



UFAM

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS-UFAM
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO- PROPESP
PROGRAMA DE POS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA-PPGQ

COMPOSIÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIMALÁRICA DE CIPÓ-TUÍRA [*Bonamia ferruginea* (Choisy) Hallier f.]

EDIZON VEIGA LOPES

Manaus-AM
30 de Abril de 2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS-UFAM
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO- PROPESP
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA-PPGQ

EDIZON VEIGA LOPES

COMPOSIÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIMALÁRICA DE CIPÓ-TUÍRA [*Bonamia ferruginea* (Choisy) Hallier f.]

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química na área de concentração de Química Orgânica.

Orientador: Dr. Adrian Martin Pohlit

Coorientadora: Dra. Zelina Estevam dos Santos Torres

MANAUS-AM
30 de Abril de 2015

EDIZON VEIGA LOPES

COMPOSIÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIMALÁRICA DE CIPÓ-TUÍRA [*Bonamia ferruginea* (Choisy) Hallier f.]

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química na área de concentração de Química Orgânica.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Adrian Martin Pohlit (Presidente)

Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA

Prof. Dr. Anderson Cavalcante Guimarães (Membro externo)

Universidade Federal do Amazonas em Itacoatiara – UFAM

Prof^a Dra. Cecília Verônica Nunez (Membro interno)

Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA

Parecer da banca examinadora: _____

Dedico a Deus por me proporcionar mais uma vitória em minha vida, a minha esposa e filhos por me amparar nos momentos mais difíceis dessa caminhada. Aos meus pais José Antônio da Silva Lopes e Aldinete de Albuquerque Veiga, por não medir esforços para me ajudar em toda a minha vida, e família por me apoiar nas minhas decisões de sempre querer subir mais um degrau, tanto nos estudos como, na vida pessoal.

AGRADECIMENTOS

- A Deus por me fortalecer nos momentos difíceis da vida.
- A minha esposa e filhos por me apoiar e por serem meus portos de refúgio.
- Aos meus pais, irmãos e família pelo apoio e incentivos.
- Ao meu orientador Dr. Adrian Martin Pohlit por acreditar em meus esforços, com paciência e valiosas orientações.
- A minha coorientadora Dra. Zelina Estevam dos Santos Torres, por não medir esforços para me repassar valiosas orientações e pelo conhecimento repassado.
- Ao Prof. Dr. Antônio Carlos Siani da FIOCRUZ pela colaboração e obtenção de análises de HPLC e RMN.
- Ao Dr. Luiz Francisco Rocha e Silva, (Fundação de Medicina Tropical), pela análise *in vitro* e *in vivo* da atividade antiplasmódica dos extratos vegetais desse trabalho.
- Aos órgãos de fomento CNPq e FAPEAM: PRONEX – Rede malária.
- Ao projeto NOSSAPLAM-Núcleo de Novas Safras e Substâncias Ativas em Escala Multigrama de Plantas Amazônicas (FAPEAM/PRONEX), que custeou todo o meu trabalho, bem como as passagens e diárias de viagem.
- Ao Curso de Pós-Graduação em Química (PPGQ) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), pela oportunidade de dar continuidade aos meus estudos.
- Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), por dar suporte para a realização de toda a parte experimental do trabalho.
- À FAPEAM pela bolsa concedida.
- Aos amigos e colegas de turma nas disciplinas tanto no mestrado quanto na graduação, pela troca de conhecimentos durante todos esses anos.
- Aos amigos conquistados no Laboratório de Princípios Ativos da Amazônia-LAPAAM/INPA.
- A todos que ajudaram direta ou indiretamente na conclusão deste trabalho.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.” (José de Alencar).

RESUMO

Bonamia ferruginea (Choisy) Hallier f., popularmente conhecida como cipó-tuíra, é uma liana de pequeno porte com caule e folhas aveludadas de cor marrom, utilizada pela população amazônica no tratamento de malária.

No presente trabalho, foi avaliada a atividade antiplasmódica *in vitro* contra o *Plasmodium falciparum* dos extratos preparados por infusão e decocção de caule e folha, e extratos feitos das mesmas partes da planta, em aparelho de soxhlet com clorofórmio, metanol e água. Os extratos metanólico e aquoso da folha foram testados contra o *Plasmodium berghei* *in vivo* em camundongos. Os extratos não apresentaram atividade antimalárica *in vitro* ou *in vivo*. Também foi realizado um estudo da composição química de *B. ferruginea*. Optou-se pelo fracionamento cromatográfico do extrato clorofórmico do caule, mesmo não sendo considerado ativo (40,6% de inibição a $50 \mu\text{g/mL}^{-1}$) frente ao *P. falciparum* no teste *in vitro*. Do extrato hexânico proveniente do caule de *B. ferruginea*, foram isolados os triterpenos lupeol, friedelina e glutinol. Do extrato clorofórmico do caule, obtiveram-se as cumarinas escopoletina e isofraxidina e o hemiterpeno 2-metil-1, 2, 3, 4-butanotetrol, isolado do extrato acetato de etila do caule de *B. ferruginea*. A caracterização das substâncias isoladas foram realizada por técnicas espectroscópicas como EMAR e RMN uni e bidimensional, além de comparação com dados da literatura.

Palavras-chave: *Bonamia ferrugínea*, *Calycobulus ferrugineus*, *Prevostea ferruginea*, Convolvulaceae, cumarinas, terpenos e isoprenos.

ABSTRACT

Bonamia ferruginea (Choisy) Hallier f., popularly known as cipó-tuíra is a small liana that has velvety, brown-colored leaves and stems. It is used by the Amazonian people in the treatment of malaria.

In vitro antiplasmodial activity against *Plasmodium falciparum* was evaluated for extracts that were prepared by infusion and decoction of stem and leaf, and soxhlet extraction using chloroform, methanol and water as solvents. The methanol and aqueous leaf extracts were tested against *Plasmodium berghei* *in vivo* in mice. All extracts were inactive *in vitro* and *in vivo*.

This work was performed to study the chemical composition of *B. ferruginea*. We opted for the chromatographic fractionation of the chloroform extract, although it was not considered active (40.6% inhibition at 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) against *P. falciparum* in the *in vitro* test. From the hexane extract of the stem of *B. ferruginea* the triterpenes lupeol, friedelin and glutinol were isolated. The chloroform extract of the stem provided the coumarins scopoletin and isofraxidin. A hemiterpene, 2-methyl-1,2,3,4-butanetetrol, was isolated from the ethyl acetate extract of the stem of *B. ferruginea*.

The characterization of the isolated compounds was performed by spectroscopic techniques such as MS and one and two dimensional NMR, and comparison with literature data.

Keywords: *Bonamia ferruginea*, *Calycobulus ferrugineus*, *Prevostea ferruginea*, Convolvulaceae, coumarins, terpenes and isoprene.

LISTA DE FIGURA

Figura 1. Área de prevalência da malária no mundo.....	23
Figura 2. Áreas de transmissão da malária no Brasil e países Amazônicos.	24
Figura 3. Drogas antimaláricas naturais.	26
Figura 4. Drogas antimaláricas sintéticas.	27
Figura 5. Drogas antimaláricas semi-sintéticas.....	28
Figura 6. Distribuição geográfica da família Convolvulaceae.....	30
Figura 7. Alguns terpenoides e cumarinas isolados da família Convolvulácea.	31
Figura 8. Flavonoides e cromanos identificados em Convolvulaceae.....	32
Figura 9. Exemplos de alcalóides e outras substâncias isoladas da família Convolvulaceae.....	33
Figura 10. Substâncias isoladas a partir de <i>Bonamia spectabilis</i>	34
Figura 11. Substâncias isoladas a parti de <i>Bonamia spectabilis</i> .(continuação).....	35
Figura 12. Substâncias identificadas de <i>Bonamia ferruginea</i>	37
Figura 13. Éter propargílico do lupeol.....	38
Figura 14. Atribuições das correlações das metilas no HMBC da friedelina (SFH-C ₂ - A)...	58
Figura 15. Ampliação da região de correlação das metilas do espectro de HMBC da friedelina (SFH-C ₂ - A).	59
Figura 16. Ampliação da região de acoplamento em COSY da friedelina (SFH-C ₂ - A).....	59
Figura 17. Atribuições das correlações das metilas no HMBC do glutinol SFH-C ₂ -B.	63
Figura 18. Ampliação da região de correlação das metilas 23, 23, 25 e 26, no espectro de HMBC da SFH-C ₂ -B.	64
Figura 19. Ampliação da região de correlação das metilas 27, 28, 29 e 30 da SFH-C ₂ -B....	65
Figura 20. Atribuições das correlações das metilas no HMBC do lupeol, (SFH-C ₄ - A).....	69
Figura 21. Ampliação da região de correlação do HMBC dos hidrogênios das metilas 23, 24, 25, e 26 do lupeol (SFH-C ₄ - A).	69
Figura 22. Ampliação da região de correlação do HMBC dos hidrogênios das metilas 27, 28, 29, e 30 do lupeol (SFH-C ₄ -A).	70
Figura 23. Estrutura do anel A e B do lupeol e ampliação da região de acoplamento do espectro de COSY (SFH-C ₄ - A).	70
Figura 24. Estruturas das possíveis cumarinas para a SFC-C ₄ -A.....	73
Figura 25. Atribuições das correlações de HMBC (H), COSY (C) e NOESY (N) da SFC-C ₄ -A (escopoletina).	74
Figura 26. Ampliação do espectro de HMBC da SFC-C ₄ -A (escopoletina).	74

Figura 27. Ampliação do espectro de NOESY da SFC-C ₄ -A (escopoletina).....	75
Figura 28. Possíveis estruturas para a cumarina isolada SFC- C ₅ -B.	77
Figura 29. Estrutura da cumarina SFC-C ₅ -B.....	78
Figura 30. Espectro de HMBC da cumarina SFC-C ₅ -B.....	78
Figura 31. Espectro de COSY da SFC- C ₅ -B.	79
Figura 32. Ampliação da região de acoplamento da SFC- C ₅ -B.	79
Figura 33. Estruturas da isofraxidina e fraxidina.	80
Figura 34. Estrutura da cumarina e atribuições de HMBC, COSY e NOESY da SFC-C ₅ -B.	80
Figura 35. Correlação do espectro de HMBC (H) e COSY (C) da (SFE- C ₂ -C).....	82
Figura 36. Ampliação da região de correlação no HMBC da SFE- C ₂ -C.....	83
Figura 37. Ampliação do espectro de COSY do 2-C-metil-butano-1,2,3,4-tetrol (SFE-C ₂ - C).....	83
Figura 38. Estruturas dos todos os isômeros do 2-metil-butano-1,2,3,4-tetrol.....	84

LISTA DE FLUXOGRAMA

Fluxograma 1. Fracionamento cromatográfico do extrato hexânico do caule (E.H.C).....	45
Fluxograma 2. Fracionamento cromatográfico da fração SFH-C ₁ -C.....	46
Fluxograma 3. Fracionamento cromatográfico da fração SFH-C ₁ -B.....	47
Fluxograma 4. Fracionamento cromatográfico da fração SFH-C ₃ - E. Isolamento da fração SFH-C ₄ -A.....	47
Fluxograma 5. Extração a quente do material vegetal desgraxificado com solventes clorados.	48
Fluxograma 6. Partição líquido- líquido do extrato clorado.....	50
Fluxograma 7. Fracionamento cromatográfico da fração CHCl ₃	50
Fluxograma 8. Fracionamento cromatográfico da SFC-C ₁ - C.....	51
Fluxograma 9. Fracionamento cromatográfico da SFC-C ₂ -A.....	52
Fluxograma 10. Fracionamento cromatográfico da SFC- C ₃ -A.....	52
Fluxograma 11. Fracionamento cromatográfico da SFC- C ₄ -C.....	53
Fluxograma 12. Fracionamento cromatográfico do Extrato do caule em AcOEt (E.C.A) ...	54
Fluxograma 13. Fracionamento cromatográfico da SFE- C ₁ -F.....	54

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Rendimento e teor extrativo dos processos de extração de caule de <i>B. ferruginea</i> em CHCl ₃ , MeOH e H ₂ O.	43
Tabela 2. Rendimento e teor extrativo dos processos de extração de caule de <i>B. ferruginea</i> em hexano, DCM, CHCl ₃ e AcOEt.....	43
Tabela 3. Avaliação de inibição do crescimento <i>in vitro</i> da cepa K1 de <i>P. falciparum</i> pelos extratos de <i>Bonamia ferrugínea</i>	55
Tabela 4. Dados extraídos dos espectros uni e bidimensionais da estrutura da freidelina (RMN-400 MHz/100 MHz; ppm; CDCl ₃).	60
Tabela 5. Dados extraídos dos espectros uni e bidimensionais da estrutura do glutinol (RMN-400 MHz/100 MHz; ppm; CDCl ₃).....	66
Tabela 6. Dados espectrais uni e bidimensionais de RMN do glutinol (RMN-400 MHz/100 MHz; ppm; CDCl ₃).(continuação).....	67
Tabela 7 Dados extraídos dos espectros uni e bidimensionais da estrutura da lupeol (RMN-400 MHz/100 MHz; ppm; CDCl ₃).(continuação)	72
Tabela 8. Dados espectrais para escopoletina (SFC-C ₄ -A) (RMN-300 /75 MHz; CDCl ₃). .	76
Tabela 9. . Dados extraídos dos espectros uni e bidimensionais da estrutura da isofraxidina (RMN-300/75 MHz; CDCl ₃).	81
Tabela 10. Dados comparativos entre os estereoisómeros 2-C-metil eritritol e o 2-C-metil tetrol de Moen et al., (2007).	84
Tabela 11. Dados extraídos dos espectros uni e bidimensionais da estrutura da 2 metil-C-eritritol (RMN -300 MHz/75 MHz; ppm; CDCl ₃).....	85

Lista de anexos

Anexo 1. LC-HRMS de friedelina (SFH-C ₂ - A) em ACN/HCO ₂ H: <i>i</i> -PrOH. Com tempo de retenção do pico em 6,5 min.....	94
Anexo 2. Espectro de RMN de ¹ H da friedelina (SFH-C ₂ - A) em 400 MHz, CDCl ₃	95
Anexo 3. Ampliação da região do hidrogênio 4 (2,22 ppm) de friedelina (SFH-C ₂ - A) em 400 MHz, CDCl ₃	96
Anexo 4. Espectro de ¹³ C da friedelina (SFH-C ₂ - A) em CDCl ₃ (300 MHz).....	97
Anexo 5. Espectro de DEPT 135° da friedelina (SFH-C ₂ - A) em CDCl ₃ (300 MHz).	98
Anexo 6. Espectro de DEPT 90° da friedelina (SFH-C ₂ - A) em CDCl ₃ (300 MHz).....	99
Anexo 7. Espectro de correlação de RMN 2D ¹ H- ¹³ C HSQC da friedelina (SFH-C ₂ - A) em 75/300 MHz, CDCl ₃	100
Anexo 8. Espectro de correlação ¹ H- ¹³ C HMBC da friedelina (SFH-C ₂ A) em CDCl ₃ (¹³ C: 75 e ¹ H-300 MHz).....	101
Anexo 9. Espectro de correlação ¹ H- ¹ H COSY da friedelina (SFH-C ₂ - A) em CDCl ₃ (300 MHz).	102
Anexo 10. HRMS do glutinol (SFH-C ₂ - B) em ACN: <i>i</i> -PrOH (1:1).	103
Anexo 11. Espectro de RMN de ¹ H do glutinol (SFH-C ₂ - B) em CDCl ₃ 400 MHz).....	104
Anexo 12. Espectro de ¹³ C do glutinol (SFH-C ₂ - B) em CDCl ₃ (400 MHz).....	105
Anexo 13. Espectro de correlação ¹ H- ¹³ C HSQC do glutinol (SFH-C ₂ - B) em CDCl ₃ (¹³ C:100 MHz e ¹ H:400 MHz).....	106
Anexo 14. Espectro de correlação ¹ H- ¹³ C HMBC do glutinol (SFH-C ₂ - B) em CDCl ₃ (¹³ C:75 MHz e ¹ H:300 MHz).....	107
Anexo 15. Espectro de correlação em 2D 1H-1H COSY do glutinol (SFH-C ₂ - B) em CDCl ₃ (300 MHz).	108
Anexo 16. LC-HRMS do lupeol (SFH-C ₄ - A) em metanol (infusão direta).	109
Anexo 17. Espectro de RMN de ¹ H do lupeol (SFH-C ₄ - A) em CDCl ₃ (400 MHz).....	110
Anexo 18. Espectro de RMN de ¹³ C do lupeol (SFH-C ₄ - A) em CDCl ₃ (300 MHz).....	111
Anexo 19. Espectro de DEPT 90° do lupeol (SFH-C ₄ - A) em CDCl ₃ (300 MHz).....	112
Anexo 20. Espectro de DEPT135° do lupeol (SFH-C ₄ - A) em CDCl ₃ (300 MHz).....	113
Anexo 21. Espectro de correlação ¹ H- ¹³ C HSQC do lupeol (SFH-C ₄ - A) em CDCl ₃ (¹³ C:75 e ¹ H:300 MHz).	114
Anexo 22. Espectro de correlação ¹ H- ¹³ C HMBC do lupeol (SFH-C ₄ - A) em CDCl ₃ (¹³ C:75 e ¹ H:300 MHz).....	115
Anexo 23. Espectro de correlação em 2D ¹ H- ¹ H COSY do lupeol (SFH-C ₄ - A) em CDCl ₃	

(300 MHz).	116
Anexo 24. LC-HRMS da escopoletina (SFC-C ₄ - A) em metanol.	117
Anexo 25. Espectro de RMN de ¹ H da escopoletina (SFC-C ₄ - A) em CDCl ₃ (300 MHz)..	118
Anexo 26. Espectro de RMN de ¹³ C da escopoletina (SFC-C ₄ - A) em CDCl ₃ (300 MHz).	119
Anexo 27. Espectro de correlação ¹ H- ¹³ C HSQC da escopoletina (SFC-C ₄ - A) em CDCl ₃ (¹³ C:75 e ¹ H:300 MHz).	120
Anexo 28. Espectro de correlação ¹ H- ¹³ C HMBC da escopoletina (SFC-C ₄ - A) em CDCl ₃ (¹³ C:75 e ¹ H:300 MHz).	121
Anexo 29. Espectro de correlação ¹ H- ¹ H COSY da escopoletina (SFC-C ₄ -A) em CDCl ₃ (300 MHz).	122
Anexo 30. Espectro de correlação ¹ H- ¹ H NOESY da escopoletina (SFC-C ₄ - A) em CDCl ₃ (300 MHz).	123
Anexo 31. LC-HRMS da isofraxidina (SFC- C ₅ -B) em metanol.	124
Anexo 32. Espectro de RMN de ¹ H da isofraxidina (SFC- C ₅ -B) em CDCl ₃ (300 MHz).	125
Anexo 33. Espectro de RMN de ¹³ C da isofraxidina (SFC- C ₅ -B) em CDCl ₃ (300 MHz).	126
Anexo 34. Espectro de correlação ¹ H- ¹³ C HSQC da isofraxidina (SFC- C ₅ -B) em CDCl ₃ (¹³ C:75 e ¹ H:300 MHz).	127
Anexo 35. Espectro de correlação ¹ H- ¹³ C HMBC da isofraxidina (SFC- C ₅ -B) em CDCl ₃ (¹³ C:75 e ¹ H:300 MHz).	128
Anexo 36. Espectro de correlação ¹ H- ¹ H COSY da isofraxidina (SFC- C ₅ -B) em CDCl ₃ (300 MHz).	129
Anexo 37. LC-HRMS do 2-C-metil-eritritol (SFC- C ₅ -B) em acido fórmico.	130
Anexo 38. Espectro de RMN de ¹ H do 2-C-metil-eritritol (SFC- C ₅ -B) em CDCl ₃ (300 MHz).	131
Anexo 39. Espectro de RMN de ¹³ C do 2-C-metil-eritritol (SFC- C ₅ -B) em CDCl ₃ (300 MHz).	132
Anexo 40. Espectro de correlação ¹ H- ¹³ C, HSQC do 2-C-metil-eritritol (SFC-C ₅ -B) em CDCl ₃ (¹³ C:75 e ¹ H:300 MHz).	133
Anexo 41. Espectro de correlação ¹ H- ¹³ C, HMBC do 2-C-metil-eritritol (SFC-C ₅ -B) em CDCl ₃ (¹³ C:75 e ¹ H:300 MHz).	134
Anexo 42. Espectro de correlação ¹ H- ¹ H, COSY do 2-C-metil-eritritol (SFC-C ₅ -B) em CDCl ₃ (300 MHz).	135

LISTA DE ABREVEATURA

1D- unidimensional

2D- bidimensional

AcOEt- acetato de etila

ACT- *artemisinin-based combined therapy*

APCI- *atmospheric pressure chemical ionization*

C₆H₁₄ - hexano

CA-LTQPN- Central Analítico do Laboratório Temático de Química de Produtos Naturais

CC-cromatografia em coluna

CCD- cromatografia em camada delgada

CHCl₃- clorofórmio

COSY- *correlation spectroscopy*

CP₁As- extrato aquoso do caule do ponto de coleta 1 em aparelho de soxhlet

CP₁Ms- extrato metanolico da folha do ponto de coleta 1 em aparelho de soxhlet

CP₂ Ai- extrato aquoso do caule do ponto de coleta 2 por infusão

CP₂Ac- extrato aquoso do caule do ponto de coleta 2 por decocção

CP₂Cl_s- extrato clorofórmico do caule do ponto de coleta 2 em aparelho de soxhlet

DCM - diclorometano

DEPT- *distortionless enhancement by polarization transfer*

DMSO- dimetilsulfóxido

E.C.A- extrato do caule em acetato de etila

E.C.C- extrato do caule em clorofórmio

E.C.D-C- extrato do caule em diclorometano e clorofórmio

E.C.DCM-1- extrato do caule em diclorometano 1

E.C.DCM-2- extrato do caule em diclorometano 2

E.H.C- extrato hexânico do caule

EMBRAPA-AM- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-Amazonas

FNT- α - fator de necrose tumoral α

FP₁As- extrato aquoso da folha do ponto de coleta 1 em aparelho de soxhlet

FP₁Ms- extrato metanolico da folha do ponto de coleta 1 em aparelho de soxhlet

FP₂Ac- extrato aquoso da folha do ponto de coleta 2 por decocção

FP₂Ai- extrato aquoso da folha do ponto de coleta 2 por infusão

FP₂Cl_s- extrato clorofórmico da folha do ponto de coleta 2 em aparelho de soxhlet

Fr. A..E.C- fração acetato de etila do extrato clorado

Fr. M/H.E.C- Fração hidroalcoólica do extrato clorado

Fr.C.E.C- fração clorofórmica do extrato clorado

Fr.H.E.C-fração hexânica do extrato clorado

h- altura

HMBC- *heteronuclear multiple bond correlation*

HSQC- *heteronuclear single quantum correlation*

INPA- Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

IV- infravermelho

LC-MS- *liquid chromatography coupled to mass spectrometry*

MeOH- metanol

MVCD- material vegetal do caule desgraxificado

MVCD-C- material vegetal do caule desgraxificado e extraído com clorados

NOESY- *nuclear Overhauser enhancement spectroscopy*

OMS- Organização Mundial da Saude

RMN de ¹³C- ressonância magnética nuclear de carbono -13

RMN de ¹H- ressonância magnética nuclear de proton

RMN- ressonância magnética nuclear

SFC-C₁ - sub-fração proveniente da fração CHCl₃ (Fr. CHCl₃) do caule

SFC-C₂ - sub-fração proveniente da SFC-C₁

SFC-C₃ - sub-fração extraída da SFC-C₂

SFC-C₄ – A-sub-fração concebida da SFC-C₃, escopoletina

SFC-C₅ – B-sub-fração concebida da SFC-C₄, isofraxidina

SFE-C₁-C- sub-fração obtida do fracionamento do extrato acetato de etila (E.C.A)

SFE-C₂-C sub-fração proveniente da SFE-C₁ do de extrato acetato de etila (E.C.A), 2-C-
metil eritritol

SFH-C₁- sub-fração obtida do fracionamento cromatográfico do extrato hexânico (E.H)

SFH-C₂-A- sub-fração retirada da SFH-C₁ do (E.H), friedelina

SFH-C₂-A- sub-fração retirada da SFH-C₁ do (E.H), glutinol

SFH-C₃- sub-fração proveniente da SFH-C₁ do (E.H)

SFH-C₄- A-sub-fração obtida da SFH-C₃ do (E.H), lupeol

UFAM- Universidade Federal do Amazonas

UV- ultravioleta

WHO- *World Health Organization*

WRAIR- *Walter Reed Army Institute of Research*

Φ- diâmetro

Sumário

1. INTRODUÇÃO	21
2. REVISÃO BIBLIOGRAFICA	22
2.1. Períodos de transmissibilidade	22
2.2. Sintomas da malária.....	22
2.3. A malária no mundo.....	23
2.1.3. A malária no Amazonas.....	24
2.2. Desenvolvimento de drogas antimaláricas.....	25
2.3. A família Convolvulaceae	30
2.4. Estudos químicos anteriores do gênero Bonamia.....	33
2.5. Levantamento bibliográfico sobre Bonamia ferruginea.....	35
2.5.1. Descrição botânica e uso medicinal de Bonamia ferruginea.....	36
2.5.2. Distribuição Geográfica.....	36
2.5.3. Uso na cosmética.....	36
2.5.4. Estudos químicos anteriores de (Bonamia ferruginea)	36
3. OBJETIVO	38
3.1. Geral.....	38
3.2. Específicos.....	38
4. METODOLOGIA.....	38
4.1. Materiais e métodos	38
4.1.1. Equipamentos	38
Os seguintes aparelhos foram utilizados para a condução dos trabalhos.....	38
4.2. Cromatografia.....	39
4.2.1. Cromatografia em Coluna (CC).....	39
4.2.2. Cromatografia em camada delgada (CCD).....	40
4.3. Métodos espectroscópicos.....	40

4.3.1. Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	40
4.3.2. Cromatografia líquida acoplada ao espectro de massa LC-MS.....	40
4.3.3. Cromatografia líquida de alta eficiência CLAE.	40
4.4. Solventes	41
4.5. Coleta e identificação de material.....	41
4.6. Secagem e moagem do material.	41
4.7. Preparação dos extratos.....	41
4.7.1. Preparação dos extratos por soxhlet.....	42
4.7.2. Infusão.....	42
4.8. Rotaevaporação.....	42
4.9. Testes biológicos.....	44
4.9.2. Testes antiplasmódicos in vivo	44
4.10. Extração por maceração (desgraxificação).....	45
4.11. Fracionamento do extrato hexânico do caule (E.H.C).....	45
4.12. Purificação da SFH-C ₁ -C	45
4.13. Fracionamento da SFH-C ₁ -B.....	46
4.14. Purificação da SFH-C ₃ -E	47
4.15. Nova extração	48
4.16. Extração com AcOEt (E.C.A).....	49
4.17. Fracionamento por partição líquido-líquido do extrato do caule extraído com clorados (E.C.D-C).....	49
4.18. Fracionamento cromatográfico da Fr.C.E.C.....	50
4.19. Fracionamento cromatográfico da SFC-C ₁ -C.....	51
4.20. Purificação da SFC-C ₂ -A	51
4.22. Purificação da fração SFC-C ₄ -C.....	53
4.24. Purificação da fração SFE- C ₁ - F.....	54
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.	55
5.1. Teste in vitro para atividade antiplasmódica.....	55

5.2.	Testes in vivo.	56
5.3.	Identificação das substâncias isoladas do extrato E.H.C.	56
5.3.1.	Identificação estrutural da SFH-C ₂ -A.	56
5.3.2.	Elucidação estrutural de SFH-C ₂ - B	62
5.3.3.	Elucidação estrutural da SFH-C ₄ - A.	68
5.3.4.	Elucidação estrutural da SFC-C ₄ -A.	73
5.3.5.	Elucidação estrutural da SFC-C ₅ -B.	77
5.3.6.	Elucidação estrutural da SFE-C ₂ -C.	82
6.	CONCLUSÃO	86
7.	REFERENCIA BLIBIOGRAFICA.	87
8.	ANEXOS	93

1. INTRODUÇÃO

Há muito tempo a população mundial vem sofrendo com doenças parasitárias, a saber, amebíase, doença de Chagas, giardíase, leishmaniose, toxoplasmose, tricomoníase e malária, sendo essa última uma das mais preocupantes. O nome malária vem do italiano "*male ária*", ou seja, ar ruim, contaminado (Brasil, 2004). Esse nome deu-se porque antigamente, as pessoas acreditavam que se contaminavam ao respirar o odor dos pântanos (Oliveira e Szczerbowski, 2009; Padilha e Sales, 2011). Em 1880, o médico francês Laveran que trabalhava na Argélia, identificou o causador desta doença infecto-parasitária, parasita do gênero *Plasmodium*. Posteriormente, em 1897, Sir Ronald Ross, médico militar inglês servindo na Índia, demonstrou que os mosquitos do gênero *Anopheles* são seus transmissores (Brasil, 2004).

As pesquisas vêm desenvolvendo medicamentos que combatem a malária. Mas com todas essas novas drogas antimaláricas o parasita vem desenvolvendo resistência frente às drogas existentes mesmo que esse tratamento seja realizado na forma de terapias combinadas como são prescritos os ACTs (terapias combinadas a base de artemisinina), que são as drogas de primeira linha no mundo. Diversos antimaláricos têm suas origens em plantas medicinais. As plantas medicinais e seus derivados consistiram durante muito tempo a base da terapêutica e, atualmente, cerca de 25% dos fármacos utilizados são de origem vegetal, enquanto 50% são de origem sintética, mas relacionados aos princípios isolados de plantas medicinais

Isto deve - se, em parte, à grande variedade de espécies (250 - 500 mil) de plantas existentes na flora mundial, muitas com importantes propriedades terapêuticas. Nos últimos anos, tem-se verificado um grande aumento nos estudos que comprovam o que se conhece empiricamente, visto que a medicina popular é rica em exemplos de plantas utilizadas para diversos fins, que substituem, muitas vezes, a prescrição médica. Acreditam-se que cerca de 80% da população mundial use as plantas como primeiro recurso terapêutico (Ferreira et al., 2012).

Há muito tempo já vem sendo desenvolvidas pesquisas na qual o objeto de estudo são plantas da floresta Amazônica. Várias instituições de ensino e pesquisa vem desenvolvendo tal trabalho a fim de melhorar a vida da população. Com isso as mesmas procuram estudar mais aprofundadamente as propriedades biológicas e a composição química. Nesse intuito, no presente trabalho, estudou-se uma das plantas utilizadas pelos ribeirinhos no combate à malária que tem o nome popular de cipó-tuíra (*Bonamia ferruginea* (Choisy) Hallier f.).

2. REVISÃO BIBLIOGRAFICA

2.1. Malária, parasita e vetores.

A malária é causada por protozoários do gênero *Plasmodium*. O parasita é transmitido através da picada da fêmea do mosquito do gênero *Anopheles*. A ocorrência mais abundante do vetor é nos horários crepusculares, ao entardecer e ao amanhecer, todavia, são encontrados infectando durante todo o período noturno, porém em menor quantidade em algumas horas da noite. A doença não é contagiosa. Raramente pode ocorrer a transmissão por meio de transfusão de sangue contaminado ou do uso compartilhado de seringas contaminadas. Mais rara ainda é a transmissão congênita (Brasil, 2009). O período de incubação da malária varia de acordo com a espécie de plasmódio, para o *P. falciparum*, é de 8 a 12 dias; para o *P. vivax*, de 13 a 17 dias; e *P. malariae*, de 18 a 30 dias. (Brasil, 2009).

2.1. Períodos de transmissibilidade

O mosquito é infectado ao sugar o sangue de uma pessoa com gametócitos de *Plasmodium* circulantes. Os gametócitos surgem na corrente sanguínea, em período que varia de poucas horas para o *P. vivax* é de 7 a 12 dias para o *P. falciparum*. Para malária por *P. falciparum*, o indivíduo pode ser fonte de infecção por até 1 ano; *P. vivax*, até 3 anos; e *P. malariae*, por mais de 3 anos, caso não seja adequadamente tratado (Brasil, 2009).

2.2. Sintomas da malária.

A malária é uma doença que degrada o ser humano rapidamente com os sintomas de febres cíclicas de 48 ou 72 h dependendo da espécie de *Plasmodium* infectador (glóbulos vermelhos são destruídos pelos esquizontes e merozoítos são libertados no sangue). Isso ocorre em 3 fases:

(1) fase fria dura entre 15 min à 1 h

(2) fase quente dura entre 2-6 h. Estado febril de 40°C, convulsões e dano cerebral epitérmico. Possíveis efeitos de hipotensão, tosse, dor de cabeça e costas, náuseas, dores abdominais, vômitos, diarreia e estado de inconsciência.

(3) fase úmida – baixa de febre e fadiga/sonolência

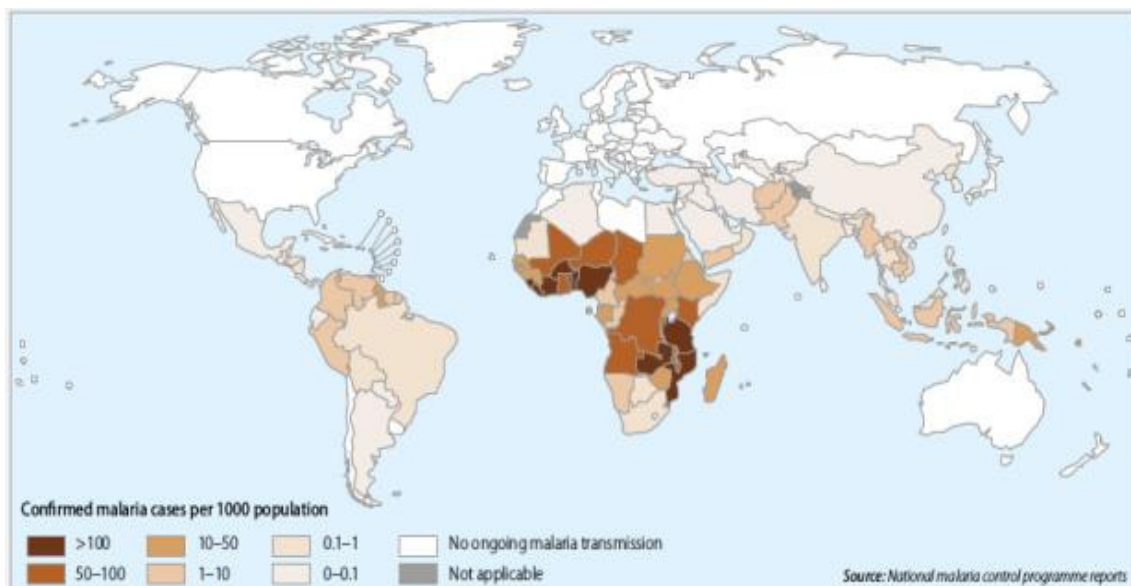
A febre é provocada pela produção de fator de necrose tumoral- α (FNT- α) pelos macrófagos (glóbulos brancos), que circulam no sangue. Esses danos causados no ser humano podem levar à morte por complicações posteriores como doenças microvasculares, e efeitos secundários da malária cerebral (Brasil, 2008).

2.3. A malária no mundo.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a transmissão da malária ocorre em todas as seis regiões do mundo (WHO, 2014). Globalmente, cerca de 3,2 bilhões de pessoas correm o risco de se infectar com a malária, e 1,2 bilhão estão em alto risco (> 1 em 1.000 chances de contrair malária em um ano). De acordo com as últimas estimativas, 198 milhões de casos de malária ocorreram globalmente em 2013 (faixa de incerteza 124-283 milhões) e a doença levou a 584 mil mortes (intervalo de incerteza 367-755 mil) (Figura 1).

O fardo é mais pesado na Região Africana da OMS. Estima-se que 90% de todas as mortes nessa região ocorrem devido à malária. Dessas mortes, 78% são de crianças com menos de 5 anos de idade. Nessa região, cerca de 40% das despesas com saúde pública, são com em decorrência da malária. No período de 2012 a 2013, houve uma pequena diminuição dos casos de infestação e mortalidade mundialmente, já que em 2012 ocorreram 207 milhões de casos de infecção e 627 mil mortes (WHO, 2013).

Figura 1. Área de prevalência da malária no mundo.



Fonte: WHO, (2014).

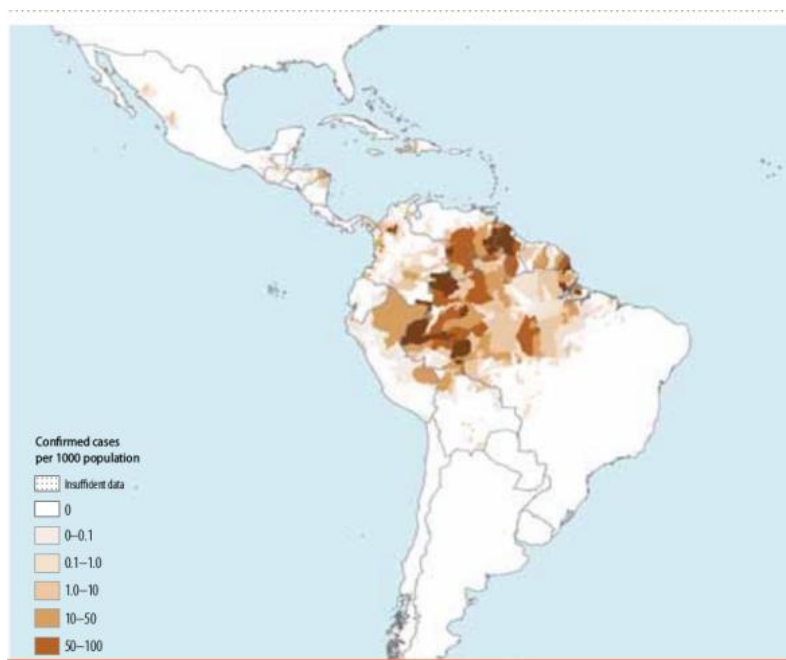
2.3.1. A malária no Brasil

No Brasil, três espécies de parasitas estão associadas à malária em seres humanos: *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae*. Os demais parasitas humanos nunca foram registrados por transmissão autóctone no Brasil, estando restrita a determinadas regiões do continente Africano e o sudeste da Ásia (*P. cynomolgi* e *P. knowlesi*) (Brasil, 2010). O foco de ocorrência

dos parasitas transmissores da malária no Brasil está na região norte do país como mostra a Figura 2.

De acordo com a OMS (WHO, 2013), o Brasil é um dos países que devem conseguir reduzir em 75% os casos de malária até o final de 2015. O país é responsável por 52% dos casos da doença e 59% das mortes registradas dessa doença nas Américas. Por esse motivo vem-se buscando novos avanços nas formas de prevenção e tratamento desse parasita, que aflige a população da região amazônica. A doença ocorre mais frequentemente em um determinado período. Na Amazônia Legal, a transmissão é instável e geralmente em focos isolados, alcançando picos principalmente após o período chuvoso do ano (Xavier e Rebelo, 1999).

Figura 2. Áreas de transmissão da malária no Brasil e países Amazônicos.



Fonte: WHO, (2014).

2.1.3. A malária no Amazonas

Em 2010, no Estado do Amazonas, quinze municípios estavam entre os que contribuíram com 80% dos casos de malária na Amazônia Legal (Manaus, São Gabriel da Cachoeira, Eirunepé, Atalaia do Norte, Coari, Barcelos, Tabatinga, Manicoré, Tefé, Lábrea, Borba, Tapauá, Rio Preto da Eva, Itacoatiara e Guajará) (Brasil, 2011).

Houve diminuição de 28,3% do número de casos de malária por *P. falciparum* no estado enquanto na Amazônia Legal houve um decréscimo de 1,1%. A proporção de *P. falciparum* no estado foi de 12,2% e nos 15 municípios acima mencionados de 11,8%. Eirunepé, Barcelos, Atalaia do Norte, Borba e São Gabriel da Cachoeira apresentaram aumento de malária por *P. falciparum* (Brasil, 2011). Em grande parte desses municípios, a população utiliza medicamentos retirados da floresta para o combate de algumas doenças entre elas a malária. Dentre as várias ervas utilizadas para o combate dessa doença, as principais plantas utilizadas são: boldo, figatíl, quina, picão, cipó-tuíra, dentre outras (Reiners, 2010).

2.2. Desenvolvimento de drogas antimaláricas.

Durante um grande período de tempo, a civilização vem desenvolvendo medicamentos que ajudam no combate à malária. Os primeiros registros de tratamento da malária são do período da Era Cristã. Os chineses já tratavam a malária com *Ch'ang shan*, uma preparação que consistia na raiz pulverizada da planta *Dichroa febrifuga*, cujo princípio ativo é o alcaloide febrifugina (1, Figura 3), (Koepfly et al., 1947, 1949).

O uso da quina como febrífugo, foi observado entre os ameríndios do Peru por volta de 1600, e daí, foi levada por mercadores e jesuítas até a Europa. Sua eficácia é indiscutível, como é até hoje. Porém, o conteúdo e princípio ativo (quinina) variava de partida para partida de casca em infusão devido à existência de várias espécies e variedade da *Cinchona*. Em consequência, as vezes o produto funcionava, as vezes não. Além disso, a quina foi usada no princípio contra todo tipo de febres e ela só funcionava contra a febre malária. A variedade na eficácia da quina abriu a primeira brecha para o primeiro grande conflito: defensores versus inimigos da quina (Camargo, 1995; Agosta, 1997). Em 1820, os químicos franceses Pelletier e Caventou isolaram a substância ativa da casca da quina, o alcalóide quinina (2, Figura 3), (Gomes, 1990).

O composto azul de metileno (4, Figura 4) foi utilizado em 1891 também para tratar a malária em dois pacientes infectados, que comprovou sua atividade. Tornou-se o primeiro fármaco sintético usado no combate da malária (Oliveira e França, 2011).

Em 1925, investigadores alemães modificaram a estrutura do azul de metileno e sintetizaram a pamaquina ou plasmocina (5, Figura 4), sendo este o primeiro fármaco capaz de prevenir recidivas da malária *vivax*. Sete anos depois, em 1932, foi desenvolvida a mepacrina (6, Figura 4), também designada atebrina ou quinacrina, ativa contra os estágios sanguíneos do *P. falciparum* (Greenwood, 1995 *apud* Karaman, 2013).

Foi precisamente a partir da II Grande Guerra Mundial que surgiram os maiores avanços na pesquisa e desenvolvimento de novas substâncias ativas por parte das principais potências econômicas e militares da época como: cloroquina (**7**, Figura 4, Slater, 1993), amodiaquina (**8**, Figura 4), primaquina (**9**, Figura 4), sulfadoxina-e-pirimetamina (**10**, Figura 4). O desenvolvimento de drogas antimaláricas vem crescendo gradativamente. Na década de 70 em plena Guerra do Vietnam, o Departamento de Defesa Norte-Americano, também através do *Walter Reed Army Institute of Research* (WRAIR), concebeu a mefloquina (**11**, figuras 4), um análogo da quinina, para dar resposta à resistência do parasita aos fármacos existentes na época (Vale et al., 2005).

Em 1972 foi isolado o sesquiterpeno artemisinina (**3**, Figura 3) a partir da *Artemisia annua*. Essa planta já era usada na China há cerca de 2000 anos para o tratamento de febres (Klayman, 1985). Muito embora a artemisinina seja utilizada clinicamente para o tratamento da malária, o seu uso terapêutico é limitado devido a sua baixa solubilidade, tanto em óleo quanto em água. Assim, muitos derivados semi-sintéticos têm sido desenvolvidos para melhorar a eficiência e solubilidade como: artesunato (**12**, Figura 5), artemeter (**13**, Figura 5), diidroartemisinina (**14**, Figura 5) e arte-éter (**15**, Figura 5) (Franco et al., 2009).

Figura 3. Drogas antimaláricas naturais.

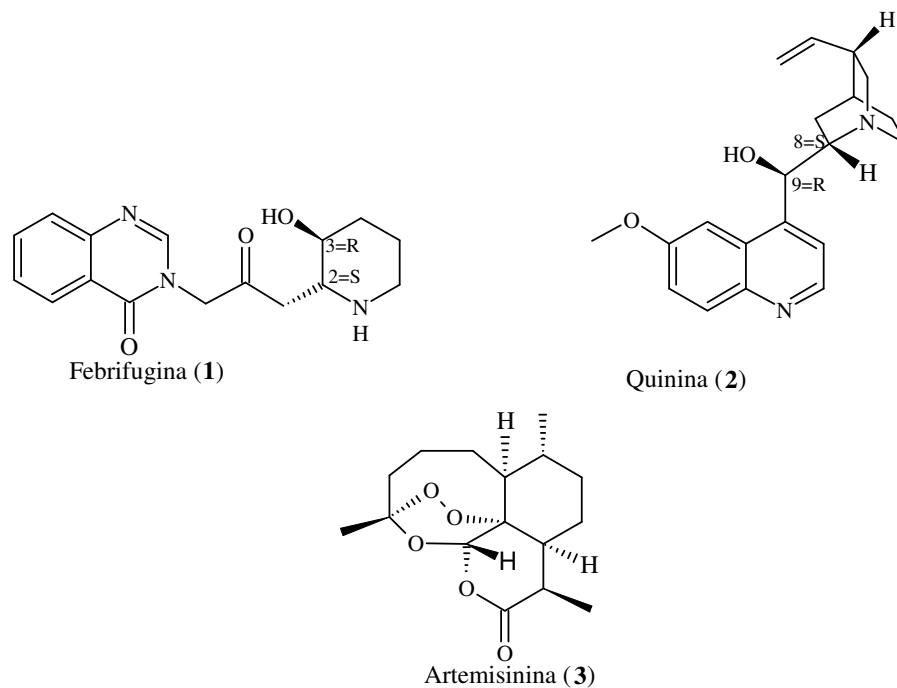


Figura 4. Drogas antimaláricas sintéticas.

