

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

DAIANE BRITO DOS ANJOS

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIMALÁRICA *IN VITRO* DE
Endopleura uchi (HUBER) CUATREC E *Himatanthus sucuuba* (SPRUCE) WOOD.**

Manaus-Amazonas

2021

DAIANE BRITO DOS ANJOS

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIMALÁRICA *IN VITRO* DE
Endopleura uchi (HUBER) CUATREC E *Himatanthus sucuuba* (SPRUCE) WOOD.**

Dissertação apresentada ao Programa Multi-institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia na área de concentração saúde.

Orientador: Dr. Adrian Martin Pohlit

Coorientadora: Dra. Zelina Estevam dos Santos Torres

Manaus-Amazonas

2021

Ficha Catalográfica

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

A599c Anjos, Daiane Brito dos
Composição química e atividade antimalárica *in vitro* de
Endopleura uchi (Huber) Cuatrec e *Himatanthus sucuuba* (Spruce)
Wood. / Daiane Brito dos Anjos . 2021
104 f.: il. color; 31 cm.

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

1. ácido ursólico. 2. *Plasmodium falciparum*. 3. malária. 4. uxi-
amarelo. I. Pohlit, Adrian Martin. II. Universidade Federal do
Amazonas III. Título

DAIANE BRITO DOS ANJOS

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIMALÁRICA *IN VITRO* DE
Endopleura uchi (HUBER) CUATREC E *Himatanthus sucuuba* (SPRUCE) WOOD.**

Dissertação apresentada ao Programa Multi-institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia na área de concentração saúde.

Aprovado em: 01 março de 2021

BANCA EXAMINADORA

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

Dra. Rosemary Aparecida Roque - Membro
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA)

Dra. Cecília Verônica Nunez - Membro
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA)

Com todo o amor do mundo dedico esse trabalho àquela que me deu a vida e me ensinou a vivê-la, minha querida mãe Marlene, às minhas irmãs Ana Cláudia, Luciana, Tamiles e ao meu amado esposo Cristian, que tanto me apoiou durante esses anos.

AGRADECIMENTO

Primeiramente a Deus, que me permitiu concluir mais essa etapa na minha vida e me sustentou nos momentos mais difíceis durante essa trajetória;

À minha família, por todo o apoio, o incentivo e a compreensão nos momentos de ausência;

À minha mãe, por ter me dado à oportunidade de estudar e concluir mais um ciclo da minha vida, minhas irmãs, *in memoriam* do meu irmão Alessandro, que sempre me apoiou e me incentivou a estudar e a acreditar nos meus sonhos;

Ao meu esposo Cristiano, pela dedicação, amor, incentivo, apoio e companheirismo durante essa trajetória. Obrigada por tudo por sempre estar ao meu lado, segurando a minha mão, nos momentos difíceis;

Ao professor Dr. Adrian Martin Pohlit, pela orientação nesse trabalho, pela disponibilidade e contribuição na minha formação;

À Dra. Zelina Torres, pela co-orientação, paciência, pelos conselhos e amizade durante esses dois anos;

Aos meus amigos Lais Garcia e Edizon Veiga, pela colaboração, apoio, disponibilidade e ensinamentos, sou muito grata a vocês pessoas leais e incríveis;

Aos colegas do laboratório LAPAAM, Diana Sangama, Marlene Camargo, Tiago Pereira, Djalma Pereira, pela colaboração e disponibilidade;

Às minhas amigas Adélia Marques, Adriana Cardoso, Samara Claudia, Suziane Rodrigues, Thaissa Cunha, obrigada meninas pelo acolhimento, amizade, pelos almoços divertidos, gratas pela amizade de vocês, pessoas mais que especiais em minha vida;

A Universidade Federal do Estado do Amazonas (UFAM) e ao Instituto de Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA), onde este trabalho foi desenvolvido;

Ao órgão de fomento FAPEAM, pelo financiamento do projeto e da bolsa de mestrado concedida;

Enfim, agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho. Sou imensamente grata por tudo.

