mesmo procedimento foi empregado para preparar as partículas controle (MB-controle), mas ao final do procedimento, as partículas foram mantidas sob agitação em 100 mL de metanol para a desnaturação das enzimas.

Após o processo de imobilização, 1,5 mg das MB contendo as enzimas imobilizadas foram avaliadas frente a sua capacidade catalítica. A um tubo de microcentrifugação de 1,5 mL foi adicionado 1,5 mg das MB e uma 5 µL de uma solução 50 mM de L-arginina preparada em 20 mM formiato de amônio, pH 9,50 (tampão de atividade). O volume da reação foi ajustado para 100 µL com o tampão A e mantida a 37 °C por 10 minutos. Após esse tempo, foi realizado a separação magnética e o sobrenadante centrifugada a 10000 g por 10 minutos a 4 °C, após a centrifugação, 1 µL foi injetado no sistema de LC-HRMS em acordo com condições descritas no item 3.2 e 3.3. O sinal do produto formado (ornitina) foi monitorado em *m/z* 133,0971. Após o ensaio de atividade as partículas foram armazenadas a -18 °C em uma solução de Tris-HCl [20 mM, pH 7,05] contendo 10% (v/v) de glicerol. Observação: O descongelamento da enzima deve ser realizado em banho de gelo.

3.9 Prova de conceito

Os ligantes de referências utilizados para a caracterização da MB-Arg foram reportados por de Sousa et al. 2014,¹¹³ e o procedimento seguido foi adaptado de Vanzolini et al. 2015.²⁵ Inicialmente preparou uma solução contendo os ligantes de referências (-)-epicatequina, (+)-catequina e um não ligante aciclovir na concentração de 20 μ M no tampão A. O método cromatográfico desenvolvido para a separação dos ligantes constitui de: Eluição gradiente, A - água/ácido fórmico (0,1%) e B – acetonitrila, realizada nas seguintes condições 0-1 min, 15-20% B; 1-8 min, 20-52% B; 8,01-9 min, 100% B; e reequilibrada com 15% de B por 3 min, a uma vazão de 0,2 mL/min, forno a 40 °C. A coluna analítica utilizada foi HSS T3 (1.8 μ m, 2.1 x 100 mm). Os parâmetros do MS foram: modo positivo de ionização; nebulizador 3 bar, energia do quadrupolo 5 eV, vazão do gás de secagem 8 L/min (N₂), temperatura do gás de secagem 180 °C, tempo de transferência de 80 μ s e pré-pulso de 8,0 μ s, tensão do *End Plate* e capilar de 500 V e 4500 V, respectivamente. A calibração do MS foi realizada com uma solução de formiato de sódio 1 mM com massas de referências de 100-1000, após a corrida cromatográfica os dados de MS foram recalibrados com o mesmo calibrante na mesma faixa de massa.

Posteriormente, 1,5 mg das MB-Arg foram pipetadas e com auxílio de um separador magnético o sobrenadante foi descartado, e as particuladas foram lavadas 3 vezes com 200 μ L do tampão A. Após o procedimento de limpeza, 100 μ L da solução contendo os ligantes de referências foram adicionadas ao tubo de microcentrifugação contendo as MB-Arg e, este foi agitado por 30 segundos (em vórtex), deixado em repouso por 150 segundos e colocado em um separador magnético manual, por 120 segundos. O sobrenadante foi coletado e armazenado (S-1). As MB-Arg foram lavadas com 200 μ L com o tampão de atividade agitando-se em vórtex, por 10 segundos. O sobrenadante foi coletado após 120 segundos no separador magnético manual (S-2). O procedimento de lavagem foi realizado três vezes com 200 μ L com o tampão A (S-3). Após o procedimento de lavagem, foi realizada a extração dos ligantes através da adição de 100 μ L de MeOH. O tubo foi agitado, em um *thermomixer*, a 300 rpm e 25 °C por um período de 600 segundos. O sobrenadante foi separado por 120 segundos no separador magnético e coletado (S-

4). Ao final, as MB-Arg foram lavadas mais três vezes de acordo com o procedimento de lavagem descrito, coletando os sobrenadantes S-5. O mesmo procedimento foi realizado com as partículas controle.

Os sobrenadantes S-1 a S-5 dos experimentos com partículas ativas (MB-Arg) e controle (MB-ArgC) foram analisadas empregando o método cromatográfico desenvolvido para a análise dos ligantes conhecidos e a detecção foi realizada em *Full Scan* e no modo positivo de ionização empregando os parâmetros descritos acima. E razão de afinidade entre as MB-Arg e MB-ArgC foi calculada de acordo com a Equação 1:

$$\text{Razão de afinidade} = \frac{\text{Área do íon}_{(\text{MB-Arg})}}{\text{Área do íon}_{(\text{MB-ArgC})}} \quad (\text{Equação 1})$$

3.10 Obtenção dos extratos

As raízes de *T. ochracea*, folhas, caule e raízes de *B. coccolobifolia*, folhas e caule de *Diospyros burchellii*, folhas de *Pouteria ramiflora*, raízes *Tocoyena formosa*, raízes de *Kielmeyera coriacea*, caule de *Davilla elliptica*, folhas de *Tecoma stans* e folhas de *Hancornia speciosa* foram secas em uma estufa a 40 °C durante três dias e depois o material seco foi moído e colocado em erlenmeyers com etanol 99,5% para a extração por 3 dias. O extrato bruto concentrado foi obtido com a evaporação do solvente em rotoevaporador sobre pressão reduzida, a temperatura de 40 °C e armazenados a -18 °C. As espécies supracitas foram coletadas em 15 de dezembro de 2010 na Rodovia DF 480, Lote 01, Setor de Múltiplas Atividades do Gama - SMA - Gama / DF, sob as autorizações ambientais nº 021/2010 - SUGAP/IBRAM (supressão vegetal) e nº 043/2010 – IBRAM, sendo os espécimes testemunhos depositados no Herbário da EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia (CEN), Brasília/DF. Os estudos dessas espécies possuem Autorização de Acesso e de Remessa de Amostra de Componente do Patrimônio Genético nº 010698/2013-2 (CNPq).

3.11 Triagem biológica dos extratos frente a arginase

Os extratos foram doados pelo Laboratório de Bioquímica e Química Orgânica da Universidade Federal de Goiás – Regional Catalão.

Para avaliação da atividade catalítica da arginase na presença dos extratos, foram transferidos 10 µL da enzima (0,28 mg/mL) para um tubo de microcentrifugação de 1,5 mL, adicionando 5 µL de uma solução de 50 mM de arginina (preparada em 20 mM formiato de amônio, pH 9,50) e 5 µL de uma solução contendo 1,0 mg/mL dos extratos (descritos no item 3.11), e por fim o volume foi ajustado para 100 µL com o tampão A. O sistema reacional foi incubado por 10 min a 37 °C. Após a incubação, a reação foi interrompida adicionando-se 100 µL de etanol gelado (-18 °C) e centrifugada a 10000 g por 10 minutos a 4°C. Do sobrenadante foram injetados 1 µL no LC-HRMS para monitoramento do produto da reação, o método utilizado está descrito no item 3.3. Esse procedimento foi realizado em duplicata. A porcentagem de inibição foi calculada comparando a atividade da enzima na presença e ausência do extrato.

3.12 Triagem e desenvolvimento de métodos cromatográficos dos extratos – LC-PDA

O desenvolvimento das condições cromatográficas para a análise dos extratos vegetais foi realizado em um sistema de UHPLC Nexera (Shimadzu, Kyoto, Japão) empregando o sistema *Method Scouting Solution*. Para triagem de colunas adotou-se o conceito de ortogonalidade.^{122,123} Os valores de Fs referem ao comparativo de ortogonalidade entre as colunas. As colunas avaliadas foram:

- F1 Coluna 1: Cortecs™ C18+ (2,1 x 100 mm) 2,7µm (Part No. 186007397) Waters. F₁=0 F₂=23 F₃=17,74 F₄=12,95
- F2 Coluna 2: Porosachell 120 Bonus-RP (2,1 x 100mm) 2,7 µm (Part. No. 695768-901) Agilent. F₁=23,0 F₂=0 F₃=11,05 F₄=21,38
- F3 Coluna 3: Ascentis® Express Phenyl-Hexil (2,1 x 100mm) 2,7 µm (Part. No. Cat#53336-U) Supelco. F₁= 17,74 F₂= 11,05 F₃=0 F₄= 10,58

- F4 Coluna 4: Ascentis® Express F5 (2,1 x 100mm) 2,7 µm (Part. No. S11019) Supelco. F₁=12,95 F₂=21,38 F₃= 10,58 F₄= 0

A extração em fase sólida foi realizada com 50 mg de extrato etanólico utilizando cartucho C₁₈. Foram realizadas duas extrações com 7 mL de fase móvel na proporção de 10:90 e 85:15 de ACN/H₂O, sendo a última a fração de trabalho. As análises foram realizadas empregando gradiente de eluição linear variando de 5% a 100% de ACN em 20 min, permanecendo em 100% durante 3 min antes de retornar à condição inicial (5% ACN). Empregou-se como fase móvel água (A) e acetonitrila (C), acidificados com 0,1% ácido fórmico; vazão de 0,3 mL/min; forno a 40 °C. Os extratos foram preparados na concentração de 1,0 mg/mL e o volume de amostra injetada foi de 5 µL. A separação foi monitorada em UV no comprimento de onda de 254 nm.

3.13 Desenvolvimento dos métodos cromatográficos por LC-QqTOF para os extratos

Após a triagem da melhor coluna, os extratos foram injetados no LC-MS em eluição gradiente de 5-100% em 20 minutos, vazão 0,4 mL/min, temperatura do forno 40 °C. A coluna analítica utilizada foi Ascentis® Express F5 (2,7 µm, 2,1x100mm). Os parâmetros do MS foram: modo positivo e negativo de ionização; nebulizador 3 bar, energia do quadrupolo 5 eV, vazão do gás de secagem 8 L/min (N₂), temperatura do gás de secagem 180 °C, tempo de transferência de 80 µs e pré-pulso de 8,0 µs, tensão do *End Plate* e capilar de 500 V e 4500 V, respectivamente.

Após a obtenção do perfil cromatográfico foi realizado o ajuste na inclinação do gradiente, ou seja, alterando a variação da porcentagem de solvente orgânico por minuto. E o método com o maior número de bandas para o extrato R13F, seguiu as seguintes condições: modo gradiente de eluição variando de 5 a 20% de B em 14 min, 20 a 60% de B em 5 min, 60 a 100% de B em 1 min e mantido por mais 1 min, seguido de uma etapa de reequilíbrio da coluna (5% de B) por 3 min (tempo total de 24 min) e empregando como fase móvel água acidificada com 0,1% ácido fórmico (A) e acetonitrila (B); vazão de 0,4 mL/min; temperatura de 40° C. O volume de amostra injetado foi 1 µL. E para o extrato R24R, eluição

gradiente de 5-100% de B em 20 minutos, utilizando igualmente as demais especificações. A detecção foi realizada por meio do espectrômetro de massas operando em modo positivo e negativo de ionização, numa faixa de m/z 100-1000 e empregando as condições que seguem: voltagem do capilar, 4500 V; pressão do nebulizador (N_2), 3,0 bar; gás de secagem (N_2), 8,0 L/min a 180° C, tempo de transferência de 80 μ s e pré-pulso de 8,0 μ s, energia do quadrupolo 5 eV. A calibração do MS foi realizada com uma solução de formiato de sódio 5 mM com massas de referências de 100-1000 Da, após a corrida cromatográfica os dados de MS foram recalibrados com o mesmo calibrante, na mesma faixa de massa (100-1000 Da). O espectrômetro de massas foi programado para aquisição em modo auto MS/MS (3 precursores) em experimentos com diferentes energias de colisões (20, 30, 40, 50 e 60 eV) para todos os ranges de m/z .

3.14 Viabilidade enzimática na presença de MeOH

Para o monitoramento da viabilidade catalítica da arginase na presença de MeOH, foram transferidos 5, 10, 20, 30 e 40 μ L de MeOH para tubos de microcentrifugação de 1,5 mL, adicionando em cada tubo 5 μ L de uma solução de arginina 50 mM (preparada em formiato de amônio 20 mM, pH 9,50) e 10 μ L de uma solução enzimática na concentração de 0,28 mg/mL. O volume foi ajustado para 100 μ L com o tampão de atividade A (observação: a enzima foi adicionada por último). Os microtubos foram incubados por 10 minutos a 37 °C. Após a incubação, a reação foi interrompida adicionando-se 100 μ L de etanol (-18 °C) e centrifugada a 10000 g por 10 minutos a 4 °C. Dos sobrenadantes foram injetados 5 μ L no LC-MS nas condições descritas no item 3.3.

3.15 Ensaio de *ligand fishing*

Inicialmente, 100 μ L (2,5 mg) das MB-Arg foram pipetadas com auxílio de uma pipeta, e com a assistência de um separador magnético o sobrenadante foi descartado e as partículas foram lavadas 3 vezes com 200 μ L do tampão A. Após o procedimento de limpeza, 100 μ L das soluções dos extratos de R13F e R24R de concentrações de 2,0 mg/mL foram pipetadas e adicionadas em tubos de

microcentrifugação diferentes contendo as MB-Arg e, este foi agitado por 30 segundos (em vórtex), deixado em repouso por 150 segundos e colocado em um separador magnético manual, por 120 segundos. O sobrenadante foi coletado e armazenado (S-1). As MB-Arg foram lavadas com 200 μ L com o tampão de atividade agitando-se em vórtex, por 10 segundos. O sobrenadante foi coletado após 120 segundos no separador magnético manual (S-2). O procedimento de lavagem foi realizado três vezes com 200 μ L do tampão A (S-3). Após o procedimento de lavagem, foi realizada a extração dos ligantes através da adição de 150 μ L de MeOH. O tubo foi agitado, em um thermomixer, a 300 rpm a 25 °C por um período de 600 segundos. O sobrenadante foi separado por 120 segundos no separador magnético e coletado (S-4). Ao final, as MB-Arg foram lavadas mais três vezes de acordo com o procedimento de lavagem descrito, coletando os sobrenadantes S-5. O mesmo procedimento foi realizado com as partículas controle. Esse procedimento foi repetido para as partículas controle, e em ambos os casos realizados em duplicata.

Os sobrenadantes S-1 a S-5 dos experimentos com partículas ativas (MB-Arg) e controle (MB-controle) foram analisadas empregando o método cromatográfico desenvolvido para a análises dos extratos, descrito no item 3.12. Foram consideradas como substâncias potencialmente ativas aquelas que apresentaram razão de afinidade superior a 1,69 (equação 1).

4. Resultados e discussão

4. Resultados e discussão

Para o desenvolvimento deste trabalho as seguintes etapas foram realizadas (figura 4.1).

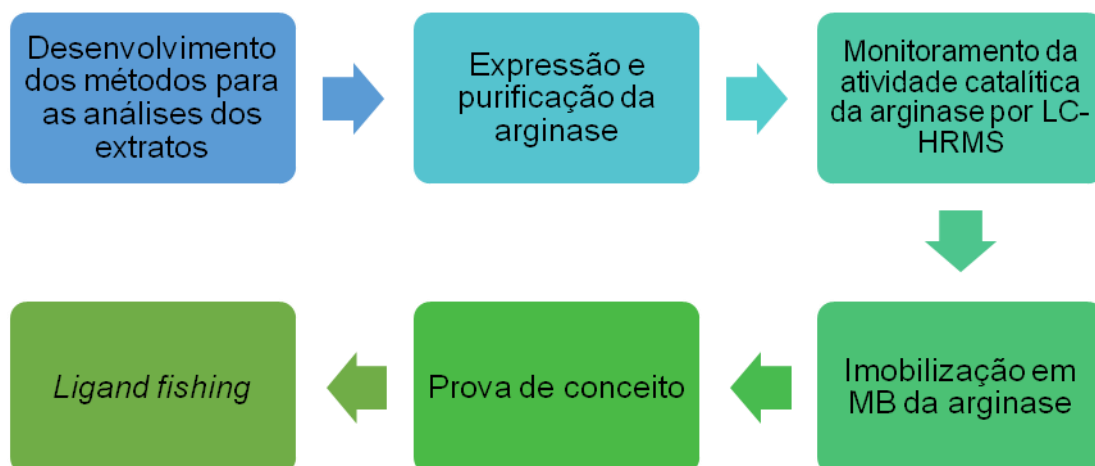


FIGURA 4. 1. Etapas realizadas para desenvolvimento do projeto.

4.1 Desenvolvimento de métodos para as análises dos extratos

O método de monitoramento de atividade catalítica da arginase foi empregado para triar o potencial de inibição dos extratos vegetais estudados, tal como descrito em 3.11. A porcentagem de inibição foi calculada a partir do experimento controle, contendo apenas a enzima e seu substrato. A figura 4.2 ilustra os resultados obtidos.

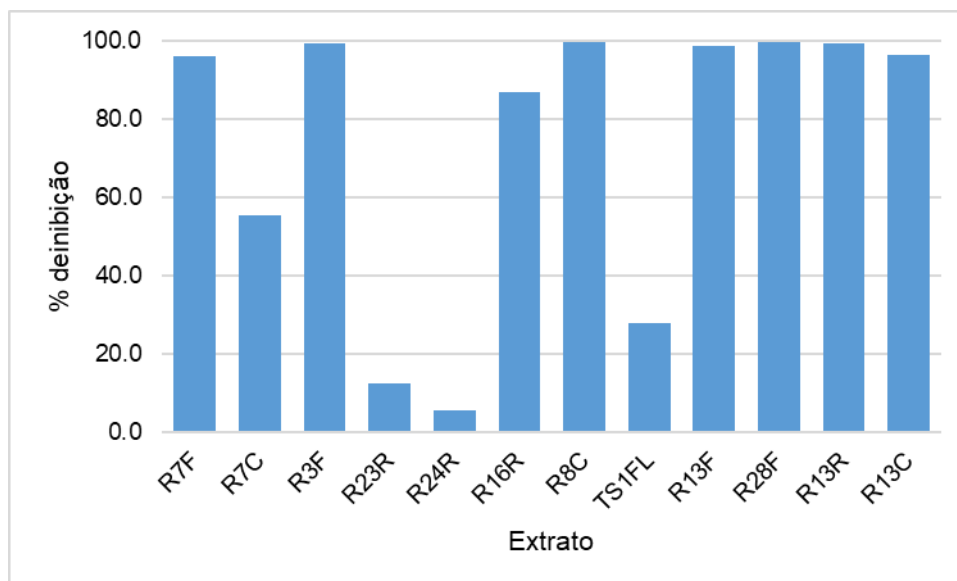


FIGURA 4. 2. Gráfico referente a triagem do potencial de inibição dos extratos. Raízes de *T. ochrace* (R24R); folhas (R13F), caule (R13C) e raízes (R13R) de *B. coccolobifolia*; folhas (R7F) e caule (R7C) de *D. burchellii*; folhas de *P. ramiflora* (R3F); raízes de *T. formosa* (R23R); raízes de *K. coriacea* (R16R); caule de *D. elliptica* (R8C); folhas de *T. stans* (TS1FL); folhas de *H. speciosa* (R28F).

Dentre os extratos analisados, o mais ativo foi o R28F. Porém, para a triagem por *ligand fishing*, foi escolhido o extrato R13F que apresentou atividade inibitória relevante e possui alguns dados na literatura sobre o isolamento e caracterização dos seus constituintes químicos, assim como avaliação biológica frente à arginase.^{113,114} Também foi selecionado para triagem o extrato R24R por ser o menos ativo. Para verificar o perfil químico dos extratos (*fingerprint*) foram utilizados os métodos descritos em 3.13. A combinação do ensaio de *ligand fishing* com LC-HRMS permitiu a identificação e caracterização de novos *hits*.^{14,24} O desenvolvimento do método por LC-HRMS se fez necessário para obtenção do *fingerprint* dos extratos, o qual facilitou a caracterização dos ligantes.¹²⁴ Para o desenvolvimento dos métodos cromatográficos para a análise dos extratos R13F e R24R, foram necessárias três etapas: (1) limpeza dos extratos por SPE, (2) triagem das colunas e (3) alteração da porcentagem de modificador orgânico/min.

A etapa de limpeza dos extratos por SPE (etapa 1) teve como objetivo a extração de compostos que são possíveis interferentes nas análises por LC-MS, como por exemplo, açúcares, clorofila, graxas e taninos. Para a limpeza destes interferentes (*clean-up*) utilizou-se um sistema de SPE com cartucho C₁₈, sendo a eluição inicial constituída de 5% de acetonitrila em água, para remoção dos

compostos de alta polaridade, seguida por eluição com 85% de acetonitrila em água, originando assim a fração que foi utilizada nas demais etapas deste trabalho. Os compostos de baixa polaridade, como graxas, lipídios, esteróides e clorofilas permaneceram retidos na fase estacionária do cartucho.

Na etapa de triagem da colunas (etapa 2), seguiu-se o conceito de ortogonalidade desenvolvido por Synder e colaboradores.¹²³ Assim, para uma coluna ser considerada ortogonal ela deve apresentar uma função de comparação de coluna (Fs) maior que 10. Essa função delinea a diferença de seletividade entre duas colunas. Colunas com Fs entre 3 e 10 são consideradas similares e quando o $F_s < 3$ são equivalentes. Neste intuito, foram selecionadas colunas com $F_s > 10$ (figura 4. 3), sendo consideradas completamente ortogonais entre si. Os dados de F_s foram verificados na plataforma *USP database*.^{122,123}

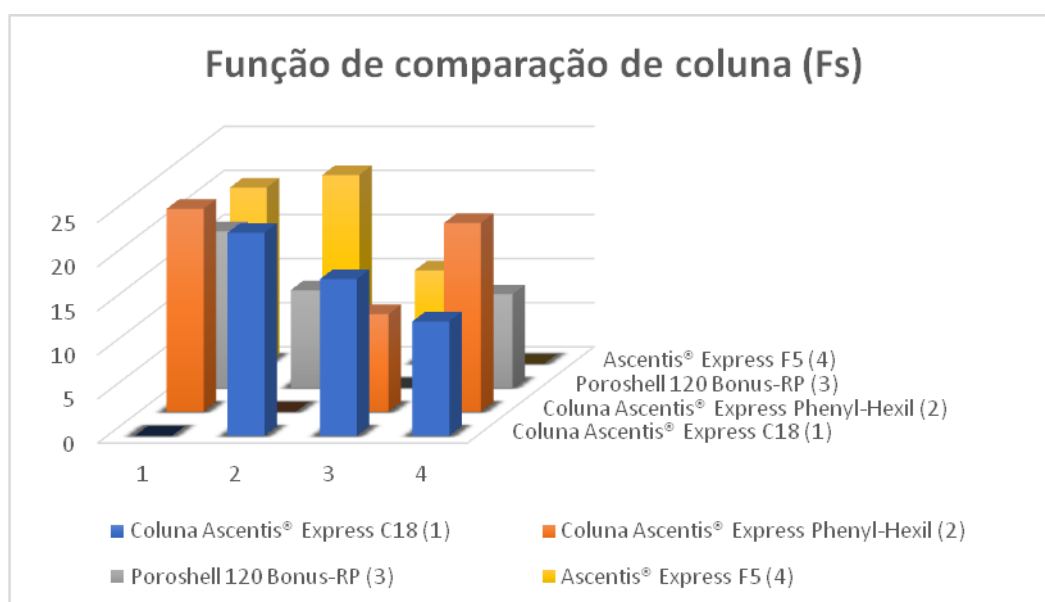


FIGURA 4. 3. Comparação do F_s das colunas selecionadas, sendo que todas apresentam valores de $F_s > 10$. Especificações das colunas: 2,1 x 100 mm, 2,7 μ m.

