



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
Centro de Ciências da Saúde
Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos



**Prospecção de substâncias anti-amilóide pancreática em produtos naturais:
extratos das ervas-de-passarinho *Struthanthus marginatus* (Desr.) Blume e
Struthanthus concinnus (Mart.) Mart. (Loranthaceae)**

MARIANA FREIRE CAMPOS

Rio de Janeiro, 29 setembro de 2020.

MARIANA FREIRE CAMPOS

**Prospecção de substâncias anti-amilóide pancreática em produtos naturais:
extratos das ervas-de-passarinho *Struthanthus marginatus* (Desr.) Blume e
Struthanthus concinnus (Mart.) Mart. (Loranthaceae)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos (PBV) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia Vegetal.

Orientadores:

Profa. Dra. Suzana Guimarães Leitão

Profa. Dra. Rosineide Costa Simas

Prof. Dr. Luis Mauricio Trambaioli da Rocha e Lima

Rio de Janeiro, 29 setembro de 2020.

FICHA CATALOGRÁFICA

CIP - Catalogação na Publicação

FC198p Freire Campos, Mariana
Prospecção de substâncias anti-amilóide pancreática em produtos naturais: extratos das ervas-de-passarinho *Struthanthus marginatus* (Desr.) Blume e *Struthanthus concinnus* (Mart.) Mart. (Loranthaceae)
/ Mariana Freire Campos. -- Rio de Janeiro, 2020.
104 f.

Orientadora: Suzana Guimarães Leitão.
Coorientadora: Rosineide Costa Simas.
Coorientador: Luis Mauricio Trambaioli da Rocha e Lima.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Decania do Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, 2020.

1. Biotecnologia. 2. Farmacognosia. 3. Química de Produtos Naturais. 4. Botânica Aplicada. I. Guimarães Leitão, Suzana, orient. II. Costa Simas, Rosineide, coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

MARIANA FREIRE CAMPOS

**Prospecção de substâncias anti-amilóide pancreática em produtos naturais:
extratos das ervas-de-passarinho *Struthanthus marginatus* (Desr.) Blume e
Struthanthus concinnus (Mart.) Mart.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos (PBV) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia Vegetal.

Dra. Maíra Fasciotti Pinto Lima (**INMETRO**)

Profa. Dra. Yraima Moura Lopes Cordeiro (**UFRJ**)

Prof. Dr. Celso Luis Salgueiro Lage (**INPI**)

Profa. Dra. Suzana Guimarães Leitão (**UFRJ**)

Profa. Dra. Rosineide Costa Simas (**UFG**)

Prof. Dr. Luis Mauricio Trambaioli da Rocha e Lima (**UFRJ**)

Rio de Janeiro, ____ de _____ de 20 ____.

“O começo de todas as ciências é o espanto de as coisas serem o que são.”

Aristóteles

AGRADECIMENTOS

“Quando você tem medo e faz mesmo assim, isso é coragem.”
Neil Gaiman em “Coraline e o Mundo Secreto”

Não poderia iniciar os agradecimentos deste trabalho sem mencionar o amor e apoio de meus pais Alcicleide e Elcio, minha irmã Juliana, meus tios, tias, primos e primas. Vocês foram, sem dúvidas, a minha maior torcida e serei eternamente grata.

Agradeço especialmente à Professora Suzana Leitão, querida Tia Su, por ter me abraçado durante estes dois anos e confiado a mim um trabalho tão bonito e importante. Agradeço por todas as palavras de carinho e por todos os momentos em que compartilhou comigo coisas que só a sua vasta experiência proporcionaram. Obrigada, professora, por guiar meus passos até aqui com maestria, delicadeza e leveza.

À queridíssima Professora Rosineide Simas, a nossa Tia Rosy, que mudou nossas vidas por completo. Agradeço por ter a oportunidade de ser orientada por ti e agradeço muito mais por ter me ensinado tantas coisas valiosas. Se hoje sou uma pessoa melhor, é porque passaste em minha vida e nenhuma palavra jamais vai expressar o quanto aprendi contigo. Este trabalho não seria o mesmo sem a tua doce presença, sem teus olhares criteriosos e tuas contribuições sábias.

Agradeço ao Professor Luis Mauricio Lima pela parceria e principalmente pelo entusiasmo em assumir a co-orientação deste trabalho. Obrigada por ter me recebido na família do Laboratório de Biotecnologia Farmacêutica e por ensinar a todos nós outras técnicas e abordagens.

Ao querido Professor Rodrigo, que esteve presente quando comecei a me encantar pelo mundo dos Produtos Naturais e da Biotecnologia, que me deu asas desde a graduação, fornecendo uma base imprescindível para que eu chegasse ao mestrado e me mantivesse nele. Mesmo um tantinho longe, esteve presente em todos os momentos importantes desta jornada. Guardo seus ensinamentos em meu coração e não poderia deixar de citá-lo aqui.

Agradeço muito à professora Gilda Leitão, que me ajudou e acolheu nesse mundo da Cromatografia Contracorrente. Obrigada, professora, por todos os ensinamentos e também por ter cedido as dependências de seu laboratório em prol deste trabalho. Agradeço também às suas preciosas alunas: Carlinha e Simony, que são amigas e mentoras incríveis.

Agradeço muitíssimo às queridas amigas do Laboratório de Biotecnologia Farmacêutica - Pbiotech, Celimar e Isabela. Agradeço de forma especial à Celimar, que de forma tão dedicada me ajudou nos momentos cruciais de início de projeto, me

ensinando a pensar nos ensaios, a tratar os dados e planejar tudo com antecedência e calma.

Aos amigos do Laboratório de Fitoquímica e Farmacognosia – LabFitoFar, por todo o companheirismo e também, por terem me acolhido nesta família incrível. ansiosamente por começar novas etapas com todos vocês. Espero ter deixado com vocês só coisas boas, assim como vocês fizeram comigo. Existe um pedacinho de cada um aqui nesse trabalho. Um agradecimento especial à Rafa, aluna de iniciação científica que acompanhou uma boa parte do projeto.

Agradeço aos queridos técnicos da Central Analítica por toda a ajuda não só nas análises propriamente ditas, mas também no processo de preparo de amostras e processamento de dados. Mais do que isso, gostaria de agradecer aos olhares ternos, palavras amigas e companheirismo no dia-a-dia. Aline, Marcos e Jonatas: vocês são exemplos para mim.

Aos queridos amigos feitos no Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas – LaCEM, da Universidade Federal de Goiás, em especial os professores Boniek Gontijo e Andréa Rodrigues. Obrigada por terem me recebido tão bem em meio a rotina do laboratório, permitindo que uma parte deste trabalho pudesse ser realizada.

Ao Herbário Professor Jorge Pedro Carauta (HUNI), na UNIRIO, e Herbário da Universidade da Universidade Federal do Rio de Janeiro (RFA) por realizarem um trabalho belíssimo e por me auxiliarem no depósito do material utilizado nesta pesquisa.

Com amigos a gente vai muito mais longe por isso não poderia deixar de agradecer aos meus super amigos Isabele, Wallace, Virgínia, Danilo, Laura, Raíssa e Patrick pela força, pelas palavras amigas e por tantos anos de caminhada ao meu lado.

Agradeço a toda a equipe de docentes e servidores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos pela companhia e auxílio durante toda a minha formação.

Agradeço muitíssimo ao professor Carlos Henrique Reif de Paula, por ter nos retornados tão prontamente e por ter realizado a identificação das espécies.

Agradeço à banca examinadora por aceitar o convite de participar deste momento tão importante para mim e meus orientadores.

Por último e não menos importante, agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/CAPES e também à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro/FAPERJ, pelas bolsas concedidas e financiamento desta pesquisa.

RESUMO

As substâncias de origem vegetal possuem grande diversidade química, o que faz com que apresentem muitas atividades específicas nos sistemas biológicos. Neste contexto, estas substâncias oferecem uma grande fonte de agentes que podem ser combinados às terapias tradicionais de doenças que ainda afetam uma grande parte da população, como é o caso do Diabetes Mellitus. Dentre os fatores reconhecidos como causadores da diminuição do quantitativo de células β -pancreáticas em pacientes de diabetes, está a agregação amiloide de um importante hormônio também produzido por estas células: a amilina, que se caracteriza como uma proteína amiloidogênica cujos agregados podem causar diversos danos à viabilidade celular, contribuindo para a evolução do diabetes. Em 2017, uma extratoteca de extratos foi testada em sua totalidade como iniciativa à prospecção de substâncias derivadas da flora nativa brasileira como potenciais fontes de inibidores da agregação amiloide da amilina humana. Dentre os extratos ativos, os extratos em hexano e diclorometano das ervas-de-passarinho *Struthanthus concinnus* e *Struthanthus marginatus*, preparados em 2008, demonstram indícios de que atuam na inibição da agregação da amilina. Foi, então, objetivo deste trabalho investigar a atividade inibitória de agregação do hormônio amilina promovida por extratos, frações e substâncias isoladas das ervas-de-passarinho da região serrana do estado do Rio de Janeiro - *Struthanthus marginatus* (Desr.) Blume e *Struthanthus concinnus* (Mart.) Mart., relacionando a atividade observada ao o perfil químico dos extratos já ensaiados e extratos novos. Após da coleta de um novo material, em 2018, os extratos recém-preparados em hexano e diclorometano também demonstraram indícios de atividade anti-agregante. Assim, para avaliar o desempenho das amostras frente a agregação amiloide da amilina humana, ensaios de fluorescência utilizando a tioflavina T foram realizados com os extratos de 2008 e 2018, frações e substâncias isoladas dos extratos em hexano de 2008. Através de DI-APCI(\pm)-MS de e GC-MS, os extratos ativos (2008 e 2018) foram comparados quanto ao seu perfil químico afim de verificar suas semelhanças e diferenças, e correlacioná-las com os padrões de atividade observados. Este é o primeiro relato não só de plantas brasileiras na busca de potenciais inibidores da agregação amiloide da amilina humana, como também é o primeiro registro de extratos contendo substâncias de baixa polaridade investigado para este fim, visto que as investigações são focadas basicamente em polifenóis. A observação da atividade dos extratos em hexano e diclorometano das ervas-de-passarinho pode representar uma promissora fonte de agentes contra agregação amiloide da amilina humana, não dispensando, evidentemente, a necessidade de estudos posteriores que avaliam questões relacionadas a toxicidade dos extratos e substâncias tanto *in vivo* quanto *in vitro*, além da confirmação da natureza dos agregados, bem com sua toxicidade, por técnicas de microscopia. Tais abordagens continuam sendo investigadas pelo grupo em relação não só as ervas-de-passarinho como com as demais amostras presentes na biblioteca de extratos.

ABSTRACT

Plant substances have a broad chemical diversity, which causes them to have many specific activities in biological systems. In this context, these substances offer a great source of agents that can be combined with traditional therapies for diseases that still affect a large part of the population, such as diabetes mellitus. Among the factors recognized as causing the decrease in the mass of pancreatic β -cells in patients with diabetes, is the amyloid aggregation of an important hormone also produced by these cells: amylin, which is characterized as an amyloidogenic protein whose aggregates can cause various damages in cell viability, contributing to the evolution of diabetes. In 2017, a library of extracts was tested as an initiative to prospect substances derived from native Brazilian flora as potential sources of human amylin amyloid aggregation inhibitors. Among the most active samples, hexane and dichloromethane extracts of *Struthanthus concinnus* and *Struthanthus marginatus* mistletoes, prepared in 2008, demonstrated evidences that they would act in inhibiting the aggregation of amylin. Therefore, the objective of this work is to investigate the inhibitory activity of the aggregation, promoted by the extracts, fractions and substances isolated from the mistletoes of the state of Rio de Janeiro - *Struthanthus marginatus* (Desr.) Blume and *Struthanthus concinnus* (Mart.) Mart., relating the observed activity to the chemical profile of the extracts. After the collection of a new material, in 2018, freshly prepared extracts in hexane and dichloromethane also showed evidence of anti-aggregating activity. Thus, to evaluate the performance of the samples against the amyloid aggregation of human amylin, fluorescence immunoassays using thioflavin T were performed with the extracts of 2008 and 2018, fractions and substances isolated from the 2008 hexane extracts. Through DI-APCI (\pm)-MS of and GC-MS, the chemical profile of the active extracts (2008 and 2018) were compared in order to verify their similarities, and correlate them with the observed activity patterns. This is the first report not only of Brazilian plants in search of potential inhibitors of human amylin amyloid aggregation, but also the first record of extracts containing substances of low polarity investigated for this purpose, since the investigations are basically focused on polyphenols. The observation of the activity of the extracts in hexane and dichloromethane of the mistletoes can represent a promising source of agents against amyloid aggregation of human amylin, but further studies are still needed in order to evaluate issues related to the toxicity of the extracts and substances both *in vivo* and *in vitro*. It is also important to confirm the nature of the aggregates, as well as their toxicity, by microscopic techniques. Such approaches continue to be investigated by the group in relation not only to the birds' herbs but also to the other samples present in the extract library.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Distribuição biogeográfica da família Loranthaceae. Retirado de Tropicos – Missouri Botanical Garden (<http://www.tropicos.org>) 26
- Figura 2.** *Struthanthus concinnus*. Ypu, Nova Friburgo – RJ. Set. 2018. Fonte: Acervo pessoal 27
- Figura 3.** *Struthanthus marginatus*. Centro, Petrópolis – RJ. Out. 2018. Fonte: Acervo pessoal 28
- Figura 4.** Estruturas químicas das substâncias identificadas em *S. marginatus* e *S. concinnus* por Leitão *et al.*, 2013 (*continua*) 30
- Figura 4.** Estruturas químicas das substâncias identificadas em *S. marginatus* e *S. concinnus* por Leitão *et al.*, 2013 (*conclusão*) 31
- Figura 5.** Representação da amilina humana. Fonte: *Phoenix Biotech Website*. (<http://www.phoenixbiotech.net>). Acessado em 6 de março de 2019 33
- Figura 6.** Esquema de fases do processo de agregação da amilina *in vitro*. 1: Fase *lag*; 2: Fase de alongação; 3: Fase de saturação ou *plateau* 34
- Figura 7.** Estrutura química da tioflavina T. Retirado de Hawe *et al.*, 2008 35
- Figura 8.** Estruturas químicas de substâncias de origem natural já testadas quanto a sua ação inibitória na agregação amiloide da amilina humana 37
- Figura 9.** Exsiccatas de *S. concinnus* (a) e *S. marginatus* (b) depositadas no Herbário Professor Jorge Pedro Pereira Carauta, na Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO). Fonte: Acervo pessoal 43
- Figura 10.** Esquemas do fracionamento dos extratos etanólicos de *S. concinnus* (a) e *S. marginatus* (b) preparados em 2008. FSCH: Extrato em hexano de *S. concinnus* preparado em 2008. FSCD: Extrato em diclorometano de *S. concinnus* preparado em 2008. FSCA: Extrato em acetato de etila de *S. concinnus* preparado em 2008. FSCB: Extrato em butanol de *S. concinnus* preparado em 2008. FSMH: Extrato em hexano de *S. marginatus* preparado em 2008. FSMC: Extrato em diclorometano de *S. marginatus* preparado em 2008. FSMA: Extrato em acetato de etila de *S. marginatus* preparado em 2008. FSMB: Extrato em butanol de *S. marginatus* preparado em 2008 44

Figura 11. Separação manual do material vegetal coletado de <i>S. marginatus</i> e <i>S. concinnus</i> . Fonte: Acervo pessoal	45
Figura 12. Extração das partes aéreas de <i>S. concinnus</i> por percolação, com etanol comercial (96°GL). Fonte: Acervo pessoal	45
Figura 13. Partição líquido-líquido, em funil de separação, do extrato etanólico de <i>Struthanthus concinnus</i> . Fonte: Acervo pessoal	46
Figura 14. Esquemas e informações de rendimento do fracionamento dos extratos etanólicos de <i>S. concinnus</i> (a) e <i>S. marginatus</i> (b) preparados em 2018. SCH: Extrato em hexano de <i>S. concinnus</i> preparado em 2018. SCD: Extrato em diclorometano de <i>S. concinnus</i> preparado em 2018. SCA: Extrato em acetato de etila de <i>S. concinnus</i> preparado em 2018. SCB: Extrato em butanol de <i>S. concinnus</i> preparado em 2018. SMH: Extrato em hexano de <i>S. marginatus</i> preparado em 2018. SMD: Extrato em diclorometano de <i>S. marginatus</i> preparado em 2018. SMA: Extrato em acetato de etila de <i>S. marginatus</i> preparado em 2018. SMB: Extrato em butanol de <i>S. marginatus</i> preparado em 2018	47
Figura 15. Desempenho dos extratos em hexano (FSMH), diclorometano (FSMD), acetato de etila (FSMA) e FSMB), preparados em 2008, de <i>S. marginatus</i> , frente a agregação amiloide da amilina humana monitorada por tioflavina T	51
Figura 16. Desempenho dos extratos em hexano (FSCH), diclorometano (FSCD), acetato de etila (FSCA) e FSCB), preparados em 2008, de <i>S. concinnus</i> , frente a agregação amiloide da amilina humana monitorada por tioflavina T	51
Figura 17. Extratos em hexano e diclorometano de <i>S. marginatus</i> (a) e <i>S. concinnus</i> (b), preparados em 2008, frente a agregação amiloide da amilina humana. O efeito dos extratos foi monitorado pelos ensaios de fibrilação empregando tioflavina T. FSMH: Extrato em hexano de <i>Struthanthus marginatus</i> . FSCH: Extrato em hexano de <i>Struthanthus concinnus</i> . FSMD: Extrato em diclorometano de <i>Struthanthus marginatus</i> . FSCD: Extrato em diclorometano de <i>Struthanthus concinnus</i> . CT: controle (tampão fosfato pH 7,4)	52
Figura 18. Efeito de três diferentes concentrações (1 µM, 10 µM e 50 µM) de curcumina frente a agregação amiloide da amilina humana	53
Figura 19. Efeito dos extratos em hexano e diclorometano de <i>Struthanthus marginatus</i> e <i>Struthanthus concinnus</i> frente a agregação amiloide da amilina humana, monitorado	

por tioflavina T. A: Extrato em diclorometano de *S. marginatus*. B: Extrato em hexano de *S. concinnus*. C: Extrato em diclorometano de *S. concinnus*. D: Extrato em hexano de *S. marginatus*. CT: controle (tampão fosfato pH 7,4) 54

Figura 20. Efeito das frações em mistura e de substâncias isoladas por Leitão *et al.* (2013) nos extratos em hexano de *S. marginatus* (a) e *S. concinnus* (b), frente a agregação amiloide da amilina humana, monitorado pelo ensaio de fluorescência da tioflavina T. SM-13: fração 13 do extrato em hexano de *S. marginatus*. SM-9: fração 9 do extrato em hexano de *S. marginatus*. SM-7: fração 7 do extrato em hexano de *S. marginatus*. SC-17: fração 17 do extrato em hexano de *S. concinnus*. SC-15: fração 15 do extrato em hexano de *S. concinnus*. SC-18: fração 18 do extrato em hexano de *S. concinnus*. SC-16: fração 16 do extrato em hexano de *S. concinnus*. CT: controle (tampão fosfato pH 7,4) 58

Figura 21. Estrutura química do 3-O-n-acil-lup-20(29)-en-3 β ,7 β ,15 α -triol 58

Figura 22. Estrutura química do obtusifoliol 59

Figura 23. Estrutura química do γ -sitosterol 60

Figura 24. Estrutura química da 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona 60

Figura 25. Estrutura química azadiractina 62

Figura 26. Perfil químico dos extratos em hexano e diclorometano preparados em 2008 e 2018, das espécies *Struthanthus marginatus* e *S. concinnus* por Cromatografia em Camada Delgada (CCD). SMH: Extrato em hexano de *S. marginatus*, preparado em 2018. SMD: Extrato em diclorometano de *S. marginatus*, preparado em 2018. SCH: Extrato em hexano de *S. concinnus*, preparado em 2008. SCD: Extrato em diclorometano de *S. concinnus*, preparado em 2018. FSMH: Extrato em hexano de *S. marginatus*, preparado em 2008. FSMD: Extrato em diclorometano de *S. marginatus*, preparado em 2008. FSCH: Extrato em hexano de *S. concinnus*, preparado em 2008. FSCD: Extrato em diclorometano de *S. concinnus*, preparado em 2008. Eluição: Hexano:Acetato de Etila, na proporção 9,5:0,5 63

Figura 27. Espectro de íons totais dos extratos etanólicos de *S. marginatus* preparados em 2008 e em 2018, por infusão direta em APCI, nos modos de ionização positivo (a e b) e negativo (c e d) 65

Figura 28. Espectro de íons totais dos extratos etanólicos de <i>S. concinnus</i> preparados em 2008 e em 2018, por infusão direta em APCI, nos modos de ionização positivo (a e b) e negativo (c e d)	66
Figura 29. Espectro de íons totais dos extratos em hexano de <i>S. marginatus</i> preparados em 2008 e em 2018, por infusão direta em APCI, nos modos de ionização positivo (a e b) e negativo (c e d)	68
Figura 30. Espectro de íons totais dos extratos em diclorometano de <i>S. marginatus</i> preparados em 2008 e em 2018, por infusão direta em APCI, nos modos de ionização positivo (a e b) e negativo (c e d)	69
Figura 31. Espectro de íons totais dos extratos em hexano de <i>S. concinnus</i> preparados em 2008 e em 2018, por infusão direta em APCI, nos modos de ionização positivo (a e b) e negativo (c e d)	70
Figura 32. Espectro de íons totais dos extratos em diclorometano de <i>S. concinnus</i> preparados em 2008 e em 2018, por infusão direta em APCI, nos modos de ionização positivo (a e b) e negativo (c e d)	70
Figura 33. Comparação dos cromatogramas de íons totais em GC-MS dos extratos em hexano e diclorometano, de <i>Struthanthus concinnus</i> , preparados em 2008 e 2018. (a) Extratos em hexano de <i>S. marginatus</i> . (b) Extratos em diclorometano de <i>S. marginatus</i>	74
Figura 34. Comparação dos cromatogramas de íons totais em GC-MS dos extratos em hexano e diclorometano, de <i>Struthanthus marginatus</i> , preparados em 2008 e 2018. (a) Extratos em hexano de <i>S. concinnus</i> . (b) Extratos em diclorometano de <i>S. concinnus</i>	75
Figura 35. Substâncias identificadas com similaridade espectral superior ou igual a 90% no extrato em hexano de <i>Struthanthus marginatus</i> , preparado em 2018. Cromatograma de íons totais por GC-MS. (I) palmitato de etila, com score de (95%). (II) fitol, com score de 92%. (III) linolenato de etila, com score de 90%. (IV) tetratriacontano, com score de 94%. (V) β -amirona, com score de 91%	77
Figura 36. Substâncias identificadas com similaridade espectral superior ou igual a 90% no extrato em hexano de <i>Struthanthus marginatus</i> , preparado em 2008. Cromatograma de íons totais por GC-MS. (I) palmitato de etila, com score de (93%). (II) fitol, com score	

de 97%. (III) heneicosano, com score de 94%. (IV) β -amirona, com score de 90% 78

Figura 37. Substâncias identificadas com similaridade espectral superior ou igual a 90% no extrato em diclorometano de *Struthanthus marginatus*, preparado em 2018. Cromatograma de íons totais por GC-MS. (I) palmitato de etila, com score de 95%. (II) fitol, com score de 96%. (III) linolenato de etila, com score de 92%. (IV) tetratriacontano, com score de 94%. (V) β -amirona, com score de 91% 79

Figura 38. Substâncias identificadas com similaridade espectral superior ou igual a 90% no extrato em diclorometano de *Struthanthus marginatus*, preparado em 2008. Cromatograma de íons totais por GC-MS. (I) pentacosano, com score de 97% 79

Figura 39. Substâncias identificadas com score superior ou igual a 90% no extrato em hexano de *Struthanthus concinnus*, preparado em 2018. Cromatograma de íons totais por GC-MS. (I) fitol, com score de 92%. (II) esqualeno, com score de 92% 80

Figura 40. Substâncias identificadas com similaridade espectral superior ou igual a 90% no extrato em hexano de *Struthanthus concinnus*, preparado em 2008. Cromatograma de íons totais por GC-MS. (I) palmitato de etila, com score de 95%. (II) fitol, com score de 97%. (III) esqualeno, com score de 93%. (IV) β -amirona, com score de 91%. (V) cicloartenol, com score de 91%. (VI) 3 β -24-metilenocicloartan-3-ol, com score de 92% 80

Figura 41. Estruturas químicas das substâncias identificadas por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas no extrato em hexano, preparado em 2008 de *Struthanthus concinnus*. (I) palmitato de etila, com score de 95%. (II) fitol, com score de 97%. (III) esqualeno, com score de 93%. (IV) β -amirona, com score de 91%. (V) cicloartenol, com score de 91%. (VI) 3 β -24-metilenocicloartan-3-ol, com score de 92% 81

Figura 42. Cromatograma de íons totais por GC-MS do extrato em diclorometano de *Struthanthus concinnus* (2018) após derivatização com BSTFA. Substâncias identificadas na forma de ésteres de trimetil silil, com score superior a 90%. (I) Glicerol (94%). (II) ácido succínico (93%). (III) ácido málico (94%). (IV) glicose (96%). (V) ácido palmítico (93%). (VI) ácido alfa-linolênico (93%) 84

Figura 43. Estruturas químicas das substâncias identificadas por GC-MS, na forma de ésteres de trimetil silil, no extrato SCD de *Struthanthus concinnus*. (I) glicerol (94%). (II) ácido succínico (93%). (III) ácido málico (94%). (IV) Glicose (96%). (V) ácido palmítico (93%). (VI) ácido alfalinolênico (93%) **84**

Figura 44. Substâncias identificadas com similaridade espectral superior ou igual a 90% no extrato em diclorometano, de *Struthanthus concinnus*, preparado em 2008. Cromatograma de íons totais por GC-MS. (I) palmitato de etila, com score de 93%. (II) fitol, com score de 96%. (III) obtusifoliol, com score de 90%. (IV) β -amirona, com score de 90% **85**

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Exemplos de produtos naturais vegetais a partir dos quais foram desenvolvidos fármacos ou que são utilizados como fármacos (<i>continua</i>)	22
Quadro 1. Exemplos de produtos naturais vegetais a partir dos quais foram desenvolvidos fármacos ou que são utilizados como fármacos (<i>conclusão</i>)	23
Quadro 2. Substâncias, isoladas e em mistura, identificadas nos extratos de hexano de <i>S. marginatus</i> e <i>S. concinnus</i> por Leitão <i>et al.</i> , 2013	57
Quadro 3. Presença das substâncias anotadas por GC-MS nos extratos em hexano e diclorometano, preparados em 2008 e 2018, das ervas-de-passarinho <i>Struthanthus marginatus</i> e <i>Struthanthus concinnus</i>	76

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Números de tombo no Herbário Prof. Jorge Pedro Pereira Carauta (HUNI) e no Herbário da Universidade Federal do Rio de Janeiro (RFA) e dados de rendimento da partição líquido-líquido dos extratos de *S. marginatus* e *S. concinnus* 43
- Tabela 2.** Comparativo dos íons encontrados por APCI(-) nos diferentes extratos etanólicos de *S. marginatus* e *S. concinnus* entre os anos de 2008 e 2018 67
- Tabela 3.** Comparativo dos íons encontrados por APCI(+) nos diferentes extratos etanólicos de *S. marginatus* e *S. concinnus* entre os anos de 2008 e 2018 67
- Tabela 4.** Comparativo dos íons encontrados por APCI(-) nos extratos em hexano e diclorometano de *S. marginatus* e *S. concinnus* entre os anos de 2008 e 2018 71
- Tabela 5.** Comparativo dos íons encontrados por APCI(+) nos diferentes extratos etanólicos, em hexano e em diclorometano de *S. marginatus* e *S. concinnus* entre os anos de 2008 e 2018 72
- Tabela 6.** Proposições de identificação das substâncias presentes no extrato em diclorometano derivatizado (BSTFA) de *Struthanthus concinnus*. TR = tempo de retenção em minutos. As fórmulas apresentadas foram sugeridas com base na comparação com a base de dados NIST 5, já considerando a adição de radicais pela derivatização (*continua*) 82
- Tabela 6.** Proposições de identificação das substâncias presentes no extrato em diclorometano derivatizado (BSTFA) de *Struthanthus concinnus*. TR = tempo de retenção em minutos. As fórmulas apresentadas foram sugeridas com base na comparação com a base de dados NIST 5, já considerando a adição de radicais pela derivatização (*conclusão*) 83

LISTA DE ABREVIATURAS

A.U.	<i>arbitrary units</i>
AcOEt	Acetato de etila
APCI	<i>Atmospheric pressure chemical ionization</i>
BuOH	Butanol
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
d.i.	Diâmetro interno
DCM	Diclorometano
DI-APCI(±)-MS	Injeção direta em espectrômetro de massas, com fonte de ionização APCI, no modo positivo e negativo
DMT1	Diabetes mellitus tipo 1
DMT2	Diabetes mellitus tipo 2
EGCG	galato de epigallocatequina (<i>epigallocatechin gallate</i>)
EI	<i>Electron ionization</i>
ESI	<i>Electrospray ionization</i>
FSC	Extrato etanólico de <i>S. concinnus</i> , preparado em 2008
FSCD	Extrato em diclorometano de <i>Struthanthus concinnus</i> 2008
FSCH	Extrato em hexano de <i>Struthanthus concinnus</i> 2008
FSM	Extrato etanólico de <i>S. concinnus</i> , preparado em 2008
FSMD	Extrato em diclorometano de <i>Struthanthus marginatus</i> 2008
FSMH	Extrato em hexano de <i>Struthanthus marginatus</i> 2008
GC	<i>Gas Chromatography</i>
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
HEX	Hexano
hiAPP	<i>Human islet amyloid polypeptide</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HRMS	<i>High-Resolution Mass Spectrometry</i>
LC	<i>Liquid Chromatography</i>
m/z	Razão massa sobre carga
MeOH	Metanol
MS	<i>Mass Spectrometry</i>
°GL	Grau Gay Lussac
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SC	Extrato etanólico de <i>S. marginatus</i> , preparado em 2018
SCD	Extrato em diclorometano de <i>Struthanthus concinnus</i> 2018
SCH	Extrato em hexano de <i>Struthanthus concinnus</i> 2018

SM	Extrato etanólico de <i>S. marginatus</i> , preparado em 2018
SMD	Extrato em diclorometano de <i>Struthanthus marginatus</i> 2018
SMH	Extrato em hexano de <i>Struthanthus marginatus</i> 2018
TR	Tempo de retenção

SUMÁRIO

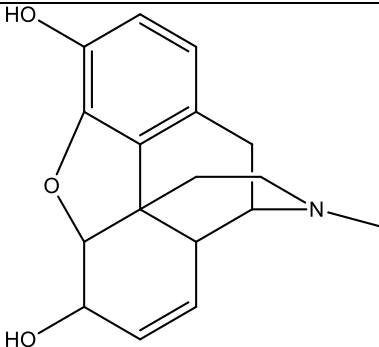
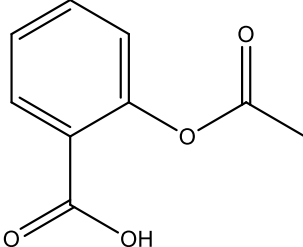
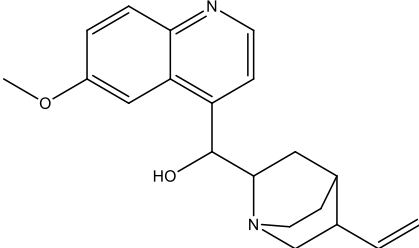
1. INTRODUÇÃO	22
1.1. Loranthaceae Juss.	25
1.2. <i>Struthanthus</i> Mart.	26
1.3. Diabetes Mellitus e a amilina humana	31
1.4. Produtos naturais como potenciais inibidores da agregação amiloide da amilina	36
1.5. Ferramentas aplicadas à pesquisa em plantas medicinais	38
1.6. Justificativa	41
2. OBJETIVOS	41
2.1. Objetivo geral	41
2.2. Objetivos específicos	42
3. MATERIAIS E MÉTODOS	42
3.1. Coleta de material vegetal	42
3.1.1. Aquisição do material vegetal em 2008	42
3.1.2. Coleta do novo material vegetal em 2018	42
3.2. Preparo dos extratos	44
3.2.1. Extratos de <i>S. marginatus</i> e <i>S. concinnus</i> preparados em 2008	44
3.2.2. Extratos de <i>S. marginatus</i> e <i>S. concinnus</i> preparados em 2018	45
3.3. Ensaio de fibrilação do hormônio amilina frente aos extratos de <i>S. marginatus</i> e <i>S. concinnus</i> preparados em 2008 e 2018	47
3.3.1. Preparo das amostras	47
3.3.2. Condições e parâmetros dos ensaios	48
3.4. Análise dos extratos etanólicos, em hexano e em diclorometano por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) de <i>S. marginatus</i> e <i>S. concinnus</i> de 2008 e 2018	48
3.5. Análise dos extratos etanólicos e partições em hexano e diclorometano por DI-APCI(±)-MS	49
3.5.1. Preparo de amostra	49
3.5.2. Parâmetros	49
3.6. Análise dos extratos preparados em 2008 e 2018 por GC-MS	49
3.6.1. Preparo de amostra	49
3.6.2. Parâmetros	50

3.7.	Processamento e análises dos espectros de massas e gráficos de cinética de agregação	50
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4.1.	Ensaio de fibrilação da amilina humana	50
4.1.1.	Extratos de <i>S. concinnus</i> e <i>S. marginatus</i> preparados em 2008	50
4.1.2.	Extratos de <i>S. concinnus</i> e <i>S. marginatus</i> de preparados em 2018	52
4.1.3.	Substâncias isoladas dos extratos em hexano de <i>S. marginatus</i> e <i>S. concinnus</i> preparados em 2008	57
4.2.	Comparação dos extratos etanólicos, em hexano e em diclorometano de <i>S. marginatus</i> e <i>S. concinnus</i> preparados em 2008 e 2018	62
4.3.	Comparação do perfil químico dos extratos etanólicos, em hexano e em diclorometano preparados em 2008 e 2018 por DI-APCI(±)-MS	64
4.4.	Perfil Químico dos extratos em hexano e diclorometano de <i>S. marginatus</i> e <i>S. concinnus</i> preparados em 2008 e 2018 por GC-MS	73
5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	85
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86

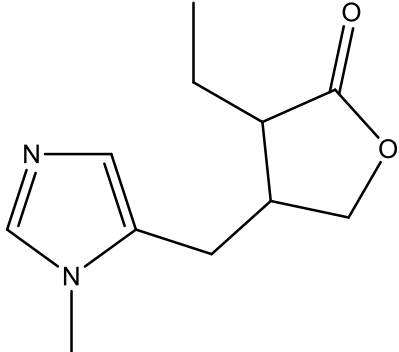
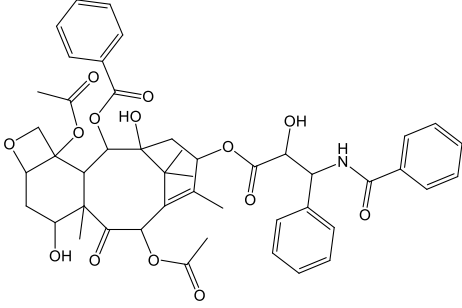
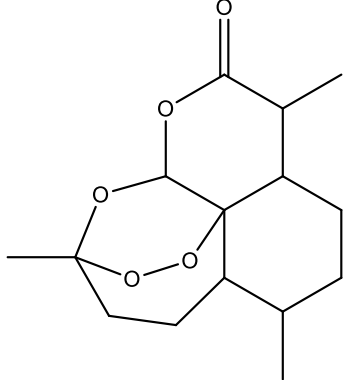
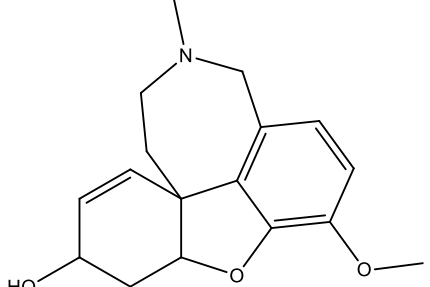
1. INTRODUÇÃO

As plantas são consideradas o recurso terapêutico mais antigo existente entre culturas ao redor do mundo, e foram utilizadas de diferentes maneiras ao longo da história da humanidade (Maciel *et al.*, 2002; Simões & Schenkel, 2002). Mesmo atualmente, os produtos naturais vegetais representam não só uma importante fonte de substâncias ativas, mas também atuam como fonte de inspiração ou produtos de partida para fármacos, o que significa um impacto positivo na medicina moderna (Simões & Schenkel, 2002; McKee *et al.*, 2014) (**Quadro 1**).