A vida não é fácil para nenhum de nós. Mas e daí? Nós devemos ter persistência e, acima de tudo, confiança em nós mesmos. Devemos acreditar que somos talentosos em alguma coisa, e que essa coisa, a qualquer custo, deve ser alcançada.

Marie Curie

RESUMO

Diversas plantas estão sendo utilizadas na medicina popular como antimaláricos, dentre essas espécies estão a *Endopleura uchi* e a *Himatanthus sucuuba* utilizadas pela comunidade remanescentes de quilombos de Oriximiná no Pará. O presente trabalho teve como objetivo estudar a composição química e avaliar a atividade antiplasmódica *in vitro* de extratos, frações e substância isoladas das espécies *E. uchi* e *H. sucuuba* frente à cepa K1 (resistente a cloroquina) de *Plasmodium falciparum*. Inicialmente foram avaliados seis extratos da espécie *E. uchi* e 16 extratos da espécie *H. sucuuba*, onde os extratos etanólicos da casca de *E. uchi* apresentaram o melhor rendimento, para a espécie *H. sucuuba* os melhores rendimentos tanto da casca como da folha foram aqueles extraídos com solventes de baixa polariedade. Como na concentração inibitória mínima (CI₅₀) dos extratos de *E. uchi* não apresentaram atividade sobre o *Plasmodium falciparum*, não foi dada a continuidade ao seu fracionamento. Os extratos das folhas de *H. sucuuba* obtidos com acetato de etila e clorofórmio exibiram CI₅₀ de 20,9 e 24,7 respectivamente. O extrato de acetato de etila foi submetido a fracionamento, utilizando coluna cromatográfica (CC). Obtiveram-se 18 frações que foram reunidas conforme seus perfis de cromatografia em camada delgada analítica (CCD) resultando em cinco frações, quatro dessas frações apresentaram atividade antiplasmódica parcial (CI₅₀ 11,7; 15,4; 16,8 e 19,6 ug/mL). A fração FDB2 foi submetida a um novo fracionamento utilizando CC. Deste novo fracionamento foi isolado o ácido ursólico, essa substância apresentou atividade antiplasmódica promissora (CI₅₀ 3,87 ug/mL). O relato da composição química e atividade antimalárica das folhas *H. sucuuba* é inédito na literatura.

Palavras-chaves: ácido ursólico, *Plasmodium falciparum*, malária, uxi-amarelo.

ABSTRACT

Several plants are being used in folk medicine as antimalarials, among these species are *Endopleura uchi* and *Himatanthus sucuuba* used by the remaining quilombo communities of Oriximiná in Pará. This study aimed to study the chemical composition and evaluate the in vitro antiplasmodic activity of extracts, fractions and substances isolated from the *E. uchi* and *H. sucuuba* species against the K1 (chloroquine resistant) strain of *Plasmodium falciparum*. Initially, six extracts of the species *E. uchi* and 16 extracts of the species *H. sucuuba* were evaluated, where the ethanol extracts of the *E. uchi* bark showed the best yield, for the species *H. sucuuba* the best yields of both the bark and the leaf were those extracted with low polarity solvents. As with the minimum inhibitory concentration (IC_{50}), the extracts did not show activity on *Plasmodium falciparum*, their fractionation was not continued. The extracts of the leaves of *H. sucuuba* obtained with ethyl acetate and chloroform showed IC_{50} of 20.9 and 24.7, respectively. The ethyl acetate extract was subjected to fractionation, using a chromatographic column (CC). 18 fractions were obtained, which were gathered according to their analytical thin layer chromatography profiles (CCD) resulting in five fractions, four of these fractions showed partial antiplasmodic activity (IC_{50} 11.7; 15.4; 16.8 and 19.6 $\mu\text{g} / \text{mL}$). The FDB2 fraction was subjected to a new fractionation using CC. Ursolic acid was isolated from this new fractionation, this substance showed promising antiplasmodic activity (IC_{50} 3.87 $\mu\text{g} / \text{mL}$). The report of the chemical composition and antimalarial activity of *H. sucuuba* leaves is unprecedented in the literature.

