



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

**Composição química e atividade antimalárica de *Geissospermum urceolatum* A. H.
Gentry (Apocynaceae)**

BRUNA DE OLIVEIRA

MANAUS – 2018

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

BRUNA DE OLIVEIRA

Composição química e atividade antimalárica de *Geissospermum urceolatum* A. H. Gentry (Apocynaceae)

Tese apresentada ao Programa Multi-institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia, área de concentração Biotecnologia para a Saúde.

Orientador: Dr. Adrian Martin Pohlit

Ficha Catalográfica

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

Oliveira, Bruna
O48c Composição química e atividade antimalárica de *Geissospermum urceolatum* A. H. Gentry (Apocynaceae) / Bruna Oliveira. 2018
170 f.: il.; 31 cm.

Orientador: Adrian Martin Pohlit
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. acariquara branca. 2. aspidoscarpina. 3. sinapato de metila. 4. 4-N-metil-akuamicina. 5. *Plasmodium falciparum*. I. Pohlit, Adrian Martin II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

Dedico esse trabalho a aqueles que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la. A minha mãe Vilma e meu pai João.

AGRADECIMENTO

Primeiramente a Deus e Nossa Senhora que nunca me permitiram perder a fé e me sustentaram em tantos momentos de turbulência.

Aos meus pais João e Vilma, que sempre foram meu alicerce em tudo na vida. Ao meu irmão Renato que sempre me apoiou nesta caminhada. A todos os demais familiares, tios e primos, que sempre ficaram na torcida pelo meu sucesso. A vovó Mariana que sempre foi um grande exemplo de determinação. E a minha querida Nina, parceira de sempre.

Ao professor Dr. Adrian M. Pohlit, pela paciência, amizade e orientação durante esta caminhada.

A todos os mestres do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, pelos ensinamentos e conselhos nos momentos de desespero.

A todos os integrantes da Central Analítica e Temática de Química e Produtos Naturais, em especial ao grande amigo Magno Perea, por sua dedicação, capacidade e boa vontade em tantos momentos de desesperos.

A toda equipe do Laboratório de RMN da UFAM, em especial ao Kidney Neves e a Amanda, por me ajudarem sempre, com tanta dedicação e boa vontade.

A toda equipe do Laboratório de Malária e Dengue, em especial a Jaqueline Siqueira, Marcia Souza, Karla Lagos, Suellen Monteiro, Lais Garcia, Diana Sangana e Marlene Marcelino, agradeço toda dedicação e boa vontade sempre.

Aos colegas, amigos e irmãos do laboratório que tanto me ajudaram em tantos momentos de turbulência, aprendizagem e risos: Marlene Marcelino, Rita Cynara, Diana Sangana, Lais Garcia, Karla Lagos, Andreia Montoia, Abrão Alexandre, Paula Suellen, Yara Lins, Berna Almeida, Renan Feitosa, Tiago Barbosa, Edzon Lopes. Com ajuda de vocês foi bem menos difícil.

E aos amigos que mesmo um pouco mais distantes nunca deixaram de me apoiar nestes anos de caminhada: Andrea Brigida, Andreia Figueiredo, Natascha Sandy, Bianca Santana, Ingrid Michele, Karina Mayo, Adriana Vieitos, Sueli Vieira, e todos os demais não citados, meu muito obrigada. A energia positiva de vocês me ajudaram muito em todos os momentos desta caminhada.

Aos órgãos de fomento CAPES, pela bolsa de doutorado e a FAPEAM, pelo financiamento do projeto Núcleo de Novas Safras e Substâncias Ativas em Escala Multigrama de Plantas Amazônicas (NOSSAPLAM).

***"Algo só é impossível até que alguém
duvide e acabe provando o contrário."
(Albert Einstein)***

RESUMO

A situação da malária no Brasil e no mundo ainda é muito preocupante nos dias atuais. Uma das causas desta situação é a existência de cepas do *Plasmodium* resistente aos antimaláricos atuais. Por isso, há necessidade da busca por novas drogas, que sejam mais eficazes e menos tóxicas. Diversas espécies vegetais vêm sendo usadas na medicina popular como antimaláricos, como a *Cinchona spp.* e a *Artemisia annua*, plantas que foi isolado a quinina e a artemisinina. Na família Apocynaceae, as espécies do gênero *Geissospermum* e *Aspidosperma*, tem se destacado como potencial antimalárico. Assim, esse trabalho teve como objetivo estudar a composição química e avaliar a atividade antiplasmódica *in vitro* de extratos, frações e substâncias da *Geissospermum urceolatum*, através de estudo bioguiado. O material vegetal foi coletado na Reserva Florestal Ducke do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), em Manaus, no Amazonas. Foram comparados sete (7) métodos de extração diferentes para cada parte da planta (folha, galho e casca), porém o método 7 foi testado apenas na casca. Para definir o perfil químico inicial dos extratos secos foi realizada análise por espectroscopia de massa de alta resolução (EMAR) por infusão direta das amostras. Os dados obtidos por EMAR foram tratados e interpretados quimiometricamente através do programa Chemoface. Esses foram avaliados por parte da planta separadamente (folha, galho e casca), comparando método de extração, *m/z* e porcentagem em relação ao pico base (maior que 5%). Os dezenove (19) extratos foram testados para atividade antimalárica (Concentração Inibitória 50% - CI_{50}) *in vitro*, três (3) dos extratos da casca se mostraram ativos, com CI_{50} de 14,5 $\mu\text{g/mL}$, 12 $\mu\text{g/mL}$ e 9,7 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. Os dados quimiométricos foram trabalhados para encontrar uma relação entre os extratos ativos e o perfil químico, onde o que diferencia esse grupo dos demais é a presença de três (3) picos principais: 329,18; 175,18; 217,07. Correlacionando atividade e rendimento dos métodos testados, definiu-se o método 7 (M7) como método de estudo, então uma nova extração em maior escala foi realizada, foram obtido dois extratos secos (BOT1 e BOT2). O extrato seco preparado (BOT1), foi submetido a fracionamento, utilizando coluna cromatográfica (CC), como fase estacionária foi utilizado Sephadex LH-20 e fase móvel MeOH 100%, das 8 subfrações obtidas, 5 foram submetidas a teste de CI_{50} , RMN e EMAR. Destas uma foi parcialmente ativa (PA) (30 $\mu\text{g/mL}$) e uma foi ativa (A) (1,93 $\mu\text{g/mL}$). O extrato seco (BOT2) foi submetido a partição e foi obtido 2 frações principais, ambos foram submetidos RMN, EMAR e teste de CI_{50} , ambas frações foram ativas. Essas frações foram fracionadas utilizando CC e CLAE, destas 4 substâncias foram elucidadas como: Sinapiato de metila (S2) (CI_{50} 24,5 $\mu\text{g/mL}$) e 4-*N*-metil-akuammicine (S3) (CI_{50} 27,1 $\mu\text{g/mL}$) que não apresentaram atividade antiplasmódica nos testes *in vitro*; aspidocarpina (S1) (CI_{50} 2,42 $\mu\text{g/mL}$) que apresentou atividade antiplasmódica menor do que observado em estudos anteriores e o dímero de fenil propanóide (S4). O fracionamento bioguiado se mostrou eficiente no isolamento de substâncias com atividade antiplasmódica *in vitro*.

PALAVRAS-CHAVES: acariquara branca, aspidocarpina, sinapiato de metila, 4-*N*-metil-akuamicina, *Plasmodium falciparum*.

ABSTRACT

The malaria situation in Brazil and in the world is still very worrying these days. One of the causes of this situation is the existence of Plasmodium strains resistant to current antimalarials. Therefore, there is a need for the search for new drugs, which are more effective and less toxic. Several plant species have been used in folk medicine as antimalarials, such as Cinchona spp. and Artemisia annua, plants that have been isolated from quinine and artemisinin. In the family Apocynaceae, the species of the genus Geissospermum and Aspidosperma, has been highlighted as an antimalarial potential. Thus, the objective of this work was to study the chemical composition and to evaluate the in vitro antiplasmodic activity of extracts, fractions and substances of Geissospermum urceolatum, through a bioguided study. The plant material was collected at the Ducke Forest Reserve of the National Institute of Amazonian Research (INPA), in Manaus, Amazonas. Seven (7) different extraction methods were compared for each part of the plant (leaf, twig and bark), but method 7 was tested only on the bark. In order to define the initial chemical profile of dry extracts, high resolution mass spectrometry (HRMS) analysis was performed by direct infusion of the samples. The data obtained by EMAR were treated and interpreted chemimetrically through the Chemoface program. These were evaluated by the plant separately (leaf, twig and bark), comparing extraction method, m / z and percentage relative to the base peak (greater than 5%). The nineteen extracts were tested for antimalarial activity (Inhibitory Concentration 50% - IC50) in vitro, three (3) of the shell extracts were active, with IC50 of 14.5 µg / mL, 12 µg / mL and 9, 7 µg / mL respectively. The chemometric data were used to find a relation between the active extracts and the chemical profile, where what differentiates this group from the others is the presence of three (3) main peaks: 329,18; 175.18; 217.07. In order to correlate the activity and yield of the tested methods, method 7 (M7) was defined as the method of study, then a new scale extraction was performed, two dry extracts (BOT1 and BOT2) were obtained. Sephadex LH-20 and mobile phase 100% of the 8 subfractions obtained were submitted to IC 50 test, using a chromatographic column (CC) as the stationary phase. and EMAR. Of these, one was partially active (PA) (30 µg / mL) and one was active (A) (1.93 µg / mL). The dry extract (BOT2) was partitioned and 2 main fractions were obtained, both of which were submitted to NMR, HRT and IC50 test, both fractions were active. These fractions were fractionated using CC and HPLC, of these 4 substances were elucidated as: Methyl Sinapiato (S2) (IC50 24.5 µg / mL) and 4-N-methyl-akuammicine (S3) (IC50 27.1 µg / mL) that did not present antiplasmodic activity in the in vitro tests; aspidocarpine (S1) (IC50 2.42 µg / mL) which showed lower antiplasmodic activity than observed in previous studies and phenyl propanoid (S4) dimer. The bioguided fractionation was efficient in the isolation of substances with antiplasmodic activity in vitro.

KEYWORDS: white acariquara, aspidocarpina, methyl naphthate, 4-N-methyl-akuamycin, Plasmodium falciparum.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa da situação de risco da malária no Brasil. (Fonte: BRASIL (a), 2017(a); BRASIL, 2017 (b)).....	20
Figura 2. Gráfico dos casos notificados por estado na Amazônia, nos anos de 2016 e 2017 (BRASIL, 2018(d)).	21
Figura 3. Esquema do ciclo evolutivo do <i>Plasmodium</i> no homem (FRANÇA, et al., 2008).	22
Figura 4. Estrutura da cloroquina (32), mefloquina (33), 1 derivados da artemisinina (artemeter (34) e artesunato (35)) e lumefantrina (36).	23
Figura 5. Países com resistência a artemisinina confirmada, em 2016. Classificação por número de TCA`s resistentes (WHO, 2018).	26
Figura 6. Distribuição da família Apocynaceae Juss. (Fonte: TROPICOS, 2016).....	27
Figura 7. Classes de alcaloides derivados do aminoácido triptofano (DEWICK, 2002).....	28
Figura 8. Formação de compostos fenilpropanoides.	29
Figura 9. Mapa de Ocorrência do gênero <i>Geissospermum</i> Allemão spp. (Fonte: TROPICOS, 2016).	31
Figura 10. Mapa da ocorrência da espécie <i>Geissospermum urceolatum</i> . (Fonte: TROPICOS, 2016).	40
Figura 11. Mapa Reserva Ducke (marco M581) (RIBEIRO et al., 1999).....	45
Figura 12. Foto <i>G. urceolatum</i> no dia da coleta (C) e com o nº de catalogação da planta. Foto das folhas (A) e das cascas (B) lavadas.	46
Figura 13. Cromatograma CLAE-DAD da fração BO12CF12, método MA, coluna analítica.	57
Figura 14. Cromatograma CLAE-DAD da fração BO12CF12, método MA, coluna preparativa.	57
Figura 15. Cromatograma CLAE-DAD da fração BOF24C17, método MB, coluna preparativa.	59
Figura 16. Cromatograma do método M35 coluna analítica, da amostra BODCMIV.....	60
Figura 17. Rendimentos das sucessivas extrações de casca, galhos e folhas utilizando os métodos de 1 a 7.	64
Figura 18. Gráfico de escore de PCA (A) e biplot (B) para os dados dos folhas.....	69
Figura 19. Gráfico de escore de PCA (A) e biplot (B) para os dados dos galhos.....	71
Figura 20. Gráfico de escore de PCA (A) e biplot (B) para os dados das cascas.....	72

Figura 21. Sinapiato de metila (2- Ácido propenóico, 3- (4- hidroxí-3, 5- dimetoxifenil) - éster metílico). Substância S2.	75
Figura 22. Ampliação da região de δ 8,0 a 3,0 do espectro de RMN de ^1H da substância S2, em CDCl_3	76
Figura 23. Ampliação da região de δ 40 a δ 150 do espectro de HSQC da substância S2, em CDCl_3	77
Figura 24. Ampliação da região de δ 100 a δ 180 do espectro de HMBC da substância S2, em CDCl_3	78
Figura 25. Principais correlações do espectro de HMBC da substância S2, em CDCl_3	78
Figura 26. Principais correlações observadas no espectro de COSY da substância S2.....	79
Figura 27. Espectro de COSY da substância S2.	80
Figura 28. Espectro de massa por <i>electrospray</i> de alta resolução (ESI-EMAR) da substância S2.	83
Figura 29. 4N-metil-akuamicina (Curanium, 2, 16, 19, 20-tetradé-hidro-17-metoxi-4- metil-17-oxo). Substância S3.	84
Figura 30. Ampliação da região de δ 7,5 a 5,6 do espectro de RMN de ^1H da substância S3, em CD_3OD	85
Figura 31. Ampliação da região de δ 4,8 a δ 1,0 do espectro de RMN de ^1H da substância S3, em CD_3OD	86
Figura 32. Ampliação da região de δ 70 a δ 150 (A) e de δ 70 a δ 150 (B) do espectro de HSQC da substância S3, em MeOH.	87
Figura 33. (A) ampliação da região de δ 5 a 90 do espectro de HMBC e (B) as principais correlações do HMBC, da região aromática da substância S3.....	89
Figura 34. (A) ampliação da região de δ 90 a 180 do espectro de HMBC e (B) as principais correlações do HMBC, da região aromática da substância S3.....	91
Figura 35. Principais correlações e espectro de COSY da substância S3.	93
Figura 36. Correlações observadas no NOESY da substância S3.....	94
Figura 37. Espectro de massa fragmentação por <i>electrospray</i> de alta resolução (HR-ESI-MS) da substância S3.	98
Figura 38. {2- [2-hidroxí-3-metoxi-5-(3-propenoato de metila) fenil]-3-(3-hidroxí-4-metoxi-fenil)propan-1-ol} Substância S4.	99
Figura 39. Ampliação da região de δ 7,8 a 6,0 do espectro de RMN de ^1H da substância S4, em Cl_3D	100

Figura 40. Ampliação da região de δ 4,2 a 2,7 do espectro de RMN de ^1H da substância S4, em Cl_3D	100
Figura 41. Ampliação da região de δ 30 a δ 155 do espectro de HSQC da substância S4, em CDCl_3	101
Figura 42. (A) Principais correlações do anel A. (B) Ampliação da região de δ 7,9 a 6,2 e δ 4,1 a 2,5 do espectro de HMBC do anel A, da substância S4.....	102
Figura 43. (A) Principais correlações do anel B. (B) Ampliação da região de δ 7,8 a 6,1 e δ 4,1 a 2,5 do espectro de HMBC do anel B, da substância S4.....	104
Figura 44. (A) Correlações de COSY da substância S4. (B) Ampliação do espectro de COSY da substância S4.	106
Figura 45. Principais correlações observadas no NOESY da substância S4.....	107
Figura 46. Aspidocarpina (1- (17-Hidroxi-16-metoxiespidospermidin-1-il) etanona) Substância S1.	110
Figura 47. Ampliação da região de δ 12,0 a 6,4 do espectro de RMN de ^1H da substância S1, em CDCl_3	111
Figura 48. Ampliação da região de δ 5,4 a δ 3,7 do espectro de RMN de ^1H da substância S1, em CDCl_3	112
Figura 49. Ampliação da região de δ 3,3 a δ 0,6 do espectro de RMN de ^1H da substância S1, em CDCl_3	112
Figura 50. Ampliação da região de δ 4 a 35 do espectro de HSQC da substância S1, em CDCl_3	113
Figura 51. Ampliação da região de δ 34 a 60 do espectro de HSQC da substância S1.....	114
Figura 52. Ampliação da região de δ 60 a 120 do espectro de HSQC da substância S1.....	114
Figura 53. (A) Principais correlações do anel B. (B) Ampliação da região de δ 4 a 45 (B1) e δ 45 a 90 (B2) do espectro de HMBC da região aromática da substância S1.....	115
Figura 54. (A) Principais correlações do HMBC da região δ 100 a 180. (B) Ampliação da região de δ 100 a 180 do espectro de HMBC da região aromática da substância S1.....	117
Figura 55. Principais correlações do espectro de COSY da substância S1.....	119
Figura 56. Espectro de massa por <i>electrospray</i> de alta resolução (HR-ESI-MS) da substância S1.....	124
Figura 57. Proposta de fragmentação para MS/MS do pico em m/z 371,2331 para a substância 1 (OLIVEIRA, 2008).	125

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Métodos testados nas extrações de <i>G. urceolatum</i>	48
Tabela 2. Preparo do extrato utilizando a metodologia 7.....	51
Tabela 3. Dados das colunas CC realizadas a partir do extrato BOT1.....	53
Tabela 4. Dados das colunas CC realizadas a partir do extrato BOT2.....	55
Tabela 5. Relação de subfrações/substâncias isoladas da coluna C12.....	56
Tabela 6. Relação de subfrações/substâncias isoladas da fração BO12CF12, no CLAE, coluna preparativa, método MA.....	58
Tabela 7. Relação de frações/substâncias isoladas da amostra BODCMIII, coluna C17.....	59
Tabela 8. Relação de subfrações/substâncias isoladas da fração BOF24C17, no CLAE, coluna preparativa, método MB.....	60
Tabela 9. Relação das substâncias isoladas e cujas estruturas foram elucidadas por RMN e LC-EMAR.....	62
Tabela 10. Rendimento das extrações pelos métodos 1 a 7.....	66
Tabela 11. Tabela de atividade antimalárica <i>in vitro</i> dos extratos de folhas, galhos e cascas.	68
Tabela 12. Dados de RMN de ¹ H e COSY do Sinapiato de metila (substância S2).....	80
Tabela 13. Dados de RMN de ¹³ C, HSQC e HMBC do Sinapiato de metila (substância S2).	81
Tabela 14. Dados de RMN de ¹ H do Sinapiato de metila (substância S2) e da literatura.....	81
Tabela 15. Dados de RMN de ¹³ C do Sinapiato de metila (substância S2) e da literatura.....	82
Tabela 16. Dados de RMN de ¹ H do 4-N-Metil-Akuamicina (substância S3) e a literatura (PROKSA, et al., 1989).....	95
Tabela 17. Dados de RMN de ¹ H do 4-N-Metil-Akuamicina (substância S3).....	96
Tabela 18. Dados de RMN de ¹³ C do 4-N-Metil-Akuammicine (substância S3).....	97
Tabela 19. Dados de RMN de ¹ H, COSY e NOESY da substância S4.....	108
Tabela 20. Dados de RMN de ¹³ C, HSCQ e HMBC da substância S4.....	109
Tabela 21. Dados de RMN de ¹ H, COSY da Aspidocarpina (substância S1).....	120
Tabela 22. Dados de RMN de ¹³ C da Aspidocarpina (substância S1) e da literatura.....	121
Tabela 23. Dados de RMN de ¹ H da Aspidocarpina (substância S1) e da literatura.....	122
Tabela 24. Dados de RMN de ¹³ C da Aspidocarpina (substância S1) e da literatura.....	123

Tabela 25. Inibição do Crescimento e Concentração Inibitória 50% (IC ₅₀) <i>in vitro</i> da cepa K1 e de <i>P. falciparum</i> frente às amostras descritas.....	128
Quadro 1. Espécies descritas do gênero <i>Geissospermum</i> Allemão (CAMARGO et al., 2013; SANTOS et al., 2013; MUÑOZ et al., 2000; MBEUKUI et al., 2012; STEELE et al., 2002; BERTANI, et al., 2005).....	31
Quadro 2. Principais alcaloides encontrados no gênero <i>Geissospermum</i> Allemão spp (CAMARGO, et al., 2017; RAMOS et al., 2017).....	34
Fluxograma 1. Fluxograma das frações/subfrações do extrato BOT1 e resultados preliminares de Screening e CI ₅₀	54
Fluxograma 2. Fluxograma das frações/subfrações do extrato BOT2 e resultados preliminares de Screening e CI ₅₀	61
Esquema 1. Representação da preparação e fracionamento	47

LISTA DE ABREVIATURAS

AM	Amazonas
PA	Pará
PNCM	Programa Nacional de Controle da Malária
TCA	Terapia Combinada de Artemisinina
OMS	Organização Mundial de Saúde
GPARC	Plano Geral para Contenção da Resistência a Artemisinina
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CC	Cromatografia em Coluna
CLAE	Cromatografia Líquida de alta Eficiência
EM	Espectrometria de Massas
INPA	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
DMSO	Dimetilssulfóxido
UV	Ultravioleta
PCA	Principal Component Analysis
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
CL/EM	Cromatografia líquida acopladas a espectroscopia de massas
EMAR-IES	Espectrometria de Massas de Alta Resolução com ionização por <i>electrospray</i>
CI ₅₀	Concentração Inibitória
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
UFAM	Universidade Federal da Amazônia
CAPES	Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior
FAPEAM	Fundação de Amparo a Pesquisa no Estado do Amazonas
MeOH	Metanol
DCM	Diclorometano
AcOET	Acetato de Etila
EtOH	Etanol

SUMARIO

DEDICATORIA	V
AGRADECIMENTOS	VI
RESUMO	VIII
ABSTRACT	IX
LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE TABELAS	XIII
LISTA DE ABREVIATURAS	XV
SUMÁRIO	15
1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1 A malária no Brasil e no mundo	20
2.2 Tratamento da malária	23
2.3 Surgimento de cepas resistentes a antimaláricos	25
2.4 Família Apocynaceae	27
2.5 Etnobotânica da família Apocynaceae e gênero <i>Geissospermum</i> Allemão	29
2.6 Gênero <i>Geissospermum</i> Allemão	30
3 OBJETIVOS	41
3.1 Objetivos gerais	41
3.2 Objetivos específicos	41
4 PARTE EXPERIMENTAL	42
4.1 Materiais	42
4.1.1 Equipamentos.....	42
4.1.2 Solventes e reveladores	42
4.2 Métodos	43
4.2.1 Cromatografia em camada delgada (CCD).....	43
4.2.2 Cromatografia em coluna (CC).....	43
4.2.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	44
4.2.4 Métodos espectométricos	44
4.2.4.1 Espectroscopia de massas (EM).....	44
4.2.4.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear.....	44
4.2.5 Parte experimental.....	45
4.3 Coleta, identificação e preparo do material vegetal	45

4.3.1 Coleta e identificação do material vegetal.....	45
4.3.2 Secagem e moagem do material vegetal.....	46
4.4 Preparação dos extratos e estudo quimiométrico.....	47
4.4.1 Métodos de extração.....	47
4.4.1.1 Calculo do rendimento das extrações	49
4.4.2 Análise por CCD dos extratos e testes para alcaloides	49
4.4.3 Análise dos extratos por EM e tratamentos quimiométrico dos dados.....	49
4.4.4 Ensaio de biodirecionamento.....	51
4.5 Estudo fitoquímico.....	51
4.5.1 Obtenção do extrato para fracionamento/isolamento.....	51
4.5.2 Fracionamento cromatográfico.....	52
4.6 Testes biológicos e bioensaios.....	62
4.6.1 Cepa K1 de <i>P. falciparum</i>.....	62
4.6.2 Atividade antimalárica <i>in vitro</i>.....	62
4.6.2.1 Extratos.....	62
4.6.2.2 Frações e substâncias avaliadas na abordagem bioguiada de isolamento.....	62
4.6.3 Calculo.....	62
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	64
6.1 Estudo dos métodos de extração.....	64
6.1.1 Rendimento das extrações.....	65
6.1.2 Resultado do teste antiplasmodial <i>in vitro</i> dos extratos.....	67
6.1.3 1 Perfil químico dos extratos por EM e quimiometria.....	69
6.2 Estudo de frações e susbtâncias identificadas.....	73
6.2.1 Identificação de substâncias.....	74
6.2.2 Resultado do teste antiplasmodial <i>in vitro</i>.....	126
7 CONCLUSÃO.....	129
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	130
ANEXOS.....	138

1. INTRODUÇÃO

Ainda hoje, para milhões de pessoas que vivem em alguns países em desenvolvimento, cuja assistência médica e farmacêutica é de difícil acesso, o uso de medicamentos a base de plantas é uma das principais opções de tratamento. Grande parte desta população confia no poder das plantas como primeiro recurso para saúde (CHAN, 2015). Assim os produtos naturais são considerados excelentes fornecedores de princípios ativos para o benefício da saúde, sendo que, mais de 90% das classes terapêuticas derivam de protótipos naturais (NEWMAN & CRAGG, 2007). O contínuo estudo da composição química de matérias-primas naturais, visando a proposição de novos princípios ativos é condição essencial para o desenvolvimento de novos medicamentos.

As pesquisas químicas e farmacêuticas nas últimas décadas contribuíram para o desenvolvimento de muitas drogas, para cura ou alívio de doenças, que ainda assolam a humanidade, tais como: tuberculose, sífilis, herpes, câncer e hanseníase e para doenças como depressão (MELO et al., 2007; MENDES et al., 2010).

Apesar do grande número de drogas sintéticas disponíveis no mercado, as plantas medicinais ainda são muito utilizadas para algumas doenças. No caso da malária a maioria dos medicamentos comerciais são derivados de produtos naturais, como exemplos a quinina que é obtida das cascas de espécies de *Cinchona* e a artemisinina que é obtida da *Artemisia annua*. A descoberta desta última pela chinesa Youyou Tu rendeu-lhe o Prêmio Nobel de Medicina em 2015 (BOURDY et al., 2008).

Na África, 80% da população faz uso da medicina tradicional como primeiro tratamento para a malária. Estudos indicam o registro do uso de mais de 1.200 espécies de plantas para o tratamento da malária e de suas febres em todo o mundo (WILLCOX et al., 2004; DEHARO & GINSBURG, 2011).

Estudos etnobotânicos como fonte de busca são mais eficientes na descrição e descoberta de plantas com potencial terapêutico do que a busca aleatória (BRANDÃO et al. 1992; ELISABETSKY, 2005). Para cada 22.900 substâncias sintetizadas, um medicamento é colocado no mercado, mas quando a pesquisa é feita com plantas de uso popular ou tradicional, a relação é cerca de 50 vezes menor. Enquanto apenas 1% das plantas selecionadas aleatoriamente se mostraram eficazes para o tratamento da malária, 20% das

plantas selecionadas a partir de trabalhos etnobotânicos foram eficazes contra esta doença (BRITO, 1995; KRETTLI et al., 2001).

Na família Apocynaceae alguns gêneros apresentam frutos comestíveis (*Couma*, *Ambelania*), outras apresentam potencial paisagístico pela beleza das flores (*Aspidosperma* spp., *Mandevilla* spp.), mas alguns são utilizados pela população pelas suas propriedades medicinais (*Aspidosperma nitidum*, *Aspidosperma olivaceum*, *Geissospermum vellosii*, *Geissospermum sericeum*, *Geissospermum argenteum*). Existem muitos relatos do grande número de alcaloides indólicos isolados desta família. Muitos destes alcaloides podem agir em sistemas de neurotransmissores como agonistas se ligando a receptores opiáceos e colinérgicos, possuem ação anti-inflamatória, combatem problemas de diabetes, estômago e câncer e também possuem atividade antimalárica. (RIBEIRO et al., 1999; CAMARGO et al., 2013; CHIERRITO et al., 2014).

Uma alternativa para se obter compostos puros e biologicamente ativos de extratos naturais complexos é desenvolver o estudo bioguiado. A técnica é empregada por pesquisadores devido aos amplos benefícios que apresenta e, segundo Oldoni et al. (2016), a principal vantagem de se utilizar esse tipo de processo é que conforme o fracionamento é executado, as frações e subfrações obtidas podem ser submetidas à ensaios e assim saber onde a atividade biológica está concentrada, aumentando as chances que os compostos isolados sejam realmente os mais bioativos.

Novas pesquisas com plantas são importantes, uma vez que, através delas, novas substâncias podem ser descobertas como alternativa terapêutica para inúmeras enfermidades que atingem o ser humano. Para contribuir com o conhecimento da composição química e na descoberta de substâncias com potencial como novas drogas antimaláricas, este trabalho têm como ênfase a investigação de alcaloides e substâncias ativas da *Geissospermum urceolatum* em abordagens envolvendo instrumentação analítica, ferramentas quimiométricas e isolamento de novas substâncias, através de estudo bioguiado por ensaios *in vitro*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A Malária no mundo e no Brasil

A malária, popularmente conhecida por impaludismo, paludismo ou febre intermitente, é uma doença infecciosa parasitária, transmitida por mosquitos do gênero *Anopheles* e provocada por protozoários do gênero *Plasmodium*. Apresenta grande morbidade, sendo considerado um dos mais graves problemas de saúde pública do mundo. Esta parasitose acomete milhões de pessoas nas áreas tropicais e subtropicais do planeta, e continua sendo de considerável impacto econômico no Brasil e no mundo. Em 2016 foram registrados 216 milhões casos de malária e 445.000 mortes no mundo (WHO, 2017(a)).

O quadro epidemiológico da malária no Brasil ainda é preocupante nos dias atuais. Teve declínio nos anos de 2015 (com 140 mil casos) e 2016 (com 128 mil casos), porém em 2017 teve um grande aumento no número de casos, com mais de 190 mil casos confirmados (Figura 1). Desses, 99,9% foram transmitidos nos Estados da Amazônia Legal (Figura 2), sendo o *Plasmodium vivax* a espécie causadora de mais de 80% dos casos (BRASIL, 2010; WHO, 2015(a); BRASIL, 2017(b), BRASIL, 2018(d)).

Figura 1. Mapa da situação de risco da malária no Brasil. (Fonte: BRASIL (a), 2017(a); BRASIL, 2017 (b)).

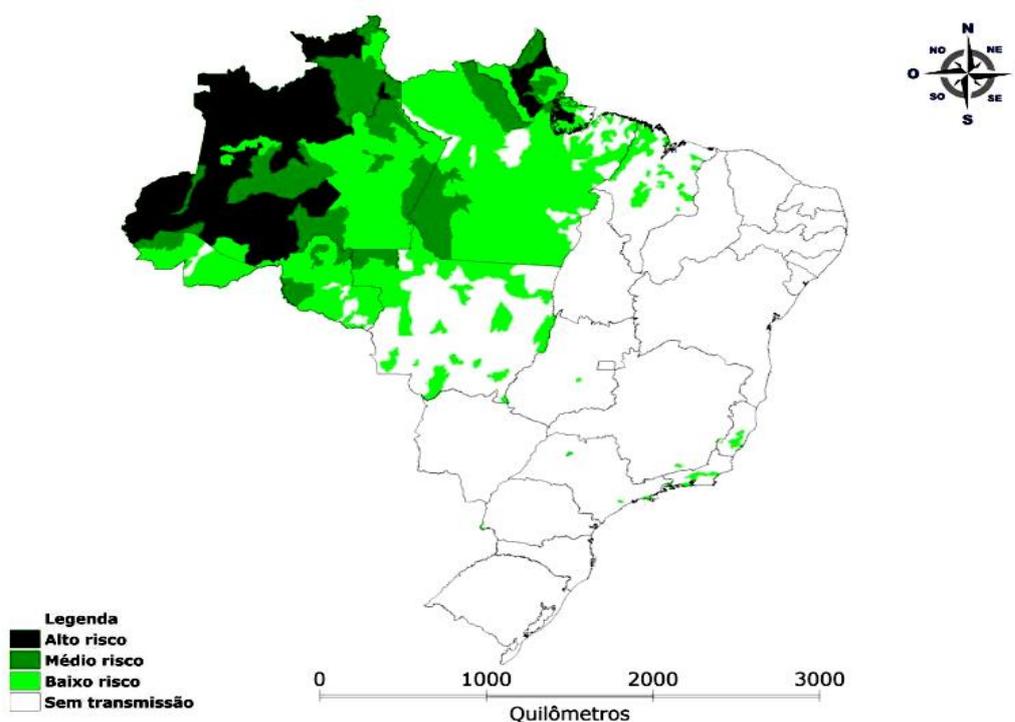
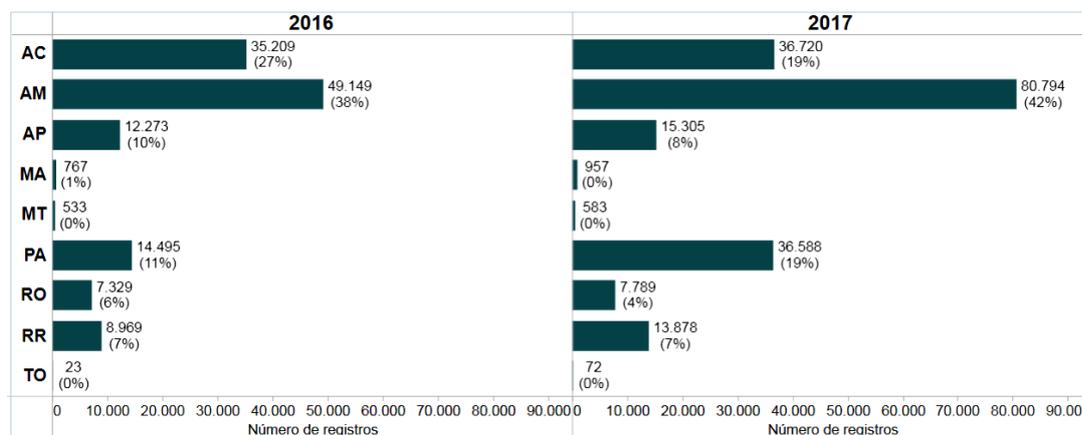


Figura 2. Gráfico dos casos notificados por estado na Amazônia, nos anos de 2016 e 2017 (BRASIL, 2018(d)).

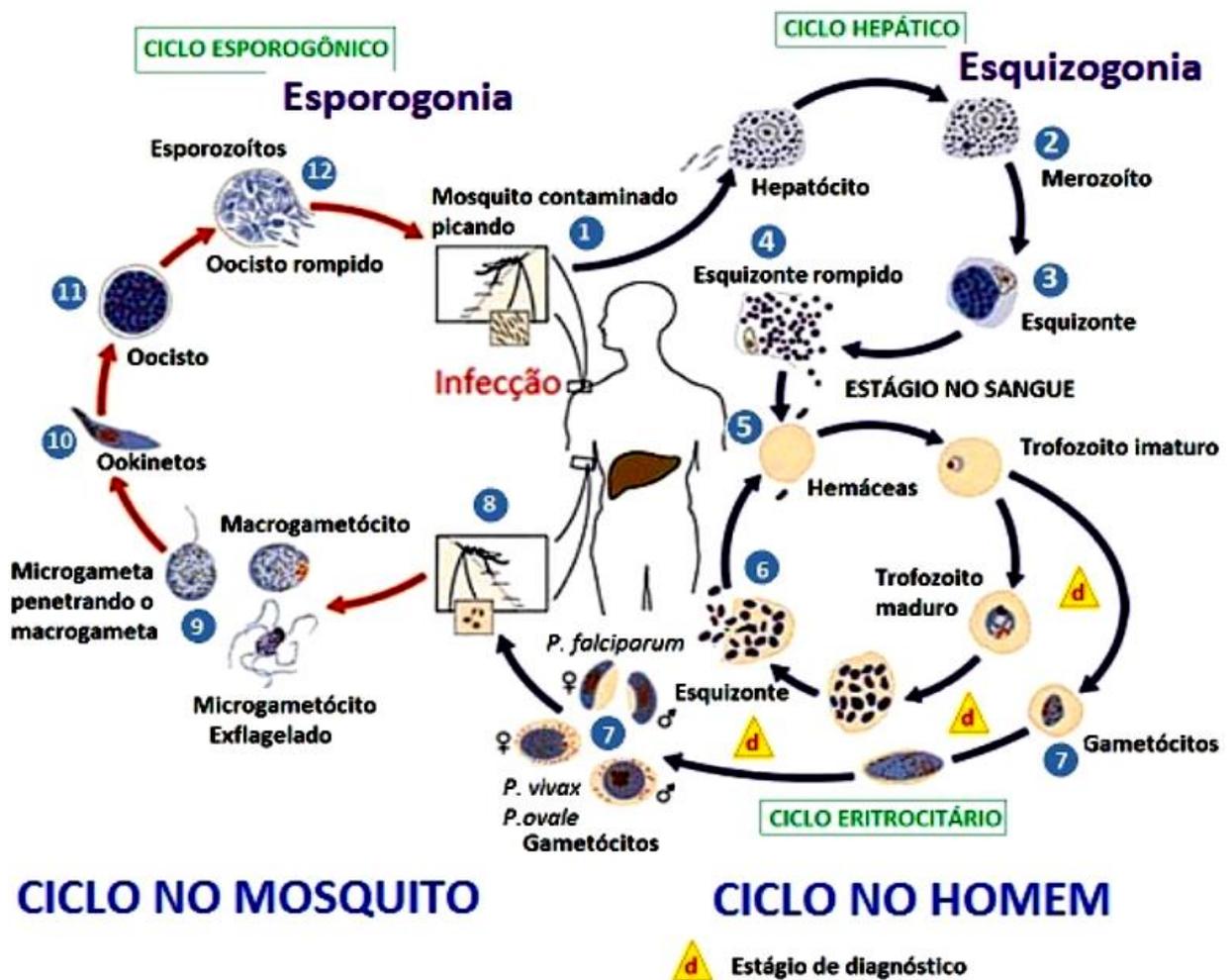


Os agentes etiológicos da malária são espécies de parasitas do gênero *Plasmodium*. As espécies associadas à malária humana são: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi*. Destas, a que causa mais mortes é a *P. falciparum*. Na África é responsável por 90% das mortes. No Brasil, nunca foi registrada transmissão autóctone de *P. ovale*, que é restrita a determinadas regiões da África. A transmissão natural da malária ocorre por meio da picada de fêmeas infectadas de mosquitos do gênero *Anopheles*, sendo mais importante a espécie *Anopheles darlingi*, cujos criadouros preferenciais são coleções de água limpa, quente, sombreada e de baixo fluxo, muito frequentes na Amazônia brasileira (WILLCOX, et al., 2004; BRASIL, 2010).

A infecção inicia-se quando os parasitas (esporozoítos) são inoculados na pele pela picada do vetor, os quais irão invadir as células do fígado, os hepatócitos (Figura 3) (YANG & BODDAY, 2017). Nessas células, multiplicam-se e dão origem a milhares de novos parasitas (merozoítos), que rompem os hepatócitos e, caindo na circulação sanguínea, vão invadir as hemácias, dando início à segunda fase do ciclo, chamada de esquizogonia sanguínea. É nessa fase sanguínea que aparecem os sintomas da malária (COWMAN et al., 2016). O desenvolvimento do parasita nas células do fígado requer aproximadamente uma semana para o *P. falciparum* e *P. vivax* e cerca de duas semanas para o *P. malariae*. Nas infecções por *P. vivax* e *P. ovale*, alguns parasitas se desenvolvem rapidamente, enquanto outros ficam em estado de latência no hepatócito. São, por isso, denominados hipnozoítos (do grego *hipnos*, sono). Esses hipnozoítos são responsáveis pelas recaídas da doença, que ocorrem após períodos variáveis de incubação (geralmente dentro de seis meses) (BRASIL, 2010; NEVES, 2010).

Na fase sanguínea do ciclo, os merozoítos formados rompem a hemácia e invadem outras, dando início a ciclos repetitivos de multiplicação eritrocitária. Os ciclos eritrocitários repetem-se a cada 48 horas nas infecções por *P. vivax* e *P. falciparum* e a cada 72 horas nas infecções por *P. malariae*. Depois de algumas gerações de merozoítos nas hemácias, alguns se diferenciam em formas sexuadas: os macrogametas (feminino) e microgametas (masculino). Esses gametas no interior das hemácias (gametócitos) não se dividem e, quando ingeridos pelos insetos vetores, irão fecundar-se para dar origem ao ciclo sexuado do parasita (MEIBALAN & MARTI, 2017; BRASIL, 2010; NEVES, 2010).

Figura 3. Esquema do ciclo evolutivo do *Plasmodium* no homem (FRANÇA, et al., 2008).

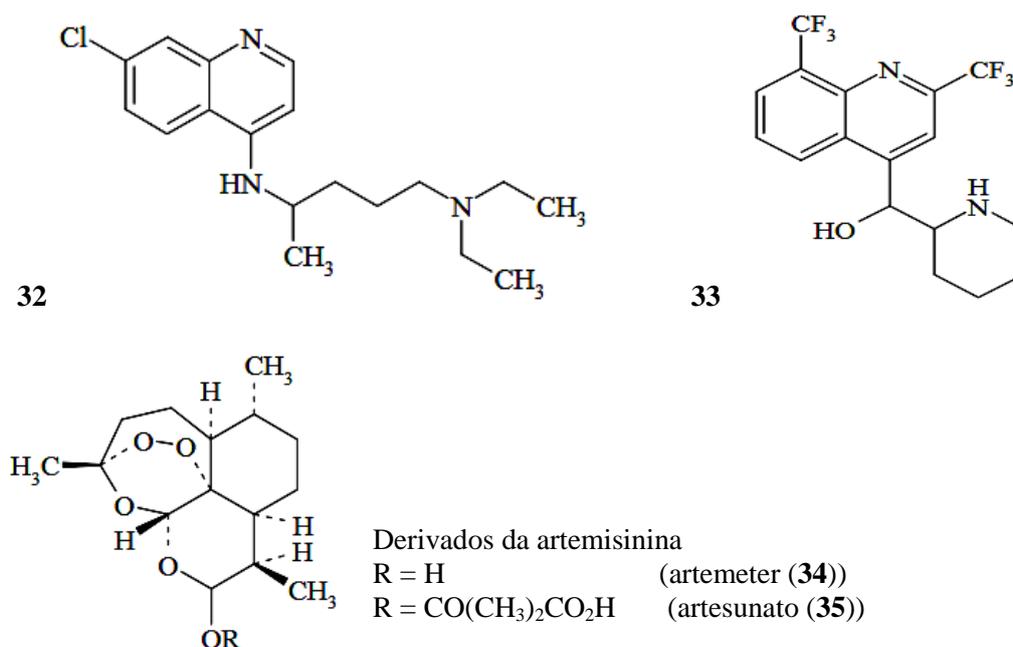


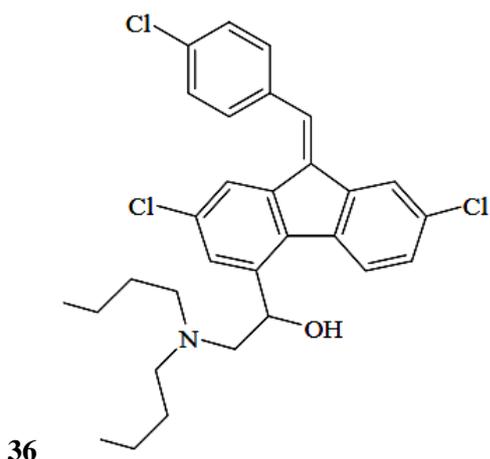
2.2 Tratamento para malária

O Ministério da Saúde tem uma política nacional para o tratamento da malária, segundo o qual orienta a terapêutica e disponibiliza gratuitamente os medicamentos, através do SUS (Sistema Único de Saúde). Criou também o Programa Nacional de Controle da Malária (PNCM) cujo objetivo no tratamento da malária é atingir o parasita nos seus pontos-chaves do seu ciclo evolutivo, que é a interrupção da esquizogonia sanguínea, responsável pela patogenia e manifestações clínicas da infecção, a destruição de formas latentes do parasita no ciclo tecidual (hipnozoítos) das espécies *P. vivax* e *P. ovale*, evitando, assim, as recaídas tardias e interrupção da transmissão do parasito, pelo uso de drogas que impedem o desenvolvimento de formas sexuadas dos parasitos (gametócitos) (BRASIL, 2010).

Dentre os primeiros compostos ativos contra formas eritrocíticas de *P. falciparum* e *P. vivax*, destaca-se a quinina pertencente a família das quinolinas que incluem as 4-aminoquinolinas, as 8-aminoquinolinas e os álcoois quinolínicos. Dentre esses fármacos o mais eficaz foi a cloroquina (Figura 4), uma das substâncias antimaláricas mais utilizadas para a supressão e profilaxia da malária em muitas regiões endêmicas. Atua como um agente esquizonticida e foi portanto o fármaco preferido até o surgimento da resistência do parasita. (GREGSON & PLOWE, 2005).

Figura 4. Estrutura da cloroquina (32), mefloquina (33), 1 derivados da artemisinina (artemeter (34) e artesunato (35)) e lumefantrina (36).





Por causa da resistência do *Plasmodium* as monoterapias, a partir de 2006 a OMS definiu como terapêutica de primeira linha a combinação à base de artemisinina (Figura 4) (Terapia Combinada a Arteminina - TCA) para o tratamento malária não complicada causada do *P. falciparum*. A definição do tipo de tratamento depende da espécie de *Plasmodium*, da idade do paciente, da história de exposição anterior à infecção e outras condições associadas, como gravidez, outras doenças e gravidade da doença. De acordo com os protocolos de tratamento, as drogas são associadas, sendo que para o *P. falciparum* indica-se a associação: artemeter (**31**) + lumefantrina (**33**), artesunato (**32**) + mefloquina (**30**), quinina + doxiciclina + primaquina. Para o *P. vivax* ou *P. ovale* indica-se a associação: cloroquina (**29**) + primaquina (WHO, 2015(b); BRASIL, 2010; WHO, 2015 (c)).

A eficácia de uma droga antimalárica depende de sua capacidade de inibir e interromper as funções vitais do parasita. A artemisinina e seus derivados produzem uma rápida resolução da parasitemia com redução do número de parasitas no sangue segundo um fator de aproximadamente 10000 em cada ciclo assexuado, muito mais do que qualquer outro antimalárico, porém possuem tempo de meia-vida curto. É recomendado seu uso em combinação com drogas com tempo de meia-vida longo para garantir a eficácia. TCA's tem sido parte integrante dos notáveis sucessos no controle global da malária, e existe um amplo consenso de que proteger a eficácia dessas combinações de medicamentos é uma prioridade urgente (WHO, 2015 (c)).

2.3 Surgimento de cepas resistentes a antimaláricos

O conceito de resistência a drogas antimaláricas de acordo com a OMS é “a habilidade de uma cepa de parasita sobreviver e/ou se multiplicar, a despeito da administração e absorção de uma droga administrada em doses iguais ou maiores do que usualmente recomendadas, mas dentro dos limites de tolerância de tais substâncias” (WHO, 2015 (c)).

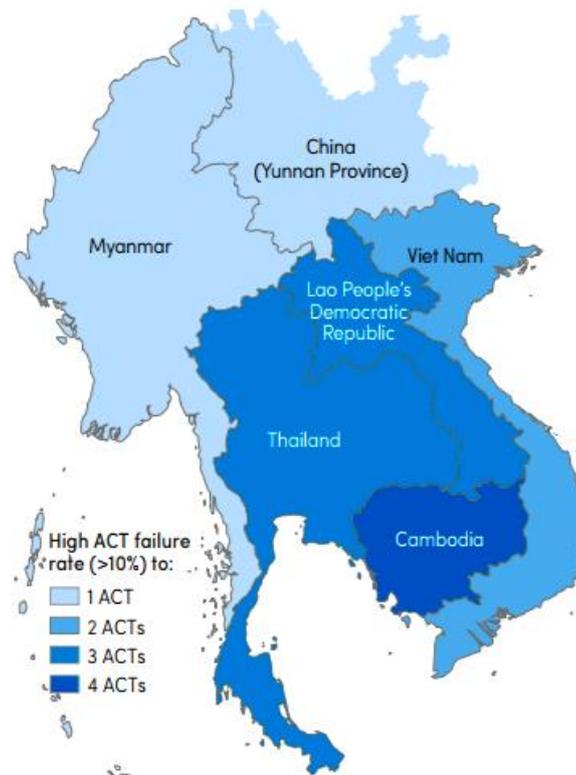
A principal consequência da resistência aos antimaláricos é o fracasso do tratamento. Essa resistência aos antimaláricos já foi documentada em três das cinco espécies de malária que afeta os seres humanos: *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae*. O aparecimento de resistência aos antimaláricos tem como base eventos genéticos, que ocorrem independentemente do fármaco. O problema é agravado pela resistência cruzada, em que a resistência a uma droga confere resistência a outros medicamentos que pertencem a uma mesma família química ou que tenham modos de ação semelhantes (WHO, 2015 (b)).

O surgimento das primeiras cepas de *Plasmodium falciparum* resistentes à cloroquina ocorreu na década de 60. Foi inicialmente observadas na América do Sul e no Sudeste da Ásia e estende-se hoje por todas as regiões endêmicas nos três continentes. Um dos principais motivos que levou à resistência foi o consumo generalizado do medicamento como forma profilática contra a malária, como ocorreu nos anos de 1959 e 1960 com o método do “sal cloroquinado” no Pará e no Amazonas (WELLENS et al., 1991).

No Brasil a multiressistência foi verificada desde a década de 80 na região amazônica. Em 1995 foi relatada a resistência à cloroquina e a alguns derivados superior a 60% na população testada em regiões da Amazônia. No ano de 2000 estudos mostraram multirresistência a medicações alternativas para a malária causada pelo *P. falciparum*. Foi encontrado resistência a mefloquina em crianças em Manaus-AM (COUTO et al., 1995; NORONHA et al., 2000).

Em 2008 foi confirmada a resistência à artemisinina na fronteira do Camboja e Tailândia. A OMS procedeu medidas de contenção para evitar o alastramento da resistência a essa droga. Porém a resistência já foi detectada em mais 3 países da região do Grande Mekong: República Democrática Popular do Laos, Myanmar e Vietnam. (Figura 5) (MENARD & DONDORP, 2017; WHO, 2016(b); WHO, 2015(b); WHO, 2017(a); WHO, 2018).

Figura 5. Países com resistência a artemisinina confirmada, em 2016. Classificação por número de TCA's resistentes (WHO, 2018).



O surgimento de resistência do *P. falciparum* à artemisinina é uma preocupação de saúde pública urgente, uma vez que a resistência à artemisinina e seus derivados aumenta o risco de resistência ao fármaco associado nos TCA's. Em janeiro de 2011, a OMS lançou o plano global para a contenção da resistência a artemisinina (GPARC), que invoca quatro metas e recomendações principais: parar a propagação de parasitas resistentes, incrementar o monitoramento e vigilância para avaliar a ameaça da resistência artemisinina, melhorar o acesso ao diagnóstico e tratamento racional com TCA's e investir na investigação relacionada com a resistência da artemisinina (MENARD & DONDORP, 2017; WHO, 2015; WHO, 2013; WHO, 2017; WHO, 2018). No Brasil o Programa Nacional de Controle da Malária – PNCM coordena as medidas para reduzir a incidência e a gravidade da malária.

Os insucessos enfrentados no controle da malária com a resistência do *Plasmodium* a drogas antimaláricas intensifica a necessidade da busca por novas drogas antimaláricas que tenham baixo custo, que possuam mecanismo de ação diferente dos existentes e com reduzida toxicidade. É necessário que os antimaláricos possuam duas propriedades principais: que tenha capacidade de eliminar os parasitas circulantes no sangue do hospedeiro e que reduza a

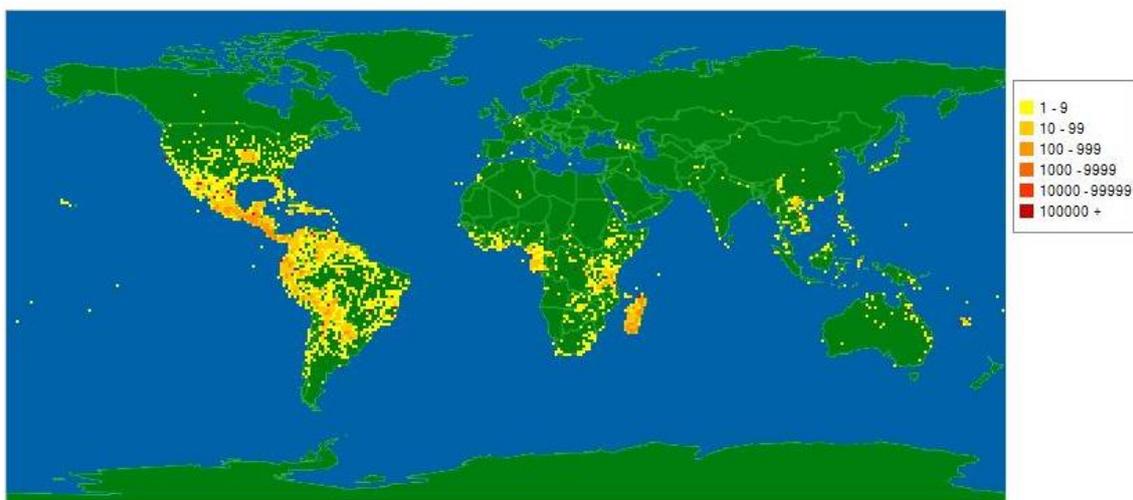
possibilidade de reinfeção do parasita (WHO, 2015(a); OKELL et al., 2014; RIDDER, et al., 2008; PETERS, 1985).

2.4 Família Apocynaceae

As apocináceas constituem uma família que se caracteriza por apresentar grande variabilidade morfológica em seus órgãos florais, presença de vasos laticíferos e pela diversidade de substâncias resultantes do seu metabolismo secundário que, na maioria das vezes, possuem propriedades farmacológicas. Possui grande importância econômica, onde são bastante utilizadas na ornamentação de parques e principalmente as espécies pertencentes aos gêneros: *Catharanthus*, *Nerium*, *Plumeria* e *Thevetia* (MOURA & AGRA, 1989; RIBEIRO et al., 1999).

Plantas da família Apocynaceae estão incluídas filogeneticamente na ordem Gentiales, são espécies dicotiledôneas bem evoluídas caracterizadas normalmente pela presença de látex. Essa família contém aproximadamente 5100 espécies e 357 gêneros sendo encontradas predominantemente nos trópicos e subtropicais, porém são menos frequentes em regiões temperadas (Figura 6). Na flora brasileira, são catalogadas como apocináceas mais de 400 espécies em 41 gêneros, sendo 40 espécies e 16 gêneros destes encontrados na Amazônia (FORZZA, 2010; RIBEIRO et al., 1999; NAZAR et al., 2013; CAMPBELL & HAMMOND, 1989; SOUZA & LORENZI, 2008).

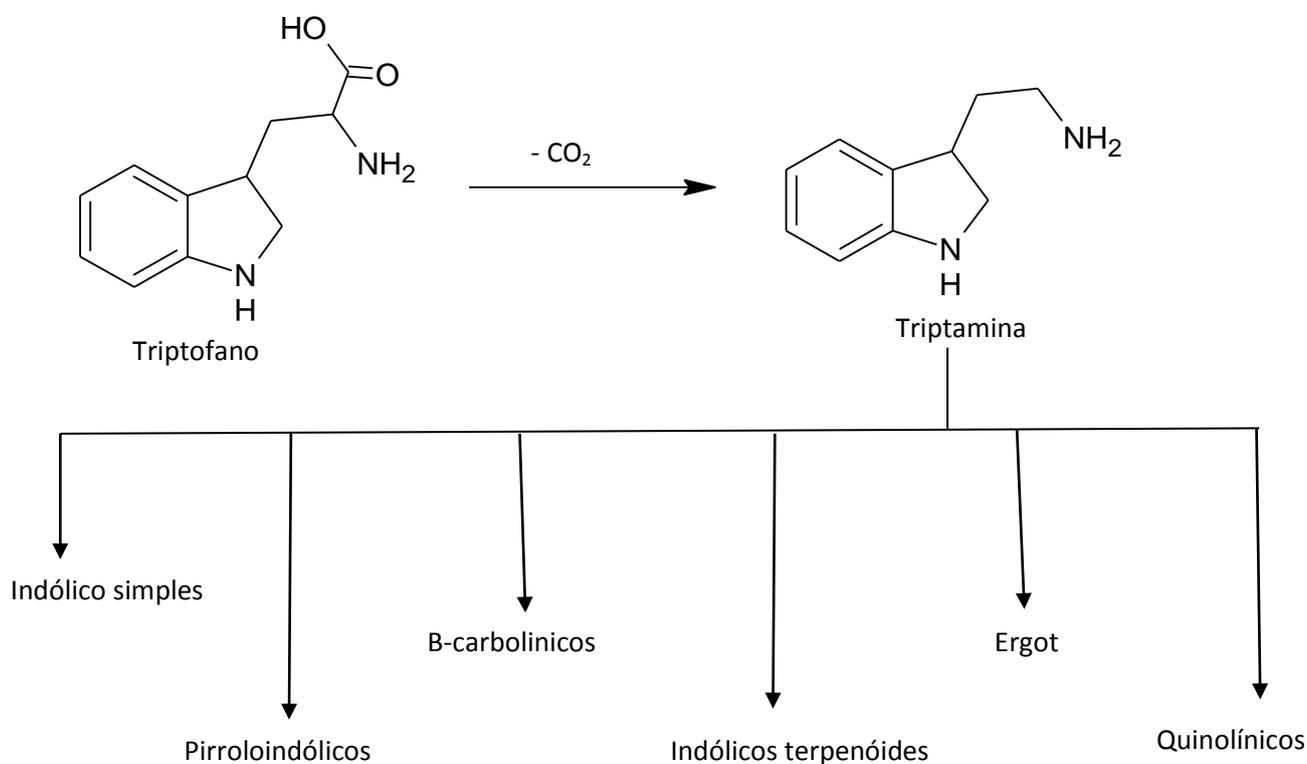
Figura 6. Distribuição da família Apocynaceae Juss. (Fonte: TROPICOS, 2016).



O principal e mais importante uso de Apocynaceae está relacionado aos alcalóides do metabolismo secundário, que são utilizados na elaboração de medicamentos. Desses, os mais famosos são a vincristina e vimblastina, utilizados como quimioterápicos extraídos da *Catharanthus roseus* (sín. *Vinca rósea*). Na Amazônia, muitas espécies são utilizadas pelas populações locais, indígenas e caboclas, por suas propriedades medicinais. A infusão da casca de algumas espécies de *Aspidosperma*, como *A. nitidum* é utilizada no tratamento de malária (RIBEIRO et al., 1999).

A família Apocynaceae caracteriza-se quimicamente pela ocorrência frequente de alcalóides. Em muitos gêneros há predominantemente a ocorrência de alcalóides indólicos de considerável diversidade estrutural, muitos deles contendo esqueleto β -carbólico simples, com sistemas tricíclicos de anéis pirido-indólicos (Figura 7). A marcação isotópica de precursores indica que a parte indólica desses alcalóides é derivada biossinteticamente do triptofano e a parte não indólica, provavelmente de carboidratos, pela via chiquimato (DEWICK, 2002; MOURA & AGRA, 1989).

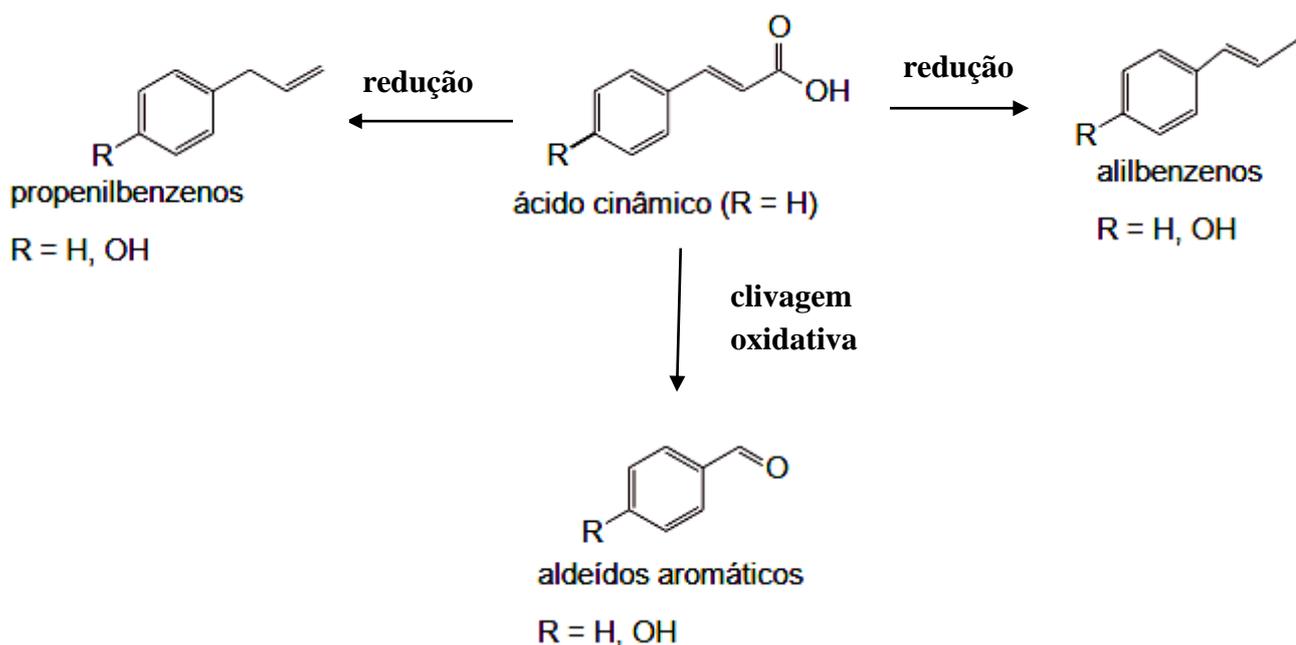
Figura 7. Classes de alcalóides derivados do aminoácido triptofano (DEWICK, 2002).



Estudos recentes apontam novas classes de substâncias sendo isoladas da família Apocynaceae e sendo responsáveis por atividades terapêuticas. O gênero *Macrosiphonia* que também é um gênero importante da família, estudos fitoquímicos apresentam isolamento de substâncias além de alcalóides, como lignanas (DE ASSIS JUNIOR et al., 2013).

A biogênese dos lignóides, principalmente neolignananas e lignanas, pode ser explicada pelo acoplamento oxidativo entre unidades monoméricas radicalares dependendo do acoplamento desses radicais nas diferentes posições possíveis. Quatro classes de monômeros estão comumente envolvidos no acoplamento oxidativo do processo biogenético dos lignóides: ácido cinâmico, propenilfenóis e alilfenóis (Figura 8). Os precursores primários dos lignóides desenvolvem-se a partir da fenilalanina e envolvem a formação de ácidos cinâmicos, aldeídos cinâmicos e álcoois cinâmicos (BARBOSA FILHO, 2004; DEWICK, 2002; GOTTLIEB, 1984).

Figura 8. Formação de compostos fenilpropanoides.



2.5 Etnobotânica da família Apocynaceae e gênero *Geissospermum* Allemão

A etnobotânica surge para a melhor compreensão entre o estudo de etnias e suas interações com as plantas, resgatando os conhecimentos tradicionais passados de geração em geração e contribuindo para descoberta de novas drogas (FONSECA-KRUEL & PEIXOTO,

2004). E revelam o uso de várias espécies vegetais na medicina tradicional no tratamento da malária, como *Cantharantus roseus*, *Cinchona calisaya*, *Cuphea ingrata*, *Geissospermum sericeum*, *Jateorrhiza palmata*. Diversas espécies já foram testadas e apresentaram atividade contra o *Plasmodium*, dentre elas destacam-se: *Bathysa cuspidata*, *Cosmos sulphureus*, *Cecropia hololeuca*, *Erisma clacaratum*, *Gomphrena arborescens*, *Musa paradisíaca*, *Ocotea odorífera*, *Pradosia lactescens*. E ainda espécies distribuídas e usadas na região amazônica: *Quassia amara* L., *Picrolemma sprucei* Hook. f., *Aspidosperma ulei* Markgr., *Aspidosperma* spp., *Geissospermum* spp. e *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke (POHLIT et al., 2013; TORRES et al., 2013; BOTSARIS, 2007).

A família Apocynaceae possui muitos relatos da sua utilização como antimaláricos, um gênero amplamente utilizado popularmente é o *Aspidosperma*, deste as espécies *A. quebracho*, *A. nitidum*, *A. excelsum*, *A. marcgravianum*, *A. macrocarpon*, *A. megalocarpon* veem sendo estudados como potenciais agentes antimaláricos (OLIVEIRA, 2009). Na Amazônia são utilizadas pelas populações locais, indígenas e caboclas, por suas propriedades medicinais (RIBEIRO et al., 1999). Com base nos estudos etnobotânicos de espécies de Apocynaceae descrito por SANTOS et al. (2013), foram identificadas 78 espécies distribuídas em 28 gêneros de Apocynaceae ocorrentes em diversas regiões do Brasil.

2.6 Gênero *Geissospermum* Allemão

O gênero *Geissospermum* spp apresenta árvores com folhas alterno dísticas, de tronco acanalado ou fenestrado, podendo alcançar de 15 a 22 metros de altura. São conhecidas popularmente como acariquara-branca, acariquara, pau-pereira e são encontradas nas Guianas, Venezuela, Peru, Bolívia, Suriname e no Brasil (Figura 9). Neste ultimo, tem predomínio nas matas do Amazonas e Pará, mas também com ocorrência nas regiões nordeste, sudeste, centro-oeste e sul (RIBEIRO et al., 1999; TROPICOS, 2016). Este gênero é composto por 6 espécies cujas descrições estão na Quadro 1.

