

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

LEDJANE VIEIRA DE FREITAS

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE SINÉRGICA *IN VITRO* E *IN VIVO*
DE PRODUTOS NATURAIS DA AMAZÔNIA E SEUS
DERIVADOS CONTRA *PLASMODIUM* SPP.

MANAUS – AM
2017

LEDJANE VIEIRA DE FREITAS

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE SINÉRGICA *IN VITRO* E *IN VIVO* DE PRODUTOS NATURAIS DA AMAZÔNIA E SEUS DERIVADOS CONTRA *PLASMODIUM* SPP.

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Amazonas, como pré-requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: desenvolvimento, avaliação da qualidade e da utilização de insumos, produtos farmacêuticos e cosméticos.

Orientador: Dr. Adrian Martin Pohlit

Co-orientadora: Dra. Zelina E. dos Santos Torres

Manaus - AM
2017

LEDJANE VIEIRA DE FREITAS

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE SINÉRGICA *IN VITRO* E *IN VIVO* DE PRODUTOS NATURAIS DA AMAZONIA E SEUS DERIVADOS CONTRA *PLASMODIUM* SPP.

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovado em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA:

Presidente: Dr. Adrian Martin Pohlit
Centro de Biotecnologia da Amazônia/Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia.

Avaliador: Dra. Katia Solange Cardoso Rodrigues dos Santos
Universidade Federal do Amazonas - UFAM

Avaliador: Dra. Ingrid Reis da Silva
Centro de Biotecnologia da Amazônia - CBA

Manaus - AM
2017

AGRADECIMENTOS

- À Deus por me proporcionar o dom da vida.
- À minha família pela compreensão, apoio e incentivo.
- Ao meu orientador Dr. Adrian Martin Pohlit pela orientação e incentivo.
- À minha co-orientadora Dra. Zelina E. dos Santos Torres pela orientação, apoio e incentivo.
- Ao Dr. Luiz Francisco Rocha e Silva pela orientação, amizade, incentivo e dedicação para a realização desse trabalho.
- A Msc. Daiane Dias Ferreira, pelo apoio e parceria nos ensaios de sinergismo.
- A Msc. Márcia, Laís Garcia Jordão, Suellen Michiles, pelo apoio, disponibilidade e auxílio nos estudos *in vitro*.
- A Msc. Karla Lagos, pelo apoio, amizade, disponibilidade e auxílio nos estudos *in vivo*.
- Ao Dr. Francisco Célio, pelo apoio, coleta do material vegetal.
- Aos amigos, companheiros de luta, Jaqueline Siqueira, Jakeline Santos e Túlio Azevedo, pela força, incentivo e convivência na vida acadêmica e pessoal.
- Aos amigos do Lapaam pelas instruções, colaboração, incentivo, e dedicação: Abraão Alexandre, Andréia Montoia, Berna de Souza, Edizon Lopes, Gustavo dos Santos, Marieta, Tiago Barbosa, Rita Cynara, Paula Suellen, Yara Lins.
- À Dona Sandra que tão carinhosamente preparou minhas refeições.
- À Maria Cléo pelas sábias instruções e amizade.
- À Geisa Lima, pela amizade, apoio e incentivo.
- Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas (UFAM).
- A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) pela parceria.
- Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), onde foi realizada a parte experimental do trabalho.
- À FAPEAM, pela bolsa concedida.
- A todos que ajudaram direta ou indiretamente na conclusão deste trabalho.

Que a minha coragem seja maior que meu medo e minha
força seja tão grande quanto minha fé.

Autor desconhecido

RESUMO

A malária é uma doença infecciosa e potencialmente fatal, causou grande impacto nos primórdios históricos da humanidade e perpetua até os dias atuais. Atualmente o parasita apresenta resistência aos fármacos disponíveis, tornando urgente a busca e descoberta de novas moléculas antimaláricas. Apesar de ser um grande desafio para pesquisadores, o estudo de plantas medicinais é uma estratégia promissora, pois fornece moléculas com potencial farmacológico antimalárico, como por exemplo, as substâncias 6 α -acetoxigedunina (6 α -ACG) e 4-nerolidilcatecol diacetilado (4-NCAC₂), contudo, o metabolismo de primeira passagem reduz a atividade antimalárica *in vivo* dessas drogas. Diante do exposto, como tentativa de aumentar a atividade antimalárica das substâncias, em especial no modelo antimalárico *in vivo*, este estudo teve como objetivo avaliar a atividade sinérgica *in vitro* e *in vivo* de produtos naturais da Amazônia contra *Plasmodium* spp. Para isso, foram avaliadas as atividades antiplasmodial *in vitro*, sinérgica *in vitro* e antiplasmodial *in vivo* utilizando 6 α -ACG (isolada de *Carapa guianensis*), seu derivado semi-sintético 6 α -hidroxi-deacetilgedunina, o derivado semi-sintético 4-NCAC₂ (isolado de *Piper peltata*) e dilapiol (DIL, isolado de *Piper aduncum*). Para o teste *in vitro* foram utilizadas as cepas padronizadas de *P. falciparum* K1, na qual foi utilizado método do microteste proposto por Trager & Jensen (1976). O cultivo do teste de sinergismo *in vitro* foi precedido pelo método de Trager & Jensen, porém, as proporções das associações dos compostos, bem como a classificação seguiram o método descrito por Odds (2003). Nos testes *in vivo*, foram utilizadas as cepas de *P. berghei* NK65, utilizando o método supressão da parasitemia de Peters (1965). Foi possível observar que o DIL não exerce atividade antiplasmodial *in vitro*, mas quando associado 6 α -ACT ou 4-NCAC₂ ao DIL, as substâncias apresentam um melhor IC₅₀. Tanto a associação entre 4-NCAC₂ e 6 α -ACG quanto 6 α -HIDROXI e 6 α -ACG foram classificadas como indiferente, ou seja, não apresentam atividade sinérgica. Neste trabalho, assim com em outros, DIL foi capaz de aumentar os níveis de inibição da parasitemia por *P. berghei* em associação com um limonóide.

Palavras-chave: Sinergismo, antimalárico, produtos naturais

ABSTRACT

Malaria is an infectious and potentially fatal disease that has had a major impact on mankind's historical origins and perpetuates it to the present day. Currently the parasite presents resistance to available drugs, making it urgent to search for and discover new antimalarial molecules. Although it is a major challenge for researchers, the study of medicinal plants is a promising strategy because it provides molecules with pharmacological antimalarial potential, such as 6 α -acetoxyglycine (6 α -ACG) and diacetylated 4-nerolidylcatechol (4-NCAC₂), however, first pass metabolism reduces the *in vivo* antimalarial activity of these drugs. In view of the above, in an attempt to increase the antimalarial activity of the substances, especially in the antimalarial model *in vivo*, this study aimed to evaluate the synergistic activity *in vitro* and *in vivo* of natural products of the Amazonian against *Plasmodium* spp. For this, the *in vitro* anti-plasmodial activities, *in vitro* synergistic and antiplasmodial *in vivo* were evaluated using 6 α -ACG (isolated from *Carapa guianensis*), its semi-synthetic derivative 6 α -hydroxy-deacetylenedunine, the semi-synthetic derivative 4-NCAC₂ (isolated *Piper peltata*) and dilapiol (DIL, isolated from *Piper aduncum*). The standard strains of *P. falciparum* K1 were used for the *in vitro* test, in which the microtest method proposed by Trager & Jensen (1976) was used. The *in vitro* synergism test culture was preceded by the Trager & Jensen method, however, the proportions of the association of the compounds as well as the classification followed the method described by Odds (2003). In the *in vivo* tests, strains of *P. berghei* NK65 were used, using the parasitemia suppression method of Peters (1965). It was possible to observe that DIL does not exert extensive modulatory activity *in vitro*, but when associated with 6 α -ACT or 4-NCAC₂ to DIL, the substances have a better IC₅₀. Both the association between 4-NCAC₂ and 6 α -ACG and 6 α -HIDROXI and 6 α -ACG were classified as indifferent, that is, they did not present synergistic activity. In this work, as with others, DIL was able to increase inhibition levels of *P. berghei* parasitemia in association with a limonoid.

Keywords: synergism, antimalarial, natural products

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Mapa das áreas de risco par infecção da malária no Brasil.....	18
Figura 2:	Estrutura química do 6 α -acetoxigedunina.....	22
Figura 3:	Estrutura química do 4-nerolidilcatecol diacetilado.....	23
Figura 4:	Estrutura química do dilapiol.....	24
Figura 5:	Cromotograma da fração TC17E.....	31
Figura 6:	Esquema de purificação do produto de desacetilação do 6 α -ACT.....	32
Figura 7:	Coluna cromatográfica realizada com o extrato de <i>P. peltata</i>	34
Figura 8:	Acetilação de 4-NC.....	35
Figura 9:	Estrutura química do 6 α -acetoxigedunina.....	41
Figura 10:	Estrutura química do 4-NC.....	43
Figura 11:	Estrutura química do DIL.....	45
Figura 12:	Concentração em μ M de cada substância na placa teste.....	48
Figura 13:	Curva de dose-resposta gerada pela associação de 4-NCAC ₂ e 6 α -ACG em <i>P. falciparum</i>	49
Figura 14:	Curva de dose-resposta gerada pela associação de 6 α -HIDROXI e 6 α -ACG em <i>P. falciparum</i>	49

LISTA DE QUADROS

Quadro 1:	Principais antimaláricos.....	20
Quadro 2:	Tratamento farmacológico para malária.....	25
Quadro 3:	Comparação dos modos de sinergismos de alguns fármacos comuns.....	25
Quadro 4:	Classificação da associação.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Condições analíticas e semipreparativa da corrida cromotografica por CLAE.....	31
Tabela 2:	Rendimento de massa obtido do óleo volátil de <i>P. aduncum</i> (antes de desidratar o óleo).....	36
Tabela 3:	Rendimento de massa obtida do óleo desidratado de <i>P. aduncum</i>	36
Tabela 4:	Concentrações das substâncias na placa teste para <i>P. falciparum</i> K1.....	38
Tabela 5:	Concentrações iniciais para cada associação.....	39
Tabela 6:	Comparação dos dados de RMN ¹ H e ¹³ C de 6α-ACG e dados da literatura.....	42
Tabela 7:	Comparação dos dados de RMN ¹ H e ¹³ C do 4-NC e dados da literatura.....	44
Tabela 8:	Comparação dos dados de RMN ¹ H e ¹³ C do DIL e dados da literatura.....	46
Tabela 9:	Valores da CI ₅₀ <i>in vitro</i> contra <i>P. falciparum</i> K1.....	47
Tabela 10:	Valores de CI ₅₀ da associação entre as substâncias 4-NCAC2 e 6α-ACG em <i>P. falciparum</i>	50
Tabela 11:	Valores da CI ₅₀ da associação entre as substâncias 6α-HIDROXI e 6α-ACG em <i>P. falciparum</i>	51
Tabela 12:	Supressão <i>in vivo</i> do crescimento de <i>P. berghei</i> após tratamento oral com substâncias.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

ΣCIF	Somatória da concentração inibitória fracionada
4-NC	4-nerolidilcatecol
4-NCAC₂	4-nerolidilcatecol diacetilado
6α-ACG	6α-acetoxigedunina
6α-HIDROXI	6α-hidroxidesacetilgedunina
ACN	Acetonitrila
AcOEt	Acetato de etila
ACT	Terapia combinada à base de artemisinina
CCD	Cromatografia de camada delgada
CE₅₀	Concentração efetiva mediana
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CI₅₀	Concentração inibitória média
CIF	Concentração inibitória fracionada
CLAE	Cromatografia líquida de alta de eficiência
CYP	Citocromo P450
DCM	Diclorometano
DIL	Dilapiol
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
Embrapa	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
INPA	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
Lapaam	Laboratório de Princípios Ativos da Amazônia
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa
LC-HRMS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa de alta resolução
NK	Célula Natural Killer
OC	Óleo de castor
PBS	Phosphate buffered saline
RMN	Espectrometria de ressonância magnética nuclear
RMN¹³C	Ressonância magnética de carbono

RMN¹H	Ressonância magnética de próton
RPMI	Roswell park memorial institute
XΣCIF	Média da somatória da concentração inibitória fracionada

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	15
1 REVISÃO DE LITERATURA	17
1.1 MALÁRIA	17
1.1.1 Características gerais da malária	17
1.2 EPIDEMIOLOGIA DA MALÁRIA	17
1.2.1 Malária no mundo e no Brasil	17
1.3 CICLO EVOLUTIVO DO PARASITA NO HOMEM	18
1.4 RESISTÊNCIA AOS ANTIMALÁRICOS	19
1.5 ANTIMALÁRICOS E PRODUTOS NATURAIS DA AMAZÔNIA E SEUS DERIVADOS	20
1.5.1 6 α -acetoxigedunina (6- α ACG)	22
1.5.2 4-nerolidilcatecol (4-NC) e derivados	23
1.5.3 Dilapiol	24
1.6 SINERGISMO	25
2 OBJETIVOS	28
2.1 OBJETIVO GERAL	28
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
3 MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1 SOLVENTES E EQUIPAMENTOS	29
3.2 ASPECTOS LEGAIS E ÉTICOS	29
3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	29
3.4 METODOLOGIA FITOQUÍMICA	30
3.4.1 Fração rica em limonóides	30
3.4.2 Obtenção de 6 α -ACG por CLAE	30
3.4.3 Obtenção do limonóide semissintético 6 α -hidroxidesacetilgedunina (6 α -HIDRO)	31
3.4.3.1 Reação de desacetilação do 6 α -ACG	32
3.4.4 Obtenção de 4-NC	33

3.4.4.1 Reação de acetilação do 4-NC	35
3.4.5 Obtenção de dilapiol (DIL).....	35
3.5 ENSAIOS BIOLÓGICOS	37
3.5.1 Teste de citotoxicidade	37
3.5.2 Ensaio de atividade antiplasmódica <i>in vitro</i>	38
3.5.3 Ensaio da atividade sinérgica <i>in vitro</i>	39
3.5.4 Ensaio de atividade antiplasmódica <i>in vivo</i>	40
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1 CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA E IDENTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS	41
4.1.1 6 α -ACG	41
4.1.2 4-NC	43
4.1.3 DIL	45
4.1.4 Avaliação do teste de citotoxicidade	45
4.1.5 Atividade antiplasmódica <i>in vitro</i>	47
4.1.6 Atividade sinérgica <i>in vitro</i>	48
4.1.7 Atividade antiplasmódica <i>in vivo</i>	51
CONCLUSÃO	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
ANEXOS	64

INTRODUÇÃO

A malária é uma doença infecciosa, de evolução crônica, com manifestações episódicas de caráter agudo e potencialmente fatal, causada por protozoário do gênero *Plasmodium* e transmitida por mosquitos do gênero *Anopheles*. É considerada uma doença de saúde pública e econômica em países de clima tropical e subtropical. O conhecimento etnofarmacológico é uma ferramenta categórica para identificação de novas espécies bioativas e isolamento de substâncias potencialmente candidatas ao desenvolvimento de novos antimaláricos e outros medicamentos (CARVALHO *et al.*, 1990; BRASIL, 2014a).

A resistência medicamentosa está se tornando um grande problema no combate da malária. Resistência às drogas é definida como redução da eficácia do fármaco em curar ou promover a melhora dos sintomas, e essa fatalidade tem se tornado crescente na maioria das classes medicamentosas. O mecanismo de resistência deve ser investigado a fim de propor novos modelos de associações de fármacos, além do estudo sinérgico de plantas candidatas à descoberta de fármacos, ou seja, pesquisas sinérgicas podem ser uma importante ferramenta ao combate da malária (HEMAISWARYA *et al.*, 2008; SILVA, 2012; YANG *et al.*, 2014).

Um fator limitante à farmacocinética e à biodisponibilidade dos fármacos e derivados de plantas são as enzimas do intestino delgado e do fígado como os citocromos P450 (CYP). As CYP's são catalisadores oxidativos de xenobióticos e exercem a função de reduzir níveis plasmáticos de drogas. Todos os fármacos que estejam sujeitos ao metabolismo de primeira passagem serão parcialmente inativados pela família da CYP (BADAL *et al.*, 2011; ZANGER e SCHWAB, 2013).

A célula possui sinalizadores em sua superfície que são ativadas por mediadores denominados mensageiros celulares que podem ser excitatórios ou inibitórios. Assim, diferentes agentes podem ativar ou inibir o mesmo sítio, atuando dessa forma de maneira sinérgica. Trabalhos comprovam o efeito sinérgico de substâncias naturais de plantas para atividade antimalárica *in vivo*. Substâncias inibidoras do CYP, sem atividade antimalárica, quando associadas a substâncias com propriedades antiplasmódicas, têm sua ação aumentada,

como por exemplo, o dilapiol e gedunina, respectivamente (OMAR *et al.*, 2003a; OMAR *et al.*, 2003b; ZHOU *et al.*, 2010; YANG *et al.*, 2014).

Com base nessas descobertas, o grupo de pesquisa Laboratório de Princípios Ativos da Amazônia (LAPAAM/INPA) vem isolando diversos produtos naturais a partir de plantas antimaláricas da Amazônia e preparando derivados utilizando semi-síntese. Deste modo, o LAPAAM vem avaliando a atividade antimalárica dessas substâncias contra *Plasmodium* spp., contudo, algumas dessas substâncias apresentam atividade moderada *in vivo* que se acredita possa ser atribuída ao metabolismo de primeira passagem dessas substâncias pela CYP.

Logo, o presente trabalho tem o objetivo de avaliar a atividade sinérgica *in vitro* e *in vivo* de dilapiol e isolados de plantas amazônicas contra *Plasmodium* spp. Como resultado principal, espera-se potencializar a ação farmacológica das substâncias e derivados antimaláricos contra *Plasmodium* spp.

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 MALÁRIA

1.1.1 Características gerais da malária

A malária é uma das mais antigas doenças infecciosas do mundo. Sozinha, matou mais pessoas do que todas as guerras até o momento. Essa terrível doença é caracterizada por sintomas como febres intermitentes, calafrios, cefaleia e sudorese. Ao longo dos anos, nas regiões atingidas, vem sendo conhecida por denominações variadas como: paludismo, impaludismo, febre palustre, febre intermitente, febre terçã benigna, febre terçã maligna, além de nomes populares como maleita, sezão, tremedeira, batedeira ou febre (ROCHA E SILVA *et al.*, 2011; BRASIL, 2014b).

A transmissão do agente causador da malária ocorre pela picada da fêmea do mosquito *Anopheles* infectado pelo *Plasmodium* spp. Ao todo são mais de cem espécies do gênero, mas apenas seis infectam o homem, são elas: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale*, *P. knowlesi* e *P. cynomolgi* (OGUIKE *et al.*, 2011; TA *et al.*, 2014).

Para estudo experimental *in vivo* são utilizadas as espécies *P. berghei*, *P. yoelli*, *P. cynomolgi*, *P. vinckei* e *P. chabaudi*. Sendo que a espécie mais utilizada na experimentação em camundongos é a *P. berghei*. Acredita-se que o ensaio *in vivo* seja capaz de reproduzir a fase sanguínea (CARLTON *et al.*, 2002; SANCHEZ, 2007; NOGUEIRA e ROSÁRIO, 2010; CUROTTO *et al.*, 2013).

