

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS- UFAM
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA

ATIVIDADE ANTIMALÁRICA *IN VITRO* E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE
***Machaerium ferox* (Benth.) Ducke (FABACEAE)**

ADRIANA CARDOSO DA SILVA

MANAUS – AM

2021

ADRIANA CARDOSO DA SILVA

**ATIVIDADE ANTIMALÁRICA *IN VITRO* E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE
Machaerium ferox (Benth.) Ducke (FABACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), para obtenção do título de mestre em biotecnologia.

ORIENTADOR: Dr. ADRIAN MARTIN POHLIT

CO-ORIENTADORA: Dra. ZELINA ESTEVAM DOS SANTOS TORRES

CO-ORIENTADOR: Dr. EDIZON VEIGA LOPES

MANAUS – AM

2021

Ficha Catalográfica

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

S586a Silva, Adriana Cardoso da
Atividade antimalárica in vitro e composição química de
Machaerium ferox (Benth.) Ducke (Fabaceae) / Adriana Cardoso da
Silva . 2021
63 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Adrian Martin Pohlit
Coorientadora: Zelina Estevam dos Santos Torres
Coorientador: Edizon Veiga Lopes
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal
do Amazonas.

1. Epicatequina. 2. Plasmodium falciparum. 3. Machaerium ferox.
4. Malária. 5. Triterpeno. I. Pohlit, Adrian Martin. II. Universidade
Federal do Amazonas III. Título

ADRIANA CARDOSO DA SILVA

**ATIVIDADE ANTIMALÁRICA *IN VITRO* E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE
Machaerium ferox (Benth.) Ducke (FABACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), para obtenção do título de mestre em biotecnologia.

Aprovado em: 16 de dezembro de 2021

BANCA EXAMINADORA

Dr. Adrian Martin Pohlit – Presidente
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA)

Dra. Rosemary da Silva Roque – Membro
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA)

Nádia Cristina Falcão Bucker – Membro
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Audenira Cardoso e Josimar Lima, e à minha família, por toda força, amor e carinho, sem eles este trabalho e muitos dos meus sonhos não se realizariam.

Ao meu noivo, Diogo, por ser o melhor companheiro que eu poderia ter. Que possamos comemorar juntos todas as conquistas e objetivos realizados.

Aos amigos que fazem a vida ser mais leve e cheia da alegria, e que são conforto em momentos difíceis, obrigada pelo ombro amigo, pelos conselhos e pela confiança.

Ao meu orientador, Adrian Martin Pohlit, e meu coorientadores Zelina Torres e Edizon Lopes pela disponibilidade, por todos os ensinamentos e pela confiança em mim depositada.

Aos meus colegas de pesquisa do LAPAAM, pela ajuda, parceria e aprendizados compartilhados nos últimos dois anos.

RESUMO

Em Oriximiná, no Pará, um município com alto índice de malária, grupos tradicionais como povos remanescentes de quilombos puderam experimentar e conhecer plantas úteis contra a doença e seus sintomas. A *Machaerium ferox* é nativa da Amazônia e utilizada por comunidades tradicionais como fitoterápico no tratamento de doenças. O presente trabalho teve como objetivo estudar a composição química e avaliar a atividade antiplasmódica *in vitro* dos extratos de *M. ferox* frente a cepa K1 (resistente a cloroquina) de *Plasmodium falciparum*. Foram avaliados oito extratos obtidos do caule de *M. ferox*. O extrato que obteve melhor resultado, considerando rendimento e atividade antiplasmódica foi o extrato de acetona. O extrato de acetona apresentou concentração inibitória mínima (CI₅₀) de 21,3 µg/mL (14,1 – 32,4 µg/mL), sendo considerado parcialmente ativo. O extrato de acetona foi submetido à extração líquido-líquido e fracionamento utilizando coluna cromatográfica (CC). Da fração de acetato F.AcOEt foram obtidas 200 subfrações reunidas em 8 frações conforme seus perfis cromatográficos visualizados em CCD. A primeira fração reunida (37,1 mg) apresentou um bom nível de pureza e foi levada à análise de RMN (1D e 2D). Da análise da substância concluiu-se que se tratava do flavonóide epicatequina. Da fração clorofórmica foram obtidas 152 subfrações reunidas em 5 frações. A segunda fração reunida (4,7 mg) apresentou um bom nível de pureza e foi levada à análise de RMN (1D e 2D). Conforme análise, concluiu-se que a substância se trata de um triterpeno pentacíclico, porém não foi possível identificar a substância comparando-a com dados da literatura. Este é o primeiro relato da presença de epicatequina na espécie *M. ferox*.

Palavras-chave: Epicatequina, *Plasmodium falciparum*, *Machaerium ferox*, malária, triterpeno.

ABSTRACT

In Oriximiná, Pará, a municipality with a high rate of malaria, traditional groups such as remnant peoples from quilombos were able to experience and learn about useful plants against the disease and its symptoms. *Machaerium ferox* is native from Amazon and used by traditional communities as an herbal medicine to treat diseases. The present work aimed to study the chemical composition and evaluate the in vitro antiplasmodic activity of the extracts of the *M. ferox* species against the K1 (chloroquine resistant) strain of *Plasmodium falciparum*. Eight extracts obtained from the stem of the *M. ferox* species were evaluated. The extract that obtained the best result, considering yield and antiplasmodic activity was the acetone extract. Acetone extract had a minimum inhibitory concentration (IC₅₀) of 21.3 µg/mL (14.1 – 32.4 µg/mL), being considered partially active. The acetone extract was subjected to liquid-liquid extraction and fractionation using column chromatography (CC). From the F.ACoET fraction, 200 subfractions were obtained, divided into 8 fractions according to their chromatographic profiles visualized on CCD. The first fraction gathered (37.1 mg) showed a good purity level and was submitted to NMR analysis (1D and 2D). The analysis of the substance led to the conclusion that it was the flavonoid epicatechin. From the F.CHCl₃ fraction, 152 subfractions were obtained, divided into 5 fractions. The second fraction gathered (4.7 mg) showed a good level of purity and was submitted to NMR analysis (1D and 2D). According to the analysis, it was concluded that the substance is a pentacyclic triterpene, but it was not possible to identify the substance by comparing it with literature data. This is the first report of the presence of epicatechin in the species *M. ferox*.

Keywords: Epicatechin, *Plasmodium falciparum*, *Machaerium ferox*, malaria, triterpene.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	X
LISTA DE TABELAS.....	XI
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	XII
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	4
2.1 Malária	4
2.2 Resistência a antimaláricos	6
2.3 Antimaláricos usados no tratamento de malária	7
2.4 Uso de plantas medicinais no tratamento de doenças.....	9
2.5 Família Fabaceae	10
2.6 Gênero <i>Machaerium</i>	11
2.7 <i>Machaerium ferox</i> (Benth.) Ducke (Fabaceae).....	11
2.8 Atividade biológica e composição química de <i>Machaerium</i> spp.	12
3 OBJETIVOS.....	15
3.1 Geral.....	15
3.2 Específicos	15
4 MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1 Equipamentos e aparelhos analíticos	16
4.2 Coleta e processamento do material vegetal.....	16
4.3 Preparação dos extratos em pequena escala.....	17
4.4 Preparação do extrato em maior escala.....	18
4.5 Isolamento de substâncias de <i>M. ferox</i>	18
4.6 Isolamento da substância A	20
4.7 Isolamento da substância B.....	20
4.8 Testes biológicos.....	21

5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
5.1	Coleta e processamento do material vegetal	23
5.2	Extração em pequena escala	23
5.3	Atividade antimalárica <i>in vitro</i> – triagem	23
5.4	Extração em maior escala para isolamento de substâncias	24
5.5	Substância A – Epicatequina	25
5.6	Substância B - (AS2B).....	33
6	CONCLUSÃO	38
7	REFERÊNCIAS	39
8	ANEXOS.....	47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mapa de municípios prioritários para malária no Brasil.....	1
Figura 2 - Antimaláricos isolados de plantas.....	2
Figura 3 - Ciclo de vida do <i>Plasmodium</i>	5
Figura 4 - Países que apresentaram resistência de <i>Plasmodium</i> spp. à TCA	7
Figura 5 - Drogas utilizadas no tratamento de malária humana	8
Figura 6 - <i>Machaerium ferox</i>	12
Figura 7 - Constituintes químicos de espécies de <i>Machaerium</i>	13
Figura 8 - Substâncias isoladas de <i>M. hirtum</i> em trabalhos anteriores.....	13
Figura 9 - Substâncias isoladas de <i>M. multiflorum</i> em trabalhos anteriores.....	14
Figura 10 - Ampliações do espectro de COSY da substância A	26
Figura 11 – Atribuições das correlações de COSY para a substância A.....	27
Figura 12 – Ampliações do espectro de HMBC para os anéis A e B da substância A.....	28
Figura 13 - Espectro de HMBC ampliado em correlações do anel B da substância A	29
Figura 14 – Ampliações do espectro de HMBC para o anel C da substância A	29
Figura 15 – Atribuições das correlações heteronucleares de HMBC da substância A.....	30
Figura 16 - A estrutura da epicatequina.....	30
Figura 17 - Catequinas do chá verde com atividade antiplasmódica.....	30
Figura 18 - Ampliação do espectro de RMN de ¹ H da substância B.....	33
Figura 19 - Ampliação do espectro de COSY da substância B (AS2B).....	34
Figura 20 - Estruturas das substâncias β-amirenona (27) e germanicona (28).....	34
Figura 21 - Ampliação do espectro de COSY da substância AS2B	35
Figura 22 - Ampliação do espectro de HMBC da substância B (AS2B).....	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Rendimentos dos extratos secos de <i>M. ferox</i> e seus respectivos teores extrativos.	23
Tabela 2 - Inibição in vitro de extratos de <i>M. ferox</i> frente à estirpe K1 de <i>P. falciparum</i>	24
Tabela 3 - Dados de RMN 1D e 2D da substância A (epicatequina, 24) (300/75 MHz; ppm; CD ₃ OD).....	31
Tabela 4 - Dados de RMN de ¹³ C e ¹ H da substância A e dados da literatura para epicatequina (24)	32
Tabela 5 - Dados de RMN 1D e 2D da substância B (AS2B) (300/75 MHz; CD ₃ Cl ₃)	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1D	Unidimensional
2D	Bidimensional
AcOEt	Acetato de etila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AS1A	Substância A
AS2B	Substância B
Benth.	Bentham
CA	Central Analítica
CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia de camada delgada
CI ₅₀	Concentração inibitória de 50%
COSY	<i>Correlation spectroscopy</i>
CTA	Conhecimento tradicional associado
<i>d</i>	Dubleto
<i>dd</i>	Duplo dubleto
DMSO	Dimetilsulfóxido
EAC1	Extrato acetônico de <i>M. ferox</i> em grande escala
F.AcOEt	Fração de acetato de etila de EAC1
F.CHCl ₃	Fração clorofórmica de EAC1
F.hex	Fração hexânica de EAC1
FMT-HVD	Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado
HEPES	Ácido (hidroxietil)piperazina etanosulfônico
HHDBP	Hexaidrodibenzopirano
HMBC	<i>Heteronuclear multiple bond coherence</i>

HSQC	<i>Heteronuclear single quantum correlation</i>
IC	Intervalo de confiança
INPA	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
<i>J</i>	Constante de acoplamento
K1	Cepa de <i>Plasmodium falciparum</i> resistente à cloroquina
LAPAAM	Laboratório de Princípios Ativos da Amazônia
LTQPN	Laboratório Temático de Química de Produtos Naturais
<i>m</i>	Multiplete
NOESY	<i>Nuclear Overhauser effect spectroscopy</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
PNCM	Programa Nacional de Controle da Malária
RMN	Ressonância magnética nuclear
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
<i>s</i>	Singleto
<i>sl</i>	Singleto largo
sp.	Abreviatura de espécie
spp.	Abreviatura de espécies
SUS	Sistema Único de Saúde
TCA	Terapia combinada à base da artemisinina
TMS	Tetrametilsilano
UV	Ultravioleta
δ	Deslocamento químico

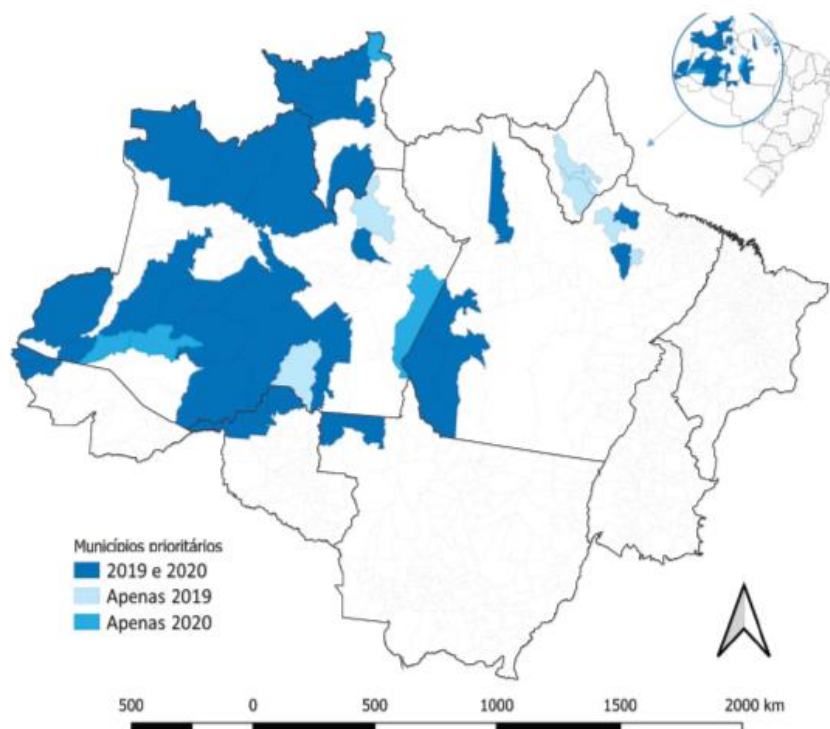
1 INTRODUÇÃO

A malária é uma doença causada por parasitas do gênero *Plasmodium* e é transmitida pela fêmea do mosquito do gênero *Anopheles* durante o repasto sanguíneo. Existem cinco espécies de *Plasmodium* que são de maior relevância epidemiológica para a malária humana, dos quais *P. falciparum* e *P. vivax* são os mais prevalentes, sendo *P. falciparum* o mais perigoso (OMS, 2015).

Apesar de evitável e tratável, a malária tem grande impacto na saúde e subsistência das pessoas. Em 2020 a doença acometeu pessoas em mais de 85 países. Nesse mesmo ano estimou-se 241 milhões de casos e 627 mil mortes ao redor do mundo, 14 milhões de casos a mais que o ano de 2019. Os países afetados pela malária são principalmente de regiões tropicais e subtropicais (OMS, 2020).

No Brasil, a transmissão concentra-se na região amazônica (Figura 1). Em 2019, foram notificados 157.454 casos de malária em todo o país, uma redução de 19% em relação a 2018. No primeiro semestre de 2020 foram registrados 60.713 casos de malária (BRASIL, 2020). A redução se deve, principalmente, à integração das ações de saúde realizadas pelo Governo Federal em parceria com os Estados, Municípios e a população contra a doença.

Figura 1 - Mapa de municípios prioritários para malária no Brasil

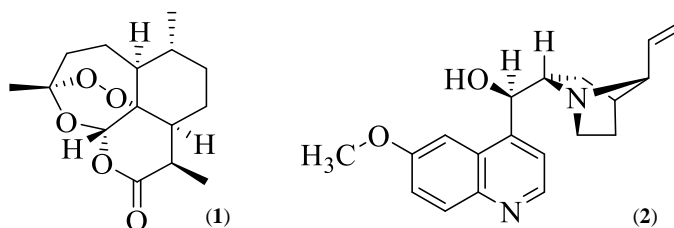


Fonte: Brasil (2020)

Em muitos países, o progresso da erradicação da doença é ameaçado pelo rápido desenvolvimento e resistência do mosquito aos inseticidas, além da resistência dos parasitos a medicamentos antimaláricos (OMS, 2016). Novos medicamentos com estruturas e mecanismos de ação únicos são urgentemente necessários para tratar cepas de malária resistentes.

Historicamente, substâncias de origem natural representam uma fonte importante para a descoberta e desenvolvimento de novos medicamentos para diversas doenças. Alguns dos medicamentos utilizados nos tratamentos de primeira linha contra malária tiveram como origem plantas medicinais, como o medicamento artemisinina (1), isolado das folhas de *Artemisia annua*, planta medicinal nativa da Ásia, e a quinina (2), obtida a partir de cascas de *cinchona* spp., nativas da América do Sul (FAURANT, 2011).

Figura 2 - Antimaláricos isolados de plantas



Artememisinina (1) e quinina (2).

As plantas medicinais exercem um papel importante na prevenção e no tratamento de diversas doenças. Além de serem utilizadas por povos tradicionais, podem ser estudadas como ricas fontes de substâncias com potencial para desenvolvimento de novas drogas (SHAKYA, 2016).

Ao longo dos séculos, os povos da região amazônica buscaram recursos florestais para o tratamento de doenças, incluindo a malária, resultando em conhecimentos terapêuticos experimentados tradicionalmente e que têm se provado eficientes em diversos estudos. Em Oriximiná, no Pará, um município com alto índice de malária, grupos tradicionais como povos remanescentes de quilombos puderam experimentar e conhecer plantas úteis contra a doença e seus sintomas. A maioria das espécies utilizadas é nativa, mostrando a conexão entre as comunidades tradicionais e a biodiversidade local (OLIVEIRA et al., 2015). Muitas plantas citadas por esta e outras comunidades tradicionais e indígenas vêm sendo estudadas na procura de moléculas que apresentam atividade contra *Plasmodium*, no entanto, ainda existem diversas espécies potencialmente eficazes a serem exploradas.

A *Machaerium ferox* é nativa da Amazônia e utilizada por comunidades tradicionais como fitoterápico no tratamento de doenças (OLIVEIRA et al., 2015). Esse trabalho tem como intuito a investigação da atividade contra o parasito da malária, *Plasmodium falciparum*, dessa planta amazônica, bem como a descoberta de novas substâncias antimaláricas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Malária

A malária é uma doença infecciosa cujo agente etiológico é um protozoário do gênero *Plasmodium*. As principais espécies associadas à malária humana são: *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi*. Outras espécies antes associadas apenas à malária em símios, atualmente já apresentam casos de infecções em humanos, entre elas, *P. brasilianum*, *P. cynomolgi* e *P. simium*, das quais *P. brasilianum* e *P. simium* já possuem relatos de infecções na Amazônia brasileira e venezuelana, respectivamente (JONGWUTIWES et al., 2004; SINGH & DANESHVAR, 2013; LALREMRUATA et al., 2015; BRASIL et al, 2017).

A malária manifesta-se como uma doença febril aguda. Em um indivíduo não-imune, os sintomas usualmente aparecem entre 10 a 15 dias após a picada do mosquito infectado. Na fase inicial da malária, os sintomas são semelhantes à maioria das síndromes febris agudas, como náuseas, tonturas, cansaço, febre contínua e sudorese, o que pode confundir profissionais de saúde e retardar o diagnóstico correto. Tal retardo, comum em áreas onde a doença não é endêmica, pode resultar em complicações como anemia grave, edema pulmonar, insuficiência renal aguda, malária cerebral e óbito (COSTA et al., 2010).

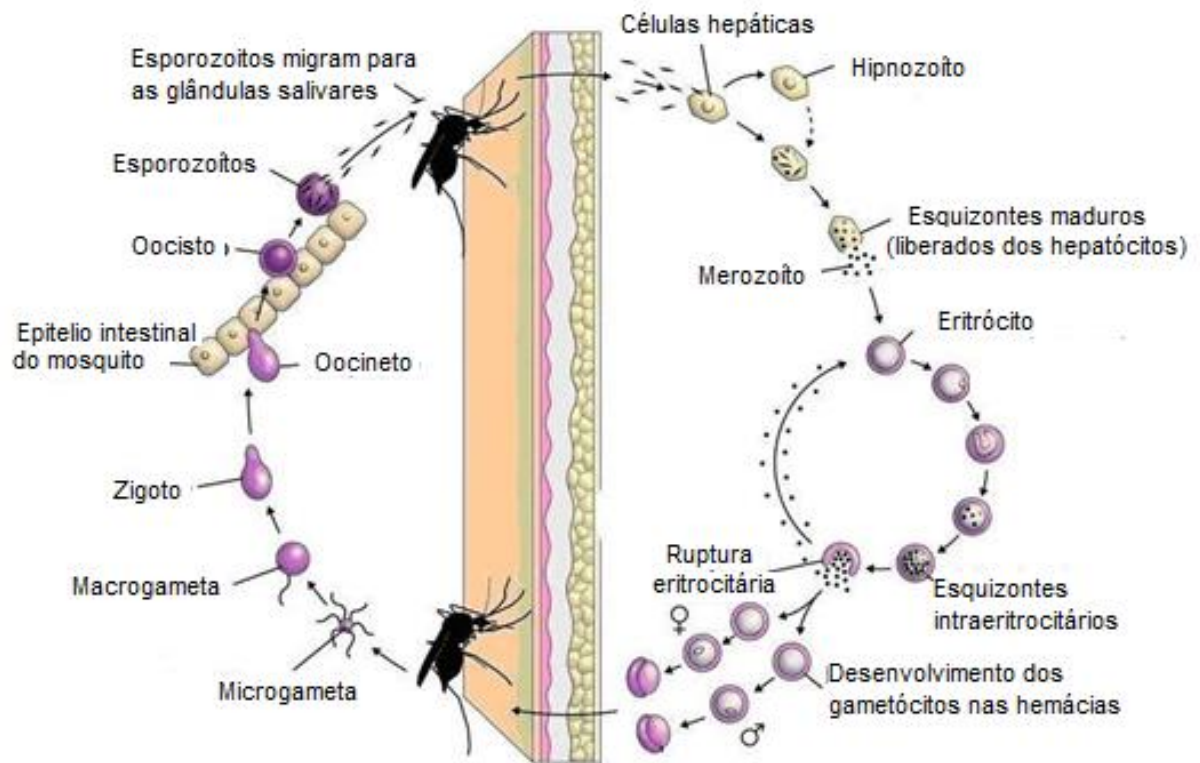
A transmissão natural da malária ocorre por meio da picada do mosquito fêmea infectado do gênero *Anopheles*, sendo mais importante na Amazônia (brasileira) a espécie *Anopheles darlingi*, cujos criadouros preferenciais são coleções de água limpa, quente, sombreada e de baixo fluxo (BRASIL, 2010). A transmissão também depende das condições climáticas, que podem afetar o número e a sobrevivência dos mosquitos, tais como, padrões de precipitação, temperatura e umidade. Em diversos locais, a transmissão é sazonal, com pico durante e depois da estação de chuvas (OPAS, 2019).

2.1.1 Ciclo de vida do *Plasmodium*

Nos hospedeiros humanos, a infecção malárica inicia-se durante o repasto sanguíneo infectante do inseto vetor, no qual acontece a inoculação de 15 a 200 esporozoítos infectantes sob a pele do hospedeiro, permanecendo ali por 15 minutos antes de alcançarem a corrente sanguínea (Figura 3). Os esporozoítos migram por diferentes células até a infecção dos hepatócitos, onde irão desenvolver-se por aproximadamente uma semana para *P. falciparum* e *P. vivax* e cerca de duas semanas para *P. malariae* (NEVES et al., 2010).

Após a invasão do hepatócito, na fase hepática, os esporozoítos se diferenciam em trofozoítos pré-eritrocíticos que se multiplicam por reprodução assexuada do tipo esquizogonia, dando origem a esquizontes teciduais e posteriormente a milhares de merozoítos que invadirão os eritrócitos. Essa primeira fase do ciclo é também denominada exo-eritrocítica ou pré-eritrocítica, pois precede o ciclo sanguíneo do parasito (NEVES et al., 2010).

Figura 3 - Ciclo de vida do *Plasmodium*



Fonte: Fundacion Io (2020).

Nas infecções causadas por *P. vivax* e *P. ovale*, o mosquito vetor inocula esporozoítos que podem ficar em estado de latência no hepatócito, denominados hipnozoítos, sendo estes os responsáveis pelas recaídas tardias da doença. As recaídas ocorrem quando há esquizogonia tardia desses parasitos dormentes no interior do hepatócito (NEVES et al., 2010).

A invasão dos eritrócitos pelos merozoítos tissulares inicia o ciclo eritrocítico. O desenvolvimento intra-eritrocítico se dá por esquizogonia, onde haverá formação de merozoítos que invadirão novos eritrócitos. Após algumas gerações de merozoítos, ocorre a diferenciação em estágios sexuais, os gametócitos, que seguirão seu desenvolvimento no mosquito vetor, dando origem ao esporozoíto (Figura 3) (NEVES et al., 2010).

O ciclo sexuado inicia-se quando a fêmea do anofelino ingere as formas sanguíneas do parasito, dos quais apenas os gametócitos serão capazes de evoluir no inseto. No intestino do

mosquito, os gametócitos serão transformados em gametas. O gametócito feminino transforma-se em macrogameta e o gametócito masculino dá origem a oito microgametas. A fecundação do macrogameta por um microgameta forma um ovo ou zigoto, que após 24 horas passa a movimentar-se, sendo denominado oocineto. No intestino médio, o oocineto se encista na camada epitelial, passando a ser chamado de oocisto. Após o processo de divisão esporogônica e crescimento do oocisto, ocorre a ruptura de sua parede, liberando os esporozoítos formados durante a esporogonia. Através da hemolinfa, estes migram até as glândulas salivares, onde serão injetados no hospedeiro vertebrado juntamente com a saliva, durante o repasto sanguíneo infectante (NEVES et al., 2010).

2.2 Resistência a antimaláricos

O monitoramento da eficácia de drogas antimaláricas é um componente chave para o controle da malária. O surgimento da resistência de parasitos do gênero *Plasmodium* a medicamentos antimaláricos tem sido uma preocupação na luta contra a doença. A resistência ao antimalárico resulta em uma eliminação atrasada ou incompleta dos parasitas no sangue do paciente que está sendo tratado com o medicamento, aumentando os riscos de mortalidade da doença e a transmissão de parasitas resistentes para outros mosquitos (OMS, 2021).

O problema da resistência aos antimaláricos é agravado pela ocorrência da resistência cruzada, cuja resistência a uma droga resulta na perda de eficácia de outros medicamentos que pertencem à mesma família química ou que têm mecanismos de ação semelhantes, como os antifolatos pirimetamina e proguanil (FRANÇA et al., 2008).