Key words: ursolic acid, *Plasmodium falciparum*, malaria, uxi-yellow.

SUMÁRIO

Lista de figuras	xii
Lista de tabelas	xiv
Lista de anexos	xv
Lista de abreviaturas e símbolos.....	xvi
1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO BIBLIOGRAFICA.....	20
2.1 Malária.....	20
2.2 Ciclo biológico do parasita	21
2.2.1Ciclo de vida do <i>Plasmodium</i> no homem.....	21
2.2.2 O ciclo de vida do <i>Plasmodium</i> no mosquito.....	22
2.2.3 Vetor e agente etiológico.....	22
2.2.4 Ocorrência da malária no mundo e no Brasil	24
2.3 Uso de plantas medicinais no tratamento da malária	26
2.4 Primeiros fármacos utilizados para tratamento da malária.....	26
2.5 Resistência aos antimaláricos	28
2.6 Família Humiriaceae.....	29
2.6.1 <i>Endopleura uchi</i> (Huber) Cuatrec	30
2.6.2 Composição química e atividade biológica <i>Endopleura uchi</i>	31
2.7 Família Apocynaceae	33
2.7.1 Distribuição botânica de <i>Himatanthus sukuuba</i> (Spruce) Wood.....	34
2.7.2 Composição química e atividade biológica do gênero <i>Himatanthus</i>	36
3 OBJETIVOS	40
3.1 Geral	40
3.2 Específicos.....	40
4 PARTE EXPERIMENTAL	41
4.1 Material e método.....	41
4.1.1Equipamentos	41
4.1.2 Coleta do material vegetal	41
4.1.3 Secagem/ moagem do material vegetal	42
4.2 Cromatografia.....	42
4.2.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)	42
4.2.2 Cromatografia em coluna (CC)	43
4.3 Métodos espectroscópicos	43

4.3.1 Ressonância magnética nuclear (RMN)	43
4.3.2 Cálculo do rendimento das extrações	43
4.4 Preparação dos extratos, frações e isolamento das substâncias.....	43
4.4.1 1º Extração em pequena escala dos extratos	43
4.4.2 Extração a quente por decocção	44
4.4.3 Extração a quente por infusão	44
4.4.4 2º Extração em grande escala dos extratos	45
4.4.5 Fracionamento do extrato acetato de etila da folha (EDB-A)	46
4.4.6 Purificação da fração FDB2	47
4.5 Microteste para atividade antiplasmódica <i>in vitro</i>	48
4.5.1 Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Plasmodium falciparum</i>	48
4.5.2 Microteste de suscetibilidade <i>in vitro</i>	48
4.5.3 Análise estatística dos dados	49
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
5.1 Rendimentos das extrações de <i>Endopleura uchi</i>	50
5.1.1 Atividade antimalárica <i>in vitro</i> de <i>Endopleura uchi</i>	50
5.2 Rendimentos dos extratos e frações de <i>Himatanthus sucuuba</i>	51
5.2.1 Atividade antimalárica <i>in vitro</i> de <i>Himatanthus sucuuba</i>	53
5.2.2 Peneiragem de extratos para atividade antiplasmódica <i>in vitro</i>	53
5.2.3 CI ₅₀ dos extratos de <i>H. sucuuba</i>	54
5.2.4 Fracionamento dos extratos de AcOEt	55
5.3 Estudos das frações e substância identificada	56
5.4 Identificação da substância.....	56
5.4.1 Elucidação estrutural da substância 1BDG1	56
5.4.2 Resultado do teste antiplasmódica <i>in vitro</i> da substância ácido ursólico	71
6 CONCLUSÃO	73
7 REFERÊNCIAS	74
ANEXO.....	83