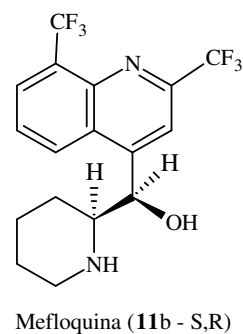
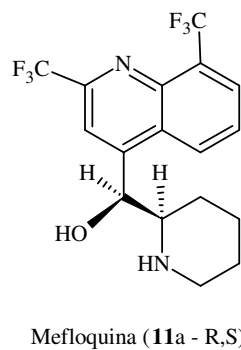
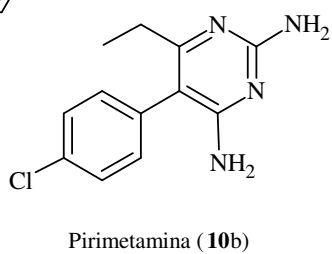
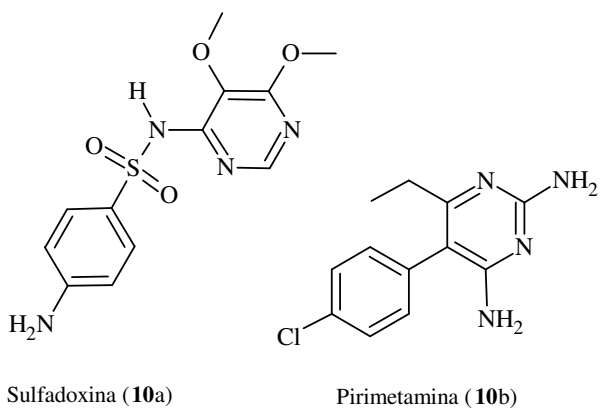
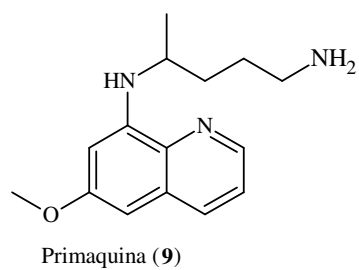
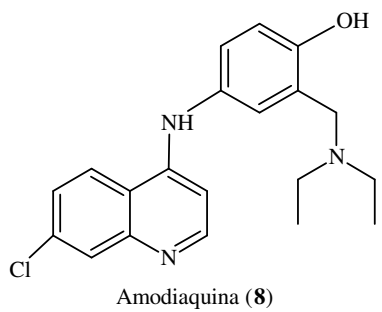
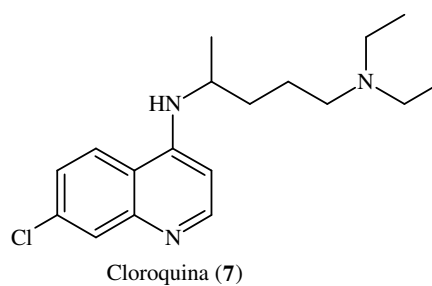
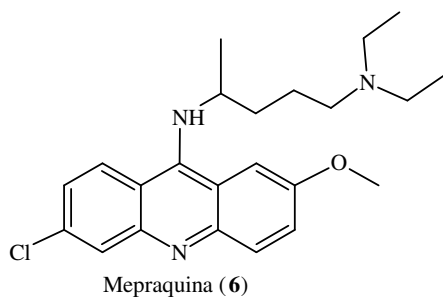
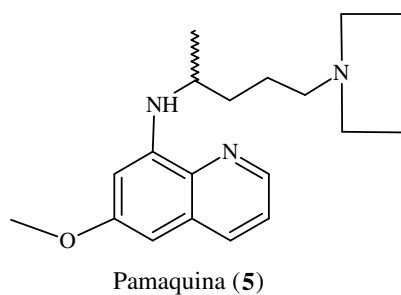
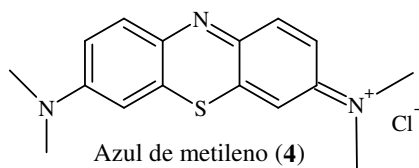
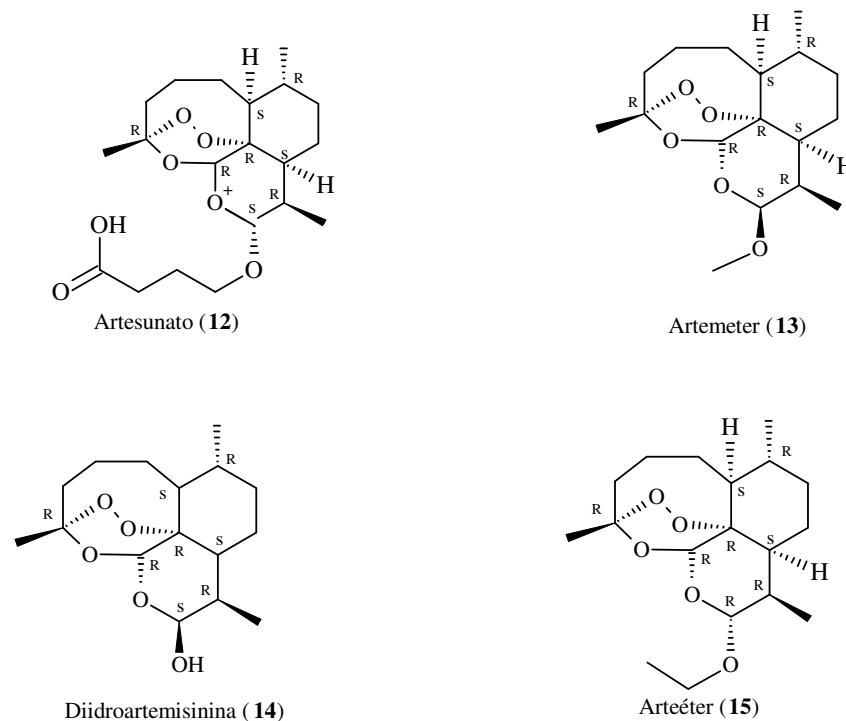


Figura 5. Drogas antimaláricas semi-sintéticas.



A resistência aos antimaláricos tem sido documentada principalmente pelos parasitos *P. falciparum*, *P. malariae* e *P. vivax*. O *P. falciparum* vem adquirindo resistência a todos os antimaláricos utilizados atualmente como: amodiaquina (8), cloroquina (7), mefloquina (11), quinina (2) e sulfadoxina-pirimetamina (10a, 10b) e, mais recentemente, a derivados de artemisinina. As distribuições geográficas e as taxas de propagação da resistência variaram consideravelmente (WHO, 2010).

A resistência do *Plasmodium falciparum* à cloroquina tornou-se o maior problema da saúde pública a nível mundial. Os primeiros casos de resistência foram relatados em 1957 na fronteira entre a Tailândia e o Camboja e na Colômbia. Em 1978, foram encontrados pela primeira vez casos de resistência na África e desde então, foi se espalhando por quase todo o mundo. Em 1973, a Tailândia se tornou o primeiro país a substituir a cloroquina (7) como antimalárico de primeira linha. Mais tarde outros países da Ásia e América do Sul fizeram o mesmo. Em 1993, África, começando no Malawi, substituiu a cloroquina no tratamento de *P. falciparum* (Talisuna, 2004 *apud* Freitas, 2010; Bloland et al., 1998).

O *P. vivax* desenvolveu resistência rapidamente à sulfadoxina-pirimetamina (10a, 10b)

em muitas áreas. A resistência desses parasitas à cloroquina está limitada em grande parte para a Indonésia, Papua Nova Guiné, Timor-Leste e outras partes da Oceania. Há também relatos sobre a resistência do *P. vivax* no Brasil e Peru. O *P. vivax* permanece sensível à cloroquina na maior parte do Sudeste da Ásia, o subcontinente indiano, a península coreana, Oriente Médio, África do Nordeste e América do Sul e Central (WHO, 2010).

Inicialmente a malária era tratada com derivados de artemisinina como tratamento monoterápicos, mas com o aumento de casos de resistência do parasita, muitos países já eliminaram essa forma de tratamento, mas não todos. Em dezembro de 2014, o *marketing* de derivados da artemisinina como monoterápicos foi permitido por apenas oito países: Angola, Cabo Verde, Colômbia, Guiné Equatorial, Gâmbia, São Tomé e Príncipe, Somália e Suazilândia. Além disso, a partir de dezembro de 2014, 24 empresas farmacêuticas, metade localizada na Índia, continuaram a comercializar monoterapias orais de artemisinina (WHO, 2014).

Atualmente, a Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda o uso da terapêutica de combinação baseada na artemisinina (*artemisinin-based combination therapy*, ACT) para tratamento da malária não-complicada em áreas de resistência a múltiplos fármacos. A artemisinina e os seus derivados artesunato (**12**), arteméter (**13**), diidroartemisinina (**14**) produzem o rápido desaparecimento da parasitemia e a rápida resolução da sintomatologia (WHO, 2014).

Para evitar a resistência, a OMS recomenda as seguintes combinações: arteméter + lumefantrina; artesunato + amodiaquina; artesunato + mefloquina; artesunato + sulfadoxina + pirimetamina. Mesmo assim, apesar das alterações na sensibilidade do parasita à artemisinina em alguns países, os ACTs permaneceram geralmente clínica e parasitológicamente eficazes. A resistência do *P. falciparum* aos atuais medicamentos antimaláricos disponíveis (ACTs) tem sido detectada em áreas na fronteira do Camboja e Tailândia (WHO, 2014). Partindo destes dados, tornaram-se necessários estudos contínuos e investigativos com ênfase em possíveis resistências a essas novas combinações de drogas já que o parasita tem esse poder de se torna resistente mediante aos tratamentos prolongados.

A resistência aos atuais antimaláricos preocupa os agentes de saúde pública do mundo todo. Há necessidade urgente para a descoberta de novas classes de antimaláricos jamais vistos pelos parasitas em clínicas, para contribuir com o controle e eventual erradicação dessa doença.

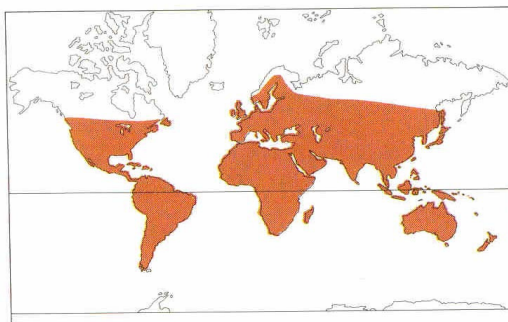
Com o histórico de grandes medicamentos antimaláricos vindo ou sintetizados a partir

de protótipos de esqueletos de substâncias isoladas de plantas utilizadas tradicionalmente contra malária, no presente estudo buscou-se no conhecimento popular uma das plantas utilizadas contra a malária que pertence à família Convolvulaceae, para estudos da composição e atividade antimalárica inéditos.

2.3. A família Convolvulaceae

A família Convolvulaceae, de acordo com Austin e Cavalcante (1982), possui larga distribuição mundial com numerosas espécies nos trópicos e pouquíssimas nas zonas temperadas, compreendendo 55 gêneros, com 1930 espécies, com distribuição nos trópicos e subtropicais de todo o mundo (Figura 4).

Figura 6. Distribuição geográfica da família Convolvulaceae.



Fonte: Heywood (1993) *apud*, Michelin, (2004).

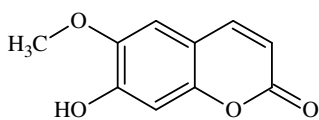
Ocorrem nessa família ervas parasíticas e lianas herbáceas ou lenhosas, raramente árvores ou arbustos. Suas folhas são alternadas simples. As flores são hermafroditas, grandes ou reduzidas, frequentemente com brácteas; tem cinco sépalas frequentemente desiguais e cinco pétalas unidas. O fruto é geralmente uma cápsula envolta por sépalas persistentes (Ribeiro et al., 1999).

A família Convolvulaceae possui um elevado número de espécies importantes na indústria alimentícia como por exemplo a batata-doce, *Ipomoea batatas* (L.) Poir., cujas raízes são ricas em açúcar e substâncias mucilaginosas sendo bastante consumida na alimentação doméstica. Muitas de suas espécies também são empregadas como forragem para animais. Apresentam ainda potencial paisagístico devido as suas flores vistosas, grandes e de variadas cores e com cálice persistente. Outras são invasoras de culturas. Na indústria farmacêutica são extraídos produtos químicos como ésteres e resinas com potencial alelopático de *Merremia dissecta* (Jacq.) Hall. f.; na medicina doméstica são bastante utilizadas *Ipomoea purga* Hayne e *Convolvulus scammonia* L., pelo seu valor purgativo e

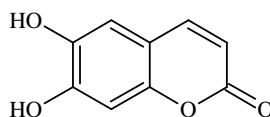
lactescente (Leite, 2001).

Muitas classes de substâncias já foram isoladas da família como mono, sesqui, di e triterpenoides; substâncias da rota do chiquimato: cumarinas, ácido benzoico e derivados do ácido cinâmico (Kim et al., 2008; Meira et al., 2008; Meira et al., 2012; Pareda-Miranda e Bah, 2003, Modi et al., 2010), flavonoides: flavonóis, chalconas, antrocianinas, flavonas e flavononas (Ferraz et al., 2011, Sohail Akhtar et al., 2009, Mann et al., 1999, Gupta et al., 2013, Kumar et al., 2010), xantonas: mangiferina, alcaloides: pirrolidina, tropanos, calystegines, indolizidinas e ergolinas (Jenett-Siems et al., 1997, Griffin e Lin, 2000, Schimming et al., 1998, Schimming et al., 2005), lignanas (Ferreira et al., 2006, Paska et al., 1999).

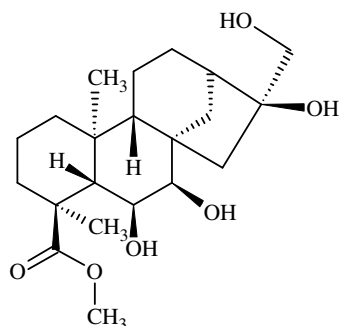
Figura 7. Alguns terpenoides e cumarinas isolados da família Convolvuláceae.



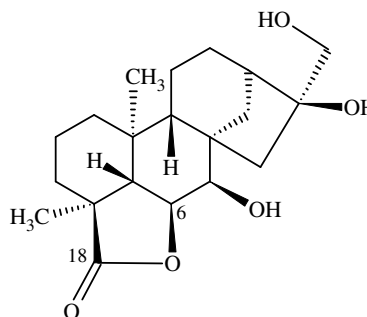
Escopoletina (16)



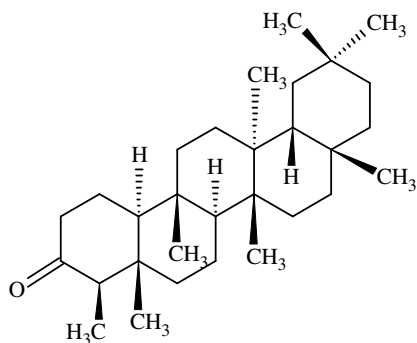
Escoletina (17)



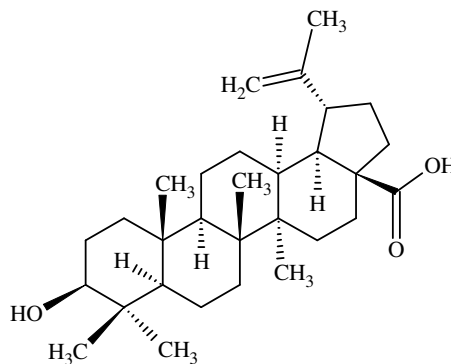
6 β ,7 β ,16 β ,17-tetrahidroxi ent-kauran-18-oato de metila (18)



7 β ,16 β ,17-triidroxi ent-kauarn-18(6 β)-oato (19)

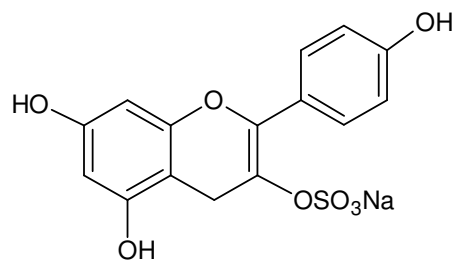


Friedelina (20)

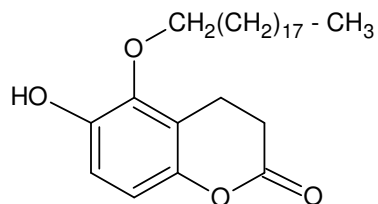


Ácido betuliníco (21)

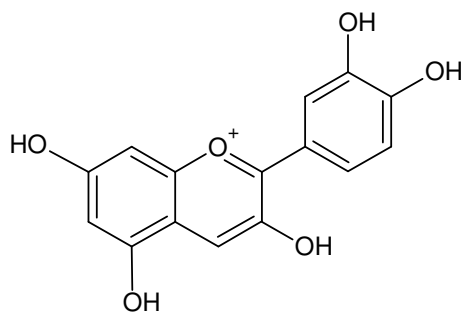
Figura 8. Flavonoides e cromanos identificados em Convolvulaceae.



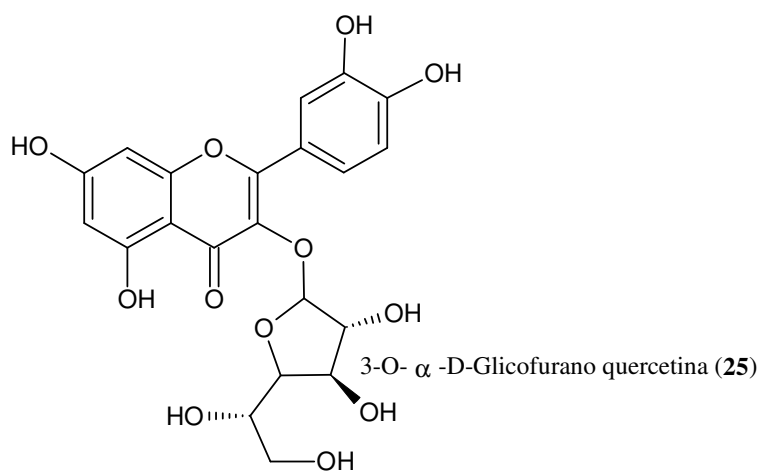
Kampferol 3-sulfato (22)



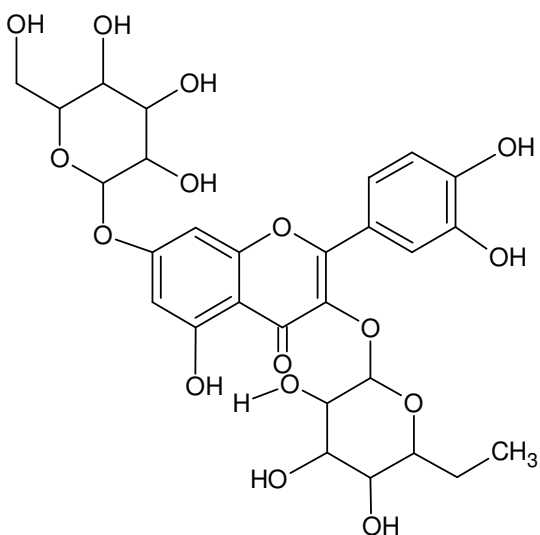
6-Hidroxi-5-nonadecanoxicroman-2-ona (23)



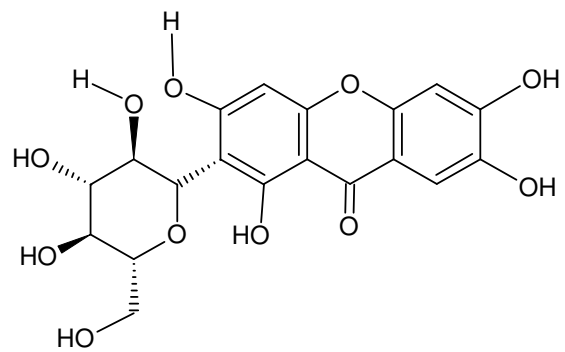
Cianidina (24)



3-O-α-D-Glicofurano quercetina (25)

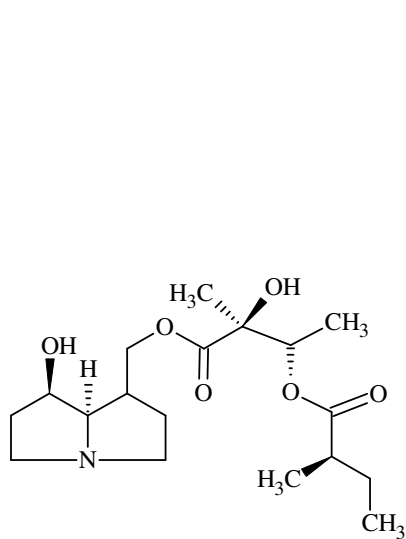


3-O-β-D-Diglicopiranosildiidro quercetina (26)

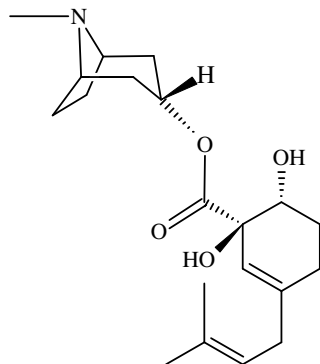


Mangisferina (27)

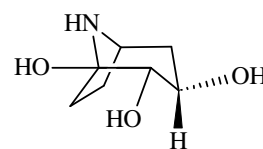
Figura 9. Exemplos de alcalóides e outras substâncias isoladas da família Convolvulaceae.



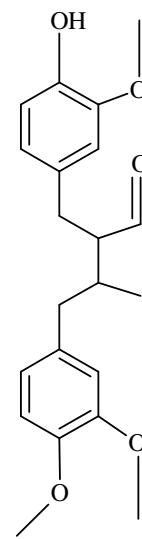
Ipangulina D₁₀ (27)



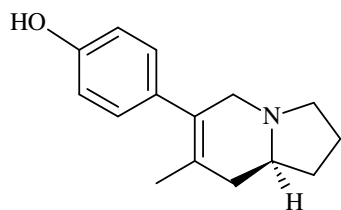
Consiculina (28)



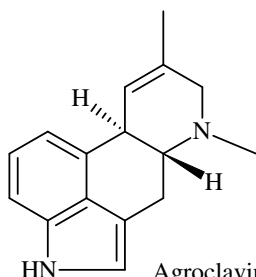
Calistegina (30)



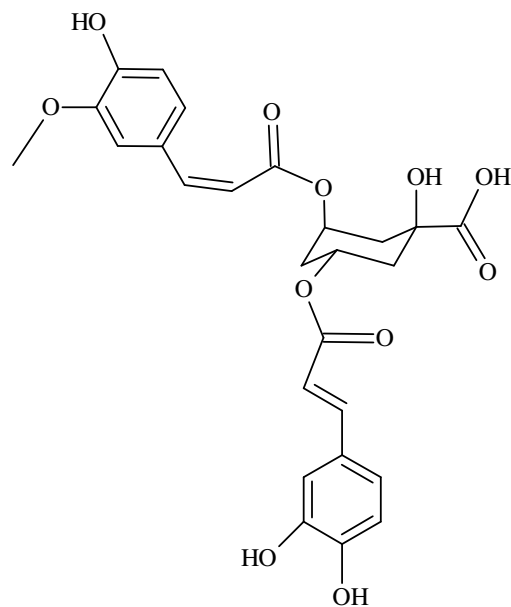
Arctigen (34)



Ipalbidina (31)



Agroclavina (32)



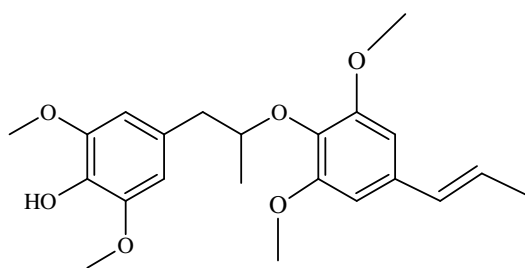
3, 5, O - Di - ácido cafeoilquico (33)

2.4. Estudos químicos anteriores do gênero *Bonamia*.

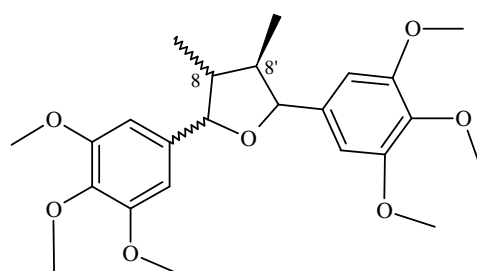
Existem poucos dados sobre a composição química de *Bonamia* spp. Torfem et al., (2000), em seu trabalho com *Bonamia spectabilis* de ocorrência em Madagascar isolaram de

partes aéreas, ligninas hexametoxilignanas (**36** e **37**) e sesquiliganas bonaspectina A-B (**43**, **45**), bonaspectina C 4''-O-glicosídeo (**44**), bonaspectina C e bonaspectina-D-4''-O-glicosídeo e as sesquieolignanas neobonaspectina A (**46**), neobonaspectina B (**47**), (Kraft et al., (2002), trabalhando com a mesma espécie isolaram lignanas do tipo viroligina A (**35**), hexametoxilignanas α e β (**36** e **37** respectivamente), e sesquiliganas do tipo bonaspectina E-H (**38-41**, respectivamente), as substâncias isoladas nesses dois trabalhos foram testados contra o *Plasmodium falciparum*, sendo que o bonaspectina D 4'' -O-glicosídeo (**42**) exibiu boa inibição do parasita em concentrações de 50 e 0,78 $\mu\text{g/mL}$. Ott et al., (2006), trabalhando com essa espécie isolou bonabilina A (**48**) e monoterprenoide 3 α -aceloxitropano (**49**).

Figura 10. Substâncias isoladas a partir de *Bonamia spectabilis*.

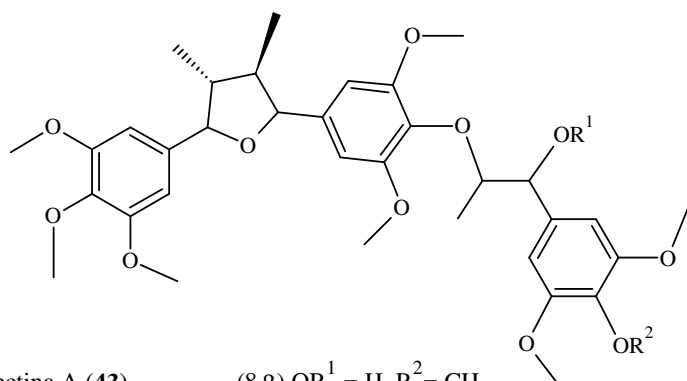


Virologina A (**35**)



(8 β) Hexametoxilignanas (**36**)

(8 α) Hexametoxilignanas (**37**)



Bonaspectina A (**43**)

Bonaspectina C (**44**)

Bonaspectina B (**45**)

Bonaspectina D (**42**)

Bonaspectina E (**38**)

Bonaspectina F (**39**)

Bonaspectina G (**40**)

Bonaspectina H (**41**)

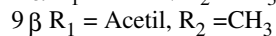
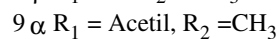
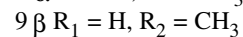
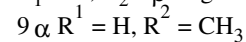
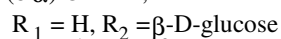
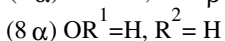
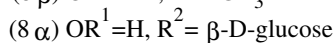
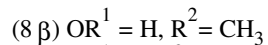
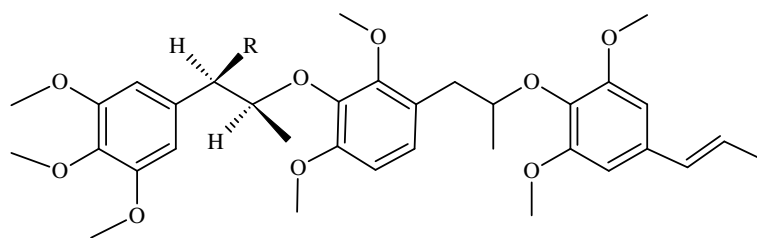
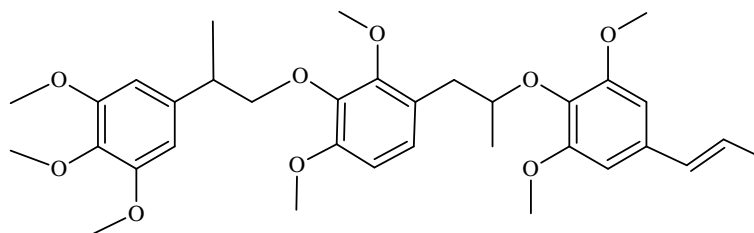


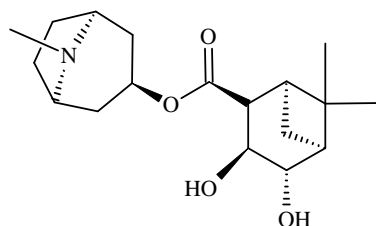
Figura 11. Substâncias isoladas a parti de *Bonamia spectabilis*.(continuação).



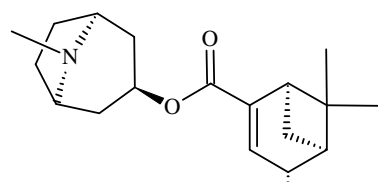
Neobonaspectina A (46)



Neobonaspectina B (47)



Bonabilina A (48)



Bonabilina B (49)

2.5. Levantamento bibliográfico sobre *Bonamia ferruginea*.

A planta *Bonamia ferruginea* é conhecida popularmente como cipó-tuíra. Durante o levantamento bibliográfico, observou-se uma grande diversidade de nomes científicos. Foram encontradas 3 espécies conhecidas popularmente como cipó-tuíra: *Bignonia tuira* Ried da família Bignoniaceae (Correa, 1984); *Calycobolus ferrugineus* Choisy da família Convolvulaceae (Revilla, 2002) e *Bonamia ferruginea* (Choisy) Hallier f. (Austin et al., 1982).

Conforme Austin e Cavalcante, (1982) e Staples e Austin, (2009), *Prevostea ferruginea* (Choisy) foi relatado pela primeira vez em 1825, *C. ferrugineus* em 1907 e *B. ferruginea* em 1968. Austin et al., afirma que essas espécies são sinónimas. Talvez isso ocorra porque a família convolvulácea tenha uma distribuição geográfica cosmopolita. Tais equívocos de sinónmia podem ser esclarecidos em sites como Re flora que possui uma vasta

lista de espécies da flora Brasileira, bem como no W3-Tropicos (*Missouri Botanical Garden*) (Mobot, 2015).

2.5.1. Descrição botânica e uso medicinal de *Bonamia ferruginea*.

É uma trepadeira com folhas alternadas e comumente cordatas no contorno. Tem flores bissexuais, caule fino, marrom-esverdeado, de toque aveludado. É espécie tropical de terra firme, frequente em beiras de estrada e em cultivos (Pas et al., 2008). Esses dados corroboram com os descritos por Dias et al., (2003), em exsicata encontrados no herbário do INPA com depósito de nº 213346.

2.5.2. Distribuição Geográfica.

B. ferruginea é endêmica em todo Brasil, Austin et al., (1982).

2.5.3. Uso na cosmética.

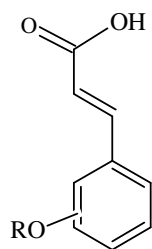
A *B. ferruginea* é indicada como cosmético. É amplamente utilizada como ativador celular, desintoxicante da pele e como fitoterápico adstringente e tônico. É usada no tratamento de icterícia, hepatite e leucorréia. Os chás são usados internamente e em compressa. (Revilla, 2002).

2.5.4. Estudos químicos anteriores de (*Bonamia ferruginea*)

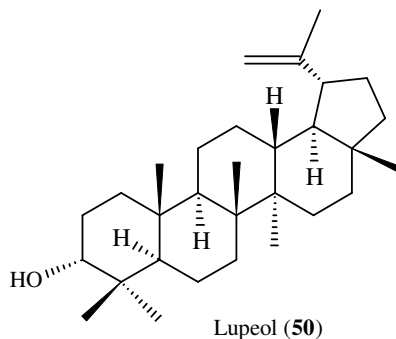
Siani et al. (1996) estudaram a composição química do cipó-tuíra (*Bonamia ferruginea*). A extração foi realizada por maceração utilizando acetato de etila como solvente. A cromatografia foi realizada com solvente $\text{CHCl}_3/\text{C}_6\text{H}_{14}$ como eluente e CG-MS como técnica de identificação. Foram encontrados derivados hidróxilados e metóxilados do ácido cinâmico (**49**) e terpenoides. Em uma das amostras foi observada uma mistura dos terpenos: lupeol (**50**), α -amirina (**51**), β -amirina (**52**), taraxerol (**53**), taraxasterol (**54**) e glutinol (**55**).

Dias et al., (2003) realizou um estudo de iniciação científica no qual trabalhou na parte fitoquímica e isolou a escopoletina (**17**) de *B. ferruginea*.

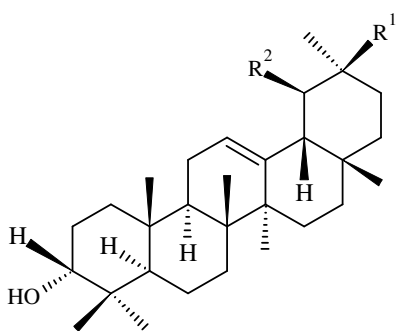
Figura 12. Substâncias identificadas de *Bonamia ferruginea*.



Acido cinâmico (49)
R=H ou CH₃

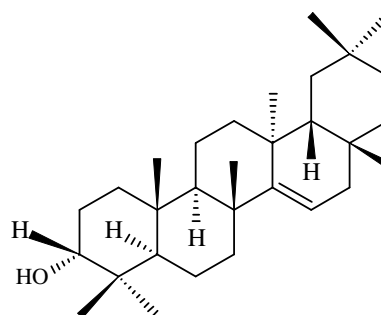


Lupeol (50)

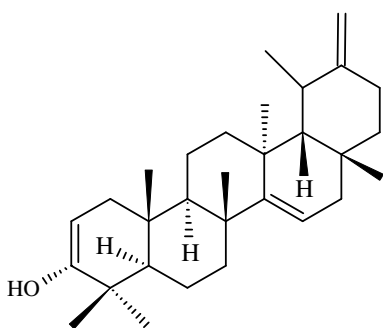


α -amirina (51)

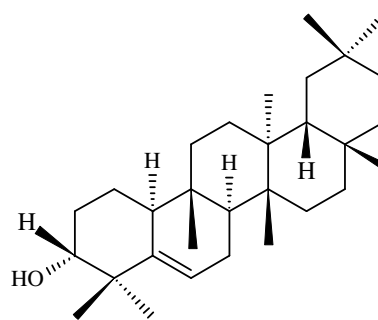
β -amirina (52)



Taraxerol (53)



Taraxasterol (54)

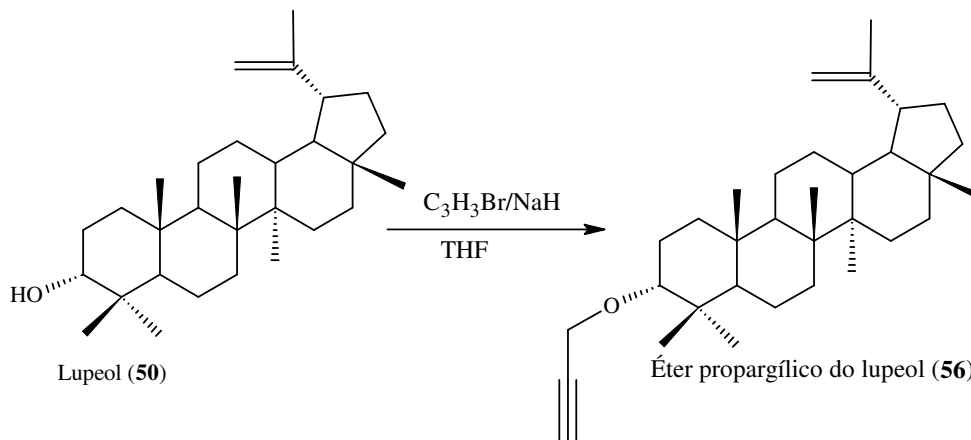


Glutinol (55)

Dentre as substâncias identificadas nesta espécie, o lupeol (50) foi testado contra o *Plasmodium falciparum in vitro* e inibiu em 49% o crescimento do parasita em uma concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$, essa inibição aumentou para o produto semi-sintético, o éter

propargílico do lupeol (**56**). Assim para o derivado (**56**) obteve-se uma redução de 81% no crescimento do *P. falciparum in vitro* em uma concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$. Mesmo quando testados em uma concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$ o éter propargílico do lupeol (**56**) continua sendo mais ativo que o lupeol (**50**) (Borgati, 2013).

Figura 13. Éter propargílico do lupeol.



3. OBJETIVO

3.1. Geral

Realizar um estudo da composição química e atividade antimalárica de *Bonamia ferruginea*.

3.2. Específicos

Descobrir os extratos, frações e metabólitos secundários com atividade antimalárica *in vitro* e *in vivo*.

Contribuir para o conhecimento dos componentes químicos de *Bonamia ferruginea*.

4. METODOLOGIA

4.1. Materiais e métodos

4.1.1. Equipamentos

Os seguintes aparelhos foram utilizados para a condução dos trabalhos.

Balança analítica: Marca Master, modelo AY220, com limite máximo de peso de 220 g e mínimo de 0,001 g.

Balança semi-analítica: Marca Toledo, modelo ARC120, com limite de peso de 3100 g e

mínimo de 0,01 g.

Lâmpada de UV: Marca UVP, modelo CC-10 (ondas longas, 365 nm e ondas curtas, 254 nm).

Liofilizador: Marca Christ, Modelo ALPHA 2-4 LSC.

Moinho de facas: Marca Marconi, modelo MA 340.

Rotaevaporador: Marca Fisaton, modelo 804.

Banho de ultrassom: Marca Unique, modelo USC-1800A.

Espectrômetro de RMN: Marca Bruker *Ultrashield* de 300 MHz.

Espectrômetro de RMN: Marca Avance Bruker *Ultrashield* de 400 MHz. FIOCRUZ

Espectrômetro de massas MicrOTof-QII, Marca Burker

Polarímetro Jasco P-1030. FIOCRUZ

4.2. Cromatografia

4.2.1. Cromatografia em Coluna (CC)

As colunas cromatográficas foram realizadas utilizando sílicas de fase normal e reversa (Merck), sílica gel (0,063 - 0,200 mm), sílica gel *flash* (0,040 - 0,063 mm) e RP-18 (0,040 - 0,063 mm).

Para as CCs foram utilizados três procedimentos de eluentes mais ou menos padronizadas variando apenas o volume de eluição.

Procedimento 1

O primeiro procedimento iniciou-se com um aumento de polaridade dos solventes hexano 100%, seguida de C₆H₁₄/CHCl₃ (90:10), aumentando-se em 10% até CHCl₃ 100%. Um gradiente análogo foi utilizado com CHCl₃/AcOEt até 100% AcOEt e AcOEt/MeOH até 100% MeOH, variando-se o volume do eluente de 30 a 200 mL, dependendo do tamanho da coluna/amostra.

Procedimento 2

O segundo procedimento iniciou-se com 100% hexano, depois usou-se C₆H₁₄/CHCl₃ (90:10), aumentando-se a polaridade de 10% em volumes sucessivos até a proporção 50:50. Em seguida a eluição procedeu-se com variação de 20% de C₆H₁₄/CHCl₃, finalizando-se com CHCl₃ 100%, variando-se o volume do eluente de 40 a 120 mL.

Procedimento 3

O terceiro procedimento foi realizado em CC de fase reversa onde iniciou-se a eluição com H₂O/MeOH na proporção de 90:10, em seguida, mudou-se para 70:30 e depois 50:50 em incrementos de 60 mL.

4.2.2. Cromatografia em camada delgada (CCD).

Foram utilizadas cromatoplasas de fase normal e reversa RP-18 da Merck 20 × 20 cm, recortando-se placas até uma altura de 5 cm. Para as análises de extrato, frações e reunião de subfrações cromatográficas, as placas de CCD foram visualizadas em câmara de luz UV nos comprimentos de onda 254 e 365 nm e reveladas com solução de *p*-anisaldeído em aquecimento a 100°C.

4.3. Métodos espectroscópicos

4.3.1. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear unidimensionais (1D) RMN ¹H, RMN ¹³C, DEPT 135° e DEPT 90° foram registrados utilizando o espectrômetro Bruker, operando a 300 e 400 MHz e 75 e 100 MHz para as frequências de ¹H e ¹³C, respectivamente. Também foram registrados espectros de RMN bidimensionais (2D) de COSY, NOESY, HSQC e HMBC, o equipamento pertencente a CA-LTQPN (Central Analítica do Laboratório Temático de Química de Produtos Naturais- INPA). Os solventes deuterados para análises foram clorofórmio, acetona e água. Os deslocamentos químicos foram registrados em ppm (δ).

4.3.2. Cromatografia líquida acoplada ao espectro de massa LC-MS.

Os cromatográficos foram gerados utilizando um LC-MS da Bruker, a fonte de ionização realizada em APCI e com detector micrOTOF-Q II. Foram utilizados os solventes isopropanol, metanol e acetonitrila. Essa análise forneceu as massas de alta resolução das substâncias. O programa de computador MASSYLINX, forneceu a massa teórica, bem como uma possível fórmula molecular, com esses dados foi realizada a variação do fator de erro para a referida fórmula. Também permite avaliar a pureza das substâncias e a composição química das misturas.

4.3.3. Cromatografia líquida de alta eficiência CLAE.

Foi utilizado sistema de cromatografia líquida da Shimadzu (VP), com duas bombas LC-10AD, degaseificador DGU-14, injetor automático SIL-10AD, forno de coluna CTO-10 e detector por arranjo de fotodiodo SPD-M10A. Os dados foram obtidos por interface SCL-10a. Aquisição de dados e controle foram pelo software Shimadzu CLASS-VP, versão 6.13 SP2.

O cromatográfico foi obtido utilizando o extrato AcOET, para comparar com o obtido por Siani et al., (2006). A coluna utilizada foi uma RP-18 e 250-4,6 (5 μm), com um fluxo de

1 mL/min. A primeira corrida foi de 0 a 40 min com 25% de CH₃CN/H₂O + ácido fórmico até pH = 2,7, de 40 a 70 min com CH₃CN 100% e de 70 a 75 min com 25% de CH₃CN/H₂O ácida novamente. A concentração da amostra foi de 2 mg/mL.

4.4. Solventes

Os solventes utilizados nesse trabalho foram de grau técnico sendo todos submetidos a secagem com Na₂SO₄ e destilação fracionada para assegurar sua pureza adequada.

4.5. Coleta e identificação de material

Os exemplares utilizados nas análises químicas foram coletados no mini-campus da UFAM, atrás do prédio de Ciências Agrárias (Mini-campus) e na EMBRAPA-AM, localizado na Rodovia AM-10, km 29, S/N, Manaus AM. A primeira coleta foi realizada no dia 17 de maio de 2013, pela manhã com o auxílio do Prof. Dr. Francisco Célio Maia Chaves, onde o material coletado foi retirado de dois exemplares e demarcado como ponto 1 e ponto 2, e as localizações, realizadas em GPS respectivamente em S 2° 53' 19,6'' W 59° 58' 3,8'' e S 2° 53' 22,4'' W 59° 58' 3,2''. O terceiro ponto de coleta foi no mini campus do UFAM, próximo a Faculdade de Ciências Agrárias. A identificação botânica do material vegetal da espécie coletada foi efetuada por meio de exsicata depositada no herbário de INPA com número de depósito 258.159 (coletor Chaves, F.C.M em 17 de maio de 2013).

4.6. Secagem e moagem do material.

As amostras de material vegetal foram separadas em folha e caule, e levadas secagem em temperatura ambiente em estufa aberta por 24 horas. Posteriormente foram secadas em estufa climatizada a uma temperatura de 45°C por 48 h totalizando assim 72 h de secagem. Esta etapa foi realizada na EMBRAPA.

Após a secagem e moagem do material vegetal, iniciou-se a preparação das amostras. Foi realizada a trituração das folhas e haste em moinho elétrico. A higienização do instrumento foi realizada após a moagem de cada espécie, a fim de evitar a contaminação entre as partes da planta.

4.7. Preparação dos extratos

Trabalho realizado por Scudeller et al. (2009), no Parque do Jaú, cita o cipó-tuíra como sendo umas das diversas plantas utilizadas pela população amazonense como antimalárica, onde as partes utilizadas são folhas e cascas pelo método de infusão das duas

partes juntas. Partindo desses dados foram realizadas três extrações.

4.7.1. Preparação dos extratos por soxhlet

O primeiro método utilizado foi o de soxhlet (extração contínua líquido-sólido). Para a extração foram utilizados água, metanol e clorofórmio, para essa extração foi utilizado material vegetal diferente. As extrações foram realizadas todos com massa de 25 g de folha ou caule (Tabela 1).

4.7.2. Infusão.

Foram colocados 350 mL de água em dois erlemmeyer (total 700 mL) e os erlemmeyer foram levados a aquecer. Logo que alcançou o ponto de ebulição, foram despejadas essas água sobre as massas de folha e caule (25 g cada), que estavam separadas em dois becker, deixando-se tampada por 15 min. As misturas quentes foram filtradas em papel de filtro. Os dados de extração estão apresentados na Tabela 1.

4.7.3. Decocção.

Foram colocados 25,0 g de cada parte da planta (caule e folha) aos 2 erlenmeyers de 500 mL, que continha as partes da planta, foram acrescentados 350 mL de água em cada mistura, então essa mistura foi levada a ebulição por 15 min, e em seguida houve a filtração a quente. Os métodos de extração resultaram em 10 extratos, sendo 6 por soxhlet, 2 por infusão e 2 por decocção, (Tabela 1).

4.8. Rotaevaporação

Todos os extratos do aparelho de soxhlet e soluções resultando de decocção e infusão foram concentrados utilizando um rotaevaporador. Após a evaporação dos extratos metanólico e clorofórmico foram adicionados 30 mL de água para permitir seu congelamento no freezer e posterior liofilização.

Por questão de tempo e espaço no liofilizado optou-se por diminuir o volume dos extratos aquosos. Nos extratos aquosos foram acrescentados 100 mL de etanol para auxiliar no arraste de água e tornando mais fácil a evaporação da água. No final, os extratos aquosos ficaram com volume que variava de 20 a 25 mL. Todas as 10 amostras após concentradas foram congeladas a uma temperatura de -26°C e posteriormente liofilizadas.

Tabela 1. Rendimento e teor extrativo dos processos de extração de caule de *B. ferruginea* em CHCl₃, MeOH e H₂O.

Parte, Solventes, rendimento m (g), teor extrativo % e códigos																
Parte	CHCl ₃ (soxhlet)			MeOH (soxhlet)			H ₂ O (soxhlet)			H ₂ O (infusão)			H ₂ O (decocção)			
	m (g)	%	Cód.	m (g)	%	Cód.	m (g)	%	Cód.	m (g)	%	Cód.	m (g)	%	Cód.	
Caule	0,17	0,68	CP ₂ Cl _s	1,63	6,51	CP ₁ M _s	1,12	4,47	CP ₁ A _s	1,16	4,63	CP ₂ A _i	1,04	4,15	CP ₂ A _c	
folha	0,25	1,00	FP ₂ Cl _s	1,98	7,90	FP ₁ M _s	2,06	8,22	FP ₁ A _s	1,45	5,74	FP ₂ A _i	1,35	5,39	FP ₂ A _c	

*Todas as extrações foram feitas utilizando 25 g de material vegetal novo.

** Cód.= código

Tabela 2. Rendimento e teor extrativo dos processos de extração de caule de *B. ferruginea* em hexano, DCM, CHCl₃ e AcOEt.

Parte, Solventes, rendimento m (g), teor extrativo % e códigos																
Parte	Hexano (maceração)			DCM 1 (soxhlet)			DCM 2 (soxhlet)			CHCl ₃ (soxhlet)			AcOEt (soxhlet)			
	m (g)	%	Cód.	m (g)	%	Cód.	m (g)	%	Cód.	m (g)	%	Cód.	m (g)	%	Cód.	
Caule	8,55	0,57	E.C.H	5,60	1,12	E.C.DCM-1	5,15	1,05	E.C.DCM-2	6,95	1,39	E.C.C	10,0	0,68	E.C.A	

*A extração hexânica foi realizada com 1,5 kg.

*A extração com DCM foi realizada com 0,99 kg, do material vegetal vindo da extração com hexano.

*A extração com CHCl₃ foi realizada com 0,5 kg, do material vegetal vindo da extração com hexano.

*A extração com AcOEt foi realizada com 1,470 kg, material vegetal vindo das extrações anteriores.

4.9. Testes biológicos

4.9.1. Testes antiplasmódicos *in vitro*.

A cepa multi-resistente K1 (MRA-159, MR4, ATCC Manassas Virginia) foi mantida em cultivo contínuo segundo o método de Trager e Jensen (1976), pela equipe do Prof. Dr. Luiz Francisco Rocha e Silva. Para o micro teste foi utilizada uma parasitemia inicial de 1 – 2% e hematócrito de 3%.

Preparação de amostra de extratos para testes.

Para os testes biológicos foram pesados duas vezes 1 mg de cada extrato. Os extratos foram solubilizados em DMSO na concentração estoque de 5 mg/mL, e posteriormente diluídas em meio completo para obtenção das concentrações de teste (50 e 5 µg/mL).

Teste antimalárico

O teste foi realizado como descrito por Andrade-Neto et al., (2007) e foram executados pela equipe do Prof. Dr. Luiz Francisco Rocha e Silva. As diluições das amostras foram aplicadas em poços de micro-placa contendo hemácias parasitadas. Cada concentração foi testada em triplicata. A placa foi incubada por 48 h a 37°C. Após a incubação, o conteúdo dos poços foi avaliado mediante microscopia óptica. A inibição do crescimento dos parasitos foi determinada pela comparação com os controles de crescimento sem tratamento, segundo fórmula abaixo:

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

4.9.2. Testes antiplasmódicos *in vivo*

O teste biológico *in vitro* será realizado na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas sob a responsabilidade do Prof. Dr. Luiz Francisco Rocha e Silva e colaboradores, o bioensaio será realizado com camundongos albinos, onde os quais terão suas massas entre 24 e 32 gramas. O inóculo será preparado com sangue de um camundongo infectado pelo *P. berghei*, cuja parasitemia será calculada, onde o sangue será retirado da calda de um dos camundongos, a partir disso será preparada uma solução com DMSO, a qual será utilizada como contaminante dos outros animais, após 24 horas de contaminação dar-se-a o início do tratamento com as substancias isoladas ou semissintéticas, onde será usada duas vias de administração (oral e subcutânea). No quinto e sétimo dia será realizado uma coleta do sangue dos animais e realizada a análise por microscopia óptica.