Quadro 1. Exemplos de produtos naturais vegetais a partir dos quais foram desenvolvidos fármacos ou que são utilizados como fármacos. (*continua*)

Fármaco	Estrutura química	Origem botânica	Uso (s)
morfina		<i>Papaver somniferum</i> L.	Analgésico em dores severas
ácido acetilsalicílico		Derivado da salicilina, de <i>Salix alba</i> L.	Anti-inflamatório
quinina		<i>Cinchona succirubra</i> Pav. ex Klotsch	Tratamento de malária

Quadro 1. Exemplos de produtos naturais vegetais a partir dos quais foram desenvolvidos fármacos ou que são utilizados como fármacos. (conclusão)

pilocarpina		<i>Pilocarpus microphyllus</i> Stapf ex Holm.	Glaucoma crônico
taxol		<i>Taxus brevifolia</i> Nutt.	Câncer de mama
artemisinina		<i>Artemisia annua</i> L.	Tratamento de malária
galantamina		<i>Galanthus nivalis</i> L.	Tratamento de Alzheimer

Fonte: Dias *et al.*, 2012.

Nos anos de 1981 a 2008, pelo menos 62% dos medicamentos usados no tratamento de câncer, por exemplo, eram projetados a partir de produtos naturais ou então derivados deles (Cragg *et al.*, 2009). Estendendo-se até o ano de 2014, dos protótipos que chegaram ao mercado, os números se mantêm: 60% eram derivados, mimetizavam ou foram inspirados por produtos naturais (Newman & Cragg, 2016). Newman e Cragg

(2020) recentemente expandiram o conhecimento sobre este assunto. Para agentes quimioterápicos, por exemplo, de 1981 até 2019, a representatividade dos produtos naturais dentre as é de 33,5%. Este número aumenta quando são considerados os produtos que mimetizam produtos naturais, elevando a proporção para mais de 60%.

Apesar de os números parecerem bastante satisfatórios, algumas doenças ainda afetam um grande número de pessoas e as buscas por terapias alternativas estão sempre em foco. Os produtos naturais apresentam grande diversidade química, o que faz com que apresentem muitas atividades específicas nos sistemas biológicos (Nishimura & Matsumori, 2020) e, neste contexto, estas substâncias oferecem uma grande fonte de agentes que podem ser combinados às terapias tradicionais.

A pesquisa em novos agentes terapêuticos no reino vegetal é multidisciplinar e engloba áreas como a fitoquímica, responsável pelo isolamento, a purificação e caracterização dos princípios ativos; a etnobotânica e a etnofarmacologia, que possuem como base o conhecimento tradicional; e também a farmacologia, área responsável pela avaliação dos efeitos farmacológicos produzidos pelas preparações vegetais ou mesmo pelas substâncias químicas isoladas (Maciel *et al.*, 2002; Mendonça-Filho & Menezes, 2003; Vendruscolo *et al.*, 2005; Albuquerque e Hanazaki, 2006). Num cenário de incremento das pesquisas e do avanço tecnológico, a bioprospecção representa uma ferramenta central, envolvendo a aplicação de tecnologias avançadas para o desenvolvimento de produtos que permeiam desde medicamentos às fragrâncias, tendo como matéria-prima a biodiversidade (Artuso, 2002; Ramesha *et al.*, 2011).

Basicamente, três caminhos são reconhecidos para a pesquisa em produtos naturais: as abordagens quimiotaxonômica, etnodirigida e randômica. A abordagem quimiotaxonômica, consiste na seleção, coleta e investigação de espécies para as quais existam conhecimentos fitoquímicos, ou mesmo farmacológicos, de espécies ou grupos que possuam alguma relação filogenética, partindo-se do princípio que quanto maior o grau desta relação, mais semelhante será a composição química ou ainda o efeito farmacológico observado. Já na abordagem etnofarmacológica, as espécies são selecionadas de acordo com informações advindas do conhecimento de diferentes povos e etnias, através de indicações acerca de determinada enfermidade ou sintoma (Albuquerque e Hanazaki, 2006). Estas duas abordagens geraram descobertas importantes e sempre foram muito utilizadas na pesquisa em produtos naturais, sendo a abordagem etnofarmacológica considerada o cerne dos medicamentos antes do estabelecimento dos sintéticos (Harvey, 2002).

Surgindo como uma alternativa moderna, a abordagem randômica considera a diversidade química as espécies vegetais como potencial alvo de investigações, e consiste na sua coleta e investigação ao acaso, o que não significa ausência completa de critério (Harvey, 2002; Albuquerque e Hanazaki, 2006). Uma técnica que se tornou comum nestes estudos é o *high throughput screening* (HTS). É considerada uma técnica de otimização da pesquisa, na qual grandes bibliotecas de substâncias, ou amostras mais complexas, são testadas como potencialmente inibidoras de determinado efeito biológico (Mishra *et al.*, 2008). Estas triagens baseadas na abordagem randômica foram muito úteis na busca de quimioterápicos de origem natural, por exemplo (Cragg & Pezzuto, 2016).

O Brasil é o país com a maior biodiversidade do mundo, com aproximadamente 20% das espécies viventes do planeta. Tratando-se das espécies vegetais, cerca de 20-24% da diversidade mundial de angiospermas ocorre em território brasileiro, sendo muitas delas endêmicas (MMA, 2020). Em razão da heterogeneidade de habitats e grande extensão territorial, a flora brasileira conta com uma grande diversidade de metabólitos secundários produzidos, o que representa uma importante fonte na pesquisa de agentes terapêuticos de origem natural (Valli *et al.*, 2018).

1.1. Loranthaceae Juss.

Globalmente, a família Loranthaceae é composta por mais de 1000 espécies, distribuídas em 76 gêneros (Liu *et al.*, 2018), com distribuição principalmente nas regiões tropicais (**Figura 1**), com poucas espécies com ocorrência documentada nas regiões temperadas da América do Sul, Ásia, Austrália, Europa e Nova Zelândia (Vidal-Russell & Nickrent, 2008). Os representantes desta família são exclusivamente epífitos hemiparasitas generalistas, que possuem capacidade fotossintética e dependem exclusivamente de agentes bióticos para realizar a sua polinização (Guimarães, 2006; Vidal-Russell & Nickrent, 2008).

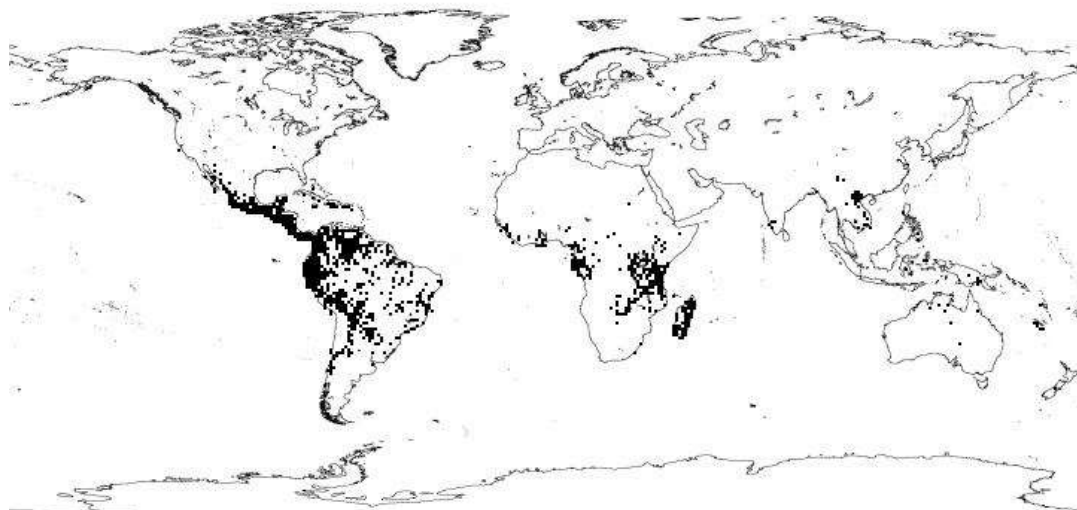


Figura 1. Distribuição biogeográfica da família Loranthaceae. Retirado de Tropicos – Missouri Botanical Garden (<http://www.tropicos.org>). Data de acesso: 15 de junho de 2020.

No Brasil, a família possui ocorrência confirmada em todas as regiões do país e é encontrada na Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal. A maior diversidade, no entanto, é encontrada na Amazônia e no Cerrado (Arruda *et al.*, 2012; JBRJ, 2018). No país, é registrada a ocorrência de 12 gêneros, com 129 espécies no total, sendo 68 endêmicas (Dettke & Caires, 2015). Os representantes desta família são popularmente conhecidos principalmente como “erva-de-passarinho”, devido ao seu modo de dispersão que depende do depósito das sementes nos hospedeiros mediado pelos pássaros (Lorenzi, 2000; Arruda *et al.*, 2006; JBRJ, 2018). São plantas perenes, que parasitam árvores e arbustos dentre uma grande gama de espécies hospedeiras. Outras espécies podem ser incluídas nesta denominação e no Estado do Rio de Janeiro, estas espécies estão classificadas, além de Loranthaceae, na família Santalaceae.

Quanto à composição química das espécies, há o registro de terpenos, glicosídeos, lignanas, flavonóides, proantocianidinas, carboidratos, ácidos graxos, aminoácidos, fenilpropanóides, taninos e alcalóides (Guimarães, 2006; Leitão, 2009; Leitão, 2013, Leitão *et al.*, 2013). Tradicionalmente, os integrantes desta família são indicados em casos de distúrbios respiratórios, artrites, distúrbios inflamatórios, condiloma, hemorroidas, câncer e diabetes (Guimarães, 2006).

1.2. *Struthanthus* Mart.

Struthanthus Mart. conta com cerca de 60 a 70 espécies globalmente e 53 no Brasil, sendo, destas últimas, 24 endêmicas (Reif & Andreato, 2011; JBRJ, 2020). Comparativamente, é um dos gêneros que apresenta maior diversidade no Brasil do

que no restante da América do Sul (Arruda *et al.*, 2012), tendo ocorrência confirmadas nos seguintes biomas brasileiros: Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica e Pampa (JBRJ, 2020).

Struthanthus concinnus (Mart.) Mart. (**Figura 2**) é uma espécie endêmica brasileira (JBRJ, 2018), fato este que talvez possa explicar a pequena quantidade de estudos encontrados, sendo quase todos relacionados à taxonomia e ecologia da espécie. De ocorrência bastante comum na região serrana do Estado do Rio de Janeiro (Reif & Andreatta, 2006), *S. concinnus* é a espécie de erva-de-passarinho mais dispersa no país, ocorrendo nos Estados de Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Minas Gerais, Goiás, Pará e Amazonas (Lorenzi, 2000; Leitão, 2009).



Figura 2. *Struthanthus concinnus*. Ypu, Nova Friburgo – RJ. Set. 2018. Fonte: Acervo pessoal.

Struthanthus marginatus (Desr.) Blume (**Figura 3**) ocorre no Peru, Panamá, Costa Rica e no Brasil, onde está distribuída nos Estados do Rio de Janeiro, Minas Gerais, Pernambuco, Paraíba e Bahia (Reif de Paula, 2004; Reif e Andreatta, 2006). Ao contrário de *S. concinnus*, a literatura acerca de *S. marginatus* é mais rica, embora, ainda assim, com poucos estudos de natureza química. Para esta espécie há registro da atividade citotóxica, antiulcerogênica, antimicrobiana, antioxidante e anti-inflamatória (Vieira *et al.*, 2005; Martins *et al.*, 2006; Pissinate, 2006; Freire *et al.*, 2011; Vittorazzi *et al.*, 2015; Gramma *et al.*, 2016; Freire *et al.*, 2018). A espécie foi incluída na primeira edição da Farmacopeia Brasileira, na qual o extrato das folhas era indicado como

descongestionante, na tosse, no tratamento de bronquite e pneumonia, denominada como “erva-de-passarinho miúda”. Curiosamente, a atividade inibitória frente a cepas de *Mycobacterium tuberculosis* (ATCC 35338) de extratos, frações e substâncias isoladas desta espécie foram reportadas por Leitão *et al.* (2013).



Figura 3. *Struthanthus marginatus*. Centro, Petrópolis – RJ. Out. 2018. Fonte: Acervo pessoal.

Considerando a literatura acerca das ervas-de-passarinho, de maneira geral, se observam mais estudos em relação à sua ecologia e anatomia, em razão do hábito de vida destas espécies. Poucos são os estudos que discorrem sobre a composição química das espécies. Considerando a distribuição cosmopolita da família Loranthaceae, acredita-se a pequena quantidade de estudos acerca de *S. concinnus* seja devido ao fato de ser uma espécie endêmica brasileira (JBRJ, 2020).

Um dos problemas enfrentados em relação à pesquisa em plantas medicinais é a classificação taxonômica das espécies, que lida com a constante atualização da nomenclatura e também com a sua posição filogenética (Leal *et al.*, 2016). Para *S. marginatus*, por exemplo, não são encontrados muitos registros sobre o seu potencial químico ou farmacológico. No entanto, ao realizar a pesquisa com o nome da sinonímia, *Struthanthus vulgaris*, como palavra-chave, encontra-se quase toda a literatura disponível referente às atividades biológicas da espécie.

Quanto à composição química do gênero há registro na literatura de reações cromogênicas positivas para alcaloides, saponinas, taninos, catequinas, esteroides, triterpenoides, açúcares, flavonoides e carotenoides, um método já muito utilizado e considerado agora ultrapassado (Salatino, 1993; Pissinate, 2006; Coe *et al.*, 2010; Freire *et al.*, 2011). No entanto, ao longo dos últimos anos, o cenário de poucos estudos acerca da composição química de *Struthanthus* mudou, considerando tanto as espécies brasileiras como as demais.

Dentre as substâncias isoladas e/ou identificadas em espécies de *Struthanthus* estão a rutina em *S. subtilis* (Cordero *et al.*, 2003), fitol (1), lupeol (2), obtusifoliol (3), taraxerol (4), 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona (5), taraxasterol (6), 24-metilenocicloartanol (7), α -amirenona (8), β -amirina (9), estigmasterol (10), 3-O-n-acil-lup-20(29)-en-3 β ,7 β ,15 α -triol (11), γ -sitosterol (12), 3-O-[6'-O-n-acil- β -glucosil]-sitosterol e sitosterol em *S. marginatus* e *S. concinnus* (Leitão *et al.*, 2013) (**Figura 4**); ácido clorogênico, ácido rosmarínico e quercetina em *S. vulgaris* (Marques *et al.*, 2017); ácido glicólico, ácido succínico, ácido glicérico, ácido málico, eritriol, ácido benzoico, ácido treônico, ácido chiquímico, frutose, ácido quínico, ácido benzoico, ácido hexadecanoico, ácido octadecanoico, sacarose, quercetina, ácido *p*-cumaroilquínico, ácido cafeoilquínico e seus isômeros em *S. marginatus* (Freire *et al.*, 2011); palmitato de metila, *n*-heneicosano, *n*-nonacosano, clionasterol, lupeol, β - e α -amirina, 9,19-ciclolanostan-24-en-3-ol, β -friedelanol, 24-metileno-9,19-ciclolanostan-3-ol, acetato de α -amirina, acetato de lupeol, *n*-tetracontano para *S. syringifolius* (Cunha *et al.*, 2012); α -amirina, lupenona, nonacosano, β -amirina e lupenol em *S. marginatus* (Siqueira *et al.*, 2016).

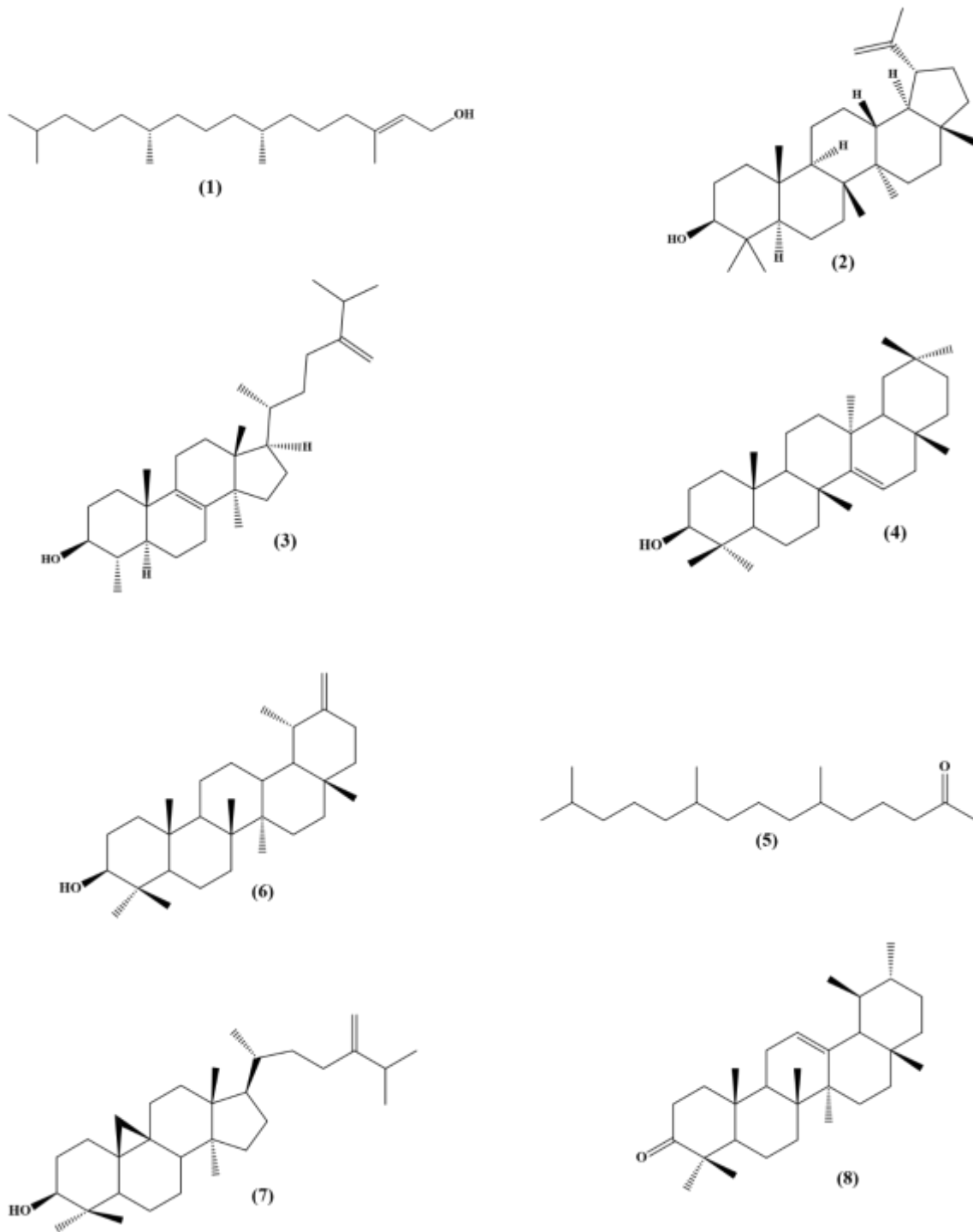


Figura 4. Estruturas químicas das substâncias identificadas em *S. marginatus* e *S. concinnus* por Leitão *et al.*, 2013. (*continua*)

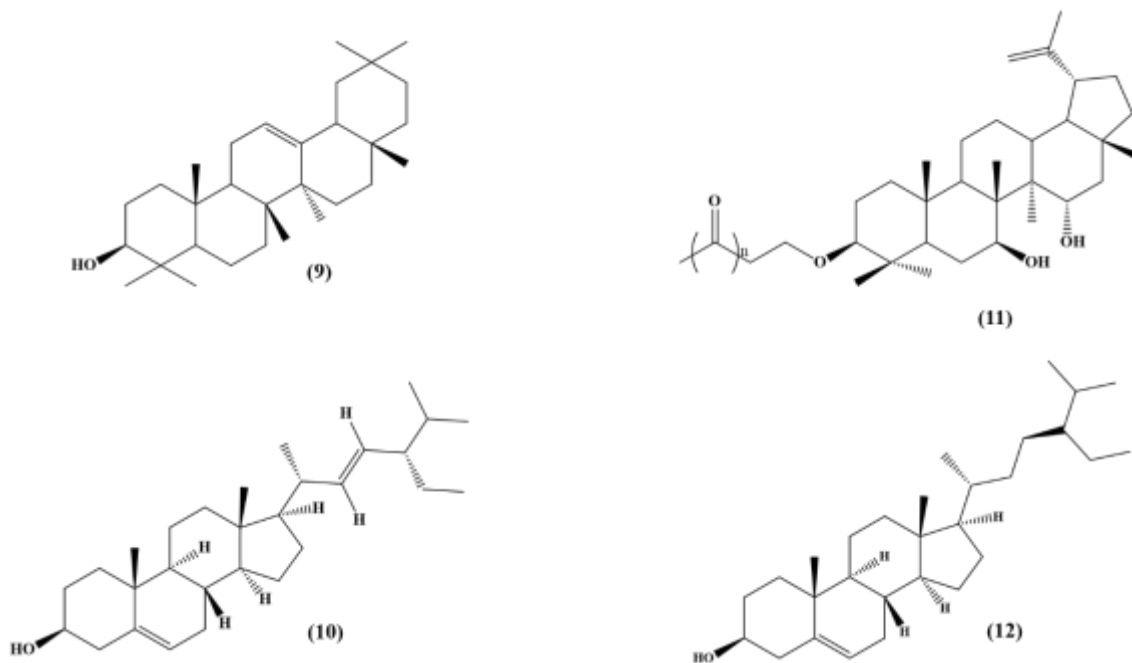


Figura 4. Estruturas químicas das substâncias identificadas em *S. marginatus* e *S. concinnus* por Leitão *et al.*, 2013. (conclusão)

Registros na literatura descrevem algumas atividades biológicas, como a citotóxica e antibacteriana, para espécies do gênero *Struthanthus* (Cordero *et al.*, 2003; Matsubara *et al.*, 2003; Vieira *et al.*, 2005; Coe *et al.*, 2010; Leitão *et al.*, 2013), bem como as atividades anti-inflamatória, gastroproterora e tóxica para larvas adultas de *Schistosoma mansoni* (Cunha *et al.*, 2012; Gramma *et al.*, 2016; Marques *et al.*, 2017; Freire *et al.*, 2018). Tradicionalmente, espécies deste gênero são indicadas para uso em ulcerações, para assepsia de feridas, dores e também em casos de picada de cobra (Mors *et al.*, 2000; Otero *et al.*, 2000; Guimarães, 2006).

Uma problemática no campo da arborização urbana envolve as ervas-de-passarinho. Plantas parasitas são consideradas um dos principais fatores bióticos que alteram a qualidade das espécies cultivadas para arborização urbana (Leal *et al.*, 2006). Programas da prefeitura de cidades como Petrópolis fazem a remoção destas espécies nas principais ruas do centro turístico da cidade. Desta forma, estudos que avaliem a natureza das substâncias produzidas por estas espécies, com sua possível aplicação farmacológica, são imprescindíveis para justificar a utilização destas espécies em detrimento de sua retirada e descarte.

1.3. Diabetes Mellitus e a amilina humana

O diabetes mellitus é uma enfermidade complexa e multifatorial que afeta mais de 400 milhões de pessoas no mundo (Nowotny *et al.*, 2015; OMS, 2016). Caracterizada

pelo aumento da concentração sanguínea de glicose, adultos e crianças podem ser afetados. Os dois tipos mais comuns de diabetes mellitus são o tipo 1 (DMT1), conhecida anteriormente por diabetes dependente de insulina, e o diabetes mellitus tipo 2 (DMT2), que afeta a maioria dos pacientes (OMS, 2016).

O tratamento para diabetes envolve não só uso de medicamentos orais para controle glicêmico como também a reeducação alimentar e a prática de exercícios, além do acompanhamento psicológico (*American Diabetes Association, 2018*). O medicamento oral de primeira escolha utilizado no tratamento do DMT2 é a metformina, uma biguanida derivada da guanidina, substância natural isolada de *Galega officinalis* L. (Fabaceae) (Bailey, 1988; Rena *et al.*, 2017). A guanidina, na ocasião de sua descoberta, despertou a atenção para pesquisas em relação às suas propriedades anti-hiperglicêmicas, porém era uma substância de elevada toxicidade e que impossibilitou seu uso clínico. Embora todo o mecanismo de ação deste medicamento não esteja completamente esclarecido, a metformina atua principalmente no fígado, através de um mecanismo múltiplo que inibe a gliconeogênese (Rena *et al.*, 2017).

No organismo humano, a manutenção da concentração da glicose sanguínea realizada pela insulina depende de fatores tais como disponibilidade de nutrientes, estímulos hormonais e neuronais estejam coordenados e em equilíbrio (Schrimpe-Rutledge *et al.*, 2012; Cerf, 2013). Para o DMT2, basicamente dois fatores, que possuem suas bases fisiológicas em diferentes mecanismos, são identificados como razões do quadro hiperglicêmico. O primeiro relaciona-se à diminuição da efetividade do hormônio insulina, também denominada resistência à insulina, que leva a uma maior necessidade de produção deste hormônio. O segundo fator diz respeito a degeneração e conseqüente perda ou redução das células β -pancreáticas, responsáveis diretamente pela produção do hormônio insulina (Kahn, 2003; Kahn, 2009; Westermarck *et al.*, 2011; Nowotny *et al.*, 2015). Em pessoas acometidas pelo DMT2 a exposição prolongada a níveis altos de glicose pode resultar na redução ou perda das células β -pancreáticas pelo aumento da apoptose celular, e/ou pela sua replicação reduzida, em razão de estresse oxidativo e processos inflamatórios (Karaca *et al.*, 2009; Gilbert & Liu, 2012, Cerf, 2013). Outro processo envolvido na degeneração beta-pancreática está na elevação da produção de insulina e amilina devido a demanda hormonal para manutenção dos níveis glicêmicos, resultando na aglomeração de espécies tóxicas de amilina e levando ao processo de apoptose das células β -pancreáticas (Montane *et al.*, 2012).

A amilina humana (**Figura 5**) é um hormônio peptídico de 37 aminoácidos, co-produzido e co-secretado pelas células β -pancreáticas com a insulina. Também denominada como *human islet amyloid polypeptide* (hIAPP), a amilina (assim como insulina) é secretada em resposta a estímulos glicêmicos, tanto pós-prandial quanto na manutenção de níveis de jejum desses dois hormônios. Possui um papel determinístico no metabolismo de carboidratos, atuando na captação de glicose mediada pela insulina e também no esvaziamento gástrico, além de atuar na própria modulação da secreção de insulina e na secreção de glucagon (Rushing *et al.*, 2000; Westermarck *et al.*, 2011; Pithadia *et al.*, 2016).

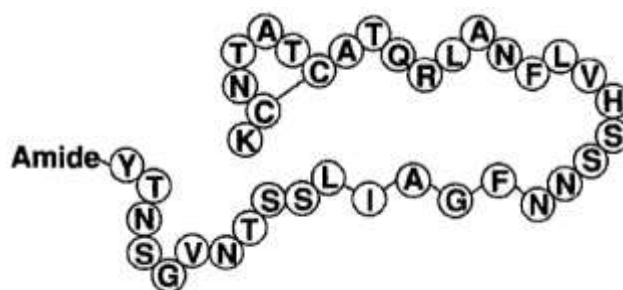


Figura 5. Representação da amilina humana. Fonte: *Phoenix Biotech Website*. (<http://www.phoenixbiotech.net>). Acessado em 06 de março de 2019.

As primeiras evidências conhecidas de formas tóxicas em pâncreas são do início do século XX por Opie (1901), que comparou o pâncreas de indivíduos diabéticos e não diabéticos, revelando que, entre os indivíduos diabéticos, alguns possuíam grandes massa de material hialino, tipo amiloide (similar a amilo, amido). Mais tarde, na década de 80, esse material amiloide foi isolado de pâncreas de gatos e humanos diabéticos e identificados como agregados peptídicos, tendo sido denominado de amilina por Westermarck *et al.* (1987) e *islet amyloid polypeptide* (IAPP) por Cooper *et al.* (1988). Além de suas funções regulares anteriormente citadas, a amilina tem despertado a atenção para pesquisas por seu envolvimento na evolução do Diabetes Mellitus do tipo 2 (Rushing *et al.*, 2000; Westermarck *et al.*, 2011; Pithadia *et al.*, 2016). Estudos relatam a toxicidade dos agregados de amilina humana em células produtoras de insulina nos adultos de ratos e humanos (Lorenzo *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 2016) que, em resposta à agregação amiloide, podem sofrer apoptose, necrose e danos na membrana plasmática, reduzindo a quantidade de células viáveis capazes de produzir insulina e agravando, assim, evolução do diabetes mellitus (Zhang *et al.*, 2016).

O mecanismo completo pelo qual os agregados de amilina são tóxicos às células β -pancreáticas ainda não foi completamente elucidado. O material fibrilar maduro é considerado inerte e não parece possuir um papel na toxicidade dos agregados (Zhang

et al., 2016). Sugere-se que os oligômeros, no entanto, sejam responsáveis por interferir na integridade física da membrana celular, formando poros ou a rompendo (Brender *et al.*, 2012, Kao *et al.*, 2015). Uma vez determinada esta relação entre a citotoxicidade e os oligômeros de amilina, a inibição destes últimos se tornam um alvo potencial para impedir o progresso da doença (Daval *et al.*, 2010).

