

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIENCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**Investigação química e farmacológica de espécies vegetais
da região Amazônica contra a Malária**



DOMINIQUE FERNANDES DE MOURA DO CARMO

MANAUS – AM
Junho/ 2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIENCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DOMINIQUE FERNANDES DE MOURA DO CARMO

**Investigação química e farmacológica de espécies vegetais
da região Amazônica contra a Malária.**



Tese apresentada ao programa de pós-graduação em química da Universidade Federal do Amazonas, como um dos requisitos para a obtenção do título de doutor em Ciências - Química. Área de atuação: Química de produtos naturais.

Orientador: Dr. Jefferson Rocha de Andrade e Silva.

Co - Orientadora: Dr^a Ana Cláudia Fernandes Amaral.

MANAUS – AM
Junho / 2014

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese a minha família, em especial ao meu esposo Eclesiaste Amazonas do Carmo por ser tão especial em minha vida.

À minha filha Maria Heloísa, pelo grande Dom de amor para nossa família.

Aos meus orientadores prof. Jefferson Rocha de Andrade Silva e profa. Ana Cláudia Fernandes Amaral.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço a Deus, por me colocar numa família iluminada e abençoada, me dar força sempre quando eu mais preciso e guiar sempre meu caminho para junto Dele.

Aos meus pais pelo incentivo aos estudos, pelo amor, carinho, por apoiarem as minhas escolhas, ajudar em tudo que preciso.

As minhas irmãs Danielle e Débora pela alegria da convivência, é maravilhoso sentir que tenho vocês comigo.

Ao meu amado Eclesiaste, pelas infinitas ajudas diárias, todo este tempo junto a você não há problema que eu não possa resolver. Obrigada por me incentivar nas escolhas, apoiar nas decisões, me confortar nos desafios, cuidando e zelando do nosso amor. Amor da minha vida, obrigada por tudo! É tão saber que temos tesouros: a nossa filha Maria Heloísa e o nosso segundo filho, Miguel Ângelo, que está crescendo dentro de mim.

Aos meus amigos: Júnior, Edinilze, Aimêe, Jaqueline, Richardson, Mayane, Elzalina, Eliana, Renyer e Jean que comemoram comigo hoje mais uma vitória!

É sempre bom lembrar nossos momentos de alegria e convivência diária. Obrigada pelo carinho e estou muito feliz por que tenho vocês até hoje no meu caminho e na minha vida.

Ao meu orientador Dr. Jefferson Rocha de Andrade Silva pela confiança em mim depositada e acima de tudo pelo rigor científico em conduzir a realização deste trabalho.

À minha co-orientadora Dr^a. Ana Cláudia Fernandes Amaral pela orientação e por todos os ensinamentos transferidos.

Ao professor Dr. Virgílio Estólio do Rosário e ao Instituto de Higiene e Medicina tropical (IHMT) de Lisboa, pelo tempo, espaço, equipamentos e material cedido para a realização dos ensaios biológicos e o incentivo da equipe para o desenvolvimento do mesmo. Não poderia deixar de agradecer a D^{ra} Dinora Lopes, quem esteve ao meu lado para a execução dos ensaios antimaláricos, quem com

todo profissionalismo e paciência conduziu a execução do cronograma de atividades, possibilitando para que a minha estadia em Portugal fosse a mais produtiva possível.

À Catarina Alves e Zoraima Neto pelos ensinamentos repassados.

À Dr^a. Ana Cláudia Fernandes Amaral por ter cedido o laboratório de plantas medicinais e derivados (Farmanguinhos FIOCRUZ, Rio de Janeiro), para a utilização do HPLC.

À professora Cinthya Iamille Frithz Brandão de Oliveira, pela oportunidade e confiança na realização do teste farmacológico, além dos ensinamentos.

Aos professores membros da banca Dr. Marcos Batista, Dr. Igor, Dr^a. Maria Lúcia Belém Pinheiro, Dr^a. Maria de Meneses e Dr. Jefferson Rocha de Andrade e Silva, pelas valiosas contribuições.

A FAPEAM e a CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

A malária é uma das mais importantes infecções parasitárias de seres humanos, devido à alta morbidade e mortalidade. Diversos fármacos foram descobertos, a partir de plantas medicinais, para atuar contra esta doença, dentre eles a quinina e artemisinina. Com o objetivo de contribuir com as pesquisas já realizadas e proporcionar a descoberta de novos compostos antimaláricos, foram selecionadas duas plantas da região Amazônica: a espécie *Ampelozizyphus amazonicus*, conhecida como cerveja de índio, e a espécie *Vismia cayennensis*, conhecida como Lacre. A partir de suas partes botânicas, foram preparados os extratos hexânicos, clorofórmicos, etanólicos e aquosos, os quais foram submetidos aos testes antimaláricos esquizontocidas hepáticos (frente ao *Plasmodium. berghei*) e sanguíneos (frente ao *Plasmodium. falciparum*). Os resultados farmacológicos, para a espécie *A. amazonicus*, indicam que os extratos clorofórmicos, aquosos das cascas das raízes e cerne do caule exibem uma atividade antimalárica, *in vitro*, frente ao *P. berghei*, com valores de IC₅₀ entre 19,6 e 39,9 µg/mL. O extrato clorofórmico das cascas das raízes foi o mais ativo frente ao *P. falciparum*, através dele foi possível isolar e identificar o ácido betulínico como a substância mais ativa, com valor de IC₅₀ = 2,56 para 3D7 e 3,76 µg/mL para Dd2. A cromatografia líquida de alta eficiência permitiu a quantificação deste constituinte nos extratos obtidos, sendo possível observar uma correlação entre a quantidade do ácido betulínico e a atividade antimalárica observada, assim os extratos que apresentaram o maior conteúdo do triterpeno foram os mais ativos. Para as amostras de *V. cayennensis*, o extrato clorofórmico foi o único ativo com IC₅₀ = 4,65 para 3D7 e 7,26 µg/mL para Dd2. Nos ensaios *in vivo*, na fase hepática, foi possível identificar apenas um extrato ativo, o extrato diclorometano das cascas do caule de *A. amazonicus*. Dos extratos ativos foram isolados 12 substâncias, sendo 9 da espécie *A. amazonicus* e 3 de *V. cayennensis*. Neste contexto, a abordagem etnofarmacológica associada ao perfil químico, se mostram ferramentas úteis e promissoras na busca de novos

fármacos, permitindo contribuir significativamente para o conhecimento científico do potencial antimalárico da flora amazônica e deste modo, abrir perspectivas para o desenvolvimento de novos antimaláricos.

ABSTRACT

Malaria is one of the most important parasitic infections of humans due to the high morbidity and mortality. Several drugs have been discovered, from medicinal plants, to act against this disease, among them quinine and artemisinin. With the goal of contributing to the research and to provide the discovery of new antimalarial compounds, were selected two plants of the Amazon region: the species *Ampelozizyphus amazonicus* known as Indian beer and *Vismia cayennensis*, known as Lacre. From his botanical parts, were prepared the hexane, chloroform and ethanolic extracts, which were subject to antimalarial schizontocidal liver (against *Plasmodium. berghei*) and erythrocytic (against *Plasmodium. falciparum*) tests. The pharmacological results for the specie *A. amazonicus*, indicate that chloroform and aqueous extracts of the root bark and stem displays an antimalarial activity in vitro against *P. berghei* with IC_{50} values between 19.6 and 39.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The chloroform extract of the root bark was the most active against *P. falciparum*, through it was possible to isolate and identify the betulinic acid as the substance most active with value of $IC_{50} = 2,56$ to 3D7 and 3,76 $\mu\text{g}/\text{mL}$ to Dd2. The high performance liquid chromatography allowed the quantification of this constituent in the extracts obtained, being possible to observe a correlation between the quantity of betulinic acid and antimalarial activity observed, thus extracts that showed the highest content of the triterpene were the most active. For samples of *V. cayennensis*, the chloroform extract was the only active with $IC_{50} = 4.65$ for 3D7 and 7.26 $\mu\text{g} / \text{mL}$ for Dd2. An *in vivo* assay, in the hepatic phase, was only possible to identify an active extract, the dichloromethane extract of the stem bark of *A. amazonicus*. Of the active extracts 12 substances were isolated, being 9 of the specie *A. amazonicus* and 3 of *V. cayennensis*. In this context, the ethnopharmacological approach associated with the chemical profile, appear useful and promising tools in the search for new drugs, allowing to contribute significantly to the scientific knowledge of the antimalarial potential of

the Amazon flora and thus, open perspectives for the development of new antimalarials

SUMÁRIO

ÍNDICE DE TABELAS	
ÍNDICE DE ESQUEMAS	
ÍNDICE DE QUADROS	
ÍNDICE DE ESPECTROS	
ÍNDICE DE FIGURAS	
RESUMO	
ABSTRACT	
1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Família Rhamnaceae	06
1.1.1 Família Rhamnaceae no Brasil	07
1.2 <i>Ampelozizyphus</i>	08
1.3 <i>Ampelozizyphus amazonicus</i>	09
1.3.1 Saponinas	11
1.4 A família Clusiaceae	16
1.5 O gênero <i>Vismia</i>	18
1.6 A espécie <i>Vismia cayennensis</i>	20
1.6.1 Constituintes químicos de <i>V. cayennensis</i>	21
2. OBJETIVOS	24
2.1 OBJETIVO GERAL	24
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1 Coleta e identificação botânica	26
3.2 Solventes e reagentes	26
3.3 Equipamentos	27
3.3.1 Cromatografia líquida acoplado ao espectrômetro de massas (LC-MS)	27
3.3.2 Cromatógrafo com fase gasosa acoplado a espectrômetro de massas (CG-EM)	28
3.3.3 Espectrômetro de massas	31
3.3.4 Ressonância magnética nuclear	29
3.3.5 Ponto de fusão	29
3.4 Preparação de extratos e fracionamento	29
3.4.1 Obtenção dos extratos de <i>A. amazonicus</i>	29
3.4.2 Obtenção do extrato saponínico	30
3.4.2.1 Fracionamento em XAD-16	31
3.4.3 Obtenção do extrato aquoso	31
3.4.3.1. Método Rodrigues (1989)	31
3.4.3.2 Método quilombola (Oliveira et al, 2011)	32
3.4.3.3 Método Brandão (1991)	32
3.4.4 Fracionamento dos extratos clorofórmicos e diclorometano	32
3.4.4.1 Fracionamento do EDCCAa	33

3.4.4.1.1 Purificação da fração CCFR2	34
3.4.4.1.2 Purificação da fração CCFR6	38
3.4.4.1.3 Purificação da fração CCFR7	40
3.4.4.2 Fracionamento do ECCECAa	41
3.4.4.2.1 Purificação da fração CECFR2	42
3.4.4.2.2 Purificação da fração CECFR4_5	43
3.4.4.2.3 Purificação da fração CECFR6	45
3.4.4.2.4 Análise dos precipitados PECC	48
3.4.4.2.5 Fracionamento PECC 1, PECC 2, PECC3 e PECC 6	48
3.4.4.3 Fracionamento do ECCRAa	49
3.4.4.4 Fracionamento do ECCERAa	51
3.4.4.5 Fracionamento em SPE	51
3.4.4.6 Fracionamento em XAD-16	52
4.5 Obtenção dos extratos de <i>Vismia cayennensis</i>	52
4.5.1 Fracionamento líquido-líquido do extrato etanólico dos frutos	54
4.5.2 Fracionamento do extrato clorofórmico de <i>V. cayennensis</i> (ECFVc)	54
4.5.2.1 Fracionamento do ECFVc 4_5	55
4.5.2.2 Fracionamento do ECFVc 6_8	56
4.5.2.3 Fracionamento do ECFVc 9_12	57
4.5.3 Quantificação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	58
4.5.3.1 Preparação dos extratos	58
4.5.3.2 Análise Cromatográfica	59
4.5.3.3 Condições cromatográficas	59
4.5.3.4 Linearidade	59
4.5.3.4.1 Preparação da curva padrão da substância química majoritária	59
4.5.3.4.2 Repetibilidade	60
4.5.3.4.3 Limites de detecção e quantificação	60
4.5.4 Análises de Cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas (CLAE-EM)	61
4.5.5 Desenvolvimento de método por CLAE/DAD para avaliação do perfil químico de extratos/frações de <i>Vismia cayennensis</i>	62
4.5.5.1 Preparação das amostras	62
4.5.5.2 Condições cromatográficas	62
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
5.1 Rendimento dos extratos	63
5.2 Análise estrutural das substâncias isoladas	64
5.2.1 Elucidação estrutural de 6ab	64
5.2.2 Elucidação estrutural de CCFR2/11-16/16-18	70
5.2.3 Elucidação estrutural de CCFR6/ 24-29 / P	73
5.2.4 Elucidação estrutural de CECFR2/ 4_7	77
5.2.5 Elucidação estrutural de CECFR4_5/ 58_63	78
5.2.6 Elucidação estrutural de Azul/ECCECAa	81
5.2.7 Elucidação estrutural de PECC4	84
5.2.8 Elucidação estrutural de PECC5	87

5.2.9 Elucidação estrutural de CRF1/1_9	90
5.3 Substâncias isoladas de <i>V. cayennensis</i>	92
5.3.1 Elucidação estrutural de ECFVc 4_5/24_25/P	92
5.3.2 Elucidação estrutural de ECFVc 6_8	98
5.3.3 Elucidação estrutural de ECFVc 9_12/9_19P	102
5.4 Avaliação dos extratos polares por LC-MS	106
6. FARMACOLOGIA	114
6.1 Malária	114
6.2 Vetores	118
6.3 Epidemiologia	119
6.3.1 Malária no mundo	119
6.3.2 Malária no Brasil	121
6.4 Tratamento da Malária	122
6.4.1 Quinina e compostos relatados	122
6.4.2 Combinação de antifolato	127
6.4.3 Composto de artemisinina	128
7. MATERIAIS E MÉTODOS	130
7.1 Ensaio de hemólise	130
7.2 Avaliação da sensibilidade do <i>Plasmodium falciparum</i> , em ensaios <i>in vitro</i> na fase eritrocitária.	131
7.3 Índice de seletividade	132
7.4 Ensaios de hepatotoxicidade	132
7.5 Avaliação da sensibilidade do <i>P. berghei</i> , em ensaios <i>in vitro</i> na fase hepática	133
7.6 Teste esquizonticida eritrocitário e exoeritrocitário <i>in vivo</i> com <i>P. berghei</i>	134
7.6.1 Ensaio <i>in vivo</i> fase hepática	134
7.6.2 Ensaio <i>in vivo</i> fase hepática II	135
7.6.3 Ensaio <i>in vivo</i> na fase eritrocitária do ciclo de desenvolvimento do <i>Plasmodium berghei</i> – 4 days suppressive test	136
7.7 Atividade potencial antimalárica através da inibição da formação de β -hematina	137
7.8 Estudos dos efeitos farmacológicos de extratos de <i>A. amazonicus</i>	141
7.8.1 Animais e considerações de ética	141
7.8.2 Modelos experimentais	141
7.8.3 Teste do efeito de extratos e frações de <i>A. amazonicus</i> em modelo de comportamento geral de camundongos	142
7.8.4 Avaliação da atividade motora utilizando o modelo do Campo Aberto	147
7.8.5 Efeito na atividade hipnosedativa no modelo de sono induzido por pentobarbital	143
7.8.6 Análise estatística	144
8. RESULTADOS E DISCUSSÃO	145
8.1 Teste hemolítico	145
8.2 Análise dos extratos e substâncias isoladas de <i>A. amazonicus</i> frente ao <i>P. berghei</i> e <i>P. falciparum</i>	147

8.2.1 Ensaio de hepatotoxicidade	147
8.2.2 Ensaio de determinação da atividade antimalárica.....	149
8.2.2.1 Ensaios <i>in vitro</i> na fase hepática	149
8.2.3 Ensaios <i>in vitro</i> na fase eritrocitária	153
8.2.3.1 Ensaios <i>in vitro</i> com extratos/substâncias de <i>A. amazonicus</i>	153
8.3 Ensaios <i>in vitro</i> com extratos/frações de <i>V. cayennensis</i>	163
8.4 Avaliação da inibição da formação de hemozoína pelos extratos/frações/ substâncias isoladas de <i>A. amazonicus</i> e <i>V. cayennensis</i>	168
8.5 Avaliação da atividade <i>in vivo</i>	173
8.6 Efeito de extratos e substâncias puras isoladas de <i>A. amazonicus</i> em modelo de comportamento geral de camundongos.....	178
8.6.1 Efeito na atividade hipnosedativa no modelo de sono induzido por pentobarbital.....	180
8.6.2 Efeito dos extratos e frações isoladas de <i>Ampelozizyphus amazonicus</i> na atividade motora utilizando o modelo do Campo Aberto.....	183
9. CONCLUSÕES	190
10. ANEXOS	193
10.1 Preparo dos reagentes.....	193
10.1.1 Vanilina Sulfúrica (Mattos, 1997).....	193
10.1.2 Komarowsky (Brandão, 1991).....	193
10.1.3 NP/PEG (Wagner, 1996).....	193
10.1.4 Reagente de Lieberman Burchard (Wagner, 1996).....	194
11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	195
12. ESPECTROS	218

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1 – Rendimentos dos extratos brutos de <i>A. amazonicus</i>	63
TABELA 2 – Deslocamentos químicos no RMN ¹ H e ¹³ C para 6 ab 5.....	68
TABELA 3 – Deslocamentos químicos no RMN ¹ H para CCFR2/11-16/ FR 11-16, em comparação com dados da literatura (Ferreira, 2011).....	71
TABELA 4 – Deslocamentos químicos no RMN ¹³ C para CCFR2/11-16/ FR 11-16, em comparação com dados da literatura (Ferreira, 2011).....	72
TABELA 5 – Deslocamentos químicos no RMN ¹ H para CCFR6/24-29/ P.....	76
TABELA 6 – Deslocamentos químicos no RMN ¹³ C para CECFR2/ 4_7.....	77
TABELA 7 – Deslocamentos químicos no RMN ¹ H e ¹³ C para CECFR4_5/ 58_63,em comparação com dados da literatura (Brandão, 1991).....	80
TABELA 8 – Dados de RMN ¹ H e RMN ¹³ C da cumarina Azul/ECCECAa.....	83
TABELA 9 – Dados de RMN ¹ H e RMN ¹³ C da PECC 4.....	86
TABELA 10 – Deslocamentos químicos no RMN ¹³ C para PECC 5.....	89
TABELA 11 – Dados de RMN ¹ H e RMN ¹³ C da CRF1/1_9.....	91
TABELA 12 – Deslocamentos químicos de RMN de ¹ H e ¹³ C de ECFVc 4_5/24_25/ P, em CHCl ₃ -d ₆ (Linuma et al, 1995).....	97
TABELA 13 – Comparação dos dados de RMN de ¹ H e ¹³ C de ECFVc 6_8.....	101
TABELA 14 – Comparação dos dados de RMN ¹ H e ¹³ C de ECFVc 4_5.....	104
TABELA 15 – DML (Dose mínima letal).....	148
TABELA 16 – Atividade de extratos de <i>A. amazonicus</i> , <i>in vitro</i> , contra as formas hepáticas do <i>Plasmodium berghei</i>	150
TABELA 17 – Concentração inibitória (IC ₅₀) dos extratos de <i>A. amazonicus</i>	156
TABELA 18 – Concentração de ácido betulínico nos extratos de <i>A. amazonicus</i>	162
TABELA 19 – Valores de IC ₅₀ de extratos e frações dos frutos de <i>V. cayennensis</i>	165
TABELA 20 – Resultados de I _{análise} no ensaio β-hematina.....	169
TABELA 21 – Relação estatística entre o tempo de latência e o tempo de sono.....	182

ÍNDICE DE ESQUEMAS

ESQUEMA 1 – Esquema de fracionamento do EDCCAa através da coluna filtrante.....	33
ESQUEMA 2 – Esquema de fracionamento da fração CCFR2.....	34
ESQUEMA 3 – Esquema do fracionamento da fração CCFR2/06-6b.....	35
ESQUEMA 4 – Esquema do fracionamento da fração CCFR2/7_10.....	36
ESQUEMA 5 – Esquema do fracionamento da fração CCFR2/FR11-16.....	37
ESQUEMA 6 – Esquema do fracionamento da fração CCFR6.....	39
ESQUEMA 7 – Esquema do fracionamento da fração CCFR7.....	40
ESQUEMA 8 – Esquema de fracionamento do ECCECAa através da coluna filtrante.....	42
ESQUEMA 9 – Esquema do fracionamento da fração CECFR4_5/ 45_47.....	44
ESQUEMA 10 – Esquema do fracionamento da fração CECFR/6.....	47
ESQUEMA 11 – Fluxograma do fracionamento e isolamento bioguiado de compostos de <i>V. cayennensis</i>	53
ESQUEMA 12 – Fracionamento do ECFVc.....	55
ESQUEMA 13 – Fracionamento do ECFVc 4_5.....	56
ESQUEMA 14 – Fracionamento do ECFVc 9_12.....	58
ESQUEMA 15 – Esquema de fragmentação da substância 6ab5.....	65
ESQUEMA 16 – Proposta de fragmentação 5, 6, 7, 8, 2', 3', 4', 5'-octametóxi- flavona.....	76
ESQUEMA 17 – Proposta de fragmentação de Azul/ECCECAa.....	82
ESQUEMA 18 – Proposta de fragmentação de ECFVc 4_5/24_25/P.....	94

ÍNDICE DE ESPECTROS

ESPECTRO 1 – Cronograma de íons totais e espectro de massa de 6ab 5	218
ESPECTRO 2 – Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) de 6 ab 5, ampliação das metilas	219
ESPECTRO 3 – Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) de 6 ab 5, ampliação dos hidrogênios olefínicos	219
ESPECTRO 4 – Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) de 6 ab 5, ampliação do hidrogênios carbinólico.	220
ESPECTRO 5 - Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) de 6 ab 5, ampliação do multiplete	220
ESPECTRO 6 – Espectro de RMN de ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) de 6 ab 5	221
ESPECTRO 7 – Mapa de contorno de HMBC (400 MHz, CDCl ₃) de 6ab 5	221
ESPECTRO 8 – Mapa de contorno de HMBC (400 MHz, CDCl ₃) de 6ab 5	222
ESPECTRO 9 – Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) de CCFR2/11-16/FR 11-16	223
ESPECTRO 10 – Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) referente aos carbonos da dupla ligação	224
ESPECTRO 11 – Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) referente ao carbono carbinólico da posição 3	224
ESPECTRO 12 – Espectro de massas da substância CCFR6/ 24-29 / P obtido com ionização de eletrospray (ESI) e detecção de íons negativos	225
ESPECTRO 13 – Espectro de massas MS/MS do pico m/z 461 da substância CCFR6/ 24-29 / P	225
ESPECTRO 14 – Espectro de massas MS/MS/MS do pico m/z 313 da substância CCFR6/ 24-29 / P	226
ESPECTRO 15 – Espectro de massas MS ⁶ do pico m/z 242 da substância CCFR6/ 24-29 / P	226
ESPECTRO 16 – Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) de CCFR6/ 24-29/P	227
ESPECTRO 17 – Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) de CCFR6/ 24-29/P	227
ESPECTRO 18 – Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de CECFR2/ 4_7	228
ESPECTRO 19 – Espectro de RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) de CECFR2/ 4_7	229
ESPECTRO 20 – Espectro de massas de CECFR4_5/ 58_63	229
ESPECTRO 21 – Espectro de RMN de ¹ H de CECFR4_5/ 58_63, em destaque os sinais referentes às metilas	230
ESPECTRO 22 – Espectro de RMN de ¹ H de CECFR4_5/ 58_63	230
ESPECTRO 23 – Espectro de RMN de ¹³ C de CECFR4_5/ 58_63	231
ESPECTRO 24 – Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, MeOD) de Azul/ECCECAa	231

ESPECTRO 25 – Espectro de RMN ¹³ C (125 MHz, MeOD) de Azul/ECCECAa	232
ESPECTRO 26 – Espectro de massas da substância Azul/ECCECAa	232
ESPECTRO 27 – Espectro de massas da substância PECC 4	233
ESPECTRO 28 – Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, DMSO) de PECC 4	234
ESPECTRO 29 – Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, DMSO) de PECC 4	234
ESPECTRO 30 – Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, DMSO) de PECC 4	235
ESPECTRO 31 – Espectro de RMN ¹³ C (125 MHz, DMSO) de PECC 4	235
ESPECTRO 32 – Ampliação do espectro de RMN ¹³ C (125 MHz, DMSO) de PECC 4	236
ESPECTRO 33 – Espectro de massas da substância PECC 5	237
ESPECTRO 34 – Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃ / MeOD) do PECC 5	238
ESPECTRO 35 – Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃ / MeOD) do PECC 5	238
ESPECTRO 36 – Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃ / MeOD) do PECC 5, com ampliação no próton H-3	239
ESPECTRO 37 – Espectro de RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃ / MeOD) do PECC 5	240
ESPECTRO 38 – Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃ / MeOD) de CRF1/1_9, com ampliação na região de 2,3 a 5,4 ppm	241
ESPECTRO 39 – Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃ / MeOD) de CRF1/1_9, com ampliação na região de 2,3 a 5,4 ppm	242
ESPECTRO 40 – Espectro de DEPT 135 (125 MHz, CDCl ₃ / MeOD) de CRF1/1_9	242
ESPECTRO 41 – Espectro de RMN de ¹³ C de ECFVc 4_5/24_25/P	243
ESPECTRO 42 – Espectro de RMN de ¹ H de ECFVc 4_5/24_25/P, ampliação dos grupos hidroxilas	243
ESPECTRO 43 – Espectro de RMN de ¹ H de ECFVc 4_5/24_25/P, ampliação do próton enólico H-2	244
ESPECTRO 44 – Espectro de RMN de ¹ H de ECFVc 4_5/24_25/P, ampliação dos tripletos referente aos prótons olefínicos	244
ESPECTRO 45 – Espectro de RMN de ¹ H de ECFVc 4_5/24_25/P, ampliação do duplete e duplo-duplete referente a prótons metilênicos	245
ESPECTRO 46 – Espectro de RMN HSQC de ECFVc 4_5/24_25/P	246
ESPECTRO 47 – Espectro de RMN HMBC de ECFVc 4_5/24_25/P, correlações do H-2	247
ESPECTRO 48 – Espectro de RMN de ¹ H de ECFVc 6_8 (CDCl ₃ ; 500 MHz) – destaque da região das metilas	248
ESPECTRO 49 – Espectro de RMN de ¹ H em expansão parcial com sinais de quarteto da substancia ECFVC 6_8	249
ESPECTRO 50 – Espectro de RMN de ¹ H em expansão parcial com destaque os acoplamentos vicinal e geminal	250
ESPECTRO 51 – Expansão parcial do espectro de RMN de ¹ H de ECFVc 6_8 – multiplicidade do H – ax	251
ESPECTRO 52 – Espectro de RMN de ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) de ECFVc 6_8	252

ESPECTRO 53 – Espectro de DEPT 135 e DEPT 90 (125 MHz, CDCl ₃) de ECFVc 6_8.....	253
ESPECTRO 54 – Espectro de RMN de ¹ H (CDCl ₃ ; 400 MHz) Expandido em 10,03 – 15,77 ppm.....	254
ESPECTRO 55 – Espectro de RMN de ¹ H Expandido (6,97 – 7,16 ppm) de ECFVc 4_5 em CDCl ₃	255
ESPECTRO 56 – Espectro de RMN de ¹³ C de ECFVc 4_5 (CDCl ₃ ; 400 MHz).....	256

ÍNDICE DE QUADROS

QUADRO 1 – Divisão e subdivisões da Família Clusiaceae	16
--	----

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 – Fármacos oriundos de plantas medicinais.....	04
FIGURA 2 – <i>Zizyphus jujuba</i>	08
FIGURA 3 – <i>A. amazonicus</i> na forma de arbusto (I) e cipó (II).....	10
FIGURA 4 – Ciclização de oxiesqualeno para vários esqueletos de saponinas.....	15
FIGURA 5 – A - Parênquima esponjoso com cavidade fenólica, B - Floema com prismas e fenólicos e C – epicarpo e mesocarpo dos frutos.....	18
FIGURA 6 – A - Folhas e B – Frutos de <i>V. cayennensis</i>	20
FIGURA 7 – Distribuição na região amazônica de <i>V. cayennensis</i>	21
FIGURA 8 – benzofenonas isoladas das folhas de <i>V. cayennensis</i>	22
FIGURA 9 – Material botânico: A – Folhas; B – Raízes e C – Caule.....	30
FIGURA 10 – Cromatografia em camada delgada das subfrações obtidas por coluna filtrante do ECCECAa.....	41
FIGURA 11 – Cromatografia em camada delgada da fração CECFR4_5/58_63, tendo como eluente Hex/AcOEt 6:4 e como revelador Vanilina Sulfúrica.....	45
FIGURA 12 – Cromatografia em camada delgada da fração VERM, tendo como eluente Hex/AcOEt 6:4 e como revelador Vanilina Sulfúrica.....	45
FIGURA 13 – Cromatografia em camada delgada dos precipitados obtidos do extrato ECCECAa.....	48
FIGURA 14 – Cromatografia em camada delgada da fração PECC 1-19.....	49
FIGURA 15 – Cromatografia em camada delgada dos precipitados obtidos do extrato clorofórmico das cascas das raízes de <i>A. amazonicus</i>	50
FIGURA 16 – Cromatografia das frações de 9 a 19, oriundas da fração ECFVc 9_12.....	58
FIGURA 17 – Estrutura de 6ab 5 - Lupeol.....	67
FIGURA 18 – I – Sitosterol; II - Estigmasterol.....	71
FIGURA 19 – 5, 6, 7, 8, 2', 3', 4', 5' – octametóxilflavona - Agehoustina A.....	74
FIGURA 20 – Ácido esteárico.....	78
FIGURA 21 – Ácido 3 β ,28 diidroxi-lup-20(29)-eno-27-óico.....	81
FIGURA 22 – Estrutura da cumarina codificada como Azul/ECCECAa.....	83
FIGURA 23 – Ácido betulínico.....	85
FIGURA 24 – Ácido melalêucico.....	88
FIGURA 25 – Betulina.....	91
FIGURA 26 – Espectro de massas de primeira ordem, em modo full scan, juntamente com fragmentação em segunda ordem do íon precursor de m/z 459, de ECFVc 4_5/24_25/P avaliado em modo negativo.....	93
FIGURA 27 – 1,3,8 triidroxi-4,5,7-trisoprenil-7-metil-antrone (harunganol B). Correlações observadas no espectro de HMBC.....	98
FIGURA 28 – Estrutura da Friedelina.....	100
FIGURA 29 – Estrutura da substância ECFVc 4_5 - Vismina.....	103
FIGURA 30 – Cromatogramas e espectros no UV do EECRAa.....	108

FIGURA 31 – Espectro de massas do EECRAa.....	109
FIGURA 32 – Cromatogramas e espectros dos extratos etanólicos e aquosos de <i>A. amazonicus</i>	110
FIGURA 33 – Cromatograma de HPLC do extrato CMB.....	111
FIGURA 34 – Espectros de UV, referente aos picos de 1 a 6, de CMB.....	112
FIGURA 35 – Espectro de MS/MS de CMB.....	113
FIGURA 36 – 3-O-β-D-glucopiranosil-(1→2)-α-L-ranopiranosil-15α-acetil-ampelozigenina.....	113
FIGURA 37 – Ciclo de vida das espécies de <i>Plasmodium</i>	115
FIGURA 38 – A – Oocisto. B – Oocisto com largo número de esporozoítos e C – Esquizonte contendo numerosos merozoítos.....	116
FIGURA 39 – Hemozoína.....	117
FIGURA 40 – <i>Anopheles darlingi</i>	118
FIGURA 41 – A – <i>A. stephensi</i> ; B – <i>A. Gambiae</i>	119
FIGURA 42 – Adaptado de WHO (2011).....	120
FIGURA 43 – Áreas de risco de transmissão da Malária na América do Sul.....	121
FIGURA 44 – Estrutura molecular da quinina.....	126
FIGURA 45 – Estrutura molecular da cloroquina.....	124
FIGURA 46 – Estrutura molecular da mefloquina.....	126
FIGURA 47 – Estrutura molecular da lumefantrina.....	127
FIGURA 48 – Estrutura molecular da artemisinina.....	129
FIGURA 49 – Labtek's de 300 µL.....	134
FIGURA 50 – Esquema representativo do ensaio <i>in vivo</i> da atividade antimalárica da fase eritrocitária do ciclo de vida do parasita.....	136
FIGURA 51 – Heme livre evidenciando o grupamento carboxila (1) e a formação do grupamento carboxil-propionato (2) que promoverá a dimerização.....	139
FIGURA 52 – Esquema de formação de cristais de hemozoína a partir de dímeros de β-hematina.....	140
FIGURA 53 – Esquema do teste do Campo Aberto.....	143
FIGURA 54 – Esquema do teste tempo de sono Induzido por Pentobarbital.....	144
FIGURA 55 – Deformações da membrana celular, indicando a atividade hemolítica das saponinas.....	146
FIGURA 56 – Placa de Ágar sangue com halo de hemólise.....	147
FIGURA 57 – Cromatografia em camada delgada (CCD) de frações pré-purificadas.....	152
FIGURA 58 – Cromatograma e espectro de UV do ácido betulínico detectado em 210 nm.....	160
FIGURA 59 – Cromatograma dos extratos de <i>A. amazonicus</i> obtido por CLAE-DAD.....	161
FIGURA 60 – Cromatograma dos extratos EACRAa obtido por CLAE-DAD.....	162
FIGURA 61 – Cromatografia em camada delgada de sílica de fase normal, das frações oriundas da cromatografia em coluna (CC) do ECFVc.....	164
FIGURA 62 – Cromatograma do extrato clorofórmico dos frutos de <i>V. cayennensis</i>	166

FIGURA 63 – Cromatograma e espectros de UV de: A – ECFVc 4_5 e B – ECFVc 6_8.....	168
FIGURA 64 – Estrutura do heme (hemina).....	170
FIGURA 65 – Estrutura da hemozoína.....	171
FIGURA 66 – Ensaio <i>in vivo</i> Fase Hepática.....	174
FIGURA 67 – Ensaio <i>in vivo</i> Fase Hepática II.....	175
FIGURA 68 – Ensaio <i>in vivo</i> Fase Eritrocitária.....	176
FIGURA 69 – Tempo médio de sobrevivência dos camundongos.....	176
FIGURA 70 – Efeito de diferentes frações de <i>Ampelozizyphus amazonicus</i> Ducke, na concentração de 50 mg/kg, no tempo de latência do sono no modelo de sono induzido por pentobarbital em camundongos.....	181
FIGURA 71 – Efeito de diferentes frações de <i>Ampelozizyphus amazonicus</i> Ducke, na concentração de 50 mg/kg, no tempo total de sono induzido por pentobarbital em camundongos.....	182
FIGURA 72 – Efeito de frações isoladas de <i>Ampelozizyphus amazonicus</i> Ducke no comportamento animal de camundongos no modelo do Campo Aberto: movimentação na caixa.....	185
FIGURA 73 – Efeito de frações isoladas de <i>Ampelozizyphus amazonicus</i> Ducke no comportamento animal de camundongos no modelo do Campo Aberto: números de cruzamentos na caixa.....	185
FIGURA 74 – Efeito de frações isoladas de <i>Ampelozizyphus amazonicus</i> Ducke no comportamento animal de camundongos no modelo do Campo Aberto: números de vezes que o animal levanta o corpo na caixa.....	186
FIGURA 75 – Efeito de frações isoladas de <i>Ampelozizyphus amazonicus</i> Ducke no comportamento animal de camundongos no modelo do Campo Aberto: números de vezes que o animal limpa/coça o focinho na caixa.....	187
FIGURA 76 – Tempo, em segundos, do comportamento exploratório ou parado dos camundongos (n=6).....	188

LISTA DE ABREVIATURAS

AcOet – Acetato de etila

CCD – Cromatografia em camada delgada

CC – Cromatografia em Coluna.

CDCl_3 – Clorofórmio

HPLC – High performance liquid chromatography CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência

DEPT – Distortionless Enhancement by Polarization Transfer

DMSO – DimetilSulfóxido

CH_2Cl_2 – Diclorometano

MeOD – Metanol deuterado

Hex – Hexano.

HMBC – Coerência heteronuclear em ligações múltiplas

COSY – Correlation Spectroscopy

MeOH - Metanol

CCDP – Cromatografia em camada delgada preparativa

R_f – Fator de retenção

RMN ^{13}C – Ressonância Magnética Nuclear de carbono – 13

RMN ^1H – Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio

UV – Ultravioleta

p.f – Ponto de Fusão

IV – Infravermelho.

APCI – ionização química a pressão atmosférica

s – simpleto

t – tripleto

d – duplete

dd – duplo-duplete

m – multiplete

ESI-MS – Electrospray Ionization Mass Spectrometry

MS – Mass Spectrometry

m/z – Mass/ charge ratio

Da – Dalton

1. INTRODUÇÃO

Os produtos naturais tem servido a humanidade como fontes de agentes terapêuticos desde os primórdios da história. Diferentes culturas, tem se beneficiado das plantas por suas propriedades medicinais, fomentando a estes grupos o mais alto nível de conhecimento sobre os benefícios e malefícios das plantas no tratamento e na cura de doenças (Tangjang *et al*, 2011). Estes conhecimentos populares são fontes promissoras para o isolamento de substâncias com atividade biológica, que são indispensáveis na medicina moderna.

As plantas superiores se caracterizam por sua habilidade em produzir uma vasta variedade de metabólicos, com diferente complexidade tanto química quanto biológica, e isto têm servido como modelos para o desenvolvimento de fármacos (Ballabh *et al*, 2008). Elas são utilizadas para curar ou pelo menos atenuar o impacto, de várias enfermidades, como por exemplo, o câncer (Manosroi *et al*, 2012), AIDS (Gambari *et al*, 2006), malária (Tsabang *et al*, 2012), tripanossomíase (Abdelrahman *et al*, 2011) ou a leishmaniose (Kala-azar *et al*, 2009).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 4 bilhões de pessoas que vivem nos países em desenvolvimento confiam no poder de cura das plantas e por esta razão as utilizam com frequência (Kadir *et al*, 2012). Este dado evidencia que as plantas medicinais constituem a “espinha dorsal” da medicina tradicional, por conseguinte, para este segmento da população mundial, que geralmente não podem arcar com os custos dos medicamentos, existe a necessidade de estudar estas plantas para regular sua segurança, eficácia e para desenvolver produtos farmacêuticos normalizados.

Diferentes sistemas de medicina tradicional são conhecidos, por exemplo, a medicina tradicional da China (Liu *et al*, 2012), a Ayuverdica da Índia ou a Unani e Unani-Tibb do Paquistão (WHO, 2001). Estes sistemas baseiam-se em uma teoria, uma educação formal e uma história documentada por escrito que são periodicamente revisados baseando-se na experiência e no pensamento contemporâneo (Touwaide *et al*, 2013).

Por outro lado, os sistemas terapêuticos usados na África têm-se mantido mais informal e menos organizado e baseado principalmente em tradições orais (Fakim *et al*, 2006). Apesar das diferenças entre estas culturas todas tem um aspecto em comum: considerar o homem como parte da natureza e a necessidade em se manter uma relação harmoniosa com ela para conservar uma boa saúde (WHO, 2001).

Muitos investigadores em diferentes partes do mundo estão ativamente envolvidos em recorrer à informação disponível na medicina tradicional. A seleção baseada em seus usos tradicionais é, sem dúvida, o critério mais popular, entre os pesquisadores, na investigação de plantas e na busca de substâncias ativas (Newman, 2008). Este interesse pelo estudo sistemático de medicamentos indígenas e plantas medicinais associadas ressurgiu nos anos 70 e este fenômeno mundial foi encorajado pela OMS, estimulada por sua vez pelo impacto da “experiência chinesa” (Liu, 2012).

A investigação está justificada e tem um objetivo específico. No entanto, ao usar este método devemos ter em conta que o uso da medicina tradicional não necessariamente deve coincidir com o conceito da medicina moderna, de modo que o extrato selecionado não deve ser estudado somente pela atividade pretendida pelos agentes da cura, mas por uma gama mais ampla de modelos biológicos.

Desta forma, o estudo da rosa perivinca, *Catharanthus roseus*, de Madagascar, popularmente usada para tratar a diabetes (Srinivas *et al*, 2003) rendeu os alcaloides, vincristina e vinblastina, com potente atividade tumoral. Foi com este sentido de explorar o desconhecido, com a inspiração em descobrir novas substâncias bioativas, que atualmente existem informações incomensuráveis sobre constituintes oriundos de plantas e suas respectivas atividades biológicas, dentre estes, podemos citar o curare, relaxante muscular (Hostettmann *et al*, 2003), a quinina (oriunda de espécies de *Cinchona*) para a Malária (Achan *et al*, 2011), reserpina de *Rauwolfia serpentina* para hipertensão (Frohlich *et al*, 1994) e digoxina de *Digitalis* para doenças cardíacas (Storstein *et al*, 1977). Outras substâncias, de origem natural, também são dignas de destaque, a

salicilina, precursora do ácido acetilsalicílico (1), atropina (2), artemisinina (3), colchicina (4), efedrina (5), morfina (6), fisostigmina (7), pilocarpina (8), quinidina (9), taxol (10), tubocurarine (11) e vincristine (12) (Hostettmann *et al*, 2003) (Figura 1), exerceram uma ação farmacológica potente e atualmente produzem efeitos imediatos, mas sua origem terapêutica é muito estreita, razão pelo qual ainda necessitam de investigações científicas rigorosas (Licciardi *et al*, 2011).

A organização mundial de saúde (OMS), considerando as plantas medicinais como importantes instrumentos da assistência farmacêutica, através de vários comunicados e resoluções, expressa sua posição a respeito da necessidade de valorizar a sua utilização no âmbito sanitário ao observar que 70% a 90% da população, nos países em vias de desenvolvimento, dependem delas no que se refere à atenção primária à saúde (WHO, 2011).

A descoberta de novas substâncias proporciona à comunidade científica atual, intrepidez para a perpetuidade das pesquisas neste ramo. Assim, por exemplo, uma enfermidade como a malária, que é a maior doença parasitária em áreas tropicais atingindo regiões como a África Oriental, Sul da Ásia e América do sul (Kaur *et al*, 2009), é tratada por fármacos que se originaram de plantas medicinais ou resultaram de suas modificações. O tratamento mais específico teve início com o uso empírico do pó das cascas de *Cinchona calisaya* e *Cinchona succiruba*. Dois químicos franceses isolaram a quinina, principal alcaloide das cascas de *Cinchona*, como mencionado anteriormente (Achan *et al*, 2011).

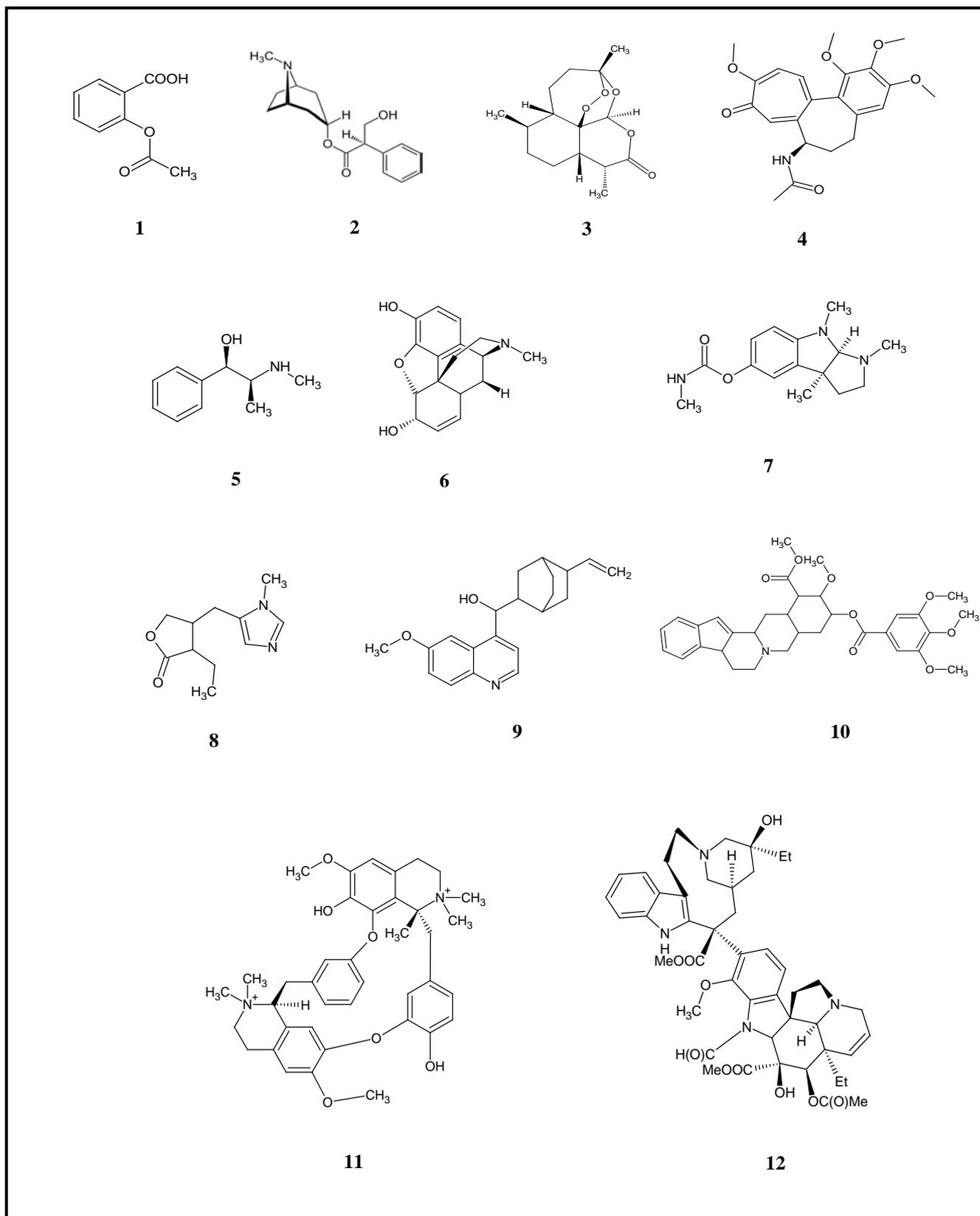


Figura 1. Fármacos oriundos de plantas medicinais

A quinina é a substância mais ativa contra os sintomas da malária, administrada com uma composição química definida. Esta descoberta marcou uma etapa essencial na utilização de infusões ou extratos de *Cinchona*. Outra substância de origem natural foi a artemisinina, isolada da *Artemisia annua*, esta planta foi usada na medicina tradicional chinesa como remédio para resfriado e febre a mais de 2000 anos, sua atividade antimalárica foi relatada em 1956 (Vaishnav *et al*, 2010). Atualmente destaca-se dos outros antimaláricos pela sua potente atividade antimalárica, ação rápida e toxicidade reduzida. Os derivados semi-sintéticos dessa substância vem sendo usada de maneira crescente (Donno *et al*, 2012). Embora eles sejam efetivos contra *P. falciparum* resistentes à cloroquina, o tratamento combinado com outra droga é recomendado, a fim de se evitar o desenvolvimento de resistência. Infelizmente já existem indícios de cepas resistentes ao tratamento baseado na terapia com artemisinina e derivados no oeste do Camboja (Dondorp *et al*, 2009).

Embora muitos esforços, para a descoberta de substâncias ativas contra malária, não tenham fornecido a erradicação da doença no mundo, os estudos realizados até o momento nos concederam alguns benefícios para o alívio dos sintomas, tais como a dor, a febre e a redução da anemia (Donno *et al*, 2012). Resultados como estes incentivam a continuação das pesquisas com os produtos naturais, além disso, formas resistentes de *P. falciparum* aos atuais medicamentos estão aumentando em todo o mundo (Weis *et al*, 2006). Portanto, a abordagem etnofarmacológica pode ser o método mais eficiente para a seleção de plantas medicinais e consequente obtenção de substâncias ativas.

Apesar de toda contribuição oriunda do uso das plantas medicinais, seu potencial é ainda pouco explorado, pois há pouco tempo que estas se tornaram objeto de estudo científico (Barros *et al*, 2008). Estima-se que, das 250.000 a 500.000 espécies de plantas existentes, apenas 1 fração tem sido investigada cientificamente pela sua atividade biológica (Ngo *et al*, 2013).

A partir dessas considerações e motivados pela necessidade de mais e melhores fármacos contra uma doença negligenciada foram selecionadas duas espécies vegetais da Amazônia, *Ampelozizyphus amazonicus* e *Vismia cayennensis*, com o objetivo de avaliar seus constituintes químicos e o potencial de cada uma como agente antimalárico.

1.1. Família Rhamnaceae

A família Rhamnaceae possui cerca de 55 gêneros e 900 espécies de distribuição cosmopolita e hábito muito variado. Inclui desde árvores e arbustos, com frequência xerófilos, até trepadeiras lenhosas e raras ervas (Gotelli *et al*, 2011). São distribuídas nas regiões temperadas, subtropicais e tropicais de todo o mundo, na América do Sul possui ampla distribuição na Amazônia brasileira, venezuelana, colombiana e peruana, expandindo-se até o Equador (Lima *et al*, 2000). Apesar de muito heterogênea, cabe salientar que a família constitui um grupo monofilético, como demonstrado em estudo com sequências de DNA (Richardson *et al*, 2000). Quanto ao aspecto taxonômico, o mesmo autor salienta a necessidade de uma nova classificação supragenérica, que leve em consideração dados moleculares, juntamente com características morfológicas das espécies.

As Rhamnaceae apresentam folhas simples, pecioladas e de tamanho variado (ocasionalmente muito reduzidas ou ausentes), alternas, subopostas ou opostas, de bordo inteiro ou serrado, trinérveas ou peninérvias, glabras ou pilosas, com ou sem estípulas (às vezes interpeciolares ou transformadas em espinhos) e, por vezes, providas de glândulas dispersas no limbo ou dispostas nas extremidades de cada dente (Lima, 2006). As flores, em geral, diminutas, pentâmeras e simétricas, podem ser pediceladas ou sésseis, bissexuais ou, menos frequentes, unissexuais, e com tubo de forma variável, por muitas vezes reduzido (Lima, 2006). Os frutos das Rhamnaceae são caracterizados como drupas, representam uma seqüência evolutiva de cápsulas e drupas sincárpicas para esquizocarpos (*sensu stricto*) (Lima, 2006), levando em consideração

o caráter do mesocarpo carnosos e comestível (Lima *et al*, 2000). Muitas espécies da família tem importância medicinal.

Destacam-se nesse sentido, *Discaria americana*, *Ceanothus* spp, *Colletia spinosissima* e *C. paradoxa* são usadas no combate à febre (Giacomelli *et al*, 2004); *Hovenia dulcis*, para asma; *Rhamnus catharticus*, *R. purshiana*, *R. pumila* e *R. alpina*, como laxantes (popularmente conhecidas como cáscara-sagrada); *Discaria americana*, *Scutia buxifolia*, *Retanilla ephedra*, *R. obcordata*, *Rhamnus inebrians* e *Ceanothus* spp. (Silva *et al*, 2014), como tônicos; e *Scutia buxifolia* por suas propriedades digitalóides, diuréticas e hipotensivas.

As Rhamnaceae são ricas em antraquinonas, alcalóides, saponinas e triterpenos pentacíclicos (Brandão,1991).

1.1.1. Família Rhamnaceae no Brasil

No Brasil, as espécies vegetais da família Rhamnaceae têm ampla distribuição, ocorrendo desde o norte até o sul do país (Gotelli *et al*, 2012), com 20 espécies (sete endêmicas) incluídas em oito gêneros: *Alvimiantha*, *Colubrina*, *Crumenaria*, *Gouania*, *Reissekia*, *Rhamnidium*, *Rhamnus* e *Ziziphus* (Lima *et al*, 2006). Espécies do gênero *Ziziphus* são bastante estudadas devido a sua popularidade, como por exemplo, a *Z. joazeiro*, típica de sertões nordestinos onde apresenta grande valor econômico e ecológico. A planta conserva-se verde o ano inteiro e seus frutos são comestíveis, sendo ricos em vitamina C (Diogenes *et al*, 2010). Muitas outras espécies de *Ziziphus* apresentam frutos comestíveis, como *Z. jujuba* a *Z. mauritiana*, sendo, inclusive, cultivadas em escala comercial (Yi-ling *et al*, 1982). *Ziziphus jujuba* (**Figura 2**) é uma planta nativa da China e muito comum na China e Coreia do sul (Zhao *et al*, 2006) com distribuição nas regiões tropicais e subtropicais da Ásia e América. Seus frutos são utilizados no tratamento de úlceras, doenças pulmonares e febre, as sementes são hipnóticas, narcóticas, sedativas, tônicas e utilizadas contra dores de estômago. Dos estudos farmacológicos já realizados, foram

encontrados nos extratos das sementes, folhas e dos frutos, atividades ansiolíticas, sedativas, hepatoprotetor, capacidade significativa de redução de peso e anti-cancer (Chowdari, 2010).



Figura 2. *Ziziphus jujuba*.

Fonte: portalsaofrancisco.com.br

O gênero *Ampelozizyphus* pertencia ao *Ziziphus*, devido à semelhança dos frutos quando imaturos (Ducke *et al*, 1935). Entretanto, três anos mais tarde, quando os frutos maduros foram encontrados e analisados identificou-se uma semelhança com plantas das famílias Rutaceae e Euphorbiaceae e, atualmente, após um extenso estudo sobre a filogenia da Rhamnaceae, as espécies foram organizadas em três grupos e 11 tribos (Richardson *et al*, 2000). Baseado nestes estudos foi estabelecido uma nova tribo, Ampelozizipheae, unicamente com o gênero *Ampelozizyphus* (Meier *et al*, 2008), o qual merece destaque por ser utilizada no tratamento de sintomas da malária e como antídoto contra veneno de cobras na região Amazônica (Krettli *et al*, 2001; Rosas *et al*, 2007; Diniz, 2009).

1.2. *Ampelozizyphus*

Este gênero é considerado monotípico em Rhamnaceae (Meier *et al*, 2008), sendo endêmico da região amazônica (Meier *et al*, 2008; Lima, 2006). Como já mencionado *Ampelozizyphus* foi inicialmente incluído na tribo Zizyphaeae por Ducke, 1935. Posteriormente, Suessenguth (1953) transferiu para o gênero Rhamneae e atualmente é incluso uma nova tribo

nesta família, a tribo Ampelozizyphaeae, para melhor posicionar este gênero (Lima, 2006). Sobre as espécies deste gênero, apenas a *Ampelozizyphus amazonicus* estava associada. No entanto, após uma exploração na cordilheira costeira da Venezuela, uma segunda espécie foi descoberta, a *Ampelozizyphus guaquirensis* (Meier *et al*, 2008).

1.3. *Ampelozizyphus amazonicus*

Ampelozizyphus amazonicus Ducke é endêmica da América do sul, com distribuição na Amazônia brasileira, venezuelana, colombiana e peruana, também encontrada na Guiana, Suriname e Guiana francesa (Meier *et al*, 2008). No Brasil é encontrada nos estados do Amazonas, Pará e Roraima, sendo encontrada em florestas de terra firme (Amaral *et al*, 2008). Floresce de outubro a dezembro e frutifica de novembro a fevereiro (Lima, 2006). *A. amazonicus* distingue-se da única outra espécie do gênero, *A. guaquirensis*, por seu hábito arborescente (trepador), inflorescência e a presença de nectários nas bases das lâminas foliares (Meier *et al*, 2008). A planta, quando jovem, assume a forma de um pequeno arbusto e com o passar do tempo transforma-se em cipó alastrando-se sobre outras árvores (**Figura 3**) (Santos *et al*, 2005).

Nas regiões onde é encontrada, a espécie é conhecida como “cerveja de índio” ou “saracura-mirá” (Rosas *et al*, 2007), mas também podemos encontrar outros nomes vulgares, como “saracura-muirá, cerveja-do-mato, cervejeira, cervejinha e curupira-mirá”. As denominações de cerveja à planta faz alusão à espuma abundante e de sabor amargo que é formada quando as cascas ou raízes são agitadas em água (Oliveira *et al*, 2011). Esta bebida aquosa possui uma metodologia de preparação, a qual é muito difundida entre os índios e os povos ribeirinhos. Seus efeitos medicinais são estimulante, energético e provoca resistência física e mental (Santos *et al*, 2005). O infuso de suas raízes é usado popularmente no tratamento contra picada de cobra e na prevenção da malária (Brandão, 1991).



I



II

Figura 3. *A. amazonicus* na forma de arbusto (I) e cipó (II).

Fonte: Fotos de Corrêa, 2007.

Em 1993, alguns pesquisadores tiveram contato direto com essa planta nos arredores de São Gabriel da Cachoeira/AM – Rio Negro. Após longa caminhada pela mata, por meio da orientação de dois indígenas do grupo tukano, a planta foi coletada e, em seguida, preparada a mistura da entrecasca das raízes e caule na água. Porções dessa bebida foram ingeridas por todos, que a partir daquele momento passaram a sentir-se restabelecidos do cansaço, da fadiga e da fome (Santos *et al*, 2005). Esta propriedade energética observada está ligada, também, na utilização pelos doentes com malária, visto objetivar não a cura propriamente dita, mas o restabelecimento da energia (Santos *et al*, 2005).

O método para preparar a bebida é, essencialmente, agitar as cascas ou raízes em água, no entanto são encontradas algumas diferenças na forma de preparo. O método descrito por Rodrigues (1989), por exemplo, o caule é levemente raspado e as cascas são batidas em água por 5 minutos. Desta forma a bebida está pronta para consumo; pelas comunidades quilombolas a agitação deve durar pelo menos dez minutos e a espuma formada pela agitação deve ser desprezada por sete vezes. Alguns comunitários afirmam que a espuma pode provocar mal estar, tontura e enjoo (Oliveira *et al*, 2011).

Com o intuito de comprovar as propriedades atribuídas à *A. amazonicus*, principalmente no que diz respeito a sua ação profilática e no tratamento da malária (Rosas *et al*, 2007), alguns estudos sobre sua farmacologia foram

realizados. Krettli e colaboradores (2001) mostraram que o extrato bruto das raízes de *A. amazonicus* é ativo contra os esporozoítas (forma infectante do agente etiológico da malária, encontrados nas glândulas salivares do mosquito vetor) do *P. gallinaceum* e/ou contra os protozoários que se encontram nos estágios iniciais do ciclo de vida do parasita. O extrato etanólico de *A. amazonicus* reduziu o parasitismo tecidual em galinhas inoculadas com o protozoário. Posteriormente, Andrade-Neto e colaboradores (2008) mostraram que culturas de esporozoítos do *P. berghei* após tratamento com extrato etanólico de *A. amazonicus* na concentração de 100 µg/mL, reduz significativamente o número de esquizonte em relação ao controle. Este resultado somado com o teste *in vivo*, onde camundongos tratados com altas doses do extrato etanólico não foram infectados após inoculação com esporozoítos, corroboram para o uso da “cerveja de índio” como um remédio profilático para malária. Dos estudos realizados frente ao *P. falciparum*, na fase sanguínea, com extratos provenientes de *A. amazonicus*, nenhuma atividade foi encontrada (Corrêia, 2007; Krettli *et al*, 2001), corroborando que a planta é eficaz na fase inicial da doença e não no tratamento.

Considerando que o uso dessa planta está sempre associado ao bem-estar e depuração do corpo é importante abordar os constituintes químicos identificados na espécie. Investigações químicas realizadas anteriormente descrevem a presença de saponinas e triterpenos em *A. amazonicus*. Das raízes já foram isoladas saponinas triterpênicas bem como outros triterpenóides como lupeol, ácido betulínico, betulina, ácido melaleucico e ácido dihidroxilup-20(29)-en-28β – oico. Essas últimas 5 substâncias também são encontradas em outras plantas (Brandão, 1991; Rosas *et al.*, 2007).

1.3.1. Saponinas

As saponinas são sintetizadas por várias plantas, possuem uma estrutura anfipática formada por resíduos hidrofílicos de açúcares ligados a

uma aglicona hidrofóbica. Apresentam esse nome devido ao fato de formarem espuma abundante quando agitados com água (do latim sapo= sabão) (Vincken *et al*, 2007) e esta propriedade resulta da diminuição da tensão superficial do líquido. O chá preparado com *A. amazonicus* forma espuma em abundância devido à presença dessas substâncias.

As saponinas triterpênicas fazem parte da família dos terpenos que é a maior família de substâncias naturais sendo constituída por mais de 40.000 moléculas diferentes. Em geral, os terpenóides tem como precursor o ácido mevalônico que é formado a partir da Acetil-Coenzima A (CoA). A Acetil-CoA é formada pela ativação da molécula de ácido acético, através de esterificação, pelo grupo tiol da molécula de CoA. O ácido mevalônico é ativado por fosforilação seguida por eliminação descarboxilativa, para gerar o pirofosfato de 3-isopentila (IPP). A isomerização deste último a pirofosfato de 2-isopentila (DMAPP) resulta numa molécula que pode ionizar-se facilmente e adicionar-se a cinco sucessivas unidades de IPP, gerando uma molécula triterpênica de 2,3 epoxi-esqualeno (Aharoni *et al.*, 2005).

Esse processo de biossíntese do 2,3 oxiesqualeno é comum aos animais, fungos, algas e plantas superiores. No entanto, após sua formação, as rotas biossintéticas entre os organismos citados divergem bastante. Os vegetais são capazes de ciclizar o 2,3-oxiesqualeno, que se encontra em uma conformação cadeira-cadeira-cadeira, gerando especificamente as agliconas de saponinas tetracíclicas do tipo damarano (Bruneton. 1999). Saponinas do tipo damarano tem recebido muita atenção de cientistas do mundo inteiro, especialmente pesquisadores chineses e japoneses, devido suas estruturas únicas e várias atividades biológicas. Investigações anteriores demonstraram que estes tipos de substâncias possuem numerosos efeitos biológicos, tais como, potente adjuvante em células, anti-tumor, anti-diabete, hepatoprotetor, antiinflamatório e efeitos antioxidantes (Ky *et al*, 2010). Uma série de rearranjos de hidreto e grupamento metila no carbocátion damarenila levam ao carbocátion C8 tirucalenila, e todas saponinas que derivam deste carbocátion são

classificadas como *saponinas do tipo tirucalano*. O anel de 5 membros ao lado do carbocátion damarenila pode expandir pelo rearranjo da ligação C16-C17, ou pelo rearranjo da ligação C13-C-17. O rearranjo da ligação C16-C17 leva ao carbocátion tetracíclico bacharenila e pode ser seguido por reações com a ligação dupla C24-C25 para formar o carbocátion pentacíclico lupenila C25. Todas saponinas que derivam destes carbocátions são classificadas como *saponinas do tipo lupano* (Vincken *et al*, 2007). O carbocátion lupenila pode ser rearranjado, mas primeiro ao carbocátion C18 germanicenila, e então através de uma série de rearranjos de hidretos para o carbocátion C13 oleanila. Todas saponinas derivadas deste carbocátion olenila são classificados como *saponinas do tipo oleanano*. O rearranjo do grupo metil α , no carbocátion germanicenila, produz o carbocátion C20 taraxasterenila, que pode ser desprotonado para produzir *saponinas do tipo taraxasterano*. O rearranjo do grupo metila no carbocátion germanicenila, seguido de vários rearranjos de hidretos, finalmente produz carbocátion C13, que pode ser desprotonado para formar *saponinas do tipo ursano*. O esqueleto ursano é, também, conhecido como esqueleto α -amirina.

O rearranjo da ligação C13-C17 no carbocátion C20 damarenila leva ao carbocátion C17, que pode ser ciclizado pelas reações com a ligação dupla no lado da cadeia para formar o carbocátion C25 pentacíclico hopenila. Todas as saponinas derivadas deste carbocátion são classificadas como *saponinas do tipo hopano*. Da ciclização inicial da conformação cadeira-barco-cadeira do oxiesqueleno, um carbocátion C20 tetracíclico protosteril é obtido, que sofre uma série de rearranjos de hidreto e grupamento metila, formando um intermediário carbocátion C9 lanosterila. Este carbocátion pode sofrer rearranjos do grupo metila e um hidreto para formar o carbocátion C5 cucurbitanila. Todas saponinas derivadas deste carbocátion são classificados como saponinas do tipo cucurbitano. O carbocátion lanosterila pode sofrer desprotonação do grupo metila C19 levando a formação do anel ciclopropano como é encontrado em cicloartenol (Vincken *et al*, 2007). Todas saponinas derivadas de cicloartenol são

classificadas como *saponinas do tipo cicloartano*. A desprotonação do carbocátion lanosterila produz lanosterol e todas saponinas derivadas de lanosterol são classificadas como saponinas do tipo lanostano. O lanosterol pode sofrer desmetilação e isomerização da ligação dupla, levando ao colesterol. As saponinas derivadas deste esqueleto são classificadas como *saponinas do tipo esteróide (Figura 4)*.

Em geral, as saponinas apresentam atividade antimicrobiana, inseticida, moluscicida e a atividade hemolítica, sendo esta a mais comum. A capacidade de produzir hemólise faz parte do sistema de proteção do vegetal contra ataques de predadores (insetos, vírus, fungos e bactérias), e, esta atividade está ligada a muitas das atividades antibacteriana, antifúngica e espermicida apresentada por uma variedade de plantas (Lacaille-Dubois & Wagner, 1996).

Além das atividades antibacteriana e antifúngica, as saponinas triterpênicas apresentam atividades contra outros micro-organismos como vírus (Chakraborty *et al*, 2002) e protozoários como *Leishmania infantum* (Germonprez *et al.*, 2005). Além disso, essas substâncias tem sido testados como adjuvantes em vacinas contra o HIV-1, citomegalovírus e *Toxoplasma gondii* (Yang *et al*, 2005).

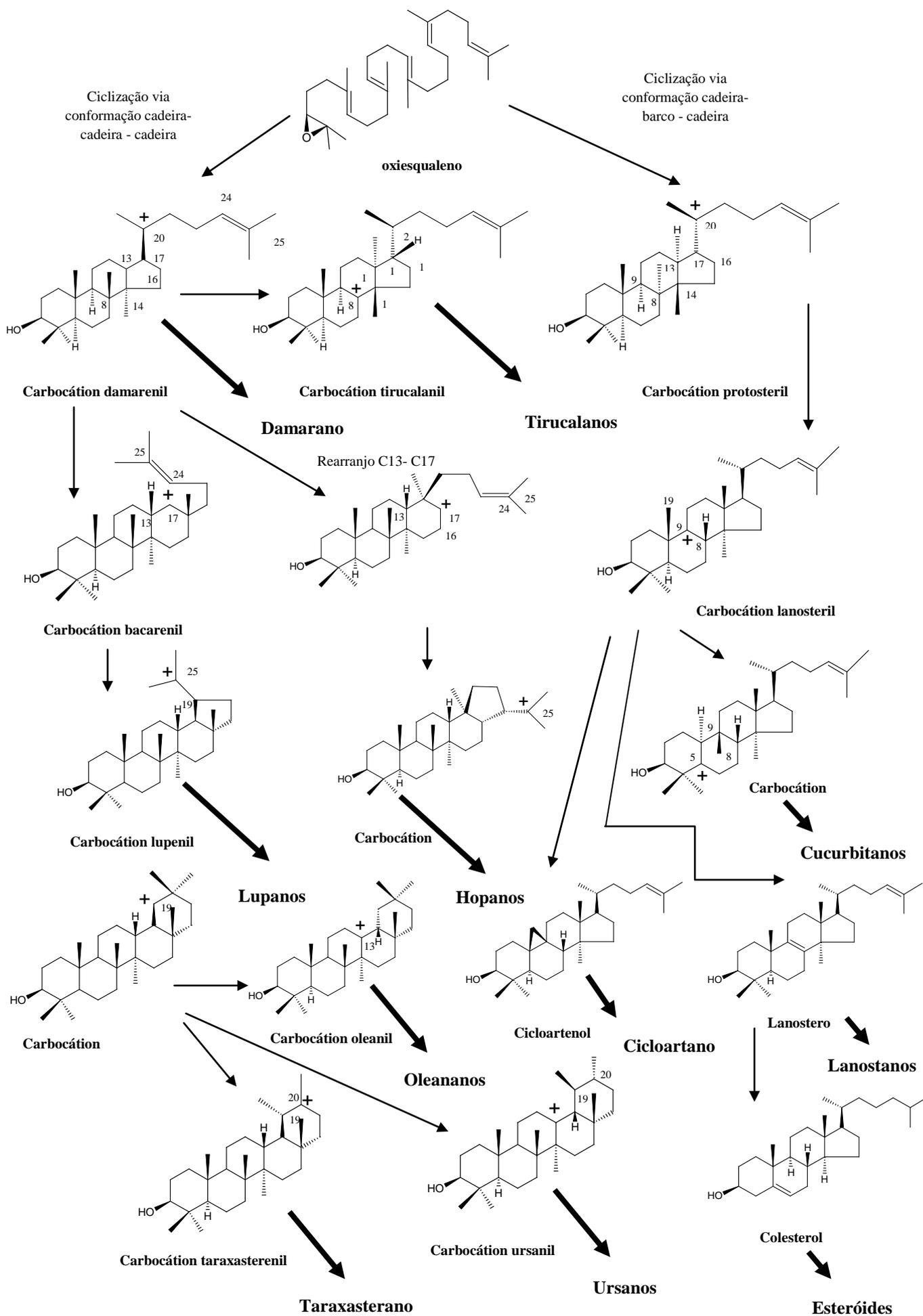


Figura 4. Ciclização de oxiesqualeno para vários esqueletos de saponinas (Vincken *et al*, 2007).

1.4.A família Clusiaceae

Plantas da família Clusiaceae, como todas as outras famílias, são fontes ricas de metabólicos secundários com atividades biológicas. As maiores classes de metabólicos secundários que têm sido isolados dessas plantas são: xantonas (Hay *et al*, 2004), cumarinas (Lavaud *et al*, 2012) e benzofenonas (Marti *et al*, 2009).

A família Clusiaceae ou Guttiferae (*nomina conservandum*), pertence à ordem Theales, subclasse Dilleniidae, classe Magnoliopsida e divisão Magnoliophyta (Cronquist, 1981); sendo dividida em seis subfamílias: Kielmeyeroideae, Calophytiloideae, Hypericoideae, Clusioideae, Moronoboideae e Lorotemonoideae (**Quadro 1**) (Silva, 2010). As plantas são compostas por árvores, subarbustos e poucas ervas, constituída aproximadamente por 40 gêneros e 1200 espécies, as quais são, principalmente, distribuídas nas regiões tropicais (Marti *et al*, 2009).

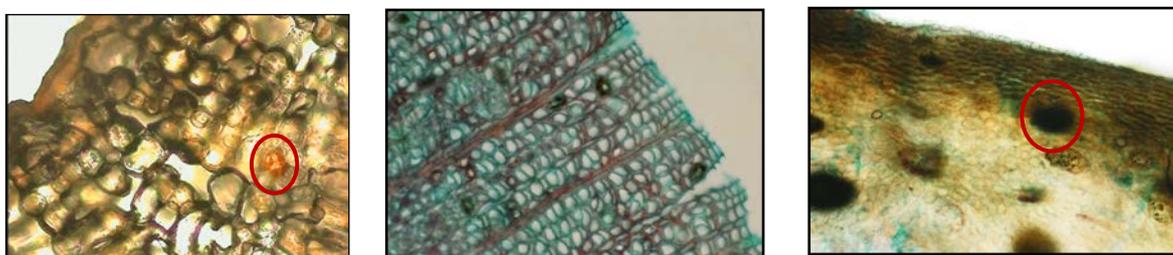
Quadro 1. Divisão e subdivisões da Família Clusiaceae (Fonte: Silva, 2010).

Subfamília	Tribo	Gênero	Número de espécies
Kielmeyeroideae	Kielmeyereae	Kielmeyara	20
		Mahuera	8
	Caraipeae	Caraipa	20
		Haploclathra	4
	Bonnetiaceae	Bonnetia	18
		Archytaceae	2
Calophytiloideae	Calophylleae	Calophyllum	110
		Mesua	40
		Manea	50
Clusioideae	Clusieae	Clusia	145

		Tomovita	60
		Allanblackia	8
	Garcinieae	Garcinia	200
		Penphalanium	7
		Rheedia	45
		Moronobea	7
Moronoboideae		Pentadesma	4
		Platonia	2
		Symphonia	20
Lorostemonoideae		Lorostemon	3
	Cratoxyleae	Cratoxylum	6
	Hypericaceae	Hypericum	400
Hypericoideae		Harungana	1
	Vismieae	Psorospermum	40
		Vismia	35

A presença de látex é uma característica comum das Clusiaceae e suas plantas são caracterizadas por possuírem folhas opostas ou alternas, sendo elas simples, sem estípulas e com várias nervuras secundárias delgadas. Raramente encontram-se flores solitárias. As inflorescências são vistosas, compostas por flores geralmente assimétricas, contendo de 2 a 5 sépalas distintas e 4 ou 5 pétalas persistentes, andróginas ou unissexuadas. Os frutos podem ser cápsula, quando secos e baga ou drupa, quando carnosos (Cronquist, 1981). Na família são encontradas, com grande frequência, células secretoras de substâncias fenólicas dispersas, geralmente produzindo proantocianidinas e armazenando vários tipos de xantonas. Em trabalho realizado por Moura e colaboradores (2008)

sobre as características morfológicas das folhas, cascas e frutos de *Vismia cayennensis* foi observado a presença de um parênquima esponjoso compacto com cavidade fenólica no limbo foliar (**Figura 5-A**); células quadrangulares e parênquima cortical desenvolvido contendo idioblastos fenólicos cristalíferos presente nas cascas (**Figura 5-B**) e nos frutos, ao longo do mesocarpo amiláceo com numerosos ductos secretores e feixes vasculares (**Figura 5-C**). Neste trabalho foi possível comprovar a existência de substâncias fenólicas em diferentes partes da planta.



A

B

C

Figura 5. A - Parênquima esponjoso com cavidade fenólica, B - Floema com prismas e fenólicos e C – epicarpo e mesocarpo dos frutos (Moura *et al*, 2008).

1.5. O gênero *Vismia*

O gênero *Vismia* é pertencente à família Clusiaceae, subfamília Hypericoideae e tribo Vismieae (Santos *et al*, 2000), compreendendo 52 espécies e com ampla distribuição nas Américas Central e Sul. As antraquinonas são metabólitos típicos que constituem esse gênero (Miraglia *et al*, 1981), e a ocorrência de antraquinonas preniladas é limitado apenas a três gêneros da família Clusiaceae: *Vismia*, *Hurungana* e *Psorospermum* (Delle monache, 1985). Há ainda outros componentes também encontrados nesse gênero, tais como vários triterpenóides, diantraquinonas, benzofenonas e lignanas (Nagen e De Oliveira, 1997).

Medicinalmente, algumas espécies de *Vismia* são apreciadas por seu látex alaranjado, que é usado por tribos existentes em toda bacia amazônica para o tratamento de herpes, fungo e feridas, além do uso do látex para a pintura do corpo (Miliken, 1999). O exsudato também é empregado na medicina popular como antireumático, em tumores e contra úlceras crônicas (Reys *et al*, 2004).

Uma espécie bastante estudada deste gênero é a *Vismia latifolia*, popularmente conhecida como pau-de-sangue, Lacre, Lacre-vermelho. A casca desta planta é utilizada na medicina popular como tônico e febrífugo. Outro derivado desta planta é sua resina que é utilizada como tinta para pinturas artísticas em tela. Prévios estudos fitoquímicos de *V. latifolia* revelaram a predominância de derivados xantônicos (Santos *et al*, 2000).

Outra espécie com bastante citação na literatura é a *V. guianeensis*, encontrada comumente nas capoeiras, não tendo sido vista em abundância nas matas (Almeida, 1993). É encontrada como arbusto ou árvore pequena nas Américas do sudoeste do México até o Brasil (Monacelli *et al*, 1999). No nosso país há ampla distribuição nas regiões do Norte e Nordeste (Almeida, 1993), sendo utilizada pela aplicação de seu látex (resina amarelo-avermelhado denominada goma-lacre ou goma-guta) e da infusão das folhas, no combate das afecções dermatológicas denominadas “impinges” causadas por fungos, além de outras aplicações, como purgativo. O decocto e a infusão das suas folhas mais as cascas são utilizados para reumatismo, como tônico e febrífugo (Almeida, 1993).

Em *Vismia guianensis* muitos metabólicos secundários já foram identificados na sua constituição: sitosterol, vismiona H (Botta *et al*, 1986), quinonas (Gonzales *et al*, 1980; Delle monache *et al*, 1985), diantronas (Politi *et al*, 2004), antraquinonas (Bilia *et al*, 2000; Politi *et al*, 2004) e xantonas (Botta *et al*, 1986; Bilia *et al*, 2000). Seo e colaboradores (2000) conseguiram isolar da fração clorofórmica das raízes de *V. guianeensis* cinco benzofenonas denominadas de vismiaguianonas e duas benzocumarinas chamadas de vismiaguianis. No mesmo trabalho os autores isolaram, a partir de extratos de raízes, cinco benzofenonas

(vismiaguiononas A, B,C, D e E) e duas benzocumarinas (vismiagianinas A e B). Monache e colaboradores (1980) identificaram na composição química dos frutos de *V. guianeensis* dois antranoides prenilados (γ -hidróxi-ferruginina A e γ,γ -dihidroxi-ferruginina A). Posteriormente, foi observada a atividade antioxidante de compostos fenólicos presentes nos extratos dos frutos de *V. guianeensis*, os antranoides prenilados ferruginina A, γ -hidroxiferruginina e da antraquinona vismiona A (Álvarez *et al*, 2008).

1.6. A espécie *Vismia cayennensis*

V. cayennensis, vulgarmente conhecida como “árvore-da-febre, goma-lacre, pau-de-lacre, lacre-branco e Pichirina”, é uma árvore de pequeno porte, de 6 a 7 metros de altura; galhos lisos; folhas em forma de lâminas de 8-13 cm de comprimento e 3 a 7 cm de largura, meio elíptica ou oblonga - elíptica para lanceoladas ou ovais ou oblongeoladas; frutos de 10-15 mm de comprimento (Corrêa, 1984) (**Figura 6**).



A



B

Figura 6 – A - Folhas e B – Frutos de *V. cayennensis*.

Fonte: www.mobot.org/mobot/research/ven-guayana/clusiaceae/vismia.

Habitam as capoeiras e áreas de regeneração natural da Região Amazônica (**Figura 7**), com distribuição na América tropical, América do Norte, oeste da América do Sul e na África (Miraglia *et al*, 1981). Também são habitantes das bordas de florestas, savanas, terras baixas de árvores com folhas semipermanentes, espalhadas pelo Amazonas, Colômbia,

Guiana, Suriname, Goiana Francesa e Nordeste do Brasil (Mourão *et al*, 2001).

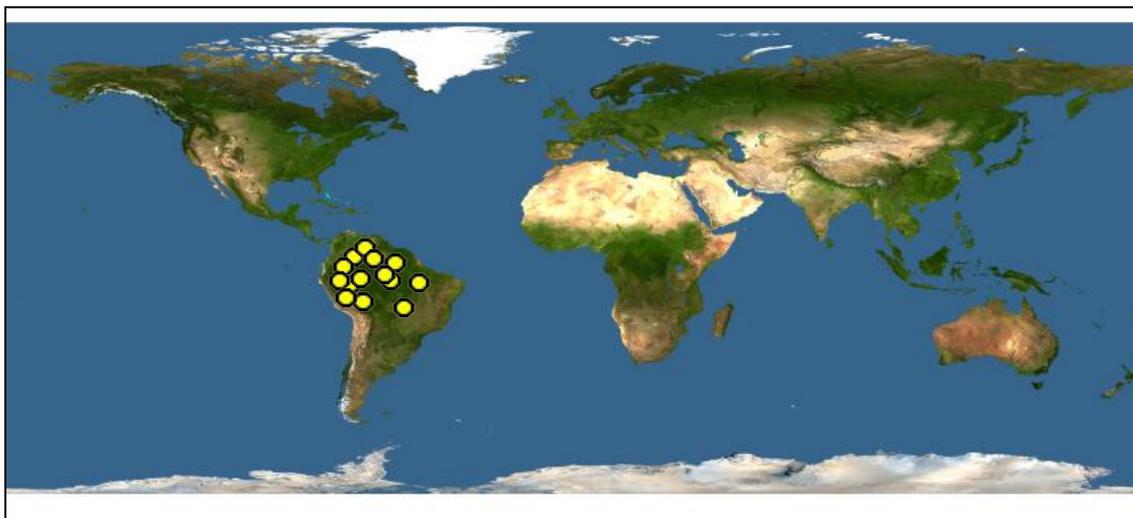


Figura 7 – Distribuição na região amazônica de *V. cayennensis*.
Fonte: www.discoverlife.org/20/m?kind=Vismia+cayennensis

A espécie *V. cayennensis* é utilizada, popularmente, como antireumática, para tratar infecções fúngicas que afetam a boca de crianças e baixar febres (Miliken e Albert, 1999). Segundo Miliken e Colaboradores (1999) os povos Yanomami do Amazonas, utilizam esta espécie para combater infecções de pele e no tratamento de lesões devidas a leishmaniose do tipo cutânea. O látex é friccionado nas bordas da lesão cutânea, obtendo-se a cicatrização da ferida.

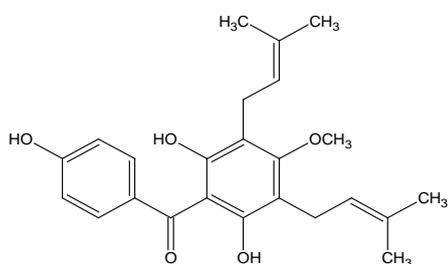
1.6.1. Constituintes químicos de *V. cayennensis*

Sobre a química de *V. cayennensis* os estudos ainda são limitados, dentre eles podemos mencionar estudo com as cascas, onde foram isolados a antraquinona fisiona (1,8-dihidroxi-3-metil-6-metoxi-antraquinona), sitosterol, lupeol, fridolina, ácido betulínico e fridelan - 3β -ol

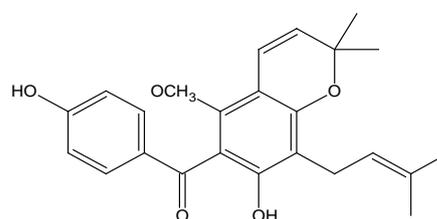
(Miraglia *et al*, 1981), dos frutos já foram isolados e identificados o ácido crisofânico, isocariofileno, β – selineno, trans – α – farneseno, vismiona A, vismiona B, ferruginina e γ – γ' - diidroxiferruginina A (Pinheiro *et al.*, 1984).

Também é relatado um estudo bastante relevante sobre as folhas, onde descreve o isolamento, pela primeira vez, de benzofenonas, denominadas como vismiafenonas D-G (**Figura 8**) (Fuller *et al*, 1999).

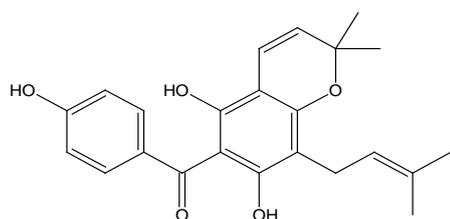
As vismiafenonas D – G foram avaliadas quanto sua atividade anti – HIV e somente a vismiafenona D exibiu atividade inibitória.



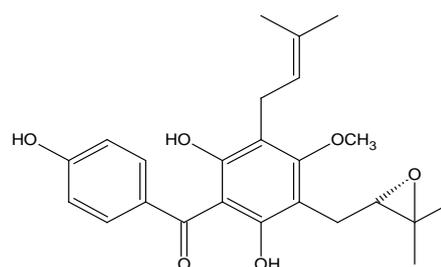
Vismiafenona D



Vismiafenona F



Vismiafenona E



Vismiafenona G

Figura 8 – benzofenonas isoladas das folhas de *V. cayennensis*.

Apesar da espécie em destaque não ser mencionada para a prevenção ou tratamento da malária em seu uso popular, ela foi escolhida para estudo químico e avaliação antimalárica pelo histórico que a família e o gênero nos oferecem: eles são uma rica fonte de compostos fenólicos com um vasto espectro de atividades biológicas. Además, a espécie *V. guineensis*, encontrada no oeste da África, é citada na medicina popular para o tratamento da malária (Menan *et al*, 2006), e um antranóide prenilado, identificado como vismiona H, isolado de suas raízes mostrou-se ser um potente antimalárico, com IC₅₀ de 0,088 µg/mL quando avaliado frente as formas eritrocitárias de *P. falciparum*. Neste trabalho sugere-se a importância de um grupo funcional –OR na posição C3 (François *et al*, 1999). Adicionalmente, algumas substâncias isoladas de outras espécies da família Clusiaceae, apresentam comprovada atividade antimalárica (Hay *et al*, 2004; Marti *et al*, 2009; François *et al*, 1999).