1.2 EPIDEMIOLOGIA DA MALÁRIA

1.2.1 Malária no mundo e no Brasil

A malária continua a ser um importante problema de saúde pública apesar dos esforços persistentes para controle e prevenção. Em 2014 foram notificados 214 milhões de casos de malária e cerca de 438 mil mortes a nível mundial com uma estimativa de 3,2 bilhões de pessoas em 97 países e territórios vivem em área de risco por infecção da malária (WHO, 2015).

A Região Norte do Brasil é responsável por 99% dos casos de malária no país. Fora da região amazônica, mais de 80% dos casos registrados são importados dos estados

pertencentes à área endêmica brasileira, de outros países amazônicos, do continente africano, ou do Paraguai. Existem relatos de transmissão no Piauí, Paraná e em áreas de Mata Atlântica nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e Espírito Santo. A transmissão de malária é resultado de um intrincado processo envolvendo fatores biológicos, ecológicos, socioeconômicos e comportamentais, apresentando uma transição temporal de altas e baixas taxas, sendo a hidrografia e o clima fatores importantes na transmissão do agravo (DE CASTRO e SINGER, 2013; BRASIL, 2014b).

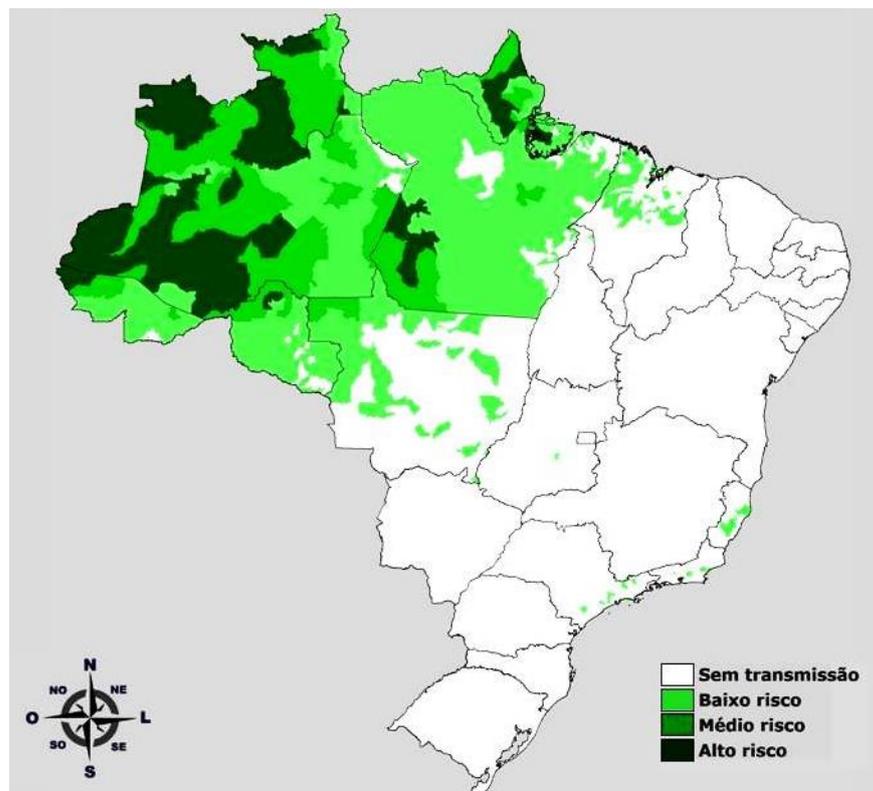


Figura 1: Mapa das áreas de risco para infecção da Malária no Brasil. Fonte: Brasil, 2014.

1.3 CICLO EVOLUTIVO DO PARASITA NO HOMEM

O ciclo de vida do parasita no homem pode ser dividido em duas fases: fase hepática e ciclo eritrocítico. Durante o repasto sanguíneo, o mosquito infectado inocula os esporozoítos de *Plasmodium*, forma infectante ao homem. Em um período de quinze à quarenta e cinco minutos da penetração dos esporozoítos nos capilares sanguíneos e linfáticos, os esporozoítos invadem os hepatócitos, iniciando a fase hepática. Já no hepatócito, os merozoítas passam por uma divisão assexuada passando a ser chamados então de esquizontes hepáticos. Depois da

maturação dos esquizontes nos hepatócitos, ocorre o rompimento dos hepatócitos infectados e, por conseguinte, a liberação dos merozoítos que invadem os eritrócitos (MÉNARD, 2000; REY, 2008).

Após a penetração dos merozoítos nos glóbulos vermelhos, é dado início ao ciclo eritrocítico. No interior dos eritrócitos os merozoítos passam por vários processos de amadurecimento, a qual recebem os respectivos nomes: trofozoíta jovem, trofozoíta maduro e esquizonte. É possível reproduzir estas formas eritrocíticas nos ensaios *in vitro* (FERREIRA, 2005; REY, 2008).

De modo geral, o parasita passa por vários estágios de desenvolvimento. Todas as fases apresentam características estruturais próprias de diferentes complementos proteicos responsáveis pelo escape ao sistema imunológico. Acredita-se que estes complementos proteicos são os responsáveis pela resistência aos medicamentos (FLORENS *et al.*, 2002; LACERDA-QUEIROZ *et al.*, 2008; BRASIL, 2014b).

1.4 RESISTÊNCIA AOS ANTIMALÁRICOS

Resistência a fármacos antimaláricos é definida como a capacidade de uma estirpe de parasita sobreviver e/ou multiplicar, apesar da absorção de um fármaco administrado em doses iguais ou superiores àquelas geralmente recomendadas, mas dentro da tolerância do paciente. O parasita da malária é bem conhecido por suas frequentes mutações. Durante a infecção e com inadequados níveis do fármaco, as mutações resistentes sobrevivem e propagam, tornando-se um grande obstáculo no sucesso do tratamento da infecção, além de contribuir significativamente para a mortalidade mundial relacionadas com a malária (WHO, 2010).

Atualmente, já foram documentados fármacos resistentes ao *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae*. Dentre estes, o *P. falciparum* desenvolveu resistência a quase todos os fármacos antimaláricos atualmente em uso; enquanto o *P. vivax* foi encontrado resistente à cloroquina e primaquina; e o *P. malariae* tem sido relatada como sendo resistentes à cloroquina e pirimetamina em algumas áreas.

Deste modo, compreender o modo de ação e mecanismo de resistência a drogas é de fundamental importância, tanto para otimizar os antimaláricos quanto para descoberta de novas terapias com novos alvos. Sendo assim, os produtos naturais e seus derivados podem

ser uma poderosa ferramenta na descoberta dessas novas moléculas (YOUNG, 1957; OLLIARO, 2001; MAGUIRE *et al.*, 2002; WHO, 2010; WELLS, 2011).

1.5 ANTIMALÁRICOS E PRODUTOS NATURAIS DA AMAZÔNIA E SEUS DERIVADOS

Do ponto de vista clínico, os antimaláricos são utilizados como agentes profiláticos (em menor grau) e agentes terapêuticos. Os fármacos são classificados de acordo com suas ações. Podem ser esquizonticidas, que eliminam as formas hepáticas em desenvolvimento ou hipnozoítos; esquizonticidas sanguíneos, que são capazes de atuar nos parasitas eritrocíticos; e os gametocidas, que impedem a transmissão para o mosquito ao matar os parasitas nos estágios sexuados.

A maioria dos fármacos antimaláricos disponíveis atualmente estão em uso há décadas e pouco se sabe sobre o modo de ação e os mecanismos de resistência. Os principais antimaláricos podem ser observados no Quadro 1.

Quadro 1: Principais antimaláricos.

Fármaco	Classe	Ação Antimalárica	Mecanismo de Ação
Cloroquina	4-Aminoquinolina	Esquizonticida sanguíneo	Seu mecanismo de ação não foi claramente definido, acredita-se que seja devido à interação com o DNA do parasita e à inibição enzimática.
Amodiaquina	4-Aminoquinolina	Esquizonticida sanguíneo	Fármaco relacionado com à cloroquina, contudo, supõe-se que partilha o mesmo mecanismo de ação com esse antimalárico.
Quinina	Quinolino metanol	Esquizonticida sanguíneo	Desconhecido.
Quinidina	Quinolino metanol	Esquizonticida sanguíneo	Desconhecido.
Mefloquina	Quinolino metanol	Esquizonticida sanguíneo	Desconhecido.
Primaquina	8-Aminoquinolina	Hipnozoíta	Desconhecido.
Sulfadoxina-	Combinação de	Esquizonticida	Inibição enzimática na via de

pirimetamina	antagonistas do folato	sanguíneo	síntese de folatos – a dihidropteroato sintase.
Proguanil	Antagonista do folato	Esquizonticida	Inibição enzimática na via de síntese de folatos – a dihidropteroato sintase.
Doxiciclina	Tetraciclina	Esquizonticida sanguíneo	Acredita-se que possa inibir a síntese proteica ou outras funções ao nível da mitocôndria ou do apicoplasto.
Halofantrina	Fenantreno metanol	Esquizonticida sanguíneo	Desconhecido.
Artemisininas	Endoperóxidos de lactona sesquiterpênicos	Esquizonticida sanguíneo	Produção de radicais livres após a clivagem das pontes de endoperóxido da artemisinina catalizada pelo ferro ou através da inibição da cálcio ATPase do parasita.
Atovaquona-proguanil	Combinação de quinona-antagonista do folato	Gametocida	Acredita-se que possa interferir na cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria, anulando seu potencial de membrana.

Fonte: Adaptado a partir de Katzung *et al.* (2014).

Por outro lado, pode-se afirmar que a descoberta e o desenvolvimento de análogos à base de artemisinina possibilitou o surgimento de uma nova classe de antimaláricos altamente eficazes, a qual é considerada atualmente a classe mais importante de fármacos. Uma vez que para superar o problema de quimiorresistência, foi preconizada a terapia combinada à base de artemisinina (ACT). A combinação de fármacos artemisinina e outros endoperóxidos são essenciais no tratamento ao combate da resistência do *Plasmodium* (LOMBARD *et al.*, 2012).

O cerne do conhecimento da medicina tradicional foi responsável pela descoberta e o desenvolvimento de compostos terapêuticos em uso hoje como os já detalhados acima, desde os precursores antimaláricos quinina isolado em 1820 da casca da árvore quina (*Cinchona officinalis*), e artemisinina identificado em 1971 das folhas de absinto doce (*Artemisia annua*). Assim, ainda hoje o estudo de plantas medicinais continua sendo uma estratégia para descoberta de novas moléculas frente à resistência dos antimaláricos (KLAYMAN, 1985; CRAGG e NEWMAN, 2005).

O LAPAAM a mais de 17 anos investiga produtos naturais da Amazônia e seus derivados contra *Plasmodium* spp. Dentre elas, destacam-se as substâncias: 6 α -

acetoxigedunina e 4-nerolidilcatecol diacetilado (CARVALHO e KRETTLI, 1991; BRANDÃO *et al.*, 1997; CAMPBELL *et al.*, 1997; CAMPBELL *et al.*, 1998; CAMPBELL *et al.*, 2000; KRETTLI *et al.*, 2001; ANDRADE-NETO *et al.*, 2004).

1.5.1 6 α -acetoxigedunina

A 6 α -acetoxigedunina (6- α ACG) (Figura 2) é obtida das sementes de *Carapa guianensis*, nativa da região Amazônica. Essa espécie é conhecida popularmente como andiroba. As suas sementes são constituídas principalmente por tetranortriterpenóides (limonóides), metabólitos caracterizado por apresentar propriedades farmacológicas como ação anti-inflamatória, antitumoral, repelente, antimicrobiana, vermífida, antialérgica, analgésica e antimalárica (MIOT *et al.*, 2004; PENIDO *et al.*, 2005; AMBROZIN *et al.*, 2006; FREIRE *et al.*, 2006; TAPPIN *et al.*, 2008; FARIAS *et al.*, 2010; MIRANDA JUNIOR, 2010).

Os constituintes químicos encontrados nas sementes e folhas da *C. guianensis* são 17 β -hidroxiazadiradiona, xilocesina k, gedunina, 6- α ACG, 7-desacetoxi-7-oxogedunina, 1,2-di-hidro-3 β -hidroxi-7-desacetoxi-7-oxogedunina, angolensato de metila, 6 α -acetoxiepoxiazaradiona, andirobina e 6 α -hidroxigedunina (PENIDO *et al.*, 2005; AMBROZIN *et al.*, 2006).

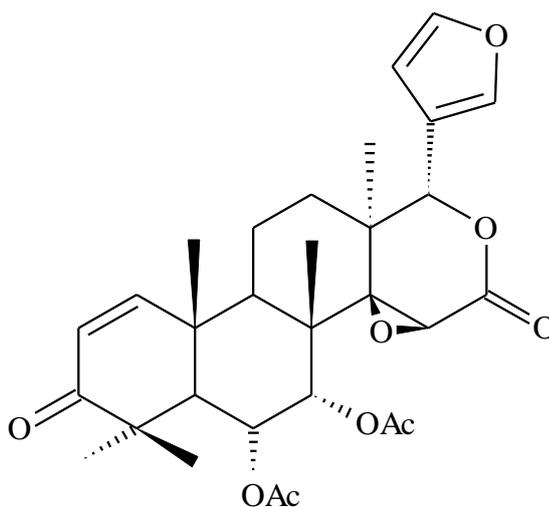


Figura 2: Estrutura química do 6 α -acetoxigedunina.

Dentre esses, o limonóide 6- α ACG apresentou potencial antimalárico contra a cepa K1 de *P. falciparum* ($CI_{50} = 7,0 \mu\text{M}$) e supressão da parasitemia em camundongos infectados com a cepa NK65 de *P. berghei* (65% na dose de 100 mg/kg/dia). Resultados também comprovam a baixa toxicidade dessa substância em células normais (PEREIRA, 2013; PEREIRA *et al.*, 2014)

1.5.2 4-nerolidilcatecol e derivados

O terpeno-fenilpropanóide 4-nerolidilcatecol (4-NC) é obtido da planta caapeba ou pariparoba (*Piper peltatum L.*), de fácil cultivo, conhecida por nomes indígenas e muito utilizada por povos amazônicos contra a malária, têm como principal metabólito secundário 4-nerolidilcatecol (YUNCKER, 1973; KIJOA *et al.*, 1980; MILLIKEN, 1997; MONGELLI *et al.*, 1999).

Com relação à ação do 4-NC, em um estudo realizado pelo grupo de pesquisa Lapaam foi avaliada a atividade antimalárica *in vitro* e *in vivo* de 4-NC contra *P. falciparum* e *P. berghei*, respectivamente. Por meio deste, concluiu-se que a atividade foi significativa *in vitro* e insignificativa *in vivo* (DE ANDRADE-NETO *et al.*, 2007; ROCHA E SILVA *et al.*, 2011).

Deste modo, a fim de aprofundar os estudos químicos, o grupo submeteu 4-NC a um processo de diacetilação (Figura 3), resultando em derivado com maior estabilidade química e a novos ensaios contra a cepa de K1 de *P. falciparum* ($CI_{50} = 4,8 \mu\text{M}$) e supressão da parasitemia em camundongos infectados com a cepa NK65 de *P. berghei* (>30% na dose de 200 mg/kg/dia) (PINTO, 2008; DA SILVA PINTO *et al.*, 2009; ROCHA E SILVA *et al.*, 2011).

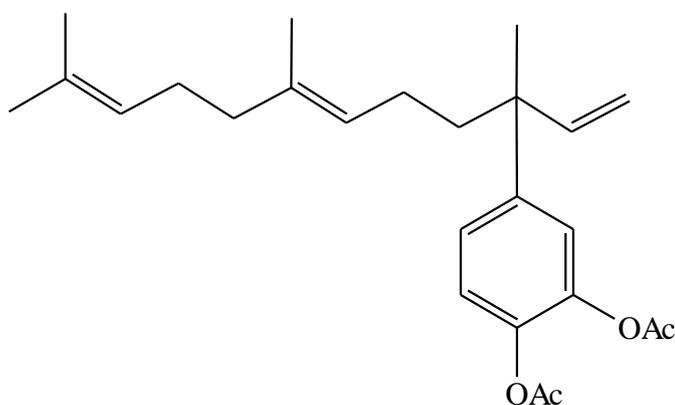


Figura 3: Estrutura química do 4-nerolidilcatecol diacetilado.

1.5.3 Dilapiol

Dilapiol (DIL) é um fenilpropanóide (Figura 4), princípio ativo majoritário do óleo volátil presente nas folhas da espécie vegetal *Piper aduncum*, conhecida popularmente como pimenta cravada, matico, aperta-Ruão, pimenta longa ou bambu piper. Os exemplares deste vegetal apresentam-se como arbustos aromáticos, de rápido crescimento, podendo atingir mais de 5 m de altura (GUENGERICH, 2007; POHLIT *et al.*, 2013).

No que tange a farmacologia, o seu óleo é utilizado na forma oral e tópica, por possuir atividades anti-sépticas, antimicrobianas e analgésicas, além de agir como inseticida contra larvas de *A. aegypti*. Em complemento, o estudo do óleo para atividade antiplasmódica comprovou ser altamente e ligeiramente eficaz contra os clones W2 e Dd2 de *P. falciparum*, respectivamente (MILLIKEN, 1997; NAVICKIENE *et al.*, 2006; DE MORAIS *et al.*, 2007; DUARTE *et al.*, 2007; FAZOLIN *et al.*, 2007; MIRANDA JUNIOR, 2010; POHLIT *et al.*, 2013).

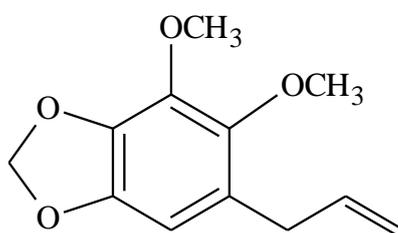


Figura 4: Estrutura química do dilapiol.

Desde sua gênese, o grande desafio dos novos compostos antimaláricos tem sido o metabolismo de primeira passagem, por limitar sua atividade em estudos *in vivo*. De encontro a essa problemática, o dilapiol, que, por um lado não exerce atividade sobre a parasitemia, apresenta-se, contudo, como potente inibidor da CYP3A4 *in vitro*, sendo sua atividade inibitória 23,3 vezes superior ao Cetoconazol (inibidor da CYP3A4 utilizado em testes como padrão). Também é caracterizado por possuir baixa toxicidade, mesmo quando administrado só ou em tratamento binário (BOURRET-BERNARD, 1995; BUDZINSKI *et al.*, 2000; OMAR *et al.*, 2003b).

1.6 SINERGISMO

Utiliza-se a combinação de vários extratos de plantas medicinais com o propósito de melhorar a eficácia das substâncias. Essa combinação pode cooperar de forma sinérgica, possibilitando duplicar ou multiplicar o efeito terapêutico. A farmacologia clássica comprova os efeitos sinérgicos ao fazer combinações de várias drogas, inclusive com os antimaláricos.

Para o tratamento da malária, foi preconizada a associação medicamentosa com artemisinina, as ACT's, como observado no Quadro 2. Isso ocorre uma vez que a dupla ação farmacológica resulta em sinergismo, que, além de aumentar a eficácia dos fármacos, também reduz a farmacoresistência e a dosagem dos medicamentos, de modo a garantir a margem de segurança ao paciente (WHO, 2010; LOMBARD *et al.*, 2012).

