



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**  
**PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**IZABEL PESQUEIRA RIBEIRO DE ARAÚJO**

**BUSCA DE INIBIDORES DE CISTEÍNO PROTEASES EM  
ESPÉCIES DE *Passiflora* UTILIZANDO ISOLAMENTO  
BIOGUIADO**

***SEARCH FOR CYSTEINE PROTEASE INHIBITORS IN *Passiflora*  
SPECIES USING BIOGUIDED ISOLATION***



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**  
**PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**IZABEL PESQUEIRA RIBEIRO DE ARAÚJO**

**BUSCA DE INIBIDORES DE CISTEÍNO PROTEASES EM**  
**ESPÉCIES DE *Passiflora* UTILIZANDO ISOLAMENTO**  
**BIOGUIADO**

Dissertação de Mestrado apresentado  
ao Programa de Pós-Graduação em  
Química, da Universidade Federal de  
Sergipe, para a obtenção do título de  
Mestre em Química.

**Orientador:** Prof. Dr. James Almada da Silva

***SEARCH FOR CYSTEINE PROTEASE INHIBITORS IN *Passiflora****  
***SPECIES USING BIOGUIDED ISOLATION***

*Master dissertation presented to the  
Post Graduate Program in Chemistry  
of the Federal University of Sergipe to  
obtain MSc. in Chemistry.*



FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

A663b      Araújo, Izabel Pesqueira Ribeiro de  
Busca de inibidores de cisteino proteases em espécies de  
*Passiflora* utilizando isolamento bioguiado / Izabel Pesqueira  
Ribeiro de Araújo; orientador James Almada da Silva – São  
Cristóvão, SE, 2022.  
147 f. : il.

Dissertação (mestrado em Química) – Universidade Federal de  
Sergipe, 2022.

1. Química. 2. *Passiflora*. 3. Matéria médica vegetal. 4. Fenóis.  
5. Flavonóides. 6. Enzimas proteolíticas. 7. Inibidores enzimáticos.  
I. Silva, James Almada, orient. II. Título.

CDU 543.645.4:615.355



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE  
Programa de Pós-Graduação em Química  
PPGQ



**FOLHA DE APROVAÇÃO**

Membros da Comissão Julgadora da Dissertação de Mestrado de Izabel Pesqueira Ribeiro de Araujo apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Sergipe em 22/11/2022.

Prof. Dr. James Almada da Silva

Departamento de Farmácia do Campus de Lagarto - UFS

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Valéria Regina de Souza Moraes

Departamento de Química - UFS

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Gizelle Angela Barroso Vieira

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sertão Pernambucano -  
IFSertãoPE

**SÃO CRISTÓVÃO - SE**

**Novembro, 2022**

## RESUMO

As cisteíno proteases, catepsinas B, C e K, estão diretamente envolvidas com a depressão e ansiedade e por isso podem ser utilizadas como alvo biológicos na busca de fármacos ansiolíticos. Como espécies de *Passiflora* são utilizadas tradicionalmente para o tratamento da ansiedade, plantas desse gênero apresentam potencial para a busca de inibidores de cisteíno proteases, podendo atuar auxiliando no tratamento da ansiedade. Assim, o objetivo deste trabalho foi isolar inibidores de cisteíno proteases, utilizando a papaína como modelo, por meio do isolamento bioguiado de metabólitos secundários com as espécies *Passiflora cincinnata*, *P. edulis* e *P. foetida*. Os extratos das partes aéreas das espécies foram obtidos por maceração utilizando etanol (1:4, m/v; 72 h). O extrato com maior inibição enzimática foi fracionado por partição líquido-líquido (PLL), utilizando hexano, diclorometano e acetato de etila. A fração com maior inibição enzimática foi submetida a cromatografia líquida clássica (CLC) e posteriormente a subfração mais ativa foi analisada e submetida ao isolamento por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Extratos (125; 250 e 500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), frações e subfrações (500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), e substâncias isoladas (250 à 15,62  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) foram avaliados quanto ao efeito de inibição da papaína, em poços construídos em placa de petri contendo ágar/leite, por método desenvolvido no laboratório. Os compostos fenólicos e flavonoides totais dos extratos foram quantificados em espectrofotômetro utilizando reagente Folin-Ciocalteu e  $\text{AlCl}_3$ , respectivamente. Dentre os extratos das três espécies, observou-se que a *Passiflora foetida* (PF) apresentou a maior inibição enzimática ( $40,1\% \pm 2,16$ ), e que, o extrato dos galhos (PFG) dessa espécie teve o maior percentual de inibição ( $47,2\% \pm 2,55$ ). O PFG apresentou teor de compostos fenólicos e flavonoides de  $49,42 \pm 0,92$  mg EqAG/g, e  $19,39 \pm 1,98$  mg EqQUE/g, respectivamente. Além da presença de flavonoides neste extrato, detectou-se a presença de antraquinonas, alcaloides, triterpenos e ácidos graxos. Como a fração diclorometano (PFGD), obtida do extrato PFG após PLL, apresentou a maior inibição enzimática ( $38,31\% \pm 0,09$ ), ela foi submetida a CLC. A subfração PFGD-E ( $45,83\% \pm 0,79$ ) apresentou um dos melhores resultados de inibição enzimática, e massa suficiente para seguir o processo de isolamento (HPLC), e assim foi selecionada. Após otimização da separação cromatográfica desta subfração obteve-se seis frações (PFGD-E1 a PFGD-E6). O processo de análise por RMN, mostrou que três estavam ainda em mistura (PFGD-E2 a PFGD-E4), e que a classe predominante dessa mistura, são as flavanonas. As outras três frações (PFGD-E1, PFGD-E5, PFGD-E6) foram identificadas como sendo os flavonoides: 5,4'-dihidroxi-7-metoxi-flavonona (E1), 5-hidroxi-7,3',4'-trimetoxi-flavonona (E5) e 5-hidroxi-7,4'-dimetoxi-flavona (E6). As substâncias E5 e E6 ( $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) apresentaram inibição enzimática de  $13,66\% \pm 3,26$  e  $18,73\% \pm 4,27$ , respectivamente, uma baixa inibição quando comparado com a fração PFGD-E ( $45,83\% \pm 0,79$ ). As substâncias E1, E5 e E6 foram submetidas a "docking molecular" com as catepsinas B, C e K, onde se observou uma maior afinidade frente a catepsina C. Em vista disso, conclui-se que a espécie em estudo possui potencial de inibição de cisteíno proteases, entretanto, estas substâncias, isoladamente, não são as maiores responsáveis pela atividade observada nos extratos e frações.

**Palavras-chave:** *Passiflora*, flavonoides, fenóis, protease, inibição enzimática.

## ABSTRACT

The cysteine proteases, cathepsins B, C and K, are directly involved with depression and anxiety and therefore can be used as biological targets in the search for anxiolytic drugs. As *Passiflora* species are traditionally used for the treatment of anxiety, plants of this genus have potential to search for cysteine protease inhibitors, which can improve in the treatment of anxiety. Thus, the objective of this work was to isolate cysteine protease inhibitors, using papain as a model, through bioguided isolation of secondary metabolites with the species *Passiflora cincinnata*, *P. edulis* and *P. foetida*. Extracts of aerial parts of the species were obtained by maceration using ethanol (1:4, m/v; 72 h). The extract with the highest enzymatic inhibition was fractionated by liquid-liquid partition (PLL), using hexane, dichloromethane and ethyl acetate. The fraction with the highest enzymatic inhibition was subjected to classical liquid chromatography (CLC) and later the most active subfraction was analyzed and subjected to isolation by high performance liquid chromatography (HPLC). Extracts (125; 250 and 500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), fractions and subfractions (500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), and substances (250 to 15.62  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) were evaluated for papain inhibition, in wells constructed in a petri dish containing agar/milk, by a method developed in the laboratory. The total phenolic compounds and flavonoids of the extracts were quantified in a spectrophotometer using Folin-Ciocalteu and  $\text{AlCl}_3$  reagents, respectively. Among the extracts of the three species, it was observed that *Passiflora foetida* (PF) presented the highest enzyme inhibition ( $40.1\% \pm 2.16$ ), and that the branches extract (PFG) of this species had the highest percentage of inhibition ( $47.2\% \pm 2.55$ ). The PFG presented phenolic compounds and flavonoids content of  $49.42 \pm 0.92$  mg EqAG/g, and  $19.39 \pm 1.98$  mg EqQUE/g, respectively. In addition to the presence of flavonoids in this extract, anthraquinones, alkaloids, triterpenes and fatty acids was detected. As the dichloromethane fraction (PFGD), obtained from the PFG extract after PLL, showed the highest enzymatic inhibition ( $38.31\% \pm 0.09$ ), it was submitted to CLC. The PFGD-E subfraction ( $45.83\% \pm 0.79$ ) showed one of the best enzymatic inhibition results, and sufficient mass to follow the isolation process (HPLC), and so it was selected. After optimizing the chromatographic separation of this subfraction, six fractions were obtained (PFGD-E1 to PFGD-E6). The NMR analysis process showed that three were still in mixture (PFGD-E2 to PFGD-E4), and that the predominant class of this mixture are flavanones. The other three fractions (PFGD-E1, PFGD-E5, PFGD-E6) were identified as flavonoids: 5,4'-dihydroxy-7-methoxy-flavanone (E1), 5-hydroxy-7,3',4'-trimethoxy-flavanone (E5) and 5-hydroxy-7,4'-dimethoxy-flavone (E6). Substances E5 and E6 (250  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) showed enzyme inhibition of  $13.66\% \pm 3.26$  and  $18.73\% \pm 4.27$ , respectively, a low inhibition when compared to the PFGD-E fraction ( $45.83\% \pm 0.79$ ). Substances E1, E5 and E6 were subjected to molecular docking with cathepsins B, C and K, where a greater affinity towards cathepsin C was observed. In view of this, it is concluded that the species under study has the potential to inhibit cysteine proteases, however, these substances, alone, are not the main responsible for the activity observed in the extracts and fractions.

**Keywords:** *Passionfruit, flavonoids, phenols, protease, enzyme inhibition.*

## SUMÁRIO

|          |                                                                                             |           |
|----------|---------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO</b>                                                                           | <b>1</b>  |
| 1.1      | <i>Passiflora</i>                                                                           | 3         |
| 1.1.1    | PERFIL QUÍMICO                                                                              | 4         |
| 1.1.2    | <i>Passiflora edulis</i>                                                                    | 7         |
| 1.1.3    | <i>Passiflora cincinnata</i>                                                                | 9         |
| 1.1.4    | <i>Passiflora foetida</i>                                                                   | 11        |
| 1.2      | EXTRAÇÃO E ISOLAMENTO BIOGUIADO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM ESPÉCIES DE <i>Passiflora</i> | 14        |
| 1.3      | ENSAIOS BIOQUÍMICOS                                                                         | 15        |
| 1.3.1    | ATIVIDADE ENZIMÁTICA                                                                        | 16        |
| 1.3.2    | CISTEÍNO PROTEASES                                                                          | 17        |
| 1.3.3    | CISTEÍNO PROTEASE ENVOLVIDAS NA DEPRESSÃO                                                   | 19        |
| 1.3.4    | INIBIDORES DE CISTEÍNO PROTEASE                                                             | 21        |
| <b>2</b> | <b>OBJETIVOS</b>                                                                            | <b>23</b> |
| 2.1      | OBJETIVO GERAL                                                                              | 23        |
| 2.2      | OBJETIVOS ESPECÍFICOS                                                                       | 23        |
| <b>3</b> | <b>METODOLOGIA</b>                                                                          | <b>24</b> |
| 3.1      | COLETA E EXTRAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL                                                       | 24        |
| 3.1.1    | COLETA E IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA                                                             | 24        |
| 3.1.2    | EXTRAÇÃO                                                                                    | 24        |
| 3.2      | FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DO EXTRATO MAIS ATIVO                                          | 25        |
| 3.3      | ISOLAMENTO DOS METABÓLITOS                                                                  | 26        |
| 3.4      | PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA                                                                      | 29        |
| 3.5      | QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS                                                 | 29        |
| 3.6      | QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONOIDES TOTAIS                                                         | 31        |
| 3.7      | ATIVIDADE DE INIBIÇÃO ENZIMÁTICA                                                            | 32        |
| 3.8      | IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS                                                               | 33        |
| 3.8.1    | Ressonância Magnética Nuclear                                                               | 33        |
| 3.8.2    | Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas                                   | 34        |
| 3.3      | DOCKING MOLECULAR                                                                           | 34        |
| 3.3.1    | Preparação da Estrutura                                                                     | 34        |
| 3.3.2    | Estudo de Docking Molecular                                                                 | 34        |
| 3.4      | CONFEÇÃO DE GRÁFICOS E ANÁLISES ESTATÍSTICAS                                                | 35        |

|          |                                                                                                                   |            |
|----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>4</b> | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>                                                                                     | <b>36</b>  |
| 4.1      | OBTENÇÃO DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DAS ESPÉCIES <i>Passiflora edulis</i> , <i>P. cincinnata</i> e <i>P. foetida</i> | 36         |
| 4.2      | FRACIONAMENTO DO EXTRATO DOS GALHOS DE <i>P. foetida</i>                                                          | 38         |
| 4.3      | PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA                                                                                            | 39         |
| 4.4      | ATIVIDADE DE INIBIÇÃO ENZIMÁTICA DOS EXTRATOS E FRAÇÕES                                                           | 47         |
| 4.4.1    | EXTRATOS BRUTOS DAS ESPÉCIES <i>P. cincinnata</i> , <i>P. edulis</i> e <i>P. foetida</i>                          | 47         |
| 4.4.2    | EXTRATOS BRUTOS DAS PARTES AÉREAS DE <i>P. foetida</i>                                                            | 49         |
| 4.4.3    | FRAÇÕES PROVENIENTES DO EXTRATO BRUTO DOS GALHOS DE <i>P. foetida</i>                                             | 52         |
| 4.4.4    | SUBFRAÇÕES PROVENIENTES DA FRAÇÃO DICLOROMETANO DOS GALHOS DE <i>P. foetida</i> POR CLC                           | 53         |
| 4.5      | QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS E FLAVONOIDES TOTAIS E SUA RELAÇÃO COM A INIBIÇÃO ENZIMÁTICA                 | 55         |
| 4.6      | ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS                                                                | 64         |
| 4.7      | IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS                                                                            | 69         |
| 4.7.1    | Misturas de flavanonas                                                                                            | 69         |
| 4.7.2    | 5,4'-dihidroxi-7-metoxi-flavanona (PFGD-E1)                                                                       | 71         |
| 4.7.3    | 5-hidroxi-7,3',4'-trimetoxi-flavanona (PFGD-E5)                                                                   | 77         |
| 4.7.4    | 5-hidroxi-7,4'-dimetoxi-flavona (PFGD-E6)                                                                         | 84         |
| 4.8      | ATIVIDADE DE INIBIÇÃO ENZIMÁTICA DA PAPAÍNA COM AS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS                                           | 92         |
| 4.8.1    | AVALIAÇÃO DO EFEITO SINÉRGICO DA MISTURA DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS                                                 | 95         |
| 4.9      | DOCKING MOLECULAR                                                                                                 | 97         |
| <b>5</b> | <b>CONCLUSÕES</b>                                                                                                 | <b>104</b> |
| <b>6</b> | <b>PERSPECTIVAS</b>                                                                                               | <b>105</b> |
| <b>7</b> | <b>REFERÊNCIAS</b>                                                                                                | <b>106</b> |

*Dedico este trabalho a minha  
mãe, Marineide Pesqueira. Minha  
fonte de força, inspiração e fé.*

*“Não fui eu que ordenei a você? Seja forte e corajoso! Não se apavore nem desanime, pois o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar.”*

**Josué 1:9**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me dar força durante toda essa jornada e mesmo eu sendo tão pequena, ele me tornou capaz de ultrapassar barreiras tão grandes.

A Universidade Federal de Sergipe, por toda oportunidade dada a mim durante essa trajetória.

Ao meu querido orientador Prof.<sup>o</sup> Dr.<sup>o</sup> James Almada da Silva, pela paciência, incentivo, amizade e por todos os ensinamentos para a vida profissional e pessoal.

Aos pesquisadores do LPNBio, em especial aos meus amigos, Rosana, Italo, Sandrielly, Mariana, Dayara, Anny Kelly e Victor, pelas risadas, ensinamentos, compreensão e paciência.

Ao LaBMIC, em especial aos técnicos Denis, Rute, Daniela, e ao querido Prof.<sup>o</sup> Dr.<sup>o</sup> Rafael Ciro Marques Cavalcante, pelos valiosos ensinamentos e apoio.

Ao DEFAL, pelo espaço e colaboração, em especial a Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Natalia Nogueira Saraiva por sempre se mostrar disponível a colaborar.

Ao PPGQ, secretaria e professores, por todos ensinamentos e parcerias. Ao Centro de Laboratórios de Química Multiusuários, por disponibilizar os equipamentos.

A minha amada mãe, Marineide, obrigada por tudo, porque em meio a toda distância, seu amor percorreu cada quilômetro até mim todos os dias, espero poder retribuir até o fim das nossas vidas.

A minha melhor amiga, Quelen. Você é parte fundamental nisso, nem todo agradecimento exposto aqui será mensurável perto de tudo que fez e faz por mim.

As minhas irmãs, Isadora e Isamaria, os meus amigos, Fabiano, Marcos, Thaysa, Alexandra, Lorena e demais, que se fizeram presente em meio a todos os percalços dessa caminhada, que eu consiga retribuir todo amor a vocês.

A CAPES, pelo apoio financeiro, que foi de suma importância para que esse sonho fosse concretizado.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                   |                                                                                       |
|-------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| 5HT               | 5-Hidroxitriptamina                                                                   |
| A01               | Acesso 01                                                                             |
| A02               | Acesso 02                                                                             |
| AcOEt             | Acetato de Etila                                                                      |
| AlCl <sub>3</sub> | Cloreto de Alumínio                                                                   |
| Asp               | Aspartil                                                                              |
| CCD               | Cromatografia em Camada Delgada                                                       |
| CLC               | Cromatografia Líquida Clássica                                                        |
| CLQM              | Centro de Laboratórios de Química Multiusuários                                       |
| COVID-19          | coronavírus disease 2019                                                              |
| COX-2             | Cicloxigenase-2                                                                       |
| COXIB             | Anti-inflamatórios não esteroidais                                                    |
| Ctrl              | Controle                                                                              |
| Cys               | Cisteína                                                                              |
| DAD               | <i>Diode Array Detector</i>                                                           |
| DCM               | Diclorometano                                                                         |
| DMSO              | Dimetilsulfóxido                                                                      |
| E64               | trans-epoxisuccinil-L-leucilamido(4-guanidino)butano (inibidor de cisteína proteases) |
| EAG               | Ácido Gálico                                                                          |
| ECA               | Enzima conversora da angiotensina                                                     |
| EDTA              | Ácido etilenodiamino tetra-acético                                                    |
| EM                | Espectrometria de Massas                                                              |
| FeCl <sub>3</sub> | Cloreto Férrico                                                                       |
| HA                | Hidroalcolico                                                                         |
| HCl               | Ácido Clorídrico                                                                      |
| Hex               | Hexano                                                                                |
| His               | Histidina                                                                             |
| HPLC              | <i>High Performance Liquid Chromatography</i>                                         |
| IDO               | Indoleamina 2,3-dioxigenase                                                           |
| KOH               | Hidróxido de Potássio                                                                 |
| LCP               | Laboratório de Análises de Compostos Orgânicos Poluentes                              |
| LPNBio            | Laboratório de Produtos Naturais e Bioativos                                          |
| NEMA              | Núcleo de Ecologia e Monitoramento Ambiental                                          |
| OAR               | Enzima $\beta$ -cetoacil ACP redutase                                                 |
| PDB               | Protein Data Bank                                                                     |
| PFA01             | <i>Passiflora foetida</i> Acesso 01                                                   |
| PFA02             | <i>Passiflora foetida</i> Acesso 02                                                   |
| PFG               | Extrato dos Galhos de <i>Passiflora foetida</i>                                       |
| PFGD              | Extrato da fração Diclorometano dos galhos de <i>Passiflora foetida</i>               |
| PFGD-E1           | 5,4'-dihidroxi-7-metoxi-flavanona                                                     |
| PFGD-E5           | 5-hidroxi-7,3',4'-trimetoxi-flavanona                                                 |

|          |                                                                                              |
|----------|----------------------------------------------------------------------------------------------|
| PFGD-E6  | 5-hidroxi-7,4'-dimetoxi-flavona                                                              |
| QUE      | Quercetina                                                                                   |
| RMN      | Ressonância Magnética Nuclear                                                                |
| SARS-Cov | Síndrome Respiratória Aguda Grave do Coronavírus                                             |
| Ser      | Serino                                                                                       |
| SISGEN   | Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do<br>Conhecimento Tradicional Associado |
| SNC      | Sistema Nervoso Central                                                                      |
| SUS      | Sistema Único de Saúde                                                                       |
| TMS      | Tetrametilsilano                                                                             |
| UNIVASF  | Universidade Federal do Vale do São Francisco                                                |
| UV       | Ultravioleta                                                                                 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>TABELA 1.</b> Reveladores químicos usados na identificação de metabólitos secundários presentes nas partes aéreas da <i>Passiflora foetida</i> A02.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 29 |
| <b>TABELA 2.</b> Rendimento da maceração das espécies em estudo.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 36 |
| <b>TABELA 3.</b> Rendimento da maceração das partes aéreas da espécie em estudo.<br>.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 37 |
| <b>TABELA 4.</b> Resultado da triagem fitoquímica nas partes aéreas da <i>Passiflora foetida</i> A02.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 45 |
| <b>TABELA 5.</b> Resultado da triagem fitoquímica nas subfrações mais ativas.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 46 |
| <b>TABELA 6.</b> Concentração de compostos fenólicos totais (mg EqAG/g de extrato), flavonoides totais (mg EqQUE/g de extrato) das espécies de <i>Passiflora</i> e atividade de inibição enzimática dos extratos na concentração de 500 µg/mL. Foram realizadas análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey. Letras diferentes indicam diferença estatística e letras iguais indicam que não há diferença estatística entre os grupos, segundo o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) .....              | 57 |
| <b>TABELA 7.</b> Concentração de compostos fenólicos totais (mg EqAG/g de extrato), flavonoides totais (mg EqQUE/g de extrato) das partes aéreas de <i>Passiflora foetida</i> e atividade de inibição enzimática dos extratos na concentração de 500 µg/mL. Foram realizadas análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey. Letras diferentes indicam diferença estatística e letras iguais indicam que não há diferença estatística entre os grupos, segundo o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) ..... | 60 |
| <b>TABELA 8.</b> Concentração de compostos fenólicos totais (mg EqAG/g de extrato), flavonoides totais (mg EqQUE/g de extrato) das subfrações da <i>Passiflora foetida</i> e atividade de inibição enzimática dos extratos na concentração de 500 µg/mL. Foram realizadas análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey. Letras diferentes indicam diferença estatística e letras iguais indicam que não há diferença estatística entre os grupos, segundo o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) .....    | 63 |

|                                                                                                                                                                |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>TABELA 9.</b> Dados de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) da substância PFGD-E1 e comparação com os dados da literatura .....  | 71 |
| <b>TABELA 10.</b> Dados de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) da substância PFGD-E5 e comparação com os dados da literatura ..... | 78 |
| <b>TABELA 11.</b> Dados de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) da substância PFGD-E6 e comparação com os dados da literatura ..... | 85 |
| <b>TABELA 12.</b> Resultado do <i>docking</i> para o complexo (Flavonoide + Enzima)..                                                                          | 95 |

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>FIGURA 1.</b> Medicamentos à base de <i>Passiflora</i> . Seakalm®: composto por <i>Passiflora incarnata</i> L.; Ansiodoron®, por <i>P. alata</i> , <i>Valeriana officinalis</i> e <i>Avena sativa</i> ; e A Saúde da Mulher®, por <i>P. alata</i> , casca de laranja amarga, salicilato de sódio e tintura de <i>Pluméria lancifolia</i> (agoniada) ..... | 2  |
| <b>FIGURA 2.</b> Principais flavonoides já identificados em espécies de <i>Passiflora</i> ...                                                                                                                                                                                                                                                                | 5  |
| <b>FIGURA 3.</b> Principais alcaloides já identificados em espécies de <i>Passiflora</i> .....                                                                                                                                                                                                                                                               | 6  |
| <b>FIGURA 4.</b> Principais saponinas já identificados em espécies de <i>Passiflora</i> ....                                                                                                                                                                                                                                                                 | 6  |
| <b>FIGURA 5.</b> Fotografias da espécie <i>Passiflora edulis</i> com destaque para a suas partes aéreas (flor, a esquerda; folhas e fruto, a direita) .....                                                                                                                                                                                                  | 7  |
| <b>FIGURA 6.</b> Metabólitos secundários isolados da espécie <i>P. edulis</i> .....                                                                                                                                                                                                                                                                          | 9  |
| <b>FIGURA 7.</b> Fotografias da espécie <i>Passiflora cincinnata</i> com destaque para a suas partes aéreas (flor, folhas, a esquerda; e fruto, a direita) .....                                                                                                                                                                                             | 10 |
| <b>FIGURA 8.</b> Metabólitos secundários isolados da espécie <i>P. cincinnata</i> .....                                                                                                                                                                                                                                                                      | 11 |
| <b>FIGURA 9.</b> Fotografias da espécie <i>Passiflora foetida</i> com destaque para suas partes aéreas (flor, a esquerda; folha e fruto, a direita) .....                                                                                                                                                                                                    | 12 |
| <b>FIGURA 10.</b> Metabólitos secundários isolados da espécie <i>P. foetida</i> .....                                                                                                                                                                                                                                                                        | 13 |
| <b>FIGURA 11.</b> Estrutura química da Passifloricina A proposta por ECHEVERRI e estrutura química da Passifloricina A corrigida por MURGA .....                                                                                                                                                                                                             | 14 |
| <b>FIGURA 12.</b> Imagem da estrutura tridimensional da papaína .....                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 18 |
| <b>FIGURA 13.</b> Sobreposição das estruturas das catepsinas K (amarelo), L (azul), S (vermelho), V (verde) e papaína (magenta). Localizado no sítio ativo da enzima está o inibidor piperazínico (preto) .....                                                                                                                                              | 19 |
| <b>FIGURA 14.</b> Sobreposição das catepsinas B (PDB 1GMY), C (PDB 3PDF) e K (PDB 5TUN) com a papaína (PDB 9PAP), e suas respectivas porcentagens de semelhanças (SS: Sequência de Similaridade) .....                                                                                                                                                       | 20 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>FIGURA 15.</b> Fluxograma do isolamento bioguiado de substâncias da <i>Passiflora</i> . Em destaque estão representados os extratos/frações que tiveram maiores valores de inibição enzimática .....                                                                                                                           | 28 |
| <b>FIGURA 16.</b> Reação representativa de oxirredução do reagente de Folin-Ciocalteu com compostos fenólicos .....                                                                                                                                                                                                               | 30 |
| <b>FIGURA 17.</b> Reação de formação do complexo do flavonoide com o alumínio do cloreto de alumínio .....                                                                                                                                                                                                                        | 31 |
| <b>FIGURA 18.</b> Ilustração da formação de halos ao redor dos poços no meio de cultura ágar/leite .....                                                                                                                                                                                                                          | 32 |
| <b>FIGURA 19.</b> Análise das subfrações PFGD-A à PFGD-H por cromatografia em camada delgada (CCD). Reveladores utilizados: (A) UV 254nm; (B) UV 365nm; (C) Vanilina Sulfúrica 1% .....                                                                                                                                           | 38 |
| <b>FIGURA 20.</b> Análise das frações das partes aéreas de <i>P. foetida</i> por cromatografia em camada delgada (CCD) para a identificação de compostos fenólicos. CCD antes (A) e depois (B) da revelação com cloreto férrico 5% e reação química entre compostos fenólicos e cloreto férrico (C) .....                         | 40 |
| <b>FIGURA 21.</b> Análise das frações das partes aéreas de <i>P. foetida</i> por cromatografia em camada delgada (CCD) para a identificação de flavonoides. CCD antes (A) e depois (B) da revelação com cloreto de alumínio 5% sob luz UV 365 nm e reação química entre flavonoides e cloreto de alumínio (C) .....               | 41 |
| <b>FIGURA 22.</b> Análise das frações das partes aéreas de <i>P. foetida</i> por cromatografia em camada delgada (CCD) para a identificação de antraquinonas e cumarinas. CCD antes (A) e depois (B) da revelação com hidróxido de potássio 5% e reação química das cumarinas e antraquinonas em meio básico (C) .....            | 42 |
| <b>FIGURA 23.</b> Análise das frações das partes aéreas de <i>P. foetida</i> por cromatografia em camada delgada (CCD) para a identificação de triterpenos e ácidos graxos. CCD antes (A) e depois (B) da revelação com vanilina sulfúrica 1% e reação química entre ácidos graxos, triterpenos e vanilina sulfúrica 1% (C) ..... | 43 |

**FIGURA 24.** Análise das frações das partes aéreas de *P. foetida* por cromatografia em camada delgada (CCD) para a identificação de alcaloides. CCD antes (A) e depois (B) da revelação com reagente de Dragendorff e reação química entre o alcaloide e o reagente de Dragendorff (C) ..... 44

**FIGURA 25.** Porcentagem de inibição da papaína com os extratos brutos da *Passiflora edulis*, *P. cincinnata* e *P. foetida* utilizando três concentrações diferentes (125, 250, 500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e para comparação estatística foi utilizado o inibidor E64 (10  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ). Foram realizadas análise de variância ANOVA e teste de Tukey. Letras diferentes indicam diferença estatística e letras iguais indicam que não há diferença estatística entre os grupos, segundo o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) ..... 48

**FIGURA 26.** Porcentagem de inibição da papaína com os extratos brutos das partes aéreas de *Passiflora foetida* A02 utilizando as concentrações: 125, 250, 500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e para comparação estatística foi utilizado o inibidor E64 (10  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ). Foram realizadas análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey. Letras diferentes indicam diferença estatística e letras iguais indicam que não há diferença estatística entre os grupos, segundo o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) ..... 51

**FIGURA 27.** Porcentagem de inibição da papaína com as frações obtidas da partição líquido-líquido dos galhos de *Passiflora foetida* (500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e para comparação estatística foi utilizado o inibidor E64 (10  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ). Foram realizadas análise de variância ANOVA e teste de Tukey. Letras diferentes indicam diferença estatística e letras iguais indicam que não há diferença estatística entre os grupos, segundo o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) ..... 52

**FIGURA 28.** Porcentagem de inibição da papaína das frações obtidas por cromatografia líquida clássica a partir da fração diclorometano dos galhos da *Passiflora foetida* A02 (PFGD) (500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e para comparação estatística foi utilizado o inibidor E64 (10  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ). Foram realizadas análise de variância ANOVA e teste de Tukey. Letras diferentes indicam diferença estatística e letras iguais indicam que não há diferença estatística entre os grupos, segundo o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) ..... 54

**FIGURA 29.** Curva de calibração do ácido gálico (10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , 20  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , 40  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , 80  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) ..... 55

- FIGURA 30.** Curva de calibração da quercetina ( $6,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ,  $12,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ,  $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ,  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) ..... 56
- FIGURA 31.** Cromatogramas das frações PFGD-C (A) e PFGD-D (B) obtidos por HPLC com as seguintes condições da escala analítica: coluna C18 Shim-Pack,  $4,6 \times 250 \text{ mm}$ ,  $10 \mu$  e vazão de  $1 \text{ mL/min}$ . A detecção foi realizada por UV a 254 e 365 nm, com fase móvel de ACN+0, 1% Ácido fórmico/ $\text{H}_2\text{O}$  (65/35) ..... 65
- FIGURA 32.** Características espectrais no UV-Vis de diferentes flavonoides, e espectro de absorção de cada anel do flavonoide ..... 66
- FIGURA 33.** Cromatogramas da fração PFGD-E obtidos por HPLC com as condições na escala analítica: coluna C18 Shim-Pack,  $4,6 \times 250 \text{ mm}$ ,  $10 \mu$  e vazão de  $1 \text{ mL/min}$ ; detecção foi realizada por UV a 254 e 365 nm e fase móvel de ACN+0,1% Ácido fórmico/ $\text{H}_2\text{O}$  (55/45), e seus os espectros de UV em cada banda, com seus devidos tempos de retenção ..... 67
- FIGURA 34.** Cromatogramas da fração PFGD-E obtidos por HPLC com as condições na escala preparativa: coluna C18 Shim-Pack,  $21,2 \times 250 \text{ mm}$ ,  $10 \mu$  e vazão de  $14 \text{ mL/min}$ . A detecção foi realizada por UV a 254 e 365 nm e fase móvel de ACN+0,1% Ácido fórmico/ $\text{H}_2\text{O}$  (55/45) ..... 68
- FIGURA 35.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) mostrando sinais característicos de flavanonas nas amostras PFGD-E2, PFGD-E3 e PFGD-E4, e esqueleto da estrutura química de uma flavanona. (A) Espectro de RMN  $\text{H}^1$ , (B) Ampliação do sinal de hidrogênio quelado, (C) Ampliação dos sinais de H-3 característicos de flavononas.....70
- FIGURA 36.** Estrutura química e espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da 5,4'-dihidroxi-7-metoxi-flavanona ..... 73
- FIGURA 37.** Gráfico de contorno de COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da 5,4'-dihidroxi-7-metoxi-flavanona ..... 74
- FIGURA 38.** Gráfico de contorno de HSQC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da 5,4'-dihidroxi-7-metoxi-flavanona. As correlações hidrogênios e carbonos são vistas entre chaves:  $\{^1\text{H}, ^{13}\text{C}\}$  ..... 75

- FIGURA 39.** Gráfico de contorno de HMBC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da 5,4'-dihidroxi-7-metoxi-flavanona. As correlações entre hidrogênios e carbonos são vistas entre chaves:  $\{^1\text{H}, ^{13}\text{C}\}$  ..... 76
- FIGURA 40.** Espectro de Massas obtido em ionização por electrospray no modo SCAN negativo (-4,5 kV) a 308 K da PFGD-E1 ..... 77
- FIGURA 41.** Estrutura química e espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da 5-hidroxi-7,3',4'-trimetoxi-flavanona ..... 80
- FIGURA 42.** Gráfico de contorno de COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da 5-hidroxi-7,3',4'-trimetoxi-flavanona ..... 81
- FIGURA 43.** Gráfico de contorno de HSQC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da 5-hidroxi-7,3',4'-trimetoxi-flavanona. As correlações hidrogênios e carbonos são vistas entre chaves:  $\{^1\text{H}, ^{13}\text{C}\}$  ..... 82
- FIGURA 44.** Gráfico de contorno de HMBC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da 5-hidroxi-7,3',4'-trimetoxi-flavanona. As correlações entre hidrogênios e carbonos são vistas entre chaves:  $\{^1\text{H}, ^{13}\text{C}\}$  ..... 83
- FIGURA 45.** Espectro de Massas obtido em ionização por electrospray no modo SCAN positivo (4,5 kV) a 308 K da PFGD-E5 ..... 84
- FIGURA 46.** Estrutura química e espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da 5-hidroxi-7,4'-dimetoxi-flavona ..... 87
- FIGURA 47.** Gráfico de contorno de COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da 5-hidroxi-7,4'-dimetoxi-flavona ..... 88
- FIGURA 48.** Gráfico de contorno de HSQC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da 5-hidroxi-7,4'-dimetoxi-flavona. As correlações hidrogênios e carbonos são vistas entre chaves:  $\{^1\text{H}, ^{13}\text{C}\}$  ..... 89
- FIGURA 49.** Gráfico de contorno de HMBC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da 5-hidroxi-7,4'-dimetoxi-flavona. As correlações entre hidrogênios e carbonos são vistas entre chaves:  $\{^1\text{H}, ^{13}\text{C}\}$  ..... 90
- FIGURA 50.** Espectro de Massas obtido em ionização por electrospray no modo SCAN positivo (4,5 kV) da PFGD-E1 ..... 91

**FIGURA 51.** Porcentagem de inibição da papaína com as substâncias isoladas da fração PFGD-E (PFGD-E1 a PFGD-E6) utilizando as concentrações: 250, 125, 62,5, 31,25 e 15,62  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para comparação estatística foi utilizado o inibidor E64 (10  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) e a fração de origem PFGD-E (500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Foram realizadas análise de variância ANOVA e teste de Tukey. Letras diferentes indicam diferença estatística e letras iguais indicam que não há diferença estatística entre os grupos, segundo o teste de Tukey ( $p<0,05$ ) ..... 94

**FIGURA 52.** Porcentagem de inibição da papaína com as substâncias isoladas em mistura, para avaliar o efeito sinérgico, utilizando suas proporções na subfração E, 2:2:1 (E1/E5/E6), para comparação estatística foi utilizado o inibidor E64 (10  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) e a fração de origem PFGD-E (500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Foram realizadas análise de variância ANOVA e teste de Tukey. Letras diferentes indicam diferença estatística e letras iguais indicam que não há diferença estatística entre os grupos, segundo o teste de Tukey ( $p<0,05$ ) ..... 96

**FIGURA 53.** Interações do ligante PFGD-E1 com os aminoácidos circundantes de cada enzima ..... 99

**FIGURA 54.** Interações do ligante PFGD-E5 com os aminoácidos circundantes de cada enzima ..... 100

**FIGURA 55.** Interações do ligante PFGD-E6 com os aminoácidos circundantes de cada enzima ..... 101

**FIGURA 56.** Estruturas químicas do campferol e das substâncias isoladas neste estudo (PFGD-E1, PFGD-E5 e PFGD-E6) ..... 102

## 1 INTRODUÇÃO

O nordeste brasileiro tem o maior número de espécies medicinais nativas, e a caatinga é o seu principal bioma, com uma grande diversidade de publicações sobre florística, fitoquímica e etnobotânica. Cada planta possui diferentes características medicinais, servindo muitas vezes para comunidades como um meio bastante eficaz para o tratamento de algumas enfermidades <sup>[1]</sup>. A situação econômica e a tradição cultural de grande parte dos países em desenvolvimento estimulam a população a usar as plantas medicinais no atendimento primário de saúde <sup>[2]</sup>.

As plantas medicinais despertam o interesse para a busca de novos recursos terapêuticos por meio de investigações científicas, no intuito de descobrir novos candidatos a fármaco e desenvolver, a partir disso, medicamentos alopáticos e/ou fitoterápicos <sup>[3]</sup>. Ao compreender como elas são utilizadas nas comunidades, a sua identificação e investigação mais detalhada no contexto da medicina tradicional, pode gerar a incorporação no setor de saúde pública. A produção de novos fitoterápicos podem auxiliar na Atenção Primária à Saúde no que diz respeito ao Sistema Único de Saúde (SUS) <sup>[4]</sup>.

As plantas são fontes ricas em metabólitos secundários com diferentes funções ecológicas, como à proteção de ataques de insetos e herbívoros, incidência da radiação ultravioleta, doenças etc. Diferente dos metabólitos primários, onde estão incluídos os lipídeos, protédeos e glicídios, que possuem funções vitais definidas, os metabólitos secundários, em geral, apresentam estrutura complexa, baixa massa molecular, atividade biológica marcante e são encontrados em concentrações muito baixas <sup>[5, 6]</sup>.

Espécies do gênero *Passiflora*, como a *Passiflora foetida*, *Passiflora cincinnata* e *Passiflora edulis*, utilizadas pela medicina tradicional, são de grande importância para a indústria, por possuírem uma matéria prima valiosa, como os frutos e folhas, na qual rendem sucos e chás utilizados pela população para tratamento de doenças <sup>[7]</sup>. A *Passiflora edulis* é a espécie com maior produção de frutos, e conseqüentemente com maior aquisição pela população, usados normalmente como relaxantes e calmantes, com estudos que comprovam esses efeitos em suas partes aéreas <sup>[8]</sup>. Os frutos da *Passiflora cincinnata* e *Passiflora*

*foetida* são utilizados principalmente pela população da zona rural, sendo que além do suco da polpa, também se faz uso das folhas para o preparo de chás, com ação calmante [9].

Muitas espécies do gênero *Passiflora* são utilizados pela medicina tradicional, principalmente como sedativos, ansiolíticos e anticonvulsivantes, e esses efeitos já foram comprovados cientificamente [10]. O uso tradicional dessas espécies de *Passiflora* como alimento e no tratamento de certas enfermidades, estimulam a investigação mais profunda de suas propriedades químicas e biológicas, para ratificar o seu uso e assim abrir possibilidades de transformar esses produtos naturais em medicamentos.

Atualmente é possível adquirir em farmácias, medicamentos constituídos por extratos ou folhas de *Passiflora*, como o Seakalm®, Ansiodoron® e A saúde da mulher® (FIGURA 1).

**FIGURA 1.** Medicamentos à base de *Passiflora*. Seakalm®: composto por *Passiflora incarnata* L.; Ansiodoron®, por *P. alata*, *Valeriana officinalis* e *Avena sativa*; e A Saúde da Mulher®, por *P. alata*, casca de laranja amarga, salicilato de sódio e tintura de *Pluméria lancifolia* (agoniada).



**FONTE:** Ultrafarma [19].

A maior parte dos estudos relatam a presença principalmente, de flavonoides [11–13], com diversas propriedades biológicas, entretanto com estudos

voltados sobretudo na atividade sedativa, antiespasmódica e ansiolítica <sup>[14]</sup>. Contudo, por conta da grande diversidade de metabólitos secundários bioativos presentes nesse gênero, há um aumento crescente de estudos do potencial biológico das espécies de *Passiflora* para outras enfermidades e com ensaios envolvendo enzimas como alvos biológicos <sup>[15–18]</sup>.

É importante ressaltar que as enzimas têm sua contribuição no que diz respeito ao desenvolvimento de fármacos, pois muito dos fármacos presentes no mercado foram descobertos através da inibição de enzimas importantes em processos fisiológicos e patológicos <sup>[20]</sup>. Por exemplo, os fármacos: Captopril® e Enalapril® são inibidores da enzima conversora da angiotensina (ECA), enzima importante em doenças do sistema circulatório. Os inibidores seletivos de ciclooxigenase-2 (COX-2), enzima importante em processos inflamatórios, também são exemplos de potenciais biológicos descobertos utilizando ensaios de inibição enzimática.

Estudos comprovam que nos últimos anos a papaína, assim como outras cisteíno proteases têm sido utilizadas como alvo terapêutico para a descoberta de novos fármacos para diversas doenças, como por exemplo a artrite, doenças vasculares, câncer, assim como também têm sido vistos como novo potencial para a descoberta de fármacos que podem ser utilizados no tratamento de doenças infecciosas e alérgicas <sup>[21–23]</sup>.

### **1.1 *Passiflora***

O gênero *Passiflora* constitui de trepadeiras herbáceas, normalmente com gavinhas e poucas com ervas eretas. São espécies arbustivas, conhecidas como pequenas árvores com caules cilíndricos e com bastante ramificações. Podendo atingir de cinco a dez metros de comprimento <sup>[24]</sup>.

As flores dessa espécie apresentam aspectos que possibilitam a ocorrência de polinização cruzada, por serem grandes, atraentes e coloridas, e exalarem um odor característico e forte, além de possuir néctar em abundância, encontrado na base da corona <sup>[25]</sup>.

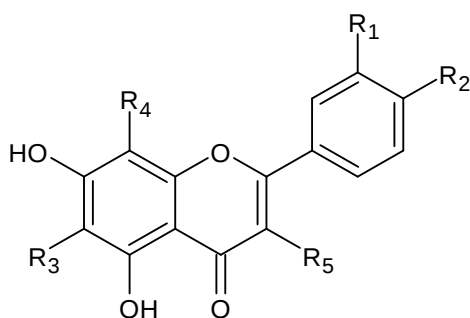
No Brasil, as espécies de *Passiflora alata*, *P. caerulea*, *P. cincinnata*, *P. edulis*, *P. edulis f. flavicarpa*, *P. laurifolia*, *P. nitida*, *P. quadrangularis*, *P. racemosa* e *P. speciosa* são de grande importância para a economia nacional, além de serem cultivadas em escala comercial para produção, principalmente, do suco simples e concentrado, pó, néctar, licor, vinho e geleia [26].

Este gênero é conhecido popularmente em diferentes países por suas propriedades medicinais e funcionais, em especial, por seu efeito calmante e relaxante. No interior do Brasil, principalmente nas áreas rurais, as frutas frescas e secas são utilizados, na forma de chás ou sucos, para o tratamento de algumas doenças, como: ansiedade, insônia, tremores em idosos, diabetes, obesidade, entre outras [7].

#### 1.1.1 PERFIL QUÍMICO

O uso popular e as atividades biológicas comprovadas de plantas medicinais estão relacionados a presença de constituintes químicos de classes distintas, e assim os metabólitos secundários isolados de plantas do gênero *Passiflora* possuem grande interesse medicinal.

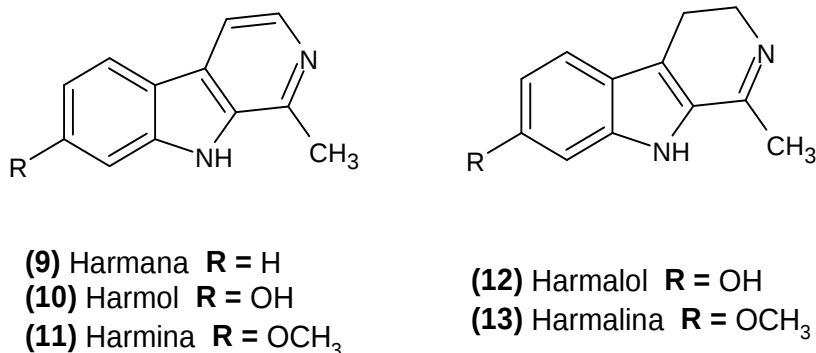
Entre os constituintes químicos mais frequentemente citados como presentes nessas espécies estão os flavonoides, que são compostos bioativos do grupo dos polifenóis, conhecidos principalmente por serem responsáveis em proteger a planta contra danos oxidativos [27]. Os flavonóides possuem várias atividades biológicas, como ação antiinflamatória [28], antiviral [29], antibacteriana [30], antialérgica [31] e vasodilatadora [32], e estão associados à prevenção de doenças crônicas, como o câncer [33] e as doenças cardiovasculares [34]. Esse gênero é rico em compostos fenólicos, em especial os flavonóides C-glicosilados derivados da luteolina (1) e apigenina (2): orientina (3), isoorientina (4), vitexina (5), isovitexina (6); e os não glicosilados como quercetina (7) e campferol (8) (FIGURA 2).