Figura 9. Mapa de Ocorrência do gênero *Geissospermum* Allemão spp. (Fonte: TROPICOS, 2016).



Quadro 1. Espécies descritas do gênero *Geissospermum* Allemão (CAMARGO et al., 2013; SANTOS et al., 2013; MUÑOZ et al., 2000; MBEUKUI et al., 2012; STEELE et al., 2002; BERTANI, et al., 2005).

Nome da espécie	Parte usada	Etnobotânica	Composição Química	Teste	Atividade antimalárica	Distribuição Geográfica
<i>G. argenteum</i> woodson	casca	Antimalárico e antimicrobiano	Alcaloides	Extrato testado <i>in vitro</i>	CI ₅₀ = 4.6 µg	Brasil (AM, AP, RO), Venezuela e Guianas
				Extrato testado <i>in vivo</i>	83% do ciclo intra-hepático (<i>P. yoelii</i>)	
<i>G. laeve</i> (Vell.) Miers (Sinônimo: <i>G. Vellosii</i> Fr. All)	casca	Dor no estômago, febre, tontura e antimalárico	Alcaloides e taninos	Extrato testado <i>in vitro</i>	CI ₅₀ = 2.22 µg	Brasil (AP, PA, AM, MA, BA, DF, MG, ES, RJ) e Guianas
				Extrato testado <i>in vivo</i>	< 50% ([] 50mg/kg)	
<i>G. reticulatum</i> A. H. Gentry	folha e casca	Anti-HIV, antitripanossoma	-	-	-	Brasil (AC, RO), Bolívia, Peru, Venezuela
<i>G. sericeum</i> Benth. & Hook. F.	casca	Antimalárico	Alcaloides	Extrato testado <i>in vitro</i>	CI ₅₀ = 1.78 µg	Brasil (AP, AM, AC, RO, MA) e Guianas
<i>G. urceolatum</i> A. H. Gentry	casca	Antimalárico	-	-	-	Brasil (PA, AM) e Guianas

O gênero *Geissospermum* Allemão começou a ser explorado quimicamente no final do século XIX, não só no Brasil, mas por pesquisadores europeus. A primeira espécie a ser pesquisada foi o pau-pereira (*G. vellosii* Allemão), a qual foi considerada por Gustavo Peckolt (1861-1923) uma das dez plantas medicinais brasileiras mais importantes (SANTOS et al., 1998). Estudos etnobotânicos das espécies do Gênero (Quadro 1) relata sua utilização no tratamento de febres, falta de apetite, má digestão, tontura, prisão de ventre e malária, sendo que a sua ação curativa estava associada ao seu gosto amargo. Estudos dos extratos para atividade antimalárica para algumas destas espécies comprova os dados etnobotânicos (CAMARGO et al., 2013; SANTOS et al., 2013; MUÑOZ et al., 2000; MBEUKUI et al., 2012; STEELE et al., 2002; BERTANI, et al., 2005).

Este gênero é rico em alcaloides indólicos (PACCIONI & HUSSON, 1978), os quais, provavelmente, agem nos sistemas neurotransmissores opiáceos, GABAérgicos, colinérgico: associado a receptor muscarínico (PEREIRA et al., 2007). Com a apresentação destas características, os alcaloides indólicos são utilizados como hipotensor arterial, simpatolítico, diurético, vasoconstritor periférico, estimulante respiratório, anestésico, agente bloqueador adrenérgico, espasmogênico intestinal, sedativo e relaxante do músculo esquelético (PEREIRA et al., 2007). Já foi relatada ainda a atividade antitumoral, antimicrobiana, anti-hipertensiva, estimulante do sistema nervoso central, anticolinesterásica, no tratamento da leishmaniose, diabetes e antimalárica (FIGUEIREDO et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2009).

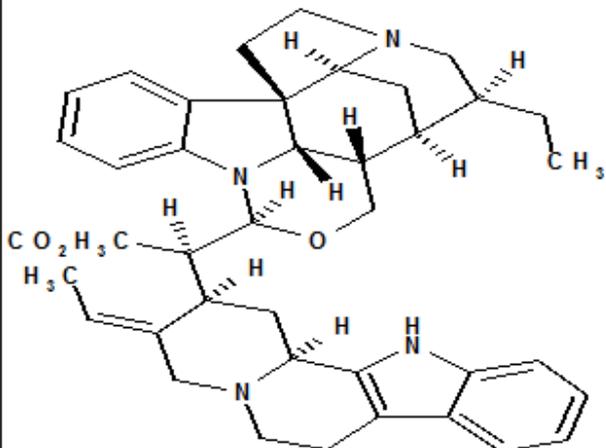
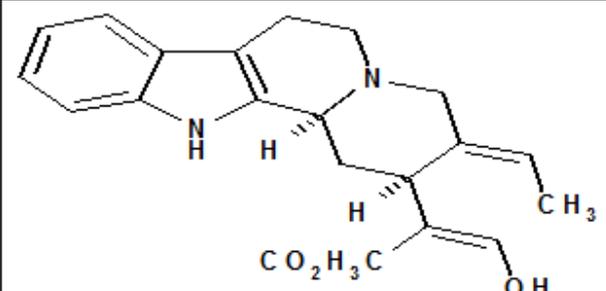
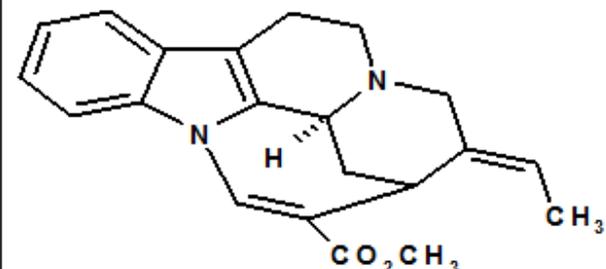
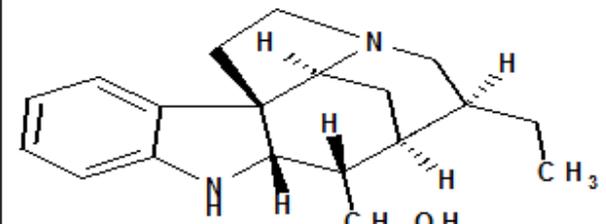
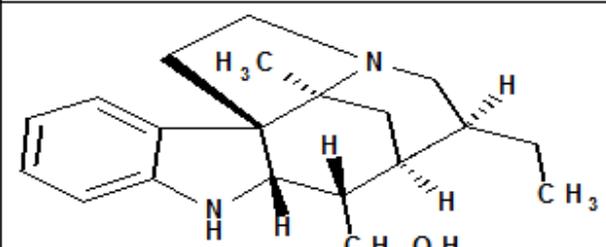
Paccioni & Husson (1978) isolaram da espécie *G. argenteum* Woodson quatro alcaloides do tipo aspidospermina: aspidocarpina (**16**), aspidospermina (**15**), desmetoxiaspidospermina (**14**) e desmetilaspidospermina (**17**). Steele et al. (2002) identificaram na *G. sericeum* Benth. & Hook.f. três alcaloides indólicos: geissosquizolina (**4**), geissosquizolina-N-óxido (**18**) e 1,2- de-hidro-geissosquizolina (**19**) e um alcaloide β -carbolina (flavopereirina) (**6**). Ramos et al. (2017) isolou três novos alcaloides monoterpênicos: geissoleavine (**29**), *O*-metilgeissoleavine (**30**) e 3',4',5',6'-tetrahidrogeissospermine (**31**). A atividade antimalárica das espécies *G. sericeum* e *G. argenteum* foi verificada pelas pesquisas de Steele et al. (2002) e Bertani et al. (2005), visto que o uso deste gênero na medicina popular contra malária é muito difundido na América do Sul, principalmente na Guiana Francesa. Foi isolado, ainda, a geissospermina (**1**), considerada o principal deles, e isolada, primeiramente, por O. Hesse em 1877 (PUISIEUX et al., 1959; CAMARGO et al., 2013; RAMOS et al., 2017). Os principais alcaloides conforme relatado por Camargo et al. (2013) e Ramos et al. (2017), estão descritos no Quadro 2.

Os compostos **1, 4, 6, 8, 9, 16, 18 e 19** já foram testados para atividade antimalárica *in vitro* (Quadro 2), os mais ativos foram os compostos **1 e 9**. Pode se verificar a grande importância deste gênero como precursor de drogas antimaláricas (MBEUNKUI et al., 2012; STEELE et al., 2002; CARMARGO et al., 2013; CHIERRITO et al., 2014).

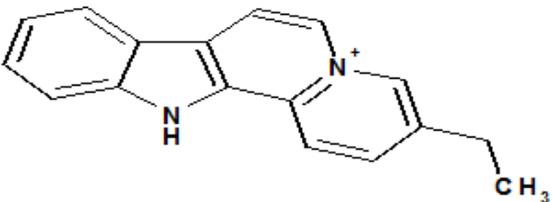
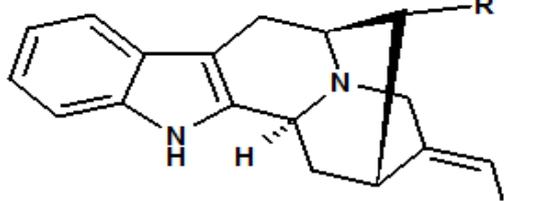
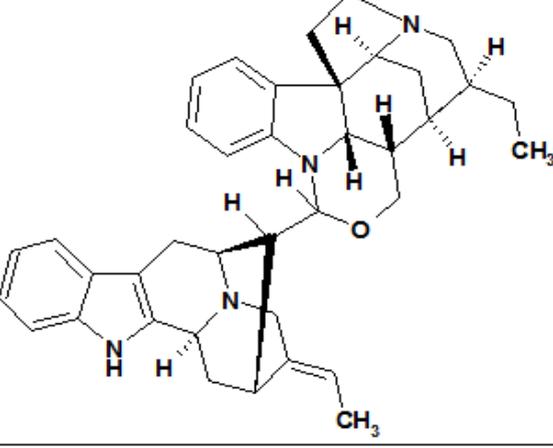
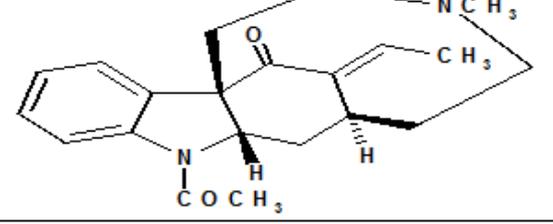
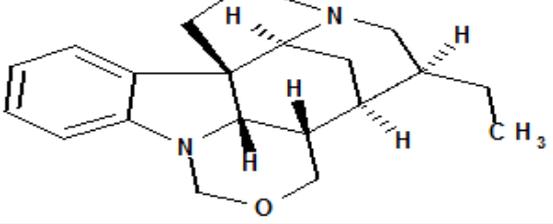
A *Geissospermum urceolatum*, assim como outras espécies do gênero, *Geissospermum* foram identificadas há poucos anos, e eram identificados apenas como pau-pereira. Estudos etnobotânicos indicam o seu uso principalmente por sua amargura, e vem sendo utilizada para doenças do fígado, malária e outras enfermidades (CAMARGO et al., 2013).

A *Geissospermum urceolatum* é conhecida popularmente como acariquara-branca, apresenta se como uma árvore com folhas concolores, que quando jovens são cobertas por pelos deitados ferrugíneos. Até o presente momento, sua distribuição foi descrita somente no Brasil (AM e PA) e na Bolívia (Figura 10). Não foram encontrados sinônimos para esta espécie nos principais sites de busca (RIBEIRO et al., 1999; TROPICOS, 2016). A importância do estudo desta espécie é que não há publicações sobre sua composição química e efeitos farmacológicos de substâncias isoladas desta espécie em nenhum site de busca (como Scielo, Scopus, Scifinder, Science Direct). O único dado encontrado desta espécie é o trabalho feito por Martins (2010) utilizando frações alcaloídicas de extratos da planta, onde o foco do trabalho foi o estudo da atividade das frações alcaloídicas na pressão arterial e na contração de músculos lisos de ratos.

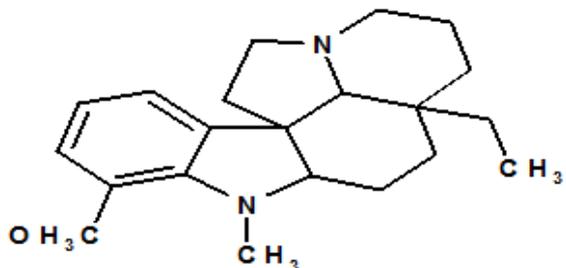
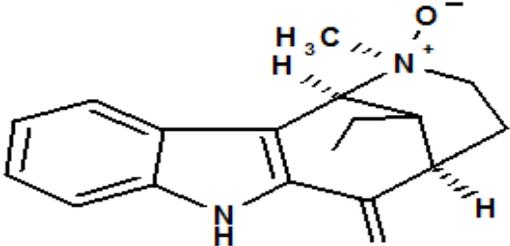
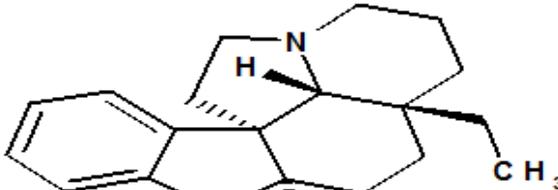
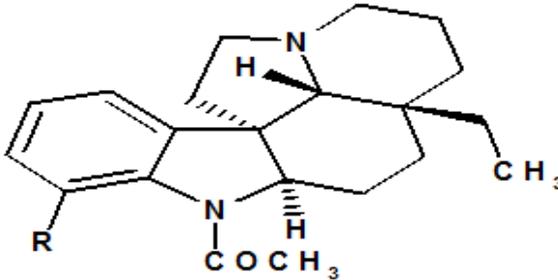
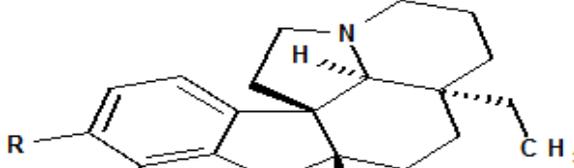
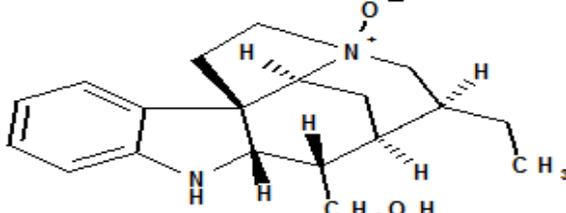
Quadro 2. Principais alcaloides (estrutura, nome, fórmula molecular, massa molecular e atividade antiplasmódica (μM)) encontrados no gênero *Geissospermum* Allemão spp (CARMARGO, et al., 2017; RAMOS et al., 2017).

Nº	Estrutura	Nome / Fórmula / Massa / Atividade
1		geissospermina
		$\text{C}_{40}\text{H}_{48}\text{N}_4\text{O}_3$
		600,38
		$\text{CI}_{50} = 5,02$ (MBEUNKUI et al, 2012)
2		geissoschizina
		$\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_3$
		352,17
3		apogeissoschizina
		$\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_2$
		334,16
4		geissoschizolina
		$\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}$
		298,2 $\text{CI}_{50} = 10,29$ (MBEUNKUI et al, 2012) >40 (STEELE et al, 2002)
5		pereirina
		$\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}$
		300,22

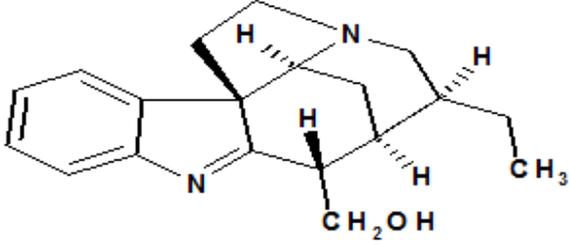
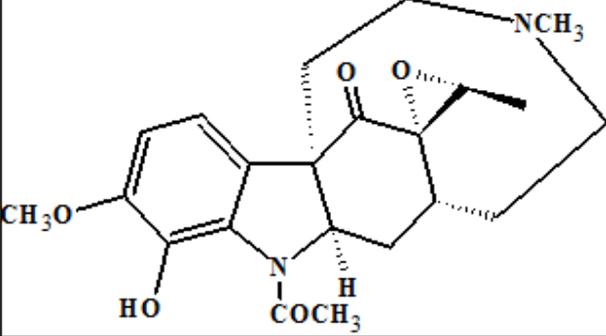
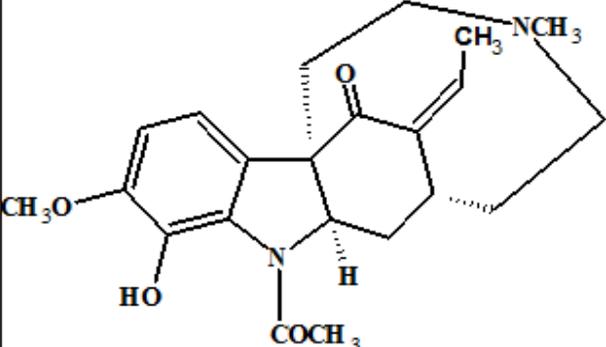
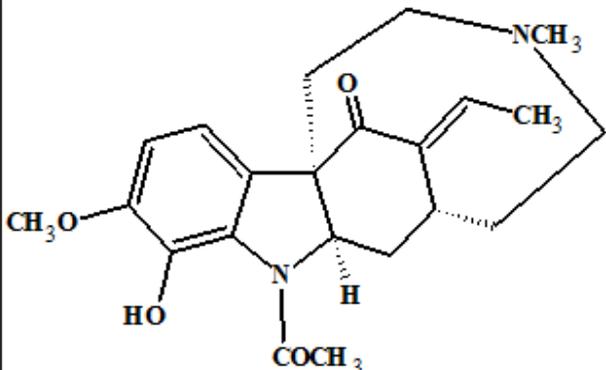
Quadro 2. Principais alcaloides (estrutura, nome, fórmula molecular, massa molecular e atividade antiplasmódica (μM)) encontrados no gênero *Geissospermum* Allemão spp (CARMARGO, et al., 2017; RAMOS et al., 2017). (continuação).

Nº	Estrutura	Nome / Fórmula / Massa / Atividade
6		flavopereirina
		$\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{N}_2$
		246,11
		$\text{CI}_{50} = 11,53$ (STEELE et al, 2002)
7		vellosimina
		$\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}$ (R: COH)
		292,15
		8
$\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}$ (R: CH_2OH)		
295,18		
$\text{CI}_{50} = 157,00$ (MBEUNKUI et al, 2012)		
9		geissolosimina
		$\text{C}_{38}\text{H}_{44}\text{N}_4\text{O}$
		572,35
		$\text{CI}_{50} = 0,96$ (MBEUNKUI et al, 2012)
10		geissovellina
		$\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_2$
		326,19
11		Geissoschizona
		$\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}$
		310,23

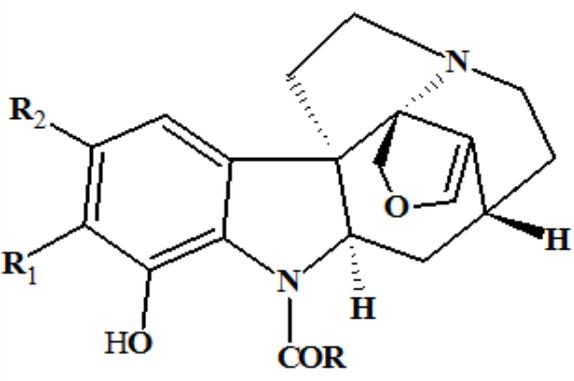
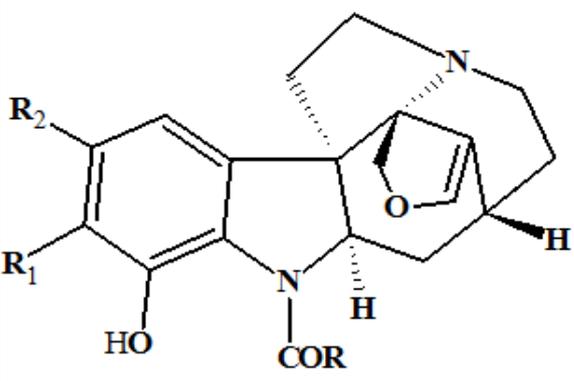
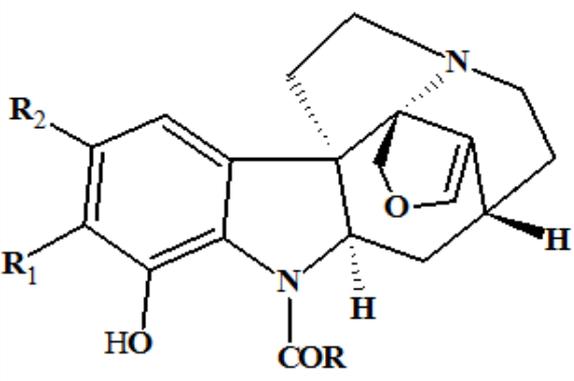
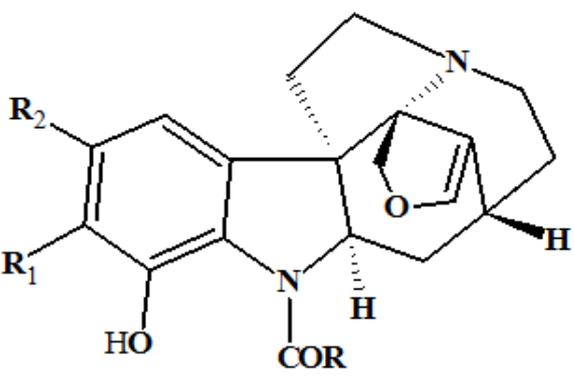
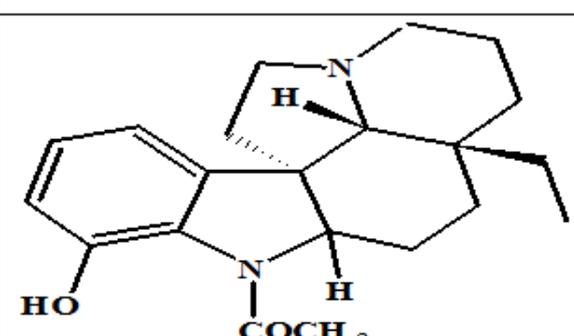
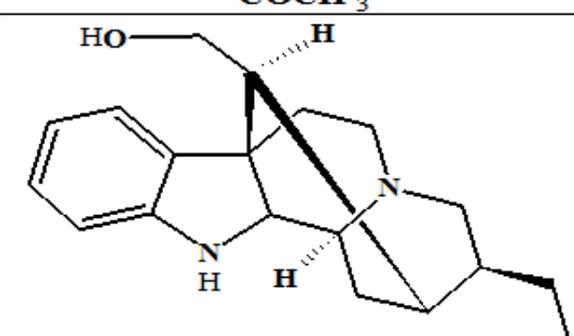
Quadro 2. Principais alcaloides (estrutura, nome, fórmula molecular, massa molecular e atividade antiplasmódica (μM)) encontrados no gênero *Geissospermum* Allemão spp (CARMARGO, et al., 2017; RAMOS et al., 2017). (continuação).

Nº	Estrutura	Nome / Fórmula / Massa / Atividade
12		12-metoxi-1-metilspidospermidina
		$\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}$
		326,23
13		pausperadina A
		$\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}$
		326,23
14		dimetoxiaspidospermina
		$\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}$ (R=H)
		310,2
15		aspidospermina
		$\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_2$ (R=OCH ₃)
		341,22
16		aspidoscarpina
		$\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_3$ (R= OCH ₃)
		370,22
17		dimetilaspidorpermina
		$\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_2$ (R= H)
		340,21
18		4N -oxido-geissoschizolina
		$\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_2$
		314,19
		$\text{CI}_{50} = >40$ (STEELE et al, 2002)

Quadro 2. Principais alcaloides (estrutura, nome, fórmula molecular, massa molecular e atividade antiplasmódica (μM)) encontrados no gênero *Geissospermum* Allemão spp (CARMARGO, et al., 2017; RAMOS et al., 2017). (continuação).

Nº	Estrutura	Nome / Fórmula / Massa / Atividade
19		1,2-dihidrogeissoschizolina
		$\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}$
		296,18
		$\text{CI}_{50} = 27,26$ (STEELE et al, 2002)
20		10-dimetoxi-12-hidroxi-17,19-epoxigeissovellina
		$\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}$
		399,19
21		derivado da geissovellina
		$\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_4$
		383,19
22		derivado da geissovellina
		$\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_4$
		383,19

Quadro 2. Principais alcaloides (estrutura, nome, fórmula molecular, massa molecular e atividade antiplasmódica (μM)) encontrados no gênero *Geissospermum* Allemão spp (CARMARGO, et al., 2017; RAMOS et al., 2017).) (continuação).

Nº	Estrutura	Nome / Fórmula / Massa / Atividade
23		derivado da geissospermidina
		$\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_3$ (R= CH ₃ , R1=R2=H)
		338,16
24		derivado da geissospermidina
		$\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_4$ (R=CH ₃ , R1=H, R2=OCH ₃)
		368,17
25		derivado da geissospermidina
		$\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_3$ (R=CH ₂ CH ₂ CH ₃ , R1=R2=H)
		366,19
26		derivado da geissospermidina
		$\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_4$ (R=CH ₃ , R1=OCH ₃ , R2=H)
		368,17
27		O- dimetilaspidospermina
		$\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_2$
		340,21
28		geissosreticulatina
		$\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}$
		298,2

Quadro 2. Principais alcaloides (estrutura, nome, fórmula molecular, massa molecular e atividade antiplasmódica (μM)) encontrados no gênero *Geissospermum* Allemão spp (CARMARGO, et al., 2017; RAMOS et al., 2017). (continuação).

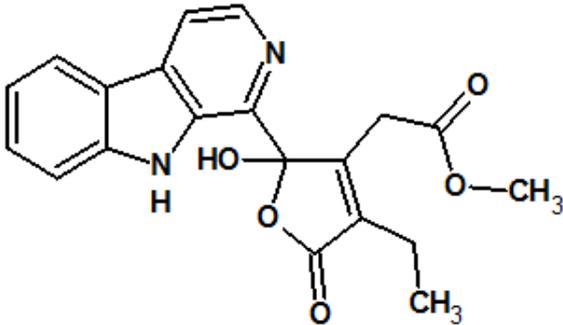
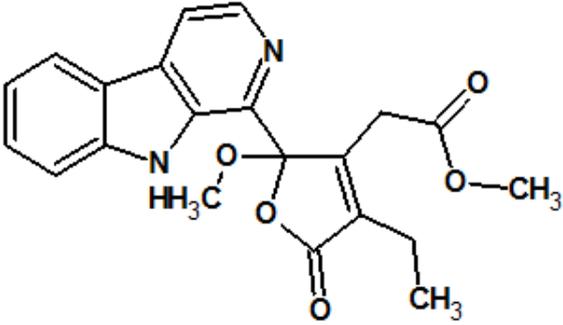
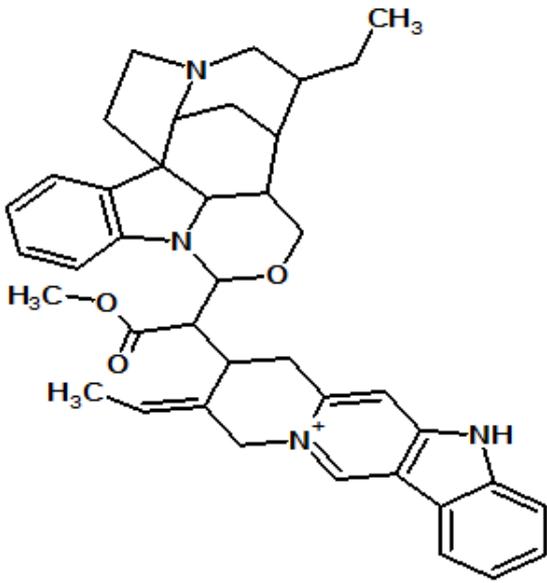
Nº	Estrutura	Nome / Fórmula / Massa / Atividade
29		geissoleavina
		$\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_5$
		366,36
30		O -metilgeossoleavina
		$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_5$
		380,39
31		tetradihidrogeissospermina
		$\text{C}_{40}\text{H}_{45}\text{N}_4\text{O}_3$
		629,8

Figura 10. Mapa da ocorrência da espécie *Geissospermum urceolatum*. (Fonte: TROPICOS, 2016).



3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Contribuir para o conhecimento da composição química e potencial antimalárico da *Geissospermum urceolatum*.

3.2 Objetivos Específicos

- Identificar componentes químicos inéditos em extratos (de *G. urceolatum*) por espectrometria de massas de alta resolução e métodos quimiométricos;
- Avaliar a atividade antiplasmódica de extratos e frações (de *G. urceolatum*) contra a cepa K1 do *Plasmodium falciparum in vitro*;
- Isolar e elucidar estruturas, componentes químicos (de *G. urceolatum*) com elevada atividade contra a cepa K1 de *P. falciparum* e potencial antimaláricos.

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Materiais

4.1.1 Equipamentos

- Balança analítica: Marca Ohaus, modelo AY220 .
- Balança semi-analítica: Marca Ohaus, modelo ARC120 .
- Estufa de secagem e esterilização: Marca Famem, modelo 320-SE.
- Lâmpada UV: Marca Chromato-Vue Carbinet, modelo CC-10 (ondas longas 365 nm e ondas curtas 254 nm).
- Moinho de 4 facas: Marca Marconi, modelo MA 340.
- Rota evaporador: Marca Fisatom, modelo 804.
- Banho de ultrassom: Marca Unique, modelo USC-1800 A.
- Manta aquecedora: Marca Fisatom, modelo 752 A.
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE): Marca Shimatzu, modelo LC-6AD;
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado a espectrometria de massas de alta resolução (CL-EMAR): CLAE: Marca Shimatzu; EMAR (Marca Bruker Daltonics, Modelo MicrOTOF-QII com analisador time-of-flight de alta resolução e fonte ESI);
- Ressonância Magnética Nuclear (RMN) (300 MHz): Marca Bruker Biospin, Modelo Fourier 500, de 7.0 Tesla;
- Ressonância Magnética Nuclear (RMN) (500 MHz): Bruker Avance IIIHD, 500,13 MHz, sonda BBFO Plus SmartProbe TM.

4.1.2 Solventes e reveladores

Os solventes utilizados neste trabalho foram de grau técnico, sendo submetidos a destilação para evitar risco de contaminação das amostras. Para as análises feitas por CCD e CC e para as análises de CLAE foram de grau HPLC da marca Tedia. Para as análises de EM eram de grau LC/MS marca J.T.B e água Mili-Q.

As placas de CCD foram reveladas com luz UV (254 e 365 nm) e com Reagente Dragendorff, NP em MeOH Absoluto, PEG 5% em MeOH absoluto e Cloreto Férrico.

4.2 Métodos

4.2.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)

As análises em camada delgada foram realizadas em cromatoplasmas com suporte de alumínio com camadas de espessura de 0,25 mm e indicador de fluorescência:

- TLC sílica gel 60 F₂₅₄ Merck;
- TLC sílica gel 60 preparativa F₂₅₄, Merck;
- TLC óxido de alumínio 60 F₂₅₄, Merck;
- TLC sílica gel 60 RP-18 F₂₅₄, Merck.

As amostras foram dissolvidas no solvente apropriado, aplicada na cromatofolha com uso de capilar de vidro. Em seguida, foram eluídas no sistema cromatográfico pré-determinado de acordo com a amostra. As placas foram iluminadas com luz de ultravioleta de 254 e 365 nm, e depois reveladas com reagente de Dragendorff e/ou anisaldeído/aquecimento.

4.2.2 Cromatografia em coluna (CC)

Para a realização de fracionamento de extratos e isolamento de substâncias por cromatografia em coluna cromatográfica foram utilizadas as seguintes fases estacionárias:

- Sílica gel 60 (0,063 – 0,200 mm), Merck;
- Sílica gel 60 *flash* (0,040 – 0,063 mm), Merck;
- Óxido de alumínio 60 (0,063 – 0,200 mm), Merck;
- Sephadex LH-20, GE Healthcare;
- Sílica gel 60 (0,063 – 0,200 mm) Merck, impregnada com acetato de sódio (preparada com 80 g de sílica gel 60, adicionada uma solução de acetato de sódio na concentração 8 g/mL na mistura H₂O : MeOH (2 : 9), misturar bem e levar a estufa por 12 hs);

- Sílica gel 60 (0,063 – 0,200 mm) , Merck, impregnada com bicarbonato de sódio (COSTA et. al., 2006).

4.2.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

250 × 4,6250 × 20 As análises em CLAE foram realizadas no Laboratório de Princípios Ativos da Amazônia (LAPAAM) do INPA. As colunas utilizadas nos testes foram uma analítica Shim-pack PREP-ODS(H)KIT 250 × 4,6 mm e a preparativa Shim-pack PREP-ODS(H)KIT 250 × 20 mm.

4.2.4 Métodos espectrométricos

4.2.4.1 Espectrometria de massas (EM)

As análises de espectro de massa foram realizadas no CA-LTQPN (Central Analítica do Laboratório Temático de Química de Produtos Naturais - INPA) no equipamento Marca Bruker Daltonics, modelo MicroTOF-QII, operando com fonte *electrospray* (ESI) em modo positivo, 17500 FWHM. As amostras foram injetadas por infusão direta e por LC/MS.

4.2.4.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

Os experimentos de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram realizados no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear (NMR Lab) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) em Manaus. Os espectros de RMN unidimensionais (^1H , ^{13}C e DEPT135 - *Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*) e bidimensionais (COSY, HSQC e HMBC) foram obtidos em espectrômetro de ressonância magnética nuclear (Bruker Avance IIIHD, 500 MHz, sonda BBFO Plus SmartProbe TM). Os deslocamentos químicos foram expressos em ppm (δ) e as constantes de acoplamento (J) foram registradas em (Hz). Foi utilizado o programa TopSpin 3.5 para a manipulação dos espectros de RMN.

4.2.5 Parte Experimental

O trabalho experimental foi realizado no LAPAAM, no INPA. As análises de RMN foram realizadas no CA-LTQPN no INPA e no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear (RMN Lab) da UFAM. E os testes antiplasmodial *in vitro* foram realizados no Laboratório de Cultivo de *Plasmodium falsiparum* (Laboratório de Malária e Dengue) no INPA.

4.3 Coleta, identificação e preparo do material vegetal

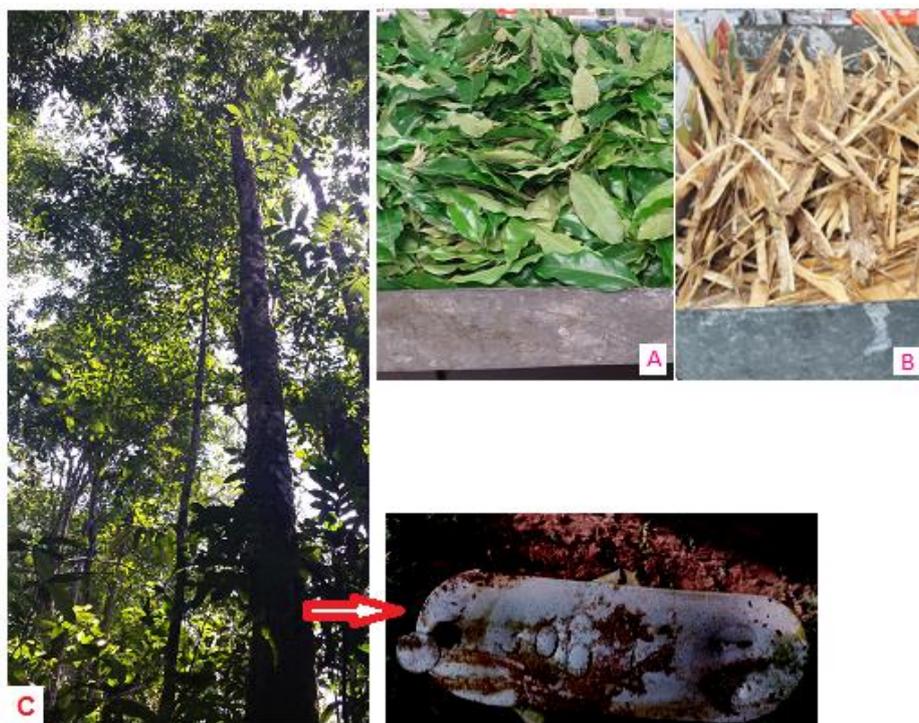
4.3.1 Coleta e identificação do material botânico

O material botânico (folhas, galhos e casca) de *G. urceolatum* A. H. Gentry foi coletado dia 28 de setembro de 2014 na Reserva Florestal Adolpho Ducke em Manaus – AM. O material botânico foi coletado com base na excisata nº 181857 do Herbário do INPA. A planta é a de nº 3069 (Figura 11), e está localizada no marco M 581 (Mapa da Reserva Ducke) (Figura 12).

Figura 11. Mapa Reserva Ducke (marco M581) (RIBEIRO et al., 1999).



Figura 12. Foto *G. urceolatum* no dia da coleta (C) e com o nº de catalogação da planta. Foto das folhas (A) e das cascas (B) lavadas.



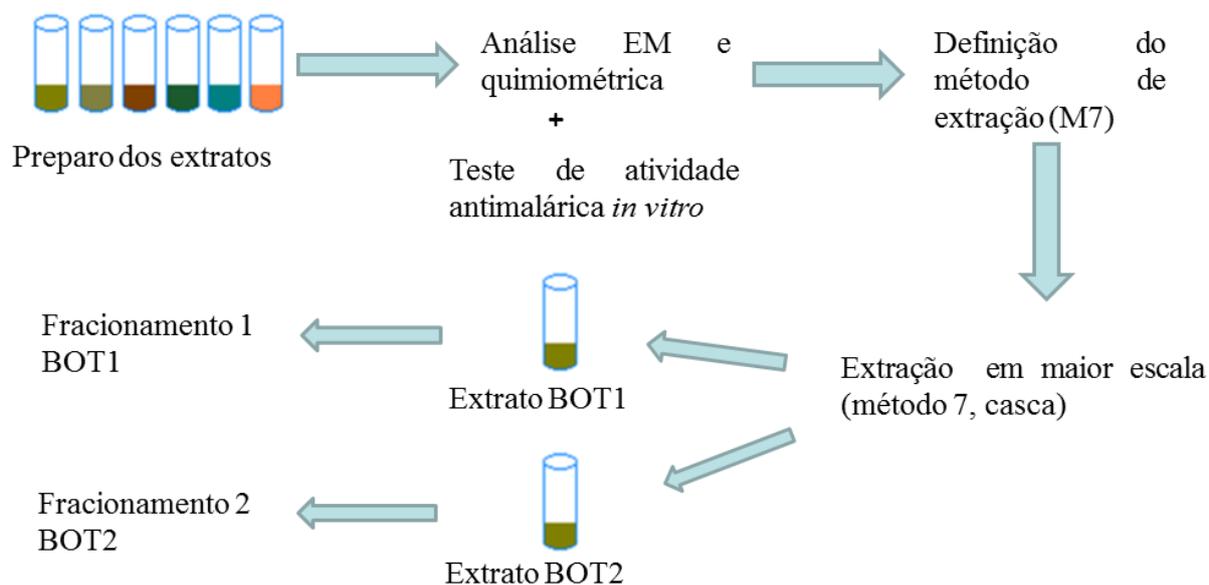
4.3.2 Secagem e moagem do material vegetal

As amostras do material vegetal foram separadas em folha, galho e casca. Todo material vegetal, logo após a coleta, foi lavado com água e levado à estufa climatizada à temperatura de 40°C e aquecido até peso constante (totalizando 20 dias de secagem) (Figura 12). O material vegetal foi seco separadamente por partes e mantidos na mesma estufa, porém em gavetas diferentes.

Após a secagem do material vegetal, ainda separado por partes (folha, galho e casca) iniciou-se a trituração das amostras em moinho elétrico de 4 facas. Após trituração de cada parte da planta, o moinho foi limpo e higienizado a fim de evitar contaminação com as outras partes da planta. O material seco e moído de cada parte da planta foi, então, pesado, embalado e mantido na geladeira até a extração.

4.4 Preparação de extratos para estudo quimiométrico e biodirecionamento

Esquema 1. Representação da preparação e fracionamento dos extratos.



Nota: A representação acima esquematiza o preparo dos extratos e o fracionamento, onde foram preparados extratos utilizando sete metodologias diferentes e três partes da planta (folha, galho e casca), exceto para o método 7 que foi utilizado somente a casca. Os extratos foram testados por análise de EM + quimiometria, rendimento e foram realizados testes de atividade antimalárica *in vitro*. O extrato que teve maior rendimento e atividade antimalárica foi definido como método de estudo (M7 – método 7). Foi realizada extração em maior escala, e posterior fracionamento, utilizando 2 métodos diferentes de fracionamento inicial: Fracionamento 1: foi utilizando coluna com fase estacionária de Sephadex LH-20 e solvente MeOH; Fracionamento 2: foi utilizado partição ácido/base.

4.4.1 Métodos de extração

Para a espécie investigada, a metodologia para obtenção dos extratos foi definida após testes de diferentes métodos de extração baseadas em métodos já utilizados em estudos anteriores de outras espécies desse gênero. Há apenas uma publicação descrevendo método de extração para esta espécie (MARTINS, 2010). Com base na revisão bibliográfica do gênero *Geissospermum* e métodos de extração utilizados no LAPAAM, foram testadas diferentes procedimentos (Tabela 1), a fim de definir o melhor método de extração para cada parte estudada, levando em consideração os resultados quantitativos e qualitativos.

Os métodos de 1 a 6, foram testados para 03 partes da planta: folha, galho e casca. O método 7 foi testado apenas na casca.

Tabela 1. Métodos testados nas extrações de *G. urceolatum*.

Nº	ESPÉCIES	PARTE DA PLANTA	METODOLOGIA			REFERÊNCIAS
			SOLVENTE	CONDIÇÕES	TEMPO	
1	<i>G. sericeum</i>	casca	MeOH : H ₂ O (9:1)	Ultrassom + aquecimento 40°C	Imediato (10 min)	STEELE et al, 2002
2	<i>G. vellosii</i>	casca	MeOH	Maceração + Temp. ambiente	3 dias	MBEUNKUI et al, 2012
3	<i>G. vellosii</i>	casca	EtOH 95%	Maceração + Temp. ambiente	2 dias	LIMA et al, 2009
4	<i>G. reticulatum</i>	folha e casca	EtOH : H ₂ O (70:30)	Maceração + Temp. ambiente	3 dias	REINA et al, 2012
5	<i>G. vellosii</i>	casca	EtOH 95%	Ultrassom + aquecimento 40°C	Imediato (10 min)	RAPOPORT et al, 1958
6	-	-	Hexano	Ultrassom + Temp. ambiente	Imediato (10 min)	LAPAAM
			EtOH 95%	Ultrassom + aquecimento 40°C		
7	-	-	MeOH + 1% NH ₄ OH	Maceração + Temp. ambiente	7 dias	LAPAAM

Nota: O método 6 e 7, são métodos que o LAPAAM usa/usou em pesquisas de outras espécies.

Para todos os métodos extrativos foram utilizados a mesma quantidade de material vegetal seco e moído (1,0 g) e a extração foi realizada até exaurir todo o material, por repetidas extrações. Todas as amostras foram filtradas em papel de filtro antes de serem rotaevaporadas, as amostras aquecidas durante a extração foram filtradas a quente e as demais a temperatura ambiente. Na descrição de cada método abaixo, o solvente foi adicionado ao material vegetal em erlenmeyers e/ou béquer, e logo após submetido as condições metodológicas específicas de cada método:

- No Método 1, na extração foi utilizado o solvente MeOH : H₂O (9 : 1). A mistura foi levada ao ultrassom por 10 minutos, logo após é aquecido à 40°C;
- No Método 2, na extração foi utilizado o solvente MeOH 100%. A mistura foi mantida sob maceração à temperatura ambiente por 3 dias;

- No Método 3, na extração foi utilizado o solvente EtOH 95%. A mistura foi mantida sob maceração a temperatura ambiente por 2 dias;
- No método 4, na extração foi utilizado o solvente EtOH : H₂O (70 : 30). A mistura foi mantida sob maceração a temperatura ambiente por 3 dias;
- No método 5, na extração foi utilizado o solvente EtOH 95%. A mistura foi levada ao ultrassom por 10 minutos, logo após é aquecido a 40°C até a fervura;
- No método 6, o solvente utilizado nas 3 primeiras extrações foi o Hexano. Nesta etapa, a mistura foi mantida sob maceração temperatura ambiente por 1 hora. Na segunda etapa, o solvente foi o EtOH 95%. A mistura foi levada ao ultrassom por 10 minutos e aquecida a 40°C até a fervura;
- No método 7 o solvente utilizado foi MeOH + 1% NH₄OH, a mistura foi mantida sob maceração a temperatura ambiente por 7 dias.

Logo após cada extração, as soluções obtidas foram submetidas à rotaevaporação para concentração de cada extrato. Cada extrato rotaevaporado foi catalogado e adicionado a um frasco de vidro pesado previamente. Os frascos foram submetidos a evaporação em “banho de areia em manta aquecedora” à 40°C até a evaporação completa. As amostras secas foram pesadas, foi calculado o rendimento e depois foram armazenadas em freezer para posterior análise.

4.4.1.1 Cálculo do rendimento das extrações

O do rendimento dos extratos foi calculado utilizando o seguinte algoritmo:

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

4.4.2 Análise por CDD dos extratos e teste para alcaloides

Pequenas amostras de todos os extratos (128 extratos secos) obtidos dos 7 métodos diferentes foram pesados e solubilizada a uma concentração de 1 mg/mL em MeOH. As análises foram realizadas por aplicação de aproximadamente 10 µL da solução do extrato em placas de sílica gel 60 F₂₅₄, no sistema de fase móvel clorofórmio: metanol (7 : 1) a fim de

verificar o perfil químico dos extratos por CCD. As amostras da mesma parte da planta e mesmo método extrativo foram comparadas.

As placas de CCD eluídas foram iluminadas por irradiação UV (254 e 365 nm) e por Reagente Dragendorff (alcaloides apresentam cor marrom-alaranjada após a aplicação deste reagente) para verificar a presença de alcaloides (WAGNER & BLADT, 1996). A presença de manchas marrom-alaranjadas sugere a presença de alcaloides, uma vez que o revelador é característico para substâncias alcaloídicas. Os extratos que tinham o mesmo perfil por CCD foram unidas no mesmo frasco, secos por evaporação e pesados.

4.4.3 Análise dos extratos por EM e tratamento quimiométrico dos dados

Amostras de todos os extratos obtidos (19 ao todo: 06 extratos de folhas, 06 extratos de galhos e 07 extratos de cascas) foram pesados e solubilizados a uma concentração de 1 mg/mL (solução estoque) em metanol. Aliquotas (5 µL) das soluções estoque foram posteriormente diluídas com metanol (760 µL), água (197 µL) e ácido fórmico (3 µL) separadamente, uma concentração de 5,2 µg/mL (concentração da amostra injetada), essas soluções resultantes foram analisadas por infusão direta no espectrômetro de massas de alta resolução.

Os espectros de massa foram obtidos utilizando um equipamento MicroTOF-QII, com as seguintes condições analíticas: *source type*: ESI; *Focus*: active; *scan begin*: 50 *m/z*; *scan end*: 900 *m/z*; *ion polarity*: positive; *set capillary*: 3000 V; *set end plate offset*: -500 V; *set nebulizer*: 0.4 Bar; *set dry heater*: 200°C; *set dry gas*: 5.0 l/min; *set divert valve*: waste.

Durante o tratamento dos espectros de ESI-EMAR, inicialmente cada amostra foi calibrada com infusão direta de formiato de sódio, e posteriormente análise da amostra. Os resultados obtidos foram analisados. Esses foram avaliados por parte da planta separadamente (folha, galho e casca), comparando método de extração, *m/z* e porcentagem em relação ao pico base (maior que 5%), os íons de intensidade abaixo de 5% relativo ao íon principal foram negligenciados (SCHIOZER et al., 2012). A partir desta análise e obtenção dos dados foi realizada, para cada amostra, análise multivariada através do software Chemoface versão 1.5 (NUNES et al., 2012). A análise de componentes principais (PCA) foi calculada através

da variação dos íons registrados, e para algumas análises dos extratos foi necessário pré-processamento.

4.4.4 Ensaio de biodirecionamento

Para bioguiar os estudos fitoquímicos se procedeu os testes de atividade antimaláricos *in vitro* dos 19 extratos preparados com 7 metodologias diferentes, utilizando o *Plasmodium falciparum* cepa K1 (conforme metodologia descrita no item 4.6 – Testes biológicos). Os resultados obtidos no teste de atividade antimalárica (item 6.1.3 - Perfil químico dos extratos por EM e quimiometria), e o resultado do rendimento dos extratos (Tabela 11) , definiu-se que o método de extração utilizado é o método 7, e a parte da planta a casca.

4.5 Estudo fitoquímico

4.5.1 Obtenção do extrato para fracionamento/isolamento

Utilizando o método 7 de extração, foram realizadas 3 extrações consecutivas em cada frasco com material vegetal, as soluções foram filtradas em papel de filtro, rotaevaporadas, secas e pesadas. Após a secagem foram armazenadas em geladeira para posterior fracionamento (Tabela 2).

Tabela 2. Preparo do extrato utilizando a metodologia 7.

Material Vegetal (g)	Solvente (mL)	Extrato seco (g)	Rendimento (%)
367,00	1,000 MeOH + 20 NH ₄ OH	10.05 (BOT1)	2,7
610,00	2.000 MeOH + 20 NH ₄ OH	16.10 (BOT2)	2,6

Esse extrato seco metanólico da casca BOT1 e BOT2 (método 7) da *G. urceolatum* A. H. Gentry foi escolhido para ser submetido ao fracionamento cromatográfico baseado nos testes para alcaloides, rendimentos, nos resultados de atividade antimalárica *in vitro* dos extratos e no estudo quimiométrico dos extratos.

4.5.2 Fracionamento Cromatográfico

Foram utilizados 2 métodos distintos para fracionamento do extrato seco, a primeira (extrato BOT1) utilizando sílica Sephadex LH-20 para partição e obtenção da fração alcaloídicas e ativa, uma vez que estudos revelaram que a atividade do gênero é devido a presença de alcaloides. E o segundo (extrato BOT2) método por partição ácido/base do extrato seco, fracionamento por CC e utilização de técnicas de HPLC para isolamento de substâncias a partir de subfrações.

Em geral, as placas de CCD comparativas, foram eluídas utilizando a mesma fase móvel e fase estacionária. A fase móvel utilizada foi: Acetato de Etila : Ácido Acético : Ácido Fórmico : H₂O (100 : 11 : 11 : 27) e a fase estacionária, cromatofolhas de sílica gel 60 F₂₅₄, da Merck.

Fracionamento/isolamento do extrato BOT1

O fracionamento do extrato BOT1 para obter frações ricas em alcaloides foi realizado por coluna CC, utilizando como fase estacionária Sephadex LH-20 (C2). Foi preparada uma coluna empacotada com Sephadex LH-20 (70 g) em MeOH. A amostra (3,6 g) foi solubilizada em MeOH, filtrada em membrana microporosa e aplicada na coluna. A fase móvel utilizada na coluna foi MeOH 100%.

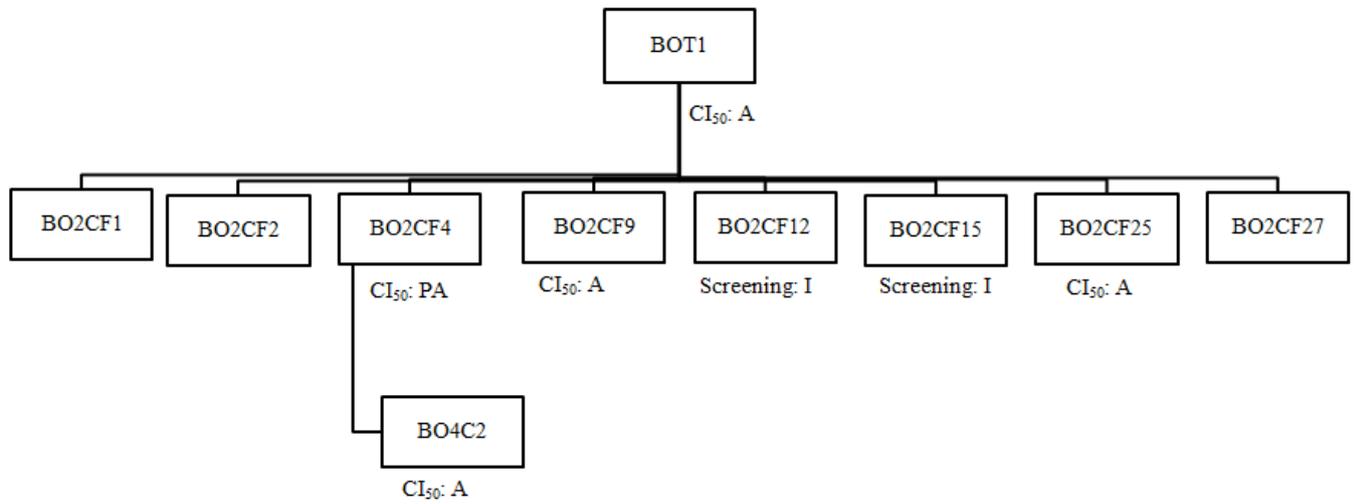
Com base nos resultados de teste antiplasmodial *in vitro* descritos parcialmente no fluxograma 1, e a partir dos indicativos positivo para alcaloides. As frações obtidas na coluna C2 foram realizadas outras colunas CC (Tabela 3 e Fluxograma 1) e algumas subfrações obtidas nestas colunas, porém não houve isolamento de substâncias com pureza necessária para elucidação. Foram obtidas apenas duas frações BO2CF1 (obtida na coluna C2) e a BO4C2 (obtida na coluna C4). Após análise de RMN, LC/MS e CCD verificou-se que apesar de ter sido fracionadas por métodos diferentes, essas duas frações deverão conter, majoritariamente, a mesma substância cuja estrutura não foi possível elucidar. E apenas a BO4C2 foi enviada para teste de atividade antimalárica *in vitro*, pois a BO2CF1 não possui massa suficiente para realizar o teste.

Tabela 3. Dados das colunas CC realizadas a partir do extrato BOT1.

Nº	Amostra fracionada	Fase estacionária	Dados da coluna (altura e diâmetro em cm)	Fase móvel	Nº subfrações obtidas (reunidas)
C2	BOT1	Sephadex LH-20	h: 66,8 e ϕ : 3,6	A	8 * ¹
C3	BO2CF4	Sílica gel 60 <i>flash</i>	h: 50,1 e ϕ : 2,1	B	6 * ²
C4	BO2CF4	Sephadex LH-20	h: 7,5 e ϕ : 1,0	A	5 * ¹
C5	BO2CF9	Óxido de alumínio	h: 17,3 e ϕ : 1,5	B	5 * ²
C6	BO3CF6	Óxido de alumínio	h: 7,5 e ϕ : 1,0	B	3 * ²
C7	BO3CF4	Sephadex LH-20	h: 15,0 e ϕ : 1,0	B	4 * ²
C8	BO3CF2	Sephadex LH-20	h: 15,0 e ϕ : 1,0	B	2 * ²
C9	BO5CF5	Sílica gel 60	h: 50,1 e ϕ : 2,1	B	8 * ²
C10	BO2CF12	Óxido de alumínio	h: 50,1 e ϕ : 2,2	B	11 * ²
C11	BO10CF17	Sílica gel 60	h: 17,3 e ϕ : 1,5	C	15 * ²

Nota: Fase móvel: (A) Isocrático: MeOH 100%, (B) Gradiente: AcOEt em hexanos (0 a 100%), AcOEt em MeOH (0 a 100%) e MeOH, AcOH e HCOOH (0 a 10%) e (C) Isocrático: AcOEt : AcOH : HCOOH : H₂O (100 : 11 : 11 : 27). O nº de subfrações reunidas é o resultado da união das subfrações obtidas na coluna comparadas por CCD. *¹ foi obtido uma substância/fração impura. *² coluna CC que não foi obtido subfração pura e não resultou em substância elucidada. A coluna C1 foi realizada em estágio realizado na Fiocruz Manguinhos – RJ, apenas para treinamento de manipulação da Sephadex LH-20.

Fluxograma 1. Fluxograma das frações/subfrações do extrato BOT1 e resultados preliminares de Screening e CI_{50} .



Nota: Inibição do Crescimento (Screening) e Concentração Inibitória 50% (CI_{50}) *in vitro* da cepa K1 e de *P. falciparum* resultados preliminares drente às amostras testadas. Onde (I) é inativo, (PA) é parcialmente ativo e (A) é ativo.

Fracionamento/isolamento do extrato BOT2

O extrato BOT2 foi submetido à partição ácido/base de acordo com a metodologia de Ramos et. al. (2017), na partição a primeira fase de diclorometano foi identificada como BODCFMI e a segunda como BODCFMII. Estas frações foram submetidas para teste antiplasmodial *in vitro* e análise de LC-EMAR.

As colunas CC realizadas a partir destas frações estão descritas na Tabela 4, e as CC que foi obtida substâncias elucidadas estão descritas detalhadamente no texto, juntamente com as análises realizadas por CLAE.

Tabela 4. Dados das colunas CC realizadas a partir do extrato BOT2.

Nº	Amostra fracionada	Fase estacionária	Dados da coluna (altura e diâmetro em cm)	Fase móvel	Nº subfrações obtidas (reunidas)
C12	BODCFMI	Sílica gel 60 impregnada com AcONa	h: 50,1 ϕ : 2,1	A	7
C13	BODCFMI	Sílica gel 60 impregnada com AcONa	h: 17,3 e ϕ : 1,5	A	7 * ¹
C14	BODCFMI	Sílica gel 60 <i>flash</i>	h: 15,0 e ϕ : 1,0	B	4 * ¹
C15	BODCFMII	Sílica gel 60 impregnada com NaHCO ₃	h: 50,1 e ϕ : 2,1	C	5 * ¹
C16	BODCFMIV	Sílica gel 60 impregnada com NaHCO ₃	h: 50,1 e ϕ : 2,1	C	5 * ¹
C17	BODCFMIII	Sílica gel 60 impregnada com NaHCO ₃	h: 50,1 e ϕ : 2,1	A	7

Nota: Fase móvel: (A) Gradiente: AcOEt em hexanos (0 a 100%), AcOEt em MeOH (0 a 100%) e MeOH, AcOH e HCOOH (0 a 10%) , (B) Isocrático: AcOEt : AcOH : HCOOH : H₂O (100 : 11 : 11 : 27) e (C) Gradiente: DCM em hexanos (0 a 100%), AcOEt em DCM (0 a 100%) e MeOH em AcOEt (0 a 100%). O nº de subfrações reunidas é o resultado da união das subfrações obtidas na coluna comparadas por CCD. *¹ coluna CC que não foi obtido subfração pura e não resultou em substância elucidada.

A coluna C12 foi preparada utilizando a fração BODCMI (300 mg) solubilizada em MeOH, a coluna foi empacotada com sílica gel 60 impregnada com Acetato de Sódio. A fase móvel utilizada foi gradiente: AcOEt em hexanos (0 a 100%), AcOEt em MeOH (0 a 100%) e MeOH, AcOH e HCOOH (0 a 10%), foram coletadas alíquotas de aproximadamente 30 mL cada, no total foram 40 subfrações. Estas foram comparadas por CCD e as amostras foram unidas e obteve-se 7 subfrações que foram evaporadas, secas e pesadas (Tabela 5).

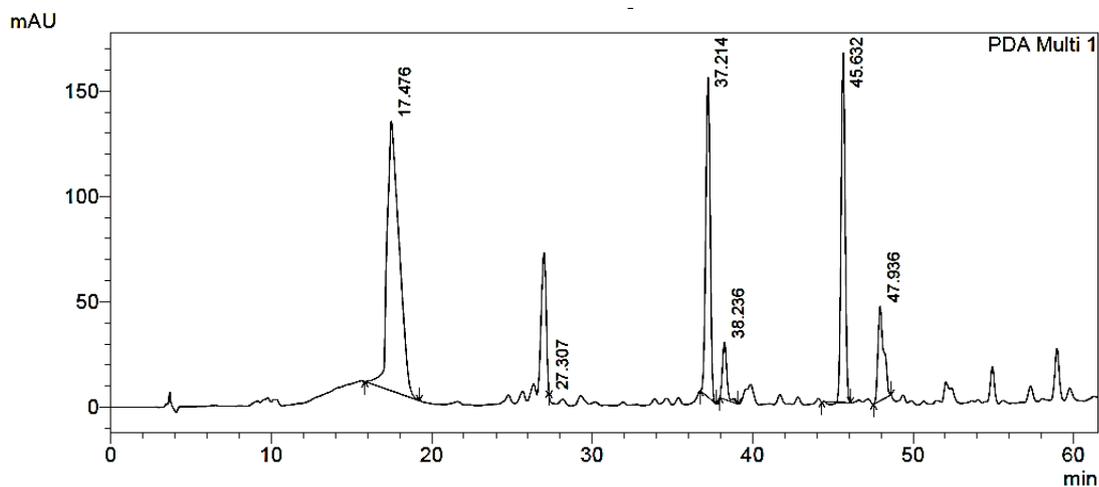
Tabela 5. Relação de subfrações/substâncias isoladas da coluna C12.

Frações reunidas	Subfrações	Intensidade (alcaloides)	Massa (mg)
1 (BO12CF1)	1 – 5		0,2
2 (BO12CF6)	6 – 8		47,1
3 (BO12CF10)	9 – 10	+	16,6
4 (BO12CF12)	12 - 20	++	43,2
5 (BO12CF22)	21 - 25		9,9
6 (BO12CF26)	26 - 30		11,3
7 (BO12CF36)	31 - 40		143,70

A fração BO12CF12 foi preparada na concentração de 1mg/mL em MeOH e testada em CCD fase reversa, a fim de se verificar a separação em coluna reversa (CLAE). Após verificar que havia uma boa separação, a amostra (amostra foi solubilizada em MeOH, filtrada em membrana microporosa, na concentração de 1mg/mL) foi submetida à análise em CLAE, a fim de se definir um método para separação em coluna preparativa. O método foi otimizado em coluna analítica (Figura 13), de forma a permitir a separação em escala preparativa. O método (MA) definido: gradiente de 0 - 35 min (35 - 55% de B), de 35 - 70 min (55 - 70% de B) e de 70 a 80 min 100% de B (sendo B: MeOH e A: mistura MeOH : H₂O 0.1% HCO₂H), o fluxo de 0,8 mL/min. A fração BO12CF12 (amostra solubilizada em MeOH, filtrada em membrana microporosa, concentração de 15 mg/mL) foi injetada em coluna preparativa (Figura 14), com adaptação do método MA para preparativa. Foi realizada

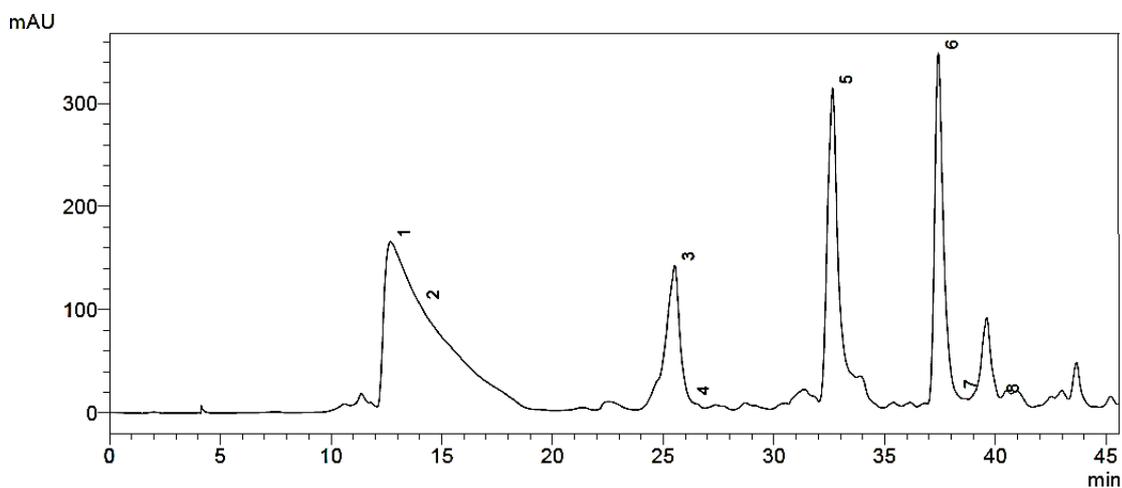
2 análises na coluna preparativa, as subfrações obtidas (picos) foram recolhidos em frascos identificados e posteriormente foi submetido a evaporação, secagem e pesagem (Tabela 6).

Figura 13. Cromatograma CLAE-DAD da fração BO12CF12, método MA, coluna analítica.



NOTA: Identificação e o tempo de retenção – TR de cada pico: Pico 1, TR: 17,47 min; Pico 2, TR: 27,30 min; Pico 3, TR: 37,21 min; Pico 4, TR: 38,23 min; Pico 5, TR: 45,63 min; Pico 6, TR: 47,93 min.

Figura 14. Cromatograma CLAE-DAD da fração BO12CF12, método MA, coluna preparativa.



NOTA: Numeração e identificação dos picos: Pico 1: BO12CP1 (**S1**), Pico 2: BO12CP2, Pico 3: BO12CP3, Pico 4: BO12CP4 (**S4**), Pico 5: BO12CP5 e Pico 6: BO12CP6.

Tabela 6. Relação de subfrações/substâncias isoladas da fração BO12CF12, no CLAE, coluna preparativa, método MA.