Foi neste sentido que a espécie *V. cayennensis* foi escolhida, desta forma a pretensão na descoberta de novos compostos antimaláricos é pela primeira vez sugerida, portanto, os resultados obtidos foram inéditos. Os estudos sobre identificação e isolamento dos compostos presentes em *V. cayennensis* ainda são escassos, conseqüentemente, o estudo fitoquímico atrelado ao estudo biológico é de grande valia para a comunidade científica e para a população.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliação química e biológica das folhas, do caule, das raízes de *Ampelozizyphus amazonicus* (Rhamnaceae) e frutos de *Vismia cayennensis* (Clusiaceae), visando o aprimoramento do conhecimento químico das espécies e verificação de suas propriedades medicinais relacionados à malária e à sua ação estimulante e energética.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade hemolítica direta dos extratos de *A. amazonicus* sobre eritrócitos humanos;
- Realizar ensaios preliminares para a avaliação do potencial antimalárico dos extratos obtidos;
- Fracionar o (s) extrato (s) ativo (s) de *A. amazonicus* e *V. cayennensis*;
- Purificar e caracterizar os compostos químicos presentes nos extratos bioativos das duas espécies botânicas;
- Avaliar a toxicidade aguda e as propriedades ansiolíticas dos extratos de *A. amazonicus* em camundongos;
- Avaliar os efeitos farmacológicos na atividade motora, no modelo campo aberto além da avaliação das atividades hipnóticas e sedativas, em modelo de sono induzido por pentobarbital.
- Avaliar a citotoxicidade de extratos, frações e substâncias isoladas, frente às células hepáticas HepG2;
- Realizar ensaios *in vitro* para estudo da atividade antimalárica durante o ciclo hepático, utilizando *Plasmodium berghei* ANKA, e na fase de desenvolvimento eritrocitário, utilizando *Plasmodium falciparum* ANKA;
- Realizar ensaios esquizontocidas eritrocitário e exoeritrocitário *in vivo* em camundongos BALB/c infectados com *P. berghei*;

- Avaliar a inibição *in vitro* de β -hematina pelos extratos, frações e substâncias isoladas.
- Desenvolver o método para avaliar o perfil cromatográfico de extratos de *A. amazonicus* e *V. cayennensis*.
- Quantificar o (s) componente (s) majoritário (s) nos extratos apolares de *A. amazonicus*.
- Desenvolver metodologias analíticas, por CLAE acoplado ao espectrômetro de massas, nos extratos polares de *A. amazonicus*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Coleta e identificação botânica

Ampelozizyphus amazonicus foi coletada na fazenda experimental da UFAM, situada no km 38 da estrada Manaus, BR 174 – Presidente Figueiredo em Abril/2008. Uma exsicata correspondente à espécie encontra-se depositada no herbário botânico do INPA sob número 191532.

Vismia cayennensis foi coletada na Reserva Florestal Ducke, km 26, Manaus, AM 010 – Itacoatiara em Fevereiro/2008, a exsicata correspondente à espécie encontra-se no herbário do INPA sob o número 18448.

3.2. Solventes e reagentes

Os solventes e os reagentes foram procedentes das marcas – Tedia ou Merck grau HPLC e P.A. A água utilizada nos experimentos foi água Milli-Q.

Os fracionamentos cromatográficos em coluna (CC) foram realizados em colunas de vidro, utilizando gel de sílica 60 (70–230 mesh ou 230-400 mesh, Merck), Sephadex LH-20, sílica C-18 ou resina de poliestireno amberlite XAD – 16 (Sigma) como fases estacionárias, conforme a natureza da amostra. As dimensões da coluna variaram de acordo com a quantidade de material empregado. As eluições foram feitas com solventes orgânicos destilados, puros ou misturas de solventes combinados em ordem crescente de polaridade.

A avaliação dos perfis cromatográficos das frações obtidas nos processos de fracionamento foi realizada por cromatografia em camada delgada (CCD). Para as cromatografias analíticas foram utilizadas

cromatofolhas de alumínio 20x20 cm recobertas com gel de sílica GF²⁵⁴ com 0,2 mm de espessura da marca Merck®.

A detecção das substâncias sobre CCD ocorreu pela visualização sob luz visível e ultravioleta (UV) em comprimentos de onda de 254 e 365 nm, seguida pela aplicação de agentes de revelação, por exemplo, vanilina sulfúrica, NP/PEG ou Komarowsky.

3.3. Equipamentos

3.3.1. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplado ao espectrômetro de massas (CLAE-DAD-EM)

As análises de CLAE – DAD – EM foram realizadas na Central Analítica – CBA.

O equipamento utilizado nas análises por CLAE foi o modelo HPLC Shimadzu LC-20, equipado com bomba de material inerte e com detectores DAD e ECD e HPLC Shimadzu LC 20, na região de 190 – 600 nm. Foi utilizado uma coluna C18 (Luna), 5 µ, tamanho 4,6 mm x 15 cm (Phenomenex), o aparelho também é equipado com injetor automático e forno de coluna e acoplado a um espectrômetro de massa Bruker microTOF Q-II (Brucker Daltonic), ajustado para os seguintes parâmetros de operação: temperatura do gás de secagem a 200° C, fluxo de 4 mL/mim, nitrogênio como gás nebulizador à pressão de 0,4 Bar e voltagem do capilar de 4500 V. As análises foram realizadas no modo negativo e a aquisição do espectro foi realizada no modo *full scan* de 0 a 120 Da.

Os solventes, metanol ou acetonitrila, utilizados nas diferentes análises por CLAE, foram de alta qualidade – grau CLAE – TEDIA.

A água foi obtida por destilação em sistema Mili-Q e os solventes foram filtrados em filtro 0,45 µm (marca Milipore) antes da utilização.

3.3.2. Cromatógrafo com fase gasosa acoplado a espectrômetro de massas (CG-EM)

As amostras foram analisadas em um cromatógrafo a gás Agilent Technologies 6896 N equipado com injetor split/splitless, acoplado a um espectrômetro de massas por impacto de elétrons, a 70eV, com detector de quadrupolo seletivo de massas AGILENT 5973 e banco de dados de espectroteca Wiley 7n (40.000 registros) do Instituto de Tecnologia em Fármacos de Manguinhos – far-manguinhos (FIOCRUZ) Rio de Janeiro. Todas as análises foram efetuadas em coluna HP-5 MS (5% difenil e 95% demetil polisiloxano) com dimensões de 30 m X 25 mm X 0,25 µm; gás de arraste : Helio 1mL/min; e razão de split 1:20.

3.3.3. Espectrômetro de Massas

As análises foram realizadas no espectrômetro de massas pertencente à Central Analítica- UFAM.

Os espectros de massas foram adquiridos usando um espectrômetro *ion trap* LCQ Fleet (Thermo Scientific) equipado com uma fonte de *eletronspray* operando no modo positivo ou modo negativo. A temperatura de vaporização foi de 250°C, o fluxo de “sheath gás” 30 L h⁻¹, gás auxiliar 5 Pa, corrente de descarga 3 µA e fluxo de 50 µL min⁻¹.

A administração das amostras foi feita por infusão direta através de bomba de fluxo controlado. As amostras foram preparadas em solução de metanol grau HPLC, tendo suas concentrações ajustadas para 50 ppm. Fez-se necessário adicionar gotas de ácido acético glacial para auxiliar a análise *tandem*. Para os experimentos MS/MS/MS, a taxa de fluxo de gás, a energia de colisão, e entrada de células foram ajustadas para otimizar o sinal de cada amostra e o máximo de informação sobre a estrutura do íon de interesse.

3.3.4. Ressonância Magnética Nuclear

As análises foram realizadas na Central Analítica da Fiocruz- RJ. Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) foram registrados em espectrômetros Bruker AC – 400 (400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C), utilizando DMSO – d_6 , MeOD ou CDCl_3 como solventes e TMS ($\delta = 0,0$ ppm) como referência interna. A interpretação dos dados foi realizada com o auxílio da técnica DEPT 135 e DEPT 90 e confirmados por dados espectroscópicos de correlação bidimensional HMBC e HSQC.

3.3.5. Ponto de fusão

Os pontos de fusão das substâncias foram obtidos em aparelhos eletrônicos da marca Toledo FP 62, no qual a faixa de aquecimento é programada pelo operador e o aparelho confirma no display a temperatura de fusão da amostra, juntamente com um aviso sonoro. Foi utilizado taxa de aquecimento de $5^\circ\text{C}/\text{min}$.

3.4. Preparação dos extratos e fracionamento

3.4.1. Obtenção dos extratos de *A. amazonicus*

As raízes, os caule e as folhas foram lavados, posteriormente secos em estufa com circulação de ar em temperatura de 40°C , por dois dias. Posteriormente, fez-se a separação das cascas das raízes do seu cerne e o procedimento foi igualmente realizado para o caule (**Figura 9**).

Todos os materiais botânicos foram triturados em moinho de facas, e os materiais em pó obtidos foram submetidos à extração, por agitação mecânica, com diferentes solventes orgânicos em ordem crescente de eluição (hexano, clorofórmio/diclorometano, etanol e água), na proporção de 1:10 por 8 horas. Após este período os extratos obtidos foram filtrados e

os resíduos vegetais foram novamente extraídos com o mesmo solvente por 8 horas. Este processo foi repetido até o esgotamento da extração.

Após a filtração, os solventes foram removidos sob pressão reduzida em um evaporador rotativo na temperatura média de 45°C. Os extratos secos resultantes foram armazenados em vidro âmbar.



30 - A

Material pulverizado = 420g
Fonte: fm2.fieldmuseum.org



30 - C

Material pulverizado das cascas = 630 g
Material pulverizado do cerne = 1500 g
Fonte: Corrêa, 2007.



30 - B

Material pulverizado das cascas = 250 g
Material pulverizado do cerne = 585 g
Fonte: Carmo, 2008.

Figura 9. Material botânico: A – Folhas; B – Raízes e C – Caule.

3.4.2 Obtenção do extrato saponínico

Inicialmente 5 g do extrato etanólico das cascas das raízes (EECRAa) foram solubilizado em um pequeno volume de metanol e, após a total dissolução do extrato foi adicionado, em excesso, éter para promover a precipitação das saponinas. O precipitado rico em saponinas foi separado do sobrenadante, por filtração a vácuo, e na solução remanescente foi

adicionado, novamente, éter em excesso. Este procedimento foi repetido até uma obtenção máxima de precipitado. O total de 20 g de extrato etanólico foi utilizado nesta metodologia. Obteve-se 15.7 g de extrato concentrado de saponinas, Brandão (1991).

3.4.2.1 Fracionamento em XAD-16

10 g do extrato saponínico foram solubilizado em 200 mL de água e eluído em 400 g de XAD-16. A eluição foi conduzida com água e as frações aquosas resultantes foram liofilizadas, obtendo-se um rendimento de 4.63 g de extrato saponínico. Este material foi identificado como extrato saponínico pós-XAD (ESPX).

3.4.3 Obtenção do extrato aquoso

Após as sucessivas macerações das raízes, caule e folhas, em ordem crescente de polaridade (pg. 29), realizou-se uma última extração, utilizando a água como solvente. A solução extrativa aquosa foi liofilizada, codificada como EACRAa (extrato aquoso das cascas das raízes de *A. amazonicus*) e mantida no freezer.

As preparações aquosas das raízes e do caule de cerveja de índio são efetivas para a prevenção da malária, suas metodologias são passadas de geração a geração (pg. 09). Conforme esse conhecimento popular foram preparados os chás das cascas das raízes e caule de *A. amazonicus* para estudo químico e farmacológico.

3.4.3.1 Método Rodrigues (1989)

Retiraram-se as cascas do caule, as quais foram pesadas (1g) e, posteriormente, agitadas com água por cerca de 5 minutos. A solução foi deixada em repouso por um período de 24 horas. O chá foi preparado na

proporção de 1% (m/v) em água destilada, sendo posteriormente filtrado e liofilizado. A amostra foi codificada como CMR (Chá Método Rodrigues).

3.4.3.2 Método quilombola (Oliveira *et al*, 2011)

Com as cascas das raízes secas (1g) foi procedida a extração com água destilada, em uma proporção de 1% (m/v). A solução foi agitada manualmente por um período de 10 minutos e a espuma formada foi desprezada, a solução aquosa foi separada do resíduo botânico e uma nova porção de água destilada, mantendo-se o mesmo volume, foi adicionada. Este procedimento foi repetido por sete vezes, sempre desprezando a espuma formada. A amostra foi codificada como CMR (Chá Método Quilombola).

3.4.3.3 Método Brandão (1991)

Em 9.8 g das cascas das raízes, foram adicionados 38 mL de água destilada, à temperatura ambiente. A solução foi submetida à agitação mecânica, constante, por um período de 24 h. A solução foi filtrada em algodão, e em seguida foi repetida a mesma operação, mas com 5 mL de água. A solução aquosa resultante foi liofilizada, A amostra foi codificada como CMB (Chá Método Brandão).

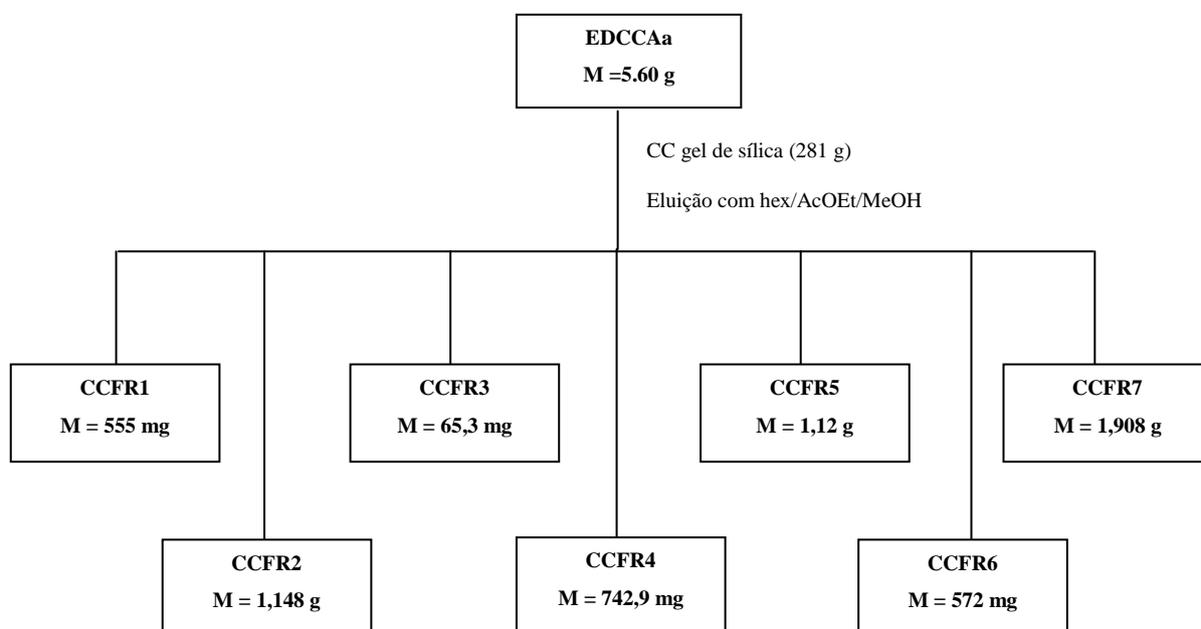
3.4.4 Fracionamento dos extratos clorofórmicos e diclorometano

Os extratos clorofórmicos e diclorometano foram submetidos a uma coluna filtrante, utilizando como suporte para a fase estacionária (sílica gel), um funil de separação, o qual foi acoplado a um Kitassato para a coleta das frações. A passagem dos solventes pela sílica foi acelerada por uma bomba de sucção conectada ao kitassato. Todas as colunas foram eluídas com solventes puros ou misturas Hex/AcOEt/ MeOH em gradiente de polaridade crescente.

O extrato diclorometano das cascas do caule (EDCCAA) (4,5 g) foi submetido à cromatografia em coluna filtrante sobre sílica gel 60 (230 – 400 mesh) (281 g) resultando em 7 frações; o extrato clorofórmico do cerne do caule (ECCECAa) (6,3 g) após fracionamento em gel de sílica (290 g) gerou 7 frações; os extratos clorofórmico das cascas das raízes (ECCRAa) (1,20 g) e cerne das raízes (ECCERAa) (1,50 g) também foram submetidos à mesma metodologia com sílica gel (140 e 150g, respectivamente) resultando em 4 frações, para cada extrato fracionado.

3.4.4.1 Fracionamento do EDCCAA (Extrato diclorometano das cascas do caule de *A. amazonicus*)

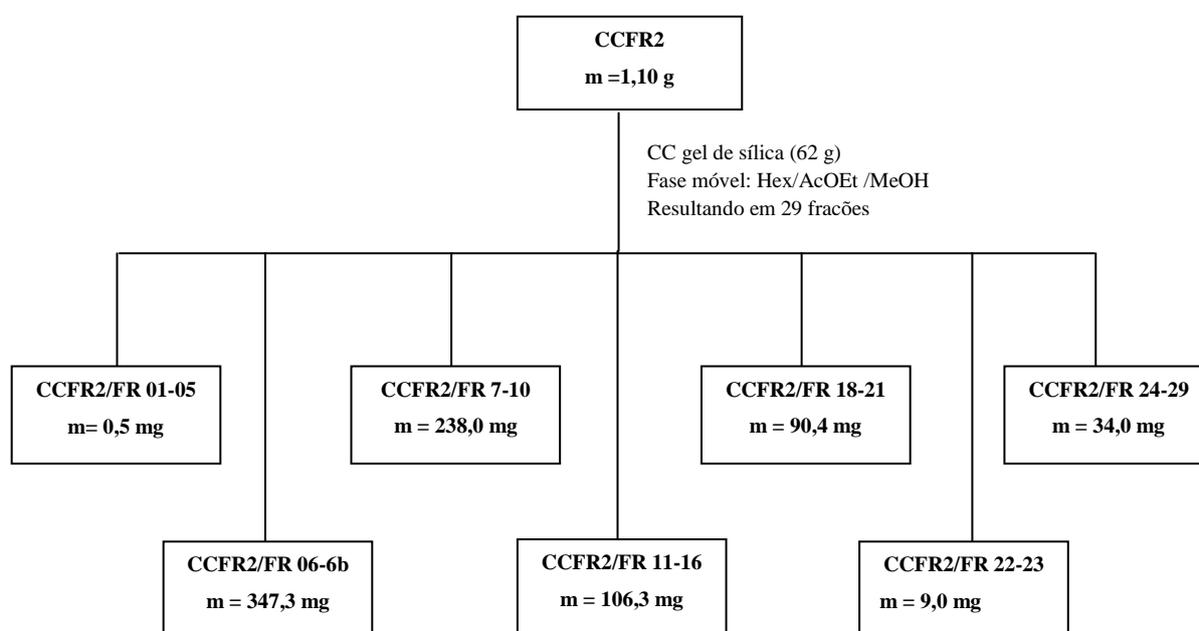
O fracionamento do EDCCAA, gerou 7 frações, codificadas como CCFR1, CCFR2, CCFR3, CCFR4, CCFR5, CCFR6 e CCFR7 (**Esquema 1**). Estas frações foram eluídas, respectivamente por Hex/AcOEt 90:10, Hex/AcOEt 30:70, Hex/ AcOEt 30:70, Hex/ AcOEt 30:70, Hex/ AcOEt 30:70, AcOEt (100) e MeOH (100).



Esquema 1. Esquema de fracionamento do EDCCAA através da coluna filtrante.

3.4.4.1.1 Purificação da fração CCFR2

A fração CCFR2, devido ao excelente perfil de separação cromatográfica observado em CCD e um bom rendimento, foi submetida à cromatografia em coluna de vidro (30 x 5 cm) empacotada com sílica gel (70-230 mesh, m = 62 g), e tendo como fase móvel Hex, AcOEt e MeOH, em gradiente de eluição. Este procedimento forneceu 29 frações (**Esquema 2**). Estas frações foram reunidas em 7 grupos, mediante análises comparativa das frações por CCD em eluente Hex/AcOEt 8:2, e pela utilização dos reveladores vanilina sulfúrica e Komarowsky.

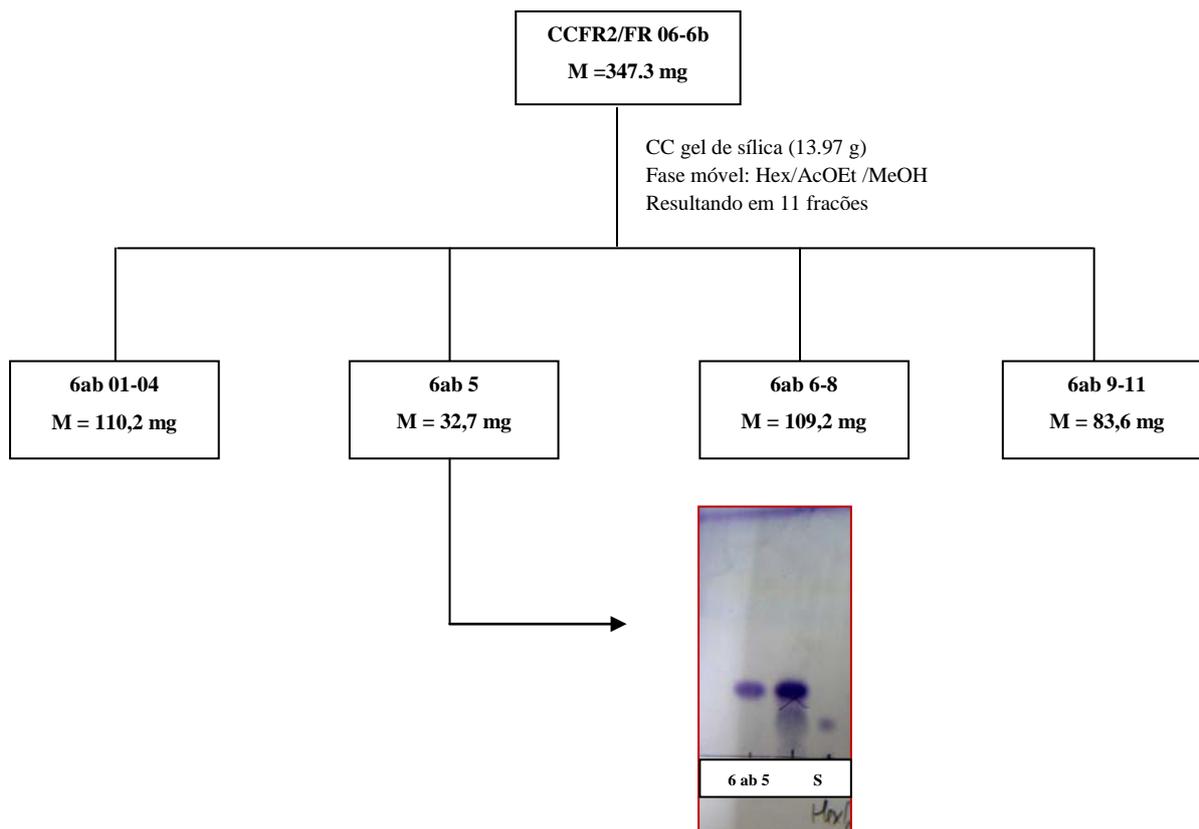


Esquema 2. Esquema de fracionamento da fração CCFR2.

A fração CCFR2/FR 06-6b foi submetida a uma nova cromatografia em coluna (30 cm de altura e 2,5 cm de diâmetro). Fase estacionária sílica gel (70-230 mesh, 13,97 g), fase móvel Hex, AcOEt e MeOH com gradiente crescente de polaridade.

As 11 frações coletadas (**Esquema 3**) foram analisadas por CCD de sílica gel, com eluente Hex/AcOEt 9:1 e reveladas com vanilina sulfúrica e

Komarowvsky. Após a reunião, as frações foram novamente avaliadas por CCD, utilizando o eluente Hex/AcOEt 9:1 e como revelador vanilina sulfúrica. A partir desta avaliação constatou-se que a fração **6ab 5** apresentou uma única mancha de cor lilás. Esta amostra foi analisada por diversos métodos espectrométricos para determinação da estrutura química.

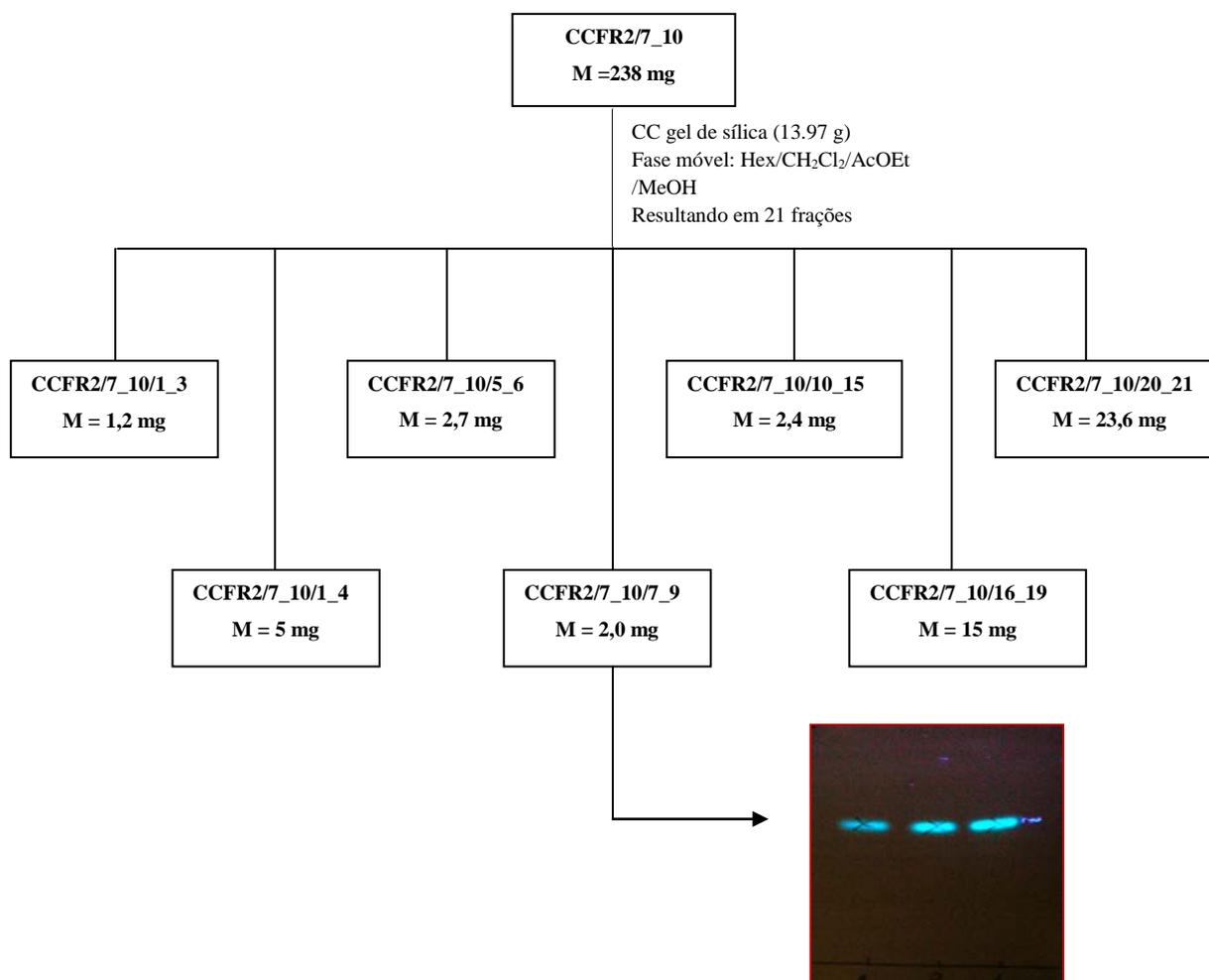


Esquema 3. Esquema do fracionamento da fração CCFR2/06-6b e cromatografia em camada delgada da fração 6ab 5, comparada com o padrão de sitosterol (s).

A fração CCFR2/7_10 (Ver purificação da fração CCFR2, p. 34) foi submetida a fracionamento em coluna com 30 cm de altura e 2,5 cm de diâmetro, obtendo-se 21 frações, de 5 mL cada, que foram reagrupadas em quatro frações (**Esquema 4**), de acordo com o perfil cromatográfico observado em CCD.

O esquema a seguir mostra o fracionamento de CCFR2/7_10, gerando um sólido amorfo amarelado codificado como CCFR2/7_10/7_9.

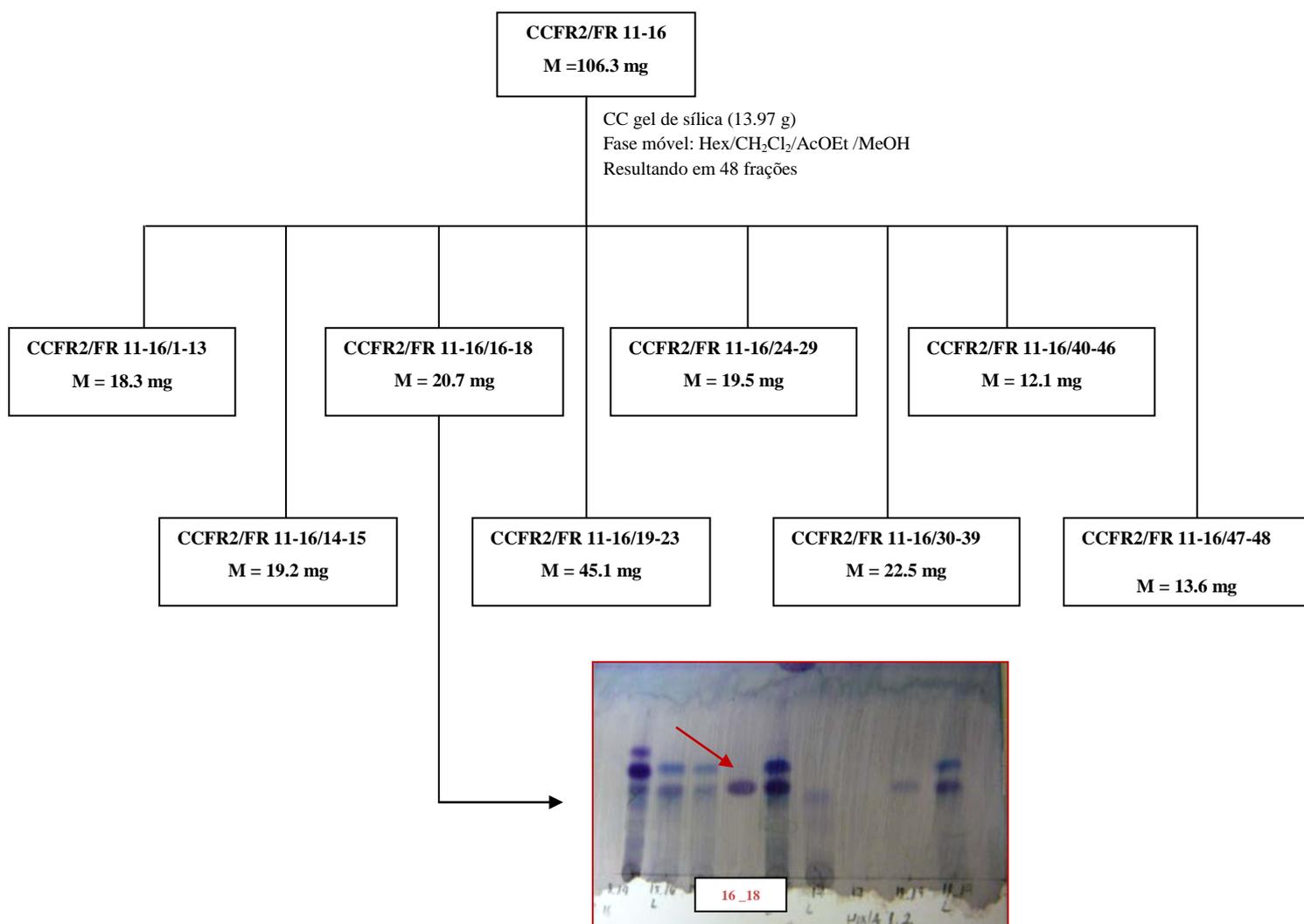
A análise por CCD (Fase móvel Hex/AcOEt 8:2), apresentou uma mancha azul predominante, quando a placa foi submetida à irradiação de luz ultravioleta. No entanto, devido a pequena quantidade de massa da fração, não foi possível a obtenção dos espectros de RMN de ^{13}C e bidimensionais (RMN-2D) para a elucidação do composto.



Esquema 4. Esquema do fracionamento da fração CCFR2/7_10 e Cromatografia em camada delgada da fração CCFR2/7_10/7_9, utilizando como eluente uma mistura de hexano e acetato de etila 8:2, e como revelador lâmpadas de U_{365nm}.

A fração CCFR2/11-16 (Ver purificação da fração CCFR2, p. 34) foi submetida à cromatografia em coluna de 30 cm de altura e 2,5 cm de diâmetro, utilizando como fase estacionária sílica gel (70-230 mesh) e como fase móvel o mesmo sistema de eluente citado anteriormente.

As frações, após remoção do solvente, foram comparadas por CCD de sílica. A análise dos cromatogramas permitiu a reunião de 9 frações (**Esquema 5**).



Esquema 5. Esquema do fracionamento da fração CCFR2/FR 11-16 e Cromatografia em camada delgada da fração CCFR2/11-16/16-18. Utilizando como eluente uma mistura de hexano e acetato de etila 8:2, e como revelador vanilina sulfúrica

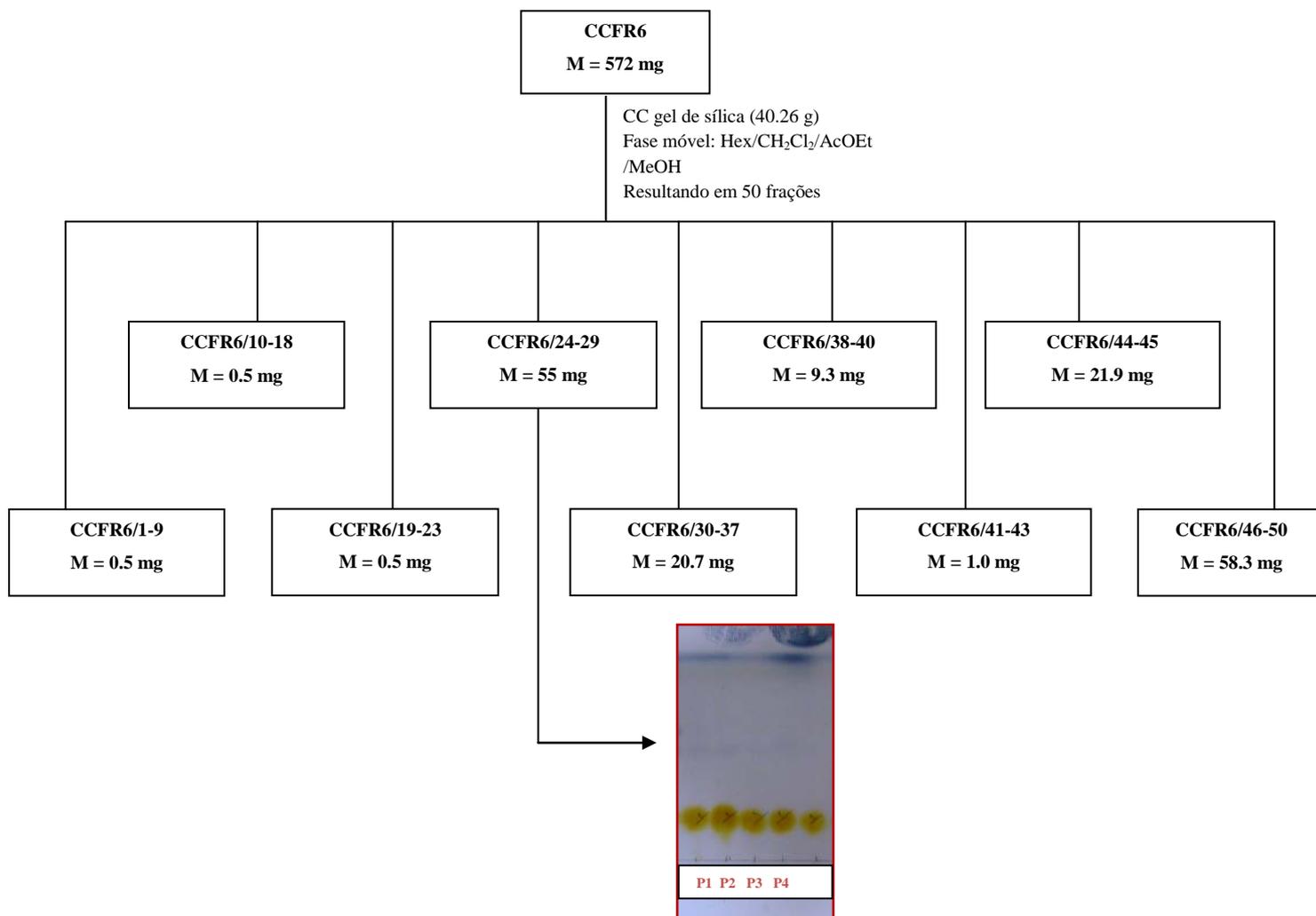
Dentre as frações coletadas, a fração CCRFR2/11-16/16-18 foi isolada como cristais na forma de agulhas, apresentando relativa pureza com o aparecimento de uma única mancha violácea na cromatoplaça de sílica normal (sistema de solvente Hex/ AcOEt 8:2;revelador: vanilina sulfúrica. Esta amostra foi adicionada às demais para análises espectroscópicas.

Os materiais dos grupos CCFR2/FR 18-21, CCFR2/FR 22-23, CCFR2/FR 24-29 (Ver purificação da fração CCFR2, p. 34), mostraram ser uma mistura complexa por CCD e foram recromatografados em coluna de sílica gel (70-230 mesh, 15,2 g) usando-se, como fase móvel Hexano, AcOEt e MeOH em polaridade crescentes, foram coletadas, respectivamente 19, 10 e 23 frações. As frações foram reunidas conforme análise em CCD e, após várias tentativas de purificação, não foi obtida nenhuma substância pura.

3.4.4.1.2 Purificação da fração CCFR6

Para purificação da sub-fração CCFR6 foi utilizada sílica gel (70-230 mesh). Para a montagem da coluna, com base nas metodologias descritas anteriormente, foram pesados 40,26 g de sílica gel, o qual foi misturado com hexano. A mistura foi então colocada numa coluna de vidro (35 cm de altura por 5,0 cm de diâmetro) e seu empacotamento foi feito de forma simples, com apenas a força da gravidade. O fracionamento da amostra foi realizado pelo acréscimo da fase móvel no topo da coluna, composta de misturas de Hex/ AcOEt e MeOH em ordem crescente de polaridade. As frações recolhidas (50 frações) apresentavam um volume aproximado de 5 mL e foram associados em 9 frações (**Esquema 6**), após comparação do seu perfil cromatográfico por CCD. Destas frações, apenas uma, CCFR6/24-29, apresentou um perfil cromatográfico com resolução razoável para futuro fracionamento. Na CCD, após inspeção pela luz ultravioleta nos comprimentos de onda 254 e 366 nm, foi observada uma mancha de coloração amarelada intensa, e com o objetivo de isolar esta substância foi

preparado uma CCDP (cromatografia em camada delgada preparativa) em cromatofolhas de sílica gel 60 F₂₅₄ (Merck).



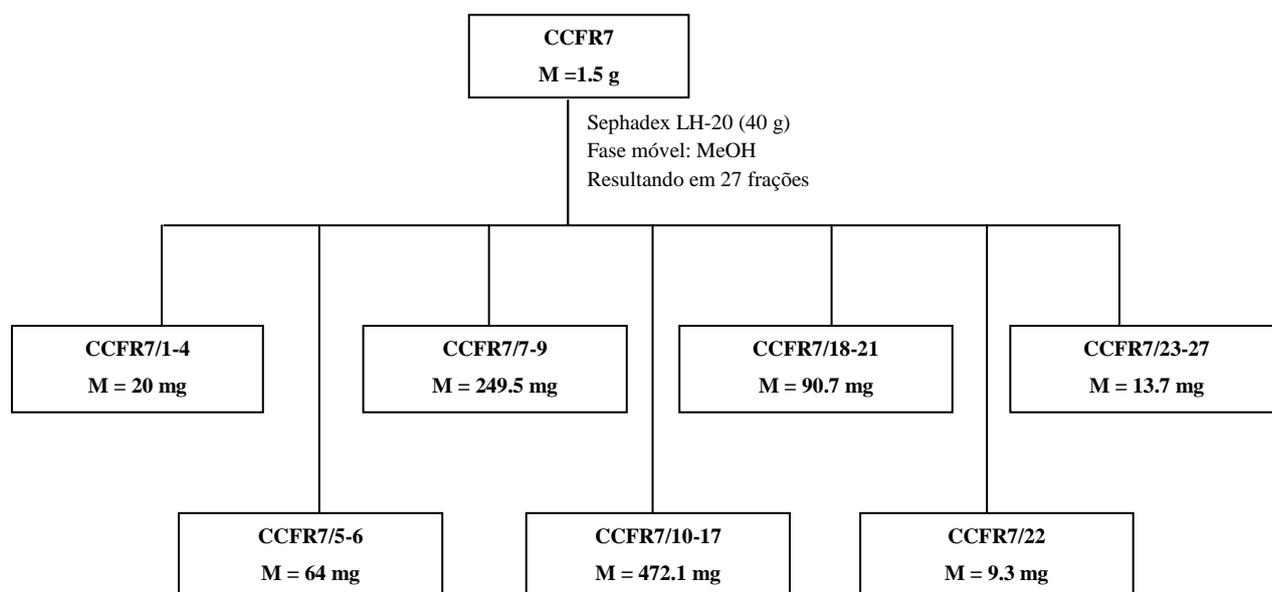
Esquema 6. Esquema do fracionamento da fração CCFR6 e CCD utilizando como eluente uma mistura de Hex/ AcOEt 7:3 e como revelador Vanilina Sulfúrica.

Uma alíquota de 10 µL da fração, na concentração de 2 mg/mL foi aplicada na placa. O tempo de desenvolvimento dos cromatogramas foi de aproximadamente 20 minutos, utilizando-se como fase móvel o sistema de solvente composto por Hex/AcOEt (7:3, v/v). As cromatoplasas foram visualizadas sob luz ultravioleta e a substância observada foi delimitada e cortada com tesoura. As fatias cortadas foram solubilizadas com metanol

por um período de 24 horas, após este período a fração foi filtrada em papel de filtro e logo após foi realizada a cromatografia em camada delgada, onde foi observada a pureza da fração, a qual foi codificada como CCFR6/ 24-29 / P.

3.4.4.1.3 Purificação da fração CCFR7

Para purificação da sub-fração CCFR7 (Ver purificação do EDCCAA, p. 33) foi utilizado o gel lipofílico Sephadex LH-20. Para a montagem da coluna (35 cm X 5,0 cm), foram pesados 40 g do gel, o qual foi misturado com metanol. Um total de 1,5 g de amostra foi solubilizado em metanol, em uma proporção de 200 mg para 2 mL, o qual posteriormente foi aplicado no topo da coluna de gel Sephadex LH-20 e em seguida eluída com metanol. A vazão da coluna foi de 45 gotas por minuto e as frações foram retiradas a cada 1 minuto. Foram obtidos um total de 27 frações as quais foram avaliadas por CCD C-18, usando o reagente de Komarowsky como revelador. Com base nas semelhanças do perfil cromatográfico as frações foram reunidas em 7 grupos (**Esquema 7**).



Esquema 7. Esquema do fracionamento da fração CCFR7. E CCD utilizando como eluente uma mistura de hexano e acetato de etila 2:8, e como revelador Vanilina Sulfúrica.

Das frações obtidas, a fração CCFR7/10-17 apresentou maior rendimento, portanto foi selecionada para purificação em CC, no entanto, não foi possível o isolamento de nenhuma substância pura, devido a complexidade das frações.

3.4.4.2 Fracionamento do ECCECAa (Extrato clorofórmico do cerne do caule de *A. amazonicus*)

O fracionamento cromatográfico do ECCECAa, através da coluna filtrante, forneceu 7 frações, codificadas como CECFR1, CECFR2, CECFR3, CECFR4, CECFR5 e CECFR7. Os solventes ou gradientes que eluíram as frações foram, respectivamente, Hex/ AcOEt 90:10, Hex/ AcOEt 30:70, Hex/ AcOEt 30:70, Hex/ AcOEt 30:70, Hex/ AcOEt 30:70, acetato de etila (100) e metanol (100).

As frações CECFR2 e CECFR3 apresentaram um aspecto amorfo de coloração amarelada. Os precipitados foram submetidos a sucessivas lavagens com metanol e separados conforme o grau de pureza, resultando em 7 frações codificadas como PECC (precipitado do cerne do caule) (**Esquema 8**).

As 5 primeiras sub-frações foram avaliadas por cromatografia em camada delgada (CCD) (**Figura 10**) tendo sílica-gel (70-230 mesh) como adsorvente e Hex, AcOEt (7:3) como eluente e revelação com solução de Komarowvsky.

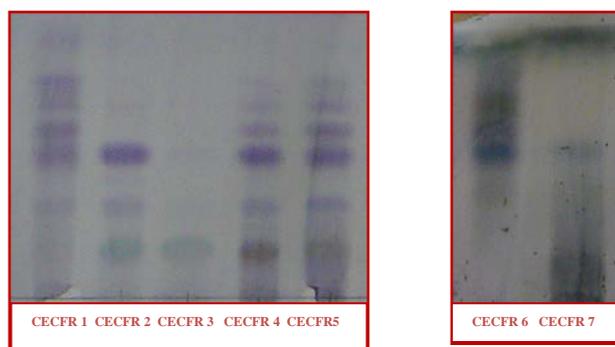
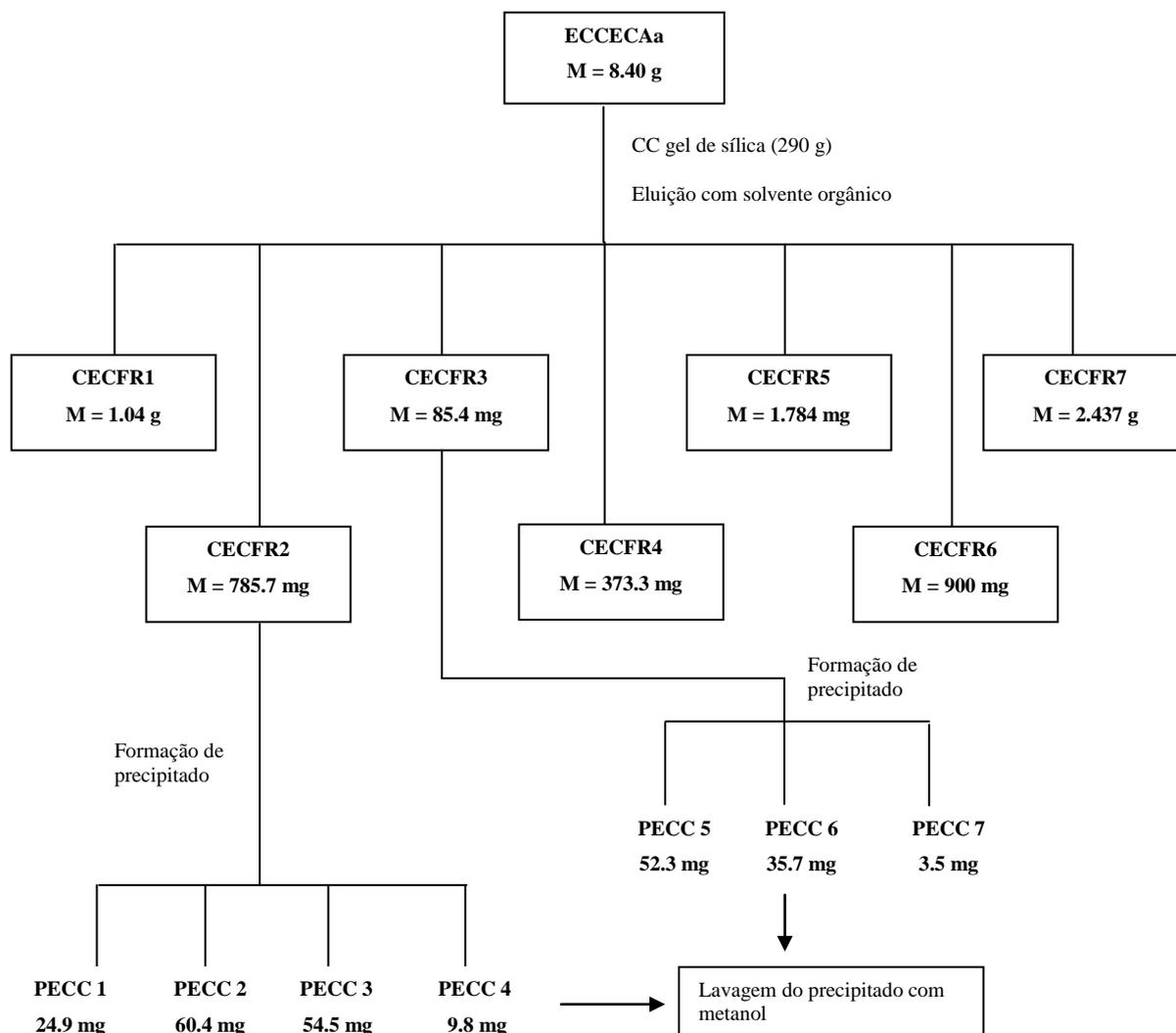


Figura 10. Cromatografia em camada delgada das subfrações obtidas por coluna filtrante do ECCECAa. Utilizando como eluente uma mistura de hexano e acetato de etila, e como revelador komarowvsky.



Esquema 8. Esquema de fracionamento do ECCECAa através da coluna filtrante.

Para avaliação das demais frações a mesma metodologia para análise cromatográfica foi utilizada, com exceção da proporção do eluente, que neste caso uma melhor separação foi obtida com Hex/AcOEt 3:7. Conforme as semelhanças observadas por CCD foram reunidas as frações CECFR4 e CECFR5.

3.4.4.2.1 Purificação da fração CECFR2

A sub-fração CECFR2 foi adsorvida em 1,0 g de sílica gel e em seguida foi submetida ao fracionamento em coluna cromatográfica (25 cm x 3,0 cm)

(30g de sílica gel). Foram utilizados os seguintes eluentes hexano como eluente de empacotamento, misturas de Hex, CH₂Cl₂, AcOEt e MeOH em ordem crescente de polaridade, posteriormente a coluna foi lavada com metanol. Diante deste procedimento foram coletadas 45 frações, as quais foram submetidas à análise em CCD e reunidas conforme semelhança.

As frações de 4 a 7 foram reunidas por apresentarem perfil químico semelhante. O bom perfil cromatográfico com poucas manchas em CCD e boa quantidade de amostra (87 mg) incentivou a realização de um novo fracionamento nas mesmas condições anteriormente mencionadas. Desta coluna foi isolado um composto em forma de cristais brancos codificado de **CECFR2/ 4_7** (10 mg).

3.4.4.2.2 Purificação da fração CECFR4_5

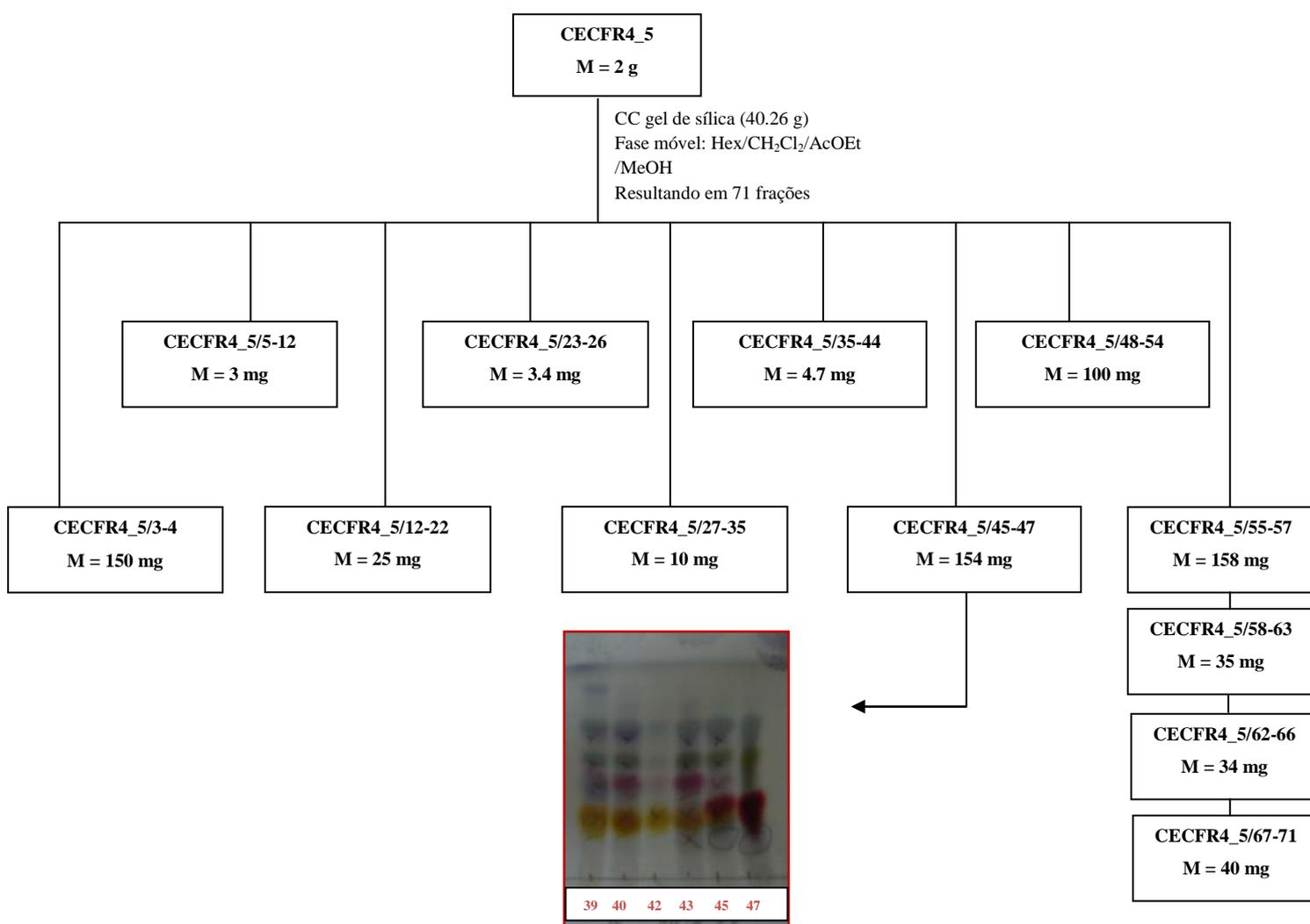
As sub-frações CECFR4 e CECFR5 foram avaliadas por CCD (Ver fracionamento do ECCECAa, pg. 42) onde foi observado o perfil químico semelhante das mesmas. Estas amostras foram reunidas e codificadas como CECFR4_5.

A fração CECFR4_5 foi fracionada por cromatografia em coluna (2,157 g), utilizando como fase estacionária 65 g de sílica (70-230 mesh) e como fase móvel misturas de hexano:CH₂Cl₂:AcOEt:MeOH, resultando em 71 frações. Todas as frações foram avaliadas por CCD, e aquelas que apresentaram perfil químico semelhante foram reunidas, resultando em 25 frações (**Esquema 9**).

Da fração codificada como CECFR4_5/58_63, após a evaporação do solvente, foi obtido um precipitado branco amorfo, esta substância foi avaliada por CCD que após revelação por vanilina sulfúrica foi observada a presença de uma única mancha (**Figura 11**).

Das demais frações apenas uma, CECFR4_5/ 45_47 (154 mg), apresentou um bom perfil cromatográfico (separação dos seus constituintes em CCD), justificando a continuidade dos fracionamentos cromatográficos. Esta fração, portanto, foi cromatografada numa coluna, de 30 cm de altura

e 2,5 cm de diâmetro, preparada com 6,81 g de sílica gel (230-400 mesh), com misturas de eluentes Hex:AcOEt de polaridade crescente (100:0 a 60:40, volume total de 0,2L; 50:50 0,5 L; 0:100, 0,2 L; AcOEt: MeOH 50:50, 0,4L e MeOH 0,2L). Após a eluição foram obtidos 16 frações de 5 mL cada. As frações coletadas foram observadas previamente sob luz ultravioleta a 254 nm e a 365 nm e posteriormente, as placas cromatográficas foram reveladas com solução de vanilina sulfúrica. As frações que apresentaram perfil químico semelhante foram reunidas, resultando em 9 frações.



Esquema 9. Esquema do fracionamento da fração CECFR4_5/ 45_47. E CCD utilizando como eluente uma mistura de hexano e acetato de etila 7:3, e como revelador Vanilina Sulfúrica.



Figura 11. Cromatografia em camada delgada da fração CECFR4_5/58_63, tendo como eluente Hex/AcOEt 6:4 e como revelador Vanilina Sulfúrica.

Das nove frações oriundas da CECFR4_5/ 45_47, a fração codificada como CECFR4_5/ 45_47/ 8_10 (25 mg) foi sujeita a cromatografia preparativa em camada delgada (3 placas) (Hex:Ac,6:4), possibilitando o isolamento de um novo composto ao qual se atribui o código VERM (1,5 mg) (**Figura 12**), porém a pouca quantidade impossibilitou a elucidação do composto.

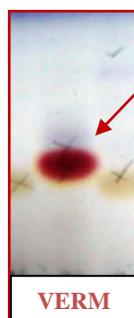


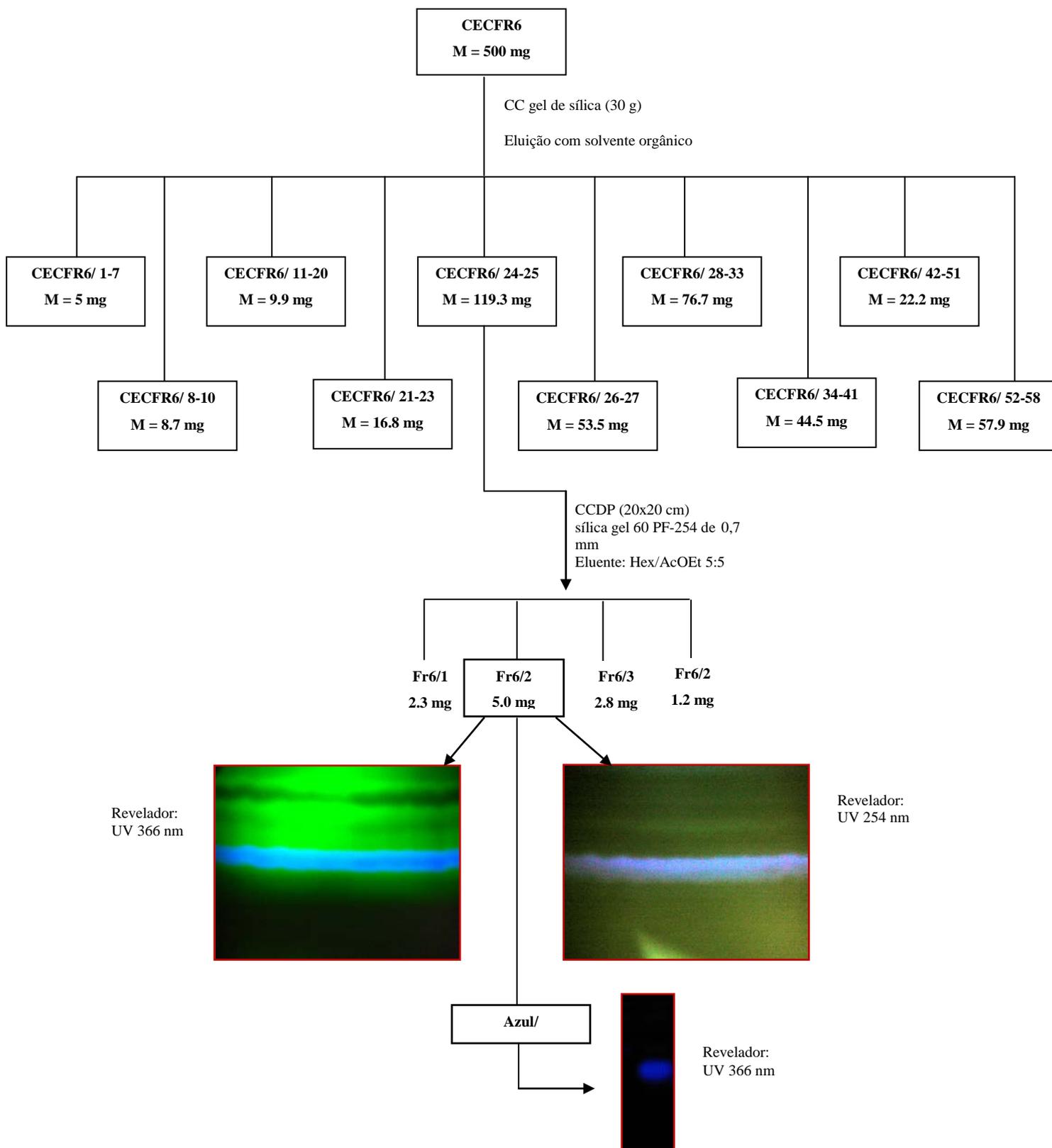
Figura 12. Cromatografia em camada delgada da fração VERM, tendo como eluente Hex/AcOEt 6:4 e como revelador Vanilina Sulfúrica.

3.4.4.2.3 Purificação da fração CECFR6

A sub-fração CECFR6 (Ver fracionamento do ECCECAa, p. 42) foi cromatografada em coluna de sílica gel 60 (Altura = 30 cm e diâmetro = 3,0 cm), eluído em Hex, gradiente crescente de Hex/CH₂Cl₂, CH₂Cl₂, gradiente

crescente de CH₂Cl₂/ AcOEt, AcOEt, gradiente crescente de AcOEt / EtOH até 100 % de EtOH, obtendo-se um total de 58 frações de aproximadamente 10 mL cada. As frações foram analisadas por CCD e reunidas em 8 novas frações, de acordo com o perfil cromatográfico semelhante apresentado (**Esquema 10**).

A fração reunida 24-25 (119,3 mg) após ser analisada por CCD, foi submetida a uma cromatografia em camada delgada preparativa utilizando como eluente hexano/ AcOEt 50%. Ao final da CCDP obteve-se 4 frações. A fração 2 após ser analisada por CCD apresentou-se pura recebendo o código de **Azul/ ECCECAa** devido a intensa fluorescência observada quando a amostra era submetida as irradiações UV nos comprimentos de onda 254 nm e 365 nm.



Esquema 10. Esquema do fracionamento da fração CECFR/6 e CCDP da fração Fr6/2, utilizando como eluente uma mistura de hexano e acetato de etila 5:5, e como revelador lâmpadas de U_{254nm} e U_{366nm} .

3.4.4.2.4 Análise dos precipitados PECC

A análise dos precipitados foi realizada por CCD de fase normal (sílica) e como solvente de eluição foi utilizada uma mistura de Hex/AcOEt 1:1 (**Figura 13**). As frações PECC 4 e PECC5 apresentaram um maior grau de pureza e após recristalização foram enviadas para análise por espectroscopia de RMN de ^1H e ^{13}C e espectrometria de massas.

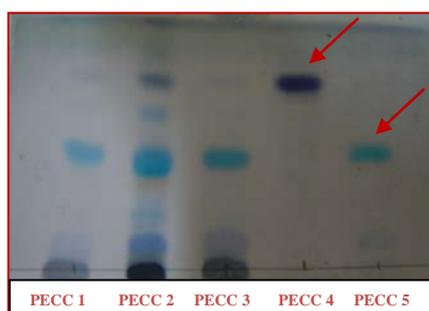


Figura 13. Cromatografia em camada delgada dos precipitados obtidos do extrato ECCECAa. Utilizando como eluente uma mistura de hexano e acetato de etila 5:5, e como revelador komarowsky.

3.4.4.2.5 Fracionamento PECC 1, PECC 2, PECC3 e PECC 6

Os precipitados PECC1, PECC 2, PECC 3 e PECC 6 foram submetidos a um fracionamento por cromatografia em coluna (20 cm x 2 cm), fase estacionária: gel de sílica (70-230 mesh, 8,2 g), fase móvel: Hex, CH_2Cl_2 , AcOEt, MeOH em gradiente de eluição. O fracionamento de PECC1 levou à obtenção de 15 frações. Entre estas, a fração PECC 1-19 (**Figura 14**), apresentou apenas uma mancha nas análises por CCD, utilizando o sistema de eluente Hex/AcOEt 1:9, indicando trata-se de substância pura. Entretanto, o baixo rendimento obtido, apenas 1 mg da amostra, inviabilizou a realização de outros testes para confirmação da pureza e identidade.

No fracionamento cromatográfico de PECC 2, PECC3 e PECC 6, as frações originaram um precipitado branco. A análise por CCD dos mesmos

revelou apenas uma única mancha e com o mesmo Rf, indicando tratar-se do mesmo composto. No entanto, as frações foram avaliadas por espectrometria de massas para comprovar, de fato, se é a mesma substância.



Figura 14. Cromatografia em camada delgada da fração PECC 1-19. Utilizando como eluente Hex/AcOEt 1:9 e revelador vanilina sulfúrica.

3.4.4.3 Fracionamento do ECCRAa (Extrato clorofórmico das cascas das raízes de *A. amazonicus*)

O fracionamento do ECCRAa (1,30 g) por coluna filtrante (pg. 32) forneceu 4 frações denominadas de CRF1 (617 mg), CRFR2 (366,5 mg), CRFR3 (135,5 mg) e CRFR4 (27,1 mg). As três primeiras frações apresentaram a formação de precipitados (após a evaporação parcial do solvente), estes foram separados de seus sobrenadantes e as impurezas remanescentes foram retiradas com AcOEt. Posteriormente, as frações foram submetidas à técnica de cristalização utilizando o princípio de solubilidade, neste caso com metanol. As amostras foram solubilizadas em 400 μ L de metanol, sob temperatura de 55°C. Os frascos foram mantidos sobre a bancada para a evaporação do solvente e à medida que os solventes evaporavam ocorria formação de cristais nas paredes dos frascos. Os cristais foram recolhidos para frascos previamente pesados, analisados por CLAE e enviados para análises espectroscópicas. Os precipitados foram codificados como **2a** (186,5 mg), **2b** (323,9 mg) e **2c** (26,1 mg), respectivamente.

Após a avaliação em CCD (**Figura 15**) verificou-se que todos os precipitados eram semelhantes, porém a fração **2c** (26,1 mg) apresentou uma única mancha lilás, após revelação com vanilina sulfúrica.

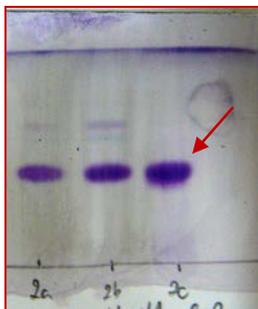


Figura 15. Cromatografia em camada delgada dos precipitados obtidos do extrato clorofórmico das cascas das raízes de *A. amazonicus*. Utilizando como eluente uma mistura de hexano e acetato de etila 8:2, e como revelador vanilina sulfúrica.

A fração CRF1 (400 mg) foi submetida à CC em coluna de vidro (35 cm x 5 cm) com 40,26 g de sílica gel (70-230 mesh) e os eluentes, Hex/CH₂Cl₂/AcOEt em gradiente de eluição. Foram recolhidos 26 frações no total de 5 mL cada. O fracionamento foi acompanhado por CCD e as frações agrupadas de acordo com os resultados observados nas cromatoplas. Esse procedimento levou a obtenção de 5 grupos, dos quais dois foram selecionados para análises posteriores

- Grupo 1 = As frações 1-9 foram reunidas e apresentaram-se como um sólido branco (10 mg) denominado **CRF1/ 1_9**. Observou-se apenas uma mancha em CCD em sistemas de diferentes eluentes, sendo enviado para análises espectroscópicas.
- Grupo 2 = O material deste grupo apresentou-se (frações 10-13) como um sólido branco denominado CRF1/ 10-15 (30 mg). A comparação das análises por CCD indicaram que a substância tratar-se da mesma substância codificada como **2c**.

3.4.4.4 Fracionamento do ECCERAA (Extrato clorofórmico do cerne da raiz de *A. amazonicus*)

O fracionamento do ECCERAA (1,40 g) por coluna filtrante (pg. 33) forneceu 4 frações denominadas de CERF1 (131,2 mg), CERF 2 (783,1 mg), CERF 3 (1,04 g) e CERF 4 (2,08 g). Os solventes ou gradientes que eluíram as frações foram, respectivamente, Hex/ AcOEt 90:10, Hex/ AcOEt 30:70, acetato de etila (100) e metanol (100).

A fração CERF 2 apresentou um bom rendimento e um excelente perfil cromatográfico, esta foi submetida à coluna cromatográfica, usando sílica gel 60 e os eluentes Hex/AcOEt/EtOH. No entanto, os fracionamentos realizados não conduziram ao isolamento de qualquer outra substância pura ou diferente das anteriormente isoladas.

3.4.4.5 Fracionamento em SPE

Cerca de dois gramas dos extratos polares: CMB, CMR, CMQ, EECRAA (extrato etanólico das cascas das raízes de *A. amazonicus*), EECCAa (extrato etanólico das cascas do caule), EECERAA (extrato etanólico do cerne do raiz) e EECECAa (extrato etanólico do cerne do caule) foram dissolvidos em 2 mL de água e aplicado em um cartucho contendo 2000 mg octadecilsilano como fase estacionária (C-18, Strata phenomenex). A eluição das frações foi conduzida sob pressão reduzida em um sistema de vácuo, com a aplicação de eluente com diferentes proporções de H₂O/MeOH. Inicialmente a amostra foi aplicada sob a ação da gravidade e posteriormente a pressão do sistema foi reduzida. Após a aplicação da amostra, esta foi eluída com inicialmente com H₂O, posteriormente a polaridade foi, aumentada até a obtenção de MeOH puro; as amostras aquosas foram liofilizadas, todas as frações obtidas foram submetidas a análise por LC-MS e para cada extrato um número de três frações foi obtida.

3.4.4.6 Fracionamento em XAD-16

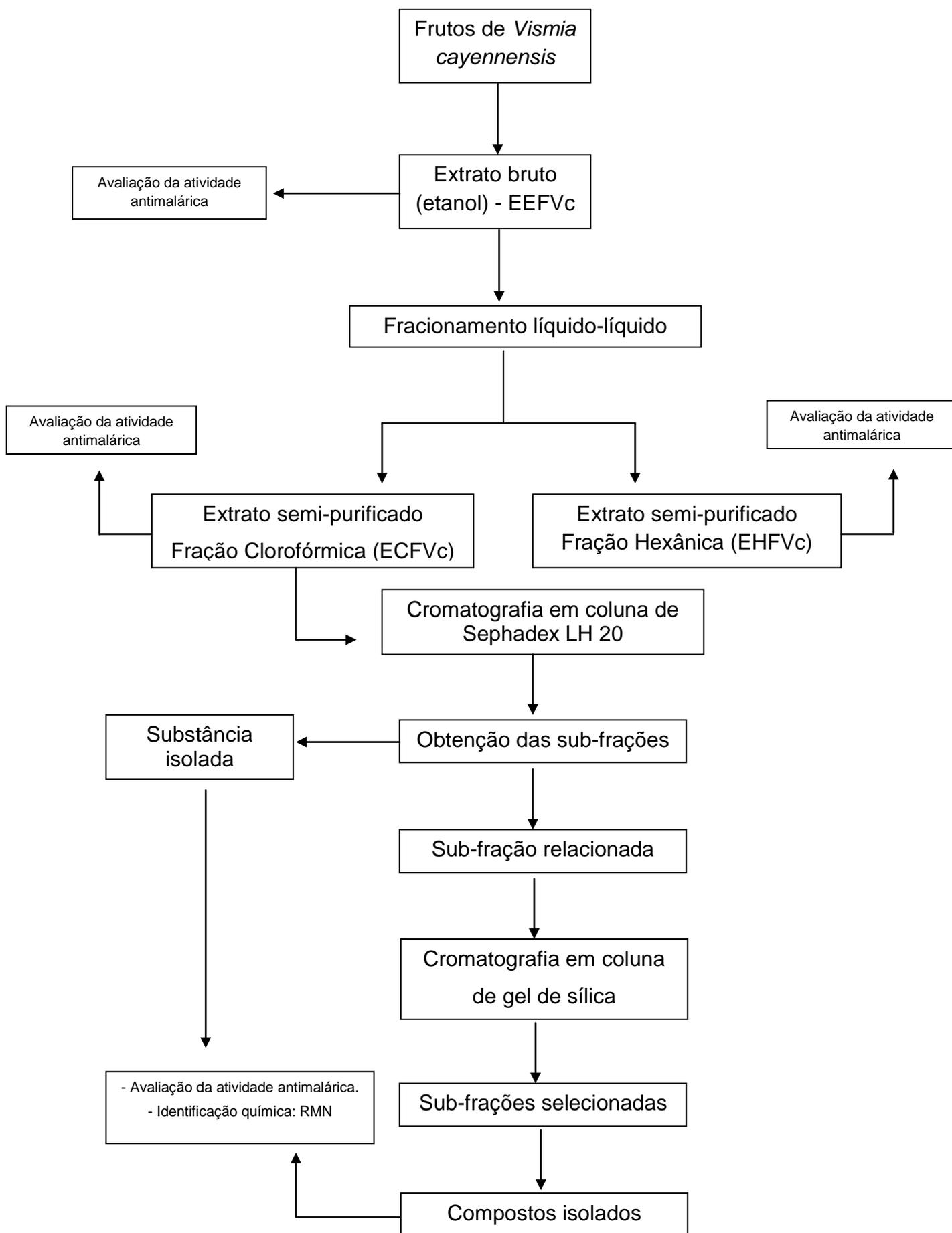
Foi preparada uma solução a 50% de hipoclorito de sódio e deixou-se a fase estacionária em contato com esta solução por um período de 24 horas (over-night). Após o período de limpeza, lavou-se a XAD-16 com água MiliQ abundantemente.

De todos os extratos mencionados anteriormente foram separados dois mg, os quais foram submetidos a uma coluna de 2,5 x 5 cm de resina Amberlite XAD-16 (Sigma), empregando-se H₂O (10 mL), H₂O/MeOH (80:20, 60:40, 40:60, 20:80), MeOH (10 mL). Apesar de ter sido realizado o fracionamento em ordem crescente de polaridade, para cada amostra apenas três frações apresentaram quantidade mínima (1 mg) para a realização das análises por CLAE.

4.5. Obtenção dos extratos de *Vismia cayennensis*

Para o preparo dos extratos de *V. cayennensis* foram pesados 240 g dos frutos, os quais foram cortados ao meio e triturados com o auxílio de um pistilo em um frasco de vidro contendo 100 mL de etanol. Esta metodologia foi adotada com o objetivo de extrair os constituintes presentes na resina do interior dos frutos de *V. cayennensis*.

Após a trituração do material, o recipiente foi deixado em repouso por um período de 48 horas a temperatura ambiente. A metodologia descrita foi repetida por mais 5 vezes com a renovação do solvente. Após a filtração, os solventes foram removidos sob pressão reduzida utilizando evaporador rotativo na temperatura média de 40°C (**Esquema 11**).



Esquema 11. Fluxograma do fracionamento e isolamento bioguiado de compostos de *V. cayennensis*

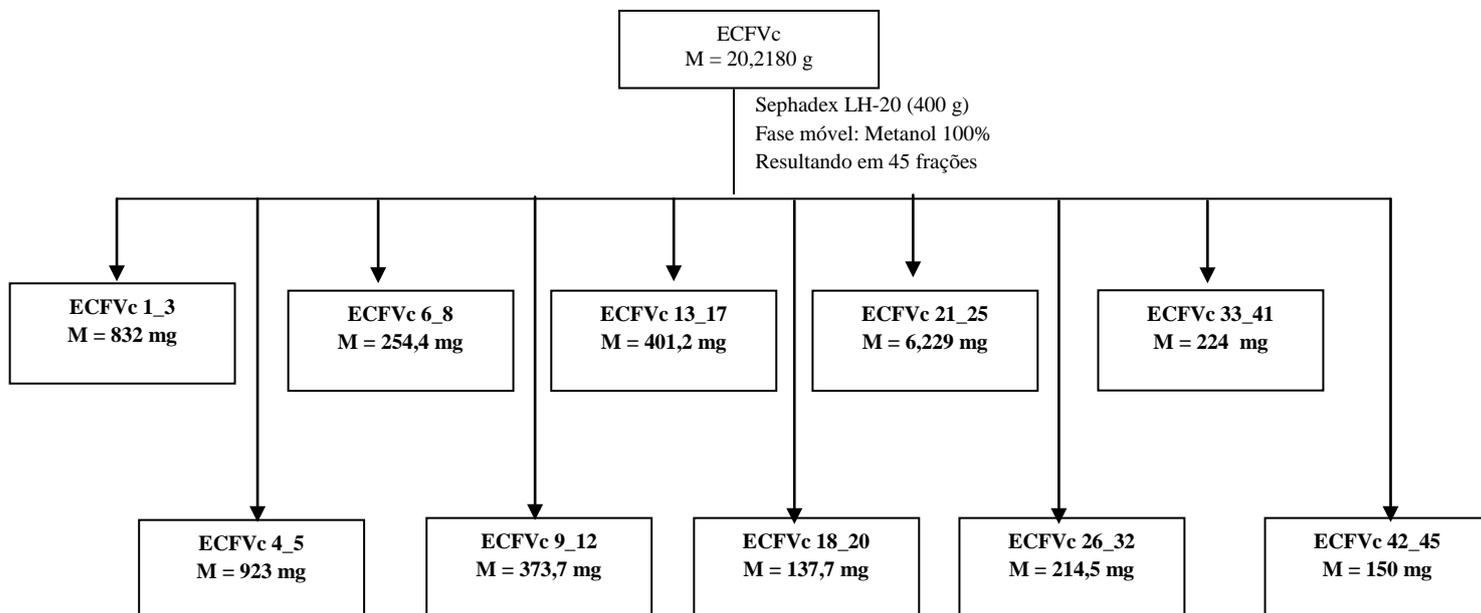
4.5.1. Fracionamento líquido-líquido do extrato etanólico dos frutos

O fracionamento do extrato etanólico (50 g) pela técnica de extração líquido-líquido foi feito pela partição em série, em funil de separação, com solventes hexano e clorofórmio. As frações hexânica (10,15 g) e clorofórmica (20,12 g) obtidas foram concentradas a 60°C, em rotaevaporador. Todas as frações obtidas foram submetidas à análises biológicas.

4.5.2 Fracionamento do extrato clorofórmico de *V. cayennensis* (ECFVc)

Para a purificação do ECFVc foi utilizado o gel lipofílico Sephadex LH-20. Para a montagem da coluna foram pesados 400 g do gel, o qual foi misturado com metanol. A mistura foi então colocada numa coluna e o seu empacotamento foi feito de forma simples, com a força da gravidade.

Um total de 20 g de extrato foi cromatografado, o material foi dissolvido em metanol e somente a parte solúvel foi colocado sobre a coluna (15,8 g). A diluição obedecia a uma proporção de 2 g de amostra dissolvidos em 30 mL de metanol. Em seguida foram aplicados no topo da coluna de gel Sephadex LH-20 e após a penetração da amostra no gel, foram eluídas em metanol. A vazão da coluna foi 53 gotas por minuto e as frações foram retiradas a cada 1 minuto. As frações obtidas (45) foram avaliadas por CCD, tendo NP-PEG e vanilina sulfúrica como reveladores. Com base nessas análises, as frações que apresentaram perfil químico semelhante foram reunidas perfazendo um total de 10 frações (**Esquema 12**).

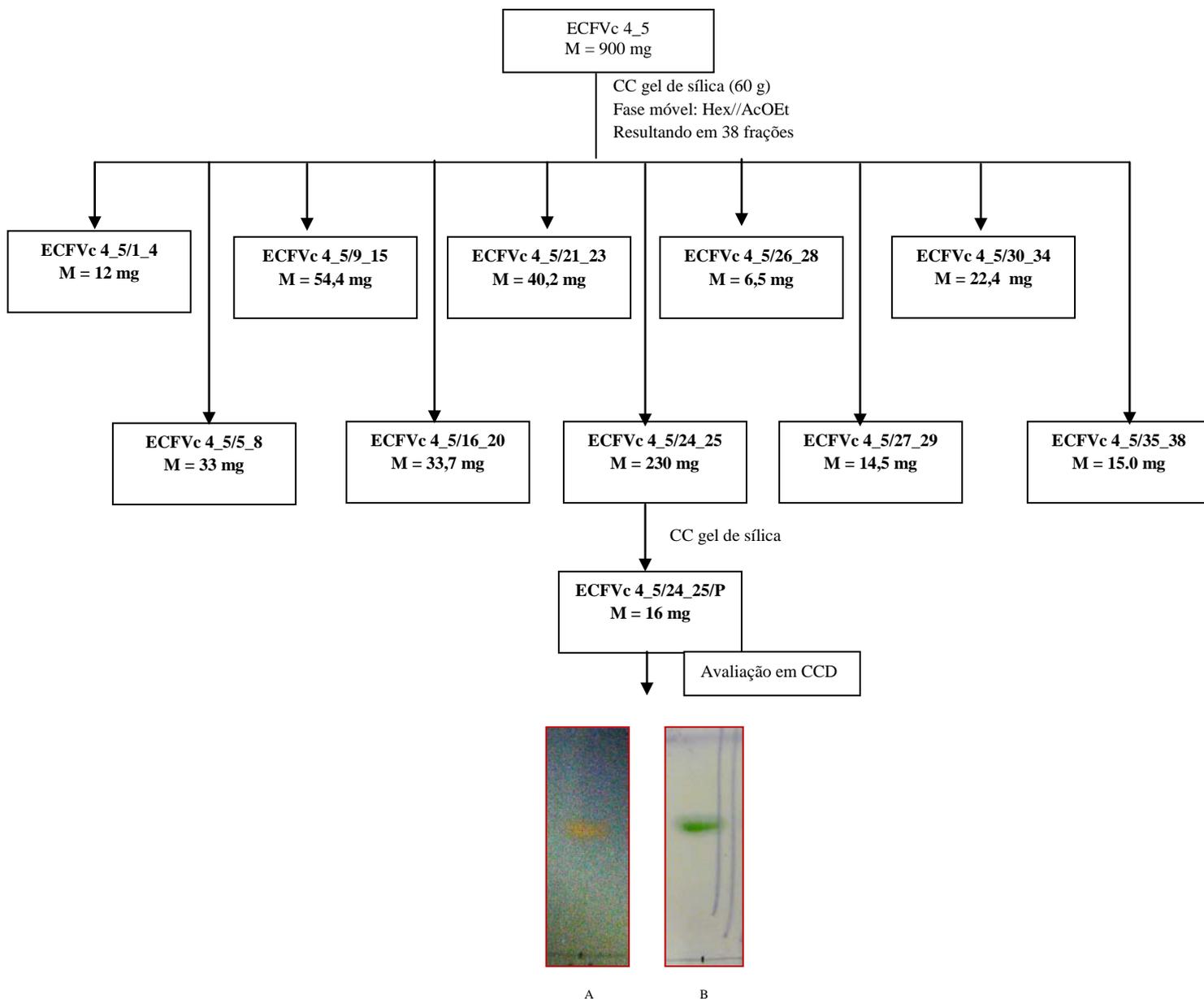


Esquema 12. Fracionamento do ECFVc.

4.5.2.1 Fracionamento do ECFVc 4_5

Para obtenção de uma separação preliminar da fração ECFVc 4_5, foi realizada uma coluna cromatográfica com 60 g de sílica e 900 mg da fração. A fase móvel foi composta por Hex/AcOEt em diferentes concentrações. Foram coletadas 38 frações, que após análise por CCD foram reunidas de acordo com a semelhança do perfil químico, (**Esquema 13**). As frações que apresentaram maior grau de pureza foram recromatografadas.

A subfração 24_25 (230 mg), devido ao maior rendimento obtido entre as frações coletadas, foi purificada através de CC de sílica gel e eluída com Hex/AcOEt, conforme mencionado anteriormente. Com este procedimento obteve-se 16 mg de um composto denominado de **ECFVc 4_5/ 24_25/P**. Esta fração foi isolada sob a forma de um sólido esverdeado; quando submetido a análise em CCD, eluída com Hex/AcOEt 9:1, este material apresentou uma única mancha de cor amarela quando revelada com NP-PEG com posterior observação no UV_{365nm}, e tom esverdeado bem definido frente ao reagente vanilina sulfúrica.



Esquema 13. Fracionamento do ECFVc 4_5. A – Cromatograma da fração 4_5/24_25/P, revelada com NP-PEG e observação sob a luz UV 365nm. B – Cromatograma após revelação com vanilina sulfúrica. Sistema de eluente composto por hexano:AcOEt 9:1.