O método cromatográfico usado para selecionar a melhor coluna foi constituído de um gradiente linear de eluição de 5 a 100% de acetonitrila em 20 minutos, utilizando o *Method Scouting Solution®* para a fácil automatização da sequência de análises (figura 4.4).

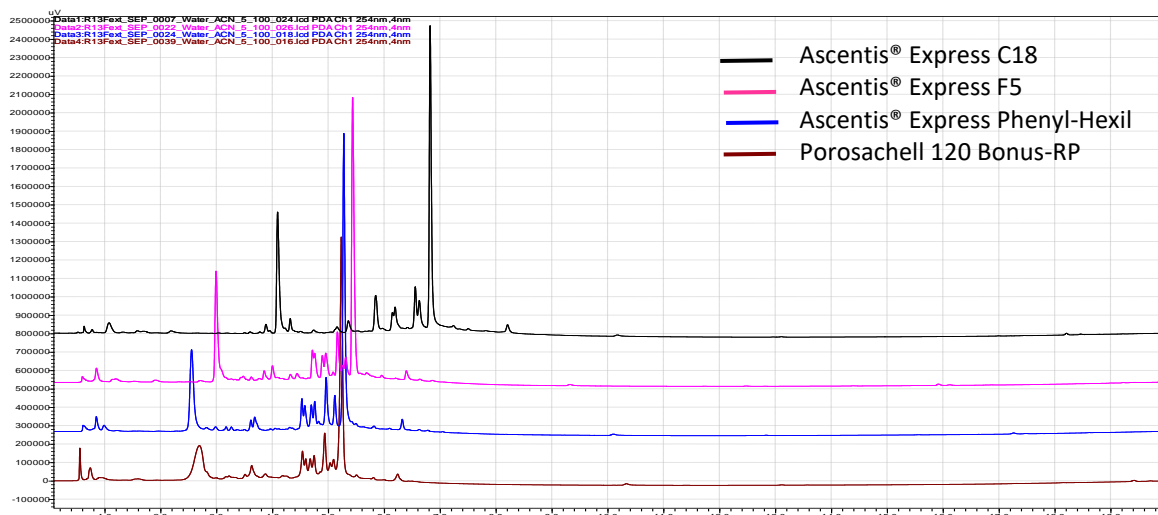


FIGURA 4. 4. Cromatogramas obtidos para a etapa de triagem de colunas para o extrato R13F. Condição cromatográfica: colunas triadas, vazão 0,4 mL/min, modo eluição gradiente de 5 a 100% v/v de ACN/H₂O (ambos solventes acidificados com 0,1% de ácido fórmico), em 20 minutos, temperatura de 40 °C e monitoramento a 254 nm.

Os cálculos do número de bandas foram realizados para o tempo total do gradiente (20 minutos), sendo empregado os mesmos parâmetros de integração para obtenção e comparação do número de bandas cromatográficas. Através dos resultados, foi possível observar que o método foi capaz de distinguir entre as diferentes colunas utilizadas na triagem (figura 4.5).

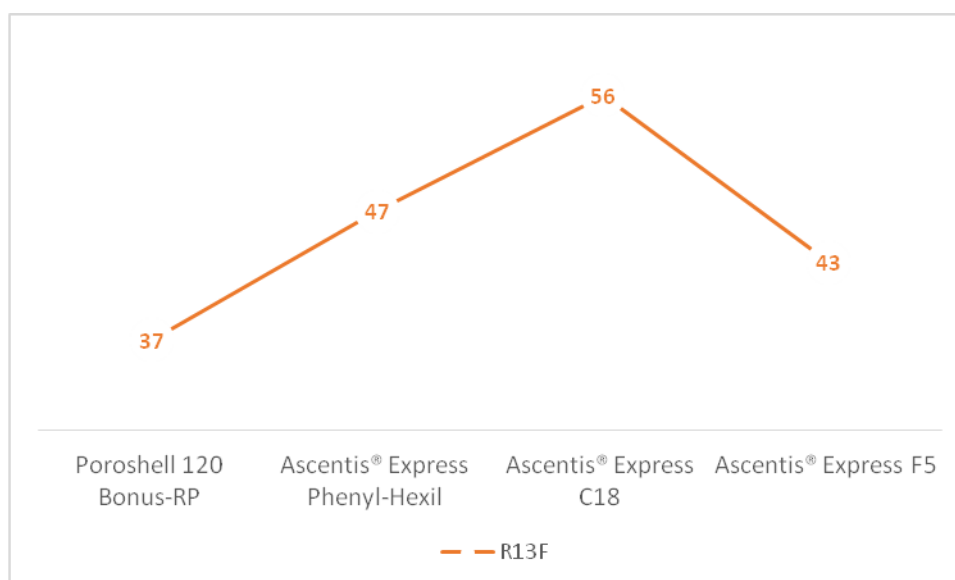


FIGURA 4. 5. Gráfico do número de bandas cromatográficas obtidas para a análise do extrato R13F utilizando diferentes colunas.

A melhor coluna, ou seja, aquela que apresentou o maior número de bandas cromatográficas foi a Ascentis Express C18 (2,1 x 100 mm), com tamanho de partícula de 2,7 µm. A etapa de triagem das colunas não foi realizada para o extrato R24R, mas com a finalidade de manter os mesmos parâmetros de separação, optou-se por utilizar a mesma coluna para este extrato.

A última etapa (etapa 3) do desenvolvimento do método para a análise dos extratos por LC-MS constituiu na alteração da porcentagem de modificador orgânico/min, ou seja, modificar a inclinação do gradiente. Os cálculos foram realizados a partir dos cromatogramas obtidos por LC-UV, sendo os métodos finais transferidos para o LC-HRMS. Os cromatogramas obtidos estão apresentados nas figuras 4.6 e 4.7.

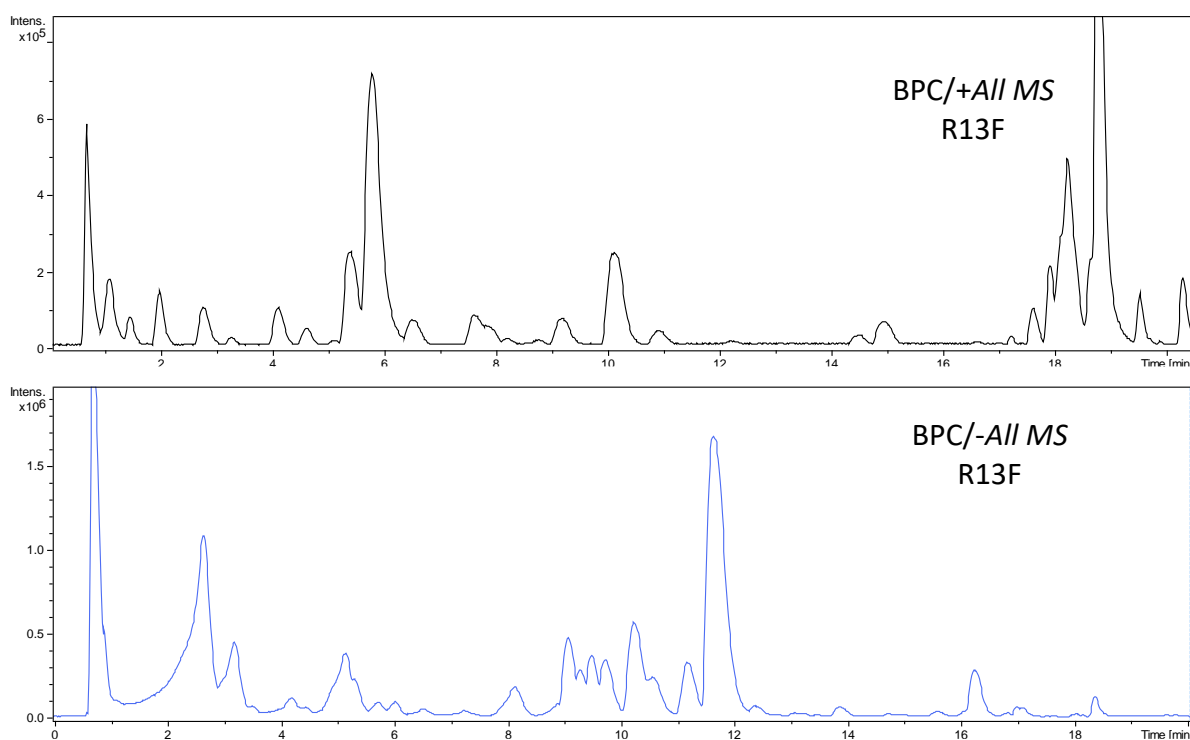


FIGURA 4. 6. Cromatogramas do pico base (BPC) obtidos por LC-HRMS em ambos os modos de ionização oriundos da etapa 3 para R13F. Condição cromatográfica: coluna Ascentis Express C18 (2,1x100 mm) 2,7 µm, modo gradiente de eluição variando de 5 a 20% de B em 14 min, 20 a 60% de B em 5 min, 60 a 100% de B em 1 min e mantido por mais 1 min, empregando como fase móvel água acidificada com 0,1% ácido fórmico (A) e acetonitrila (B); vazão de 0,4 mL/min; temperatura de 40° C.

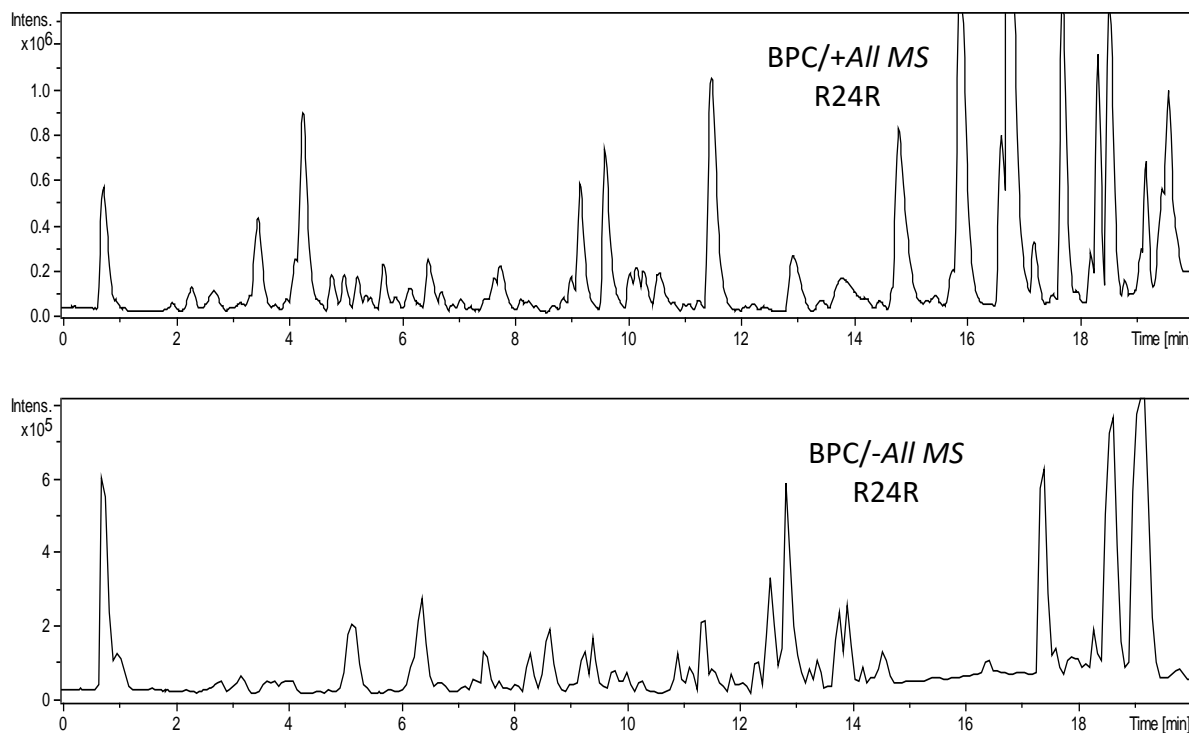


FIGURA 4. 7. Cromatogramas do pico base (BPC) obtidos por LC-HRMS em ambos os modos de ionização oriundos da etapa 3 para R24R. Condições cromatográficas: coluna Ascentis Express C18 (2,1x100 mm) 2,7 μ m, modo gradiente de eluição variando de 5 a 100% de B em 20 min, e empregando como fase móvel água acidificada com 0,1% ácido fórmico (A) e acetonitrila (B); vazão de 0,4 mL/min; temperatura de 40° C.

As condições cromatográficas desenvolvidas empregando o LC-HRMS para ambos os extratos foram capazes de separar as bandas cromatográficas de forma suficiente para realização deste trabalho. Esta etapa é de suma importância para as análises dos ensaios de *ligand fishing*, pois neste ensaio os ligantes identificados estão muitas vezes em quantidades insuficientes para gerar um espectro em MS² de boa qualidade, sendo necessário retomar ao *fingerprint* do extrato para identificação dos ligantes. Sendo assim, quanto mais separados os compostos estiverem, menor será a chance de supressão iônica (o que dificulta a qualidade do MS²) ou de dúvidas quanto a sua isomeria (por exemplo, na identificação de epímeros).

Do ponto de vista químico há poucos estudos publicados sobre a composição química das espécies *B. coccolobifolia* e *T. ochracea*. O gênero *Byrsonima* é rico em flavonoides destacando-se, flavanois e seus heterosídeos, flavanonas, biflavonoides, catequinas e epicatequinas, proantocianidinas, compostos triterpênicos, além de derivados de ácidos gálicos, derivados do ácido quínico e da

espécie *B. coccolobifolia* já foram isoladas algumas triterpenos, flavonoides, taninos e lignanas.^{113,114,125} Para o gênero *Tabebuia* estudos fitoquímico relataram a presença de naftoquinonas, furanonaftoquinonas, antraquinonas, derivados do ácido benzoico, derivados de benzaldeído, iridóides, cumarinas e flavonoides, sendo este gênero conhecido por ser rico em naftoquinonas.^{126,127}

4.2 Expressão e purificação da arginase

O protocolo de expressão e purificação da arginase de *L. amazonensis* seguido foi adaptado de Sousa et al, 2014.¹¹³ Esse procedimento foi realizado sob orientação da Profa. Dulce Helena Ferreira de Souza. A fração obtida com a eluição de 300 mM na coluna de níquel foi aplicada em uma coluna de troca aniônica QFF Hi-Trap e o perfil cromatográfico está mostrado na figura 4.8.

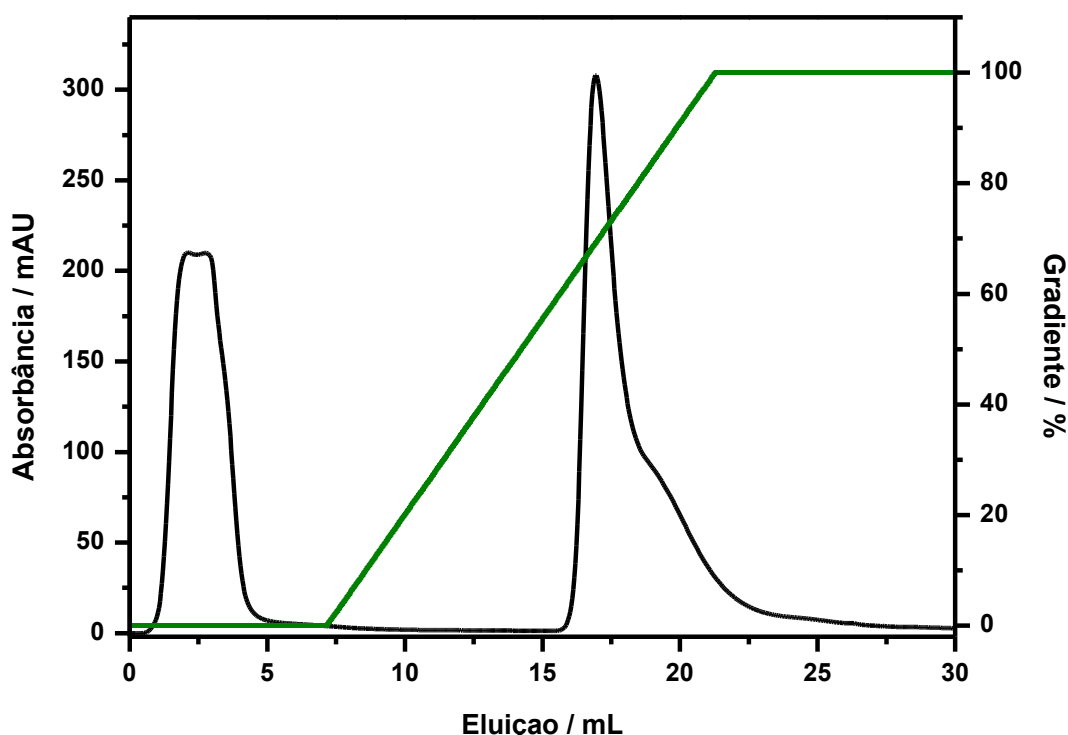


FIGURA 4. 8. Cromatograma referente a etapa de purificação realizada no FPLC Äkta. Condição cromatográfica: Coluna QFF Hi-Trap equilibrada com Tampão A por 10 min e gradiente de eluição de 0 a 100 % de NaCl [1 mol/L] em 20 min, vazão de 1 mL/min.

Como pode ser observado no cromatograma acima, há a presença de três bandas cromatograficas, a banda correspondente a arginase eluiu próximo ao volume de 16 mL coeluido com outra banda próximo a 19,5 mL. Portanto ela foi coletada com variação de 1 em 1 mL, resultando em 4 frações de 1 mL cada. O processo de expressão e purificação foi acompanhado por análise de SDS-PAGE e por análise de atividade enzimática, monitorando a formação de ornitina por LC-HRMS. As frações 16 e 17 foram as que apresentaram maior atividade catalítica (figura 4. 9) e exibiram uma pureza suficiente para a realização deste trabalho (figura 4.10). As frações 18 e 19 estavam impuras e, portanto, essas frações foram descartadas.

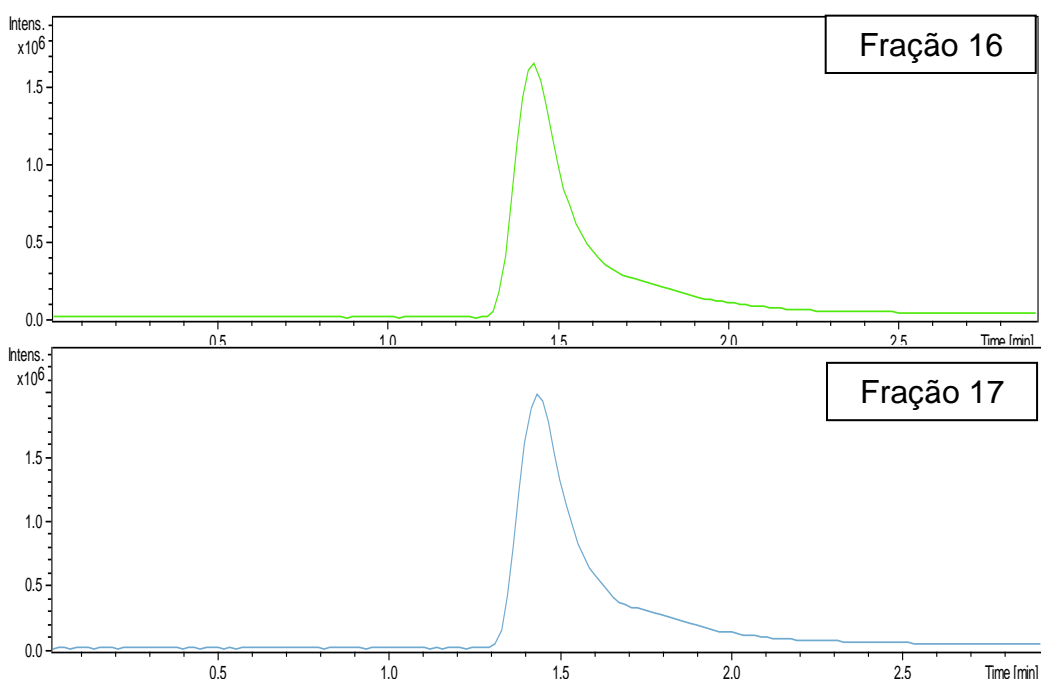


FIGURA 4. 9. Cromatogramas de íons extraídos de m/z 133,0971 [ornitina + H]⁺, correspondente ao ensaio atividade catalítica das frações 16 e 17 cv. Condição cromatográfica: coluna Acquity HSS T3 (1.8 μ m, 2.1x100mm), vazão 0,2 mL/min, modo eluição isocrático ACN: H₂O (1:99, v/v) ambas acidificadas com 0,1% de ácido fórmico, temperatura de 40 °C, injeção de 1 μ L.

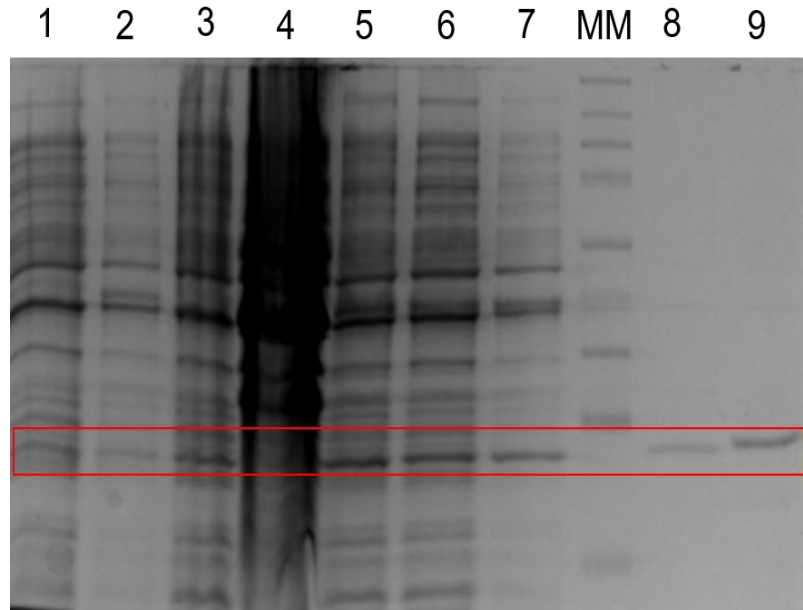


FIGURA 4. 10. Gel SDS-PAGE da purificação da arginase. Em 1 após a indução, 2 antes da indução, 3 sobrenadante do lisado celular, 4 precipitados do lisado celular, 5 lavagens da coluna de níquel, 6 lavagens da coluna de níquel com imidazol 5 mM, 7 lavagens da coluna de níquel com imidazol 300 mM, 8 e 9 frações ativas (16 e 17) após purificação na coluna QFF, MM marcador de massa molecular. A marcação molecular corresponde a arginase.