**FIGURA 2.** Principais flavonoides já identificados em espécies de *Passiflora*.

| FLAVONOIDES      | R <sub>1</sub> | R <sub>2</sub> | R <sub>3</sub> | R <sub>4</sub> | R <sub>5</sub> | <i>Passiflora</i>        | FONTE:                                          |
|------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|--------------------------|-------------------------------------------------|
| (1) Luteolina    | OH             | OH             | H              | H              | H              | <i>P. foetida</i>        | Nguyen <i>et. al</i> (2015) <sup>[35]</sup>     |
| (2) Apigenina    | H              | OH             | H              | H              | H              | <i>P. edulis</i>         | Yuan <i>et. al</i> (2017) <sup>[36]</sup>       |
| (3) Orientina    | OH             | OH             | H              | GLICOSE        | H              | <i>P. tripartita</i>     | Costa <i>et. al</i> (2016) <sup>[37]</sup>      |
| (4) Isoorientina | OH             | OH             | GLICOSE        | H              | H              | <i>P. bogotensi</i>      | Costa <i>et. al</i> (2016) <sup>[37]</sup>      |
| (5) Vitexina     | H              | OH             | H              | GLICOSE        | H              | <i>P. quadrangularis</i> | Costa <i>et. al</i> (2016) <sup>[37]</sup>      |
| (6) Isovitexina  | H              | OH             | GLICOSE        | H              | H              | <i>P. alata</i>          | Costa <i>et. al</i> (2016) <sup>[37]</sup>      |
| (7) Quercetina   | OH             | OH             | H              | H              | OH             | <i>P. incarnata</i>      | Masteikova <i>et. al</i> (2008) <sup>[38]</sup> |
| (8) Campferol    | OH             | H              | H              | H              | OH             | <i>P. palmeri</i>        | Ulubelen <i>et. al</i> (1984) <sup>[39]</sup>   |

Os alcaloides presentes em *Passiflora* são do tipo indólicos, que compreendem o segundo grande grupo de alcaloides atualmente conhecidos, como o harmana (9), harmol (10), harmina (11), harmolol (12) e harmalina (13) (FIGURA 3) <sup>[40]</sup>. Muitos têm valor na medicina como tranquilizantes <sup>[41]</sup>, anti-inflamatório <sup>[42]</sup> e tratamentos contra o câncer <sup>[43]</sup>. Os alcaloides desempenham papel importante no estoque de nitrogênio e transporte deste no organismo, além disso, alcaloides de núcleo aromáticos, como quinolínicos e indólicos, podem desempenhar função de proteção à radiação ultravioleta, mas tendo como principal função a defesa química das plantas contra predadores <sup>[5]</sup>.

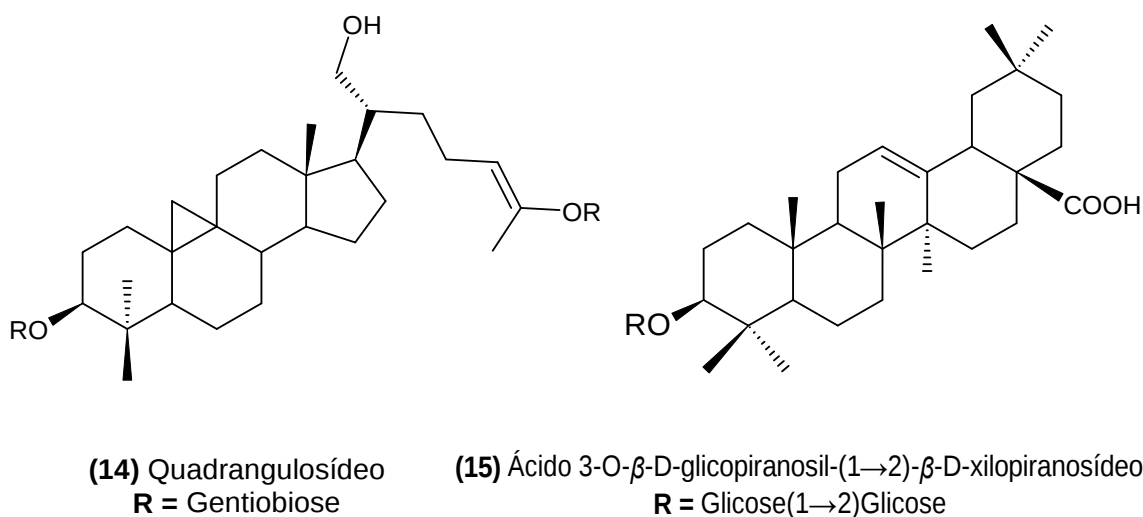
**FIGURA 3.** Principais alcaloides já identificados em espécies de *Passiflora*.



**FONTE:** Hamid *et. al*, 2017 <sup>[40]</sup>.

O gênero *Passiflora* também é rico em saponinas triterpênicas, como o quadrangulosídeo (14) e o ácido 3-O- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-xilopiranosídeo (15) (FIGURA 4) <sup>[15]</sup>. A sua estrutura química pode ser do tipo glicosídeos de esteroides ou de terpenos policíclicos, que produzem espuma persistente em solução aquosa. Algumas saponinas apresentam atividade hemolítica, contudo, quando administradas por via oral, são praticamente atóxicas <sup>[5]</sup>.

**FIGURA 4.** Principais saponinas já identificados em espécies de *Passiflora*.



**FONTE:** Gosmann *et.al*, 2011 <sup>[15]</sup>.

O conhecimento atual sobre a composição química e atividades farmacológicas de espécies do gênero *Passiflora* exibe o seu potencial para o desenvolvimento de medicamentos ansiolíticos e hipnóticos/sedativos, tendo grande potencialidade para contribuir no desenvolvimento de novos medicamentos. As pesquisas realizadas com o propósito de isolar e identificar metabólitos secundários bioativos contribuirão para a descoberta de futuros fármacos, colaborando assim para o avanço farmacológico e biológico da espécie [10, 11, 44, 45].

### 1.1.2 *Passiflora edulis*

A espécie de *Passiflora edulis* (FIGURA 5) é uma das mais populares, por sua relevância como matéria prima para a produção de suco. É conhecida popularmente como maracujá-amarelo, maracujá-roxo ou maracujá-azedo. É uma espécie nativa do Brasil, mas que pode ser encontrada em regiões tropicais e subtropicais, com algumas modificações genéticas [46].

**FIGURA 5.** Fotografias da espécie *Passiflora edulis* com destaque para a suas partes aéreas (flor, a esquerda; folhas e fruto, a direita).



**FONTE:** Próprio Autor.

Essa espécie produz frutos comestíveis, utilizados na indústria alimentícia, na produção de sorvetes, vinhos, coquetéis e sobremesas. Seu cultivo está

basicamente voltado para a indústria, em especial, devido ao seu sabor mais ácido e maior rendimento, além de apresentar em sua composição elevado teor de carotenoides [9].

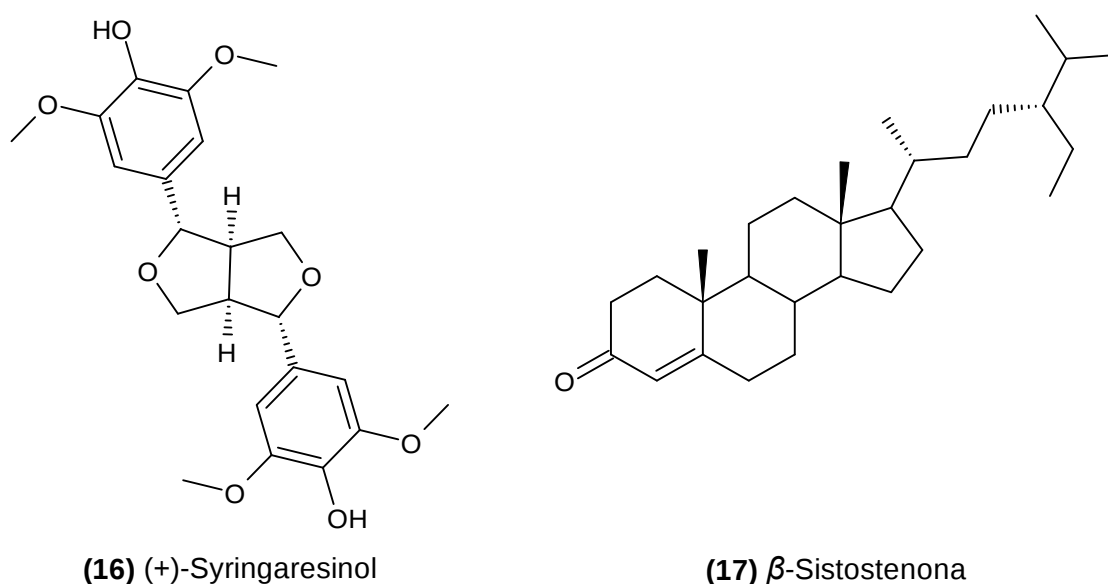
Casca e semente desse maracujá, são subprodutos da indústria de alimentos, que podem apresentar interesse tecnológico e biológico, onde mais de 75% deste resíduo poderia ser transformado em ingrediente com propriedades bioativas para promoção de saúde [47]. *Passiflora edulis* tem sido usada medicinalmente na América do Sul como: sedativa, diurética, anti-helmíntica, antidiarreica, estimulante, tônico, e também no tratamento da hipertensão, sintomas da menopausa e cólica em bebês [9].

Estudos comprovam a eficácia dessa planta (*P. edulis*) para algumas atividades biológicas, como a farinha da casca de seu fruto que apresentou atividade antihiperglicemiante [48], o extrato etanólico das cascas que apontou efeito anti-inflamatório [49], efeitos neuro-protetores foram expressos no extrato acetônico das folhas e galhos [50], em outro estudo o extrato etanólico das partes aéreas apresentou efeito ansiolítico [8] e também foi visto o efeito antidepressivo no extrato etanólico das folhas e galhos [51].

Por ser uma das espécies mais estudadas da família Passifloraceae, já foram identificadas várias classes de constituintes fitoquímicos, tais como flavonoides, alcaloides, saponinas, esteroides e terpenos, cumarinas, glicosídeos cardioativos, carboidratos e aminoácidos não proteicos [52, 53].

As substâncias majoritárias, e rendimentos com base na massa do extrato bruto, que já foram isoladas desta espécie, são os flavonoides: luteolina – 0,01% (1), apigenina – 0,02% (2); isoorientina – 0,04% (4), isovitexina – 0,06% (6), a lignana: (+)-syringaresinol – 0,03% (16), e o esteroide:  $\beta$ -sitostenona – 0,09% (17) [36] (FIGURA 6).

**FIGURA 6.** Metabólitos secundários isolados da espécie *P. edulis*.



**FONTE:** Yuan *et. al*, 2017 <sup>[36]</sup>.

### 1.1.3 *Passiflora cincinnata*

A espécie de *Passiflora cincinnata* (FIGURA 7), popularmente conhecida como maracujá-do-mato e maracujá-silvestre, é espontânea na região semiárida do nordeste brasileiro, possui resistência a seca, pragas e doenças, sendo, portanto, uma cultura perene <sup>[54]</sup>. Esta espécie pode ser encontrada também em regiões de matas úmidas, com denominações populares regionais diversas: maracujá-mochila, maracujá-tubarão, maracujá-bravo, maracujá de casca verde e maracujá do mato <sup>[55, 56]</sup>.

**FIGURA 7.** Fotografias da espécie *Passiflora cincinnata* com destaque para a suas partes aéreas (flor, folhas, a esquerda; e fruto, a direita).



**FONTE:** Próprio Autor.

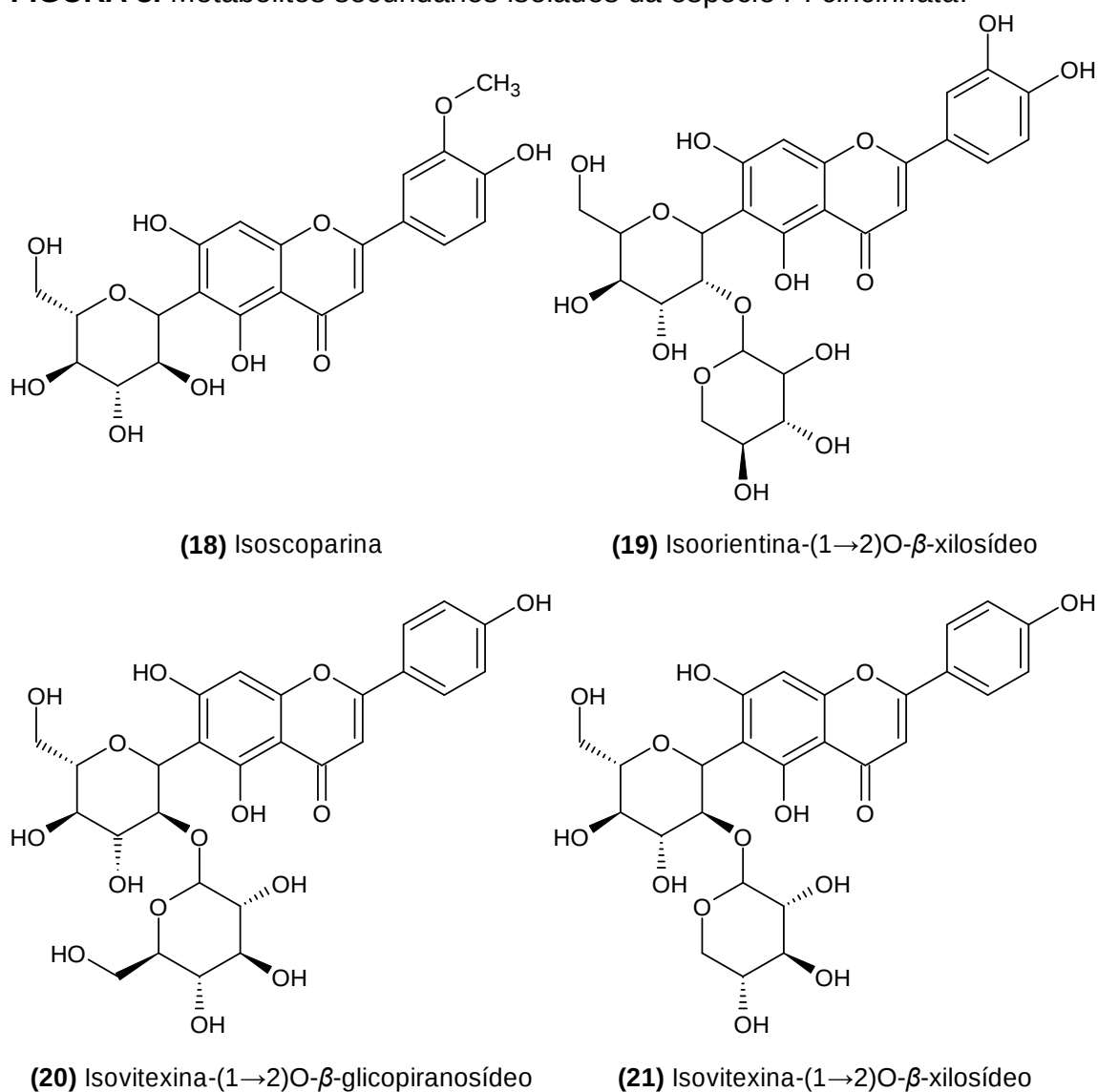
Segundo Zucarelli (2009) <sup>[57]</sup>, a *P. cincinnata* tem sido utilizada por populações tradicionais para fins nutricionais, ornamentais e medicinais. O extrativismo desta planta cresce com a produção de doces e geleias nas indústrias instaladas nos municípios de Curaçá, Uauá e Canudos, no interior do estado da Bahia <sup>[58]</sup>.

É bastante utilizada na medicina popular, principalmente no nordeste brasileiro, contudo há uma deficiência muito grande de estudos para esta espécie, principalmente, quanto a suas propriedades farmacológicas e medicinais. Já foram relatadas as atividades antimicrobiana no extrato hidroalcolico das partes aéreas <sup>[59]</sup>, já o extrato etanólico das partes aéreas apresentou potencial anti-inflamatório <sup>[60]</sup> e em outro estudo a solução aquosa da polpa da fruta apontou efeito antioxidante <sup>[61]</sup>.

As classes de metabólitos já identificadas nessa espécie são: taninos condensados, flavonas, flavononóis, flavonóis, xantonas, chalconas, auronas, flavanonas, leucoantocianidina, catequinas e alcalóides <sup>[62, 63]</sup>. Amaral (2018) <sup>[64]</sup> isolou seis flavonoides das folhas de *Passiflora cincinnata*, e obtiveram os seguintes rendimentos percentuais (m/m) com base na massa do extrato bruto isoorientina – 0,16% (4), isovitexina – 0,26% (6), isoscoparina – 0,06% (18), isoorientina-(1→2)O-β-xilosídeo – 0,04% (19), isovitexina-(1→2)O-β-

glicopiranosídeo – 0,19% (20) e Isovitexina-(1→2)O- $\beta$ -xilosídeo – 0,05% (21) (FIGURA 8).

**FIGURA 8.** Metabólitos secundários isolados da espécie *P. cincinnata*.



**FONTE:** Amaral, 2018 <sup>[64]</sup>.

#### 1.1.4 *Passiflora foetida*

A *Passiflora foetida* (FIGURA 9) tem origem em áreas tropicais da América do Sul e Índia ocidental, contudo, também se encontra presente em outras regiões ao redor do mundo. É conhecido como maracujá-catinga, maracujá de cobra, maracujá de lagartinho, maracujá de sapo, maracujá de raposa, maracujá

hirsuto do Sul, maracujá de cheiro, maracujá fedorento e maracujá de estalo, devido ao som produzido pelo fruto quando espremido ou esmagado. Suas folhas quando esmagadas exalam um odor forte, que para algumas pessoas chega a ser desagradável [65].

**FIGURA 9.** Fotografias da espécie *Passiflora foetida* com destaque para suas partes aéreas (flor, a esquerda; folha e fruto, a direita).



**FONTE:** Próprio Autor.

Ela tem sido muito explorada comercialmente em alguns países, em especial na Índia, devido às suas importantes propriedades medicinais, como o tratamento da histeria e insônia. As folhas são aplicadas a cabeça para tratamento da vertigem e dores. No Brasil o extrato das folhas é usado de forma tópica para tratamento de erisipela, doenças de pele e inflamações, e seus frutos são usados para tratar asma e distúrbios biliares [66–68].

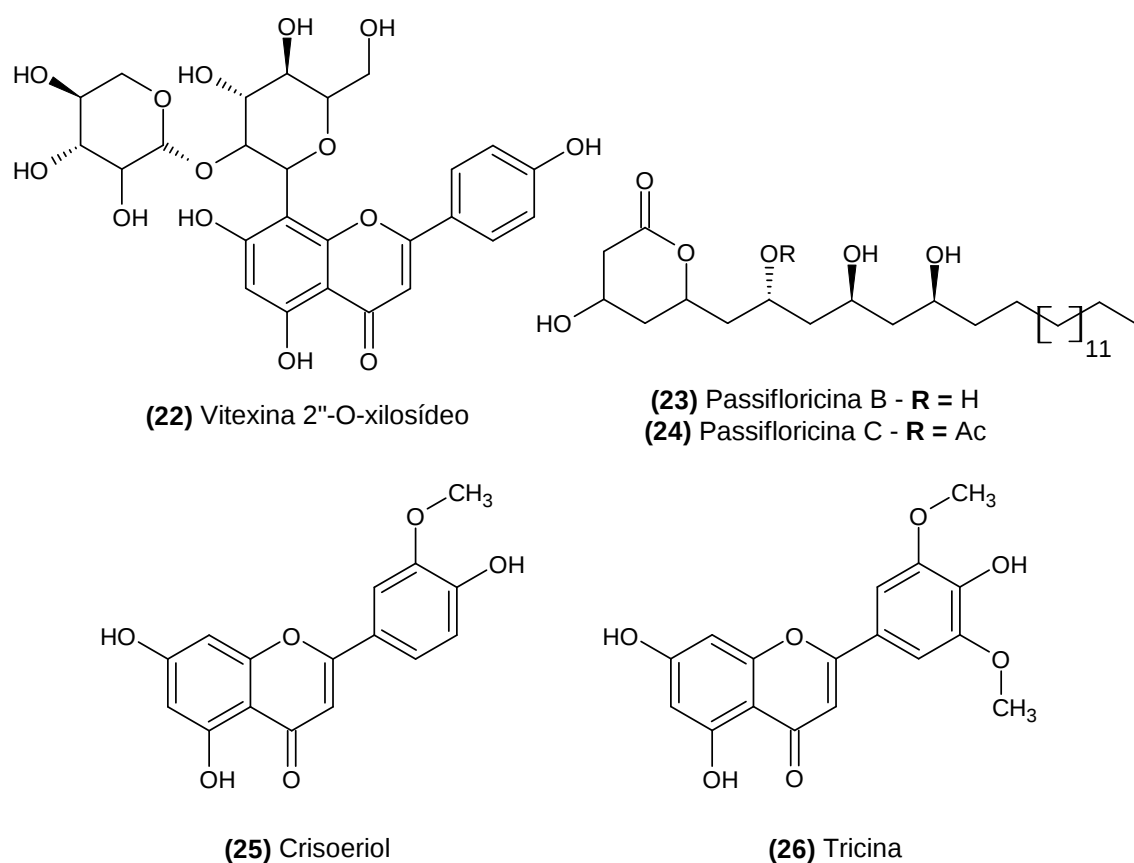
Esta espécie demonstrou atividades anti-inflamatórias através do extrato metanólico dos galhos [35]. Além disso o extrato etanólico das folhas apresentou atividade analgésica e anti-inflamatória [69], o extrato etanol/acetona das folhas e frutos mostrou potencial antibacteriana [70], o extrato etanólico das partes aéreas apresentou potencial analgésico, antidiarreico e citotóxica [71] e o extrato metanólico das folhas demonstrou atividade antidepressivo [72].

Os principais constituintes fitoquímicos presentes na *Passiflora foetida* são compostos fenólicos, flavonóides, alcaloides, saponinas, glicosídeos

cardíacos e policetídeos  $\alpha$ -pironas [73, 74]. De acordo com estudos feitos por Song *et. al* (2018) [75], foi possível identificar mais de 65 compostos presentes nos frutos, sendo 39 agliconas fenólicas, 14 glicosídeos fenólicos e 22 ésteres fenólicos, através da cromatografia líquida de alta performance acoplada a espectrometria de massas.

No estudo de Nguyen *et. al*, (2015) [35], a partir da fração acetato de etila, foi possível isolar dez flavonoides, entre eles a: luteolina – 0,07% (1), orientina – 0,08% (3), vitexina-2-O-xilosídeo – 0,05% (22), crisoeriol – 0,03% (25) e tricina – 0,03% (26) (FIGURA 10). Seus rendimentos percentuais foram calculados com base na massa da fração acetato de etila, como pode ser observado.

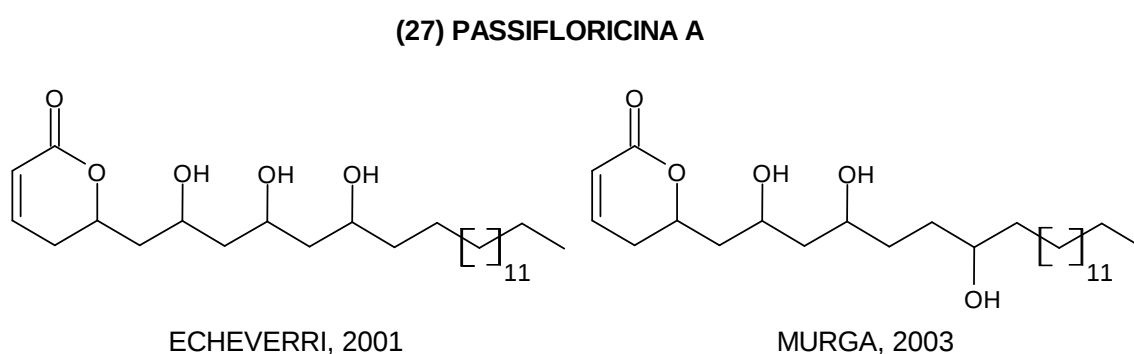
**FIGURA 10.** Metabólitos secundários isolados da espécie *P. foetida*.



**FONTE:** Nguyen *et. al*, 2015 [35]; Echeverri, *et.al* 2001 [74].

ECHEVERRI *et.al* (2001) <sup>[74]</sup>, a partir da fração acetato de etila, isolou pela primeira vez três poliketídeos  $\alpha$ -pironas (encontradas somente na resina da *Passiflora foetida*), com os respectivos rendimentos: passifloricina A – 1,25% (27), passifloricina B – 1,66% (23) e passifloricina C – 2,5% (24) (FIGURA 7). Em 2003, Murga *et. al* <sup>[76]</sup> publicou uma síntese da passifloricina A com uma correção na sua estrutura, possível de ser visualizada na FIGURA 11.

**FIGURA 11.** Estrutura química da Passifloricina A proposta por Echeverri e sua estrutura corrigida por Murga.



**FONTE:** Próprio autor.

No estudo de Cardona *et. al* (2004) <sup>[77]</sup>, seis passifloricinas foram avaliadas quanto ao seu potencial leishmanicida e citotóxico, obtendo ED<sub>50</sub> de 0,5 a 24  $\mu$ M, e LD<sub>50</sub> de 0,2 a 10,3  $\mu$ M, sendo que a passifloricina A foi o composto mais ativo com LD<sub>50</sub> = 0,2  $\pm$  0,02  $\mu$ M e ED<sub>50</sub> = 0,5  $\pm$  0,1  $\mu$ M.

## 1.2 EXTRAÇÃO E ISOLAMENTO BIOGUIADO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM ESPÉCIES DE *Passiflora*

As técnicas de extração e a natureza do solvente extrator podem afetar diretamente os rendimentos e a quantidade de metabólitos extraídos da planta, podendo afetar nos resultados das atividades biológicas e farmacológicas, logo, é importante conhecer a natureza do material, para que possam utilizar técnicas adequadas ao estudo <sup>[78]</sup>.

O processo de fracionamento de extratos vegetais com a finalidade de isolar substâncias ativas podem ser monitorados por ensaios com a avaliação da atividade biológica/bioquímica, desde os extratos até as frações/subfrações, resultando na descoberta de substâncias com potenciais bioativos [79–81] (FIGURA 12). Obviamente, o ponto mais característico deste estudo é a parte biológica/bioquímica, a qual vai servir de “guia” para selecionar ou indicar compostos e/ou extratos com potenciais bioativos.

Em estudos de isolamento de metabólitos em espécies de *Passiflora* por técnicas cromatográficas, normalmente é usado sílica gel como fase estacionária, a fase móvel ideal é uma mistura binária de solvente orgânicos [15, 82, 83]. Contudo, é necessária uma avaliação sobre os tipos de compostos de interesse, e assim definir quais os parâmetros (fase móvel e fase estacionária) necessários para a separação das substâncias.

O HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) é um equipamento eficiente no isolamento e no auxílio da identificação de moléculas provenientes de extratos vegetais. Possui grandes vantagens como, permitir que dados qualitativos e quantitativos sejam obtidos para amostras de polaridades variadas em uma única eluição, curto tempo de preparo da amostra a ser analisada, e permitindo várias formas de detecção, o que pode aumentar a especificidade e o conteúdo de informações por ensaio [84].

Nos isolamentos por HPLC utilizando extratos, a coluna C<sub>18</sub> tem uso habitual, por sua vasta aplicabilidade analítica, além de conseguir separar facilmente compostos aromáticos, como os flavonoides; alcaloides; fenóis etc [85–87]. Normalmente, a fase móvel utilizada para análises com C<sub>18</sub> como fase estacionária, são misturas de tampões aquosos com solventes polares, por exemplo metanol e acetonitrila [88, 89].

### 1.3 ENSAIOS BIOQUÍMICOS

A identificação das substâncias bioativas presentes em plantas, assim como seus mecanismos de ação, tem sido uns dos maiores desafios para a química farmacêutica, bioquímica e a farmacologia. Nas investigações das atividades biológicas com extratos vegetais é fundamental que os bioensaios

sejam sensíveis e reprodutíveis para a detecção de efeitos específicos. Os bioensaios podem ser realizados utilizando enzimas como alvo biológicos, organismos biologicamente simples, como microrganismos, cultura de células animais ou humanas, e microcrustáceos [90].

### 1.3.1 ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A maioria das enzimas são proteínas com estrutura grande e complexa, por possuírem longas cadeias de aminoácidos, unidas através de ligações peptídicas. Elas são produzidas dentro das células dos seres vivos, plantas, fungos, bactérias, e organismos microscópios unicelulares e agem como catalisadores em reações bioquímicas. Sua classificação pode ser dada de acordo com suas reações, como por exemplo, as lipases atuam decompondo as gorduras em glicerol e ácidos graxos, amilases decompõem o amido em açúcares mais simples, celulasas decompõem a celulose, proteases que decompõem as proteínas, etc [91].

Muitas das enzimas presentes em organismos vivos são alvos biológicos e por isso possuem grande potencial para a busca de novos fármacos [92]. Por exemplo, existem pesquisas onde se buscam inibidores da enzima acetilcolinesterase, enzima envolvida na doença de Alzheimer [93]. A enzima  $\beta$ -cetoacil ACP redutase (OAR) pode ser usada como alvo para a busca de novos compostos antimaláricos [94], assim como, as enzimas histonas deacetilase tem sido usada para o desenvolvimento de fármacos tripanocidas [95].

Na classificação das enzimas, tem-se as hidrolases, que são responsáveis pela reação de hidrólise de ligações covalente. Um dos seus subgrupos são as proteases, que vem ganhando destaque em pesquisas, tanto como potencial terapêutico, como para encontrar seus possíveis inibidores [96]. As proteases são classificadas quanto à natureza química do sítio catalítico ou mecanismo de ação. Cada classe de proteases tem seu conjunto particular de aminoácidos no sítio ativo. As serina proteases apresentam a tríade catalítica composta por Ser, His e Asp. As cisteína proteases mostram os aminoácidos

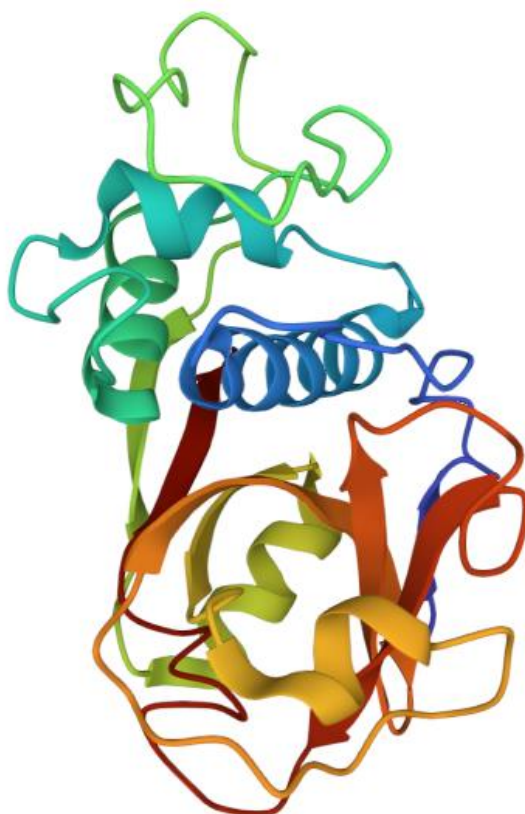
Cys, Asp e His. Os aspártico proteases, Asp e Asp e as metaloproteases apresentam um íon metálico no sítio ativo [97].

### 1.3.2 CISTEÍNO PROTEASES

As cisteíno proteases são enzimas que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas de proteínas, degradando-as ou produzindo peptídeos menores, e tem funções vitais nos organismos vivos. O nome dessa família é dado devido ao principal resíduo de aminoácido presente no sítio ativo da enzima, a cisteína. Além disso, são potenciais alvos farmacológicos para o combate de doenças no sistema circulatório [98], doenças infecciosas [99], inflamatórias [100], degradação óssea [101] e câncer [102]. A catepsina L, por exemplo, é uma importante cisteíno protease, na qual tem papel fundamental no que diz respeito a entrada do vírus SARS-Cov-2, na célula, logo substâncias que inibam esta enzima podem ser usadas no desenvolvimento de fármacos com atividade antiviral [103].

Uma importante enzima da classe das cisteíno proteases, encontradas no látex do mamoeiro, *Carica papaya* é a papaína (FIGURA 12). Esta enzima foi a primeira cisteíno protease a ser cristalizada e ter sua estrutura determinada. Essa família de enzimas possui um sítio catalítico que é formado por uma tríade catalítica com os resíduos de aminoácidos Cisteína - 25, Histidina - 159 e Aspartato - 158, que são responsáveis pela hidrólise irreversível de peptídeos [104].

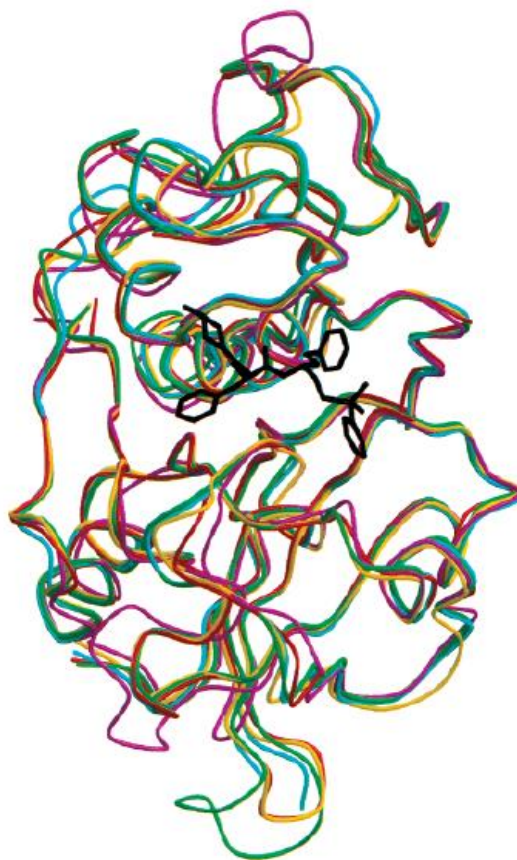
**FIGURA 12.** Imagem da estrutura tridimensional da papaína.



**FONTE:** Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB). Código Protein Data Bank (PDB): 9PAP.

Existem diversas enzimas semelhantes à papaína, denominadas *papain-like*, como as representadas na FIGURA 13. Estas enzimas possuem semelhança com a papaína na sua sequência de aminoácidos, e por isso estão dentro deste grupo <sup>[105, 106]</sup>. Por esse motivo a papaína pode ser utilizada como modelo para a busca de inibidores de cisteíno proteases que pertencem a este grupo.

**FIGURA 13.** Sobreposição das estruturas das catepsinas K (amarelo), L (azul), S (vermelho), V (verde) e papaína (magenta). Localizado no sítio ativo da enzima está o inibidor piperazínico (preto).

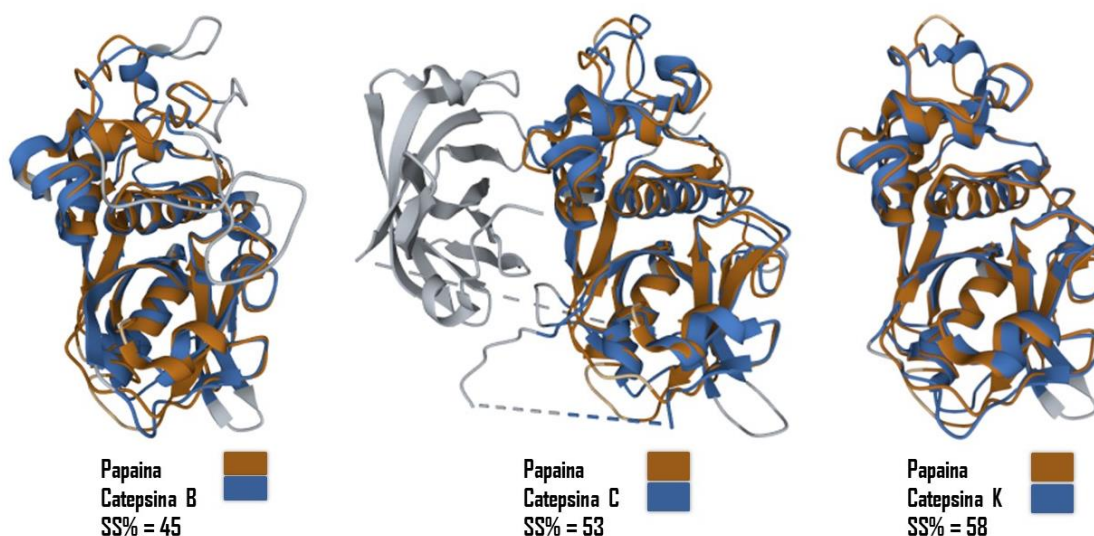


**FONTE:** SOMOZA *et. al*, 2000 <sup>[106]</sup>.

### 1.3.3 CISTEÍNO PROTEASE ENVOLVIDAS NA DEPRESSÃO

As catepsinas são cisteíno proteases pertencentes ao grupo das *papain-like*, com função na homeostase celular (responsável pela estabilidade do equilíbrio interno da célula), regulando a apoptose e autofagia (FIGURA 14). Tem ligação direta com o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, onde tem sido amplamente estudada. Com isso, o comprometimento da função normal da catepsina desempenha um papel crucial na fisiopatologia das doenças neurodegenerativas e, nos últimos anos, surgiram estudos que comprovam a influência das catepsinas em transtornos mentais, devido ao seu envolvimento em doenças da memória, hiperatividade e na depressão, comportamento semelhante à ansiedade <sup>[107]</sup>.

**FIGURA 14.** Sobreposição das catepsinas B (PDB 1GMY), C (PDB 3PDF) e K (PDB 5TUN) com a papaína (PDB 9PAP), e suas respectivas porcentagens de semelhanças (SS: Sequência de Similaridade).



**FONTE:** Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB).

A catepsina K foi recentemente detectada no parênquima cerebral e tem sido associada a distúrbios neurocomportamentais, como a esquizofrenia e depressão. Logo, o estudo das funções que a catepsina K desempenha no cérebro torna-se altamente relevante. Uma pesquisa com a RNA mensageiro da catepsina K mostrou que, uma indução geral do sistema dopaminérgico em animais, sem esse gene, resultaram em níveis reduzidos de ansiedade [108].

A Catepsina B, uma das proteases mais estudada, é expressa na maioria das células do corpo, e participa de muitos processos fisiológicos e patológicos, como respostas inflamatórias agudas e crônicas, além de interagir estreitamente com citocinas pró-inflamatórias, envolvidas nos mecanismos de desenvolvimento do cérebro. Um trabalho mostrou que foi possível ver camundongos com comportamento do tipo depressivo, apresentarem atividade aumentada da catepsina B no hipotálamo quando comparados aos animais de controle [109].

A expressão da catepsina C, uma cisteína protease lisossomal, é predominantemente induzida na micróglia da neuroinflamação. No entanto,

ainda existem poucos estudos sobre o papel da catepsina C na fisiopatologia da depressão. Um estudo mostrou que a super expressão da catepsina C promoveu resposta inflamatória periférica e central, com aumento significativo de TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 no soro, hipocampo e córtex pré-frontal, e consequente regulação positiva de IDO (indoleamina 2,3-dioxigenase) e regulação negativa da expressão de 5HT (5-hidroxitriptamina) no cérebro, e, assim, agravando comportamentos semelhantes a depressão, acessados por teste de campo aberto, teste de natação forçada e teste de suspensão de cauda <sup>[110]</sup>.

Diante disso, é de extrema importância a busca de inibidores dessas enzimas, com o objetivo de se descobrir novos candidatos à fármacos com efeito sobre o SNC (Sistema Nervoso Central), em especial sobre problemas envolvidos com a depressão e ansiedade. Já que o gênero *Passiflora* tem sido utilizado pela medicina tradicional no tratamento contra a ansiedade, um dos efeitos da depressão, é importante investigar os efeitos de inibição dos seus componentes químicos frente a essas enzimas.

#### 1.3.4 INIBIDORES DE CISTEÍNO PROTEASE

Os inibidores das cisteino proteases inibem estas enzimas ao formar complexos, após interagir com sítios enzimáticos importantes, impedindo sua atividade catalítica, logo, são moléculas de suma importância para a modulação ou inativação de enzimas envolvidas com doenças. Esses inibidores têm sido estudados no desenvolvimento de fármacos antimaláricos <sup>[111]</sup>, descoberta de agentes anti-infecciosos <sup>[112]</sup>, agentes anticâncer <sup>[113]</sup> e antivirais contra SARS-CoV-2 <sup>[114]</sup>.

A *Passiflora* tem em sua composição química uma variedade de metabólitos secundários que possuem atividade enzimática, principalmente os flavonoides, que são metabólitos secundários que há muitos anos são estudados neste gênero e que são utilizados pela indústria farmacêutica para a produção de medicamentos ansiolíticos <sup>[115]</sup>.

Atualmente os flavonoides também estão sendo estudados como possíveis inibidores de cisteíno protease. Em pesquisa para encontrar inibidores

de falcipain-2 e plasmepsin II, cisteíno proteases que estão diretamente ligadas a malária, foram usadas 15 tipos diferentes de flavonoides, sendo a luteonina (70,9% e  $2,9 \pm 0,1 \mu\text{M}$ ), quercetina (75,8% e  $3,3 \pm 0,3 \mu\text{M}$ ) e kaempferol (76,2% e  $2,1 \pm 0,2 \mu\text{M}$ ), presentes na *Passiflora*, os que apresentaram excelentes percentuais de inibição frente a falcipain-2 [116].

A 3CL<sup>pro</sup> é uma cisteíno protease que atualmente vem sendo bastante estudada, e está presente no SARS-CoV. Estudos comprovam que flavonoides obtiveram leve inibição desta enzima, contudo, possíveis modificações na estrutura química, podem aumentar o efeito de inibição em até duas vezes, como foi o caso de um dos testes, inicialmente com  $\text{IC}_{50} = 72,3 \mu\text{M}$  e após a adição da metoxila, foi para  $\text{IC}_{50} = 32,0 \mu\text{M}$  [117].

Extratos de órgãos florais da *Passiflora edulis* Sims. já foram objetos de estudo para a inibição da papaina e da tripsina, e os resultados mostram percentuais maiores que 80% de inibição enzimática da papaína em diferentes partes dos órgãos florais [118].

Outras classes de metabólitos secundários, além dos flavonoides, como alcaloides, terpenoides, antraquinonas e diaril-heptanóides, vem sendo estudados para tratamento contra o SARS-CoV-2. Esses constituintes naturais derivados de ervas medicinais têm propriedades anti-inflamatórias e antivirais, bem como efeitos inibitórios no ciclo de vida viral, incluindo entrada, replicação, montagem e liberação do vírus [119].

Em vista disso, os flavonoides se mostraram potentes inibidores frente a algumas classes de enzimas, logo, se faz necessário novas pesquisas com esses metabólitos secundários, especialmente aqueles presentes em espécies de *Passiflora*, que é promissora no tratamento de doenças como a ansiedade. Por isso, é preciso avaliar o potencial de inibição desses flavonoides, com outras cisteíno proteases, principalmente aquelas que estão diretamente ligadas a doenças como a depressão e ansiedade.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Isolar inibidores de cisteíno proteases de espécies de *Passiflora* por meio de estudo bioguiado.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar extratos etanólicos das espécies *P. edulis*, *P. cincinnata* e *P. foetida*;
- Quantificar compostos fenólicos totais e flavonoides totais dos extratos etanólicos das espécies *P. edulis*, *P. cincinnata*, *P. foetida*;
- Identificar as classes de metabólitos secundários das subfrações mais ativas;
- Realizar o fracionamento cromatográfico do extrato e frações mais ativas;
- Isolar as substâncias presentes nas frações mais ativas por cromatografia líquida de alta eficiência;
- Realizar ensaios de inibição enzimática (papaína) dos extratos das espécies *P. edulis*, *P. cincinnata*, *P. foetida* e das frações, subfrações e substâncias isoladas obtidas do extrato da planta com maior atividade de inibição enzimática;
- Identificar as substâncias isoladas por Ressonância Magnética Nuclear e Espectrometria de Massas.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 COLETA E EXTRAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

##### 3.1.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA

No dia 11 de dezembro de 2020, pelo turno da manhã, as três espécies de *Passiflora* (*P. edulis*, *P. cincinnata* e *P. foetida*) foram coletadas na cidade de Petrolina-PE. A *Passiflora foetida* Acesso 01 (PFA01) e *Passiflora foetida* Acesso 02 (PFA02) foram coletadas na Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), (9° 19' 18.552" S - 40° 33' 29.088" W), e no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sertão Pernambucano (IFSertão) (9° 20' 9" S - 40° 41' 58" W), respectivamente. A coleta da *Passiflora cincinnata* (PC) também foi realizada na UNIVASF (9° 19' 19.200" S - 40° 33' 36.612" W), enquanto a *Passiflora edulis* (PE) foi coletada no bairro Dom Avelar (9° 21' 32.580"S - 40° 28' 57.036" W).

Uma exsicata foi preparada em cada coleta e em seguida encaminhada ao Núcleo de Ecologia e Monitoramento Ambiental (NEMA) na UNIVASF, Petrolina, para identificação taxonômica e depósito. Os códigos de registro de cada uma das espécies foram: *Passiflora foetida* A01, PISF 12913; *Passiflora foetida* A02, PISF 16035; *Passiflora cincinnata*, PISF 12914; *Passiflora edulis*, PISF 12915. Os números de cadastro do material vegetal do SisGen foram: *Passiflora edulis*, AC28856; *Passiflora cincinnata*, AF44801; *Passiflora foetida* A01, A8A465B e *Passiflora foetida* A02, A201AEE.