4.5.2.2 Fracionamento do ECFVc 6_8

À fração ECFVc 6_8 (250 mg) procedeu-se à cromatografia em coluna de sílica - gel (230-400 mesh) (16,5 g) com Hex, CH₂Cl₂, AcOEt e EtOH. As frações recolhidas foram combinadas em nove grupos, mediante análise comparativa por CCD. A fração 10, codificado como **ECFVc 6_8/10** (10 mg) foi sujeita a uma cristalização com os solventes Hex/ AcOEt 1:1, os cristais obtidos foram purificados por CCDP (2 placas, Hex/AcOEt 8:2). Desta

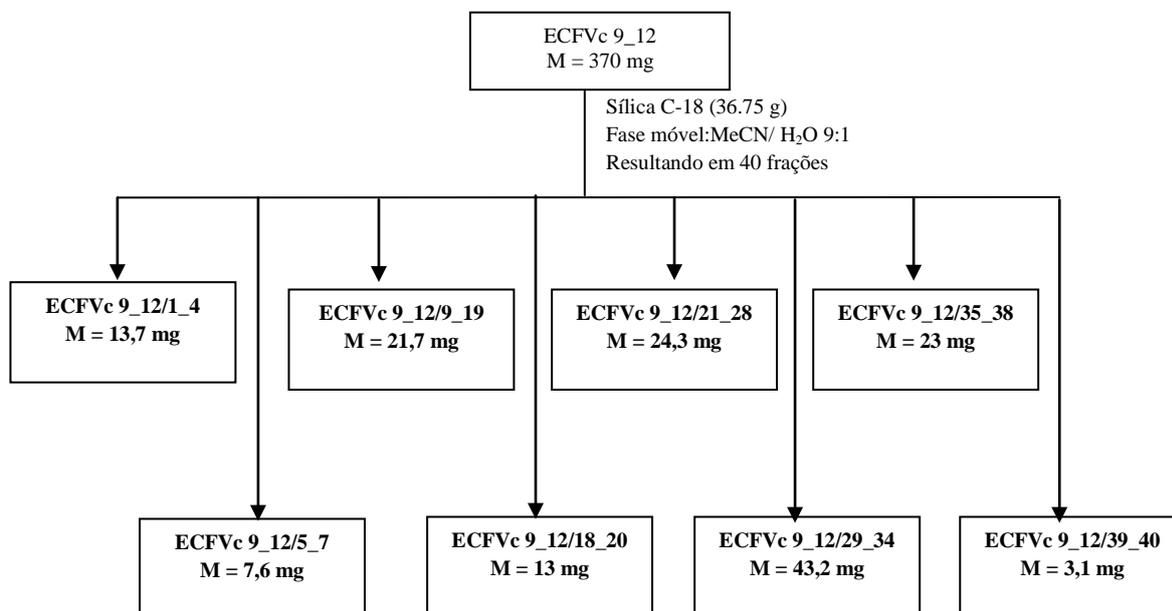
purificação obteve-se um composto puro (6 mg), sob a forma de cristais brancos. Por CCD, esta fração, apresentou uma única mancha roxa intensa, frente ao reagente Lieberman Burchard.

4.5.2.3 Fracionamento do ECFVc 9_12

As frações de 9 a 12, devido à similaridade do perfil químico foram reunidas. Após reunião a fração foi codificada como **ECFVc 9_12** (370 mg), e posteriormente fracionada por coluna de gel de sílica octadecilsilano (C - 18), eluída com Acetonitrila/ H₂O 9:1, resultando em 40 frações. As frações oriundas da CC foram avaliadas em CCD, reveladas com NPPEG e as que apresentaram perfil químico semelhante foram reunidas (**Esquema 14**).

A fração codificada como ECFVc 9_12/9_19 mostrou relativa pureza quando submetida a CCD (**Figura 16**). Foi constatada a presença de uma substância de coloração amarela. Quando revelada com NP-PEG com posterior observação no UV_{365 nm}, um perfil cromatográfico semelhante também foi obtido após revelação com vanilina sulfúrica.

A fração foi purificada por CCDP (C-18, utilizando como fase móvel CH₃CN/ H₂O 9:1). Desta forma foi obtida a substância codificada como **ECFVc 9_12/9_19/P**.



Esquema 14. Fracionamento do ECFVc 9_12.

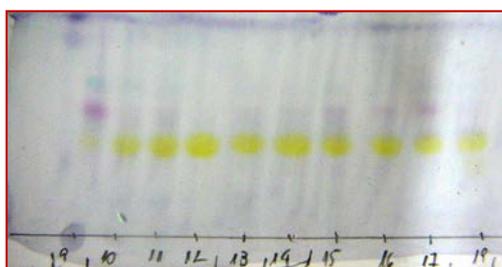


Figura 16. Cromatografia das frações de 9 a 19, oriundas da fração ECFVc 9_12. Revelador: Vanilina Sulfúrica. Sistema de eluente composto por MeCN/ água 9:1.

4.5.3 Quantificação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

4.5.3.1 Preparação dos extratos

Os extratos de *A. amazonicus* foram preparados conforme descrito no item 3.4.1 (pg. 29). Os extratos brutos e a substância **(2c)** foram submetidos a vários testes de solubilidades com diferentes solventes orgânicos polares. A maioria dos extratos foi solúvel em MeOH, contudo, aqueles extratos que apresentaram solubilidade parcial neste solvente,

incluindo a substância **2c**, foram sonicados em banho de ultrassom (modelo 2510, marca Branson) por 30 minutos, obtendo-se a solubilidade total das amostras. Os extratos foram pesados e diluídos de forma obter-se uma concentração final de 1 mg/ mL.

4.5.3.2 Análise Cromatográfica

Uma alíquota de 20 µL de cada amostra foram injetados na coluna de HPLC (Shimadzu XR – ODS 50 mm x 2 mm tipo C-18) e a eluição foi realizada com acetonitrila/água 65:35 (% v/v) a uma taxa de fluxo de 1 mL/min e monitorizada a 210 nm (Zhao *et al*, 2007). Este procedimento foi realizado em triplicata.

4.5.3.3 Condições cromatográficas

A análise de HPLC foi realizada num cromatógrafo de gradiente Shimadzu LC-8Avp equipado com duas bombas LC-8Avp, controladas por um módulo de interface, um injetor automático e um detector SPD-M10Avp de arranjo de diodos (DAP). Os solventes foram filtrados utilizando um sistema Millipore, e separação cromatográfica foi realizada sobre uma coluna C18 (150 mm x 4,6 mm, 05:00; Shimpack). Os solventes de qualidade para HPLC e água Milli-Q foram usadas no estudo cromatográfico e todo o experimento de cromatografia foi realizada à temperatura ambiente.

Todos os experimentos cromatográficos foram realizados no modo isocrático. A análise foi completada dentro de 20 min com uma melhor resolução dos picos adjacentes e baixo consumo de solvente.

4.5.3.4. Linearidade

4.5.3.4.1. Preparação da curva padrão da substância química majoritária

A partir da substância química majoritária, dos extratos de *A. amazonicus*, foi preparado uma solução na concentração de 1 mg/mL em metanol, foram feitas sucessivas diluições obtendo-se 7 concentrações: 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.62, 7.81 µg/mL. Para cada concentração foram preparadas três amostras sendo as análises realizadas em triplicata.

A linearidade do método proposto foi efetuada mediante a obtenção de três curvas autênticas, do cálculo do coeficiente de variação (CV%) entre os pontos da curva e do coeficiente de correlação linear (r^2).

4.5.3.4.2 Repetibilidade

A verificação da repetibilidade apresentada pelo método foi realizada mediante a análise de uma diluição na concentração de 250 µg/ mL. Experimentos de repetibilidade *intra-day* e *inter-day* foram realizados e para cada experimento foi calculado o desvio padrão relativo (DPR %). Para o método *inter-day* o cálculo foi realizado mediante a área de 12 injeções de três dias (quatro injeções sucessivas a cada dia) e para o método *intra-day* foram à área de cinco injeções no mesmo dia.

4.5.3.4.3 Limites de detecção e quantificação

O limite de detecção (LD) de um método analítico corresponde à menor quantidade de um analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada como um valor exato. O limite de quantificação (LQ) corresponde à menor quantidade de um analito que pode ser determinada quantitativamente com uma precisão e exatidão adequadas utilizando um determinado procedimento experimental. Os limites de detecção e quantificação foram calculados matematicamente a partir da curva padrão da substância padrão (isolada de *A. amazonicus*) usando as equações 1 e 2, respectivamente.

Equação 1:

$$LD = \frac{3 \times s}{S}$$

Na qual: s = desvio padrão do branco; S = o coeficiente angular do gráfico de calibração (sensibilidade do aparelho).

Equação 2:

$$LQ = \frac{10 \times s}{S}$$

Na qual: s = desvio padrão do branco; S = o coeficiente angular do gráfico de calibração (sensibilidade do método).

4.5.4. Análises de Cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas (CLAE-EM)

Realizou-se uma investigação química utilizando a cromatografia líquida, para a separação dos constituintes presentes nos extratos MCR, MCB, MCQ, EECCAa, EECRAa, EECERAa, EECECAa (ver Materiais e Métodos, pg. 31), juntamente com espectrômetro de massas, para a identificação dos compostos conhecidos através da massa molar e dos padrões de fragmentação.

As análises qualitativas foram realizadas em aparelho HPLC Shimadzu LC-20. A coluna foi de fase reversa C-18 (base sílica derivatizada com octadecilsilano - 4,6 mm/ 25 cm; Luna C-18 (2) 5 μ - Phenomenex) fluxo 0,5 mL/min com eluente Acetonitrila: ácido fórmico 0,1%/H₂O: ácido fórmico 0,1%. A porcentagem de ACN (C) e água (A) variaram da seguinte forma: gradiente linear de 10 a 90% C (0-65 min); isocrático a 90% C (66-75 min); gradiente linear de 90 a 10% C (76-80 min) e isocrático a 10% C (81-90 min) (Zhang *et al*, 2010). O detector PDA foi definido em 200-210 nm. Foi utilizada a técnica Hifenada associando o CLAE com espectrometria de massas, e até mesmo o espectrômetro de massas em sequência (MS/MS), conforme descrito na seção Equipamentos (pg. 28).

4.5.5. Desenvolvimento de método por CLAE/DAD para avaliação do perfil químico de extratos/frações de *Vismia cayennensis*

4.5.5.1. Preparação das amostras

As amostras foram previamente preparadas em uma única concentração, 1 mg/mL. O material seco foi precisamente pesado e diluído em metanol. Posteriormente as amostras foram sonicadas em banho de ultrassom por 20 minutos a temperatura ambiente. Após este tempo, o material foi centrifugado e o sobrenadante foi transferido para os vials.

4.5.5.2. Condições cromatográficas

Na análise foi empregado um sistema de eluição gradiente no modo reverso, no qual a porcentagem de metanol (B) e água contendo 0,05% de TFA variou da seguinte forma: gradiente linear de 30 a 50% B (0-5 min); 50 a 90% B (5-35 min) e isocrático a 90% B (35-45 min); gradiente linear de 90 a 30% B (45-55 min) e isocrático a 30% (55-60 min).

Ao término da corrida foi empregado um gradiente de volta de 30 a 50% em 2 min e o tempo de espera para o acondicionamento foi de 10 min. A vazão empregada foi de 1 mL/ min e em cada análise foram injetadas 20 µL da amostra utilizando a coluna C₁₈ da marca Merck Lichrospher (5 µm, 250 x 4.6 mm. O detector PDA foi definido em 200-600 nm (Politi *et al*, 2004).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Rendimentos dos extratos

Os extratos obtidos (**Tabela 1**) foram avaliados frente às formas hepáticas de *P. berghei* e eritrocitárias de *P. falciparum*. Àqueles que apresentaram atividade farmacológica foram encaminhados para fracionamento químico, com o objetivo de isolar e identificar o(s) composto(s) ativo(s).

Tabela 1. Rendimentos dos extratos brutos de *A. amazonicus*.

Código	Nome dos extratos	Quantidade (g)	Rendimento (%)
EHCRaAa	Extrato hexânico das cascas das raízes	0,39	0,15
ECCRaAa	Extrato clorofórmico das cascas das raízes	1,43	0,57
EECRaAa	Extrato etanólico das cascas das raízes	24,04	9,6
EHCERaAa	Extrato hexânico do cerne das raízes	0,45	0,076
ECCERaAa	Extrato clorofórmico do cerne das raízes	1,40	0,24
EECERaAa	Extrato etanólico do cerne das raízes	37,80	6,46
EHCCAa	Extrato hexânico da casca do caule	0,38	0,06
EDCCAa	Extrato diclorometano das cascas do caule	5,65	0,89
EECCAa	Extrato etanólico das cascas do caule	15,5	2,46
EHCECAa	Extrato hexânico do cerne do caule	0,53	0,035
ECCECAa	Extrato clorofórmico do cerne do caule	8,50	0,56

EECECAa	Extrato etanólico do cerne do caule	26,66	1,77
EHFSAa	Extrato hexânico das folhas secas	4,62	1,1
ECFSAa	Extrato clorofórmico das folhas secas	7,01	1,66
EEFSAa	Extrato etanólico das folhas secas	61,3	14,59
EACRAa	Extrato aquoso das cascas das raízes	63,5	25,4
CMR	Chá método Rodrigues	0,151	15,1
CMQ	Chá método Quilombola	0,037	3,7
CMB	Chá método Brandão	0,51	5,2
ES	Extrato saponínico	15,7	78,5
ESPX	Extrato saponínico pós XAD	4,63	46,3

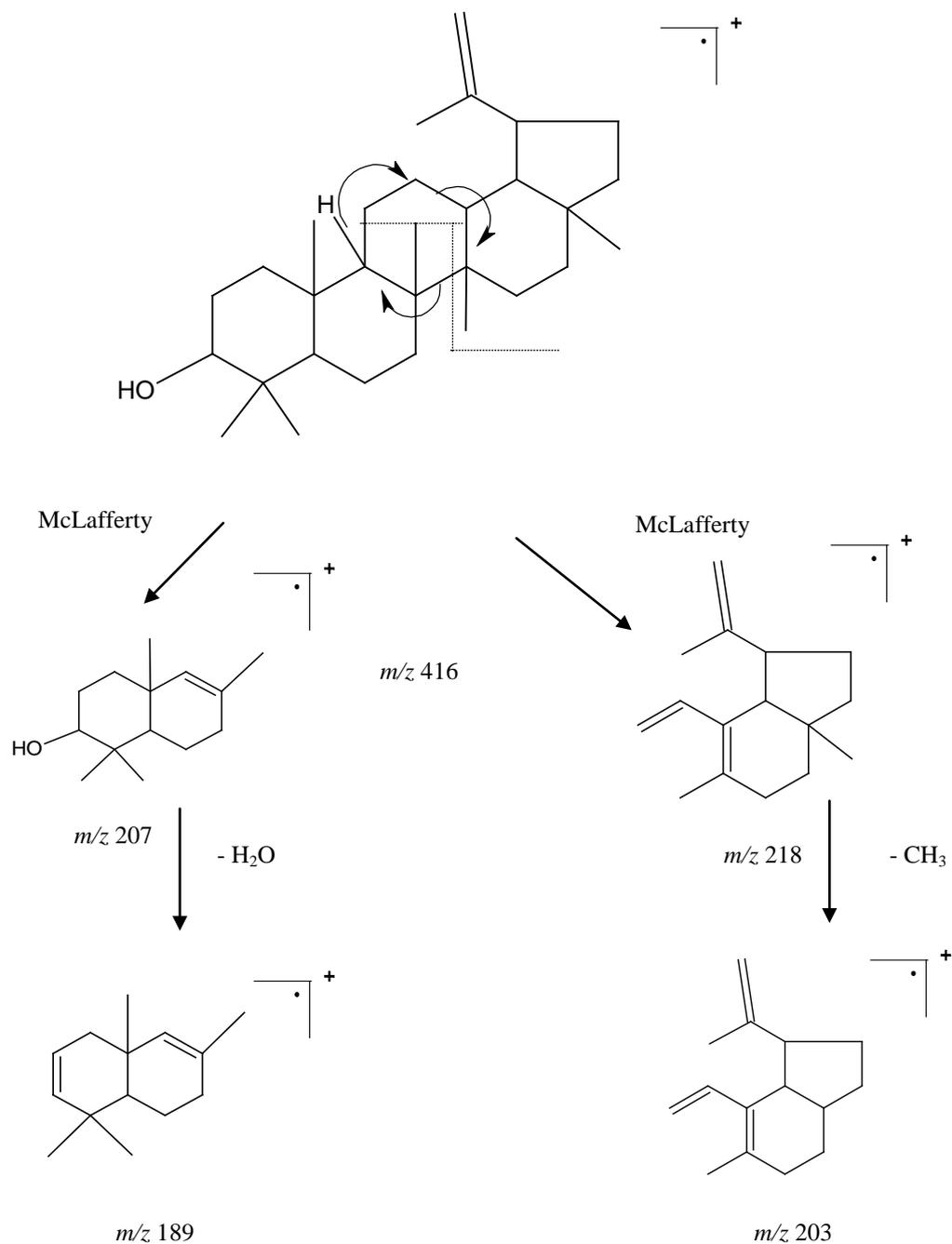
5.2. Análise estrutural das substâncias isoladas

5.2.1. Elucidação estrutural de 6ab 5

A substância 6ab 5 foi isolada conforme descrito no item 4.4.4.1.1 (Ver Materiais e Métodos pg. 35). O composto foi analisado por CG/EM, RMN ^1H , RMN ^{13}C , HMBC, HSQC e COSY e seus dados espectroscópicos foram comparados com os obtidos da literatura (Mebe *et al*, 1998).

Na análise de CG/EM foi possível observar um sinal principal com tempo de retenção 41,88 minutos. O espectro de massas de 6ab 5 (**espectro 1, pg. 218**) mostrou um sinal em m/z 426 u, relativo ao íon molecular da substância. Adicionalmente, foram observadas fragmentações típicas de triterpenos pentacíclicos em m/z 218, 207, 203 e 189 referente ao rearranjo

McLafferty no anel C. Destes os mais intensos foram m/z 189 e 207 u, que são característicos de fragmentações de compostos com esqueleto tipo lupano. O esquema de fragmentação é apresentado a seguir (**Esquema 15**) (Mebe *et al*, 1998).



Esquema 15. Esquema de fragmentação da substância 6ab 5.

O espectro de RMN de ^1H apresentou um grande número de sinais em δ 0,77 – 1,04, sendo que nessa região foram observado claramente seis sinais simples de metilas (em δ 0,77, 0,80, 0,84, 0,96, 0,98 e 1,04) **(Espectro 2, pg. 219)** e um sinal simples relativo à metila ligada a carbono insaturado (em δ 1,69).

Estes dados espectroscópicos sugeriram a natureza de 6ab 5 como um triterpeno, cuja classe foi definida através dos sinais referentes aos hidrogênios olefínicos em δ 4,58 (*dd*, $J = 2.6$ e 1.3 Hz) e δ 4,69 (*d*, $J = 2.4$ Hz) **(Espectro 3, pg. 219)**, que são característicos dos triterpenos com esqueleto lupano. Já o sinal de hidrogênio carbinólico em δ 3,20 (*dd* 1H, 5,1 e 11,1 Hz), definiu a substituição de C-3 por um grupo hidroxila, que foi disposto em β devido à magnitude das constantes de acoplamento do hidrogênio carbinólico H-3 **(Espectro 4, pg. 220)**. Outro sinal em destaque foi um multiplete em δ 2,37 **(Espectro 5, pg. 220)** referentes ao H-19 (Haque *et al*, 2006). No espectro de carbono destacam-se os seguintes sinais: um sinal 79,0 ppm atribuído ao carbono C-3; Sinais em 150,9 e 109,3 atribuídos aos carbonos olefínicos C-20 e C-29, respectivamente. Os sinais atribuídos a sete grupos metínicos do lupeol **(Espectro 6, pg. 221)**.

As correlações entre os hidrogênios vinílicos foram confirmadas por meio do COSY. Este experimento mostra também a correlação entre o duplo-dublete em δ 4,57 (H - 29) e a grupo metila em δ 1,69 (H- 30). O multiplete em δ 2,38 (H-19) está relacionado com o sinal em δ 1,34 (H_a -21), que foi correlacionado com o sinal em δ 1,92 (H_b -21) **(espectro 7, pg. 221)**.

No espectro de HMBC **(Espectro 8, pg. 222)** foi possível observar o sinal dos hidrogênios do grupo metila C- 30 em δ 1,69, o qual foi correlacionado com o sinal do C - 19 (δ 47,9), C - 29 (δ 109,3) e C- 20 (δ 150,8).

Estes dados estão listados na tabela 2 conduziram a estrutura do triterpeno 3β - hidroxí - 18,19 - lup - 20(29- eno) (lupeol) **(Figura 17)**.

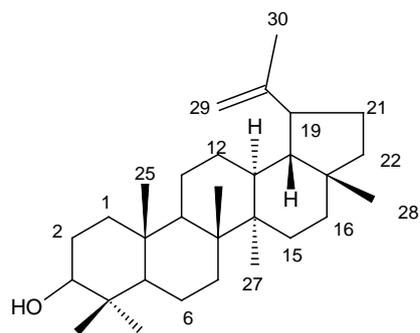


Figura 17. Estrutura de 6 ab 5 - Lupeol.

Tabela 2. Deslocamentos químicos no RMN ^1H e ^{13}C para 6 ab 5, em comparação com dados da literatura (^aReynolds *et al*, 1986; ^bWonhoff *et al*, 1970).

Sinal	^1H δ (ppm), multiplicidade, J (Hz)	Lit. ^a δ_{H}	COSY	^{13}C /HSQ C δ (ppm)	HMBC	δ_{C} 6 ab 5	Lit. ^b δ_{C}
1	1,56, α, m (H); 0,86,	0,91, 1,68			C2 (^2J), C5 (^3J), C25 (^3J)	38,8	38,7
2	1,56, m (2H)	1,54, q , 1,61, d	3		C1 (^2J)	27,4	27,4
3	3,20, dd (1H, 5,1 e 11,1 Hz)	3,18, dd	2	79,02	C24 (^3J), C23 (^3J)	78,9	79,0
4	-	-				38,8	38,8
5	0,68 d , J = 9,15 Hz	0,69, d			C1 (^3J), C6 (^2J), C23, C24	55,2	55,3
6	1,29 α, m ; 1,56 β, m	1,39, q , 1,54, d			C5 (^2J)	18,1	18,3
7	1,29, m (2H)	1,41, m			C26 (^3J)	34,3	34,3
8	-	-				40,2	40,8
9	1,29, m (1H)	1,28, d			C7(^3J), C25(^3J)	50,4	50,4
10	-	-				37,2	37,2
11	1,20, m (1H), 1,38, d (1H, 1,5)	1,25, q , 1,42, d				21,9	20,9
12	1,07, m (1H), 1,62, m (1H)	1,07, q , 1,68, d				25,2	25,1
13	1,65 m	1,67, t			C27(^3J)	37,9	38,0
14	-	-				42,8	42,8
15	0,99, d (1H, 2,1), 1,88, t (1H, 2,4)	1,01, d , 1,71, t				27,4	27,4
16	1,49, m (2,4)	1,38, t , 1,49, d			C28 (^3J)	35,5	35,6
17	-	-				42,9	43,0
18	1,36, m (1H)	1,37, t				48,3	48,3
19	2,38, m (1H)	2,39, m	21	48,00	C29 (^3J), C30(^3J)	47,9	47,9
20	-	-				150,8	150,9
21	1,34, m (1H), 1,92, m (1H)	1,33, m , 1,93, m	19		C30(^3J), C21(^2J), C18(^2J), C29, C20	29,6	29,7
22	1,18, β, m (1H), 1,39, α, m (1H)	1,20, m , 1,42, m				40,0	40,0
23	0,98, s (3H)	0,98, s		28,00	C23 (^3J), C4(^2J), C5(^3J), C3	27,9	27,9
24	0,77, s (3H)	0,77, s		15,36	C1 (^3J), C5 (^3J)	15,4	15,3

Tabela 3. Deslocamentos químicos no RMN ^1H e ^{13}C para 6 ab 5, em comparação com dados da literatura (^aReynolds *et al*, 1986; ^bWonhoff *et al*, 1970).

25	0,84, s (3H)	0,84, s		16,12	C1(³ J), C5(³ J)	16,0	16,1
26	1,04, s (3H)	1,04, s			C7(³ J), C8(² J), C14(² J)	15,4	15,9
27	0,96, s (3H)	0,97, s		14,50	C15(³ J), C8(³ J), C14(² J)	15,4	14,5
28	0,80, s (3H)	0,79, s		18,01	C16(³ J), C17(² J), 19(⁴ J)	18,3	18,0
29	4,69, <i>d</i> (1H, 2.4), 4,58, <i>dd</i> (1H)	4,69, <i>m</i> , 4,56, <i>m</i>	30	109,31	C19(³ J), C30(³ J)	109,3	109,3
30	1,69, s (3H)	1,69, s	29	19,32	C19(³ J), C29(³ J), C20(² J)	19,2	19,3

5.2.2. Elucidação estrutural de CCFR2/11-16/16-18

Os tratamentos cromatográficos com a fração **CCFR2/FR 11-16** (Ver Materiais e Métodos pg. 34) forneceram um sólido cristalino, em forma de agulhas, incolor, solúvel em clorofórmio, denominado **CCFR2/11-16/16-18**. O espectro de RMN ^1H (500 MHz) da substância (**Espectro 9, pg. 223**), obtido em CDCl_3 mostrou um duplete largo em δ 5,36, com constante de acoplamento de 4,92 Hz, sugerindo a presença de hidrogênio olefínico ligado ao carbono 6. O multiplete em δ 3,56 pode ser atribuído ao hidrogênio ligado a carbono carbinólico. Foram observados ainda sinais entre δ 0,69 e 2,32, característicos de absorções de hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos. Estes sinais confirmam a presença do β -sitosterol.

Os sinais de dois duplete, em δ 5,03, com $J = 15,2$ Hz e $J = 8,5$ Hz, referente ao hidrogênio ligado ao carbono olefínico da posição 23; e em δ 5,16, com $J = 15,2$ Hz e $J = 8,5$ Hz, correspondente ao hidrogênio ligado ao carbono olefínico da posição 22, estes sinais confirmam a presença do estigmasterol.

O espectro de RMN ^{13}C obtido em CDCl_3 apresentou 36 linhas espectrais. Os sinais em δ 140,76 e 121,70 foram atribuídos aos carbonos da ligação dupla entre C-5 e C-6 dos esteróides sitosterol e estigmasterol. Foram observados em δ 138,29 e 129,29 (**Espectro 10, pg. 224**) sinais característicos dos átomos de carbono da ligação dupla entre C-22 e C-23, do estigmasterol. Foi observado ainda um sinal em δ 71,82 (**Espectro 11, pg. 224**) atribuído ao carbono carbinólico C-3. A comparação dos dados espectroscópicos obtidos com dados descritos na literatura (Goad, 1991), permitiu confirmar que **CCFR2/11-16/FR 11-16** tratava-se da mistura constituída pelos esteróides sitosterol e estigmasterol, cujas estruturas estão mostradas na **Figura 18**. Os dados de RMN de ^1H e ^{13}C estão mostrados na Tabela 3 e 4, respectivamente.

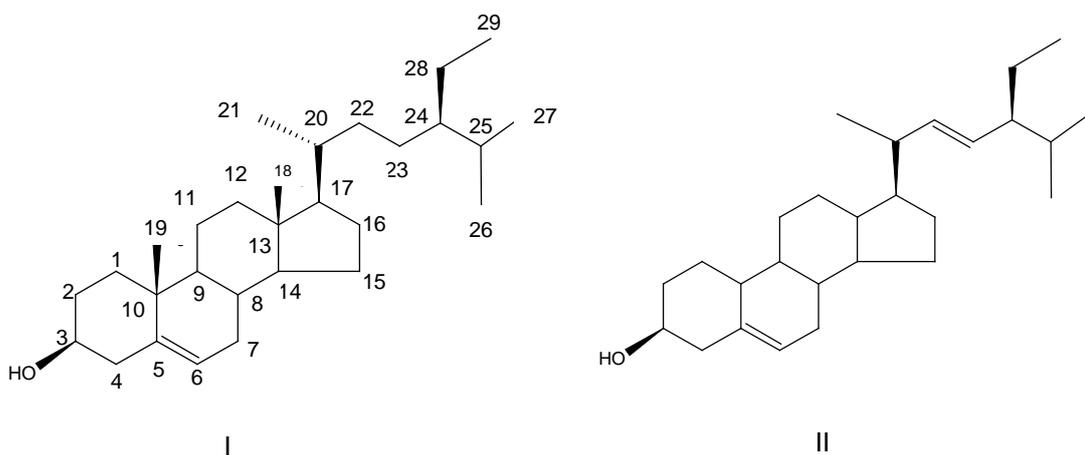


Figura 18. I – sitosterol; II - estigmasterol.

Tabela 3. Deslocamentos químicos no RMN ^1H para CCFR2/11-16/FR 11-16, em comparação com dados da literatura (Ferreira, 2011).

H	δ_{H} - Sitosterol	δ_{H} (Ferreira, 2011)	δ_{H} - Estigmasterol	δ_{H} (Ferreira, 2011)
H-3	3,52 (m)	3,53 (m)	3,52 (m)	3,53 (m)
H-6	5,36 (d, $J = 4,92$ Hz)	5,35 (d)	5,36 (d, $J = 4,92$ Hz)	5,35 (d)
H-22	-	-	5,16 (dd, $J = 15,2; 8,5$)	5,16 (dd, $J = 15; 8,5$)
H-23	-	-	5,03 (dd, $J = 15,2; 8,5$)	5,02 (dd, $J = 15; 8,5$)
Me-18	0,68 (s)	0,68 (s)	0,70 (s)	0,70 (s)
Me-19	1,01 (s)	1,01 (s)	1,03 (s)	1,01 (s)
Me-21	0,92 (d, $J = 6,8$)	0,92 (d, $J = 6,5$)		

Tabela 4. Deslocamentos químicos no RMN ¹³C para CCFR2/11-16/FR 11-16, em comparação com dados da literatura (Ferreira, 2011).

C	δ_C - Sitosterol	δ_C (Ferreira, 2011)	δ_C - Estigmasterol	δ_C (Ferreira, 2011)
5	140,76	140,79	140,76	140,79
10	36,52	36,53	36,52	36,53
13	42,23	42,25	42,23	42,25
CH				
3	71,82	71,83	71,82	71,83
6	121,70	121,73	121,70	121,73
8	-	31,90	-	31,90
9	50,16	50,17	50,16	50,20
14	56,78	56,80	56,88	56,90
17	56,08	56,09	55,98	55,99
20	36,15	36,17	40,47	40,49
22	-	-	138,29	138,32
23	-	-	129,28	129,27
24	45,87	45,88	51,24	51,26
25	28,25	28,93	28,25	29,71
CH₂				
1	37,27	37,28	37,27	37,28
2	31,69	31,70	31,69	31,70
4	42,33	42,34	42,33	42,34
7	31,92	31,93	31,92	31,94
11	21,11	21,11	21,11	21,07
12	39,79	39,81	39,70	39,71
15	24,31	24,35	24,31	24,38
16	29,20	29,20	29,20	29,20
22	33,97	33,98	-	-
23	26,12	26,13	25,40	-
28	23,09	23,10	23,09	25,42

CH₃				
18	11,87	11,88	11,99	12,00
19	19,40	19,41	19,40	19,41
21	18,79	18,80	18,79	21,23
26	19,82	19,83	19,82	19,83
27	19,04	19,06	19,04	19,00
29	12,06	12,07	12,06	12,26

As sub-frações CCFR3, CCFR4 e CCFR5 apresentaram perfil químico semelhante, porém mais complexo que a fração CCFR2, por este motivo estas frações foram guardadas e o estudo químico teve continuidade com as sucessivas frações.

5.2.3. Elucidação estrutural de CCFR6/ 24-29 / P

A fração CCFR6/24-29/P (11 mg) foi isolado da fração CCFR6/24_29 (Ver Materiais e Métodos, pg. 39) sob a forma de cristais de cor amarela.

Para a obtenção do espectro de massas, esta substância foi injetada ESI-MS e examinados os espectros de massa tanto em modo positivo como negativo. De uma forma geral no modo positivo, foram observados poucos íons, ao invés, em modo negativo o número de íons revelados foi muito maior e em suficiente abundância. Todos os íons de abundância mais elevada foram sujeitos a uma análise por MS/MS de forma a se obter mais informação estrutural sobre a substância em questão.

A análise do espectro de massa de ESI-MS, modo negativo (**Espectro 12, pg. 225**) revelou um íon a um valor de m/z igual 461 correspondente ao pico íon pseudomolecular $[M-H]^-$, depois de obtido o espectro por ESI-MS/MS correspondente a este íon, análise dos fragmentos revelou a presença de m/z 446 referente à perda de uma metila ($-CH_3$) $[M-H-15]^-$. O valor em m/z 328 é referente às perdas de 2x (CH_3), 2x ($O=CH_2$) e 1 X (CO) $[M-H-118]^-$ e em m/z 313, apresentou fragmentos referentes à perda de

uma metila [M-H-15]⁻ (**Espectro 13, pg. 225**), os espectros obtidos a partir da 3^o ionização (**Espectro 14 e 15, pg. 226**) forneceu picos que permitiu deduzir que os íons com *m/z* 298 e 285 são relativos a perda de um grupo metila (-CH₃) [M-H-15]⁻ e um grupo carbonila (-CO) [M-H-28]⁻.

O espectro de RMN de ¹H (**Espectro 16, pg. 227**) mostrou a presença de apenas oito sinais sendo todos simples, os sinais de singletos em δ 3,88 (3H), 3,91 (3H), 3,95 (9H), 3,98 (3H), 4,00 (3H) e 4,10 (3H) foram compatíveis com a presença de oito metoxilas na molécula. A classe da molécula foi confirmada pela presença de mais dois singletos (1 H cada) em δ 6,79 e 7,14 (**Espectro 17, pg. 227**), indicando a presença de somente dois hidrogênios em uma estrutura típica de um núcleo de flavona (Quijano *et al*, 1982).

Através da comparação entre os dados espectroscópicos discutidos anteriormente e os dados registrados na literatura (**Tabela 5**) chegou-se à conclusão que CCFR6/ 24-29 / P tratava-se do composto Agehoustina A (5, 6, 7, 8, 2', 3', 4', 5' – octametóxilflavona) (**Figura 19**), um metabólito secundário raro e isolado pela primeira vez na família Rhamnaceae.

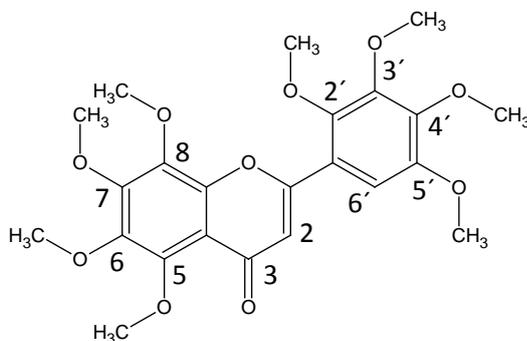
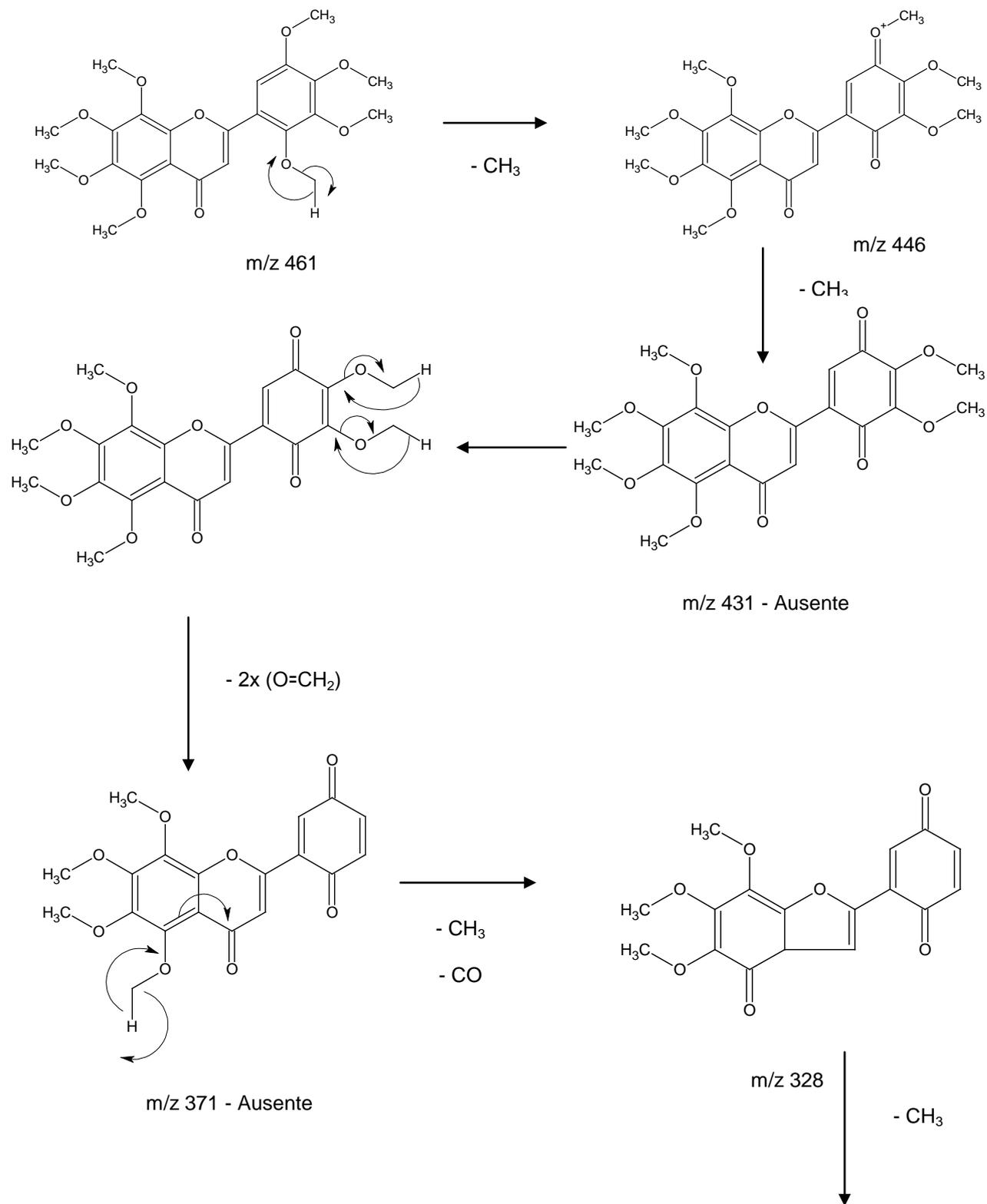
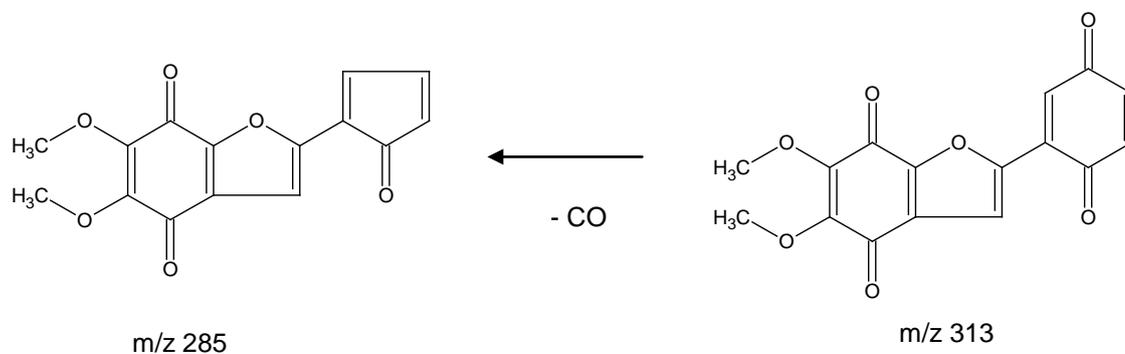


Figura 19. 5, 6, 7, 8, 2', 3', 4', 5' – octametóxilflavona - Agehoustina A

No **Esquema 16, pg. 76**, são propostas partículas responsáveis pelos respectivos íons detectados no espectro de massas, esses fragmentos confirmam a estrutura proposta.





Esquema 16. Proposta de fragmentação e constituição dos íons compatíveis com os valores dos picos detectados nos espectros de massas de 5, 6, 7, 8, 2', 3', 4', 5' – octametóxilavona.

Tabela 5. Deslocamentos químicos no RMN ^1H para CCFR6/ 24-29 / P, em comparação com dados da literatura (Quijano *et al*, 1982).

C	δ_{H} - CCFR6/ 24-29 / P	δ_{H} (Quijano <i>et al</i> , 1982)
2'-OCH ₃	3,98 (s)	3,98
3'-OCH ₃	3,95 (s)	3,95
4'-OCH ₃	3,95 (s)	3,95
5'-OCH ₃	3,95 (s)	3,95
6'	6,79 (s)	6,88
2	7,14 (s)	7,13
5-OCH ₃	4,10 (s)	4,09
6-OCH ₃	3,91 (s)	3,91
7-OCH ₃	3,88 (s)	3,89
8-OCH ₃	4,00 (s)	3,99

5.2.4. Elucidação estrutural de CECFR2/ 4_7

O fracionamento cromatográfico do extrato clorofórmico do cerne do caule de *A. amazonicus* (ECCECAa) (Ver Materiais e Métodos, pg. 41), resultou no isolamento de um sólido com aspecto de cristais incolores. Esse sólido é solúvel em clorofórmio e, após análise em CCD e revelação com vanilina, apresentou-se com uma única mancha, sendo rotulada de CECFR2/4_7 (10,0 mg).

O espectro de RMN ^1H (**Espectro 18, pg. 228**), obtido com CDCl_3 a 500 MHz, mostrou a presença de sinais em δ 0,88 (*t*) referente à absorção de hidrogênios de grupos metílicos (CH_3); 1,25 (*m*) referente à absorção de hidrogênios de grupos metilênicos (CH_2); 1,63 (*qd*) referente ao H-3 e 2,34 (*t*) referente ao hidrogênio H-2 característico de ácido graxo saturado.

Analisando os dados do espectro de RMN ^{13}C (**Espectro 19, pg. 229**) obtido em CDCl_3 a 125 MHz foi possível organizar a **Tabela 6**, na qual constam os valores de 1 carbono metílico (CH_3), 16 carbonos metilênicos (CH_2) e 1 carbono não hidrogenado (C).

Tabela 6. Deslocamentos químicos no RMN ^{13}C para CECFR2/ 4_7.

C	δ_{H}	δ_{C}
1	-	179,72
2	2,34 (<i>t</i> , $J = 7,45$ Hz)	34,02
3	1,63 (<i>qd</i> , $J = 7,40$ Hz)	31,97
4	1,25 (<i>m</i>)	29,73
5	1,25 (<i>m</i>)	29,73
6	1,25 (<i>m</i>)	29,73
7	1,25 (<i>m</i>)	29,73
8	1,25 (<i>m</i>)	29,73

9	1,25 (m)	29,70
10	1,25 (m)	29,68
11	1,25 (m)	29,63
12	1,25 (m)	29,47
13	1,25(m)	29,40
14	1,25 (m)	29,28
15	1,25 (m)	29,10
16	1,25 (m)	24,72
17	1,25 (m)	22,73
18	0,88 (t, $J = 6,56$ Hz)	14,14

Estes dados juntamente com os dados de RMN ^1H permitiu a identificação do ácido esteárico (ácido octadecanóico) (**Figura 20**) isolado do ECCECAa.

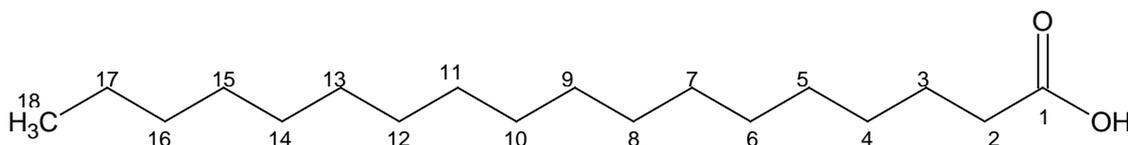


Figura 20. Ácido esteárico

5.2.5. Elucidação estrutural de CECFR4_5/ 58_63

Este metabólito foi isolado do ECCECAa após purificação da fração CECFR4_5 (Ver Materiais e Métodos, pg. 43).

O espectro de massas de CECFR4_5/ 58_63 apresentou o íon molecular em m/z 472, sugerindo uma fórmula molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_4$. O espectro apresentou ainda os picos em m/z 441, atribuídos à perda de um

grupamento hidroximetileno, m/z 423, atribuída a uma consecutiva perda de uma molécula de água, m/z 395, atribuída a uma consecutiva perda de um grupo carboxila (**Espectro 20, pg. 229**).

O espectro de RMN de ^1H (**Espectro 21, pg. 230**) de CECFR4_5/ 58_63 mostrou cinco sinais em δ 0,64, 0,72, 0,85, 0,98 e 1,63 ppm (3H, s Me-23, 24, 25, 26 e 30), sinais referentes aos grupos metílicos terciários. Os sinais em δ 4,67 e 4,55 ppm (1H, s), típicos de hidrogênios vinílicos de sistema triterpênico do tipo lupeno, foram atribuídos ao hidrogênios H-29 e H-29' do grupo isopropenil, e ao grupo metil vinílico foi atribuído ao singlete em δ 1,63 ppm. Ainda no espectro de RMN de ^1H foi observado um duplo duplete em δ 3,55 ppm (dd 1H, 5,0 e 11,3 Hz), o qual definiu a substituição de C-3 por um grupo hidroxila, que foi disposto em β devido à magnitude das constantes de acoplamento do hidrogênio carbinólico H-3. O multiplete em δ 2,25 ppm foi atribuído ao próton metínico em C-19. A presença de uma segunda hidroxila na molécula, foi confirmada pela presença de dois duplos dupletos em 3,96 ppm (dd 2H, 4,0 e 10,3 Hz) e em 4,25 ppm (dd 2H, 3,9 e 10,2 Hz) (**Espectro 22, pg. 230**), os quais foram atribuídos aos hidrogênios H-28a e H-28b e sinais em δ 1,23 e 1,96 referente a desproteção nos hidrogênios H-16 e a mesma desproteção foi percebida nos hidrogênios H-22 pelos sinais δ 1,17 e 1,83. No espectro de RMN de ^{13}C foi observado um sinal em δ 59,7 referente ao carbono metilênico hidroxilado C-28.

O espectro de RMN de ^{13}C (**Espectro 23, pg. 231**), confirma a presença de 5 carbonos metílicos, doze carbonos metilênicos, 5 metínicos e 8 carbonos desidrogenados, prefazendo um total de 30 carbonos.

Análise comparativa dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C deste metabólito com os previamente descritos para o lupeol e registros na literatura (Brandão, 1991) (**Tabela 7**), possibilitou sugerir a estrutura **21** para CECFR4_5/ 58_63, substância já descrita na literatura, como sendo o ácido 3 β , 28 – diidroxilup-20(29)-eno-27-óico.

Tabela 7. Deslocamentos químicos no RMN ^1H e ^{13}C para CECFR4_5/58_63, em comparação com dados da literatura (Brandão, 1991).

Sinal	^1H δ (ppm), multiplicidade, J (Hz)	Lit. δ_{H}	δ_{C} CECFR 4_5/58_63	Lit. δ_{C}
1	1,57, α, m (H); 0,86,	-	38,4	39,2
2	1,57, m (2H)	-	27,1	27,6
3	3,55, dd (1H, 5,0 e 11,3 Hz)	3,18	76,8	78,4
4	-	-	38,5	39,1
5	0,67 d , $J = 8,7$ Hz	-	55,2	55,7
6	1,28 α, m ; 1,57 β, m	-	18,5	18,4
7	1,28, m (2H)	-	34,8	35,7
8	-	-	40,9	41,6
9	1,28, m (1H)	-	51,1	52,1
10	-	-	37,0	37,2
11	1,19, m (1H), 1,39, m (1H)	-	20,7	21,2
12	1,07, m (1H), 1,63, m (1H)	-	25,6	25,3
13	1,69 m	-	38,5	39,0
14	-	-	55,3	56,2
15	-	-	22,8	23,5
16	1,23, m , 1,96, m	-	32,5	33,5
17	-	-	46,5	46,6
18	1,37, m (1H)	-	46,5	47,1
19	2,25, m (1H)	2,50, m (1H)	48,8	47,2
20	-	-	150,3	151,0
21	1,35, m (1H), 1,93, m (1H)	-	30,3	30,8
22	1,17, β, m (1H), 1,83, α, m (1H)	-	37,0	37,5
23	0,85, s (3H)	0,8	28,0	28,1
24	0,64, s (3H)	0,60	15,7	15,7
25	0,72, s (3H)	0,95	16,2	16,5
26	0,98, s (3H)	1,15	15,8	16,6
27	-	-	177,3	179,3
28	-	3,92/4,38 (dd , $J=12\text{Hz}$)	59,72	60,2
29	4,67, m (1H), 4,55, m (1H)	4,75/4,60	109,5	109,4
30	1,63, s (3H)	1,64, s (3H)	18,9	19,5

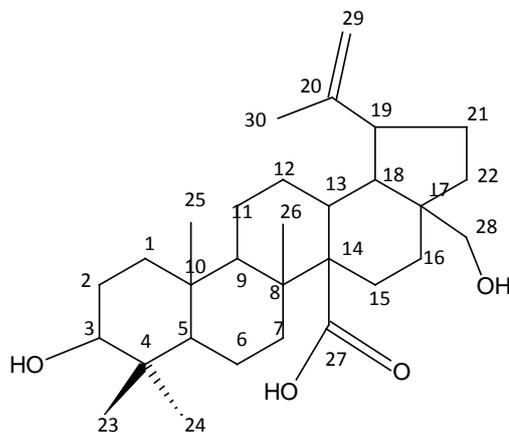


Figura 21. Ácido 3 β,28 diidroxi-lup-20(29)-eno-27-óico.

5.2.6 Elucidação estrutural de Azul/ECCECAa

A substância codificada como Azul/ECCECAa foi isolada do fração CECFR6, conforme descrito na seção Materiais e Métodos (pg. 47), e apresentou uma massa correspondente a 5 mg. Realizou-se para esta amostra somente experimentos de RMN 1D (^1H e ^{13}C) e experimento eletrospray modo negativo (ES-) devido a pouca quantidade isolada.

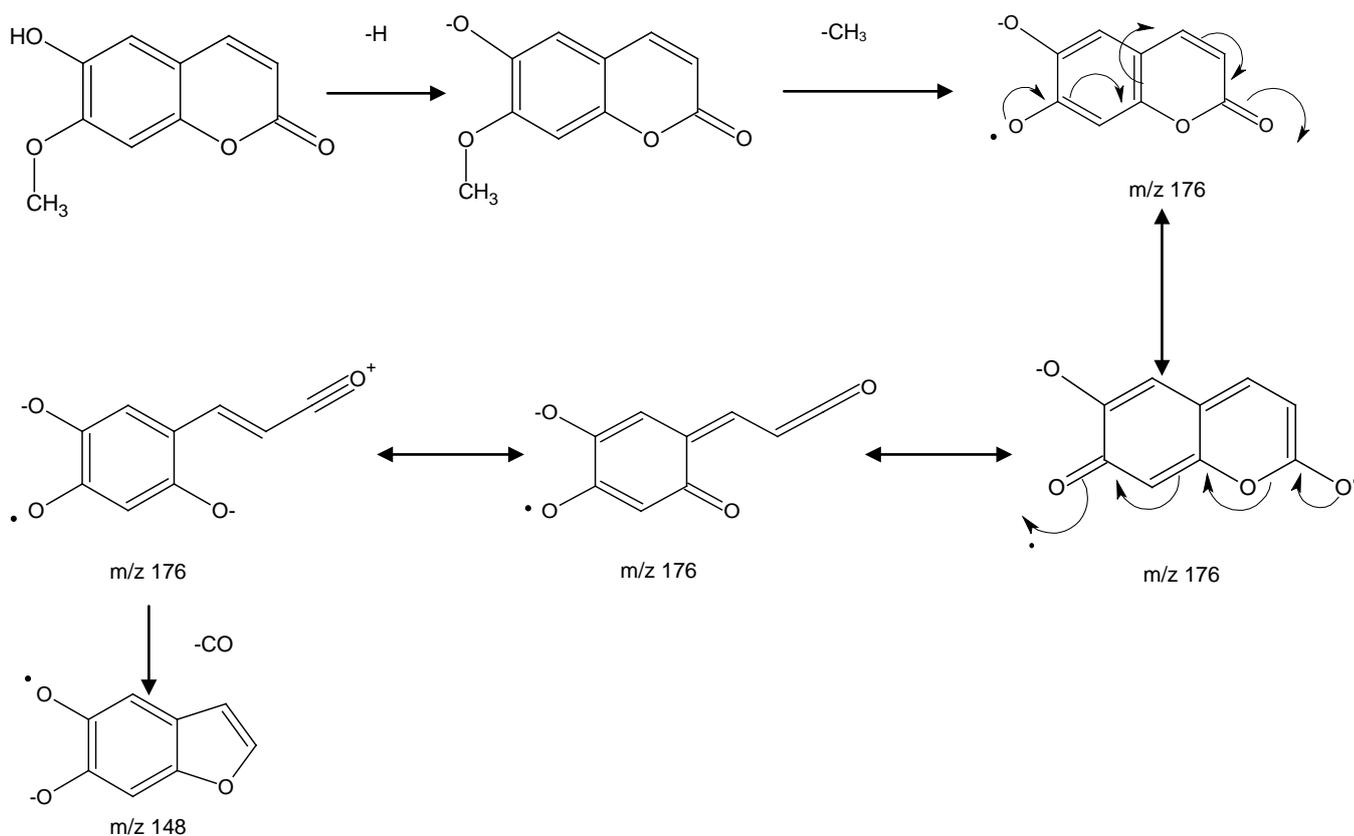
No espectro de RMN ^1H (**Espectro 24, pg. 231**) observou-se a presença de impurezas, mas foi possível identificar dois dupletos em δ 6,20 ($J = 10,0$ Hz, 1 H) e δ 7,86 ($J = 10,0$ Hz, 1 H), referentes aos hidrogênios H-3 e H-4 respectivamente, característicos de cumarinas (Costa *et al*, 2012). Notou-se também a presença de dois singletos em δ 6,77 e δ 7,12 correspondente aos hidrogênios 5 e 8 e um singlete em δ 3,91 correspondente a uma metoxila.

Com a análise do espectro de RMN ^{13}C (**Espectro 25, pg. 232**), verificou-se a presença de 8 carbonos, os quais possuem deslocamentos químicos em 57,0 (OMe), 104,14 (H-8), 107,0 (H-5), 110,14 (H-10), 112,73 (H-3), 144,0 (H-4), 148,0 (H-7) e 146,0. Para uma molécula pertencente à classe cumarina era esperado a identificação do sinal de um carbono lactônico e de um carbono ligado ao oxigênio. Estes carbonos são quaternários e não foram possíveis de serem identificados no espectro de ^{13}C .

Para auxiliar na elucidação da fração foi realizado o experimento de espectrometria de massas (**Espectro 26, pg. 232**). O espectro de massa

registrou alguns picos de menores intensidades em m/z 403 e m/z 459 relativo às impurezas presentes na amostra e o íon molecular em m/z 192, compatível com a fórmula molecular $C_{10}H_8O_4$, através dos picos em m/z 176 e m/z 148 foi possível confirmar a presença de alguns grupos funcionais que não foram identificados no espectro de RMN de ^{13}C .

No experimento de eletrospray modo negativo, verificou-se que a fração quando perde um próton estabiliza melhor a carga negativa provavelmente pela possibilidade de ressonância na molécula, sugerindo a presença do anel aromático, esta possibilidade de conjugação favorece a perda da metila radicalar originando o pico em m/z 176, o íon registrado em m/z 148 é relativo à migração do radical até o oxigênio da lactona, gerando um radical estável que após sucessivas migrações de carga, há perda de CO, sugerindo a presença da lactona na estrutura da molécula conforme demonstrado na figura a seguir (**Esquema 17**).



Esquema 17. Proposta de fragmentação e constituição dos íons compatíveis com os valores dos picos detectados nos espectros de massas de Azul/ECCECAa.

Com as observações de RMN de ^1H e ^{13}C em comparação com dados da literatura (Selim *et al*, 2012) conforme descrito na Tabela 8 e propostas de fragmentação pode-se confirmar que a fração codificada como Azul/ECCECAa é correspondente a cumarina 6-hidróxi-7 metoxicumarina – Isoescopoletina (**Figura 22**). Sendo pela primeira vez encontrada na espécie *A. amazonicus*.

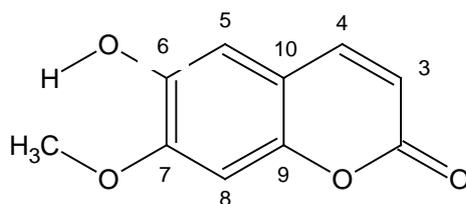


Figura 22. Estrutura da cumarina codificada como Azul/ECCECAa.

Tabela 8. Dados de RMN ^1H e RMN ^{13}C da cumarina Azul/ECCECAa em comparação com dados da literatura.

Posição	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H} (Literatura)	δ_{C} (Literatura)
2	-	-	-	161,8
3	6,20 (d, J=10,0 Hz)	112,73	6,72 (d, J=9,5 Hz)	117,5
4	7,86 (d, J=10,0 Hz)	144,00	7,95 (d, J=9,5 Hz)	147,3
5	6,77	107,00	5,35	113,4
6	-	148,00	6,25 d	143,6
7	-	146,35	-	146,2
OMe	3,91	57,00	3,79	56,1
8	7,12	104,14	6,80	104,2
9	-	-	-	-
10	-	110,14	-	111,3

5.2.7 Elucidação estrutural de PECC4

A substância **PECC 4**, isolada do ECCECAa (Ver Materiais e Métodos, pg. 48), apresentou características de um sólido cristalino e incolor após sucessivas lavagens com metanol. O espectro de massas (**Espectro 27, pg. 233**) foi obtido a partir do espectrômetro de massas com ionização por *ionização química a pressão atmosférica (APCI)*, modo positivo. Um sinal foi relacionado ao íon protonado em m/z 457, correspondendo à fórmula molecular $C_{30}H_{48}O_3$. Os sinais de maiores intensidade em m/z 439 e 393 foram atribuídos à perda de uma molécula de água, seguido da perda de HCOOH, confirmando a presença de um grupo carboxila na molécula. O espectro de RMN 1H (**Espectro 28, pg. 234**) apresenta seis simpletos δ_H 0,92, 0,64, 0,76, 0,86, 0,86 e 1,64 referentes a seis grupos metilas (**Espectro 29, pg. 234**). Apresenta também um simpleto em δ_H 3,31 em referência ao hidrogênio da carboxila e um duplete em δ_H 4,68 e um multiplete em δ_H 4,65 correspondentes a dois hidrogênios olefínicos (**Espectro 30, pg. 235**). No espectro de carbono (**Espectro 31, pg. 235**) são destaques sinais com deslocamento químico em δ_C 177,13 correspondente ao carbono carbonílico de ácido carboxílico (C-28), em δ_C 76,69 referente ao carbono carbinólico (C-3), em δ_C 109,51 atribuído ao carbono metilênico (C-29) e em δ_C 150,20, correspondente ao carbono vinílico (C-20). Os carbonos metílicos apresentaram deslocamentos químicos entre 14,29 (C-27) e 28,00 (C-23) ppm (**Espectro 32, pg. 236**).

Através da análise do mapa de contornos HMBC verifica-se que o sinal de hidrogênio em δ_H 0,64 atribuído ao H-24 se correlaciona com os sinais de carbono em δ_C 27,97 (C-2), 76,69 (C-3), 38,40 (C-4) e 55,32 (C-5). Ao sinal de hidrogênio em δ_H 0,76, atribuído ao H-25, foi observada correlações com os carbonos em δ_C 40,16 (C-9) e δ_C 36,63 (C-10). Estes fatos permitem localizar a posições das metilas H-24 e H-25.

Continuando a análise do mapa de contornos HMBC, pode-se observar que os sinais de hidrogênios olefínicos em δ_H 4,48 e 4,65 mostram correlação com os carbonos em δ_C 18,85 (C-30) e 49,84 (C-19).

Estas informações aliadas à comparação com os dados da literatura **(Tabela 9)** e acrescidos das análises dos fragmentos obtidos no espectrômetro de massas permitiram propor a estrutura ácido 3 β -hidroxi-28-carboxi-lup-20(29)-eno-óico (ácido betulínico) **(Figura 23)**.

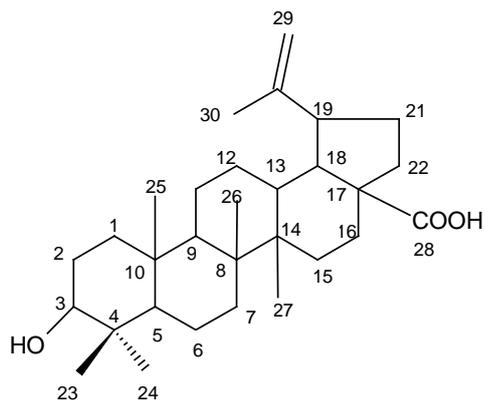


Figura 23. Ácido betulínico.

Tabela 9. Dados de RMN ^1H e RMN ^{13}C da PECC 4, em comparação com dados da literatura (Sharma *et al*, 2010).

Sinal	^1H δ (ppm), multiplicidade, J (Hz)	Lit. δ_{H}	^{13}C /HSQC δ (ppm)	HMBC	δ_{C} PECC 4	Lit. δ_{C}
1	1,52, α, m (2H)	-	38,17	-	38,17	39,0
2	1,43, m (2H)	-	27,06	-	27,06	27,6
3	2,95, m	3,30	76,69	-	76,69	78,2
4	-	-	-	-	38,40	39,1
5	-	-	-	-	55,32	55,5
6	-	-	-	-	17,87	18,4
7	1,37, m (2H)	-	33,83	-	33,83	34,5
8	-	-	-	-	40,16	40,8
9	-	-	-	-	54,80	50,7
10	-	-	-	-	36,63	37,3
11	-	-	-	-	20,36	21,0
12	-	-	-	-	24,99	25,7
13	-	-	-	-	37,51	38,1
14	-	-	-	-	41,91	42,5
15	-	-	-	-	29,10	30,2
16	-	-	-	-	31,62	32,9
17	-	-	-	-	46,51	47,1
18	-	-	-	-	48,45	48,1
19	-	2,30	-	-	49,84	49,2
20	-	-	-	-	150,20	150,1
21	1,80, m (2H)	-	-	-	30,00	30,6
22	-	-	-	-	36,24	37,0
23	0,92, s (3H)	0,93, s	28,00	-	28,00	27,9
24	0,64, s (3H)	0,75, s	15,64	C3 (^3J), C2 (^4J), C4 (^2J), C5 (^3J)	15,64	15,5
25	0,76, s (3H)	0,82, s	15,69	C9 (^3J), C10	16,69	16,4
26	0,86, s (3H)	0,96, s	15,84	C7 (^3J), C14 (^2J), C9 (^3J)	15,84	16,7
27	0,86, s (3H)	0,96, s	14,20	C7 (^3J), C14 (^2J), C9 (^3J)	14,29	15,0
28	-	-	-	-	177,13	182,3
29	4,68, d (1H, 1.72), 4,58, m (1H)	4,70, m , 4,80, m	109,51	C30 (^3J), C17 (^4J)	109,51	109,3
30	1,64, s (3H)	1,64, s	18,85	C29 (^3J), C20 (^2J)	18,85	19,4

5.2.8 Elucidação estrutural de PECC5

Da fração ECCECAa foram isolados 52,3 mg de um precipitado de cor branca, após sucessivas lavagens com metanol, codificado como PECC 5 (Ver Materiais e Métodos, pg. 48). O cromatograma obtido por CCD mostrou uma única mancha de coloração azul, após revelação com Komarowsky e aquecimento a 100°C, indicativo de uma substância com característica triterpênica (Brandão, 1991).

Informações obtidas por espectrometria de massas por APCI ionização química, modo positivo, forneceu a fórmula molecular $C_{30}H_{46}O_5$. Na página **237** é apresentado o espectro de massas (**Espectro 33**) e as prováveis vias de fragmentação para o PECC 5. O espectro de massas do PECC 5 apresentou um sinal do íon molecular em m/z 487 [M + H], seguido de sinal em m/z 469 [M + H] atribuído a perda de água. O sinal intenso em m/z 423 [M + H] foi relacionado à proveniente perda de água seguido da perda de HCOOH, o sinal em m/z 425 [M + H] foi atribuído à perda $H_2O - CO_2$ e o sinal em m/z 441 [M + H] sugeriram a perda de HCOOH. Estes dados permitem concluir que a fração PECC 5 é um ácido.

Por meio dos espectros de RMN 1H e RMN ^{13}C foram atribuídos os deslocamentos químicos e caracterizados os átomos de hidrogênio e carbono que compõem a estrutura da substância. O espectro de RMN 1H (**Espectro 34, pg. 238**) mostraram cinco sinais simples em δ 0,75, 0,86, 0,93, 1,05 e 1,70 ppm, 3H para cada sinal integrado, correspondente aos hidrogênios dos grupos metilas. Os sinais correspondentes a dois dubletos em δ 4,56 (*dd*, $J = 2.8$ e 1.3 Hz) e δ 4,68 (*d*, $J = 2.1$ Hz) foram relacionados a dois hidrogênios geminais olefínicos (H-29a e H-29b), em campo mais baixo devido à ligação com o carbono da dupla ligação, provocando forte efeito de desblindagem (**Espectro 35, pg. 238**). Estes sinais somados ao deslocamento do sinal do grupo metila em δ 1,70 foram característicos de hidrogênios pertencentes a um grupamento isopropenil, sugerindo um triterpeno pentacíclico do tipo lupeno (Haque *et al*, 2006).

Um sinal em δ 3.10 (dd $J = 11.4$ e 5.0 Hz) foi associado ao acoplamento do hidrogênio em C-3 com os hidrogênios H-2 (H-2a e H-2b) (**Espectro 36, pg. 239**), os valores calculados de J , indicaram uma configuração axial para o hidrogênio metínico (Brandão, 1991).

O espectro de RMN ^{13}C (**Espectro 37, pg. 240**) indicou a presença de trinta átomos de carbono na estrutura de PECC 5, evidenciando a natureza triterpênica da substância. Desses sinais, dois em campo mais baixo, δ 179,25 e 180,19, foram associados a dois grupos carboxílicos (Brandão, 1991). Outros dois sinais em campo baixo desblindados em δ 151,52 e 110,61 foram atribuídos a ligação dupla que apresentou um grupo isopropenila, com deslocamentos químicos específicos em δ 19,45, 151,52 e 110,61 para os carbonos C-30, C-20 e C-19 (Haque *et al*, 2006). O espectro apresentou um sinal característico em δ 79,88 de carbono oxigenado. Este deslocamento foi compatível com a presença de hidroxila livre na posição equatorial em C-3 do esqueleto lupênico (Brandão, 1991). Os valores de deslocamento para C-1 (39,99 ppm) e C-5 (57,04 ppm) indicaram um grupo hidroxila no mesmo plano, mostrando a interação desses carbonos e o deslocamento para o campo mais baixo (Carvalho *et al*, 1998). Outro aspecto relevante no esqueleto lupênico de PECC 5 foi a ausência do grupo metila C-27 em δ 14, presente no espectro de carbono do lupeol. Nesta posição foi evidenciado um grupo carboxila (Brandão *et al*, 1991). Frente a todas as evidências e em comparação com dados da literatura (**Tabela 10**) foi proposta para PECC 5 a estrutura do ácido 3β - hidroxí - 20 (29) - lup - 20(29) - eno - 27, 28 - dióico, ácido melalêucico (**figura 24**), já isolado anteriormente de *A. amazonicus* (Brandão, 1991).

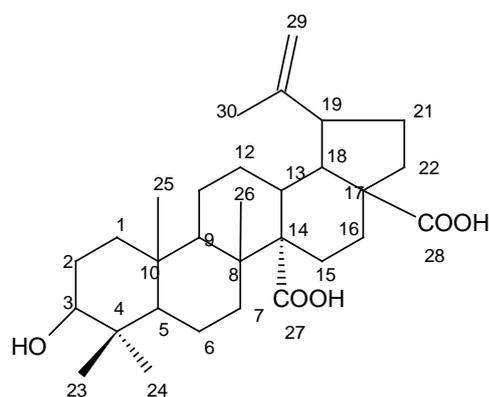


Figura 24. Ácido melalêucico.

Tabela 10. Deslocamentos químicos no RMN ^{13}C para PECC 5 em comparação com os dados da literatura (^aBrandão, 1991; ^bCorrêa, 2007).

Carbono	δ_{C} PECC 5	Lit. ^a δ_{C}	Lit. ^b δ_{C}
1	39,99	38,8	38,0
2	28,92	28,1	28,1
3	79,88	78,6	77,8
4	39,99	38,9	39,8
5	57,04	55,4	55,2
6	19,25	18,4	17,8
7	35,62	34,8	34,0
8	41,13	40,3	40,0
9	53,03	51,9	52,0
10	38,28	37,3	37,51
11	21,88	20,8	19,8
12	28,09	27,5	27,0
13	40,09	39,8	39,8
14	60,88	59,8	58,4
15	27,55	26,3	26,5
16	38,98	37,7	38,0
17	57,30	56,2	56,2
18	52,95	51,2	51,5
19	41,49	47,2	47,4
20	151,52	150,7	149,6
21	30,79	30,7	30,8
22	38,64	37,5	37,5
23	28,85	28,0	28,0
24	16,27	15,6	15,7
25	17,28	16,8	16,2
26	17,57	17,2	16,7
27	179,25	178,5	176,6
28	180,19	179,4	177,2

Tabela 10. Deslocamentos químicos no RMN ¹³C para PECC 5 em comparação com os dados da literatura (^aBrandão, 1991; ^bCorrêa, 2007).

29	110,61	109,7	109,8
30	19,45	19,1	18,5

5.2.9. Elucidação estrutural de CRF1/1_9

A substância CRF1/1_9 (10 mg) foi isolada da fração CRF1 como um sólido branco solúvel em clorofórmio.

O espectro de RMN de ¹H (**Espectro 38, pg. 241**) apresentou sinais em δ 0,76 a δ 1,68 referentes às metilas, adicionalmente foram observados sinais de hidrogênios vinílicos em δ 4,56 (*dd*) e δ 4,69 (*d*; $J = 2,4$ Hz) referentes ao hidrogênio H- 29 da ligação dupla terminal. O duplo duplete em δ 3,18 ($J = 5,4$ e $10,8$ Hz) é relativo ao hidrogênio carbinólico H-3, estes acoplamentos indicaram a presença de β - configuração.

Foram observados dois dupletos em 3,82 e 3,30 ppm, os quais foram atribuídos aos hidrogênios H-28a e H-28b e sinais em δ 1,21 e 1,92 referente a desproteção nos hidrogênios H-16 e a mesma desproteção foi percebida nos hidrogênios H-22 pelos sinais δ 1,01 e 1,83.

O RMN de ¹³C (**Espectro 39, pg. 242**) e o subespectro de DEPT 135° (**Espectro 40, pg. 242**) apresentou sinais em δ 150,8 (carbono não hidrogenado) e δ 109,6 (carbono metilênico) característicos dos átomos dos carbonos vinílicos C-20 e C-29, respectivamente, também foram observados sinais em δ 79,0, referente ao carbono carbinólico, e em δ 60,6 referente ao carbono metilênico hidroxilado C-28, estes sinais apontam para uma molécula triterpênica do tipo lupano próxima ao ácido betulínico diferenciando neste último sinal apresentado. Os dados de RMN de ¹H de CRF1/1_9 foram comparados com os dados da literatura para a betulina (**Figura 25**) isolado da espécie *Salacia cordata* (Tito *et al*, 1992) e os dados de RMN de ¹³C foram comparados com àqueles apresentados por Mahato e Kundu (1994) (**Tabela 11**).

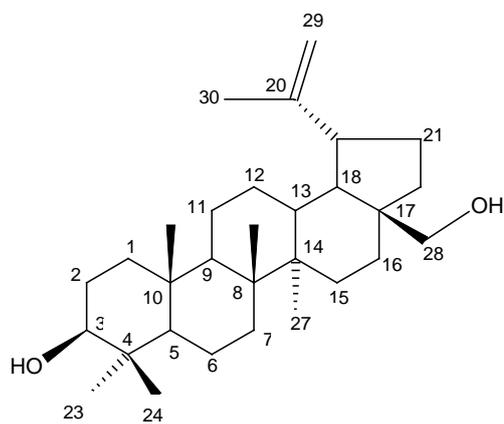


Figura 25. Betulina.

Tabela 11. Dados de RMN ^1H e RMN ^{13}C da CRF1/1_9, em comparação com dados da literatura (^aTito *et al*, 1992; ^b Mahatu & Kundu, 1994).

Sinal	^1H δ (ppm), multiplicidade, J (Hz)	Lit. ^a δ_{H}	δ_{C} CRF1/1_9	Lit. ^b δ_{C}
1	1,56, α, m (H); 0,86,	1,64, m (1H); 0,89, m (1H)	38,6	38,8
2	1,56, m (2H)	1,58, m	27,2	27,2
3	3,20, dd (1H, 5,1 e 11,1 Hz)	3,18, dd (1H; 5,1 e 10,8)	79,0	78,9
4	-	-	38,8	38,9
5	-	0,67, d (1H; 9,0)	55,3	55,3
6	-	-	18,3	18,3
7	1,38, m (2H)	1,39, m (2H)	34,0	34,3
8	-	-	41,0	40,9
9	-	1,26, m (1H)	50,4	50,4
10	-	-	37,2	37,2
11	-	1,42, m (1H); 1,18, d (1H; 4,2)	20,9	20,9
12	-	1,63, m (1H); 1,05, m (1H)	25,2	25,3
13	-	1,62, m (1H)	37,3	37,3
14	-	-	42,7	42,7
15	-	1,68, m (1H); 1,04, d (1H; 2,7)	27,0	27,0
16	-	1,92, m (1H); 1,20, d (1H; 4,2)	29, 2	29,2
17	-	-	47,8	47,8
18	-	1,57, m (1H)	48,8	48,8
19	-	2,38, m (1H)	47,6	47,8
20	-	-	150,8	150,6

Tabela 11. Dados de RMN ¹H e RMN ¹³C da CRF1/1_9, em comparação com dados da literatura (^aTito *et al*, 1992; ^b Mahatu & Kundu, 1994).

21	1,91, <i>m</i> (2H)	1,95, <i>m</i> (2H)	29,8	29,8
22	-	1,84, <i>d</i> (1H; 3,3); 1,02, <i>m</i> (1H)	34,3	34,0
23	0,97, <i>s</i> (3H)	0,97, <i>s</i>	28,0	28,0
24	0,78, <i>s</i> (3H)	0,76, <i>s</i>	16,0	15,4
25	0,83, <i>s</i> (3H)	0,82, <i>s</i>	16,1	16,1
26	1,03, <i>s</i> (3H)	1,02, <i>s</i>	15,6	16,0
27	0,98, <i>s</i> (3H)	0,98, <i>s</i>	14,8	14,8
28	3,8, <i>dd</i> (1H; 3,5 e 10,5); 3,34, <i>dd</i> (1H; 3,5 e 10,7)	3,78, <i>dd</i> (1H; 3,9 e 10,2); 3,31, <i>dd</i> (1H; 3,0 e 10,8)	60,6	60,2
29	4,68, <i>d</i> (1H, 1,72), 4,58, <i>m</i> (1H)	4,68, <i>m</i> (1H), 4,58, <i>m</i> (1H)	109,6	109,6
30	1,68, <i>s</i> (3H)	1,68, <i>s</i>	19,1	19,1

5.3. Substâncias isoladas de *V. cayennensis*

5.3.1. Elucidação estrutural de ECFVc 4_5/24_25/P

Esta substância foi isolada do extrato ECFVc, precisamente da sub-fração ECFVc 4_5, a partir de fracionamentos em CC (Ver Materiais e Métodos, pg. 55). A substância foi isolada na forma de um sólido esverdeado.

A **figura 26** mostra o espectro de massas em *full scan* apresentando os íons precursores da molécula desprotonada ([M-H]⁻) de ECFVc 4_5/24_25/P, juntamente com as fragmentações obtidas de segunda ordem (MS/MS).

4_5_4_5 #2-51 RT: 0,01-0,40 AV: 49 NL: 6,16E4
 T: ITMS - c ESI Full ms [125,00-1000,00]

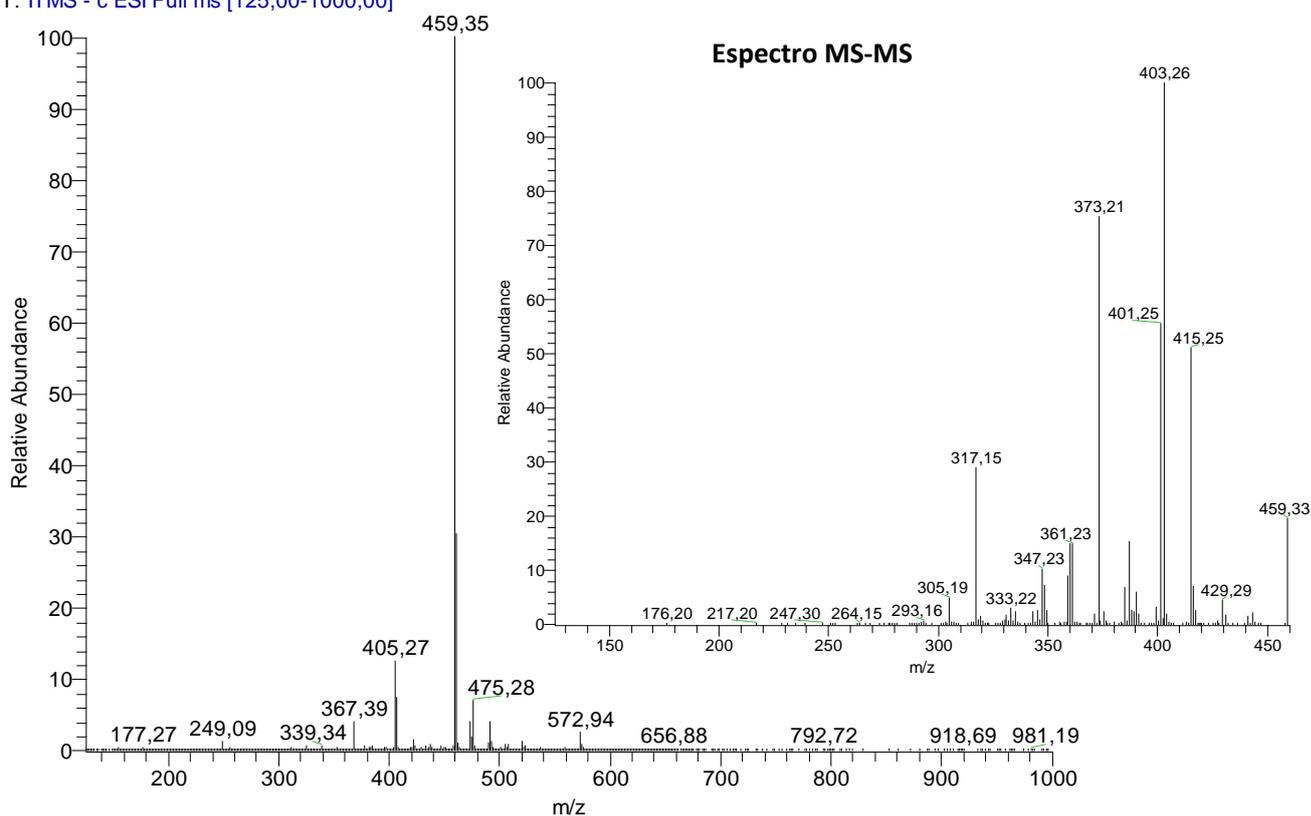
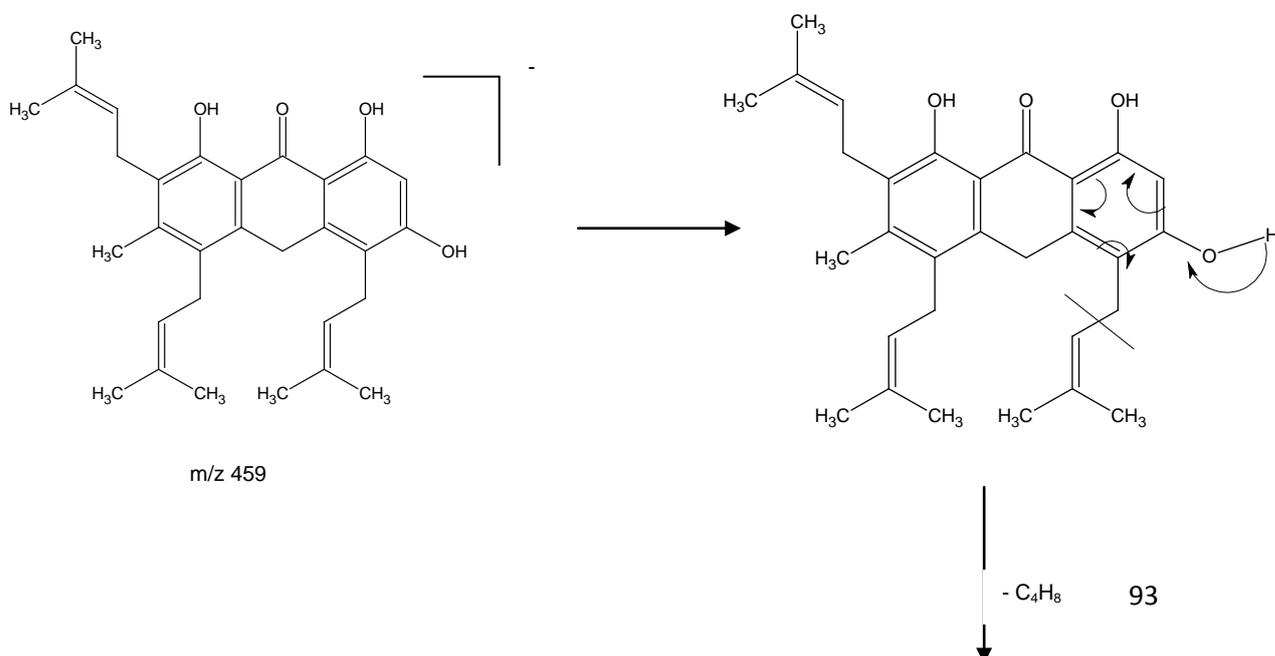
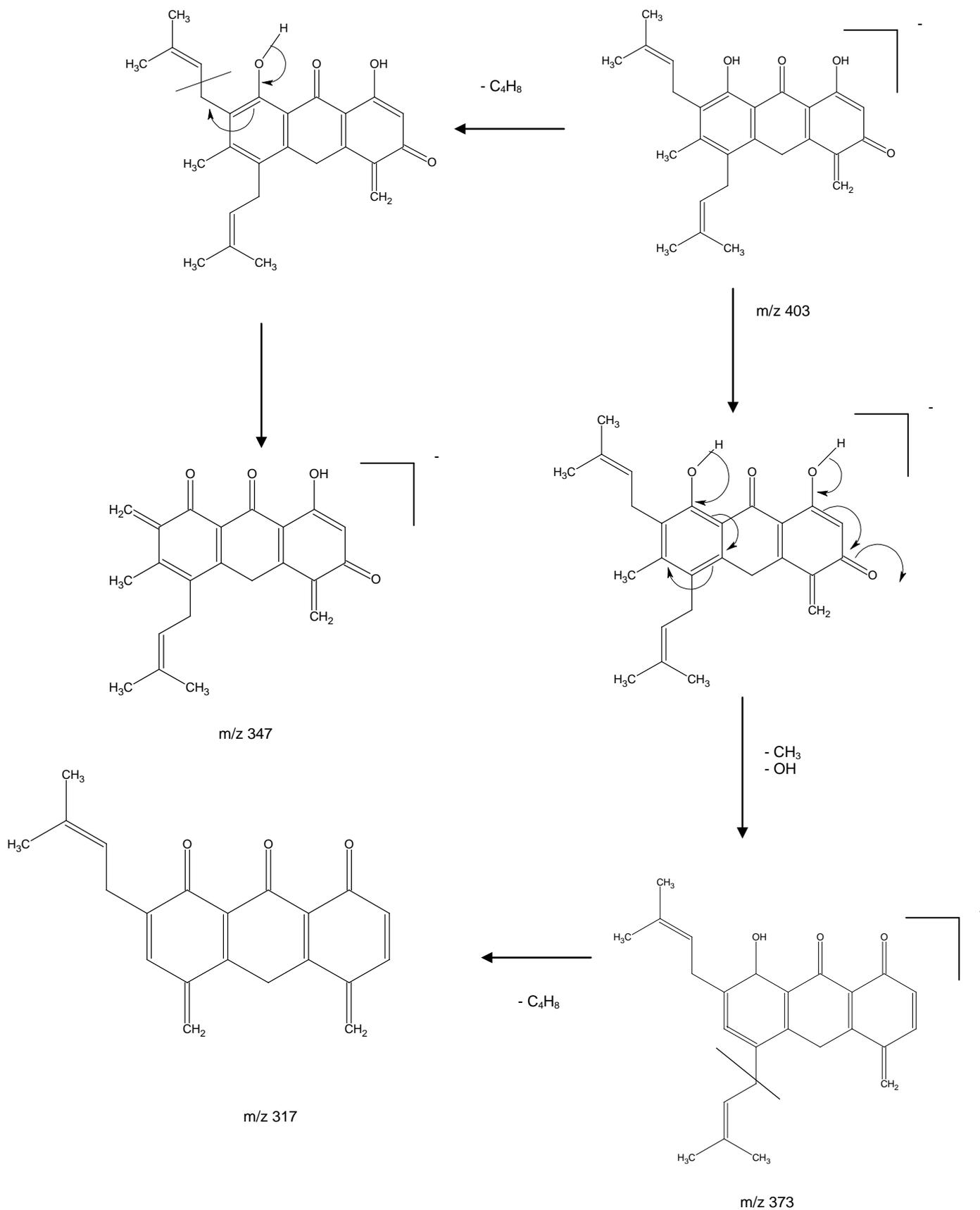


Figura 26. Espectro de massas de primeira ordem, em modo full scan, juntamente com fragmentação em segunda ordem do íon precursor de m/z 459, de ECFVc 4_5/24_25/P avaliado em modo negativo.

