

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

KARLA LAGOS NOGUEIRA

SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMALÁRICA *IN VITRO* E *IN VIVO*, CITOTOXICIDADE E TOXICIDADE AGUDA DE DERIVADOS SEMISSINTÉTICOS DE 4-NEROLIDILCATECOL

Manaus
2016

KARLA LAGOS NOGUEIRA

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMALÁRICA *IN VITRO* E *IN VIVO*, CITOTOXICIDADE E TOXICIDADE AGUDA DE DERIVADOS SEMISSINTÉTICOS DE 4-
NEROLIDILCATECOL**

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

Orientador: Dr. Adrian Martin Pohlit.

Co-orientador: Dr. Luiz Francisco Rocha e Silva.

Manaus
2016

Ficha Catalográfica

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

N778s Nogueira, Karla Lagos
Síntese e avaliação da atividade antimalárica in vitro e in vivo,
citotoxicidade e toxicidade aguda de derivados semissintéticos de
4-nerolidilcatecol / Karla Lagos Nogueira. 2016
102 f.: il.; 31 cm.

Orientador: Adrian Martin Pohlit
Coorientador: Luiz Francisco Rocha e Silva
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. Plasmodium falciparum. 2. Plasmodium berghei. 3. derivados
de peltatol A. 4. derivados de 4-nerolidilcatecol. I. Pohlit, Adrian
Martin II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

DEDICATÓRIA

Dedico todos o esforço empregado para que pudéssemos obter todos os resultados deste trabalho aos meus orientadores Dr. Adrian Martin Pohlit e Dr. Luiz Francisco Rocha e Silva e também à querida amiga Dra. Ana Cristina da Silva Pinto por terem sido mentores de uma proposta de projeto tão relevante não apenas para o contexto desse grupo de pesquisa, no qual estive inserida, mas também para a complementação e dedução de muitos questionamentos acerca do que se pode realizar a mais dentro do contexto da saúde pública no que se refere aos antimaláricos.

Dedico a capacitação, a desenvoltura, as experiências técnicas, morais e emocionais adquiridas no decorrer deste trabalho a todos os professores e amigos do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), especialmente do Laboratório de Princípios Ativos da Amazônia (Lapaam/INPA), Central Analítica do Laboratório Temático de Química de Produtos Naturais (CALTQPN/INPA), Coordenação de Pesquisas em Ciências da Saúde (CPCS/INPA), Biotério Central/INPA, Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias (Embrapa Amazônia Ocidental), Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas (FCF/UFAM), Fundação de Medicina Tropical – Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) e Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA) que compartilharam mais que seus conhecimentos mais também sua sabedoria e cumplicidade.

Enfim, dedico a realização desse desafio especialmente à minha família, amigos e professores que também se esforçaram em apoio a esta causa. Com uma lembrança especial, dedico essa conquista à querida tia Izandina Aparecida Lopes dos Santos por ter sido a pessoa que há 11 anos abriu a primeira porta de possibilidades para mim, acreditado no meu potencial dentro da pesquisa.

AGRADECIMENTOS

A Deus que sempre tão bondoso, cuidadoso e misericordioso se fez presente à imagem dos familiares, amigos e mestres em todos os momentos. Na imensidão da minha gratidão estão aqueles que transcendendo suas habilidades e posições profissionais e intelectuais se fizeram amigos, transcendendo sua generosidade se fizeram irmãos e transcendendo sua fraternidade se fizeram verdadeiros anjos...nomes preciosos que ocupam um lugar muitíssimo especial no meu coração.

Agradeço pelo resgate: da alegria em viver, da autoconfiança, da confiança no próximo, do equilíbrio, da reafirmação na aliança com Deus, da capacidade de recomeçar e de superação, de forma especial, ao meu esposo Marcello Paulino, à minha mãe M^a do Rosario Carvalho Lagos, às amigas Anna Carolina de Souza Hanna e Márcia de Jesus Amazonas da Silva, ao professor/amigo José Pereira de Moura Neto (JP) que foram anjos de Deus me sustentando, apoiando e impulsionando para seguir em frente.

Ao INPA, especialmenete representado nas pessoas de Dr. Wanderli Pedro Tadei e Dr. Adrian Martin Pohlit e demais colaboradores técnicos, Biotério Central do INPA nas pessoas de Msc. Leonardo Brandão Mattos, Paulo Gustavo Marelo, Rogério Farias Naiff, Andressa Karina Leitão da Encarnação, Tânia Cristina Sumita e Milena Castro Miranda, FCF/UFAM nas pessoas de Dr. Emerson Silva Lima, Dra. Marne Carvalho de Vasconcellos e demais colaboradores, FMT-HVD na pessoa de Dr. Luiz Francisco Rocha e Silva e demais colaboradores, Embrapa Amazônia Ocidental na pessoa de Dr. Célio Maia Chaves e à Fundação de Amparo a Pesquisa do Amazonas – FAPEAM.

O coração ansioso deprime o homem, mas uma
palavra bondosa o anima.

(Provérbios: 12.25)

Quando a ansiedade já me dominava no íntimo, o
teu consolo trouxe alívio à minha alma.

(Salmos: 94.19)

Desejo que no decorrer da busca pelo conhecimento
sempre se adquira muito mais sabedoria.

RESUMO

A malária está entre as mais importantes doenças infecciosas prevalentes nas regiões tropicais e subtropicais no mundo que pode conduzir a um grave e duradouro estado de morbidade, sendo portanto considerada um grave problema de saúde pública. A doença é possível de ser transmitida por 5 espécies do gênero *Plasmodium* spp. infectantes de humano que são inoculadas no hospedeiro vertebrado humano mediante a picada das espécies vetoras do gênero *Anopheles* spp. próprias de cada região endêmica no mundo. Na América do Sul, o Brasil tem importante representação nos índices de malária também atribuída à endêmica região amazônica. A busca por novas drogas antimaláricas é uma necessidade urgente visto que em todo o mundo são crescentes os casos de resistência à maioria das drogas utilizadas na restrita terapia antimalárica. Historicamente tem-se quinina e artemisinina como antimaláricos clássicos cujo isolamento deu-se a partir de plantas e os quais serviram como modelo para o desenvolvimento de antimaláricos sintéticos e/ou semissintéticos com características físico-químicas e farmacológicas mais aprimoradas. Este estudo teve como objetivo reproduzir por meio de semissíntese alguns derivados, em maior escala maior de massa, da substância natural 4-nerolidilcatecol (4-NC), isolado de *Piper peltata*, afim de avaliá-los quanto a sua atividade antimalárica *in vitro*, mediante inibição de *Plasmodium falciparum*, atividade citotóxica em linhagem celular fibroblástica normal (MRC-5) e determinar seus índices de seletividade (IS) além da avaliação *in vivo* para verificação da supressão de *Plasmodium berghei* (espécie transmissora de malária para modelo murino) e avaliação da toxicidade aguda após administração oral dos derivados ao modelo animal sadio. Foram sintetizados nove derivados de 4-NC, sendo dois deles inéditos, bem como dois novos derivados de peltatol A, substância também isolada de *P. peltata*. Os melhoramentos químicos e reacionais conduziram a obtenção de derivados com maiores rendimentos, diminuição de tempo reacional em escala de dias além da confirmada possibilidade da substituição de solventes clorados por solventes mais limpos que conduzem a obtenção de rendimentos equivalentes aos obtidos por meio de solventes clorados. Em relação aos resultados obtidos *in vitro*, apenas o novo derivado propanoilado de 4-NC foi considerado parcialmente ativo contra *P. falciparum* (CI₅₀ = 10,5 µM). Já na análise *in vivo*, o percentual de supressão parasitária dos derivados contra a espécie plasmodial causadora de malária em roedores e que é amplamente utilizada para este tipo de avaliação, constatou-se que os novos derivados dipropanoilado, dibutirilado e dipentanoilado, e ainda a mistura dos derivados monometilados e epoxidados e peltatol A, todos à dose de 200 mg/kg/dia, exibiram supressão da parasitemia contra *P. berghei* de 41, 33, 47, 36, 40 e 51%, respectivamente, em comparação aos controles tratados apenas com o veículo (branco). Os derivados não foram considerados tóxicos para a linhagem MRC-5, tampouco estimularam quaisquer sinais de toxicidade aguda em camundongos sadios após

administração oral e ainda apresentaram satisfatórios índices de seletividade. Por fim, ainda que os níveis de inibição dos derivados estudados não tenham sido considerados significativos à dose de 200 mg/kg/dia, seu mecanismo de ação antimalárica – inibição da biossíntese de isoprenóides e inibição da formação de hemozoína – ainda os torna competitivos e passíveis de melhores estudos acerca de sua exploração como antimaláricos e/ou outras atividades biológicas.

Palavras-chave: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium berghei*, derivados de peltatol A, derivados de 4-nerolidilcatecol.

ABSTRACT

Malaria is among the most important infectious diseases prevalent in the tropical and subtropical regions of the world that can lead to a serious and longstanding morbidity and is therefore considered a serious public health problem. The disease is possible to be transmitted by 5 species of the genus *Plasmodium* spp. Infecting humans that are inoculated into the human vertebrate host by biting the vector species of the genus *Anopheles* spp. Of each endemic region in the world. In South America, Brazil has an important representation in malaria indices also attributed to the endemic Amazon region. The search for new antimalarial drugs is an urgent necessity, as cases of resistance to most of the drugs used in restricted antimalarial therapy worldwide are increasing. Historically quinine and artemisinin have been used as classic antimalarial drugs whose isolation was from plants and which served as a model for the development of synthetic and / or semisynthetic antimalarials with improved physicochemical and pharmacological characteristics. The objective of this study was to reproduce by means of semisynthesis some derivatives of a larger mass scale of the natural substance 4-nerolidylcatechol (4-NC), isolated from *Piper peltata*, in order to evaluate them for their antimalarial activity *in vitro*, By inhibition of *Plasmodium falciparum*, cytotoxic activity in normal fibroblastic cell line (MRC-5) and to determine their selectivity indices (IS), in addition to the *in vivo* evaluation to verify the suppression of *Plasmodium berghei* (malaria transmitting species for murine model) and evaluation Of acute toxicity after oral administration of the derivatives to the healthy animal model. Nine 4-NC derivatives were synthesized, two of them unpublished, as well as two new derivatives of peltatol A, a substance also isolated from *P. peltata*. The chemical and reactional improvements led to the achievement of derivatives with higher yields, a reduction in reaction time in a day scale, and the possibility of substitution of chlorinated solvents by cleaner solvents, which lead to yields equivalent to those obtained with chlorinated solvents. Regarding the results obtained *in vitro*, only the new propionylated derivative of 4-NC was considered partially active against *P. falciparum* ($IC_{50} = 10.5 \mu M$). In the *in vivo* analysis, the percentage of parasite suppression of the derivatives against the plasmodial species causing malaria in rodents and that is widely used for this type of evaluation, it was found that the new dipropionylated, dibutyrylated and dipentylated derivatives, as well as the mixture of the monomethylated and epoxidized derivatives and peltatol A, all at a dose of 200 mg / kg / day, showed suppression of parasitemia against *P. berghei* of 41, 33, 47, 36, 40 and 51%, respectively, compared to controls treated with the vehicle alone (blank). The derivatives were not considered to be toxic to the MRC-5 lineage nor did they stimulate any signs of acute toxicity in healthy mice after oral administration and still showed satisfactory selectivity indices. Finally, although the inhibition levels of the derivatives studied were not considered significant at a dose of 200 mg / kg / day,

their mechanism of antimalarial action - inhibition of isoprenoid biosynthesis and inhibition of hemozoin formation - still makes them competitive and which may be better investigated for their exploitation as antimalarials and / or other biological activities

Keywords: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium berghei*, peltatol A derivatives, 4-nerolidylcatechol derivatives.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Ciclo biológico de <i>Plasmodium</i> spp. em humano e no vetor <i>Anopheles</i> spp.....	22
Figura 2:	Moléculas antimaláricas naturais precursoras de modelos sintéticos mais aprimorados.....	30
Figura 3:	Espécie vegetal <i>Piper peltata</i> no campus da Embrapa.....	32
Figura 4:	Estruturas de alguns dos constituintes químicos de folhas e raízes de <i>P. umbellata</i>	33
Figura 5:	Estrutura de 4-nerolidilcatecol.....	34
Figura 6:	Derivados semissintéticos de 4-NC (1). Derivados metilados (2 e 3), benzoilado (4), benzilados (5, 6 e 7), acetilado (8) e epoxidado (9).....	36
Figura 7:	Estrutura de análogos e derivados de 4-NC já estudados.....	39
Figura 8:	Estruturas dos dímeros de catecóis prenilados: peltatóis A, B e C.....	45
Figura 9:	Delineamento experimental das etapas gerais desde a obtenção do extrato de <i>Piper peltata</i> até a avaliação das atividades biológicas dos derivados de 4-NC.....	47
Figura 10:	Etapas da obtenção do extrato de <i>P. peltata</i> desde a planta fresca no campo.....	49
Figura 11:	Isolamento de 4-NC a partir da farofa do extrato de <i>P. peltata</i>	50
Figura 12:	Estruturas dos derivados metilados a partir de 4-NC.....	51
Figura 13:	Estruturas dos derivados benzilados a partir de 4-NC.....	52
Figura 14:	Estrutura dos derivados epoxidados a partir do derivado diacetilado de 4-NC.....	53
Figura 15:	Estruturas de novos derivados esterificados de 4-NC.....	54
Figura 16:	Estrutura química de peltatol A (13).....	56
Figura 17:	Estruturas de novos derivados esterificados de peltatol A.....	56
Figura 18:	Células viáveis visualizadas pelo método alamar blue.....	71
Figura 19:	Gráfico de intervalos de confiança bootstrap dos dados de sobrevida tendo a natureza química das substâncias como causa de variação.....	80
Figura 20:	Curvas das sobrevidas segundo a forma de administração. P-valor do teste de Log Rank.....	80
Figura 21:	Gráfico de intervalos de confiança bootstrap dos dados de sobrevida pela combinação de dois fatores de variação (via de administração e composto).....	81

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: CI ₅₀ de 4-NC e seus derivados contra a cepa K-1 de <i>P. falciparum</i>	37
Quadro 2: Valores de CI ₅₀ de 4-NC e percentuais de inibição parasitária previamente determinados <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	42
Quadro 3: Supressão <i>in vivo</i> da parasitemia de <i>P. berghei</i> em camundongos tratados com outros derivados de 4-NC.	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. 4-NC (1) isolado de <i>P. peltata</i> e seus derivados semissintéticos (2 a 12).....	58
Tabela 2. Peltatol A (13) e seus derivados semissintéticos (14 e 15).....	58
Tabela 3. Teores percentuais do extrato de <i>P. peltata</i> obtidos a partir da extração de 150 g da raiz, e de 4-NC e peltatol A isolados do extrato por Cromatografia em Coluna <i>flash</i>	65
Tabela 4: Comparação entre os valores de rendimentos das metodologias de base e deste estudo.....	67
Tabela 5: Concentrações inibitórias <i>in vitro</i> de 4-NC (1), peltatol A (13) e seus derivados (2 a 12, 14 e 15) testados contra <i>P. falciparum</i> (K-1) e fibroblastos (MRC-5)	69
Tabela 6: Supressão de <i>P. berghei in vivo</i> em camundongos tratados pelas vias oral e subcutânea com substâncias isoladas ou derivados semissintéticos de 4-NC.....	73

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

4-NC	4-nerolidilcatecol
Ac₂O	Anidrido acético
AcOEt	Acetato de etila
AIDS	Síndrome da imuno deficiência adquirida
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i> [®]
AUC_{0-∞}	Área sob a curva de concentração
BnBr	Brometo de benzila
C₅H₅N	Piridina
CALTQPN	Central Analítica do Laboratório Temático de Química de Produtos Naturais
CBA	Centro de Biotecnologia da Amazônia
CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia em camada delgada
CCDP	Cromatografia em camada delgada preparativa
CC_{flash}	Cromatografia em coluna <i>flash</i>
CEUA	Comissão de ética no uso de animais
CI₅₀	Concentração inibitória média
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-DAF	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjos de fotodiodo
COX	Cicloxigenase
COX-1	Cicloxigenase constitutiva
COX-2	Cicloxigenase induzida
CPCS	Coordenação de Pesquisa em Ciências da Saúde
CQ	Cloroquina
CQR	Cloroquina resistente
CQS	Cloroquina sensível
DCM	Diclorometano
DL₅₀	Dose letal média
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOXO	Doxorrubicina
DP	Desvio padrão
Embrapa	Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias
EtOH	Etanol
FCF	Faculdade de Ciências Farmacêuticas
FMT-HVD	Fundação de Medicina Tropical – Heitor Vieira Dourado
G6PD	Glicose-6-fosfato desidrogenase
HCT-8	Linhagem celular de carcinoma humano de cólon
Hex	Hexano
HL-60	Linhagem tumoral humana de leucemia
HP-β-CD	Hidroxipropil-beta-ciclodextrina
IC	Intervalo de confiança
INPA	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

IS	Índice de seletividade
IT	Índice terapêutico
Kel	Constante de eliminação
LAPAAM	Laboratório de Princípios Ativos da Amazônia
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas
LQFM-002	(<i>E</i>)- <i>N</i> -(3,7-dimetilocta-2,6-dienil)-1,3-dimetil-1H-pirazol-5-amino
LQFM-15	(<i>E</i>)-4-(3,7-dimetilocta-2,6-dienilamino)
<i>m</i>-CPBA	Ácido <i>meta</i> -cloroperoxibenzóico
MDA/MB-435	Linhagens celulares de carcinoma de mama
MeOH	Metanol
MEP	Média do erro padrão
MMP's	Metaloproteinases
MRA-159	Malaria Research and Reference (referência genômica)
MRC-5	Medical Research Council cell strain 5 (Fibroblasto fetal de pulmão humano)
MTBE	Metil-terc-butil-éter
MTI	Mosquiteiro tratado com inseticida
MTT	Método do sal de tratazolium
Ø	Diâmetro
OECD	Organization for Economic Cooperation and Development
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Phosphate buffered saline
PEG	Polietilenoglicol
PLA₂	Fosfolipase A ₂
PVA	Polivinilacetato
Q	Quinina
R_F	Fator de retenção
RMN	Ressonância magnética nuclear
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SF-295	Linhagem celular de carcinoma de sistema nervoso central
<i>t</i>_{1/2}	Tempo de meia vida
TNF-α	Fator de necrose tumoral
UFAM	Universidade Federal do Amazonas
Vd	Volume de distribuição
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	16
1 REVISÃO DE LITERATURA	18
1.1 MALÁRIA.....	18
1.1.1 Aspectos gerais.....	18
1.1.2 Considerações recentes sobre os aspectos epidemiológicos.....	19
1.1.3 Ciclo biológico e sintomatologias.....	21
1.2 DROGAS ANTIMALÁRICAS E RESISTÊNCIA PLASMODIAL.....	22
1.3 METODOLOGIAS NA PESQUISA DE NOVOS ANTIMALÁRICOS.....	24
1.3.1 Fases estratégicas para desenvolvimento de fármacos.....	24
1.3.2 Expectativas em relação em relação a estudos <i>in vivo</i>	25
1.3.3 Utilização de modelo animal <i>in vivo</i>	26
1.3.4 Relação parasita-hospedeiro.....	26
1.3.5 Vantagens e desvantagens na experimentação animal para malária.....	28
1.4 PLANTAS: ORIGEM DE ANTIMALÁRICOS ATUAIS.....	29
1.5 PIPER PELTATA L. MIQUEL: UTILIZAÇÕES E ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	31
1.5.1 4-nerolidilcatecol (4-NC): aspectos gerais.....	34
1.5.2 Viabilidade tecnológica de 4-NC.....	35
1.6 DERIVADOS E ANÁLOGOS DE 4-NC.....	36
1.6.1 Avaliações biológicas preliminares.....	37
1.6.2 Abordagens metodológicas <i>in vivo</i>	39
1.7 PELTATÓIS.....	44
2 OBJETIVOS	46
2.1 OBJETIVO GERAL.....	46
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	46
3 METODOLOGIA	47
3.1 ISOLAMENTO DE SUBSTÂNCIAS NATURAIS A PARTIR DE P. PELTATA.....	48
3.1.1 Estudo sobre solventes para extração de <i>P. peltata</i>	48
3.1.2 Isolamento de 4-nerolidilcatecol (1).....	49
3.2 SÍNTESE DOS DERIVADOS SEMISSINTÉTICOS DE 4-NEROLIDILCATECOL..	50
3.2.1 Síntese dos derivados metilados (2, 3 e 4).....	51

3.2.2	Síntese dos derivados benzilados (5, 6 e 7).....	52
3.2.3	Síntese do derivado diacetilado epoxidado (9).....	53
3.2.4	Síntese de novos derivados de 4-NC (10, 11 e 12).....	54
3.2.5	Isolamento de peltatol A (13).....	55
3.2.6	Síntese de novos derivados de peltatol A (14 e 15).....	56
3.3	CONDUTA ÉTICA.....	58
3.4	AVALIAÇÕES BIOLÓGICAS <i>IN VIVO</i>	59
3.4.1	Animais e parasitas.....	59
3.4.2	Avaliação da supressão de <i>Plasmodium berghei</i>	59
3.4.3	Avaliação da toxicidade aguda.....	60
3.4.4	Análise estatística dos dados <i>in vivo</i>	61
3.5	AVALIAÇÕES BIOLÓGICAS <i>IN VITRO</i>	62
3.5.1	Parasitas e linhagem celular.....	62
3.5.2	Microteste de susceptibilidade <i>in vitro</i>	62
3.5.3	Avaliação da viabilidade celular pelo método Dose-Resposta (alamar blue).....	63
3.5.4	Análise estatística dos dados <i>in vitro</i>	64
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
4.1	ESTUDOS SOBRE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE 1 E 13.....	65
4.2	PREPARAÇÃO DOS DERIVADOS SEMISSINTÉTICOS.....	66
4.3	AVALIAÇÕES BIOLÓGICAS <i>IN VITRO</i>	69
4.3.1	Microteste de susceptibilidade.....	69
4.3.2	Avaliação da viabilidade celular.....	70
4.3.3	Índice de seletividade (IS).....	72
4.4	AVALIAÇÃO BIOLÓGICA <i>IN VIVO</i>	73
4.4.1	Supressão parasitária de <i>P. Berghei</i>	73
4.4.2	Avaliação da toxicidade aguda.....	77
4.4.3	Análise estatística das sobrevidas segundo causas de variação.....	79
	CONCLUSÃO	82
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
	APÊNDICES	98
	ANEXOS	100

INTRODUÇÃO

A malária é uma das mais importantes doenças infecciosas causadoras de morbidade e mortalidade em todo o mundo (RAPPUOLI & ADEREM, 2011). Atualmente, a malária encontra-se instalada em 106 países no mundo e ocasionou cerca de 438.000 óbitos dos 214 milhões de casos no ano de 2015 (WHO, 2015). Ela é transmitida pelo mosquito vetor, a fêmea do gênero *Anopheles* que inocula o parasita do gênero *Plasmodium* no hospedeiro vertebrado, a partir de quando o parasita sofre uma série de transformações em etapas evolutivas que se passam no fígado e na circulação sanguínea do hospedeiro desencadeando uma série de sintomas que conduzem a um estado de morbidade indicativo da doença, período no qual geralmente é realizado o diagnóstico da doença e seu tratamento (BIAMONTE et al., 2013; WALKER et al., 2014).

Ainda no ano de 2015, cerca de 3.200 bilhões de pessoas, o equivalente à metade da população mundial, encontravam-se em áreas com risco de contrair malária, cerca de 95 países em todo o mundo. Atualmente o risco de transmissão de malária pode ser considerado inexistente nas variadas regiões do Brasil. Contudo, a região norte, especialmente a região amazônica e ainda na cidade de Manaus têm-se as áreas de importante endemicidade no mundo (WHO, 2016 a,b). Esses casos são desencadeados especialmente mediante a infecção de humanos pelas espécies: *Plasmodium vivax* que é a principal espécie parasitária responsável pelos casos de malária no Brasil (85%) e *P. falciparum* que é a segunda mais prevalente (15%) (WHO, 2013).

Aspectos como movimento populacional de suscetíveis, precariedade da infraestrutura da saúde pública, mudanças ambientais, aumento da população de

mosquitos vetores e modificações genéticas têm conduzido a um complexo quadro de resistência dos parasitos aos antimaláricos existentes. Com isso, a busca por novas moléculas ativas contra os parasitas da malária em especial *P. falciparum* vêm sendo objeto de pesquisa de grupos de pesquisa que atuam tanto na intervenção da resistência adquirida pelos parasitas quanto na diversificação da ação terapêutica em diferentes etapas do ciclo do parasita (WALKER et al., 2014).

Com base no primeiro antimalárico introduzido no mercado farmacêutico, a quinina, molécula natural isolada a partir de espécies amazônicas (*Cichona* spp.) e também no antimalárico artemisinina, molécula posteriormente isolada da *Artemisia annua* de origem chinesa, a produção de novas drogas antimaláricas passou a estar inspirada nesses modelos pioneiros antimaláricos. Com base na grande biodiversidade da flora da América do Sul, estima-se que o potencial para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes terapêuticos antimaláricos continue a ser propício (POHLIT et al., 2013).

A espécie vegetal amazônica *Piper peltata* passou a ser uma espécie bastante interessante como fonte de substâncias antimaláricas a partir de quando passou a ser notada por sua utilização popular para o tratamento de vários males, dentre eles a malária. Diversas investigações sobre seu potencial biológico levaram à constatação de que suas atividades biológicas e principalmente a atividade antimalárica poderiam ser atribuídas ao metabólito secundário 4-nerolidilcatecol (4-NC) que apresentou-se promissor em estudos de inibição plasmodial *in vitro* (ANDRADE-NETO et al., 2007). Problemas relacionados à instabilidade fotooxidativa desta molécula inspiraram o desenvolvimento de 7 derivados semissintéticos que em geral agregaram melhor estabilidade, atividade antimalárica, entre outras propriedades, que levou o INPA a patentear esses derivados de 4-NC (PINTO et al., 2009; LIMA et al., 2013).

Desta forma, uma série de indícios resultantes de estudos anteriores corroboram para que os derivados de 4-NC compreendam um grupo de substâncias interessantes a serem submetidos a melhores e mais aprofundadas investigações que visem a comprovação de sua atividade antimalárica, especialmente no âmbito de sua eficácia *in vivo* e sua segurança toxicológica. Assim, esse estudo contribui com a real e urgente necessidade pela busca de novas drogas antimaláricas.

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 MALÁRIA

1.1.1 Aspectos gerais

A malária pode ser definida como uma doença infecciosa que representa um dos mais graves problemas de saúde pública e é considerada uma das principais causas de mortalidade e morbidade em todo o mundo. É popularmente conhecida como sezão, paludismo, maleita, febre terçã e febre quartã (FRANSSEN et al., 1997). Ela está amplamente distribuída nas regiões tropicais e subtropicais de todo o planeta de forma que é considerada uma das mais importantes doenças parasitárias tropicais (RAPPUOLI & ADEREM, 2011).

A malária é causada pelo protozoário do gênero *Plasmodium* que é transmitido pela saliva da fêmea do mosquito do gênero *Anopheles* durante o repasto sanguíneo. Cinco espécies de *Plasmodium* são causadoras da doença em humanos: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* e *P. knowlesi* (WALKER et al., 2014). Quanto ao vetor, o gênero *Anopheles* conta com cerca de 465 espécies das quais aproximadamente 70 são capazes de transmitir o parasito da malária para humanos ao redor do mundo (SINKA, 2013). A espécie mais recém notificada como vetora para humanos foi *An. stephensi* (FAULD et al., 2104). No Amazonas as infecções causadas somente pelo *P. falciparum*, e também as causadas tanto por *P. falciparum* quanto por *P. vivax* (infecções mistas) representaram 14,1% dos casos notificados, enquanto que as infecções por *P. vivax* correspondem a 85,8% da ocorrência da doença (BRAZ et al., 2013).

Dentre as 54 espécies de *Anopheles* ocorrentes no Brasil, 33 delas ocorrem na Amazônia e apenas 9 são conhecidas como espécies infectantes de humanos nessa região (TADEI & THATCHER, 2000). As principais espécies de vetores na regiões de floresta são *Anopheles darlingi*, *An. albitarsis*, *An. albimanus*, *An. marajoara* e *An. aquasalis* (MORENO et al., 2007; ROCHA et al., 2008). Apesar de *Anopheles darlingi*, o principal vetor, estar presente em cerca de 80% do país, a incidência de malária no Brasil é há muito quase que exclusivamente (99,8% do número total de casos) restrita à Amazônia (TAUIL & DANIEL-RIBEIRO, 1998).

1.1.2 Considerações recentes sobre os aspectos epidemiológicos

Atualmente o risco de transmissão de malária pode ser considerado inexistente nas variadas regiões do Brasil com exceção da região norte, especialmente na região amazônica e na cidade de Manaus. Esse risco é mais iminente nas áreas rurais dessa região, contudo, alternativas tradicionais preventivas como uso de repelentes e mosquiteiros, além de terapia profilática a base de atovaquona-proguanil, doxiciclina ou mefloquina, apesar de essa última não ser uma recomendação obrigatória das diretrizes nacionais das autoridades sanitárias brasileiras, devem e podem ser consideradas por pessoas em situações de risco (WHO, 2016 a).

Segundo a Fundação de Vigilância em Saúde (FVS), ao final dos cinco primeiros meses do ano (período de maior risco de transmissão da doença) de 2016 houve uma redução de 20,7% no número de casos de malária em relação aos casos registrados no mesmo período no ano anterior, os quais caíram de 24.697 naquele ano para 19.563 neste ano. Em uma comparação ainda mais recente e ampliada sobre os oito primeiros meses do ano, registrou-se 59,7 mil casos de janeiro a agosto de 2015 contra 33,5 mil casos no mesmo período de 2016 o que representa uma diminuição de 44% em relação ao mesmo período do ano anterior (G1 AMAZONAS, 2016 a).

Em geral, no estado do Amazonas a doença apresenta-se com uma distribuição geográfica e epidemiológica bastante heterogênea devido às características das particularidades de ocupação de cada região. Nesse contexto, os maiores destaques vão para o município de São Gabriel da Cachoeira e para a capital do Estado, Manaus. Aquele, localizado no Alto Rio Negro, foi o único município a não alcançar as metas de combate e prevenção previstas no Plano Plurianual de Prevenção e Controle da Malária implementado pela FVS de forma que registrou de janeiro a maio de 2016 4.535 casos, um acréscimo de 126% em relação ao mesmo período no ano anterior. Já Manaus, registrou aumento de 86% no número de casos nos cinco primeiros meses de 2016 com 4.099 casos contra 2.193 registros no ano anterior (G1 AMAZONAS, 2016 b).

Ainda no ano de 2016, cerca de 3.200 milhões de pessoas, o equivalente a metade da população mundial, encontram-se em áreas com risco de contrair malária, áreas estas distribuídas ao longo de 95 países em todo o mundo. No ano de 2015, dos aproximados 214 milhões de casos da doença, 438.000 foram a óbito, mas a seriedade com que se vem intervindo com medidas preventivas ao controle da malária resultou em

uma real e expressiva redução em cerca de 60% da taxa de mortalidade nas populações de risco e de 65% em crianças menores de 5 anos, em todo o mundo em comparação com as taxas registradas em 2000. Desta forma, estima-se que entre os anos de 2000-2015 houve uma redução de 37% da incidência da doença em todo o mundo. No entanto, a África Subsaariana ainda continua a ter os maiores índices de malária (88%) em relação à taxa global, de forma que em 2015, 90% das mortes por malária ocorreram nessa região. Portanto, a maioria dos casos e mortes são na África Subsaariana, mas também seguidos das regiões da Ásia, América Latina e, em menor proporção no Oriente Médio. (WHO, 2016 b,c).

