

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS

COMPOSIÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO ANTIMALÁRICA  
*in vitro* DE EXTRATOS E SUBSTÂNCIAS DE *Andropogon*  
*leucostachyus* Kunth (Poaceae)

TÚLIO ALVES DE AZEVEDO

MANAUS  
2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS

TÚLIO ALVES DE AZEVEDO

COMPOSIÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO ANTIMALÁRICA  
*in vitro* DE EXTRATOS E SUBSTÂNCIAS DE *Andropogon*  
*leucostachyus* Kunth (Poaceae)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Dr. Adrian Martin Pohlit  
Co-orientadora: Dr<sup>a</sup>. Zelina Estevam dos Santos Torres

MANAUS  
2017

### Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

A994c Azevedo, Tulio Alves de  
Composição química e avaliação antimalárica in vitro de extratos e substâncias de *Andropogon leucostachyus* Kunth (Poaceae) / Tulio Alves de Azevedo. 2017  
126 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Adrian Martin Pohlit  
Coorientador: Zelina Estevam dos Santos Torres  
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Produtos naturais. 2. *P. falciparum*. 3. Ácido-(E)-3-(2,3,6-trimetoxifenil) acrílico. 4. Sitosterol. 5. Estigmasterol. I. Pohlit, Adrian Martin II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

**TÚLIO ALVES DE AZEVEDO**

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO ANTIMALÁRICA  
*in vitro* DE EXTRATOS E SUBSTÂNCIAS DE *Andropogon  
leucostachyus* Kunth (Poaceae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovado em 20 de Janeiro de 2017

**BANCA EXAMINADORA**

**Dr. Adrian Martin Pohlit**

Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA)

**Dr<sup>a</sup>. Karen Regina Carim da Costa Magalhães**

Universidade Federal do Amazonas (UFAM)

**Dr<sup>a</sup>. Cecília Verônica Nunez**

Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me auxiliar e permitir a conclusão da pesquisa.

Ao meu orientador Adrian Pohlit e co-orientadora Zelina Torres, pelos ensinamentos e amizade.

Aos colegas de laboratório do grupo LAPAAM, Abraão, Andréia, Edizon, Rita e Tiago, e às colegas de mestrado, Ledjane e Jaqueline, pela amizade e por auxiliarem em vários momentos da pesquisa.

As minhas irmãs e irmão, Andrezza, Soraya e Stephan, ao meu cunhado, Emanuel, aos meus sobrinhos, Anne, Asaph, Antony e Samuel, e a minha noiva, Jakeline, pelo carinho, apoio e suporte, me dando forças nos momentos de desânimo e me encorajando em todos os momentos do mestrado.

## RESUMO

A ausência de novos fármacos e a emergente resistência dos parasitos aos antimaláricos convencionais estimula a busca de novas substâncias para o tratamento da malária. Com o intuito de se obter novas substâncias antimaláricas, o grupo de pesquisa Laboratório de Princípios Ativos da Amazônia (LAPAAM) estuda diversas plantas medicinais da Amazônia, demonstrando previamente que extratos de *Andropogon leucostachyus* Kunth apresentam boa atividade antimalárica *in vitro* e *in vivo* em modelo roedor, contudo, não foram determinadas as substâncias ativas responsáveis por tal atividade. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo isolar, purificar, identificar e/ou elucidar as estruturas de substâncias presentes em *A. leucostachyus* Kunth e avaliá-las em ensaios *in vitro* contra cepas K1 de *Plasmodium falciparum* cloroquina-resistente para determinação de suas respectivas atividades antimaláricas. Para tanto foram preparados extratos com hexano e acetato de etila, os quais foram submetidos a técnicas cromatográficas para isolamento de substâncias e avaliação antimalárica. A determinação das estruturas químicas foi possível por meio de técnicas espectroscópicas de ressonância magnética nuclear (RMN) 1D e 2D e espectrometria de massas de alta resolução (EMAR). A partir dos extratos hexânicos de parte aérea e de raiz foram isolados dois esteroides em mistura, estigmasterol e sitosterol, e do extrato acetato de etila foi isolado um fenilpropanóide, o ácido (*E*)-3-(2,3,6-trimetoxifenil) acrílico. A mistura de estigmasterol e sitosterol mostrou-se inativo no ensaio antimalárico, enquanto o ácido (*E*)-3-(2,3,6-trimetoxifenil) acrílico apresentou-se ativo na triagem inicial, inibindo o crescimento do parasita em 82,5% na concentração de 50 µg/mL, porém inativo na concentração inibitória do parasito (CI<sub>50</sub>), com valor de 13,5 µg/mL ou 57 µmol.

Palavras-Chave: Produtos naturais, *P. falciparum*, ácido (*E*)-3-(2,3,6-trimetoxifenil) acrílico, sitosterol, estigmasterol

## ABSTRACT

The absence of new drugs and the emerging parasites resistance to conventional antimalarials stimulate the search for new substances for the treatment of malaria. In order to obtain new antimalarial substances, the research group Laboratory of Active Principles of the Amazon (LAPAAM) study several medicinal plants of the Amazon, demonstrating previously that extracts of *Andropogon leucostachyus* Kunth have good antimalarial activity *in vitro* and *in vivo* in rodent model, however, the active substances were not determined Responsible for such activity. Thus, the present work aimed to isolate, purify, identify and / or elucidate the structures of substances present in *A. leucostachyus* Kunth and to evaluate them in *in vitro* assays against K1 *Plasmodium falciparum* chloroquine-resistant to determine their respective activities Antimalarial drugs. For this, extracts were prepared with hexane and ethyl acetate, which were submitted to chromatographic techniques for substance isolation and antimalarial evaluation. The determination of the chemical structures was possible by spectroscopic techniques of nuclear magnetic resonance (NMR) 1D and 2D and high resolution mass spectrometry (HRMS). From the hexane extracts of shoot and root were isolated two steroids in mixture, stigmasterol and sitosterol, and from ethyl acetate extract was isolated a phenylpropanoid, (*E*)-3-(2,3,6-trimethoxyphenyl) acrylic acid. The mixture of stigmasterol and sitosterol was inactive in the antimalarial assay, while (*E*)-3-(2,3,6-trimethoxyphenyl) acrylic acid was active in the initial screening, inhibiting parasite growth by 82,5% in the concentration of 50 µg/mL, however inactive at inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>), with a value of 13,5µg/mL or 57 µmol.

Key Words: Natural products, *P. falciparum*, (*E*)-3-(2,3,6-trimethoxyphenyl) acrylic acid, sitosterol, stigmasterol

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLA E SÍMBOLOS

AcOEt	Acetato de etila
ACT	Terapia combinada à base de artemisinina
CBA	Centro de Biotecnologia da Amazônia
CCD	Cromatografia em camada delgada
CDCl <sub>3</sub>	Clorofórmio deuterado
CHCl <sub>3</sub>	Clorofórmio
CI <sub>50</sub>	Concentração que inibe em 50% o crescimento do parasito
COSY	<i>Correlation spectroscopy</i>
DEPT	<i>Distortion less enhancement by polarization transfer</i>
Hex	Hexano
HMBC	<i>Heteronuclear multiple bond correlation</i>
HSQC	<i>heteronuclear single quantum correlation</i>
INPA	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
LAPAAM	Laboratório de Princípios Ativos da Amazônia
MeOH	Metanol
OMS	Organização Mundial da Saúde
RMN	Ressonância magnética nuclear
SISBIO	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
TAAC	Extrato acetato de etila de parte aérea em pequena escala
TAACMEOH	Extrato metanólico das partes aéreas preparado a partir do resíduo da extração acetato de etila em maior escala
TAACOET	Extrato acetato de etila de parte aérea em maior escala
TAACOET-iso	Substância isolada do extrato acetato de etila de parte aérea em maior escala
TACL	Extrato clorofórmico de parte aérea em pequena escala
TACME	Extrato metanólico de parte aérea em pequena escala preparado a

	partir do resíduo da extração acetato de etila em pequena escala
TAH	Extrato hexânico de parte aérea em pequena escala
TAHEX	Extrato hexânico de parte aérea em maior escala
TAHEX-estig	Substância isolada do extrato hexânico parte aérea em maior escala
TCLME	Extrato metanólico de parte aérea em pequena escala preparado a partir do resíduo da extração clorofórmica em pequena escala
TRAC	Extrato acetato de etila de raiz em pequena escala
TRCL	Extrato clorofórmico de raiz em pequena escala
TRH	Extrato hexânico de raiz em pequena escala
TRHEX	Extrato hexânico de raiz em maior escala
TRHEX-iso25	Substância isolada do extrato hexânico de raiz em maior escala

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura básica dos flavonóides.....	24
Figura 2	Estrutura dos ácidos benzóico e cinâmico.....	25
Figura 3	Estrutura do isopreno.....	27
Figura 4	Procedimentos para obtenção de extratos de parte aérea TAH, TAAC, TACL, TACME e TCLME em pequena escala.....	44
Figura 5	Procedimentos para obtenção de extratos de raiz TRH, TRAC e TRCL em pequena escala.....	47
Figura 6	Procedimentos para obtenção de extratos da parte aérea TAHEX, TAACOET, TAACME em maior escala.....	50
Figura 7	Procedimento para obtenção de extrato das raízes TRHEX em maior escala.....	51
Figura 8	Fluxograma do fracionamento do extrato hexânico (TRHEX) das raízes por cromatografia em coluna aberta.....	53
Figura 9	Fluxograma do fracionamento do extrato hexânico (TAHEX) das partes aéreas por cromatografia em coluna aberta.....	54
Figura 10	Fluxograma do fracionamento da fração 16 (TAHEX) das partes aéreas por cromatografia em coluna aberta.....	55
Figura 11	Fluxograma do fracionamento do extrato acetato de etila (TAACOET) das partes aéreas por cromatografia em coluna aberta.....	56
Figura 12	Fluxograma do fracionamento das frações do extrato acetato de etila (TAACOET) das partes aéreas por cromatografia em coluna aberta.....	57
Figura 13	EMAR de TAHEX-estig.....	63
Figura 14	Estrutura dos esteroides estigmasterol e sitosterol.....	66
Figura 15	EMAR de TAACOET-iso.....	68
Figura 16	Possíveis estruturas para a substância TAACOET-iso.....	68
Figura 17	Demonstração das correlações observadas no espectro de HMBC aplicando as duas possíveis estruturas para TAACOET-iso.....	71
Figura 18	Correlações observadas no espectro de NOESY aplicando as duas possíveis estruturas para TAACOET-iso.....	72

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Algumas espécies de Poaceae utilizadas tradicionalmente contra malária.....	29
Tabela 2	Extratos e óleo essencial de Poaceae avaliados em ensaio <i>in vitro</i> contra <i>P. falciparum</i> .....	31
Tabela 3	Atividade antimalárica <i>in vitro</i> de isolados de <i>Bambusa vulgaris</i> (Poaceae).....	31
Tabela 4	Poaceae avaliadas em ensaio antimalárico <i>in vivo</i> .....	33
Tabela 5	Rendimento das extrações da parte aérea das raízes em pequena escala empregando-se maceração com auxílio de banho de ultrassom.....	60
Tabela 6	Rendimento das extrações da parte aérea das raízes em maior escala empregando-se maceração com auxílio de banho de ultrassom.....	61
Tabela 7	Comparação dos dados de RMN <sup>13</sup> C e DEPT 135° de TAHEX-estig com os descritos na literatura para estigmasterol e sitosterol.....	64
Tabela 8	Dados de RMN de <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C-DEPT 135° de TAACOET-iso e dados da literatura de RMN de <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C do isômero ácido ( <i>E</i> )-3-(2,3,4-trimetoxifenil) acrílico, com valores dispostos em função da estrutura de TAACOET-iso.....	73
Tabela 9	Atividade antimalárica <i>in vitro</i> contra <i>P. falciparum</i> dos extratos das partes aéreas e raízes de <i>A. leucostachyus</i> .....	76
Tabela 10	Atividade antimalárica <i>in vitro</i> contra <i>P. falciparum</i> das substâncias isoladas de <i>A. leucostachyus</i> .....	77

## LISTA DE ANEXOS

Anexo 1	Estrutura de alguns flavonóides encontrados em Poaceae.....	88
Anexo 2	Estrutura de alguns ácidos fenólicos encontrados em Poaceae.....	90
Anexo 3	Estrutura de alguns terpenos encontrados em Poaceae.....	91
Anexo 4	RMN de <sup>1</sup> H de TAHEX-estig(300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	92
Anexo 5	RMN de <sup>1</sup> H de TRHEX-iso25 (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	93
Anexo 6	Ampliação de RMN de TAHEX-estig na faixa de δ 0,6 a δ 2,2 ppm (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	94
Anexo 7	Ampliação de RMN de <sup>1</sup> H de TAHEX-estig na faixa entre δ 3,3 a δ 5,6 (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	95
Anexo 8	Ampliação de RMN de <sup>1</sup> H de TRHEX-iso25 na faixa entre δ 0,6 a δ 1,6 ppm (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	96
Anexo 9	Ampliação de RMN de <sup>1</sup> H de TRHEX-iso25 na faixa entre δ 3,5 a δ 5,4 (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	97
Anexo 10	DEPT 135° de TAHEX-estig (75 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	98
Anexo 11	DEPT 135° de TRHEX-iso25 (75 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	99
Anexo 12	Ampliação de RMN de DEPT 135° de TAHEX-estig na faixa entre δ 75 a δ 145 (75 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	100
Anexo 13	Ampliação de RMN de DEPT 135° de TAHEX-estig na faixa entre δ 25 a δ 35 (75 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	101
Anexo 14	Ampliação de RMN de DEPT 135° de TRHEX-iso25 na faixa entre δ 105 a δ 150 (75 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	102
Anexo 15	Ampliação de RMN de DEPT 135° da substância 2 na faixa entre δ 25 a δ 35 (75 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	103
Anexo 16	RMN de <sup>13</sup> C de TAHEX-estig (75 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	104
Anexo 17	Espectro de RMN de <sup>1</sup> H de TAACOET-iso (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> )...	105
Anexo 18	Ampliação <sup>1</sup> H de TAACOET-iso faixa de δ 8,3 a δ 7,9 (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	106

Anexo 19	Ampliação $^1\text{H}$ de TAACOET-iso na faixa de $\delta$ 6,5 a $\delta$ 7,1 (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	107
Anexo 20	Ampliação $^1\text{H}$ de TAACOET-iso na faixa de $\delta$ 3,7 a $\delta$ 4,0 (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	108
Anexo 21	Espectro de COSY de TAACOET-iso (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	109
Anexo 22	Ampliação de COSY de TAACOET-iso na faixa de $\delta$ 6,5 a $\delta$ 8,0 (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	110
Anexo 23	Ampliação de COSY de TAACOET-iso na faixa de $\delta$ 6,5 a $\delta$ 8,0 (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	111
Anexo 24	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de TAACOET-iso (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ )...	112
Anexo 25	Ampliação RMN $^{13}\text{C}$ faixa de $\delta$ 53 a $\delta$ 64 (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	113
Anexo 26	DEPT $135^\circ$ de TAACOET-iso (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	114
Anexo 27	Ampliação DEPT $135^\circ$ de TAACOET-iso faixa de $\delta$ 49 a $\delta$ 66 (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	115
Anexo 28	Espectro de NOESY de TAACOET-iso (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	116
Anexo 29	Ampliação NOESY de TAACOET-iso na faixa de $\delta$ 3,6 a $\delta$ 4,2 (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	117
Anexo 30	Espectro HSQC de TAACOET-iso (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	119
Anexo 31	Ampliação HSQC de TAACOET-iso na faixa de $\delta$ 3,6 a $\delta$ 4,2 (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	120
Anexo 32	Ampliação HSQC de TAACOET-iso na faixa de $\delta$ 6,5 a $\delta$ 8,0 (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	121
Anexo 33	Espectro HMBC de TAACOET-iso (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	122
Anexo 34	Ampliação HMBC de TAACOET-iso na faixa de $\delta$ 3,6 a $\delta$ 4,2 (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	123
Anexo 35	Ampliação HMBC de TAACOET-iso na faixa de $\delta$ 6,0 a $\delta$ 7,5 (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	124
Anexo 36	Ampliação HMBC de TAACOET-iso na faixa de $\delta$ 7,5 a $\delta$ 9,0 (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	125
Anexo 37	SISBIO – Comprovante de registro para coleta de material botânico.....	126

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	17
2.	REVISÃO DA LITERATURA.....	18
2.1.	Malária no mundo.....	18
2.2.	Malária no Brasil.....	19
2.3.	Produtos naturais e antimaláricos.....	20
2.4.	Resistência aos antimaláricos.....	21
2.5.	Família Poaceae.....	22
2.5.1.	Características botânicas de Poaceae.....	23
2.5.2.	Flavonóides em Poaceae.....	23
2.5.3.	Ácidos fenólicos em Poaceae.....	25
2.5.4.	Terpenos em Poaceae.....	26
2.5.5.	Importância econômica de Poaceae.....	27
2.5.6.	Poaceae e uso tradicional contra malária.....	28
2.5.7.	Poaceae e ensaios antimaláricos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .....	30
2.5.8.	<i>Andropogon</i> Linneaus.....	34
2.5.9.	<i>Andropogon leucostachyus</i> Kunth.....	35
3.	OBJETIVOS.....	37
4.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
4.1.	Equipamentos e solventes.....	38
4.2.	Obtenção dos ensaios antimaláricos <i>in vitro</i> .....	38
4.3.	Obtenção dos espectros de ressonância magnética nuclear e massas de alta resolução.....	39
4.4.	Coleta e identificação botânica de <i>A. leucostachyus</i> .....	39
4.5.	Preparação e secagem de <i>A. leucostachyus</i> .....	39
4.6.	Moagem e acondicionamento de <i>A. leucostachyus</i> .....	40

<b>4.7.</b>	<b>Extrações em pequena escala das partes aéreas e raízes de <i>A. leucostachyus</i>.....</b>	<b>40</b>
4.7.1.	Extrato hexânico das partes aéreas em pequena escala (TAH)....	41
4.7.2.	Extrato acetato de etila das partes aéreas em pequena escala (TAAC).....	41
4.7.3.	Extrato metanólico do resíduo da extração acetato de etila das partes aéreas em pequena escala (TACME).....	42
4.7.4.	Extrato clorofórmico das partes aéreas em pequena escala (TACL).....	42
4.7.5.	Extrato metanólico do resíduo da extração clorofórmica das partes aéreas em pequena escala (TCLME).....	42
4.7.6.	Extrato hexânico das raízes em pequena escala (TRH).....	45
4.7.7.	Extrato acetato de etila das raízes em pequena escala (TRAC)...	45
4.7.8.	Extrato clorofórmico das raízes em pequena escala (TRCL).....	46
<b>4.8.</b>	<b>Extrações em maior escala das partes aéreas e raízes de <i>A. leucostachyus</i>.....</b>	<b>48</b>
4.8.1.	Extrato hexânico das partes aéreas em maior escala (TAHEX)...	48
4.8.2.	Extrato acetato de etila das partes aéreas em maior escala (TAACOET).....	49
4.8.3.	Extrato metanólico das partes aéreas em maior escala (TAACMEOH).....	49
4.8.4.	Extrato hexânico das raízes em maior escala (TRHEX).....	51
<b>4.9.</b>	<b>Isolamento de substâncias por técnicas cromatográficas.....</b>	<b>52</b>
4.9.1.	Fracionamento cromatográfico de TRHEX.....	52
4.9.2.	Fracionamento cromatográfico de TAHEX.....	53
4.9.3.	Fracionamento cromatográfico de TAACOET.....	55
<b>4.10.</b>	<b>Metodologia para avaliação antimalárica <i>in vitro</i> dos extratos e substâncias isoladas de <i>A. leucostachyus</i>.....</b>	<b>58</b>
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>60</b>
<b>5.1.</b>	<b>Rendimento e teor extrativo de extratos das partes aéreas e raízes, obtidos das extrações em pequena e maior escala de <i>A. leucostachyus</i>.....</b>	<b>60</b>

5.2.	Identificação da mistura estigmasterol e sitosterol, obtidos no fracionamento dos extratos hexânicos das partes aéreas e raízes de <i>A. leucostachyus</i> .....	62
5.3.	Elucidação do ácido (E)-3-(2,3,6-trimetoxifenil) acrílico, obtido no fracionamento do extrato acetato de etila das partes aéreas de <i>A. leucostachyus</i> .....	67
5.4.	Atividade antimalárica <i>in vitro</i> dos extratos e substâncias isolados de <i>A. leucostachyus</i> .....	75
6.	CONCLUSÃO.....	78
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79
8.	ANEXOS.....	88

## 1. INTRODUÇÃO

A malária é uma doença parasitária provocada por protozoários pertencentes ao gênero *Plasmodium*, e transmitido pela picada do mosquito fêmea do gênero *Anopheles*. No mundo, duas espécies se destacam como agentes da malária, *P. falciparum* e *P. vivax*, sendo ao primeiro atribuído a maioria dos óbitos e casos graves da doença, e ao segundo, maior distribuição geográfica (WHO, 2015; WHO, 2017).

O aparecimento de *Plasmodium* resistente aos antimaláricos convencionais vem sendo relatado mundialmente. Tal fato é extremamente preocupante devido não existirem outros fármacos que ofereçam níveis equivalentes de eficácia e segurança (WHO, 2014a).

A partir dessa preocupação, esforços em busca de novos candidatos antimaláricos vêm ocorrendo globalmente utilizando produtos naturais provenientes de plantas medicinais, uma vez que importantíssimos antimaláricos como a quinina e artemisinina foram descobertos a partir de plantas (TU, 2011; CRAGG e NEWMAN, 2013).

A família Poaceae é constituída por plantas angiospérmicas monocotiledôneas popularmente conhecidas como capim, grama ou gramínea, compreendendo a uma enorme gama de gêneros e espécies (SORENG *et al.*, 2015). A literatura relata que capins são utilizados na medicina tradicional para o tratamento de malária e estudos preliminares do Laboratório de Princípios Ativos da Amazônia (LAPAAM) demonstram atividade antimalárica promissora para extratos de *Andropogon leucostachyus*. Deste modo, a presente pesquisa é voltada para a descrição das substâncias antimaláricas dessa espécie amazônica.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Malária no mundo

A malária é uma doença parasitária provocada por protozoários pertencentes ao filo Myzozoa, subfilo Apicomplexa, classe Aconoidasida, ordem Haemospororida, família Plasmodiidae, gênero *Plasmodium* (TAXONOMICON, 2015a). As manifestações clínicas da doença são febre aguda, sudorese, fraqueza e cefaléia. É comumente conhecida por impaludismo, febre intermitente, febre terçã, febre quartã, maleita, sezão, tremedeira e bateadeira (BRASIL, 2014).

Cerca de 150 espécies de *Plasmodium* são responsáveis por provocar malária em diferentes hospedeiros vertebrados, porém apenas 5 parasitam humanos, os quais são: *Plasmodium falciparum*, *P. knowlesi*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. vivax* (NEVES et al., 2010; WHO, 2014b). No entanto, em 2014, um caso de malária humana foi associado ao *P. cynolmogi*, até então responsável por causar a doença somente em macacos, trazendo um alerta sobre a possibilidade de que outras espécies, além das 5 até então reconhecidas como capazes de provocar malária em humanos (TA et al., 2014).

O *P. falciparum* é responsável pela maioria dos óbitos e casos graves da doença, ocorrendo principalmente no continente africano, enquanto o *P. vivax* possui uma ampla distribuição geográfica, devido sua fácil adaptação nos mosquitos vetores, suportar maiores altitudes, e possuir um estágio latente, conhecido como hipnozoíto, no qual se apresenta em “dormência”, sobrevivendo no hospedeiro por longos períodos de tempo, podendo se ativar e desencadear novamente a doença (WHO, 2014b; WHO, 2017).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a malária ocorre em 91 países, com cerca de 216 milhões de casos e 445 mil mortes em 2017 (WHO, 2017).

Tais valores referentes à incidência e mortalidade são elevados, porém representam um avanço na luta contra a malária, uma vez que sinalizam decréscimo da incidência da doença em 41%, e de mortes em 62%, desde 2000 até 2015, e decréscimo da incidência da doença em 20%, desde 2010 a 2016 (WHO, 2016; WHO 2017).

A transmissão da malária ocorre majoritariamente por vetores fêmeos pertencentes ao filo Arthropoda, superclasse Hexapoda, classe Insecta, ordem Diptera, subordem Nematocera, infraordem Culicomorpha, superfamília Culicoidea, família Culicidae, subfamília Culicinae, gênero *Anopheles* (TAXONOMICON, 2015b). Outros mecanismos de transmissão da doença são: transfusão sanguínea, compartilhamento de agulhas contaminadas e transmissão congênita (BRASIL, 2014).

Dentre as mais de 400 espécies de anofelinos capazes de transmitir *Plasmodium* spp., somente 30 são consideradas bons vetores devido ao envolvimento de vários aspectos, como por exemplo, serem suscetíveis a infecção por plasmódios humanos e serem antropofílicos (preferência por sangue humano aos de outros vertebrados) (BRASIL, 2006; WHO, 2014b).

## 2.2. Malária no Brasil

Três espécies de *Plasmodium* são causadoras de malária humana no Brasil, as quais são *P. falciparum*, *P. malariae* e *P. vivax*. Contudo, as que se destacam na epidemiologia são o *P. vivax* e *P. falciparum*, sendo o primeiro associado a cerca de 88% dos casos, e juntos responsáveis por praticamente 100% das notificações da doença (BRASIL, 2008; WHO, 2017).

Quanto aos vetores, as espécies que se destacam são *Anopheles darlingi*, *A. albiparvus* e *A. aquasalis*. O *A. darlingi* é o principal mosquito transmissor de malária no

Brasil. Isso se deve a sua alta antropofilia, ampla distribuição e alta densidade no território nacional (BRASIL, 2014; WHO, 2015).

A região amazônica, constituída pelos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins, é considerada área endêmica para malária, sendo responsável por quase 99% dos registros nacionais. Entre janeiro a maio de 2015, foram notificados nessa região cerca de 41 mil exames positivos da doença, dentre os quais os estados do Amazonas e Acre contabilizaram juntos quase 70% dos casos, com aproximadamente 21 e 8 mil exames positivos, respectivamente (BRASIL, 2013; 2015).

### **2.3. Produtos naturais e antimaláricos**

O uso de produtos naturais pela medicina tradicional é bastante antigo. Como exemplo, pode-se citar os registros de argila Mesopotâmicos, datados de 2600 a.C, os quais relatam o uso medicinal de diversos insumos provenientes de plantas; outro exemplo é o famoso Papiro de Ebers, documento egípcio datado de 1500 a.C contendo cerca de 700 drogas, a maioria proveniente de plantas medicinais (CRAGG e NEWMAN, 2005).

O exemplo mais bem sucedido do uso de conhecimentos etnobotânicos para o desenvolvimento de fármacos refere-se às drogas antimaláricas, com a descoberta dos produtos naturais quinina e artemisinina (CRAGG e NEWMAN, 2013). A quinina foi o primeiro medicamento padronizado para tratamento de malária, sendo isolado em 1820 pelos farmacêuticos Pierre Joseph Pelletier e Joseph Caventou a partir do estudo fitoquímico das cascas de árvores de *Cinchona* spp. Porém em meados de 1600, antes

do isolamento, a casca de cinchona já era utilizada pelos europeus para o tratamento de malária (SNEADER, 2005; ACHAN *et al.*, 2011).

Estudos para novos fármacos foram impulsionados no período entre a Primeira e Segunda Guerra Mundial, surgindo importantes antimaláricos sintéticos baseados na estrutura da quinina, como exemplos a cloroquina, primaquina, proguanil e pirimetamina. A cloroquina foi o fármaco padrão para a supressão e profilaxia da malária em muitas regiões endêmicas até o surgimento de parasitos resistentes (FRANÇA *et al.*, 2008).

Outro fármaco antimalárico importante proveniente de produtos naturais de plantas é a artemisinina, isolada em 1972 das cascas de *Artemisia annua*, a qual era utilizada pelos chineses para tratamento de quadros febris desde 340 a.C. A partir da artemisinina foram produzidos importantes derivados semissintéticos, os quais são artesunato, artemeter, arte-éter, diidroartemisinina, entre outros (FRANÇA *et al.*, 2008). Atualmente, a artemisinina e seus derivados são empregados em combinação a outros antimaláricos (*Artemisinin-based Combination Therapies*- ACTs) para o tratamento de malária *P. falciparum* em diversos países (WHO, 2017).

## **2.4. Resistência aos antimaláricos**

Os principais parasitos causadores de malária vêm desenvolvendo resistência aos antimaláricos convencionais. O *P. falciparum* tem desenvolvido resistência a artemisinina e seus derivados, além de vários medicamentos antimaláricos, de modo a abranger todas as classes de medicamentos existentes para seu tratamento, e o *P. vivax* tem desenvolvido resistência aos medicamentos cloroquina, sulfadoxina-pirimetamina e primaquina. (WHITE, 1998; WHITE, 2004; WHO, 2010).

O aparecimento de *Plasmodium* resistente aos antimaláricos convencionais e, principalmente *P. falciparum* resistente a artemisinina e seus derivados é extremamente preocupante devido a não existirem, no momento, outras classes de fármacos que ofereçam nível equivalente de eficácia e segurança comparados a artemisinina e seus derivados (WHO, 2014a).

Buscas por novos candidatos a fármacos vêm ocorrendo devido à emergente resistência aos antimaláricos existentes. O grupo LAPAAM vem desenvolvendo estudos com plantas medicinais amazônicas, obtendo substâncias ativas para o tratamento antimalárico, como exemplos, o 4-nerolidilcatecol e seus derivados sintéticos, obtido de *Piper peltatum*, planta popularmente conhecida como caapeba (ANDRADE-NETO *et al.*, 2007; ROCHA E SILVA *et al.*, 2015) e a elipticina e seus derivados sintéticos, obtida de *Aspidosperma vargasii*, árvore popularmente conhecida como carapanaúba (ANDRADE-NETO *et al.*, 2007; MONTOIA *et al.*, 2014).

## **2.5. Família Poaceae**

Poaceae, também conhecida como Gramineae, pertence à classe Equisetopsida, subclasse Magnoliidae, superordem Liliales, ordem Poales, e compreende uma grande família de plantas angiospérmicas monocotiledôneas comumente chamadas de capim, grama ou gramínea, sendo constituída por cerca de 800 gêneros e 12.000 espécies, distribuídas filogeneticamente dentro de 12 subfamílias, 6 supertribos, 51 tribos e 80 subtribos (CLAYTON e RENVOIZE, 1986; WATSON e DALLWITZ, 1992; SORENG *et al.*, 2015).

A mesma é considerada a quarta maior família em quantidade de espécies, ocorrendo praticamente em todos continentes, com exceção da Antártica, e cobrindo

aproximadamente 31% a 43% da superfície terrestre (SHANTZ, 1954; WHITE *et al.*, 2000; PETERSON, 2013). No Brasil, a família é representada por 225 gêneros e 1.486 espécies (FILGUEIRAS *et al.*, 2015).

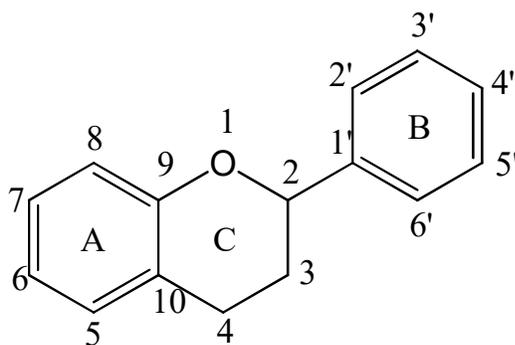
#### 2.5.1. Características botânicas de Poaceae

As gramíneas se caracterizam pelo fruto simples e seco exclusivo denominado cariopse (também chamado de cereal ou grão), além de apresentar caules especializados, denominados colmos, os quais são divididos em gomos (entrenós), e separados por discos transversais (nós) (GPWG *et al.*, 2001). As flores são dispostas em espiguetas, inflorescência na qual as flores encontram-se inseridas a um eixo (denominado ráquila ou ráquis). Na base da inflorescência encontram-se duas brácteas secas, opostas e estéreis, denominadas glumas, e logo acima, encontram-se duas brácteas secas e opostas denominadas glumelas, as quais envolvem os cereais (cariopse) (PETERSON, 2013)

#### 2.5.2. Flavonóides em Poaceae

Os flavonóides são os compostos fenólicos mais comuns encontrados em plantas, com estrutura carbônica C6-C3-C6, constituídos por dois anéis aromáticos (anel A e anel B) ligados a um heterociclo oxigenado formado por 3 carbonos (anel C) (KUMAR e PANDEY, 2013) (Figura 1).

Figura 1. Estrutura básica dos flavonóides



Em 1976, Harborne e colaboradores realizaram estudo de prospecção para flavonóides com 217 representantes de Poaceae demonstrando que o grupo C-glicoflavonas e a substância tricín são os constituintes majoritários na família, ocorrendo em 93% das espécies estudadas. Demonstrou também a ocorrência de flavonóides sulfatados em 16% das amostras, e que os flavonóides apigenina, quercetina, campeferol e luteolina-7-glicosídeo são raros na família (HARBORNE e WILLIAMS, 1976) (Anexo 1).