Para determinar a concentração de proteínas totais nas frações 16 - 19 realizou-se o teste Bradford, onde 995 μL da solução de Bradford e 5 μL das frações coletadas foram adicionadas a um tubo de microcentrifugação. As leituras foram realizadas após 5 minutos de reação em espectrofotômetro à 595 nm, e as concentrações determinadas estão na tabela 4. 1.

TABELA 4. 1. Concentrações de proteínas totais realizados por Bradford. A relação entre a absorbância vs concentração foi realizada com uma curva analítica previamente preparada com BSA, seguindo o mesmo procedimento, e o coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,996.

Frações	Concentração (mg/mL)
16	0,48
17	0,61
18	0,23
19	0,25

4.3 Monitoramento da atividade catalítica da arginase por LC-HRMS

A arginase catalisa a conversão de L-arginina em L-ornitina e ureia, fazendo parte do ciclo da ureia nos seres vivos, e nos parasitas da *Leishmania* ssp. está envolvida na produção das poliaminas, as quais são responsáveis pela proliferação do parasita como mostrado na figura 1.4.⁸²

O monitoramento da atividade catalítica da arginase é realizado através do método indireto para a detecção do produto da reação. Este método emprega o uso de enzimas acopladas com reações em múltiplas etapas e a detecção utiliza o comprimento de onda fixo de 580 nm, e através da absorbância são realizados os estudos bioquímicos desta enzima (figura 4. 11).

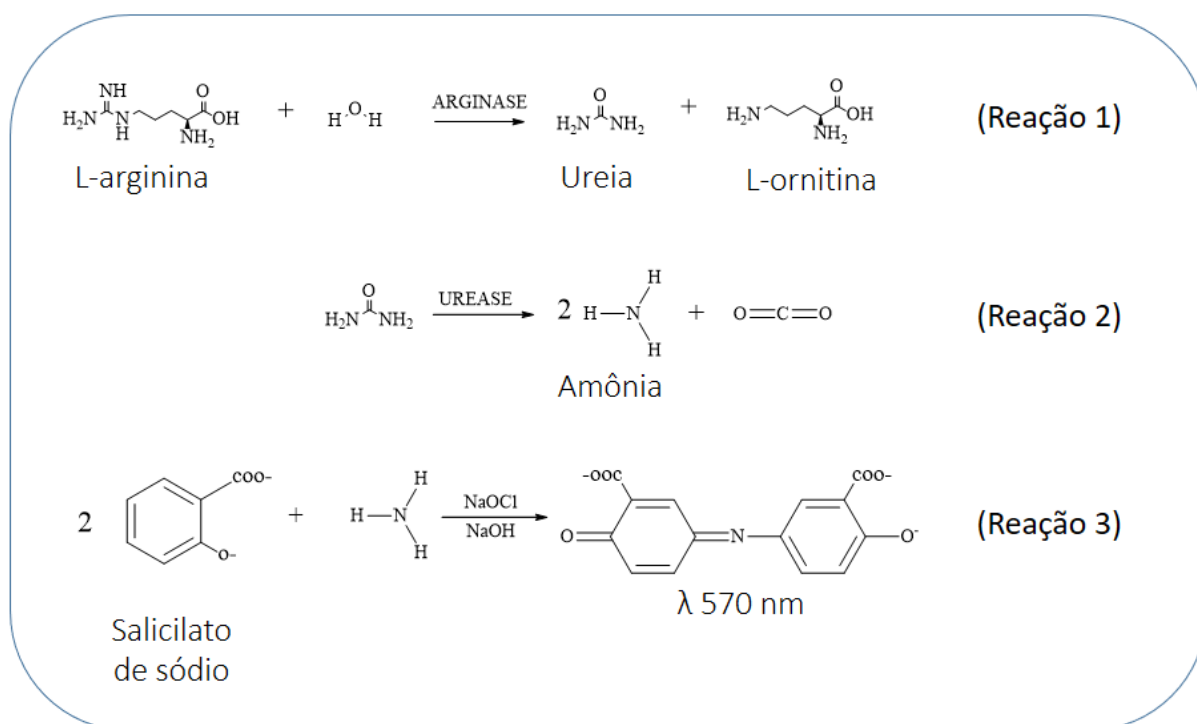


FIGURA 4. 11. Reações envolvidas no método indireto de análise da atividade catalítica.

Freqüentemente, o produto de uma reação enzimática é difícil de ser detectado diretamente. E esses problemas de detecção estão relacionados com as propriedades das moléculas formadas após a reação catalítica, como por exemplo, o tamanho, a estabilidade, a solubilidade, ou porque o produto é espectroscopicamente “apagado” (sem ausência de cromóforos que geram as absorções na região do UV ou Vis).¹²⁸

Como pode ser observado na figura 4.11, o indofenol gerado pelas reações acopladas é a substância escolhida para monitorar indiretamente a reação catalítica através da formação de ureia. Por se tratar de um método colorimétrico pode ocorrer a identificação de falsos-positivos, uma vez que se tratando de mistura complexa, como por exemplo, extratos de PN, podem apresentar compostos que absorvem nesse comprimento de onda. Outro problema decorrente deste método de enzimas acopladas é o estabelecimento de condições ótimas para as ambas enzimas, onde na primeira etapa a reação é decorrente da arginase e na segunda etapa à uréase. Outro problema recorrente é a volatilidade da amônia, uma vez que a reação da terceira etapa é dependente dela, então qualquer quantidade de amônia desprendida no manuseio da amostra pode levar a valores errôneos. Ademais, se os extratos inibirem a urease na mesma proporção que inibem a arginase é impossível descobrir se ele inibiu ou não a arginase, uma vez que, a quantificação é realizada através da reação três.¹²⁸

Diante deste cenário, condições para monitoramento direto da L-ornitina por LC-HRMS foi investigado. Inicialmente realizou a otimização dos parâmetros do MS, sendo eles tempo de transferência, pré-pulso e energia do quadrupolo, os valores que apresentaram maior resposta analítica foram 80 μ s, 5 μ s e 1 eV respectivamente. Esses parâmetros são primordiais no desenvolvimento de um método analítico empregando um sistema do tipo QqTOF, uma vez que estão diretamente relacionados com a massa do analito e labilidade dos compostos. Após essa etapa, foi realizada uma busca na literatura, na qual resultou na informação da coluna HSS T3 para separação cromatográfica da arginina e ornitina.¹²⁹ O método relatado foi adaptado e a separação foi suficiente para monitorar a atividade catalítica (figura 4. 12).

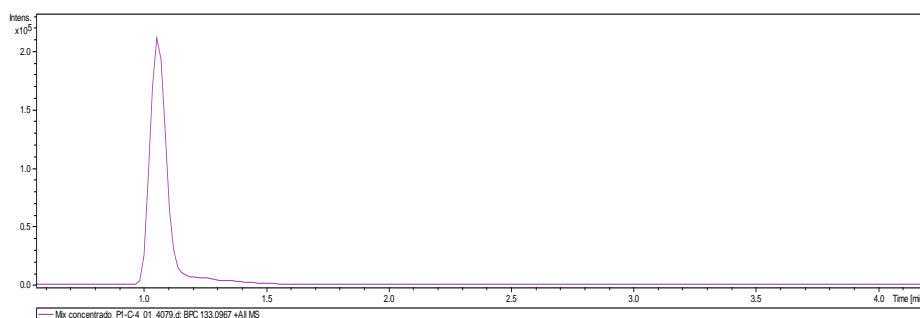


FIGURA 4. 12. Cromatograma de íon extraído correspondente a [ornitina+H]⁺ 133,0971. Condição cromatográfica: coluna Acquity HSS T3 (1.8 μ m, 2.1x100mm), vazão 0,2 mL/min, modo eluição isocrático ACN:H₂O (1:99, v/v) ambas acidificadas com 0,1% de ácido fórmico, temperatura de 40 °C.

Devido à pequena diferença de polaridade entre os dois compostos, foi necessário a análise no modo isocrático de eluição, e utilizando apenas 1% de acetonitrila para evitar o “enovelamento” da cadeia de C₁₈. Uma vez estabelecidas as condições de separação para a L-ornitina e L-arginina, foi possível mensurar a atividade catalítica da arginase através da formação referente a ornitina.

4.4 Imobilização da enzima arginase em partículas magnéticas (MB-arg)

A arginase foi imobilizada por ligação covalentemente via glutaraldeído na superfície das partículas magnéticas revestidas com sílica e derivadas com grupo amino (-NH₂) na superfície (Bioclone). Inicialmente, as partículas são funcionalizadas com o reagente bifuncional glutaraldeído através de uma reação de adição nucleofílica de -NH₂ a carbonila do aldeído, o grupo -NH₂ das partículas ataca a carbonila do glutaraldeído, ocorrendo a formação de uma ligação imina com a partícula (figura 4. 13).

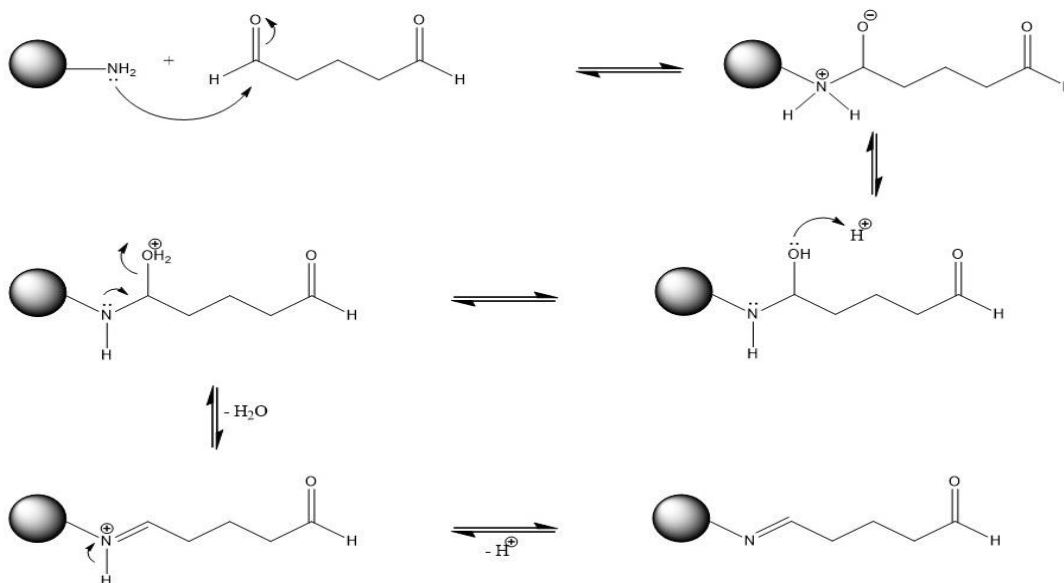


FIGURA 4. 13. Representação esquemática do mecanismo de reação entre o glutaraldeído e o grupo amino das partículas.

O reagente bifuncional glutaraldeído também pode ser chamado de espaçador ou *crosslinker*, uma vez que a sua cadeia de 5 átomos de carbono propicia a enzima imobilizada uma maior liberdade conformacional do que se ela

estivesse ligada diretamente ao grupo aminopropila da partícula.¹³⁰ Após a funcionalização das partículas com o espaçador, o sistema reacional é lavado com excesso de tampão formiato de amônio [20 mM, pH 7,05] para a remoção das moléculas de glutaraldeído que não se ligaram ao suporte (figura 4.14).

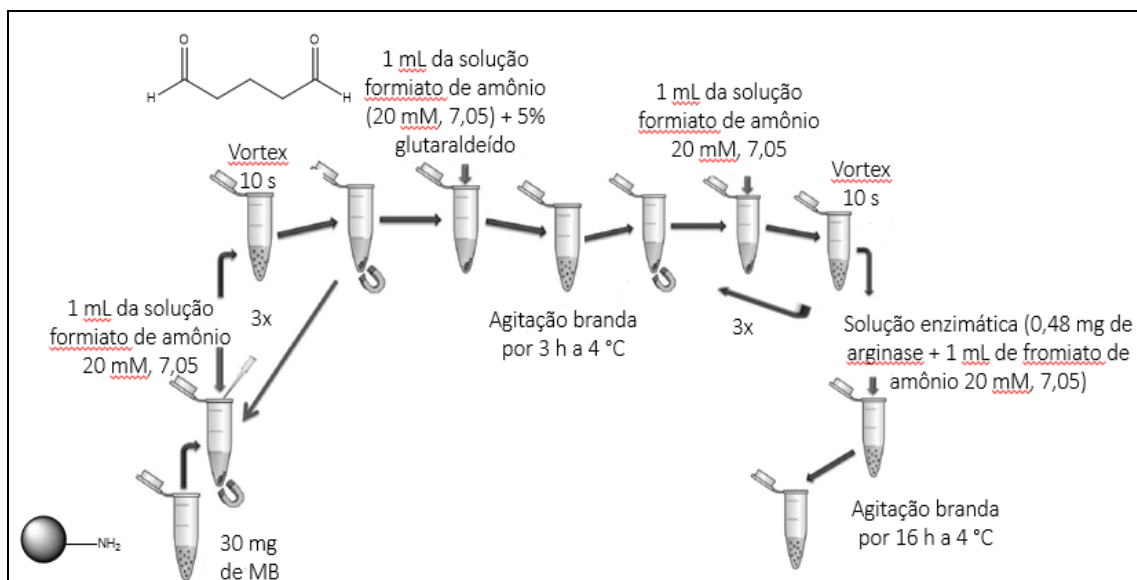


FIGURA 4. 14. Esquema para o preparo das MB-Arg.

O próximo passo consiste na adição da enzima, ocorrendo novamente uma reação de adição nucleofílica na outra extremidade da carbonila do glutaraldeído, porém agora a reação ocorre com os grupamentos $-NH_2$ da enzima (figura 4. 15), os quais podem ser provenientes da extremidade N-terminal ou das cadeias laterais do resíduo de aminoácido que possui $-NH_2$.

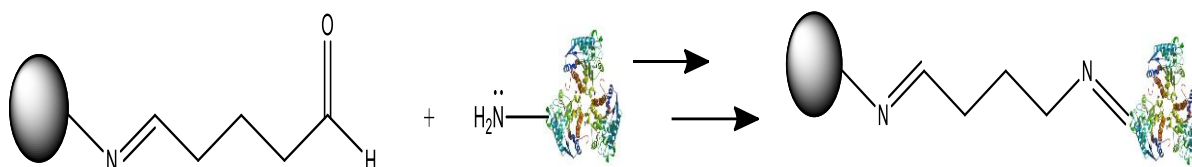


FIGURA 4. 15. Representação esquemática da imobilização da arginase em partículas magnéticas, onde a reação entre o espaçador e a proteína se dá através de grupamentos $-NH_2$ livres da enzima.

No entanto, antes da adição da arginase para a imobilização, fez-se necessário uma etapa de dialise, que teve como objetivo a troca de tampão, pois no processo de imobilização tampões nucleofílicos devem ser evitados, como é o caso do tampão Tris-HCl o qual possui um grupo $-NH_2$ (figura 4. 16) que compete com os

-NH₂ cadeia lateral dos resíduos de lisina presente na estrutura da enzima pela a carbonila do espaçador, se esta etapa não fosse realizada ocorreria a imobilização tanto do tampão Tris-HCl quanto da enzima, o que prejudicaria a eficiência do biorreator.

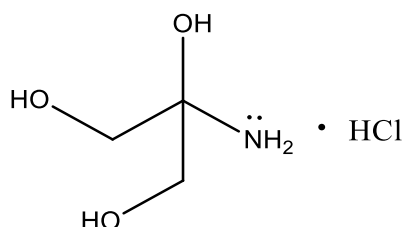


FIGURA 4. 16. Estrutura química do tampão Tris-HCl.

Para contornar esse problema foi realizada a diálise da solução enzimática para o tampão formiato de amônio [20 mM, pH 7,05], o qual não possui -NH₂ livre. Inicialmente foi medida a atividade da enzima antes da diálise, para verificar se a mesma possuía atividade antes do início do procedimento. Após a troca de tampão foi medida a atividade novamente e observou-se que a enzima continuava ativa (figura 4. 17). É possível observar que há uma diferença de intensidade entre a atividade realizada antes e depois da diálise, e essa diferença se deve ao fato de que no processo de diálise ocorre o aumento do volume do dialisado, ocorrendo assim a diluição da enzima. Após verificar que a enzima continuava ativa foi dado seguimento para o procedimento de imobilização.

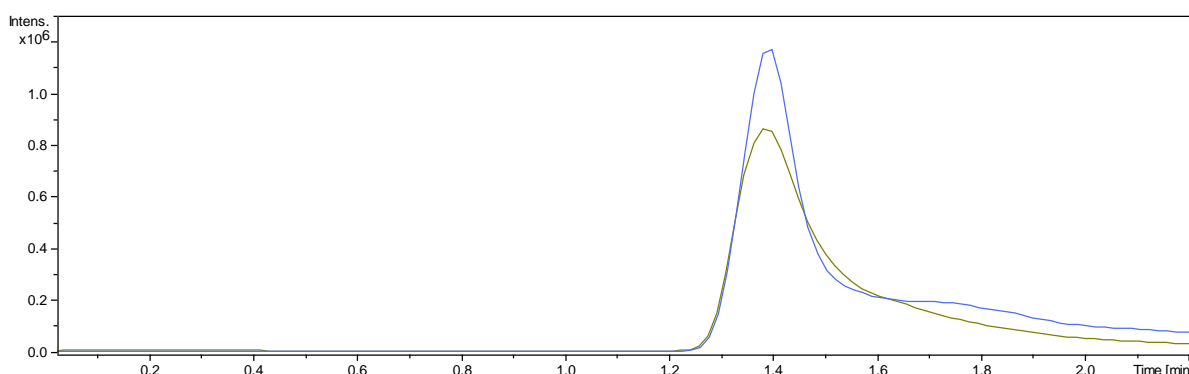


FIGURA 4. 17. Sobreposição dos Cromatogramas de íons extraídos [ornitina + H]⁺, correspondente ao ensaio atividade catalítica da arginase antes (azul) após (marrom) da diálise. Condição cromatográfica: coluna Acquity HSS T3 (1.8 μm, 2.1 x 100 mm), vazão 0,2 mL/min, modo eluição isocrático ACN: H₂O (1:99, v/v) ambas acidificadas com 0,1% de ácido fórmico, temperatura de 40 °C, injeção de 1 μL.

Posteriormente à troca de tampão, a solução enzimática foi adicionada ao sistema de imobilização como descrito na figura 4. 14. A atividade da enzima imobilizada foi avaliada a partir da reação das MB-Arg (como descrito em 3.4), e foi observado que a enzima continuou ativa após a imobilização, uma vez que foi possível observar a formação do produto ornitina (figura 4. 18).

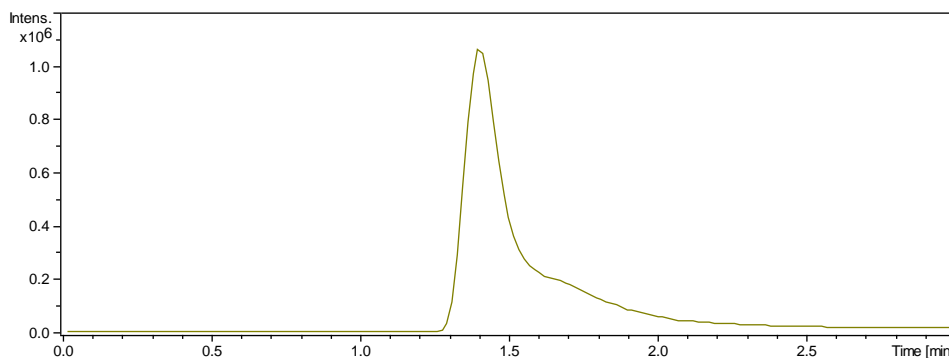


FIGURA 4. 18. Cromatograma de íons extraídos [ornitina + H]⁺, correspondente ao ensaio atividade catalítica da arginase após a imobilização. Condição cromatográfica: coluna Acquity HSS T3 (1.8 μ m, 2.1 x 100 mm), vazão 0,2 mL/min, modo eluição isocrático ACN: H₂O (1:99, v/v) ambas acidificadas com 0,1% de ácido fórmico, temperatura de 40 °C, injeção de 1 μ L.

O processo de imobilização é heterogêneo, sendo constituído das partículas e da solução. A atividade enzimática como mencionada acima é realizada com as partículas as quais contêm as enzimas imobilizadas via ligação covalente, e a outra fase é o sobrenadante. E no intuito de verificar se todas as enzimas foram imobilizadas foi realizado o ensaio de Bradford e a reação enzimática com o sobrenadante após as 16 h, e observou-se que na reação não houve produção de ornitina e no ensaio de Bradford não foi possível identificar a presença de proteína, o que de fato comprova que toda arginase presente na solução foi imobilizada.

4.5 Ensaio de *ligand fishing* (bioconjugação)

De modo geral em ensaios de *ligand fishing* utilizando MB, o procedimento é realizado em 4 etapas (figura 4.19). No entanto, se o sistema extração empregar meios drásticos, como por exemplo, o uso de 100% de solvente orgânico o biorreator pode ser desnaturado, não podendo ser reutilizado.^{14,23} Essa

abordagem possibilita a extração do ligante diretamente da matriz de forma rápida, economizando solventes e tempo.

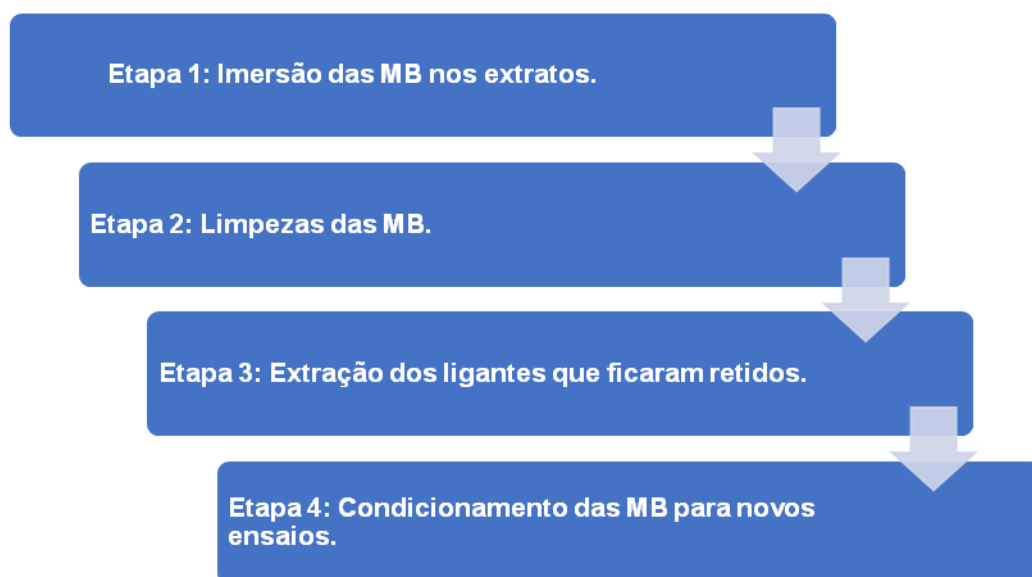


FIGURA 4. 19. Esquema referente as etapas do ensaio de *ligand fishing*.