Globalmente, o número de casos de malária caiu de cerca de 262 milhões em 2000 para 214 milhões em 2015. Já o número de mortes por malária caiu de um total estimado de 839.000 em 2000 para 438.000 em 2015. Ou seja, dos 106 países acometidos pela doença em 2000, 57 conseguiram uma redução de pelo menos 75% de incidência em 2015. Desde 2000, as taxas de mortalidade por malária caíram 72% na região das Américas, 65% na região do Pacífico Ocidental, 64% na região do Mediterrâneo Oriental, e ainda que a região africana tenha os maiores índices de mortalidade, ao longo dos últimos 15 anos essa taxa foi reduzida em 66% na população em geral e em 71% nas crianças de até 5 que constituem a população mais vulnerável (WHO, 2016d).

Os principais métodos de intervenção ao controle da doença na África subsaariana mas também em regiões endêmicas em geral têm sido o uso de mosquiteiro tratado com inseticida (MTI), borrifação intradomiciliar com inseticidas residuais e o uso da terapia combinada dos derivados da artemisinina (ACT), este último tem-se mostrado muito eficaz ao tratamento do mais letal e prevalente plasmódio humano (*P. falciparum*), já o primeiro recurso tem-se mostrado de maior impacto na prevenção de cerca de 68% dos casos na África (WHO, 2016d).

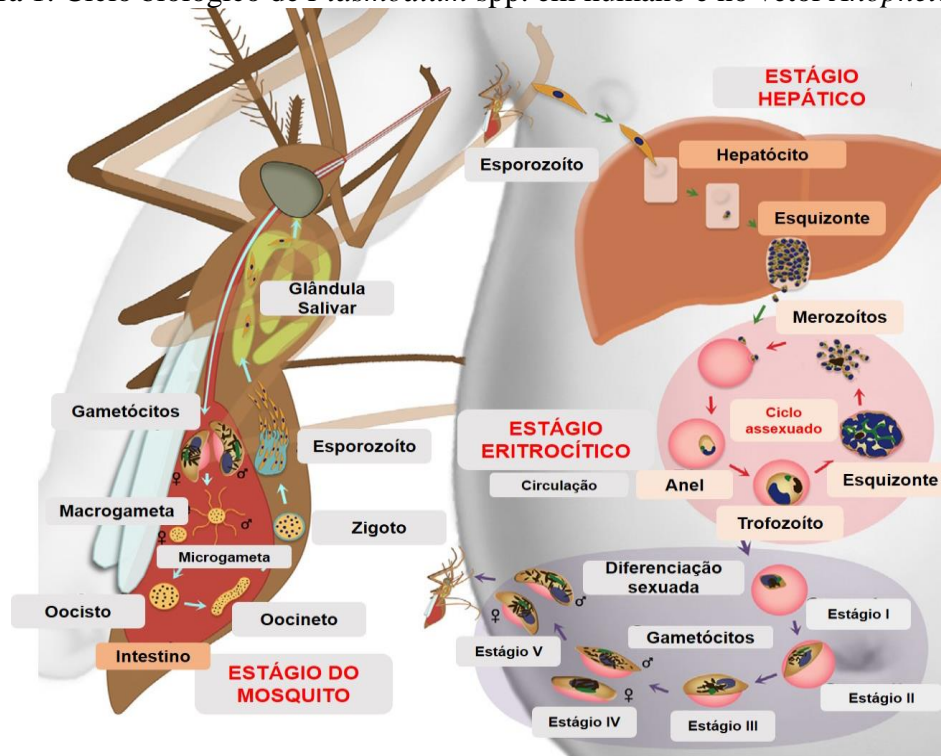
1.1.3 Ciclo biológico e sintomatologias

O ciclo biológico do parasita da malária é determinado a partir do percurso que as diferentes formas parasitárias do *Plasmodium* assumem tanto no vetor quanto após a inoculação no hospedeiro vertebrado (Figura 1). A fêmea do gênero *Anopheles* inocula os esporozoítos na corrente sanguínea do hospedeiro humano, os esporozoítos infectam as células hepáticas e assumem a forma madura de esquizontes e merozoítos que se rompem após essa replicação inicial no fígado (esquizogonia exo-eritrocítica ou tissular). Após essa ruptura, os parasitas se multiplicam de forma assexuada nos eritrócitos (esquizogonia eritrocítica) de forma que os merozoítos infectam as células vermelhas sanguíneas onde atingem o estágio maduro (trofozoítos) que passam a esquizontes que se rompem liberando merozoítos preparados para penetrarem nas hemácias. Nessa fase, alguns parasitas sofrem diferenciação sexual eritrocitária (microgametócitos – macho e macrogametócitos-fêmea).

O ciclo esporogônico inicia-se com a multiplicação dos parasitas no intestino médio do mosquito através da formação de zigotos formados pela penetração dos microgametas nos macrogametas. Os zigotos tornam-se móveis e alongados (ocinetos) e invadem a parede do intestino médio do mosquito onde se desenvolvem em oocistos. Os oocistos aumentam de tamanho, se rompem e liberam esporozoítos que migram para as glândulas salivares do mosquito estando aptos a inocularem um novo hospedeiro humano perpetuando o ciclo de vida do parasita da malária (BIAMONTE et al., 2013).

Os responsáveis pelas manifestações clínicas e sintomas da doença são as formas sanguíneas do parasita. Os sintomas se desenvolvem a partir de cerca de 6 dias após a infecção. A maioria das infecções por *P. falciparum* apresentam sintomas dentro de 1 mês, podendo ocorrer de forma tardia quando há uso de profilaxia. Infecções por *Plasmodium vivax*, *P. malariae* e *P. ovale* geralmente apresentam um período de incubação mais longo e têm menos probabilidade de causar a forma grave da doença. *Plasmodium vivax* e *P. ovale* podem apresentar episódios de recaída devido à ativação de hipnozoítos, já *P. falciparum* e *P. malariae* não oferecem essa possibilidade. Em caso de episódios seguidos de malária por *P. falciparum* é sugestivo de que tenha havido falha do tratamento ou re-infecção. Os casos de recrudescência são marcados por episódios onde os parasitas reaparecem no sangue após o tratamento interrompido por não ter havido completa eliminação (WALKER et al., 2014).

Figura 1: Ciclo biológico de *Plasmodium* spp. em humano e no vetor *Anopheles* spp.



Fonte: Adaptado a partir de Biamonte et al. (2013).

1.2 DROGAS ANTIMALÁRICAS E RESISTÊNCIA PLASMODIAL

Segundo recomendação da Organização Mundial da Saúde (OMS) desde 2010, o tratamento padrão para malária por *P. falciparum* consiste na terapia combinada à base de artemisinina (ACT's) e em casos de agravamento é seguido o uso parenteral da quinina e recentemente o uso do artesunato, este último está mais relacionado à baixa mortalidade. A cloroquina ainda se faz eficiente em muitos países contra *P. vivax* e casos de recaída ocasionados por este plasmódio devem ser tratados com primaquina (para completa eliminação de hipnozoítos da malária por *P. ovale* e *P. vivax* por um período de 14 dias, o que oferece risco de hemólise para pacientes com deficiência de glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PD) e esses pacientes já representaram uma prevalência de 3% na cidade de Manaus (SANTANA et al., 2009; DONDORP et al., 2010).

Dentre os fatores causadores das epidemias maláricas nas diversas regiões do mundo e principalmente na região amazônica, muitos estão relacionadas ao movimento populacional de suscetíveis, precária infraestrutura da saúde pública, mudanças ambientais, aumento da população de mosquitos vetores e as modificações genéticas

que conduzem à resistência dos parasitos aos antimaláricos e inseticidas (GARDNER et al., 2002; WHO, 2004). Acredita-se que o aparecimento da resistência tenha sido atribuído à ocorrência de mutações gênicas espontâneas e à pressão seletiva dos medicamentos sobre as populações de parasitos sensíveis e resistentes (MACKINNON, 2005).

A resistência dos parasitas da malária aos medicamentos usualmente empregados tem sido noticiada desde a década de 90, de forma que após identificação das variadas espécies de plasmódios, constatou-se que *P. falciparum* era predominantemente resistente devido à não responsividade ao tratamento à base de quinino (BOULOS, 1996; ZALIS, 1998). Uma das primeiras tentativas ao contorno da resistência ao quinino e à erradicação da malária no Brasil foi a adoção da nova molécula sintética com propriedades semelhantes ao quinino, a cloroquina, que teve seu uso indiscriminado na Amazônia pela comercialização de sal de cozinha cloroquinado que findou por contribuir com o aparecimento dos primeiros registros de resistência à cloroquina na América Latina (ZALIS, 1998).

O panorama mundial atual da resistência às drogas empregadas no tratamento para malária conta com a quase total resistência à cloroquina por parte do *P. falciparum* e resistência generalizada para sulfadoxina-pirimetamina. As demais espécies do parasita permanecem sensíveis à cloroquina (WHO, 2012). A resistência adquirida por *P. falciparum* é um dos maiores desafios ao controle da malária e implicou, especialmente na Amazônia, em um aumento de mortalidade (SANTANA FILHO et al., 2007). Algumas falhas no tratamento com cloroquina da malária por *P. vivax* já são relatadas em partes da Ásia e a resistência à artemisinina encontra-se emergente no sudeste da Ásia (WALKER et al., 2014). Já no início dos anos 2000, o Amazonas já contava com uma resistência de 10% por parte do *P. vivax* à cloroquina (SANTANA FILHO et al., 2007). Ainda na região amazônica, já são apontados casos de resistência de *P. vivax* à cloroquina, a droga que é a primeira escolha para o tratamento de malária por esse parasita (GAMA et al., 2011; CHEHUAN et al., 2013; MARQUES et al., 2013). A aquisição de resistência às drogas por parte dos parasitas vem se desenvolvendo de forma mais rápida que a descoberta e produção de novas drogas antimaláricas (MARQUES et al., 2013).

Conhecendo-se o arsenal terapêutico utilizado atualmente e as fragilidades do mesmo em relação a sua suscetibilidade em vir se tornando ineficaz diante da

resistência plasmodial, o que se idealiza como requisitos para novas drogas é que não ofereçam problema de resistência, tenham uma ação imediata, sejam seguras especialmente para crianças e grávidas e que promovam a cura em dose única. Nesse contexto, uma nova meta de pesquisa a novas drogas tem sido a busca por agentes bloqueadores de transmissão, que apesar de ainda ser imaturo pode ser o campo mais transformador de todos para alcançar o objetivo final de erradicar a malária (BIAMONTE et al., 2013).

1.3 METODOLOGIAS NA PESQUISA DE NOVOS ANTIMALÁRICOS

1.3.1 Fases estratégicas para desenvolvimento de fármacos

Apesar dos grandes avanços no desenvolvimento e implementação de estratégias de intervenções inovadoras, a comunidade científica ainda enfrenta importantes limitações na compreensão do ciclo biológico de *Plasmodium* spp. e sua complexa interação com o hospedeiro humano. Estudos para estabelecer as interações parasita-hospedeiro e as características fisiopatológicas da infecção são necessários e importantes porém perfazem uma etapa limitante da pesquisa por serem difíceis de serem realizados em seres humanos (ZUZARTE-LUIS et al., 2014).

Para derivados candidatos a drogas antimaláricas é pressuposto que passem por basicamente três fases pré-seletivas até que possam ser conduzidos à etapa de estudos clínicos. Na primeira fase – fase de pré-seleção – podem ser estudados muitos candidatos, cerca de 10.000 compostos extraídos de uma biblioteca de produtos naturais ou sintéticos, os quais podem ser submetidos a uma triagem *in vitro* (*screening*) contra cepa de *P. falciparum* para monitoração de crescimento e proliferação ou ainda podem ser submetidos à detecção de inibidores de alvo-específicos do parasita por meio de *screening in silico* ou enzimático que ao terem uma atividade biológica confirmada no parasita são submetidos a testes de citotoxicidade; na segunda fase- escolha de protótipo – apenas um máximo de 10 candidatos a drogas são avaliadas quanto a sua capacidade de bloqueio de transmissão, testes *in vivo*, toxicidade aguda, avaliação *ex-vivo* com *P. vivax* e avaliação da ação radical pela eliminação das formas hepáticas; a terceira fase – desenvolvimento de drogas – conta com um número ínfimo de candidatos (máximo 3)

dos quais se avalia potência *in vitro*, eficácia *in vivo*, toxicologia, farmacologia e mecanismo de ação (FLANNERY et al., 2013; JIMENEZ-DIAZ et al., 2013 a).

1.3.2. Espectativas em relação a estudos *in vivo*

A necessidade urgente de desenvolvimento de novos medicamentos é principalmente atribuída à resistência adquirida aos antimaláricos já utilizados. Apesar de os compostos ativos *in vitro* contra as formas eritrocíticas de *P. falciparum* estarem em uma escala de milhares, é limitada a etapa seguinte direcionada à conversão destes compostos em novos medicamentos, visto que, assim como a demanda obtida da síntese de compostos limita os testes *in vitro*, tempo e eficiência terapêutica são pontos determinantes em novas estratégias de teste *in vivo*. Alto rendimento e alta capacidade de triagem *in vivo* na seleção rápida de novos compostos antimaláricos é o que se pretende a partir de novas abordagens de testes afim de avaliar a capacidade dos compostos em estagnar ou diminuir a taxa de replicação do parasita. Em uma nova tendência na condução de pesquisas por novas drogas antimaláricas apoia-se a execução de triagens *in vivo* como ensaios preliminares na identificação de moléculas destinadas a ensaios clínicos (JIMENEZ-DIAS et al., 2013b).

O que de fato se espera desse tipo de rastreio é uma observação integrada da eficácia da droga em um contexto fisiológico, de forma que se possa observar a disponibilidade da droga no hospedeiro e sua ação antiparasitária intrínseca. Estudos farmacocinéticos *in vivo* são fundamentais para seleção de moléculas mesmo quando estas não apresentam níveis satisfatórios de inibição ao *P. berghei* mas podem estar biodisponíveis em escala suficientemente aceitável para serem conduzidos a ensaios mais específicos e variados. Ainda que os resultados obtidos a partir de testes *in vivo* inspirem um nível avançado de confiança, não se pode, unicamente, a partir desses resultados, definir totalmente o status de uma moléculas como sendo promissora ou não à referida atividade biológica. Isto porque, a exemplo da artemisinina e azitromicina, moléculas com registro de baixa biodisponibilidade em testes preliminares em animais e baixa atividade *in vitro*, são hoje eficientes terapias antimaláricas usuais *in vivo*. A seleção de moléculas para estudos mais específicos *in vivo*, com modelo murino humanizado, também são passos relevantes apoiados pelo idealismo dos ensaios preliminares *in vivo*. Visto que estes ensaios propiciam a avaliação, em especial, de um

parâmetro muitíssimo importante, o índice terapêutico (IT) o qual estima a diferença dos níveis eficazes de droga no sangue e os que são tóxicos para o humano (JIMENEZ-DIAS et al., 2013 b).

1.3.3 Utilização de modelo animal *in vivo*

A utilização de modelos animais no estudo da malária vem se mostrando ferramenta bem estável em pesquisas, e sua larga utilização, em especial de modelos roedores mais que os primatas não humanos, pode ser justificada por sua capacidade em conduzir a um desdobramento bem aproximado das variadas apresentações da doença em humanos. Ainda que estudos estejam direcionados à forma humana da doença, estudá-la em organismo humano apresenta limitações, impedimentos e desvantagens em relação a utilização de modelo animal. Toda a burocrática disponibilização de amostras de órgãos e tecidos humanos representativos além da falta de domínio na manipulação de mecanismos às respostas imunológicas são alguns dos aspectos que tornam a utilização do modelo animal mais apropriada (LANGHORNE et al., 2011).

A utilização de modelos animais, mais especificamente de roedores infectados por malária, vem sendo desenvolvida há décadas e contribui significativamente para a compreensão da biologia básica do parasita, resposta do hospedeiro, patogênese e conduz à compreensão de doenças humanas a partir de uma visão extrapolada ao que ocorre no modelo animal. Para isso estão disponíveis variadas cepas dos seguintes plasmódios infectantes de modelo de roedor: *Plasmodium berghei*, *P. yoelii*, *P. chabaudi* e *P. vinckei* (WHITE et al., 2010; CRAIG et al., 2012).

1.3.4 Relação parasita-hospedeiro

Muitas das drogas antimaláricas já utilizadas foram triadas para verificação da sua eficácia terapêutica *in vivo* contra diferentes estágios de desenvolvimento do *Plasmodium berghei*, parasita específico de roedores, visando sua condução a testes contra parasita de malária humana. É importante perceber que para cada espécie de plasmódio que se deseja estudar existe um modelo animal adequado a essa investigação. Historicamente, o macaco rhesus foi o primeiro modelo animal no qual foi estudada a

infecção de hemácias por *Plasmodium coatneyi*, já que primatas não-humanos podem perfeitamente serem utilizados como modelo de estudo para infecções causadas pelas diferentes espécies plamodiais infectantes de humanos. Nesse contexto, tem-se tradicionalmente utilizado a espécie parasitária *Plasmodium knowlesi* para o melhor entendimento do comportamento da forma parasitária invasora de hemácias, o merozoíto. Por outro lado, não só é importante adequar o melhor modelo animal ao parasita como também variar a espécie parasitária em um mesmo modelo animal pois, se cada quadro sintomático observado no modelo animal é desencadeado pela severidade intrínseca a cada parasita não humano, e esta está correlacionada a um parasita especificamente, a variação do parasita também amplia o conhecimento acerca da totalidade do quadro sintomático da doença (LANGHORNE et al., 2011).

Plasmodium berghei tem sua utilização bastante difundida em pesquisas *in vivo* que visam respostas terapêuticas ou relação dos-resposta por ser uma espécie bastante acessível e pertinente a esses ensaios (FIDOK et al., 2004; JIMENEZ-DIAS et al., 2013 b). Contudo, há casos em que a espécie de plasmódio infectante de humano para o qual a terapia esteja sendo estudada seja sensível à droga, mas a espécie parasitária específica para o modelo animal disponível não o seja, havendo então necessidade da utilização de um modelo animal (murino) adaptável ou personalizado à finalidade investigativa do estudo, o modelo humanizado. Existe, portanto, uma necessidade de definir cuidadosamente o parasita a ser utilizado, como esse parasita é formado no organismo e de que forma a infecção é iniciada e até mesmo promover estudos de expressão gênica.

Nesse contexto tem-se o antimalárico pirimidina como exemplo de droga em que não se atingiu a expectativa de uma promissora ação antimalárica quando submetida aos ensaios em murino com seu respectivo parasita específico mas mostrou-se promissora quando respondeu ativamente em testes com modelo humanizado. Um outro caso particular da especificidade existente na relação parasita-hospedeiro pode ser visualizada com relação ao *Plasmodium cynomolgi*, este possui capacidade de reproduzir a patogênese única do *Plasmodium vivax* quanto a capacidade de formar o estágio parasitário que marca os episódios de recrudescência, o hipnozoíto, capacidade esta que ajuda, por exemplo, no estudo de alvos de ação de medicamentos e vacinas (RICKLEFS & OUTLAW, 2010).

1.3.5 Vantagens e desvantagens na experimentação animal para malária

O modelo a ser selecionado para cada estudo deve ser o que melhor refletir resposta e similaridades com a doença humana em questão, além de serem consideradas sempre as diferenças e limitações de cada modelo proposto. Cada modelo ou sistema experimental utilizados nos estudos buscam que seja possível exprimir de forma relevante os mecanismos da malária humana de modo a desenvolver o quadro mais amplo possível da doença afim de que ofereça campo para uma análise conjunta para intervenção da doença (LANGHORNE et al., 2011).

A utilização de roedores como modelo animal tem a vantagem de viabilizar o desenvolvimento de estudo *ex-vivo* no qual um animal imunossuprimido pode receber eritrócitos humanos infectados com um tipo de parasita especificamente humano, como por exemplo *P. falciparum*, possibilitando o estudo da ação da droga na forma parasitária alvo de desenvolvimento sanguíneo. Outra possibilidade é o de verificação de eventos imunológicos importantíssimos também ao desenvolvimento de vacinas mediante a utilização de modelos bem usuais emergencialmente como ratos e primatas (LANGHORNE et al., 2011).

Ainda que muitos prefiram considerar como desvantajosas as variações visíveis nos modelos de roedores durante a manifestação da doença, ou que ainda como uma limitação e indefinição de resultados decorrentes da utilização desse modelo de estudo, é preferível que se compreenda que tais variações refletem em todas as possíveis e imagináveis manifestações da doença em humanos. É exatamente por questões como essas que se deve ter cautela na interpretação de resultados de estudo com modelos de roedores de forma que se esteja consciente sobre sua importância mas também suas limitações e buscando modelos de roedores que melhor expressem as diferentes situações de campo (CLASER et al., 2014).

A possibilidade de diversificação dos quadros clínicos apresentados pela malária que podem ser gerados a partir variadas combinações entre parasita-camundongo, em alguns momentos da pesquisa, pode ser considerada como um inconveniente, já que os efeitos da infecção, as respostas imunológicas inatas e a aquisição de imunidade podem ser amplamente variáveis de indivíduo para indivíduo, o que torna questionável se realmente os achados em um modelo animal específico pode

ser extrapolado para o entendimento da malária em humanos. Assim, o indicado é que se utilize o modelo apropriado às particularidades do foco de cada pesquisa ao invés de alimentar a expectativa de um único modelo que contemple todas as nuances da malária humana (LANGHORNE et al., 2011).

Muito do conhecimento imunológico básico de doenças infecciosas como a malária foi adquirido a partir de estudos em camundongos e pode ser aplicado em grande parte aos seres humanos apesar de pequenas diferenças. O paralelo estabelecido nos estudos de malária entre humanos e modelo animal está, por exemplo, na produção de IL-10 por células T IFN γ -CD4 observada pela primeira vez em seres humanos recuperados de malária por *P. falciparum* e posteriormente observado em modelo de roedor. Em termos práticos, o modelo de roedor para malária pode nem sempre prever quais vacinas obteriam sucesso para humanos mas certamente fazem a previsão confiável das falhas dessas vacinas sendo importantes para evitar produção de vacinas ineficazes (LANGHORNE et al., 2011).

Como muitas das abordagens do estudo com modelo animal são utilizadas para elucidar mecanismos de patogênese, o estudo acaba perdendo sua eficácia ou validade por não acompanhar o momento real no qual o tratamento é empregado na forma humana grave da doença que ocorre após o início dos sintomas, sendo esta, portanto, uma explicação do porque muitas terapias para malária grave são eficazes em roedores mas falham em estudo humano. Desta forma é sugestivo que a metodologia de tratamento dos modelos animais infectados seja paralelo ou equivalente a empregada aos seres humanos após o aparecimento dos sinais clínicos (LANGHORNE et al., 2011).

1.4 PLANTAS: ORIGEM DE ANTIMALÁRICOS ATUAIS

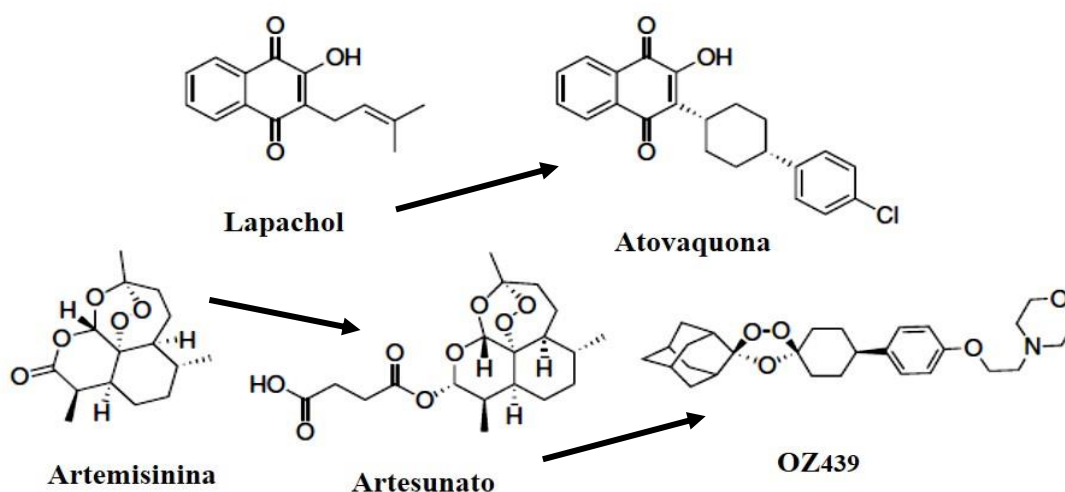
As primeiras e principais drogas empregadas na terapia antimalárica no mundo foram produzidas a partir ou com base em moléculas isoladas de plantas (FRANÇA et al., 2008). A quinina, um alcaloide natural, foi o primeiro antimalárico descoberto com comprovada ação antimalárica tendo sido isolada em 1820 da casca da quina (*Cinchona* spp.).

O lapachol, uma naftoquinona natural a partir da qual sintetizou-se a atovaquona, foi isolado das casca da *Tabebuia avellanedae* (Ipê roxo) em 1882. Tanto a

quinina quanto o lapachol já eram utilizadas para tratar febre e malária no século XIX na América do Sul. A quinina e o lapachol são exemplos de substâncias naturais provenientes das plantas da bacia amazônica com comprovada atividade antimalárica. Já a artemisinina, isolada de *Artemisia annua*, é também uma droga de origem natural a partir da qual foram sintetizados derivados que compoem uma classe de antimaláricos muito importante hoje baseada na combinação de seus derivados (ACT's) com antimaláricos quinolínicos (HUDSON, 1993; ACHAN et al., 2011).

A utilização de substâncias naturais como protótipos para a síntese de derivados semissintéticos e substâncias análogas tem sido importante no desenvolvimento e produção de novos antimaláricos (Figura 2). Isso pode ser constatado ao observarmos, por exemplo, que a partir da otimização química do lapachol originou-se a atovaquona, uma molécula com melhores característica de biodisponibilidade; a partir da quinina, que possui um esquema prolongado de doses terapêuticas, sintetizou-se a cloroquina com esquema de administração de doses reduzidas e por fim o artesunato, originado a partir da modificação da artemisinina, com característica de melhor solubilidade e base de modelo para a concepção de endoperóxidos antimaláricos como OZ439 (CRUZ et al., 2013; POHLIT et al., 2013).

Figura 2: Moléculas antimaláricas naturais precursoras de modelos sintéticos mais aprimorados.



Fonte: Adaptada a partir de Cruz et al. (2013).

Na América do Sul, mais especificamente na Amazônia, tem-se a maior biodiversidade do planeta com mais de 40.000 espécies de plantas cientificamente classificadas na região. Contudo, a falta de conhecimento farmacológico sobre o

potencial dessa flora representa um dos maiores desafios para o desenvolvimento científico baseado em fitofármacos do Brasil (CALDERON et al., 2009). Pelo menos 30 moléculas de diferentes fontes naturais da América do Sul, ativas contra malária, já foram identificadas e publicadas. Uma característica indicativa de potencial antimalárico dessas substâncias é um *cut-off* aproximado da concentração inibitória média (CI₅₀) de 1 µM que tem sido apresentado por quase 0,5% dessas diferentes entidades químicas dessa região (BRAVO et al., 2002; CRUZ et al., 2013).

Atualmente mais de 20.000 compostos ativos contra os parasitos do gênero *Plasmodium* são pertencentes ao acervo natural da América Sul. Contudo, o que se tem observado é a posição fornecedora quase que estática do Brasil em relação ao mercado internacional de fitoterápicos e produtos farmacêuticos derivados de plantas, mercado este que vem movimentando anualmente cerca de no mínimo US\$ 22 bilhões (PINTO et al., 2002; GUIGUEMDE et al., 2012). Por fim, o que se almeja das novas drogas antimaláricas é que sejam ativas seletivamente contra todas as 5 espécies de plasmódios infectantes de humanos, tenham níveis de toxicidade nulo ou pelo menos aceitáveis em humanos e que atuem no bloqueio de transmissão das formas sexuadas do parasito para o vetor (POHLIT et al., 2013).

1.5 *PIPER PELTATA* L. MIQUEL: UTILIZAÇÕES E ATIVIDADES BIOLÓGICAS

A família Piperaceae contém 12 gêneros, cerca de 2000 espécies bem estabelecidas em regiões de clima tropical e subtropical e tem o gênero *Piper* L. como um dos mais representativos. As espécies do gênero *Piper* ocorrentes no Brasil são *P. peltata* e *P. umbellata* (FIGUEIREDO & SAZIMA, 2000).

A espécie de interesse para este estudo, *Piper peltata* (L.) Miquel (Figura 3) é uma árvore arbustiva de cerca de 1-2 metros de altura e que ocorre nas américas Central e do Sul sendo conhecida por variadas sinonímias populares: caapeba, caapeba-do-norte, caapeba branca, caapeba verdadeira, malvarisco, pariparoba, aguxima, dentre outros.

Figura 3: Espécie vegetal *Piper peltata* no campus da Embrapa.



É diversificada sua utilização para vários males na medicina tradicional: hepatite, úlceras cutâneas, dor de cabeça, conjuntivite, erisipela, leishmaniose, queimaduras, reumatismo e inflamação (DESMARCHELIER et al., 1997; DESMARCHELIER & SCHAUS, 2000). A partir da sua utilização popular para o tratamento de malária (DI STASI et al., 2002), estudos vêm sendo realizados *in vitro* e *in vivo* com extratos de diferentes partes da planta com a finalidade de comprovar cientificamente a atividade biológica antiplasmodial dessa espécie.