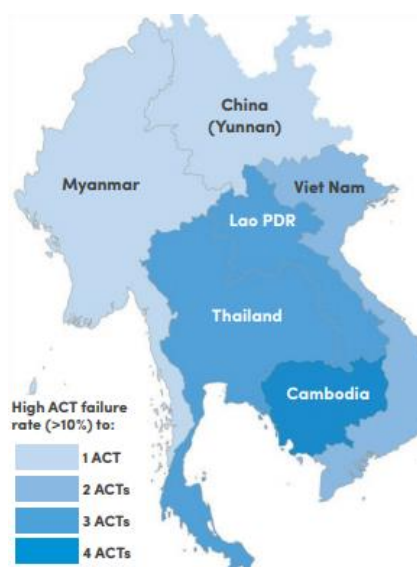
O primeiro caso de resistência à cloroquina foi registrado na Tailândia em 1957, no qual o parasito *P. falciparum* apresentou resistência ao medicamento cloroquina, amplamente utilizado para o tratamento de malária na época. Desde então, a resistência de *P. falciparum* a antimaláricos comumente usados como a cloroquina (3), mefloquina (4) e sulfadoxina-pirimetamina (5-6) (Figura 5) se propagou entre os continentes, resultando na inutilização destas drogas para o tratamento da malária causada por este parasita. Também já foram relatados casos de resistência de *P. vivax* à cloroquina e à mefloquina (ANTONY & PAJIRA, 2016).

A propagação da resistência a tratamentos monoterápicos contra malária fez com que a OMS recomendasse apenas tratamentos combinados. A mais utilizada atualmente é a TCA – terapia combinada à base de artemisinina. Apesar de ter sido, por vários anos, uma solução

eficaz contra a propagação da resistência dos parasitas, atualmente alguns países já relataram resistência a esse tratamento (OMS, 2016) (Figura 4).

A resistência do *Plasmodium* aos medicamentos antimaláricos tem sido um dos maiores desafios para a erradicação da malária. A resistência à artemisinina já foi relatada em países do sudeste asiático, na região do grande Mekong, representando um risco iminente para o tratamento (OMS, 2016).

Figura 4 - Países que apresentaram resistência de *Plasmodium* spp. à TCA



Fonte: OMS (2016)

2.3 Antimaláricos usados no tratamento de malária

A escolha dos medicamentos a serem utilizados contra malária depende da espécie do plasmódio, idade do paciente, gravidade da doença e gestação (CAMARGO, 2003). De acordo com a OPAS (2019), a melhor opção terapêutica disponível, especialmente para malária causada por *P. falciparum*, é o tratamento combinado com derivados de artemisinina (TCA). Artesunato (7) e arteméter (8) são alguns dos derivados de artemisinina indicados para o TCA. Este método de tratamento é recomendado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) por ser uma alternativa ao problema de aumento da resistência dos parasitas a diversas drogas antimaláricas.

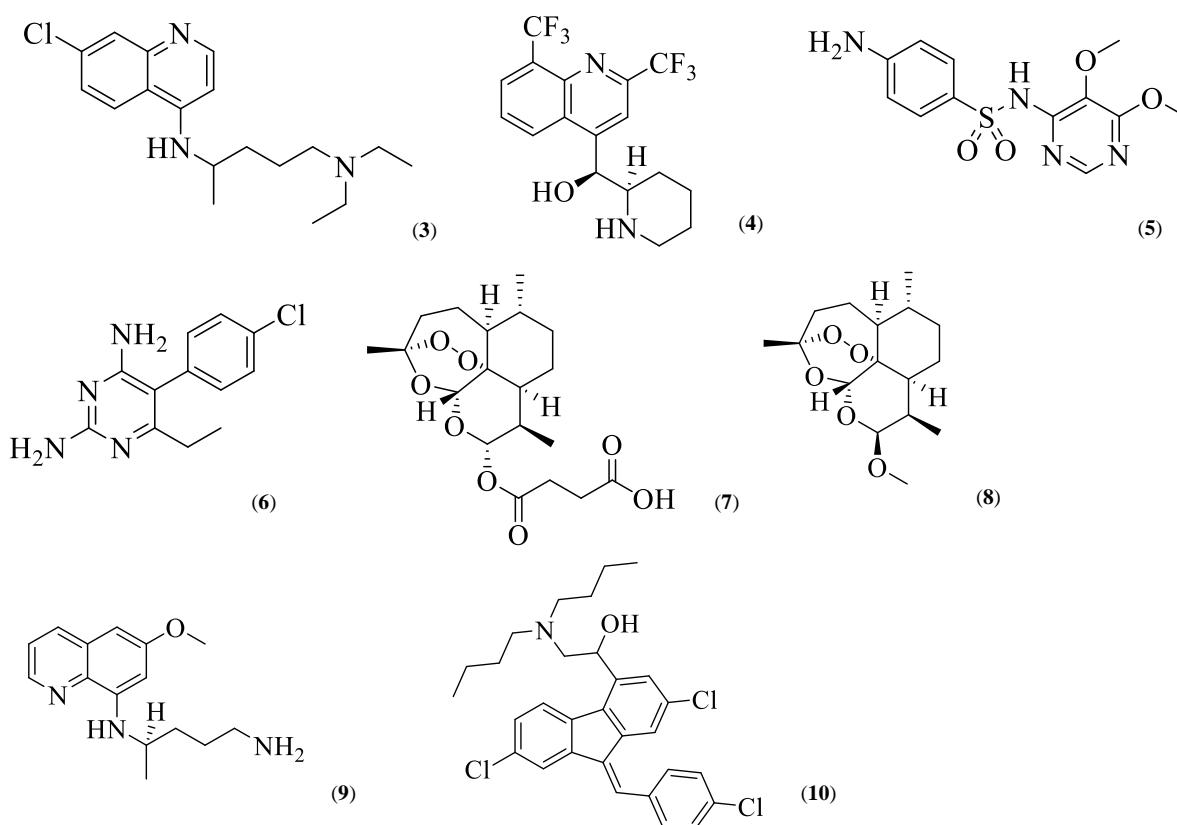
No Brasil, existe o Programa Nacional de Controle da Malária (PNCM) do Ministério da Saúde, que através do SUS (Sistema Único de Saúde), orienta a terapêutica e disponibiliza os medicamentos necessários para que haja um tratamento adequado da doença. O tratamento visa atingir o parasito em pontos chave do seu ciclo evolutivo, como a interrupção da esquizogonia sanguínea, responsável pela patogenia e manifestações clínicas da infecção, a

destruição de hipnozoítos das espécies *P. vivax* e *P. ovale*, para evitar recaídas da doença, e a interrupção da transmissão do parasito utilizando drogas que impedem a formação de gametócitos (BRASIL, 2010).

Entre as drogas recomendadas pelo PNCM para o tratamento, a cloroquina e a primaquina são utilizadas combinadamente para casos de infecções por *P. vivax* e *P. ovale*, onde a cloroquina (3) age contra as formas eritrocitárias assexuadas e gametócitos, controlando os sintomas clínicos e a parasitemia, e a primaquina (9) atua como hipnozoitocida.

Para infecções por *P. falciparum* ou infecções cruzadas, é utilizada a TCA. Várias combinações de drogas são sugeridas, como a ingestão simultânea de arteméter (8) e lumefantrina (10), ou artesunato (7) e mefloquina (4), geralmente combinadas com uma dose única de primaquina, pois esta combinação bloqueia a transmissão para os vetores, interrompendo o ciclo da doença (BRASIL, 2020).

Figura 5 - Drogas utilizadas no tratamento de malária humana



Cloroquina (3), mefloquina (4), sulfadoxina (5), pirimetamina (6), Artesunato (7), arteméter (8), primaquina (9), lumefantrina (10).

2.4 Uso de plantas medicinais no tratamento de doenças

Desde os tempos antigos pessoas buscam medicamentos na natureza para o tratamento de suas doenças. Até onde se tem conhecimento, a maioria das civilizações e culturas antigas registraram de alguma maneira o uso de plantas medicinais (SAAD et al., 2016). A evidência mais antiga por escrito do uso de plantas na preparação de medicamentos foi encontrada em Nagpur na Índia, com aproximadamente 5 mil anos de idade, compreendia receitas para preparação de medicamentos referentes a mais de 250 plantas diferentes (PETROVSKA, 2012). Outros relatos escritos foram encontrados na China e no Egito e datam de milhares de anos antes da civilização cristã.

As plantas medicinais são aquelas capazes de aliviar ou curar enfermidades e têm tradição de uso como remédio em uma população ou comunidade. Normalmente são utilizadas como chás ou infusões (ANVISA, 2020). As plantas medicinais dão origem aos fitoterápicos, e também podem ser utilizadas para obter substâncias com atividades biológicas de interesse comercial.

Atualmente, as plantas ainda são consideradas fontes importantes para a descoberta de novas moléculas bioativas. O metabolismo secundário das plantas representa um reservatório único de diversidade química, que pode servir como fonte de novos fármacos, seja diretamente ou após otimizações químicas (FEHER & SCHMIDT, 2003).

2.4.1 Plantas: Origem dos antimaláricos atuais

Por centenas de anos duas plantas medicinais, quina (*Cinchona* spp.) e qinghao (*Artemisia annua*), foram importantes no tratamento da malária, antes mesmo da compreensão do ciclo de vida do parasita. A quina é uma árvore da família das rubiáceas, nativa da América Central e América do Sul. Diversas partes da planta, como as cascas, a raiz e as folhas eram utilizadas por povos nativos dessas regiões para preparar infusões destinadas a curar diversos males, em especial estados febris.

O registro mais antigo de uso da quina data do ano de 1638 no Peru. Neste ano, a condessa de Chinchón, esposa do vice-rei do Peru, foi acometida com uma forte febre que foi tratada e curada com uma poção feita por índios denominada “quina-quina”. Hoje sabe-se que a febre da condessa era decorrente de infecção por malária. Após o relato da cura, um pó feito com raízes da planta começou a ser comercializado e exportado para diversos países como medicamento. Em 1820, a partir das cascas de quina (*Cinchona* spp.), foi isolada, pelos

químicos franceses Joseph Pelletier e Joseph Caventou, a primeira droga antimalárica, a quinina (2).

Por vários anos, a quinina (2) foi amplamente utilizada contra malária, assim como seus análogos sintéticos, como a cloroquina (3) e a mefloquina (4). Tais drogas ainda são utilizadas atualmente contra algumas cepas, porém o surgimento da resistência de *Plasmodium falciparum* a essas substâncias tornou necessária a descoberta de drogas com novos mecanismos de ação.

A artemisinina (1), droga que se tornaria alternativa aos tratamentos quinolínicos, foi isolada na China em 1971 a partir de folhas de *Artemisia annua* L., uma planta ancestralmente utilizada no tratamento contra malária no país. Hoje em dia, a artemisinina e em especial os seus derivados, são antimaláricos importantes no tratamento da doença devido ao TCA (MESHNICK & DOBSON, 2001).

2.5 Família Fabaceae

A família Fabaceae possui cerca de 650 gêneros e aproximadamente 18 mil espécies, representando uma das maiores famílias de Angiospermas. No Brasil, ocorrem cerca de 200 gêneros e 1.500 espécies desta família que geralmente é caracterizada pela presença de frutos em forma de vagem, englobando desde espécies arbóreas até herbáceas anuais, como soja e feijão (CARVALHO & GAIAD, 2019).

Espécies da família Fabaceae são utilizadas como plantas medicinais no tratamento de diversas doenças. Rahman e Parvin (2014) realizaram um levantamento de 32 espécies dessa família utilizadas por moradores de uma cidade indiana para o tratamento de doenças como asma, diarreia, doenças renais, febre, malária, paralisia e tosse. Outro estudo demonstrou a atividade antibacteriana e antioxidante dos extratos de plantas da família Fabaceae (CHANDA; DUDHATRA; KANERIA, 2010).

Algumas espécies da família Fabaceae, como copaíba (*Copaifera reticulata* Ducke) e mamangá (*Senna occidentalis* (L.) Link), já demonstraram atividade antiplasmódica *in vitro* contra *P. falciparum* em estudos prévios (SILVA et al., 2011; SOUZA et al., 2017). Extratos e substâncias de *Prosopis juliflora*, conhecida como algaroba, manifestaram atividade antimalárica *in vivo* contra *Plasmodium berghei* (BATISTA et al., 2018).

2.6 Gênero *Machaerium*

O gênero *Machaerium* Pers. (sinônimo: *Drepanocarpus* G. Mey.) engloba mais de 100 espécies encontradas em países da América do Sul, na China, Índia e México. Pertencente à família Fabaceae, suas espécies são encontradas em diferentes ambientes vegetacionais, e são utilizadas para fins medicinais e também na recomposição de áreas degradadas (ELSOHLY et al., 1999; FILARDI et al., 2021; POLIDO & SARTORI, 2007)

As plantas do gênero *Machaerium* estão sendo pesquisadas quanto a sua utilização por moradores de comunidades tradicionais no tratamento de doenças e como quimiopreventivo (RIBEIRO et al., 2015). Há relatos de sua utilização no tratamento de afta, cólicas menstruais, diarreia e malária (AMEN et al., 2015). Estudos já demonstraram a atividade antimalárica de extratos e substâncias de *M. ferox*, *M. floribunda* e *M. multiflorum* (MUHAMMAD et al., 2001; KVIST et al, 2006; OLIVEIRA et al., 2015). Algumas das atividades citadas serão tratadas em seções posteriores.

Além de suas propriedades medicinais, algumas espécies deste gênero são utilizadas em diferentes formas na agricultura, para auxiliar na proteção de plantas por alelopatia durante seu desenvolvimento, além da utilização de seus extratos como larvicidas em plantações. Sua madeira também é utilizada, servindo como substituta da madeira de jacarandá que é obtida de *Dalbergia nigra* (XIMENEZ et al., 2017; BEZERRA et al., 2019).

2.7 *Machaerium ferox* (Benth.) Ducke (Fabaceae)

A *M. ferox* é uma trepadeira nativa da região Amazônica com caule em ramos armados e folhas em formato de estípulas espinescentes (Figura 6). Tem flores em formato de cálice campanulado com pétalas rosas ou lilases. Seus frutos são do tipo núrcula (FLORA DO BRASIL, 2019). É conhecida por aturiá ou juquiri-preto, e em Oliveira et al. (2015) é citada pelo nome de saratudo. É encontrada principalmente nas regiões norte e nordeste do país, em florestas de igapó e florestas de várzea (FLORA DO BRASIL, 2019).

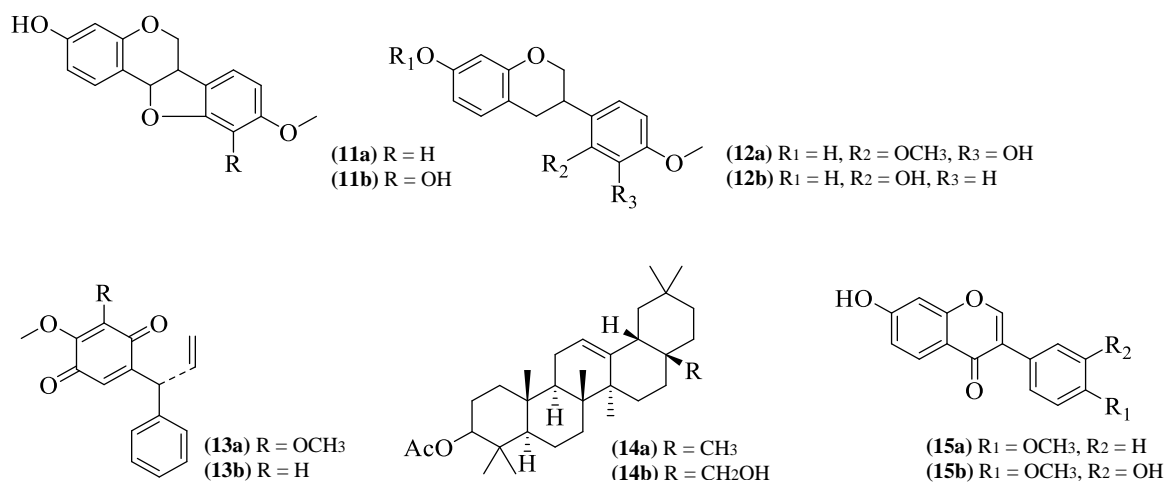
Figura 6 - *Machaerium ferox*

Apesar de ter propriedades medicinais ainda pouco pesquisadas, alguns estudos já relataram o uso em tratamentos contra icterícia, doenças pulmonares e malária (OLIVEIRA et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2015). A planta também é utilizada por moradores de comunidades ribeirinhas de Santarém – Pará no tratamento de picada de cobras como *Bothrops jararaca* (MOURA et al., 2015).

2.8 Atividade biológica e composição química de *Machaerium* spp.

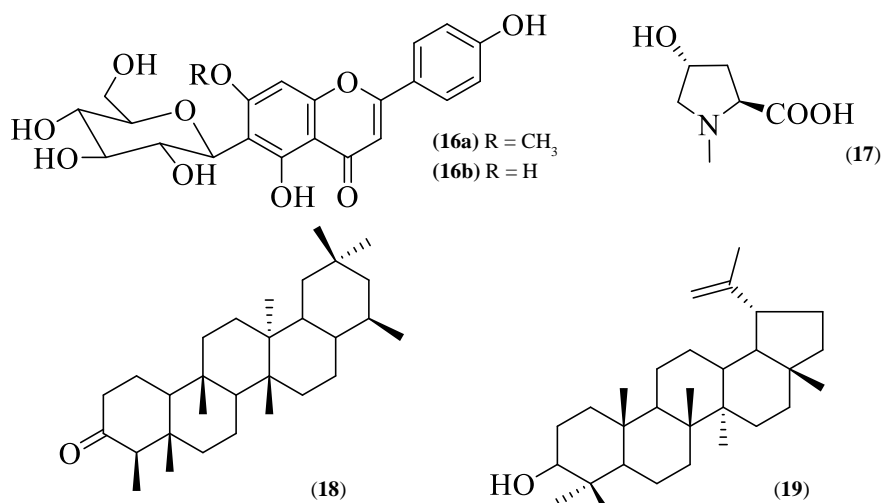
Em um estudo sobre plantas medicinais utilizadas por remanescentes de quilombos de Oriximiná no Pará, o extrato etanólico do caule de *M. ferox* apresentou atividade antimicobacteriana em *Mycobacterium tuberculosis* (OLIVEIRA et al., 2011). Em outros trabalhos utilizando conhecimento tradicional, Oliveira et al. (2015) e Kvist et al. (2006) testaram extratos de diversas plantas contra malária, onde os extratos etanólicos de *M. ferox* e *M. floribunda* mostraram-se parcialmente ativas contra *P. falciparum in vitro*, com CI_{50} de 20 $\mu\text{g/mL}$ e 87 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Ribeiro et al. (2015) demonstraram o potencial quimiopreventivo de extratos hidroalcoólicos de jacarandá-bico-de-pato (*M. hirtum*).

Trabalhos anteriores revelaram a presença de isoflavonóides (**11**, **12**), quinonas (**13**) e triterpenoides (**14**) em *Machaerium incorruptibile*, *M. scleroxyton* e *M. vestitum* (ALVES et al., 1966; KUROSAWA et al., 1978; CONDE-SALAZAR et al., 1980). Em um estudo bioguiado utilizando o extrato etanólico do caule de *M. aristulatum* foram isoladas duas isoflavonas (**15**) que demonstraram boa atividade contra o protozoário *Giardia* (ELSOHLY et al., 1999).

Figura 7 - Constituintes químicos de espécies de *Machaerium*

Nomes das substâncias: Medicarpina (**11a**), vesticarpano (**11b**), mucrunulato (**12a**), vestitol (**12b**), R-3,4-dimetoxidalbergiona (**13a**), R-4-metoxidalbergiona (**13b**), acetato de β -amirina (**14a**), eritrodio-3-acetato (**14b**), formononetina (**15a**) e calicosina (**15b**). Fontes: Alves et al. (1966); Kurosawa et al. (1978); Conde-Salazar et al. (1980); Elshohly et al. (1999).

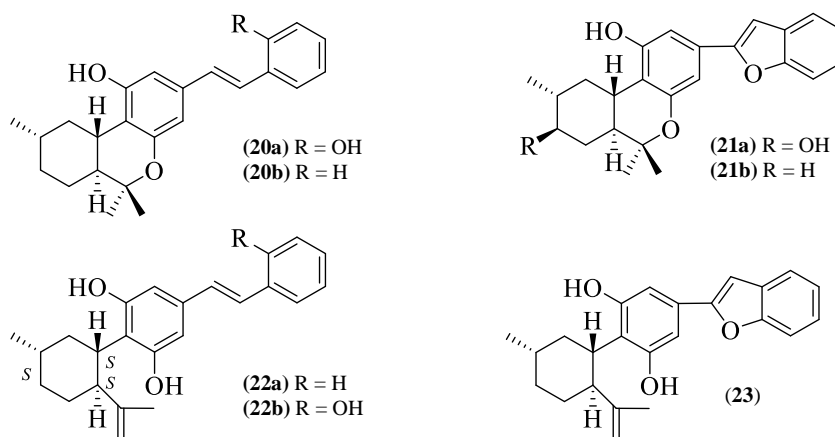
Com o intuito de identificar os constituintes químicos majoritários de *M. hirtum* e avaliar suas frações, Ignoato et al. (2013) realizaram uma investigação farmacológica utilizando folhas e galhos da espécie. Cinco substâncias foram isoladas e identificadas como as flavonas swertisina (**16a**) e isovitexina (**16b**), o alcaloide 4-hidroxi-*N*-metilprolina (**17**) e os triterpenos friedelina (**18**) e lupeol (**19**). As frações hexânicas obtidas das folhas e dos galhos demonstraram a maior atividade anti-inflamatória em ratos dentre as avaliadas.

Figura 8 - Substâncias isoladas de *M. hirtum* em trabalhos anteriores

Nomes das substâncias: Swertisina (**16a**), isovitexina (**16b**), 4-hidroxi-*N*-metilprolina (**17**), friedelina (**18**) e lupeol (**19**). Fonte: Ignoato et al. (2013).

Um estudo químico e biológico realizado por Muhammad et al. (2003) resultou no isolamento de cinco substâncias a partir de *M. multiflorum*, dois novos *trans*-hexaidrodibenzopiranos (HHDBP's): machaeriol C (**20a**) e machaeriol D (**21a**) e três novos 5,6-*seco*-HHDBP's: machaeridiol A (**22a**), machaeridiol B (**22b**) e machaeridiol C (**23**). Os mesmos pesquisadores haviam isolado e testado previamente dois *trans*-hexaidrodibenzopiranos, nomeados machaeriol A (**20b**) e machaeriol B (**21b**) (MUHAMMAD et al., 2001). Dentre estes, machaeriol B (**21b**) e machaeridiol B (**22b**) demonstraram atividade antimalárica contra cepa W2 de *Plasmodium falciparum*, com CI_{50} de 120 ng/mL e 220 ng/mL, respectivamente.

Figura 9 - Substâncias isoladas de *M. multiflorum* em trabalhos anteriores



Nomes das substâncias: Machaeriol C (**20a**), machaeriol A (**20b**), machaeriol D (**21a**), machaeriol B (**21b**), machaeridiol A (**22a**), machaeridiol B (**22b**) e machaeridiol C (**23**). Fonte: Muhammad et al. (2001); Muhammad et al. (2003);

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

- Descobrir novo agente antimalárico a partir de *Machaerium ferox*

3.2 Específicos

- Obter extratos ativos a partir de *M. ferox*.
- Avaliar a atividade antiplasmódica *in vitro* dos extratos contra *Plasmodium falciparum*.
- Isolar substâncias a partir das frações ativas
- Caracterizar e identificar as substâncias isoladas por ressonância magnética nuclear

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi desenvolvido nas dependências do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). A espécie estudada faz parte de um grupo de etnoespécies utilizadas por comunidades remanescentes de quilombos do município de Oriximiná – PA, reconhecidas como detentoras do conhecimento tradicional associado (CTA) identificável sobre o uso de plantas medicinais no tratamento de malária (OLIVEIRA et al., 2015), das quais o LAPAAM/INPA possui anuência para este estudo assinada pelos representantes da Associação de Comunidades Remanescentes de Quilombos do Município de Oriximiná (ARQMO). A espécie utilizada nesse trabalho foi cadastrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen: A6270E8). Foi realizado o tombamento da exsicata no Herbário do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia – INPA com o número de registro 289801.

4.1 Equipamentos e aparelhos analíticos

Os seguintes equipamentos foram utilizados durante a realização das análises e condução dos experimentos laboratoriais desse trabalho:

- Balança analítica: marca Master, modelo AY220, com limite máximo de 220 g e mínimo de 0,001 g;
- Balança semi-analítica: marca Master, modelo ARC120, com limite de peso de 3100 g e mínimo de 0,01 g;
- Banho de ultrassom: marca Unique, modelo USC-1800A;
- Espectrômetro de RMN: marca Bruker Ultrashield de 300 MHz;
- Lâmpada de UV: marca UVP, modelo CC-10 (ondas longas, 365 nm, e curtas, 254 nm);
- Moinho de facas: marca Marconi, modelo MA340;
- Rotaevaporador: marca Fisatom, modelo 804.

4.2 Coleta e processamento do material vegetal

A coleta dos caules de *M. ferox* foi realizada no dia 22 de maio de 2019, na Reserva Florestal Adolfo Ducke, localizada no quilômetro 28 da rodovia AM 010, município de Manaus – AM. No Laboratório de Princípios Ativos da Amazônia (LAPAAM) as amostras foram cortadas e secas em estufa de circulação de ar a uma temperatura de 30°C, com sua massa sendo monitorada diariamente por meio de pesagem, até obtenção de peso constante.

Após a secagem, o material foi triturado em moinho de facas. A amostra triturada foi armazenada em sacos de papel e potes de plástico a fim de evitar proliferação de fungos.

4.3 Preparação dos extratos em pequena escala

Os extratos de *M. ferox* foram preparados com base em métodos utilizados em estudos anteriores com esta espécie. Muhammad et al. (2003) e Oliveira et al. (2015) relataram atividades de extratos de *M. ferox* obtidos por extração a frio, percolação e maceração, respectivamente, com solventes de baixa a alta polaridade. Baseado nestes relatos, optou-se pela extração por maceração. Também foram realizadas extrações por decocção e infusão, considerando que estes são os métodos comumente utilizados nas comunidades tradicionais.