A presença de um pico majoritário com m/z de 459 daltons é compatível com a fórmula molecular $C_{30}H_{36}O_4$. Notamos a presença de sinais referentes às perdas de três grupos 2-metil-prop-1-enila (m/z 56 daltons), em m/z 403, 347 e 317 daltons (**Esquema 18**).





Esquema 18. Proposta de fragmentação e constituição dos íons compatíveis com os valores dos picos detectados nos espectros de massas de ECFVc 4_5/24_25/P.

No espectro de RMN ^{13}C é possível observar a presença de trinta sinais de carbono, nos quais foram observados os seguintes grupamentos 7 metilas, 4 metilenos, 4 metinos e 15 carbonos quaternários, incluindo o carbono carbonílico em δ 192,16. O espectro de RMN de ^1H (**Espectro 41, pg. 243**) revela dois sinais simples em δ 12,59 e δ 13,23 referentes aos grupamentos hidroxila formando ligação de hidrogênio com a carbonila (**Espectro 42, pg. 243**), dois hidrogênios aromáticos a δ 6,75 (1H, s) e δ 2,3 (2H, s) ppm, um grupo metila ligado ao anel aromático em δ 1,81 (3H, d, $J = 4,8$ Hz, acoplamento a longa distância), adicionalmente se observa e um sinal simples reduzido em δ 6,76 referente ao hidrogênio enólico H-2, o aparecimento de um sinal em δ 6,29 relacionado ao CH_2 da forma cetônica (**Espectro 43, pg. 244**). Os deslocamentos químicos, em campo mais alto, das hidroxilas queladas são característicos de uma estrutura 1,8 – diidroxiantrona (Pinheiro *et al*, 1984). O espectro de RMN de ^1H também mostra ressonâncias características de três fragmentos do grupo 3,3-dimetilalil; três tripletos para os hidrogênios olefínicos em δ 4,89 (1H, t, $J = 6,6$ Hz), δ 5,0 (1H, t, $J = 6,6$ Hz) e δ 5,26 (1H, t, $J = 7,2$ Hz) (**Espectro 44, pg. 244**), um duplete em δ 3,50 (2H, d, $J = 7,07$ Hz) e dois duplos dupletos para os prótons de dois metilenos em δ 3,35 (Ha, Ha', dd, $J = 6,3$ e 14,52 Hz) e 3,38 (Hb, Hb', dd, $J = 6,31$ e 14, 52 Hz) (**Espectro 45, pg. 245**) e cinco singletos para metilas olefínicas em δ 1,85, 1,78, 1,72, 1,70 e 1,54.

Na análise do espectro de HSQC foi possível identificar a correlação dos prótons equivalentes, do grupo metileno da cadeia dimetilalil em δ 3,36 e δ 3,38 com os carbonos em δ 27,35 e 24,36, respectivamente. Um padrão de conectividade similar apareceu para outra cadeia lateral em δ 3,50 que correlaciona com o carbono em δ 21,84 (**Espectro 46, pg. 246**).

Por último, o espectro HMBC, que indica informações de conectividade a larga distância H-C, mostra a correlação entre o hidrogênio enólico (H-2) em δ 6,29 com o C-3 (160,8 ppm), C-4 (117,04 ppm), C-9a (111,9 ppm) e uma correlação a distância com o C-10 (20,90 ppm) (**Espectro 47, pg.**

247), correlações do H-8 com C-8 (113,7 ppm), e H-1 com C-1 (160,9 ppm), C-3 (160,85 ppm) e C-4 (117,04 ppm).

As demais correlações obtidas (**Tabela 12**), juntamente com os dados de massas, RMN de ^1H , Dept 135 $^\circ$ e RMN de ^{13}C permitiram propor a estrutura de um antrone 1,3,8 triidroxilado. Em 1984, Pinheiro e colaboradores publicaram um trabalho sobre o isolamento de alguns antranóides prenilados, dentre eles estão o composto γ – hidróxi antrone B, isolado dos frutos de *V. Japurensis*, esta molécula é semelhante com a ECFVc 4_5/24_25/P diferenciando em um grupo dimetilalil, que no caso da γ – hidróxi antrone B é substituída por um cadeia 3 hidróxi-metil-but-2-enil. Anos mais tarde, Linuma e colaboradores (1995) isolaram da espécie *Harungia madagascariensis* uma substância com os deslocamentos químicos semelhantes à substância ECFVc 4_5/24_25/P, incluindo a presença de três grupos dimetilalil, tal substância foi isolada pela primeira vez por esse grupo de pesquisa e identificada como 1,3,8 triidroxil-4,5,7-triisoprenil-7-metil-antrone (harunganol B) (**Figura 27**).

É a primeira vez que harunganol B é isolada da espécie *V. cayennensis*, assim como é o primeiro registro desta substância no gênero *Vismia*.

Tabela 12. Deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C e as principais correlações observadas no espectro de HMBC de ECFVc 4_5/24_25/P, em $\text{CHCl}_3\text{-d}_6$ (Iinuma *et al*, 1995).

Sinal	^1H δ (ppm), multiplicidade, J (Hz)	^{13}C δ (ppm)	Lit. δ_c	HMBC
1	13,23	160,9	164,8	C1, C-3, C-4
2	6,75 s (1H); 6,29 s (2H)	109,3	102,1	C-3, C-4, C-9a, C-10
3	-	160,8	163,5	
4	-	117,04	119,0	
4a	-	145,7	143,0	
5	-	128,29	129,6	
6	-	145,8	145,7	
7	-	-	127,4	
8	12,59	159,9	160,0	C-8
8a	-	113,7	113,8	
9	-	192,1	193,9	
9 a	-	111,9	110,1	
10	2,3 s (2H)	20,90	28,1	C-4, C-4a, C-5
10 a	-	135,9	137,4	
11	3,36 dd (2H; 6,31 e 14,52)	27,35	24,5	C-4, C-12, C-3
11'	3,38 dd (2H; 6,31 e 14,52)	24,36	24,5	C-10a, C-12', C-3
12	4,91 t (1H; 6,6)	121,25	122,3	
12'	5,0 t (1H; 6,6)	121,25	122,3	
13	-	133,12	132,0	
13'	-	133,12	132,0	
14	1,72 s (3H)	25,62	25,5	C-15, C-12
14'	1,78 s (3H)	25,71	25,5	C-12', C-13', C-15', C-21
15	1,85 s (3H)	17,97	17,7	C-14, C-12
15'	1,85 s (3H)	17,97	17,7	C-12', C-13', C-14', C-21
16	3,5 d (2H; 7,07)	21,84	25,1	C-8, C-17
17	-	121,18	122,4	
18	-	133,82	131,8	
19	1,70 s (3H)	25,62	23,8	C-17, C-18
20	1,85 s (3H)	17,94	16,1	C-18, C-17
21	1,81 d (3H; 18,01)	18,01	19,0	C-5, C-11'

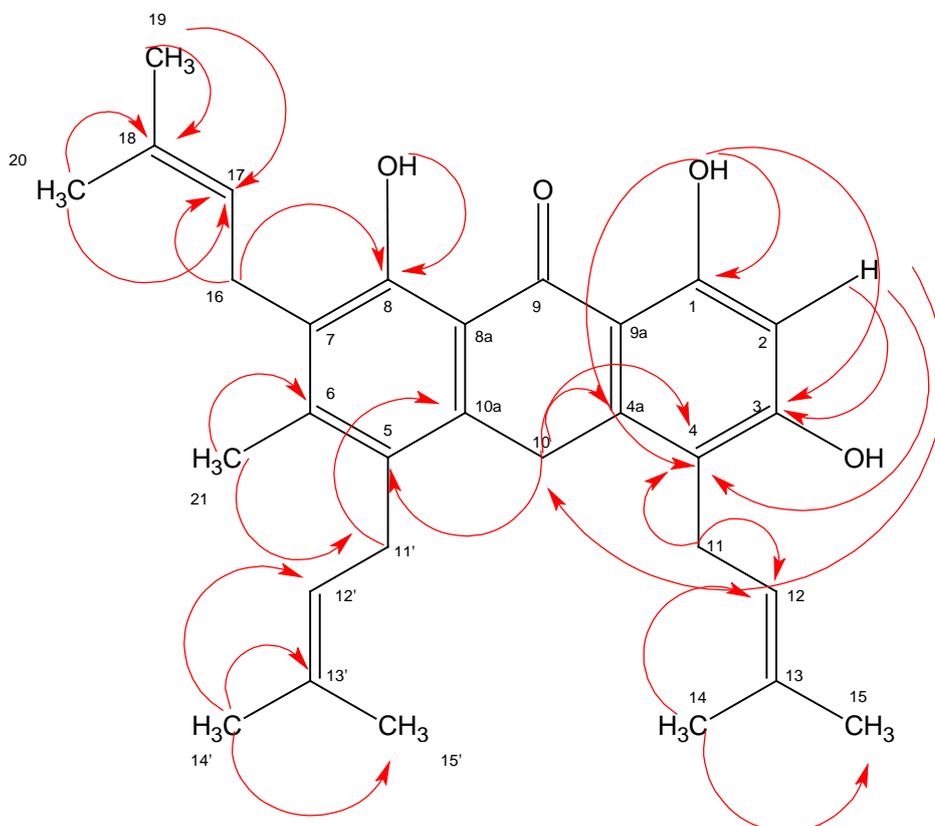


Figura 27. 1,3,8 triidroxi-4,5,7-triisoprenil-7-metil-antrona (harunganol B). Correlações observadas no espectro de HMBC.

5.3.3. Elucidação estrutural de ECFVc 6_8

A substância ECFVc 6_8 foi obtida do extrato clorofórmio dos frutos como um sólido em formato de branco em agulhas, com ponto de fusão 266 – 271°C (Ver Materiais e Métodos, pg. 56). A análise de ECFVc 6_8 por CCD – gel de sílica, utilizando como eluente a mistura de solventes Hex/Ac 7:3, apresentou teste positivo ao reagente de Lieberman Burchard, com coloração roxa característica de triterpenos pentacíclicos (Mattos, 1998).

O cromatograma de ECFVc 6_8 obtido por cromatografia gasosa acoplado ao espectrômetro de massas (CG/EM), registrou apenas um sinal de tempo de retenção de 49,29 min, sugerindo a presença de um único constituintes. O espectro de massas, obtido por impacto de elétrons apresentou um sinal relacionado ao íon molecular em m/z 426 ($M^{•+}$) com baixa intensidade, compatível com a fórmula molecular $C_{30}H_{50}O$. O

espectro apresentou também, entre outros, os fragmentos de m/z 69 ($M+•-357$) (100%) atribuído ao rearranjo de McLafferty com formação de um fragmento característico $R-C\equiv O^+$. Os demais fragmentos do espectro de massa observados foram característicos de triterpenos da série dos fridelanos (Klass *et al*, 1992).

A análise do espectro de hidrogênio (**Espectro 48, pg. 248**), obtido a 500 MHz em clorofórmio deuterado, apresentou os seguintes deslocamentos químicos:

- Oito sinais simples atribuídos aos deslocamentos em $\delta = 0.73, 0.87, 0.88, 0.95, 1.00, 1.01, 1.05$ e 1.18 com integração relacionada a 3H, para cada sinal integrado. Sendo sete sinais de grupo metila ligados a carbonos quaternários e um ao hidrogênio terciário;
- Um sinal duplo sobreposto (CH_3CH) em $0,88$ ($J = 6,5$ Hz), o qual apresentou acoplamento com um sinal de quarteto em $2,24$ ($J = 6,5$ Hz) (**Espectro 49, pg. 249**);
- Sinais múltiplos em $\delta 1,30 - 2,36$ regiões características de hidrogênios alicíclicos (Silverstein, 2000), destacando-se dois duplos – dubletos em $\delta 2,39$ ($J = 13,7, 5,0$ e $2,0$ Hz) referente ao H – 2 na posição equatorial (Almeida, 2007). O valor de $J = 13,7$ corresponde ao acoplamento geminal entre H-2ax e H-2eq e os valores de $J = 5,0$ e
- $2,0$ Hz correspondentes ao acoplamento vicinal axial – equatorial e equatorial - equatorial dos hidrogênios de C – 1 e C - 2 (**Espectro 50, pg. 250**) (Silverstein, 2000).
- O sinal em $\delta 2,29$ deveria ser observado dois duplos – dubletos referente ao H – 2 na posição axial, porém a difícil visualização ocorreu devido à sobreposição com os sinais em $\delta 2.24$ (Duarte, 2000).

Em $\delta 1,68$ foi verificado sinais de duplo-dublete referentes ao acoplamento vicinal axial – axial ($J = 13.0$ e 5.0 Hz) entre H-2ax e H-1ax (**Espectro 51, pg. 251**) (Silverstein p. 173, 2000).

O espectro de RMN ^{13}C (**Espectro 52, pg. 252**) mostrou a presença de 30 sinais, relacionados a 8 CH_3 , 11 CH_2 , 4 CH e 7 carbonos quaternários, pela

técnica DEPT ($\theta = 135^\circ$ e 90°) (tabela 3, p. 59). Os deslocamentos químicos em δ 28,16, 30,50, 37,45, 38,30, 39,70, 42,14 e 213,9 sugerem que a substância possui esqueleto friedelano (Klass *et al.*, 1992). A presença de um carbono carbonílico foi confirmada através do deslocamento químico em δ 213,9.

No **espectro 53, pg. 253** estão identificados os espectros de DEPT 135 e 90 que permitiram distinguir entre os grupos CH_3 , CH_2 e CH . Os sinais para cima de DEPT 135 mostram os grupos CH_3 e CH , os sinais de DEPT 90 mostraram o grupo de CH , aqueles não identificados no DEPT 90 foram relacionados aos carbonos quaternários.

Com base nos resultados obtidos e por comparação com aqueles descritos na literatura (**Tabela 13**), a substância codificada como ECFVc 6_8 foi identificado como o triterpeno pentacíclico friedelina (**Figura 28**).

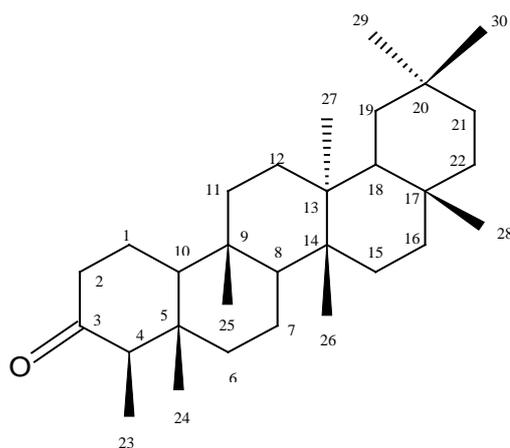


Figura 28. Estrutura da Friedelina.

Tabela 13. Comparação dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C da amostra ECFVc 6_8 com os dados da literatura (^aDuarte, 2000; ^bKlass *et al* , 1992).

Carbono	δ_c ECFVc 6_8	DEPT	Lit. ^a δ_c	δ_H ECFVc 6_8	Lit. ^a δ_H	Lit. ^b δ_H
1	22,28	CH ₂	22,31	1,95 <i>m</i>	1,96 <i>m</i>	1,96
2	41,53	CH ₂	41,56	2,39 <i>dd</i> (Heq; <i>J</i> = 13.7; 5.0; 2.0) 2,29 <i>m</i> (H ax)	2,39 <i>m</i> ; H2a 2,28 <i>m</i> ; H2b	2,39 2,28
3	213,9	C=O	212,98	-	-	-
4	58,21	CH	58,30	2,24 (<i>q</i> ; <i>J</i> = 6,5)	2,28 <i>m</i>	2,25
5	42,14	C	42,17	-	-	-
6	41,27	CH ₂	41,38	1,76 (<i>dd</i> , Heq; <i>J</i> = 8.4; 2.7) 1,27 (<i>m</i> , Hax)	-	1,75; 1,28
7	18,23	CH ₂	18,29	1,45 (<i>m</i>)	-	1,49; 1,37
8	53,09	CH	53,18	1,37 (<i>m</i>)	-	1,39
9	37,45	C	37,52	-	-	-
10	59,45	CH	59,58	1,55	-	1,53
11	35,61	CH ₂	35,69	1,38 (1H; <i>m</i>)	-	1,46; 1,26
12	30,50	CH ₂	30,55	1,35 (1H; <i>m</i>)	-	1,34; 1,34
13	39,70	C	39,77	-	-	-
14	38,30	C	38,37	-	-	-
15	32,41	CH ₂	32,50	1,27 (<i>m</i>)	-	1,46; 1,27
16	35,99	CH ₂	36,08	-	-	1,57; 1,36

17	29,99	C	30,05	-	-	-
18	42,76	CH	42,90	-	-	1,56
19	35,33	CH ₂	35,40	1,37 (1H; <i>m</i>)	-	1,38; 1,20
20	28,16	C	28,20	-	-	-
21	32,75	CH ₂	32,86	1,51 (<i>m</i>)	-	1,51; 1,30
22	39,25	CH ₂	39,30	1,48 (1H; <i>m</i>)	-	1,50; 0,94
23	6,84	CH ₃	6,81	0,88 <i>d</i> (6,5)	0,86 <i>d</i> (7.8)	0,87
24	14,66	CH ₃	14,68	0,73 (3H, <i>s</i>)	0,71 <i>s</i>	0,71
25	17,95	CH ₃	17,97	0,87 (3H, <i>s</i>)	0,85 <i>s</i>	0,86
26	20,26	CH ₃	20,27	1,00 (3H, <i>s</i>)	1,00 <i>s</i>	1,00
27	18,68	CH ₃	18,66	1,05 (3H, <i>s</i>)	1,05 <i>s</i>	1,05
28	32,09	CH ₃	32,13	1,18 (3H, <i>s</i>)	1,17 <i>s</i>	1,17
29	35,03	CH ₃	35,03	1,01 (3H, <i>s</i>)	1,00 <i>s</i>	1,00
30	31,78	CH ₃	31,81	0,95 (3H, <i>s</i>)	0,95 <i>s</i>	0,95

5.3.3. Elucidação estrutural de ECFVc 9_12/9_19P

A análise do espectro de hidrogênio em solvente de clorofórmio deuterado de ECFVc 9_12/9_19P permitiu as seguintes observações: um simpleto para um grupo metil aromático em δ 2,43, a presença de 3 sinais simples em δ 15,77, 11,93 e 10,03 (**Espectro 54, pg. 254**), seus deslocamentos químicos em campo baixo parecem indicar a presença de hidroxilas fenólicas, o sinal de simpleto em δ 11,93 é típico de hidroxila aromática quelada à carbonila (MOREIRA *et al*, 2006), e a presença de dois moléculas dimetilalil pelo dupletos em δ 3,50 (1H, dd, $J=5,1$ e $8,2\text{Hz}$) e

δ 3,48 (1H, dd, $J=4,9$ e $8,5$ Hz). O conjunto de três multipletos (**Espectro 55, pg. 255**), todos integrando um hidrogênio, em $\delta_H = 6,99, 7,04$ e $7,14$ é característico de hidrogênios aromáticos com padrões de acoplamento do tipo *orto-meta*, *orto-orto* e *orto - meta* (Moreira *et al*, 2006), foi observado um sinal simples em δ 5,35 referente a um próton vinílico em ressonância (Kouam *et al*, 2010).

O forte deslocamento químico de um dos grupos hidroxil (δ 15,77) junto com a presença de um grupo metil aromático são característicos para derivados do 8,9-diidroximetil-antrona (Kouam *et al*, 2010).

O espectro de RMN ^{13}C indicou a presença de dois metilenos (δ 40,6 e 40,6), seis metinos (δ 131,7, 117,8, 114,5, 118,2, 125,2, 125,2), cinco grupos metilas (δ 22,7, 25,0, 25,0, 25,0, 25,0) e doze carbonos quaternários (50,2, 110,9, 191,1, 115,8, 118,8, 122,5, 136,4, 136,4, 136,4, 139,3, 153,9, 161,5), sendo que um foi descrito ao carbonil (191,1).

Os dados de RMN ^1H e RMN ^{13}C (**Espectro 56, pg. 256**) listados na tabela abaixo quando comparados com os da literatura (Delle Monache *et al*, 1980) confirmaram a caracterização de 3,11,13-4,4-triisoprenil-9-metil-antrone (vismina) (**Figura 29**), substância que pertence ao grupo das ferrugininas da classe de antranóides prenilados.

Os dados de RMN ^{13}C foram atribuídos de acordo com os presentes na literatura para vismina (Nicoletti *et al*, 1982) (**Tabela 14**).

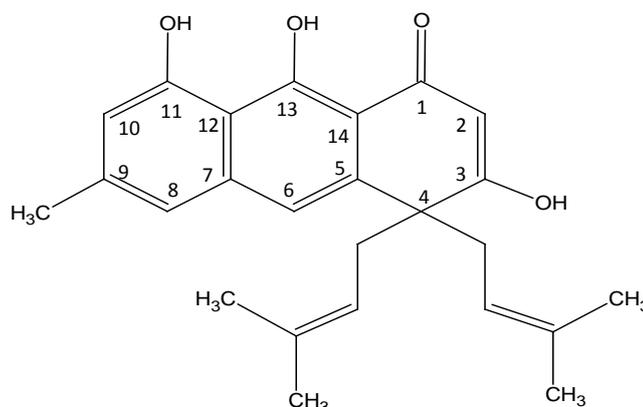


FIGURA 29. Estrutura da substância ECFVc 4_5 - Vismina

TABELA 14. Comparação dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C da amostra ECFVc 4_5 com os da literatura.

RMN ^1H			RMN ^{13}C	
H	Dados do espectro em CDCl_3 (δ)	Dados da literatura em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}^*$ e Acetona- d_6 (δ)	C	Dados do espectro em CDCl_3 (δ)
1	-	-	1	191,1
2	5,35, s	5,80, s	2	131,7
3	9,72, s	9,80, s	3	161,5
4	-	-	4	50,2
5	-	-	5	136,4
6	7,01, s	7,0, s	6	117,8
7	-	-	7	118,8
8	6,71, s	6,60, s	8	114,5
9	-	-	9	122,5
10	7,19, s	7,35, s	10	118,2
11	15,64, s	16,10, s	11	139,3
12	-	-	12	110,9
13	11,93	-	13	153,9
14	-	-	14	115,8
15	3,2-2,6, m	3,3-2,7, m	15	40,6
15'	3,2-2,6, m	3,3-2,7, m	15`	40,6
16	5,10, t	4,67, t	16	125,2
16`	5,10, t	4,67, t	16	125,2
17	-	-	17	136,4

17'	-	-	17	136,4
18	1,59, s	1,43, s	18	25,0
18`	1,59, s	1,43, s	18`	25,0
19	1,59, s	1,43, s	19	25,0
19`	1,59, s	1,43, s	19	25,0
20	2,44, s	2,31, s	20	22,7

5.4. Avaliação dos extratos polares por LC-MS

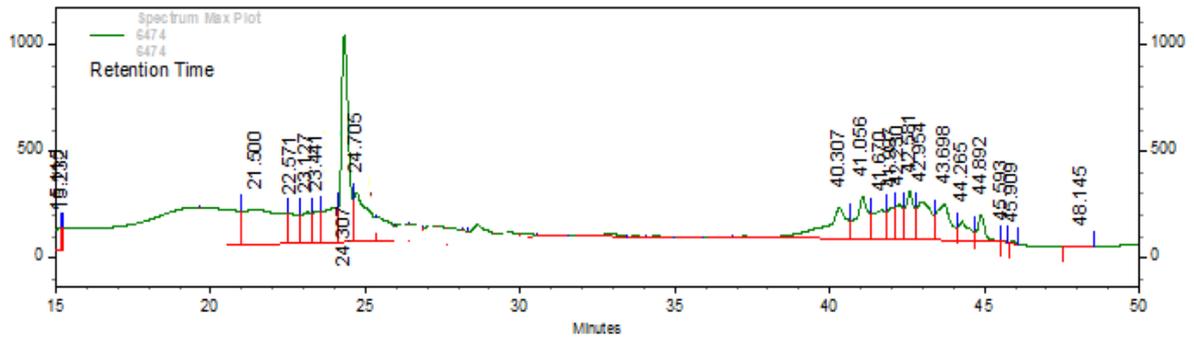
Vários métodos cromatográficos, como cromatografia camada fina bidimensional e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), podem ser utilizados para determinação da composição das saponinas de uma matriz vegetal, porém é necessária a utilização de métodos de detecção diferentes do UV-Vis (ultravioleta visível), já que a ausência de cromóforos em saponinas, só permite sua detecção entre 200 e 210 nm, o que limita os solventes disponíveis para a fase móvel (Oleszek *et al*, 2002).

Assim o uso de técnicas hífenadas, associando CLAE com espectrometria de massas, ou até espectrômetros de massas em sequência (MS/MS), começou a ser mais frequente para análise de saponinas (Wu *et al*, 2010).

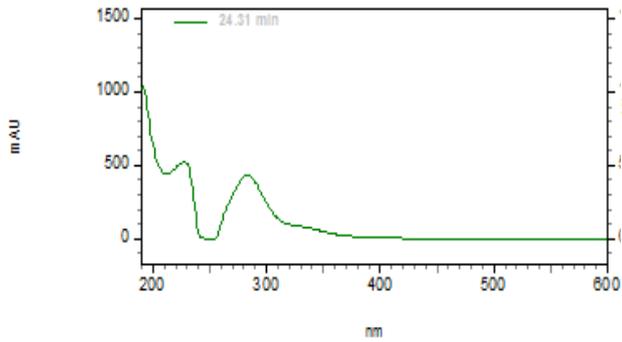
A espectrometria de massas é baseada na ionização de um composto, que em seguida é separado com base da razão massa/carga (m/z), e o número de íons que correspondem a cada unidade de m/z é registrado na forma de um espectro. Na espectrometria de massas em sequência MS/MS, um íon é selecionado na fragmentação inicial, e se fragmenta novamente, gerando íons filhos, obtendo informações estruturais da molécula, permitindo assim o uso de amostras complexas sem uso prévio de técnicas cromatográficas (Silverstein *et al*, 2006). Partindo deste princípio, nos extratos polares (previamente tratados) foram obtidas informações sobre a estrutura das saponinas presentes nas amostras.

Na **figura 30** encontra-se o cromatograma obtido por CLAE para o EECRAa e espectros de UV. Observa-se um pico principal no tempo de retenção 24,30 min, com espectro de UV característico de flavonoide, contendo dois máximos de absorção devidos ao núcleo da benzopirona: um entre 240-285 nm (banda II) e outro entre 300-400 nm (banda I). Em geral a banda II é atribuída à absorção do anel A e a banda I devido ao anel B (Zuanazzi, 2001). Entre 40,30 e 48,13 min foram observadas absorções no UV em comprimentos de ondas baixos, indicando se tratar de substâncias sem grupos cromóforos. Essas substâncias não foram

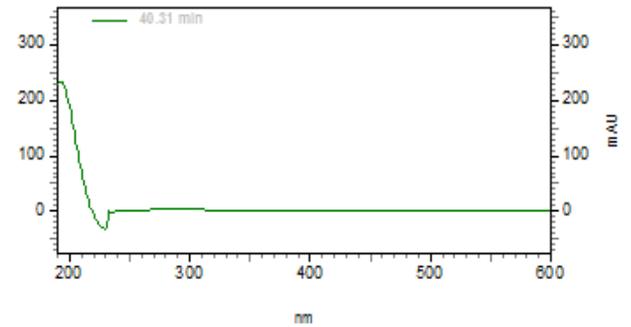
detectadas em λ 254 nm confirmando a possibilidade de se tratar de triterpenos ou saponinas (Oleszek, 2002).



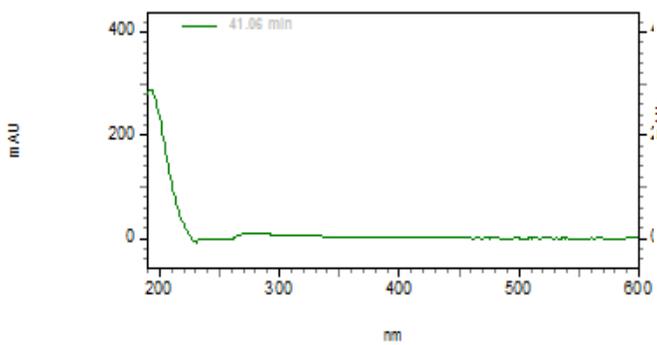
Spectrum at time 24.31 min.



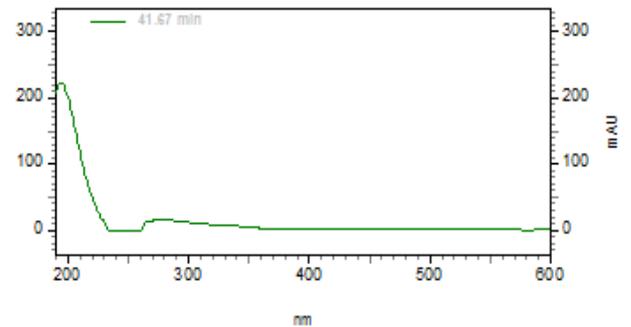
Spectrum at time 40.31 min.



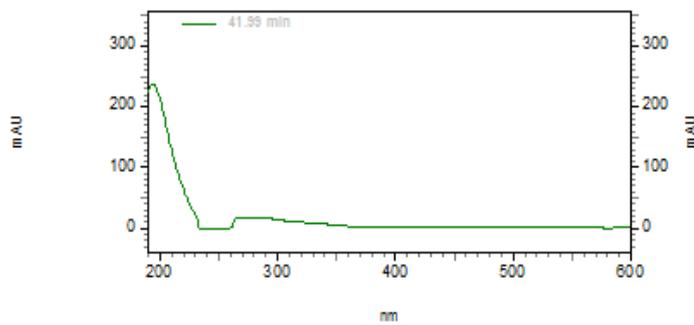
Spectrum at time 41.06 min.



Spectrum at time 41.67 min.



Spectrum at time 41.99 min.



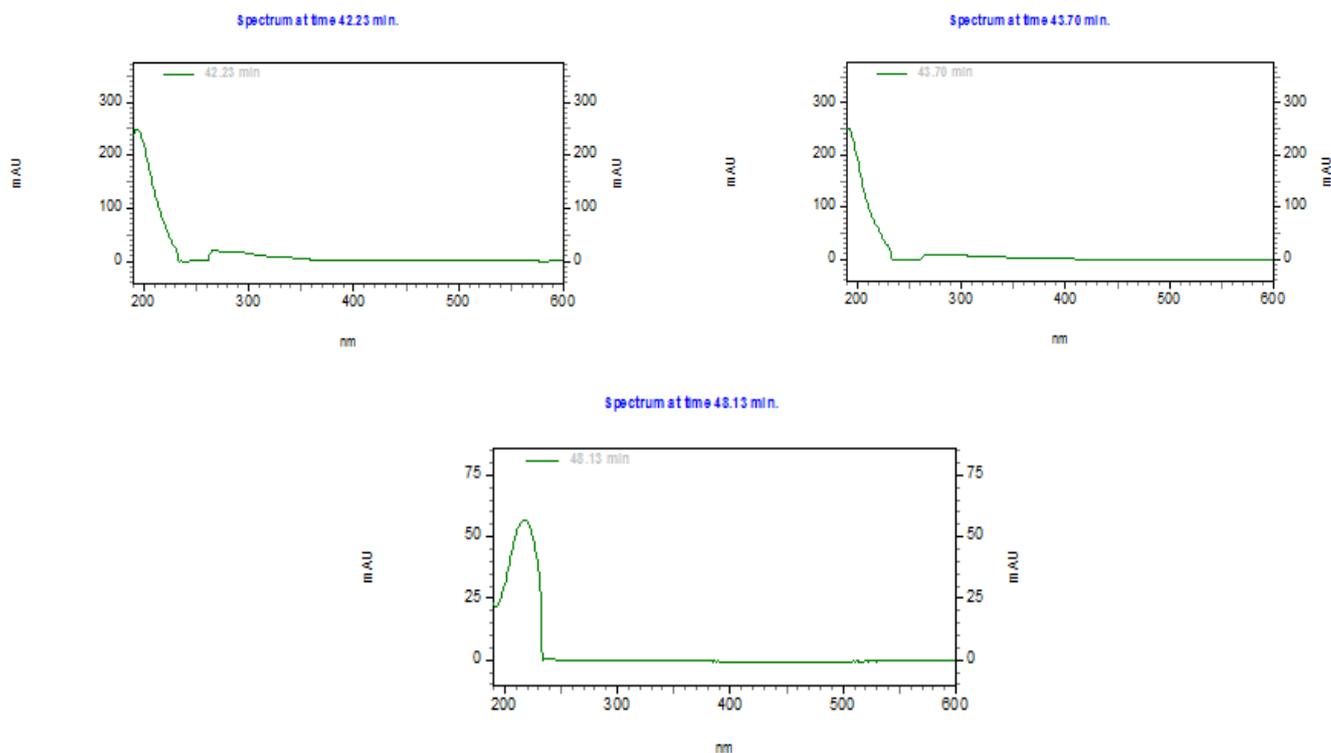
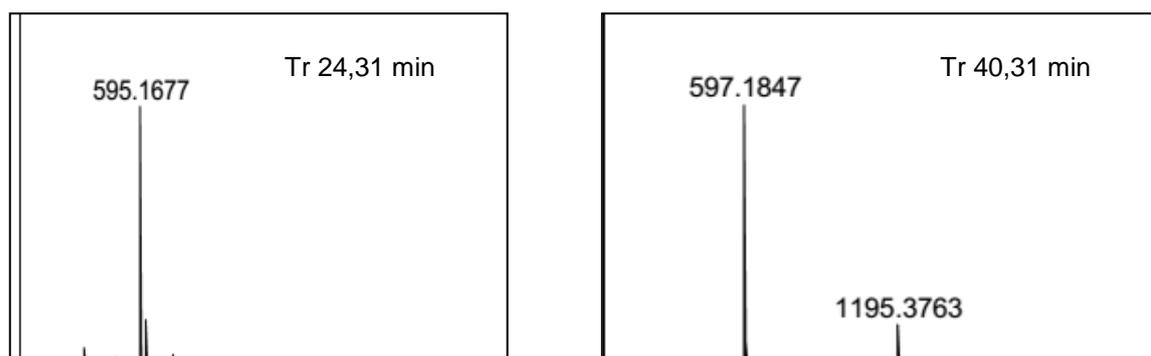


FIGURA 30. Cromatogramas e espectros no UV do EECRAa

A comparação dos tempos de retenção com os dados do ESI (-) MS, permitiu aferir a classe saponinas como a classe majoritária no extrato EECRAa, uma vez que as saponinas são substâncias de elevada massa molecular (600-2000 u.m.a) (**Figura 31**).



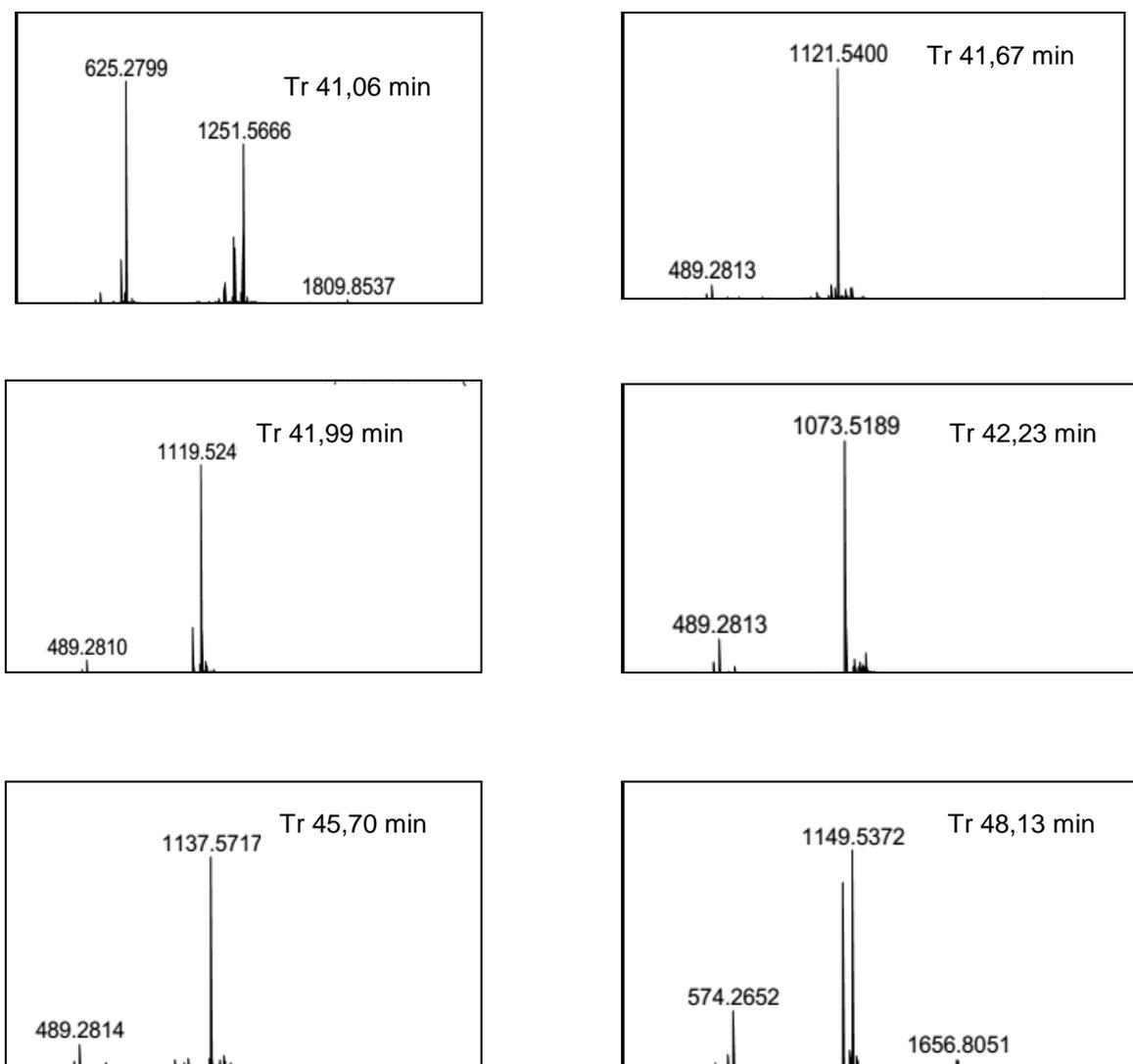


FIGURA 31. Espectro de massas do EECRAa (extrato etanólico das cascas das raízes de *A. amazonicus*).

As amostras codificadas como CMR, CMQ, EECCAa, EECERAa e EECECAa, apresentaram perfil químico semelhante ao EECRAa, ou seja, com poucas substâncias detectadas no comprimento de onda a 254 nm e a maioria detectadas nos comprimentos de onda entre 200 e 210 nm (**Figura 32**).

Os espectros de massas apresentaram valores entre 600 e 1800 u.

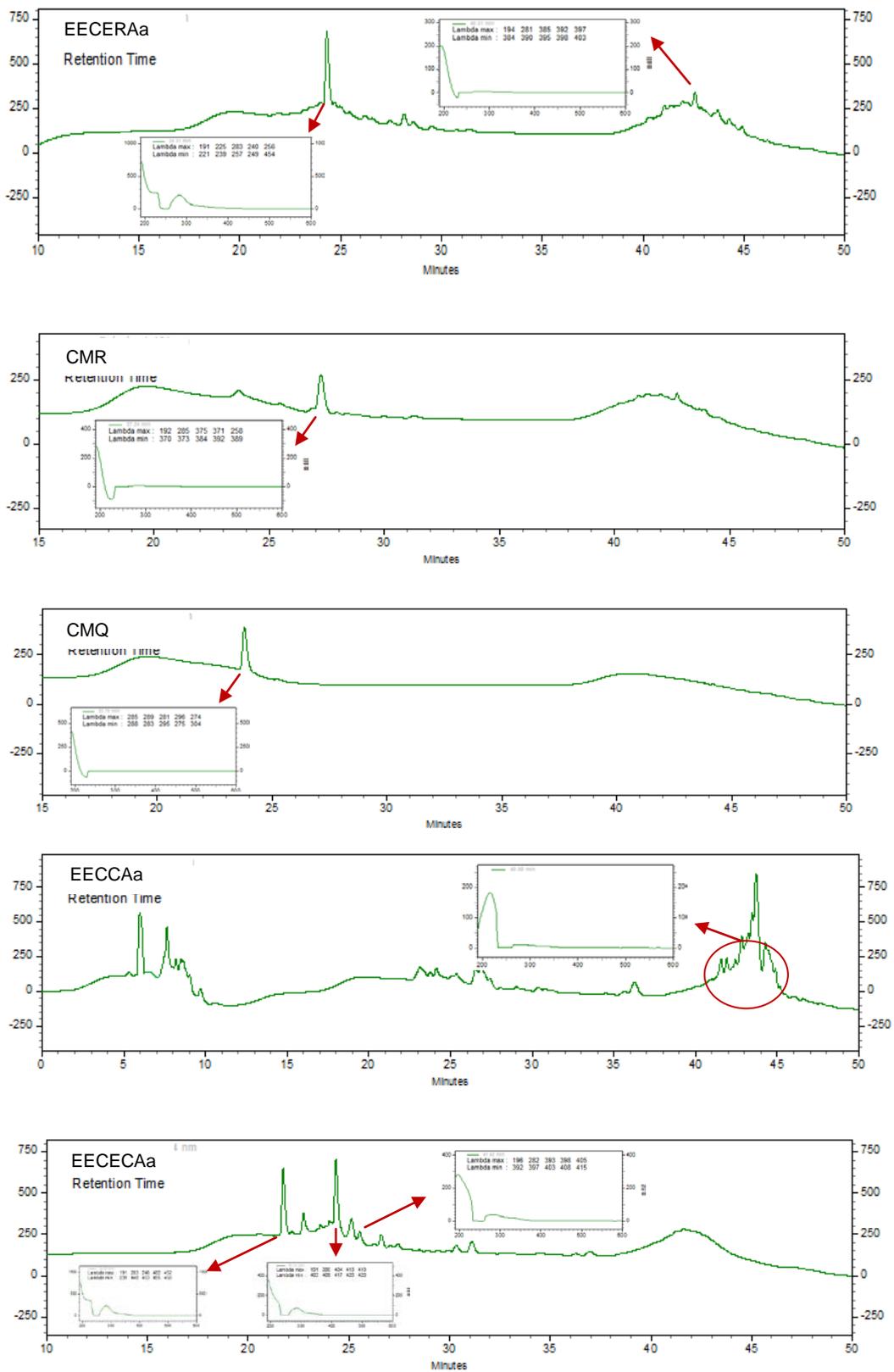


FIGURA 32. Cromatogramas e espectros dos extratos etanólicos e aquosos de *A. amazonicus*: EECERAA (extrato etanólico do cerne das raízes), CMR (chá método rodrigues), CMQ (chá método quilombola), EECCAa (extrato etanólico das cascas do caule) e EECECAa (extrato etanólico do cerne do caule).

O extrato CMB (chá método brandão) apresentou um excelente perfil cromatográfico (**Figura 33**), permitindo combinar o tempo de retenção das substâncias com os dados de absorção no UV. Através destes espectros foi possível identificar a presença de saponinas e de compostos fenólicos na amostra.

A técnica forneceu, também, informações sobre o íon molecular e fragmentos característicos que possibilitaram identificar as estruturas de saponinas.

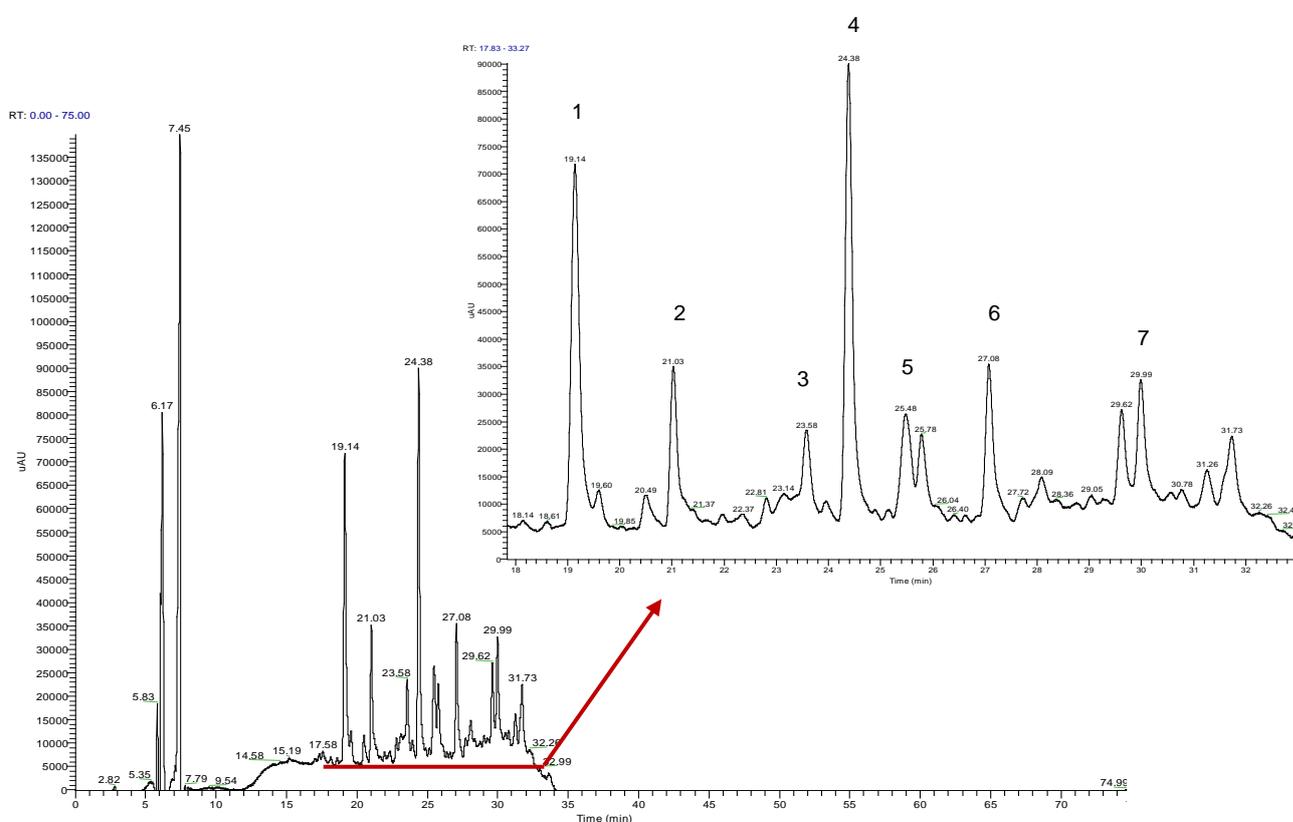


FIGURA 33. Cromatograma de HPLC do extrato CMB.

Os espectros das substâncias nos Trs 5,83, 6,17 e 7,45 apresentaram bandas de absorção condizentes com as de saponinas. A mesma classe foi identificada nos Trs 21,03, 23,58, 25,48, 28,09, 29,62, 29,99, 31,26 e 31,73 (**Figura 34**). Os outros picos, de maior amplitude, apresentaram absorções características de substâncias fenólicas.

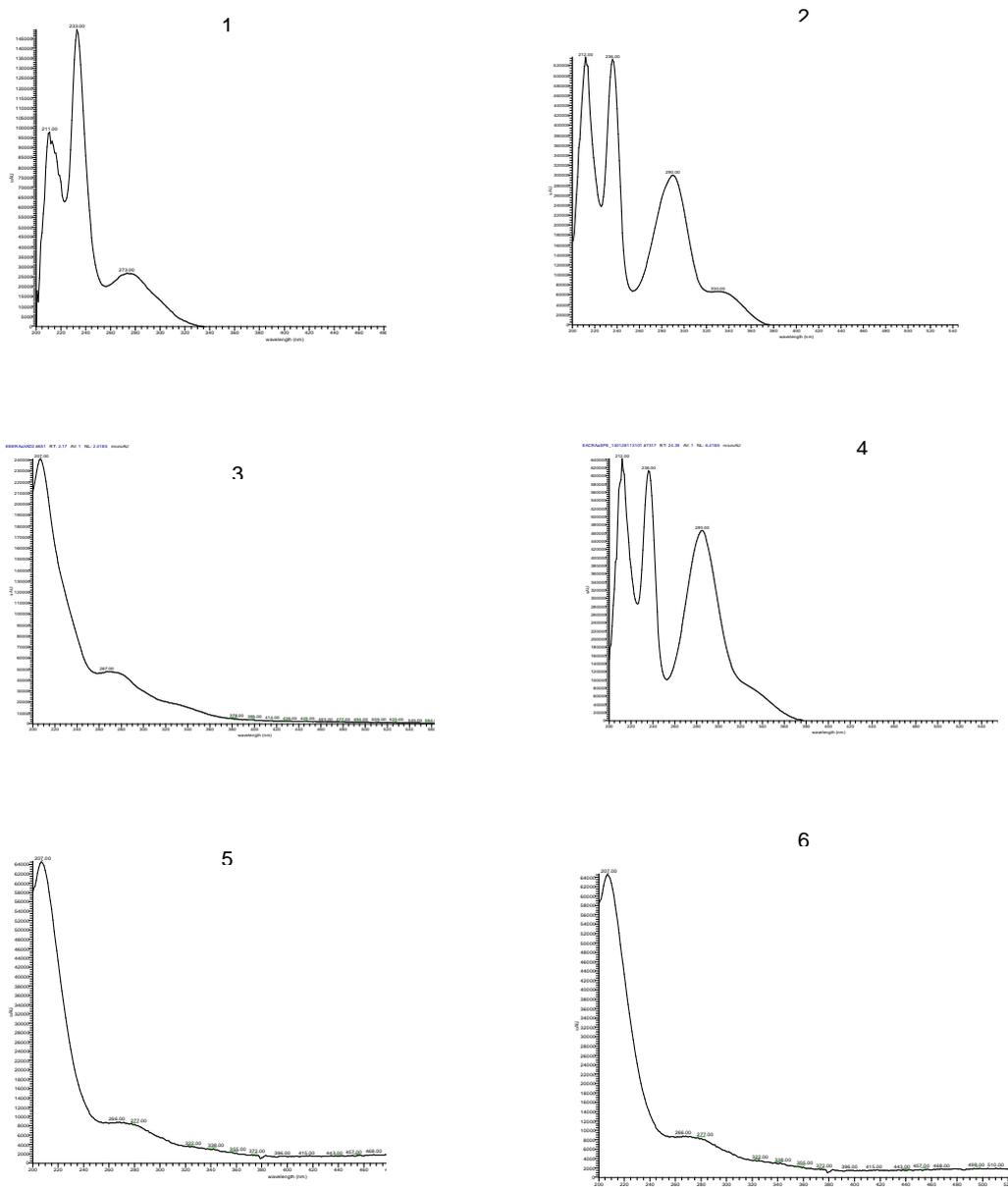


Figura 34. Espectros de UV, referente aos picos de 1 a 6, de CMB.

A substância **3** com T_r de 23,58 minutos, exibiu o íon molecular desprotonado [M-H] em m/z 851 ($C_{45}H_{72}O_{15}$). A fragmentação de segunda ordem (EM/EM) de m/z 851 gerou os íons em m/z 641, referente à perda de uma ramnose [M-H-146], juntamente com $-CH_3CO$ [M-H-43]⁻, uma molécula de água e 4H, constituindo uma perda total de

210 daltons. Eliminação posterior de glicose, $[M-H-210 -162]^-$ conduziu ao pico m/z 479 $[M-H]^-$ (**Figura 35**).

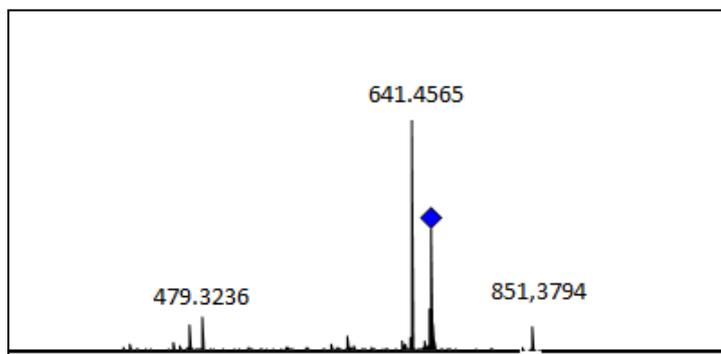


Figura 35. Espectro de MS/MS de CMB.

Os padrões de fragmentação foram atribuídos a saponina 3-O- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-ramnopiranosil-15 α -acetil-ampelozigenina (**Figura 36**), já isolada da espécie *A. amazonicus* (Brandão *et al*, 1993).

Nos demais espectros de massa foram possíveis identificar valores de m/z 943, 957, 1001, 1005, 1017, 1019, 1029, 1043, 1059, 1143 e 1161. No entanto, a investigação das estruturas por MS/MS, em comparação com dados da literatura, não foram suficientes para afirmar as estruturas das substâncias, o isolamento e a identificação por RMN de 1H e ^{13}C se fazem necessárias.

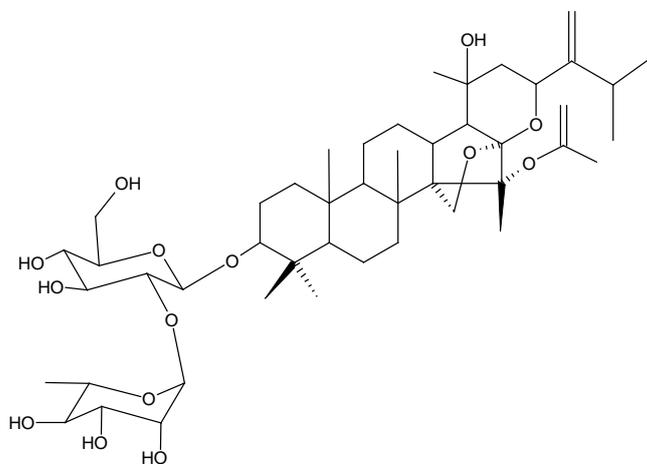


Figura 36. 3-O- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-ramnopiranosil-15 α -acetil-ampelozigenina.

6. FARMACOLOGIA

6.1. A Malária

Atualmente, a malária é uma das infecções mais devastadoras do mundo, isso porque cerca de 3,3 bilhões de pessoas - metade da população mundial – vivem em áreas com risco de transmissão. De acordo com dados recentes da OMS, em 2010 ocorreram cerca de 216 milhões de casos com aproximadamente 655.000 mortes (WHO, 2012). Anualmente, 243 milhões de novos casos são informados e aproximadamente 1 milhão de mortes atingindo, principalmente, crianças com idade menor que 5 anos são registrados (WHO, 2011).

Malária é causada por parasitas do gênero *Plasmodium* cujo ciclo de vida envolve hospedeiros vertebrados. Quatro espécies de *Plasmodium* causam malária em humanos: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malarie* e *P. ovale*. Destes, *P. falciparum* é o responsável pela maioria das mortes (WHO, 2012). Parasitas causadores da malária são transmitidas por mosquitos fêmeas pertencentes ao gênero *Anopheles*. O ciclo do parasita é dividido dentro de três diferentes fases – uma no mosquito (o ciclo esporogônico) e dois no hospedeiro humano: o ciclo eritrocitário (em células vermelhas humanas) e o ciclo exoeritrocitário (fora das células vermelhas) (**Figura 37**).

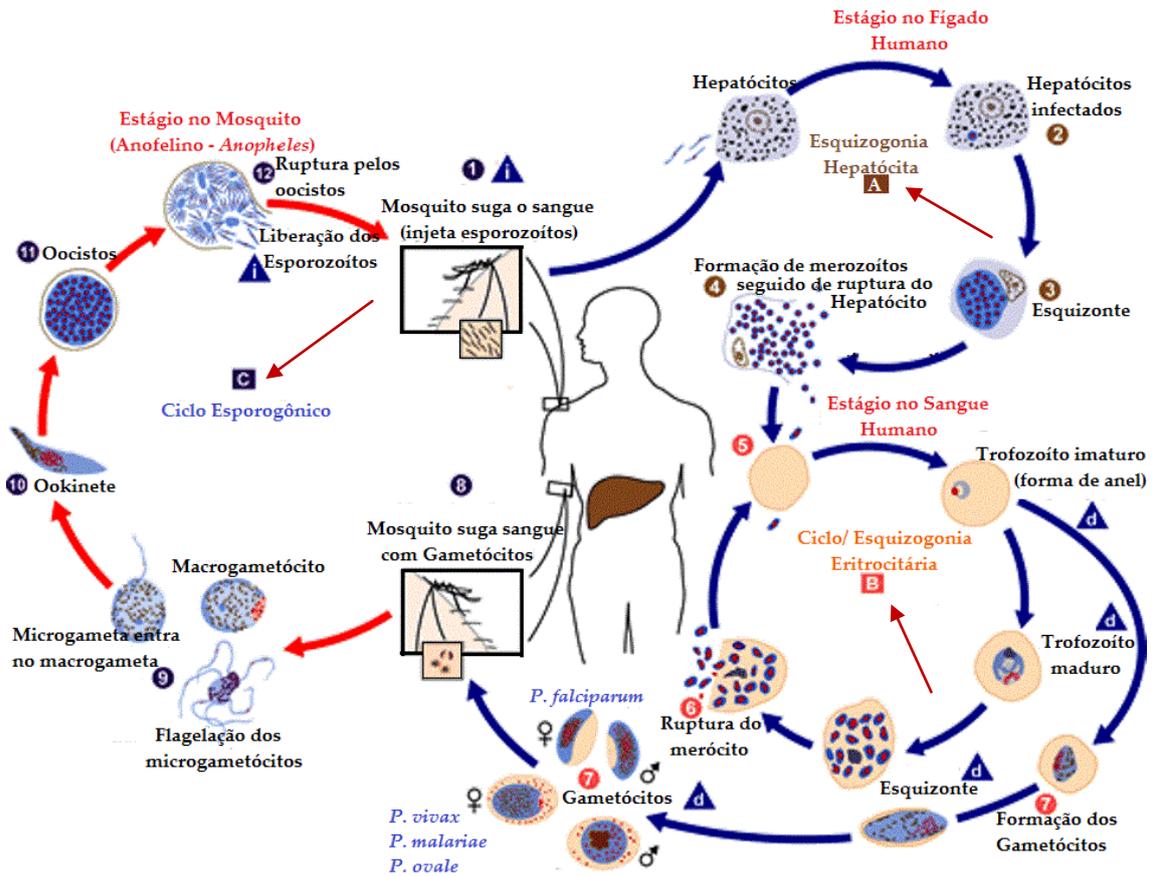
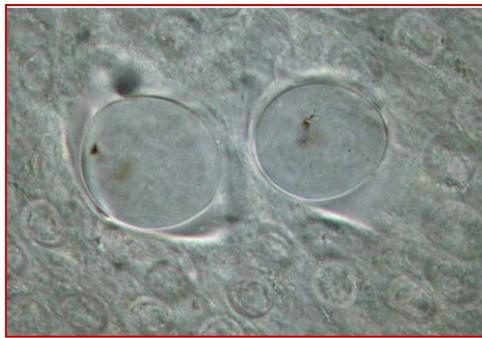


FIGURA 37 – Ciclo de vida das espécies de *Plasmodium*.

Fonte: França *et al*, 2008.

Os gametócitos macho e fêmea do parasita são ingeridos pelo mosquito quando ele se alimenta do sangue do homem, e eles formarão gametas machos e fêmeas dentro do estômago do mosquito. Ambos os gametas se fundem, gerando os zigotos que podem se mover e eles são chamados de oocinetos. O oocinete penetra a parede do estômago do mosquito e torna-se um oocisto redondo (Figura 38 a). Dentro do oocisto, o núcleo divide-se repetidamente com a formação de um largo número de esporozoítos (Figura 38 b). Quando os esporozoítos são totalmente formados, os oocistos rompem-se, liberando os esporozoítos dentro da cavidade do corpo do mosquito (hemocele). Os esporozoítos migram para as glândulas salivares de onde eles podem ser inoculados para dentro do hospedeiro humano. O tempo necessário para o desenvolvimento dos esporozoítos, variam com a temperatura, humidade e em menor grau com as espécies do parasita da malária, mas geralmente é de cerca de 8-15 dias.

O ciclo humano começa com a inoculação dos esporozoítos (o estágio infectivo do *Plasmodium*) que infecta células hepáticas. Ao longo de um período de 7-12 dias, os parasitas multiplicam-se até que as células hepática rompem-se (ciclo exoeritrocitário). Então os parasitas (merozoítos) **(Figura 38 c)** são liberados dentro da corrente sanguínea e invadem as células vermelhas onde eles se multiplicam novamente. As células vermelhas infectadas são destruídas, os parasitas invadem novas células saudas e o ciclo é repetido (Knell, 1991).



A



B



C

FIGURA 38. **A** – Oocisto. **B** – Oocisto com largo número de esporozoítos e **C** – Esquizonte contendo numerosos merozoítos.

Fonte: Culleton, 2005.

Durante o estágio eritrocitário o parasita degrada 70% da hemoglobina dentro das células vermelhas. A degradação da hemoglobina ocorre dentro de um compartimento ácido do parasita conhecido como vacúolo

alimentar, desta forma é liberado uma porção protéica (globina) e a heme (complexo ferro-porfirina). Cerca de 30% ou mais da globina é digerida pelo parasita e usada como fonte de aminoácido para síntese de suas próprias proteínas (Costa *et al*, 2007).

Heme livre (Fe^{3+}) é uma molécula lipofílica, ela pode facilmente intercalar na membrana e causar mudanças na permeabilidade da membrana, organização lipídica e induzir a peroxidação lipídica da membrana do parasita (Ryter *et al*, 2000). Desta forma este resíduo gera espécies reativas de oxigênio (ROS) e pode induzir ao estresse oxidativo, levando o parasita a morte (Kumar *et al*, 2007). No entanto, o parasita possui eficientes mecanismos de desintoxicação com o auxílio da enzima heme polimerase (Costa *et al*, 2007), formando um composto inerte, insolúvel, cristalino e não tóxico ao parasita, o pigmento malárico hemozoína (Silva *et al*, 2005) (**Figura 39**).

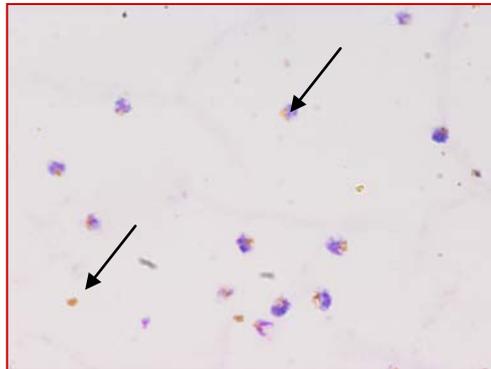


FIGURA 39 - Hemozoína
Fonte: Carmo, 2009.

Os sintomas da malária aparecem cerca de 9 a 14 dias após a picada do mosquito, embora este tempo varie com as diferentes espécies de *Plasmodium*. Tipicamente, malária produz febre, dor de cabeça, vômito e sintomas semelhante à gripe. Malária pode matar por infecção e destruição das células vermelhas (anemia) e pela obstrução dos capilares que

transportam o sangue para o cérebro ou outros órgãos vitais (França *et al*, 2008).

6.2. Vetores

A principal via de transmissão ao homem é através da picada das fêmeas dos insetos dípteros do gênero *Anopheles*, pertencentes à família Culicidae, subordem Nematocera, ordem Díptera (Foratinni *et al*, 2002), compreendendo cerca de 480 espécies. No entanto somente em torno de 50 são responsáveis na transmissão da malária ao homem (Barbosa *et al*, 2011). Segundo Garnham e colaboradores (1998) no Brasil, as cinco espécies de anofelinos mais importantes pertencem a dois subgêneros, a saber: *Nyssorhynchus*, cujas espécies representativas no País são: *A.darling*; *A. aquasalis* e *A. albitarsis domesticus*. E ao subgênero *kerteszia*, no qual se destacam as espécies *A. cruzi* e *A. bellator*

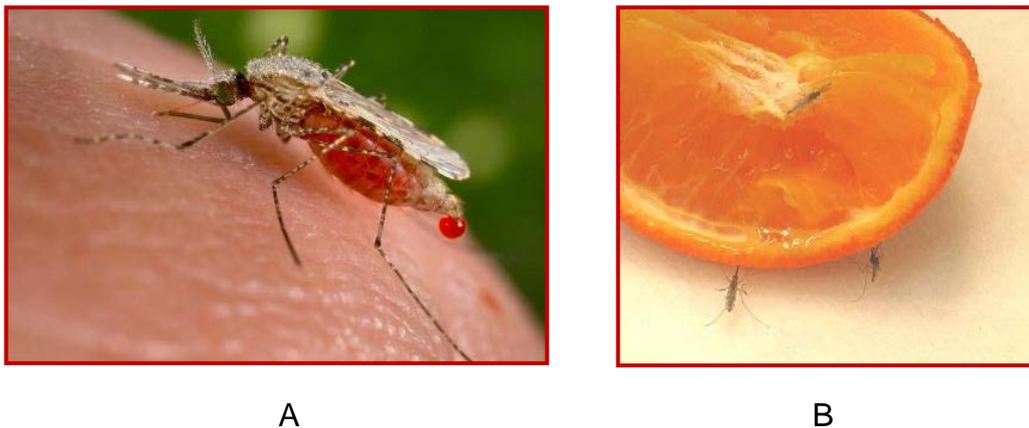
O *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi* (**Figura 40**) é o principal transmissor na região amazônica, apresentando maior grau de antropofilia e eficácia de transmissão. Na América Latina é capaz de transmitir *P. falciparum*, *P.vivax* e *P. malarie* (Silva-Nunes *et al*, 2012). Distribui-se nas regiões litorâneas, principalmente nos criadouros de água doce localizados nos terreno altos, distantes da influência das marés, bem como nas regiões interioranas. Desde as zonas orientais do México até o Norte da Argentina (Silva-Nunes *et al*, 2012) e recentemente foi detectado, pela primeira vez, no oeste do Panamá (Loaiza *et al*, 2009).



FIGURA 40 – *Anopheles darlingi*

Fonte: <http://bellacapilla.blogspot.com.br/2012/09/malaria.html>.

No Brasil, antes das campanhas de erradicação, ocorria em todo o território, com exceção do Rio Grande do Norte, Paraíba e Rio Grande do Sul (Tadei & Dutary – Thatcher, 2000). As demais espécies são consideradas vetores secundários, tais como *Anopheles (N) aquasalis* (importante no litoral do País), *Anopheles (N) albitarsis*, *Anopheles (K) cruzii* (predominante no sul do Brasil) e *Anopheles (K) bellator* (Forattini, 2002). Outras espécies de *Anopheles* são conhecidas, mas seu grau de incidência e distribuição é maior em outros países, dentre elas podemos citar: *Anopheles stephensi* (**Figura 41 - a**), vetor primário na Índia e outras cidades do oeste Asiático (Kovendan *et al*, 2014); *A. gambiae* (**Figura 41 - b**) é o maior e mais eficiente vetor da Malária na África, onde três espécies são encontradas no oeste da África e no Sul de Benim: *A. gambiae* (Downes, 1968), *A. arabiensis* e *A. melas* (Assogba *et al*, 2014).



A **B**
FIGURA 41. A – *A. stephensi*. B – *A. Gambiae*.
Fonte: Culleton, 2005.

6.3. Epidemiologia

6.3.1 Malária no mundo

Em 2008 foram registrados 243 milhões de casos da doença no mundo, a maioria no Continente Africano (85%), no Sudeste Asiático (10%), região oriental do Mediterrâneo (4%) e Continente Americano (WHO, 2009). Em

2009, dos 225 milhões de casos registrados, a população foi acometida por 781 mortes (WHO, 2010). Já em 2010 foram estimados 216 milhões de casos de malária e 655.000 mortes em todo o mundo, com predomínio nas crianças abaixo de cinco anos e mulheres grávidas (WHO, 2011) (**Figura 42**). Em 2012 foram estimados 207 milhões de casos de malária, dos quais 627.000 mortes foram registradas; atualmente, ainda existe uma estimativa de 3,4 bilhões de pessoas que continuam vivendo em áreas de risco, principalmente no Sudeste da Ásia e na África (onde ocorrem 80% dos casos de Malária) (WHO, 2013).

Conforme pôde ser observado, houve uma diminuição no número de casos e mortes por malária e isto é devido aos esforços globais para controlar e eliminar esta doença. Desde 2000, cerca de 3,3 milhões de vidas foram salvas, as mortes foram reduzidas em 45%, globalmente, e sendo 49% só na África (WHO, 2013). No entanto ainda é preciso seguir com a luta para erradicar a doença, já que milhões de pessoas vivem em área de risco, como mencionado anteriormente.

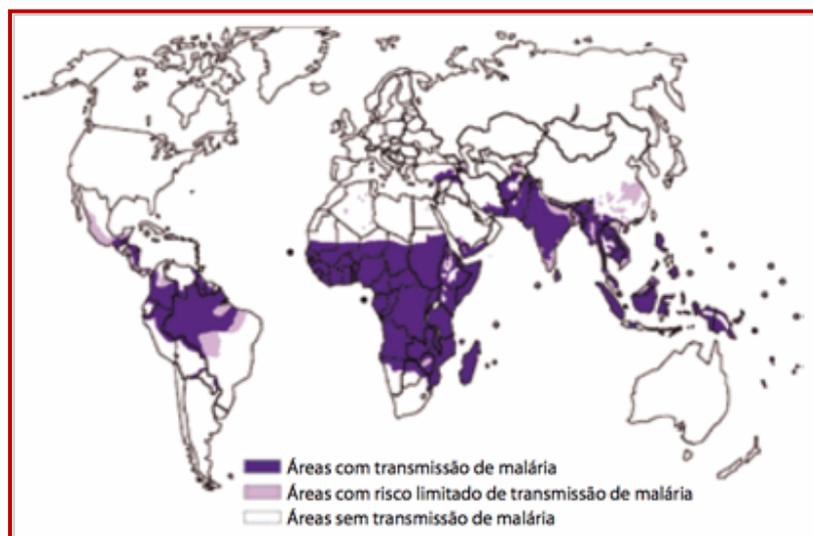


FIGURA 42. Adaptado de WHO (2011).

6.3.2. Malária no Brasil

Em um importante trabalho de revisão, realizado por Cruz e colaboradores (2013), é mencionado que: dos 13 países pertencentes à América do Sul, a saber – Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Colômbia, Equador, Guiana, Paraguai, Peru, Suriname, Uruguai, Venezuela e Guiana Francesa, os maiores casos da doença são encontrados principalmente no Brasil e Colômbia. Os países Uruguai e Chile são livres de Malária e Argentina e Paraguai possuem um eficiente sistema de controle sobre a doença. Um total de 2 países são considerados áreas de alto risco, 6 países de médio risco e 3 países de baixo risco de transmissão (**Figura 43**). Assim, países como a Colômbia, Suriname, Guiana Francesa e Guiana alcançam números de 15%, 15%, 85% e 35% da população que vivem em áreas de risco, respectivamente.

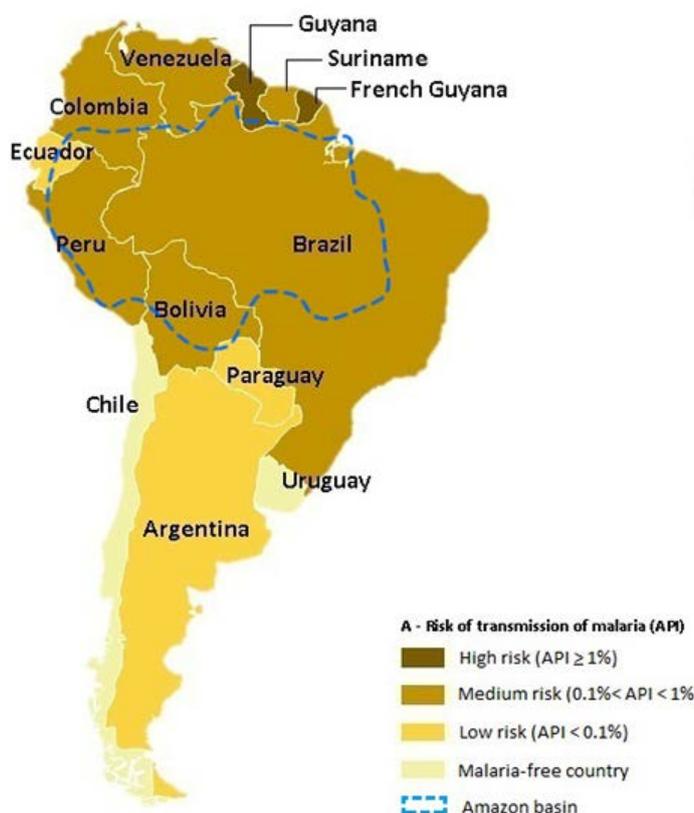


FIGURA 43. Áreas de risco de transmissão da Malária na América do Sul. (Cruz *et al*, 2013)

O Brasil é responsável por 40% do total de casos de malária registrados na América do Sul, e 20% da população está em regiões com risco de transmissão da doença (WHO, 2011). No país, *P. falciparum* é responsável por aproximadamente 10% dos casos relatados, sendo a grande maioria (90%) dos casos devido à infecção por *P. vivax*. Existem relatos, porém com menor frequência, de infecções por *P. malariae* e *P. ovale*. Os principais insetos vetores no país são *A. darling*, *A. albitarsis* e *A. aquasalis*. A transmissão ocorre predominantemente na Amazônia legal (Acre, Amapá, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Tocantins e parte do Maranhão) que compreende 61% do território brasileiro, onde ocorre 99% das infecções (WHO, 2011).

A transmissão da malária no Brasil é concentrada no estado do Amazonas (<http://www.paho.org/hq/index.php>), cerca de 600.000 casos de malária ocorrem anualmente nesta região; quase 80% são causados por *P. vivax*, e os demais por *P. falciparum* (Ribeiro *et al*, 2008). No trabalho realizado por Cabral e colaboradores (2010) é encontrado dados de vulnerabilidade à malária na sede de Santa Isabel do Rio Negro, um pequeno município na Amazônia brasileira; o artigo relata o aumento da incidência de malária na terra indígena Yanomâmi nos anos de 2003 a 2007, ocasionado pelo ambiente local que é altamente propício à proliferação e circulação de vetores (*A. darling*). Este fator é acrescido pela dinâmica de povoamento e pela presença de grupos populacionais de alta mobilidade em frequente contato com a população ribeirinha e indígena.

6.4. Tratamento da Malária

Há um limitado número de drogas que podem ser usados para tratar ou prevenir a malária. Os mais usados são quinina e seu derivados, combinações antifolatos e derivados da artemisinina.

6.4.1. Quinina e compostos relatados

Quinina (**Figura 44**), uma quinolina de *Cinchona sp*, o qual foi isolado das cascas de *Cinchona calisaya* (Wells *et al*, 2009), foi o primeiro antimalárico apresentado e sua utilização foi registrada antes do século XVII. Sua biossíntese estabelecida foi em 1960 e mostrado que se origina a partir do triptofano e geraniol (Burrows *et al*, 2011).

É um composto destinado para a malária cerebral (Meshnick, 2002) e seu mecanismo de ação ainda é incerto. A quinina pode interagir com os fosfolípides da membrana do vacúolo digestivo, resultando na inibição de algumas vias de transporte de íons, como a de cálcio, comprometendo a degradação da hemoglobina (heme) levando à morte do parasita (Fitch, 2000).

A partir deste composto outros antimaláricos foram sintetizados, a primaquina (8-aminoquinolina) e cloroquina (4 - aminoquinolina). Estas drogas causam a morte do parasita pela inibição na formação da hemozoína, o mesmo mecanismo de ação é proposto para a quinina (Burrows *et al*, 2011).

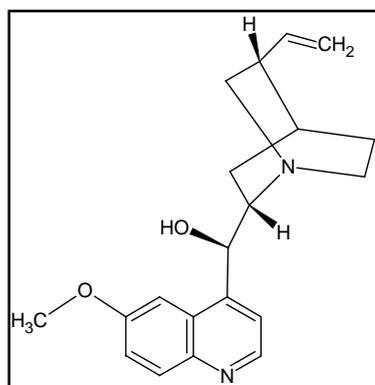


Figura 44. Estrutura molecular da quinina.

A Cloroquina (**CQ**) foi utilizada como antimalárico por mais de 30 anos e teve grande importância pela sua ação esquizotônica, além da eficácia, baixo custo e pouca toxicidade aos pacientes no tratamento profilático da doença. Contudo em razão do seu elevado uso, atualmente encontramos resistência das cepas do *P. falciparum* (França *et al*, 2008). Por razões que não são claras, resistência à cloroquina surgiu mais rapidamente para *P. falciparum* do que para *P. vivax* (Weis *et al*, 2009). Os relatos iniciais de

resistência à cloroquina foram no Brasil e Sudeste Asiático, hoje esta resistência está presente na grande maioria das áreas endêmicas de malária, tornando o fármaco desaconselhado para o tratamento de malária por *P. falciparum*. A CQ foi substituída, em algumas áreas pela combinação de dois antifolatos: sulfadoxina e pirimetamina (Fandasir®) (Weis *et al*, 2009). Porém surgiram os primeiros relatos de falha terapêutica na Ásia, América do Sul e África (Wongsrichanalai *et al.*, 2002).

O mecanismo de ação da cloroquina ainda não é totalmente esclarecido, sendo fonte de profundas investigações para os pesquisadores. Tem sido sugerido que as quinolinas atuam dentro do vacúolo digestivo promovendo uma alteração do gradiente de pH entre o meio interno e externo deste. A droga também inibe a cristalização da hemozoína dentro do vacúolo. Pensa-se que a cloroquina (**Figura 45**) atua por inibição funcional de uma ou mais das enzimas envolvidas neste processo, impedindo assim a desintoxicação da ferriporfirina IX (FP) e originando a morte dos parasitas (Kumar *et al*, 2007).

Burrows e colaboradores (2011), explicam que a quinina e a cloroquina atravessam a membrana do eritrócito, porém no vacúolo digestivo sofrem protonação em virtude do meio ácido; as formas protonadas ficam presas, sendo incapazes de atravessar a membrana da célula e portanto de serem expulsos dela. Tal fato provoca o acúmulo destes fármacos nos eritrócitos e levando os parasitas à morte.

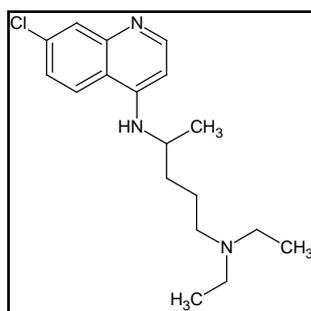


Figura 45. Estrutura molecular da cloroquina.

Já foi demonstrado que parasitas resistentes à cloroquina acumulam níveis de fármaco bastante inferiores aos acumulados por parasitas sensíveis, de onde se pode concluir que a resistência a este composto resulta da exclusão do fármaco do local de ação, em oposição a uma mudança no seu alvo terapêutico (Krogstad *et al*, 1987).

A primaquina é uma 8-aminoquinoleína com ação contra os gametócitos dos eritrócitos e hipnozoítos hepáticos das formas recidivantes do *P. vivax* e *P. ovale*. É rapidamente absorvida pela via oral, alcançando concentrações plasmáticas de pico em uma a três horas, e vida média de 5 horas, sendo rapidamente metabolizada no fígado com intensa reciclagem hepática. Os efeitos adversos mais graves estão relacionados aos elementos formados no sangue e na medula óssea (Ferreira *et al*, 2011)

A mefloquina (**Figura 46**), outro antimalárico de grande importância no tratamento da doença, é um aril-aminoálcool derivado da quinina. Foi produzida durante os anos 70 pelo exército Norte Americano, com o objetivo principal de combater a resistência aos fármacos existentes na época. É um potente esquizonticida sanguíneo, de ação prolongada bastante utilizado no tratamento de pacientes contra o *P. falciparum* (Cravo *et al.*, 2002). Os primeiros casos de *P. falciparum* resistente à mefloquina surgiram no princípio dos anos 80 e atualmente a resistência a este composto é um obstáculo sério a um eficiente controle da malária em diversas áreas geográficas (Cravo *et al.*, 2002). Curiosamente, verificou-se um fenômeno de resistência intrínseca em áreas onde a mefloquina nunca havia sido utilizada, sendo este um resultado provável da pressão seletiva por outros fármacos (quinina possivelmente). Em 2002, a combinação terapêutica mefloquina-artesunato (MQ-AS) foi adotado como tratamento de primeira linha contra *P. falciparum* no Peru (Gutman *et al*, 2009), devido as limitações dos tratamentos com cloroquina e sulfadoxina-pirimetamina. A mefloquina, como outras quinolinas, tem afinidade pelos fosfolípidos de membrana do vacúolo parasitófago e, alguns estudos têm sugerido que a droga iniba a endocitose da hemoglobina para dentro do vacúolo, causando a morte do parasita.

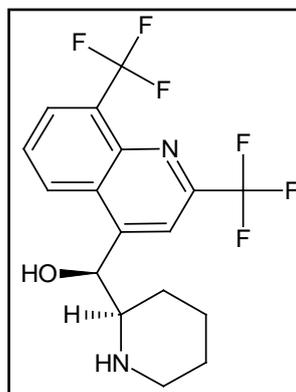


Figura 46. Estrutura molecular da mefloquina.

A lumefantrina (**Figura 47**) é um aril-aminoálcool quimicamente relacionado com a quinina e a mefloquina. Trata-se de é uma droga altamente lipofílica e sua biodisponibilidade aumenta, substancialmente, se a droga é administrada após uma refeição rica em gordura (Kolade et al, 2006). É um importante antimalárico para o tratamento da doença, já que a OMS, em decorrência da resistência às monoterapias convencionais, o inseriu em terapias multimedicamentosas contendo derivados da artemisinina (ACT – associações terapêuticas à base de artemisinina) (WHO, 2006). Desde 2001, 56 países já adotaram como recomendação da OMS o tratamento em associação com a artemisinina (ACTs).

O Brasil, como outros países endêmicos de malária, está adotando a associação entre lumefantrina/artemeter (Coartem®) como alternativa para o tratamento da doença (WHO, 2006), Coartem® é uma combinação em dose fixa de 20 mg de artemeter e 120 mg de lumefantrina, sendo efetivo no tratamento contra infecções de *P. falciparum* em áreas de alto risco e multirresistência a fármacos antimaláricos (Fanello et al, 2007). Lumefantrina exerce atividade esquizonticida eritrocitária em *P. falciparum*, *P. vivax* e outros *Plasmodium* spp. Artemeter inibe ou interrompe a esquizogonia eritrocitária e gametocitogonia, diminuindo as chances de transmissão da doença (Fanello et al, 2007). Estudos revelam (Piola et al, 2010) que combinações de lumefantrina/artemeter são seguras e eficientes contra infecções com *Plasmodium falciparum*, incluindo em mulheres grávidas.

6.4.2. Combinação de antifolato

Essas drogas são várias combinações de inibidores dihidrofolato-reductase e drogas de sulfã. Embora essas drogas tenham atividade antimalarial quando usadas sozinhas, as resistências podem desenvolver rapidamente. Quando usada em combinação, ela produz um efeito de sinergismo sobre o parasita e pode ser efetivo mesmo na presença de resistência aos componentes individuais.

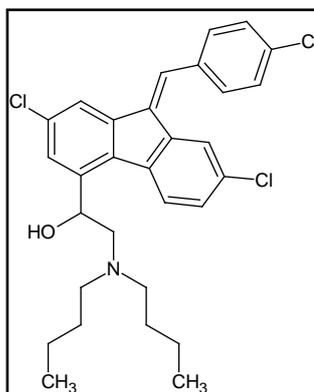


Figura 47. Estrutura molecular da lumefantrina.