Várias flavonas e glicoflavonas foram identificadas e isoladas de *Saccharum officinarum*, como exemplos temos as substâncias swertisina, a shaftosida e tricín-7-glicosídeo (ZHU *et al.*, 2010). Para o gênero *Avena*, a literatura indica que os flavanoides majoritários são os glicoflavonas isovitexina-2''-arabinosídeo e vitexina-2''-ramnosídeo, com algumas espécies apresentando traços de tricín-5-glicosídeo e tricín-7-glicosídeo (SALEH *et al.*, 1988) (Anexo 1).

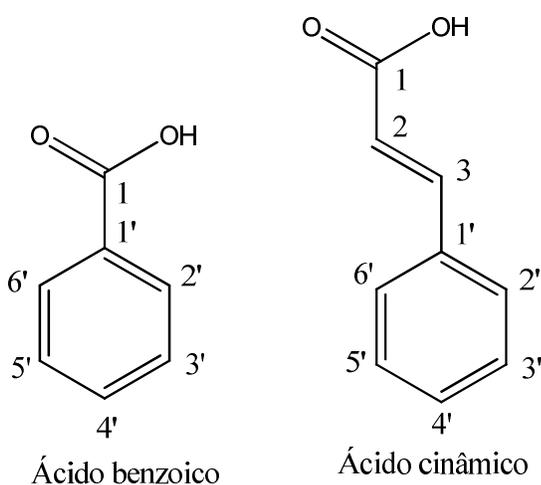
Outra classe de flavonoides presentes na família são as antocianinas, como exemplos temos a malvidina, isolado de *Oriza sativa*, e a cianidina-3-glicosídeo e peonidina-3-glicosídeo, presentes em *Bothriochloa ischaemum*, *Anthoxanthum odoratum*, *Zea mays*, entre outras espécies (FOSSEN *et al.*, 2002; HYUN e CHUNG, 2004) (Anexo 1).

### 2.5.3. Ácidos fenólicos em Poaceae

Os ácidos fenólicos são substâncias formadas por um anel fenólico e um grupo ácido carboxílico, este último apresentando entre 1 a 3 carbonos. Os ácidos fenólicos apresentam esqueleto C6-C1, correspondente ao ácido benzóico e seus derivados ou esqueleto C6-C3, referente ao ácido cinâmico e seus derivados (GOLENIOWSKI et al., 2013) (Figura 2).

Os ácidos fenólicos apresentam várias atividades biológicas, como exemplos, antiulceroso (BARROS et al., 2008; NANJUNDAIAH; ANNAIAH; DHARMESH, 2011), antioxidante, antimicrobiano (SOVA, 2012) e antitumoral (DE; BALTAS; BEDOS-BELVAL, 2011) e vem sendo empregados na busca de novos candidatos a fármacos para o tratamento de tuberculose (CARVALHO et al., 2008) e malária (PÉREZ et al., 2012).

Figura 2. Estrutura dos ácidos benzóico e cinâmico



Em Poaceae, dentre os derivados do ácido cinâmico encontramos o ácido *p*-cumarínico, presente em *Bambusa vulgaris*, *Dactylis glomeratae*, *Fetusca rubra* e *Urochloa humidicola* (KOMLAGA, 2015; MIKA et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2017);

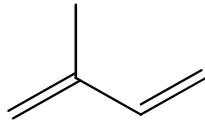
o ácido ferúlico, presente em *Cynodon dactylon*, *Echinochloa colona*, *Dactylis glomeratae* e *Fetusca rubra* (GOMAA; ABDELGAWAD, 2012; MIKA et al., 2005; SHABI et al., 2010); o ácido caféico, presentes em *Paspalum atratum*, *Dactylis glomeratae* e *Fetusca rubra* (DA SILVA PINTO et al., 2015; MIKA et al., 2005); e os ácidos isoferúlico e ácido *p*-metoxicinâmico, presentes em *Lolium multiflorum* (PONCE et al., 2009) (Anexo 2).

Dentre os derivados do ácido benzóico temos o ácido ftálico, obtido de *Vetiveria zizanioides* (HUANG et al., 2004); os ácidos vanílico e *p*-hidroxibenzoico, obtidos de *Urochloa humidicola*, *Dactylis glomeratae* e *Fetusca rubra* (MIKA et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2017); o ácido protocatequínico, presente em *Echinochloa colona*, *Dactylis glomeratae* e *Fetusca rubra* (GOMAA; ABDELGAWAD, 2012; MIKA et al., 2005) e o ácido siríngico, presente em *Cynodon dactylon* e *Echinochloa colona* (GOMAA; ABDELGAWAD, 2012; SHABI et al., 2010) (Anexo 2)

#### 2.5.4. Terpenos em Poaceae

Os terpenos são substâncias cujo esqueleto carbônico é formado por subunidades do isopreno (Figura 3), e de acordo com a quantidade de subunidades de isopreno na cadeia carbônica, os terpenos são classificados em hemiterpenos ( $C_5$ ), monoterpenos ( $C_{10}$ ), sesquiterpenos ( $C_{15}$ ), diterpenos ( $C_{20}$ ), sesterterpenos ( $C_{25}$ ), triterpenos ( $C_{30}$ ), tetraterpenos ( $C_{40}$ ) e politerpenos ( $C_5$ )<sub>n>8</sub> (BREITMAIER, 2006).

Figura 3. Estrutura do isopreno



Os terpenos apresentam várias atividades biológicas, sendo empregados no tratamento de doenças. Entre os mais famosos medicamentos baseados em terpenos temos a artemisinina, droga utilizada para o tratamento de malária resistente, e o paclitaxel, agente quimioterápico utilizado para o tratamento de diversos tipos de câncer (WANG *et al.*, 2005) (Anexo3).

Em Poaceae, a maioria dos terpenos descritos foi identificada a partir de óleos essenciais de gramíneas do gênero *Cymbopogon*, como exemplos têm o limoneno, citrionelol, neral e geraniol, presentes em *Cymbopogon citratus*, *C. flexuosus*, *C. martinii*, *C. proximus*, entre outras espécies do gênero (GANJEWALA, 2009) (Anexo 3).

Outras classes de terpenos descritas são sesquiterpenos, como exemplo o vetidiol, presente em *Vetiveria zizanioides*; os triterpenos, como a friedelina e epifriedelanol, obtidos de *Sinocalamus affinis*; e os fitoesteróis, como o sitosterol e estigmasterol, presentes em *Schizostachyum lumampao* e *Sinocalamus affinis* (XIONG *et al.*, 2012; RAGASA *et al.*, 2014) (Anexo3).

#### 2.5.5. Importância econômica de Poaceae

A família apresenta vários usos economicamente importantes, porém o com maior destaque refere-se ao seu uso como alimento por meio do consumo de gramíneas forrageiras e cereais (GIBSON, 2009; FAO, 2013). Os cereais são uma importante fonte de alimento para os animais e a principal para os seres humanos, sendo que em 2013,

dos quase 2,3 bilhões de toneladas produzidos, 1 bilhão de toneladas foi destinado ao uso alimentar humano e cerca de 750 milhões de toneladas para alimentação animal (FAO, 2013)

Os cereais são tão importantes para alimentação, que apenas oito são responsáveis por fornecer aproximadamente 55% a 60% das calorias alimentares e 50% das proteínas dos seres humanos, os quais são trigo (gênero *Triticum*), milho (gênero *Zea*), arroz (gênero *Oryza*), cevada (gênero *Hordeum*), sorgo (gênero *Sorghum*), aveia (gênero *Avena*), centeio (gênero *Secale*) e painço (gênero *Panicum*) (FAO, 1995; CORDAIN, 1999)

#### 2.5.6. Poaceae e uso tradicional contra malária

Estudos etnobotânicos relatam o uso de representantes da família Poaceae para o alívio e/ou tratamento de malária, como a ingestão de chás de *Cymbopogon schoenanthus* em Madagascar (RANDRIANARIVELOJOSIA *et al.*, 2003); ingestão de chás de *Cymbopogon citratus* na Nigéria, Togo e Himalaia-Paquistão (AJIBESIN *et al.*, 2008; KOUDOUVO *et al.*, 2011; MUJTABA SHAH *et al.*, 2014), chás de *Saccharumoffi cinarum*, de *Imperata cylindrical* e de *Pennisetum purpureum* em Benin (YETEIN *et al.*, 2013), e chás de *Eleusine indica*, *Panicum subalbidum*, *Sorghum guineense* e *Zeamays* (NADEMBEGA *et al.*, 2011) (Tabela 1).

Tabela 1. Algumas espécies de Poaceae utilizadas tradicionalmente contra malária

Espécie	Parte	Preparo	Referência
<i>C. citratus</i>	Folha	Decocção	(AJIBESIN <i>et al.</i> , 2008; KODOUVO, <i>et al.</i> , 2011; MUJTABA <i>et al.</i> , 2013)
<i>C. giganteus</i>	Flores	Maceração	(NADEMBEGA <i>iet al.</i> , 2011)
<i>C. proximus</i>	Planta	Decocção	(NADEMBEGA <i>et al.</i> , 2011)
<i>C. schoenanthus</i>	Folha	Decocção	(RANDRIANARIVELOJOSIA, <i>et al.</i> , 2003)
<i>E. indica</i>	Planta	Decocção	(NADEMBEGA <i>et al.</i> , 2011)
<i>I. cylindrical</i>	Raiz	Infusão	(YETEIN <i>et al.</i> , 2013)
<i>P. subalbidum</i>	Planta	Maceração	(NADEMBEGA <i>et al.</i> , 2011)
<i>P. purpureum</i>	Colmo/Folha	Decocção	(YETEIN <i>et al.</i> , 2013)
<i>S. officinarum</i>	Colmo	Decocção Infusão	(AJIBESIN <i>et al.</i> , 2008; YETEIN <i>et al.</i> , 2013)
<i>S. guineense</i>	Folha	Maceração	(NADEMBEGA <i>et al.</i> , 2011)
<i>Z. mays</i>	Folha	Decocção	(NADEMBEGA <i>et al.</i> , 2011)

### 2.5.7. Poaceae e ensaios antimaláricos *in vitro* e *in vivo*

Encontram-se na literatura avaliações *in vitro* de extratos e óleos essenciais de Poaceae apresentando boa atividade antimalárica, exemplos são o óleo essencial de *Cymbopogon citratus*, com concentração que inibe em 50% o crescimento do parasito (CI<sub>50</sub>) de 4,2 µg/mL (AKONO NTONGA *et al.*, 2014), extratos de *Cymbopogon validus* e *Setaria megaphylla* com CI<sub>50</sub> de 5,8 µg/mL e 4,5 µg/mL, respectivamente (CLARKSON *et al.*, 2004), e extrato de *Bambusa vulgaris* com CI<sub>50</sub> de 4,7 µg/mL (VALDÉS *et al.*, 2010) (Tabela 2).

Observa-se também substâncias isoladas de Poaceae apresentando significativas atividades antimaláricas em ensaios *in vitro*, exemplos são o ácido *p*-cumarínico e ácido cinâmico, cujos valores de CI<sub>50</sub> em cepa 3D7 foram de 0,84 e 0,92 µM, enquanto em cepa W2 foram 1,54 e 1,41 µM, respectivamente (KOMLAGA, 2015). Outra substância avaliada foi o a tricina, com CI<sub>50</sub> em cepa 3D7 de 4,54 µM, e em cepas W2 foi de 5,93 µM (KOMLAGA, 2015) (Tabela 3).

Tabela 2. Extratos e óleo essencial de Poaceae avaliados em ensaio *in vitro* contra *P. falciparum*

Espécie	Solvente	Cepa	CI <sub>50</sub> (µg/mL)	Referências
<i>P. falciparum</i>				
<i>B. vulgaris</i>	MeOH	GHA (CQ-S)	4,7	(VÁLDES, et al., 2010)
<i>C. citratus</i>	Óleo essencial	B1 (CQ-R)*	4,2	(AKONO NTONGA, et al., 2014)
<i>C. Validus</i>	MeOH/DCM	D10 (CQ-S)**	5,8	(CLARKSON, et al., 2004)
<i>S. megaphylla</i>	MeOH/DCM	D10 (CQ-S)	4,5	(CLARKON, et al., 2004)

\* CQ-R, cloroquina-resistente; \*\* CQ-S, cloroquina-sensível

Tabela 3. Atividade antimalárica *in vitro* de isolados de *Bambusa vulgaris* (Poaceae)

Substância	CI <sub>50</sub> (µM)	Cepa <i>P. falciparum</i>	Referência
Ácido <i>p-cumarínico</i>	0,84 ± 0,90	3D7 (CQ-S)*	
	1,54 ± 0,64	W2 (CQ-R)**	
Ácido cinâmico	0,92 ± 0,10	3D7 (CQ-S)	(KOMLAGA, 2015)
	1,41 ± 0,38	W2 (CQ-R)	
Tricina	4,54 ± 0,37	3D7 (CQ-S)	
	5,93 ± 1,13	W2 (CQ-R)	

\* CQ-S, cloroquina-sensível; \*\* CQ-R, cloroquina-resistente

Ensaio *in vivo* de extratos etanólicos de *Panicum maximum* e *Setaria megaphylla* apresentaram significativa supressão do crescimento do parasito. Para *Panicum maximum* observou-se supressão de 74,3% (dose de 144 mg/kg em 4 dias de tratamento) e para *Setaria megaphylla*, supressão de 85,7% (dose 300 mg/kg em 4 dias de tratamento) (OKOKON et al., 2007; 2011). Outros exemplos temos do extrato de *Bambusa arundinacea* (ESMAEILI et al., 2015), extratos e óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (TCHOUMBOUGNANG et al., 2005; MELARIRI et al., 2011), extrato e frações de *Eleusine indica* (ETTEBONG et al., 2012) e extratos de *Gynerium sagittatum* e *Hymenachne donacifolia* (MUÑOZ et al., 2000) (Tabela 4).

Tabela 4. Poaceae avaliadas em ensaio antimalárico *in vivo*

Espécie (planta)	Parte	Solvente	Parasito	Dose (dias de tratamento)	Supressão (%)	Referência
<i>B. arundinacea.</i>	Goma	Metanol	<i>P. berghei</i>	10 mg/kg (4)	26%	(ESMAEILI, <i>et al.</i> , 2015)
<i>C.citratus</i>	Folhas	Óleo essencial	<i>P. berghei</i>	500, 300 e 200 mg/kg (4)	500 mg - 86,6%; 300 mg - 81,7%; 200 mg - 62,1%	(TCHOUMBOUGNAN <i>et al.</i> , 2005)
<i>O.gratissimum</i>	Folhas	Óleo essencial	<i>P. berghei</i>	500, 300 e 200 mg/kg(4)	500 mg - 77,8%; 300 mg - 75,2%; 200 mg - 55%	
<i>C.citratus</i> <i>V.amygdalina</i>	Folhas	Diclorometano	<i>P. berghei</i>	Mistura 400 e 600 mg/kg(4)	400 mg - 85%; 600 mg - 95%	(MELARIRI, <i>et al.</i> , 2011)
<i>E. indica</i>	-	Etanol	<i>P. berghei</i>	600, 400 e 200 mg/kg (4)	600 mg - 64,7%; 400 mg - 34,8%; 200 mg - 15,1%	(ETTEBONG <i>et al.</i> , 2012)
<i>G.sagittatum</i>	Caule	-	<i>P. vinckeipetteri</i>	522 mg/kg (4)	11%	(MUÑOZ, <i>et al.</i> , 2000)
<i>H.donacifolia</i>	Planta	-	<i>P. vinckeipetteri</i>	1000 mg/kg(4)	0%	
<i>P.maximum</i>	Folhas	Etanol	<i>P. berghei</i>	144, 96 e 48 mg/kg (4)	144 mg - 74,3%; 96 mg - 73,5%; 48 mg - 65,8%	(OKOKON <i>et al.</i> , 2011)
<i>S.megaphylla</i>	Folhas	Etanol	<i>P. berghei</i>	300, 200 e 100 mg/kg (4)	300 mg - 85,7%; 200 mg - 76,4%; 100 mg - 62,9%	(OKOKON <i>et al.</i> , 2007)

### 2.5.8. *Andropogon* Linneaus

*Andropogon* Linneaus pertence à subfamília Panicoideae, tribo Andropogoneae, sendo considerado um dos gêneros mais representativos compreendendo aproximadamente 100 a 120 espécies, com distribuição cosmopolita em regiões tropicais e subtropicais (CLAYTON e RENVOIZE, 1986; NAGAHAMA e NORRMANN, 2012; TAXONOMICON, 2015c). Nas Américas o gênero é representado por aproximadamente 60 espécies, e no Brasil encontram-se 30 espécies, distribuídas em todo o território nacional (NAGAHAMA e NORRMANN, 2012; ZANIN, 2015).

As espécies desse gênero são perenes, geralmente de crescimento cespitoso (vários caules, formando tufo), apresentando colmos eretos com 20 a 310 cm de altura, folhas não aromáticas, inflorescências geralmente plumosas e espiguetas aos pares (CAMPBELL, 2003; ZANIN e LONGHI-WAGNER, 2011). Diversos representantes de *Andropogon* foram reclassificados para outros gêneros, diminuindo consideravelmente a literatura sobre os metabólitos secundários deste gênero.

Estudos etnobotânicos relatam o uso medicinal de gramíneas, alguns exemplos: *A. birconis*, utilizado para dores nos rins por nativos da Amazônia Boliviana (BOURDY *et al.*, 2000), *A. glomeratus*, utilizado para problemas de pele por nativos do Estado da Virginia (EUA)(MORGAN e PERRY, 2010) e *A. squarrossus*, utilizado para disenteria em quatro distritos de Bangladesh (ZAKARIA *et al.*, 2011).

### 2.5.9. *Andropogon leucostachyus* Kunth

*Andropogon leucostachyus* Kunth são plantas perenes, cespitosas (raízes em forma de tufos), com colmos eretos, entrenós sólidos, nós glabros (sem pelos ou penugem), apresentando espiguetas em pares (CLAYTON *et al.*, 2006; ZANIN e LONGHI-WAGNER, 2011)

Encontram-se distribuídos nas Antilhas, América Central, México e América do Sul (W3TROPICOS, 2015). Na Amazônia tais plantas são conhecidas popularmente como rabo-de-cavalo, enquanto no restante do Brasil são conhecidas como capim-colchão ou capim-membeca (HIRUMA-LIMA *et al.*, 2002; ZANIN e LONGHI-WAGNER, 2011)

Estudos etnobotânicos no Brasil demonstram o uso medicinal de *A. leucostachyus*. Em Minas Gerais, na área urbana, a espécie vem sendo utilizada como diurético, emoliente e diaforético (MESSIAS *et al.*, 2015). Na Bahia e região do nordeste brasileiro é utilizada como diurético e para tratamento de depressão (COSTA-NETO, 1999; ALBUQUERQUE *et al.*, 2007; AGRA *et al.*, 2008), e na Amazônia, utilizada como analgésico e antitérmico (HIRUMA-LIMA *et al.*, 2002).

Não se encontram na literatura estudos de isolamento de substâncias para *A. leucostachyus*, apenas o estudo de prospecção fitoquímica para flavonoides feito por Harborne e colaboradores (1976), o qual demonstrou a presença de flavanoides C-glicosídeos, e das substâncias tricina e luteoferol (HARBORNE e WILLIAMS, 1976).

Existem poucos relatos na literatura sobre o uso medicinal ou ensaios para avaliação de atividade antimalárica para *Andropogon* spp. Em 2015, o grupo de pesquisa LAPAAM demonstrou resultado promissor do extrato metanólico de *A.*

*leucostachyus* nos ensaios *in vitro* contra *P. falciparum* ( $CI_{50} = 7,1 \mu\text{g/mL}$ ) e *in vivo* contra *P. berghei* (dose 250 mg/kg - 71% de inibição do crescimento do parasito em 4 dias de tratamento) (LIMA *et al.*, 2015).

O presente trabalho visa dar continuidade as pesquisas realizadas com extratos de *A. leucostachyus* com intuito de obter substâncias ativas, em trabalho químico inédito, a partir do emprego de técnicas cromatográficas, elucidá-las por meio de técnicas espectroscópicas e testá-las em ensaios antimaláricos *in vitro* contra *P. falciparum*.

### 3. OBJETIVOS

#### GERAL

- Contribuir para o conhecimento da composição química da espécie *Andropogon leucostachyus* e avaliar sua atividade antimalárica.

#### ESPECÍFICOS

- Isolar substâncias a partir de extratos e frações de parte aérea e raízes de *Andropogon leucostachyus*;
- Identificar ou elucidar por métodos espectroscópicos as estruturas das substâncias isoladas;
- Determinar a concentração das substâncias isoladas que inibe 50% do crescimento (CI<sub>50</sub>) *in vitro* contra *Plasmodium falciparum*.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Equipamentos e solventes

- Balança analítica: marca Marte, modelo AY220, carga máxima de 220 g e precisão de 0,0001 g;
- Balança semi-analítica: marca Adventurer, modelo ARC120 carga máxima de 3,10 kg e precisão de 0,01 g;
- Banho de ultrassom: marca Unique, modelo USC-1800A;
- Espectro de Massas de Alta Resolução – HMRS:BrukerDaltonics, modelo MicroTOF-QII;
- Manta aquecedora: marca Fisatom, modelo 752A
- Ressonância Magnética Nuclear – RMN: Bruker ultrashild Fourier 300 MHz
- Rotaevaporador: marca Fisatom, modelo 802;
- Moinho de facas: marca Marconi, modelo 340;
- Solventes: hexano, clorofórmio, acetato de etila, acetona e metanol (purificados por destilação fracionada).

### 4.2. Obtenção dos ensaios antimaláricos *in vitro*

Os ensaios antimaláricos *in vitro* de extratos e substâncias isoladas foram realizados pela Msc. Márcia Alves Souza no Laboratório de Malária e Dengue (INPA), sob coordenação do Dr. Luiz Francisco Rocha e Silva.

### **4.3. Obtenção dos espectros de ressonância magnética nuclear e massas de alta resolução**

Os espectros 1D e 2D de ressonância magnética nuclear e espectros de massas de alta resolução foram realizados pela Dr<sup>a</sup>. Zelina Estevam dos Santos Torres na Central Analítica do Laboratório Temático de Química de Produtos Naturais (CALTQPN/INPA).

### **4.4. Coleta e identificação botânica de *A. leucostachyus***

Inicialmente, foi pedido a autorização de coleta de *A. leucostachyus* no Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) e para a Reserva Florestal Adolph Ducke (INPA). Após obtido autorização tanto pelo SISBIO (Anexo 34) quanto INPA, realizou-se no dia 20 de abril de 2015 a coleta de *A. leucostachyus* na Reserva Florestal Adolpho Ducke, localizada em Manaus, quilômetro 26 da estrada Manaus/Itacoatiara - AM-010.

Após a coleta, confeccionou-se uma exsiccata com material fértil, a qual foi levada para identificação no Herbário do INPA, sendo depositado sob o número 268.217. O restante do material foi levado ao LAPAAM/INPA.

### **4.5. Preparação e secagem de *A. leucostachyus***

O material vegetal coletado foi lavado em água corrente para retirada de terra e outras sujidades macroscópicas e deixado para secar em temperatura ambiente por 12 h.

Após, foi feita a separação das raízes e partes aéreas, as quais foram pesadas e colocadas na estufa de circulação de ar forçado para secar entre 35 a 38°C por duas semanas.

#### **4.6. Moagem e acondicionamento de *A. leucostachyus***

O material previamente seco e separado em partes aéreas e raízes foi triturado em moinho de facas, e seus respectivos pós foram acondicionados em sacolas plásticas, pesadas e identificadas. Após a identificação, as sacolas foram acondicionadas sob refrigeração com o intuito de diminuir a absorção de umidade e proliferação de microorganismos até o momento de preparo dos extratos.

#### **4.7. Extrações em pequena escala das partes aéreas e raízes de *A. leucostachyus***

Utilizou-se maceração com auxílio de ultrassom para a obtenção dos extratos das partes aéreas e raízes de *A. leucostachyus*. Os solventes usados para as extrações foram hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, previamente destilados para uso. Os procedimentos empregados para as extrações em pequena escala das partes aéreas encontram-se na figura 4, e para as extrações em pequena escala de raízes, na figura 5. Os extratos obtidos em pequena escala foram enviados para avaliação antimalárica com intuito de auxiliar na escolha dos extratos ativos promissores.

#### 4.7.1. Extrato hexânico das partes aéreas em pequena escala (TAH)

Para obtenção do extrato hexânico das partes aéreas (TAH) foi empregada extração por sonicação em banho de ultrassom de 4 h a 40-43°C, seguido de maceração (18 h em temperatura ambiente). Utilizaram-se 10,1 g de partes aéreas secas e as mesmas foram extraídas 7 vezes com hexano a fim de exaurir o material vegetal. Os extratos obtidos foram filtrados, concentrados em rotaevaporador com pressão reduzida em temperatura abaixo de 50°C, secos e reunidos, obtendo-se 97,7 mg de TAH (Figura 4). O resíduo (torta) foi seco em temperatura ambiente, e dividido em duas porções, uma porção com 4,8 g para ser extraído com acetato de etila, e outra com 4,4 g para extração com clorofórmio (Figura 4).

#### 4.7.2. Extrato acetato de etila das partes aéreas em pequena escala (TAAC)

Para obtenção do extrato acetato de etila das partes aéreas (TAAC) foram utilizados 4,8 g do resíduo do material vegetal seco proveniente da extração TAH. Empregou-se similarmente a metodologia descrita para TAH, realizando-se 9 extrações com acetato de etila para exaurir o material, obtendo-se 161,7 mg de TAAC. O resíduo do material vegetal foi seco em temperatura ambiente e guardado (4,5 g) para extração com metanol (Figura 4).

#### 4.7.3. Extrato metanólico do resíduo da extração acetato de etila das partes aéreas em pequena escala (TACME)

Para obtenção do extrato metanólico do resíduo da extração acetato de etila das partes aéreas (TACME) foram utilizados 4,5 g do resíduo do material vegetal seco proveniente da extração TAAC. Empregou-se similarmente a metodologia descrita para TAH, realizando-se 4 extrações com metanol para exaurir o material vegetal, obtendo-se 223,9 mg de TACME. O resíduo vegetal desse processo foi desprezado (Figura 4).

#### 4.7.4. Extrato clorofórmico das partes aéreas em pequena escala (TACL)

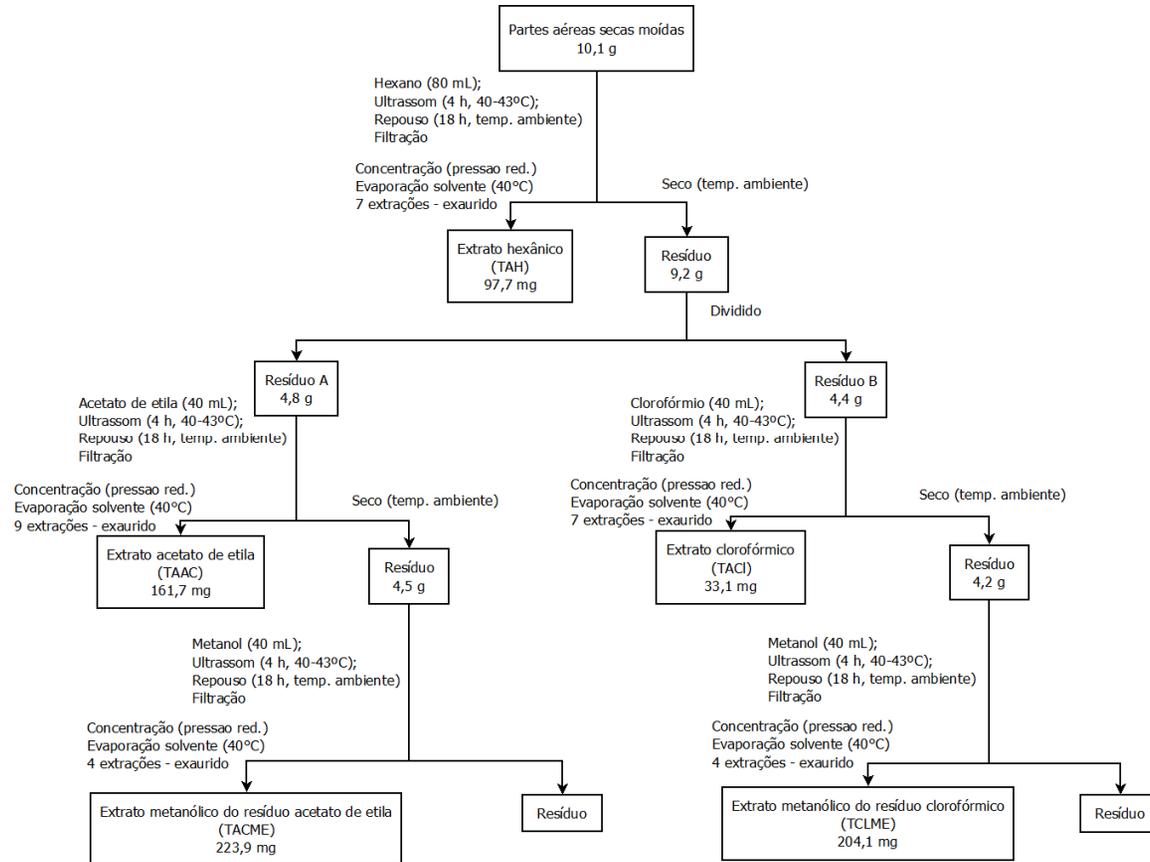
Para obtenção do extrato clorofórmico das partes aéreas (TACL) foram utilizados 4,4 g do resíduo do material vegetal seco proveniente da extração TAH. Empregou-se similarmente a metodologia descrita para TAH, realizando-se 7 extrações para exaurir o material vegetal, obtendo-se 33,1 mg de TACL. O resíduo do material vegetal foi seco em temperatura ambiente e guardado 4,2 g para extração com metanol (Figura 4).

#### 4.7.5. Extrato metanólico do resíduo da extração clorofórmica das partes aéreas em pequena escala (TCLME)

Para obtenção do extrato metanólico do resíduo da extração clorofórmica das partes aéreas (TCLME) foi utilizado como solvente o metanol e 4,2 g do resíduo vegetal seco proveniente da extração TACL. Empregou-se similarmente a metodologia descrita

para TAH, realizando-se 4 extrações para exaurir o material, obtendo-se 204,1 mg de TCLME. O resíduo do material vegetal extraído foi desprezado (Figura 4).

Figura 4. Procedimentos para obtenção dos extratos hexânico (TAH), acetato de etila (TAAC), clorofórmico (TACL), metanólico do resíduo acetato de etila (TACME) e metanólico do resíduo clorofórmico (TCLME) das partes aéreas de *A. leucostachyus* em pequena escala



#### 4.7.6. Extrato hexânico das raízes em pequena escala (TRH)

Para obtenção do extrato hexânico das raízes (TRH) foi empregado extração por sonicação em banho de ultrassom por 4 h a 40-43°C, seguido de maceração (18 h em temperatura ambiente). Utilizaram-se 10,1 g de raízes as quais foram extraídas 6 vezes com hexano a fim de exaurir o material vegetal. Os extratos obtidos foram filtrados, concentrados em rotaevaporador com pressão reduzida em temperatura abaixo de 50°C, secos e reunidos, obtendo-se 48,3 mg de TRH. O resíduo (torta) foi seco em temperatura ambiente e, após secagem, foi dividido em duas porções, uma porção com 5,1 g para ser extraído com acetato de etila, e outra com 4,6 g para extração com clorofórmio (Figura 5).