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Ciclo de vida do <i>Plasmodium</i>	21
Figura 2- Mosquito do gênero <i>Anopheles</i>	23
Figura 3- Distribuição de casos de malária no mundo	24
Figura 4- Mapa de risco da malária por município de infecção no Brasil em 2019.....	25
Figura 5- Estruturas químicas de antimaláricos naturais.....	27
Figura 6- Estruturas químicas dos antimaláricos sintéticas.....	28
Figura 7- Esquema indicando o período aproximado de introdução das drogas antimaláricas (caixas azul) e de notificação da resistência aos antimaláricos (caixa verde).	29
Figura 8- Distribuição dos gêneros da família Humiriaceae	30
Figura 9- <i>Endopleura uchi</i> (Huber) Cuatrec in natura (Reserva Florestal Adolpho Ducke, INPA)	31
Figura 10- Estruturas químicas de esteroides isolados da casca da espécie <i>Endopleura uchi</i>	32
Figura 11- Estruturas químicas de isolados da casca da espécie <i>Endopleura uchi</i>	33
Figura 12- Distribuição geográfica da família Apocynaceae	34
Figura 13- Aspecto morfológico de <i>Himatanthus sucuuba</i> (Spruce) Wood	35
Figura 14- <i>Himatanthus sucuuba</i> (Spruce) Wood, Reserva Adolpho Ducke, INPA	35
Figura 15- Estruturas químicas de iridóides isolados da casca e do látex da espécie <i>Himatanthus sucuuba</i>	36
Figura 16- Estruturas químicas de triterpenos e iridóides isolados da casca e do látex de <i>Himatanthus sucuuba</i>	37
Figura 17- Estruturas químicas de alcalóides isolados <i>Himatanthus lancifolius</i>	39
Figura 18- Mapa de localização da Reserva Florestal Adolpho Ducke	42
Figura 19- Espectro de massa (EM) APCI (modo positivo) da substância 1BDG1	56
Figura 20- Ampliação do espectro de RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) na faixa de δ_{H} 0,67 a 1,03 características de metílicos (CH_3).....	57
Figura 21- Ampliação do espectro de RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) na faixa de δ_{H} 1,23 a 2,12 características de metilênico (CH_2).....	58
Figura 22- Ampliação do espectro de RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) dos sinais δ_{H} 5,12 e 2,99 característicos de metínico (CH)	58
Figura 23- Ampliação do espectro de RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) dos sinais δ_{H} 12,0 e 4,31 característicos de hidrogênio de carboxila e álcool secundário, respectivamente.....	59