##### 3.1.2 EXTRAÇÃO

As partes aéreas (flor, galhos e folhas) das plantas em estudo foram secas em estufa com ventilação forçada a uma temperatura de 40°C, por 72 horas (DeLeo). O material seco foi triturado em liquidificador (Colombo, MOD. BR 19L), pesado e submetido a maceração (72 horas) utilizando como solvente extrator o álcool etílico absoluto (99,8% v/v) (Alphatec), na proporção 1:4 m/v (planta/solvente), uma única vez <sup>[120]</sup>. Em seguida, os extratos foram filtrados

com papel filtro (Unifil, 80 g/m<sup>2</sup>, Alemanha) e submetidos à evaporação do solvente em evaporador rotativo (Alpax, modelo EQ 9027, Brasil) sob pressão reduzida na temperatura de 40°C. O cálculo do rendimento (Re) dos extratos foi realizado de acordo com a fórmula a seguir.

$$Re (\%) = \frac{M_{ext}}{M_f} \times 100$$

Onde: Re = rendimento do extrato (%); M<sub>ext</sub> = massa do extrato seco (g); M<sub>f</sub> = massa da planta seca (g).

As partes aéreas da *Passiflora* com maior atividade de inibição enzimática, foram separadas (galhos, folhas, flores e frutos), e seus extratos foram preparados utilizando as mesmas condições mencionadas anteriormente. Entretanto, uma maceração exaustiva foi realizada, para aumentar o rendimento de extração, com renovação do solvente, a cada 72 h, duas vezes.

### 3.2 FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DO EXTRATO MAIS ATIVO

Inicialmente, 8,20 g do extrato bruto mais ativo, PFG (galhos de *Passiflora foetida*, A02), foi dissolvido em 500 mL de etanol/água 60:40 (v/v) e transferido para um funil de separação de 1 L. Em seguida uma partição líquido-líquido foi realizada utilizando os seguintes solventes em ordem crescente de polaridade: hexano (3 x 167 mL), diclorometano (3 x 167 mL), acetato de etila (3 x 167 mL). Posteriormente, realizou-se a eliminação dos solventes de todas as frações obtidas em evaporador rotativo a 40° C.

Cromatografia Líquida Clássica (CLC) foi utilizada para a separação dos metabólitos secundários bioativos da fração que apresentou maior atividade enzimática. Desse modo, utilizou-se uma coluna cromatográfica de vidro (550 mm x 50 mm) preenchida com 15 cm de sílica gel (70-230 mesh, 60 Å) para o fracionamento de 3,35 g da fração mais ativa, diclorometano (PFGD), proveniente do extrato dos galhos de *Passiflora foetida* (PFG). A fase móvel utilizada nesta separação foi hexano/acetato de etila, 2:1 (v/v). Foram coletadas 84 subfrações (30 mL), que após as reuniões resultou em 8 subfrações (PFGD-A à PFGD-H). O monitoramento das subfrações foi realizado por CCD

(MACHEREY-NAGEL, DC-Fertigfolien ALUGRAM® Xtra SIL G/UV 254) com placas alumínio de 4 x 5 cm recobertas com gel de sílica, utilizando câmara de UV (254 e 365 nm) e vanilina sulfúrica 1%, como reveladores.

As frações mais ativas e com massa suficiente para a continuação do estudo foram analisadas por HPLC-DAD para encontrar a melhor condição de separação das substâncias. Posteriormente foi realizado o escalonamento das condições cromatográficas para a escala semi-preparativa para conduzir o isolamento das substâncias.

### 3.3 ISOLAMENTO DOS METABÓLITOS

O HPLC (Shimadzu®) utilizado para análise e isolamento das substâncias está equipado com duas bombas LC-6AD, degaseificador DGU-20A3R, detector DAD SPD-M20A, auto injetor SIL-20A e controladora CBM-20A.

As frações PFGD-C e PFGD-D foram injetadas no HPLC no modo isocrático, para encontrar as melhores condições de separação. As condições utilizadas para cada fração foram as seguintes.

Coluna C18 Shim-Pack, 4,6 x 250 mm, 10  $\mu$

Fase Móvel: ACN+0,1% Ácido fórmico/H<sub>2</sub>O (65/35)

Vazão: 1 mL/min

V<sub>injeção</sub>: 20  $\mu$ L

T: 36 °C

$\lambda$ : 365 e 254 nm

A fração PFGD-E (340mg) foi submetida a análise e isolamento das substâncias, no modo isocrático. As condições podem ser visualizadas a seguir.

**PFGD-E****ESCALA ANALÍTICA**

Coluna C18 Shim-Pack, 4,6 x 250 mm,  
10 µ

Fase Móvel: ACN+0,1% Ácido  
fórmico/H<sub>2</sub>O (55/45)

Vazão: 1 mL/min

V<sub>injeção</sub>: 20 µL

T: 36 °C

λ: 365 e 254 nm

**ESCALA PREPARATIVA**

Coluna C18 Shim-Pack, 21,2 x 250  
mm, 10 µ

Fase Móvel: ACN+0,1% Ácido  
fórmico/H<sub>2</sub>O (55/45)

Vazão: 14 mL/min

V<sub>injeção</sub>: 500 µL

T: 36 °C

λ: 365 e 254 nm

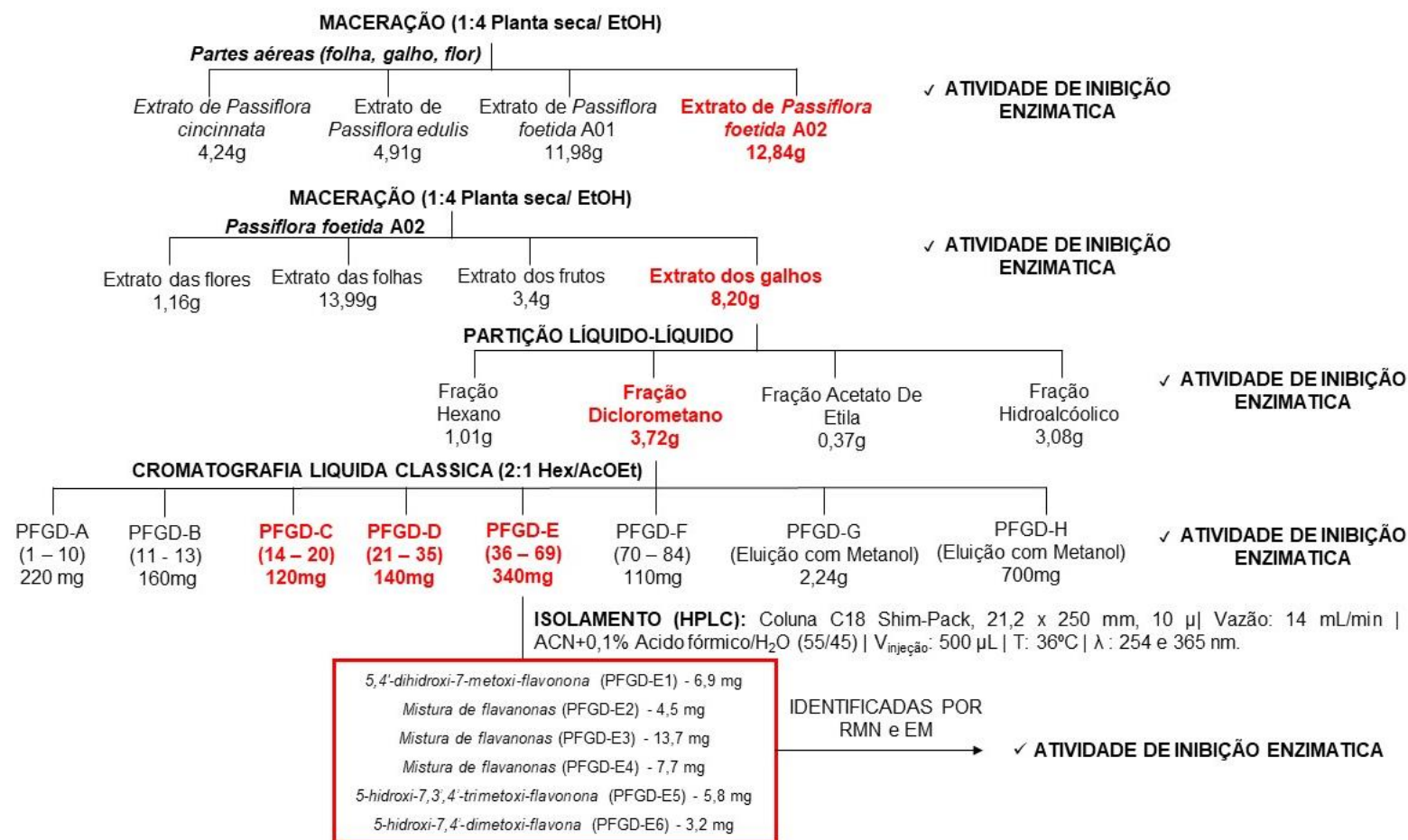
O fator de escalonamento para obtenção da vazão a ser utilizada em escala semi-preparativa foi calculado utilizando a equação abaixo.

$$S = \frac{R_p^2 L_p}{R_A^2 L_A}$$

Onde R<sub>P</sub> e R<sub>A</sub> são os raios da coluna preparativa e analítica, respectivamente, e L<sub>p</sub> e L<sub>A</sub>, são os comprimentos das colunas preparativa e analítica, respectivamente.

A seguir pode-se ver o fluxograma do processo de isolamento bioguiado, desde a maceração com cada espécie de *Passiflora* até as substâncias isoladas (FIGURA 15).

**FIGURA 15.** Fluxograma do isolamento bioguiado de substâncias da *Passiflora*. Em destaque estão representados os extratos/frações que tiveram maiores valores de inibição enzimática.



**FONTE:** Próprio Autor.

### 3.4 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA

As análises fitoquímicas foram realizadas utilizando placas de alumínio (4 x 5 cm) de CCD (MACHEREY-NAGEL, DC-Fertigfolien ALUGRAM® Xtra SIL G/UV 254) recobertas com sílica gel. Os extratos brutos das partes aéreas da espécie com maior percentual de inibição enzimática e algumas subfrações mais ativas foram aplicados à placa com auxílio de capilares de vidro e submetidas a eluição com hexano/acetato de etila (2:1) como fase móvel. Em seguida, as placas foram submetidas a reveladores físicos UV<sub>254</sub> nm e UV<sub>365</sub> nm e reveladores químicos (TABELA 1) <sup>[121]</sup>.

**TABELA 1.** Reveladores químicos usados na identificação de metabólitos secundários presentes nas partes aéreas da *Passiflora foetida* A02.

| REVELADOR               | SUBSTÂNCIA                  |
|-------------------------|-----------------------------|
| Reagente de Dragendorff | Alcaloides                  |
| AlCl <sub>3</sub> 5%    | Flavonoides                 |
| FeCl <sub>3</sub> 5%    | Compostos Fenólicos         |
| KOH 5%                  | Cumarinas e Antraquinonas   |
| Vanilina Sulfúrica 1%   | Triterpenos e Ácidos Graxos |
| Gelatina 2,5%           | Taninos                     |

**FONTE:** Wagner e Blant, 1996 <sup>[121]</sup>.

Para identificar a presença de taninos na fração diclorometano, a um tubo de ensaio foi adicionado 2 mL da fração diclorometano (10 mg.mL<sup>-1</sup>), 2 gotas de HCl diluído (0,5M) e aos poucos foi sendo acrescentado gota a gota da solução de gelatina a 2,5% (m/v) <sup>[122]</sup>.

### 3.5 QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

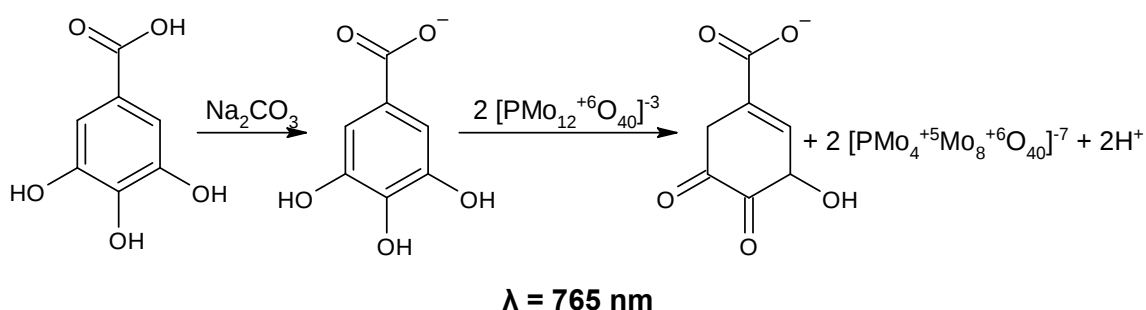
A quantificação dos compostos fenólicos foi realizada utilizando o método colorimétrico utilizado por da Silva *et. al* (2020) <sup>[123]</sup> com algumas modificações, utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu (DINÂMICA, COD. 2326, LOTE 90198).

Soluções estoque dos extratos foram preparados na concentração de  $5 \text{ mg.mL}^{-1}$ , e em seguida diluídas em metanol para a concentração de  $500 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Esta análise foi realizada após a adição de 0,5 mL da amostra (extrato vegetal) e 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu 1:10 (v/v) em tubos de ensaio recobertos com papel alumínio. Após 8 minutos, adicionou-se 2 mL de carbonato de sódio 4% (m/v). A mistura permaneceu em repouso por 2 horas, e em seguida realizou-se a leitura em espectrofotômetro digital (EDUTECH, EEQ-9023) a 765 nm.

Uma curva de calibração de ácido gálico, nas concentrações de  $10 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ ,  $20 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ ,  $40 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ ,  $80 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $100 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ , foi construída. A equação da reta obtida foi utilizada para quantificar os compostos fenólicos totais. Os resultados foram representados em equivalente de ácido gálico, em miligramas por grama de extrato (mg EqAG/g). As análises foram realizadas em triplicata, e as mesmas foram repetidas pelo menos duas vezes.

A reação que demonstra a oxidação de compostos fenólicos e redução do molibdênio com a formação de um produto de coloração azulada pode ser observada na FIGURA 16.

**FIGURA 16.** Reação representativa de oxirredução do reagente de Folin-Ciocalteu com compostos fenólicos.



**FONTE:** Munteanu e Apetrei, 2021 [124].

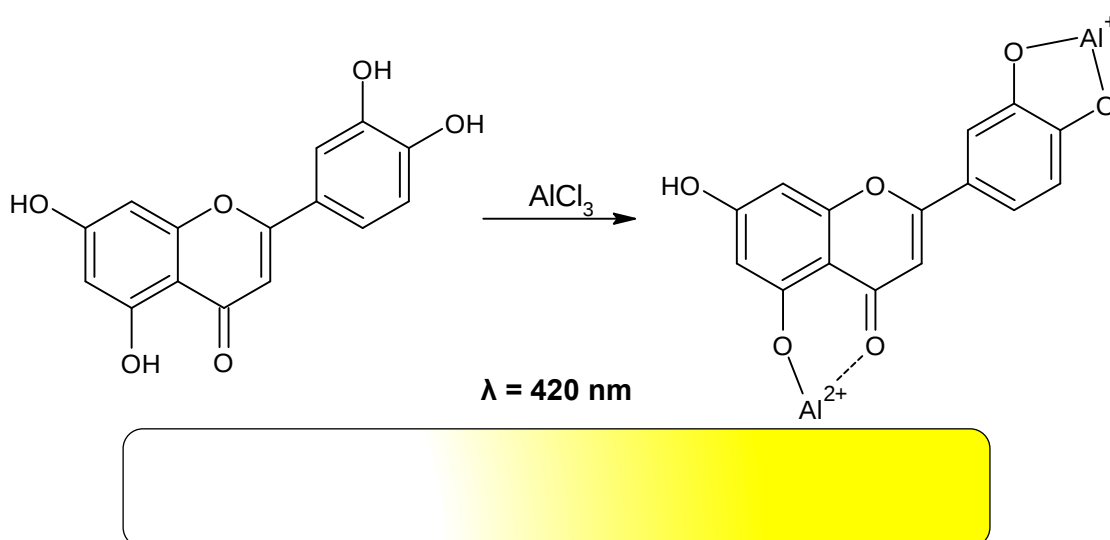
### 3.6 QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONOIDES TOTAIS

A quantificação de flavonoides totais <sup>[123]</sup> foi realizada com a mesma solução de extrato ( $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) preparada previamente. Para esta análise foram adicionados 0,5 mL da solução de extrato, 0,5 mL de cloreto de alumínio 2% e 2,5 mL de metanol a tubos de ensaio. As soluções foram mantidas em repouso por 30 min e em seguida submetidas a leitura em espectrofotômetro a 420 nm.

Uma curva de calibração usando quercetina foi construída nas concentrações  $6,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ,  $12,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ,  $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ,  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . A partir da equação da reta, quantificou-se os flavonoides totais. O conteúdo foi expresso em equivalente de quercetina, em miligramas por grama de extrato (mg EqQUE/g). As análises foram realizadas em triplicata, e as mesmas foram repetidas pelo menos duas vezes.

A reação que demonstra a formação do complexo de flavonoide com o cloreto de alumínio (com intensificação da cor), pode ser observada na FIGURA 17.

**FIGURA 17.** Reação de formação do complexo do flavonoide com o alumínio do cloreto de alumínio.



**FONTE:** Ilmi *et. al*, 2020 <sup>[125]</sup>.

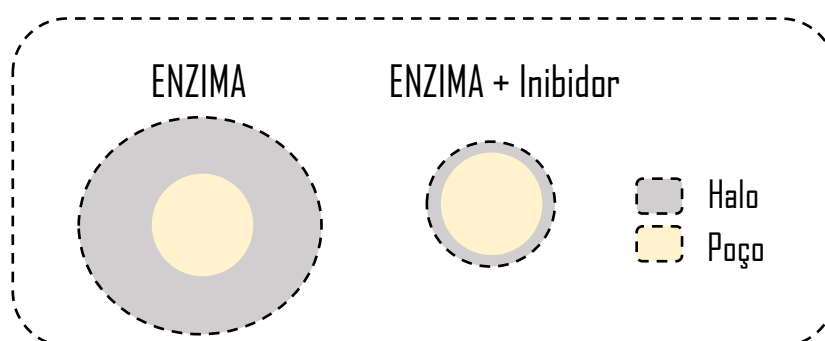
### 3.7 ATIVIDADE DE INIBIÇÃO ENZIMÁTICA

A metodologia de determinação da inibição enzimática, desenvolvida no Laboratório de Produtos Naturais e Bioativos (LPNBio) <sup>[126]</sup>, foi conduzida em placas de petri com ágar contendo leite como fonte de substrato. Inicialmente, realizou-se o preparo e esterilização do Ágar nutriente (IONLAB) na concentração  $28 \text{ g.L}^{-1}$ , com adição de 0,25% (m/v) leite (Molico® desnatado). Em seguida, foram vertidos 50 mL do meio ágar/leite em placas de Petri (d=14 cm). Após a solidificação do meio, foram construídos poços no ágar com o diâmetro de 9,5 mm, utilizando um cilindro oco de aço esterilizado.

Para a preparação da solução de papaína (Dinâmica), foi utilizado tampão fosfato  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$ , contendo  $5 \text{ mmol.L}^{-1}$  de EDTA (ACS), pH= 6,7. As soluções de extrato foram preparadas na proporção 1:40 v/v (E64/enzima ou extrato/enzima). Antes de adicionar a solução enzimática com extrato/inibidor E64 ( $10 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) (Sigma) aos poços, incubou-se essa mistura por 5 minutos a  $25^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, as placas de Petri foram mantidas a  $37^{\circ}\text{C}$  em estufa bacteriológica (INCUBATOR, SPX-350B) durante um período de 24h.

A atividade enzimática foi observada a partir da formação de halos ao redor dos poços no ágar-leite (FIGURA 18). Para auxiliar a visualização dos halos, adicionou-se em cada placa 20 mL de HCl  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ . A medida dos halos foi realizada com o auxílio de um paquímetro digital (Starrett, 799A-6/150).

**FIGURA 18.** Ilustração da formação de halos ao redor dos poços no meio de cultura ágar/leite.



**FONTE:** Próprio Autor.

O cálculo utilizado para obter a porcentagem da inibição enzimática dos extratos testados foi a seguinte.

$$\text{Inibição enzimática (\%)} = 100 \times [1 - (A_{\text{amostra}}/A_{\text{enzima}})]$$

Onde a  $A_{\text{amostra}}$  é a área do halo formado em volta dos poços contendo o extrato/enzima e,  $A_{\text{enzima}}$  é a área do halo formado em volta dos poços contendo apenas enzima.

Os extratos vegetais foram testados nas concentrações de 125; 250 e 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; as frações e subfrações foram testadas na concentração de 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; e as substâncias isoladas foram testadas na concentração de 250, 125, 62,5, 31,25 e 15,62  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Um controle positivo somente com a solução enzimática e DMSO (Synth) na mesma concentração dos experimentos (2,5%, v/v) foi utilizado.

### 3.8 IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS

#### 3.8.1 Ressonância Magnética Nuclear

As substâncias foram identificadas por Ressonância Magnética Nuclear unidimensional (RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$ ) e bidimensionais (COSY, HSQC e HMBC), além da comparação com os dados da literatura. As análises por RMN foram realizadas na Central de Análises de Fármacos, Medicamentos e Alimentos (CAFMA) da Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF).

Para as substâncias isoladas, pelo menos 3 mg de cada substância foi dissolvida em clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ), e analisadas em espectrômetro Bruker Ascend™ 400, operados a 400 MHz para as análises de  $^1\text{H}$  e 100 MHz para as análises do  $^{13}\text{C}$ , a 298 K. O tetrametilsilano (TMS) foi utilizado como referência nas análises.

### 3.8.2 Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

A aquisição dos espectros de massas por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CL-EM) foi realizada no Centro de Laboratórios de Química Multiusuários (CLQM) em parceria com Laboratório de Análises de Compostos Orgânicos Poluentes (LCP), ambos do Departamento de Química da UFS – Campus São Cristóvão.

As análises foram realizadas no cromatógrafo da Shimadzu (Quioto, Japão) SFC Nexera UC acoplado ao espectrômetro de massas monoquadruplo, modelo LCMS-2020, fonte electrospray no modo SCAN ( $m/z$  100 a 400), positivo (4,5 kV) e negativo (- 4,5 kV). Foi utilizada a coluna C<sub>18</sub> Shim-Pack (250 x 4,6 mm, 3  $\mu$ m) da Shimadzu, na temperatura de 35°C, com *heart block* a 200°C, DL 250°C, nitrogênio como gás nebulizador e gás de secagem a 1,5 e 10 L/min, respectivamente. Foi utilizada a fase móvel ACN adicionado de 0,1% Ácido fórmico/H<sub>2</sub>O (55/45), vazão de 0,5 mL/min e volume de injeção de 5  $\mu$ L. As amostras (200  $\mu$ g/mL) foram solubilizadas com a fase móvel e filtradas utilizando filtro 0,22  $\mu$ m.

## 3.3 DOCKING MOLECULAR

### 3.3.1 Preparação da Estrutura

A estrutura cristalográfica de raios-X das proteínas foi obtida do banco de dados de proteínas RCSB (*Research Collaboratory for Structural Bioinformatics*), com código PDB de adesão: 1GMY, 3DPF e 5TUN <sup>[127]</sup>. As moléculas de água foram removidas do arquivo de cristalização do PDB e a proteína foi otimizada para ancoragem utilizando o pacote Gromacs. A estrutura tridimensional do ligante e seus derivados foram construídos utilizando o software Gauss View, e as suas geometrias foram otimizadas com cálculos DFT utilizando o programa Gaussian 09. Todos os cálculos foram realizados usando DFT no nível funcional B3LYP/ 6-31G\*\* <sup>[128]</sup>.

### 3.3.2 Estudo de Docking Molecular

O docking molecular é um processo automático para prever as interações

dos ligantes com seus alvos, para os ligantes com o modelo de proteína a técnica foi realizada utilizando o pacote de software AutoDock 4.2 [129]. No início, o modelo de proteína foi aprimorado com a adição de hidrogênios, utilizando o módulo construtor Autodock, e foram adicionadas cargas de Gasteiger ao sistema. A macromolécula foi mantida rígida, enquanto, todos os ângulos de torção nas pequenas moléculas foram definidos para girar livremente. O tamanho e o centro da caixa de grade foram definidos em 50×50×50 Å<sup>3</sup> para permitir que o ligante gire livremente. O método do algoritmo genético Lamarckiano (LGA) foi utilizado com 250 cálculos de ancoragem separados, consistindo no máximo de 25 milhões de avaliações de energia, o número máximo de 27.000 gerações, com uma taxa de mutação de 0,02, uma taxa de cruzamento de 0,80, tolerância de cluster de 2 Å e tamanho populacional de 150, foram executados. A estrutura com a menor energia livre de ligação no aglomerado com maior densidade, foi escolhida como a melhor posição de ancoragem.

### 3.4 CONFECÇÃO DE GRÁFICOS E ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para os ensaios de atividade enzimática, foram realizados pelo menos dois experimentos independentes, em triplicata, e os valores obtidos foram organizados em planilhas, utilizando *Microsoft Office Excel*®, versão 2019.

Os resultados foram tratados através da análise de variância (ANOVA) de 1 via, e aplicado o pós-teste de Tukey, utilizando o programa *GraphPad Prism*<sup>TM</sup> 9.0. Os resultados foram considerados diferentes estatisticamente quando  $p < 0,05$ .

As análises de regressão linear das curvas de calibração do ácido gálico e quercetina para a quantificação de compostos fenólicos e flavonoides totais, respectivamente, foram realizadas no *Microsoft Office Excel*®, versão 2019.

Para construir os cromatogramas foi utilizado o programa computacional Origin<sup>TM</sup>® versão 6.0. Para o processamento e análises dos espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C foi usado o programa MestReNova® versão 6.1.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DAS ESPÉCIES *Passiflora edulis*, *P. cincinnata* e *P. foetida*

Existem técnicas de extração que podem causar a degradação dos compostos termossensíveis, devido à altas temperaturas que são intrínsecas de algumas técnicas <sup>[130]</sup>. Logo, é de suma importância que se utilize técnicas que minimizem a degradação desses compostos <sup>[131]</sup>. Deste modo, a obtenção dos extratos etanólicos de cada espécie foram realizadas por maceração, uma técnica simples e que utiliza condições amenas.

As partes aéreas de cada espécie vegetal foram submetidas a extração por maceração e os rendimentos podem ser visualizados na TABELA 2. Após a maceração com etanol, obteve-se 4,25 g (2,74%), 4,91 g (2,45%), 11,98 g (5,99%) e 12,84 g (6,42%) de extrato da *P. cincinnata* (PC), *P. edulis* (PE), e *P. foetida* (PFA01 e PFA02), respectivamente.

Pode-se observar que o maior rendimento de extração foi atingido com a PFA02. Existem alguns fatores que contribuem para esse resultado, como o local da coleta (por influências da irrigação, luz, pragas, solo, etc) e maturação da planta, quando se compara plantas da mesma espécie, a proporção das partes da planta (folhas, flores, frutos) <sup>[130]</sup>, e a concentração de metabólitos secundários presente em cada espécie.

**TABELA 2.** Rendimento da maceração das espécies em estudo.

| Planta                        | Massa | Volume de Solvente | Rendimento % |
|-------------------------------|-------|--------------------|--------------|
| <i>Passiflora cincinnata</i>  | 155 g | 620 mL             | 2,74         |
| <i>Passiflora edulis</i>      | 200 g | 800 mL             | 2,45         |
| <i>Passiflora foetida</i> A01 | 200 g | 800 mL             | 5,99         |
| <i>Passiflora foetida</i> A02 | 200 g | 800 mL             | 6,42         |

**FONTE:** Próprio autor.

Após a realização dos ensaios de inibição enzimática (Tópico 4.4) com cada um dos extratos, selecionou-se a *Passiflora foetida* A02 para a realização do fracionamento e isolamento dos inibidores de cisteína proteases por ter apresentado o maior percentual de inibição.

Uma nova extração, com uma quantidade maior de material vegetal foi realizada, para que fosse possível o isolamento dos metabólitos secundários, uma vez que esta nova extração foi realizada com cada uma das partes da planta separadamente (folhas, galhos, flores, frutos).

Partindo-se de 225,0 g, 174,9 g, 15,8 g e 43,9 g de galhos, folhas, flores e frutos da PFA02, respectivamente, obteve-se 8,2 g (3,64%), 13,9 g (7,99%), 1,2 g (7,32%) e 3,4 g (7,74%) de cada extrato (TABELA 3).

**TABELA 3.** Rendimento da maceração das partes aéreas da espécie em estudo.

| Planta                         | Massa    | Volume de Solvente | Rendimento % |
|--------------------------------|----------|--------------------|--------------|
| <i>P. foetida</i> A02- GALHOS  | 225 g    | 900 mL             | 3,64         |
| <i>P. foetida</i> A02 - FOLHAS | 174,92 g | 700 mL             | 7,99         |
| <i>P. foetida</i> A02 - FLOR   | 15,84 g  | 67 mL              | 7,32         |
| <i>P. foetida</i> A02 - FRUTOS | 43,89 g  | 176 mL             | 7,74         |

**FONTE:** Próprio autor.

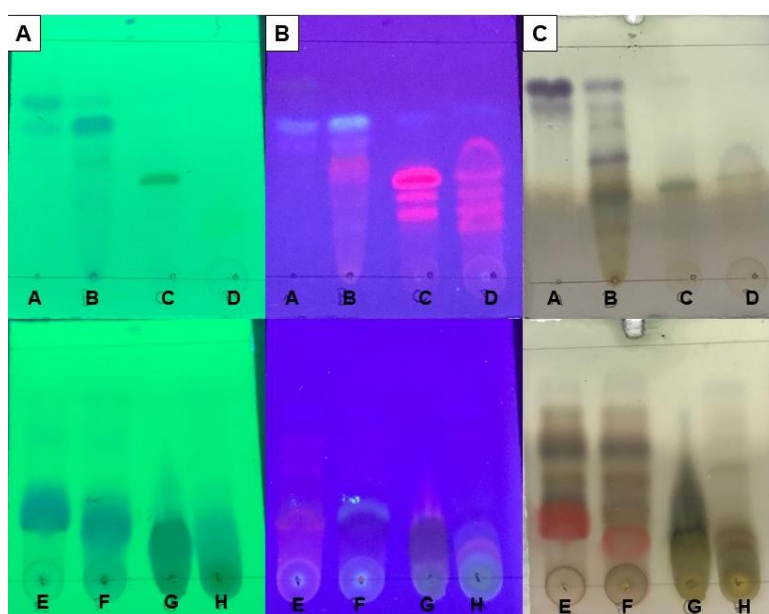
Na TABELA 3 foi visto que os maiores rendimentos de extração foram obtidos para o extrato das folhas, flores e frutos. Um fator responsável por esse resultado, é a maior produção de metabólitos secundários, pelas folhas, flores e frutos, quando comparado com os galhos. Além disso os galhos possuem em sua composição polímeros lignocelulósicos que são insolúveis nos solventes orgânicos, logo não serão extraídos no processo <sup>[132]</sup>. Essas concentrações de metabólitos secundários estão diretamente ligadas ao rendimento que cada parte aérea apresenta <sup>[130]</sup>.

## 4.2 FRACIONAMENTO DO EXTRATO DOS GALHOS DE *P. foetida*

O extrato dos galhos de *Passiflora foetida* A02 (PFG), como apresentou o maior potencial de inibição de cisteíno proteases (Tópico 4.4), foi submetido a partição líquido-líquido, o que resultou em quatro frações: PFGHex (1,01 g), PFGD (3,72 g), PFGAcOEt (0,37 g), PFGHA (3,08 g). Na sequência, a fração com maior inibição enzimática (PFGD: fração diclorometano dos galhos de *P. foetida*) foi submetida a um fracionamento por cromatografia líquida clássica. Após o fracionamento cromatográfico obteve-se 8 subfrações que após as reuniões realizadas de acordo com a semelhança em seu perfil químico, obteve-se 8 subfrações (PFGD-A à PFGD-H).

As massas obtidas de cada subfração foram: PFGD-A: 220 mg, PFGD-B: 160 mg, PFGD-C: 120 mg, PFGD-D: 140 mg, PFGD-E: 340 mg, PFGD-F: 110 mg, PFGD-G: 2,24 g e PFGD-H: 700 mg. Estas subfrações foram analisadas por CCD utilizando hexano/acetato de etila, 2:1 (v/v) como eluente, e UV (254 e 365 nm) e vanilina sulfúrica 1% como reveladores (FIGURA 19).

**FIGURA 19.** Análise das subfrações PFGD-A à PFGD-H por cromatografia em camada delgada (CCD). Reveladores utilizados: (A) UV 254nm; (B) UV 365nm; (C) Vanilina Sulfurica 1%.



**FONTE:** Próprio autor.

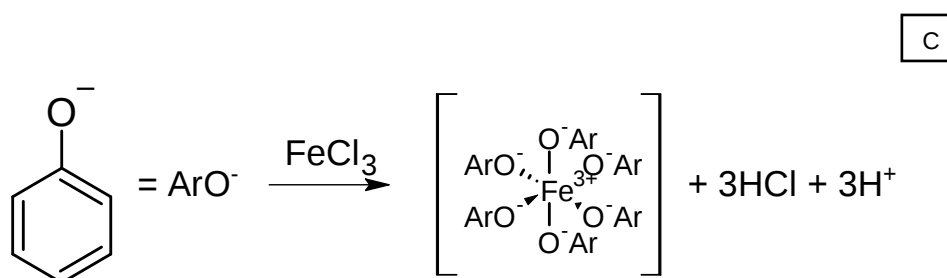
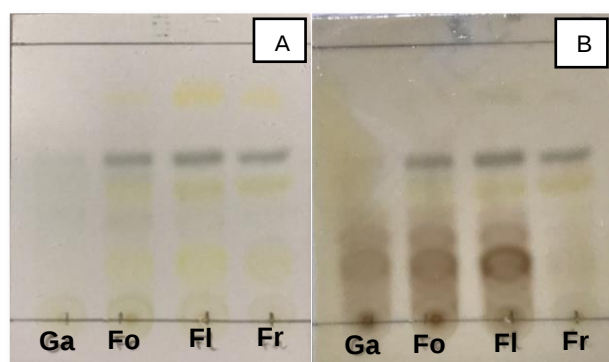
As análises realizadas por CCD foram utilizadas para verificar a separação cromatográfica e a complexidade das subfrações obtidas, e assim auxiliar no isolamento das substâncias nas próximas etapas de separação. Pode-se observar que o processo de separação por CLC foi conduzido como esperado, uma vez que se observa substâncias com polaridades cada vez maiores da subfração PGFD-A para a subfração PGFD-H, e consequentemente com perfis químicos diferentes.

### 4.3 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA

Com o objetivo de identificar as classes de metabólitos secundários presentes nesses extratos, diferentes reveladores químicos e luz UV (254 e 365 nm) foram utilizados. As análises indicaram a presença de flavonoides, fenóis, triterpenos, ácidos graxos, alcaloides e antraquinonas nos extratos das folhas, galhos e flores de *P. foetida* (TABELA 4). No extrato dos frutos não se detectou antraquinonas e alcaloides, enquanto as cumarinas não foram detectadas em nenhum dos extratos.

Em todos os extratos foi possível identificar a presença de compostos fenólicos, evidenciados com bandas de coloração marrom (FIGURA 20B). A reação que ocorre é a formação de um complexo entre o ferro e os compostos fenólicos (FIGURA 20C).

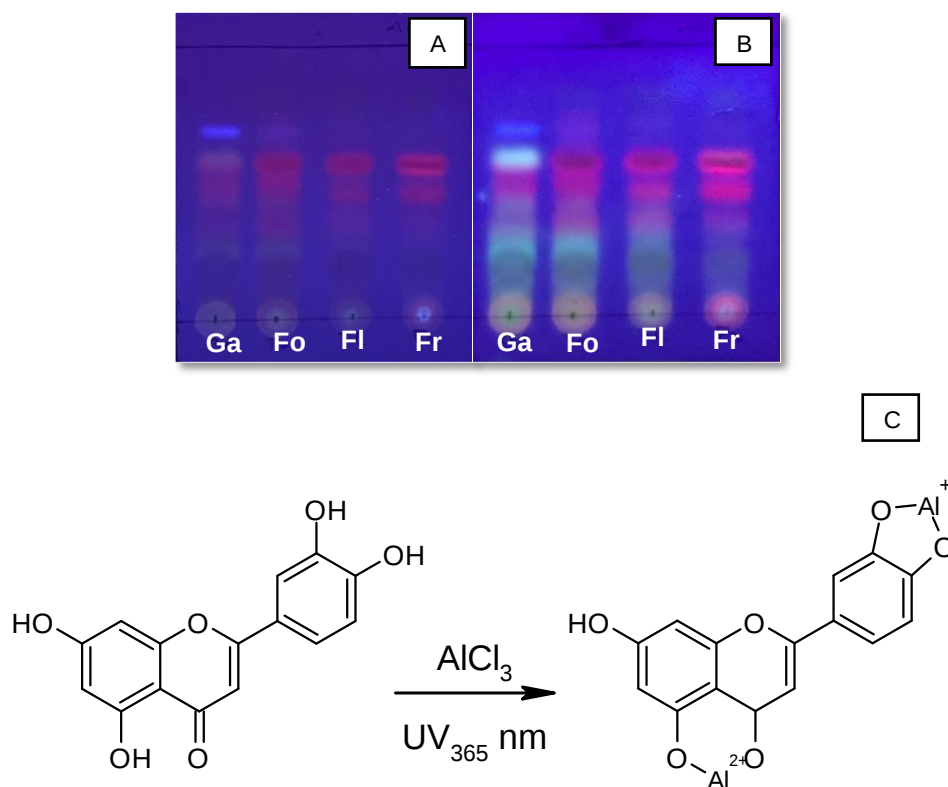
**FIGURA 20.** Análise das frações das partes aéreas de *P. foetida* por cromatografia em camada delgada (CCD) para a identificação de compostos fenólicos. CCD antes (A) e depois (B) da revelação com cloreto férrico 5% e reação química entre compostos fenólicos e cloreto férrico (C).



**Ga:** Galhos; **Fo:** Folhas; **Fl:** Flores; **Fr:** Frutos; **FONTE:** Pereira, 2020 <sup>[133]</sup>.

Na FIGURA 21 pode-se observar a intensificação das bandas em UV<sub>365</sub> nm, depois do contato da placa de CCD com a solução de cloreto de alumínio, indicando a presença de flavonoides nos extratos (FIGURA 21B). A reação que ocorre é a formação de um complexo entre o alumínio presente no AlCl<sub>3</sub>, e os flavonoides (FIGURA 21C).

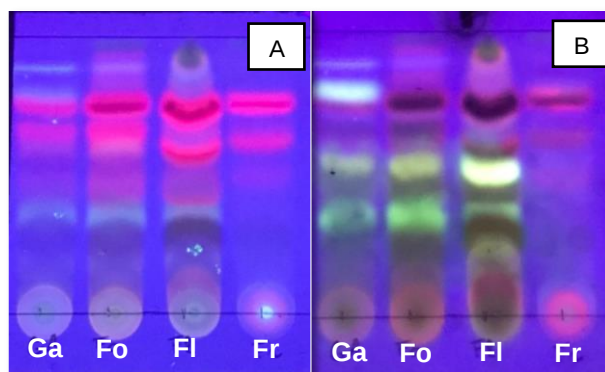
**FIGURA 21.** Análise das frações das partes aéreas de *P. foetida* por cromatografia em camada delgada (CCD) para a identificação de flavonoides. CCD antes (A) e depois (B) da revelação com cloreto de alumínio 5% sob luz UV 365 nm e reação química entre flavonoides e cloreto de alumínio (C).



**Ga:** Galhos; **Fo:** Folhas; **Fl:** Flores; **Fr:** Frutos. **FONTE:** Ilmi *et. al*, 2020 [125].

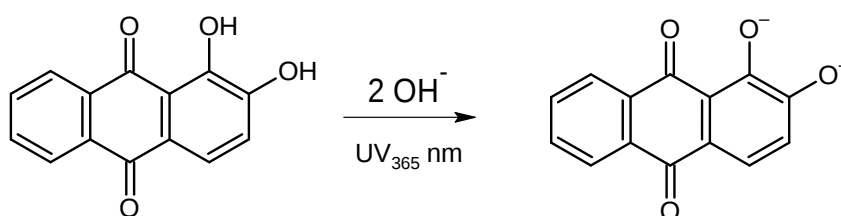
Na FIGURA 22B, as bandas no  $\text{UV}_{365}$  com a cor amarela indicam a presença de antraquinonas nos galhos, folhas e flores. Além disso, não há bandas no  $\text{UV}_{365}$  na cor azul-esverdeado que indiquem a presença de cumarinas em nenhum dos extratos testados. A reação que evidencia a presença de antraquinonas ocorre por conta da desprotonação das hidroxilas em meio básico, enquanto para detecção de cumarinas ocorre uma reação de hidrólise alcalina (FIGURA 22C).

**FIGURA 22.** Análise das frações das partes aéreas de *P. foetida* por cromatografia em camada delgada (CCD) para a identificação de antraquinonas e cumarinas. CCD antes (A) e depois (B) da revelação com hidróxido de potássio 5% e reação química das cumarinas e antraquinonas em meio básico (C).

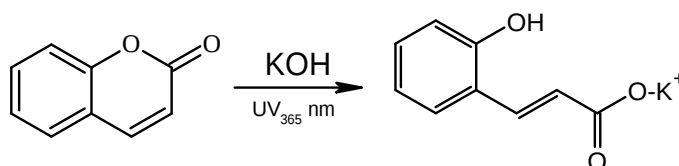


#### Reação de Antraquinonas

C



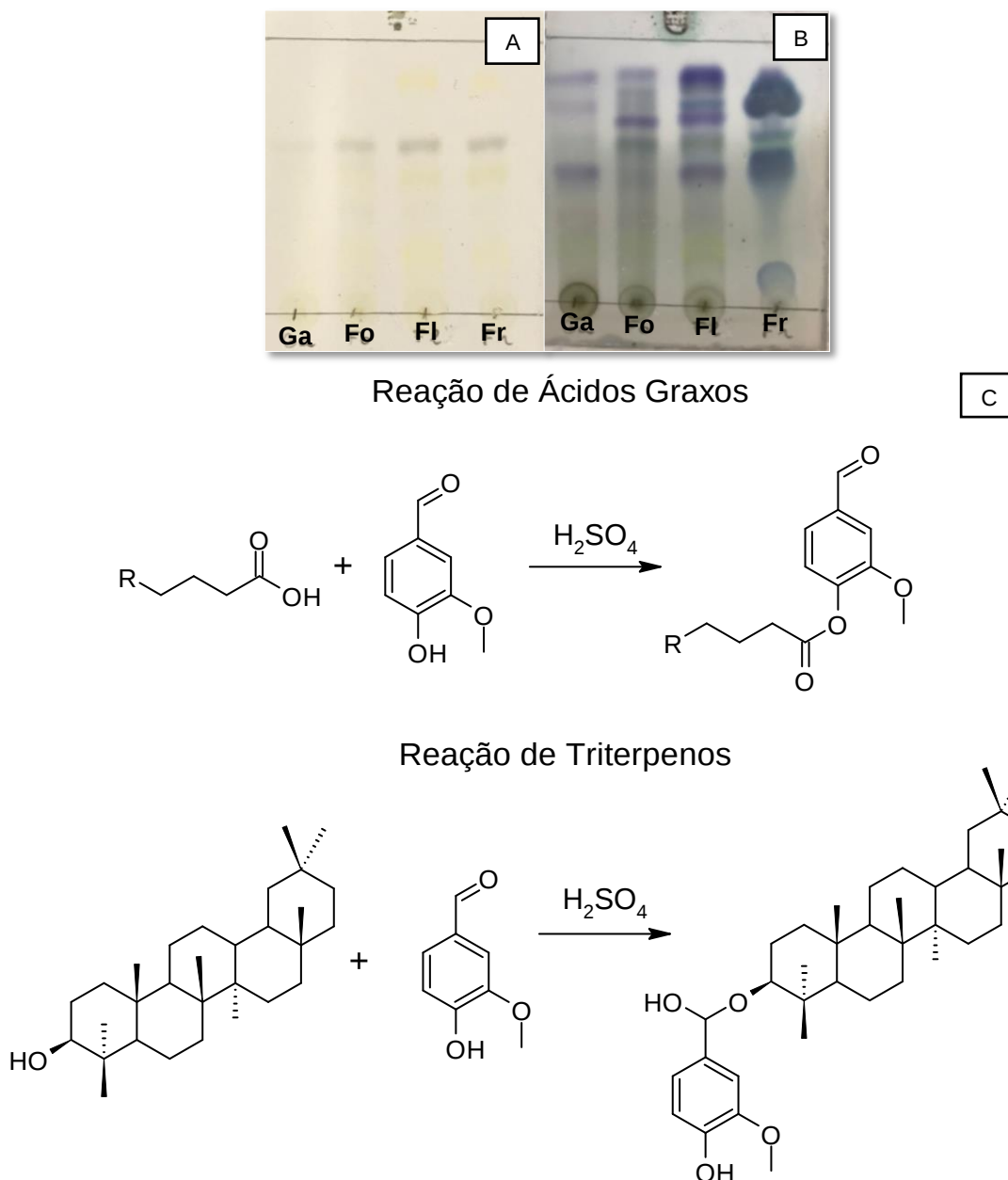
#### Reação de Cumarinas



**Ga:** Galhos; **Fo:** Folhas; **Fl:** Flores; **Fr:** Frutos; **FONTE:** Dulo, et. al 2021 <sup>[134]</sup>; Kiliç, 2013 <sup>[135]</sup>.

Na FIGURA 23, observa-se o surgimento de bandas na cor azul, que indica a presença de ácidos graxos, e na cor violeta que indica a presença de triterpenos, em todos os extratos das partes aéreas, após o contato da placa de CCD com a vanilina sulfúrica (FIGURA 23B). A reação para formação de hemiacetais é o princípio para detecção de triterpenos, e a reação de esterificação é estabelecida para detecção de ácidos graxos (FIGURA 23C).

**FIGURA 23.** Análise das frações das partes aéreas de *P. foetida* por cromatografia em camada delgada (CCD) para a identificação de triterpenos e ácidos graxos. CCD antes (A) e depois (B) da revelação com vanilina sulfúrica 1% e reação química entre ácidos graxos, triterpenos e vanilina sulfúrica 1% (C).