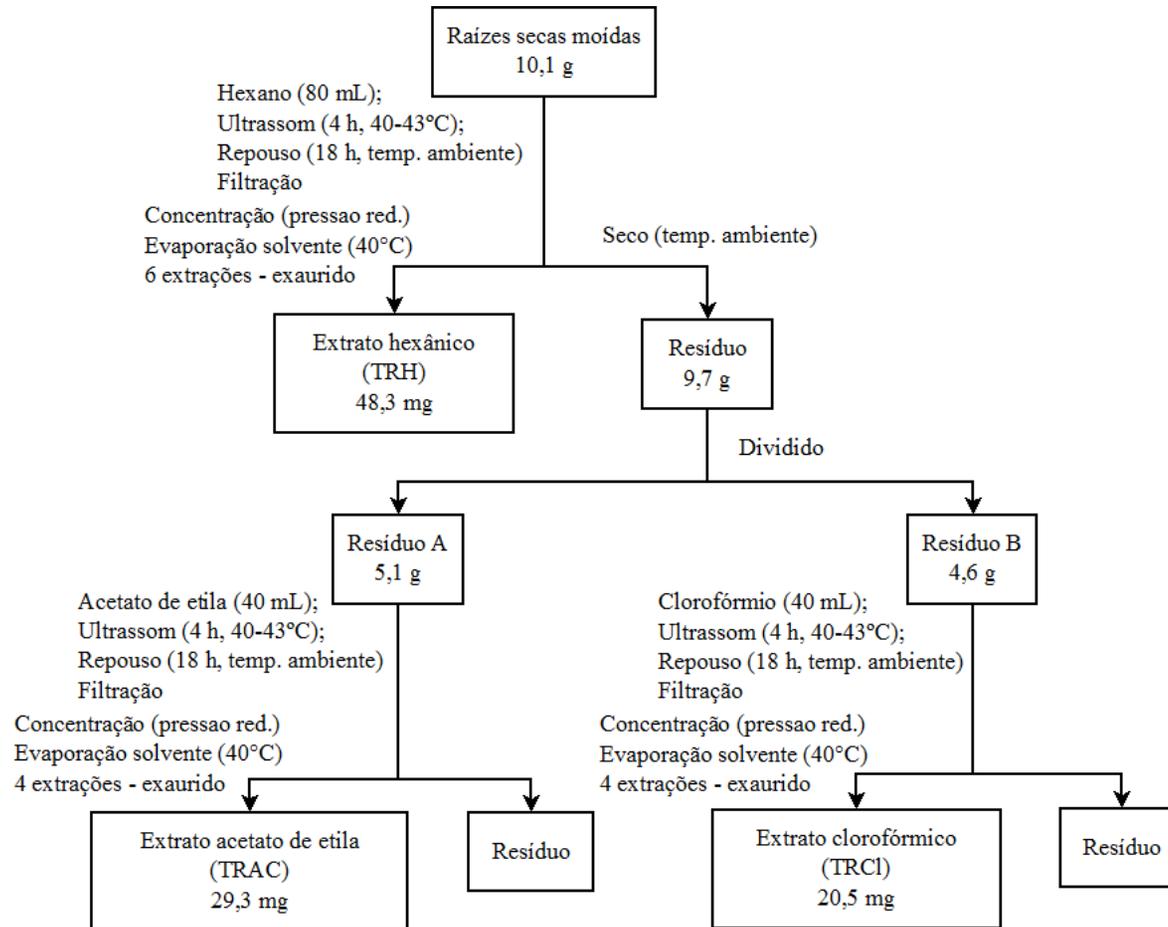
#### 4.7.7. Extrato acetato de etila das raízes em pequena escala (TRAC)

Para obtenção do extrato acetato de etila das raízes (TRAC) foram utilizados 5,1 g do resíduo do material vegetal seco proveniente da extração TRH. Empregou-se similarmente a metodologia descrita para TRH, realizando-se 4 extrações com acetato de etila para exaurir o material vegetal, obtendo-se 29,3 mg de TRAC. O resíduo do material vegetal extraído foi desprezado (Figura 5).

#### 4.7.8. Extrato clorofórmico das raízes em pequena escala (TRCL)

Para obtenção do extrato clorofórmico das raízes (TRCL) foram utilizados 4,6g do resíduo do material vegetal seco proveniente da extração TRH. Empregou-se similarmente a metodologia descrita para TRH, realizando-se 4 extrações com clorofórmio para exaurir o material vegetal, obtendo-se 20,5 mg de TRCL. O resíduo do material vegetal extraído foi desprezado (Figura 5).

Figura 5. Procedimentos para obtenção dos extratos hexânico (TRH), acetato de etila (TRAC) e clorofórmico (TRCL) das raízes de *A. leucostachyus* em pequena escala.



#### 4.8. Extrações em maior escala das partes aéreas e raízes de *A. leucostachyus*

Utilizou-se maceração com auxílio de ultrassom para a obtenção dos extratos das partes aéreas e das raízes de *A. leucostachyus*. Os solventes usados para as extrações foram hexano, acetato de etila e metanol para parte aérea e apenas hexano para as raízes. Os procedimentos empregados para as extrações em maior escala das partes aéreas encontram-se na figura 6, e para a extração em maior escala das raízes na figura 7. Aos extratos obtidos em maior escala foram empregadas técnicas cromatográficas para o isolamento de substâncias.

##### 4.8.1. Extrato hexânico das partes aéreas em maior escala (TAHEX)

Para obtenção do extrato hexânico das partes aéreas (TAHEX) em maior escala empregou-se sonicação em banho de ultrassom por 4 h a 40-43°C, seguido de maceração (18 h em temperatura ambiente). Utilizaram-se 580,1 g da parte aérea do material vegetal seco e as mesmas foram extraídas 5 vezes com hexano, a fim de exaurir o material vegetal. Os extratos obtidos foram filtrados, concentrados em rotaevaporador com pressão reduzida em temperatura abaixo de 50°C, secos e reunidos, obtendo-se 5,8 g de TAHEX. O resíduo foi seco em temperatura ambiente e foram guardados 560,7 g para serem extraídos com acetato de etila (Figura 6).

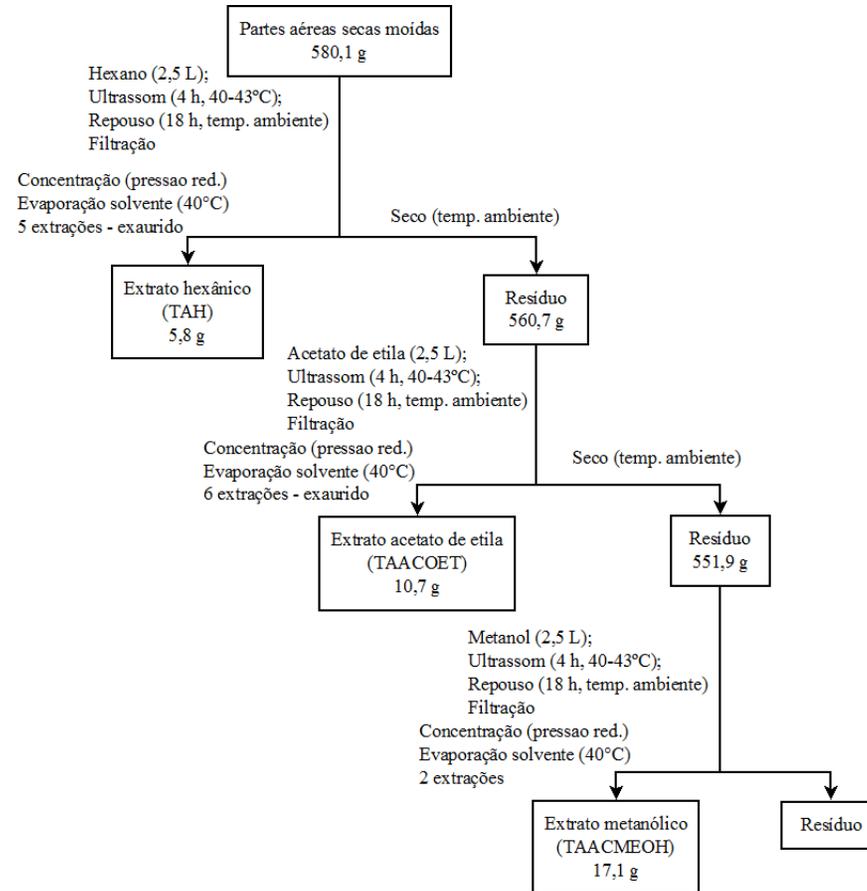
#### 4.8.2. Extrato acetato de etila das partes aéreas em maior escala (TAACOET)

Para a obtenção do extrato acetato de etila das partes aéreas (TAACOET) foram utilizados 560,7 g do resíduo vegetal seco proveniente da extração TAHEX. Empregou-se similarmente a metodologia descrita para TAHEX, realizando-se 6 extrações com acetato de etila para exaurir o material vegetal, obtendo-se 10,7 g de TAACOET. O resíduo foi seco em temperatura ambiente e foram guardados 551,9 g para serem extraídos com metanol (Figura 6).

#### 4.8.3. Extrato metanólico das partes aéreas em maior escala (TAACMEOH)

Para obtenção do extrato metanólico das partes aéreas (TAACMEOH) foram utilizados 551,9 g do resíduo do material vegetal seco proveniente da extração TAACOET. Empregou-se similarmente a metodologia descrita para TAHEX, realizando-se apenas 2 extrações com metanol, porém não exaurindo o material, obtendo-se 17,1 g de TAACMEOH (Figura 6).

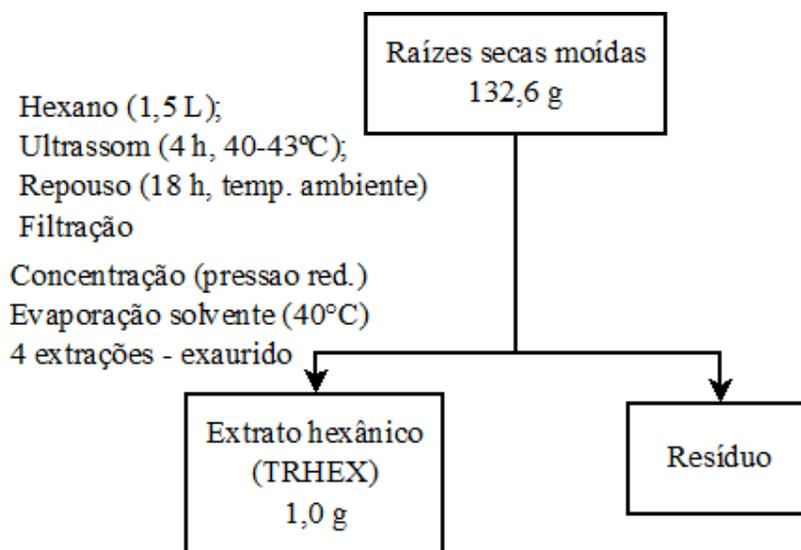
Figura 6. Procedimentos para obtenção dos extratos hexânico (TAHEX), acetato de etila (TAACOET) e metanólico (TAACMEOH) das partes aéreas de *A. leucostachyus* em maior escala.



#### 4.8.4. Extrato hexânico das raízes em maior escala (TRHEX)

Para a obtenção do extrato hexânico de raiz (TRHEX) em maior escala empregou-se sonicação em banho de ultrassom por 4 h a 40-43°C, seguido de maceração (18 h em temperatura ambiente). Utilizaram-se 132,6 g das partes aéreas secas e as mesmas foram extraídas 4 vezes com hexano a fim de exaurir o material vegetal. Os extratos obtidos foram filtrados, concentrados em rotaevaporador com pressão reduzida em temperatura abaixo de 50°C, secos e reunidos, obtendo-se 1,0 g de (TRHEX). O resíduo do material vegetal extraído foi desprezado (Figura 7).

Figura 7. Procedimento para obtenção do extrato hexânico (TRHEX) das raízes de *A. leucostachyus* em maior escala



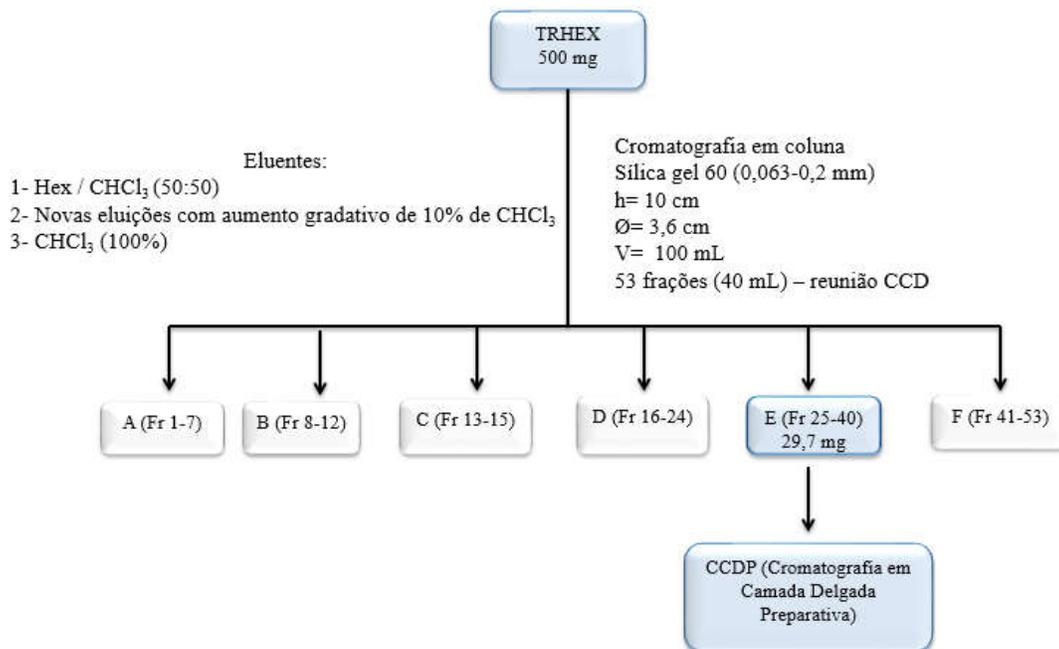
## 4.9. Isolamento de substâncias por técnicas cromatográficas

### 4.9.1. Fracionamento cromatográfico de TRHEX

Realizaram-se cromatografias em camada delgada (CCD) com o extrato hexânico das raízes (TRHEX) com vários sistemas de solventes a fim de escolher o eluente mais indicado para a separação de substâncias ou misturas de substâncias. As CCDs foram observadas com lâmpada de luz ultravioleta (UV, 254-336 nm) e reveladas com o revelador anisaldeído.

O fracionamento foi realizado em coluna aberta 3,6 cm × 60 cm (diâmetro × altura) e sílica gel 60 (0,063-0,2 mm, Merck). Utilizaram-se 0,5 g do extrato TRHEX e 20 g de sílica para empacotamento da coluna, obtendo-se 10 cm de altura de sílica empacotada na coluna. A coluna foi eluída inicialmente com 100 mL de hexano:clorofórmio (5:5), sendo feitas novas eluições aumentando-se gradativamente a polaridade do eluente em 10% de clorofórmio até alcançar clorofórmio 100%. Obtiveram-se 53 frações de aproximadamente 40 mL cada, as quais foram reunidas baseadas nos seus perfis de CCD em 6 grupos. Novas CCDs foram realizadas a fim de encontrar melhor sistema para separar um constituinte de interesse presente nas frações reunidas de 25 a 40 (29,7 mg) (Figura 8).

Figura 8. Fluxograma do fracionamento do extrato hexânico (TRHEX) das raízes por cromatografia em coluna aberta



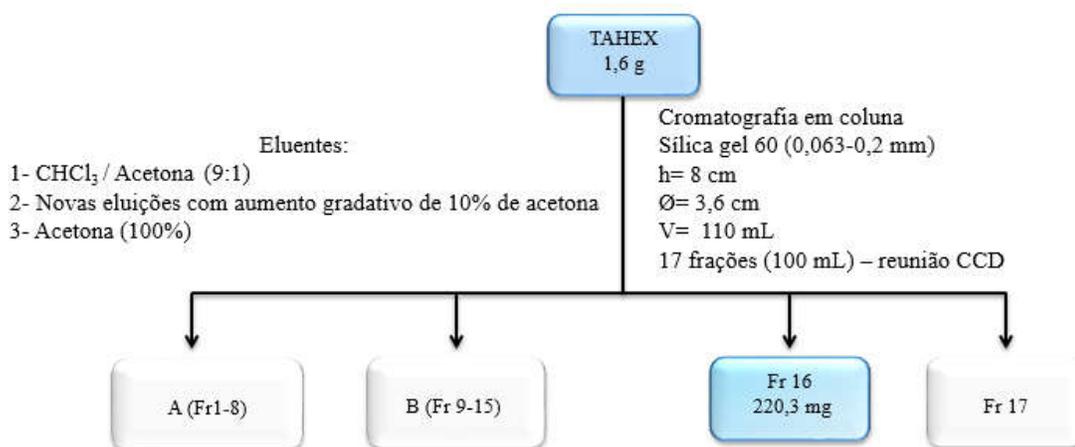
Foram preparadas duas placas preparativas utilizando-se, para cada placa, 30 g de sílica preparativa (Merck) e quantidade suficiente de água destilada. A sílica foi vertida, com auxílio de carrinho, a placas de vidro 20 cm × 20 cm, e deixadas para secar em temperatura ambiente por 1 h, e em estufa a 100°C por 4 h. Em seguida realizou-se o isolamento utilizando as placas preparativas com o auxílio de lâmpada ultravioleta UV 254 nm, empregando-se como fase móvel hexano:clorofórmio:acetona (7:2:1). Após o processo obteve-se 5,7 mg de um sólido amorfo, codificado como TRHEX-iso25.

#### 4.9.2. Fracionamento cromatográfico de TAHEX

O fracionamento do extrato hexânico das partes aéreas (TAHEX) foi realizado em coluna aberta 3,2 cm × 60 cm (diâmetro × altura) e sílica gel 60 (0,063-0,2 mm,

Merck). Utilizaram-se 1,6 g do extrato TAHEX e quantidade de sílica suficiente para obter 8 cm de altura de sílica empacotada na coluna. A coluna foi eluída inicialmente com 110 mL do sistema clorofórmio:acetona (9:1), sendo feitas novas eluições aumentando-se gradativamente a polaridade do eluente em 10% de acetona até alcançar acetona 100%. Obtiveram-se 17 frações de 100 mL cada, que foram reunidas em 4 grupos baseando-se nos seus perfis de CCDs. Novas CCDs foram feitas a fim de encontrar melhor sistema para separar um constituinte de interesse presente na fração 16 (220,3 mg) (Figura 9).

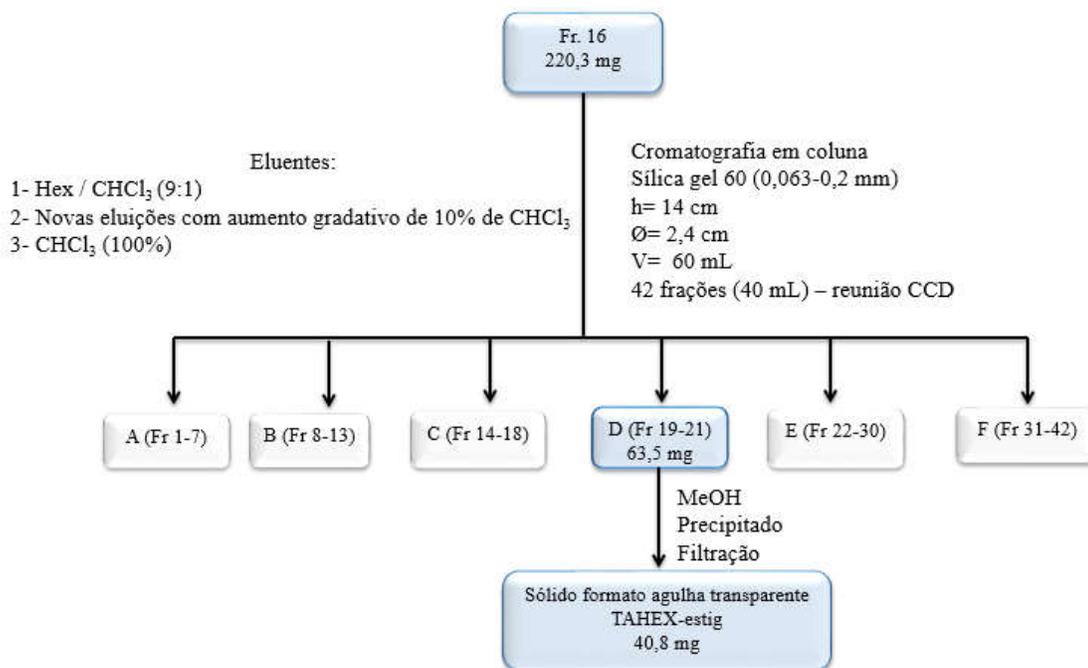
Figura 9. Fluxograma do fracionamento do extrato hexânico (TAHEX) das partes aéreas por cromatografia em coluna aberta



Realizou-se novo fracionamento em coluna aberta 2,4 cm × 60 cm (diâmetro × altura) com sílica gel 60 (0,063-0,2 mm, Merck). Utilizaram-se os 220,3 mg da fração 16 (obtido da coluna anterior) e quantidade de sílica suficiente para obter 14 cm de altura de sílica empacotada na coluna. A coluna foi eluída inicialmente com 60 mL do sistema hexano:clorofórmio: (9:1), sendo feitas novas eluições aumentando-se gradativamente a polaridade do eluente em 10% de clorofórmio até alcançar

clorofórmio 100%, obtendo-se 42 frações de 40 mL cada. Reuniram-se as frações 19 a 21 (63,5 mg) e fez-se uma precipitação com metanol, e em seguida filtrou-se o material em papel de filtro, obtendo 40,8 mg de um sólido transparente, codificado como TAHEX-estig (Figura 10).

Figura 10. Fluxograma do fracionamento da fração 16 (TAHEX) das partes aéreas por cromatografia em coluna aberta

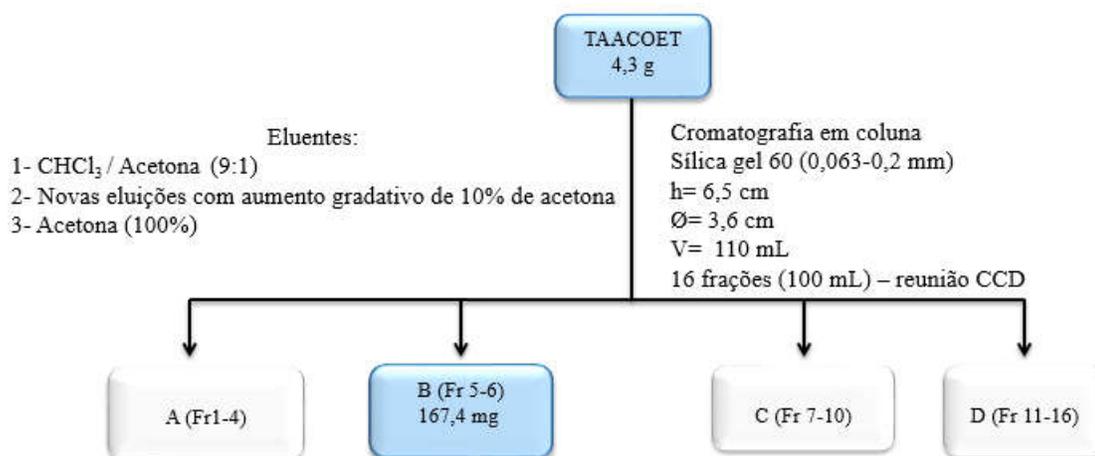


#### 4.9.3. Fracionamento cromatográfico de TAACOET

O fracionamento do extrato acetato de etila das partes aéreas (TAACOET) foi realizado em coluna aberta 4,5 cm × 60 cm (diâmetro × altura) e sílica gel 60 (0,063-0,2 mm, Merck). Utilizaram-se 4,3 g do extrato TAACOET e quantidade de sílica suficiente para obter 6,5 cm de altura de sílica empacotada na coluna. A coluna foi eluída inicialmente com 110 mL do sistema clorofórmio:acetona (9:1), sendo feitas novas

eluições aumentando-se gradativamente a polaridade do eluente em 10% de acetona até alcançar acetona 100%. Obtiveram-se 16 frações de 100 mL cada, que foram reunidas em 4 grupos baseando-se nos seus perfis de CCD. Novas CCDs foram realizadas a fim de encontrar o melhor sistema para separar um constituinte de interesse presente nas frações reunidas 5 a 6 (167,4 mg) (Figura 11).

Figura 11. Fluxograma do fracionamento do extrato acetato de etila (TAACOET) das partes aéreas por cromatografia em coluna aberta

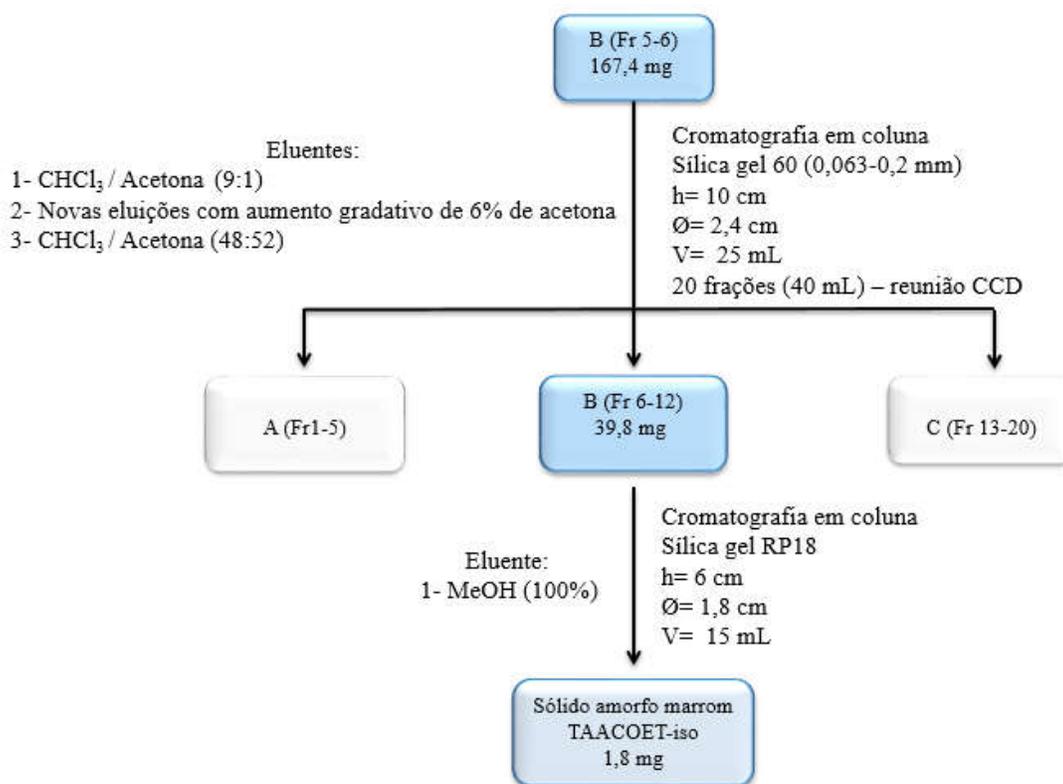


Realizou-se novo fracionamento em coluna aberta 1,8 cm  $\times$  40 cm (diâmetro  $\times$  altura) com sílica gel 60 (0,063-0,2 mm, Merck). Utilizaram-se os 167,4 mg das frações reunidas 5 a 6 e quantidade de sílica suficiente para obter 10 cm de altura de sílica empacotada na coluna. A coluna foi eluída inicialmente com 25 mL do sistema clorofórmio:acetona (9:1), sendo feitas novas eluições aumentando-se gradativamente a polaridade do eluente em 6% de acetona até alcançar clorofórmio:acetona (48:52). Obtiveram-se 20 frações de 40 mL cada reunidas em 3 grupos (Figura 12).

Com as frações reunidas 6 a 12 (39,8mg) fez-se uma nova cromatografia em coluna aberta de 1,8 cm  $\times$  40 cm (diâmetro  $\times$  altura) e utilizando quantidade de sílica

fase reversa (RP18, MERCK) suficiente para obter 6 cm de altura de sílica empacotada na coluna. Eluiu-se a mesma apenas com metanol, e após o procedimento, obteve-se 1,8 mg de um sólido amorfo e de coloração marrom/laranja, codificado como TAACOET-iso (Figura 12).

Figura 12. Fluxograma do fracionamento das frações do extrato acetato de etila (TAACOET) das partes aéreas por cromatografia em coluna aberta



#### 4.10. Metodologia para avaliação antimalárica *in vitro* dos extratos e substâncias isoladas de *A. leucostachyus*

As técnicas empregadas para o ensaio antimalárico *in vitro* foram o cultivo contínuo de *P. falciparum* (TRAGER e JENSEN, 1976), sincronização dos parasitos no estágio trofozoíto (LAMBROS e VANDERBERG, 1979) e avaliação por microteste (RIECKMANN *et al.*, 1978). Para o cultivo, utilizaram-se cepas K1 de *P. falciparum* (cloroquina-resistentes).

Para a realização do ensaio seguiu-se a metodologia descrita em Andrade-Neto (2007), na qual parasitos foram cultivados e sincronizados no estágio trofozoíto na concentração de 1-2% e hematócrito de 2%, sendo então encubados por 48 h a 37°C em microplacas de 96 poços contendo os extratos e substâncias isoladas (diluídos em DMSO e meio completo para concentrações ideais de teste). Após a incubação, fez-se a avaliação do conteúdo dos poços por microscopia óptica e determinou-se o percentual de inibição do crescimento do parasito pela comparação entre a parasitemia nos poços controle sem amostra e a parasitemia nos poços com extratos e substâncias. A fórmula do percentual de inibição do crescimento do parasito encontra-se abaixo:

$$\text{Percentual de inibição (\%)} = 100 \times (\text{parasitemia controle} - \text{parasitemia amostra}) \div \text{parasitemia controle}$$

Na etapa de triagem, os extratos e substâncias foram testadas nas concentrações finais de 50 e 5µg/mL. Para determinação da atividade antimalárica *in vitro* dos extratos e substâncias foram considerados “ativos” os extratos ou substâncias com valores de

percentual de inibição entre 80 a 100% na concentração de 50  $\mu\text{g/mL}$ ; “parcialmente ativos”, os com valores entre 50 a 79%, e “inativos”, com valores menores que 50%.

Após a triagem em 50 e 5 $\mu\text{g/mL}$ , os extratos e substâncias considerados ativos ou parcialmente ativos são novamente avaliados aplicando-se os mesmos procedimentos descritos acima, porém em 7 concentrações. Os resultados são então adicionados ao software Microcal Origin, o qual calcula a concentração que inibe em 50% o crescimento do parasito ( $\text{CI}_{50}$ ). Os valores de  $\text{CI}_{50}$  são classificados quanto sua atividade antimalárica em “muito ativo”, para substâncias e extratos com valores de  $\text{CI}_{50}$  menor que 0,1  $\mu\text{g/mL}$ ; “ativo”, com valores de  $\text{CI}_{50}$  entre 0,1 até 5  $\mu\text{g/mL}$ ; “Moderadamente ativo”, valores de  $\text{CI}_{50}$  entre 5 até 10  $\mu\text{g/mL}$ , e “inativo”, para valores de  $\text{CI}_{50}$  maiores que 10  $\mu\text{g/mL}$

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Rendimento e teor extrativo

Os rendimentos e teores extrativos obtidos nas extrações em pequena e maior escala de parte aérea e raiz (Tabelas 5 e 6), juntamente com a equação para o cálculo de rendimento encontram-se logo abaixo:

$$\text{Rendimento (\%)} = 100 \times \text{massa do extrato (g)} \div \text{massa do material vegetal (g)}$$

Tabela 5. Rendimento das extrações da parte aérea das raízes em pequena escala empregando-se maceração com auxílio de banho de ultrassom

Parte	Solvente	Código	Material vegetal (g)	Massa do extrato (mg)	Rendimento (%)
Aéreas	Hex	(TAH)	10,1	97,7	1,0
	AcOEt	(TAC)	4,8	161,7	3,4
	CHCl <sub>3</sub>	(TCL)	4,4	33,1	0,7
	MeOH	(TACME)	4,5	223,9	5,0
	MeOH	(TCLME)	4,2	204,1	4,9
Raízes	Hex	(TRH)	10,1	48,3	0,5
	AcOEt	(TRAC)	5,1	29,3	0,6
	CHCl <sub>3</sub>	(TRCL)	4,6	20,5	0,4

Legendas: Hex: hexano; AcOEt: acetato de etila; CHCl<sub>3</sub>: clorofórmio; MeOH: metanol.

Tabela 6. Rendimento das extrações da parte aérea das raízes em maior escala empregando-se maceração com auxílio de banho de ultrassom.

Parte	Solvente	Código	Material vegetal (g)	Massa do extrato (g)	Rendimento (%)
Aéreas	Hex	(TAHEX)	580,1	5,8	1,0
	AcOEt	(TAACOET)	560,7	10,7	1,9
	MeOH *	(TAACMEOH)	551,9	17,1	3,1
Raízes	Hex	(TRHEX)	132,6	1,0	0,7

Legendas: \*: não exaurido; Hex: hexano; AcOEt: acetato de etila; MeOH: metanol.

Os rendimentos dos extratos metanólicos das raízes e das partes aéreas tanto na pequena extração como na maior escala são os que apresentaram melhores valores de rendimento, contudo todos os extratos obtidos possuem rendimentos baixos.

## 5.2. Identificação de mistura de estigmasterol e sitosterol obtidos no fracionamento dos extratos hexânicos das partes aéreas e das raízes

O fracionamento cromatográfico dos extratos hexânicos de raízes e partes aéreas forneceram substâncias codificadas como TRHEX-iso25 e TAHEX-estig. Ao analisar as duas por CCD (eluente clorofórmio 100%) observou-se que ambas possuem o mesmo fator de retenção ( $R_f$ ) de 0,3, sugerindo que ambas possuem as mesmas substâncias.

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (Anexos 4 e 5) e DEPT 135° (Anexos 10 e 11) das amostras apresentaram perfis espectrais muitíssimo semelhantes, corroborando que TRHEX-iso25 e TAHEX-estig são as mesmas substâncias, diferindo apenas que o TAHEX-estig apresentasse com maior pureza.

O espectro de massas de alta resolução (EMAR) de TAHEX-estig (Figura 13) exibiu dois picos, demonstrando mistura de 2 substâncias, o primeiro pico com  $m/z$  397,3818, consistente com uma fórmula  $[\text{M} - \text{H}_2\text{O} + \text{H}]$  de  $\text{C}_{29}\text{H}_{49}$ , assim a primeira substância deverá possuir fórmula  $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}$ , e o segundo pico com  $m/z$  395,3666, consistente com uma fórmula  $[\text{M} - \text{H}_2\text{O} + \text{H}]$  de  $\text{C}_{29}\text{H}_{47}$ , de modo que a segunda substância deverá possuir fórmula  $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}$ .