Quadro 2: Tratamento farmacológico para malária.

Infecção	Tratamento Farmacológico
<i>P. falciparum</i>	Quinina + doxiciclina ou clindamicina; Proguanil + atovoquona; Arteméter + lumefantrina.
<i>P. malariae</i> , <i>P. vivax</i> ou <i>P. ovale</i>	Cloroquina, possivelmente seguida pela primaquina no caso de <i>P. vivax</i> ou <i>P. ovale</i>
Quimioprofilaxia (curto prazo)	Proguanil + atovoquona ou doxiciclina
Quimioprofilaxia (longo prazo)	Cloroquina + proguanil; mefloquina ou doxiciclina

Fonte: Adaptado de (WHO, 2010).

Os efeitos sinérgicos podem ser classificados de acordo com o mecanismo de ação (Quadro 3) e podem ser: aditivo, onde a resposta final é a soma dos efeitos dos fármacos; somação, obtém resultado semelhante à do efeito individual; e potencialização, o efeito final é maior que a soma do resultado individual (DU *et al.*, 2006).

Quadro 3: Comparação dos modos de sinergismos de alguns fármacos comuns.

Efeito	Mecanismo de ação	Exemplo
Aditivo	Medicamentos com os mesmos mecanismos de ação.	Ácido acetil salicílico × Diclofenaco sódico
Somação	Medicamentos que agem por diferentes modos.	Meperidina × Cetoprofeno
Potencialização	Medicamentos que atuam em	Codeína

	diferentes receptores.	× Imipramina
--	------------------------	-----------------

Fonte: Adaptado de (SECOLI, 2001).

Atualmente, sugerem-se os seguintes mecanismos para efeitos de sinergia: efeitos multi-alvo sinérgico; farmacocinéticas ou efeitos físico-químicos baseados na melhoria da solubilidade, taxa de reabsorção e biodisponibilidade; interações de agentes com mecanismos de resistência bacteriana; eliminação ou neutralização de efeitos adversos dos agentes contidos no extrato (WAGNER e ULRICH-MERZENICH, 2009).

Pode se dizer que a descoberta de mecanismos sinérgicos à base de plantas medicinais é uma perspectiva para descoberta de novos medicamentos. O avanço da química analítica e biologia molecular, por exemplo, foram imprescindíveis para o estudo da sinergia a partir de plantas medicinais (WAGNER e ULRICH-MERZENICH, 2009; YANG *et al.*, 2014). Seguindo a mesma corrente, estudos *in vitro* já evidenciam que produtos naturais afetam enzimas metabolizadoras de fármacos, como os microsomas CYP3A4, o que eleva o potencial e a relevância de novas descobertas nesta linha de pesquisa (BARTLE e FERLAND, 1998; FOSTER *et al.*, 1999; NEBEL *et al.*, 1999; BUDZINSKI *et al.*, 2000; FOSTER *et al.*, 2003).

Grande parte na perda ou na manutenção da eficácia terapêutica de fármacos são devidas as CYPs, que são uma superfamília de enzimas catalizadoras de xenobióticos, incluindo fármacos que obrigatoriamente utilizam o metabolismo de primeira passagem (DING e KAMINSKY, 2003; LÄPPLE *et al.*, 2003; DALY, 2004; NELSON *et al.*, 2004; GUENGERICH, 2007; ZANGER e SCHWAB, 2013). São agrupadas em famílias, subfamílias e isoenzima específica. As famílias CYP 1, 2 e 3 são os principais responsáveis pelo metabolismo de xenobióticos, sendo a CYP3A4 a principal metabolizadora de fármacos, tornando-os terapeuticamente menos eficazes, além de ter preferência por compostos lipofílicos e moléculas grandes.

Cabe ressaltar que a inibição de uma enzima específica da CYP reduz a depuração metabólica dos fármacos ou produtos derivados de plantas, aumentando a biodisponibilidade e sua eficácia terapêutica. Deste modo produtos naturais podem atuar de forma sinérgica nesse processo de inibição (SHOU *et al.*, 1998; SCOTT e HALPERT, 2005; VAN WATERSCHOOT *et al.*, 2009; BADAL *et al.*, 2011; HENDRYCHOVÁ *et al.*, 2011; YANG *et al.*, 2014). Talvez por isso, a avaliação do potencial inibidor de componentes ativos isolados e produtos à base de plantas comerciais contra o CYP3A4 tem despertado o interesse

de pesquisadores, como exemplo as pesquisas realizadas com a substância isolada dilapiol do vegetal *Piper aduncum* (SPATZENEGGER e JAEGER, 1995; CRESPI *et al.*, 1997; BUDZINSKI *et al.*, 2000; MARKOWITZ e DEVANE, 2000; FOSTER *et al.*, 2001; IOANNIDES, 2002; CHEN *et al.*, 2009).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade sinérgica de produtos naturais da Amazônia contra *Plasmodium* spp.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar as substâncias 6 α -acetoxigedunina das sementes de *C. guianensis*, 4-nerolidilcatecol das raízes de *P. peltata*; e dilapiol do óleo volátil das folhas e fluorescências de *P. aduncum*;
- Preparar 4-nerolidilcatecol diacetilado a partir do 4-nerolidilcatecol isolado;
- Avaliar o sinergismo de 6 α -acetoxigedunina com 4-nerolidilcatecol diacetilado para atividade *in vitro* contra cepa de *P. falciparum*;
- Avaliar o sinergismo de 6 α -acetoxigedunina com 6 α -hidroxi-desacetilgedunina para atividade *in vitro* contra cepa de *P. falciparum*;
- Avaliar o sinergismo de dilapiol com 6 α -acetoxigedunina para atividade *in vivo* contra cepa de *P. berghei*;
- Avaliar o sinergismo de dilapiol com 4-nerolidilcatecol diacetilado para atividade *in vivo* contra cepa de *P. berghei*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 SOLVENTES E EQUIPAMENTOS

- Solventes diversos destilados: MeOH, hexano, AcOEt, CHCl₃, C₃H₆O;
- Moinho de facas (marca Trapp, modelo Trf 300),
- Balança analítica (marca Ohaus, modelo Adventurer, carga máxima 210 g com precisão de 0,0001 g);
- Balança semi-analítica (marca Ohaus, modelo Adventurer, carga máxima 3,10 kg com precisão de 0,01 g);
- Manta aquecedora (marca Fisatom, modelo 752);
- Banho de ultrassom (marca Unique, modelo USC 1400);
- Rotaevaporador (marca Fisatom 802);
- Espectrômetro de Massa de Alta Resolução-HRMS (marca Waters, modelo Xevo);
- Ressonância magnética nuclear-RMN (equipamento Bruker, 300 MHz).

3.2 ASPECTOS LEGAIS E ÉTICOS

Seguindo a instrução normativa que rege esse país para coleta de material botânico (Decreto nº 5.718, de 13 de março de 2006) segue em anexo licença cedida pelo sistema de autorização e informação em biodiversidade (SISBIO), comprovante de registro de número 46477-1 (Anexo A). O protocolo de testes *in vivo* foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do INPA (Anexo B).

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As concentrações inibitórias medianas (CI₅₀) das substâncias analisadas foram determinadas por meio de curvas sigmoidais dose-resposta, utilizando-se o software OriginPro 8, analisando-se os respectivos intervalos de confiança 95% e coeficientes lineares (R).

3.4 METODOLOGIA FITOQUÍMICA

3.4.1 Fração rica em limonóides

O pesquisador do INPA, Msc. Roberto Figliuolo, extraiu 8 kg da torta residual vinda da extratora do óleo de andiroba do município de Carauari-AM, utilizando soxhlet piloto com etanol (3×6 h). Retirou o solvente por rotoevaporação e, ao resfriar à temperatura ambiente por 72 h, observou a formação de precipitados, os quais foram filtrados, codificados e armazenados. A massa de 8,4 g de precipitado foi disponibilizada ao nosso grupo de pesquisa para submetê-la a purificação cromatográfica.

3.4.2 Obtenção de 6 α -ACG por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A massa de 8,4 g do precipitado foi colocada em balão de fundo redondo de 500 mL e aquecida a 70 °C com MeOH, sobre agitação em refluxo por 1 h. Em seguida, a solução alcoólica foi filtrada com papel de filtro e deixada em repouso a temperatura ambiente por 7 dias. Ocorreu a formação de cristais tipo agulha que foram filtrados a vácuo. Logo após a filtração, os cristais foram lavados com MeOH gelado.

A massa de 1 mg dos cristais foi dissolvida em 1 mL de ACN e submetida a análise por CLAE com coluna analítica fase reversa C-18 (*Shim-pack*, dimensão 250 \times 4,6 mm, partícula de 5 μ m) no sistema isocrático ACN:H₂O (70:30), injeção de 15 μ L à 1 mg/mL, fluxo de 1,0 mL/min e o sistema foi monitorado à 219 nm. O cromatograma (Figura 5) mostrou dois picos com tempo de retenção de 13,1 e 16,9 min.

As duas substâncias foram isoladas por CLAE semipreparativa fase reversa C-18 (*Shim-pack*, dimensão 250 \times 20 mm, partícula de 5 μ m). O isolamento das substâncias correspondentes aos dois picos ocorreu através da dissolução de 800 mg dos cristais em ACN. A solução resultante foi dividida em 5 alíquotas de 1 mL com concentração de 160 mg/mL. O resumo das condições da corrida cromatográfica são descritos na Tabela 1. As substâncias isoladas apresentaram massa de 113 mg (13,0 min) e 534 mg (16,4 min), tratando-se de 7-desacetil-7-oxogedunina e 6 α -acetoxigedunina, respectivamente.

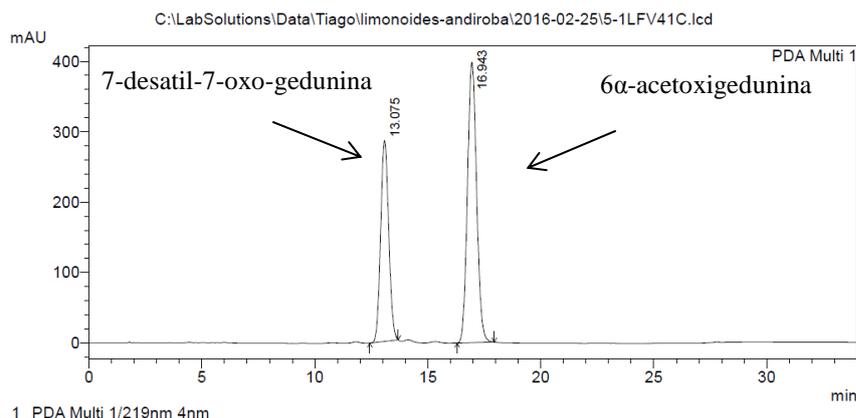


Figura 5: Cromatograma da fração TC17E.

Tabela 1: Condições analítica e semipreparativa da corrida cromatográfica por CLAE.

Condição utilizada	Coluna analítica	Coluna semipreparativa
Dimensões da coluna	250 × 4,6 mm	250 × 20 mm
Fluxo	1,0 mL/min	16 mL/min
Concentração da amostra	1,0 mg/mL	100 mg/mL
Volume de injeção	15 µL	1,0 mL
λ	219 nm	219 nm
Fase móvel	ACN:H ₂ O (70:30)	

Shim pack PREP-ODS (H) KIT (5 µm)

3.4.3 Obtenção do limonóide semissintético 6α-hidroxidesacetilgedunina (6α-HIDROXI)

Todas as etapas referentes à obtenção da 6α-HIDROXI foi realizada pelo aluno de doutorado Tiago B. Pereira, o qual submeteu o 6α-ACT à reação de desacetilação e obteve o produto 6α-HIDROXI conforme descrição no tópico 3.4.1.

3.4.3.1 Reação de desacetilação do 6 α -ACG

Antes de iniciar a reação, dissolveram-se 10,5 g de KOH em 2,5 mL de H₂O destilada e adicionou-se MeOH em quantidade suficiente para 500 mL em um balão volumétrico.

O limonoide 6 α -ACG (633,2 mg) foi colocado na presença de 7,6 mL da solução hidroalcoólica de NaOH em refluxo por 40 min entre 60-70 °C. Em seguida, aumentou-se o volume do meio reacional com 15 mL de H₂O e neutralizou-se com HCl 0,1 N. Logo após a neutralização, realizou-se a extração da fase orgânica com DCM (3 \times 10 mL). A fase orgânica foi secada com Na₂SO₄ e rotaevaporada, rendendo a massa de 600,9 mg.

A massa de 600,9 mg da fase orgânica foi submetida à coluna cromatográfica *flash* com sílica gel 60 (0,040- 0,063 mm; h \times θ 17 \times 2,7 cm; fluxo: 5 cm/min) no sistema de solvente hexano:AcOEt (7:3) (Figura 6). A coluna foi lavada com AcOEt (100%), seguida de MeOH (100%). As frações foram reunidas conforme o perfil cromatográfico no CCD.

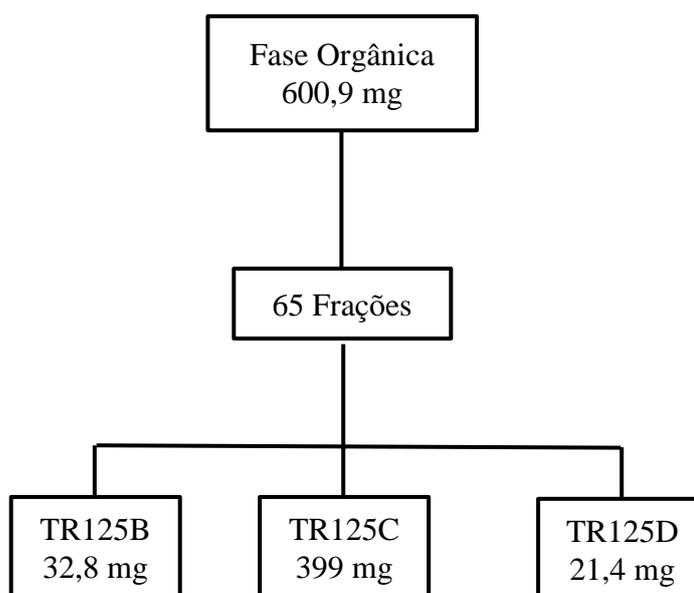


Figura 6: Esquema de purificação do produto de desacetilação do 6 α -ACT.

O produto da reação (TR125C) puro foi analisado no LC-MS e RMN e os dados comparados com a literatura (Pereira *et al.*, 2014) comprovaram a desacetilação e formação do 6 α -HIDROXI.

3.4.4 Obtenção de 4-NC

A partir do extrato metanólico das raízes secas de *P. peltata* cedido pelo Dr. Orivaldo Lacerda Júnior, foi realizado o isolamento por cromatografia em coluna (de 38 cm de altura × 6 cm de diâmetro) sob vácuo, de sílicas flash gel 60 (0,040-0,063mm) da Merck, com 10 g de extrato de raíz de *P. peltata*. Foram coletadas 16 frações. A partir da fração 9 à 13, obteve-se 4-NC, conforme a Figura 7 (DE ANDRADE-NETO *et al.*, 2007; PINTO, 2008).

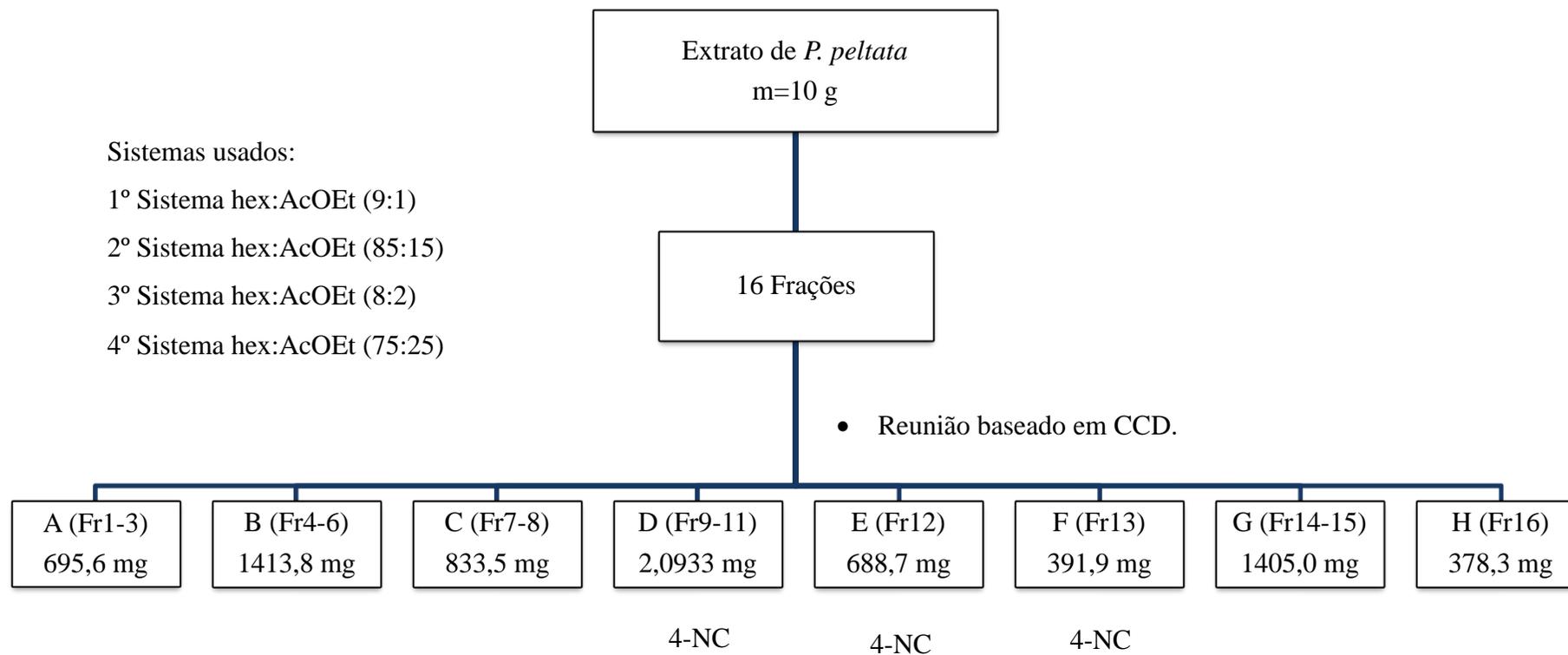


Figura 7: Coluna cromatográfica realizada com o extrato de *P. peltata* e isolamento de 4-NC.

3.4.4.1 Reação de acetilação do 4-NC

Após confirmação da pureza do 4-NC isolado por RMN, foi realizado o procedimento reacional para obtenção do derivado diacetilado. A reação ocorreu em um balão de fundo redondo com 100 mg de 4-NC, em seguida foi adicionado 60,1 μL de anidrido acético e 660 μL de piridina (catalizador e solvente), tampou-se o balão com septo de borracha e, a esse septo, foi acoplado uma bexiga contendo gás de N_2 . O mesmo permaneceu sob agitação por 24 h. A reação química é demonstrada abaixo.