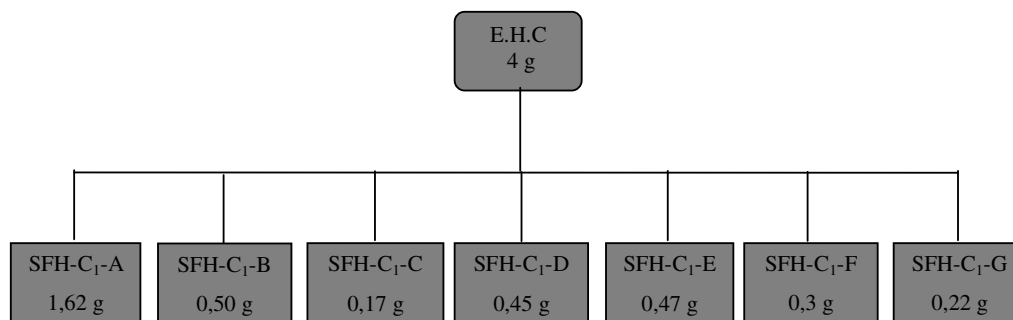
4.10. Extração por maceração (desgraxificação).

O extrato clorofórmico do caule (CP₂Cl_s, Tabela 1) cuja preparação foi descrita na pagina 42, continha quantidade significativa de substâncias apolares de acordo com análises de CCD e RMN. Optou-se por realizar um processo de extração em hexano (maceração). O material foi colocado em dois erlenmeyers de 3 L e adicionado 2 L de hexano e levado ao banho de ultrassom (4 × 45 min, 40°C. Após isso, foi filtrado em papel filtro e concentrado em rotaevaporador com uma temperatura de banho de 50°C. Depois, foi colocado em banho de areia por 72 h, para evaporação do solvente, sendo que o frasco foi agitado vigorosamente a cada 12 h e pesado a cada 12 h até que o peso do frasco tornasse constante. Após secagem dos extratos da 1^a a 4^a extração com hexano (maceração), com 1,5 kg de material vegetal seco obteve-se um total de 8,55 g (0,57%) de extrato hexânico como demonstrado na tabela 1. A partir dai o material vegetal foi deixado em bandejas a temperatura ambiente em capelas para evaporação do solvente residual.

4.11. Fracionamento do extrato hexânico do caule (E.H.C)

Uma porção (4 g) do E.H.C foi submetida a uma coluna cromatográfica com o intuito de isolara a substância observada em CCD com R_f de 0,35 em CHCl₃/C₆H₁₄ (3:7), R_f de 0,40 em CHCl₃/C₆H₁₄ (3:7) e R_f de 0,45 em CHCl₃/C₆H₁₄ (4:6). A sílica gel (200 g; 0,063-0,200 mm, Merck), foi ativada por 12 h em estufa climatizada a 100°C e depois foi empacotada (Φ × h 4: 30 cm) utilizando hexano (C₆H₁₄). A eluição foi realizada com 200 mL, utilizando procedimento 1 descrito na pagina 40. As 115 subfrações foram reunidas conforme seus perfis cromatográficos em 7 frações (Fluxograma 1), após serem analisadas em CCD.

Fluxograma 1. Fracionamento cromatográfico do extrato hexânico do caule (E.H.C).

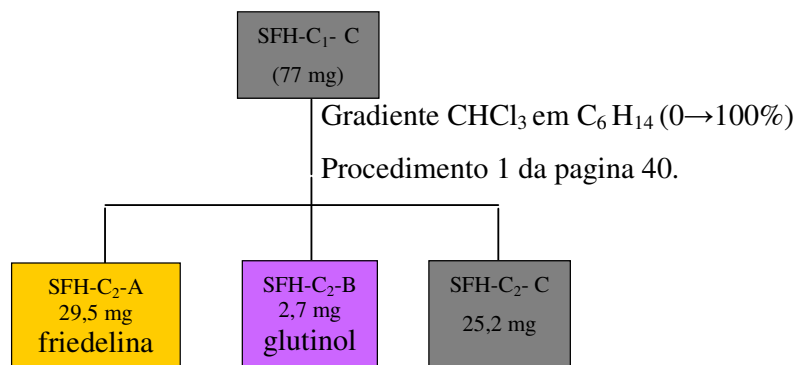


4.12. Purificação da SFH-C₁-C

Com uma porção (77 mg) da SFH-C₁-C, foi realizada uma coluna cromatográfica. Uma coluna (Φ × h 1: 20 cm), foi empacotada com sílica (39 g; 0,063-0,200 mm, Merck), previamente ativada com hexano. A eluição foi feita com incrementos 30 mL de solvente nas proporções descritas no procedimento 1 da pagina 40. O referido procedimento gerou 20

subfrações, que após serem analisadas em CCD, foram reunidas conforme seus perfis cromatográficos em 3 frações (Fluxograma 2).

Fluxograma 2. Fracionamento cromatográfico da fração SFH-C₁-C.

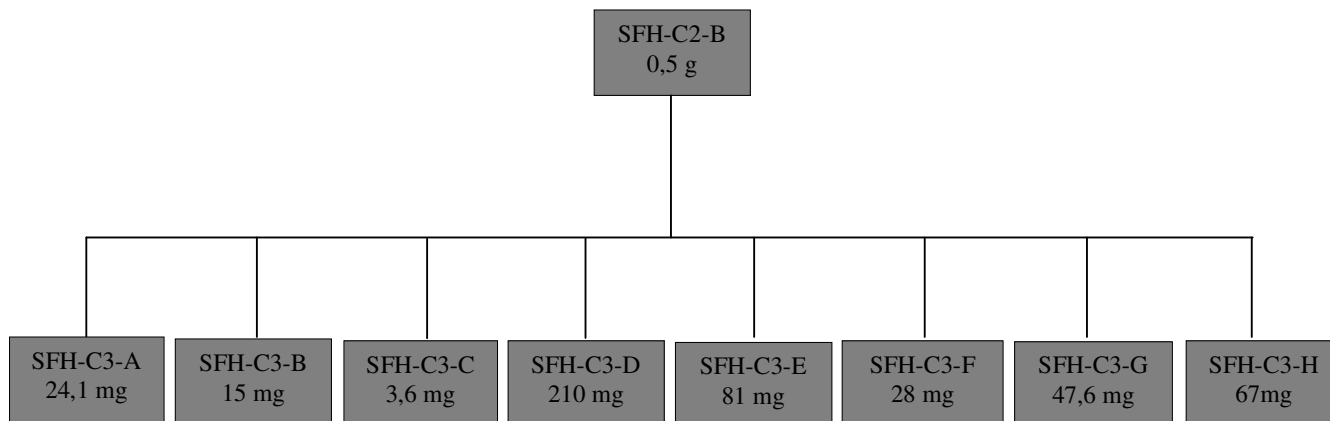


A substância SFH-C₂-A isolada do E.H.C, caracterizou-se como um sólido branco. Sua solubilidade foi observada em CHCl₃. Em CCD, após revelação com anisaldeído e alguns segundos de aquecimento muda-se a coloração amarelada à qual passa para cor lilás intensa, com o eluente C₆H₁₄/CHCl₃ na proporção de 7:3 com R_F de 0,35. Espectros de HRMS, RMN 1D e 2D foram obtidos (Anexos, 1-9).

A substância SFH-C₂-B isolada do E.H.C (Anexo 10) se apresentou como um sólido cristalino branco amarelado. Exibe solubilidade em CHCl₃. Após revelação com anisaldeído e aquecimento mostrou-se uma coloração de lilás intensa. Com o eluente C₆H₁₄/CHCl₃ na proporção de 7:3 apresentou um R_F de 0,40. Espectros de HRMS, RMN 1D e 2D foram obtidos (Anexos, 10-14).

4.13. Fracionamento da SFH-C₁-B

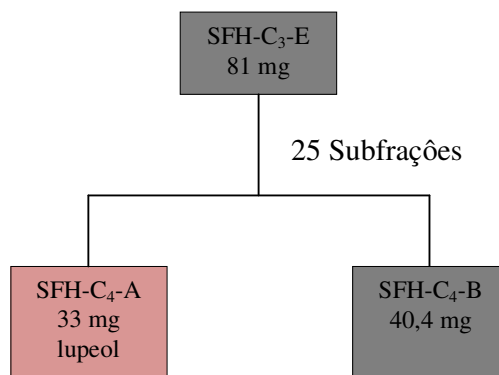
A SFH-C₁-B foi submetida a um fracionamento a fim de purificar mais. Uma coluna ($\Phi \times h$ 2,3: 30 cm) foi empacotada com sílica *flash* (50 g; 0,040- 0,063 mm; previamente ativada a 110°C por 12 h) em hexano. A eluição foi feita com incrementos de 60 mL de solvente cada proporção descrita no procedimento 1 da página 40. Esse procedimento gerou 35 subfrações que foram reunidas em 8 frações, baseando-se em seus perfis de CCD (Fluxograma 3).

Fluxograma 3. Fracionamento cromatográfico da fração SFH-C₁-B.

4.14. Purificação da SFH-C₃-E

A subfração foi levada a outro fracionamento utilizando uma coluna com o diâmetro menor que a última ($\Phi \times h$ 1: 25 cm), para purificar a substância com R_F de 0,45 em $C_6H_{14}/CHCl_3$ (7:3). Para isso, a coluna foi empacotada em hexano com sílica *flash* (30 g; 0,040- 0,063 mm) previamente ativada. A eluição foi realizada utilizando o procedimento 1 descrito na página 40, com incremento de solventes de 40 mL. Geraram-se 25 subfrações que, após analisadas por CCD de fase normal, foram reunidas em 2 frações (Fluxograma 4).

Fluxograma 4. Fracionamento cromatográfico da fração SFH-C₃-E. Isolamento da fração SFH-C₄-A.



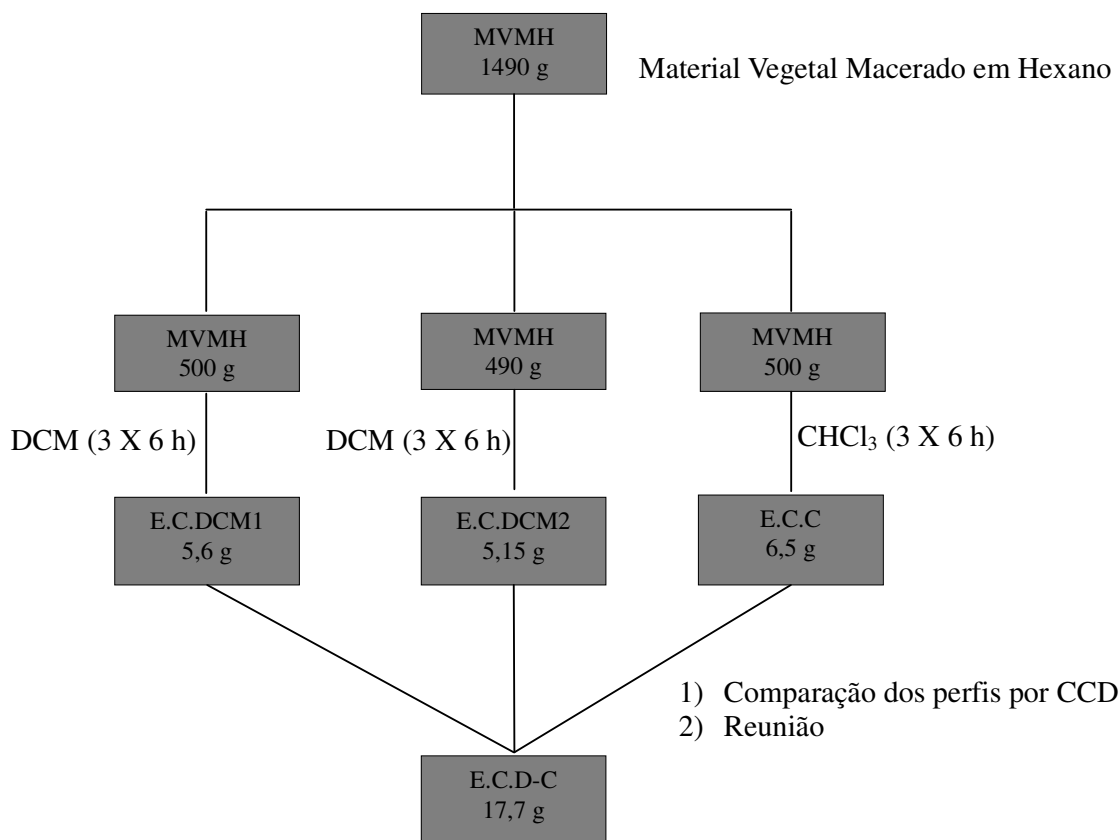
A substância SFH-C₄- A isolada do E.H.C (anexo 15), caracterizou-se como um sólido de cor branca. Apresentava solubilidade em $CHCl_3$. Após revelada com anisaldeído com alguns segundos de aquecimento, a cor muda para cor lilás intensa. Com o eluente $C_6H_{14}/CHCl_3$ na proporção de 8:2 apresentava R_F de 0,45. Espectros de HRMS, RMN 1D e 2D foram obtidos (Anexos, 15-22).

4.15. Nova extração

Em seguida o material vegetal macerado em hexano (MVMH) seco foi extraído com CHCl_3 e DCM por soxhlet (Tabela 2; pag. 44). O material vegetal (1,5 kg) foi dividido em 3 partes, 2 de 500 g e uma de 490 g e levado separadamente à extração, a qual foi realizada em 3×6 h cada, sendo monitorada a cada 6 h por CCD em fase normal.

A primeira extração (500 g em 3×6 h) rendeu o extrato (E.C.DCM 1) e segunda extração (490g com 3×6 h) rendeu o extrato (E.C.DCM 2), extraídos com diclorometano, tabela 2. Na terceira parte o material vegetal (500g em 3×6 h), foi extraído com CHCl_3 , rendendo o extrato (E.C.C) (Tabela 2). Após seco em banho de areia por 72 h. Após análises dos extratos por CCD, resolveu-se uni-las por terem o mesmo perfil cromatográfico. O extrato clorado foi levado a secar em banho de areia, sendo agitado e pesado regularmente até que o peso se tornasse constante, totalizando 17,7 g de extratos do caule extraído com clorados (E.C.D.C) (Fluxograma 5).

Fluxograma 5. Extração a quente do material vegetal desgraxificado com solventes clorados.



4.16. Extração com AcOEt (E.C.A).

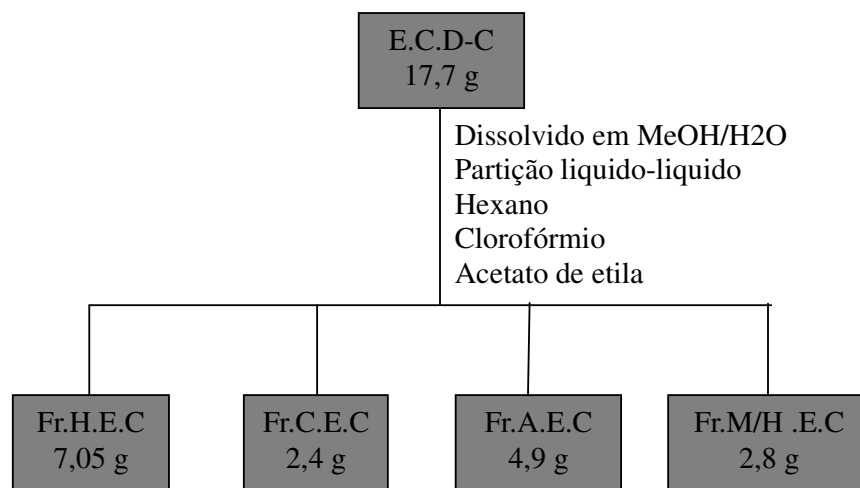
Ao término da extração com DCM e CHCl_3 , o material vegetal foi deixado na capela por 96 h para evaporar os solventes. Esse material vegetal do caule previamente extraído com hexano e extraído por clorados (MVCD-C) foi extraído a seguir com AcOEt. Para essa finalidade, a massa total de 1.470 g foi dividido em 3 porções de 490 g, sendo extraído por 3×6 h em aparelho de soxhlet. No final da extração, os extratos foram reunidos e totalmente evaporados, resultando em 10 g de E.C.A (Tabela 2).

4.17. Fracionamento por partição líquido-líquido do extrato do caule extraído com clorados (E.C.D-C)

O extrato E.C.D-C, foi dissolvido em 500 mL de MeOH/ H_2O (9:1), utilizando ultrassom por 15 min. Depois a solução resultante foi colocada em funil de separação de 2 L e em seguida foi adicionado hexano até o volume de fases atingir a proporção de 1:1. A mistura foi agitada vigorosamente e deixado em repouso por 15 min até que se formou bifase. A fase hexânica foi removida e o procedimento foi repetido por mais 3 vezes, monitoradas por CCD. Em seguida esse mesmo processo foi repetido com clorofórmio e acetato de etila. Sempre ao término de cada processo se ajustava a quantidade de água em metanol para 70:30, após extração com hexano e antes da extração com AcOEt.

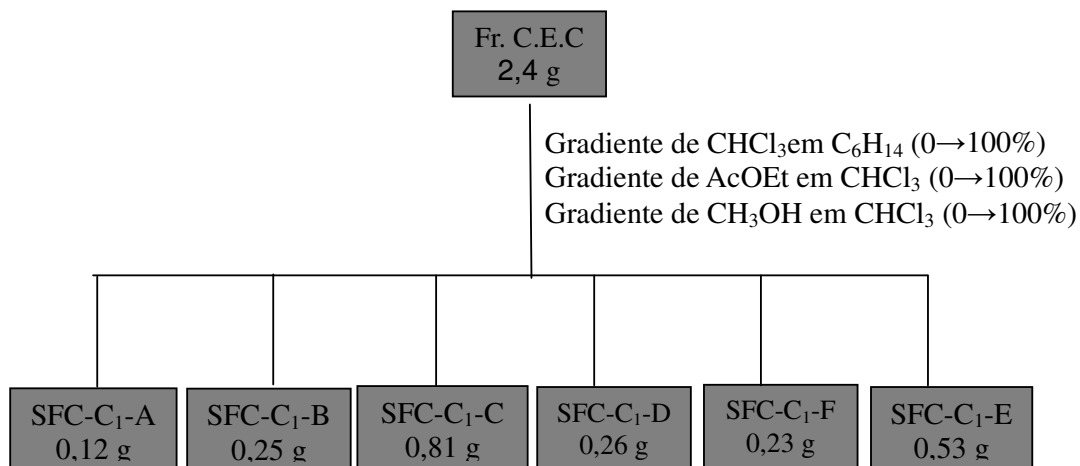
Em seguida foi realizada a concentração das frações em rotaevaporador a uma temperatura de banho de 50°C . No caso da fração hidroalcoólica, foi necessário realizar um acréscimo de etanol até atingir a proporção de 3:1 EtOH/ H_2O , para auxiliar na evaporação de água. Depois o extrato foi levado para o freezer (-26°C) para congelar, e em seguida liofilizar. As demais frações, após a concentração em rotaevaporador, foram levadas ao banho de areia por 72 h para evaporar o solvente residual. Em seguida foram todas pesadas. Os pesos estão apresentados no fluxograma 6.

Fluxograma 6. Partição líquido líquido do extrato clorado



4.18. Fracionamento cromatográfico da Fr.C.E.C

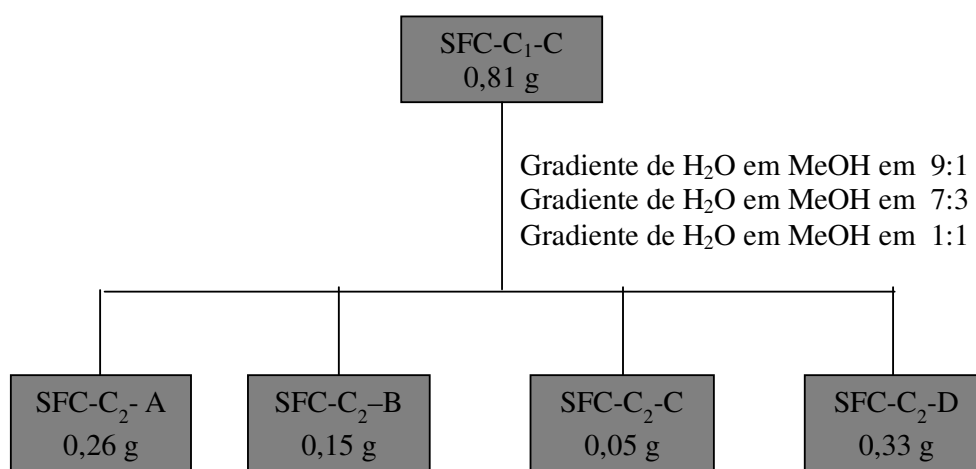
A Fr.C.E.C foi submetida à cromatografia em coluna ($\Phi \times h = 4: 30$ cm) utilizando sílica gel (200 g; 0,063-0,200 mm, Merck) previamente ativada e empacotada com hexano. A eluição foi realizada com incrementos de eluentes de 200 mL. A eluição foi realizada utilizando o procedimento 2 descrito na página 41. Foram coletadas 126 frações de 20 mL, que foram reunidas em 6 frações baseando-se em análises de CCD (Fluxograma 7).

Fluxograma 7. Fracionamento cromatográfico da fração CHCl_3 .

4.19. Fracionamento cromatográfico da SFC-C₁-C

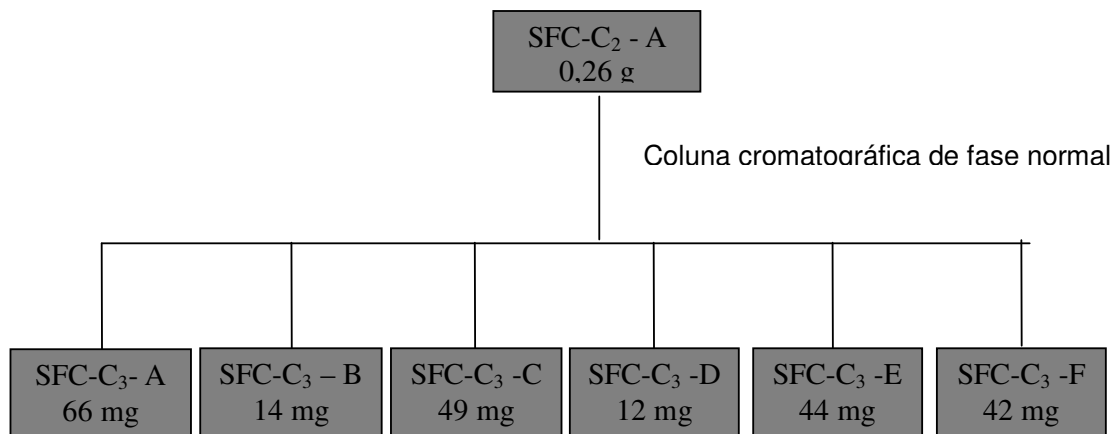
A SFC-C₁-C (0,81g) apresentava uma mancha principal com impureza por CCD de fase normal. Após realizar CCD de fase reversa, observou-se que as substâncias apolares foram retidas. Assim foi feita uma coluna cromatográfica ($\Phi \times h = 2,3: 25$ cm) de fase reversa Merck RP-18 (0,040- 0,063 mm). A eluição foi realizada com incrementos de eluente de 60 mL, utilizando o procedimento 3 descrito na página 42. Foram obtidas 15 frações que, após analisadas por CCD e confirmada a separação de substâncias apolares, foram combinadas em 4 frações (Fluxograma 8).

Fluxograma 8. Fracionamento cromatográfico da SFC-C₁-C.

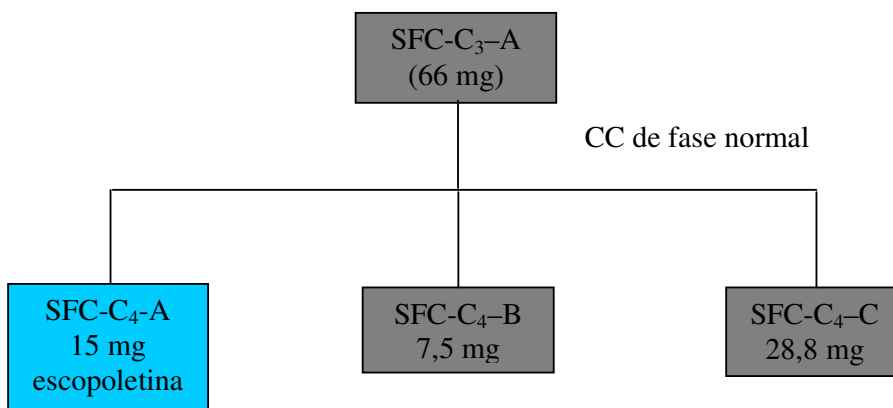


4.20. Purificação da SFC-C₂-A

Após analisadas as frações reunidas da coluna anterior (SFC-C₂-A, 0,26 g) observou-se uma mistura de metabólitos secundários. Em seguida, foi realizada uma coluna (120 g; $\Phi \times h = 1: 35$ cm) de sílica *flash* previamente ativada. A coluna foi empacotada com hexano. A eluição deu-se utilizando o procedimento 2 como descrito na página 41, com um volume total de 30 mL por incrementos de eluentes. Foram recolhidas 45 frações que, após analisadas por CCD de fase normal, foram reunidas em 5 frações (Fluxograma 9).

Fluxograma 9. Fracionamento cromatográfico da SFC-C₂-A.4.21. Purificação da fração SFC-C₃-A

Apos analisadas as frações reunidas da coluna anterior SFC- C₃ - A (66 mg) observou-se que ainda tinha mistura de substâncias. Foi realizada uma coluna ($\Phi \times h$ 1: 35 cm) utilizando o procedimento 2 como descrito na pagina 42, em incrementos de eluentes de 30 mL. Foram recolhidas 24 subfrações que após análise por CCD foram reunidas em 3 frações (Fluxograma 10).

Fluxograma 10. Fracionamento cromatográfico da SFC- C₃ -A.

A substância SFC-C₄-A isolada do E.C.D-C caracterizou-se como cristais com uma coloraçãolaranja escuro. Sua solubilidade foi observada em CHCl₃, a qual após revelada com anisaldeído e aquecida, em poucos tempo desaparece a coloração amarelada da placa de CCD. Após o resfriamento da placa de CCD por algumas horas a coloração amarela torna-se visível novamente. Com o eluente CHCl₃ / AcOEt na proporção de 7:3 tem um R_F de 0,44. Após a eluição, foi observado em UV com o comprimento de onda de 365 nm. Observou uma

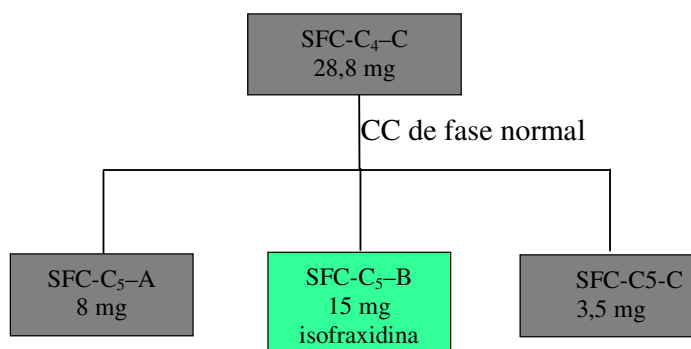
coloração azul intensa, que é uma característica de cumarinas. Espectros de HRMS, RMN 1D e 2D foram obtidos (Anexos, 23-29).

4.22. Purificação da fração SFC-C₄-C

Da coluna anterior, SFC-C₄-C apresentava substância de R_F próximo da substância em SFC-C₄-A. Experimentos com solventes revelaram o melhor sistema de eluente AcOEt/CHCl₃ (10:90).

Em seguida, foi realizada coluna ($\Phi \times h = 1: 35$ cm) com o sistema de eluente acima, utilizando incrementos de solventes de 30 mL. Foram obtidas 10 frações com aproximadamente 20 mL cada. Essas frações foram reunidas em 3 após análise em CCD (Fluxograma 11).

Fluxograma 11. Fracionamento cromatográfico da SFC- C₄ -C

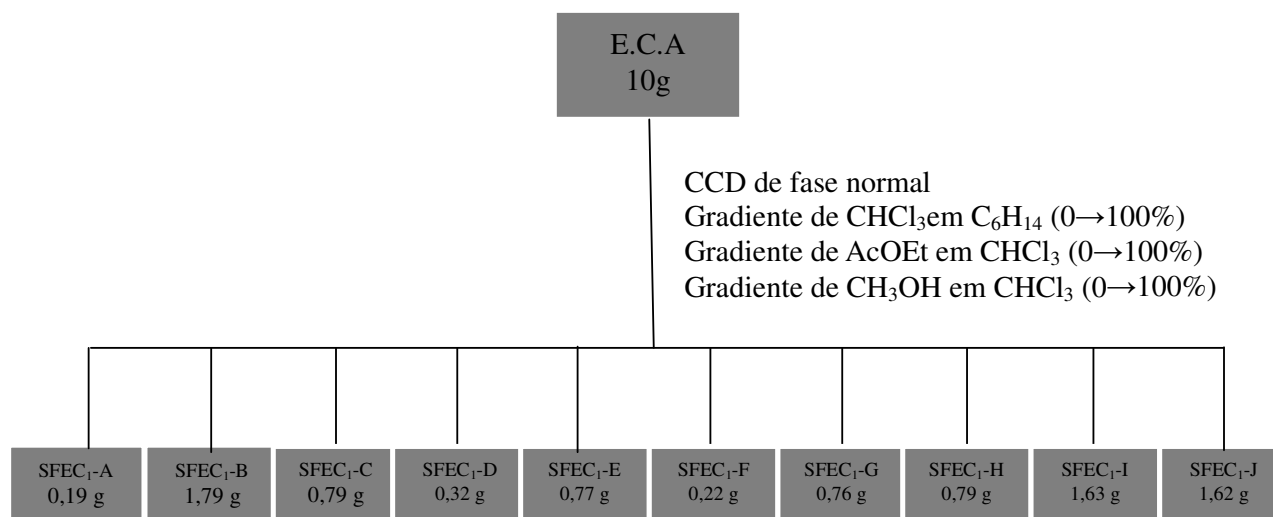


A substância SFC-C₅-B caracterizou-se como cristais com uma coloração laranja escuro. Sua solubilidade foi observada em CHCl₃. Observou-se em CCD de fase normal reveladas em *p*-anisaldeído uma coloração verde e com alguns segundos de aquecimento aparece uma coloração escura. Com o eluente CHCl₃ / AcOEt na proporção de 9:1, tem um R_F de 0,55. Espectros de HRMS, RMN 1D e 2D foram obtidos (Anexos, 30-35).

4.23. Fracionamento cromatográfico do extrato em acetato de etila (E.C.A)

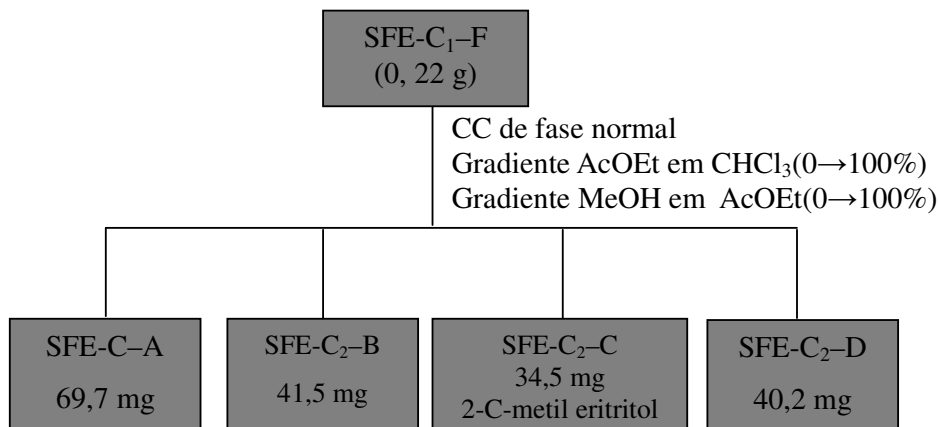
O extrato do caule em acetato de etila (10 g) foi submetido à coluna cromatográfica ($\Phi \times h = 4: 30$ cm), utilizando sílica gel (200 g, 0,063-0,200 mm, Merck). A coluna foi empacotada com hexano. A eluição foi realizada conforme o procedimento 1 descrito na página 41, com volumes de incrementos de eluentes de 200 mL. Ao término, foram coletadas 140 frações com 20 mL cada, e após análises por CCD foram reunidas em 10 frações com base em seus perfis cromatográficos (Fluxograma 12).

Fluxograma 12. Fracionamento cromatográfico do extrato do caule em AcOEt (E.C.A) .



4.24. Purificação da fração SFE- C₁- F

Análise por CCD revelou mistura de substâncias na SFE-C₁-F. Essa amostra (0,22 g) foi cromatografada em coluna ($\Phi \times h = 1,9: 30$ cm) de sílica *flash* (0,040- 0,063 mm). O processo de eluição foi o procedimento 2 descrito na página 37, com 40 mL sendo o volume de incremento do solvente. Foram colhidas 30 subfrações com 20 mL cada. Após análises por CCD foram reunidas em 4 frações (Fluxograma 13).

Fluxograma 13. Fracionamento cromatográfico da SFE- C₁-F

A substância SFE-C₂-C caracterizou-se como um sólido amorfo de coloração laranja escuro. Sua solubilidade foi observada em MeOH. Observou-se em CCD de fase normal reveladas em *p*-anisaldeído uma coloração lilás claro com alguns segundos de aquecimento a 100°C. Com o eluente AcOEt/ CHCl_3 na proporção de 9:1, tem um R_F de 0,45. Espectros de

HRMS, RMN 1D e 2D foram obtidos (Anexos, 36-41).

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.

5.1. Teste *in vitro* para atividade antiplasmódica

Os extratos de *Bonamia ferruginea* não se mostraram ativos frente ao *Plasmodium falciparum*. Para que fosse considerado ativo teria que ter um fator de inibição de crescimento parasitária igual ou maior que 80% (Tabela 3).

Tabela 3. Avaliação de inibição do crescimento *in vitro* da cepa K1 de *P. falciparum* pelos extratos de *Bonamia ferrugínea*.

Solvente	Método	Parte	Código do extrato	Redução do crescimento do parasito (%)		Resultado
				50 (µg/mL)	5 (µg/mL)	
H ₂ O	infusão	caule	CP ₂ Ai	0	0	I
		folha	FP ₂ Ai	13,3	0	I
MeOH	soxhlet	caule	CP ₁ Ms	15	0	I
		folha	FP ₁ Ms	29,9	1	I
H ₂ O	decocção	caule	CP ₂ Ac	9,8	0	I
		folha	FP ₂ Ac	8,8	0	I
CHCl ₃	soxhlet	folha	FP ₂ Cls	6,4	0	I
		caule	CP ₂ Cls	40,6	0	I
H ₂ O	soxhlet	folha	FP ₁ As	0	0	I
		caule	CP ₁ As	7,7	0	I

*Como critério de atividade *in vitro* foi estabelecido que as amostras que inibirem o crescimento dos parasitos de: 80 a 100% = ativas; 50 a 79% = parcialmente ativas; < 50% = inativa.

I= inativo

Com a obtenção desses dados foi possível direcionar os estudos fitoquímicos para o extrato que deu uma melhor redução no crescimento do parasita que nesse trabalho foi o extrato clorofórmico, com 40,6 % de inibição a 50 (µg/mL).

5.2. Testes *in vivo*.

No teste *in vivo* contra o *Plasmodium berghei* foram avaliados dois extratos FP₂Ai e FP₁Ms. Ambos foram inativos contra o *P. berghei*.

5.3. Identificação das substâncias isoladas do extrato E.H.C.

5.3.1. Identificação estrutural da SFH-C₂-A.

O cromatograma de LC-HRMS apresentou um sinal com tempo de retenção de 6.5 min. Esse sinal apresenta íon aduto m/z 427.3944 [M+H]⁺, compatível com a fórmula molecular C₃₀H₅₀O, correspondente a um índice de deficiência de hidrogênio (IDH) igual a seis. Foi realizado o cálculo de erro utilizando a m/z teórica do íon aduto em m/z 427.3940 [M+H]⁺, obtida através do software Masslynx. A fórmula abaixo mostra uma variação de erro de $\Delta = 0,93$ ppm. Isso é um forte indício da concordância da m/z experimental e teórica para a fórmula C₃₀H₅₀O (Anexo 1).

$$\text{Formula } \Delta = \frac{\text{Massa teórica} - \text{massa experimental} \times 10^6 \text{ ppm}}{\text{Massa teórica}}$$

Um outro pico em m/z 409,3831, indica a perda de uma molécula de água [M+H-H₂O], o que foi confirmado com os cálculos utilizando a fórmula anterior e mostrou uma variação de fator de erro de $\Delta = 0,73$ ppm.

Análise do espectro de RMN de ¹H da SFH-C₂-A.

O espectro RMN de hidrogênio apresentou sete singletos de metilas: δ_H 0,70(3H); 0,86(3H); 0,92(3H); 0,97(3H); 0,98(3H); 1,02(3H) e 1,15(3H) com a presença de um dubletos em δ_H 0,84 (3H) (Anexo 2).

Análise do espectro de RMN de C¹³ da SFH-C₂-A.

O espectro de RMN de C¹³ apresentou 30 sinais de carbono, sendo que mostrou um sinal em δ_C 6,8 ppm indicativo de um esqueleto friedelano (Anexo 4). A análise do RMN para a obtenção do DEPT 135° e o DEPT 90°, apresentou 23 sinais de carbono, dos quais onze são sinais de carbonos metilênicos (CH₂), quatro de carbonos metínicos (CH) e oito carbonos metínicos (CH₃) (Anexos 4, 5 e 6; Tabela 4).

Uma busca na literatura de triterpenos revelou que SFH-C₂-A apresentava dados de RMN de ¹H, ¹³C e LC-RHMS consistente com dados da literatura da friedelina (Aragão, 1990 e Mahato e Kundu, 1994). Buscou-se confirmação da identidade dessa substância utilizando técnicas de RMN bidimensionais.

Análise dos dados de HSQC da SFH-C₂-A.

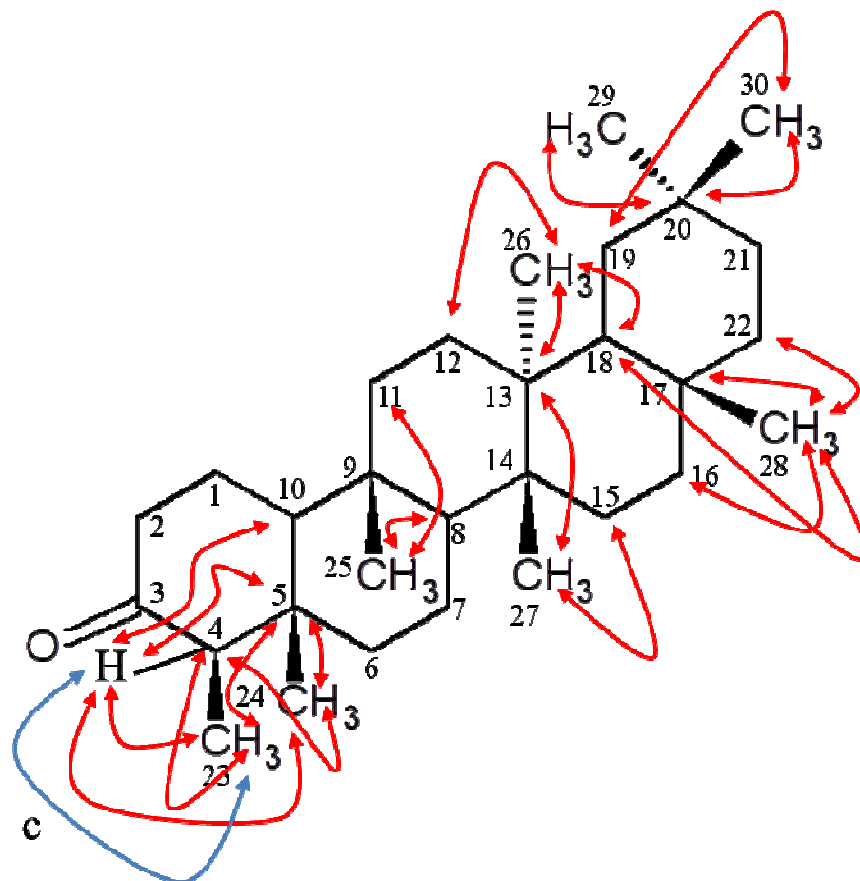
No anel A, exibiram-se correlações diretas entre o carbono 4 e o hidrogênio δ 2,22. Nas posições 5, 9, 13, 14, 17 e 20, não havia correlação com hidrogênios, corroborando com os dados de Aragão, (1990) e Mahato e Kundu (1994), que descrevem os mesmos como carbonos quaternários. O deslocamento químico δ_C 213,4 sugere a presença de um carbono carbonílico na estrutura o que corrobora com o sinal de Mahato e Kundu, (1994) (Anexo 4).

Análise dos dados de HMBC da SFH-C₂-A.

As correlações observadas no HMBC estão resumidas na figura 12.

No diagrama de contorno do espectro bidimensional de correlação heteronuclear C-H à longa distância (HMBC) foram observadas as correlações heteronucleares entre os sinais dos hidrogênios δ_H 0,86 da metila 23 com os carbonos δ_C 58,2 e 42,1, que correspondem aos carbonos 4 e 5, respectivamente (Figura 15). Também correlações entre os hidrogênios δ_H 0,70 da metila 24 com os carbonos δ_C 58,2 e 42,1, que correspondem aos carbonos 4 e 5, respectivamente. Foram observados os hidrogênios δ_H 0,84 da metila 25 correlacionando-se com os carbonos δ_C 53,1 e 35,5, referentes aos carbonos 8 e 11, respectivamente. Os hidrogênios δ_H 1,02 da metila 26 correlaciona-se com os carbonos δ_C 30,5; 39,7 e 42,7, referentes aos carbonos 12, 13 e 18 respectivamente (Tabela 4).

Foram observadas correlações entre os sinais em δ_H 0,98 da metila 27 com os sinais em δ_C 39,7 e 32,4, referentes aos carbonos 13 e 15, respectivamente. Também foram observadas correlações entre os sinais em δ_H 1,15 da metila 28 com os sinais em δ_C 36,0; 30,0; 42,7 e 39,3, referente aos carbonos 16, 17, 18 e 22, respectivamente. Os sinais em δ_H 0,92 da metila 29 apresentaram apenas uma correlação com o sinal em δ_C 28,2 referente ao carbono 20, que é quaternário de acordo com análise dos DEPTs. Isso corrobora com a referida posição da metila 29, sendo que os hidrogênios δ_H 0,92 da metila 30 mostraram correlação com os sinais de carbono em δ_C 28,2 e 35,3 referente ao carbono 19 e 20 respectivamente. O sinal em δ_H 2,22 do carbono 4 correlaciona-se com os sinais de carbonos em δ_C 6,87; 14,7; 42,1 e 59,4, referentes aos carbonos 23, 24, 5 e 10, respectivamente (Figura 14 e 15, Anexo 8).

Figura 14. Atribuições das correlações das metilas no HMBC da friedelina (SFH-C₂- A).

Análise do espectro de COSY.

Por se tratar de um triterpeno e as análises terem sido realizadas em aparelho de RMN de 300 MHz, não foi possível observar todos os acoplamentos entre hidrogênios a curta distancia, mas um acoplamento bem evidente foi observado entre os sinais de δ_H 0,86 e 2,22, referente aos hidrogênios da metila 23 e o hidrogênio do carbono 4 (Figura 14 e 16, Anexo 9).

Figura 15. Ampliação da região de correlação das metilas do espectro de HMBC da friedelina (SFH-C₂- A).

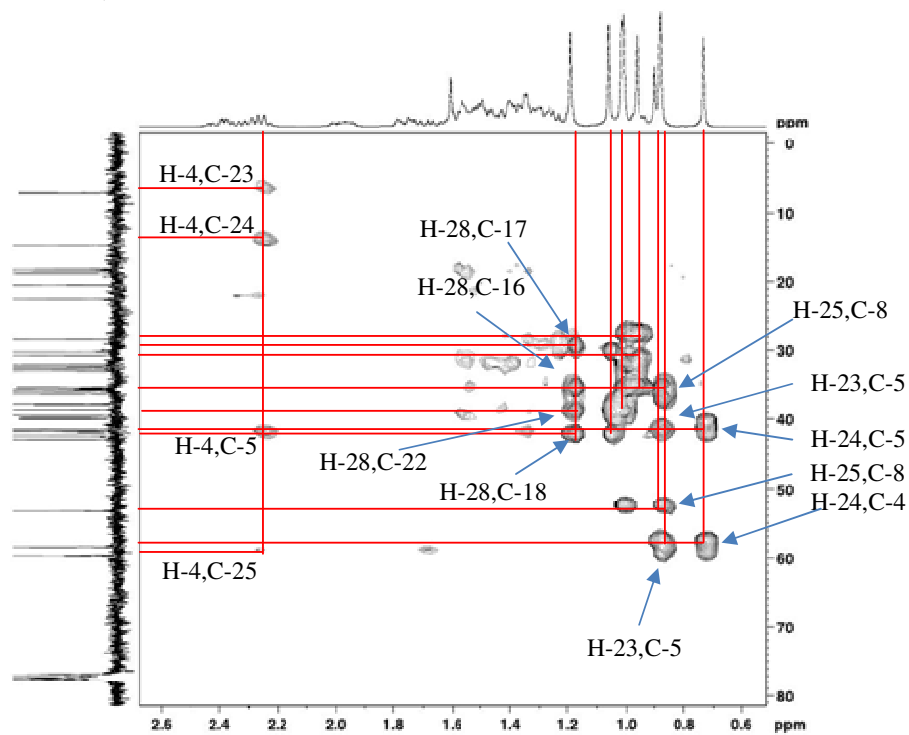


Figura 16. Ampliação da região de acoplamento em COSY da friedelina (SFH-C₂- A).

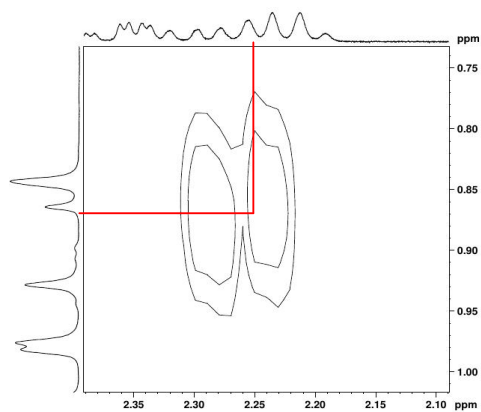


Tabela 4. Dados extraídos dos espectros uni e bidimensionais da estrutura da freidelina (RMN-400 MHz/100 MHz; ppm; CDCl₃).