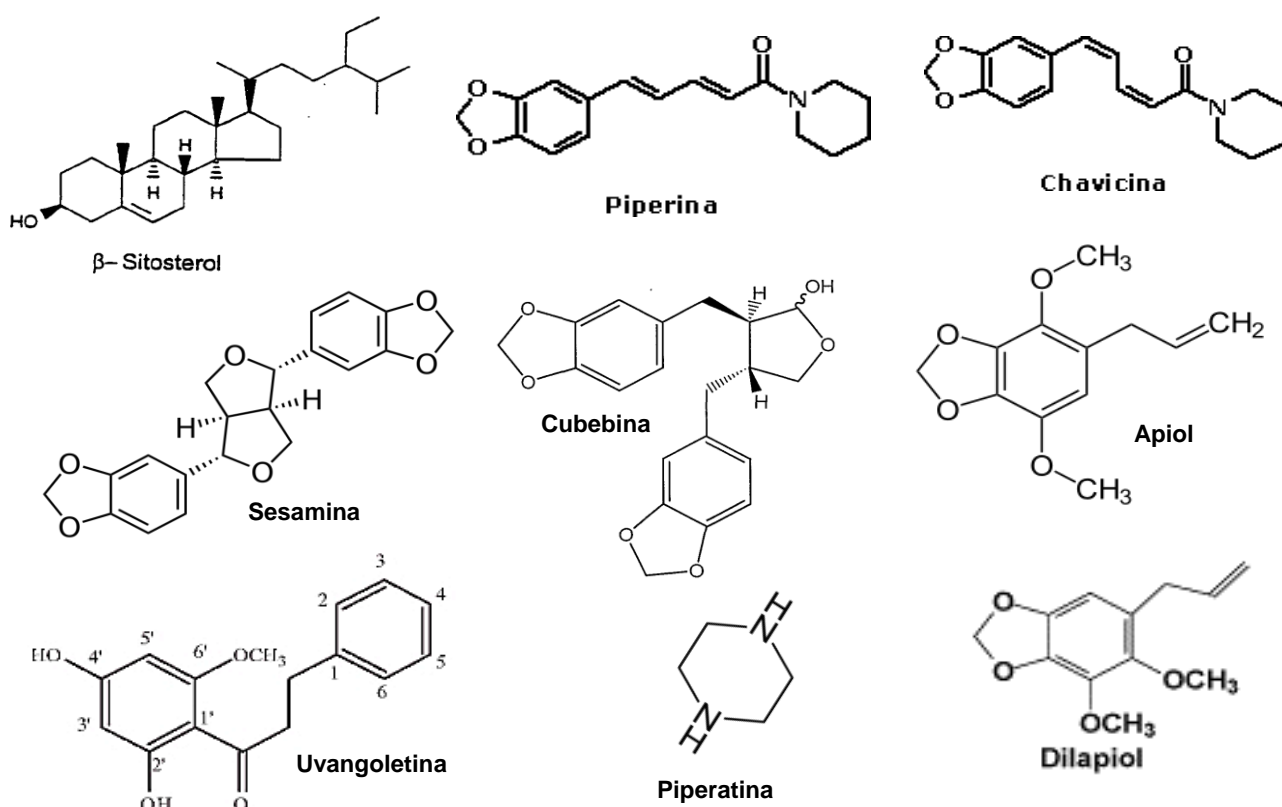
Através de estudos preliminares observou-se supressão *in vivo* de 66% da parasitemia de *Plasmodium berghei* quando administrado em camundongos por via oral sob a forma de extrato etanólico em uma concentração de 500 mg/kg (AMORIM et al., 1986) e outro expressivo resultado foi demonstrado mediante uma inibição *in vitro* de 49% de microcultura de *P. falciparum* ao contato com soro de camundongos que haviam sido tratados previamente com extrato aquoso de raiz, caule e folhas de *P. peltata* (SALA-NETO, 1992).

Estudos químicos de *P. umbellata* revelaram a presença de vários constituintes extraídos de suas folhas e raízes: 4-nerolidilcatecol, β -sitosterol, chavicina, piperina, cubebina, diidrocubebina, sesamina, 2-hidroxi-5,7-dimetoxi-3,4-metilenodioxiflavonol, apiol, dilapiol, pariparobina, jamborandina, piperatina, vogonina, uvangoletina e N-benzoilmesalina (Figura 4) (KIJOA et al., 1980; BASTOS et al., 1998; VIANA et al., 2000; NORIEGA et al., 2001).

Algumas das atividades biológicas comprovadas dos extratos de *P. peltata* e *P. umbellata* desde que essas espécies passaram a ser notadas pela suas utilizações medicinais populares foram: atividade anti-inflamatória (DESMARCHELIER et al.,

2000), atividade inibitória positiva de fosfolipases para duas miotoxinas ofídicas de *Bothrops asper* (NÚÑEZ et al., 2005), atividade antioxidante e foto protetora anti-UVB do extrato de *P. umbellata* (SILVA et al., 2005), inibição *in vitro* das metaloproteinases (MMP's) 2 e 9 da matriz da pele e *in vivo* da MMP-9, ambas reguladoras da exposição a raios UVB (ROPKE et al., 2006; BARROS et al., 2007), atividade citotóxica e antitumoral *in vitro* frente a linhagens tumorais de mama, cólon e leucemia (PINTO, 2002; PINTO et al., 2006), atividade anti-HIV (VERMANI & GARG, 2002), atividade *in vitro* contra larvas de *Aedes aegypti* (POHLIT et al., 2004), atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* e fungicida contra *Trichophyton rubrum* (RODRIGUES et al., 2006).

Figura 4. Estruturas de alguns dos constituintes químicos de folhas e raízes de *P. umbellata*.

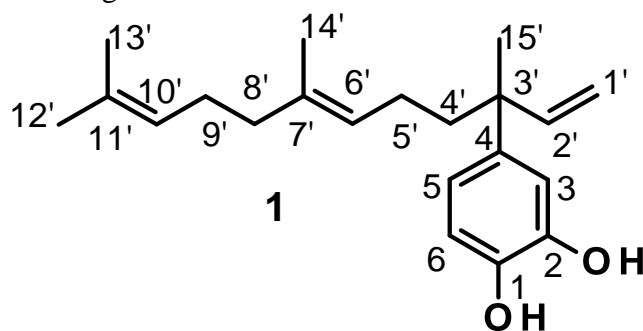


A partir deste contexto dos estudos levantados por muitos autores sobre as variadas atividades dessas duas espécies passou-se a investigar a qual dos metabólitos da planta estavam atribuídas essas atividades, o que conduziu aos princípio ativo 4-nerolidilcatecol e às primeiras investigações sobre seu potencial antimalárico.

1.5.1 4-nerolidilcatecol (4-NC): aspectos gerais

4-nerolidilcatecol (4-NC) (Figura 5) é um componente extraído das raízes, folhas e frutos das espécies *P. umbellata* e *P. peltata*. É um catecol sesquiterpênico de origem biossintética mista, de cor amarelo-avermelhado e aspecto oleoso (KIJJOA et al., 1980; BERGAMO et al., 2005; PINTO et al., 2010).

Figura 5. Estrutura de 4-nerolidilcatecol.



As atividades inicialmente relacionadas ao extrato bruto de *P. peltata* foram gradativamente sendo comprovadas e atribuídas ao composto 4-NC a partir de estudos *in vitro* e *in vivo* feitos com a substância isolada do extrato. Algumas dessas atividades comprovadas são: tranquilizante, antioxidante (superior ao α -tocoferol, indicando-o como potencial fármaco para condições patológicas onde ocorra participação do estresse oxidativo), antioxidante (baseada na supressão de radicais livres de ABTS) (UJO et al., 2008), ação analgésica, anti-inflamatória (BARROS, 2005; PERAZZO et al., 2005), ação leishmanicida *in vitro* (BRAGA et al., 2007), ação antitripanossômica *in vitro* (ATINDEHOU et al., 2004), surpreendente atividade anti-leucêmica na forma livre e complexado com HP- β -CD sobre a linhagem leucêmica K-562, e anti-carcinoma sobre as células do tumor ascítico de Ehrlich (SOARES, 2007), efeito protetor na genotoxicidade induzida por ciclofosfamida, antioxidante, anti-inflamatório e analgésico (VALADARES et al., 2007) e moderada inibição *in vitro* (CI₅₀ = 9 μ g/mL) de *P. falciparum* (PINTO, 2002). Conforme descrito por membro deste grupo de pesquisa, este composto possui, portanto, importante atividade antimalárica, anti-inflamatória e antioxidante, além de ser útil na indústria cosmética (PINTO et al., 2010), ação citotóxica sobre linhagens celulares de melanoma (SK-MEL-28, SK-MEL-103, e SK-MEL-147 (BROHEM et al., 2009).

A atividade antimalárica de 4-NC já foi descrita sendo considerada significativa com a inibição *in vitro* de 50% da parasitemia ($CI_{50} = 0,16 - 6,71 \mu\text{M}$) tanto da estirpe de *P. falciparum* padrão quanto da isolada de campo amazônico. Já *in vivo* foi testado nas doses de 200, 400 e 600 mg/kg/dia por onde obteve-se uma supressão máxima de 63% da parasitemia de *Plamodium berghei* após os 4 dias de tratamento do modelo murinho pelas vias oral e subcutânea (ANDRADE-NETO et al, 2007; ROCHA E SILVA et al, 2011).

1.5.2 Viabilidade tecnológica de 4-NC

Estudos que visam o controle sobre a quantificação deste princípio ativo e sua maior produção de biomassa cultivada de *P. peltata* já foram desenvolvidos e seus resultados corroboram a possibilidade de utilização em escala industrial da espécie para finalidade de pesquisa e desenvolvimento medicinal (PENA et al., 2005; PINTO et al., 2010). No entanto, o largo cultivo da espécie em nossa região, a fácil obtenção do extrato, o domínio do isolamento do princípio ativo 4-NC e as variadas probabilidades de exploração das comprovadas atividades biológicas do mesmo, não perfazem um conjunto de fatores que tornam totalmente facilitada a pesquisa em torno deste composto, haja vista que suas propriedades físico-químicas são desfavoráveis, principalmente no que diz respeito a sua baixa solubilidade em água ($3 \mu\text{g/mL}$), coeficiente de partição ($\log P = 6,997 \pm 0,37$) e baixa foto estabilidade que o torna quimicamente instável e facilmente degradável (SOARES, 2007).

Alguns estudos voltaram-se a explorar metodologias para melhora de algumas propriedade de 4-NC de forma a conduzi-lo a um estado de viabilidade tecnológica e terapêutica. Esses estudos são importantes porque fornecem uma idéia de viabilidade tecnológica extrapolada aos derivados de 4-NC. A solubilidade da molécula de 4-NC é melhorada quando formado um complexo de inclusão em solução de HP- β -CD a 30% (p/v) (REZENDE & BARROS, 2004). A fotoestabilidade é aumentada mediante revestimento da substância pura com polímeros PVA-PEG 6% tornando formulações viáveis para administração de fármacos em micropartículas sólidas (ARAÚJO-JÚNIOR et al., 2013), comprovada aquisição de maior estabilidade do 4-NC quando complexado com HP- β -CD na proporção de 2:1 viabilizou a utilização das propriedades biológicas dessa substância em formulações orais e tópicas por encaixá-lo nas condições ideais de

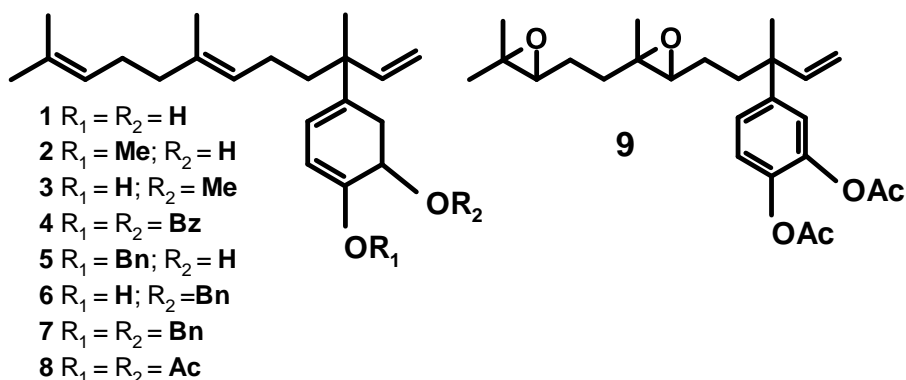
classificação II de fármacos - baixa solubilidade mas alta permeabilidade (SOARES et al., 2009).

1.6 DERIVADOS E ANÁLOGOS DE 4-NC

Os derivados semissintéticos de 4-NC abordados neste projeto são, em parte, resultado da tese de doutorado da Dra. Ana Cristina da Silva Pinto, que vislumbrou a produção de derivados que tivessem melhores estabilidade e atividades biológicas. Na figura 6 pode-se observar as estruturas das substâncias precursoras (1 e 8) dos derivados inéditos (2-7 e 9) obtidos a partir daquele trabalho.

O conjunto de derivados obtidos a partir desse estudo foi patenteado pelo INPA (EP, 2009; INPI, 2009; US, 2009; WIPO, 2009) e a partir dele, abriram-se vertentes de estudos a serem realizados sobre melhoramento acerca da produção desses derivados em maior escala de massa (gramas), melhores investigações das atividades biológicas voltadas às atividades antiplasmodial *in vitro* e *in vivo*, citotoxicidade, farmacologia, toxicocinética e tecnologia farmacêutica para elaboração de uma forma farmacêutica, entre outros.

Figura 6. Derivados semissintéticos de 4-NC (1). Derivados metilados (2 e 3), benzilado (4), benzilados (5, 6 e 7), acetilado (8) e epoxidado (9).



Fonte: Adaptado a partir de Pinto et al. (2009).

1.6.1 Avaliações biológicas preliminares

Algumas avaliações *in vitro* sobre a atividade antiplasmodial em *Plasmodium falciparum* e citotóxica frente a algumas linhagens tumorais humanas já foram realizadas por Pinto et al. (2009) (Quadro 1). Por essas avaliações preliminares percebeu-se a necessidade de dar sequência a investigações mais completas e diversificadas sobre a atividade antimalárica e toxicidade desses derivados.

Quadro 1: CI₅₀ de 4-NC e seus derivados contra a cepa K-1 de *P. falciparum*.

Compostos	Código	CI ₅₀	
		µg/mL	µM
4-NC	1	0,21	0,67
4-NC monometilado- <i>p</i>	2	PA	-
4-NC monometilado- <i>m</i>	3	I	-
4-NC dibenzoilado	4	0,35	0,67
4-NC monobenzilado- <i>p</i>	5	1,56	3,86
4-NC monobenzilado- <i>m</i>	6	1,15	2,84
4-NC dibenzilado	7	11,14	22,52
4-NC diacetilado	8	-	-
4-NC diacetilado-diepoxidado	9	1,7	3,95
Cloroquina	CQ	0,46	0,89
Quinina	Q	0,004	0,012

I= Inativo (inibição < 50%); PA= parcialmente ativo (inibição entre 50-79%) a 2,5 e 50 µg/mL.

Fonte: Adaptado a partir de Pinto et al. (2009).

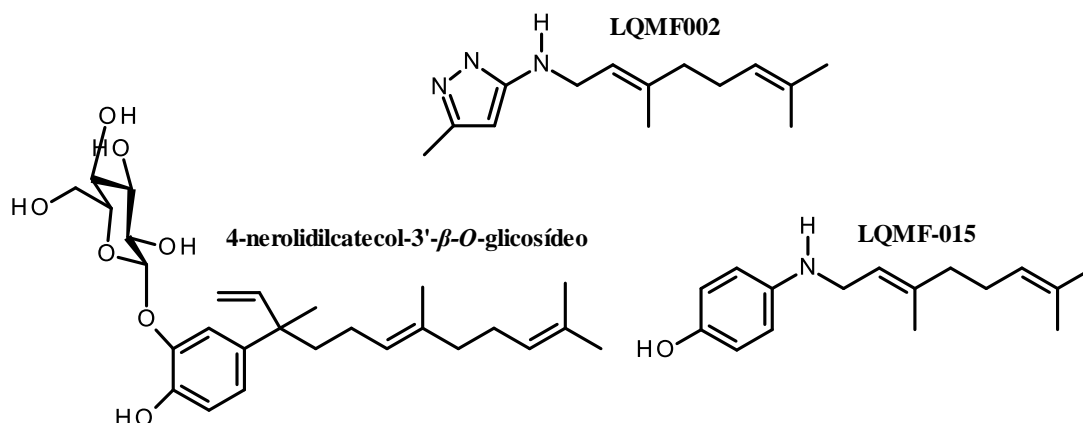
Esses derivados mostraram-se mais estáveis a luz, ar e pH a temperatura ambiente em relação ao precursor 4-NC e por este motivo passaram a serem vistos como uma potencial nova classe de substâncias antimaláricas com melhores propriedades químicas e farmacológicas. Nos primeiros estudos sobre a atividade antimalárica *in vitro* frente a cepa K1 (cloroquina-resistente) de *P. falciparum*, os derivados patenteados mais interessantes foram: o dibenzoilado **4**, que demonstrou a maior atividade (CI₅₀ = 0,67 µM); os dois monobenzilados **5** e **6** com CI₅₀ = 3,86 e 2,84 µM, respectivamente e o derivado diacetilado-diepoxidado **9** (CI₅₀ = 3,95 µM). O derivado monometilado **2** foi parcialmente ativo (inibição de 50 – 79%) na concentração de 50 µg/mL e o monometilado **3** foi considerado inativo nessa mesma concentração (inibição < 50%) (PINTO et al., 2009). A partir desse estudo, passou-se a investigar

sobre a atividade antimalárica *in vivo* de 4-NC e dos derivados que se mostraram mais interessantes *in vitro* (ROCHA E SILVA et al., 2011; ROCHA E SILVA et al., 2015 a).

A avaliação dos derivados patenteados contra linhagens tumorais (HL-60, HCT-8, SF-295 e MDA/MB-435) demonstrou que enquanto o derivado monometilado **3** mostrou-se potencialmente citotóxico ($CI_{50} = 43,8 - 63,0 \mu M$), o derivado monometilado **2** foi ativo contra células leucêmicas em humanos; já os derivados dibenzilado **7**, monobenzilado **6** e dibenzoilado **4** não foram ativos contra nenhuma das linhagens tumorais testadas. Outro derivado de 4-NC, não incluído na patente, já descrito na literatura mas sintetizado a partir de 4-NC como produto intermediário para obtenção de **9** foi o derivado diacetilado **8** que apresentou atividade mais significativa frente a todas as linhagens tumorais desse estudo (PINTO et al., 2009). As propriedades antioxidante, citotóxica e de estabilidade dos derivados de 4-NC foram avaliadas de forma qualitativa e comparativa visando explorar novas utilizações para esses compostos. Desta forma, os derivados foram em geral menos citotóxicos e mais estáveis e mantenedores de sua capacidade antioxidante que o 4-NC (LIMA et al., 2013).

Estudos mais recentes envolvem moléculas análogas e outros derivados semissintéticos de 4-NC (Figura 7) que tiveram algumas das atividades biológicas anteriormente atribuídas ao 4-NC confirmadamente melhoradas nos derivados e/ou análogos. O análogo (*E*)-4-(3,7-dimetilocta-2,6-dienilamino) fenol (LQFM-015) mostrou-se eficiente quando avaliada *in vitro* quanto a sua capacidade antiinflamatória, reduzindo em 18% a atividade de PLA_2 e inibindo a COX-1 ($CI_{50} = 36 \mu M$) e COX-2 ($CI_{50} = 28 \mu M$) (LINO et al., 2012). O derivado (*E*)-*N*-(3,7-dimetilocta-2,6-dienil)-1,3-dimetil-1H-pirazol-5-amino (LQFM002) foi avaliado *in vitro* e *in vivo* para comprovação de sua atividade antiinflamatória a qual foi atribuída aos efeitos de redução na migração de leucócitos, diminuição dos níveis de TNF- α , inibição da atividade da PLA_2 *in vitro* e ainda um efeito antinociceptivo que pode envolver o sistema opioidérgico (COSTA et al., 2013). O derivado 4-nerolidilcatecol-3'- β -O-glicosídeo conserva sua atividade antioxidante comparada a do precursor e sugere melhores atividades biológicas que o precursor por se tratar de uma molécula mais solúvel e estável (ARAÚJO-CORDEIRO et al., 2013). Desta forma, esses dados ajudam a justificar a importância das substâncias naturais como base para a síntese de novos derivados e análogos que sejam substâncias melhores que seus precursores naturais.

Figura 7. Estrutura de análogos e derivados de 4-NC já estudados.



Fonte: Adaptado a partir de Lino et al. (2012); Costa et al. (2013) e Araújo-Cordeiro et al. (2013).

1.6.2 Abordagens metodológicas *in vivo*

Devido aos contraditórios resultados sobre a performance de 4-NC quando analisado *in vitro* e *in vivo*, algumas investigações farmacológicas foram realizadas ao longo do tempo afim de avaliar alguns parâmetros farmacocinéticos desta molécula. Em 2004, estudo de Rezende & Barros validou um método, para quantificação de 4-NC em plasma de ratos, baseado na extração líquido-líquido por análise isocrática em CLAE de fase reversa com tempo de corrida total da análise inferior a 15 min e com detecção por UV. Neste estudo foi possível confirmar a alta afinidade de 4-NC por eritrócitos (células sanguíneas), conforme especulado por Freitas (1999) quando suspeitou da existência de um alto coeficiente de partição de eritrócitos com base na alta lipossolubilidade de 4-NC. Esta confirmação deu-se mediante a recuperação média de 5,34 - 1,1 µg/mL de 4-NC do plasma de ratos analisados em períodos de 1 a 70 min após administração intravenosa de 10 mg/kg de solução parenteral de 4-NC 2,5 mg/mL em 30% de HP-β-CD de. Após o quinto minuto da administração da droga a variação média de sua concentração plasmática ficou entre 1,1 - 1,8 µg/mL sendo as maiores taxas detectadas nos 1° e 3° minutos (5,3 - 2,3 µg/mL), respectivamente. Os parâmetros volume de distribuição (*Vd*) de 500 mL e coeficiente de eliminação (*Kel*) de 6,6 seg para uma dose de 100 mg/kg via intravenosa demonstraram a ocorrência de uma ampla distribuição mas também rápida taxa de eliminação de 4-NC do plasma.

Em outro estudo farmacocinético do análogo LQFM002 de 4-NC, demonstrou-se que após sua administração intravascular de 11 mg/kg em ratos que tiveram 250 µL

de sangue coletado em intervalos de tempo diferentes em um período de 120 min, chegou-se a uma taxa de biodisponibilidade ($AUC_{0-\infty}$) de $48,21 \pm 8,22 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ (concentração plasmática), tempo de meia vida ($t_{1/2}$) de 17 min, *clearance* $0,069 \pm 0,01 \text{ mL/h}$ e V_d de $1,74 \pm 0,47 \text{ mL}$. Em concordância com o estudo acima citado, o valor de V_d deste estudo também é característico de moléculas lipofílicas e sugere ainda uma grande distribuição extravascular, possivelmente com alta tendência à ligação a componentes teciduais. Este análogo foi sintetizado com base na molécula de 4-NC, inspirado na sua ótima atividade antioxidante, mas com o objetivo de possuir melhores propriedades farmacocinéticas, baixa toxicidade, maior eficácia e menos reações adversas e através dos resultados de seu estudo farmacocinético confirmaram-se os resultados já esperados para moléculas com sua característica físico-química (SILVA et al., 2013).

Estudo de Bastos et al. (2013) sobre desenvolvimento e validação de um método analítico para recuperar e quantificar 4-NC em solução de proteína plasmática pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjos de fotodiodos (CLAE-DAF) visou mimetizar o comportamento da substância na matriz cutânea (microdiálise). Esse estudo foi estimulado pela necessidade de avaliar a biodisponibilidade em nível tecidual, com que substâncias lipofílicas, como 4-NC, desempenham ao serem incorporadas em formulações cosméticas e terapêuticas, tal como o extrato de *P. umbellata*, por possuir alta ação antioxidante, superior a do α -tocoferol (ROPKE et al., 2005; BALDOQUI et al., 2009). Neste estudo solução metanólica de 4-NC foi incorporada à solução perfusante de plasma humano de forma a obter soluções em três concentrações teóricas distintas a serem avaliadas (7,5, 10,0 e 15,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) as quais apresentaram uma média de recuperação de $73,4 \pm 3,0$, $95,1 \pm 5,0$ e $69,2 \pm 2,0$, respectivamente, inferindo que além de o método em questão ser eficiente para quantificação de 4-NC e atender as exigências da legislação, avaliações pré-clínicas de amostras de solução proteica plasmática, ainda que *in vitro*, como esta, sobre a permeabilidade cutânea de substâncias naturais com característica lipofílica podem ser representativas da sua permeabilidade ou recuperação tecidual *in vivo*, e ainda sugere que a albumina colabora para uma melhor quantificação de substâncias altamente lipofílicas *in vitro*.

Rocha e colaboradores têm conduzido estudos *in vitro* e *in vivo* mais especificamente voltados para o entendimento da atividade antimalárica de derivados de

4-NC especialmente sintetizados pelo grupo do LAPAAM/INPA. Esses derivados foram selecionados por terem apresentado atividade *in vitro* mais pronunciada em estudos preliminares realizados pelo mesmo grupo de pesquisa (PINTO et al., 2009). O primeiro estudo de Rocha e Silva e colaboradores sobre o comportamento *in vitro* de 4-NC explorou a sua atividade antimalárica frente a cepa K1 cloroquina resistente (CQR), cloroquina sensível 3D7 (CQS) e a isolados de campo amazônicos de *P. falciparum* (M1 e M2), além da verificação da existência de atividade inibitória de diferentes diluições do plasma sanguíneo de camundongos sadios que receberam 4-NC na dose de 200 mg/kg contra as formas sanguíneas de *P. falciparum* aos 60 e 120 min após administração da dose por via oral. E ainda, a atividade *in vivo* explorou o percentual de inibição de *P. berghei* em camundongos tratados com 4-NC nas doses de 200, 400 e 600 mg/kg/dia de acordo com a metodologia do teste supressivo de Peters. O resultados deste estudo podem ser verificados no quadro 2 (ROCHA E SILVA et al., 2011).

Os resultados *in vitro* demonstraram que entre todas as cepas e isolados de campo de *P. falciparum* testados, o isolado de campo (M1) mostrou-se mais sensível ($CI_{50} = 0,16 \mu M$) a 4-NC e a cepa 3D7 (CQS) menos sensível ($6,71 \mu M$). Em relação à avaliação da atividade antimalárica de 4-NC do plasma de camundongos sadios, em diferentes tempos de análise pós-administração e diferentes diluições, observou-se que os maiores percentuais de inibição ocorreram após os primeiros 60 min e na menor diluição (1:10) do plasma contendo 4-NC administrado na dose de 200 mg/kg/dia, de forma que na medida em que o plasma foi sendo mais diluído a inibição foi decrescendo, e em ambos os tempos de análise decorridos da administração de 4-NC, a ação de 4-NC (ou seus derivados) do plasma foi menos eficiente aos isolados de campo M1 e M2 (58,6 e 18,6%) e mais eficiente à cepa K1 (86,3 e 58,5%), respectivamente. Já para os resultados *in vivo*, foi demonstrado que ação foi dependente da dose, de forma que na maior dose de 600 mg/kg/dia houve supressão significativa de 63,1%, sendo a mesma tendência observada para o tempo de sobrevivência que foi maior (26 dias) na maior dose teste. Na menor dose (200 mg/kg/dia), a menor e maior supressão (14,5 e 54%) foram apresentadas na via oral no 5° e 7° dia, respectivamente. Na dose intermediária (400 mg/kg/dia), a mesma tendência de resultados da dose anterior foi observada, com a menor e maior supressão (34,4 e 48,8%) sendo conferidas também à via oral no 5° e 7° dia, respectivamente. O maior intervalo de sobrevivência foi observado na via oral (21-26 dias) e o menor intervalo na via subcutânea (17-23 dias).

Quadro 2: Valores de CI_{50} de 4-NC e percentuais de inibição parasitária previamente determinados *in vitro* e *in vivo*.

Substâncias	$CI_{50} \pm DP$ (μM)			
	Cepas		Isolados de campo	
	K1	3D7	M1	M2
4-NC	1,91 \pm 0,41	6,71 \pm 1,15	0,16 \pm 0,06	2,64 \pm 0,58
CQ	0,62 \pm 0,1	0,16 \pm 0,02	-	-
Q*	0,12 \pm 0,02	0,18 \pm 0,02	-	-

Diluição de plasma	% Inibição após 60 min				% Inibição após 120 min			
	K1	3D7	M1	M2	K1	3D7	M1	M2
	1:10	86,3	73,3	58,6	82,9	58,5	51,7	56,5
1:20	16,3	0	0	5,7	12,6	21,6	30,2	1,4
1:40	0	0	0	0	0	0	0	0

4-NC (mg/kg/dia)	% inibição do crescimento parasitário				Tempo médio de sobrevida \pm DP (dias)	
	Oral		Subcutânea		Oral	Subcutânea
	Dia 5	Dia 7	Dia 5	Dia 7		
200	14,5	54	0	41	22 \pm 0,7	21 \pm 0
400	34,4	48,8	0	40,6	24 \pm 1,1	22 \pm 3
600	63,1	59,7	0	61,3	26 \pm 1,2	23 \pm 4
CN*	-	-	-	-	21 \pm 0,3	17 \pm 3,5
CQ*	91-97				32 \pm 3	

* Q= quinina; CN= controle negativo (Tween-20 a 2% ou solução salina); CQ= cloroquina (controle positivo).

Fonte: Adaptado a partir de Rocha e Silva et al. (2011).

No estudo mais recente de Rocha e Silva e colaboradores (ROCHA E SILVA et al., 20015a) sobre os derivados semissintéticos de 4-NC, três deles foram avaliados quanto a capacidade de inibir a formação de hemozoina *in vitro*, inibir a via de isoprenoides em culturas de *P. falciparum* e sua atividade antimalárica *in vivo*. No referido estudo foram avaliados dois dos derivados sintetizados de forma inédita nos estudos de Pinto (2008), os derivados dibenzoilado **4**, monobenzilado **6** e o derivado diacetilado **8** já descrito na literatura mas que ainda não havia tido sua atividade antimalárica avaliada.

Os resultados *in vitro* demonstraram que o derivado **8** inibiu a formação de hemozoina em até 50% na maior concentração teste (50 μM) além de ter inibido significativamente a biossíntese dos três metabólitos isoprenoides avaliados em 36, 41 e

41%, respectivamente, (ubiquinona 8, menaquinona 4 e dolicol 12) em culturas sensíveis a cloroquina de *P. falciparum*, já o derivado 3 exibiu uma inibição máxima de 20% na maior concentração teste. O derivado 6 também foi atuante na via metabólica de isoprenoides inibindo significativamente a síntese de dolicol 12 em 45% enquanto 8 inibiu o mesmo em 41%, ambos a 4 µM. Contudo, ambos os derivados não afetaram a síntese proteica de *P. falciparum in vitro*. O tratamento de culturas contendo o parasita sob as forma de anel, trofozoíto e esquizonte não apresentaram inibição da síntese de proteínas quando comparadas a culturas não tratadas.

Através das análises *in vivo* apenas o derivado 8 apresentou-se vantajoso quanto sua atividade antimalárica de 44% a dose de 50 mg/kg/dia sobre o precursor natural 4-NC na mesma dose, porém ao ter alguns de seus parâmetros farmacocinéticos avaliados constatou-se a não detecção de deste derivado no sangue murino após uma hora de ingestão das doses de 50 e 600 mg/kg/dia tampouco foi detectado após sua mistura ao sangue total e diretamente ao plasma de sangue murino *in vitro*, já para análise da detecção de 8 no sangue total e no plasma humano *in vitro* foi possível detectá-lo no tempo de retenção de 6,3 min sob as formas ionizadas $[M+H-C_2H_2O]^+$, $[M+H]^+$, $[M+NH_4]^+$, $[M+Na]^+$ e $[M+K]^+$. O derivado 4 apresentou percentual de inibição de *P. berghei* inferior a de 8 às doses de 10, 50 e 200 mg/kg/dia com maior percentual apresentado ao 5º dia na via subcutânea (48%). Em relação ao tempos de sobrevivida não foram observadas diferenças significativas entre os derivados testados que proporcionaram, ambos, tempo de sobrevivência entre 17-21 dias.

Vale ressaltar que além da abordagem quantitativa conseguida com os testes de avaliação antimalárica *in vitro* e *in vivo*, uma das principais contribuições deste estudo consistiu em relacionar a via de atuação dessa classe de compostos ao seu mecanismo de ação. Desta forma, sugeriu-se que ao inibirem a prenilação ou interferirem na disponibilidade desses isoprenos ubiquinona (coenzima Q) e menaquinona (vitamina K), importantes mantenedores da sobrevivência do parasita (proteção antioxidante e no mecanismo respiratório), esses derivados estão incapacitando bioquimicamente com que os mecanismos de resistência do parasita às drogas ocorram ao nível de apicoplasto, onde ocorre a prenilação dos isoprenos e outras proteínas essenciais à manutenção da sobrevivência do parasita, e/ou ao nível de vacúolo digestivo com a interferência da formação da hemozoína.