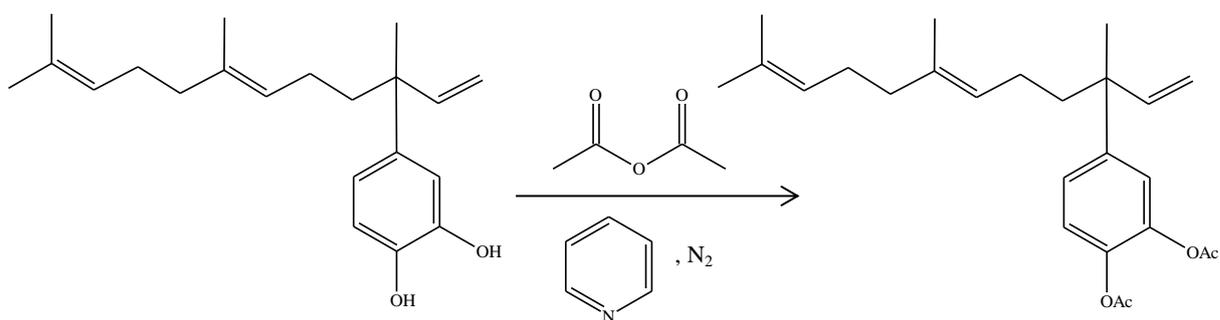


Figura 8: Acetilação de do 4-NC.

Após o tempo da reação foi realizado o procedimento pós-reacional que consiste na remoção do anidrido acético e piridina. Em um funil de separação de 125 mL foi adicionado o conteúdo do balão reacional previamente lavado com hexano (10 mL) e água por intensa agitação e repouso houve a separação das fases. Descartou-se a fase inferior e adicionou-se 10 mL de HCl 0,1N, agitou-se, após um período de repouso ocorreu a separação das fases. Novamente descartou-se a fase inferior, essa repetição ocorreu com a adição de soluções de NaHCO_3 saturada e NaCl saturada no volume de de 10 mL cada. Após todas as lavagens, rotaevapou-se e armazenou-se o resíduo seco na geladeira.

3.4.5 Obtenção de DIL

Na manhã dos dias 25/02/20015 e 01/03/20015 da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), km 29, foram coletados da área de cultivo, talos com folhas de *P.*

aduncum. O material vegetal foi desidratado a temperatura ambiente por 72h. Após a secagem foi determinado o teor de umidade, segundo o algoritmo abaixo:

$$\text{Umidade (\%)} = \frac{\text{massa fresca} - \text{massa seca}}{\text{massa fresca}} \times 100$$

$$\text{Umidade (\%)} = \frac{4267 - 3200}{4267} \times 100$$

$$\text{Umidade (\%)} = 25$$

Posteriormente foi realizada a extração do óleo de dilapiol pelo processo de hidrodestilação (Klevenger). O processo de extração ocorreu no laboratório de plantas medicinais da Embrapa Amazônia Ocidental. Em um balão de 1200 mL foram colocadas 400 g de folhas e talos secos de *P. aduncum* e acrescentado água acima da metade da capacidade máxima do balão. Acoplou-se o sistema de Klevenger ao balão. O processo de hidrodestilação durou aproximadamente 4 h. Ao todo foram feitas 8 extrações, sendo 4 no primeiro e mais 4 no segundo dia. O rendimento de óleo obtido é demonstrado na Tabela 2.

Tabela 2: Rendimento de massa obtido do óleo volátil de *P. aduncum* (antes de desidratar o óleo).

Data	Massa Óleo (g)	Teor %
28/02/2015	45,05	2,81
01/03/2015	42,19	2,64
Total	87,24	5,45

Para remoção total de água e substâncias polares, foi adicionado 15 g de NaCl para cada 1 g de óleo. O óleo foi dividido e colocado em dois fracos contendo 43,19 g de óleo bruto cada, foi adicionado NaCl e agitado, posteriormente foi filtrado com funil e papel filtro. O rendimento de óleo desidratado é demonstrado na Tabela 3.

Tabela 3: Rendimento de massa obtido do óleo desidratado de *P. aduncum*.

Frasco	Massa (g)	Teor (%)
1	27,68	1,73
2	28,62	1,78
Total	56,30	3,51

Para a etapa de isolamento e purificação do DIL, foi montado um sistema de hidrodestilação a vácuo. Em um balão de 50 mL foram colocados 27,68 g de óleo e submetido à destilação fracionada a vácuo. Foram coletadas 3 frações, onde foram comparadas com padrão em cromatoplasas em fase normal. A fração 2 (obtida à uma temperatura de destilação de 120 °C e pressão de 150 mmHg), apresentou maior similaridade com o padrão de DIL, constatando a obtenção de do dilapiol (POHLIT *et al.*, 2013).

3.5 ENSAIOS BIOLÓGICOS

Avaliação laboratorial da atividade antimalárica *in vitro* e *in vivo* foi realizada no Laboratório de Malária e Dengue do INPA e no Biotério Central do INPA, respectivamente.

3.5.1 Teste de citotoxicidade

O ensaio de citotoxicidade foi realizado no Laboratório de Cultura de Células da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, sob a responsabilidade do Dr. Emerson Silva Lima. Utilizou-se o método de Alamar blue (NAKAYAMA *et al.*, 1997), utilizando fibroblastos normais de pulmão humano (MRC5) que foram mantidos em meio DMEM com alta glicose em estufa bacteriológica com 5% CO₂ em atmosfera de 37 °C. Essas células foram plaqueadas na concentração de $0,5 \times 10^4$ células/poço em placa de 96 poços com volume final de 100µL/poço, após 24h de incubação as células foram tratadas com os compostos 6- α ACT, 4-NCAC₂ e DIL em concentrações decrescentes de 200 até 1,56 µg/mL. Como controle positivo foi utilizado doxorubicina 20 µg/mL e controle negativo DMSO 0,5 %. Após 48 h de incubação foi adicionado 10 µL do alamar blue e deixado 2 h para o tempo de metabolização da célula, decorrido esse período realizou-se a leitura em leitor de microplaca (DTX-800 Beckman Coulter).

3.5.2 Ensaio de atividade antiplasmódica *in vitro*

O cultivo *in vitro* da cepa de *P. falciparum* para atividade antimalárica foi realizado no Laboratório de Malária e Dengue/INPA. A cepa testada foi a multi-resistente K1 de *P. falciparum*, esta é mantida em cultivo contínuo (TRAGER e JENSEN, 1976).

Para o microteste as amostras foram preparadas em DMSO e posteriormente dissolvidas em meio de cultura RPMI. As amostras foram diluídas em duplicata em 7 diferentes concentrações na microplaca de 96 poços com 1-2 % de hemácias parasitadas e hematócrito de 2 %. Após o período de incubação por 48 h a 37 °C e adicionado mistura padrão de gases - O₂, CO₂, N₂ (mesmas condições da cultura), foram avaliados o percentual da parasitemia examinados no microscópio óptico (ANDRADE-NETO *et al.*, 2007). O controle de crescimento do protozoário foi comparado à inibição do crescimento dos parasitas das amostras testes conforme a fórmula:

$$\% \text{ inibição} = \frac{(\text{parasitemia do controle} - \text{parasitemia com amostra})}{\text{parasitemia do controle}} \times 100$$

As substâncias foram solubilizadas em DMSO e testadas individualmente e associadas ao DIL. De cada solução, foram realizadas 5 diluições em meio de cultura e 100 µL das amostras diluídas foram aplicadas em uma placa teste de 96 poços. As concentrações das substâncias em cada poço é representada na Tabela 4.

Tabela 4: Concentrações das substâncias na placa teste para *P. falciparum* K1.

6αACT µM	DIL µM	DIL + 6α-ACG µM	DIL + 4-NCAC ₂ µM	6α-HIDROXI µM
80	100	100 + 80	100 + 40	40
40	50	100 + 40	100 + 20	20
20	25	100 + 20	100 + 10	10
10	12,5	100 + 10	100 + 5	5
5	6,25	100 + 5	100 + 2,5	2,5
2,5	3,125	100 + 2,5	100 + 0,625	1,25

3.5.3 Ensaio da atividade sinérgica *in vitro*

Para analisar o sinergismo, foi determinada a concentração inibitória (CI_{50}) de cada substância, posteriormente realizou-se um novo microteste fazendo as seguintes combinações: 4-NCAC₂ com 6 α -ACG; e 6 α -HIDROXI e 6 α -ACG. As combinações foram preparadas nas seguintes proporções de 5:0, 4:1, 3:2, 2:3, 1:4 e 0:5, em placas de 96 poços, com suas duplicatas. As concentrações iniciais estão descritas na Tabela 5, posteriormente foi realizada diluições seriadas. Como controle positivo e negativo foram utilizadas as drogas cloroquina e quinina, respectivamente.

Tabela 5: Concentrações iniciais dos compostos para cada associação.

Proporção	Concentração Iniciais dos Compostos (μ M)			
	4-NCAC ₂	6 α -ACG	6 α -HIDROXI	6 α -ACG
5:0	40	-	40	-
4:1	32	16	32	16
3:2	24	32	24	32
2:3	16	48	16	48
1:4	8	64	8	64
0:5	-	80	-	80

A partir da CI_{50} de cada associação, foram realizadas os seguintes cálculos:

- Concentração inibitória fracionária (CIF) = CI_{50} do fármaco combinado / CI_{50} do fármaco individual;
- Somatória da concentração inibitória fracionária (Σ CIF) = CIF do fármaco A + CIF do fármaco B;
- Média da somatória da concentração inibitória fracionária ($X\Sigma$ CIF) = somatória das Σ CIF / 4.

Com base no $X\Sigma$ CIF foi possível classificar a associação dos compostos de acordo com o Quadro 4 (ODDS, 2003; BIAVATTI, 2009).

Quadro 4: Classificação da associação.

χ^2 CIF	Classificação
$\leq 0,5$	Sinérgica
$\geq 0,5$	Indiferente
≥ 4	Antagônica

Onde, **sinérgica** representa efeito aumentado a partir da associação dos compostos; **indiferente**, falta de efeito; e **antagônica**, ligação dos compostos químicos aos receptores agonistas, porém sem ativá-los.

3.5.4 Ensaio de atividade antiplasmódica *in vivo*

A cepa NK65 do *P. berghei* foi mantida em camundongos albinos por passagens sanguíneas semanais de animal para animal. A parasitemia foi acompanhada por esfregaços sanguíneos corados pelo Panótico® e examinados em microscópio ótico (100×). O animal com o percentual de 10-20% de parasitemia foi considerado ideal para o teste. Para padronização, foram inoculadas 10^5 hemácias parasitadas diluídas em 200 μ L de PBS por via intraperitoneal. Os camundongos foram divididos em grupo de controle negativo, tratado com óleo de castor, e grupo de controle positivo, tratado com dose curativa de 10 mg/kg/dia de cloroquina. Após 24 h de inoculação, os animais foram tratados com 25 mg/kg/dia de DIL, 100 mg/kg/dia de 6 α -ACG, 200 mg/kg/dia de 4-NCAC₂, além do tratamento binário de 25 mg/kg/dia de DIL + 100 mg/kg/dia de 6 α -ACG, 25 mg/kg/dia de DIL + 200 mg/kg/dia de 4-NCAC₂, por 4 dias consecutivos, via oral (PETERS, 1965; ROCHA E SILVA *et al.*, 2011). No 5° e 7° dias de teste, a parasitemia foi avaliada a partir de esfregaços sanguíneos, fixados e corados pelo Panótico® e examinados em microscópio ótico (1000×). A supressão do protozoário é calculada em relação aos respectivos controles em cada experiência, de acordo com a equação:

$$\text{Supressão da parasitemia} = 100 \times (A - B)/A$$

Onde: A= Média da parasitemia do controle negativo; B = Média da parasitemia do grupo teste (OBIH e MAKINDE, 1984).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA E IDENTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS

4.1.1 6 α -ACG

O composto 6 α -ACG foi obtido em forma de cristal branco. Foi analisado por meio de LC-HRMS, onde apresentou o íon molecular protonado de $m/z = 541,2438 [M^+ + H]$, correspondendo a uma fórmula molecular de $C_{30}H_{36}O_9$, com erro de $\Delta = 2,2$ ppm (Anexo C).

Para a confirmação da estrutura de 6 α -ACG foram analisados dados de RMN 1H e ^{13}C (Anexos D à F). As referidas estruturas são resultados de dissertações e teses de dados já comparados com a literatura, então foram tabelados apenas os dados espectrais e comparado com a literatura, os mesmos se encontram na Tabela 6.

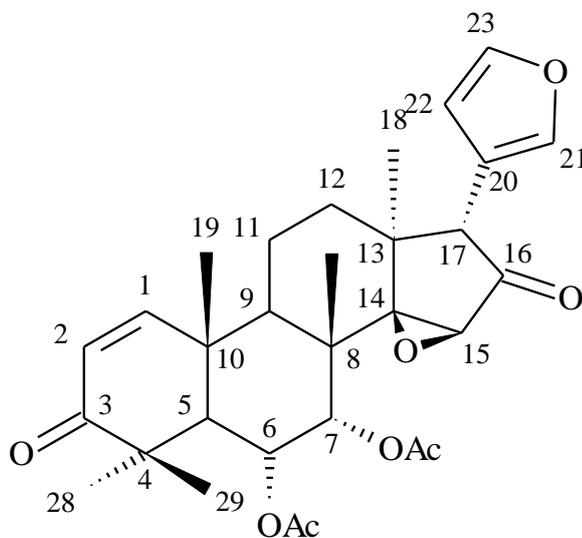


Figura 9: Estrutura química do 6 α -acetoxigedunina.

Tabela 6. Comparação dos dados de RMN ^1H e ^{13}C de 6 α -ACG e dados da literatura.
Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de 6 α -ACG (CDCl_3 , 300 MHz (^1H), 75MHz (^{13}C)).

Nº carbono	RMN de ^{13}C (δ_{C})		RMN de ^1H (δ_{H})	
	6- α -ACT	Lit.*	6- α -ACT	Lit.*
C-1	156,2	156,2	7,1 <i>d</i> (<i>J</i> = 10,1 Hz)	7,07 <i>d</i> (<i>J</i> = 10,1 Hz)
C-2	126,6	126,6	5,98 <i>d</i> (<i>J</i> = 10,1 Hz)	5,94 <i>d</i> (<i>J</i> = 10,1 Hz)
C-3	204,1	204,1	-	-
C-4	50,0	44,9	-	-
C-5	47,8	47,8	2,56 <i>d</i> (<i>J</i> = 12,5 Hz)	2,52 <i>d</i> (<i>J</i> = 12,4 Hz)
C-6	69,7	69,7	5,31 <i>dd</i> (<i>J</i> = 12,5; 2,36 Hz)	5,27 <i>dd</i> (<i>J</i> = 12,4; 2,4 Hz)
C-7	72,6	72,6	4,93 <i>d</i> (<i>J</i> = 2,36 Hz)	4,89 <i>d</i> (<i>J</i> = 2,4 Hz)
C-8	43,1	43,1	-	-
C-9	38,4	38,4	2,57 <i>dd</i> (<i>J</i> = 12,5; 5,0 Hz)	2,53 <i>m</i>
C-10	40,6	40,6	-	-
C-11	15,0	15,0	2,02 <i>m</i> ; 1,87 <i>m</i>	1,85 <i>m</i> ; 1,98 <i>m</i>
C-12	25,9	25,9	1,77 <i>m</i> ; 1,63 <i>m</i>	1,59 <i>m</i> ; 1,74 <i>m</i>
C-13	38,8	48,8	-	-
C-14	69,5	69,5	-	-
C-15	56,2	56,2	3,65 <i>s</i>	3,61 <i>s</i>
C-16	167,2	167,1	-	-
C-17	78,1	78,1	5,64 <i>s</i>	5,61 <i>s</i>
C-18	17,9	17,9	1,28 <i>s</i>	1,24 <i>s</i>
C-19	21,0	21,4	1,25 <i>s</i>	1,21 <i>s</i>
C-20	120,3	120,3	-	-
C-21	141,2	141,2	7,5 <i>dl</i> (<i>J</i> = 1,32 Hz)	7,41 <i>d</i> (<i>J</i> = 1,3 Hz)
C-22	109,8	109,8	6,36 <i>t</i> (<i>J</i> = 1,32 Hz)	6,33 <i>t</i> (<i>J</i> = 1,3 Hz)

C-23	143,1	143,1	7,4 <i>dl</i> ($J=1,32$ Hz)	7,41 <i>t</i> ($J=1,3$ Hz)
C-28	31,7	31,6	1,29 <i>s</i>	1,26 <i>s</i>
C-29	20,3	20,2	1,20 <i>s</i>	1,17 <i>s</i>
C-30	18,1	18,1	1,30 <i>s</i>	1,27 <i>s</i>
6-CO ₂ CH ₃	21,2	21,2	2,07 <i>s</i>	2,03 <i>s</i>
7-CO ₂ CH ₃	21,4	21,9	2,18 <i>s</i>	2,15 <i>s</i>
6-CO ₂ CH ₃	170,2	170,1	-	-
7-CO ₂ CH ₃	170,1	170,0	-	-

Fonte: * Hofer, 2009

4.1.2 4-NC

O composto 4-NC foi obtido em forma de líquido viscoso de coloração alaranjado. Foi analisado por meio de LC-HRMS, onde apresentou o íon molecular protonado de $m/z = 400,55$ [$M^+ + H$], o que corresponde a um fórmula molecular de $C_{21}H_{30}O_2$, com erro de $\Delta = 1,7$ ppm (Anexos G e H).

Os espectros de RMN 1H foram tabelados e comparados com os dados espectroscópicos da literatura. Como pode ser observado na Tabela 7, o composto 4-NC apresenta dados de RMN de 1H e ^{13}C idênticos à literatura, confirmando a autenticidade do composto e o seu alto grau de pureza. Os espectros não serão detalhadamente descritos neste trabalho porque todas as substâncias isoladas foram resultados de dissertações e teses de dados já comparados com a literatura.

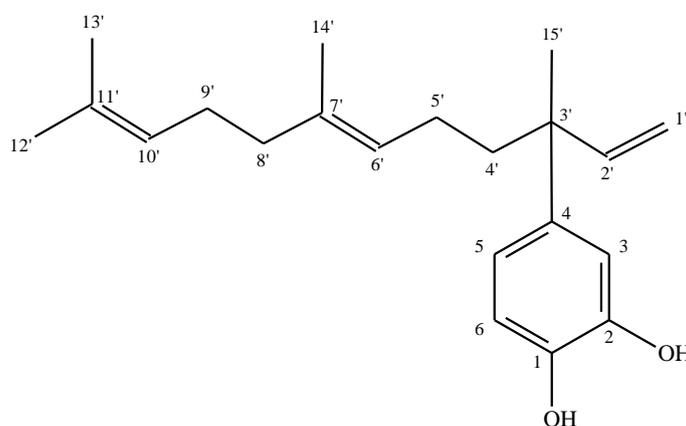


Figura 10: Estrutura química do 4-NC.

Tabela 07. Comparação dos dados de RMN ^1H e ^{13}C do 4-NC e dados da literatura.