Figura 24- Expansão do mapa de contorno HSQC (^1H : 300 MHz, ^{13}C : 75 MHz, DMSO- d_6) da correlação ^1J dos δ_{H} 2,99 - δ_{C} 77,3 e δ_{H} 5,12 - δ_{C} 125,0 ppm.	60
Figura 25- Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) com ampliações δ_{C} 55,2-42,1, δ_{C} 39,5-36,8 e δ_{C} 33,2-15,7 ppm.	61
Figura 26- Principal esqueleto triterpeno pentacíclico encontrado na <i>H. succuba</i> (WOOD et. al., 2001).	61
Figura 27- Mapa de correlação de HMBC (75 MHz, DMSO- d_6) com ampliação do acoplamento δ_{H} 2,10- δ_{C} 138,6 ppm.	62
Figura 28- Mapa de correlação de HMBC (75 MHz, DMSO- d_6) com ampliação do acoplamento δ_{H} 2,10- δ_{C} 178,8 ppm.	63
Figura 29 - Mapa de contorno COSY ^1H - ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) com ampliação do acoplamento δ_{H} 2,10 - δ_{H} 1,30 ppm.	64
Figura 30 - Estrutura do ácido ursólico.	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Massa dos extratos das folhas da segunda extração de <i>H. sucuuba</i> e seus respectivos rendimentos a partir do material vegetal utilizado	46
Tabela 2- Massa dos extratos secos das cascas de <i>Endopleura uchi</i> e seus respectivos rendimentos a partir do material vegetal utilizado 1 g	50
Tabela 3- Peneiragem in vitro de extratos de <i>Endopleura uchi</i> frente à estirpe K1 de <i>P. falciparum</i>	51
Tabela 4- Massa dos extratos secos de <i>Himatanthus sucuuba</i> extração em pequena escala e seus respectivos rendimentos a partir do material vegetal utilizado	52
Tabela 5- Inibição do crescimento in vitro de <i>P. falciparum</i> das amostras da espécie <i>Himatanthus sucuuba</i>	53
Tabela 6- CI ₅₀ dos extratos das folhas da espécie <i>Himatanthus sucuuba</i>	54
Tabela 7- Inibição in vitro de <i>P. falciparum</i> pelas frações dos extratos AcOEt das folhas de <i>Himatanthus sucuuba</i>	55
Tabela 8- Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C da substância 1DBG1 em DMSO.....	66
Tabela 9- Dados espectrais de RMN 1D e 2D da substância 1DBG1 ¹ H 300/ ¹³ C 75 MHz; ppm; DMSO-d ₆	68
Tabela 10- Dados de RMN de ¹³ C e ¹ H da 1DBG1 em Piridina-d ₅	69
Tabela 11- CI ₅₀ das substâncias da espécie <i>Himatanthus sucuuba</i>	71
Quadro 1- Uso de espécies de <i>Himatanthus</i> para fins medicinais e atividades farmacológicas	38
Fluxograma 1- Obtenção dos extratos brutos pelo método de maceração.....	45
Fluxograma 2- Fracionamento cromatográfico do extrato acetato de etila da folha (EDB-A)	46
Fluxograma 3- Fracionamento cromatográfico da fração cromatográfica do extrato de <i>H. sucuuba</i>	47

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1 - Espectro de massas modo negativo da substância 1DBG1	84
Anexo 2 - Espectro de fragmentação do íon m/z 455,40 da substância 1DBG1	85
Anexo 3 - Espectro de massa modo positivo da substância 1DBG1	86
Anexo 4 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz) da substância 1DBG1, em DMSO $-d_6$	87
Anexo 5 - Ampliação do espectro de RMN de ^1H (300 MHz) da substância 1DBG1, em DMSO $-d_6$	88
Anexo 6 - Ampliação do espectro de RMN de ^1H (300 MHz) da substância 1DBG1, em DMSO $-d_6$	89
Anexo 7 - Espectro de RMN HSQC (^1H - 300 MHz, ^{13}C -75 MHz) da substância 1DBG1, em DMSO- d_6	90
Anexo 8 - Ampliação do espectro de RMN HSQC (^1H - 300 MHz, ^{13}C -75 MHz) da substância 1DBG1, em DMSO- d_6	91
Anexo 9 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz) da substância 1DBG1 em DMSO- d_6	92
Anexo 10 - Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz) da substância 1DBG1 em DMSO- d_6	93
Anexo 11 - Espectro de RMN DEPT 135 (75 MHz) da substância 1DBG1, DMSO- d_6	94
Anexo 12 - Ampliação do espectro de RMN DEPT 135 (75 MHz) da substância 1DBG1, DMSO- d_6	95
Anexo 13 - Espectro de RMN HMBC (^1H -300 MHz, ^{13}C - 75 MHz) da substância 1DBG1, em DMSO- d_6	98
Anexo 14 - Ampliação do espectro de RMN HMBC (^1H -300 MHz, ^{13}C - 75 MHz) da substância 1DBG1, em DMSO- d_6	99
Anexo 15 - Espectro de RMN COSY (300 MHz) da substância 1DBG1, em DMSO- d_6	100
Anexo 16 - Ampliação do espectro de RMN COSY (300 MHz) da substância 1DBG1, em DMSO- d_6	101
Anexo 17 - Espectro de RMN de ^1H e ampliação (300 MHz) da substância 1DBG1, em Piridina- d_5	102
Anexo 18 - Espectro de RMN de ^{13}C e ampliação (75 MHz) da substância 1DBG1, em Piridina- d_5	103
Anexo 19 - Espectro de DEPT 135 e ampliação (75 MHz) da substância 1DBG1, em Piridina- d_5	104