1.7 PELTATÓIS

Os peltatóis, tal como o 4-nerolidilcatecol, são também metabólitos secundários da subespécie *P. peltata* da família Piperaceae e tiveram seu isolamento e caracterização introduzidos no estudo de Gustafson e colaboradores (1992) no qual pretendia-se atribuir a atividade anti-HIV a componentes específicos do extrato de *P. peltata* ao qual já se havia atribuído tal atividade (WEISLOW et al., 1989).

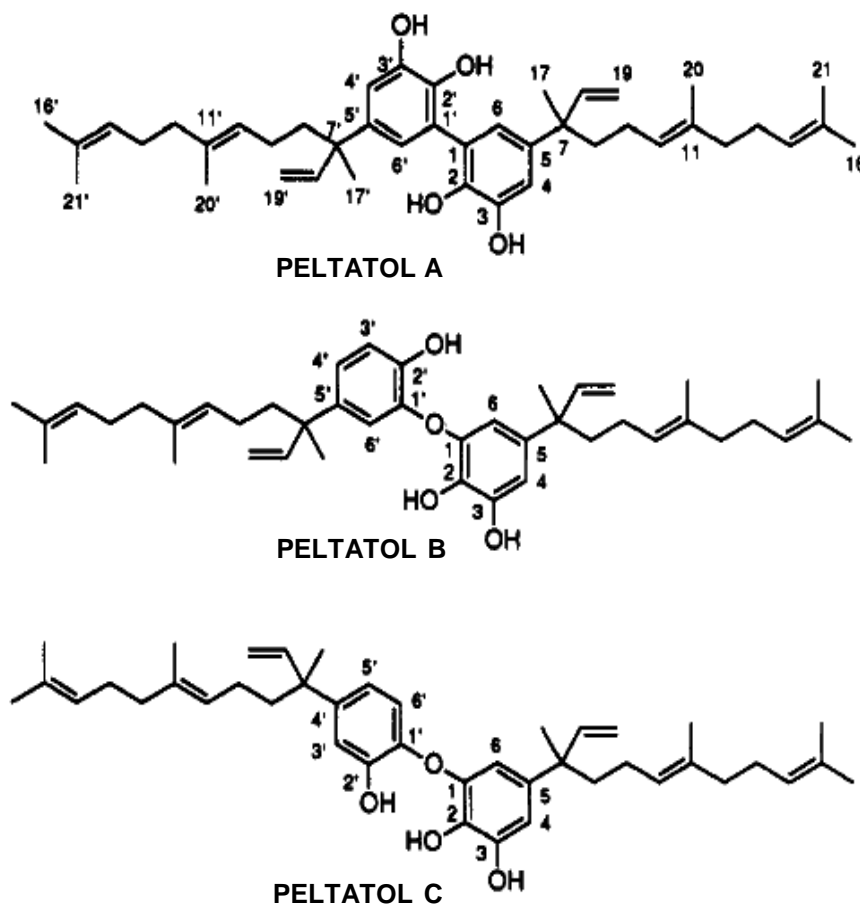
Aos metabólitos secundários de vegetais costuma-se atribuir a capacidade de desempenho de atividades biológicas ou farmacológicas utilizadas na terapias popular e convencional (EVANS, 1995). Esses princípios ativos de origem natural resultantes do metabolismo secundário, geralmente de caráter lipofílico, como 4-NC e os peltatóis, mas também de caráter hidrofílico, têm suas atividade biológicas intrínsecas relacionadas a uma linha de defesa do variados níveis de processos oxidativos a que estão sujeitas as macromoléculas (ácidos nucléicos, lipídeos, proteínas etc) essenciais às funções orgânicas humanas (FREITAS, 1999), sendo portanto considerados excelentes agentes antioxidantes.

A partir dos estudo de Weislow e colaboradores (1989) onde se investigou algumas das atividade biológicas do extrato das raízes de *P. umbellata*, dentre elas a atividade anti-HIV, Gustafson e colaboradores chegaram à fração do extrato que era responsável pela inibição do HIV *in vitro* através do mecanismo baseado na inibição da morte celular induzida pelo HIV mediante a fator protetivo que é gerado após acoplamento específico de certas substâncias a sítios receptores de forbol (PDBu).

Da fração ativa no ensaio de ligação do receptor PDBu identificou-se uma molécula constituída por um dímero simétrico confirmado pela exibição de dados de RMN duplicados referente à porção alifática de 4-NC do qual os peltatóis derivam, identificando-se assim o Peltatol A. Uma outra molécula também foi elucidada, diferenciada da primeira apenas em relação ao modo a partir do qual os grupos catecólicos se interligavam, sugerindo que os catecóis se haviam interligado por um éter difenil possivelmente ligado a um dos oxigênios catecólicos, o Peltatol B. Já a terceira molécula, Peltatol C, apresentou-se como um isômero de peltatol B diferindo apenas na posição do oxigênio de ligação entre os grupos catecólicos.

Após isolamento dos três peltatóis (Figura 8) identificados naquele trabalho, eles foram conduzidas isoladamente aos ensaios confirmatórios para sua atividade biológica anti-HIV.

Figura 8. Estruturas dos dímeros de catecóis prenilados: peltatóis A, B e C.



Fonte: Adaptado a partir de Gustafson et al. (1992).

Ao Peltatol A foi atribuída uma inibição de até 75% dos efeitos citopáticos sofridos pelos linfócitos T durante a infecção por HIV quando avaliado nas concentrações de 1 – 10 $\mu\text{g/mL}$ apresentando a citotoxicidade $\geq 20 \mu\text{g/mL}$. Já os peltatóis B e C foram avaliados estando sob a forma de mistura (1:1) apresentaram um perfil de atividade anti HIV parecido ao Peltatol A (GUSTAFSON et al, 1992).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antimalárica *in vivo* e toxicidade aguda de derivados semissintéticos de 4-nerolidilcatecol.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Explorar e comparar novos solventes em substituição aos solventes clorados na etapa extrativa das raízes de *P. peltata* afim de desenvolver métodos extrativos “mais verdes”;

Isolar princípios ativos de *P. peltata* e sintetizar derivados a partir deles;

Realizar semissíntese de derivados de 4-nerolidilcatecol implementando melhorias reacionais para obtenção de maiores rendimentos;

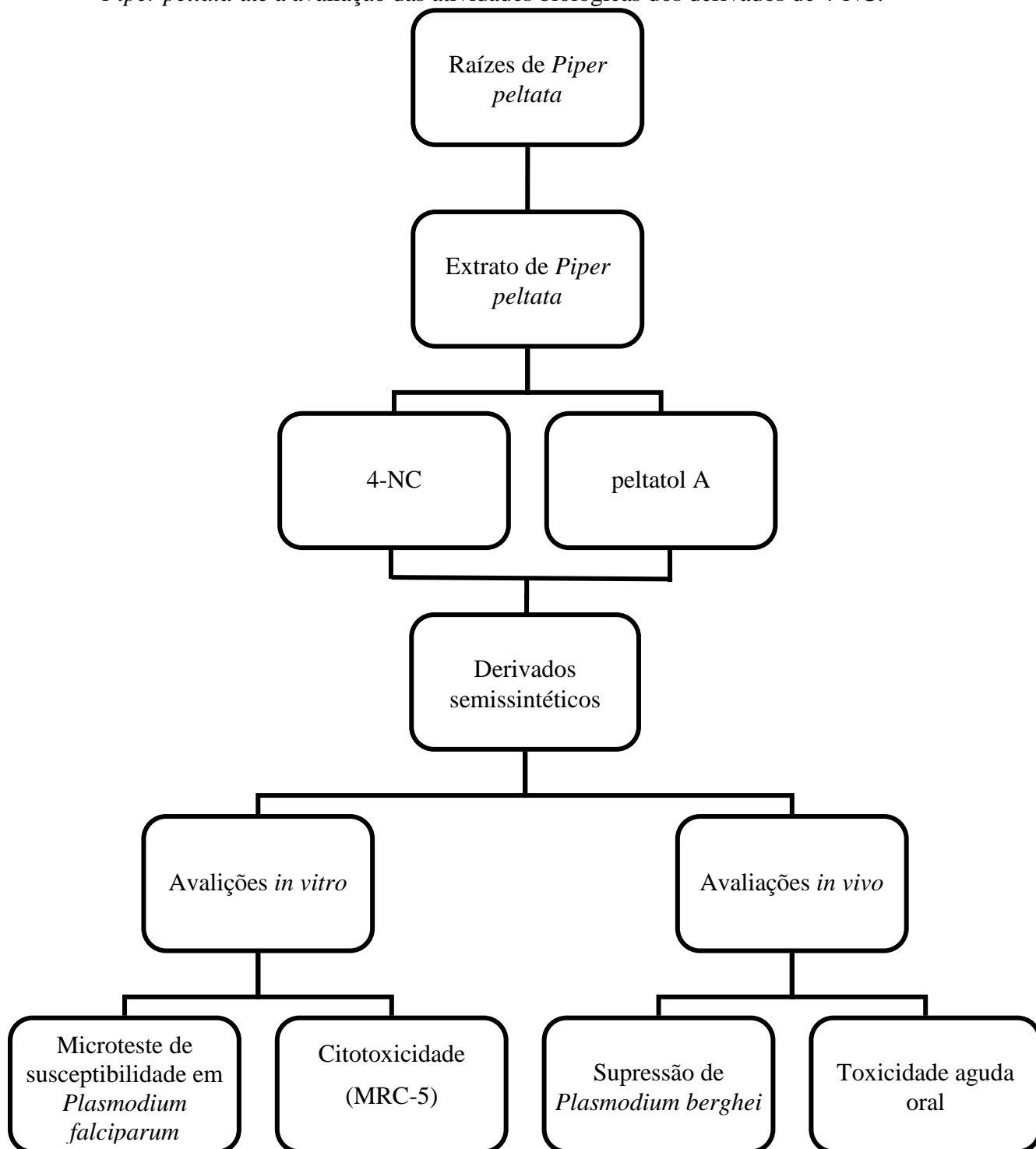
Avaliação da suscetibilidade *in vitro* de novas ativos isolados e derivados obtidos;

Avaliação da eficácia terapêutica antimalárica *in vivo* dos derivados semissintéticos de 4-nerolidilcatecol em camundongos infectados com *Plasmodium berghei*;

Avaliação da toxicidade aguda e da citotoxicidade dos derivados semissintéticos.

3 METODOLOGIA

Figura 9. Delineamento experimental das etapas gerais: desde a obtenção do extrato de *Piper peltata* até a avaliação das atividades biológicas dos derivados de 4-NC.



3.1 ISOLAMENTO DE SUBSTÂNCIAS NATURAIS A PARTIR DE *P. PELTATA*

A metodologia adotada para obtenção tanto do extrato bruto de *P. peltata* quanto da substância natural 4-NC (**1**) se baseou na metodologia de Andrade-Neto et al. (2007). A metodologia para obtenção dos derivados semissintéticos esteve baseada na metodologia de Pinto et al. (2009), ambos com modificações relacionadas à substituição de solventes clorados e ajustes das proporções dos reagentes de forma a conseguir melhores rendimentos dos derivados para conduzi-los aos experimentos *in vivo* que consiste no objetivo maior deste trabalho.

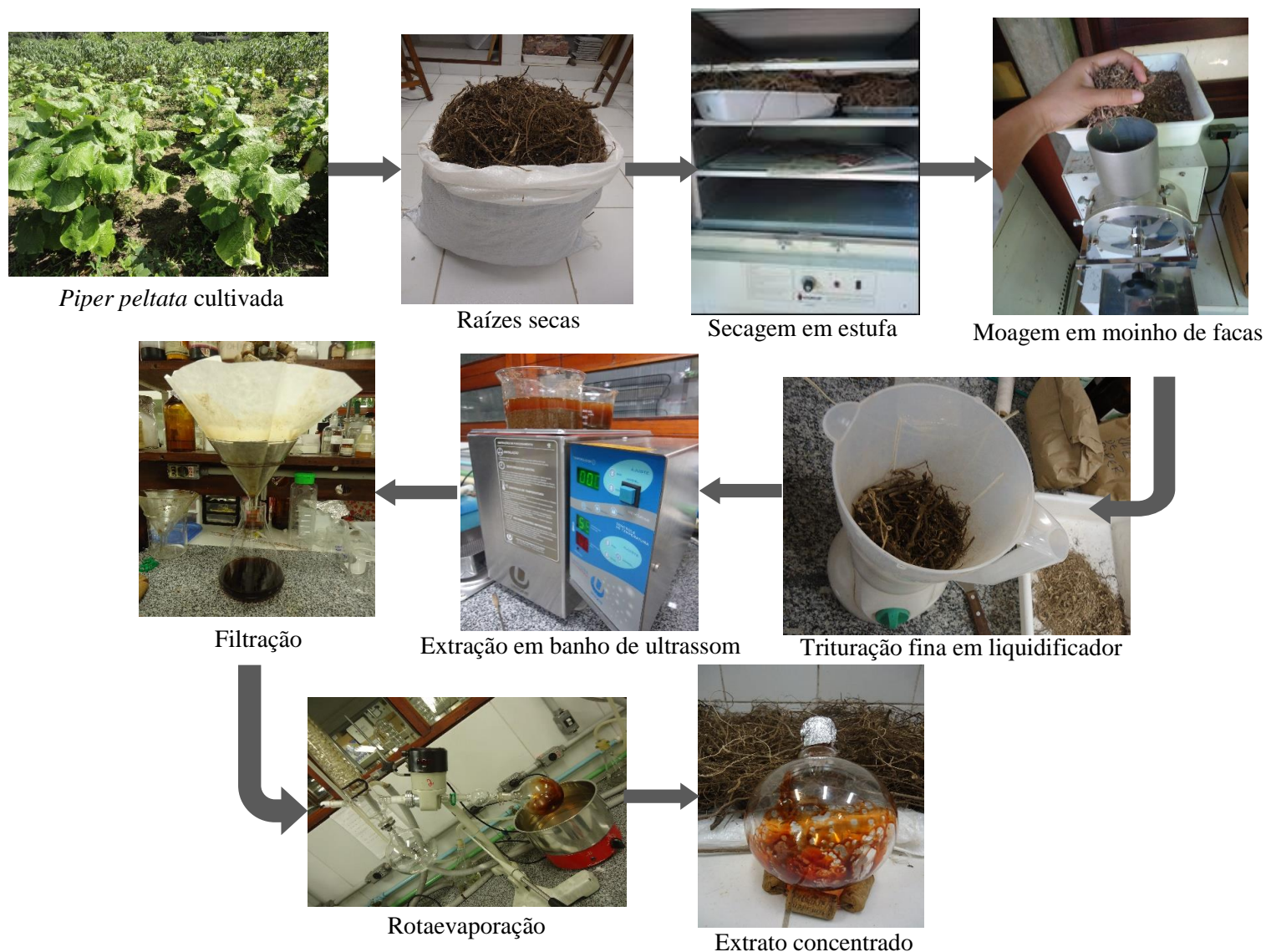
Todas as substâncias envolvidas neste estudo, tanto as naturais isoladas a partir de *P. peltata* como todos os derivados semissintéticos estão listadas nas tabelas 1 e 2 no final da seção 3.2.6.

3.1.1 Estudo sobre solventes para extração de *P. peltata*

As raízes de *Piper peltata* foram coletadas no campos da Embrapa Amazônia Ocidental, Km 29 da AM-010 e gentilmente cedidas através da colaboração com o engenheiro agrônomo Dr. Francisco Célio Maia Chaves. A autorização para coleta desta espécie foi devidamente solicitada e concedida pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – SISBIO (Anexo A).

As raízes coletadas foram secas em estufa com circulação de ar por um período de 48 horas em temperatura de 40°C tendo como indicativo de estado apropriado de secagem o ponto em que as raízes estivessem quebradiças. Em seguida, as raízes secas foram trituradas em moinho elétrico e posteriormente remoídas em liquidificador para obtenção de material vegetal pulverizado. Os solventes selecionados para estudo da extração foram analisados separadamente: etanol (EtOH), metil-terc-butil-éter (MTBE) e acetato de etila (AcOEt). Ao final foi possível calcular o teor extrativo obtido através das opções de solventes disponíveis (Tabela 3). Na sequência, porções de 150 g de material vegetal moído foram transferidas para um erlenmeyer de 250 mL, adicionou-se 150 mL do solvente selecionado e submeteu-se esse material a extração por sonicação por um período de 15 minutos e posterior filtragem através de papel de filtro para um balão de fundo redondo. O processo extrativo foi realizado em três extrações consecutivas e o volume final filtrado foi concentrado por rotaevaporação (Figura 10).

Figura 10. Etapas da obtenção do extrato de *P. peltata* desde a planta fresca no campo.



3.1.2 Isolamento de 4-nerolidilcatecol (1)

O extrato bruto de *P. peltata* obtido a partir do processo extrativo por sonicação foi incorporado a uma porção de sílica gel da mesma que compunha a fase estacionária da coluna, por meio de mistura em cadinho e pistilo, na proporção de 1:1 (m/m) – tal mistura denominamos “farofa” - e foi direcionada a cromatografia em coluna de fase normal (CC) para isolamento de 4-NC (Figura 11). Para isso, utilizou-se uma coluna de vidro ($\varnothing = 5,0$ cm; $h = 35$ cm) empacotada com a fase estacionária de sílica gel 60 (0,0632-0,200 mm) MERCK tendo como fase móvel a mistura de solventes Hex:AcOEt (9:1) com aumento de polaridade e MeOH para lavagem da coluna ao final do isolamento. As frações coletadas foram comparadas por cromatografia de camada

delgada comparativa (CCDC) com um padrão previamente isolado e identificado de 4-NC (cromatofolhas de alumínio 20×20 cm em sílica gel 60 F254 MERCK). Desta forma, as frações que continham o spot referente ao 4-NC foram reunidas e em frações onde observou-se misturas de 4-NC com outra substância fez-se necessário a repurificação da fração por cromatografia de camada delgada preparativa (CCDP). Ao final do processo de isolamento e reunião de frações comuns, o material isolado foi rotaevaporado e pesado para obtenção do rendimento da substância obtida a partir da coluna (Rc) e rendimento total (Rt) a partir da massa de raízes secas (m/m).

$$Rc\% = (\text{Massa de 4-NC isolado} / \text{Massa de extrato bruto}) \times 100$$

$$Rt\% = (\text{Massa de 4-NC isolado} / \text{Massa de raízes secas}) \times 100$$

Figura 11. Isolamento de 4-NC a partir da farofa do extrato de *P. peltata*.



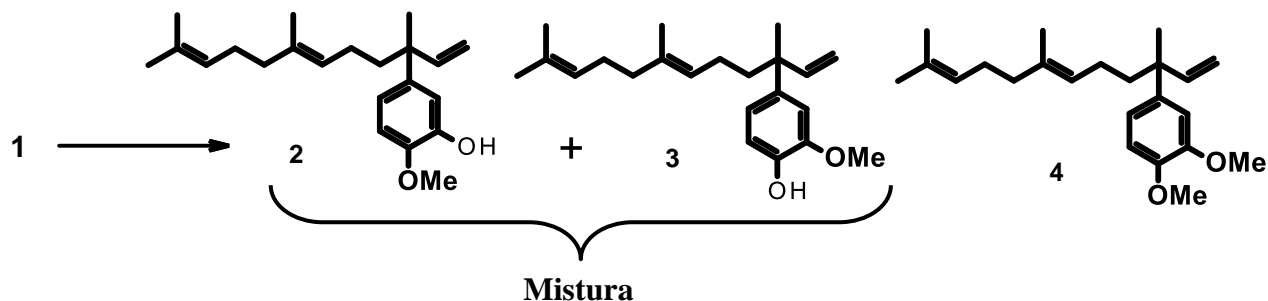
3.2 SÍNTESE DOS DERIVADOS SEMISSINTÉTICOS DE 4-NEROLIDILCATECOL

Nas próximas seções são descritas as semissínteses dos derivados a partir de 4-nerolidilcatecol e peltatol A isolados de *Piper peltata*.

Após a síntese e purificação de cada derivado abaixo, eles foram enviados para caracterização e confirmação de suas identidades na Central Analítica do Laboratório Temático de Química em Produtos Naturais (CA-LTQPN). As amostras foram analisadas por ressonância magnética nuclear (RMN de ^1H , ^{13}C) e cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas (LC-MS) e os dados foram comparados aos descritos e elucidados em Pinto et al. (2009).

3.2.1 Síntese dos derivados metilados (2, 3 e 4)

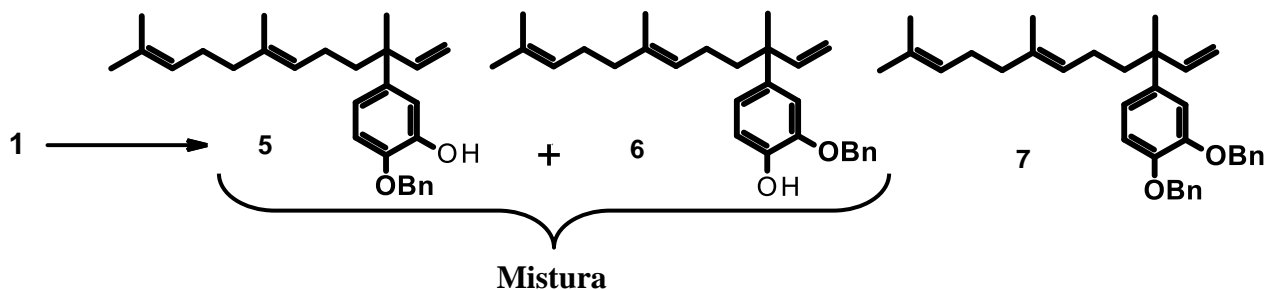
Figura 12. Estruturas dos derivados metilados a partir de 4-NC.



Para a preparação dos derivados metilados, procedeu-se com a alquilação de **1** (650 mg, 2,07 mmol, 1 eq-g) solubilizado em 6 mL de acetona, K_2CO_3 (1150 mg, 4 eq-g) e iodeto de metila (CH_3I) (195 μL , 1,5 eq-g). A reação permaneceu sob agitação, sob nitrogênio (N_2) por 20 h. Ao final do período da reação adicionaram-se hexano e água ao meio reacional e agitou-se a mistura em funil de separação por onde se observou a separação entre as fases aquosa e hexânica. Esse processo extrativo foi realizado três vezes consecutivas e ao final as fases hexânicas resultante de cada extração foram reunidas, rotaevaporadas e purificadas por cromatografia em coluna *flash* com substituição da sílica *flash* por sílica de cromatografia preparativa e com utilização de pressão, com sistema de eluição Hex:acetona (85:15). Obteve-se então os derivados metilados monosubstituídos sob a forma da mistura de **2+3** (187 mg, 27,5%) e ainda o derivado *O,O*-dimetilado **4** (300 mg, 52,5%), o que não é possível pela metodologia com diazometano (CH_2N_2) que apenas resulta nas formas monometiladas, conforme o demonstrado em Pinto et al. (2009). Contudo as condições reacionais para obtenção de **4** com maior rendimento (57%) deu-se por **1** (525 mg, 1,7 mmol, 1 eq-g) em 6 mL de acetona, K_2CO_3 (971 mg, 5,85 mmol, 3,5 eq-g) e CH_3I (261 μL , 4,18mmol, 2,5 eq-g).

3.2.2 Síntese dos derivados benzilados (5, 6 e 7)

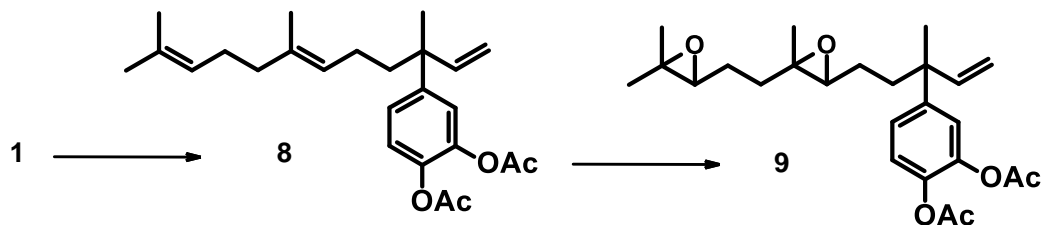
Figura 13. Estruturas dos derivados benzilados a partir de 4-NC.



Para síntese dos derivados benzilados monosubstituídos (**5** e **6**) adicionou-se **1** (1 g, 3 mmol, 1 eq-g) em 5 mL de dimetilformamida (DMF), carbonato de potássio (K_2CO_3) (1,76 g, 4 eq-g) e brometo de benzila (BnBr) (190 μ L, 0,5 eq-g). A reação permaneceu sob agitação, sob nitrogênio (N_2) por 4 h. Ao final do período de reação adicionou-se hexano e solução aquosa de NaOH a 1% ao meio reacional e agitou-se a mistura em um funil de separação para que houvesse separação entre as fases orgânica e aquosa, por fim a fase orgânica da primeira extração foi lavada com água destilada e a fase orgânica resultante foi separada. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio (Na_2SO_4) em seguida rotaevaporada e purificada por cromatografia *flash* com sílica gel 60 (0.040-0.063 mm; 230-400 mesh ASTM, MERCK) com sistema de eluição Hex:AcOEt (99:1-95:5) seguida de cromatografia em placa preparativa com eluição no sistema ternário Hex : AcOEt : $CHCl_3$ (95:5:1) por onde obteve-se a mistura **5+6** (88,5 mg, 7%) além da formação do derivado **7** cujas condições reacionais para obtenção em maior rendimento (38%) deu-se pela reação de **1** (500 mg, 1,5 mmol) em 5 mL DMF, K_2CO_3 (880 mg, 4 eq-g) e BnBr (568 μ L, 3 eq-g). O meio reacional foi extraído como descrito anteriormente e purificado por cromatografia em coluna *flash* eluída no sistema ternário Hex:Acetona:DCM (99:0,5:0,5).

3.2.3 Síntese do derivado diacetilado epoxidado (9)

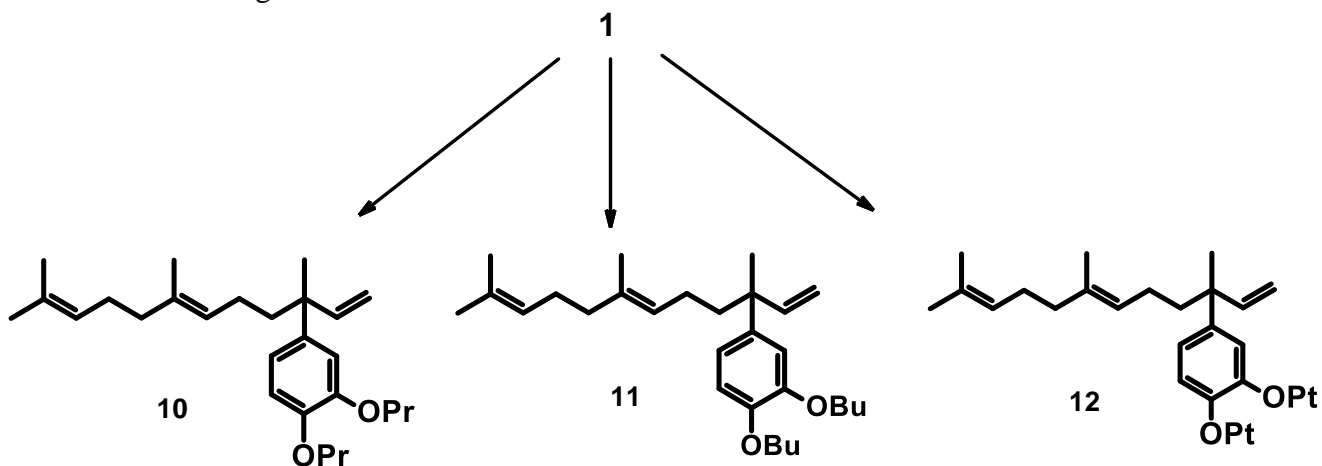
Figura 14. Estrutura dos derivados epoxidados a partir do derivado diacetilado de 4-NC.



A reação de esterificação para obtenção de **8** (73%) deu-se pela mistura de **1** (1 g, 6.4 mmol) em 602 μL , 6,37 mmol, 2 eq-g de anidrido acético (Ac_2O) e 513 μL , 6,37 mmol, 1 eq-g de piridina ($\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$) sob agitação e sob nitrogênio (N_2) por 4 h. O meio reacional foi extraído com hexano, HCl 0,1 N, solução saturada de bicarbonato de sódio (NaHCO_3) e NaCl. Em seguida foi rotaevaporado e purificado por cromatografia em coluna *flash* com solventes Hex:AcOEt (9:1). O derivado diacetilado (500 mg, 2 mmol) foi submetido a oxidação ao ser solubilizado em 12 mL de DCM ao qual adicionou-se ácido *meta*-cloroperbenzóico (*m*-CPBA 1300 mg, 7,5 mmol, 4 eq-g) sob agitação e sob nitrogênio (N_2) por 4 h estando o balão reacional imerso em banho de gelo-NaCl (-10 $^\circ\text{C}$) nas primeiras 2 h de reação. Ao meio reacional foi adicionada água destilada, solução 5% NaHCO_3 , solução de tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) e DCM, agitou-se por 5 min. e extraiu-se com hexano. O produto foi rotaevaporado e purificado por cromatografia em coluna *flash* com solventes Hex:AcOEt (98:2) com aumento de polaridade por onde obteve-se o derivado **9** (168 mg, 17%).

3.2.4 Síntese de novos derivados de 4-NC (10, 11 e 12)

Figura 15. Estruturas de novos derivados esterificados de 4-NC.



Outras reações de esterificação de 4-NC foram realizadas, em paralelo, pela colaboração do Dr. Orival Lacerda Jr. através das quais obtiveram-se os derivados di-propanoilado, di-butililado e di-pentanoilado (**10**, **11** e **12**, respectivamente). Para isso, separadamente, suspendeu-se **1** (1 g, 3 mmol) em 3 mL de anidrido propílico, butírico e valérico, respectivamente e piridina (1,5 mL). Cada reação permaneceu sob agitação por 12 h a 25°C. Após esse tempo, a cada meio reacional foi adicionado hexano e lavou-se sequencialmente com soluções de Na₂CO₃ 5% e HCl 1%, secou-se com Na₂SO₄ e filtrou-se. Cada filtrado foi evaporado utilizando-se rotaevaporação e cada produto bruto foi purificado em coluna cromatográfica *flash*, usando Hex:AcOEt (98:2), com aumento de polaridade adequada a cada derivado com os rendimentos isolados de 746 mg (55%), 730 mg (50%) e 539 mg (35%), respectivamente.

10: RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ: 6,85 (*d* 2,0 Hz, 1H, Ar-H₃), 6,81 (*d* 8,1 Hz, 1H, H₆-Ar), 6,75 (*dd* 8,4 e 2,1 Hz, 1H, Ar- H₅), 5,99 (*dd* 18,0 e 1,5 Hz, 1H), 5,09 (*m*, 2H), 5,11 (*m*, 1H), 2,04 (*m*, 2H), 2,61-2,53 (*m*, 4H), 1,95 (*m*, 2H), 1,81 (*m*, 2H), 1,74(*m*, 2H), 1,68 (*s*, 3H), 1,60 (*s*, 3H), 152, (*s*, 3H), 1,29-1,24 (*m*, 6H), 1,23 (*s*, 3H). RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ: 171,9 (C=O), 171,63 (C=O), 147 (C2'), 143,1 (C2), 141,3 (C1), 140,3 (C4), 134,9 (C7'), 131,3 (C11'), 124,5 (C10'), 124,3 (C6'), 119,0 (C5), 114,8 (C3), 114,1 (C6), 111,5 (C1'), 44,19 (C2''), 44,01 (C2'''), 43,72 (C3'), 41,07 (C4'), 39,63 (C8'), 26,67 (C9'), 25,64 (C14'), 24,80 (C12'), 23,13 (C5'), 17,63 (C15') e 15,85

(C13'), 14,13 (C3'') e 9,15 (C3'''). LC-MS m/z 427,2824 [M+H]⁺, C₂₇H₃₉O₄ $\Delta = 5,61$; [M+Na]⁺ 449,2655, C₂₇H₃₈O₄Na $\Delta = 2,89$.