Dados dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do 4-NC (RMN-300 MHz/75 MHz; ppm; CDCl_3).				
N ^o carbono	RMN de ^{13}C (δ_{C})		RMN de ^1H (δ_{H})	
	4-NC	Lit.*	4-NC	Lit.*
C-1	140,9	141,1	-	-
C-2	143,1	143,2	-	-
C-3	114,9	115,1	6,80 <i>d</i> (<i>J</i> =3 Hz)	6,83 <i>d</i> (<i>J</i> =2 Hz)
C-4	141,3	141,4	-	-
C-5	119,0	119,3	6,78 <i>dd</i> (<i>J</i> =9; 3 Hz)	6,73 <i>dd</i> (<i>J</i> =8; 2 Hz)
C-6	114,2	114,4	6,87 <i>d</i> (<i>J</i> =9 Hz)	6,78 <i>d</i> (<i>J</i> =8 Hz)
C-1'	111,5	111,6	5,08 <i>dd</i> (<i>J</i> =9; 3 Hz)	5,05 <i>dd</i> (<i>J</i> =10,5; 1,3 Hz) 5,00 <i>dd</i> (<i>J</i> =17; 1,3 Hz)
C-2'	147,0	147,1	6,00 <i>dd</i> (<i>J</i> =18; 12 Hz)	5,97 <i>dd</i> (<i>J</i> =17; 10,5 Hz)
C-3'	43,8	43,8	-	-
C-4'	41,0	41,2	1,72 <i>m</i>	1,90 <i>m</i>
C-5'	23,1	23,2	1,84 <i>m</i>	1,60 <i>m</i>
C-6'	124,5	124,5	5,10 <i>t</i> (<i>J</i> =3 Hz)	5,08 <i>t</i> (<i>J</i> =7,5 Hz)
C-7'	135,0	135,1	-	-
C-8'	39,6	39,7	1,99 <i>m</i>	2,10 <i>m</i>
C-9'	26,7	26,8	2,06 <i>m</i>	1,90 <i>m</i>
C-10'	124,5	124,7	5,11 <i>t</i> (<i>J</i> =3 Hz)	5,09 <i>t</i> (<i>J</i> =7,5 Hz)

C-11'	131,4	131,4	-	-
C-12'	25,6	25,7	1,34 s	1,51 s
C-13'	17,6	17,7	1,62 s	1,59 s
C-14'	15,0	15,9	1,54 s	1,67 s
C-15'	25,0	25,0	1,70 s	1,30 s

Fonte: * KIJOA *et al.* (1980).

4.1.3 DIL

O composto DIL obtido em forma de líquido amarelado e solúvel em CHCl_3 , foi analisado por meio de LC-MS, onde apresentou o íon molecular protonado de $m/z = 222,24$ [$\text{M}^+ + \text{H}$], e fórmula molecular de $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_4$ (Anexos I e J). Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C foram analisados com o intuito de confirmar a referida estrutura, isso foi realizado por meio de comparação entre os dados espectrais obtidos e o encontrado na literatura conforme Dill (2009), todos os dados então inseridos na Tabela 8. Os espectros confirmam o alto grau de pureza de DIL. Apesar de ter sido usado espectros bi-dimensionais, os mesmos não serão detalhados, tendo em vista que todas as substâncias isoladas foram resultados de dissertações e teses de dados já comparados com a literatura.

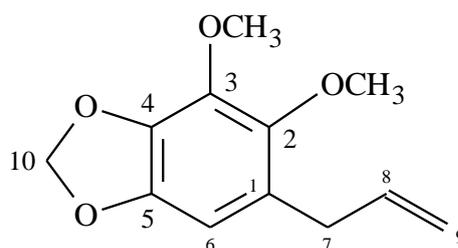


Figura 11: Estrutura química do DIL.

Tabela 8. Comparação dos dados de RMN ^1H e ^{13}C do DIL e dados da literatura.

Dados dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do DIL (RMN-300 MHz/75 MHz; ppm; CDCl_3).

Nº carbono	RMN de ^{13}C (δ_{C})		RMN de ^1H (δ_{H})	
	DIL	Lit.*	DIL	Lit.*
C-1	136,0	136,5		
C-2	102,7	101,5	5,90 (2H, s)	5,81 (2H)
C-3	144,7	145,0	-	
C-4	137,8	137,8	-	
C-5	144,4	145,0	-	
C-6	126,2	126,6	-	
C-7	102,7	102,3	6,37 (1H, s)	6,33 (1H)
C-8	33,9	33,8	3,31 (2H, dt)	3,32 (2H, <i>dd</i>)
C-9	137,4	137,8	5,95 (1H, m)	5,88 (1H, <i>m</i>)
C-10	115,5	115,8	5,09 (2H, m)	4,68; 4,71 (2H, <i>dd</i>)
C-11	61,2	61,6	3,97 (3H, s)	3,77 (3H, s)
C-12	61,6	69,3	4,03 (3H, s)	4,03 (3H, s)

Fonte: *Dill, 2009

4.1.4 Avaliação do teste de citotoxicidade

Foi avaliada a citotoxicidade para as células normais das substâncias DIL, 6 α -ACG e 4-NCAC₂, a metodologia adotada foi alamar blue, a mesma tem como propósito avaliar se ocorre alguma interferência na viabilidade da linhagem celular. Após a leitura da microplacas por fluorescência, observou-se que nenhuma das substâncias testadas eram tóxicas para as células normais (fibroblastos humanos MRC-5), dados que corroboram com Bernard Omar *et al.*(2003), Pereira *et al.* (2014), Rocha e Silva *et al.* (2015).

4.1.5 Atividade antiplasmódica *in vitro*

O teste foi realizado três vezes em semanas diferentes com suas respectivas duplicatas, a média da CI_{50} dos testes é apresentado na Tabela 9.

O CI_{50} de 6 α -ACG foi de 24,6 μ M, enquanto os dados de Pereira *et al.* (2014) foi 7 μ M. O 4-NCAC₂ apresentou um CI_{50} de 13,57 μ M enquanto Rocha e Silva *et al.* (2015) relata CI_{50} de 4,8 μ M. Já o CI_{50} de 6 α -HIDROXI foi de 6,74 μ M, dado equivalente ao de Pereira *et al.* (2014), CI_{50} de 5 μ M. O DIL apresentou $CI_{50} < 100$ μ M, a literatura apenas relata que DIL não apresenta atividade antiplasmodial *in vitro*, porém, não descreve com exatidão o valor do CI_{50} . O valor do CI_{50} para a associação de 6 α -ACG com DIL foi 5,23 μ M, enquanto 4-NCAC₂ com DIL foi 2,54 μ M e 6 α -HIDROXI com DIL foi 2,06 μ M. Foi possível observar que quando associados ao DIL, as substâncias apresentam um melhor IC_{50} . Não existem relatos na literatura para estes tipos de associações.

Tabela 9: Valores da CI_{50} *in vitro* contra *P. falciparum* K1.

Substâncias	CI_{50} (μ M)
6 α -ACG	24,6
4-NCAC ₂	3,57
DIL	> 100
6 α -HIDROXI	6,74
6 α -ACG + DIL	5,23
4-NCAC ₂ + DIL	2,54
6 α -HIDROXI + DIL	2,06

Foi possível observar que o DIL sozinho não teve efeito significativo sobre a parasitemia, mas quando associado às outras substâncias tem uma melhora significativa. Foram considerados com baixa atividade apresentando CI_{50} acima de 50 μ g/mL para cepas resistentes e sensíveis a cloroquina (DILL, 2009).

4.1.6 Atividade sinérgica *in vitro*

Foram estudadas duas associações *in vitro* contra *P. falciparum*: 4-NCAC₂ e 6 α -ACG; 6 α -HIDROXI e 6 α -ACG. As concentrações iniciais das substâncias foram 40 μ M para 4-NCAC₂, 40 μ M para 6 α -HIDROXI e 80 μ M para 6 α -ACG. As concentrações das substâncias na placa teste é demonstrada na Figura 12.

5:0	4:1		3:2		2:3		1:4		0:5
100% A μ M	80% A 20% B μ M		60% A 40% B μ M		40% A 60% B μ M		20% A 80% B μ M		100% B μ M
40	32	16	24	32	16	48	8	64	80
20	16	8	12	16	8	24	4	32	40
10	8	4	6	8	4	12	2	16	20
5	4	2	3	4	2	6	1	8	10
2,5	2	1	1,5	2	1	3	0,5	4	5
1,75	1	0,5	0,75	1	0,5	1,5	0,25	2	2,5
0,85	0,5	0,25	0,375	0,5	0,25	0,75	0,125	1	1,75

Figura 12: Concentração em μ M de cada substância na placa teste.

Ao final de cada experimento de associação, foram geradas dez curvas do tipo dose-resposta, que corresponde a CI₅₀, conforme pode ser observado nas Figuras 13 e 14. Sendo que, quatro curvas dose-resposta, correspondem a combinação das substâncias em diferentes (4:1, 3:2, 2:3, e 1:4) e duas curvas correspondentes as substâncias administradas sozinhas (5:0 e 0:5). Após determinar o CI₅₀ de cada associação, é realizado o cálculo do CIF da associação, definido a CIF foi feito o cálculo da Σ CIF e, por conseguinte foi possível calcular a $X\Sigma$ CIF e definir a classificação da associação.

A CI₅₀ de 4-NCAC₂ foi 13,32 μ M enquanto que 6 α -ACG apresentou CI₅₀ de 24,07 μ M. Ao se calcular a Σ CIF de cada associação, foram obtidos valores que variaram de 1,22 a 2,97 (Tabela 10).

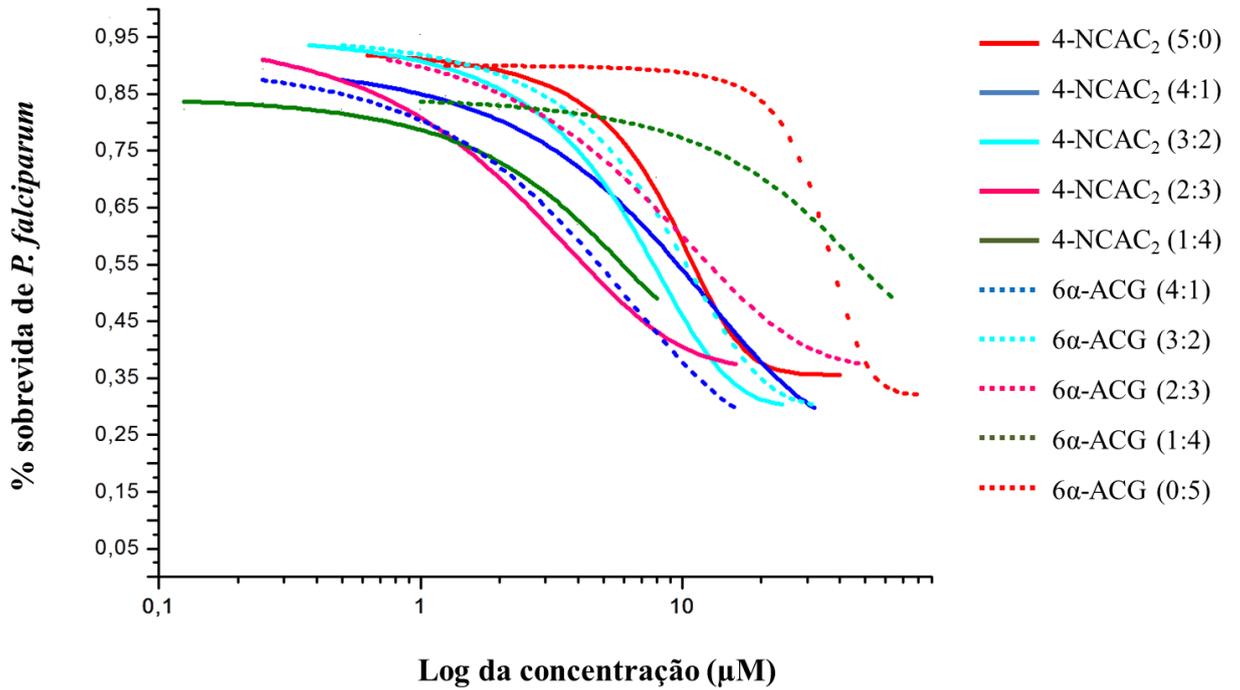


Figura 13: Curvas de dose-resposta geradas pela associação de 4-NCAC₂ e 6α-ACG em *P. falciparum*.

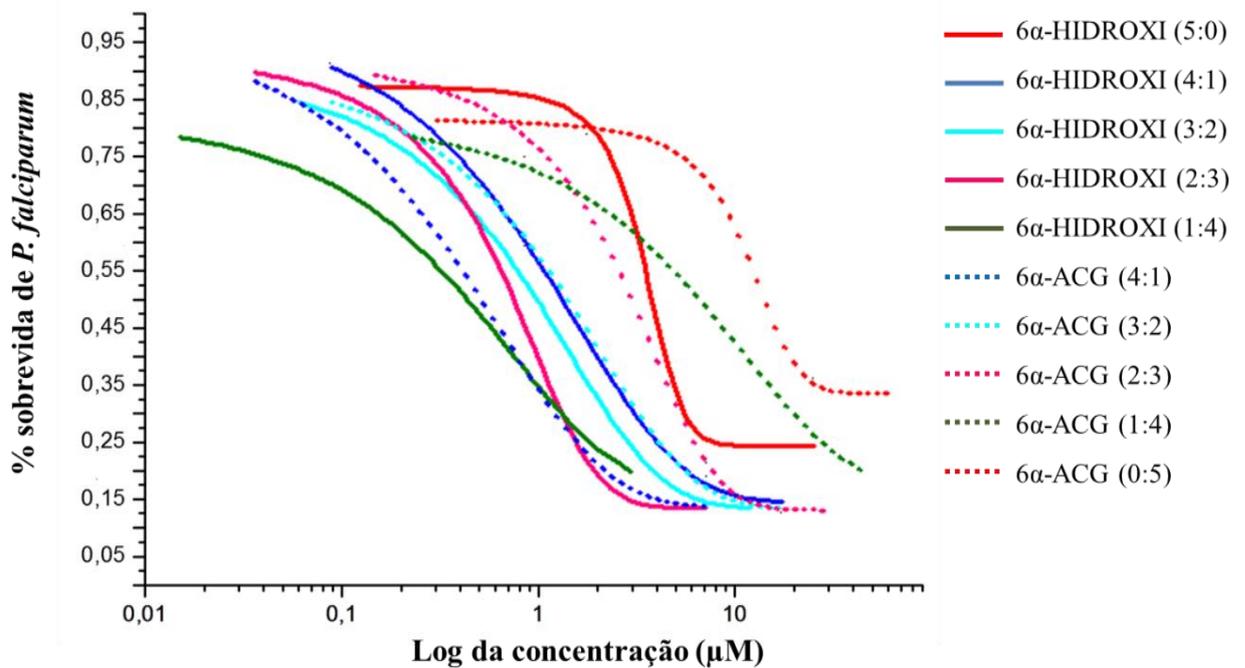


Figura 14: Curvas de dose-resposta geradas pela associação de 6α-HIDROXI e 6α-ACG em *P. falciparum*.

Tendo como referência a CI_{50} de cada associação, e as respectivas CIF de ambas as substâncias, foi calculada a $X\Sigma CIF$, as quais são apresentadas na Tabela 11. Baseado na classificação de Odds (2003) apresentada no tópico 3.6.3 da Metodologia (Quadro 4), tanto a associação entre 4-NCAC₂ e 6 α -ACG, como 6 α -HIDROXI e 6 α -ACG apresentaram interação indiferente. Por sua vez, a média da ΣCIF , a qual representa o comportamento geral da associação foi de 1,74, indicando uma interação indiferente de acordo com a classificação adotada no presente trabalho.

Tabela 10: Valores de CI_{50} da associação entre as substâncias 4-NCAC₂ e 6 α -ACG em *P. falciparum*.

Associação	CE ₅₀ da associação (μ M)		CIF da associação		ΣCIF	$X\Sigma CIF$
	(CI 95 %)		(μ M)			
	4-NCAC ₂	6 α -ACG	4-NCAC ₂	6 α -ACG		
5:0	13,32	-	-	-	-	
4:1	13,15	5,82	0,99	0,23	1,22	
3:2	10,48	13,11	0,78	0,53	1,31	1,74
2:3	8,53	20,25	0,64	0,82	1,46	
1:4	7,56	59,59	0,56	2,41	2,97	
0:5	-	24,07	-	-	-	

A CI_{50} de 6 α -HIDROXI foi 7,52 μ M (Tabela 11) enquanto que 6 α -ACG apresentou CI_{50} de 24,08 μ M. Ao se calcular a ΣCIF de cada associação, foram obtidos valores que variaram de 0,71 a 0,9.

Tendo como referência a CI_{50} de cada associação, e as respectivas CIF de ambos as substâncias, foi calculada a $X\Sigma CIF$ (Tabela 12). Por sua vez, a média da ΣCIF , a qual representa o comportamento geral da associação foi de 0,75, indicando uma interação indiferente de acordo com a classificação adotada no presente trabalho.

Tanto a associação entre 4-NCAC₂ e 6 α -ACG quanto 6 α -HIDROXI e 6 α -ACG foram classificadas como indiferente, ou seja, não apresentam atividade sinérgica.

Tabela 11: Valores da CI_{50} da associação entre as substâncias 6 α -HIDROXI e 6 α -ACG em *P. falciparum*.

Associação	CE ₅₀ da associação (μ M)		CIF da associação (μ M)		Σ CIF	X Σ CIF
	(IC 95 %)		(IC 95%)			
	6 α -HIDROXI	6 α -ACG	6 α -HIDROXI	6 α -ACG		
5:0	7,52	-	-	-	-	
4:1	4,64	2,34	0,62	0,09	0,71	
3:2	3,46	4,62	0,46	0,19	0,65	
2:3	2,69	9,14	0,36	0,37	0,73	0,75
1:4	4,33	8,0	0,58	0,32	0,9	
0:5	-	24,08	-	-	-	

4.1.7 Atividade antiplasmódica *in vivo*

Para avaliação da atividade antimalárica *in vivo* foi utilizado o teste de supressão de Peters (1965). Foram formados 7 grupos de 5 camundongos cada, no qual se dividiram em grupo controle positivo (tratado com cloroquina 10 mg/kg/dia), grupo controle negativo (óleo de castor/OC 10%), e grupos testes (tratados com as substâncias de modo unitário e binário). Os animais foram tratados via oral com as substâncias 6 α -ACG, 4-NCAC₂ e DIL. Também foi realizado o tratamento binário com as combinações: 6 α -ACG e DIL; 4-NCAC₂ e DIL; 6 α -ACG e 4-NCAC₂. O resultado do teste está apresentado na Tabela 12.

O DIL na dose de 25 mg/kg/dia apresentou supressão da parasitemia de 19,3 % e 33,6 % no quinto e sétimo dia, respectivamente. No entanto, Omar *et al.* (2003) não apresentou nenhum tipo de inibição em doses que variaram de 25-100 mg/kg/dia, porém, foi identificado algumas diferenças nos estudos, como por exemplo, este estudo utilizou camundongo *Balb/c*, infectado com *P. berghei*, cepa NK65, enquanto Omar *et al.* (2003) camundongo CD1, infectado com *P. berghei*, cepa ANKA.

A inibição da parasitemia de 6 α -ACG na dose de 100 mg/kg/dia foi de 25 % no quinto dia e ausência de atividade no sétimo dia. O trabalho de Pereira *et al.*, (2014) apresentou atividade amplasmódial superior a este estudo utilizando a mesma dose, com inibição da parasitemia de 65 % e 46,3 % no quinto e sétimo dia, respectivamente.