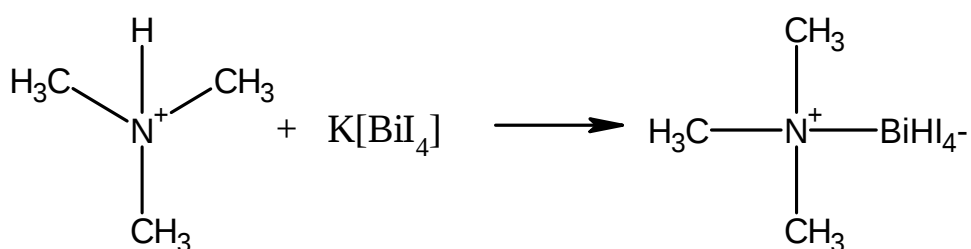
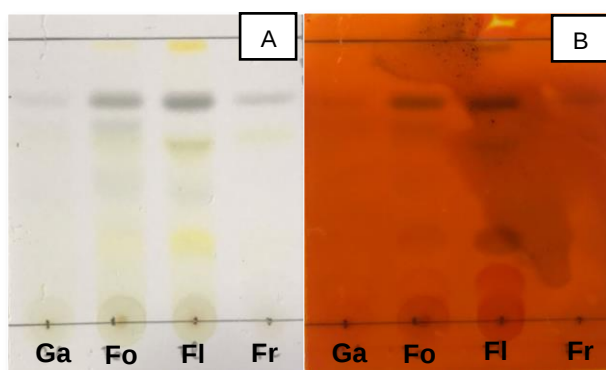


**Ga:** Galhos; **Fo:** Folhas; **Fl:** Flores; **Fr:** Frutos; **FONTE:** Próprio Autor.

Na FIGURA 24B, bandas na cor laranja são identificadas e indicam a presença de alcaloides nos extratos das folhas, flores e com menor intensidade no extrato dos galhos, entretanto, não foi possível visualizar essa banda no extrato dos frutos. A reação para identificação de alcaloides ocorre entre o

nitrogênio protonado e o tetraiodobismutato de potássio presentes no reagente de Dragendorff (FIGURA 24C).

**FIGURA 24.** Análise das frações das partes aéreas de *P. foetida* por cromatografia em camada delgada (CCD) para a identificação de alcaloides. CCD antes (A) e depois (B) da revelação com reagente de Dragendorff e reação química entre o alcaloide e o reagente de Dragendorff (C).



**Ga:** Galhos; **Fo:** Folhas; **Fl:** Flores; **Fr:** Frutos; **FONTE:** Próprio Autor.

**TABELA 4.** Resultado da triagem fitoquímica nas partes aéreas da *Passiflora foetida* A02.

| SUBSTÂNCIAS                | GALHOS | FOLHAS | FLOR | FRUTO |
|----------------------------|--------|--------|------|-------|
| <i>Triterpenos</i>         | +      | +      | +    | +     |
| <i>Ácidos Graxos</i>       | +      | +      | +    | +     |
| <i>Flavonoides</i>         | +      | +      | +    | +     |
| <i>Compostos fenólicos</i> | +      | +      | +    | +     |
| <i>Cumarinas</i>           | -      | -      | -    | -     |
| <i>Antraquinonas</i>       | +      | +      | +    | -     |
| <i>Alcaloides</i>          | +      | +      | +    | -     |

(+): presente; (-): ausente. **FONTE:** Próprio Autor.

No estudo de Patil e Paikrao (2012) <sup>[79]</sup>, todas as classes de metabólitos secundários citadas acima, incluindo esteroides e taninos, foram identificadas no extrato etanólico de *Passiflora foetida* (folhas e frutos). Porém como o estudo não traz as informações do extrato de cada parte aérea da espécie de modo separado, não tem como saber se os metabólitos secundários presentes no extrato estão presentes nas folhas e/ou nos frutos, contudo, compostos da classe dos flavonoides, alcaloides, triterpenos e antraquinonas, são comuns com os resultados deste trabalho.

Tandoro *et. al* (2020) <sup>[73]</sup> identificaram no extrato das folhas e no extrato dos frutos de *Passiflora foetida*, alcaloides, flavonoides, compostos fenólicos e esteroides, na forma de glicosídeos cardioativos, enquanto as saponinas (que podem ser esteroidais ou triterpenoidais) foram identificadas somente nos extratos das folhas. Como pode-se ver os autores detectaram alcaloides no extrato dos frutos de *Passiflora foetida*, enquanto aqui neste trabalho essa classe não foi identificada. Isso pode acontecer devido a alguns fatores, como local e época da coleta, além das condições de extração que não foram as mesmas deste trabalho.

Antony *et. al.* (2021) <sup>[136]</sup> identificaram no extrato dos galhos somente flavonoides e esteroides, diferente deste trabalho (TABELA 4), onde se detectou, além deste metabólitos secundários, triterpenos, antraquinonas e alcaloides.

Mais uma vez o local e a época da coleta, o tipo de extração, entre outros, são fatores primordiais que podem afetar a quantidade dos metabólitos secundários presentes na espécie vegetal.

Não foi possível encontrar na literatura, dados que abordem a composição fitoquímica no extrato das flores de *Passiflora foetida*, logo, esse é o primeiro estudo que aborda a presença de constituintes como alcaloides, compostos fenólicos (flavonoides e antraquinonas) e triterpenos, nessa parte da planta.

Os testes fitoquímicos também foram realizados nas subfrações mais ativas (PFGD-C, PFGD-D e PFGD-E), para identificar quais classes de metabólitos presentes poderiam ser os prováveis responsáveis pela inibição. Além dos testes realizados com os extratos, a fração PFGD foi submetida ao teste para detectar taninos, já que essa classe de metabólitos secundários é considerada um potente inibidor inespecífico de enzimas, devido a sua complexação com proteínas <sup>[137]</sup>. Contudo, o resultado do teste de taninos foi negativo, descartando então a possibilidade de serem os taninos, os responsáveis pela inibição da fração diclorometano.

As análises indicaram a presença de triterpenos, compostos fenólicos e alcaloides nas três subfrações. Os flavonoides estão presentes somente na PFGD-C e PFGD-E, e os ácidos graxos não estão presentes em nenhuma das subfrações (TABELA 5).

**TABELA 5.** Resultado da triagem fitoquímica nas subfrações mais ativas.

| SUBSTÂNCIAS                | PFGD-C | PFGD-D | PFGD-E |
|----------------------------|--------|--------|--------|
| <i>Triterpenos</i>         | +      | +      | +      |
| <i>Ácidos Graxos</i>       | -      | -      | -      |
| <i>Flavonoides</i>         | +      | -      | +      |
| <i>Compostos fenólicos</i> | +      | +      | +      |
| <i>Alcaloides</i>          | +      | +      | +      |

(+): presente; (-): ausente. **FONTE:** Próprio Autor.

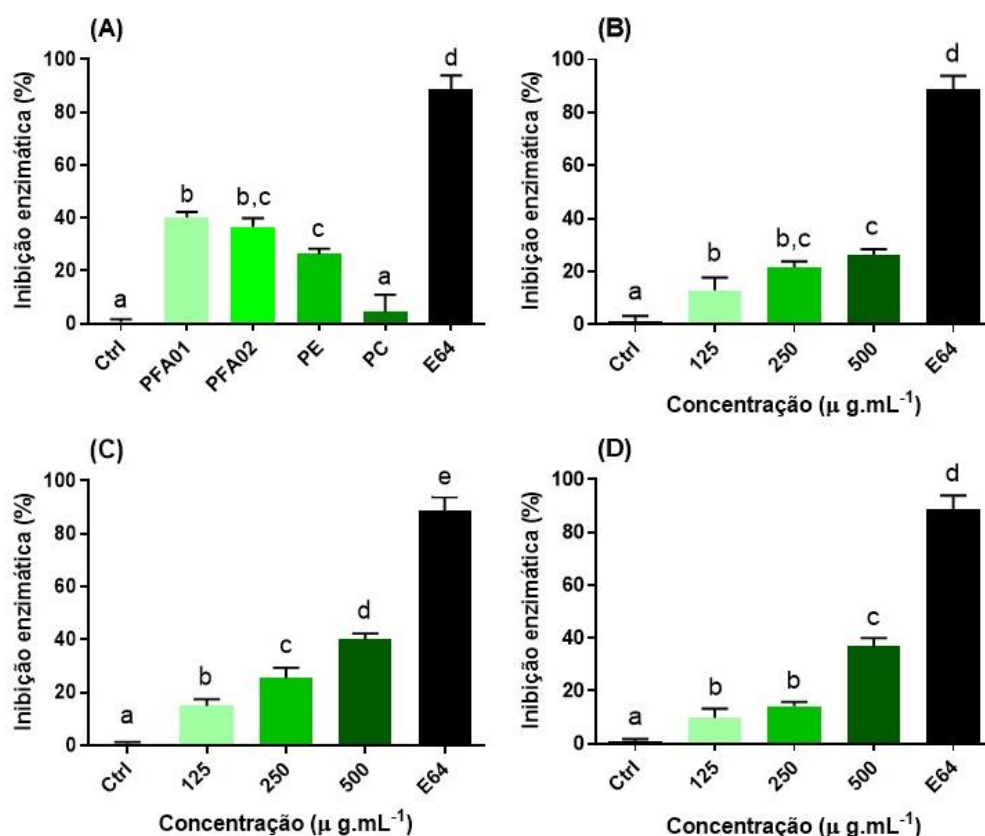
A *Passiflora* é uma fonte muito rica em várias classes de metabólitos secundários, incluindo alcaloides, flavonoides, saponinas, monoterpenos, sesquiterpenos e carotenoides, além de minerais, fibras e vitaminas, que já são explorados pelo ser humano <sup>[138]</sup>. Entretanto, fatores como solo, local, época do ano, podem afetar a produção desses metabólitos.

#### **4.4 ATIVIDADE DE INIBIÇÃO ENZIMÁTICA DOS EXTRATOS E FRAÇÕES**

##### **4.4.1 EXTRATOS BRUTOS DAS ESPÉCIES *P. cincinnata*, *P. edulis* e *P. foetida***

Como um *screening* inicial, os ensaios de inibição enzimática foram realizados com os extratos brutos das partes aéreas de três espécies de *Passiflora*: *Passiflora foetida*, *Passiflora cincinnata* e *Passiflora edulis*. Estes resultados podem ser observados na FIGURA 25.

**FIGURA 25.** Porcentagem de inibição da papaína com os extratos brutos da *Passiflora edulis*, *P. cincinnata* e *P. foetida* utilizando três concentrações diferentes (125, 250, 500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e para comparação estatística foi utilizado o inibidor E64 (10  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ). Foram realizadas análise de variância ANOVA e teste de Tukey. Letras diferentes indicam diferença estatística e letras iguais indicam que não há diferença estatística entre os grupos, segundo o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).



(A) Extratos das espécies *P. edulis* (PE), *P. cincinnata* (PC) e *P. foetida* (PF), na concentração 500  $\mu\text{g/mL}$ ; (B) *Passiflora edulis*; (C) *Passiflora foetida* A01; (D) *Passiflora foetida* A02. E64: Inibidor; Ctrl: Controle. FONTE: Próprio Autor.

Pode-se observar na FIGURA 25A que os extratos de *P. foetida* A01 (40,15%) e *P. foetida* A02 (36,67%), apresentaram os maiores valores de inibição enzimática, e não apresentaram diferença estatística, portanto, ambos os acessos apresentaram o mesmo efeito de inibição enzimática.

O extrato de *Passiflora cincinnata* não apresentou atividade de inibição enzimática, como pode-se observar na FIGURA 25A. Dessa forma não foi

avaliado o efeito da concentração deste extrato sobre a atividade de inibição enzimática.

O extrato de *P. edulis*, (FIGURA 25B) apresentou atividade de inibição enzimática em todas as concentrações testadas: 125  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (12,97%), 250  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (15,37%) e 500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (22,57%), apresentando diferença estatística em relação ao controle negativo (Ctrl). Entretanto, a concentração de 250  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  não possui diferença estatística com as outras duas concentrações.

A PFA01 apresentou atividade enzimática em todas as concentrações testadas (FIGURA 25C): 125  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (14,91%), 250  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (25,47%) e 500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (40,15%), mostrando um efeito concentração-dependente, ou seja, quanto maior a concentração de extrato, maior foi a atividade de inibição enzimática. Como pode-se observar houve diferença estatística entre todos os grupos.

A PFA02 também apresentou atividade enzimática em todas as concentrações testadas (FIGURA 25D). Observa-se que todas as concentrações tiveram diferença estatística com o controle, porém, as concentrações de 125  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (9,73%) e 250  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (14,22%) não possuem diferença estatística entre si.

O E64, é um inibidor irreversível de cisteíno proteases, e foi utilizado como controle positivo de inibição. Esta substância apresentou porcentagem de inibição em 88,56% (10  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ), e apresentou diferença estatística com todas as frações testadas.

Como pode ser visto nos gráficos da FIGURA 25, os extratos de *P. foetida* obtiveram destaque na inibição, demonstrando seu potencial para a descoberta de inibidores de cisteíno proteases. Apesar do local de coleta da *P. foetida* serem diferentes (Acesso 01 e 02), os extratos desses acessos não possuem diferença estatística entre os seus resultados de inibição enzimática. Isso reforça que esta espécie é a mais promissora na busca desses inibidores.

#### 4.4.2 EXTRATOS BRUTOS DAS PARTES AÉREAS DE *P. foetida*

Como a *P. foetida* foi a planta que apresentou os melhores resultados de inibição enzimática, ela foi selecionada para o fracionamento e isolamento dos

possíveis inibidores de cisteíno proteases. Deste modo, as partes aéreas da *Passiflora foetida* (folhas, galhos, flor e frutos) foram separadas, após a escolha da espécie vegetal mais ativa, e seus extratos foram submetidos aos ensaios de inibição enzimática. A *P. foetida* acesso 02 (PFA02) foi escolhido pela maior disponibilidade da planta no local da coleta, uma vez que os extratos brutos dos dois acessos (A01 e A02) não mostraram diferença estatística em suas atividades de inibição enzimática.

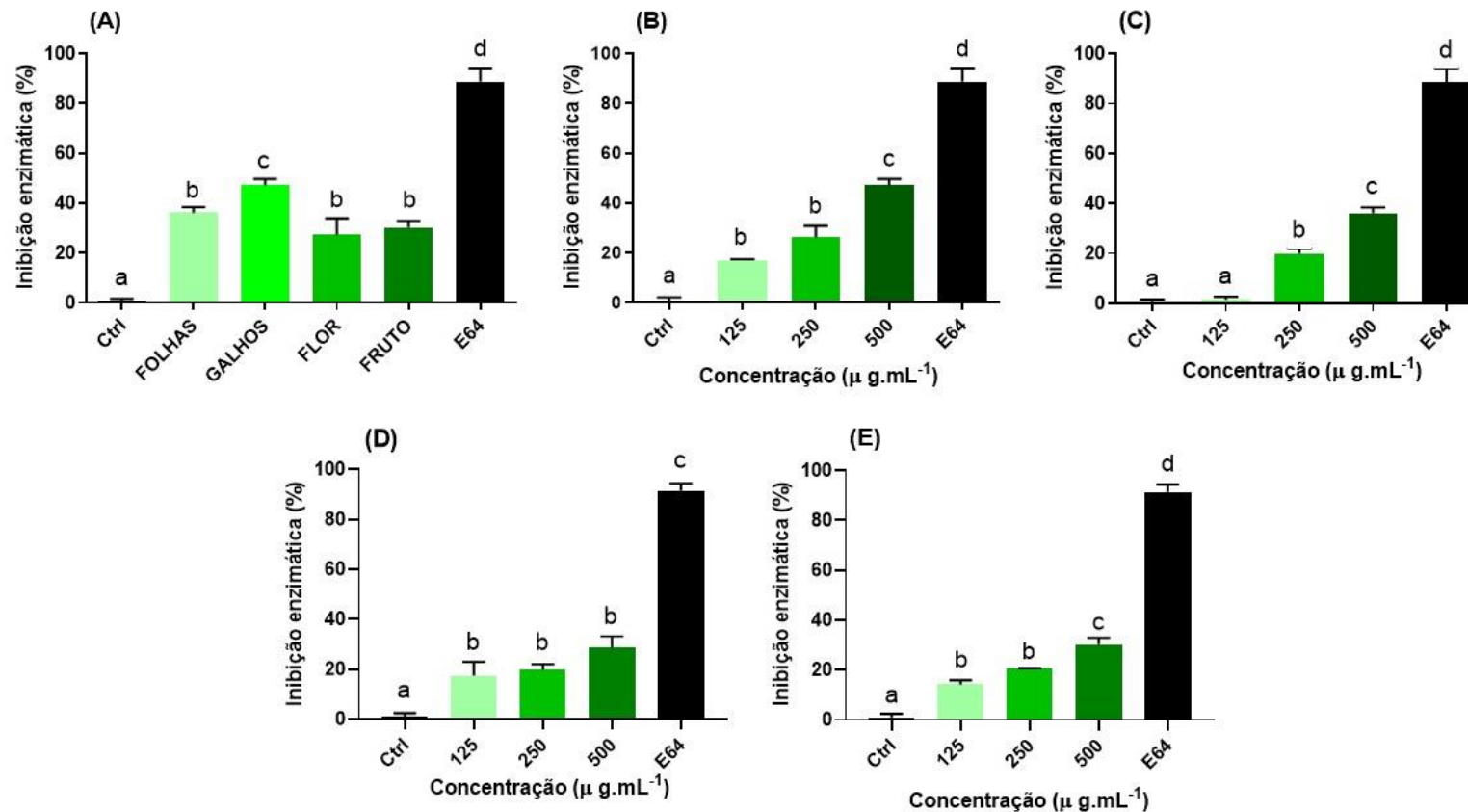
Observa-se na FIGURA 26A que a concentração de 500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  mostrou novamente a maior inibição para todos os extratos vegetais, tendo o extrato dos galhos da *Passiflora foetida* (PFG) a maior porcentagem de inibição (47,17%). Como pode-se observar, houve diferença estatística entre os extratos dos galhos e todos os outros extratos.

Pode-se observar nas FIGURAS 26B, 26D e 26E que as concentrações de 125 e 250  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  não mostraram diferença estatística entre si, para o extrato dos galhos (PFG), extrato das flores (PFFI) e extrato dos frutos (PFFr). Para o extrato das folhas (PFFo) (FIGURA 26C), observou-se o efeito concentração-dependente, porém, a concentração de 125  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  não teve diferença estatística com o controle negativo.

No estudo de Paulraj (2014) <sup>[139]</sup> avaliou-se o efeito de inibição das enzimas  $\alpha$ -glucosidase e  $\alpha$ -amilase com o extrato das mistura das partes aéreas da *Passiflora foetida*. Os resultados mostraram potencial de inibição da  $\alpha$ -glucosidase (> 70%), e potencial de inibição da  $\alpha$ -amilase (> 80%). Diante disso, conclui-se que as partes aéreas (folhas, galhos, flores e frutos) dessa espécie apresentam potencial em inibir outros tipos de enzima.

Todos os resultados apresentados nos gráficos da FIGURA 26, mostram que os extratos dos galhos de *P. foetida* possuem o maior potencial inibitório, logo, o estudo colaborou para identificar qual parte aérea da espécie pode ser a responsável pela maior concentração de inibidores de cisteíno proteases. Além disso, este é o primeiro trabalho na literatura que apresenta resultados sobre a inibição de uma cisteíno protease frente a espécie de *Passiflora foetida*.

**FIGURA 26.** Porcentagem de inibição da papaína com os extratos brutos das partes aéreas de *Passiflora foetida* A02 utilizando as concentrações: 125, 250, 500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e para comparação estatística foi utilizado o inibidor E64 (10  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ). Foram realizadas análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey. Letras diferentes indicam diferença estatística e letras iguais indicam que não há diferença estatística entre os grupos, segundo o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

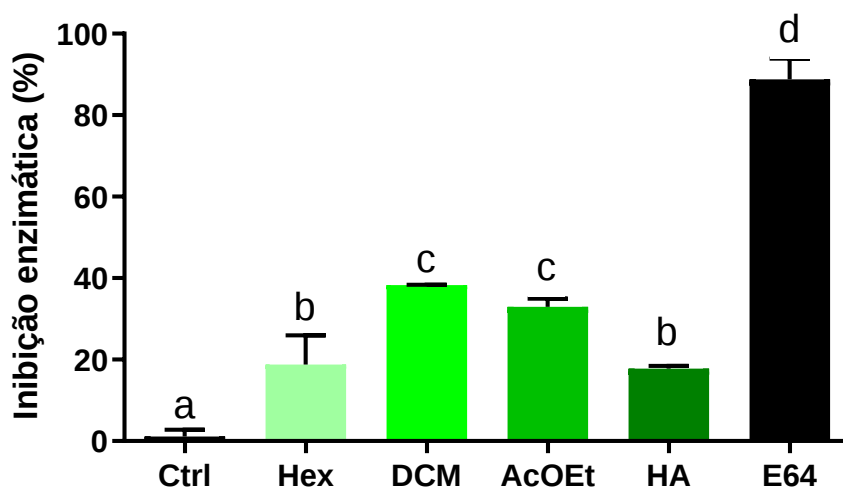


(A) Extratos de *P. foetida* na concentração de 500  $\mu\text{g/mL}$ ; (B) GALHOS; (C) FOLHAS; (D) FLOR; (E) FRUTO; E64: Inibidor; Ctrl: Controle. **FONTE:** Próprio autor.

#### 4.4.3 FRAÇÕES PROVENIENTES DO EXTRATO BRUTO DOS GALHOS DE *P. foetida*

O extrato dos galhos de *P. foetida* foi selecionado para seguir o estudo de isolamento bioguiado, pois foi o que apresentou maior atividade de inibição enzimática, além de possuir maior disponibilidade (massa) dentre as partes estudadas. Logo, este extrato foi submetido a partição líquido-líquido, obtendo-se as frações hexano, diclorometano, acetato de etila e hidroalcolica, que em seguida foram submetidas a atividade de inibição enzimática na concentração de 500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (FIGURA 27).

**FIGURA 27.** Porcentagem de inibição da papaína com as frações obtidas da partição líquido-líquido dos galhos de *Passiflora foetida* (500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e para comparação estatística foi utilizado o inibidor E64 (10  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ). Foram realizadas análise de variância ANOVA e teste de Tukey. Letras diferentes indicam diferença estatística e letras iguais indicam que não há diferença estatística entre os grupos, segundo o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).



**E64:** Inibidor; **Ctrl:** Controle; **Hex:** Hexano; **DCM:** Diclorometano; **AcOEt:** Acetato de etila; **HA:** Hidroalcolico; **FONTE:** Próprio autor.

A fração diclorometano dos galhos de *P. foetida* (PFGD) apresentou maior média de atividade de inibição enzimática (38,31%), seguido da fração acetato de etila (PFGAcOEt) (32,92%), entretanto não mostrou diferença estatística

entre si. Contudo, como a fração PFGD possuía a maior massa (3,72 g), selecionou-se esta fração para o isolamento das substâncias bioativas.

A fração hexano (PFGHex) (18,78%) e a fração hidroalcóolica (PFGHA) (17,79%) dos galhos de *P. foetida* resultaram em menores efeitos de inibição enzimática, sem diferença estatística entre elas (FIGURA 27). Mesmo não possuindo um potencial de inibição de cisteíno proteases relevante, a fração hexano das folhas de *P. foetida* inibiu em 96,46% a enzima acetilcolinesterase (0,8 mg.mL<sup>-1</sup>), segundo FILHO *et al.* (2018) [140]. Logo, é necessário que novos estudos sejam realizados para verificar se as frações dos galhos, com menores potenciais de inibição de cisteíno protease, também possuem resultados melhores na inibição de outras classes de enzimas.

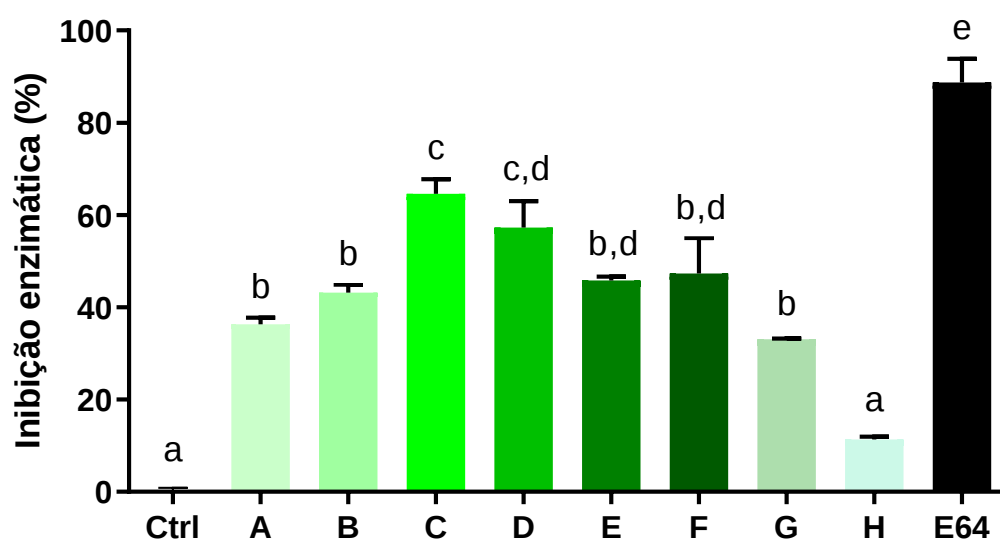
Portanto, com os resultados apresentados nos gráficos da Figura 27, há indícios de que as substâncias presentes nas frações diclorometano e acetato de etila são potenciais inibidores de cisteíno protease presentes na espécie.

#### 4.4.4 SUBFRAÇÕES PROVENIENTES DA FRAÇÃO DICLOROMETANO DOS GALHOS DE *P. foetida* POR CLC

Após os resultados de inibição enzimática com as frações da partição líquido-líquido, a fração diclorometano (PFGD) foi escolhida para continuar o estudo. Esta fração foi submetida ao fracionamento por CLC, resultando em oito subfrações. Na sequência, estas subfrações foram submetidas a atividade de inibição enzimática.

Como pode-se observar na Figura 28, a PFGD-C obteve a maior média percentual de inibição enzimática (64,63%), seguido da PFGD-D (57,24%), PFGD-F (47,36%) e PFGD-E (45,83%), entretanto não se observou diferença estatística entre PFGD-C e PFGD-D, e entre PFGD-F e PFGD-E. As outras frações apresentaram os seguintes valores de inibição enzimática, em ordem decrescente: PFGD-B (43,14%), PFGD-A (36,28%), PFGD-G (33,09%) e PFGD-H (11,33%).

**FIGURA 28.** Porcentagem de inibição da papaína das frações obtidas por cromatografia líquida clássica a partir da fração diclorometano dos galhos da *Passiflora foetida* A02 (PFGD) ( $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e para comparação estatística foi utilizado o inibidor E64 ( $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ). Foram realizadas análise de variância ANOVA e teste de Tukey. Letras diferentes indicam diferença estatística e letras iguais indicam que não há diferença estatística entre os grupos, segundo o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).



E64: Inibidor; Ctrl: Controle; FONTE: Próprio Autor.

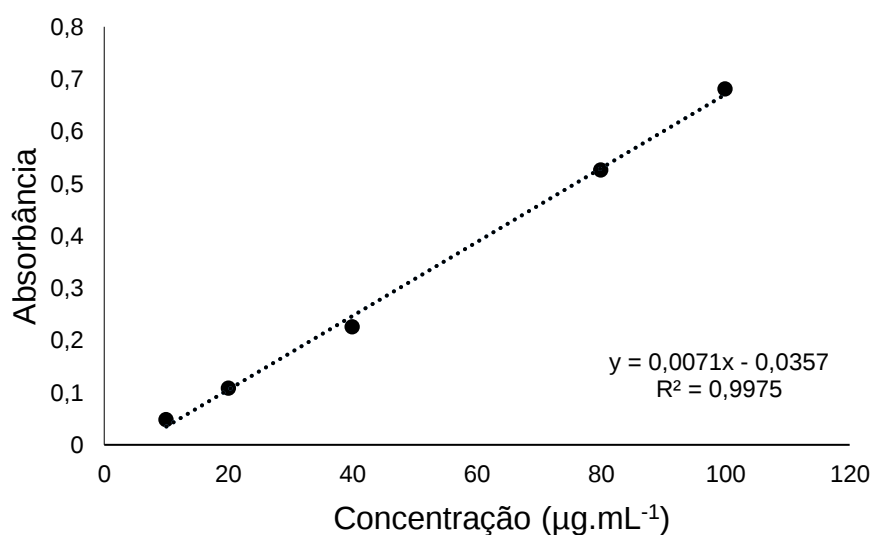
Todas as subfrações, com exceção da PFGD-H, obtiveram diferença estatística com o controle, portanto, a subfração PFGD-H não possui potencial de inibição de cisteína proteases.

As subfrações PFGD-C (120 mg) e PFGD-D (140 mg) foram escolhidas para o isolamento e identificação das substâncias, já que apresentaram os maiores percentuais de inibição enzimática, enquanto a subfração PFGD-E foi selecionada, pelos seguintes fatores: maior massa (340 mg) dentre as frações mais ativas e percentual de inibição sem diferença estatística com a subfração PFGD-D.

#### 4.5 QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS E FLAVONOIDES TOTAIS E SUA RELAÇÃO COM A INIBIÇÃO ENZIMÁTICA

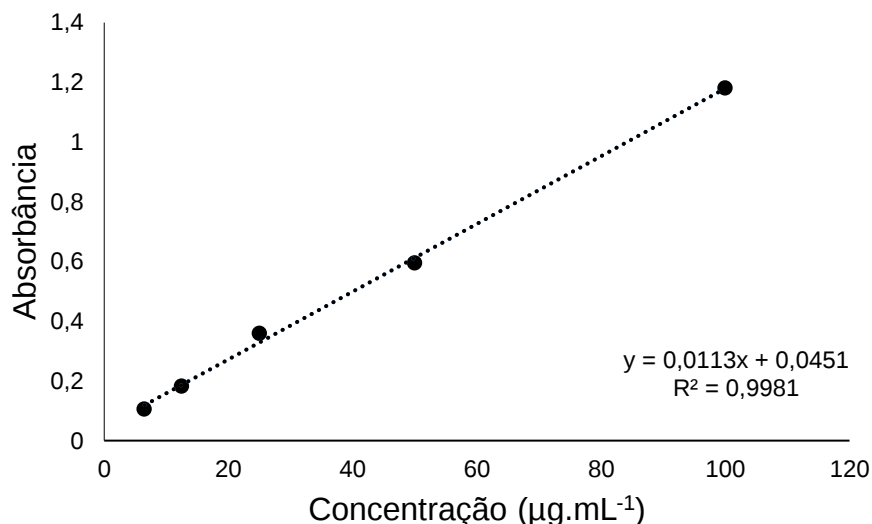
Para quantificar os compostos fenólicos totais e flavonoides totais foram construídas curvas de calibração utilizando o ácido gálico e a quercetina, respectivamente (FIGURA 29 e 30). Empregando a equação da reta construída com ácido gálico ( $y = 0,0071x - 0,0357$ ) foi possível determinar o teor de compostos fenólicos totais (mg EqAG/g de extrato) presente nas amostras, enquanto utilizando a equação da reta construída com a quercetina ( $y = 0,0113x + 0,0451$ ) foi possível determinar o teor (mg EqQUE/g de extrato) de flavonoides totais presente nas amostras.

**FIGURA 29.** Curva de calibração do ácido gálico (10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , 20  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , 40  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , 80  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ).



**FONTE:** Próprio Autor.

**FIGURA 30.** Curva de calibração da quercetina ( $6,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ,  $12,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ,  $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ,  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ).



**FONTE:** Próprio Autor.

Como pode-se observar na TABELA 6, os dois acessos de *P. foetida* (PFA01) apresentaram as maiores concentrações de compostos fenólicos (PFA01:  $63,43 \pm 2,58 \text{ mg EqAG/g}$  de extrato; PFA02:  $51,18 \pm 4,82 \text{ mg EqAG/g}$  de extrato), mas diferentes estatisticamente. Em contrapartida, a *P. cincinnata* apresentou a menor concentração ( $34,56 \pm 0,69 \text{ mg EqAG/g}$  de extrato), assim como a *P. edulis* que foi estatisticamente igual ( $37,05 \pm 1,39 \text{ mg EqAG/g}$  de extrato).

Em relação a quantificação de flavonoides totais a PFA02 apresentou maior concentração ( $33,66 \pm 1,48 \text{ mg EqQUE/g}$  de extrato), quando comparado com a PFA01 e as outras espécies. Como pode ser observado na TABELA 6, as concentrações de flavonoides totais da PC ( $25,03 \pm 3,13 \text{ mg EqQUE/g}$  de extrato), PE ( $23,48 \pm 7,02 \text{ mg EqQUE/g}$  de extrato) e PFA01 ( $28,28 \pm 3,89 \text{ mg EqQUE/g}$  de extrato) não apresentaram diferença estatísticas entre si.

**TABELA 6.** Concentração de compostos fenólicos totais (mg EqAG/g de extrato), flavonoides totais (mg EqQUE/g de extrato) das espécies de *Passiflora* e atividade de inibição enzimática dos extratos na concentração de 500 µg/mL. Foram realizadas análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey. Letras diferentes indicam diferença estatística e letras iguais indicam que não há diferença estatística entre os grupos, segundo o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

| AMOSTRAS | COMPOSTOS FENÓLICOS<br>(mg EqAG/g de extrato) | FLAVONOIDES<br>(mg EqQUE/g de extrato) | INIBIÇÃO ENZIMÁTICA (%)     |
|----------|-----------------------------------------------|----------------------------------------|-----------------------------|
| PC       | 34,56 ± 0,69 <sup>a</sup>                     | 25,03 ± 3,13 <sup>a</sup>              | 2,68 ± 6,44 <sup>a</sup>    |
| PE       | 37,05 ± 1,39 <sup>a</sup>                     | 23,48 ± 7,02 <sup>a</sup>              | 22,57 ± 2,13 <sup>b</sup>   |
| PFA01    | 63,43 ± 2,58 <sup>b</sup>                     | 28,28 ± 3,89 <sup>a</sup>              | 40,15 ± 2,17 <sup>c</sup>   |
| PFA02    | 51,18 ± 4,82 <sup>c</sup>                     | 33,66 ± 1,48 <sup>b</sup>              | 36,67 ± 3,3 <sup>b, c</sup> |

PC: *Passiflora cincinnata*; PE: *Passiflora edulis*; PFA01: *Passiflora foetida* Acesso 01; PFA02: *Passiflora foetida* Acesso 02.

No estudo de Leal *et. al* (2018) <sup>[141]</sup> a concentração média de compostos fenólicos nos extratos das folhas ( $36,90 \pm 19,98$  mg EqAG/g de extrato) e dos galhos ( $45,53 \pm 14,14$  mg EqAG/g de extrato) da *P. cincinnata* foram ligeiramente superiores ao determinado neste trabalho (TABELA 6) ( $34,56 \pm 0,69$  mg EqAG/g de extrato), mas que parece não haver diferença estatística visto que os desvios padrão dos resultados destes autores foram muito elevados. Deste modo, os resultados, da quantificação de fenólicos, deste trabalho foram corroborados com os de Leal *et al.* (2018). Já quando comparamos a concentração de flavonoides, Leal *et. al* (2018) detectaram valores inferiores ao deste trabalho (TABELA 6), sendo  $1,42 \pm 0,01$  mg EqQUE/g de extrato (folhas) e  $1,37 \pm 0,21$  mg EqQUE/g de extrato (galhos).

Na *Passiflora edulis* a maioria dos trabalhos abordam a quantificação do extrato da polpa e cascas dos frutos, impossibilitando a comparação com este trabalho. No entanto, dois autores determinaram os compostos fenólicos e flavonoides totais para folhas e galhos dessa espécie. No estudo de Ramaiya *et. al* (2014) <sup>[142]</sup> a concentração de fenóis totais no extrato metanólico das folhas e galhos foi de  $23,7 \pm 1,1$  mg EqAG/g e  $25,8 \pm 0,6$  mg EqAG/g, respectivamente, valores inferiores ao deste trabalho (TABELA 6). Já Martins *et. al* (2015) <sup>[143]</sup> apresentou resultados superiores, onde no extrato etanólico das folhas determinou-se  $46,7 \pm 1,15$  mg EqAG/g de extrato. Badalova *et. al* (2021) <sup>[144]</sup> obteve com o extrato metanólico dos frutos valores inferiores de compostos fenólicos totais ( $1,44 \pm 0,26$  mg EqAG/g de extrato) e flavonoides ( $1,23 \pm 0,24$  mg EqQUE/g de extrato) quando comparados aos desse trabalho.

A diferença nos valores de quantificação entre os estudos pode ser relacionada com o tipo de material em análise <sup>[130]</sup>, sendo que, nas quantificações com as partes aéreas de forma separadas, os dados vão apresentar composição e quantidade diferente de metabólitos secundários, que são extremamente importantes e de contribuição direta nas divergências dos resultados. Na literatura não há trabalhos que mostrem as quantificações com extrato das partes aéreas reunidas.

Com relação a atividade de inibição enzimática, os extratos da PE e PC, apesar de apresentarem quantidades próximas de fenóis e flavonoides, apresentaram resultados diferentes na inibição, logo, é possível que algum

metabólito secundário específico seja o responsável pelo maior efeito de inibição do extrato da PE.

Os extratos PFA01 e PFA02, obtiveram os maiores resultados da inibição enzimática e maiores concentrações de fenóis e flavonoides, sendo a espécie escolhida para continuar os estudos, indicando que esta classe de metabólitos secundários pode ser a principal classe responsável pela inibição enzimática.

A seguir pode-se observar se há correlação entre a quantidade de compostos fenólicos e flavonoides totais presentes nas partes aéreas (galhos, folhas, flor e frutos) de *P. foetida* e o efeito de inibição enzimática (TABELA 7).

De acordo com a TABELA 7, o extrato das folhas apresentou a maior concentração de compostos fenólicos ( $64,21 \pm 6,60$  mg EqAG/g de extrato) e de flavonoides ( $30,99 \pm 3,29$  mg EqQUE/g de extrato), e tiveram diferença estatística com todas as demais partes aéreas citadas no estudo.

Os compostos fenólicos presentes nas flores ( $55,69 \pm 1,04$  mg EqAG/g de extrato) e nos galhos ( $49,42 \pm 0,92$  mg EqAG/g de extrato) não tiveram diferença estatística entre si. Entretanto, na concentração de flavonoides, houve diferença estatística entre estas partes ( $9,20 \pm 0,87$  mg EqQUE/g de extrato das flores e  $19,39 \pm 1,98$  mg EqQUE/g de extrato dos galhos).

A menor concentração de compostos fenólicos foi encontrada nos frutos ( $30,46 \pm 2,36$  mg EqAG/g de extrato). Além disso não se detectou flavonoides neste extrato ( $0,00 \pm 0,85$  mg EqQUE/g de extrato). Esses resultados obtiveram diferenças estatísticas com as demais partes aéreas.

**TABELA 7.** Concentração de compostos fenólicos totais (mg EqAG/g de extrato), flavonoides totais (mg EqQUE/g de extrato) das partes aéreas de *Passiflora foetida* e atividade de inibição enzimática dos extratos na concentração de 500 µg/mL. Foram realizadas análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey. Letras diferentes indicam diferença estatística e letras iguais indicam que não há diferença estatística entre os grupos, segundo o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

| AMOSTRAS       | COMPOSTOS FENÓLICOS<br>(mg EqAG/g de extrato) | FLAVONOIDES<br>(mg EqQUE/g de extrato) | INIBIÇÃO ENZIMÁTICA (%)   |
|----------------|-----------------------------------------------|----------------------------------------|---------------------------|
| PFA02 – GALHOS | 49,42 ± 0,92 <sup>a</sup>                     | 19,39 ± 1,98 <sup>a</sup>              | 47,17 ± 2,55 <sup>a</sup> |
| PFA02 – FOLHAS | 64,21 ± 6,60 <sup>b</sup>                     | 30,99 ± 3,29 <sup>b</sup>              | 36,16 ± 2,28 <sup>b</sup> |
| PFA02 – FLOR   | 55,69 ± 1,04 <sup>a</sup>                     | 9,20 ± 0,87 <sup>c</sup>               | 28,64 ± 6,69 <sup>b</sup> |
| PFA02 – FRUTOS | 30,46 ± 2,36 <sup>c</sup>                     | 0,00 ± 0,85 <sup>d</sup>               | 30,33 ± 2,60 <sup>b</sup> |

PFA02: *Passiflora foetida* Acesso 02.

No estudo de Asir (2014) <sup>[145]</sup> analisou-se o teor de compostos fenólicos e flavonoides em diferentes partes aéreas da *Passiflora foetida* (folha, sementes, raiz, frutos maduros e frutos não maduros), em diferentes extratos. Os resultados demonstraram que os extrato aquoso e etanol apresentaram as maiores concentrações de compostos fenólicos. Consequentemente, isso respalda a utilização do etanol no presente estudo, para extrair a maior quantidade possível de compostos fenólicos.

Tandoro (2020) <sup>[73]</sup> obteve concentrações inferiores de compostos fenólicos para as folhas ( $22,92 \pm 0,18$  mg EqAG/g de extrato) e frutos ( $6,53 \pm 1,02$  mg EqAG/g de extrato), e na concentração de flavonoides dos frutos ( $1,56 \pm 0,27$  mg EqQUE/g de extrato) e das folhas ( $7,01 \pm 0,10$  mg EqQUE/g), quando comparados com os dados da TABELA 7. Essa discrepância entre os resultados pode estar ligada aos diferentes métodos de extração aplicado no trabalho citado (infusão para as folhas e maceração por três horas utilizando água destilada como solvente extrator para os frutos).

Ainda não foram publicados trabalhos que descrevem a quantificação de compostos fenólicos e flavonoides totais dos galhos e flores de *P. foetida*, logo, esse é o primeiro trabalho que aborda essas informações e a suas correlações com as demais partes aéreas citadas (folhas e frutos).

Relacionando a atividade de inibição enzimática com as concentrações de compostos fenólicos e flavonoides totais, pode-se observar que o extrato das folhas e dos galhos possuem concentrações diferentes destes compostos, tendo as folhas as maiores concentrações. Entretanto, o extrato dos galhos possui a maior porcentagem de inibição, logo, é provável que esse extrato, possua em sua composição, concentrações maiores de um determinado composto fenólico/flavonoide que interagem de forma mais eficiente com a enzima. Outra hipótese seria a presença de outras classes de metabólitos secundários no extrato dos galhos com atividade de inibição enzimática.

Como forma de correlacionar essas duas classes (compostos fenólicos e flavonoides) com a atividade de inibição enzimática, foi realizada a quantificação dos compostos fenólicos e flavonoides totais nas subfrações mais ativas (PFGD-C, PFGD-D e PFGD-E). Na TABELA 8, pode-se observar o resultado da

quantificação de compostos fenólicos e flavonoides, assim como a correlação com a atividade de inibição enzimática de cada subfração.

A maior concentração de compostos fenólicos está na PFGD-E, com  $288,07 \pm 10,95$  mg EqAG/g de extrato, diferente estatisticamente de todas as outras subfrações. A PFGD-C ( $29,07 \pm 2,27$  mg EqAG/g de extrato) e PFGD-D ( $22,80 \pm 3,62$  EqAG/g de extrato), resultou em concentrações que não tem diferença estatística entre si.

Na quantificação de flavonoides, todas as subfrações tiveram diferença estatísticas, concedendo destaque a PFGD-C com a maior concentração de flavonoides ( $21 \pm 3,72$  mg EqQUE/g de extrato). A PFGD-E resultou em uma concentração de  $17,32 \pm 2,16$  mg EqQUE/g de extrato, enquanto que na PFGD-D não foi detectado flavonoides ( $0,00 \pm 0,97$  mg EqQUE/g de extrato).

Comparando os resultados da quantificação com atividade de inibição enzimática, é visto que os flavonoides não são os principais responsáveis pela inibição da papaína, uma vez que a porcentagem de inibição da PFGD-C não tem diferença estatística com PFGD-D, fração onde não se detectou flavonoides ( $0,00 \pm 0,97$  mg EqQUE/g de extrato). Análise similar pode ser realizada para as subfrações PFGD-D e PFGD-E, onde se observa a mesma atividade de inibição enzimática. Percebe-se que quando presente, a quantidade de flavonoides é muito inferior a quantidade de compostos fenólicos, o que indica que algum outro composto fenólico, de classe diferente dos flavonoides, está sendo o principal responsável por tal efeito.

**TABELA 8.** Concentração de compostos fenólicos totais (mg EqAG/g de extrato), flavonoides totais (mg EqQUE/g de extrato) das subfrações da *Passiflora foetida* e atividade de inibição enzimática dos extratos na concentração de 500 µg/mL. Foram realizadas análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey. Letras diferentes indicam diferença estatística e letras iguais indicam que não há diferença estatística entre os grupos, segundo o teste de Tukey (p<0,05).

| AMOSTRAS | COMPOSTOS FENÓLICOS<br>(mg EqAG/g de extrato) | FLAVONOIDES<br>(mg EqQUE/g de extrato) | INIBIÇÃO<br>ENZIMÁTICA (%)   |
|----------|-----------------------------------------------|----------------------------------------|------------------------------|
| PFGD-C   | 29,07 ± 2,27 <sup>a</sup>                     | 21 ± 3,72 <sup>a</sup>                 | 64,63 ± 2,21 <sup>a</sup>    |
| PFGD-D   | 22,80 ± 3,62 <sup>a</sup>                     | 0,00 ± 0,97 <sup>b</sup>               | 57,24 ± 4,06 <sup>a, b</sup> |
| PFGD-E   | 288,07 ± 10,95 <sup>b</sup>                   | 17,32 ± 2,16 <sup>c</sup>              | 45,83 ± 0,56 <sup>b</sup>    |

PFGD: Fração diclorometano dos galhos da *Passiflora foetida*.