A extração por maceração foi primeiramente realizada em pequena escala. Foram preparados extratos com 6 solventes diferentes, utilizando um período de extração de 10 dias, nos quais foi realizada agitação em banho de ultrassom por 1 hora a cada 24 horas. Foi utilizado 1 g de material vegetal para 25 mL de solvente, sendo estes: hexano, clorofórmio, acetato de etila, acetona e etanol. Também foi utilizada uma mistura hidroalcoólica na proporção de 1:1 de etanol e água. Os extratos obtidos foram colocados para secar em banho de areia e posteriormente pesados para calcular o rendimento das extrações.

4.3.1 Infusão de *M. ferox*

Para a extração por infusão, foram utilizados 1 g de amostra e 25 mL de água. Aqueceu-se a água até temperatura de ebulição, em seguida, o aquecimento foi cessado e a amostra de material vegetal foi adicionada à água. A mistura descansou por 1 h com o recipiente tampado, e após isso foi filtrada e colocada para secar em banho de areia.

4.3.2 Decocção de *M. ferox*

Para a decocção, 1 g de amostra foi adicionado a 25 mL de água aquecida até temperatura de ebulição. A mistura seguiu aquecendo em fervura por 1 h. Pequenas quantidades de água foram adicionadas durante o processo para manter o volume de 25 mL. Após o tempo de 1 h, a mistura foi filtrada e o filtrado foi colocado para secar em banho de areia.

Após a evaporação completa, as amostras foram pesadas para cálculo do teor de extrativos a partir da equação abaixo, e os resultados estão apresentados na tabela 1 (seção 5.2).

$$\text{Teor extrativo} = \frac{(\text{massa do extrato seco obtido}) * 100}{\text{massa do material vegetal utilizado}} \quad (1)$$

Os extratos obtidos foram submetidos a testes biológicos *in vitro* para determinar a atividade antiplasmódica contra *P. falciparum* (seção 4.8). O extrato que obteve melhor resultado, considerando rendimento (Tabela 1) e atividade antiplasmódica (Tabela 2), foi selecionado para a extração em maior escala, posterior fracionamento e identificação de substâncias isoladas. O extrato de acetona foi o selecionado para dar continuidade aos procedimentos.

4.4 Preparação do extrato em maior escala

A extração em maior escala foi realizada a partir do método de maceração, utilizando 500 g de material vegetal seco de *M. ferox* e acetona como solvente. Foram realizadas extrações sucessivas em frasco tipo mariote, havendo retirada do extrato e reposição de solvente a cada 24 horas por 7 dias. Este extrato foi codificado como EAC1.

Todas as soluções obtidas foram filtradas e concentradas em evaporador rotativo, e posteriormente colocadas para secar em banho de areia até ser verificada a estabilização da massa. Após secagem em banho de areia, foi verificado o rendimento final do extrato EAC1.

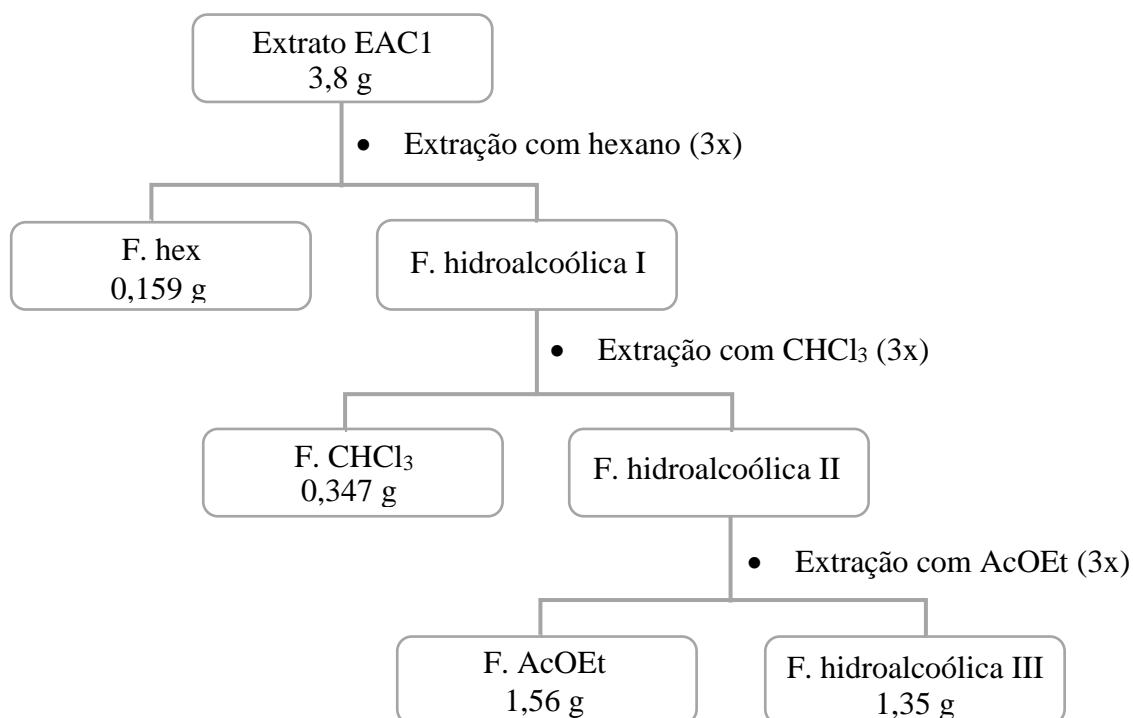
4.5 Isolamento de substâncias de *M. ferox*

4.5.1 Extração líquido-líquido do extrato EAC1

Para a extração líquido-líquido, o extrato EAC1 foi dissolvido em uma mistura de metanol e água (3:7) e agitado em ultrassom por 25 minutos. Após dissolução completa, foram realizadas as extrações em funil de separação com os seguintes solventes: hexano, clorofórmio e acetato de etila, conforme o fluxograma 1. Cada extração foi repetida por três vezes com cada solvente.

Após a extração líquido-líquido, as frações foram colocadas para secar em banho de areia para posteriormente serem pesadas. A partir das frações obtidas foram realizadas CCDs para visualizar os perfis cromatográficos das frações geradas e dar prosseguimento ao fracionamento para o isolamento de substâncias.

Fluxograma 1 - Extração líquido-líquido do extrato EAC1



4.5.2 Cromatografia em coluna (CC)

As colunas cromatográficas foram realizadas utilizando sílica gel (0,063 - 0,200 mm), Merck. Foram utilizadas colunas de vidro, nas quais o tamanho e diâmetro variaram de acordo com a necessidade de cada procedimento de separação.

4.5.3 Cromatografia em camada delgada (CCD) analítica

Foram utilizadas cromatoplasas de fase normal marca Merck 20×20 cm, recortando-se as placas até uma altura de 5 cm. Para as análises de extratos, frações e reunião de subfrações cromatográficas, as placas de CCD foram visualizadas em câmara de luz UV nos comprimentos de onda 254 e 365 nm e reveladas com solução de *p*-anisaldeído em aquecimento a 100°C.

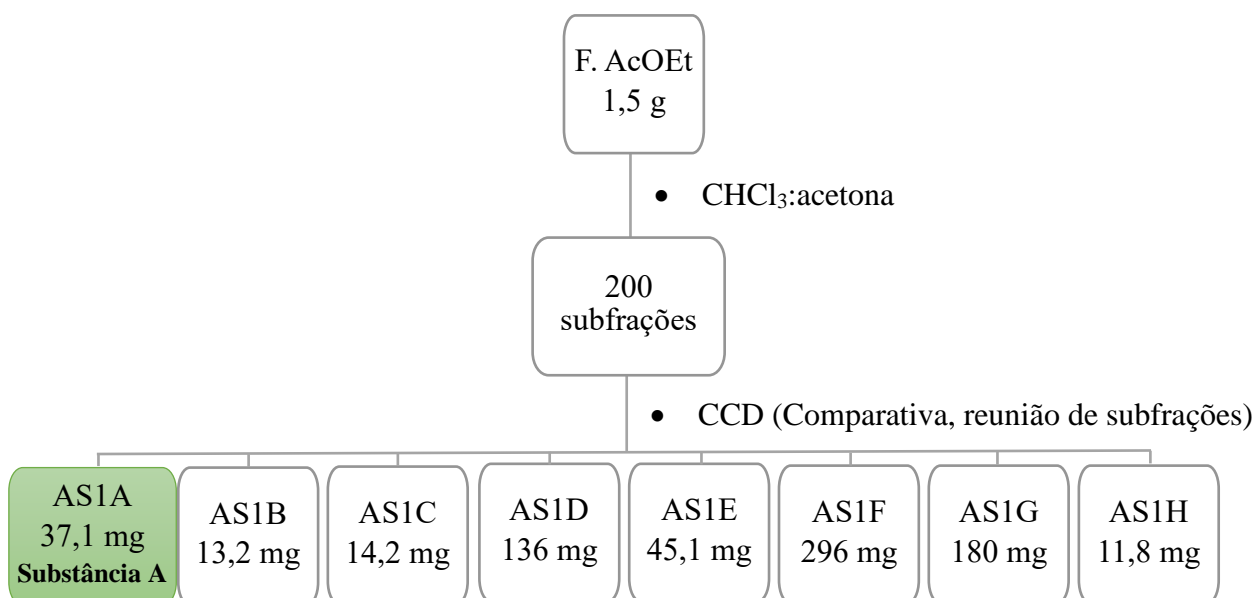
4.5.4 Ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética de hidrogênio e carbono (1D) foram obtidos em um espectrômetro da marca Bruker modelo Fourier 300 (7,05 T), operando na frequência de 300 MHz (RMN ¹H) e 75 MHz (RMN ¹³C), utilizando solvente deuterado, além do padrão de referência TMS (tetrametilsilano/Sigma-Aldrich) no solvente utilizado. Também foram registrados espectros de RMN bidimensionais (2D) de COSY, HSQC, HMBC, NOESY e J_{RES} na CA-LTQPN do INPA. Os deslocamentos químicos foram registrados em ppm (δ).

4.6 Isolamento da substância A

O fracionamento foi realizado com uma alíquota de 1,5 g da fração F.AcOEt (obtida do extrato EAC1 conforme descrito na seção 4.5.1) por meio de cromatografia em coluna aberta de 2 cm de diâmetro e 15 cm de altura de sílica gel (0,063-0,200 mm, Merck) empacotada com CHCl_3 . A coluna foi eluída com 100 mL de CHCl_3 100%, seguida de 100 mL de uma mistura binária de CHCl_3 e acetona (9:1) com aumento de polaridade de 10% (90:10 a 0:100), totalizando 1,1 L de eluentes. Foram obtidas 200 subfrações, as quais foram reunidas em 8 frações, conforme seus perfis cromatográficos visualizados em CCD. A fração AS1A (37,1 mg) apresentou um bom nível de pureza, observado por CCD (codificada como substância A) e foi levada a análise de RMN (1D e 2D).

Fluxograma 2 - Isolamento da substância A

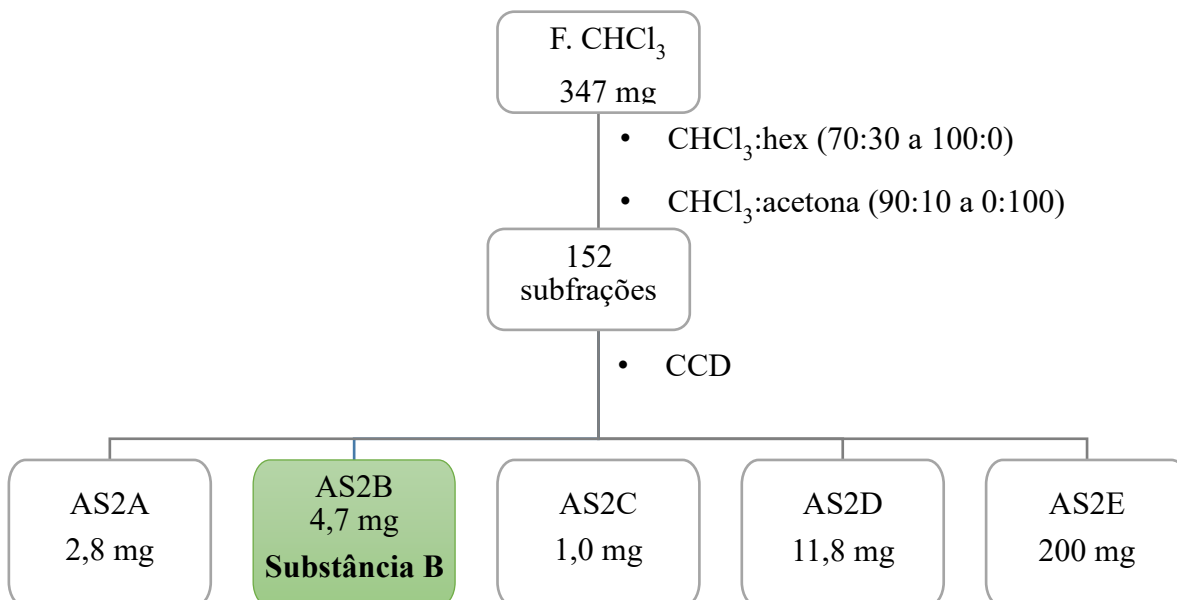


4.7 Isolamento da substância B

O segundo fracionamento foi realizado utilizando uma alíquota de 347 mg da fração F. CHCl_3 . Foi realizado cromatografia em coluna aberta de sílica gel (diâmetro \times altura = 2 \times 15 cm; 0,063-0,200 mm, Merck) empacotada com CHCl_3 . A coluna foi eluída com 100 mL de CHCl_3 100% seguida de uma mistura binária de CHCl_3 :Hex (7:3) com aumento de polaridade (70:30 a 100:0), e seguindo com o aumento de polaridade utilizando CHCl_3 :acetona (90:10 à 0:100), totalizando 1,1 L de eluente utilizado. Foram obtidas 152 subfrações, as quais foram reunidas em 17 e depois 5 frações, conforme seus perfis cromatográficos. A fração AS2B (4,7 mg) apresentou um bom nível de pureza, observado por CCD (codificada como substância B)

e foi levada a análise de RMN (1D e 2D). Na fração AS2E (200 mg) foram reunidas as subfrações que não apresentaram potencial para isolamento de substâncias.

Fluxograma 3 - Isolamento da substância B



4.8 Testes biológicos

4.8.1 Cultivo *in vitro* de *Plasmodium falciparum*

O cultivo *in vitro* de *P. falciparum* e os bioensaios foram realizados no Laboratório de Cultivo de *Plasmodium falciparum* do Laboratório de Malária e Dengue /INPA com o auxílio da Mestre Laís Garcia Jordão. O método utilizado é uma adaptação da técnica de Trager e Jensen (1976) feita pela Gerência de Malária da FMT-HVD (ANDRADE-NETO et al., 2007), o qual baseia-se no desenvolvimento *in vitro* dos estágios eritrocitários de *P. falciparum*.

A cultura foi realizada utilizando a cepa K1 de *P. falciparum*, resistente à cloroquina e pirimetamina. A cepa foi cultivada em eritrócitos humanos do tipo A+ na temperatura de 37°C, em frascos de poliestireno de 50 mL hermeticamente fechados, a uma atmosfera de baixa tensão de oxigênio (5% de CO₂, 5% de O₂ e N₂ balanceado (White Martins)).

Foram adicionados aos frascos cerca de 500 µL de eritrócitos parasitados e 4,5 mL de meio RPMI 1640 (Gibco®) suplementado com NaHCO₃ (32 mM), HEPES (25 mM), hipoxiaxantina (37 mM), glutamina (2 mM), glicose (10 mM), 0,4 mL de gentamicina e 10% de plasma humano inativado tipo A+. A troca do meio de cultura e a adição de mistura carbogênica foram realizadas diariamente, assim como a adição de eritrócitos sempre que a concentração de parasitas se encontrava elevada (>5%).

O crescimento dos parasitas foi acompanhado durante a troca de meio de cultura, por meio de esfregaços sanguíneos corados em panótico® e observados em microscópio óptico. A parasitemia foi calculada e expressa em percentagem a partir da contagem de 2000 eritrócitos.

4.8.2 Microteste de suscetibilidade *in vitro*

O microteste de suscetibilidade foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Rieckmann et al. (1978), com adaptações de Andrade-Neto et al. (2007). As amostras foram testadas nas concentrações de 50 e 5 µg/mL na etapa de triagem. Entre essas, as que apresentaram percentual de inibição igual ou acima de 80% foram consideradas relevantes e avaliadas em sete concentrações, entre 100 a 1,56 µg/mL (concentrações finais/concentrações nos poços), para determinação da concentração capaz de reduzir o crescimento do parasita em 50% (CI₅₀).

As amostras foram preparadas utilizando DMSO em soluções estoque de concentração 10 mg/mL e diluídas em meio de cultura RPMI 1640 para as concentrações a serem testadas. As amostras foram testadas em triplicata na triagem e duplicata para o cálculo de CI₅₀, em microplaca de 96 poços. Em cada poço foi adicionada uma suspensão de hemácias com parasitemia inicial de 1% sincronizadas em estágio de anel por meio de adição de sorbitol, juntamente com a amostra a ser testada em um volume final de 200 µL, incubadas por 48 h a 37°C. Para o controle do crescimento, os poços foram preparados e incubados sem amostras, contendo apenas a suspensão de hemácias e o DMSO na mesma quantidade da maior concentração das amostras (1% de DMSO no poço).

Após a incubação, foram preparados esfregaços sanguíneos para cada poço, corados em panótico®. Estes foram observados em microscópio para a aferição da parasitemia, a partir da contagem de cerca de 2000 eritrócitos para cada esfregaço. A parasitemia expressa em percentagem foi calculada pela Equação 2:

$$\text{Parasitemia (\%)} = \frac{N^\circ \text{ total de parasitas} * 100}{N^\circ \text{ total de hemácias}} \quad (2)$$

4.8.3 Análise estatística de dados

A concentração inibitória de 50% de crescimento (CI₅₀) foi calculada com o auxílio do software GraphPad Prism 5.0, onde o efeito antiparasitário das amostras foi medido em relação ao controle livre de drogas, em um intervalo de confiança de 95% (IC 95).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Coleta e processamento do material vegetal

A massa inicial da amostra de caule de *M. ferox* foi de 1,2 kg. Após cinco dias de secagem em estufa, sua massa final foi de 697,2 g.

5.2 Extração em pequena escala

5.2.1 Rendimento das extrações

Os rendimentos dos extratos secos (mg) e teores de extrativos (rendimento percentual) das extrações estão apresentados na tabela 1. Como pode ser visualizado na tabela, o rendimento dos extratos obtidos por maceração cresceu conforme o aumento da polaridade dos solventes, onde a solução hidroalcoólica 1:1 apresentou o maior rendimento, seguida pelas extrações por etanol e acetona. Nota-se também, que mesmo utilizando um solvente de alta polaridade, as extrações realizadas pelos métodos tradicionais de infusão e decocção com H₂O obtiveram rendimento mediano se comparados com a maceração à temperatura ambiente.

Tabela 1 - Rendimentos dos extratos secos de *M. ferox* e seus respectivos teores extrativos.

Solvente	Rendimento de extrato seco	Teor de extrativos
	(mg)	(%)
Hexano	6,0	0,60
CHCl ₃	6,4	0,64
Acetato de etila	20,5	2,05
Acetona	61,2	6,12
Etanol	68,4	6,84
Etanol:H ₂ O	86,9	8,69
H ₂ O (Infusão)	28,3	2,83
H ₂ O (Decocção)	33,6	3,36

5.3 Atividade antimalárica *in vitro* – triagem

Os extratos de *M. ferox* foram submetidos a uma triagem baseada na sua inibição *in vitro* da cepa K1 de *Plasmodium falciparum* resistente à cloroquina em duas concentrações (50 e 5,0 µg/mL). Os percentuais de inibição dos extratos estão apresentados na tabela 2. Inicialmente, as amostras que apresentaram inibição da parasitemia na maior concentração igual ou superior a 80% foram consideradas relevantes. Os valores de referência para os cálculos

foram as parasitemias do controle contendo apenas DMSO e a suspensão de hemácias parasitadas.

Tabela 2 - Inibição *in vitro* de extratos de *M. ferox* frente à estirpe K1 de *P. falciparum*

Extrato/solvente da extração	Inibição (%)	
	Concentração	
	50 µg/mL	5,0 µg/mL
Hexano	11	0,0
CHCl ₃	88	11
Acetato de etila	53	4,4
Acetona	86	2,9
Etanol	34	0,0
Etanol:H ₂ O	43	0,0
H ₂ O (Infusão)	21	0,0
H ₂ O (Decocção)	28	0,0

De acordo com os dados da Tabela 2, os extratos de CHCl₃ e acetona exibiram as maiores inibições do crescimento do parasita (acima de 80%). Comparando os rendimentos dos extratos e suas atividades, nota-se que apesar de demonstrar boa atividade contra o parasita, o extrato de CHCl₃ foi um dos que resultaram no menor rendimento final (Tabela 1), o que pode ser uma desvantagem quando se pretende obter substâncias isoladas. O extrato de acetona além de apresentar inibição > 80% em 50 µg/mL, obteve um bom rendimento final.

5.4 Extração em maior escala para isolamento de substâncias

5.4.1 Rendimento percentual do extrato acetônico de *M. ferox* - EAC1

O rendimento (percentual) da extração foi de 3,8 g (0,76%). Nota-se que, ao contrário do procedimento em pequena escala, o extrato de acetona não apresentou um bom rendimento final. Isto ocorreu devido à necessidade de interromper precocemente o processo de extração, por conta das medidas de prevenção à infecção e propagação da Covid-19 implementadas em março de 2020.

5.4.2 Atividade antimalárica *in vitro* do extrato EAC1 – CI₅₀

Para o teste de CI_{50} , todas as amostras foram testadas em duplicata com sete diluições cada (100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56 $\mu\text{g/mL}$). Os critérios utilizados para classificação da atividade dos extratos brutos estão de acordo com os definidos na literatura (OLIVEIRA et al., 2015) e estão apresentados a seguir:

Concentração inibitória 50% (CI_{50}):

- $CI_{50} > 25 \mu\text{g/mL} = \text{inativo (I)}$
- $25 \mu\text{g/mL} \geq CI_{50} > 10 \mu\text{g/mL} = \text{parcialmente ativo (PA)}$
- $10 \mu\text{g/mL} \geq CI_{50} > 1,0 \mu\text{g/mL} = \text{ativo (A)}$
- $CI_{50} \leq 1,0 \mu\text{g/mL} = \text{muito ativo (MA)}$

A partir dos valores de CI_{50} obtidos para o extrato acetônico do caule de *M. ferox* (CI_{50} 21,3; IC (95%) 14,1 – 32,4 $\mu\text{g/mL}$), pode-se considerar o extrato parcialmente ativo. Um valor semelhante para extratos etanólicos utilizando caule desta mesma espécie foi encontrado por Oliveira et al. (2015), que obtiveram uma CI_{50} de 20 $\mu\text{g/mL}$.

5.5 Substância A – Epicatequina

A substância A foi isolada da fração de acetato de etila (F.AcOEt), proveniente do extrato acetônico do caule de *M. ferox* (EAC1, Fluxograma 2). Apresentou-se como um sólido amorfo branco, solúvel em metanol e parcialmente solúvel em acetona. Na análise em CCD, apresentou uma coloração vermelha escura após revelação com *p*-anisaldeído, sendo submetida às técnicas espectroscópicas de RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais, cujos espectros estão incluídos nos Anexos 1-6. Após análise dos resultados e comparação com dados da literatura, propôs-se a estrutura química como sendo do flavonóide, de fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6$, a epicatequina. Para a confirmação da proposta foram analisados todos os dados espectrais e ainda foi feita comparação de dados de RMN com os dados da literatura (Tabela 4).

Observando o espectro de RMN de ^1H , pode-se notar a presença de dois dubletos localizados na região de δ_{H} 5,94 ($J = 2,3 \text{ Hz}$) e δ_{H} 5,92 ($J = 2,3 \text{ Hz}$), sinalizando os hidrogênios aromáticos H-6 e H-8, respectivamente (Figura 11, Anexo 1, Tabela 3). Em δ_{H} 2,75 e 2,89 são observados dois duplos dubletos, referentes aos hidrogênios H-4 $_{\alpha}$ ($J = 17; 2,5 \text{ Hz}$) e H-4 $_{\beta}$ ($J = 17; 4,5 \text{ Hz}$), respectivamente.

Um singleto largo em δ_{H} 4,82 refere-se ao hidrogênio metínico H-2 da epicatequina. Em δ_{H} 4,18 aparece um multipeto atribuído ao hidrogênio H-3 ligado a um carbono carbinólico. Os sinais em δ_{H} 6,77 ($J = 8,1 \text{ Hz}$) e em δ_{H} 6,80 ($J = 1,8 \text{ Hz}$ e $8,1 \text{ Hz}$) são dos hidrogênios

aromáticos. O duplete em δ_H 6,98 ($J = 1,8$ Hz) refere-se ao H-2' em acoplamento meta (Anexo 1).

O espectro de ^{13}C apresentou 15 linhas espectrais (Anexo 2). Utilizando-se dos dados espectrais de DEPT135 (Anexo 3) e HSQC (Anexo 4), foi possível afirmar que essa substância apresentava 1 sinal de metileno (CH_2), 7 de metilas e/ou metinos (CH_3/CH) e 7 de carbonos quaternários (C, Tabela 3).

A análise do espectro de COSY (Anexo 6) mostrou acoplamento entre os hidrogênios do anel B na posição 2' (δ_H 6,80) com o hidrogênio 3' (δ_H 6,77) e um acoplamento 1-3 com o sinal de hidrogênio em δ_H 6,98 (H-6') (Figura 10, Tabela 3), por isso, o sinal de H-2' apresentou-se como um duplo duplete. Os hidrogênios geminais do carbono 4 (δ_H 2,75 e 2,89, anel C) apresentaram acoplamento geminal, e também com H-3 (δ_H 4,18). No anel A, o H-8 (δ_H 5,92) apresentou um acoplamento com o H-6 (δ_H 5,94), e pelos dados obtidos de deslocamento químico, os carbonos nas posições 5 e 7 podem ter hidroxilas como substituintes. Algumas correlações estão mostradas na figura 10 e 11, anexos 1 e 6, e inseridos na tabela 3.