Em relação à estrutura, a amilina pode ser encontrada em 3 conformações: monômeros, oligômeros e fibras. Os monômeros referem-se aos peptídeos funcionais, que podem sofrer enovelamento em estruturas α -hélice e então se agregarem em oligômeros. Os oligômeros, que são intermediários ainda solúveis, acumulam-se em fibras insolúveis, de conformação em folha- β , gerando os depósitos amiloides nas células (Zhang *et al.*, 2016). A agregação amiloide da amilina envolve basicamente três fases (**Figura 6**), *in vitro*: a fase *lag*, na qual é possível observar o hormônio livre na forma de monômeros e alguns poucos oligômeros; a fase de alongação, que consiste na formação e alongamento das fibras a partir dos monômeros e oligômeros; e finalmente a fase de saturação ou *plateau*, onde as fibras amiloides já estão inteiramente formadas e em equilíbrio (Abedini *et al.*, 2015; Kiriyaama & Nochi, 2018).

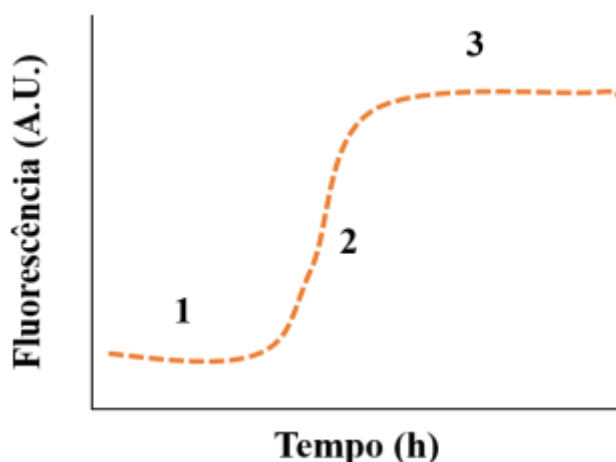


Figura 6. Esquema de fases do processo de agregação da amilina *in vitro*. 1: Fase *lag*; 2: Fase de alongação; 3: Fase de saturação ou *plateau*.

Entender como ocorre o processo de agregação amiloide é primordial não só para avaliar o desenvolvimento das amiloidoses, como também identificar, para fins terapêuticos, alvos para impedir a sua formação (Yakupova *et al.*, 2019). Para o estudo *in vitro* dos agregados de proteínas amiloides, incluindo a amilina, tanto com propósitos quantitativos quanto qualitativos, prevalecem os métodos colorimétricos, como o vermelho de congo e a tioflavina T.

A tioflavina T (ThT, do inglês *thioflavin T*) (**Figura 7**), um corante benzotiazol catiônico, é muito utilizada para monitoramento da formação de fibras amiloides em proteínas, incluindo a sua quantificação devido ao seu alto tropismo por elas (Khurana *et al.*, 2005; Xue *et al.*, 2017). Estruturalmente, esta substância possui uma porção terminal hidrofóbica, formada por um grupamento dimetilamina junto a um grupo fenil (II), e uma porção de maior polaridade formada pelo anel benzotiazol (I) (Khurana *et al.*, 2005).

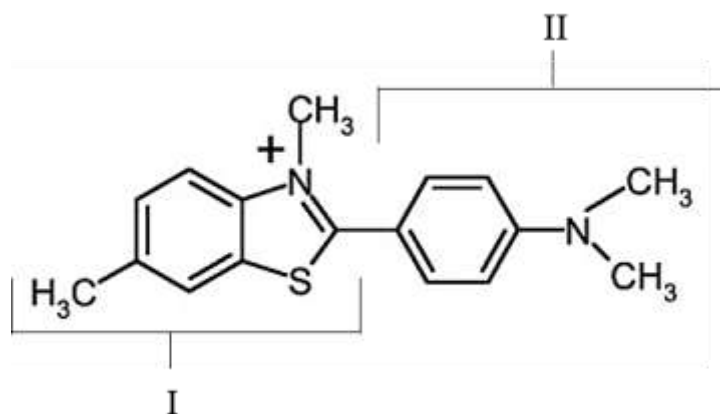


Figura 7. Estrutura química da tioflavina T. Retirado de Hawe *et al.*, 2008.

A tioflavina possui uma única ligação C-C central que permite que os anéis benzotiazol e anilina rotacionem livremente. Na ausência de ligação entre o corante e a fibra amiloide, após a excitação luminosa, esta rotação livre causa o relaxamento de seu estado localmente excitado para um estado de transferência de carga não- radiativa (CT). Este fenômeno resulta, então, na ausência fluorescência. A ligação do corante à fibra, no entanto, resulta na imobilização rotacional dos anéis e acredita-se que isto causa os aumentos de fluorescência detectados em aproximadamente 482nm (excitação em 450nm) (Naiki *et al.*, 1989; Quin *et al.*, 2017; Xue *et al.*, 2017).

Além do DMT2, algumas outras importantes doenças apresentam, em sua evolução, a agregação tóxica de proteínas, como o Alzheimer, Huntington e Parkinson (Eisele *et al.*, 2015; Velandar *et al.*, 2017). Nestas doenças, estão envolvidas as proteínas β -amiloides, huntingtina e α -sinucleína, respectivamente (Lovestone 2002; Arrasate & Finkbeiner, 2011; Araki *et al.*, 2019). As amiloidoses, como são denominadas estas condições, podem ser definidas como resultado de um depósito tecidual de amiloides, ou seja, material fibrilar que se origina de proteínas precursoras (Merlini, 2004; Lachmann & Hawkins, 2006), cuja deposição pode ocorrer pela presença de proteínas anormais, pelo excesso de proteínas normais, pelo processo de envelhecimento e também por razões não desvendadas até então (Wechalekar *et al.*, 2016).

Qualquer momento durante o processo cinético de agregação consiste em potencial alvo de pesquisas. Atualmente, a estratégia de identificação de substâncias que possam atuar no tratamento de amiloidoses concentra-se na inibição da aglomeração amiloide, por inibição da formação de amiloide tóxica, ou estabilização dos agregados e remodelação ou degradação de oligômeros tóxicos e fibras insolúveis (Pithadia *et al.*, 2016; Velander *et al.*, 2017).

1.4. Produtos naturais como potenciais inibidores da agregação amiloide da amilina

Os produtos naturais possuem uma grande diversidade química, o que reflete diretamente em comportamentos frequentemente muito específicos em sistemas biológicos, resultando em uma grande variedade de atividades farmacológicas. Neste contexto, os produtos do metabolismo vegetal têm despertado a atenção para pesquisas acerca de inibidores de agregação amiloide (Pithadia *et al.*, 2016; Velander *et al.*, 2017).

Dentre as substâncias de origem natural já testadas quanto à aglomeração amiloide da amilina, estão o resveratrol (13), o galato de epigallocatequina (EGCG) (14), o ácido rosmarínico (15), a baicaleína (16), a oleuropeína (17), a curcumina (18), entre outras (Rigacci *et al.*, 2010; Velander *et al.*, 2016; Pithadia *et al.*, 2016; Velander *et al.*, 2017) (**Figura 8**).

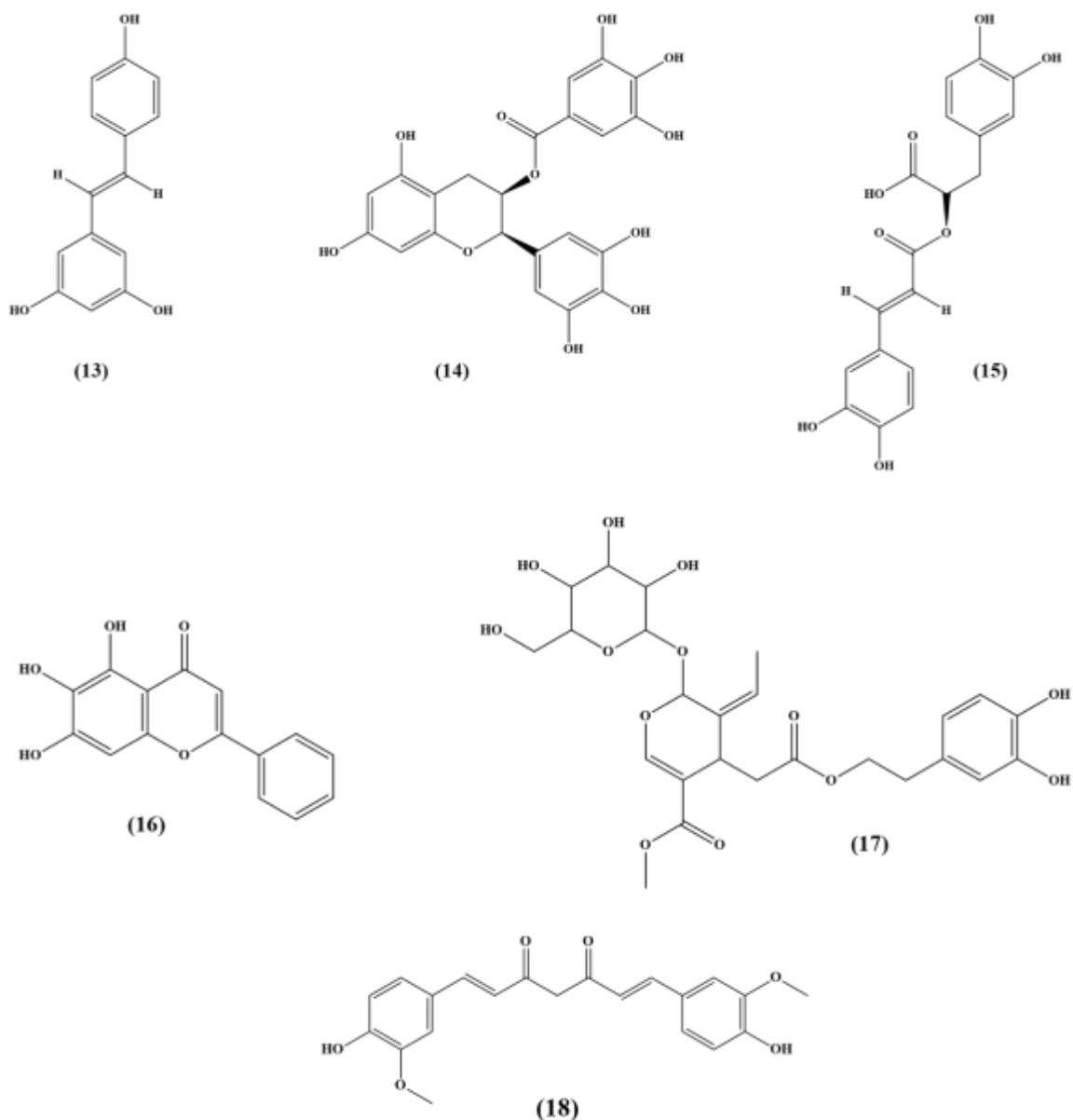


Figura 8. Estruturas químicas de substâncias de origem natural já testadas quanto a sua ação inibitória na agregação amiloide da amilina humana.

O EGCG (14), o resveratrol (13), a oleuropeína (17) e a curcumina (18) são as substâncias oriundas de plantas mais estudadas quanto a sua ação frente a amilina humana (Pithadia *et al.*, 2016; Chaari, 2020). Todas estas substâncias são polifenóis de origem vegetal, classe que recebe destaque nos estudos acerca de agregação amiloide de proteínas (Pithadia *et al.*, 2016).

O galato de epigallocatequina é um representante da classe dos flavonoides e é possível encontrar diversos relatos na literatura sobre a sua capacidade de se ligar a uma vasta gama de proteínas, com alta afinidade (Yang *et al.*, 2014). Nas doenças baseadas na agregação amiloide de proteínas, o EGCG é uma das substâncias mais

bem estudadas, com registros de inibição da agregação amiloide de β -amiloide, α -sinucleína e hIAPP (Cao & Raleigh, 2012), além de apresentar relatos em ensaios clínicos na prevenção de Alzheimer, Parkinson e Huntington (Mähler *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2014). Quanto ao mecanismo de ação, o EGCG atua principalmente no redirecionamento da via de formação dos agregados, ou seja, favorecendo a formação de produtos de baixa toxicidade (Porat *et al.*, 2006; Dhouafli *et al.*, 2018). Na amilina humana, o galato de epigallocatequina é capaz de inibir a formação de agregados de natureza amiloide tanto na fase *lag* quanto na fase da elongação, além de desagregar fibras pré-formadas (Meng *et al.*, 2010; Cao & Raleigh, 2012). Outro importante polifenol que age sob estes mecanismos é o resveratrol, bastante conhecido como componente antioxidante das uvas e do vinho (Dhouafli *et al.*, 2018). Já a aglicona da oleuropeína, componente fenólico majoritário do azeite de oliva, é uma das poucas substâncias para a qual há registro da ação protetiva. Esta substância, quando presente durante o processo de agregação da amilina, possui capacidade de reduzir a citotoxicidade causada pelos agregados em cultura de células RIN-5F (Rigacci *et al.*, 2011; Dhouafli *et al.*, 2018; Chaari, 2020).

A curcumina, extraída principalmente como componente majoritário do rizoma de *Curcuma longa* L. e talvez seja, para amilina humana e as demais proteínas amiloides, a substância natural mais estudada (Daval *et al.*, 2010). Diversos estudos relatam as atividades antioxidante, anti-inflamatória, antiviral, citotóxica, antitumoral e antibacteriana associadas à curcumina (Mazumder *et al.*, 1995; Jurenka, 2009; Tyagi *et al.*, 2015; Hewlings & Kalman, 2017; Giordano & Tommonaro, 2019), incluindo também a menção à ação inibitória na agregação em proteínas amiloidogênicas como a α -sinucleína, proteína envolvida na doença de Parkinson, e o β -amiloide, associado ao Alzheimer (Yang *et al.*, 2005; Garcia-Alloza *et al.*, 2007; Pandey *et al.*, 2008; Daval *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2013). Na agregação amiloide da amilina *in vitro*, mais especificamente, a curcumina é capaz de reduzir a formação de fibras amiloides, favorecendo a formação de agregados estruturalmente distintos e não-tóxicos (Daval *et al.*, 2010; Sparks *et al.*, 2012).

1.5. Ferramentas aplicadas a estudos fitoquímicos

Dentre as técnicas analíticas disponíveis, a espectrometria de massas tem demonstrado ser uma ferramenta muito útil na pesquisa em plantas medicinais e produtos naturais, pois permite a aquisição de grandes grupos de dados que refletem o perfil químico da amostra em questão. É uma técnica muito versátil que pode ser utilizada isolada ou ainda acoplada a outras. O termo “técnicas hifenadas” refere-se à

aplicação de técnicas de análises combinadas, com o intuito de aumentar o poder analítico das mesmas (Patel *et al.*, 2010). Isolada ou em conjunto com outras técnicas, como a Ressonância Magnética Nuclear (RMN), a MS (do inglês, *Mass Spectrometry*) também possui importante valor na elucidação estrutural de substâncias. No entanto, na pesquisa em produtos naturais, o que mais chama a atenção de pesquisadores para as vantagens da MS é seu uso na análise de amostras complexas. Conforme os equipamentos evoluem, tornam-se mais sensíveis e a possibilidade de coleta de dados aumenta (Bouslimani *et al.*, 2014). Basicamente, um espectrômetro de massas é responsável por transformar a amostra em íons em fase gasosa e dispersar esses íons até o analisador, onde serão separados de acordo com a sua razão massas sobre carga (m/z) e isto gera um espectro que relaciona esta razão massa-carga a uma abundância relativa (%). Desta forma, a composição dos equipamentos varia de acordo com os mecanismos utilizados para cumprir estas funções (Williams, 1997; Barofsky, 1999).

Os analitos, na sua maioria, são convertidos em íons na fonte de ionização. Este processo pode ocorrer de várias formas, de acordo com as distintas fontes disponíveis. Para produtos naturais, as mais comumente utilizadas são as fontes de ionização por *electrospray* (do inglês, *Electrospray Ionization* – ESI), e as a ionização química à pressão atmosférica (do inglês, *Atmospheric Pressure Chemical Ionization* – APCI) (Williams, 1997). Na ionização por APCI, os íons são formados em fase gasosa através de uma alta voltagem aplicada (*corona discharge*). Este processo ioniza os analitos após o uso de um gás nebulizador para formar aerossóis e os íons formados são carregados até o analisador e o detector, que realizam a separação dos íons e seus fragmentos por sua razão massa/carga (m/z) e a sua conversão em um sinal elétrico que pode ser medido e amplificado (Williams, 1997; Clarke, 2017).

Uma técnica também bastante utilizada, principalmente em relação a extratos preparados em hexano e diclorometano, é a Cromatografia Gasosa (GC, do inglês *Gas Chromatography*), que apresenta uma grande gama de aplicações, realizando a detecção de substâncias até mesmo em concentrações baixas e sendo considerada simples, sensível e efetiva em separação de componentes em misturas (Al-Rubaye *et al.*, 2017). A combinação entre a Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (GC-MS) é considerada uma ferramenta muito útil de identificação e quantificação de substâncias. Nesta técnica, há a produção de íons em fase a gasosa que são direcionados ao detector de massas e então analisados de acordo com a sua razão massa/carga (m/z). Para a produção dos íons, várias são as opções de ionização e dentre as mais utilizadas estão a ionização química e a ionização por impacto de

elétrons (Hage, 2018). A detecção feita pelos analisadores resulta em um espectro que, somado ao tempo de retenção na cromatografia e os padrões de fragmentação, pode ser comparado com bases de dados, gerando um *score* de similaridade entre as substâncias analisadas e as propostas.

Uma condição indispensável para a utilização da cromatografia em fase gasosa é que os analitos sejam voláteis nas temperaturas utilizadas. Mesmo sendo uma técnica de aplicabilidade ampla, algumas substâncias orgânicas podem ser muito polares para serem analisados por GC. Embora não seja sempre um procedimento de primeira escolha, uma vez que envolve uma etapa onde há manipulação adicional da amostra, a derivatização das pode ser empregada para tornar as substâncias a serem analisadas suficientemente voláteis para que sejam detectadas por GC (Özek & Demirci, 2012; Rockwood *et al.*, 2018). A derivatização consiste em, quimicamente, modificar a estrutura de um analito a fim de favorecer a sua análise por determinada técnica analítica, através da adição de um grupamento funcional conhecido. Além de garantir e facilitar a volatilização das substâncias, a derivatização também é utilizada para garantir a estabilidade térmica de substâncias, modificar suas propriedades cromatográficas, aumentar a eficiência do processo de ionização ou ainda favorecer determinados padrões de fragmentação (Rockwood *et al.*, 2018).

A sililação é o modo de derivatização considerado mais simples e mais versátil, e consiste na substituição dos hidrogênios ativos de grupamentos -OH, -NH e -SH por um grupo silil. Nesta substituição, a interação dipolo-dipolo é reduzida, o que causa o aumento da volatilidade do analito e melhora nas propriedades cromatográficas. Além disso, como vantagem adicional, o novo grupamento silil das substâncias derivadas formadas podem gerar padrões de fragmentação característicos que podem auxiliar e facilitar a elucidação estrutural das substâncias (Halket & Zaikin, 2003). O BSTFA, *N,O*-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida, é um agente derivatizante bastante utilizado e age na sililação de álcoois, fenóis, ácidos, aminoácidos, tióis, aminotióis, polióis e açúcares, podendo ser empregado sozinho ou em conjunto com um segundo agente derivatizante para aumentar a gama de grupamentos atingidos. Os produtos gerados por este processo são denominados derivados TMS (trimetilsilil) e apresentam em sua estrutura o grupamento $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ (Poole & Zlatkis, 1979; Halket & Zaikin, 2003).

Os extratos vegetais são considerados matrizes muito complexas, que reúnem inúmeras substâncias advindas dos processos extrativos. A composição destes extratos pode variar não só em relação em relação à quantidade, concentração e natureza das substâncias, mas também entre famílias, gêneros e até mesmo espécies. Desta forma,

utilização de ferramentas analíticas na pesquisa em produtos naturais permite execução de diferentes vertentes de pesquisa, sendo principalmente focadas na desrepliação, evitando o isolamento de produtos que não sejam os de interesse; na metabolômica, identificando o maior número de metabólitos possível; e no controle de qualidade de insumos farmacêuticos e fitoterápicos (Wolfender *et al.*, 2010; Salem *et al.*, 2020).

1.6. Justificativa

Os produtos naturais vegetais apresentam uma vasta gama de atividades já descritas, nas mais variadas abordagens e é inegável o impacto que a pesquisa em metabólitos secundários vegetais possui na medicina moderna. No cenário da pesquisa em amiloidoses, diversos registros já são encontrados na literatura no que diz respeito à ação dos produtos naturais para proteínas envolvidas, por exemplo, nas doenças de Alzheimer e Parkinson, o que gera evidências da sua possível ação também frente à amilina, visto que o processo de agregação destas proteínas possui algumas semelhanças. Num contexto geral, poucos registros são encontrados correlacionando, no entanto, a agregação amiloide da amilina e os produtos naturais. Considerando a atividade para plantas nativas brasileiras, não são encontrados relatos na literatura.

Sob esta perspectiva, parte da biblioteca de extratos do Laboratório de Fitoquímica e Farmacognosia (que incluía os extratos preparados em 2008) foi testada em 2017 frente à agregação amiloide da amilina humana, através em uma parceria estabelecida com o Laboratório de Biotecnologia Farmacêutica - pbiotech. Nesta ocasião, foi realizada a triagem de cerca de 74 extratos, de 14 espécies nativas brasileiras. Dentre os extratos mais ativos, destacaram-se os extratos em hexano e diclorometano, preparados em 2008, de *S. marginatus* e *S. concinnus*, para os quais foi possível observar indícios de uma redução da agregação amiloide *in vitro*. A junção destas informações, associadas à escassez de informações acerca da atividade de produtos naturais frente à amilina motivou o estudo destas espécies através deste projeto.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Prospectar e identificar extratos, frações e substâncias isoladas das ervas-de-passarinho da região serrana do estado do Rio de Janeiro - *Struthanthus marginatus* (Desr.) Blume e *Struthanthus concinnus* (Mart.) Mart. com atividade inibitória de agregação amiloide *in vitro* do hormônio amilina.

2.2. Objetivos específicos

Foram propostos como objetivos específicos:

(i) Comparar os perfis químicos dos extratos já ensaiados com os novos que serão preparados;

(ii) Avaliar a atividade inibitória promovida pelos extratos preparados em 2018 destas duas espécies na fibrilação do peptídeo amilina através de ensaios de fluorescência, em comparação com os extratos preparados em 2008;

(iii) Avaliar a atividade inibitória da fibrilação peptídeo amilina promovida pelas substâncias isoladas e/ou identificadas anteriormente dos extratos das duas espécies: fitol, taraxerol, obtusifoliol, 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona, lupeol, sitosterol, taraxasterol, β -amirina, α -amirenona, 24-metilenocicloartanol, 3-O-n-acil-lup-20(29)-en-3 β ,7 β ,15 α -triol e γ -sitosterol;

(iv) Contribuir para o aumento dos dados acerca da composição química de *S. marginatus* e *S. concinnus*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Coleta de material vegetal

3.1.1. Aquisição do material vegetal em 2008

Partes aéreas de *S. marginatus* e folhas de *S. concinnus* foram adquiridas através de vendedores em feiras livres dos municípios de Petrópolis e Nova Friburgo, respectivamente, em 2008, conforme descrito por Leitão, 2009. Na ocasião da coleta deste material, *S. marginatus* parasitava um indivíduo de *Vernonia* sp, popularmente conhecido como assapeixe, e *S. concinnus* encontrava-se sobre uma amoreira, *Morus alba* L. Todo o material foi depositado no Herbário da Universidade Federal do Rio de Janeiro (RFA/UFRJ).

3.1.2. Coleta do novo material vegetal em 2018

Partes aéreas, incluindo as inflorescências e frutos, de *Struthanthus marginatus* e *S. concinnus* foram coletadas em Cascatinha (22°30'26.0"S 43°10'49.3"W), Petrópolis e Ypu (22°17'38.5"S 42°31'50.1"W), Nova Friburgo, respectivamente, na região serrana do Estado do Rio de Janeiro. *S. marginatus* parasitava uma espécie do gênero

Magnolia, da família Magnoliaceae, enquanto que *S. concinnus*, parasitava uma espécie de *Phyllostachys*, um bambu da família Poaceae.

As espécies foram identificadas pelo Prof. Dr. Carlos Henrique Reif de Paula, da Universidade Santa Úrsula (USU) e parte do material coletado foi destinado ao depósito no Herbário Prof. Jorge Pedro Pereira Carauta da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (HUNI) (**Figura 9**) e no Herbário da Universidade Federal do Rio de Janeiro (RFA). A **Tabela 1** dispõe os números de tombo de cada espécie nos dois herbários supracitados.

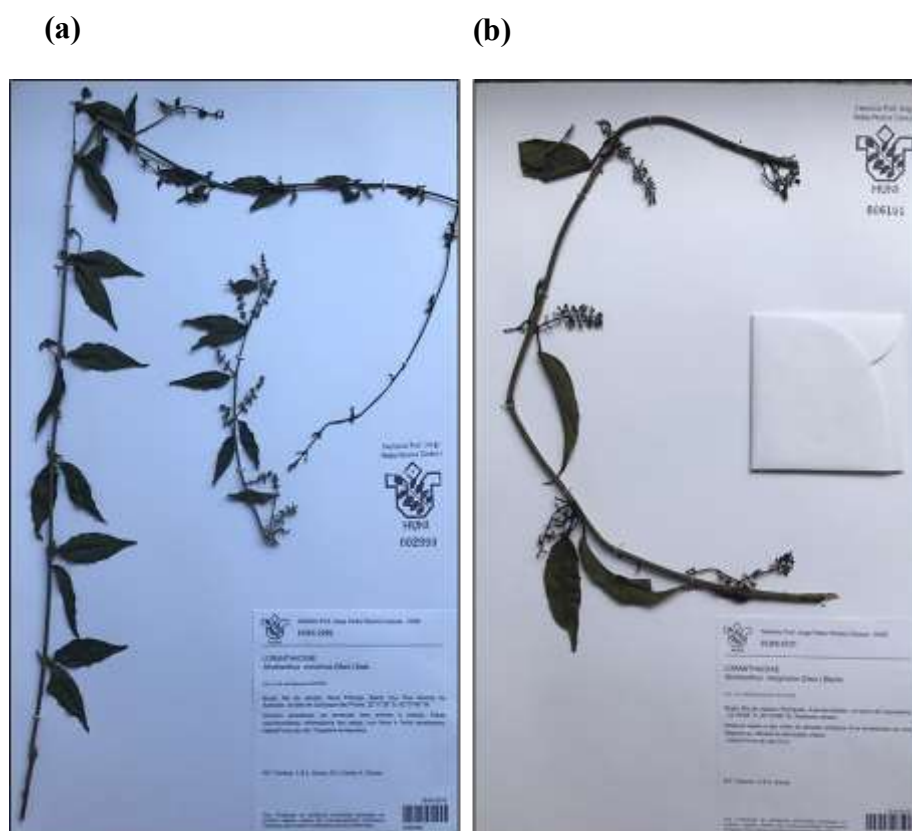


Figura 9. Exsicatas de *S. concinnus* (a) e *S. marginatus* (b) depositadas no Herbário Professor Jorge Pedro Pereira Carauta, na Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO). Fonte: Acervo pessoal.

Tabela 1. Números de tombo no Herbário Prof. Jorge Pedro Pereira Carauta (HUNI) e no Herbário da Universidade Federal do Rio de Janeiro (RFA) e dados de rendimento da partição líquido-líquido dos extratos de *S. marginatus* e *S. concinnus*.

	<i>S. marginatus</i>	<i>S. concinnus</i>
Nº de tombo HUNI	HUNI6101	HUNI2999
Nº de tombo RFA	RFA43351	RFA43325

3.2. Preparo dos extratos

3.2.1. Extratos de *S. marginatus* e *S. concinnus* preparados em 2008

Após a coleta, o material foi seco em temperatura ambiente e extraído com etanol 96°GL. Conforme descrito por Leitão (2009), os extratos etanólicos de *S. marginatus* e *S. concinnus* resultantes foram repartidos entre água e os solventes de polaridade crescente hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol saturado em água, gerando os extratos sinalizados nas **Figuras 10a e 10b**.

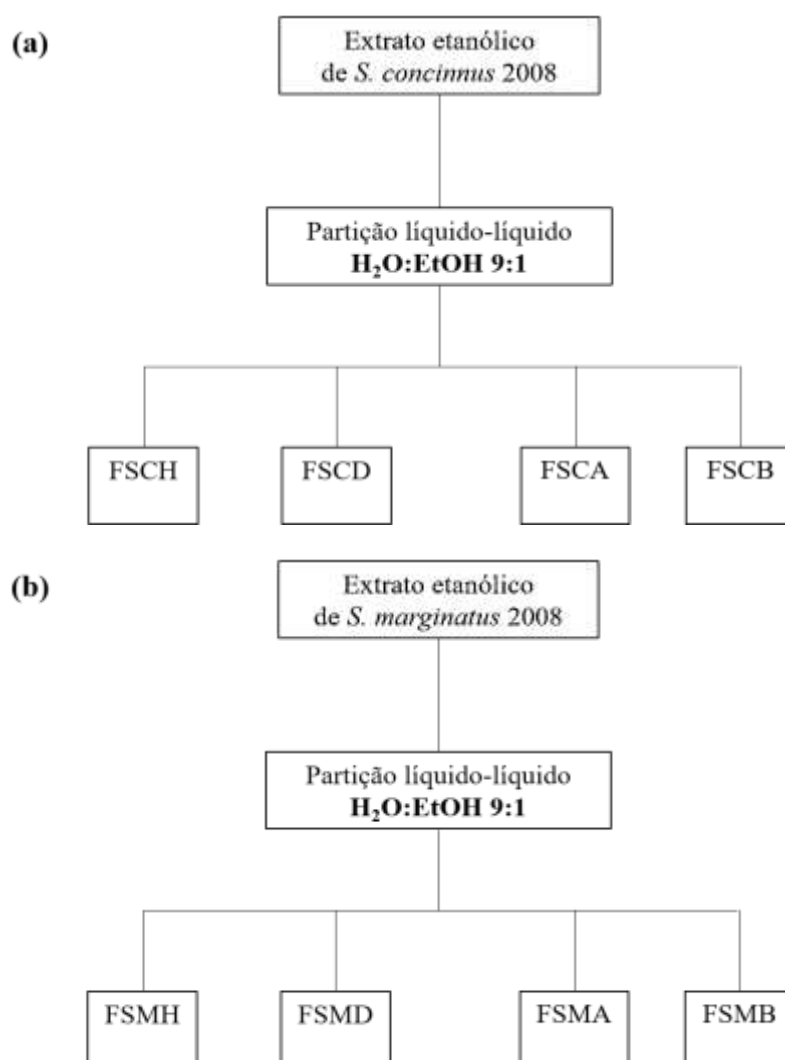


Figura 10. Esquemas do fracionamento dos extratos etanólicos de *S. concinnus* (a) e *S. marginatus* (b) preparados em 2008. FSCH: Extrato em hexano de *S. concinnus* preparado em 2008. FSCD: Extrato em diclorometano de *S. concinnus* preparado em 2008. FSCA: Extrato em acetato de etila de *S. concinnus* preparado em 2008. FSCB: Extrato em butanol de *S. concinnus* preparado em 2008. FSMH: Extrato em hexano de *S. marginatus* preparado em 2008. FSMD: Extrato em diclorometano de *S. marginatus* preparado em 2008. FSMA: Extrato em acetato de etila de *S. marginatus* preparado em 2008. FSMB: Extrato em butanol de *S. marginatus* preparado em 2008.

3.2.2. Extratos de *S. marginatus* e *S. concinnus* preparados em 2018

O material vegetal coletado foi separado manualmente (**Figura 11**) e então seco em estufa ventilada (SOLAB SL 100) durante três dias, a 40 °C. Após a etapa de secagem, todo o material vegetal foi triturado em moinho de facas do tipo Wiley (Marconi) e apenas as folhas, caule e raízes das duas espécies foram extraídos. Do material seco, 646,4 g de *S. marginatus* e 598,3 g de *S. concinnus* foram extraídos com etanol 96 °GL, utilizando um percolador, por três semanas (**Figura 12**). Os extratos etanólicos resultantes foram então concentrados em evaporador rotatório Hei-VAP Core (Heidolph), identificados, pesados e mantidos refrigerados, a 5 °C. Para o extrato etanólico de *S. marginatus* foi obtido um rendimento de 14,6%, resultando em 94,3 g, e o extrato de *S. concinnus*, um rendimento de 20,9%, resultando em 125,2 g.



Figura 11. Separação manual do material vegetal coletado de *S. marginatus* e *S. concinnus*. Fonte: Acervo pessoal.



Figura 12. Extração das partes aéreas de *S. concinnus* por percolação, com etanol comercial (96°GL). Fonte: Acervo pessoal.

O fracionamento inicial do extrato etanólico de ambas as espécies foi realizado pela metodologia de partição líquido-líquido (**Figura 13**), em funil de separação, utilizando 40g de cada um dos extratos solubilizados em cerca de 100 mL de uma solução água:etanol (9:1). Esta suspensão foi repartida entre os solventes de polaridade crescente: hexano, diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol saturado em água, gerando os extratos descritos nas **Figuras 14a e 14b**. Cerca de 100 mL dos solventes foram adicionados à solução hidro-alcóolica, com repetição realizada até o esgotamento visual do solvente.