11: RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ : 6,85 (*d* 2,0 Hz, 1H, Ar-H₃), 6,81 (*d* 8,1 Hz, 1H, H₆-Ar), 6,75 (*dd* 8,4 e 2,1 Hz, 1H, Ar- H₅), 5,99 (*dd* 18,0 e 10,8 Hz, 1H), 5,09 (*m*, 2H), 5,11 (*m*, 1H), 2,27 (*t*, 2H), 2,53 (*t*, 2H), 2,04 (*m*, 2H), 1,95 (*m*, 2H), 1,81 (*m*, 2H), 1,80-1,73 (*m*, 4H), 1,74 (*m*, 2H), 1,68 (*s*, 3H), 1,60 (*s*, 3H), 152 (*s*, 3H), 1,23 (*s*, 3H), 1,03 (*t*, 3H), 0,835 (*t*, 3H). RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ : 170,9 (C=O), 170,06 (C=O), 147 (C2'), 143,1(C2), 141,3 (C1), 140,3 (C4), 134,9 (C7'), 131,3 (C11'), 124,5 (C10'), 124,3 (C6'), 119,0 (C5), 114,8 (C3), 114,1 (C6), 111,5 (C1'), 44,19 (C2''), 44,01 (C2'''), 43,72 (C3'), 41,07 (C4'), 39,63 (C8'), 35,96 (C2''), 35,29 (C2'''), 26,67 (C9'), 25,64 (C14'), 24,80 (C12'), 23,13 (C5'), 18,33 (C3''), 18,12 (C3'''), 17,63 (C15'), 15,85 (C13'), 13,69 (C4''), 13,46 (C4'''). LC-MS m/z 477,2964 [M+Na]⁺, C₂₉H₄₂NaO₄ $\Delta = 3,56$.

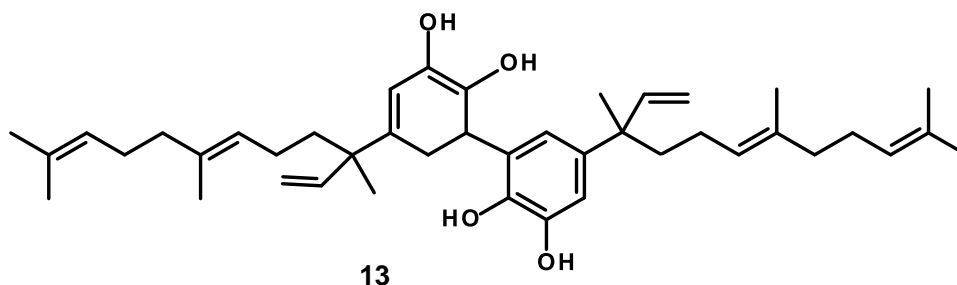
12: RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ : 6,85 (*d* 2,0 Hz, 1H, Ar-H₃), 6,81 (*d* 8,1 Hz, 1H, H₆-Ar), δ 6,75 (*dd* 8,4 e 2, Hz 1H, Ar- H₅), 5,99 (*dd* 18,0 e 10,8 Hz, 1H), 5,09 (*m*, 1H), 5,07 (*m*, 1H), 2,52-2,43 (*m*, 4H), 2,04 (*m*, 2H), 1,95 (*m*, 2H), 1,81 (*m*, 2H), 1,74 (*m*, 2H), 1,733-1,67 (*m*, 4H), 1,68 (*s*, 3H), 1,60 (*s*, 3H), 1,45-1,37 (*m*, 4H), 152 (*s*, 3H), 1,23 (*s*, 3H), 0,942 (*m*, 6H). RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ : 171,23 (C=O), 171,12 (C=O), 147 (C2'), 143,1 (C2), 141,3 (C1), 140 (C4), 134,9 (C7'), 131,3 (C11'), 124,5 (C10'), 124,3 (C6'), 119,0 (C5), 114,8 (C3), 114,1 (C6), 111,5 (C1'), 43,72 (C3'), 41,07 (C4'), 39,63 (C8'), 33,83 (C2''), 33,79 (C-2'''), 26,98 (C3''), 26,93 (C3'''), 26,67 (C9'), 25,64 (C14'), 24,80 (C12'), 23,13 (C5'), 22,28 (C4''), 22,26 (C4'''), 17,63 (C15'), 15,85 (C13'), 13,72 (C5'' e C5'''). LC-MS m/z 505,3288 [M+Na]⁺ C₃₁H₄₆NaO₄ $\Delta = 6,133$.

3.2.5 Isolamento de peltatol A (13)

Durante a purificação do extrato de *P. peltata* para isolamento de 4-NC em CC, as últimas frações coletadas que continham uma mistura de 4-NC e uma segunda substância natural mais apolar que o 4-NC, de acordo com análise por CCDC. Procedeu-se nova fase de isolamento dessa segunda substância a qual foi identificada

como peltatol A, já caracterizada e descrita por Gustafson et al. (1992). A substância **13** (Figura 16) foi também submetida a reações de semissíntese para obtenção de novos derivados.

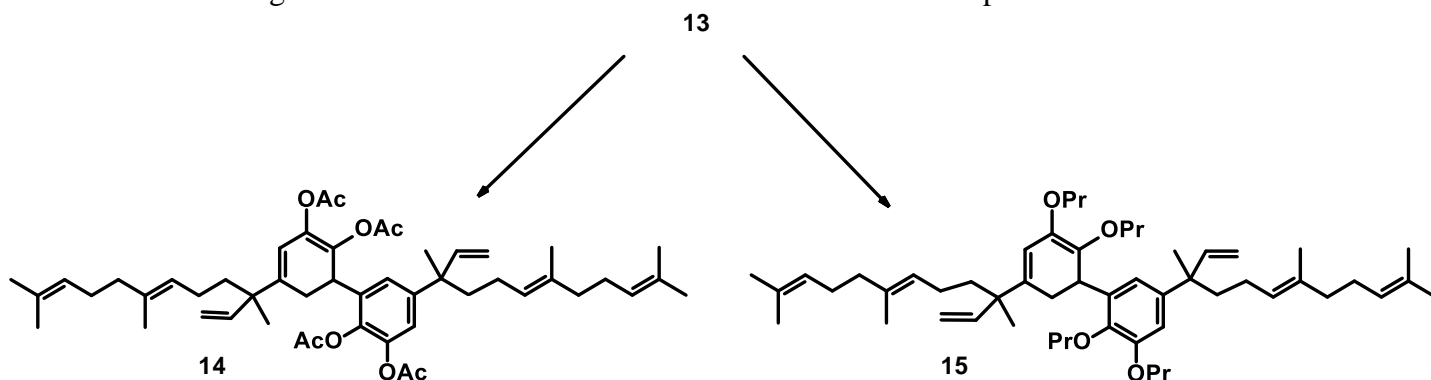
Figura 16. Estrutura química de peltatol A (**13**).



13: RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 6,91 (*d* 2,1 Hz, 3H), 6,79 (*d* 2,1 Hz, 5H), 5,05 (*dd* 10,7 e 1,5 Hz, 1H), 5,02 (*dd* 17,5 e 1,5 Hz, 1H), 5,99 (*d* 17,5 e 1,5 Hz, 2H), 1,94 (*m*, 4H), 1,75 (*m*, 5H), 5,08 (*m*, 6H), 2,02 (*m*, 8H), 1,81 (*m*, 9H), 5,10 (*m*, 10H), 1,50 (*s*, 12 CH_3), 1,56 (*s*, 13 CH_3), 1,64 (*s*, 14 CH_3), 1,34 (*s*, 15 CH_3). RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ : 138,19 (C1), 144,47 (C2), 113,35 (C3), 141,38 (C4), 120,57 (C5), 124,91 (C6), 111,74 (C1'), 146,76 (C2'), 43,94 (C3'), 41,12 (C4'), 23,24 (C5'), 124,34 (C6'), 135,03 (C7'), 39,70 (C8'), 26,73 (C9'), 124,45 (C10'), 131,33 (C11'), 25,71 (C12'), 17,69 (C13'), 15,96 (C14'), 24,93 (C15'). LC-MS *m/z* 627,4335 $[\text{M}+\text{H}]^+$, $\text{C}_{42}\text{H}_{59}\text{O}_4$ $\Delta = 12,43$.

3.2.6 Síntese de novos derivados de peltatol A (**14** e **15**)

Figura 17. Estruturas de novos derivados esterificados de peltatol A.



A partir do isolamento de **13** também procedeu-se com a síntese inédita de dois novos derivados esterificados, o derivado *O,O,O,O*-tetracetilado **14** e *O,O,O,O*-tetrapropanoilado **15**. Ambos foram também sintetizados pelo Dr. Orivaldo Lacerda Jr. que procedeu com a suspensão de **13** (500 mg, 0,6 mmol e 200 mg, 0,25 mmol,

respectivamente) em 2 mL e 2,5 mL, respectivamente, de seus respectivos anidridos (acético e propílico) e piridina (1 mL e 1,5 mL, respectivamente). Cada reação permaneceu sob agitação por 12 h a 25°C. A cada meio reacional foi adicionado hexano obtendo-se duas fases. Lavou-se a fase orgânica sucessivamente com soluções de HCl 1% e Na₂CO₃ 5%, secou-se com Na₂SO₄ e filtrou-se. Os produtos de cada reação foram purificados em coluna cromatográfica *flash* com eluição nos sistemas Hex:AcOEt 95:5 e 97:3, respectivamente, chegando-se aos rendimentos 571 mg (87,5%) e 132 mg (19%), respectivamente.

14: RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ: 7,12 (*d* 2,3 Hz, 2H, Ar-H₃), 7,08 (*d* 2,3 Hz, 2H, Ar-H₅), 5,98 (*dd* 10,4 e 17,6 Hz, 4H), 5,09 (*dd* 10,8 e 1,6 Hz, 4H), 5,12 (*m*, 2H), 5,07 (*m*, 2H), 2,24 (*s*, 6H, COOMe), 2,01 (*s*, 6H, COOMe), 2,05 (*m*, 4H), 1,96 (*m*, 4H), 1,83 (*m*, 4H), 1,77 (*m*, 4H), 1,65 (*s*, 6H), 1,59 (*s*, 6H), 1,49 (*s*, 6H), 1,35 (*s*, 6H). RMN ¹³C (100 Mhz, CDCl₃) δ: 168,28 (C1''-C=O), 168,07 (C1'''-C=O), 146,23 (C2'), 145,74 (C2), 142,12 (C4), 137,89 (C1), 135,23 (C7'), 131,31 (C11'), 131,15 (C6), 126,69 (C5), 124,34 (C6'), 124,14 (C10'), 121,(C3), 44,26 (C3'), 40,99 (C4'), 39,69 (C8'), 26,70 (C9'), 25,70 (C12'), 24,77 (C15'), 20,75 (C2''), 20,16 (C2'''), 17,69 (C13'), 15,91(C14'). LC-MS *m/z* 817,4587 [M+Na]⁺, C₅₀H₆₆O₈Na Δ = 9,54.

15: RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ: 7,12 (*d* 2,3 Hz, 2H, Ar-H₃), 7,08 (*d* 2,3 Hz, 2H, Ar-H₅), 5,98 (*dd* 10,4 e 17,6 Hz 4H), 5,09 (*dd* 10,8 e 1,6 Hz, 4H), 5,12 (*m*, 2H), 5,07 (*m*, 2H), 2,52 (*q*, 4H), 2,27 (*q*,4H), 2,05 (*m*,4H), 1,96 (*m*, 4H), 1,83 (*m*, 4H), 1,77 (*m*, 4H), 1,65 (*s*, 6H), 1,59 (*s*, 6H), 1,49 (*s*, 6H), 1,35 (*s*, 6H), 1,21 (*t*, 6H), 0,098 (*t*, 6H). RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ: 171,8 (C1''-C=O), 171,5 (C1'''-C=O), 145,82 (C2'), 145,99 (C2), 142,25 (C4), 137,96 (C1), 135,17 (C7'), 131,29 (C11'), 131,26 (C6), 126,47 (C5), 124,36 (C6'), 124,19 (C10'), 121,60 (C3), 44,26 (C3'), 41,02 (C4'), 39,70 (C8'), 27,52 (C2''), 26,95(C2'''), 26,71 (C9'), 24,79 (C12'), 24,79 (C15'), 17,69 (C13'), 15,91(C14'), 9,10 (C3''), 8,93 (C3'''). LC-MS *m/z* 873,5261 [M+Na]⁺, C₅₄H₇₄O₈Na Δ = 2,28.

Abaixo tem-se um resumo geral sobre a identificação de todas as substâncias abordadas neste estudo. Na tabela 1 tem-se **1** e seus 11 derivados semissintéticos: **2**, **3**, **5**, **6**, **7** e **9** que constituíram o principal alvo de reprodução neste trabalho, **4** e **8** já descritos na literatura mas o primeiro obtido de forma inédita no LAPAAM-INPA e o segundo

intermediário precursor de **9** e ainda três derivados semissintéticos novos **10**, **11** e **12**. A tabela 2 apresenta o resumo da identificação de **13** e de dois de seus derivados novos **14** e **15**.

Tabela 1. 4-NC (**1**) isolado de *P. peltata* e seus derivados semissintéticos (**2** a **12**).

Identificação	Nome	Radicais substituídos		Fórmula molecular	<i>m/z</i> calculado
		R ₁	R ₂		
1	4-nerolidilcatecol	H	H	C ₂₁ H ₃₀ O ₂	314,2342
2	1- <i>O</i> -monometil	Me	H	C ₂₂ H ₃₂ O ₂	328,5123
3	2- <i>O</i> -monometil	H	Me	C ₂₂ H ₃₂ O ₂	328,5123
4	1,2- <i>O,O</i> dimetil	Me	Me	C ₂₃ H ₃₄ O ₂	342,2627
5	1- <i>O</i> - monobenzil	Bn	H	C ₂₈ H ₃₆ O ₂	404,2765
6	2- <i>O</i> -monobenzil	H	Bn	C ₂₈ H ₃₆ O ₂	404,2765
7	1,2- <i>O,O</i> -dibenzil	Bn	Bn	C ₃₅ H ₄₂ O ₂	494,3286
8	1,2- <i>O,O</i> -diacetil	Ac	Ac	C ₂₅ H ₃₄ O ₄	398,2246
9	1,2- <i>O,O</i> - diacetil – 10',6'-diepoxil	Ac	Ac	C ₂₅ H ₃₂ O ₆	430,3022
10	1,2- <i>O,O</i> - dipropanoil	Pr	Pr	C ₂₇ H ₃₈ O ₄	426,2824
11	1,2- <i>O,O</i> -dibutiril	Bu	Bu	C ₂₉ H ₄₂ O ₄	454,2964
12	1,2- <i>O,O</i> -dipentanoil	Pt	Pt	C ₃₁ H ₄₆ O ₄	482,3319

Me=metil, Bn=benzil, Ac=acetil, Pr=propanoil, Bu=butiril, Pt=pentanoil

Tabela 2. Peltatol A (**13**) e seus derivados semissintéticos (**14** e **15**).

Identificação	Nome	Radicais substituídos	Fórmula molecular	<i>m/z</i> calculado
		R (4x)		
13	Peltatol A	R = H	C ₄₂ H ₅₈ O ₄	626,4335
14	1,1',2,2'- <i>O,O',O,O'</i> – tetra-acetil-peltatol-A	R = Acetil	C ₅₀ H ₆₆ O ₈	794,4587
15	1,1',2,2'- <i>O,O',O,O'</i> – tetra-propanoil- Peltatol-A	R = Propanoil	C ₅₄ H ₇₄ O ₈	850,5261

3.3 CONDUTA ÉTICA

Os testes *in vivo* foram realizados em conformidade com as Diretrizes de Conduta Ética no Cuidado e Uso de Animais do Instituto Nacional de Pesquisas da

Amazônia (INPA) após a aprovação da Comissão de Ética para Uso de Animais (Anexo B - CEUA 029/2013).

3.4 AVALIAÇÕES BIOLÓGICAS *IN VIVO*

3.4.1 Animais e parasitas

Foram utilizados, como modelo animal para as avaliações biológicas *in vivo*, camundongos, fêmeas, adultas da espécie *Mus musculos* e linhagem *Balb/c* (25 ± 5 g de peso) que receberam água e comida *ad libitum*. O parasita infectante de modelo murino utilizada foi a cepa NK65 de *Plasmodium berghei* mantida incubada *in vivo* através de sucessivas passagens de animal a animal no Biotério Central do INPA e criopreservada em nitrogênio líquido (-196°C) com 50% de *glycerolight* no laboratório de Malária e Dengue da CPCS/INPA.

3.4.2 Avaliação da supressão de *Plasmodium berghei*

A metodologia seguida para realização do teste *in vivo* baseou-se em Peters (1965) e Rocha-e-Silva et al. (2011) com modificações.

Foram separados de forma randômica grupos contendo 5 camundongos com idade entre 6 a 8 semanas de vida, estes foram identificados quanto ao grupo teste dos derivados e controles, levando-se em conta duas vias de administração (oral e subcutânea). Para cada grupo em separado, foram pesados e inoculados por via intraperitoneal com 200 μL de suspensão sanguínea contendo 1×10^5 hemácias parasitadas por *P. berghei* em *phosphate buffered saline* (PBS). Passadas as 24 h da inoculação os animais de cada grupo foram tratados através da administração de 200 μL dos respectivos derivados na dose de 200 mg/kg/dia através de gavagem – para os grupos de via oral – e injeção dorsal – para os grupos da via subcutânea. O grupo do controle positivo foi tratado com a droga de referência cloroquina na dose de 10 mg/kg/dia e o grupo do controle negativo recebeu apenas o veículo Cremophor[®] EL (óleo de castor) a 10% em água. O tratamento foi realizado durante os 4 dias consecutivos após o dia da inoculação e nos 5^o e 7^o dias foram preparadas lâminas com esfregaços sanguíneos a partir de uma gota de sangue da calda de cada animal dos

grupos, estas foram coradas com Panótico® e visualizadas em um microscópio óptico para avaliação da supressão parasitária.

A diferença entre a média da parasitemia do grupo controle negativo (100%) e o grupo teste foi calculada como porcentagem de supressão do crescimento parasitário (PSC) conforme descrito abaixo:

A = Média da parasitemia do controle negativo

B = Média da parasitemia do grupo teste

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

A classificação dos derivados quanto a sua atividade foi baseada nos critérios de Coutinho et al. (2013) e Rezende et al. (2013) em que são consideradas substâncias ativas as que apresentam supressão parasitária a partir de 40%, parcialmente ativas de 30-40% e inativas abaixo de 30%. A sobrevivência dos animais foi determinada a partir do acompanhamento da sua mortalidade por um período de 40 dias seguidos da inoculação.

3.4.3 Avaliação da toxicidade aguda

A determinação da toxicidade aguda foi realizada com base nas Diretrizes para ensaios de produtos químicos para toxicidade aguda oral (*Guidelines for the testing of chemicals for acute oral toxicity*) da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (*Organization for Economic Cooperation and Development*) (OECD, 2001). O esquema para avaliação tóxica aguda de substâncias a essa dose está descrito no Anexo C.

A existência de toxicidade aguda dos derivados foi avaliada em camundongos saudáveis com idade entre 8 a 12 semanas de vida. Estes foram separados aleatoriamente, foram identificados quanto ao grupo teste dos derivados e grupo controle negativo, foram pesados e tratados por via oral através da administração de 200 µL dos respectivos derivados na dose de 2 g/kg/dia por meio de gavagem. Paralelamente, o grupo controle negativo foi tratado oralmente com a administração de 200 µL da suspensão do veículo óleo de castor 10%. A mortalidade, peso, sintomas e aspectos de estado físico geral desses animais foram acompanhados durante as 4 h seguintes à administração das drogas e durante 30 min. nos 8 dias seguintes.

Por este ensaio há a possibilidade de uma previsão em torno da determinação da dose letal para 50% dos animais em teste (DL_{50}), podendo esta ser calculada pela média geométrica entre a maior dosagem causadora de 0% de mortalidade (**a**) e a menor dosagem causadora de 100% de mortalidade (**b**) (OKOKON & NWAFOR, 2009).

$$DL_{50} = \sqrt{a \times b}$$

3.4.4 Análise estatística dos dados *in vivo*

Cada derivado foi testado em dois experimentos independentes. Para comparações das médias das parasitemias em momentos diferentes foram realizadas análises de variância com o teste *post hoc* de Mann-Whitney no software Microcal Origin® 8.1 (OriginLab, Northampton, MA, EUA). Pode ser considerado um valor de $p < 0,05$ como estatisticamente significativo.

Para análise estatística do parâmetro sobrevida em que se utilizou dois fatores, via de administração e especificidade química do composto, como causas de variação deste parâmetro, foi utilizado o método de intervalos de confiança bootstrap (95%) em conjunto com a análise de sobrevida (Kaplan Meier e teste de Log Rank). O software estatístico utilizado foi o R 3.3.0, com pacotes diversos. O nível de significância utilizado foi de 5%.

3.5 AVALIAÇÕES BIOLÓGICAS *IN VITRO*

3.5.1 Parasitas e linhagem celular

A cepa utilizada para o microteste da susceptibilidade *in vitro* foi a cepa padronizada K1 de *P. falciparum* (cloroquina (CQR), pirimetamina e cicloguanil resistente) (MRA-159, MR4, ATCC, Manassas Virginia). Esta foi cultivada no Laboratório Malária e Dengue do INPA com base na metodologia de Träger e Jensen (1976) com as modificações descritas em Silva (2009). O método baseia-se no desenvolvimento laboratorial dos estágios eritrocitários de *P. falciparum*.

A linhagem celular utilizada para avaliação da citotoxicidade foi de fibroblastos de pulmão humano (MRC-5) adquiridos a partir da *American Type Culture Collection*[®], EUA (ATCC). Estas células foram cultivadas no Laboratório de Cultura de Células da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal da Amazonas (FCF/UFAM) de acordo com procedimento descrito em Nakayama et al. (1997).

3.5.2 Microteste de susceptibilidade *in vitro*

A atividade antiplasmódica *in vitro* das substâncias foi determinada após de um *screening* destas nas concentrações de 50 a 5 µg/mL. Como critério de atividade foi estabelecido que amostras que inibiram o crescimento dos parasitas de 80 a 100% foram consideradas ativas; de 50 a 79%, parcialmente ativas; e, < 50%, inativas (PINTO et al., 2009). O microteste de susceptibilidade *in vitro*, por sua vez, foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Rieckmann et al. (1978) obedecendo modificações conforme Andrade-Neto et al. (2007).

As substâncias foram dissolvidas em DMSO na concentração de 10 mg/mL e posteriormente rediluídas em meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI 1640) para a obtenção de sete diluições sucessivas (1:2) para cada amostra, perfazendo concentrações finais de 100 a 1,56 µg/mL. Como controle positivo foi utilizada a cloroquina em sete concentrações (variando de $3,4 \times 10^3$ a 2,5 µg/mL) e, como controle negativo, uma suspensão de hemácias a partir de 1% de DMSO. As amostras e os controles foram aplicados em microplacas de 96 poços com 180 µL de suspensão de hemácias parasitadas com predomínio de trofozoítos jovens (hematócrito de 2% e

parasitemia de 1%). Em seguida, foram adicionados 20 µL de solução com a substância a ser testada, obtendo-se o volume final de 200 µL por poço. As microplacas foram submetidas à incubação por 48 h a 37°C sob as mesmas condições de cultivo do parasita: baixa tensão de O₂ (5% de O₂, 5% de CO₂ e 90% de N₂) em câmara acrílica e estufa bacteriológica.

Ao término do período de incubação foram preparadas lâminas de esfregaços sanguíneos a partir de alíquotas do sedimento de hemácias provenientes de cada poço, estas foram coradas por panótico[®] e tiveram seu percentual de parasitemia observado ao microscópio óptico. As parasitemias resultantes dos poços testes foram comparadas às parasitemias dos poços controles no intuito de avaliar a viabilidade de crescimento do parasita em cada amostra.

3.5.3 Avaliação da viabilidade celular pelo método Dose-Resposta (alamar blue)

Este ensaio foi realizado em colaboração com o Dr. Emerson Silva Lima e foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Células pela aluna Márcia de Jesus Amazonas da Silva (FCF/UFAM).

As células MRC-5 foram plaqueadas na concentração de $0,5 \times 10^4$ células/placa com um volume final de 100 µL/poço e incubadas por um período de 24 h para aderência. Após esse período, as células foram tratadas com os compostos previamente diluídos em DMSO (Sigma-Aldrich, Alemanha) e em seguida testados nas concentrações de 200, 170, 150, 120 e 80 µg/mL sobre MRC-5. Essa placa permaneceu em incubadora de CO₂ por um período de 48 h a 37°C. Como controle positivo utilizou-se doxorubicina (Sigma-Aldrich, Alemanha), fármaco padrão de citotoxicidade, e controle negativo 0,5% DMSO. Imediatamente após o término do período de incubação foram adicionados 10 µL de alamar blue[™] (resazurina) a 0,4% (950 µL DMEM + 50 µL de alamar blue) aos poços testes e aguardou-se 2 h para metabolização necessárias para esta linhagem celular.

A leitura de fluorescência foi monitorada em aparelho de microplacas (DTX-800 Beckman Coulter) na faixa de 540 nm excitação e 585 nm de emissão. O cálculo foi realizado conforme fórmula abaixo:

$$\% \text{ Viabilidade} = \frac{F_t \times 100}{\Delta F_b}$$

Onde:

F_t = (fluorescência da célula + meio + substância + resazurina)

ΔF_b = (fluorescência da célula + meio + resazurina)

Os resultados de porcentagem de viabilidade celular acima de 90% foram considerados aceitáveis para substâncias não citotóxicas. Os testes foram realizados em triplicata e em três experimentos independentes (interdia).

3.5.4 Análise estatística dos dados *in vitro*

Em relação ao microteste de susceptibilidade, a inibição do crescimento dos parasitas foi determinada através de curva dose-resposta mediante a comparação da média das parasitemias de cada concentração da amostra com a média dos controles sem a droga, obtendo-se a CI_{50} mediante regressão linear utilizando o programa de software Microcal Origin[®] 8.1 (OriginLab, Northampton, MA, EUA).

Em relação ao teste de viabilidade celular, os valores de CI_{50} foram calculados em programa de estatística GraphPad Prism, versão 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA) e foram obtidos por meio da curva sigmoide da concentração droga-resposta pela interpolação linear. Os experimentos foram analisadas usando as médias e seus intervalos de confiança de 95% (IC) correspondentes com base na regressão não linear onde $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ESTUDOS SOBRE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE **1** E **13**

Na tabela 3 estão apresentados os resultados dos teores extrativos das substâncias naturais majoritárias contidas no extrato de *P. peltata*, **1** e **13**, bem como o teor extrativo do extrato bruto quando submetido à extração por sonicação em diferentes solventes e com variação de temperatura.

Tabela 3. Teores percentuais do extrato de *P. peltata* obtidos a partir da extração de 150 g da raiz, e de 4-NC e peltatol A isolados do extrato por Cromatografia em Coluna *flash*.

Solventes	Temperatura (°C)	Teor de extrato (%)	4-NC (1) [*] (%)	Peltatol A (13) (%)
EtOH	25	25,5	1,75	0,77
EtOH	50	26,0	1,80	0,79
MTBE	25	45,5	5,60	1,20
AcOEt	25	45,3	5,40	1,12
CHCl ₃ :EtOH ^a	25 ^a	13 ^a	5.70 ^a	-

^a Valores obtidos pela metodologia base de Andrade-Neto et al. (2007) e repetida por Pinto et al. (2009).

* Teor extrativo de **1** calculado em relação a massa de raiz seca.

EtOH = etanol; MTBE = metil-terc-butil-éter; AcOEt = acetato de etila; CHCl₃ = clorofórmio

Para a extração com MTBE ou AcOEt foi possível observar os melhores resultados de rendimentos para **1** de forma que esses resultados mais se aproximaram do resultado da literatura pioneira de nosso grupo para extração de 4-NC (ANDRADE-NETO et al., 2007) e o que foi repetido por Pinto et al. (2009) para extração de 4NC de onde está baseada a metodologia para obtenção dos derivados. Desta forma, obtivemos pelo menos duas alternativas de solventes em substituição aos clorados (CHCl₃) que possuem elevada toxicidade (cancerígenos) e difícil descarte, o que constitui um ótimo resultado em termos de química mais verde. A semelhança de polaridade desse solventes em relação ao CHCl₃ propicia uma boa reprodução dos teores extrativos.

Ainda que o resultado para MTBE tenha sido ligeiramente melhor em relação ao de AcOEt, a utilização de AcOEt nesse método é mais propícia visto que é relativamente mais barato se comparado ao MTBE. Além disso, AcOEt possui ponto de ebulição superior ao do MTBE (77 °C versus 55 °C, respectivamente), o que diminui as perdas por evaporação durante a manipulação. O AcOEt também possui metodologia de

repurificação e destilação mais simples e bem estabelecidas no LAPAAM/INPA. Então, por esses e outros motivos, com base nos resultados obtidos de custo-benefício, o AcOEt foi o solvente de escolha para extração do 4-NC e peltatol A das raízes de *P. peltata* para síntese dos derivados semissintéticos.

4.2 PREPARAÇÃO DOS DERIVADOS SEMISSINTÉTICOS

As melhorias reacionais alcançadas neste trabalho são principalmente referentes e comparativas aos resultados de Pinto (2008) e Pinto et al. (2009) por serem as literaturas de base para a execução da metodologia de obtenção dos derivados. Em geral, observaram-se melhorias em relação à diminuição dos tempos reacionais e a obtenção de maiores rendimentos, sendo este último muitíssimo importante para que se chegasse ao propósito de avaliação biológica *in vivo*, o objetivo principal deste trabalho.

Ainda que não tenha havido substituição total dos reagentes utilizados em Pinto et al. (2009) pelos utilizados neste trabalho, pôde-se perceber que as várias repetições reacionais ajustando proporções de reagentes, adicionando ou retirando catalizador, modificando momentos de adição de solventes e reagentes limitantes e ainda sujeitando o sistema a maiores ou menores temperaturas entre outros, conduziram a melhoria nos rendimentos dos derivados tornando possível a avaliação de sua atividade antimalárica em camundongos, modelo murino utilizado neste trabalho. Além de ter possibilitado a realização de outros testes biológicos como: toxicidade aguda, citotoxicidade e microteste para *P. falciparum*, os quais contribuíram para uma exploração ainda mais ampla do potencial biológico destes derivados.

Otimizar os padrões reacionais constitui uma etapa muito importante para que o desenvolvimento de moléculas baseadas em química de produtos naturais não estagne na etapa de identificação e caracterização, ou esteja restrita a poucas avaliações *in vitro*, que geralmente requerem massa em pequena escala, mas que possa avançar em relação às possibilidades de avaliações biológicas mais refinadas e fundamentais a chegada dessas moléculas ao nível de protótipos terapêuticos.