Figura 10 - Ampliações do espectro de COSY da substância A

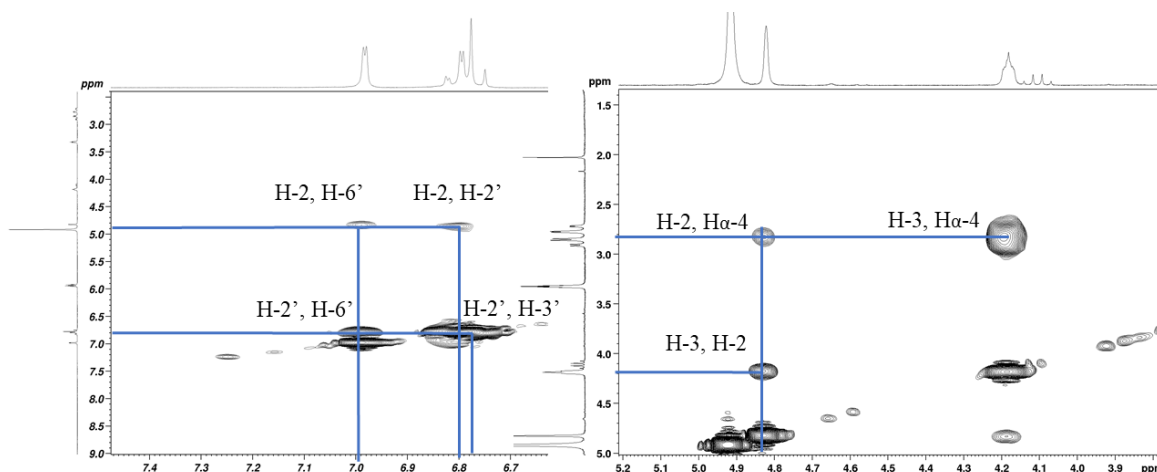
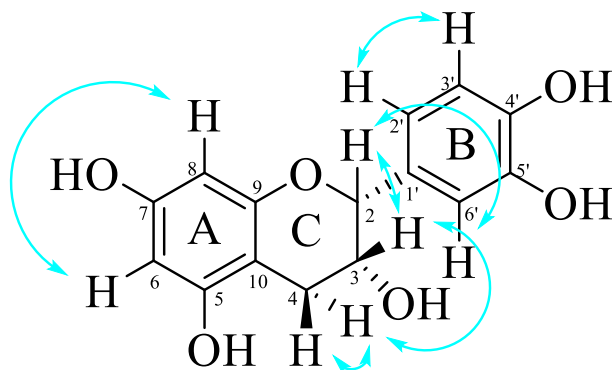


Figura 11 – Atribuições das correlações de COSY para a substância A



No mapa de contorno do HMBC (Anexo 5, Figuras 12-14) foi possível observar no anel A a correlação do H-6 ($\delta_{\text{H}} 5,94; d$) com C-8 ($\delta_{\text{C}} 94,4$) e C-10 ($\delta_{\text{C}} 98,6$) e H-8 ($\delta_{\text{H}} 5,92; d$) com C-5 ($\delta_{\text{C}} 155,9$) e C-10. No anel B, o hidrogênio com $\delta_{\text{H}} 6,80$ (H-2'), mostrou correlação com os carbonos $\delta_{\text{C}} 78,4$ e $144,3$ referentes os carbonos C-2 do anel C e C-4' do anel B. O hidrogênio H-3' ($\delta_{\text{H}} 6,77; d$) correlaciona-se com os carbonos em C-1' ($\delta_{\text{C}} 130,8$) e C-5' ($\delta_{\text{C}} 144,5$), o H-6' ($\delta_{\text{H}} 6,98; d$) mostrou correlação com os carbonos com $\delta_{\text{C}} 78,4$, $118,0$ e $130,8$, referentes aos carbonos nas posições C-2, C-2' e C-1', respectivamente. Algumas das correlações no espectro de HMBC importantes para os anéis A e B podem ser visualizadas nas Figuras 12 e 13.

Figura 12 – Ampliações do espectro de HMBC para os anéis A e B da substância A

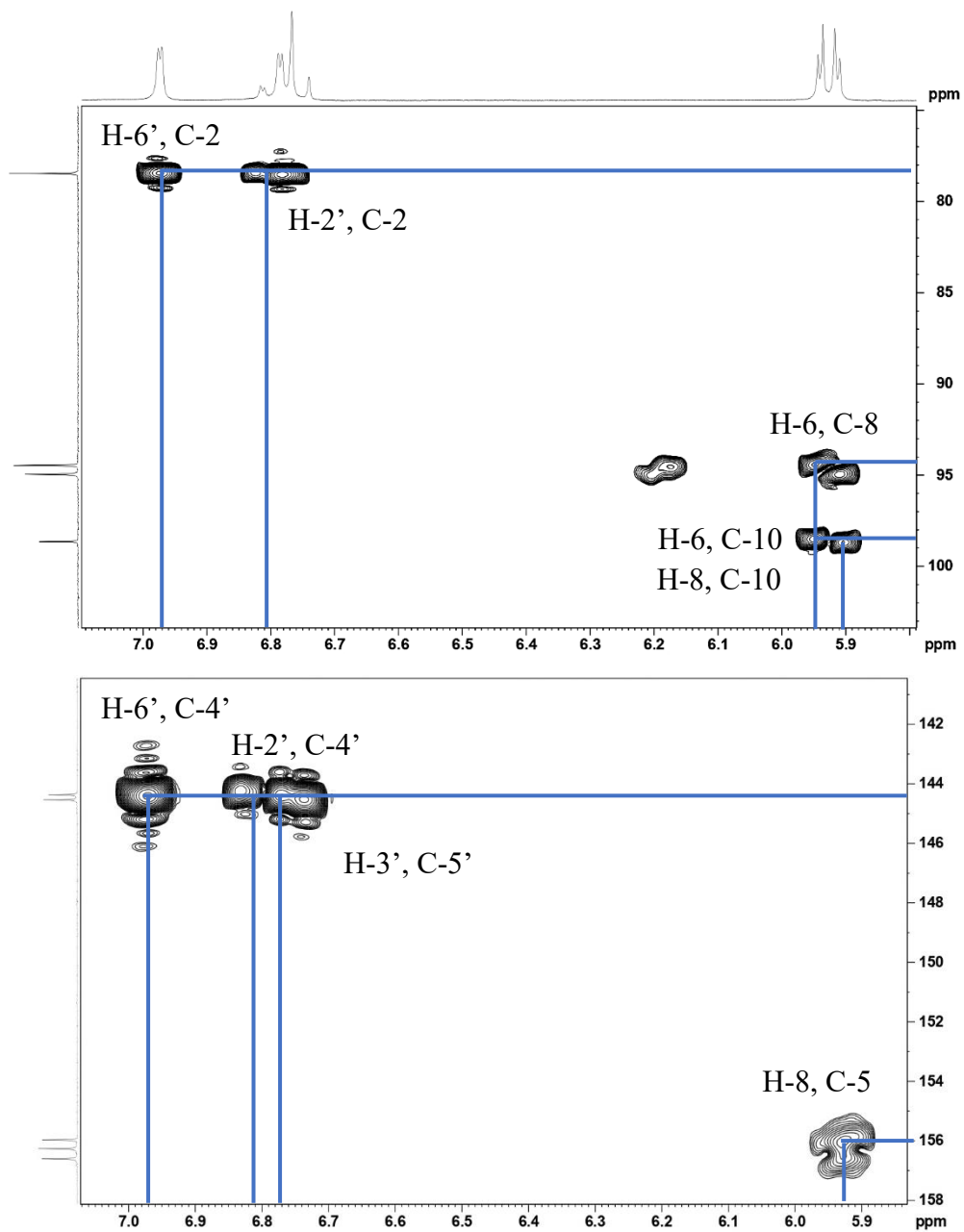
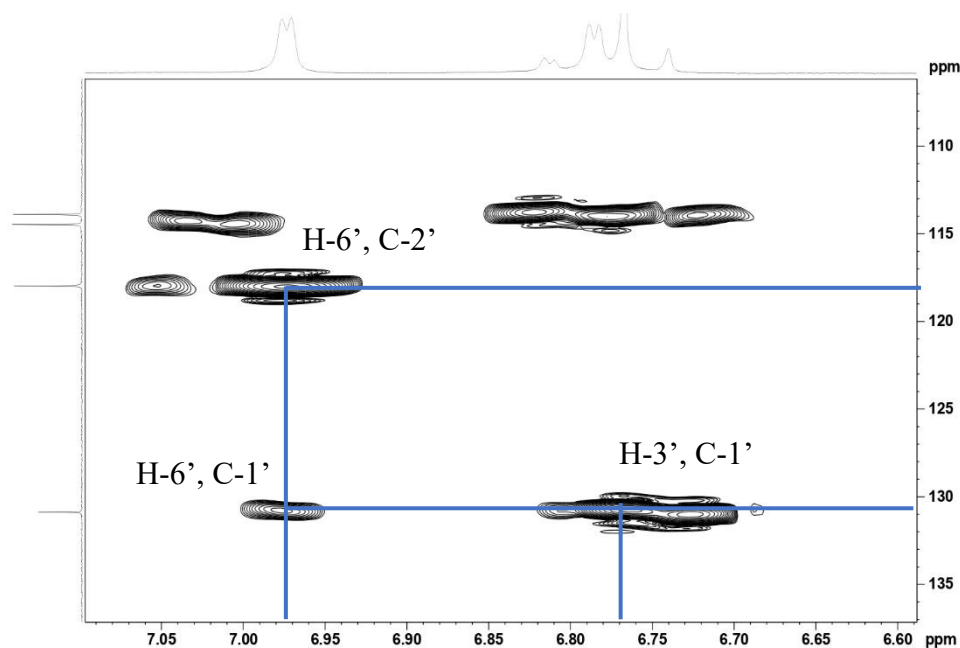
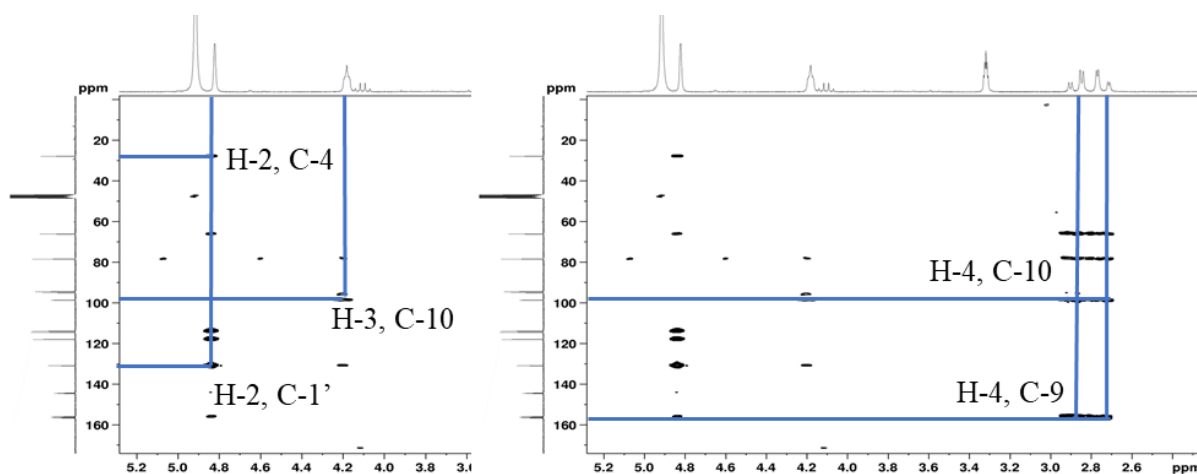


Figura 13 - Espectro de HMBC ampliado em correlações do anel B da substância A



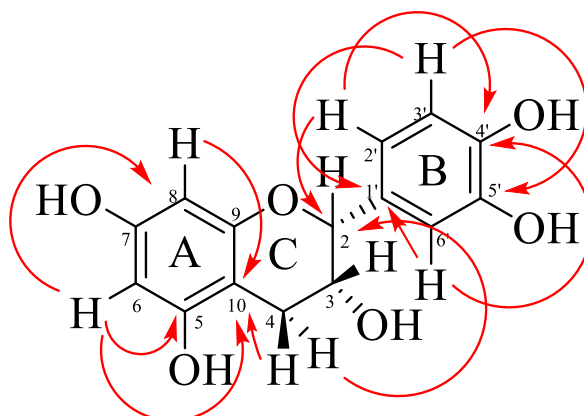
No anel C, H-4_α e H-4_β (δ_H 2,75 e 2,89, respectivamente) apresentaram correlação com C-9 e C-10 (δ_C 156,2 e δ_C 98,6, respectivamente), o H-3 (δ_H 4,18; *m*) apresentou correlação com C-2 (δ_C 78,4) e C-10 (δ_C 98,6) e C-1' (δ_C 130,8), e o H-2 (δ_H 4,82; *s*) correlacionou-se com C-4 (anel A) e C-1' e C-2' (anel B). Algumas correlações estão destacadas na Figura 14.

Figura 14 – Ampliações do espectro de HMBC para o anel C da substância A



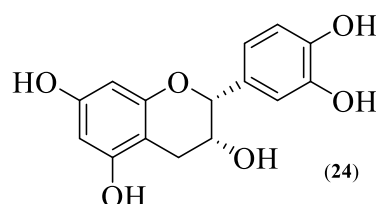
Na figura 15 estão atribuídas algumas das correlações heteronucleares HMBC (1H - ^{13}C) mais importantes para a substância A (epicatequina).

Figura 15 – Atribuições das correlações heteronucleares de HMBC da substância A



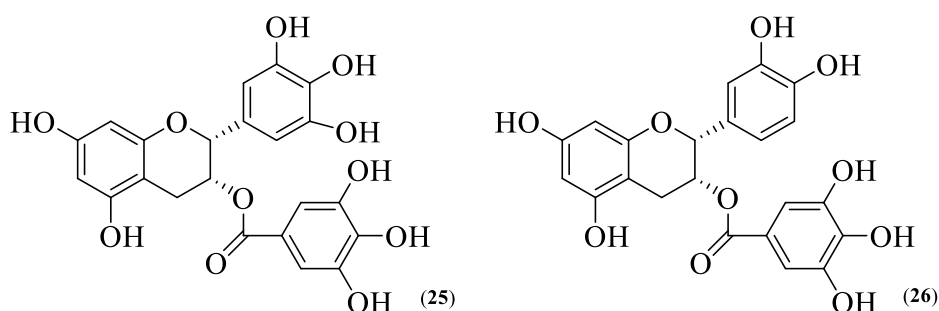
Comparando-se os dados de RMN de 1D e 2D obtidos para a substância A com a literatura de Lôbo et al. (2008) (Tabela 4) concluiu-se tratar-se da substância epicatequina (**24**) (Figura 16). Os dados também foram comparados com os dados disponíveis da literatura para a substância catequina, porém os deslocamentos químicos dos hidrogênios H-2 e H-3 e os desdobramentos dos sinais não correspondem ao visualizado para a substância A.

Figura 16 - A estrutura da epicatequina



A epicatequina é citada por Sanella et al. (2007) como uma das mais importantes catequinas do chá verde (*Camellia sinensis*). No estudo de Sanella et al. (2007), foi investigada a atividade antiplasmódica *in vitro* contra *P. falciparum* das catequinas mais abundantes na planta, o galato de epigallocatequina (25) e o galato de epicatequina (26), na qual o galato de epicatequina (26) apresentou CI_{50} de 10,9 μM e 7,2 μM contra cepas 3D7 (cloroquina-sensível) e FCR-1/FVO (cloroquina-resistente), respectivamente.

Figura 17 - Catequinas do chá verde com atividade antiplasmódica



Apesar de não haver relatos de identificação da epicatequina em espécies do gênero *Machaerium*, esta substância foi identificada em espécies variadas da família Fabaceae. Chakravarthy e Gode (1985) identificaram a substância na espécie *Pterocarpus marsupium* e investigaram sua ação no sistema nervoso central de ratos, no qual não apresentou nenhum efeito desagradável. David et al. (2002) demonstraram a atividade antioxidante parcial da epicatequina isolada de *Dioclea lasiophylla*.

Tabela 3 - Dados de RMN 1D e 2D da substância A (epicatequina, **24**) (300/75 MHz; ppm; CD₃OD)

Unidimensionais		Bidimensionais (δ_H)		
C	¹³ C (δ_C)/DEPT	¹ H (δ_H)/HSQC	HMBC	COSY
C-2	78,4 (CH)	4,82 (<i>sl</i>)	6,80; 6,98; 4,18; 2,75	6,80; 2,89; 4;18
C-3	66,0 (CH)	4,18 (<i>m</i>)	4,82; 2,75	2,89; 4,82;
C-4	27,8 (CH ₂)	α 2,75 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 17; 2,5 Hz) β 2,89 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 17; 4,5 Hz)	4,82	2,89; 4,18; 2,75
C-5	155,9 (C)		4,82	
C-6	94,9 (CH)	5,94 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,3 Hz)	5,92	2,89; 5,92
C-7	156,6 (C)		5,94	
C-8	94,4 (CH)	5,92 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,3 Hz)	5,94	
C-9	156,2 (C)		5,94; 2,75	
C-10	98,6 (C)		5,94; 2,75	
C-1'	130,8 (C)		6,77; 6,98; 4,82; 4,18	
C-2'	117,9 (CH)	6,80 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 8,1; 1,8 Hz)	4,82; 6,98	6,98
C-3'	114,4 (CH)	6,77 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,1 Hz)	6,80	
C-4'	144,3 (C)		6,80; 6,98	
C-5'	144,5 (C)		6,77	
C-6'	113,9 (CH)	6,98 (<i>d</i> , <i>J</i> = 1,8 Hz)	6,77; 4,82	6,80; 4,92

Tabela 4 - Dados de RMN de ^{13}C e ^1H da substância A e dados da literatura para epicatequina (24)

C	RMN de ^{13}C (δ_{C})		RMN de ^1H (δ_{H})	
	Observado	Lit*	^1H (δ_{H})/HSQC	Lit*
C-2	78,4 (CH)	79,1	4,82 (<i>sl</i>)	4,82 (<i>sl</i>)
C-3	66,0 (CH)	66,6	4,18 (<i>m</i>)	4,17 (<i>sl</i>)
C-4	27,8 (CH ₂)	28,5	α 2,75 (<i>dd</i> , $J=17$ e 2,5 Hz) β 2,89 (<i>dd</i> , $J=17$ e 4,5 Hz)	α 2,85 (<i>dd</i> , $J=16,8$ e 4,5 Hz); β 2,72 (<i>dd</i> , $J=16,8$ e 2,4 Hz)
C-5	155,9 (C)	156,7	-	-
C-6	94,9 (CH)	96,0	5,94 (<i>d</i> , $J = 2,3$ Hz)	5,93 (<i>d</i> , $J = 1,8$ Hz)
C-7	156,6 (C)	157,3	-	-
C-8	94,4 (CH)	95,3	5,92 (<i>d</i> , $J = 2,3$ Hz)	5,91 (<i>d</i> , $J = 1,8$ Hz)
C-9	156,2 (C)	157,1	-	-
C-10	98,6 (C)	99,5	-	-
C-1'	130,8 (C)	131,7	-	-
C-2'	117,9 (CH)	119,0	6,80 (<i>dd</i> , $J = 8,1$; 1,8 Hz)	6,79 (<i>dd</i> , $J = 8,1$; 1,2 Hz)
C-3'	114,4 (CH)	115,4	6,77 (<i>d</i> , $J = 8,1$ Hz)	6,75 (<i>d</i> , $J = 8,1$ Hz)
C-4'	144,3 (C)	145,1	-	-
C-5'	144,5 (C)	145,0	-	-
C-6'	113,9 (CH)	115,0	6,98 (<i>d</i> , $J = 1,8$ Hz)	6,97 (<i>d</i> , $J = 1,2$ Hz)

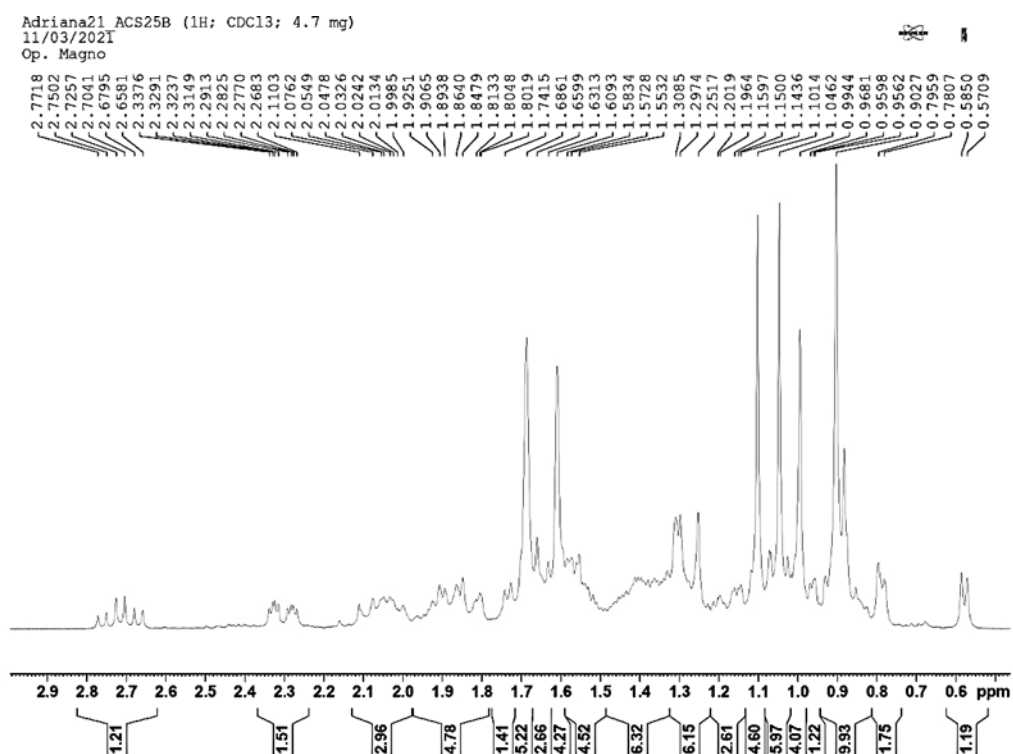
*Lôbo et. al (2008) CD₃OD, 300 MHz.

5.6 Substância B - (AS2B)

A substância B (AS2B) foi isolada da fração clorofórmica (F.CHCl₃), proveniente do extrato acetônico do caule de *M. ferox* (Fluxograma 3). Na análise em CCD, apresentou uma coloração escura após revelação com *p*-anisaldeído, sendo submetida às técnicas espectroscópicas de RMN de ¹H e ¹³C (300 MHz) uni e bidimensionais, cujos espectros estão incluídos nos Anexos (7-16).

O espectro de ¹H, apresentou um perfil condizente com um triterpeno pentacíclico, no qual foi possível observar sete singletos nas regiões δ_H 0,90; 0,91; 1,0; 1,05; 1,10; 1,61 e 1,69, referentes aos hidrogênios dos grupos metílicos. Na figura 18 é possível visualizar o espectro de RMN de ¹H ampliado na região onde há sinais característicos de metila. O espectro apresentou, ainda, um tripleto aparente em δ_H 5,10, característico de hidrogênio vinílico (Anexo 7).

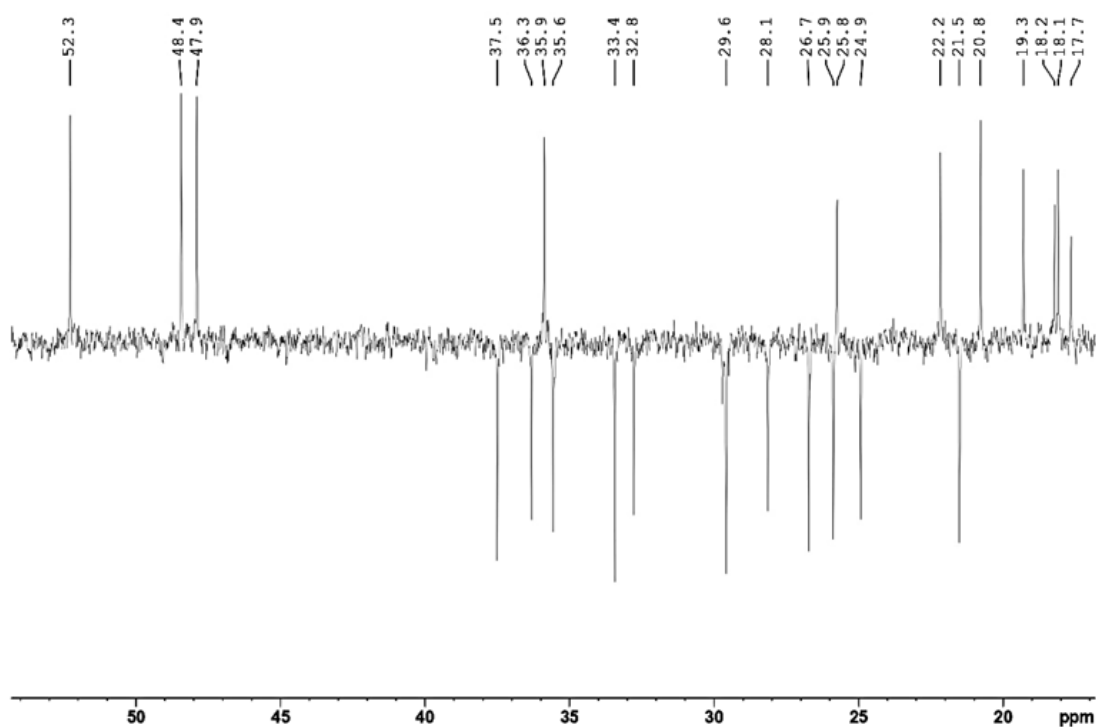
Figura 18 - Ampliação do espectro de RMN de ¹H na faixa de δ_H 0,5 a 2,9 da substância B



O espectro de RMN ¹³C apresentou 30 linhas espectrais (Anexos 8 e 9), corroborando com o perfil do espectro de hidrogênio para um triterpeno pentacíclico. A análise do espectro DEPT 135° mostrou a presença de 11 sinais de amplitude negativa e 12 sinais de amplitude positiva (Anexo 10).

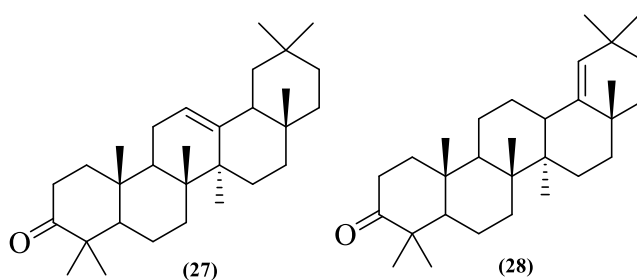
Ainda no espectro DEPT, a ausência de 7 sinais observados no espectro de RMN ^{13}C indica a presença de carbonos quaternários. Um sinal em δ_{C} 216,7 indica que a molécula possui um grupo carbonílico de cetona. Sinais de deslocamento δ_{C} 125,0 e δ_{C} 131,0 confirmam a presença da dupla ligação relacionada ao sinal de hidrogênio em δ_{H} 5,10.