Frações reunidas	Subfrações	Substâncias isoladas	Massa (mg)
1 (BO12CP1)	1A , 1B	BO12CP1 (S1)	3,7
2 (BO12CP2)	2A, 2B	-	2,0
3 (BO12CP3)	3A, 3B	-	3,1
4 (BO12CP4)	4A, 4B	BO12CP4 (S4)	1,9
5 (BO12CP5)	5A, 5B	-	0,4
6 (BO12CP6)	6A,6B	-	0,1

As substâncias BO12CP1 e BO12CP4 foram enviadas para análise de RMN e LC-EMAR. As subfrações BO12CP2, BO12CP5, e BO12CP6 são subfrações impuras. A subfração BO12CP3 foi submetida à CCD preparativa (utilizando placa preparativa e fase móvel da CCD). Foram obtidas 4 subfrações da CCD, destas somente subfração BO12CP31 foi identificada como substância (**S2**) e foi enviada para análise em RMN e LC/MS.

Uma parte da fração BODCMII (500 mg), foi submetida a uma nova partição, na tentativa de obter uma separação em meio mais alcalino que o da metodologia (pH 10) (RAMOS et. al., 2017). A fração BODCMII foi solubilizada em DCM, esta solução foi elevada a pH 11 e separado a fração BODCMIII, e posteriormente próximo pH 12, obteve-se a fração BODCMIV, a solução foi alcalinizada com solução de NH₄OH e NaOH.

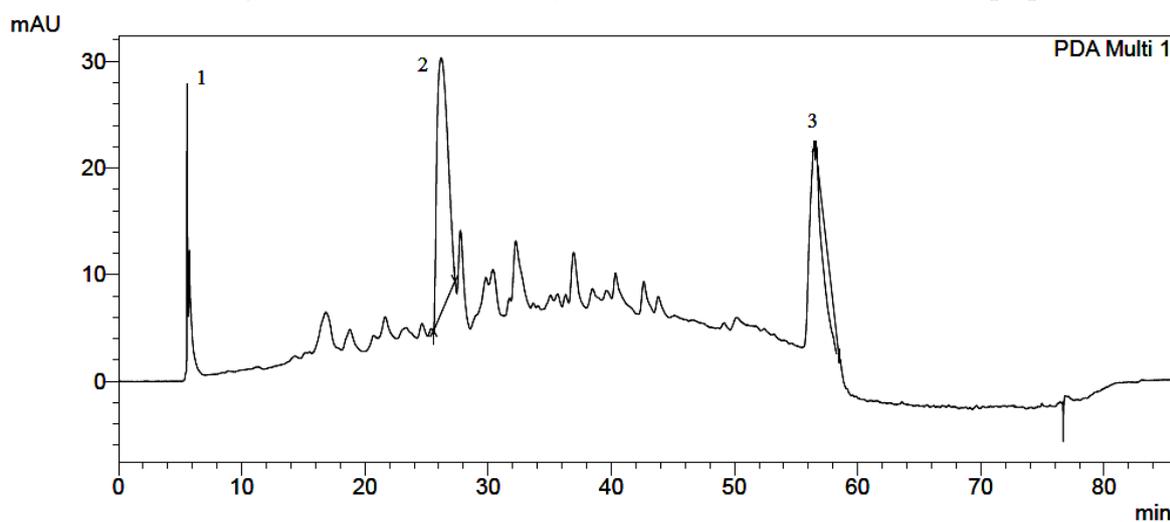
A coluna C17 foi empacotada com sílica gel 60 impregnada com Bicarbonato de Sódio. A fração BODCMIII (50 mg) foi adicionada a coluna. A fase móvel utilizada foi gradiente: DCM em hexanos (0 a 100%), AcOEt em DCM (0 a100%) e MeOH em AcOEt (0 a100%). Foram coletadas alíquotas a cada 10 mL, o numero total de frações foram 24. Estas foram comparadas por CCD e reagrupadas conforme descrito na tabela 7.

Tabela 7. Relação de frações/substâncias isoladas da amostra BODCMIII, coluna C17.

Frações reunidas	Subfrações	Intensidade (alcaloides)	Massa (mg)
1 (BOF1-5C17)	1-5		0,6
2 (BOF6-7C17)	6-7		0,3
3 (BOF8-11C17)	8-11	+	2,0
4 (BOF12-13C17)	12-13	+	1,2
5 (BOF14-17C17)	14-17	+	2,5
6 (BOF18-23C17)	18-23	+	34,4
7 (BOF24C17)	24	++	27,8

A fração BOF24C17 foi separada analiticamente no HPLC em coluna preparativa, utilizando o método (MB): gradiente de 0 - 70 min (30 - 70% de B) e de 70 a 80 min 100% de B (sendo B: MeOH e A: mistura MeOH : H₂O 0.1% TFA), o fluxo de 13,0 mL/min. A fração BOF24C17 (amostra solubilizada em MeOH, filtrada em membrana microporosa, concentração de 15 mg/mL) foi injetada em coluna preparativa (Figura 15), com adaptação do método MA para preparativa. Foram realizadas 2 análises na coluna preparativa, as subfrações obtidas (picos) foram recolhidos em frascos identificados e posteriormente foi submetido a evaporação, secagem e pesagem (Tabela 8).

Figura 15. Cromatograma CLAE-DAD da fração BOF24C17, método MB, coluna preparativa.



NOTA: Numeração e identificação dos picos: Pico 1: BOF24C17P5, Pico 2: BOF24C17P26 (S3), Pico 3: BOF24C17P58.

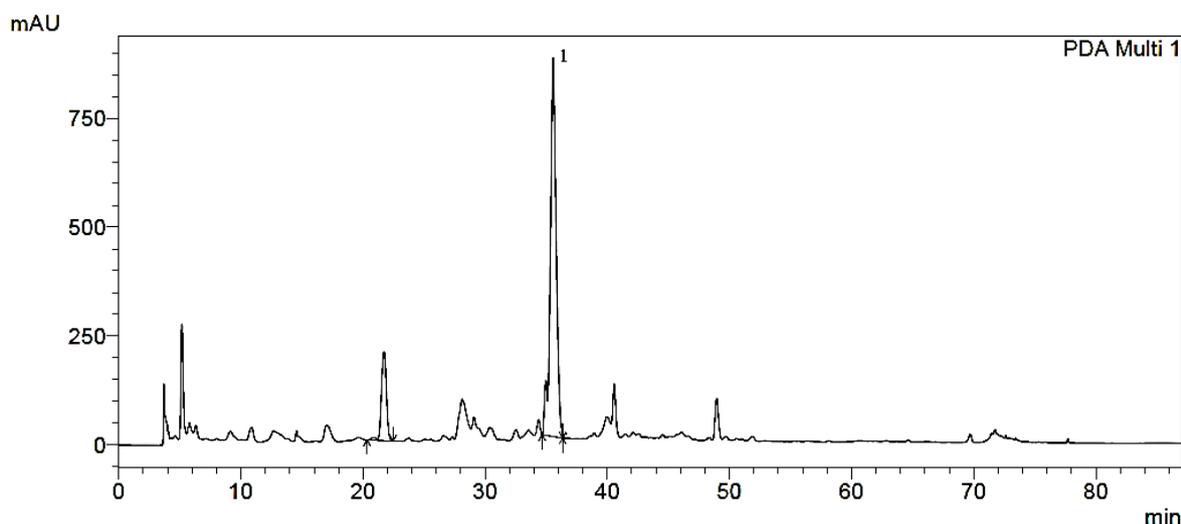
Tabela 8. Relação de subfrações/substâncias isoladas da fração BOF24C17, no CLAE, coluna preparativa, método MB.

Frações reunidas	Subfrações	Substâncias isoladas	Massa (mg)
1 (BOF24C17P5)	1A , 1B	-	20,0
2 (BOF24C17P26)	2A, 2B	BOF24C17P26 (S3)	5,7
3 (BOF24C17P58)	3A, 3B	-	0,5

A amostra BOF24C17P26 (S3) foi enviada para análise de RMN, LC-EMAR e teste antiplasmodial *in vitro*.

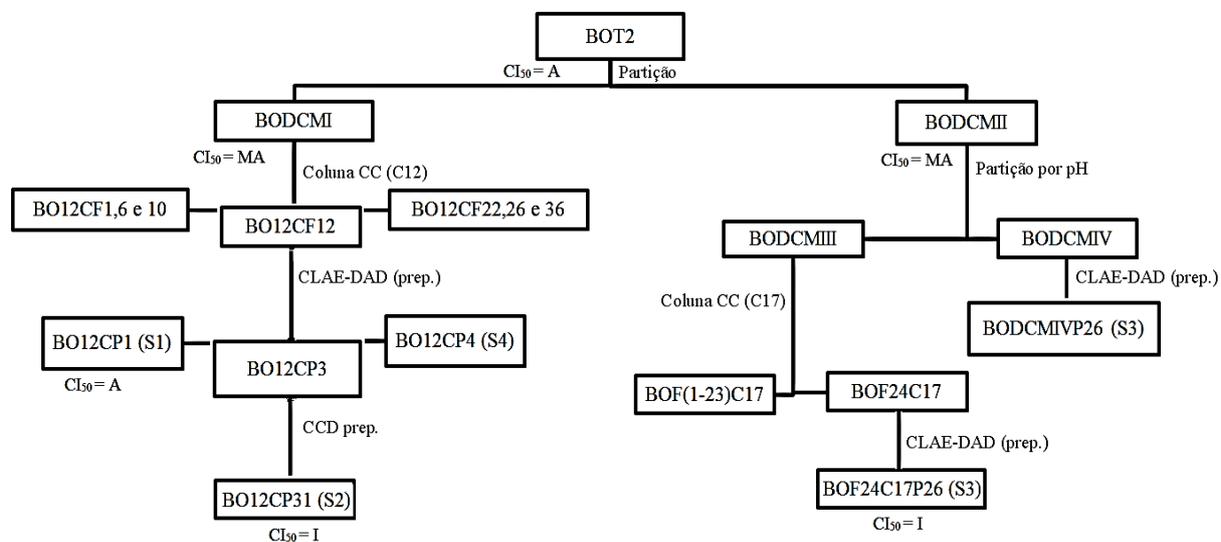
A fração BODCMIV foi submetida a isolamento no HPLC em coluna preparativa, utilizando o método MB. A fração (amostra solubilizada em MeOH, filtrada em membrana microporosa, concentração de 15 mg/mL) foi injetada em coluna preparativa (Figura 16), com adaptação do método MB para preparativa. Foram realizadas 2 análises na coluna preparativa, as subfrações obtidas (picos) foram recolhidos em frascos identificados e posteriormente foi submetido a evaporação, secagem e pesagem.

Figura 16. Cromatograma do método M35 coluna analítica, da amostra BODCMIV.



A amostra obtida na coluna preparativa foi definida como BODCMIVP26 (S3) (massa obtida 1,8 mg) foi enviada para análise no RMN e LC-EMAR.

Fluxograma 2. Fluxograma das frações/subfrações do extrato BOT2 e resultados preliminares de Screening e CI_{50} .



Nota: Inibição do Crescimento (Screening) e Concentração Inibitória 50% (CI_{50}) *in vitro* da cepa K1 e de *P. falciparum* resultados preliminares dentre às amostras testadas. Onde (I) é inativo, (PA) é parcialmente ativo, (A) é ativo e (MA) é muito ativo.

Tabela 9. Relação das substâncias isoladas e cujas estruturas foram elucidadas por RMN e LC-EMAR.

Número	Código da amostra	Massa obtida (mg)
1	BO12CP1 (S1)	3,30
2	BO12CP4 (S4)	1,70
3	BO12CP31 (S2)	1,40
4	BOF24C17P26 (S3)	5,70
5	BODCMIVP26 (S3)	1,80

4.6 Testes biológicos e bioensaios

4.6.1 Cepa K1 de *P. falciparum*

A cepa multirresistente K1 (MRA-159, MR4, ATCC Manassas Virginia) foi mantida em cultivo contínuo segundo método de Trager e Jensen (1976). Para o micro teste foi utilizada uma parasitemia inicial de 1 – 2% e hematócrito de 2%.

4.6.2 Atividade antimalárica *in vitro*

Inicialmente no screening a redução do crescimento do parasita foi avaliada em duas concentrações (50 e 5 µL/mL, screening). As amostras consideradas ativas no screening (inibem o crescimento do parasita de 80 a 100%) tiveram as suas concentrações inibitórias 50% (CI₅₀) determinadas.

4.6.2.1 Extratos

Os 19 amostras de extrato, cuja preparação e análise por EMAR e CCD foram tratadas na seção 4.4, foram testadas para atividade antimalárica *in vitro*:

- 06 extratos de folhas (BOA1, BOD1, BOG1, BOJ1, BON1 e BOQ1), 06 extratos de galhos (BOB1, BOE1, BOH1, BOL1, BOO1, BOR1) e 07 extratos de cascas (BOC1, BOF1, BOI1, BOM1, BOP1, BOS1, BOT1);

- BOT foi repetido após extração em maior escala, e foi reanalisado como BOT1 e BOT2.

4.6.2.2 Frações e substâncias avaliadas na abordagem bioguiada de isolamento

As 07 amostras de frações que foram testadas para atividade antimalárica *in vitro*, frente à cepa K1 de *Plasmodium falciparum*:

- As 05 frações do extrato BOT1: BO₂CF4, BO₂CF9, BO₂CF12, BO₂CF15 e BO₂CF25;
- As 02 frações do extrato BOT2: BODCMI e BODCMII.

As subfrações e substâncias que foram testadas para atividade antimalárica *in vitro* frente à cepa K1 de *Plasmodium falciparum*, foram a subfração BO4C2 e as substâncias BO12CP1 (S1), BOF24C17P26 (S3) e BO12CP31 (S2).

4.6.2.3 Preparo das amostras

- Screening

As substâncias foram solubilizadas 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).

- Determinação da Concentração Inibitória

As substâncias foram solubilizadas em DMSO na concentração estoque de 10 mg/mL, e posteriormente diluídas em meio completo para obtenção das sete concentrações de teste (100 e 0,14 µg/mL).

4.6.2 Calculo

O teste foi realizado como descrito por Andrade-Neto et al. (2007). 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 horas a 37°C. Após a incubação, o conteúdo dos poços foi avaliado mediante microscopia óptica. A inibição do crescimento dos parasitas foi determinada pela comparação com os controles de crescimento sem amostra, segundo fórmula abaixo:

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

Parasitemia do controle

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

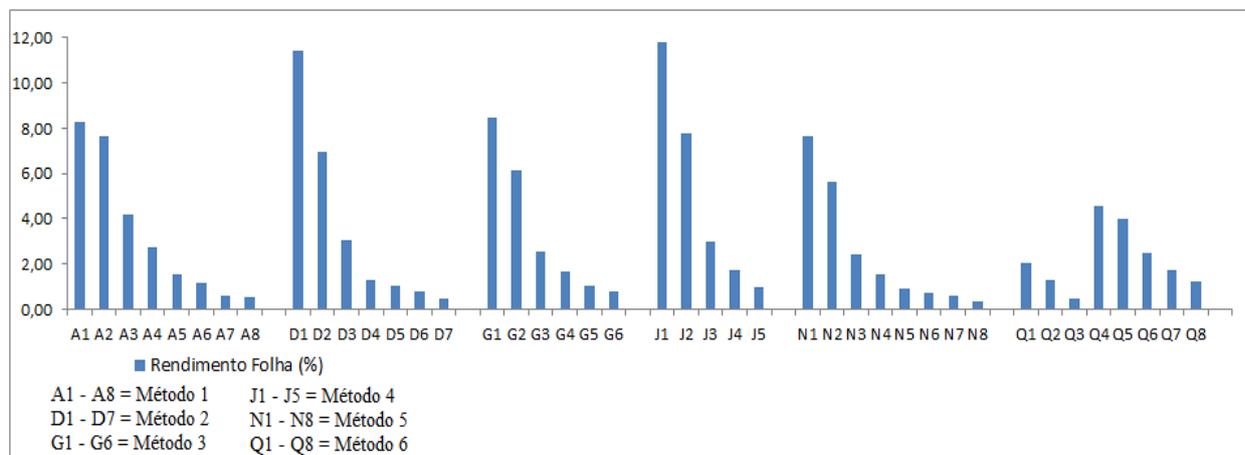
6.1 Estudos dos métodos de extração

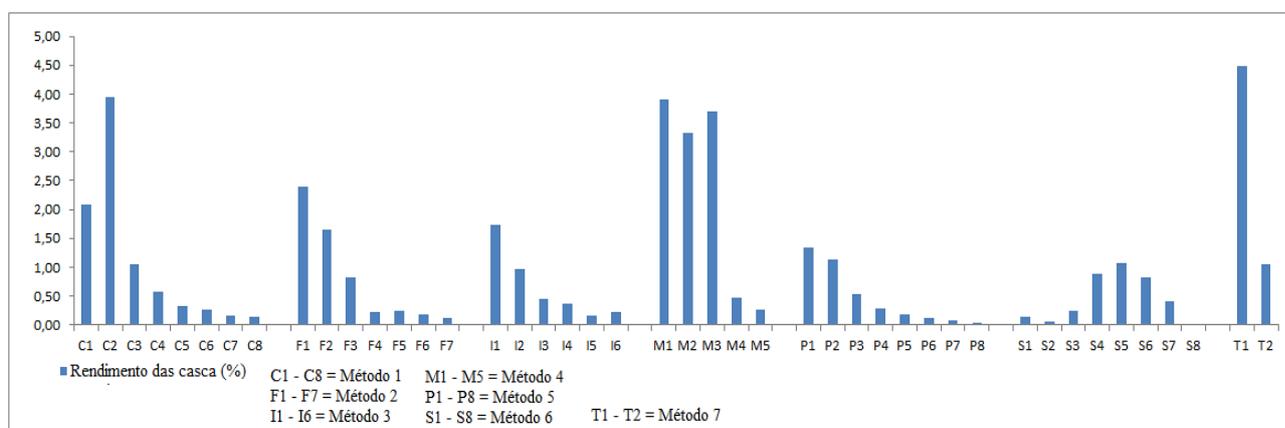
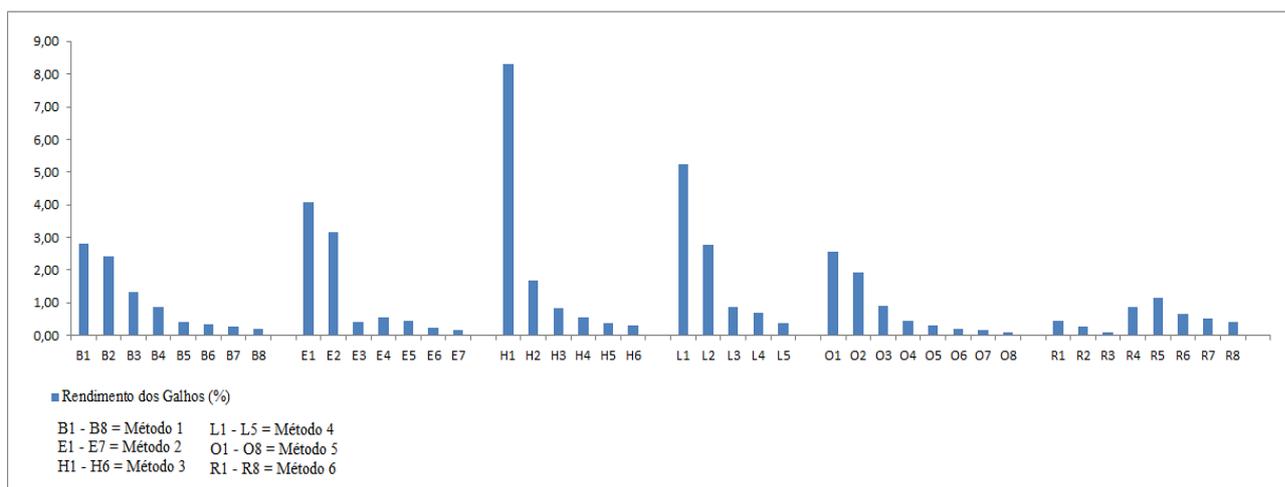
6.1.1 Rendimento das Extrações

Os extratos obtidos, em sua maioria os derivados das folhas, possuem coloração esverdeada e os derivados dos galhos e casca possuem coloração marrom claro. Na Figura 16, são apresentados os rendimentos das extrações individuais/sequenciais que foram feitas cada amostra de material vegetal em cada método (1 a 7) avaliados. O material vegetal foi submetido a sucessivas extrações até ser exaurido. Os rendimentos dos diferentes métodos variaram bastante (Tabela 5). Para as folhas, o melhor rendimento foi obtido no método 4 e o rendimento mais baixo foi obtido no método 6. Para os galhos o melhor rendimento foi obtido no método 3 e o rendimento mais baixo foi obtido no método 6. Para as cascas o melhor rendimento foi obtido no método 7 e o rendimento mais baixo foi obtido nos métodos 5 e 6.

No método 6 observa-se uma curva atípica das curvas de extração, onde as três primeiras extrações tem um rendimento muito baixo, isso pode ser justificado pelo solvente utilizado nesta etapa (hexano). A partir da quarta extração o solvente utilizado foi o EtOH 95% a quente, o que justifica maior índice extrativo.

Figura 17. Rendimentos das sucessivas extrações de casca, galhos e folhas utilizando os métodos de 1 a 7.





Nota: *Métodos 1* (Solvente utilizado é MeOH:H₂O (9:1) levado ao ultrassom por 10 minutos e aquecimento a 40°C), a amostra foi submetida a 8 repetições do método, até exaurir o material vegetal. *Método 2* (Solvente utilizado é MeOH e o método maceração a temperatura ambiente por 3 dias), a amostra foi submetida a 7 repetições do método, até exaurir o material vegetal. *Método 3* (Solvente utilizado é EtOH 95% e o método maceração a temperatura ambiente por 2 dias), a amostra foi submetida a 6 repetições do método, até exaurir o material vegetal. *Método 4* (Solvente utilizado é EtOH : H₂O (70 : 30) e o método maceração a temperatura ambiente por 3 dias), a amostra foi submetida a 5 repetições do método, até exaurir o material vegetal. *Método 5* (Solvente utilizado é EtOH 95% levado ao ultrassom por 10 minutos e aquecimento a 40°C por 5 dias), a amostra foi submetida a 8 repetições do método, até exaurir o material vegetal. *Método 6* (Solvente utilizado nas 3 primeiras extrações é Hexano e o método maceração a temperatura ambiente. Na segunda etapa o solvente é EtOH 95% levado ao ultrassom por 10 minutos e aquecimento a 40°C), a amostra foi submetida a 8 repetições do método, até exaurir o material vegetal. *Método 7* (Solvente utilizado é o MeOH + 1% NH₄OH e o método maceração a temperatura ambiente por 7 dias), a amostra foi submetida a 2 repetições do método, até exaurir o material vegetal.

Com isso verificou-se através do cálculo do rendimento, que não era possível definir somente um método de extração para as diferentes partes da planta (folha, galho e casca). Como esse projeto tem como interesse o isolamento de substâncias com atividade antimalárica foi realizado em conjunto com o rendimento, teste antimalárico *in vitro* dos

extrados e análise de EM associado à PCA, a fim de definir qual a melhor metodologia de extração para o estudo bioguiado, para isolamento de substâncias ativas e de preferência inéditas.

Os rendimentos globais dos extratos (após a reunião dos extratos obtidos por extração sequencial) das diferentes metodologias estão descritos na Tabela 10.

Tabela 10. Rendimento das extrações pelos métodos 1 a 7.

Método	Código da Amostra	Parte da Planta	CCD (Dragendorff)	Rendimento (%)
1	BOA1	Folha	+	3,34
	BOB1	Galho	++	1,08
	BOC1	Casca	+++	1,07
2	BOD1	Folha	+	3,58
	BOE1	Galho	++	1,29
	BOF1	Casca	+++	0,8
3	BOG1	Folha	+	3,44
	BOH1	Galho	++	2,00
	BOI1	Casca	+++	0,65
4	BOJ1	Folha	+	5,06
	BOL1	Galho	++	1,98
	BOM1	Casca	+++	2,34
5	BON1	Folha	+	2,48
	BOO1	Galho	++	0,82
	BOP1	Casca	+++	0,46
6	BOQ1	Folha	+	2,23
	BOR1	Galho	++	0,55
	BOS1	Casca	+++	0,46
7	BOT1	Casca	++++	2,77

NOTA: (+) indica a intensidade da mancha na análise de CCD utilizando a solução Dragendorff como revelador (manchas de cor alaranjada), onde (+) poucos manchas, (++) média quantidade de manchas e acima de (+++) grande intensidade de manchas.

6.1.2 Resultado do teste antiplasmódico *in vitro* dos extratos

Das amostras testadas (Tabela 11), sete (BOC1, BOE1, BOG1, BOI1, BOM1, BON1, BOP1 e BOT1) apresentaram-se ativas, nove (BOA1, BOD1, BOH1, BOJ1, BOL1, BOO1, BOQ1, BOR1, BOS1) apresentaram-se parcialmente ativas, na concentração de 50 µg/mL, inibindo mais de 80% do crescimento *in vitro* da cepa K1 de *P. falciparum*. As amostras BOB1 e BOF1 foram consideradas inativas na concentração de 50 µg/mL, inibindo menos de 50% do crescimento *in vitro* da cepa K1 de *P. falciparum*.

As amostras ativas foram testadas em sete concentrações para determinação de suas CI_{50} (Concentração que inibe 50% do crescimento do *P. falciparum in vitro*). No teste de CI_{50} as nove amostras testadas, três (BOI1, BOP1 e BOT1) foram consideradas ativas e duas (BOD1 e BOG1) foram consideradas parcialmente ativas *in vitro* frente à cepa K1 de *P. falciparum*. O restante foi considerado inativo. Em geral, essa etapa mostra a concentração da atividade antiplasmódica nos extratos das cascas, em acordo com resultados etnobotânicos para uso de *Geissospermum* spp. E apresenta atividade *in vitro* parecida com o relatado para outras espécies do gênero (Quadro 1): *G. argenteum* ($CI_{50} = 4,6 \mu\text{g/mL}$), *G. laeve* ($CI_{50} = 3,1 \mu\text{g/mL}$), *G. vellosii* ($CI_{50} = 2,2 \mu\text{g/mL}$) e *G. sericeum* ($CI_{50} = 1,78\mu\text{g/mL}$) (CAMARGO et al., 2013; SANTOS et al., 2013; MUÑOZ et al., 2000; MBEUKUI et al., 2012; STEELE et al., 2002; BERTANI, et al., 2005).

Tabela 11. Tabela de atividade antimalárica *in vitro* dos extratos de folhas, galhos e cascas.

ATIVIDADE ANTIMALARICA IN VITRO						
Código da Amostra	Parte da Planta	Screening (%)			CI ₅₀	
		50 (µg/mL)	5 (µg/mL)	Classificação da atividade	CI ₅₀ (µg/mL)	Classificação da atividade
BOA1	Folha	73,8	0	PA	-	-
BOB1	Galho	48,9	18,6	I	-	-
BOC1	Casca	81,1	0	A	> 50	I
BOD1	Folha	76,3	43,6	PA	31	PA
BOE1	Galho	84,5	51,2	A	> 50	I
BOF1	Casca	37,5	8,1	I	-	-
BOG1	Folha	81,7	27,1	A	25,7	PA
BOH1	Galho	64,6	24,5	PA	-	-
BOI1	Casca	88,1	33,1	A	14,5	A
BOJ1	Folha	67,8	12,8	PA	-	-
BOL1	Galho	58,1	17,5	PA	-	-
BOM1	Casca	80	22,7	A	> 50	I
BON1	Folha	85,3	33	A	33	I
BOO1	Galho	57,2	2,2	PA	-	-
BOP1	Casca	86,7	29,5	A	12	A
BOQ1	Folha	68,3	28,5	PA	-	-
BOR1	Galho	53,9	0	PA	-	-
BOS1	Casca	66	0	PA	-	-
BOT1	Casca	89,5	10,4	A	9,7	A

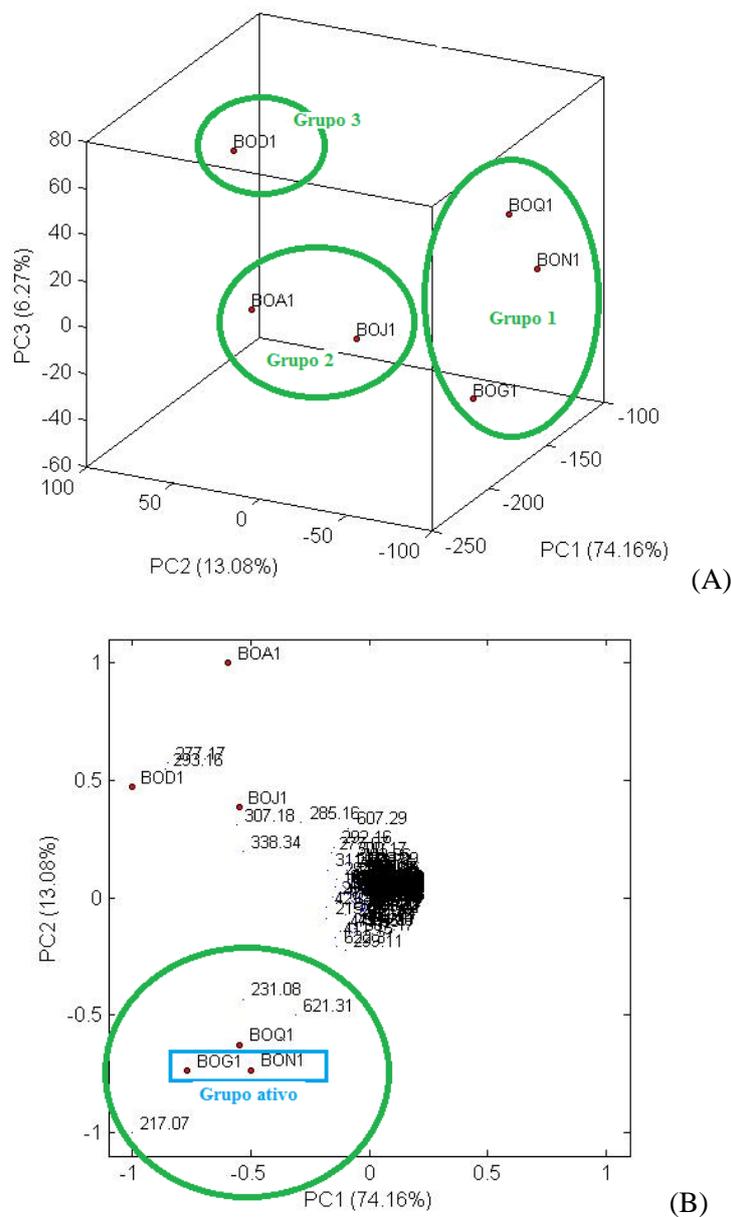
Nota: Inibição do Crescimento e Concentração Inibitória 50% (CI₅₀) *in vitro* da cepa K1 e de *P. falciparum* frente às amostras descritas. Como critério de atividade *in vitro* foi estabelecido que as amostras que inibem o crescimento dos parasitos de 80 a 100% são ativas (A), de 50 a 79% são parcialmente ativas (PA) e < 50% inativa (I). Como critério de atividade *in vitro* foi estabelecido que as amostras com CI₅₀ de < 1 µg/mL é muito ativa (MA), de 1 a 15 µg/mL é ativa (A), de 16 a 30 µg/mL é parcialmente ativa (PA) e > 30 µg/mL é inativa (I).

6.1.3 Perfil químico dos extratos por EM e quimiometria

Na análise dos extratos por espectroscopia de massas observa-se um grande número de picos (m/z) para cada amostra. Percebe-se, ainda, que alguns desses picos principais se repetem na maioria das amostras da mesma parte de planta, como se esperaria. Para auxiliar na interpretação dos resultados, foi utilizado o programa Chemoface, análise estatística (PCA) através do tratamento dos dados obtidos por EM. A análise inicial foi realizada entre as partes da planta separadamente, a fim de se analisar a composição relativa dos extratos e identificar extratos com componentes com m/z associados à atividade antiplasmodial.

No gráfico de PCA das folhas (Figura 18) observam-se três grupos principais que possuem amostras que correlacionam entre si, onde o Grupo 1 é composto pelas amostras BOG1, BON1 e BOQ1, o Grupo 2 é composto por BOA1 e BOJ1 e o Grupo 3 é composto por BOD1. Mas quando correlacionamos estas amostras com os resultados do teste de atividade *in vitro*, onde somente as amostras BOG1 e BON1 foram ativas na redução do crescimento do parasita. Essas 2 amostras estão dentro do grupo 1, e de acordo com os dados estatísticos (Figura 19B) os picos que estão correlacionando esses extratos são m/z 231,08, 621,31 e 217,07, sendo que o pico m/z 217,07 esta correlacionando as duas amostras mais ativas das folhas (BOG1 e BON1) na redução do crescimento do parasita. Como sugestão de classe de possíveis substâncias destes íons, é que são alcaloides. Quando comparados com os alcaloides descritos no gênero (Quadro 2), não há nenhuma correlação aparente, podendo ser fragmento de alguma substância ou uma substância ainda não descrita no gênero.

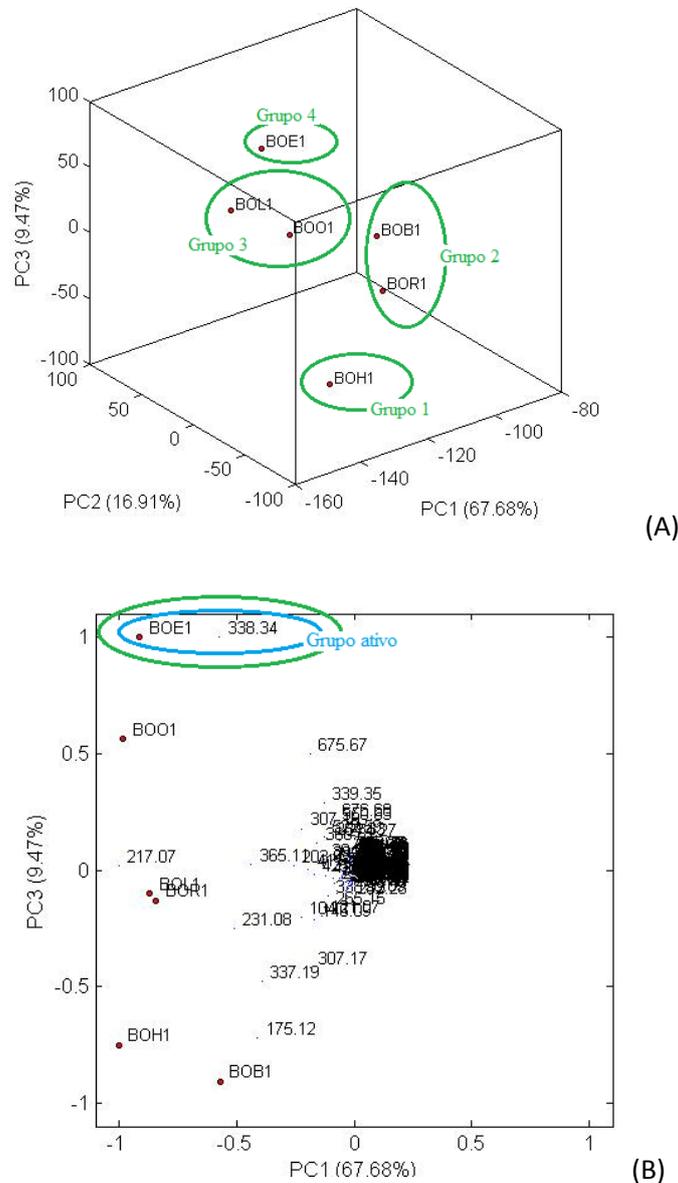
Figura 18. Gráfico de escore de PCA (A) e biplot (B) para os dados das folhas.



No gráfico de PCA dos galhos (Figura 19) observam-se quatro grupos. O Grupo 1 é composto apenas pelo extrato BOH1, o Grupo 2 é composto pelos extratos BOR1 e BOB1, o Grupo 3 é composto pelo extrato BOL1 e BOO1 e o Grupo 4 é composto apenas pelo extrato BOG1. Quando correlacionamos estes extratos com os resultados do teste de atividade *in vitro* para os extratos de galhos, somente o extrato BOE1 foi ativo na redução do crescimento do parasita, etapa do screening. Esse extrato encontra-se sozinho dentro de um grupo, sem correlação significativa com nenhum outro extrato. De acordo com os dados estatísticos o pico que está diferenciando essa das outras é o m/z 338,34. A amostra BOE1 teve inibição do

crescimento, mas o CI_{50} foi alto (inativo) e os demais extratos de galhos não apresentaram resultado significativo frente às cepas testadas.

Figura 19. Gráfico de escore de PCA (A) e biplot (B) para os dados dos galhos.

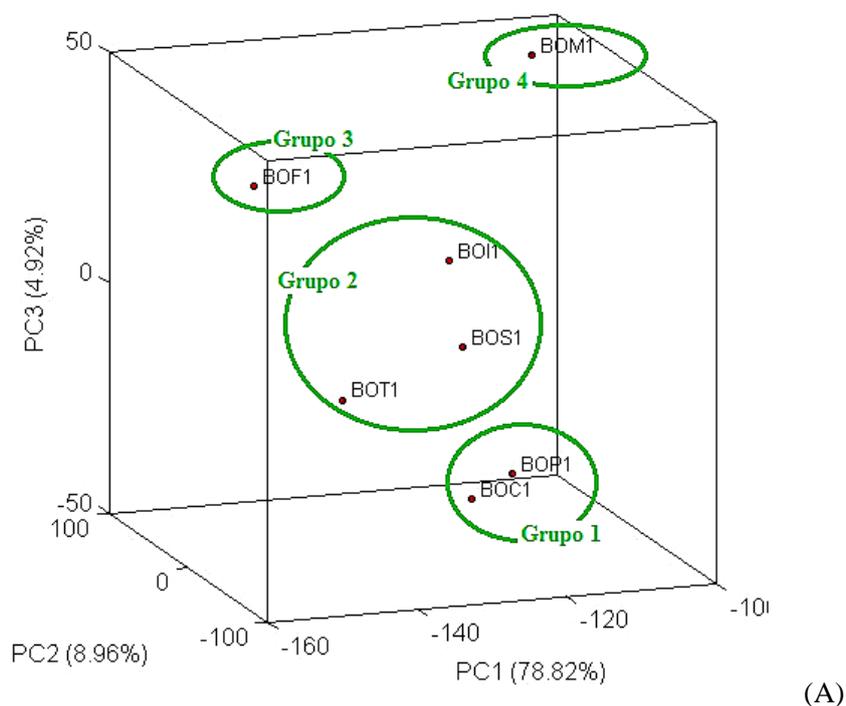


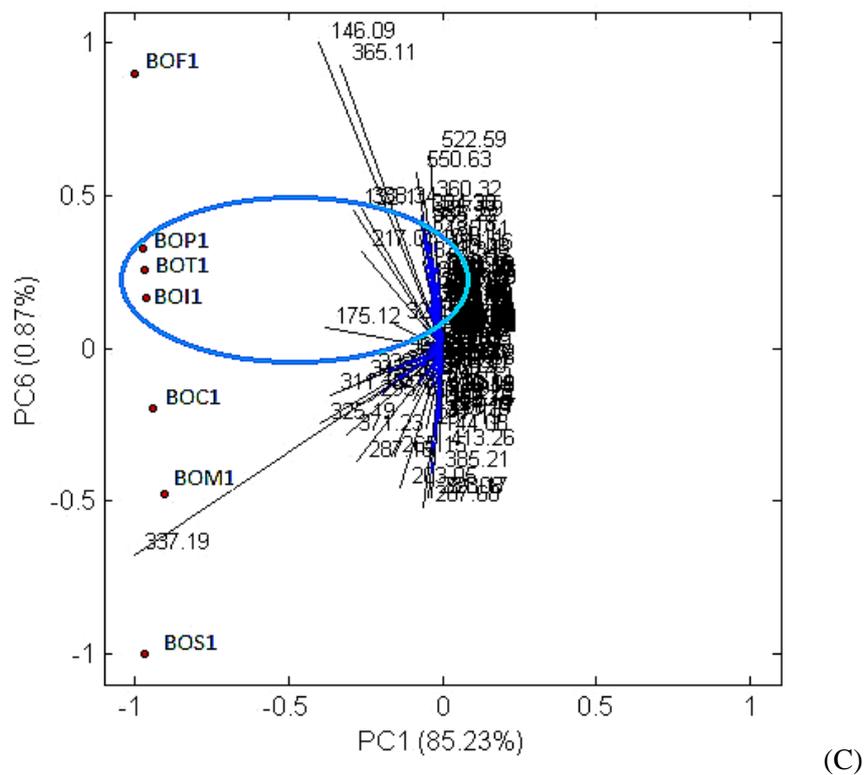
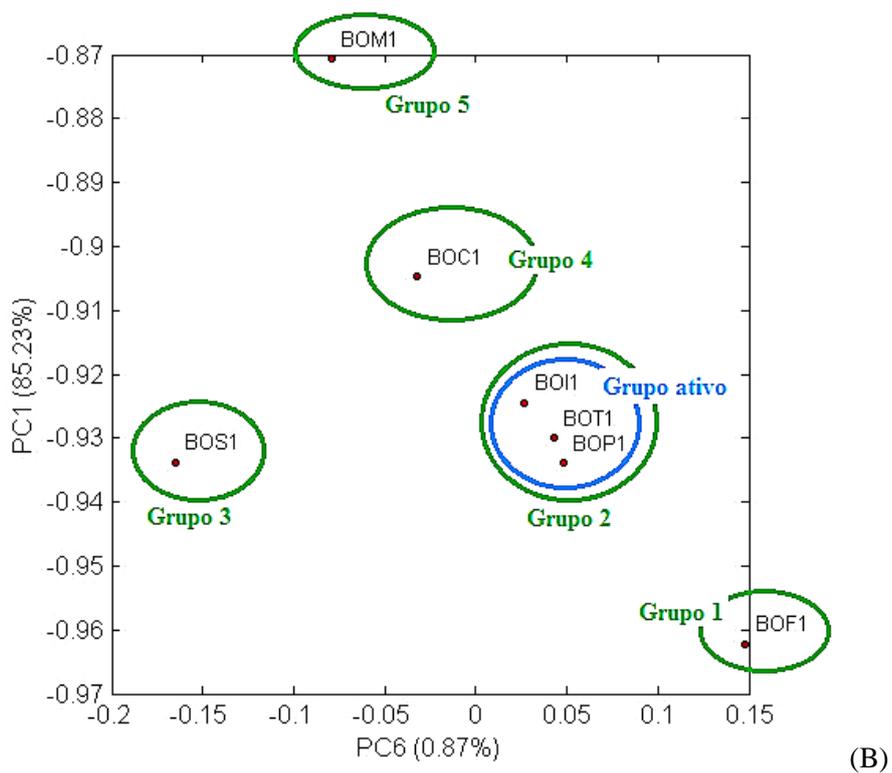
No gráfico de PCA das cascas (Figura 20 (A)) observam-se quatro grupos principais que possuem extratos que correlacionam entre si. O Grupo 1 é composto pelos extratos BOC1 E BOP1. O Grupo 2 é composto por BOI1, BOT1 e BOS1 e os grupos 3 e 4 são compostos por apenas 1 extrato cada, onde o Grupo 3 é composto pelo extrato BOF1 e o Grupo 4 é composto pelo extrato BOM1. Na relação entre PC1, PC2 e PC3 não existe correlação entre as amostras BOI1, BOP1 e BOT1 que são amostras que apresentam atividade na redução do crescimento do parasita (superior a 80%, concentração 50 $\mu\text{g/mL}$) e

na inibição do crescimento CI_{50} . Entretanto, observa-se que a amostra BOF1 está sozinha em um grupo, essa foi a única amostra da casca inativa nos 2 testes de atividade.

Para haver uma correlação entre as amostras das cascas (amostras com atividade antimalárica *in vitro*) foi necessário um pré-processamento dos dados (os dados foram normalizados antes de aplicar PCA). Relacionando PC1 e PC6 observou-se correlação entre as amostras BOI1, BOP1 e BOT1. De acordo com os dados estatísticos os íons m/z que esta correlacionando essas amostras são os três picos principais m/z : 329,18; 175,18; 217,07. Como sugestão de classe de possíveis substâncias destes íons, é que são alcaloides. Quando comparados com os alcaloides descritos no gênero (Quadro 2), não há nenhuma correlação aparente, podendo ser fragmento de alguma substância ou uma substância ainda não descrita no gênero. Acredita-se que alguns desses íons possam estar relacionados com os resultados positivos para atividade antimalárica.

Figura 20. Gráfico de escore de PCA (A) e biplot (B) para os dados das cascas.





Dentre todos os extratos analisados e os íons correlacionados no estudo quimiométrico associado à atividade nos extratos de casca e folhas o íon em comum é o m/z

217,07. Esse íon não foi correlacionado a nenhuma substância descrita no gênero neste estudo inicial.

Foram identificados outros íons correlacionados aos três extratos ativos da casca, dentre esses o íon *m/z* esses são comuns nos três extratos numa proporção parecida: 337,19 (100%), 325,19 (>50%), 365,10 (<50%), 371,23 (<40%), 287,18 (<30%), 339,20 (<20%). Ao correlacionar esses íons com as principais substâncias isoladas do gênero *Geissospermum* Allemão (Quadro 2), podemos sugerir que o íon 371 seja a substância **16** (aspidocarpina) e íon 339 seja a substância **23**, para os demais íons não foi encontrado correlação com as substâncias descritas na literatura para o gênero (CAMARGO *et. al*, 2013). Das substâncias propostas a **16** (aspidocarpina) possui atividade antimalárica comprovada (CI₅₀ 0,019) (ANDRADE-NETO & POHLIT *et. al*, 2007).

Com base nos dados encontrados no PCA, teste *in vitro* e rendimentos, definiu-se que o melhor método de extração é o sete (7). Pois entre as três amostras do grupo considerado ativo (BOT1, BOP1 e BOI1) no PCA, a BOT1 possui menor CI₅₀ e maior rendimento nas extrações. Com base nesses resultados foi preparado extrato em maior escala utilizando o método 7.

6.2 Estudo das frações e substâncias identificadas

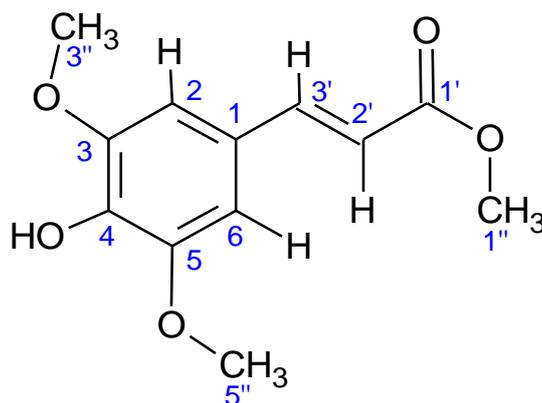
6.2.1 Identificação das substâncias

Todas as substâncias obtidas nesse trabalho foram caracterizadas por técnicas uni e bidimensionais de RMN ¹H e ¹³C, cujos espectros estão incluídos nos anexos. As substâncias também foram caracterizadas por CL-EMAR.

6.2.2.1 Identificação estrutural de BO12CP31 (Sinapato de metila) (S2)

Os aspectos importantes dos espectros de RMN ¹H e ¹³C, DEPT, COSY, HSQC, HMBC e LC/MS da substância (S2) (Figura 21) estão discutidos nos tópicos a seguir levando a identificação da substância isolada (Tabela 12 e 13, Anexos 1 (A e B), 2, 3, 4, 5, 6 e 7).

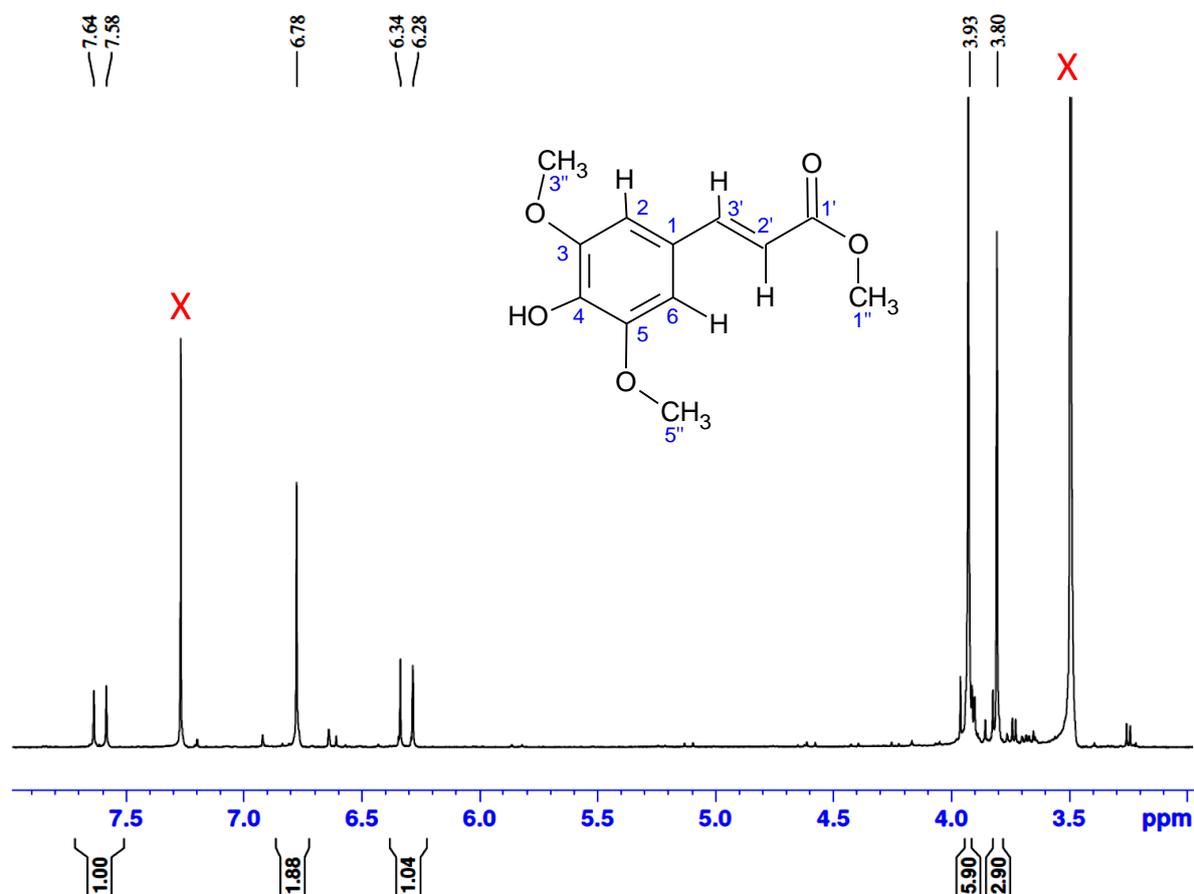
Figura 21. Sinapato de metila (4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil-2-propenoato de metila), substância S2.



Análise de espectro de RMN ¹H da substância BO12CP31 (S2)

No espectro de RMN de ¹H (Anexo 1A) da BO12CP31 observam-se na ampliação do espectro na região δ 8,0 a 3,0 (Figura 22) dubletos em δ 7,60 (H-3') e outro em δ 6,30 (H-2'), ambos com integração equivalente a 1 hidrogênio, constante de acoplamento de 16 Hz, que são característicos de hidrogênios vinílicos acoplados. Um singlete em δ 6,78 com integração equivalente a 2 hidrogênios, foi atribuído aos H-2 e H-6 (anel aromático) e possuem o mesmo deslocamento devido a simetria da molécula. Também singletos em δ 3,92 (H-3'' e H-5''), com integral equivalente a 6 hidrogênios referente as metoxilas do anel aromático e o outro, em δ 3,98 (H-1''), com integral equivalente a 3 hidrogênios, referente a metoxila ligada ao carbono C-1'. O hidrogênio δ 3,50 foi identificado como solvente MeOH, para confirmar amostra foi submetida a novo processo de secagem, o espectro de RMN de ¹H realizado após a secagem (Anexo 1 B) confirma que o solvente foi retirado, e foi observado neste espectro o hidrogênio em δ 5,77 que é o hidrogênio da hidroxila (-OH) em C-4.

Figura 22. Ampliação da região de δ 8,0 a 3,0 do espectro de RMN de ^1H da substância S2, em CDCl_3 .



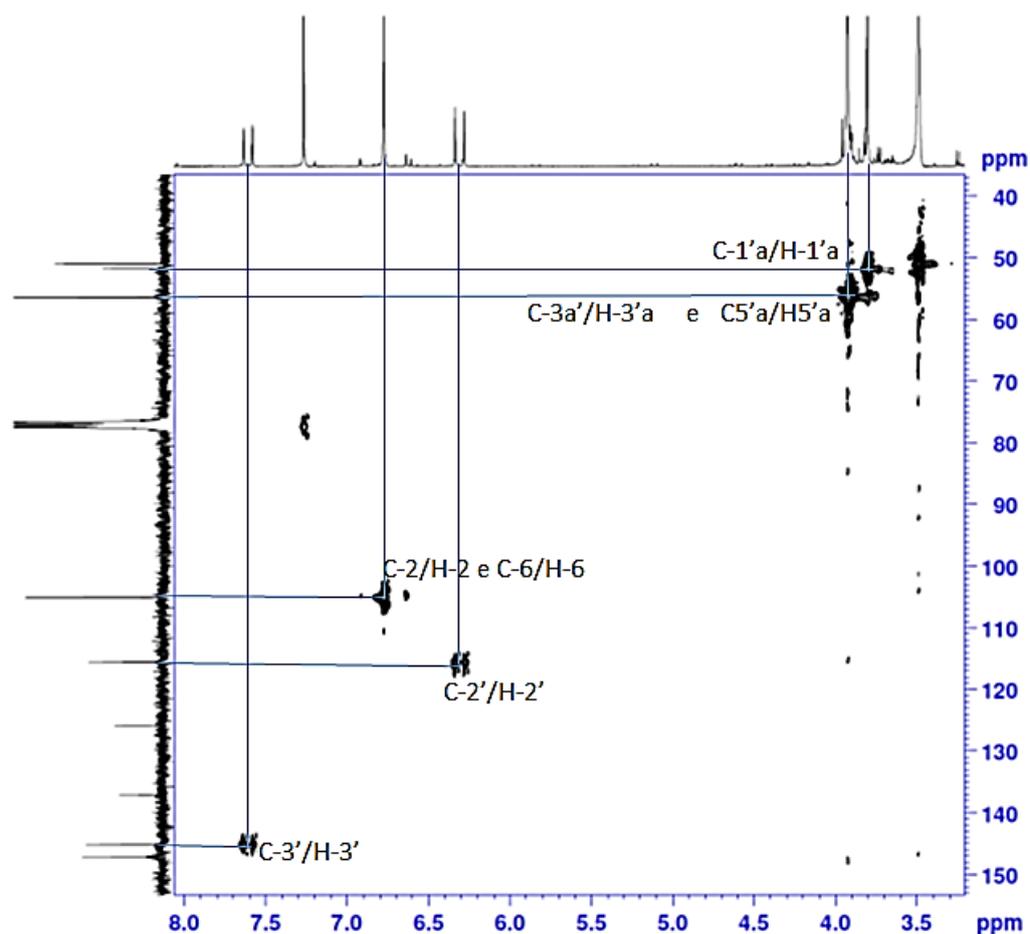
Análise de espectro de RMN de ^{13}C e DEPT 135 da substância BO12CP31 (S2)

O espectro de RMN de ^{13}C da substância (S2) (Anexo 2) apresentou 9 sinais de carbono, onde 3 sinais estão duplicados e são correspondentes a 6 carbonos, devido a simetria da molécula. E o espectro do DEPT 135 (Anexo 3) apresentou 5 sinais de carbono, sendo 2 destes sinais estão duplicados e correspondente a 4 carbonos. Os sinais correspondentes aos carbonos metínicos (CH): C-3' (δ 145,15), C-2' (δ 115,53), C-2 e C-6 (δ 105,01). Carbonos metílicos (CH_3): C-3'' e C-5'' (δ 56,32), C-1'' (δ 51,65). E por comparação com o espectro de RMN ^{13}C , sinais de carbonos quartenários: C-1' (δ 167,61), C-3 e C-5 (δ 147,18), C-4 (δ 137,10), C-1 (δ 125,85) (Tabela 14).

Análise do espectro de HSQC da substância BO12CP31 (S2)

Uma ampliação do espectro de HSQC (Anexo 4) e apresentada na Figura 23 as correlações observadas e estão descritas na Tabela 13.

Figura 23. Ampliação da região de δ 40 a δ 150 do espectro de HSQC da substância S2, em CDCl₃.



Análise do espectro de HMBC da substância BO12CP31 (S2)

No espectro de HMBC (Anexo 5) são observadas as seguintes correlações entre os sinais de hidrogênio e carbono em 2J e 3J .

Na ampliação do espectro de δ 100 a δ 180 (Figura 24) destacam-se as seguintes correlações (Figura 24) entre hidrogênio e carbono, em 2J : entre o H-2 e o C-1', H-2 e o C-3, H-6 e o C-5, H-3' e o C-1, H-2 e o C1, H-6 e o C-1, H-3' e o C-2'. As correlações entre hidrogênio e carbono em 3J , observadas foram: entre o H-3' e o C-1', H-1'' e o C-1', H-3'' e o C-3, H-5'' e o C-5, H-2 e o C-3', H-6 e o C-3', H-2 e o C-4, H-6 e o C-4, H-2' e o C-1, H-3' e o C-2, H-3' e o C-6, H-2 e o C-6, H-6 e o C-2.

Figura 24. Ampliação da região de δ 100 a δ 180 do espectro de HMBC da substância S2, em CDCl_3 .

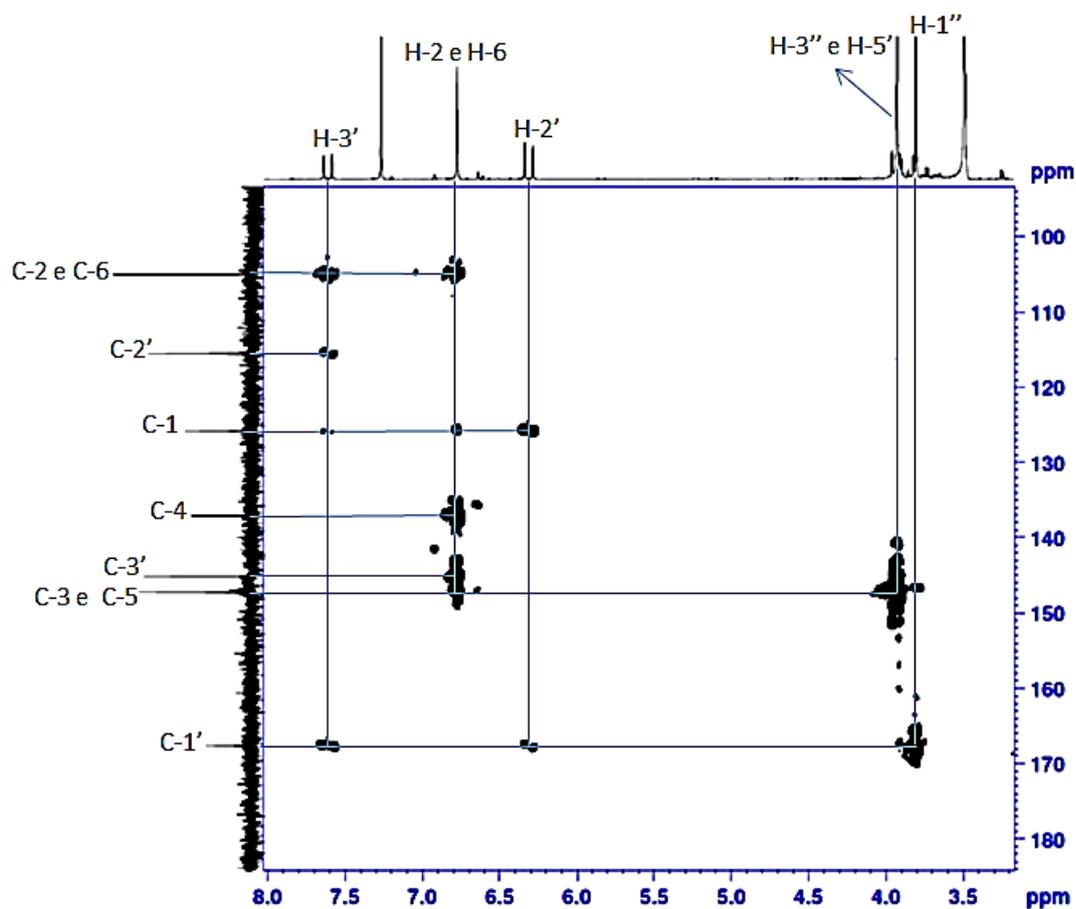
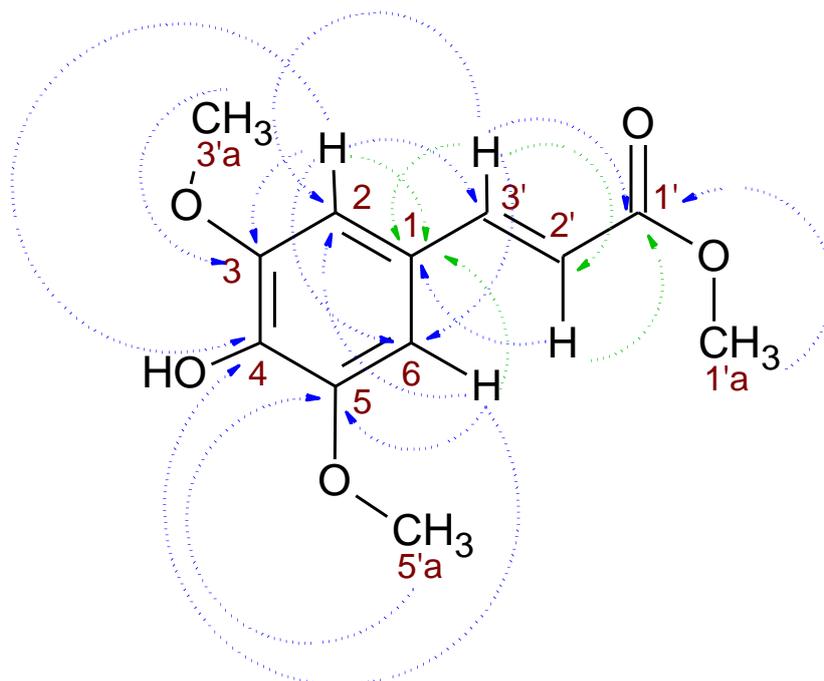


Figura 25. Principais correlações do espectro de HMBC da substância S2, em CDCl_3 .



NOTA: Na figura estão as principais correlações do HMBC, onde as setas em azul são as correlações em 3J e as setas em verde são as correlações em 2J .

Análise do espectro de COSY da substância BO12CP31 (S2)

No espectro de COSY (Anexo 6) são observadas as seguintes correlações entre os sinais de hidrogênio em 3J , 4J e 5J . Observando a Figura 26, destaca-se a correlação de 3J entre o H-3' e o H-2'. Também é observado correlação de 4J entre o H-3' e os H-2 e H-6. As correlações de 5J também foram observadas, entre o H-2 e os H-3'a e H-2', e entre o H-6 e os H-5'a e H-2'.

Figura 26. Principais correlações observadas no espectro de COSY da substância S2.

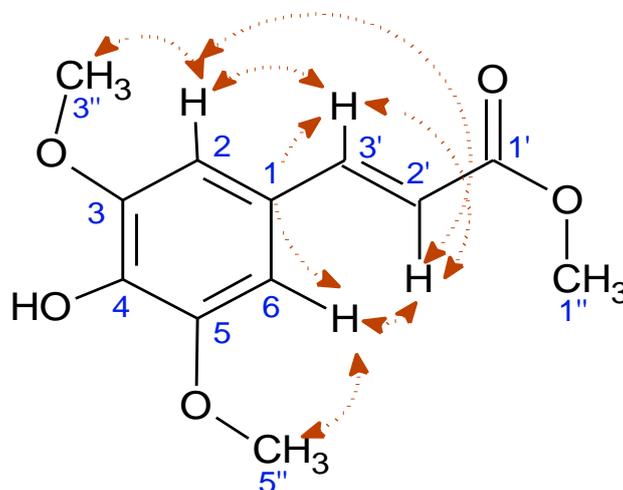


Figura 27. Espectro de COSY da substância S2.

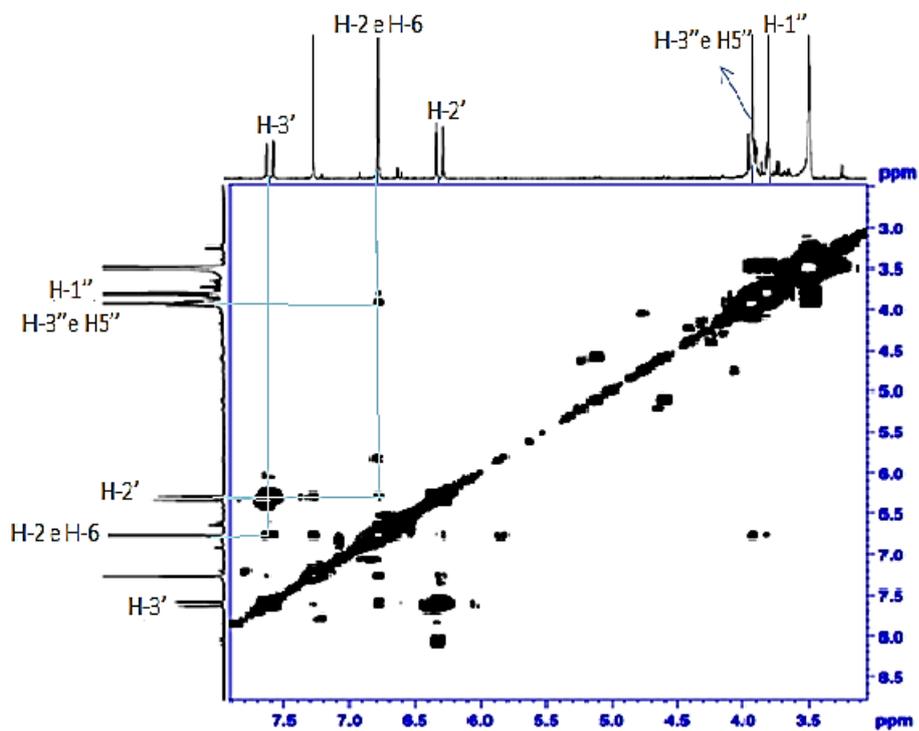


Tabela 12. Dados de RMN de ^1H e COSY do Sinapato de metila (substância S2).