Nº carbono	RMN de ¹³ C (δ _C)			Bidimensionais (δ _H)			RMN de ¹ H (δ _H)	
	Observado	Lit.*	DEPT	HSQC	HMBC	COSY	Observado	Lit.**
C-1	22,30	22,3	CH ₂	1,95			1,95	1,95 (m)
C-2	41,55	41,5	CH ₂	2,38			2,38	
C-3	213,44	213,2						
C-4	58,21	58,2	CH	2,22	0,86; 0,70	0,86	2,22	2,22 (m)
C-5	42,17	42,1	C		0,86; 0,70; 2,22			
C-6	41,26	41,3	CH ₂	1,53			1,53	
C-7	18,23	18,2	CH ₂	1,84			1,84	
C-8	53,09	53,1	CH	1,39	0,84		1,39	
C-9	37,42	37,4	C					
C-10	59,43	59,4	CH	1,54	2,22		1,54	
C-11	35,5	35,6	CH ₂	1,55	0,84		1,55	
C-12	30,51	30,5	CH ₂	1,31	1,02		1,31	
C-13	39,68	39,1	C		0,98; 1,02			
C-14	38,28	38,3	C					
C-15	32,40	32,4	CH ₂	1,48	0,98		1,48	
C-16	35,99	36,0	CH ₂	1,52	1,15		1,52	
C-17	29,99	30,0	C		1,15			

Tabela 4. Dados extraídos dos espectros uni e bidimensionais da estrutura da freidelina (RMN-400 MHz/100 MHz; ppm; CDCl₃). (continuação)

Nº carbono	RMN de ¹³ C (δ _C)			Bidimensionais (δ _H)			RMN de ¹ H (δ _H)	
	Observado	Lit.*	DEPT	HSQC	HMBC	COSY	Observado	Lit.**
C-18	42,74	42,8	CH	1,56	1,15		1,56	
C-19	35,34	35,3	CH ₂	1,21	0,92		1,21	
C-20	28,18	28,1	C		0,92; 0,97			
C-21	32,75	32,7	CH ₂	1,26			1,26	
C-22	39,26	39,2	CH ₂	1,46	1,15		1,46	
C-23	6,87	6,8	CH ₃	0,86	2,22		0,86	0,88
C-24	14,67	14,6	CH ₃	0,70	2,22		0,70	0,72
C-25	17,93	17,9	CH ₃	0,84			0,84	0,87
C-26	20,29	20,2	CH ₃	1,02			1,02	1,01
C-27	18,71	18,6	CH ₃	0,98			0,98	1,05
C-28	32,09	32,1	CH ₃	1,15			1,15	1,18
C-29	35,05	35,0	CH ₃	0,92			0,92	0,95
C-30	31,80	31,8	CH ₃	0,97			0,97	1,02

Lit* Muhato e KIndu, 1994.

Lit.** Liu et al., 2013.

5.3.2. Elucidação estrutural de SFH-C₂- B

O cromatográfico de LC-MS apresentou um pico único com 5,5 min de tempo de retenção, com o íon em m/z 427,4166 $[M+H]^+$ e outro íon mais intenso com m/z de 409,4071 o que foi inferido que poderia ser uma perda de água (Anexo 10). A partir desses dados foi suposta a fórmula $C_{30}H_{50}O$. O programa Masslynx foi utilizado para calcular a m/z do íon aduto $[M+H]^+$ ($C_{30}H_{51}O^+$) e o fragmento $[M+H-H_2O]^+$ ($C_{30}H_{49}^+$). Os erros (Δ), foram, respectivamente, 18,3 e 3,66 ppm o que está dentro do aceitável.

Análise do espectro de RMN de 1H

No espectro de 1H , observaram-se sinais de oito singletos de metilas com deslocamentos químicos de: δ_H 0,83 (3H); 0,93 (3H); 0,97 (3H); 0,98 (3H); 1,02 (3H); 1,07 (3H); 1,12 (3H); 1,14 (3H) (Anexo 11). Levando em consideração a fórmula proveniente do LC-HRMS, e os demais sinais no espectro de RMN de 1H , foram consistentes com um triterpeno, com sinais em δ_H 3,47 e 5,62 consistente com δ_H de hidrogênio α de uma hidroxila. Análise do espectro de ^{13}C .

No espectro de ^{13}C observaram-se sinais de 30 picos de carbono (Anexo 12), consistentes com a estrutura de um triterpeno. No espectro, observaram-se dois picos bem característicos de dupla ligação em δ_C 122 e 141,6 (Anexo 12).

Análise do espectro de HSQC.

No anel A, foi observado correlação entre o hidrogênio δ_H 3,46 (H-3) e o carbono δ_C 76 (C-3), esse deslocamento tanto de hidrogênio quanto de carbono na posição 3, são característico de carbono hidroxilado (Anexo 13). As outras correlações estão resumidas na Tabela 5 e 6.

Análise do espectro de HMBC

As correlações das metilas auxiliaram nas suas atribuições. O sinal do hidrogênios δ_H 1,14 (H-23) correlacionam-se com os sinais dos carbonos δ_C 27,8, 76, 40,8, 28,7 e 141, correspondente aos carbonos nas posições, 3, 4, 24 e 5, respectivamente. Os hidrogênios δ_H 1,04 (H-24) correlacionam-se com os carbonos δ_C 76, 40,8, 141,6 e 25,3, correspondente aos carbonos nas posições: 3, 4, 5 e 23, respectivamente. Os hidrogênios δ_H 0,85 (H-25) correlacionam-se com os carbonos δ_C 47,4, 34,8 e 49,2, correspondentes aos carbonos nas posições, 8, 9 e 10, respectivamente. Os sinais dos hidrogênios δ_H 1,09 (H-26), observou-se correlacionando-se com os carbonos δ_C 47,4; 37,8 e 31,9, correspondente aos carbonos nas posições, 8, 14 e 15, respectivamente (Figuras 17 e 18, Anexo 14).

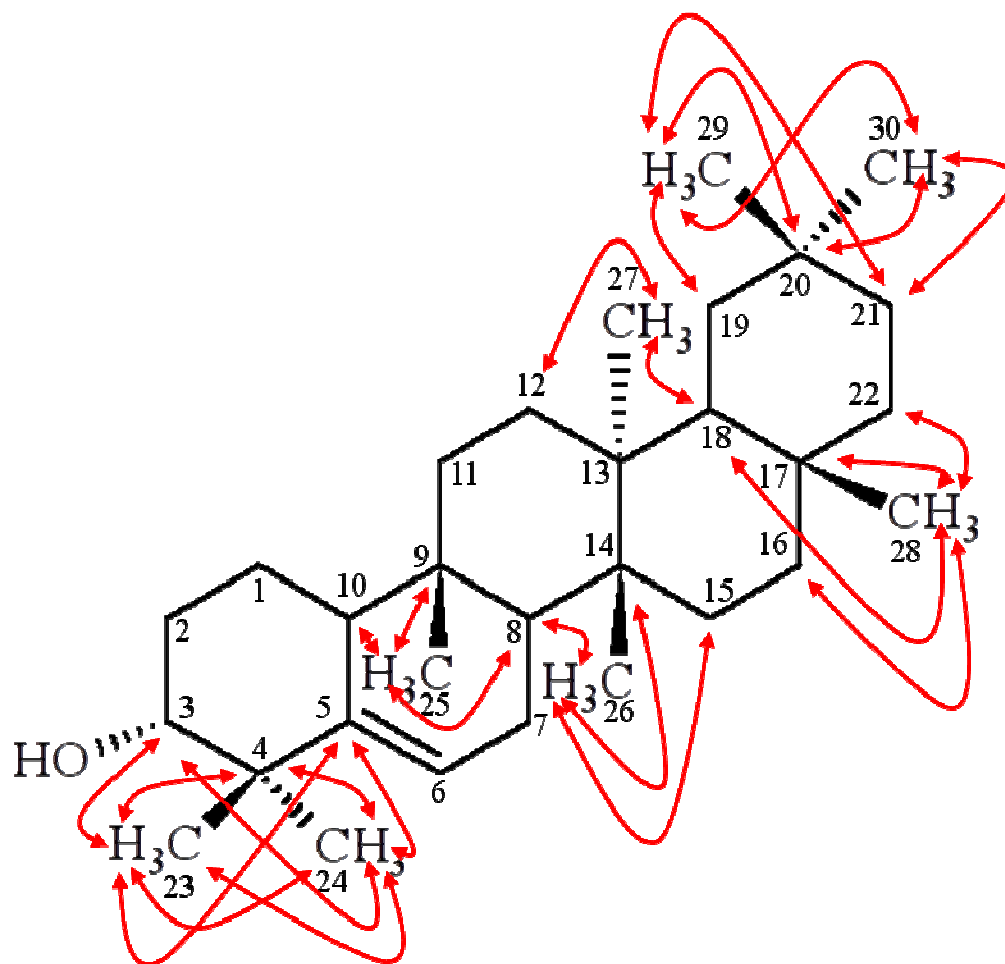
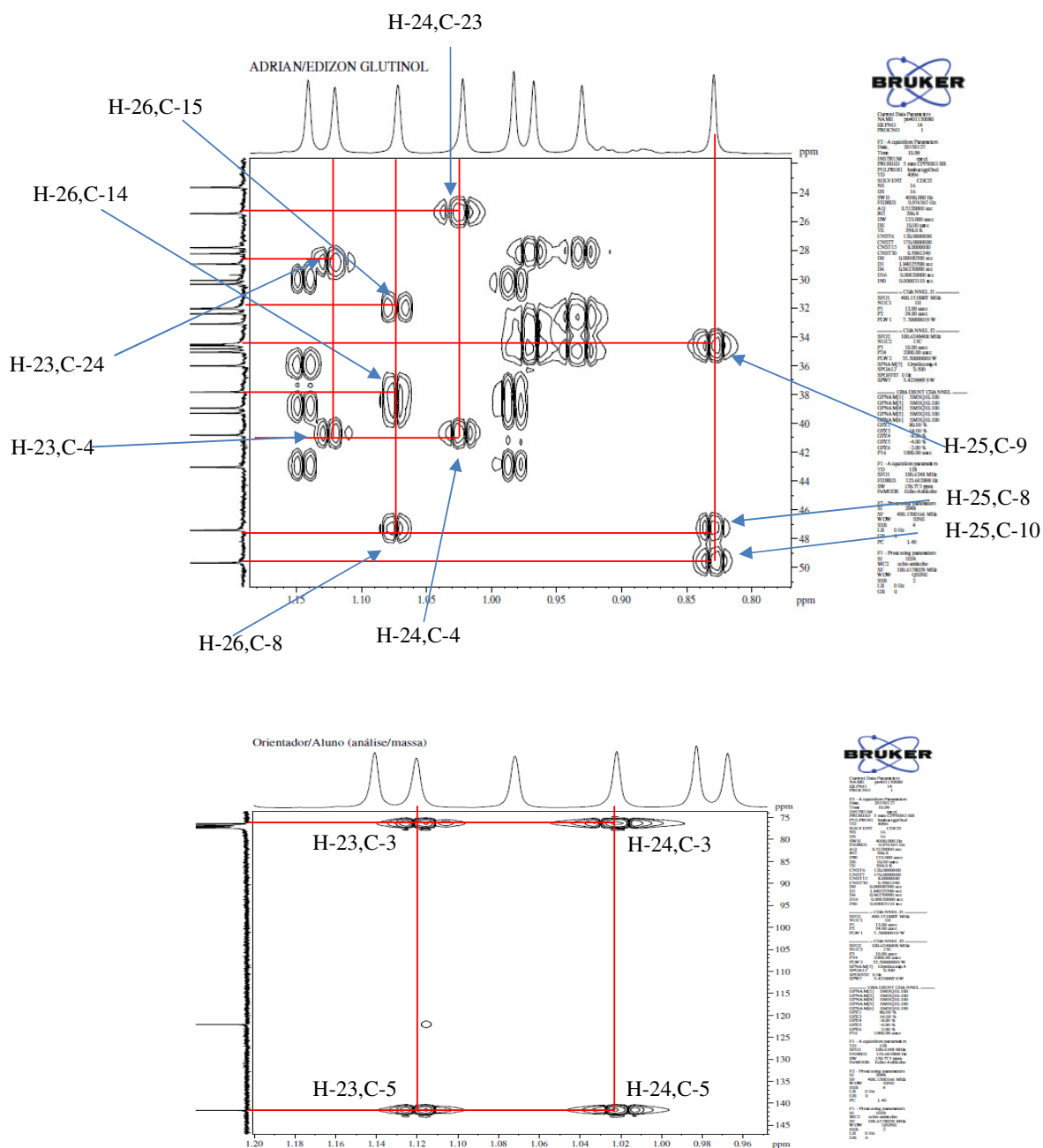
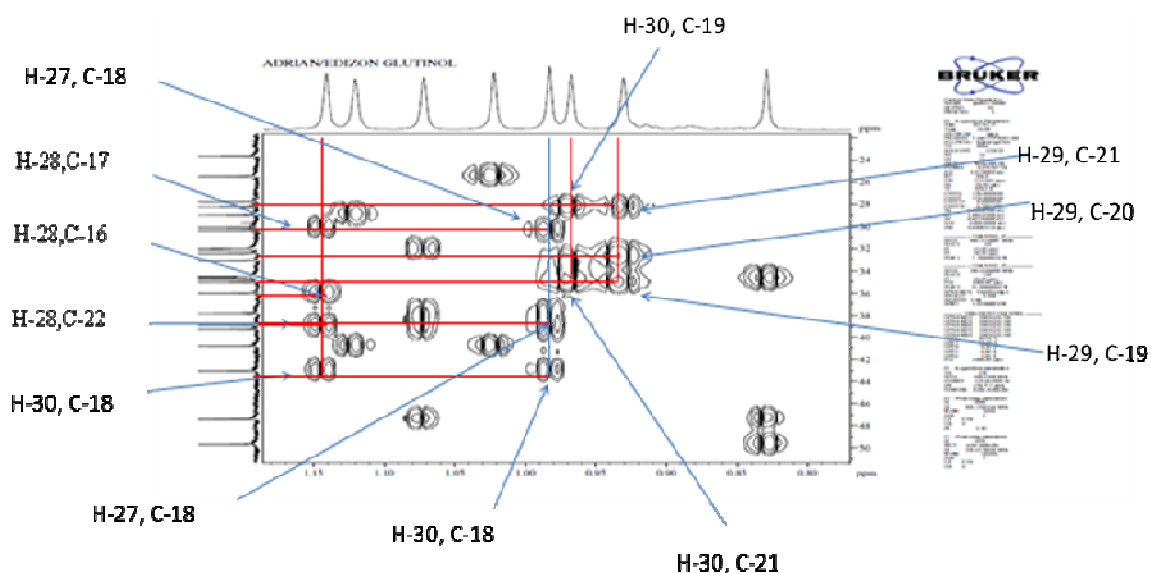
Figura 17. Atribuições das correlações das metilas no HMBC do glutinol SFH-C₂-B.

Figura 18. Ampliação da região de correlação das metilas 23, 23, 25 e 26, no espectro de HMBC da SFH-C₂-B.



O sinal dos hidrogênios δ_H 1,00 (H-27) correlacionam-se com os sinais de carbonos δ_C 30,4 e 42,8, correspondente aos carbonos nas posições 12 e 18, respectivamente. Os sinais de dos hidrogênios δ_H 1,16 (H-28) correlaciona-se com os carbonos δ_C 38,5; δ 30,0 δ 42,8 e δ 38,9, correspondentes aos carbonos nas posições, 16, 17, 18 e 22, respectivamente (Tabela 6). O sinal dos hidrogênios δ_H 0,95 (H-30) correlaciona-se com os dos carbonos δ_C 35,0; 28,2 e 32,9, correspondente aos carbonos nas posições 19, 20 e 21, respectivamente. O sinal dos hidrogênios δ_H 0,95 (H-29) correlacionam-se com o sinal dos carbonos δ_C 28,2; 32,9 e 34,5, correspondente aos carbonos nas posições, 20, 21 e 30, respectivamente (Figura 17 e 19, Anexo 14 e Tabela 5 e 6).

Figura 19. Ampliação da região de correlação das metilas 27, 28, 29 e 30 da SFH-C2-B.



Após analisar os dados dos espectros uni e bidimensionais anteriores e compararmos nossos dados com os da literatura, podemos afirmar que a substância isolada do extrato hexânico (E.H.C) é o glutinol (Anexos 10-15).

Tabela 5. Dados extraídos dos espectros uni e bidimensionais da estrutura do glutinol (RMN-400 MHz/100 MHz; ppm; CDCl₃).

Nº carbono	RMN de ¹³ C (δ _C)			Bidimensionais (δ _H)			RMN de ¹ H (δ _H)	
	Observado	Lit.*	DEPT	HSQC	HMBC	COSY	Observado	Lit.**
C-1	18,0	18,2	CH ₂	1,48			1,48	
C-2	27,8	27,8	CH ₂	1,67			1,67	
C-3	76,0	76,3	CH	3,46	1,14; 104		3,46	3.47
C-4	40,8	39,2	C		1,14; 104			
C-5	141,0	141,6	C		1,14; 104			
C-6	122,6	122,0	CH	5,62			5,62	5.63
C-7	23,7	23,6	CH ₂	1,85			1,85	
C-8	47,4	49,6	CH	1,51	0,85; 1,09		1,51	
C-9	34,8	34,8	C		0,85		-	
C-10	49,2	47,4	CH	2,00	0,85		2,00	
C-11	34,6	34,5	CH ₂	1,56			1,56	
C-12	30,4	30,3	CH ₂	1,35	1,00		1,35	
C-13	39,3	40,8	C					
C-14	37,8	37,8	C		1,09			
C-15	31,9	32,0	CH ₂	1,29	1,09		1,29	
C-16	38,5	36,0	CH ₂	0,93	1,16		0,93	
C-17	30,0	30,0	C		1,16			

Tabela 6. Dados espectrais uni e bidimensionais de RMN do glutinol (RMN-400 MHz/100 MHz; ppm; CDCl₃). (continuação)

Nº carbono	RMN de ¹³ C (δ _C)			Bidimensionais (δ _H)			RMN de ¹ H (δ _H)	
	Observado	Lit.*	DEPT	HSQC	HMBC	COSY	Observado	Lit.**
C-18	42,8	43,0	CH	1,57	1,00; 1,16		1,57	
C-19	35,0	35,0	CH ₂	1,35	0,99		1,35	
C-20	28,2	28,2	C		0,99; 0,95			
C-21	32,9	33,1	CH ₂	1,46	0,99; 0,95		1,46	
C-22	38,9	38,9	CH ₂	0,89	1,16		0,89	
C-23	25,3	28,9	CH ₃	1,14			1,14	1.14
C-24	28,7	25,4	CH ₃	1,04			1,04	1.04
C-25	16	16,1	CH ₃	0,85			0,85	0.85
C-26	19,4	19,6	CH ₃	1,09			1,09	1.09
C-27	18,2	18,4	CH ₃	1,00			1,00	1.00
C-28	32,2	32,3	CH ₃	1,16			1,16	1.16
C-29	35	34,4	CH ₃	0,99			0,99	0.99
C-30	34,5	32,1	CH ₃	0,95	0,99		0,95	0.95

Lit* Miranda et al., 2012.

Lit.**Zhong-Zhao et al., 2011.

5.3.3. Elucidação estrutural da SFH-C₄- A.

Análise do espectro de RMN de ¹H da SFH-C₄- A.

O espectro de RMN de hidrogênio apresentou sete singletos: δ_H 0,70; 0,76; 0,80; 0,91; 0,94; 1,00; 1,65, que pelas integrais representam metilas. Apresentaram-se dois hidrogênios vinílicos terminais em δ_H 4,56 e 4,68. O sinal em δ_H 3,19 (m) é característico de hidrogênio em posição alfa de uma hidroxila (Anexo 17).

Análise do espectro de ¹³C da SFH-C₄- A.

O espectro RMN de ¹³C evidenciou a presença de 30 sinais de carbono. No espectro de C¹³ apareceu deslocamento químico em δ_C 79,0 correspondente ao carbono característico de carbono hidroxilado. Em comparação dos dados obtidos no RMN de carbono e no DEPT 135° e 90° observou a presença de seis carbonos quaternários (C), sete carbonos metílicos (CH₃), onze carbonos metilênicos (CH₂) e seis carbonos metínicos (CH). No espectro de DEPT observou-se a presença de um CH₂ com deslocamento químico δ_C 109 característico de carbono metilênico terminal e o deslocamento químico em δ_C 150 característico de carbono quaternário de dupla ligação o que corrobora com nossos dados de RMN de ¹H (Anexos 18, 19e 20) (Tabela 7). Em comparação dos dados de RMN com os da literatura permitiu inferir que a substância SFH-C₄-A poderia ser o lupeol (Ogbole, et al., 2014; Noor et al., 2014). Para confirmar a identidade, foram analisados os dados de RMN bidimensionais, que auxiliaram na atribuição dos sinais, bem como o cromatograma de HRMS.

O cromatograma de LC-MS apresentou um pico com tempo de retenção de 4,9 min. Esse pico apresentou íon em m/z 409,3907 [M+H]⁺, compatível com a fórmula molecular C₃₀H₅₀O, o que vem confirmar a perda de uma água do lupeol, correspondente a um índice de deficiência de hidrogênio (IDH) igual a seis, para confirmar o cálculo de erro (Δ), a massa teórica que foi obtida utilizando o Masslynx que gerou outro íon molecular já com a perda da água em m/z 409, 3913 [M+H], utilizando a fórmula abaixo obteve-se $\Delta = 1,47$ ppm, uma concordância boa com a fórmula molecular C₃₀H₅₀O (Anexo 16).

Análise dos dados de HMBC da SFH-C₄- A.

Várias correlações de ¹H-¹³C foram observadas no espectro de HMBC da SFH-C₄-A (Anexo 22). Na figura 18 estão apresentados os dados de correlações e ampliações provenientes do espectro de HMBC da SFH-C₄-A. As correlações apresentadas nessa figura estão de acordo com os dados de RMN de ¹H, RMN de ¹³C, DEPT, bem como os dados de HSQC, HMBC e COSY (Anexos 16-23 Tabela 7, Figura 20, 21 e 22).

Figura 20. Atribuições das correlações das metilas no HMBC do lupeol, (SFH-C₄- A).

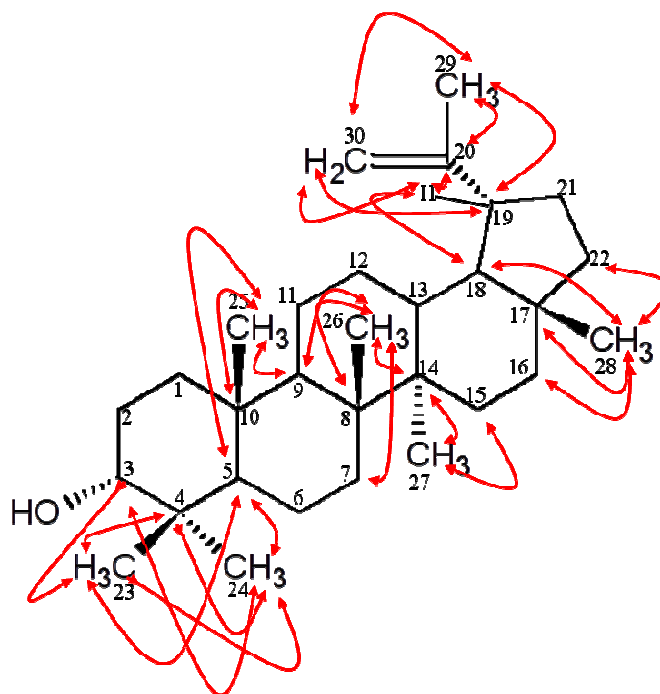


Figura 21. Ampliação da região de correlação do HMBC dos hidrogênios das metilas 23, 24, 25, e 26 do lupeol (SFH-C₄- A).

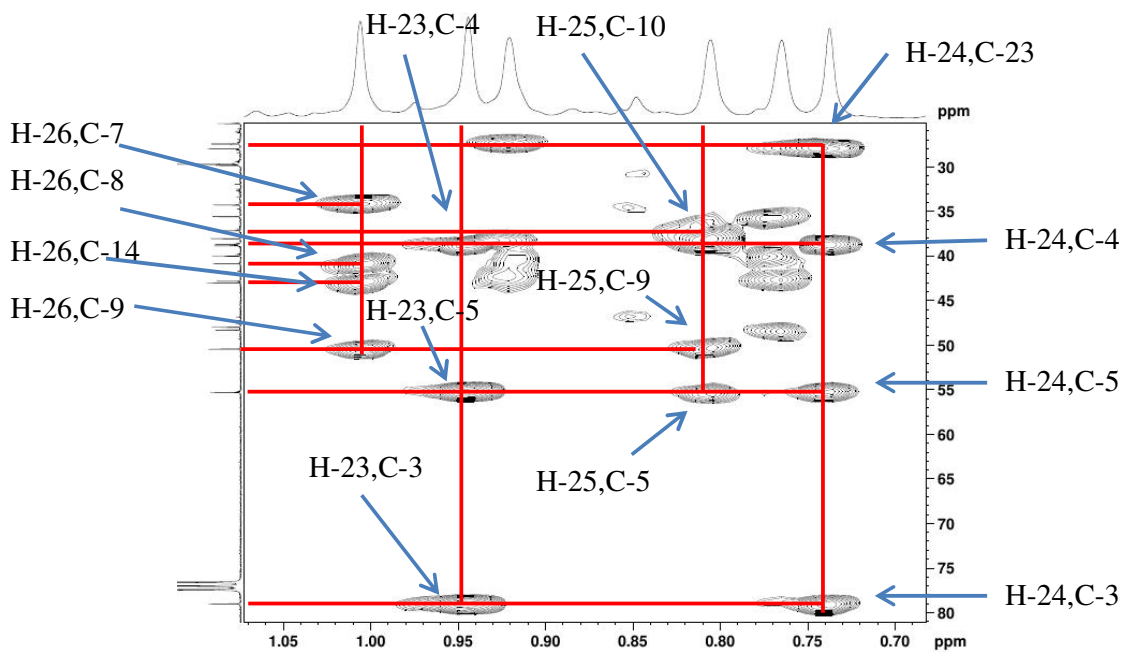
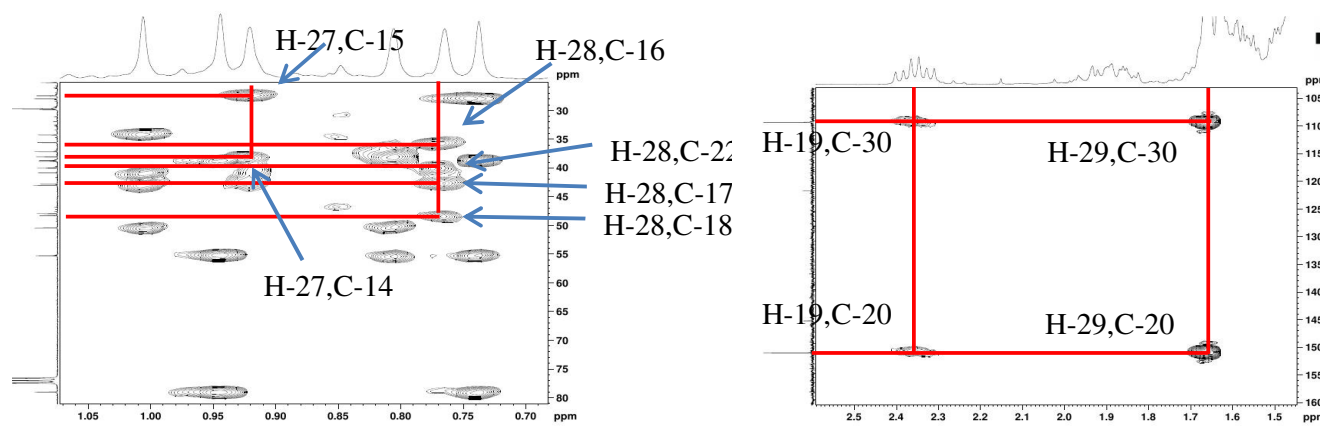


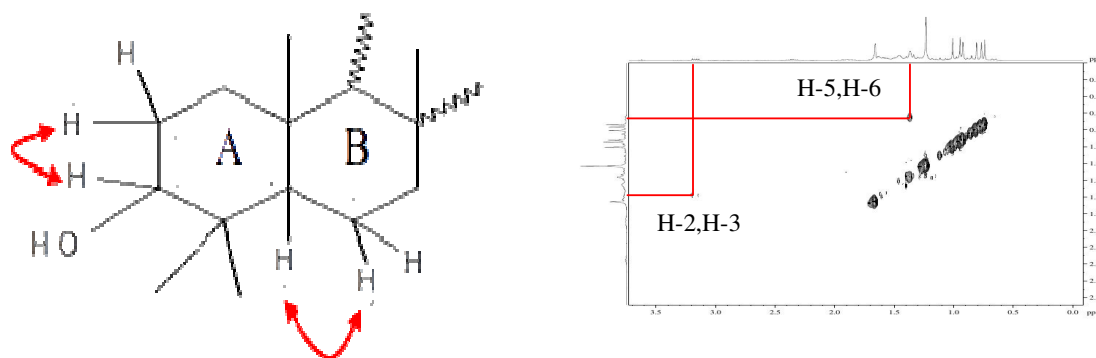
Figura 22. Ampliação da região de correlação do HMBC dos hidrogênios das metilas 27, 28, 29, e 30 do lupeol (SFH-C₄-A).



Análise dos dados de COSY do lupeol (SFH-C₄-A).

Apenas duas correlações foram observadas no COSY da SFH-C₄-A, o hidrogênio δ_H 3,19 (H-3) com os hidrogênios δ_H 1,60 (H-2) e entre o hidrogênio δ_H 0,70 (H-5) com o hidrogênio δ_H 1,39 (H-6) (Figura 23, Anexo 23).

Figura 23. Estrutura do anel A e B do lupeol e ampliação da região de acoplamento do espectro de COSY (SFH-C₄-A).



Todos os dados de RMN 1D e 2D e HRMS apontam para a identidade da SFH-C₄-A ser o lupeol (Venkatachalapathi, 2012 e Prakash et al., 2012).

Tabela 7. Dados extraídos dos espectros uni e bidimensionais da estrutura da lupeol (RMN-400 MHz/100 MHz; ppm; CDCl₃).

Nº carbono	RMN de ¹³ C (δ _C)			Bidimensionais (δ _H)			RMN de ¹ H (δ _H)	
	Observado	Lit.*	DEPT	HSQC	HMBC	COSY	Observado	Lit.**
C-1	38,7	38,7	CH ₂	0,90			0,90	
C-2	27,4	27,4	CH ₂	1,60		3,19	1,60	
C-3	79	79,0	CH	3,19	0,96; 0,74		3,19	
C-4	38,8	38,9	C		0,96; 0,74			
C-5	55,3	55,3	CH	0,68	0,96; 0,74; 0,83	1,39	0,68	
C-6	18,3	18,3	CH ₂	1,39; 1,52			1,39; 1,52	
C-7	34,3	34,3	CH ₂	1,39			1,39	
C-8	40,8	40,8	C					
C-9	50,04	50,4	CH	1,25	0,83; 1,03		1,25	
C-10	36,6	37,2	C		0,83			
C-11	21,3	20,9	CH ₂	1,26			1,26	
C-12	25,2	25,1	CH ₂	1,66			1,66	
C-13	38,4	38,5	CH	1,65			1,65	
C-14	42,8	42,8	C		1,03; 0,94			
C-15	34,3	34,3	CH ₂	1,68	0,94		1,68	
C-16	35,6	35,6	CH ₂	1,46	0,78		1,46	
C-17	41,5	43,0	C		0,78			

Lit* Ogbole, et al., 2014; Lit** Noor et al., 2014.

Tabela 7 Dados extraídos dos espectros uni e bidimensionais da estrutura da lupeol (RMN-400 MHz/100 MHz; ppm; CDCl₃). (continuação)

Nº carbono	RMN de ¹³ C (δ _C)			Bidimensionais (δ _H)			RMN de ¹ H (δ _H)	
	Observado	Lit.*	DEPT	HSQC	HMBC	COSY	Observado	Lit.**
C-18	48,4	48,3	CH	1,37			1,37	
C-19	47,9	48	CH	2,37	2,37; 0,78		2,37	
C-20	150	151.0	C					
C-21	29,6	29.8	CH ₂	1,25			1,25	
C-22	40,0	40.0	CH ₂	1,38			1,38	
C-23	27,9	28,0	CH ₃	0,96	0,96		0,96	1,00
C-24	15,5	15,4	CH ₃	0,74			0,74	0,77
C-25	16,1	16,1	CH ₃	0,83			0,83	0,90
C-26	16	16,0	CH ₃	1,03			1,03	1,04
C-27	14,6	14,5	CH ₃	0,94			0,94	0,93
C-28	18,04	18,0	CH ₃	0,78			0,78	0,85
C-29	19,3	19,3	CH ₃	1,67	4,56		1,67	1,65
C-30	109,2	109,3	CH ₂	4,56; 4,68			4,56; 4,68	4,54; 4,66

Lit* Ogbole, et al., 2014.

Lit** Noor et al., 2014.

5.3.4. Elucidação estrutural da SFC-C₄-A.

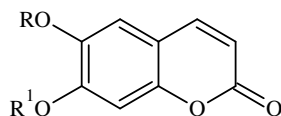
O cromatográfico de RHMS exibiu um pico com tempo de retenção de 5 min e m/z 193,0498 $[M+H]^+$. O m/z condiz à fórmula C₁₀H₈O₄. Foi feito cálculo no Masslynx para todos os principais íons adutos dessa fórmula, 193,0498 $[M+H]^+$, 215,0314 $[M+Na]^+$, 407,0730 $[Dímero+Na]^+$. Foram realizados os cálculos da Δ do erro, com os resultados de $\Delta= 1,55$, $\Delta= 2,79$ e $\Delta= 3,19$ ppm, respectivamente (Anexo 24).

Análise dos espectros de RMN de ¹H e ¹³C da SFC-C₄-A.

O espectro de hidrogênio apresentou 5 picos sendo 3 singletos: com deslocamento químico em δ_H 3,96 (3H), na posição δH 6,85 (1H), na posição em δ_H 6,92 (1H), O espectro apresentou 2 dubletos: na posição δ_H 6,28 (1H; $J = 9$ Hz), outra na posição δ_H 7,56 (1H; $J = 9$ Hz) (Anexo 25, Tabela 8).

O espectro de carbono apresentou 10 picos (Anexo 26, Tabela 8). Esses dados foram comparados aos adquiridos por Dias et al., (2003) para escopoletina (Figura 24) . Na época restou duvidas se o caso de Dias et al. não se tratava da isoescopoletina (Figura 24), devido à semelhança de dados de RMN. No presente trabalho foram adquiridos dados de RMN em 2D, para confirmar a identidade de SFC-C₄-A.

Figura 24. Estruturas das possíveis cumarinas para a SFC-C₄-A.



R=CH₃, R¹ = H Escopoletina

R=H, R¹ = CH₃ Isoescopoletina

Espectros de RMN de 2D da cumarina SFC-C₄-A.

As correlações observadas no HMBC da SFC-C₄-A estão resumidas na Figura 25 as ampliações das correlações estão apresentadas na Figura 26 e Tabela 8, Anexo 28.

Figura 25. Atribuições das correlações de HMBC (H), COSY (C) e NOESY (N) da SFC-C₄-A (escopoletina).

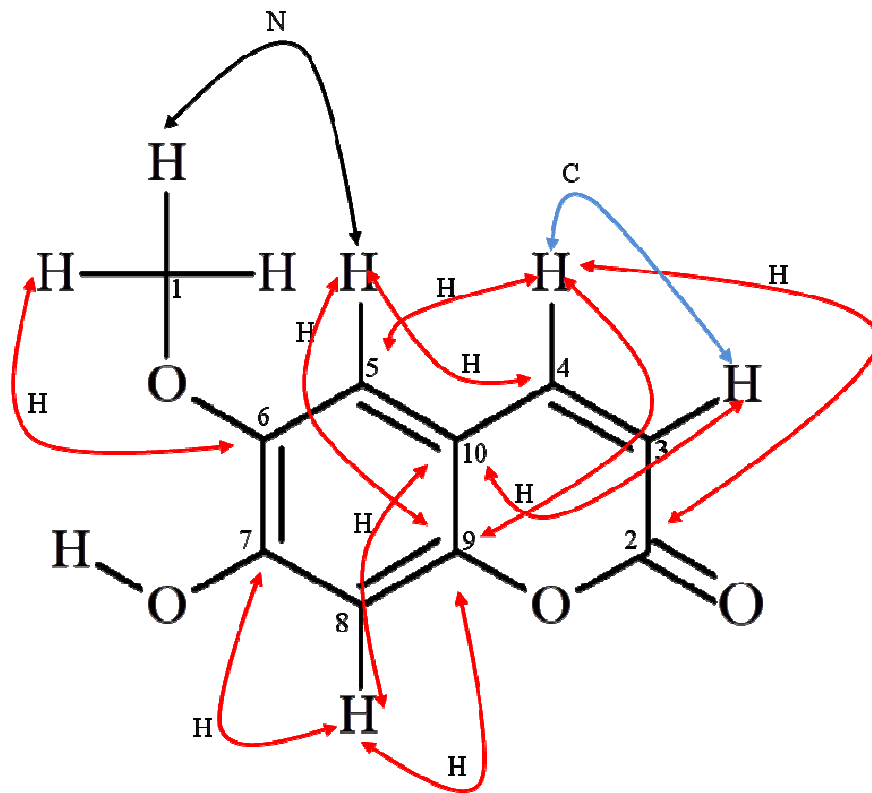
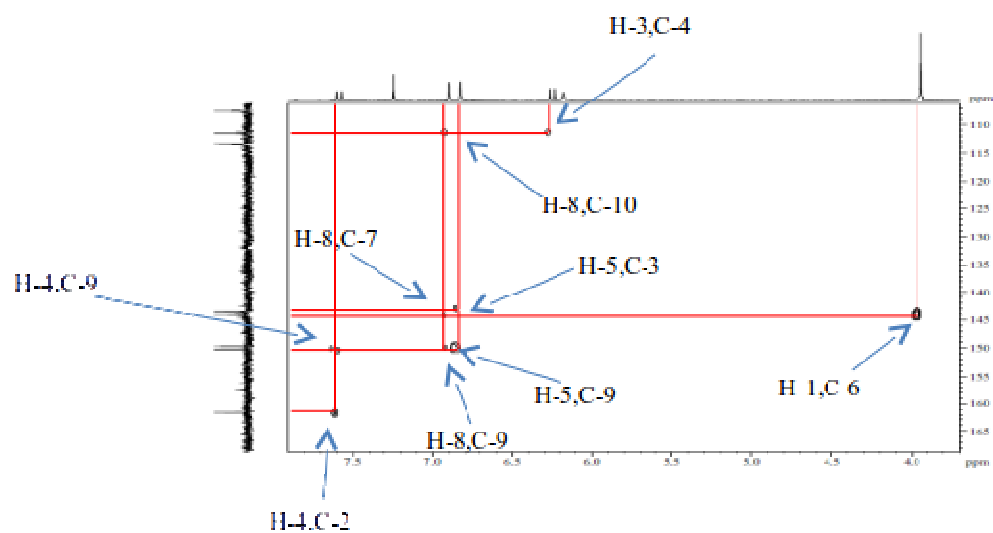


Figura 26. Ampliação do espectro de HMBC da SFC-C₄-A (escopoletina).



Análise do espectro de COSY da SFC-C₄-A (escopoletina).

No espectro obtido dessa substância, foi obtido apenas uma correlação entre os sinais de hidrogênios na posição δ_H 6,28 (H-2) e δ_H 7,56 (H-3) (Figura 25 Anexo 29).

Análise do espectro de NOESY da SFC-C₄-A (escopoletina).

No espectro de NOESY mostra correlação entre hidrogênios à longa distância pelo espaço. O espectro de NOESY foi importante para a confirmação da posição da metoxila evidência a identidade da SFC-C₄-A ser a escopoletina. O espectro mostrou correlação entre os hidrogênios δ_H 3,96, da metoxila e o hidrogênio δ_H 6,86 sendo o mesmo do anel aromático da posição 5 (Figura 25 e 27, Anexo 30).

Figura 27. Ampliação do espectro de NOESY da SFC-C₄-A (escopoletina).

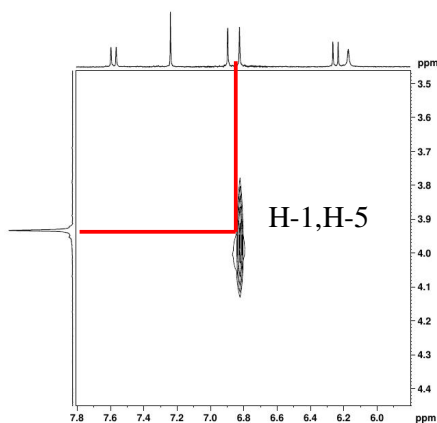


Tabela 8. Dados espectrais para escopoletina (SFC-C₄-A) (RMN-300 /75 MHz; CDCl₃).

Nº carbono	RMN de ¹³ C (δ _C)			Bidimensionais (δ _H)				RMN de ¹ H (δ _H)	
	Observado	Lit.*	DEPT	HSQC	HMBC	COSY	NOESY	Observado	Lit.**
C-1	56,3	56.4	CH ₃	3,93				3,93	3.96
C-2	161,1	161.4	C		143,1				
C-3	113,3	113.4	CH	6,24		7,56		6,24	6.27
C-4	143,1	143.3	CH	7,56	6,83			7,56	7.60
C-5	107,4	107.5	CH	6,83	7,56		3,93	6,83	6.85
C-6	143,8	144.0	C		3,93				
C-7	144,0	149.7	C		6,89				
C-8	103,7	103.2	CH	6,89				6,89	6.92
C-9	150,0	150.0	C		6,83; 7,56; 6,89				
C-10	111,2	111.5	C		6,24; 6,89				

Lit** Kang., et al., 2014.

Lit* Terra et al., 2013.

5.3.5. Elucidação estrutural da SFC-C₅-B.

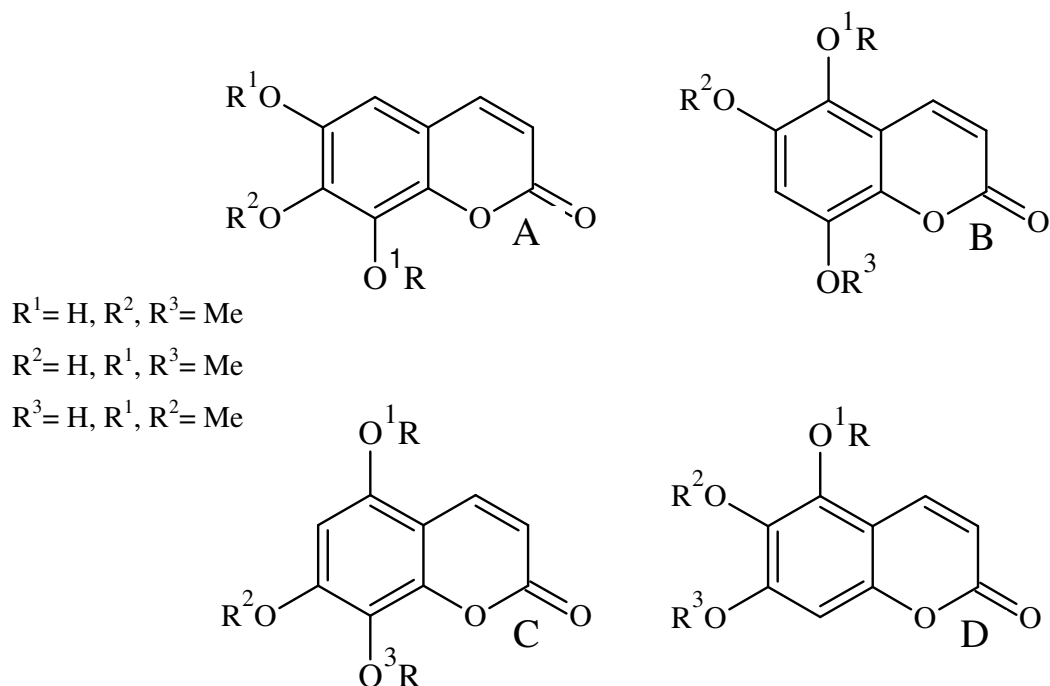
Antes do isolamento da SFC-C₅-B, essa substância havia sido detectada em uma mistura com escopoletina. A análise de LC-HRMS dessa mistura revelou que a substância com tempo de retenção de 5,3 min possuía m/z 223,0620 [M+H]⁺ e 245,0437 [M+Na]⁺, maior que a da escopoletina (Seção 5.4, Anexo 24). Desses dados pode-se inferir uma fórmula molecular de C₁₁H₁₀O₅ (Δ [M+H]⁺ e [M+Na]⁺, a variação de fator de erro deu Δ = 6,27 e 4,48 ppm, respectivamente das razões m/z (Anexo 31).

Análise do espectro de RMN de ¹H e ¹³C da SFC-C₅-B.

O espectro de hidrogênio apresentou 5 picos, sendo 3 singletos: com deslocamento químico em δ_H 3,92 (3H), δ_H 4,06 (3H) e δ_H 6,64 (1H). O espectro de RMN de ¹H apresentou dubletos em δ_H 6,26 (1H) e δ_H 7,58 (1H). Esses dados evidenciam a presença de duas metoxilas na estrutura da SFC-C₅-B. No espectro de carbono, observou-se 11 picos, o que corrobora com os dados de RMN de ¹H quanto à presença de duas metóxila (Tabela 9, Anexos 32, 33e 34).

A análise dos espectros de RMN da SFC-C₅-B revelou semelhança com os dados da cumarina escopoletina, com uma metóxila a mais (hidroxi-dimetoxi-cumarina). *A priori* existem 12 isômeros constitucionais com esses três substituintes no anel aromático (A-D) conforme Figura 28.

Figura 28. Possíveis estruturas para a cumarina isolada SFC- C₅ -B.



A análise das correlações do espectro de HMBC da SFC-C₅-B estão apresentadas nas Figuras 29 e 30 e resumido na Tabela 9 (Anexo 35).

Figura 29. Estrutura da cumarina SFC-C₅-B.

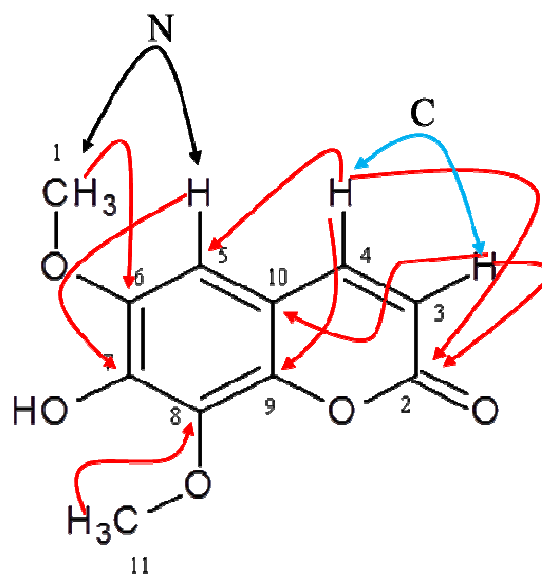
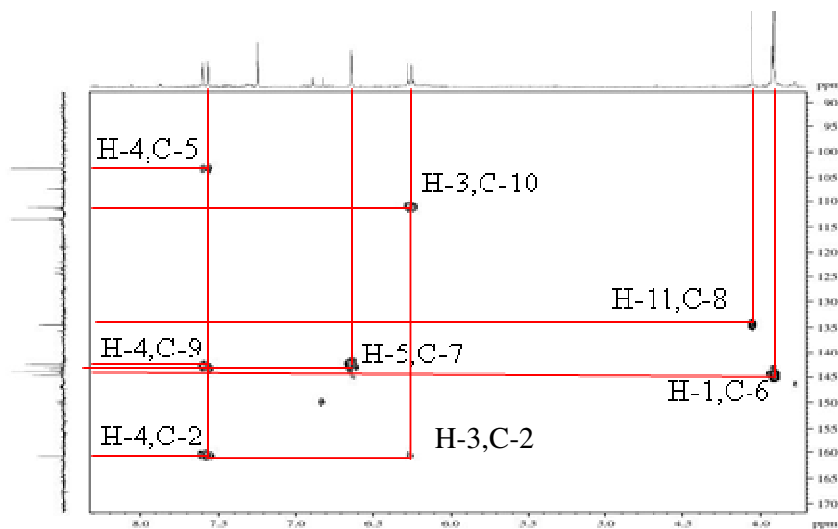


Figura 30. Espectro de HMBC da cumarina SFC-C₅-B.