Figura 19 - Ampliação do espectro de COSY na faixa de δ 0 a 3 da substância B (AS2B)



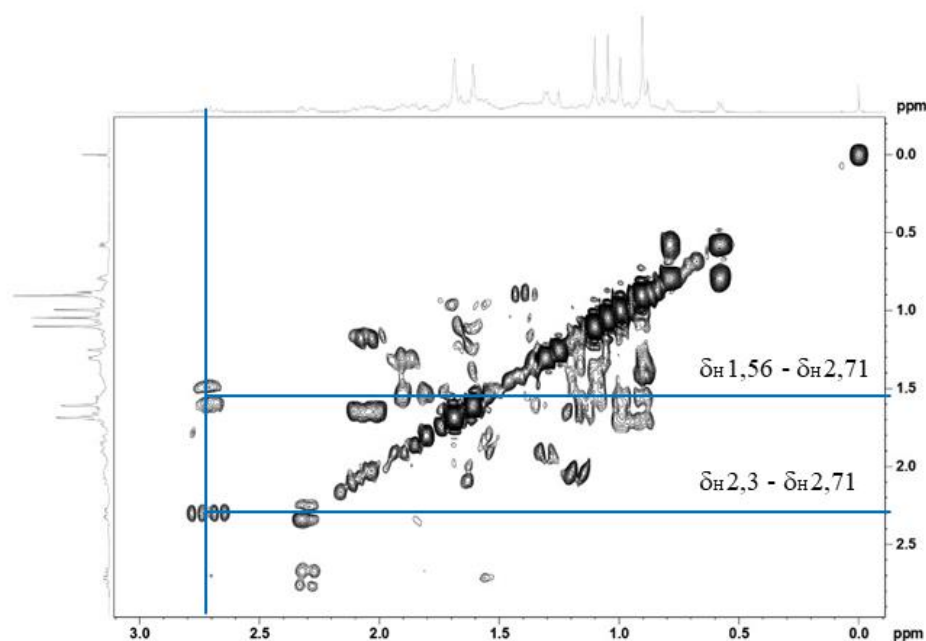
Considerando as análises dos espectros de RMN ^1H , RMN ^{13}C e DEPT/HSQC, chegou-se à conclusão de que a substância AS2B se trata de um triterpeno com fórmula de $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}$. Triterpenos com a mesma fórmula molecular e sinais semelhantes foram identificados em outras espécies da família Fabaceae, entre eles a β -amirenona (**27**) e a germaniconona (**28**). Na figura 20 estão mostradas as estruturas identificadas na espécie *Pterogyne nitens* (REGASINI et al., 2009). No anexo 17 são mostrados os dados da literatura para essas duas substâncias.

Figura 20 - Estruturas das substâncias β -amirenona (**27**) e germaniconona (**28**)



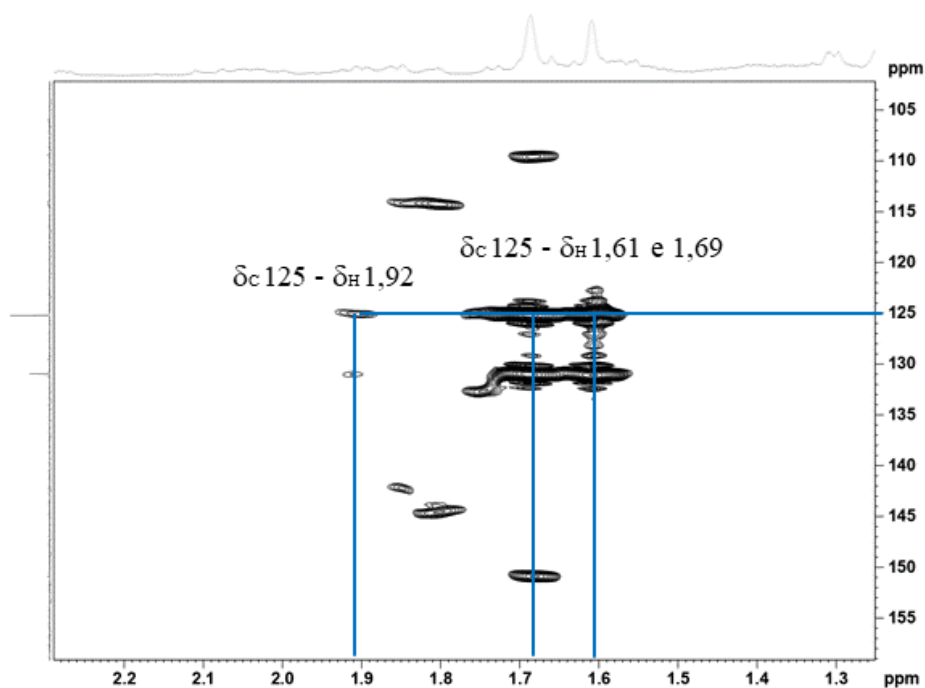
No diagrama de contorno do espectro bidimensional de correlação heteronuclear C-H à longa distância (HMBC) foram observadas correlações heteronucleares entre os sinais do hidrogênio δ_H 2,71 (δ_C 37,5) com os carbonos de deslocamento δ_C 33,4 (δ_H 1,87 e 1,56) e δ_C 216,7, essas relações puderam ser confirmadas no espectro de COSY, mostrado na figura 21. O hidrogênio da metila em δ_C 20,8 (δ_H 1,10) mostrou correlação com o carbono em δ_C 216,7, também com o carbono em δ_C 48,7 e a metila em δ_C 22,2 (δ_H 1,05).

Figura 21 - Ampliação do espectro de COSY da substância AS2B



Os carbonos das metilas em δ_C 17,7 e 25,8 mostraram correlação com o hidrogênio em δ_H 5,1, do carbono vinílico em δ_C 125,0. Este carbono também se correlaciona com os hidrogênios em δ_H 1,04 e 1,92, dos carbonos metilênicos em δ_C 36,4 e δ_C 28,1, respectivamente. Algumas das correlações citadas podem ser visualizadas na figura 22.

Figura 22 - Ampliação do espectro de HMBC na faixa de δ_H 1,3 a 2,2 da substância B (AS2B)



O carbono em δ_C 48,7 apresentou correlação com os hidrogênios em δ_H 1,05, 1,10, 1,0; 1,67; 0,90, referentes a metilas. Também se correlacionou com o hidrogênio do carbono metínico em δ_C 47,9 (δ_H 1,59), devido a isso, o sinal δ_C 48,7 foi atribuído a dois carbonos.

Foram discutidas apenas algumas das correlações para essa estrutura, as demais encontram-se inseridas na Tabela 5 em ordem decrescente de deslocamento químico. Nos anexos 11-16, podem ser visualizadas as correlações elencadas.

Apesar da substância AS2B ter apresentado sinais semelhantes com os encontrados em triterpenos já estudados em outros trabalhos, muitos sinais e correlações mostraram-se distintos dos comumente encontrados nas substâncias analisadas. Desta forma, não foi possível identificar a substância AS2B.

Tabela 5 - Dados de RMN 1D e 2D da substância B (AS2B) (300/75 MHz; CD₃Cl₃)

Unidimensionais		Bidimensionais (δ_H)		
¹³ C (δ_C) (ppm)	DEPT 135°	¹ H (δ_H)/HSQC	HMBC	COSY
216,7	C		2,71; 1,56; 1,10; 2,30	
131,0	C		1,61; 1,69; 1,92	
125,0	CH	5,10 (<i>t ap.</i> , $J = 7,1$ Hz)	1,61; 1,69; 1,04; 1,92	1,69
52,2	CH	1,60 (<i>m</i>)	1,0; 0,90	
50,3	C		1,04	
48,7	C		1,59; 1,05; 1,10; 1,0; 1,67; 0,90	
48,4	CH	1,70 (<i>m</i>)		
47,9	CH	1,59 (<i>m</i>)	1,18	
45,3	C			
37,5	CH ₂	2,71 (<i>ddd</i> , $J = 6,5$; 13,8; 7,5 Hz) 2,30 (<i>ddd</i> , $J = 4,1$; 6,8; 6,8 Hz)		1,56; 2,30
36,3	CH ₂	1,04 (<i>m</i>)	0,91	
35,6	CH ₂	1,31 (<i>m</i>)	0,90	
35,9	CH ₂	0,58 (<i>d</i>) 0,79 (<i>d</i>) 1,87 (<i>m</i>)		
33,4	CH ₂	1,56 (<i>m</i>)	2,71	2,71
32,8	CH ₂	1,67 (<i>m</i>)	1,0; 1,18	
29,6	C			
28,1	CH ₂	1,92 (<i>m</i>) 1,30 (<i>m</i>) 1,18 (<i>m</i>)	1,30	
26,7	CH ₂	2,06 (<i>m</i>)		
26,0	C		1,70; 1,87	
25,9	CH ₂	1,38 (<i>m</i>)	0,91	
25,8	CH ₃	1,69 (<i>s</i>) 2,04 (<i>m</i>)	1,61; 5,10	5,10
24,9	CH ₂	1,88 (<i>m</i>)		
22,2	CH ₃	1,05 (<i>s</i>)	1,10	
21,5	CH ₂	1,56 (<i>m</i>)	1,04	
21,1	C	2,04	2,04; 1,67	
20,8	CH ₃	1,10 (<i>s</i>)	1,05; 1,59	
19,3	CH ₃	0,91 (<i>s</i>)	1,59; 1,10	
18,2	CH ₃	0,90 (<i>s</i>)	1,61	
18,1	CH ₃	1,0 (<i>s</i>)	1,61	
17,7	CH ₃	1,61 (<i>s</i>)	5,10; 1,69; 1,04	

6 CONCLUSÃO

Dos extratos avaliados do caule de *M. ferox*, o extrato acetônico apresentou atividade antimalárica parcial contra *Plasmodium falciparum*.

Foram isoladas duas substâncias do extrato acetônico de *M. ferox*, o flavonóide epicatequina, e o triterpeno pentacíclico AS2B. Este é o primeiro relato da presença de epicatequina na espécie *M. ferox*.

O presente trabalho contribuiu para o conhecimento da composição química da espécie *M. ferox*, com uma substância inédita nesta espécie.

7 REFERÊNCIAS

AHMED, S. A.; GOGAL, R. M.; WALSH, J. E. A new rapid and simple nonradioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes an alternative to [3H] thymidine incorporation assay. **Journal of Immunological Methods**, v. 170, n. 2, p. 211-224, 1994. DOI: [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(94\)90396-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(94)90396-4)

ALVES, H. M.; ARNDT, V. H.; OLLIS, W. D.; EYTON, W. B.; GOTTLIEB, O. R.; MAGALHÃES, M. T. Triterpenoids isolated from *Machaerium incorruptibile*. **Phytochemistry**, v. 5, n. 6, p. 1327-1330, 1966. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)86130-0](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)86130-0)

AMEN, Y. M.; MARZOUK, A. M.; ZAGHLOUL, M. G.; AFIFI, M. S. The genus *Machaerium* (Fabaceae): taxonomy, phytochemistry, traditional uses and biological activities. **Natural Product Research**, v. 29, n. 15, p. 1388-1405, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1080/14786419.2014.1003062>

ANDRADE-NETO, V. F.; POHLIT, A. M.; PINTO, A. C. S.; SILVA, E. C. C.; NOGUEIRA, K. L.; MELO, M. R.; VIEIRA, P. P. R. *In vitro* inhibition of *Plasmodium falciparum* by substances isolated from Amazonian antimalarial plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 3, p. 359-366, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0074-02762007000300016>

ANTONIO, G. G. BRAULIO, M. F.; PEDRO, G., MELCHOR, G. H.; ANGEL, G. R. 13C NMR spectra of olean-18-ene derivatives. **Phytochemistry**, v. 20, n. 8, p. 1919-21, 1981. Disponível em <<https://digital.csic.es/bitstream/10261/22041/1/PHY-1981-20-1919.pdf>> Acesso em 15/06/2021.

ANTONY, H. A.; PARIJA, S. C. Antimalarial drug resistance: an overview. **Tropical Parasitology**, v. 6, n. 1, p. 30-41, 2016. DOI: <https://doi.org/10.4103/2229-5070.175081>

ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Medicamentos fitoterápicos e plantas medicinais. 2020. Disponível em <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/medicamentos/fitoterapicos>> Acesso em 15/06/2021.

BATISTA, R.; SANTANA, C. C.; AZEVEDO-SANTOS, A. V.; SUAREZ-FONTES, A. M.; FERRAZ, J. L.; SILVA, L. A. M.; VANNIER-SANTOS, M. A. *In vivo* antimalarial extracts and constituents of *Prosopis juliflora* (Fabaceae). **Journal of Functional Foods**, v. 44, p. 74-78, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.02.032>

BENTO, C. C.; TANGERINA, M. M. P.; ZANATTA, A. C.; SARTORI, Â. L. B.; FRANCO, D. M.; HIRUMA-LIMA, C. A.; SANNOMIYA, M. Chemical constituents and allelopathic activity of *Machaerium eriocarpum* Benth. **Natural Product Research**, p. 1-5, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1508136>

BONNIER, F.; KEATING, M. E.; WROBEL, T. P.; MAJZNER, K.; BARANSKA, M.; GARCIA-MUNOZ, A.; BYRNE, H. J. Cell viability assessment using the Alamar blue assay: A comparison of 2D and 3D cell culture models. **Toxicology In Vitro**, v. 29, n. 1, p. 124– 131, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2014.09.014>

BRASIL, P.; ZALIS, M. G.; DE PINA-COSTA, A.; SIQUEIRA, A. M.; JÚNIOR, C. B.; SILVA, S.; DANIEL-RIBEIRO, C. T. Outbreak of human malaria caused by *Plasmodium simium* in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: a molecular epidemiological investigation. **The Lancet Global Health**, v. 5, n. 10, p. e1038-e1046, 2017. DOI: [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(17\)30333-9](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(17)30333-9)

BRASIL. Guia de tratamento da malária no Brasil. Brasília: Ministério da Saúde, 2020. Disponível em https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_tratamento_malaria_brasil.pdf Acesso em 17/02/2022.

BRASIL. Guia prático de tratamento da malária no Brasil. Brasília: Ministério da Saúde, 2010. Disponível em https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_pratico_malaria.pdf Acesso em 17/02/2022.

BRASIL. Malária: o que é, causas, sintomas, tratamento, diagnóstico e prevenção: Ministério da saúde. Disponível em <http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/malaria> Acesso em 03/09/19.

BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE; SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Boletim epidemiológico. **Malária – 2020**, 2020. Disponível em https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/boletins-epidemiologicos/especiais/2020/boletim_especial_malaria_1dez20_final.pdf Acesso em 17/02/2022.

CAMARGO, E. P. Malária, maleita, paludismo. **Ciência e Cultura**, v. 55, n. 1, p. 26-29, 2003. Disponível em http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0009-67252003000100021&lng=en&nrm=iso Acesso em 17/2/2022.

CARVALHO, P. E. R.; GAIAD, S. Espécies arbóreas brasileiras – Fabaceae em **Agência Embrapa de Informação Tecnológica (AGEITEC)**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA. Disponível em <https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/especies_arboreas_brasileiras/arvore/CONT00fu17wvyo02wyiv807nyi6s9ggg9il.html>. Acesso em: 21/11/2019.

CHANDA, S.; DUDHATRA, S.; KANERIA, M. Antioxidative and antibacterial effects of seeds and fruit rind of nutraceutical plants belonging to the Fabaceae family. **Food & Function**, v. 1, n. 3, p. 308-315, 2010. DOI: 10.1039/c0fo00028k

CONDE-SALAZAR, L.; DIEZ, A. G.; RAFEENSPHRGER, F.; HAUSEN, B. M. Contact allergy to the Brazilian rosewood substitute *Machaerium scleroxylon* Tul.(Pao ferro). **Contact Dermatitis**, v. 6, n. 4, p. 246-250, 1980. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0536.1980.tb04923.x>

COSTA, A. D. P.; BRESSAN, C. D. S.; PEDRO, R. S.; VALLS-DE-SOUZA, R.; SILVA, S. D.; SOUZA, P. R. D.; BRASIL, P. Diagnóstico tardio de malária em área endêmica de dengue na extra-Amazônia brasileira: experiência recente de uma unidade sentinela no Estado do Rio de Janeiro: **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 5, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0037-86822010000500020>.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1830, n. 6, p. 3670-3695, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.02.008>

DA SILVA, T. M.; PINHEIRO, C. D.; ORLANDI, P. P.; PINHEIRO, C. C.; PONTES, G. S. Zerumbone from *Zingiber zerumbet* (L.) smith: a potential prophylactic and therapeutic agent against the cariogenic bacterium *Streptococcus mutans*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 18, n. 1, p. 301, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12906-018-2360-0>

DAVID, J. P.; SANTOS, E. O. D.; MIRANDA, M. S.; BARREIROS, A. L.; SANTOS, I. D. D.; DAVID, J. M. Atividade antioxidante da epicatequina-(2 β → 7, 4 β → 8)-epicatequina isolada de *Dioclea lasiophylla*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, p. 5-6, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2002000300003>

ELSOHLY, H. N.; JOSHI, A. S.; NIMROD, A. C. Antigiardial isoflavones from *Machaerium aristulatum*. **Planta Medica**, v. 65, n. 05, p. 490-490, 1999.

FAURANT, C. From bark to weed: the history of artemisinin. **Parasite: journal de la Société Française de Parasitologie**, v. 18, n. 3, p. 215, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1051/parasite/2011183215>

FEHER, M.; SCHMIDT, J. M. Property distributions: differences between drugs, natural products, and molecules from combinatorial chemistry. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, v. 43, n. 1, p. 218-227, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1021/ci0200467>

FILARDI, F.L.R.; LIMA, H.C.; CARDOSO, D.B.O.S. 2020. *Machaerium* in **Flora do Brasil 2020**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB23055>>. Acesso em: 02 ago. 2021

FLORA DO BRASIL. *Machaerium ferox* (Mart. ex Benth.) Ducke. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB83307>>. Acesso em: 21/11/2019

FRANÇA, T. C.; SANTOS, M. G.; FIGUEROA-VILLAR, J. D. Malária: aspectos históricos e quimioterapia. **Química Nova**, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000500060>

FUNDACIÓN IO. **Ciclo biológico de la malária**. Disponível em <<https://fundacionio.com/salud-io/enfermedades/parasitos/malaria/ciclo-biologico-de-la-malaria/>>. Acesso em: 16/01/2020

IGNOATO, M. C.; FABRÃO, R. M.; SCHUQUEL, I. T.; BOTELHO, M. F.; BANNWART, G.; POMINI, A. M.; SANTIN, S. M. Chemical constituents of *Machaerium hirtum* Vell.(Fabaceae) leaves and branches and its anti-inflammatory activity evaluation. **Natural Product Research**, v. 27, n. 17, p. 1556-1561, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1080/14786419.2012.738204>

JONGWUTIWES, S.; PUTAPORNTIP, C.; IWASAKI, T.; SATA, T.; KANBARA, H. Naturally acquired *Plasmodium knowlesi* malaria in human, Thailand. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 12, p. 2211, 2004. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid1012.040293>

KRETTLI, A. U.; ADEBAYO, J. O.; KRETTLI, L. G. Testing of natural products and synthetic molecules aiming at new antimalarials. **Current Drug Targets**, v. 10, n. 3, p. 261-270, 2009. DOI: <https://doi.org/10.2174/138945009787581203>

KUROSAWA, K.; OLLIS, W. D.; REDMAN, B. T.; SUTHERLAND, I. O.; GOTTLIEB, O. R. Vestitol and vesticarpan, isoflavonoids from *Machaerium vestitum*. **Phytochemistry**, v. 17, n. 8, p. 1413-1415, 1978. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)94599-0](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)94599-0)

KVIST, L. P.; CHRISTENSEN, S. B.; RASMUSSEN, H. B.; MEJIA, K.; GONZALEZ, A. Identification and evaluation of Peruvian plants used to treat malaria and leishmaniasis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, n. 3, p. 390-402, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.01.020>

LALREMRUATA, A.; MAGRIS, M.; VIVAS-MARTÍNEZ, S.; KOEHLER, M.; ESEN, M.; KEMPAIAH, P.; METZGER, W. G. Natural infection of *Plasmodium brasilianum* in humans: man and monkey share quartan malaria parasites in the Venezuelan Amazon. **EBioMedicine**, v. 2, n. 9, p. 1186-1192, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2015.07.033>

LÔBO, L. T.; CASTRO, K. C. F.; ARRUDA, M. S. P.; SILVA, M. N. D.; ARRUDA, A. C.; MÜLLER, A. H.; SOUZA FILHO, A. P. D. S. Potencial alelopático de catequinas de *Tachigali myrmecophyla* (Leguminosae). **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 493-497, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000300005>

MESHNICK, S. R.; DOBSON, M. J. The history of antimalarial drugs. In: **Antimalarial chemotherapy**. Humana Press, Totowa, NJ, 2001. p. 15-25. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-59259-111-4_2

MOURA, V. M.; DE SOUSA, L. A. F.; DOS-SANTOS, M. C.; RAPOSO, J. D. A.; LIMA, A. E.; DE OLIVEIRA, R. B.; MOURÃO, R. H. V. Plants used to treat snakebites in Santarém, western Pará, Brazil: an assessment of their effectiveness in inhibiting hemorrhagic activity induced by *Bothrops jararaca* venom. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 161, p. 224-232, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.12.020>

MUHAMMAD, I.; LI, X. C.; DUNBAR, D. C.; ELSOHLY, M. A.; KHAN, I. A. Antimalarial (+)-*trans*-hexahydrodibenzopyran derivatives from *Machaerium multiflorum*. **Journal of Natural Products**, v. 64, n. 10, p. 1322-1325, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1021/np0102861>

MUHAMMAD, I.; LI, X. C.; JACOB, M. R.; TEKWANI, B. L.; DUNBAR, D. C.; FERREIRA, D. Antimicrobial and antiparasitic (+)-*trans*-hexahydrodibenzopyrans and analogues from *Machaerium multiflorum*. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 6, p. 804-809, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1021/np030045o>

NAKANE, T. MAEDA, Y.; EBIHARA, H.; ARAI, Y.; MASUDA, K.; TAKANO, A.; ABDEL-HALIM, O. B. Fern constituents: triterpenoids from *Adiantum capillus-veneris*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 50, n. 9, p. 1273-1275, 2002. DOI: 10.1248/cpb.50.1273

NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 11. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2010.

OLIVEIRA, D. R.; KRETTLI, A. U.; AGUIAR, A. C. C.; LEITÃO, G. G.; VIEIRA, M. N.; MARTINS, K. S.; LEITÃO, S. G. Ethnopharmacological evaluation of medicinal plants used against malaria by quilombola communities from Oriximiná, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 173, p. 424-434, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.07.035>

OLIVEIRA, D. R.; LEITÃO, G. G.; COELHO, T. S.; SILVA, P. E.; LOURENÇO, M. C. S.; LEITÃO, S. G. Ethnopharmacological versus random plant selection methods for the evaluation of the antimycobacterial activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 5, p. 793-806, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2011005000084>

OMS. Organização Mundial da Saúde. **Global technical strategy for malária 2016–2030**. 2015. Disponível em https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/176712/9789241564991_eng.pdf?sequence=1 Acesso em 09/03/2019

OMS. Organização Mundial da Saúde. **Artemisinin and artemisinin-based combination therapy resistance: Status Report**. 2016.

OMS. Organização Mundial da Saúde. **Malaria**. 2021. Disponível em <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/malaria> Acesso em 14/06/2021.

OMS. Organização Mundial da Saúde. **World malaria status report 2016**. 2016. Disponível em <https://apps.who.int/iris/handle/10665/255213> Acesso em 09/03/2019.

OMS. Organização Mundial da Saúde. **World malaria report 2020**. Disponível em https://cdn.who.int/media/docs/default-source/malaria/world-malariareports/978924004049-eng.pdf?sfvrsn=8f4af712_5&download=true Acesso em 12/12/2021

OPAS. **Folha informativa – Malária**. Organização Pan-Americana de Saúde. Disponível em https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5682:folhainformativa-malaria&Itemid=812 Acesso em 02/09/2019.

- PABÓN, A.; RAMIREZ, O.; RÍOS, A.; LÓPEZ, E.; DE LAS SALAS, B.; CARDONA, F.; BLAIR, S. Antiplasmodial and cytotoxic activity of raw plant extracts as reported by knowledgeable indigenous people of the Amazon region (Vaupés Medio in Colombia). **Planta Medica**, v. 82, n. 08, p. 717-722, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1055/s-0042-104283>
- PENIDO, A. **Brasil reduz em 38% casos de malária em relação a 2018**. Ministério da Saúde, 2019. Disponível em <<http://www.saude.gov.br/noticias/agencia-saude/45391-brasil-reduz-em-38-casos-de-malaria-em-relacao-a-2018>> Acesso em 02/09/2019.
- PETROVSKA, B. B. Historical review of medicinal plants' usage. **Pharmacognosy Reviews**, v. 6, n. 11, p. 1, 2012. DOI: <https://doi.org/10.4103/0973-7847.95849>
- POLIDO, C. A.; SARTORI, A. L. B. The genus *Machaerium* (Leguminosae-Papilionoideae-Dalbergieae) in the Brazilian Pantanal. **Rodriguésia**, v. 58, n. 2, p. 313-329, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1590/2175-7860200758208>
- RAHMAN, A. H. M. M.; PARVIN, M. I. A. Study of medicinal uses on Fabaceae family at Rajshahi, Bangladesh. **Research in Plant Sciences**, v. 2, n. 1, p. 6-8, 2014. DOI: <https://doi.org/10.12691/plant-2-1-2>
- REGASINI, L. O. MAGELA V. G.; Fernandes, D. C.; DA SILVA BOLZANI, V.; CAVALHEIRO, A. J.; SIQUEIRA SILVA, D. H. Identification of triterpenes and sterols from *Pterogyne nitens* (fabaceae-caesalpinioideae) using high-resolution gas chromatography. **Journal of the Chilean Chemical Society**, v. 54, n. 3, p. 218-221, 2009.
- REVILLA, J. **Plantas úteis da bacia amazônica**. Manaus, BR: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, 2002.
- RIBEIRO, D. L.; CILIÃO, H. L.; SPECIAN, A. F. L.; SERPELONI, J. M.; SOUZA, M. F. D.; TANGERINA, M. M. P.; CÓLUS, I. M. S. Chemical and biological characterisation of *Machaerium hirtum* (Vell.) Stehlfeld: absence of cytotoxicity and mutagenicity and possible chemopreventive potential. **Mutagenesis**, v. 31, n. 2, p. 147-160, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1093/mutage/gev066>
- RIECKMANN, K. H.; CAMPBELL, G. H.; SAX, L. J.; EMA, J. E. Drug sensitivity of *Plasmodium falciparum*. **The Lancet**, v. 311, n. 8054, p. 22-23, 1978.
- SAAD, G. D. A.; LÉDA, P. H. D. O.; SÁ, I. D.; SEIXLACK, A. C. C. **Fitoterapia contemporânea: tradição e ciência na prática clínica**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.