Nº H	Substância S2 (CDCl ₃ , 300MHz)	
	δ (ppm), mult., J (Hz) e Int.	COSY
1''	3,80; s; 3H	-
2 e 6	6,78; s; 2H	3,92 ; 6,30
2'	6,30; d; 16; 1H	-
3'	7,60; d; 16; 1H	6,30 ; 6,78
3'' e 5''	3,92; s; 6H	-
OH	5,77; s; 1H	-

Tabela 13. Dados de RMN de ^{13}C , HSQC e HMBC do Sinapato de metila (substância S2).

N° C	Substância S2 (CDCl ₃ , 75MHz e 500MHz)		
	δ (ppm), mult.	HSCQ	HMBC
1	125,85; C	-	7,60 ; 6,30 ; 6,78
1'	167,61; C	-	7,60 ; 6,30 ; 3,80
1''	51,65; CH ₃	3,80	-
2 e 6	105,01; CH	6,78	7,60 ; 6,78
2'	115,53; CH	6,30	7,60
3	147,18; C	-	6,78 ; 3,92
3'	145,15; CH	7,60	6,78
3'' e 5''	56,32; CH ₃	3,92	-
4	137,10; C	-	6,78
5	147,18; C	-	6,78 ; 3,92

Tabela 14. Dados de RMN de ^1H do Sinapato de metila (substância S2) e da literatura.

N° H	Substância 2 (CDCl ₃ , 300 MHz)			Othman@Ghazali, 2012 (CDCl ₃ , 400MHz)		
	δ (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)	δ (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)
1''	3,80	s	-	3,80	s	-
2 e 6	6,78	s	-	6,77	s	-
2'	6,30	d	16	6,30	d	16
3'	7,60	d	16	7,60	d	16
3'' e 5''	3,92	s	-	3,92	s	-
4-OH	5,77	s	-	5,76	s	-

Tabela 15. Dados de RMN de ^{13}C do Sinapato de metila (substância S2) e da literatura.

Nº C	Substância 2 (CDCl ₃ , 75MHz)		Othman@Ghazali, 2012 (CDCl ₃ , 100MHz)	
	δ (ppm)	Multiplicidade	δ (ppm)	Multiplicidade
1	125,85	C	126,5	C
1'	167,61	C	167,8	C
1''	51,65	CH ₃	52,1	CH ₃
2	105,01	CH	105,4	CH
2'	115,53	CH	115,19	CH
3	147,18	C	147,6	C
3'	145,15	CH	145,5	CH
3''	56,32	CH ₃	56,7	CH ₃
4	137,10	C	137,5	C
5	147,18	C	147,6	C
5''	56,32	CH ₃	56,7	CH ₃
6	105,01	CH	105,4	CH

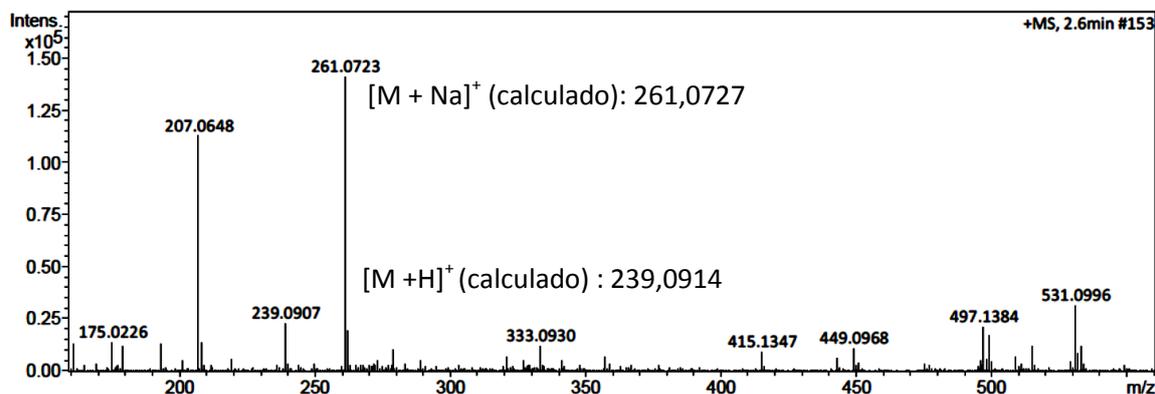
Com esses dados obtidos nas análises de RMN a substância S2 foi definida como Sinapato de metila em comparação dos dados da literatura conforme descrito nas Tabelas 14 e 15 (OTHMAN@GHAZALI, 2012; OHKATSU et al., 2008; Li & GUO, 2017).

Análise de espectro de massa da substância BO12CPI (S2)

No espectro de massa por *electrospray* de alta resolução (ESI-EMAR) (Figura 28) observa-se o pico m/z 261,0723, como íon aduto, onde se sugere adição de Na^+ a estrutura $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_5$ (calculado m/z 261,0727), com um erro de $\Delta= 1,53$. Foi observado ainda o íon m/z 239,0907, íon correspondente ao aduto de H^+ , o erro de $\Delta= 2,92$. Esses dados somados aos obtidos nas análises de RMN, corroboraram para a identificação da substância 2 foi definida

como Sinapato de metila (OTHMAN@GHAZALI, 2012; OHKATSU *et al.*, 2008; Li & GUO, 2017; MARQUES, 2014).

Figura 28. Espectro de massa por *electrospray* de alta resolução (ESI-EMAR) da substância S2.

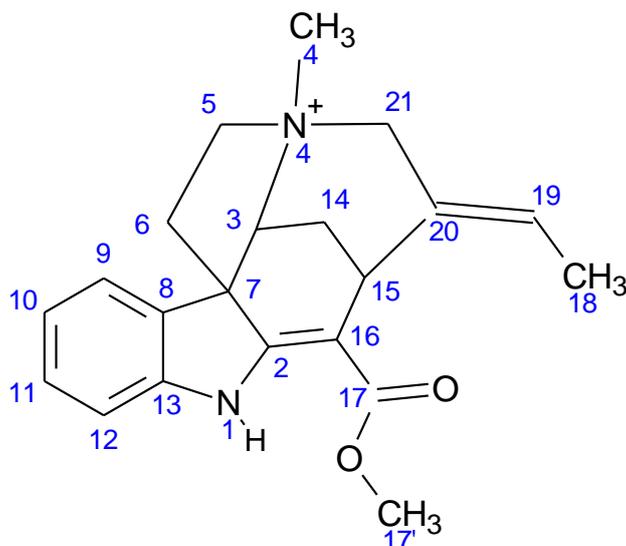


6.2.2.2 Identificação estrutural de BOF24C17P26 (4N-metil-akuamicina) (S3)

A substância S3 foi isolada por 2 metodologias diferentes (Fluxograma 2) e foi identificada como BOF24C17P26 e BODCMIVP26 (essa substancia foi armazenada), foi adotado o código BOF24C17P26 para substância S3 (Figura 29), porque foi a enviada para teste *in vitro*.

Os aspectos importantes dos espectros de RMN de ¹H e de ¹³C, DEPT, COSY, HSQC, HMBC, NOESY e LC/MS da substância (S3) estão discutidos nos tópicos a seguir levando a identificação das substância isolada (Tabela 16 e 17, Anexos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 e 15).

Figura 29. 4*N*-metil-akuamicina (Curanium, 2, 16, 19, 20-tetrade-hidro-17-metoxi-4- metil-17-oxo). Substância S3.



Análise de espectro de RMN ¹H da substância BOF24C17P26 (S3)

O espectro de RMN de ¹H (Anexo 8) da BOF24C17P26 (Tabela 16) observa-se na ampliação do espectro na região aromática (Figura 30) observam-se dois duplos dubletos, um em δ 7,52 (*J* 7,5 Hz) atribuído ao H-9 e o outro em δ 7,03 (*J* 7,7 Hz) atribuído ao H-12, ambos com integral equivalente a 1 hidrogênio. E dois duplo duplo dubleto, um em δ 7,25 (*J* 7,7; 7,7; 1,0 Hz) atribuído ao H-11 e o outro em δ 6,98 (*J* 7,5; 7,5; 1,0 Hz) atribuído ao H-10, ambos com integração equivalente a 1 hidrogênio. E um quarteto largo em δ 5,80 (*J* \cong 7,5) de hidrogênio vinílico.

Na ampliação do espectro na região δ 4,8 a 1,0 (Figura 31) apresentam-se dois singletos em δ 4,54 e δ 4,18, os sinais apresentam integração equivalente a 1 hidrogênio, foram atribuídos a H-3 e H-15 respectivamente; em δ 4,14 com integração equivalente a 2 hidrogênios, atribuídos aos H-21 α e H-21 β ; em δ 3,84 e δ 3,43, com integração equivalente a 3 hidrogênios, foram atribuídos a H-17' e H-4', que correspondem as metilas ligadas ao grupo éster e ao nitrogênio (N-4). Cinco multipletos, em δ 3,89-3,92 com integração equivalente a 2 hidrogênios, atribuídos aos H-5 α e H-5 β ; em δ 2,88-2,95, δ 2,62-2,65, δ 2,12-2,15 e δ 1,56-1,61 todos com integração equivalente a 1 hidrogênio, atribuídos aos H-6 α , H-14 α , H-6 β e H-14 β , respectivamente. Também foi observado um duplo dubleto em δ 1,75 (*J* 7; 1 Hz), com integração equivalente a 3 hidrogênios, atribuído ao H-18 que corresponde a metila do radical vinil.

Figura 30. Ampliação da região de δ 7,5 a 5,6 do espectro de RMN de ^1H da substância S3, em CD_3OD .

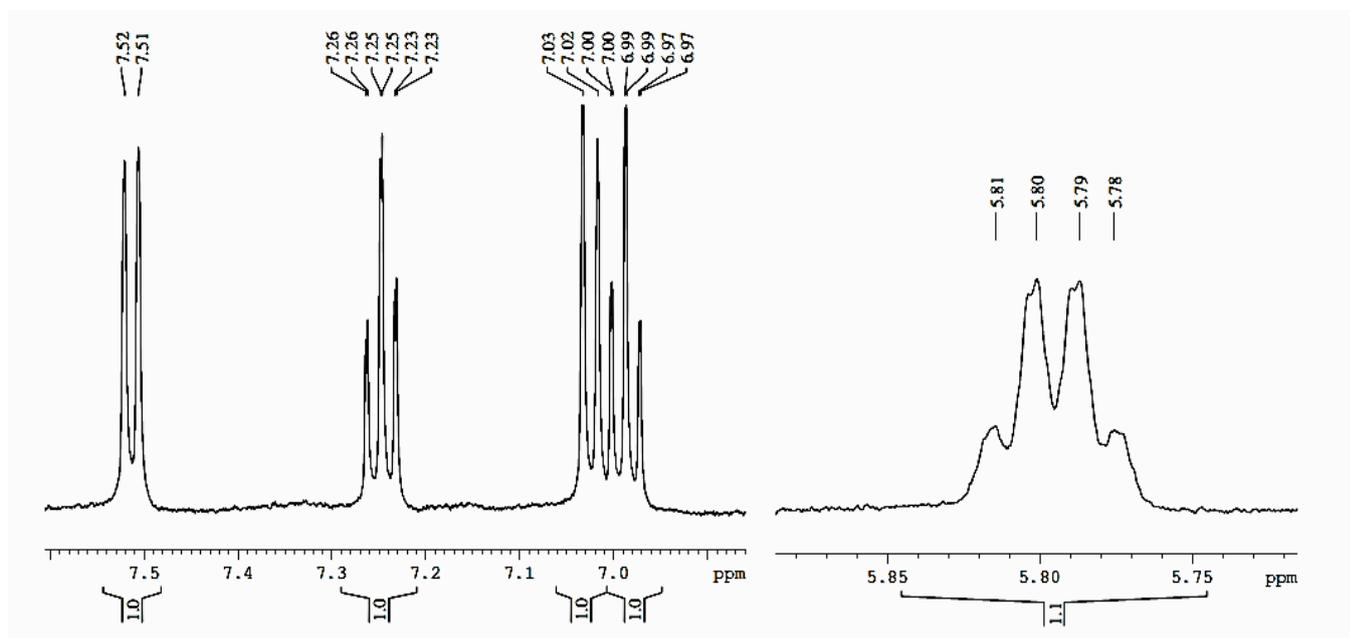
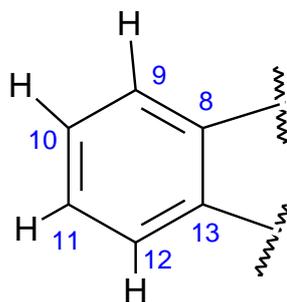
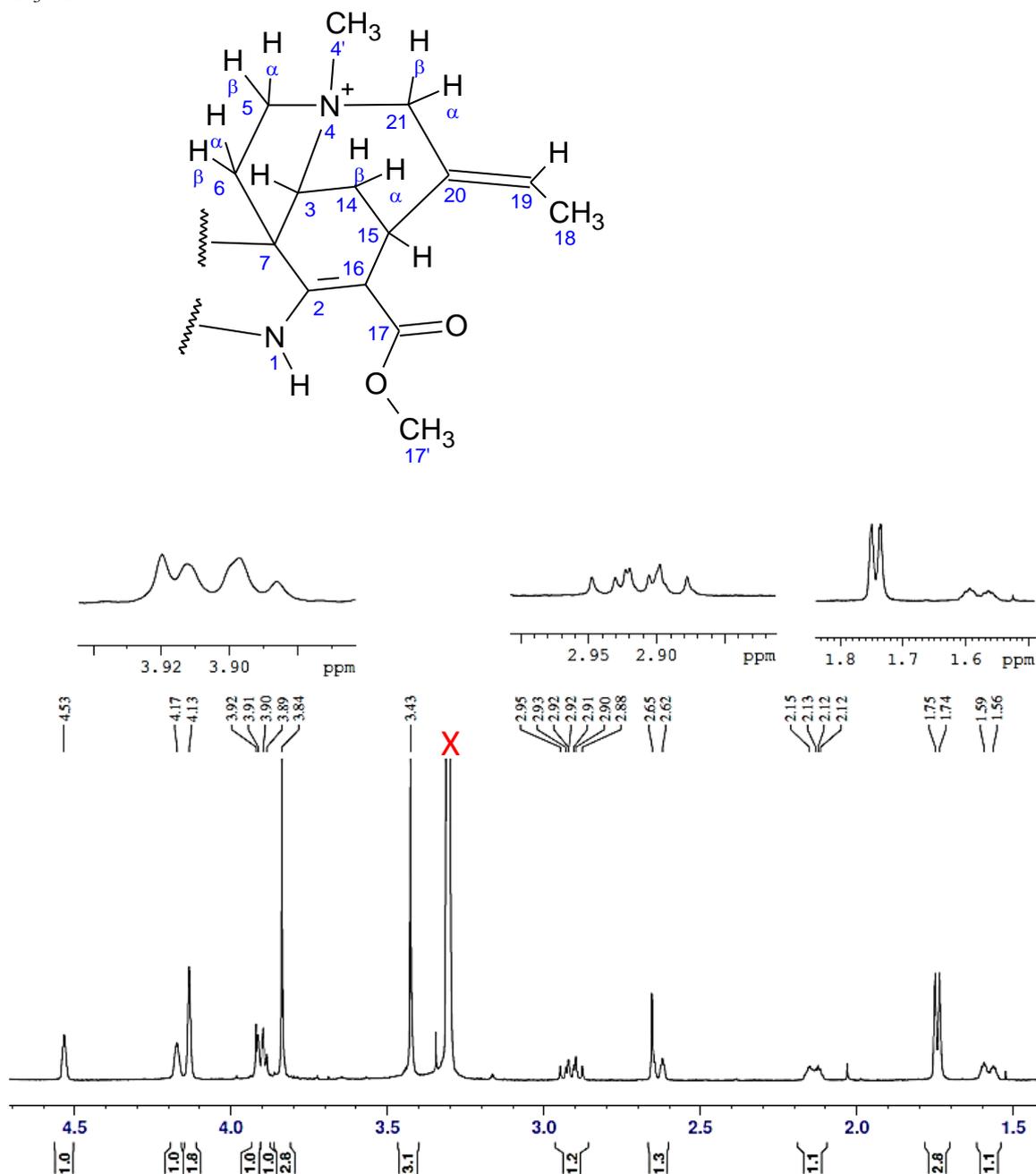


Figura 31. Ampliação da região de δ 4,8 a δ 1,0 do espectro de RMN de ^1H da substância S3, em CD_3OD .



Análise de espectro de RMN de ^{13}C e DEPT 135 da substância BOF24C17P26 (S3)

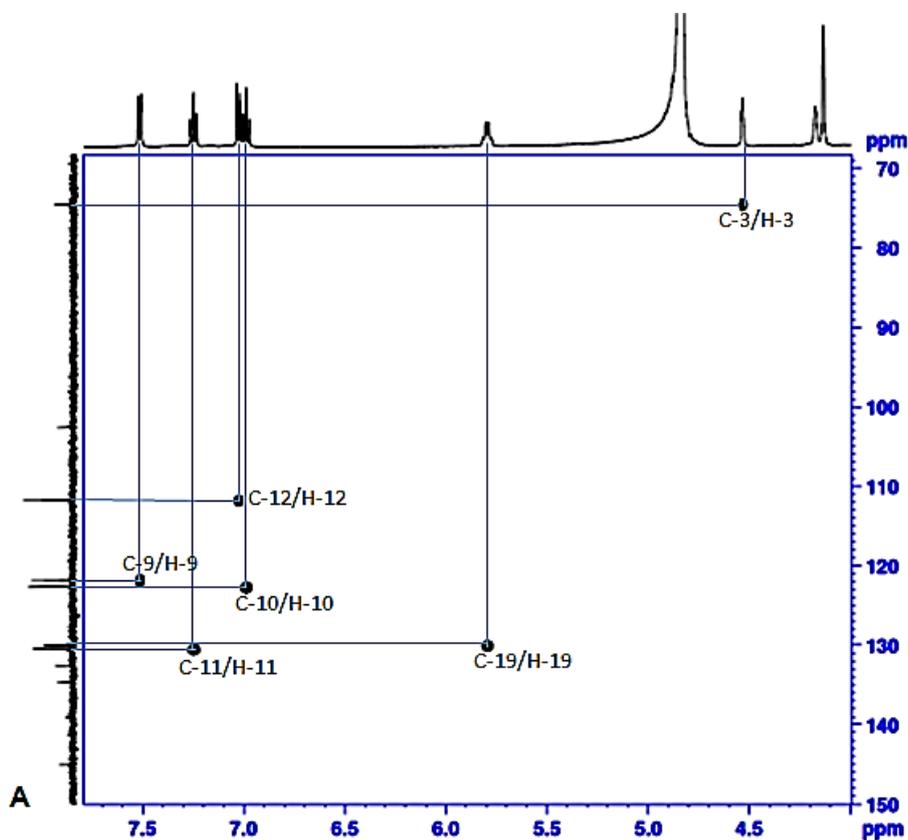
O espectro de RMN de ^{13}C da substância S3 (Anexo 9) apresentou 21 sinais de carbonos. E a análise do DEPT 135 (Anexo 10) apresentou 14 sinais de carbonos. Os sinais correspondentes aos carbonos metínicos (CH): C-11 (δ 130,47), C-19 (δ 130,01), C-10 (δ 122,64), C-9 (δ 121,82), C-12 (δ 111,73), C-3 (δ 74,50), C-15 (δ 29,66). Os sinais de carbono CH_2 (metilênico) :C-21 (δ 66,97), C-5 (δ 65,66), C-6 (δ 43,72), C-14 (δ 28,73). Carbonos

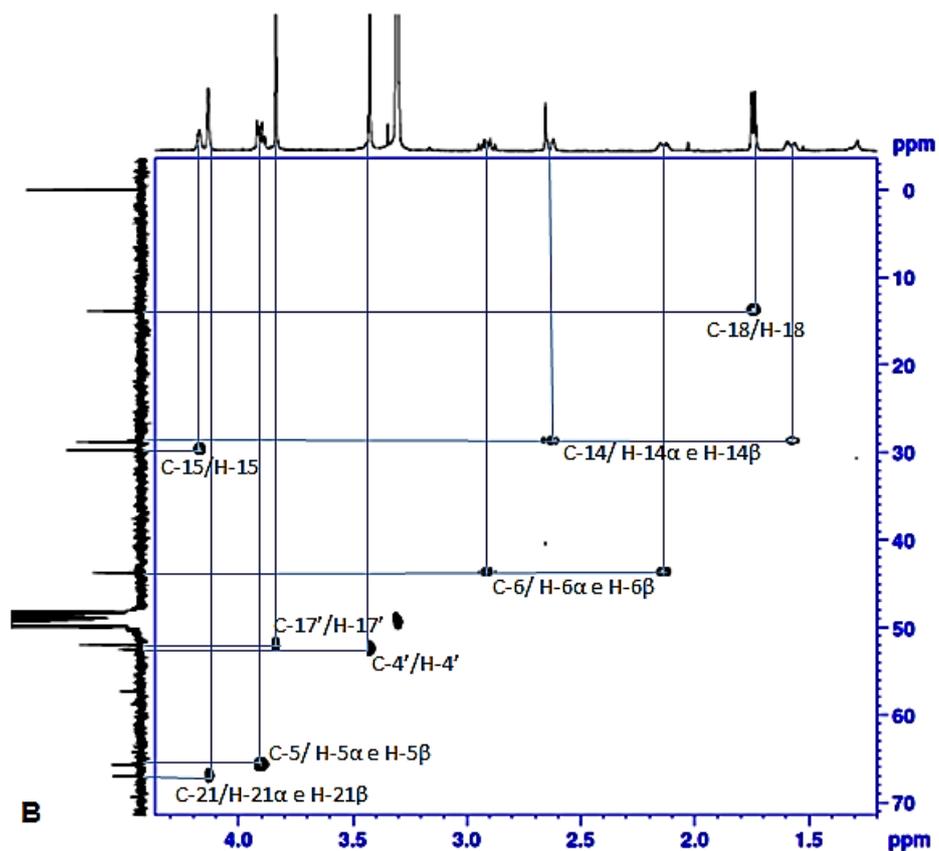
metílicos (CH₃): C-4' (δ 52,46), C-17' (δ 51,94), C-18 (δ 13,79). E sinais de carbonos quartenários: C-17 (δ 168,14), C-2 (δ 164,76), C-13 (δ 145,00), C-8 (δ 134,65), C-16 (δ 102,58), C-7 (δ 57,25) (Tabela 19).

Análise do espectro de HSQC da substância BOF24C17P26 (S3)

Uma ampliação do espectro de HSQC (Anexo 11) e apresentada na Figura 32 as correlações observadas e estão descritas na Tabela 18.

Figura 32. Ampliação da região de δ 70 a δ 150 (A) e de δ 70 a δ 150 (B) do espectro de HSQC da substância S3, em MeOH.



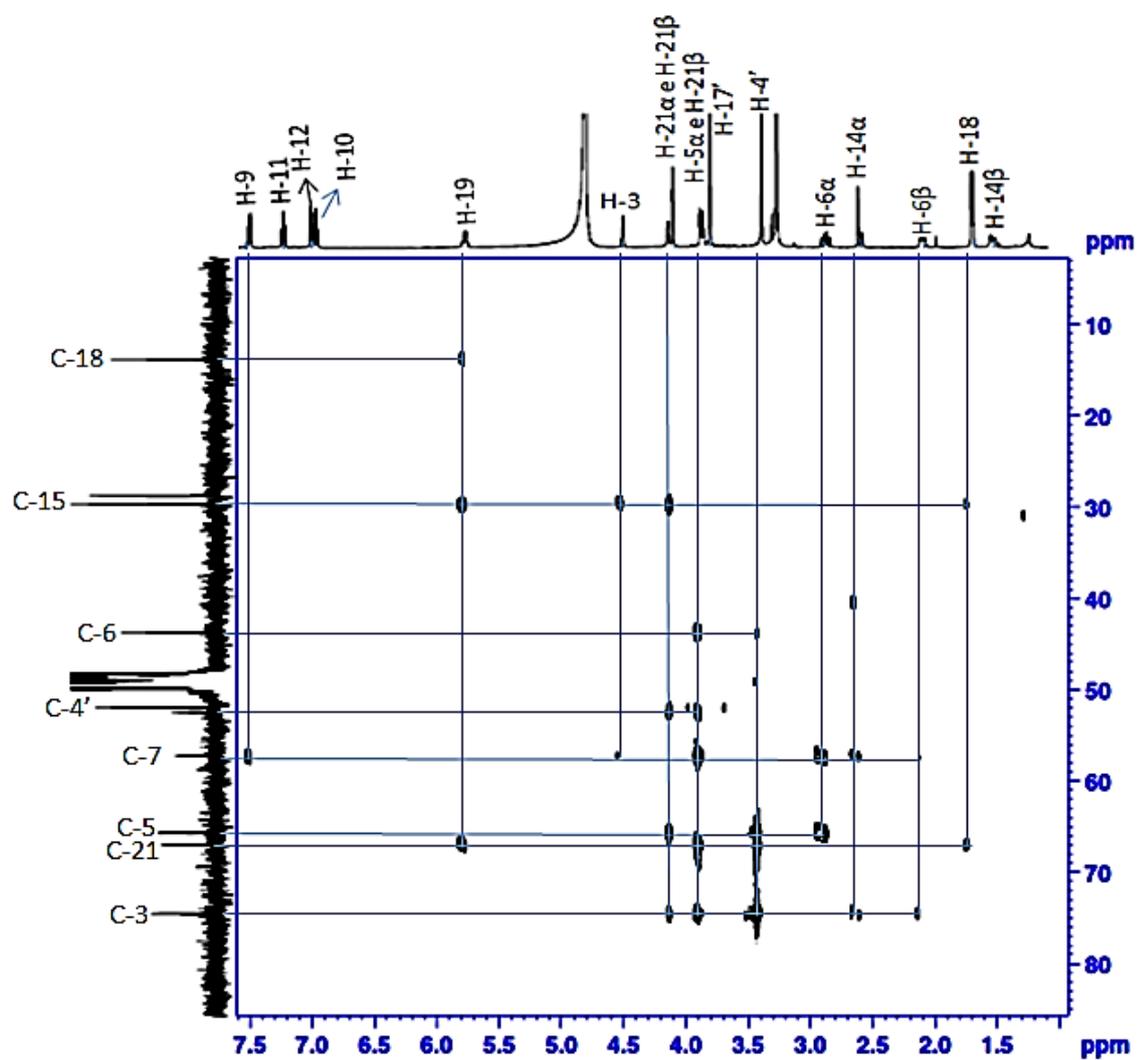


Análise do espectro de HMBC da substância BOF24C17P26 (S3)

No espectro de HMBC (Anexo 12) são observadas as seguintes correlações entre os sinais de hidrogênio e carbono em 2J , 3J e 4J .

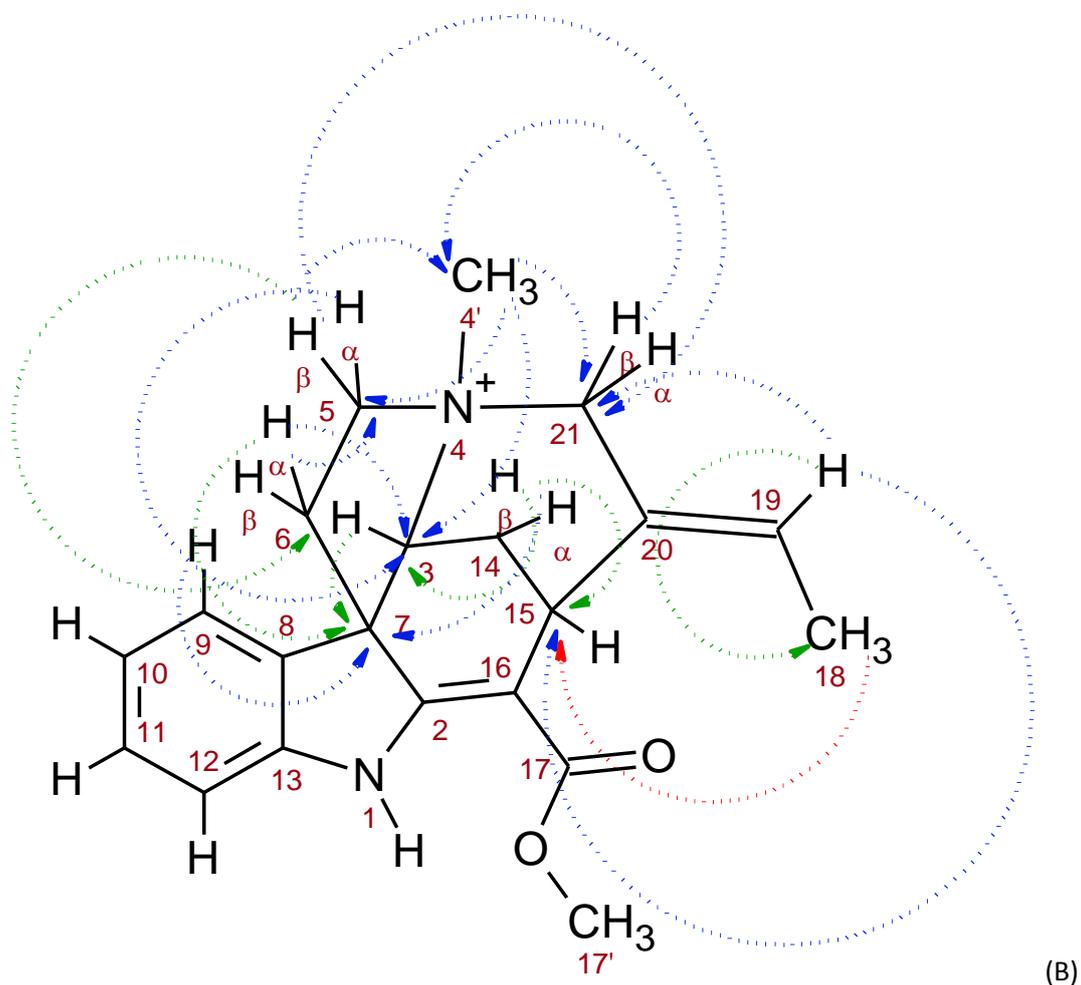
Na ampliação do espectro de δ 5 a 90 (Figura 33A) e as principais correlações desta região (Figura 33B), e a ampliação de δ 90 a 185 (Figura 34A) e as principais correlações desta região. Todas as correlações entre hidrogênio e carbono estão descritas na Tabela 18.

Figura 33. (A) ampliação da região de δ 5 a 90 do espectro de HMBC e (B) as principais correlações do HMBC, da região aromática da substância S3.



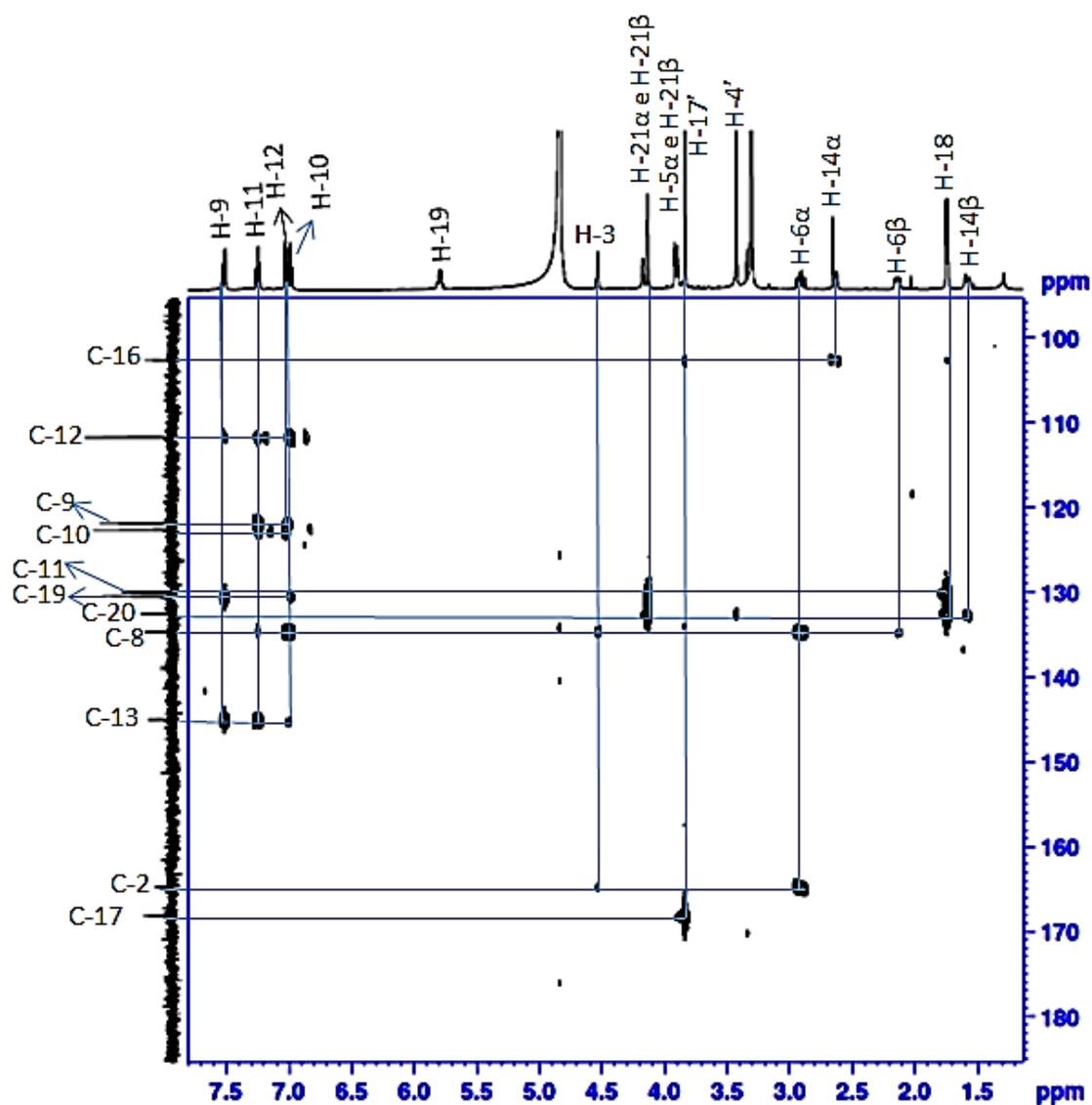
(A)

Figura 33. (A) ampliação da região de δ 5 a 90 do espectro de HMBC e (B) as principais correlações do HMBC, da região aromática da substância S3. (continuação)



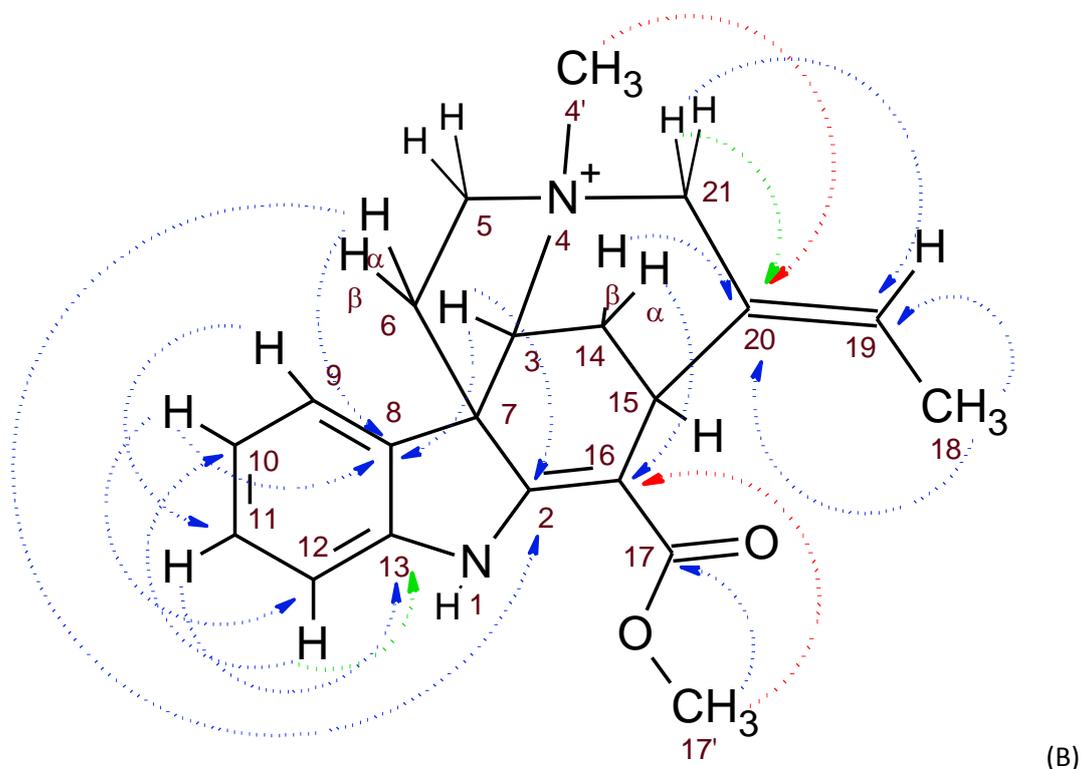
NOTA: Na figura (B) estão as principais correlações do HMBC, onde as setas em azul são as correlações em 3J , as setas em laranja são as correlações em 4J e as setas em verde são as correlações em 2J .

Figura 34. (A) ampliação da região de δ 90 a 180 do espectro de HMBC e (B) as principais correlações do HMBC, da região aromática da substância S3.



(A)

Figura 34. (A) ampliação da região de δ 90 a 180 do espectro de HMBC e (B) as principais correlações do HMBC, da região aromática da substância S3.

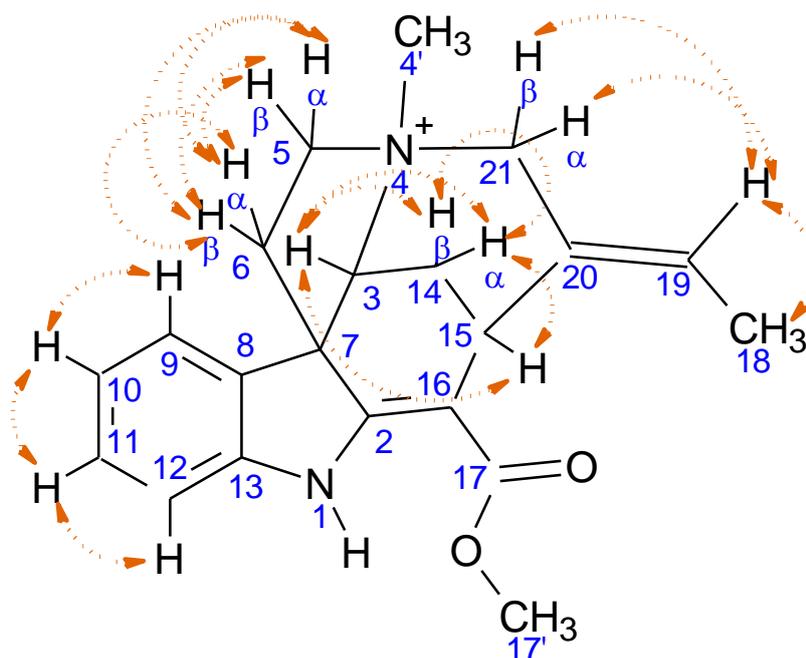


NOTA: Na figura (B) estão as principais correlações do HMBC, onde as setas em azul são as correlações em 3J , as setas em laranja são as correlações em 4J e as setas em verde são as correlações em 2J .

Análise do espectro de COSY da substância BOF24C17P26 (S3)

No espectro de COSY (Anexo 13) são observadas as seguintes correlações entre os sinais de em 2J , 3J , 4J e 5J . Observando a Figura 35, destacam-se a seguinte correlação entre em 2J : entre o H-6 α e o H-6 β e entre o H-14 α e o H-14 β . Correlação em 3J : entre o H-10 e os H-11 e o H-9; entre o H-11 e o H-12; entre o H-19 e o H-18; entre o H-3 e os H-14 α e o H-14 β ; entre o H-15 e o H-14 α ; entre o H-5 α e os H-6 α e H-6 β ; entre o H-5 β e os H-6 α e H-6 β . E correlações em 4J : entre o H-3 e o H-15; entre o H-21 α e o H-19; entre o H-21 β e o H-19. E correlações em 5J : entre H-21 α e H-18; entre H-21 β e o H-18.

Figura 35. Principais correlações e espectro de COSY da substância S3.



Análise do espectro de NOESY da substância BOF24C17P26 (S3)

No espectro de NOESY (Anexo 14) são observadas as seguintes correlações entre os sinais de hidrogênio (Figura 36): entre o H-18 com H-19 e H-15; H-6 α com H-6 β ; H-6 β com H-5 α , H-5 β e H-15; H-4' e com os H-15, H-5 α , H-5 β , H-21 α e H-21 β ; H-21 α com H-4' e H-19; H-21 β com H-4' e H-19; H-19 com H-18, H-21 α e H-21 β .

Figura 36. Correlações observadas no NOESY da substância S3.

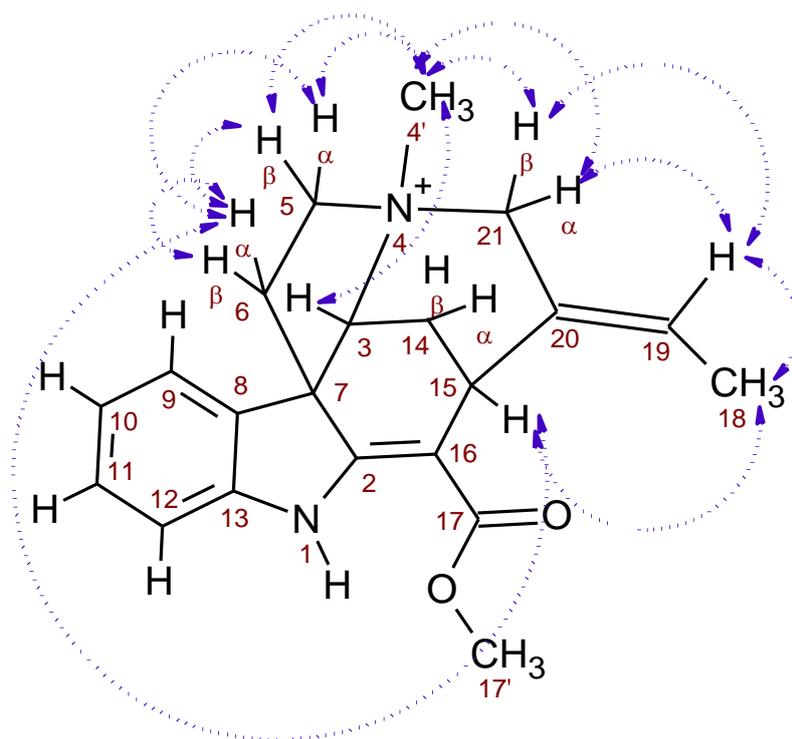


Tabela 16. Dados de RMN de ^1H do 4-*N*-Metil-Akuamicina (substância S3) e a literatura (PROKSA, et al., 1989).

N° H	Substância S3 (4- <i>N</i> -Metil-Akuamicina)	4-metilakaunium cloreto (PROKSA, et al., 1989)
	(CD_3OD , 500 MHz)	(CD_3OD)
	δ (ppm), mult., J (Hz) e Int.	δ (ppm), mult. (literatura)
3	4,54; s; 1H	4,56
4'	3,43; s; 3H	3,45; s
5	3,89-3,91; m; 2H	3,94; m
6 α	2,88-2,95; m; 2H	2,90; ddd
6 β	2,12-2,15; m; 1H	2,12; dd
9	7,52; dd; 7,6; 1H	7,57; ddd
10	6,98; ddd; 7,5/7,5/1; 1H	6,99; ddd
11	7,25; ddd; 7,7/7,7/1,0; 1H	7,24; ddd
12	7,03; dd; 7,6; 1H	7,03; ddd
14 α	2,62-2,65; m; 1H	2,66; ddd
14 β	1,56-1,61; m; 1H	1,55; m
15	4,18; s; 1H	4,16
17'	3,84; s; 3H	3,83; s
18	1,75; s; 3H	1,73; s
19	5,81; q; 1H	5,81; q
21 α e 21 β	4,14; s; 2H	4,16

Tabela 17. Dados de RMN de ^1H do 4-*N*-Metil-Akuamicina (substância S3).

Nº H	Substância S3 (4- <i>N</i> -Metil-Akuamicina) (CD ₃ OD, 500 MHz)		
	δ (ppm), mult., J (Hz) e Int.	COSY	NOESY
3	4,54; s; 1H	1,56-1,61 ; 2,62-2,65 ; 4,18	-
4'	3,43; s; 3H	-	4,54; 4,14; 3,89-3,91
5	3,89-3,91; m; 2H	2,88-2,95 ; 2,12-2,15	-
6 α	2,88-2,95; m; 2H	2,12-2,15	4,18; 3,89-3,91; 2,12- 2,15
6 β	2,12-2,15; m; 1H	-	2,88-2,95
9	7,52; dd; 7,6; 1H	-	-
10	6,98; ddd; 7,5/7,5/1; 1H	7,25 ; 7,52	-
11	7,25; ddd; 7,7/7,7/1,0; 1H	7,03	-
12	7,03; dd; 7,6; 1H	-	-
14 α	2,62-2,65; m; 1H	1,56-1,61	-
14 β	1,56-1,61; m; 1H	-	-
15	4,18; s; 1H	2,62-2,65	-
17'	3,84; s; 3H	-	-
18	1,75; s; 3H	-	5,81; 4,18
19	5,81; q; 1H	4,14 ; 1,75	4,14; 1,75
21 α e 21 β	4,14; s; 2H	5,81 ; 1,75	3,43; 5,81

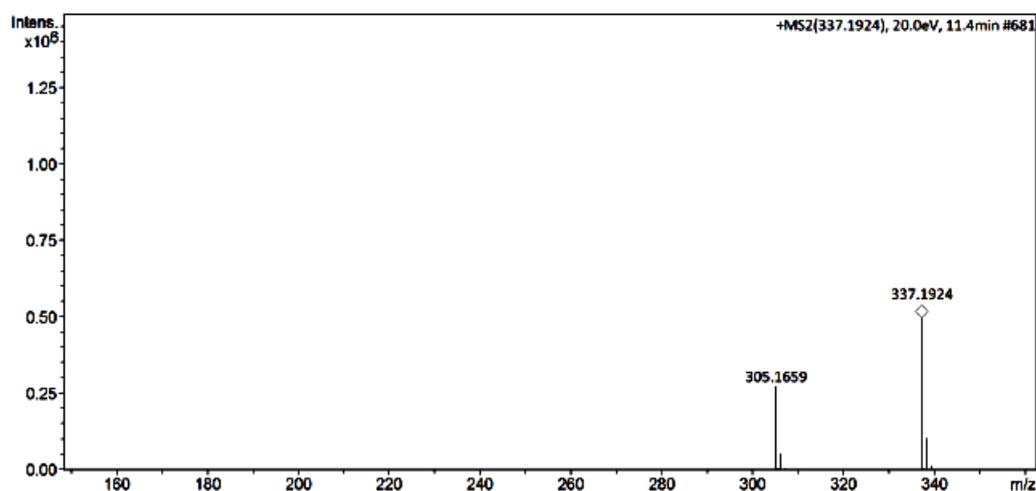
Tabela 18. Dados de RMN de ^{13}C do 4-*N*-Metil-Akuammicine (substância S3).

N° C	Substância S3 (4- <i>N</i> -Metil-Akuamicina) (CD ₃ OD, 75 MHz)		
	δ (ppm), mult.	HSQC	HMBC
2	164,76; C	-	2,88-2,95; 4,54
3	74,50; CH	4,54	2,62-2,65; 3,89-3,91; 2,12-2,15; 3,43; 4,14
4'	52,46; CH ₃	3,43	4,14; 3,89-3,91
5	65,66; CH ₂	3,89-3,91	4,14; 3,4; 2,88-2,95
6	43,72; CH ₂	2,88-2,95 / 2,12-2,15	3,89-3,91; 3,43
7	57,25; C	-	4,54; 2,62-2,65; 7,52; 3,89-3,91; 2,88-2,95; 2,12-2,15
8	134,65; C	-	4,54; 6,98, 7,03; 7,25; 2,88-2,95; 2,12-2,15
9	121,82; CH	7,52	7,25; 6,98
10	122,64; CH	6,98	7,03; 7,25
11	130,47; CH	7,25	7,52; 6,98
12	111,73; CH	7,03	7,52; 6,98; 7,25
13	145,00; C	-	7,52; 7,25; 7,03; 6,98
14	28,73; CH ₂	2,62-2,65 / 1,56-1,61	-
15	29,66; CH	4,18	5,81; 4,54; 4,14; 1,75
16	102,58; C	-	2,62-2,65; 3,84
17	168,14; C	-	3,84
17'	51,94; CH ₃	3,84	-
18	13,79; CH ₃	1,75	5,81
19	130,01; CH	5,81	4,14; 1,75
20	132,59; C	-	1,75; 1,56-1,61; 4,14; 3,43
21	66,97; CH ₂	4,14	5,81; 3,89-3,9; 3,43; 1,75

Análise de espectro de massa da substância BOF24C17P26 (S3)

No espectro de IES-EMAR (Anexo 15) (Figura 37) observa-se o íon m/z 337,1924, onde se sugere a estrutura $C_{25}H_{25}N_2O_2$ (calculado m/z 337,1911), com um erro de $\Delta = 4,74$. Foi observado ainda na fragmentação o íon m/z 305,1659, consiste com a perda de um agrupamento CH_3OH . Com esses dados somados aos obtidos nas análises de RMN a substância S3 foi definida como 4-*N*-metil-akuamicina (curânio, 2,16,19,20-tetra-diidro-17-metoxi-4-metil-17-oxo) (SCIFINDER, 2018).

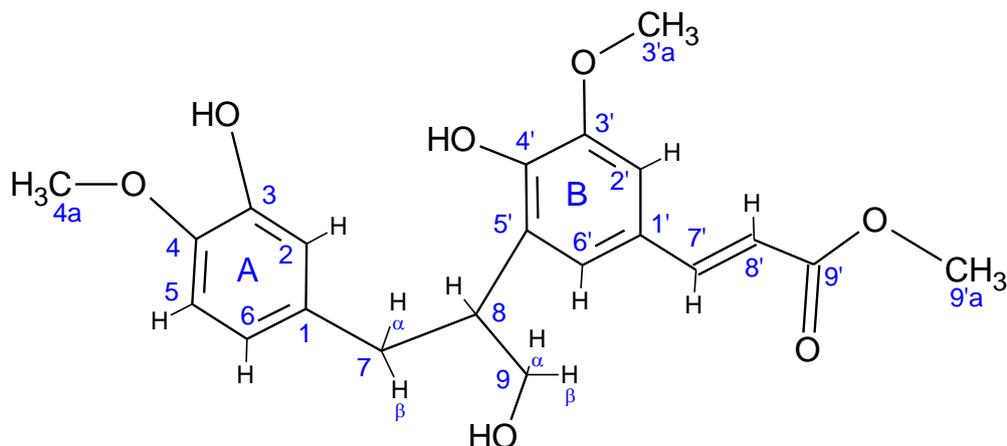
Figura 37. Espectro de massa fragmentação por *electrospray* de alta resolução (HR-ESI-MS) da substância S3.



6.2.2.3 Identificação estrutural de BO12CP4 (S4)

Os aspectos importantes dos espectros de RMN de 1H e de ^{13}C , DEPT, COSY, HSQC, HMBC, NOESY e LC/MS da substância S4 (Figura 38) foram discutidos nos tópicos a seguir levando a identificação da substância isolada (Tabela 19 e 20, Anexos 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 e 23).

Figura 38. {2- [2-hidroxi-3-metoxi-5-(3-propenoato de metila) fenil]-3-(3-hidroxi-4-metoxifenil)propan-1-ol} Substância S4.



Análise de espectro de RMN ¹H da substância BO12CP4 (S4)

No espectro de RMN de ¹H (Anexo 16) da BO12CP4 (Tabela 19) pode se observar na ampliação do espectro na região δ 7,8 a 6,0 (Figura 39) cinco dubletos, um em δ 7,60 (J 16 Hz), atribuído ao H-7'; em δ 6,97 (J 1,8 Hz), atribuído ao H-6'; em δ 6,93 (J 1,8 Hz), atribuído ao H-2'; em δ 6,63 (J 1,8 Hz), atribuído ao H-2; em δ 6,27 (J 16 Hz), atribuído ao H-8', todos com integração equivalente a 1 hidrogênio. E um dubleto largo em δ 6,77 (J 7,8 Hz), atribuído ao H-5, e um duplo dubleto δ 6,64 (J 7,8 / 1,8 Hz), atribuído ao H-6, ambos com integração equivalente a 1 hidrogênio. Os hidrogênios H-2, H-5 e H-6 são anel A, os hidrogênios H-2', H-5' e H-6' são do anel B e os hidrogênios H-7' e H-8' são característicos de posição H vinílicos da cadeia propenoica.

Na ampliação do espectro na região δ 4,2 a 2,7 (Figura 40) observam-se quatro singletos, em δ 3,92, δ 3,80 e δ 3,79, todos com integração equivalente a 3 hidrogênios, atribuídos as metilas H-3'a, H-4'a e H-9'a. E um singlete em δ 3,4 com integração equivalente a 1 hidrogênio, atribuído ao H-8. Um duplo dubleto *dd* em δ 3,84 (J 5 / 1 Hz), com integração equivalente a 2 hidrogênios, atribuídos aos H-9 α e H-9 β . Apresentou-se dois duplo dubleto em δ 2,96-3,02 (integral para 1H) e em δ 2,88-2,95 (integral para 1H) e com J = 13,7 Hz (acoplamento geminal) e J = 7,6 Hz (acoplamento vicinal em H-8), atribuídos aos H-7 α e H-7 β .

Figura 39. Ampliação da região de δ 7,8 a 6,0 do espectro de RMN de ^1H da substância S4, em Cl_3D .

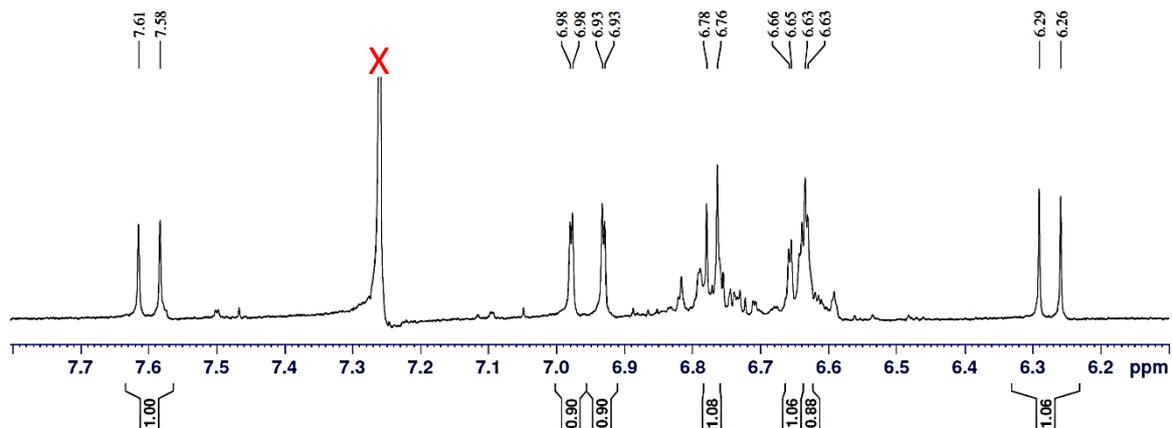
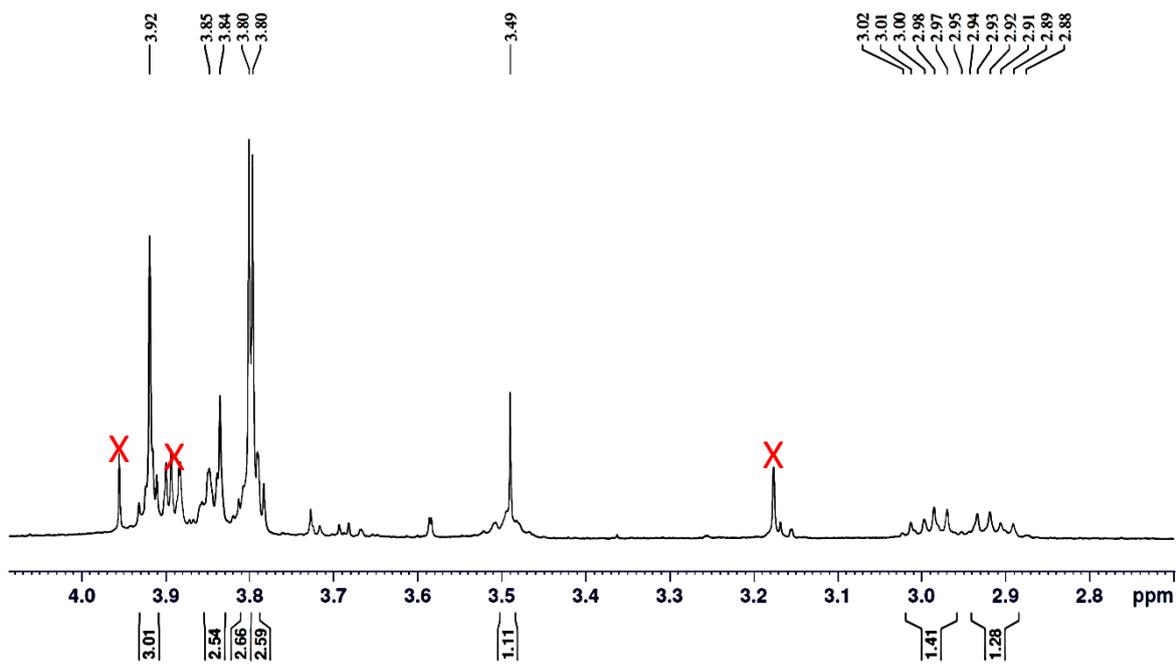


Figura 40. Ampliação da região de δ 4,2 a 2,7 do espectro de RMN de ^1H da substância S4, em Cl_3D .



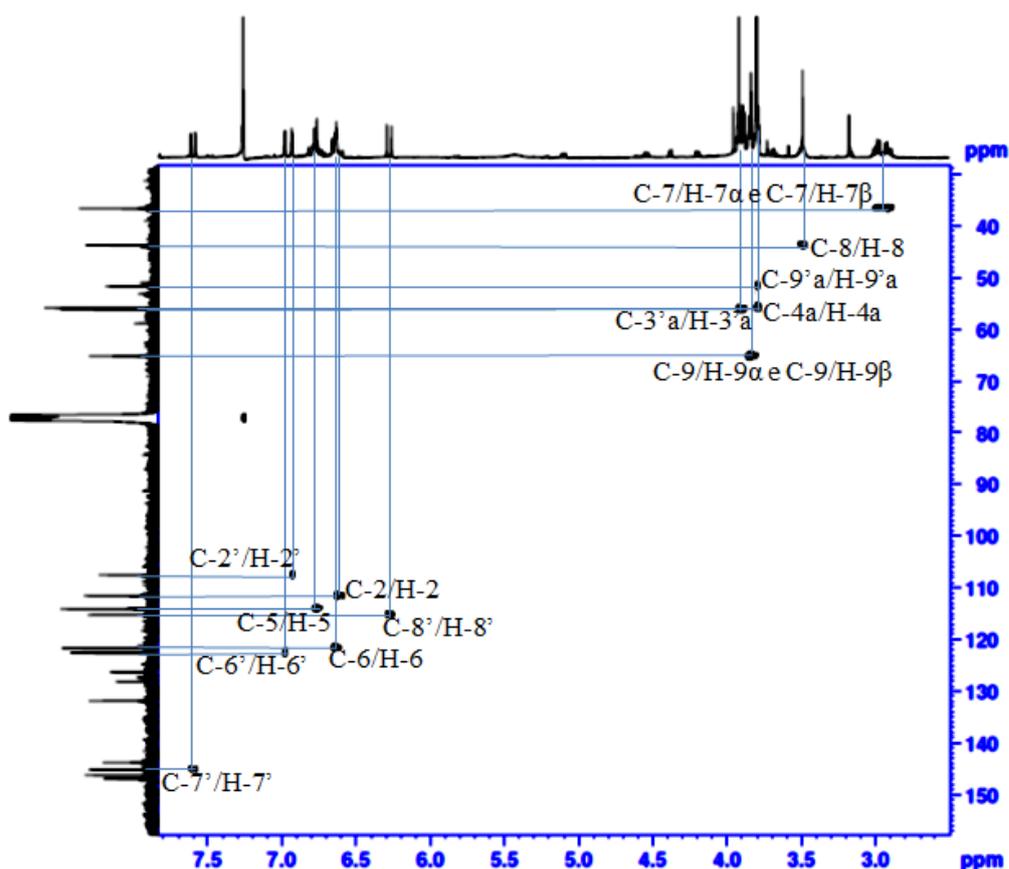
Análise de espectro de RMN de ^{13}C e DEPT 135 da substância BO12CP4 (S4)

O espectro de RMN de ^{13}C da substância S4 (Anexo 17) apresentou 21 sinais de carbonos. E a análise do DEPT 135 (Anexo 18) apresentou 13 sinais de carbonos. Os sinais correspondentes aos carbonos metínicos (CH): C-7' (δ 145,12), C-6' (δ 122,56), C-6 (δ 121,65), C-8' (δ 115,15), C-5 (δ 114,08), C-2 (δ 111,48), C-2' (δ 107,67), C-8 (δ 43,65). Os sinais de carbono CH_2 (metilênico): C-9 (δ 65,09), C-7 (δ 36,55). Carbonos metílicos (CH_3): C-3'a (δ 56,06), C-4a (δ 55,81), C-9'a (δ 51,64). E sinais de carbonos quartenários: C-9' (δ 167,69), C-3' (δ 146,88), C-4 (δ 146,21), C-4' (δ 146,16), C-3 (δ 143,80), C-1 (δ 131,78), C-5' (δ 128,12), C-1' (δ 1126,27) (Tabela 13).

Análise do espectro de HSQC da substância BO12CP4 (S4)

Pelo espectro de HSQC (Anexo 19) são observadas as correlações entre os sinais de hidrogênio em 1J com os carbonos (Tabela 19), a ampliação destes está na Figura 41.

Figura 41. Ampliação da região de δ 30 a δ 155 do espectro de HSQC da substância S4, em CDCl_3

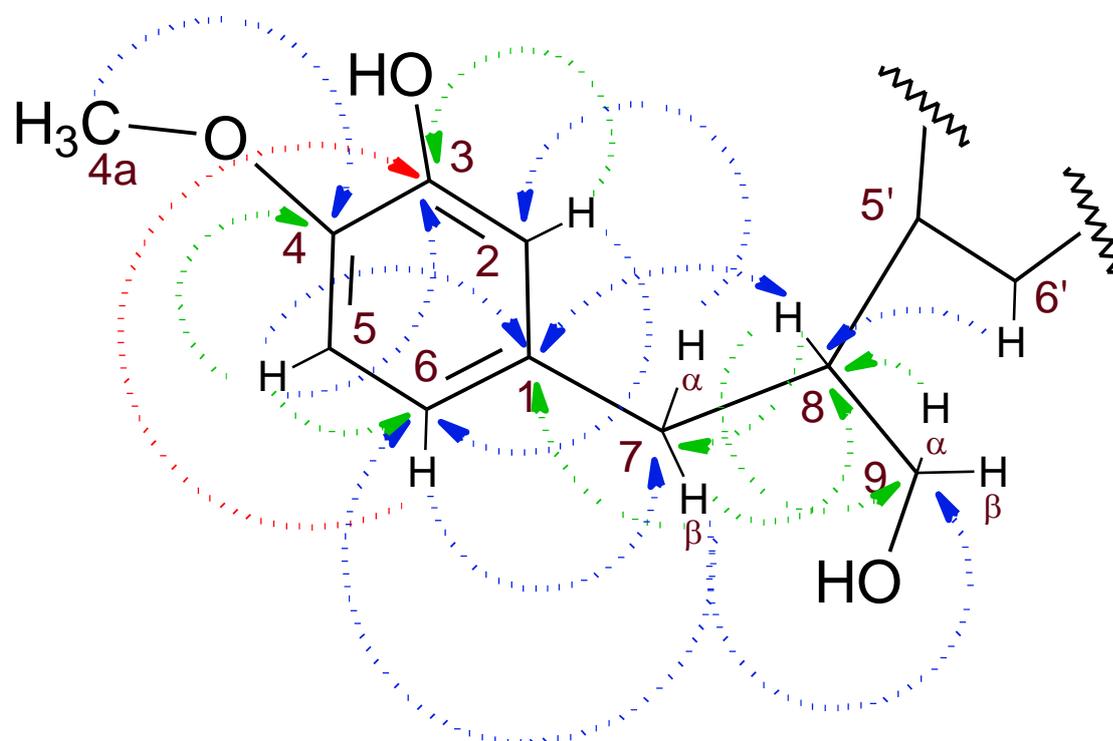


Análise do espectro de HMBC da substância BO12CP4 (S4)

No espectro de HMBC (Anexo 20) são observadas correlações entre os sinais de hidrogênio e carbono separadas por duas (2J), três (3J) e quatro (4J).