Os dados do espectro de HMBC foram consistentes com a não substituição da posição 5 do anel aromático (correlação 3J entre δ_H 7,58 (H-4, 1H) e o δ_C 103,2 (C-5) deixando 3 possíveis isômeros constitucionais do tipo A identificado na figura 28.

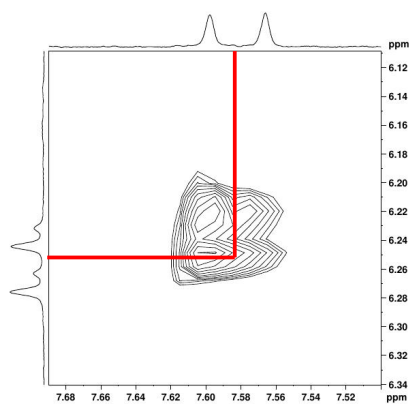
Com a exceção de uma correlação 2J entre δ_H 6,26 (H-3) e o δ_C 160,7 (C-2), todas as

demais correlações no HMBC foram interpretadas como sendo 3J que levaram à atribuições dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C dos núcleos aromáticos (Figura 29, Tabela 9).

Análise do espectro de COSY (C) da SFC- C_5 -B.

No espectro de COSY observou-se apenas uma correlação entre os sinais dos em δ_{H} 6,26 (H-3) e δ_{H} 7,58 (H-4) (Figura 31. Anexo 36).

Figura 31. Espectro de COSY da SFC- C_5 -B.



Análise do espectro de NOESY (N) da SFC- C_5 -B.

No espectro de NOESY observou-se uma correlação que foi atribuída aos sinais dos hidrogênios da metoxila em δ_{H} 3,92 (H-1) e o H-5 (H_δ 6,64) (Figura 32) Com isso o conjunto de dados de RMN de ^1H , RMN de ^{13}C , HMBC e COSY eram consistentes com a estrutura da fraxidina ou isofraxidina (Figura 33).

Figura 32. Ampliação da região de acoplamento da SFC- C_5 -B.

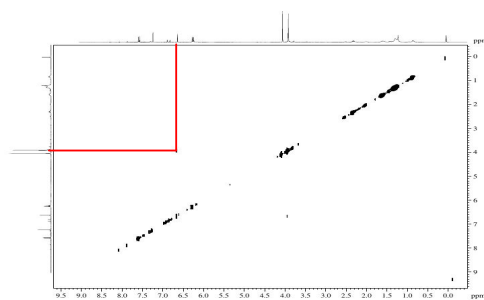
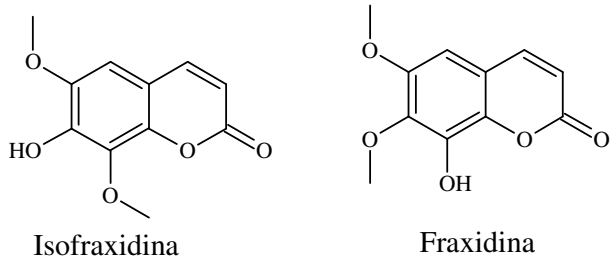
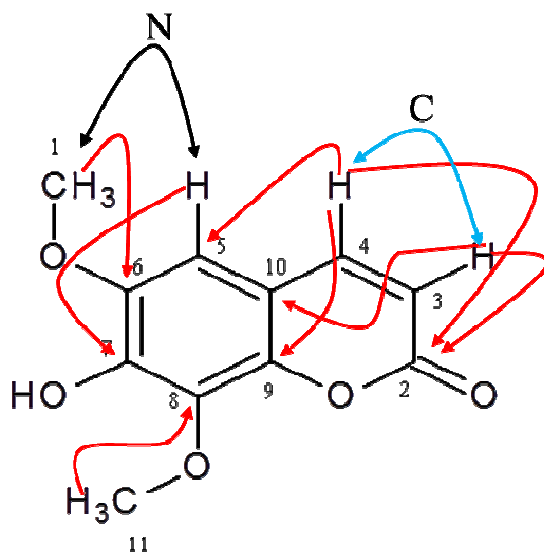


Figura 33. Estruturas da isofraxidina e fraxidina.



Esses isômeros ainda não tinham sido relatados em Convolvulaceae, sendo relatado apenas em planta da mesma ordem como *Solanum indicum* da família Solanaceae (ordem Solanales). São relatados em várias outras famílias. Esses isômeros foram isolados em maior frequência no gênero *Artemisia*, em 11 espécies da família Asteraceae.

Figura 34. Estrutura da cumarina e atribuições de HMBC, COSY e NOESY da SFC-C₅-B.



A rigor, os dados de RMN da literatura estão de acordo com a identidade de SFC-C₅-B podendo ser a isofraxidina (Figura 34). Isso se baseia na suposição de que no espectro de HMBC não há acoplamento 4J entre H-5 e H-8, o que poderia levar a uma inversão na atribuição de C-7 e C-8 (e conclusão de que a SFC-C₅-B tratar-se-ia da fraxidina).

Foram consultados dados de RMN da literatura da fraxidina e isofraxidina (Figura 33), que estão resumidas na tabela 9. Como se pode observar, os dados para SFC-C₅-B estão bem consistentes com os dados para isofraxidina.

Tabela 9. . Dados extraídos dos espectros uni e bidimensionais da estrutura da isofraxidina (RMN-300/75 MHz; CDCl₃).

Nº carbono	RMN de ¹³ C (δ _C)				Bidimensionais (δ _H)				RMN de ¹ H (δ _H)		
	Observado	Lit.*	Lit.**	DEPT	HSQC	HMBC	COSY	NOESY	Observado	Lit.*	Lit.**
C-1	56,5	56,4	55,9	CH ₃	3,92			6,64	3,92	3,94 s	3,71 s
C-2	160,7	160,6	160,1	C		6,26; 7,58					
C-3	113,5	113,5	114,5	CH	6,26		7,58		6,26	6,28 d J= 10	6,28 d, J= 10
C-4	143,9	143,8	144,6	CH	7,58				7,58	7,60 d J= 10	7,83 d, J= 10
C-5	103,2	103,2	100,2	CH	6,64	5,58			6,64	6,66 s	6,74 s
C-6	144,6	144,6	148,9	C		3,92					
C-7	142,5	142,6	141,2	C		6,64					
C-8	134,5	134,4	138,2	C		4,06					
C-9	143,06	143,0	140,3	C		7,58					
C-10	111,2	111,2	114,2	C		6,26					
C-11	61,6	61,6	60,5	CH ₃	4,06				4,06	4,09 s	3,79 s

Lit.^{C***eH**} Hu et al ., 2011. (400 MHz, CDCl₃) Fraxidina.

Lit.^{C* eH*} Panichayupakaranan et al., 1995. (500 MHz, CDCl₃) Isofraxidina.

5.3.6. Elucidação estrutural da SFE-C₂-C.

O cromatográfico de LC-HRMS mostrou pico cromatográfico com tempo de retenção de 0,5 min, que possuíam dois íon adutos com m/z 137,0846 $[M+H]^+$ e 159,0682 $[M+Na]^+$. Para essas massas foi inferida a fórmula C₅H₁₂O₄. Com o auxílio do programa computacional Masslynx, foi obtida a massa teórica para ambos o picos e então realizado o cálculo do erro Δ . Para os dois picos, os valores de Δ foram 23,3 e 30 ppm, respectivamente. Esses valores são altos mas aceitáveis para substâncias já conhecidas, contando ainda com outros dados apresentados a seguir (Anexo 37).

Análise do espectro de ¹H da (SFE- C₂ -C).

De acordo com os dados da tabela 12, o espectro de RMN de hidrogênio mostrou um singlete em δ_H 1,21(s), esse deslocamento químico tem característica de metila (3H). Os hidrogênios em δ_H 3,91 dd; 3,75 dd e 3,68 dd, o hidrogênio δ_H 3,65 apresentou-se como tripleto e o hidrogênio δ_H 3,56 apresentou-se como um dubleto. Esses deslocamentos são característicos de hidrogênios α de álcoois alquílicos (Figura 35 e Anexo 38). Os espectros de ¹³C e DEPTs confirmam a presença de 5 carbonos nessa estrutura sendo um quaternário, dois metilênicos, um metínico e um metílico (Tabela 11, Anexo 39). Os dados das correlações do espectro de HSQC contido na tabela 11 corroboram com os dados de 1D (Tabela 10 e 11 e Anexo 40).

Análise do espectro de HMBC da SFE- C₂ -C.

Com os dados espectrais descritos anteriormente e com as correlações do HSQC e HMBC descrito na tabela 11 (Anexo 40 e 41 e Figura 35 e 36), foi possível inferir que uma estrutura para a SFE- C₂-C, como sendo o 2-C-metil-butano-1,2,3,4-tetrol.

Figura 35. Correlação do espectro de HMBC (H) e COSY (C) da (SFE- C₂-C).

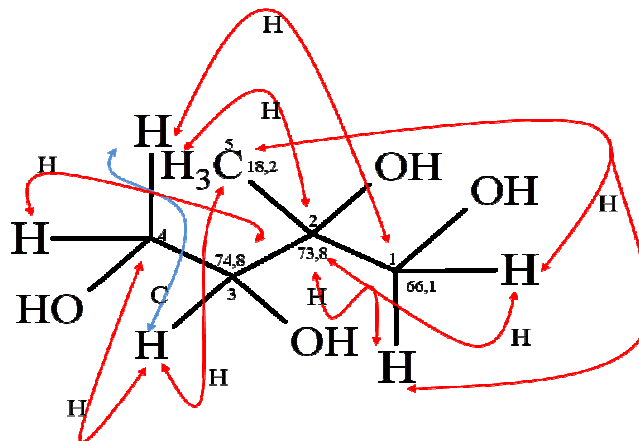
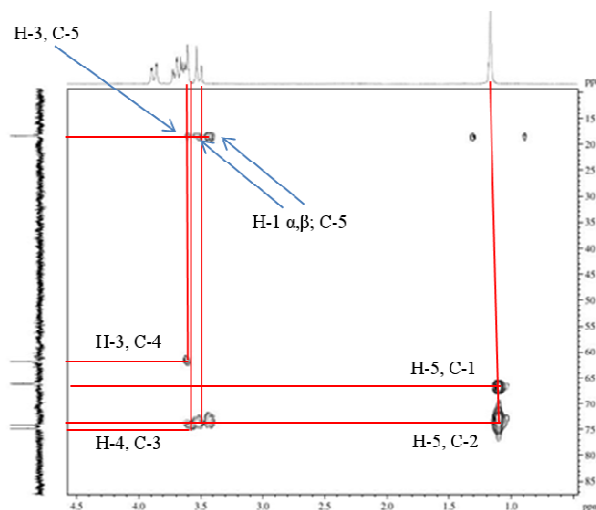


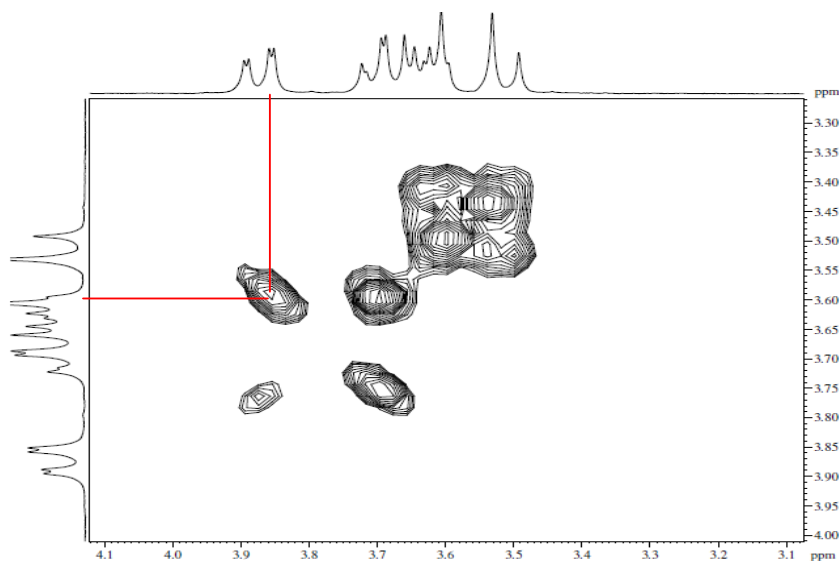
Figura 36. Ampliação da região de correlação no HMBC da SFE- C₂-C.



Espectro de COSY do 2-metil-butano-1,2,3,4-tetrol (SFE- C₂ -C).

O espectro exibiu apenas uma correlação entre hidrogênios vizinhos, onde o sinal do hidrogênio em δ_H 3,75 (H-3) está correlacionando com o sinal do hidrogênio em δ_H 3,68 (H-4) (Figura 35 e 37, Anexo 42).

Figura 37. Ampliação do espectro de COSY do 2-C-metil-butano-1,2,3,4-tetrol (SFE-C₂ - C).



Existem 4 estereoisômeros do 2-*C*-metil-butano-1,2,3,4-tetrol conforme mostrado na figura 36. De acordo com trabalhos consultados (Sakamoto et al., 2000; Sevenka et al., 2008) é difícil distingui-los utilizando RMN de ^1H , RMN de ^{13}C e polarimetria. Um método conseguiu diferenciar os 4 estereoisômeros por dicroísmo circular (Moen et al., 2007).

Figura 38. Estruturas dos todos os isômeros do 2-metil-butano-1,2,3,4-tetrol.

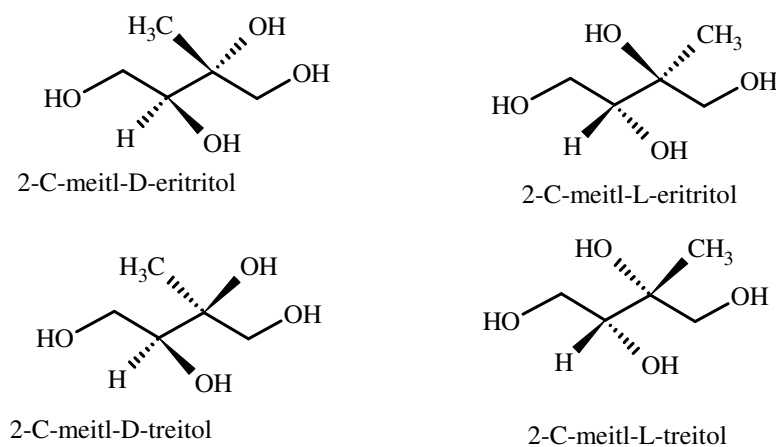


Tabela 10. Dados comparativos entre os estereoisômeros 2-*C*-metil eritritol e o 2-*C*-metil tetrol de Moen et al., (2007).

Nº. C/H	Teitrol	Teitrol	SFE-C ₂ -C	SFE-C ₂ -C	Eritritol	Eritrito
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	66,4	3,40-3,45	66,1	3,56-3,61	67,9	3,40-3,50
2	74,4		73,9		75,8	
3	75,4	3,55	74,8	3,75	76,6	3,58
4	62,2	3,67-3,45	61,9	3,68-3,91	63,6	3,52-3,75
5	19,4	1,0	18,2	1,21	20	1,1

Tabela 11. Dados extraídos dos espectros uni e bidimensionais da estrutura da 2 metil-C- eritritol (RMN -300 MHz/75 MHz; ppm; CDCl₃).

Nº carbono	RMN de ¹³ C (δ _C)			Bidimensionais (δ _H)				RMN de ¹ H (δ _H)	
	Observado	Lit.*	DEPT	HSQC	HMBC	COSY	NOESY	Observado	Lit.*
C-1	66,1	67,9	CH ₂	3,56; 3,61	1,21		6,64	3,56; 3,61dd	3,40; 3,50 dd
C-2	73,9	75,8	C		1,21; 3,56; 3,61				
C-3	74,8	76,6	CH ₂	3,75	3,68	3,68		3,75 t	3,75 t
C-4	61,9	63,9	CH	3,68; 3,91	3,75			3,68; 3,91 dd	3,58; 3,52 dd
C-5	18,2	20	CH ₃	1,21	3,75; 3,56; 3,61			1,21 s	1,1 s

Lit*. Moen, et al., 2007.

6. CONCLUSÃO

O estudo fitoquímico do caule de *Bonamia ferruginea* (cipó-tuíra) levou ao isolamento de três classes de substâncias. Do extrato hexânico foram isolados os triterpenos lupeol, friedelina e glutinol. Do extrato clorofórmico foram isoladas duas cumarinas, a escopoletina e a isofraxidina. Do extrato acetato de etila foi isolado o hemiterpeno 2-C-metil eritritol. Os extratos clorofórmicos, metanólicos e aquosos, feitos em soxhlet e extratos aquosos feitos por infusão e decocção não se mostraram ativos contra o *Plasmodium falciparum* no teste *in vitro*. Os extratos metanólico e aquoso não foram ativos contra o *Plasmodium berghei* em testes *in vivo*.

O presente trabalho foi de grande relevância, pois contribuiu para o conhecimento da composição química desse gênero e espécie. Há poucos trabalhos na literatura sobre o gênero *Bonamia*. Sobre a espécie *B. ferruginea*, existiam relatos da presença de escopoletina (Dias et al., (2002) e da detecção de alguns triterpeno e outras substâncias não isolados (Siani et al., 2006).

Cabe ainda uma investigação mais aprofundada dessa planta já que a população ribeirinha se utiliza do chá dessa planta para tratamento da malária, podendo a mesma, não agir diretamente no parasita, mas na recuperação hepática do paciente.

7. REFERENCIA BIBLIOGRAFICA.

Agosta, W.C., Medicines and Drugs from Plants. Journal of Chemical Education. v. 74, 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, and Vieira, P.P. *In vitro* inhibition of *Plasmodium falciparum* by substances isolated from Amazonian antimalarial plants. Mem Instituto Oswaldo Cruz. v. 102, 2007.

Aragão, P.C.A., Toledo, J.B., Morais, A.A., Braz-Filho, R. Substâncias naturais isoladas de *Stigmaphyllon e Brsonima variabilis*. Quimica Nova. v. 13, 1990.

Austin, D.F., Cavalcante, P.B. Convolvulácea da Amazônia. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA), Museu Paraense Emílio. 1982.

Bloland, P.B., Kazembe, P.N., J. Oloo, A.J., Barat, B.L.M., Ruebush, T.K. Chloroquine in Africa: critical assessment and recommendations for monitoring and evaluating chloroquine therapy efficacy in sub-Saharan Africa. Tropical Medicine and International Health. v. 3, 1998.

Bloland, P.B., Kazembe, P.N., Oloo, A.J., Himonga, B., Barat, L.M., Ruebush, T.K. Chloroquine in Africa: critical assessment and recommendations for monitoring and evaluating chloroquine therapy efficacy in sub-Saharan Africa. Tropical Medicine and International Health. v. 3, 1998.

Borgati, T.F.; Síntese e Atividade Antimalárica de Derivados 1,2,3-Triazólicos do lupeol. Dissertação apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais. 2013.

Brasil. Fundação de Vigilância em saúde do Amazonas. Laboratório de Saúde Pública. Laboratório de Controle de Qualidade. Manual do diagnóstico da malária. 2008.

Brasil. Ministério da Defesa. Exército Brasileiro. Departamento-Geral do Pessoal. Diretoria de Saúde; Informativo sobre saúde preventiva. 2004.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de vigilância epidemiológica / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. 7. ed. Brasília : Ministério da Saúde. 2009.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia prático de tratamento da malária no Brasil / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília: Ministério da Saúde. 2010.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema nacional de vigilância em saúde: relatório de situação: Amazonas / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. 5. ed. Brasília: Ministério da Saúde. 2011.

- Camargo, R.P. A malária encenada no grande teatro social. *Estudos Avançados*. v. 9, 1995.
- Corrêa, P. M.; Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional. v. 2, 1984.
- Dias, H.B., Pohlit, A.M. Estudo fitoquímico Biomonitorado de *Bonamia ferruginea*. In: XIII Jornada de Iniciação Científica do PIBID/CNPq/FAPEAM/INPA. v. 13, 2004, Manaus. Resumo XIII Jornada de Iniciação Científica do PIBID/CNPq/FAPEAM/INPA. Manaus: INPA. v. 13, 2004.
- Ferraz. H. O., Silva. M. G, Carvalho. R., Suffredini. I.B., Kato. E. T. M., Arakaki, F. Bacchi, E. Phytochemical study and evaluation of the antimicrobial activity and cytotoxicity of *Cuscuta racemosa* M. *Revista Brasileira de Farmacognosia* . v. 21, 2011.
- Ferreira, E.M., Noronha, L.K.G., Silva, J.S., Costa, T.S.A., Silva, S.M., Costa, A.C. Levantamento do gênero *Bauhinia* através de análises feitas no herbario ian. *Anais do 10º Seminário Anual de Iniciação Científica da UFRA*, 26 à 29 de setembro de 2012.
- Ferreira. A. A, Amaral. A. F, Duarte. I. D. G, Oliveira. P. M, Alves. R. B, Silveira. D, Azevedo. A. O, Raslan. D. S, Castro. M. S. A. Antinociceptive effect from *Ipomoea cairica* extract. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 105, 2006.
- Franco, L.L., Gomes, P.R., Vale, M.S. Almeida, M.V. Síntese de Tetraoxanos, Candidatos a Antimaláricos. Sociedade Brasileira de Química (SBQ), 32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 2009.
- Freitas, L.L. Eficácia da associação de arteméter e lumefantrina no tratamento da malária por *Plasmodium falciparum* resistente à cloroquina em Timor Leste; Aluna do 6º ano de Mestrado Integrado de Medicina da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, 2010.
- Gomes, E.T. Substâncias químicas de origem vegetal com interesse medicamentoso. medicamentos de origem vegetal. *Boletim SPQ*. v. 42, 1990.
- Greendwood, D., Conflicts of interest: The genesis of synthetic antimalarial agents in peace and war. *J. Antimicrob Chemother*. v. 36, 1995.
- Griffin, W. J., Lin, G. D. Chemotaxonomy and geographical distribution of tropane alkaloids. *Phytochemistry*. v. 53, 2000.
- Gupta, P., Sharma, U., Gupta. P., Siripurapu, K. B., Maurya, R. Evolvosides C–E, flavonol-4-O-triglycosides from *Evolvulus alsinoides* and their anti-stress activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. v. 121, 2013.
- Heywood, V.H. Flowering plants of the world. New York: Oxford University Press. 1993.
- Hu, H.B., Zheng, X.D., Jian, Y.F., Liu, J.X., Zhu, J.H. Constituents of the *Root of Anemone tomentosa*. *Arch Pharm Res*. v. 34, 2011.
- Jenett-Siems, K., Schimming, T., Kaloga, M., Eich, E., Siems, K., Gupta, M .P., Witte, L e Hartmann, T., Pyrolidizine alkaloids of *Ipomoea hederifolia* and related of species. *Phytochemistry*. v. 47, 1997.

- Kang, Y.F., Liu, C.M., Kao, C.L., Chen, C.Y. Antioxidant and Anticancer Constituents from the Leaves of *Liriodendron tulipifera*. *Molecules*. v. 19, 2014.
- Karaman, R. Antimalarial Atovaquone Prodrugs Based on Enzyme Models Molecular Orbital Calculations Approach. Nova Science Publishers. 2013.
- Kim, K.H., Jin, M.R., Choi, S.Z., Son, M.W., e Lee, K.R. Three new ent-kaurane diterpenoids from the seeds of *Pharbitis nilh*. *Heterocycles*. v. 75, 2008.
- Klayman, D.L. Qinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China. *Science*. v. 228, 1985.
- Koepfly, J. B., Mead, J. F., Brockman, J. A., Jr. Alkaloids of *Dichroa febrifuga*. I. Isolation and Degradative Studies. *Journal of the American Chemical Society*. v. 71, 1949.
- Koepfly, J. B.; Mead, J. F.; Brockman, J. A., Jr. An alkaloid with antimalarial activity from *Dichroa febrifuga*. *Journal of the American Chemical Society*. v. 69, 1947.
- Kraft, C., Jenett-Siems, K., Köhler, I., Tofern-Reblin, B., Siems, K., Bienzle, U., Eich, E. Antiplasmodial activity of sesquilignans and sesquieolignans from *Bonamia spectabilis*; *Phytochemistry*. v. 60, 2002.
- Kumar, M., Ahmad, A., Rawat, P., Khan, M. F., Rasheed, N., Gupta, P., Sathiamoorthy, B., Bhatia, G., Palit, G., Maurya, R. Antioxidant flavonoid glycosides from *Evolvulus alsinoides*, *Fitoterapia*. v. 81, 2010.
- Leite, K.R.B. Aspectos micromorfológicos das espécies do gênero *merremia* dennst. (convolvulaceae) nativas no estado da Bahia, Brasil; Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade Estadual de Feira de Santana. [S.I], 2001.
- Liu, B., Jian, L., Chen, G., Song, X., Han, C., Wang, J. Chemical constituents and *in vitro* anticancer. *Chemistry of Natural Compounds*. v. 49, 2014.
- Mahato, S.B., Kundu, A.P., ¹³C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids-a compilation and some salient features. *Phytomchemistry*. v. 37, 1994.
- Mann, P., Tofern, B., Kaloga, M., Eich, E. Flavonoid sulfates fron convolvulaceae. *Phytochemistry*. v. 50, 1999.
- Meira, M., David, J.M., David, J.P., Araújo, S.V., Regis, T.L., Giuliatti, A.M., Queiróz, L.P. Constituintes químicos de *Ipomoea subincana* Meisn. (Convolvulaceae) *Química Nova*. v. 31, 2008.
- Meira, M., Silva, E.P., David, J.M., David, J.P. Review of the genus *Ipomoea*: traditional uses, chemistry and biological activities. *Revista Brasileira de Farmacognósia*. v. 22, 2012.
- Michelin, D.C. Análise fitoquímica e ensaios biológicos da raiz de *Operculina macrocarpa* (L.) Urb. (CONVOLVULACEAE), Dissertação para obtenção do título de mestre, Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, 2004.
- Miranda, M.L.D., Souza, A.F., Rodrigues, E.D., Garcez, F.R., Garcez, W.S. Constituintes

- químicos das folhas de *Riedeliella graciliflora* Harms (Leguminosae). *Quim. Nova.* v. 35, 2012.
- Modi, A.J., Khadabadi, S.S., Farooqui, I.A., Deore, S.L. *Argyreia speciosa* Linn.F: Phitochemintry, Pharmacognosy and Pharmacological studies. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research.* v. 2, 2010.
- Moen, A.R., Ruud, K., Anthonsen, T. Chemo-Enzymatic Synthesis of All Isomers of 2-Methylbutane-1,2,3,4-tetraol – Important Contributors to Atmospheric Aerosols. *European Journal of Organic Chemistry.* 2007.
- Noor, S., Prodhan, A.F.T. Zohora, F.T., Tareq, F.S., Ahsan, M., Hasan, C.M., Islam, S.N. Phytochemical, Antioxidant, Antimicrobial, Thrombolytic as well as Cytotoxic Studies on the Stem Bark of Manilkara zapota (Sapotaceae). *Asian Journal of Chemistry.* v. 26, 2014.
- Ogbole, O., Adeniji, J., Jaiyeoba, E.A.J., Kamdem, R., Chouddhary, M. Anthraquinones and triterpenoids from *Senna siamea* (Fabaceae) Lam inhibit poliovirus activity. *African Journal of Microbiology Research.* v. 8, 2014.
- Oliveira, A.A., França, T.C.C. Lactato desidrogenase como alvo molecular para quimioterapia antimalarial; Seção de Engenharia Química Instituto Militar de Engenharia; Praça General Tibúrcio, 80, 22290-270, Rio de Janeiro/RJ, Brasil. Ver. C&T, 3º Trimestre de 2011.
- Oliveira, A.R.M., Szczerbowski, D. Quinina: 470 anos de história, controvérsias e desenvolvimento. *Quimica Nova.* v. 32, 2009.
- Ott, S.C., Jenett-Siems, K., Pertz, H.H., Siems, K., Witte, L., Eich, E. Bonabiline A, a Monoterpenoid 3 α -Acylxytropane from the Roots of *Bonamia spectabilis* showing M₃ Receptor Antagonist Activity. *Planta Medica.* v. 72, 2006.
- Padilha, J., Sales, T. Malária: uma doença tão antiga quanto complicada. *Ciências para todos,* 2011.
- Panichayupakaranant, H., Noguchi, H., Eknankul, W., Sankawa, U. Naphthoquinones and coumarins from *Impatiens balsamina* root cultures. *Phytochemistry.* v. 40, 1995.
- Pareda-Miranda. R., Bah, M. Biodynamic constituents in the Mexican morning glories: purgative remedies transcending boundaries. *Current Topics in Medicinal Chemistry.* v. 3, 2003.
- Pas, L.S., Mendonça, M.S. Aspectos morfoanatômicos de *Bonamia ferruginea* (Choisy) Hallier f. (Convolvulaceae). *Revista Brasileira Planta. Medica. Botucatu.* v. 10, 2008.
- Paska, C., Innocenti, G., Kunvari, M., Laszlo, M., Szilagy, L. Lignan production by *Ipomoea cairica* callus cultures *Phytochemistry.* v. 52, 1999.
- Peters, W. Drug resistance in *Plasmodium berghei* incke and Lips, 1948. 3. Multiple drug resistance. *Exp Parasitol.* v. 171965.
- Prakash, C.V.S., Prakash, I. Isolation and Structural Characterization of Lupane Triterpenes

from *Polypodium Vulgare*. Research Journal of Pharmaceutical Sciences. v. 1, 2012.

Reiners, A.A.O; Ricci, H.A., Azevedo, R.C.S., uso de plantas medicinais para tratar a malária. Cogitare Enfermagem. v. 15, 2010.

Revilla, J. Apontamento para cosmético da Amazônia. Sebrae-AM/INPA. 2002.

Ribeiro, J.E.L., Hopkins, M.J.G, Sothers, A.A.C., Costa, M.A.S., Brito, J.M., Souza, M.A.D., Martins, L.H.P., Lohmann, L.G, Assunção, P.A.C.L., Pereira, E.C., Silva, C.F., Mesquita, M.R., Procópio, L.C. Flora da reserva Ducke: Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra firme na Amazônia Central. 19 ed. Manaus: INPA. 1999.

Schimming, T., Tofern, B., Mann, P., Richter, A., Jenett-Siems, K., Draeger, B., Asano, A., Gupta, M.P., Correa, M.D., Eich, E. Distribution and taxonomic significance of calystegines in the convolvulaceae. Phytochemistry. v. 49, 1998.

Schimming, T., Jenett-Siems, K., Mann, P., Tofern-Reblin, B., Milson, J., Johnson, R.W., Derooin, T., Austin, D.F., Eich, E. Calystegines as chemotaxonomic markers in the Convolvulaceae. Phytochemistry. v. 66, 2005.

Scudeller, V.V., Veiga, J.B. Etnoconhecimento de plantas de uso medicinal nas comunidades São João do Tupé e Central (Reserva de Desenvolvimento Sustentável do Tupé). UEA Edições, Manaus, 2009.

Siani, A.C., Silva, A.M.P., Sampaio, A. L. F., Rocha, L.M. Estudos químicos do *calycobolus ferrugineus* (cipo-tuira). In: XIV Simposio de plantas medicinais do Brasil, 1996, Florianopolis, Livro de Resumos do Simposio de Plantas Mediciniais do Brasil. v. 1, 1996.

Siani, A.C., Silva, A.M.P., Sampaio, A. L. F., Soares, R. O. A., Rosas, E. C., Santos, R. R., Oliveira, M.G.M. Avaliação farmacológica da *Bonamia ferruginea* (Choisy) Hallier (cipó tuíra). In: III Jornada Paulista de Plantas Mediciniais, 1997, Campinas. Livro de Resumo da III Jornada Paulista de Plantas Mediciniais. v. 1, 1997.

Slater, A.F.G. Chloroquine: mechanism of drug action and resistance in *Plasmodium falciparum*. Pharmacology and Therapeutics. v. 57, 1993.

Sohail Akhtar, M.D., Kaskoos, R.A., Mir, S.R, Ali, M. New chromone derivative from *Evolvulus alsinoides* Linn. aerial parts. Journal of Saudi Chemical Society. v. 13, 2009.

Staples, W., Austin, D.F. Revision of neotropical *calycobolus* and *porana* (Convolvulaceae). Edinburgh Journal of Botany. v. 66, 2009.

Talisuna, A.O., Bloland, P.D.U. History, dynamics and public health importance of malária parasite resistance. Clin Microbiol Rev. v. 17, 2004.

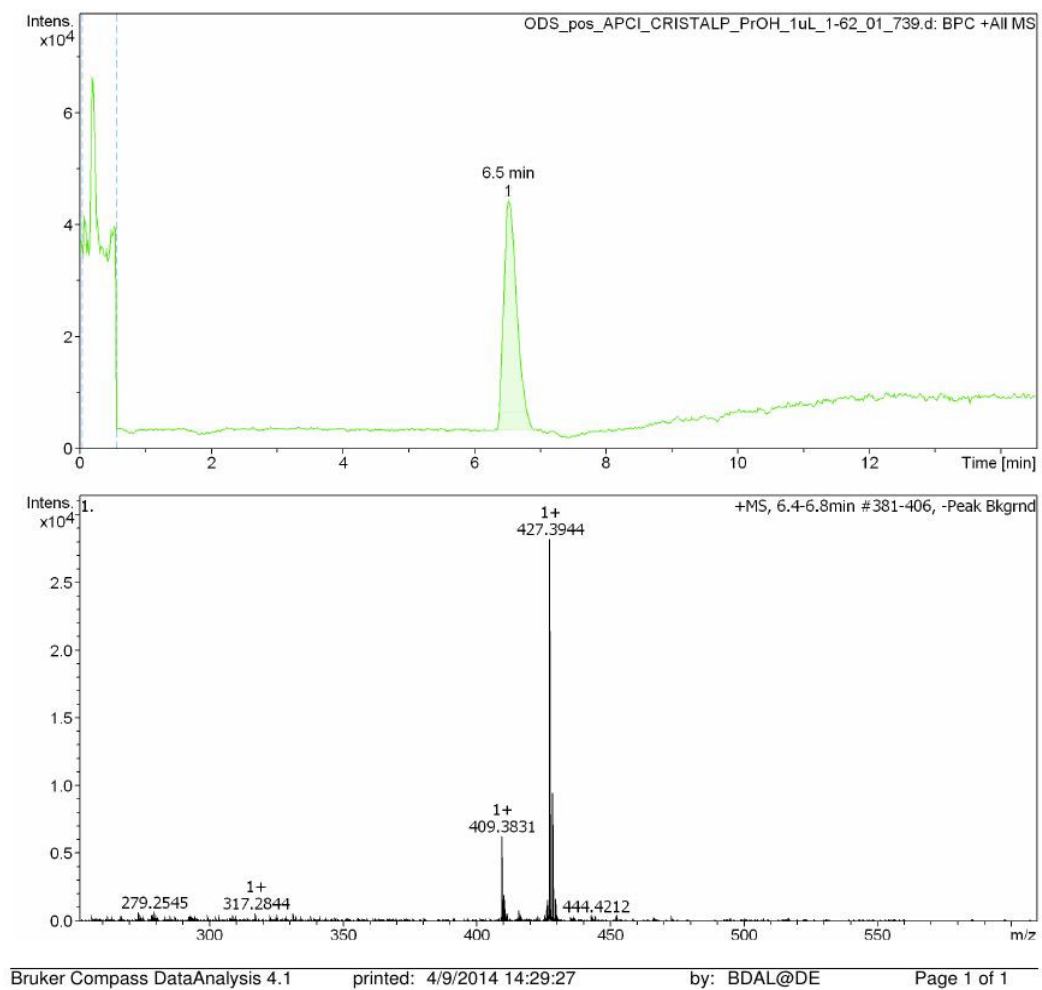
Terra, W.S., Vieira, I.J.C., Braz-Filho, R., Freitas, W.R., Kanashiro, M.M., Torres, M.C.M. Lepidotrichilins A and B, New Protolimonooids with Cytotoxic Activity from *Trichilia Lepidota* (Meliaceae). Molecules. v. 18, 2013.

Torfem, B., Jenett-Siems, K., Siems, K., Jakupovic, J., Eich, E. Bonaspectins and neobonaspectins, first sesquillignans and sesqui-neolignans from a convolvulaceous species. Phytochemistry. v. 53, 2000.

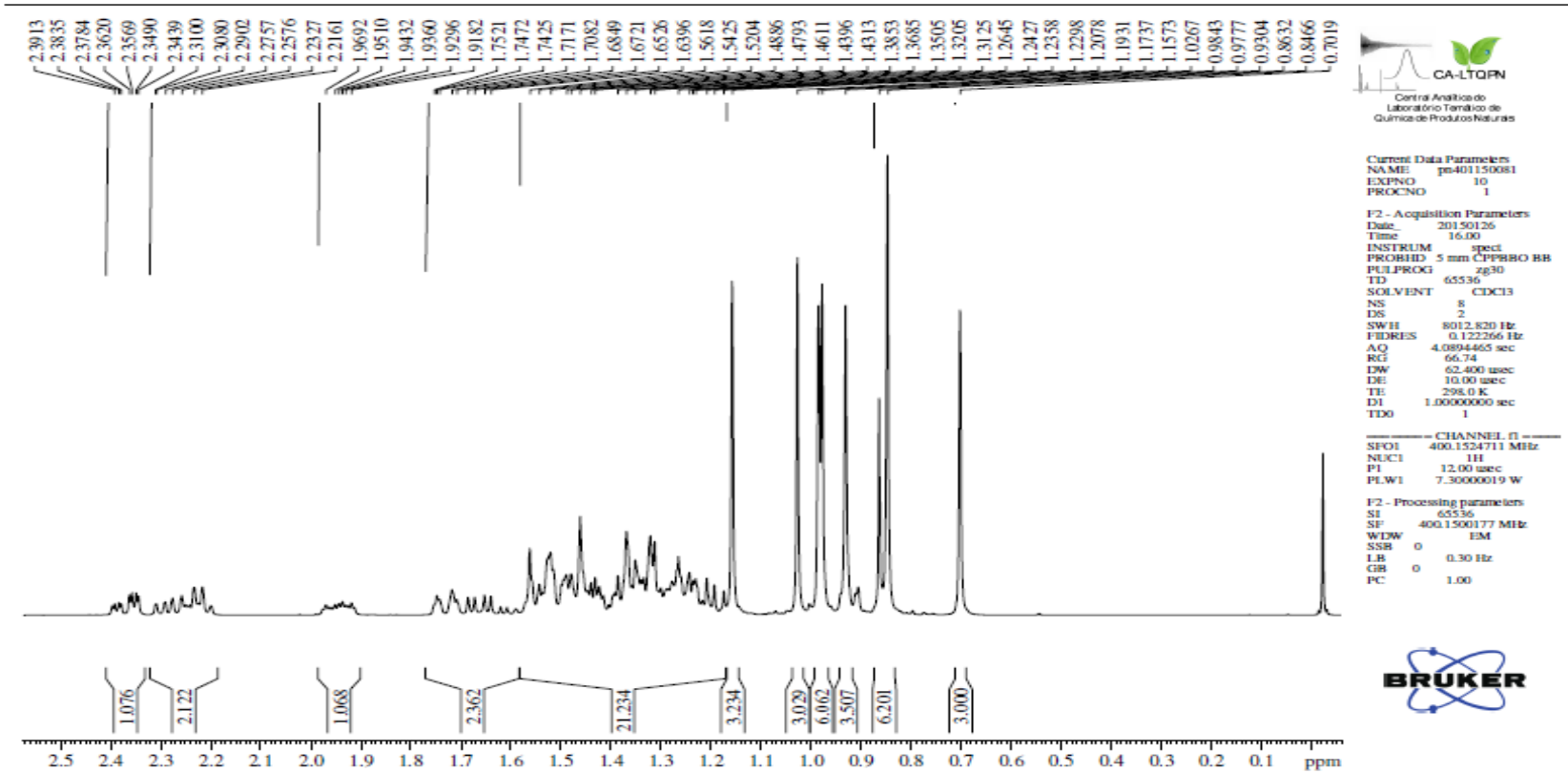
- Trager, W., Jensen, J.B. Human malaria parasites in continuous culture. *Science*. v. 193, 1976.
- Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. 14 Feb 2014 - 4344 Shaw Boulevard - Saint Louis, Missouri 63110 do Rio de Janeiro
- Vale, N., Moreira, R., Gomes, P. Quimioterapia da malária um século no desenvolvimento de antimaláricos. *Química Nova*. v. 5, 2005.
- Venkatachalapathi, S., Ravi, S. isolation and quantification of lupeol in *Strobilanthes ciliatus* nees by HPTLC method. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. v. 4, 2012.
- WHO (World Health Organization). Guidelines for the treatment of malaria. Second edition. 2010.
- WHO (World Health Organization). Guidelines for the treatment of malaria. Second edition. 2013.
- WHO (World Health Organization). Guidelines for the treatment of malaria. Second edition. 2014.
- Xavier, M.S.P., Rebelo J.M.M., Espécies de Anopheles (Culicidae, Espécies de Anophelinae) em área endêmica de malária. *Rev. Saúde Pública*. v. 33, 1999.
- Zhong-Zhao, W., Jun, L., Li, T.X., Qiang, L.G. Triterpenes and Steroids from Semi-mangrove Plant *Hibiscus tiliaceus*. *Chinese Journal of Natural Medicines*. v. 9, 2011.

8. ANEXOS

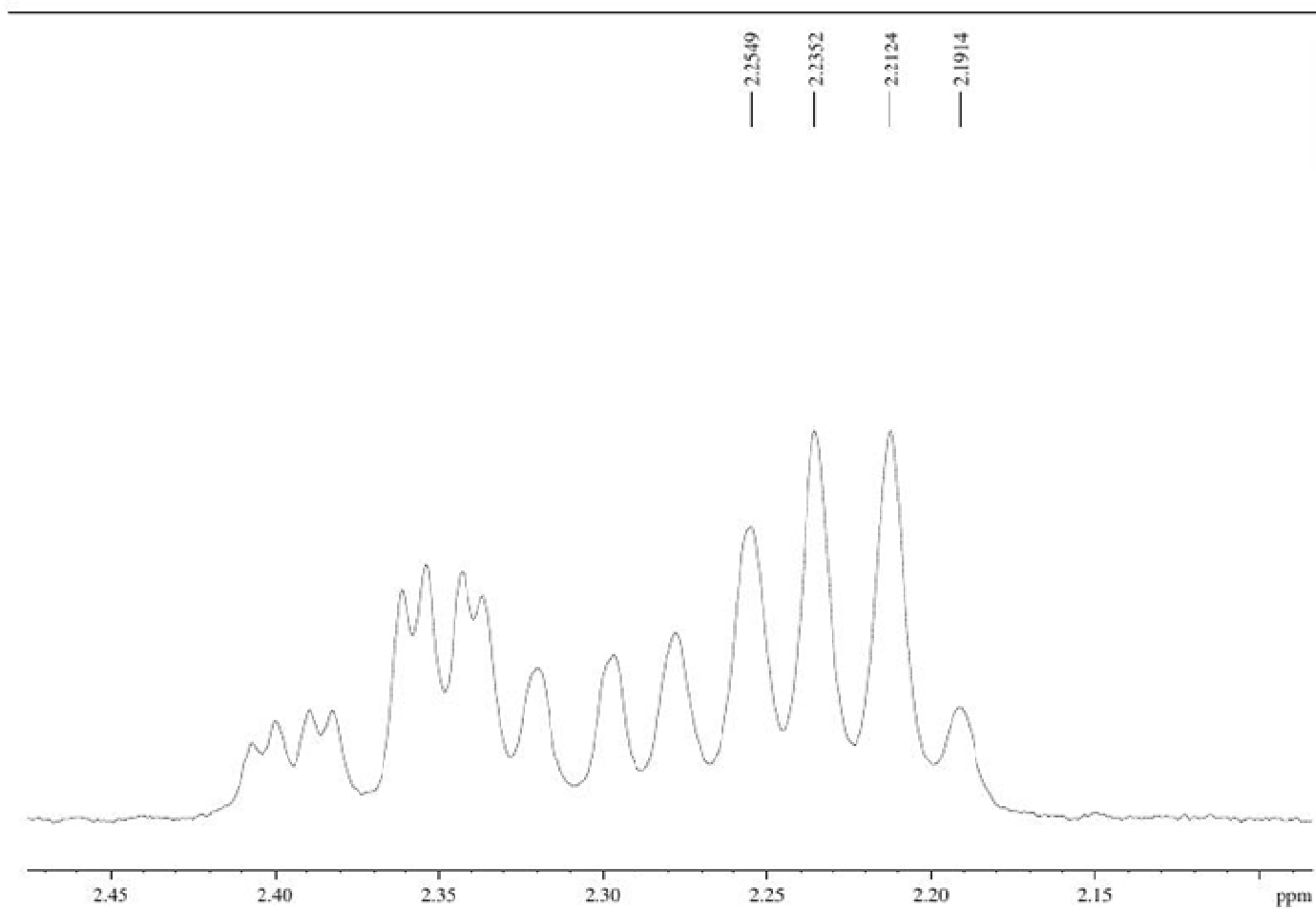
ANEXOS



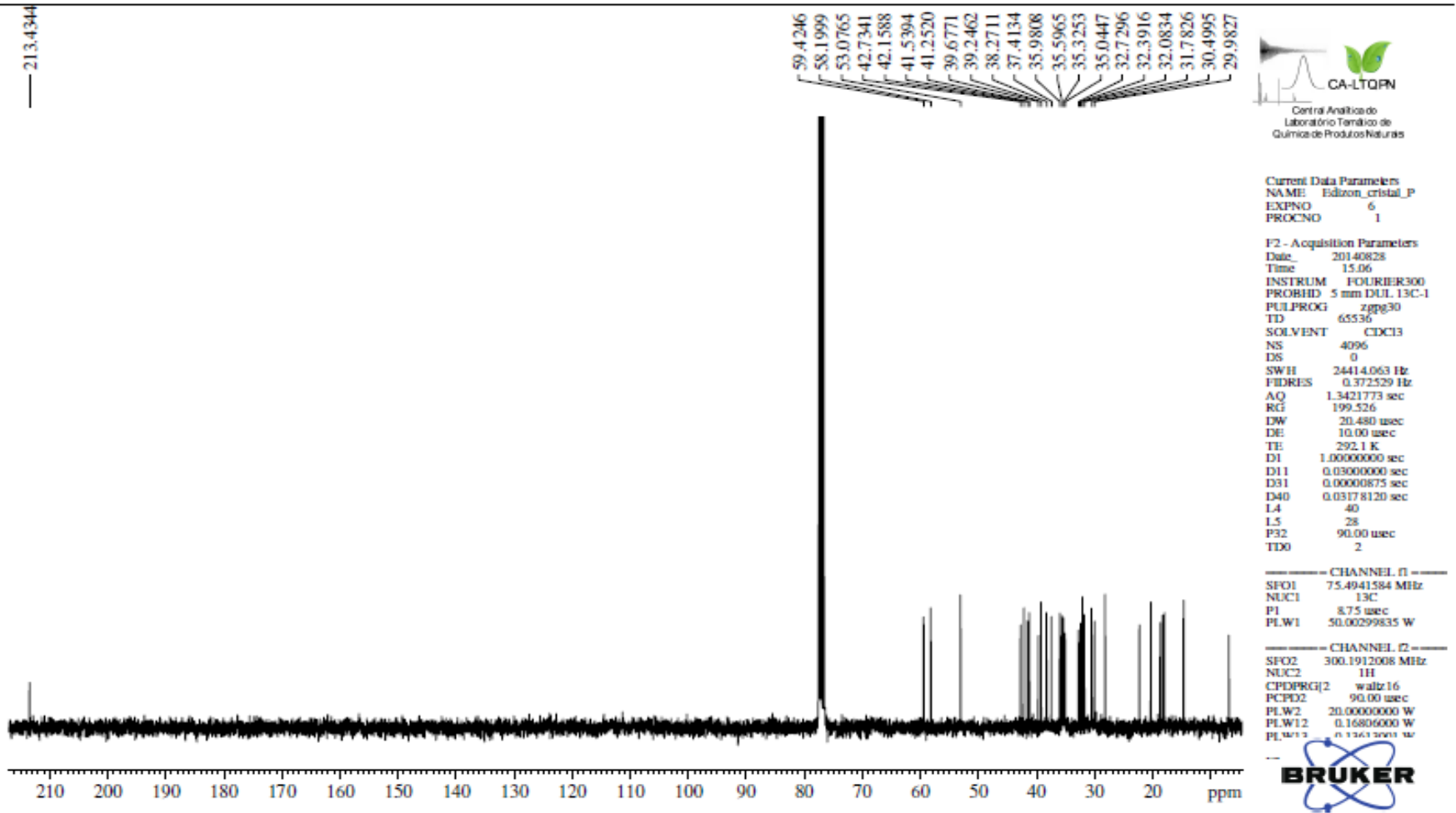
Anexo 1. LC-HRMS de friedelina (SFH-C₂- A) em ACN/HCO₂H:*i*-PrOH. Com tempo de retenção do pico em 6,5 min.