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ATCC	American Type Culture Collection
α	Alfa
AcOEt	Acetato de etila
β	Beta
CPPN	Coordenação de Pesquisa em Produtos Naturais
COSAS	Coordenação de Sociedade Ambiental e Saúde
COSY	Espectroscopia de correlação homonuclear
CCD	Cromatografia em camada delgada
CC	Cromatografia em coluna
CQR	Resistência à cloroquina
CQ	Cloroquina
CI ₅₀	Concentração inibitória de 50%
DMSO	Dimetilssulfóxido
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DB11A	Extrato de hexano da folha <i>H. sucuuba</i>
DB11B	Extrato acetato de etila da folha <i>H. sucuuba</i>
DB11D	Extrato etanólico da folha <i>H. sucuuba</i>
DB11E	Extrato hidroalcoólica da folha <i>H. sucuuba</i>
DB11F	Extrato clorofórmico da folha <i>H. sucuuba</i>
DB11G	Extrato H ₂ O (decoção) da folha <i>H. sucuuba</i>
DB11H	Extrato H ₂ O (infusão) da folha <i>H. sucuuba</i>
DB11C	Extrato de acetona da folha <i>H. sucuuba</i>
DB12A	Extrato etanólico da casca <i>H. sucuuba</i>
DB12B	Extrato H ₂ O (decoção) da casca <i>H. sucuuba</i>
DB12C	Extrato clorofórmico da casca <i>H. sucuuba</i>
DB12D	Extrato de acetato de etila da casca <i>H. sucuuba</i>
DB12E	Extrato hidroalcoólica da casca <i>H. sucuuba</i>
DB12F	Extrato H ₂ O (infusão) da casca <i>H. sucuuba</i>
DB12G	Extrato de acetona da casca <i>H. sucuuba</i>
DB12H	Extrato hexânico da casca <i>H. sucuuba</i>
EDB-A	Extrato de acetato de etila
FDB1	Fração hexânico <i>H. sucuuba</i>
FDB2	Fração de acetato de etila <i>H. sucuuba</i>
FDB3	Fração de acetato de etila <i>H. sucuuba</i>
FDB4	Fração de acetona <i>H. sucuuba</i>
FDB5	Fração de metanol <i>H. sucuuba</i>
FMT-HVD	Fundação de Medicina Tropical Heitor Vieira Dourado
Hz	Hertz
HSQC	Correlação quântica única heteronuclear
HMBC	Heteronuclear Multiple Quantum Correlation
HF	Halofantrina
HFR	Resistência à Halofantrina
INPA	Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia
<i>J</i>	Constante de acoplamento
LAPAAM	Laboratório de Principio Ativo da Amazônia
MQ	Mefloquina
MQR	Resistência a mefloquina

MHz	Megahertz
OMS	Organização Mundial de Saúde
QRN	Resistência a quinina
RMN ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN ¹³ C	Ressonância magnética nuclear carbono
RMN	Ressonância magnética nuclear
SP	Sulfadoxina-pirimetamina
SPR	Resistência a sulfadoxina-pirimetamina
TCA	Terapia combinada de artemisinina
WOOD	Woodson
1DBG1	Substância isolada <i>H. sucuuba</i>
Δ	Deslocamento químico

1 INTRODUÇÃO

A malária, conhecida também como paludismo, é uma doença debilitante que afeta milhões de pessoas nas regiões tropicais e subtropicais. A malária humana é provocada pelo protozoário do gênero *Plasmodium*. Em alguns casos, a doença pode evoluir de forma rápida, levando o indivíduo à morte (BRASIL, 2019). Considera-se uma doença de grande importância, devido às altas taxas de casos, principalmente na região amazônica (BRASIL, 2009; 2010; 2019). Nos estados da região da Amazônia legal foram registados mais de 99% de casos da doença da malária brasileira nos estados.