Na ampliação do espectro de HMBC (Figura 42 e Figura 43) observa-se as principais correlações entre hidrogênio e carbono.

Figura 42.(A) Principais correlações do anel A. (B) Ampliação da região de δ 7,9 a 6,2 e δ 4,1 a 2,5 do espectro de HMBC do anel A, da substância S4.



NOTA: Na figura (A) estão as principais correlações do HMBC, onde as setas em azul são as correlações em 3J , as setas em laranja são as correlações em 4J e as setas em verde são as correlações em 2J .

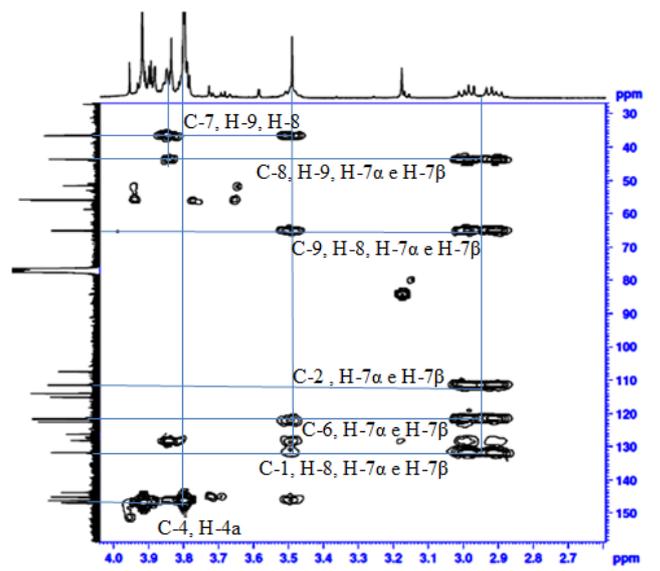
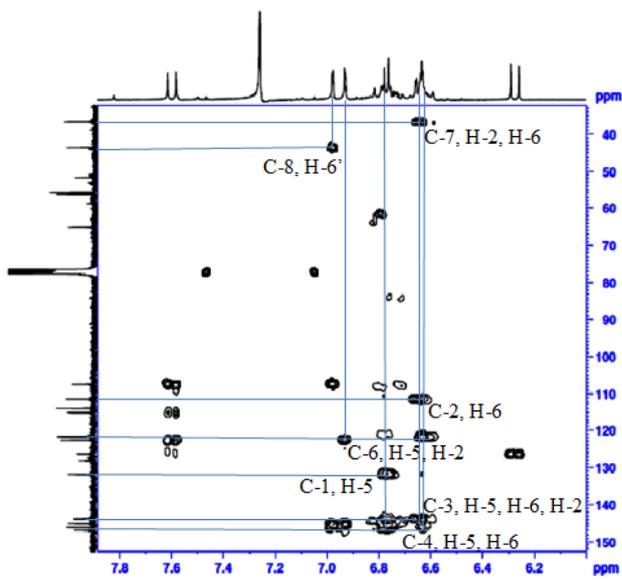
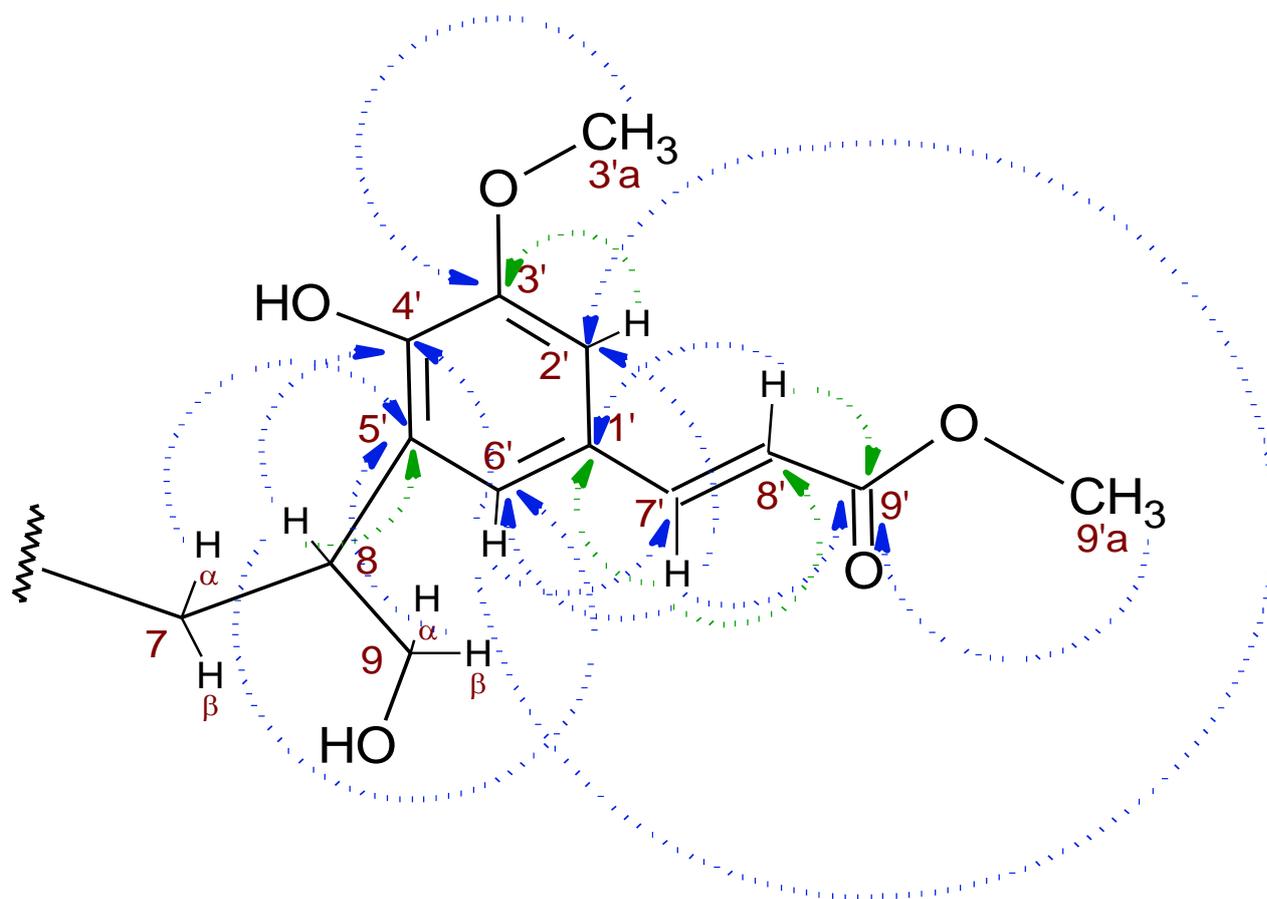
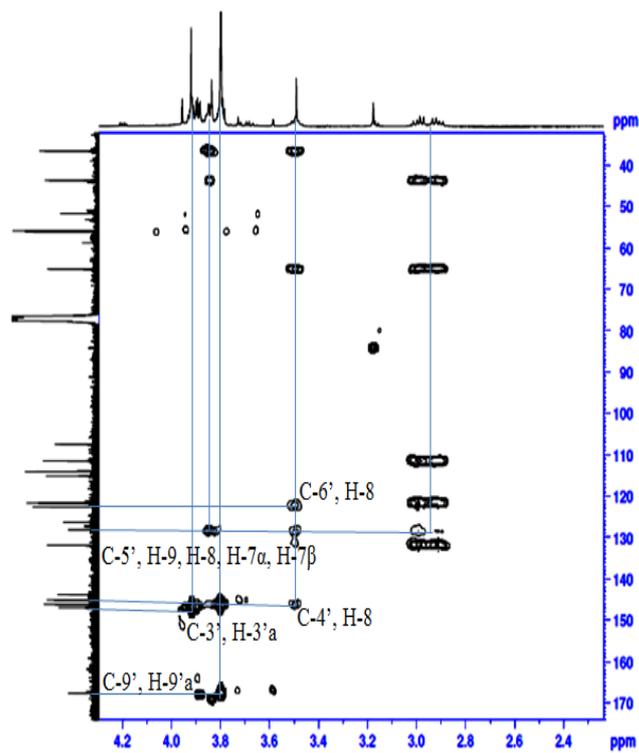
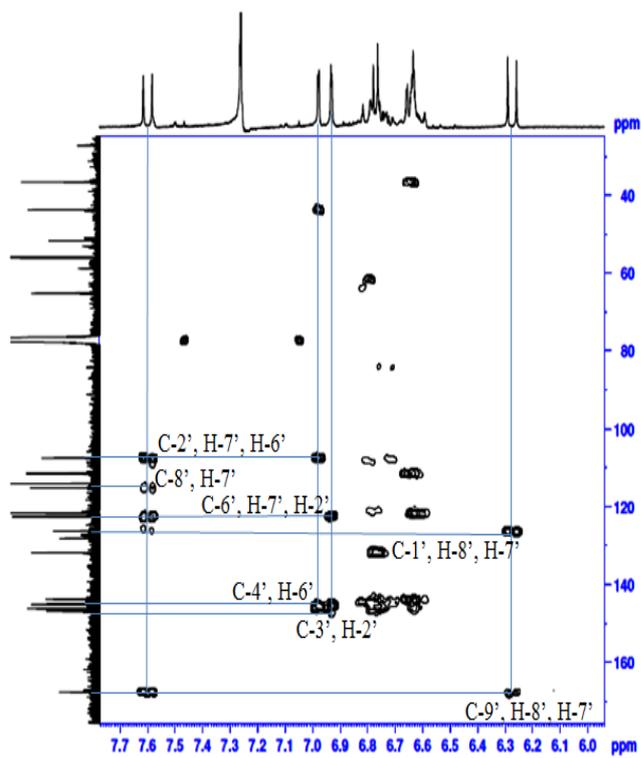


Figura 43. (A) Principais correlações do anel B. (B) Ampliação da região de δ 7,8 a 6,1 e δ 4,1 a 2,5 do espectro de HMBC do anel B, da substância S4.



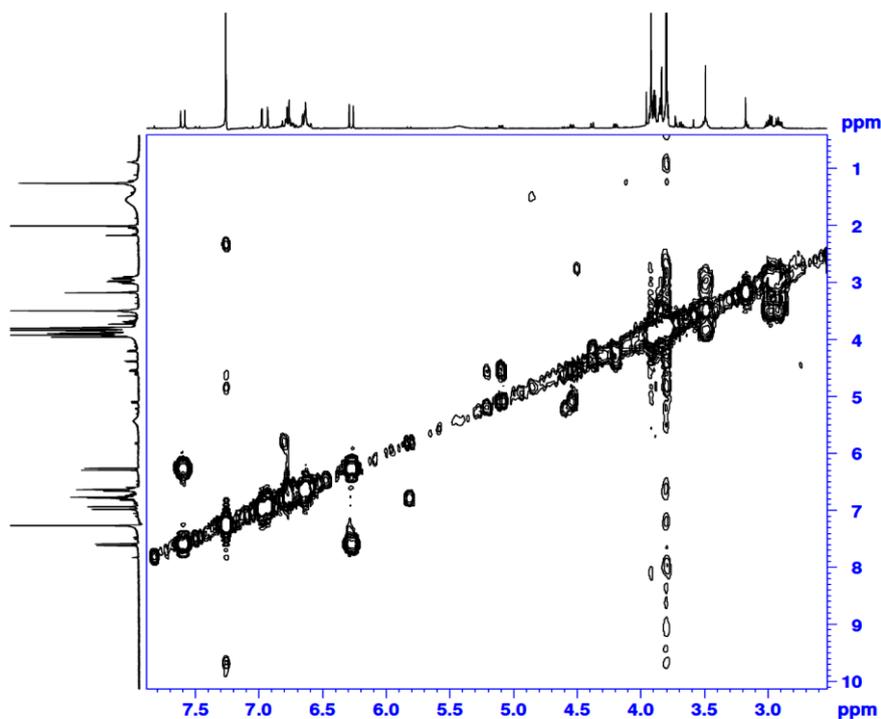
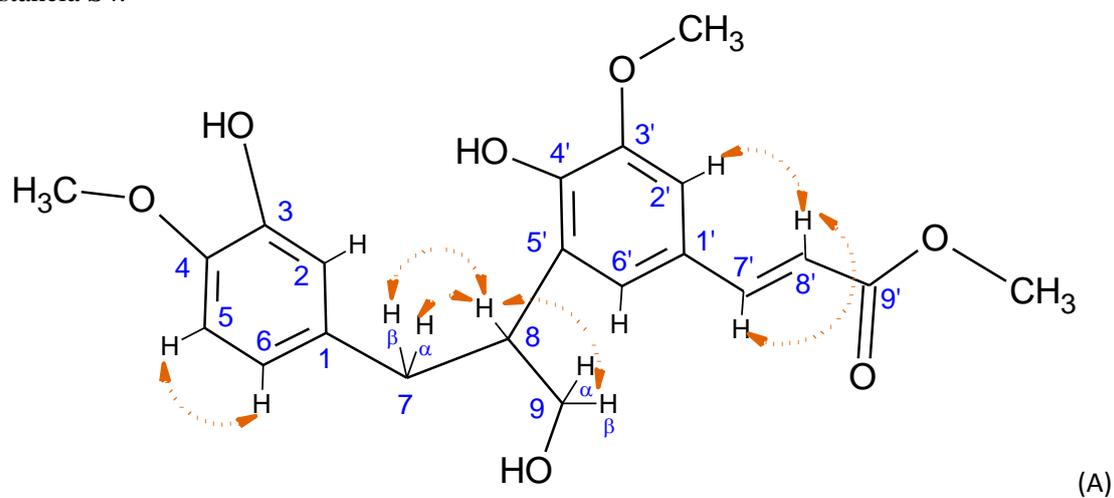
NOTA: Na figura (A) estão as principais correlações do HMBC, onde as setas em azul são as correlações em 3J , as setas em laranja são as correlações em 4J e as setas em verde são as correlações em 2J .



Análise do espectro de COSY da substância BO12CP4 (S4)

No espectro de COSY (Anexo 21) são observadas correlações (Figura 44) entre os sinais de hidrogênios separados por duas (2J), três (3J), quatro (4J) e cinco (5J) ligações. Observando a Figura 44, destacam-se a seguinte correlação entre hidrogênio em 3J : entre H-7' com H-8'; entre H-5 com H-6; entre H-8 com H-7 α e H-7 β ; entre H-8 com H-9 α e o H-9 β . E correlações entre hidrogênios em 4J : entre H-2' com H-8'.

Figura 44. (A) Correlações de COSY da substância S4. (B) Ampliação do espectro de COSY da substância S4.



(B)

Análise do espectro de NOESY da substância BO12CP4 (4)

No espectro de NOESY (Anexo 22) são observadas as seguintes correlações (Tabela 19) entre os sinais de hidrogênio (Figura 45): entre H-7 α com os H-7 β e H-8, H-2, H-6', H-9 α , H-9 β ; entre H-8 com os H-3'a, H-9 α , H-9 β , H-2, H-6'; entre H-8' com os H-7', H-6', H-2'; entre H-2 com os H-9 α , H-9 β , H-8, H-4a; entre H-6 com H-5; entre H-6' com os H-7', H-7 α , H-7 β , H-9 α , H-9 β , H-8, H-8'; entre H-2' com os H-3'a, H-8', H-7'; entre H-7' com os H-6', H-9'a, H-8'.

Figura 45. Principais correlações observadas no NOESY da substância S4.

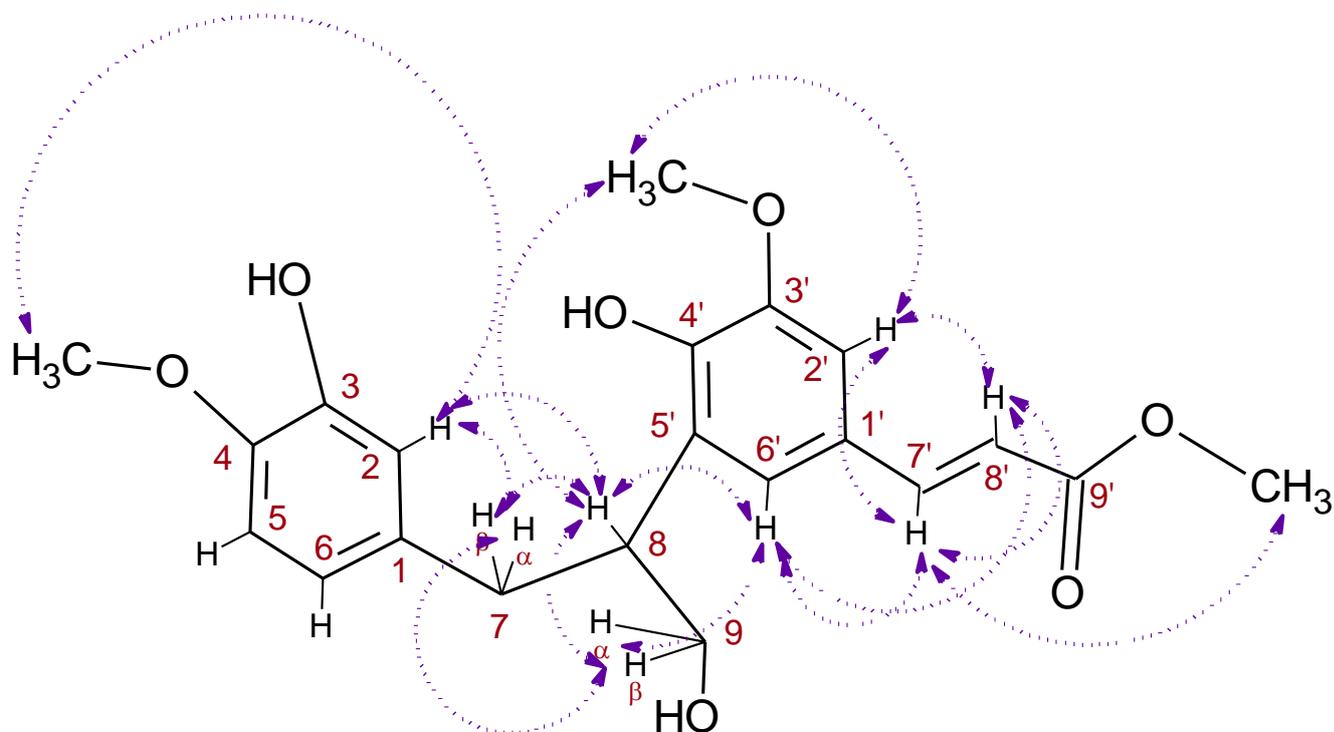


Tabela 19. Dados de RMN de ^1H , COSY e NOESY da substância S4.

Nº H	Substância S4 (MeOD, 500 MHz)		
	δ (ppm), mult., J (Hz), int.	COSY	NOESY
2	6,63; d; 1,8; 1H	-	2,88-2,95; 2,95-3,02; 3,49; 3,80
2'	6,93; d; 1,8; 1H	6,27	7,60; 6,27; 3,91
5	6,77; dl; 1,8 / 7,8; 1H	6,64	-
6	6,64; dd; 1,8 / 7,8; 1H	-	6,77
6'	6,97; d; 1,8; 1H	-	7,60; 6,27; 2,88-2,95; 2,95-3,02; 3,49; 3,84
7 α	2,88-2,95; dddd; 7,6 / 13,7; 1H	3,49	3,49; 6,63; 6,97
7 β	2,95-3,02; dddd; 7,6 / 13,7; 1H	3,49	3,49; 6,63; 6,97
7'	7,60; d; 16; 1H	6,27	6,97; 6,27; 3,79
8	3,49; s; 1H	-	3,91; 2,88-2,95; 2,95-3,02; 3,84; 6,63; 6,97
8'	6,27; d; 16; 1H	-	7,60; 6,93; 6,97
9 α	3,84; dd; 1,0 / 5,0; 1H	3,49	6,97; 2,88-2,95; 2,95-3,02
9 β	3,84; dd; 1,0 / 5,0; 1H	3,49	6,97; 2,88-2,95; 2,95-3,0
3'a	3,91; s; 3H	-	6,93
4a	3,80; s; 3H	-	6,63
9'a	3,79; s; 3H	-	-

Tabela 20. Dados de RMN de ^{13}C , HSCQ e HMBC da substância S4.

N° C	Substância 4 (MeOD, 75MHz)		
	δ (ppm), mult.	HSCQ	HMBC
1	131,78; C	-	6,77; 3,49; 2,96-3,02; 2,88-2,95
1'	126,27; C	-	6,27; 7,60
2	111,48; CH	6,63	6,64; 2,96-3,02; 2,88-2,95
2'	107,67; CH	6,93	7,60; 6,97
3	143,80; C	-	6,64; 6,63; 6,77
3'	146,88; C	-	3,91; 6,93
4	146,21; C	-	6,77; 6,64; 3,80
4'	146,16; C	-	6,97; 3,49
5	114,08; CH	6,77	-
5'	128,12; C	-	3,84; 3,49; 2,96-3,02; 2,88-2,95
6	121,65; CH	6,64	6,77; 2,96-3,02; 2,88-2,95; 6,63
6'	122,56; CH	6,97	7,60; 6,93; 3,49
7	36,55; CH ₂	2,96-3,02/ 2,88-2,95	6,63; 6,64; 3,84; 3,49
7'	145,12; CH	7,60	6,97
8	43,65; CH	3,49	6,97; 3,84; 2,96-3,02; 2,88-2,95
8'	115,15; CH	6,27	7,60
9	65,09; CH ₂	3,84	3,49; 2,96-3,02; 2,88-2,95
9'	167,69; C	-	7,60; 6,27; 3,79
3'a	56,06; CH ₃	3,91	-
4a	55,81; CH ₃	3,80	-
9'a	51,64; CH ₃	3,79	-

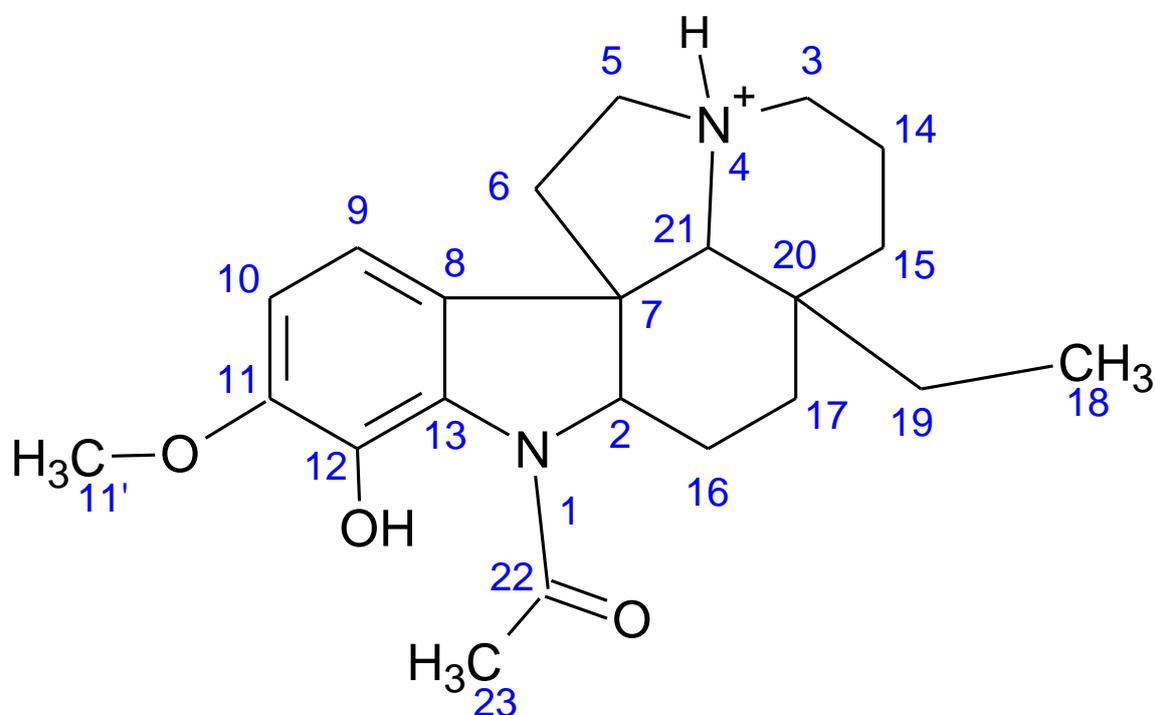
Análise de espectro de massa da substância BO12CP4 (S4)

No espectro de massas de IES-EMAR (Anexo 23) observa-se o pico 389,1544, como íon aduto. Com esses dados somados aos obtidos nas análises de RMN a substância S4 foi elucidada como {2- [2-hidroxi-3-metoxi-5-(3-propenoato de metila) fenil]-3-(3-hidroxi-4-metoxi-fenil)propan-1-ol} Substância S4, não foi encontrados dados desta substância nos principais sites de busca (como Scifinder, Chemspider e Google), com isso sugere-se que esta seja o primeiro relato.

6.2.2.4 Identificação estrutural de BO12CP1 (aspidocarpina) (S1)

Os aspectos importantes dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C , DEPT, COSY, HSQC, HMBC e LC-EMAR da substância (S1) (Figura 46) foram discutidos nos tópicos a seguir levando a identificação das substância isolada (Tabela 21, 22 e 23, Anexos 24, 25, 26, 27, 28, 29 e 30).

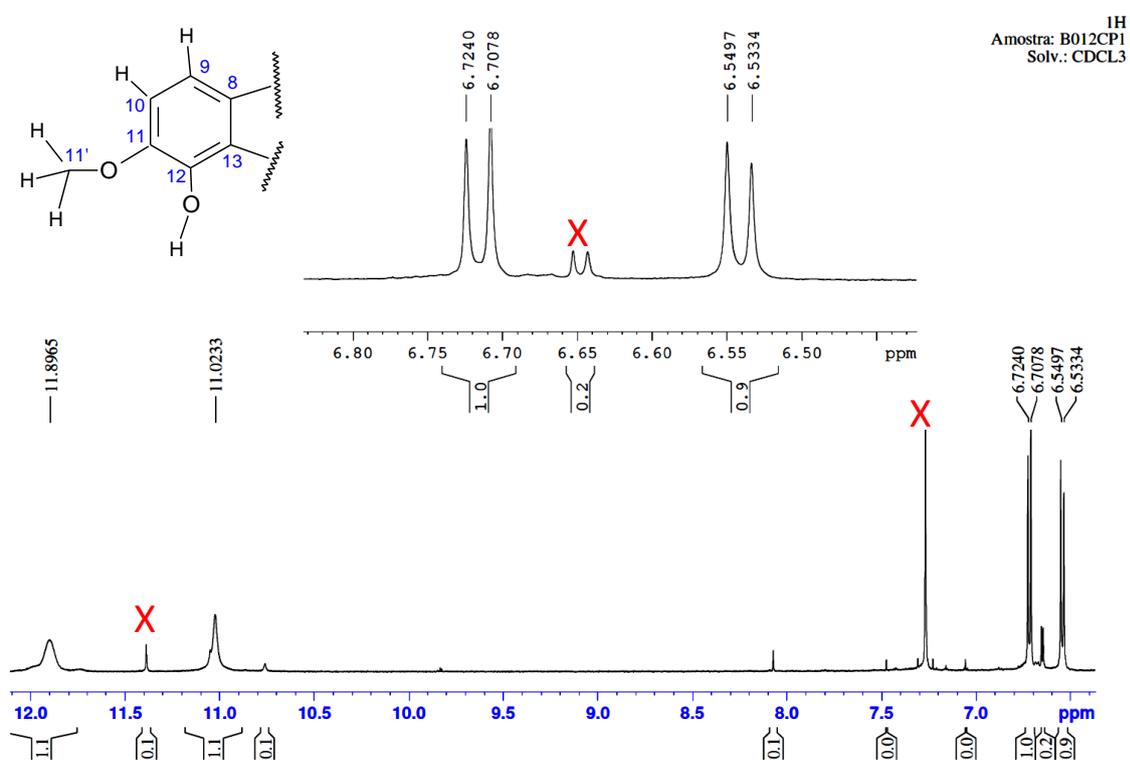
Figura 46. Aspidocarpina (1- (17-Hidroxi-16-metoxiespidospermidin-1-il) etanona) Substância S1.



Análise de espectro de RMN ^1H da substância BO12CP1 (S1)

No espectro de RMN de ^1H da BO12CP1 (Anexo 24) observam-se dois singletos um em δ 11,89 e o outro em δ 11,02, ambos com integração equivalente a 1 hidrogênio, foram atribuídos ao o H-4' (N $^+$ -H) e o H-12' (Figura 47). Os dubletos m δ 6,71 e em δ 6,54, ambos com integração equivalente a 1 hidrogênio e constante de acopamento de 8 Hz e foram atribuídos aos H-10 e H-9, respectivamente, são característicos de hidrogênios aromáticos de acoplamento orto (Figura 47).

Figura 47. Ampliação da região de δ 12,0 a 6,4 do espectro de RMN de ^1H da substância S1, em CDCl_3 .



A ampliação do espectro na região δ 5,4 a 3,7 (Figura 48) e δ 3,5 a 0,6 (Figura 49) todos os sinais estão descritos na Tabela 21.

Análise de espectro de RMN de ^{13}C e DEPT 135 da substância BO12CP1 (S1)

O espectro de RMN de ^{13}C da substância S1 (Anexo 25) apresentou 22 sinais de carbono e a análise do DEPT 135 (Anexo 26) apresentou 16 sinais de carbono, onde quatro sinais são de CH (metínico): C-9 (δ 111,29), C-10 (δ 110,05), C-21 (δ 71,54), C-2 (δ 66,63). Oito são CH_2 (metilênico) :C-3 (δ 52,80), C-5 (δ 51,39), C-6 (δ 36,74), C-15 (δ 32,75), C-19 (δ 29,99), C-16 (δ 24,42), C-17 (δ 22,12), C-14 (δ 19,15). Três são metílicos (CH_3): C-11' (δ 56,52), C-23 (δ 22,96), C-18 (δ 6,65). E sete sinais de carbonos quaternários: C-22 (δ 170,59), C-11 (δ 150,44), C-12 (δ 138,11), C-8 (δ 129,20), C-13 (δ 127,53), C-7 (δ 50,87), C-20 (δ 36,22) (Tabela 22).

Análise do espectro de HSQC da substância BO12CP1 (S1)

No espectro de HSQC (Anexo 27) as correlações entre os sinais de hidrogênio em 1J com os carbonos estão descritas na Tabela 22. Ampliações do espectro estão na figura Figura 50, 51 e 52.

Figura 50. Ampliação da região de δ 4 a 35 do espectro de HSQC da substância S1, em CDCl_3 .

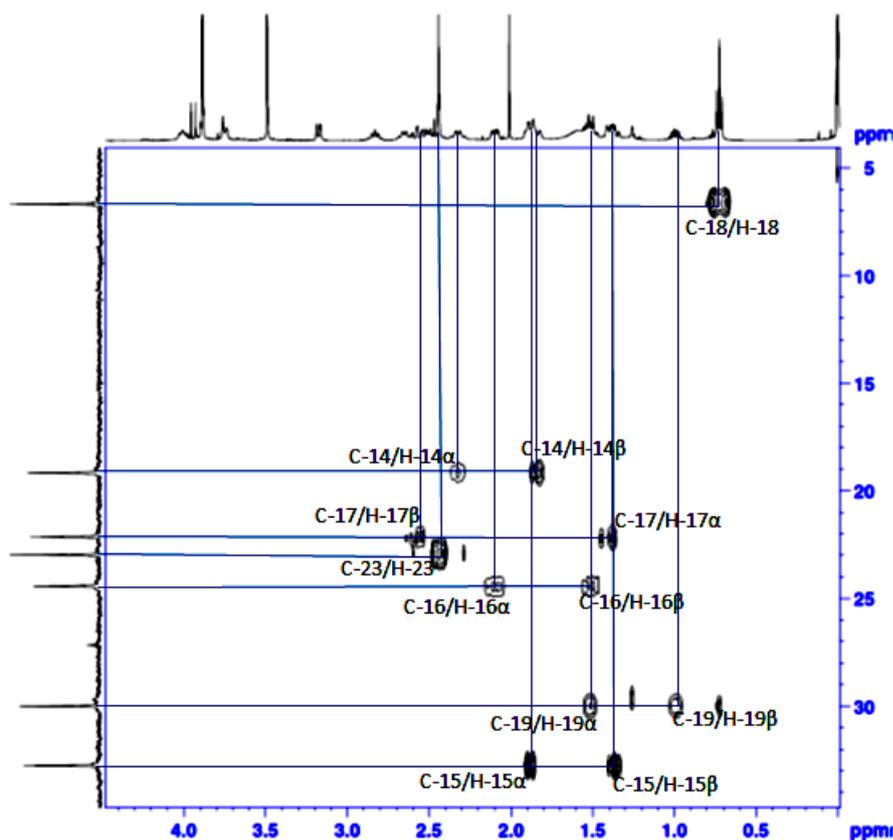


Figura 51. Ampliação da região de δ 34 a 60 do espectro de HSQC da substância S1.

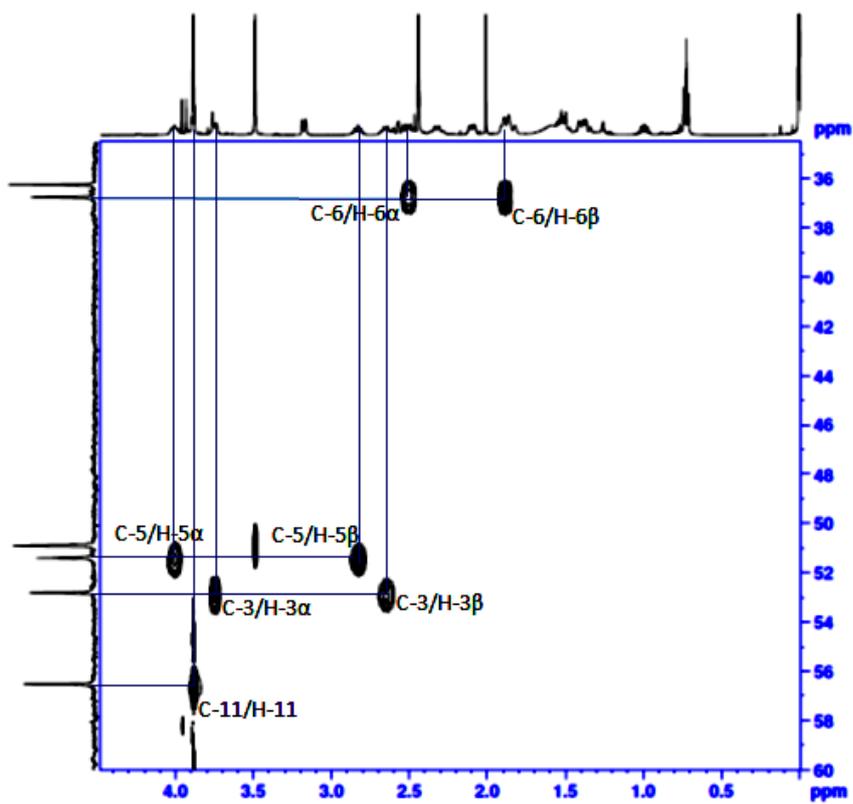
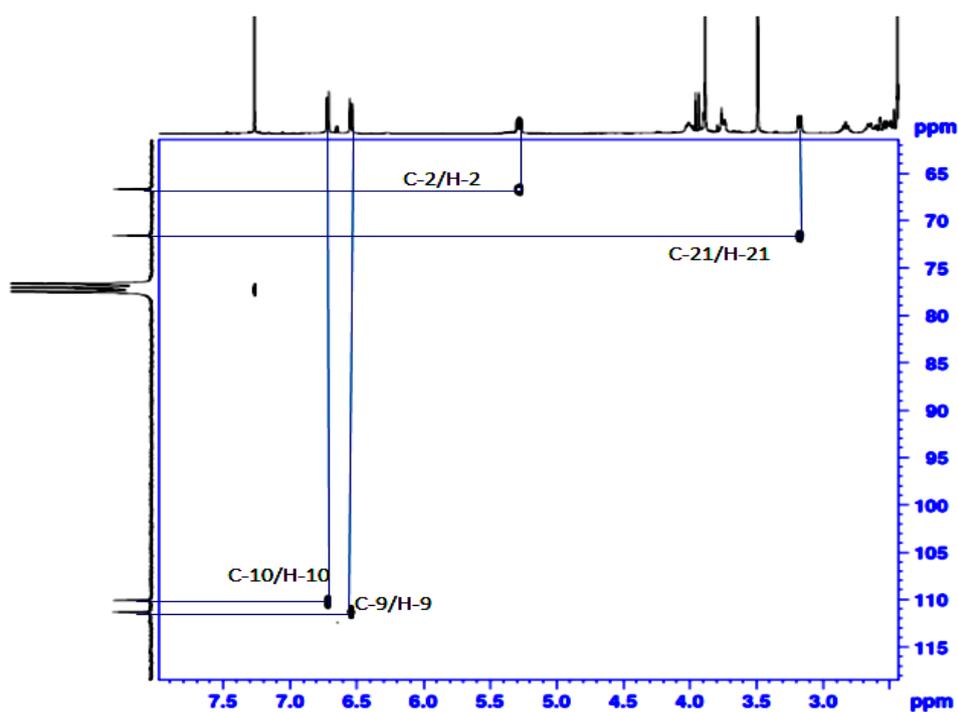


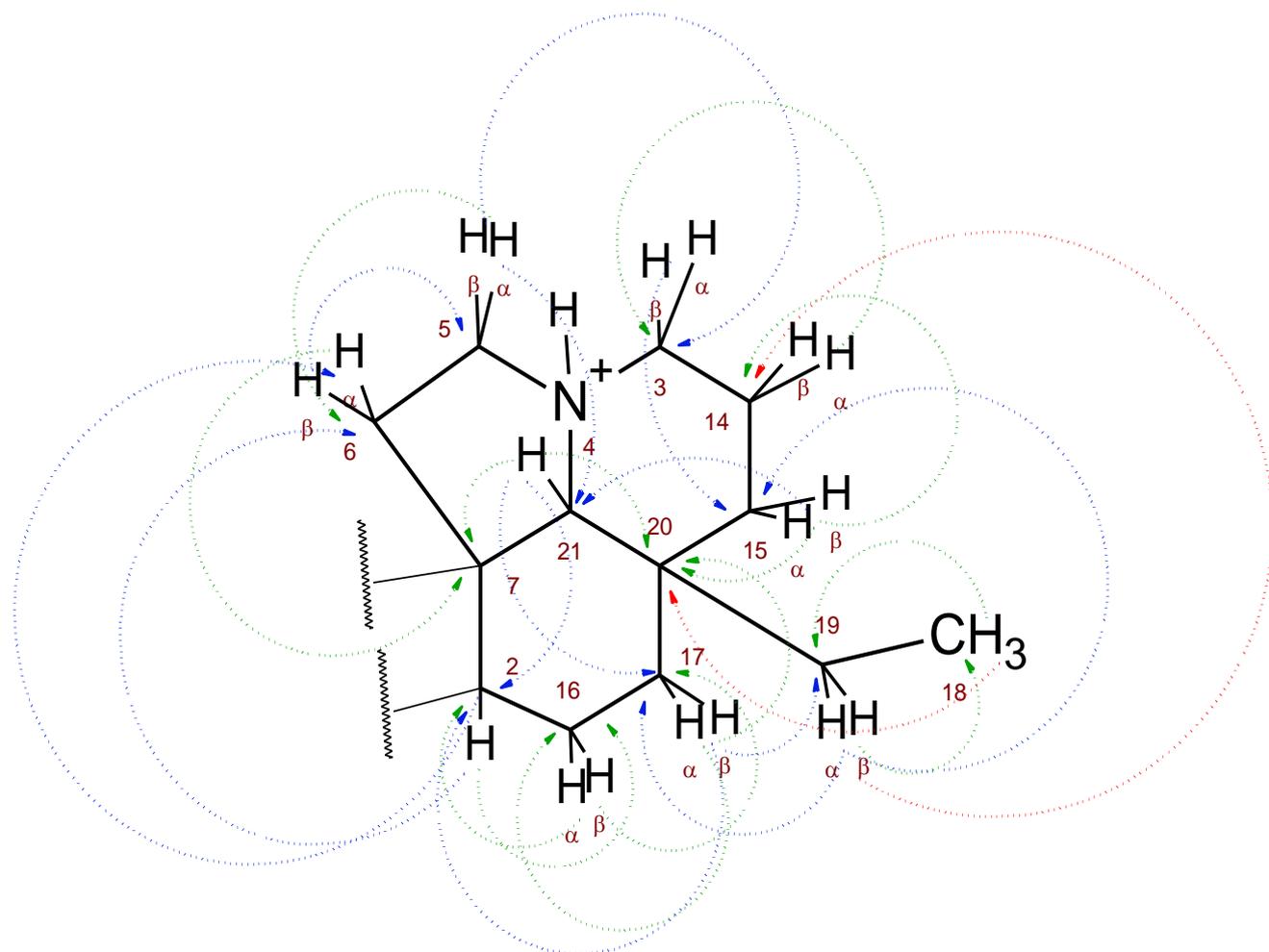
Figura 52. Ampliação da região de δ 60 a 120 do espectro de HSQC da substância S1.



Análise do espectro de HMBC da substância BO12CP1 (S1)

No espectro de HMBC (Anexo 28) são observadas correlações entre os sinais de hidrogênio e carbono em 2J , 3J e 4J (Tabela 22). As principais correlações estão descritas na Figuras 53 e 54 e suas respectivas ampliações.

Figura 53. (A) Principais correlações do anel B. (B) Ampliação da região de δ 4 a 45 (B1) e δ 45 a 90 (B2) do espectro de HMBC da região aromática da substância S1.



(A)

NOTA: Na figura (A) estão as principais correlações do HMBC, onde as setas em azul são as correlações em 3J , as setas em laranja são as correlações em 4J e as setas em verde são as correlações em 2J .

Figura 53. (A) Principais correlações do anel B. (B) Ampliação da região de δ 4 a 45 (B1) e δ 45 a 90 (B2) do espectro de HMBC da região aromática da substância S1. (continuação)

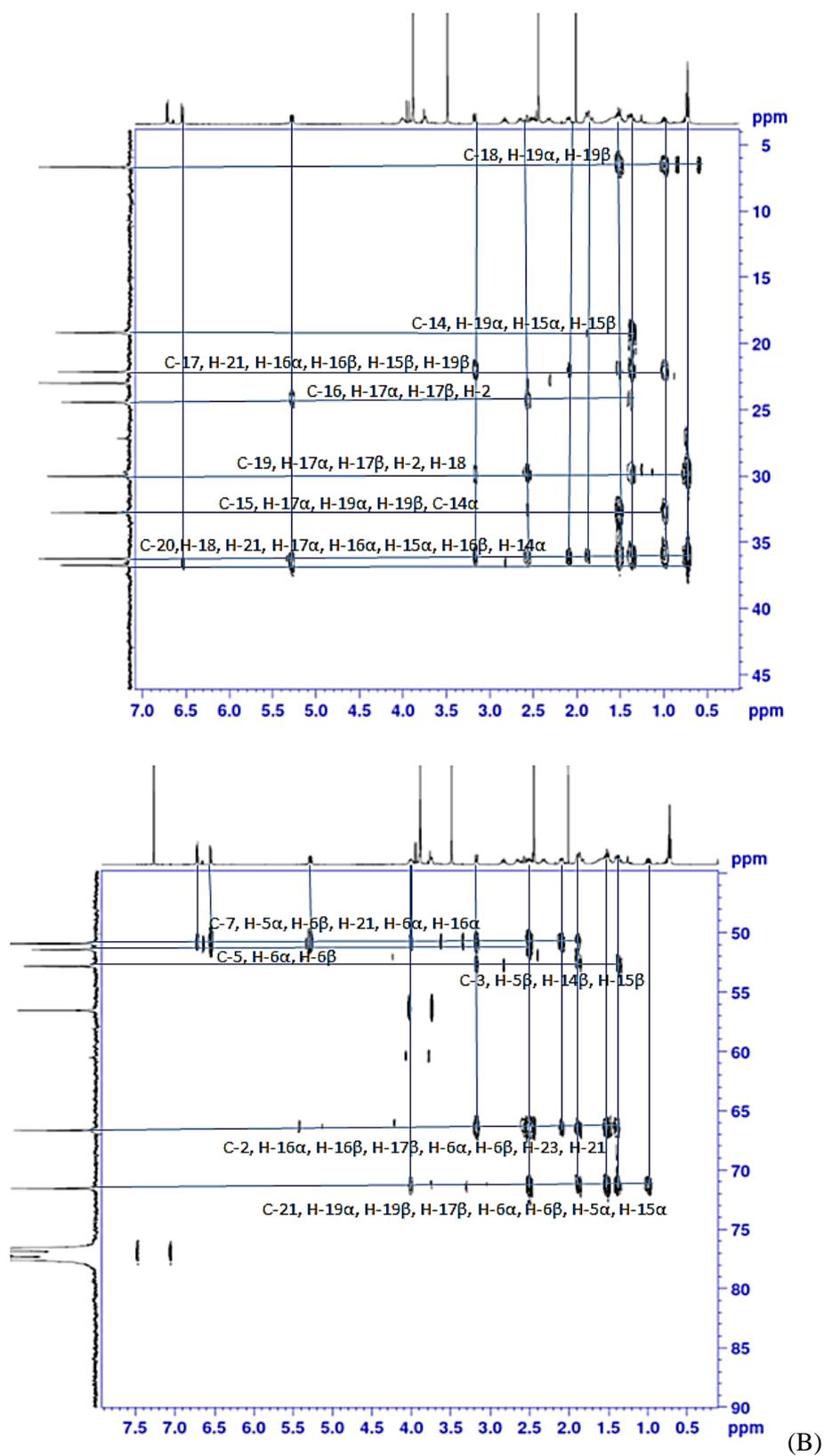
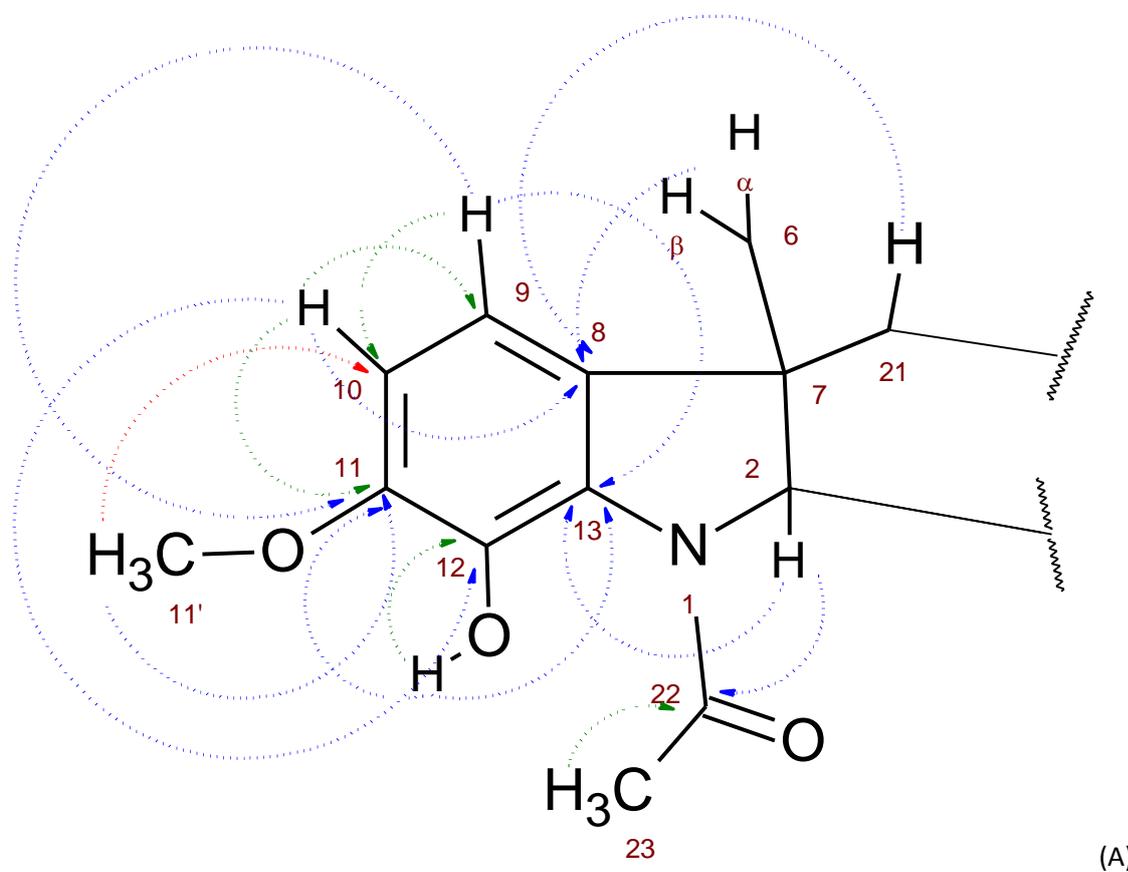
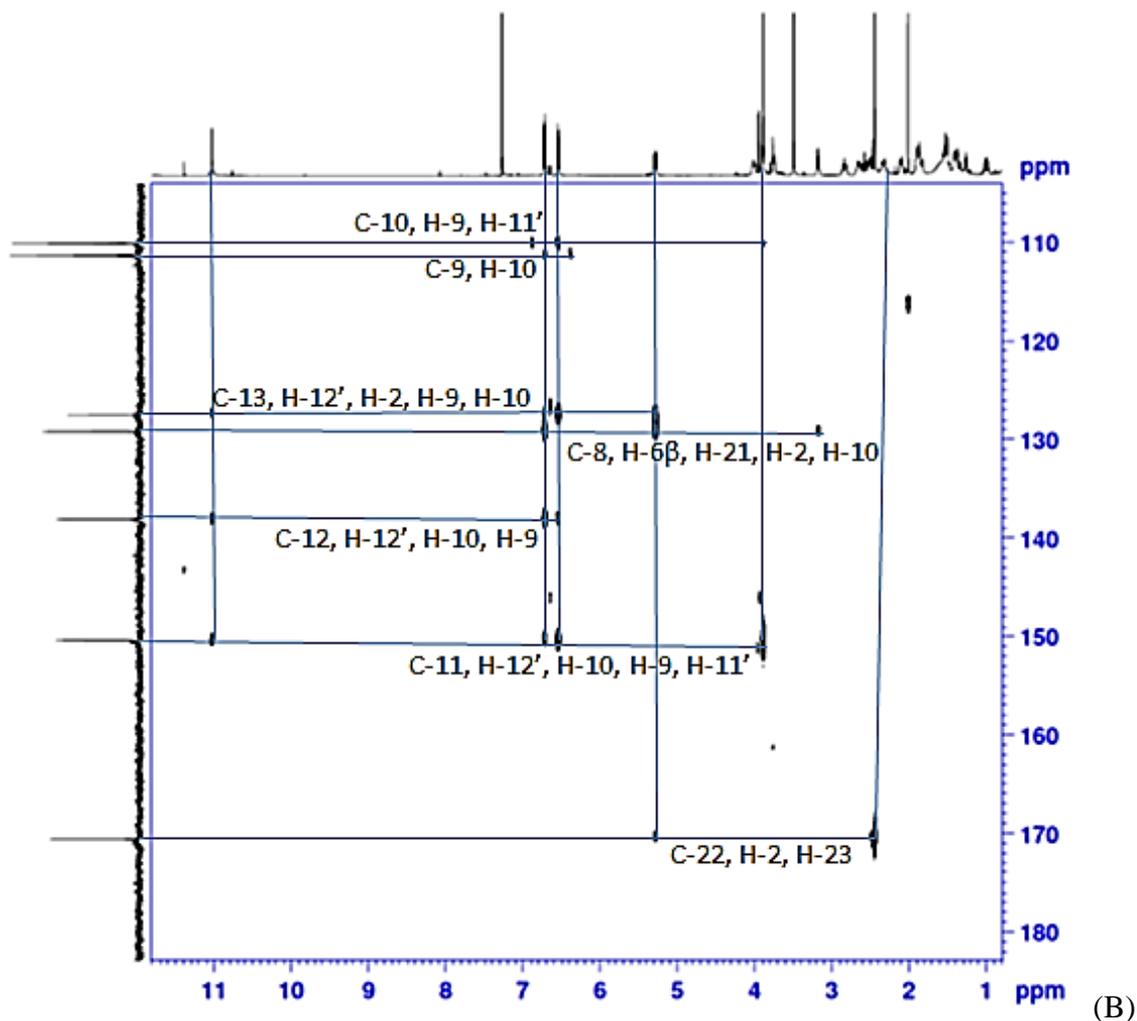


Figura 54. (A) Principais correlações do HMBC da região δ 100 a 180. (B) Ampliação da região de δ 100 a 180 do espectro de HMBC da região aromática da substância S1.



NOTA: Na figura (A) estão as principais correlações do HMBC, onde as setas em azul são as correlações em 3J , as setas em laranja são as correlações em 4J e as setas em verde são as correlações em 2J .

Figura 54. (A) Principais correlações do HMBC da região δ 100 a 180. (B) Ampliação da região de δ 100 a 180 do espectro de HMBC da região aromática da substância S1.



Análise do espectro de COSY da substância BO12CP1 (S1)

No espectro de COSY (Anexo 29) são observadas as seguintes correlações entre os sinais de hidrogênio em 2J , 3J e 4J . Observando a Figura 55, destacam-se as seguintes correlações entre hidrogênio em 2J : entre o H-5 α e H-5 β ; H-3 α e o H-3 β ; H-5 β e os H-6 α e H-6 β ; H-17 α e o H-16 β ; H-6 α e o H-6 β ; H-14 α e o H-14 β ; H-16 α e o H-16 β ; H-15 α e o H-15 β ; H-19 α e H-19 β . Correlações entre hidrogênios em 3J : entre o H-4' e os H-3 β , H-5 β , H-21 e H-4 α ; H-2 e os H-16 α e H-16 β ; H-5 α e os H-6 α e H-6 β ; H-3 α e os H-14 β e H-14 α ; H-5 β e os H-6 α e H-6 β ; H-17 α e o H-16 β ; H-14 α e os H-15 β e H-3 α ; H-19 α e o H-18; H-18 e os H-19 β e H-19 α ; e o H-10 e o H-9. E correlações entre hidrogênios em 4J : entre o H-21 e os H-15 β e H-17 β .

Figura 55. Principais correlações do espectro de COSY da substância S1.

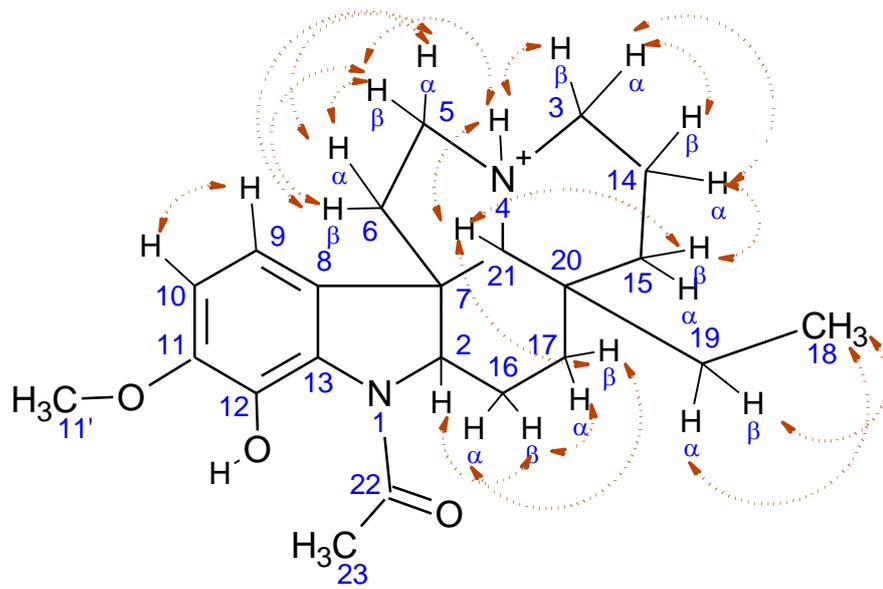


Tabela 21. Dados de RMN de ¹H, COSY da Aspidocarpina (substância S1).

Nº H	Substância 1 (sal da aspidocarpina) (CDCl ₃ , 500MHz)	
	δ (ppm), mult., J (Hz), int.	COSY
2	5,28; dd; 11 / 6; 1H	1,51; 2,09
3α	3,74; dl; 11; 1H	1,84; 2,64; 2,32
3β	2,64; m; 1H	-
5α	4,00; m; 1H	1,88; 2,50; 2,82
5β	2,82; m; 1H	1,88; 2,50
6α	2,50; m; 1H	1,88
6β	1,88; m; 1H	-
9	6,54; d; 8; 1H	-
10	6,71; d; 8; 1H	6,54
14α	2,32; m; 1H	1,36; 1,84
14β	1,84; m; 1H	-
15α	1,87; m; 1H	1,63
15β	1,36; m; 1H	-
16α	2,09; m; 1H	1,51
16β	1,50; m; 1H	0,98
17α	2,57; dd; 14/3; 1H	1,51
17β	1,37; m; 1H	-
18	0,72; t; 15 / 7; 3H	0,98
19α	1,51; m; 1H	-
19β	0,98; dq; 14 / 7; 1H	-
21	3,17; d; 10; 1H	1,37
23	2,43; s; 3H	-
11'	3,88; s; 3H	-
12' (OH)	11,02; s; 1H	-
4' (sal)	11,89; s; 1H	2,64; 2,82; 3,17; 4,00

Tabela 22. Dados de RMN de ^{13}C , HSQC e HMBC da Aspidocarpina (substância S1).

N° C	Substância S1 (sal de aspidocarpina) (CDCl ₃ , 75MHz)		
	δ (ppm), mult.	HSQC	HMBC
2	66,63; CH	5,28	2,43; 3,17; 2,50; 2,09; 1,50; 1,37
3	52,80; CH ₂	3,74; 2,64	2,82; 1,84; 1,36
5	51,39; CH ₂	4,00; 2,82	2,50; 1,88
6	36,74; CH ₂	2,50; 1,88	6,54; 5,28; 2,82
7	50,87; C	-	4,00; 3,17; 2,50; 2,09; 1,88
8	129,20; C	-	1,88; 3,17; 5,28; 6,71
9	111,29; CH	6,54	6,71
10	110,05; CH	6,71	6,54; 3,88
11	150,44; C	-	11,02; 6,71; 6,54; 3,88
12	138,11; C	-	11,02; 6,71; 6,54
13	127,53; C	-	11,02; 5,28; 6,54; 6,71
14	19,15; CH ₂	2,32; 1,84	1,51; 1,36; 1,87
15	32,75; CH ₂	1,87; 1,36	3,74; 2,57; 1,51; 0,98; 2,32
16	24,42; CH ₂	2,09; 1,50	2,57; 1,37; 5,28
17	22,12; CH ₂	2,57; 1,37	3,17; 2,09; 1,50; 1,36; 0,98
18	6,65; CH ₃	0,72	0,98; 1,51
19	29,99; CH ₂	1,51; 0,98	3,17; 2,57; 1,37; 0,72
20	36,22; C	-	0,72; 3,17; 2,09; 1,87; 1,50; 1,37
21	71,54; CH	3,17	1,87; 4,00; 2,50; 1,51; 1,37; 0,98
22	170,59; C	-	5,28; 2,43
23	22,96; CH ₃	2,43	-
11'	56,52; CH ₃	3,88	-

Tabela 23. Dados de RMN de ¹H da Aspidocarpina (substância S1) e da literatura.

Nº H	Substância S1 (sal da aspidocarpina) (CDCl ₃ , 500 MHz)			Henrique et al.,2010 (CDCl ₃ , 500 MHz) aspidocarpina		
	δ (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)	δ (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)
2	5,28	dd	11; 6	4,06	dd	11;6
3α	3,74	dl	11	3,04	d	13,5
3β	2,64	m	-	1,93-2,08	m	-
5α	4,00	m	-	3,12	ddd	9;9;2
5β	2,82	m	-	2,26	d	9
6α	2,50	m	-	1,93-2,08	m	-
6β	1,88	m	-	1,46-1,68	m	-
9	6,54	d	8	6,61	d	8
10	6,71	d	8	6,69	d	8
14α	2,32	m	-	1,93-2,08	m	-
14β	1,84	m	-	1,14	d	13,5
15α	1,87	m	-	1,46-1,68	m	-
15β	1,36	m	-	1,09	dd	13,5; 4,5
16α	2,09	m	-	1,46-1,68	m	-
16β	1,50	m	-	1,82-1,89	m	-
17α	2,57	dd	14; 3	1,46-1,68	m	-
17β	1,37	m	-	1,71	dd	13; 3,5
18	0,72	t	15; 7	0,64	t	7,5
19α	1,51	m	-	0,86	dq	14; 7
19β	0,98	dq	14; 7	1,38	dq	14;7
21	3,17	d	10	2,23	s	-
23	2,43	s	-	2,32	s	-
11'	3,88	s	-	3,87	s	-
12'	11,02	s	-	10,95	s	-
4'	11,89	s	-	-	-	-

Tabela 24. Dados de RMN de ^{13}C da Aspidocarpina (substância S1) e da literatura.

N° C	Substância S1 (sal da aspidocarpina) (CDCl ₃ , 125MHz)		Henrique et al.,2010 aspidocarpina (CDCl ₃ , 125MHz)	
	δ (ppm)	Multiplicidade	δ (ppm)	Multiplicidade
2	66,63	CH	70,5	CH
3	52,80	CH ₂	53,9	CH ₂
5	51,39	CH ₂	52,7	CH ₂
6	36,74	CH ₂	39,6	CH ₂
7	50,87	C	52,4	C
8	129,20	C	133,3	C
9	111,29	CH	112,6	CH
10	110,05	CH	110,3	CH
11	150,44	C	149,6	C
12	138,11	C	137,8	C
13	127,53	C	127,7	C
14	19,15	CH ₂	23,2	CH ₂
15	32,75	CH ₂	34,3	CH ₂
16	24,42	CH ₂	25,4	CH ₂
17	22,12	CH ₂	21,8	CH ₂
18	6,65	CH ₃	6,99	CH ₃
19	29,99	CH ₂	30,3	CH ₂
20	36,22	C	35,7	C
21	71,54	CH	70,9	CH
22	170,59	C	169,5	C
23	22,96	CH ₃	22,9	CH ₃
11'	56,52	CH ₃	53,7	CH ₃

Com esses dados obtidos nas análises de RMN a substância S1 foi definida como sal de aspidocarpina em comparação dos dados da literatura conforme descrito nas Tabelas 23 e 24 não é possível determinar o contraíon do sal. A amostra analisada foi coletada como fração de CLAE-DAD preparativa em MeOH + ácido fórmico 0,1% (HENRIQUE *et al.*, 2010; OLIVEIRA, 2008).

Análise de espectro de massa da substância BO12CP1 (S1)

No espectro de massa por *electrospray* de alta resolução (HR-ESI-MS) (Figura 56) observa-se o pico m/z 371,2331, como íon molecular, onde o programa sugere como fórmula molecular $C_{22}H_{31}N_2O_3$ (calculado m/z 371,2329), com um erro ($\Delta = -0.54$). Foram observados ainda o íon m/z 329,2236 indicando a perda de um grupamento C_2H_2O , do íon m/z 284,1629 indicando a perda de etilamina ($CH_3CH_2NH_2$), do íon m/z 190,0863 e do íon m/z 124,1123 (Figura 57). Com esses dados somados aos obtidos nas análises de RMN a substância S1 foi definida como (+)-aspidocarpina **16** (HENRIQUE *et al.*, 2010; OLIVEIRA, 2008).

Figura 56. Espectro de massa por *electrospray* de alta resolução (HR-ESI-MS) da substância S1.