Os espectros de  $^1\text{H}$  de TAHEX-estig e TRHEX-iso25 revelam um conjunto de sinais na região de  $\delta$  0,67 a 2,3 ppm indicando a presença de hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos, típicos de estrutura terpênica (Anexos 4 e 5). Observa-se o sinal em  $\delta$  0,67 ppm (3H, s), característico dos hidrogênios da metila na posição 18 do sitosterol, e outro sinal em  $\delta$  0,69 ppm (3H, s), referente aos hidrogênios de metila na posição 18 do estigmasterol. Observa-se também dois sinais característicos dos hidrogênios de carbonos olefínicos das posições 22 e 23 do estigmasterol em  $\delta$  5,01

ppm (1H,  $dd = 18,5; 8,3$  Hz) e em  $\delta$  5,14 ppm (1H,  $dd = 18,5; 8,3$  Hz). Verifica-se sinais comuns tanto para o estigmasterol quanto para o sitosterol em  $\delta$  1,00 ppm (6H,  $s$ ), pertencente aos hidrogênios da metila na posição 19, outro sinal em  $\delta$  3,52 ppm (2H,  $m$ ), referente ao hidrogênio carbinólico na posição 3, e o sinal em  $\delta$  5,35 ppm (2H,  $d, J = 5,1$  Hz), característico do hidrogênio de carbono olefínico na posição 6 (KOJIMA *et al.*, 1990; PIERRE e MOSES, 2015) (Anexos 7, 8 e 9).

No espectro de DEPT 135° de TRHEX-iso25 e TAHEX-estig observaram-se os sinais em  $\delta$  129,3 (CH<sub>2</sub>) e  $\delta$  138,3 (CH<sub>2</sub>), característicos de carbonos olefínicos presentes nas posições C-23 e C-22 do estigmasterol, além dos sinais em  $\delta$  26,0 e  $\delta$  33,9, característicos de carbonos metilênicos presentes nas posições C-23 e C-22 do sitosterol (Anexos 12 a 13). Os RMN de <sup>13</sup>C e DEPT 135° da amostra TAHEX-estig (Anexos 16 e 10) foram comparados com a literatura (KOJIMA *et al.*, 1990), confirmando a presença da mistura de sitosterol e estigmasterol (Tabela 7).

Figura 13. EMAR de TAHEX-estig

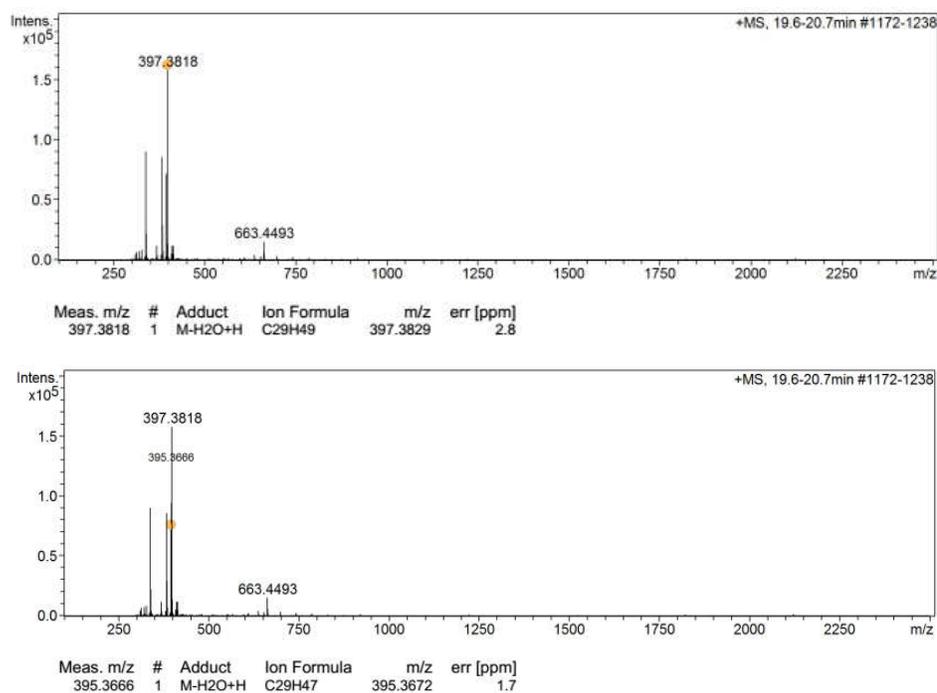


Tabela 7. Comparação dos dados de RMN  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135° de TAHEX-estig com os descritos na literatura para estigmasterol e sitosterol

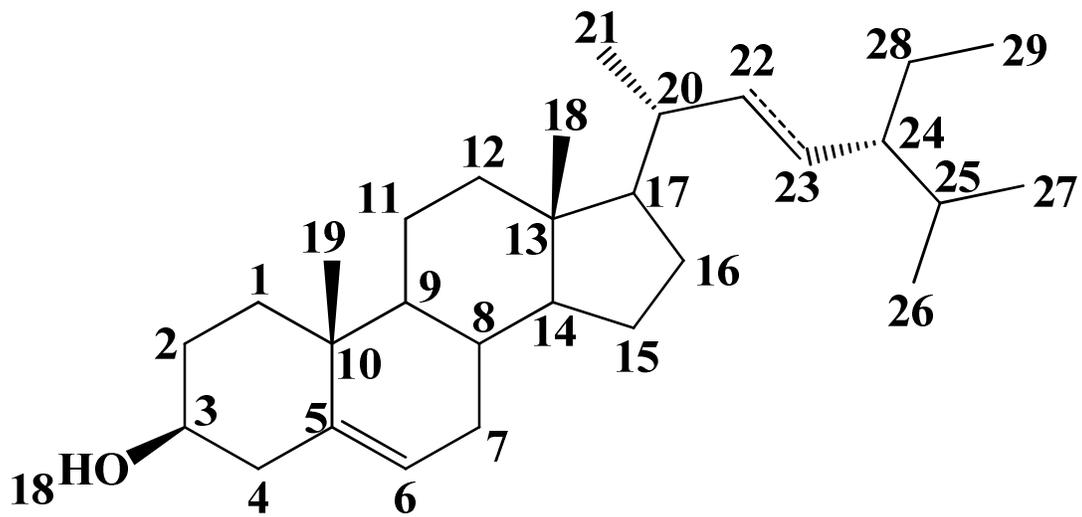
C	DEPT 135°	TAHEX-estig		(Kojima et al.,1990)	
		Sitosterol	Estigmasterol	Sitosterol	Estigmasterol
		$\delta^{13}\text{C}^{\text{a}}$		$\delta^{13}\text{C}^{\text{b}}$	
1	CH <sub>2</sub>		37,2		37,2
2	CH <sub>2</sub>		31,6		31,6
3	CH		71,8		71,8
4	CH <sub>2</sub>		42,3		42,3
5	C		140,8		140,7
6	CH		121,7		121,7
7	CH <sub>2</sub>		31,9		31,9
8	CH		31,9		31,9
9	CH		50,1		50,1
10	C		36,5		36,5
11	CH <sub>2</sub>		21,1		21,1
12	CH <sub>2</sub>	39,8	39,7	39,8	39,7
13	C	42,2	42,2	42,3	42,2
14	CH	56,9	56,8		56,8
15	CH <sub>2</sub>	24,3	24,4	24,3	24,4
16	CH <sub>2</sub>	28,3	28,9	28,2	28,9
17	CH	56,0	55,9	56,0	55,9
18	CH <sub>3</sub>	11,9	12,0	11,9	12,0

Tabela 7. Continuação

		TAHEX-estig		(Kojima <i>et al.</i> ,1990)	
		Sitosterol	Estigmasterol	Sitosterol	Estigmasterol
C	DEPT 135°	$\delta^{13}\text{C}^{\text{a}}$		$\delta^{13}\text{C}^{\text{b}}$	
19	CH <sub>3</sub>	19,4		19,4	
20	CH	36,2	40,5	36,1	40,5
21	CH <sub>3</sub>	18,8	21,2	18,8	21,2
<b>22</b>	CH <sub>2</sub> / CH	33,9	138,3	33,9	138,3
<b>23</b>	CH <sub>2</sub> / CH	26,0	129,3	26,0	129,2
24	CH	45,8	51,2	45,8	51,2
25	CH	29,1	31,9	29,1	31,9
26	CH <sub>3</sub>	19,8	21,1	19,8	21,1
27	CH <sub>3</sub>	19,0		19,0	
28	CH <sub>2</sub>	23,0	25,4	23,0	25,4
29	CH <sub>3</sub>	12,1	12,3	12,0	12,3

<sup>a</sup> Espectro obtido com CDCl<sub>3</sub>,75 MHz; <sup>b</sup> Espectro obtido com CDCl<sub>3</sub> 100 MHz

Figura 14. Estrutura dos esteróides estigmasterol e sitosterol



C<sub>22</sub>-C<sub>23</sub> (ligação simples) Sitosterol

C<sub>22</sub>-C<sub>23</sub> (dupla ligação) Estigmasterol

### 5.3. Ácido (*E*)-3-(2,3,6-trimetoxifenil) acrílico obtido pelo fracionamento do extrato acetato de etila da parte aérea

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) da amostra TAACOET-iso, observam-se 3 sinais de hidrogênios de metoxilas quase sobrepostos em aproximadamente  $\delta$  3,84-3,86 ppm (9H, *s*), além de sinais na região de aromáticos em  $\delta$  6,61 (1H, *d*,  $J = 9,1$  Hz),  $\delta$  6,92 (1H, *d*,  $J = 9,1$  Hz) e  $\delta$  6,97 ppm (1H, *d*,  $J = 16,3$  Hz) e 1 sinal deslocado em  $\delta$  8,13 ppm (1H, *d*,  $J = 16,3$  Hz) (Anexo 17). O experimento  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY apresentou as correlações entre o sinal em  $\delta$  6,61 com  $\delta$  6,92 ppm, e entre o sinal  $\delta$  6,97 com  $\delta$  8,12 ppm (Anexos 21, 22 e 23).

O espectro de TAACOET-iso apresenta 12 sinais, sendo 3 na região dos carbonos carbinólicos, 8 de carbonos olefínicos ou aromáticos e 1 de grupo carbonila. No DEPT 135° observaram-se 7 sinais positivos ( $\text{CH}_3$  e CH), sendo 3 referentes às metoxilas e 4 característicos de carbonos aromáticos ou carbonos olefínicos em  $\delta$  105,7,  $\delta$  115,0,  $\delta$  120,9 e  $\delta$  138,0 ppm. Analisando os dados de  $^{13}\text{C}$  (Anexos 24 e 25) e DEPT 135° (Anexos 26 e 27) é possível confirmar 5 carbonos quaternários em  $\delta$  111,7,  $\delta$  147,0,  $\delta$  150,0,  $\delta$  153,8 e  $\delta$  172,6 ppm.

O espectro de massas de alta resolução da substância (EMAR) de TAACOET-iso (Figura 15) exibiu um íon com  $m/z$  239,0917, consistente com uma fórmula  $[\text{M} + \text{H}]$  de  $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{O}_5$ , assim a substância deverá possuir fórmula  $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_5$ . Com a fórmula apresentada pelo EMAR e os dados de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135° foi possível sugerir duas estruturas (Figura 16), ambas contendo um anel aromático apresentando 3 metoxilas e dois hidrogênios vicinais, além de um radical contendo um grupo carboxila ( $\delta$  172,6 ppm) e dois hidrogênios vicinais de carbonos olefínicos.

Figura 15. EMAR de TAACOET-iso

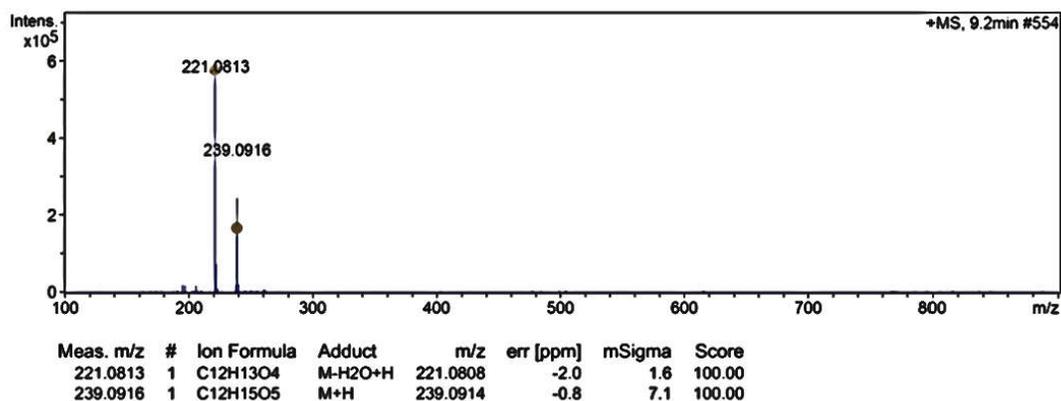
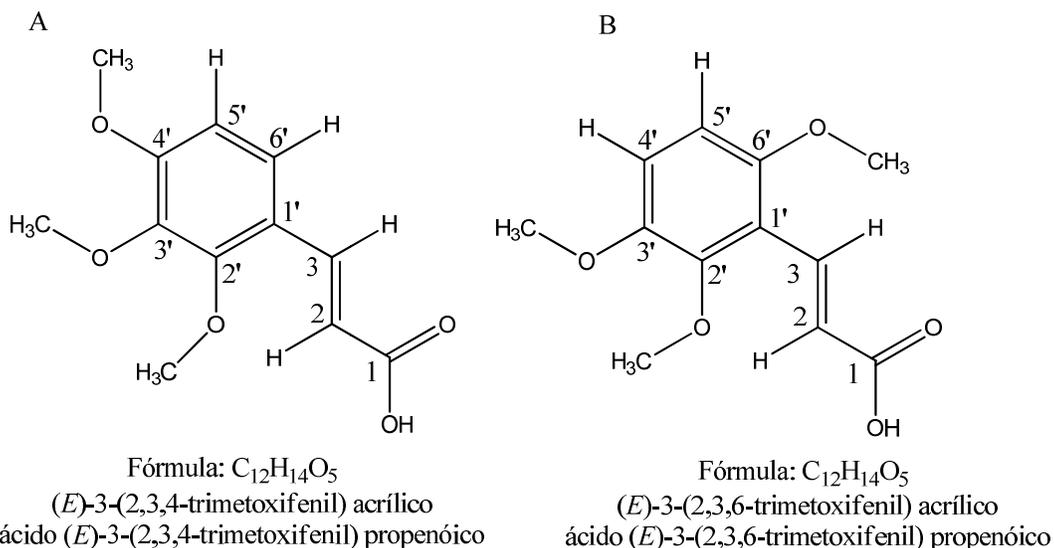


Figura 16. Possíveis estruturas para a substância TAACOET-iso



A estrutura “A” é conhecida como ácido (*E*)-3-(2,3,4-trimetoxifenil) acrílico ou ácido (*E*)-3-(2,3,4-trimetoxifenil) propenóico, com espectro de <sup>1</sup>H bem definido na literatura com 3 sinais de metoxilas em δ 3,88 (3H, *s*), δ 3,91 (3H, *s*) e δ 3,94 ppm (H, *s*), outros 2 sinais em δ 6,41-6,46 (1H, *d*, H-2, *J* = 16,1 Hz) e δ 7,95-8,01 ppm (1H, *d*, H-3, *J* = 16,1 Hz), com valores típicos de <sup>3</sup>*J*<sub>trans</sub> de hidrogênios vinílicos, além de 2 sinais em δ 6,69-6,72 ppm (1H, *d*, H-5', *J* = 8,8 Hz) e δ 7,28-7,31 (1H, *d*, H-6', *J* = 8,8 Hz), com valores típicos de <sup>3</sup>*J*<sub>orto</sub> de carbonos aromáticos (SRIVASTAVA *et al.*, 2007).

Observa-se que a substância TAACOET-iso possui os sinais em  $\delta$  6,97 (1H, *d*,  $J = 16,3$  Hz) e  $\delta$  8,13 ppm (1H, *d*,  $J = 16,3$  Hz), com valores típicos de  ${}^3J_{\text{trans}}$  de hidrogênios vinílicos, os quais são semelhantes aos sinais em  $\delta$  6,41-6,46 (1H, *d*, H-2,  $J = 16,1$  Hz) e  $\delta$  7,95-8,01 ppm (1H, *d*, H-3,  $J = 16,1$  Hz) descritos na literatura para o ácido (*E*)-3-(2,3,4-trimetoxifenil) propenóico, permitindo assim definir as posições de H-2 para o hidrogênio em  $\delta$  6,97 ppm e de H-3 para o hidrogênio em  $\delta$  8,13 ppm.

No mapa de contorno HSQC observa-se o hidrogênio  $\delta$  6,97 ppm correlacionando em  ${}^1J$  com o carbono  $\delta$  120,9 (C-2) (Anexos 30 e 32) e a longa distância (HMBC) com os carbonos em  $\delta$  172,6 (C-1) e  $\delta$  117,7 ppm (C-1') (Anexos 33 e 35), enquanto o hidrogênio  $\delta$  8,13 ppm correlaciona-se em  ${}^1J$  com o carbono  $\delta$  138,0 ppm (C-3) (Anexos 30 e 32) e a longa distância (HMBC) com os carbonos em  $\delta$  120,9 (C-2),  $\delta$  150,0 (C-2'),  $\delta$  153,8 (C-6') e  $\delta$  172,6 ppm (C-1) (Tabela 8, Anexos 33 e 36).

Observa-se através dos mapas de contorno HSQC (Anexo 30) apenas 2 sinais para os hidrogênios das metoxilas em  $\delta$  3,84 e 3,85 ppm, os quais correlacionam em  ${}^1J$  com os carbonos  $\delta$  55,9 e 61,0 ppm, respectivamente (Tabela 8, Anexo 31) e a longa distância (HMBC) com os carbonos em  $\delta$  147,0 (C-3') e  $\delta$  153,8 ppm (C'-6) (Tabela 8; Anexos 33 e 34), enquanto o hidrogênio  $\delta$  3,86 ppm correlaciona-se apenas a longa distância (HMBC) com o carbono  $\delta$  150,0 ppm (C-2') (Tabela 8; Anexos 33 e 34).

Os hidrogênios  $\delta$  6,61 (1H, *d*,  $J = 9,1$  Hz) e  $\delta$  6,92 ppm (1H, *d*,  $J = 9,09$  Hz) apresentaram valores típicos de  ${}^3J_{\text{orto}}$  de hidrogênios aromáticos arílicos. No mapa de contorno HSQC observa-se o hidrogênio  $\delta$  6,61 ppm correlacionando em  ${}^1J$  com o carbono  $\delta$  105,7 ppm (C-5') (Anexos 30 e 32) e a longa distância (HMBC) com os carbonos em  $\delta$  117,7 (C-1'),  $\delta$  147,0 (C-3') e  $\delta$  154,0 ppm (C-6') (Anexos 33 e 35), e o hidrogênio  $\delta$  6,92 ppm correlacionando em  ${}^1J$  com o carbono  $\delta$  115,0 ppm (C-4')

(Anexos 30 e 32) e a longa distância (HMBC) com os carbonos em  $\delta$  147,0 (C-3'),  $\delta$  150,0 (C'-2) e  $\delta$  154,0 ppm (C'-6) (Tabela 8; Anexos 33 e 35).

Após determinado todas as correlações HMBC, observa-se que a estrutura "B" é a mais aceitável, isto devido apresentar apenas correlações em  $^2J$  e  $^3J$ , enquanto a estrutura "A" apresentaria correlações  $^2J$  e  $^3J$  e ainda duas correlações em  $^4J$  (Figura 17).

Os dados de NOESY corroboram que a substância TAACOET-iso trata-se da estrutura "B" (Figura 18), referente ao ácido (*E*)-3-(2,3,6-trimetoxifenil) acrílico ou ácido (*E*)-3-(2,3,6-trimetoxifenil) propenóico, uma vez que observa-se o acoplamento espacial  $^1H$ - $^1H$  entre os hidrogênios da metoxila em  $\delta$  3,84 ppm (3'-OCH<sub>3</sub>) com o hidrogênio aromático  $\delta$  6,92 ppm (H-4') e os hidrogênios da metoxila em  $\delta$  3,85 ppm (6'-OCH<sub>3</sub>) com os hidrogênios aromáticos  $\delta$  6,61 ppm (H-5') e  $\delta$  6,97 ppm (H-2), além dos hidrogênios da metoxila  $\delta$  3,86 ppm (2'-OCH<sub>3</sub>) com o hidrogênio  $\delta$  8,13 ppm (H-3).

Quando analisado os acoplamentos espaciais  $^1H$ - $^1H$  de NOESY para a estrutura "A", observasse acoplamentos aparentemente distantes e superiores a 3 ângström entre os hidrogênios da metoxila em  $\delta$  3,85 ppm com o hidrogênio aromático  $\delta$  6,61 ppm, além dos hidrogênios da metoxila em  $\delta$  3,86 ppm com o hidrogênio aromático  $\delta$  8,13 ppm.

Figura 17. Demonstração das correlações observadas no espectro de HMBC aplicando as duas possíveis estruturas para TAACOET-iso

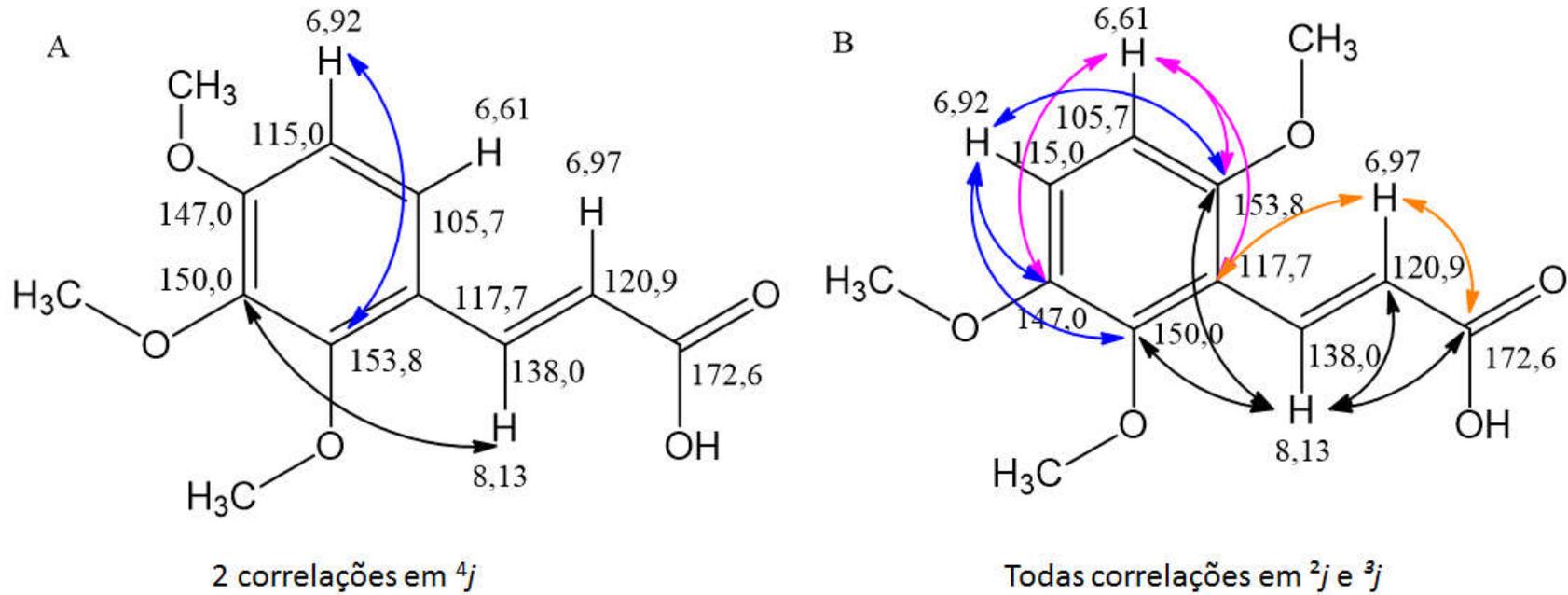
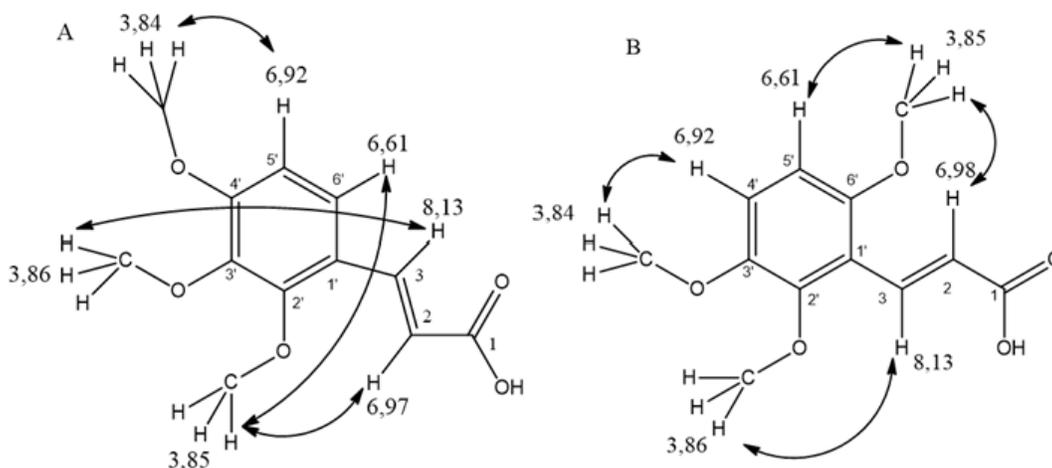


Figura 18. Correlações observadas no espectro de NOESY aplicando as duas possíveis estruturas para TAACOET-iso



A observação de valores diferentes para dados de RMN uni e bidimensional entre o ácido (*E*)-3-(2,3,4-trimetoxifenil) acrílico, substância já descrita na literatura, e a substância TAACOET-iso, corroboram que esta última corresponda ao ácido (*E*)-3-(2,3,6-trimetoxifenil) acrílico. Os dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ -DEPT 135° de TAACOET-iso foram comparados com dados da literatura de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do seu isômero, e para tal comparação, os dados da literatura foram dispostos em função da estrutura de TAACOET-iso, com intuito de facilitar a observação dos valores diferentes para  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  das duas substâncias. (Tabela 8).

Tabela 8. Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ -DEPT 135° de TAACOET-iso e dados da literatura de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do isômero (*E*)-3-(2,3,4-trimetoxifenil) acrílico, com valores dispostos em função da estrutura de TAACOET-iso

	TAACOET-iso			Literatura	
	DEPT 135°	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$ (WILEY)	$\delta^1\text{H}$ (SRIVASTAVA <i>et al.</i> , 2007)
1	C	172,6	-	167,8	-
2	CH	120,9	6,97 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 16,26 Hz)	123,0	6,41-6,46 (1H, <i>d</i> , <i>j</i> = 16,08 Hz)
3	CH	138,0	8,13 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 16,26 Hz)	138,2	7,95-8,01 (1H, <i>d</i> , <i>j</i> = 16,08 Hz)
1'	C	117,7	-	120,2	-
2'	C	150,0	-	154,8	-
3'	C	147,0	-	152,4	-
4'	CH	115,0	6,92 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 9,09 Hz)	118,0	7,28-7,31 (1H, <i>d</i> , <i>j</i> = 8,79 Hz)
5'	CH	105,7	6,61 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 9,09 Hz)	108,4	6,69-6,72 (1H, <i>d</i> , <i>j</i> = 8,79 Hz)
6'	C	153,8	-	142,0	-

Tabela 8. Continuação

		TAACOET-iso		Literatura	
	DEPT 135°	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$ (WILEY)	$\delta^1\text{H}$ (SRIVASTAVA <i>et al.</i> , 2007)
2'-OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	56,5	3,86 (3H, <i>s</i> )	56,2	3,94
3'-OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	55,9	3,84 (3H, <i>s</i> )	60,8	3,91
6'-OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	61,0	3,85 (3H, <i>s</i> )	61,8	3,88

#### 5.4. Atividade antimalárica *in vitro* dos extratos e substâncias isolados de *A. leucostachyus*

Dos 7 extratos testados na triagem para avaliação da atividade antimalárica, 4 foram considerados ativos, com valores de inibição do crescimento do parasito maiores que 80% na concentração de 50 µg/mL, os quais são: Extrato hexânico (TAH) e acetato de etila (TAC) das partes aéreas, e extrato clorofórmico (TRCL) e acetato de etila (TRAC) das raízes (Tabela 9).

Os 3 extratos considerados parcialmente ativos, com valores entre 60 a 79% de inibição do parasito na concentração de 50 µg/mL, foram o extrato clorofórmico (TCL) e metanólico (TACME) obtidos do resíduo acetato de etila das partes aéreas, e o extrato hexânico (TRH) das raízes (Tabela 9).

A mistura de estigmasterol e sitosterol (TAHEX-iso25) mostrou-se inativa na triagem, inibindo o crescimento do parasito em apenas de 36,2% na concentração de 50 µg/mL (Tabela 10). Já o ácido (*E*)-3-(2,3,6-trimetoxifenil) acrílico (TAACOET-iso) foi considerado ativo na triagem, com inibição do parasito em 82,5% na concentração de 50 µg/mL, contudo inativo quando calculado seu valor de  $CI_{50}$ , o qual foi 13,5 µg/mL ou 57 µmol (Tabela 10).

Tabela 9. Atividade antimalárica *in vitro* contra *P. falciparum* dos extratos das partes aéreas e raízes de *A. leucostachyus*

Espécie	Parte	Solvente	Código	Cepa <i>P. falciparum</i>	Triagem (% inibição <i>P. falciparum</i> )		
					50 µg/mL	5 µg/mL	CI <sub>50</sub> (µg/mL)
<i>A. leucostachyus</i>	Aéreas	Hex	TAH	K1	80,2	0,0	30,3
		AcOEt	TAC	K1	100,0	78,9	14,3
		CHCl <sub>3</sub>	TCL	K1	79,0	10,0	-
		MeOH	TACME	K1	60,2	24,6	24,6
	Raízes	Hex	TRH	K1	77,1	25,9	-
		AcOEt	TRAC	K1	98,9	10,1	15,8
		CHCl <sub>3</sub>	TRCL	K1	100,0	14,4	29,9

Tabela 10. Atividade antimalárica *in vitro* contra *P. falciparum* das substâncias isoladas de *A. leucostachyus*

Substância	Código	Cepa <i>P. falciparum</i>	Triagem (% inibição <i>P. falciparum</i> )			
					CI <sub>50</sub>	CI <sub>50</sub>
			50 µg/mL	5 µg/mL	(µg/mL)	(µmol)
Ácido (E)-3-(2,3,6-trimetoxifenil) acrílico	TAACOET-iso	K1	82,5	25,3	13,5	57
Estigmasterol + sitosterol	TRHEX-iso25	K1	36,2	1,3	>50	-

## 6. CONCLUSÃO

Este trabalho vem a contribuir com o conhecimento químico de *A. leucostachyus*, sendo a primeira descrição de isolamento da substância ácido (*E*)-3-(2,3,6-trimetoxifenil) acrílico e da mistura de estigmasterol e sitosterol na espécie.

Os extratos acetato de etila das raízes e partes aéreas foram os mais ativos nos testes antimaláricos *in vitro* contra *P. falciparum*, inibindo na triagem em 98,9 e 100% o crescimento do parasita quando empregado a concentração de 50 µg/mL, e apresentando valores de  $CI_{50}$  de 15,8 e 14,3 µg/mL, respectivamente.

O ácido (*E*)-3-(2,3,6-trimetoxifenil) acrílico não foi considerado ativo, uma vez que seu valor de  $CI_{50}$  foi de 13,5 µg/mL ou 57 µmol, contudo a classe de derivados do ácido cinâmico é bastante promissora, existindo estudos de ensaios antimaláricos e síntese de substâncias a partir do ácido cinâmico para o desenvolvimento de novos candidatos antimaláricos.

Observou-se também que tanto os extratos hexânicos de raízes quanto de partes aéreas possuem os esteróides estigmasterol e sitosterol, porém a mistura das duas substâncias não obteve atividade significativa na triagem *in vitro* contra *P. falciparum*, inibindo o crescimento do parasito em apenas 36,2% quando empregado a concentração de 50 µg/mL.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHAN, J. et al. Quinine, an old anti-malarial drug in a modern world: role in the treatment of malaria. **Malar J**, v. 10, p. 144, 2011.

AGRA, M. D. F. et al. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Rev Bras Farmacog**, v. 18, p. 472-508, 2008.

AJIBESIN, K. K. et al. Ethnobotanical survey of Akwa Ibom State of Nigeria. **J Ethnopharmacol**, v. 115, n. 3, p. 387-408, 2008.

AKONO NTONGA, P. et al. Activity of *Ocimum basilicum*, *Ocimum canum*, and *Cymbopogon citratus* essential oils against *Plasmodium falciparum* and mature-stage larvae of *Anopheles funestus* s.s. **Parasite**, v. 21, n. 33, p. 1-8, 2014.