Figura 13. Partição líquido-líquido, em funil de separação, do extrato etanólico de *Struthanthus concinnus*.
Fonte: Acervo pessoal.

Os extratos resultantes foram concentrados em evaporador rotatório Hei-VAP Core (Heidolph), sob pressão reduzida, identificados e armazenados em refrigerador, a 5°C.

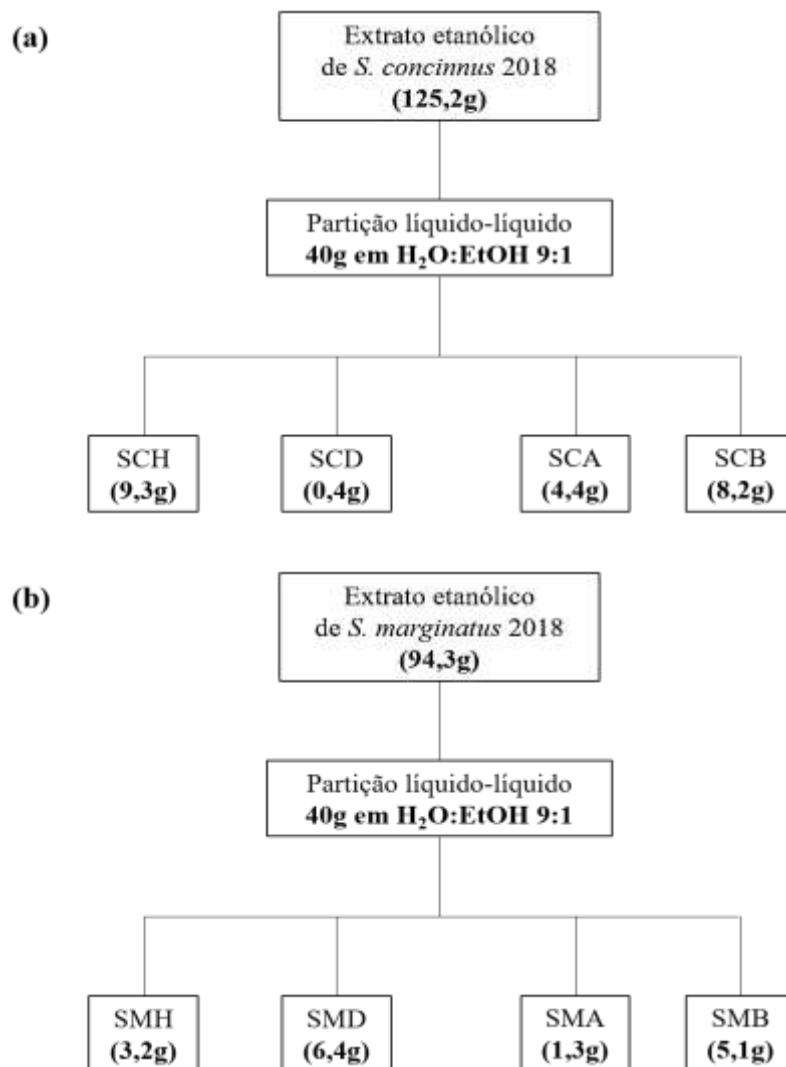


Figura 14. Esquemas e informações de rendimento do fracionamento dos extratos etanólicos de *S. concinnus* (a) e *S. marginatus* (b) preparados em 2018. SCH: Extrato em hexano de *S. concinnus* preparado em 2018. SCD: Extrato em diclorometano de *S. concinnus* preparado em 2018. SCA: Extrato em acetato de etila de *S. concinnus* preparado em 2018. SCB: Extrato em butanol de *S. concinnus* preparado em 2018. SMH: Extrato em hexano de *S. marginatus* preparado em 2018. SMD: Extrato em diclorometano de *S. marginatus* preparado em 2018. SMA: Extrato em acetato de etila de *S. marginatus* preparado em 2018. SMB: Extrato em butanol de *S. marginatus* preparado em 2018.

3.3. Ensaios de fibrilação do hormônio amilina frente aos extratos de *S. marginatus* e *S. concinnus* preparados em 2008 e 2018

3.3.1. Preparo das amostras

Soluções estoque dos extratos e das frações ativas foram preparadas nas concentrações de 20 mg.mL⁻¹, em DMSO, e agitados em vórtex (Eppendorf) por 1 min.

Para os ensaios, as soluções estoque foram diluídas a uma concentração-teste de 0,2 mg.mL⁻¹ em tampão fosfato pH 7,2.

3.3.2. Condições e parâmetros dos ensaios

Para fins de controle, os ensaios delineados nesta sessão tomaram curcumina (Sigma-Aldrich) como substância de comparação (Daval *et al.*, 2010; Sparks *et al.*, 2012).

A amilina humana sintética (Genscript; >95% pureza; estoque em DMSO 100%) foi incubada a 50 µM em 50 mM Na₂HPO₄ pH 7.4, com 20 µM ThT, e na presença dos extratos e frações. A cinética agregação foi conduzida em placa de 96 poços de fundo preto Costar, coberta por filme transparente (para evitar evaporação) e monitorada para fluorescência de ThT com excitação ajustada a 440nm e emissão a 485nm. Para os extratos preparados em 2008 empregou-se o espectrofluorímetro - SpectraMax M5 - (Molecular Devices) com. Para os extratos de 2018, além das substâncias isoladas por Leitão *et al.* (2013), empregou-se o espectrofluorímetro Synergy H1 (Biotek). Em todos os experimentos as medidas foram coletadas por leituras a cada 3 minutos, após 3 segundos de vibração linear automática. Os experimentos foram conduzidos a 25 °C

3.4. Análise dos extratos etanólicos, em hexano e em diclorometano por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) de *S. marginatus* e *S. concinnus* de 2008 e 2018

Após o fracionamento, os extratos em hexano e diclorometano das duas ervas-de-passarinho (SCH, SCD, SMH, SMD, FSCH, FSCD, FSMH e FSMD) foram submetidos a CCD, em cromatoplasca de 5cm de altura, de sílica gel 60 com suporte de alumínio (Merck). Os extratos foram solubilizados em placa de toque e aplicados com 0,5cm de distância entre si e 1 cm de distância do fim da placa. As eluições foram feitas em cubas de vidro, utilizando uma mistura de hexano e acetato de etila, nas proporções 9,5:0,5. Ao final, as placas foram borrifadas com solução aquosa de vanilina a 1%, seguida de ácido sulfúrico 30%, e aquecidas em placa de aquecimento (LABTEK) para revelação.

3.5. Análise dos extratos etanólicos e partições em hexano e diclorometano por DI-APCI (±)- MS

3.5.1. Preparo de amostra

Para esta análise 10 mg de cada extrato foram solubilizados em 1 mL de metanol. A amostra foi centrifugada por 5 minutos a 10.000 RPM em micro-centrifuga Kasvi K14-1215, e então diluída em metanol na proporção 1:3.

3.5.2. Parâmetros

Os extratos etanólicos e as partições de ambas as espécies coletadas em 2018 foram primeiramente analisadas por espectrometria de massas, por infusão direta, utilizando a fonte de ionização *Atmospheric Pressure Chemical Ionization* (APCI). Foram realizados os ensaios em modo positivo (+) e negativo (-) de ionização em um analisador IonTrap 3D (LCQ Fleet, Thermo Fisher Scientific) acoplado a um cromatógrafo UHPLC (Dionex, Thermo Fisher Scientific), utilizado para automação das injeções. Neste sistema, foram utilizadas como fase móvel MeOH:H₂O acrescida de 0,1% de ácido fórmico para o modo positivo, e 0,1% de NH₄OH 1% para o modo negativo com fluxo de 100 µL.min⁻¹. Foram injetados 10 µL de cada amostra com tempo de corrida de 5 minutos.

As condições de fonte para APCI para ambos os modos de ionização foram *sheat gas* 30, *auxiliary gas* 5 e *source voltage* de 6 kV com descarga corona de 5 µA e com *tube lens* de 110V. A temperatura do capilar foi 350 °C e a temperatura da fonte foi 450 °C. Para modo positivo de ionização a faixa medida foi de *m/z* 50-1000, para modo negativo de ionização a faixa medida foi de *m/z* 50 a 1200.

3.6. Análise dos extratos preparados em 2008 e 2018 por GC-MS

3.6.1. Preparo de amostra

Aproximadamente 1 mg de cada um dos extratos em hexano e diclorometano de 2008 (FSCH, FSCD, FSMH e FSMD) e de 2018 (SCH, SCD, SMH e SMD) foi diluído em 1mL de hexano (pureza = 96%) ou diclorometano (pureza = 99,8%), e 200 µL das soluções foram transferidas para *inserts* para injeção. Adicionalmente, para o extrato SCD, a amostra foi preparada na concentração de 5 mg.mL⁻¹, nas quais foram adicionados 300 µL do derivatizante BSTFA (N,O-Bis-(trimetilsilil)trifluoroacetamida)

seguido de aquecimento por 30 minutos, a 40 °C. Cerca de 200 µL da solução foram transferidos para um *insert* para injeção no equipamento.

3.6.2. Parâmetros

Os extratos em hexano e diclorometano foram analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) no sistema QP2010SE Shimadzu, com injetor automático AOC20 Shimadzu, equipado com uma coluna Agilent DB-5 (5% fenilmetilpolisiloxano) (30 m x 0,25 mm x 0,20 µm).

Para a detecção, o sistema foi operado com energia de ionização de 70eV, utilizando hélio como gás carreador, num fluxo constante de 1 mL.min⁻¹ e 1 µL de volume de injeção, em *split* 50:1 para o extrato SCD e 5:1 para os extratos SCH, SMH e SMD. A temperatura do injetor foi mantida em 270 °C e a da fonte de íons em 260 °C. Já a temperatura do forno foi programada para 60 °C (isoterma de 2 minutos), com incrementos de 10 °C.min⁻¹ até 290 °C (isoterma de 5 minutos) para o extrato em diclorometano no *S. concinnus*, preparado em 2018. A faixa de varredura utilizada foi de *m/z* 35 – 500 e o tempo total de corrida foi de 35 minutos. Para os demais extratos, a programação da temperatura foi de 200°C (isoterma de 2 minutos), com incrementos de 10°C.min⁻¹ até 290°C (isoterma de 15 minutos). A faixa de varredura utilizada foi de *m/z* 35 – 800 e o tempo total de corrida foi de 35 minutos.

3.7. Processamento e análises dos espectros de massas e gráficos de cinética de agregação

Para processamento dos dados resultantes da atividade anti-agregação de amilina dos extratos, frações e substâncias isoladas, foi utilizado o software Excel (Microsoft) para compor as planilhas de dados brutos e o software GraphPad Prism 7 para montagem dos gráficos de cinética. Para os espectros de massas, os dados obtidos foram processados no software XCalibur 2.2 SP1.48 (Thermo Fischer Scientific).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Ensaio de fibrilação da amilina humana

4.1.1. Extratos de *S. concinnus* e *S. marginatus* preparados em 2008

Os extratos de *S. concinnus* e *S. marginatus* preparados em 2008 foram ensaiados em 2017, em conjunto com uma biblioteca de extratos, frente a agregação amiloide da

amilina humana (**Figuras 15 e 16**). Apesar de todos os extratos apresentarem resultados satisfatórios em relação ao controle (agregação amilóide de amilina humana *in vitro* na ausência de aditivos), os extratos em hexano e diclorometano de ambas as espécies pareciam ser os mais promissores.

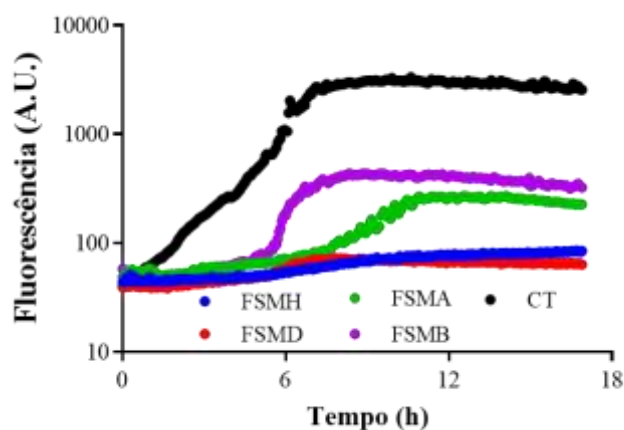


Figura 15. Desempenho dos extratos em hexano (FSMH), diclorometano (FSMD), acetato de etila (FSMA) e FSMB), preparados em 2008, de *S. marginatus*, frente a agregação amiloide da amilina humana monitorada por tioflavina T.

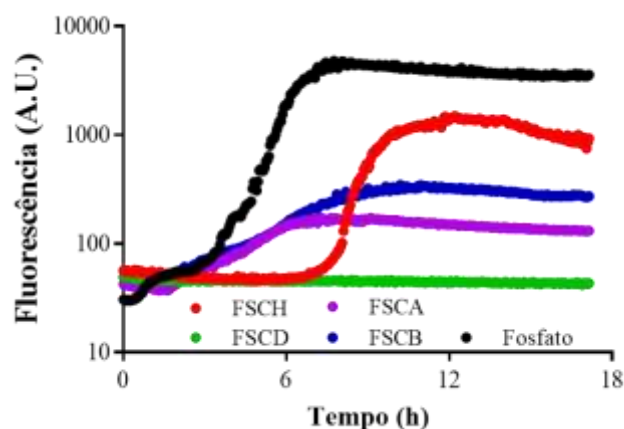


Figura 16. Desempenho dos extratos em hexano (FSCH), diclorometano (FSCD), acetato de etila (FSCA) e FSCB), preparados em 2008, de *S. concinnus*, frente a agregação amiloide da amilina humana monitorada por tioflavina T.

Os extratos em hexano (FSCH, FSMH) e diclorometano (FSCD e FSMD) foram os que apresentaram os melhores resultados (**Figura 17**). Os extratos FSMH, FSMD e FSCD apresentaram incremento de fluorescência de ThT modestos ou não-detectados, indicando agregação amiloide não detectável quando comparados ao controle. É possível verificar para os extratos de *S. marginatus* (**Figura 17a**).

A única exceção foi o extrato em hexano de *S. concinnus*, para o qual apesar de também haver um aumento da fase *lag* em comparação ao controle, é possível observar um posterior incremento da fluorescência ao redor de 8h (**Figura 17b**). Ainda assim, a curva para este extrato se mantém abaixo da curva do controle. Estes resultados compreendem o primeiro relato de uma triagem realizada com fins de identificação de potenciais inibidores da agregação da amilina utilizando espécies brasileiras.

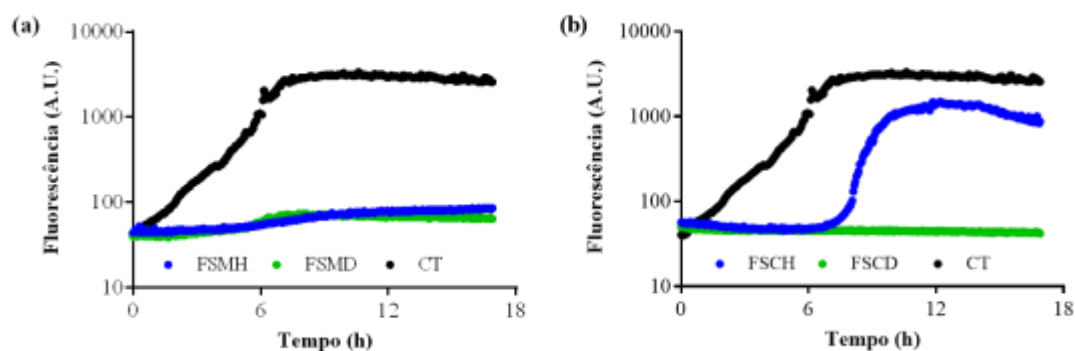


Figura 17. Extratos em hexano e diclorometano de *S. marginatus* (a) e *S. concinnus* (b), preparados em 2008, frente a agregação amiloide da amilina humana. O efeito dos extratos foi monitorado pelos ensaios de fibrilação empregando tioflavina T. FSMH: Extrato em hexano de *Struthanthus marginatus*. FSCH: Extrato em hexano de *Struthanthus concinnus*. FSMD: Extrato em diclorometano de *Struthanthus marginatus*. FSCD: Extrato em diclorometano de *Struthanthus concinnus*. CT: controle (tampão fosfato pH 7,4).

4.1.2. Extratos de *S. concinnus* e *S. marginatus* de preparados em 2018

Em razão da limitação na quantidade das amostras de 2008, não seria possível realizar a continuação das análises através do fracionamento bioguiado. Desta maneira, julgou-se necessária a realização de uma nova coleta de material vegetal e a preparação de novos extratos. Desta maneira, para verificar se o novo material coletado também apresentaria atividade, novos ensaios foram realizados.

Os resultados para estes ensaios estão dispostos na **Figura 19 (a-d)**. Nestes e nos experimentos que se seguiram, os extratos foram comparados ao desempenho da curcumina baseados em dados da literatura (Daval *et al.*, 2010; Sparks *et al.*, 2012). Em um teste prévio pra definir a concentração a ser utilizada, nos mesmos parâmetros nos quais foram realizados os ensaios com o material das ervas-de-passarinho, três concentrações foram testadas (**Figura 18**).

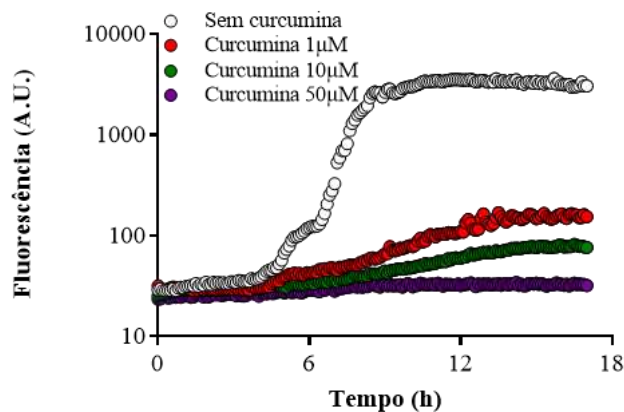


Figura 18. Efeito de três diferentes concentrações (1 μM , 10 μM e 50 μM) de curcumina na agregação amiloide da amilina humana.

Das concentrações testadas, todas possuem efeito na agregação amiloide do peptídeo. Mesmo na menor concentração (1 μM), nota-se uma diminuição na fase de alongação, com posterior alcance do *plateau*, em comparação ao controle. Já na concentração de 10 μM observa-se um incremento sutil da fluorescência apenas após aproximadamente 10h de experimento, enquanto que na concentração de 50 μM observa-se um comportamento praticamente constante da leitura de fluorescência. Por esta razão, para fins de controle, foi escolhida esta última concentração da curcumina, confirmando os resultados observados por Daval *et al.* (2010), onde a curcumina foi capaz de inibir a formação de fibras amiloides nas concentrações de 10 a 100 μM .

Na **Figura 19** é possível observar o desempenho dos extratos SMH, SCH, SMD e SCD frente a agregação amiloide da amilina, onde a curva para todos eles localiza-se abaixo da curva do controle, demonstrando que os novos extratos também possuem efeito neste fenômeno. De maneira geral, não é observado o padrão sigmoide característico de agregação amiloide para nenhum dos extratos, com todas as curvas permanecendo em níveis baixos de fluorescência ao longo das 24 horas de experimento.

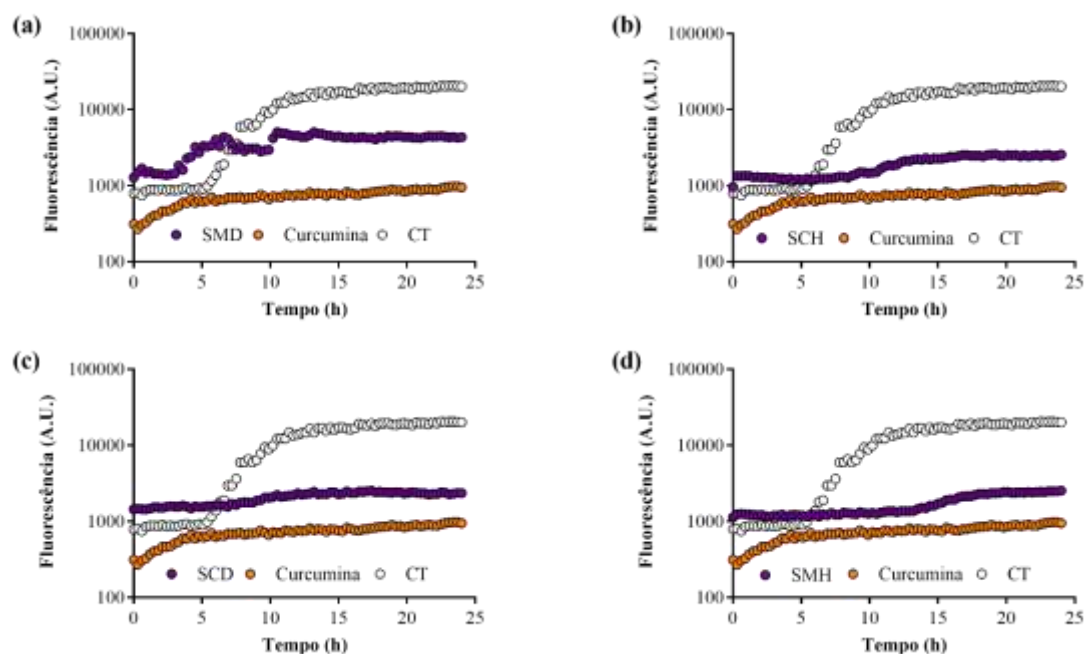


Figura 19. Efeito dos extratos em hexano e diclorometano de *Struthanthus marginatus* e *Struthanthus concinnus* frente a agregação amiloide da amilina humana, monitorado por tioflavina T. A: Extrato em diclorometano de *S. marginatus*. B: Extrato em hexano de *S. concinnus*. C: Extrato em diclorometano de *S. concinnus*. D: Extrato em hexano de *S. marginatus*. CT: controle (tampão fosfato pH 7,4).

Os extratos SMH, SCH e SCD possuem desempenhos bastante semelhantes (**Figura 19b e d**). Considerando, para este ensaio, que a amilina humana sem tratamento algum, apresentou uma fase *lag* de aproximadamente 5 horas de duração, é possível observar um grande incremento da fase *lag*, para estes dois extratos. Na presença do extrato SMH (**Figura 19d**) a fase *lag* da amilina possui o maior incremento, fazendo com que alcançasse mais que o dobro de sua duração. Apesar de haver para SMH, SCH e SCD um aumento na fluorescência, há uma rápida estabilização que durou até o fim das 24h de experimento. A fase de alongação também se apresenta bastante reduzida, seguida do alcance do *plateau*.

O extrato em diclorometano de *S. concinnus* foi considerado o mais ativo (**Figura 19c**), em razão do comportamento praticamente constante da curva de cinética. É possível observar também para este extrato um aumento da duração da fase *lag* para aproximadamente o dobro, seguido de um sutil incremento da fluorescência em aproximadamente 10h. Há, no entanto, uma rápida estabilização.

O extrato em diclorometano de *S. marginatus* é o menos ativo, quando comparado aos demais (**Figura 19a**). Nota-se que, apenas para este extrato, ocorre um encurtamento da fase *lag* quando comparado ao controle, o que resulta no adiantamento

da fase de alongação, a qual seguem-se dois incrementos de fluorescência antes de alcançar o *plateau*.

Registros na literatura demonstram que muitas espécies são indicadas e utilizados no tratamento de DMT2, revelando como esta abordagem se torna importante para a medicina moderna e o desenvolvimento de terapias alternativas (Moradi *et al.*, 2018). Espécies como o melão de São Caetano (*Momordica charantia* L.) e a pata-de-vaca branca (*Bauhinia forficata* Link) são conhecidas popularmente como eficazes no tratamento desta doença (Alam *et al.*, 2015). Na família Loranthaceae há o registro de algumas espécies utilizadas no tratamento de diabetes, como *Loranthus curviflorus* Benth, no Oriente Médio; *L. micranthus* Hook, f., na Nova Zelândia e na Nigéria; *Psittacanthus calyculatus* G. Don, na América Central; *Tapinanthus dodoneifolius* (DC) Danser and *Globimetula cupulata* (DC) Van Tieghem, na medicina tradicional Nigeriana (Marles & Farnsworth, 1995; Osadebe *et al.*, 2004; Ojewole & Adewole, 2007), não sendo encontrados, no entanto, registros das espécies do gênero *Struthanthus*.

Uma vez que os agregados de amilina estão relacionados com a morte celular em pacientes de DMT2 (Fernández, 2014) e existem relatos de representantes da família Loranthaceae na medicina tradicional no tratamento de diabetes, é importante avaliar de maneira mais criteriosa as ações observadas, uma vez que possam existir substâncias ou classes de substâncias na família que sejam comuns entre os gêneros e possam atuar nestes sistemas biológicos. Sendo assim, seria possível obter uma nova indicação para as ervas-de-passarinho do gênero *Struthanthus* através da abordagem randômica.

Três triagens de extratos vegetais frente a agregação amiloide da amilina humana são encontrados na literatura (Kao *et al.*, 2015; Sharoyan *et al.*, 2015; Fuentes *et al.*, 2016). Kao *et al.* (2015) e Fuentes *et al.* (2015) demonstraram a atividade de extratos em acetato de etila de espécies comumente consumidas nos Estados Unidos, como frutas ou condimentos. A extração com acetato de etila gera extratos com grande concentração de substâncias mais polares, como flavonoides e demais substâncias fenólicas, substâncias que protagonizam as investigações na agregação amiloide de proteínas em geral. Em todas as investigações citadas, os extratos também foram monitorados através de ensaios utilizando o ThT, mas nenhum deles demonstra o comportamento da proteína em ao longo da cinética de agregação amiloide. Um outro ponto em comum destes trabalhos, entretanto, é a ausência de caracterização química dos extratos que exibem atividade promissora.

Devido à sua natureza polar, as substâncias presentes em extratos em acetato de etila, não são extraídas por solventes como hexano e diclorometano (Gregorová *et al.*, 2010; Ashour *et al.*, 2019). Por esta razão, embora estas classes de substâncias tenham sido confirmadas na família Loranthaceae e até mesmo no gênero *Struthanthus*, a hipótese é de que a atividade observada não seja atribuída a elas em razão dos extratos que demonstraram atividade serem preparados com solventes de polaridade menor. A atividade apresentada por outras classes químicas que não substâncias fenólicas, como as saponinas e os alcaloides (Ma *et al.*, 2020) evidencia, no entanto, que outras abordagens devem ser investigadas, principalmente frente a IAPP que possui poucos registros na literatura. Além disso, motiva também a continuação dos estudos acerca da atividade apresentada pelos extratos em hexano e diclorometano de ervas-de-passarinho brasileiras.

Ao comparar estes resultados com o desempenho dos extratos de 2008 (FSCH, FSCD, FSMH e FSMD), observa-se que apenas os extratos SMH e SCD mantiveram padrões semelhantes aos seus equivalentes anteriores, FSMH e FSCD, respectivamente. SCD permanece, inclusive, como o extrato mais ativo dentre os testados. Nos extratos em diclorometano de *S. marginatus* e nos extratos em hexano de *S. concinnus*, nota-se uma alteração na atividade observada.

Estudos demonstram que variações no perfil químico podem existir de espécies de erva-de-passarinho de acordo com o hospedeiro e que estas variações podem acarretar em diferenças observadas no padrão de atividade. Os extratos de *Loranthus micranthus* (Linn.) de 5 diferentes hospedeiros, por exemplo, foram ensaiados quanto a sua atividade antidiabética e apresentaram diferenças entre si (Osadebe *et al.*, 2004). Nas próprias folhas de *S. marginatus*, houve diferença, ainda que sutil, das substâncias encontradas em indivíduos que parasitavam *Morus rubra* e *Dombeya wallichii*, detectadas através de GC-MS (Siqueira *et al.*, 2016). Desta forma, uma das razões pelas quais observa-se uma diferença na atividade dos extratos FSCH e SCH, e nos extratos FSMD e SMD, pode ter relação com os hospedeiros distintos das plantas em questão, gerando mudanças no perfil de substâncias das espécies. Desta maneira, todos os extratos tiveram seus perfis químicos comparados para verificar padrões de semelhança entre os anos de 2008 e 2018 que pudessem justificar a atividade farmacológica observada.

4.1.3. Substâncias isoladas dos extratos em hexano de *S. marginatus* e *S. concinnus* preparados em 2008

Em 2013, Leitão *et al.* publicaram um estudo realizando a caracterização de terpenoides inéditos na ocasião para *Struthanthus marginatus* e *Struthanthus concinnus*. Ao todo foram identificadas 13 substâncias, dispostas em 7 frações, como exposto no **Quadro 2**. Em razão dos resultados observados para os extratos das ervas-de-passarinho, estas substâncias e frações foram testadas a fim de verificar a sua possível ação anti-agregatória.

Quadro 2. Substâncias, isoladas e em mistura, identificadas nos extratos de hexano de *S. marginatus* e *S. concinnus* por Leitão *et al.*, 2013.

Código	Identificação	Substâncias identificadas
SC-15	Fração 15 do extrato em hexano de <i>S. concinnus</i>	fitol taraxasterol β -amirina α -amirenona 24-metilenocicloartanol
SC-16	Fração 16 do extrato em hexano de <i>S. concinnus</i>	taraxerol
SC-17	Fração 17 do extrato em hexano de <i>S. concinnus</i>	obtusifoliol
SC-18	Fração 18 do extrato em hexano de <i>S. concinnus</i>	γ -sitosterol 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona
SM-7	Fração 7 do extrato em hexano de <i>S. marginatus</i>	6,10,14-trimetil-2-pentadecanona fitol lupeol
SM-9	Fração 9 do extrato em hexano de <i>S. marginatus</i>	sitosterol estigmasterol
SM-13	Fração 13 do extrato em hexano de <i>S. marginatus</i>	3-O-n-acil-lup-20(29)-en-3 β ,7 β ,15 α -triol

Nenhuma das substâncias isoladas, nem mesmo as misturas testadas refletiram a atividade demonstrada pelos extratos, indicando que estas amostras podem não corresponder às substâncias responsáveis pela atividade ou, pelo menos não isoladamente (**Figura 20**).

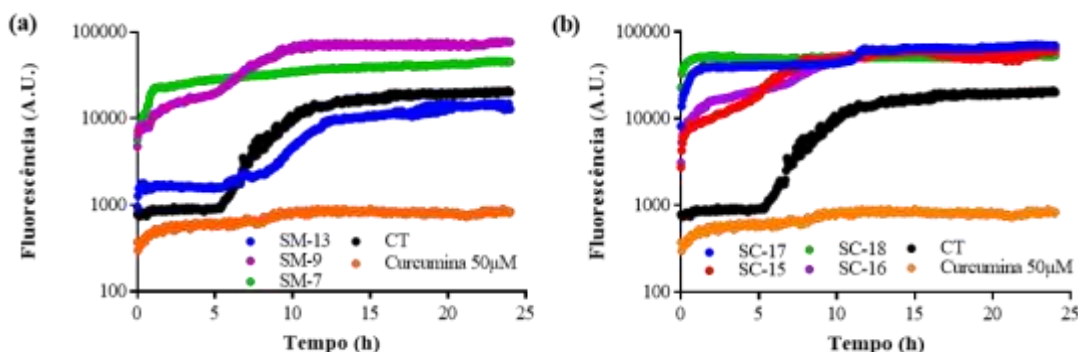


Figura 20. Efeito das frações em mistura e de substâncias isoladas por Leitão *et al.* (2013) nos extratos em hexano de *S. marginatus* (a) e *S. concinnus* (b), frente a agregação amiloide da amilina humana, monitorado pelo ensaio de fluorescência da tioflavina T. SM-13: fração 13 do extrato em hexano de *S. marginatus*. SM-9: fração 9 do extrato em hexano de *S. marginatus*. SM-7: fração 7 do extrato em hexano de *S. marginatus*. SC-17: fração 17 do extrato em hexano de *S. concinnus*. SC-15: fração 15 do extrato em hexano de *S. concinnus*. SC-18: fração 18 do extrato em hexano de *S. concinnus*. SC-16: fração 16 do extrato em hexano de *S. concinnus*. CT: controle (tampão fosfato pH 7,4).

No entanto, a fração SM-13, que corresponde ao 3-O-n-acil-lup-20(29)-en-3 β ,7 β ,15 α -triol (**Figura 21**), apresenta um desempenho considerado interessante. Para esta substância, é possível observar um ligeiro aumento na duração da fase *lag*, fazendo-a ultrapassar as 5h, além de também reduzir a duração da fase de alongação (**Figura 20a**). O aumento da fase *lag* e a diminuição da fase de alongação observados podem estar relacionados não com a inibição da agregação, mas à lentificação da nucleação e do alongamento das fibras, respectivamente (Pithadia *et al.*, 2016).