A combinação típica de drogas usual é Sulfadoxina/Pirimetamina (SP), a qual é efetiva contra formas de *P. falciparum* e *P. vivax*. É indicada para o tratamento e profilaxia da malária, sendo que no tratamento é indicada sempre que a infecção ocorra em regiões com resistência à cloroquina (Hawkins *et al*, 2007). Esta combinação poderia ser usado para tratamento preventivo de *P.falciparum* em crianças e para mulheres grávidas. A meia-vida longa de SP produz um efeito profilático prolongado, o que permite uma administração em dose única, sob supervisão (Aponte *et al*, 2009).

No entanto, surgiram os primeiros casos publicados de resistência na fronteira da Tailândia- Camboja. Atualmente, já existem níveis elevados de resistência a este composto em grande parte do sudoeste Asiático, sul da China e Amazonas. A resistência à SP só atingiu o continente Africano

nos anos 80, e embora existam ainda áreas onde o parasita é sensível ao fármaco, a sua eficácia está comprometida (Wongsrichanalai *et al.*, 2002).

6.4.3. Composto de artemisinina

A única droga atualmente em vigor é a artemisinina (**Figura 48**) e seus derivados (artemether, arteéter e artesunato). Esses compostos são usados para o tratamento de malária cerebral e tem mostrado mais rápida resolução da febre quando comparado com a quinina. Apresenta baixa toxicidade e alta eficiência contra os parasitas resistentes a cloroquina (Costa *et al.*, 2007).

A vantagem da artemisinina é sua meia vida curta e, portanto, o desenvolvimento de resistências é pouco provável. Contudo, os primeiros sinais de resistência à artemisinina têm sido relatadas no oeste de Cambodja (Ivers *et al.*, 2010). Esta resistência foi confirmada na fronteira entre o Cambodja e Tailândia em 2008 e há suspeitas em partes de Mianmar e Vietnã (WHO, 2012). Com o objetivo de controlar e evitar estas resistências, o desenvolvimento de drogas como combinações é agora obrigatória e claramente benéfica: eficácia clínica é aumentada e a evolução da resistência é diminuída (Hastings, 2011).

O mecanismo de ação da artemisinina parece estar relacionado à sua capacidade química de gerar radicais livres, que são prejudiciais ao parasita. Há evidências experimentais sobre a formação de um complexo de transição heme-artemisinina, e nesta interação é produzido uma série de radicais de oxigênio e carbono, originados da transferência de elétrons de Fe^{+2} para o grupo peróxido quando a artemisinina interage com o heme. As interações mais efetivas entre os átomos de H da artemisinina e o anel porfírico do heme ocorrem nos átomos de H ligados aos átomos de carbono C9, C8a, C5a, C4 e C7 da artemisinina (Costa *et al.*, 2007).

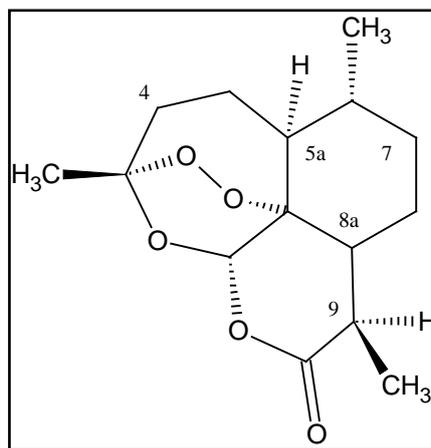


Figura 48. Estrutura molecular da artemisinina.

É na espécie *Artemisia annua* onde encontramos este princípio ativo antimalárico. A artemisinina foi isolada do extrato etéreo e demonstrou atividade durante testes farmacológicos (Rodrigues *et al*, 2006). A busca por novos compostos antimaláricos incentivam a continuidade dos estudos químicos e farmacológicos desta espécie. Em um trabalho realizado por Akkawi e colaboradores (2014) foi demonstrada a ação antimalárica dos extratos aquoso das folhas, preparados por infusão.

7. MATERIAIS E MÉTODOS

7.1 Ensaio de hemólise

O teste *in vitro* para verificar a atividade hemolítica dos extratos polares de *A. amazonicus* e extratos de *V. cayennensis* foi realizado no Instituto Leônidas e Maria Deane (FioCruz/AM) sob supervisão do Dr. Luis André Morais Mariuba. O objetivo deste ensaio é determinar a concentração citotóxica dos extratos brutos frente aos eritrócitos.

Para a realização deste teste utilizou-se sangue venoso humano centrifugado a 2500 rpm por 10 minutos para o preparo de solução de hemácias. A coleta de amostras de sangue periférico foi feita por punção de voluntários adultos e saudáveis, de acordo com os requisitos definidos pelo comitê de ética em Experimentação em humanos.

Todos os extratos de *A. amazonicus* e os três extratos de *V. cayennensis* obtidos foram testados. E eles foram preparados em DMSO nas concentrações de 500 µg/mL e 250 µg/mL. As concentrações que provocaram a lise nos eritrócitos foram consideradas tóxicas. As concentrações atóxicas foram selecionadas para a realização dos ensaios antimaláricos, *in vitro*, na fase eritrocitária.

Os ensaios da atividade hemolítica foram realizados segundo a metodologia descrita por Yigit e colaboradores (2009), com modificações, através da difusão das amostras em ágar sangue, em duplicata. O meio foi preparado em placas de Petri a 5% v/v, onde foram inoculadas 20 µL das amostras em orifícios feitos no meio. Após este período, as placas foram incubadas a 35°C durante 24 horas. Para controle foram utilizados 20 µL dos solventes puros (solventes que foram utilizados no preparo de cada amostra) aplicados nas placas. Para o controle positivo utilizou-se uma solução de saponina, na concentração de 1000 µg/mL, sendo aplicado o mesmo volume, 20 µL, sobre a placa. E para o controle negativo foi utilizada uma solução salina na concentração de 0,9%. Todos os controles receberam o mesmo tratamento das amostras. Após 24 horas, as placas

foram inspecionadas quanto à presença de halos de hemólise, estes medidos em milímetros.

7.2 Avaliação da sensibilidade do *Plasmodium falciparum*, em ensaios *in vitro* na fase eritrocitária, de extratos/frações/substâncias de *V. cayennensis* e *A. amazonicus*.

Os ensaios apresentados a seguir foram desenvolvidos em Portugal, no Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, UEI Malária e CMDT LA sob orientação geral do professor **Doutor Virgílio E. do Rosário**, e orientado tecnicamente pela **Doutora Dinora Lopes**.

Clones 3D7 e Dd2 de *P. falciparum*, foram mantidos em cultivo contínuo. O meio de cultivo (RPMI 1640) foi trocado diariamente e a cultura mantida a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂, com hematocrito de 5%. A avaliação *in vitro* da atividade antimalárica na fase eritrocitária do ciclo de vida do *P. falciparum* foi realizada com culturas sincronizadas (com sorbitol a 5%) na fase de anel, submetidas a 7 diferentes concentrações dos extratos e frações em estudo (250, 125, 62,5, 31,25, 15,62, 7,81 e 3,90 µg/mL), utilizando como controle a mesma cultura sem adição de compostos.

Colocaram-se 50 µL de cada uma das concentrações a testar em microplacas, e meio de cultura nos controles. A estas soluções foram adicionados 50 µL de cultura, com 1% de parasitêmia e hematócrito final de 2%. Cada uma das amostras foi testada em duplicata. Após 48h de incubação com os fármacos, nas condições de cultivo acima descritas, as placas foram congeladas. Para efetuar a leitura dos resultados do ensaio de susceptibilidade as placas foram descongeladas e adicionaram-se 100 µL de tampão de lise contendo Sybr Green na concentração de 0,2 µL/mL por poço; as placas foram levemente agitadas em agitador horizontal de forma a homogeneizar o conteúdo de cada poço. Após 1 hora de incubação no escuro, à temperatura ambiente, a fluorescência foi medida num fluorímetro com comprimento de excitação e emissão, de 485 e 530

nm, respectivamente. Em paralelo foi realizada as leituras dos ensaios, de acordo com Mark III da OMS, por microscopia óptica, em cada um dos clones de *P. falciparum*, as estirpes sensível (3D7) e resistente (Dd2) à cloroquina. Foi contado o número de parasitas viáveis, isto é, com três ou mais núcleos bem definidos, num total de 200 parasitas. A partir do número de esquizontes, foram calculadas as porcentagens de inibição de cada uma das concentrações relativamente ao controle, tendo sido determinado por análise de regressão não linear, o IC₅₀ para cada substância (software - versão HnonLin V 1.1, www.malaria.farch.net).

7.3 Índice de seletividade

O índice de seletividade (IS) é a relação entre as atividades citotóxicas e antiparasitárias de cada extrato, fração ou composto. O IS foi obtido através da razão entre o valor de IC₅₀ para ensaios de hepatotoxicidade e IC₅₀ para *P. falciparum* (cepa 3D7 e Dd2). Valores obtidos maiores que 10 são atribuídos para extratos com toxicidade ausente ou moderada, valores menores ou iguais a 10 indicam toxicidade dos extratos (Bézevin, 2003).

7.4 Ensaios de hepatotoxicidade

Os ensaios esquizonticidas com extratos e substâncias puras isoladas de plantas requerem um estudo prévio de seu efeito sobre a viabilidade das células Hep G2. Foram testadas, em duplicata, concentrações de 250, 125, 62.5, 15.25, 7.8 e 3,9 µg/ml para determinar a dose letal mínima, que inibe em 30% o crescimento dos hepatócitos (DML 30%). Células cultivadas apenas em meio de cultura foram usadas como controle. A partir da suspensão de células tripsinizadas, foi realizada uma diluição de forma a obter 3×10^3 células/200µl por poço em microplacas de 96 poços (Nunc®). As microplacas foram incubadas em estufa de CO₂ a 37° C, durante 24 horas, de modo a permitir a adesão das células em suspensão.

Ao fim deste período, o sobrenadante de cada poço foi substituído por 200µl dos extratos ou substâncias puras isoladas e as culturas foram incubadas por mais 24 horas. Ao final de 48 horas de incubação com as substâncias a testar, foram adicionados 20µl/poço de solução MTT (Sigma®) à concentração de 5mg/ml em RPMI 1640, sem vermelho fenol (Sigma®). O MTT é um sal de tetrazólio, solúvel em água, e que confere uma cor amarelada ao meio. O MTT dissolvido é convertido numa substância púrpura, insolúvel em água, mas solúvel em isopropanol. Quando esta solução é adicionada ao meio de cultura, esta conversão é efectuada apenas pelas células viáveis, através das desidrogenases mitocondriais. Após o período de 3 horas com o MTT, o sobrenadante foi retirado e o corante formado foi diluído em 200µl/poço de isopropanol ácido (0,1 N de HCl). As microplacas, então, foram lidas em espectrofotômetro com filtro de 630 nm. A viabilidade das células frente às drogas testes foi avaliada por interpolação linear para determinação da concentração que elimina 30% dos hepatócitos (DML 30%).

7.5 Avaliação da sensibilidade do *P. berghei*, em ensaios *in vitro* na fase hepática.

Foram preparadas Labtek's (**Figura 49**) com 300 µl de uma suspensão de 10×10^4 células por poço. Após 24h de crescimento dos hepatócitos, as glândulas salivares dos mosquitos *A. stephensi* infectados com *P. berghei* ANKA foram dissecadas e a cada poço foram adicionados 100µl de meio Williams contendo 10×10^4 esporozoítos. As células foram incubadas durante 3h a 37°C com 5% CO₂. Posteriormente foi retirado o sobrenadante, e adicionados 300 µl de cada extrato (com as referidas concentrações); e incubadas em estufa a 37°C com 5% CO₂. Após 24h (H₂₄) de infecção administrou-se a 2ª dose de cada extrato. Ao fim de 48h de infecção, as células foram lavadas com 500 µl de uma solução de PBS + Azida, e fixadas com metanol. Posteriormente, as placas foram

incubadas, durante 1h a 37°C com 5% CO₂, com 100 µl de solução Ab (i72/SI).

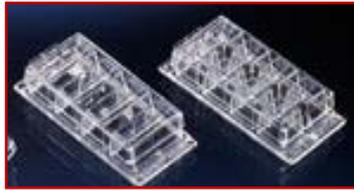


Figura 49. Labtek's de 300 µL.

Após incubação, retirou-se o meio e adicionou-se a cada poço 100 µl de solução Ab (GAM-Ig/FITC) – Blue de Evans, incubou-se em estufa de CO₂ durante aproximadamente 1h; foi efetuada uma lavagem com PBS e rejeitou-se o sobrenadante. Foi retirada a estrutura dos poços da labteck, e efetuou-se uma montagem em 1:1 de glicerol/ PBS + Azida; e procedeu-se à observação ao microscópio de fluorescência para avaliação/contagem do desenvolvimento dos esquizontes hepáticos.

7.6 Teste esquizonticida eritrocitário e exoeritrocitário *in vivo* com *P. berghei*

7.6.1 Ensaio *in vivo* fase hepática

O efeito antimalárico, *in vivo*, dos extratos EDCCAa, ECCRAa, ES, CMB, CMR e EACRAa foram avaliados pela sua capacidade de inibir a invasão e o desenvolvimento do ciclo hepático do *P. berghei* modelo roedor em relação ao controle não tratado. Camundongos *Mus Musculus* estirpe Balb C, fêmeas, foram inoculados por via intraperitoneal, com 26.000 esporozoítos no dia 0. Os animais mantidos em condições controladas de temperatura e luminosidade, cerca de 21 °C, com períodos de 12 h luz/12 h escuro, com dieta e água *ad libitum* (Carraz *et al.*, 2006; Parvanova *et al.*, 2009). Os procedimentos de experimentação animal foram realizados de acordo com as Diretrizes nacionais para a manipulação de animais de

laboratório (Decreto-Lei n.º 129/92 de 6 de Julho). No 1º dia, foram administrados intraperitonealmente os compostos em estudo (Carraz *et al.*, 2006). Foram utilizados três camundongos por grupo, num total de sete grupos, e realizados dois ensaios independentes. Os grupos dos compostos em estudo foram tratados com 25 mg/kg/dia de composto e os restantes grupos, os controles: controle positivo - tratados com 15 mg/kg/dia de primaquina; controle negativo - grupo não tratado. Os compostos foram administrados durante 4 dias consecutivos, sendo que a primaquina foi administrada em dose única 1 h antes da inoculação dos esporozoítos (Carraz *et al.*, 2006). A evolução da parasitemia foi verificada por microscopia óptica em esfregaços sanguíneos realizados diariamente, entre o 4º dia e o 20º dia após inoculação dos esporozoítos. Depois foram calculadas para cada grupo a média das parasitemias dos murganhos.

7.6.2 Ensaio *in vivo* fase hepática II

Em simultâneo, foi avaliada a capacidade de inibir apenas o desenvolvimento do ciclo hepático do *P. berghei* modelo roedor em relação ao controle não tratado. Camundongos *Mus Musculus* estirpe Balb C, fêmeas, foram inoculados por via intraperitoneal, com 26.000 esporozoítos, no dia 0 e mantidos como descrito anteriormente (Carraz *et al.*, 2006). No 1º dia, foram administrados intraperitonealmente os compostos em estudo.

Foram utilizados três camundongos por grupo, num total de sete grupos, e realizado um ensaio. Todos os grupos, incluindo o controle positivo – primaquina, foram tratados com 15 mg/kg, em dose única, de composto com exceção do controle negativo - grupo não tratado. A evolução da parasitemia foi verificada por microscopia óptica em esfregaços sanguíneos realizados diariamente, entre o 4º e o 20º dia após inoculação dos esporozoítos, a partir de gota de sangue da cauda e corados com Giemsa 20% (Fluka, ref. 48900). Posteriormente foram calculadas para cada grupo a média das parasitemias dos camundongos.

7.6.3 Ensaio *in vivo* na fase eritrocitária do ciclo de desenvolvimento do *Plasmodium berghei* – 4 days suppressive test

Para avaliação da atividade antimalárica *in vivo*, na fase eritrocitária (Figura 50), dos compostos extraídos de *A. amazonicus* foi utilizado *P. berghei* ANKA (modelo roedor).



Figura 50: Esquema representativo do ensaio *in vivo* da atividade antimalárica da fase eritrocitária do ciclo de vida do parasita

Camundongos *Mus Musculus* estirpe Balb C, fêmeas, foram infectados por via intraperitoneal, com 10^6 eritrócitos parasitados, no dia 0 e mantidos em condições controladas de temperatura e luminosidade, cerca de 21 °C, com períodos de 12 h luz/12h escuro, com dieta e água *ad libitum* (Ajaiyeoba, *et. al*, 1999; Peters, 1975). No dia 0, 2 h após inoculação dos parasitas, foram administradas intraperitonealmente os compostos em estudo. Foram utilizados três camundongos por grupo, num total de sete grupos, e realizados dois ensaios independentes sendo os grupos do

primeiro ensaio tratados com 25 mg/kg/dia de composto e os restantes grupos foram os controles (controle positivo) – tratados com 10 mg/kg/dia de cloroquina (Sigma, ref. C6628); controle negativo – grupo não tratado). Os compostos foram administrados durante 4 dias consecutivos tendo a evolução da parasitemia sido verificada por microscopia óptica, através de esfregaços sanguíneos realizados 96 h após D₀ a partir de gota de sangue da cauda e corados com Giemsa 20% (Fluka, ref. 48900). Posteriormente os esfregaços eram realizados de dois em dois dias (Ajaiyeoba, *et. al.*, 1999; Peters, 1975). Foram calculadas para cada grupo a média das parasitêmias dos camundongos e verificado o tempo médio de sobrevivência dos mesmos.

7.7 Atividade potencial antimalárica através da inibição da formação de β -hematina

As seguintes soluções foram preparadas: HCl 1M; NaOH 0,1 M; Hepes 20 mM; 15% de piridina em Hepes 20 mM (pH = 7.5); Solução saturada de acetato de sódio (pH = 5.0), a qual foi obtida com 18 g de acetato de sódio, 24 mL de ácido acético e 10 mL de água; Amostras: Soluções estoque de substâncias, extratos e frações foram preparados em uma mistura de HCl 0,1 M/ MeOH/ DMSO (5:3:2). As concentrações das amostras foram de 50 mM, 25 mg/mL e 15 mg/mL para os compostos puros, extratos e frações, respectivamente.

O ensaio de hemozoína foi realizado como descrito por Vargas e colaboradores (2011). Resumidamente 10 μ L dos compostos, frações e extratos em diferentes concentrações, conforme mencionado anteriormente, foram preparados e adicionados a uma microplaca de 96 poços de fundo em “U” (2 mL) juntamente com 100 μ L da solução estoque da hematina (preparada diariamente com 6.8 mg de hemina bovina diluída em 10 mL de NaOH a 0,1 M) e 10 μ L de HCl 1 M em triplicata. As suspensões foram então homogenizadas a 900 rpm por 10 min e uma solução de 60 μ L de acetato de sódio (12,9 M, pH 5,0), pré aquecido a

60°C, foram adicionados à cada poço. A concentração final nos poços foram 2,1 mM para compostos puros, 1,38 mg/mL para frações e 0,83 mg/mL para extratos. A microplaca foi incubada a 60°C por 90 min, em seguida adicionou 750 µL de solução piridina (15% (v/v)) em 20 mM Hepes pH 7,5. Nessa solução os sólidos foram homogenizados e deixados em repouso por 15 min para que houvesse sua sedimentação. Posteriormente, 100 µL do sobrenadante dos poços da placa foram transferidos para outra microplaca de 300 µL. A microplaca foi lida a 405 nm (espectrofotômetro UV Vis BioMate™ 3), os dados obtidos foram representados pela variável $A_{\text{análise}}$. Os resultados expressos em concentração de heme livre foram calculados a partir da diferença dos resultados da $A_{\text{análise}}$ pela absorbância da solução de heme (hematina ou hemina), esta solução foi preparada conforme a metodologia acima com uma pequena alteração, a solução de piridina foi substituída por 750 µL de Hepes 20 mM, para este protocolo foi adotado o nome de $A_{\text{análise/branca}}$, e foi realizada com o objetivo de retirar a absorbância remanescente de hematina. A seguir a fórmula utilizada para a realização dos cálculos:

$$\text{I. } \Delta A_{\text{análise}} = A_{\text{análise}} - A_{\text{análise/branca}}$$

Também foi descontada a absorbância das amostras, para isto foram realizados mais dois controles denominados de $A_{\text{controle/branco}}$ e $A_{\text{controle/branco/branco}}$. As metodologias adotadas foram nas mesmas condições acima, mas na ausência de hematina e para o $A_{\text{controle/branco/branco}}$ um volume de 750 µL de Hepes 20 mM foi adicionado em substituição à piridina.

A absorbância residual da amostra, independente da inibição do complexo β -hematina, foi calculada usando a seguinte fórmula:

$$\text{II. } \Delta A_{\text{controle/branco}} = A_{\text{controle/branco}} - A_{\text{controle/branco/branco}}$$

O resultado final da inibição do complexo β -hematina pelas amostras testadas foi calculado pela equação:

$$\text{III. } I_{\text{análise}} = \Delta A_{\text{análise}} - \Delta A_{\text{controle/branco}}$$

Se a $I_{\text{análise}}$ tem um valor positivo, o ensaio é considerado positivo, portanto, a amostra é classificada como ativa. Neste sentido um valor negativo indica um resultado negativo.

A determinação quantitativa da inibição da formação de β -hematina foi realizada com o padrão cloroquina. Uma solução estoque foi preparada na concentração de 25 mM e a partir desta solução foram realizadas 6 diluições sucessivas, de forma que a última solução apresentou uma concentração de 0.39 mM. O IC_{50} foi calculado através do gráfico de dose-resposta obtido pelo programa GraphPad Prism.

No experimento *in vitro* realizado neste trabalho, a β -hematina foi sintetizada a partir da mistura da hematina (o heme) com o acetato de sódio, onde o íon acetato formado retirou um hidrogênio do grupamento carboxila da heme, deixando neste um excedente eletrônico essencial para o processo de dimerização e formação dos cristais hemozoicos, de acordo como está descrito na **figura 51**. Portanto o extrato, fração ou substância pura que impediu a formação da hemozoína foi considerado ativo por ter conservado a molécula heme e desta forma preservando um ambiente hostil para o parasita.

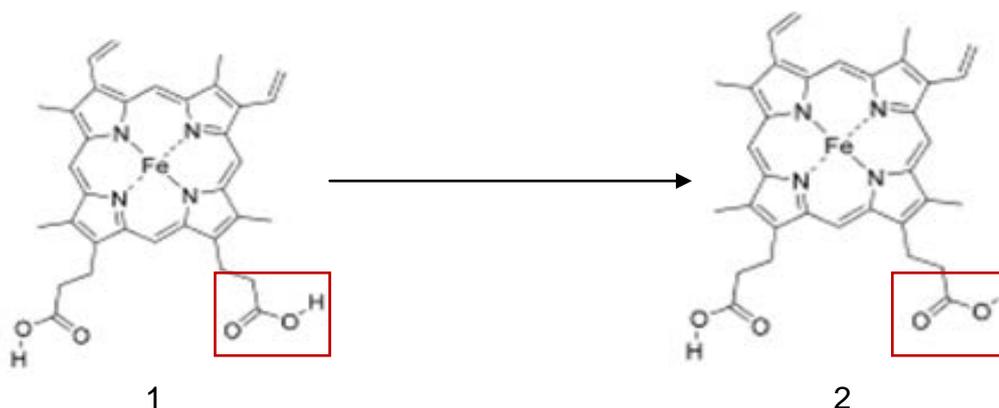


Figura 51. Heme livre evidenciando o grupamento carboxila (1) e a formação do grupamento carboxil-propionato (2) que promoverá a dimerização.

Para identificar se a amostra inibiu ou não a formação da β -hematina, foi utilizado a solução piridina (15% (v/v)) em 20 mM Hepes pH 7,5. A piridina é capaz de formar um complexo com a hematina, denominado de Py-Fe(III)PPIX, desta forma se a amostra impedir a formação da β -hematina este complexo será formado e identificado por uma coloração vermelha, cujo os valores de absorbância das soluções são obtidos no comprimento de onda de 405 nm. Adicionalmente se a amostra for inativa não há a formação do complexo porque o processo de dimerização, promovido pelo acetato de sódio, levou a formação da β -hematina, cuja estrutura (**Figura 52**) (os círculos em destaque mostram os grupos carboxil-propionato ligados ao ferro) não favorece uma interação com a piridina.

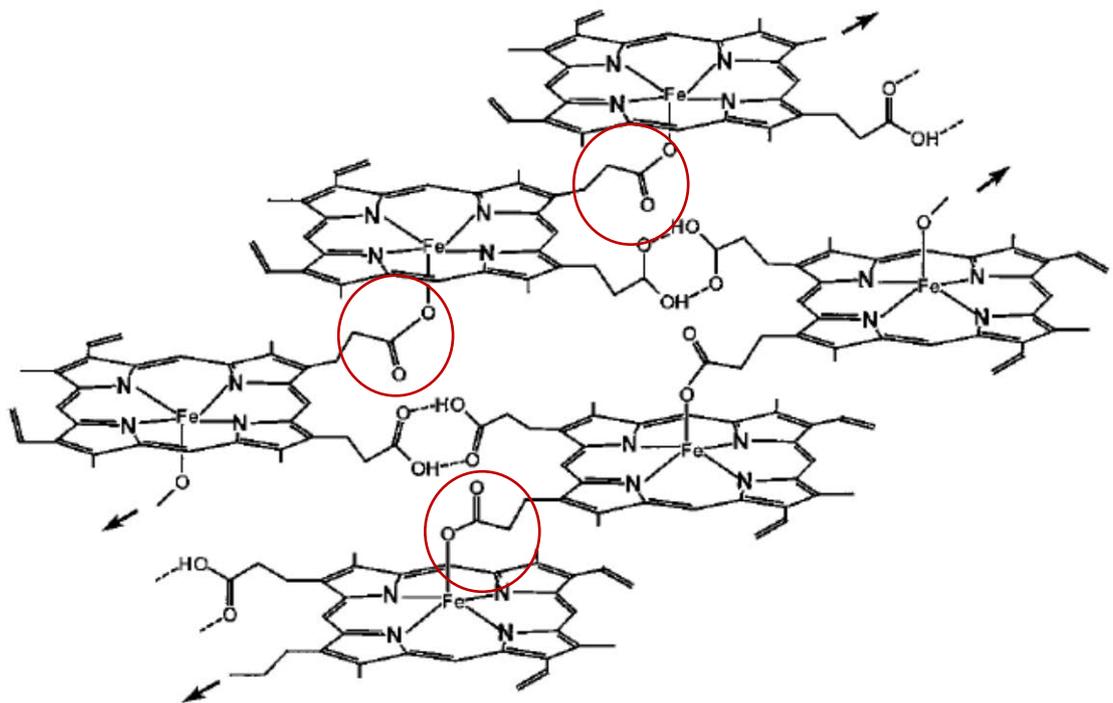


Figura 52. Esquema de formação de cristais de hemozoína a partir de dímeros de β -hematina.
Fonte: Pereira, L.M.O

7.8 Estudos dos efeitos farmacológicos de extratos de *A. amazonicus*

7.8.1 Animais e considerações de ética

Foram utilizados camundongos Swiss, machos e fêmeas (20-30g), oriundos do Biotério Central da Universidade Federal do Amazonas. Os animais foram acondicionados em gaiolas de polietileno e mantidos sob temperatura média de 22°C, em ciclos claro/escuro de 12/12 horas, recebendo ração padrão e água à vontade. Todos os protocolos seguiram estritamente as normas internacionais de cuidados com animais de laboratório e foram aprovados pelo comitê de ética em pesquisa animal da UFAM.

7.8.2 Teste do efeito de extratos e frações de *A. amazonicus* em modelo de comportamento geral de camundongos

Os animais foram separados em grupos (n = 6), e tratados via oral com 12 substratos relativos à *A. amazonicus*, controle positivo (cafeína, 50 mg/kg) e veículo (solução salina) (10 mL/kg). Foram anotados o comportamento dos camundongos nos tempos de: 0 minuto, 5 minutos, 10 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 60 minutos e 90 minutos, para que pudéssemos futuramente analisar o tempo do início da ação de cada extrato, a melhor dose a ser utilizada, a toxicidade em relação à dose e ao tipo específico de extrato e se havia diferenças quanto ao efeito dos diferentes tipos de extrato, estabelecendo assim a curva de tempo de ação de cada extrato e seus possíveis efeitos.

Foram observados os seguintes efeitos: frequência respiratória, analgesia, agitabilidade, motilidade, espasmos abdominais, defecação e micção.

7.8.3 Avaliação da atividade motora utilizando o modelo do Campo Aberto

A atividade exploratória de animais de laboratório pode ser analisada pela tarefa do campo aberto que permite observar como o animal se comporta em um ambiente amplo (Ho *et al*, 2002). A tendência natural do animal em um ambiente novo é a de explorá-lo, apesar do conflito com o medo provocado pelo ambiente (Montgomery *et al*, 1955). O objetivo deste teste é avaliar a atividade estimulante ou depressora do extrato, podendo ainda indicar atividades mais específicas como ansiolítica/ansiogênica. O teste é realizado em uma caixa de madeira com dimensões 30x30x15 cm, em que o fundo é dividido por linhas pretas em 12 quadrados iguais (**Figura 53**). Neste experimento é avaliada a movimentação espontânea entre as divisões da caixa que indica a atividade exploratória dos animais. Pode-se avaliar também o medo dos animais que se reflete pela imobilidade na caixa e a capacidade de exploração do ambiente e fuga. Avalia-se a atividade exploratória dos animais: sua movimentação espontânea (número de cruzamentos, com as quatro patas, entre as divisões do campo), o número de comportamentos de autolimpeza (“grooming”) e de levantar (“rearing”), registrados durante um período de 4 minutos, após os tratamentos. Os camundongos foram divididos em grupos (n=6) e tratados, por via intraperitoneal (I) e por via oral (II), divididos em grupos: Grupo 1: Chá pelo método Rodrigues (CMR); Grupo 2: Chá pelo método Brandão (CMB); Grupo 3: EDCCAa na concentração de 50 mg/kg e veículo (10 mL/Kg) e 30 minutos após foram colocados no centro do campo aberto para início do teste. Os animais permaneceram na caixa por 5 minutos, sendo que o primeiro minuto não é computado, pois é o tempo para ambientação do animal ao local.

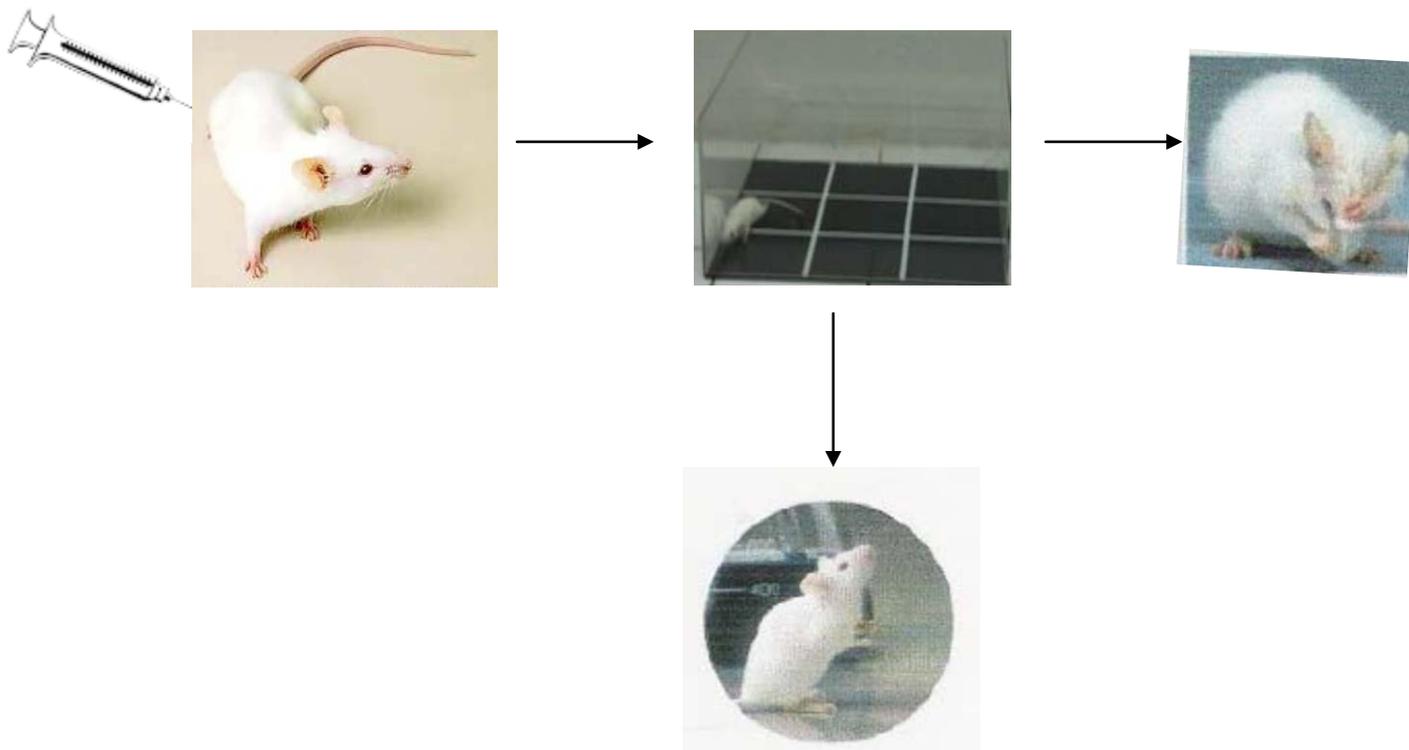


Figura 53. Esquema do teste do Campo Aberto.

7.8.4 Efeito na atividade hipnosedativa no modelo de sono induzido por pentobarbital

Os animais foram divididos em grupos ($n = 6$) e receberam, por via oral, extrato e frações isoladas na concentração de 50 mg/kg e veículo (10 mL/Kg). Após uma hora da administração, os animais receberam pentobarbital sódico (60 mg/Kg, i.p.). O tempo desde a administração do pentobarbital até a perda e a recuperação do reflexo de endireitamento foi registrado como duração do sono, em segundos. A perda do reflexo de endireitamento é a incapacidade que o animal apresenta de voltar à posição normal quando colocado em decúbito dorsal. O critério para a recuperação do reflexo de endireitamento foi fixado quando o animal saiu da imposição por três vezes consecutivas. (Carlini *et al*, 1986; Mattei *et al*, 1998). Simplificando, observamos os camundongos para que pudéssemos

analisar o tempo de latência e o tempo total de sono durante os 120 minutos de experimento (**Figura 54**).

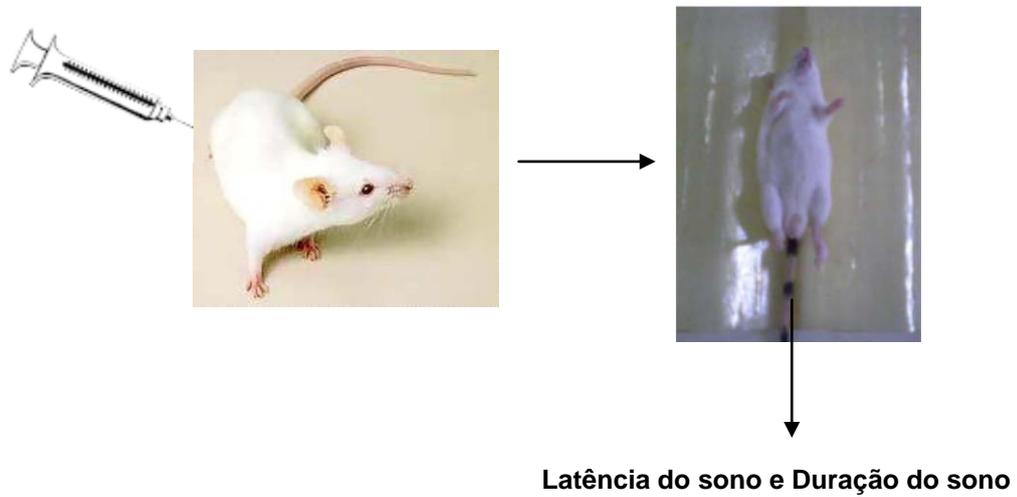


Figura 54. Esquema do teste tempo de sono Induzido por Pentobarbital.

7.8.5 Análise estatística

Os níveis de significância entre os grupos experimentais e o controle serão feitos utilizando-se o Teste T de Student e ou ANOVA. Os valores foram considerados significativos quando $p < 0,05$ e expressos como média \pm erro padrão da média.

8. RESULTADOS E DISCUSSÃO

8.1. Teste Hemolítico

A avaliação da atividade hemolítica em placas de Agar sangue foi realizada com os 23 extratos de *A. amazonicus* e três extratos de *V. cayennensis* (Ver Preparação dos extratos e fracionamento, pg 32 e pg 52). Neste ensaio os extratos de baixa e média polaridade de *A. amazonicus* e os extratos de *V. cayennensis* apresentaram resultados negativos nas duas concentrações testadas. Os extratos polares de *A. amazonicus*, a saber: EECERAA, EECCAA, EECECAA, EEFSAA, EACRAA, CMR, CMQ, CMB, ES e ESPX apresentaram resultados positivos na maior concentração testada (500 µg/mL), nos quais foram observados halos de hemólise de: 1.3, 1.4, 1.3, 0.9, 1.5, 1.6, 1.7, 1.5, 1.9 e 1.9 cm, respectivamente.

Partindo do princípio que os extratos polares apresentam, como constituintes majoritários, as saponinas em sua composição química, conforme já mencionado, este resultado já era esperado. As saponinas são conhecidas por interagirem com os esteróis das membranas dos eritrócitos, acarretando um aumento da permeabilidade da membrana com consequente ruptura da célula; Augustin e colaboradores (2011) propuseram um mecanismo de ação das saponinas para a hemólise dos eritrócitos a partir da interação espontânea entre a parte hidrofóbica da saponina com a membrana da célula, favorecendo assim a formação de complexos, os quais se acumulam na membrana gerando curvatura (**figura 55**), estas deformações são as responsáveis pela permeabilidade da membrana, permitindo a passagem de íons e macromoléculas.

Através da hemólise ocorre a liberação de hemoglobina livre no plasma, tornando extremamente necessário a verificação desta atividade em extratos de plantas com uso medicinal contra a malária. Portanto, os resultados encontrados neste teste conduzem a uma avaliação preliminar da toxicidade dos extratos frente aos eritrócitos, este dado é de extrema importância na busca de um novo antimalárico, pois a presença de

toxicidade restringe a sua utilização, sendo necessária a determinação da concentração letal para seu uso.

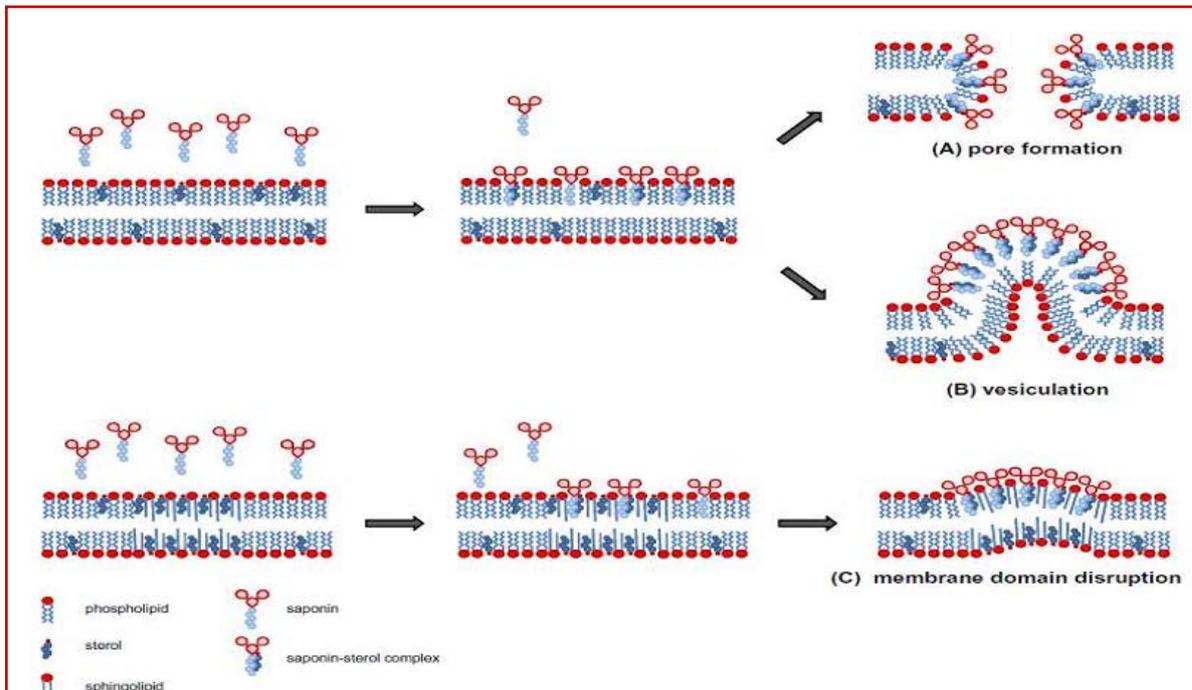


Figura 55. Deformações da membrana celular, indicando a atividade hemolítica das saponinas (Augustin *et al*, 2011).

Nenhum dos extratos causou hemólise na concentração de 250 µg/mL, sendo esta a concentração inicial para a avaliação da atividade antimalárica, na fase eritrocitária, dos extratos de *A. amazonicus* e *V. cayennensis*.

A **figura 56** ilustra os resultados obtidos para algumas amostras.

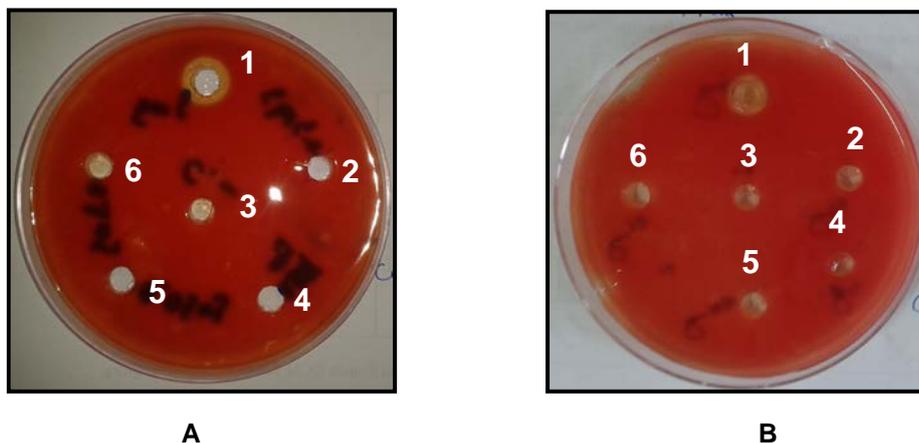


Figura 56. Placa de Ágar sangue com halo de hemólise e demais discos representando resultado negativo, sem halo de hemólise: **A** = 1– ES, 2– EHCRAa, 3– ECCRAa, 4– EHCERAa, 5– ECCERAa, 6– EHCCAa; **B** = 1–EEFSAa, 2– EHFSAa, 3– ECFSaAa, 4– ECCECAa, 5– ECFVc, 6– EEFVc. Fonte: Carmo, Dominique (2013).

8.2. Análise dos extratos e substâncias isoladas de *A. amazonicus* frente ao *P. berghei* e *P. falciparum*

8.2.1. Ensaio de hepatotoxicidade

Foram realizados dois ensaios independentes em triplicata e determinados os valores médios das leituras para cada uma das concentrações e as porcentagens de células vivas relativamente ao respectivo controle positivo, que consistiu numa microcultura sem amostra, correspondendo a 100% de células vivas.

Como critério de avaliação, foram determinado valores da dose mínima letal de 30% (DML30) de inibição do crescimento celular. As substâncias que apresentaram $DML30 \leq 50 \mu\text{g/mL}$ foram considerados altamente tóxicas (Madureira *et al*, 2002). Desta forma foram identificadas as concentrações não tóxicas, as quais foram utilizadas para a realização dos testes de avaliação da atividade esquizonticida tecidular (fase hepática) em, concentrações inferiores à dose DML determinada.

Os extratos de *A. amazonicus* apresentaram uma toxicidade tolerável, com DML 30% variando entre 57,86 e 1795 $\mu\text{g/mL}$ (**Tabela 15**) exceto para o extratos EHCCAa e para as substâncias ECFVc 4_5/24_25/P e CCFR6/

24-29/P, que apresentaram valores médios de 45,71, 49,88 e 1,77 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, sendo considerados altamente tóxicos.

A razão para os demais extratos e substâncias não terem sido testados, foi devido à falta de células hepáticas para realização do experimento.

Tabela 15. DML (Dose mínima letal) – Dose que inibiu 30% do crescimento celular.

Código da amostra	DML ($\mu\text{g/mL}$) 1° Resultado	DML ($\mu\text{g/mL}$) 2° Resultado	Doses a serem testadas na fase hepática ($\mu\text{g/mL}$)
EHCRaA	57,86	63,085	62,5/31,25
ECCRaA	64,52	66,782	62,5/31,25
EECRaA	142,98	140,5	125/62,5
EACRaA	235,09	224,679	125/62,5
ECCERaA	71,07	70,27	62,5/31,25
EECERaA	356,82	393,805	250/125
EHCCaA	46,16	45,26	31,25/15,6
EDCCaA	89,92	90,01	62,5/31,25
EECCaA	314,65	310,15	250/125
EHCECaA	208,80	214,418	125/62,5
ECCECaA	175,53	144,401	125/62,5
EECECaA	222,66	245,619	250/125
EHFSAa	82,69	95,192	62,5/31,25
ECFSAa	140,87	155,857	125/62,5
EEFSAa	186,09	203,95	125/62,5
CMR	366,53	360,13	250/125
CMB	206,89	210,5	125/62,5
CMQ	1794,67	1598,02	1000/500
ES	150,96	148,67	125/62,5

ESPX	80,95	82,33	62,5/31,25
Ácido melalêucico	256,48	250,3	250/125
5,6,7,8,2',3',4',5' – Octametóxiflavona.	1,56	1,99	1,95/3,90
1,3,8-triidroxi-4,5,7- triiisoprenil-7-metil-antrone.	48,53	51,23	31,25/15,6

8.2.2. Ensaio de determinação da atividade antimalárica

Quatro tipos diferentes de ensaios foram utilizados: ensaios *in vitro* para estudo da atividade antimalárica durante o ciclo hepático, utilizando *P. berghei* ANKA; e ensaios *in vitro* com *Plasmodium falciparum* para estudo da atividade antimalárica esquizonticida para parasitas na fase de desenvolvimento eritrocitário; e, finalmente, ensaios *in vivo* em modelo de *Plasmodium berghei* ANKA infectando camundongos Balb/C para a fase hepática e, também, para fase eritrocitária.

8.2.2.1. Ensaios *in vitro* na fase hepática

Para a determinação da atividade antimalárica na fase hepática, procedeu-se à observação ao microscópio de fluorescência para avaliação/contagem do crescimento dos esquizontes hepáticos e por interpolação linear foram calculados os valores médios de IC₅₀.

A realização deste ensaio (Ver Materiais e Métodos, pg. 133) é complexa e necessita de uma reprodução climática para o crescimento e desenvolvimento dos esporozoítos, o que significa que os valores de umidade e temperatura devem ser exatos para a obtenção de um experimento com êxito.

De acordo com Gessler *et al*, 1994, se o extrato exibir um IC₅₀ menor que 10 µg/mL, a atividade antimalárica é muito boa, de 10 a 50 µg/mL, a

atividade antimalárica é moderada e acima de 50 µg/mL, o extrato é considerado ter baixa atividade antimalárica.

Dos extratos testados (**Tabela 16**), três demonstraram uma moderada atividade esquizonticida, com valores de IC₅₀: 19,6, 30,1 e 39,9 µg/mL referente aos ECCECAa, ECCRAa e EACRAa, respectivamente. As concentrações ativas estão abaixo dos respectivos de valores de DML. Os demais extratos foram considerados inativos.

Tabela 16. Atividade de extratos de *A. amazonicus*, *in vitro*, contra as formas hepáticas do *Plasmodium berghei* em linhagem de células hepáticas Hep G2 A16.

Código da amostra	IC ₅₀ (ug/mL)
EHCRAa	69,6
ECCRAa	30,1
EECERAa	82,0
EACRAa	39,9
ECCECAa	19,6
EECECAa	264,6
EHFSAa	72,5
ECFSAa	127,5
EEFSAa	83,9
EHCECAa	54,5

Os resultados encontrados neste trabalho corroboram os resultados de outros pesquisadores. Em trabalhos mais antigos encontramos informações sobre a inatividade de extratos brutos e de frações semipurificadas da planta contra as formas sanguíneas de *P. berghei* e *P. gallinaceum* (Kretlli *et al*, 2001), em um trabalho realizado por Andrade-Neto e colaboradores (2008), cuja a metodologia para o ensaio antimalárico foi a mesma utilizada neste trabalho. Encontramos que o extrato etanólico das raízes foi capaz de reduzir, significativamente, o

número de esquizontes, sendo considerado ativo (IC_{50} calculado de 28,2 $\mu\text{g/mL}$). O extrato aquoso das raízes (EACRAa) obtido neste trabalho, de polaridade próxima ao extrato etanólico, apresentou atividade moderada com IC_{50} próximo ao encontrado por Andrade-Neto *et al*, 2008. Este resultado, preliminar, revela a existência de atividade antimalárica de *A. amazonicus* na fase inicial da doença, que a leva a ser indicada pela população.

Os demais extratos foram avaliados pela primeira vez quanto ao sua ação antimalárica. Os resultados obtidos pelos ECCECAa e ECCRAa foram considerados promissores, e, por este motivo foram submetidos aos fracionamentos químicos, com o objetivo inicial de monitorar por bioensaio e identificar as substâncias relacionadas ao uso popular atribuído a planta. No entanto, não foi possível testar as substâncias isoladas, devido às dificuldades encontradas para a obtenção de um número razoável de esporozoítos.

Os extratos polares de *A. amazonicus*, como mencionado na literatura, são ricos em saponinas (Brandão, 2001; Rosas *et al*, 2007). Estes metabólicos apresentam um amplo espectro de atividades biológicas e farmacológicas. A sua atividade mais comum é a capacidade em produzir hemólise, esta atividade faz parte do sistema de proteção do vegetal contra ataques de predadores (inseto, vírus, fungos e bactérias) (Bruneton, 1999), e a ela está associada outras atividades como antibacteriana, antifúngica e espermicida, apresentada por uma variedade de plantas (Lacaille-Dubois & Wagner, 1996).

Além das atividades antibacteriana e antifúngica, as saponinas apresentam atividades moluscicida, atuando contra o esquistossomo (Sindambiwe *et al*, 1998; Abdel-Gawad *et al*, 1999), anti-inflamatória (Navarro *et al*, 2001), e atua contra micro-organismos como vírus e protozoários (*leishmania infantum*) (Germonprez *et al*, 2005). Uma série de trabalhos sobre a ação farmacológica das saponinas é encontrada na literatura, mas no que diz respeito à atividade antimalárica frente ao *P. berghei*, na fase hepática, nenhum trabalho foi realizado até o momento.

Pelo histórico farmacológico destes metabólicos e o resultado encontrado para o EACRAa, acredita-se no potencial antimalárico das raízes de *A. amazonicus*, na fase inicial da doença, devido a presença das saponinas. Porém, faz-se necessário o isolamento e a avaliação, *in vitro*, destas substâncias frente às formas exo-eritrocitária em desenvolvimento. Adicionalmente torna-se interessante realizar os ensaios *in vivo*, para a comprovação científica da planta como profilática.

Nos extratos ECCECAa e ECCRAa foi possível identificar a presença de triterpenos, através da análise das frações pré-purificadas em CCD (**Figura 57**), utilizando os reveladores indicativos desta classe química. Os triterpenos são reativos ao komarowvsky, apresentando uma coloração azul ou lilás, e à vanilina sulfúrica, apresentando uma coloração lilás (Wagner, 1996). Ainda, pelo trabalho fitoquímico realizado, foi possível isolar triterpenos pentacíclicos do tipo lupeno, dentre eles: ácido melalêucico (ECCECAa), betulina (ECCRAa) e ácido betulínico (ECCECAa/ECCRAa), corroborando com dados da literatura (Rosas *et al*, 2007; Brandão, 2001; Corrêa, 2007).

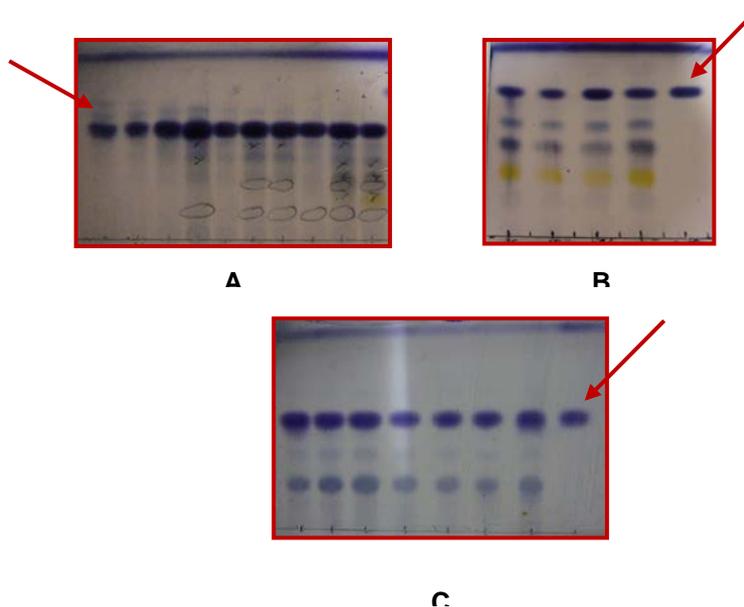


Figura 57. Cromatografia em camada delgada (CCD) de frações pré-purificadas: **A** = Frações do ECCECAa, revelador - komarowvsky; **B** = Frações do ECCECAa, revelador - komarowvsky; **C** = Frações do ECCRAa, revelador – Vanilina sulfúrica.

Fonte: Carmo, Dominique (2013).

Diversas plantas de uso tradicional que contêm esses ácidos triterpênicos possuem atividade como anti-inflamatória, hepatoprotetora, analgésica, cardiotônica e sedativa. Além destas atividades, estes ácidos apresentam atividade antitumoral (Alvarenga *et al*, 2005). O ácido betulínico, por exemplo, é conhecido pelas suas propriedades antiinflamatórias e cancerígenas. Através das investigações decorridas descobriu-se o potencial citotóxico do ácido betulínico para as células de melanomas cancerígenos, não só em ratos como mesmo em células humanas. O triterpeno não só inibe o crescimento das células malignas, como provoca mesmo a autodestruição, a sua morte “programada” (apoptose). A sua grande especificidade para as células tumorais tem também outra vantagem: não ataca as células saudáveis circundantes (Kommera *et al*, 2010). Tendo em conta que os atuais medicamentos existentes no mercado funcionam como um veneno, matando e impedindo de se replicar qualquer tipo de células quer sejam malignas ou não, o ácido betulínico adquire certa vantagem sobre estes medicamentos.

Além da ação antitumoral, a literatura confirma a ação antiplasmodial deste triterpeno, porém na fase sanguínea contra *P. falciparum* (Ziegler *et al*, 2004; Domínguez-Carmona *et al*, 2009). A atividade observada nos dois extratos, provavelmente deve-se a presença dos triterpenos, mas faz-se necessário a avaliação destas substâncias contra *P. berghei*, na fase hepática.

8.2.3. Ensaio *in vitro* na fase eritrocitária

8.2.3.1. Ensaio *in vitro* com extratos/substâncias de *A. amazonicus*

Em virtude da facilidade de realização deste experimento, pois as condições para o desenvolvimento do parasita são facilmente alcançadas com uma estufa de CO₂, um maior número de amostras foi testado. Além

disso, a utilização do reagente Syber Green permite que os resultados sejam obtidos em questão de segundos.

A partir dos valores determinados, definiram-se extratos/substâncias de elevada, média e baixa atividade. Conforme Chinchilla e colaboradores (2012), para extratos com $IC_{50} < 5 \mu\text{g/mL}$, foram considerados muito ativos, com $5 > IC_{50} > 50$, considerados ativos, $50 > IC_{50} > 100$, pouco ativos e $IC_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$, foram considerados inativos. Foi calculada a concentração capaz de inibir o crescimento de 50% dos parasitas (IC_{50}) na fase sanguínea, em comparação com os controles.

Os extratos EHCECAa, EECRAa, EACRAa, ECCERAa, EECERAa, ECCECAa, EHFSAa, ECFSAa, EEFSAa demonstraram possuir uma atividade antiplasmódica moderada, com valores de $IC_{50} 50 > IC_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$. Os extratos EHCRAa, ECCRAa, EDCCAa e EHFSAa apresentaram uma evidente atividade antiplasmódica contra *P. falciparum* sensível e resistente à cloroquina com valores de $IC_{50} < 10 \mu\text{g/mL}$.

O extrato mais ativo foi o ECCRAa, obtido das raízes de *A. amazonicus* (este extrato também apresentou resposta positiva na fase inicial da doença, quando avaliado frente ao *P. berghei*). Este resultado é apresentado pela primeira vez, dado que a literatura afirma que a espécie em estudo não apresenta atividade antimalárica, na fase sanguínea, frente ao *P. falciparum* (Krettli *et al*, 2001; Andrade-Neto *et al*, 2008; Oliveira *et al*, 2011). Acredita-se que a metodologia adotada para a obtenção dos extratos, obtidos a partir da extração por diferentes solventes em ordem crescente de polaridade, tenha contribuído para a obtenção de extratos mais ativos frente ao *P. falciparum*.

Uma possibilidade aqui aventada seria associar a ação antimalárica da planta aos compostos de média polaridade, neste caso, aos triterpenos pentacíclicos. Diante desses resultados os estudos fitoquímicos foram realizados com os extratos clorofórmicos, com o objetivo de isolar as substâncias bioativas, passando pela purificação das frações, conforme descrito em materiais e métodos.

O ECCECAa (Ver Materiais e Métodos, pg. 41) foi submetido a uma coluna filtrante, utilizando como eluente Hexano, AcOEt e Metanol em gradiente de polaridade crescente, fornecendo 7 frações. Na fração, codificada como CECFR2, foi observado a presença de precipitados, os quais foram lavados com AcOEt e separados conforme grau de pureza. O precipitado PECC 4 foi identificado, através dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C , como sendo o triterpeno Ácido melalêucico. Este triterpeno foi avaliado frente às formas 3D7 e Dd2, sendo considerado inativo frente aos clones do *P. falciparum* 3D7 e Dd2 (**Tabela 17**).

A partir de sucessivos fracionamentos da sub-fração CECFR2, foi possível isolar o ácido esteárico, que mediante ao teste antimalárico *in vitro* foi considerado ativo frente ao *P. falciparum*, com IC_{50} de 5,98 $\mu\text{g/mL}$ para 3D7 e 2,73 $\mu\text{g/mL}$ para Dd2 .

A partir do fracionamento do ECCRAa, obtiveram-se 4 frações, sendo que nas três primeiras frações foram observados a presença de precipitados. Os precipitados foram lavados com AcOEt, obtendo-se, desta forma, o ácido betulínico. Para este triterpeno foi detectada uma relevante atividade antimalárica com valores de IC_{50} de 2,56 $\mu\text{g/mL}$ para 3D7 e 3,73 $\mu\text{g/mL}$ para Dd2.

A fração 1, codificada como CRF1, por ter apresentado um bom rendimento, foi submetida a um fracionamento por cromatografia em coluna, utilizando sílica gel como fase estacionária e como eluentes hexano, diclorometano, metanol em gradiente de polaridade crescente, fornecendo 26 frações. As frações de 1 a 9 foram avaliadas por CCD, onde foi observada a presença de um único composto, que após análise por RMN de ^1H e ^{13}C , foi identificado como sendo triterpeno betulina. Este triterpeno também exibiu uma potente ação antimalárica com valores de IC_{50} de 7,56 $\mu\text{g/ml}$ para 3D7 e 3,15 $\mu\text{g/ml}$ para Dd2, porém inferior ao ácido betulínico.

As demais substâncias, obtidas a partir dos extratos clorofórmicos, não apresentaram quantidades suficientes para serem submetidos à avaliação antimalárica.

Tabela 17. Concentração inibitória (IC₅₀) dos extratos de *A. amazonicus* frente aos clones 3D7 e Dd2 de *Plasmodium falciparum* e valores de Índice de seletividade (IS).

Extratos	<i>P. falciparum</i> (3D7) IC ₅₀ (µg/ml)	<i>P. falciparum</i> (Dd ₂) IC ₅₀ (µg/ml)	Índice de Seletividade (IS) HepG2/3D7	Índice de Seletividade (IS) HepG2/Dd2
EHCRAa	50,60 ± 9,58	32,01 ± 2,16	1,14	1,81
ECCRAa	13,79 ± 3,29	14,63 ± 7,093	4,68	4,41
EECRAa	54,08 ± 1,70	68,64 ± 4,16	2,62	2,06
EACRAa	66,98 ± 11,88	78,26 ± 1,92	3,50	3,01
ECCERAa	55,03 ± 0,49	54,78 ± 0,11	1,29	1,31
EECERAa	71,09 ± 1,62	75,76 ± 2,36	7,57	7,61
EDCCAa	40,50 ± 3,79	34,52 ± 1,32	2,20	2,57
EHCECAa	58,97 ± 6,04	45,36 ± 10,43	0,84	1,11
ECCECAa	51,10 ± 0,01	54,94 ± 0,07	3,42	3,18
EHFSAa	43,70 ± 4,01	38,04 ± 0,151	5,16	5,84
ECFSAa	70,30 ± 4,83	45,36 ± 5,41	3,16	4,84
EEFSAa	73,98 ± 1,41	74,71 ± 0,76	4,52	4,41
Lupeol	3,42 ± 2,15	2,31 ± 0,31	-	-
Ácido betulínico	2,56 ± 1,51	3,76 ± 0,69	-	-
Betulina	7,56 ± 3,20	3,15 ± 0,03	-	-
Ácido esteárico	5,98 ± 3,43	2,73 ± 0,44	-	-
Ácido melalêucico	247,25 ± 5,02	345,1 ± 16,97	1,03	0,74
*CQ	0,01 ± 0. 1	0,203 ± 0. 1	3620,5	2277,5

*CQ - Cloroquina

O cálculo do índice de seletividade (IS) para cada composto foi feito a partir da razão entre a dose tóxica letal para 50% das células (DL_{50}) e sua atividade anti-*P. falciparum*. Essa análise demonstrou que o ECCRAa é promissor, com valor de $IS > 3$ (Bezevin *et al*, 2003), os demais extratos e compostos apresentaram baixa seletividade ($< 3,0$).

O ácido betulínico, é amplamente distribuído no reino vegetal, presente em frutas e verduras, suas fontes tradicionais são em espécies europeias do gênero *Betula* (Hostettmann *et al*, 2003), é um composto já conhecido pela variedade de atividades biológicas e farmacológicas, dentre elas podemos citar as antiinflamatória, anti-HIV, antifúngica (Domínguez-Carmona *et al*, 2009), antihelmítica, antioxidante, propriedades imunomodulatórias e antineoplásica em diferentes células cancerígenas humanas (Sharma *et al*, 2010). Além dessas ações, o ácido betulínico vem despontando como uma substância potencialmente eficaz contra o *P. falciparum* (Ziegler *et al*, 2004).

Há vários trabalhos na literatura descrevendo ensaios de atividade antiplasmódica investigando extratos de plantas ricas em triterpeno, muitas vezes sendo o ácido betulínico o componente responsável pelo o efeito. A atividade antimalárica do triterpeno foi investigada pela primeira vez por Bringmann e colaboradores (1997), apresentando uma ação moderada sobre *P. falciparum* (NF 54) com IC_{50} de 10,5 $\mu\text{g/mL}$. Desde então outros estudos vêm relatando o potencial antimalárico do ácido betulínico sobre diferentes cepas do mesmo protozoário (Duker-Eshun *et al*, 2004; Attioua; Weniger; Chabert, 2007; Lenta *et al*, 2007; Lenta *et al*, 2008; Domínguez-Carmona *et al*, 2011; Zofou *et al*, 2011). Steele e colaboradores (1999) demonstraram que o ácido betulínico possui atividade antiplasmódica moderada tanto contra *P. falciparum* resistente (K1) quanto sensível à cloroquina ($IC_{50} = 19,6 \mu\text{g/mL}$ e $25,9 \mu\text{g/mL}$, respectivamente). A betulina, por sua vez mostrou-se ser completamente inativa às mesmas cepas, com IC_{50} de 500 $\mu\text{g/mL}$, evidenciando que a modificação da posição C-17 altera drasticamente a atividade. Betulinaldeído, com um aldeído em C28, mostrou-se ativo com IC_{50} de 6,5

$\mu\text{g/mL}$ (Suksamrarn *et al*, 2006). Porém, neste trabalho, verificamos que a betulina é ativa frente às formas sensível e resistente 3D7 e Dd2, respectivamente, de *P. falciparum*. Sobre esta atividade antiprotozoária, já foi comprovada a ação antimalárica deste triterpeno frente à cepa 3D7 de *P. falciparum*, bem como o mecanismo de ação, o qual foi associado às alterações na forma da membrana do eritrócito, conhecido como estomatócitos (Ziegler *et al*, 2004).

É sabido que a membrana dos eritrócitos é formada por dois domínios, um primeiro pela bicamada lipídica, e a outra formada pelo citoesqueleto. A bicamada é formada por partes ligeiramente iguais de lipídeos e proteínas. Os lipídeos encontrados são o colesterol, igualmente distribuídos em ambas às faces da bicamada, e fosfolipídeos que tem suas constituições diferenciadas em cada lado da bicamada (Lehninger *et al*, 2007). Em pesquisas realizadas por seu grupo de pesquisa de Ziegler e colaboradores (2004) demonstraram que o *Plasmodium* sobrevive, essencialmente, do colesterol presente na bicamada lipídica, neste sentido moléculas análogas a este lipídio poderiam liga-se a membrana do eritrócito, modificando os benefícios que o colesterol proporciona ao *Plasmodium*.

Os triterpenos pentacíclicos testados, dentre eles o ácido betulínico, betulina e lupeol foram capazes de se incorporar dentro da camada lipídica provocando alteração na morfologia dos eritrócitos, os triterpenos capazes de doarem uma ligação de hidrogênio provocaram contração nas células, conhecidos como equinócitos; os triterpenos incapazes de doar uma ligação de hidrogênio provocaram expansão nos eritrócitos, conhecidos como estomatócitos, estas alterações inibiram o crescimento do *P. falciparum* (Ziegler *et al*, 2004).

Em contrapartida o ácido melalêucico não apresentou atividade antimalárica, uma explicação seria um interação intramolecular entre as carboxilas o que impede incorporação da molécula na membrana do eritrócito (Costa *et al*, 2007).

Além do ECCECAa o ácido betulínico também foi isolado do ECCRAa. É provável que este triterpeno seja majoritário nas raízes de *A. amazonicus*,

para desenvolver esta teoria pensou-se em quantificar o ácido betulínico nos extratos brutos de *A. amazonicus* (Ver Materiais e Métodos, pg. 49) e correlacionar com os valores de IC₅₀ encontrados nos ensaios esquizotóxicas *in vitro* na fase de desenvolvimento eritrocitário.

A importância da identificação dos constituintes mais importantes de um vegetal é pelo estabelecimento de marcadores químicos, componente ou classe de componente presente no material vegetal, idealmente o próprio princípio ativo, e preferencialmente que tenha correlação com o efeito terapêutico. Neste sentido a substância em destaque foi quantificada pelo método por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) nos extratos selecionados para estudo neste trabalho.

As análises foram realizadas em CLAE-DAD, utilizando eluição no modo isocrático, acetonitrila/água 65: 35 (% v/v), com o objetivo de se obter uma boa separação da banda do analito de interesse dos outros compostos presentes na matriz e um perfil cromatográfico satisfatório para todos os extratos para assim comparar, qualificar e quantificar o ácido betulínico em todas as amostras de *A. amazonicus*. Esses cromatogramas foram monitorados no comprimento de onda 210 nm.

Na análise do perfil cromatográfico do ácido betulínico (**Figura 58**) observa-se uma boa identificação do analito de interesse, com linha de base e bandas definidas.

Foram selecionadas as amostras que apresentaram elevada atividade antimalárica frente ao *P. falciparum*, os extratos EHCRAa, ECCRAa e EDCCAa.

Segundo Santos e colaboradores (2005), *A. amazonicus* é utilizada como preventivo e para o tratamento da malária a partir da mistura da entrecasca das raízes e caule em água. O conteúdo adquire uma coloração amarelada e espumante semelhante à cerveja, esta bebida é tomada diariamente, antes do banho, retirando-se a espuma (Brandão, 1991). Através desta informação, esperava-se que os extratos polares apresentassem atividade antimalárica, porém seus valores de IC₅₀ foram superiores aos valores encontrados para os extratos clorofórmicos. A

ausência desta atividade pode ser explicada pela ausência do ácido betulínico. Portanto, para afirmar esta hipótese também foi analisado o EACRAa para determinar a quantidade do triterpeno no extrato.

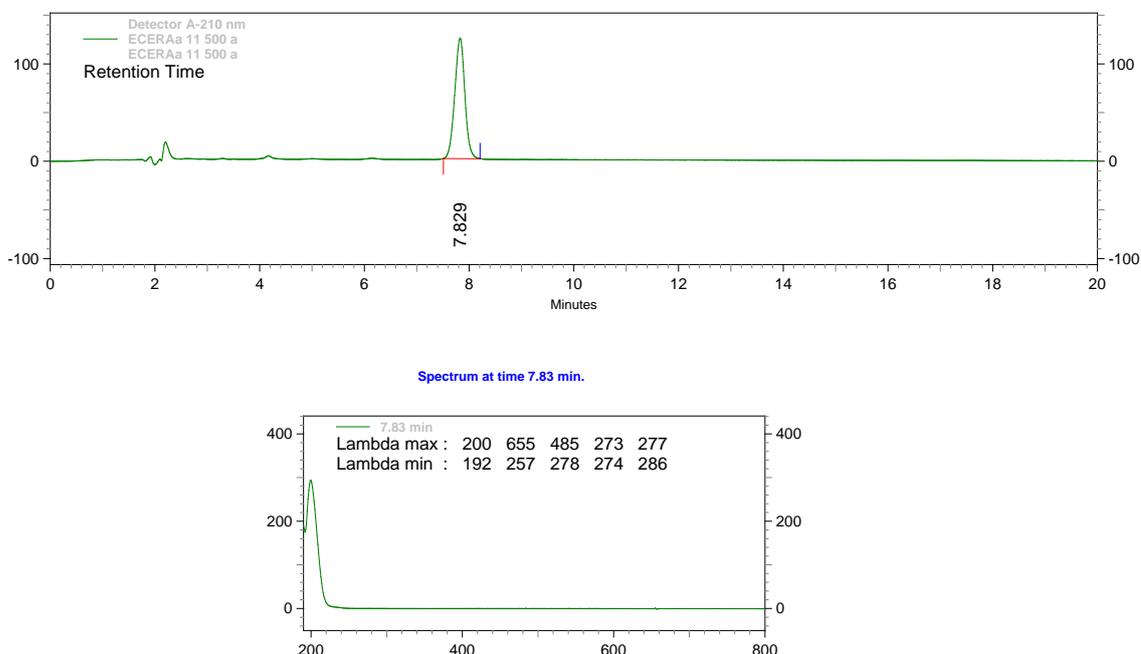


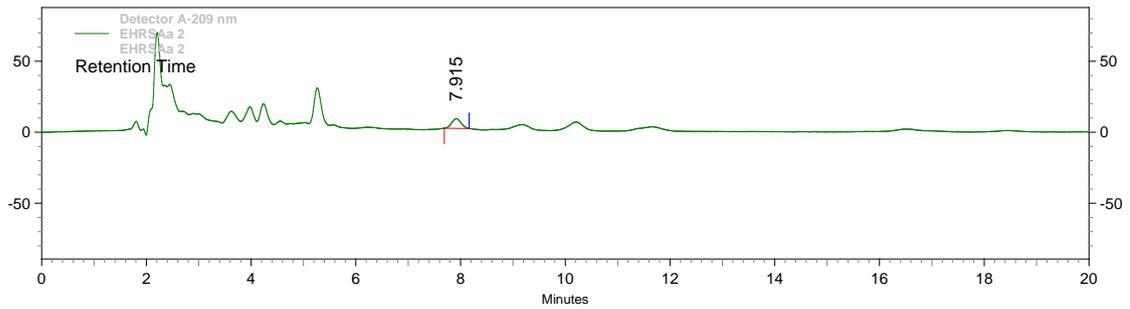
Figura 58. Cromatograma e espectro de UV do ácido betulínico detectado em 210 nm.

Na análise dos perfis cromatográficos dos extratos de *A. amazonicus* (**Figura 59**) observa-se que houve uma separação adequada do analito de interesse, a linha de base não foi alterada e as bandas estão definidas, esta boa separação foi obtida em 20 minutos de corrida usando as condições descritas. Foi possível identificar o ácido betulínico no EHCRAa, ECCRAa e EDCCAa.

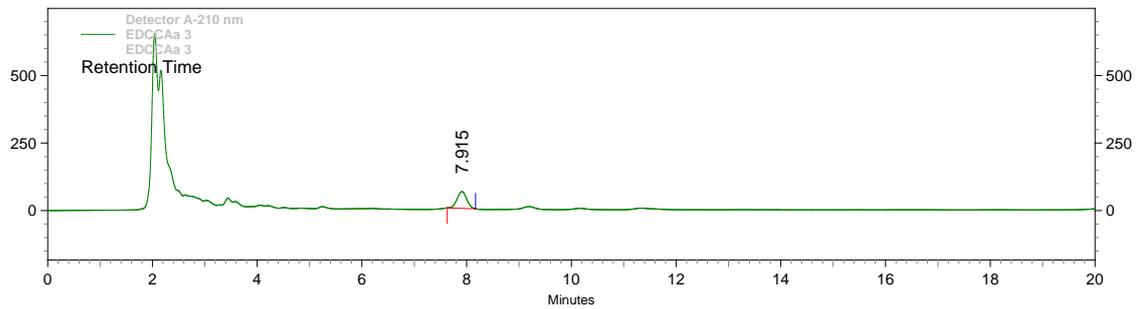
Através dos resultados discriminados na **Tabela 18** é possível estabelecer uma relação entre as atividades antimaláricas dos extratos e a quantidade do ácido betulínico nas amostras. O triterpeno foi encontrado como componente majoritário no ECCRAa, com concentração de 300, 85 $\mu\text{g/mL}$ para cada 1 mg/mL de amostra, em relação aos demais extratos o triterpeno é muito mais abundante neste extrato, fato já observado quando a amostra foi submetido a purificação por técnicas de cromatografia

clássica, onde repetidas vezes o composto foi isolado. Através desta quantificação pôde-se confirmar que o ácido betulínico é o componente majoritário nas cascas das raízes.

EHCRAa



EDCCAa



ECCRAa

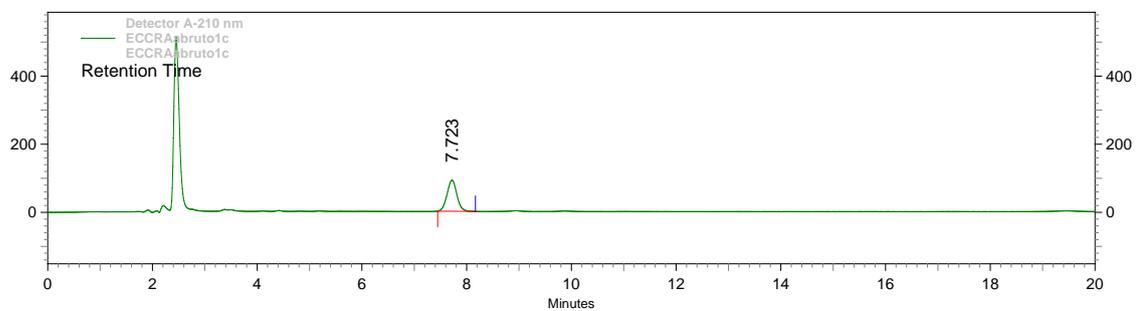


Figura 59. Cromatograma dos extratos de *A. amazonicus* obtido por CLAE-DAD.

Tabela 18. Concentração de ácido betulínico nos extratos de *A. amazonicus*.

Extrato	Concentração (µg/mL)	<i>P. falciparum</i> IC ₅₀ (µg/mL)	
		3D7	Dd2
EHCRAa	32,12	50,60 ± 9,58	32,01 ± 2,16
ECCRAa	300,85	13,79 ± 3,29	14,63 ± 7,09
EDCCAa	268,76	40,50 ± 3,79	34,52 ± 1,32
EACRAa	78,76	66,98 ± 11,88	78,26 ± 1,92

Através destes resultados podemos sugerir que o conteúdo do ácido betulínico na amostra está fortemente relacionado com a atividade antimalárica da espécie *A. amazonicus*, uma vez que nos demais extratos avaliados a presença de ácido betulínico é inferior e os valores IC₅₀ encontrados revelam menores atividades antimaláricas. Adicionalmente, no EACRAa (**Figura 60**) só foi possível identificar o triterpeno quando foi preparada uma solução mais concentrada de 20 mg/mL, onde foi encontrado 78,76 µg/ mL de ácido betulínico na solução, tal valor corresponde a 0,003% do triterpeno no chá, o que justifica a baixa atividade antimalárica do extrato contra o *P. faciparum*.

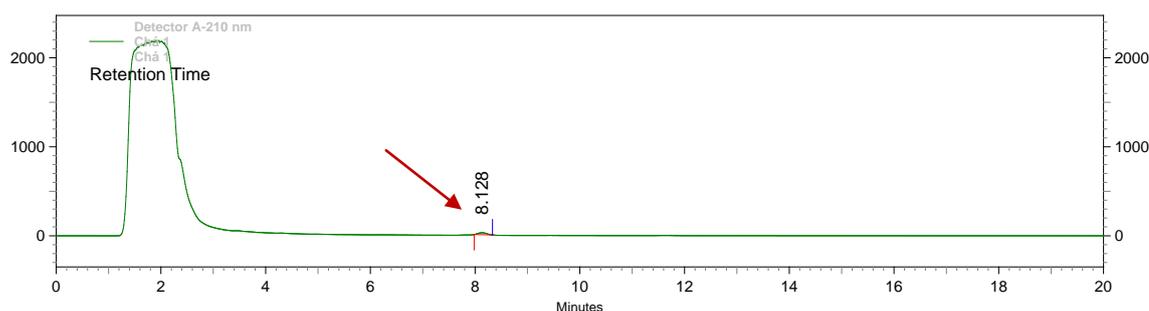


Figura 60. Cromatograma dos extratos EACRAa obtido por CLAE-DAD.

8.3. Ensaio *in vitro* com extratos/frações de *V. cayennensis*

Os ensaios foram realizados, inicialmente, com os extratos EHFVc, ECFVc e EEFVc, destes, o ECFVc apresentou excelente atividade antimalárica, com valores de $IC_{50} < 10 \mu\text{g/mL}$ nas duas cepas testadas, 3D7 e Dd2 (**Tabela 19**). Em face a esta atividade observada, o extrato foi escolhido para um fracionamento por bioensaio com o intuito de isolar ou identificar as substâncias bioativas.

O ECFVc foi submetido a purificações em gel lipofílico Sephadex LH-20, resultando em 10 frações. Todas as frações apresentaram atividade, mas pudemos classificar as frações ECFVc 1_3, ECFVc 4_5 e ECFVc 6_8 como muito ativas frente aos clones 3D7 e Dd2. À vista disso, as frações foram submetidas ao fracionamento em coluna, resultando em três substâncias: 3,11,13-4,4-triisoprenil-9-metil-antrone (vismina), 1,3,8-triidroxi-4,5,7-triisoprenil-7-metil-antrone (harunganol B) e Friedelina, porém devido a quantidade ínfima obtida das amostras, não foi possível avaliá-las quanto ao seus potenciais antimaláricos.

Na impossibilidade de identificar a substância ativa, estabeleceu-se o padrão de combinação de cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD) para identificar os metabólitos secundários presentes no extrato e nas frações ativas de *V. cayennensis*.

A análise de CCD das frações revelada sob luz ultravioleta (luz UV), mostrou a existência de compostos fenólicos pela fluorescência e pela ação do revelador NP-PEG (**Figura 61**).

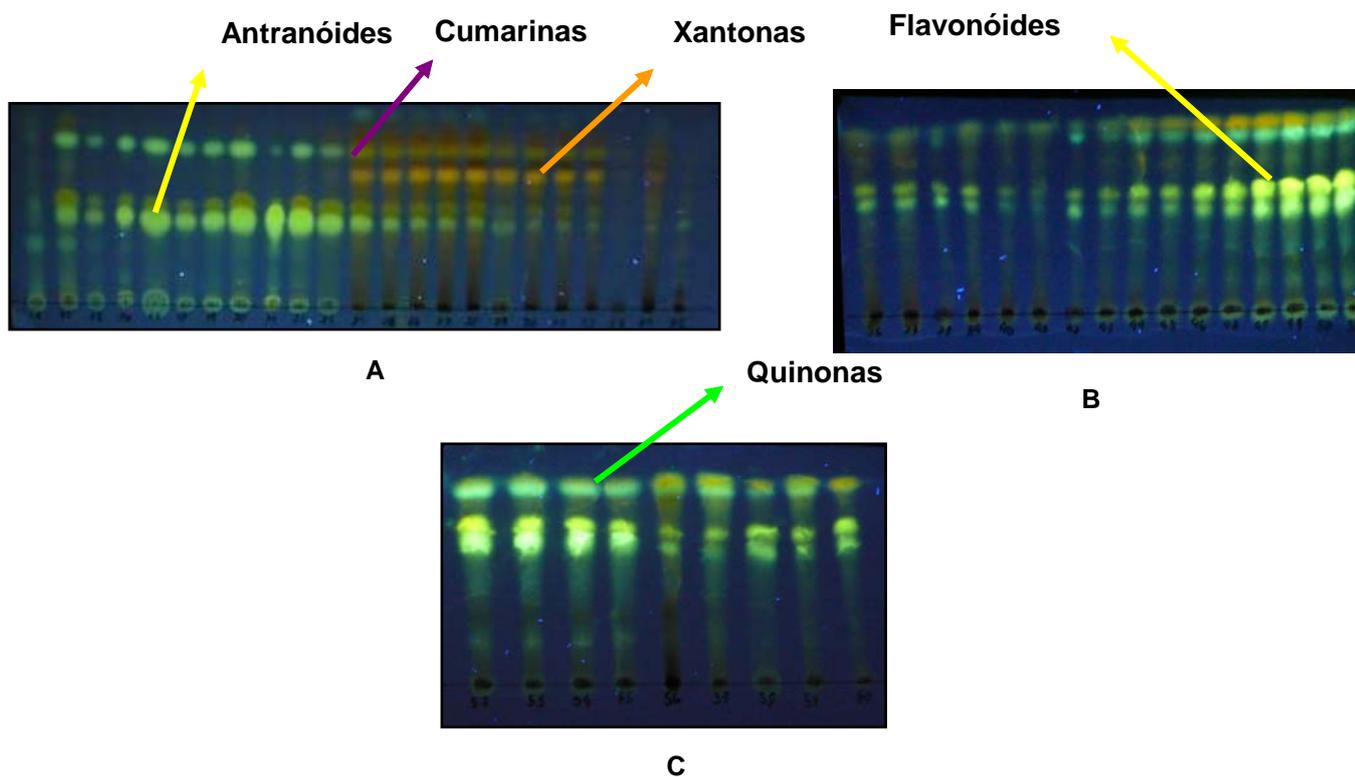


Figura 61. Cromatografia em camada delgada de sílica de fase normal, das frações oriundas da cromatografia em coluna (CC) do ECFVc.

O perfil cromatográfico obtido por CCD indicou a presença de: cumarinas, identificadas pela coloração roxa (Simões *et al*, 1999), xantonas cuja absorção da luz na região de 400 nm é responsável pela coloração alaranjada; quinonas identificadas pela coloração amarelada ou esverdeada intensa (Simões *et al*, 1999). A coloração amarelada também é indicativo de flavonóides e antranóides (Wagner, 1996). Sendo reafirmada esta informação pela análise por CLAE-DAD.

Tabela 19. Valores de IC₅₀ de extratos e frações dos frutos de *V. cayennensis*.

Extratos/Frações	IC ₅₀ (µg/mL) ± SD 3D ₇	IC ₅₀ (µg/mL) ± SD Dd ₂
ECFVc	4,65 ± 0,21	7,26 ± 0,14
EHFVc	>250	>250
EEFVc	>250	>250
ECFVc 1_3	8,00 ± 0,12	18,38 ± 0,11
ECFVc 4_5	5,16 ± 0,15	7,10 ± 0,19
ECFVc 6_8	6,00 ± 0,12	9,43 ± 0,1
ECFVc 9_12	27,34 ± 0,3	25,60 ± 0,12
ECFVc 13_17	34,55 ± 0,18	30,32 ± 0,44
ECFVc 18_20	37,86 ± 0,23	14,34 ± 0,42
ECFVc 21_25	32,48 ± 0,09	21,92 ± 0,26
ECFVc 26_32	29,44 ± 0,13	13,35 ± 0,31
ECFVc 33_41	31,30 ± 0,21	25,82 ± 0,09
ECFVc 42_45	36,87 ± 0,11	19,68 ± 0,36

A investigação de metabólitos secundários nos frutos da planta foi aprofundada com o auxílio de CLAE-DAD, a qual fornece acurácia informações sobre as classes de produtos químicos presentes.