Um dos problemas relacionados ao ensaio de *ligand fishing* é a viabilidade enzimática na presença de solventes orgânicos. Muitas das vezes é necessário o uso de solventes orgânicos para solubilizar os analitos, e o uso destes solventes altera a constante dielétrica do meio e a camada de hidratação, e com isso ocasiona a desnaturação proteica. A viabilidade enzimática na presença destes solventes é intrínseca e deve ser avaliada para cada proteína.¹³¹

Este trabalho utilizou diversos compostos das mais variadas solubilidades, assim, para verificar qual o melhor solvente orgânico para solubilizar os compostos/extratos foi realizado um ensaio de solubilidade, e os analitos apresentaram maior solubilidade em metanol. Para verificar a viabilidade enzimática da arginase na presença de MeOH, como descrito em 3.14, variou-se a porcentagem de MeOH no meio reacional. A atividade enzimática foi comparada com a reação que continha apenas a enzima e o substrato. Os resultados destes experimentos estão ilustrados no gráfico mostrado na figura 4. 20.

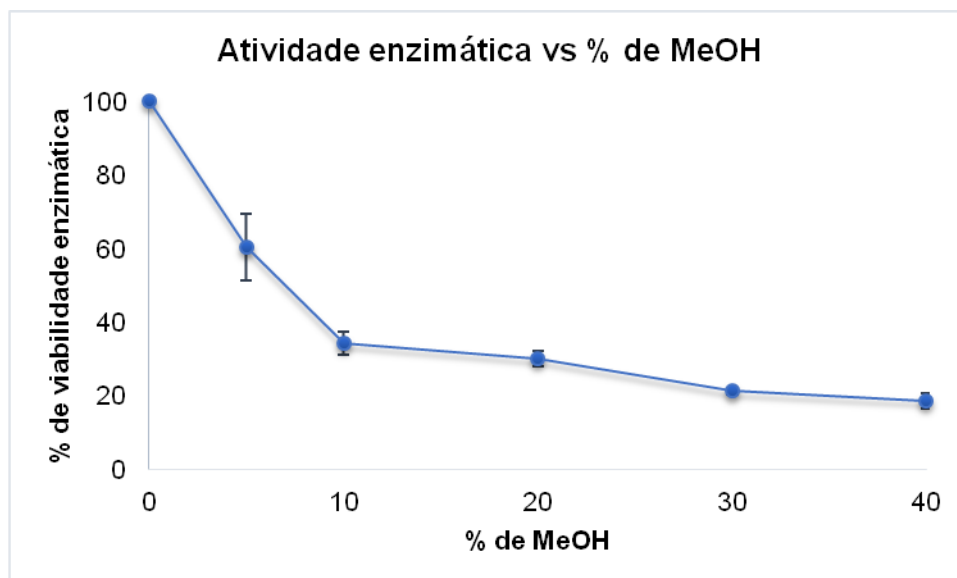


FIGURA 4. 20. Viabilidade da arginase na presença de MeOH.

Desta forma, ao adicionar MeOH na solução contendo arginase, a atividade enzimática cai drasticamente, mesmo com 5%. A fim de utilizar a maior quantidade de enzima ativa, ou seja, com maior viabilidade enzimática, os demais estudos deste trabalho utilizaram uma concentração de MeOH de até 5%.

4.5.1 Prova de conceito usando as MB-Arg

Para modular o ensaio de afinidade (*ligand fishing*) foram selecionados compostos conhecidos como inibidores (ligantes) de arginase: (+)-catequina (I) e (-)-epicatequina (II), reportados com IC_{50} de 1,7 e 1,6 μ M, respectivamente.¹¹³ Pelos ensaios de inibição enzimática *in vitro* realizados no laboratório, o nucleosídeo sintético aciclovir (III) foi identificado como sendo um não inibidor de arginase (figura 4. 21).

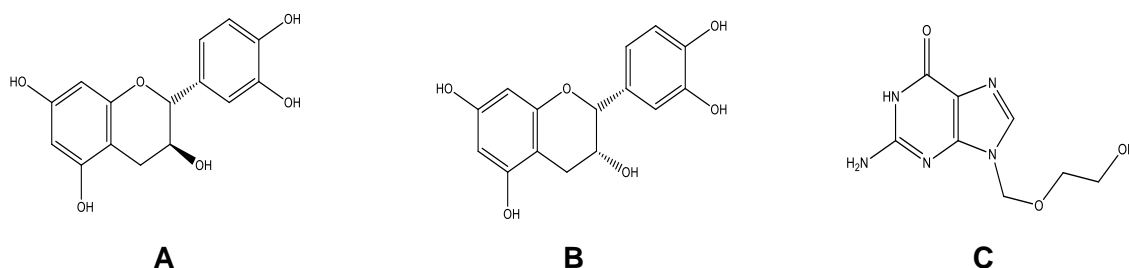


FIGURA 4. 21. Ligantes de referência utilizados.¹¹³

Deste modo, para o monitoramento do ensaio de *ligand fishing* utilizando os compostos de referência foi desenvolvido um método por LC-HRMS para a separação desta mistura (figura 4. 21). O método por LC-HRMS empregou o modo de eluição gradiente, pois os compostos apresentam polaridades distintas (figura 4.22).

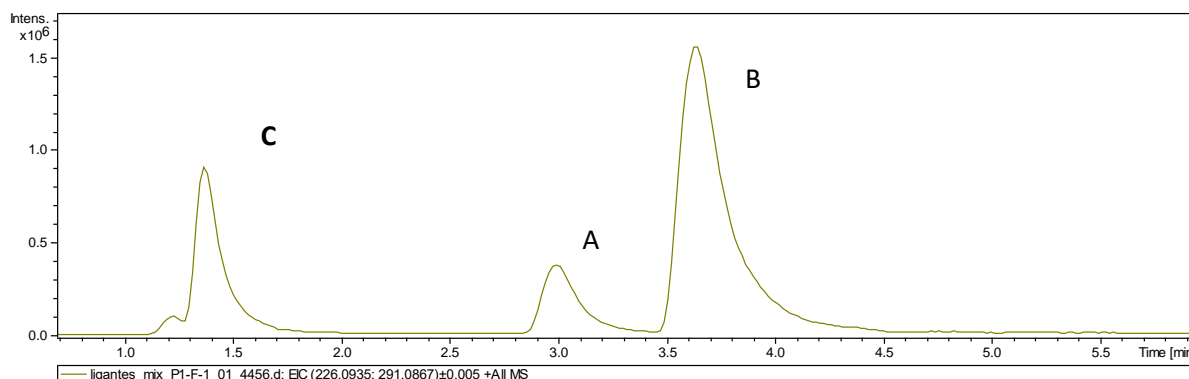


FIGURA 4. 22. Perfil cromatográfico dos ligantes com afinidade conhecida [Acquity HSS T3 (100 x 2.1 mm; 1.8 μ m); A: H₂O (0,1% de Ac. fórmico), B: ACN; eluição gradiente: 0-1 min (15-20% B); 1-8 min (20-52% B); 8,01-9 min (52-100%), vazão 0,2 mL/min]. Solução dos compostos (+)-catequina (A), (-)epicatequina (B) e aciclovir (C) preparadas na concentração de 20 μ M. Volume de injeção 1 μ L.

Após o desenvolvimento do método cromatográfico, foi realizado o ensaio de afinidade de acordo com o procedimento descrito na seção 3.9, injetando no LC-HRMS 10 μ L de uma solução 20 μ M contendo a mistura dos compostos A, B e C.

A razão de afinidade foi calculada pela equação 1 (descrita em 3.10) e está mostrada abaixo (tabela 4.2). A razão de afinidade foi mensurada em relação a área da banda cromatográfica das MB-Arg dividida pela área das MB-ArgC, sendo uma substância bioconjugada quando a razão é superior a 1. Deste modo, as MB-ArgC são utilizadas para identificar aquelas substâncias que não interagem com a proteína na sua forma ativa.

TABELA 4. 2. Valores de área obtidos para os ensaios de bioconjugação.

Compostos	Área do pescado MB-ativa	Área do pescado MB-controle	Razão de afinidade*
(+)-catequina	59212,0	33339,1	1,78
(-)-epicatequina	50698,5	30026,1	1,69
aciclovir	0	0	0

A razão de afinidade calculada para a (+)-catequina (**A**) e (-)-epicatequina (**B**) foram de 1,78 e 1,69, respectivamente,¹¹³ e o nucleosídeo acilcovir (**C**) não foi retido, pois se trata de um não ligante para esta enzima. No ensaio de bioafinidade o composto **A** apresentou uma maior razão que **B** e isso pode ser indicativo que ele possui maior afinidade pela enzima. Portanto, foi possível determinar que a enzima mesmo estando imobilizada é eficiente no reconhecimento de seus ligantes, podendo então empregar este modelo na triagem de ligantes para este alvo biológico específico.

Ademais, tendo modulado o ensaio de *ligand fishing* utilizando as sondas mencionadas e realizada a prova de conceito, os experimentos puderam ser então empregados para o estudo dos extratos vegetais.

4.5.2 Ensaio de *ligand fishing* no extrato das folhas de *B. coccolobifolia*

Inicialmente foram realizados três experimentos com tempos de carregamento 2, 5 e 10 minutos, uma vez que o tempo é um fator importante para a eficiência do ensaio de afinidade. Foram utilizados como sonda a (+)-catequina e (-)-epicatequina, esses compostos não foram adicionados no extrato, pois os mesmos foram identificados nesta matriz.¹¹³ Os resultados estão mostrados na figura 4. 23.

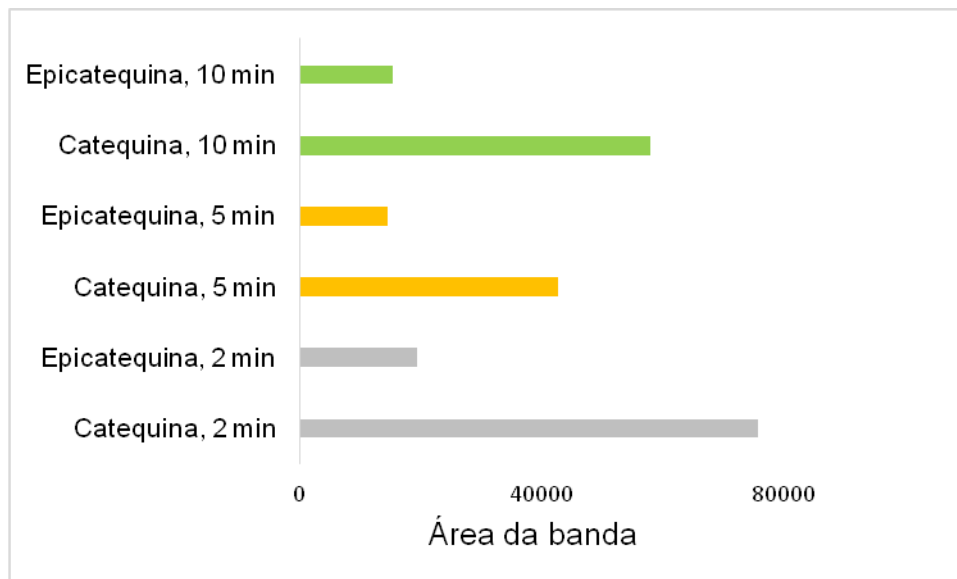


FIGURA 4. 23. Influências do tempo de carregamento.

O melhor tempo de carregamento foi de 2 min, e como pode ser observado, tempos mais longos de carregamento não aumentaram as quantidades de catequina e epicatequina retidas, o que sugere que o equilíbrio de associação (k_{on}) enzima-ligante já havia ocorrido no tempo de 2 minutos. Portanto, o tempo de carregamento de 2 min foi selecionado para o ensaio de *ligand fishing* com extratos.

Com o tempo de carregamento estabelecido, o ensaio foi aplicado ao extrato etanólico das folhas de *B. coccolobifolia* (figura 4. 24). Os sobrenadantes coletados na etapa 3, ou seja, etapa de extração foram analisados via LC-HRMS, nos modos positivo e negativo de ionização tal como descrito na seção 3.12. Comparando os cromatogramas (anexo 1), verificou-se a presença de 19 bandas cromatográficas e os resultados estão mostrados na tabela 4.3. No modo positivo de ionização observou os mesmos íons.



FIGURA 4. 24. Fotografia das etapas do ensaio de *ligand fishing* (descrito em 3.15). Fonte: o autor.

TABELA 4. 3. Resultados do ensaio de *ligand fishing* para o extrato R13F.

	Tr (min)	Razão de afinidade	[M-H] ⁻
1	2,67	2,03	289,0805
2	3,59	1,85	289,0805
3	3,7	2,64	609,1613
4	4,44	2,97	197,0465
5	5,15	2,35	609,1613
6	5,33	2,72	463,1002
7	5,89	2,61	433,0887
8	6,3	2,00	447,1045
9	8,12	2,63	599,1181
10	9,85	1,93	423,0817
11	10,57	2,18	695,4156
12	10,59	1,52	423,0817
13	10,88	1,54	695,4156
14	11,67	1,77	695,4156
15	14,28	0,92	293,1825
16	15,12	1,38	487,3523
17	15,86	1,34	487,3523
18	15,94	0,96	293,1825
19	16,22	1,55	487,3523

Foram considerados como ligantes da arginase aqueles compostos que obtiveram uma razão de afinidade $> 1,69$, pois foi a razão obtida para (-)-epicatequina usada como sonda. Neste contexto, foram considerados 12 ligantes (Tabela 4.3). A Figura 4.25 exemplifica as diferenças de razões obtidas para os 19 íons detectados no sobrenadante da etapa de extração da MB-Arg. Nota-se também que íons de mesmo [M-H]⁻ foram detectados em tempos de retenção diferentes e apresentam diferenças em razão de afinidade, por exemplo o [M-H]⁻ 695,4156. Esses resultados evidenciam a seletividade do ensaio em identificar ligantes entre os isômeros presentes na mistura, uma vez que eles apresentam diferentes razões de afinidade.

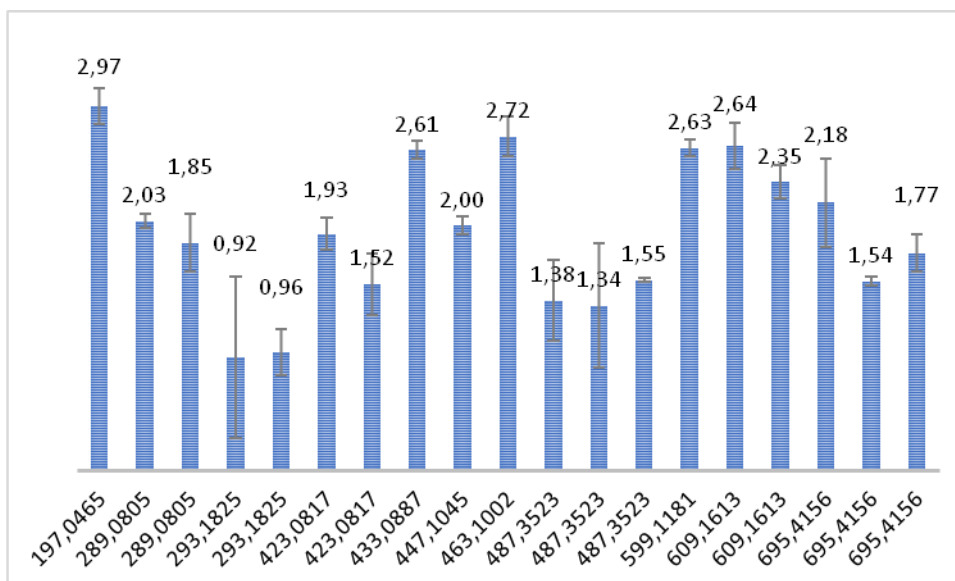


FIGURA 4. 25. Razões de afinidades para cada ligante.

Para caracterização química dos ligantes, as estruturas foram inferidas com base nos fragmentos obtidos pelos experimentos de LC-HRMS e uso de bibliotecas virtuais de compostos como MetFrag,¹³² GNPS,^{21,133} PubChem¹³⁴ e ChemSpider¹³⁵. Estas bases de dados buscam as substâncias pela massa exata (ou fórmula molecular) e dependendo da biblioteca é possível obter o MS/MS da substância por trabalhos anteriores ou por fragmentação *in silico*, sendo os compostos sugeridos por paridade espectral.

Assim, nove dos doze ligantes tiveram suas estruturas inferidas pelos seus espectros de HRMS. Dos 9 compostos, 8 apresentaram espectros de MS/MS similares, os quais levaram aos fragmentos 151,0387 e 109,0289 que são característicos de flavonoides.^{22,136,137} Seis dos compostos inferidos são derivados de flavonoides e um galato de etila (anexo 1). Os outros dois compostos foram caracterizados como (+)-catequina e (-)-epicatequina através de suas fragmentações (figura 4. 26) e confirmados por injeção de padrão.

Os compostos de $[M-H]^-$ 695,4156 apresentaram nas condições experimentais examinadas fragmentações insuficientes para sua caracterização, os quais levam aos fragmentos 487,3418 e perdas de 18 Da. Na tentativa de contornar esse problema empregou-se o LC-IT, porém o íon fragmento 487 também não produziu fragmentações em condições MSn. O íon de $[M-H]^-$ igual a 423,0817 (R ad. 1,93) não foi fragmentado devido a sua baixa intensidade. O *threshold* de fragmentação foi estabelecido em 10^3 , porque abaixo desse valor é considerado

sinal de fundo do equipamento. Para a elucidação estrutural destes ligantes condições de isolamento por LC-SPE serão investigados para análise por RMN ¹H e bidimensionais

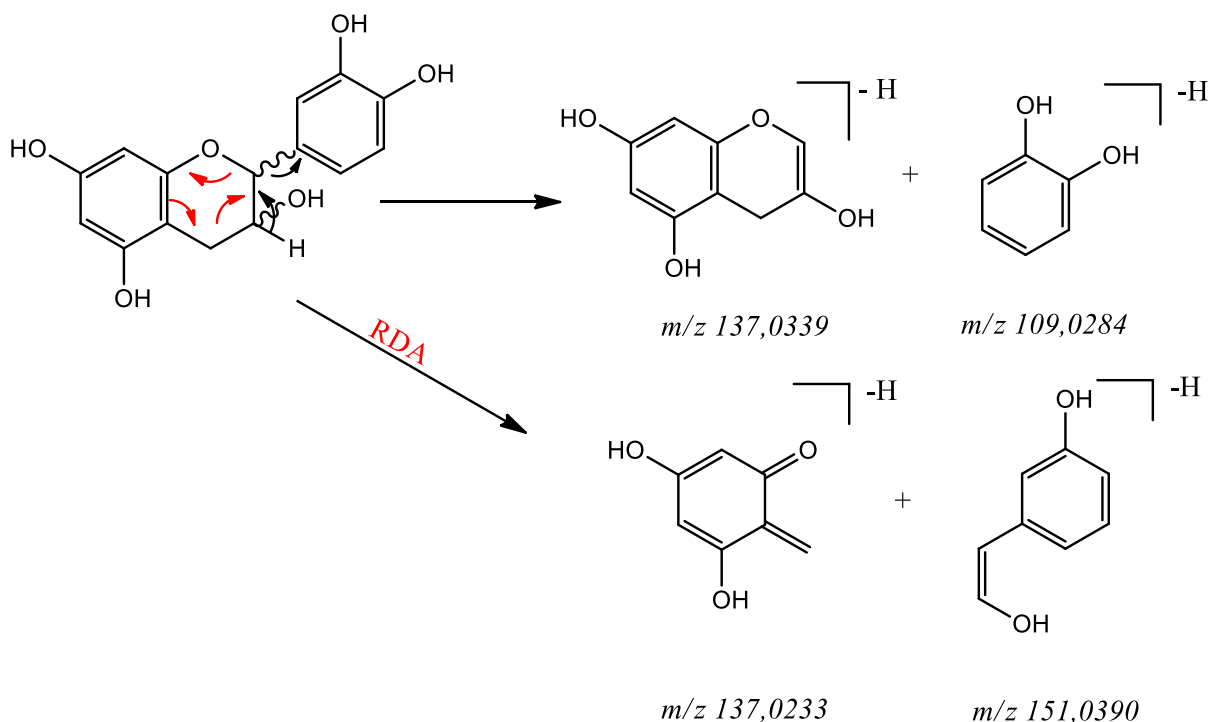


FIGURA 4. 26. Proposta de fragmentação para a (+)-catequina/(-)-epicatequina de [M-H]⁻ 289,0707. Adaptado¹³⁸

Os flavonoides possuem uma estrutura contendo três anéis chamados de A, B e C (figura 4. 27). As modificações mais usais ocorrem nas hidroxilas ligadas a estes anéis, no caso da quercetina elas estão no C-3, C-7, C-5, C-4' e C-5'.¹³⁶ No que diz respeito às fragmentações obtidas por ESI-MS/MS, a nomenclatura utilizada foi elaborada por Ma et al., 1997.¹³⁹ Embora os padrões de fragmentação por MS alteram com a instrumentação utilizada, diversos autores relataram que mesmo utilizando outras fontes de ionização (ESI, APCI ou MALDI) ou outros analisadores (QqQ, IT ou QTOF) os principais caminhos de fragmentação dos flavonoides são aparentemente independentes do modo de ionização utilizado ou dos tipos de analisadores aplicados, mudando apenas a abundância relativa dos íons.^{136,140-142}

Para agliconas, as fragmentações identificadas como ^{i,j}A₀ e ^{i,j}B₀ são usados para se referir a fragmentos contendo os anéis A e B intactos, onde os sobrescritos i e j indicam as ligações quebradas do anel-C.¹³⁵ Por outro lado, os

flavonoides muitas das vezes apresentam em sua estrutura modificações contendo açúcares e os íons contendo a aglicona são rotulados como X_j , Y_j e Z_j , onde j é o número da ligação interglicosídica quebrada, contada a partir da aglicona, sendo a ligação glicosídica com aglicona numerada como 0 e a identificação Y_0 corresponde a identificação da aglicona. Os fragmentos de glicosídeo, com cargas retidas na porção do glicosídeo, são designados como B_i , onde i representa o número de ligações quebradas, contadas a partir da unidade de açúcar terminal (figura 4.27).^{136,139}

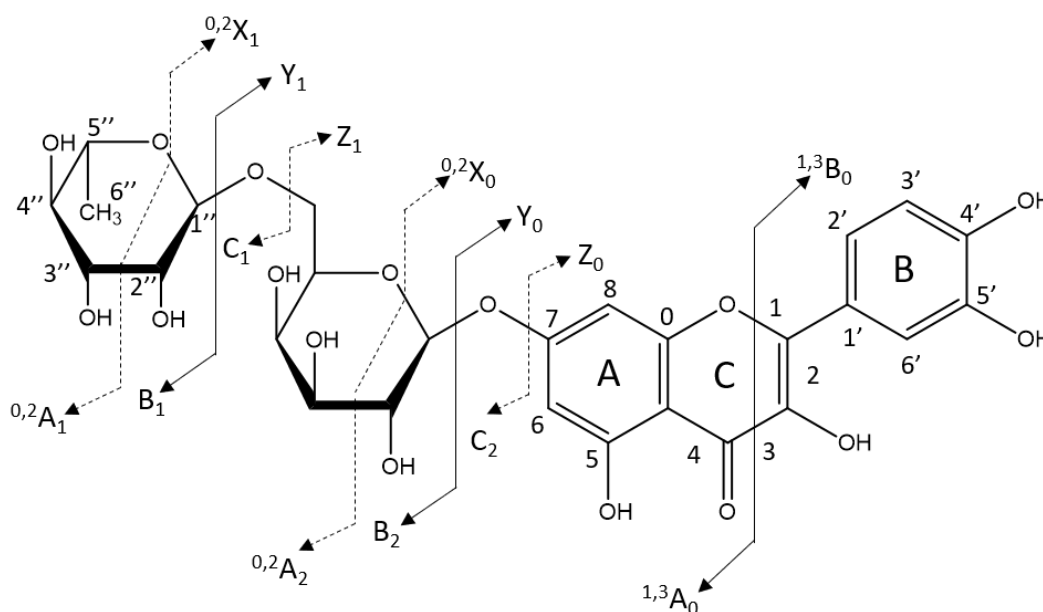


FIGURA 4. 27. Nomenclatura das fragmentações dos flavonoides. Adaptado¹³⁶

O íon de $[M-H]^-$ igual a 609,1446 foi detectado no cromatograma em tempos de retenção diferentes. Os flavonoides glicosilados na maioria das vezes contêm uma ou duas unidades de glicosídeos e, essas unidades podem ligar-se em duas formas diferentes formando di-O-glicosídeos, ou um ligado ao outro formando O-diglicosídeos. A diferenciação é feita baseando-se na presença dos íons radicais característicos. O espectro de íons produto dos di-O-glicosídeos apresentam fragmentos $[Y_1-H]^-$ e $[Y_0-2H]^-$, enquanto que nos espectros de O-diglicosídeos apenas o $[Y_0-H]^-$ é observado¹³⁶. Com esse método foi possível inferir os isômeros do 609,1446 (tabela 4.4). A caracterização da sequência dos açúcares é inviável de ser realizada por MS.¹³⁶

A diferenciação de isômeros posicionais dos outros flavonoides pode ser realizada com base em fragmentações características, onde o íon $[Y_0-CO]^-$ é observado apenas para 7-O-monoglicosídeo, enquanto o fragmento $[Y_0-2H-CO]^-$ foi descrito para os isômeros 3-O-monoglicosídeo. No caso de flavonoides 3,7-di-O-glicosídeos com diferentes unidades de monoméricas, a posição pode ser facilmente determinada, uma vez que somente a perda da porção 3-O-glicosídica produz o íon radical $[Y1-H]^-$.¹³⁶ Ademais, a presença de um substituinte no anel A pode ser deduzida através do mecanismo de retro-Diels-Alder (como mostrado na figura 4.26). Os dados dos compostos inferidos estão mostrados na tabela 4.4 e as estruturas na figura 4. 28.