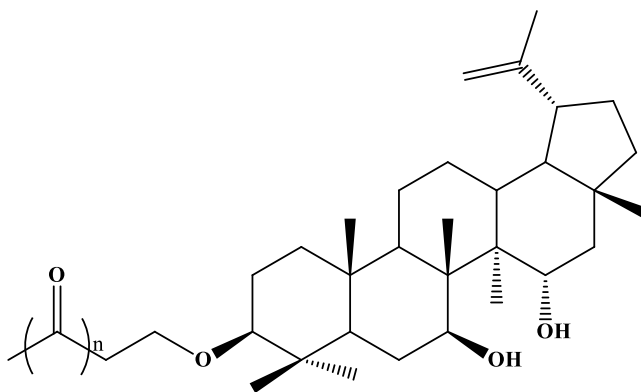


Figura 21. Estrutura química do 3-O-n-acil-lup-20(29)-en-3 β ,7 β ,15 α -triol.

O 3-O-n-acil-lup-20(29)-en-3 β ,7 β ,15 α -triol é representante de uma classe de substâncias consideradas raras na natureza (Leitão *et al.*, 2013). Na família Loranthaceae, essa substância foi isolada anteriormente apenas em *Hyphear tanakae* (Franch. & Sav.) Hosok., uma espécie japonesa de visco. Uma vez que os ensaios foram

realizados utilizando apenas uma concentração, acredita-se que, em concentrações maiores, seja possível observar um desempenho melhor para esta substância, como demonstrado por Wu *et al.* (2017) ao ensaiar diversas concentrações de um componente do azeite de oliva, a oleuropeína.

O desempenho das frações e substâncias de *S. concinnus* foi mais baixo, comparado ao de *S. marginatus*. Observa-se para todas elas as frações testadas um perfil bastante semelhante, com grande incremento da fluorescência até as horas iniciais de experimento, seguido de uma estabilização (**Figura 20b**). Para o obtusifoliol, SC-17 (**Figura 22**), e a mistura de γ -sitosterol (**Figura 23**) e 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona (**Figura 24**), fração SC-18, a estabilização da curva é alcançada primeiro do que para as demais frações testadas, o que pode estar relacionado ao mecanismo de ação das substâncias em questão. Como não é observada uma fase *lag*, sugere-se que as frações estejam atuando como um acelerador da formação de agregados, favorecendo a sua nucleação, sejam eles oligômeros ou de natureza fibrilar.

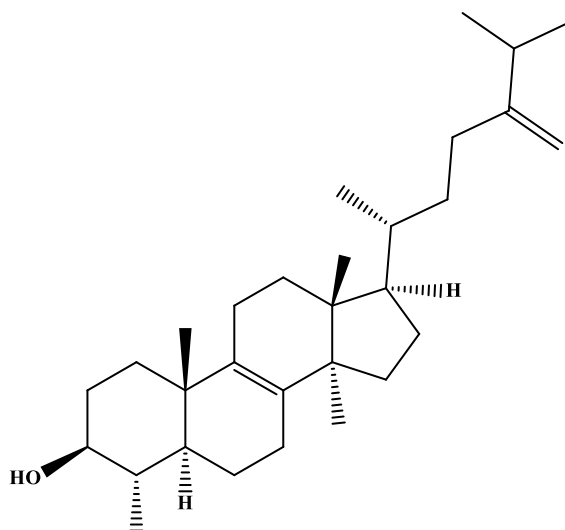


Figura 22. Estrutura química do obtusifoliol.

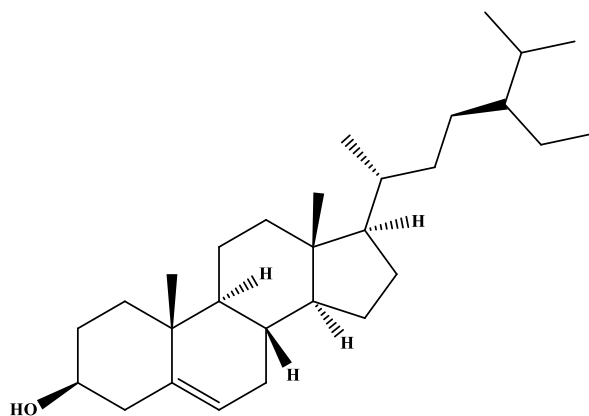


Figura 23. Estrutura química do γ -sitosterol.

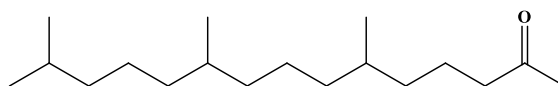


Figura 24. Estrutura química da 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona.

Diversas substâncias de origem natural já foram ensaiadas quanto a sua atividade anti-agregação amiloide em diversos alvos. Observa-se uma grande participação de substâncias fenólicas nestas abordagens, como a apigenina, miricetina, quercitina e o kaempferol, substâncias comuns e já muito descritas em diversas espécies. Os mecanismos de ação observados variam entre a prevenção de mudanças conformacionais, estabilização e/ou formação de agregados não tóxicos, inibição da fibrinogênese, aceleração da polimerização completa e até mesmo a desagregação de agregados pré-formados (Dhouafli *et al.*, 2018).

Para a amilina humana, já foram ensaiadas muitas substâncias de origem vegetal, também com maior registro de substâncias fenólicas, segundo os registros da literatura, por serem moléculas menores e que apresentam as mais variadas interações em sistemas biológicos (Pithadia *et al.*, 2016). Em razão da sua maior polaridade, a presença destas substâncias e seus similares em extratos em hexano em diclorometano é muito limitada, pelo menos tratando-se de substâncias majoritárias. Este fato pode ser interpretado como uma possível nova abordagem na prospecção de substâncias com potencial de inibição da agregação amiloide, a qual investiga substâncias de média a baixa polaridade. Como evidenciado não só pelos resultados provenientes da triagem da extratoteca (dados não mostrados) como pelos resultados apresentados pelos extratos das ervas-de-passarinho, o desempenho principalmente dos extratos SCH, SCD e SMH demonstram ser muito promissores.

Das substâncias que não se enquadram nas categorias de polifenóis e já foram ensaiados na agregação amiloide de proteínas, encontram-se os alcaloides, como a cafeína, a berberina, a betaína, a nicotina, a tetrametilpirazina, a tabersonina, a tetrandrina e a galantamina (He *et al.*, 2011; Chu *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2014; Kai *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2018; Cai *et al.*, 2018; Janitschke *et al.*, 2019; Ren *et al.*, 2019; Cai *et al.*, 2019; Lin *et al.*, 2020; Ma *et al.*, 2020).

A maioria das substâncias supracitadas foram testadas quanto a capacidade de inibição da agregação de peptídeo beta-amiloide (Ma *et al.*, 2020), envolvido na patofisiologia de doença de Alzheimer (*Alzheimer's disease*). Dentre estes, apenas a cafeína foi ensaiada quanto à sua atividade frente a capacidade de inibição de agregação de amilina humana, inibindo a formação dos agregados (Cheng *et al.*, 2011). Saponinas também são descritas, principalmente aquelas isoladas do gênero *Panax*, como os ginsenosídeos, frente ao beta-amiloide e a α -sinucleína (Ardah *et al.*, 2015; Han *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2019; Ma *et al.*, 2020). Nenhuma saponina, no entanto, foi descrita com atividade na agregação amiloide da amilina humana.

Outra evidência a favor de substâncias de maior massa molecular, como triterpenoides, que podem atuar de maneira efetiva no processo de agregação da amilina humana é a azadiractina (**Figura 25**). Este limonoide, isolado de *Azadirachta indica* A. Juss, conhecida popularmente como nim, possui atividade descrita como inseticida (Luntz & Nisbet, 2000) além de apresentar atividade antidiabética em modelos *in vivo* (Dubey *et al.*, 2019). Esta substância foi capaz de inibir a formação de fibras amiloides da amilina, além de atuar na desagregação de fibras pré-formadas e, em modelos de cultura de células, protegê-las da citotoxicidade induzida pelos agregados de IAPP (Dubey *et al.*, 2019).

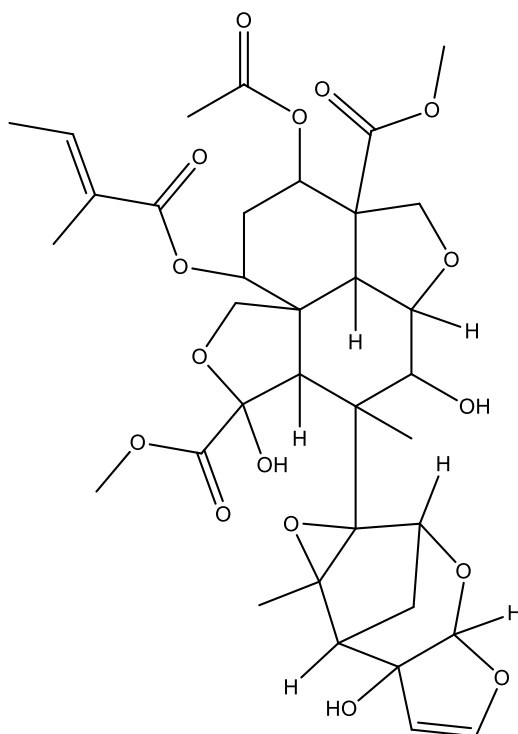


Figura 25. Estrutura da azadiractina.

4.2. Comparação dos extratos etanólicos, em hexano e em diclorometano de *S. marginatus* e *S. concinnus* preparados em 2008 e 2018

O perfil cromatográfico dos extratos em CCD foi o primeiro indício da semelhança grande entre as duas espécies (**Figura 26**). Quando comparadas pelos anos diferentes de preparo dos extratos, também é possível observar um perfil bastante semelhante. Nos extratos produzidos em 2018, observa-se uma grande semelhança entre os extratos em hexano e diclorometano de *S. marginatus* (MH e MD). Para os extratos do mesmo ano, no entanto de *S. concinnus* (CH e CD), esta semelhança não foi observada.

Visualmente, considerando as diferentes extrações, em 2008 e 2018, para os extratos em hexano de *S. concinnus* (SCH e FSCH) e de *S. marginatus* (MH e FMH), nota-se um perfil no qual as principais bandas se repetem inclusive em intensidades de cor semelhantes. O gradiente de bandas de coloração roxa gerado após a revelação com soluções de vanilina e ácido sulfúrico sugerem a presença de esteróis, ácidos graxos e terpenoides, classes químicas já antes relatadas no gênero e esperadas nos extratos preparados, uma vez considerados os solventes extratores.

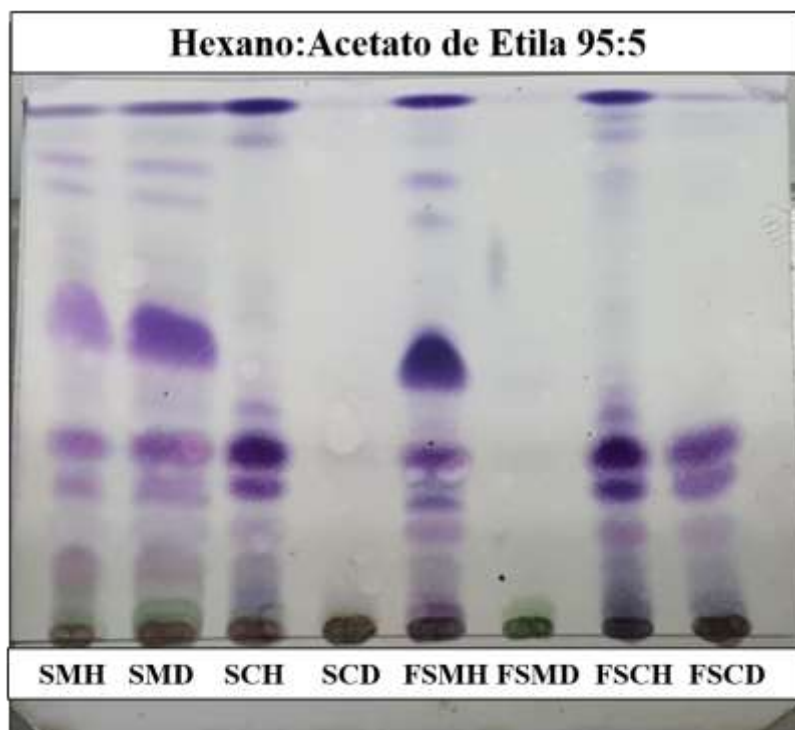


Figura 26. Perfil químico dos extratos em hexano e diclorometano preparados em 2008 e 2018, das espécies *Struthanthus marginatus* e *S. concinnus* por Cromatografia em Camada Delgada (CCD). SMH: Extrato em hexano de *S. marginatus*, preparado em 2018. SMD: Extrato em diclorometano de *S. marginatus*, preparado em 2018. SCH: Extrato em hexano de *S. concinnus*, preparado em 2008. SCD: Extrato em diclorometano de *S. concinnus*, preparado em 2018. FSMH: Extrato em hexano de *S. marginatus*, preparado em 2008. FSMH: Extrato em diclorometano de *S. marginatus*, preparado em 2008. FSCH: Extrato em hexano de *S. concinnus*, preparado em 2008. FSCD: Extrato em diclorometano de *S. concinnus*, preparado em 2008. Eluição: Hexano:Acetato de Etila, na proporção 9,5:0,5.

Duas exceções se destacam: os extratos em diclorometano de *S. concinnus* preparado em 2018 (CD), e o extrato também em diclorometano de *S. marginatus* preparado em 2008 (FMD). Estes extratos apresentaram rendimento muito abaixo dos demais e a composição que também parece se diferenciar. A origem de aplicação concentra as amostras por completo, não sendo possível visualizar a eluição das mesmas nos solventes utilizados na eluição. Observadas sob luz ultravioleta (365nm), nota-se no extrato em diclorometano de 2018 (SCD), duas bandas bastante pronunciadas de fluorescência azul e violeta, sendo as demais bandas de coloração vermelha, como no extrato em diclorometano de *S. marginatus* (2008) (dados não mostrados).

4.3. Comparação do perfil químico dos extratos etanólicos, em hexano e em diclorometano preparados em 2008 e 2018 por DI-APCI(±)-MS

Diante da confirmação do bom desempenho dos extratos nos ensaios de fibrilação da amilina, julgou-se necessária que uma análise química preliminar comparativa entre os extratos de 2008 e 2018 fosse realizada, para um maior conhecimento das amostras e também para incremento dos dados acerca das ervas-de-passarinho. Além disso, a comparação visava verificar as semelhanças e diferenças entre os extratos, considerando as diferentes épocas de coleta, os hospedeiros e o local de coleta. Estas análises foram realizadas com base nos íons mais intensos extraídos dos espectros totais.

Para *Struthanthus*, a maioria dos estudos de composição química foi realizado por cromatografia gasosa (Cordero *et al.*, 2003; Freire *et al.*, 2011; Cunha *et al.*, 2012; Leitão *et al.*, 2013; Siqueira *et al.*, 2016 Marques *et al.*, 2017), sendo menos frequentes aqueles relacionados ao perfil das espécies por técnicas de ionização a pressão atmosférica como ESI e APCI. Sendo assim, as análises foram realizadas com fonte de ionização por APCI, nos modos de ionização positivo e negativo que abrangem uma margem maior de detecção. A fonte de ionização por APCI foi escolhida uma vez que contempla a maior parte das substâncias, favorecendo a melhor ionização de substâncias de natureza menos polar (Garcia-Ac *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2015)

Comparativamente, nos extratos etanólicos de *S. marginatus* (**Figura 27**), observa-se uma grande semelhança entre os perfis químicos, tanto em modo positivo quanto em modo negativo por APCI considerando que a extração das amostras de 2018 foram realizadas 10 anos depois, o que pode indicar uma boa estabilidade desses extratos. Em modo positivo (**Figura 27a e 27b**), é possível notar a grande semelhança dos extratos na região de m/z 500 a 600, além da presença, nos dois extratos, de íons comuns, como m/z 593, 621 e 696. Já em modo negativo (**Figura 27c e 27d**), também é possível observar a repetição de alguns íons entre os extratos de 2008 e 2018, como m/z 431, 563, 695, 709. Na região de m/z 500 – 900 os extratos também guardam grande semelhança tanto nos íons apresentados, como em sua abundância relativa.

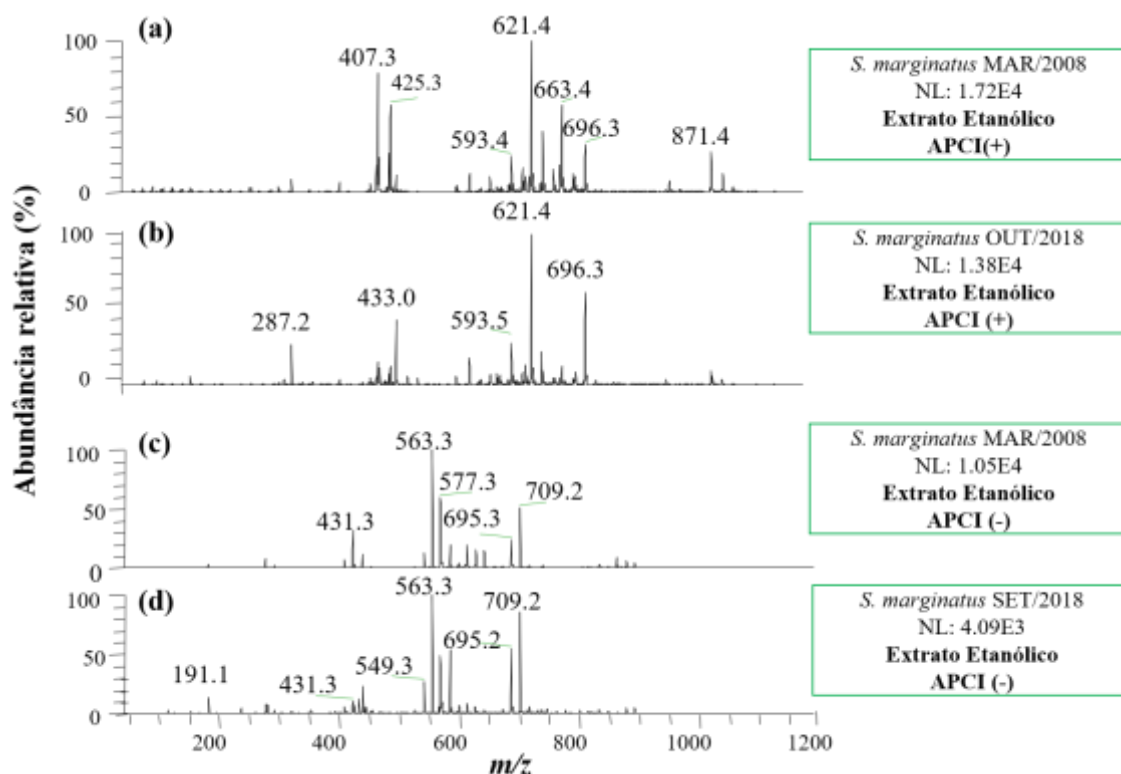


Figura 27. Espectro de íons totais dos extratos etanólicos de *S. marginatus* preparados em 2008 e em 2018, por infusão direta em APCI, nos modos de ionização positivo (a e b) e negativo (c e d).

No geral, em *S. concinnus*, em APCI positivo, os perfis químicos dos extratos também são muito semelhantes (**Figura 28a e 28b**). É possível observar a variação da maioria dos íons entre cerca de m/z 90 a 700. Nota-se a repetição de íons bastante representativos m/z 397, 409, 423, 621 e 696. Em modo negativo (**Figura 28c e 28d**), é possível observar a grande diferença entre os perfis dos extratos etanólicos, entre os anos distintos. Embora seja possível verificar íons que se repetem (m/z 620 e 634), a quantidade de íons é superior no extrato de 2018 e também é possível observar, neste extrato, que são evidenciados tanto íons de m/z superior a 800, quanto inferior a m/z 400. O extrato de 2008, por sua vez, concentra os íons entre m/z 400 a 750.

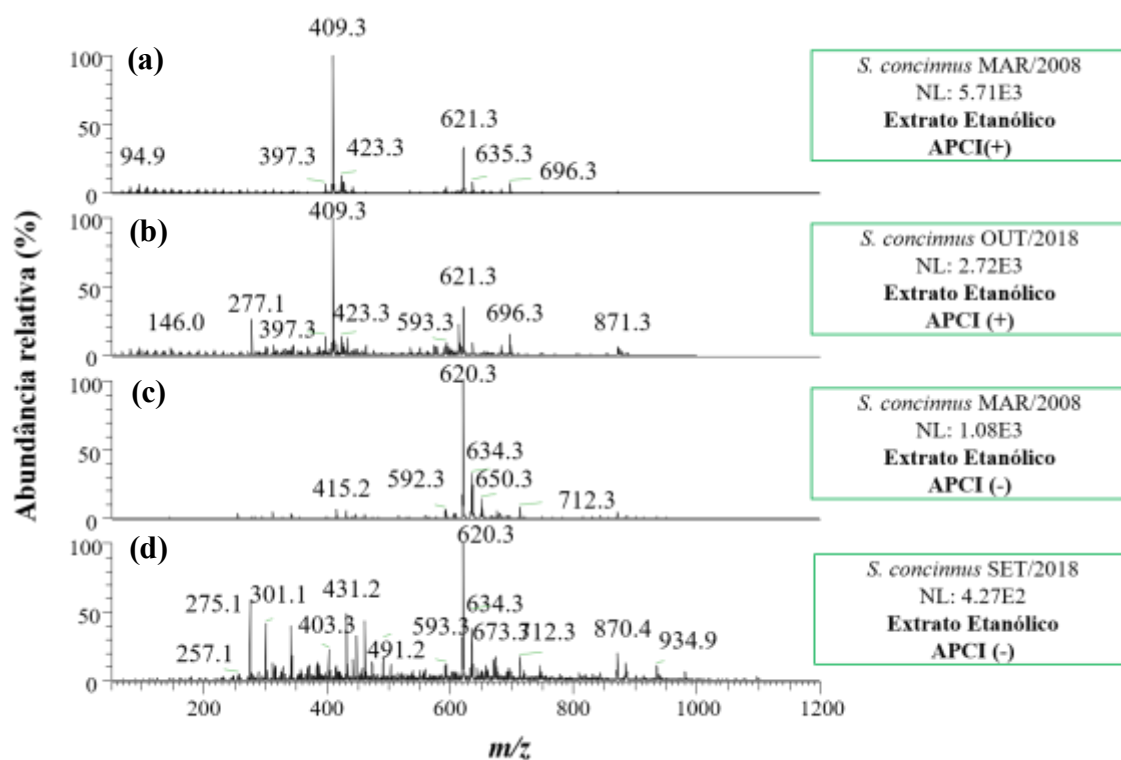


Figura 28. Espectro de íons totais dos extratos etanólicos de *S. concinnus* preparados em 2008 e em 2018, por infusão direta em APCI, nos modos de ionização positivo (a e b) e negativo (c e d).

Quando comparados através de um Diagrama de Venn, os extratos etanólicos preparados em 2008 e 2018, das duas espécies, geraram as **Tabelas 2 e 3**. Entre as duas espécies, os extratos de *S. marginatus* (FSM e SM) em APCI (-) possuem a maior semelhança entre os íons (66%) do que os extratos de *S. concinnus* (28%), como pôde ser observado visualmente pelo *fingerprint* dos extratos. O mesmo é observado para APCI (+), no qual os extratos de *S. marginatus* são mais semelhantes (60%) entre os diferentes anos de coleta, do que os extratos de *S. concinnus* (46%).

Tabela 2. Comparativo dos íons encontrados por APCI (-) nos diferentes extratos etanólicos de *S. marginatus* e *S. concinnus* entre os anos de 2008 e 2018.

Identificação APCI (-)	Total	Íons (m/z)	Total comum	Íons comuns (m/z)
FSC	13 (47%)	576; 712; 592; 651; 650; 633; 622; 886; 636; 653; 619; 637; 748	8 (28%)	634; 870; 620; 431; 621; 635; 431
SC	7 (25%)	831; 871; 884; 251; 673; 461; 593		
FSM	6 (16%)	887; 638; 650; 651; 448; 652	25 (66%)	621; 620; 593; 565; 696; 637; 580; 709; 870; 710; 8720; 622; 447; 871; 578; 594; 579; 695; 564; 636; 563; 577; 431; 432
SM	7 (18%)	635; 885; 884; 634; 607; 619; 886		

Tabela 3. Comparativo dos íons encontrados por APCI (+) nos diferentes extratos etanólicos de *S. marginatus* e *S. concinnus* entre os anos de 2008 e 2018.

Identificação APCI (+)	Total	Íons (m/z)	Total comum	Íons comuns (m/z)
SFSC	16 (33%)	620; 565; 638; 637; 609; 589; 536; 535; 639; 653; 564; 563; 425; 651; 681; 619	22 (46%)	621; 593; 407; 682; 635; 696; 410; 424; 872; 534; 622; 871; 623; 423; 697; 594; 636; 577; 409; 411; 624
SC	10 (21%)	575 ;433; 576; 614; 596; 613; 397; 615; 874; 574		
FSM	14 (30%)	887; 638; 637; 609; 536; 697; 613; 535; 610; 639; 564; 563; 651; 652	28 (60%)	621; 680; 679; 593; 407; 696; 433; 410; 595; 661; 662; 424; 872; 622; 664; 871; 623; 423; 594; 665; 663; 426; 425; 406; 408; 409; 405;
SM	5 (10%)	682; 635; 636; 874; 624		

Os perfis dos extratos ativos frente a agregação amiloide da amilina humana estão expostos nas **Figuras 29 a 32**. Para *S. marginatus*, é possível observar que tanto em modo positivo (**Figura 29a e 29b**), quanto em modo negativo (**Figura 29c e 29d**), que o extrato em hexano de 2008 concentra o maior número de íons. Nota-se também a repetição dos íons *m/z* 621, 663 e 871 entre os extratos de anos distintos em modo

positivo, enquanto que o perfil dos extratos em modo negativo aparenta ser bastante diferente. Nos extratos em diclorometano desta espécie, em modo positivo (**Figura 30a e 30b**), existe uma concentração dos íons entre m/z 500 a 700, fazendo com que o perfil de íons seja semelhante entre os extratos, sendo possível notar também sutis diferenças na abundância relativa dos sinais. Quanto ao modo negativo (**Figura 30c e 30d**), assim como os extratos em hexano, os extratos em diclorometano possuem perfil químico diferentes entre si. O extrato em 2008 possui maior número e de íons.

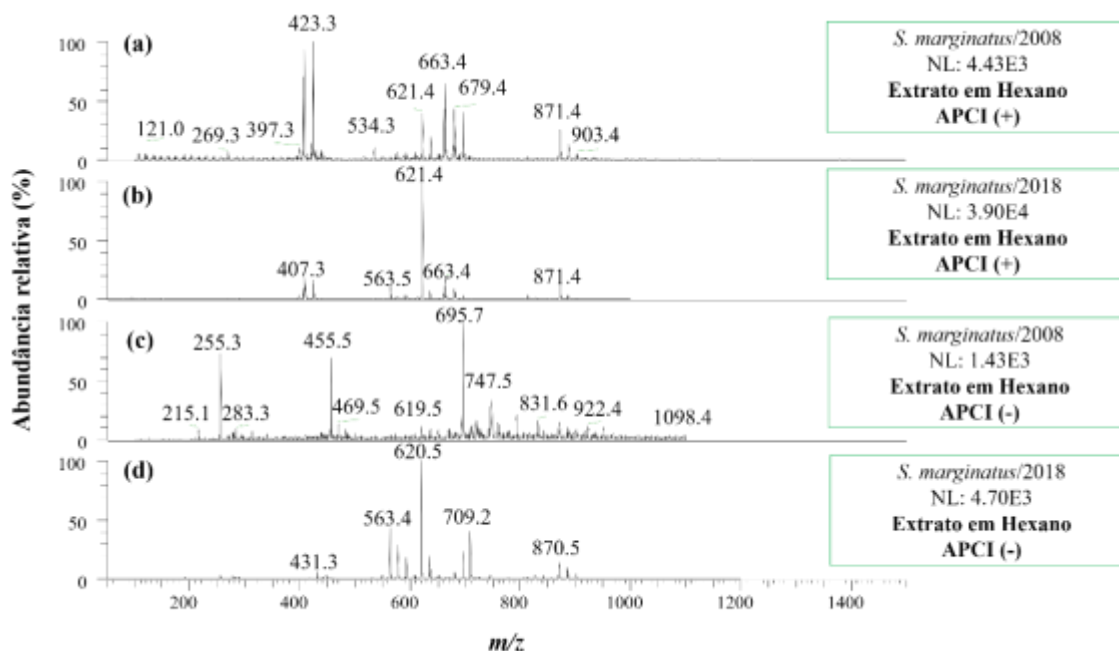


Figura 29. Espectro de íons totais dos extratos em hexano de *S. marginatus* preparados em 2008 e em 2018, por infusão direta em APCI, nos modos de ionização positivo (a e b) e negativo (c e d).

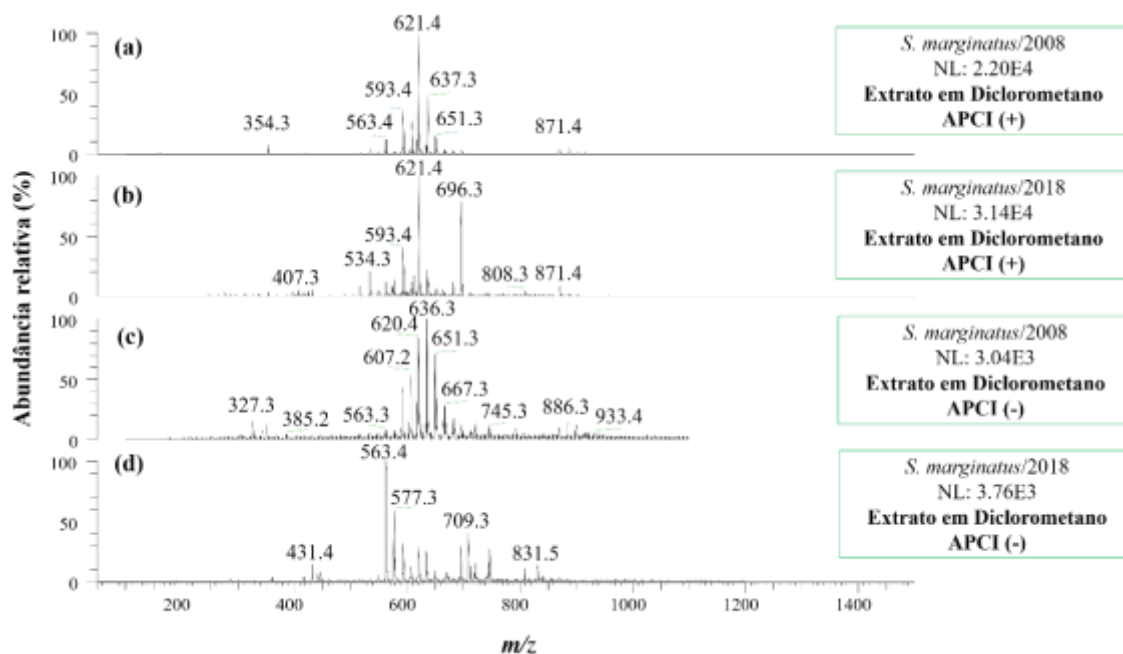


Figura 30. Espectro de íons totais dos extratos em diclorometano de *S. marginatus* preparados em 2008 e em 2018, por infusão direta em APCI, nos modos de ionização positivo (a e b) e negativo (c e d).

Assim como observado para *S. marginatus*, o perfil químico dos extratos em hexano e diclorometano, em anos distintos, de *S. concinnus* possuem perfil semelhante em APCI positivo (**Figura 31a e 31b**) e perfil distinto em modo negativo (**Figura 31c e 31d**). Nos extratos em hexano, em modo positivo, é possível notar a repetição de 4 íons, m/z 409, 423, 621 e 871. Já no modo negativo, os extratos se apresentam com os perfis químicos muito distintos entre si. Os extratos em diclorometano de *S. concinnus* são os que concentram o maior número de diferenças (**Figura 32**). Seja em modo positivo (**Figura 32a e 32b**) ou em modo negativo (**Figura 32c e 32d**) os extratos de 2008 não só concentram uma maior quantidade de íons quando comparados aos extratos de 2018, como também apresentam um perfil de distribuição destes íons bastante diferente.