O extrato clorofórmico dos frutos de *V. cayennensis* foi submetido à cromatografia líquida de alta eficiência em cromatógrafo equipado com detector de arranjo de diodo. Cerca de 1 mg do ECFVc foi solubilizado em metanol e analisado.

A figura **62** apresenta o perfil cromatográfico do ECFVc com seus respectivos espectros na luz ultravioleta dos compostos com tempo de retenção 11,01 min, 14,88 min, 16,46 min, 19,31 min, 23,67min e 24,91 minutos. Os espectros apresentaram absorções características no UV de substâncias fenólicas, a maior classe de metabólicos foram reconhecidos como vismiona, xantonas, antraquinona, benzofenona, derivados de

antranóides com base nas absorções no UV peculiares as respectivas classes metabólicas.

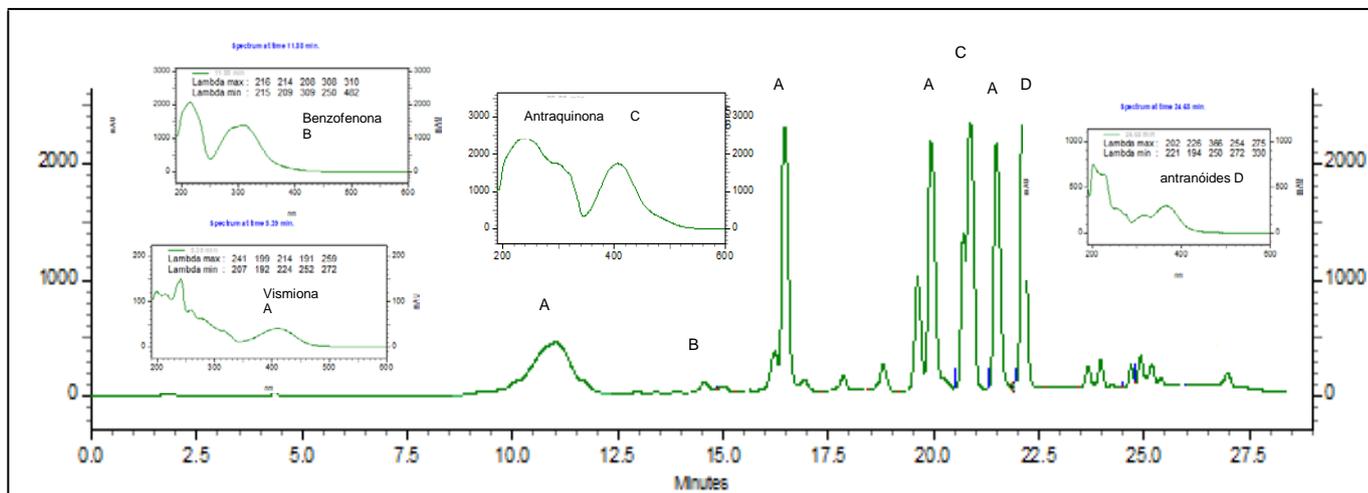
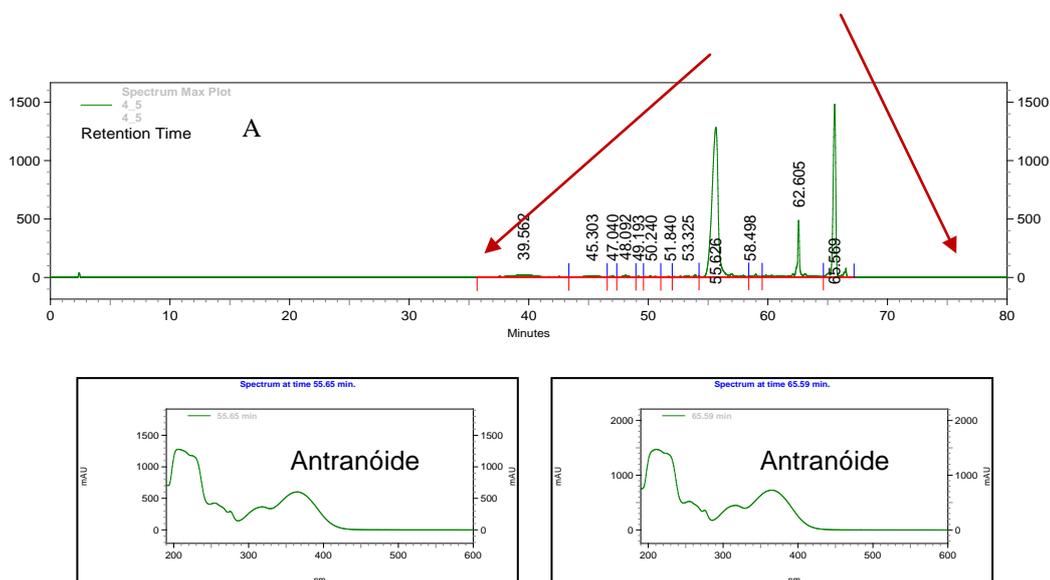


Figura 62. Cromatograma do extrato clorofórmico dos frutos de *V. cayennensis*

O sinal em 11,01 minutos apresentou um espectro no UV que mostra máximos de absorção em 201, 212, 239 e 405, em concordância com aqueles obtidos na literatura para algumas vismionas isoladas de *Vismia guineensis* (Politi *et al.*, 2004). Estas absorções peculiares são devidas ao esqueleto antraceno com um anel não aromático formados através do ácido poli- β -cetônico. O sinal em 14,88 minutos apresentou um espectro no UV que mostra máximos de absorção em 216 e 306 nm sendo provável ser uma benzofenona prenilada (Monache *et al.*, 1985). O sinal em 19,31 minutos e 23,67 minutos apresentam um espectro no UV semelhantes, com quatro máximos de absorções (219, 222, 346 e 406 nm) e (241, 263, 352 e 405 nm), respectivamente, também característicos de cromóforos de vismionas. Estes constituintes são conhecidos serem típicos metabólicos do gênero *Vismia* (Miraglia *et al.*, 1981; Botta *et al.*, 1983). O sinal em 24,68 minuto identificou compostos de antranóides pelas características máximas observados no espectro de UV (λ_{\max} 226, 275 e 366 nm) (Politi *et al.*, 2004).

O cromatograma da fração ECFVc 4_5 apresentou duas substâncias majoritárias, com os máximos de absorções semelhantes, enquanto que a fração ECFVc 6_8 apresentou apenas uma substância majoritária também com o mesmo perfil no espectro de UV. No espectro de UV (**Figura 63**) podemos identificar quatro máximos de absorção (no meio com intensidades decrescentes), característicos de antranóides (Politi *et al*, 2004). Os metabólitos presentes em espécies da família Clusiaceae são dotados de ações biológicas, destacando-se atividades antibacterianas (Hay *et al*, 2004), antifúngicas (Winter *et al*, 1995), citotóxicas e antimaláricas (Ignatushchenko *et al*, 1998). Sobre a atividade antimalárica destes metabólitos encontramos uma gama de informações na literatura, indicando o potencial antimalárico destas classes químicas (Hay *et al*, 2004; Hou *et al*, 2009; Dai *et al*, 2014), justificando os resultados encontrados neste trabalho.



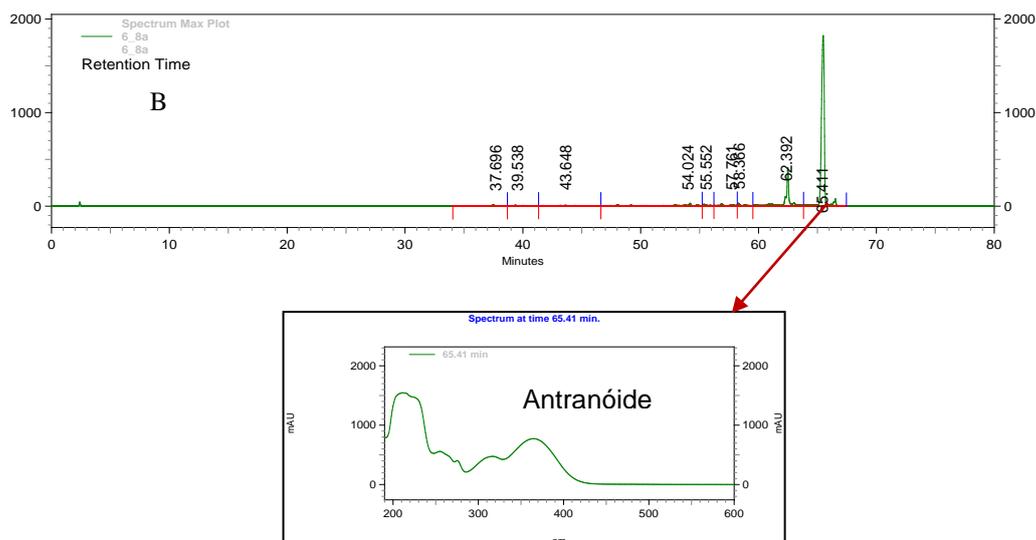


Figura 63. Cromatograma e espectros de UV de: **A** – ECFVc 4_5 e **B** – ECFVc 6_8.

8.4. Avaliação da inibição da formação de hemozoína pelos extratos/frações/substâncias isoladas de *A. amazonicus* e *V. cayennensis*

Com o objetivo de se avaliar um possível mecanismo de ação de extratos, frações e substâncias isoladas, foi avaliada a capacidade destes de inibir a formação da hemozoína. Foi utilizado um protocolo *in vitro* que mimetiza o ambiente *in vivo* no vacúolo digestivo do parasita, onde o produto da digestão da hemoglobina é depositado na forma polimerizada. Neste protocolo, quanto maior for a formação de heme livre, menor a concentração de hemozoína, portanto, mais ativa a amostra avaliada.

Os compostos testes são incubados em um tampão de acetato, que induz a formação de hemozoína. A quantidade de heme livre é então dosada e os resultados são calculados, os valores positivos indicam que a amostra é ativa. Conforme demonstrado na Tabela 20, os extratos clorofórmicos e aquosos de *A. amazonicus* inibiram a formação de hemozoína.

Tabela 20. Resultados de $I_{análise}$ para Extratos, Frações e Substâncias isoladas testadas no ensaio β -hematina.

Código dos extratos de <i>A. amazonicus</i>	$I_{análise}$
Cloroquina	0,383
EHCRaA	0,0450
ECCRaA	0,0103
EECRaA	0,1527
EACRaA	0,1647
EHCERaA	-0,0230
ECCERaA	0,0970
EECERaA	-0,0470
EHCCaA	-0,0380
EDCCaA	0,0963
EECCaA	-0,0756
EHCECaA	-0,0453
ECCECaA	0,1900
EECECaA	-0,0840
EHFSAa	0,1297
ECFSAa	0,1257
EEFSAa	0,1210
CMR	0,2677
CMQ	0,1860
CMB	0,1453
ES	0,1203
ESPX	0,0787
Código dos extratos/frações de <i>V. cayennensis</i>	
ECFVc	0,124

ECFVc 1_3	0,212
ECFVc 4_5	0,276
ECFVc 6_8	0,267
ECFVc 9_12	0,213
substância isolada	
5, 6, 7, 8, 2', 3', 4', 5' – octametóxilavona	0,0757

Após uma breve revisão da literatura sobre o mecanismo de ação do parasita nas células eritrocitárias, é pertinente lembrarmos que o *Plasmodium* atua se alimentando da hemoglobina e liberando o grupamento heme (**Figura 64**). Este grupo é uma estrutura em anel tetradentado conhecida como ferriprotoporfirina IX (Fe(III)PPIX) ou hematina, sendo tóxico ao parasita devido a sua habilidade de desestabilizar e lisar membranas (lipoperoxidação) (Francisco *et al*, 2010).

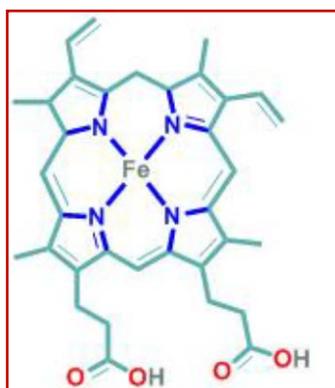


Figura 64. Estrutura do heme (hemina).
Fonte: Francisco *et al*, 2010.

No entanto o parasita desenvolveu estratégias que viabilizaram sua sobrevivência nesse ambiente eritrocítico e o mecanismo mais aceito é que ocorre o sequestro da heme em cristais de hemozoína (**Figura 65**), conhecido

como pigmento malárico. Análises espectroscópicas e por cristalografia indicaram que a hemozoína tem a mesma estrutura da β -hematina (Silva *et al*, 2005). A β -hematina é um dímero de heme formado por laços covalentes recíprocos entre grupos carboxila, essencialmente por ligações de hidrogênio, e os grupos carboxil-propionato com os átomos de ferro entre duas moléculas heme.

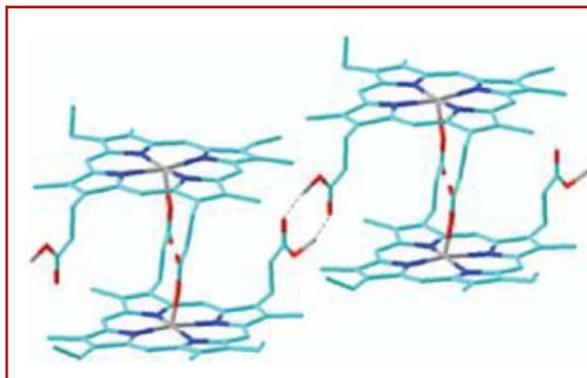


Figura 65. Estrutura da hemozoína.
Fonte: Francisco *et al*, 2010.

O ensaio realizado com os extratos CMQ, CMR, ECCECAa, EECRAa, EACRAa e frações ECFVc 1_3, ECFVc 4_5, ECFVc 6_8, ECFVc 9_12 evidenciaram uma forte interação com o grupo heme, em valores mais próximos ao padrão cloroquina, sugerindo a presença de substâncias com potencial atividade de inibição de polimerização do heme nestes extratos.

Para os extratos EHCRAa, ECCRAa, ECCERAa, EDCCAa, EHFSa, ECFSAa, EEFSa, CMB, ES, ESPX e a substância 5, 6, 7, 8, 2', 3', 4', 5' – octametóxilflavona também foram observadas interações com o grupo heme, mas com valores inferiores aos valores obtidos nas amostras mencionadas anteriormente. Sendo assim, em todos os extratos, frações ou composto, em que foram obtidos valores de $I_{análise}$ positivos, são os mais promissores à identificação de substâncias em potencial da inibição da β -hematina e conseqüentemente a polimerização do heme.

Quanto à única substância testada pode-se fazer as seguintes considerações: as flavonas pertencem a um grupo de metabólitos

secundários, os flavonóides, com um diversificado número de substâncias com atividades farmacológicas: antiinflamatórios, antibacterianos, antioxidantes e cicatrizantes (Vieira *et al*, 2008), além de comprovada eficácia contra a malária. Um estudo realizado em 2004 por Oliveira e colaboradores provou que o extrato etanólico 80% e as frações ricas em flavonóides das raízes de *Bidens pilosa* são ativos contra as formas eritrocitárias, *in vitro*, de *P. falciparum* e formas eritrocitárias, *in vivo*, de *P. beghei*. Quatro anos depois outro estudo revelou uma flavanona prenilada com atividade antimalárica, a Lonchocarpol A isolada das cascas de *Erythrina fusca* (Khaomek *et al*, 2008). Seus resultados classificaram o composto com sendo de baixa toxicidade e bastante ativo contra as formas eritrocitárias, *in vitro*, de *P. falciparum* (clone K1).

Sobre as flavonas, estudos biológicos demonstraram que esta classe química possui atividade antimalárica; duas flavonas preniladas, denominadas de artocapones A e B, isoladas das cascas de *Artocarpus champeden* apresentaram potente atividade contra *P. falciparum* (clone 3D7) (Widyawaruyanti *et al*, 2007) e flavonas metoxiladas foram capazes de potencializar a atividade antimalárica da cloroquina e qinghaosu (QHS) (Elford *et al*, 1987).

Estes estudos são exemplos da potencialidade antimalárica das flavonas, no entanto, nenhum estudo foi encontrado sobre o mecanismo de ação das mesmas. No teste de inibição *in vitro* de β – hematina, realizado neste trabalho, o resultado obtido de $I_{análise} = 0,1983$ sugere que a 5, 6, 7, 8, 2', 3', 4', 5' – octametóxilflavona provavelmente atua como inibidora da formação da hemozoína através de seu acúmulo nos vacúolos alimentares do parasita, impedindo a polimerização do produto de degradação da hemoglobina, o heme em hemozoína, com consequente desenvolvimento de toxicidade para os parasitas, devido ao aumento do heme livre. Com este resultado podemos presumir que as flavonas possam ser inibidores da hemozoína.

A inibição da formação da β -hematina pelos extratos e frações mencionados, deve-se a presença de substâncias capazes de interagir

com o grupo heme [ferriprotoporfirina IX (Fe(III)PPIX)]. Adams e colaboradores (1996) descreveram que os antimaláricos do tipo 4-quinolinocarbinolamina, como a quinina e a amodiaquina, se complexariam por meio de seus oxigênios carbinólicos com o ferro e por interações do tipo p-p entre os anéis aromáticos. Diante deste estudo, podemos compreender a atividade observada nos extratos de *A. amazonicus*, dado que, os seus constituintes majoritários, os triterpenos (para os extratos clorofórmicos e diclorometano) e saponinas (para os extratos polares), comumente apresentam um carbono carbinólico em suas estruturas. Para as frações *V. cayennensis*, a atividade é justificada pela presença dos compostos fenólicos.

8.5. Avaliação da atividade *in vivo*

No ensaio *in vivo* Fase Hepática e no *in vivo* Fase Eritrocitária foram realizados dois ensaios independentes, sendo que no segundo ensaio as concentrações testadas dos compostos EDCCAa, ECCRAa e ES foram de 12,5 mg/kg/dia porque os camundongos apresentaram sinais de toxicidade ao utilizar a concentração de 25 mg/kg/dia.

Após a inoculação dos esporozoítos e através dos esfregaços sanguíneos realizados verificamos que em todos os compostos testados, e em ambos os ensaios (Fase Hepática e Fase Hepática II) começam a surgir parasitas entre o 4º e o 6º dia enquanto que no controle não tratado acontece no 6º dia.

Ao analisar a **Figura 66** verificamos que nos camundongos tratados com Primaquina (controle positivo) a parasitemia é inexistente enquanto que nos grupos restantes é observável e comparável com a parasitemia média dos camundongos do controle não tratado. No ensaio 1 o controle não tratado apresentou uma parasitemia média de 1,345 % e os compostos EDCCAa, ECCRAa, EACRAa, CMB, ES e CMR de 0,79%, 1,725%, 2,7%, 2,16%, 1,885% e 1,285%, respectivamente. No ensaio 2 o controle não tratado apresentou uma parasitemia média de 5,945% e os compostos

EDCCAa, ECCRAa, EACRAa, CMB, ES e CMR de 1,52%, 8,485%, 5,82%, 3,645%, 2,765% e 7,12%, respectivamente. De acordo com os resultados obtidos os compostos testados não apresentam atividade antimalárica, uma vez que não inibem o desenvolvimento do ciclo hepático (a invasão e o desenvolvimento de esquizontes hepáticos), com exceção do EDCCAa que apresenta uma relevante atividade antimalárica devido a redução de parasitemia em relação ao controle não tratado.

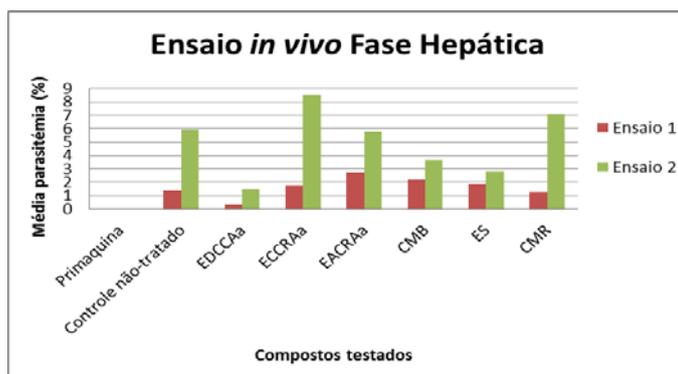


Figura 66. Ensaio *in vivo* Fase Hepática

No ensaio *in vivo* Fase Hepática II foram realizados dois ensaios independentes, mas o ensaio 2 não decorreu como seria de esperar e conseqüentemente não se obteve resultados.

Ao analisar a **Figura 67** verificamos que nos camundongos tratados com Primaquina (controle positivo) a parasitemia é inexistente, assim como no composto EDCCAa, enquanto que nos restantes grupos, também, é observável e comparável com a parasitemia média dos camundongos do controle não tratado. No ensaio 1 o controle não tratado apresentou uma parasitemia média de 1,35% e os compostos, ECCRAa, EACRAa, CMB, ES e CMR de 3,79%, 1,77%, 2,81%, 2,70% e 2,73%, respectivamente. De acordo com os resultados obtidos os compostos testados não apresentam atividade antimalárica, uma vez que não inibem o desenvolvimento de esquizontes hepáticos, porém o EDCCAa inibiu consideravelmente o crescimento dos parasitas, sendo considerado um extrato ativo.

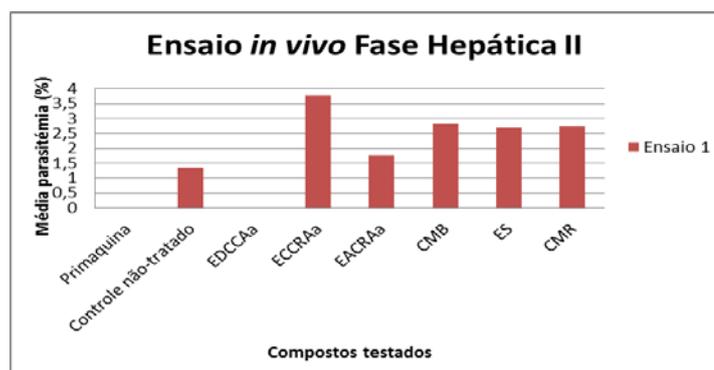


Figura 67: Ensaio *in vivo* Fase Hepática II

No ensaio *in vivo* Fase Eritrocitária após a inoculação com *P. berghei* e os quatro dias consecutivos de administração dos compostos verificamos, através dos esfregaços sanguíneos, que em todos os compostos testados não ocorre supressão da parasitemia. Ao analisar a **Figura 68** verificamos que nos camundongos tratados com Cloroquina (controle positivo) a parasitemia é inexistente enquanto que nos restantes grupos é observável e comparável com a parasitemia média dos camundongos do controle não tratado. No ensaio 1 o controle não tratado apresentou uma parasitemia média de 5,78% e os compostos EDCCAa, ECCRAa, EACRAa, EtOH 80%, ES, CMR de 4,85%, 6,34%, 2,90%, 4,41%, 4,55% e 4,36%, respectivamente. No ensaio 2 o controle não tratado apresentou uma parasitemia média de 2,38% e os compostos EDCCAa, ECCRAa, EACRAa, CMB, ES e CMR de 2,66%, 2,09%, 2,04%, 2,12 %, 2,55% e 1,56%, respectivamente. De acordo com os resultados obtidos os compostos testados não apresentam atividade antimalárica, uma vez que não inibe o ciclo eritrocitário. Na **Figura 69** observamos o tempo de sobrevivência média dos camundongos infectados e tratados, comparativamente ao grupo controle, tendo sido observado que nenhum dos compostos testados aumentou o seu tempo de sobrevivência.

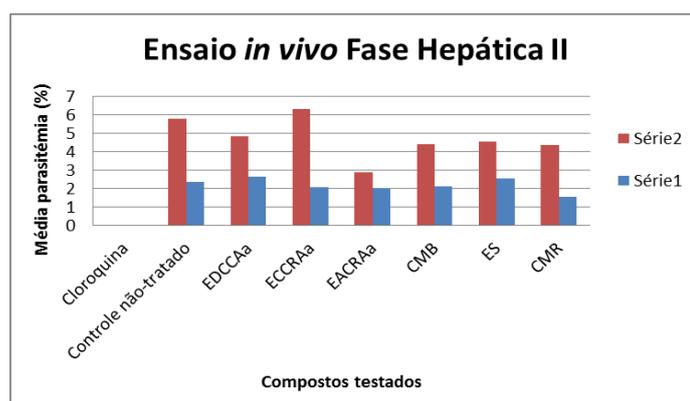


Figura 68: Ensaio *in vivo* Fase Eritrocitária.

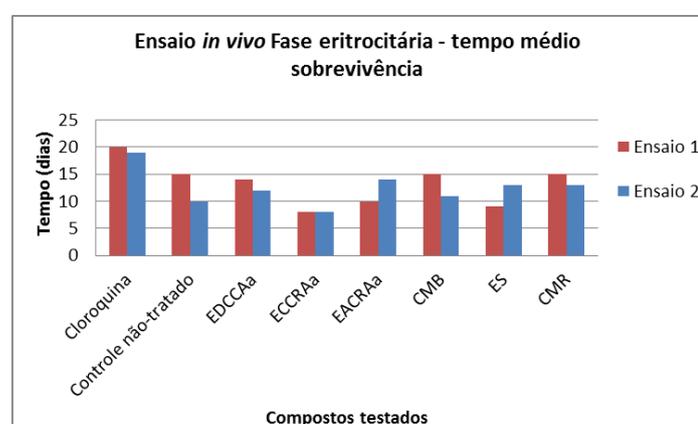


Figura 69: Tempo médio de sobrevivência dos camundongos.

Através dos ensaios realizados, esperava-se esclarecer se a espécie em estudo, de fato atua contra as formas iniciais de desenvolvimento dos esporozoítas *in vivo*, no entanto, lamentavelmente, os resultados obtidos não foram os esperados. Apenas um extrato foi capaz de inibir a invasão e o desenvolvimento do ciclo hepático do *P. berghei*, e este extrato não é caracterizado por substâncias polares em sua composição, uma vez que trata-se do extrato dicloromentano das cascas do caule de *A. amazonicus* (EDCCAa). Em contrapartida os chás, preparados de acordo com os métodos tradicionais, não apresentaram nenhuma atividade antimalárica tanto no ciclo hepático quanto no ciclo eritrocitário. Segundo a literatura, os extratos aquosos e etanólicos das raízes de *A. amazonicus*, não apresentam atividade *in vitro* contra *P. falciparum*, *in vivo* contra *P. berghei* e *in vivo*

contra *P. gallinaceum*, e para estes dois últimos experimentos foi observado que os animais desenvolveram um maior número de parasitas, e morreram mais cedo que o grupo de animais não tratados. Diante destes resultados, foi proposto que os extratos polares sejam ativos contra os esporozoítos, e esta atividade anti-esporozoítica seja a verdadeira explicação para a ação profilática de *A. amazonicus* (Kretlli *et al*, 2001).

É importante considerarmos que o ciclo da malária inicia quando o mosquito inocula os esporozoítos na derme do hospedeiro intermediário no momento do repasto sanguíneo. Esses parasitos atravessam o endotélio vascular e alcançam o fígado em menos de 30 minutos e entram nos hepatócitos e se desenvolvem. Uma vez dentro dos hepatócitos, os esporozoítos são, provavelmente, mais protegidos da ação da droga (Kretlli *et al*, 2001). Neste trabalho, a metodologia utilizada para avaliar a ação antimalárica dos extratos foi em administrar os compostos nos camundongos após a invasão dos esporozoítos, uma vez que os agentes profiláticos atuam na passagem do estágio exoeritrocitário para o eritrocitário, matando o parasita quando esse deixa o fígado (Taranto *et al*, 2006). A metodologia adotada possivelmente explica a ausência de atividade dos extratos polares de *A. amazonicus* na fase hepática, introduzindo uma nova esperança sobre o poder profilático contra a malária de *A. amazonicus*, corroborando com o trabalho realizado em 2008 por Andrade – Neto e colaboradores, quando foi comprovada a ação profilática do extrato etanólico 80% de *A. amazonicus* na fase hepática da doença, tratando, inicialmente os animais e posteriormente expondo os animais à picada dos mosquitos (*Anopheles Stefensi*) infectados.

A espécie também é indicada para o tratamento da Malária, porém os resultados obtidos através do ensaio *in vivo*, na fase eritrocitária, designam para ausência de ação contra *P. berghei*. Estes dados podem ser parcialmente explicados ao fato de muitas plantas usadas tradicionalmente no tratamento da malária, poderem ter outras ações terapêuticas, que não a atividade sobre o parasita (Kretlli *et al*, 2001). Desta forma, assumiremos que o efeito medicinal de *A. amazonicus* seria um efeito fortificante,

estimulante e depurativo, o que ajudaria a combater a malária tanto no processo de cura como impedindo recaídas (Oliveira *et al*, 2011). Tais efeitos foram avaliados e seus resultados são discutidos a seguir.

8.6. Efeito de extratos e substâncias puras isoladas de *A. amazonicus* em modelo de comportamento geral de camundongos.

Os referidos ensaios necessitavam de uma grande quantidade de amostra, em torno de 50 mg, esta fator limitou a realização do experimento em apenas 10 amostras de *A. amazonicus*, a saber: EECERAA, EECRAA, ES, ESPX, EDCCAA, ECCECAA, PECC 4, CMR, CMB e ECCRAA.

Este modelo tem a finalidade de avaliar os efeitos gerais dos extratos e substâncias isoladas de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke, levando em consideração tempo de ação, duração de seus efeitos, toxicidade e confiabilidade. Desta forma, este experimento serviu para nos dar um direcionamento quanto aos outros experimentos que foram realizados posteriormente. A partir dele pudemos definir qual eram os melhores extratos a serem utilizados e seu tempo de ação.

Foram observadas as seguintes reações para cada amostra: no extrato **EECERAA**- 50 % dos camundongos apresentaram uma analgesia leve entre 30-60 minutos; em **EECRAA** todos os animais apresentaram uma analgesia leve entre 30-60 minutos, com redução da motilidade no mesmo período; para o **ES** os animais apresentaram aumento da frequência respiratória desde os 5 minutos de experimento e permaneceram assim até o final do mesmo (90 minutos). Além disto, houve uma analgesia leve que se iniciou aos 30 minutos de experimento e aos 60 minutos estava ausente ou quase imperceptível; no extrato **EDCCAA** além do aumento da frequência respiratória, que se iniciou em média aos 15 minutos, houve também no mesmo período (a partir dos 15 minutos de experimento) aumento da motilidade, espasmos abdominais frequentes e leve analgesia que permaneceram em média até os 60 minutos de experimento.

Outra manifestação de dois dos quatro camundongos foi à redução da defecação e da micção, além de notável ataxia, que surgiram aos 30 minutos de experimento e permaneceram até o final do mesmo (90 minutos).

Para a substância **PECC 4** o único sinal apresentado pelos camundongos era a analgesia, que se iniciou a partir dos 15 minutos de experimento e permaneceu até o final do experimento (90 minutos).

Os resultados observados com **CMR** indicaram aumento da frequência respiratória que se iniciou aos 30 minutos de experimento e persistiu até o final do mesmo. Aos 60 minutos, houve agitabilidade dos animais. Somente aos 90 minutos de teste que se pode notar aumento da atividade exploratória.

Na amostra **ESPX** a única alteração encontrada foi o aumento da frequência respiratória que se iniciou aos 30 minutos de experimento e durou até o final do mesmo aos 90 minutos.

No **CMB** houve aumento da frequência respiratória com aumento da atividade exploratória. Este comportamento persistiu até os 90 minutos.

ECCRAa apresentou uma diminuição da motilidade nos primeiros 60 minutos com leve analgesia, após os 60 minutos até os 90 minutos houve uma melhora na motilidade, enquanto que, para o **ECCECAa** nos 10 primeiros minutos foi observado, somente, aumento da frequência respiratória, nos próximos 80 minutos, além da frequência respiratória, houve também aumento da taxia e ptose, uma analgesia leve com diminuição da defecação e micção.

As propriedades energéticas de *A.amazonicus* já foram mencionadas por Santos e colaboradores (2005), e desta maneira foi descrita: “Espumosa como cerveja, amarga que nem chimarrão, adocicada quando chega à boca. Seus efeitos imediatos, fim da fadiga, tristeza vai embora, disposição para o trabalho, forças redobram. A cabeça fica no lugar, raciocínio é perfeito. Não é alucinógena nem tóxica. Eis aí que parece a poção mágica da felicidade”. Inclusive foi citado que alguns pesquisadores após beberem do chá de saracurá-mirá caminharam por três horas e meia

na mata sem reclamarem de cansaço e ainda com bom humor. É de sabedoria e de uso tradicional entre os índios e caboclos da região do Rio Negro e também em outras áreas da Amazônia, que o chá das raízes e do caule de *A. amazonicus* restabelece o cansaço e a fadiga.

Diante destas informações e confrontando com os resultados preliminares obtidos pelo modelo de comportamento geral de camundongos, pode-se concluir que os extratos EDCCAA, CMR, ESPX e CMB apresentaram respostas de ação estimulante e energética pela observação de aumento da frequência respiratória, agitabilidade dos animais, aumento da atividade exploratória, aumento da motilidade, espasmos abdominais com redução da defecação e da micção.

Os resultados positivos para o CMR e CMB, são bastante promissores na comprovação da eficácia de *A. amazonicus* como estimulante, pois a metodologia de preparação dos dois extratos foi de acordo com o uso popular (Ver Materiais e Método, pg 31), además o poder energético dos chás pode está relacionado com sua ação antimalárica, visto a espécie não curar propriamente a doença, mas proporcionar o restabelecimento da energia (Santos *et al*, 2005).

8.6.1. Efeito na atividade hipnosedativa no modelo de sono induzido por pentobarbital

Os animais foram divididos em seis grupos (n = 6), além do grupo controle salina (n = 6). Os extratos utilizados foram: Grupo 1 = CMR; Grupo 2 = CMB; Grupo 3 = ECCRAa; Grupo 4 = EDCCAA; Grupo 5 = ES; Grupo 6 = ESPX.

Nos grupos 1, 2, 3, 4 e 5 não se pode observar sedação completa dos animais. O decúbito dorsal não foi à posição na qual os mesmos permaneceram. Houve uma leve sedação de todos os animais, mas estes se mantiveram acordados.

Nos grupos 3, 4 e 5 houve aumento nítido da frequência respiratória durante todo o experimento, com diminuição, mas não extinção, em média, aos 89 minutos de experimento.

Embora os animais não estivessem em sedação completa (uma vez que os mesmos ao serem colocados sobre a bancada não permaneciam em decúbito dorsal e ainda tinham capacidade de se locomoverem pela bancada, mesmo com movimentos lentificados e esteriotipados) podia-se notar certo grau de sedação leve. Quando eram colocados na gaiola, os animais ficavam imóveis, porém ao toque leve movimentavam-se por toda a gaiola.

Não houve sedação completa por longos períodos nos grupos 2, 3, 4 e 5.

Nos grupos salina e 6, houve sedação completa e duradoura em 80% dos animais.

Conforme é mostrado na **Figura 70**, notou-se, com a realização deste experimento, que o período de latência não diferiu entre os extratos, no entanto, todos os extratos diferiram do veículo.

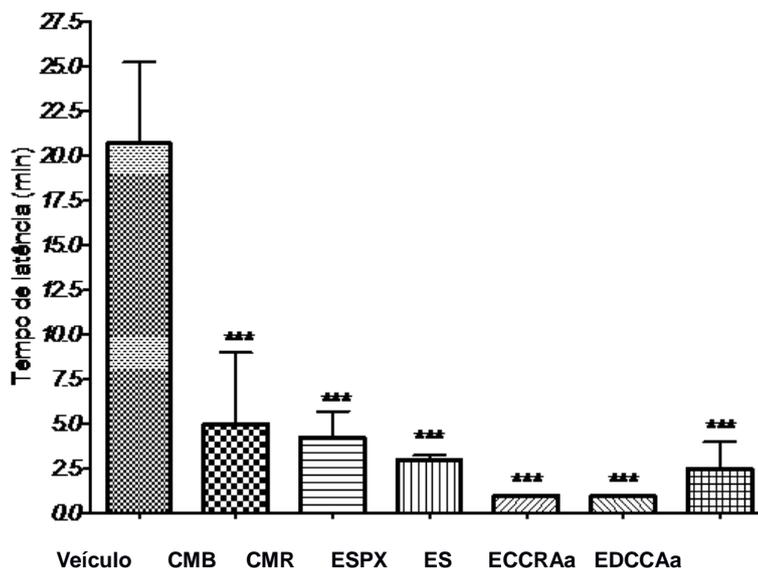


Figura 70. Efeito de diferentes frações de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke, na concentração de 50 mg/kg, no tempo de latência do sono no modelo de sono induzido por pentobarbital em camundongos. *** $p < 0,001$ vs Veículo. (ANOVA, seguido do Teste de Multi-comparação de Newman-Keuls). Onde: CMB = Chá método Brandão; CMR = Chá Método Rodrigues; ESPX = Extrato Saponínico pós XAD; ES = Extrato Saponínico; ECCRAa; EDCCAa.

Quanto ao tempo de sono, a **Figura 71** mostra que todos os extratos diferem do veículo, no entanto, os extratos não diferem entre si, com exceção do extrato saponínico (ESPX). Assim, os grupos entre si diferem do grupo ESPX.

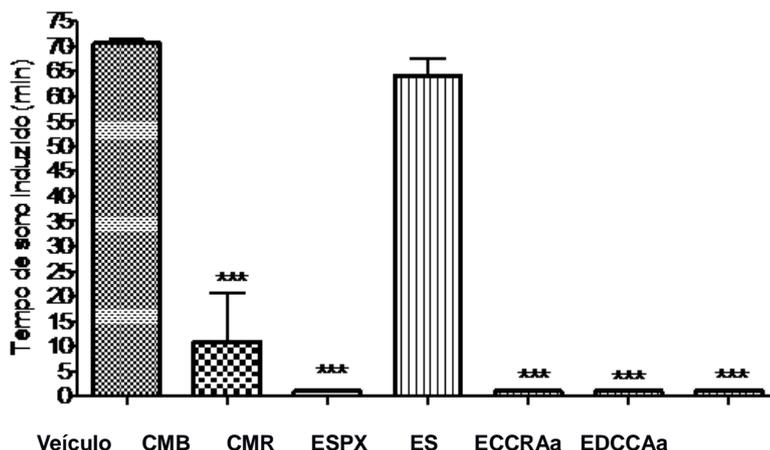


Figura 71. Efeito de diferentes frações de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke, na concentração de 50 mg/kg, no tempo total de sono induzido por pentobarbital em camundongos. *** $p < 0,001$ vs Veículo e EST. (ANOVA, seguido do Teste de Multi-comparação de Newman-Keuls). Onde: CMB = Casca pelo método Brandão; CMR = Casca pelo método Rodrigues; ESPX = Extrato Saponínico pós-XAD; ES = Extrato Saponínico; ECCRAa; EDCCAa.

A tabela 21 demonstra estatisticamente a relação entre extrato usado e tempo de latência e o tempo de sono.

Tabela 21. Relação estatística entre o tempo de latência e o tempo de sono.

Amostras	Tempo de sono	Tempo de latência
Veículo	70,5 +/- 0,87	20,67 +/- 4,57
CMB	10,80 +/- 9,8 ***	5,0 +/- 4,0
CMR	1,0 +/- 0,0 ***	4,25 +/- 1,46
ESPX	64,0 +/- 3,49	3,0 +/- 0,26
ES	1,0 +/- 0,0 ***	1,0 +/- 0,0
ECCRAa	1,0 +/- 0,0 ***	1,0 +/- 0,0
EDCCAa	1,0 +/- 0,0***	2,5 +/- 1,5

O teste do tempo de sono induzido por pentobarbital permite verificar a atividade sedativa/hipnótica de uma substância, considerando que uma droga já apresente efeitos sedativo/hipnóticos. Neste teste é verificado o efeito sinérgico, ou seja, quando duas drogas que possuem o mesmo efeito são utilizadas juntas espera-se potencialização do efeito, no caso deste modelo, o tempo de sono. Portanto, o princípio deste teste é verificar se uma droga possui a capacidade de potencializar o efeito sedativo e hipnótico do pentobarbital sódico (Riley, Spinks, 1958), e a droga, portanto que diminuir a atividade sedativa/hipnótica do pentobarbital sódica apresenta atividade antidepressora do sistema nervoso central (SNC), o que no caso da *A. amazonicus* comprovaria seus efeitos energéticos, estimulantes, bem estar e de bom humor.

Dos extratos avaliados de *A. amazonicus* os resultados mostraram que houve uma diminuição da latência do sono e diminuição do tempo de sono, exceto para o ESPX, que comparativamente ao veículo, praticamente não apresentou nenhuma alteração na duração do sono com a dose utilizada. A literatura afirma que a diminuição da latência e o aumento na duração do sono são típicos de drogas depressoras do SNC (Willianson *et al*, 1996), com base na análise dos resultados observou-se que o ESPX apresentou atividade depressora, mas não causa sedação ou hipnose. Portanto neste extrato a metodologia adotada (Ver Materiais e Método, p. 31) retirou as substâncias ativas para este modelo.

8.6.2 Efeito dos extratos e frações isoladas de *Ampelozizyphus amazonicus* na atividade motora utilizando o modelo do Campo Aberto

Os animais foram divididos em três grupos (n=4), além dos grupos salina e controle (administração de pentobarbital). A dose de escolha foi a de 50mg/kg.

Este teste avalia a atividade exploratória dos animais: sua movimentação espontânea (número de cruzamentos, com as quatro patas,

entre as divisões dos campos) na periferia (atividade exploratória) e no centro (atividade ansiolítica ou sedativa), o número de comportamentos de auto-limpeza, de levantar, assim como o tempo em que o animal permaneceu parado (imobilidade = sedação ou medo) (Montgomery, 1955).

Dados na literatura demonstraram que o aumento na atividade locomotora espontânea dá uma indicação do nível de excitabilidade do sistema nervoso central (Mansur *et al*, 1971), comprovando o efeito estimulante da droga. No presente estudo, os extratos testados apresentaram um maior tempo sem movimentação na caixa em comparação com o controle (**Figura 72**) e (**Figura 73**), tal comportamento pode estar relacionada com a sedação resultante da depressão do sistema nervoso central.

No entanto, levando em consideração aos experimentos anteriores, que demonstraram que alguns extratos de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke apresentam atividade estimulatória sobre o comportamento dos camundongos, tal teste foi definido como inconclusivo, uma vez que está em oposição ao que foi relatado nos experimentos anteriores. Uma alternativa desta resposta pode estar relacionada à via de administração utilizada neste modelo, que foi a via intraperitonal e, portanto, desviando a via metabólica de primeira passagem, que possivelmente a amostra deva sofrer quando administrada pela via oral. Desta forma, é importante a realização do mesmo experimento, onde as amostras devam ser administradas por via oral.

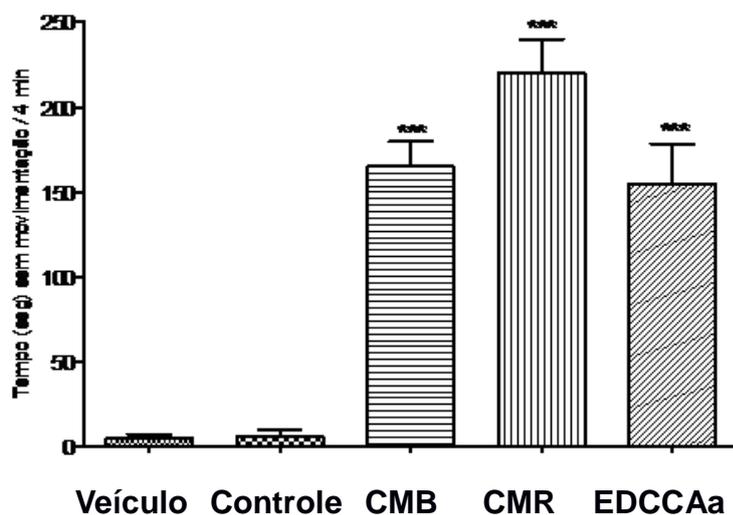


Figura 72. Efeito de frações isoladas de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke no comportamento animal de camundongos no modelo do Campo Aberto: movimentação na caixa. *** $p < 0,001$ vs Veículo e Controle.

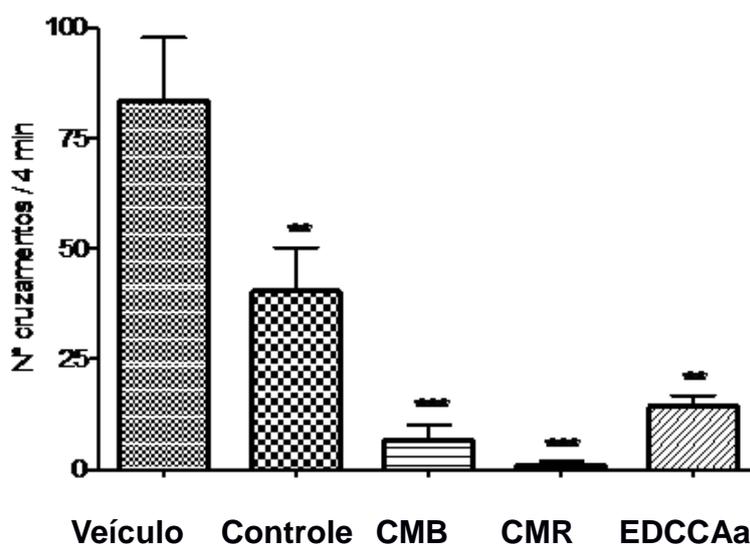


Figura 73. Efeito de frações isoladas de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke no comportamento animal de camundongos no modelo do Campo Aberto: números de cruzamentos na caixa. *** $p < 0,001$ vs Veículo e Controle.

Em alguns estudos o ato de levantar de roedores tem sido focalizado como um aspecto de comportamento exploratório (Johansson *et al*, 1989), porém em outros estudos verificamos que a diminuição do ato de levantar pode estar relacionada ao efeito ansiolítico da droga (Hugues, 1972). De acordo com os resultados obtidos (**Figura 74**) os extratos analisados apresentaram propriedades ansiolíticas, o controle de ansiedade e estado

de alerta relaxando os músculos comprovam o uso popular de *A. amazonicus* como revitalizante. Através dos ditos populares sabe-se que o chá da referida espécie provoca “um estado de bem estar, a cabeça fica no lugar e o raciocínio é perfeito” (Santos *et al*, 2005).

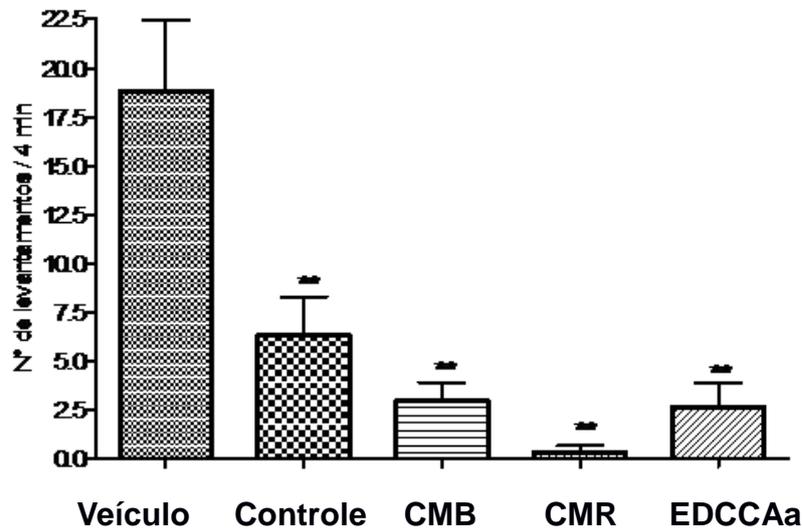


Figura 74. Efeito de frações isoladas de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke no comportamento animal de camundongos no modelo do Campo Aberto: números de vezes que o animal levanta o corpo na caixa. ** $p < 0,01$ vs Veículo.

Na literatura é referido que o aumento da autolimpeza é observado em roedores apreensivos, e em um grande número de estudos, pesquisadores observaram que drogas ansiolíticas reduzem a autolimpeza no campo aberto (Dunn *et al*, 1981; Moody *et al*, 1993). Conforme pode ser observado na **Figura 75**, os resultados dos chás **CMB** e **CMR** diferiram do veículo, principalmente para o chá CMR, o que reafirma a atividade ansiolítica destes extratos, porém para o extrato EDCCAa verificamos um menor efeito ansiolítico.

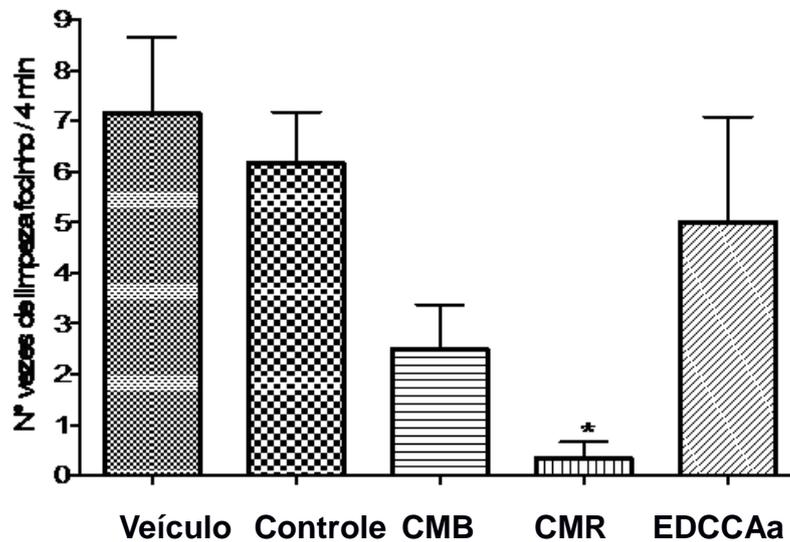


Figura 75. Efeito de frações isoladas de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke no comportamento animal de camundongos no modelo do Campo Aberto: números de vezes que o animal limpa/coça o focinho na caixa. * $p < 0,05$ vs Veículo.

O mesmo ensaio foi realizado, porém as amostras foram administradas por via oral, nas concentrações de 10mg/kg e 50 mg/kg. Em relação ao número de cruzamentos, com as quatro patas, dentro do campo aberto, bem como o comportamento de levantar-se e de auto-limpeza, foi observado que os animais tratados com ECCRAa apresentaram intensa atividade ($34,67 \pm 6,74$) em relação ao grupo controle, tanto em relação ao número de cruzamentos quanto ao tempo em que os animais exerciam alguma atividade característica exploratória. Esta fração e o EDCCAa ($129 \pm 2,64$), foram capazes de aumentar o estímulo exploratório nos animais tratados de maneira mais significativa que as demais frações, embora todas tenham apresentado respostas exploratórias mais ativas quando comparadas ao grupo controle (**Figura 76**).

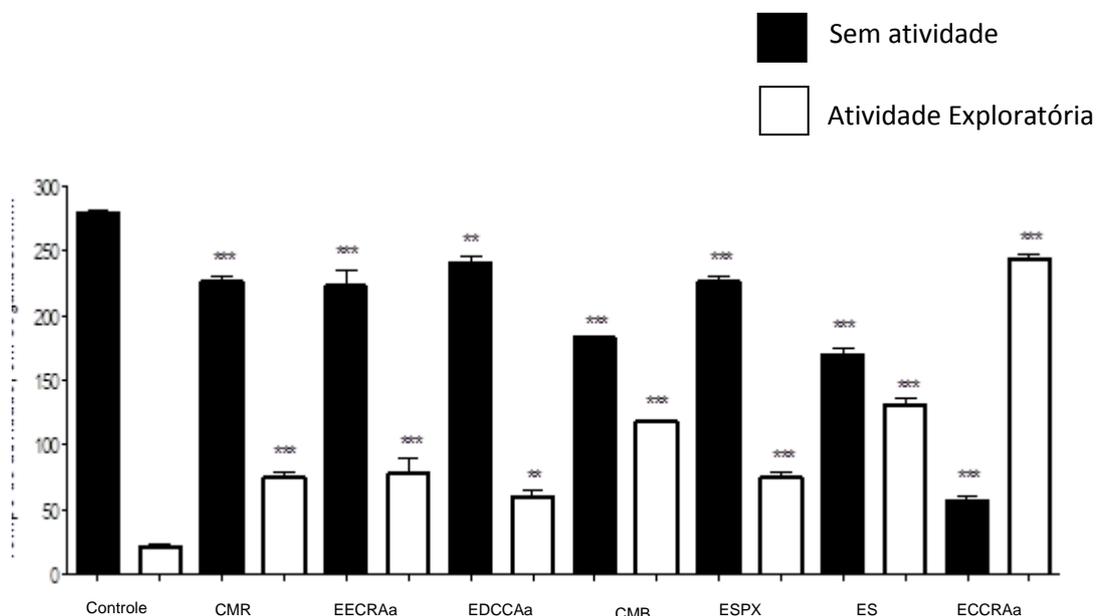


Figura 76. Tempo, em segundos, do comportamento exploratório ou parado dos camundongos (n=6) submetidos ao teste do campo aberto 60 minutos após tratamento, via oral, do veículo (controle) das diluições das amostras e das amostras testes, nas concentrações de 10ml/kg e 50 mg/kg, respectivamente. Teste Estatístico de Comparação Múltipla de Tukey, onde ** p<0,01 e *** p<0,001 vs os respectivos controles.

No teste de campo aberto, a análise de variância sobre os camundongos tratados com ECCRAa mostrou aumento significativo quanto ao tempo de motilidade e redução no que se refere ao tempo de imobilidade, dados muito mais relevante do que os apresentados pelo demais grupos experimentais, quando tratados por via intraperitoneal. Neste teste mostrou um aumento quanto ao tempo de exploração dos camundongos, sugerindo um compartilhamento de mecanismos neurais comum, decorrentes da ativação de mecanismos responsáveis pelos processos neurobiológicos básicos que aumentam a atividade exploratória e a movimentação espontânea. Desta forma, a locomoção total e a atividade vertical (*rearing*) que, quando aumentadas, encontram-se relacionadas aos efeitos de drogas estimulantes (Prut *et al*, 2003). Foi observado um aumento significativo do número de cruzamentos totais dos quadrantes quando comparado com o grupo tratado com solução salina (controle), esta exploração está relacionada com a excitabilidade do SNC, reafirmando a atividade estimulante da amostra. Estes dados corroboram com o uso popular da espécie quanto ao seu poder energético (Santos *et al*, 2005), este estudo permitiu evidenciar pela primeira

vez o efeito estimulante e energético de *A. amazonicus*. Quanto ao efeito antimalárico da espécie, no que diz respeito ao tratamento da doença, *A. amazonicus* deve auxiliar na recuperação do paciente com malária devido a sua ação imunoestimulante (Oliveira *et al*, 2011), de fato as saponinas podem ativar o sistema imunológico humano (Kaiser *et al*, 2009) e conforme observado nas análises por LC-MS, as amostras polares são ricas em saponinas. Em um trabalho realizado por Peçanha e colaboradores (2013) foi comprovada as propriedades imunomodulatórias da espécie, que apresentou capacidade de estimular a produção de linfócitos B quando os ratos foram infectados com *P. chabaudi*.

A via de administração foi essencial para a observação do efeito estimulante de *A. amazonicus*.

9. CONCLUSÕES

Os resultados apresentados neste trabalho apontam positivamente para a utilização do uso de plantas medicinais na medicina tradicional e na busca de novos medicamentos contra a malária. A abordagem utilizada proporcionou informações relevantes sobre a atividade biológica das espécies estudadas, além do contributo ao conhecimento químico de *A. amazonicus* e *V. cayennensis*.

Os estudos químicos e biológicos realizados com as espécies *A. amazonicus* e *V. cayennensis* permitem as seguintes conclusões:

- a) Da espécie *A. amazonicus* foi possível isolar nove substâncias, denominados de lupeol, betulina, ácido betulínico, ácido melalêucico, ácido 3 β ,28 diidroxi-lup-20(29)-eno-27-óico, mistura dos esteroides - sitosterol/estigmasterol, 5, 6, 7, 8, 2', 3', 4', 5' – octametóxi flavona e 6-hidróxi-7 metoxicumarina (Isoescopoletina), vale a pena ressaltar que estas duas substâncias são descritas pela primeira vez para o gênero e contribuem para a química da família.
- b) Do ECFVc foi possível obter três substâncias, denominadas de friedelina, vismina e 1,3,8 triidroxi-4,5,7-triisoprenil-7-metil-antrona (harunganol B), esta última é descrita pela primeira vez no gênero *Vismia*.
- c) Nos estudos biológicos verificou-se que o ECCRAa exibiu atividade antimalárica pronunciada no modelo *in vitro* tanto na fase hepática, com IC₅₀ de 30,1 μ g/mL, quanto a fase sanguínea com IC₅₀ de 13,79 para 3D7 e 14,63 μ g/mL para Dd2. O triterpeno ácido betulínico, isolado deste extrato, apresentou uma elevada atividade antimalárica, podendo ser o responsável pela ação antiplasmodial encontrada no extrato.
- d) O ácido betulínico foi quantificado nos extratos de *A. amazonicus*, através da cromatografia líquida de alta eficiência, e foi encontrado em maior quantidade nos ECCRAa e EDCCAAa, onde os resultados biológicos frente ao *P. falciparum* foram os mais promissores. Para o

ECCRAa, o ácido betulínico está presente em uma concentração de 300,85 µg/mL e no EDCCAA, 268,76 µg/mL, para este último extrato a atividade antimalárica foi menor, com IC₅₀ de 40,50 µg/mL para 3D7 e 34,52 µg/mL para Dd2 , devido a menor quantidade de ácido betulínico presente.

Estes resultados suportam a hipótese de que a atividade antimalárica é atribuída, pelo menos em parte, a presença do ácido betulínico. Embora não podemos descartar a possibilidade de outros compostos também participarem desta ação, mesmo os que se apresentam em pequenas quantidades que não nos permitiram o isolamento, identificação e disponibilidade para o teste biológico.

- e) Os resultados obtidos nos experimentos de avaliação da atividade antimalárica *in vivo*, na fase hepática e na fase eritrocitária, frente à *P. berghei*, contrariam as nossas expectativas, já que, os extratos foram inativos, com exceção do EDCCAA que apresentou uma relevante atividade antimalárica devido a redução de parasitemia. Porém os chás, preparados conforme o conhecimento popular não apresentaram atividade. Algumas explicações concernentes a estes resultados podem ser abordadas: a via de administração adotada neste trabalho foi à via intraperitoneal, e, portanto, pode ter sido desviada a via metabólica de primeira passagem, que possivelmente a amostra deva sofrer quando administrada pela via oral; as amostras foram administradas no 1º dia, após a inoculação dos esporozoítos. Provavelmente a espécie em estudo possua atividade anti-esporozoítica e ela seja a verdadeira explicação para a ação profilática de *A. amazonicus*, portanto as amostras a serem testadas, devem ser primeiramente administradas nos animais, posteriormente deve ser feita a inoculação do esporozoítos.
- f) Os resultados obtidos pelos estudos farmacológicos de *A. amazonicus*, em modelo de comportamento geral de camundongos e modelo campo aberto, permitiram comprovar os efeitos estimulante, energético e fortificante da espécie, porém a via de administração

oral foi imprescindível para observação destas atividades. Este resultado farmacológico pode está associado à presença de saponinas nas amostras, pois conforme os resultados obtidos por LC-MS, esta classe de metabólitos é majoritária nos extratos polares.

- g) A ação imonoestimulante da planta deve auxiliar na recuperação do paciente com malária.

Por fim, este trabalho proporcionou informações importantes sobre o efeito antimalárico das espécies estudadas, abrindo perspectivas para a continuação da pesquisa, fato de importante relevância uma vez que a resistência do *Plasmodium falciparum* torna o arsenal profilático e terapêutico contra a malária bastante restrito.

10. ANEXOS

10.1. PREPARO DOS REAGENTES

10.1.1. Vanilina Sulfúrica (Mattos, 1997).

O revelador é constituído por duas soluções:

Solução A - 1g de vanilina, solubilizada em 100 mL de etanol

Solução B - 5g H₂SO₄ concentrado, dissolvidos em 100 mL de etanol (96%) sob resfriamento.

A cromatoplaça foi pulverizada com a solução A, seguida da solução B e aquecida por 10 min a 100 °C (reagente geral; saponinas: coloração rósea ou azul (núcleo triterpenoidal oleanólico)).

10.1.2 Komarowsky (Brandão, 1991).

O revelador é constituído por duas soluções:

Solução A - ácido sulfúrico a 50%.

Solução B - solução de 4-hidroxibenzaldeído a 2%, em metanol.

Antes do uso, misturam-se 2 mL de solução A com 3 mL de solução B.

A cromatoplaça foi pulverizada com a mistura das soluções A e B e aquecida por 10 min a 60 °C (saponinas e as agliconas desenvolvem coloração do amarelo ao azul).

10.1.3. NP/PEG (Wagner, 1996)

O revelador é constituído por duas soluções:

Solução A - solução metanólica de difenil-boriloxi-etilamina a 2%.

Solução B - solução etanólica de polietilenoglicol-4000 a 5%.

A cromatoplaça foi pulverizada com a solução A, seguida da solução B; depois de alguns minutos, sob luz ultravioleta a $\lambda=254$ nm observa-se a intensificação da fluorescência, que revela a presença de flavonóides e outros compostos fenólicos.

10.1.4. Reagente de Lieberman Burchard (Wagner, 1996)

Foram misturados, sob refrigeração, 5 mL de anidrido acético, 5 mL de ácido sulfúrico concentrado e 50 mL de etanol.

A cromatoplaça foi pulverizada com a solução acima e, em seguida, aquecida por 10 min a 100°C (específico para triterpenos e esteroides. Triterpenos pentacíclicos desenvolvem coloração de rósea forte e esteroides, coloração esverdeada).

11. REFERÊNCIAS

- ABDELRAHMAN, S.H. Trypanocidal Activity of Some Sudanese Medicinal Plants against Experimental *Trypanosoma evansi* Infection. *Research Journal of Medicinal Plant*, (5): 756-763, 2011.
- ABDEL-GAWAD, M.M; EL-SAYED, M. M; ABDEL-HAMEED, E. S. Moluscicidal steroidal saponins and lipid content of *Agave decipiens*. *Fitoterapia*, (70): 371-381.
- ACHAN, J; TALISUNA A.O; ERHART, A; YEKA, A; TIBENDERANA, J.K; BALIRAINÉ, F.N; ROSENTHAL, P.J; D'ALESSANDRO, U. Quinine, an old anti-malarial drug in a modern world: role in the treatment of malaria. *Malaria Journal*, (10):144, 2011.
- ADAMS, P.A; BERMAN, P. A. M; EGAN, T. J; MARSH, P. J; SILVER, J. *J. Inorg. Chem*, 63-69, 1996.
- AUGUSTIN, J.M; KUZINA, V; ANDERSEN, S.B; BAK, S; Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. *Phytochemistry*, (72): 435-457, 2011.
- AHARONI, A; JONGSMA, M.A; BOUWMEESTER, H.J. Volatile science? Metabolic engineering of terpenoids in plants. *TRENDS in Plant Science*, (10): 594-602, 2005.
- ÁLVAREZ, R.E; JIMENEZ, G.O.J; POSADA, C.M.A; ROJANO, B.A; GIL, J.H.G; GARCÍA, C.M.P; DURANGO, D.L.R. Antioxidant activity and phenolic content of extracts from berries of two species of *Vismia* genus (Guttiferae). *Vitae*, 1 (15): 165-172, 2008.
- ALVARENGA, N; FERRO, E.A. Bioactive triterpenes and related compounds from Celastraceae. *Studies in Natural Products Chemistry*, (30), 2005.
- AMARAL, A.C.F.; FERREIRA, J.L.P.; MOURA, D.F.; CARVALHO, J.R.; OHANA, D.T.; ECHEVARRIA, A.; ROSÁRIO, V.E.; LOPES, D.; SILVA, J.R.A..Updated studies on *Ampelozizyphus amazonicus*, a medicinal plant used in the Amazonian Region. *Pharmacognosy Reviews*, (2): 308-316, 2008.

- AKKAWI, M; JABER, S; ABU-REMELEH, Q; ENGEU, O. P; LUTGEN, P. Investigation of *Artemisia Annu*a and *Artemisia Sieberi* Water Extracts Inhibitory Effects on B-Hematin Formation. *Med Aromat Plants*, 1 (3): 150, 2014.
- AJAIYEoba, E. O; ABALOGU, U. I; KREBS, H. C; ODUOLA, A. M. *In vivo* antimalarial activities of *Quassia amara* and *Quassia undulata* plants extract in mice. *J. Ethnopharmacology*, (67): 321-325, 1999.
- ALMEIDA, E. R. Plantas medicinais brasileiras: conhecimentos populares e científicos. São Paulo: Hemus, 225-226, 1993.
- ALMEIDA, M. E. Estudo do efeito do extrato de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke em modelos experimentais de comportamento. 15. Projeto de iniciação científica – Universidade Federal do Amazonas, Manaus.
- ANDRADE-NETO, V.F; BRANDÃO; M.G.L, ROSÁRIO; V.E, KRETTLI; A.U. *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke (Rhamnaceae), a medicinal plant used to prevent malaria in the Amazon Region, hampers the development of *Plasmodium berghei* sporozoites. *International Journal for Parasitology*, (38): 1505 – 1511, 2008.
- ASSOGBA, B. S; DJOGBÉNOU, L; SAIZONOU, J; DIABETÉ, A; DABIRÉ, R.K; MOIROUX, N; GILLES, J. R. L; MAKOUTODÉ, M; BALDET, T. Characterization of swarming and mating behaviour between *Anopheles coluzzii* and *Anopheles melas* in a sympatry area of Benin. *Acta Tropica*, (132): 53–63, 2014.
- ATTIOUA, B; WENIGER, B; CHABERT, P. Antiplasmodial activity of constituents isolated from *Croton lobatus*. *Pharmaceutical biology*, 4 (45): 263-266, 2007.
- BALLABH, B; CHAURASIA, O.P; AHMED, Z; SINGH, S.B. Traditional medicinal plants of cold desert Ladakh—Used against kidney and urinary disorders. *Journal of Ethnopharmacology*, (118): 331–339, 2008.
- BARBOSA, L. M. C e SOUTO, R. N. P. Aspectos ecológicos de *Anopheles* (*Nyssorhyncus*) *darlingi* Root 1926 e *Anopheles* (*Nyssorhyncus*) *marajoara* Galvão e Damasceno 1942 (Diptera:

- Culicidae) nos bairros Marabaixo I e Zerão, Macapá, Amapá, Brasil. *Biota Amazônia*, 1 (1): 19-25, 2011.
- BARROS, F. M. C. Variabilidade sazonal, atividade antimicrobiana, fracionamento bio-guiado, isolamento e elucidação estrutural dos principais constituintes do óleo essencial de *Lippia Alba* (MILL.) N. E. Brown. 162p. Dissertação de mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria, RS. 2008.
 - BEZIVIN, C; TOMASI, S; LOHEZIC-LE DEVEHAT, F; BOUSTIE, J. Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines. *Phytomedicine*, 6 (10): 499-503, 2003.
 - BILLA, A. R; YUSUF, A. W; BRACA, A; KEITA, A; MORELLI, I. New prenylated anthraquinones and xanthenes from *Vismia guineensis*. *J. Nat. Prod*, (63): 16 – 21, 2000.
 - BOTTA, B; MONACHE, G. D; MONACHE, F. D; BETOLLO, G. B. M; MENICHINI, F. Vismione H and prenylated xanthenes from *Vismia guineensis*. *Phytochemistry*, (25):1217-1219, 1986.
 - BOONSRI, S; KARALAI, C; PONGLIMANONT, C; OPAS – KANJANA, A; CHANTRAPROMMA, K. Antibacterial and cytotoxic xanthenes from the roots of *Cratoxylum formosum*. *Phytochemistry*, (67) 723 – 727, 2006.
 - BRANDÃO, M.G.L. Estudo Químico das raízes do *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke planta utilizada popularmente na Amazônia como preventivo da malária. *Tese de Doutorado*, Belo Horizonte, Minas Gerais - Brasil UFMG-ICEx/DQ.00223 T.00047, 1991.
 - BRANDÃO, M. G. L; LACAILLE-DUBOIS, M-A; TEXEIRA, WAGNER, H. A dammarane-type saponin from the roots of *Ampelozizyphus amazonicus*. *The International Journal of Plant Biochemistry*, (4) 34: 1123-1127, 1993.
 - BRUNETON, J. Triterpenes and steroids. *J. pharmacognosy phytochemistry*, (2) : 661-719, 1999.
 - BURROWS, J. N; CHIBALE, K; WELLS, T. N. C. The State of the Art in Anti-Malarial Drug Discovery and Development. *Current Topics in Medicinal Chemistry* (11) 1226-1254, 2011.

- CABRAL, A. C; FÉ, N. F; SUARÉZ-MUTIZ, M. C; BÓIA, M. N; CARVALHO – COSTA, F. A. Increasing incidence of malaria in the Negro River basin, Brazilian Amazon. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, (104) : 556–562, 2010.
- CALVOSA, V. S. I; ADAGU, I. S; PÓVOA, M. M.. *Plasmodium falciparum*: emerging mefloquine resistance in vitro in Para State, north Brazil. *Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene*, (95): 330-331, 2001.
- CARLINI E. A, CONTAR J de D. P, SILVA-FILHO A. R, DA SILVEIRA-FILHO N. G, FROCHTENGARTEN M. L, BUENO O. F. Pharmacology of lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf.). I. Effects of teas prepared from the leaves on laboratory animals. *J Ethnopharmacol*, (17): 37- 64, 1986.
- CARMO, D. F. M. Lisboa: Universidade Nova de Lisboa, 2009.
- CARVALHO, M.G; VELANDIA, J.R; OLIVEIRA, L.F; BEZERRA, F.B. Triterpenos isolados de *Eschweilera longipes* Miers (Lecythidaceae). *Química nova*, (21): 1998.
- CARRAZ ET AL. A plant-derived morphinan as a novel lead compound active against malaria liver stages. *Plos medicine* 3: 2392-2402, 2006.
- CÁUPER, G. C. B. Biodiversidade Amazônica. Volume 1, Manaus-AM, 2006.
- CHARKRABORTY, A.; BRANTNER, A.; MUKAINAKA, T.; NOBUKUNI, Y.; KUCHIDE, M.; KONOSHIMA, T.; TOKUDA, H.; NISHINO, H. Cancer chemopreventive activity of *Achyranthes aspera* leaves on Epstein–Barr virus activation and two-stage mouse skin carcinogenesis. *Cancer Letters*, (177) 1-5, 2002.
- CHOWDARI, AJAY. Phytochemical and anti-cancer activity of fruits of *Ziziphus jujube* Mill, 2010.
- CORRÊA, G. M. Contribuição à validação de uma planta utilizada popularmente como preventivo da malária: *ampelozizyphus amazonicus*. Dissertação de mestrado, Manaus-AM, 2007.

- CORRÊA, M.P. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. *Colaboração de Leonan de A. Penna*. Rio de Janeiro: IBDF, 1984.
- COSTA, F.T.M; LOPES, S.C.P; ALBRECHT, L; ATAÍDE, R; SIQUEIRA, A. M; SOUZA, R. M; RUSSELL, B; RENIA, L; MARINHO, C.R.F., LACERDA, M.V.G.. On the pathogenesis of *Plasmodium vivax* malaria: Perspectives from the Brazilian Field. *International Journal for Parasitology*, 42: 1099–1105, 2012.
- COSTA, T.O.G; ALMEIDA, R.A; KOOLEN, H.H.F; SILVA, F.M.A; PINTO, A.C. Constituintes químicos do caule de *Protium hebetatum* (Burseraceae). *Acta amazônica*, 42(4): 557 – 560, 2012.
- COSTA, M.S; KIRALJ, R; FERREIRA, M.M.C. Estudo teórico da interação existente entre artemisinina e o heme. *Quim. Nova*, (30): 25-31, 2007.
- COSTA, P. R. R. Produtos naturais como ponto de partida para a descoberta de novas substâncias bioativas: Candidatos a fármacos com ação antiofídica, anticâncer e antiparasitária. *Rev. Virtual Quim*, (1): 58-66. Data de publicação na Web: 2 de Fevereiro de 2009.
- CRONQUIST, A. An integrated system of classification of flowering plants. *New York: Columbia University* : 1260 p, 1981.
- CRUZ, L. R; SPANGENBERG, T; LACERDA, M. V. G; WELLS, T. N. C. Malaria in South America: a drug discovery perspective, (12): 168, 2013.
- CULLETON, Richard. A pictorial guide to rodent malaria parasites. 2005.
- DAI, Y; HARINANTENAINA, L; BOWMAN, J. D; FONSECA, I, O; BRODIE, P. J; GOETZ, M; CASSERA, M. B; KINGSTON, D. G. I. Isolation of antiplasmodial anthraquinones from *Kniphofia ensifolia*, and synthesis and structure–activity relationships of related compounds. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 1 (1): 269-276, 2014.
- DANIEL-RIBEIRO C. T, LACERDA M. V, OLIVEIRA-FERREIRA J. *Plasmodium vivax* malaria in the Brazilian Amazon: some aspects of its epidemiology, clinical spectrum and naturally induced immune responses. *Bull Soc Pathol Exot*, (101) : 243–8, 2008.

- DELLE MONACHE, D. F. Chemistry and biological activity of secondary metabolites of Vismieae. *Revista Latinoamericana de Química*, (16): 5-15, 1985.
- DIDEROT, N. T, SILVERE, N; ETIENNE, T. Xanthonas as therapeutic agents: chemistry and pharmacology. *Lead molecules from natural products: discovery and new trends*, 2006.
- DINIZ, L. R. L. Efficacy of triterpene saponins from roots of *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke on diuresis in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, (123): 275-279, 2009.
- DIÓGENES, F.E.P.; OLIVEIRA, A.K.; COELHO, M.F.B; MAIA, S.S.S; AZEVEDO, R.A.B. Pré-tratamento com ácido sulfúrico na germinação de sementes de *Ziziphus joazeiro* Mart. – Rhamnaceae. *Rev. Bras. Pl. Med.*, Botucatu, 12 (2): 188-194, 2010.
- DOMÍNGUEZ – CARMONA, D. B; ESCALANTE – EROSA, F; GARCÍA – SOSA, K; RUIZ – PINELL, G; GUTIERREZ – YAPU, D; CHAN – BACAB, M.J; GIMÉNEZ – TURBA, A; PEÑA – RODRIGUEZ, L. M. Antiprotozoal activity of Betulinic acid derivatives. *Phytomedicine*, 2009.
- DONDORP, A.M; NOSTEN, F; YI, P; DAS, D. Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N Engl J Med*, (361):455–67, 2009.
- DONNO, A.D; GRASSI, T; IDOLO, A; GUIDO, M; PAPADIA, P; CACCIOPPOLA, A; VILLANOVA, L; MERENDINO, A; BAGORDO, F; FANIZZI, F.P. First-time comparison of the in vitro antimalarial activity of *Artemisia annua* herbal tea and artemisinin. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 2012.
- DOWNES, J.A. The Swarming And Mating Fight Of Diptera. *Annu. Rev. Entomol*, (14) 271–298, 1968.
- DUARTE, P. L. Tese de doutorado, departamento de química, UFMG, 2000.
- DUCKE, A. Plantes nouvelles ou peu commune de la région Amazonienne. *Arquivos do jardim botânico do Rio de Janeiro*, Rio de Janeiro, (2): 157–172, 1935.

- DUKER-ESHUN, G; JAROSZEWSKI, J. W; ASOMANING, W. A; OPPONGBOACHIE, F; BROGGER CHRISTENSEN, S. Antiplasmodial constituents of *Cajanus cajan*. *Phytotherapy Research*, 2 (18): 128-130, 2004.
- DUNN, A. J; GUILD, A. L; KRAMARCY, N. R; WARE, M. D. Benzodiazepines decrease grooming in response to novelty but not ACTh or beta-endorphin. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, (15): 605-608, 1981.
- ELFORD, B.C; ROBERTS, M.F; PHILLIPSON, J.D; WILSON, R.J. Potentiation of the antimalarial activity of qinghaosu by methoxylated flavones. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 81(3):434-6, 1987.
- FERREIRA, O. R. Contribuição ao estudo químico e avaliação da atividade antioxidante dos frutos verdes de *Clusia Paralicola* (Clusiaceae). Dissertação de mestrado, Recife, Pernambuco, 2011.
- FERREIRA, M. E. S; MENDONÇA, M. S; VIEIRA, J. L. M. Metemoglobinemia em pacientes com malária por *Plasmodium vivax* em uso oral de primaquina. *Revista da sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 1 (44): 2011.
- FORATTINI, OP. *Culicidologia médica*. São Paulo: Edusp, (2): 2002.
- FRANCISCO, A.I, VARGAS, M.D. Ferroquina: o antimalárico do futuro. *Revista Virtual de Química*, (2): 118-129, 2010.
- FRANÇA, T. C. C; SANTOS, M. G; FIGUEROA-VILLAR, J.D. Malária: aspectos históricos e quimioterapia. *Quim. Nova*, 31 (5): 1271-1278, 2008.
- FRANÇOIS, G; STEENACKERS, T; ASSI, L. A; STEGLICH, W; LAMOTTKE, K; HOLENZ, J; BRINGMANN, G. Vismione H and structurally related anthranoid compounds of natural and synthetic origin as promising drugs against the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*: structure-activity relationships. *Parasitol Res*, (85): 582-588, 1999.
- FROHLICH, E. W. Current approaches in the treatment of hypertension. *Current Problems in Cardiology*, (7): 401-469, 1994.

- FULLER, R. W; WESTERGAARD, C. K; COLLINS, J. W; CARDELLINA, J. H; BOYD, M. R.; Vismiapheones D-G, New Prenylated Benzophenones from *Vismia cayeannensis*. *Journal Natural Products*, (62): 67-69, 1999.
- GAMBARI, R; LAMPRONTI, L. Inhibition of immunodeficiency type-1 virus (**HIV-1**) life cycle by medicinal plant extracts and plant-derived compounds. *Advances in Phytomedicine*, (2): 299-311, 2006.
- GARNHAM, PCC. Malaria parasites of man:life-cycles and morphology (excluding ultrastructure). In: *Malaria – Principles and Practice of Malariology*. London: Churchill Livingstone, (1) p. 61-85, 1998.
- GERMONPREZ, N; MAES, L; PUYVELDE, L.V; TRI, M.V; TUAN, D.A; DE KIMPE, N. *In Vitro* and *in Vivo* Anti-Leishmanial Activity of Triterpenoid Saponins Isolated from *Maesa balansae* and Some Chemical Derivatives. *J. Med. Chem*, 32-37, 2005.
- GESSLER, M.C; NKUNYA, M.H.H; MWASUMBI, L.B; HEINRICH, M. and TANNER, M. Screening Tanzanian medicinal plants for antimalarial activity. *Acta Tropica*, (56): 65-77, 1994.
- GIACOMELLI, S. R; MALDANER, G; GONZAGA, W. A; GARCIA, C.M; SILVA, U.F; DALCOL, I,I; MOREL, A.F. Cyclic peptide alkaloids from the bark of *Discaria Americana*, (65) 7: 933- 937, 2004.
- GOAD, J. L. *Methods in Plant Biochemistry* (7): 369, London, 1991.
- GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. [*Molecular Aspects of Medicine*](#), (27): 1-93, 2006.
- GLAUERT, A.M; DINGLE, J.T; LUCY, J.A. Action of saponin on biological cell membranes. *Nature* 952 – 955, 1962.
- GONZALES, G. J.; MONACHE F. D.; MONACHE, G. D.; BETTOLO B.M.; Chemistry of the genus *Vismia*. *Journal o Medicinal Plant Research*, (40): 347-350, 1980.
- GOTELLI, M; GALATI, B; MEDAN, D. Pollen, Tapetum, and Orbicule development in *Colletia paradoxa* and *Discaria americana* (Rhamnaceae). *The Scientific World Journal*, 2012.

- HAQUE, M.R; RAHMAN, K.M; HASAN, C.M; RASHID, M.A. *J. Pharm. Sci*, (5): 71-72, 2006.
- HARUNA, M; TANAKA, M; SUGIMOTO, T; KOJIMA, R; SUZUKI, Y; KONOSHIMA, T; KOZUKA, M; ITO, K. Alteration of Na⁺ permeability in human erythrocytes as studied by ²³Na-NMR and inhibition of the kidney Na⁺,K⁺-ATPase activities with saponins: Interaction of *Gleditsia* saponins with human erythrocyte membranes. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, (5): 827-830, 1995.
- HASTINGS, I. How artemisinin-containing combination therapies slow the spread of antimalarial drug resistance. *Trends in Parasitology*, (27) 67-72, 2011.
- HAY, A – E; HÉLESBEUX, J – J; DUVAL, O; LABAIED, M; GRELLIER, P; RICHOMME, P. Antimalarial xanthenes from *Calophyllum caledonicum* and *Garcinia vieillardii*. *Life Sciences*, (75): 3077–3085, 2004.
- HAWKINS, V. N; JOSHI, H; RUNGSIHIRUNRAT, K; NA-BANGCHANG, K; SIBLEY, C.H; Antifolates can have a role in the treatment of *Plasmodium vivax*. *Trends in Parasitology*, 23 (5): 213-222, 2007.
- HO YJ, EICHENDORFF J, SCHWARTING RK. Individual response profiles of male Wistar rats in animal models for anxiety and depression. *Behav Brain Res*, (136) :1-12, 2002.
- HOSTETTMANN, K; QUEIROZ, E.F; VIEIRA, P.C. Princípios de plantas superiores. São Carlos: EdUFSCar (IV): 9-38, 2003.
- HOU, Y; CAO, S; BRODIE, P.J; CALLMANDER, M. W; RATOVOSON, F; RAKATOBÉ, E, A; RASAMISON, V. E; ALUMASA, J. N; ROEPE, P. D. Antiproliferative and antimalarial anthraquinones of *Scutia myrtina* from the Madagascar forest. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 7 (17): 2871 – 2876, 2009.
- [HTTP://WWW.BBC.CO.UK/PORTUGUESE/ULTIMAS_NOTICIAS/2012/12/121217_MALARIA_WHO_LK_RN.SHTML](http://www.bbc.co.uk/portuguese/ultimas_noticias/2012/12/121217_malaria_who_lk_rn.shtml), (OMS, 2012).
- [HTTP://BELLACAPILLA.BLOGSPOT.COM.BR/2012/09/MALARIA.HTML](http://bellacapilla.blogspot.com.br/2012/09/malaria.html)

- HUGHES, R.N. Chlordiazepoxide-modified exploration in rats. *Psychopharmacology*, Berlin, (24): 462-469, 1972.
- [IGNATUSHCHENKO, M.V.](#); [WINTER, R.W.](#); [BÄCHINGER, H.P.](#); [HINRICHS, D.J.](#); [RISCOE, M.K.](#) Xanthenes as antimalarial agents; studies of possible mode of action. *FEBS Lett*, 409(1):67-73, 1997.
- IINUMA, M; TOSA, H; ITO, T; TANAKA, T; AQIL, M. Two prenylated anthrones in *Harungana madagascariensis*. *Phytochemistry*, 1 (40): 267-271, 1995.
- JOHANSSON, C; AHLENIUS, S. Evidence for the involvement of 5-HT_{1A} receptors in the mediation of exploratory locomotor activity in the rat. *Journal of Psychopharmacology*, (3): 32-35, 1989.
- KADIR, M. F; BIN'; SAYEED, M. S; MIA, M.M.K. Ethnopharmacological survey of medicinal plants used by indigenous and tribal people in Rangamati, Bangladesh. *Journal of Ethnopharmacology*, (144): 627–637, 2012.
- KALA-AZAR; FEVER, B; FEVER, D; SORE, O; SORE, T; UTA, ULCER C; BOI, A; BOIS, P; ESPUNDIA. Leishmaniasis (*Cutaneous and Visceral*). The Center of food security & public health, 2009.
- KAUR, K; JAIN, M; KAUR, T; JAIN, R. Antimalarials from nature. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 17: 3229–3256, 2009.
- KENELL AJ. Malária, The Wellcome Trust, *Oxford University*, 1991.
- KHAOMEK, P; ICHINO, C; ISHIYAMA, A; SEKIGUCHI, H; NAMATAME, M; RUANGRUNGSI, N; SAIFAH, E; KIYOHARA, H; OTOGURO, K, OMURA, S; YAMADA, H. *In vitro* antimalarial activity of prenylated flavonoids from *Erythrina fusca*. *J Nat Med*, (62): 62-217, 2008.
- KIM, D. S. H. L; PEZZUTO, J. M; PISHA, E. Synthesis of betulinic acid derivatives with activity against human melanoma. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, (8):1707-1712, 1998.
- KLASS, J; TINTO, W. F; MACLEAN, S; REYNOLDS, W. Fridelane Triterpenoids from *Peritassa compta*: Complete ¹H and ¹³C assignments by 2D NMR spectroscopy. *Journal of Natural Products*, (55): 1626-1630, 1992.