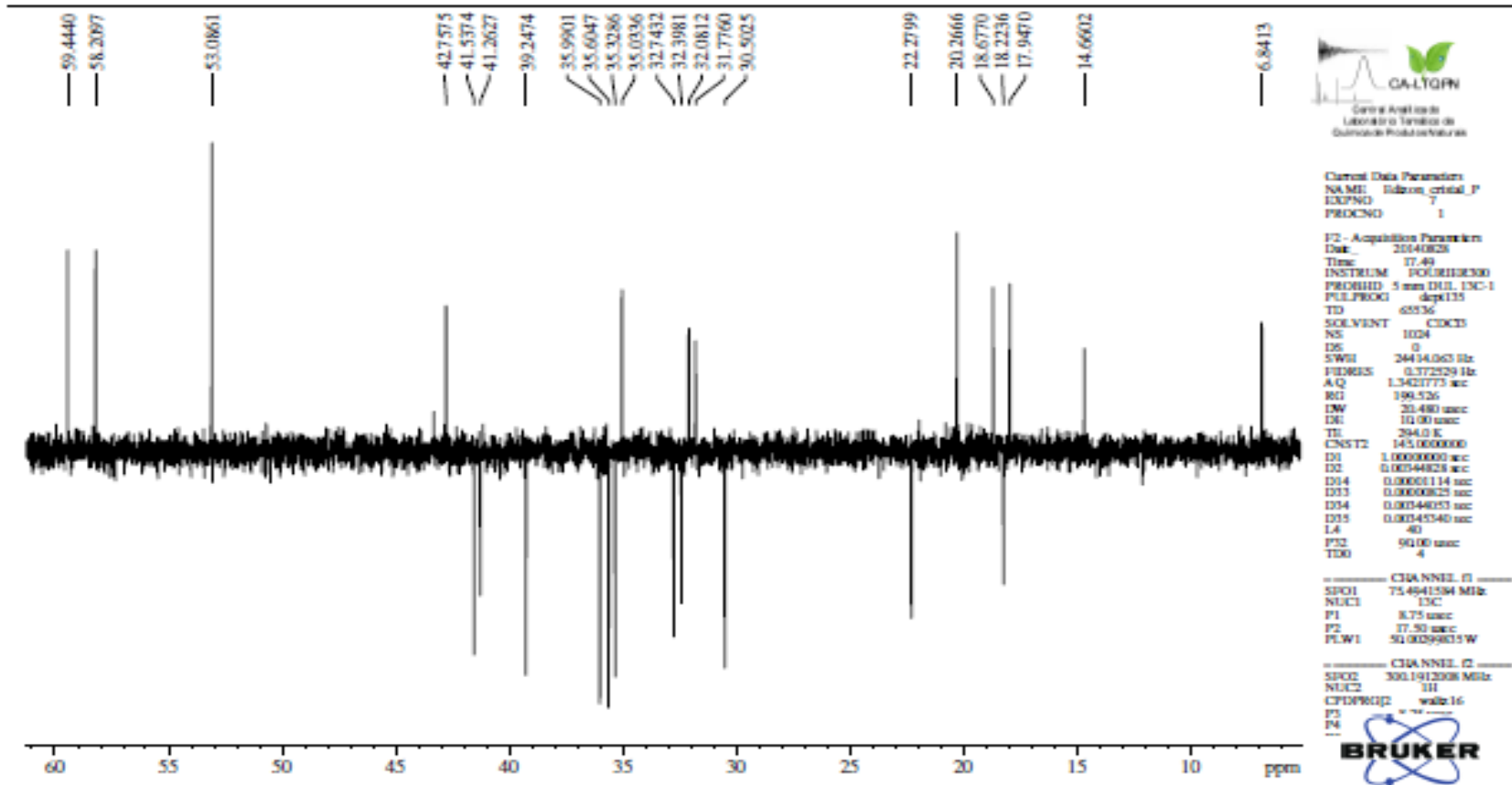
Anexo 2. Espectro de RMN de ^1H da friedelina (SFH-C₂- A) em 400 MHz, CDCl₃.



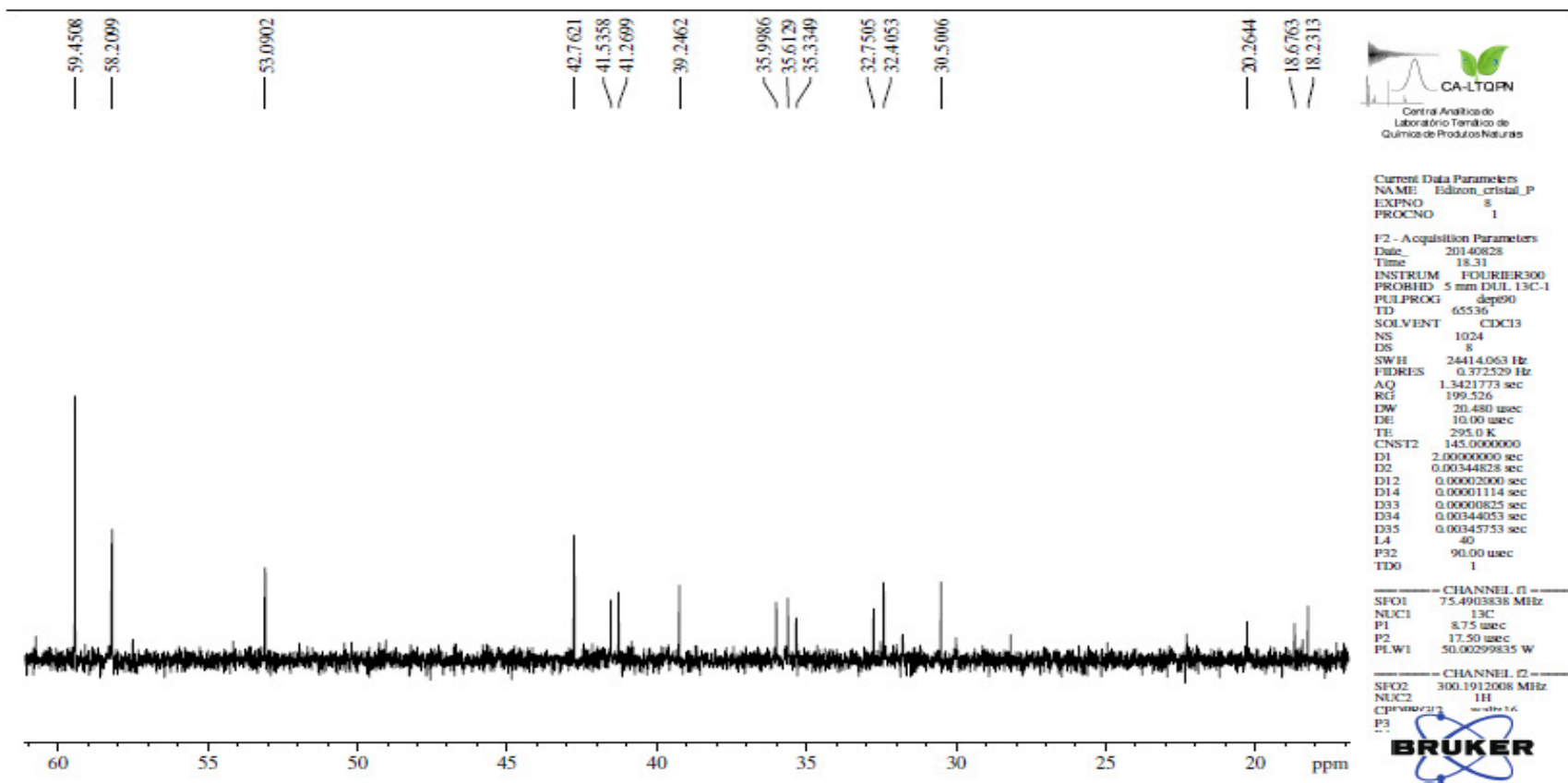
Anexo 3. Ampliação da região do hidrogênio 4 (2,22 ppm) de friedelina (SFH-C₂- A) em 400 MHz, CDCl₃.



Anexo 4. Espectro de ^{13}C da friedelina (SFH-C₂- A) em CDCl_3 (300 MHz).



Anexo 5. Espectro de DEPT 135° da friedelina (SFH-C₂- A) em CDCl₃ (300 MHz).



Anexo 6. Espectro de DEPT 90° da friedelina (SFH-C₂- A) em CDCl₃ (300 MHz).



```

Current Data Parameters
NAME: 14430001_0
EXPNO: 1
PROCNO: 1

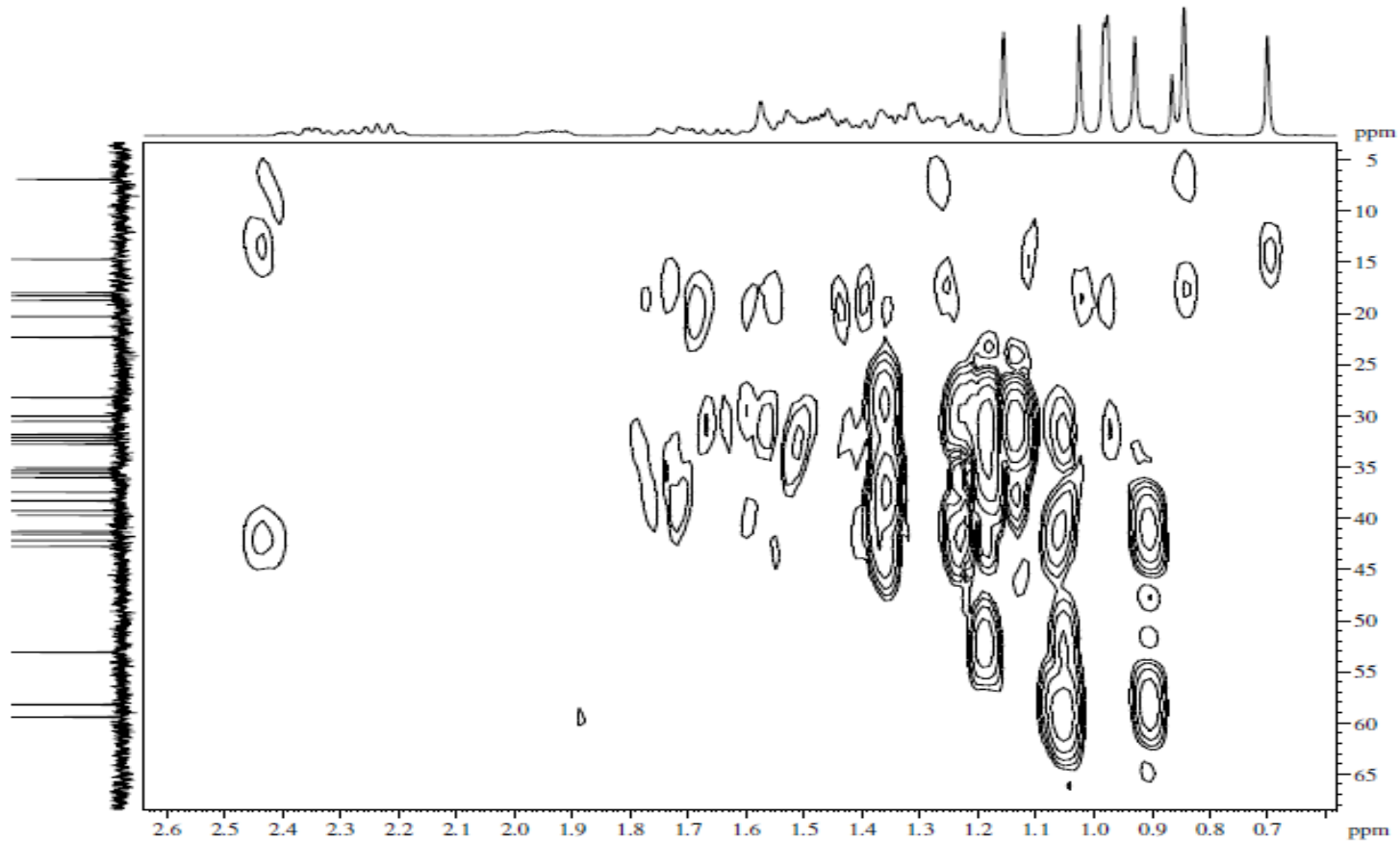
F2 - Acquisition Parameters
Date_: 20140828
Time: 10:29
INSTRUM: zgpg30
PROBHD1: 5 mm DLI, 13C-1
PULPROG: zgpg30
TD: 65536
SOLVENT: CDCl3
NS: 128
DS: 4
SWH: 6101.536 Hz
FIDRES: 2.580272 Hz
AQ: 0.167722 sec
RG: 109.526
DW: 81.820 sec
DE: 33.00 sec
TE: 296.9 K
CNS12: 0.45000000
CNS13: 0.00000000
D1: 1.50000000 sec
D2: 0.0004420 sec
D3: 0.00000000 sec
D36: 0.00000000 sec
D37: 0.00000000 sec
D38: 0.00000000 sec
D39: 0.00000000 sec
D40: 0.00000000 sec
===== CHANNEL f1 =====
NUC1: 13C
P1: 7.70 sec
P2: 15.50 sec
PLW1: 20.00000000 W
===== CHANNEL f2 =====
SFO2: 75.4802714 MHz
NUC2: 13C
P3: 5.70 sec
PLW2: 20.00000000 W
===== GRADIENT CHANNEL =====
G1P1A.M1: RG17.1
G1P1A.M2: RG17.1
G1P2A.M1: RG17.1
G1P2A.M2: RG17.1
C1P1: 50.00 %
C1P2: 50.00 %
C1P3: 40.10 %
PSG: 1000.00 sec

F1 - Acquisition parameters
TD: 65536
SFO1: 75.4802714 MHz
FIDRES: 2.580272 Hz
SWH: 6101.536 Hz
PULPROG: zgpg30

F2 - Processing parameters
SI: 32768
SF: 300.1360484 MHz
WDW: SINC
SSB: 0
LB: 0 Hz
GB: 0
PC: 1.40

F1 - Processing parameters
SI: 32768
SF: 75.4802714 MHz
WDW: SINC
SSB: 0
LB: 0 Hz
GB: 0

```



Anexo 8. Espectro de correlação ^1H - ^{13}C HMBC da friedelina (SFH-C₂ A) em CDCl_3 (^{13}C : 75 e ^1H -300 MHz).



Current Data Parameters
NAME: fiedelina_cristal_2
EXPRNO: 3
PROCNO: 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20100528
Time 11.28
INSTRUM PULPROB300
PROBHD 5 mm DUL-13C-1
PULPROG zgpg30
TD 32768
SOLVENT CDCl3
NS 4
DS 16
SWH 3051.750 Hz
FIDRES 1.490116 Hz
AQ 0.3705463 sec
RG 32.4189
DW 163.840 sec
DE 10.00 sec
TE 283.2 K
D0 0.0000000 sec
D1 1.0000000 sec
D15 0.0000000 sec
D16 0.0000000 sec
DND 0.0000000 sec

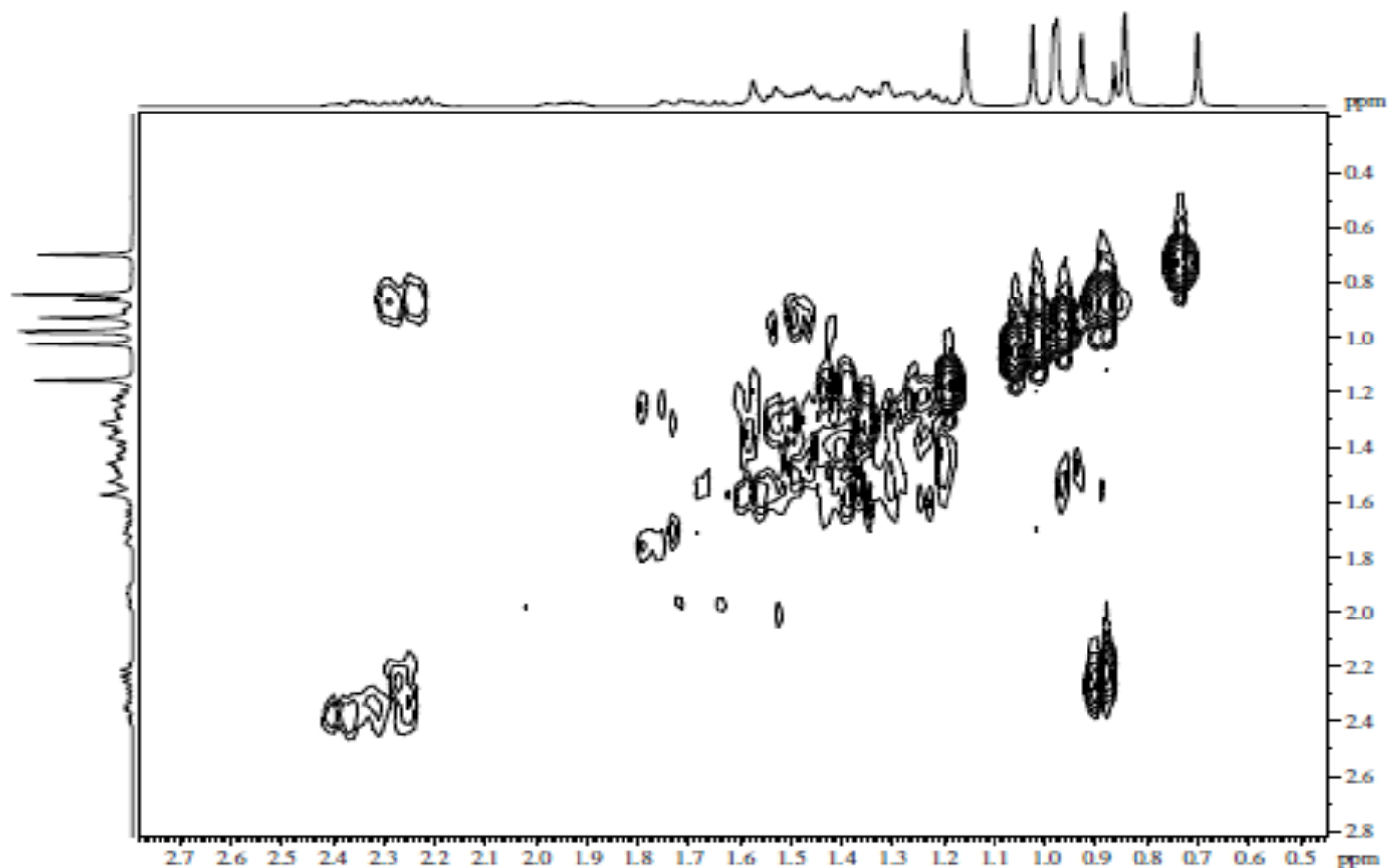
----- CHANNEL f1 -----
NUC1 13C
NUC2 1H
P1 7.75 sec
PL1 0.0000000 W

----- CHANNEL CPDANNE1 -----
CPDANNE1[1] 13C
GPR1 10.00 %
P16 1.0000000 sec

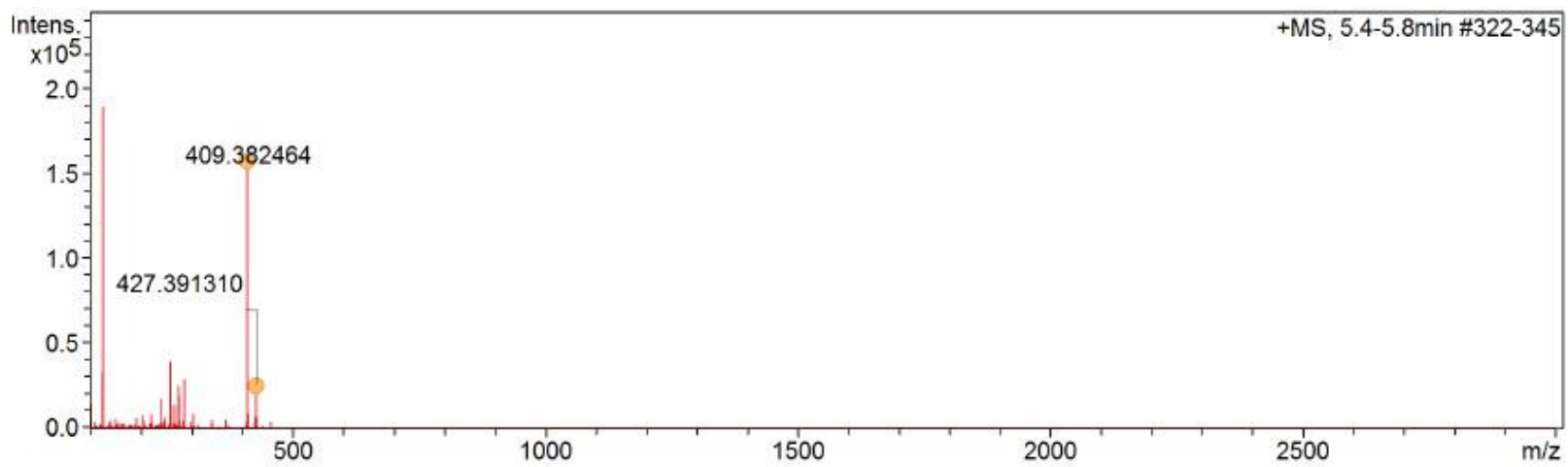
F1 - Acquisition parameters
TD 131072
SFO1 300.1413506 MHz
FIDRES 70.840000 Hz
AQ 10.000000 sec
RG 32.4189

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 300.1400000 MHz
WDW 0
SSB 0
LB 0 Hz
GB 0
PC 1.00

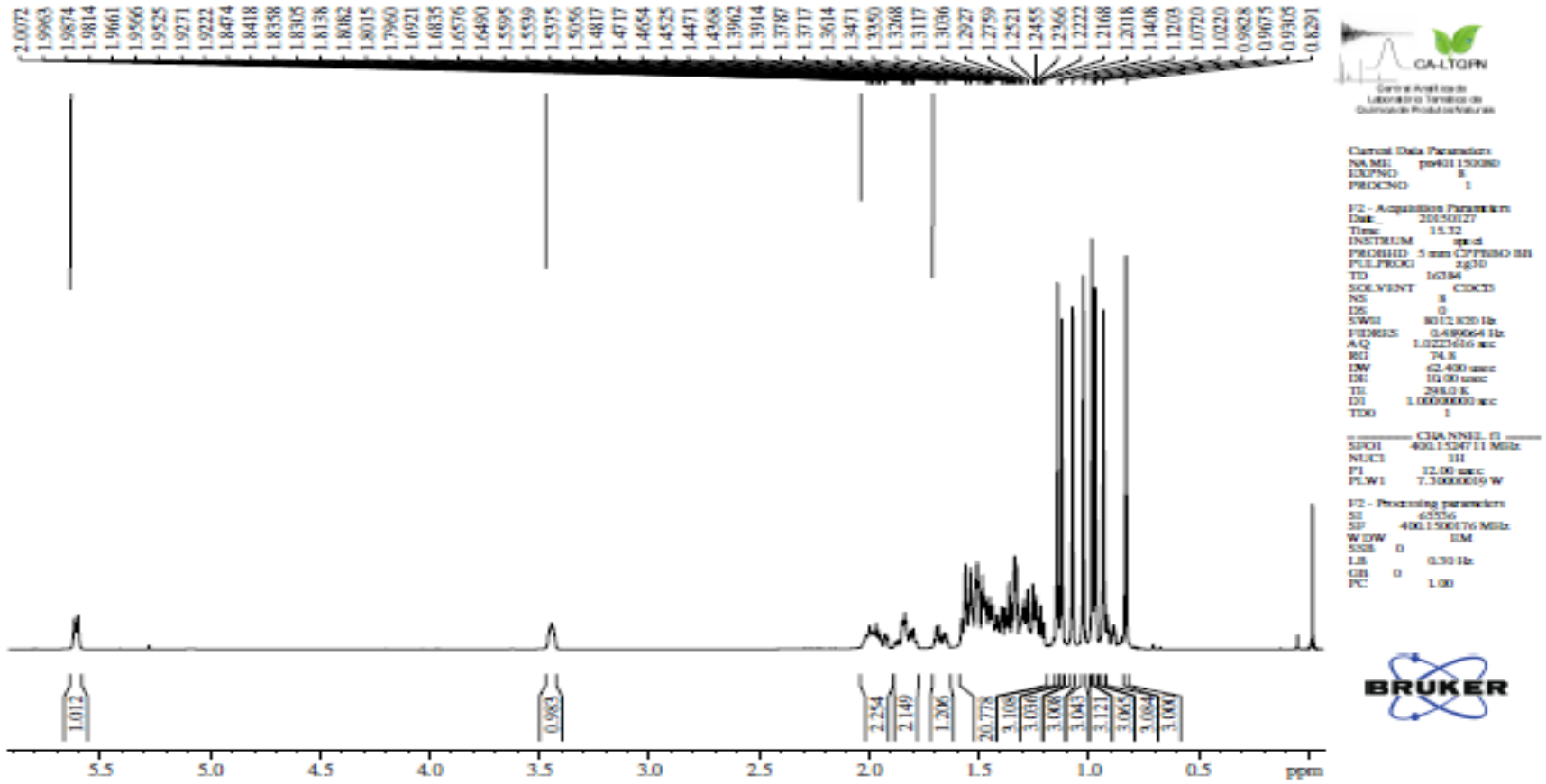
F1 - Processing parameters
SI 131072
SF 300.1400000 MHz
WDW 0
SSB 0
LB 0 Hz
GB 0



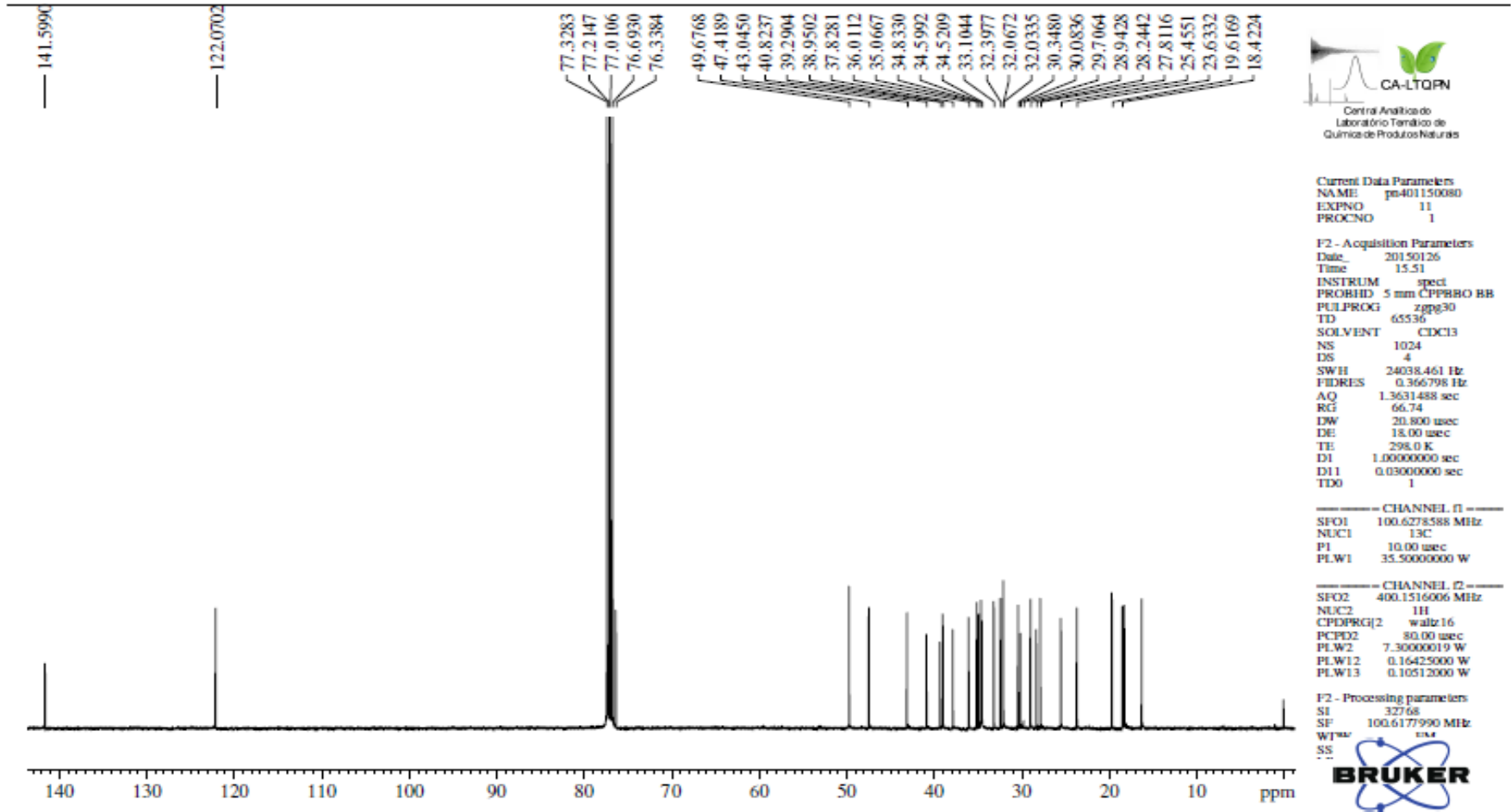
Anexo 9. Espectro de correlação ^1H - ^1H COSY da fiedelina (SFH-C₂- A) em CDCl₃ (300 MHz).



Anexo 10. HRMS do glutinol (SFH-C₂- B) em ACN:*I*-PrOH (1:1).

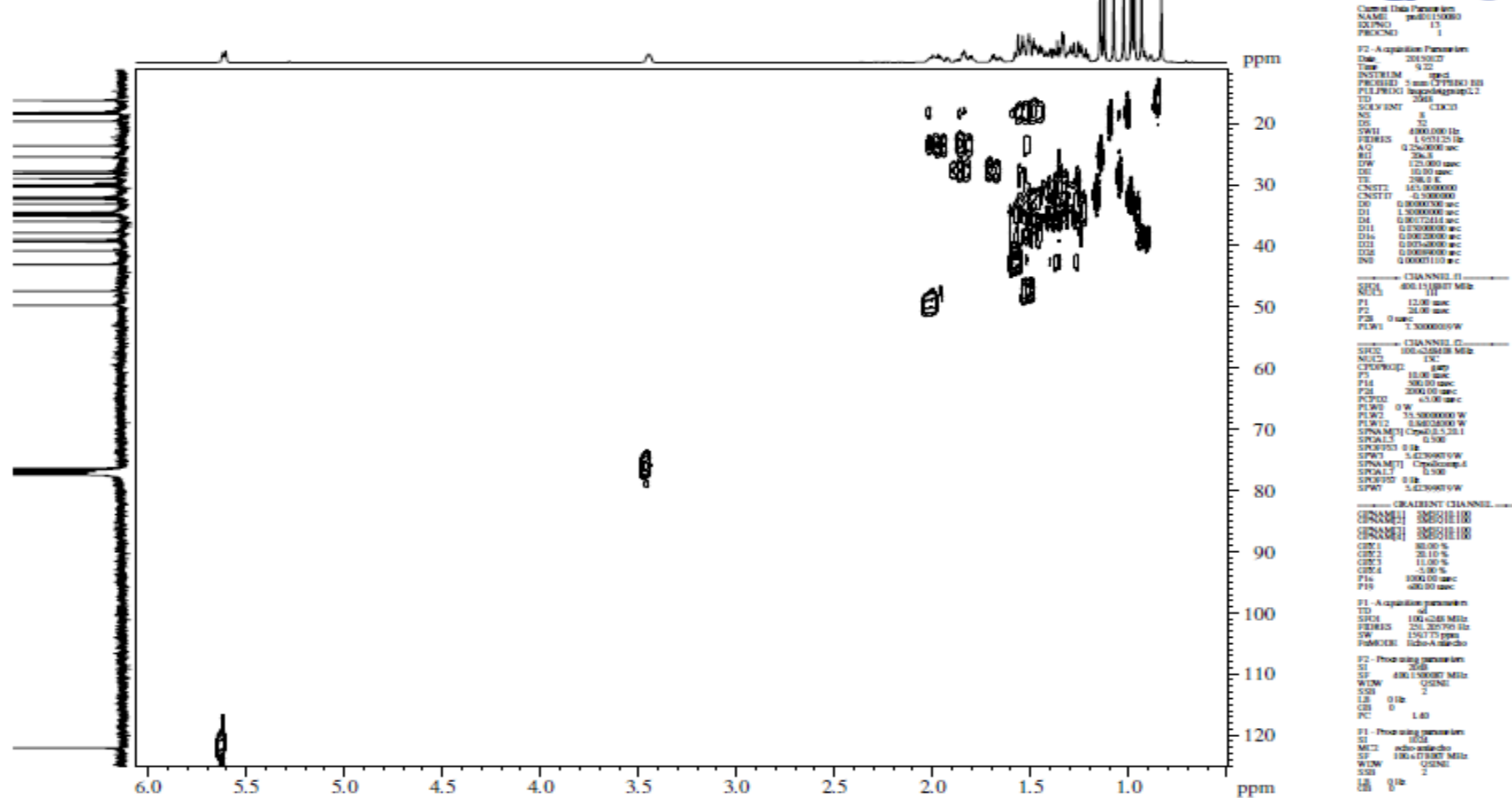


Anexo 11. Espectro de RMN de ¹H do glutinol (SFH-C₂- B) em CDCl₃ 400 MHz).



Anexo 12. Espectro de ¹³C do glutinol (SFH-C₂- B) em CDCl₃ (400 MHz).

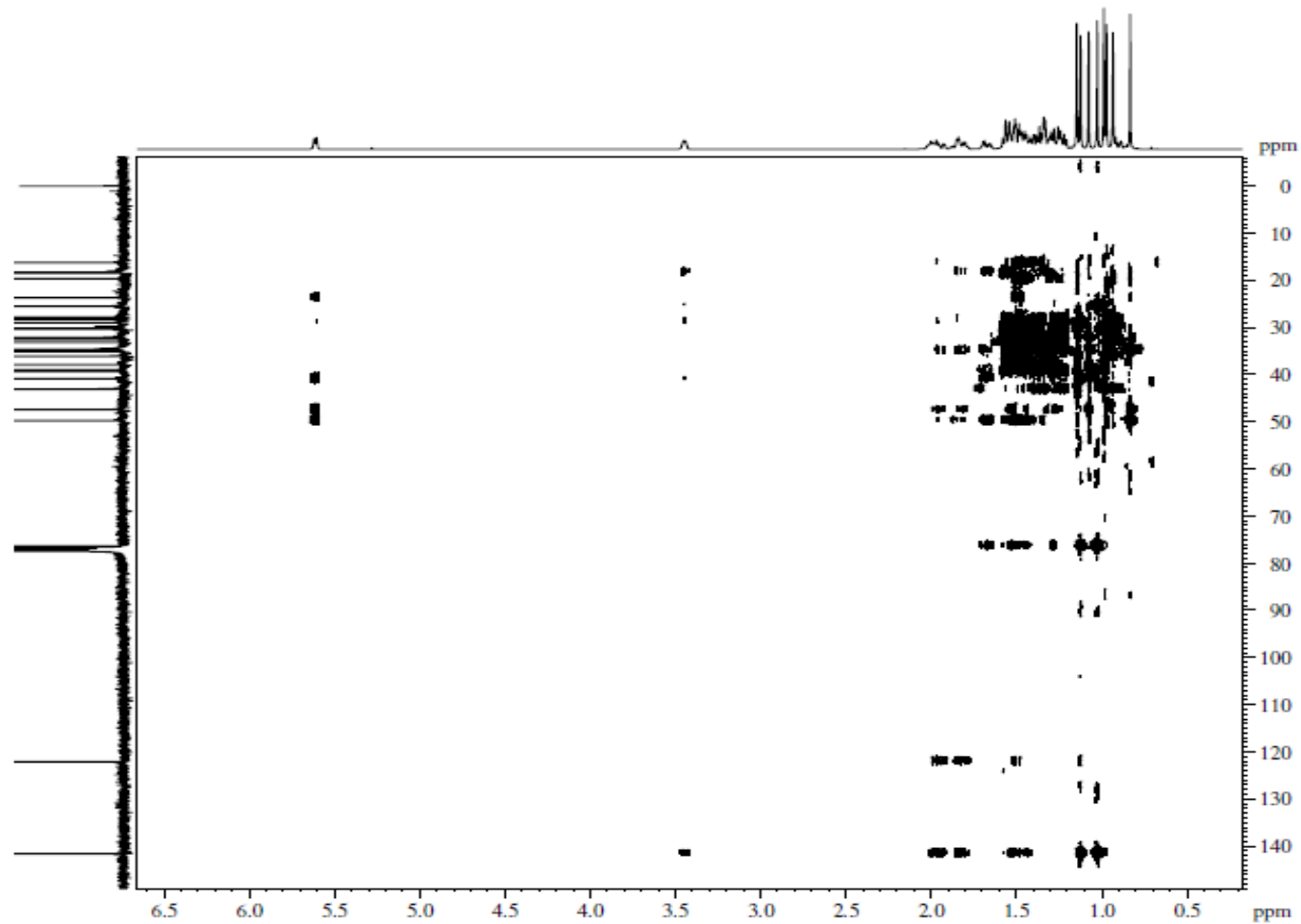
Adrian/Edizon glutinol



Current Data Parameters
 NAME: pro0115000
 EXPNO: 1
 PROCNO: 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ : 20150127
 Time : 9:32
 INSTRUM: spect
 PROBHD: 5 mm CPYHBO 1H
 PULPROG: zgpg30
 TD : 32768
 SOLVENT : CDCl3
 NS : 8
 DS : 4
 SWH : 4000.000 Hz
 FIDRES : 1.523125 Hz
 AQ : 0.256890 sec
 RG : 206.4
 SQW : 123.000 usec
 DE : 10.00 usec
 TE : 298.2 K
 CNST1 : 143.000000
 CNST2 : -4.500000
 DQ : 0.000000 usec
 DI : 1.500000 usec
 DI1 : 0.0017216 usec
 DI2 : 0.0750000 usec
 DI3 : 0.0002000 usec
 DI4 : 0.0036000 usec
 DI5 : 0.0000000 usec
 DI6 : 1.0000113 usec
 SFO :
 --- CHANNEL f1 ---
 NUC1 : 13C
 P1 : 12.00 usec
 P2 : 24.00 usec
 PCP : 0 usec
 PLW1 : 1.3000000 W
 --- CHANNEL f2 ---
 NUC2 : 1H
 PCPCP00P : spt
 P1 : 12.00 usec
 P14 : 300.00 usec
 P16 : 300.00 usec
 P18 : 63.00 usec
 P19 : 0 usec
 P2 : 35.5000000 W
 P2W17 : 3.6000000 W
 SPINMUT1 : 0
 SPINMUT2 : 0
 SPINMUT3 : 0
 SPINMUT4 : 0
 SPINMUT5 : 0
 SPINMUT6 : 0
 SPINMUT7 : 0
 SPINMUT8 : 0
 SPINMUT9 : 0
 SPINMUT10 : 0
 SPINMUT11 : 0
 SPINMUT12 : 0
 SPINMUT13 : 0
 SPINMUT14 : 0
 SPINMUT15 : 0
 SPINMUT16 : 0
 SPINMUT17 : 0
 SPINMUT18 : 0
 SPINMUT19 : 0
 SPINMUT20 : 0
 --- GRADIENT CHANNELS ---
 GRNAM1 : ZGRAD1
 GRNAM2 : ZGRAD2
 GR1 : 0.00 %
 GR2 : 20.10 %
 GR3 : 11.00 %
 GR4 : -1.00 %
 P14 : 3000.00 usec
 P16 : 600.00 usec
 F1 - Acquisition parameters
 TD : 65536
 SFO : 100.628156 MHz
 FIDRES : 250.205705 Hz
 SW : 17507.75 ppm
 FWHM : 1.585954 Hz
 F2 - Processing parameters
 SI : 32768
 SF : 400.150000 MHz
 WTM : 0.900000
 SSB : 2
 LB : 0.10 Hz
 GB : 0
 PC : 1.40
 F1 - Processing parameters
 SI : 16384
 SF : 100.628156 MHz
 WTM : 0.900000
 SSB : 2
 LB : 0.10 Hz
 GB : 0

Anexo 13. Espectro de correlação ¹H-¹³C HSQC do glutinol (SFH-C₂- B) em CDCl₃ (¹³C:100 MHz e ¹H:400 MHz).



Current Data Parameters
 NAME: ps40115080
 EXPNO: 4
 PROCNO: 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_: 20100127
 Time: 10:09
 INSTRUM: spect
 PROBHD: 5 mm CPYBBO BB
 PULPROG: zgpg30
 TD: 4096
 SFO: 400.1419970
 NS: 16
 DS: 16
 SWH: 4000.000 Hz
 FIDRES: 0.0745671 Hz
 AQ: 0.5120000 sec
 RG: 2048
 DW: 125.000 usec
 DE: 10.00 usec
 TE: 298.2 K
 CNU16: 120.000000
 CNU17: 120.000000
 CNU18: 0.000000
 CNU19: 0.5001749
 D0: 0.0000000 sec
 D1: 1.04025500 sec
 D6: 0.00250000 sec
 D16: 0.00030000 sec
 IN0: 0.00001100 sec

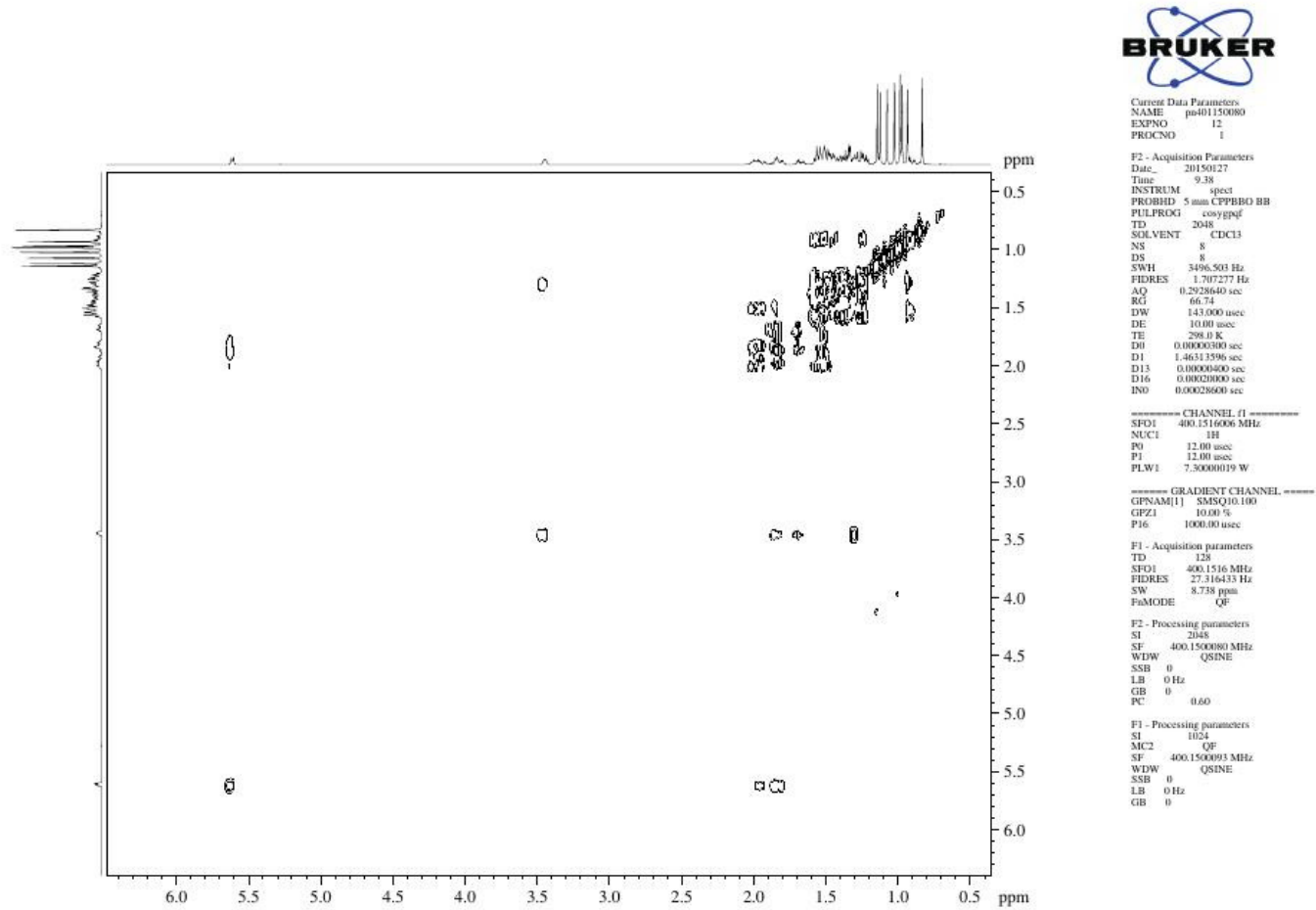
--- C13A NUC1 F1 ---
 SFO1: 400.1419970 MHz
 NUC1: 13
 P1: 12.00 usec
 P2: 24.00 usec
 PLW1: 7.30000019 W
 --- C13A NUC1 F2 ---
 SFO2: 100.6248408 MHz
 NUC2: 13C
 P3: 10.00 usec
 P4: 2000.00 usec
 PLW2: 35.50000001 W
 SPNAME1: C13A NUC1 F1
 SPNAME2: C13A NUC1 F2
 SFOA17: 0.18
 SFOA18: 5.42399979 W

--- C13A NUC1 F3 ---
 SFO3: 100.6248408 MHz
 NUC3: 13C
 P5: 10.00 usec
 P6: 2000.00 usec
 PLW3: 35.50000001 W
 SPNAME3: C13A NUC1 F3
 SPNAME4: C13A NUC1 F4
 SFOA17: 0.18
 SFOA18: 5.42399979 W

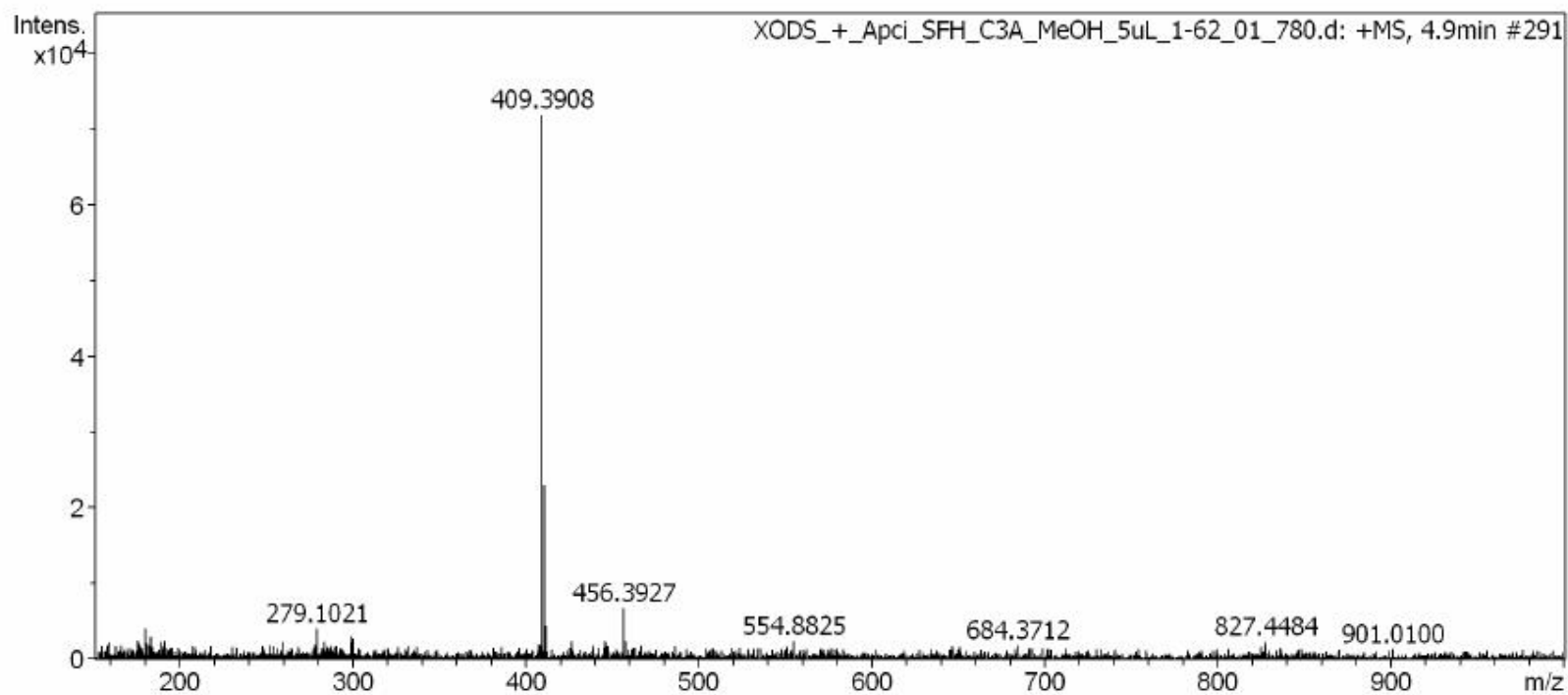
--- C13A NUC1 F4 ---
 SFO4: 100.6248408 MHz
 NUC4: 13C
 P7: 10.00 usec
 P8: 2000.00 usec
 PLW4: 35.50000001 W
 SPNAME5: C13A NUC1 F4
 SPNAME6: C13A NUC1 F5
 SFOA17: 0.18
 SFOA18: 5.42399979 W

F1 - Processing parameters
 TD: 128
 SFO1: 400.1419970 MHz
 FIDRES: 0.0745671 Hz
 SW: 4000.000000 Hz
 PULPROG: zgpg30
 F2 - Processing parameters
 SI: 2048
 SF: 400.1419970 MHz
 WINDW: SINE
 SSB: 4
 LB: 0 Hz
 GB: 0
 PC: 1.40
 F3 - Processing parameters
 SI: 1024
 SF: 100.6248408 MHz
 WINDW: COSY
 SSB: 2
 LB: 0 Hz
 GB: 0

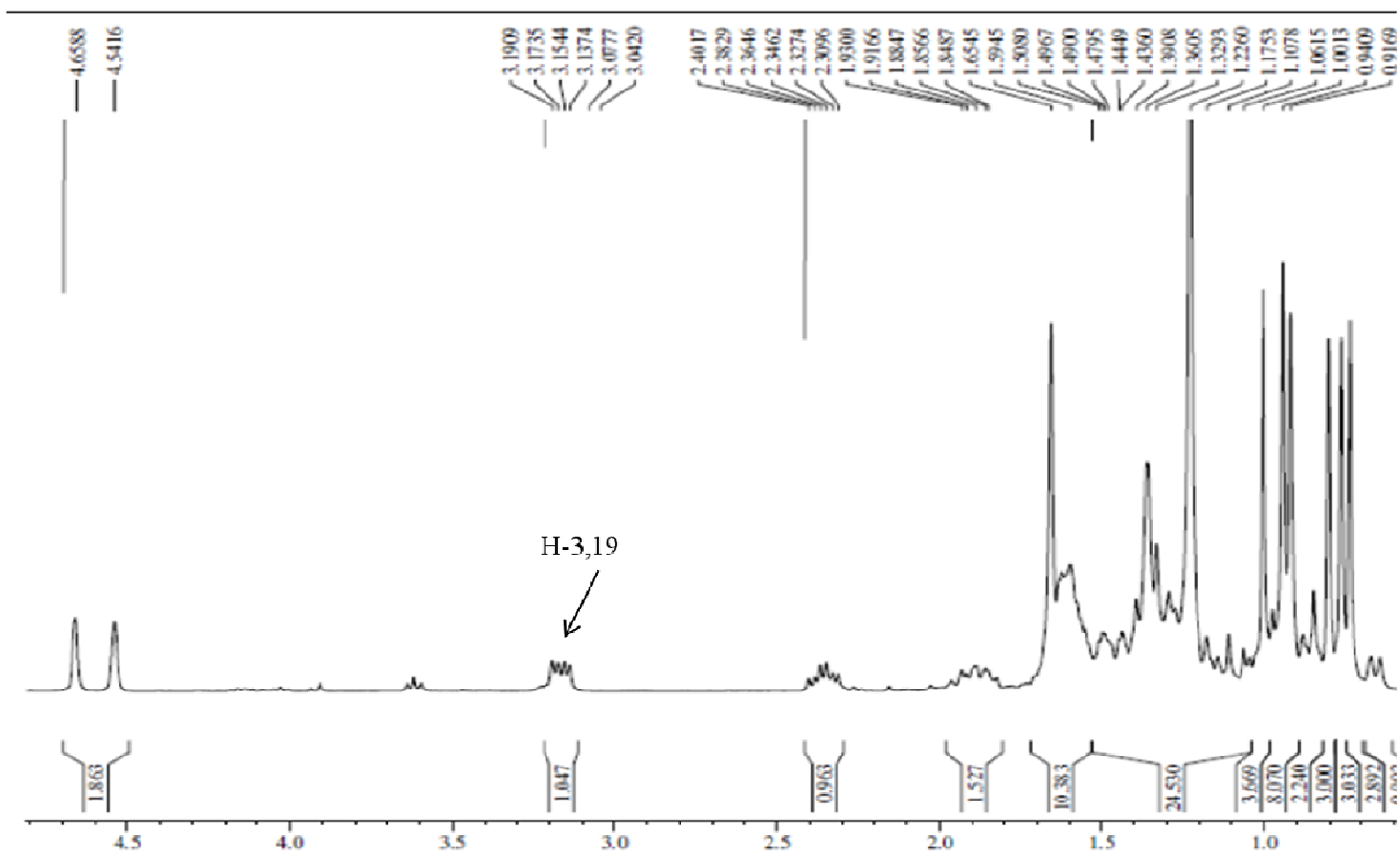
Anexo 14. Espectro de correlação ^1H - ^{13}C HMBC do glutinol (SFH-C₂- B) em CDCl_3 (^{13}C :75 MHz e ^1H :300 MHz).