O 4-NCAC₂ na dose de 200 mg/kg/dia apresentou supressão da parasitemia de 35,5 % e 40 % no quinto e sétimo dia, respectivamente. Rocha e Silva *et al.* (2015) utilizou a mesma dose e a inibição da parasitemia foi de 62 % e 42 % no quinto e sétimo dia, respectivamente.

Quando associado a dose de 25 mg/kg/dia de DIL à de 100 mg/kg/dia de 6 α -ACG, foi possível observar sinergismo, como uma melhora nos índices de inibição da parasitemia quando comparado ao resultado de 6 α -ACG administrado sozinho, com 30,3 % e 47,5 % no quinto e sétimo dia, respectivamente. Todavia, quando associado DIL na dose de 25 mg/kg/dia à de 200 mg/kg/dia de 4-NCAC₂, ocorreu uma diminuição da atividade antiplasmodial quando comparado a atividade de 4-NCAC₂ administrado sozinho, que foi de 20,7 % no quinto dia ausência de atividade no sétimo dia. Apesar de inicialmente não fazer parte dos objetivos deste trabalho, foi combinado 100 mg/kg/dia de 6 α -ACG à 200 mg/kg/dia de 4-NCAC₂, a inibição da parasitemia foi de 18,1 % e 20,3 %, no quinto e sétimo dia, respectivamente, ou seja, atividade antiplasmodial inferior do que administradas essas substâncias sozinhas.

Tabela 12: Supressão *in vivo* do crescimento de *P. berghei* após tratamento oral do hospedeiro com as substâncias.

Dose (mg/kg/dia)	Inibição da parasitemia (%)		Tempo de sobrevivência ± DP (dias)
	Dia 5	Dia 7	
6 α -ACG 100	25,0	0	17 ± 0
4NCAC ₂ 200	35,5	40,0	20 ± 1
DIL 25	19,3	33,6	19 ± 2
6 α -ACG + DIL 100 + 25	30,3	47,5	20 ± 2
4NCAC ₂ + DIL 200 + 25	20,7	0	17 ± 0
6 α -ACG + 4NCAC ₂ 100 + 200	18,1	20,3	24 ± 2
Cloroquina 10	99,1	98,7	> 40
OC 10%	3,6 ± 0,7	2,1 ± 0,5	17 ± 0,5

Em ensaios anteriores de supressão da parasitemia *in vivo*, foi utilizado DMSO e água na formulação. O presente trabalho se diferenciou dos demais do Lapaam, a fim de melhorar a

absorção. Foi desenvolvida uma formulação utilizando OC 10%, tendo como resultado final uma emulsão em água.

Semelhante a pesquisa de Omar *et al.* (2003), o DIL foi capaz de aumentar os níveis de inibição da parasitemia por *P. berghei* em associação com um limonóide, neste estudo o 6 α -ACG. Foram observados níveis ligeiramente mais elevados do que quando 6 α -ACG foi utilizado sozinho. Em contra partida, o DIL inibiu a parasitemia *in vivo* na dose de 25 mg/kg/dia de maneira significativa no sétimo dia. Ressalta-se que Omar *et al.* (2003) utilizou óleo essencial cujo principal componente era DIL, nos ensaios *in vivo* empregou doses que variavam de 25 mg/kg/dia à 100 mg/kg/dia e nenhuma concentração evidenciou atividade antiplasmodial, distinto deste trabalho que utilizou o DIL purificado e se demonstrou ativo contra *P. berghei*.

Ressalta-se a importância de repetir o teste *in vivo* duas vezes, o que não foi possível durante o período deste estudo.

Para Silva (2012), as substâncias, quando administradas concomitantemente, criam a possibilidade de que uma possa alterar os efeitos farmacológicos da outra. O resultado final pode ser a intensificação, como ocorreu neste trabalho associando o limonóide ao DIL, diminuição dos efeitos de uma ou das duas drogas, como observado associando o 4-NCAC₂ ao DIL, até o aparecimento de novo efeito que não é observado com nenhum dos dois fármacos usados isoladamente.

CONCLUSÃO

Não foi observado sinergismo *in vitro* em combinações de 4-NCAC₂ + 6 α -ACG ou 6 α -HIDROXI + 6 α -ACG.

Um efeito sinérgico relevante foi observado para DIL + 6 α -ACG contra *P. falciparum* *in vitro*. Precisa de mais repetição para confirmar esse resultado.

Dilpaiol administrado via oral em doses de 25 mg/kg/dia apresentou supressão relevantes de *P. berghei*. Esse resultado precisa de confirmação em outro experimento administrados via oral, o DIL (25 mg/kg/dia) + 6 α -ACG (100 mg/kg/dia) exibiram níveis significativos de supressão da parasitemia nos dias 5 e 7, além de efeitos sinérgicos em relação aos mesmos administrados separadamente. Repetição da avaliação *in vivo* se faz necessária para confirmação do resultado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMBROZIN, A. R. et al. Limonoids from andiroba oil and *Cedrela fissilis* and their insecticidal activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, n. 3, p. 542-547, 2006.

ANDRADE-NETO, V. F. et al. Antimalarial activity of *Bidens pilosa* L.(Asteraceae) ethanol extracts from wild plants collected in various localities or plants cultivated in humus soil. **Phytotherapy Research**, v. 18, n. 8, p. 634-639, 2004.

ANDRADE-NETO, V. F. et al. In vitro inhibition of *Plasmodium falciparum* by substances isolated from Amazonian antimalarial plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 3, p. 359-366, 2007.

BADAL, S. et al. Cytochrome P450 1 enzyme inhibition and anticancer potential of chromene amides from *Amyris plumieri*. **Fitoterapia**, v. 82, n. 2, p. 230-236, 2011.

BARTLE, W.; FERLAND, G. Fiddleheads and the international normalized ratio. **New England Journal of Medicine**, v. 338, n. 21, p. 1550-1550, 1998.

BIAVATTI, M. W. Synergy: an old wisdom, a new paradigm for pharmacotherapy. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 3, p. 371-378, 2009.

BOURRET-BERNARD, C. **Biological activities and mode of action of lignans from the Piperaceae**. University of Ottawa (Canada), 1995.

BRANDÃO, M. et al. Antimalarial activity of extracts and fractions from *Bidens pilosa* and other *Bidens* species (Asteraceae) correlated with the presence of acetylene and flavonoid compounds. **Journal of ethnopharmacology**, v. 57, n. 2, p. 131-138, 1997.

BRASIL. **Guia de Vigilância em Saúde**. Guia de Vigilância em Saúde 2014a.

BUDZINSKI, J. et al. An *in vitro* evaluation of human cytochrome P450 3A4 inhibition by selected commercial herbal extracts and tinctures. **Phytomedicine**, v. 7, n. 4, p. 273-282, 2000.

CAMPBELL, W. E. et al. Composition and antimalarial activity *in vitro* of the essential oil of *Tetradenia riparia*. **Planta Medica**, v. 63, n. 03, p. 270-272, 1997.

CAMPBELL, W. E. et al. Cytotoxic and antimalarial alkaloids from *Brunsvigia littoralis*. **Planta Medica**, v. 64, n. 01, p. 91-93, 1998.

CAMPBELL, W. E. et al. Bioactive alkaloids from *Brunsvigia radulosa*. **Phytochemistry**, v. 53, n. 5, p. 587-591, 2000.

CARLTON, J. M. et al. Genome sequence and comparative analysis of the model rodent malaria parasite *Plasmodium yoelii yoelii*. **Nature**, v. 419, n. 6906, p. 512-519, 2002.

CARVALHO, L. et al. Antimalarial activity of crude extracts from Brazilian plants studied *in vivo* in *Plasmodium berghei*-infected mice and *in vitro* against *Plasmodium falciparum* in culture. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research Revista Brasileira de Pesquisas Medicas e Biologicas/Sociedade Brasileira de Biofisica**, v. 24, n. 11, p. 1113-1123, 1990.

CARVALHO, L. H.; KRETTLI, A. U. Antimalarial chemotherapy with natural products and chemically defined molecules. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, p. 181-184, 1991.

CASTRO, M. C.; SINGER, B. H. Meio ambiente e saúde: metodologia para análise espacial da ocorrência de malária em projetos de assentamento. **Revista Brasileira de Estudos de População**, v. 24, n. 2, p. 247-262, 2013.

CHEN, J. et al. Tobacco mosaic virus (TMV) inhibitors from *Picrasma quassioides* Benn. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 15, p. 6590-6595, 2009.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Biodiversity: A continuing source of novel drug leads. **Pure and Applied Chemistry**, v. 77, n. 1, p. 7-24, 2005.

CRESPI, C. L.; MILLER, V. P.; PENMAN, B. W. Microtiter plate assays for inhibition of human, drug-metabolizing cytochromes P450. **Analytical Biochemistry**, v. 248, n. 1, p. 188-190, 1997.

CUROTTO, S. M. et al. Malária em mamíferos silvestres. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 15, n. 1, p. 67-77, 2013.

DALY, A. K. Pharmacogenetics of the cytochromes P450. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 4, n. 16, p. 1733-1744, 2004.

DILL, L. S. M. Estudo Fitoquímico dos constituintes voláteis e fixos de *Piper hispidum* SW. e avaliação *in vitro* da atividade Leishmanicida e Antiplasmodial. 2009. Dissertação, Mestrado em Moléculas Bioativas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Experimental. Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho.

DING, X.; KAMINSKY, L. S. Human Extrahepatic Cytochromes P450: Function in xenobiotic metabolism and tissue-selective chemical toxicity in the respiratory and gastrointestinal tracts*. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 43, n. 1, p. 149-173, 2003.

DU, L. et al. Effects of the differentiated keratinocyte phenotype on expression levels of CYP1–4 family genes in human skin cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 213, n. 2, p. 135-144, 2006.

DUARTE, M. C. T. et al. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 2, p. 197-201, 2007.

FARIAS, M. et al. Avaliação *in vitro* dos efeitos do óleo da semente de *Carapa guianensis* Aubl. sobre larvas de nematóides gastrintestinais de caprinos e ovinos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 2, p. 220-226, 2010.

FAZOLIN, M. et al. Insecticidal properties of essential oils of *Piper hispidinervum* C. DC.; *Piper aduncum* L. and *Tanaecium nocturnum* (Barb. Rodr.) Bur. & K. Shum against *Tenebrio molitor* L., 1758. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 1, p. 113-120, 2007.

FERREIRA, M. Malária: conceito, etiologia e ciclo evolutivo. VERONESI, R.; FOCACCIA, R. **Tratado de Infectologia**, v. 2, p. 1280, 2005.

FLORENS, L. et al. A proteomic view of the *Plasmodium falciparum* life cycle. **Nature**, v. 419, n. 6906, p. 520-526, 2002.

FOSTER, B. et al. Effect of natural health products on cytochrome P-450 drug metabolism. **Can J Infectious Dis Supp**, v. 10, n. B, p. 1, 1999.

FOSTER, B. C. et al. An *in vitro* evaluation of human cytochrome P450 3A4 and P-glycoprotein inhibition by garlic. **J Pharm Pharm Sci**, v. 4, n. 2, p. 176-184, 2001.

FOSTER, B. C. et al. *In vitro* inhibition of human cytochrome P450-mediated metabolism of marker substrates by natural products. **Phytomedicine**, v. 10, n. 4, p. 334-342, 2003.

FREIRE, D. D. C. B.; BRITO-FILHA, C. R. D. C.; CARVALHO-ZILSE, G. A. Efeito dos óleos vegetais de andiroba (*Carapa* sp.) e copaíba (*Copaifera* sp.) sobre forídeo, pragas de colméias (Diptera: Phoridae) na Amazônia Central. **Acta Amazonica**, v. 36, n. 3, p. 365-368, 2006.

GUENGERICH, F. P. Cytochrome p450 and chemical toxicology. **Chemical Research in Toxicology**, v. 21, n. 1, p. 70-83, 2007.

HEMAISWARYA, S.; KRUTHIVENTI, A. K.; DOBLE, M. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. **Phytomedicine**, v. 15, n. 8, p. 639-652, 2008.

HENDRYCHOVÁ, T. et al. Flexibility of human cytochrome P450 enzymes: molecular dynamics and spectroscopy reveal important function-related variations. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1814, n. 1, p. 58-68, 2011.

HOFER, M.; GREGER, H.; MEREITER, K. 6 α -Acetoxypedunin. **Acta Crystallographica Section E: Structure Reports Online**, v. 65, n. 8, p. o1942-o1943, 2009.

IOANNIDES, C. Pharmacokinetic interactions between herbal remedies and medicinal drugs. **Xenobiotica**, v. 32, n. 6, p. 451-478, 2002.

KATZUNG, B. G.; MASTERS, S. B.; TREVOR, A. J. **Basic & clinical pharmacology**. McGraw-Hill Medical New York, 2014.

KLAYMAN, D. L. Qinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China. **Science**, v. 228, n. 4703, p. 1049-1055, 1985.

KIJJOA, A. et al. 4-nerolidylcatechol from *Pothomorphe umbellata*. **Planta Medica**, v. 39, n. 05, p. 85-87, 1980.

KRETTLI, A. U. et al. The search for new antimalarial drugs from plants used to treat fever and malaria or plants randomly selected: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 8, p. 1033-1042, 2001.

LACERDA-QUEIROZ, N.; TEIXEIRA, M. M.; TEIXEIRA, A. L. Imunopatogênese da malária cerebral. **Revista Bras Neurol**, v. 44, n. 1, p. 13-9, 2008.

LÄPPLE, F. et al. Differential expression and function of CYP2C isoforms in human intestine and liver. **Pharmacogenetics and Genomics**, v. 13, n. 9, p. 565-575, 2003.

LOMBARD, M. C. et al. Antimalarial and anticancer activities of artemisinin–quinoline hybrid-dimers and pharmacokinetic properties in mice. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, n. 5, p. 834-841, 2012.

MAGUIRE, J. D. et al. Chloroquine-resistant *Plasmodium malariae* in south Sumatra, Indonesia. **The Lancet**, v. 360, n. 9326, p. 58-60, 2002.

MARKOWITZ, J. S.; DEVANE, C. L. Rifampin-induced selective serotonin reuptake inhibitor withdrawal syndrome in a patient treated with sertraline. **Journal of Clinical Psychopharmacology**, v. 20, n. 1, p. 109-110, 2000.

MÉNARD, R. The journey of the malaria sporozoite through its hosts: two parasite proteins lead the way. **Microbes and Infection**, v. 2, n. 6, p. 633-642, 2000.

MILLIKEN, W. Plants for malaria, plants for fever: medicinal species in Latin America—a bibliographic survey. Kew: Royal Botanic Gardens, Kew, 116p, 1997.

MIOT, H. A. et al. Comparative study of the topical effectiveness of the Andiroba oil (*Carapa guianensis*) and DEET 50% as repellent for *Aedes* sp. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 46, n. 5, p. 253-256, 2004.

MIRANDA JUNIOR, R. N. C. Avaliação da atividade antiplasmódica in vitro dos óleos de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) e pimenta-de-macaco (*Piper aduncum* L). 2010.

MONGELLI, E. et al. Cytotoxic 4-nerolidylcatechol from *Pothomorphe peltata* inhibits topoisomerase I activity. **Planta Medica**, v. 65, n. 04, p. 376-378, 1999.

MORAIS, S. M. et al. Chemical composition and larvicidal activity of essential oils from *Piper* species. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, n. 10, p. 670-675, 2007.

NAKAYAMA, G. R. et al. Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro. **Journal of immunological methods**, v. 204, n. 2, p. 205-208, 1997.

NAVICKIENE, H. M. D. et al. Composition and antifungal activity of essential oils from *Piper aduncum*, *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. **Química Nova**, v. 29, n. 3, p. 467-470, 2006.

NEBEL, A. et al. Potential metabolic interaction between St. John's wort and theophylline. **The Annals of Pharmacotherapy**, v. 33, n. 4, 1999.

NELSON, D. R. et al. Comparison of cytochrome P450 (CYP) genes from the mouse and human genomes, including nomenclature recommendations for genes, pseudogenes and alternative-splice variants. **Pharmacogenetics and Genomics**, v. 14, n. 1, p. 1-18, 2004.

NOGUEIRA, F.; ROSÁRIO, V. E. D. Métodos para avaliação da atividade antimalárica nas diferentes fases do ciclo de vida do *Plasmodium*. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 1, n. 3, p. 109-124, 2010.

OBIH, P.; MAKINDE, J. Effect of *Azadirachta indica* on *Plasmodium berghei berghei* in mice. **African Journal of Medicine and Medical Sciences**, v. 14, n. 1-2, p. 51-54, 1984.

ODDS, F. C. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 1, p. 1-1, 2003.

OGUIKE, M. C. et al. *Plasmodium ovale curtisi* and *Plasmodium ovale wallikeri* circulate simultaneously in African communities. **International Journal for Parasitology**, v. 41, n. 6, p. 677-683, 2011.

OLLIARO, P. Mode of action and mechanisms of resistance for antimalarial drugs. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 89, n. 2, p. 207-219, 2001.

OMAR, S. et al. Antimalarial activities of gedunin and 7-methoxygedunin and synergistic activity with dillapiol. **Annals of applied biology**, v. 143, n. 2, p. 135-141, 2003a.

OMAR, S. et al. Traditionally-used antimalarials from the Meliaceae. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 3, n. 2, p. 133-139, 2003b.

PENIDO, C. et al. Anti-allergic effects of natural tetranortriterpenoids isolated from *Carapa guianensis* Aublet on allergen-induced vascular permeability and hyperalgesia. **Inflammation Research**, v. 54, n. 7, p. 295-303, 2005.

PEREIRA, T. B. **Limonóides antimaláricos a partir de resíduos do processo de produção de óleo de andiroba (*Carapa* spp. - Meliaceae)**. 2013. 142 Dissertação (Mestre). Química, Universidade Federal do Amazonas

PEREIRA, T. B. et al. *In vitro* and *in vivo* anti-malarial activity of limonoids isolated from the residual seed biomass from *Carapa guianensis* (andiroba) oil production. **Malaria Journal**, v. 13, n. 1, p. 1, 2014.

PETERS, W. Drug resistance in *Plasmodium berghei* Vincke and Lips, 1948. I. Chloroquine resistance. **Experimental parasitology**, v. 17, n. 1, p. 80-89, 1965.

PINTO, A. C. S. **Desenvolvimento de substâncias semi-sintéticas e bioativas a partir de 4-nerolidilcatechol e dilapiol**. 2008. Ph. D. Thesis, Universidade Federal do Amazonas.

POHLIT, A.; PINTO, A. C. S.; MAUSE, R. *Piper aduncum* L.: Planta pluripotente e fonte de substâncias fitoquímicas importantes. **Revista Fitos**, v. 2, n. 01, p. 7-18, 2013.

REY, L. Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais. In: (Ed.). **Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais**: Guanabara Koogan, 2008.

ROCHA E SILVA, L. F. et al. *In vivo* and *in vitro* antimalarial activity of 4-nerolidylcatechol. **Phytotherapy Research**, v. 25, n. 8, p. 1181-1188, 2011.

ROCHA E SILVA, L. F. R. et al. *In vivo* antimalarial activity and mechanisms of action of 4-nerolidylcatechol derivatives. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 6, p. 3271-3280, 2015.