SANNELLA, A. R.; MESSORI L.; CASINI, A.; VINCIERI, F. F.; BILIA, A. R.; MAJORI, G.; SEVERINI, C. Antimalarial properties of green tea. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 353, n. 1, p. 177-181, 2007. DOI: 10.1016/j.bbrc.2006.12.005

SHAKYA, A. K. Medicinal plants: future source of new drugs. **International Journal of Herbal Medicine**, v. 4, n. 4, p. 59-64, 2016. Disponível em <<https://www.florajournal.com/archives/2016/vol4issue4/PartA/4-2-13-120.pdf>> Acesso em 17/12/2021.

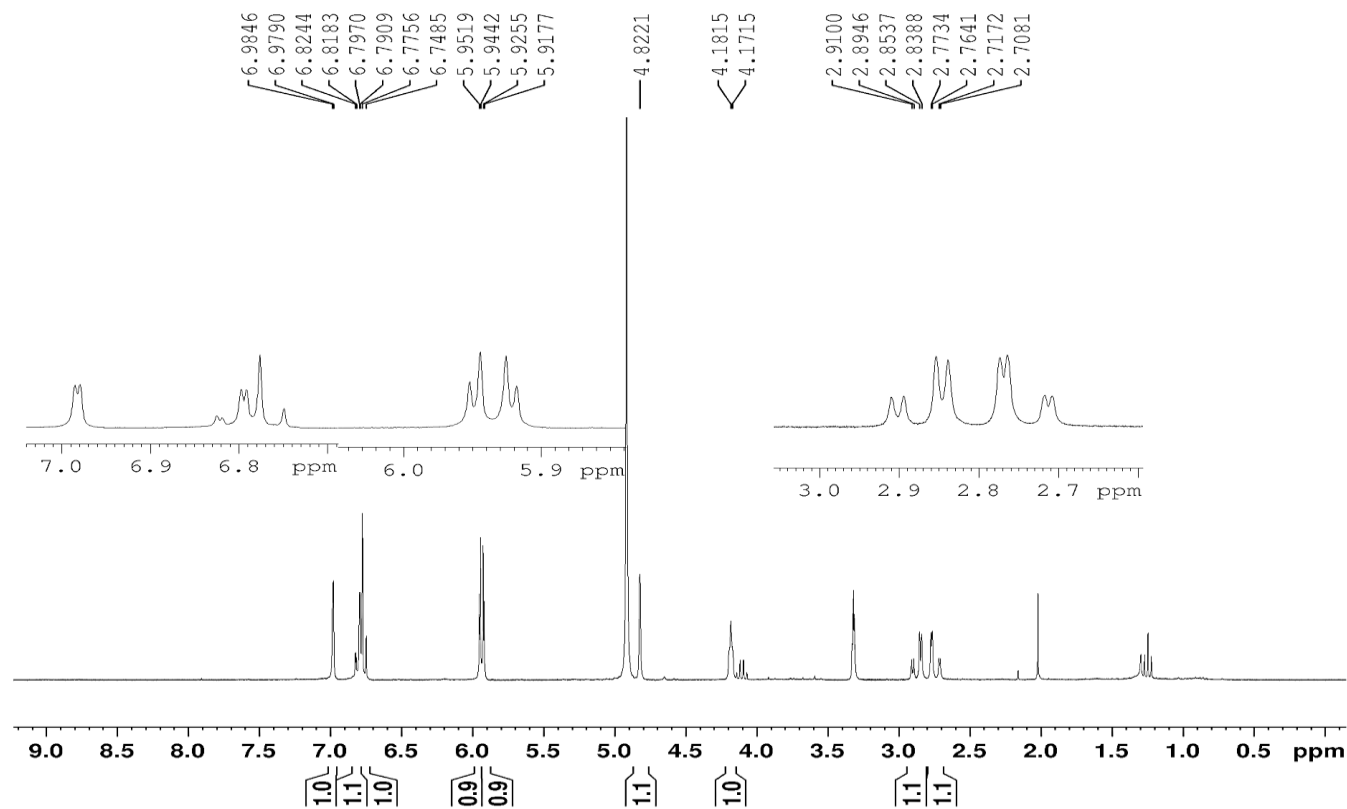
SILVA, J. R. D. A.; RAMOS, A. D. S.; MACHADO, M.; DE MOURA, D. F.; NETO, Z.; CANTO-CAVALHEIRO, M. M.; LOPES, D. A review of antimalarial plants used in traditional medicine in communities in Portuguese-speaking countries: Brazil, Mozambique, Cape Verde, Guinea-Bissau, São Tomé and Príncipe and Angola. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, p. 142-158, 2011.

SINGH, B.; DANESHVAR, C. Human infections and detection of *Plasmodium knowlesi*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 2, p. 165-184, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1128/CMR.00079-12>.

SOUZA, G. A.; DA SILVA, N. C.; DE SOUZA, J.; DE OLIVEIRA, K. R.; DA FONSECA, A. L.; BARATTO, L. C.; MORAES, W. P. *In vitro* and *in vivo* antimalarial potential of oleoresin obtained from *Copaifera reticulata* Ducke (Fabaceae) in the Brazilian Amazon rainforest. **Phytomedicine**, v. 24, p. 111-118, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2016.11.021>.

TRAGER, W.; JENSEN, J. Human malaria parasites in continuous culture. **Science**, v. 193, n. 4254, p. 673-675, 1976. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.781840>.

8 ANEXOS

ANEXO 1 Espectro de RMN de ^1H da epicatequina (AS1A; CD_3OD ; 300 MHz).Fr-ACS22A (1H; metanol-d4; 10 mg) 16/10/2020
Op. Sabrina

```

Current Data Parameters
NAME      Adriana20_Fr-ACS22A
EXPNO     1
PROCNO    1

F2 - Acquisition Parameters
Date_     20201016
Time      11.08
INSTRUM   FOURIER300
PROBHD    5 mm DUL 13C-1
PULPROG   zg
TD         65536
SOLVENT   MeOD
NS         16
DS         0
SWH        6103.516 Hz
FIDRES     0.093132 Hz
AQ         5.3687091 sec
RG         14.1241
DW         81.920 usec
DE         6.50 usec
TE         293.6 K
D1         1.00000000 sec
TDO        1

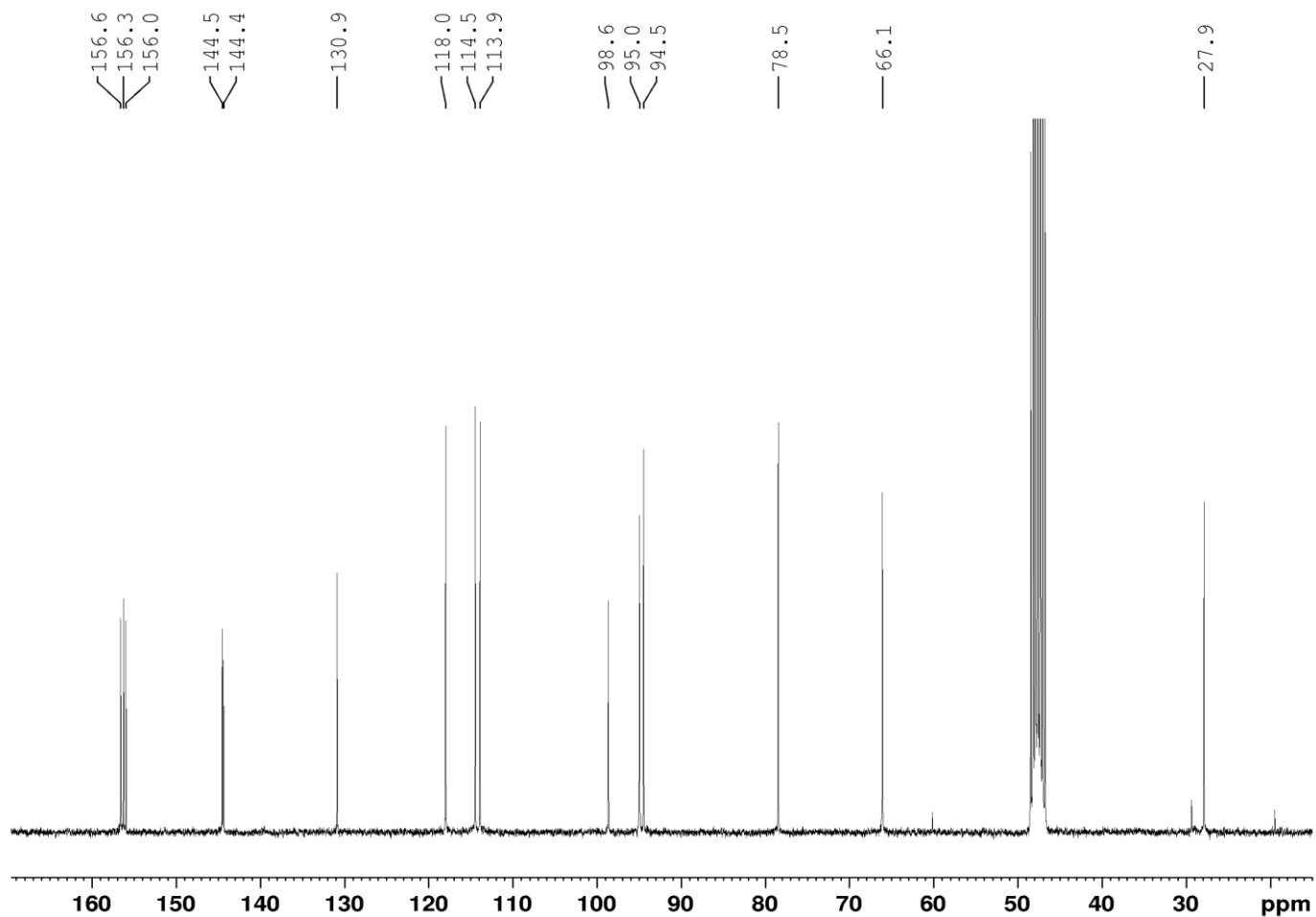
----- CHANNEL f1 -----
SFO1      300.2019513 MHz
NUC1       1H
P1         8.50 usec
FLW1      20.00000000 W

F2 - Processing parameters
SI         65536
SF         300.2000000 MHz
WDW        EM
SSB        0
LB         0 Hz
GB         0
PC         1.00

```

ANEXO 2 Espectro de RMN de ^{13}C da epicatequina (AS1A; CD_3OD ; 75 MHz)

Fr-ACS22A (^{13}C ; metanol-d₄; 10 mg)16/10/2020
Op. Sabrina



```

Current Data Parameters
NAME      Adriana20_Fr-ACS22A
EXPNO    2
PROCNO   1

F2 - Acquisition Parameters
Date_    20201016
Time     22.24
INSTRUM  FOURIER300
PROBHD   5 mm DUL 13C-1
PULPROG  zgpg30
TD       32768
SOLVENT  MeOD
NS       51200
DS       0
SWH      24414.063 Hz
FIDRES   0.745058 Hz
AQ       0.6710886 sec
RG       501.187
DW       20.480 usec
DE       10.00 usec
TE       295.0 K
D1       0.10000000 sec
D11      0.03000000 sec
D31      0.00000875 sec
D40      0.03084430 sec
L4       20
L5       2
P32     90.00 usec
TDO     1

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

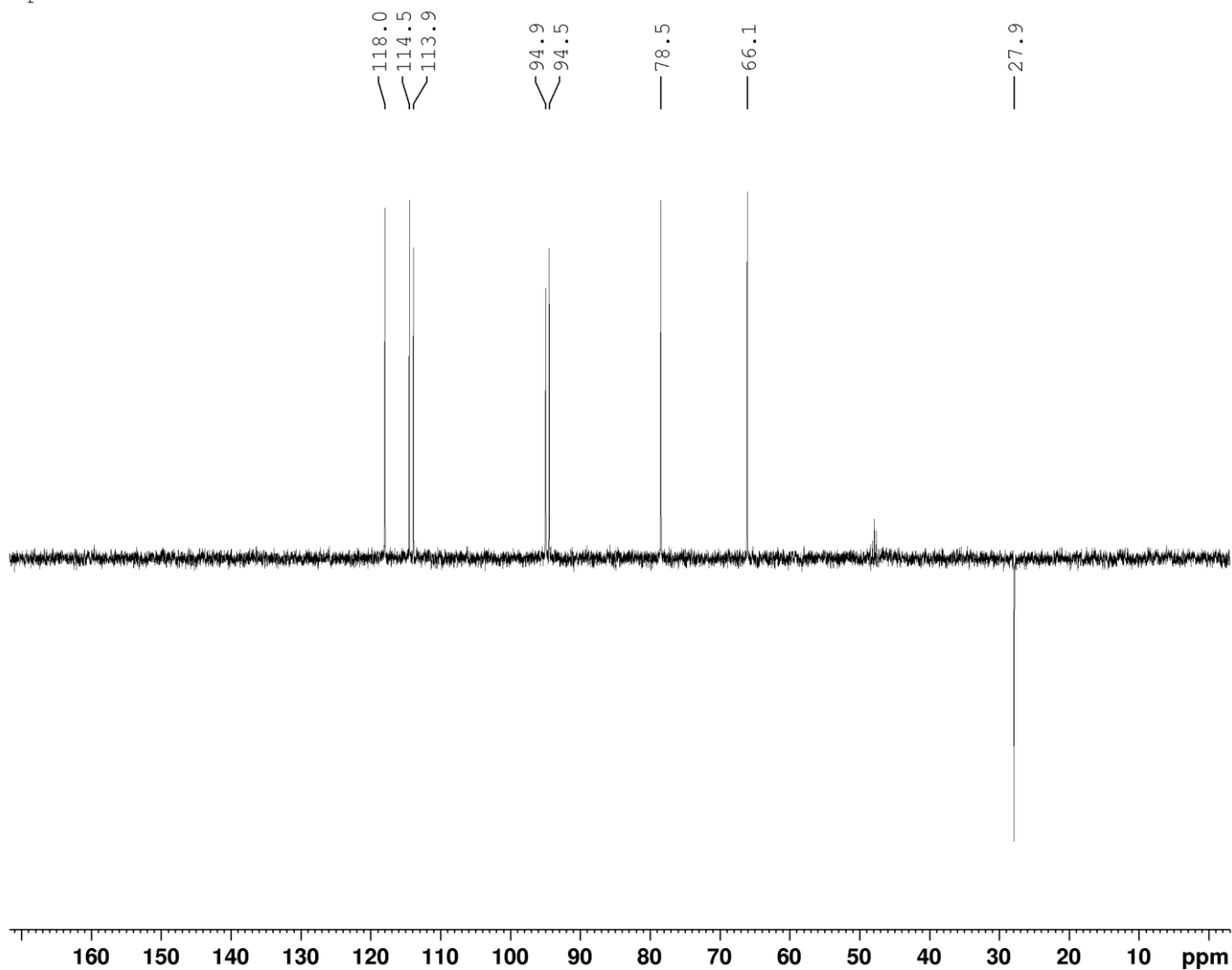
===== CHANNEL f2 =====
SFO2    300.2012008 MHz
NUC2    1H
CPDPRG2 waltz16
PCPD2   90.00 usec
PLW2    20.00000000 W
PLW12   0.17839999 W
PLW13   0.08973100 W

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

```

ANEXO 3 Espectro de DEPT 135 da epicatequina (AS1A; CD₃OD; 75 MHz)

Fr-ACS22A (DEPT 135; metanol-d₄; 10 mg) 16/10/2020
Op. Sabrina



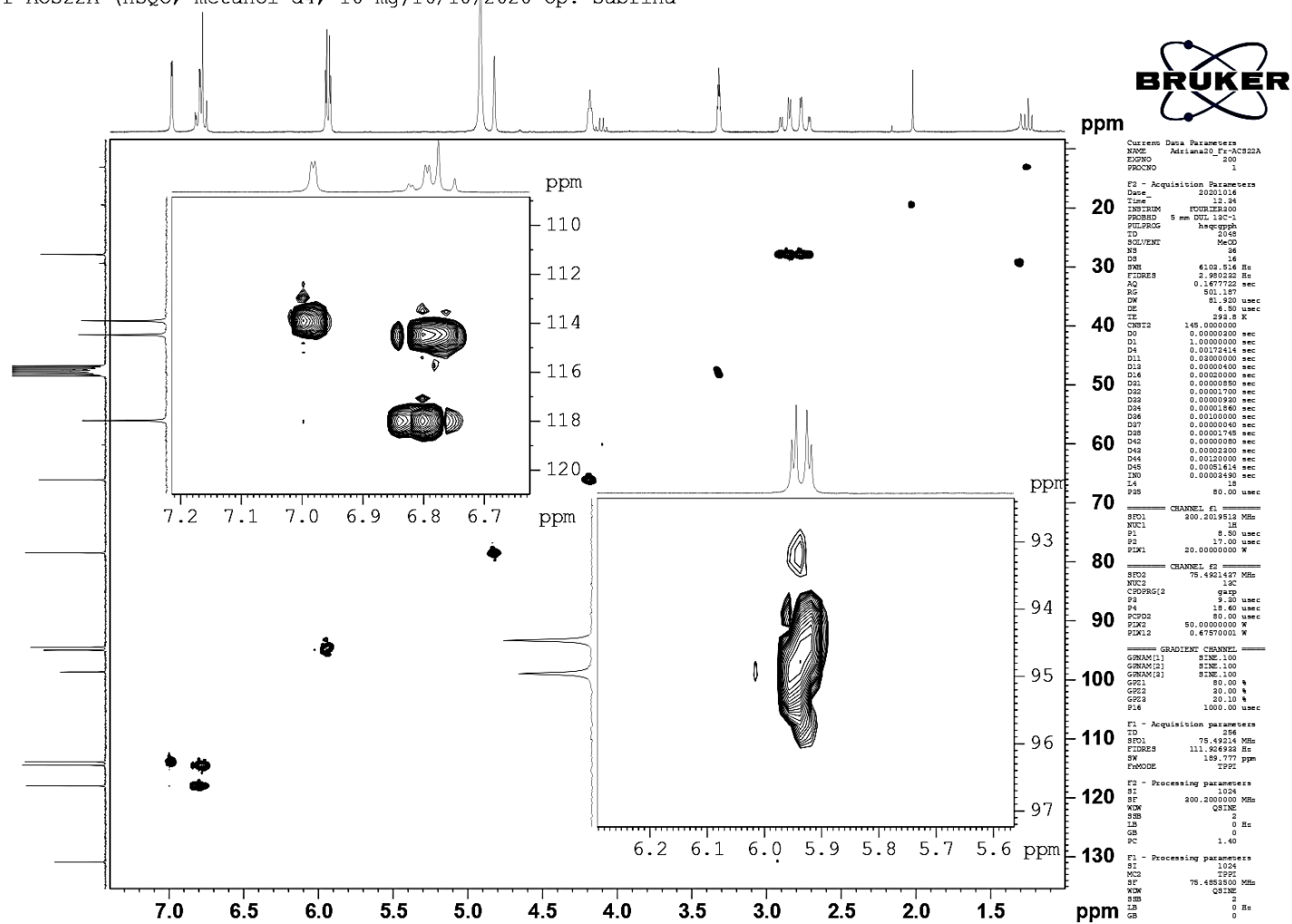
Current Data Parameters
NAME Adriana20_Fr-ACS22A
EXPNO 4
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20201016
Time 21.22
INSTRUM FOURIER300
PROBHD 5 mm DUL 13C-1
PULPROG dept135
TD 65536
SOLVENT MeOD
NS 1536
DS 0
SWH 24414.063 Hz
FIDRES 0.372529 Hz
AQ 1.3421773 sec
RG 501.187
DW 20.480 usec
DE 10.00 usec
TE 294.6 K
CNST2 145.0000000
D1 1.00000000 sec
D2 0.00344828 sec
D14 0.00001114 sec
D33 0.00000850 sec
D34 0.00344003 sec
D35 0.00345303 sec
L4 40
P32 90.00 usec
TD0 1

===== CHANNEL f1 =====
SFO1 75.4928985 MHz
NUC1 13C
P1 8.75 usec
P2 17.50 usec
PLW1 50.00299835 W

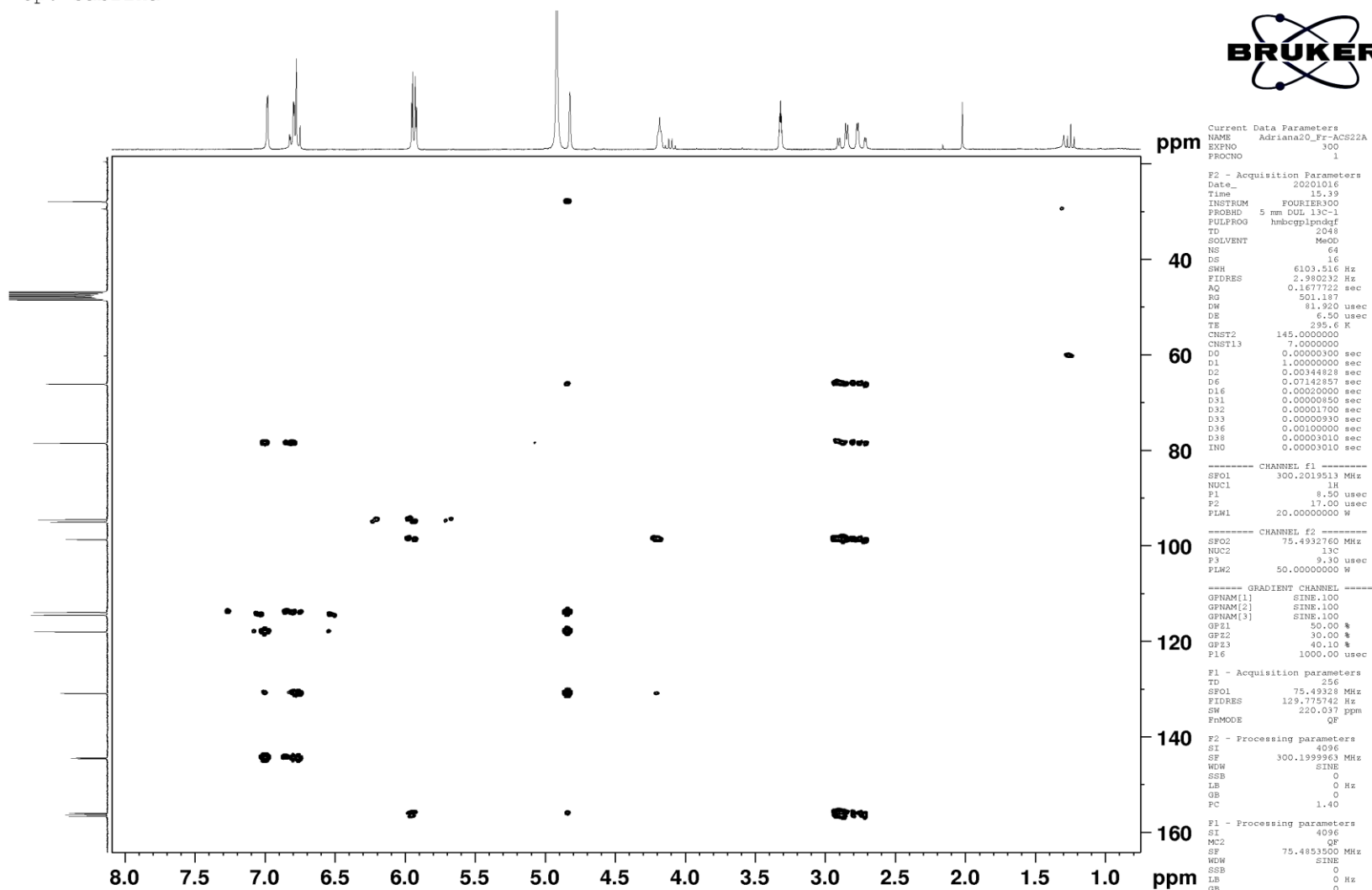
===== CHANNEL f2 =====
SFO2 300.2012008 MHz
NUC2 1H
CPDPRG2 waltz16
P3 8.50 usec
P4 17.00 usec
PCPD2 90.00 usec
PLW2 20.00000000 W
PLW12 0.17839999 W

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

ANEXO 4 Espectro de HSQC da epicatequina (AS1A; CD₃OD; ¹H-300, ¹³C-75 MHz)Fr-ACS22A (HSQC; metanol-d₄; 10 mg)16/10/2020 Op. Sabrina