Os compostos **2**, **3**, **5**, **6** e **9** já foram avaliados como inibidores de arginase e os valores aproximados de IC_{50} reportados foram de 1,6; 1,7, 2,0; 12,2 e 10,0 μM , respectivamente.^{113,143}

TABELA 4. 4. Compostos e dados do LC-HRMS dos ligantes identificados (2, 3 e 9) e inferidos (1, 4-8) do extrato etanólico das folhas de *B. coccolobifolia*.

#	Substância	Íon precursor [M-H]-	[M-H]- teórico	Erro	Formula molecular	Íons fragmentos
1	Galato de etila	197,0449	197,0444	2,5	C ₉ H ₁₀ O ₅	169,0150 (1%); 139,0039 (3%); 124,0161 (100%); 123,0079 (9%)
2	(-)-Epicatequina	289,0708	289,0707	0,3	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	151,0382 (22%); 137,0249 (24%); 123,0449 (100%); 109,0287 (77%)
3	(+)-Catequina	289,0707	289,0707	0,0	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	151,0397 (29%); 137,0249 (23%); 123,0449 (100%); 109,0287 (71%)
4	Quercetina-3-O-pentosídeo	433,0766	433,0765	0,2	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₁	300,0266 (90%); 271,0241 (100%); 151,0031 (7%); 109,0186 (0,8%)
5	Quercetina-3-O-rhamnoside	447,0923	447,0922	0,2	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	300,0266 (95%); 271,0239 (100%); 151,0032 (15%); 109,0290 (1%)
6	Quercetina-3-O-hexosídeo	463,0869	463,0871	-0,4	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	300,0268 (100%); 271,0242 (83%); 151,0034 (8%); 109,0285 (0,5%)
7	Quercetina-3-O-deoxihexosídeo- 7-O-hexose	609,1446	609,145	-0,7	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	462,0762 (12%); 301,0352 (46%); 299,0293 (100%); 125,0236 (4%)
8	Quercetina-3-O-(O-galoil)- deoxihexosídeo	599,1028	599,1031	-0,5	C ₂₈ H ₂₃ O ₁₅	301,0347 (100%); 273,0397 (9%); 151,0034 (34%); 169,0137(2%); 109,0291 (0,9%)
9	Quercetina-3-O-hexosídeo- deoxihexosídeo	609,1439	609,145	-1,8	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	300,0271 (100%); 271,0244 (16%); 151,0035 (3%)

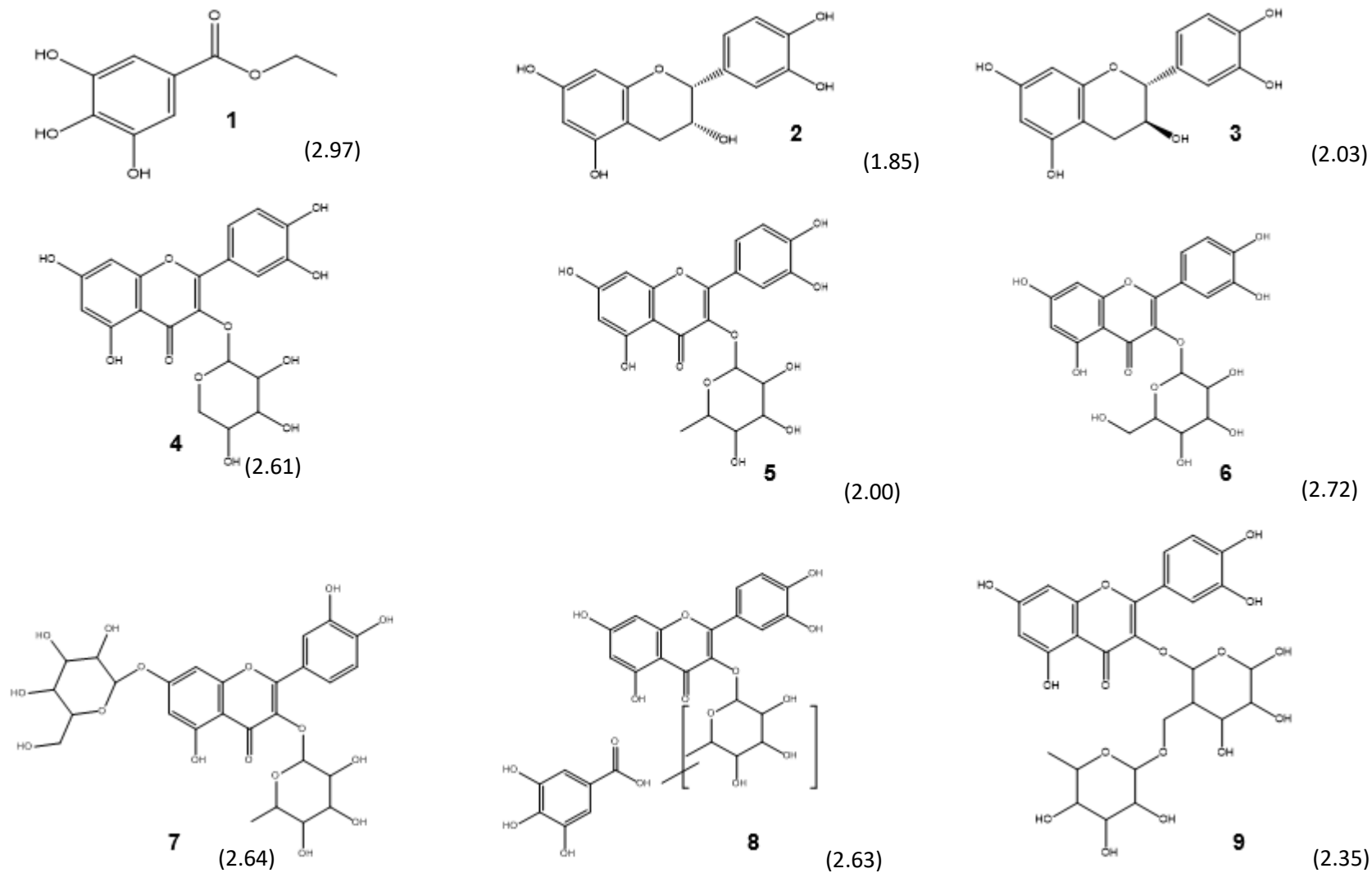


FIGURA 4. 28. Ligantes identificados no extrato etanólico das folhas *B. coccolobifolia*. Os valores entre parênteses referem-se a razão de afinidade.

4.5.3 Ensaio de *ligand fishing* no extrato das raízes de *T. ochracea*

Este extrato foi escolhido para contrapor o ativo, uma vez que ele apresentou a menor inibição entre os extratos ensaiados. Outra razão pela qual motivou a escolha deste extrato foi que ao analisar o *fingerprint* não foram observados fragmentações características de flavonoides¹³⁹. Os flavonoides são considerados ativos em arginase,¹¹⁵ no entanto, vários estudos classificam esses compostos como inibidores promíscuos.¹⁴⁴⁻¹⁴⁶

As mesmas condições de carregamento estabelecidos para o extrato de *B. coccolobifolia* foram utilizadas para o extrato de *T. ochracea* (R24R). O ensaio de *ligand fishing* foi realizado como descrito em 3.15 e os sobrenadantes coletados na etapa 3 (extração dos ligantes) das MB-Arg e MB-ArgC foram analisados nos modos positivo e negativo de ionização, nas condições desenvolvidas para este extrato (seção 3.13). Comparando os cromatogramas de íons totais, foram verificadas a presença de 39 íons em acordo com os resultados mostrados na tabela 4.5.

TABELA 4. 5. Resultados do ensaio de fishing para o extrato R24R.

#	Tr (min)	Razão de afinidade	[M-H]
1	2,67	0,44	389,123
2	2,94	2,87	259,0605
3	4,70	0,69	353,1017
4	7,98	7,92	599,323
5	8,48	10,71	599,323
6	8,96	8,10	599,323
7	9,24	2,30	293,1754
8	10,27	17,97	293,1754
9	12,62	3,74	293,1754
10	9,01	0,28	517,3161
11	7,98	0,11	549,3416
12	8,48	0,12	549,3416
13	8,96	0,11	549,3416
14	8,04	4,51	677,301
15	8,53	1,87	677,301
16	8,97	**	677,301
17	9,89	0,25	487,3419
18	10,42	0,23	487,3419
19	11,37	0,29	487,3419
20	9,89	0,17	533,3474
21	9,88	10,94	583,3295
22	10,44	12,90	583,3295
23	11,39	13,13	583,3295
24	9,88	**	661,3094
25	10,45	**	661,3094
26	11,37	**	661,3094
27	10,56	1,51	325,0713
28	11,24	0,65	779,1926
29	12,02	0,13	564,3297
30	11,53	**	311,1681
31	11,90	0,10	476,2779
32	12,33	1,10	619,2048
33	12,96	**	645,3117

Continua

Continuação Tabela 4.5

#	Tr (min)	Razão de afinidade	[M-H]-
34	12,98	**	567,3348
35	11,75	0,30	293,2115
36	13,37	0,40	293,2115
37	14,78	1,59	543,331
38	15,00	0,61	435,1802
39	15,60	0,08	399,2744

** compostos que foram retidos apenas pelas MB-Arg.

Como mencionado, devido a possibilidade de interações inespecíficas com as partículas, este tipo de experimento deve ser sempre conduzido paralelamente a um experimento controle (MB-ArgC) e a partir das áreas, calcula-se a razão de afinidade de cada ligante entre a MB ativa e a MB controle (equação 1). Diante disto, na figura 4. 29 são mostradas as razões de afinidades para cada ligante oriundo do extrato R24R, para a melhor visualização dos resultados obtidos. Neste trabalho foram considerados como ligantes retidos, aqueles que obtiveram razão de afinidade superior a 1,69, uma vez que esse foi o menor valor obtido na prova de conceito.

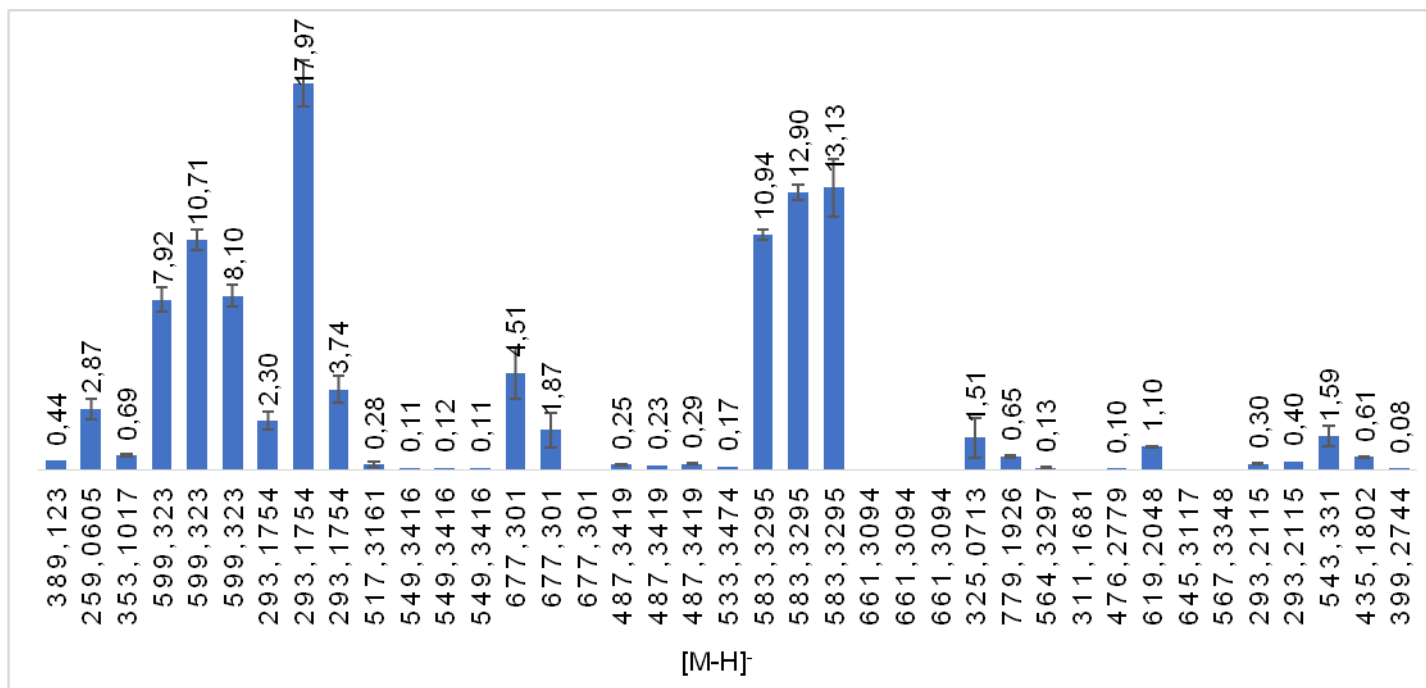


FIGURA 4. 29. Razões de afinidades para cada ligante.

Dos 39 íons detectados 19 foram considerados como ligantes. Os ligantes de [M-H]⁻ igual a 667,3010 (Tr 8,97 min), 661,3094, 311,1681, 645,3117 e 567,3348 foram identificados somente no sobrenadante do extraído das MB-Arg, ou seja, não foram detectados no extraído das partículas controle (tabela 4.5), mostrando assim que esses ligantes têm afinidade apenas pelas MB contendo a enzima ativa.

Os ligantes de [M-H]⁻ igual a 259,0605, 599,3230, 293,1754, 677,3010 583,3295 e 619,2048 foram retidos com uma razão de afinidade na faixa de 2-17. Os compostos de [M-H]⁻ igual a 389,1230, 353,1017, 517,3161, 549,3416, 487,31419, 779,1926, 564,3297, 476,2779, 293,2115, 435,1802 e 399,2744 foram retidos por interações não específicas com as MB, uma vez que as suas razões de afinidade foram inferiores a 1. Os íons de [M-H]⁻ igual a 677,3010 (Tr 8,53 min), 325,0713, 619,2048 e 543,3310 foram desconsiderados por estar dentro da faixa de erro.

Dentre os ligantes há compostos de mesma massa exata em diferentes tempos de retenção no cromatograma o que indica que eles são isômeros e apresentam diferentes razões de afinidade.

Como pode ser visto na figura 4. 2, este extrato apresentou a menor inibição dentre os extratos avaliados, sugerindo que este resultado pode ser atribuído a 3 fatores: (1) ausência dos flavonoides que frequentemente apresentam elevado potencial de inibição enzimática; (2) ligantes são minoritários no extrato; (3) ligantes são de baixa afinidade.

Embora este extrato tenha sido escolhido para contrapor o ativo, e assim esperávamos que ocorresse a identificação de ligantes com baixa razão de afinidade, isso não foi o observado. Neste extrato foi possível identificar 19 compostos com altas razões de afinidades e diferentemente dos resultados obtidos para o extrato R13F em que foram pescados os compostos de fácil ionização, no ensaio com o R24R observa-se que os ligantes são minoritários, pois mesmo utilizando o *fingerprint* deste extrato não foi possível obter os MS/MS para a maioria dos ligantes devido aos mesmos não alcançarem o *threshold* de fragmentação. Portanto, devido a esse motivo, não foi possível inferir as estruturas dos ligantes. Os compostos que alcançaram o *threshold* apresentaram complexidade espectral elevada e mesmo utilizando as bibliotecas disponíveis não foi possível caracterizá-los. No entanto, para contornar esse problema, condições de LC-SPE serão estudadas para o isolamento e caracterização química por RMN. Além disso os

compostos isolados serão submetidos aos ensaios de inibição, mecanismo de inibição e constantes de afinidade (K_D).

5. Conclusão

5. Conclusão

Em busca de um modelo de triagem de ligantes em extratos naturais, a enzima arginase foi imobilizada em partículas magnéticas aminopropiladas e sua atividade foi mantida após processo de imobilização, podendo esta enzima ser aplicada nos ensaios de *ligand fishing*. O ensaio foi validado com uma combinação de compostos de referência com a atividade conhecida, demonstrando seletividade entre os ligantes.

Os ensaios de *ligand fishing* foram modulados avaliando-se o tempo de carregamento e percentual de solvente orgânico utilizado para solubilizar o extrato. O melhor tempo de pesca foi estabelecido em 2 minutos e o percentual máximo de MeOH foi de 5%. A triagem de ligantes realizada nos extratos demonstrou ser uma abordagem simples, rápida e robusta na busca de novos inibidores para a arginase. Nove dos doze compostos pescados no extrato de *B. coccolobifolia* foram inferidos por LC-HRMS e para os demais compostos serão avaliadas condições de LC-SPE para isolamento e identificação. No extrato das raízes de *T. ochracea* os dezenove compostos retidos apresentaram baixa intensidade de ionização nas condições experimentais, o que impossibilitou obter um espectro de íons produtos de boa qualidade para inferir os ligantes retidos, mesmo retornando ao *fingerprint*. O modelo desenvolvido é eficiente no reconhecimento e extração de ligantes que são minoritários nos extratos e muitas das vezes esses compostos são negligenciados pelas técnicas convencionais de triagens.

Assim, os resultados obtidos evidenciaram que o método desenvolvido nesta dissertação representa uma abordagem analítica valiosa na busca por novos ligantes em extratos de produtos naturais e o modelo de ensaio desenvolvido apresenta aplicabilidade no processo de descoberta de potenciais *hits* que atuem como inibidores de arginase, visto que se trata de um alvo validado para quimioterapia de leishmaniose.