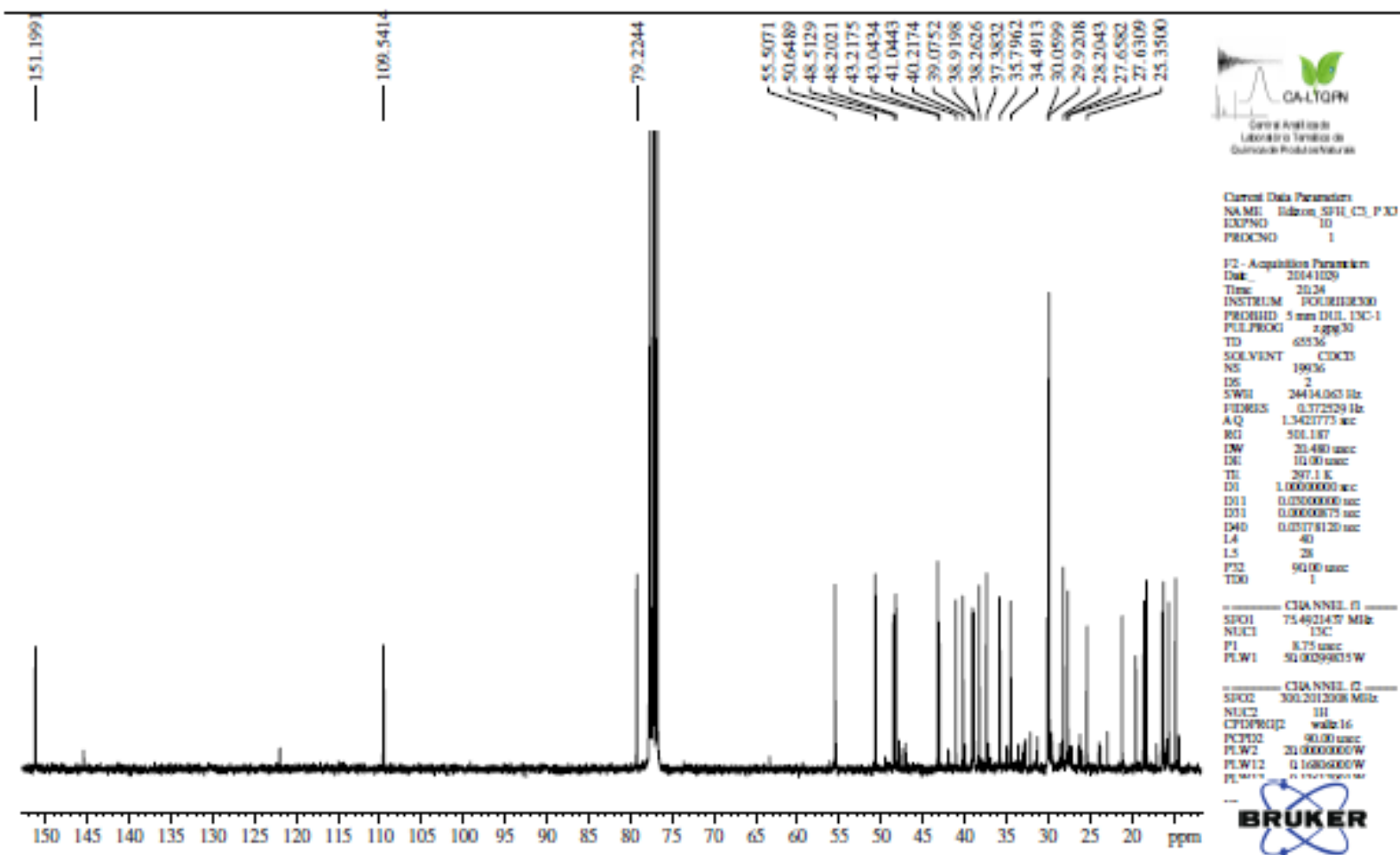
Anexo 15. Espectro de correlação em 2D 1H-1H COSY do glutinol (SFH-C₂- B) em CDCl₃ (300 MHz).



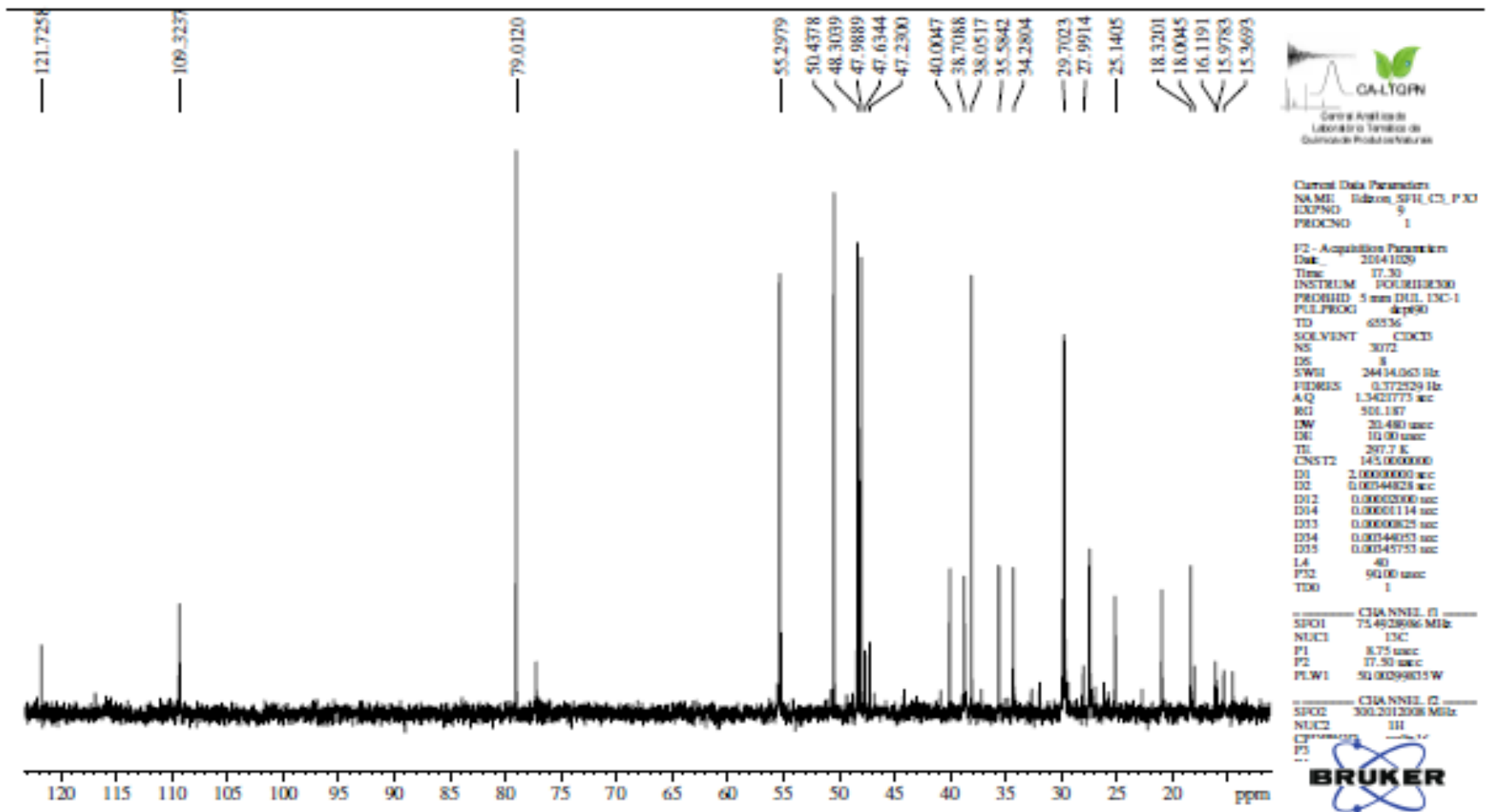
Anexo 16. LC-HRMS do lupeol (SFH-C₄- A) em metanol (infusão direta).



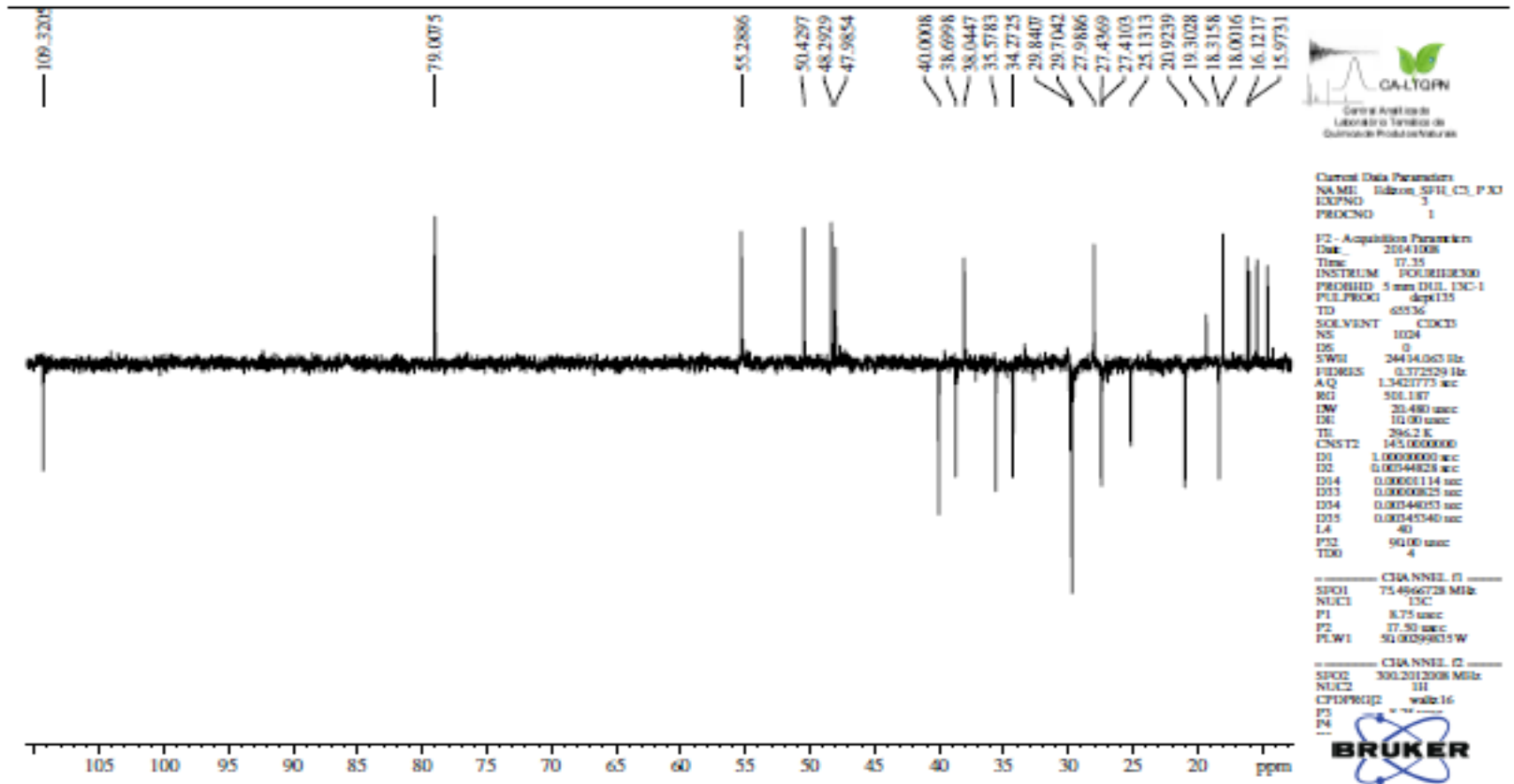
Anexo 17. Espectro de RMN de ^1H do lupeol (SFH-C₄- A) em CDCl_3 (400 MHz).



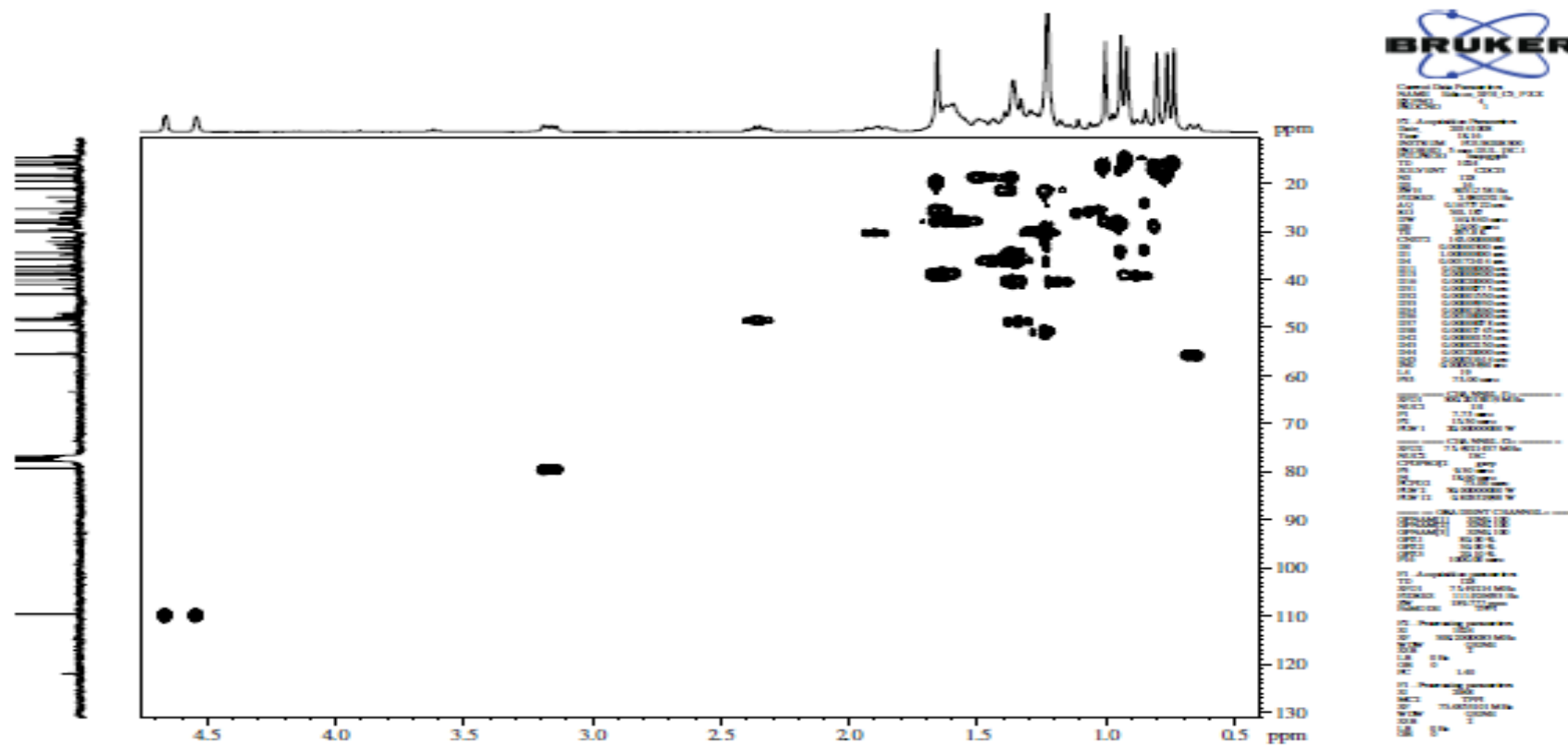
Anexo 18. Espectro de RMN de ^{13}C do lupeol (SFH-C₄- A) em CDCl_3 (300 MHz).



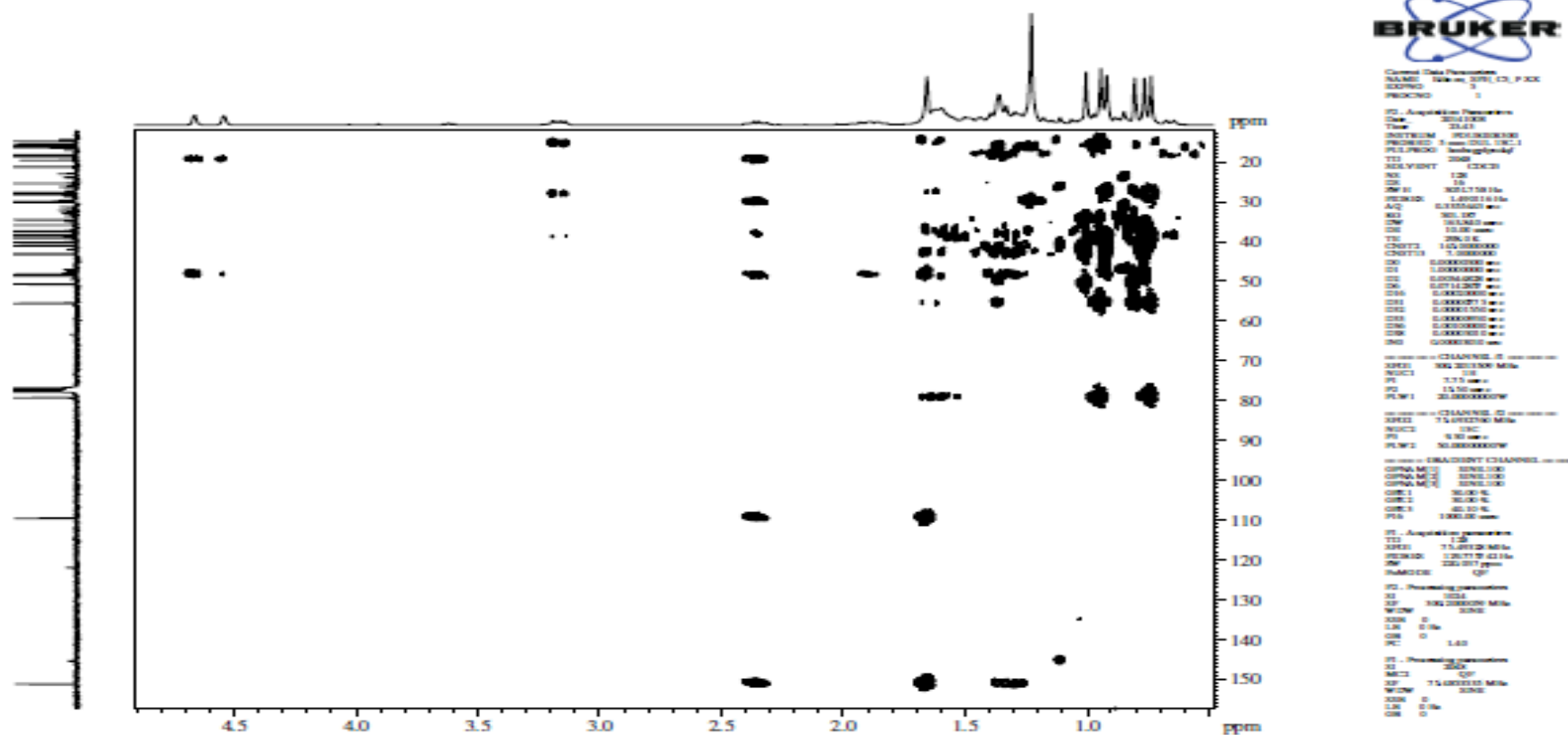
Anexo 19. Espectro de DEPT 90° do lupeol (SFH-C4- A) em CDCl₃ (300 MHz).



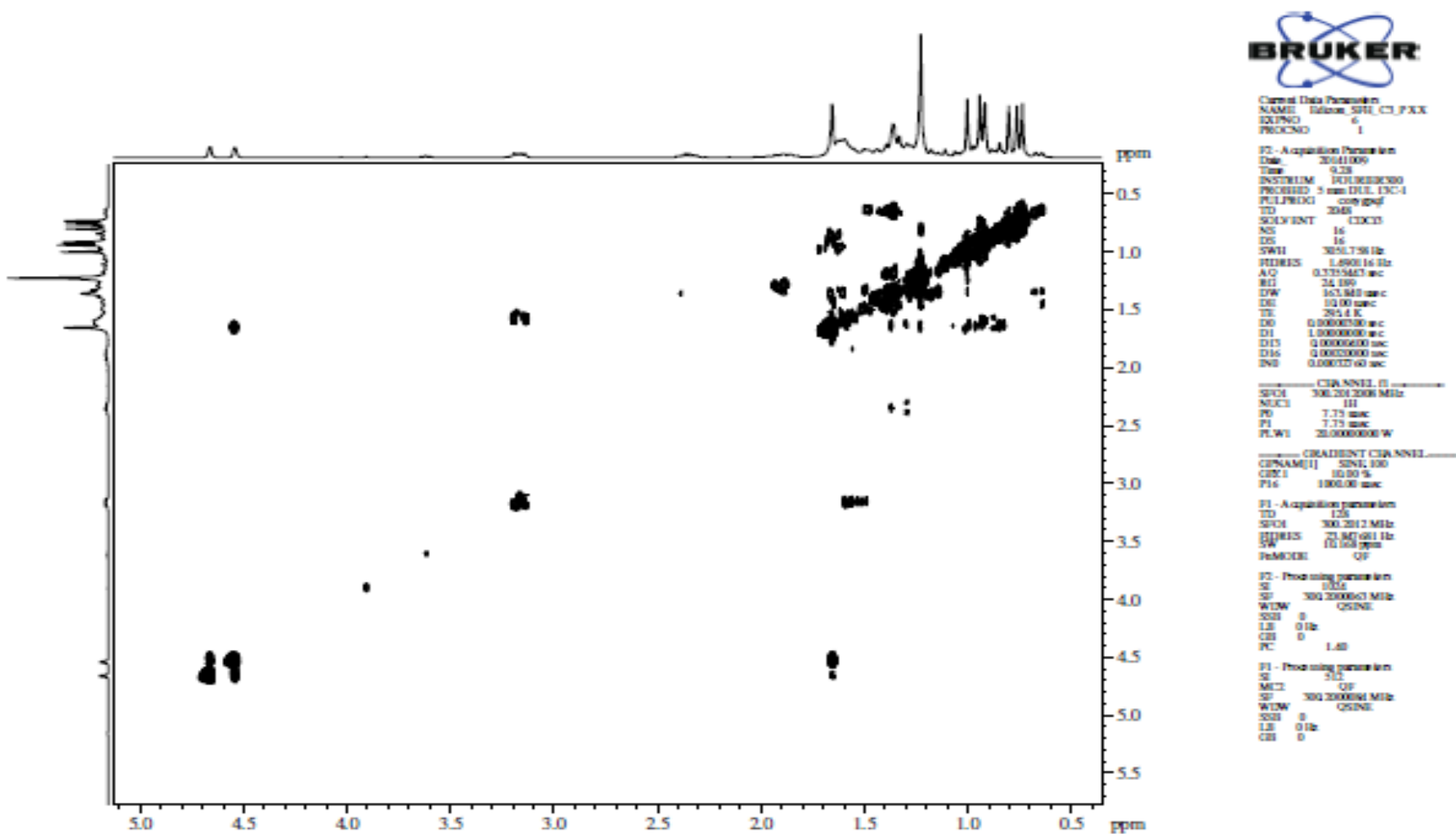
Anexo 20. Espectro de DEPT135° do lupeol (SFH-C₄- A) em CDCl₃ (300 MHz).



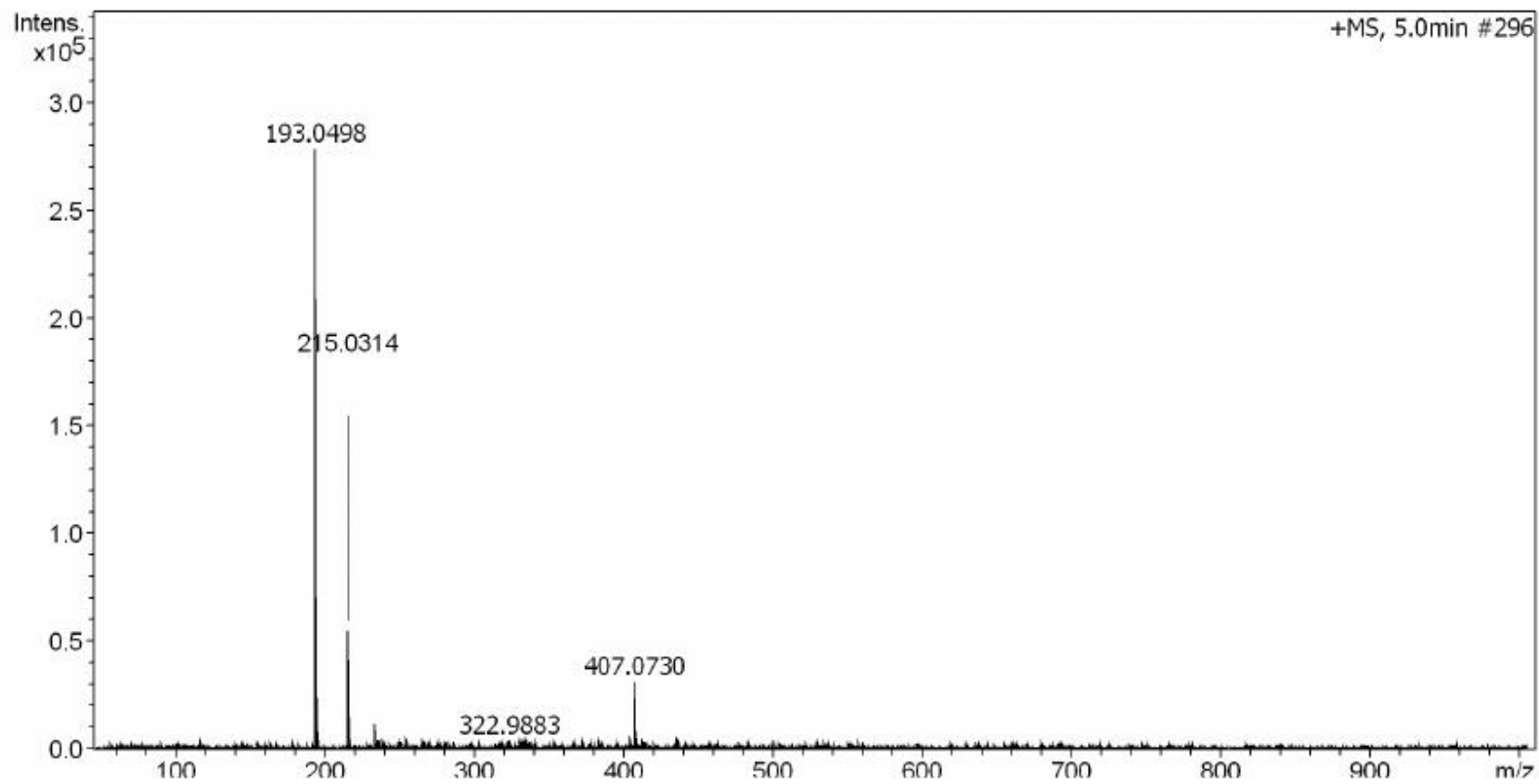
Anexo 21. Espectro de correlação ¹H-¹³C HSQC do luteol (SFH-C₄- A) em CDCl₃ (¹³C:75 e ¹H:300 MHz).



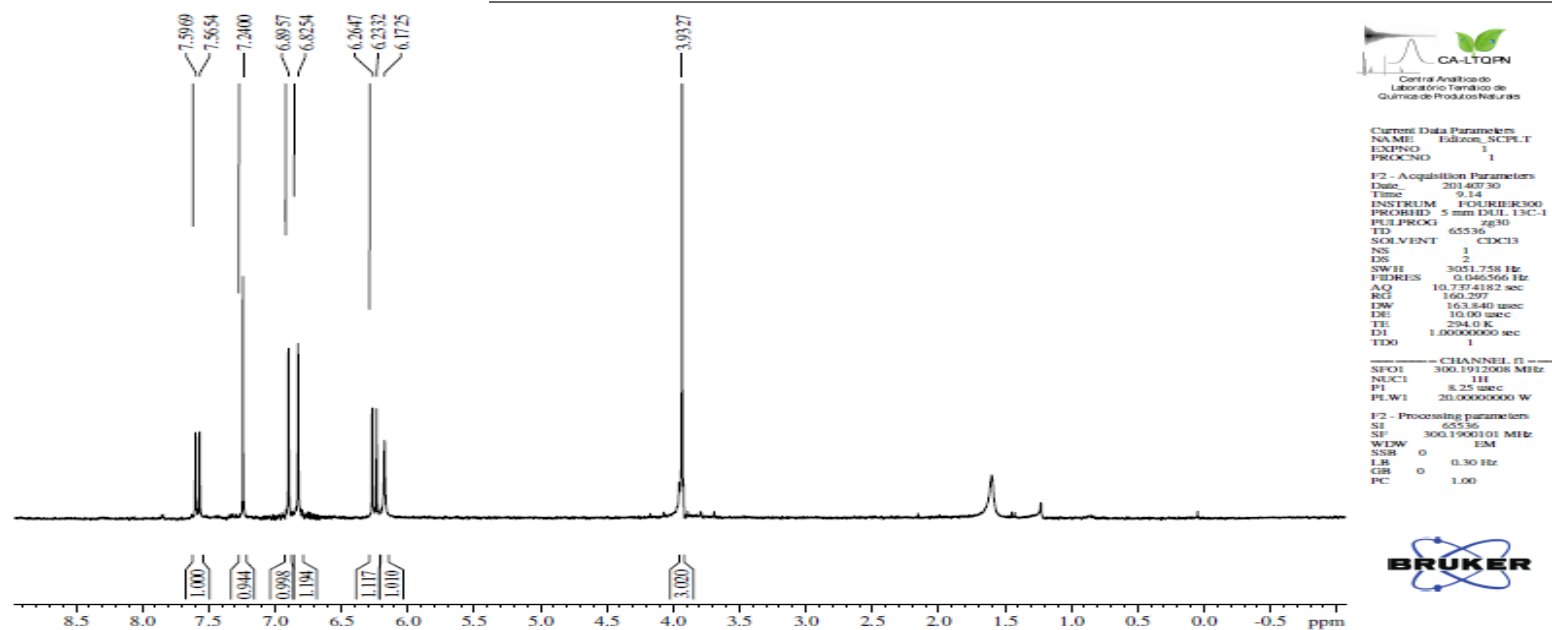
Anexo 22. Espectro de correlação ^1H - ^{13}C HMBC do lupeol (SFH-C₄- A) em CDCl_3 (^{13}C :75 e ^1H :300 MHz).



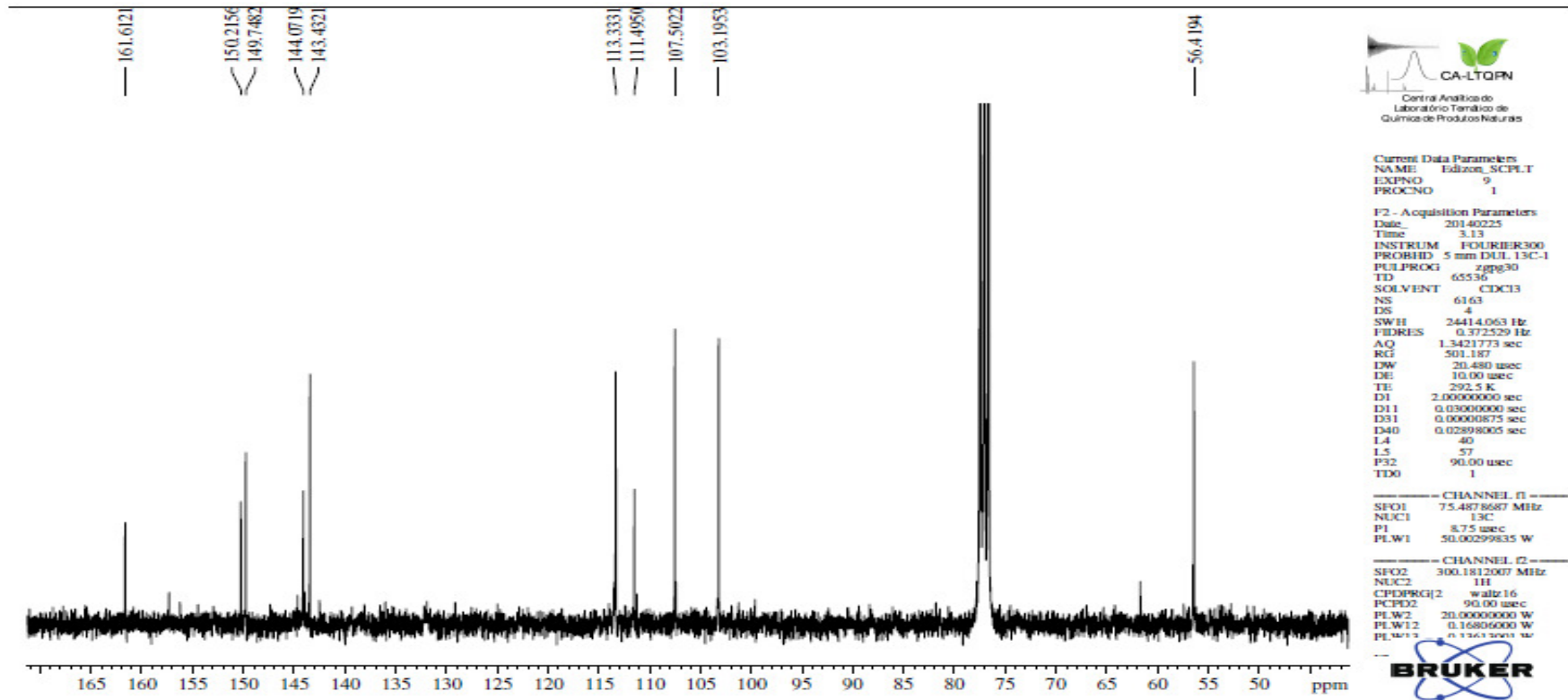
Anexo 23. Espectro de correlação em 2D ^1H - ^1H COSY do lupeol (SFH-C₄- A) em CDCl_3 (300 MHz).



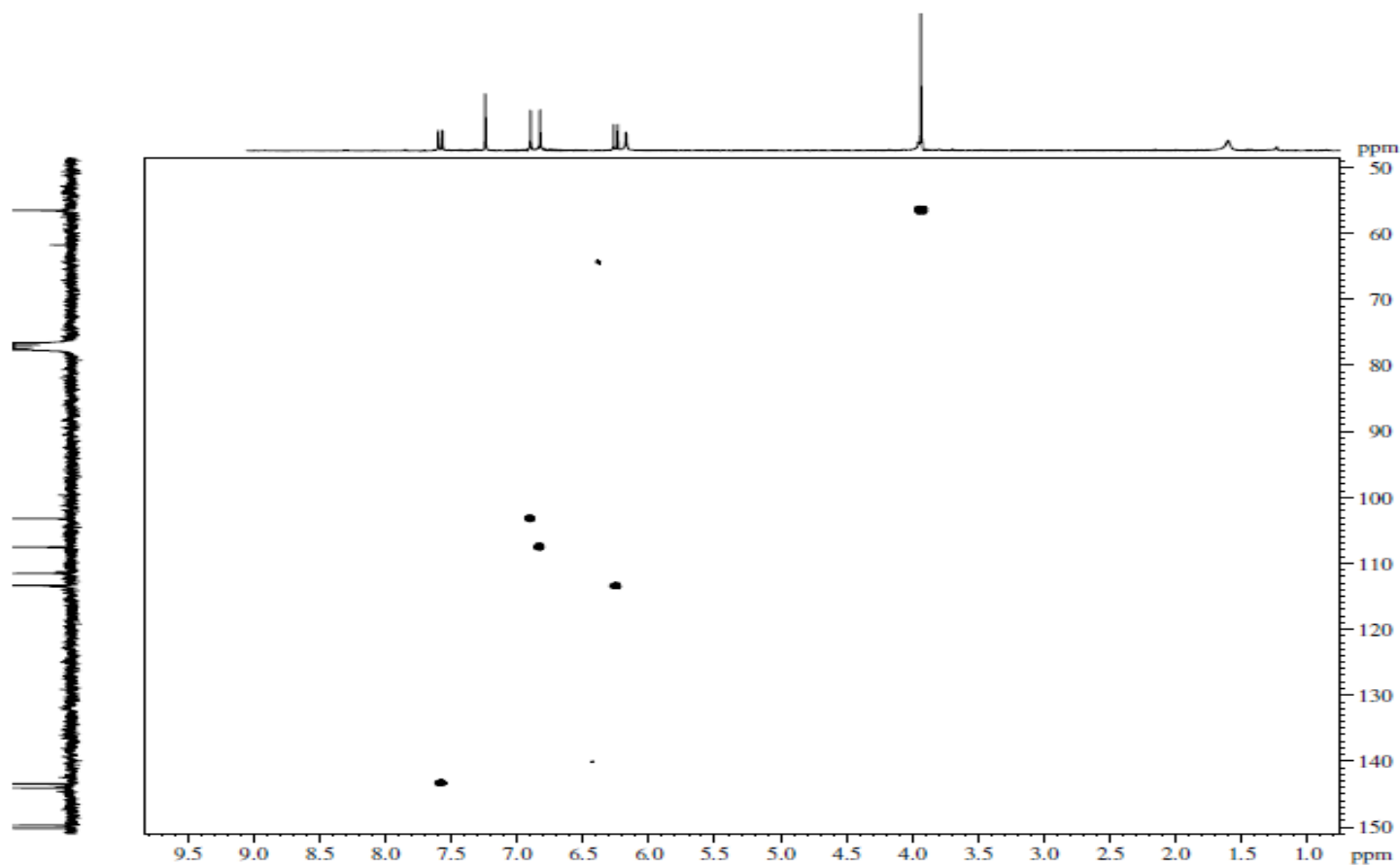
Anexo 24. LC-HRMS da escopoletina (SFC-C₄- A) em metanol.



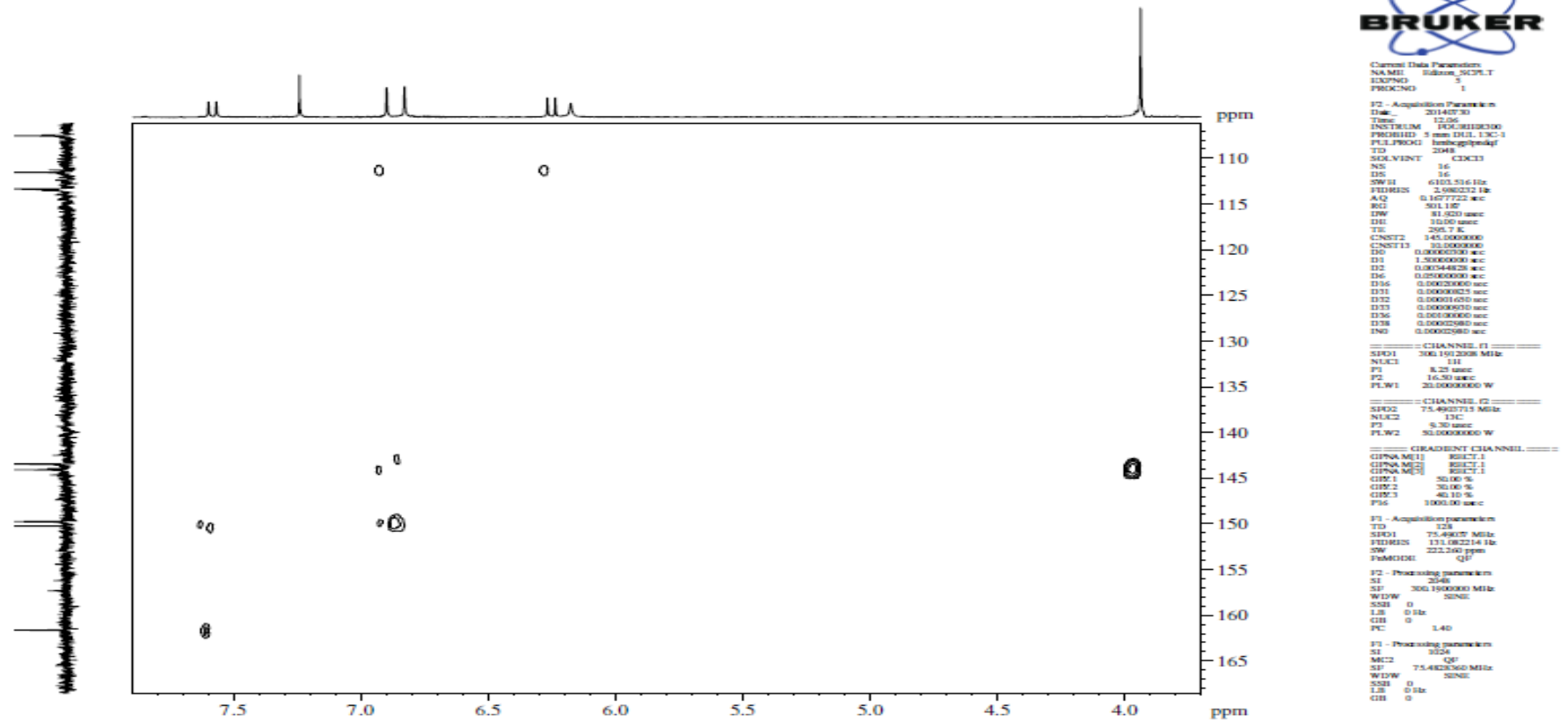
Anexo 25. Espectro de RMN de ^1H da escopoletina (SFC-C₄- A) em CDCl_3 (300 MHz).