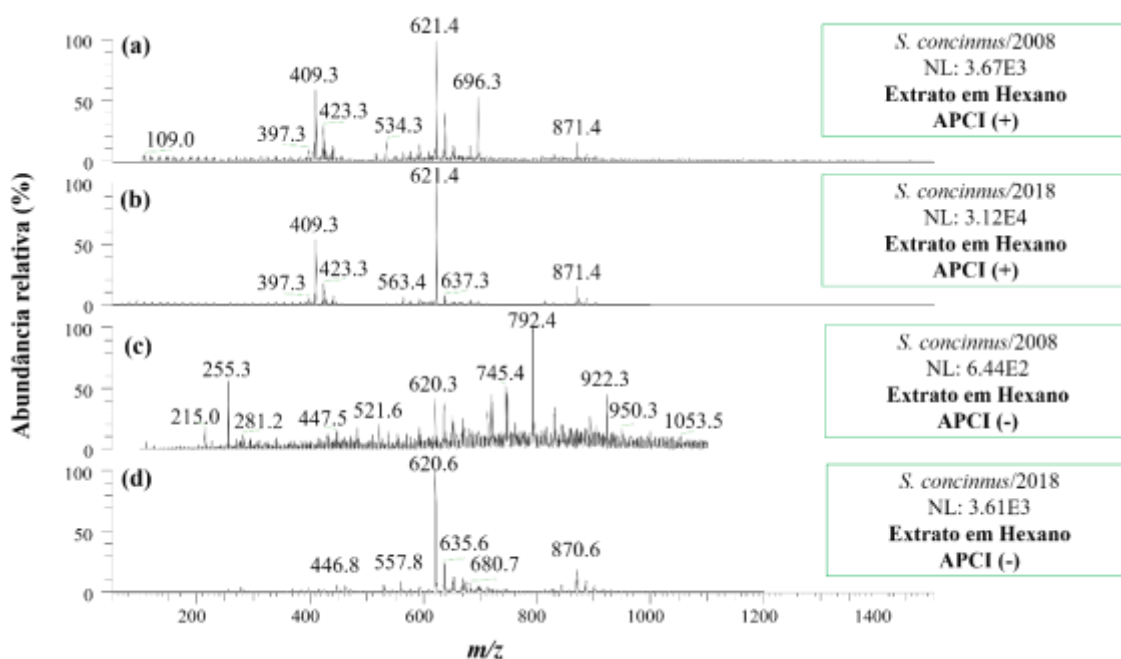


Figura 31. Espectro de íons totais dos extratos em hexano de *S. concinnus* preparados em 2008 e em 2018, por infusão direta em APCI, nos modos de ionização positivo (a e b) e negativo (c e d).

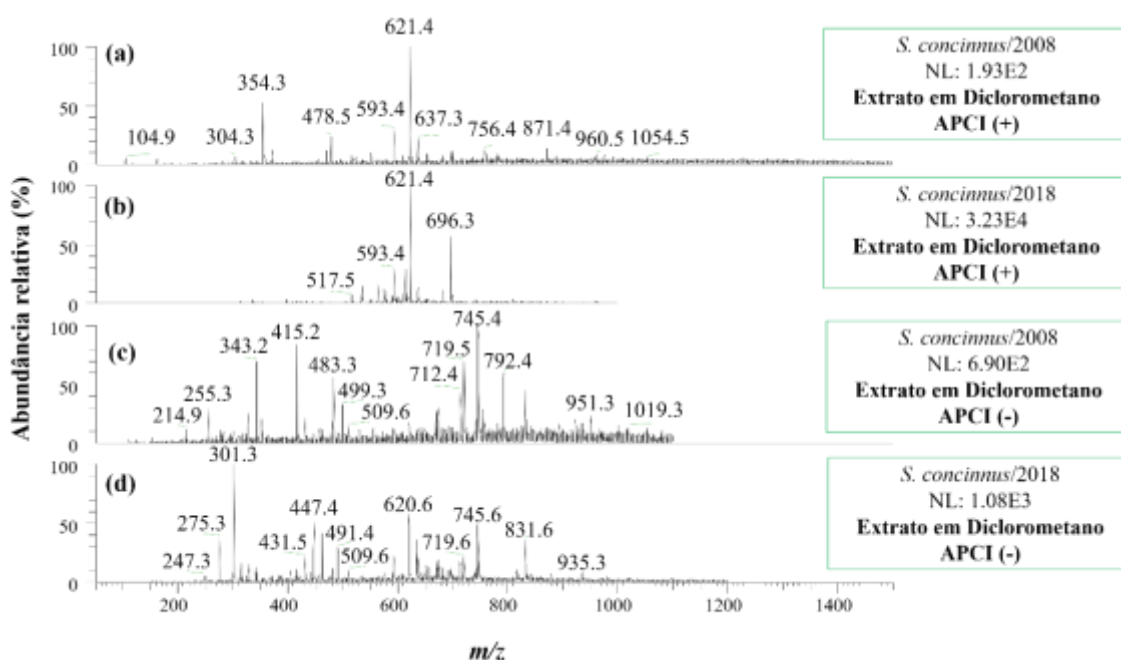


Figura 32. Espectro de íons totais dos extratos em diclorometano de *S. concinnus* preparados em 2008 e em 2018, por infusão direta em APCI, nos modos de ionização positivo (a e b) e negativo (c e d).

Os extratos ativos frente à agregação da amilina (hexano e diclorometano) em APCI positivo e negativo também foram comparados através de um diagrama de Venn, baseado nos 200 íons mais abundantes, gerando a **Tabela 4**, para APCI(-) e a **Tabela 5**, para APCI (+). Os extratos FSCD e SCD são os mais semelhantes entre si (49%),

seguidos pelos extratos FSCH e SCH, com 31%, e pelos extratos em hexano (FSMH e SMH) e diclorometano (FSMD e SMD), com 22% de íons comuns.

Tabela 4. Comparativo dos íons encontrados por APCI (-) nos extratos em hexano e diclorometano de *S. marginatus* e *S. concinnus* entre os anos de 2008 e 2018.

Identificação APCI (-)	Total	Íons (m/z)	Total comum	Íons comuns (m/z)
FSCH	18 (40%)	831; 720; 793; 255; 713; 749; 746; 922; 722; 719; 721; 747; 712; 748; 750; 745; 832; 792	14 (31%)	621; 620; 638; 635; 637; 654; 674; 669; 670; 653; 636; 651; 652
SCH	13 (29%)	673; 887; 696; 870; 872; 622; 871; 623; 634; 671; 695; 619; 886		
FSMH	22 (52%)	743; 831; 720; 793; 255; 713; 749; 746; 744; 722; 671; 719; 721; 669; 747; 712; 651; 748; 750; 745; 832; 792	9 (22%)	620; 887; 696; 870; 872; 871; 695; 636; 886
SMH	11 (26%)	621; 593; 635; 637; 622; 623; 634; 594; 431; 619; 432		
FSCD	7 (18%)	793; 255; 922; 671; 950; 750; 792	19 (49%)	743; 673; 831; 720; 713; 749; 746; 744; 722; 719; 669; 670; 747; 712; 748; 431; 745; 832
SCD	13 (33%)	621; 593; 635; 696; 637; 193; 674; 650; 622; 634; 594; 636; 432		
FSMD	10 (31%)	620; 638; 637; 654; 623; 669; 653; 651; 652; 619	7 (22%)	621; 593; 635; 650; 622; 594; 636
SMD	15 (47%)	831; 696; 713; 722; 634; 721; 695; 747; 712; 748; 431; 745; 832; 432		

Em APCI positivo (**Tabela 5**), os extratos demonstram proporção de íons comuns maiores do que em APCI negativo. Os extratos mais semelhantes entre si são FSMH e SMH, com 65% de íons compartilhados. Em seguida, notam-se os extratos FSCD e SCD, com 54% de semelhança, e por último os extratos FSMD e SMD, com 48%, e os extratos FSCH e SCH, com 38%.

Tabela 5. Comparativo dos íons encontrados por APCI (+) nos diferentes extratos etanólicos, em hexano e em diclorometano de *S. marginatus* e *S. concinnus* entre os anos de 2008 e 2018.

Identificação APCI (-)	Total	Íons (m/z)	Total comum	Íons comuns (m/z)
FSCH	16 (33%)	593; 654; 609; 589; 611; 697; 607; 610; 639; 683; 663; 653; 651; 681; 652; 619	18 (38%)	621; 620; 887; 638; 682; 635; 696; 637; 872; 622; 888; 871; 623; 594; 636; 873; 624
SCH	14 (29%)	407; 410; 424; 423; 613; 397; 564; 563; 425; 408; 874; 411; 409; 405		
FSMH	4 (10%)	638; 534; 888; 697	26 (65%)	621; 680; 679; 887; 407; 682; 696; 661; 662; 424; 872; 622; 664; 871; 623; 423; 665; 663; 873; 425; 406; 681; 408; 409; 405
SMH	10 (25%)	565; 635; 410; 589; 594; 564; 426; 636; 563; 624		
FSCD	13 (26%)	407; 410; 424; 872; 871; 423; 397; 639; 683; 653; 425; 619; 409	27 (54%)	621; 593; 638; 682; 635; 575; 696; 637; 576; 609; 517; 534; 622; 536; 623; 611; 697; 516; 578; 613; 594; 535; 610; 577; 624; 574
SCD	10 (20%)	565; 595; 589; 614; 596; 615; 564; 636; 563; 681		
FSMD	6 (13%)	620; 887; 639; 651; 652; 619;	23 (48%)	621; 593; 638; 635; 696; 637; 654; 609; 595; 872; 622; 596; 871; 623; 594; 607; 535; 610; 653; 564; 563; 624
SMD	19 (39%)	407; 682; 575; 576; 517; 534; 614; 664; 536; 697; 613; 578; 516; 665; 683; 615; 636; 577; 574		

4.4. Perfil Químico dos extratos em hexano e diclorometano de *S. marginatus* e *S. concinnus* preparados em 2008 e 2018 por GC-MS

Os extratos preparados em 2008 (FSMH, FSMD, FSCH e FSCD) e 2018 (SMH, SMD, SCH e SCD) foram analisados por GC-MS, uma técnica tipicamente utilizada na pesquisa em produtos naturais para a detecção de substâncias de baixa polaridade (David *et al.*, 2013).

Quanto ao perfil por Cromatografia Gasosa, os extratos em hexano de *S. marginatus* preparados em anos distintos apresentam um perfil bastante semelhante (**Figura 33a**). Com exceção da região entre 10 e 12 min, a diferença entre os cromatogramas parece relacionar-se apenas a abundância da substância em questão. Os cromatogramas dos extratos em diclorometano desta espécie (**Figura 33b**), também guardam semelhanças, embora neste caso seja mais pronunciada a diferença entre as abundâncias relativas dos sinais, principalmente na área de 20 a 22 min. É também possível observar uma diferença na região até 7 min, que está presente no extrato de 2018 e ausente no extrato de 2008.

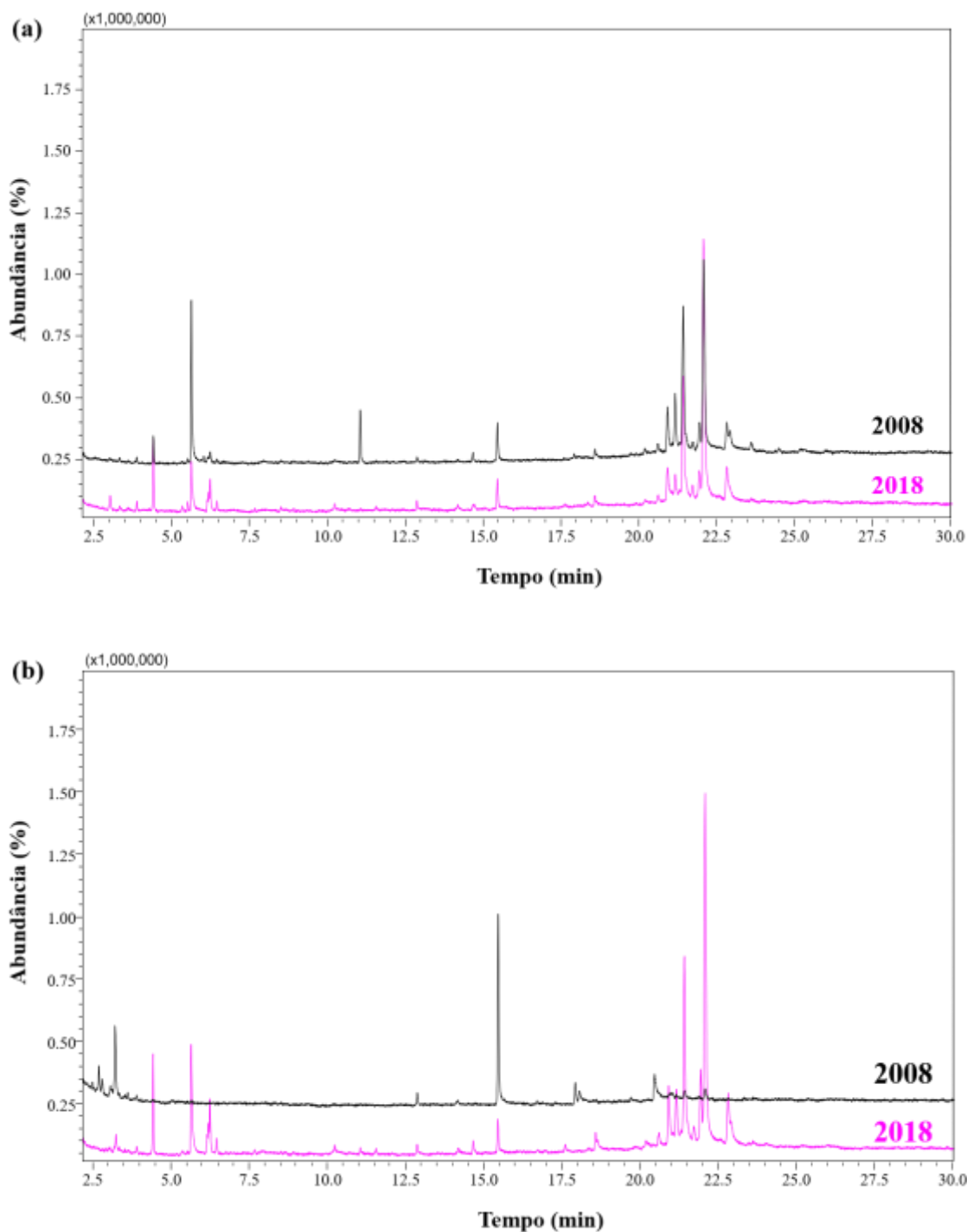


Figura 33. Comparação dos cromatogramas de íons totais em GC-MS dos extratos em hexano e diclorometano, de *Struthanthus concinnus*, preparados em 2008 e 2018. (a) Extratos em hexano de *S. marginatus*. (b) Extratos em diclorometano de *S. marginatus*.

Já para os extratos de *S. concinnus* (**Figura 34**), as diferenças entre os extratos são maiores. Os extratos em hexano e diclorometano de 2008, como já observado pelo perfil em CCD, são bastante semelhantes entre si. Quando comparados aos extratos de 2018, no entanto, apresentam consideráveis diferenças. Os extratos em hexano (**Figura 34a**) parecem apresentar diferenças maiores em abundância das substâncias, além de ser

possível observar que o extrato de 2008 parece ser mais rico quando comparado ao de 2018. Quanto aos extratos em diclorometano (**Figura 34b**), observa-se que não houve detecção de substâncias pelo método utilizado no extrato de 2018, fazendo com que seja muito o mais distinto de todos os extratos em seu perfil de substâncias orgânicas voláteis.

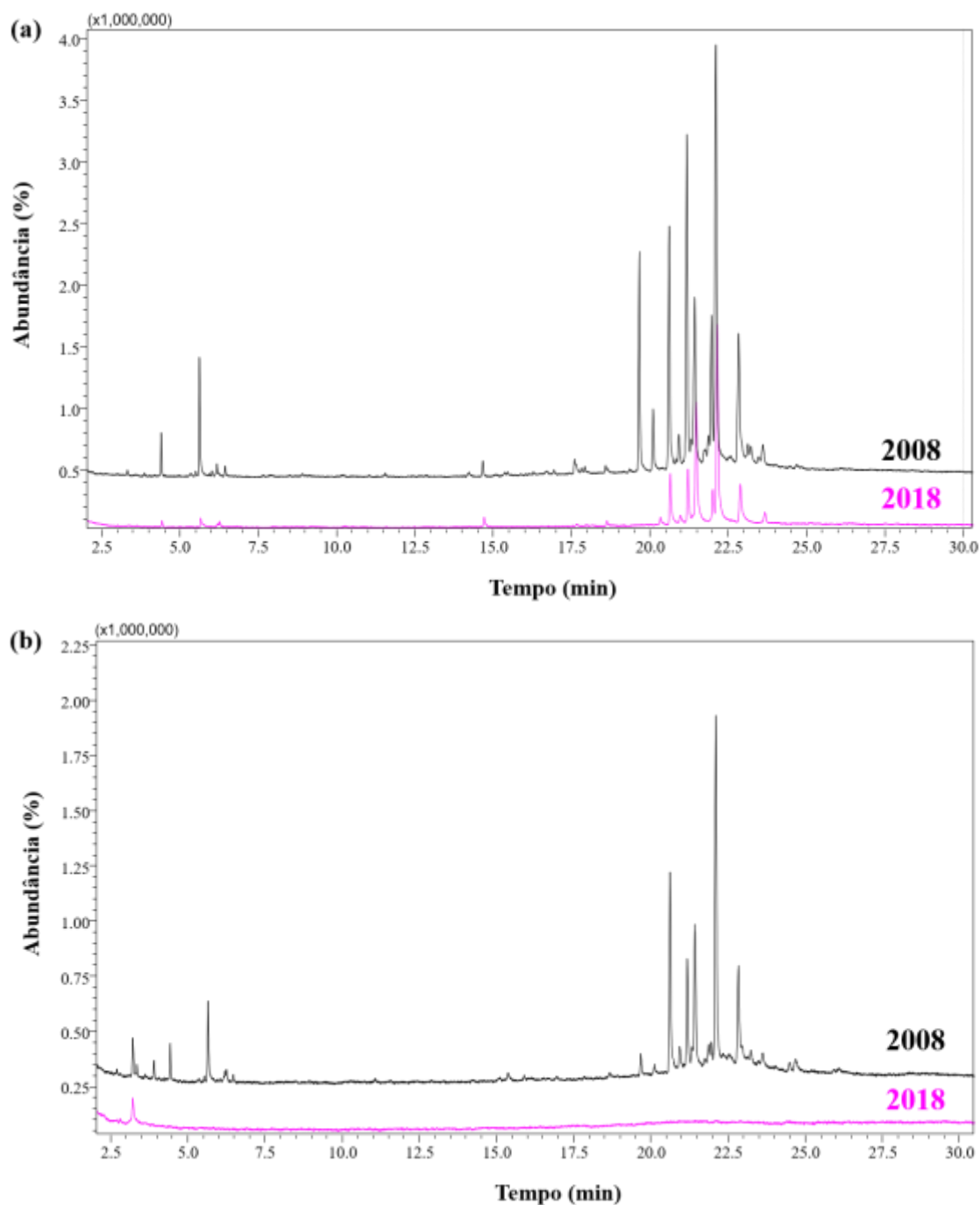


Figura 34. Comparação dos cromatogramas de íons totais em GC-MS dos extratos em hexano e diclorometano, de *Struthanthus marginatus*, preparados em 2008 e 2018. (a) Extratos em hexano de *S. concinnus*. (b) Extratos em diclorometano de *S. concinnus*.

Dos 65 picos integrados em todos os extratos analisados, com exceção do extrato em diclorometano de 2018 de *S. concinnus*, 33 puderam ser putativamente anotados considerando a sua similaridade espectral igual ou superior a 90%, quando comparada a uma base de dados (**Figuras 35 a 39**). Dentre as substâncias anotadas, estão presentes representantes de classe como ésteres de ácidos graxos, alcanos e terpenoides (**Quadro 3**). O fitol, por exemplo, identificado por Leitão *et al.* (2013) em frações dos extratos em hexano das duas espécies, pôde ser também encontrado nos extratos em hexano de *S. marginatus* e *S. concinnus* preparados em 2018 e no extrato em diclorometano de *S. marginatus* do mesmo ano. Além disso, das substâncias propostas, algumas (ou semelhantes) estão descritas também para o gênero, confirmando os dados fornecidos pela literatura (Freire *et al.*, 2011; Cunha *et al.*, 2012; Siqueira *et al.*, 2016). No entanto, não são encontrados registros da atividade destas substâncias frente a agregação amiloide da amilina.

Quadro 3. Presença das substâncias anotadas por GC-MS nos extratos em hexano e diclorometano, preparados em 2008 e 2018, das ervas-de-passarinho *Struthanthus marginatus* e *Struthanthus concinnus*.

Substância anotada	FSMH	FSMD	FSCH	FSCD	SMH	SMD	SCH	SCD
palmitato de etila	X		X	X	X	X	X	
fitol	X		X	X	X	X		
β-amirona	X			X	X	X		
linolenato de etila					X	X		
tetratriacontano					X	X		
heneicosano	X							
pentacosano		X	X				X	
esqualeno			X				X	
cicloartenol			X					
3β-24-metilenocicloartan-3-ol			X					
glicerol								X
ácido succínico								X
ácido málico								X
ácido alfa-linolênico								X
glicose								X
ácido palmítico								X
obtusilfoliol				X				

Nos extratos em hexano de *S. marginatus*, considerando os dois anos distintos (**Figuras 35 e 36**), foram anotados o palmitato de etila, o fitol e a β -amirona. Apenas no extrato preparado em 2018 foram também anotados o linolenato de etila e o tetratriacontano. Já o heneicosano foi anotado apenas no extrato de 2008, também já identificado em *S. syringifolius* (Cunha *et al.*, 2012). Nesta mesma espécie foi identificado o palmitato de metila, que assim como o palmitato de etila, são ésteres do ácido palmítico, um ácido graxo com atividade anti-inflamatória, muito comum em plantas superiores (Saeed *et al.*, 2012; Zhukov, 2015).

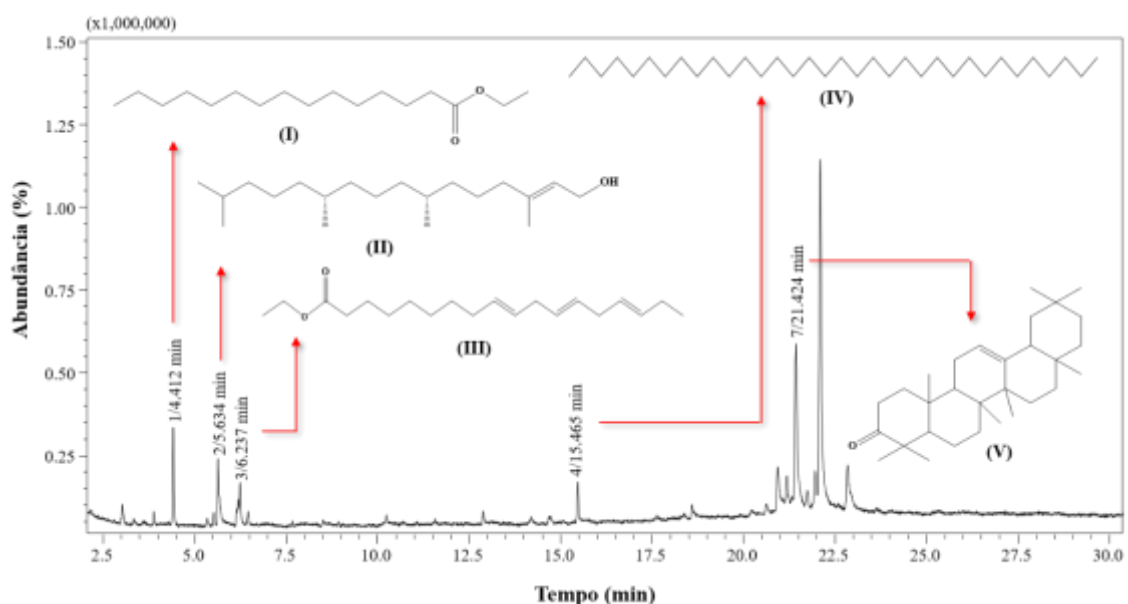


Figura 35. Substâncias identificadas com similaridade espectral superior ou igual a 90% no extrato em hexano de *Struthanthus marginatus*, preparado em 2018. Cromatograma de íons totais por GC-MS. (I) palmitato de etila, com score de (95%). (II) fitol, com score de 92%. (III) linolenato de etila, com score de 90%. (IV) tetratriacontano, com score de 94%. (V) β -amirona, com score de 91%.

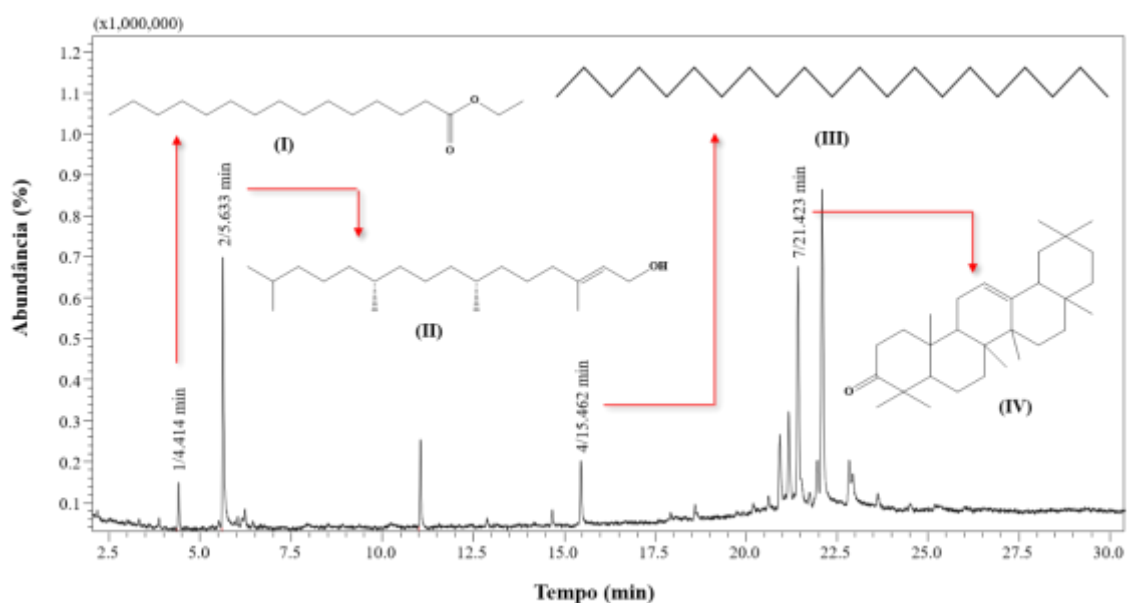


Figura 36. Substâncias identificadas com similaridade espectral superior ou igual a 90% no extrato em hexano de *Struthanthus marginatus*, preparado em 2008. Cromatograma de íons totais por GC-MS. (I) palmitato de etila, com score de (93%). (II) fitol, com score de 97%. (III) heneicosano, com score de 94%. (IV) β -amirona, com score de 90%.

Para a mesma espécie, nos extratos em diclorometano (**Figura 37 e 38**), dos 17 picos integrados no total, 6 foram anotados com similaridade espectral superior a 90%. No extrato de 2018 (**Figura 37**) foram anotados o palmitato de etila (95%), o fitol (96%), o linolenato de etila (92%), o tetratriacontano (94%) e a β -amirona (91%). No extrato de 2008 (**Figura 38**), apenas o hidrocarboneto pentacosano foi anotado com similaridade espectral superior a 90% (97%).

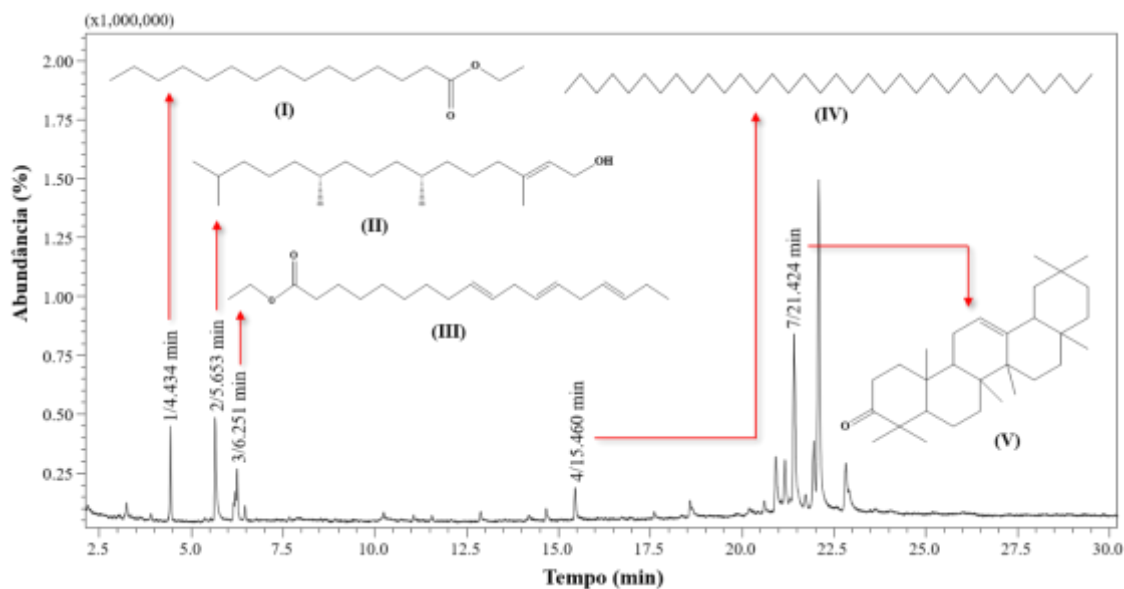


Figura 37. Substâncias identificadas com similaridade espectral superior ou igual a 90% no extrato em diclorometano de *Struthanthus marginatus*, preparado em 2018. Cromatograma de íons totais por GC-MS. (I) palmitato de etila, com score de 95%. (II) fitol, com score de 96%. (III) linolenato de etila, com score de 92%. (IV) tetratriacontano, com score de 94%. (V) β -amirona, com score de 91%.

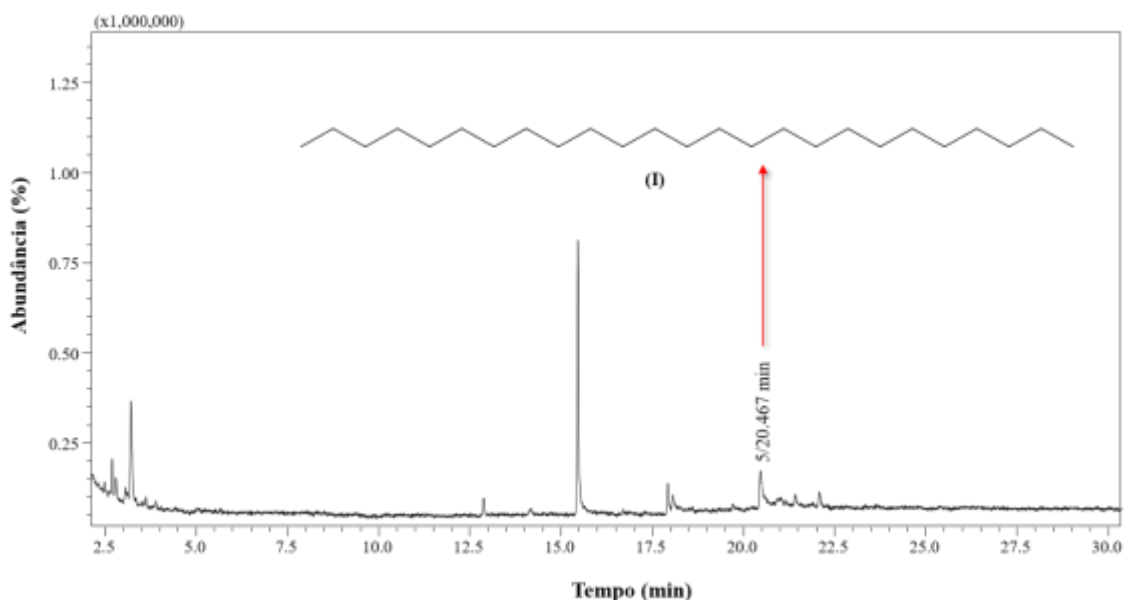


Figura 38. Substâncias identificadas com similaridade espectral superior ou igual a 90% no extrato em diclorometano de *Struthanthus marginatus*, preparado em 2008. Cromatograma de íons totais por GC-MS. (I) pentacosano, com score de 97%.

Quanto a *S. concinnus*, no extrato em hexano de 2018 foram identificadas apenas duas substâncias com similaridade espectral superior a 90%: o fitol e o esqualeno, ambos com score de 92% (**Figura 39**). No extrato de 2008 (**Figura 40**), foram anotados o palmitato de etila (95%) (**Figura 41I**), o fitol (97%) (**Figura 41II**), o esqualeno (93%) (**Figura 41III**), a β -amirona (91%) (**Figura 41IV**), o cicloartenol (91%) (**Figura 41V**) e o

3 β -24-metilenocicloartan-3-ol (92%) (**Figura 41VI**). O esqualeno, já foi registrado em espécies da família Loranthaceae, no extrato em hexano das folhas de *Scurrula parasitica* L. (Muhammad *et al.*, 2018). O esqualeno é um precursor da biossíntese de fitoesteróis e de colesterol em plantas, substâncias comuns em extratos em hexano (Lou-Bonafonte *et al.*, 2018).