Referências

Referências

1. Pilon; A. C.; Valli; M.; Dametto; A. C.; Pinto; M. E. F.; Freire; R. T.; Castro-Gamboa; I.; Andricopulo; A. D. & Bolzani; V. S. NuBBEDB: an updated database to uncover chemical and biological information from Brazilian biodiversity. *Sci. Rep.* **7** (1): 7215, 2017.
2. Pinto; A. C.; Silva; D. H. S.; Bolzani; V. D. S.; Lopes; N. P. & Epifanio; R. D. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. *Quim. Nova* **25** 45–61, 2002.
3. Barreiro; E. J. & Bolzani; V. D. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. *Quim. Nova* **32** (3): 679–688, 2009.
4. Flausino; O.; Valli; M. & Bolzani; V. Biodiversidade brasileira: uma fonte potencial de agentes terapêuticos ainda inexplorada. In: Química de produtos naturais: novos fármacos e a moderna farmacognosia, 3 Ed. Yunes, R. A. & Filho, V. C. (Eds), UNIVALI, 2012, p. 353.
5. Mishra; B. B. & Tiwari; V. K. Natural products: An evolving role in future drug discovery. *Eur. J. Med. Chem.* **46** (10): 4769–4807, 2011.
6. DeCorte; B. L. Underexplored opportunities for natural products in drug discovery. *J. Med. Chem.* **59** (20): 9295–9304, 2016.
7. Batista; A. N. L.; M. dos Santos; F.; Batista; J. M & Cass; Q. B. Enantiomeric mixtures in natural product chemistry: separation and absolute configuration assignment. *Molecules* **23** (2): 492, 2018.
8. Johnson; T. *CRC Ethnobotany Desk Reference*. 1^a ed., CRC Press, 1998, p 1224.
9. Dewick; P. M. *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*. 3^a ed., Wiley, 2009, p 539.
10. Newman; D. J. & Cragg; G. M. Natural products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod.* **79** (3): 629–661, 2016.
11. Guo; B.; Wang; Y.; Sun; X. & Tang; K. Bioprospecting of endophytic fungi for bioactive natural products: recent trends and future perspectives. *Microbiol. Appl.* **1**: 346-364, 2012.
12. Harvey; A. L. Natural products as a screening resource. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **11** (5): 480–484, 2007.
13. Lam; K. S. New aspects of natural products in drug discovery. *Trends*

- Microbiol.* **15** (6): 279–289, 2007.
14. Cieśla; Ł. & Moaddel; R. Comparison of analytical techniques for the identification of bioactive compounds from natural products. *Nat. Prod. Rep.* **33** (10): 1131–1145, 2016.
 15. Dias; D. A.; Urban; S. & Roessner; U. A historical overview of natural products in drug discovery. *Metabolites* **2** (2): 303–336, 2012.
 16. Lau; E. C.; Mason; D. J.; Eichhorst; N.; Engelder; P.; Mesa; C.; Kithsiri Wijeratne; E. M.; Gunaherath; G. M. K. B.; Gunatilaka; A. A. L.; La Clair; J. J. & Chapman; E. Functional chromatographic technique for natural product isolation. *Org. Biomol. Chem.* **13** (8): 2255–2259, 2015.
 17. Lang; G.; Mayhudin; N. A.; Mitova; M. I.; Sun; L.; van der Sar; S.; Blunt; J. W.; Cole; A. L. J.; Ellis; G.; Laatsch; H. & Munro; M. H. G. Evolving trends in the dereplication of natural product extracts: new methodology for rapid, small-scale investigation of natural product extracts. *J. Nat. Prod.* **71** (9): 1595–1599, 2008.
 18. Ng; J.; Bandeira; N.; Liu; W.-T.; Ghassemian; M.; Simmons; T. L.; Gerwick; W. H.; Linington; R.; Dorrestein; P. C. & Pevzner; P. A. Dereplication and *de novo* sequencing of nonribosomal peptides. *Nat. Methods* **6** (8): 596–599, 2009.
 19. Sprender, R. F.; Aquino; A. J. Perfil cromatográfico - desreplecando para não reisolar. in *Cromatografia Líquida* ed. Cass, Q. B. & Cassiano, N. Elsevier, 2015, p 374.
 20. Maldaner; L.; Collins; C. H. & Jardim; I. C. S. F. Fases estacionárias modernas para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa. *Quim. Nova* **33** (7): 1559–1568, 2010.
 21. Wang; M. *et al.* Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nat. Biotechnol.* **34** (8): 828–837, 2016.
 22. Aquino; A. J.; da C. Alves; T.; Oliveira; R. V.; Ferreira; A. G. & Cass; Q. B. Chemical secondary metabolite profiling of *Bauhinia longifolia* ethanolic leaves extracts. *Ind. Crops Prod.* **132** 59–68, 2019.
 23. Zhuo; R.; Liu; H.; Liu; N. & Wang; Y. Ligand fishing: a remarkable strategy for discovering bioactive compounds from complex mixture of natural products. *Molecules* **21** (11): 1516, 2016.
 24. Vanzolini; K. L.; da F. Sprenger; R.; Leme; G. M.; de S. Moraes; V. R.; Vilela;

- A. F. L.; Cardoso; C. L. & Cass; Q. B. Acetylcholinesterase affinity-based screening assay on *Lippia gracilis* Schauer extracts. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **153** 232–237, 2018.
25. Vanzolini; K. L.; Vieira; L. C. C.; Corrêa; A. G.; Moaddel; R. & Cass; Q. B. Acetylcholinesterase immobilized on modified magnetic beads as a tool for screening a compound library. *Microchim. Acta* **182** (13–14): 2209–2213, 2015.
26. Hage, D. S.; Ruhn; P. F. Handbook of Affinity Chromatography. 2^a ed., CRC Press, 2005, p 928.
27. Dossou; K. S. S.; Devkota; K. P.; Morton; C.; Egan; J. M.; Lu; G.; Beutler; J. A. & Moaddel; R. Identification of CB1/CB2 ligands from *Zanthoxylum bungeanum*. *J. Nat. Prod.* **76** (11): 2060–2064, 2013.
28. Ciesla; L.; Okine; M.; Rosenberg; A.; Dossou; K. S. S.; Toll; L.; Wainer; I. W. & Moaddel; R. Development and characterization of the $\alpha 3\beta 4\alpha 5$ nicotinic receptor cellular membrane affinity chromatography column and its application for on line screening of plant extracts. *J. Chromatogr. A* **1431** 138–144, 2016.
29. Wang; S.; Sun; M.; Zhang; Y.; Zhang; J. & He; L. EGFR/cell membrane chromatography-online-high performance liquid chromatography/mass spectrometry method for screening EGFR antagonists from radix *Angelicae Pubescentis*. *Sci. China Chem.* **53** (11): 2357–2362, 2010.
30. Wang; S.; Sun; M.; Zhang; Y.; Du; H. & He; L. A new A431/cell membrane chromatography and online high performance liquid chromatography/mass spectrometry method for screening epidermal growth factor receptor antagonists from radix *Sophorae flavescens*. *J. Chromatogr. A* **1217** (32): 5246–5252, 2010.
31. Kool; J.; Eggink; M.; van Rossum; H.; van Liempd; S. M.; van Elswijk; D. A.; Irth; H.; Commandeur; J. N. M.; Meerman; J. H. N. & Vermeulen; N. P. E. Online biochemical detection of Glutathione-S-Transferase P1-Specific inhibitors in complex mixtures. *J. Biomol. Screen.* **12** (3): 396–405, 2007.
32. Lin; P.; Zhao; S.; Lu; X.; Ye; F. & Wang; H. Preparation of a dual-enzyme co-immobilized capillary microreactor and simultaneous screening of multiple enzyme inhibitors by capillary electrophoresis. *J. Sep. Sci.* **36** (15): 2538–2543, 2013.
33. Peng; M.-J.; Shi; S.-Y.; Chen; L.; Zhang; S.-H.; Cai; P. & Chen; X.-Q. Online coupling solid-phase ligand fishing with high-performance liquid

- chromatography–diode array detector–tandem mass spectrometry for rapid screening and identification of xanthine oxidase inhibitors in natural products. *Anal. Bioanal. Chem.* **408** (24): 6693–6701, 2016.
34. Vanzolini; K. L.; Vieira; L. C. C.; Corrêa; A. G.; Cardoso; C. L. & Cass; Q. B. Acetylcholinesterase immobilized capillary reactors–tandem mass spectrometry: an on-flow Tool for ligand Screening. *J. Med. Chem.* **56** (5): 2038–2044, 2013.
 35. da Silva; J. I.; de Moraes; M. C.; Vieira; L. C. C.; Corrêa; A. G.; Cass; Q. B. & Cardoso; C. L. Acetylcholinesterase capillary enzyme reactor for screening and characterization of selective inhibitors. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **73** 44–52, 2013.
 36. van Breemen; R. B.; Huang; C.-R.; Nikolic; D.; Woodbury; C. P.; Zhao; Y.-Z. & Venton; D. L. Pulsed ultrafiltration mass spectrometry: a new method for screening combinatorial libraries. *Anal. Chem.* **69** (11): 2159–2164, 1997.
 37. van Breemen; R. B.; Tao; Y. & Li; W. Cyclooxygenase-2 inhibitors in ginger (*Zingiber officinale*). *Fitoterapia* **82** (1): 38–43, 2011.
 38. Li; H.; Song; F.; Xing; J.; Tsao; R.; Liu; Z. & Liu; S. Screening and structural characterization of α -glucosidase inhibitors from hawthorn leaf flavonoids extract by ultrafiltration LC-DAD-MS n and SORI-CID FTICR MS. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **20** (8): 1496–1503, 2009.
 39. Vanzolini; K. L.; Ainsworth; S.; Bruyneel; B.; Herzig; V.; Seraus; M. G. L.; Somsen; G. W.; Casewell; N. R.; Cass; Q. B. & Kool; J. Rapid ligand fishing for identification of acetylcholinesterase-binding peptides in snake venom reveals new properties of dendrotoxins. *Toxicon* **152** 1–8, 2018.
 40. Chen; L.; Wang; X.; Liu; Y. & Di; X. Dual-target screening of bioactive components from traditional Chinese medicines by hollow fiber-based ligand fishing combined with liquid chromatography–mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **143** 269–276, 2017.
 41. Lourenço Vanzolini; K.; Jiang; Z.; Zhang; X.; Curcino Vieira; L. C.; Gonçalves Corrêa; A.; Lucia Cardoso; C.; Bezerra Cass; Q. & Moaddel; R. Acetylcholinesterase immobilized capillary reactors coupled to protein coated magnetic beads: a new tool for plant extract ligand screening. *Talanta* **116** 647–652, 2013.
 42. Wubshet; S. G.; Brighente; I. M. C.; Moaddel; R. & Staerk; D. Magnetic ligand

- fishing as a targeting tool for HPLC-HRMS-SPE-NMR: α -Glucosidase inhibitory ligands and alkylresorcinol glycosides from *Eugenia catharinae*. *J. Nat. Prod.* **78** (11): 2657–2665, 2015.
43. Wang; H.; Zhao; X.; Wang; S.; Tao; S.; Ai; N. & Wang; Y. Fabrication of enzyme-immobilized halloysite nanotubes for affinity enrichment of lipase inhibitors from complex mixtures. *J. Chromatogr. A* **1392** 20–27, 2015.
 44. Tao; Y.; Jiang; Y.; Li; W. & Cai; B. Zeolite based solid-phase extraction coupled with UPLC-Q-TOF-MS for rapid analysis of acetylcholinesterase binders from crude extract of *Corydalis yanhusuo*. *RSC Adv.* **6** (100): 98476–98486, 2016.
 45. Guo; J.; Lin; H.; Wang; J.; Lin; Y.; Zhang; T. & Jiang; Z. Recent advances in bio-affinity chromatography for screening bioactive compounds from natural products. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **165** 182–197, 2019.
 46. Schiel; J. E. & Hage; D. S. Kinetic studies of biological interactions by affinity chromatography. *J. Sep. Sci.* **32** (10): 1507–1522, 2009.
 47. de Moraes; M. C.; Vanzolini; K. L.; Cardoso; C. L. & Cass; Q. B. New trends in LC protein ligand screening. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **87** 155–166, 2014.
 48. Jonker; N.; Kool; J.; Irth; H. & Niessen; W. M. A. Recent developments in protein–ligand affinity mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **399** (8): 2669–2681, 2011.
 49. Zehender; H. & Mayr; L. M. Application of mass spectrometry technologies for the discovery of low-molecular weight modulators of enzymes and protein–protein interactions. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **11** (5): 511–517, 2007.
 50. Seok; Y.-J.; Sondej; M.; Badawi; P.; Lewis; M. S.; Briggs; M. C.; Jaffe; H. & Peterkofsky; A. High Affinity Binding and Allosteric Regulation of *Escherichia coli* Glycogen Phosphorylase by the histidine phosphocarrier protein, HPr. *J. Biol. Chem.* **272** (42): 26511–26521, 1997.
 51. Cooper; M. A. Optical biosensors in drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **1** (7): 515–528, 2002.
 52. Tao; Y.; Zhang; Y.; Wang; Y. & Cheng; Y. Hollow fiber based affinity selection combined with high performance liquid chromatography–mass spectroscopy for rapid screening lipase inhibitors from lotus leaf. *Anal. Chim. Acta* **785** 75–81, 2013.
 53. Yang; Z.; Zhang; Y.; Sun; L.; Wang; Y.; Gao; X. & Cheng; Y. An ultrafiltration high-performance liquid chromatography coupled with diode array detector and

- mass spectrometry approach for screening and characterising tyrosinase inhibitors from mulberry leaves. *Anal. Chim. Acta* **719** 87–95, 2012.
54. Hou; G.; Niu; J.; Song; F.; Liu; Z. & Liu; S. Studies on the interactions between ginsenosides and liposome by equilibrium dialysis combined with ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* **923–924** 1–7, 2013.
 55. Zhang; A.; Ye; F.; Lu; J. & Zhao; S. Screening α -glucosidase inhibitor from natural products by capillary electrophoresis with immobilised enzyme onto polymer monolith modified by gold nanoparticles. *Food Chem.* **141** (3): 1854–1859, 2013.
 56. Zhang; Y.; Wang; Q.; Liu; R.; Zhou; H.; Crommen; J.; Moaddel; R.; Jiang; Z. & Zhang; T. Rapid screening and identification of monoamine oxidase-A inhibitors from *Corydalis* rhizome using enzyme-immobilized magnetic beads based method. *J. Chromatogr. A* **1568**, 1-8, 2019
 57. Wu; G.; Jiang; X.; Gong; Y.; Hu; Y.; Bai; X. & Liao; X. Ligand fishing of anti-neurodegenerative components from *Lonicera japonica* using magnetic nanoparticles immobilised with monoamine oxidase B. *J. Sep. Sci.* **42** (6): 1–10, 2019.
 58. Zhao; Y.-M.; Wang; L.-H.; Luo; S.-F.; Wang; Q.-Q.; Moaddel; R.; Zhang; T.-T. & Jiang; Z.-J. Magnetic beads-based neuraminidase enzyme microreactor as a drug discovery tool for screening inhibitors from compound libraries and fishing ligands from natural products. *J. Chromatogr. A* **1568** 123–130, 2018.
 59. Wang; Z.; Li; X.; Chen; M.; Liu; F.; Han; C.; Kong; L. & Luo; J. A strategy for screening of α -glucosidase inhibitors from *Morus alba* root bark based on the ligand fishing combined with high-performance liquid chromatography mass spectrometer and molecular docking. *Talanta* **180** 337–345, 2018.
 60. Hu; Y.; Fu; A.; Miao; Z.; Zhang; X.; Wang; T.; Kang; A.; Shan; J.; Zhu; D. & Li; W. Fluorescent ligand fishing combination with in-situ imaging and characterizing to screen Hsp 90 inhibitors from *Curcuma longa* L. based on InP/ZnS quantum dots embedded mesoporous nanoparticles. *Talanta* **178** 258–267, 2018.
 61. Zhu; Y.-T.; Ren; X.-Y.; Yuan; L.; Liu; Y.-M.; Liang; J. & Liao; X. Fast identification of lipase inhibitors in oolong tea by using lipase functionalised Fe₃O₄ magnetic nanoparticles coupled with UPLC–MS/MS. *Food Chem.* **173**

- 521–526, 2015.
62. Deng; X.; Shi; S.; Li; S. & Yang; T. Magnetic ligand fishing combination with high-performance liquid chromatography–diode array detector–mass spectrometry to screen and characterize cyclooxygenase-2 inhibitors from green tea. *J. Chromatogr. B* **973** 55–60, 2014.
 63. Zhu; Y.-T.; Jia; Y.-W.; Liu; Y.-M.; Liang; J.; Ding; L.-S. & Liao; X. Lipase ligands in *Nelumbo nucifera* leaves and study of their binding mechanism. *J. Agric. Food Chem.* **62** (44): 10679–10686, 2014.
 64. Li; Y.; Chen; Y.; Xiao; C.; Chen; D.; Xiao; Y. & Mei; Z. Rapid screening and identification of α -amylase inhibitors from *Garcinia xanthochymus* using enzyme-immobilized magnetic nanoparticles coupled with HPLC and MS. *J. Chromatogr. B* **960** 166–173, 2014.
 65. Zhang; Y.; Shi; S.; Chen; X. & Peng; M. Functionalized magnetic nanoparticles coupled with mass spectrometry for screening and identification of cyclooxygenase-1 inhibitors from natural products. *J. Chromatogr. B* **960** 126–132, 2014.
 66. Singh; N.; Ravichandran; S.; Spelman; K.; Fugmann; S. D. & Moaddel; R. The identification of a novel SIRT6 modulator from *Trigonella foenum-graecum* using ligand fishing with protein coated magnetic beads. *J. Chromatogr. B* **968** 105–111, 2014.
 67. Liu; Q.; Shi; S.; Liu; L.; Yang; H.; Su; W. & Chen; X. Separation and purification of bovine serum albumin binders from *Fructus polygoni orientalis* using off-line two-dimensional complexation high-speed counter-current chromatography target-guided by ligand fishing. *J. Chromatogr. A* **1304** 183–193, 2013.
 68. Qing; L.-S.; Xue; Y.; Zheng; Y.; Xiong; J.; Liao; X.; Ding; L.-S.; Li; B.-G. & Liu; Y.-M. Ligand fishing from *Dioscorea nipponica* extract using human serum albumin functionalized magnetic nanoparticles. *J. Chromatogr. A* **1217** (28): 4663–4668, 2010.
 69. Qing; L.-S.; Xue; Y.; Deng; W.-L.; Liao; X.; Xu; X.-M.; Li; B.-G. & Liu; Y.-M. Ligand fishing with functionalized magnetic nanoparticles coupled with mass spectrometry for herbal medicine analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* **399** (3): 1223–1231, 2011.
 70. Qing; L.-S.; Shan; X.-Q.; Xu; X.-M.; Xue; Y.; Deng; W.-L.; Li; B.-G.; Wang; X.-L. & Liao; X. Rapid probe and isolation of bioactive compounds from *Dioscorea*

- panthaica* using human serum albumin functionalized magnetic nano-particles (HSA-MNPs)-based ligand fishing coupled with electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **24** (22): 3335–3339, 2010.
71. Dixon; D. P. & Edwards; R. Roles for stress-inducible lambda glutathione transferases in flavonoid metabolism in plants as identified by ligand fishing. *J. Biol. Chem.* **285** (47): 36322–36329, 2010.
 72. Bilal; M.; Zhao; Y.; Rasheed; T. & Iqbal; H. M. N. Magnetic nanoparticles as versatile carriers for enzymes immobilization: A review. *Int. J. Biol. Macromol.* **120** 2530–2544, 2018.
 73. Alexander; S. P.; Fabbro; D.; Kelly; E.; Marrion; N. V; Peters; J. A.; Faccenda; E.; Harding; S. D.; Pawson; A. J.; Sharman; J. L.; Southan; C. & Davies; J. A. The concise guide to pharmacology 2017/18: Enzymes. *Br. J. Pharmacol.* **174** S272–S359, 2017.
 74. Musharraf; S. G.; Bhatti; M. S.; Choudhary; M. I. & Rahman; A. Screening of inhibitors of angiotensin-converting enzyme (ACE) employing high performance liquid chromatography-electrospray ionization triple quadrupole mass spectrometry (HPLC-ESI-QqQ-MS). *Eur. J. Pharm. Sci.* **101** 182–188, 2017.
 75. Guido; R. V. C.; Andricopulo; A. D. & Oliva; G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. *Estud. Avançados* **24** (70): 81–98, 2010.
 76. Copeland; R. A.; Harpel; M. R. & Tummino; P. J. Targeting enzyme inhibitors in drug discovery. *Expert Opin. Ther. Targets* **11** (7): 967–978, 2007.
 77. Santos; A.; Branquinha; M.; D’Avila-Levy; C.; Kneipp; L. & Sodr e; C. Proteins and Proteomics of *Leishmania* and *Trypanosoma*. Springer, 2014, p 392.
 78. Visek; W. J. Arginine and disease states. *J. Nutr.* **115** (4): 532–541, 1985.
 79. Munder; M. Arginase: an emerging key player in the mammalian immune system. *Br. J. Pharmacol.* **158** (3): 638–651, 2009.
 80. D’Antonio; E. L.; Ullman; B.; Roberts; S. C.; Dixit; U. G.; Wilson; M. E.; Hai; Y. & Christianson; D. W. Crystal structure of arginase from *Leishmania mexicana* and implications for the inhibition of polyamine biosynthesis in parasitic infections. *Arch. Biochem. Biophys.* **535** (2): 163–176, 2013.
 81. Camargo; E. P.; Coelho; J. A.; Moraes; G. & Figueiredo; E. N. *Trypanosoma spp.*, *Leishmania spp.* and *Leptomonas spp.*: Enzymes of ornithine-arginine metabolism. *Exp. Parasitol.* **46** (2): 141–144, 1978.

82. Roberts; S. C.; Tancer; M. J.; Polinsky; M. R.; Gibson; K. M.; Heby; O. & Ullman; B. Arginase plays a pivotal role in polyamine precursor metabolism in *Leishmania*. *J. Biol. Chem.* **279** (22): 23668–23678, 2004.
83. Pegg; A. E. Regulation of ornithine decarboxylase. *J. Biol. Chem.* **281** (21): 14529–14532, 2006.
84. Muxel; S. M.; Aoki; J. I.; Fernandes; J. C. R.; Laranjeira-Silva; M. F.; Zampieri; R. A.; Acuña; S. M.; Müller; K. E.; Vanderlinde; R. H. & Floeter-Winter; L. M. Arginine and polyamines fate in *Leishmania* infection. *Front. Microbiol.* **8** 2018.
85. Balaña-Fouce; R.; Calvo-Álvarez; E.; Álvarez-Velilla; R.; Prada; C. F.; Pérez-Pertejo; Y. & Reguera; R. M. Role of trypanosomatid's arginase in polyamine biosynthesis and pathogenesis. *Mol. Biochem. Parasitol.* **181** (2): 85–93, 2012.
86. Di Gioia; S.; Sardo; C.; Castellani; S.; Porsio; B.; Belgiovine; G.; Carbone; A.; Giammona; G. & Cavallaro; G. From genesis to revelation: the role of inflammatory mediators in chronic respiratory diseases and their control by nucleic acid-based drugs. *Curr. Drug Deliv.* **14** (12): 253–271, 2016.
87. Das; P.; Lahiri; A.; Lahiri; A. & Chakravorty; D. Modulation of the arginase pathway in the context of microbial pathogenesis: a metabolic enzyme moonlighting as an immune modulator. *PLoS Pathog.* **6** (6): e1000899, 2010.
88. Colotti; G. & Ilari; A. Polyamine metabolism in *Leishmania*: from arginine to trypanothione. *Amino Acids* **40** (2): 269–285, 2011.
89. Iniesta; V.; Gómez-Nieto; L. C. & Corraliza; I. The inhibition of arginase by N- ω -hydroxy-L-arginine controls the growth of *Leishmania* inside macrophages. *J. Exp. Med.* **193** (6): 777–784, 2001.
90. Kropf; P.; Fuentes; J. M.; Fähnrich; E.; Arpa; L.; Herath; S.; Weber; V.; Soler; G.; Celada; A.; Modolell; M. & Müller; I. Arginase and polyamine synthesis are key factors in the regulation of experimental leishmaniasis in vivo. *FASEB J.* **19** (8): 1000–1002, 2005.
91. Jean-Robert Ioset & Chatelain. Drug discovery and development for neglected diseases: the DNDi model. *Drug Des. Devel. Ther.* **5** 175–181, 2011.
92. Fundação Oswaldo Cruz. Leishmaniose. 2013. Available at: <https://agencia.fiocruz.br/leishmaniose>. (Accessed: 16th February 2019)
93. Ilari; A.; Fiorillo; A.; Genovese; I. & Colotti; G. Polyamine-trypanothione pathway: an update. *Future Med. Chem.* **9** (1): 61–77, 2017.
94. R. Blanco; V. & M. Nascimento-Júnior; N. Leishmaniasis: general aspects

- related with the disease, the parasite cycle, available drugs, novel prototypes and vaccines. *Rev. Virtual Química* **9** (3): 861–876, 2017.
95. Phlebotominae. 2018. Disponível em: <<https://pt.wikipedia.org/wiki/Phlebotominae>.> Acesso em: 16 de fevereiro de 2019.
 96. Akhoundi; M.; Kuhls; K.; Cannet; A.; Votýpka; J.; Marty; P.; Delaunay; P. & Sereno; D. A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **10** (3): e0004349, 2016.
 97. Chappuis; F.; Sundar; S.; Hailu; A.; Ghalib; H.; Rijal; S.; Peeling; R. W.; Alvar; J. & Boelaert; M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat. Rev. Microbiol.* **5** (11): 873–882, 2007.
 98. Torres-Guerrero; E.; Quintanilla-Cedillo; M. R.; Ruiz-Esmenjaud; J. & Arenas; R. Leishmaniasis: a review. *F1000Research* **6** 750, 2017.
 99. World Health Organization. Leishmaniasis. 2018. Disponível em: <<https://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>.> Acesso em 16 de fevereiro de 2019.
 100. Plimmer; H. G. & Thomson; J. D. Further results of the experimental treatment of trypanosomiasis in rats: being a progress report of a committee of the royal society. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **80** (536): 1–10, 1908.
 101. Silberstein; A. Conformational analysis of amphotericin B-cholesterol channel complex. *J. Membr. Biol.* **162** (2): 117–126, 1998.
 102. Smorenburg; C. H.; Seynaeve; C.; Bontenbal; M.; Planting; A. S. T.; Sindermann; H. & Verweij; J. Phase II study of miltefosine 6% solution as topical treatment of skin metastases in breast cancer patients. *Anticancer. Drugs* **11** (10): 825–828, 2000.
 103. Petri; W. A. Therapy of intestinal protozoa. *Trends Parasitol.* **19** (11): 523–526, 2003.
 104. Amato; V. S.; Tuon; F. F.; Bacha; H. A.; Neto; V. A. & Nicodemo; A. C. Mucosal leishmaniasis. *Acta Trop.* **105** (1): 1–9, 2008.
 105. No; J. H. Visceral leishmaniasis: Revisiting current treatments and approaches for future discoveries. *Acta Trop.* **155** 113–123, 2016.
 106. Kapil; S.; Singh; P. K. & Silakari; O. An update on small molecule strategies targeting leishmaniasis. *Eur. J. Med. Chem.* **157** 339–367, 2018.