Na tabela 4 estão apresentados dados que permitem fazer uma análise comparativa entre os valores de rendimentos de 4-NC e peltatol A e seus derivados em comum obtidos pela metodologia de Pinto et al. (2009) e Gustafson et al. (1992) e aqueles obtidos neste estudo. Tanto Pinto et al. (2009) quanto Gustafson et al. (1992)

utilizaram solventes clorados para obtenção de **1** e **13** a partir das raízes de *P. peltata* de forma que o primeiro chegou a um teor extrativo para **1** de 13% e o segundo chegou a um teor extrativo de 10%, enquanto que neste estudo obteve-se um teor de 45,3% com a substituição de solvente clorado, conforme já apresentado.

Tabela 4: Comparação entre os valores de rendimentos das metodologias de base e deste estudo.

Compostos	Pinto et al. (2009)/ Gustafson et al. (1992)*		Este estudo	
	R (%)**	Tempo reacional	R (%)**	Tempo reacional
1	5,7/2,4*	45 min.	5,4	45 min.
2	8,4	30 min.	-	-
3	7,7	30 min.	-	-
2+3	-	-	27,5	20 h
4	-	-	57	24 h
5	7,3	24 h	-	-
6	6,4	24 h	-	-
5+6	-	-	7	4 h
7	26	24 h	38	2 h
8	90,2	17 h	73	4 h
9	56,3	7 dias	17	4 h
10	-	-	55	12 h
11	-	-	50	12 h
12	-	-	35	12 h
13	0,2*	-	1,12	-
14	-	-	87,5	12 h
15	-	-	19	12 h

Valores calculados em relação às massas de seus respectivos substratos de origem (1** ou **13**)

A obtenção dos dois derivados monometilados (**2** e **3**) juntamente com o derivado dimetilado (**4**) deve-se a possibilidade de alquilação simultânea nas duas hidroxilas (R_1 e R_2) de **1** com CH_3I , o que não é possível pela síntese que utiliza diazometano, o qual só possibilita a metilação de uma única hidroxila por vez em caso das hidroxilas serem vicinais, como o que ocorre em **1**.

Nas reações por onde foram obtidos os derivados monobenzilados (**5**, **6**) e dibenzilado (**7**) apenas modificaram-se as proporções dos reagentes para diferenciar reações por onde se leva à formação dos monobenzilados em escala muito superior ao dibenzilado. Contudo, observou-se que em reações onde o objetivo era obter os

derivados monobenzilados sempre houve formação, ainda que mínima, do derivado dibenzilado. A obtenção isoladamente de **7** foi conseguida pela adição da quantidade de BnBr em excesso sem que houvesse formação de **5** e **6**.

Nos demais derivados **10**, **11**, **12**, **14** e **15** observou-se a substituição de ambas as hidroxilas disponíveis em **1** e todas as hidroxilas em **13**, levando à formação de derivados di e tetrasubstituídos respectivamente. Essas reações de esterificação foram realizadas com a adição do respectivo anidrido carboxílico e não de cloretos de ácido carboxílico, como o observado em algumas esterificações de Pinto et al. (2009). Estes últimos, embora mais eficientes em termos de reatividade que os anidridos, tem a desvantagem de serem mais tóxicos.

Os derivados monometilados (**2** e **3**) e monobenzilados (**5** e **6**) foram isolados das suas respectivas misturas reacionais na forma de misturas. Em variadas combinações de fases móveis, não foi possível obter uma separação satisfatória dos regioisômeros monoalquilados em CCDC, tampouco em CC *flash*, o que tornou inviável a obtenção de cada regioisômero separadamente em escala de massa necessária aos testes biológicos *in vivo*. Por possuírem as mesmas características de polaridade entre si, os regioisômeros de cada mistura não apresentaram R_F 0,1 (fator de retenção) entre si nos variados sistemas de eluição testados, de forma que as variações de sistemas apenas alterava o fator o R_F médio da dupla de isômeros mas não aumentava resolução dos constituintes.

A separação de misturas de derivados monoalquilados foi julgada inviável diante do propósito de se obter quantidades maiores o suficiente para os testes biológicos e suas repetições em substâncias isoladas. Desta forma, observou-se que através de métodos manuais, como cromatografia de bancada, o isolamento de cada derivado monoalquilado de sua respectiva mistura levaria a várias repetições reacionais e cromatográficas, gasto excessivo de reagentes e materiais, sendo portanto muito dispendioso. Contudo, isolou-se poucos miligramas de cada derivado monoalquilado através de CCDC afim de confirmar suas massas molares (m/z) por LC-MS e para diferenciá-los quanto à posição do radical substituído (*para* ou *meta*) por RMN.

4.3 AVALIAÇÕES BIOLÓGICAS *IN VITRO*

4.3.1 Microteste de susceptibilidade

A avaliação da susceptibilidade de *P. falciparum* aos derivados patenteados de 4-NC não constituiu um dos objetivos principais deste trabalho visto que isso já foi avaliado em Pinto et al. (2009). Contudo, por alguns dos derivados terem sido isolados na forma de misturas monoalquiladas (regioisômeros), fez-se necessária a avaliação *in vitro* da atividade destes frente a *P. falciparum* afim de compará-las a seus respectivos isômeros isoladamente.

Na tabela 5 estão apresentados os valores de CI_{50} para as análises *in vitro* das substâncias naturais isoladas de *P. peltata* (**1** e **13**) e seus derivados semissintéticos (**2** a **12**, **14** e **15**), respectivamente, testadas no microteste de susceptibilidade em cepa cloroquina resistente K1 de *P. falciparum*, viabilidade celular em fibroblasto humano MRC-5 e seus respectivos índices de seletividade (IS).

Tabela 5: Concentrações inibitórias *in vitro* de 4-NC (**1**), peltatol A (**13**) e seus derivados (**2** a **12**, **14** e **15**) testados contra *P. falciparum* (K-1) e fibroblastos (MRC-5)

Nº de Substâncias ou misturas	CI_{50} (μ M)		
	<i>P. falciparum</i> (K-1)	MRC-5	IS ^a
1	0,67 ^b	> 600*	> 895*
2+3	154*	489*	3,17*
4	153*	476*	3,11*
5+6	113*	> 400*	> 3,54*
7	22,5 ^b	> 400*	> 17,7*
8	4,85 ^b	< 15,7 ^b	< 3,24 ^b
9	3,95 ^b	> 400*	> 101*
10	10,5*	ND	ND
11	92,9*	> 400*	> 4,31*
12	162*	377*	2,33*
13	79,8*	294*	3,68*
14	28,9*	> 200*	> 6,92*
15	53,7*	ND	ND
Cloroquina	0.13 ^b	ND	ND
Quinina	0.16 ^b	ND	ND

^a Valores de índice de seletividade calculados a partir de CI_{50} (MRC-5)/ CI_{50} (K-1)

^b Dados previamente publicados em Pinto et al. (2009) e Rocha e Silva et al. (2015)

ND: valores não determinados; * Valores inéditos para este estudo

De acordo com os parâmetros para categorização de atividade *in vitro* para substâncias isoladas, são consideradas aquelas com $CI_{50} \leq 0,1 \mu M$ (muito ativo); $CI_{50} 0,1 \geq 5 \mu M$ (ativo); $CI_{50} 5 \geq 20 \mu M$ (parcialmente ativo) e $CI_{50} > 20$ (inativo) (SANTOS-TORRES et al., 2013). Assim, nenhuma das substâncias foi considerada muito ativa. As substâncias **1**, **8** e **9** estão na faixa de substâncias consideradas ativas, o novo derivado **10** foi classificado como parcialmente ativo e todos os demais apresentaram-se inativos, utilizando o critério descrito acima. Em estudos anteriores apenas o derivado de 4-NC metilado na posição *para* foi considerado parcialmente ativo (PINTO et al., 2009). A substância **1** foi considerada ativa e **6** foi classificado como parcialmente ativo (ROCHA-E-SILVA et al., 2015 a).

Em relação a essa classe de substâncias, os terpenos são apontados em muitos trabalhos que avaliam sua atividade antiplasmódica, como substâncias que possuem significativa atividade *in vitro* contra *P. falciparum* (GOULART et al., 2004; ANDRADE-NETO et al., 2007; ROCHA-E-SILVA et al., 2015 a) bem como seus derivados semissintéticos e análogos que conservam a cadeia terpênica aberta (ROCHA-E-SILVA et al., 2015 b). Essa atividade há muito é dedicada às subclasses di-, tri- e sesquiterpenos, assim como os derivados do presente estudo (FREDERICH et al. 1999; MUHAMMAD et al. 2004).

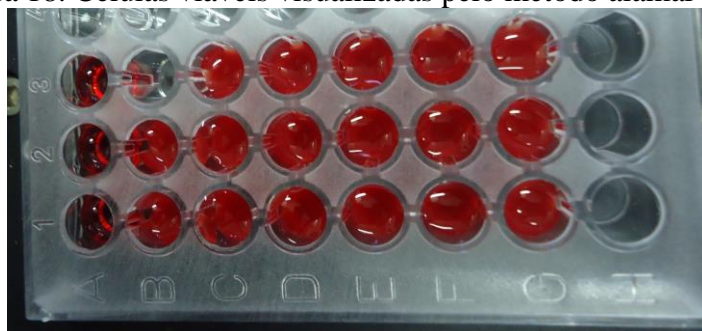
4.3.2 Avaliação da viabilidade celular

A determinação da toxicidade por meio da avaliação de viabilidade de células normais foi essencial para fazer uma previsão sobre a letalidade dessas substâncias naturais e seus derivados, na forma isolada ou em mistura, ao seres humanos, quando almejada a sua utilização como substâncias antimaláricas. Além disso, avaliar a citotoxicidade é importante tendo-se em vista que esta é uma das principais razões pelas quais as novas substâncias são descartadas ainda em fases iniciais da investigação (HUANG et al., 2016).

Em Pinto et al. (2009) a viabilidade desses derivados foi determinada pela metodologia de MTT - Método do sal de tratazolium (MOSMANN, 1983) cujo princípio baseia-se na redução de um substrato amarelo, o sal de tetrazolium MTT, por enzimas mitocondriais (dehidrogenases). Essa reação resulta em um produto azul/roxo (cristais de formazana), reação que ocorre somente em células vivas e que estejam com

suas mitocôndrias ativas, configurando-se assim um ensaio versátil e quantitativo. No presente estudo, no entanto, a metodologia utilizada foi a do alamar blue (NAKAYAMA et al., 1997), em que a resazurina – um indicador fluorescente, colorimétrico com propriedades redox (como os sais de tetrazólio) – é reduzida pelo metabolismo de células em estado de proliferação, indicando como células viáveis as que apresentaram a forma reduzida do indicador (fluorescência rósea) e como células não viáveis as que apresentaram a forma oxidada do indicador (azul) (Figura 18).

Figura 18. Células viáveis visualizadas pelo método alamar blue.



Após avaliação das substâncias pela metodologia alamar blue para determinação de seus níveis de citotoxicidade em linhagem MRC-5 durante um período de 48 h, observou-se que nenhuma das substâncias testadas interferiu significativamente na viabilidade da linhagem celular utilizada quando comparadas ao fármaco padrão doxorrubicina (DOXO). Desta forma, pode-se inferir que em nenhuma das concentrações testadas no intervalo de 80-200 $\mu\text{g/mL}$ as substâncias foram tóxicas em um período de até 48 h.

O critério adotado para a classificação desses derivados como não sendo uma classe de substâncias citotóxicas está baseado em um valor de CI_{50} mínimo a partir do qual cada uma delas passou a ser letal para as células normais do hospedeiro (MRC-5). Assim sendo, quanto menor for a citotoxicidade da substância maior será seu índice de seletividade e sua especificidade de atuação no parasita (ROCHA-E-SILVA et al., 2012).

Desta forma, com base na CI_{50} da doxorrubicina, droga controle utilizada como padrão positivo de citotoxicidade e que exibe CI_{50} em cerca de 1,1 $\mu\text{g/mL}$ (29,6 μM) contra essa linhagem de célula humanas, vem-se adotando como critério considerar citotóxicas as substâncias com $CI_{50} < 50 \mu\text{g/mL}$. Assim, como todos os derivados

apresentaram CI_{50} para fibroblasto humano superior a 50 $\mu\text{g/mL}$, nenhuma delas foi considerada citotóxica (ROCHA-E-SILVA et al., 2013).

Estudos recentes acerca da avaliação citotóxica em linhagens celulares normais também concluíram que terpenos naturais e seus derivados, em geral, não são citotóxicos (MASSON-MEYERS et al., 2013; ALMEIDA et al., 2015; VARGAS et al., 2015) corroborando com avaliações já realizadas com essa classe de substâncias em nosso grupo de pesquisa (ROCHA-E-SILVA et al., 2015 a, b). A substância **1** e os seus derivados monosubstituídos com pequenos grupos substituintes (metila e acetila) e sob a forma isolada expressaram as melhores atividades citotóxicas na maioria das linhagens tumorais nas quais foram testadas e não expressam toxicidade em linhagens normais (PINTO et al., 2009; LIMA et al., 2013).

4.3.3 Índice de seletividade (IS)

A importância da determinação do IS de substâncias com interesse terapêutico está na capacidade de se fazer uma estimativa do quanto essa substância é menos tóxica para as células do hospedeiro (linhagem normal) que para o parasita a ser combatido (NAKAMURA et al., 2006).

Pôde-se inferir bons índices de seletividade dos derivados aqui testados em fibroblasto humano a partir da razão $CI_{50} \text{ MRC-5}/CI_{50} P. \textit{falciparum}$, onde como parâmetro para classificação de seletividade, foram consideradas, substâncias seletivamente tóxicas para *P. falciparum* as que apresentaram $IS \geq 10$; e não seletivas as com $IS \leq 10$ (COUTINHO et al., 2013).

Como já apresentado nos resultados da tabela 6, esses derivados possuem bons índices de seletividade conforme exposto por Rocha-e-Silva et al. (2015a) bem como para outras classes de terpenos e seus derivados testados para a mesma finalidade (ROCHA-E-SILVA et al., 2015b) e para combate a linhagens tumorais (ALMEIDA et al., 2015; VARGAS et al., 2015).

4.4 AVALIAÇÃO BIOLÓGICA *IN VIVO*4.4.1 Supressão parasitária de *P. berghei*

Na tabela 6 estão os percentuais de inibição de parasitemia em modelo murino desempenhado pelos derivados sintetizados neste estudo e que ainda não haviam sido avaliados *in vivo*.

Tabela 6: Supressão de *P. berghei in vivo* em camundongos tratados pelas vias oral e subcutânea com substâncias isoladas ou derivados semissintéticos de 4-NC.

Compostos (200 mg/kg/dia)	% Parasitemia ± MEP (% inibição do crescimento parasitário)				Média de Sobrevida ± DP (dias)	
	Oral		Subcutânea		Oral	Subcutânea
	Dia 5	Dia 7	Dia 5	Dia 7		
2+3	1.19 ± 0.45 (4)	2.01 ± 0.33 (23)	0.81 ± 0.12 (31)	1.87 ± 0.37 (36)	19 ± 3	20 ± 2
4	1.34 ± 0.26 (0)	2.68 ± 0.70 (0)	1.76 ± 0.62 (0)	3.54 ± 7.54 (0)	20 ± 2	22 ± 0
5+6	1.34 ± 0.23 (0)	3.04 ± 0.36 (0)	1.63 ± 0.84 (0)	2.98 ± 0.28 (0)	19 ± 2	19 ± 2
7	1.03 ± 0.40 (17)	2.51 ± 1.20 (4)	1.64 ± 0.54 (0)	2.61 ± 1.00 (11)	22 ± 2	21 ± 2.5
9	0.85 ± 0.3 (31)	2.41 ± 0.46 (8)	0.71 ± 0.27 (40)	3.14 ± 1.29 (0)	22 ± 1	27 ± 4
10	0.73 ± 0.35 (41)	2.90 ± 0.99 (0)	1.00 ± 0.52 (15)	2.44 ± 0.56 (17)	24 ± 6	24 ± 4
11	2.18 ± 0.5 (0)	1.75 ± 0.28 (33)	0.89 ± 0.26 (24)	3.16 ± 0.96 (0)	20 ± 3	21 ± 3
12	2.08 ± 0.59 (0)	1.75 ± 0.26 (33)	0.63 ± 0.12 (47)	2.08 ± 0.54 (20)	21 ± 3.5	20 ± 3
13	2.05 ± 0.30 (0)	1.84 ± 0.83 (30)	1.08 ± 0.32 (8)	1.44 ± 0.24 (51)	24 ± 6.5	20 ± 3.5
14	1.10 ± 0.6 (11)	2.14 ± 0.80 (18)	0.94 ± 0.54 (20)	3.08 ± 1.6 (0)	27 ± 0	20 ± 2
Cloroquina (10 mg/kg/dia)	0.03 ± 0.03 (97)	0.06 ± 0.05 (98)	0.01 ± 0.04 (99)	0.08 ± 0.02 (97)	> 40	> 40
Controle (O.C) 10%	1.24 ± 0.27	2.62 ± 0.51	1.18 ± 0.40	2.94 ± 0.93	20 ± 2	21 ± 1

MEP= Média do erro padrão; DP= Desvio padrão

De forma geral, em relação à inibição da parasitemia, pôde-se observar que com exceção dos derivados **7** e **9**, os demais derivados apresentaram inibição de parasitemia crescente na passagem do 5º para o 7º dia após administração oral. Pela via subcutânea, essa tendência foi observada apenas para a mistura de **2+3** e para os derivados **7**, **10** e **13**. Observou-se ainda que para a maioria dos derivados, bem como para o controle positivo, os maiores percentuais de inibição estão relacionados à administração por via subcutânea, a qual também está associada, para a maioria dos derivados, com os maiores índices de sobrevivência. Outros derivados de 4-NC (diacetilado e dibenzoilado), ao contrário, apresentaram diminuição da parasitemia nas duas vias de administração na passagem do 5º para 7º dia bem como diminuição de sobrevivência na via subcutânea em comparação à via oral conforme demonstrado no quadro 3 (ROCHA-E-SILVA et al., 2015a).

Assim como em Rocha e Silva et al. (2011), também em estudos anteriores, a conferência de maiores percentuais de inibição *in vivo* no 7º dia observados na via subcutânea sugerem uma lentidão na absorção de drogas por essa via o que conduzi a um efeito mais retardado da droga mas também eficiente. Tanto metabolismo de primeira passagem decorrente de administração por via oral quanto a provável baixa biodisponibilidade resultante da via subcutânea conduzem a uma farmacocinética de *clearance* elevado, baixo volume de distribuição, curtos tempos de meia vida e variabilidade nas concentrações plasmáticas, conforme o que já observado em estudo com artemisinina e derivados (NAGELSCHMITZ et al., 2008; WHITE et al., 2008).

Quadro 3: Supressão *in vivo* da parasitemia de *P. berghei* em camundongos tratados com outros derivados de 4-NC.

Compostos (200 mg/kg/dia)	% Parasitemia ± MEP (% inibição do crescimento parasitário)				Média de Sobrevivência ± DP (dias)	
	Oral		Subcutânea		Oral	Subcutânea
	Dia 5	Dia 7	Dia 5	Dia 7		
4-NC (1)*	14,5	54	0	41	22 ± 0,7	21 ± 0
Diacetilado (8)	1,0 ± 0,5 (62)	1,43 ± 0,7 (48)	1,0 ± 0,3 (60)	1,0 ± 0,2 (66)	21 ± 3	19 ± 3
Dibenzoilado	1,5 ± 0,6 (46)	2,4 ± 0,6 (28)	1,4 ± 0,7 (48)	2,7 ± 0,8 (17)	21 ± 3	20 ± 2

Fonte: Adaptado a partir de Rocha e Silva et al. (2011)* e Rocha e Silva et al. (2015a).

Quanto à categorização dos derivados segundo seus níveis de atividade, alguns estudos antimaláricos *in vivo* consideram substâncias ativas aquelas com supressão parasitária > 40% em doses de 50-100 mg/kg/dia (COUTINHO et al., 2013; REZENDE et al., 2013). Desta forma, a alta dose em que essas substâncias foram testadas (200 mg/kg/dia) leva a classificá-las, de modo geral, como não ativas. Contudo, o derivado **10** foi o que apresentou as maiores supressões parasitárias nas vias oral e subcutânea e a substância natural **13** apresentou a maior supressão diante de todas as substâncias testadas e especificamente na via subcutânea.

Neste estudo, apenas o derivado semissintético **12** apresentou maior supressão de parasitemia (47%) que seu precursor **1** (41%) na via subcutânea frente a *P. berghei* quando comparado a resultados de supressão de **1** analisado nas mesmas condições em estudos anteriores e nenhum outro derivado superou a maior inibição alcançada por **1** no 7º dia (54%) (ROCHA-E-SIVA et al., 2011) (Quadro 3). Estudos antimaláricos *in vivo* anteriores e recentes demonstraram que assim como **1**, em alguns casos, outros terpenos naturais apresentaram níveis de atividade supressiva menores que de seus derivados, o que indica a possibilidade de melhoramento de atividade conseguido a partir da produção de derivados semissintéticos (ROCHA-E-SILVA et al., 2011; ROCHA-E-SILVA et al., 2013; ROCHA-E-SILVA et al., 2015b).

Uma das relevantes modificações metodológicas adotadas por nosso grupo para este estudo *in vivo* foi a substituição de DMSO como solvente para solubilização de amostras pelo óleo de castor (Cremophor® EL). O óleo de castor já tem sua utilização para esta finalidade bem estabelecida (ANDERSEN, 1997; FEENEY et al., 2014; BERTHELSEN et al., 2015), possui características de solubilidade e aplicabilidade bem versáteis e é considerado minimamente tóxico para humanos e animais, quando administrado nas vias oral e subcutânea (DIENER & SPARANO, 1968; GOSSELIN et al., 1976; MIGALLY, 1979).

Esse veículo apresentou-se mais vantajoso, propiciando uma solubilização mais homogênea de substâncias com características de baixa polaridade, de oleosas a graxas, como são as substâncias estudadas. Com esse veículo diminuiu-se o tempo gasto para solubilização das amostras de 1 h para 30 min. Além do que, passou a ser desnecessário o uso de sonicação com aquecimento, o que é importante a compostos orgânicos, e possibilitou-se a formação de emulsões de aspecto claro e homogêneo mesmo após a adição de água que antes possuía aparência de emulsão turva.

Os níveis de inibição parasitária desempenhada pelos derivados não foram considerados altos à dose de 200 mg/kg/dia. O mecanismo de ação antimalárica desses derivados pode ser considerado diferenciado – inibição da biossíntese de isoprenóides e inibição da formação de hemozoína – ainda torna esses derivados competitivos e passíveis de estudos continuados. Há evidências de que esses derivados inibam formação da hemozoína o que os direciona para um mecanismo de ação similar ao da cloroquina (ROCHA-E-SILVA et al., 2015 a).

Algumas drogas antimaláricas já utilizadas clinicamente a exemplo da quinina e do artesunato de sódio (derivado de artemisinina), tal como esses derivados, também não tiveram ótimas atividades quando testadas em modelo murino (GARAVITO et al., 2012; LOMBARD et al., 2013). Dessa forma, futuros estudos devem ser direcionados a uma abordagem farmacocinética afim de se analisar outras vantagens relacionadas a importantes parâmetros farmacocinéticos como por exemplo biodisponibilidade, biotransformação e depuração (REZENDE & BARROS, 2004).

A relação parasita-hospedeiro constitui um fator de extrema importância para que se consiga um satisfatório desenvolvimento da doença de forma a conduzir aos mesmos sintomas da malária humana e a partir disso se possa observar todos os efeitos que se desejem analisar, no caso deste trabalho a relação dose-resposta sobre o parasita (LEISEWITZ et al., 2004; MIZOBUCHI et al., 2014). Assim, é sugerido que se possa fazer a variação da espécie do parasita infectante do modelo animal utilizado no estudo, afim de que o hospedeiro testado possa ser aquele o mais sensível possível ao quadro clínico a ser combatido pela pesquisa (LANGHORNE et al., 2011).

Nesse contexto, a não responsividade em termos de diminuição satisfatória dos níveis de parasitemia por parte de *P. berghei*, quando submetido a ação dos derivados na alta dose em que foram testados, instiga-nos a possibilidade de investigar a atividade antimalárica desses derivados frente a outras espécies de *Plasmodium* spp., como por exemplo *P. chabaudi*, *P. yoelli* ou *P. vinckei*, tendo sido este último, inclusive, já utilizado em substituição ao *P. berghei*, devido a sua baixa sensibilidade, para esta mesma finalidade investigativa (JIMENEZ et al., 2014).

A idéia da repetição do teste de supressão parasitária *in vivo* com a substituição do parasita murino-específico nos leva a crer que os níveis de atividade antimalárica possam ser muito melhorados de forma a poder considerar essas drogas realmente ativas. Isso porque, conforme já registrado em estudos anteriores sobre o extrato de *P.*

peltata, 4-NC e mesmo alguns desses derivados (**4**, **5**, **6**, **8** e **9**), eles se mostraram ativos *in vitro* contra *P. falciparum* tanto no microteste de susceptibilidade direta quanto no teste da ativação do plasma sanguíneo de camundongos saudáveis que haviam ingerido tanto o extrato quanto 4-NC (AMORIM et al., 1986; SALA-NETO et al., 1992; ATINDEHOU et al., 2004; ANDRADE-NETO et al., 2007; PINTO et al., 2009, ROCHA-E-SILVA et al., 2011; ROCHA-E-SILVA et al., 2015 a).

Embora os níveis de atividade dessas substâncias não venham ao longo do tempo, desde estudo de Atindehou et al. (2004) até o mais recente (ROCHA-E-SILVA et al, 2015 a), sendo satisfatórias quando avaliadas em *Plasmodium berghei*, o fato de elas terem demonstrado atividade promissoras na espécie de parasita humano, o qual é o real alvo da ação delas, é bastante incentivador a dar sequência às investigações. Assim, o ajuste da relação parasita- hospedeiro pode ser um dos parâmetros determinantes para exibição de primícias do real potencial antimalárico *in vivo* desses derivados, além de propor um desfecho ainda mais coerente a sua real vertente biológica.

4.4.2 Avaliação da toxicidade aguda

De acordo com o Guia para teste da toxicidade aguda oral (OECD, 2001), essa avaliação conduziu a visualização de efeitos adversos, em um período de 24 h, decorrentes da administração oral de uma única ou múltiplas doses de uma substância. A escolha da dose inicial do teste obedeceu o critério de ser maior que a dose mais alta em que as substâncias foram testadas para avaliação da supressão plasmodial. Ou seja, ainda que neste trabalho todos os derivados tenham sido testados em uma única dose (200 mg/kg/dia), **1** e outros de seus derivados já haviam sido avaliados quanto a sua atividade antimalárica *in vivo* em doses superiores, até 600 mg/kg/dia (ROCHA-E-SILVA et al., 2011; ROCHA-E-SILVA et al., 2015a). Desta forma, dentre as sugestões do guia, adotou-se a dose de 2000 mg/kg/dia para o ensaio de toxicidade.

Por uma questão de disponibilidade, apenas a mistura de **2+3** e os derivados **11**, **12** e **13** tiveram avaliada sua toxicidade aguda em um único dia de tratamento e não em quatro dias conforme o tempo de tratamento em que os animais foram submetidos com os derivados no ensaio antimalárico *in vivo*. Assim, durante o acompanhamento dos animais nas primeiras 4 h após administração dos derivados e durante os 13 dias seguintes, não foram observados nenhum dos sinais de toxicidade previstos pelo guia

que norteou esse teste (alterações no couro, pelagem, olhos, mucosas, respiração, cardíaca, perda de peso, prostração, salivação, tremores, entre outros). Este procedimento, baseado no guia da OECD é bem aceito e reproduzido para avaliação da toxicidade aguda no estudo de espécies utilizadas popularmente para tratamento de malária (MOHAMMED, ERKO & GIDAY, 2014).

A ausência dos sinais indicadores de toxicidade oral aguda pode ser devido à fraca absorção dessa classe de substâncias quando administradas pela via oral pelo trato gastro intestinal, o que constitui um questionamento farmacocinético acerca de sua absorção e níveis de distribuição plasmática após administração oral, de forma que estudos anteriores já buscaram investigar esse problema (ROCHA E SILVA et al., 2015a).

Por fim, as principais limitações deste estudo estiveram relacionadas principalmente à obtenção dos derivados em maior escala de massa, sendo este o fator limitante para que as demais etapas previstas, referente à realização dos teste biológicos, pudessem ser realizadas. A disponibilidade de solventes e sílica e com pureza e quantidades necessárias às diversas repetições também constitui limitação para realização de química sintética baseada em fitoquímica, o que torna o curso das etapas de isolamento e purificação muito dispendiosas e por vezes lentas.

Já os interferentes relacionados ao desenvolvimento dos ensaios biológicos referem-se principalmente ao fato de que não se pode prever exatamente o tempo necessário à realização de triagens e determinações de concentrações inibitórias médias quando se trabalha com microorganismo sobre os quais não se tem total controle de manutenção ou viabilidade, por estarem sujeitos a contaminações ou interferências do meio em que são mantidos. Assim, constitui um grande desafio alinhar tempo de execução, performance técnica e condições laboratorias ao desenvolvimento de pesquisa cujo as bases estejam voltadas técnicas fitoquímicas estitamente clássicas.

4.4.3 Análise estatística das sobrevidas segundo causas de variação

Observou-se que dois fatores relacionados à metodologia do ensaio *in vivo* para verificação da supressão parasitária por *P. berghei* a parti da metodologia de Peters exerceram variações significantes não no efeito antiparasitário mas nos tempos de sobrevidas entre os grupos de animais que recebiam a mesma substância à mesma dose por vias de administração diferentes e referente às diferentes substância que cada grupo teste recebeu. Desta forma, entendeu-se como sendo os dois fatores causadores de variação na sobrevida a diferença química intrínseca a cada substância e a via de administração utilizada.

Na figura 19 observa-se que ao se analisar as sobrevidas, tendo como fator de variação o parâmetro “composto”, percebe-se que o índice de sobrevida, em escala de dias, conferido pela utilização da substância controle (CQ) está muito além do que foi observado para as demais substâncias utilizadas na suas formas isoladas ou em combinações. Essa observação reforça a idéia de que a relação estrutura-atividade exerce importante influência em estudos onde o perfil da resposta esteja embasado na comparação entre diferentes classes de substâncias.

Dessa forma, todas as substâncias desse estudo resultantes de isolamento direto de *P. peltata* ou de semissíntese podem ser agrupadas quimicamente como sendo substâncias terpênicas mas diferindo entre si apenas em pequenos grupamentos funcionais adicionados em substituição a uma ou ambas as hidroxilas do anel cotecólico da substância natural original, de forma que a sobrevida conferidas por elas apresentou um perfil pouco variável entre si, enquanto que a cloroquina (CQ) que é caracterizada como substância amino quinolínica conferiu um perfil de sobrevida completamente superior e diferenciado ao grupo de animais tratados com essa droga.

Na análise da sobrevida baseada na via de administração como fator de variação, verificou-se que a forma de administração, isoladamente, não interfere na sobrevida do animal ($p=0,587$), visto que as linhas indicativas das sobrevidas em cada via mantiveram-se praticamente sobrepostas ou pelo menos com a mesma tendência de variação no decorrer do tempo de 0 – 30 dias, conforme gráfico da figura 20.

Figura 19. Gráfico de intervalos de confiança bootstrap dos dados de sobrevivência tendo a natureza química das substâncias como causa de variação.