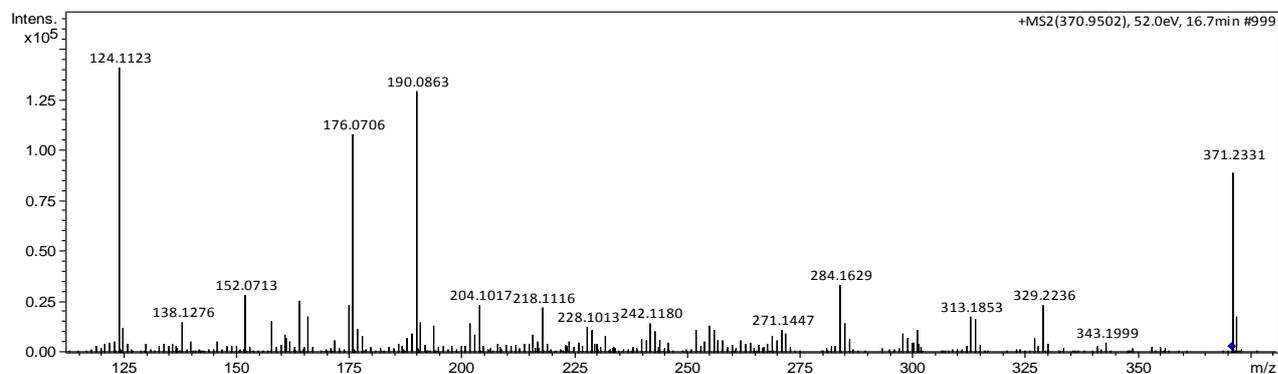
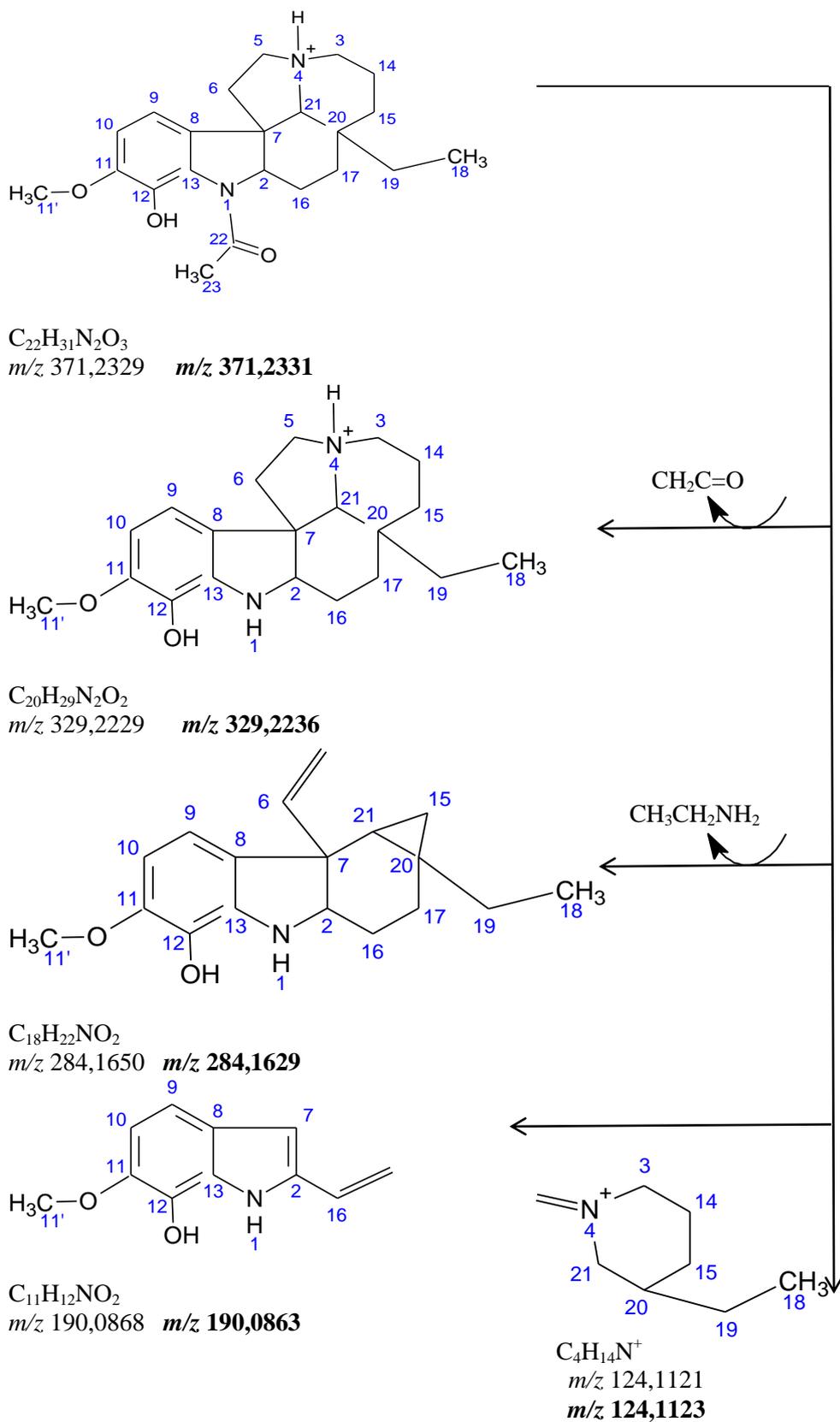


Figura 57. Proposta de fragmentação para MS/MS do pico em m/z 371,2331 para a substância S1 (OLIVEIRA, 2008).



Parecer final das subfrações e substâncias isoladas

Este é o primeiro relato de isolamento de substâncias e identificação de componentes da composição química de *Geissospermum urceolatum* A. H. Gentry.

As substâncias S1 (sal da aspidocarpina) e substância S2 (sinapato de metila) já foram isoladas anteriormente em plantas. A substância S1 (aspidocarpina) há relatos de isolamento na família Apocynaceae e no gênero *Geissospermum* sp (ANDRADE-NETO et al., 2007; CAMARGO, et al; 2013). Para a substância S2 (sinapato de metila) foi encontrado apenas um relato de isolamento na família Apocynaceae, o trabalho foi divulgado no VIII Simposio de Plantas Mediciais do Brasil, por Rocha *et al.*, 1984. Mas não foram encontrados relatos do isolamento no gênero *Geissospermum* sp.

A substância S3 (4-*N*-metil-akuammicine) foi relatada apenas por Oliver (1968), porém neste trabalho não são apresentados dados de RMN. Não foi encontrado relatos do isolamento desta substância na família Apocynaceae e no gênero *Geissospermum* sp. A substância S4 (2- [2-hidroxi-3-metoxi-5-(3-propenoato de metila) fenil]-3-(3-hidroxi-4-metoxi-fenil)propan-1-ol}) não foi encontrado nenhum relato de isolamento desta substância, o que sugere ser um fenil propanóide inédito.

Comparando os dados obtidos a análise de PCA, dentre os íons que foram identificados como possíveis relacionados a atividade dos extratos, o íon 371,22 que foi identificado como substância S1, foi definido como aspidocarpina **16**, e o íon 329, que foi identificado como fragmento de aspidocarpina **16**. Com isso, os dados encontrados direcionaram para o isolamento da substância aspidocarpina **16** (CI₅₀ 2,42 µg/mL), que apresentou atividade antiplasmodica *in vitro* ativa.

6.2.2 Resultado do teste antiplasmodial *in vitro*

O trabalho de fracionamento e isolamento foi acompanhado por ensaios de atividade antiplasmodica *in vitro* e várias frações e substâncias foram avaliadas para atividade. Dando continuidade no estudo da atividade, foram testadas frente a cepa K1 do *P. falciparum* *in vitro*, nesta etapa frações e substâncias.

Das 15 amostras testadas (extratos, frações e substâncias) (Tabela 25), duas frações BODCMI e BODCMII foram muito ativas (MA), duas frações BO2CF9 e BO2CF25 foram

ativas e uma fração BO2CF4 foi parcialmente ativa e as duas frações BO2CF12 e BO2CF25 foram inativas. A subfração BO4C13 foi inativa.

As substâncias S3 (4-*N*-metil-akuamicina) e subatância S2 (Sinapato de metila) foram inativas, porém de acordo com Othman@ghazali (2012), a substância S2 (Sinapato de metila) possui atividade 0,11 µg/mL, porém seu trabalho não descreve a metodologia utilizada nos teste *in vitro* e seu trabalho não teve nenhuma publicação em periódicos, com isso o resultado obtido no Laboratório de Malária e Dengue foi adotado como resultado para esse trabalho.

A substância S1 (aspidocarpina), foi considerada ativa no teste realizado com a substância isolada. A Aspidocarpina já foi isolada no grupo e trabalhos já publicados apresentam atividade muito ativa (MA), a diferença de atividade é justificada porque a amostra enviada para o teste não esta com pureza acima de 90% (sugere-se a presença de 20% de impurezas) (ANDRADE-NETO et al., 2007).

As amostras ativas foram testadas em sete concentrações para determinação de suas CI₅₀ (Concentração que inibe 50% do crescimento do *P. falciparum in vitro*).

Tabela 25. Inibição do Crescimento e Concentração Inibitória 50% (IC₅₀) *in vitro* da cepa K1 e de *P. falciparum* frente às amostras descritas. Como critério de atividade *in vitro* foi estabelecido que as amostras que inibem o crescimento dos parasitos de 80 a 100% são ativas (A), de 50 a 79% são parcialmente ativas (PA) e <50% inativa (I). Como critério de atividade *in vitro* foi estabelecido que as amostras com IC₅₀ de < 1 µg/mL é muito ativa (MA), de 1 a 15 µg/mL é ativa (A), de 16 a 30 µg/mL é parcialmente ativa (PA) e > 30 µg/mL é inativa (I).

ATIVIDADE ANTIMALÁRICA <i>IN VITRO</i>									
Extrato	Código da Amostra	Extrato / Fração / Subfração / Substância	Redução do Crescimento do Parasita (%)			Concentração Inibitória 50% (IC ₅₀)			Dados da Literatura (µg/mL)
			50 (µg/mL)	5 (µg/mL)	Classificação da atividade	IC50 (µg/mL)		Classificação da atividade	
						1º Experimento	2º Experimento		
BOT1	BOT1 (reanálise)	Extrato	84,96	67,26	A	9,7	5,15	A	-
	BO2CF4	Fração	82,30	15,93	A	30	-	PA	-
	BO2CF9	Fração	71,68	46,020	PA	1,93	-	A	-
	BO2CF12	Fração	49,56	18,58	I	-	-	-	-
	BO2CF15	Fração	52,21	0	I	-	-	-	-
	BO2CF25	Fração	-	-	-	14,7	-	A	-
	BO4C13	Subfração	-	-	-	valor alto	-	I	-
BOT2	BO4C2	Substância	-	-	-	1,86	-	A	-
	BOT2 (reanálise)	Extrato	-	-	-	9,7	8,2	A	-
	BODCMI	Fração	-	-	-	valor baixo (<0,50)	0,08	MA	-
	BODCMII	Fração	-	-	-	valor baixo (<0,50)	0,12	MA	-
	BO12CP1	Substância	-	-	-	2,42	-	A	0,007 (ANDRADE-NETO, <i>et al.</i> , 2007)
	BO12CP4	Substância	-	-	-	em análise	-	-	-
	BOF24C17P26	Substância	-	-	-	39,9	27,1	I	-
BO12CP31	Substância	-	-	-	38,7	24,5	I	0,11 (OTHMAN@GHAZALI, 2012)	

7 CONCLUSÃO

Este estudo da espécie *G. urceolatum* tem relevância para o conhecimento fitoquímico do gênero *Geissospermum* spp, uma vez que é a única espécie do gênero sem relatos de estudo da sua composição química e testes de atividade antiplasmódica.

Na composição química do gênero *Geissospermum* spp, pesquisas destacam a presença de alcaloides. Neste trabalho, foram isoladas quatro substâncias que revelaram o potencial singular da composição química da espécie *G. urceolatum*, onde duas das substâncias são alcaloides e as outras duas são fenil propanoides. Destes, somente o alcaloide aspidocarpina já foi relatado no gênero; já quanto ao alcaloide 4-*N*-metil-akuamicina, não há relatos de isolamento no gênero e na família. Em relação ao fenil propanóide, Sinapato de metila, não há relatos de isolamento no gênero, somente na família Apocynaceae. E quanto ao fenil propanóide, 2- [2-hidroxi-3-metoxi-5-(3-propenoato de metila) fenil]-3-(3-hidroxi-4-metoxi-fenil)propan-1-ol, não foram encontrados relatos desta substância, o que sugere ser inédita.

Neste trabalho foram realizados ensaios de atividade antiplasmódica *in vitro*, de extratos, frações, subfrações e substâncias. Obteve-se resultado de amostra ativa em todas as etapas testadas, o que comprova a atividade antiplasmódica da casca desta espécie estudada. Das 4 substâncias isoladas, 3 foram testadas para atividade antiplasmódica *in vitro*, onde o alcaloide aspidocarpina apresentou atividade.

A utilização das técnicas IES-EMAR, quimiometria sobre os dados de EM e o estudo da atividade antiplasmódica *in vitro*, para definição do método de extração, e somado ao estudo de dados de EM e da atividade antiplasmódica *in vitro*, das frações e subfrações, proporcionaram o isolamento de substâncias com potencial antimalárico.

Assim bioguiado, o presente trabalho levou à identificação de frações e substâncias ativas da casca, a parte utilizada de acariquara-branca / pau-pereira (*G. urceolatum*) pela população. Este estudo identificou a aspidocarpina em planta antimalárica regional, o que pode ser confirmatório do potencial dessa substância em humanos.

8 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ANDRADE-NETO, V.F. et al. in vitro inhibition of Plasmodium falciparum by substances isolated from amazonian antimalarial plants. **Memórias do Instituto Oswaldo cruz.** RJ. V.102, n.3, p.359-365, 2007.

BERTANI, S. et al. Evaluation of French Guiana traditional antimalarial remedies. **Journal of Ethnopharmacology**, v.98, p. 45-54, 2005.

BOTSARIS, A. Plants used traditionally to treat malaria in Brazil: the archives of Flora Medicinal. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine.** RJ, v.3, p.18, 2007.

BOURDY, G. et al. Ethnopharmacology and malaria: new hypothetical leads or old efficient antimalarials? **International Journal for Parasitology**, v. 38, p. 33-41, jan., 2008.

BRANDÃO, M. G. L., GRANDI, T. S. M., ROCHA, E. M. M., SAWYER, D. R., KRETTLI, A. U. Survey of medicinal plants used as antimalarials in the Amazon. **Journal of Ethnopharmacology**, Philadelphia, PA, v.36, p.175-82, 1992.

BRASIL (a). **Portal da Saúde.** Disponível em: (http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/fevereiro/32/Mapa-de-risco_malaria_2015.pdf). Acesso em 25 de setembro de 2017.

BRASIL (b). **Portal da Saúde.** Disponível em: (https://public.tableau.com/profile/mal.ria.brasil#!/vizhome/MiniSivep1517_2017_09_14/casos_notificados_2017_regio_Amaznica). Acesso em 25 de setembro de 2017.

BRASIL (c). **Portal da Saúde.** Disponível em: (https://public.tableau.com/profile/mal.ria.brasil#!/vizhome/Boletim_RegiaoExtra-Amazonica_Compartilhado_2017_07_28/SrieHistorica). Acesso em 25 de setembro de 2017.

BRASIL (d). **Portal da Saúde.** Disponível em: (https://public.tableau.com/profile/mal.ria.brasil#!/vizhome/MiniSivep1517_2018_02_01/casos_notificados_2017_regio_Amaznica). Acesso em 17 de fevereiro de 2018.

BRASIL. **Guia pratico de tratamento da malaria no Brasil** / Ministerio da Saude, Secretaria de Vigilancia em Saude, Departamento de Vigilancia Epidemiologica. – Brasilia: Ministerio da Saude, 2010.

BRITO, A.R.M.S. Toxicologia de plantas medicinais. Pp. 99-107. In: Di Stasi, L.C. (Org.) **Plantas Mediciniais: Arte e Ciência, um guia de estudo interdisciplinar**. 2 ed. São Paulo. Unesp. 1995.

CAMARGO, M.R.M., et al. Chemical composition, ethnopharmacology and biological activity of *Geissospermum Allemão* species (Apocynaceae Juss). **Revista Fitos**, Vol.8, p137-176, 2013.

CAMPBELL, D.G.; HAMMOND, H.G. Floristic inventory of tropical countries: The status of plant systematics, collections, and vegetation, plus recommendations of the future. NY **Batanical Gardem**. NY, p.78, 1989.

CHIERRITO, T.P.C., et al. Anti-malarial activity of indole alkaloids isolated from *Aspidosperma olivaceum*. **Malaria Journal**, Vol. 13 (suppl 1), p1-10, 2014.

DE ASSIS JUNIOR, L. R., GARCEZ, F. R., GARCEZ, W.S. Pregnanos e outros constituíndes das raízes de *Macrosiphonia petraea* (A. St.-Hil.) Kuntze (Apocynaceae). **Quimica Nova**, Vol. 36, No. 4, 519-523, 2013.

DEHARO, E.; GINSBURG, H. Analysis of additivity and synergism in the anti-plasmodial effect of purified compounds from plant extracts. **Malaria Journal**. Vol. 10 (suppl 1):S5, p1-5, 2011.

DEWICK, P.M. **Medicinal Natural Product: a biosynthetic approach**. 2nd ed, 2002.

ELISABETSKY, E. Saber tradicional e repartição de benefícios: por quê? In: Direitos de recursos tradicionais: formas de proteção e repartição de benefícios, MING, L.C.; CARVALHO, I.; VASCONCELLOS, M.C.; RADOMSKI, M.I.; COSTA, M.A.G. (Orgs.), p.47-54, Botucatu: SBEE – Unesp. 2005

FIGUEIREDO, E.R. et al. Isolamento, identificação e avaliação da atividade antileucêmica de alcalóides indólicos monoterpênicos de *Tabernaemontana salzmanii*, Apocynaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n.5, p. 675-681, 2010.

FONSECA-KRUEL, V.S.; PEIXOTO, A.L. Etnobotânica na Reserva Extrativista Marinha de Arraial do Cabo, RJ, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v.18, n.1, p.177-190, 2004.

FORZZA, R.C. **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**. Inst. de Pesq. do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, v 1, 2010.

FRANÇA, C. C. T.; SANTOS, M. G.; FUIGUEROA-VILLAR, J. D. Malária: aspectos histológicos e quimiometria. **Química Nova**, vol. 31, nº 5, SP, 2008.

PROKSA, et al. New quaternary alkaloids from *Vinca minor*. *Planta Medica*, vol 55, 1989.

NORONHA, E.; ALECRIM, M. G.; ROMERO, G. A. S.; MACÊDO, V. Resistência à mefloquina do tipo RIII em crianças com malária falciparum em Manaus, AM, Brasil. **Revista da sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. Vol. 33, nº 2, pag.201-205, MG, 2000.

COUTO, A. A.; CALVOSA, V. S.; LIMA, J. E.; SOUZA, J. M. Evolução da resistência *in vitro* do *Plasmodium falciparum* a antimaláricos em áreas de prospecção de ouro no estado do Amapá, entre 1983 e 1990. Brasil. **Revista da sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. Vol. 26, nº 4, pag.215-220, MG, 1993.

G1. Criadores de terapias contra malária e verminoses levam Nobel de Medicina. (<http://g1.globo.com/ciencia-e-saude/noticia/2015/10/criadores-de-terapias-contramalaria-e-verminoses-levam-nobel-de-medicina.html>). Acesso em 28 de fevereiro de 2016.

GOTTLIEB, O. R.; YOSHIDA, M.; Com atenção especial à química das neolignanas. **Química Nova**, vol.7, pag. 250-273, 1984.

GREGSON, A., PLOWE, C. V. (2005). Mechanisms of Resistance of Malaria Parasites to Antifolates. **Pharmacological Reviews**. 57, 117, 2005.

KRETTLI, A.U.; ANDRADE-NETO, V.F.; BRANDÃO, M.G.L.; FERRARI, W.M.S.; Search for new antimalarial drugs from plants used to treat fever and malaria or plants randomly selected: a review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, Vol. 96(8): 1033-1042. Nov, 2001.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. 2. ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2002. v. 2.

MBEUNKUI, F., et al. In vitro antiplasmodial activity of indole alkaloids from the stem bark of *Geissospermum vellosii*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, p. 471-477, 2012.

MELO, J.G., et al. Qualidade de produtos a base de plantas medicinais comercializados no Brasil: castanha-da-índia, capim-limão e centelha. **Acta Botânica Brasilica**, Vol 21, p27-36, 2007.

Menard, D. & Dondorp, A. Antimalarial Drug Resistance: A Threat to Malaria Elimination. **Cold Spring Harb Perspect Med**. 2017.

MENDES, S.S., et al. Evaluation of the anagesic and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Lippia gracilis* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**. Vol 129, p391-397, 2010.

MOURA, M.D.B.; AGRA, M.F. Apocynaceae tóxicas e medicinais ocorrentes nos estados de Pernambuco e Paraíba, Brasil. **Acta botanica Brasileira**, Vol3, p273-279, 1989.

NEVES, D. P. et al. **Parasitologia humana**. 11. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2010, p. 143-161.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal Natural Products**, Vol. 3, p461-477, 2007.

Noor Aimi Bt Othman @ Ghazali. Chemical constituents of *Kopsia Singaporensis* Ridl. and their antiplasmodial activity / Noor Aimi Bt Othman @ Ghazali.2012.

NUNES, B. et al. Chemoface: a novel free user-friendly interface for chemometrics. **Journal of the American Chemical Society**, Vol 23, p 2003-2010, 2012.

Okell, L. C.; Ghan, A. C.; Ubben, D.; Jagoe, G.; Griffin, J. T.; Tarning, J.; Baker, M.; Cairns, M.; Ferguson, N. M.; Hugo, P.; Bousema, T.; D' Alessandro, U. Contrasting benefits of different artemisinin combination therapies as first-line malaria treatments using model-based cost-effectiveness analysis. **Nature Communications**. 2014, 1-9.

OLIVEIRA, V.B. et al. Atividade biológica e alcalóides indólicos do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae): uma revisão. **Ver. Bras. Pl. Med. Botucatu**. V. 11, n.1, p.92-99, 2009.

PACCIONI J-P; HUSSON, H-P. Alcaloides de *Geissospermum argenteum*(Apocynaceae). **Phytochemistry**, v.17, n.12, p.2146-2147, 1978.

PEREIRA, M. de M. et al. Alcalóides indólicos isolados de espécies do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae). **Química Nova**, v.30, n.4, p.1-14, 2007.

PETERS, W. The problem of drug resistance in malaria. **Parasitology**. v. 90, p. 705-715, 1985.

POHLIT, A.M., et al. Amazonian Plant Natural Products: Perspectives for Discovery of New **Antimalarial Drug Leads**. **Molecules**. V.18, p. 9219-9240, 2013.

PUISIUEX, F., et al. Alkaloids of *Geissospermum laeve*. III. Geissoschizoline, apogeissoschizine and geissospermine. **Annales Pharmaceutiques Françaises**, v. 17, p. 626-633, 1959.

RAPOPORT, H. et al. Alkaloids of *Geissospermum vellosii*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 80, p. 1601-1604, 1958.

REINA, M. et al. Indole alkaloids from *Geissospermum reticulatum*. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 5, p. 928-934, 2012.

RIBEIRO, J. E. L. S., et al. **Flora da Reserva Ducke: Guia de Identificação das Plantas Vasculares de uma Floresta de Terra-Firme na Amazônia Central**, INPA: Manaus, 1999.

RIDDER, S., et al. *Artemisia annua* as a self-reliant treatment for malaria in developing countries. **Journal of Ethnopharmacology**. V. 120, p.302-314, 2008.

SANTOS, A.B.C., et al. Levantamento etnobotânico, químico e farmacológico de espécies de Apocynaceae Juss. ocorrentes no Brasil. **Revista Brasileira Plantas Medicinai**s, Vol 5, n 3, p442-458, 2013.

SCHIOZER, A. L. Electrosprays ionization mass spectrometry fingerprinting of extracts of the leaves of *Arrabidaea chica*. **Journal of the American Chemical Society**., Vol 23, p 409-414, 2012.

SCIFINDER, 2018. Pagina acessada em: <https://scifinder.cas.org/scifinder/view/scifinder/scifinderExplore.jsf>, Acesso em 07/02/2018 às 13:51.

SOUZA, C.MM.; et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química nova**, Vol. 30, n 2, p351-355, 2007.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para a identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APGII**. Instituto Plantarum, SP, 2005.

STEELE, J.C.P. et al. Indole and b-carboline alkaloids from *Geissospermum sericeum*. **Journal of Natural Products**, v.65, p.85-88, 2002.

TORRES, Z.E.S., et al. Chemical composition of *Aspidosperma ulei* Markgr. and Antiplasmodial activity of Selected Indole Alkaloids. **Molecules**. V. 18, p. 6281-6297, 2013.

TPL – The Plant List. Version. Disponível em: <http://www.theplantlist.org/tp1.1/search?q=Geissospermum>. Acesso em 29 de fevereiro de 2016.

TRAGER, W., JENSEN, J.B. HUMAN MALARIA PARASITES IN CONTINUOUS CULTURE. **SCIENCE**, 193, P. 673-675, 1976.

TROPICOS, Missouri Botanical Garden. Disponível em: <http://www.tropicos.org/Name/40013231?tab=subordinatetaxa>. Acesso 29 de fevereiro de 2016.

WAGNER, H., BLOAT, S. **Plant Drugs Analysis: A thin layer chromatography atlas**. 2nd ed, 1996.

WELLENS, T.E., WALKER-JONAH, A., PANTON, L. J. Genetic mapping of the chloroquina reresistance locus on *P. falciparum* chromosome 7. **Proc. Nall. Acoed Sci**. Vol 88, p 3382-3386, 1991.

WHO. Status report on artemisinin and ACT resistance, World Health Organization (WHO). 2015(b) (<http://www.who.int/malaria/publications/atoz/status-rep-artemisinin-act-resistance-sept2015.pdf>, acessado em 27/02-2016).

WHO. World Malaria Report 2015(a) (WHO). (<http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2015/en/>), acessado em 27 de fevereiro de 2016.

WHO. World Malaria Report 2017(a) (WHO). (<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/259492/1/9789241565523-eng.pdf?ua=1>), acessado em 17 de fevereiro de 2018.

WHO. Emergency response to artemisinin resistance in the Greater Mekong subregion: regional framework for action 2013-2015, World Health Organization (WHO). 2013 (<http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241505321/en/>) acessado em 27/02/2016.

WHO. World Health Organization: Guidelines for the treatment of Malaria. Third edition. WHO, 2015 (C).

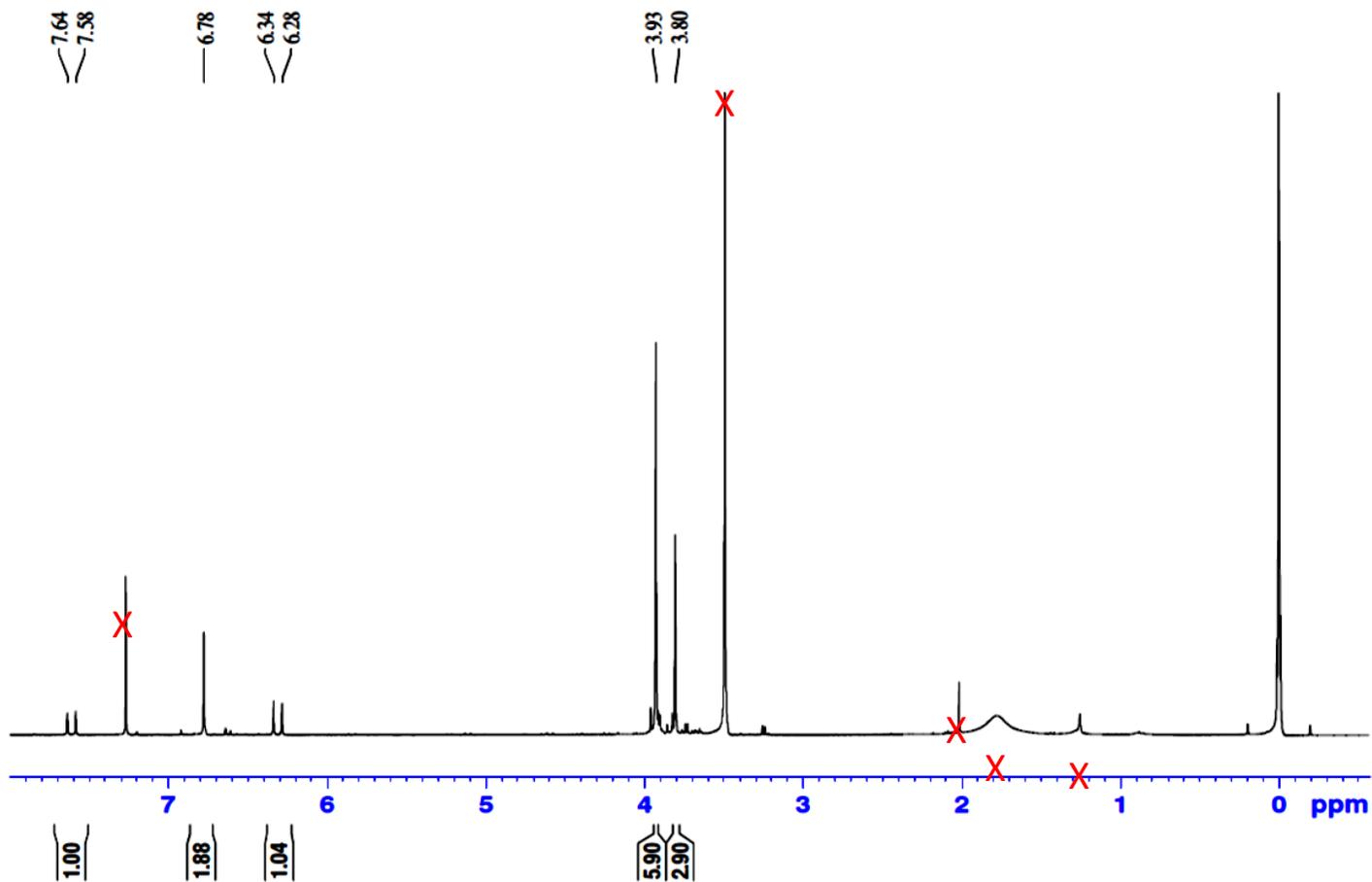
WILLCOX, M. L.; BODEKER, G.; RASOANAIVO, P. (2004) Traditional Medicinal Plants and Malária. Tradicional Medicines for Modern Times, CRC Press, London, UK. 2004.

World Health Organization. (2016b) Eliminating Malaria in the Greater Mekong Subregion - United to end a deadly disease. World Health Organization. WHO/HTM/GMP/2016.12.

ANEXOS

ANEXO 1 A (Espectro de RMN de ^1H (300 MHz) da substância S2, em CDCl_3).

Bruna_17_BO12CP31 (1H, 2.0 mg, CDCl_3)



Current Data Parameters
NAME Bruna_17_BO12CP31
EXPNO 11
PROCNO 1

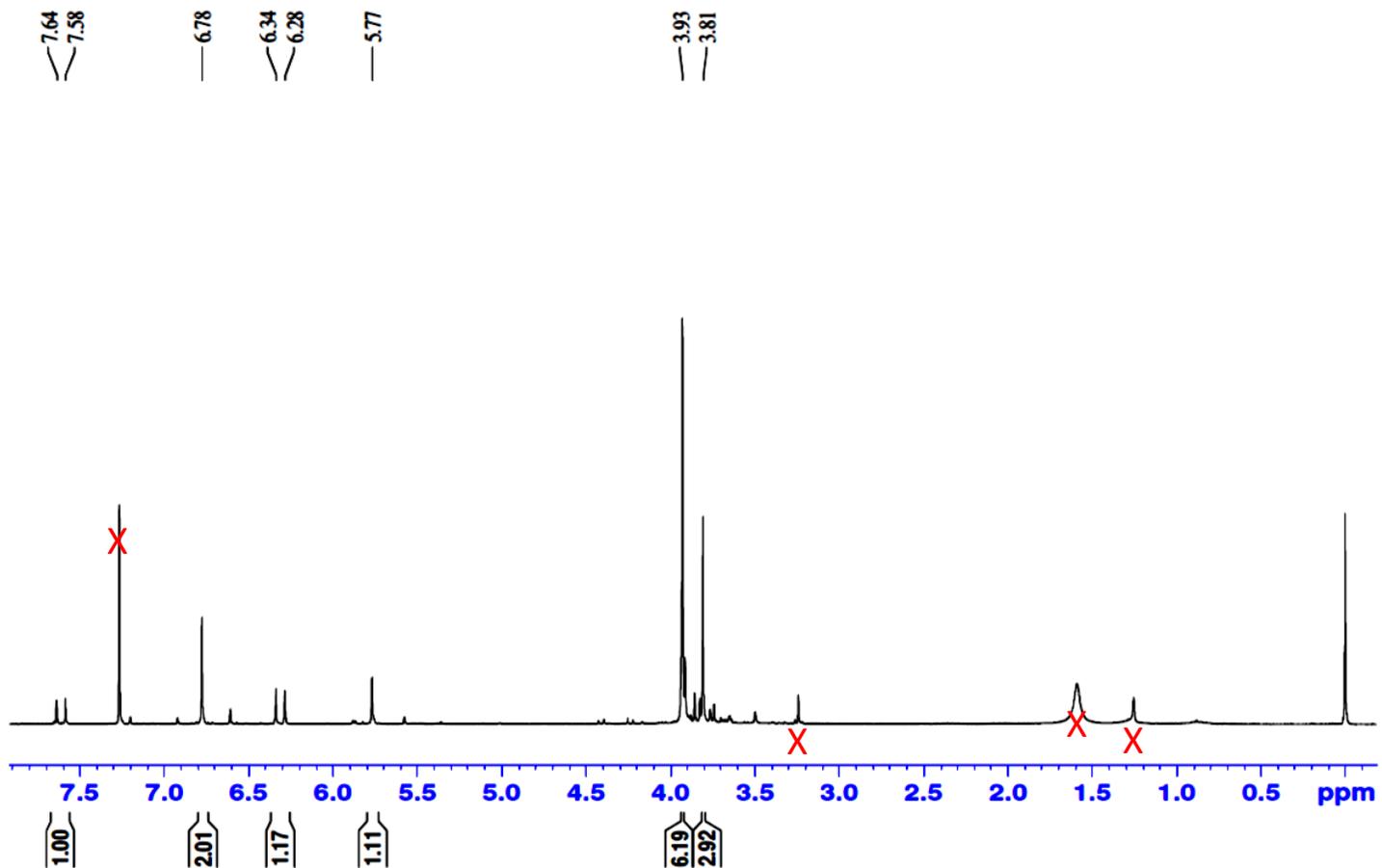
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20170906
Time 16.19
INSTRUM FOURIER300
PROBHD 5 mm DUL 13C-1
PULPROG zg
TD 65536
SOLVENT CDCl_3
NS 64
DS 2
SWH 6103.516 Hz
FIDRES 0.093132 Hz
AQ 5.3687091 sec
RG 19.443
DW 81.920 usec
DE 10.00 usec
TE 293.0 K
D1 1.0000000 sec
TD0 1

===== CHANNEL f1 =====
SFO1 300.2019513 MHz
NUC1 ^1H
P1 7.88 usec
PLW1 20.0000000 W

F2 - Processing parameters
SI 65536
SF 300.2000008 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0 Hz
GB 0
PC 1.00

ANEXO 1 B (Espectro de RMN de ^1H (300 MHz) da substância S2, em CDCl_3).

BO12CP31 (1H; CDCl_3 ; 1.5 mg)



Current Data Parameters
 NAME sem MeOH
 EXPNO 14
 PROCNO 1

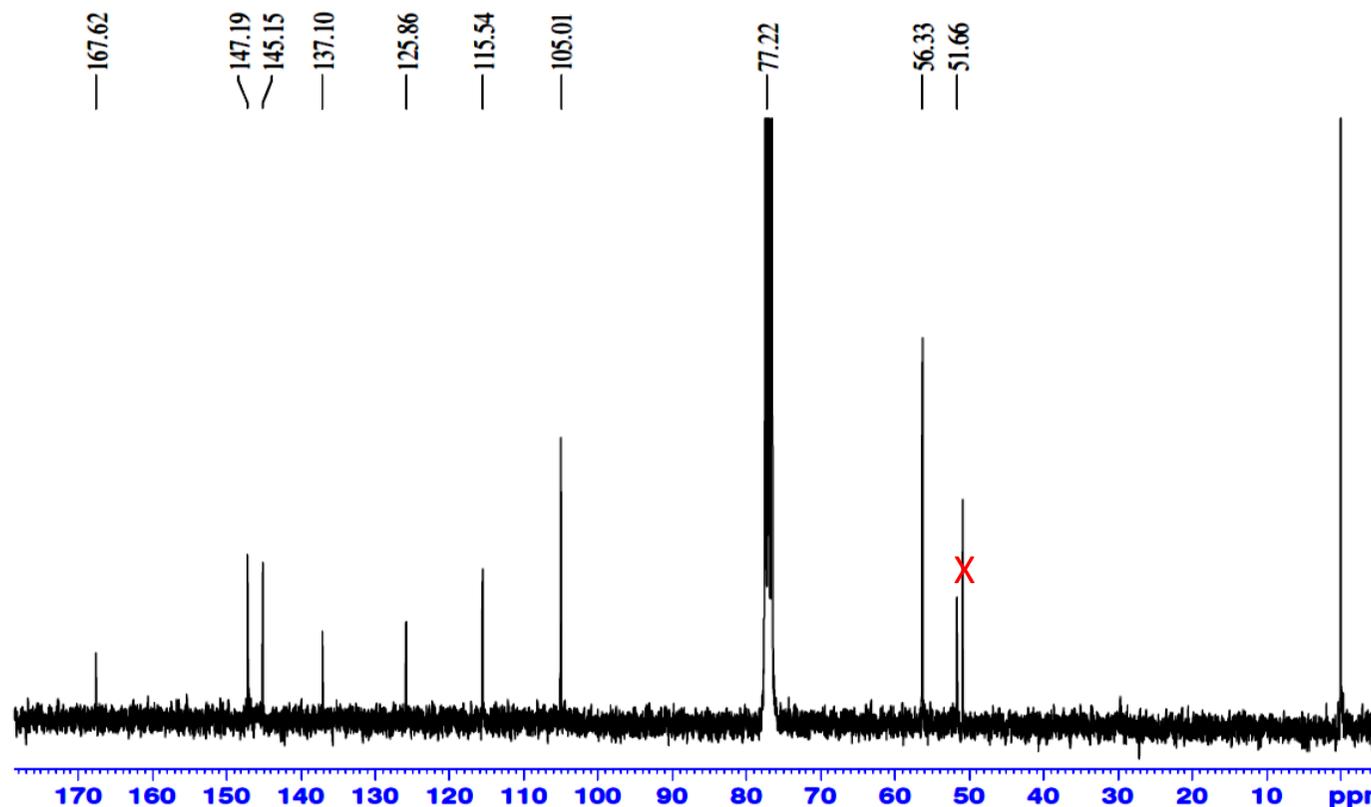
F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20171114
 Time 15.20
 INSTRUM FOURIER300
 PROBHD 5 mm DUL 13C-1
 PULPROG zg
 TD 65536
 SOLVENT CDCl_3
 NS 64
 DS 2
 SWH 6103.516 Hz
 FIDRES 0.093132 Hz
 AQ 5.3687091 sec
 RG 62.1535
 DW 81.920 usec
 DE 10.00 usec
 TE 285.8 K
 D1 1.0000000 sec
 TDO 1

===== CHANNEL f1 =====
 SFO1 300.2019513 MHz
 NUC1 ^1H
 P1 7.88 usec
 PLW1 20.0000000 W

F2 - Processing parameters
 SI 65536
 SF 300.2000014 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 0 Hz
 GB 0
 PC 1.00

ANEXO 2 (Espectro de RMN de ^{13}C (75MHz) da substância S2, em CDCl_3).

Bruna_17_BO12CP31 (^{13}C , 2.0 mg, CDCl_3)



Current Data Parameters
NAME Bruna_17_BO12CP31
EXPNO 2
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20170919
Time 17.36
INSTRUM FOURIER300
PROBHD 5 mm DUL 13C-1
PULPROG zgpg30
TD 32768
SOLVENT CDCl_3
NS 41984
DS 0
SWH 24414.063 Hz
FIDRES 0.745058 Hz
AQ 0.6710886 sec
RG 501.187
DW 20.480 usec
DE 10.00 usec
TE 292.1 K
D1 0.80000001 sec
D11 0.03000000 sec
D31 0.0000875 sec
D40 0.00467796 sec
L4 20
L5 23
P32 90.00 usec
TD0 1

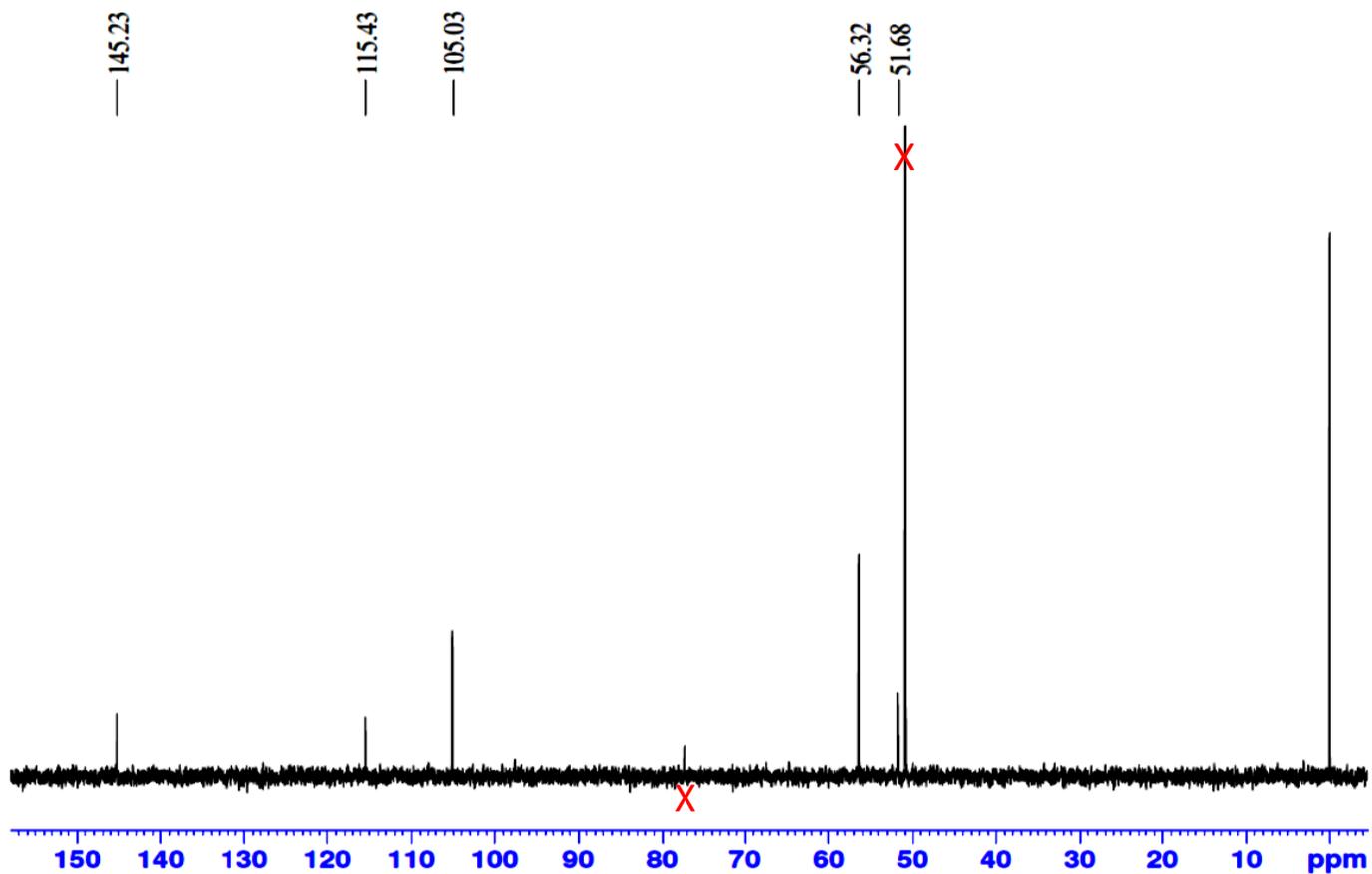
==== CHANNEL f1 =====
SFO1 75.4928982 MHz
NUC1 ^{13}C
P1 8.75 usec
PLW1 50.00299835 W

==== CHANNEL f2 =====
SFO2 300.2012008 MHz
NUC2 ^1H
CPDPRG[2] waltz16
PCPD2 90.00 usec
PLW2 20.0000000 W
PLW12 0.16806000 W
PLW13 0.13613001 W

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

ANEXO 3 (Espectro de RMN DEPT 135 (300 MHz) da substância S2, em CDCL3).

Bruna_17_BO12CP31 (Dept 135, 2.0 mg, CDC13)



Current Data Parameters
NAME Bruna_17_BO12CP31
EXPNO 4
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20170815
Time 11.23
INSTRUM FOURIER300
PROBHD 5 mm DUL 13C-1
PULPROG dept135
TD 65536
SOLVENT CDCl3
NS 2048
DS 8
SWH 24414.063 Hz
FIDRES 0.372529 Hz
AQ 1.3421773 sec
RG 501.187
DW 20.480 usec
DE 10.00 usec
TE 293.8 K
CNST2 145.000000
D1 2.0000000 sec
D2 0.00344828 sec
D14 0.00001114 sec
D33 0.00000825 sec
D34 0.00344053 sec
D35 0.00345340 sec
L4 40
P32 90.00 usec
TDO 1

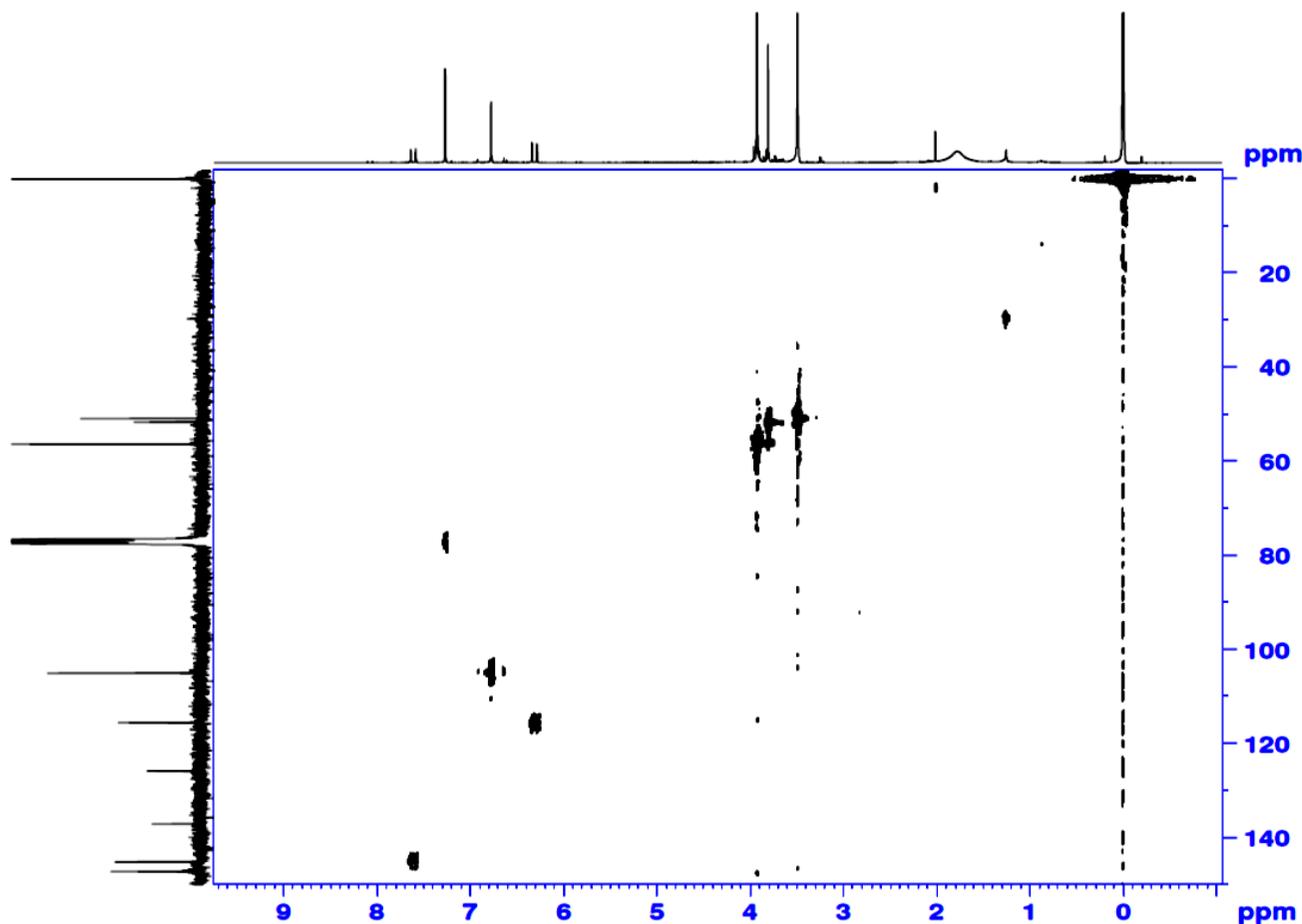
===== CHANNEL f1 =====
SFO1 75.4913881 MHz
NUC1 13C
P1 8.75 usec
P2 17.50 usec
PLW1 50.00299835 W

===== CHANNEL f2 =====
SFO2 300.2009601 MHz
NUC2 1H
CPDPRG2 waltz16
P3 8.25 usec
P4 16.50 usec
PCPD2 90.00 usec
PLW2 20.0000000 W
PLW12 0.16806000 W

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

ANEXO 4 (Espectro de RMN HSQC (300 MHz) da substância S2, em CDCL3).

BO12CP31 (HSQC; CDCl3; 1,7 mg)



```

Current Data Parameters
NAME: Brans_17_BO12CP31
EXPNO: 201
PROCNO: 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_: 20170911
Time: 11.31
INSTRUM: FQRHHR300
PROBHD: 5 mm DUL 1H/1
PULPROG: zgpg30
TD: 65536
SOLVENT: CDCl3
NS: 544
DS: 16
SWH: 6103.516 Hz
FIDRES: 2.98232 Hz
AQ: 0.167722 sec
RG: 201.187
DWB: 81.920 usec
DE: 10.00 usec
TE: 293.9 K
CNSF2: 145.000000
D0: 0.0000000 sec
D1: 1.0000000 sec
D4: 0.0017244 sec
D11: 0.0000000 sec
D13: 0.0000000 sec
D16: 0.0000000 sec
D31: 0.00000773 sec
D32: 0.00001550 sec
D33: 0.00000000 sec
D34: 0.00001860 sec
D36: 0.00100000 sec
D37: 0.00000078 sec
D38: 0.00001745 sec
D42: 0.00000135 sec
D43: 0.00002150 sec
D44: 0.00120000 sec
D45: 0.00051614 sec
L4: 0.00034490 sec
L4: 19
P35: 75.00 usec

--- CHANNEL f1 ---
NUC1: 300.2019513 MHz
NUC2: 13C
P1: 7.75 usec
P2: 15.50 usec
PLW1: 20.00000000 W

--- CHANNEL f2 ---
SFO2: 75.4921437 MHz
NUC2: 13C
CPDPRG2: gcp
P3: 0.30 usec
P4: 18.00 usec
PCPD2: 75.00 usec
PLW2: 50.00000000 W
PLW12: 0.80352008 W

--- GRADIENT CHANNEL ---
GPNAM11: SINE,100
GPNAM12: SINE,100
GPNAM13: SINE,100
GPF1: 80.00 %
GPF2: 30.00 %
GPF3: 20.00 %
P16: 1000.00 usec

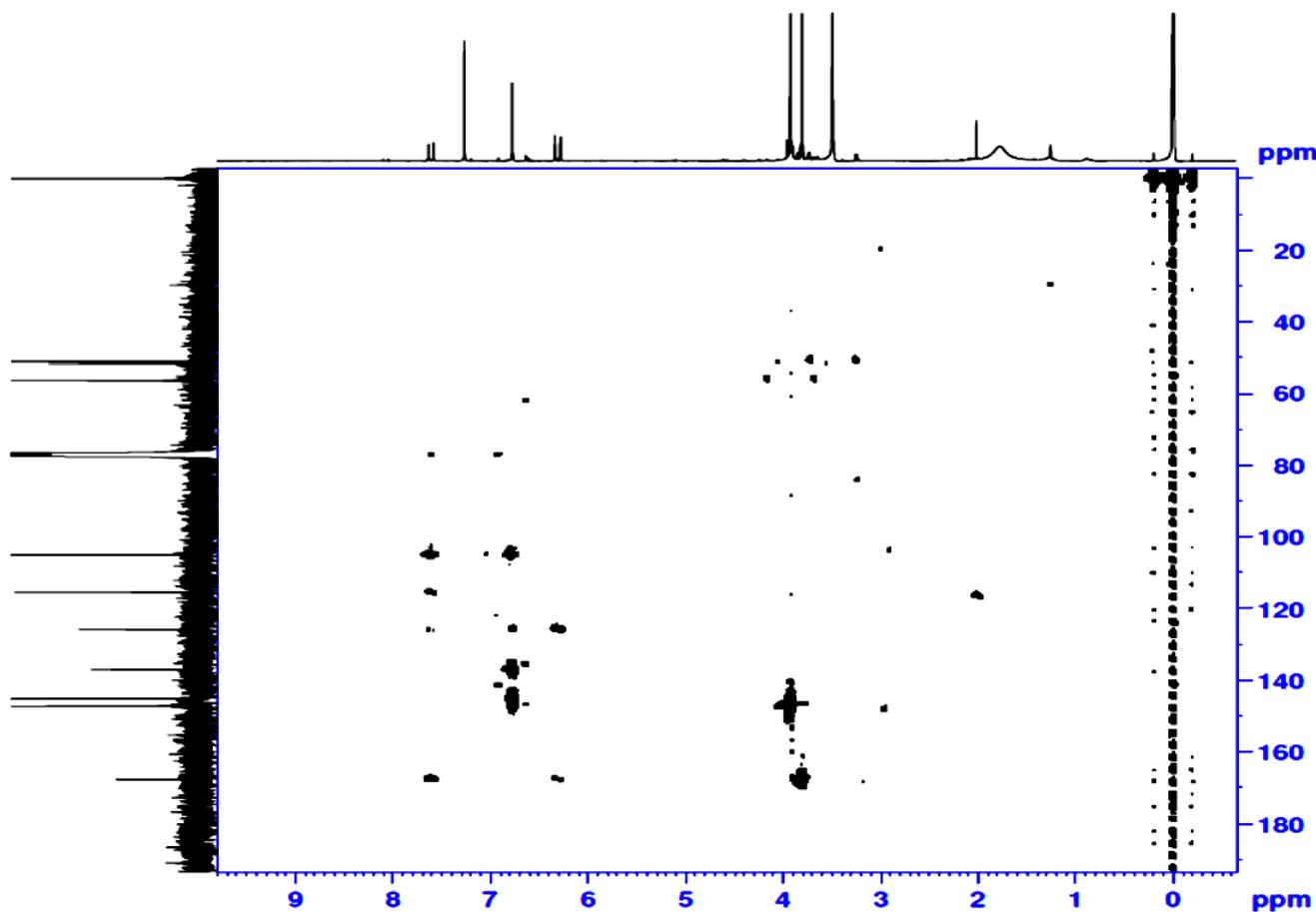
F1 - Acquisition parameters
TD: 65536
SFO1: 75.49214 MHz
FIDRES: 177.070779 Hz
AQ: 0.167722 sec
PULPROG: zgpg30

F2 - Processing parameters
SI: 65536
SF: 300.2000000 MHz
WDW: EM
SSB: 0
LB: 0 Hz
GB: 0
PC: 1.40

F1 - Processing parameters
SI: 65536
SF: 75.4915000 MHz
WDW: EM
SSB: 0
LB: 0 Hz
GB: 0
PC: 1.40
    
```

ANEXO 5 (Espectro de RMN HMBC (300 MHz) da substância S2, em CDCL3).

Bruna_17_BO12CP31 (HMBC, 2.0 mg, CDC13)



```
Current Data Parameters
NAME: Bruna_17_BO12CP31
EXPNO: 301
PROCNO: 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_: 20170806
Time: 17.02
INSTRUM: spect
PROBHD: 5 mm DUL 13C 1
PULPROG: zgpg30
TD: 65536
SOLVENT: CDCl3
NS: 520
DS: 16
SWH: 6103.51634 Hz
FIDRES: 2.980232 Hz
AQ: 0.1677722 sec
RG: 301.187
DNW: 81.920 umsec
DE: 10.00 umsec
TE: 293.1 K
CNS1: 145.000000
CNS2: 145.000000
CNS3: 8.000000
D0: 0.000000 sec
D1: 1.000000 sec
D2: 0.00344828 sec
D6: 0.0625000 sec
D16: 0.00029000 sec
D31: 0.00007564 sec
D32: 0.00001528 sec
D33: 0.00000930 sec
D36: 0.00100000 sec
D38: 0.00003010 sec
END

===== CHANNEL f1 =====
SFO1: 300.2019913 MHz
NUC1: 13C
P1: 7.64 umsec
P2: 15.28 umsec
PT.W1: 20.0000000 W

===== CHANNEL f2 =====
SFO2: 75.4932760 MHz
NUC2: 1H
P3: 9.30 umsec
PT.W2: 50.0000000 W

===== GRADIENT CHANNEL =====
GPM1M1: SING1 100
GPM1M2: SING1 100
GPM1M3: SING1 100
GPZ1: 50.00 %
GPZ2: 30.00 %
GPZ3: 40.00 %
PL1: 1000.00 umsec

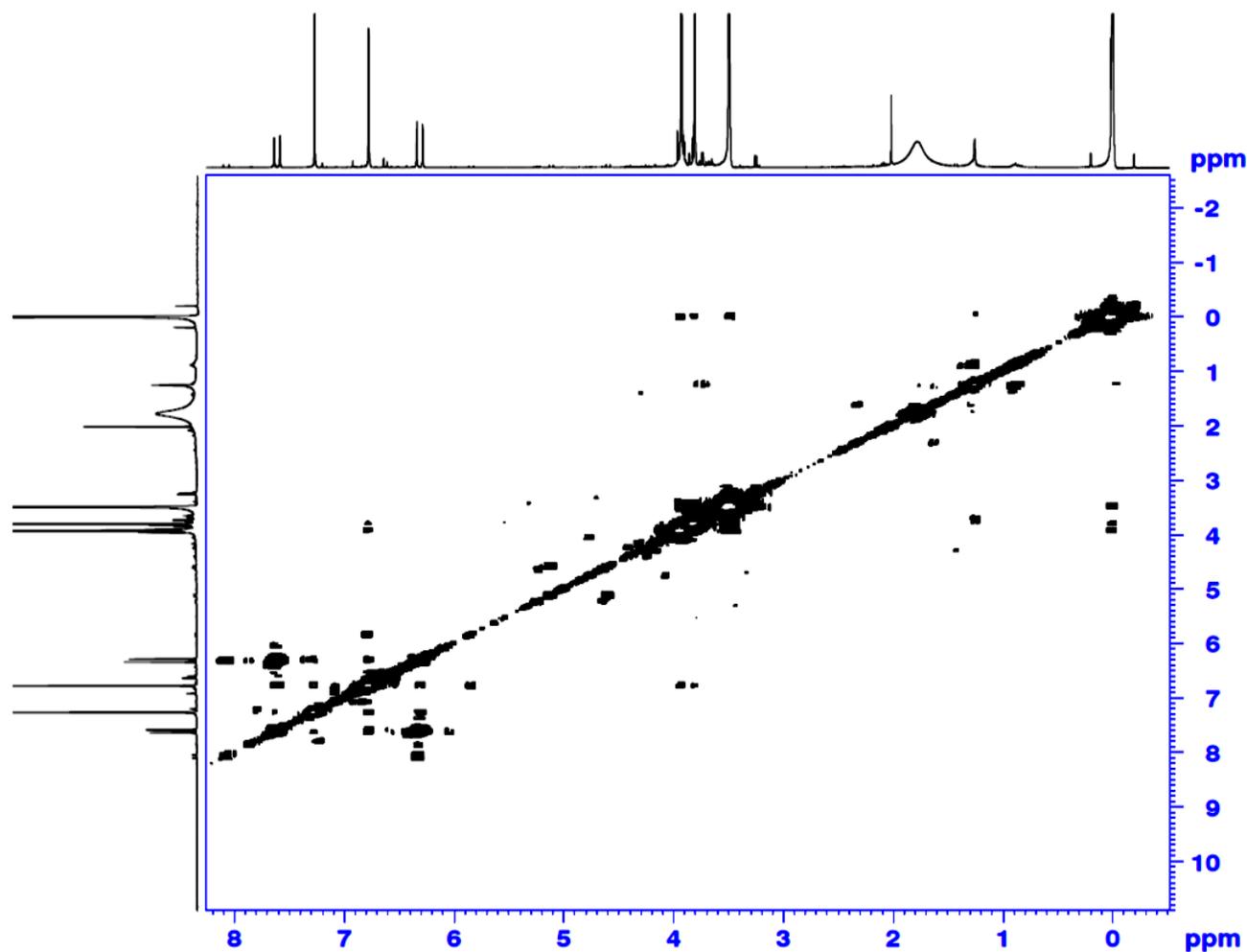
F1 - Acquisition parameters
TD: 256
SFO1: 75.49328 MHz
FIDRES: 1.29 737742 Hz
SW: 220.037 ppm
FAMODE: QF

F2 - Processing parameters
SI: 4096
SF: 300.1999926 MHz
WDW: SINE
SSB: 0
LB: 0 Hz
GB: 0
PC: 1.40

F1 - Processing parameters
SI: 4096
SF: 75.4853628 MHz
WDW: SINE
SSB: 0
LB: 0 Hz
GB: 0
```

ANEXO 6 (Espectro de RMN COSY (300 MHz) da substância S2, em CDCL3).

Bruna_17_BO12CP31 (COSY, 2.0 mg, CDCl3)



Current Data Parameters
NAME Bruna_17_BO12CP31
EXPNO 100
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20170815
Time 13.20
INSTRUM FOURIER300
PROBHD 5 mm DUL 13C-1
PULPROG cosygpqf
TD 2048
SOLVENT CDCl3
NS 38
DS 16
SWH 6103.516 Hz
FIDRES 2.980232 Hz
AQ 0.1677722 sec
RG 31.623
DW 81.920 usec
DE 10.00 usec
TE 293.4 K
D0 0.00000300 sec
D1 1.0000000 sec
D13 0.00000400 sec
D16 0.00020000 sec
IN0 0.00016380 sec

----- CHANNEL f1 -----
SFO1 300.2019513 MHz
NUC1 1H
P0 7.88 usec
P1 7.88 usec
PLW1 20.00000000 W

----- GRADIENT CHANNEL -----
GPNAM[1] SINE.100
GPZ1 10.00 %
P16 1000.00 usec

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

F2 - Processing parameters
SI 4096
SF 300.1999935 MHz
WDW QSINE
SSB 0
LB 0 Hz
GB 0
PC 1.40

F1 - Processing parameters
SI 4096
MC2 QF
SF 300.1999963 MHz
WDW QSINE
SSB 0
LB 0 Hz
GB 0

ANEXO 7 (Espectro de LC-EMAR da substância S2).

Display Report

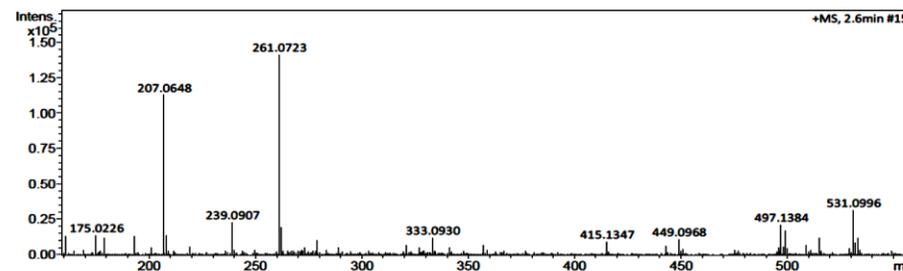
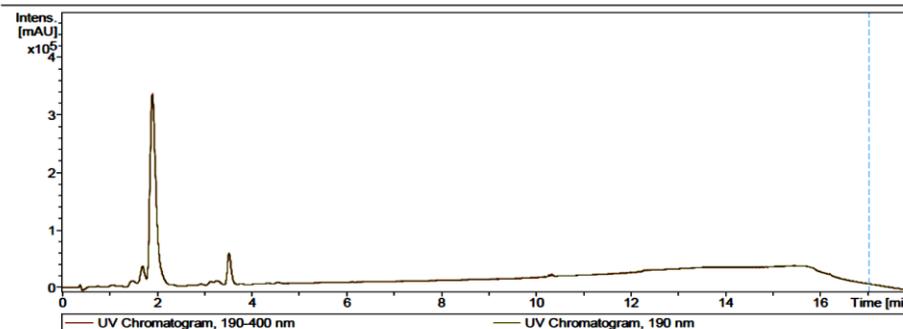
Analysis Info
 Analysis Name C:\Users\Hugo\Desktop\Dr 2017\MS\LC-MS_28-09-2017_Parte 2\LC-MS_28-09-2017_Parte 2\ODS_ESI+_BO12CP31_2uL_1-12_01_1670.d
 Method Tune_Low_ESI+_Bruna_50-900_18min.m
 Sample Name ODS_ESI+_BO12CP31_2uL
 Comment ODS50x2,0mm Flx=0,4 mL/min[Split de 0,06 mL(MS)/0,34mL(desc)];P:3700psi;F=30C
 C=1mg/mL(MeOH:ACN:1) (1mg/mL);Inj=2uL;
 A(H2O+0,1%HCOOH)/B(MeOH+0,1%HCOOH)
 0-12m_70-100%
 12-14m_100%
 14-16m_100-70%
 16-18m_70%
 inj: MeOH
 Calib.:HCOONa10mM_end

Acquisition Date 28-Sep-17 9:30:23 AM

Operator BDAL@DE
 Instrument micrOTOF-Q 228888.10431

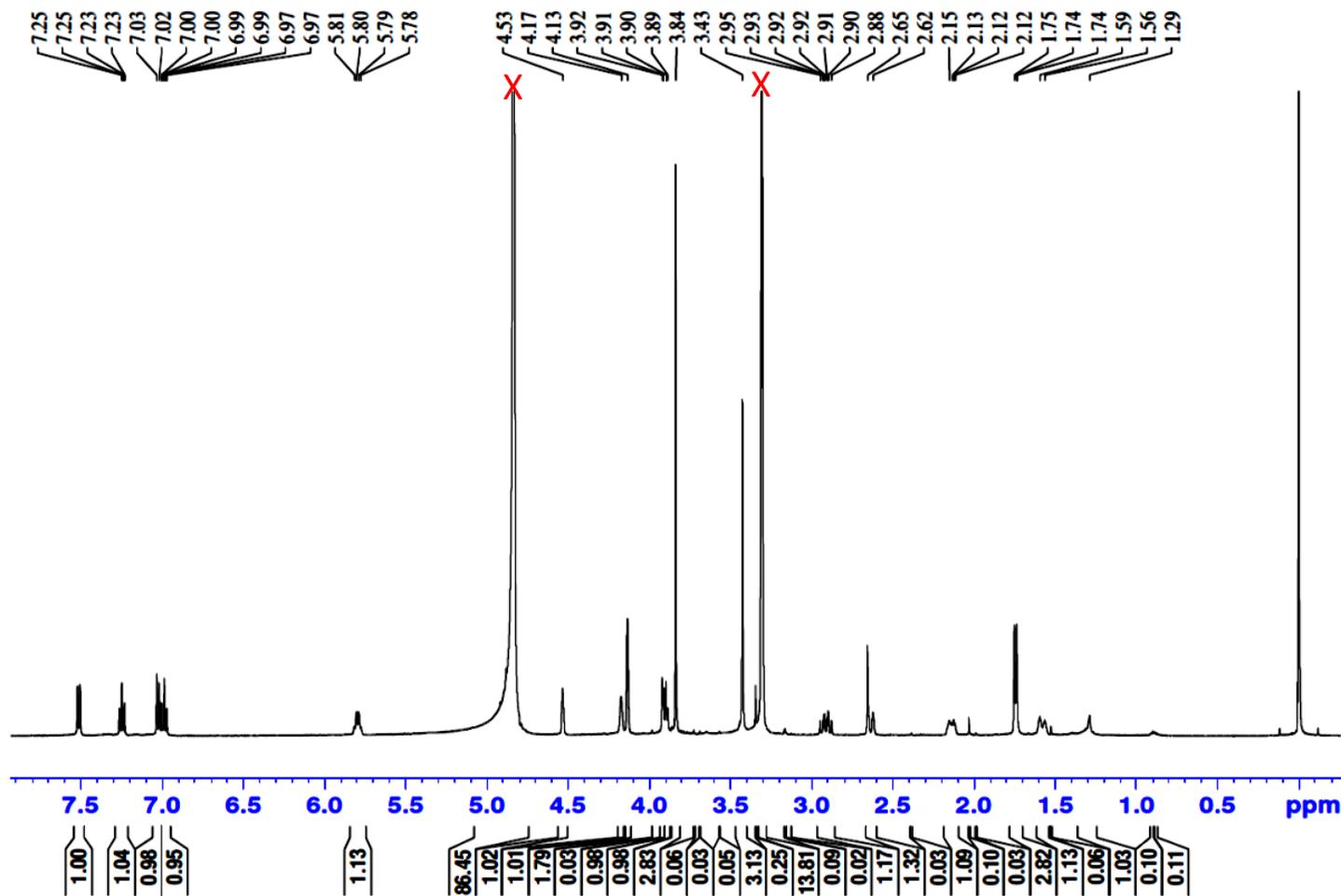
Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	5.0 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	4500 V	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	100 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	10.0 l/min
Scan End	900 m/z	Set Collision Cell RF	100.0 Vpp	Set Divert Valve	Waste



ANEXO 8 (Espectro de RMN de ^1H (500 MHz) da substância S3, em MeOD).