- KOLADE, Y.T; BABALOLA, C.P; SCRIBA, G.K.E. Analysis of the antimalarial drug halofantrine and its major metabolite N-desbutylhalofantrine in human plasma by high performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, (41): 315–319, 2006.
- KOMMERA, H; KALUDEROVIC, G. N; KALBITZ, J; DRAGER, B; PASCHKE. Small structural changes of pentacyclic lupane type triterpenoid derivatives lead to significant differences in their anticancer properties. *European Journal of Medicinal Chemistry*, (45) : 3346-3353, 2010.
- KOUAM, S. F; NJONKOU, Y. L. N; KUIGOUA, G. M; NGADJUI, B. T; HUSSAIN, H; GREEN, I. R; SCHULZ, B; KROHN, K. Psorantin, a unique methylene linked dimer of vismin and kenganthranol E, two anthranoid derivatives from the fruits of *Psorospermum aurantiacum* (Hypericaceae). *Phytochemistry Letters*, (3): 185–189, 2010.
- KOVENDAN, K; SHANTHAKUMAR, S. P; PRASEEJA, C; KUMAR, P. M; MURUGAN, K; VINCENT, S. Mosquitocidal properties of *Morinda citrifolia* L. (Noni) (Family: Rubiaceae) leaf extract and *Metarhizium anisopliae* against malaria vector, *Anopheles stephensi* Liston. (Diptera: Culicidae). *Asian Pac J Trop Dis*, (4): 173-180, 2014.
- KRETTLI, A.U, ANDRADE - NETO, V.F. BRANDÃO, M.G.L, FERRARI, W.M.S. The search for a new antimalarial drugs from plants used to treat fever and malaria or plants randomly selected: a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, (96): 1033-1042, 2001.
- KROGSTAD, D.J; GLUZMAN, I.Y; KYLE, D.E; ODUOLA, A.M; MARTIN, S.K, MILHOUS, W.K; SCHLESINGER, P.H. Efflux of chloroquine from *Plasmodium falciparum*: mechanism of chloroquine resistance. *Science*, 238 (4831):1283-5, 1987.
- KUMAR, S; GUHA, M; CHOUBEY, V; MAITY, P; BANDYOPADHYAY, U. Antimalarial drugs inhibiting hemozoin (β - hemozoin) formation: A mechanistic update. *Life Sciences*, (80): 813 – 828, 2007.

- KY, P. T; HUONG, P. T; MY, T. K; ANH, P. T; KIEM, P. V; MINH, C. V; CUONG, N. X; THAO, N. P; NHIEM, N. X; HYUN, J-H; KANG, H-K; KIM, Y,O. Dammarane-type saponins from *Gynostemma pentaphyllum*. *Phytochemistry*, (71): 994-1001, 2010.
- LACAILLE-DUBOIS, M.A.; WAGNER, H. A review of the biological and pharmacological activities of saponins. *Phytomedicine*, (2): 363-386, 1996.
- LAVAUD, A; SOLETI, R; HAY, Anne-Emmanuelle, RICHOMME, P; GUILLET, D.A. Paradoxical effects of polyphenolic compounds from Clusiaceae on angiogenesis, (83): 514–523, 2012.
- LEHNINGER, A. L; NELSON, D. L; COX, M. M. Princípios de bioquímica. 4 ed. São Paulo: Editora Sarvier, 2007.
- LENTA, B. N; NGOUELA, S; FEKAM-BOYOM, F; TATANGMO, F; FEUYA-TCHOUYA, G. R; TSAMO, E; GUT, J; ROSENTHAL, P. J; DONALD-CONNOLLY, J. Anti-plasmodial activity of some constituents of the root bark of *Harungana madagascariensis* Lam. (Hypericaceae). *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 3 (55): 464-467, 2007.
- LENTA, B. N; DEVKOTA, K. P; NGOUELA, S; FEKAM-BOYOM, F; NAZ, Q; CHOUDHARY, M. I; TSAMO, E; ROSENTHAL, P. J; SEWALD, N. Antiplasmodium and cholinesterase inhibiting activities of some constituents of *Psorospermum glaberrimum*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 2 (56) : 222-226, 2008.
- LICCIARDI, P.V; UNDERWOOD, J.R. Plant-derived medicines: A novel class of immunological adjuvants – Review. *International Immunopharmacology*, (11): 390–398, 2011.
- LIMA, R. B. Flora da reserva ducke, amazonas, brasil: rhamnaceae. *Rodriguésia* 57, (2): 247-249, 2006.
- LIMA, R. B; GIULIETTI, A. M. Diversity of the Rhamnaceae family in the Brazilian Semi-arid. In: Queiroz, L.P.; Rapini, A.; Giulietti, A.M.(Org.). Towards greater knowledge of the Brazilian Semi-arid Biodiversity. 1aed.Brasilia: Ministerio da ciencia e Tecnologia, (1): 79-81, 2000.

- LIU, Q; LUYTEN, W; PELLENS, K; WANG, Y; WANG, W, THEVISSSEN, K; LIANG, Q; CAMMUE, B.P.A; SCHOOF, L; LUO, G. Antifungal activities in plants from Chinese traditional and folk medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, (143): 772–778, 2012.
- LOAIZA, J; BERMINGHAM, E; SCOTT, M.E; ROVIRA, J. R; CONN, J.E. Anopheles Darling (Diptera) in Panama. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, (81): 23-26, 2009.
- MADEL T. L. Cultura Contemporânea e Medicinas Alternativas: Novos Paradigmas em Saúde no Fim do Século XX. *PHYSIS: Rev. Saúde Coletiva*, Rio de Janeiro, (15):145- 176, 2005.
- MADUREIRA, M.C; MARTINS, A.P; GOMES, M; PAIVA, J; CUNHA, A.P; ROSÁRIO, V. Antimalarial activity of medicinal plants used in traditional medicine in S. Tomé and Príncipe islands. *Journal of Ethnopharmacology*, (81): 23-29, 2002.
- MAHATO, S. B; KUNDU, A.P. ¹³C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids – a compilation and some salient features. *Phytochemistry*, (37): 1517-1575, 1994.
- MANOSROI, J; KORAWINWICH, B; MANOSROI, W; MANOSROI, A. Anti-proliferative activities on HeLa cancer cell line of Thai medicinal plant recipes selected from MANOSROI II database. *Journal of Ethnopharmacology*, (142): 422–431, 2012.
- MANSUR, J; MARTZ, R.M.W; CARLINI, E.A. Effects of acute and chronic administration of cannabis sativa and (-) 9-trans tetrahydrocannabinol on the behaviour of rats in open field arena. *Psychopharmacology*, (19): 338-397, 1971.
- MARTI, G; EPARVIER, V; MORETTI, C; SUSPLUGAS, S; PRADO, S; GRELLIER, P; RETAILLEAU, P; GUÉRITTE, F; LITAUDON, M. Antiplasmodial benzophenones from the trunk latex of *Moronobea coccinea* (Clusiaceae). *Phytochemistry*, 70: 75–85, 2009.
- MATTEI, R; DIAS, R.F; ESPÍNOLA, E.B; CARLINI, E.A; BARROS, S.B.M. Guaraná (*Paulinea cupana*): toxic behavioral effects in laboratory

- animals and antioxidant activity *in vitro*. *J. Ethnopharmacology*, (60) 111-6, 1998.
- MATTOS, F.J.A. Introdução à Fitoquímica Experimental. 2ª ed. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1997.
 - MEBE, P.P; CORDELL, G.A; PEZZUTO, J.M. Pentacyclic triterpenes and naphthoquinones from *Euclea divinorum*. *Phytochemistry*, (47): 311 - 313, 1998.
 - MENAN, H; BANZOUZI, J-T; HOCQUETTE, A; PÉLISSIER, Y; BLACHE, Y; KONÉ, M; MALLIÉ, M; ASSI, L. A; VALENTIN, A. Antiplasmodial activity and cytotoxicity of plants used in West African traditional medicine for the treatment of malaria. [*Journal of Ethnopharmacology*](#), (105): 131-136, 2006.
 - MONTGOMERY, K.C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. *Journal of Complementary Physiology and Psychology*, 48(4): 254 – 260, 1955.
 - MOODY, T.W; MERALI, Z; CRAWLEY, J.N. The effects of anxiolytics and other agents on rat grooming behavior. *Annals of the New York Academy of Sciences*, (90): 281-290, 1993.
 - MEIER, W; BERRY, P. E. *Ampelozizyphus guaquirensis* (Rhamnaceae), a new tree species endemic to the Venezuelan Coastal Cordillera. *Brittonia*, 60 (2):131–135, 2008.
 - MILLIKEN, W., BRUCE A. The use of medicinal plants by Yanomami indians of Brazil, Part II. *Journal of Botany*, 51 (3), 1999.
 - MIRAGLIA, M. C. M.; MESQUITA, A. A. L.; VAREJÃO, M. J. C, GOTTLIEB, O. R. Anthraquinone from *Vismia* species. *Phytochemistry*, (20): 2041-2042, 1981.
 - MOURA, D. F. M; SILVA, J. R. A; OHANA, D. T; MENDONÇA, M. S; FERREIRA, J. L. P; AMARAL. Histological study of the Leaf, Bark and Fruit of *Vismia cayennensis*. *International Journal of Botany* 4 (3): 321-325, 2008.

- MOURÃO, K. S. M. and C. M. BELTRATI. Morphology and anatomy of developing fruits and seeds of *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy (Clusiaceae). *Rev. Brasil. Biol*, 61 (1): 147-158, 2001.
- PEREIRA, L.M.O. Estudo teórico de formação do dímero de β -hematina. Dissertação de mestrado, São João Del-Rei – Minas Gerais.
- POLITI, M; NDJOKO, S. K; GUILLET, D; WOLFENDER, J. L; HOSTETTMANN, K; MORELLI, I. HPLC-UV/PAD and HPLC-MS Analyses of Leaf and Root Extracts of *Vismia guineensis* and Isolation and Identification of Two New Bianthrone. *Phytochem. Anal*, (15): 355–364, 2004.
- NAGEM, T. J.; OLIVEIRA, F.F. Xanthonas and Other Constituents of *Vismia parviflora*. *J. Braz. Chem. Soc*, (8): 505-508, 1997.
- NAMMI, S; BOINI, M. K; LODAGALA, S. D; BEHARA, R. B. S. The juice of fresh leaves of *Catharanthus roseus* Linn. reduces blood glucose in normal and alloxan diabetic rabbits. *BMC complementary and alternative medicine*, (3): 4, 2003.
- NAVARRO, P; GINER, R.M; RECIO, M.C; MÁÑEZ, S; CERDÁ-NICOLAS, M; RIOS, J.-L. In vivo anti-inflammatory activity of saponins from *Bupleurum rotundifolium*. *Life Sciences*, (68): 1199–1206, 2001.
- NEWMAN, D. J. Natural products as leads to potential drugs: an old process or the new hope for drug discovery? *J Med Chem* (51): 2589-2599, 2008.
- NGO, L. T; OKOGUN, J. I; FOLK, W. R. 21st Century natural product research and drug development and traditional medicines. *Nat. Prod*, (30): 584 – 592, 2013.
- NILAR; NGUYEN, L-H. D; VENKATRAMAN, G; SIM, K –Y; HARRISON, L. J. Xanthonas and benzophenones from *Garcinia griffithii* and *Garcinia mangostana*. *Phytochemistry*, (66): 1718–1723, 2005.
- OLIVEIRA, D. R; COSTA, A. L. M. A; LEITÃO, G. G; CASTRO, N. G; SANTOS, J. P; LEITÃO, S.G. Estudo etnofarmacognóstico da saracuramirá (*Ampelozizyphus amazonicus* Ducke), uma planta

- medicinal usada por comunidades quilombolas do Município de Oriximiná-PA, Brasil. *Acta Amazonica*, 41(3) : 383 – 392, 2011.
- OLIVEIRA, F. Q; ANDRADE-NETO, V; KRETTLI, A.U; BRANDÃO, M.G.L. New evidences of antimalarial activity of *Bidens pilosa* roots extract correlated with polyacetylene and flavonoids. *Journal of Ethnopharmacology*, (93): 39-42, 2004.
 - OLESZEK, W.A.; Chromatographic determination of plant saponins. *Journal of Chromatography A*, (967): 147–162, 2002.
 - PARVANOVA, I. ET AL. A small molecule inhibitor of signal peptide peptidase inhibits *Plasmodium* development in the liver and decrease malaria severity. *Plos One*, (4): 5078, 2009.
 - PEÇANHA, L. M. T; FERNANDES, P. D; SIMEN, T. J-T; OLIVEIRA, D. R; FITONELLI, P. V; PEREIRA, M. V. A; BARBOZA, F. F; ALMEIDA, T. S; CARVALHAL, S; PIERUCCI, A. P. T. R; LEITÃO, G. G; RASTRELLI, L; PICCINELLI, A. L; LEITÃO, S. G. Immunobiologic and Antiinflammatory Properties of a Bark Extract from *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke. *BioMed Research International*, 1-9, 2013.
 - PETERS, W. The chemotherapy of rodent Malaria, XXII. The value of drug-resistance strains of *Plasmodium berghei* in screening for blood schizontocidal activity. *Ann. Trop. Med. Parasitol*, (69): 155-171, 1975.
 - PINHEIRO, R. M; QUHAE, M.M.M; BETTOLO, G.B.M; MONACHE F.D. Prenylated anthranoids from *Vismia* species, *Phytochemistry*, (23): 1737 – 1740, 1984.
 - POLITI, M; NGJOKO, K; SANOGO, R; WOLFENDER, J. L; HOSTETTEMANN, K; MORELLI, I. HPLC-UV/PAD and HPLC – MS Analyses of Leaf and Root Extracts of *Vismia guineensis* and Isolation and Identification of Two New Bianthrone. *Phytochemistry analysis*, (15): 355-364, 2004.
 - PRUT, L; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviours: a review. *The European Journal of Pharmacology*, 13 (463) : 3-33, 2003.

- QUIJANO, L; CALDERÓN, J.S; GÓMEZ, F; RÍOS, T. Two polymethoxyflavones from *Ageratum Houstonianum*. *Phytochemistry*, (21): 2965-2967, 1982.
- REYS, C.; ESTRADA, M. E.; APAN, T. R.; AMEKRAS, B. JANKOWSKI, C. K. Cytotoxic effects of mammea type coumarins from *calophyllum brasiliense*. *Life, New York*, (75): 1635-1647, 2004.
- REYNOLDS, W. F; MCLEAN, S; POPLAWSKI, J. Total assignment of 13 C and 1H spectra of isomeric triterpenol derivatives by 2D NMR. *Tetrahedron*, 42 (13): 3419-3428, 1986.
- RICHARDSON, J. E; FAY, M. F; CRONK, Q. C. B; CHASE, M. W. A revision of the tribal classification of Rhamnaceae. *Kew Bulletin*, (55): 311– 340, 2000.
- RILEY, H; SPINKS, A. Biological assessment of tranquilizers. *J. Pharm. Pharmacol*, (10): 657-71, 1958.
- RODRIGUES, R.M. *The amazonian flora*. CEJUP, Belém, Pará, 462 pp (in Portuguese), 1989.
- ROSAS, L.V; CORDEIRO, M.S.C; NASCIMENTO S.K.R; JANUÁRIO, A.H; FRANÇA, S.C; NOMIZO, A; TOLDO, M.P.A; ALBUQUERQUE, S; PEREIRA, P.S. In vitro evaluation of the cytotoxic and trypanocidal activities of *Ampelozizyphus amazonicus* (Rhamnaceae). *Brazilian Journal Medical and Biological Research*, (40): 663-670, 2007.
- RYTER, R. W; TYRREL, R. M. Heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity Heme oxygenase has both pro- and antioxidant properties. *Free Radic. Biol. Med*, (28): 289-309, 2000.
- SANTOS, A. M. S; KAHWAGE, C. C; FERREIRA, M. R. C; SAMPAIO, N. A. Medicinas tradicionais no vale do rio negro (amazonas, brasil). Observações sobre etnofarmacologia e o uso da planta saracura-mirá (*ampelozizyphus amazonicus*): atividade farmacológica e/ou eficácia simbólica. *Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi, sér. Ciências Humanas*, Belém, (1): 137-147, 2005.
- SANTOS, M. H; NAGEM, T. J; SILVA, M. C; SILVA, L. G. F. Xanthonas from *Vismia latifolia*. *J. Braz. Chem. Soc*, (5): 537 – 539, 2000.

- SELIM, Y. A; OUF, N. H. Anti-inflammatory new coumarin from the *Ammi majus* L. *Organic and Medicinal Chemistry Letters*, 2 (1): 2012.
- SHISODE, S.B; PATIL, D.A. Petiolar anatomy in some Rhamnaceae. *Current Botany*, 2 (9): 22-25, 2011.
- SILVA, A. R. H; MOREIRA, L. R; BRUM, E. S; FREITAS, M. L; BOLIGON, A. A; ATHAYDE, M. L; ROMAN, S. S; MAZZANTI, C. M; BRANDÃO, R. Biochemical and hematological effects of acute and sub-acute administration to ethyl acetate fraction from the stem bark *Scutia buxifolia* Reissek in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 2014.
- SILVA, F. C. Trabalho de conclusão da disciplina de Estágio Curricular em Farmácia. Benzofenonas em Guttifera e perfil químico dos extratos lipofílicos de *Clusia criuva*, *Clusia fluminense* e *Hypericum carinatum*. Porto Alegre, 2010.
- SILVA, T.H.A; OLIVEIRA, M.T. Estudo de modelagem molecular de complexos ferriprotoporfirina-IX e quinolinocarbinolaminas antimaláricas: proposta de um farmacóforo. *Quim. Nova*, (28): 244-249, 2005.
- SILVA-NUNES, M; MORENO, M; CONN, J.E; GAMBOA, D; ABELES, S; VINETZ, J. M; FERREIRA, M.U. Amazonian malaria: Asymptomatic human reservoirs, diagnostic challenges, environmentally driven changes in mosquito vector populations, and the mandate for sustainable control strategies. *Acta Tropica*, (121) : 281–291, 2012.
- SILVERSTEIN, R. M; WEBSTER, F, X; KIEMLE, D. J. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos. 7 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2006.
- SIMÕES, C. M. O. Farmacognosia – da planta ao medicamento. 5 ed. Porto Alegre: UFRS, 1999.
- SINDAMBIWE, J.B; CALOMME, M; GEERTS, S; PIETERS, L; VLIETINCK, A.J; VANDEN BERGHE, D.A. Evaluation of biological activities of triterpenoid saponins from *Maesa lanceolata*. *Journal of Natural products*, (61): 585-590.
- SRINIVAS, N; MURTHY, K; BOINI; SRINIVAS, D. *BMC Complement Alternat Med*, 3 (4), 2003.

- STEELE, J. C; WARHURST, D. C; KIRBY, G. C.; SIMMONDS, M. S. *In vitro* and *in vivo* evaluation of betulinic acid as an antimalarial. *Phytotherapy Research*, 2 (13): 115-119, 1999.
- STEIN, W. D; SANCHES, C. P; LANZER, M. Virulence and drug resistance in malaria parasites. *Trends in Parasitology*, 25 (10): 441-443, 2009.
- STORSTEIN, O; HANSTEEN, V; HATLE, L; HILLESTAD, L; STORSTEIN, L. Studies on digitalis. XIII. A prospective study of 649 patients on maintenance treatment with digitoxin. *American heart journal*, 93 (4): 434-443. 1977.
- SUESSENGUTH, K. Rhamnaceae, Vitaceae, Leeaceae. *In* A. Engler and K. Prantl [eds.], *Die Natürlichen Pflanzenfamilien* 2, Aufl., 20d. Duncker and Humbolt, Berlin, Germany, 1953.
- SUKSAMRARN, S; PANSEETA, P; KUNCHANAWATTA, S; DISTAPORN, T; RUKTASING, S; SUKSAMRARN, A. Ceanothane- and lupane-type triterpenes with antiplasmodial and antimycobacterial activities from *Ziziphus cambodiana*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 4 (54): 535-537, 2006.
- TADEI, WP; DUTARY – THATCHER, B. Malaria vectors in the Brazilian Amazon: Anopheles and the subgenus Nyssorhynchus. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 2 (42): 87- 94, 2000.
- TANAKA, N; TAKAISHI, Y. Xanthones from *Hypericum chinese*. *Phytochemistry*, (67) 2146 – 2151, 2006.
- TANGJANG, S; NAMSA, N. D; ARAN, C; LITIN, A. An ethnobotanical survey of medicinal plants in the eastern Himalayan zone of Arunachal Pradesh, India. *Journal of Ethnopharmacology*, (134): 18–25, 2011.
- TARANTO, G. A; CARNEIRO, J. W. M; ARAÚJO, M. T; SILVA, B. M. Estudos sobre mecanismo de ação da artemisinina e dos endoperóxidos, a mais nova classe de agentes antimaláricos. *Sitientibus*, Feira de Santana, (34): 47-58, 2006.
- TITO, W.F; BLAIR, L.C; ALLI, A. Lupane triterpenoids of *salacia cordata*. *Journal of Natural Products*, (55): 395-298, 1992.

- TOUWAIDE, A; APPETITI. Knowledge of Eastern materia medica (Indian and Chinese) in pre-modern Mediterranean medical traditions: A study in comparative historical ethnopharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*, (148): 361–378, 2013.
- TORTOSA, R. D. El género *Colletia* (Rhamnaceae). *Parodiana*, v.5, n.2, 279-332, 1989.
- TSABANG, N; FOKOU, P. V. T; TCHOKOUAHA, L. R. Y; NOGUEM, B; BAKARNGA-VIA, I; NGUEPI, M.S.D, NKONGMENECK, B. A; BOYOM, F. F. Ethnopharmacological survey of Annonaceae medicinal plants used to treat malaria in four areas of Cameroon. *Journal of Ethnopharmacology*, (139): 171– 180, 2012.
- YIGIT, N; AKTAS, E. Comparison of the efficacy of different blood medium in determining the hemolytic activity of *Candida* species. *Journal de Mycologie Médicale*, (19): 110—115, 2009.
- VAISHNAV, P; DEMAIN, A. L. Unexpected applications of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, (29): 223–229, 2010.
- VARGAS, S; IOSET, K. N; HAY, A. E; IOSET, J.R; WITTLIN, S; HOSTETTMANN, K. Screening medicinal plants for the detection of novel 1 antimalarial products 2 applying the inhibition of β -hematin formation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 56 (5): 880-886, 2011.
- VIEIRA, A. P; SANTOS, N. R; BORGES, J. H. S; VINCENZI, M. P. A; SCHMITZ, W. O. Ação dos flavonoides na cicatrização por segunda intenção em feridas limpas induzidas cirurgicamente em ratos Wistar. *Ciências biológicas e da saúde* 29, (1): 65-74, 2008.
- VINCKEN, J. P; HENG, L; GROOT, A; GRUPPEN. Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry*, (68): 275-297, 2007.
- WAGNER, H. Plant drug analysis – A thin layer chromatography atlas. ed springer, new york, p. 383, 1996.

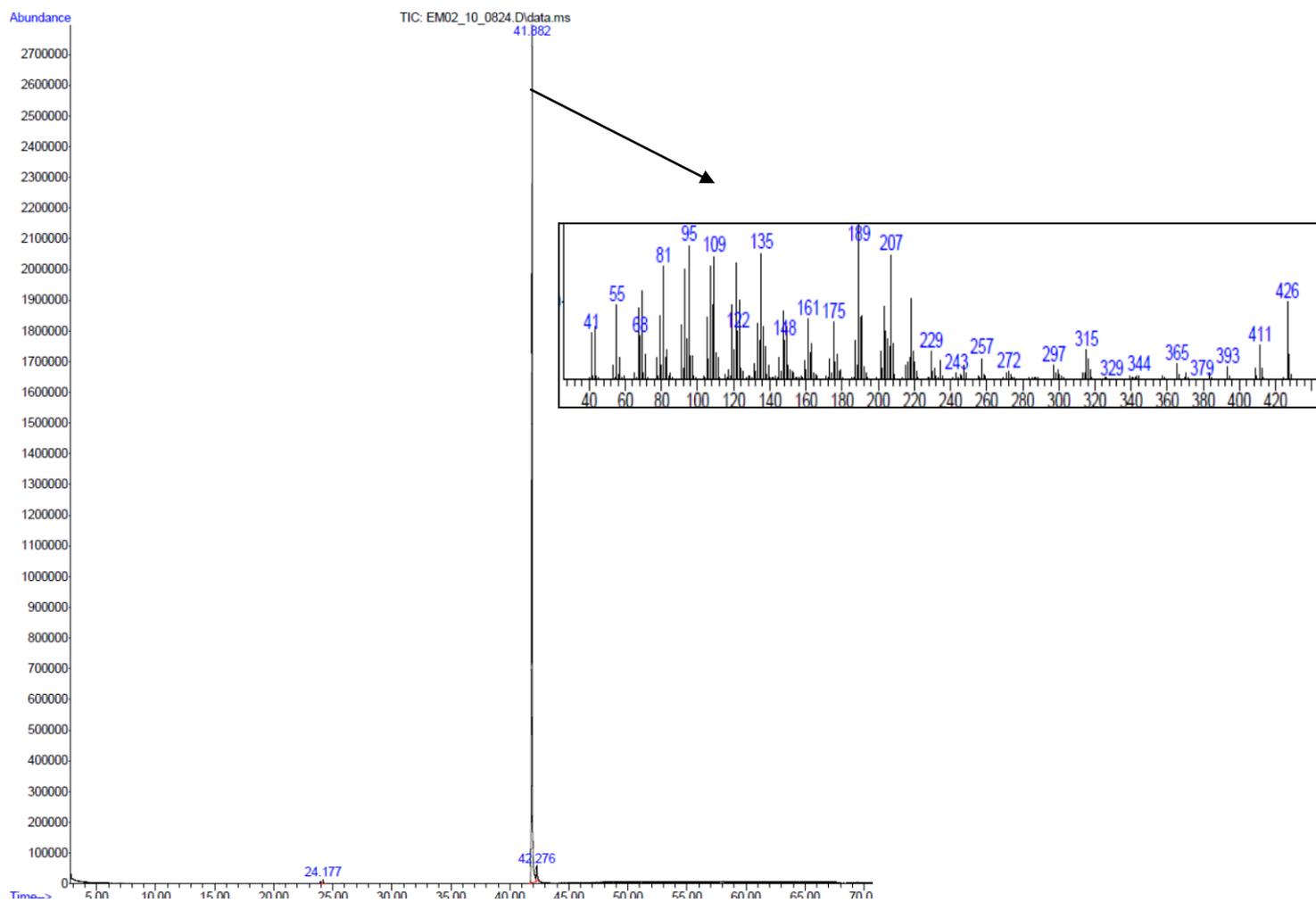
- WEINSTEIN, P; GOFF, J; SKELLY, C. Do post-disaster public health interventions impede malaria eradication? *Medical Hypotheses*, 74 (3): 403-405, 2010.
- WIDYAWARUYANTI, A; SUBEHAN; KALAUNI, S. K; AWALE, S; NINDATU, M; ZAINI, N. C; SYAFRUDDIN, D; ASIH, P. B. S; TEZUKA, Y; KADOTA, S. New prenylated flavones from artocarpus champeden and their antimalarial activity *in vitro*. *J Nat Med*, (61) :410–413, 2007.
- WILLIANSON, E.M; OKPAKO, D.T; EVANS, F.J. Selection, preparation and pharmacological evaluation of plant material. *Chichester: john wiley & sons* 228, 1996.
- WINTER, R.W; CORNON, L.L; ISABELLE, L.M; HINRICHS, D.J; RISCOE, M. K. Hydroxi-Anthraquinones as antimalarial agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, (17): 1927-1932, 1995.
- WEIS, R; SCHLAPPERA, C; BRUN, R; KAISER, M; SEEBACHER, W. Antiplasmodial and antitrypanosomal activity of new esters and ethers of 4-dialkylaminobicyclo[2.2.2]octan-2-ols. *European journal of pharmaceutical sciences*, 28 (5): 361–368, 2006.
- WEIS, T. N. C; ALONSO, P. L; GUTTERIDGE, W. E. New medicines to improve control and contribute to the eradication of malária. *Nature Reviews*, (8): 879 – 891, 2008.
- WWW.WHO.INT/AGEING/EVENTS/WHD2012/.../INDEX.HTM
- WWW.DISCOVERLIFE.ORG/20/M?KIND=VISMIA+CAYENNENSIS
- WWW.CDC.GOV/EID, 2010.
- WWW.PORTALSAOFRANCISCO.COM.BR.
- WHO: WORLD MALARIA REPORT. GENEVA: WORD HEALTH ORGANIZATION, 2011.
- WHO: WORLD MALARIA REPORT. GENEVA: WORD HEALTH ORGANIZATION, 2012.
- [HTTP://BELLACAPILLA.BLOGSPOT.COM.BR/2012/09/MALARIA.HTML](http://BELLACAPILLA.BLOGSPOT.COM.BR/2012/09/MALARIA.HTML)
- [HTTP://WWW.WHO.INT/MEDIACENTRE/NEWS/RELEASES/2013/WORLD-MALARIA-REPORT](http://WWW.WHO.INT/MEDIACENTRE/NEWS/RELEASES/2013/WORLD-MALARIA-REPORT), 2013.
- [HTTP://WWW.PAHO.ORG/HQ/INDEX.PHP](http://WWW.PAHO.ORG/HQ/INDEX.PHP), 2011.

- WONGSRICHANALAI C, PICKARD AL, WERNSDORFER WH, MESHNICK SR. Epidemiology of drug-resistant malaria. *Lancet Infect. Dis.* (4): 209-218, 2002.
- WONHOFF, E.W; FORTSCHR. *Chem. Org. Naturst*, (28): 1970.
- WU, X.; LIU, L.; ZHANG, M.; WU, D.; WANG, Y.; SUN, Y.; FAWCETT, J.P.; GU, J.; ZHANG, J.; Simultaneous analysis of isomers of escin saponins in human plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry: application to a pharmacokinetic study after oral administration. *Journal of chromatography B*: (878): 861–867, 2010.
- YIGIT, N; AKTAS, E. Comparison of the efficacy of different blood medium in determining the hemolytic activity of *Candida* species. *Journal de Mycologie Médicale*, (19): 110—115, 2009.
- YI-LING, C; PAN-KAI, C. Rhamnaceae. In: Chen Yi-ling, ed., *Fl. Reipubl. Popularis Sin*, 48(1): 1–169, 1982.
[Http://zipcodezoo.com/Plants/Z/Ziziphus_oenoplia/](http://zipcodezoo.com/Plants/Z/Ziziphus_oenoplia/)
- XU, R; FAZIO, G. C; MATSUDA, S. D. T. On the origins of triterpenoids skeletal diversity. *Review. Phytochemistry*, (66): 261-291, 2004.
- YANG, Z.G.; SUN, H.X.; FANG, W.H. Haemolytic activities and adjuvant effect of *Astragalus membranaceus* saponins (AMS) on the immune responses to ovalbumin in mice. *Vaccine*, (23): 5196-5203, 2005.
- ZHAO, G; YAN, W; CAO, D. Simultaneous determination of betulin and betulinic acid in white birch bark using PR-HPLC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 43 (3): 959-962, Feb 2007.
- ZHAO, Z; LI, J; WU, X; DAI, H; GAO, X; LIU, M; TU, P. 2006. Structures and immunological activities of two pectic polysaccharides from the fruits of *Ziziphus jujuba* Mill. *Food Research International*, (39): 917–923, 2006.
- ZHANG T. Z; LIUA, H; LIUD, XUE-TING; XUB, DE-RAN; CHENB, XIAO-QING, WANG, Q. Qualitative and quantitative analysis of steroidal saponins in crude extracts from *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* and *P. polyphylla* var. *chinensis* by high performance liquid chromatography

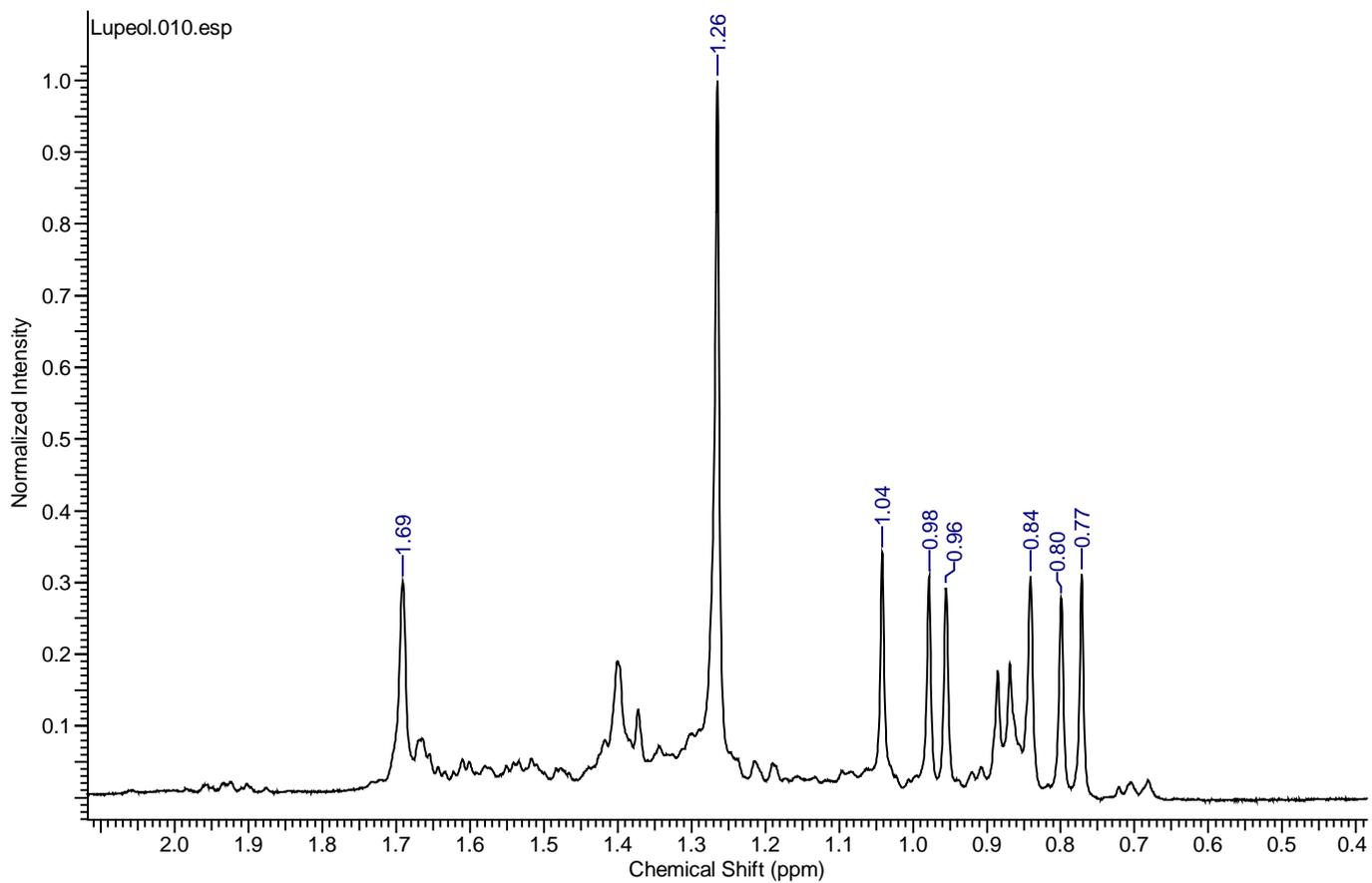
coupled with mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 1 (51): 114-124, 2010.

- ZIEGLER, H. L; FRANZYK, H; SAIRAFIANPOUR, M; TABATABAI, M; TEHRANI, M. D; BAGHERZADEH, K; HAGERSTRAND, H; STAERK, D; JAROSZEWSKI, J. W. Erythrocyte membrane modifying agents and the inhibition of *Plasmodium falciparum* growth: structure – activity relationships for betulinic acid analogues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, (12): 119–127, 2004.
- ZOFOU, D; KOWA, T. K; WABO, H. K; NGEMENYA, M. N; TANE, P.; TITANJI, V. P. *Hypericum lanceolatum* (Hypericaceae) as a potential source of new anti-malarial agents: a bioassay-guided fractionation of the stem bark. *Malaria Journal*, 10:167, 2011.

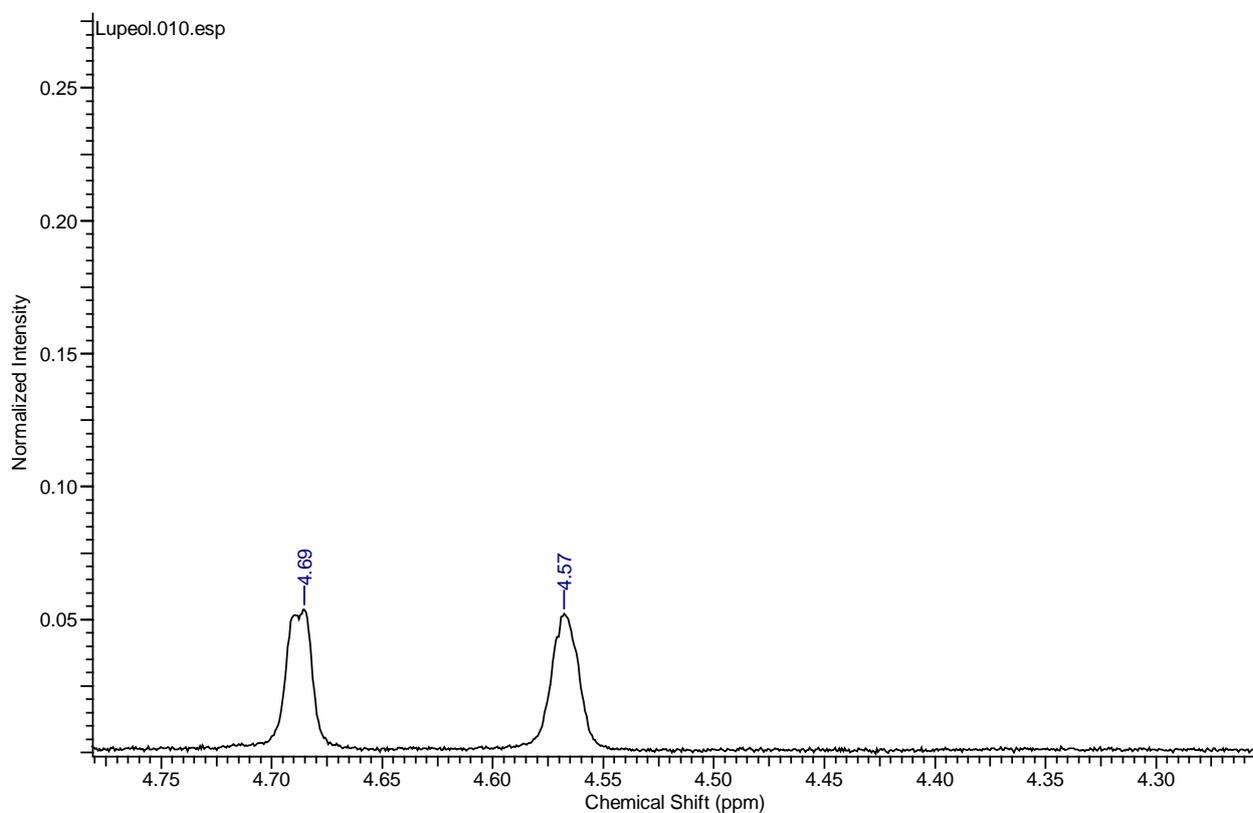
12. ESPECTROS



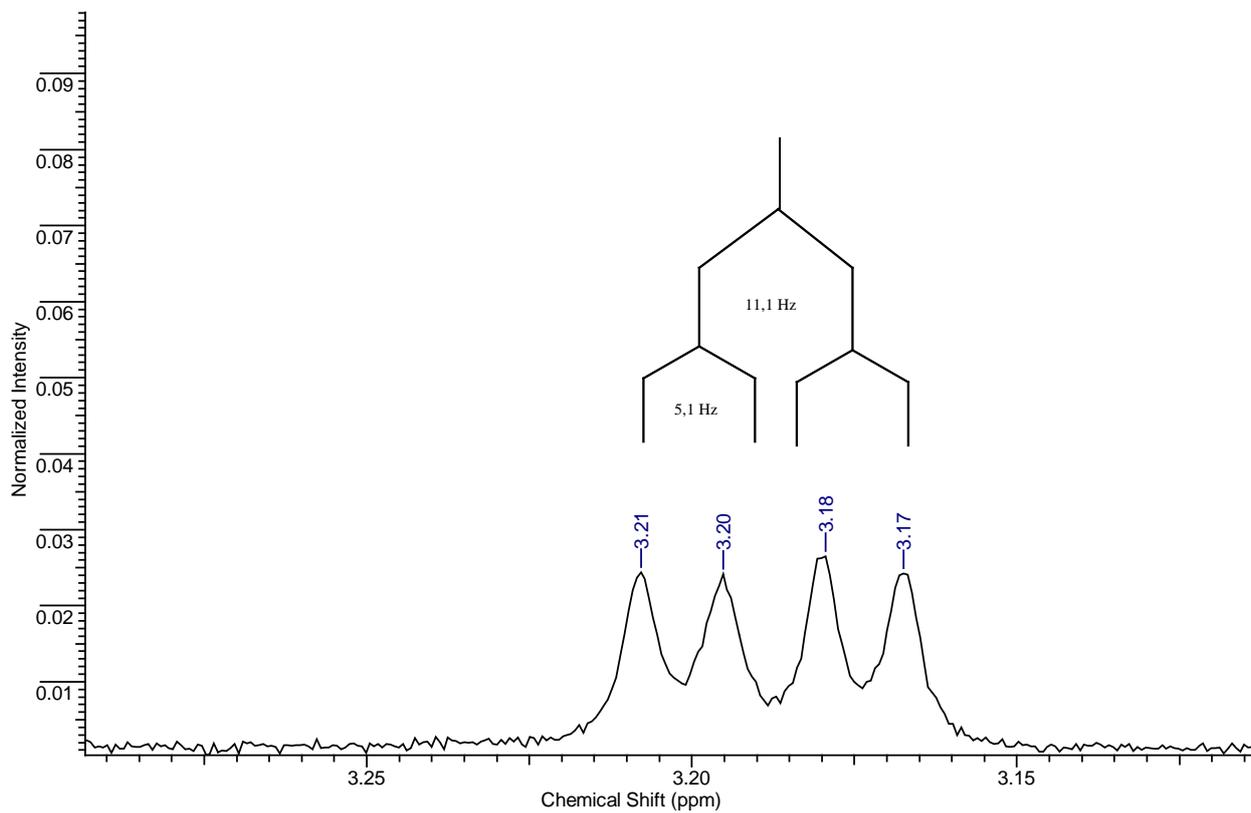
Espectro 1. Cronograma de íons totais e espectro de massa de 6ab 5.



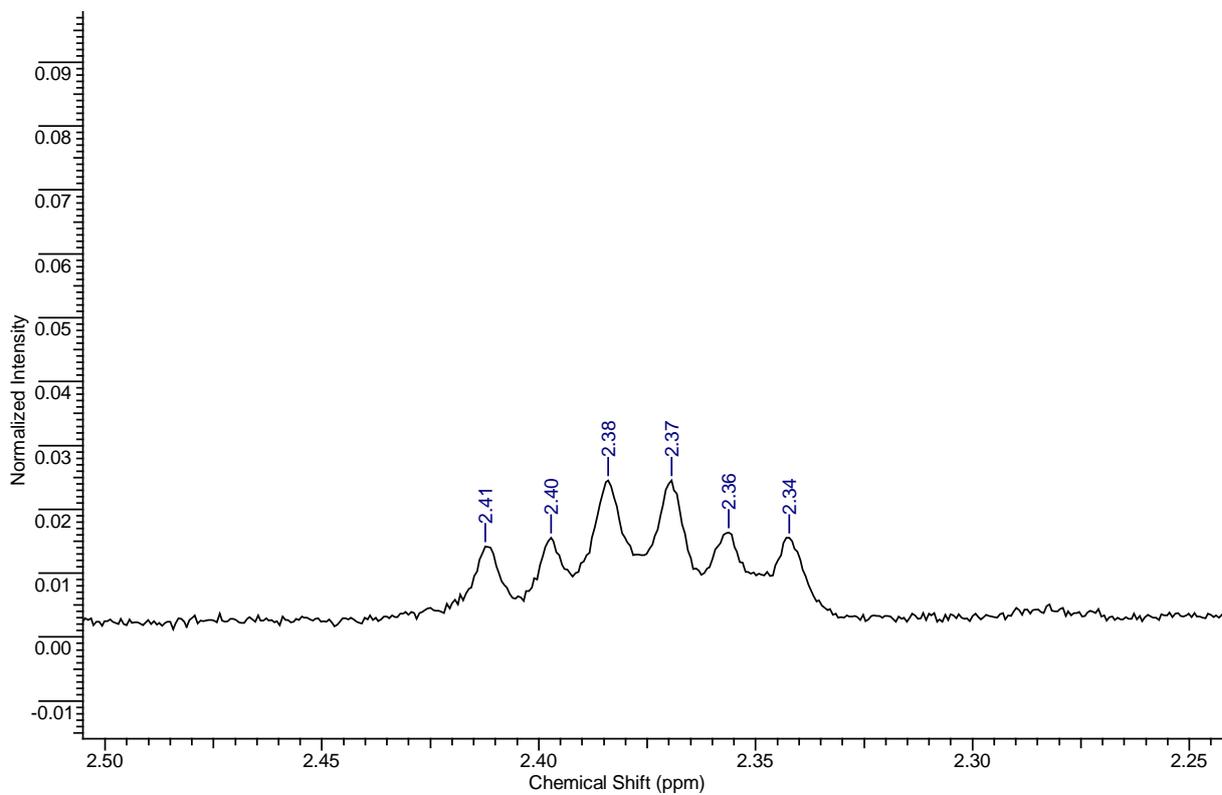
Espectro 2. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de 6 ab 5, ampliação das metilas.



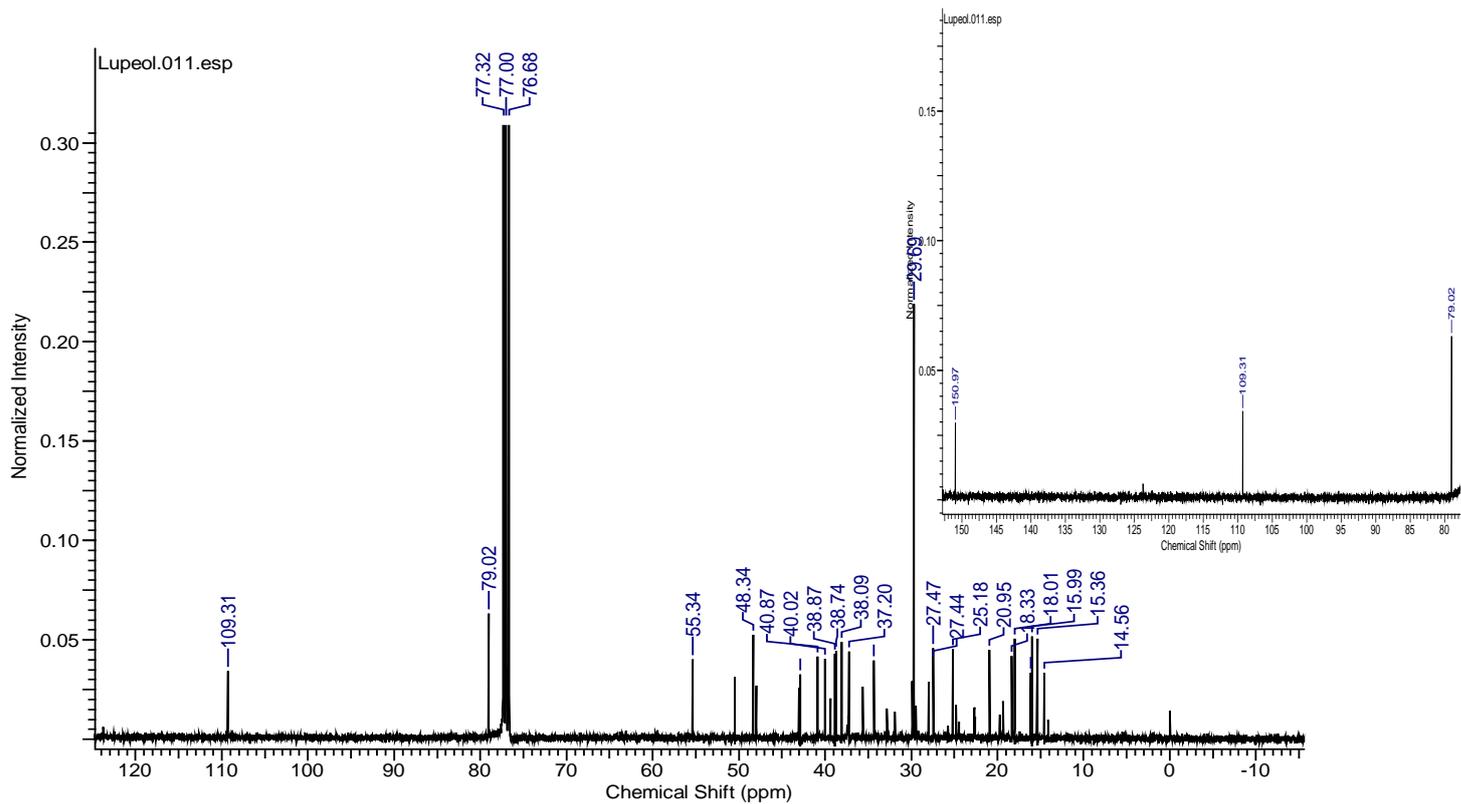
Espectro 3. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de 6 ab 5, ampliação dos hidrogênios olefínicos.



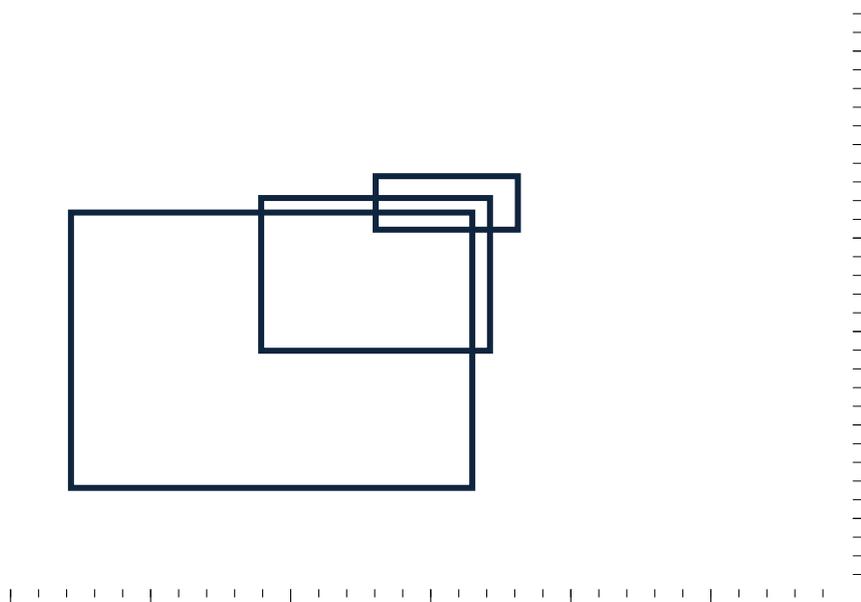
Espectro 4. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de 6 ab 5, ampliação do hidrogênios carbinólico.



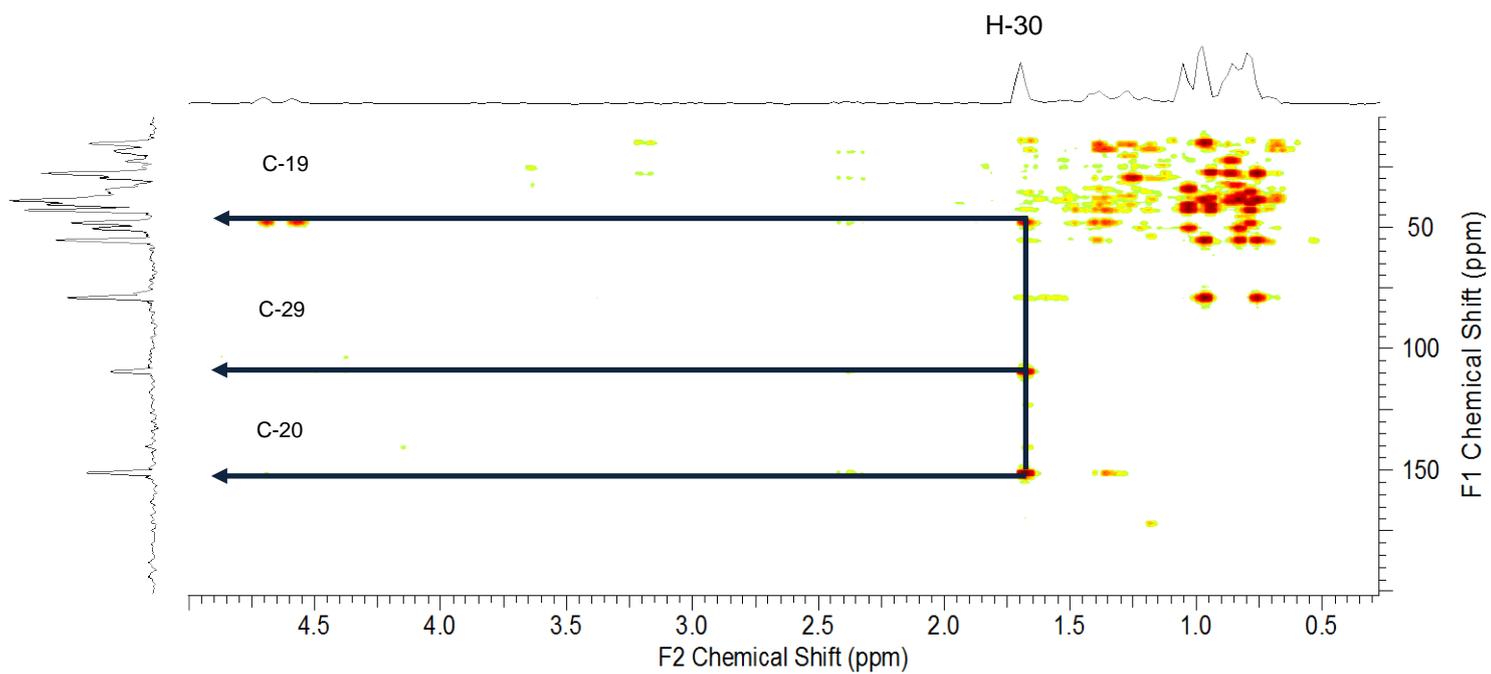
Espectro 5. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de 6 ab 5, ampliação do multipeto.



Espectro 6. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de 6 ab 5.



Espectro 7. Mapa de contorno de HMBC (400 MHz, CDCl_3) de 6ab 5.



Espectro 8. Mapa de contorno de HMBC (400 MHz, CDCl₃) de 6ab 5.

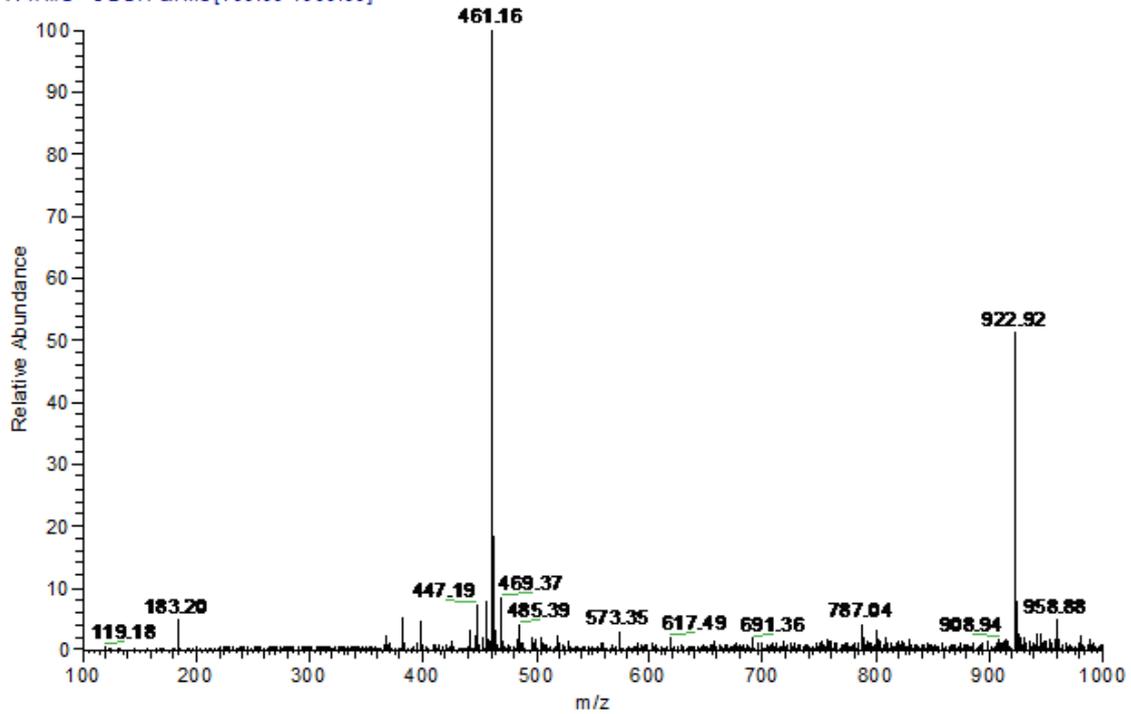


Espectro 10. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) referente aos carbonos da dupla ligação.



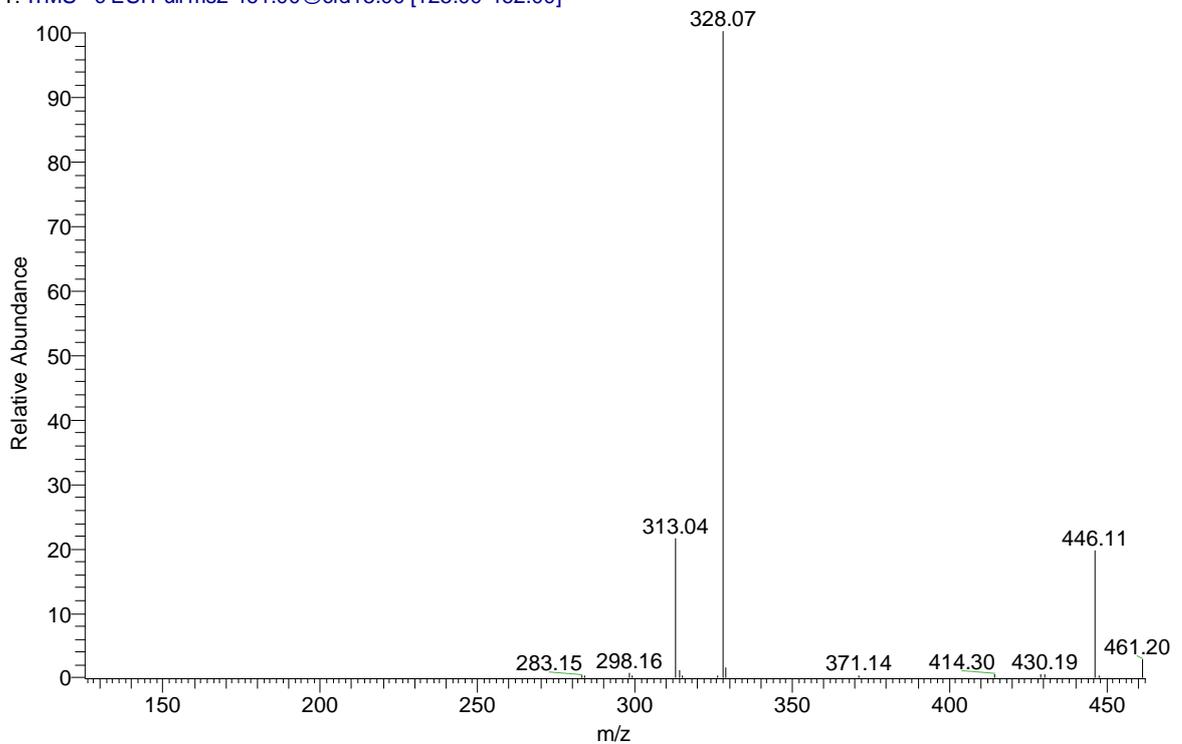
Espectro 11. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) referente ao carbono carbinólico da posição 3.

ECE_ESI #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 1.15E4
T: ITMS - c ESI Full ms [100.00-1000.00]



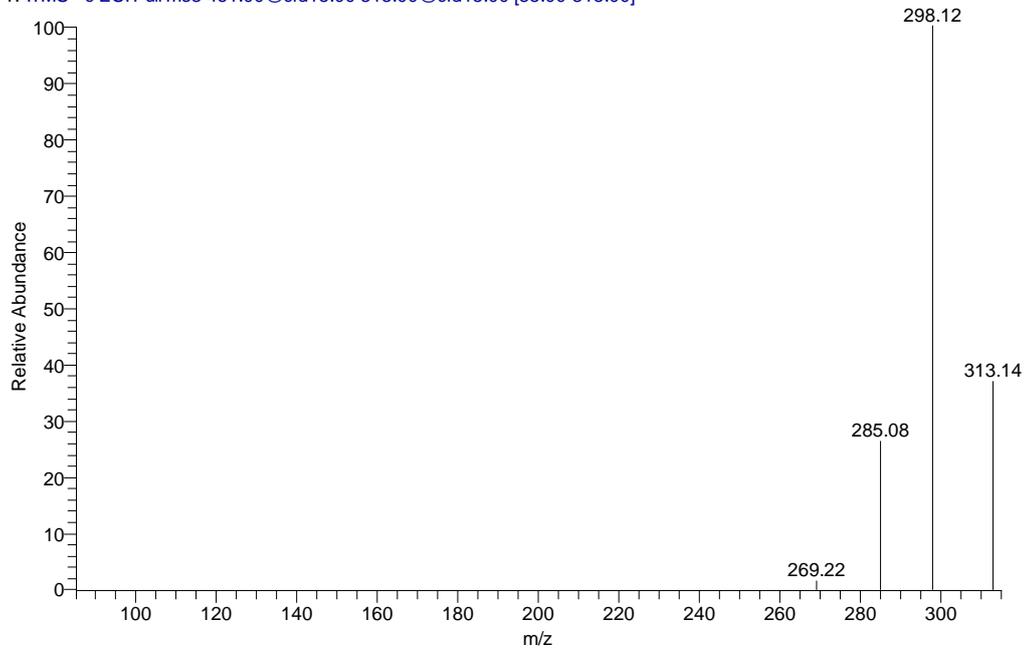
Espectro 12. Espectro de massas da substância CCFR6/ 24-29 / P obtido com ionização de eletrospray (ESI) e detecção de íons negativos.

ECE_ESI#607 RT: 8.87 AV: 1 NL: 1.43E4
T: ITMS - c ESI Full ms2 461.00@cid15.00 [125.00-462.00]



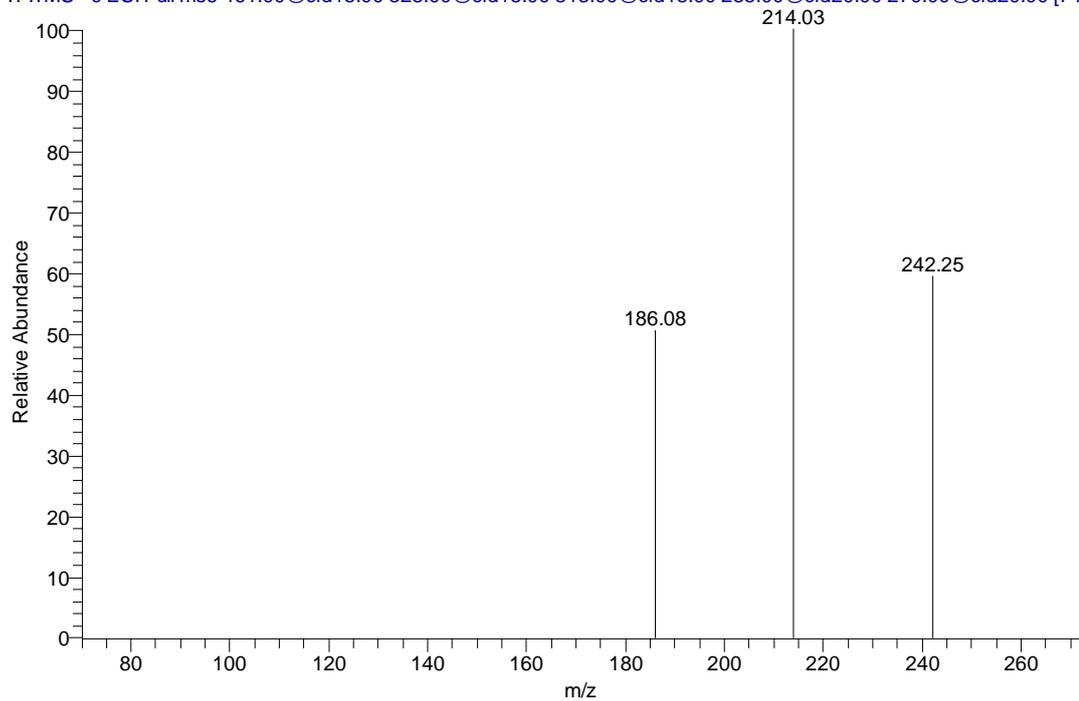
Espectro 13. Espectro de massas MS/MS do pico m/z 461 da substância CCFR6/ 24-29 / P obtido com ionização de eletrospray (ESI) e detecção de íons negativos.

ECE_ESI#649 RT: 9.39 AV: 1 NL: 1.35E3
T: ITMS - c ESI Full ms3 461.00@cid15.00 313.00@cid15.00 [85.00-315.00]

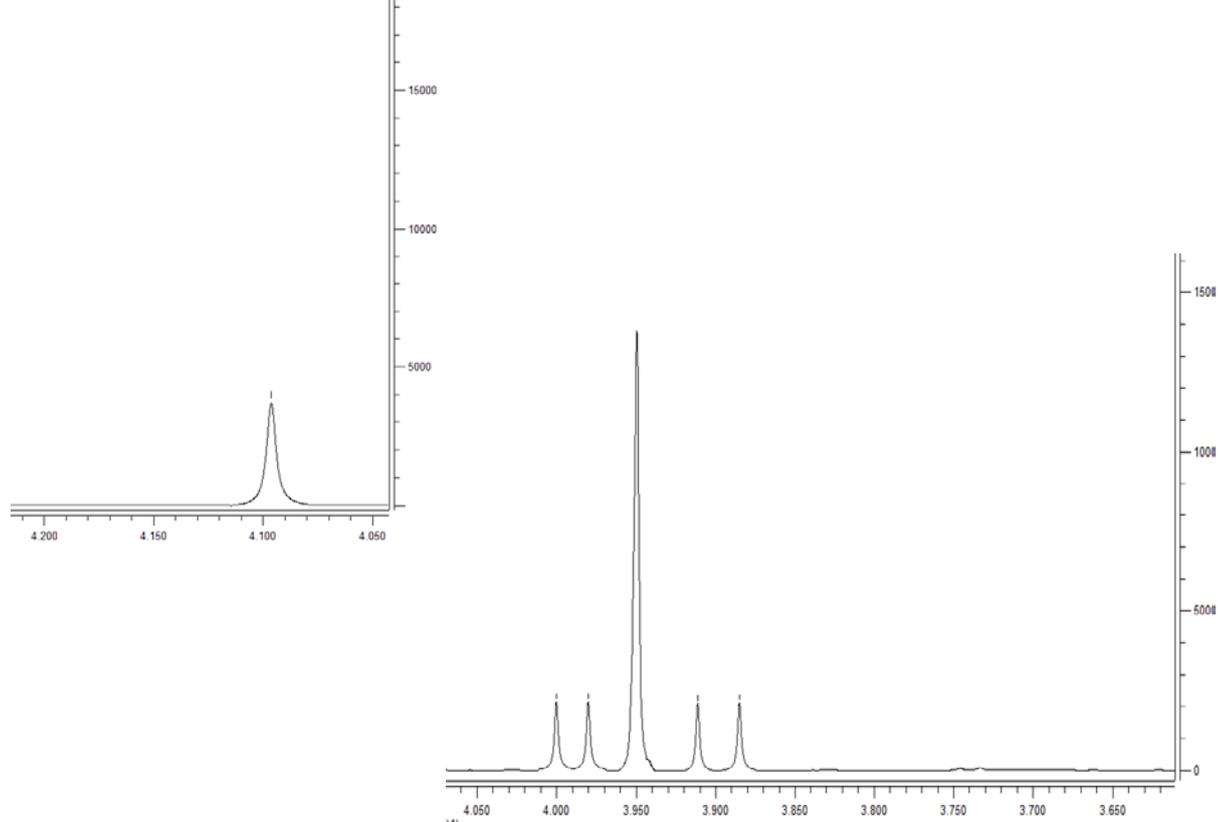


Espectro 14. Espectro de massas MS/MS do pico m/z 313 da substância CCFR6/ 24-29 / P obtido com ionização de eletrospray (ESI) e detecção de íons negativos.

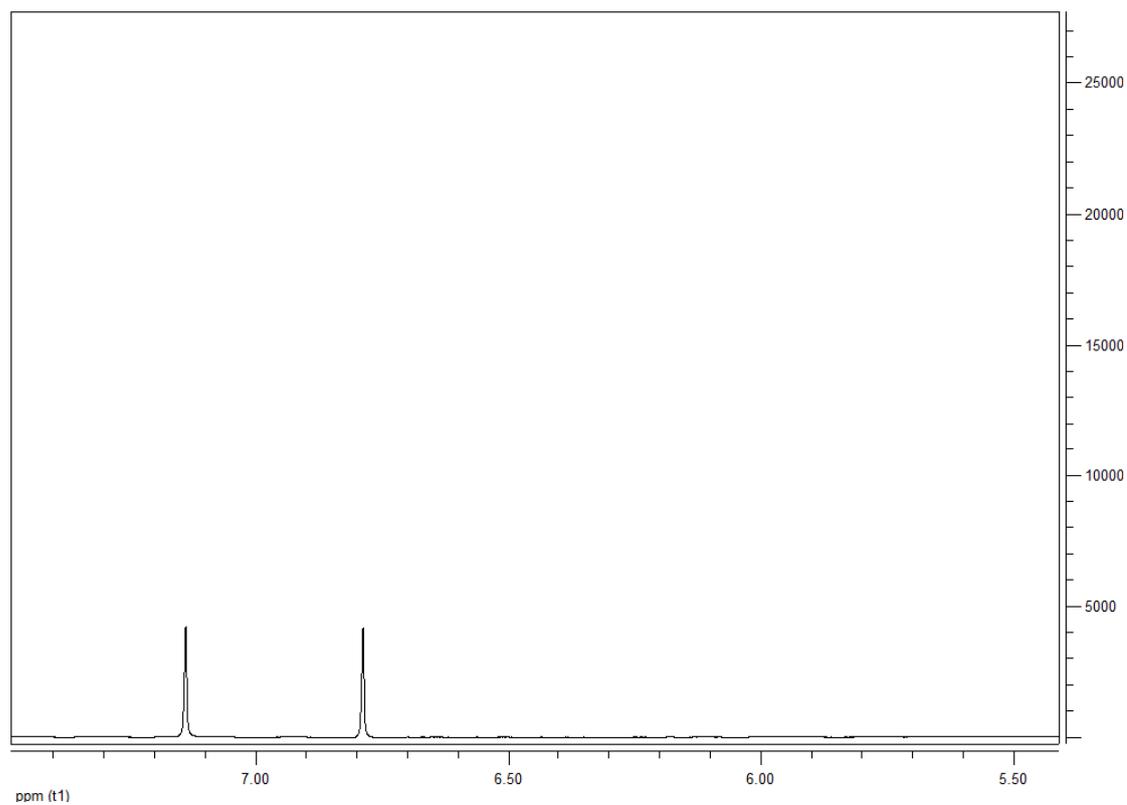
ECE_ESI#409 RT: 6.08 AV: 1 NL: 1.44E1
T: ITMS - c ESI Full ms6 461.00@cid15.00 328.00@cid15.00 313.00@cid18.00 285.00@cid20.00 270.00@cid20.00 [7 ...



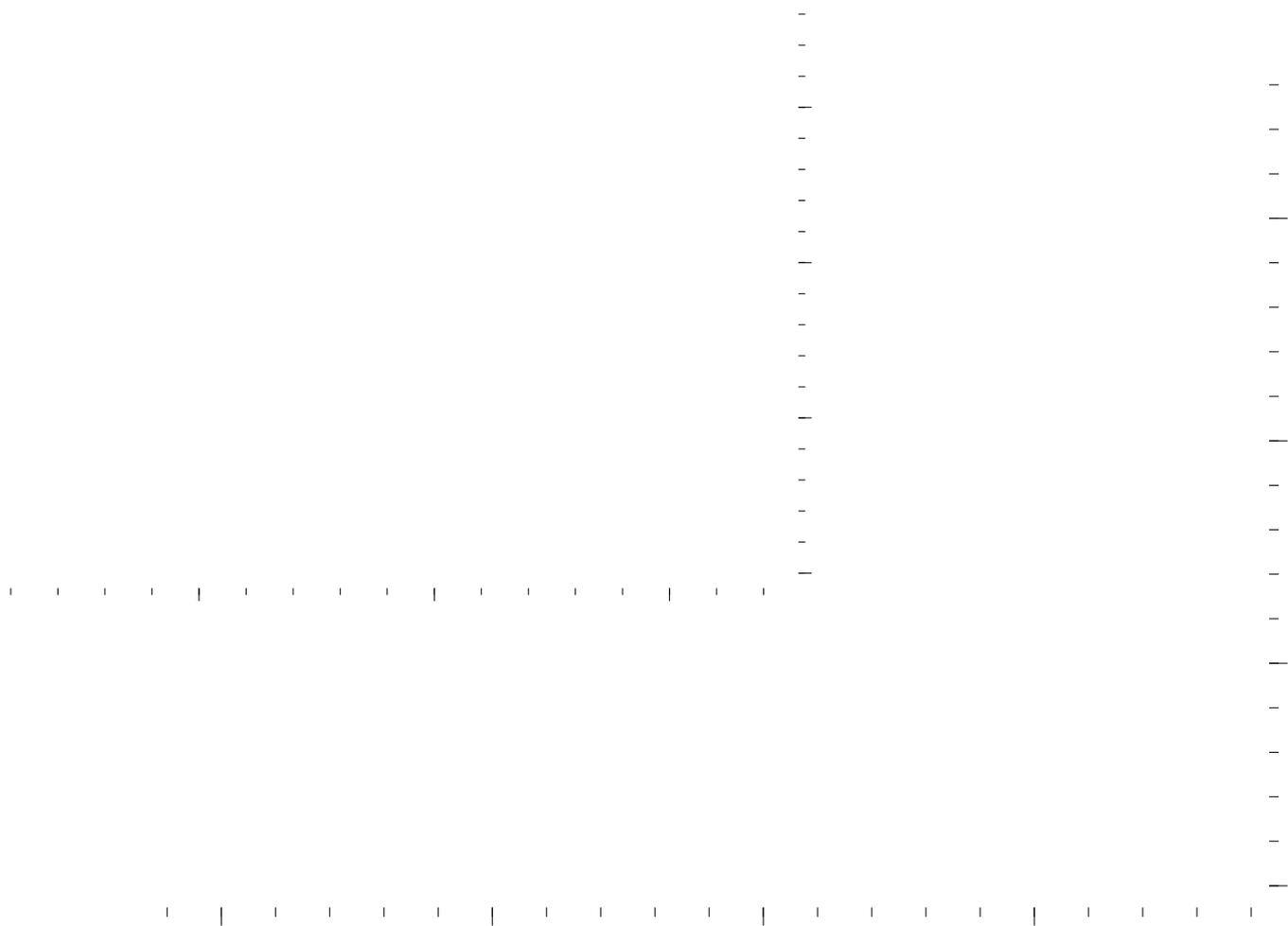
Espectro 15. Espectro de massas MS⁶ do pico m/z 242 da substância CCFR6/ 24-29 / P obtido com ionização de eletrospray (ESI) e detecção de íons negativos.



Espectro 16. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de CCFR6/ 24-29 / P referente aos sinais simples dos grupos de metoxila.

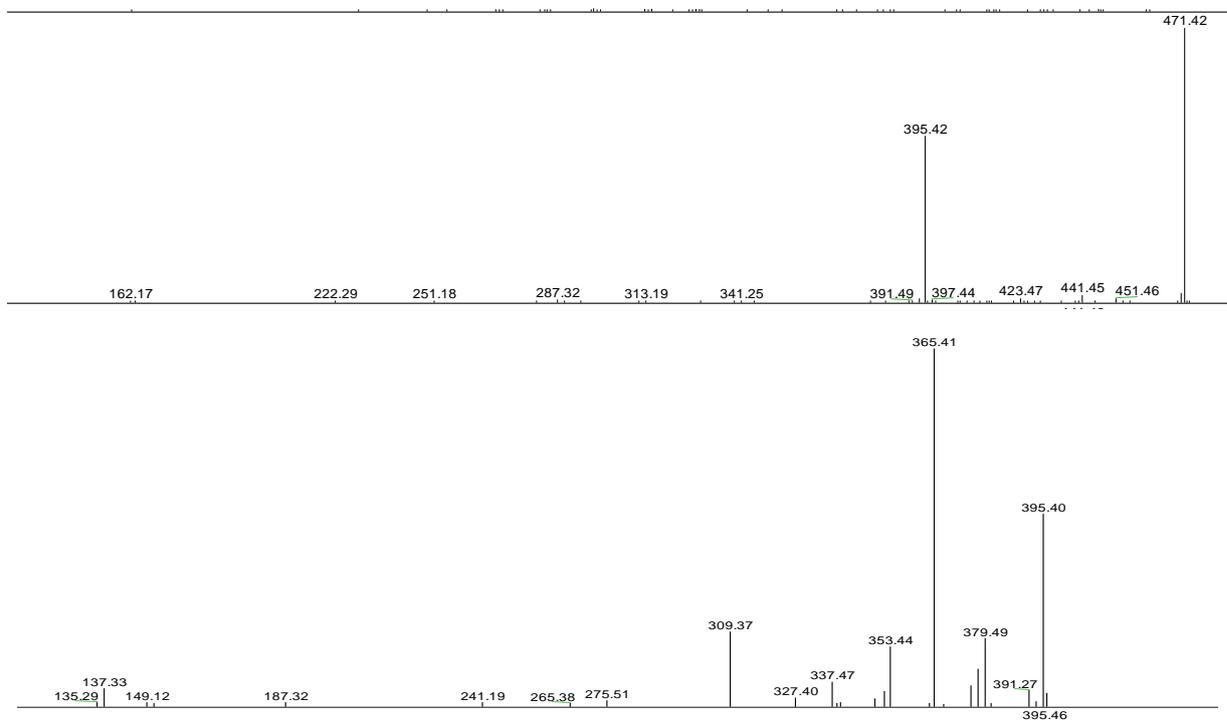


Espectro 17. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de CCFR6/ 24-29 / P.

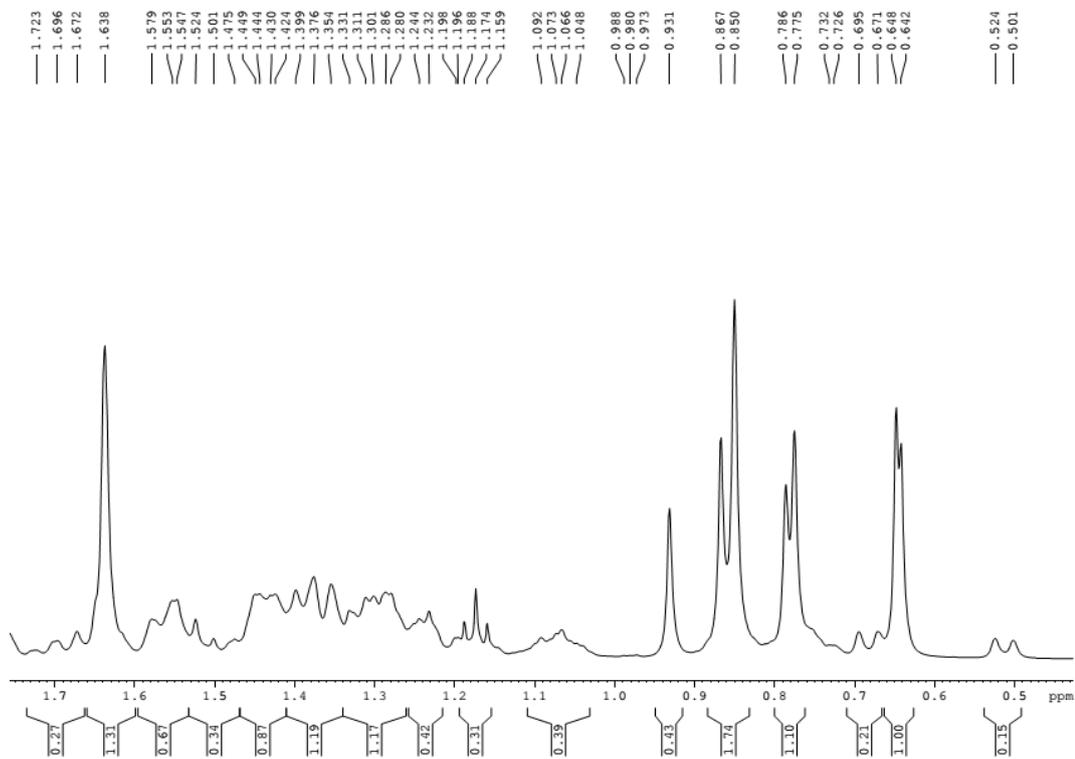


Espectro 18. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de CECFR2/ 4_7.

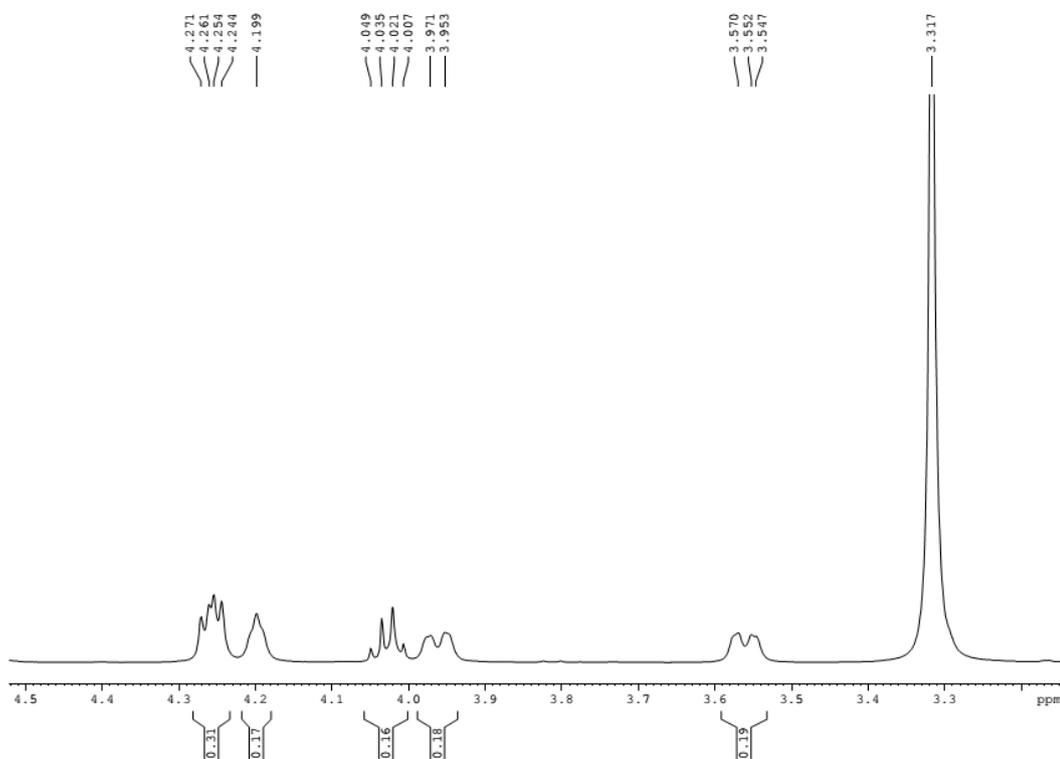
Espectro 19. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de CECFR2/ 4_7.