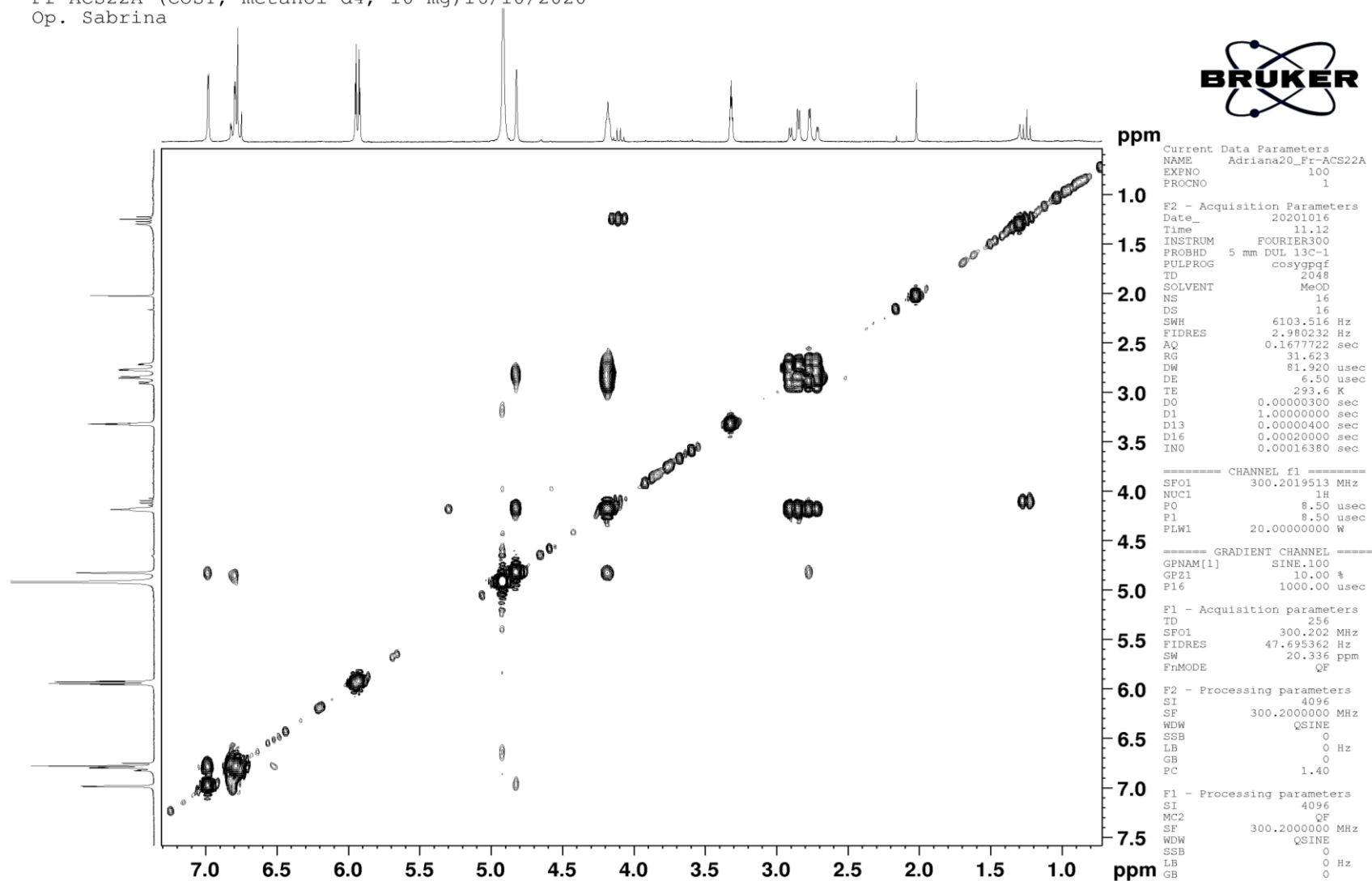
ANEXO 5 Espectro de HMBC da epicatequina (AS1A; CD₃OD; ¹H-300, ¹³C-75 MHz)

Fr-ACS22A (HMBC; metanol-d₄; 10 mg)16/10/2020
Op. Sabrina



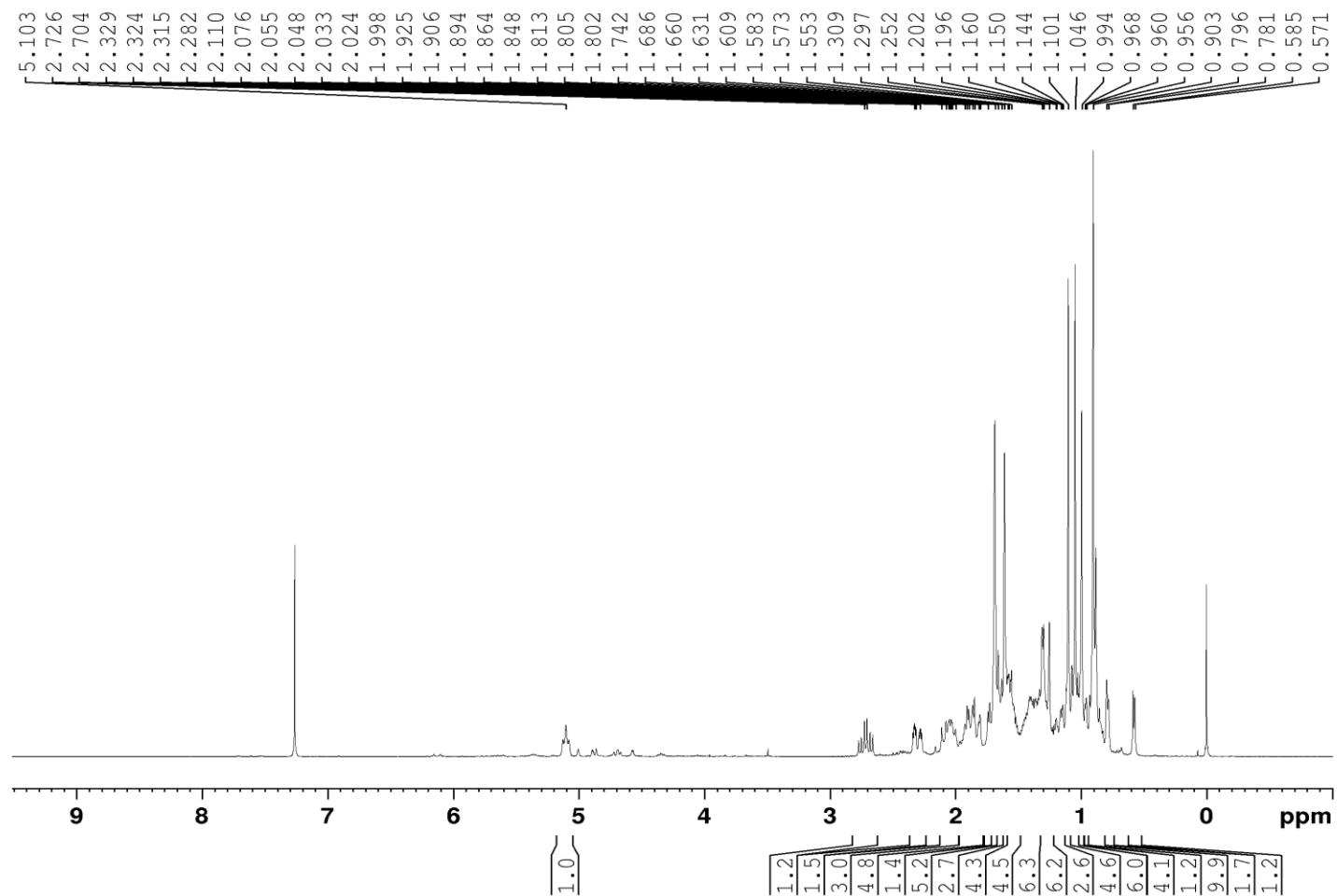
ANEXO 6 Espectro de ^1H - ^1H COSY da epicatequina (AS1A; CD_3OD ; 300 MHz)

Fr-ACS22A (COSY; metanol-d4; 10 mg)16/10/2020
Op. Sabrina



ANEXO 7 Espectro de RMN de ^1H da substância B (AS2B; CDCl_3 ; 300 MHz)

Adriana21_ACS25B (^1H ; CDCl_3 ; 4.7 mg) 11/03/2021
Op. Magno



```

Current Data Parameters
NAME      Adriana21_ACS25B - Copy
EXPNO     1
PROCNO    1

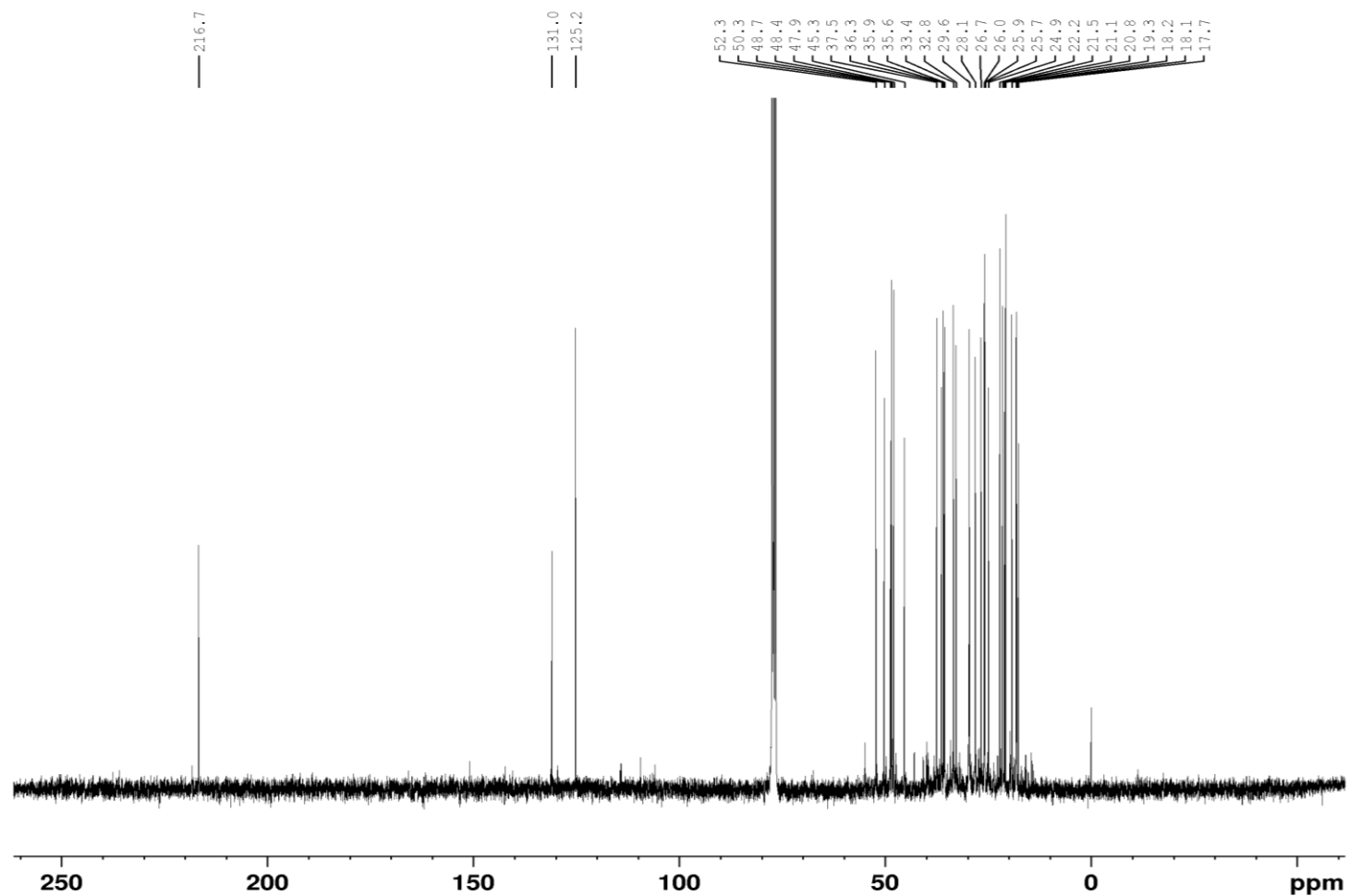
E2 - Acquisition Parameters
Date_     20210311
Time      16.23
INSTRUM   FOURIER300
PROBHD    5 mm DUL 13C-1
PULPROG   zg
TD         65536
SOLVENT   CDCl3
NS         64
DS         2
SWH        6103.516 Hz
FIDRES     0.093132 Hz
AQ         5.3687091 sec
RG         9.27396
DW         81.920 usec
DE         10.00 usec
TE         292.8 K
D1         1.0000000 sec
TDO        1

----- CHANNEL f1 -----
SF01      300.2019513 MHz
NUC1       1H
P1         7.88 usec
PLW1      20.00000000 W

E2 - Processing parameters
SI         65536
SF         300.2000030 MHz
WDW        EM
SSB        0
LB         0 Hz
GB         0
PC         1.00
  
```

ANEXO 8 Espectro de RMN de ^{13}C da substância B (AS2B; CDCl_3 ; 75 MHz)

Adriana21_ACS25B (^{13}C ; CDCl_3 ; 4.7 mg) 11/03/2021
Op. Magno



```

Current Data Parameters
NAME      Adriana21_ACS25B - Copy
EXPNO     2
PROCNO    1

F2 - Acquisition Parameters
Date_     20210311
Time      17.25
INSTRUM   FOURIER300
PROBHD    5 mm DUL 13C-1
PULPROG   zgpg30
TD         32768
SOLVENT   CDCl3
NS         58719
DS         0
SWH        24414.063 Hz
FIDRES     0.745058 Hz
AQ         0.6710886 sec
RG         501.187
DW         20.480 usec
DE         10.00 usec
TE         292.4 K
D1         0.50000000 sec
D11        0.03000000 sec
D31        0.00000875 sec
D40        0.01589210 sec
L4         20
L5         14
F32        90.00 usec
TD0        1

===== CHANNEL f1 =====
SFO1       75.4929982 MHz
NUC1       13C
P1         8.75 usec
PLW1       50.00299835 W

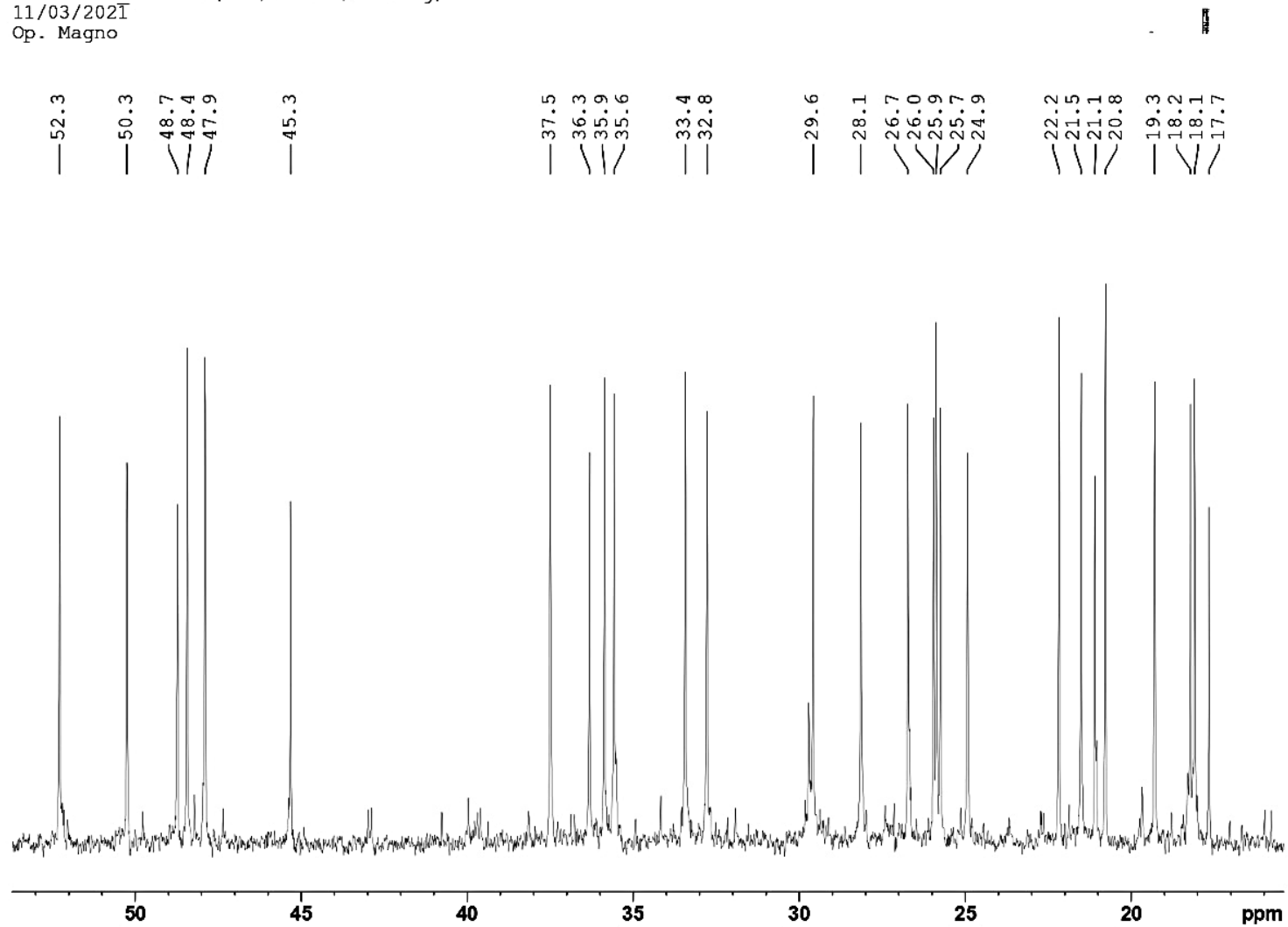
===== CHANNEL f2 =====
SFO2       300.2012008 MHz
NUC2       1H
CPDPRG2    waltz16
PCPD2      90.00 usec
PLW2       20.00000000 W
PLW12      0.17839999 W
PLW13      0.08973100 W

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

```

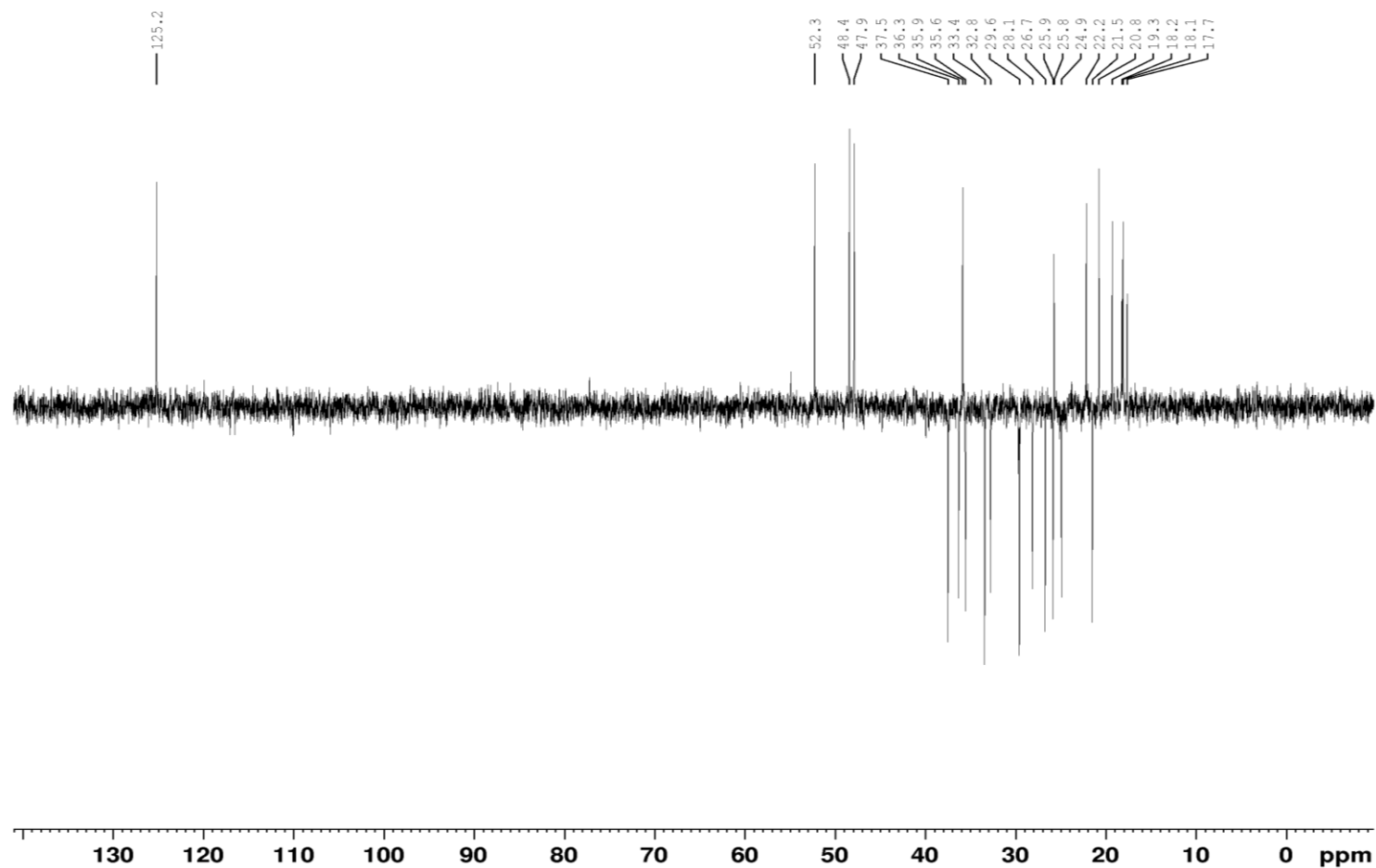
Anexo 9 Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância B (AS2B) na faixa de $\delta 10-55$ (CDCl_3 ; 75 MHz)

Adriana21 ACS25B (13C; CDCl_3 ; 4.7 mg)
11/03/2021
Op. Magno



ANEXO 10 Espectro de DEPT 135 da substância B (AS2B; CDCl₃; ¹³C-75 MHz)

Adriana21_ACS25B (dept135; CDCl₃; 4.7 mg) 12/03/2021
Op. Magno



```

Current Data Parameters
NAME      Adriana21_ACS25B - Copy
EXPNO     4
PROCNO    1

F2 - Acquisition Parameters
Date_     20210312
Time      12.54
INSTRUM   FOURIER300
PROBHD    5 mm DUL 13C-1
PULPROG   dept135
TD        65536
SOLVENT   CDCl3
NS         1024
DS         8
SWH       24414.063 Hz
FIDRES    0.372529 Hz
AQ        1.3421773 sec
RG         501.187
DM        20.480 usec
DE        10.00 usec
TE        294.0 K
CNST2     145.0000000
D1         2.00000000 sec
D2         0.00344628 sec
D14        0.00001114 sec
D33        0.00000850 sec
D34        0.00344003 sec
D35        0.00345303 sec
L4         40
F32        90.00 usec
TD0        1

===== CHANNEL f1 =====
SFO1       75.4913881 MHz
NUC1       13C
P1         8.75 usec
P2         17.50 usec
PLW1       50.00299835 W

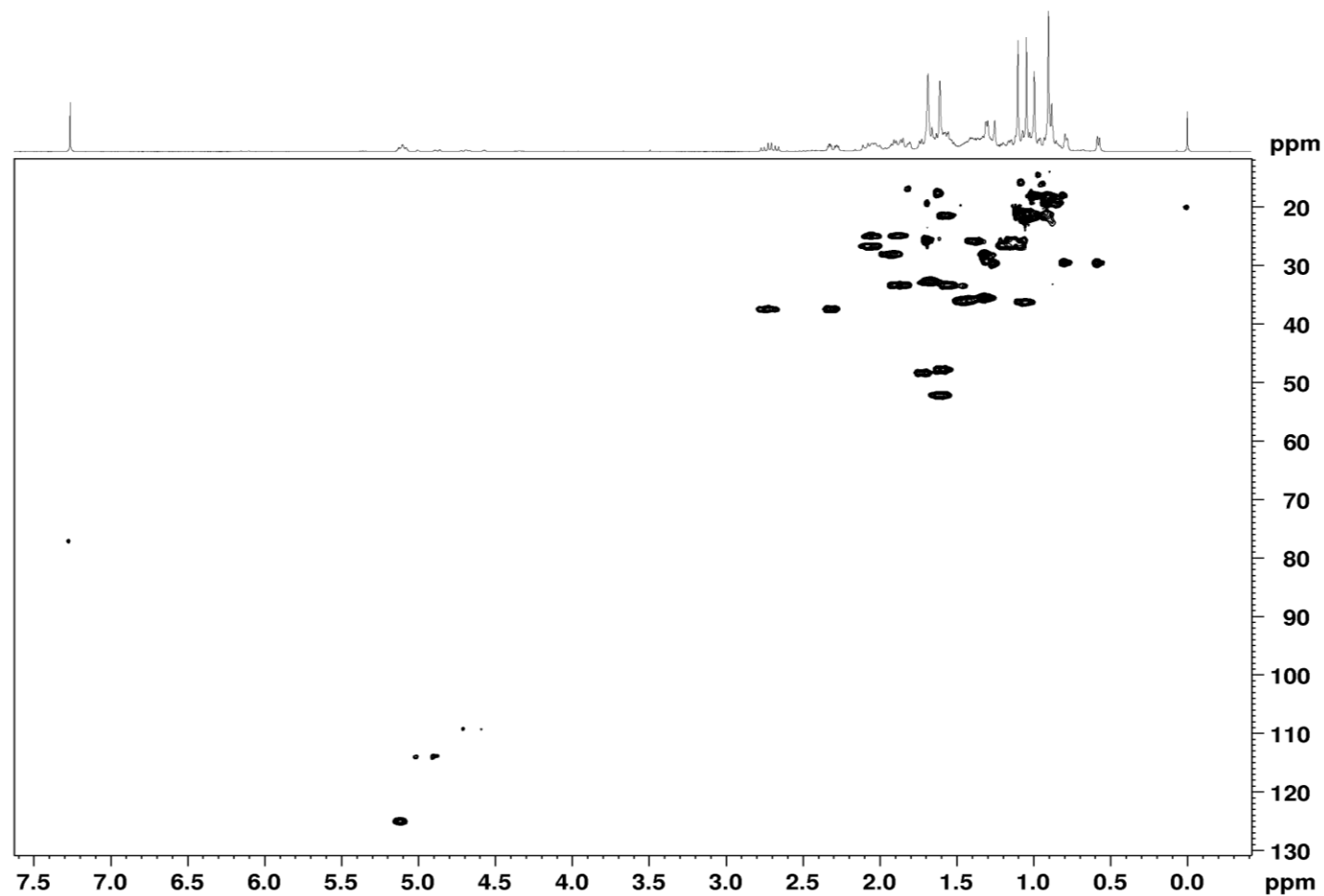
===== CHANNEL f2 =====
SFO2       300.2009601 MHz
NUC2       1H
CPDPRG2    waltz16
P3         8.50 usec
P4         17.00 usec
PCPD2     90.00 usec
PLW2       20.00000000 W
PLW12     0.17839999 W

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

```

ANEXO 11 Espectro de HSQC da substância B (AS2B; CDCl₃; ¹H-300, ¹³C-75 MHz)