^1H
 AMOSTRA: B0F24C17P26
 SOLV. MEOD



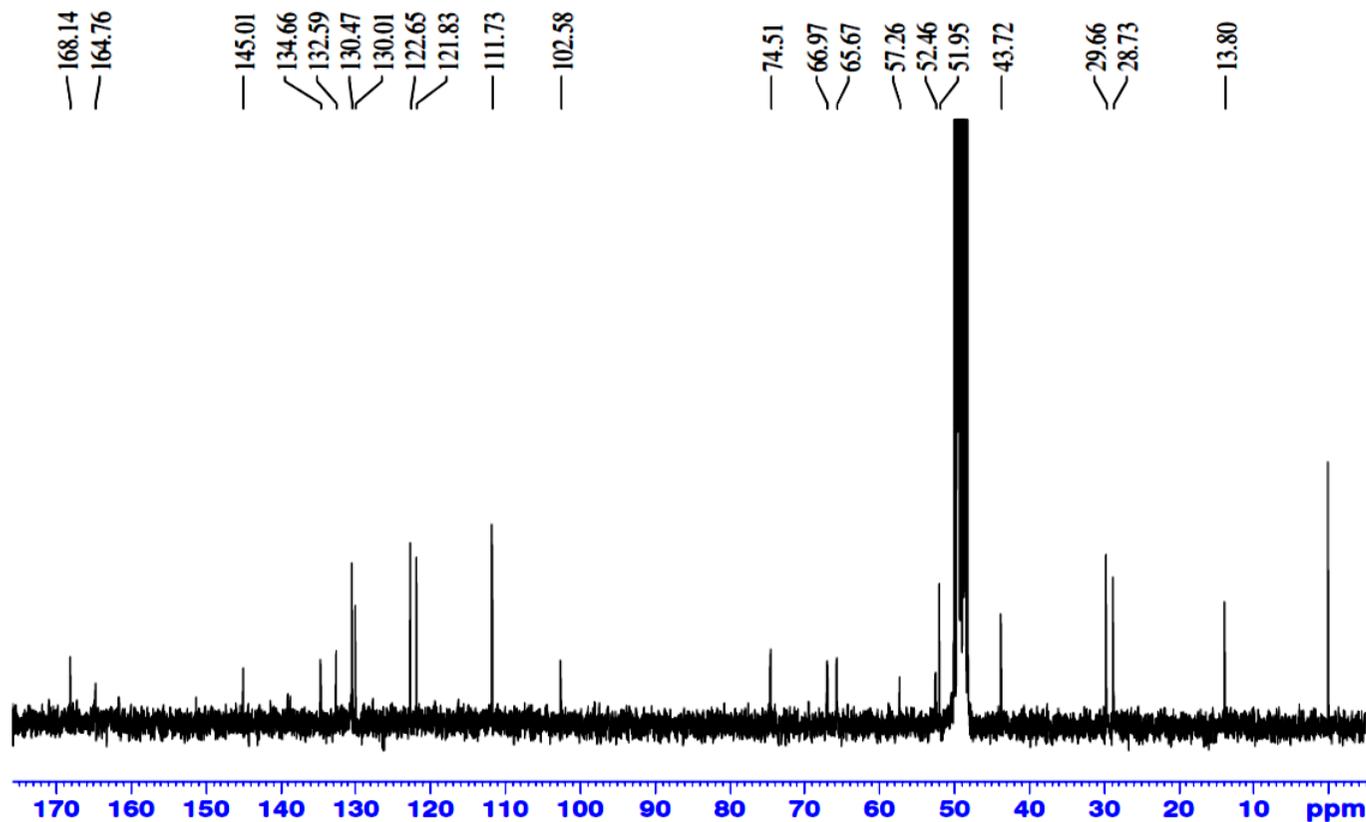
Current Data Parameters
 NAME NMR-784-17_BOF24C17P26
 EXPNO 1
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20171104
 Time 16.12 h
 INSTRUM spect
 PROBHD Z119470_0223 ()
 PULPROG zg30
 TD 65536
 SOLVENT MeOD
 NS 16
 DS 2
 SWH 10000.000 Hz
 FIDRES 0.152588 Hz
 AQ 3.2767999 sec
 RG 147.17
 DW 50.000 usec
 DE 10.00 usec
 TE 298.1 K
 D1 1.0000000 sec
 TD0 1
 SFO1 500.1330883 MHz
 NUC1 ^1H
 P1 9.40 usec
 PLW1 20.32299995 W

F2 - Processing parameters
 SI 131072
 SF 500.1300122 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 0.30 Hz
 GB 0
 PC 1.00

ANEXO 9 (Espectro de RMN de ^{13}C (75MHz) da substância S3, em MeOD).

Bruna_17_BOF24C17P26 (13C, 5.7 mg, MeOD)



Current Data Parameters
NAME Brun_17_BOF24C17P26
EXPNO 2
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20171002
Time 17.57
INSTRUM FOURIER300
PROBHD 5 mm DUL 13C-1
PULPROG zgpg30
TD 32768
SOLVENT MeOD
NS 56204
DS 0
SWH 24414.063 Hz
FIDRES 0.745058 Hz
AQ 0.6710886 sec
RG 501.187
DW 20.480 usec
DE 10.00 usec
TE 293.6 K
D1 0.40000001 sec
D11 0.03000000 sec
D31 0.00000875 sec
D40 0.01963016 sec
L4 20
L5 11
P32 90.00 usec
TDO 1

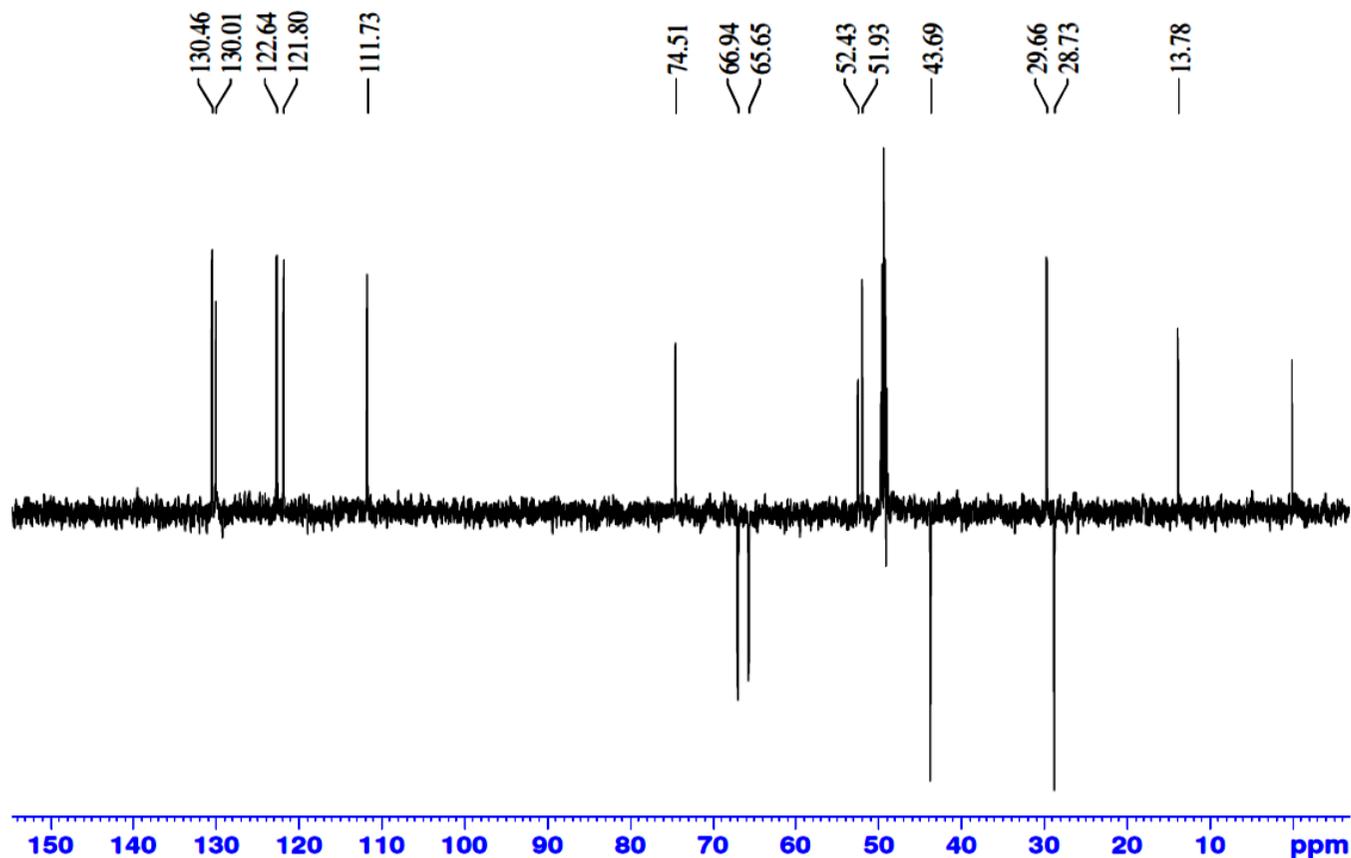
===== CHANNEL f1 =====
SFO1 75.4928982 MHz
NUC1 13C
P1 8.75 usec
PLW1 50.00299835 W

===== CHANNEL f2 =====
SFO2 300.2012008 MHz
NUC2 1H
CPDPRG2 waltz16
PCPD2 90.00 usec
PLW2 20.00000000 W
PLW12 0.16806000 W
PLW13 0.13613001 W

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 75.4852393 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.40

ANEXO 10 (Espectro de RMN DEPT 135 (500 MHz) da substância S3, em MeOD).

DEPT135
 AMOSTRA: B0F24C17P26
 SOLV. MEOD



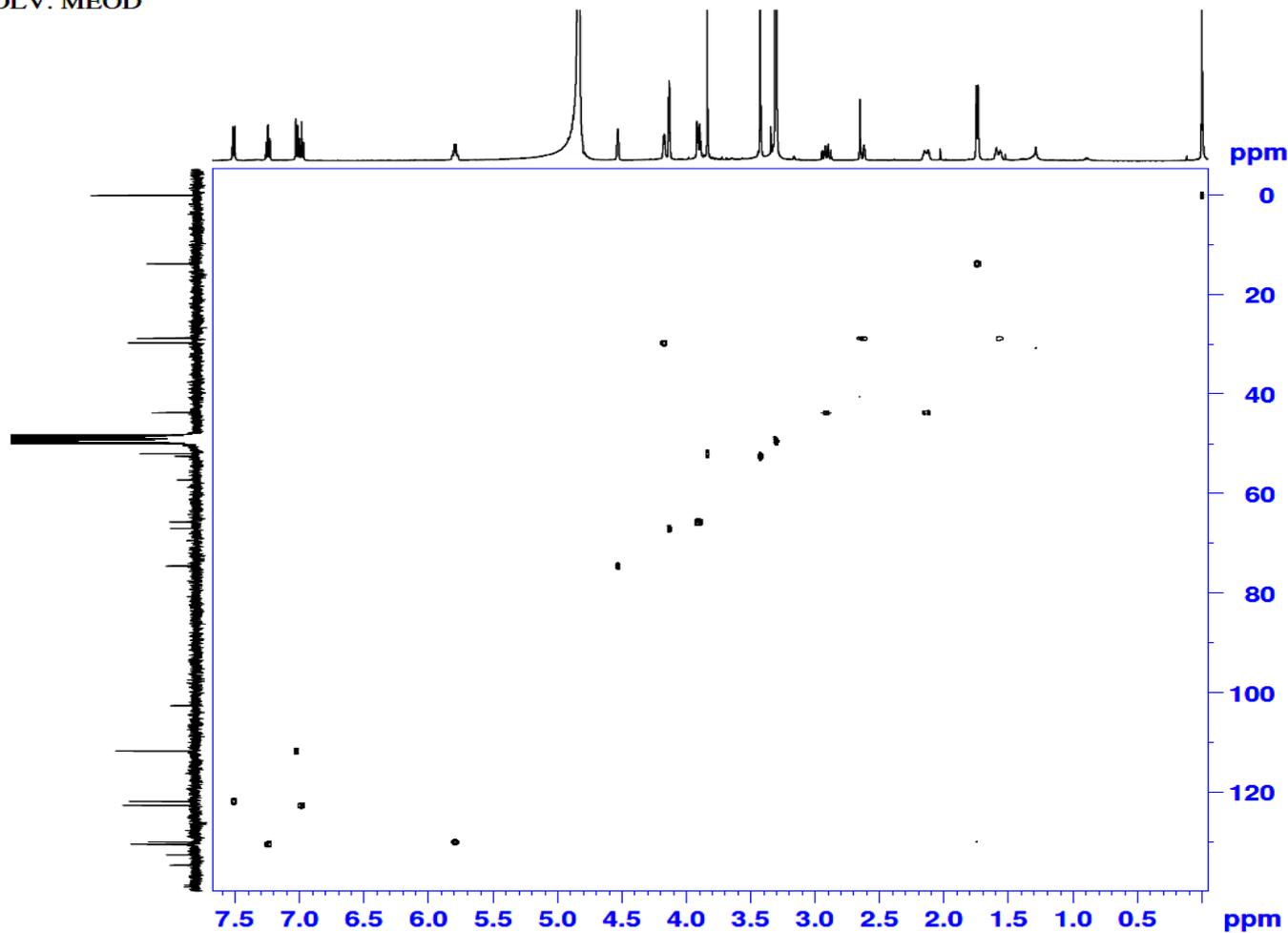
Current Data Parameters
 NAME NMR-784-17_BOF24C17P26
 EXPNO 31
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20171106
 Time 12.45 h
 INSTRUM spect
 PROBHD Z119470_0223 ()
 PULPROG deptsp135
 TD 32768
 SOLVENT MeOD
 NS 4096
 DS 8
 SWH 29761.904 Hz
 FIDRES 0.908261 Hz
 AQ 0.5505024 sec
 RG 187.25
 DW 16.800 usec
 DE 10.00 usec
 TE 298.2 K
 CNST2 145.000000
 D1 2.0000000 sec
 D2 0.00344828 sec
 D12 0.00002000 sec
 TD0 1
 SFO1 125.7716219 MHz
 NUC1 13C
 P1 10.00 usec
 P13 2000.00 usec
 PLW0 0 W
 PLW1 88.00000000 W
 SPNAM[5] Crp60comp.4
 SPOAL5 0.500
 SPOFFS5 0 Hz
 SPW5 13.44499969 W
 SFO2 500.1320005 MHz
 NUC2 1H
 CPDPRG[2] waltz16
 P3 9.40 usec
 P4 18.80 usec
 PCPD2 80.00 usec
 PLW2 20.32299995 W
 PLW12 0.28058001 W

F2 - Processing parameters
 SI 65336
 SF 125.7576075 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 3.00 Hz
 GB 0
 PC 1.40

ANEXO 11 (Espectro de RMN HSQC (500 MHz) da substância S3, em MeOD).

HSQC
 AMOSTRA: B0F24C17P26
 SOLV. MEOD



```

Current Data Parameters
NAME      NMR-784-17_BOF24C17P26
EXPNO    200
PROCNO    1

F2 - Acquisition Parameters
Date_    20171104
Time     16:49 h
INSTRUM  spect
PROBHD   Z119470_0223 (
PULPROG  zgpg30
TD        2048
SOLVENT  MeOD
NS        64
DS        16
SWH1     5514.706 Hz
FIDRES   2.692728 Hz
AQ       0.1856853 sec
RG       187.25
DW       90.667 usec
DE       10.00 usec
TE       298.2 K
CNST1    145.000000
CNST17   -0.500000
D0       0.0000000 sec
D1       1.0000000 sec
D4       0.00172414 sec
D11      0.0300000 sec
D16      0.0002000 sec
D24      0.0008900 sec
IN0      0.00001850 sec
TD0      1
SFO1     500.1322731 MHz
NUC1     13C
P1       9.40 usec
P2       18.80 usec
P28      1000.00 usec
PLW1     20.32299995 W
SFO2     125.7705643 MHz
NUC2     13C
CPDPRG2  gpgp
P3       10.00 usec
P14      500.00 usec
P24      2000.00 usec
PCPD2    70.00 usec
PLW0     0 W
PLW2     88.0000000 W
PLW12    17.8668594 W
SPNAM[3] Cyp660.0.5.20.1
SPCAL3   0.500
SFOF53   0 Hz
SPW3     13.44499969 W
SPNAM[7] Cyp660comp.4
SPCAL7   0.500
SFOF57   0 Hz
SPW7     13.44499969 W
GPNAM[1] SMSQ10.100
GR21     80.00 %
GPNAM[2] SMSQ10.100
GR22     20.10 %
GPNAM[3] SMSQ10.100
GR23     11.00 %
GPNAM[4] SMSQ10.100
GR24     -5.00 %
P16      1000.00 usec
P19      600.00 usec

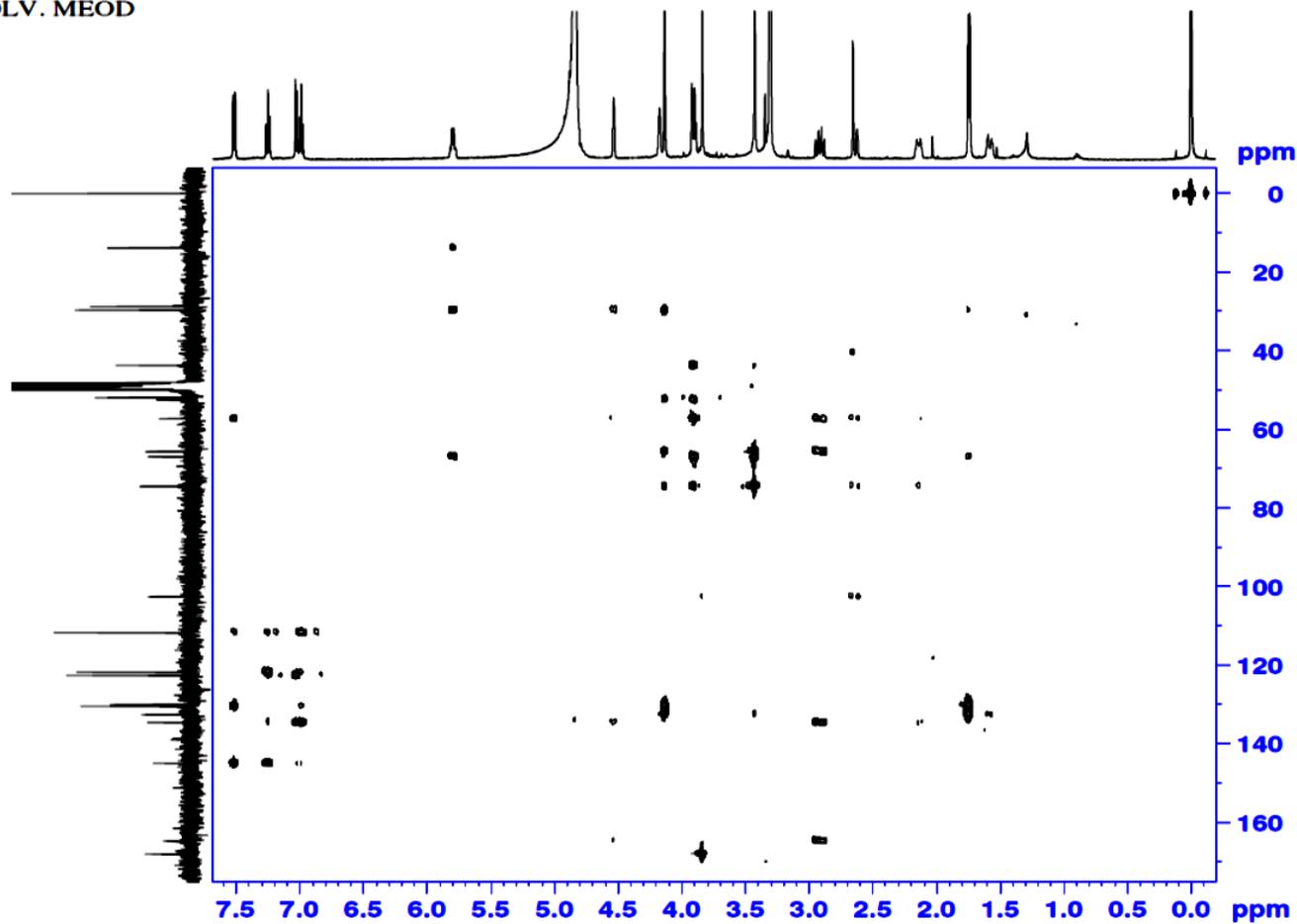
F1 - Acquisition parameters
TD        256
SFO1     125.7704 MHz
FIDRES   211.148651 Hz
SW       214.892 ppm
F2MODE   Echo-Antiecho

F2 - Processing parameters
SI        4096
SF        500.1300123 MHz
WDW       QSINE
SSB       2
LB        0 Hz
GB        0
PC        1.40

F1 - Processing parameters
SI        16384
MC2       echo-antiecho
SF        125.7576644 MHz
WDW       QSINE
SSB       2
LB        0 Hz
GB        0
    
```

ANEXO 12 (Espectro de RMN HMBC (500 MHz) da substância S3, em MeOD).

HMBC
 AMOSTRA: B0F24C17P26
 SOLV. MEOD



Current Data Parameters
 NAME NMR-784-17_B0F24C17P26
 EXPNO 300
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20171104
 Time 22.21 h
 INSTRUM spect
 PROBHD Z119470_0223 ()
 PULPROG hmbcgpipndqf
 TD 2048
 SOLVENT MeOD
 NS 128
 DS 16
 SWH 5020.080 Hz
 FIDRES 2.451211 Hz
 AQ 0.2039808 sec
 RG 187.25
 DW 99.600 usec
 DE 10.00 usec
 TE 298.2 K
 CNST2 145.000000
 CNST13 8.000000
 D0 0.0000300 sec
 D1 1.0000000 sec
 D2 0.00344828 sec
 D6 0.06250000 sec
 D16 0.00020000 sec
 INO 0.00001660 sec
 TDrv 1
 SFO1 500.1322643 MHz
 NUC1 1H
 P1 9.40 usec
 P2 18.80 usec
 PLW1 20.32299995 W
 SFO2 125.7716219 MHz
 NUC2 13C
 P3 10.00 usec
 PLW2 88.00000000 W
 GPNAM[1] SMSQ10.100
 GPZ1 50.00 %
 GPNAM[2] SMSQ10.100
 GPZ2 30.00 %
 GPNAM[3] SMSQ10.100
 GPZ3 40.10 %
 P16 1000.00 usec

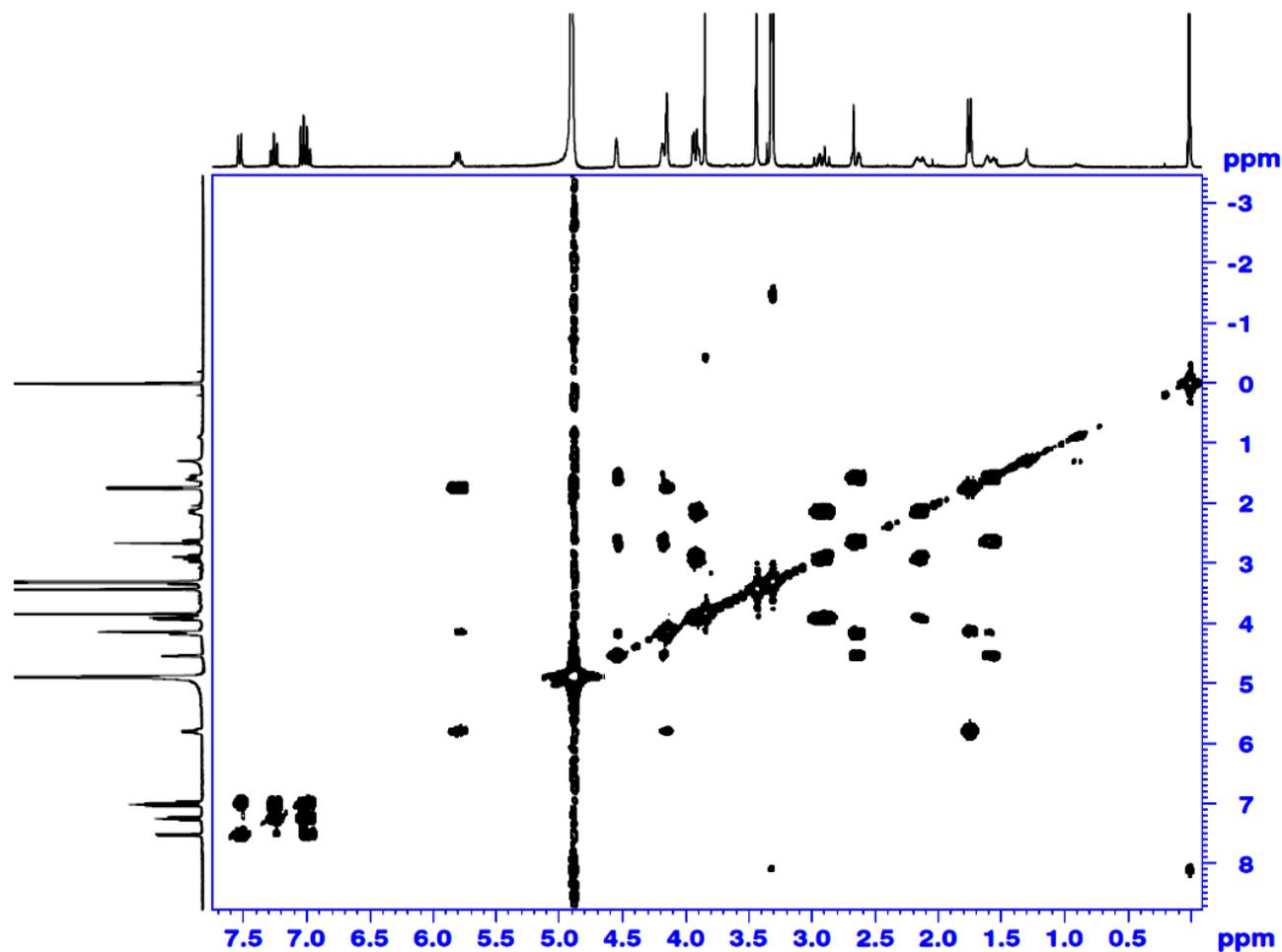
F1 - Acquisition parameters
 TD 312
 SFO1 125.7716 MHz
 FIDRES 193.080017 Hz
 SW 239.486 ppm
 FbMODE QF

F2 - Processing parameters
 SI 4096
 SF 500.1300122 MHz
 WDW SINE
 SSB 0
 LB 0 Hz
 GB 0
 PC 1.40

F1 - Processing parameters
 SI 1024
 MC2 QF
 SF 125.7576068 MHz
 WDW SINE
 SSB 0
 LB 0 Hz
 GB 0

ANEXO 13 (Espectro de RMN COSY (300 MHz) da substância S3, em MeOD).

Bruna_17_BOF24C17P26 (Cosy 5.7.0 mg, MeOD)



Current Data Parameters
NAME: Bruna_17_BOF24C17P26
EXPNO: 100
PROCNO: 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20171009
Time 17.21
INSTRUM FOUJRIER300
PROBHD 5 mm DUL 13C-1
PULPROG cosygpcqf
TD 2048
SOLVENT MeOD
NS 32
DS 16
SWH 6103.516 Hz
FIDRES 2.980232 Hz
AQ 0.1677722 sec
RG 95.7852
DW 81.920 usec
DE 10.00 usec
TE 306.0 K
D0 0.00000300 sec
D1 1.00000000 sec
D13 0.00000400 sec
D16 0.00020000 sec
IN0 0.00016380 sec

----- CHANNEL f1 -----
SFO1 300.2019513 MHz
NUC1 1H
P0 7.88 usec
P1 7.88 usec
PLW1 20.00000000 W

----- GRADIENT CHANNEL -----
GPNAM[1] SINE.100
GPZ1 10.00 %
P16 1000.00 usec

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

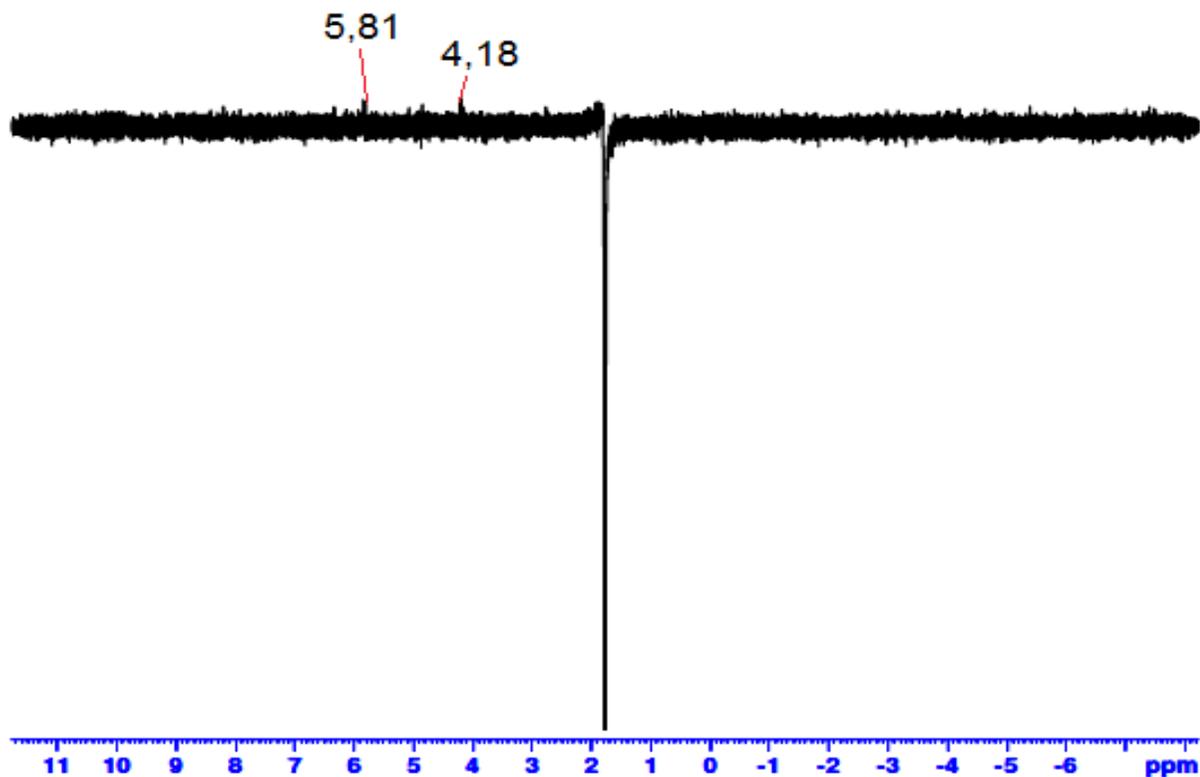
F2 - Processing parameters
SI 4096
SF 300.2000000 MHz
WDW QSINE
SSB 0
LB 0 Hz
GB 0
PC 1.40

F1 - Processing parameters
SI 4096
MC2 QF
SF 300.2000000 MHz
WDW QSINE
SSB 0
LB 0 Hz
GB 0

ANEXO 14 (Espectro de RMN NOESY (500 MHz) da substância S3, em MeOD).

$\delta H = 1,75$

NOESY 1D
Amostra: BOF24C17P26
Solv.: CD3OD
SINAL - 1,75



Current Data Parameters
NAME NMR-784-17_BOF24C17P26
EXPNO 400
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters

Date_ 20180109
Time 7.48 h
INSTRUM spect
PROBHD Z119470_0223 (C
PULPROG zgpg30
TD 65536
SOLVENT MeOD
NS 32
DS 4
SWH 10000.000 Hz
FIDRES 0.152588 Hz
AQ 3.2767999 sec
RG 187.25
DW 50.000 usec
DE 10.00 usec
TE 298.2 K
D1 2.00000000 sec
D8 0.30000001 sec
D16 0.00020000 sec
D20 0.14880000 sec
TD0 1

ZGPGTNS

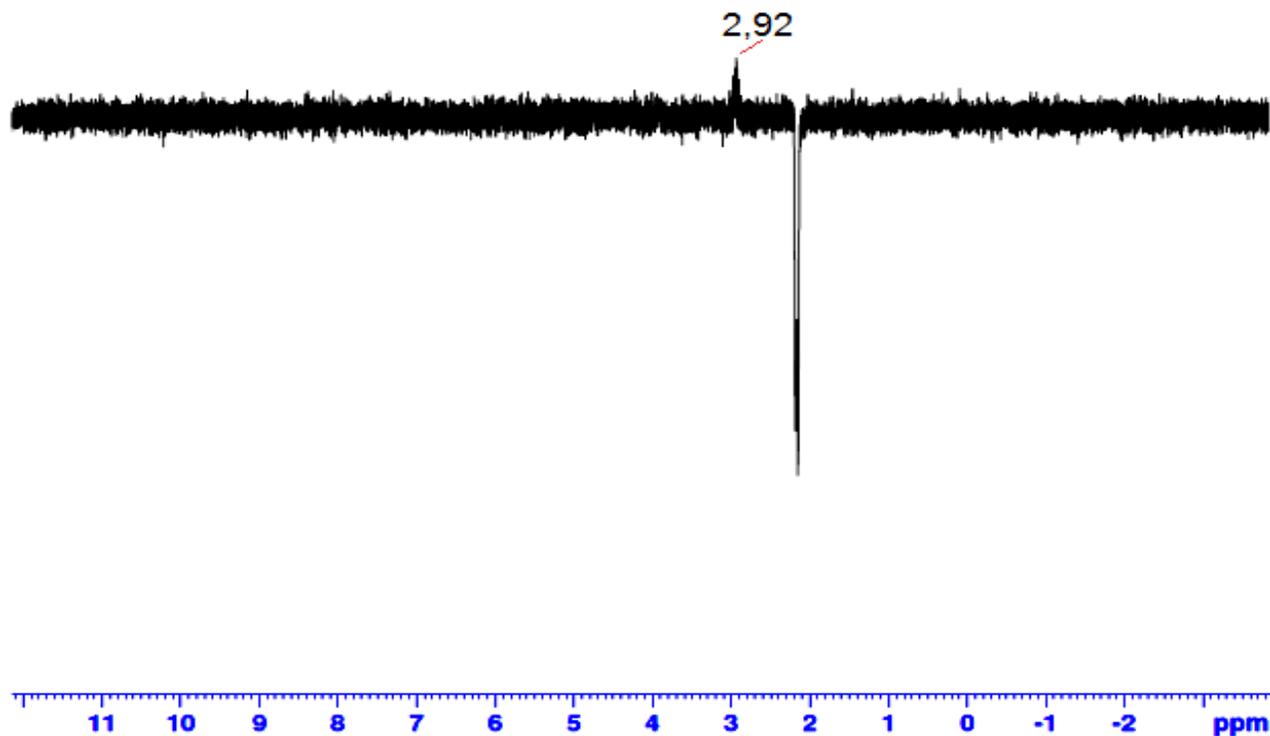
SFO1 500.1308830 MHz
NUC1 1H
P1 9.40 usec
P2 18.80 usec
P12 80000.00 usec
PLW0 0 W
PLW1 20.32299995 W
SPNAM[2] Gauss1_180r.1000
SFOAL2 0.500
SFOFSS2 0 Hz
SPW2 0.00000663 W
GPNAM[1] SMSQ10.100
GBZ1 15.00 %
GPNAM[2] SMSQ10.100
GBZ2 40.00 %
P16 1000.00 usec

F2 - Processing parameters

SF 32768
SF 500.1300000 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.10 Hz
GB 0
PC 1.00

$\delta H = 2,12$

1H_30 ZGPR
Amostra: BOF24C17P26
Solv.: CD3OD
SINAL - 2,12



Current Data Parameters

NAME rnm noesy
EXPNO 407
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters

Date_ 20180109
Time 8.40 h
INSTRUM spect
PROBHD Z119470_0223 (
PULPROG selnpgp
TD 65536
SOLVENT MeOD
NS 32
DS 4
SWH 10000.000 Hz
FIDRES 0.152588 Hz
AQ 3.2767999 sec
RG 187.25
DW 50.000 usec
DE 10.00 usec
TE 298.2 K
D1 2.0000000 sec
D8 0.30000001 sec
D16 0.00020000 sec
D20 0.14880000 sec
TD0 1

ZGOPTNS

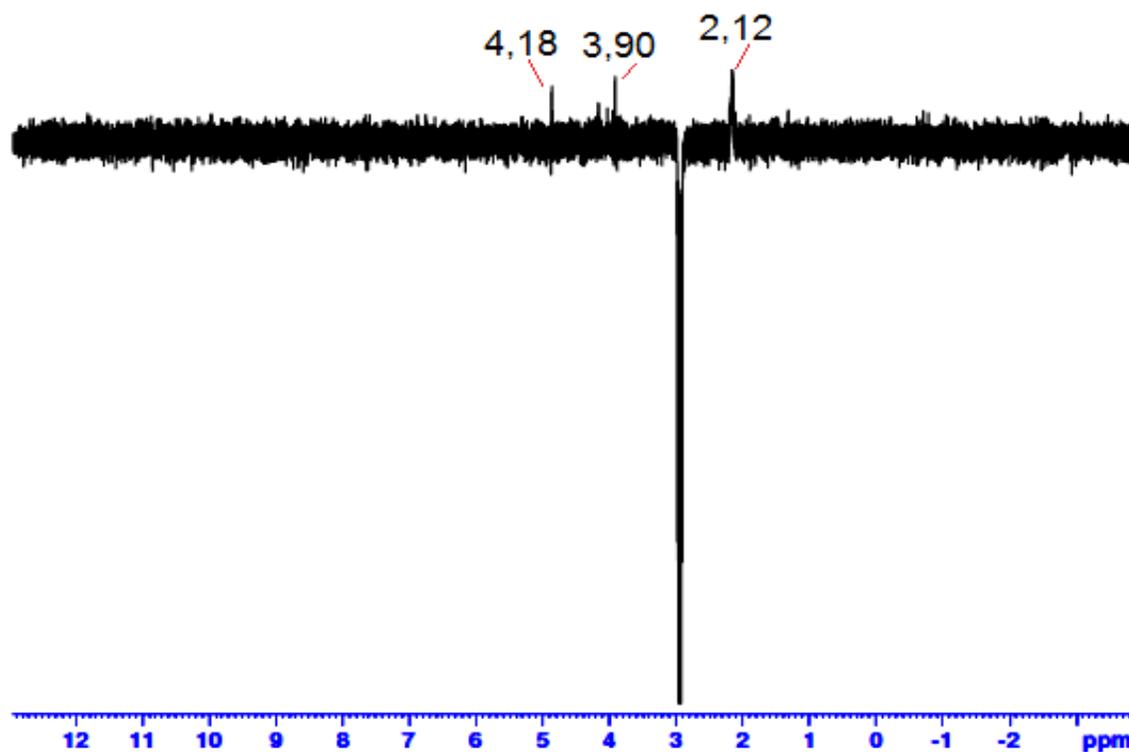
SFO1 500.1310737 MHz
NUC1 1H
P1 9.40 usec
P2 18.80 usec
P12 80000.00 usec
PLW0 0 W
PLW1 20.32299995 W
SPNAM[2] Gaus1_180r.1000
SFOAL2 0.500
SFOFFS2 0 Hz
SPW2 0.00000663 W
GPNAME[1] SMSQ10.100
GPZ1 15.00 %
GPNAME[2] SMSQ10.100
GPZ2 40.00 %
P16 1000.00 usec

F2 - Processing parameters

SI 32768
SF 500.1300000 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.10 Hz
GB 0
PC 1.00

$\delta H = 2,92$

1H_30 ZGPR
Amostra: BOF24C17P26
Solv.: CD3OD
SINAL - 2,92



Current Data Parameters
NAME: rnm noey
EXPNO: 406
PROCNO: 1

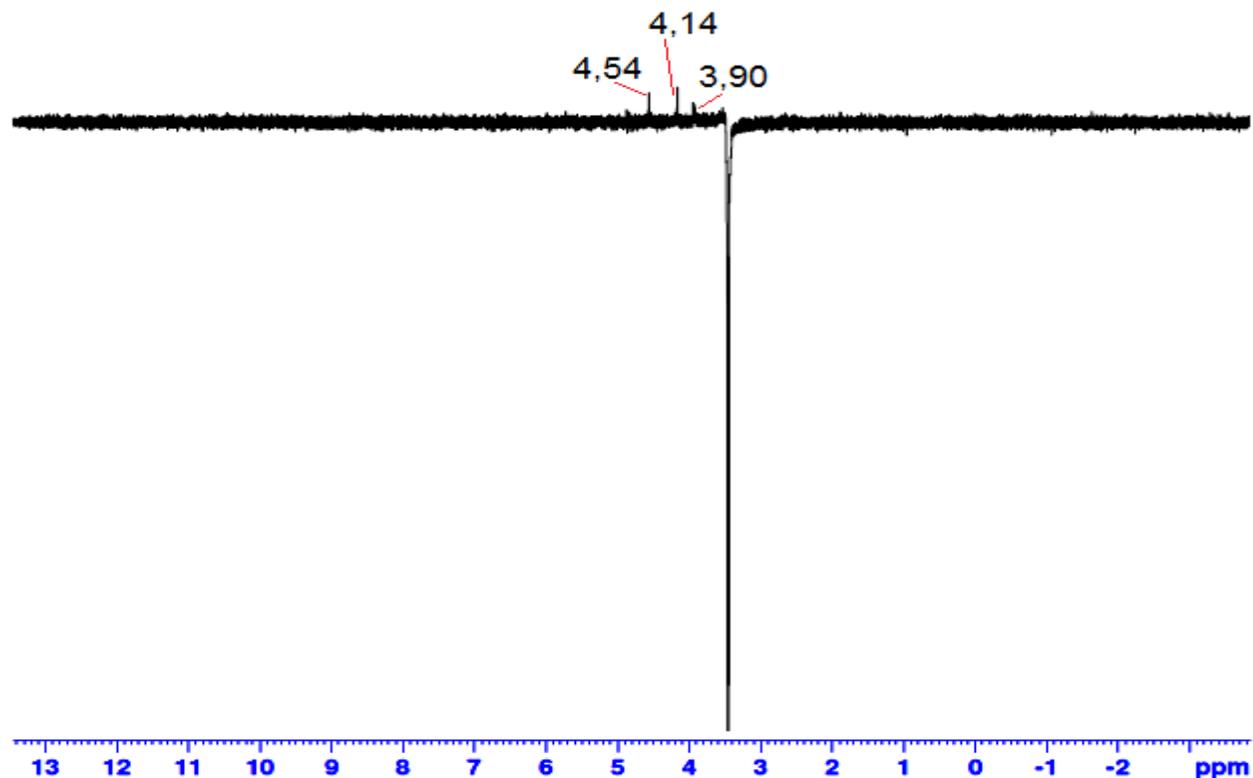
F2 - Acquisition Parameters
Date_: 20180109
Time: 8.34 h
INSTRUM: spect
PROBHD: Z119470_0223 ()
PULPROG: semogp
TD: 65536
SOLVENT: MeOD
NS: 48
DS: 4
SWH: 10000.000 Hz
FDRRES: 0.152588 Hz
AQ: 3.2767999 sec
RG: 187.25
DW: 50.000 usec
DE: 10.00 usec
TE: 298.2 K
D1: 2.0000000 sec
D8: 0.30000001 sec
D16: 0.00020000 sec
D20: 0.14880000 sec
TD0: 1

ZGPTNS
SFO1: 500.1314679 MHz
NUC1: 1H
P1: 9.40 usec
P2: 18.80 usec
P12: 80000.00 usec
PLW0: 0 W
PLW1: 20.32299995 W
SPNAM[2]: Gaus1_180r.1000
SFOA12: 0.500
SPOFFS2: 0 Hz
SPW2: 0.00000663 W
GPNAM[1]: SMSQ10.100
GFZ1: 15.00 %
GPNAM[2]: SMSQ10.100
GFZ2: 40.00 %
P16: 1000.00 usec

F2 - Processing parameters
SI: 32768
SF: 500.1300000 MHz
WDW: EM
SSB: 0
LB: 0.10 Hz
GB: 0
PC: 1.00

$\delta H = 3,43$

1H_30 ZGPR
Amostra: BOF24C17P26
Solv.: CD3OD
SINAL - 3,43



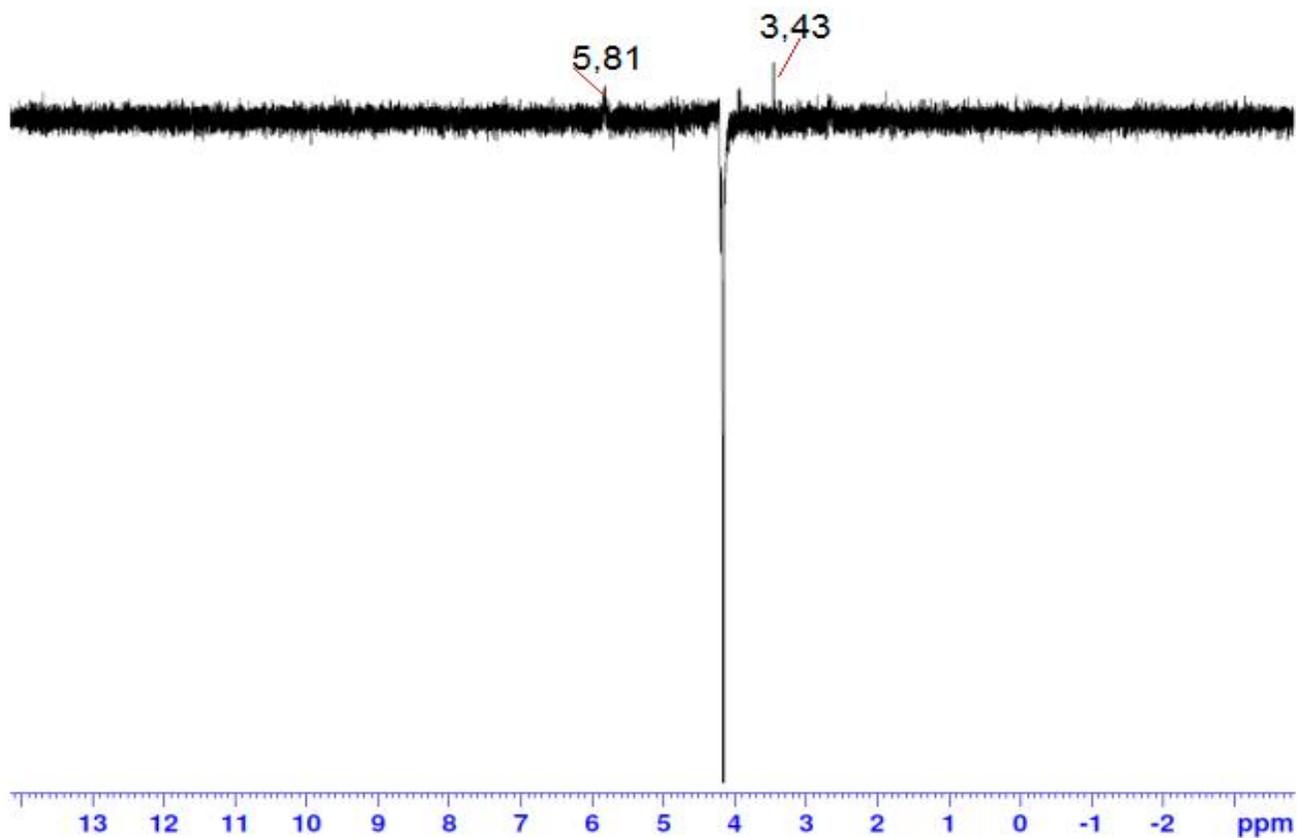
Current Data Parameters
NAME rnm noesy
EXPNO 402
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20180109
Time 8.01 h
INSTRUM spect
PROBHD Z119470_0223 ()
PULPROG selnpgp
TD 65536
SOLVENT MeOD
NS 32
DS 4
SWH 10000.000 Hz
FIDRES 0.152588 Hz
AQ 3.2767999 sec
RG 187.25
DW 50.000 usec
DE 10.00 usec
TE 298.1 K
D1 2.0000000 sec
D8 0.3000001 sec
D16 0.00020000 sec
D20 0.14880000 sec
TD0 1
ZGPTNS
SFO1 500.1317244 MHz
NUC1 1H
P1 9.40 usec
P2 18.80 usec
P12 80000.00 usec
PLW0 0 W
PLW1 20.32299995 W
SPNAM[2] Gaus1_180r.1000
SPOAL2 0.500
SPOFFS2 0 Hz
SPW2 0.00000663 W
GPNAM[1] SMSQ10.100
GPZ1 15.00 %
GPNAM[2] SMSQ10.100
GPZ2 40.00 %
P16 1000.00 usec

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 500.1300000 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.10 Hz
GB 0
PC 1.00

$\delta H = 4,14$

IH_30 ZGPR
Amostra: BOP24C17P26
Solv.: CD3OD
SINAL - 4.14



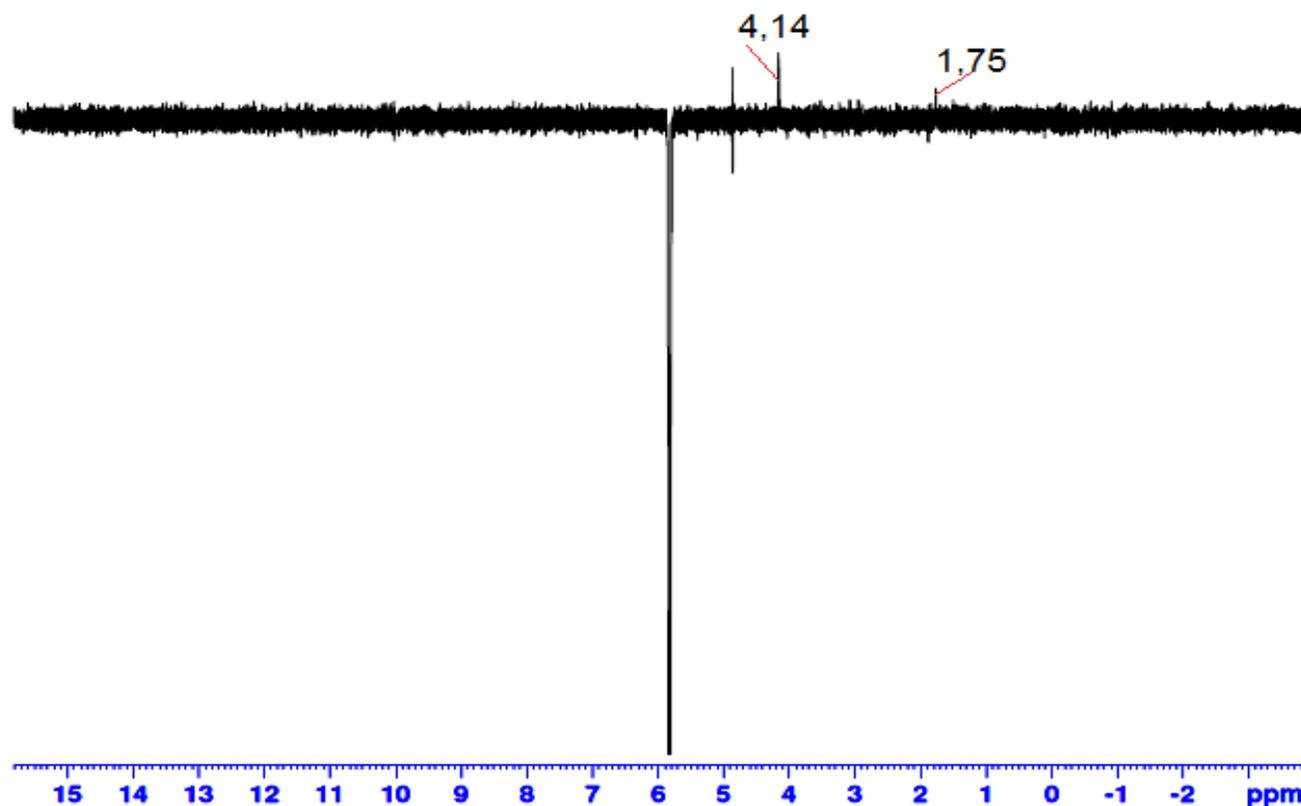
Current Data Parameters
NAME rmn noesy
EXPNO 401
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20180109
Time 7.55 h
INSTRUM spect
PROBHD Z119470_0223 ()
PULPROG selnoggp
TD 65536
SOLVENT MeOD
NS 32
DS 4
SWH 10000.000 Hz
FIDRES 0.152588 Hz
AQ 3.2767999 sec
RG 187.25
DW 50.000 usec
DE 10.00 usec
TE 298.2 K
D1 2.0000000 sec
D8 0.3000001 sec
D16 0.0002000 sec
D20 0.1488000 sec
TD0 1
ZGFTNS
SFO1 500.1320788 MHz
NUC1 1H
P1 9.40 usec
P2 18.80 usec
P12 80000.00 usec
PLW0 0 W
PLW1 20.32299995 W
SPNAM[2] Gaus1_180r.1000
SPOAL2 0.500
SPOFFS2 0 Hz
SPW2 0.00000663 W
GPNAM[1] SMSQ10.100
GPZ1 15.00 %
GPNAM[2] SMSQ10.100
GPZ2 40.00 %
P16 1000.00 usec

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 500.1300000 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.10 Hz
GB 0
PC 1.00

$\delta H = 5,81$

1H_30 ZGPR
Amostra: BOF24C17P26
Solv.: CD3OD
SINAL - 5,81



Current Data Parameters

NAME rmn noesy
EXPNO 404
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters

Date_ 20180109
Time 8.21 h
INSTRUM spect
PROBHD Z119470_0223 (
PULPROG setnogg
TD 65536
SOLVENT MeOD
NS 64
DS 4
SWH 10000.000 Hz
FIDRES 0.152588 Hz
AQ 3.2767999 sec
RG 187.25
DW 50.000 usec
DE 10.00 usec
TE 298.1 K
D1 2.0000000 sec
D8 0.3000001 sec
D16 0.00020000 sec
D20 0.14880000 sec
TD0 1

ZGPTNS

SFO1 500.1329094 MHz
NUC1 1H
P1 9.40 usec
P2 18.80 usec
P12 80000.00 usec
PLW0 0 W
PLW1 20.32299995 W
SPNAM[2] Gaus1_180r.1000
SPOAL2 0.500
SPOFFS2 0 Hz
SPW2 0.00000663 W
GPNAM[1] SMSQ10.100
GPZ1 15.00 %
GPNAM[2] SMSQ10.100
GPZ2 40.00 %
P16 1000.00 usec

F2 - Processing parameters

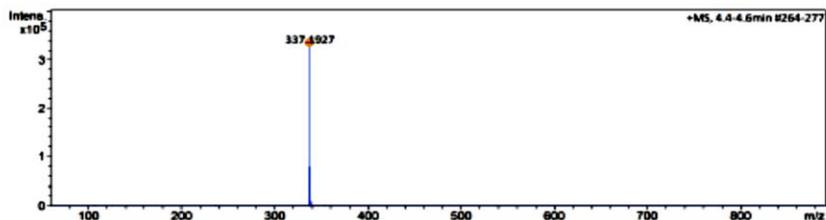
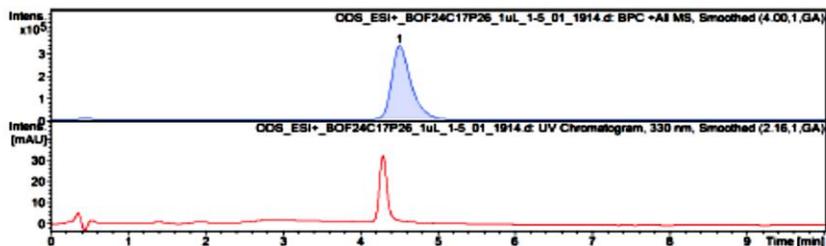
SI 32768
SF 500.130000 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.10 Hz
GB 0
PC 1.00

ANEXO 15 (Espectro de LC-EMAR e espectro de fragmentação da substância S3)

Generic Display Report

Analysis Info
 Acquisition Date 11/24/2017 3:25:33 PM
 Analysis Name D:\Data\Usuarios\2017\Adriana\Bruna\Data\LC-MS\24-11-2017\ODS_ESI+_BOF24C17P26_1uL_1-5_01_1914.d
 Method Tune_Low_ESI+_Abraao_50-900_16min.m
 Sample Name ODS_ESI+_BOF24C17P26_1uL
 Comment ODS 50x2,0mm
 Fix=0,4 mL/min; Split de 0,06 mL(MS)/0,34mL(desc); P:2472ps; F=35C
 C=0,55mg/mL MeOH; inj=1uL
 A(H2O+0,1%HCOOH)B(MeOH+0,1%HCOOH)
 D=1m_5%
 1-10m_5_100%
 10-12m_100%
 12-14m_100-5%
 14-16m_5%
 Inj: MeOH
 Calib.:HCOONa 10mM_end

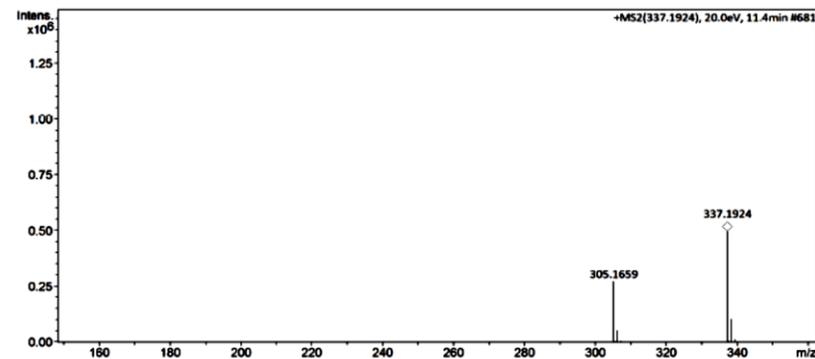
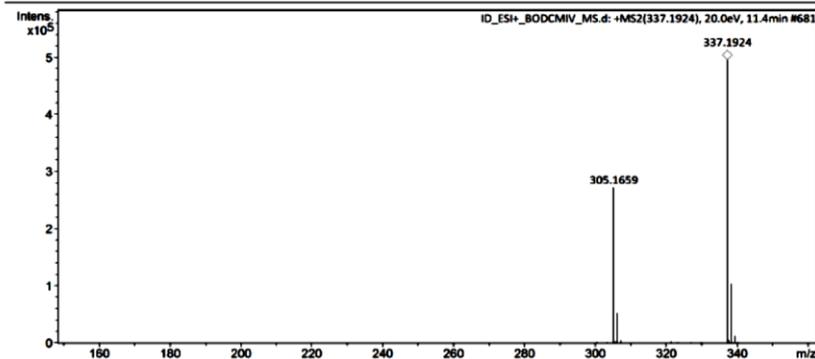
Meas. m/z	#	Adduct	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma	Score
337.1927	1	M+H	C ₂₁ H ₂₅ N ₂ O ₂	337.1911	-4.8	1.2	100.00



Display Report

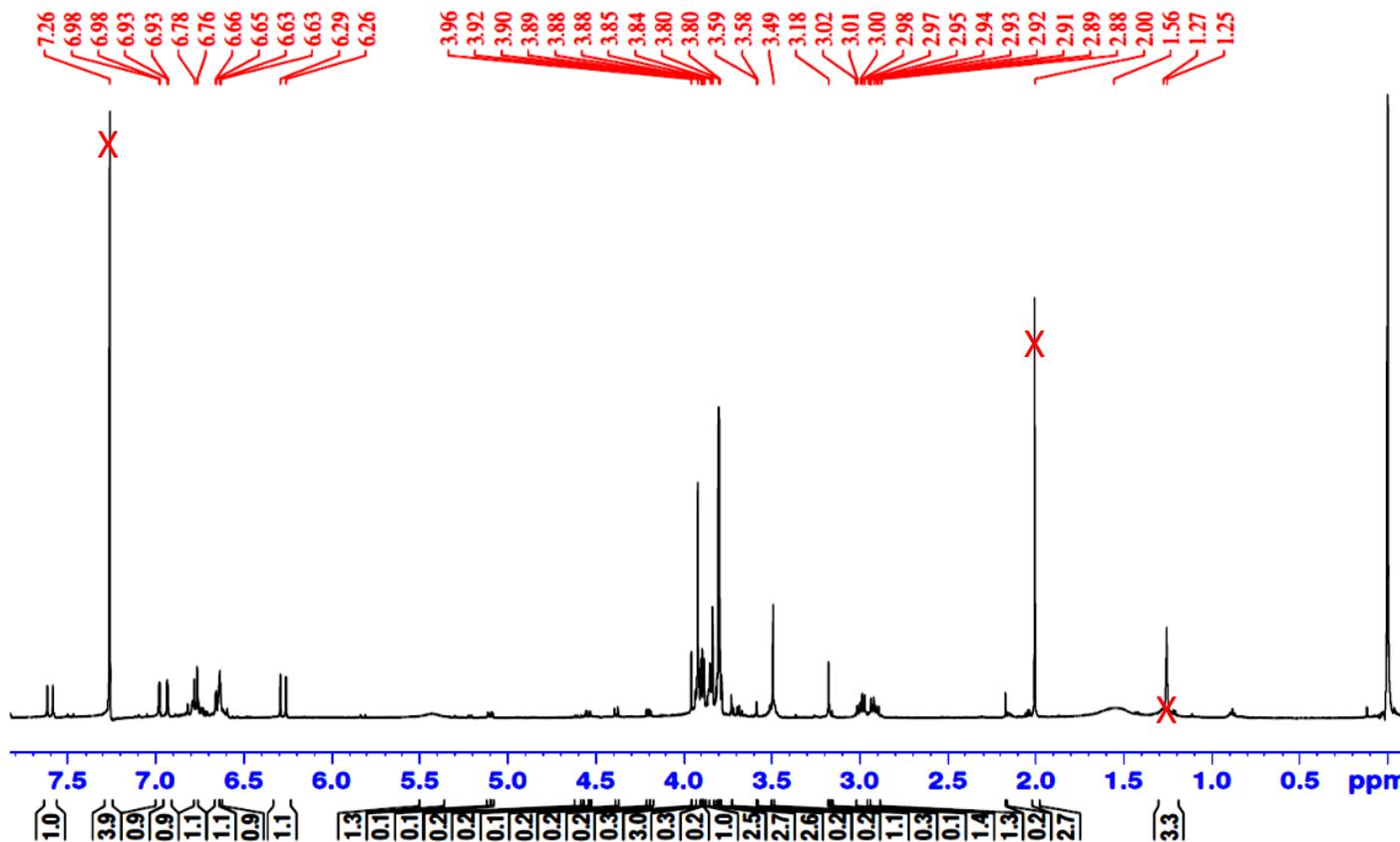
Analysis Info
 Acquisition Date 28-Nov-17 2:34:54 PM
 Analysis Name C:\Users\Hugo\Desktop\Dr 2017\MS\MS NOV2017\MS_28-11-17\ID_ESI+_BODCMIV_MS.d
 Method TuneLow_ESI+_NaFo_50-900_10mM_Padro.m
 Sample Name ID_ESI+_BODCMIV_MS
 Comment Fluxo = 300uL/h
 Diluição = 20 uL amostra (0.34mg/mL) + 880uL MeOH (LC-MS) + 100uL H2O (0.3% ácido fórmico).
 Calibr.Interno = Formiato de Na 10mM

Acquisition Parameter					
Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.5 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	4500 V	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	50 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	6.0 l/min
Scan End	900 m/z	Set Collision Cell RF	100.0 Vpp	Set Divert Valve	Waste



ANEXO 16 (Espectro de RMN de ^1H (500 MHz) da substância S4, em CDCl_3).