SANCHEZ, B. A. M. Plasmódios transfectados com a proteína de fluorescência verde (GFP) para ensaios de quimioterapia experimental. 2007.

SCOTT, E. E.; HALPERT, J. R. Structures of cytochrome P450 3A4. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 30, n. 1, p. 5-7, 2005.

SECOLI, S. R. Interações medicamentosas: fundamentos para a prática clínica da enfermagem. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 35, n. 1, p. 28-34, 2001.

SHOU, M. et al. Role of human cytochrome P450 3A4 and 3A5 in the metabolism of taxotere and its derivatives: enzyme specificity, interindividual distribution and metabolic contribution in human liver. **Pharmacogenetics and Genomics**, v. 8, n. 5, p. 391-401, 1998.

SILVA, M. F. **Estudos in vitro de potenciais antimaláricos nos estágios intraeritrocítico de *Plasmodium falciparum***. 2012. 39 (Dissertação (Mestrado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro)). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

SILVA PINTO, A. C. et al. New antimalarial and cytotoxic 4-nerolidylcatechol derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 6, p. 2731-2735, 2009.

SPATZENEGGER, M.; JAEGER, W. Clinical importance of hepatic cytochrome P450 in drug metabolism. **Drug Metabolism Reviews**, v. 27, n. 3, p. 397-417, 1995.

TA, T. H. et al. First case of a naturally acquired human infection with *Plasmodium cynomolgi*. **Malaria Journal**, v. 13, n. 1, p. 1, 2014.

TAPPIN, M. R. R. et al. Development of an HPLC method for the determination of tetranortriterpenoids in *Carapa guianensis* seed oil by experimental design. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 48, n. 4, p. 1090-1095, 2008.

TRAGER, W.; JENSEN, J. B. Human malaria parasites in continuous culture. **Science**, v. 193, n. 4254, p. 673-675, 1976.

VAN WATERSCHOOT, R. A. et al. Absence of both cytochrome P450 3A and P-glycoprotein dramatically increases docetaxel oral bioavailability and risk of intestinal toxicity. **Cancer Research**, v. 69, n. 23, p. 8996-9002, 2009.

WAGNER, H.; ULRICH-MERZENICH, G. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. **Phytomedicine**, v. 16, n. 2, p. 97-110, 2009.

WELLS, T. N. Natural products as starting points for future anti-malarial therapies: going back to our roots? **Malaria Journal**, v. 10, n. 1, p. 1, 2011.

WHO. Global report on antimalarial drug efficacy and drug resistance: 2000-2010. 2010.

WHO. **Diretrizes para o tratamento da malária**. OMS. Genebra 2010b.

_____. **World Malaria Report 2015. WHO, Geneva 2015.**

YANG, Y. et al. Synergy effects of herb extracts: pharmacokinetics and pharmacodynamic basis. **Fitoterapia**, v. 92, p. 133-147, 2014.

YOUNG, M. D. Resistance of *Plasmodium malariae* to pyrimethamine (daraprim). **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 6, n. 4, p. 621-4, 1957.

YUNCKER, T. The Piperaceae of Brazil, 2: *Piper*-Group 5; *Ottonia*; *Pothomorphe*; *Sarcorhachis*. **Hoehnea**, 1973.

ZANGER, U. M.; SCHWAB, M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 138, n. 1, p. 103-141, 2013.

ZHOU, S.-F. et al. Structure, function, regulation and polymorphism and the clinical significance of human cytochrome P450 1A2. **Drug Metabolism Reviews**, 2010.

ANEXOS

ANEXO A – Comprovante de registro para coleta de material botânico autorizado pelo SISBIO.



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Comprovante de registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico

Número: 46477-1	Data da Emissão: 03/10/2014 09:10
Dados do titular	
Nome: Ledjane Vieira de Freitas	CPF: 905.337.122-20

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	A autorização não eximirá o pesquisador da necessidade de obter outras anuências, como: I) do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador quando as atividades forem realizadas em área de domínio privado ou dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso; II) da comunidade indígena envolvida, ouvido o órgão indigenista oficial, quando as atividades de pesquisa forem executadas em terra indígena; III) do Conselho de Defesa Nacional, quando as atividades de pesquisa forem executadas em área indispensável à segurança nacional; IV) da autoridade marítima, quando as atividades de pesquisa forem executadas em águas jurisdicionais brasileiras; V) do Departamento Nacional da Produção Mineral, quando a pesquisa visar a exploração de depósitos fossilíferos ou a extração de espécimes fósseis; VI) do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, dentre outras.
3	O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	É necessário a obtenção de anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como de consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade
5	Este documento não abrange a coleta de vegetais hidróbios, tendo em vista que o Decreto-Lei nº 221/1967 e o Art. 36 da Lei nº 9.605/1998 estabelecem a necessidade de obtenção de autorização para coleta de vegetais hidróbios para fins científicos.
6	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
7	Este documento não é válido para: a) coleta ou transporte de espécies que constem nas listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção; b) recebimento ou envio de material biológico ao exterior; e c) realização de pesquisa em unidade de conservação federal ou em caverna.
8	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospeção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .

Táxons autorizados

#	Nível taxonômico	Táxon(s)
1	ESPÉCIE	Piper aduncum, Picrolemma sprucei, Carapa procera, Carapa guianensis, Pothomorphe peltata

Este documento (Comprovante de registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 13637133



Página 1/1

ANEXO B – Parecer da Comissão de Ética para Uso de Animais.



PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA
 MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO
 INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA
 ASSESSORIA DE APOIO AOS ÓRGÃOS COLEGIADOS
 COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA NO USO DE ANIMAIS

**PARECER CONSUBSTANCIADO SOBRE PROTOCOLOS DE PESQUISAS NO
 USO DE ANIMAIS**

Número do Protocolo: 029/2013	Data de Entrada: 13/11/2013
Pesquisador Responsável: ADRIAN MARTIN POHLIT	
Título do Projeto: “Núcleo de novas safras e substâncias ativas em escala multigrama de plantas amazônicas (NOSSAPLAM)”	
Início do projeto: 02/02/2014 Fim do projeto: 01/02/2016	
Instituição Responsável: INPA	

INFORMAÇÕES SOBRE O MODELO ANIMAL EXPERIMENTAL

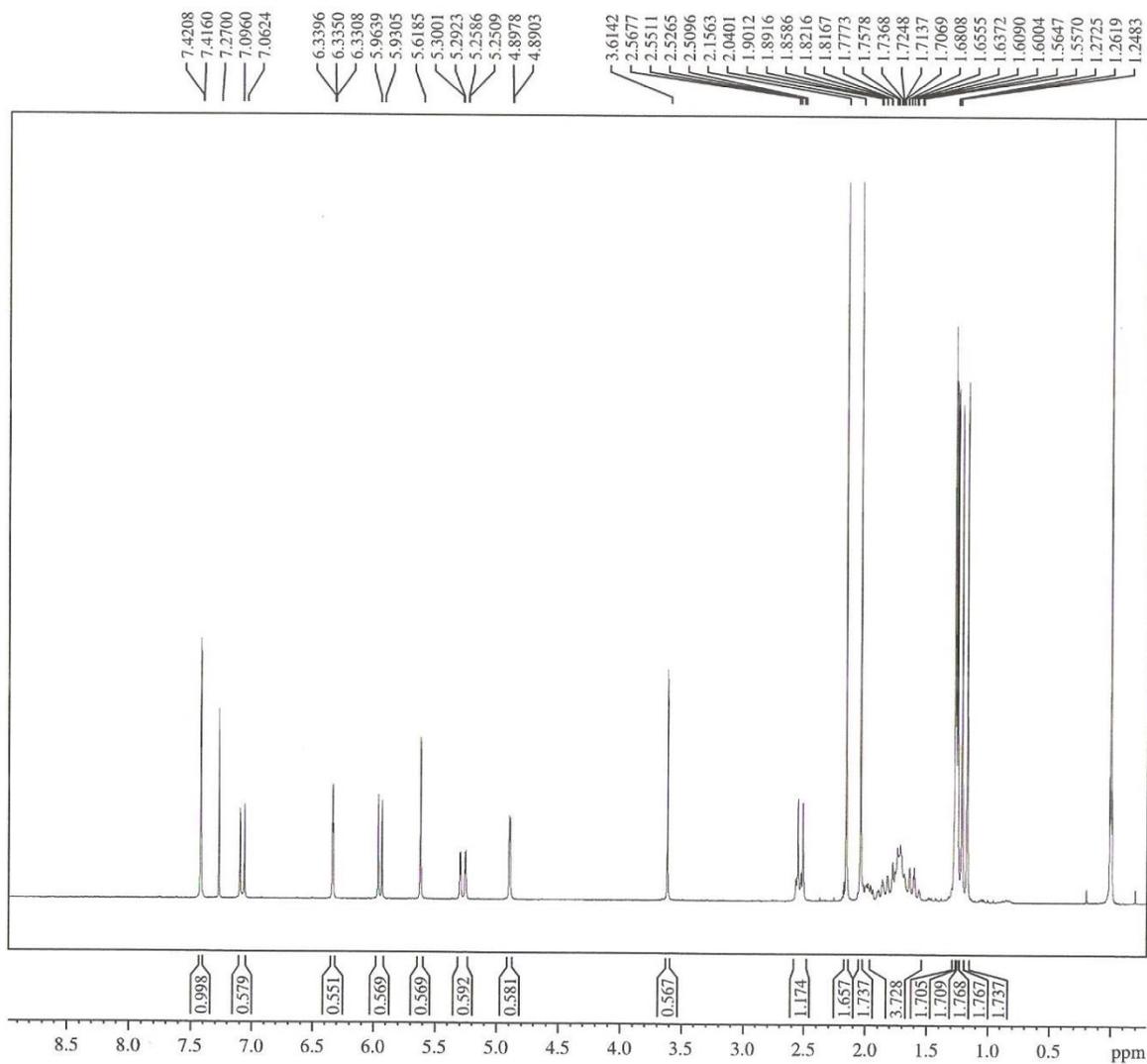
ESPÉCIE	LINHAGEM	IDADE	PESO APROX.	QUANTIDADE
				Fêmea
Mus musculos	<i>Balb/c</i>	6± semanas	25±5g	800 Para 24 meses

RECOMENDAÇÃO FINAL

Indicação: APROVADO

Data de liberação do Parecer: 04.09.2014.

Atenciosamente,

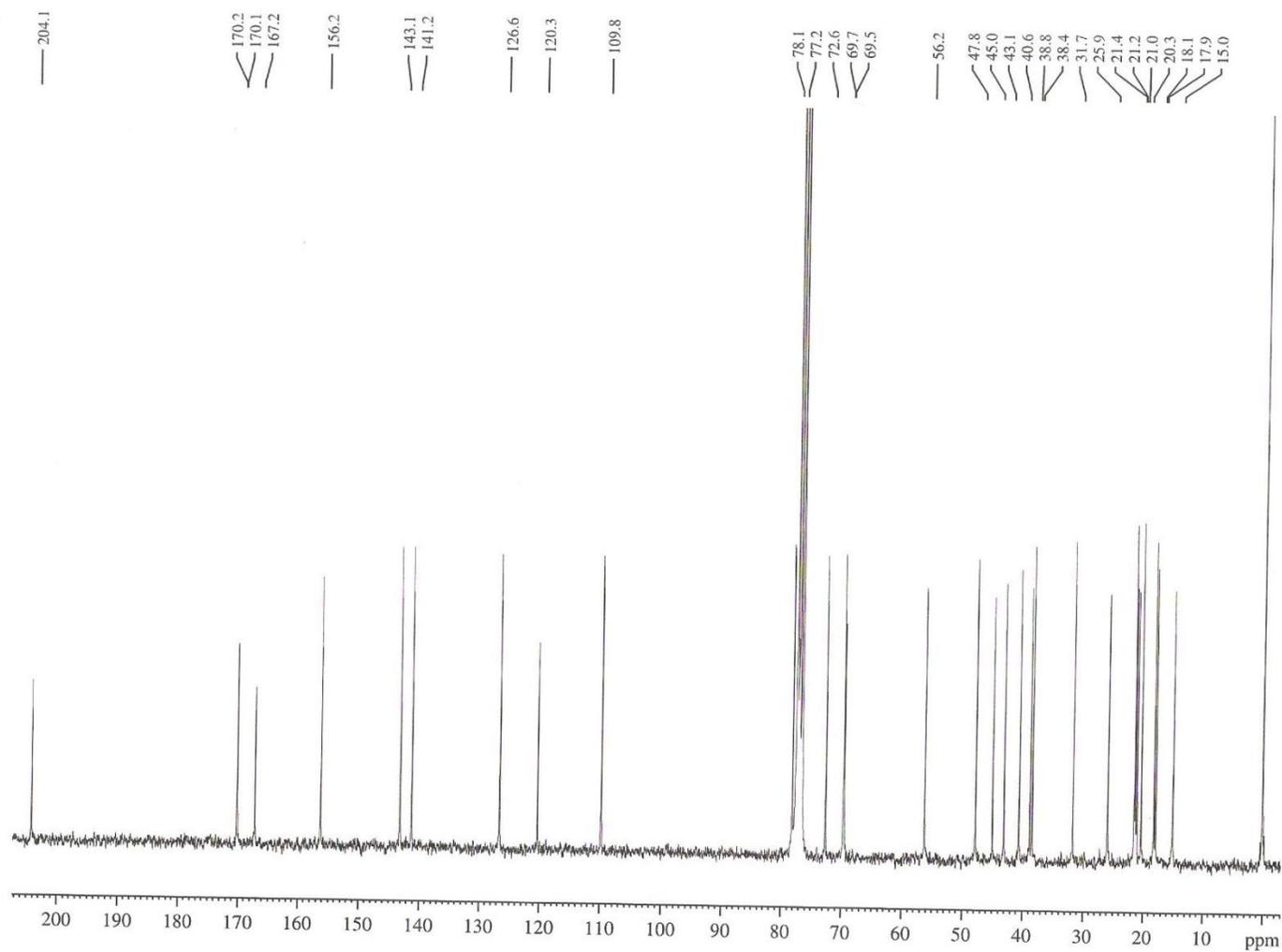
ANEXO C – RMN ¹H da substância 6α-ACG (CDC13, 300 MHz).

Current Data Parameters
 NAME Ledjane_1LVF41E
 EXPNO 11
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20161214
 Time 17.23
 INSTRUM FOURIER300
 PROBHD 5 mm DUL 13C-1
 PULPROG zg
 TD 65536
 SOLVENT CDC13
 NS 32
 DS 0
 SWH 6103.516 Hz
 FIDRES 0.093132 Hz
 AQ 5.3687091 sec
 RG 10.0721
 DW 81.920 usec
 DE 10.00 usec
 TE 1033.1 K
 D1 1.00000000 sec
 TD0 1

==== CHANNEL f1 =====
 SFO1 300.2019513 MHz
 NUC1 1H
 P1 7.64 usec
 PLW1 20.00000000 W

F2 - Processing parameters
 SI 65536
 SF 300.1999998 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 0 Hz
 GB 0
 PC 1.00

ANEXO D – RMN ^{13}C da substância 6 α -ACG (CDC13, 300 MHZ).

Central Analítica do
Laboratório Temático de
Química de Produtos Naturais

Current Data Parameters
NAME Ledjane_1LVF41E
EXPNO 2
PROCNO 1

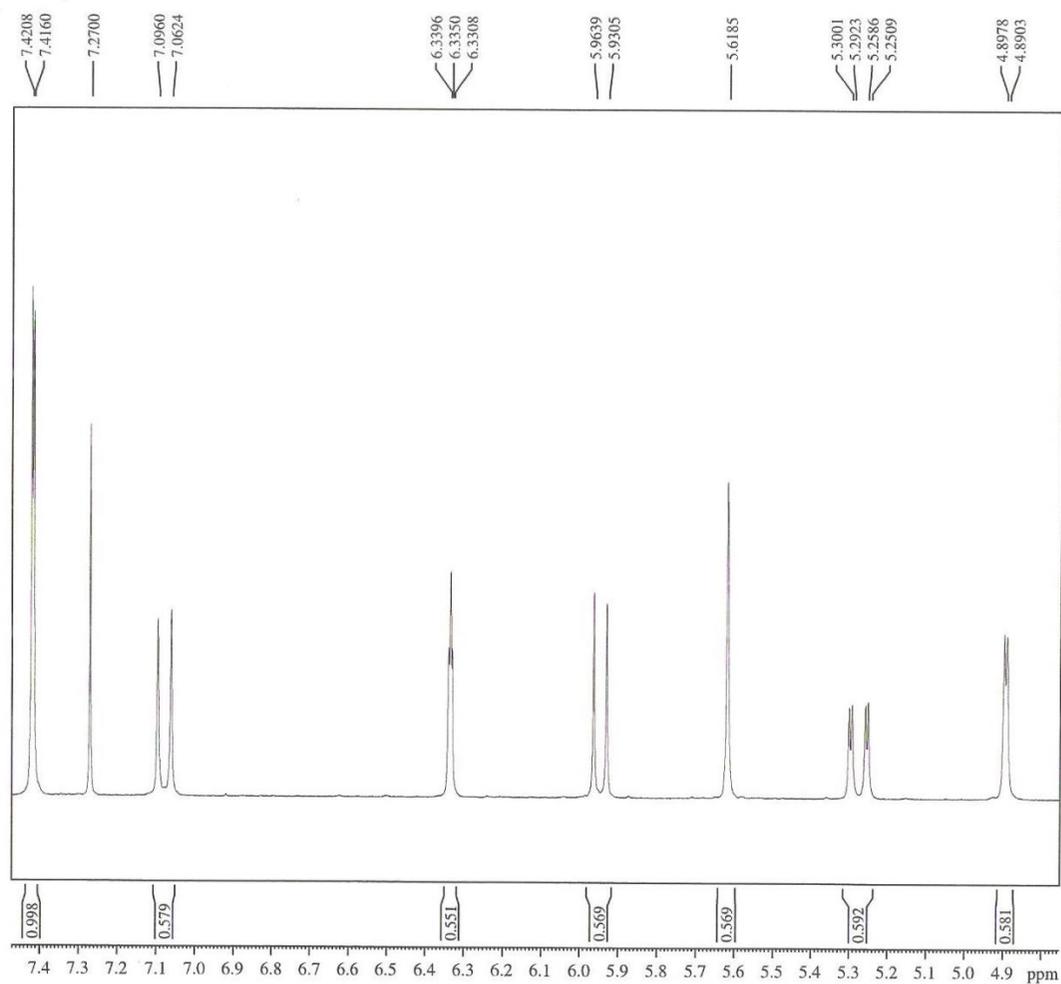
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20161214
Time 17.29
INSTRUM FOURIER300
PROBHD 5 mm DUL 13C-1
PULPROG zgpg30
TD 32768
SOLVENT CDCl3
NS 41744
DS 0
SWH 24414.063 Hz
FIDRES 0.745058 Hz
AQ 0.6710886 sec
RG 501.187
DW 20.480 usec
DE 10.00 usec
TE 1033.1 K
D1 0.5000000 sec
D11 0.0300000 sec
D31 0.00000875 sec
D40 0.01589210 sec
L4 20
L5 14
P32 90.00 usec
TDO 1

===== CHANNEL f1 =====
SFO1 75.4928982 MHz
NUC1 13C
P1 8.75 usec
PLW1 50.00299835 W

===== CHANNEL f2 =====
SFO2 300.2012008 MHz
NUC2 1H
CPDPRG2 waltz16
PCPRG2 gq00 usec



ANEXO E – Ampliação da região δ 4,8-7,5 do RMN ^1H da substância $6\alpha\text{-ACG}$ (CDC13, 300 MHz).