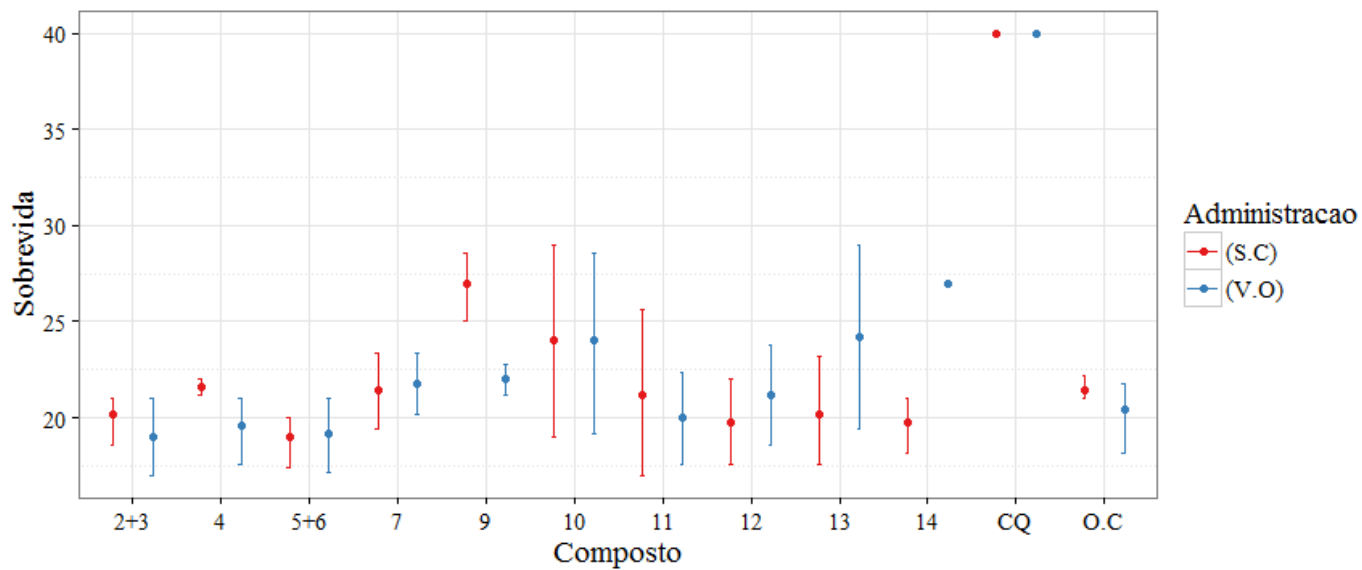
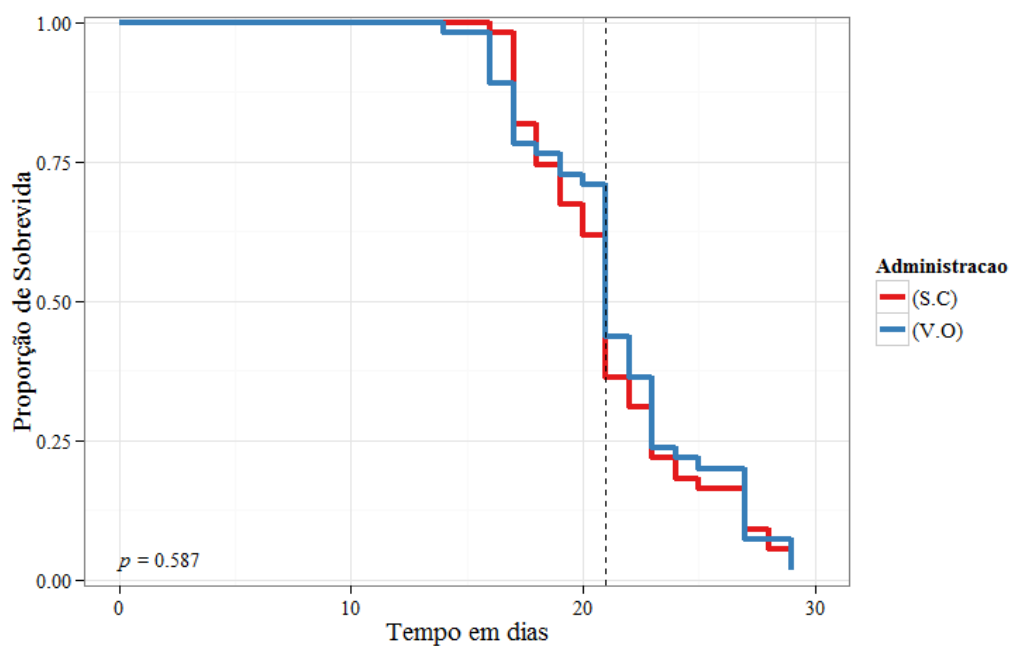
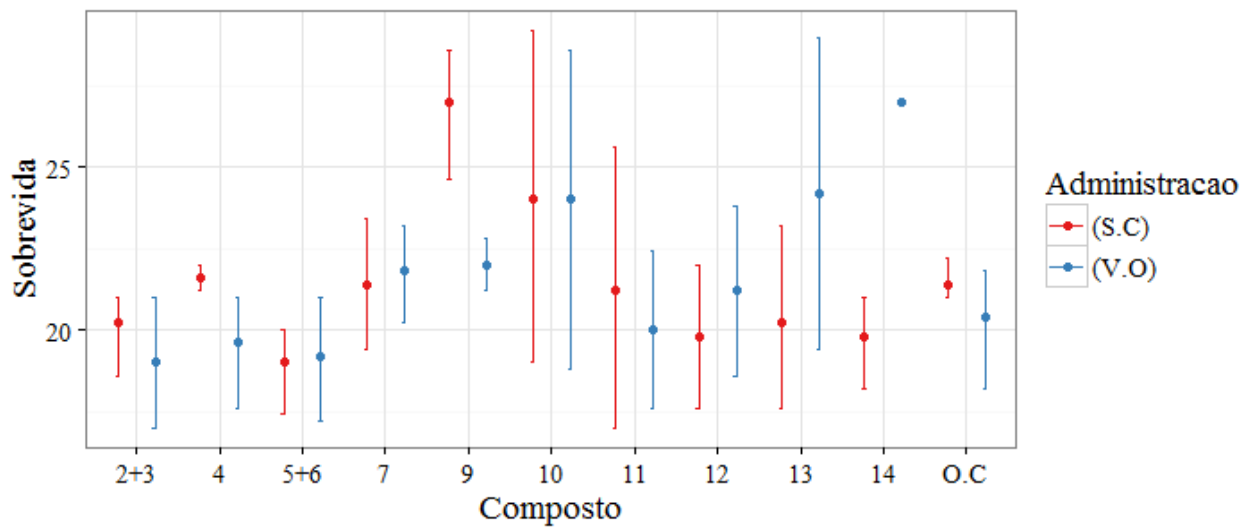


Figura 20. Curvas das sobrevivências segundo a forma de administração. P-valor do teste de Log Rank.



Já ao analisarmos estatisticamente a combinação do efeito dos dois fatores de variação da sobrevida, foi possível verificar que a administração da dose quando combinado com a natureza química específica de cada substância altera de forma significativa os valores de sobrevida, característica essa bem marcante especialmente para as substâncias 4, 9 e 14 (Figura 21).

Figura 21. Gráfico de intervalos de confiança bootstrap dos dados de sobrevida pela combinação de dois fatores de variação (via de administração e composto).



No gráfico acima os fatores de variação relacionados a via de administração e a natureza química de cada substância testada no estudo não levou em consideração, para fins comparativos, os dados relacionados à substância controle (cloroquina).

CONCLUSÃO

O processo extrativo para obtenção do extrato bruto de *P. peltata* bem como o isolamento cromatográfico dos ativos químicos do extrato foram bem sucedidos mediante substituição do solvente clorado (CHCl_3) de vasta utilização para essa finalidade por solvente considerado mais limpo (AcOEt), de forma que mediante os resultados apresentados os rendimentos obtidos por ambas as combinações de solventes condizuram a equiparados teores extrativos. Sendo portanto viável a utilização de acetato de etila para esta finalidade como alternativa de processo mais limpo, mais economicamente viável e extrativamente rentável.

De acordo com as metas foi possível chegar ao isolamento do princípio ativo 4-nerolidilcatecol (**1**) em maior escala de massa a partir, também, do aprimoramento da técnica extrativa o que possibilitou a semissíntese não só dos seus derivados previstos (**2** a **9**), mas também de mais três derivados inéditos (**10** a **12**). Além disso, o novo ajuste metodológico extrativo permitiu também o isolamento de peltatol A (**13**) em escala de massa que permitiu a semissíntese de dois novos derivados (**14** e **15**).

Embora as modificações reacionais tenham conferido melhorias de rendimento e diminuição nos tempos reacionais, a obtenção desses derivados em escala de gramas ainda continua sendo um desafio a ser superado, sendo ainda requeridos aprimoramentos reacionais e de procedimentos pós-reacionais.

Não houve alteração significativa da atividade *in vitro* contra *P. falciparum* entre os derivados monoalquilados anteriormente testados e os monoalquilados testados na forma de mistura neste estudo. O novo derivado de 4-NC **10** mostrou-se parcialmente ativo *in vitro*.

Nenhum dos derivados, bem como suas substâncias de origem, foram consideradas tóxicas *in vitro* para células normais, nem *in vivo* para camundongos saudáveis, e em geral apresentaram bons índices de seletividade.

Dentre as substâncias estudadas, as mais ativas *in vivo* na dose padrão para este estudo (200 mg/ kg/ dia) foram o peltatol A (**13**) e o derivado semissintético 1,2-*O,O*-dipentanoil de 4-nerolidilcatecol (**12**), ambos com as maiores atividades, respectivamente, na via de administração subcutânea. Na sequência, em ordem decrescente de atividade *in vivo*, tivemos o derivado semissintético de 4-NC inédito, 1,2-*O,O*-dipropanoil (**10**) e a mistura de isômeros de 1,2-*O,O*-diacetil-10',6'-diepoxil

(9). De modo geral, comparados os derivados mono- e dialquilados desse estudo, os mais ativos *in vivo* foram todos os diésteres.

Em relação à atividade antimalárica *in vivo* os derivados testados não apresentaram atividade significativa, característica de protótipos de drogas. Outras atividades biológicas poderão ser investigadas, como por exemplo atividades antioxidante e antiinflamatória.

Estima-se a necessidade da adoção de uma outra espécie parasitária de malária infectante de roedor com o intuito de refinar e identificar de forma mais coerente as limitações atreladas à espécie *P. berghei*, visto que há indícios neste estudo que nos levam a indagar sobre se é realmente adequada utilização dessa espécie na busca por indícios pré-clínicos como resultados de estudos voltados para metodologias baseada na dose-resposta como o ocorrido neste trabalho. Além do mais, a variação não só da espécie infectante mas também do modelo murino são fatores que podem e devem ser ajustados de forma a fidelizar e alinhar ainda mais os resultados de estudos que relacionam a interação parasita-hospedeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHAN, J.; TALISUNA, A.O.; ERHART, A.; YEKA, A.; TIBENDERANA, J.K.; BALIRAINÉ, F.N.; ROSENTHAL, P.J.; D'ALESSANDRO, U. Quinine an old antimalarial drug in a modern world: role in the treatment of malaria. **Malaria Journal**, v.10, p.144, 2011.
- ALMEIDA, P. D. O.; BOLETI, A. P. A.; RÜDIGER, A. L.; LOURENÇO, G. A.; VEIGA JUNIOR, V. F.; LIMA, E. S. Anti-Inflammatory activity of triterpenes isolated from *Protium paniculatum* oil-resins. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.2015, p.1-10, 2015.
- AMORIM, C.Z.; GOMES, B.E.; FLORES, C.A.; CORDEIRO, R.S.B. Antimalarial activity screening from Plants of the Genus *Pothomorphe*. **Brazilian Journal Medical and Biological Research**, v.19, n.4-5, p.569A, 1986.
- ANDERSEN, F. A. Final report on the safety assessment of PEG-30, -33, -35, -36, and -40 castor oil and PEG-30 and -40 hydrogenated castor oil. **International Journal of Toxicology**, v.16, n.3, p.269-306, 1997.
- ANDRADE-NETO, V.F.; POHLIT, A.M.; PINTO, A.C.; SILVA, E.C.; NOGUEIRA, K.L.; MELO, M.R.; HENRIQUE, M.C.; AMORIM, R.C.; SILVA, L.F.; COSTA, M.R.; NUNOMURA, R.C.; NUNOMURA, S.M.; ALECRIM, W.D.; ALECRIM, M.G.; CHAVES, F.C.; VIEIRA, P.P. *In vitro* inhibition of *Plasmodium falciparum* by substances isolated from Amazonian antimalarial plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.102, n.3, p.359-365, 2007.
- ARAÚJO-CORDEIRO, K.C.F.; REZENDE, K.R.; VAZ, B.G.; ROMÃO, W.; LIÃO, L.M.; GIL, E.S.; OLIVEIRA, V. Biosynthesis and antioxidant activity of 4NRC β -glycoside. **Tetrahedron Letters**, v.54, p.6656-6659, 2013.
- ARAÚJO-JÚNIOR, C.; COSTA, F.S.O.; TAVEIRA, S.F.; MARRETO, R.N.; VALADARES, M.C.; LIMA, E.M. Preparation of pellets containing *Pothomorphe umbellata* extracts by extrusion-spheronization: improvement of 4-nerolidylcatechol photostability. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.23, n.1, p.169-174, 2013.
- ATINDEHOU, K.K.; SCHMID, C.; BRUN, R.; KONÉ, M.W.; TRAORE, D. Antitrypanosomal and antiplasmodial activity of medicinal plants from Côte d'Ivoire. **Journal of Ethnopharmacology**, v.90, n.2-3, p.221-227, 2004.
- BALDOQUI, D.C.; KATO, M.J.; MARQUES, M.O.M. Flavonas, lignanas e terpeno de *Piper umbellata* (PIPERACEAE). **Química Nova**, v.32, n.5, p.1107-1109, 2009.
- BARROS, L.F.M.; BARROS, P.S.M.; ROPKE, C.D.; SILVA, V.V.; SAWADA, T.C.H.; BARROS, S.B.M.; BELFORT JR, R. Dose-dependent *in vitro* inhibition of rabbit corneal matrix metalloproteinases by an extract of *Pothomorphe umbellata* after alkali injury. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.40, n.8, p.1129-1132, 2007.

BARROS, S.; ROPKE, C.D.; SAWADA, T.C.H.; SILVA, V.V.; PEREIRA, S.M.M.; BARROS, S.B.M. Assessment of acute subchronic oral toxicity of ethanolic extract of *Pothomorphe umbellata* L. Miq (Piperaceae). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.41, n.1, p.53-61, 2005.

BASTOS, W.L.; MORENO, P.R.H.; LOPES, N.P.; KATO, M.J.; FURLAN, M. Metabólitos secundários e biossíntese em *Pothomorphe umbellata*. Livro de Resumos. **Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ)**, PN-073, 1998.

BASTOS, J.C.S.; CUNHA, L.C.; OSTROSKY, E.A. Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação do 4-nerolidilcatecol (4-NRC) em solução de proteína plasmática para aplicação em estudos de microdiálise cutânea. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.34, n.2, p.191-198, 2013.

BERGAMO, D.C.B.; KATO, M.J.; BOLZANI, V.S.; FURLAN, M. Biosynthetic origins of the isoprene units of 4-nerolidylcatechol in *Pothomorphe umbellata*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.16, p.1406-1409, 2005.

BERTHELSEN, R.; HOLM, R.; JACOBSEN, J.; KRISTENSEN, J.; ABRAHAMSSON, B.; MÜLLERTZ, A. Kolliphor surfactants affect solubilization and bioavailability of fenofibrate. Studies of *in vitro* digestion and absorption in rats. **Molecular Pharmaceutics**, 2015.

BIAMONTE, M.A.; WANNER, J.; ROCH, K.G.L. Recent advances in malaria drug discovery. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, p. 2829 – 2843, 2013.

BOULOS, M. Tratamento da malária. In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. (Ed.) **Tratado de infectologia**, São Paulo: Atheneu, v. 2, cap. 98, p. 1282 – 1285, 1996.

BRAGA, F.G.; BOUZADA, M.L.M.; FABRI, R.L.; MATOS, M.O.; MOREIRA, F.O.; SCIO, E.; COIMBRA, E.S. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.111, p.396-402, 2007.

BRAVO, J.A.; LAVAUD, C.; BOURDY, G.; DEHARO, E.; GIMENEZ, A.; SAUVAIN, M. Antimalarial activity of ormosanine and homoormosanine from *Bowdichia virgiloides*. **Revista Boliviana de Química**, v. 19, p. 12–17, 2002.

BRAZ, R.M.; DUARTE, E.C.; TAUIL, P.L. Caracterização das epidemias de malária em municípios da Amazônia Brasileira em 2010. **Caderno de Saúde Pública**, v. 29, n. 5, p. 935 – 944, 2013.

BROHEM, C.A.; SAWADA, T.C.H.; MASSARO, R.R. et al. Apoptosis induction by 4-nerolidylcatechol in melanoma cell lines. **Toxicology in Vitro**, v. 23, p. 111 – 119, 2009.

CALDERON, L.A.; SILVA-JARDIM, S.; ZULIANI, J.P.; ALMEIDA, A.; CIANCAGLINI, P.; PEREIRA-DA-SILVA, L.H.; STÁBELI, R.G. Amazonian biodiversity: A view of drug development for leishmaniasis and malaria. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 6, p. 1011-1023, 2009.

- CHEHUAN, Y.F.; COSTA, M.R.; COSTA, J.S.; ALECRIM, M.G.; NOGUEIRA, F.; SILVEIRA, H.; BRASIL, L.W.; MELO, G.C.; MONTEIRO, W.M.; and LACERDA, M.V. *In vitro* chloroquine resistance for *Plasmodium vivax* isolates from the Western Brazilian Amazon. **Malaria Journal**, v. 12, p. 226, 2013.
- CLASER, C.; MALLERET, B.; PENG, K.; BAKOCEVIC, N.; GUN, S.Y.; RUSSEL, B.; NG, L.G.; RENIA, L. Rodent *Plasmodium*-infected red blood cells: Imaging their fates and interactions within their hosts. **Parasitology International**, v.63, p.187-194, 2014.
- COSTA, E.A.; LINO, R.C.; GOMES, M.N.; NASCIMENTO, M.V.M.; FLORENTINO, I.F.; GALDINO, P.M.; ANDRADE, C.H.; REZENDE, K.R.; MAGALHÃES, L.O.; MENEGATTI, R. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of LQFM002 – A 4-nerolidylcatechol derivative. **Life Sciences**, v.92, p.237-244, 2013.
- COUTINHO, J.P.; AGUIAR, A.C.; SANTOS, P.A.; LIMA, J.C.; ROCHA, M.G.; ZANI, C.L.; ALVES, T.M.; SANTANA, A.E.; PEREIRA MDE, M.; and KRETTLI, A.U. *Aspidosperma* (Apocynaceae) plant cytotoxicity and activity towards malaria parasites. Part I: *Aspidosperma nitidum* (Benth) used as a remedy to treat fever and malaria in the Amazon. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.108, n.8, p.974-982, 2013.
- CRAIG, A.G., GRAU, G.E., JANSE, C., KAZURA, J.W., MILNER, D., BARNWELL, J.W., TURNER, G., LANGHORNE, J. The role of animal models for research on severe malaria. **PLoS Pathogens**, v.8, 2012.
- CRUZ, L.R.; SPANGENBERG, T.; LACERDA, M.V.G.; WELLS, T.N.C. Malaria in South America: a drug discovery perspective. **Malaria Journal**, v. 12, p. 168, 2013.
- DESMARCHELIER, C.; SLOWING, K.; CICCIA, G. Anti-inflammatory activity of *Pothomorphe peltata* leaf methanol extract. **Fitoterapia**, v. 471, n. 5, p. 556- 558, 2000.
- DESMARCHELIER, C.; BARROS, S.; REPETTO, M.; LATORRE, L.R.; KATO, M.J. Radicals and inhibits Fe(II)-dependent DNA damage. **Planta Medica**, v.63, n.6, p.561-563, 1997.
- DESMARCHELIER, C.; SCHAUS, F.W. Sesenta plantas medicinales de la Amazonia peruana: Ecología. **Etnomedicina y Bioactividad**. Peru: Ira, p.212-215, 2000.
- DIENER, R.M.; SPARANO, B.M. Effects of various treatments on the histochemical profile of the gastrointestinal mucosa in rhesus monkeys. **Toxicology and Applied Pharmacology**, n.13, p.412-419, 1968.
- DI STASI, L.C.; OLIVEIRA, G.P.; CARVALHAES, M.A.; QUEIROZ-JUNIOR, M.; TIEN, O.S.; KAKINAMI, S.H.; REIS, M.S. Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. **Fitoterapia**, v.73, n.1, p.69-91, 2002.

DONDORP, A.M.; FANELLO, C.I.; HENDRIKSEN, I.C.E.; GOMES, E.; SENI, A.; CHHAGANLAL, K.D.; BOJANG, K.; OLAOSEBIKAN, R.; ANUNOBI, N.; MAITLAND, K.; KIVAYA, E.; AGBENYEGA, T.; NGUAH, S.B.; EVANS, J.; GESASE, S.; KAHABUKA, C.; MTOVE, G.; NADJM, B.; DEEN, J.; MWANGA-AMUMPAIRE, J.; NANSUMBA, M.; KAREMA, C.; UMULISA, N.; UWIMANA, A.; MOKUOLU, O.A.; ADEDOYIN, O.T.; JOHNSON, W.B.R.; TSHEFU, A.K.; ONYAMBOKO, M.A.; SAKULTHAEW, T.; NGUM, W.P.; SILAMUT, K.; STEPNIIEWSKA, K.; WOODROW, C.J.; BETHELL, D.; WILLS, B.; ONEKO, M.; PETO, T.E.; SEIDLEIN, L.V.; DAY, N.P.J.; WHITE, N.J. Artesunate versus quinine in the treatment of severe falciparum malaria in African children (AQUAMAT): an open-label, randomised trial. **The Lancet**, v. 376, n.9753, p.1647–1657, 2010.

EVANS, C.A.R.; MILLER, N.J.; BOLWELL, P.G.; BRAMLEY, P.M.; PRIDHAM, J.B. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. **Free Radical Research**, v.22, p.375-383, 1995.

FAULD, M.K.; RUEDA, L.M.; KHAIREH, B.A. First record of the Asia malaria vector *Anopheles stenphensi* and its possible role in the resurgence of malaria in Djibouti, Horn of Africa. **Acta Tropical**, v.139, p.39 – 43, 2014.

FEENEY, O. M.; WILLIAMS, H. D.; POUTON, C. W.; PORTER, C. J. H. Stealth lipid-based formulations: Poly(ethylene glycol)-mediated digestion inhibition improves oral bioavailability of a model poorly water soluble drug. **Journal of Controlled Release**, v.192, p.219–227, 2014.

FIDOCK, D.A.; ROSENTHAL, P.J.; CROFT, S.L.; BRUN, R.; NWAKA, S. Antimalarial drug discovery: efficacy models for compound screening. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.3, p.509–520, 2004.

FIGUEIREDO, R.A.; SAZIMA, M. Pollination biology of Piperaceae species in southeastern Brazil. **Annals of Botany**, v.85, p.455-460, 2000.

FLANNERY, E.L.; CHATTERJEE, A.K.; and WINZELER, E.A. Antimalarial drug discovery - approaches and progress towards new medicines. **Nature Reviews Microbiology**, v.11, n.12, p.849-862, 2013.

FRANÇA, T.C.C.; SANTOS, M. G.S. Malária: Aspectos Históricos e Quimioterapia. **Química Nova**, v.31, n.5, p.1271-1278, 2008.

FRANSSEN, F.F.J. SMEIJSTERS, L.J.J.W.; BERGER, I.; ALDANA, B.E.M. *In vivo* and *in vitro* antiplasmodial activities of some plants traditionally used in Guatemala against malária. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.41, n.7, p.1500 – 1503, 1997.

FREDERICH, M.; HAYETTE, M. P.; TITS, M.; DE MOL. P.; ANGENOT, L. *In vitro* activities of *Strychnos* alkaloids and extracts against *Plasmodium falciparum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.43, p.2328-2331, 1999.

FREITAS, P.C.D. **Atividade antioxidante de espécies medicinais da família Piperaceae *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq e *Piper regnelli* (Miq.) C. DC.** Tese

(Doutorado em Ciências Farmacêuticas) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. São Paulo, 1999.

GAMA, B.E.; LACERDA, M.V.G.; DANIEL-RIBEIRO, C.T.; FERREIRA-DA-CRUZ, M.D.F. Chemoresistance of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* parasites in Brazil: consequences on disease morbidity and control. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, p. 159–166, 2011.

GARAVITO, G.; BERTANI, S.; QUILIANO, M.; VALENTIN, A.; ALDANA, I.; DEHARO, E. The *in vivo* antimalarial activity of methylene blue combined with pyrimethamine, chloroquine and quinine. **Memorials of Institute Oswaldo Cruz**, v.107, n.6, p.820-823, 2012.

GARDNER, M.J.; HALL, N.; FUNG, E.; WHITE, O.; BERRIMAN, M.; HYMAN, R.W.; CARLTON, J.M.; PAIN, A.; NELSON, K.E.; BOWMAN, S.; PAULSEN, I.T.; JAMES, K.; EISEN, J.A.; RUTHERFORD, K.; SALZBERG, S.L.; CRAIG, A.; KYES, S.; CHAN, M.S.; NENE, V.; SHALLOM, S.J.; SUH, B.; PETERSON, J.; ANGIUOLI, S.; PERTEA, M.; ALLEN, J.; SELENGUT, J.; HAFT, D.; MATHER, M.W.; VAIDYA, A.B.; MARTIN, D.M.A.; FAIRLAMB, A.H.; FRAUNHOLZ, M.J.; ROOS, D.S.; RALPH, S.A.; MCFADDEN, G.I.; CUMMINGS, L.M.; SUBRAMANIAN, G.M.; MUNGALL, C.; VENTER, J.C.; CARUCCI, D.J.; HOFFMAN, S.L.; NEWBOLD, C.; DAVIS, R.W.; FRASER, C.M.; BARRELL, B. Genome sequence of the human malária parasite *Plasmodium falciparum*. **Nature**, v. 419, p. 498 – 511, 2002.

GOSELIN, R. E.; HODGE, H. C.; SMITH, R. P.; GLEASON, M. N. (eds.) **Clinical Toxicology of Commercial Products**, 4. ed. Baltimore: The Williams & Wilkins Co. p. 152, 1976.

GOULART, R. H.; KIMURA, E. A.; PERES, V. J.; COUTO, A. S.; AQUINO DUARTE, F. A.; KATZIN, A. M. Terpenes arrest parasite development and inhibit biosynthesis of isoprenoids in *Plasmodium falciparum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.48, n.7, p.2502-2509, 2004.

GUIGUEMDE, W. A.; SHELAT, A. A.; GARCIA-BUSTOS, J. F. DIAGANA, T. T.; GAMO, F. J.; GUY, R. K. Global phenotypic screening for antimalarials. **Chemistry & Biology**, v. 19, n.1 p. 116–129, 2012.

GUSTAFSON, K. R.; CARDELLINA, J. H.; MCMAHON, J. B.; PANNELL, L. K.; CRAGG, G. M.; BOYD, M. R. The Peltatols, Novel HIV-Inhibitory Catechol Derivatives from *Pothomorphe peltata*. **Journal Organic Chemistry**, v. 57, n. 10, p. 2809-2811, 1992.

G1 AMAZONAS. **AM registra 33,5 mil casos de malária entre janeiro e agosto de 2016, diz FVS**. Disponível em <<http://amazonia.org.br/2016/10/am-registra-335-mil-casos-de-malaria-entre-janeiro-e-agosto-de-2016-diz-fvs/>>. Acesso em 20 out 2016a.

G1 AMAZONAS. Casos de malária caem mais de 20% no AM, segundo dados da FVS. Disponível em <<http://g1.globo.com/am/amazonas/noticia/2016/06/casos-de-malaria-caem-mais-de-20-no-am-segundo-dados-da-fvs.html>>. Acesso em 17 ago 2016b.

HUANG, R.; XIA, M.; SAKAMURU, S.; ZHAO, J.; SHAHANE, S. A.; ATTENE-RAMOS, M.; ZHAO, T.; AUSTIN, C. P.; SIMEONOV, A. Modelling the Tox21 10K chemical profiles for *in vivo* toxicity prediction and mechanism characterization. **Nature communications**, v.7, n.1042, p.1-10, 2016.

HUDSON, A.T. Atovaquone – a novel broad-spectrum anti-infective drug. *Parasitology Today*, v. 9, p. 66–68, 1993.

JIMENEZ-DIAZ, M.B.; VIERA, S.; FERNANDEZ-ALVARO, E.; ANGULO-BARTUREN, I. Animal models of efficacy to accelerate drug discovery in malaria. **Parasitology**, v.141, n.1, p.93-103, 2013a.

JIMENEZ-DIAZ, M.B.; VIERA, S.; IBANEZ, J.; MULET, T.; MAGAN-MARCHAL, N.; GARUTI, H.; GOMEZ, V.; CORTES-GIL, L.; MARTINEZ, A.; FERRER, S.; FRAILE, M.T.; CALDERON, F.; FERNANDEZ, E.; SHULTZ, L.D.; LEROY, D.; WILSON, D.M.; GARCIA-BUSTOS, J.F.; GAMO, F.J.; ANGULO-BARTUREN, I. A New *in vivo* screening paradigm to accelerate antimalarial drug discovery. **Plos One**, v.8, n.6, 2013b.

JIMENEZ-DIAZ, M.B.; VIERA, S.; FERNANDEZ-ALVARO, E.; ANGULO-BARTUREN I. Animal models of efficacy to accelerate drug discovery in malaria. **Parasitology**, v.141, p.93–103, 2014.

KIJJOA, A.; GIESBRECHT, A.M.; AKISUE, M.K.; GOTTLIEB, O.R.; GOTTLIEB, H.E. 4- Nerolidylcatechol from *Pothomorphe umbellata*. *Planta Medica*, **Journal of Medicinal Plant Research**, v.39, n.1, p.85-87, 1980.

LANGHORNE, J.; BUFFET, P.; GALINSKI, M.; GOOD, M.; HARTY, J.; LEROY, D.; MOTA, M. M.; PASINI, E.; RENIA, L.; RILEY1, E.; STINS, M.; DUFFY, P. The relevance of non-human primate and rodent malaria models for humans. **Malaria Journal**, v.10, n.23, 2011.

LEISEWITZ, A.L.; ROCKETT, K.A.; GUMEDE, B., JONES, M.; URBAN, B.; KWIATKOWSKI, D.P. Response of the Splenic Dendritic Cell Population to Malaria Infection. **Infection and Immunity**, v.72, n.7, p.4233-4239, 2004.

LIMA, E.S.; PINTO, A.C.S.; NOGUEIRA, K.L.; ROCHA E SILVA, L.F.; OLIVEIRA DE ALMEIDA, P.D.; VASCONCELLOS, M.C.; CHAVES, F.C.M.; TADEI, W.P.; POHLIT, A.M. Stability and antioxidante activity of semi-synthetic derivatives of 4-nerolidylcatechol. **Molecules**, v.17, p.178–189, 2013.