ALBUQUERQUE, U. P. et al. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. **J Ethnopharmacol**, v. 114, n. 3, p. 325-54, 2007.

ANDRADE-NETO, V. F. et al. In vitro inhibition of *Plasmodium falciparum* by substances isolated from Amazonian antimalarial plants. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 102, 2007.

BARROS, M. P. et al. Evaluation of antiulcer activity of the main phenolic acids found in Brazilian Green Propolis. **J Ethnopharmacol**, v. 120, n. 3, p. 372-377, 2008.

BOURDY, G. et al. Medicinal plants uses of the Tacana, an Amazonian Bolivian ethnic group. **J Ethnopharmacol**, v. 70, n. 2, p. 87-109, 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Ações de controle da malária: manual para profissionais de saúde na atenção básica. 1 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. (Série A. Normas e manuais técnicos).

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Diretoria Técnica de Gestão. Boletim epidemiológico: Situação epidemiológica da malária no Brasil, ano de 2007. Brasília: Ministério da Saúde, 2008.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim epidemiológico: Situação epidemiológica da malária no Brasil, 2000 a 2011. Brasília: Ministério da Saúde, 2013. v. 44.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. Guia de vigilância em saúde. 1 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica-Malária. Resumo epidemiológico por local de notificação na região endêmica, entre janeiro a maio de 2015. Brasília: Ministério da Saúde, 2015. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br>>. Acesso em: 29 mai, 2015.

BREITMAIER, E. Terpenes: Importance, general structure, and biosynthesis. **Terpenes: Flavors, Fragrances, Pharmaca, Pheromones**, p. 1-9, 2006.

CAMPBELL, C. S. *Andropogon* L. In: BARKWORTH, M. E; CAPELS, K. M., *et al* (Ed.). **Flora of North America. North of Mexico. Magnoliophyta: Commelinidae (in part): Poaceae (part 2)**. New York: Oxford University Press, v.25, 2003.

CARVALHO, S. A. et al. Synthesis and antimycobacterial evaluation of new trans-cinnamic acid hydrazide derivatives. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 18, n. 2, p. 538–541, 2008.

CLARKSON, C. et al. *In vitro* antiplasmodial activity of medicinal plants native to or naturalised in South Africa. **J Ethnopharmacol**, v. 92, n. 2-3, p. 177-91, 2004.

CLAYTON, W. D.; RENVOIZE, S. A. Genera Graminum. Grasses of the world. **Kew Bulletin Additional Series**, v. 13, 1986.

CLAYTON, W. D. et al. *Andropogon leucostachyus*. **GrassBase - The Online World Grass Flora**, 2006. Disponível em: <<http://www.kew.org/data/grasses-db/www/imp00495.htm>>. Acesso em: 27 jun, 2015.

CORDAIN, L. Cereal grains: humanity's double-edged sword. **World Rev Nutr Diet**, v. 84, p. 19-73, 1999.

COSTA-NETO, E. M. The use of medicinal plant resources in Retirolandia, State of Bahia, Brazil. **Actual Biol**, v. 21, n. 71, p. 97-109, 1999.

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

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochim Biophys Acta**, v. 1830, n. 6, p. 3670-3695, 2013.

DE, P.; BALTAS, M.; BEDOS-BELVAL, F. Cinnamic acid derivatives as anticancer agents-a review. **Curr med chem**, v. 18, n. 11, p. 1672–1703, 2011.

ESMAEILI, S. et al. Antiplasmodial activity and cytotoxicity of plants used in traditional medicine of Iran for the treatment of fever. **Iran J Pharm Res**, v. 14, n. Suppl, p. 103-107, 2015.

ETTEBONG, E. O.; NWAFOR, P. A.; OKOKON, J. E. *In vivo* antiplasmodial activities of ethanolic extract and fractions of *Eleusine indica*. **Asian Pac J Trop Med**, v. 5, n. 9, p. 673-676, 2012.

FAO. Staple foods: What do people eat? In: (Ed.). **Dimensions of need: An atlas of food and agriculture**. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1995.

\_\_\_\_\_. **FAO Statistical yearbook 2013 - World food and agriculture**. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations 2013.

FILGUEIRAS, T. S. et al. Poaceae. **Lista de espécies da flora do Brasil**, 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB193>>. Acesso em: 20 jul, 2015.

FOSSEN, T. et al. Anthocyanins of grasses. **Biochem Syst Ecol**, v. 30, n. 9, p. 855-864, 2002.

FRANÇA, T. C. C.; SANTOS, M. G. D.; FIGUEROA-VILLAR, J. D. Malária: aspectos históricos e quimioterapia. **Quim Nova**, v. 31, p. 1271-1278, 2008.

GANJEWALA, D. *Cymbopogon* essential oils: chemical compositions and bioactivities. **Int J Essent Oil Ther**, v. 3, n. 2-3, p. 56-65, 2009.

GIBSON, D. J. **Grasses and grassland ecology**. New York: Oxford University Press, 2009.

GOLENIOWSKI, M. et al. Phenolic acids. In: **Natural Products**: Springer, 2013. p. 1951–1973.

GOMAA, N.; ABDELGAWAD, H. Phytotoxic effects of *Echinochloa colona* (L.) Link.(Poaceae) extracts on the germination and seedling growth of weeds. **Span J Agric Res**, v. 10, n. 2, p. 492-501, 2012.

GPWG et al. Phylogeny and subfamilial classification of the grasses (Poaceae). **Ann Missouri Bot Gard**, v. 88, n. 3, p. 373-457, 2001.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Flavonoid patterns in leaves of the gramineae. **Biochem Syst Ecol**, v. 4, n. 4, p. 267-280, 1976.

HIRUMA-LIMA, C. A. et al. Parte I: Monocotiledonae medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica: Commelinidae medicinais. In: DI STASI, L. C. e HIRUMA-LIMA, C. A. (Ed.). **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2. São Paulo: Editora Unesp, 2002. p.41-51.

HYUN, J. W.; CHUNG, H. S. Cyanidin and malvidin from *Oryza sativa* cv. Heugjinjubyeo mediate cytotoxicity against human monocytic leukemia cells by arrest of G2/M phase and induction of apoptosis. **J Agric Food Chem**, v. 52, n. 8, p. 2213-2217, 2004.

KOJIMA, H. et al. Sterol glucosides from *Prunella vulgaris*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 7, p. 2351-2355, 1990.

KOMLAGA, G. **Search for antiplasmodial compounds from Ghanaian medicinal plants**. 2015. Tese de Doutorado (Tese de Doutorado). Université Paris-Saclay

KOUDOUVO, K. et al. An ethnobotanical study of antimalarial plants in Togo maritime region. **J Ethnopharmacol**, v. 134, p. 183-190, 2011.

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and biological activities of flavonoids: An overview. **Sci World J**, v. 2013, p. 1-16, 2013.

LAMBROS, C.; VANDERBERG, J. P. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. **J Parasitol**, v. 65, n. 3, p. 418-20, 1979.

LIMA, R. B. S. et al. *In vitro* and *in vivo* anti-malarial activity of plants from the Brazilian Amazon. **Malar J**, v. 14, n. 1, p. 1-14, 2015.

MELARIRI, P. et al. *In vitro* and *in vivo* antiplasmodial activities of extracts of *Cymbopogon citratus* Staph and *Vernonia amygdalina* Delile leaves. **J Nat Prod**, v. 4, p. 164-172, 2011.

MESSIAS, M. C. T. B. et al. Uso popular de plantas medicinais e perfil socioeconômico dos usuários: um estudo em área urbana em Ouro Preto, MG, Brasil. **Rev Bras Plantas Med**, v. 17, p. 76-104, 2015.

MONTOIA, A. et al. Antiplasmodial activity of synthetic ellipticine derivatives and an isolated analog. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 24, 2014.

MORGAN, E. E.; PERRY, J. E. Traditional medicinal plant use among Virginia's Powhatan Indians. **Banisteria**, n. 35, p. 11-31, 2010.

MUJTABA SHAH, G. et al. Traditional uses of medicinal plants against malarial disease by the tribal communities of Lesser Himalayas-Pakistan. **J Ethnopharmacol**, v. 155, n. 1, p. 450-462, 2014.

MUÑOZ, V. et al. The search for natural bioactive compounds through a multidisciplinary approach in Bolivia. Part II. Antimalarial activity of some plants used by Mosekene indians. **J Ethnopharmacol**, v. 69, n. 2, p. 139-155, 2000.

NADEMBEGA, P. et al. Medicinal plants in Baskoure, Kourittenga Province, Burkina Faso: an ethnobotanical study. **J Ethnopharmacol**, v. 133, n. 2, p. 378-395, 2011.

NAGAHAMA, N.; NORRMANN, G. A. Review of the genus *Andropogon* (Poaceae: Andropogoneae) in America based on cytogenetic studies. **Am J Bot**, v. 2012, p. 1-9, 2012.

NANJUNDAIAH, S. M.; ANNAIAH, H. N. M.; DHARMESH, S. M. Gastroprotective effect of ginger rhizome (*Zingiber officinale*) Extract: Role of gallic acid and cinnamic acid in H(+), K(+)-ATPase/*H. pylori* inhibition and anti-oxidative mechanism. **Evidence-based complementary and alternative medicine: ECAM**, v. 2011, p. 1-13, 2011.

NEVES, D. P. et al. **Parasitologia humana**. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2010.

OKOKON, J. E.; NWAFOR, P. A.; ANDREW, U. E. Antimalarial and analgesic activities of ethanolic leaf extract of *Panicum maximum*. **Asian Pac J Trop Med**, v. 4, n. 6, p. 442-446, 2011.

OKOKON, J. E.; UBULOM, P. M.; UDOKPOH, A. E. Antiplasmodial activity of *Setaria megaphylla*. **Phytother Res**, v. 21, n. 4, p. 366-368, 2007.

PÉREZ, B. et al. Cinnamic acid/chloroquinoline conjugates as potent agents against chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum*. **Chem Med Chem**, v. 7, n. 9, p. 1537–1540, 2012.

PETERSON, P. M. Poaceae (Gramineae). In: (Ed.). **eLS**: John Wiley & Sons, Ltd, 2013.

PIERRE, L. L.; MOSES, M. N. Isolation and characterisation of Stigmasterol and B-Sitosterol from *Odontonema Strictum* (Acanthaceae). **Int J I Pharm Bio Sci**, v. 2, n. 1, p. 88-96, 2015.

RAGASA, C. Y.; CHUA, A. P. U.; SHEN, C.-C. Chemical constituents of *Schizostachyum lumampao*. **J Chem Pharm Res**, v. 6, n. 4, p. 738-742, 2014.

RANDRIANARIVELOJOSIA, M. et al. Plants traditionally prescribed to treat tazo (malaria) in the eastern region of Madagascar. **Malar J**, v. 2, p. 1-9, 2003.

RIECKMANN, K. H. et al. Drug sensitivity of *Plasmodium falciparum*. An *in-vitro* microtechnique. **Lancet**, v. 1, n. 8054, p. 22-23, 1978.

ROCHA E SILVA, L. F. et al. *In vivo* antimalarial activity and mechanisms of action of 4-nerolidylcatechol derivatives. **Antimicrob Agents Chemother**, 2015.

SALEH, N. A. M.; NOZZOLILLO, C.; ALTOSAAR, I. Flavonoid variations in *Avena* species. **Biochem Syst Ecol**, v. 16, n. 7, p. 597-599, 1988.

SEIGLER, D. S. **Plant secondary metabolism**. Springer Science & Business Media, 2012.

SHANTZ, H. L. The place of grasslands in the earth's cover. **Ecology**, v. 35, n. 2, p. 143-145, 1954.

SNEADER, W. **Drug Discovery: A History**. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, 2005.

SORENG, R. J. et al. A worldwide phylogenetic classification of the Poaceae (Gramineae). **J Syst Evol**, v. 53, n. 2, p. 117-137, 2015.

SOVA, M. Antioxidant and antimicrobial activities of cinnamic acid derivatives. **Mini Rev Med Chem**, v. 12, n. 8, p. 749–767, 2012.

SRIVASTAVA, V. et al. Synthesis of diverse analogues of oenostacin and their antibacterial activities. **Bioorganic Med Chem**, v. 15, n. 1, p. 518-525, 2007.

TA, T. H. et al. First case of a naturally acquired human infection with *Plasmodium cynomolgi*. **Malar J**, v. 13, p. 1-7, 2014.

TAXONOMICON. Genus *Plasmodium* Marchiafava & Celli, 1885 (protozoan) - Systema naturae 2000. **The Taxonomicon & Systema Naturae 2000**, 2015a. Disponível em: <<http://taxonomicon.taxonomy.nl/>>. Acesso em: 26 jun, 2015

TAXONOMICON. Genus *Aedes* Meigen, 1818 (fly) - Systema naturae 2000. **The Taxonomicon & Systema Naturae 2000**, 2015b. Disponível em: <<http://taxonomicon.taxonomy.nl/>>. Acesso em: 26 jun, 2015.

\_\_\_\_\_. Genus *Andropogon* L. (1753) (plant) - Systema naturae 2000. **The Taxonomicon & Systema Naturae 2000**, 2015c. Disponível em: <<http://taxonomicon.taxonomy.nl/>>. Acesso em: 27 jun, 2015.

TCHOUMBOUGNANG, F. et al. *In vivo* antimalarial activity of essential oils from *Cymbopogon citratus* and *Ocimum gratissimum* on mice infected with *Plasmodium berghei*. **Planta Med**, v. 71, n. 1, p. 20-23, 2005.

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

W3TROPICOS. *Andropogon leucostachyus* Kunth. **Tropicos Missouri Botanical Garden**, 2015. Disponível em: <<http://www.tropicos.org/Name/25511647>>. Acesso em: 27 jun, 2015.

TU, Y. The discovery of artemisinin (qinghaosu) and gifts from Chinese medicine. **Nat Med**, v. 17, n. 10, p. 1217-1220, 2011.

VALDÉS, A. F.-C. et al. *In vitro* antimalarial activity and cytotoxicity of some selected Cuban medicinal plants. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 52, n. 4, p. 197-201, 2010.

XIONG, L. et al. Structure and bioassay of triterpenoids and steroids isolated from *Sinocalamus affinis*. **J Nat Prod**, v. 75, n. 6, p. 1160-1166, 2012.

WANG, G.; TANG, W.; BIDIGARE, R. R. Terpenoids as therapeutic drugs and pharmaceutical agents. In: (Ed.). **Natural products**: Springer, 2005. p.197-227.

WATSON, L.; DALLWITZ, M. J. **The grass genera of the world**. CAB international, 1992.

WHITE, N. J. Drug resistance in malaria. **Br Med Bull**, v. 54, n. 3, p. 703-715, 1998.

WHITE, N. J. Antimalarial drug resistance. **J Clin Invest**, v. 113, n. 8, p. 1084-1092, 2004.

WHITE, R. P.; MURRAY, S.; ROHWEDER, M. **Pilot Analysis of Global Ecosystems: Grasslands Ecosystems**. Washington: World Resources Institute 2000.

WHO. **Global report on antimalarial drug efficacy and drug resistance: 2000-2010**. Geneva: World Health Organization: 1-121 p. 2010.

\_\_\_\_\_. **Emergence and spread of artemisinin resistance calls for intensified efforts to withdraw oral artemisinin-based monotherapy from the market**. Geneva: World Health Organization 2014a.

\_\_\_\_\_. **World Malaria Report 2014**. Geneva: World Health Organization 2014b.

\_\_\_\_\_. **World Malaria Report 2015**. Geneva: World Health Organisation 2015.

\_\_\_\_\_. **World Malaria Report 2016**. Geneva: World Health Organisation 2016.

\_\_\_\_\_. **World Malaria Report 2017**. Geneva: World Health Organisation 2017.

WILEY. Wiley Subscription Services, Disponível em: < scifinder.cas.org >. Acesso em: 25 nov, 2016.

YETEIN, M. H. et al. Ethnobotanical study of medicinal plants used for the treatment of malaria in plateau of Allada, Benin (West Africa). **J Ethnopharmacol**, v. 146, n. 1, p. 154-163, 2013.

ZAKARIA, D. M. et al. Ethnomedicinal survey of medicinal plants used by folk medical practitioners in four different villages of Gazipur District, Bangladesh. **Adv Nat Appl Sci**, v. 5, n. 4, p. 392-399, 2011.

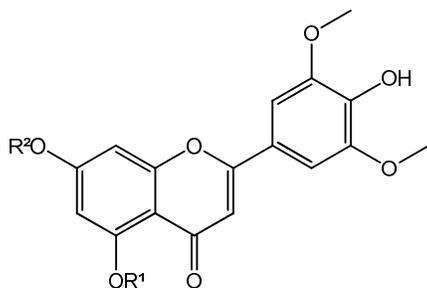
ZANIN, A. *Andropogon*. **Lista de espécies da flora do Brasil**, 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB12955>>. Acesso em: 27 jun, 2015.

ZANIN, A.; LONGHI-WAGNER, H. M. Revisão de *Andropogon* (Poaceae – Andropogoneae) para o Brasil. **Rodriguesia**, v. 62, p. 171-202, 2011.

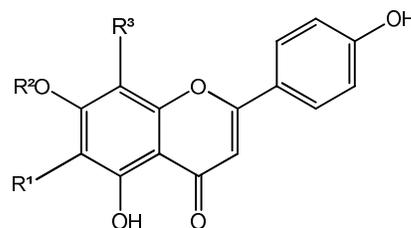
ZHU, L. et al. Isolation and purification of flavonoid glycosides from sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) juice by high-speed counter-current chromatography. **Int Sugar J**, v. 112, n. 1333, p. 1-24, 2010.

## 8. ANEXOS

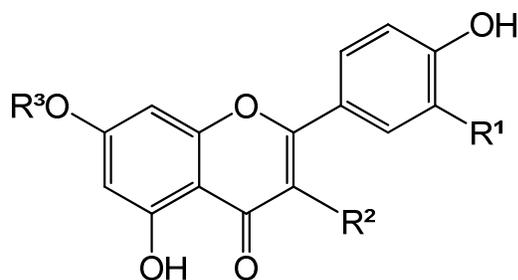
### Anexo 1. Estrutura de alguns flavonóides encontrados em Poaceae



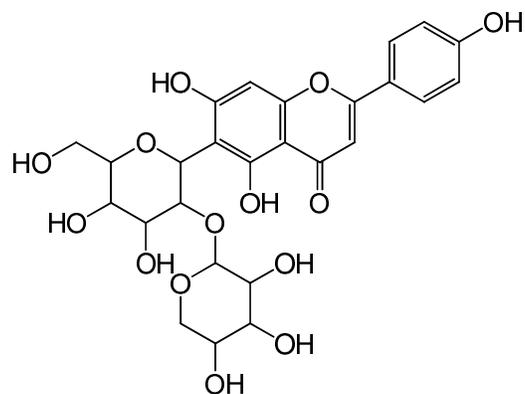
$R^1 = H; R^2 = H$       tricín  
 $R^1 = Glc; R^2 = H$     tricín-5-glicosídeo  
 $R^1 = H; R^2 = Glc$     tricín-7-glicosídeo



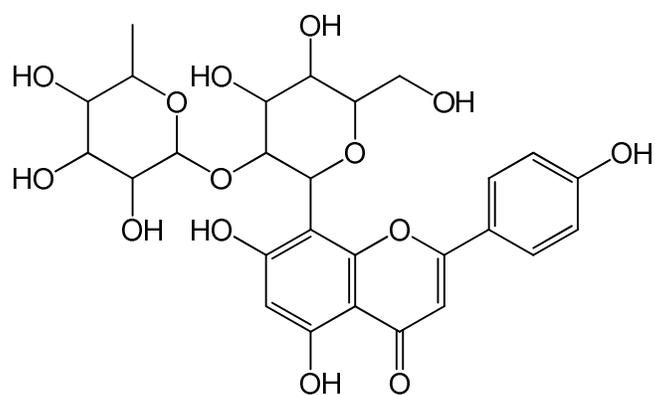
$R^1 = H; R^2 = H; R^3 = H$     apigenina  
 $R^1 = Glc; R^2 = H; R^3 = Arab$     schaftosida  
 $R^1 = Glc; R^2 = CH_3; R^3 = H$     swertisina



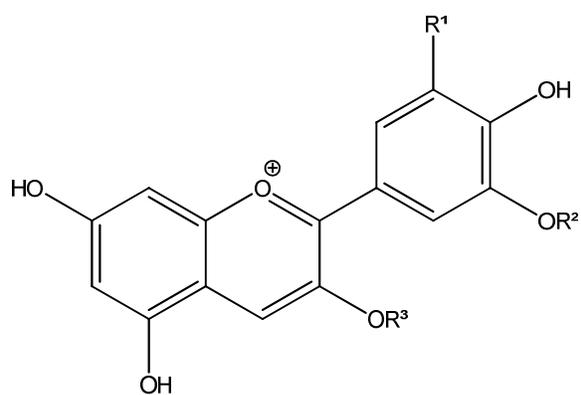
$R^1 = H; R^2 = OH; R^3 = H$       campeferol  
 $R^1 = OH; R^2 = OH; R^3 = H$       quercetina  
 $R^1 = OH; R^2 = H; R^3 = Glc$       luteolina-7-glicosídeo



isovitexina-2''-arabinoide

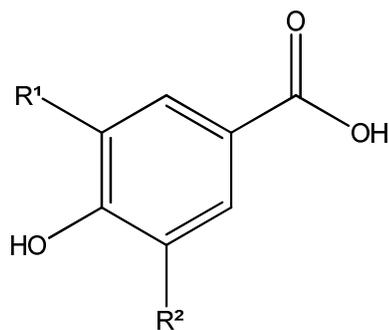


vitexina-2''-ramnoide

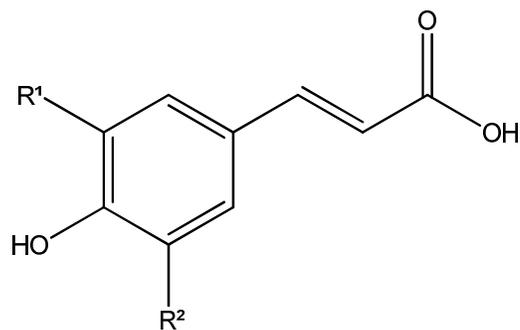


$R^1 = \text{OCH}_3$ ;	$R^2 = \text{CH}_3$ ;	$R^3 = \text{H}$	malvidina
$R^1 = \text{H}$ ;	$R^2 = \text{H}$ ;	$R^3 = \text{Glc}$	cianidina-3-glicosídeo
$R^1 = \text{H}$ ;	$R^2 = \text{CH}_3$ ;	$R^3 = \text{Glc}$	peonidina-3-glicosídeo

## Anexo 2. Estrutura de alguns ácidos fenólicos encontrados em Poaceae

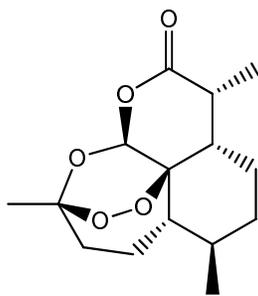


$R^1 = H;$	$R^2 = H$	ác. <i>p</i> -hidroxibenzóico
$R^1 = OH;$	$R^2 = H$	ác. protocatequínico
$R^1 = OCH_3;$	$R^2 = H$	ác. vanilínico
$R^1 = OCH_3;$	$R^2 = OCH_3$	ác. siríngico

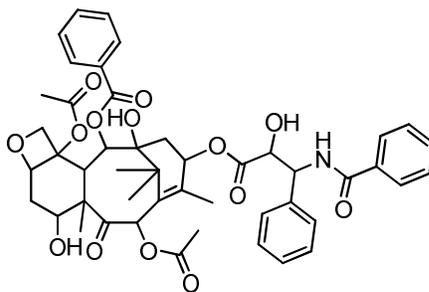


$R^1 = H;$	$R^2 = H$	ác. <i>p</i> -cumarínico
$R^1 = OH;$	$R^2 = H$	ác. cafeico
$R^1 = OCH_3;$	$R^2 = H$	ác. ferúlico
$R^1 = OCH_3;$	$R^2 = OCH_3$	ác. sinapínico

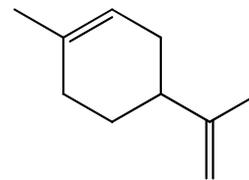
## Anexo 3. Estrutura de alguns terpenos encontrados em Poaceae



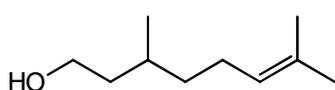
artemisinina



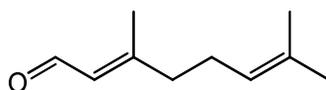
paclitaxel



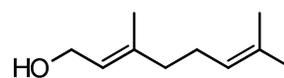
limoneno



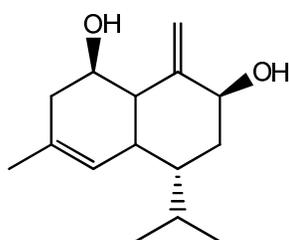
citronelol



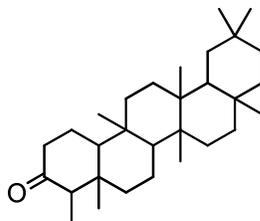
neral



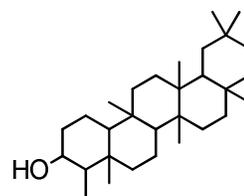
geraniol



vetidiol



friedelina



epifriedelanol

Anexo 4. RMN de  $^1\text{H}$  de TAHEX-estig (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

Tulio\_TAHex-estig (1H;  $\text{CDCl}_3$ ; 5.8 mg)  
 19/12/2016  
 Op. Zelina

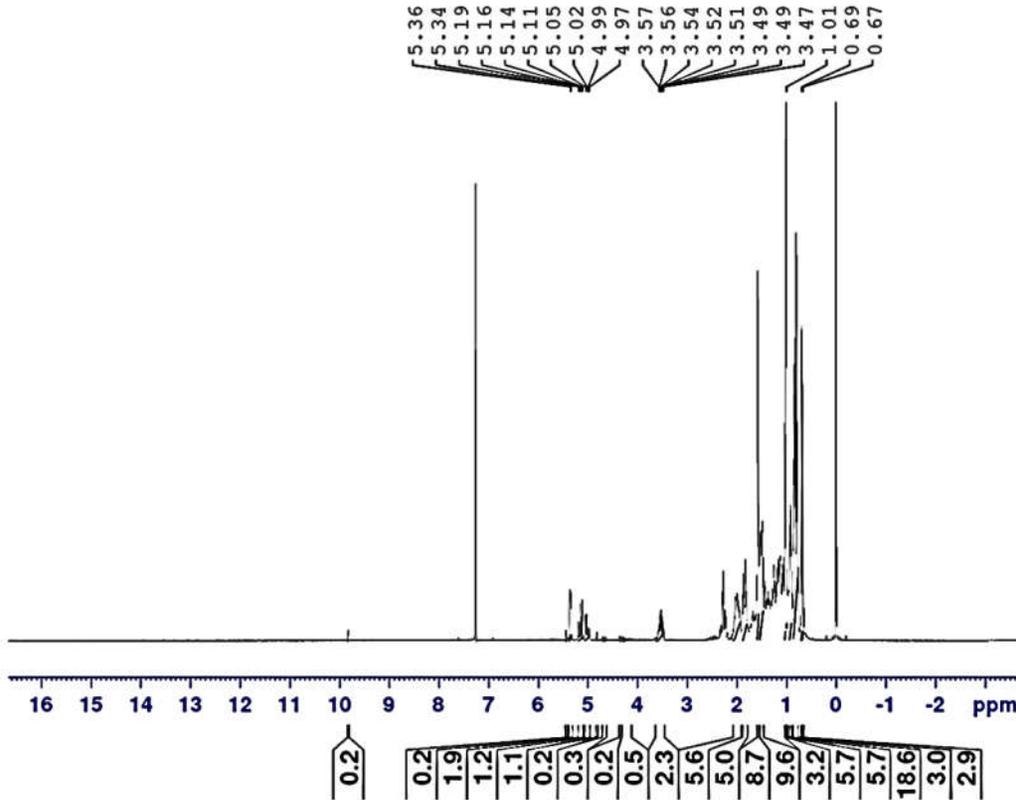


Current Data Parameters  
 NAME Tulio\_TAHex-estig  
 EXPNO 1  
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters  
 Date\_ 20161219  
 Time 16.37  
 INSTRUM FOURIER300  
 PROBHD 5 mm DUL 13C-1  
 PULPROG zg  
 TD 65536  
 SOLVENT  $\text{CDCl}_3$   
 NS 64  
 DS 0  
 SWH 6103.516 Hz  
 FIDRES 0.093132 Hz  
 AQ 5.3687091 sec  
 RG 10.8647  
 DW 81.920 usec  
 DE 10.00 usec  
 TE 293.2 K  
 D1 1.00000000 sec  
 TD0 1

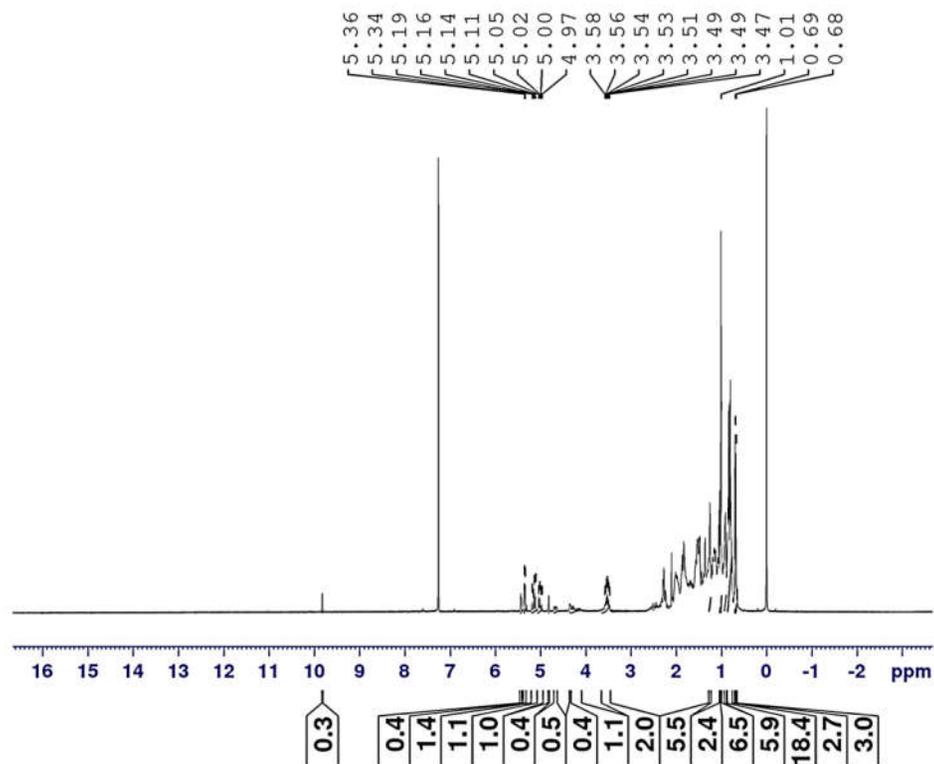
==== CHANNEL f1 =====  
 SF01 300.2019513 MHz  
 NUC1 1H  
 P1 7.64 usec  
 PLW1 20.00000000 W

F2 - Processing parameters  
 SI 65536  
 SF 300.2000031 MHz  
 WDW EM  
 SSB 0  
 LB 0 Hz  
 GB 0  
 PC 1.00



Anexo 5. RMN de  $^1\text{H}$  de TRHEX-iso25 (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