#### 4.6 ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS

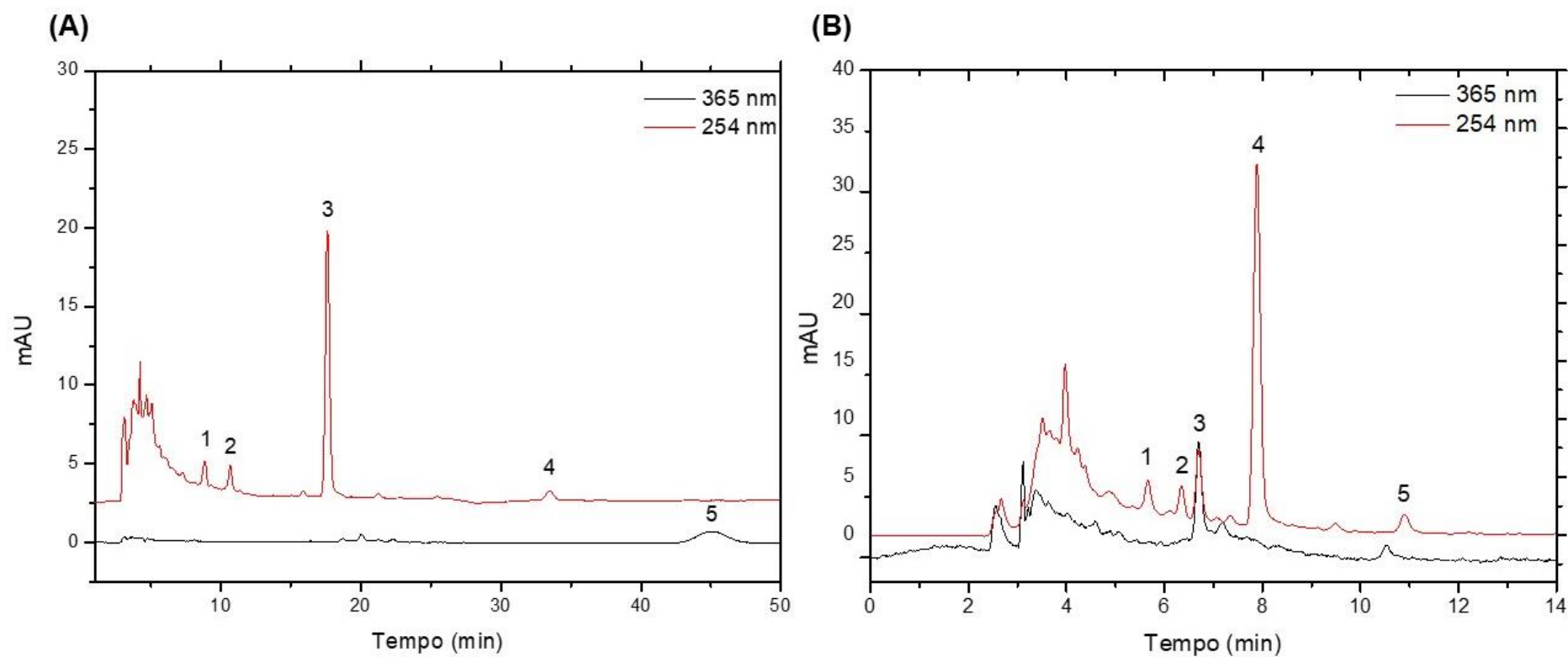
Após a obtenção das frações bioativas por meio de fracionamentos guiados pela inibição da cisteína protease, papaína, e detecção das classes de metabólitos secundários presentes nas das subfrações PFGD-C, PFGD-D e PFGD-E oriundas dos extratos dos galhos de *P. foetida*, *partiu-se* para o isolamento dos metabólitos presentes nessas subfrações. Inicialmente as subfrações PFGD-C, PFGD-D e PFGD-E foram analisadas por HPLC, para determinar as melhores condições de separação dos constituintes. Em seguida realizou-se o escalonamento em HPLC semipreparativo para o isolamento dos metabólitos secundários.

Pode-se observar na FIGURA 31A o cromatograma da subfrações PFGD-C. Este cromatograma apresentou cinco bandas bem definidas, quatro detectados em 254 nm e uma em 365nm. Contudo, a baixa intensidade das bandas dificultaria o isolamento desses constituintes no modo semipreparativo, uma vez que após o escalonamento, as bandas tendem a ficar mais largas e consequentemente com uma menor intensidade. Já a banda 3 (Tempo de retenção= 17.60 min), poderia ser mais facilmente coletada uma vez que apresentou elevada intensidade.

O cromatograma da subfração PFGD-D (FIGURA 31B) mostrou cinco bandas, com duas delas (3 e 5) sendo detectadas nos dois comprimentos (254 e 365 nm) e três (1,2 e 4) detectadas apenas em 254 nm. Com exceção das bandas 3 e 4, observam-se bandas com baixas intensidades, também dificultando o isolamento delas. Outro problema que poderia ocorrer após o escalonamento seria a coeluição das bandas 2 e 3, pois elas estão muito próximas uma da outra.

Com base nas baixas intensidades da maioria das bandas nos cromatogramas e das baixas massas dessas duas subfrações (PFGD-C, 120 mg e PFGD-D, 140 mg), seria muito difícil isolar quantidades suficiente das substâncias, para elucidar suas estruturas químicas e realizar a atividade de inibição enzimática. Com isso, o isolamento das substâncias não foi realizado com essas subfrações.

**FIGURA 31.** Cromatogramas analíticos das frações PFGD-C (A) e PFGD-D (B) obtidos por HPLC com as seguintes condições: coluna C18 Shim-Pack (4,6 x 250 mm, 10  $\mu$ ), vazão de 1 mL/min, detecção por UV a 254 e 365 nm, fase móvel ACN+0,1% ácido fórmico/H<sub>2</sub>O (65/35).

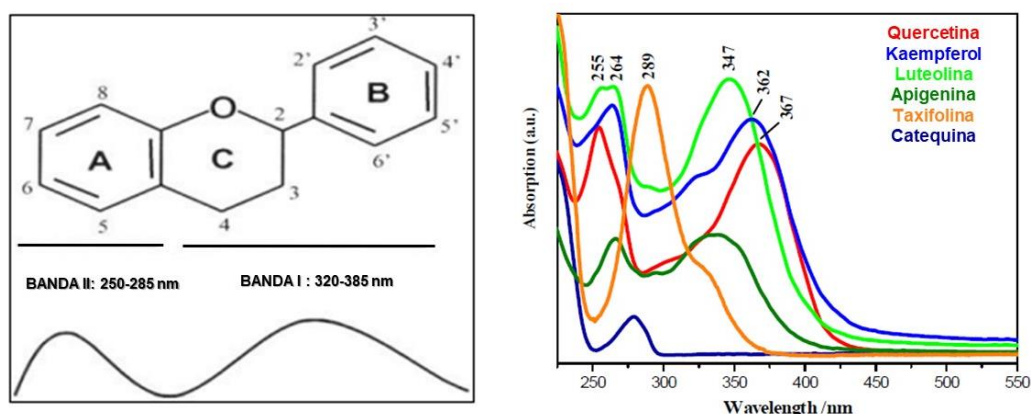


**FONTE:** Próprio Autor.

O cromatograma analítico da fração PFGD-E (FIGURA 33) revelou bandas cromatográficas com boas resoluções para a maioria delas. Com exceção das bandas 1 e 2, as outras bandas (3, 4 e 5) apresentam excelente resolução no modo analítico.

Nos espectros de UV-Vis de cada banda cromatográfica (FIGURA 33), observa-se que os seus padrões espectrais são característicos de flavonoides, revelando duas bandas de absorção principais: a banda I (320-385 nm) que representa o anel B de flavonoides, e a banda II (250-285 nm) que corresponde à absorção do anel A de flavonoides (FIGURA 32) <sup>[146]</sup>.

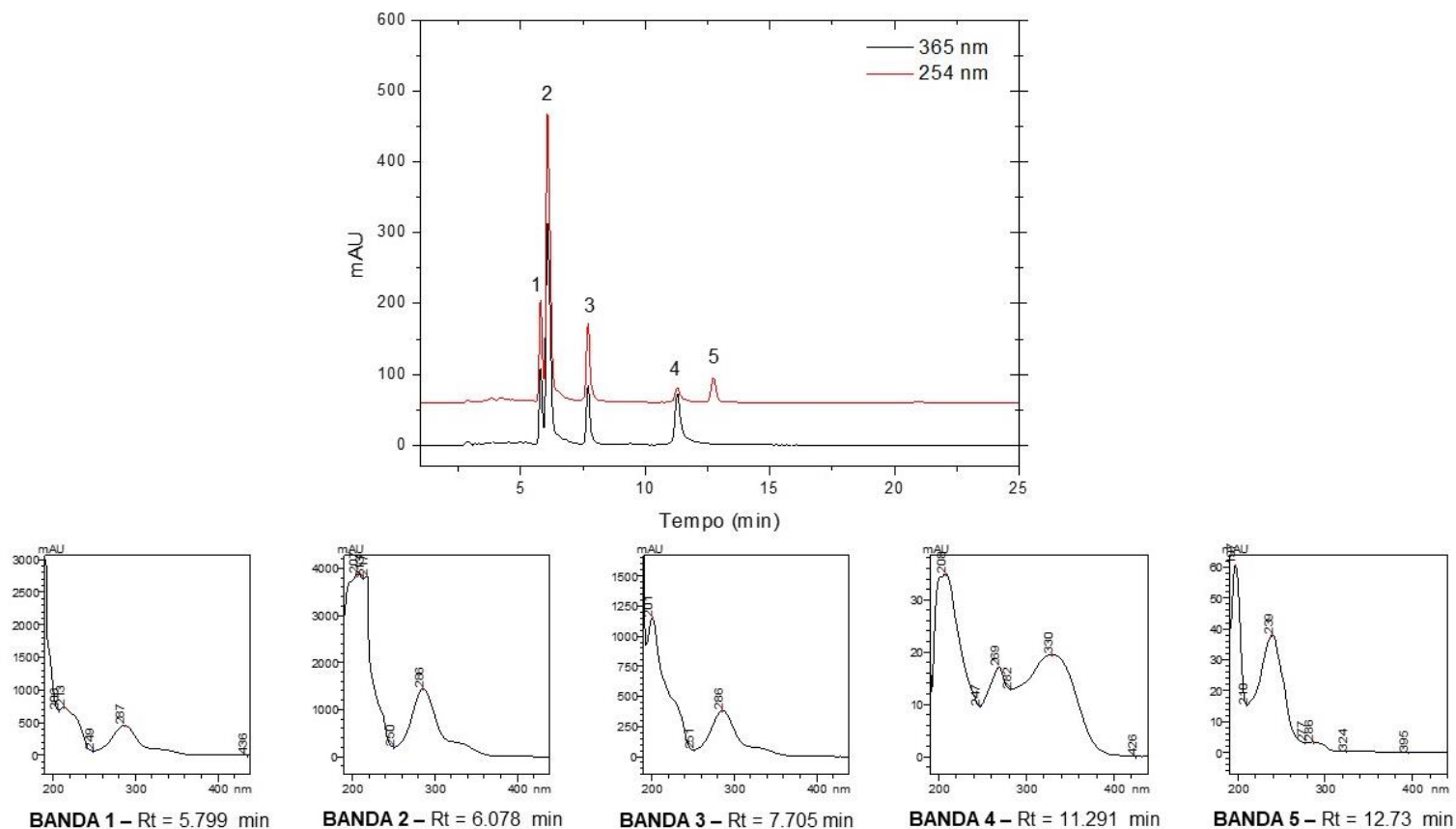
**FIGURA 32.** Características espectrais no UV-Vis de diferentes flavonoides, e espectro de absorção de cada anel do flavonoide.



**FONTE:** PRITHVIRAJ (2019) <sup>[146]</sup>; JURASEKOVA *et. al* (2007) <sup>[147]</sup>.

Comparando com os dados da literatura, todas os espectros de UV-Vis, apresentam semelhança ao padrão de flavonoides, onde as diferenças na intensidade das bandas tem relação com o tipo de substituinte que está presente nos anéis <sup>[147]</sup>, logo, é possível afirmar que todas as bandas visíveis no cromatograma, são de flavonoides.

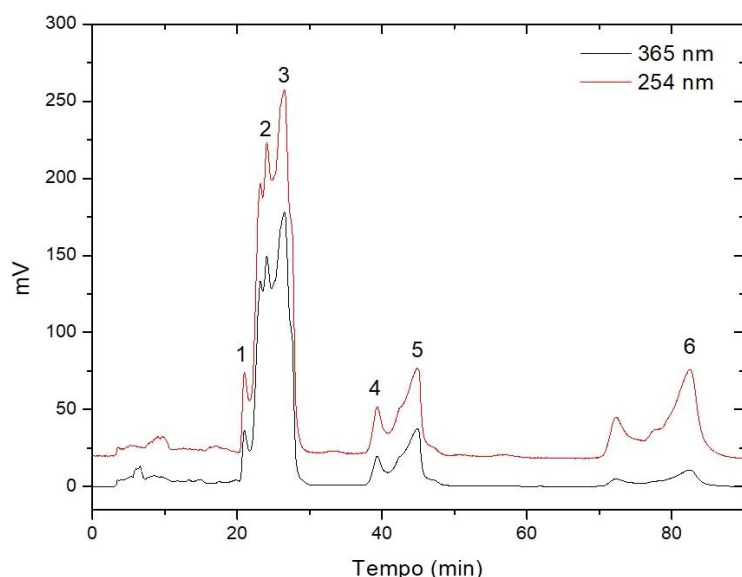
**FIGURA 33.** Cromatograma analítico da fração PFGD-E obtidos por HPLC com as seguintes condições: coluna C18 Shim-Pack (4,6 x 250 mm, 10  $\mu$ ), vazão de 1 mL/min, detecção por UV a 254 e 365 nm, fase móvel de ACN+0,1% Acido fórmico/H<sub>2</sub>O (55/45), e os espectros de UV de cada banda, com seus respectivos tempos de retenção.



**FONTE:** Próprio Autor

Iniciou-se o isolamento com a fração PFGD-E por dois motivos: não teve diferença estatística com a fração PFGD-D e por possuir maior massa. Pode-se observar na Figura 34 o cromatograma semipreparativo da subfração PFGD-E. O que se observa é que houve uma perda de resolução na separação, como se esperava, e alteração no tempo de retenção, quando comparado com as bandas do cromatograma analítico (FIGURA 33). Mesmo assim, foi possível realizar a coleta das substâncias com corte nas bandas para garantir a sua pureza.

**FIGURA 34.** Cromatograma semipreparativo da fração PFGD-E obtidos por HPLC com as seguintes condições: coluna C18 Shim-Pack (21,2 x 250 mm, 10  $\mu$ ), vazão de 14 mL/min, detecção realizada por UV a 254 e 365 nm e fase móvel ACN+0,1% ácido fórmico/H<sub>2</sub>O (55/45).



**FONTE:** Próprio Autor.

Com a PFGD-E (340mg) foi realizado o isolamento dos metabólitos secundários, resultando em 6,9 mg (PFGD-E1), 4,5 mg (PFGD-E2), 13,7 mg (PFGD-E3), 7,7 mg (PFGD-E4), 5,8 mg (PFGD-E5), 3,2 mg (PFGD-E6), o que resulta em rendimentos de 2,03%; 1,32%; 4,03%; 2,26%; 1,70%; 0,94%, respectivamente. Todas estas amostras foram enviadas para análise por RMN (Ressonância Magnética Nuclear).

## 4.7 IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS

As substâncias isoladas da subfração PFGD-E foram identificadas por RMN  $^1\text{H}$ , COSY, HSQC, HMBC, espectrometria de massas com ionização por electrospray e comparação com os dados da literatura e será detalhada nos próximos tópicos. Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento em Hertz (Hz).

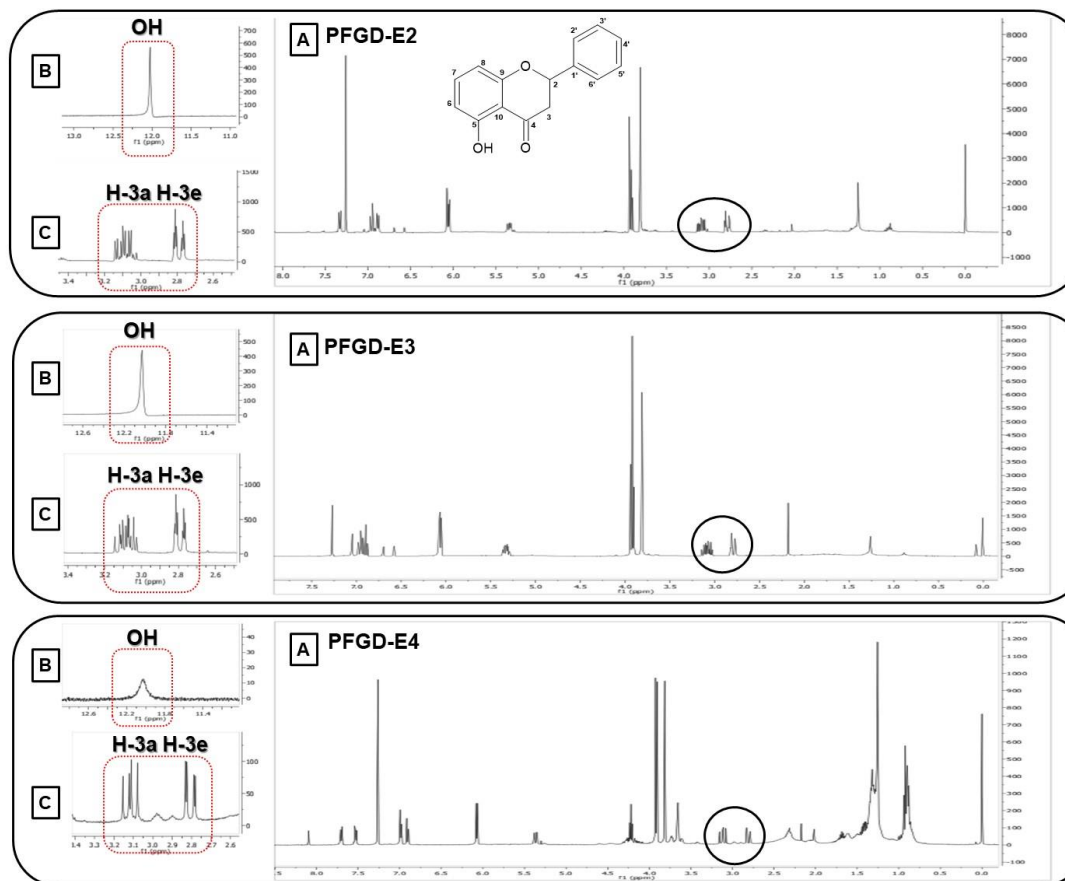
Como será visualizado a seguir, a partir da subfração PFGD-E foram isoladas duas flavanonas (Banda 1 e 5) e uma flavona (Banda 6). As demais frações coletadas, referentes as bandas 2, 3 e 4, apresentavam-se ainda em mistura e por isso não foi possível a identificação desses metabólitos secundários, por conta da complexidade da mistura. Mesmo assim a classe de flavonoides presentes nestas frações foi identificada por meio de análises realizadas por RMN  $^1\text{H}$ .

### 4.7.1 Misturas de flavanonas

As amostras referentes as bandas, 2, 3 e 4 estavam em mistura, contudo, com os dados obtidos por RMN  $^1\text{H}$  foi possível sugerir a presença de flavonoides ( $\text{C}_6\text{C}_3\text{C}_6$ ) do tipo flavanona. Alguns sinais característicos dessa classe foram observados nos espectros de RMN  $^1\text{H}$  (FIGURA 35). Foram eles: duplos dubletos na faixa de  $\delta$  2,7 a 3,1 ppm, característico de H-3e (equatorial) e H-3a (axial) do anel C; um singlete em  $\delta$  12 ppm, referente ao hidrogênio da hidroxila C-5 quelado com o oxigênio da carbonila; sinais de hidrogênios aromáticos, indicativos dos hidrogênios dos anéis A e B de flavonoides. Além desses sinais, os singletos presentes na faixa de  $\delta$  3,5 a 4,0 ppm, são característicos da presença de metoxilas.

Observa-se também sinais intensos de impurezas no espectro RMN da PFGD-E4, referentes a ésteres de ftalatos. Os sinais em  $\delta$  1,0-1,5 ppm, são característicos de hidrogênios metila ( $\text{CH}_3$ ), os hidrogênios metilênicos ( $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ ) ligados ao grupamento éster do ftalato são vistos em  $\delta$  4,0-4,5 e os sinais em  $\delta$  7,5-8,0, são referentes aos hidrogênios metínicos de anel aromático [148].

**FIGURA 35.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) mostrando sinais característicos de flavanonas nas amostras PFGD-E2, PFGD-E3 e PFGD-E4, e esqueleto da estrutura química de uma flavanona. (A) Espectro de RMN  $^1\text{H}$ , (B) Ampliação do sinal de H quelado, (C) Ampliação dos sinais de H-3 característicos de flavononas.



**FONTE:** Próprio autor.

#### 4.7.2 5,4'-dihidroxi-7-metoxi-flavanona (PFGD-E1)

Na TABELA 9 são representados os deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbonos e as constantes de acoplamentos dos hidrogênios da substância PFGD-E1, além de dados da literatura.

**TABELA 9.** Dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) da substância PFGD-E1 e comparação com os dados da literatura.

| POSIÇÃO<br>-               | PFGD-E1 ( $\text{CDCl}_3$ )   |                                | GRECCO <i>et. al</i> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) <sup>[150]</sup> |                                |
|----------------------------|-------------------------------|--------------------------------|------------------------------------------------------------------|--------------------------------|
|                            | $^1\text{H}$ $\delta$ (ppm)   | $^{13}\text{C}$ $\delta$ (ppm) | $^1\text{H}$ $\delta$ (ppm)                                      | $^{13}\text{C}$ $\delta$ (ppm) |
| <b>2</b>                   | 5,35 (dd, 13,0 e 3,0 Hz, 1H)  | 79,2                           | 5,32 (dd, $J = 13,0$ and 3,0 Hz, 1H)                             | 79,1                           |
| <b>3e</b>                  | 2,78 (dd, 17,2 e 3,0 Hz, 1H)  | 42,7                           | 2,73 (dd, $J = 17,2$ and 3,0 Hz, 1H)                             | 42,8                           |
| <b>3a</b>                  | 3,09 (dd, 17,2 e 13,0 Hz, 1H) | 42,7                           | 3,08 (dd, $J = 17,2$ and 13,0 Hz, 1H)                            | 42,8                           |
| <b>4</b>                   | -                             | 196,5                          | -                                                                | 196,5                          |
| <b>OH - 5</b>              | 12,03 (s, 1H)                 | 164,4                          | -                                                                | 163,0                          |
| <b>6</b>                   | 6,04 (d, 2,3 Hz, 1H)          | 94,7                           | 6,01 (s, 2H)                                                     | 127,6                          |
| <b>7</b>                   | -                             | 168,2                          | -                                                                | 163,6                          |
| <b>8</b>                   | 6,07 (d, 2,3 Hz, 1H)          | 94,2                           | 6,01 (s, 2H)                                                     | 93,9                           |
| <b>9</b>                   | -                             | 103,4                          | -                                                                | 102,8                          |
| <b>10</b>                  | -                             | 156,5                          | -                                                                | 157,4                          |
| <b>1'</b>                  | -                             | 130,9                          | -                                                                | 129,0                          |
| <b>2'</b>                  | 7,32 (d, 8,5 Hz, 2H)          | 128,7                          | 7,26 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H)                                       | 127,7                          |
| <b>3'</b>                  | 6,89 (d, 8,5 Hz, 2H)          | 116,3                          | 6,83 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H)                                       | 115,3                          |
| <b>OH- 4'</b>              | -                             | 156,6                          | -                                                                | 168,0                          |
| <b>5'</b>                  | 6,89 (d, 8,5 Hz, 2H)          | 116,3                          | 6,83 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H)                                       | 115,3                          |
| <b>6'</b>                  | 7,32 (d, 8,5 Hz, 2H)          | 128,7                          | 7,26 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H)                                       | 127,7                          |
| <b>OCH<sub>3</sub> - 7</b> | 3,81 (s, 3H)                  | 55,7                           | 3,77 (s, OCH <sub>3</sub> )                                      | 55,3                           |

No espectro de RMN  $^1\text{H}$  (FIGURA 36) pode ser visto um duplo dubleto em  $\delta$  2,78 ppm ( $J_{\text{H}3, \text{H}2} = 17,2$  e 3,0 Hz, 1H) e em  $\delta$  3,09 ppm ( $J_{\text{H}3, \text{H}2} = 17,2$  e 13,0 Hz, 1H), referentes aos prótons geminais H-3e (equatorial) e H-3a (axial), respectivamente, sinais característicos de flavanonas. De acordo com as constantes de acoplamento e o COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (FIGURA 37), os hidrogênios H-3a/3e, além de estarem acoplando entres si, também estão acoplando com o hidrogênio vicinal H-2, em  $\delta$  5,35 ppm (dd,  $J_{\text{H}2, \text{H}3} = 13,0$  e 3,0 Hz, 1H).

Os dubletos em  $\delta$  6,04 ppm (d,  $J_{\text{H}6, \text{H}8} = 2,3$  Hz) e  $\delta$  6,07 ppm (d,  $J_{\text{H}6, \text{H}8} = 2,3$  Hz), integrando para um hidrogênio cada, são referentes aos hidrogênios H-6 e H-8, respectivamente, e estão acoplando entre si, com constante de acoplamento típico da posição *meta* ( $J$  em torno de 2,5 Hz). O deslocamento

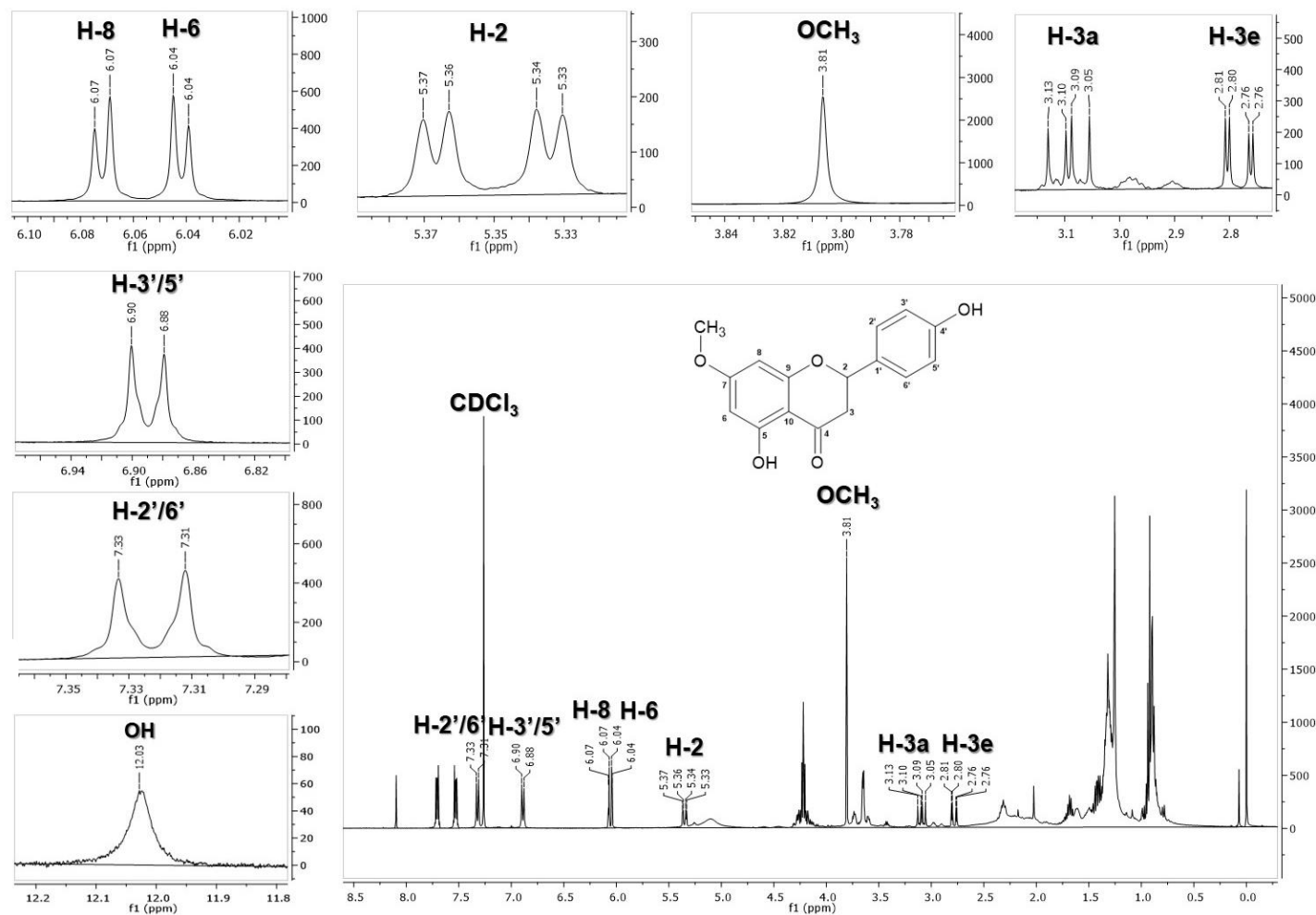
químico do H-6 e H-8 são próximos por conta do mesmo efeito de proteção dos substituintes (C-5, C-7 e C-9, oxigenados), que ambos os hidrogênios sofrem [149].

Na região de aromáticos é possível visualizar sinais referente aos hidrogênios do anel B. São vistos dois dubletos, um em  $\delta$  6,89 ppm ( $J_{H3'/5',H2'/6'} = 8,5$  Hz, 2H), referente aos hidrogênios quimicamente equivalentes H-3' e H-5' e o outro em  $\delta$  7,32 ppm ( $J_{H3'/5',H2'/6'} = 8,5$  Hz, 2H), referente aos hidrogênios H-2' e H-6', também quimicamente equivalentes. As suas constantes de acoplamento mostram que, além dos quatro hidrogênios estarem acoplando entre si, os hidrogênios H-3' e H-5', estão em posição *orto* ( $J$  em torno de 8,5 Hz) aos hidrogênios H-2' e H-6', o que indica a presença de um substituinte no C-4'. Consequentemente, os H-3' e H-5' vão apresentar deslocamento menor, que os H-2' e H-6', devido ao efeito causado pela ressonância dos pares de  $e^-$  do oxigênio sobre os carbonos C-3' e C-5', blindando seus respectivos hidrogênios. O COSY  $^1H$ - $^1H$  (FIGURA 37) confirmou a correlação entre esses hidrogênios.

O singlete altamente desprotegido em  $\delta$  12,03 ppm, integrando para um hidrogênio, indica a presença de um grupo hidroxila em um anel de seis membros (anel A), sugerindo uma forte ligação intramolecular, entre o H da hidroxila no C-5 e o oxigênio da carbonila no C-4. O singlete intenso em  $\delta$  3,81 ppm integrando para três hidrogênios é referente a uma metoxila ( $-OCH_3$ ).

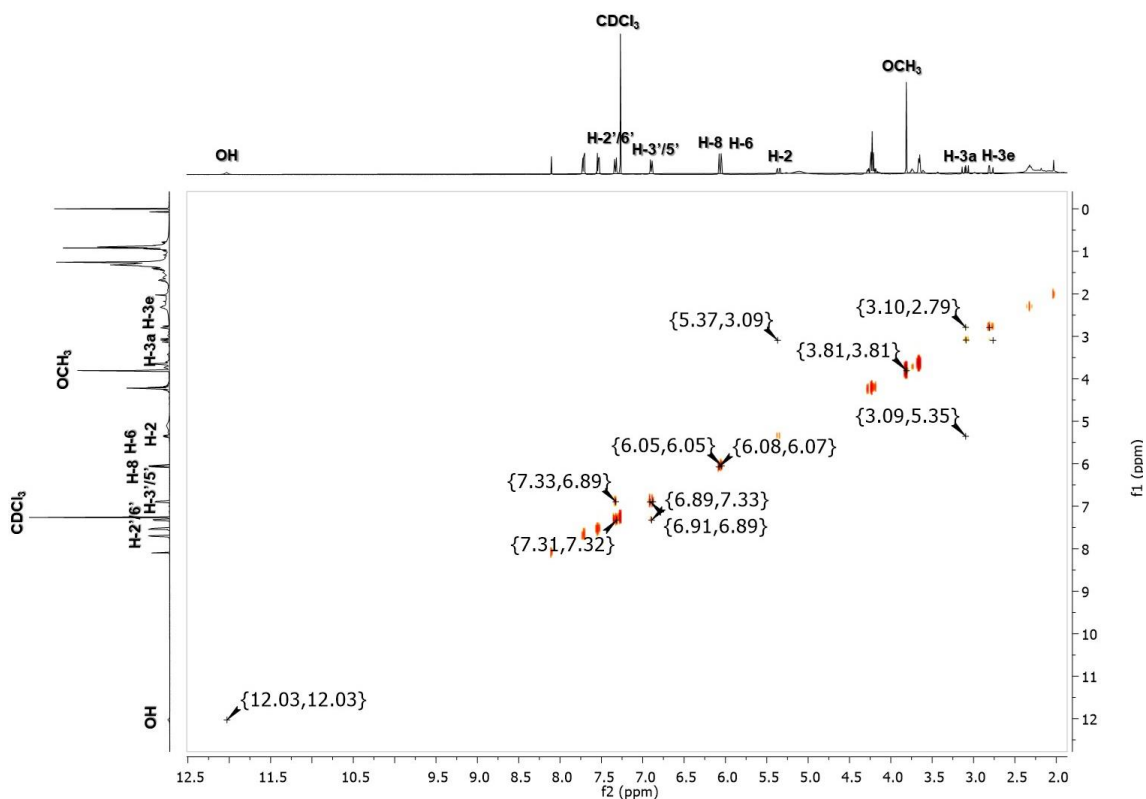
No espectro de RMN  $^1H$  da substância PFGD-E1 pode-se observar sinais de impureza, referentes a ésteres de ftalatos. Os sinais em  $\delta$  1,0-1,5 ppm, são característicos de hidrogênios metila ( $CH_3$ ), os hidrogênios metilênicos ( $CH_2$ - $CH_2$ ) ligados ao grupamento éster do ftalato são vistos em  $\delta$  4,0-4,5 e os sinais em  $\delta$  7,5-8,0, são referentes hidrogênios metínicos de anel aromático.

**FIGURA 36.** Estrutura química e espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da 5,4'-dihidroxi-7-metoxi-flavanona.



**FONTE:** Próprio Autor.

**FIGURA 37.** Gráfico de contorno de COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da 5,4'-dihidroxi-7-metoxi-flavanona.

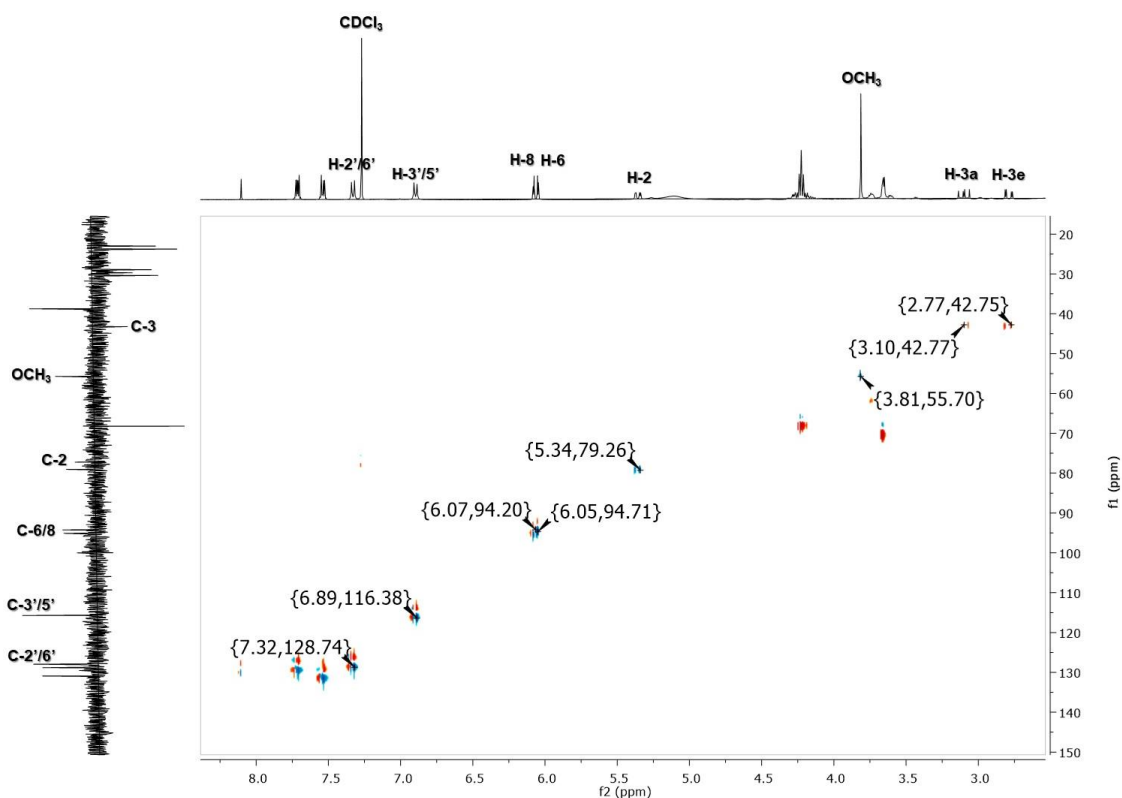


**FONTE:** Próprio Autor.

Nos espectros de HSQC (FIGURA 38) e HMBC (FIGURA 39) podem ser visualizadas as correlações entre os hidrogênios e carbonos, que confirmam a identificação da estrutura química, elucidada por RMN  $^1\text{H}$  (FIGURA 36), dados de  $^{13}\text{C}$ , COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (FIGURA 37), espectrometria de massas e dados da literatura.

No gráfico de contorno HSQC foi observado 8 sinais, e no HMBC, 14 sinais, de átomos de carbono. Os sinais mais intensos no HMBC, são:  $\delta$  196,5 ppm que foi atribuído ao C-4, típico de carbonilas e o  $\delta$  79,2 ppm que é referente ao carbono C-2, confirmado pelo HSQC, indicando a ligação direta entre o carbono e o H-2 ( $\delta$  5,35 ppm). O sinal em  $\delta$  42,7 ppm sugere um carbono metilênico, atribuído ao carbono C-3, o HSQC (FIGURA 38) confirma este indicativo.

**FIGURA 38.** Gráfico de contorno de HSQC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da 5,4'-*dihidroxi-7-metoxi-flavanona*. As correlações hidrogênios e carbonos são vistas entre chaves:  $\{^1\text{H}, ^{13}\text{C}\}$ .



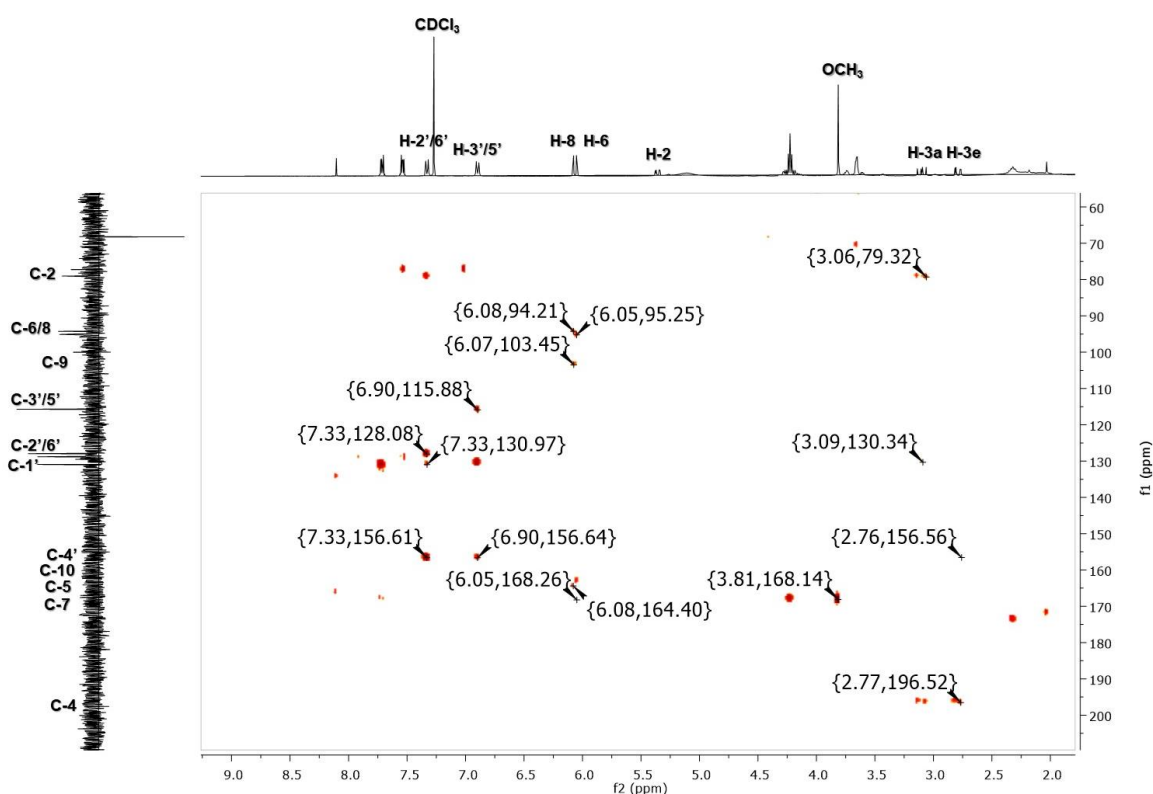
FONTE: Próprio Autor.

Os carbonos C-5 e C-4' são hidroxilados, e aos seus sinais foram atribuídos ao deslocamento químico de  $\delta$  164,4 ppm e  $\delta$  156,6 ppm, respectivamente. Os sinais  $\delta$  94,7 ppm e  $\delta$  94,2 ppm em comum aos dois espectros bidimensionais (HSQC e HMBC) são referentes aos carbonos, C-6 e C-8, respectivamente.

Os carbonos comuns aos anéis A e C, C-9 e C-10, apresentam sinais em  $\delta$  103,4 ppm e  $\delta$  156,5 ppm, respectivamente. O sinal em  $\delta$  168,2 ppm, é referente ao carbono C-7, contudo, o valor do deslocamento químico sugere que um substituinte esteja ligado a ele, e provavelmente seja uma metoxila ( $-\text{OCH}_3$ ), já que o deslocamento químico em  $\delta$  55,7 ppm, é indicado ao carbono desse substituinte, essas posições foram confirmadas pelo HMBC.

Na região dos aromáticos são vistos sinais referentes aos carbonos do anel B. O sinal em  $\delta$  130,9 ppm, refere-se ao carbono C-1'. Por conta do efeito de ressonância, causado pela hidroxila no C-4, o sinal  $\delta$  116,3 ppm, vai ser atribuído aos carbonos C-3' e C-5', e o sinal em  $\delta$  128,7 ppm, é referente aos carbonos C-2' e C-6'.

**FIGURA 39.** Gráfico de contorno de HMBC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da 5,4'-dihidroxi-7-metoxi-flavanona. As correlações entre hidrogênios e carbonos são vistas entre chaves:  $\{^1\text{H}, ^{13}\text{C}\}$ .

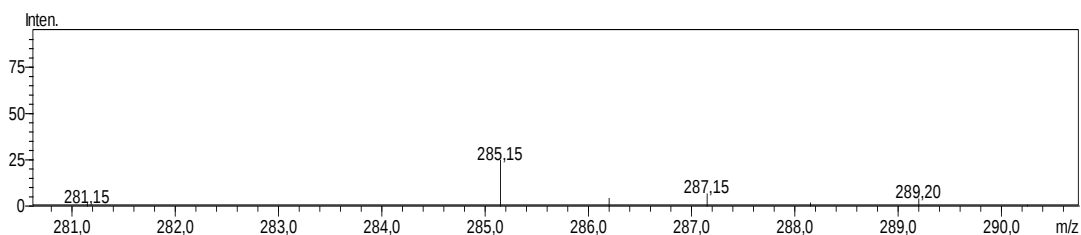


**FONTE:** Próprio Autor.

Na Figura 40, pode ser observado o espectro de massas da PFGD-E1. O sinal mais intenso, refere-se a  $[M-H]^-$   $m/z$  285,15.

De acordo com os dados espectroscópicos observados nas análises e por comparação com o estudo de GRECCO *et. Al* (2014)<sup>[150]</sup>, essa substância trata-se da sakuranetina (*5,4'-dihidroxi-7-metoxi-flavanona*).

**FIGURA 40.** Espectro de massas da PFGD-E1 obtido em ionização por electrospray no modo SCAN negativo (-4,5 kV) a 308 K.



**FONTE:** Próprio Autor.

#### 4.7.3 5-hidroxi-7,3',4'-trimetoxi-flavanona (PFGD-E5)

Na Tabela 10 são representados os deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbonos e as constantes de acoplamentos dos hidrogênios da substância PFGD-E5, além dos dados na literatura.