Para o tratamento da infecção causada pela malária são utilizados antimaláricos que tiveram suas origens e desenvolvimentos a partir de plantas utilizadas na medicina tradicional. A partir das substâncias antimaláricas naturais, a quinina e a artemisinina, foram criados os análogos sintéticos quinolínicos e derivados semissintéticos de artemisinina. Entretanto, não há vacina disponível para a prevenção da malária e as cepas de *Plasmodium* estão desenvolvendo resistência aos fármacos utilizados no tratamento da doença (WHO, 2020; COSTA, 2017). Com o surgimento de resistência do parasito aos antimaláricos, hoje há uma grande demanda por novos medicamentos.

As plantas apresentam uma grande quantidade de metabólitos secundários que podem auxiliar no tratamento da malária. É através delas que muitas comunidades buscam tratamento para diversas doenças, incluindo a malária. A região Amazônica possui uma grande diversidade de plantas. Geralmente as plantas são utilizadas em forma de chás para o auxílio e cura de doenças. O uso de substâncias químicas (princípios ativos) oriundas de produtos naturais vem contribuindo para a formulação de princípios ativos capazes de curar doenças ou diminuir seus sintomas (PEREIRA e CARDOSO, 2012; OLIVEIRA et al., 2015).

Himatanthus sucuuba (Spruce) Wood. e *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec são utilizadas por comunidades da Amazônia para o tratamento da malária. A *H. sucuuba*, é uma árvore de médio a grande porte, utilizada para o tratamento de doenças. Tanto a casca quanto o látex possuem efeito anti-inflamatório para o tratamento de gastrite, úlcera, malária, antitumoral, antifúngicos e antianêmicos. A espécie está presente na região norte do Brasil tendo uma grande importância para o mercado madeireiro, onde sua madeira é utilizada para construção (SILVA et al., 1998; OLIVEIRA et al., 2015).

A *E. uchi* é uma planta medicinal muito utilizada pela população, principalmente para combater infecções do trato feminino por possuir efeito anti-inflamatório como também para tratamento da malária. A espécie está presente na região amazônica, tendo sua madeira

utilizada para construção em geral. Seu fruto bem apreciado é utilizado para a fabricação de sorvetes e licores (MAGALHÃES et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2015).

Diante do exposto, atualmente existe uma grande necessidade por medicamentos oriundos de plantas que possuam um efeito antimalárico. A partir de estudos como este, espera-se isolar substâncias que poderão servir de modelo para novos antimaláricos.

Visando essa necessidade eminente, vários grupos de pesquisas buscam moléculas com essa finalidade. O grupo de pesquisa do Laboratório de Princípio ativo da Amazônia (LAPAAM) do INPA há muito tempo vêm contribuindo para tal feito. Com essa mesma finalidade, o presente trabalho avaliou a atividade antiplasmódica *in vitro* de *E. uchi* e *H. sucuuba*, utilizadas no combate à malária, pelos remanescentes de quilombos em Oriximiná, no estado do Pará.

2 REVISÃO BIBLIOGRAFICA

2.1 Malária

A malária é uma doença tropical infecciosa febril aguda, que afeta grande parte da Amazônia legal (COUTO et al., 2019). O parasita causador da malária é transmitido através da picada do mosquito (fêmea) do gênero *Anopheles*, que tem como agente etiológico o protozoário do gênero *Plasmodium* (principalmente *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi*) (BRASIL, 2010). Geralmente os vetores infectados por *Plasmodium* são mais ativos ao entardecer e ao amanhecer. No horário noturno, os mosquitos também são encontrados, porém em quantidades menores (BRASIL, 2009).

Segundo Lima e Guimarães (2007) a malária é uma doença que acomete cerca de 40% da população mundial, onde o maior registro da enfermidade se encontra em países de climas tropicais e subtropicais (ALMEIDA et al., 2017). É uma doença debilitante, de evolução muito rápida, podendo levar o indivíduo à morte.