Adriana21_ACS25B (HSQC; CDCl₃; 4.7 mg)
29/03/2021
Op. Magno



```

Current Data Parameters
NAME      Adriana21_ACS25B - Copy
EXPNO    200
PROCNO    1

F2 - Acquisition Parameters
Date_     20210329
Time      17:29
INSTRUM   FOURIER300
PROBHD    5 mm DUL 13C-1
PULPROG   hsqcqpqh
TD         2048
SOLVENT   CDCl3
NS         128
DS         16
SWH        6103.516 Hz
FIDRES     2.980232 Hz
AQ         0.1677722 sec
RG         501.187
DW         81.920 usec
DE         6.50 usec
TE         300.2 K
CNST2     145.0000000
DO         0.0000300 sec
D1         1.0000000 sec
D4         0.00172414 sec
D11        0.02000000 sec
D13        0.00004000 sec
D16        0.00020000 sec
D21        0.00000000 sec
D32        0.00001700 sec
D33        0.00000930 sec
D34        0.00001860 sec
D36        0.00100000 sec
D37        0.00000040 sec
D38        0.00001745 sec
D42        0.00000080 sec
D43        0.00002300 sec
D44        0.00120000 sec
D45        0.00001614 sec
INO        0.00003490 sec
L4         18
F35        80.00 usec

----- CHANNEL f1 -----
SFO1      300.2019513 MHz
NUC1      1H
P1         8.50 usec
P2         17.00 usec
PLM1      20.0000000 W

----- CHANNEL f2 -----
SFO2      75.4932760 MHz
NUC2      13C
CPCPRG[2]  qasp
F3         9.30 usec
F4         16.60 usec
PCPD2     80.00 usec
PLM2      50.0000000 W
PLM12     0.67570001 W

===== GRADIENT CHANNEL =====
GFNAM[1]  SINE.100
GFNAM[2]  SINE.100
GFNAM[3]  SINE.100
GE21      80.00 %
GE22      30.00 %
GE23      20.10 %
P16       1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
TD         256
SFO1      75.49328 MHz
FIDRES     111.926933 Hz
SW         189.774 ppm
Fsmode     TFFI

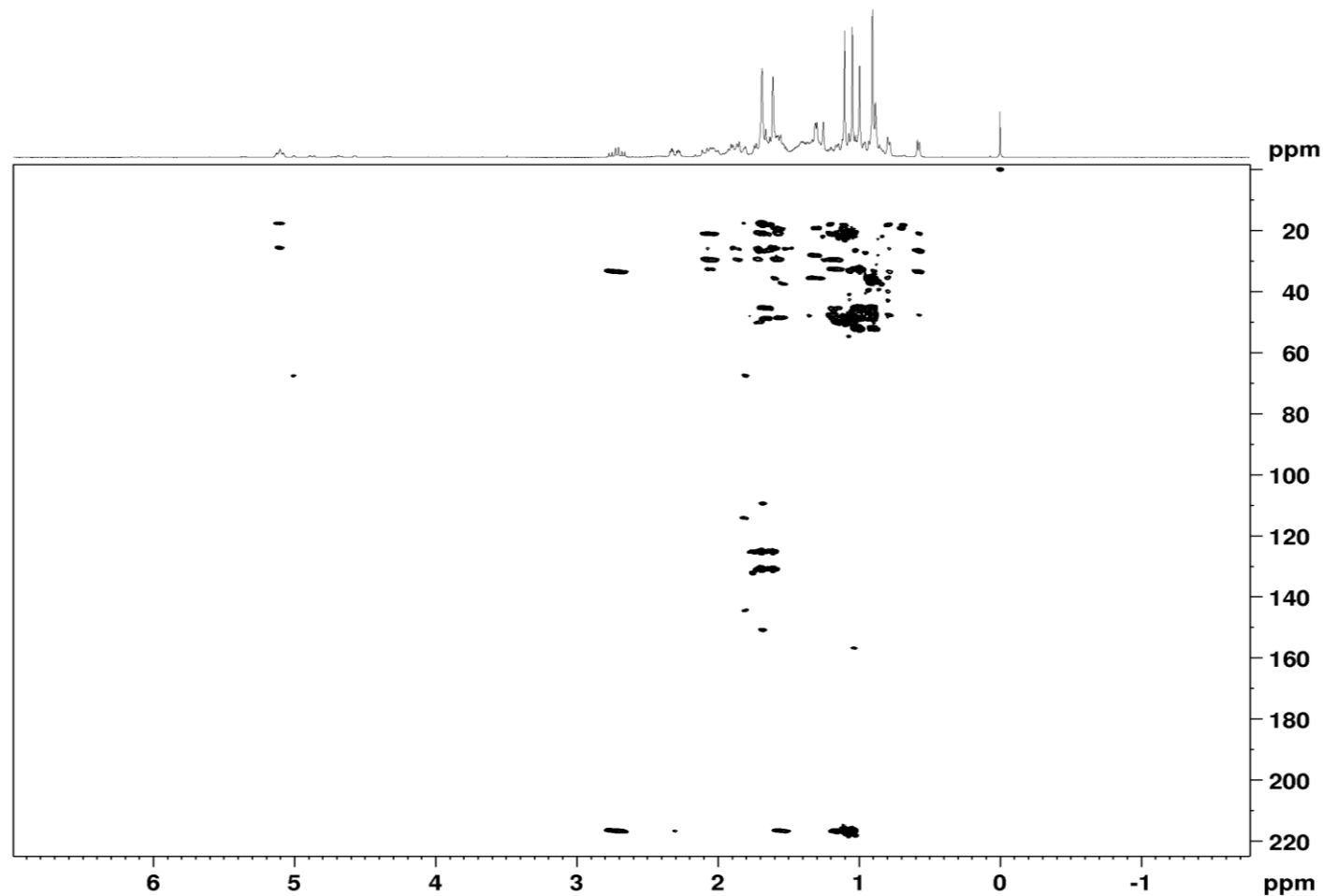
F2 - Processing parameters
SI         1024
SF         300.200033 MHz
WDW        QSINE
SSB        2
LB         0 Hz
GB         0
FC         1.40

F1 - Processing parameters
SI         1024
MC2        TFFI
SF         75.4853493 MHz
WDW        QSINE
SSB        2
LB         0 Hz
GB         0

```

ANEXO 12 Espectro de HMBC da substância B (AS2B; CDCl₃; ¹H-300, ¹³C-75 MHz)

Adriana21_ACS25B (HMBC; CDCl₃; 4.7 mg) 09/04/2021
Op. Magno



```

Current Data Parameters
NAME      Adriana21_ACS25B - Copy
EXPNO     301
PROCNO    1

F2 - Acquisition Parameters
Date_     20210409
Time      14.21
INSTRUM   FOURIER300
PROBHD    5 mm DUL 13C-1
PULPROG   hmcpg1pndqf
TD         2048
SOLVENT   cdcl3
NS         400
DS         16
SWH        6103.516 Hz
FIDRES     2.980232 Hz
AQ         0.167722 sec
RG         501.187
DM         81.920 usec
DE         6.50 usec
TE         372.6 K
CNST2     145.000000
CNST13    8.000000
D0         0.00000000 sec
D1         1.00000000 sec
D2         0.00344828 sec
D6         0.00250000 sec
D16        0.00020000 sec
D31        0.00000850 sec
D32        0.00001700 sec
D33        0.00000930 sec
D36        0.00100000 sec
D38        0.00002760 sec
LN0        0.00002760 sec

----- CHANNEL f1 -----
SF01       300.2019513 MHz
NUC1       1H
P1         8.50 usec
P2         17.00 usec
PLM1       20.00000000 W

----- CHANNEL f2 -----
SF02       75.4932760 MHz
NUC2       13C
P3         9.30 usec
PLM2       50.00000000 W

----- GRADIENT CHANNEL -----
GPNAM[1]   RECT.1
GPNAM[2]   RECT.1
GPNAM[3]   RECT.1
GPZ1       50.00 %
GPZ2       30.00 %
GPZ3       40.10 %
F16        1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
TD         256
SF01       75.49328 MHz
FIDRES     141.530792 Hz
SW         239.968 ppm
FhMODE     QF

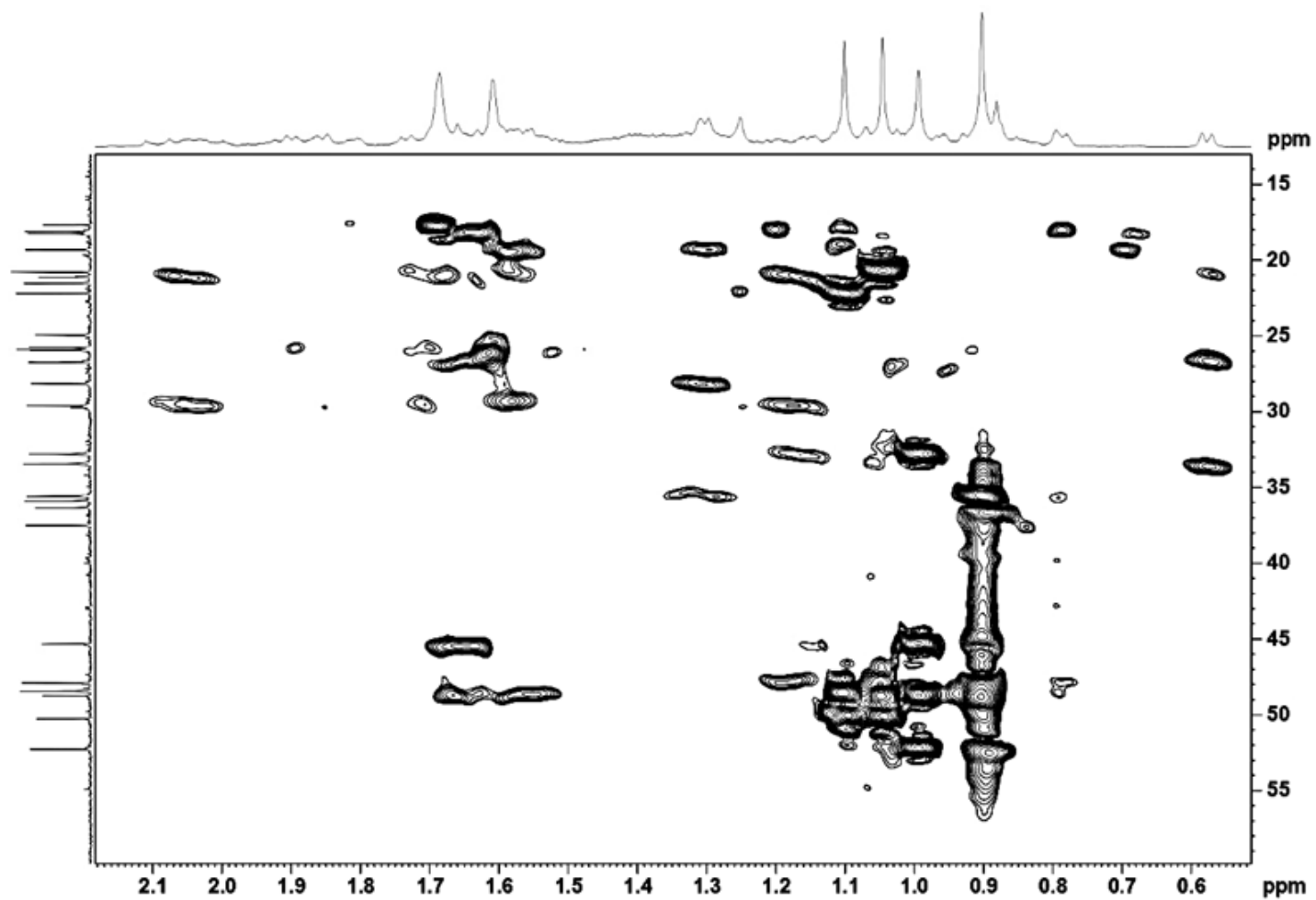
F2 - Processing parameters
SI         4096
SF         300.2000036 MHz
WDW        SINE
SSB        0
LB         0 Hz
GB         0
PC         1.40

F1 - Processing parameters
SI         4096
MC2       QF
SF         75.4853570 MHz
WDW        SINE
SSB        0
LB         0 Hz
GB         0

```

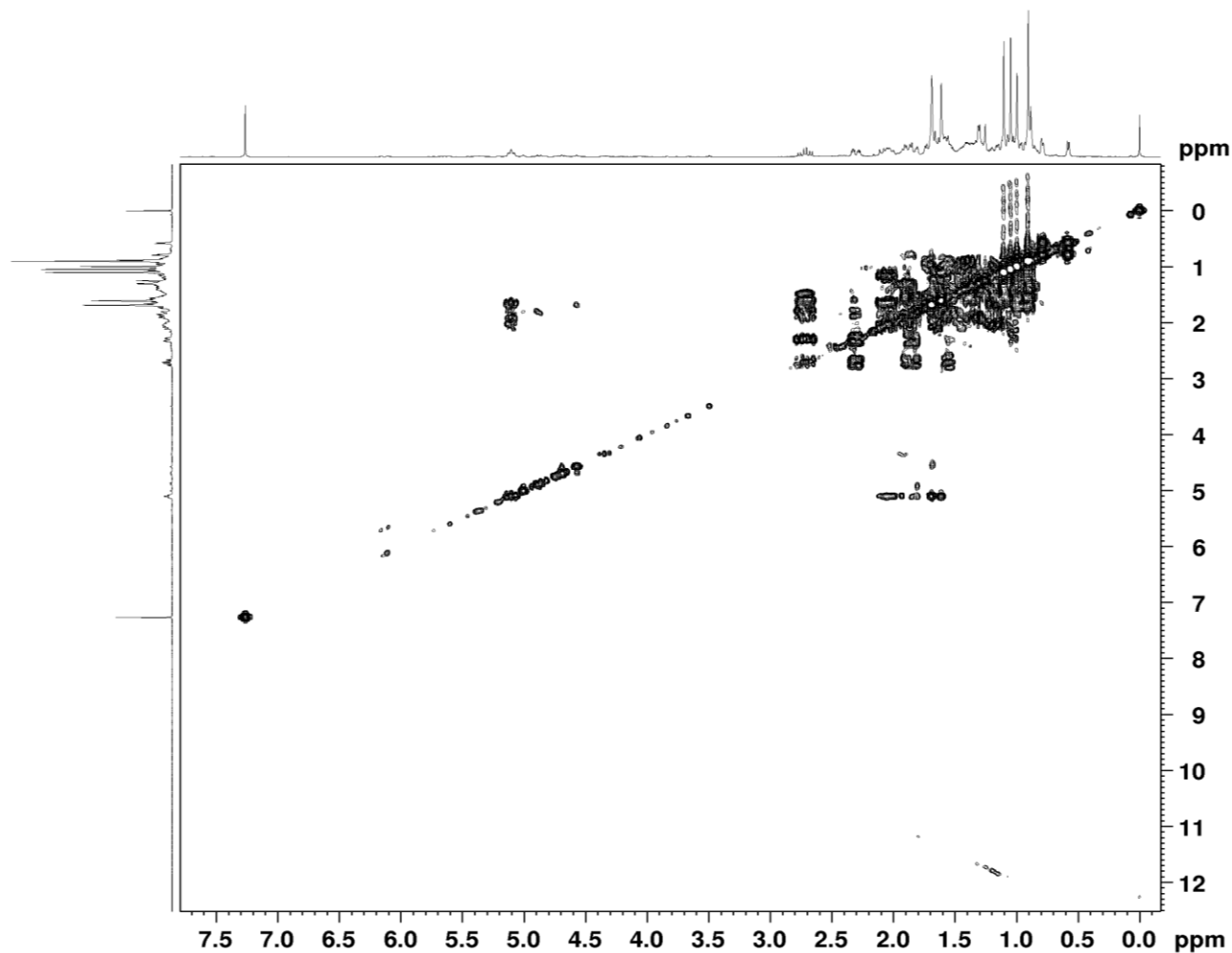
Anexo 13 – Ampliação do espectro de HMBC da substância B (AS2B) na faixa de $\delta_{\text{H}}0,5-2,2$ e $\delta_{\text{C}}13-60$ (CDCl_3 ; ^1H -300, ^{13}C -75 MHz)

Adriana21_ACS25B (HMBC; CDCl_3 ; 4.7 mg)30/03/2021 Op. Magno



ANEXO 14 Espectro ^1H - ^1H COSY da substância B (AS2B) em CDCl_3 (300 MHz)

Adriana21_ACS25B (COSY; CDCl_3 ; 4.7 mg) 29/03/2021
Op. Magno



```

Current Data Parameters
NAME      Adriana21_ACS25B - Cop3
EXPNO     100
PROCNO    1

F2 - Acquisition Parameters
Date_     20210329
Time      12.03
INSTRUM   FOURIER300
PROBHD    5 mm DUL 13C-1
PULPROG   cosygpcqf
TD         2048
SOLVENT   CDCl3
NS         64
DS         16
SWH        6103.516 Hz
FIDRES     2.980232 Hz
AQ         0.1677722 sec
RG         23.8139
DW         81.920 usec
DE         6.50 usec
TE         986.6 K
D0         0.00000300 sec
D1         1.00000000 sec
D13        0.00000400 sec
D16        0.00020000 sec
IN0        0.00016380 sec

===== CHANNEL f1 =====
SFO1      300.2019513 MHz
NUC1       1H
P0         8.50 usec
P1         8.50 usec
PLW1       20.00000000 W

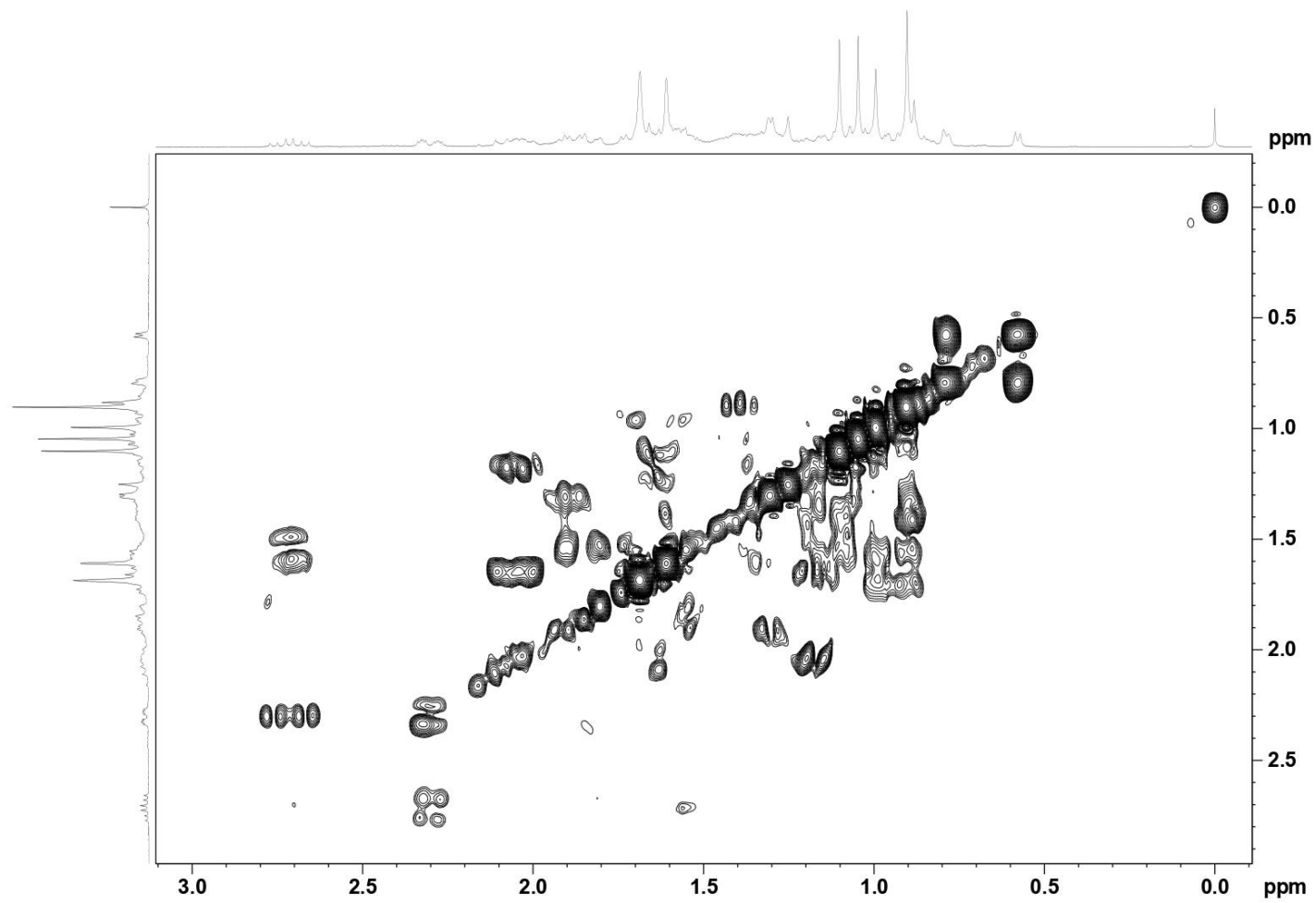
===== GRADIENT CHANNEL =====
GPNAM[1]   SINE.100
GP%1       10.00 %
P16        1000.00 usec

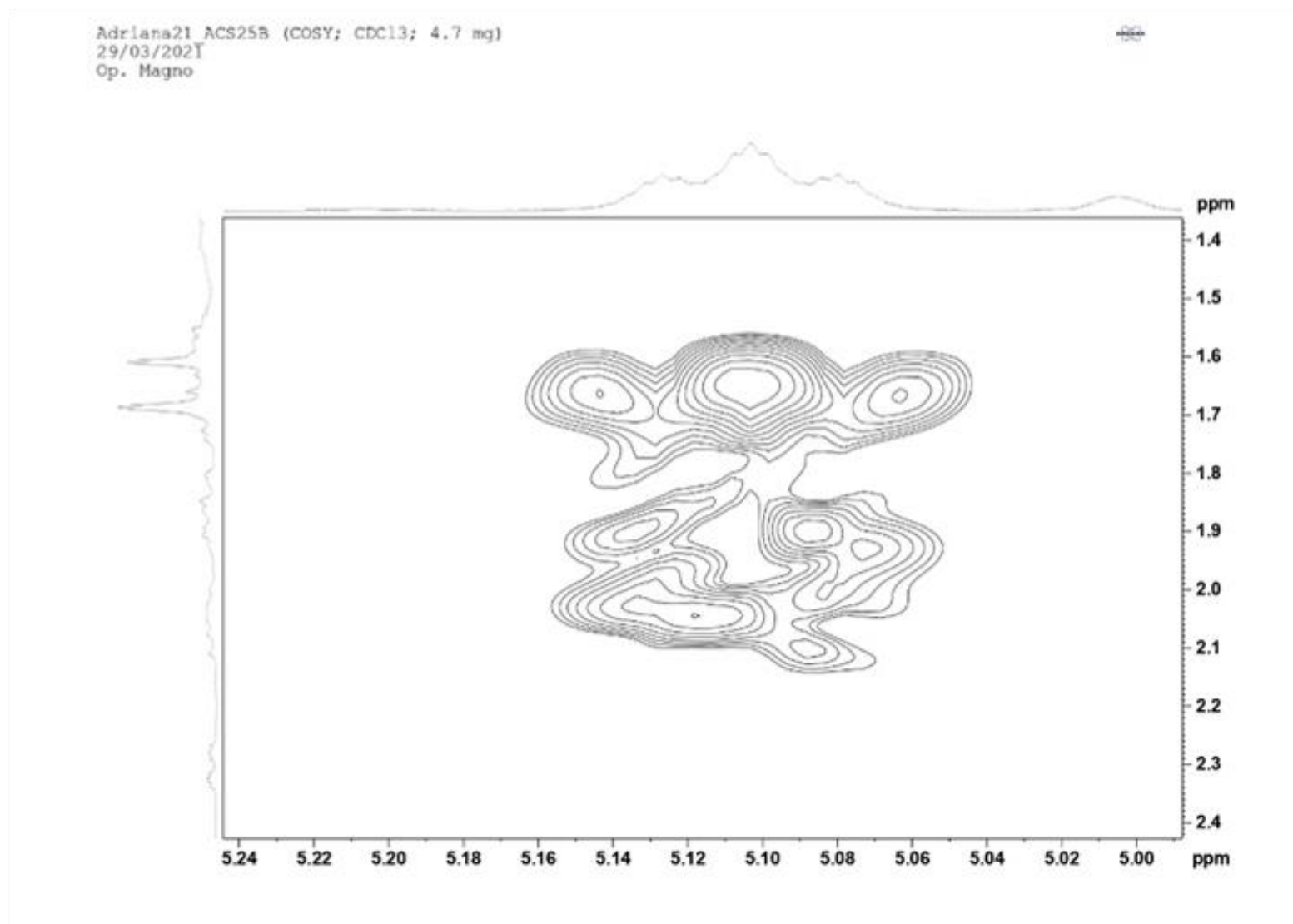
F1 - Acquisition parameters
TD         256
SFO1      300.202 MHz
FIDRES     47.695362 Hz
SW         20.336 ppm
FnMODE     QF

F2 - Processing parameters
SI         4096
SF         300.2000037 MHz
WDW        QSINE
SSB         0
LB          0 Hz
GB          0
PC          1.40

F1 - Processing parameters
SI         4096
MC2        QF
SF         300.2000032 MHz
WDW        QSINE
SSB         0
LB          0 Hz
GB          0

```

Anexo 15 - Ampliação da região δ 0-3 do espectro de ^1H - ^1H COSY da substância B (AS2B; CDCl_3 ; 300 MHz)Adriana21_ACS25B (COSY; CDCl_3 ; 4.7 mg)29/03/2021 Op. Magno

Anexo 16 - Ampliação da região de $\delta 5,00-5,24 \times \delta 1,4-2,4$ do espectro de ^1H - ^1H COSY da substância B (AS2B; CDCl_3 ; 300 MHz)

Anexo 17 - Dados de RMN de ^{13}C da literatura para β -amirenona e germaniconona

RMN de ^{13}C		
C	β -amirenona ¹	Germaniconona ²
C-1	39,9	39,9
C-2	34,1	34
C-3	218,4	217,8
C-4	47,3	47,2
C-5	54,9	55
C-6	19,7	19,7
C-7	33,8	34
C-8	40,6	40,7
C-9	50,5	50,6
C-10	36,9	37
C-11	21,7	21,7
C-12	26,2	26,3
C-13	38,5	38,6
C-14	43,3	43,4
C-15	27,5	27,6
C-16	37,4	37,7
C-17	34,3	34,4
C-18	142,6	142,6
C-19	129,9	130,4
C-20	32,4	32,4
C-21	33,3	33,4
C-22	37,7	37,4
C-23	26,9	26,9
C-24	20,9	21
C-25	16,6	16
C-26	16	16
C-27	14,5	14,5
C-28	25,3	25,3
C-29	31,3	31,3
C-30	29,2	29,2

¹Fonte: NAKANE et al. (2002)²Fonte: GONZÁLEZ et al. (1981)