**TABELA 10.** Dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $\text{C}^{13}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) da substância PFGD-E5 e comparação com os dados da literatura.

| POSIÇÃO               | PFGD-E5 ( $\text{CDCl}_3$ )   |                                | KANG LI <i>et. al</i> ( $\text{CDCl}_3$ ) <sup>[151]</sup> |                                |
|-----------------------|-------------------------------|--------------------------------|------------------------------------------------------------|--------------------------------|
|                       | $^1\text{H}$ $\delta$ (ppm)   | $\text{C}^{13}$ $\delta$ (ppm) | $^1\text{H}$ $\delta$ (ppm)                                | $\text{C}^{13}$ $\delta$ (ppm) |
| 2                     | 5,37 (dd, 13,0 e 3,0 Hz, 1H)  | 79,3                           | 5,36 (1H, dd)                                              | 79,2                           |
| 3e                    | 2,80 (dd, 17,2 e 3,0 Hz, 1H)  | 43,3                           | 2,81 (1H, dd, Heq-3)                                       | 43,4                           |
| 3a                    | 3,12 (dd, 17,2 e 13,0 Hz, 1H) | 43,3                           | 3,11 (1H, dd, Hax-3)                                       | 43,4                           |
| 4                     | -                             | 196,3                          | -                                                          | 195,0                          |
| OH - 5                | 12,03 (s, 1H)                 | 164,3                          | 12,01 (1H, s)                                              | 164,2                          |
| 6                     | 6,06 (d, 2,3 Hz, 2H)          | 94,4                           | 6,05 (2H, dd)                                              | 95,1                           |
| 7                     | -                             | 168,1                          | -                                                          | 168,0                          |
| 8                     | 6,08 (d, 2,3 Hz, 2H)          | 95,3                           | 6,05 (2H, dd)                                              | 94,3                           |
| 9                     | -                             | 163,0                          | -                                                          | 162,8                          |
| 10                    | -                             | 103,3                          | -                                                          | 103,2                          |
| 1'                    | -                             | 130,9                          | -                                                          | 130,8                          |
| 2'                    | 6,99 (m, 2H)                  | 109,8                          | 6,97 (2H, d)                                               | 111,2                          |
| 3'                    | -                             | 149,7                          | -                                                          | 149,3                          |
| 4'                    | -                             | 149,4                          | -                                                          | 149,6                          |
| 5'                    | 6,90 (d, 8,8 Hz, 1H)          | 111,4                          | 6,97 (2H, d)                                               | 109,4                          |
| 6'                    | 6,99 (m, 2H)                  | 119,1                          | 6,90 (1H, d)                                               | 118,8                          |
| OCH <sub>3</sub> - 3' | 3,92 (s, 3H)                  | 55,9                           | 3,81 (3H, s, OCH <sub>3</sub> )                            | 56,0                           |
| OCH <sub>3</sub> - 4' | 3,91 (s, 3H)                  | 56,0                           | 3,90 (3H, s, OCH <sub>3</sub> )                            | 56,0                           |
| OCH <sub>3</sub> - 7  | 3,81 (s, 3H)                  | 55,7                           | 3,92 (3H, s, OCH <sub>3</sub> )                            | 55,7                           |

No espectro de RMN  $^1\text{H}$  (FIGURA 41) pode ser visto um duplo dubleto em  $\delta$  2,80 ppm ( $J_{\text{H}3\text{a},\text{H}2} = 17,2$  e 3,0 Hz) e  $\delta$  3,12 ppm ( $J_{\text{H}3\text{e},\text{H}2} = 17,2$  e 13,0 Hz), com integração para um próton cada, referentes aos hidrogênios geminais do anel C, H-3e (equatorial) e H-3a (axial) respectivamente, sinais característicos de flavanonas. De acordo com a constante de acoplamento e gráfico de contorno COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (FIGURA 42), os hidrogênios H-3a/3e, além de estarem acoplando entres si, também estão acoplando com o hidrogênio vicinal H-2, com sinal em  $\delta$  5,37 ppm (dd,  $J_{\text{H}2,\text{H}3\text{a}} = 13,0$  e 3,0 Hz, 1H).

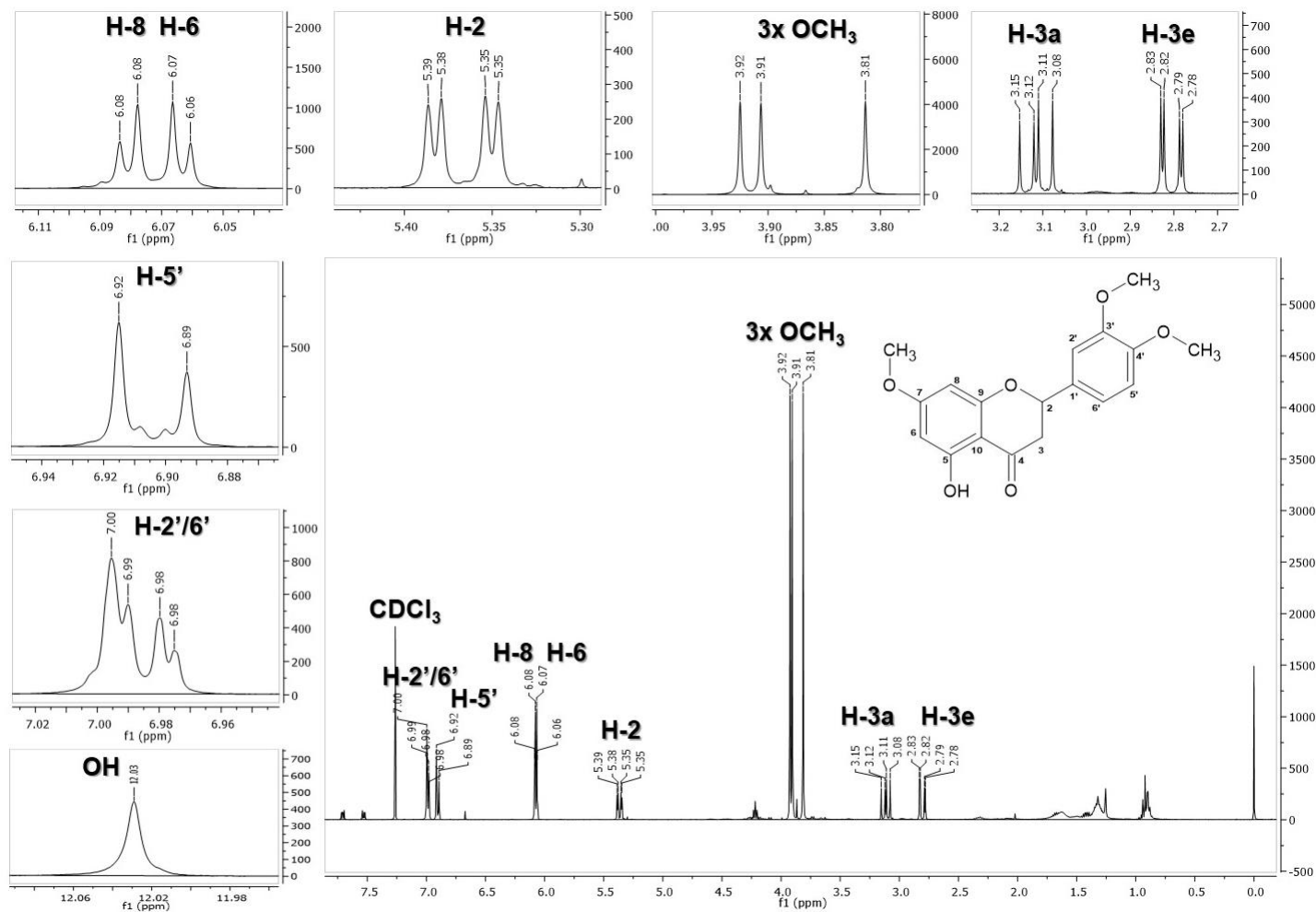
Os dubleto em  $\delta$  6,06 ppm ( $J_{\text{H}6,\text{H}8} = 2,3$  Hz, 1H) e  $\delta$  6,08 ppm ( $J_{\text{H}6,\text{H}8} = 2,3$  Hz, 1H), integrando para um hidrogênio cada, são referentes aos hidrogênios H-6 e H-8, respectivamente, e estão acoplando entre si, com constante de acoplamento típicos da posição *meta* ( $J$  em torno de 2,5 Hz). O deslocamento químico do H-6 e H-8 são próximos por conta do efeito de proteção dos substituintes, provavelmente oxigenados, em C-5 e C-7<sup>[149]</sup>.

Na região dos aromáticos (Anel B), é visto um multipletto em  $\delta$  6,99 ppm, integrando para dois hidrogênios, que provavelmente seja referente aos hidrogênios, H-2' e H-6'. O dubleto integrando para um hidrogênio em  $\delta$  6,90 ppm

( $J = 8,8$  Hz) é indicativo do H-5', por ter uma constante de acoplamento em *orto* ( $J$  em torno de 8,5 Hz), o que sugere uma substituição no C-4', provavelmente uma metoxila (-OCH<sub>3</sub>). O COSY <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H (FIGURA 42), confirmou a correlação entre esses hidrogênios.

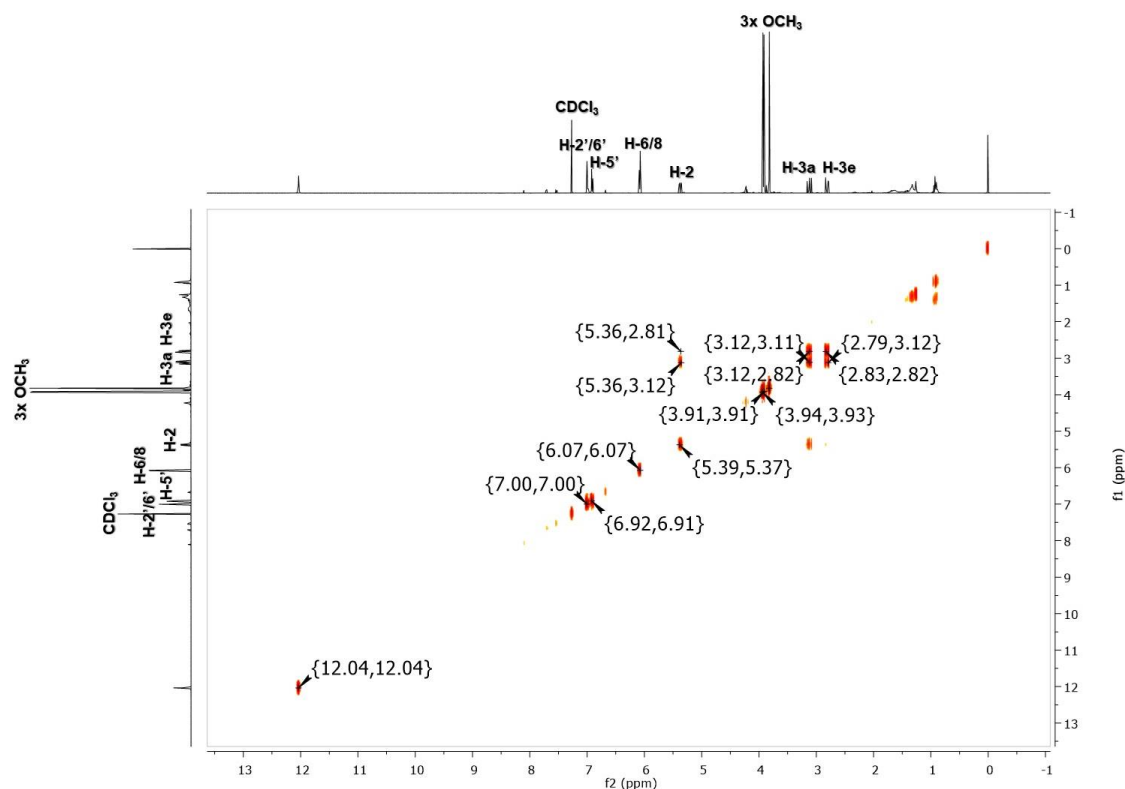
O singleto altamente desprotegido em  $\delta$  12,03 ppm, integrando para um hidrogênio, indica a presença de um grupo hidroxila, sugerindo uma forte ligação intramolecular, entre o hidrogênio da hidroxila no C-5 e o oxigênio da carbonila no C-4, sinal característico de flavonoides. Os três singletos intensos, em  $\delta$  3,92 ppm,  $\delta$  3,91 ppm e  $\delta$  3,81 ppm, integrando para três hidrogênios cada, refere-se a três metoxilas (-OCH<sub>3</sub>) localizadas nos carbonos C-3', C-4' e C-7, respectivamente.

**FIGURA 41.** Estrutura química e espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da 5-hidroxi-7,3',4'-trimetoxi-flavanona.



FONTA: Próprio Autor.

**FIGURA 42.** Gráfico de contorno de COSY  $H^1-H^1$  (400 MHz,  $CDCl_3$ ) da 5-hidroxi-7,3',4'-trimetoxi-flavanona.

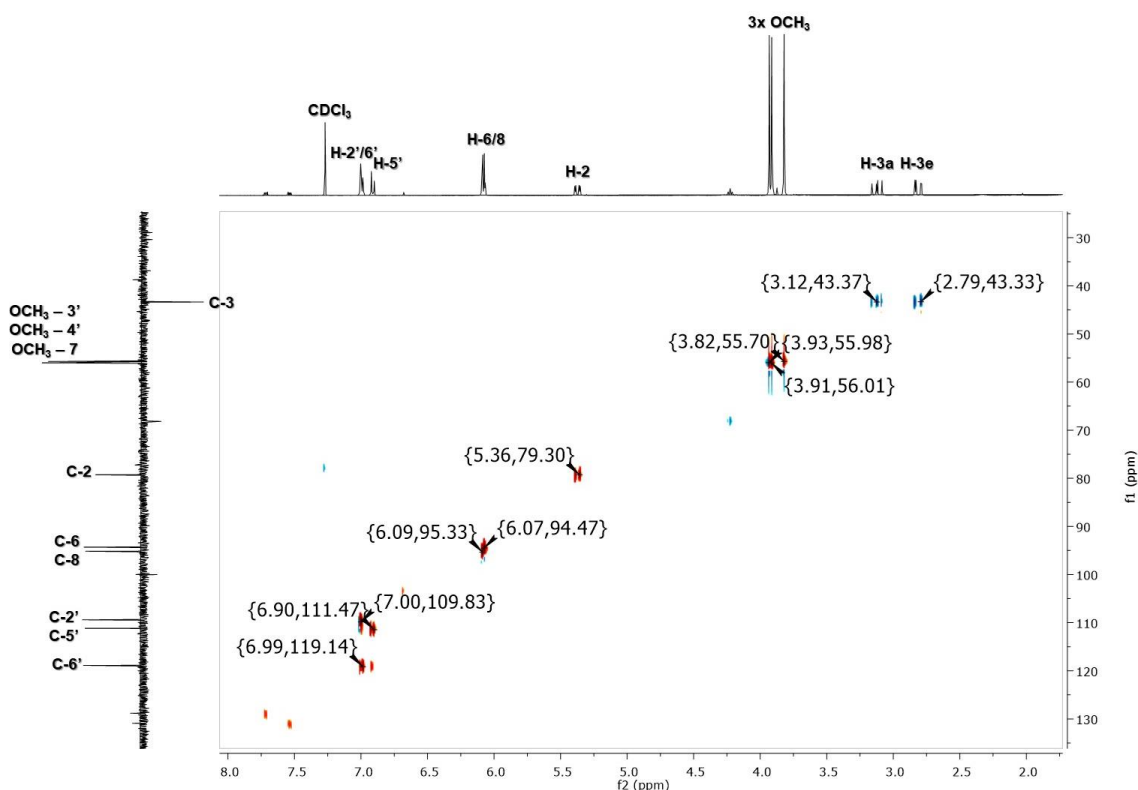


**FONTE:** Próprio Autor.

Nos espectros de HSQC (FIGURA 43) e HMBC (FIGURA 44) podem ser visualizadas as correlações entre os hidrogênios e carbonos, que confirmam a identificação da estrutura química, elucidada por RMN  $H^1$  (FIGURA 41), dados de  $C^{13}$ , COSY  $H^1-H^1$  (FIGURA 42), espectrometria de massas e dados da literatura. No gráfico de contorno HSQC foram observados 11 sinais, e no HMBC, 21 sinais, de carbono.

Os sinais mais intensos no HMBC, são:  $\delta$  196,3 ppm que foi atribuído ao C-4, por ser um sinal típico de carbonilas, e em  $\delta$  79,3 ppm que é referente ao carbono C-2, confirmado pelo HSQC, indicando a ligação direta entre o carbono e o hidrogênio ( $\delta$  5,37 ppm). O sinal em  $\delta$  43,3 ppm sugere um carbono metilênico, e por isso foi atribuído ao carbono C-3, o HSQC (FIGURA 43) confirma este indicativo.

**FIGURA 43.** Gráfico de contorno de HSQC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da 5-hidroxi-7,3',4'-trimetoxi-flavanona. As correlações hidrogênios e carbonos são vistas entre chaves:  $\{^1\text{H}, ^{13}\text{C}\}$ .



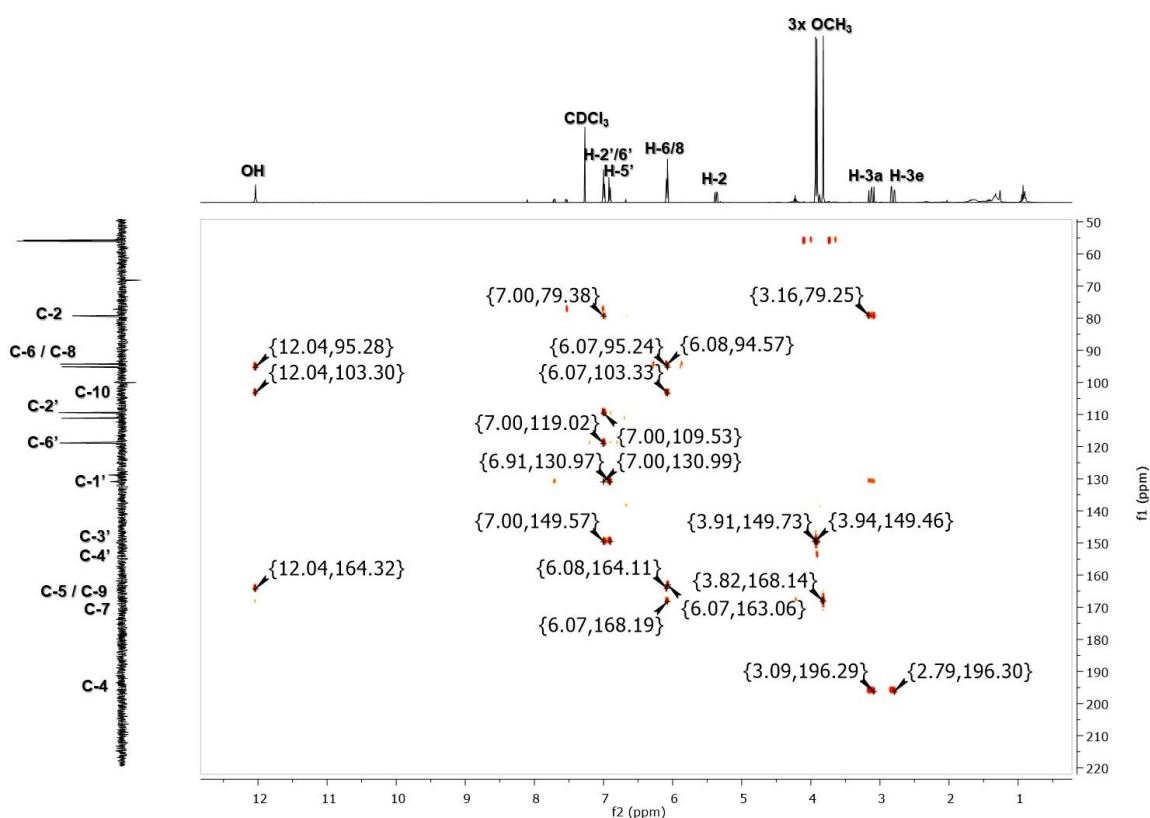
**FONTE:** Próprio Autor.

Os carbonos comuns aos anéis A e C, C-9 e C-10, apresentam sinais em  $\delta$  163,0 ppm e  $\delta$  103,3 ppm, respectivamente. O sinal em  $\delta$  168,0 ppm, é referente ao carbono C-7, contudo, o valor do deslocamento químico sugere que um substituinte esteja ligado a ele, e provavelmente seja uma metoxila ( $-\text{OCH}_3$ ), já que o deslocamento químico em  $\delta$  55,7 ppm, é indicado ao carbono desse substituinte, essas posições foram confirmadas pelo HMBC.

O carbono C-5 por ser hidroxilado, apresenta deslocamento químico de  $\delta$  164,3 ppm. O HMBC confirma essa posição com a relação entre o sinal referente a hidroxila ( $\delta$  12,03 ppm) e o seu carbono. Os sinais  $\delta$  94,4 ppm e  $\delta$  95,3 ppm em comum aos dois espectros bidimensionais (HSQC e HMBC) são referentes aos carbonos, C-6 e C-8, respectivamente.

Na região dos aromáticos para o anel B, o sinal em  $\delta$  130,9 ppm, refere-se ao carbono C-1'. Já os sinais em  $\delta$  149,7 ppm e  $\delta$  149,4 ppm, estão relacionados aos carbonos C-3' e C-4'. O HMBC mostrou que estão ligados a metoxilas, e os sinais vistos em  $\delta$  55,9 ppm,  $\delta$  56,0 ppm, são referentes aos carbonos dessas metoxilas, -OCH<sub>3</sub>-3' e -OCH<sub>3</sub>-4', respectivamente. Os carbonos C-2' e C-6', apesar de apresentaram o mesmo sinal no espectro de <sup>1</sup>H, no HSQC os sinais encontrados para esses carbonos foram em  $\delta$  109,8 ppm e  $\delta$  119,1 ppm, respectivamente. E por fim, o sinal em  $\delta$  111,4 ppm, refere-se ao C-5'.

**FIGURA 44.** Gráfico de contorno de HMBC <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da 5-hidroxi-7,3',4'-trimetoxi-flavanona. As correlações entre hidrogênios e carbonos são vistas entre chaves: {<sup>1</sup>H,<sup>13</sup>C}.

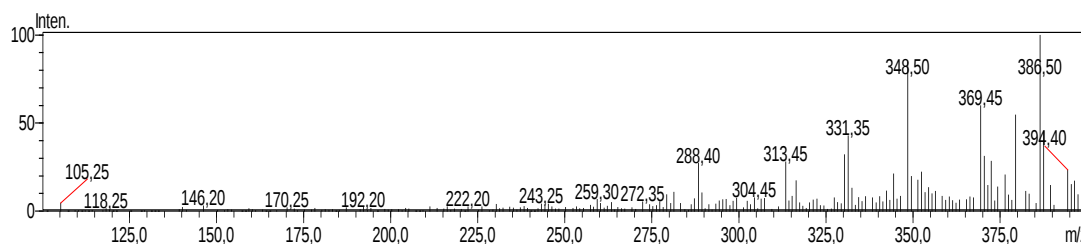


**FONTE:** Próprio Autor.

Na Figura 45, pode ser observado o espectro de massas da PFGD-E5, no modo positivo, com  $[M+H]^+$   $m/z$  331. Os sinais mais intensos, são referentes aos adutos formados:  $[M-H_2O+H]^+$   $m/z$  313,35,  $[M+H_2O+H]^+$   $m/z$  348,50 e  $[M+K]^+$   $m/z$  369,45.

De acordo com os dados espectroscópicos obtidos e por comparação com o estudo de KANG LI *et. al* (2011) <sup>[151]</sup>, essa substância é a 5-hidroxi-7,3',4'-trimetoxi-flavanona.

**FIGURA 45.** Espectro de massas da PFGD-E5 obtido em ionização por electrospray no modo SCAN positivo (4,5 kV) a 308 K.



**FONTE:** Próprio Autor.

#### 4.7.4 5-hidroxi-7,4'-dimetoxi-flavona (PFGD-E6)

Na Tabela 11 são representados os deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbonos e as constantes de acoplamentos dos hidrogênios da substância PFGD-E6, além dos dados na literatura.

**TABELA 11.** Dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) da substância PFGD-E6 e comparação com os dados da literatura.

| POSIÇÃO               | PFGD-E6 ( $\text{CDCl}_3$ ) |                              | MANGOYI <i>et. al</i> ( $\text{CDCl}_3$ ) <sup>[152]</sup> |                              |
|-----------------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------------------------------------|------------------------------|
|                       | $\text{H}^1 \delta$ (ppm)   | $\text{C}^{13} \delta$ (ppm) | $\text{H}^1 \delta$ (ppm)                                  | $\text{C}^{13} \delta$ (ppm) |
| 2                     | -                           | 164,1                        | -                                                          | 163,9                        |
| 3                     | 6,57 (s, 1H)                | 104,2                        | 6.52 (1H, s)                                               | 104,2                        |
| 4                     | -                           | 182,9                        | -                                                          | 182,4                        |
| OH - 5                | 12,81 (s, 1H)               | 162,1                        | 12.8 (1H, s,)                                              | 162,0                        |
| 6                     | 6,37 (d, 2,3 Hz, 1H)        | 97,8                         | 6.32 (1H, d, 4Hz)                                          | 98,0                         |
| 7                     | -                           | 162,5                        | -                                                          | 165,3                        |
| 8                     | 6,49 (d, 2,3 Hz, 1H)        | 92,4                         | 6.43(1H, d, 4Hz)                                           | 92,5                         |
| 9                     | -                           | 157,7                        | -                                                          | 157,6                        |
| 10                    | -                           | 105,4                        | -                                                          | 105,4                        |
| 1'                    | -                           | 123,5                        | -                                                          | 123,4                        |
| 2'                    | 7,85 (d, 9,0 Hz, 2H)        | 128,0                        | 7.78 (2H, dd, 8Hz, 4Hz)                                    | 127,9                        |
| 3'                    | 7,02 (d, 9,0 Hz, 2H)        | 114,4                        | 6.97 (2H, dd, 8Hz, 4Hz)                                    | 114,4                        |
| 4'                    | -                           | 165,4                        | -                                                          | 162,5                        |
| 5'                    | 7,02 (d, 9,0 Hz, 2H)        | 114,4                        | 6.97 (2H, dd, 8 Hz, 4Hz)                                   | 114,4                        |
| 6'                    | 7,85 (d, 9,0 Hz, 2H)        | 128,0                        | 7.78 (2H, dd, 8Hz, 4Hz)                                    | 127,9                        |
| OCH <sub>3</sub> - 4' | 3,89 (s, 3H)                | 55,3                         | 3.85 (3H, s)                                               | 55,8                         |
| OCH <sub>3</sub> - 7  | 3,90 (s, 3H)                | 55,9                         | 3.86(3H, s)                                                | 55,5                         |

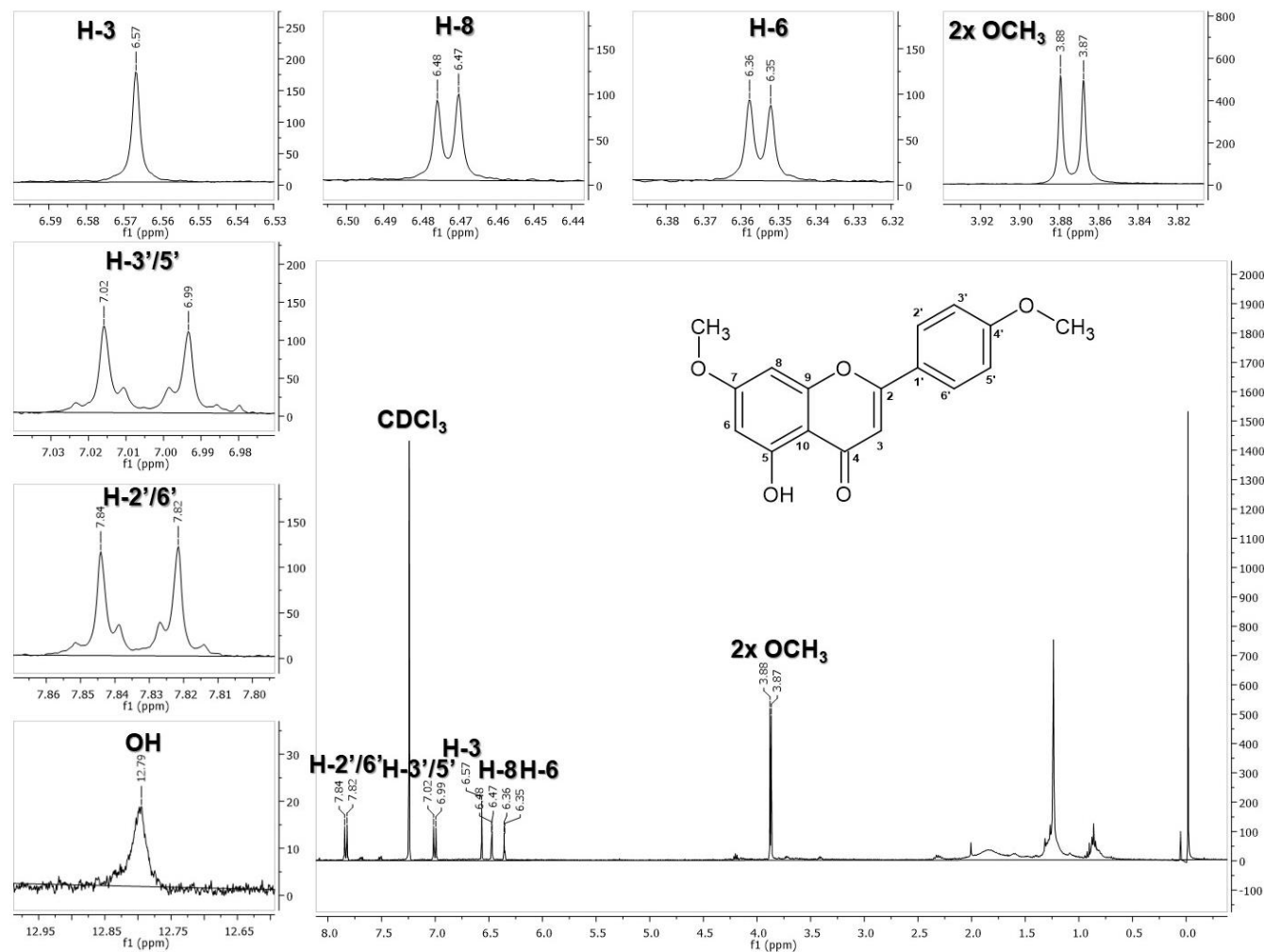
O singlete em  $\delta$  6,57 ppm, integrando para um hidrogênio, é referente ao H-3, característico de flavonas. O dubletos em  $\delta$  6,37 ppm ( $J_{\text{H}6, \text{H}8} = 2,3$  Hz) e  $\delta$  6,49 ppm ( $J_{\text{H}8, \text{H}6} = 2,3$  Hz), integrando para um hidrogênio cada, são referentes ao H-6 e H-8, respectivamente, e estão acoplando entre si, com constante de acoplamento típico da posição em *meta* ( $J$  em torno de 2,5 Hz). O deslocamento químico do H-6 e H-8 são próximos por conta do efeito de proteção dos substituintes, provavelmente oxigenados, em C-5 e C-7<sup>[149]</sup>.

Na região dos aromáticos é possível visualizar sinais referentes ao anel B. São vistos dois dubletos, um em  $\delta$  7,85 ppm ( $J_{\text{H}2'/6', \text{H}3'/5'} = 9,0$  Hz, 2H), referente aos hidrogênios quimicamente equivalentes H-2' e H-6' e em  $\delta$  7,02 ppm ( $J_{\text{H}3'/5', \text{H}2'/6'} = 9,0$  Hz, 2H), referente ao H-3' e H-5', também quimicamente equivalentes. As suas constantes de acoplamento mostram que, além dos quatro hidrogênios estarem acoplando entre si, os hidrogênios H-3' e H-5', estão em posição *orto* ( $J$  em torno de 8,5 Hz) aos hidrogênios H-2' e H-6', o que indica a presença de um substituinte no C-4'. Consequentemente, os H-3' e H-5' vão apresentar deslocamento menor, que os H-2' e H-6', devido ao efeito

ressonância causado pelo oxigênio da metoxila no C-4'. O COSY  $H^1-H^1$  (FIGURA 47) confirmou a correlação entre esses hidrogênios.

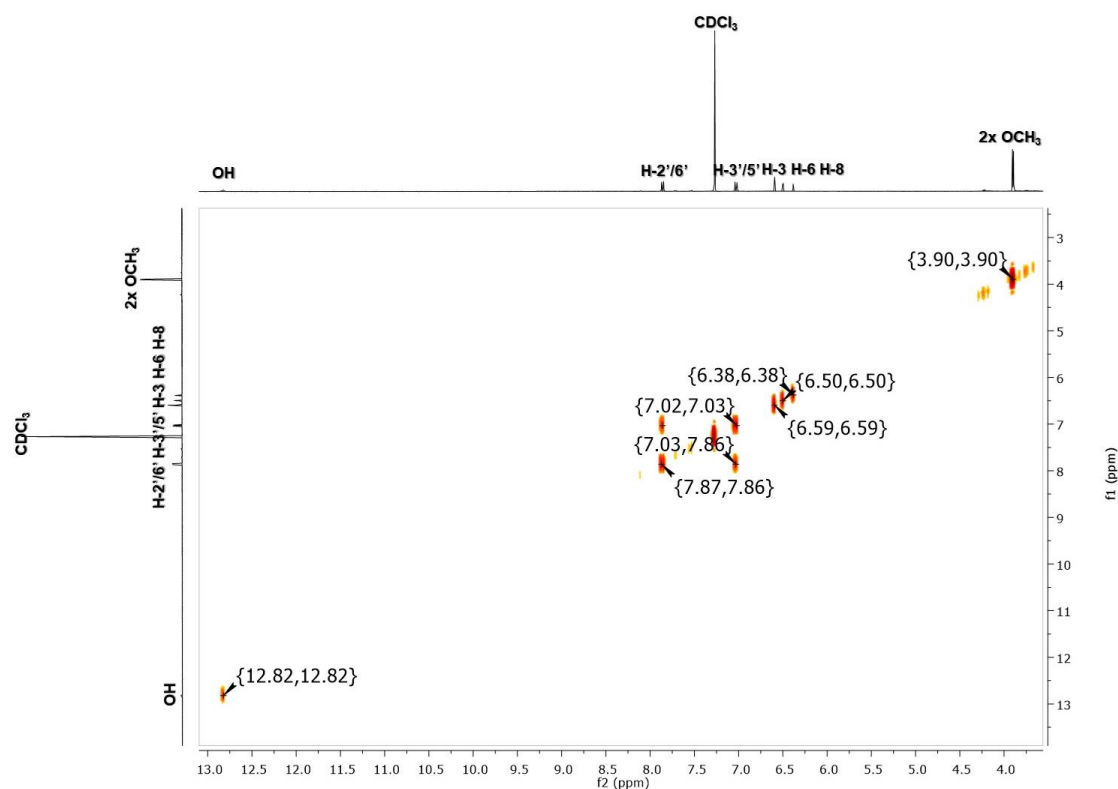
O singleto altamente desprotegido em  $\delta$  12,81 ppm, integrando para um hidrogênio, indica a presença de um grupo hidroxila no anel A, sugerindo uma forte ligação intramolecular, entre o hidrogênio da hidroxila no C-5 e o oxigênio da carbonila no C-4, sinal característico em flavonoides. Outro singleto com sinal em  $\delta$  3,90 ppm, integrando para três hidrogênios, são referentes aos hidrogênios da metoxila ( $-OCH_3$ ).

**FIGURA 46.** Estrutura química e espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da 5-hidroxi-7,4'-dimetoxi-flavona.



**FONTE:** Próprio Autor.

**FIGURA 47.** Gráfico de contorno de COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da 5-hidroxi-7,4'-dimetoxi-flavona.

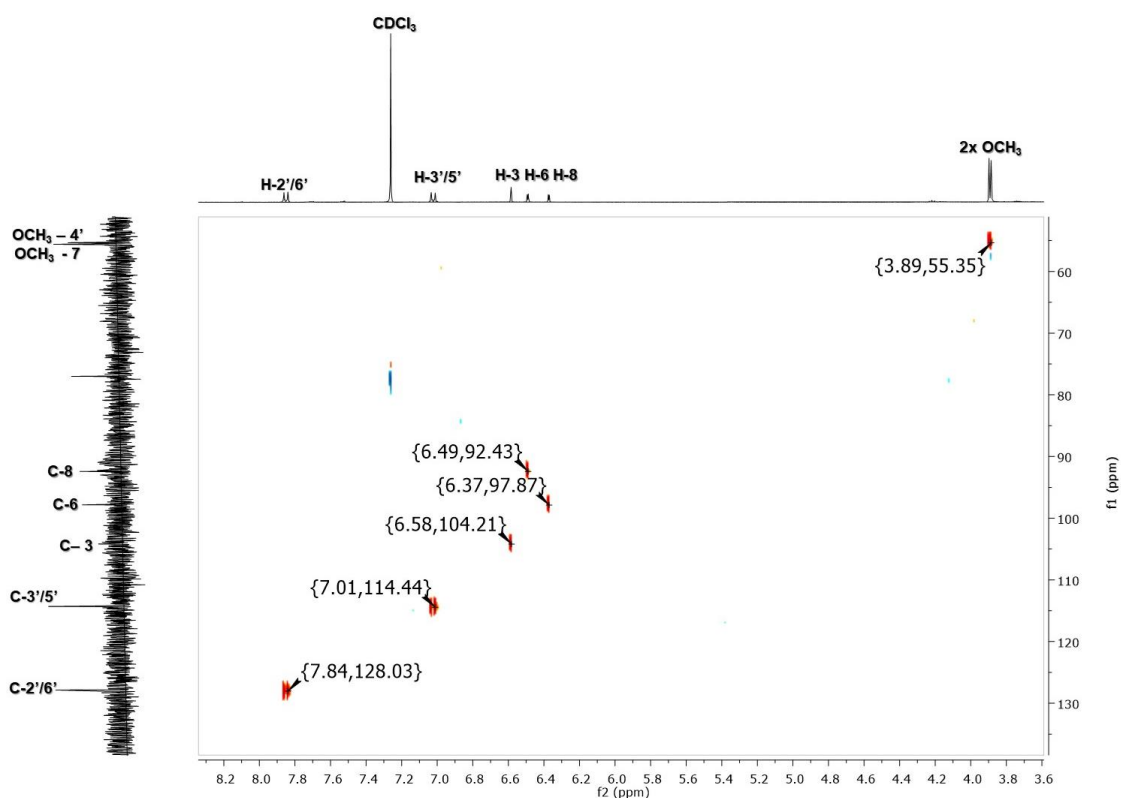


**FONTE:** Próprio Autor.

Nos espectros de HSQC (FIGURA 48) e HMBC (FIGURA 49) podem ser visualizadas as correlações entre os hidrogênios e carbonos, que confirmam a identificação da estrutura química, elucidada por RMN  $^1\text{H}$  (FIGURA 46), dados de  $^{13}\text{C}$ , COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (FIGURA 47), espectrometria de massas e dados da literatura.

No gráfico de contorno HSQC foi observado seis sinais, e no HMBC, dez sinais, de carbono. O sinal visto no HMBC, em  $\delta$  182,9 ppm, foi atribuído ao C-4, por ser um sinal típico de carbonilas. O HSQC apresenta um sinal em  $\delta$  104,2 ppm, referente ao C-3. Por conta do efeito de ressonância causado pelos pares de  $e^-$  do oxigênio da carbonila, o carbono C-2, vai apresentar deslocamento químico em  $\delta$  164,1 ppm.

**FIGURA 48.** Gráfico de contorno de HSQC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da 5-hidroxi-7,4'-dimetoxi-flavona. As correlações hidrogênios e carbonos são vistas entre chaves:  $\{^1\text{H}, ^{13}\text{C}\}$ .



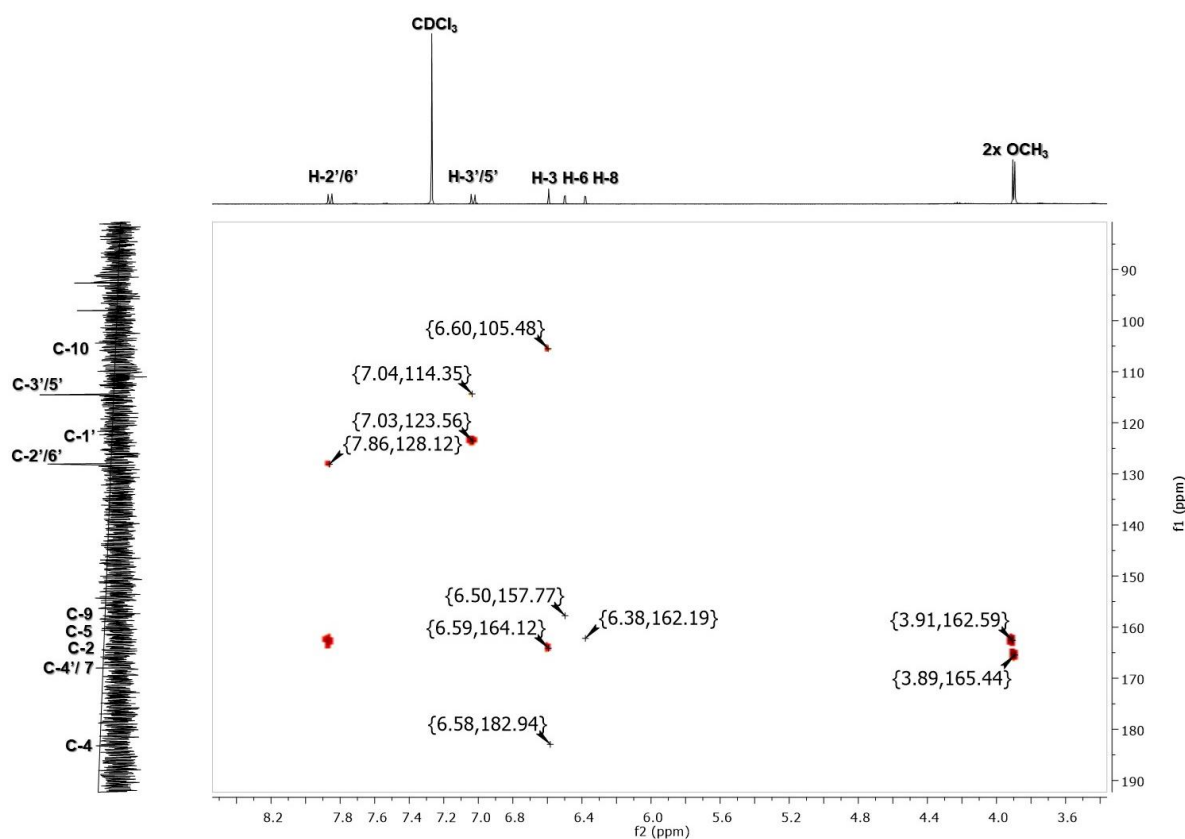
**FONTE:** Próprio Autor.

Os carbonos comuns dos anéis A e C, C-9 e C-10, são apresentados com sinais em  $\delta$  157,7 ppm e  $\delta$  105,4 ppm, respectivamente. No anel A, os sinais em  $\delta$  97,8 ppm e  $\delta$  92,4 ppm, visualizados no espectro bidimensional (HSQC) são referentes aos carbonos, C-6 e C-8, respectivamente. O sinal em  $\delta$  162,1 ppm, atribuído ao C-5, ligado a hidroxila quelada. O sinal em  $\delta$  162,5 ppm, é referente ao C-7, contudo, o valor do deslocamento químico sugere que um substituinte esteja ligado a ele, e provavelmente seja uma metoxila ( $-\text{OCH}_3$ ), o deslocamento químico em  $\delta$  55,9 ppm, é indicado ao carbono desse substituinte, através do HMBC foi possível confirmar essas posições, por conta da correlação dos hidrogênios com seus respectivos carbonos.

Na região dos aromáticos para o anel B, o sinal em  $\delta$  123,5 ppm, é indicado ao carbono C-1'. O carbono C-4, vai ter deslocamento químico em  $\delta$  165,4 ppm, por conta do efeito substituinte ligado a ele, na qual o HMBC indica

ser uma metoxila, e o sinal em  $\delta$  55,3 ppm, pertence ao carbono deste grupo. Esse mesmo efeito de proteção é visto no sinal em  $\delta$  128,0 ppm, referente aos carbonos C-2' e C-6', que vão ter deslocamento químico maior que os carbonos C-3' e C-5', com sinal em  $\delta$  114,4 ppm.

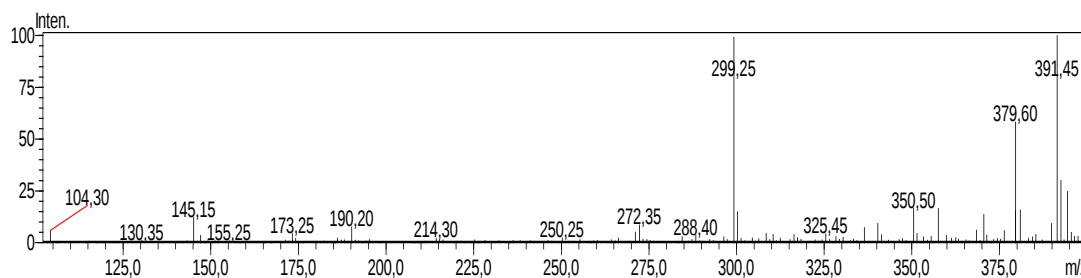
**FIGURA 49.** Gráfico de contorno de HMBC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da 5-hidroxi-7,4'-dimetoxi-flavona. As correlações entre hidrogênios e carbonos são vistas entre chaves:  $\{^1\text{H}, ^{13}\text{C}\}$ .



**FONTE:** Próprio Autor.

Na Figura 50, pode ser observado o espectro de massas da PFGD-E6. O sinal mais intenso, refere-se a  $[\text{M}+\text{H}]^+$   $m/z$  299,25. De acordo com os dados espectroscópicos obtidos e por comparação com o estudo de MANGOYI *et. al* (2015) <sup>[152]</sup>, essa substância é a 5-hidroxi-7,4'-dimetoxi-flavona.

**FIGURA 50.** Espectro de massas da PFGD-E6 obtido em ionização por electrospray no modo SCAN positivo (4,5 kV).



**FONTE:** Próprio Autor.

ULUBELEN *et. al* (1981) <sup>[153]</sup> descreveram pela primeira vez o isolamento e identificação de 12 flavonoides, são eles, crisoeriol, apigenina, isovitexina, vitexina, Vitexina 2'-xilosideo, Isovitexina 2'-xilosideo, luteolina 7-glicosideo, kaempferol, luteolina, apigenina 8-glicosideo, schaftosideo e vicenina-2. Isolados das folhas de duas variedades de *Passiflora foetida*: *P. foetida* var. *hispidica* e *P. foetida* var. *hibiscifolia*. O qual foi o primeiro relato de isolamento de metabólitos secundários com a espécie *Passiflora foetida*. ECHRVERRI (2001) <sup>[154]</sup> isolou três substâncias inéditas, denominadas de passifloricinas, na qual só estão presentes na resina da *Passiflora foetida*, as mesmas foram descritas na no tópico 1.1.4.

NGUYEN *et. al* (2015) <sup>[35]</sup> isolaram 10 flavonoides, sendo eles apigenina, luteolina, crisoeriol, tricina, quercetina-4'-metil éter, vitexina, vitexina-2"-O-xilosideo, orientina, apigenina 7- O-β-D-glicopiranosideo e luteolina 7-O-β-D-glicopiranosideo, todos isolados do extrato de galhos da *Passiflora foetida*. Estas foram avaliadas quanto a sua atividade anti-inflamatória, com a luteolina e o crisoeriol apresentando as maiores atividades anti-inflamatórias.