Tulio\_TRHEX-iso\_25 (1H;  $\text{CDCl}_3$ ; 2.4 mg)  
20/10/2016  
Op. Zelina



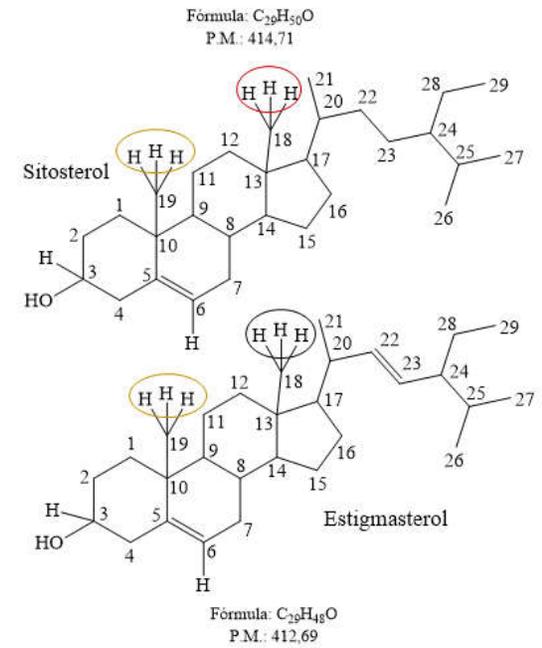
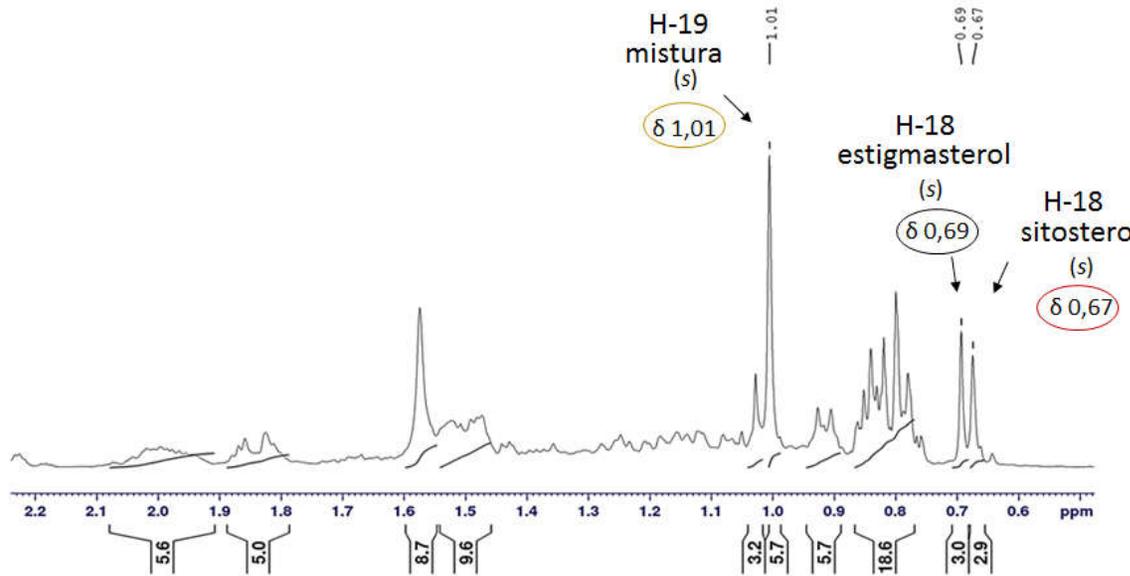
Current Data Parameters  
NAME Tulio\_TRHEX-iso\_25  
EXPNO 1  
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters  
Date\_ 20161020  
Time 17.01  
INSTRUM FOURIER300  
PROBHD 5 mm DUL 13C-1  
PULPROG zg  
TD 65536  
SOLVENT  $\text{CDCl}_3$   
NS 64  
DS 2  
SWH 6103.516 Hz  
FIDRES 0.093132 Hz  
AQ 5.3687091 sec  
RG 23.9066  
DW 81.920 usec  
DE 10.00 usec  
TE 1033.1 K  
D1 1.00000000 sec  
TD0 1

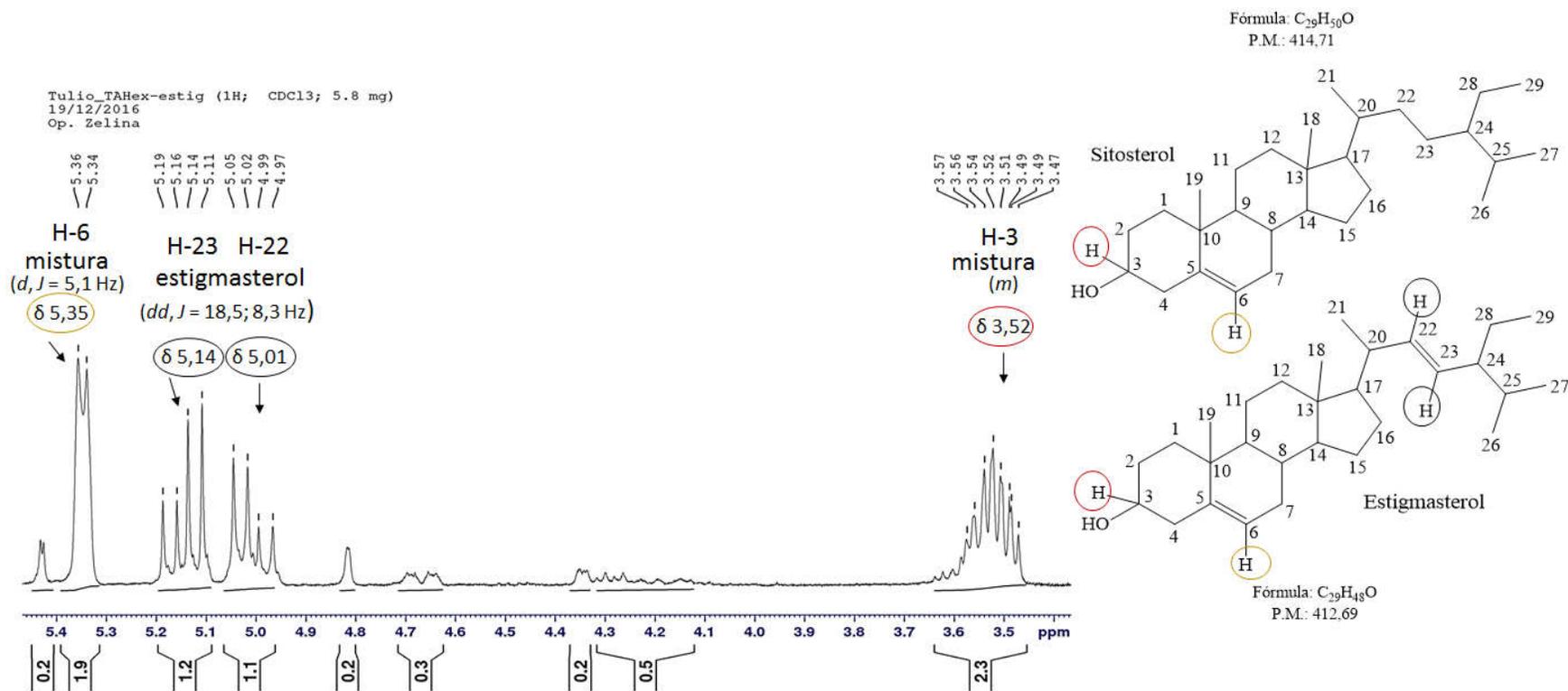
----- CHANNEL f1 -----  
SFO1 300.2019513 MHz  
NUC1  $^1\text{H}$   
P1 7.64 usec  
PLW1 20.00000000 W

F2 - Processing parameters  
SI 65536  
SF 300.2000026 MHz  
WDW EM  
SSB 0  
LB 0 Hz  
GB 0  
PC 1.00

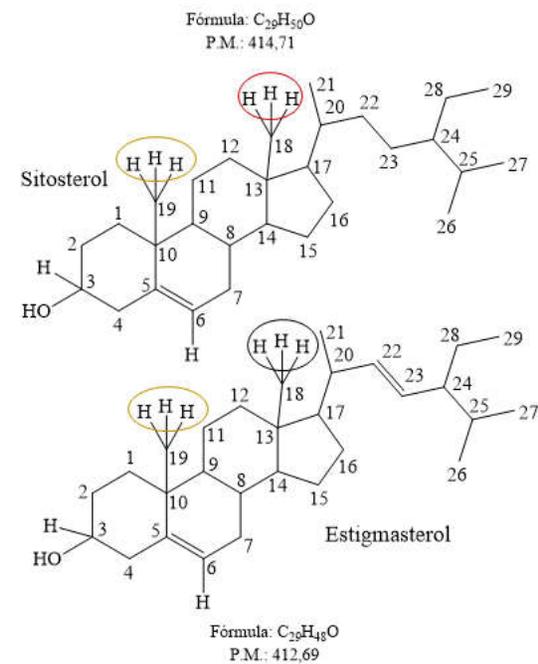
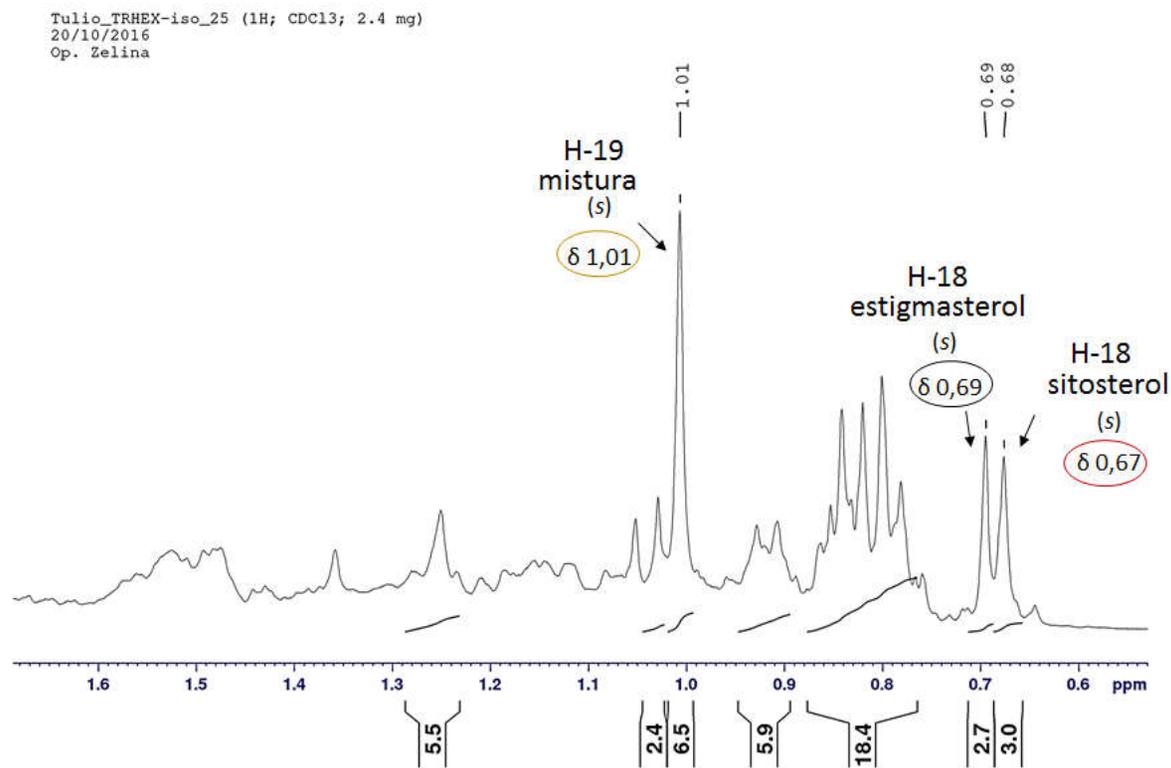
Anexo 6. Ampliação de RMN de TAHEX-estig na faixa de  $\delta$  0,6 a  $\delta$  2,2 ppm (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



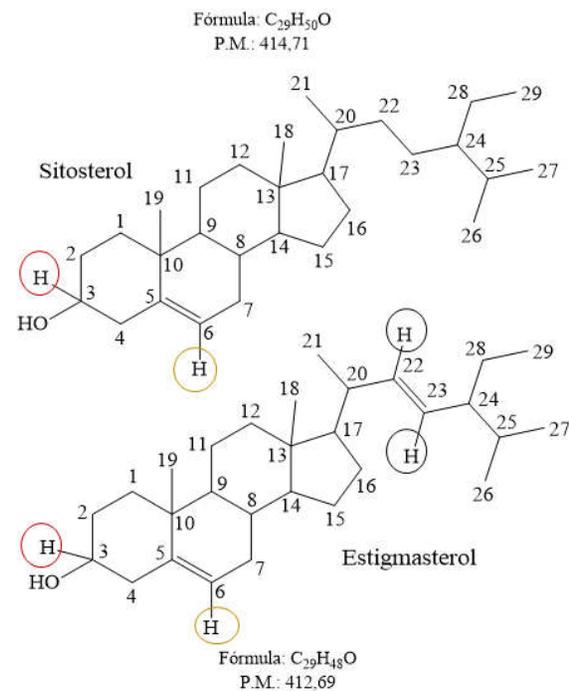
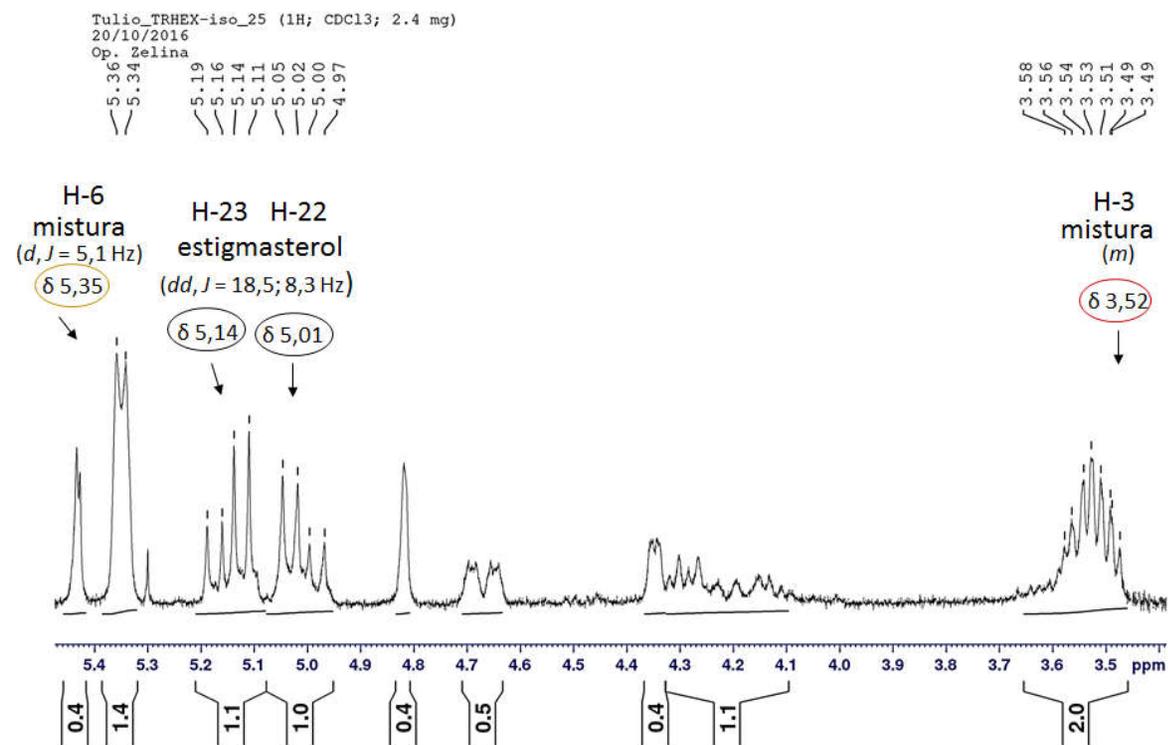
Anexo 7. Ampliação de RMN de  $^1\text{H}$  de TAHEX-estig na faixa entre  $\delta$  3,3 a  $\delta$  5,6 ppm (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

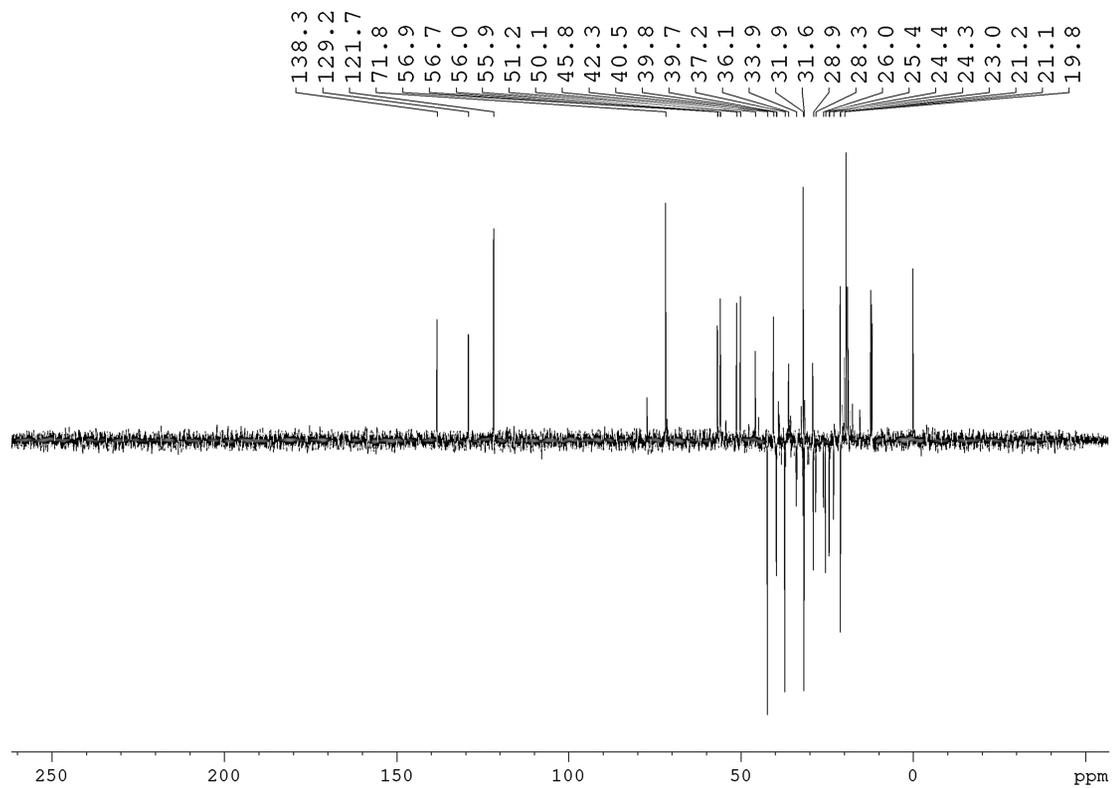


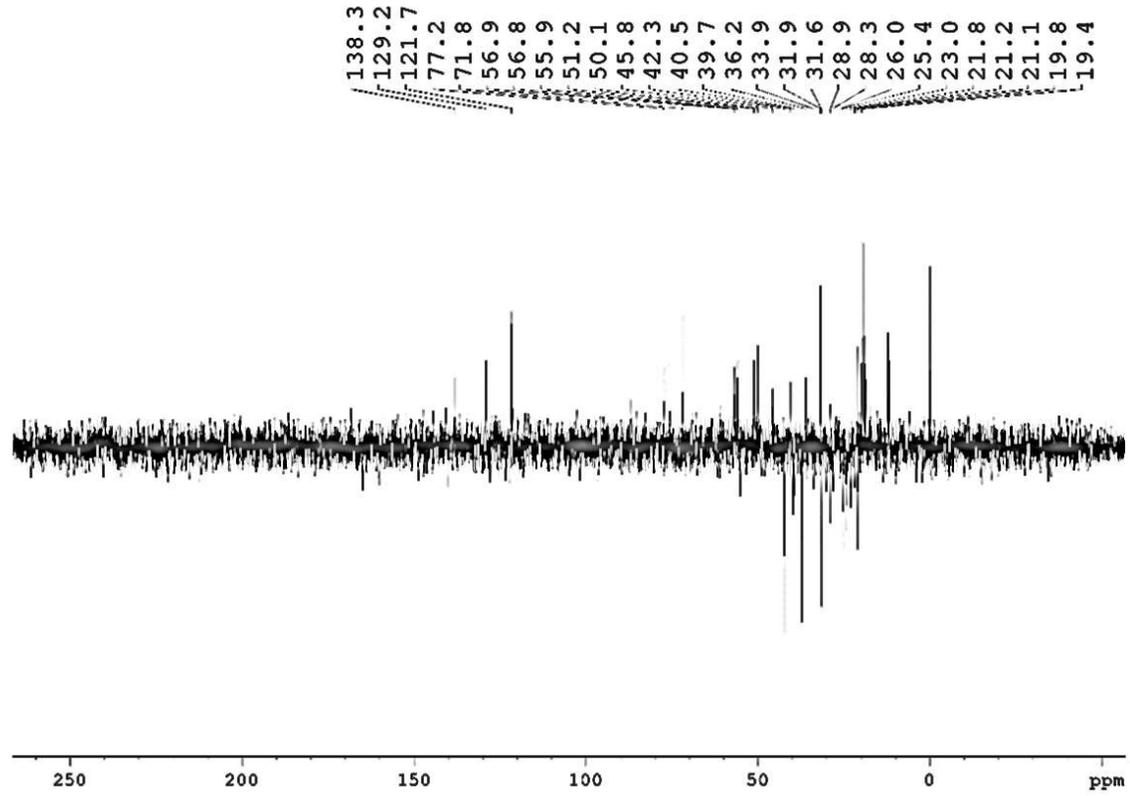
Anexo 8. Ampliação de RMN de  $^1\text{H}$  de TRHEX-iso25 na faixa entre  $\delta$  0,6 a  $\delta$  1,6 ppm (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

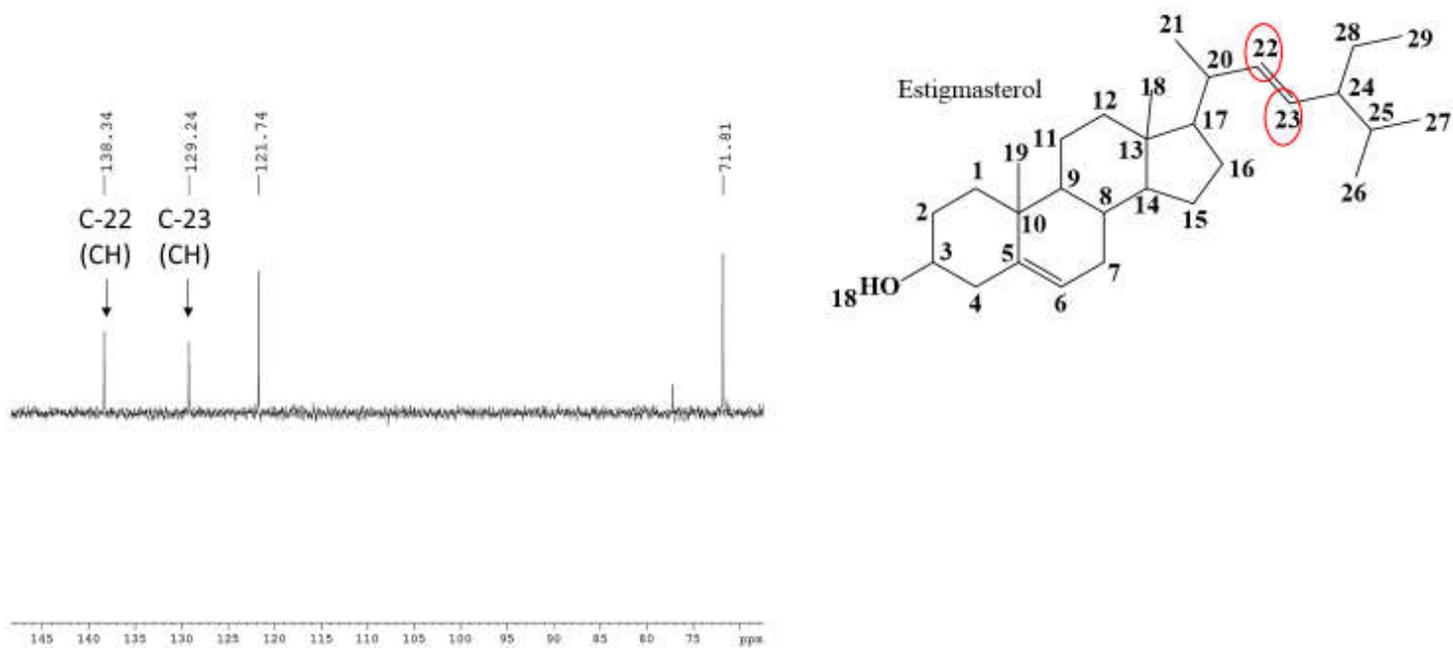


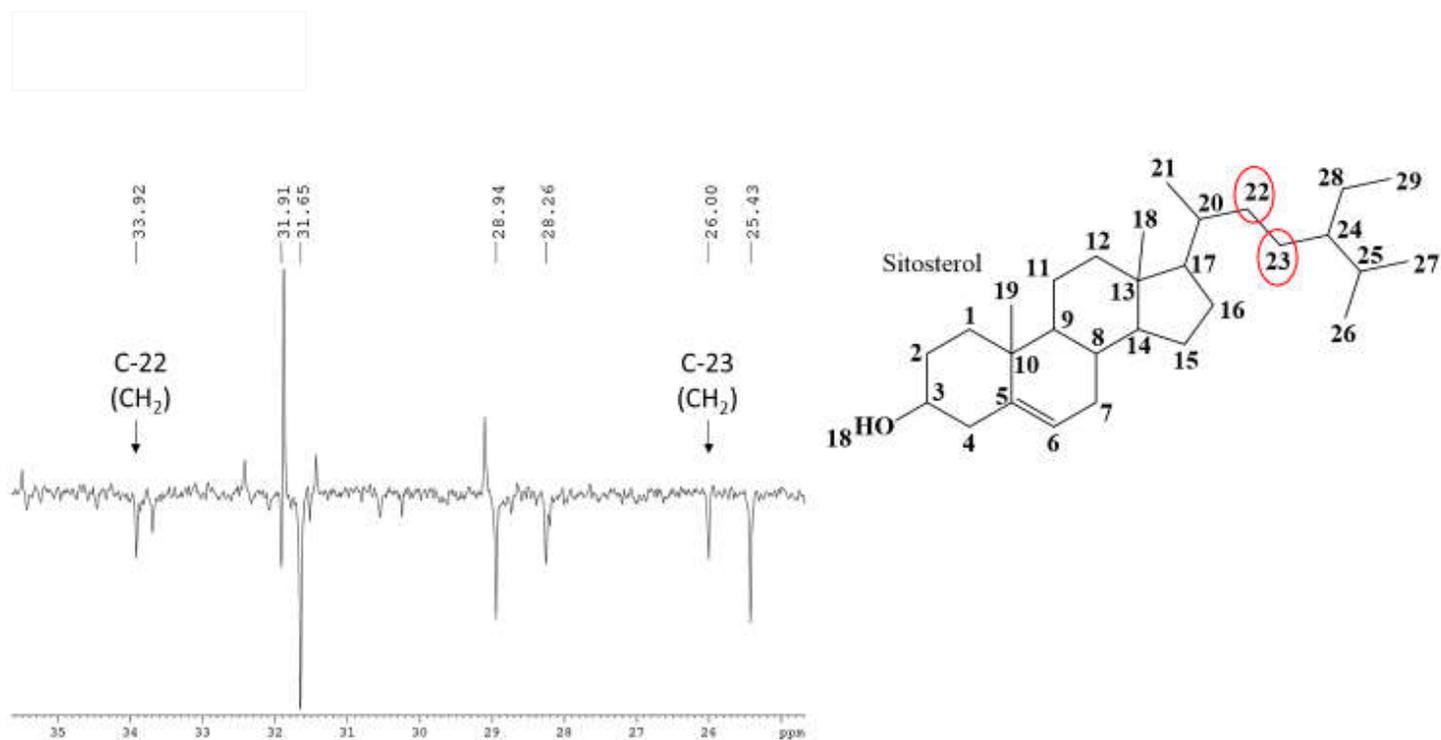
Anexo 9. Ampliação de RMN de  $^1\text{H}$  de TRHEX-iso25 na faixa entre  $\delta$  3,5 a  $\delta$  5,4 ppm (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

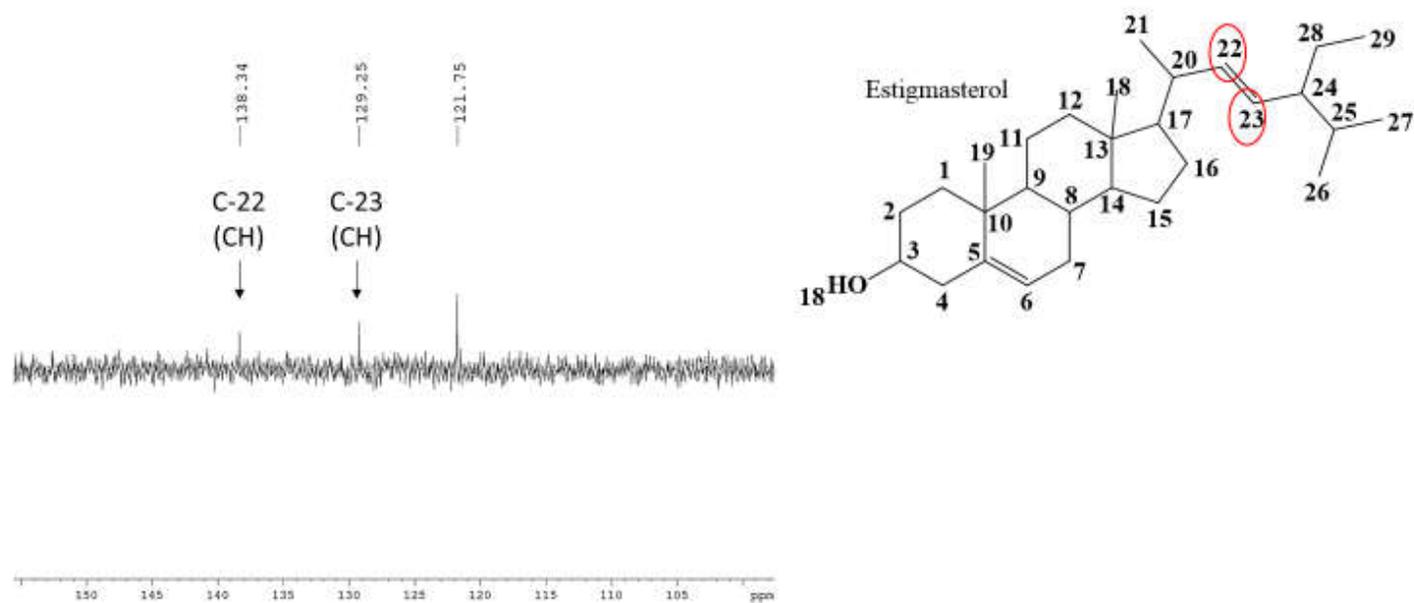


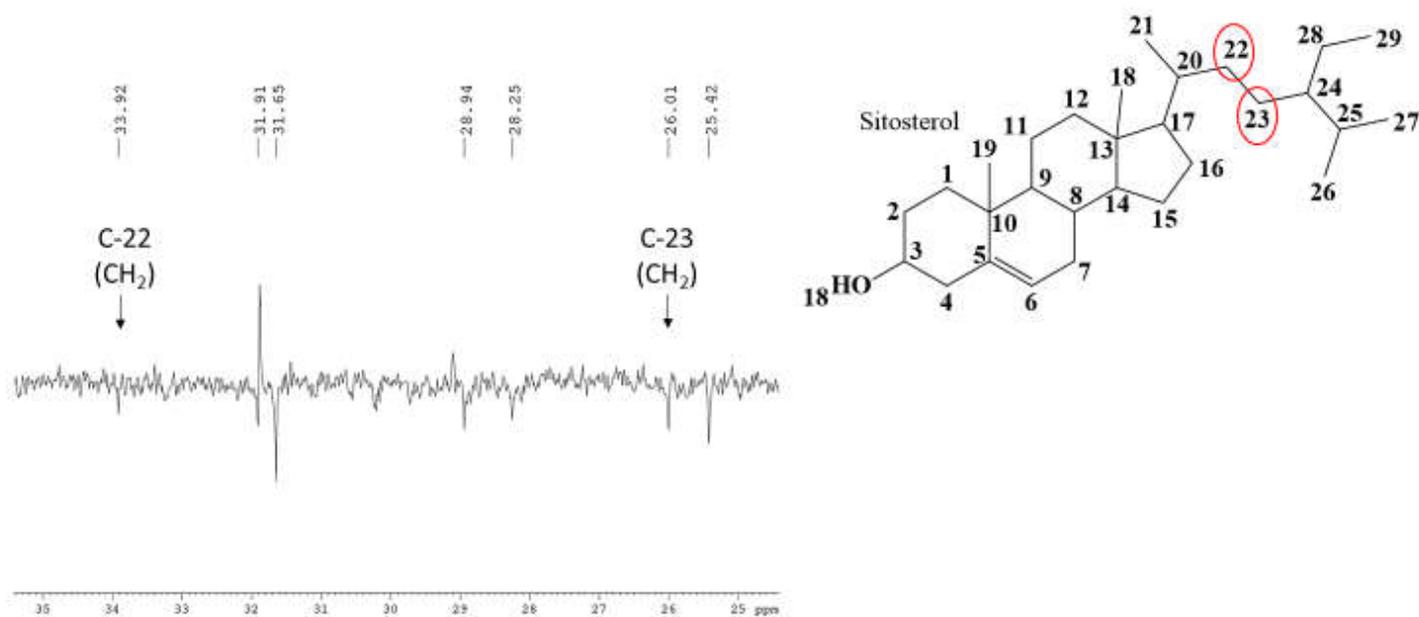
Anexo 10. DEPT 135° de TAHEX-estig (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

Anexo 11. DEPT 135° de TRHEX-iso25 (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

Anexo 12. Ampliação de RMN de DEPT 135° de TAHEX-estig na faixa entre  $\delta$  75 a  $\delta$  145 ppm (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