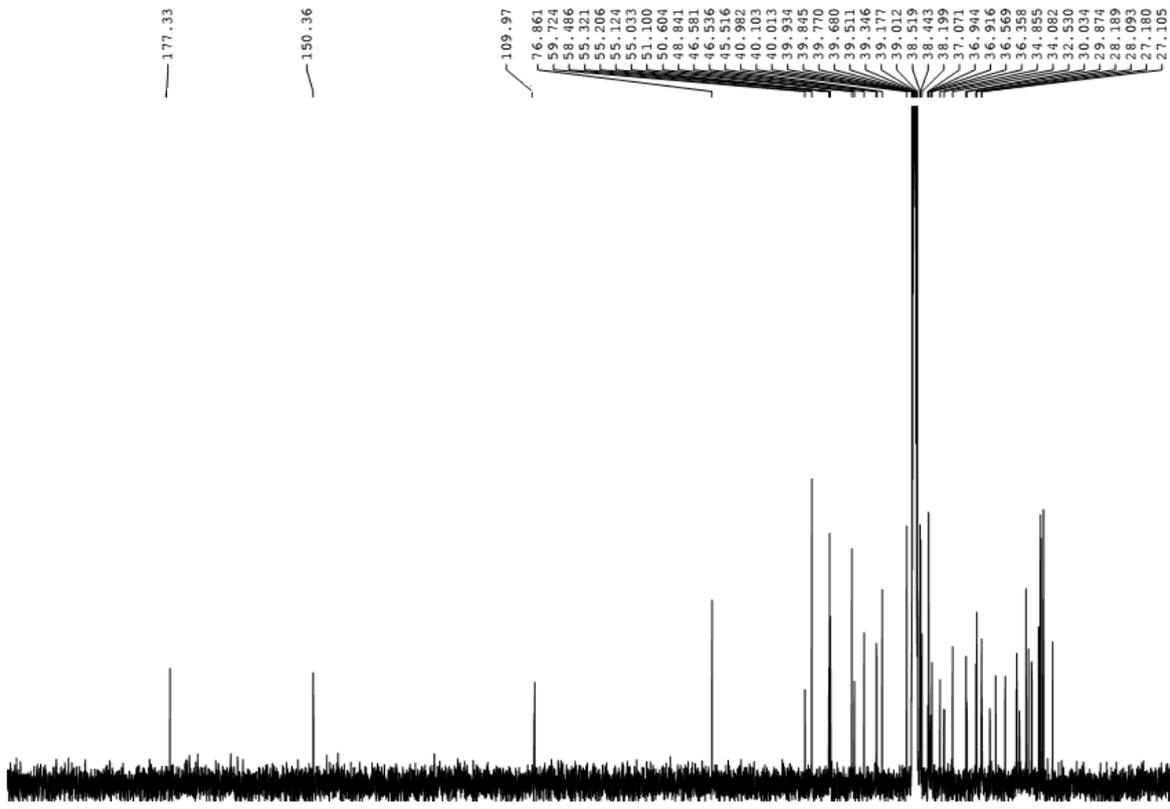
Espectro 20. Espectro de massas de CECFR4_5/ 58_63.



Espectro 21. Espectro de RMN de ^1H de CECFR4_5/58_63, em destaque os sinais referentes às metilas.

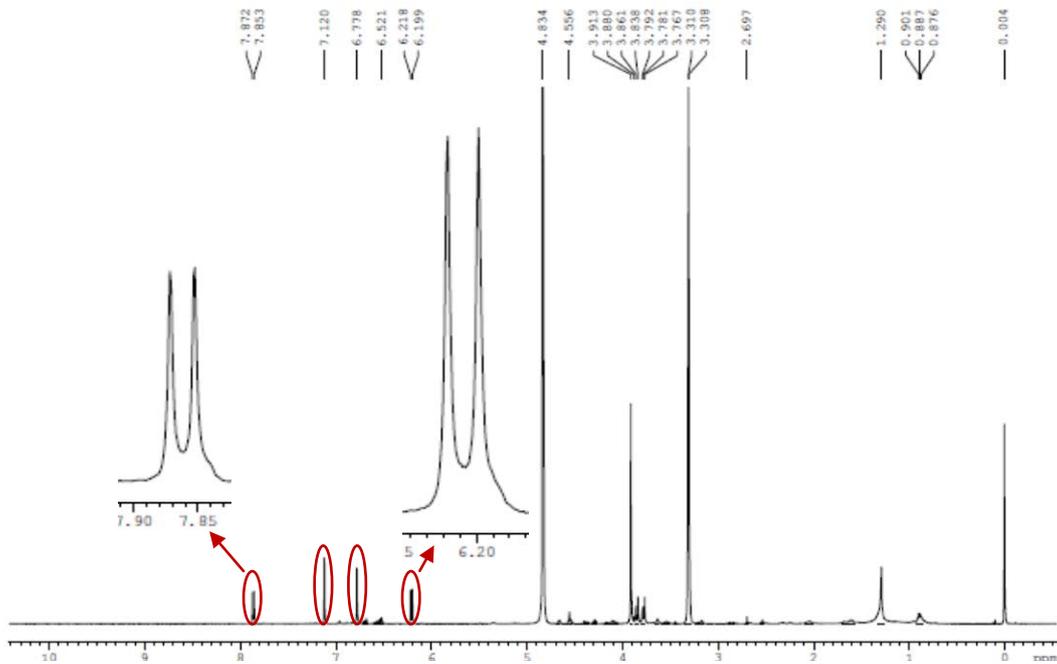


Espectro 22. Espectro de RMN de ^1H de CECFR4_5/58_63, em destaque os sinais referentes aos duplos dupletos de hidroxilas e hidrogênios metilênicos hidroxilados.



Espectro 23. Espectro de RMN de ^{13}C de CECFR4_5/58_63.

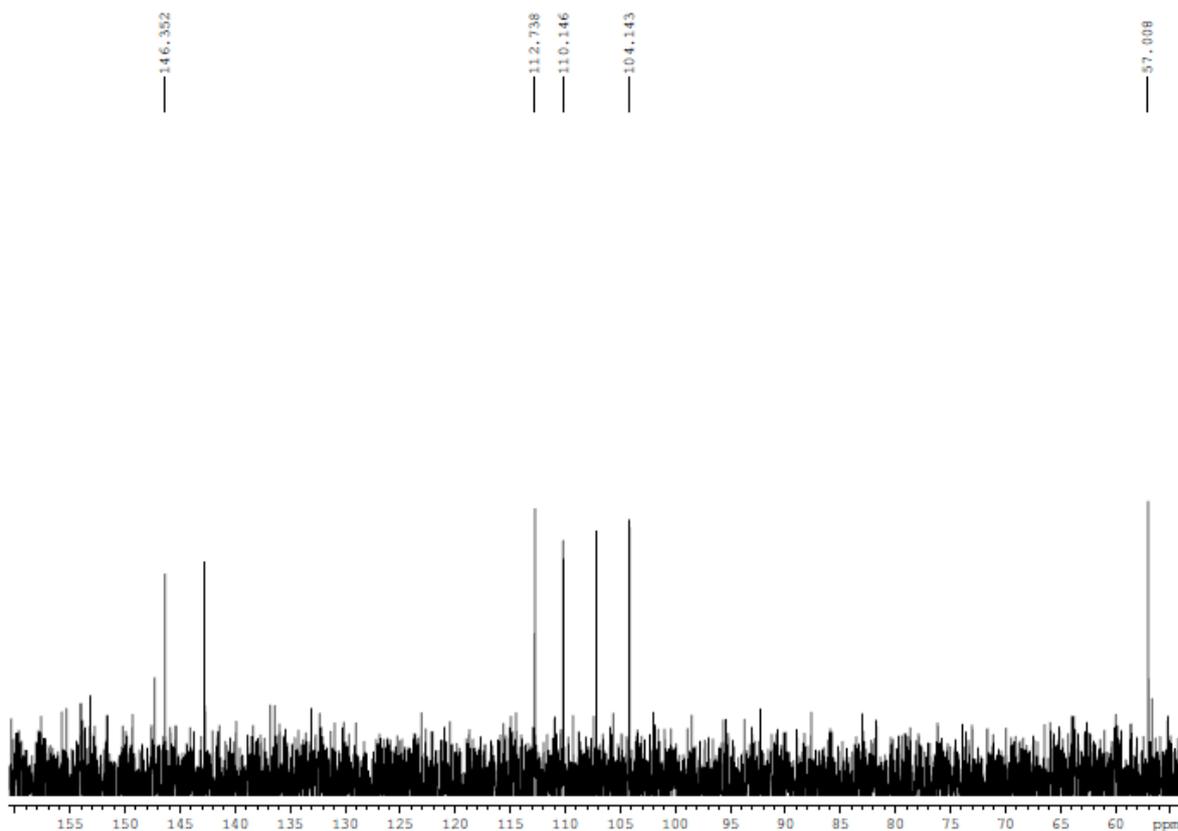
2C/5i-54 Azul AA - Ana Claudia
op. Charles



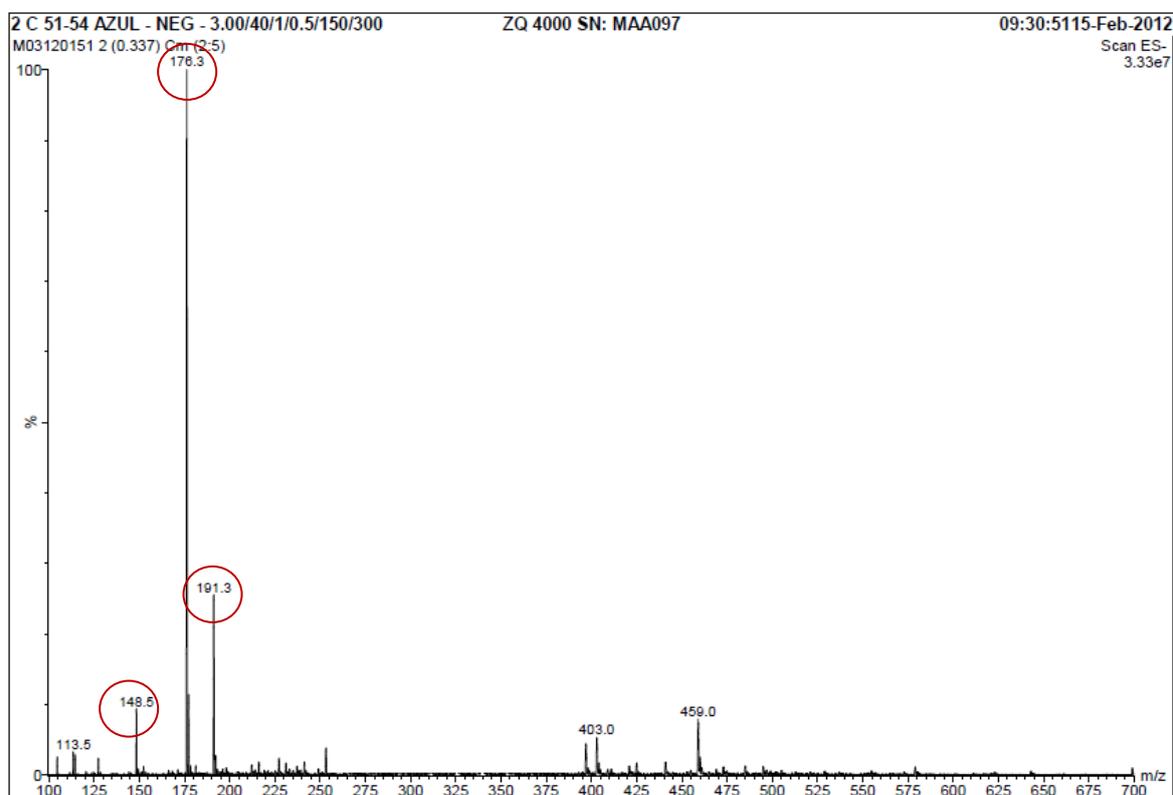
NAME pn101120084
EXPNO 10
PROCNO 1
Date_ 20120125
Time 15.22
INSTRUM spect
PROBHD mm DUL 13C-1H/
PULPROG zg30
ID 16384
SOLVENT MeOD
NS 1024
DS 0
SWH 8012.820
FIDRES 0.489064
AQ 1.0224741
RG 1290.2
EM 62.400
DE 4.00
TE 298.0
D1 2.0000000
TD0 1

CHANNEL f1
NUC1 1H
P1 9.00
PL1 -3.00
PLW 17.5415350
SFO1 500.1335009
SI 16384
SF 500.1300107
SE EM
SFB 0
LB 0.30
GB 0
PC 1.00

Espectro 24. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, MeOD) de Azul/ECCECAa.

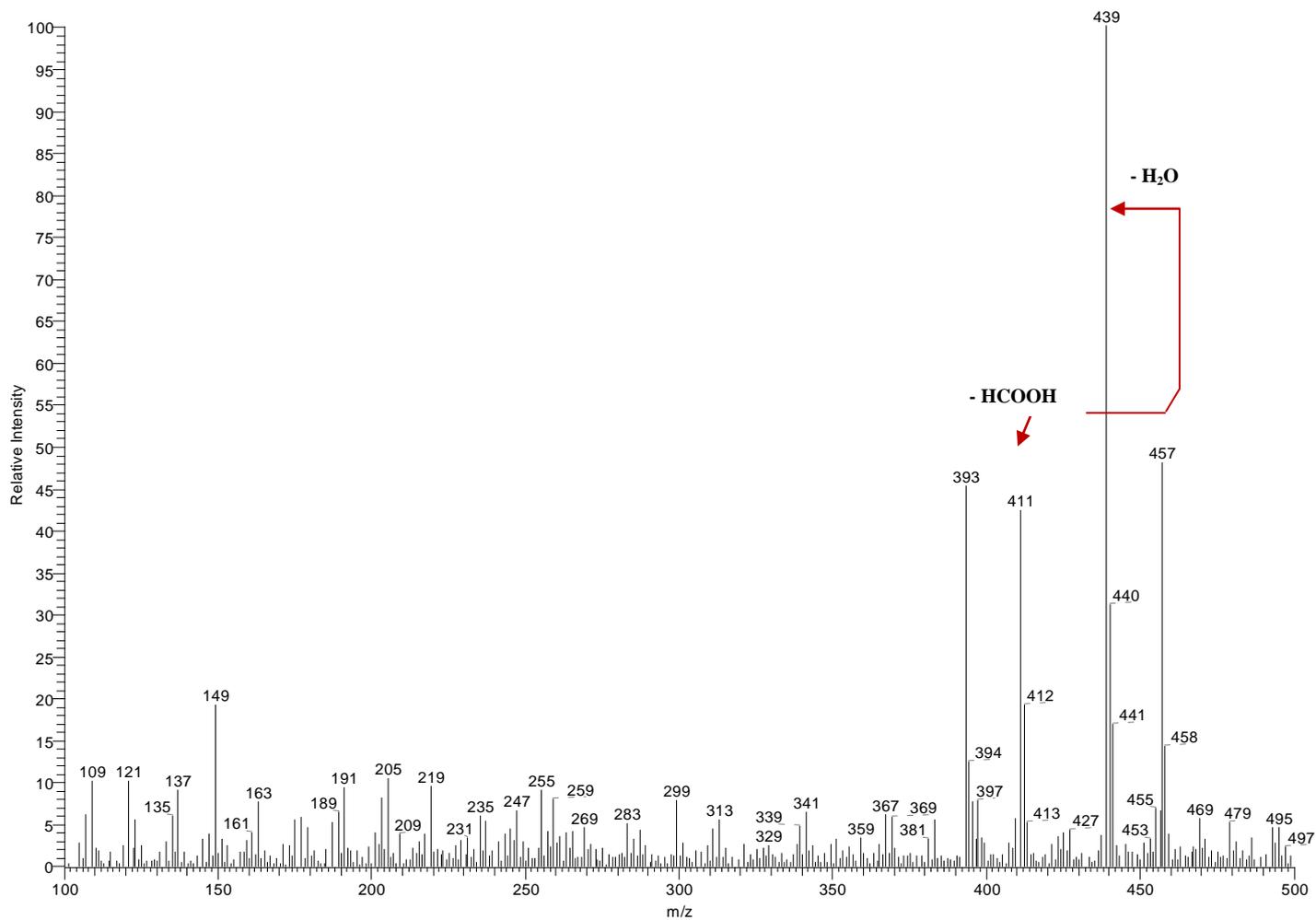


Espectro 25. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, MeOD) de Azul/ECCECAa.



Espectro 26. Espectro de massas da substância Azul/ECCECAa obtido com ionização de eletrospray (ESI) e detecção de íons negativos.

#2753 IT: 29.536 ST: 0.69 uS: 5 CR: 2.84E3
F: ITMS + c APCI corona Full ms [100.00-500.00]



Espectro 27. Espectro de massas da substância PECC 4 obtido com ionização química a pressão atmosférica (APCI) e detecção de íons positivos.



Espectro 28. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO) de PECC 4.



**Espectro 29. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO) de PECC 4.
Em destaque a ampliação da região das metilas.**



Espectro 30. Espectro de RMN ¹H (500 MHz, DMSO) de PECC 4. Em destaque a ampliação da região entre δ_H 3,31 – 4,68.

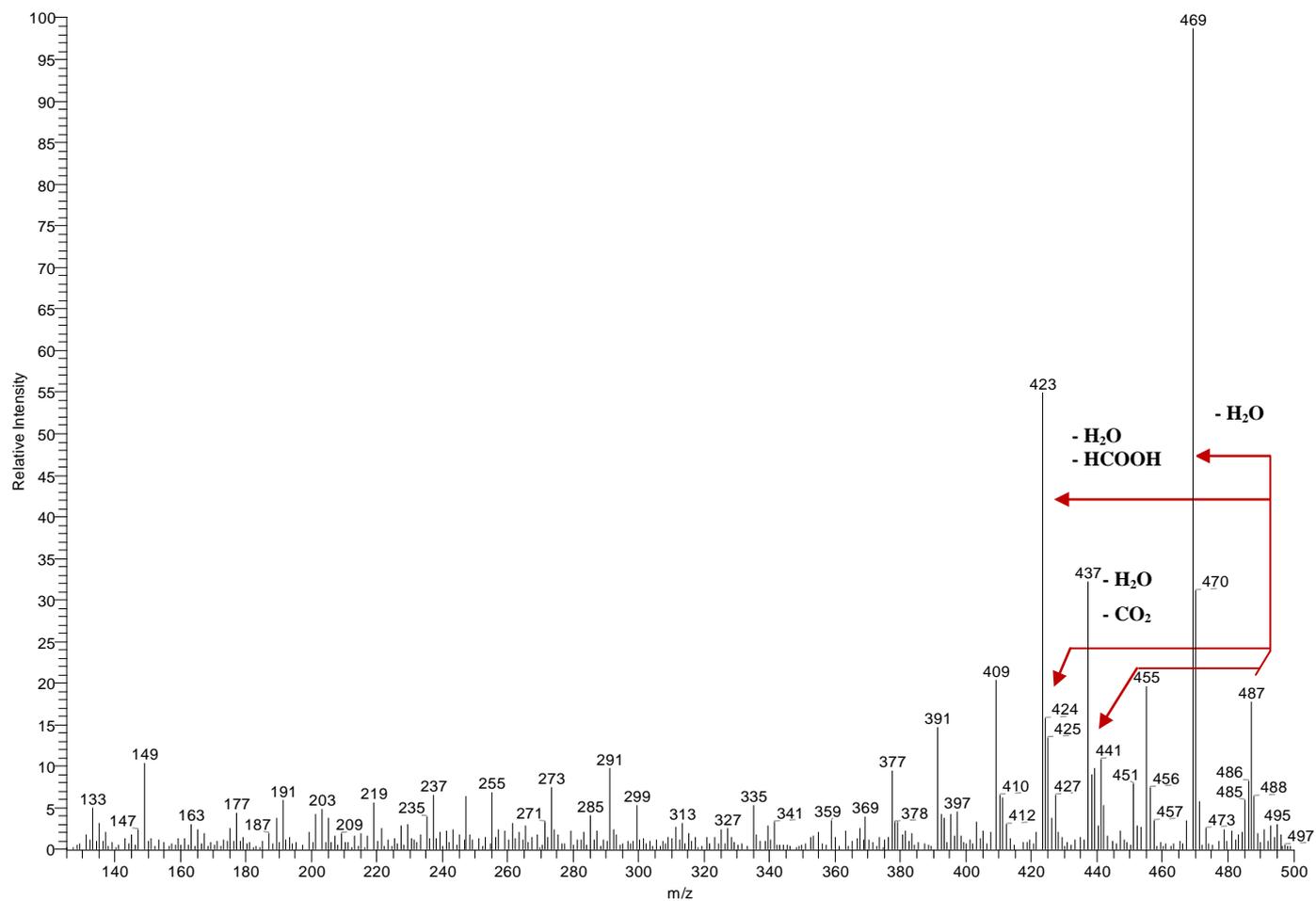


Espectro 31. Espectro de RMN ¹³C (125 MHz, DMSO) de PECC 4.

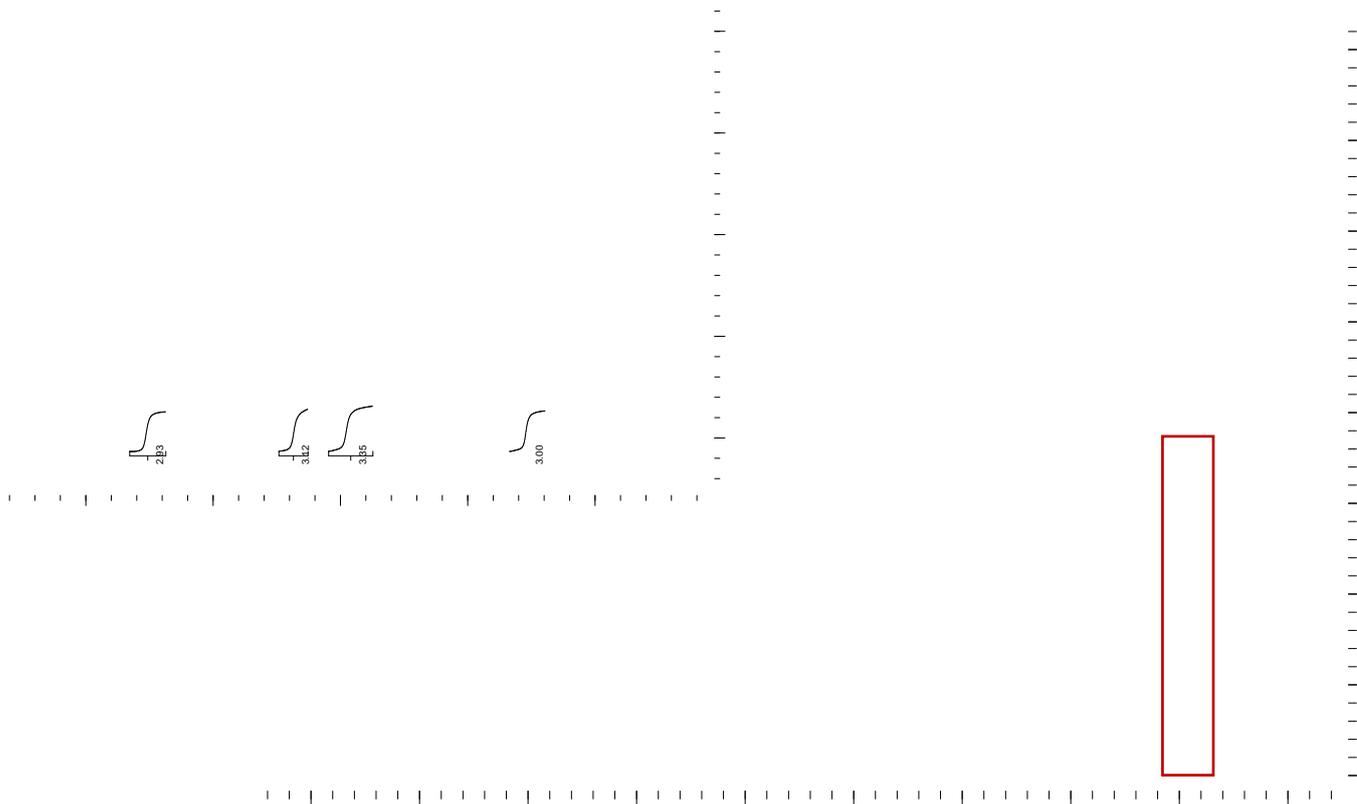


Espectro 32. Ampliação do espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO) de PECC 4.

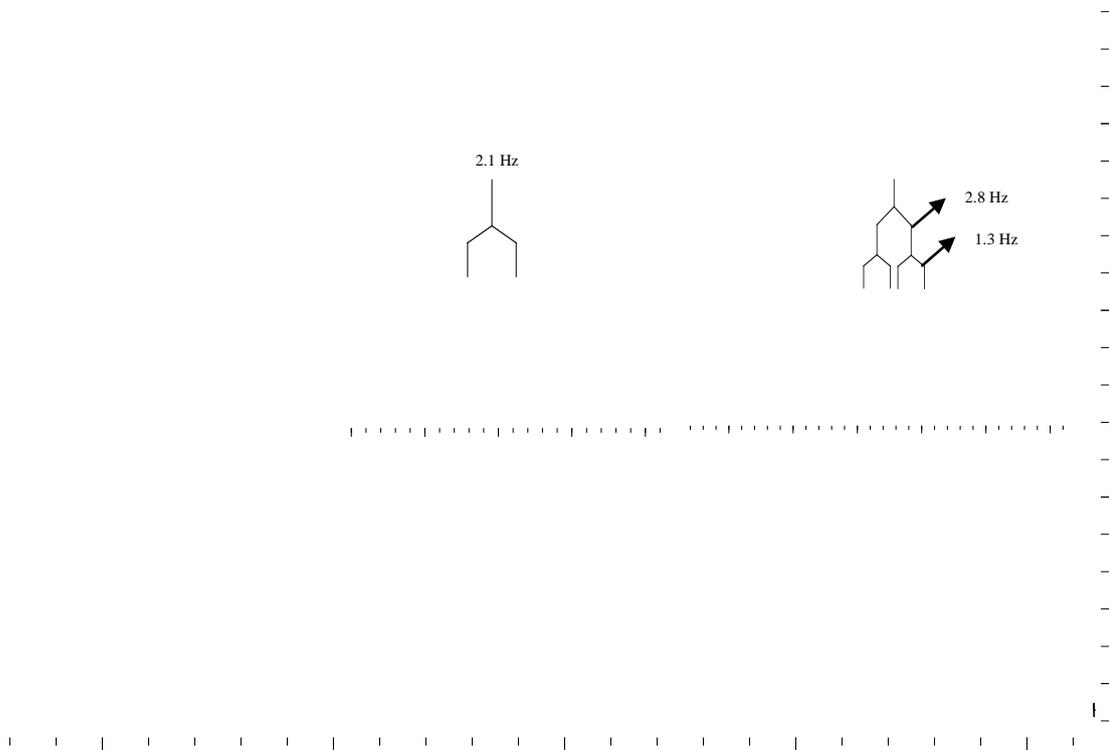
#3621 IT: 19.148 ST: 0.62 uS: 5 CR: 5.61E3
F: ITMS + c APCI corona Full ms [125.00-500.00]



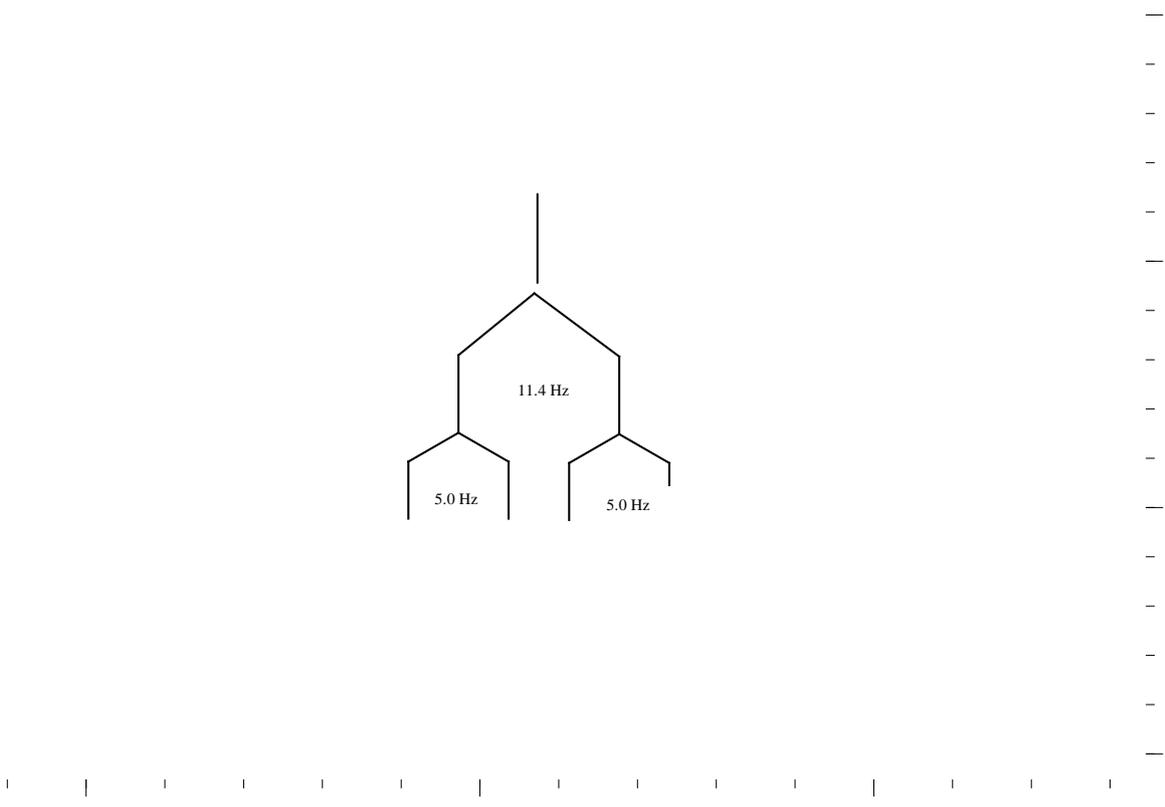
Espectro 33. Espectro de massas da substância PECC 5 obtido com ionização química a pressão atmosférica (APCI) e detecção de íons positivos.



Espectro 34. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3 / MeOD) do PECC 5, com ampliação das metilas.



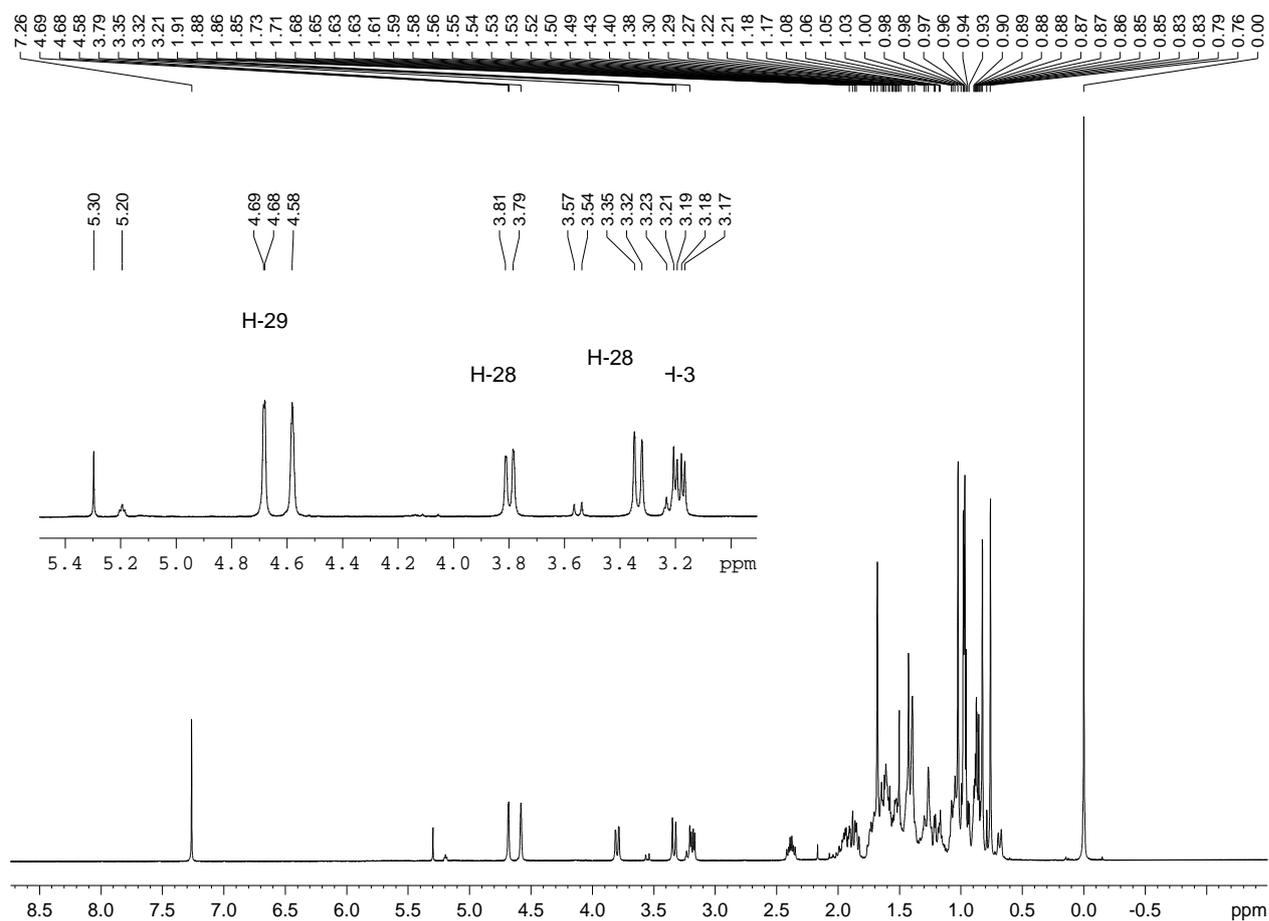
Espectro 35. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3 / MeOD) do PECC 5, com ampliação dos hidrogênios olefínicos.



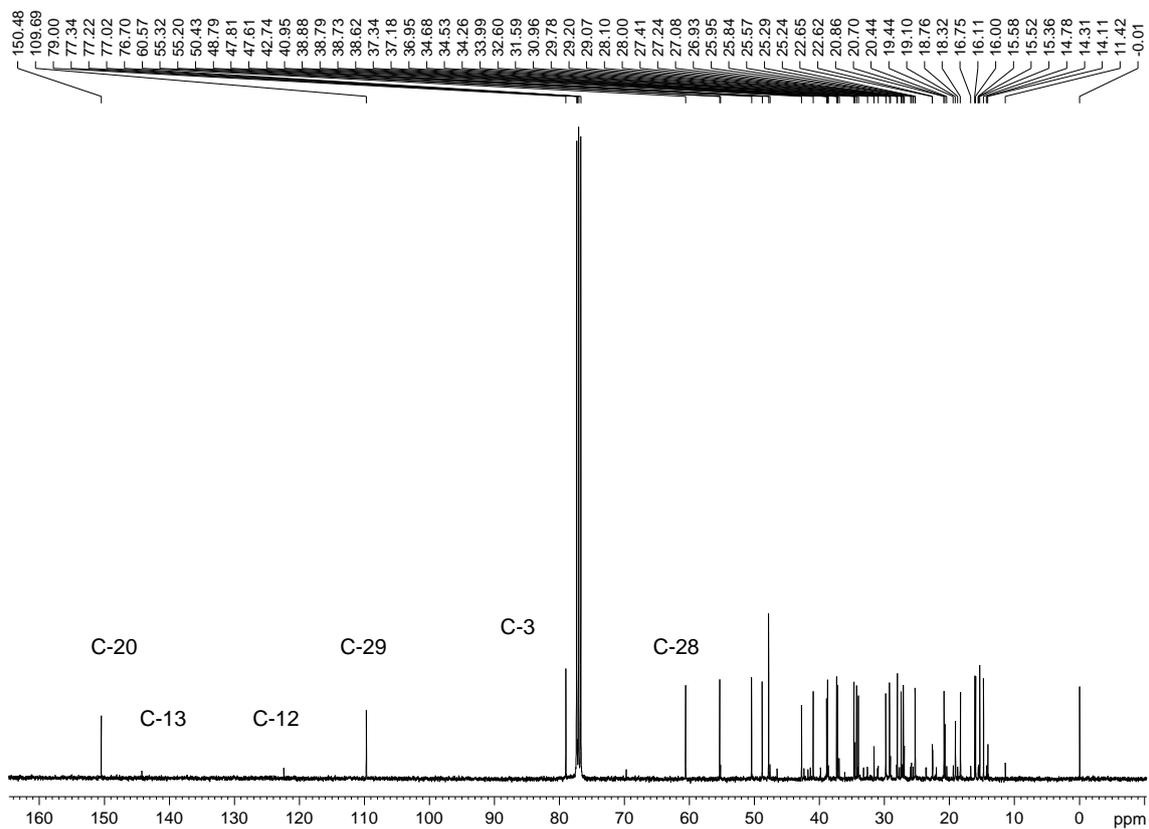
Espectro 36. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3 / MeOD) do PECC 5, com ampliação no próton H-3.



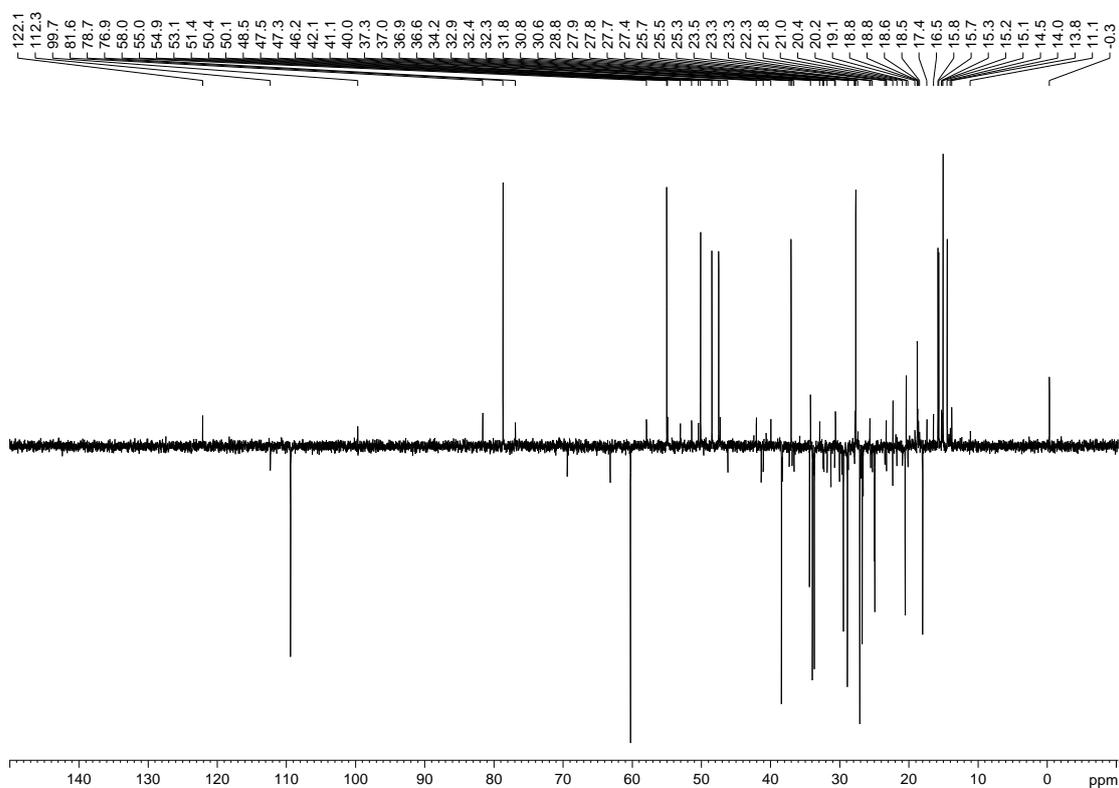
Espectro 37. Espectro de RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl₃ / MeOD) do PECC 5.



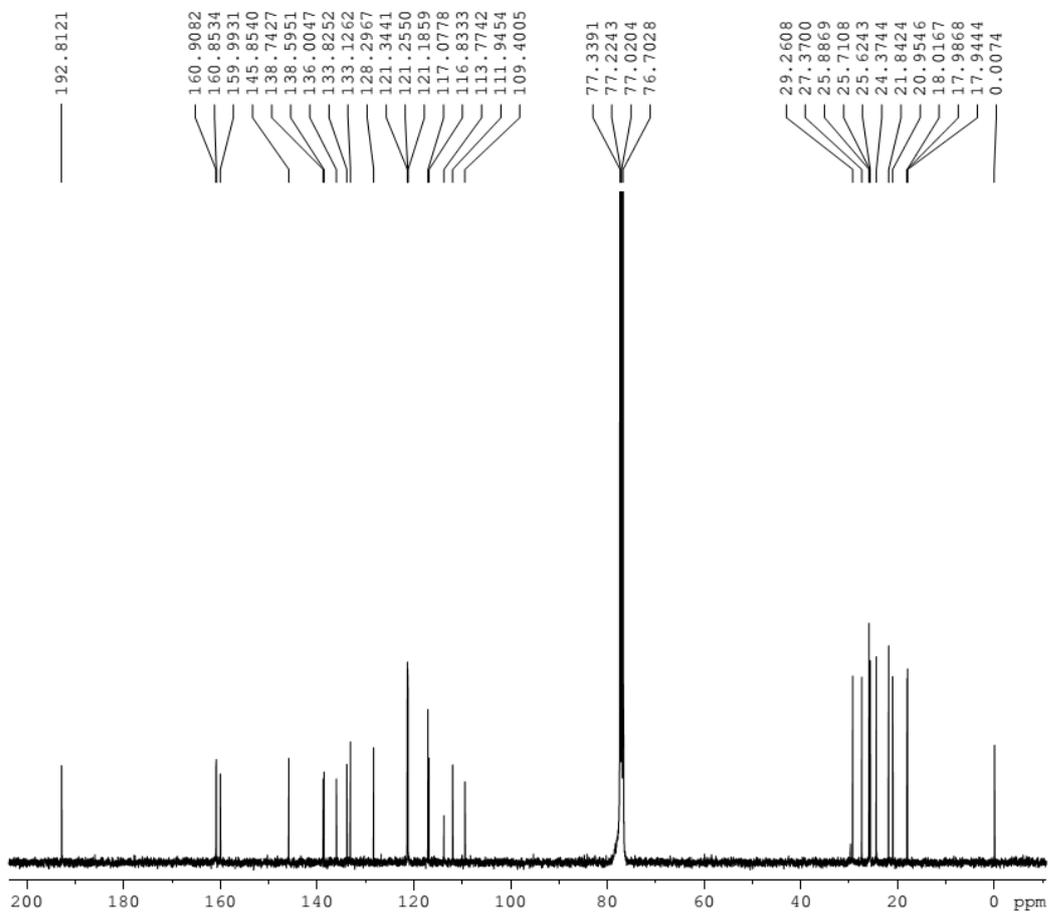
Espectro 38. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3 / MeOD) de CRF1/1_9, com ampliação na região de 2,3 a 5,4 ppm.



Espectro 39. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3 / MeOD) de CRF1/1_9.



Espectro 40. Espectro de DEPT 135 (125 MHz, CDCl_3 / MeOD) de CRF1/1_9.



Espectro 41. Espectro de RMN de ^{13}C de ECFVc 4_5/24_25/P.

Espectro 42. Espectro de RMN de ^1H de ECFVc 4_5/24_25/P, ampliação dos grupos hidroxilas.



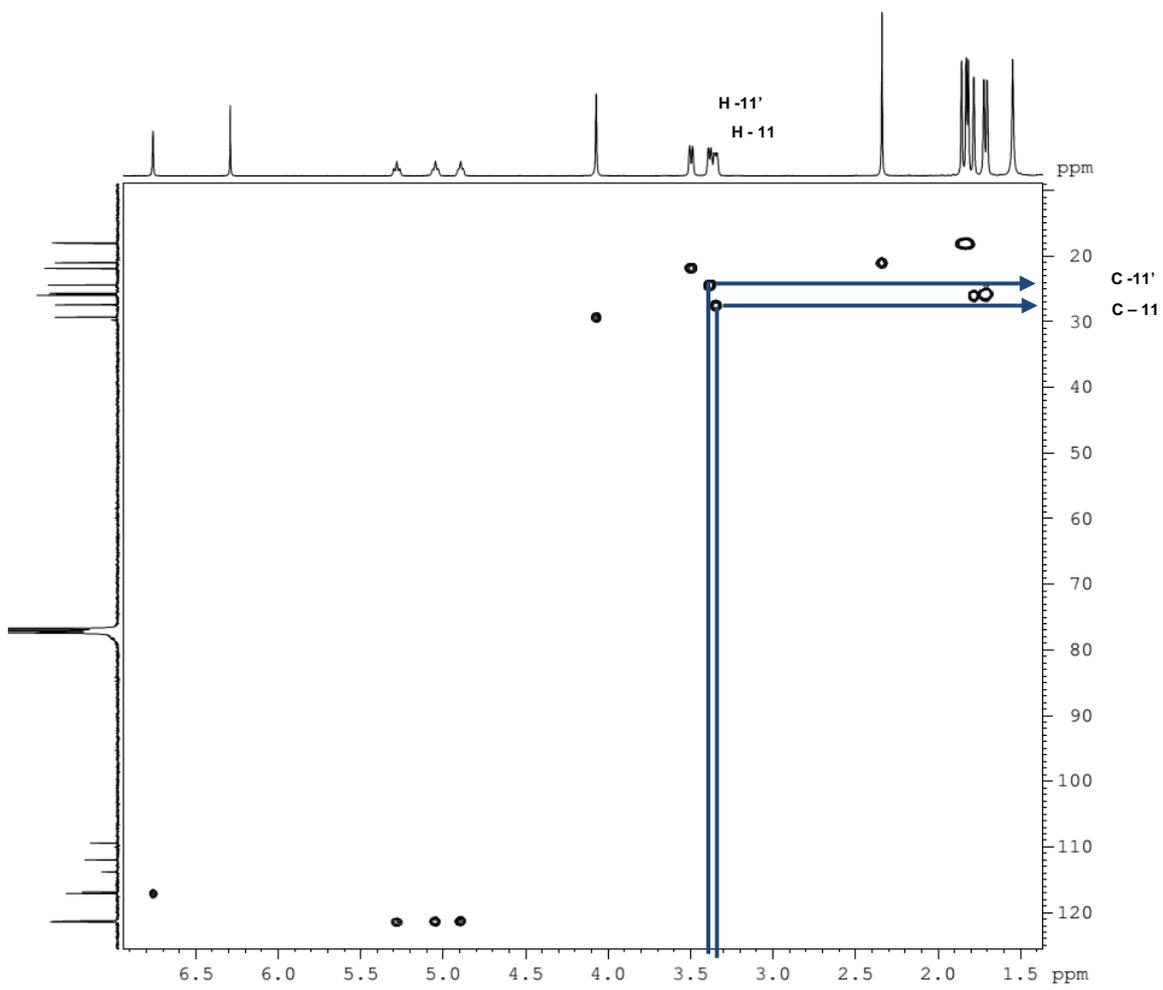
Espectro 43. Espectro de RMN de ^1H de ECFVc 4_5/24_25/P, ampliação do próton enólico H-2.



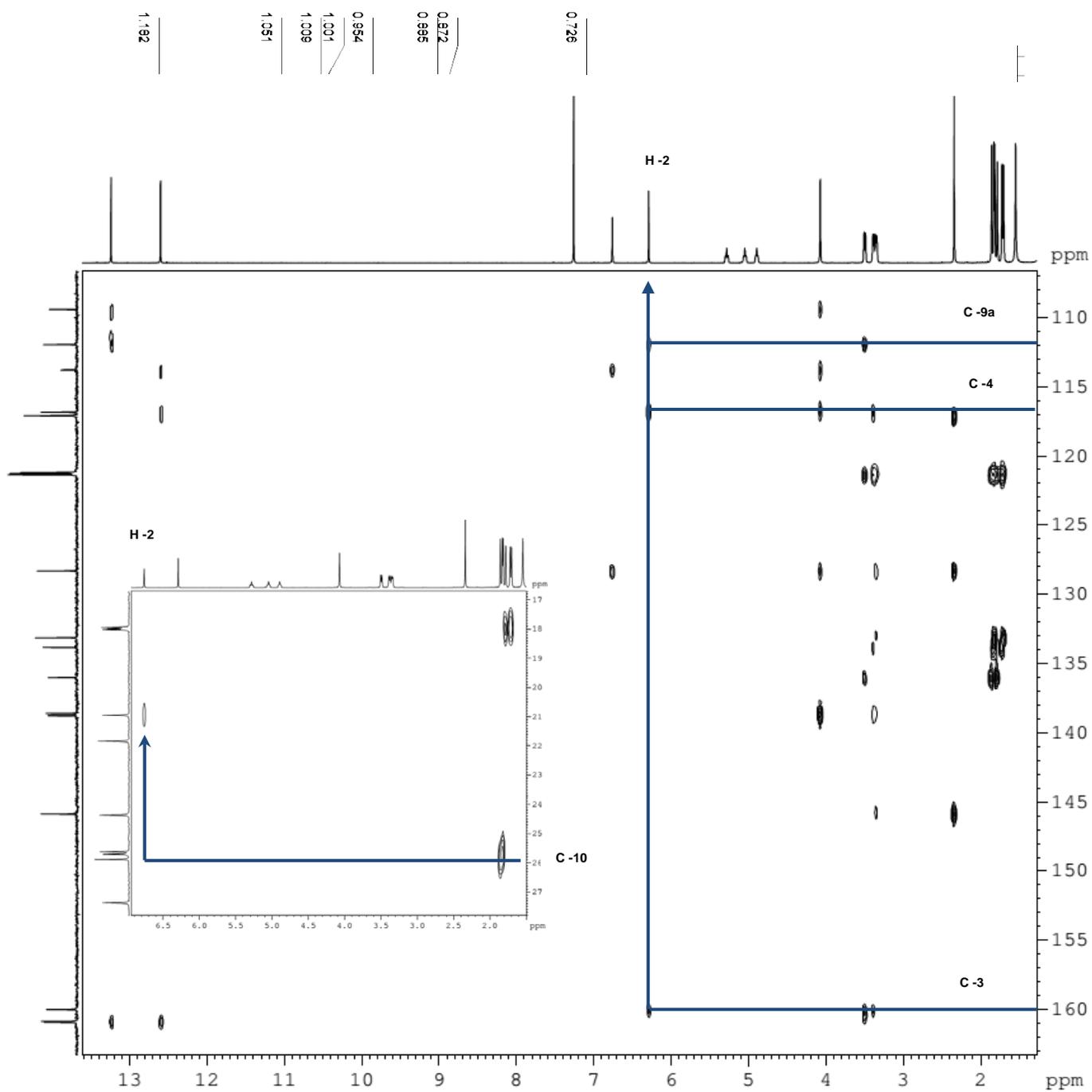
Espectro 44. Espectro de RMN de ^1H de ECFVc 4_5/24_25/P, ampliação dos tripletos referente aos prótons olefínicos.



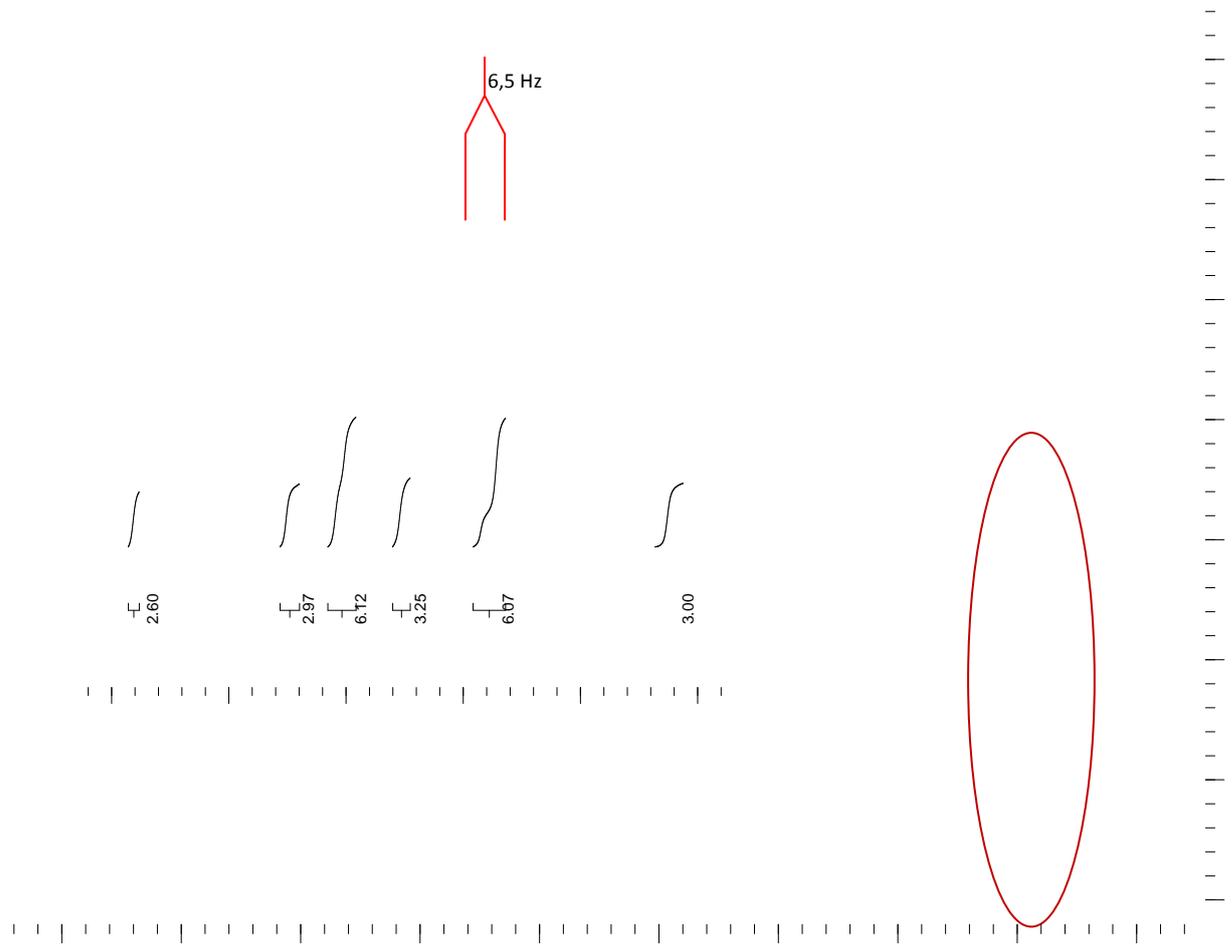
Espectro 45. Espectro de RMN de ^1H de ECFVc 4_5/24_25/P, ampliação do duplete e duplo-duplete referente a prótons metilênicos.



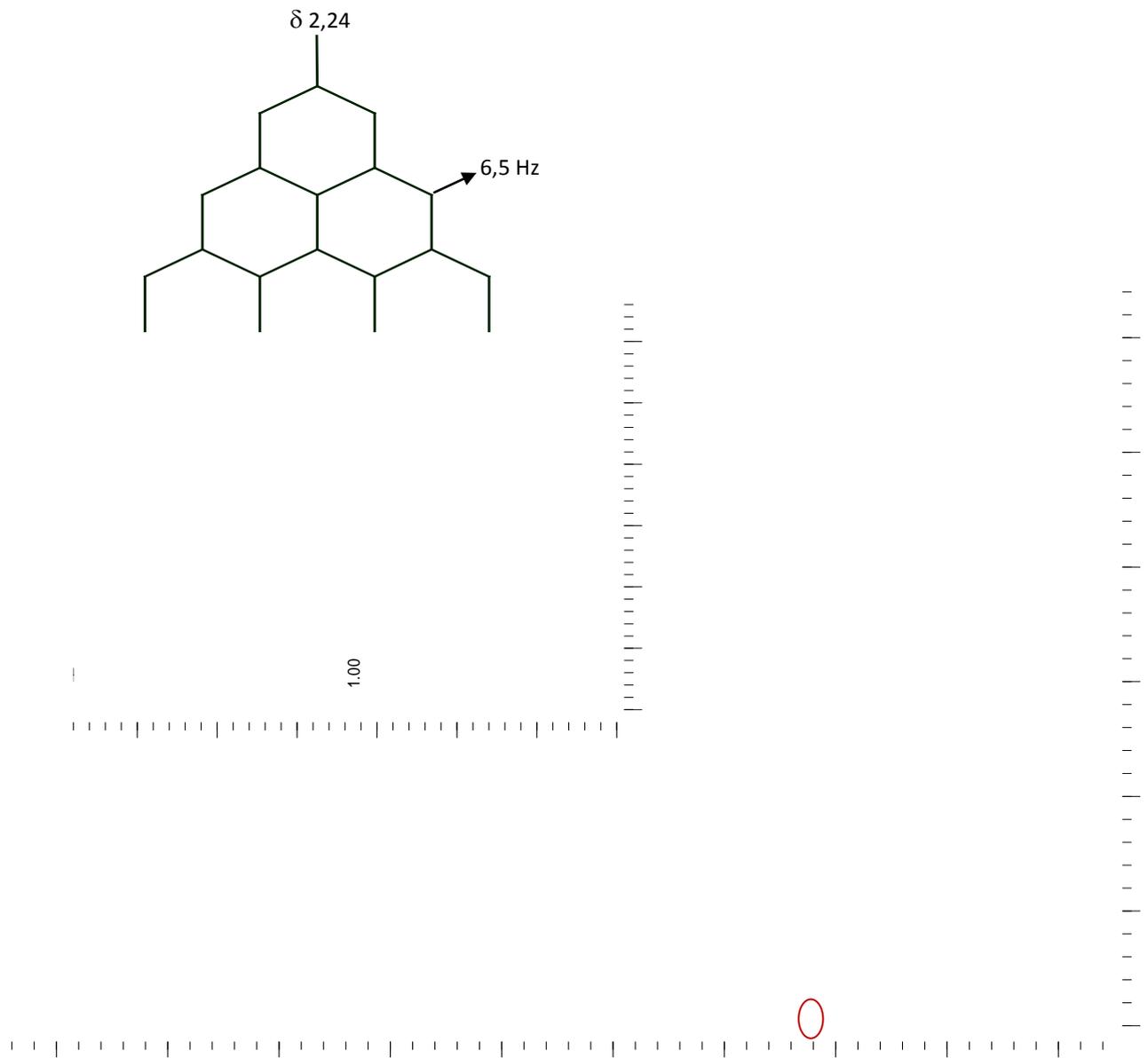
Espectro 46. Espectro de RMN HSQC de ECFVc 4_5/24_25/P.



Espectro 47. Espectro de RMN HMBC de ECFVc 4_5/24_25/P, correlações do H-2.

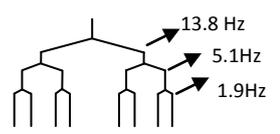


Espectro 48. Espectro de RMN de ^1H de ECFvc 6_8 (CDCl_3 ; 500 MHz) – destaque da região das metilas.



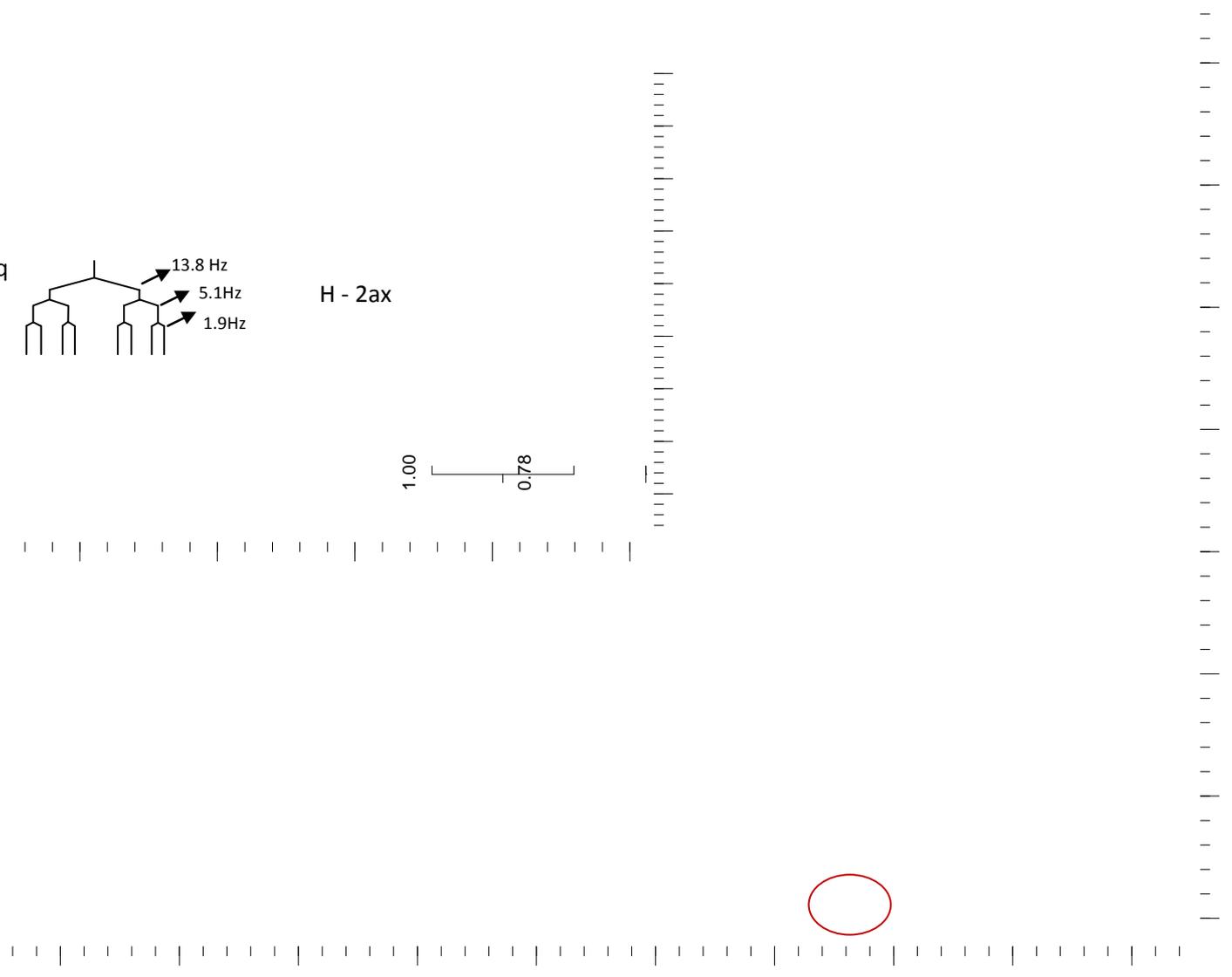
Espectro 49 – Espectro de RMN de H^1 em expansão parcial com sinais de quarteto da substancia ECFVC 6_8.

H 2- eq

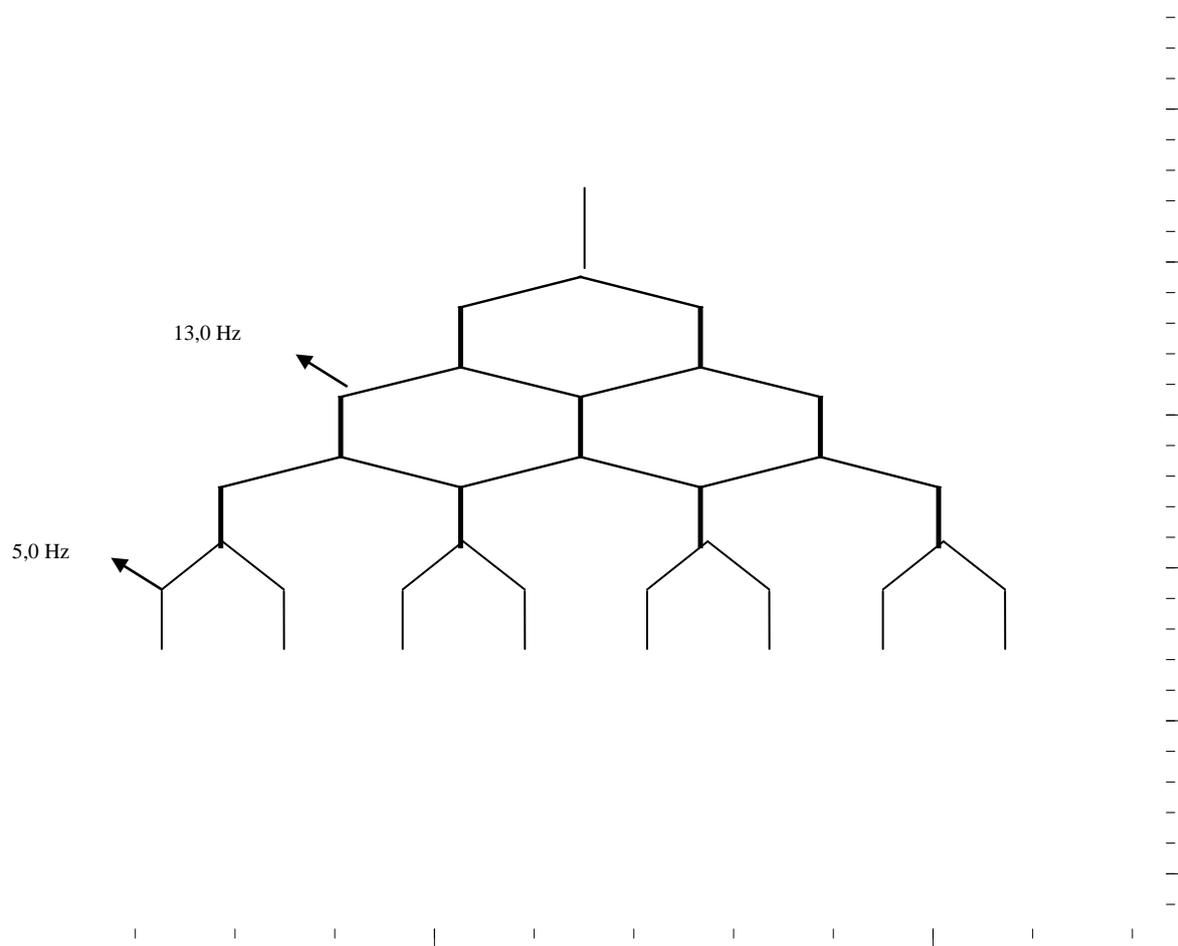


H - 2ax

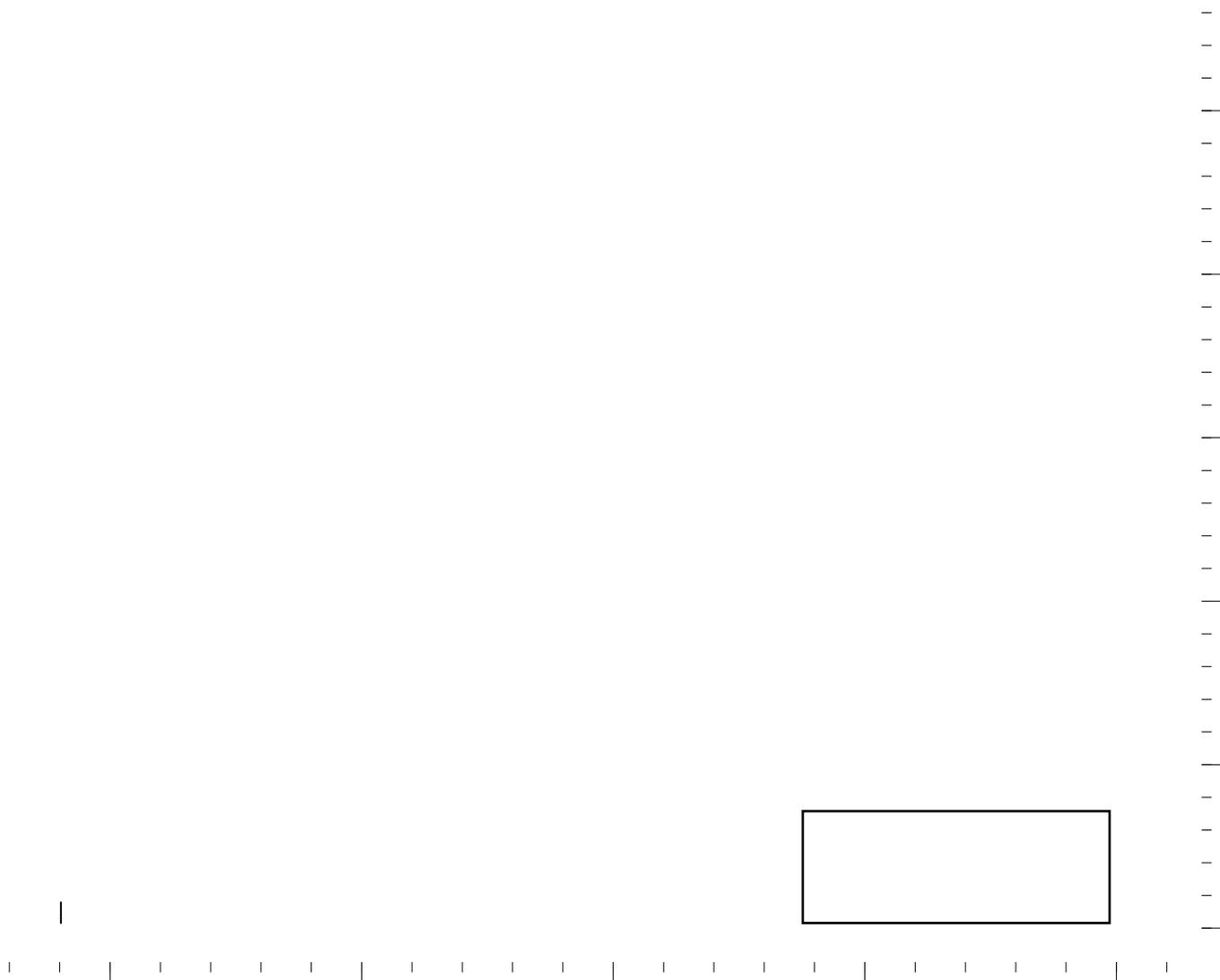
1.00 0.78



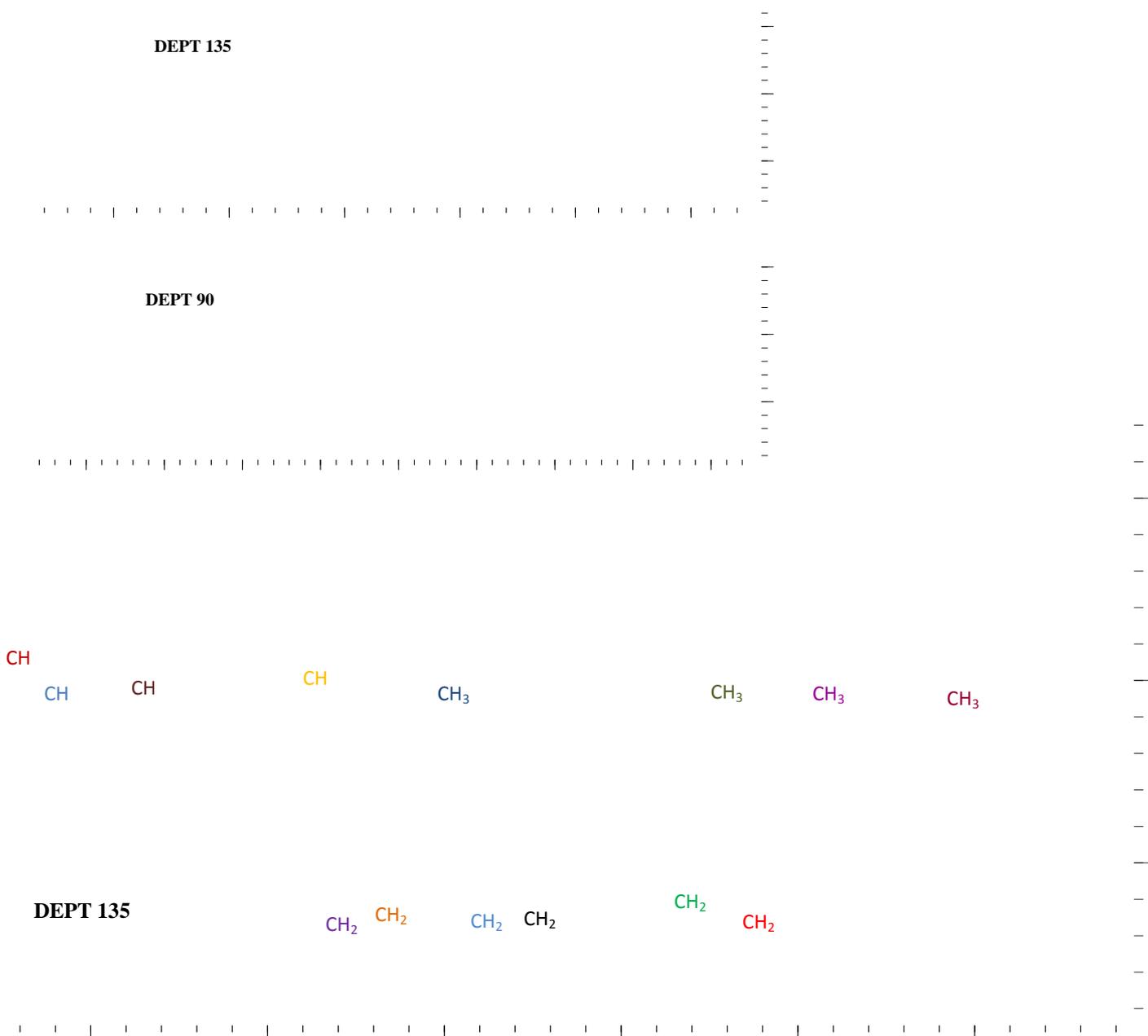
Espectro 50 – Espectro de RMN de H¹ em expansão parcial com destaque os acoplamentos vicinal e geminal.



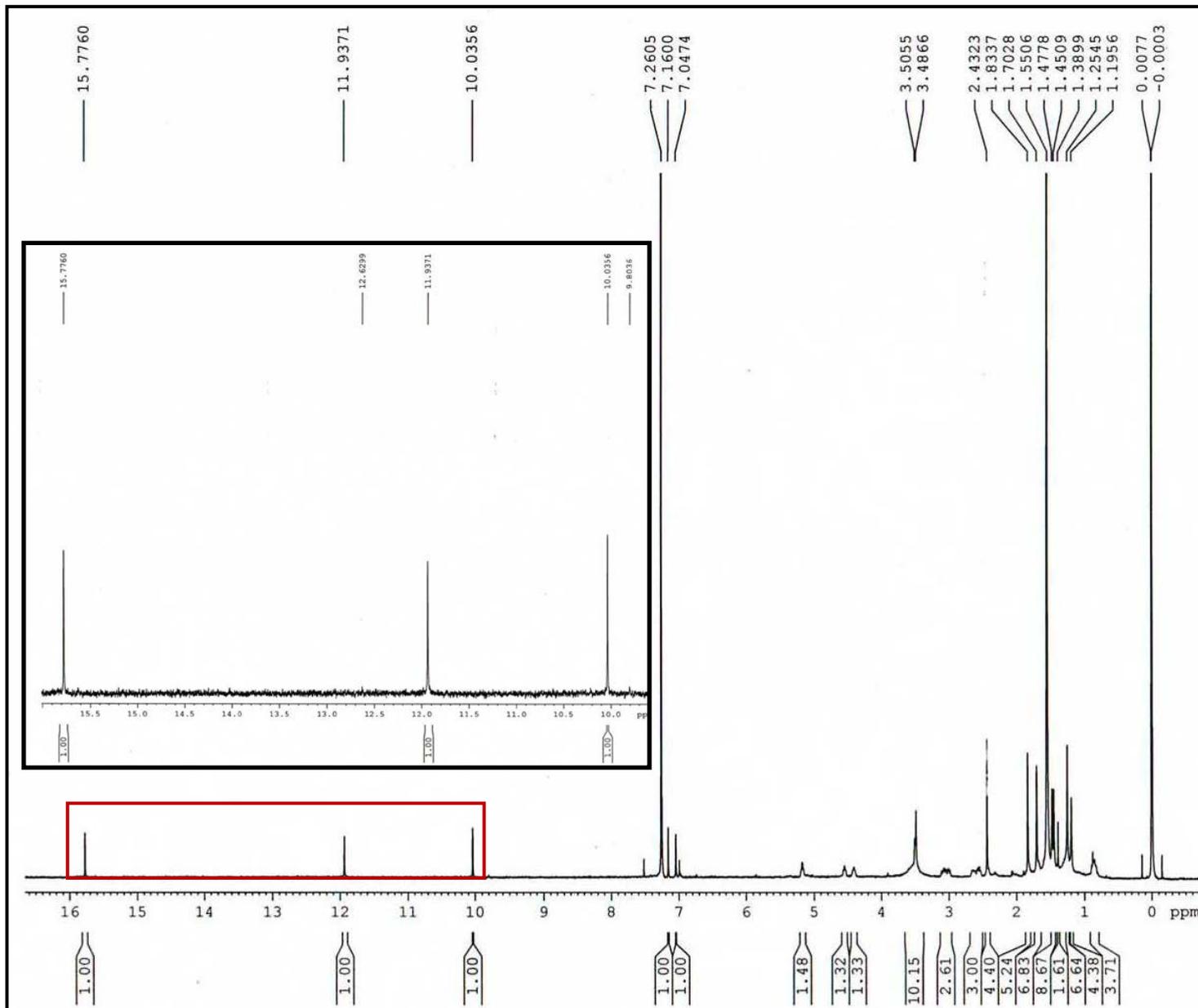
Espectro 51. Expansão parcial do espectro de RMN de ^1H de ECFVc 6_8 – multiplicidade do H – ax.



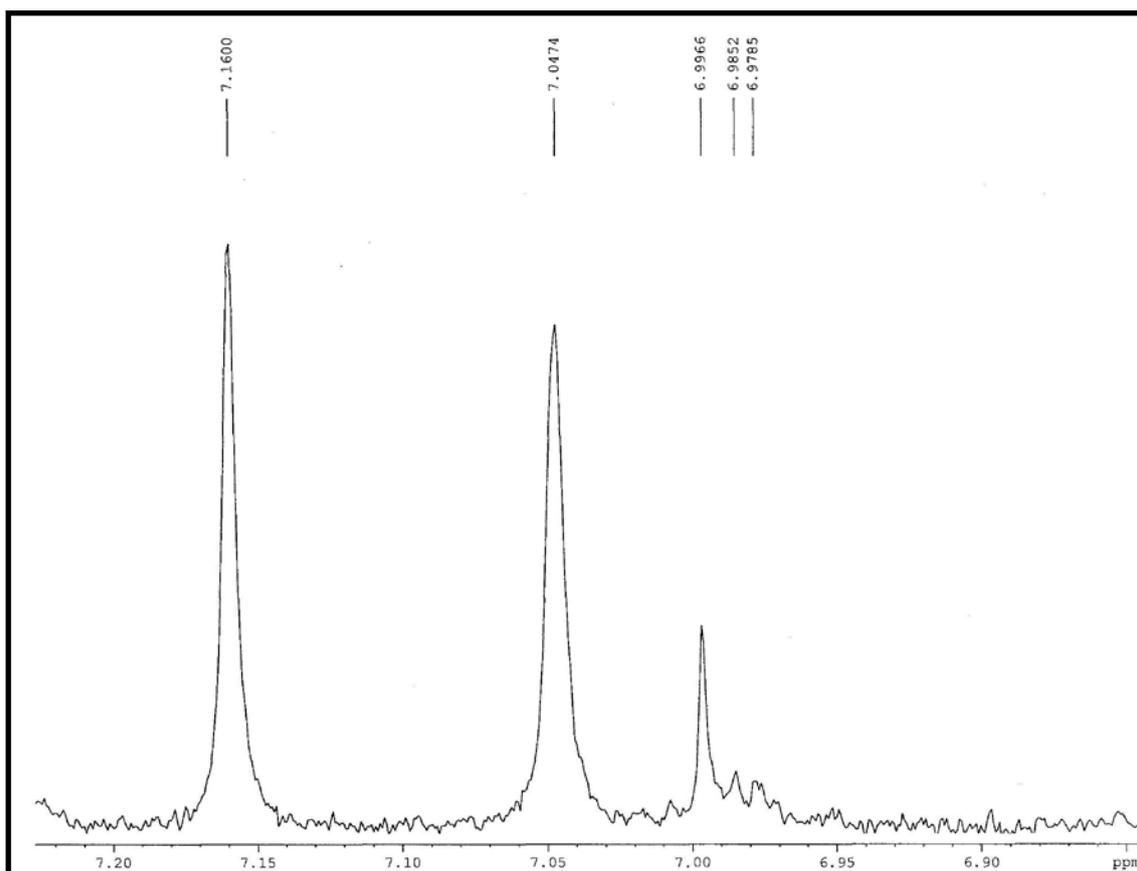
Espectro 52. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de ECFVc 6_8.



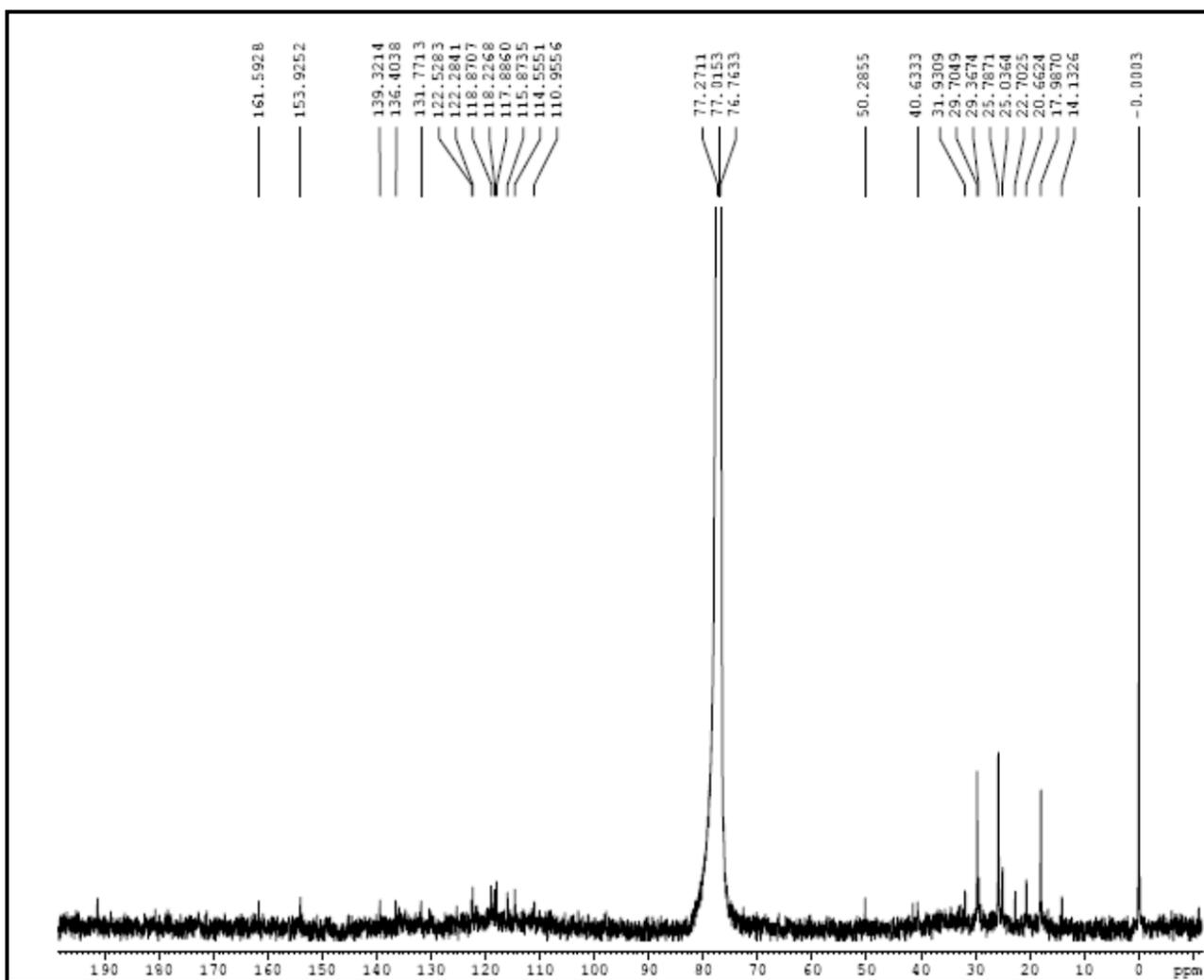
Espectro 53. Espectro de DEPT 135 e DEPT 90 (125 MHz, CDCl₃) de ECFVc 6_8.



Espectro 54. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 ; 400 MHz) Expandido em 10,03 – 15,77 ppm.



Espectro 55. Espectro de RMN de ¹H Expandido (6,97 – 7,16 ppm) de ECFVc 4_5 em CDCl₃.



Espectro 56. Espectro de RMN de ^{13}C de ECFVc 4_5 (CDCl_3 ; 400 MHz).