Os estudos fitoquímicos com a espécie de *P. foetida* ainda se encontram escassos na literatura. Contudo, os três estudos acima, mostram o quanto a espécie é rica em flavonoides, característica essa já conhecida dentro do gênero *Passiflora*. De qualquer forma, ainda se faz necessário novos estudos fitoquímicos, principalmente no isolamento de substâncias com essa planta, para verificar se ainda é possível descobrir novas substâncias, contribuindo para o

conhecimento químico mais detalhado da espécie, além da possibilidade de descobrir novos metabólitos secundários bioativos.

#### 4.8 ATIVIDADE DE INIBIÇÃO ENZIMÁTICA DA PAPAÍNA COM AS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS

Com os resultados de inibição enzimática das subfrações oriundas da fração diclorometano (PFGD), foram escolhidas as subfrações (PFGD-C, PFGD-D e PFGD-E), para proceder com isolamento das substâncias. A partir da subfração PFGD-E foi possível isolar a flavona: *5-hidroxi-7,4'-dimetoxi-flavona* (PFGD-E6), duas flavononas: *5-hidroxi-7,3',4'-trimetoxi-flavanona* e *5,4'-dihidroxi-7-metoxi-flavanona* (PFGD-E1 e PFGD-E5) e as misturas de flavononas (PFGD-E2, PFGD-E3, PFGD-E4). Estas amostras foram submetidas a atividade de inibição enzimática, como está descrito a seguir.

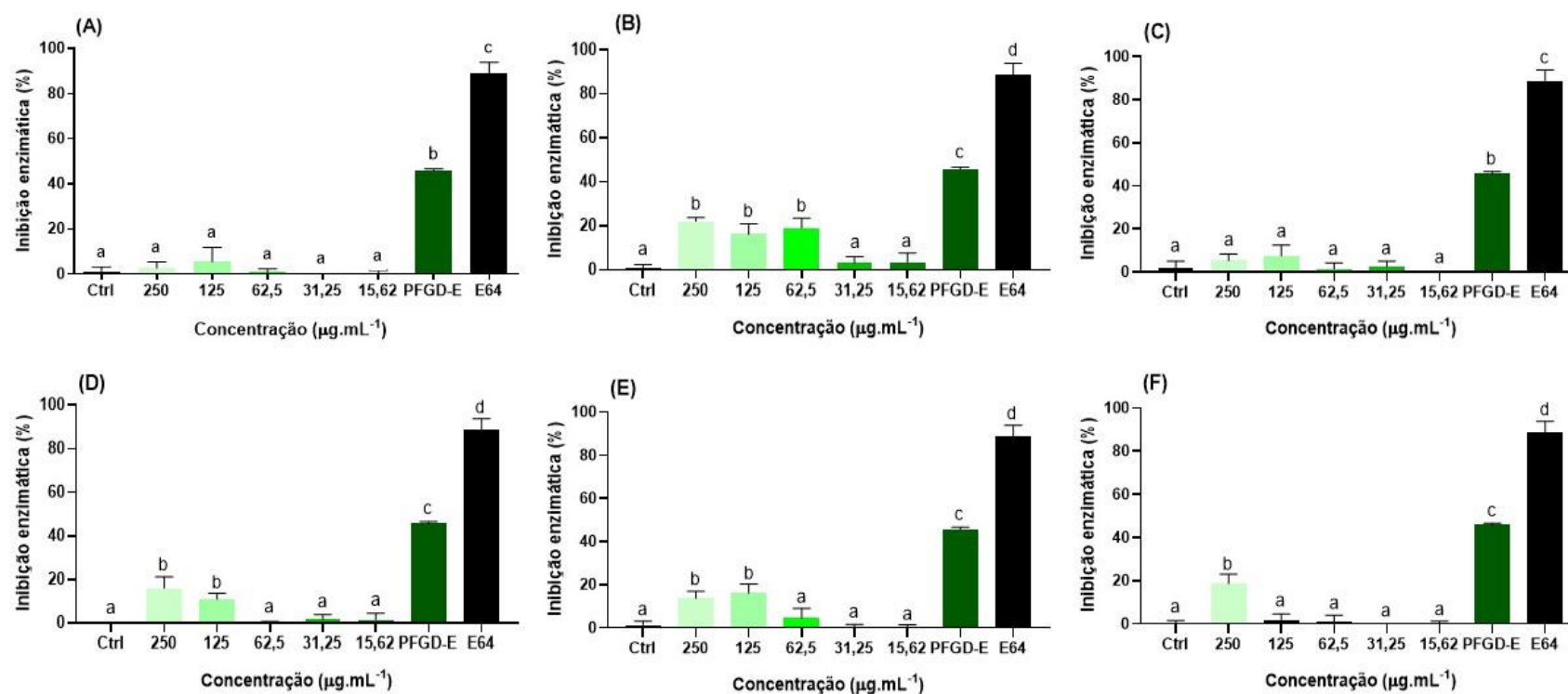
Na Figura 51 pode ser visto que as concentrações de 250 e 125  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  se destacaram com as maiores atividades de inibição enzimática, como é visualizado na FIGURA 51B (PFGD-E2), FIGURA 51D (PFGD-E4) e FIGURA 51E (PFGD-E5). A PFGD-E6 foi ativa apenas na maior concentração (18,72%) como pode ser observado na FIGURA 51F, apresentando diferença estatística com o controle.

As amostras PFGD-E1 e PFGD-E3 foram as únicas que não apresentaram atividade de inibição enzimática, como pode ser visualizado na FIGURA 51A e FIGURA 51C, respectivamente, pois não possuem diferença estatística com o controle em nenhuma das concentrações testadas. Os dados mostraram que nenhuma das substâncias e misturas, possuem inibição enzimática em concentrações menores que, 31,25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , e consequentemente, não foi visto o efeito de concentração dependente.

A PFGD-E5 apresentou inibição de 13,66% e 16,10% nas concentrações de 250 e 125  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectivamente. Já a PFGD-E6, teve o percentual de inibição em 18,72% na concentração de 250  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Essas foram as duas substâncias mais ativas, contudo não são as responsáveis pela atividade de

inibição da subfração de origem, a PFGD-E (45,83%). Esse resultado pode estar relacionado ao efeito de sinergia entre as substâncias contidas na PFGD-E. Diante disso, foram realizados testes de inibição utilizando misturas das substâncias isoladas (E1, E5 e E6), para verificar se o efeito inibitório da subfração PFGD-E se deu por sinergia com a mistura dessas substâncias.

**FIGURA 51.** Porcentagem de inibição da papaína com as amostras provenientes da fração PFGD-E (PFGD-E1 a PFGD-E6) utilizando as concentrações: 250, 125, 62,5, 31,25 e 15,62  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , para comparação estatística foi utilizado o inibidor E64 (10  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) e a fração de origem PFGD-E (500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Foram realizadas análise de variância ANOVA e teste de Tukey. Letras diferentes indicam diferença estatística e letras iguais indicam que não há diferença estatística entre os grupos, segundo o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).



(A): PFGD-E1; (B): PFGD-E2; (C): PFGD-E3; (D): PFGD-E4; (E): PFGD-E5; (F): PFGD-E6; E64: Inibidor; Ctrl: Controle; FONTE: Próprio autor.

#### 4.8.1 AVALIAÇÃO DO EFEITO SINÉRGICO DA MISTURA DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS

Nos últimos anos vem sendo estudado que, os extratos de plantas medicinais exibem atividades biológicas mais pronunciadas que seus constituintes isolados. Isso se deve, muitas vezes, às interações sinérgicas entre vários metabólitos secundários. Nesse contexto, as plantas medicinais e seus metabólitos têm sido objeto de crescente interesse, sendo que, suas interações sinérgicas, podem ser observadas tanto entre componentes de extratos vegetais quanto entre produtos naturais e fármacos sintéticos, apresentando significativo potencial terapêutico [155].

Os resultados de inibição enzimática das substâncias isoladas (PFGD-E1, PFGD-E5 e PFGD-E6) mostraram que elas de forma separada não são as principais responsáveis pelo efeito de inibição enzimática da subfração de origem (PFGD-E). Logo, foi avaliado o efeito sinérgico das substâncias isoladas, em mistura, na proporção 2:2:1 (E1/E5/E6), proporção aproximada encontrada na subfração PFGD-E, calculado de acordo com as massas de cada substância obtida após o isolamento.

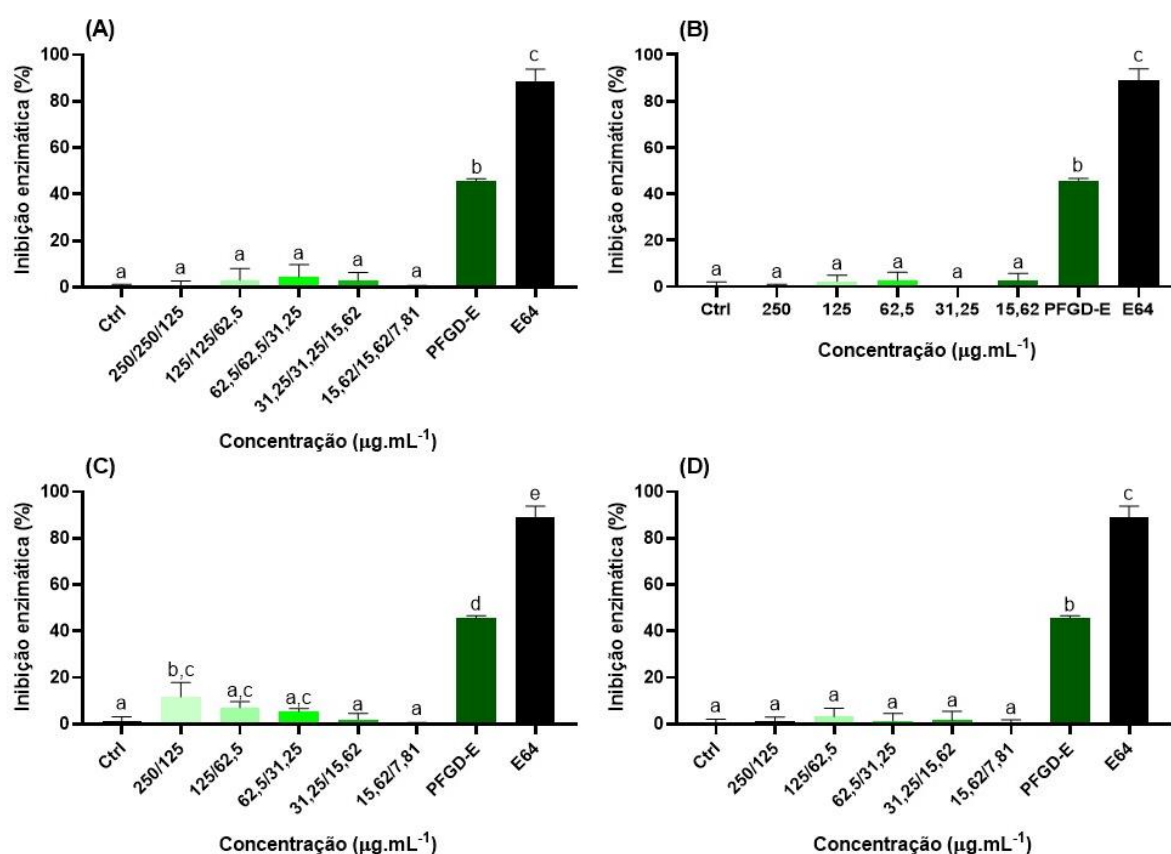
As misturas de E1/E5/E6 (FIGURA 52A), E1/E5 (FIGURA 52B) e E5/E6 (FIGURA 52D), utilizando as proporções 2:2:1, 2:2 e 2:1 respectivamente, não apresentaram diferença estatística com o controle, logo, não tem atividade de inibição enzimática. Pode-se dizer que o efeito observado nesse caso, foi antagônico, uma vez que as substâncias PFGD-E5 e PFGD-E6, quando estão separadas, apresentam inibição enzimática na concentração de 250  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , de 13,65% e 18,72%, respectivamente.

Na Figura 52C foi possível observar o efeito de inibição para a mistura E1/E6, somente na concentração de 250/125  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (11,71%), logo isso se caracteriza como efeito de sinergia, já que, as substância quando testadas separadamente nessas concentrações, não apresentaram inibição enzimática. Contudo, esse efeito em específico, não é o responsável pelo percentual de 45,83%, subfração PFGD-E.

Todas as misturas testadas foram menos ativas do que a subfração PFGD-E, logo, nem as substâncias de forma isolada e nem suas misturas

parecem ser as principais responsáveis pela atividade de inibição enzimática que a PFGD-E apresenta, como pode ser observado nos gráficos.

**FIGURA 52.** Porcentagem de inibição da papaína com as substâncias isoladas em mistura, para avaliar o efeito sinérgico, utilizando suas proporções na subfração E, 2:2:1 (E1/E5/E6), para comparação estatística foi utilizado o inibidor E64 ( $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) e a fração de origem PFGD-E ( $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Foram realizadas análise de variância ANOVA e teste de Tukey. Letras diferentes indicam diferença estatística e letras iguais indicam que não há diferença estatística entre os grupos, segundo o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).



(A): PFGD-E1/E5/E6; (B): PFGD-E1/E5; (C): PFGD-E1/E6; (D): PFGD-E5/E6; E64: Inibidor; Ctrl: Controle;

FONTE: Próprio autor.

#### 4.9 DOCKING MOLECULAR

O “docking” molecular é um processo no qual micromoléculas são ancoradas a macromoléculas (alvos biológicos) de forma a se determinar parâmetros físico-químicos de interação entre o ligante e o receptor (FIGURAS 53, 54 e 55). A partir dessas análises foi possível determinar quais os ligantes (flavonoides) que apresentaram as interações mais fortes com as cisteíno proteases envolvidas com a ansiedade (catepsinas C, B e K).

A partir dos cálculos de “docking” molecular foram obtidos valores de energias livres de ligação entre os ligantes e a enzima para diversas posições. O algoritmo genético fez uma busca de ao todo 100 posições assumidas pelos ligantes no sítio ativo das CatB (1GMY), CatC (3PDF) e CatK (5TUN). As menores energias de ligação indicam as interações mais fortes entre o ligante e a enzima (TABELA 12). A catepsina C foi a enzima que apresentou maior afinidade com as três substâncias isoladas. Isso pode ser observado também com os valores de constante de inibição dos ligantes. Quando menor essa constante, mais forte é a interação com a enzima.

**TABELA 12.** Resultado do docking para o complexo (Flavonoide + Enzima).

| <b>Complexo</b><br>(Flavonoide + Enzima) | <b>Energia Livre de</b><br><b>Ligação (KCal/mol)</b> | <b>Constante de</b><br><b>Inibição (μM)</b> |
|------------------------------------------|------------------------------------------------------|---------------------------------------------|
| <b>PFGD-E1 + 1GMY</b>                    | -6.02                                                | 38.41                                       |
| <b>PFGD-E1 + 3PDF</b>                    | <b>-7.53</b>                                         | <b>3.01</b>                                 |
| <b>PFGD-E1 + 5TUN</b>                    | -5.95                                                | 43.53                                       |
| <b>PFGD-E5 + 1GMY</b>                    | -5.70                                                | 66.55                                       |
| <b>PFGD-E5 + 3PDF</b>                    | <b>-8.04</b>                                         | <b>1.29</b>                                 |
| <b>PFGD-E5 + 5TUN</b>                    | -6.22                                                | 27.78                                       |
| <b>PFGD-E6 + 1GMY</b>                    | -5.88                                                | 49.30                                       |
| <b>PFGD-E6 + 3PDF</b>                    | <b>-7.02</b>                                         | <b>7.19</b>                                 |
| <b>PFGD-E6 + 5TUN</b>                    | -6.20                                                | 28.35                                       |

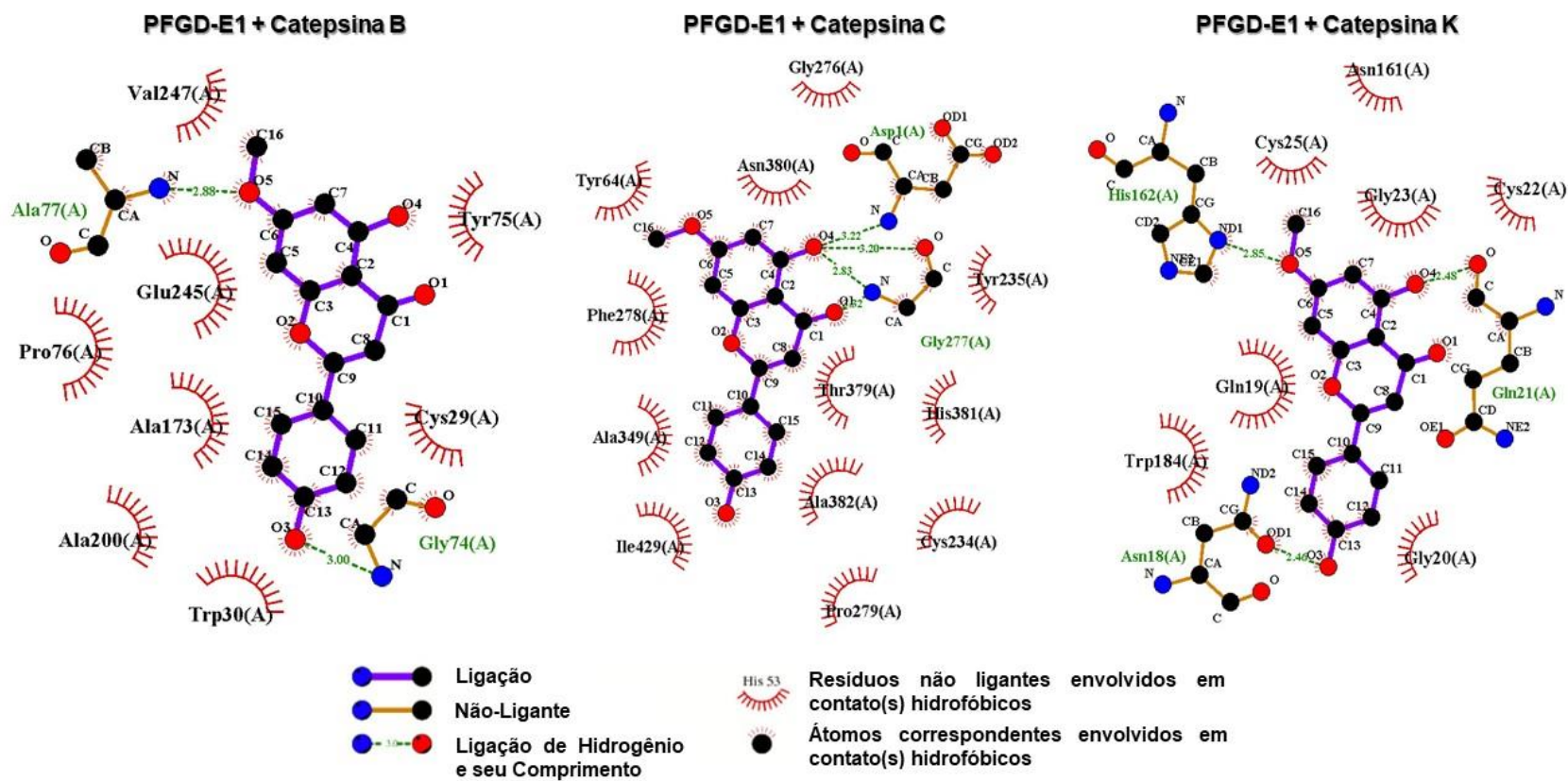
**PFGD-E1:** 5,4'-dihidroxi-7-metoxi-flavanona; **PFGD-E5:** 5-hidroxi-7,3',4'-trimetoxi-flavanona; **PFGD-E6:** 5-hidroxi-7,4'-dimetoxi-flavona; **1GMY:** Catepsina B; **3PDF:** Catepsina C; **5TUN:** Catepsina K.

Na FIGURA 53 é possível observar as interações da substância PFGD-E1 com as três catepsinas. O maior número de interações foi observado com a catepsina C. Pode-se visualizar quatro interações intermoleculares (ligações de hidrogênio), três com a hidroxila ligada ao C-5 do ANEL A e uma com o oxigênio da carbonila ligada ao C-4 do flavonoide. Estas interações ocorrem com o resíduo de aminoácido Asp1 e Gly277. Seis contatos hidrofóbicos com os resíduos da enzima, Asn380, Phe278, Ala349, Ala382, Thr379, Tyr64, também ocorrem, principalmente com os anéis A e B do flavonoide, o que corrobora para o resultado da energia livre de ligação, -7,53 Kcal/mol.

Na FIGURA 54 está ilustrado as interações entre a substância PFGD-E5, também com as três catepsinas. Contudo, o maior número de interações foi observado com a catepsina C. Pode-se observar três interações intermoleculares (ligações de hidrogênio), com a hidroxila ligada ao C-5 do anel A, outra com o oxigênio da carbonila ligada ao C-4 no anel C e no oxigênio da metoxila ligada ao C-3' no anel B. Estas interações ocorrem com os resíduos de aminoácido Gly277 e Asn66. Oito contatos hidrofóbicos com resíduos da enzima, Ala382, Pro279, Thr379, Tyr64, Leu378, Phe376, Thr2, Asp1, interagem principalmente no anel B do flavonoide, o que contribui para ocasionar na menor energia de ligação, em -8,04 Kcal/mol.

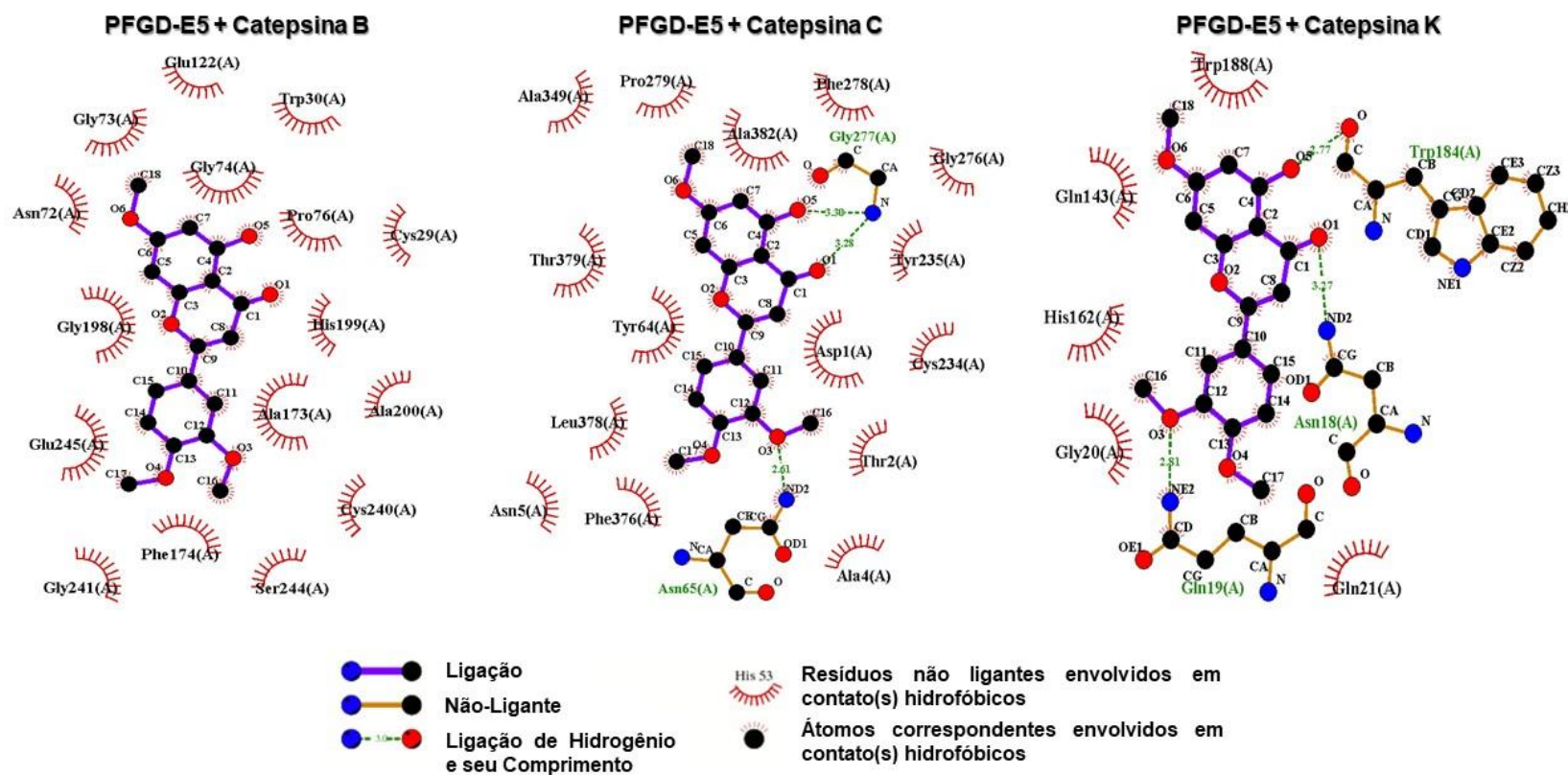
A substância PFGD-E6, também se assemelhou aos demais resultados, com a melhor interação com a catepsina C (FIGURA 55). É visto uma interação intermolecular (ligações de hidrogênio), com a hidroxila ligada ao C-5 do anel A e o resíduo de aminoácido Thr379. Os seis contatos hidrofóbicos com resíduos da enzima, Asn380, Gly277, Gly276, Tyr235, Ile429 e Phe278, também interagem principalmente com o anel B do flavonoide, e todas essas interações contribuem para o valor de energia livre de ligação resultar em -7,02 Kcal/mol, porém, foi o maior valor de energia, quando comparada com as outras duas substâncias, que pode ser explicada pelo menor número de interações entre a enzima e o ligante.

**FIGURA 53.** Interações do ligante PFGD-E1 com os aminoácidos circundantes de cada enzima.



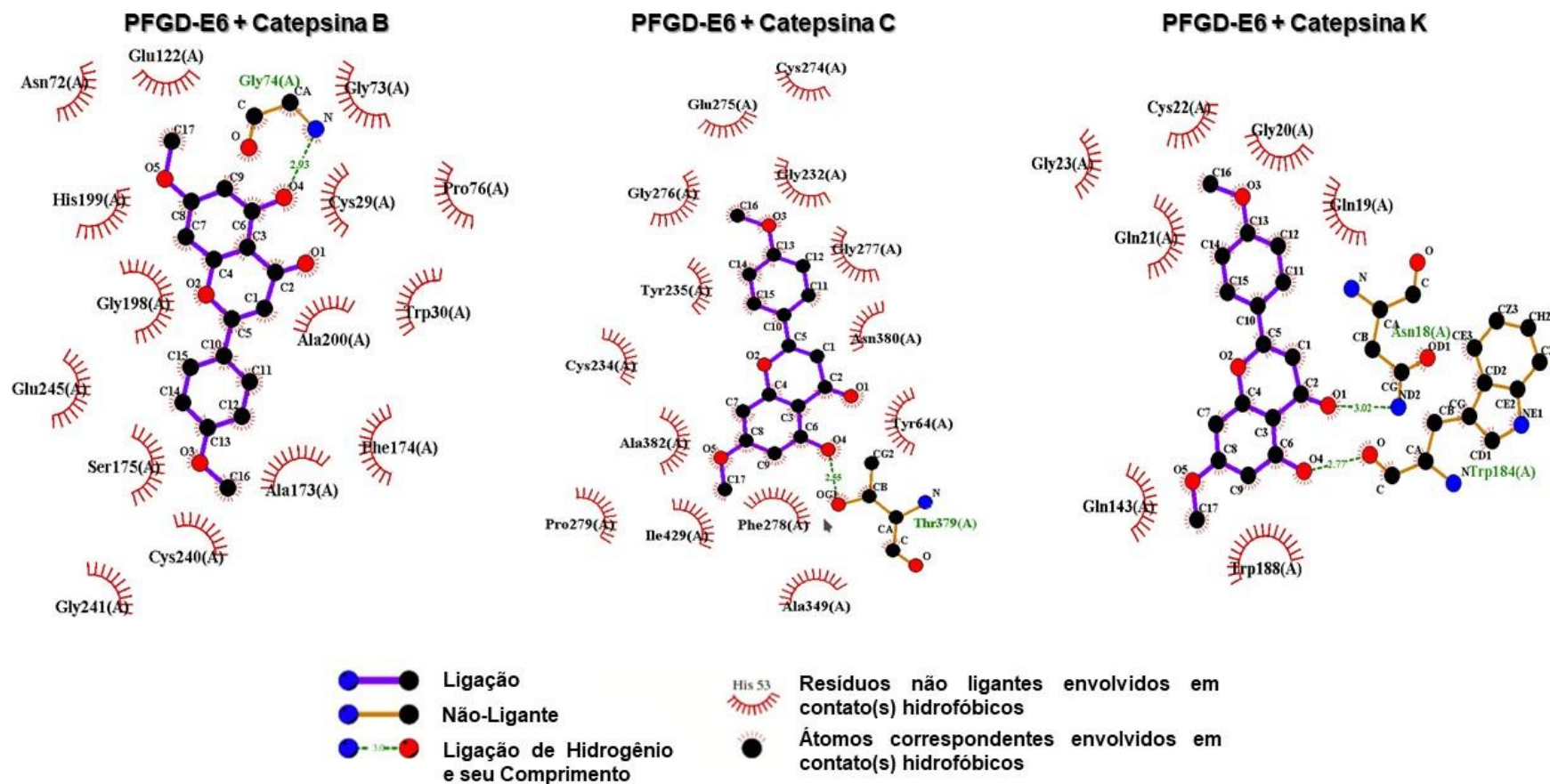
**FONTE:** Próprio Autor.

**FIGURA 54.** Interações do ligante PFGD-E5 com os aminoácidos circundantes de cada enzima.



FONTE: Próprio Autor.

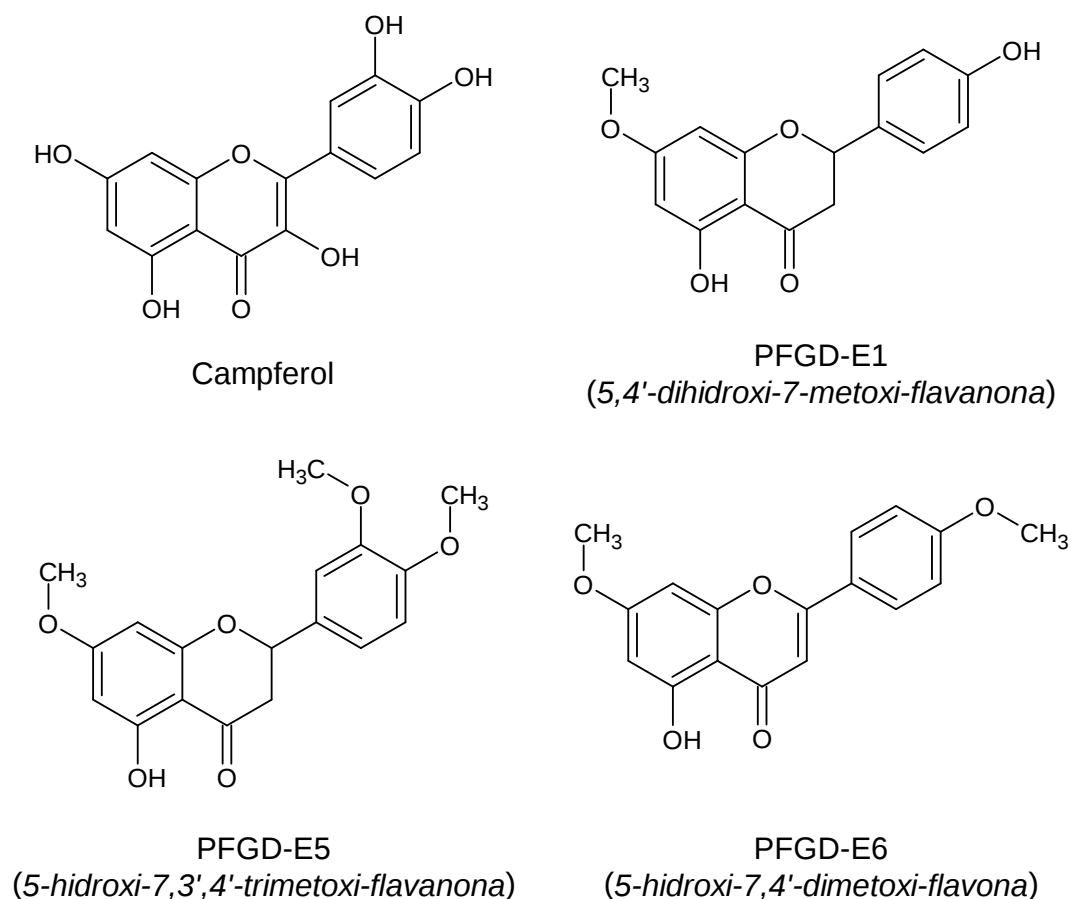
**FIGURA 55.** Interações do ligante PFGD-E6 com os aminoácidos circundantes de cada enzima.



**FONTE:** Próprio Autor.

De acordo com STIFLI *et. al* (2021) <sup>[156]</sup>, onde se avaliou as interações moleculares de flavonoides com a CatB, os mesmos interagem extensivamente com os resíduos de aminoácidos ativos da enzima, especialmente com o resíduo de His111. Quatorze dos flavonoides apresentaram forte interação com a enzima. Um deles foi o campferol, com energia livre de ligação de -6,58 Kcal/mol e valor de constante de inibição calculado de 0,014  $\mu$ M. Esse flavonoide já foi isolado em espécies de *Passiflora*, ou seja, apesar de serem substâncias diferentes, os resultados da TABELA 12 mostra que há semelhança com os resultados da CatB, uma hipótese seria em relação as estruturas apresentarem substituintes oxigenados nas mesmas posições, nos carbonos C-7 (Anel A) e C-4' (Anel B) (FIGURA 56), o que pode contribuir com os resultados das energias livres de ligação.

**FIGURA 56.** Estruturas químicas do campferol e das substâncias isoladas neste estudo (PFGD-E1, PFGD-E5 e PFGD-E6).



**FONTE:** Próprio Autor.

No trabalho de RAJA *et. al* (2022) <sup>[157]</sup>, a apigenina, narigenina e luteolina apresentaram bons resultados no encaixe do sítio ativo da Catepsina K, conforme evidenciado por suas energias de ligação livre ( $\Delta G$ ) com valores -32,82, -33,51 e -28,34 Kcal/mol, respectivamente. Esse resultado se distâcia dos dados apresentados na TABELA 12, já que nenhuma substância teve tanta afinidade assim com a catepsina K. Uma hipótese que pode ser levada em consideração, é que a maioria dos substituintes dos três flavonoides, citados acima, são hidroxilas, e isso pode ser um dos fatores que colaboram para o melhor encaixe da enzima, já que os mesmos podem contribuir para o aumento no número de interações intermoleculares.

Diante de todos os resultados, os flavonoides mais uma vez demonstraram seu potencial bioativo ao estudo *in silico*, mas ainda possuem poucos trabalhos na literatura que abordam esse tipo de estudo, como por exemplo, não há pesquisas de docking molecular entre a catepsina C e os flavonoides. Este é o primeiro trabalho descrito na literatura que mostra os resultados de docking molecular entre as catepsinas B, C e K com os flavonoides isolados (PFGD-E1, PFGD-E5 e PFGD-E6), o que faz deste, um trabalho inédito.

## 5 CONCLUSÕES

Foram detectadas no extrato dos galhos de *Passiflora foetida* as seguintes classes de metabólitos secundários: compostos fenólicos, como flavonoides e antraquinonas; alcaloides e triterpenos. Além disso, vale ressaltar que os compostos fenólicos e flavonoides totais foram quantificados pela primeira vez nos extratos dos galhos e flores de *Passiflora foetida*, o que retrata um certo ineditismo neste trabalho, no que diz respeito a caracterização química desta espécie.

Entre as espécies de *Passiflora* avaliadas, o extrato dos galhos da *P. foetida* mostrou ter grande potencial em inibir enzimas da classe das cisteíno proteases, “papain-like”. Além disso as subfrações oriundas deste extrato demonstraram o mesmo potencial de inibição enzimática, mostrando que o isolamento bioguiado é uma técnica eficiente na busca de substâncias bioativas.

Assim, foram isoladas pela primeira vez na espécie de *Passiflora foetida*, as seguintes substâncias: 5,4'-dihidroxi-7-metoxi-flavanona (PFGD-E1), 5-hidroxi-7,3',4'-trimetoxi-flavanona (PFGD-E5) e 5-hidroxi-7,4'-dimetoxi-flavona (PFGD-E6). Na atividade de inibição enzimática com as substâncias isoladas e em mistura (para avaliar o efeito sinérgico), não houve a inibição esperada, quando comparou-se com a subfração de origem (PFGD-E), conseqüentemente, pode-se dizer que essas não são as principais substâncias responsáveis pela inibição.

No estudo de “docking” molecular, as substâncias isoladas, apresentaram as mais fortes interações com a catepsina C. Com isso, é possível perceber uma certa semelhança entre os resultados *in vitro* e *in silico*. Sendo que, os resultados do estudo com a papaína mostraram uma leve inibição enzimática apenas com duas das substâncias isoladas, e no estudo de docking houve uma interação considerável apenas com a catepsina C.

Diante de todos os resultados apresentados, pode-se afirmar que as metodologias de isolamento empregadas (guiado por ensaio bioquímico) foram apropriadas para o isolamento de metabólitos secundários, contribuindo para o avanço em novas pesquisas com a *P. foetida* por conta do seu potencial apresentado.

## 6 PERSPECTIVAS

Se faz necessário novos isolamentos com as frações PFGD-C e PFGD-D, por ainda existir substâncias com potenciais de inibição em cisteíno proteases. Desse modo, valeria a pena realizar uma nova coleta, em quantidades maiores de planta, para obtenção de mais extrato dos galhos de *P. foetida*, e assim possibilitar o isolamento das substâncias bioativas destas frações. Logo, as chances de se descobrir novos e importantes inibidores de cisteíno proteases aumentaria.

Além disso, como as substâncias isoladas mostraram potencial de interação com a catepsina C, estudos futuros mais aprofundados com esses flavonoides e catepsinas C em experimentos *in vitro* e *in vivo*, poderiam levar a descoberta de importantes inibidores da catepsinas C, uma das enzimas envolvidas com patologias que afetam o sistema nervoso central, como depressão e ansiedade.

## 7 REFERÊNCIAS

- [1] Paulino, C.; Henriques, D. S. A.; Paula, G.; Coelho, B.; Fátima, M. De; Araújo, N.; Victor, P. Riqueza e Importância Das Plantas Medicinais Do Rio Grande Do Norte. *Rev. Biol. e Ciências da Terra*, **2011**, *11* (1), 157–168.
- [2] Saúde, M. da. *Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos*, 1st ed.; Ministerio da Saúde, Ed.; Brasília - DF, 2006.
- [3] Bittencourt, S. C.; Caponi, S.; Falkenberg, M. de B. O Uso Das Plantas Medicinais Sob Prescrição Médica: Pontos de Diálogo e Controvérsias Com o Uso Popular. *Rev. Bras. Farmacogn.*, **2002**, *12* (3), 89–91. <https://doi.org/10.1590/s0102-695x2002000300044>.
- [4] Pires, I. F. B.; Souza, A. A.; Feitosa, M. H. A.; Costa, S. M. Plantas Medicinais Como Opção Terapêutica Em Comunidade de Montes Claros, Minas Gerais, Brasil. *Rev. Bras. Plantas Med.*, **2014**, *16* (2 SUPPL. 1), 426–433. [https://doi.org/10.1590/1983-084X/12\\_089](https://doi.org/10.1590/1983-084X/12_089).
- [5] Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G.; Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.; Petrovick, P. R. *Farmacognosia Da Planta Ao Medicamento.Pdf*, 6th ed.; UFSC, Ed.; Porto Alegre, 2006.
- [6] Pang, Z.; Chen, J.; Wang, T.; Gao, C.; Li, Z.; Guo, L.; Xu, J.; Cheng, Y. Linking Plant Secondary Metabolites and Plant Microbiomes : A Review. *Front. Plant Sci.*, **2021**, *12* (March), 22. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.621276>.
- [7] Faleiro, F. G.; Junqueira, N. T. V.; Jesus, O. N. de; Machado, C. de F.; Ferreira, M. E.; Junqueira, K. P.; Scaranari, C.; Wruck, D. S. M.; Haddad, F.; Guimarães, T. G.; et al. *Caracterização de Germoplasma e Melhoramento Genético Do Maracujazeiro Assistidos Por Marcadores Moleculares - FASE III: Resultados de Pesquisa e Desenvolvimento 2012-2016*; CERRADOS, E., Ed.; Planaltina - DF: EMBRAPA CERRADOS, 2017.
- [8] Deng, J.; Zhou, Y.; Bai, M.; Li, H.; Li, L. Anxiolytic and Sedative Activities of *Passiflora edulis* f. *Flavicarpa*. *J. Ethnopharmacol.*, **2010**, *128* (1), 148–

153. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2009.12.043>.
- [9] Dhawan, K.; Dhawan, S.; Sharma, A. *Passiflora*: A Review Update. *J. Ethnopharmacol.*, **2004**, *94* (1), 1–23. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.02.023>.
- [10] Guerrero, F. A.; Medina, G. M. Effect of a Medicinal Plant (*Passiflora incarnata* L) on Sleep. *Sleep Sci.*, **2017**, *10* (3), 96. <https://doi.org/10.5935/1984-0063.20170018>.
- [11] Nassiri-Asl, M.; Shariati-Rad, S.; Zamansoltani, F. Anticonvulsant Effects of Aerial Parts of *Passiflora incarnata* Extract in Mice: Involvement of Benzodiazepine and Opioid Receptors. *BMC Complement. Altern. Med.*, **2007**, *7*. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-7-26>.
- [12] Yepes, A.; Ochoa-Bautista, D.; Murillo-Arango, W.; Quintero-Saumeth, J.; Bravo, K.; Osorio, E. Purple Passion Fruit Seeds (*Passiflora edulis* f. *edulis* Sims) as a Promising Source of Skin Anti-Aging Agents: Enzymatic, Antioxidant and Multi-Level Computational Studies. *Arab. J. Chem.*, **2021**, *14* (1), 102905. <https://doi.org/10.1016/J.ARABJC.2020.11.011>.
- [13] Gazolaa, A. C.; Costaa, G. M.; Castellanos, L.; Ramos, F. A.; Reginatto, F. H.; de Lima, T. C. M.; Schenkel, E. P. Involvement of GABAergic Pathway in the Sedative Activity of Apigenin, the Main Flavonoid from *Passiflora quadrangularis* Pericarp. *Rev. Bras. Farmacogn.*, **2015**, *25* (2), 158–163. <https://doi.org/10.1016/J.BJP.2015.03.009>.
- [14] Gomes, S. V. F.; Portugal, L. A.; dos Anjos, J. P.; de Jesus, O. N.; de Oliveira, E. J.; David, J. P.; David, J. M. Accelerated Solvent Extraction of Phenolic Compounds Exploiting a Box-Behnken Design and Quantification of Five Flavonoids by HPLC-DAD in *Passiflora* Species. *Microchem. J.*, **2017**, *132*, 28–35. <https://doi.org/10.1016/J.MICROC.2016.12.021>.
- [15] Gosmann, G.; Provensi, G.; Comunello, L. N.; Rates, S. M. K. Composição Química e Aspectos Farmacológicos de Espécies de *Passiflora* L. (Passifloraceae). *Rev. Bras. Biociências*, **2011**, *9* (1), 88–99.
- [16] Cao, Q.; Teng, J.; Wei, B.; Huang, L.; Xia, N. Phenolic Compounds, Bioactivity, and Bioaccessibility of Ethanol Extracts from Passion Fruit Peel

- Based on Simulated Gastrointestinal Digestion. *Food Chem.*, **2021**, 356, 129682. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2021.129682>.
- [17] Taborda, J. A. V.; Arango, W. M.; Méndez Arteaga, J. J.; Guerra Almonacid, C. M. Encapsulation of Bioactive Compounds from Byproducts of Two Species of *Passionflowers*: Evaluation of the Physicochemical Properties and Controlled Release in a Gastrointestinal Model. *Heliyon*, **2021**, 7 (7), e07627. <https://doi.org/10.1016/J.HELİYON.2021.E07627>.
- [18] Shanmugam, S.; Thangaraj, P.; dos Santos Lima, B.; Trindade, G. G. G.; Narain, N.; Mara de Oliveira e Silva, A.; Santin, J. R.; Broering, M. F.; Serafini, M. R.; Quintans-Júnior, L. J.; et al. Protective Effects of Flavonoid Composition Rich P. Subpeltata Ortega. on Indomethacin Induced Experimental Ulcerative Colitis in Rat Models of Inflammatory Bowel Diseases. *J. Ethnopharmacol.*, **2020**, 248. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2019.112350>.
- [19] Ultrafarma. Medicamentos a Base de *Passiflora* <https://www.ultrafarma.com.br/passiflora-seakalm-260mg-20-comprimidos> (accessed Mar 18, 2022).
- [20] Zheng, C. J.; Han, L. Y.; Yap, C. W.; Ji, Z. L.; Cao, Z. W.; Chen, Y. Z. Therapeutic Targets: Progress of Their Exploration and Investigation of Their Characteristics. *Pharmacol. Rev.*, **2006**, 58 (2), 259–279. <https://doi.org/10.1124/PR.58.2.4>.
- [21] Brömme, D.; Nallaseth, F. S.; Turk, B. Production and Activation of Recombinant Papain-like Cysteine Proteases. *Methods*, **2004**, 32 (2), 199–206. [https://doi.org/10.1016/S1046-2023\(03\)00212-3](https://doi.org/10.1016/S1046-2023(03)00212-3).
- [22] Judice, W. A. S.; Ferraz, L. S.; Lopes, R. de M.; Vianna, L. dos S.; Siqueira, F. da S.; Di Iorio, J. F.; Dalzoto, L. de A. M.; Trujillo, M. N. R.; Santos, T. dos R.; Machado, M. F. M.; et al. Cysteine Proteases as Potential Targets for Anti-Trypanosomatid Drug Discovery. *Bioorg. Med. Chem.*, **2021**, 46, 116365. <https://doi.org/10.1016/J.BMC.2021.116365>.
- [23] Vidal-Quist, J. C.; Ortego, F.; Hernández-Crespo, P. Contribution of Cysteine and Serine Proteases to Proteolytic Digestion in an Allergy-

- Eliciting House Dust Mite. *J. Insect Physiol.*, **2021**, *133*, 104285. <https://doi.org/10.1016/J.JINSPHYS.2021.104285>.
- [24] De Farias, V.; Maranhão, L. T.; Mushner, V. C.; Soffiatti, P. Anatomia Foliar de *Passiflora* Subgênero Decaloba (Passifloraceae): Implicações Taxonômicas. *Rodriguésia*, **2016**, *67* (1), 29–44. <https://doi.org/10.1590/2175-7860201667103>.
- [25] Costa, R. S.; Môro, F. V.; Carlos, J.; Oliveira, D. E. Influência Do Momento De Coleta Sobre a Viabilidade De Grão De Pólen Em Maracujá-Doce (*Passiflora alata* Curtis). *Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal-SP*, **2009**, *31* (4), 956–961.
- [26] Alvim Milward-de-Azevedo, M. Analysis of the Valuation of the Environment Impact and the Demand of Phytotherapies Coming from *Passionfruit* in Brazil. *Rev. FAE*, **2008**, *11* (1), 19–32.
- [27] Gadioli, I. L.; da Cunha, M. de S. B.; de Carvalho, M. V. O.; Costa, A. M.; Pineli, L. de L. de O. A Systematic Review on Phenolic Compounds in *Passiflora* Plants: Exploring Biodiversity for Food, Nutrition, and Popular Medicine. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **2018**, *58* (5), 785–807. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1224805>.
- [28] Ginwala, R.; Bhavsar, R.; Chigbu, D. G. I.; Jain, P.; Khan, Z. K. Potential Role of Flavonoids in Treating Chronic Inflammatory Diseases with a Special Focus on the Anti-Inflammatory Activity of Apigenin. *Antioxidants*, **2019**, *8* (2). <https://doi.org/10.3390/ANTIOX8020035>.
- [29] Badshah, S. L.; Faisal, S.; Muhammad, A.; Poulson, B. G.; Emwas, A. H.; Jaremko, M. Antiviral Activities of Flavonoids. *Biomed. Pharmacother.*, **2021**, *140*, 111596. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2021.111596>.
- [30] Cushnie, T. P. T.; Lamb, A. J. Antimicrobial Activity of Flavonoids. *Int. J. Antimicrob. Agents*, **2005**, *26* (5), 343. <https://doi.org/10.1016/J.IJANTIMICAG.2005.09.002>.
- [31] Kawai, M.; Hirano, T.; Higa, S.; Arimitsu, J.; Maruta, M.; Kuwahara, Y.; Ohkawara, T.; Hagihara, K.; Yamadori, T.; Shima, Y.; et al. Flavonoids and Related Compounds as Anti-Allergic Substances. *Allergol. Int.*, **2007**, *56*

- (2), 113–123. <https://doi.org/10.2332/ALLERGOLINT.R-06-135>.
- [32] Paredes, M. D.; Romecín, P.; Atucha, N. M.; O'Valle, F.; Castillo, J.; Ortiz, M. C.; García-Estañ, J. Beneficial Effects of Different Flavonoids on Vascular and Renal Function in L-NAME Hypertensive Rats. *Nutrients*, **2018**, *10* (4). <https://doi.org/10.3390/NU10040484>.
- [33] Kopustinskiene, D. M.; Jakstas, V.; Savickas, A.; Bernatoniene, J. Flavonoids as Anticancer Agents. *Nutrients*, **2020**, *12* (2). <https://doi.org/10.3390/NU12020457>.
- [34] McCullough, M. L.; Peterson, J. J.; Patel, R.; Jacques, P. F.; Shah, R.; Dwyer, J. T. Flavonoid Intake and Cardiovascular Disease Mortality in a Prospective Cohort of US Adults. *Am. J. Clin. Nutr.*, **2012**, *95* (2), 454. <https://doi.org/10.3945/AJCN.111.016634>.
- [35] Nguyen, T. Y.; To, D. C.; Tran, M. H.; Lee, J. S.; Lee, J. H.; Kim, J. A.; Woo, M. H.; Min, B. S. Anti-Inflammatory Flavonoids Isolated from *Passiflora foetida*. *Natural Product Communications*, **2015**, *10* (6). <https://doi.org/10.1177/1934578X1501000634>.
- [36] Yuan, T. Z.; Kao, C. L.; Li, W. J.; Li, H. T.; Chen, C. Y. Chemical Constituents of Leaves of *Passiflora edulis*. *Chem. Nat. Compd.* **2017**, *53* (6), 1165–1166. <https://doi.org/10.1007/S10600-017-2227-5>.
- [37] Costa, G. M.; Gazola, A. C.; Zucolotto, S. M.; Castellanos, L.; Ramos, F. A.; Reginatto, F. H.; Schenkel, E. P. Chemical Profiles of Traditional Preparations of Four South American *Passiflora* Species by Chromatographic and Capillary Electrophoretic Techniques. *Rev. Bras. Farmacogn.*, **2016**, *26* (4), 451–458. <https://doi.org/10.1016/J.BJP.2016.02.005>.
- [38] Masteikova, R.; Bernatoniene, J.; Bernatoniene, R.; Velziene, S. Antiradical Activities of the Extract of *Passiflora incarnata*. *Acta Pol. Pharm. - Drug Res.*, **2008**, *65* (5), 577–583.
- [39] Ulubelen A.; Mabry T.J.; Dellamonica G.; Chopin J. Flavonoids from *Passiflora palmeri*. *J. Nat. Prod.*, **1984**, *47* (2), 384–385.