- LINO, R.C.; MARTINS, F.I.; FLORENTINO, I.F.; NASCIMENTO, M.V.M.; GALDINO, P.M.; ANDRADE, C.H.; REZENDE, K.R.; MENEGATTI, R.; COSTA, E.A. Anti-inflammatory effect of (E)-4-(3,7-dimethylocta-2,6-dienylamino) phenol, a new derivative of 4-nerolidylcatechol. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, p.9, 2012.
- LOMBARD, M. C.; N'DA, D. D.; TRAN VAN BA, C.; WEIN, S.; NORMAN, J.; WIESNER, L.; VIAL, H. Potent *in vivo* anti-malarial activity and representative snapshot pharmacokinetic evaluation of artemisinin-quinoline hybrids. **Malaria Journal**, v.12, p.71, 2013.
- MACKINNON, M. J. Drug resistance models for malaria. **Acta Tropical**, v. 94, n. 3, p. 207-217, 2005.
- MARQUES, M.M.; COSTA, M.R.; SANTANA FILHO, F.S.; VIEIRA, J.L.; NASCIMENTO, M.T.; BRASIL, L.W.; NOGUEIRA, F.; SILVEIRA, H.; REYES-LECCA, R.C.; MONTEIRO, W.M.; LACERDA, M.V.; ALECRIM, M.G. *Plasmodium vivax* Chloroquine resistance and anemia in the western Brazilian Amazon **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 13, p. 42-47, 2013.
- MASSON-MEYERS, D. S.; ANDRADE, T. A. M.; LEITE, S. N.; FRADE, M. A. C. Cytotoxicity and wound healing properties of *Copaifera langsdorffii* oleoresin in rabbits. **International Journal of Natural Products Science**, v.3, p.10–20, 2013.
- MIGALLY, N. Effect of castor oil and benzoyl benzoate used as a vehicle for antiandrogens on the adrenal cortex. **Archives of Andrology**, v.2, p.365-369, 1979.
- MIZOBUCHI, H.; YAMAKOSHI, S.; OMACHI, S.; OSADA, Y.; SANJOBA, C.; GOTO, Y.; MATSUMOTO, Y. The accumulation of macrophages expressing myeloid-related protein 8 (MRP8) and MRP14 in the spleen of BALB/cA mice during infection with *Plasmodium berghei*. **Experimental Parasitology**, v.138, p.1-8, 2014.
- MOHAMMED, T.; ERKO, B.; GIDAY, M. Evaluation of antimalarial activity of leaves *Acokanthera schimperi* and *Croton macrostachyus* against *Plasmodium berghei* in swiss albino mice. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.14, p.314, 2014.
- MORENO, J.E.; RUBIO-PALIS, Y.; PÁEZ, E.; PÉREZ, E.; SÁNCHEZ, V. Abundance, biting behaviour and parous rate of anopheline mosquito species in relation to malaria incidence in gold-mining areas of southern Venezuela. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 21, p. 339–349, 2007.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunology Methods**, v.65, p.55-63, 1983.
- MUHAMMAD, I.; BEDIR, E.; KHAN, S. I.; TEKWNI, B. L.; KHAN, I. A.; TAKAMATSU, S.; PELLETIER, J.; WALKER, L. A. A new antimalarial quassinoid from *Simaba orinocensis*. **Journal of Natural Products**, v.67, p.772-777, 2004.

NAGELSCHMITZ, J.; VOITH, B.; WENSING, G. First assessment in humans of the safety, tolerability, pharmacokinetics, and *ex vivo* pharmacodynamic antimalarial activity of the new artemisinin derivative artemisone. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.52, p.3085–3091, 2008.

NAKAMURA, C. V.; SANTOS, A. O.; VENDRAMETTO, M. C.; LUIZE, P. S.; DIAS FILHO, B. P.; CORTEZ, D. A. G.; UEDA-NAKAMURA, T. Atividade antileishmania do extrato hidroalcoólico e de frações obtidas de folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n.1, p.61-66, 2006.

NAKAYAMA, G.R.; CATON, M.C.; NOVA, M.P.; PARANDOOSH, Z. Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability *in vitro*. **Journal of Immunological Methods**, v. 204, n. 2, p. 205–208, may. 1997.

NORIEGA, P.; ROPKE, C.D.; BARROS, S.B.M. Pré-formulação de fitoterápicos: Otimização da extração do 4-nerolidilcatecol de *Pothomoprhe umbellata* L. Miq. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.37, n.1, p.69, 2001.

NÚÑEZ, V.; CASTRO, V.; MURILLO, R.; PONCE-SOTO, L.A.; MERFORT, I.; LOMONTE, B. Inhibitory effects of *Piper umbellatum* and *Piper peltatum* extracts towards myotoxic phospholipases A2 from *Bothrops* snake venoms: Isolation of 4-nerolidylcatechol as active principle. **Phytochemistry**, v.66, n.9, p.1017-1025, 2005.

OECD - Organization for Economic Cooperation and Development. Guidelines for the testing of chemicals - Acute oral toxicity - Acute toxic class method, n.423, p.1-14. 2001.

OKONKO, J. E.; NWAFOR, P. A. Antiplasmodial activity of root extract and fractions of *Croton zambesicus*. **Jornal of Ethnopharmacology**, v.121, n.1, p.74-78, 2009.

PAHO - Pan American Health Organization. **Report on the situation of malaria in the Americas, 2008**. Washington, DC. 2009.

PENA, E.A; PINTO, A.C.S.; CHAVES, F.C.M.; COSTA, I.O.V.L.; POHLIT, A.M. Rendimentos de biomassa e de extratos em caapeba (*Pothomorphe peltata* (L.) Miq.), nas condições de Manaus – AM. **1ª Jornada Amazonense de Plantas Mediciniais – 1a JAPM**. Manaus, 16-19 Novembro 2005.

PERAZZO, F.F.; SOUZA, G.H.B.; LOPES, W.; CARDOSO, L.G.V.; CARVALHO, J.C.T.; NANAYAKKARA, N.P.D.; BASTOS, J.K. Anti-inflammatory and analgesic properties of waterethanolic extract from *Pothomorphe umbellata* (Piperaceae) aerial parts. **Journal of Ethnopharmacology**, v.99, n.2, p.215-220, 2005.

PETERS, W. Drug resistance in *Plasmodium berghei* Vincke and Lips, 1948. 3. Multiple drug resistance. **Experimental Parasitology**, v.17, n.1, p.97-102, 1965.

PINTO, A.C.; SILVA, D.H. S; BOLZANI, V.S.; LOPES, N.P.; EPIFÂNIO, RA. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, p. 45-61, 2002.

PINTO, A.C.S. **Estudo Fitoquímico e Biológico de *Pothomorphe peltata* (L.) Miquel (*Piperaceae*)**. Manaus, 156p. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Química de Produtos Naturais, UFAM, 2002.

PINTO, A.C.S.; PESSOA, C.; LOTUFO, L.V.C.; MORAES, M.O.M.; MORAES, M.E.; CAVALCANTI, B.C.; NUNOMURA, S.M.; POHLIT, A.M. *In vitro* cytotoxicity of *Pothomorphe peltata* (L.) Miquel (*Piperaceae*), isolated 4-nerolidylcatechol and its semi-synthetic diacetyl derivative. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.8, p.205-211, 2006.

PINTO, Ana Cristina da Silva. **Desenvolvimento de substâncias semi-sintéticas e bioativas a partir de 4-nerolidilcatecol e dilapiol**. 2008. 296p. Tese (Doutorado em Biotecnologia), Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2008.

PINTO, A.C.S.; SILVA, L.F.R.; CAVALCANTI, B.C.; MELO, M.R.S.; CHAVES, F.C.M.; LOTUFO, L.V.C.; MORAES, M.O.; ANDRADE-NETO, V.F.; TADEI, W.P.; PESSOA, C.O.; VIEIRA, P.P.R.; POHLIT, A.M. New antimalarial and cytotoxic 4-nerolidylcatechol derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**; v.44, p. 2731–2735, 2009.

PINTO, A.C.S.; CHAVES, F.C.M; DOS SANTOS, P.S; NUNEZ, C.V. T. W.P.; P. A.M. *Piper peltatum*: Biomass and 4-nerolidylcatechol production. **Planta Médica**, v. 76, p. 1473–1476, 2010.

POHLIT, A.M.; LIMA, R.B.; FRAUSIN, G.; SILVA, L.F.; LOPES, S.C.; MORAES, C.B.; CRAVO, P.; LACERDA, M.V.; SIQUEIRA, A.M.; FREITAS-JUNIOR, L.H.; COSTA, F.T. Amazonian plant natural products: perspectives for discovery of new antimalarial drug leads. **Molecules**, v.18, n.8, p.9219-9240, 2013.

POHLIT, A.M.; QUIGNARD, E.T.J.; NUNOMURA, S.M.; TADEI, W.P.; HIDALGO, A.F.; PINTO, A.C.S.; SANTOS, E.V.M.; MORAIS, S.K.R.; SARAIVA, R.C.G.; MING, L.C.; ALECRIM, A.M.; FERRAZ, A.B.; PEDROSO, A.C.S.; DINIZ, E.V.; OLIVEIRA, E.C.P.; DON, L.C.; QUEIROZ, M.M.A.; HENRIQUE, M.C.; SANTOS, M.; LACERDA JÚNIOR, O.S.; PINTO, P.S.; SILVA, S.G.; GRAÇA, Y.R. Screening of plants found in the State of Amazonas, Brazil for larvicidal activity against *Aedes aegypti* larvae. **Acta Amazônica**, v.34, n.1, p.97-105, 2004.

RAPPUOLI, R.; ADEREM, A. A 2020 vision for vaccines against HIV, tuberculosis and malária. **Nature**, USA, v. 473, n. 10124, p. 463 – 469, 2011.

REZENDE, K. R.; BARROS, S. B. M. Quantification of 4-nerolidylcatechol from *Pothomorphe umbellata* (*Piperaceae*) in rat plasma samples by HPLC-UV. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.40, n.3, p.373-380, 2004.

REZENDE, L.C.; FUMAGALLI, F.; BORTOLIN, M.S.; DE OLIVEIRA, M.G.; DE PAULA, M.H.; DE ANDRADE-NETO, V.F.; EMERY FDA, S. *In vivo* antimalarial activity of novel 2-hydroxy-3-anilino-1,4-naphthoquinones obtained by epoxide ring-opening reaction. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 23(16):4583-6, 2013.
RICKLEFS, R.E.; OUTLAW, D.C. A molecular clock for malaria parasites. **Science**, v.329, p.226–229, 2010.

REZENDE, L.C.; FUMAGALLI, F.; BORTOLIN, M.S.; DE OLIVEIRA, M.G.; DE PAULA, M.H.; DE ANDRADE-NETO, V.F.; and EMERY FDA, S. *In vivo* antimalarial activity of novel 2-hydroxy-3-anilino-1,4-naphthoquinones obtained by epoxide ring-opening reaction. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.23, n.16, p.4583-6, 2013.

RIECKMANN, K.H.; CAMPBELL, G.H.; SAX, L.J.; and MREMA, J.E. Drug sensitivity of *Plasmodium falciparum*. An *in-vitro* microtechnique. **Lancet**, v.1, n.8054, p.22-23, 1978.

ROCHA, J. A. M.; DE OLIVEIRA, S. B.; PÓVOA, M. M.; MOREIRA, L. A.; KRETTLI, A. U. Malaria vectors in areas of *Plasmodium falciparum* epidemic transmission in the Amazon region, Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 78, p. 872–877, 2008.

ROCHA E SILVA, L.F.; PINTO, A.C.S.; POHLIT, A.M.; QUIGNARD, E.L.; VIEIRA, P.P.; TADEI, W.P.; CHAVES, F.C.; SAMONEK, J.F.; LIMA, C.A.; COSTA, M.R.F.; ALECRIM, M.G.C.; ANDRADE-NETO, V.F. *In vivo* and *in vitro* antimalarial activity of 4-nerolidylcatechol. **Phytotherapy Research**, v.25, n.8, p.1181–1188, 2011.

ROCHA E SILVA, L.F.; MONTOIA, A.; AMORIM, R.C.N.; MELO, M.R.; HENRIQUE, M.C.; NUNOMURA, S.M.; COSTA, M.R.F.; ANDRADE NETO, V.F.; COSTA, D.S.; DANTAS, G.; LAVRADO, J.; MOREIRA, R.; PAULO, A.; PINTO, A.C.; TADEI, W.P.; ZACARDI, S.; EBERLIN, M.N.; POHLIT, A.M. Comparative *in vitro* and *in vivo* antimalarial activity of the indole alkaloids ellipticine, olivacine, cryptolepine and a synthetic cryptolepine analog. **Phytomedicine**, v.20, p.71-76, 2012.

ROCHA E SILVA, L.F.; LIMA, E.S.; VASCONCELLOS, M.C.; ARANHA, E.S.P.; COSTA, D.S.; MUSTAFA, E.V.; MORAIS, S.K.R.; ALECRIM, M.G.C.; NUNOMURA, S.M.; STRUWE, L.; ANDRADE-NETO, V.F.; POHLIT, A.M. *In vitro* and *in vivo* antimalarial activity and cytotoxicity of extracts, fractions and a substance isolated from the Amazonian plant *Tachia grandiflora* (Gentianaceae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.108, n.4, p.501-507, 2013.

ROCHA E SILVA, L. F.; NOGUEIRA, K. L.; PINTO, A. C. S.; KATZIN, A. M.; SUSSMANN, R. A. C.; MUNIZ, M. P.; ANDRADE-NETO, V. F.; CHAVES, F. C. M.; COUTINHO, J. P.; LIMA, E. S.; KRETTLI, A. U.; TADEI, W. P.; POHLIT, A. M. *In vivo* antimalarial activity and mechanisms of action of 4-nerolidylcatechol derivatives. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.59, n.6, p.3270-3280, 2015a.

ROCHA E SILVA, L. F.; RAMALHETE, C.; NOGUEIRA, K. L.; MULHOVO, S.; FERREIRA, M. J. U.; POHLIT, A. M. *In vivo* evaluation of isolated triterpenes and semi-synthetic derivatives as antimalarial agentes. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 102: p.398-402, 2015b.

RODRIGUES, E.R.; CUSTÓDIO, F.C.F.; RAMALHO, A.; NOGUEIRA, N.G.P.; LEITE, F.S.; JANUÁRIO, A.H.; FUSCO-ALMEIDA, A.M.; PIETRO, R.C.L. Action of hexane and dichlorometane partitions of *Pothomorphe umbellata* extracts to clinical isolate *Tricophyton rubrum*. Livro de Resumo. **II Simpósio de Pós-Graduação e Pesquisa**, 2006.

RODRÍGUEZ, J.C.P.; URIBE, G.A.; ARAÚJO, R.M.; NARVÁEZ, P.C.; VALENCIA, S.H. Epidemiology and control of malaria in Colombia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.106, p.114–122, 2011.

ROPKE, C.D.; SAWADA, T.C.H.; DA SILVA, V.V.; MICHALANY, N.S.; BARROS, S.B.M. Photoprotective effect of *Pothomorphe umbellata* root extract against ultraviolet radiation induced chronic skin damage in the hairless mouse. **Clinical and Experimental Dermatology**, v.30, n.3, p.272-276, 2005.

ROPKE, C.D.; SILVA, V.V.; KERA, C.Z.; MIRANDA, D.V.; ALMEIDA, R.L.; SAWADA, T.C.H.; BARROS, S.B.M. *In vitro* and *in vivo* inhibition of skin matrix metalloproteinases by *Pothomorphe umbellata* root extract. **Photochemistry and Photobiology**, v.82, n.2, p.439-442, 2006.

SALA-NETO, F.; DA SILVA, J.S.; PIRES, R.O.; NASCIMENTO, N.P.; BRENNER, C.; BOUBLI, J.P.; TOSTA, C.E. Uma nova metodologia para a avaliação da atividade antimalárica de produtos vegetais: Aplicação ao estudo de 83 espécies da flora brasileira. **Anais. 2º Simpósio de Malária**. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v.25, supl.II, p.92, 1992.

SANTANA FILHO, F.; ARCANJO, A.; CHEHUAN, Y.M.; COSTA, M.R.; MARTINEZ-ESPINOSA, F.E.; VIEIRA, J.L.; BARBOSA, M.G.V.; ALECRIM, W.D.; ALECRIM, M.G.C. Chloroquine-resistant *Plasmodium vivax*, Brazilian Amazon. **Emerging Infectious Diseases**, v.13, n.7, p.1125–1126, 2007.

SANTANA, M.S.; DE LACERDA, M.V.G.; BARBOSA, M.D.G.V.; ALECRIM, W. D.; ALECRIM, M. D. G. C. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in an endemic area for malaria in Manaus: a cross-sectional survey in the Brazilian Amazon. **PLoS One**, v. 4, p. 5259, 2009.

SANTOS-TORRES, Z.E.; SILVEIRA, E.R.; ROCHA E SILVA, L.F.; LIMA, E.S.; DE VASCONCELLOS, M.C.; DE ANDRADE UCHOA, D.E.; FILHO, R.B.; POHLIT, A.M. Chemical composition of *Aspidosperma ulei* Markgr. and antiplasmodial activity of selected indole alkaloids. **Molecules**, v.18, n.6, p.6281-6297, 2013.

SILVA, Luiz Francisco Rocha e. **Susceptibilidade in vitro de isolados de campo de *Plasmodium falciparum* à infusão (chá) de *Artemisia annua* cultivada na Região Amazônica**. 2009. 86f. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical), Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2009.

SILVA, V.V.; ROPKE, C.D.; ALMEIDA, R.L.; MIRANDA, D.V.; KERA, C.Z.; RIVELLI, D.P.; SAWADA, T.C.H.; BARROS, S.B.M. Chemical stability and SPF determination of 20 *Pothomorphe umbellata* extract gel and photostability of 4-nerolidylcatechol. **International Journal of Pharmaceutics**, v.303, n.1-2, p.125-131, 2005.

SILVA, L.; ROCHA, K.; MANEGATTI, R. Pilot pharmacokinetic study of LQFM002: The synthetic analogue of 4-nerolidylcatechol. **Revista de Biotecnologia e Ciência**, v.1, n.1, 2013.

SINKA, M.E. Global distribution of the dominant vector species of malaria, *Anopheles* mosquitoes - New insights into malaria vectors, **InTech**, 2013.

SOARES, L. A. **Preparação e caracterização do complexo de inclusão do 4-nerolidilcatecol de *Pothomorphe Umbellata* (*Piperaceae*) em 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina**. 2007. 107p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2007.

SOARES, L.M.; LEAL, A.F.V.B.; FRACETO, L.F.; MAIA, E.R.; RESCK, I.S.; KATO, M.J.; GIL, E.S.; SOUZA, A.R.; CUNHA, L.C.; REZENDE, K.R. Host-guest system of 4-nerolidylcatechol in 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin: preparation, characterization and molecular modeling. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v.64, p.23-35, 2009.

TADEI, P.W.; THATCHER, R.B. Malaria vectors in the Brazilian Amazon: *Anopheles* of the subgenus *Nyssorhynchus*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 42, p. 82 – 95, 2000.

TAUIL, P.; DANIEL-RIBEIRO, C. Some aspects of epidemiology and control of malaria in Brazil. **Research and Reviews in Parasitology**, v.58, p.163-167, 1998.

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

UJO, B.M.; AMORIM, R.G.; PINTO, A.C.S.; VAUTIER-GIONGO, C.; POHLIT, A.M. RETTORI, D. Determinação da capacidade antioxidante de 4-nerolidilcatecol: um metabólito secundário produzido pela *Pothomorphe peltata*. In: XI Encontro Regional de Biomedicina. Unesp, **Livro de Resumos**, p.1, 2008.

VALADARES, M.C.; REZENDE, K.R.; PEREIRA, E.R.T.; SOUSA, M.C.; GONÇALVES, B.; ASSIS, J.C.; KATO, M.J. Protective effects of 4-nerolidylcatechol against genotoxicity induced by cyclophosphamide. **Food and Chemical Toxicology**, v.45, n.10, p.1975-1978, 2007.

VARGAS, F. S.; DE ALMEIDA, P. D. O.; ARANHA, E. S. P.; BOLETI, A. P. A.; NEWTON, P.; DE VASCONCELLOS, M. C.; VEIGA JUNIOR, V. F.; LIMA, E. S. Biological activities and cytotoxicity of diterpenes from *Copaifera* spp. Oleoresins. **Molecules**, v.20, p.6194-6210, 2015.

VERMANI, K.; GARG, S. Herbal medicines for sexually transmitted diseases and AIDS. **Journal of Ethnopharmacology**, v.80, p.49-66, 2002.

VIANA, V.R.C.; TAVARES, E.S.; ALVES, H.M.; SIMÕES, C.; ALBARELLO, N.; FIGUEIREDO, S.F.L. Propagação *in vitro* de *Pothomorphe umbellata* para a obtenção de clones produtores de 4-nerolidilcatecol. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.81, n.1/2, p.43-47, 2000.

WALKER, N.F.; NADJM, B; WHITTY, C.J.M. Malaria. **Medicine**, v.42, n.2, p.100 – 106, 2014.

WEISLOW, O.S.; KISER, R.; FINE, D.L.; BADER, J.; SHOEMAKER, R.H.; BOYD, M.R. New soluble-formazan assay for HIV-1 ctopathic effects-application to high-flux screening of syntethic and natural-products for AIDS-antiviral activity. **Journal of National Cancer Institute**, v.81, p.577-586.

WHITE, N.J.; STEPNIEWSKA, K.; BARNES, K.; PRICE, R.N.; SIMPSON, J. Simplified antimalarial therapeutic monitoring: using the day-7 drug level? **Trends and Parasitology**, v.24, p.159–163, 2008.

WHITE, N.J., TURNER, G.D., MEDANA, I.M., DONDORP, A.M., DAY, N.P. The murine cerebral malaria phenomenon. **Trends in Parasitology**, v.26, p.11, 2010.

WHO - World Health Organization. Brazil - Health advice for travellers to the 2016 summer olympic and paralympic games. WHO, 2016a. Disponível em: <<http://www.who.int/ith/updates/20160621/en/>>

WHO - World Health Organization. 10 facts on malaria. WHO, 2016b. Disponível em: <<http://www.who.int/features/factfiles/malaria/es/>>

WHO - World Health Organization. Malaria: key facts. WHO, 2016c. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/es/>>

WHO - World Health Organization. New report signals country progress in the path to malaria elimination. WHO, 2016d. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2015/report-malaria-elimination/es/>>

WHO - World Health Organization. World malaria report 2015.

WHO - World Health Organization. World malaria report 2011. Disponível em: <who.int/malaria/world_malaria_report_2011/en/index.html>

WHO - World Health Organization. Field guide for malaria epidemic assessment and reporting. Geneva: World Health Organization; 2004.

WHO - World Health Organization. Wold malaria report 2013. Disponível em:<who.int/malaria/world_malaria_report_2013/en/index.html>

WHO - World Health Organization. World malaria report 2012. Geneva: 2012.

ZALIS, M. Malária resistente desafia a ciência. **Ciência Hoje**, v, 23, n. 135, p. 70 – 71, 1998.

ZUZARTE-LUIS, V.; MOTA, M.M.; VIGÁRIO, A.M. Malaria infections: What and how can mice teach us. **Journal of Immunological Methods**, p.10, 2014.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Equipe Científica

NOME	FORMAÇÃO	TÍTULO	ÓRGÃO	ATIVIDADE
Karla L. Nogueira	Farmacêutica	Graduação	UFAM	Mestranda
Adrian M. Pohlit	Químico	Pós-Doutor	CBA	Orientação
Luiz Franciso R. S.	Farmacêutico	Doutor	CBA	Co-Orientação
Orivaldo Lacerda Jr.	Químico	Doutor	INPA	Síntese química
Magno Perêa	Químico	Mestre	INPA	Análise RMN, LC-MS
Francisco Célio M.C.	Eng. Agrônomo	Doutor	Embrapa	Identificação botânica e coleta
Márcia de Jesus A. S.	Farmacêutica	Mestre	CBA	Avaliação citotóxica

APÊNDICE B – Colaboração em artigos publicados durante o mestrado.

Molecules 2013, 18, 178-189; doi:10.3390/molecules18010178

OPEN ACCESS

molecules

ISSN 1420-3049

www.mdpi.com/journal/molecules

Article

Stability and Antioxidant Activity of Semi-synthetic Derivatives of 4-Nerolidylcatechol

Emerson Silva Lima¹, Ana Cristina Silva Pinto², **Karla Lagos Nogueira²**,
Luiz Francisco Rocha e Silva², Patricia Danielle Oliveira de Almeida¹,
Marne Carvalho de Vasconcellos¹, Francisco Celio Maia Chaves³, Wanderli Pedro Tadei² and
Adrian Martin Pohlit^{2,*}



In Vivo Antimalarial Activity and Mechanisms of Action of 4-Nerolidylcatechol Derivatives

Luiz Francisco Rocha e Silva,^{a,c} **Karla Lagos Nogueira,^{a,b}** Ana Cristina da Silva Pinto,^a Alejandro Miguel Katzin,^d
Rodrigo A. C. Sussmann,^d Magno Perêa Muniz,^a Valter Ferreira de Andrade Neto,^e Francisco Célio Mala Chaves,^f
Julla Penna Coutinho,^{g,h} Emerson Silva Lima,ⁱ Antoniana Ursine Krettl,^{g,h} Wanderli Pedro Tadei,^a Adrian Martin Pohlit^a

National Institute for Amazon Research, Manaus, Amazonas, Brazil^a; Federal University of Amazonas, Manaus, Amazonas, Brazil^b; Center North University, Manaus, Amazonas, Brazil^c; Department of Parasitology, Institute of Biomedical Science, University of São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil^d; Laboratory of Malaria and Toxoplasmosis Biology—Rio Grande do Norte Federal University, Natal, Rio Grande do Norte, Brazil^e; EMBRAPA Amazônia Ocidental, Manaus, Amazonas, Brazil^f; René Rachou Research Center—Fiocruz, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil^g; Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil^h; School of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Amazonas, Manaus, Amazonas, Brazilⁱ

European Journal of Medicinal Chemistry 102 (2015) 398–402



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Medicinal Chemistry

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ejmech>



Short communication

In vivo evaluation of isolated triterpenes and semi-synthetic derivatives as antimalarial agents



Luiz Francisco Rocha e Silva^a, Cátia Ramalhete^b, **Karla Lagos Nogueira^c**, Silva Mulhovo^c,
Maria-José U. Ferreira^b, Adrian Martin Pohlit^{a,*}

^a Amazon Active Principles Laboratory (LAPAM), Department of Technology and Innovation (COTI), National Institute for Amazon Research (INPA), Avenida André Araújo 2936, Bairro Petrópolis, CEP 69067-375, Manaus, Amazonas, Brazil

^b Research Institute for Medicines (iMed.Ulisboa), Faculty of Pharmacy, University of Lisbon, Av. Prof. Gama Pinto, 1649-003, Lisbon, Portugal

^c Mozambican and Ethnoscience Study Center (CEMEC), Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Pedagogic University, Lhangue Campus, Av. de Moçambique, 21402161, Maputo, Mozambique

ANEXOS

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



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

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

Número: 46523-1	Data da Emissão: 06/10/2014 16:05
-----------------	-----------------------------------

Dados do titular

Nome: KARLA LAGOS NOGUEIRA	CPF: 857.743.672-15
----------------------------	---------------------

SISBIO

Observações e ressalvas

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

Táxons autorizados

#	Nível taxonômico	Táxon(s)
1	ESPECIE	Piper peltatum

ANEXO B – Parecer da Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA 029/2013)



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

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

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

INFORMAÇÕES SOBRE O MODELO ANIMAL EXPERIMENTAL

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

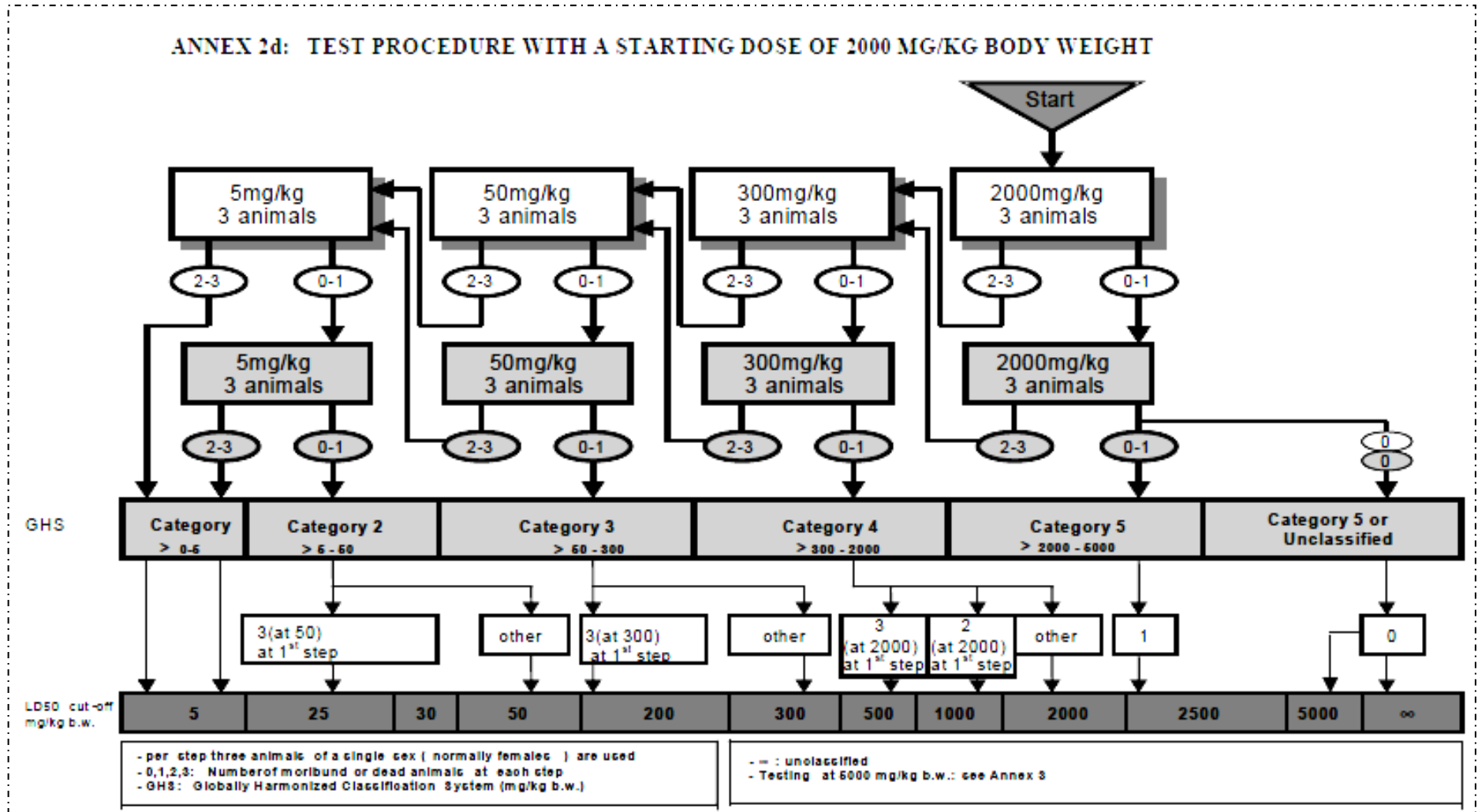
RECOMENDAÇÃO FINAL

Indicação: APROVADO

Data de liberação do Parecer: 04.09.2014.

Atenciosamente,

ANEXO C – Esquema do teste de toxicidade aguda iniciado em dose de 2000 mg/kg/dia.



Fonte: OECD, (2011).