^1H
 Amostra: B012CP4
 Solv.: CDCl_3



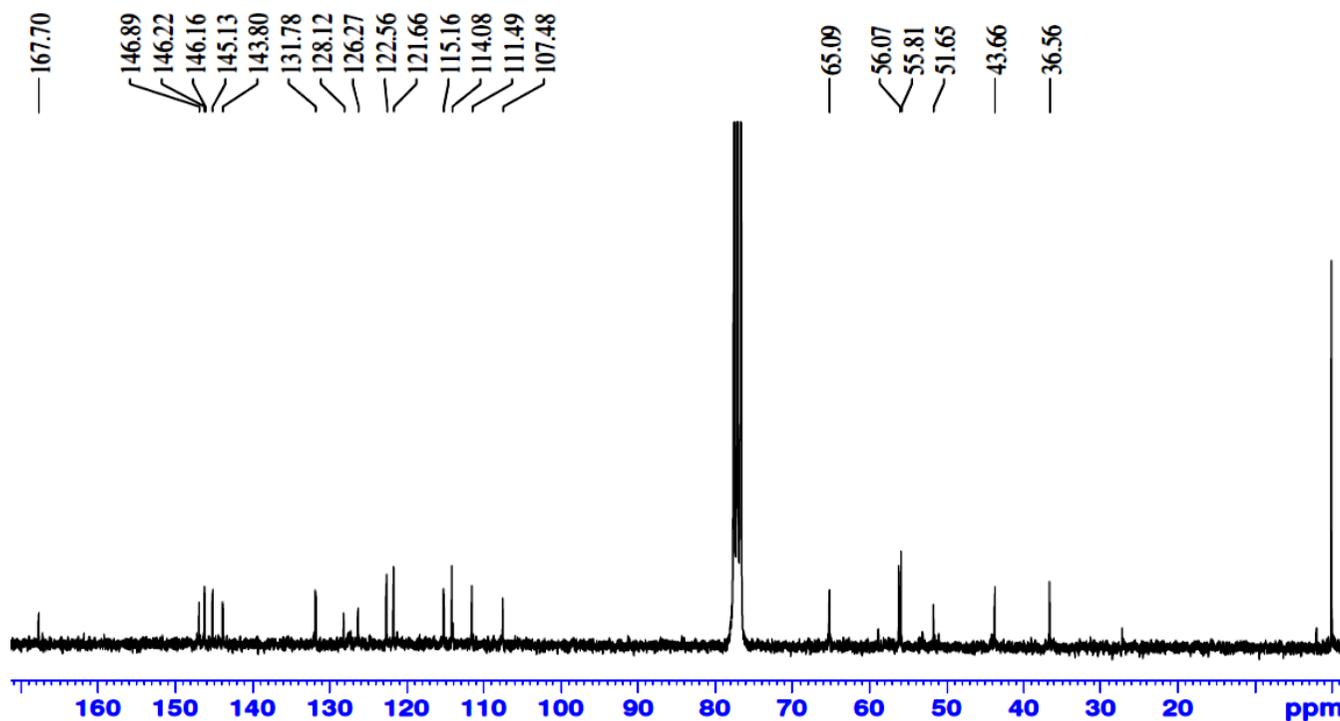
Current Data Parameters
 NAME NMR-788-17_BO12CP4
 EXPNO 1
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20171031
 Time 21.12 h
 INSTRUM spect
 PROBHD Z119470_0223 ()
 PULPROG zg30
 TD 65536
 SOLVENT CDCl_3
 NS 4
 DS 2
 SWH 10000.000 Hz
 FIDRES 0.152588 Hz
 AQ 3.2767999 sec
 RG 187.25
 DW 50.000 usec
 DE 10.00 usec
 TE 298.1 K
 D1 1.00000000 sec
 TD0 1
 SFO1 500.1330883 MHz
 NUC1 ^1H
 P1 9.40 usec
 PLW1 20.32299995 W

F2 - Processing parameters
 SI 131072
 SF 500.1300126 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 0.30 Hz
 GB 0
 PC 1.00

ANEXO 17 (Espectro de RMN de ^{13}C (75MHz) da substância S4, em CDCL₃).

BO12CP4 (13C; CDCl₃; 1,7 mg)
16/10/2017



Current Data Parameters
NAME Bruna_17_BO12CP4
EXPNO 2
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20171016
Time 8.18
INSTRUM FOURIER300
PROBHD 5 mm DUL 13C-1
PULPROG zgpg30
TD 32768
SOLVENT CDCl3
NS 86016
DS 0
SWH 24414.063 Hz
FIDRES 0.745058 Hz
AQ 0.6710886 sec
RG 501.187
DW 20.480 usec
DE 10.00 usec
TE 292.5 K
D1 0.5000000 sec
D11 0.0300000 sec
D31 0.0000875 sec
D40 0.01589210 sec
L4 20
L5 14
P32 90.00 usec
TD0 1

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

==== CHANNEL f2 =====
SFO2 300.2012008 MHz
NUC2 1H
CPDPRG2 waltz16
PCPD2 90.00 usec
PLW2 20.0000000 W
PLW12 0.16806000 W
PLW13 0.13613001 W

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

ANEXO 18 (Espectro de RMN DEPT 135 (500 MHz) da substância S4, em CDCL3).

Bruna_17_BO12CP4 (Dept135, 1.7 mg, CDC13)
17/08/17



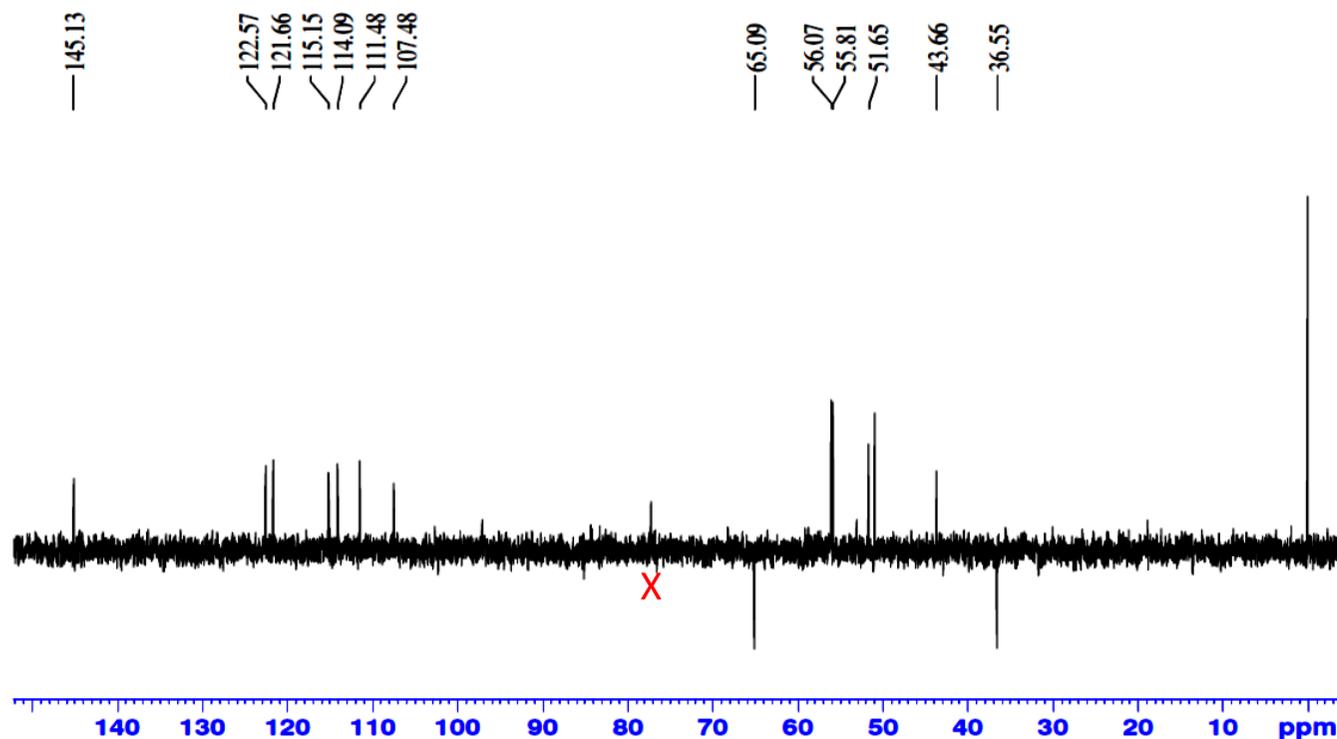
Current Data Parameters
NAME Brun_17_BO12CP4
EXPNO 4
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20170920
Time 12.13
INSTRUM FOURIER300
PROBHD 5 mm DUL 13C-1
PULPROG dept135
TD 65536
SOLVENT CDC13
NS 3597
DS 8
SWH 24414.063 Hz
FIDRES 0.372529 Hz
AQ 1.3421773 sec
RG 501.187
DW 20.480 usec
DE 10.00 usec
TE 293.2 K
CNST2 145.000000
D1 2.0000000 sec
D2 0.00344828 sec
D14 0.00001114 sec
D33 0.00000825 sec
D34 0.00344053 sec
D35 0.00345340 sec
L4 40
P32 90.00 usec
TD0 1

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

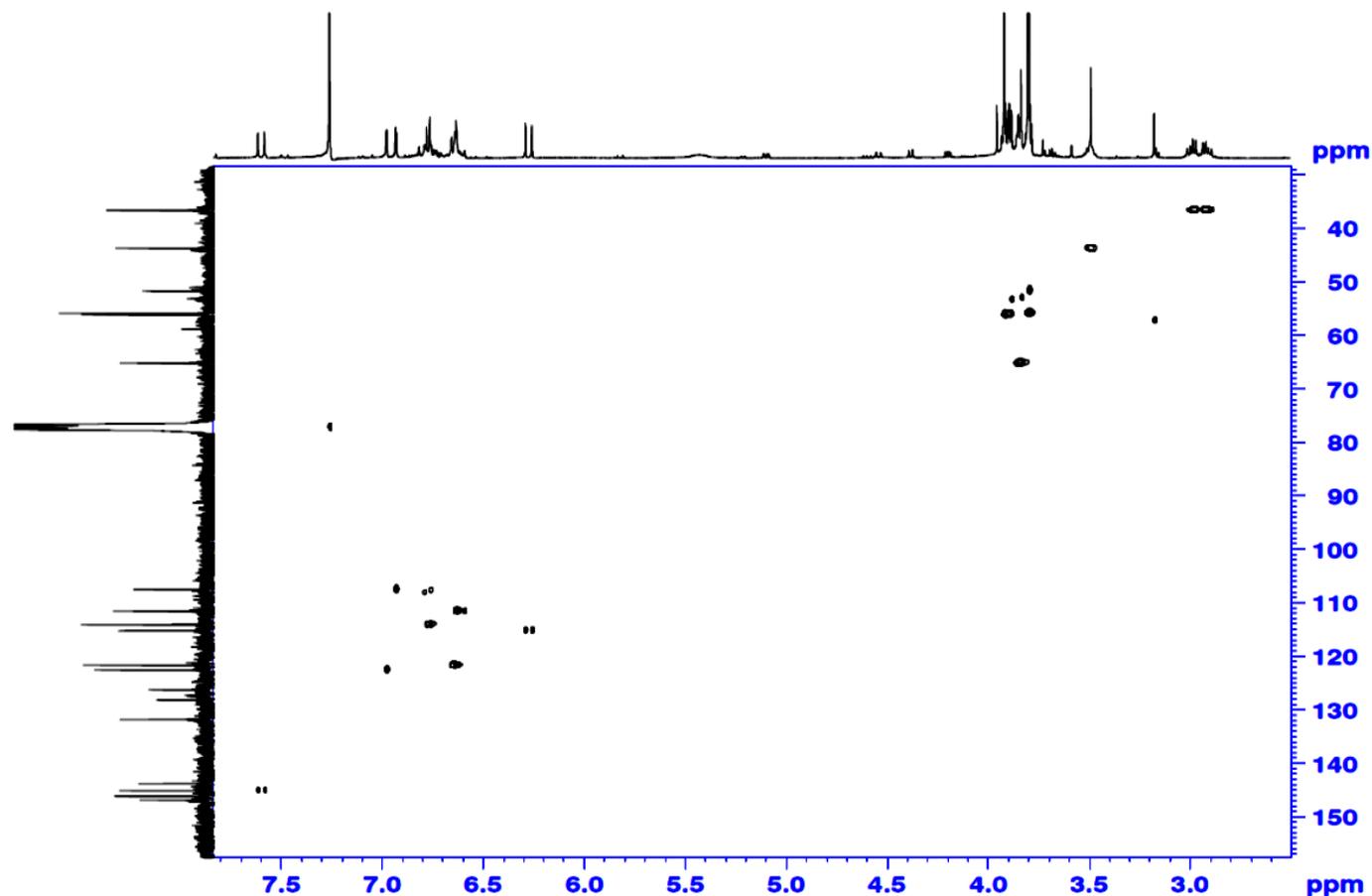
===== CHANNEL f2 =====
SFO2 300.2009601 MHz
NUC2 1H
CPDPRG2 waltz16
P3 8.25 usec
P4 16.50 usec
PCPD2 90.00 usec
PLW2 20.00000000 W
PLW12 0.16806000 W

F2 - Processing parameters
S1 32768
SF 75.4853500 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.40



ANEXO 19 (Espectro de RMN HSQC (500 MHz) da substância S4, em CDCL3).

HSQC 1H-13C
Amostra: B012CP4
Solv.: CDCL3

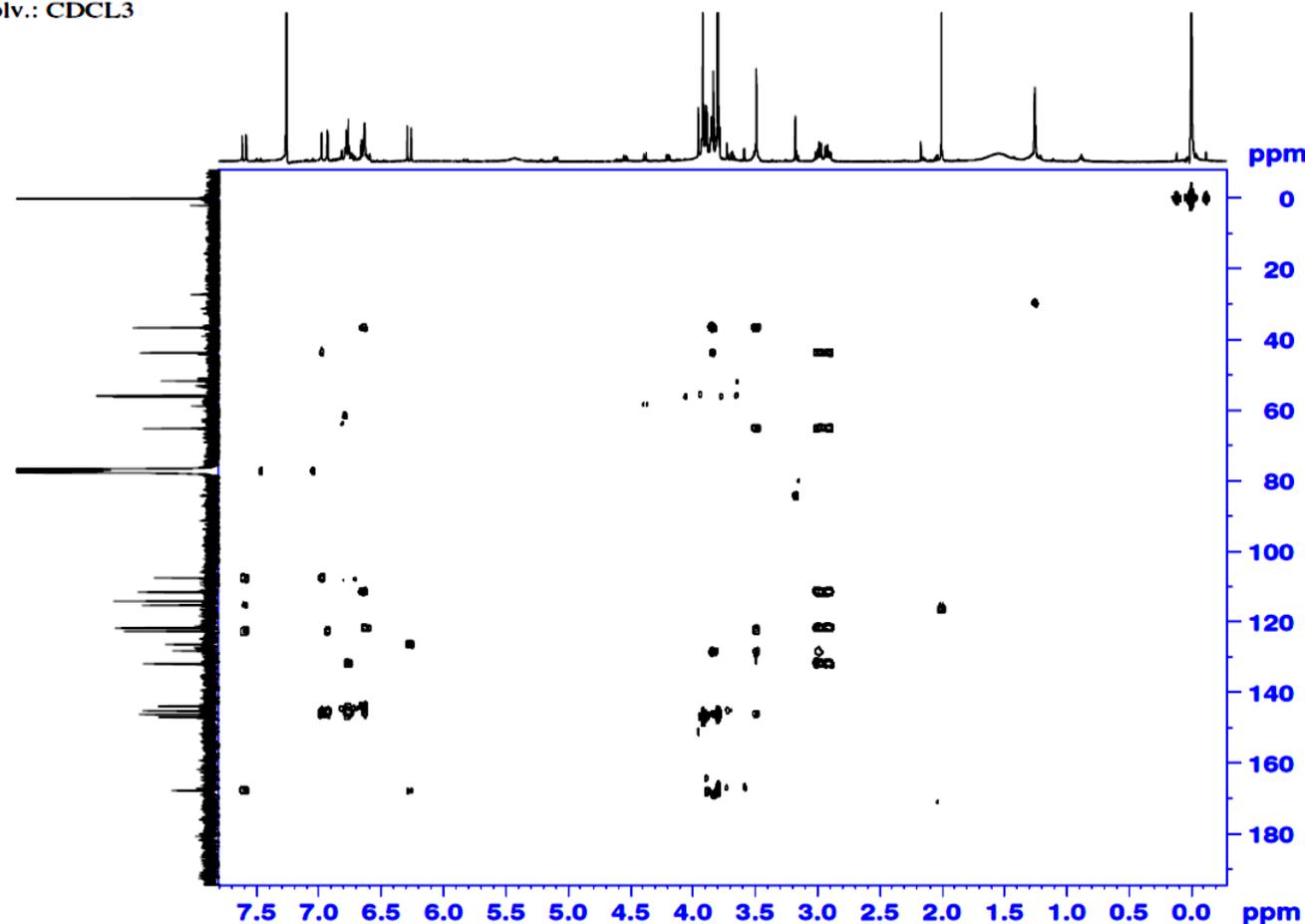


Current Data Parameters
NAME NMR-788-17_BO12CP4
EXPNO 200
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20171031
Time 22.33 h
INSTRUM spect
PROBHD Z119470_0223 ()
PULPROG hsqcetgpsisp2.2
TD 2048
SOLVENT CDCl3
NS 64
DS 16
SWH 6087.662 Hz
FIDRES 2.972491 Hz
AQ 0.1682091 sec
RG 187.25
DW 82.133 usec
DE 10.00 usec
TE 298.2 K
CNST2 145.000000
CNST17 -0.500000
D0 0.0000300 sec
D1 1.0000000 sec
D4 0.00172414 sec
D11 0.03000000 sec
D16 0.00020000 sec
D24 0.00089000 sec
IN0 0.00001850 sec
TDAV 1
SFO1 500.1325452 MHz
NUC1 1H
P1 9.40 usec
P2 18.80 usec
P28 1000.00 usec
PLW1 20.32299995 W
SFO2 125.7703643 MHz
NUC2 13C
CPDPRG2 garp
P3 10.00 usec
P14 500.00 usec
P24 2000.00 usec
PCPD2 70.00 usec
PLW0 0 W
PLW2 88.00000000 W
PLW12 1.78668594 W
SPNAM[3] Crp60,0.5,20.1

ANEXO 20 (Espectro de RMN HMBC (500 MHz) da substância S4, em CDCL3).

HMBC 1H-13C
Amostra: B012CP4
Solv.: CDCL3



Current Data Parameters
NAME NMR-788-17_BO12CP4
EXPNO 300
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20171101
Time 4:00 h
INSTRUM spect
PROBHD Z119470_0223 ()
PULPROG hmcgppndqf
TD 2048
SOLVENT CDCL3
NS 80
DS 16
SWH 5787.037 Hz
FIDRES 2.825702 Hz
AQ 0.1769472 sec
RG 187.25
DW 86.400 usec
DE 10.00 usec
TE 298.2 K
CNST2 145.000000
CNST13 8.000000
D0 0.0000300 sec
D1 1.0000000 sec
D2 0.00344828 sec
D6 0.06250000 sec
D16 0.00020000 sec
IN0 0.00001660 sec
TDav 1
SFO1 500.1323396 MHz
NUC1 1H
P1 9.40 usec
P2 18.80 usec
PLW1 20.32299995 W
SFO2 125.7716219 MHz
NUC2 13C
P3 10.00 usec
PLW2 88.0000000 W
GPNAM[1] SMSQ10.100
GPZ1 50.00 %
GPNAM[2] SMSQ10.100
GPZ2 30.00 %
GPNAM[3] SMSQ10.100
GPZ3 40.10 %
P16 1000.00 usec

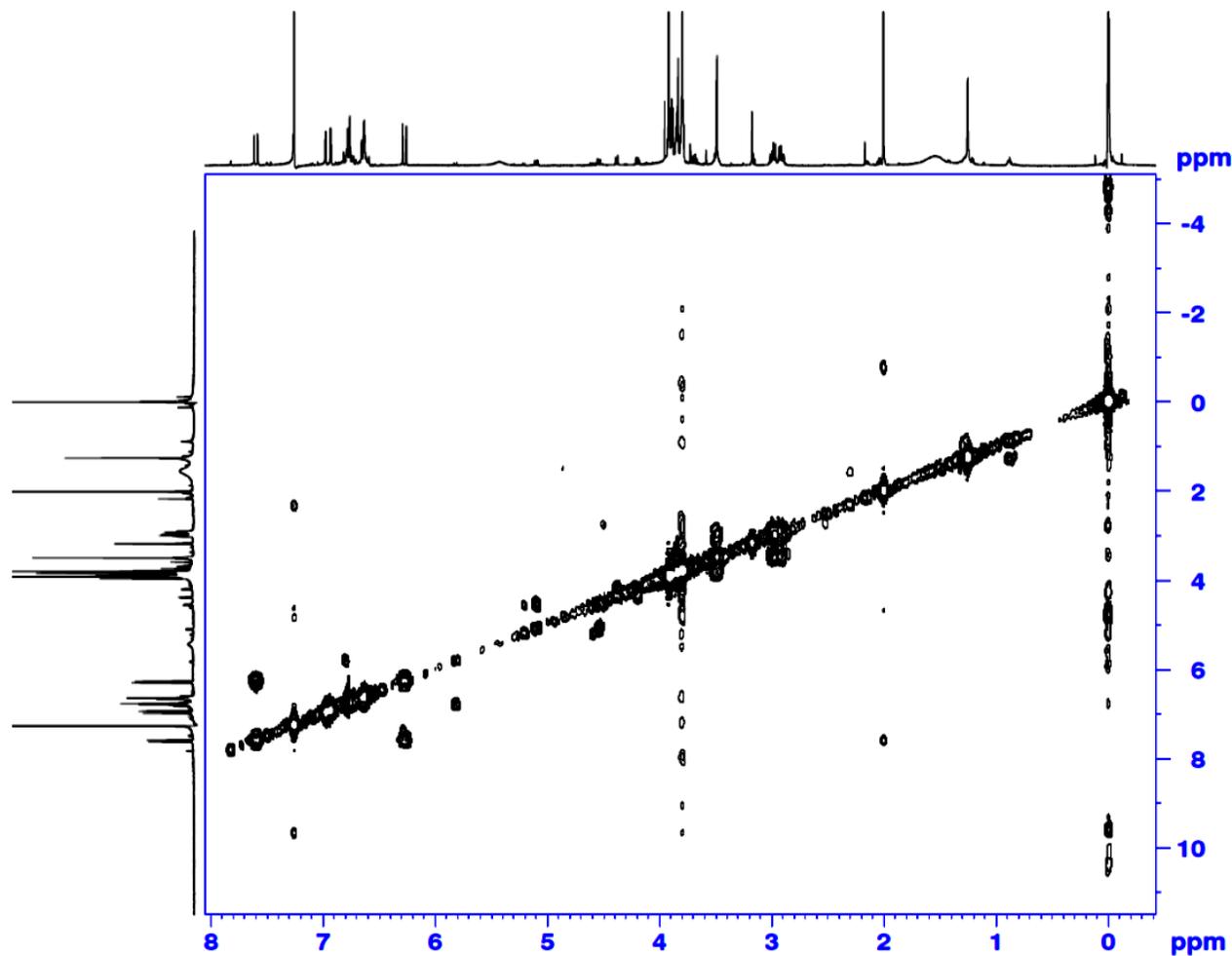
F1 - Acquisition parameters
TD 148
SFO1 125.7716 MHz
FIDRES 407.033539 Hz
SW 239.486 ppm
FnMODE QF

F2 - Processing parameters
SI 4096
SF 500.1300132 MHz
WDW SINE
SSB 0
LB 0 Hz
GB 0
PC 1.40

F1 - Processing parameters
SI 1024
MC2 QF
SF 125.7577874 MHz
WDW SINE
SSB 0
LB 0 Hz
GB 0

ANEXO 21 (Espectro de RMN COSY (500 MHz) da substância S4, em CDCL3).

COSY
 Amostra: B012CP4
 Solv.: CDCL3



Current Data Parameters
 NAME: NMR-788-17_BO12CP4
 EXPNO: 100
 PROCNO: 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_: 20171031
 Time: 21:53 h
 INSTRUM: spect
 PROBHD: Z119470_0223 ()
 PULPROG: cosygpppqf
 TD: 2048
 SOLVENT: CDCL3
 NS: 16
 DS: 16
 SWH: 10000.000 Hz
 FIDRES: 4.882813 Hz
 AQ: 0.1024000 sec
 RG: 57.94
 DW: 50.000 usec
 DE: 10.00 usec
 TE: 298.2 K
 D0: 0.00000000 sec
 D1: 1.00000000 sec
 D11: 0.03000000 sec
 D12: 0.00002000 sec
 D13: 0.00000400 sec
 D16: 0.00020000 sec
 IN0: 0.00010000 sec
 TDAV: 500.1324156 MHz
 SFO1: 500.1324156 MHz
 NUC1: 1H
 P0: 9.40 usec
 P1: 9.40 usec
 P17: 2500.00 usec
 PLW1: 20.32299995 W
 PLW10: 1.99530005 W
 GPNAM[1]: SMSQ10.100
 GPZ1: 10.00 %
 P16: 1000.00 usec

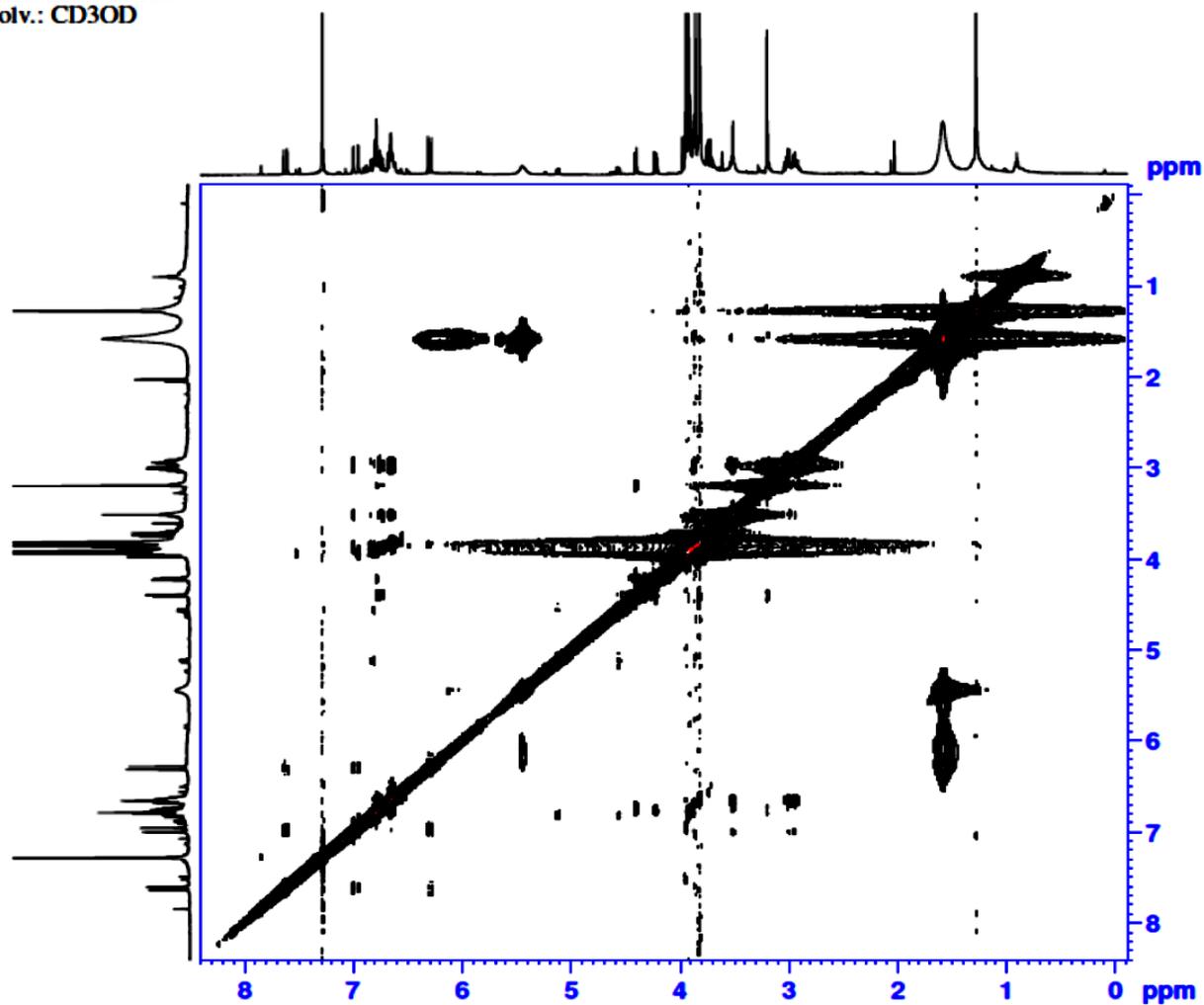
F1 - Acquisition parameters
 TD: 128
 SFO1: 500.1324 MHz
 FIDRES: 156.250000 Hz
 SW: 19.995 ppm
 FnmODE: QF

F2 - Processing parameters
 SI: 4096
 SF: 500.1300141 MHz
 WDW: QSINE
 SSB: 0
 LB: 0 Hz
 GB: 0
 PC: 1.40

F1 - Processing parameters
 SI: 1024
 MC2: QF
 SF: 500.1300142 MHz
 WDW: QSINE
 SSB: 0
 LB: 0 Hz
 GB: 0

ANEXO 22 (Espectro de RMN NOESY (500 MHz) da substância S4, em CDCL3).

NOESYPSW
Amostra: BO12CP4
Solv.: CD3OD



Current Data Parameters
NAME: NMR-021-18_BO12CP4 NOESY
EXPNO: 400
PROCNO: 401

F2 - Acquisition Parameters
Date_: 20180111
Time: 15.28 h
INSTRUM: spect
PROBHD: Z119470_0223 ()
PULPROG: noesy gpphpp
TD: 2048
SOLVENT: CDCl3
NS: 12
DS: 32
SWH: 4261.364 Hz
FIDRES: 2.080744 Hz
AQ: 0.2402987 sec
RG: 187.25
DW: 117.333 usec
DE: 10.00 usec
TE: 298.2 K
D0: 0.00010533 sec
D1: 2.00000000 sec
D8: 0.60000002 sec
D11: 0.03000000 sec
D12: 0.00002000 sec
D16: 0.00020000 sec
IN0: 0.00023460 sec
TDav: 1
SFO1: 500.1320742 MHz
NUC1: 1H
P1: 9.40 usec
P2: 18.80 usec
P17: 2500.00 usec
PLW1: 20.32299995 W
PLW10: 1.99530005 W
GPNAM[1]: SMSQ10.100
GBZ1: 40.00 %
P16: 1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
TD: 256
SFO1: 500.1321 MHz
FIDRES: 33.301365 Hz
SW: 8.523 ppm
FaMODE: States-TPPI

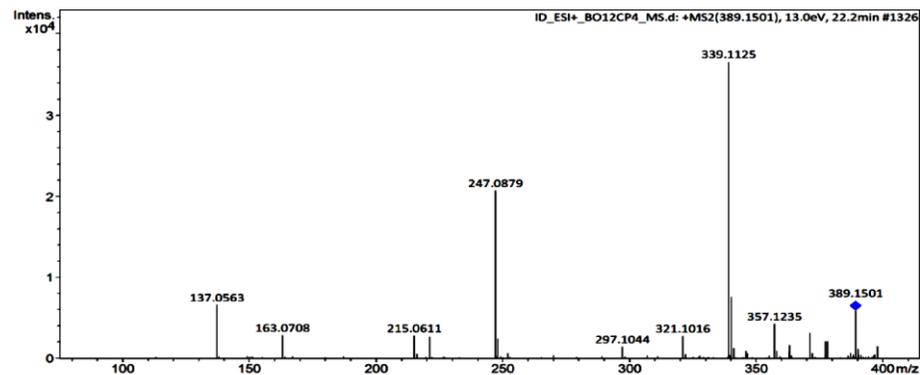
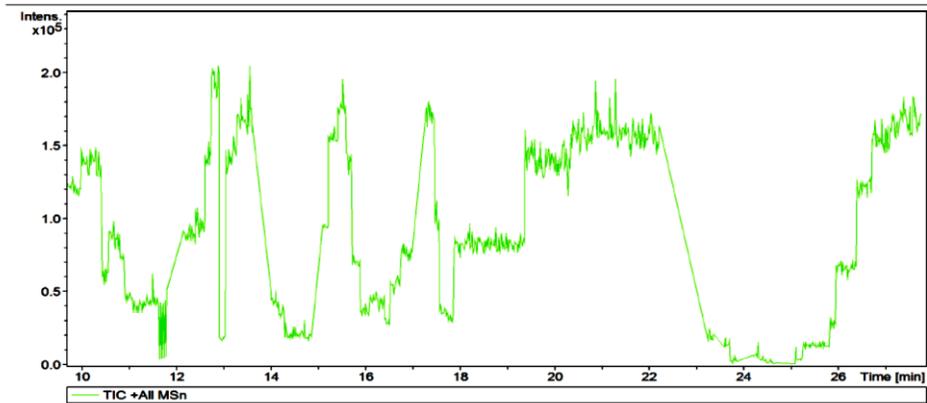
F2 - Processing parameters
SI: 1024
SF: 500.1300001 MHz
WDW: QSINE
SSB: 2
LB: 0 Hz
GB: 0
PC: 1.00

F1 - Processing parameters
SI: 1024
MC2: States-TPPI
SF: 500.1300008 MHz
WDW: QSINE
SSB: 2
LB: 0 Hz
GB: 0

ANEXO 23 (Espectro de LC-EMAR e espectro de fragmentação da substância S4)

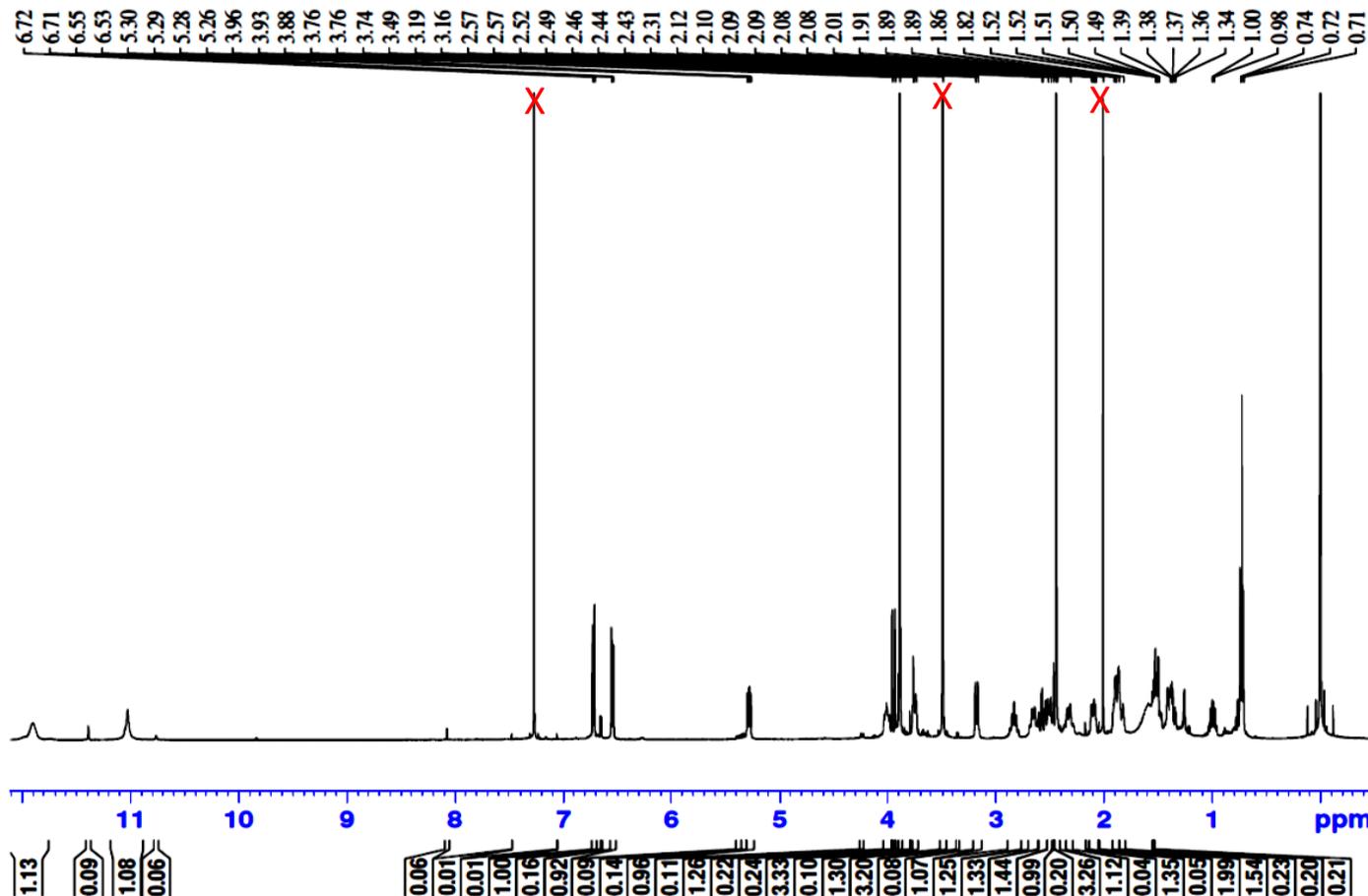
Generic Display Report

Analysis Info
Analysis Name C:\Users\Hugo\Desktop\Dr 2017\MSMS NOV2017\MS_28-11-17\ID_ESI+_BO12CP4_MS.d
Method ID_TuneLow_ESI+_NaFo_50-900_10mM_Padrão_SFOCUS. Operator BDAL@DE
Sample Name ID_ESI+_BO12CP4_MS Instrument micrOTOF-Q
Comment Fluxo = 300uL/h
Diluição = 20 uL amostra (0.34mg/mL) + 880uL MeOH (LC-MS) + 100uL H2O (0.3% ácido fórmico).
Calibr.Interno = Formiato de Na 10mM



ANEXO 24 (Espectro de RMN de ^1H (500 MHz) da substância S1, em CDCl_3).

^1H
 Amostra: B012CP1
 Solv.: CDCl_3



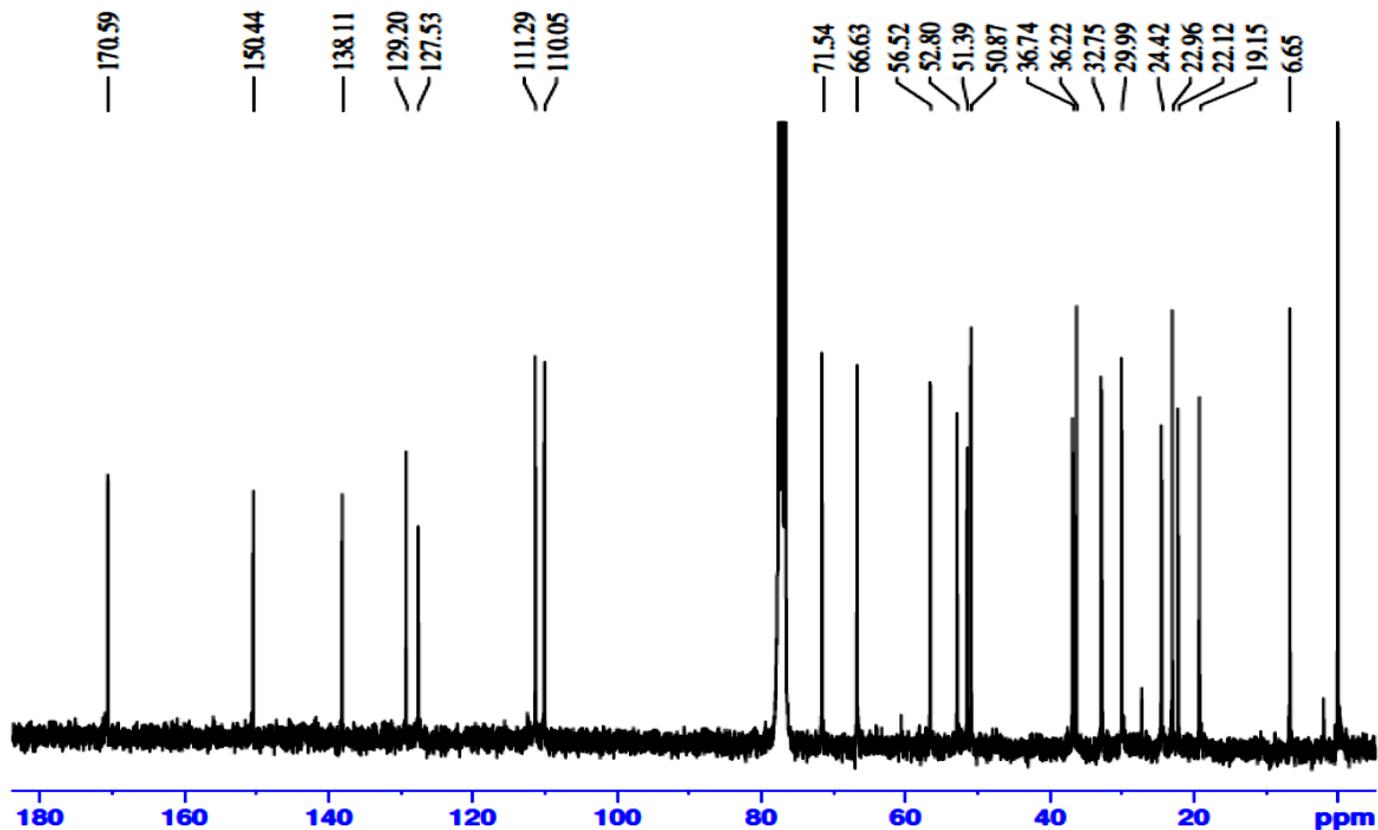
Current Data Parameters
 NAME NMR-787-17_B012CP1
 EXPNO 1
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20171101
 Time 20.41 h
 INSTRUM spect
 PROBHD Z119470_0223 ()
 PULPROG zg30
 TD 65536
 SOLVENT CDCl_3
 NS 16
 DS 2
 SWH 10000.000 Hz
 FIDRES 0.152588 Hz
 AQ 3.2767999 sec
 RG 147.17
 DW 50.000 usec
 DE 10.00 usec
 TE 298.1 K
 D1 1.00000000 sec
 TD0 1
 SFO1 500.1330883 MHz
 NUC1 ^1H
 P1 9.40 usec
 PLW1 20.32299995 W

F2 - Processing parameters
 SI 131072
 SF 500.1300096 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 0.30 Hz
 GB 0
 PC 1.00

ANEXO 25 (Espectro de RMN de ^{13}C (75MHz) da substância S1, em CDCL₃).

Bruna_17_BO12CP1 (13C, 3.3 mg, CDC13)



Current Data Parameters
NAME Bruna_17_BO12CP1
EXPNO 2
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20171014
Time 7.33
INSTRUM FOURIER300
PROBHD 5 mm DUL 13C-1
PULPROG zgpg30
TD 32768
SOLVENT CDC13
NS 145788
DS 0
SWH 24414.063 Hz
FIDRES 0.745058 Hz
AQ 0.6710886 sec
RG 501.187
DW 20.480 usec
DE 10.00 usec
TE 293.3 K
D1 0.5000000 sec
D11 0.03000000 sec
D31 0.0000875 sec
D40 0.01589210 sec
L4 20
L5 14
P32 90.00 usec
TDO 1

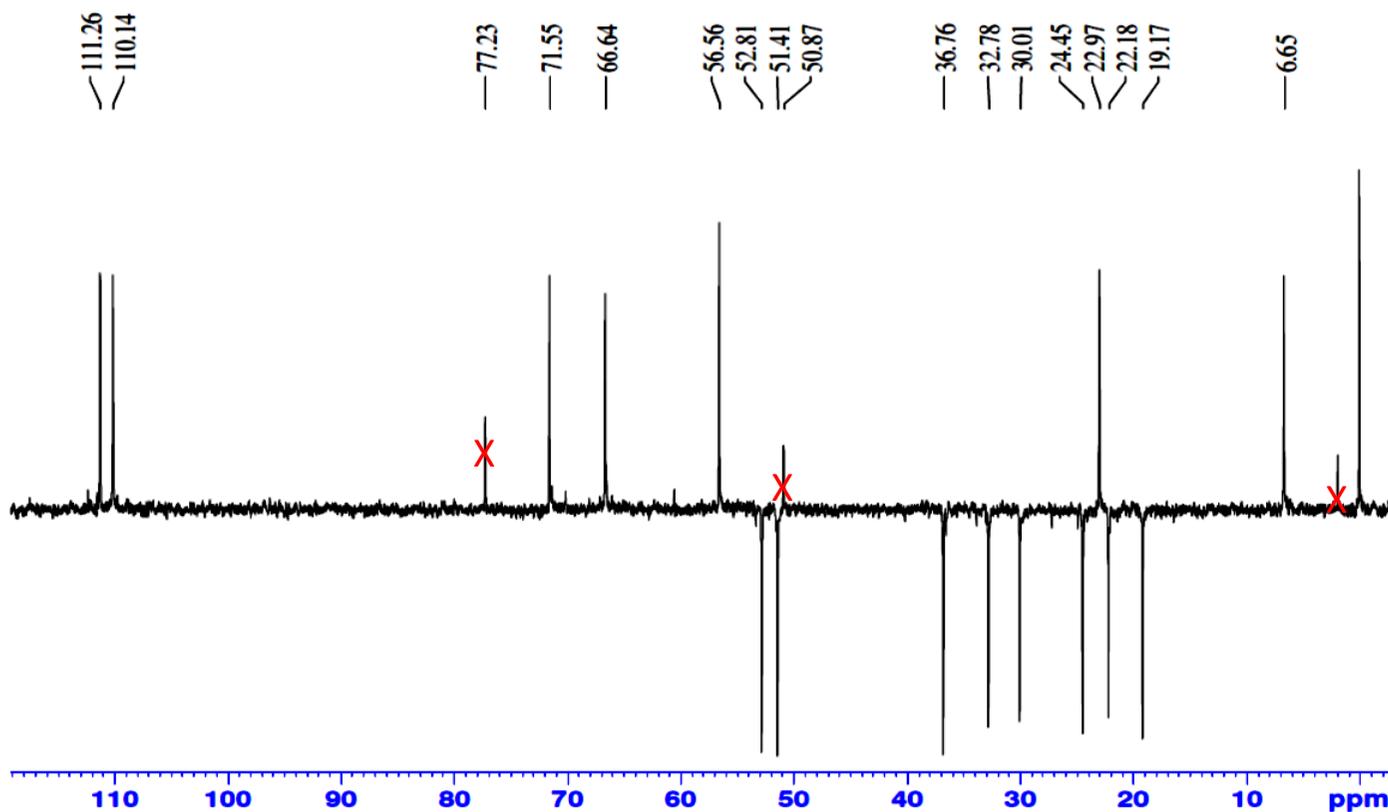
==== CHANNEL f1 =====
SFO1 75.4928982 MHz
NUC1 13C
P1 8.75 usec
PLW1 50.00299835 W

==== CHANNEL f2 =====
SFO2 300.2012008 MHz
NUC2 1H
CPDPRG[2] waltz.16
PCPD2 90.00 usec
PLW2 20.00000000 W
PLW12 0.16806000 W
PLW13 0.13613001 W

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

ANEXO 26 (Espectro de RMN DEPT135 (500 MHz) da substância S1, em CDCL3).

DEPT
 Amostra: B012CP1
 Solv.: CDCL3



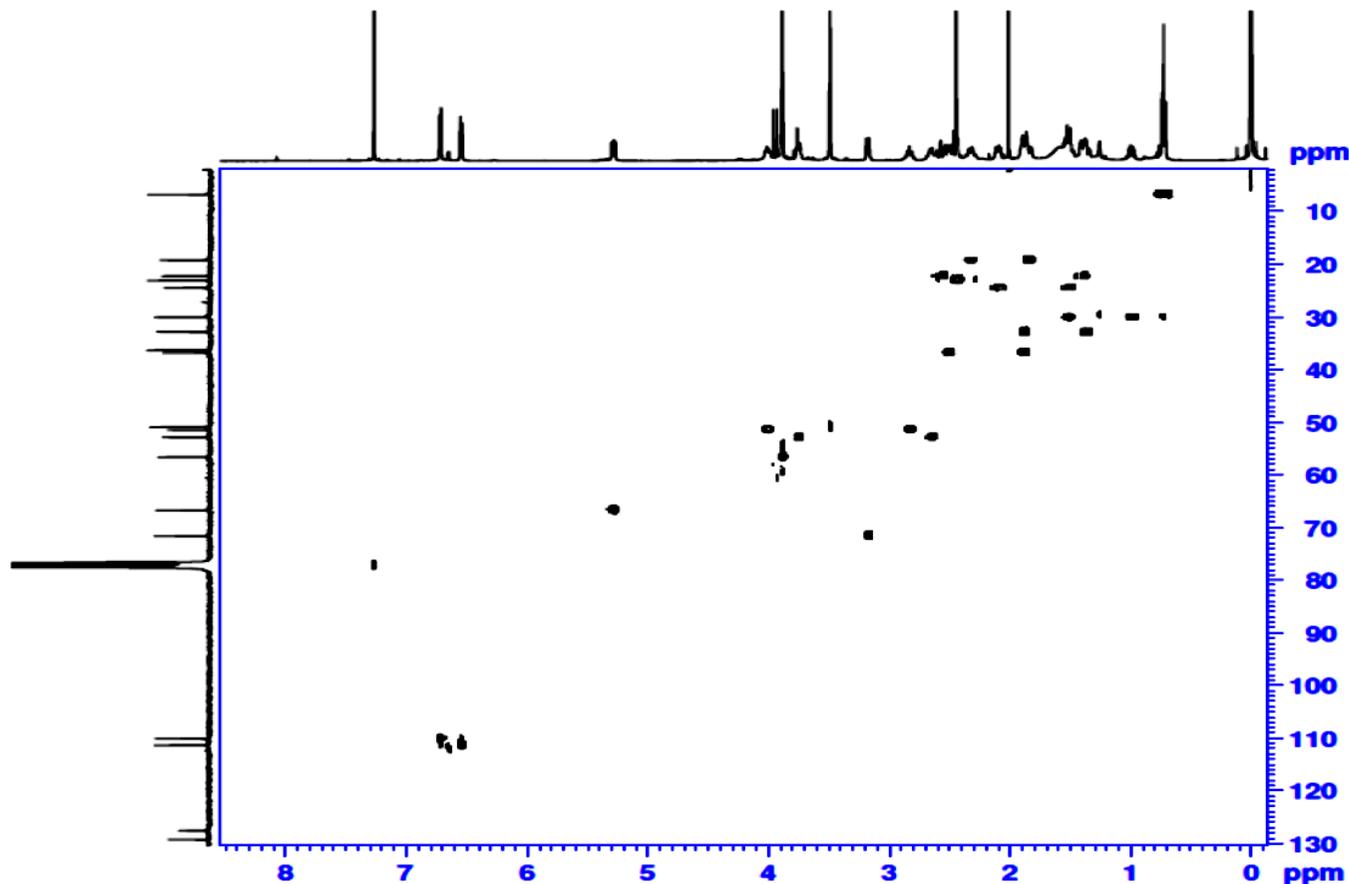
Current Data Parameters
 NAME NMR-787-17_BO12CP1
 EXPNO 3
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20171109
 Time 10.44 h
 INSTRUM spect
 PROBHD Z119470_0223 ()
 PULPROG depts135
 TD 32768
 SOLVENT CDCL3
 NS 4096
 DS 8
 SWH 29761.904 Hz
 FIDRES 0.908261 Hz
 AQ 0.5505024 sec
 RG 187.25
 DW 16.800 usec
 DE 10.00 usec
 TE 298.2 K
 CNST2 145.0000000
 D1 2.0000000 sec
 D2 0.00344828 sec
 D12 0.0002000 sec
 TD0 1
 SFO1 125.7716219 MHz
 NUC1 13C
 P1 10.00 usec
 P13 2000.00 usec
 PLW0 0 W
 PLW1 88.0000000 W
 SPNAM[5] Crp60comp.4
 SPOAL5 0.500
 SPOFFS5 0 Hz
 SPW5 13.44499969 W
 SFO2 500.1320005 MHz
 NUC2 1H
 CPDPRG[2] waltz16
 P3 9.40 usec
 P4 18.80 usec
 PCPD2 80.00 usec
 PLW2 20.32299995 W
 PLW12 0.28058001 W

F2 - Processing parameters
 SI 65536
 SF 125.7577885 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 3.00 Hz
 GB 0
 PC 1.40

ANEXO 27 (Espectro de RMN HSQC (500 MHz) da substância S1, em CDCL3).

HSQC
 Amostra: B012CP1
 Solv.: CDCL3
 Op. ASR

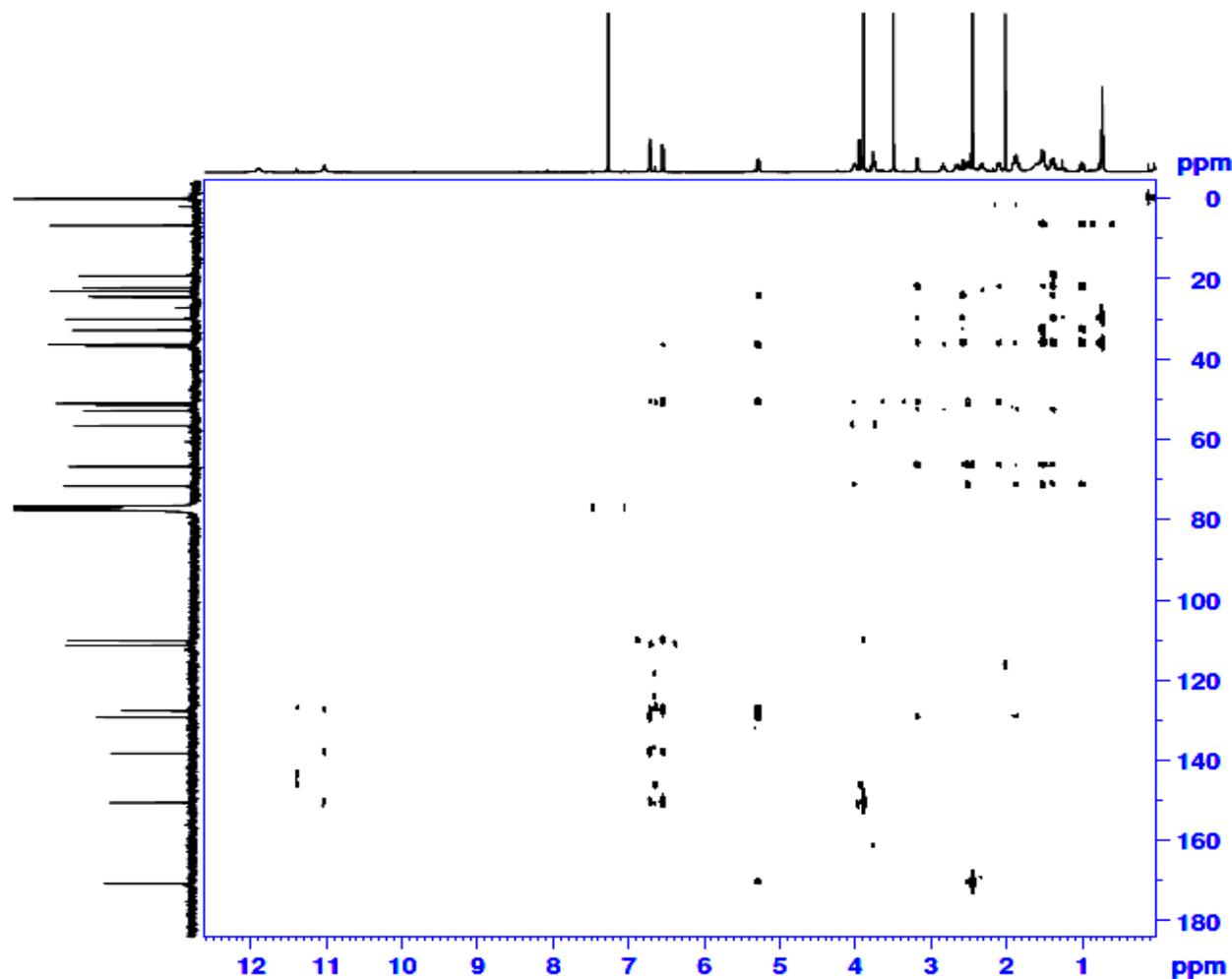


```

Current Data Parameters
NA: B012CP1
EXPNO: 300
PROCNO: 1
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20111101
Time 21.53 h
INSTRUM spect
PROBHD 1H1947Q QNP5
PULPROG zgpg30
TD 65536
SOLVENT CDCl3
NS 500
DS 4
SW H 8417.500 Hz
FREQ0 101.625000 MHz
AQ 0.2433204 sec
RG 102.25
DSW 95.400 sec
DE 10.00 sec
TE 298.15 K
CNSV2 143.000000
CNSV1 -0.000000
D0 0.0000000 sec
D1 1.0000000 sec
D2 0.0017344 sec
D3 0.0000000 sec
D4 0.0000000 sec
D5 0.0000000 sec
D6 0.0000000 sec
D7 0.0000000 sec
D8 0.0000000 sec
D9 0.0000000 sec
TEMR 1
SFO1 500.136054 MHz
NUC1 13C
P1 9.00 sec
PC1 18.00 sec
P2 1000.00 sec
PC2 20.000000 W
PLW1 20.000000 W
SFO2 125.760643 MHz
NUC2 1H
CPDPRG2 gmp
P3 10.00 sec
P4 300.00 sec
PC4 3000.00 sec
PCPD 70.00 sec
PLW2 0 W
PLW3 0.000000 W
PLW4 1.700000 W
SFO3 101.625000 MHz
SFO4 101.625000 MHz
SFO5 101.625000 MHz
SFO6 101.625000 MHz
SFO7 11.4449996 W
CPDPRG1 1
GDC1 10.00 %
CPDPRG2 1
GDC2 10.00 %
CPDPRG3 1
GDC3 10.00 %
CPDPRG4 1
GDC4 10.00 %
GDC5 10.00 %
GDC6 10.00 %
GDC7 10.00 %
GDC8 10.00 %
GDC9 10.00 %
GDC10 10.00 %
GDC11 10.00 %
GDC12 10.00 %
GDC13 10.00 %
GDC14 10.00 %
GDC15 10.00 %
GDC16 10.00 %
GDC17 10.00 %
GDC18 10.00 %
GDC19 10.00 %
GDC20 10.00 %
F1 - Acquisition parameters
TD 65536
SFO1 125.760643 MHz
FREQ0 125.760643 MHz
SW 214.867 ppm
PULPROG zgpg30
F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 500.136054 MHz
WDW EM
SSB 0
GB 0
PC 1.40
F3 - Processing parameters
SI 16384
SF 125.760643 MHz
WDW EM
SSB 0
GB 0
    
```

ANEXO 28 (Espectro de RMN HMBC (500 MHz) da substância S1, em CDCL3).

HMBC
Amostra: B012CP1
Solv.: CDCL3



Current List Parameters
NAME: NMR-787-17_B012CP1
EXPNO: 300
PROCNO: 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_: 20171108
Time: 14.23 h
INSTRUM: spect
PROBHD: Z119470.0223 (
PULPROG: hmcgcp1pndcf
TD: 4096
SOLVENT: CDCL3
NS: 103
DS: 16
SWH: 7739.938 Hz
FIDRES: 1.889633 Hz
AQ: 0.2646016 sec
RG: 187.25
CW: 64.600 usec
DE: 10.00 usec
TE: 298.1 K
CNS12: 145.000000
CNS13: 0.000000
DO: 0.0000300 sec
D1: 1.0000000 sec
D2: 0.00344828 sec
D6: 0.06250000 sec
D16: 0.00200000 sec
INO: 0.0001660 sec
TDav: 1
SFO1: 500.1331738 MHz
NUC1: 1H
P1: 9.40 usec
P2: 18.80 usec
PLW1: 20.32299995 W
SFO2: 125.7716219 MHz
NUC2: 13C
P3: 10.00 usec
PLW2: 88.0000000 W
GPNA M[1]: SMSQ10.100
GPF1: 30.00 %
GPNA M[2]: SMSQ10.100
GPF2: 30.00 %
GPNA M[3]: SMSQ10.100
GPF3: 40.10 %
P16: 1000.00 usec

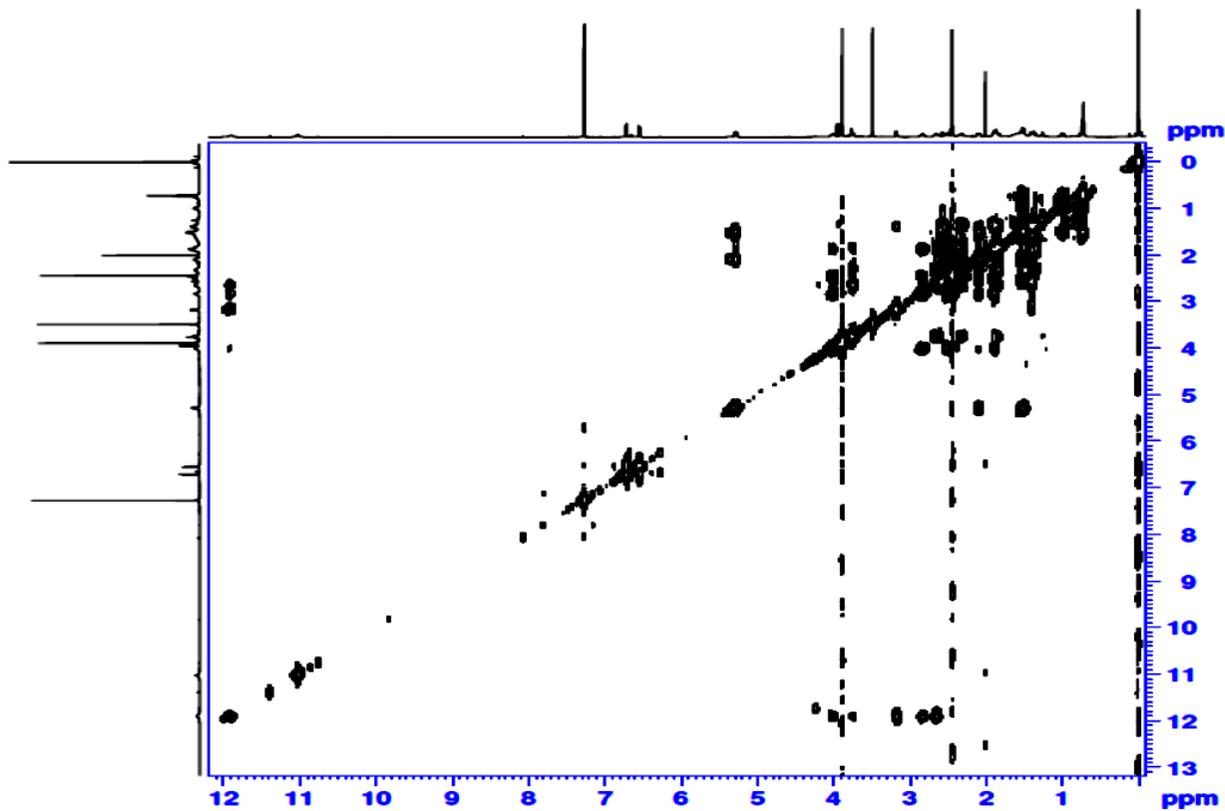
F1 - Acquisition parameters
TD: 256
SFO1: 125.7716 MHz
FIDRES: 235.316269 Hz
SW: 239.486 ppm
F2MODE: QF

F2 - Processing parameters
SI: 4096
SF: 500.1300092 MHz
WDW: SINC
SSB: 0
LB: 0 Hz
GB: 0
PC: 1.40

F1 - Processing parameters
SI: 1024
MC2: QF
SF: 125.7578110 MHz
WDW: SINC
SSB: 0
LB: 0 Hz
GB: 0

ANEXO 29 (Espectro de RMN COSY (500 MHz) da substância S1)

COSY
 Amostra: B012CP1
 Solv.: CDCL3



```

Current Data Parameters
NAME: NMR707-17_B012CP1
EXPNO: 100
PROCNO: 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_: 20171108
Time: 13.07 h
INSTRUM: spect
PROBHD: Z119470_0223 (
PULPROG: cosygppp/
TD: 2048
SOLVENT: CDCL3
NS: 16
DS: 16
SWH: 7507.507 Hz
FIDRES: 3.665775 Hz
AQ: 0.1363968 sec
RG: 187.25
DW: 66.600 usec
DE: 10.00 usec
TE: 298.2 K
D0: 0.0000000 sec
D1: 1.0000000 sec
D11: 0.0300000 sec
D12: 0.0002000 sec
D13: 0.0000400 sec
D16: 0.0002000 sec
DNO: 0.0001320 sec
TDev: 1
SFO1: 500.1332559 MHz
NUC1: 1H
PD: 9.40 usec
PI: 9.40 usec
PI7: 2500.00 usec
PLW1: 20.32299995 W
PLW10: 1.99530005 W
GPNAM[1]: SMSQ210.100
GPZ1: 10.00 %
P16: 1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
TD: 128
SFO1: 500.1333 MHz
FIDRES: 117.304802 Hz
SW: 15.011 ppm
PaMODE: CF

F2 - Processing parameters
SI: 4096
SF: 500.130093 MHz
WDW: QSSINE
SSB: 0
LB: 0 Hz
GB: 0
PC: 1.40

F1 - Processing parameters
SI: 1024
MC2: CF
SF: 500.130093 MHz
WDW: QSSINE
SSB: 0
LB: 0 Hz
GB: 0
    
```