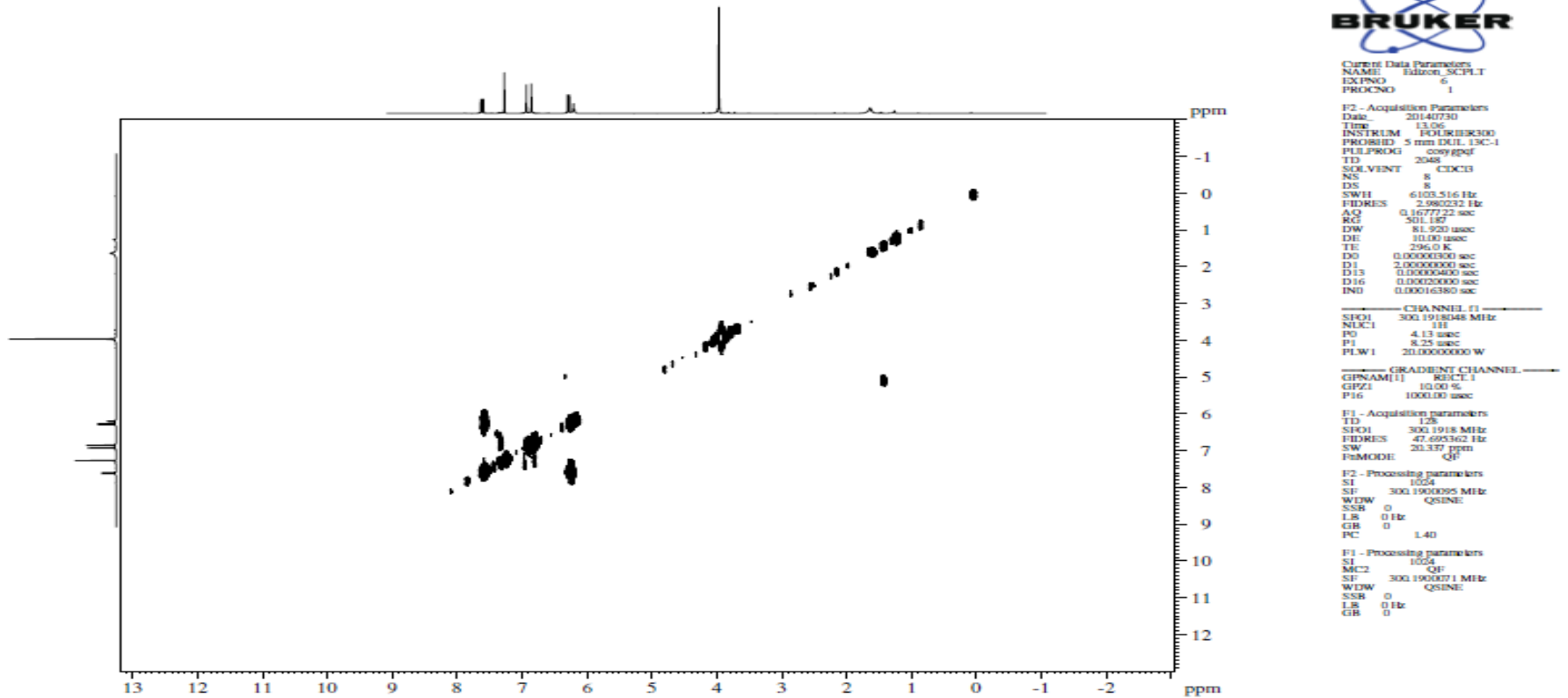
Anexo 26. Espectro de RMN de ^{13}C da escopoletina (SFC-C₄- A) em CDCl_3 (300 MHz).



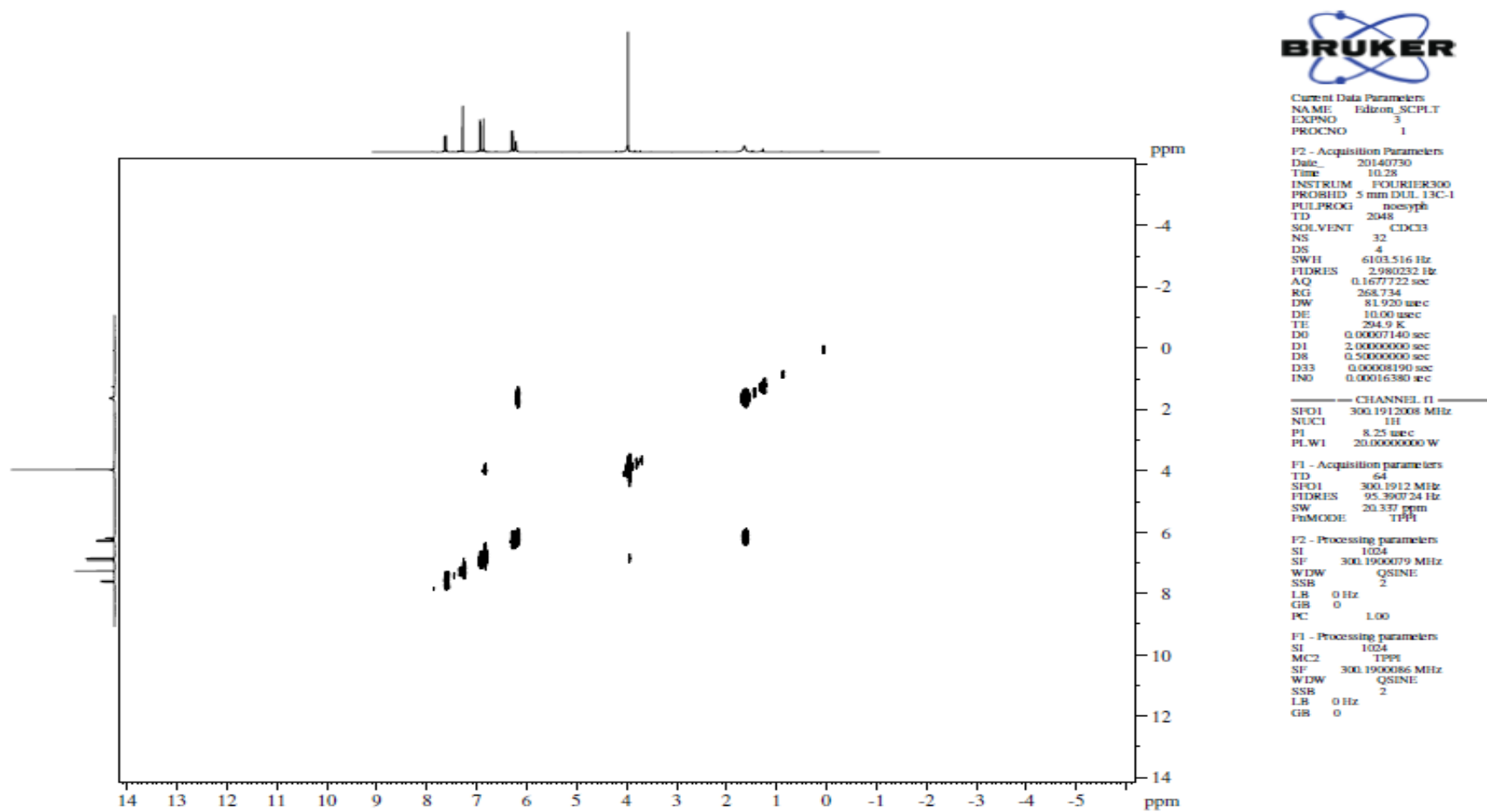
Anexo 27. Espectro de correlação ^1H - ^{13}C HSQC da escopoletina (SFC-C₄- A) em CDCl_3 (^{13}C :75 e ^1H :300 MHz).



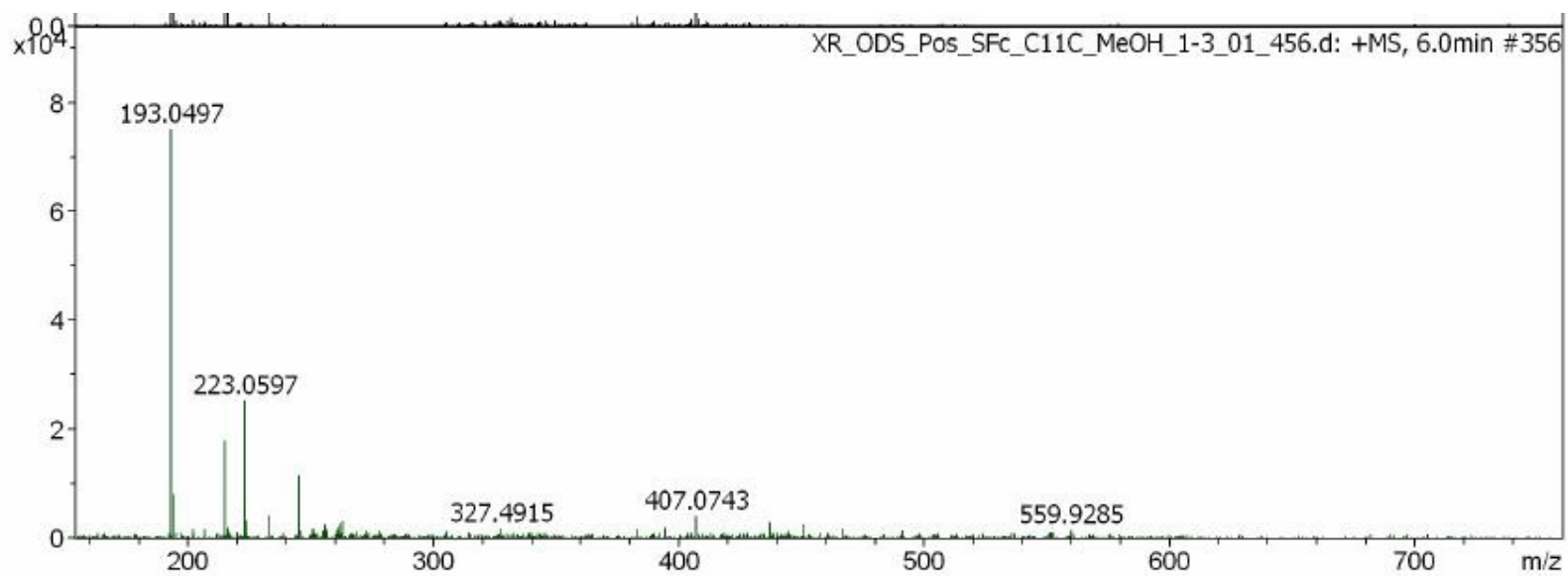
Anexo 28. Espectro de correlação ^1H - ^{13}C HMBC da escopoletina (SFC-C₄- A) em CDCl_3 (^{13}C :75 e ^1H :300 MHz).



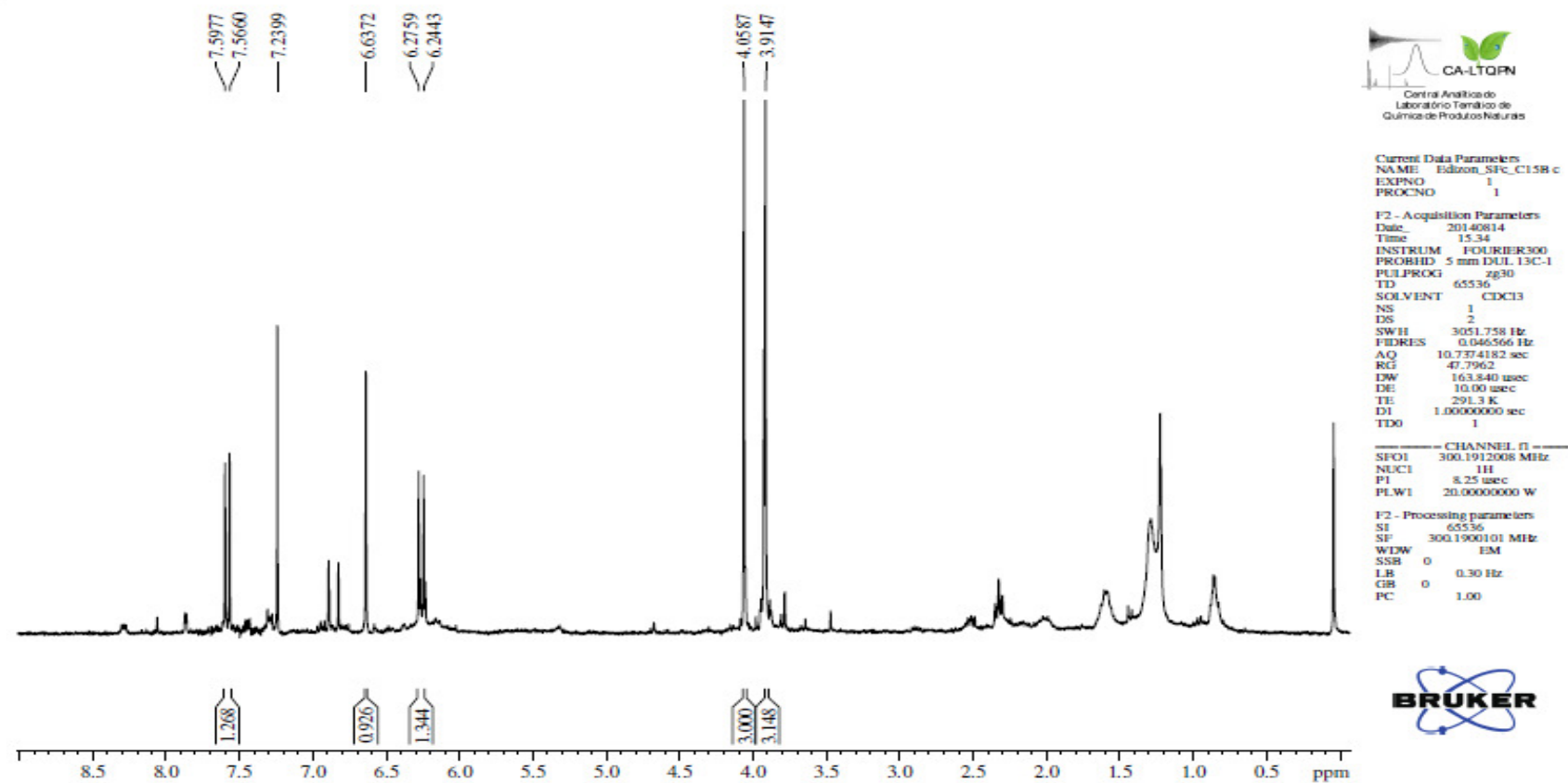
Anexo 29. Espectro de correlação ^1H - ^1H COSY da escopoletina (SFC-C₄-A) em CDCl_3 (300 MHz).



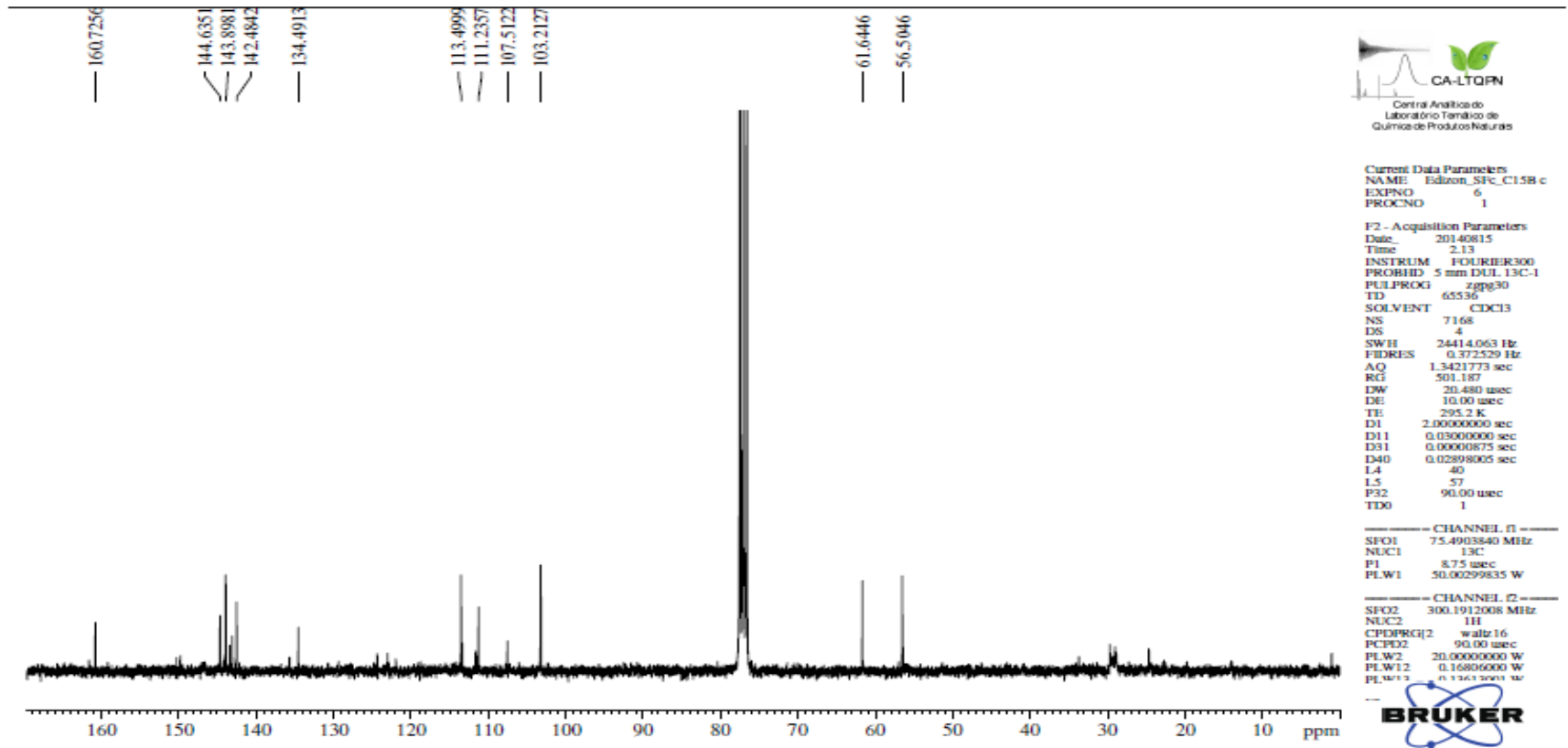
Anexo 30. Espectro de correlação ^1H - ^1H NOESY da escopoletina (SFC-C₄- A) em CDCl_3 (300 MHz).



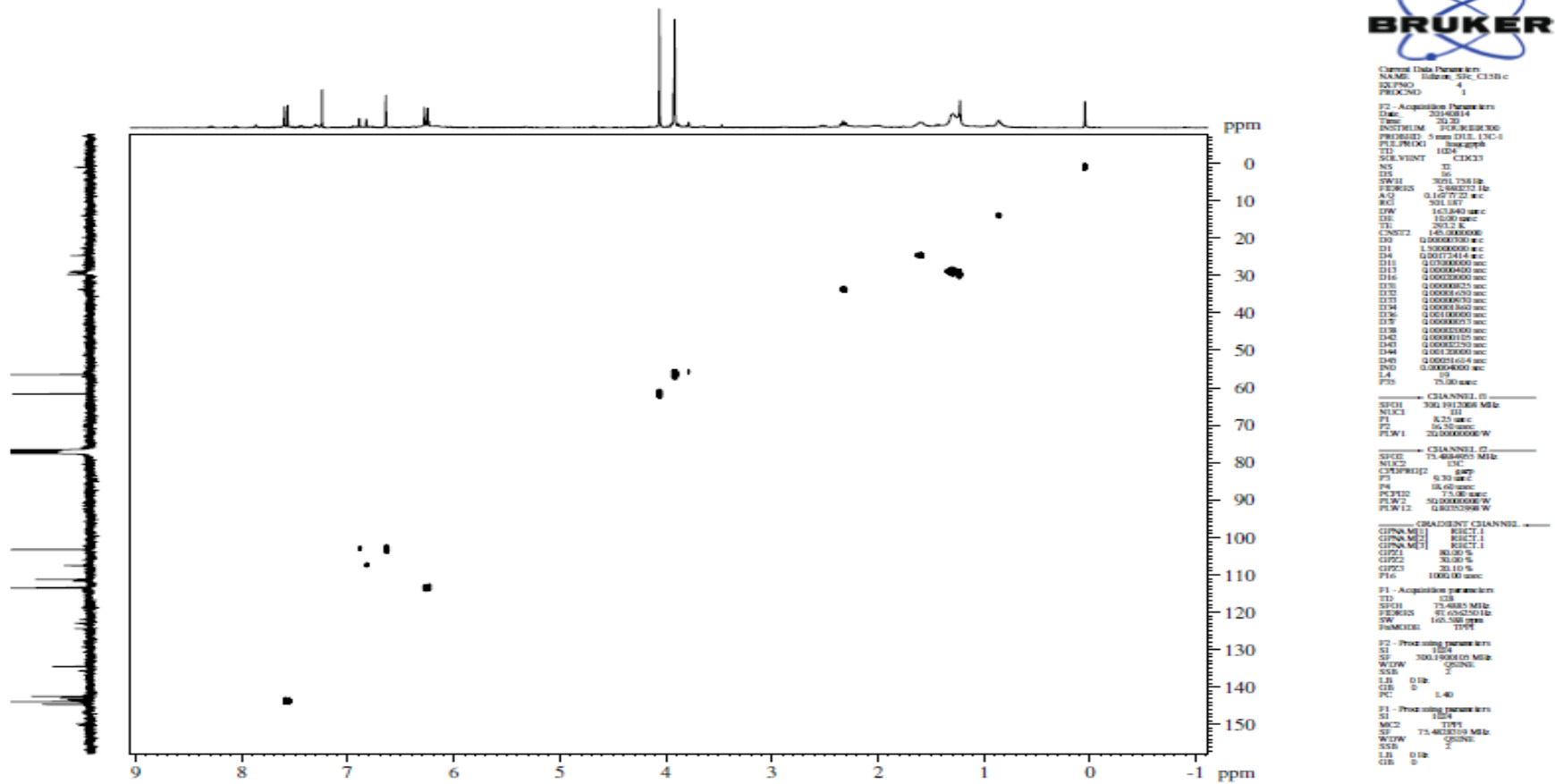
Anexo 31. LC-HRMS da isofraxidina (SFC- C₅ -B) em metanol.



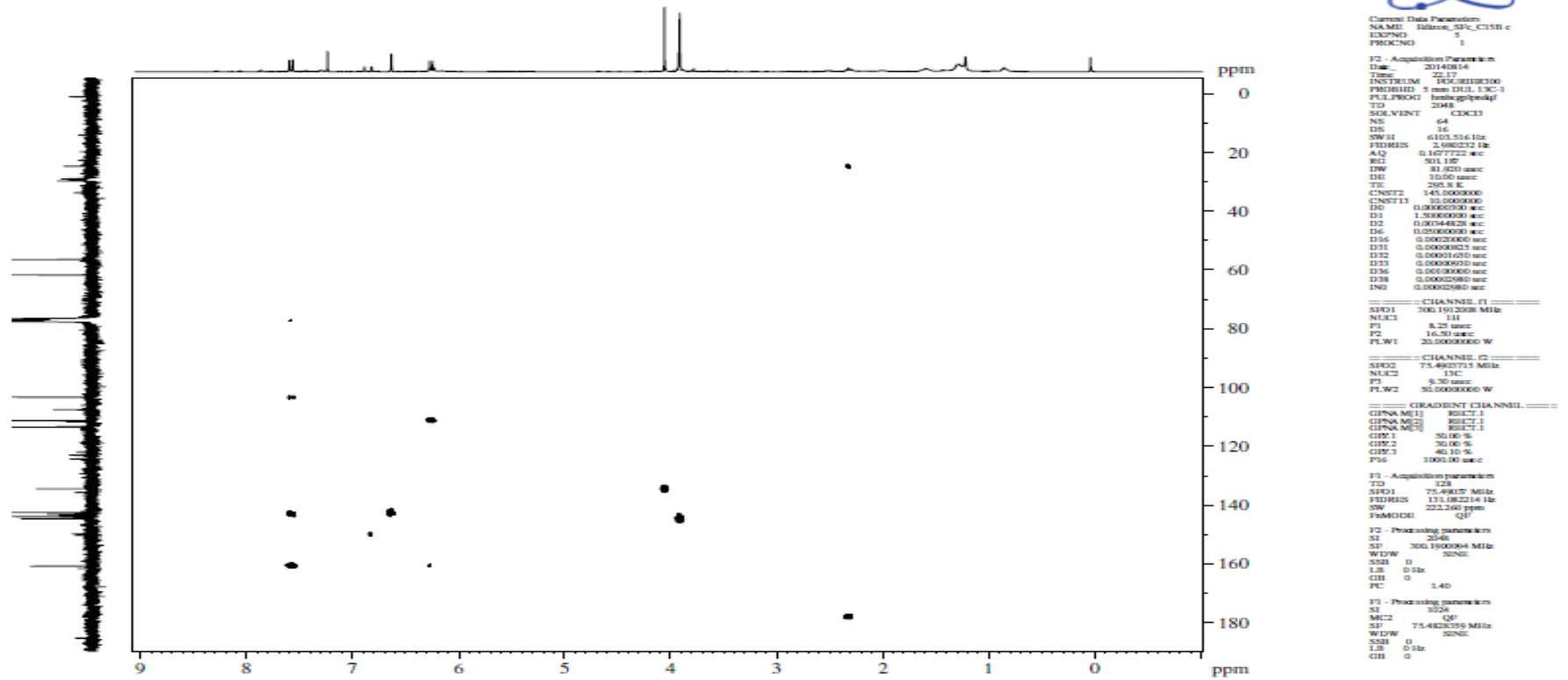
Anexo 32. Espectro de RMN de ^1H da isofraxidina (SFC- C_5 -B) em CDCl_3 (300 MHz).



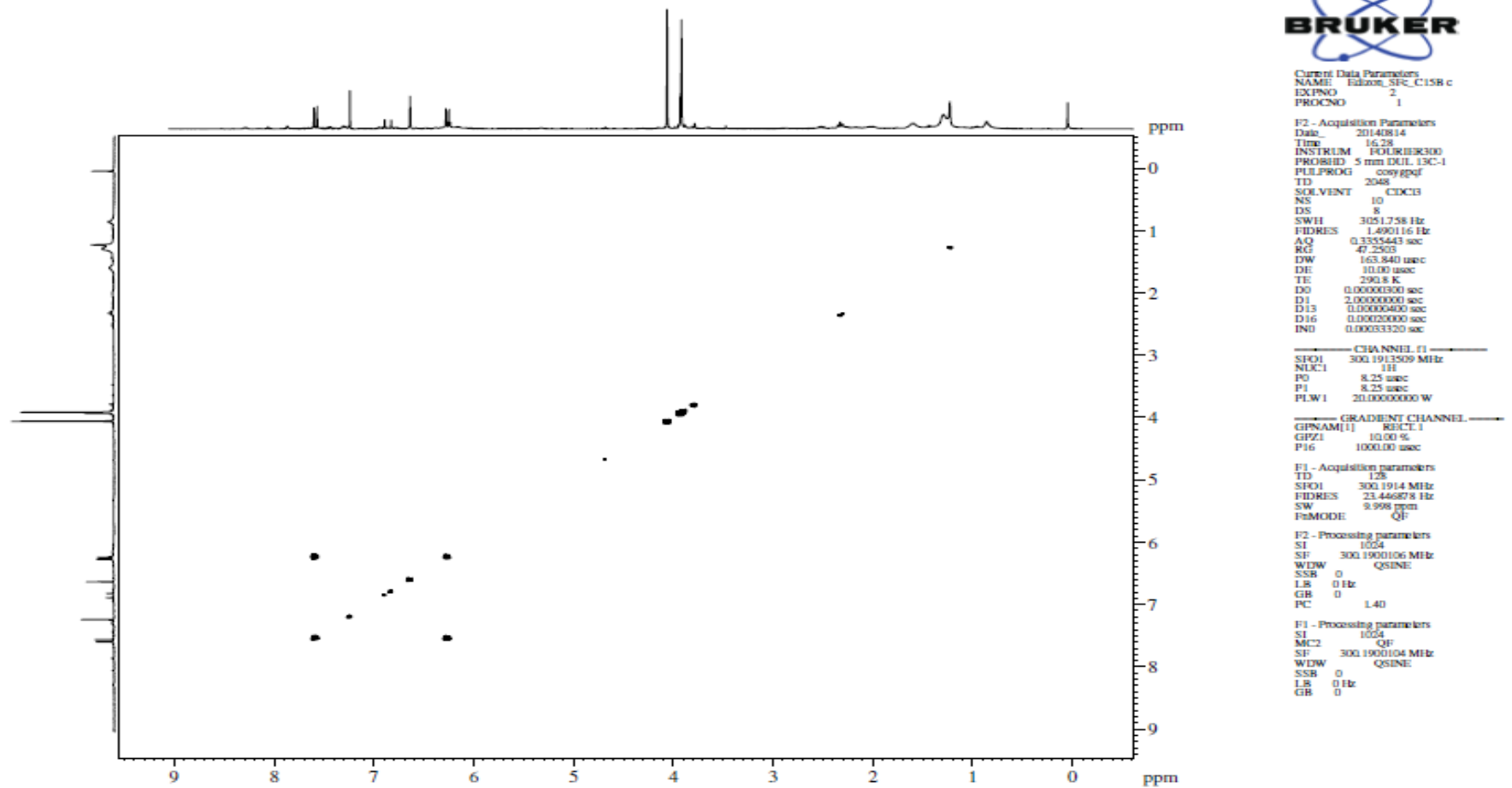
Anexo 33. Espectro de RMN de ^{13}C da isofraxidina (SFC- C₅ -B) em CDCl_3 (300 MHz).



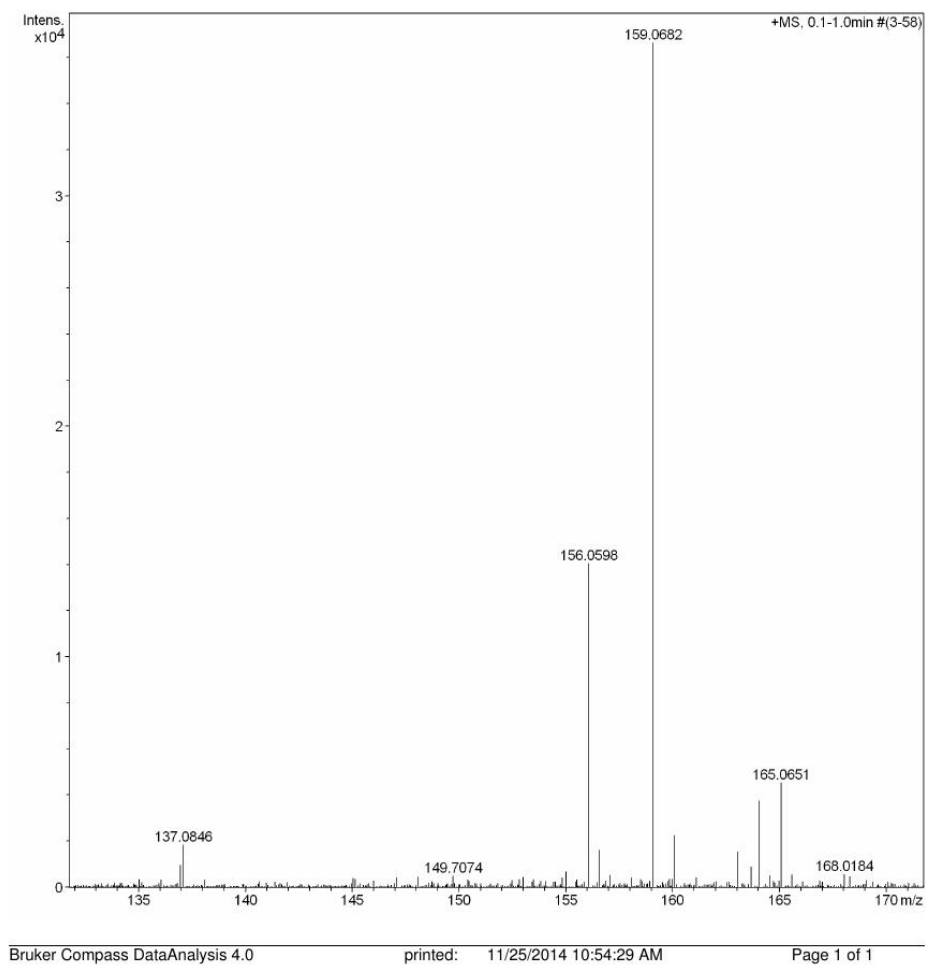
Anexo 34. Espectro de correlação ¹H-¹³C HSQC da isofraxidina (SFC- C₅ -B) em CDCl₃ (¹³C:75 e ¹H:300 MHz).



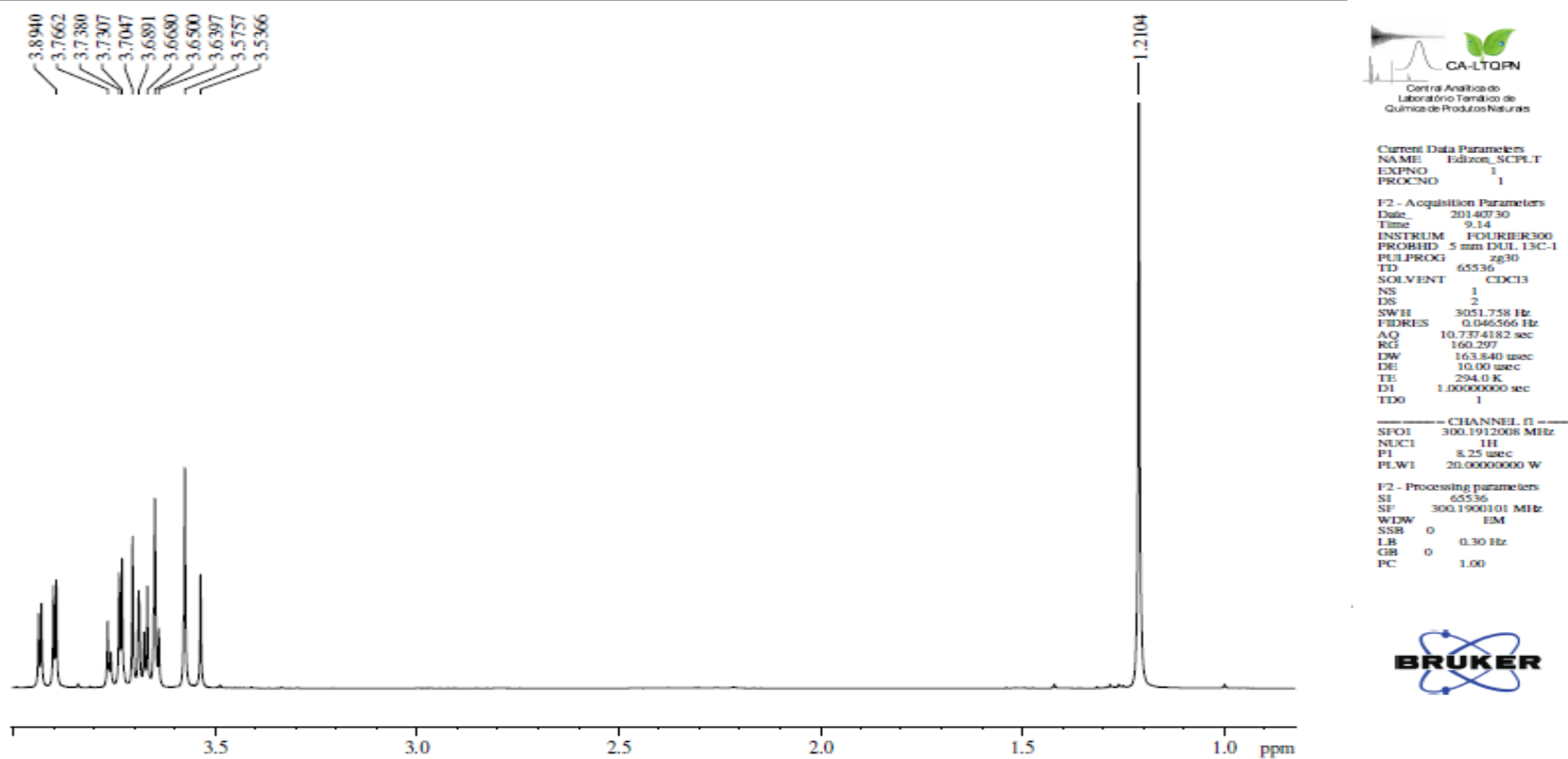
Anexo 35. Espectro de correlação ¹H-¹³C HMBC da isofraxidina (SFC- C₅-B) em CDCl₃ (13C:75 e ¹H:300 MHz).



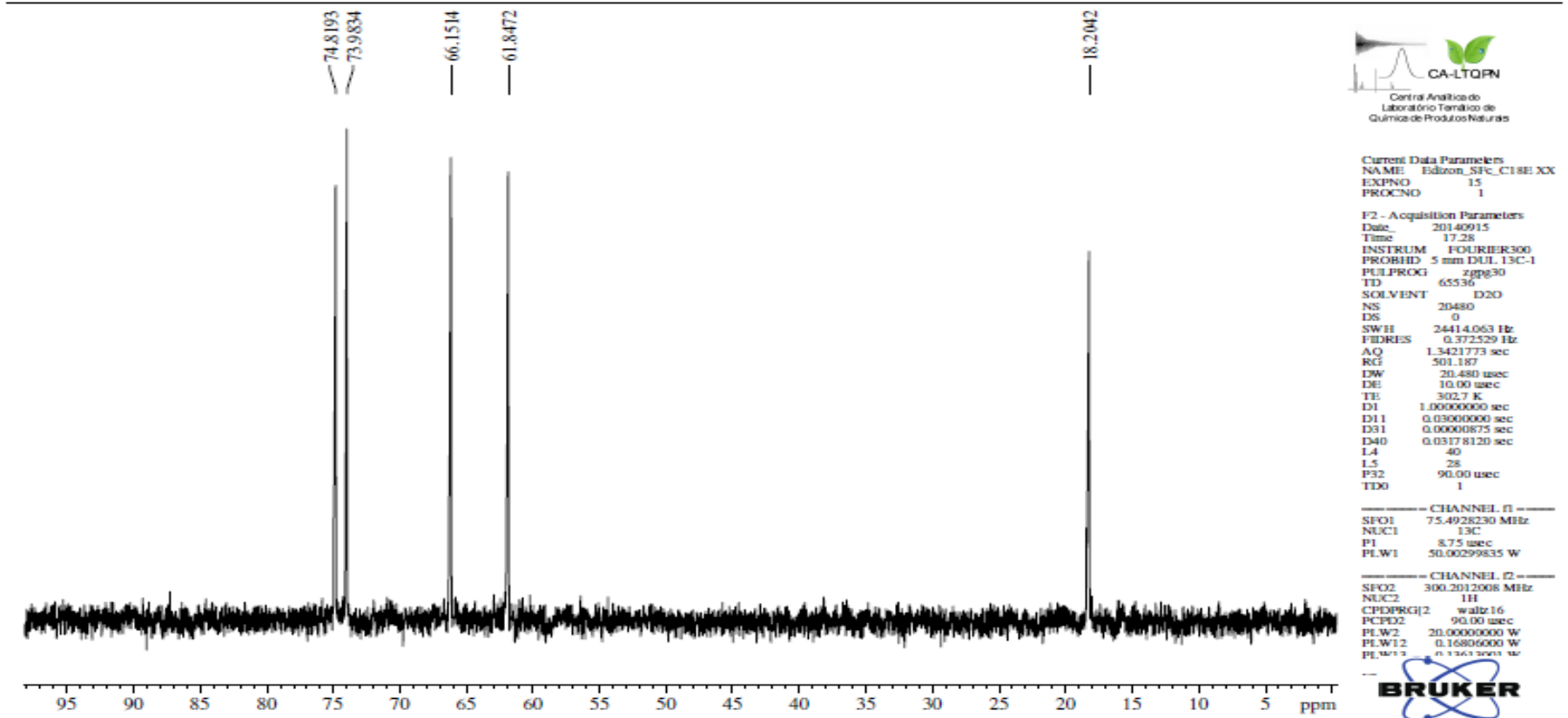
Anexo 36. Espectro de correlação ^1H - ^1H COSY da isofraxidina (SFC- C₅ -B) em CDCl₃ (300 MHz).



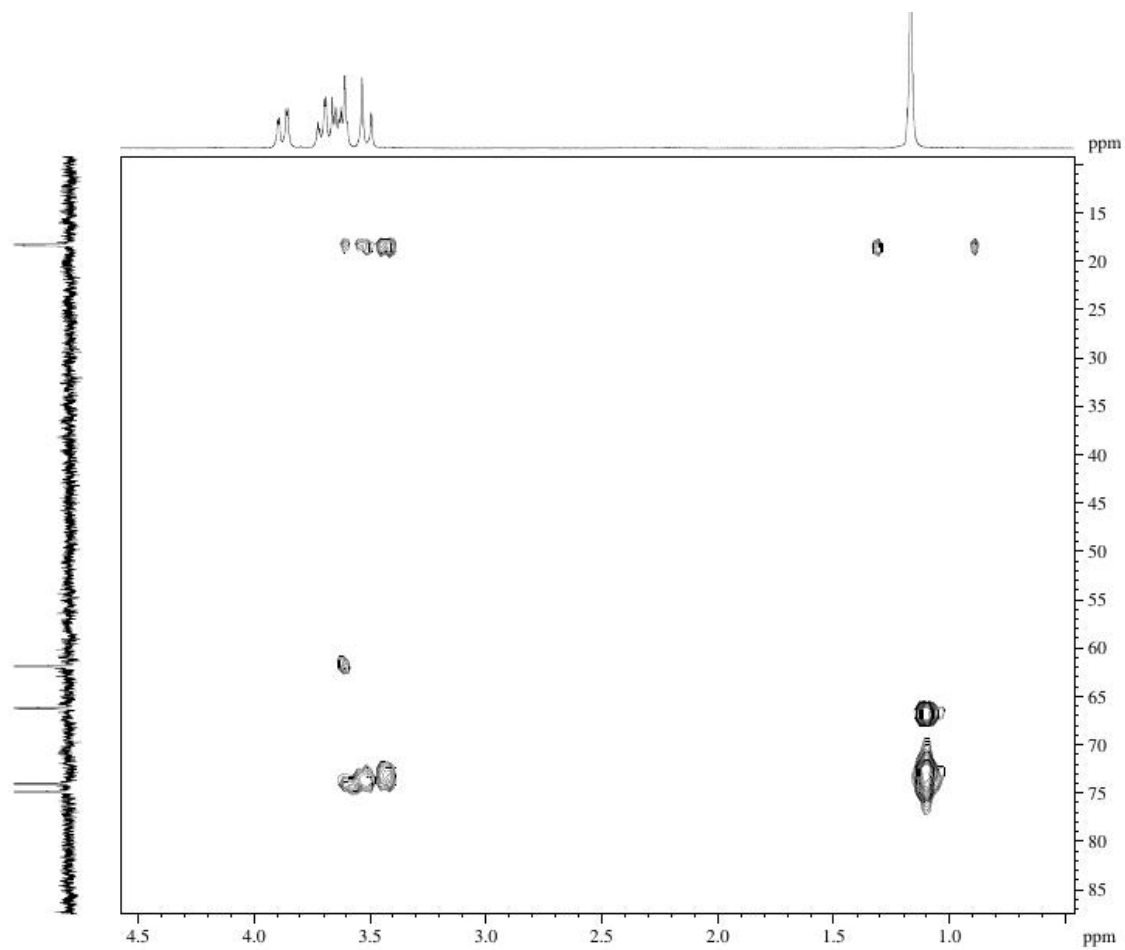
Anexo 37. LC-HRMS do 2-C-metil-eritritol (SFC- C₅ -B) em acido fórmico.



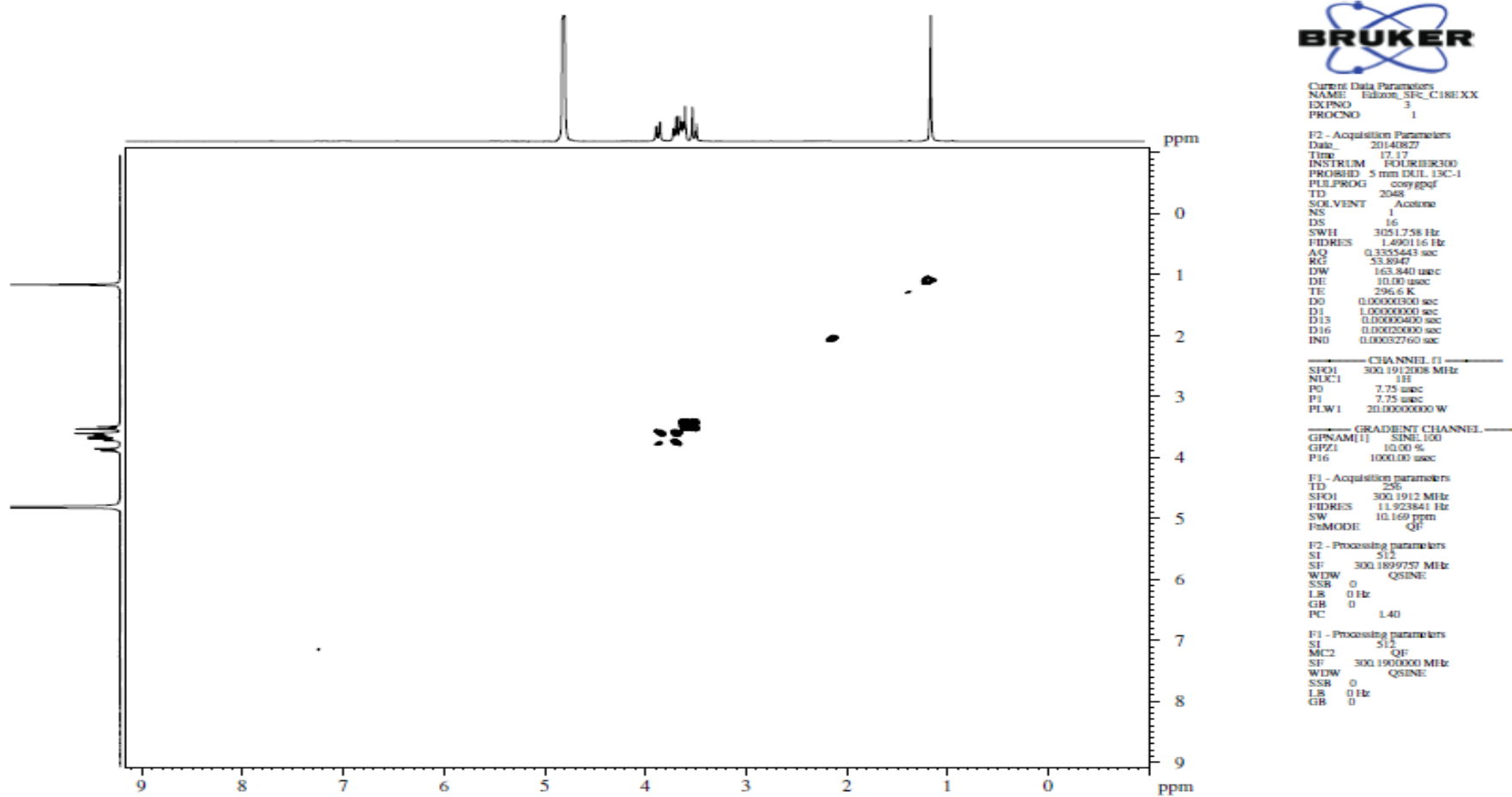
Anexo 38. Espectro de RMN de ^1H do 2-C-metil-eritritol (SFC- C₅-B) em CDCl_3 (300 MHz).



Anexo 39. Espectro de RMN de ^{13}C do 2-C-metil-eritritol (SFC- C₅ -B) em CDCl_3 (300 MHz).



Anexo 41. Espectro de correlação ^1H - ^{13}C , HMBC do 2-C-metil-eritritol (SFC-C₅-B) em CDCl_3 (^{13}C :75 e ^1H :300 MHz).



Anexo 42. Espectro de correlação ^1H - ^1H , COSY do 2-C-metil-eritritol (SFC-C₅-B) em CDCl₃ (300 MHz).