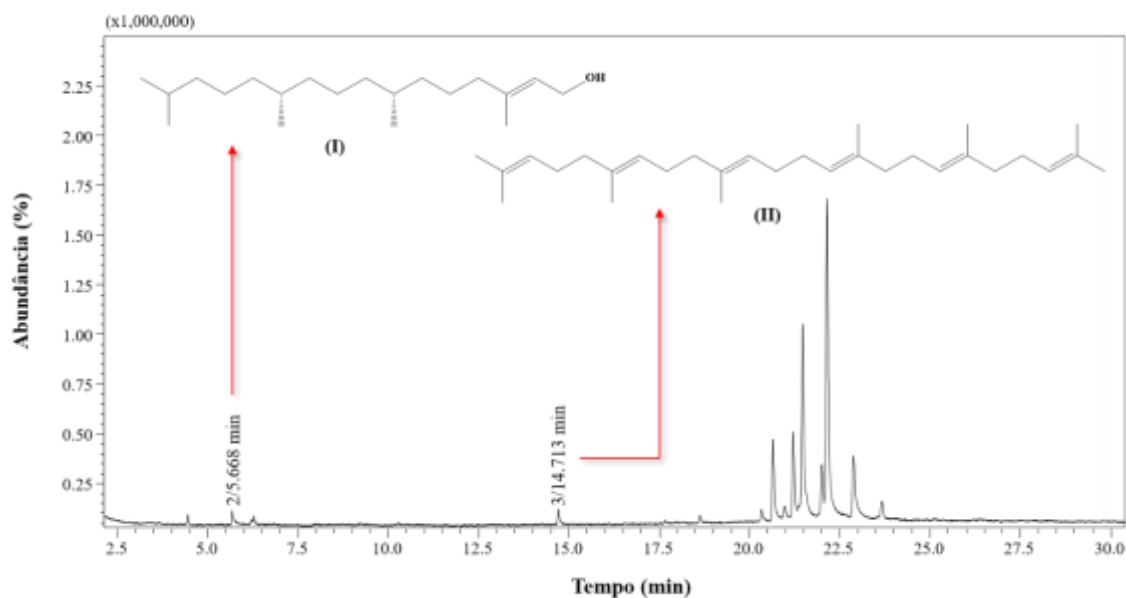


Figura 39. Substâncias identificadas com similaridade espectral superior ou igual a 90% no extrato em hexano de *Struthanthus concinnus*, preparado em 2018. Cromatograma de íons totais por GC-MS. (I) fitol, com score de 92%. (II) esqualeno, com score de 92%.

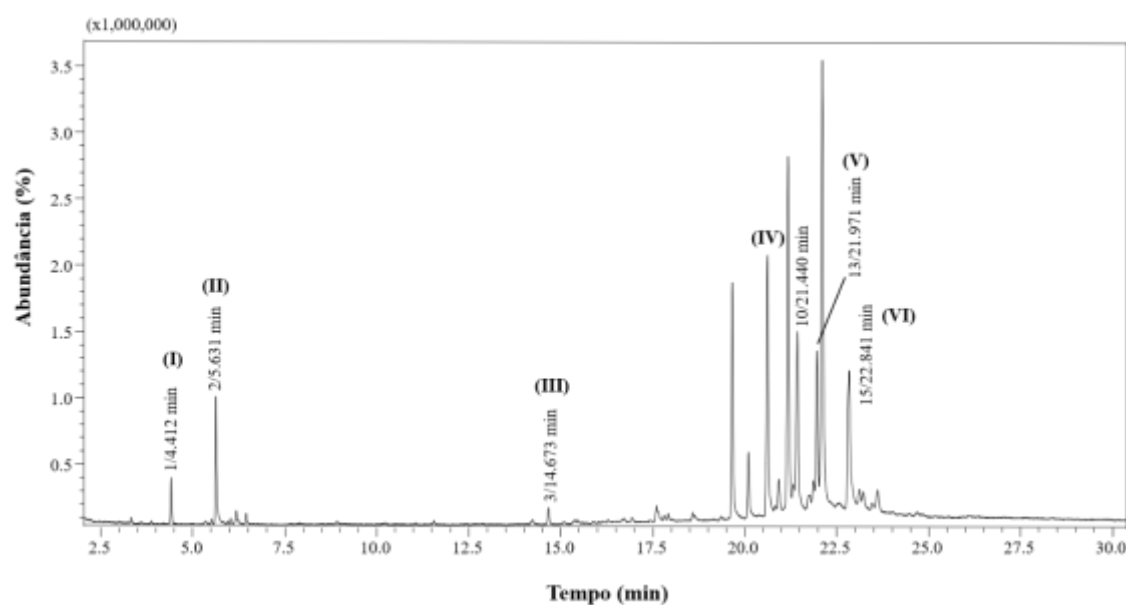


Figura 40. Substâncias identificadas com similaridade espectral superior ou igual a 90% no extrato em hexano de *Struthanthus concinnus*, preparado em 2008. Cromatograma de íons totais por GC-MS. (I) palmitato de etila, com score de 95%. (II) fitol, com score de 97%. (III) esqualeno, com score de 93%. (IV)

β -amirona, com score de 91%. (V) cicloartenol, com score de 91%. (VI) 3 β -24-metilenocicloartan-3-ol, com score de 92%.

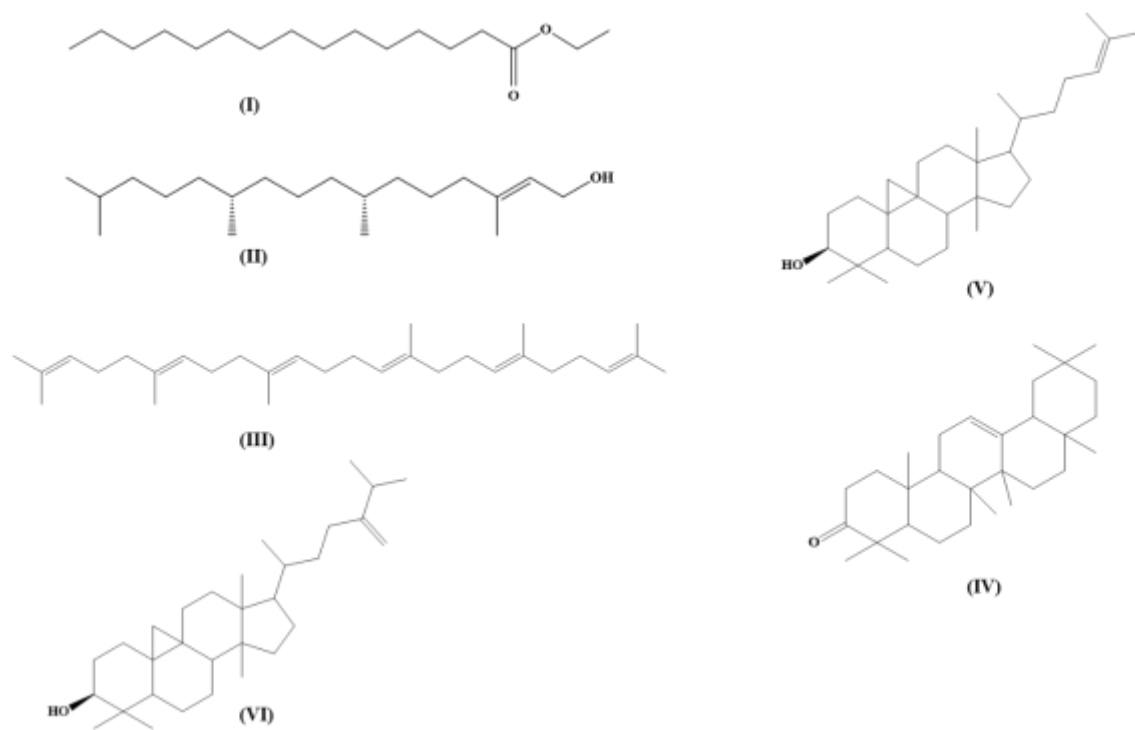


Figura 41. Estruturas químicas das substâncias identificadas por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas no extrato em hexano, preparado em 2008 de *Struthanthus concinnus*. (I) Palmitato de etila, com score de 95%. (II) fitol, com score de 97%. (III) esqualeno, com score de 93%. (IV) β -amirona, com score de 91%. (V) cicloartenol, com score de 91%. (VI) 3 β -24-metilenocicloartan-3-ol, com score de 92%.

Uma vez que o método utilizado para os demais extratos pareceu não se mostrar eficiente para revelar a composição química do extrato em diclorometano de *S. concinnus* (2018) (**Figura 34b**), foi realizada uma derivatização da amostra para favorecer a volatilização das substâncias. Após este processo, foi possível observar a diferença de natureza química das substâncias detectadas neste extrato em relação aos demais, com muitas proposições de açúcares, embora com scores relativamente baixos (**Tabela 6**).

Tabela 6. Proposições de identificação das substâncias presentes no extrato em diclorometano derivatizado (BSTFA) de *Struthanthus concinnus*. TR = tempo de retenção em minutos. As fórmulas apresentadas foram sugeridas com base na comparação com a base de dados NIST 5, já considerando a adição de grupamentos do reagente de derivatização. (continua)

Pico	TR (min)	Similaridade (%)	Anotação proposta	Massa molecular (g.mol ⁻¹)	Fórmula gerada
1	9,750	93	trimetilsilil éter de glicerol	308	C ₁₂ H ₃₂ O ₃ Si
2	10,231	93	ácido succínico, bis(trimetilsilil) ester	262	C ₁₀ H ₂₂ O ₄ Si ₂
3	11,902	65	desmetildeprenil	173	C ₁₂ H ₁₅ N
4	12,050	78	ácido cáprico, 3-trimetilsiloxi, trimetilsilil ester	332	C ₁₆ H ₃₆ O ₃ Si ₂
5	12,579	94	ácido málico, tris(trimetilsilil) ester	350	C ₁₃ H ₃₀ O ₅ Si ₃
6	15,961	86	2,3,5,6 metil-tetrakis-O-(trimetilsilil)- α -D-glicofuranosideo	482	C ₁₉ H ₄₆ O ₆ Si ₄
7	16,137	87	2,3,5,6 metil-tetrakis-O-(trimetilsilil)- α -D-glicofuranosideo	482	C ₁₉ H ₄₆ O ₆ Si ₄
8	16,253	85	ácido manônico, 2,3,5,6-tetrakis-O-(trimetilsilil)-, lactona	466	C ₁₈ H ₄₂ O ₆ Si ₄
9	16,334	86	1,3,4,5,6-pentakis-O-(trimetilsilil)-D-frutose	540	C ₂₁ H ₅₀ O ₇ Si ₅
10	16,411	89	1,3,4,5,6-pentakis-O-(trimetilsilil)- D-frutose	540	C ₂₁ H ₅₀ O ₇ Si ₅
11	16,593	87	1,2,3,4-tetrakis-O-(trimetilsilil)- D-xilopiranose	438	C ₁₇ H ₄₂ O ₅ Si ₄
12	16,650	87	α -D-glucofuranoside, metil 2,3,5,6-tetrakis-O-(trimetilsilil)	482	C ₁₉ H ₄₆ O ₆ Si ₄
13	17,255	87	D-xilopiranose, 1,2,3,4-tetrakis-O-(trimetilsilil)-	438	C ₁₇ H ₄₂ O ₅ Si ₄
14	18,022	96	glicose, pentakis-O-trimetilsilil	540	C ₂₁ H ₅₂ O ₆ Si ₅
15	18,331	93	ácido palmítico, trimetilsilil ester	328	C ₁₉ H ₄₀ O ₂ Si
16	19,860	72	ácido oleico, trimetilsilil ester	354	C ₂₁ H ₄₂ O ₂ Si

Tabela 6. Proposições de identificação das substâncias presentes no extrato em diclorometano derivatizado (BSTFA) de *Struthanthus concinnus*. TR = tempo de retenção em minutos. As fórmulas apresentadas foram sugeridas com base na comparação com a base de dados NIST 5, já considerando a adição de grupamentos do reagente de derivatização. (conclusão)

17	19,899	93	α -ácido linoleico, trimetilsilil ester	350	C ₂₁ H ₃₈ O ₂ Si
18	20,110	73	D-galactofuranose, 1,2,3,5-tetrakis-O-(trimetilsilil)-, bis(trimetilsilil) fosfato	692	C ₂₄ H ₆₁ O ₉ PSi ₆
19	22,640	78	D-turanose, heptakis(trimetilsilil)-	846	C ₃₃ H ₇₈ O ₁₁ Si ₇
20	22,846	89	1-monopalmitina, trimetilsilil eter	474	C ₂₅ H ₅₄ O ₄ Si ₂
21	23,128	80	D-turanose, heptakis(trimetilsilil)	846	C ₃₃ H ₇₈ O ₁₁ Si ₇
22	23,589	80	D-turanose, heptakis(trimetilsilil)	846	C ₃₃ H ₇₈ O ₁₁ Si ₇
23	24,059	86	1-monooleoilglicerol trimetilsilil eter	500	C ₂₇ H ₅₆ O ₄ Si ₂
24	24,124	76	1-monooleoilglicerol trimetilsilil eter	500	C ₂₇ H ₅₆ O ₄ Si ₂
25	27,395	68	ciclopenteno, 3,3-dimetil-4-metileno-1,2-bis(trimetilsililoximetil)	312	C ₁₆ H ₃₂ O ₂ Si ₂

Foram integrados 25 picos no cromatograma de íons totais (**Figura 42**). Com um score acima de 90%, foram anotados o glicerol (94%, TR 9,750min) (**Figura 43I**), o ácido succínico (93%, TR 10,231min) (**Figura 43II**), o ácido málico (94%, TR 12,579min) (**Figura 43III**), a glicose (96%, TR 18,022min) (**Figura 43IV**), o ácido palmítico (93%, TR 18,331min) (**Figura 43V**) e o ácido alfa-linolênico (93%, TR 19,899min) (**Figura 43VI**). No extrato em diclorometano desta mesma espécie, preparado em 2008, observa-se a presença de palmitato de etila (93%), fitol (96%), obtusifoliol (90%) e β -amirona (90%) (**Figura 44**).

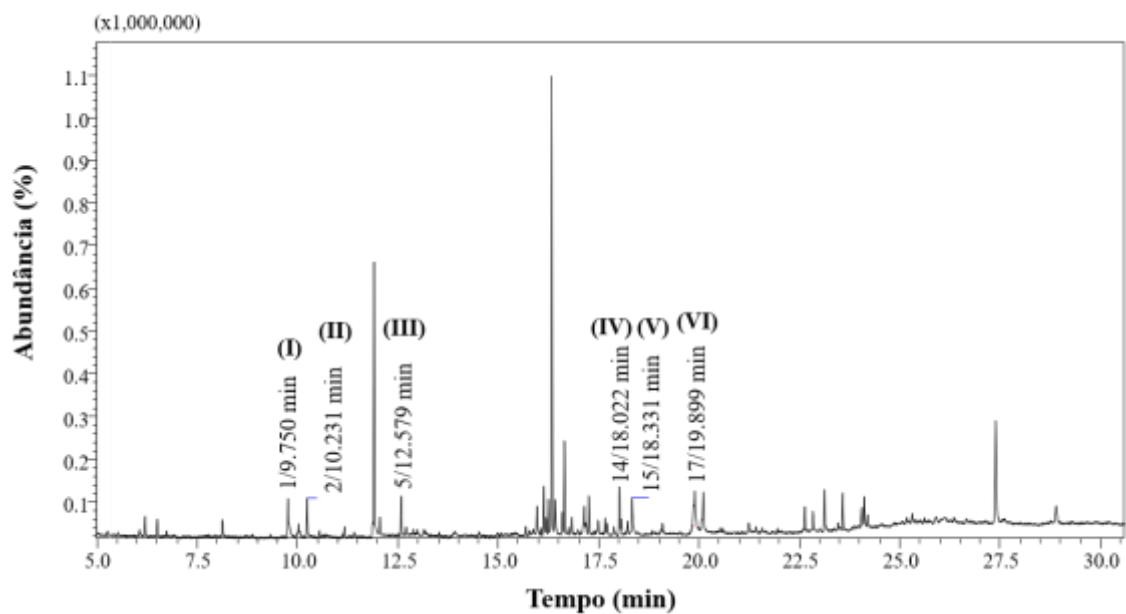


Figura 42. Cromatograma de íons totais por GC-MS do extrato em diclorometano de *Struthanthus concinnus* (2018) após derivatização com BSTFA. Substâncias identificadas na forma de ésteres de trimetil silil, com score superior a 90%. (I) glicerol (94%). (II) ácido succínico (93%). (III) ácido málico (94%). (IV) glicose (96%). (V) ácido palmítico (93%). (VI) ácido alfa-linolênico (93%).

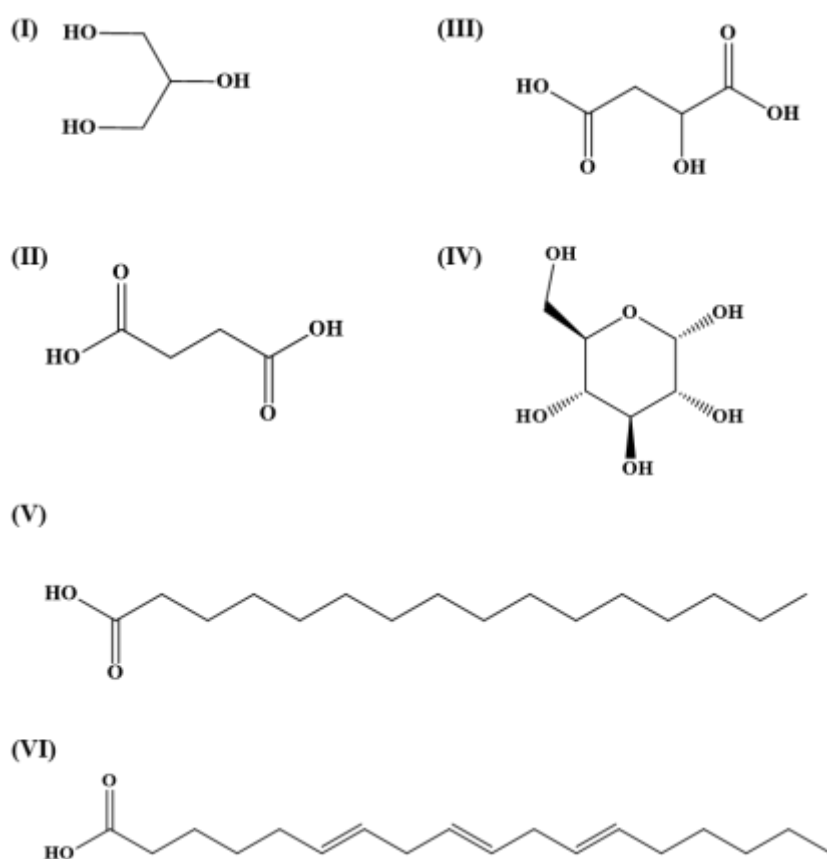


Figura 43. Estruturas químicas das substâncias identificadas por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas, na forma de ésteres de trimetilsilil, no extrato SCD de *Struthanthus concinnus*.

(I) Glicerol (94%). (II) Ácido succínico (93%). (III) Ácido málico (94%). (IV) Glicose (96%). (V) Ácido palmítico (93%). (VI) Ácido alfa-linolênico (93%).

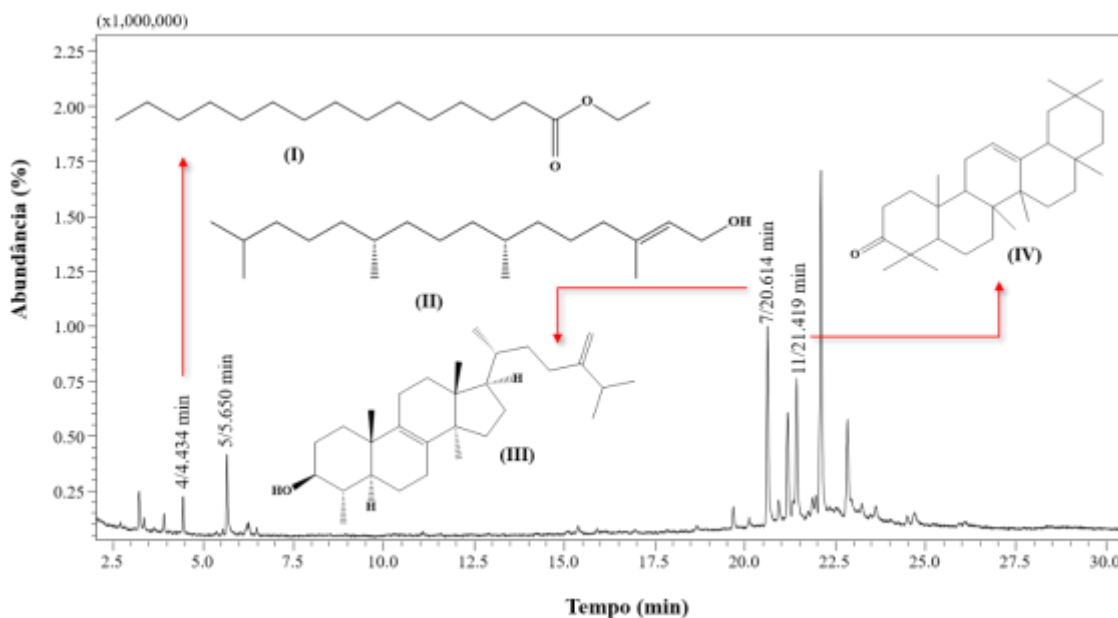


Figura 44. Substâncias identificadas com similaridade espectral superior ou igual a 90% no extrato em diclorometano, de *Struthanthus concinnus*, preparado em 2008. Cromatograma de íons totais por GC-MS. (I) palmitato de etila, com score de 93%. (II) fitol, com score de 96%. (III) obtusifoliol, com score de 90%. (IV) β -amirona, com score de 90%.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho estende o conhecimento de composição química das espécies *S. marginatus* e *S. concinnus*, as quais, até o presente, possuem poucos relatos na literatura acerca de sua composição química. Neste trabalho, demonstramos para estas espécies, uma atividade anti-agregante amiloide frente à amilina, revelando-as como potenciais fontes de novas substâncias com atividade anti-amiloide.

Apesar de terem sido coletados em épocas diferentes, os extratos preparados a partir de *S. concinnus* e *S. marginatus* demonstraram permanecer com um perfil químico geral bastante semelhante, conservando a atividade biológica observada nos ensaios iniciais. Os extratos em hexano foram os que mais apresentaram diferenças em seu perfil, quando comparados entre os anos distintos de coleta. Diferenças mais específicas, no entanto, podem estar relacionadas principalmente aos hospedeiros diferentes e ao momento metabólico da espécie. Esta comparação pode ser útil para sustentar, mais uma vez, que o metabolismo dos hospedeiros influencia na composição química da planta parasita.

Este é o primeiro relato não só de plantas brasileiras na busca de potenciais inibidores da agregação amiloide da amilina humana, como também é o primeiro registro de extratos contendo substâncias de baixa polaridade investigado para este fim, visto que as investigações são focadas basicamente em polifenóis. A observação da atividade dos extratos em hexano e diclorometano das ervas-de-passarinho pode representar uma promissora fonte de agentes contra agregação amiloide da amilina humana, não dispensando, evidentemente, a necessidade de estudos posteriores que avaliam questões relacionadas a toxicidade dos extratos e substâncias tanto *in vivo* quanto *in vitro*, além da confirmação da natureza dos agregados, bem com sua toxicidade, por técnicas de microscopia. Tais abordagens continuam sendo investigadas pelo grupo em relação não só as ervas-de-passarinho como com as demais amostras presentes na biblioteca de extratos.

Substâncias isoladas e identificadas nos extratos de 2008 não representaram a atividade observada para os extratos brutos, o que pode estar relacionado a concentração e disponibilidade das substâncias no meio reacional. No entanto, este é o primeiro registro de terpenoides da flora brasileira quanto a sua atividade anti-agregação amiloide da amilina humana e corresponde uma nova abordagem nos estudos de potenciais inibidores deste fenômeno, que atualmente conta com os protagonismos de substâncias fenólicas. Isto também gera subsídios para a continuação de estudos que considerem o mecanismo de ação destas substâncias, não sendo excluída a hipótese que possam estar envolvidas em outros processos da cinética de agregação da proteína, como por exemplo a aceleração da formação de fibras completas. Ainda assim, demais estudos são necessários para a testagem dessas substâncias purificadas tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abedini, A., Plesner, A., Cao, P., Ridgway, Z., Zhang, J., Tu, L.-H., Middleton, C. T., Chao, B., Sartori, D. J., Meng, F., Wang, H., Wong, A. G., Zanni, M. T., Verchere, C. B., Raleigh, D. P., & Schmidt, A. M. (2016). Time-resolved studies define the nature of toxic IAPP intermediates, providing insight for anti-amyloidosis therapeutics. *ELife*, 5. <https://doi.org/10.7554/eLife.12977>
- Al-Rubaye, A. F., Hameed, I. H., & Kadhim, M. J. (2017). A Review: Uses of Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) Technique for Analysis of Bioactive Natural Compounds of Some Plants. *INTERNATIONAL JOURNAL OF TOXICOLOGICAL AND PHARMACOLOGICAL RESEARCH*, 9(01).

<https://doi.org/10.25258/ijtpr.v9i01.9042>

Alam, M. A., Uddin, R., Subhan, N., Rahman, M. M., Jain, P., & Reza, H. M. (2015). Beneficial Role of Bitter Melon Supplementation in Obesity and Related Complications in Metabolic Syndrome. *Journal of Lipids*, 2015, 1–18. <https://doi.org/10.1155/2015/496169>

Albuquerque, U. P. de, & Hanazaki, N. (2006). As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 16, 678–689. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2006000500015>

Ambiente, M. do M. (2020). *Biodiversidade brasileira*. <https://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-brasileira>

American Diabetes Association. (2018). 7. Obesity Management for the Treatment of Type 2 Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes—2018. *Diabetes Care*, 41(Supplement 1), S65–S72. <https://doi.org/10.2337/dc18-S007>

Araki, K., Yagi, N., Aoyama, K., Choong, C.-J., Hayakawa, H., Fujimura, H., Nagai, Y., Goto, Y., & Mochizuki, H. (2019). Parkinson's disease is a type of amyloidosis featuring accumulation of amyloid fibrils of α -synuclein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(36), 17963–17969. <https://doi.org/10.1073/pnas.1906124116>

Ardah, M. T., Paleologou, K. E., Lv, G., Menon, S. A., Abul Khair, S. B., Lu, J.-H., Safieh-Garabedian, B., Al-Hayani, A. A., Eliezer, D., Li, M., & El-Agnaf, O. M. A. (2015). Ginsenoside Rb1 inhibits fibrillation and toxicity of alpha-synuclein and disaggregates preformed fibrils. *Neurobiology of Disease*, 74, 89–101. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2014.11.007>

Arrasate, M., & Finkbeiner, S. (2012). Protein aggregates in Huntington's disease. *Experimental Neurology*, 238(1), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2011.12.013>

Arruda, R., Carvalho, L. N., & Del-Claro, K. (2006). Host specificity of a Brazilian mistletoe, *Struthanthus aff. polyanthus* (Loranthaceae), in cerrado tropical savanna. *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 201(2), 127–134. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2005.07.001>

- Arruda, R., Fadini, R. F., Carvalho, L. N., Del-Claro, K., Mourão, F. A., Jacobi, C. M., Teodoro, G. S., Berg, E. van den, Caires, C. S., & Dettke, G. A. (2012). Ecology of neotropical mistletoes: an important canopy-dwelling component of Brazilian ecosystems. *Acta Botanica Brasilica*, 26(2), 264–274. <https://doi.org/10.1590/S0102-33062012000200003>
- Artuso, A. (2002). Bioprospecting, Benefit Sharing, and Biotechnological Capacity Building. *World Development*, 30(8), 1355–1368. [https://doi.org/10.1016/S0305-750X\(02\)00040-2](https://doi.org/10.1016/S0305-750X(02)00040-2)
- Ashour, A. S., El Aziz, M. M. A., & Gomha Melad, A. S. (2019). A review on saponins from medicinal plants: chemistry, isolation, and determination. *Journal of Nanomedicine Research*, 7(4), 282–288. <https://doi.org/10.15406/jnmr.2019.07.00199>
- Bailey, C. J. (1988). Metformin Revisited: Its Actions and Indications for Use. *Diabetic Medicine*, 5(4), 315–320. <https://doi.org/10.1111/j.1464-5491.1988.tb00996.x>
- Barofsky, D. F. (1999). Mass spectrometric analyses in agriculture and natural product research. *Brazilian Journal of Physics*, 29(3), 432–439. <https://doi.org/10.1590/S0103-97331999000300006>
- Bousslimani, A., Sanchez, L. M., Garg, N., & Dorrestein, P. C. (2014). Mass spectrometry of natural products: current, emerging and future technologies. *Natural Product Reports*, 31(6), 718. <https://doi.org/10.1039/c4np00044g>
- Brender, J. R., Salamekh, S., & Ramamoorthy, A. (2012). Membrane Disruption and Early Events in the Aggregation of the Diabetes Related Peptide IAPP from a Molecular Perspective. *Accounts of Chemical Research*, 45(3), 454–462. <https://doi.org/10.1021/ar200189b>
- Cai, Z.-Y., Wang, C.-L., Lu, T.-T., & Yang, W.-M. (2019). Berberine Alleviates Amyloid-beta Pathogenesis Via Activating LKB1/AMPK Signaling in the Brain of APP/PS1 Transgenic Mice. *Current Molecular Medicine*, 19(5), 342–348. <https://doi.org/10.2174/1566524019666190315164120>
- Cai, Z., Wang, C., He, W., & Chen, Y. (2018). Berberine Alleviates Amyloid-Beta Pathology in the Brain of APP/PS1 Transgenic Mice via Inhibiting β/γ -Secretases Activity and Enhancing α -Secretases. *Current Alzheimer Research*, 15(11), 1045–1052. <https://doi.org/10.2174/1567205015666180702105740>

- Cao, P., & Raleigh, D. P. (2012). Analysis of the Inhibition and Remodeling of Islet Amyloid Polypeptide Amyloid Fibers by Flavanols. *Biochemistry*, *51*(13), 2670–2683. <https://doi.org/10.1021/bi2015162>
- Cerf, M. E. (2013). Beta Cell Dysfunction and Insulin Resistance. *Frontiers in Endocrinology*, *4*. <https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00037>
- Chaari, A. (2020). Inhibition of human islet amyloid polypeptide aggregation and cellular toxicity by oleuropein and derivatives from olive oil. *International Journal of Biological Macromolecules*, *162*, 284–300. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.170>
- Cheng, B., Liu, X., Gong, H., Huang, L., Chen, H., Zhang, X., Li, C., Yang, M., Ma, B., Jiao, L., Zheng, L., & Huang, K. (2011). Coffee Components Inhibit Amyloid Formation of Human Islet Amyloid Polypeptide in Vitro: Possible Link between Coffee Consumption and Diabetes Mellitus. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*(24), 13147–13155. <https://doi.org/10.1021/jf201702h>
- Chu, Y. F., Chang, W. H., Black, R. M., Liu, J. R., Sompol, P., Chen, Y., Wei, H., Zhao, Q., & Cheng, I. H. (2012). Crude caffeine reduces memory impairment and amyloid β 1-42 levels in an Alzheimer's mouse model. *Food Chemistry*, *135*(3), 2095–2102. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.04.148>
- Clarke, W. (2017). Mass spectrometry in the clinical laboratory: determining the need and avoiding pitfalls. In H. Nair & W. Clarke (Eds.), *Mass Spectrometry for the Clinical Laboratory* (1st ed., pp. 1–15). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800871-3.00001-8>
- Coe, F. G., Parikh, D. M., & Johnson, C. A. (2010). Alkaloid presence and brine shrimp (*Artemia salina*) bioassay of medicinal species of eastern Nicaragua. *Pharmaceutical Biology*, *48*(4), 439–445. <https://doi.org/10.3109/13880200903168015>
- Cooper, G. J., Leighton, B., Dimitriadis, G. D., Parry-Billings, M., Kowalchuk, J. M., Howland, K., Rothbard, J. B., Willis, A. C., & Reid, K. B. (1988). Amylin found in amyloid deposits in human type 2 diabetes mellitus may be a hormone that regulates glycogen metabolism in skeletal muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *85*(20), 7763–7766. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.20.7763>

- Cordero, C. P., Pinzon, R., & Aristizabal, F. A. (2003). Cytotoxicity of bixin, rutin, pinitol B and ent-16-kauren-19-oic acid isolated from Colombian plants. *Revista Colombiana de Ciencias Químico - Farmacéuticas*, 32, 137–140.
- Cragg, G. M., Grothaus, P. G., & Newman, D. J. (2009). Impact of Natural Products on Developing New Anti-Cancer Agents †. *Chemical Reviews*, 109(7), 3012–3043. <https://doi.org/10.1021/cr900019j>
- Cragg, G. M., & Pezzuto, J. M. (2016). Natural Products as a Vital Source for the Discovery of Cancer Chemotherapeutic and Chemopreventive Agents. *Medical Principles and Practice*, 25(2), 41–59. <https://doi.org/10.1159/000443404>
- Cunha, N. L., Uchôa, C. J. de M., Cintra, L. S., Souza, H. C. de, Peixoto, J. A., Silva, C. P., Magalhães, L. G., Gimenez, V. M. M., Groppo, M., Rodrigues, V., da Silva Filho, A. A., Andrade e Silva, M. L., Cunha, W. R., Pauletti, P. M., & Januário, A. H. (2012). In Vitro Schistosomicidal Activity of Some Brazilian Cerrado Species and Their Isolated Compounds. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2012/173614>
- Daval, M., Bedrood, S., Gurlo, T., Huang, C.-J., Costes, S., Butler, P. C., & Langen, R. (2010). The effect of curcumin on human islet amyloid polypeptide misfolding and toxicity. *Amyloid*, 17(3–4), 118–128. <https://doi.org/10.3109/13506129.2010.530008>
- David, F., Dunkle, M., Tienpont, B., Mitsui, K., Ochiai, N., Sasamoto, K., Higashi, N., & Sandra, P. (2013). Gas chromatography with soft ionization mass spectrometry for the characterization of natural products. *LC GC Europe*, 26(10), 548–556.
- Freire, S.F., Silva, R., Freitas Morais, T., Ribeiro, R., Nascimento Silva, S., de Sousa Cartágenes, M. do Socorro, Abreu, I., de Sousa Ribeiro, M., da Cruz Centeno, D., Brandão Torres, L., da Rocha Borges, M., & Romão Borges, A. (2018). Protective effect of *Struthanthus marginatus* on ethanol-induced gastric damage in mice. *Pharmacognosy Research*, 10(2), 143. https://doi.org/10.4103/pr.pr_76_17
- Dettke, G. A., & Caires, C. S. (2015). *Loranthaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil*. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB152>
- Dhouafli, Z., Cuanalo-Contreras, K., Hayouni, E. A., Mays, C. E., Soto, C., & Moreno-Gonzalez, I. (2018). Inhibition of protein misfolding and aggregation by natural phenolic compounds. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75(19), 3521–3538.