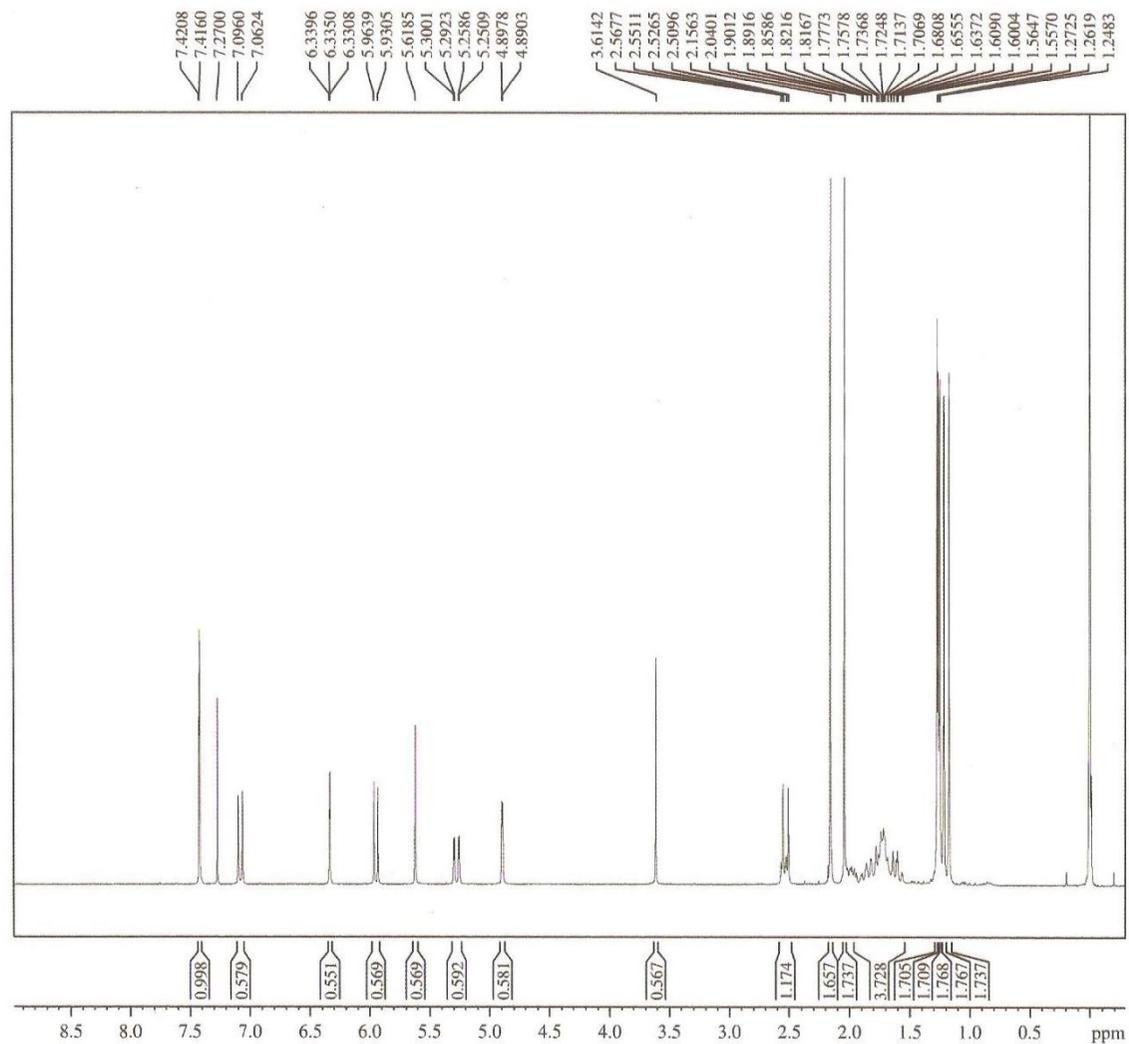
Current Data Parameters
 NAME Ledjane_1LWF41E
 EXPNO 11
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20161214
 Time 17.23
 INSTRUM FOURIER300
 PROBHD 5 mm DUL 13C-1
 PULPROG zg
 TD 65536
 SOLVENT CDC13
 NS 32
 DS 0
 SWH 6103.516 Hz
 FIDRES 0.093132 Hz
 AQ 5.3687091 sec
 RG 10.0721
 DW 81.920 usec
 DE 10.00 usec
 TE 1033.1 K
 D1 1.00000000 sec
 TD0 1

===== CHANNEL f1 =====
 SFO1 300.2019513 MHz
 NUC1 1H
 P1 7.64 usec
 PLW1 20.00000000 W

F2 - Processing parameters
 SI 65536
 SF 300.1999998 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 0 Hz
 GB 0
 PC 1.00

ANEXO F – Ampliação da região δ 1,1-2,7 do RMN ^1H da substância 6 α -ACG (CDC13, 300 MHz).



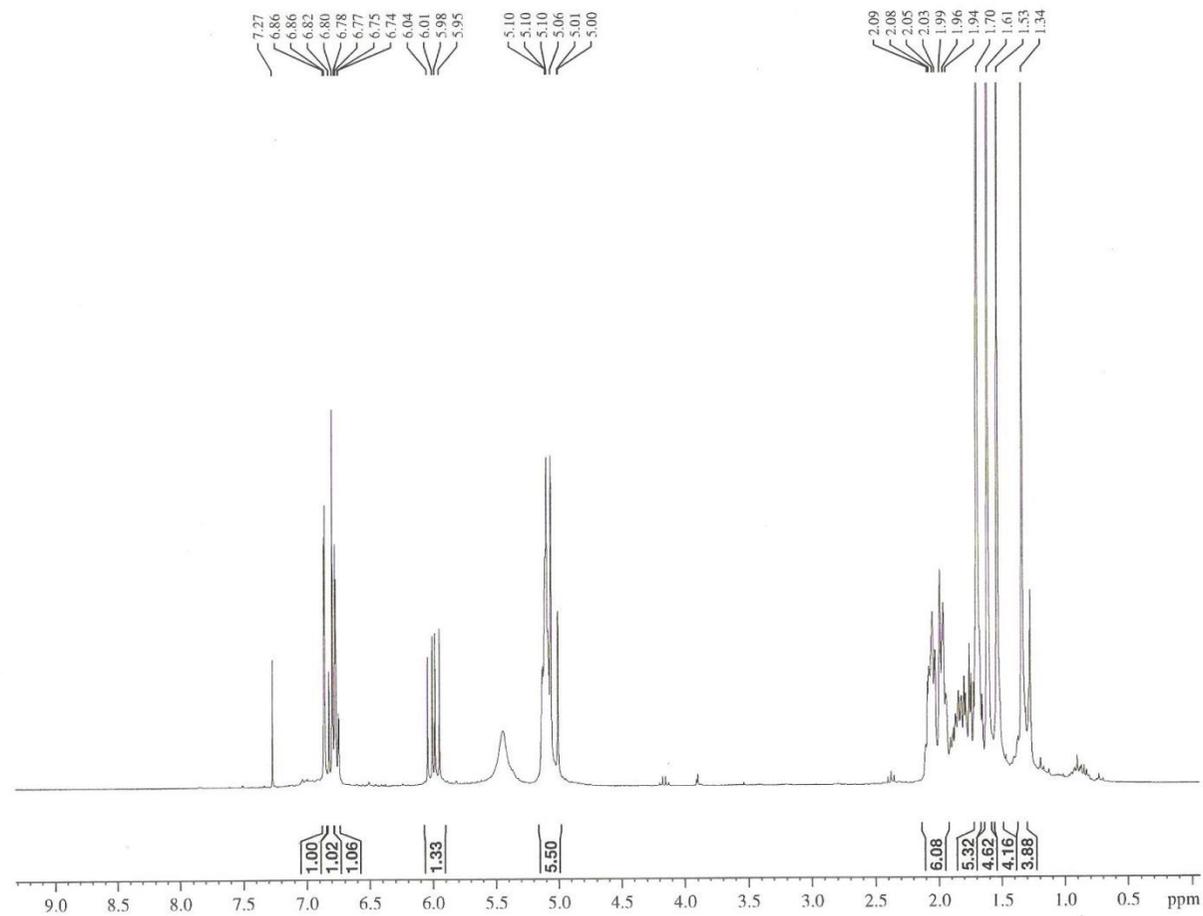
Current Data Parameters
 NAME Ledjane_1LVF41E
 EXPNO 11
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20161214
 Time 17.23
 INSTRUM FOURIER300
 PROBHD 5 mm DUL 13C-1
 PULPROG zg
 TD 65536
 SOLVENT CDC13
 NS 32
 DS 0
 SWH 6103.516 Hz
 FIDRES 0.093132 Hz
 AQ 5.3687091 sec
 RG 10.0721
 DW 81.920 usec
 DE 10.00 usec
 TE 1033.1 K
 D1 1.00000000 sec
 TD0 1

==== CHANNEL f1 =====
 SF01 300.2019513 MHz
 NUC1 1H
 P1 7.64 usec
 PLW1 20.00000000 W

F2 - Processing parameters
 SI 65536
 SF 300.1999998 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 0 Hz
 GB 0
 PC 1.00

ANEXO G – RMN ^1H da substância 4-NC (CDC13, 300 MHz).

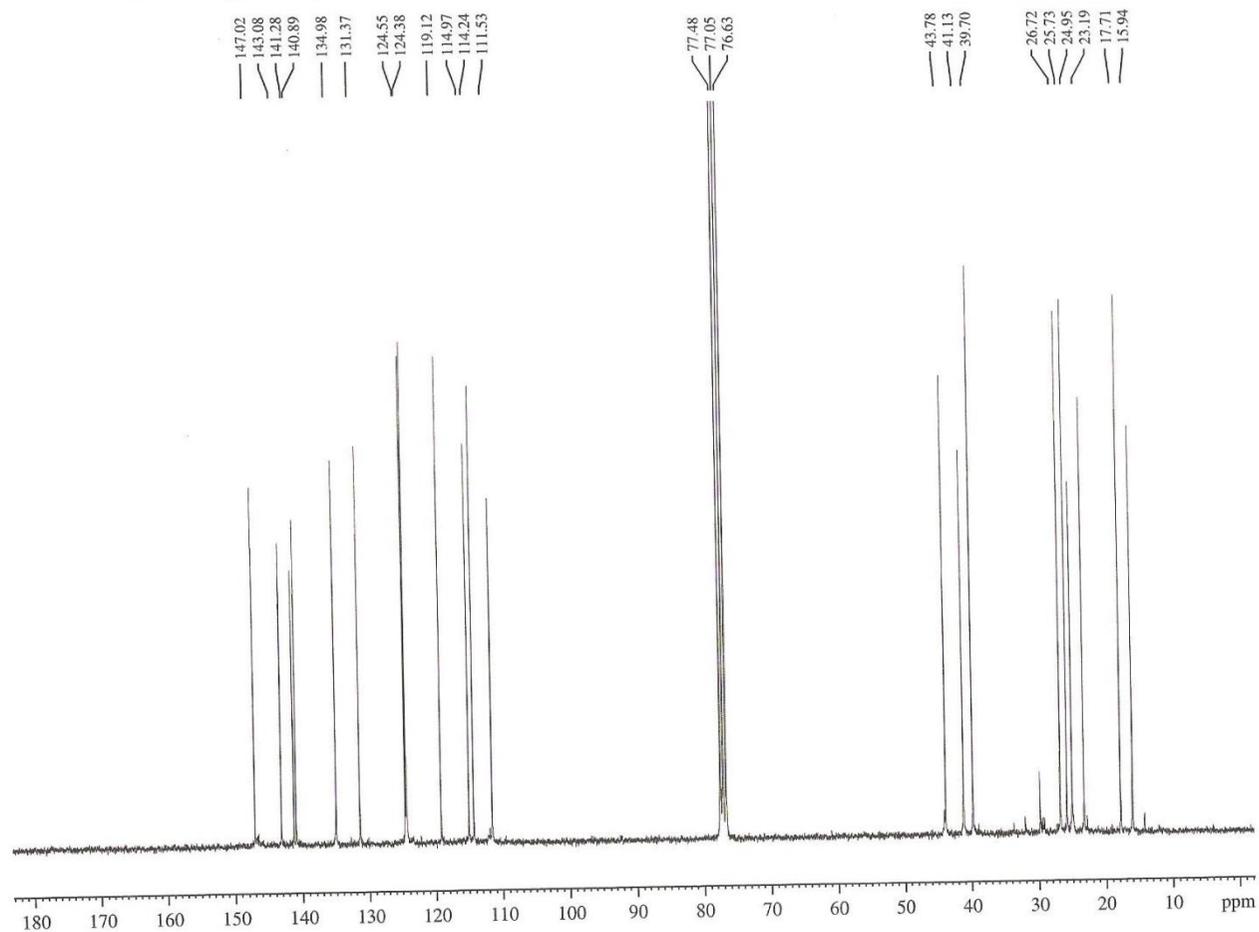


Current Data Parameters
 NAME: Orivaldo_4NC
 EXPNO: 1
 PROCNO: 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_: 20140214
 Time: 17.18
 INSTRUM: FOURIER300
 PROBHD: 5 mm DUL 13C-1
 PULPROG: zg30
 TD: 65536
 SOLVENT: CDCl3
 NS: 16
 DS: 2
 SWH: 6105.5161 Hz
 FIDRES: 0.093112 Hz
 AQ: 5.3687091 sec
 RG: 7.69867
 DW: 81.920 usec
 DE: 10.00 usec
 TE: 294.6 K
 D1: 1.00000000 sec
 TDD: 1

===== CHANNEL f1 =====
 SH01: 300.1818537 MHz
 NUC1: 1H
 P1: 8.25 usec
 PLW1: 20.00000000 W

F2 - Processing parameters
 SI: 65536
 SF: 300.1800019 MHz
 WDW: EM
 SSB: 0
 LB: 0.30 Hz
 GB: 0
 PC: 1.00

ANEXO H – RMN ^{13}C da substância 4-NC (CDC13, 300 MHz).

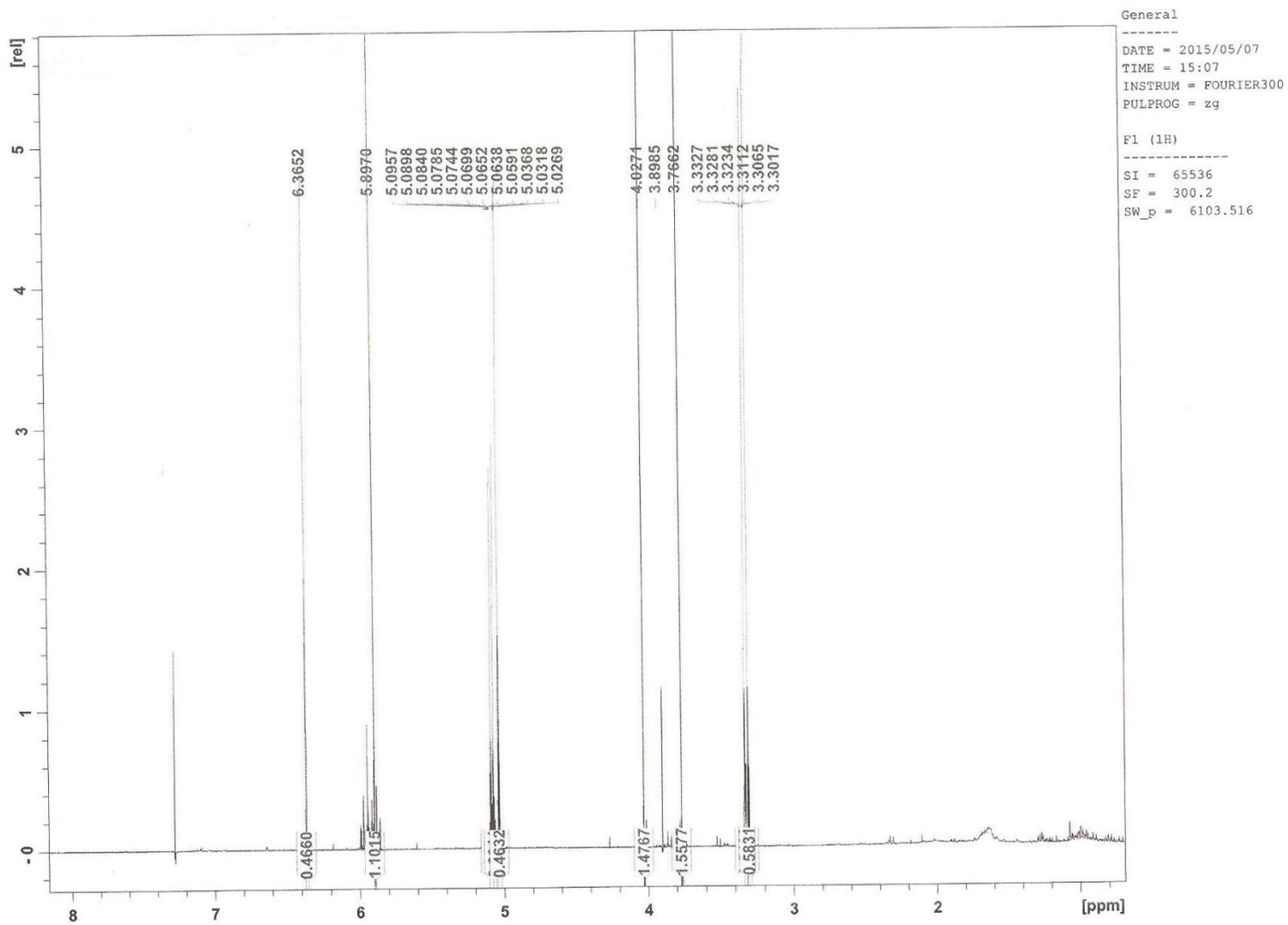
```

Current Data Parameters
NAME   Orivaldo_4NC
EXPNO   2
PROCNO   1

F2 - Acquisition Parameters
Date_   20140214
Time    17:33
INSTRUM FOURIER300
PROBHD  5 mm DUL 13C-1
PULPROG zgpg30
TD      65536
SOLVENT CDCl3
NS      10240
DS      4
SWH     24414.063 Hz
FIDRES  0.372529 Hz
AQ      1.3421773 sec
RG      501.187
DW      20.480 usec
DE      10.00 usec
TE      294.7 K
D1      2.0000000 sec
D11     0.03000000 sec
D31     0.00000873 sec
D40     0.02898005 sec
L4      40
L5      57
P32     90.00 usec
TD0     1

===== CHANNEL f1 =====
SFO1   75.4878687 MHz
NUC1    13C
P1      8.75 usec
PLW1   50.00299835 W

===== CHANNEL f2 =====
SFO2   300.1812007 MHz
NUC2    1H
CPDPRG2 waltz16
PRPR2   on
  
```

ANEXO I – RMN ¹H da substância DIL (CDC13, 300 MHZ).

ANEXO J – RMN ^{13}C da substância DIL (CDC13, 300 MHZ).