- [40] Hamid, H. A.; Ramli, A. N. M.; Yusoff, M. M. Indole Alkaloids from Plants as Potential Leads for Antidepressant Drugs: A Mini Review. *Front. Pharmacol.*, **2017**, *8* (FEB), 96. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2017.00096/BIBTEX>.
- [41] Dos Santos, K. C.; Kurtz, S. M. T. F.; Müller, S. D.; Biavatti, M. W.; De Oliveira, R. M. M. W.; Santos, C. A. D. M. Sedative and Anxiolytic Effects of Methanolic Extract from the Leaves of *Passiflora actinia*. *Brazilian Arch. Biol. Technol.*, **2006**, *49* (4), 565–573. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132006000500005>.
- [42] Song, L. L.; Mu, Y. L.; Zhang, H. C.; Wu, G. Y.; Sun, J. Y. A New Indole Alkaloid with Anti-Inflammatory from the Branches of *Nauclea officinalis*. *Nat. Prod. Res.*, **2018**, *34* (16), 2283–2288. <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1536130>.
- [43] Xu, D.; Xu, Z. Indole Alkaloids with Potential Anticancer Activity. *Curr. Top. Med. Chem.*, **2020**, *20* (21), 1938–1949. <https://doi.org/10.2174/1568026620666200622150325>.
- [44] Ribeiro, L. S. M.; Bernardino, P. C. R. R.; Blanco, B. A.; Silva, T. G. de S. e; Bernardes, M. T. C. P.; Pereira, P. S.; Kiss-Ticli, F.; Souza, A. L. T. de. Efeito Do Extrato Das Folhas Da *Passiflora edulis* Na Cicatrização Da Pele Em Ratos. *Av. en Enfermería*, **2020**, *38* (3), 325–334. <https://doi.org/10.15446/AV.ENFERM.V38N3.84534>.
- [45] de Albuquerque, A. L.; Santiago, I. C.; de Araújo, G.; Rolim, L.; Brito-Pereira, A. O.; de Carvalho, D.; Melo, H.; Albuquerque, R. S.; Figueiredo, N.; Martins, J. G. Atividade Antimicrobiana y Caracterización Fitoquímica Dos Extratos Hidroalcoholicos de *Passiflora cincinnata* Mast.(Maracujá-Do-Mato). *Rev. Cuba. Plantas Med.*, **2015**, *19* (4), 319–328.
- [46] Bernacci, L. C.; Soares-Scott, M. D.; Junqueira, N. T. V.; Passos, I. R. D. S.; Meletti, L. M. M. *Passiflora edulis* Sims: The Correct Taxonomic Way to Cite the Yellow Passion Fruit (and of Others Colors). *Rev. Bras. Frutic.*, **2008**, *30* (2), 566–576. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452008000200053>.

- [47] Cazarin, C. B. B.; Da Silva, J. K.; Colomeu, T. C.; Zollner, R. de L.; Maróstica Junior, M. R. Antioxidant Capacity and Chemical Composition of Passion Fruit Peel (*Passiflora edulis*). *Ciência Rural*, **2014**, 44 (9), 1699–1704. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20131437>.
- [48] Braga, A.; de Medeiros, T. P.; de Araújo, B. V. Investigação Da Atividade Antihiperglicemiante Da Farinha Da Casca de *Passiflora edulis* Sims, Passifloraceae, Em Ratos Diabéticos Induzidos Por Aloxano. *Rev. Bras. Farmacogn.*, **2010**, 20 (2), 186–191. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2010000200009>.
- [49] Hu, Y.; Jiao, L.; Jiang, M. H.; Yin, S.; Dong, P.; Zhao, Z. M.; Yang, D. P.; Ho, P. T.; Wang, D. M. A New C-Glycosyl Flavone and a New Neolignan Glycoside from *Passiflora edulis* Sims Peel. *Nat. Prod. Res.*, **2018**, 32 (19), 2312–2318.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1410809>.
- [50] Xu, F.; Wang, C.; Yang, L.; Luo, H.; Fan, W.; Zi, C.; Dong, F.; Hu, J.; Zhou, J. C-Dideoxyhexosyl Flavones from the Stems and Leaves of *Passiflora edulis* Sims. *Food Chem.*, **2013**, 136 (1), 94–99. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2012.07.101>.
- [51] Wang, C.; Xu, F. Q.; Shang, J. H.; Xiao, H.; Fan, W. W.; Dong, F. W.; Hu, J. M.; Zhou, J. Cycloartane Triterpenoid Saponins from Water Soluble of *Passiflora edulis* Sims and Their Antidepressant-like Effects. *J. Ethnopharmacol.*, **2013**, 148 (3), 812–817. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2013.05.010>.
- [52] Nascimento, M. C. S. do; Gama, C. Q. dos S. Estudo Fitoquímico Do Maracujá-Amarelo (*Passiflora edulis* Sims Forma Flavicarpa O. De. - PASSIFLORACEAE) e Perfil Cromatográfico de Sucos de Maracujá. *Perspect. da Ciência e Tecnol.*, **2015**, 7, 16–27.
- [53] He, X.; Luan, F.; Yang, Y.; Wang, Z.; Zhao, Z.; Fang, J.; Wang, M.; Zuo, M.; Li, Y. *Passiflora edulis*: An Insight Into Current Researches on Phytochemistry and Pharmacology. *Front. Pharmacol.*, **2020**, 11 (May), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00617>.

- [54] Paiva, I. de A. M.; Santos, S. C. L. The Maracujazeiro-Do-Mato (*Passiflora cincinnata* Mast.) and Its Economic Importance: A Narrative Review. *Res. Soc. Dev.*, **2021**, 10 (7), e18210716464–e18210716464. <https://doi.org/10.33448/RSD-V10I7.16464>.
- [55] Cervi, A. C. Passifloraceae Do Brasil. Estudo Do Gênero *Passiflora* L., Subgênero *Passiflora*. *Fontqueria*, **1997**, 45, 1–92.
- [56] Braga, M. F.; Tadeu, N.; Junqueira, V.; Faleiro, F. G.; Bernacci, L. C. *Passiflora* Spp. Maracujá-Do-Cerrado. In *Espécies Nativas da Flora Brasileira de Valor Econômico Atual ou Potencial: Plantas Para o Futuro-região Centro-oeste*; Brasília - DF: EMBRAPA CERRADO, 2016; pp 272–279.
- [57] Zucareli, V.; Ferreira, G.; Amaro, A. C. E.; Araújo, F. P. De. Fotoperíodo, Temperatura e Reguladores Vegetais Na Germinação de Sementes de *Passiflora cincinnata* Mast. *Rev. Bras. Sementes*, **2009**, 31 (3), 106–114. <https://doi.org/10.1590/s0101-31222009000300012>.
- [58] Araújo, F. P. Caracterização Da Viabilidade Morfoagronômica De Maracujazeiro (*Passiflora cincinnata* Mast.) No Semi-Árido Brasileiro, Unesp - Tese de Doutorado, 2007.
- [59] Siebra, A. L. A.; Oliveira, L. R.; Martins, A. O. B. P. B.; Siebra, D. C.; Albuquerque, R. S.; Lemos, I. C. S.; Delmondes, G. A.; Tintino, S. R.; Figueredo, F. G.; da Costa, J. G. M.; et al. Potentiation of Antibiotic Activity by *Passiflora cincinnata* Mast. Front of Strains *Staphylococcus Aureus* and *Escherichia Coli*. *Saudi J. Biol. Sci.*, **2018**, 25 (1), 37–43. <https://doi.org/10.1016/J.SJBS.2016.01.019>.
- [60] de Lavor, É. M.; Leal, A. E. B. P.; Fernandes, A. W. C.; Ribeiro, F. P. R. de A.; Barbosa, J. de M.; Gama e Silva, M.; Teles, R. B. de A.; Oliveira, L. F. da S.; Silva, J. C.; Rolim, L. A.; et al. Ethanolic Extract of the Aerial Parts of *Passiflora cincinnata* Mast. (Passifloraceae) Reduces Nociceptive and Inflammatory Events in Mice. *Phytomedicine*, **2018**, 47, 58–68. <https://doi.org/10.1016/J.PHYMED.2018.04.052>.
- [61] de Souza Silva, G.; da Silva Campelo Borges, G.; Pinho da Costa Castro,

- C. D.; de Tarso Aidar, S.; Telles Biasoto Marques, A.; Tonetto de Freitas, S.; Poloni Rybka, A. C.; Cardarelli, H. R. Physicochemical Quality, Bioactive Compounds and in Vitro Antioxidant Activity of a New Variety of Passion Fruit Cv. BRS Sertão Forte (*Passiflora cincinnata* Mast.) from Brazilian Semiarid Region. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*, **2020**, 272, 109595. <https://doi.org/10.1016/J.SCIENTA.2020.109595>.
- [62] Barbosa Santos, T.; de Araujo, F. P.; Neto, A. F.; de Freitas, S. T.; de Souza Araújo, J.; de Oliveira Vilar, S. B.; Brito Araújo, A. J.; Lima, M. S. Phytochemical Compounds and Antioxidant Activity of the Pulp of Two Brazilian Passion Fruit Species: *Passiflora cincinnata* Mast. And *Passiflora edulis* Sims. *Int. J. Fruit Sci.*, **2021**, 21 (1), 255–269. <https://doi.org/10.1080/15538362.2021.1872050>.
- [63] de Albuquerque Siebra, A., Santiago Lemos, I., de Araújo Delmondes, G., Rolim de Oliveira, L., Pereira Bezerra Martins, A., de Carvalho Siebra, D., Henrique, H., Sabino Albuquerque, R., Figueiredo Leite, N., Martins da Costa, J., Alencar de Menezes, I., & M. Atividade Antimicrobiana e Caracterização Fitoquímica Dos Extratos Hidroalcoólicos de *Passiflora cincinnata* Mast. (Maracujá-Do-Mato). *Rev. Cuba. Plantas Med.*, **2015**, 19 (4).
- [64] Amaral, J. G. *Passiflora* L. (Passifloraceae): Estudos Fitoquímicos Suportados No Desenvolvimento de Estratégias de Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas, USP - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto -Tese de Doutorado, 2018.
- [65] Lim, T. K. *Passiflora Foetida*. *Edible Med. Non-Medicinal Plants*, **2012**, 166–173. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-4053-2\\_22](https://doi.org/10.1007/978-94-007-4053-2_22).
- [66] Soares, W. S.; Rêgo, M. M.; Rêgo, E. R.; Barroso, P. A.; Medeiros, L. R. N. Caracterização de Frutos e Sementes Em Acessos de Maracujá Silvestre (*Passiflora Foetida* L.). *Rev. Bras. Plantas Med.*, **2011**, 13, 569–573. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722011000500011>.
- [67] Mani, M.; Shekhawat, M. S. Foliar Micromorphology of In Vitro-Cultured Shoots and Field-Grown Plants of *Passiflora foetida*. *Hortic. Plant J.*, **2017**,

- 3 (1), 34–40. <https://doi.org/10.1016/J.HPJ.2017.01.009>.
- [68] Nwosu, M. O. Herbs for Mental Disorders. *Fitoterapia*, **1999**, 70 (1), 58–63. [https://doi.org/10.1016/S0367-326X\(98\)00024-0](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(98)00024-0).
- [69] Sasikala, V.; Saravanan, S.; Parimelazhagan, T. Analgesic and Anti-Inflammatory Activities of *Passiflora foetida* L. *Asian Pac. J. Trop. Med.*, **2011**, 4 (8), 600–603. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(11\)60155-7](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(11)60155-7).
- [70] Mohanasundari, C.; Natarajan, D.; Srinivasan, K.; Umamaheswari, S.; Ramachandran, A. Antibacterial Properties of *Passiflora foetida* L. a Common Exotic Medicinal Plant. *African J. Biotechnol.*, **2007**, 6 (23), 2650–2653. <https://doi.org/10.5897/AJB2007.000-2426>.
- [71] Asadujjaman, M.; Mishuk, A. U. Ila.; Hossain, M. A. sla.; Karmakar, U. K. uma. Medicinal Potential of *Passiflora foetida* L. Plant Extracts: Biological and Pharmacological Activities. *J. Integr. Med.*, **2014**, 12 (2), 121–126. [https://doi.org/10.1016/S2095-4964\(14\)60017-0](https://doi.org/10.1016/S2095-4964(14)60017-0).
- [72] SANTOSH, P.; VENUGOPL, R.; NILAKASH, A. S.; KUNJBIHARI, S.; MANGALA, L. Antidepressant Activity Of Methanolic Extract Of *Passiflora foetida* Leaves In Mice. *Int J Pharm Pharm Sci*, **2011**, 3 (1), 112–115.
- [73] TANDORO, Y.; WIDYAWATI, P. S.; BUDIANTA; TARSISIUS, D. W.; SUMARGO, G. Phytochemical Identification And Antioxidant Activity Of *Passiflora foetida* Fruits And Leaves Extracts: A Comparative Study. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, **2020**, 12 (6), 55–58. <https://doi.org/10.22159/IJPPS.2020V12I6.31505>.
- [74] Echeverri, F.; Arango, V.; Quiones, W.; Torres, F.; Escobar, G.; Rosero, Y.; Archbold, R. Passifloricins, Polyketides  $\alpha$ -Pyrone from *Passiflora foetida* Resin. *Phytochemistry*, **2001**, 56 (8), 881–885. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00478-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00478-7).
- [75] Song, Y.; Wei, X. Q.; Li, M. Y.; Duan, X. W.; Sun, Y. M.; Yang, R. L.; Su, X. D.; Huang, R. M.; Wang, H. Nutritional Composition and Antioxidant Properties of the Fruits of a Chinese Wild *Passiflora foetida*. *Mol.* **2018**, Vol. 23, Page 459, **2018**, 23 (2), 459. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES23020459>.

- [76] Murga, J.; García-Fortanet, J.; Carda, M.; Marco, J. A. Asymmetric Synthesis of Passifloricin A: A Correction in Structure. *Tetrahedron Lett.*, **2003**, 44 (43), 7909–7912. <https://doi.org/10.1016/J.TETLET.2003.09.007>.
- [77] Cardona G., W.; Quiñones F., W.; Echeverri L., F. Leishmanicidal Activity of Passifloricin A and Derivatives. *Mol.* 2004, Vol. 9, Pages 666-672, **2004**, 9 (8), 666–672. <https://doi.org/10.3390/90800666>.
- [78] Oliveira, V. B.; Zuchetto, M.; Oliveira, C. F.; Paula, C. S.; Duarte, A. F. S.; Miguel, M. D.; Miguel, O. G. Efeito de Diferentes Técnicas Extrativas No Rendimento, Atividade Antioxidante, Doseamentos Totais e No Perfil Por Clae-Dad de *Dicksonia Sellowiana* (Presl.). Hook, Dicksoniaceae. *Rev. Bras. Plantas Med.*, **2016**, 18 (1), 230–239. [https://doi.org/10.1590/1983-084X/15\\_106](https://doi.org/10.1590/1983-084X/15_106).
- [79] Patil, A. S.; Paikrao, H. M. Bioassay Guided Phytometabolites Extraction for Screening of Potent Antimicrobials in *Passiflora foetida* L. *J. Appl. Pharm. Sci.*, **2012**, 2 (9), 137–142. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2012.2927>.
- [80] Phukhatmuen, P.; Raksat, A.; Laphookhieo, S.; Charoensup, R.; Duangyod, T.; Maneerat, W. Bioassay-Guided Isolation and Identification of Antidiabetic Compounds from Garcinia Cowa Leaf Extract. *Heliyon*, **2020**, 6 (4), e03625. <https://doi.org/10.1016/J.HELİYON.2020.E03625>.
- [81] Wang, T.-X.; Shi, M.-M.; Jiang, J.-G. Bioassay-Guided Isolation and Identification of Anticancer and Antioxidant Compounds from Gynostemma Pentaphyllum (Thunb.) Makino. **2018**. <https://doi.org/10.1039/c8ra02803f>.
- [82] Wosch, L.; dos Santos, K. C.; Imig, D. C.; Santos, C. A. M. Comparative Study of *Passiflora* Taxa Leaves: li. A Chromatographic Profile. *Rev. Bras. Farmacogn.*, **2017**, 27 (1), 40–49. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2016.06.007>.
- [83] DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. Cromatografia: Um Breve Ensaio. *Quim. Nova*, **1998**, 7 (7), 21–25.
- [84] Ribani, M.; Grespan Bottoli, C. B.; Collins, C. H.; Fontes Jardim, I. C. S.; Costa Melo, L. F. Validação Em Métodos Cromatográficos e

- Eletroforéticos. *Quim. Nova*, **2004**, 27 (5), 771–780. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422004000500017>.
- [85] Shanmugam, S.; Murugaiyan, I.; dos Santos Lima, B.; Serafini, M. R.; de Souza Araújo, A. A.; Narain, N.; Quintans-Júnior, L. J.; Thangaraj, P. HPLC–DAD–MS Identification of Polyphenols from *Passiflora leschenaultii* and Determination of Their Antioxidant, Analgesic, Anti-Inflammatory and Antipyretic Properties. *Arab. J. Chem.*, **2019**, 12 (6), 760–771. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2016.02.008>.
- [86] Pan, Z. H.; Ning, D. S.; Fu, Y. X.; Li, D. P.; Zou, Z. Q.; Xie, Y. C.; Yu, L. L.; Li, L. C. Preparative Isolation of Piceatannol Derivatives from Passion Fruit (*Passiflora edulis*) Seeds by High-Speed Countercurrent Chromatography Combined with High-Performance Liquid Chromatography and Screening for  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitory Activities. *J. Agric. Food Chem.*, **2020**, 68 (6), 1555–1562. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b04871>.
- [87] Argentieri, M. P.; Levi, M.; Guzzo, F.; Avato, P. Phytochemical Analysis of *Passiflora loefgrenii* Vitta, a Rich Source of Luteolin-Derived Flavonoids with Antioxidant Properties. *J. Pharm. Pharmacol.*, **2015**, 67 (11), 1603–1612. <https://doi.org/10.1111/jphp.12454>.
- [88] Zucolotto, S. M.; Fagundes, C.; Reginatto, F. H.; Ramos, F. A.; Castellanos, L.; Duque, C.; Schenkel, E. P. Analysis of C-Glycosyl Flavonoids from South American *Passiflora* Species by HPLC-DAD and HPLC-MS. *Phytochem. Anal.*, **2012**, 23 (3), 232–239. <https://doi.org/10.1002/pca.1348>.
- [89] Wang, W.; Gao, Y. T.; Wei, J. W.; Chen, Y. F.; Liu, Q. L.; Liu, H. M. Optimization of Ultrasonic Cellulase-Assisted Extraction and Antioxidant Activity of Natural Polyphenols from Passion Fruit. *Molecules*, **2021**, 26 (9), 1–14. <https://doi.org/10.3390/molecules26092494>.
- [90] Maciel, M. A. M.; Pinto, A. C.; Veiga, V. F.; Grynberg, N. F.; Echevarria, A. Plantas Medicinais: A Necessidade de Estudos Multidisciplinares. *Quim. Nova*, **2002**, 25 (3), 429–438. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422002000300016>.

- [91] Robinson, P. K. Enzymes: Principles and Biotechnological Applications. *Essays Biochem*, **2015**, 59, 1–41. <https://doi.org/10.1042/BSE0590001>.
- [92] Robertson, J. G. Enzymes as a Special Class of Therapeutic Target: Clinical Drugs and Modes of Action. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **2007**, 17 (6), 674–679. <https://doi.org/10.1016/J.SBI.2007.08.008>.
- [93] Salles Trevisan, M. T.; Viana Macedo, F. V.; Van De Meent, M.; Rhee, I. K.; Verpoorte, R. Seleção de Plantas Com Atividade Anticolinesterase Para Tratamento Da Doença de Alzheimer. *Quim. Nova*, **2003**, 26 (3), 301–304. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422003000300002>.
- [94] GRAVA, A. F. Utilização Da Enzima  $\beta$ -Cetoacil ACP Redutase (OAR) Da via FAS II de Plasmodium Falciparum Como Um Alvo Para Busca de Novos Compostos Antimaláricos, UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - Tese (Doutorado em Biotecnologia), 2014.
- [95] MONTEL, A. L. B. Estudo de Mecanismo e Desenvolvimento de Medicamentos Tripanocidas, Universidade de Brasília - Tese (Doutorado em Química), 2012.
- [96] Tremacoldi, C. R. *Proteases e Inibidores de Proteases Na Defesa de Plantas Contra Pragas*, 1<sup>a</sup>.; Belém - PA, 2009.
- [97] Muri, E. M. F. Proteases Virais: Importantes Alvos Terapêuticos de Compostos Peptideomiméticos. *Quim. Nova*, **2014**, 37 (2), 308–316. <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20140052>.
- [98] Liu, C. L.; Guo, J.; Zhang, X.; Sukhova, G. K.; Libby, P.; Shi, G. P. Cysteine Protease Cathepsins in Cardiovascular Disease: From Basic Research to Clinical Trials. *Nat. Rev. Cardiol.*, **2018**, 15 (6), 351–370. <https://doi.org/10.1038/S41569-018-0002-3>.
- [99] Siqueira-Neto, J. L.; Debnath, A.; McCall, L. I.; Bernatchez, J. A.; Ndao, M.; Reed, S. L.; Rosenthal, P. J. Cysteine Proteases in Protozoan Parasites. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **2018**, 12 (8), e0006512. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0006512>.
- [100] Vizovišek, M.; Vidak, E.; Javoršek, U.; Mikhaylov, G.; Bratovš, A.; Turk, B.

- Cysteine Cathepsins as Therapeutic Targets in Inflammatory Diseases. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, **2020**, *24* (6), 573–588. <https://doi.org/10.1080/14728222.2020.1746765>.
- [101] Dai, R.; Wu, Z.; Chu, H. Y.; Lu, J.; Lyu, A.; Liu, J.; Zhang, G. Cathepsin K: The Action in and Beyond Bone. *Front. Cell Dev. Biol.*, **2020**, *8*, 433. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2020.00433/BIBTEX>.
- [102] Gora, J.; Latajka, R. Involvement of Cysteine Proteases in Cancer. *Curr. Med. Chem.*, **2015**, *22* (8), 944–957. <https://doi.org/10.2174/0929867321666141106115624>.
- [103] Gomes, C. P.; Fernandes, D. E.; Casimiro, F.; da Mata, G. F.; Passos, M. T.; Varela, P.; Mastroianni-Kirsztajn, G.; Pesquero, J. B. Cathepsin L in COVID-19: From Pharmacological Evidences to Genetics. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, **2020**, *10*. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2020.589505>.
- [104] Amri, E.; Mamboya, F. Papain, a Plant Enzyme of Biological Importance: A Review. *Am. J. Biochem. Biotechnol.*, **2012**, *8* (2), 99–104. <https://doi.org/10.3844/AJBBSP.2012.99.104>.
- [105] Brömme, D. Papain-like Cysteine Proteases. *Curr. Protoc. protein Sci.*, **2001**, *Chapter 21* (1). <https://doi.org/10.1002/0471140864.PS2102S21>.
- [106] Somoza, J. R.; Zhan, H.; Bowman, K. K.; Yu, L.; Mortara, K. D.; Palmer, J. T.; Clark, J. M.; McGrath, M. E. Crystal Structure of Human Cathepsin V†,‡. *Biochemistry*, **2000**, *39* (41), 12543–12551. <https://doi.org/10.1021/BI000951P>.
- [107] Niemeyer, C.; Matosin, N.; Kaul, D.; Philipsen, A.; Gassen, N. C. The Role of Cathepsins in Memory Functions and the Pathophysiology of Psychiatric Disorders. *Front. Psychiatry*, **2020**, *11* (July), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2020.00718>.
- [108] Dauth, S.; Sîrbulescu, R. F.; Jordans, S.; Rehders, M.; Avena, L.; Oswald, J.; Lerchl, A.; Saftig, P.; Brix, K. Cathepsin K Deficiency in Mice Induces Structural and Metabolic Changes in the Central Nervous System That Are Associated with Learning and Memory Deficits. *BMC Neurosci.*, **2011**, *12* (1), 74. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-12-74>.

- [109] Zhanaeva, S. Y.; Rogozhnikova, A. A.; Alperina, E. L.; Gevorgyan, M. M.; Idov, G. V. Changes in Activity of Cysteine Cathepsins B and L in Brain Structures of Mice with Aggressive and Depressive-Like Behavior Formed under Conditions of Social Stress. *Bull. Exp. Biol. Med.*, **2018**, *164* (4), 425–429. <https://doi.org/10.1007/s10517-018-4004-2>.
- [110] Zhang, Y.; Fan, K.; Liu, Y.; Liu, G.; Yang, X.; Ma, J. Cathepsin C Aggravates Neuroinflammation Involved in Disturbances of Behaviour and Neurochemistry in Acute and Chronic Stress-Induced Murine Model of Depression. *Neurochem. Res.*, **2018**, *43* (1), 80–91. <https://doi.org/10.1007/s11064-017-2320-y>.
- [111] Lee, B. J.; Singh, A.; Chiang, P.; Kemp, S. J.; Goldman, E. A.; Weinhouse, M. I.; Vlasuk, G. P.; Rosenthal, P. J. Antimalarial Activities of Novel Synthetic Cysteine Protease Inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2003**, *47* (12), 3810. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.12.3810-3814.2003>.
- [112] Ndao, M.; Nath-Chowdhury, M.; Sajid, M.; Marcus, V.; Mashiyama, S. T.; Sakanari, J.; Chow, E.; Mackey, Z.; Land, K. M.; Jacobson, M. P.; et al. A Cysteine Protease Inhibitor Rescues Mice from a Lethal *Cryptosporidium Parvum* Infection. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2013**, *57* (12), 6063. <https://doi.org/10.1128/AAC.00734-13>.
- [113] Palermo, C.; Joyce, J. A. Cysteine Cathepsin Proteases as Pharmacological Targets in Cancer. *Trends Pharmacol. Sci.*, **2008**, *29* (1), 22–28. <https://doi.org/10.1016/J.TIPS.2007.10.011>.
- [114] Welker, A.; Kersten, C.; Müller, C.; Madhugiri, R.; Zimmer, C.; Müller, P.; Zimmermann, R.; Hammerschmidt, S.; Maus, H.; Ziebuhr, J.; et al. Structure-Activity Relationships of Benzamides and Isoindolines Designed as SARS-CoV Protease Inhibitors Effective against SARS-CoV-2. *ChemMedChem*, **2021**, *16* (2), 340–354. <https://doi.org/10.1002/CMDC.202000548>.
- [115] Fonseca, L. R. d.; Rodrigues, R. de A.; Ramos, A. de S.; Da Cruz, J. D.; Ferreira, J. L. P.; Silva, J. R. de A.; Amaral, A. C. F. Herbal Medicinal Products from *Passiflora* for Anxiety: An Unexploited Potential. *Sci. World*

- J., **2020**, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/6598434>.
- [116] Jin, H.; Xu, Z.; Cui, K.; Zhang, T.; Lu, W.; Huang, J. Dietary Flavonoids Fisetin and Myricetin: Dual Inhibitors of Plasmodium Falciparum Falcipain-2 and Plasmepsin II. *Fitoterapia*, **2014**, 94, 55–61. <https://doi.org/10.1016/J.FITOTE.2014.01.017>.
- [117] Liu, Y.; Liang, C.; Xin, L.; Ren, X.; Tian, L.; Ju, X.; Li, H.; Wang, Y.; Zhao, Q.; Liu, H.; et al. The Development of Coronavirus 3C-Like Protease (3CL<sup>pro</sup>) Inhibitors from 2010 to 2020. *Eur. J. Med. Chem.*, **2020**, 206, 112711. <https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2020.112711>.
- [118] Pereira, K. R. B.; Botelho-Júnior, S.; Domingues, D. P.; MacHado, O. L. T.; Oliveira, A. E. A.; Fernandes, K. V. S.; Madureira, H. C.; Pereira, T. N. S.; Jacinto, T. Passion Fruit Flowers: Kunitz Trypsin Inhibitors and Cystatin Differentially Accumulate in Developing Buds and Floral Tissues. *Phytochemistry*, **2011**, 72 (16), 1955–1961. <https://doi.org/10.1016/J.PHYTOCHEM.2011.06.009>.
- [119] Yapasert, R.; Khaw-On, P.; Banjerdpongchai, R.; Sabatier, J.-M.; Rapposelli, S. Coronavirus Infection-Associated Cell Death Signaling and Potential Therapeutic Targets. *Mol. 2021, Vol. 26, Page 7459*, **2021**, 26 (24), 7459. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES26247459>.
- [120] Sadraei, H.; Ghannadi, A.; Takei-Bavani, M. Effects of Zataria Multiflora and Carum Carvi Essential Oils and Hydroalcoholic Extracts of *Passiflora incarnata*, *Berberis integerrima* and *Crocus sativus* on Rat Isolated Uterus Contractions. *Int. J. Aromather.*, **2003**, 13 (2–3), 121–127. [https://doi.org/10.1016/S0962-4562\(03\)00092-4](https://doi.org/10.1016/S0962-4562(03)00092-4).
- [121] Wagner, H.; Bladt, S. *Plant Drug Analysis*, 2nd ed.; Springer, Ed.; 1996. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-00574-9>.
- [122] Sociedade Brasileira de Farmacognosia. Taninos <http://www.sbfognosia.org.br/Ensino/taninos.html> (accessed Sep 8, 2022).
- [123] da Silva, M. H. R.; Cueva-Yesquén, L. G.; Júnior, S. B.; Garcia, V. L.; Sartoratto, A.; de Angelis, D. de F.; de Angelis, D. A. Endophytic Fungi from *Passiflora incarnata*: An Antioxidant Compound Source. *Arch. Microbiol.*,

- 2020**, 202 (10), 2779–2789. <https://doi.org/10.1007/S00203-020-02001-Y/TABLES/4>.
- [124] Munteanu, I. G.; Apetrei, C. Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, Vol. 22, Page 3380, **2021**, 22 (7), 3380. <https://doi.org/10.3390/IJMS22073380>.
- [125] Ilmi, H. M.; Elya, B.; Handayani, R. Association Between Total Phenol And Flavonoid Contents In *Artocarpus heterophyllus* (Jackfruit) Bark And Leaf Extracts And Lipoxygenase Inhibition. *Int. J. Appl. Pharm.*, **2020**, 12 (Special Issue 1), 252–256. <https://doi.org/10.22159/IJAP.2020.V12S1.FF055>.
- [126] Andrade, A. K. de S.; Santos, L. A.; Menezes, E. S.; Cavalcante, R. C. M.; Da Silva, J. A. Otimização E Validação De Método Enzimático Semiquantitativo Simples E De Baixo Custo Para A Busca De Inibidores De Cisteino Proteases. *Quim. Nova*, **2021**, 44 (4), 473–477. <https://doi.org/https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170691>.
- [127] Berman, H. M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T. N.; Weissig, H.; Shindyalov, I. N.; Bourne, P. E. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.*, **2000**, 28 (1), 235–242. <https://doi.org/10.1093/NAR/28.1.235>.
- [128] M.J. Frisch; G.W. Trucks; H.B. Schlegel; M.J. Frisch; H.B. Schlegel; G.E. Scuseria; M.A. Robb; J.R. Cheeseman; G. Scalmani; V. Barone; et al. Gaussian 09, Revision A.02. In *Gaussian, Inc*; Wallingford CT, 2016.
- [129] Morris, G. M.; Ruth, H.; Lindstrom, W.; Sanner, M. F.; Belew, R. K.; Goodsell, D. S.; Olson, A. J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. *J. Comput. Chem.*, **2009**, 30 (16), 2785. <https://doi.org/10.1002/JCC.21256>.
- [130] Gobbo-Neto, L.; Lopes, N. P. Plantas Medicinais: Fatores de Influência No Conteúdo de Metabólitos Secundários. *Quim. Nova*, **2007**, 30 (2), 374–381. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000200026>.
- [131] Biesaga, M. Influence of Extraction Methods on Stability of Flavonoids. *J. Chromatogr. A*, **2011**, 1218 (18), 2505–2512. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2011.02.059>.

- [132] Silva, R.; Haraguchi, S. K.; Muniz, E. C.; Rubira, A. F. Aplicações de Fibras Lignocelulósicas Na Química de Polímeros e Em Compósitos. *Quim. Nova*, **2009**, 32 (3), 661–671. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000300010>.
- [133] Pereira, J. P. J.; Moura, C. D. S.; Ayres, C.; Stávale, L. M. An Innovative and Accessible Chemical Approach to Bisphenol Identification on Plastic Surfaces. *Rev. Virtual Quim*, **2020**, 13 (1), 234–241. <https://doi.org/10.21577/1984-6835.20200146>.
- [134] Dulo, B.; Phan, K.; Githaiga, J.; Raes, K.; De Meester, S. Natural Quinone Dyes: A Review on Structure, Extraction Techniques, Analysis and Application Potential. *Waste and Biomass Valorization*, **2021**, 12 (12), 6339–6374. <https://doi.org/10.1007/S12649-021-01443-9/FIGURES/7>.
- [135] Kiliç, H. Ultraviolet–Visible Study on Acid–Base Equilibria for Some 7,8-Ethylenedioxy Coumarins. *J. Mol. Liq.*, **2013**, 187, 314–319. <https://doi.org/10.1016/J.MOLLIQ.2013.08.003>.
- [136] Antony, N. M.; Fernandes, J.; Mathew, J. Phytochemical & Pharmacological Investigation of Stems of *Passiflora foetida*. *J. Pharm. Res. Int.*, **2021**, 408–414. <https://doi.org/10.9734/JPRI/2021/V33I58B34218>.
- [137] Silva, M. R.; Silva, M. A. A. P. da. Aspectos Nutricionais de Fitatos e Taninos. *Rev. Nutr.*, **1999**, 12 (1), 21–32. <https://doi.org/10.1590/S1415-52731999000100002>.
- [138] Simão, M. J.; Barboza, T. J. S.; Vianna, M. G.; Garcia, R.; Mansur, E.; Ignacio, A. C. P. R.; Pacheco, G. A Comparative Study of Phytoconstituents and Antibacterial Activity of in Vitro Derived Materials of Four *Passiflora* Species. *An. Acad. Bras. Cienc.*, **2018**, 90 (3), 2805–2813. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201820170809>.
- [139] Paulraj, J. A.; Subharamanian, H.; Suriyamoorthy, P.; Kanakasabapathi, D. Phytochemical Screening, Gc-MS Analysis And Enzyme Inhibitory Activity Of *Passiflora foetida* L. *Indo Am. J. Pharm. Res.*, **2014**, 4 (8), 9.
- [140] Filho, A. A. de M.; Kamezaki, A. K.; Ribeiro, P. R. E.; Melo, A. C. G. R.;

- Fernández, I. M.; Santos, R. C.; Chagas, E. A.; Chagas, P. C. Chemical Composition, Antioxidant and Biological Activity of Leaves *Passiflora foetida*. *Chem. Eng. Trans.*, **2018**, 64.
- [141] Leal, A. E. B. P.; de Oliveira, A. P.; Santos, R. F. dos; Soares, J. M. D.; Lavor, E. M. de; Pontes, M. C.; Lima, J. T. de; Santos, A. D. da C.; Tomaz, J. C.; Oliveira, G. G. de; et al. Determination of Phenolic Compounds, in Vitro Antioxidant Activity and Characterization of Secondary Metabolites in Different Parts of *Passiflora cincinnata* by HPLC-DAD-MS/MS Analysis. *Nat. Prod. Res.*, **2020**, 34 (7), 995–1001. <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1548445>.
- [142] Ramaiya, S. D.; Bujang, J. S.; Zakaria, M. H. Assessment of Total Phenolic, Antioxidant, and Antibacterial Activities of *Passiflora* Species. *ScientificWorldJournal.*, **2014**, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/167309>.
- [143] Martins, C. F. R.; Salles, B. C. C.; Brigagão, M. R. P. L.; Rodrigues, M. R.; Ferreira, E. B.; Duarte, S. M. da S.; Paula, F. B. de A. Ethanolic Extract of *Passiflora Edulis* Sims Leaves Inhibits Protein Glycation and Restores the Oxidative Burst in Diabetic Rat Macrophages after *Candida Albicans* Exposure. *Brazilian J. Pharm. Sci.*, **2015**, 51 (4), 869–878. <https://doi.org/10.1590/S1984-82502015000400013>.
- [144] Badalova, Vusala, Mehmet Özgür Atay, B. A. Determination of Different Biological Activities of Methanolic Extracts of Fruits of *Passiflora ligularis* Juss. and *Passiflora Edulis* Sims. *Nat. Prod. Biotechnol.*, **2021**, 1 (2), 75–84.
- [145] Asir, P. J.; Priyanga, S.; Hemmalakshmi, K. D. In Vitro Free Radical Scavenging Activity And Secondary Metabolites In *Passiflora foetida* L. *Asian J Pharm. Res Heal. Care*, **2014**, 6 (2), 3–11.
- [146] Karak, P. Biological Activities Of Flavonoids: An Overview. *Int. J. Pharm. Sci. Res.*, **2019**, 10 (4), 1567–1574.
- [147] Jurasekova, Z.; Domingo, C.; García-Ramos, J. V.; Sanchez-Cortes, S. Vibrational Spectroscopy as an Analytical Tool in the Identification and Characterization of Natural Dyes Employed in the Cultural Heritage.

COALITION, 2007, 14.

- [148] Amanda Letícia da Silva Pontes; Antonio Jorge Ribeiro da Silva; Filipe de Oliveira Chaves; Catharina Eccard Fingolo; Maria Auxiliadora Coelho Kaplan. Estudo De Contaminação Por Ftalato Em Água De Manguezal Do Rio De Janeiro. *Rev. Episteme Transversalis*, **2019**, 10 (3), 69–80.
- [149] Lima, D. I. de. Identificação de Compostos Orgânicos Na Química de Produtos Naturais Por Técnicas de RMN, Universidade Federal de Alagoas - Tese de Doutorado em Química e Biotecnologia, 2013.
- [150] Dos S. Grecco, S.; Dorigueto, A. C.; Landre, I. M.; Soares, M. G.; Martho, K.; Lima, R.; Pascon, R. C.; Vallim, M. A.; Capello, T. M.; Romoff, P.; et al. Structural Crystalline Characterization of Sakuranetin — An Antimicrobial Flavanone from Twigs of *Baccharis retusa* (Asteraceae). *Mol.* 2014, Vol. 19, Pages 7528-7542, **2014**, 19 (6), 7528–7542. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES19067528>.
- [151] Li, K.; Zhang, H.; Xie, H.; Liang, Y.; Wang, X.; Ito, Y. Preparative Isolation And Purification Of Five Flavonoids From *Pogostemon cablin* Benth By High-Speed Countercurrent Chromatography And Preparative High-Performance Liquid Chromatography. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, **2011**, 34 (15), 1617–1629. <https://doi.org/10.1080/10826076.2011.580486>.
- [152] Mangoyi, R.; Midiwo, J.; Mukanganyama, S. Isolation and Characterization of an Antifungal Compound 5-Hydroxy-7,4'-Dimethoxyflavone from *Combretum zeyheri*. *BMC Complement. Altern. Med.*, **2015**, 15 (1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/S12906-015-0934-7/TABLES/2>.
- [153] Ulubelen, A.; Topcu, G.; Mabry, T. J.; Dellamoxica, G.; Chopin, J.; Bernard, C.; Ayanoglu, E.; Dellamonica, G.; Llubelen, A.; Kerr, R. R. C-Glycosylflavonoids From *Passiflora foetida* Var. *Hispida* and *P. foetida* Var. *Hibiscifolia*. *J. Nat. Prod.*, **1981**, 45 (1), 103. <https://doi.org/10.1021/NP50019A012>.
- [154] Echeverri, F.; Arango, V.; Quiones, W.; Torres, F.; Escobar, G.; Rosero, Y.; Archbold, R. Passifloricins, Polyketides Alpha-Pyrone from *Passiflora*

- foetida* Resin. *Phytochemistry*, **2001**, 56 (8), 881–885. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00478-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00478-7).
- [155] Casanova, L. M.; Costa, S. S. Interações Sinérgicas Em Produtos Naturais: Potencial Terapêutico e Desafios. *Rev. Virtual Quim.*, **2017**, 9 (2).
- [156] İstifli, E. S.; Şihoğlu Tepe, A.; Netz, P. A.; Sarikürkcü, C.; Kiliç, İ. H.; Tepe, B. Determination of the Interaction between the Receptor Binding Domain of 2019-NCoV Spike Protein, TMPRSS2, Cathepsin B and Cathepsin L, and Glycosidic and Aglycon Forms of Some Flavonols. *Turkish J. Biol.*, **2021**, 45 (4), 484. <https://doi.org/10.3906/BIY-2104-51>.
- [157] Raja, A.; Singh, G. P.; Fadil, S. A.; Elhady, S. S.; Youssef, F. S.; Ashour, M. L. Prophylactic Anti-Osteoporotic Effect of *Matricaria chamomilla* L. Flower Using Steroid-Induced Osteoporosis in Rat Model and Molecular Modelling Approaches. *Antioxidants* 2022, Vol. 11, Page 1316, **2022**, 11 (7), 1316. <https://doi.org/10.3390/ANTIOX11071316>.