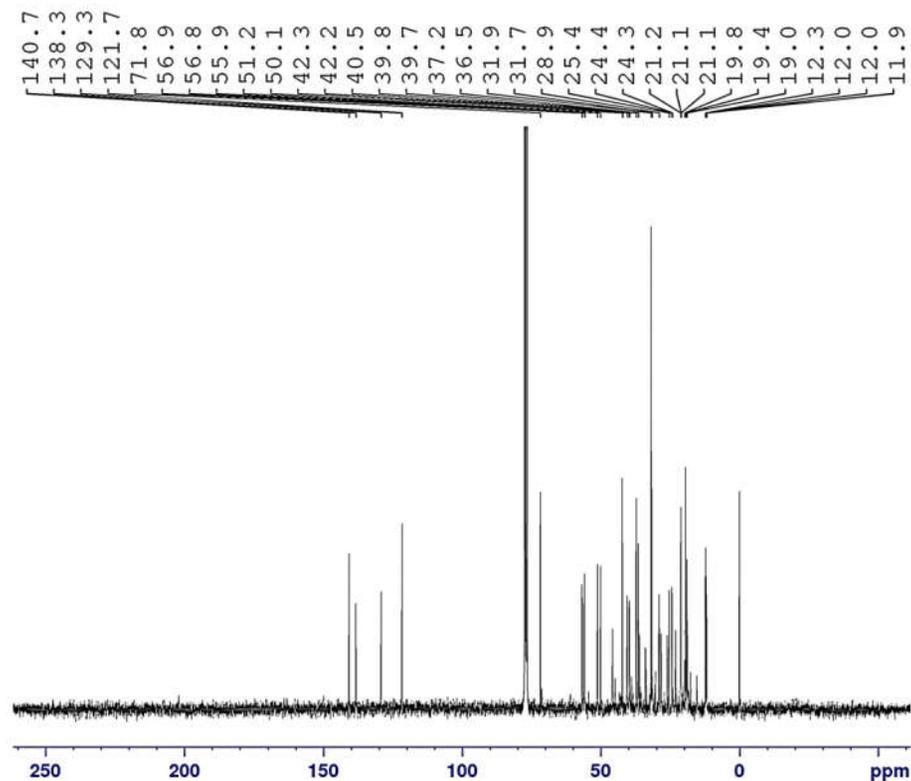
Anexo 13. Ampliação de RMN de DEPT 135° de TAHEX-estig na faixa entre  $\delta$  25 a  $\delta$  35 ppm (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

Anexo 14. Ampliação de RMN de DEPT 135° de TRHEX-iso25 na faixa entre  $\delta$  105 a  $\delta$  150 ppm (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

Anexo 15. Ampliação de RMN de DEPT 135° da de TRHEX-iso25 na faixa entre  $\delta$  25 a  $\delta$  35 ppm (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

Anexo 16. RMN de  $^{13}\text{C}$  de TAHEX-estig (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

Tulio\_TAHex-estig ( $^{13}\text{C}$ ;  $\text{CDCl}_3$ ; 5.8 mg)  
19/12/2016  
Op. Zelina



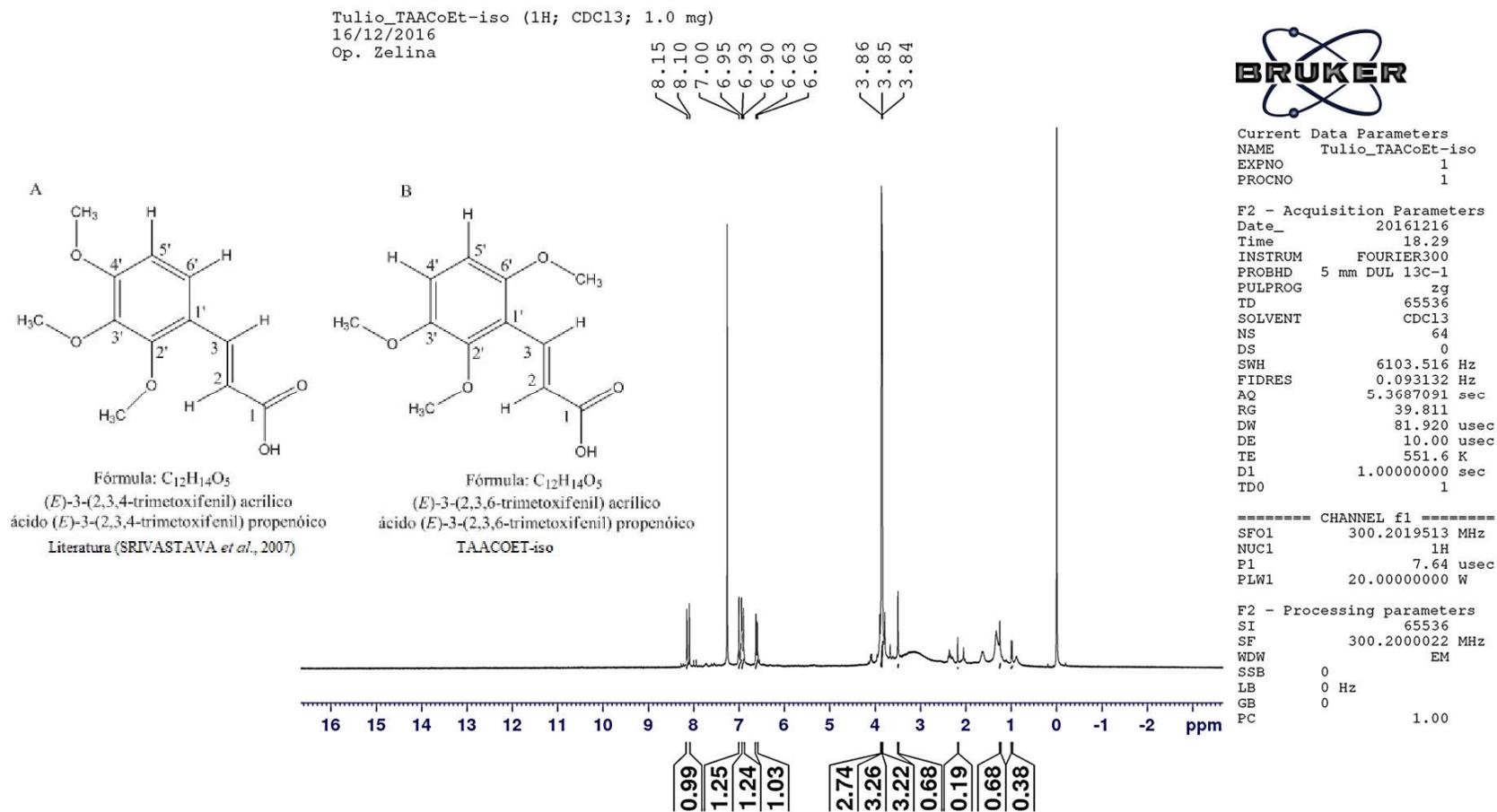
```
Current Data Parameters
NAME      Tulio_TAHex-estig
EXPNO     2
PROCNO    1

F2 - Acquisition Parameters
Date_     20161219
Time      22.10
INSTRUM   FOURIER300
PROBHD    5 mm DUL 13C-1
PULPROG   zgpg30
TD         32768
SOLVENT   CDCl3
NS         36838
DS         0
SWH        24414.063 Hz
FIDRES     0.745058 Hz
AQ         0.6710886 sec
RG         501.187
DM         20.480 usec
DE         10.00 usec
TE         293.2 K
D1         0.50000000 sec
D11        0.03000000 sec
D31        0.00000875 sec
D40        0.01589210 sec
L4         20
L5         14
P32        90.00 usec
TD0        1

----- CHANNEL f1 -----
SF01       75.4928982 MHz
NUC1        13C
P1          8.75 usec
PLW1       50.00299835 W

----- CHANNEL f2 -----
SF02       300.2012008 MHz
NUC2         1H
CPDPRG2    waltz16
PCPD2      90.00 usec
PLW2       20.00000000 W
PLW12      0.16806000 W
PLW13      0.13613001 W

F2 - Processing parameters
SI          32768
SF          75.4853500 MHz
WDW         EM
SSB         0
LB          1.00 Hz
GB          0
PC          1.40
```

Anexo 17. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de TAACOET-iso (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

Anexo 18. Ampliação  $^1\text{H}$  de TAACOET-iso faixa de  $\delta$  8,3 a  $\delta$  7,9 (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

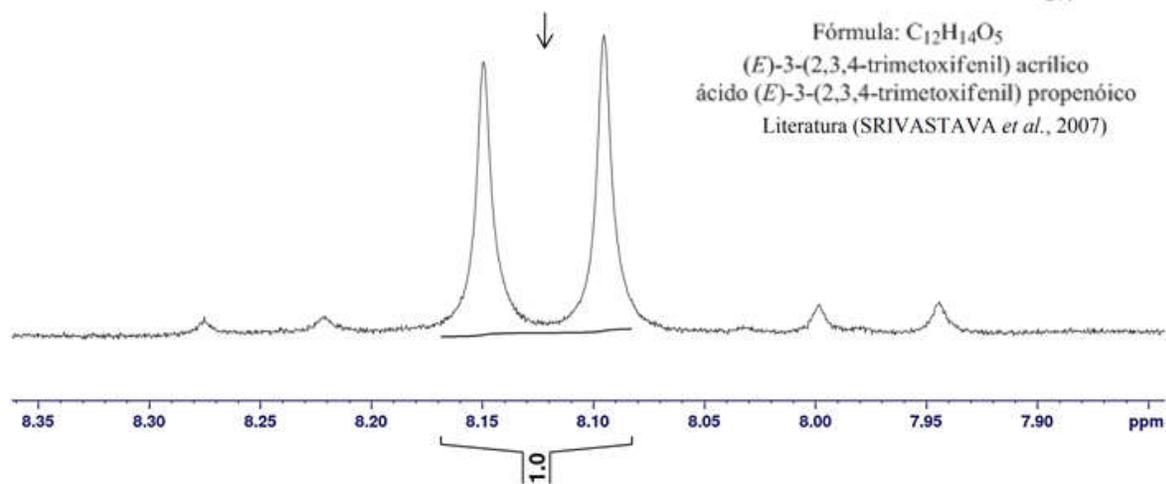
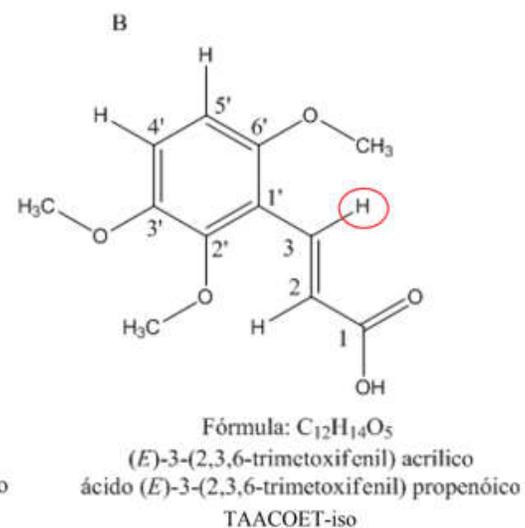
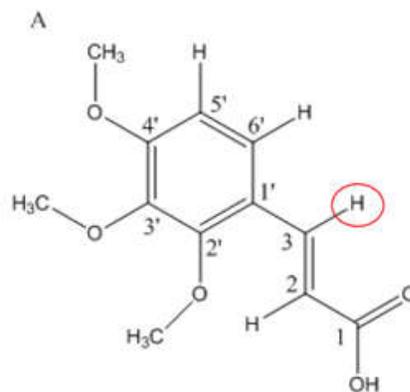
Tulio\_TAACOEt-iso (1H;  $\text{CDCl}_3$ ; 1.0 mg)  
16/12/2016  
Op. Zelina

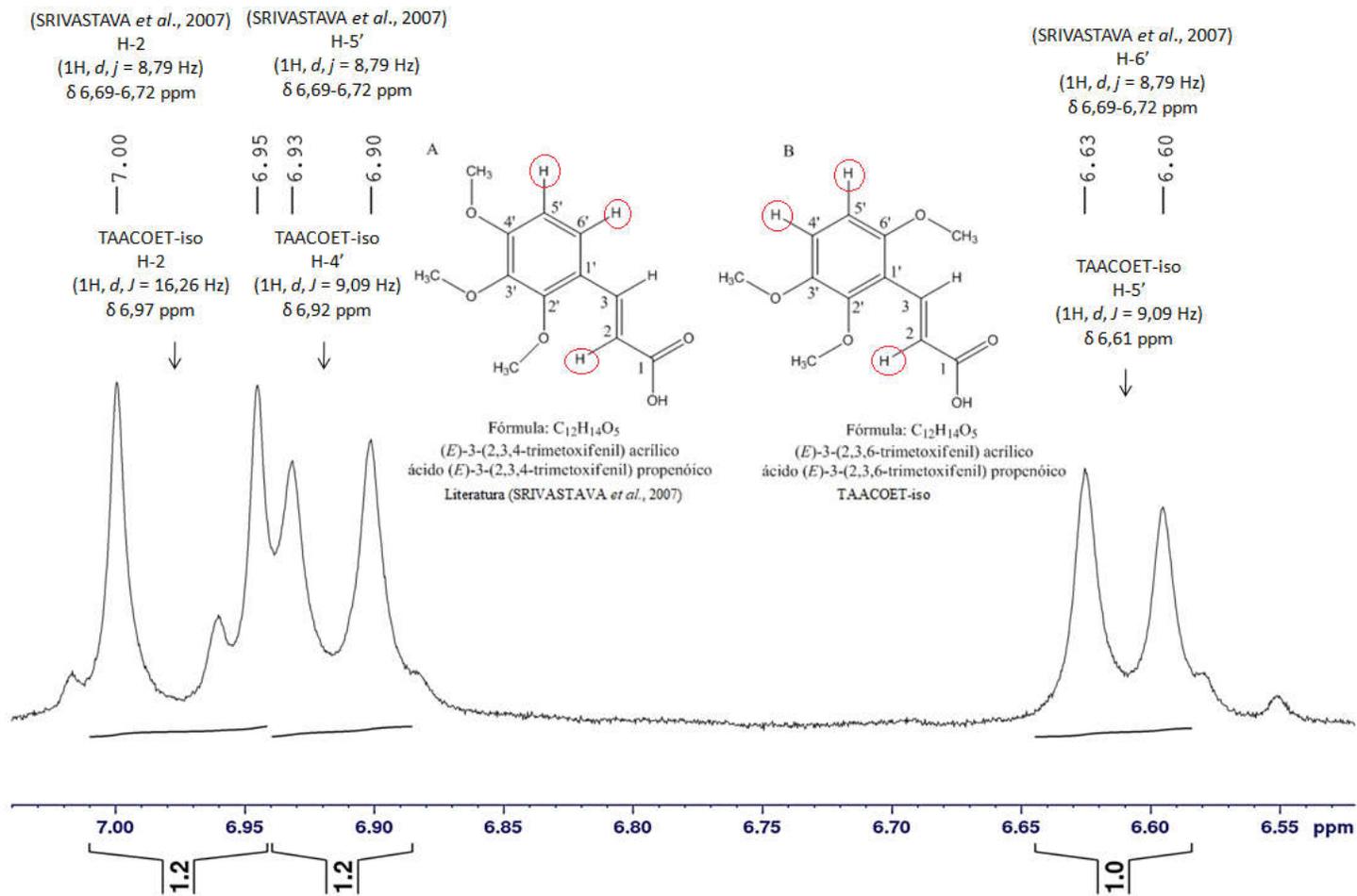
(SRIVASTAVA *et al.*, 2007)

H-3  
(1H,  $d, j = 16,08$  Hz)  
 $\delta$  7,95-8,01 ppm

8.15  
8.10

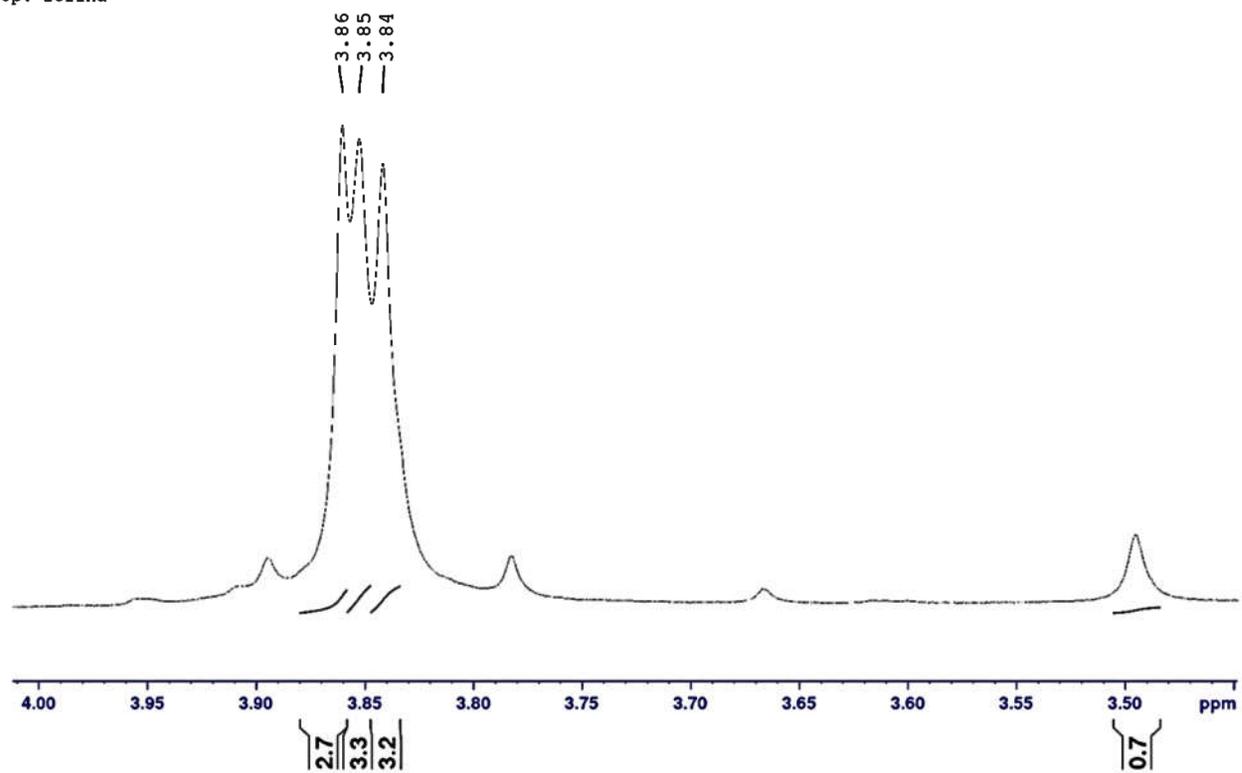
TAACOET-iso  
H-3  
(1H,  $d, J = 16,26$  Hz)  
 $\delta$  8,13 ppm

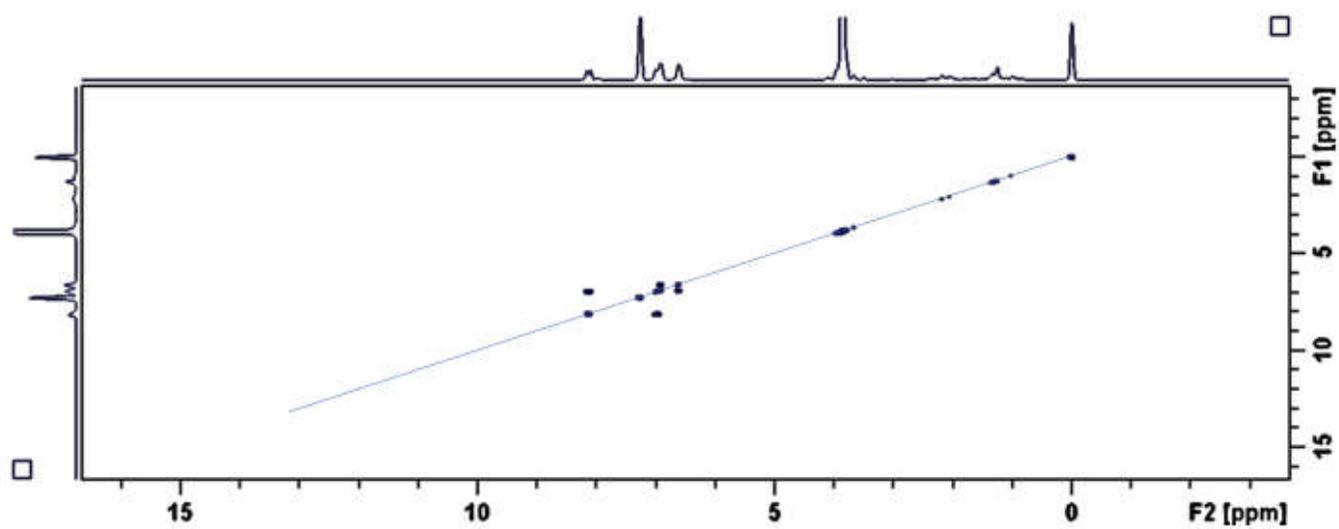


Anexo 19. Ampliação  $^1\text{H}$  de TAACOET-iso na faixa de  $\delta$  6,5 a  $\delta$  7,1 (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

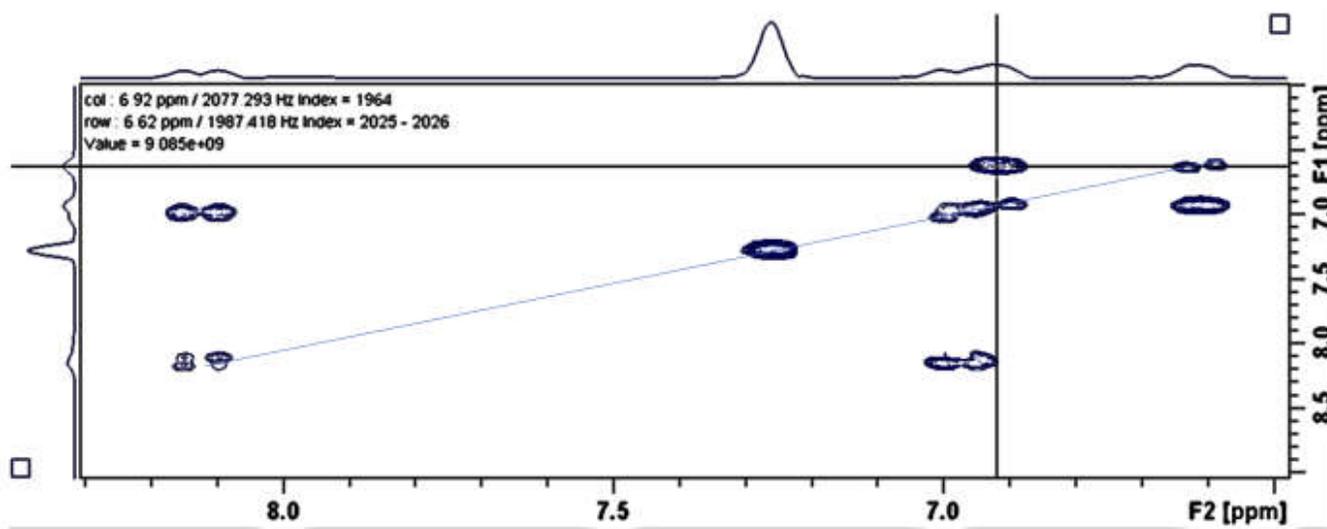
Anexo 20. Ampliação  $^1\text{H}$  de TAACOET-iso na faixa de  $\delta$  3,7 a  $\delta$  4,0 (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

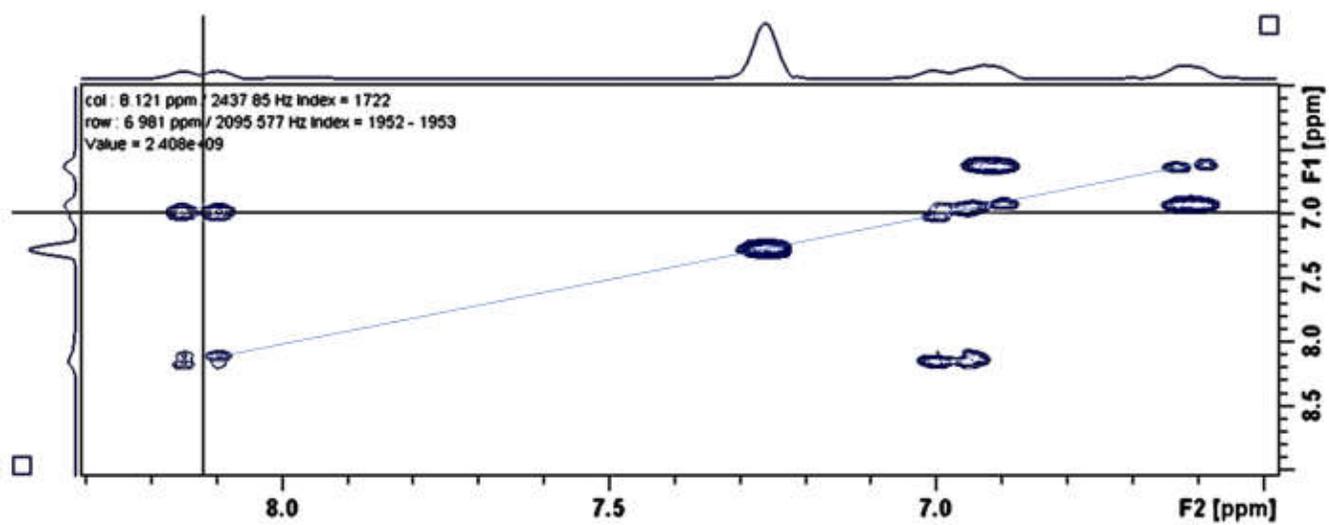
Tulio\_TAACoEt-iso (1H;  $\text{CDCl}_3$ ; 1.0 mg)  
16/12/2016  
Op. Zelina

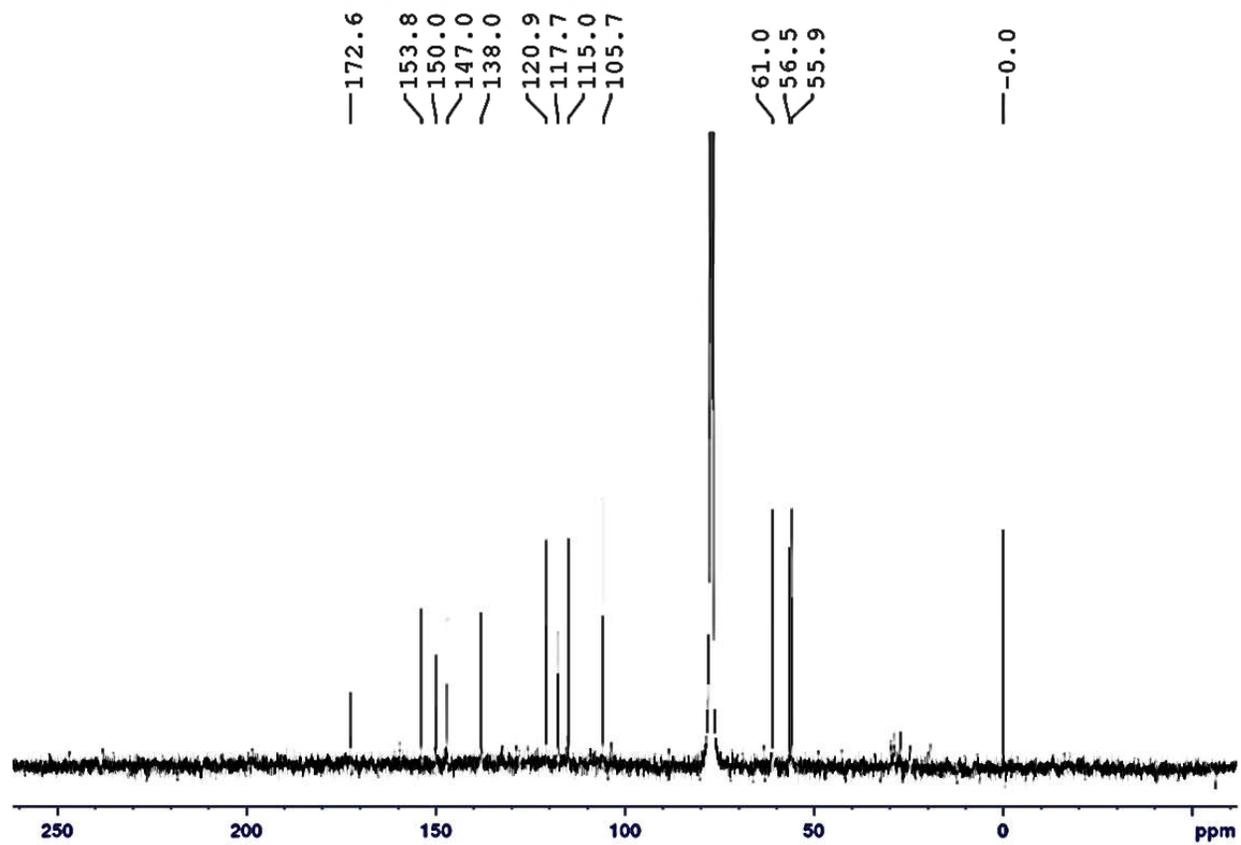


Anexo 21. Espectro de COSY de TAACOET-iso (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

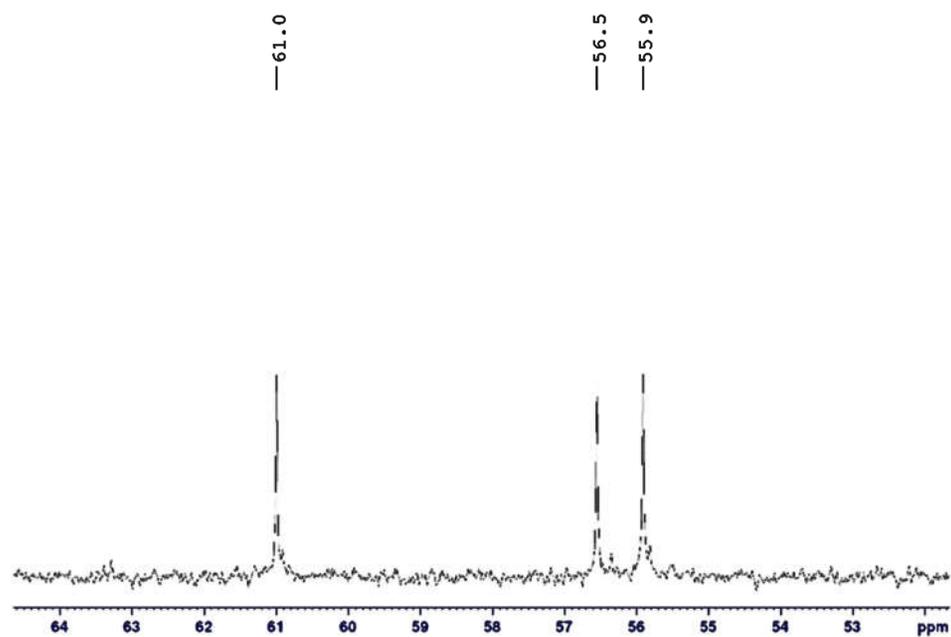
Anexo 22. Ampliação de COSY de TAACOET-iso na faixa de  $\delta$  6,5 a  $\delta$  8,0 (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

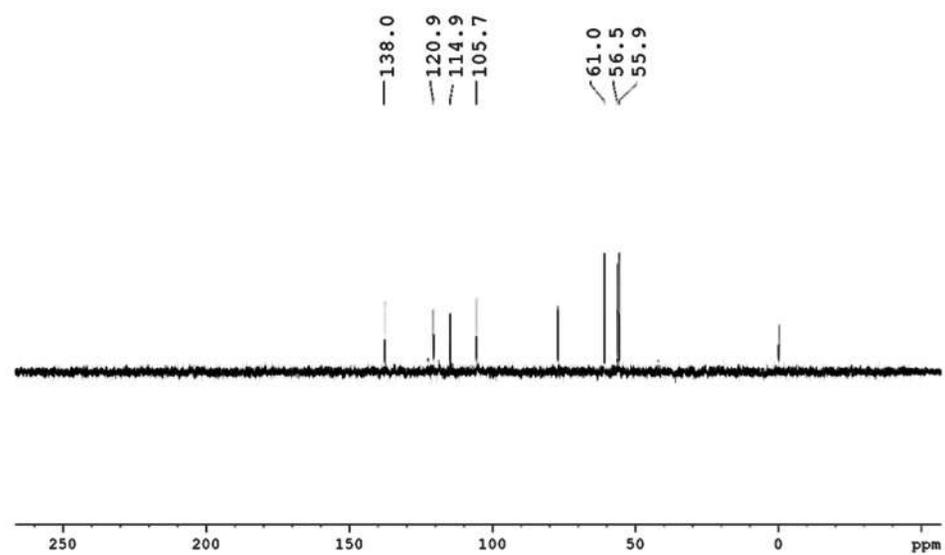


Anexo 23. Ampliação de COSY de TAACOET-isso na faixa de  $\delta$  6,5 a  $\delta$  8,0 (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