107. Fanos; V. & Cataldi; L. Renal transport of antibiotics and nephrotoxicity: a review. *J. Chemother.* **13** (5): 461–472, 2001.
108. Hamill; R. J. Amphotericin B formulations: a comparative review of efficacy and toxicity. *Drugs* **73** (9): 919–934, 2013.
109. Wong-Beringer; A.; Jacobs; R. A. & Guglielmo; B. J. Lipid formulations of amphotericin B: alinical efficacy and toxicities. *Clin. Infect. Dis.* **27** (3): 603–618, 1998.
110. Sundar; S.; Singh; A.; Rai; M.; Prajapati; V. K.; Singh; A. K.; Ostyn; B.; Boelaert; M.; Dujardin; J.-C. & Chakravarty; J. Efficacy of miltefosine in the treatment of visceral leishmaniasis in India after a decade of use. *Clin. Infect. Dis.* **55** (4): 543–550, 2012.
111. Iu Moskalenko; N. & N Pershin; G. Comparative study of the chemotherapeutic effect of paromomycin and monomycin in experimental cutaneous leishmaniasis in albino mice. *Farmak. i toksik.* **29** (1966).
112. da Silva; E. R.; Brogi; S.; Grillo; A.; Campiani; G.; Gemma; S.; Vieira; P. C. & Maquiaveli; C. C. Cinnamic acids derived compounds with antileishmanial activity target *Leishmania amazonensis* arginase. *Chem. Biol. Drug Des.* **93** (2): 139–146, 2019.
113. de Sousa; L. R. F.; Ramalho; S. D.; Burger; M. C. D. M.; Nebo; L.; Fernandes; J. B.; da Silva; M. F. das G. F.; Iemma; M. R. D. C.; Corrêa; C. J.; Souza; D. H. F. De; Lima; M. I. S. & Vieira; P. C. Isolation of arginase inhibitors from the bioactivity-guided fractionation of *Byrsonima coccolobifolia* leaves and stems. *J. Nat. Prod.* **77** (2): 392–396, 2014.
114. Sousa; L. R. F. de; Ramalho; S. D.; Fernandes; J. B.; Silva; M. F. das G. F. da; Iemma; M. R. da C.; Corrêa; C. J.; Souza; D. H. F. de; Lima; M. I. S. & Vieira; P. C. Leishmanicidal galloylquinic acids are noncompetitive inhibitors of arginase. *J. Braz. Chem. Soc.* **25** 1832–1838, 2014.
115. Girard-Thernier; C.; Pham; T.-N. & Demougeot; C. The promise of plant-derived substances as inhibitors of arginase. *Mini-Reviews Med. Chem.* **15** (10): 798–808, 2015.
116. Maquiaveli; C. C.; Lucon-Júnior; J. F.; Brogi; S.; Campiani; G.; Gemma; S.; Vieira; P. C. & Silva; E. R. Verbascoside inhibits promastigote growth and arginase activity of *Leishmania amazonensis*. *J. Nat. Prod.* **79** (5): 1459–1463, 2016.

117. Cruz; E. de M.; da Silva; E. R.; Maquiaveli; C. D. C.; Alves; E. S. S.; Lucon; J. F.; Reis; M. B. G. Dos; Toledo; C. E. M. De; Cruz; F. G. & Vannier-Santos; M. A. Leishmanicidal activity of *Cecropia pachystachya* flavonoids: Arginase inhibition and altered mitochondrial DNA arrangement. *Phytochemistry* **89** 71–77, 2013.
118. Manjolin; L. C.; dos Reis; M. B. G.; Maquiaveli; C. do C.; Santos-Filho; O. A. & da Silva; E. R. Dietary flavonoids fisetin, luteolin and their derived compounds inhibit arginase, a central enzyme in *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. *Food Chem.* **141** (3): 2253–2262, 2013.
119. dos Reis; M. B. G.; Manjolin; L. C.; Maquiaveli; C. do C.; Santos-Filho; O. A. & da Silva; E. R. Inhibition of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and rat arginases by green tea EGCG, (+)-Catechin and (–)-Epicatechin: A comparative structural analysis of enzyme-inhibitor interactions. *PLoS One* **8** (11): e78387, 2013.
120. LAEMMLI; U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227** (5259): 680–685, 1970.
121. Bradford; M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72** (1–2): 248–254, 1976.
122. Snyder; L. R. & Dolan; J. W. Optimizing selectivity during reversed-phase high performance liquid chromatography method development: Prioritizing experimental conditions. *J. Chromatogr. A* **1302** 45–54, 2013.
123. Marchand; D. H.; Snyder; L. R. & Dolan; J. W. Characterization and applications of reversed-phase column selectivity based on the hydrophobic-subtraction model. *J. Chromatogr. A* **1191** (1–2): 2–20, 2008.
124. Vanzolini; K. L.; da F. Sprenger; R.; Leme; G. M.; de S. Moraes; V. R.; Vilela; A. F. L.; Cardoso; C. L. & Cass; Q. B. Acetylcholinesterase affinity-based screening assay on *Lippia gracilis* Schauer extracts. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **153** 232–237, 2018.
125. Guilhon-Simplicio; F. & Pereira; M. de M. Aspectos químicos e farmacológicos de *Byrsonima* (Malpighiaceae). *Quim. Nova* **34** (6): 1032–1041, 2011.
126. de Abreu; M. B.; Temraz; A.; Vassallo; A.; Braca; A. & De Tommasi; N. Phenolic glycosides from *Tabebuia argentea* and *Catalpa bignonioides*. *Phytochem. Lett.* **7** 85–88, 2014.

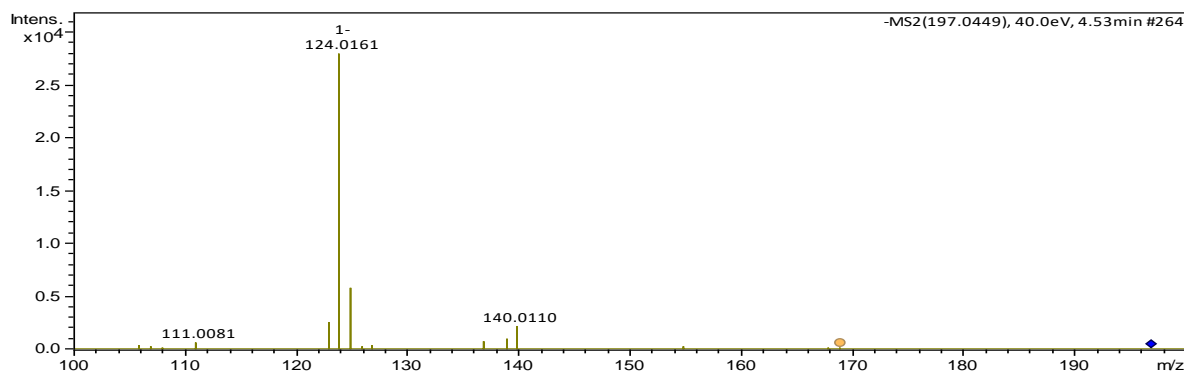
127. Suo; M.; Isao; H.; Kato; H.; Takano; F. & Ohta; T. Anti-inflammatory constituents from *Tabebuia avellanedae*. *Fitoterapia* **83** (8): 1484–1488, 2012.
128. Acker; M. G. & Auld; D. S. Considerations for the design and reporting of enzyme assays in high-throughput screening applications. *Perspect. Sci.* **1** (1–6): 56–73, 2014.
129. van Dyk; M.; Mangoni; A. A.; McEvoy; M.; Attia; J. R.; Sorich; M. J. & Rowland; A. Targeted arginine metabolomics: A rapid, simple UPLC-QToF-MSE based approach for assessing the involvement of arginine metabolism in human disease. *Clin. Chim. Acta* **447** 59–65, 2015.
130. Migneault; I.; Dartiguenave; C.; Bertrand; M. J. & Waldron; K. C. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *Biotechniques* **37** (5): 790–802, 2004.
131. Nelson, D. L.; Cox, M. M. *Princípios de bioquímica de Lehninger*. Artmed, 2011. 6. ed. 1328 p.
132. MetFrag. Disponível em: <<https://msbi.ipb-halle.de/MetFragBeta/>> Acesso em 07 de março de 2019.
133. Global Natural Product Social Molecular Networking (GNPS). Disponível em: <<https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/static/gnps-splash.jsp>> Acesso em: 7 de março de 2019.
134. PubChem. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>> Acesso em: 07 de março de 2019.
135. ChemSpider. Disponível em: <<http://www.chemspider.com/>> Acesso em: 07 de março de 2019.
136. Vukics; V. & Guttman; A. Structural characterization of flavonoid glycosides by multi-stage mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* **29** (1): 1-16, 2010.
137. Cuyckens; F. & Claeys; M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *J. Mass Spectrom.* **39** (1): 1–15, 2004.
138. LIU; G.-Q.; DONG; J.; WANG; H.; WAN; L.-R.; HASHI; Y. & CHEN; S.-Z. ESI Fragmentation studies of four tea catechins. *Chem. J. Chinese Univ.* **30** (8): 1566–1570, 2009.
139. Ma; Y. L.; Li; Q. M.; Van den Heuvel; H. & Claeys; M. Characterization of flavone and flavonol aglycones by collision-induced dissociation tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **11** (12): 1357–1364, 1997.
140. Waridel; P.; Wolfender; J.-L.; Ndjoko; K.; Hobby; K. R.; Major; H. J. &

- Hostettmann; K. Evaluation of quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry and ion-trap multiple-stage mass spectrometry for the differentiation of C-glycosidic flavonoid isomers. *J. Chromatogr. A* **926** (1): 29–41, 2001.
141. Wolfender; J.-L.; Waridel; P.; Ndjoko; K.; Hobby; K. R.; Major; H. J. & Hostettmann; K. Evaluation of Q-TOF-MS/MS and multiple stage IT-MS n for the dereplication of flavonoids and related compounds in crude plant extracts. *Analisis* **28** (10): 895–906, 2000.
142. de Rijke; E.; Zappey; H.; Ariese; F.; Gooijer; C. & Brinkman; U. A. T. Liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization and electrospray ionization mass spectrometry of flavonoids with triple-quadrupole and ion-trap instruments. *J. Chromatogr. A* **984** (1): 45–58, 2003.
143. Junior Lucon; J. F. Estudo da atividade inibitória de extratos vegetais, flavonoides e derivados do ácido cafeico sobre a enzima arginase de *Leishmania* (*Leishmania*) amazonensis. Piracicaba, Programa de Pós-graduação em Biociência Animal – USP, 2016. Tese de doutorado, 98p.
144. Baell; J. B. Feeling nature's PAINS: natural products, natural product drugs, and pan assay interference compounds (PAINS). *J. Nat. Prod.* **79** (3): 616–628, 2016.
145. Zinglé; C.; Tritsch; D.; Grosdemange-Billiard; C. & Rohmer; M. Catechol-rhodanine derivatives: Specific and promiscuous inhibitors of *Escherichia coli* deoxyxylulose phosphate reductoisomerase (DXR). *Bioorg. Med. Chem.* **22** (14): 3713–3719, 2014.
146. Tritsch; D.; Zinglé; C.; Rohmer; M. & Grosdemange-Billiard; C. Flavonoids: True or promiscuous inhibitors of enzyme? The case of deoxyxylulose phosphate reductoisomerase. *Bioorg. Chem.* **59** 140–144, 2015.

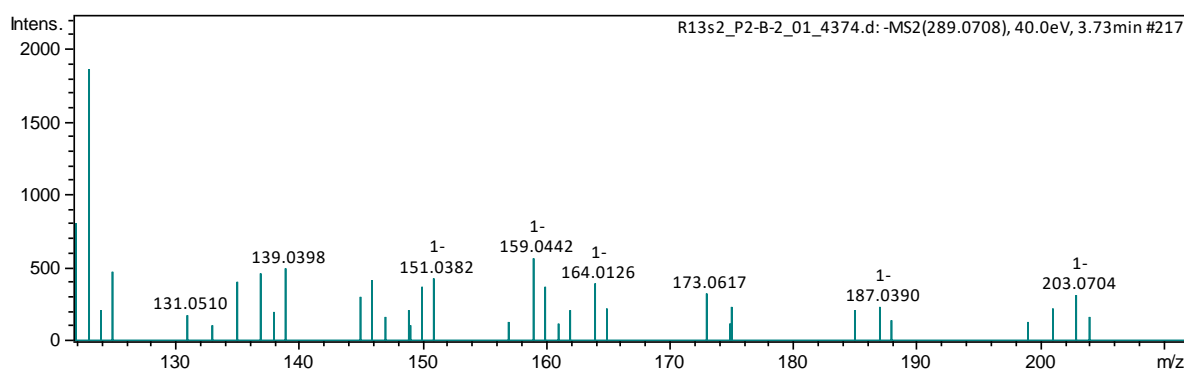
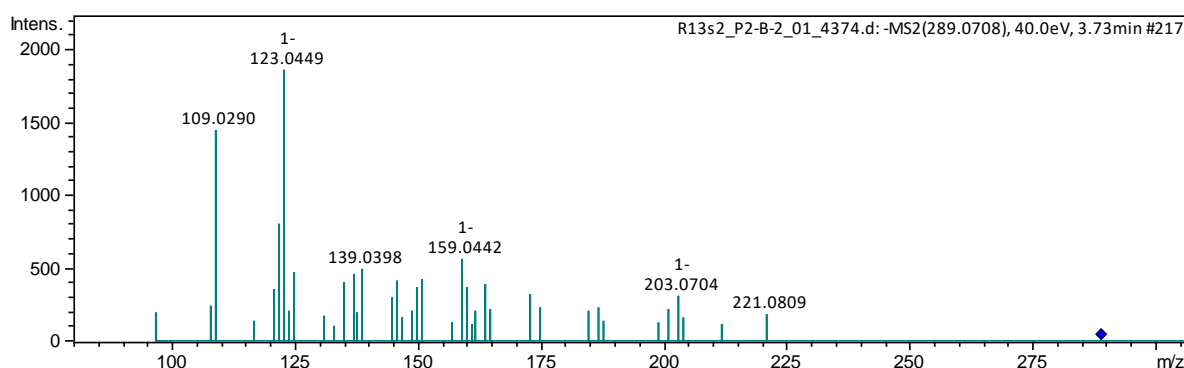
Anexo

Anexo 1: Espectro de massas dos compostos pescados no ensaio utilizando o extrato de R13F.

Composto 1 – Galato de etila

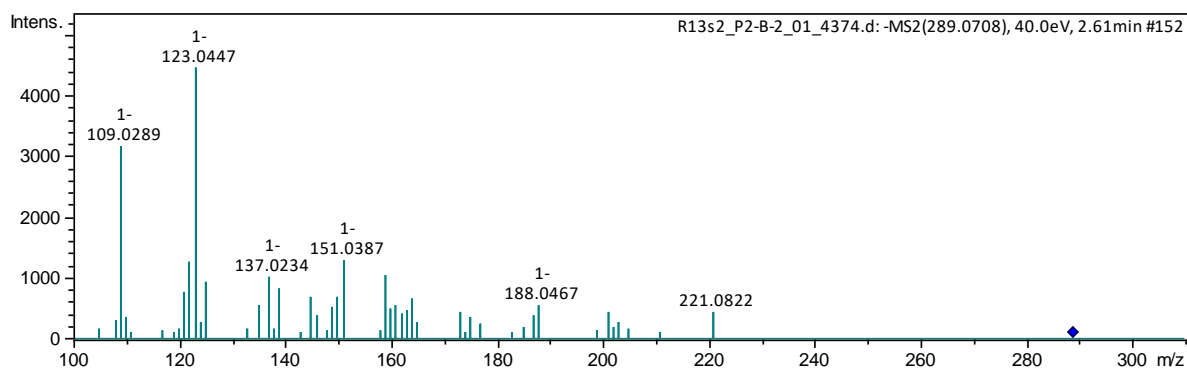


Composto 2 - Epicatequina



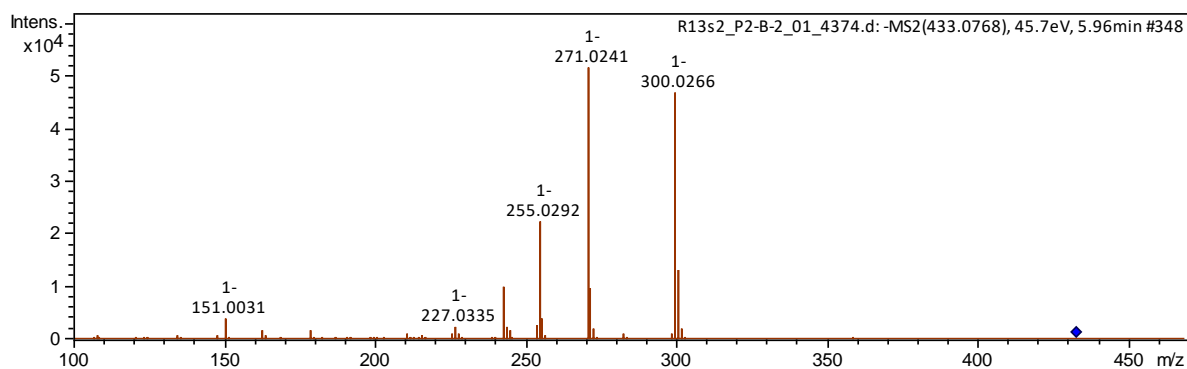
B_0^-	109,0290
$^{1,3}A_0$	137,0249
$^{1,3}B_0$	151,0382

Composto 3 - Catequina



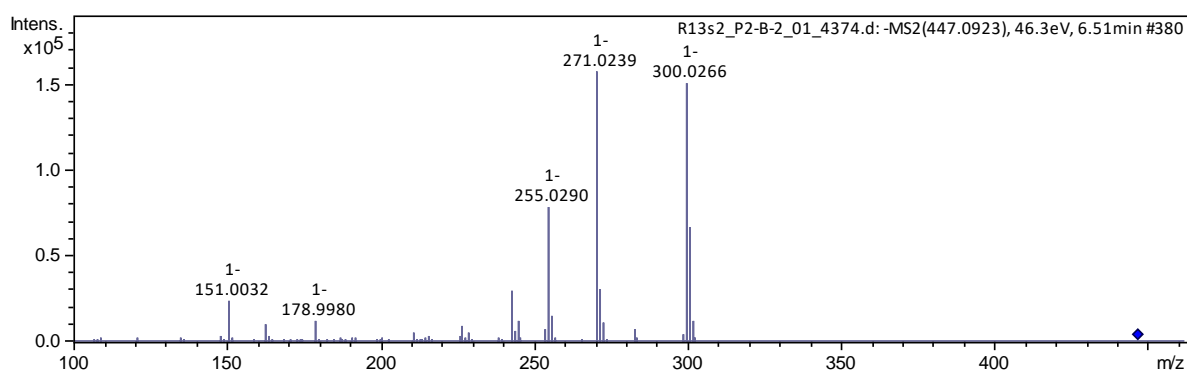
B_0^-	109,0289
$1,3A_0^-$	137,0234
$1,3B_0^-$	151,0387
$[1,3A-CO]^-$	123,0447

Composto 4 - Quercetina-3-O-pentosídeo



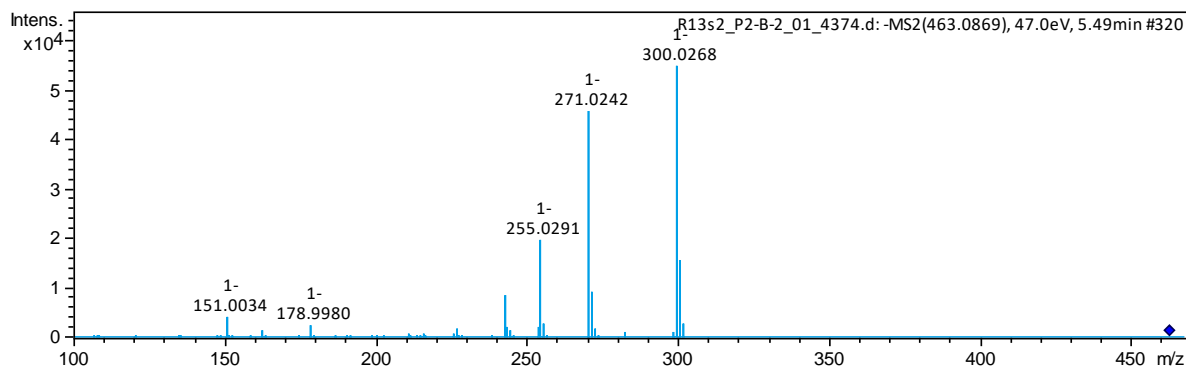
B_0^-	109,0290
$1,3A_0^-$	151,0032
$[M-H-pentose]^-$	300,0266
$[Y_0-2H-CO]^-$	271,0241