<https://doi.org/10.1007/s00018-018-2872-2>

- Dias, D. A., Urban, S., & Roessner, U. (2012). A Historical overview of natural products in drug discovery. *Metabolites*, 2(2), 303–336. <https://doi.org/10.3390/metabo2020303>
- Dubey, R., Patil, K., Dantu, S. C., Sardesai, D. M., Bhatia, P., Malik, N., Acharya, J. D., Sarkar, S., Ghosh, S., Chakrabarti, R., Sharma, S., & Kumar, A. (2019). Azadirachtin inhibits amyloid formation, disaggregates pre-formed fibrils and protects pancreatic β -cells from human islet amyloid polypeptide/amylin-induced cytotoxicity. *Biochemical Journal*, 476(5), 889–907. <https://doi.org/10.1042/BCJ20180820>
- Eisele, Y. S., Monteiro, C., Fearn, C., Encalada, S. E., Wiseman, R. L., Powers, E. T., & Kelly, J. W. (2015). Targeting protein aggregation for the treatment of degenerative diseases. *Nature Reviews Drug Discovery*, 14(11), 759–780. <https://doi.org/10.1038/nrd4593>
- Fernández, M. S. (2014). Human IAPP amyloidogenic properties and pancreatic β -cell death. *Cell Calcium*, 56(5), 416–427. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2014.08.011>
- Freire, S. M. de F., Andrade, K. N. de S., Aragão Jr, G. A., Noronha, E. P., Silva, S. do N., Cartágenes, M. do S. de S., Borges, M. O. R., Ribeiro, M. N. de S., Torres, L. M. B., & Borges, A. C. R. (2011). Antiulcerogenic activity of the extracts of *Struthanthus marginatus*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 21(6), 1089–1095. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2011005000150>
- Fuentes, A. L., Hennessy, K., Pascual, J., Pepe, N., Wang, I., Santiago, A., Chagga, C., Martinez, J., Rivera, E., Cota, P., Cunha, C., Nogaj, L. A., & Moffet, D. A. (2016). Identification of plant extracts that inhibit the formation of diabetes-linked IAPP amyloid. *Journal of Herbal Medicine*, 6(1), 37–41. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2015.11.001>
- Garcia-Ac, A., Segura, P. A., Viglino, L., Gagnon, C., & Sauvé, S. (2011). Comparison of APPI, APCI and ESI for the LC-MS/MS analysis of bezafibrate, cyclophosphamide, enalapril, methotrexate and orlistat in municipal wastewater. *Journal of Mass Spectrometry*, 46(4), 383–390. <https://doi.org/10.1002/jms.1904>
- Garcia-Alloza, M., Borrelli, L. A., Rozkalne, A., Hyman, B. T., & Bacsikai, B. J. (2007). Curcumin labels amyloid pathology in vivo, disrupts existing plaques, and partially

restores distorted neurites in an Alzheimer mouse model. *Journal of Neurochemistry*, 102(4), 1095–1104. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04613.x>

Garden, M. B. (n.d.). *Tropicos.org. Missouri Botanical Garden*. Retrieved March 6, 2020, from <http://www.tropicos.org>

Gilbert, E. R., & Liu, D. (2012). Epigenetics: The missing link to understanding β -cell dysfunction in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Epigenetics*, 7(8), 841–852. <https://doi.org/10.4161/epi.21238>

Giordano, & Tommonaro. (2019). Curcumin and Cancer. *Nutrients*, 11(10), 2376. <https://doi.org/10.3390/nu11102376>

Gregorová, J., Babica, J., Marek, R., Paulová, H., Táborská, E., & Dostál, J. (2010). Extractions of isoquinoline alkaloids with butanol and octanol. *Fitoterapia*, 81(6), 565–568. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2010.01.020>

Guimarães, A. C. (2006). Aspectos Etnobotânicos e Químicos das Famílias Loranthaceae e Viscaceae: Potencialidades Terapêuticas das “Ervas-de-passarinho” Parasitas. *Revista Fitos*, 2(1), 27–47.

Hage, D. S. (2018). Chromatography. In *Principles and Applications of Clinical Mass Spectrometry* (pp. 1–32). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816063-3.00001-3>

Halket, J. M., & Zaikin, V. G. (2003). Derivatization in Mass Spectrometry—1. Silylation. *European Journal of Mass Spectrometry*, 9(1), 1–21. <https://doi.org/10.1255/ejms.527>

Han, J., Oh, J.-P., Yoo, M., Cui, C.-H., Jeon, B.-M., Kim, S.-C., & Han, J.-H. (2019). Minor ginsenoside F1 improves memory in APP/PS1 mice. *Molecular Brain*, 12(1), 77. <https://doi.org/10.1186/s13041-019-0495-7>

Harvey, A. L. (2002). Natural products for high-throughput screening. In M. M. Iwu & J. Wootton (Eds.), *Ethnomedicine and Drug Discovery* (1st ed., pp. 39–44). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S1572-557X\(02\)80011-3](https://doi.org/10.1016/S1572-557X(02)80011-3)

He, F. Q., Qiu, B. Y., Li, T. K., Xie, Q., Cui, D. J., Huang, X. L., & Gan, H. T. (2011). Tetrandrine suppresses amyloid- β -induced inflammatory cytokines by inhibiting NF-

- κB pathway in murine BV2 microglial cells. *International Immunopharmacology*, 11(9), 1220–1225. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2011.03.023>
- Hewlings, S., & Kalman, D. (2017). Curcumin: A Review of Its' Effects on Human Health. *Foods*, 6(10), 92. <https://doi.org/10.3390/foods6100092>
- Janitschke, Nelke, Lauer, Regner, Winkler, Thiel, Grimm, Hartmann, & Grimm. (2019). Effect of Caffeine and Other Methylxanthines on Aβ-Homeostasis in SH-SY5Y Cells. *Biomolecules*, 9(11), 689. <https://doi.org/10.3390/biom9110689>
- JBRJ - Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (2018). *Loranthaceae Juss.* <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB152>
- JBRJ - Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (2020). *Struthanthus in Flora do Brasil 2020 em construção.* <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB8702>
- Jurenka, J. S. (2009). Anti-inflammatory properties of curcumin, a major constituent of *Curcuma longa*: a review of preclinical and clinical research. *Alternative Medicine Review: A Journal of Clinical Therapeutic*, 14(2), 141–153. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19594223>
- Kahn, S. E. (2003). The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of Type 2 diabetes. *Diabetologia*, 46(1), 3–19. <https://doi.org/10.1007/s00125-002-1009-0>
- Kahn, S. E., Zraika, S., Utzschneider, K. M., & Hull, R. L. (2009). The beta cell lesion in type 2 diabetes: there has to be a primary functional abnormality. *Diabetologia*, 52(6), 1003–1012. <https://doi.org/10.1007/s00125-009-1321-z>
- Kai, T., Zhang, L., Wang, X., Jing, A., Zhao, B., Yu, X., Zheng, J., & Zhou, F. (2015). Tabersonine Inhibits Amyloid Fibril Formation and Cytotoxicity of Aβ(1–42). *ACS Chemical Neuroscience*, 6(6), 879–888. <https://doi.org/10.1021/acschemneuro.5b00015>
- Kao, P.-Y., Green, E., Pereira, C., Ekimura, S., Juarez, D., Whyte, T., Arhar, T., Malaspina, B., Nogaj, L. A., & Moffet, D. A. (2015). Inhibition of toxic IAPP amyloid by extracts of common fruits. *Journal of Functional Foods*, 12, 450–457. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.12.013>
- Karaca, M., Magnan, C., & Kargar, C. (2009). Functional pancreatic beta-cell mass:

- Involvement in type 2 diabetes and therapeutic intervention. *Diabetes & Metabolism*, 35(2), 77–84. <https://doi.org/10.1016/j.diabet.2008.09.007>
- Khurana, R., Coleman, C., Ionescu-Zanetti, C., Carter, S. A., Krishna, V., Grover, R. K., Roy, R., & Singh, S. (2005). Mechanism of thioflavin T binding to amyloid fibrils. *Journal of Structural Biology*, 151(3), 229–238. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2005.06.006>
- Kiriyama, Y., & Nochi, H. (2018). Role and Cytotoxicity of Amylin and Protection of Pancreatic Islet β -Cells from Amylin Cytotoxicity. *Cells*, 7(8), 95. <https://doi.org/10.3390/cells7080095>
- Lachmann, H., & Hawkins, P. (2006). Systemic amyloidosis. *Current Opinion in Pharmacology*, 6(2), 214–220. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2005.10.005>
- Leal, L., Bujokas, W. M., & Biondi, D. (2006). Análise da infestação de erva-de-passarinho na arborização de ruas de Curitiba-PR. *FLORESTA*, 36(3).
- Leal, M. C., Hilário, A., Munro, M. H. G., Blunt, J. W., & Calado, R. (2016). Natural products discovery needs improved taxonomic and geographic information. *Natural Product Reports*, 33(6), 747–750. <https://doi.org/10.1039/C5NP00130G>
- Lee, H.-R., Kochhar, S., & Shim, S.-M. (2015). Comparison of Electrospray Ionization and Atmospheric Chemical Ionization Coupled with the Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry for the Analysis of Cholesteryl Esters. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2015, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2015/650927>
- Leitão, F., Leitão, S. G., de Almeida, M. Z., Cantos, J., Coelho, T., & da Silva, P. E. A. (2013). Medicinal plants from open-air markets in the State of Rio de Janeiro, Brazil as a potential source of new antimycobacterial agents. *Journal of Ethnopharmacology*, 149(2), 513–521. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.07.009>
- Leitão, F. S. (2009). *Plantas medicinais vendidas em feiras livres em Petrópolis e Nova Friburgo, RJ e análise fitoquímica de espécies potenciais*. Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- Leitão, F. S. (2013). *Etnobotânica urbana: espécies medicinais com potencial antimicobacteriano*. Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- Lin, M.-W., Chen, Y.-H., Yang, H.-B., Lin, C. C., & Hung, S.-Y. (2020). Galantamine

Inhibits A β 1–42-Induced Neurotoxicity by Enhancing α 7nAChR Expression as a Cargo Carrier for LC3 Binding and A β 1–42 Engulfment During Autophagic Degradation. *Neurotherapeutics*, 17(2), 676–689. <https://doi.org/10.1007/s13311-019-00803-7>

Liu, B., Le, C. T., Barrett, R. L., Nickrent, D. L., Chen, Z., Lu, L., & Vidal-Russell, R. (2018). Historical biogeography of Loranthaceae (Santalales): Diversification agrees with emergence of tropical forests and radiation of songbirds. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 124, 199–212. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2018.03.010>

Liu, X.-P., Qian, X., Xie, Y., Qi, Y., Peng, M.-F., Zhan, B.-C., & Lou, Z.-Q. (2014). Betaine suppressed A β generation by altering amyloid precursor protein processing. *Neurological Sciences*, 35(7), 1009–1013. <https://doi.org/10.1007/s10072-014-1630-y>

Lorenzi, H. (2000). *Plantas Daninhas do Brasil: Terrestres, Aquáticas, Parasitas e Tóxicas* (3ª edição). Instituto Plantarum.

Lorenzo, A., Razzaboni, B., Weir, G. C., & Yankner, B. A. (1994). Pancreatic islet cell toxicity of amylin associated with type-2 diabetes mellitus. *Nature*, 368(6473), 756–760. <https://doi.org/10.1038/368756a0>

Lou-Bonafonte, J. M., Martínez-Beamonte, R., Sanclemente, T., Surra, J. C., Herrera-Marcos, L. V., Sanchez-Marco, J., Arnal, C., & Osada, J. (2018). Current Insights into the Biological Action of Squalene. *Molecular Nutrition & Food Research*, 62(15), 1800136. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201800136>

Lovestone, S. (2002). Protein aggregates and dementia: is there a common toxicity? *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 72(2), 152–161. <https://doi.org/10.1136/jnnp.72.2.152>

Luntz, A. J. M., & Nisbet, A. J. (2000). Azadirachtin from the neem tree *Azadirachta indica*: its action against insects. *Anais Da Sociedade Entomológica Do Brasil*, 29(4), 615–632. <https://doi.org/10.1590/S0301-80592000000400001>

Ma, L., Yang, C., Zheng, J., Chen, Y., Xiao, Y., & Huang, K. (2020). Non-polyphenolic natural inhibitors of amyloid aggregation. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 192, 112197. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112197>

- Maciel, M. A. M., Pinto, A. C., Veiga Jr., V. F., Grynberg, N. F., & Echevarria, A. (2002). Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova*, 25(3), 429–438. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422002000300016>
- Mähler, A., Mandel, S., Lorenz, M., Ruegg, U., Wanker, E. E., Boschmann, M., & Paul, F. (2013). Epigallocatechin-3-gallate: a useful, effective and safe clinical approach for targeted prevention and individualised treatment of neurological diseases? *EPMA Journal*, 4(1), 5. <https://doi.org/10.1186/1878-5085-4-5>
- Marles, R. J., & Farnsworth, N. R. (1995). Antidiabetic plants and their active constituents. *Phytomedicine*, 2(2), 137–189. [https://doi.org/10.1016/S0944-7113\(11\)80059-0](https://doi.org/10.1016/S0944-7113(11)80059-0)
- Marques, F., da Costa, M., Vittorazzi, C., Gramma, L., Barth, T., de Andrade, T., Endringer, D., Scherer, R., & Fronza, M. (2017). In Vitro and In Vivo Anti-inflammatory Effects of *Struthanthus vulgaris*. *Planta Medica*, 83(09), 770–777. <https://doi.org/10.1055/s-0043-101916>
- Martins, L. G. S., Vale, L. S., Lainetti, R., & Pereira, N. A. (2006). Um estudo sobre a toxicidade da erva-de-passarinho (*Struthanthus marginatus*, Lorantaceae), parasitando trombeteira (*Datura suaveolens*, Solanaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 8(2), 63–64.
- Matsubara, S., Morosinotto, T., Bassi, R., Christian, A.-L., Fischer-Schliebs, E., Lüttge, U., Orthen, B., Franco, A. C., Scarano, F. R., Förster, B., Pogson, B. J., & Osmond, C. B. (2003). Occurrence of the lutein-epoxide cycle in mistletoes of the Loranthaceae and Viscaceae. *Planta*, 217(6), 868–879. <https://doi.org/10.1007/s00425-003-1059-7>
- Mazumder, A., Raghavan, K., Weinstein, J., Kohn, K. W., & Pommier, Y. (1995). Inhibition of human immunodeficiency virus type-1 integrase by curcumin. *Biochemical Pharmacology*, 49(8), 1165–1170. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(95\)98514-A](https://doi.org/10.1016/0006-2952(95)98514-A)
- McKee, T. C., Van Wyk, A. W. W., & Whitson, E. L. (2014). Natural Product Screening. In M. A. Rudek, C. H. Chau, W. D. Figg, & H. L. McLeod (Eds.), *Handbook of Anticancer Pharmacokinetics and Pharmacodynamics* (2^a, pp. 39–68). Humana Press.
- Mendonça Filho, R. F. W., & Menezes, F. S. (2003). Estudo da utilização de plantas

- medicinais pela população da Ilha Grande - RJ. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 13, 55–58. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2003000300021>
- Meng, F., Abedini, A., Plesner, A., Verchere, C. B., & Raleigh, D. P. (2010). The Flavanol (-)-Epigallocatechin 3-Gallate Inhibits Amyloid Formation by Islet Amyloid Polypeptide, Disaggregates Amyloid Fibrils, and Protects Cultured Cells against IAPP-Induced Toxicity. *Biochemistry*, 49(37), 8127–8133. <https://doi.org/10.1021/bi100939a>
- Merlini, G. (2004). Systemic amyloidosis: are we moving ahead? *The Netherlands Journal of Medicine*, 62(4), 104–105. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15255078>
- Mishra, K. P., Ganju, L., Sairam, M., Banerjee, P. K., & Sawhney, R. C. (2008). A review of high throughput technology for the screening of natural products. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 62(2), 94–98. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2007.06.012>
- Montane, J., Klimek-Abercrombie, A., Potter, K. J., Westwell-Roper, C., & Bruce Verchere, C. (2012). Metabolic stress, IAPP and islet amyloid. *Diabetes, Obesity & Metabolism*, 14 Suppl 3, 68–77. <https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2012.01657.x>
- Moradi, B., Abbaszadeh, S., Shahsavari, S., Alizadeh, M., & Beyranvand, F. (2018). The most useful medicinal herbs to treat diabetes. *Biomedical Research and Therapy*, 5(8), 2538–2551. <https://doi.org/10.15419/bmrat.v5i8.463>
- Mors, W. B., Rizzini, C. T., & Pereira, N. A. (2000). *Medicinal Plants of Brazil* (R. A. Defilippis (ed.); 1st ed.). Reference Pubns.
- Naiki, H., Higuchi, K., Hosokawa, M., & Takeda, T. (1989). Fluorometric determination of amyloid fibrils in vitro using the fluorescent dye, thioflavine T. *Analytical Biochemistry*, 177(2), 244–249. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(89\)90046-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(89)90046-8)
- Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2016). Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products*, 79(3), 629–661. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b01055>
- Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2020). Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of Natural Products*, 83(3), 770–803. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285>

- Nishimura, S., & Matsumori, N. (2020). Chemical diversity and mode of action of natural products targeting lipids in the eukaryotic cell membrane. *Natural Product Reports*, 37(5), 677–702. <https://doi.org/10.1039/C9NP00059C>
- Nowotny, K., Jung, T., Höhn, A., Weber, D., & Grune, T. (2015). Advanced Glycation End Products and Oxidative Stress in Type 2 Diabetes Mellitus. *Biomolecules*, 5(1), 194–222. <https://doi.org/10.3390/biom5010194>
- Ojewole, J. A. O., & Adewole, S. O. (n.d.). Hypoglycaemic and hypotensive effects of *Globimetula cupulata* (DC) Van Tieghem (Loranthaceae) aqueous leaf extract in rats. *Cardiovascular Journal of South Africa : Official Journal for Southern Africa Cardiac Society [and] South African Society of Cardiac Practitioners*, 18(1), 9–15. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17392989>
- Opie, E. L. (1901). On the relation of chronic interstitial pancreatitis to the islands of Langerhans and to diabetes mellitus. *The Journal of Experimental Medicine*, 5(4), 397–428. <https://doi.org/10.1084/jem.5.4.397>
- OMS - Organização Mundial da Saúde. (2016). *Global report on diabetes*. <https://www.who.int/publications/i/item/global-report-on-diabetes>
- Osadebe, P. O., Okide, G. B., & Akabogu, I. C. (2004). Study on anti-diabetic activities of crude methanolic extracts of *Loranthus micranthus* (Linn.) sourced from five different host trees. *Journal of Ethnopharmacology*, 95(2–3), 133–138. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.06.029>
- Otero, R., Núñez, V., Barona, J., Fonnegra, R., Jiménez, S. ., Osorio, R. ., Saldarriaga, M., & Díaz, A. (2000). Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia. *Journal of Ethnopharmacology*, 73(1–2), 233–241. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(00\)00321-4](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(00)00321-4)
- Özek, T., & Demirci, F. (2012). Isolation of Natural Products by Preparative Gas Chromatography. In S. Sarker & L. Nahar (Eds.), *Natural Products Isolation* (3^a, pp. 275–300). Humana Press. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-1-61779-624-1_11
- Pandey, N., Strider, J., Nolan, W. C., Yan, S. X., & Galvin, J. E. (2008). Curcumin inhibits aggregation of α -synuclein. *Acta Neuropathologica*, 115(4), 479–489. <https://doi.org/10.1007/s00401-007-0332-4>

- Patel, K., Patel, J., Patel, M., Rajput, G., & Patel, H. (2010). Introduction to hyphenated techniques and their applications in pharmacy. *Pharmaceutical Methods*, 1(1), 2. <https://doi.org/10.4103/2229-4708.72222>
- Pissinate, K. (2006). *Atividade citotóxica de Piper nigrum e Struthanthus marginatus. Estudo preliminar da correlação entre a citotoxicidade e a hidrofobicidade da piperina e derivados sintéticos*. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
- Pithadia, A., Brender, J. R., Fierke, C. A., & Ramamoorthy, A. (2016). Inhibition of IAPP Aggregation and Toxicity by Natural Products and Derivatives. *Journal of Diabetes Research*, 2016, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2016/2046327>
- Poole, C. F., & Zlatkis, A. (1979). Derivatization in Chromatography Introduction Practical Aspects of Chemical Derivatization in Chromatography. *Journal of Chromatographic Science*, 17(3), 113–114. <https://doi.org/10.1093/chromsci/17.3.113>
- Porat, Y., Abramowitz, A., & Gazit, E. (2006). Inhibition of Amyloid Fibril Formation by Polyphenols: Structural Similarity and Aromatic Interactions as a Common Inhibition Mechanism. *Chemical Biology & Drug Design*, 67(1), 27–37. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0285.2005.00318.x>
- Reif, C. (2004). *Contribuição à taxonomia das famílias Eromelepidaceae, Loranthaceae e Viscaceae no Estado do Rio de Janeiro*. Museu Nacional da Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- Reif, C., & Andreato, R. H. P. (2006). Sinopse de “ervas-de-passarinho” do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Pesquisas, Botânica*, 7, 255–274.
- Reif, C., & Andreato, R. H. P. (2011). Contribuição à Taxonomia de Loranthaceae do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Pesquisas, Botânica*, 62, 71–115.
- Ren, Z., Yang, M., Guan, Z., & Yu, W. (2018). Astrocytic $\alpha 7$ Nicotinic Receptor Activation Inhibits Amyloid- β Aggregation by Upregulating Endogenous αB -crystallin through the PI3K/Akt Signaling Pathway. *Current Alzheimer Research*, 16(1), 39–48. <https://doi.org/10.2174/1567205015666181022093359>
- Rena, G., Hardie, D. G., & Pearson, E. R. (2017). The mechanisms of action of metformin. *Diabetologia*, 60(9), 1577–1585. <https://doi.org/10.1007/s00125-017-4342-z>

- Rigacci, S., Guidotti, V., Bucciantini, M., Parri, M., Nediani, C., Cerbai, E., Stefani, M., & Berti, A. (2010). Oleuropein aglycon prevents cytotoxic amyloid aggregation of human amylin☆. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 21(8), 726–735. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2009.04.010>
- Rockwood, A. L., Kushnir, M. M., & Clarke, N. J. (2018). Mass Spectrometry. In *Principles and Applications of Clinical Mass Spectrometry* (pp. 33–65). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816063-3.00002-5>
- Rushing, P. A., Hagan, M. M., Seeley, R. J., Lutz, T. A., & Woods, S. C. (2000). Amylin: A Novel Action in the Brain to Reduce Body Weight*. *Endocrinology*, 141(2), 850–850. <https://doi.org/10.1210/endo.141.2.7378>
- Saeed, N. M., El-Demerdash, E., Abdel-Rahman, H. M., Algandaby, M. M., Al-Abbasi, F. A., & Abdel-Naim, A. B. (2012). Anti-inflammatory activity of methyl palmitate and ethyl palmitate in different experimental rat models. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 264(1), 84–93. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2012.07.020>
- Salatino, A. (1993). Contents of Tannins and their Histological Localization in Young and Adult Parts of *Struthanthus vulgaris* Mart. (Loranthaceae). *Annals of Botany*, 72(5), 409–414. <https://doi.org/10.1006/anbo.1993.1126>
- Salem, M. A., Perez de Souza, L., Serag, A., Fernie, A. R., Farag, M. A., Ezzat, S. M., & Alseekh, S. (2020). Metabolomics in the Context of Plant Natural Products Research: From Sample Preparation to Metabolite Analysis. *Metabolites*, 10(1), 37. <https://doi.org/10.3390/metabo10010037>
- Schrimpe-Rutledge, A. C., Fontès, G., Gritsenko, M. A., Norbeck, A. D., Anderson, D. J., Waters, K. M., Adkins, J. N., Smith, R. D., Poitout, V., & Metz, T. O. (2012). Discovery of Novel Glucose-Regulated Proteins in Isolated Human Pancreatic Islets Using LC–MS/MS-Based Proteomics. *Journal of Proteome Research*, 11(7), 3520–3532. <https://doi.org/10.1021/pr3002996>
- Sharoyan, S. G., Antonyan, A. A., Harutyunyan, H. A., & Mardanyan, S. S. (2015). Inhibition of amylin fibril formation and protection of islet β -cells by medicinal plants. *International Journal of Pharmacognosy*, 2(5), 234–241.
- Simões, C. M. O., & Schenkel, E. P. (2002). A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 12(1).

<https://doi.org/10.1590/S0102-695X2002000100005>

- Singh, P. K., Kotia, V., Ghosh, D., Mohite, G. M., Kumar, A., & Maji, S. K. (2013). Curcumin Modulates α -Synuclein Aggregation and Toxicity. *ACS Chemical Neuroscience*, 4(3), 393–407. <https://doi.org/10.1021/cn3001203>
- Siqueira, A. M., Rogério, I. T. S., Esteves, B. C., Chedier, L. M., Macedo, A. L., & Pimenta, D. S. (2016). Chemical interaction between *Struthanthus marginatus* (Desr.) Blume and two different hosts. *Eletronic Journal of Pharmacy*, 13(3), 212–219.
- Sparks, S., Liu, G., Robbins, K. J., & Lazo, N. D. (2012). Curcumin modulates the self-assembly of the islet amyloid polypeptide by disassembling α -helix. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 422(4), 551–555. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.05.013>
- Ramesha, B.T., Gertsch, J., Ravikanth, G., Priti, V., N. Ganeshiah, K., & Uma Shaanker, R. (2011). Biodiversity and Chemodiversity: Future Perspectives in Bioprospecting. *Current Drug Targets*, 12(11), 1515–1530. <https://doi.org/10.2174/138945011798109473>
- Tyagi, P., Singh, M., Kumari, H., Kumari, A., & Mukhopadhyay, K. (2015). Bactericidal Activity of Curcumin I Is Associated with Damaging of Bacterial Membrane. *PLOS ONE*, 10(3), e0121313. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121313>
- Valli, M., Russo, H. M., & Bolzani, V. S. (2018). The potential contribution of the natural products from Brazilian biodiversity to bioeconomy. *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, 90(1 suppl 1), 763–778. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201820170653>
- Velander, P., Wu, L., Henderson, F., Zhang, S., Bevan, D. R., & Xu, B. (2017). Natural product-based amyloid inhibitors. *Biochemical Pharmacology*, 139, 40–55. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.04.004>
- Velander, P., Wu, L., Ray, W. K., Helm, R. F., & Xu, B. (2016). Amylin Amyloid Inhibition by Flavonoid Baicalein: Key Roles of Its Vicinal Dihydroxyl Groups of the Catechol Moiety. *Biochemistry*, 55(31), 4255–4258. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.6b00578>
- Vendruscolo, G. S., Rates, S. M. K., & Mentz, L. A. (2005). Dados químicos e

- farmacológicos sobre as plantas utilizadas como medicinais pela comunidade do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 15(4), 361-372. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2005000400018>
- Vidal-Russell, R., & Nickrent, D. L. (2008). The first mistletoes: Origins of aerial parasitism in Santalales. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 47(2), 523–537. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2008.01.016>
- Vieira, O.M.C., Santos, M.H., Silva, G.A., Siqueira, A.M. (2005). Atividade antimicrobiana de *Struthanthus vulgaris* (erva-de-passarinho). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 15(2), 149-154. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2005000200014>
- Vittorazzi, C., Endringer, D. C., Andrade, T. U. de, Scherer, R., & Fronza, M. (2016). Antioxidant, antimicrobial and wound healing properties of *Struthanthus vulgaris*. *Pharmaceutical Biology*, 54(2), 331–337. <https://doi.org/10.3109/13880209.2015.1040515>
- Wang, M., Qin, H.-L., Leng, J., Ameduzzafar, Amjad, M. W., Raja, M. A. G., Hussain, M. A., & Bukhari, S. N. A. (2018). Synthesis and biological evaluation of new tetramethylpyrazine-based chalcone derivatives as potential anti-Alzheimer agents. *Chemical Biology & Drug Design*, 92(5), 1859–1866. <https://doi.org/10.1111/cbdd.13355>
- Wechalekar, A. D., Gillmore, J. D., & Hawkins, P. N. (2016). Systemic amyloidosis. *The Lancet*, 387(10038), 2641–2654. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)01274-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)01274-X)
- Westermarck, P., Andersson, A., & Westermarck, G. T. (2011). Islet amyloid polypeptide, islet amyloid, and diabetes mellitus. *Physiological Reviews*, 91(3), 795–826. <https://doi.org/10.1152/physrev.00042.2009>
- Westermarck, P., Wernstedt, C., Wilander, E., & Sletten, K. (1986). A novel peptide in the calcitonin gene related peptide family as an amyloid fibril protein in the endocrine pancreas. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 140(3), 827–831. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(86\)90708-4](https://doi.org/10.1016/0006-291X(86)90708-4)
- Williams, D. A. (1997). Fundamentals of mass spectrometry. In T. R. Browne (Ed.), *Pharmacochemistry Library: Stable Isotopes in Pharmaceutical Research* (26th ed., pp. 19–45). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0165-7208\(97\)80150-X](https://doi.org/10.1016/S0165-7208(97)80150-X)

- Wolfender, J.-L., Marti, G., & Ferreira Queiroz, E. (2010). Advances in Techniques for Profiling Crude Extracts and for the Rapid Identification of Natural Products: Dereplication, Quality Control and Metabolomics. *Current Organic Chemistry*, 14(16), 1808–1832. <https://doi.org/10.2174/138527210792927645>
- Wu, L., Velander, P., Liu, D., & Xu, B. (2017). Olive Component Oleuropein Promotes β -Cell Insulin Secretion and Protects β -Cells from Amylin Amyloid-Induced Cytotoxicity. *Biochemistry*, 56(38), 5035–5039. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b00199>
- Xue, C., Lin, T. Y., Chang, D., & Guo, Z. (2017). Thioflavin T as an amyloid dye: fibril quantification, optimal concentration and effect on aggregation. *Royal Society Open Science*, 4(1), 160696. <https://doi.org/10.1098/rsos.160696>
- Yakupova, E. I., Bobyleva, L. G., Vikhlyantsev, I. M., & Bobylev, A. G. (2019). Congo Red and amyloids: History and relationship. *Bioscience Reports*, 39(1). <https://doi.org/10.1042/BSR20181415>
- Yang, C. S., Wang, H., Chen, J. X., & Zhang, J. (2014). Effects of Tea Catechins on Cancer Signaling Pathways. In *The Enzymes* (36th ed., pp. 195–221). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802215-3.00010-0>
- Yang, F., Lim, G. P., Begum, A. N., Ubeda, O. J., Simmons, M. R., Ambegaokar, S. S., Chen, P. P., Kaye, R., Glabe, C. G., Frautschi, S. A., & Cole, G. M. (2005). Curcumin Inhibits Formation of Amyloid β Oligomers and Fibrils, Binds Plaques, and Reduces Amyloid in Vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 280(7), 5892–5901. <https://doi.org/10.1074/jbc.M404751200>
- Yang, Q., Lin, J., Zhang, H., Liu, Y., Kan, M., Xiu, Z., Chen, X., Lan, X., Li, X., Shi, X., Li, N., & Qu, X. (2019). Ginsenoside Compound K Regulates Amyloid β via the Nrf2/Keap1 Signaling Pathway in Mice with Scopolamine Hydrobromide-Induced Memory Impairments. *Journal of Molecular Neuroscience*, 67(1), 62–71. <https://doi.org/10.1007/s12031-018-1210-3>
- Zhang, X.-X., Pan, Y.-H., Huang, Y.-M., & Zhao, H.-L. (2016). Neuroendocrine hormone amylin in diabetes. *World Journal of Diabetes*, 7(9), 189. <https://doi.org/10.4239/wjd.v7.i9.189>
- Zhukov, A. V. (2015). Palmitic acid and its role in the structure and functions of plant cell membranes. *Russian Journal of Plant Physiology*, 62(5), 706–713.

<https://doi.org/10.1134/S1021443715050192>