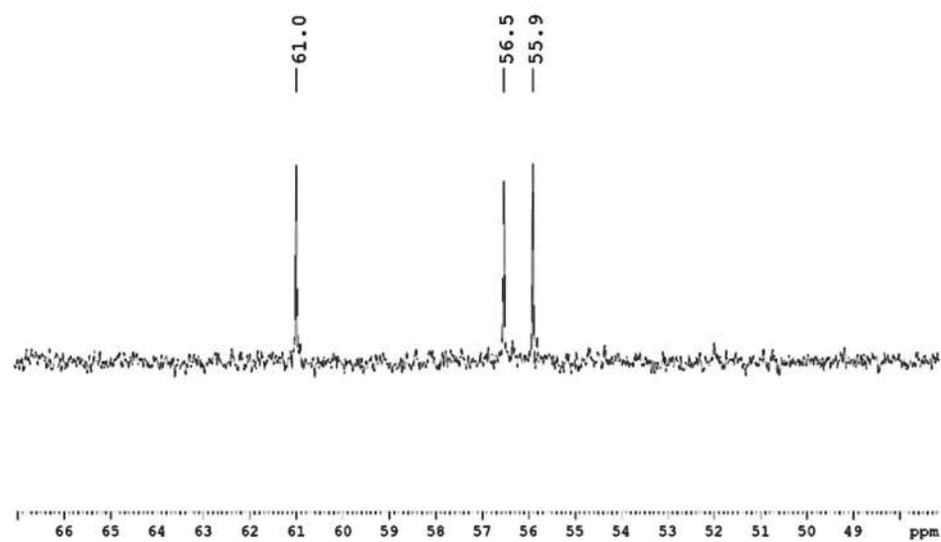
Anexo 24. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de TAACOET-iso (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

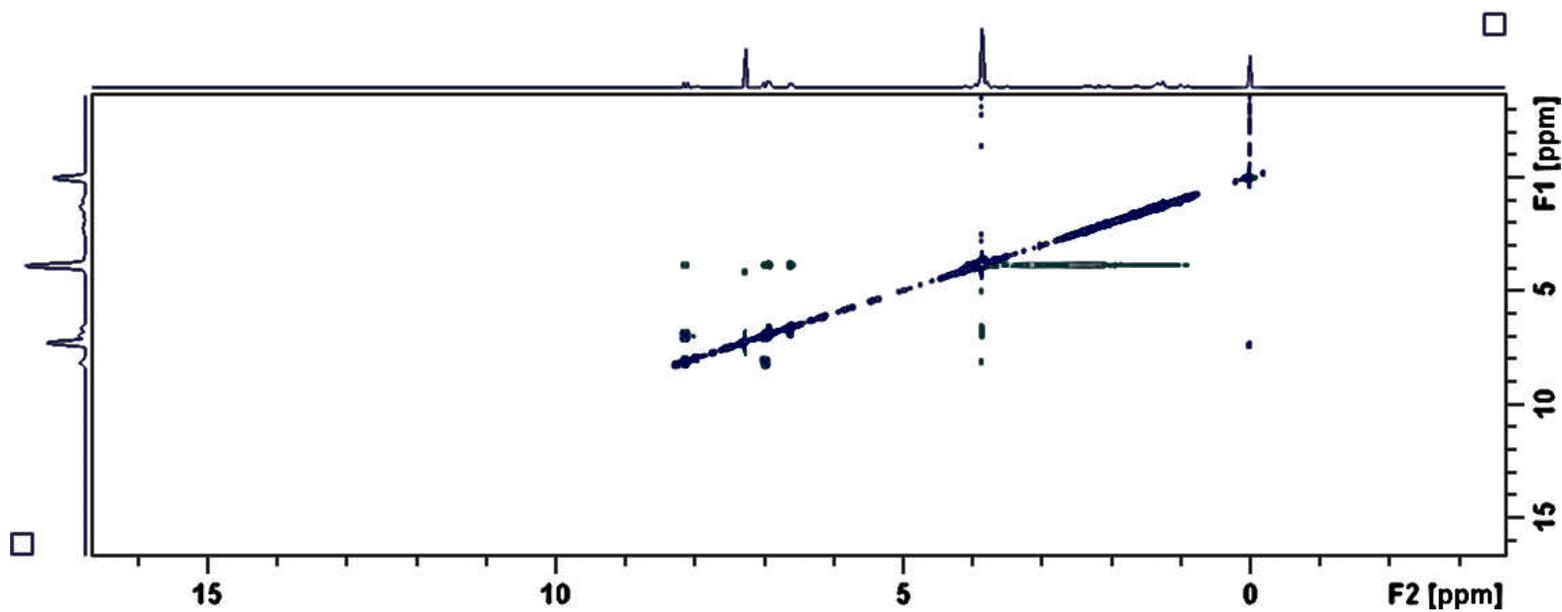
Anexo 25. Ampliação RMN  $^{13}\text{C}$  faixa de  $\delta$  53 a  $\delta$  64 (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

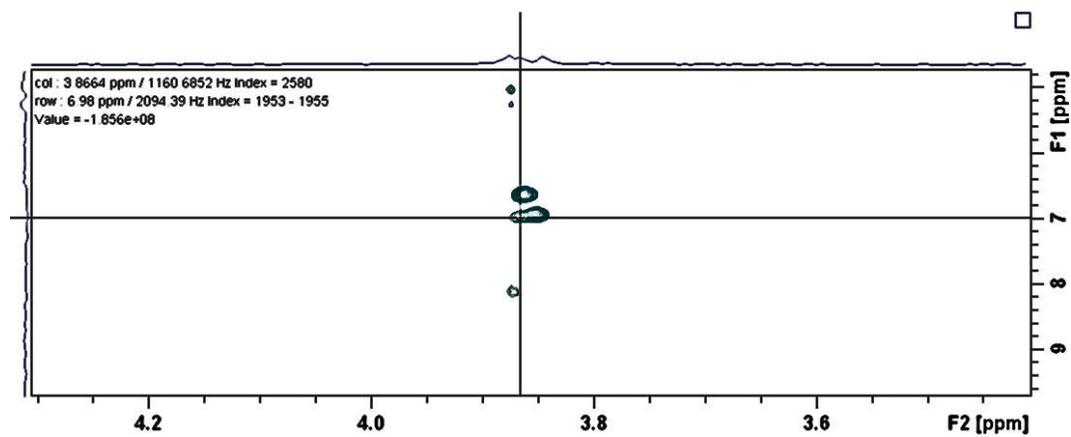
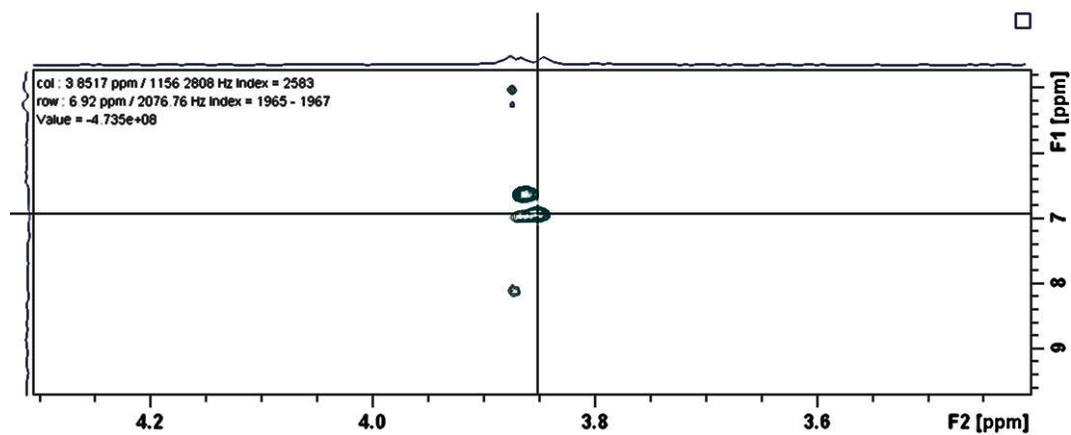


Anexo 26. DEPT 135° de TAACOET-iso (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

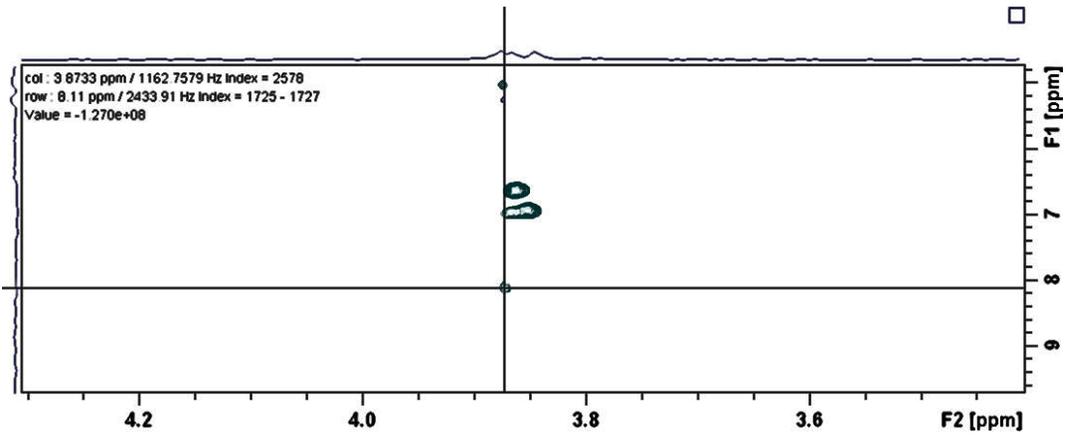
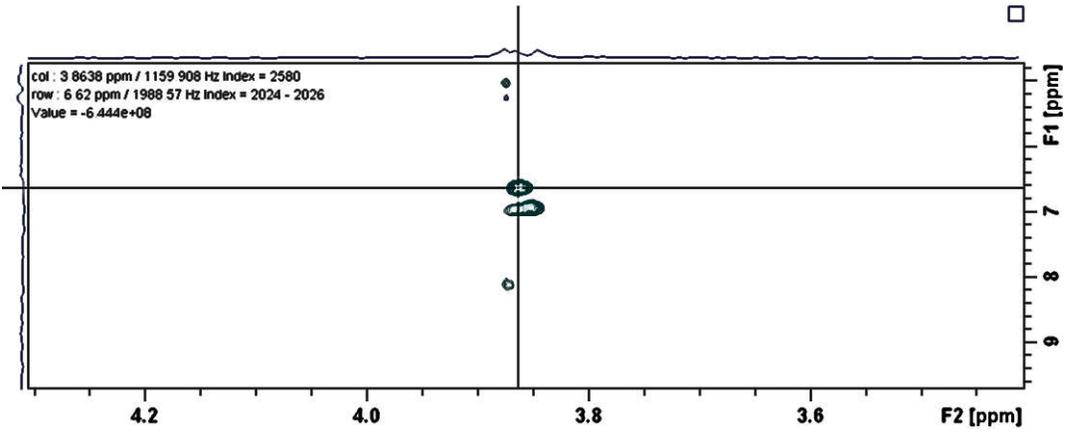
Anexo 27. Ampliação DEPT 135° de TAACOET-iso faixa de  $\delta$  49 a  $\delta$  66 (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

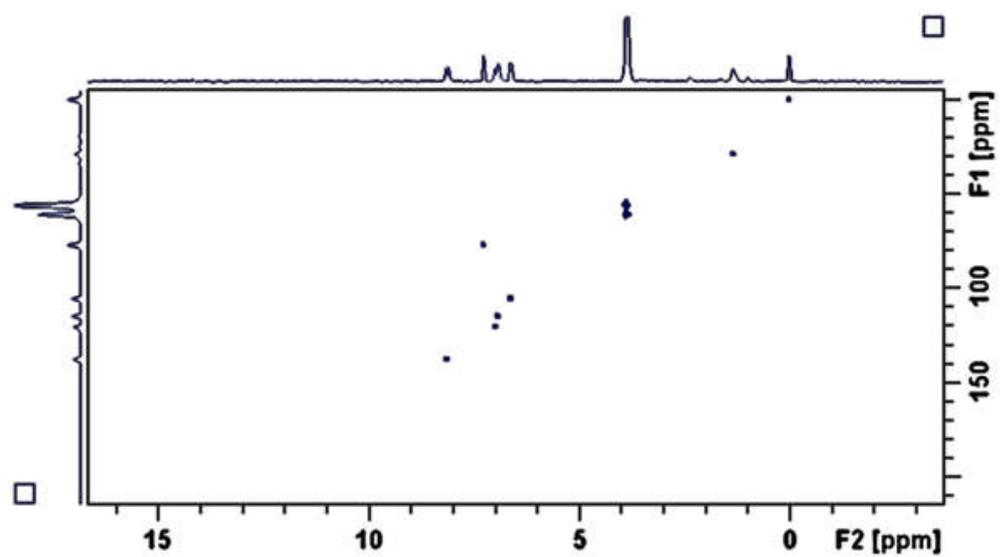


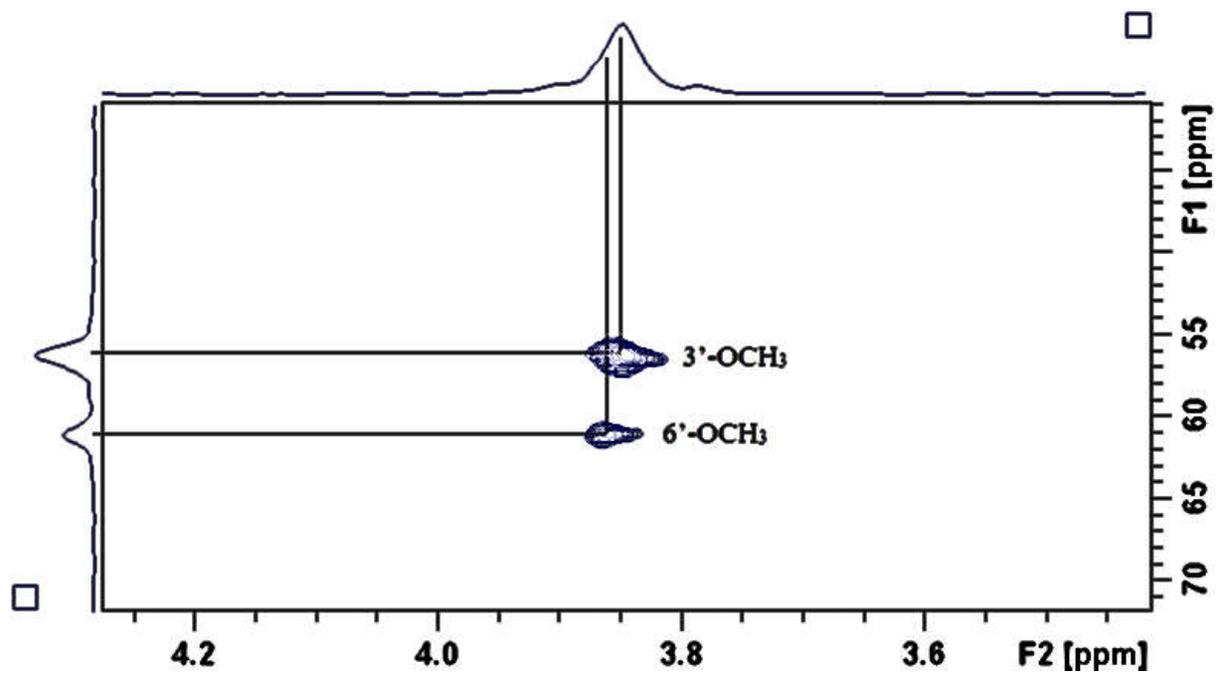
Anexo 28. Espectro de NOESY de TAACOET-iso (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

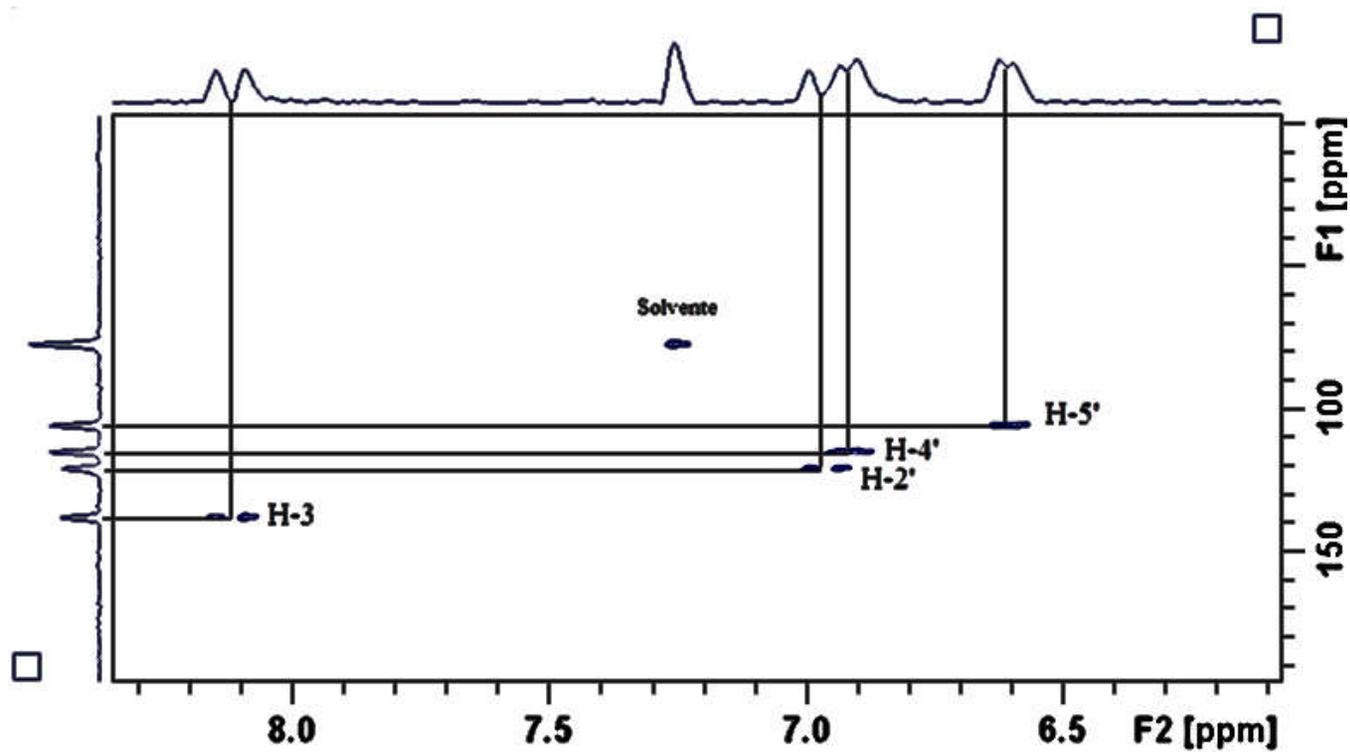
Anexo 29. Ampliação NOESY de TAACOET-iso na faixa de  $\delta$  3,6 a  $\delta$  4,2 (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

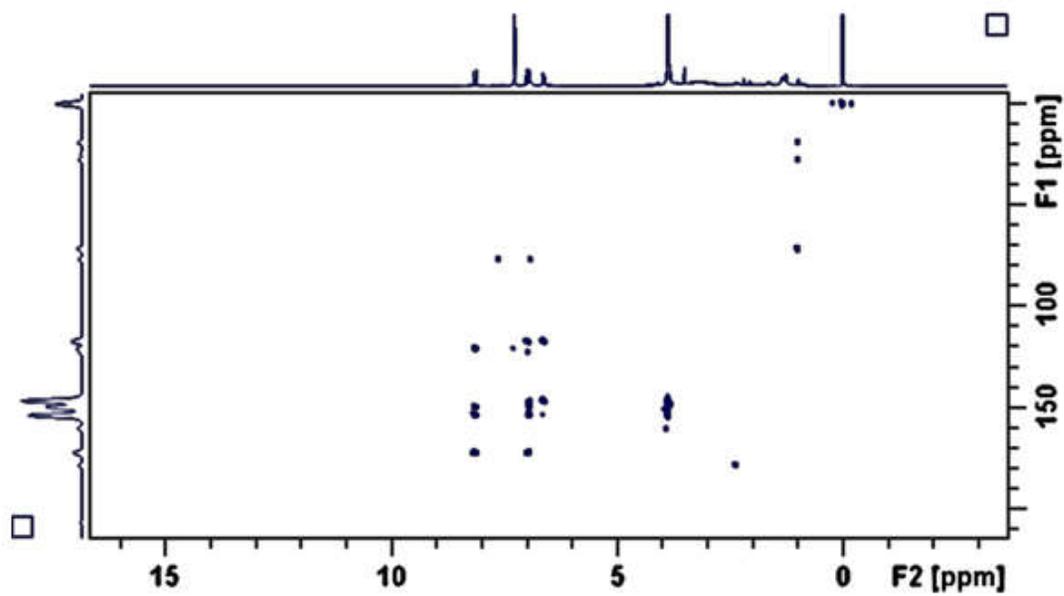
Continuação do Anexo 29

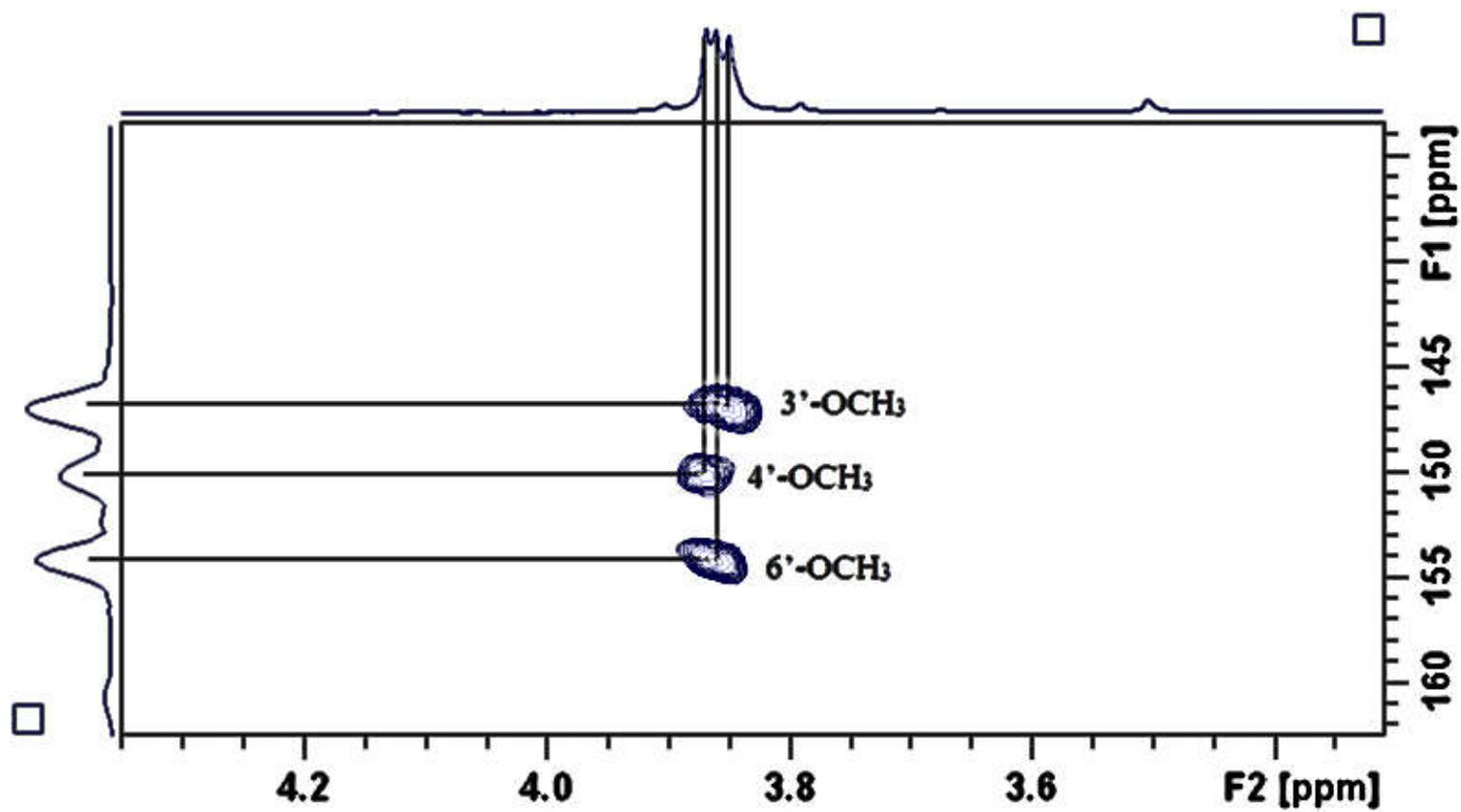


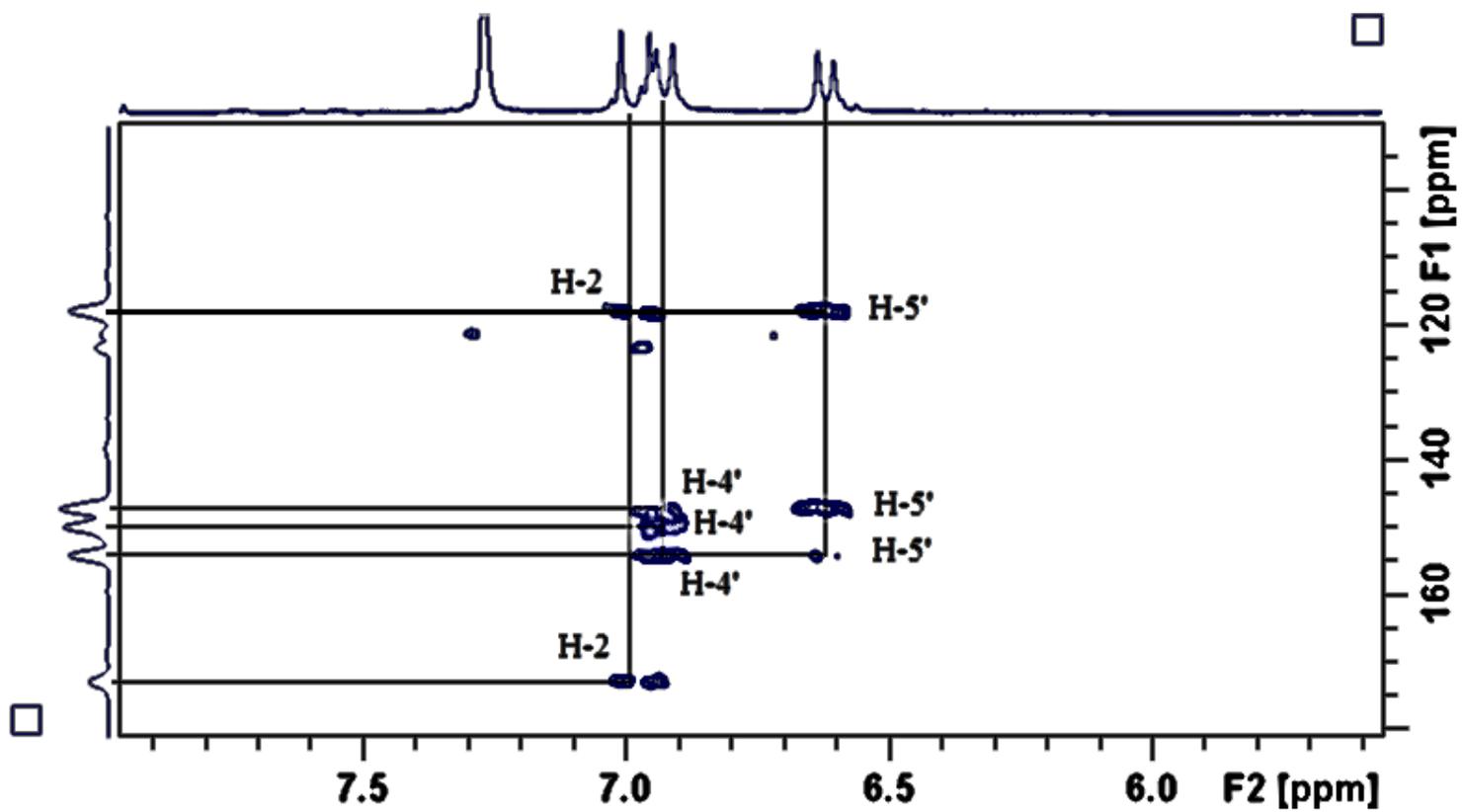
Anexo 30. Espectro HSQC de TAACOET-iso (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

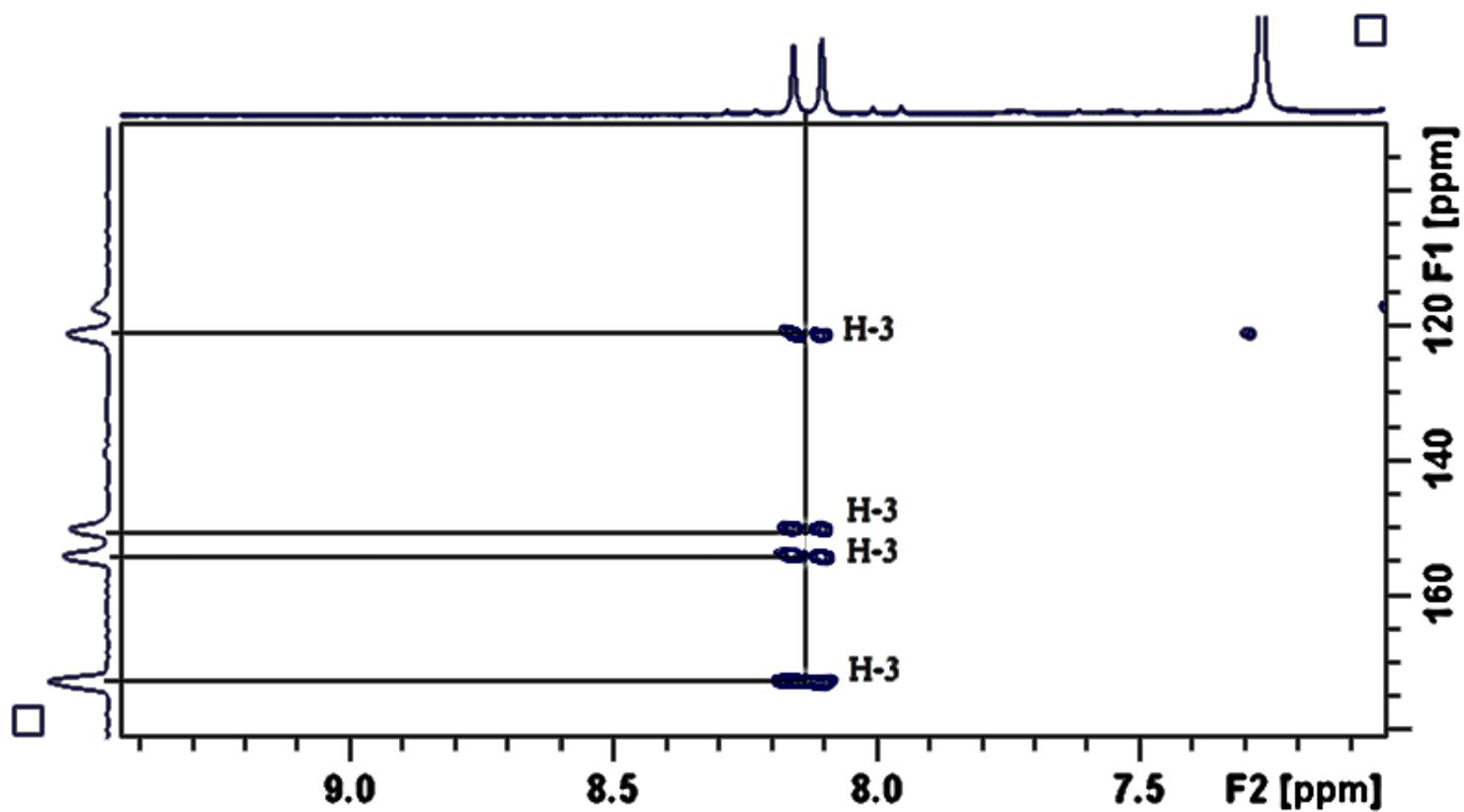
Anexo 31. Ampliação HSQC de TAACOET-iso na faixa de  $\delta$  3,6 a  $\delta$  4,2 (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

Anexo 32. Ampliação HSQC de TAACOET-iso na faixa de  $\delta$  6,5 a  $\delta$  8,0 (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

Anexo 33. Espectro HMBC de TAACOET-iso (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

Anexo 34. Ampliação HMBC de TAACOET-iso na faixa de  $\delta$  3,6 a  $\delta$  4,2 (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

Anexo 35. Ampliação HMBC de TAACOET-iso na faixa de  $\delta$  6,0 a  $\delta$  7,5 (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

Anexo 36. Ampliação HMBC de TAACOET-iso na faixa de  $\delta$  7,5 a  $\delta$  9,0 (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

## Anexo 37. SISBIO – Comprovante de registro para coleta de material botânico



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: 46446-2	Data da Emissão: 15/04/2015 13:08
Dados do titular	
Nome: Túlio Alves de Azevedo	CPF: 927.110.902-30

#### 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 <a href="http://www.ibama.gov.br">www.ibama.gov.br</a> (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 à 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, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em <a href="http://www.mma.gov.br/gen">www.mma.gov.br/gen</a> .

#### Taxons autorizados

#	Nível taxonômico	Taxon(s)
1	ESPECIE	Zanthoxylum djalma-balistae, Andropogon leucostachyus
2	REINO	Plantae

Este documento (Comprovante de registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. 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](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 39176185



Página 1/1