Composto 5 - Quercetina-3-O-rhamnoside



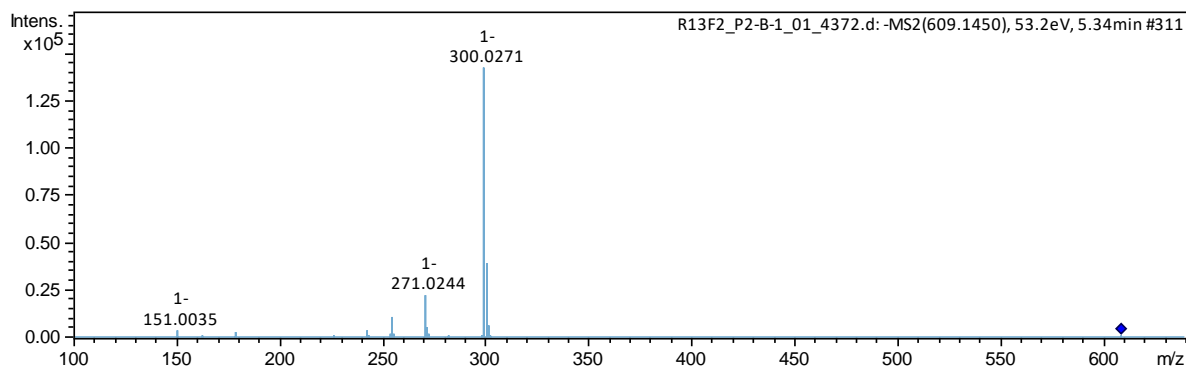
B_0^-	109,0290
$1,3A_0^-$	151,0032
$[M-H\text{-deoxyhexose}]^-$	300,0266
$[Y_0\text{-2H-CO}]^-$	271,0239

Composto 6 - Quercetina-3-O-hexosídeo



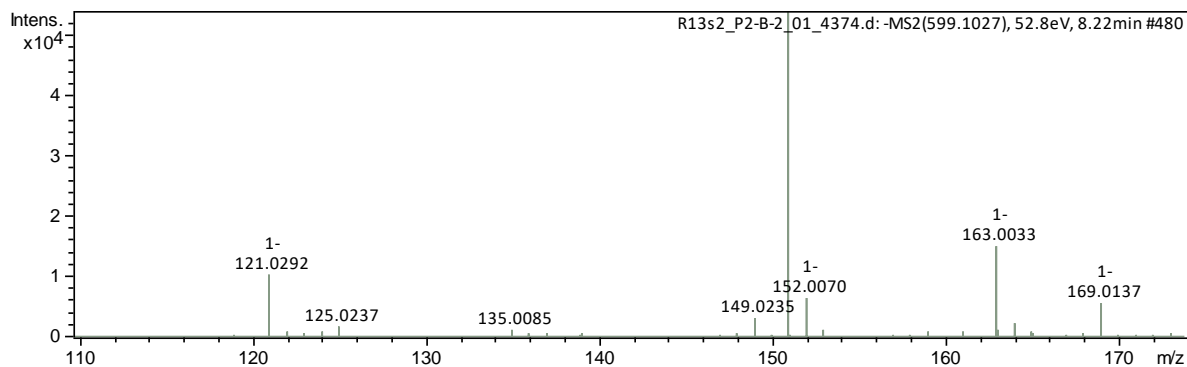
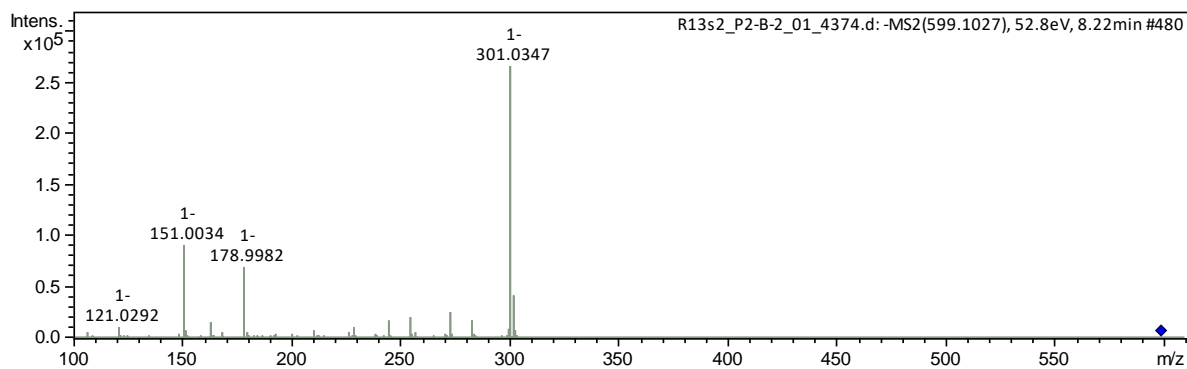
B_0^-	109,0285
$1,3A_0^-$	151,0034
$[M-H\text{-hexose}]^-$	300,0268
$[Y_0\text{-2H-CO}]^-$	271,0242

Composto 7 - Quercetina-3-O-hexosídeo-deoxihexosídeo



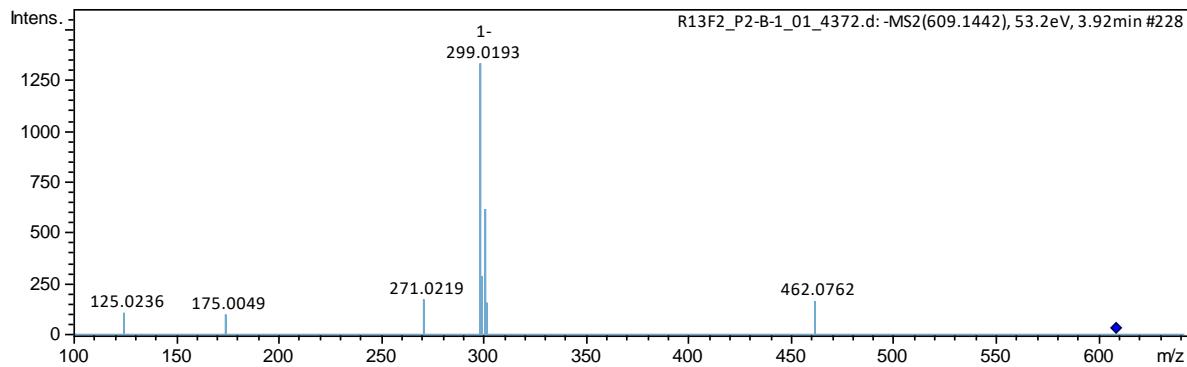
B_0^-	109,0292
$1,3A_0^-$	151,0032
$[M-H\text{-deoxyhexose-hexose}]^-$	300,0271
$[Y_0\text{-2H-CO}]^-$	271,0244

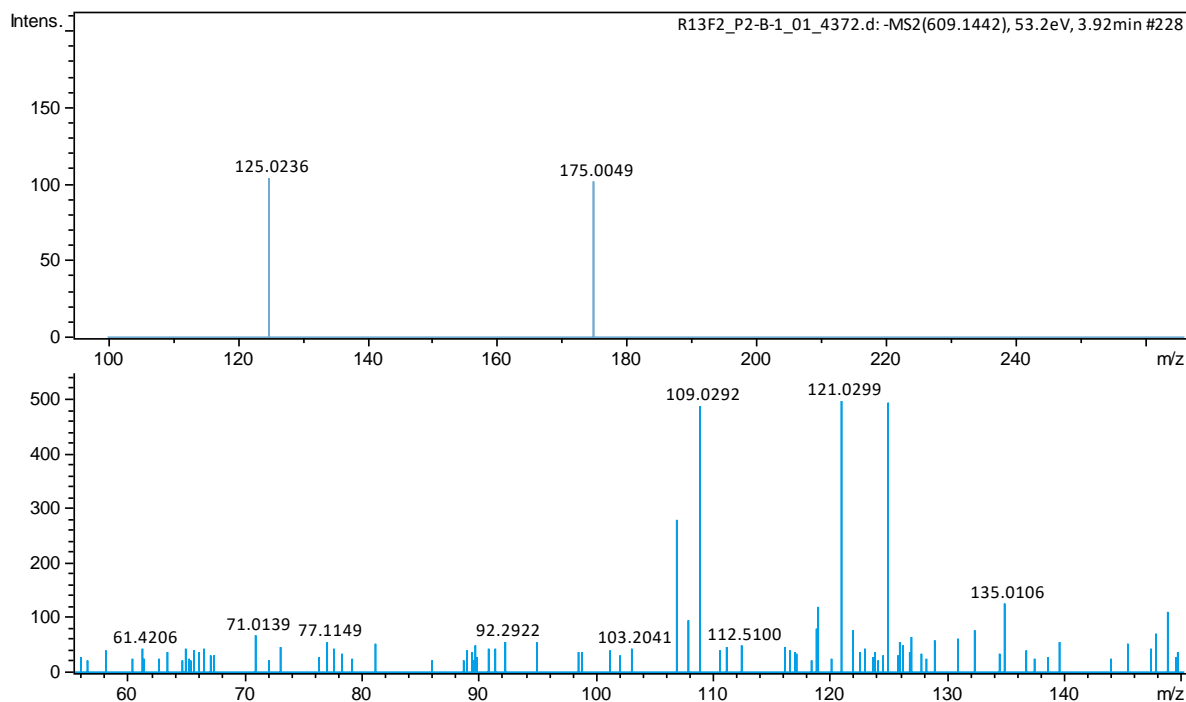
Composto 7 - Quercetina-3-O-(O-galoil)-deoxihexosídeo



B ₀ ⁻	109,0283
^{1,3} A ₀ ⁻	151,0032
[M-deoxyhexose-ácido gálico-H] ⁻	301,0266
[Y ₀ -CO] ⁻	273,0231
[Ácido gálico] ⁻	169,0137

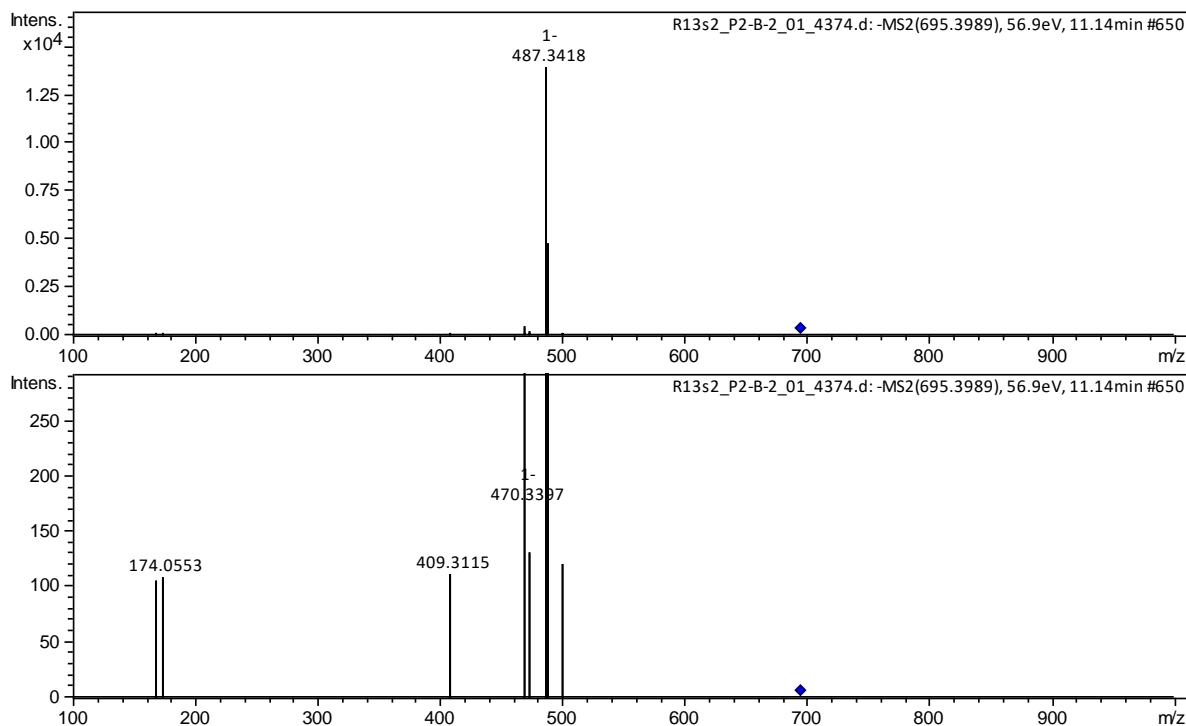
Composto 9 - Quercetina-3-O-deoxihexosídeo-7-O-hexosídeo



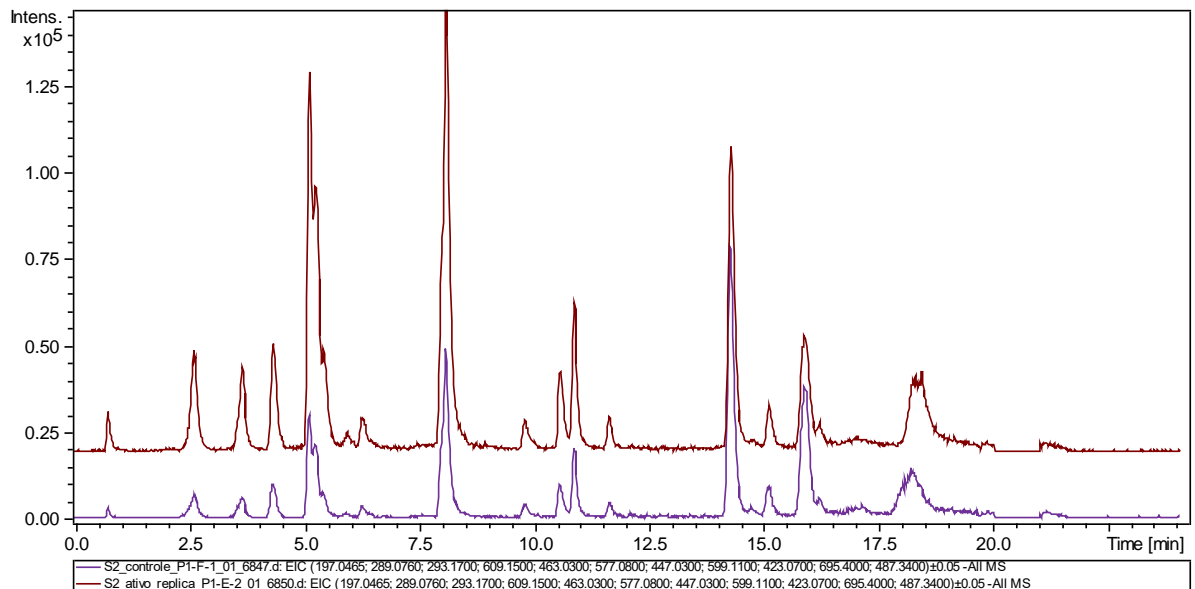
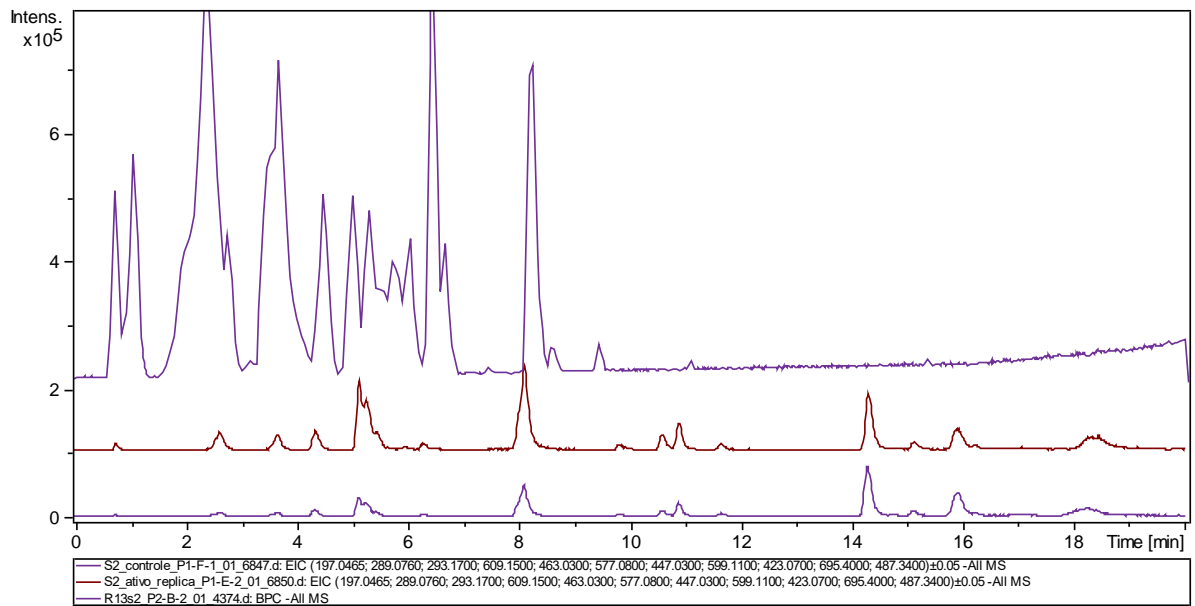


[Y ₀] ⁻	301,0267
[M-2H-deoxyhexose-hexose] ⁻	299,0193
[M-deoxyhexose] ⁻	462,0762
[Y ₀ -2H-CO] ⁻	271,0279

Espectro de massas dos 2 compostos de massa 695,3989 (desconhecidos)



Cromatogramas do ensaio de ligand fishing para o extrato de R13F.



*linha vermelha corresponde ao S2 MB-Arg

*linha azul corresponde ao S2 MB-ArgC

*linha rosa corresponde ao Extrato

Análises do ensaio de fishing para o extrato R13F.

Tr (min)	Área 1 MB- Arg	Área 2 MB- Arg	Média área MB- Arg	Área 1 MB- ArgC	Área 2 MB-ArgC	Média área MB-ArgC	R. Af.*	[M-H]
2,67	296298	309112	302705	83503	214481	148992	2,03	289,0805
3,59	62448	74707	68577,5	19812	54307	37059,5	1,85	289,0805
3,7	129971	185370	157670,5	39159	80204	59681,5	2,64	609,1613
5,15	1103441	1234742	1169091,5	331369	664199	497784	2,35	609,1613
5,33	2255823	2418386	2337104,5	667290	1050101	858695,5	2,72	463,1002
5,89	2153402	2468275	2310838,5	740691	1027667	884179	2,61	433,0887
6,3	3545077	3735289	3640183	1221550	2425402	1823476	2,00	447,1045
8,12	1410194	1468787	1439490,5	510998	584692	547845	2,63	599,1181
9,85	68990	77944	73467	31155	45118	38136,5	1,93	423,0817
10,57	107308	86500	96904	28382	60436	44409	2,18	695,4156
10,59	75871	122512	99191,5	55412	75298	65355	1,52	423,0817
10,88	321315	317276	319295,5	143797	271181	207489	1,54	695,4156
11,67	70193	74098	72145,5	29687	51898	40792,5	1,77	695,4156
14,28	623059	838081	730570	699421	893775	796598	0,92	293,1825
15,12	112129	97345	104737	79565	71868	75716,5	1,38	487,3523
15,86	358228	243547	300887,5	238863	209905	224384	1,34	487,3523
15,94	160827	169809	165318	191447	152812	172129,5	0,96	293,1825
16,22	28418	32669	30543,5	20922	18449	19685,5	1,55	487,3523
4,44	264452	261812	263132	99970	77398	88684	2,97	197,0465

*R. Af.: Razão de afinidade entre a partícula ativa e inativa (calculada pela equação 1).

Análises do ensaio de fishing para o extrato R24R.

Tr (min)	Área 1 MB- Arg	Área 2 MB-Arg	Média área MB-Arg	Área 1 MB- ArgC	Área 2 MB- ArgC	Média área MB- ArgC	R. Af.*	[M-H]
2.67	196225	191399	193812	443423	436410	439916,5	0,44	389,123
2.94	238072	180152	209112	70331	75608	72969,5	2,87	259,0605
4.70	106585	97294	101939,5	154958	140693	147825,5	0,69	353,1017
7.98	133037	139252	136144,5	18157	16225	17191	7,92	599,323
8.48	123895	122509	123202	11045	11967	11506	10,71	599,323
8.96	150999	160517	155758	18401	20060	19230,5	8,10	599,323
9.24	683400	703417	693408,5	253251	349426	301338,5	2,30	293,1754
10.27	938519	1073472	1005995,5	23371	88594	55982,5	17,97	293,1754
12.62	73753	84586	79169,5	23754	18534	21144	3,74	293,1754
9.01	239753	125943	182848	666936	629468	648202	0,28	517,3161
7.98	78098	83566	80832	759426	718866	739146	0,11	549,3416
8.48	84751	88001	86376	744545	733218	738881,5	0,12	549,3416
8.96	80896	83552	82224	737643	722099	729871	0,11	549,3416
8.04	129341	47983	88662	19264	20027	19645,5	4,51	677,301
8.53	84751	39959	62355	31521	35287	33404	1,87	677,301
8.97	278068	49508	163788	0	0	0	-**	677,301
9.89	298267	334653	316460	1261871	1269421	1265646	0,25	487,3419
10.42	1271808	1324798	1298303	5555380	5791332	5673356	0,23	487,3419
11.37	209750	250269	230009,5	738826	827723	783274,5	0,29	487,3419
9.89	332094	315186	323640	1912789	1931270	1922029,5	0,17	533,3474

Continua

Continuação da tabela do ensaio com o R24R

9.88	627950	602846	615398	56364	56183	56273,5	10,94	583,3295
10.44	1998295	2031621	2014958	152680	159822	156251	12,90	583,3295
11.39	417138	361204	389171	31171	28128	29649,5	13,13	583,3295
9.88	172037	169314	170675,5	0	0	0	-	661,3094
10.45	433228	472792	453010	0	0	0	-	661,3094
11.37	85259	95770	90514,5	0	0	0	-	661,3094
10.56	700724	628084	664404	254646,4	627423	441034,7	1,51	325,0713
11.24	3740025	3652860	3696442,5	5200699	6203579	5702139	0,65	779,1926
12.02	599162	691368	645265	5163241	4920958	5042099,5	0,13	564,3297
11.53	588882	463425	526153,5	0	0	0	-	311,1681
11.90	114880	122586	118733	1231053	1186308	1208680,5	0,10	476,2779
12.33	211172	211248	211210	189017,5	194731	191874,25	1,10	619,2048
12.96	506888	537158	522023	0	0	0	-	645,3117
12.98	2229903	2308457	2269180	0	0	0	-	567,3348
11.75	220539	203925	212232	676171,4	724249	700210,2	0,30	293,2115
13.37	711886	710093	710989,5	1794574,4	1726663	1760618,7	0,40	293,2115
14.78	294483	172105	233294	139296,8	154745	147020,9	1,59	543,331
15.00	167833	173933	170883	282349,6	276222	279285,8	0,61	435,1802
15.60	151845	169452	160648,5	2100324,3	2050516	2075420,15	0,08	399,2744

*R. Af.: Razão de afinidade entre a partícula ativa e inativa (calculada pela equação 1).

** substância retida apenas pela MB-Arg.