A pessoa infectada por malária pode apresentar sintomas como febre alta, sudorese, tremores, calafrios e dores de cabeça crônicas que podem ocorrer de forma cíclica, ou seja, em intervalos regulares (LEITE et al., 2013). A malária pode ser dividida em três fases, na primeira ocorre a fase fria que pode durar cerca de 15 min a uma hora. A segunda é chamada de fase quente e pode ter uma duração de aproximadamente duas a seis horas. Na terceira fase, chamada de úmida, ocorre uma redução da febre (BRASIL, 2010; LOPES, 2015). A malária não é transmitida de uma pessoa para outra, pois não se trata de uma doença contagiosa.

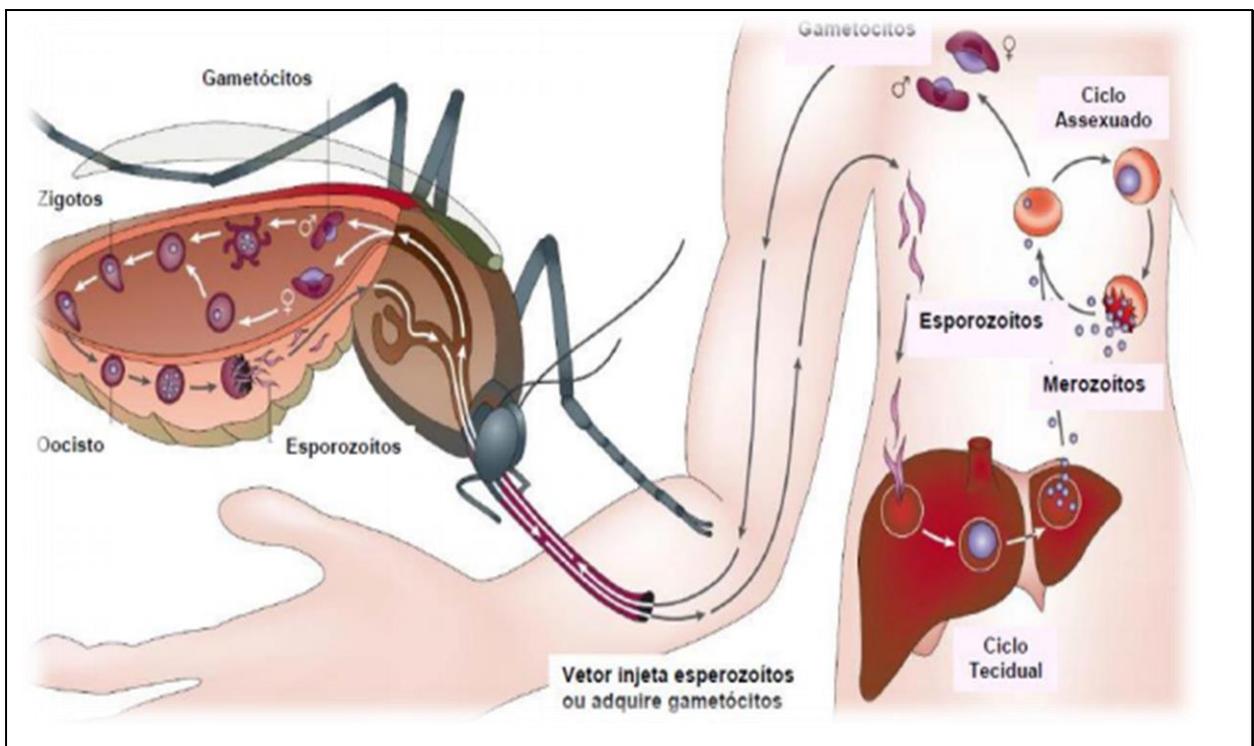
A malária foi identificada na década de 1880 pelo médico francês Charles Louis Alphonse Laveran, que identificou a doença parasitária infecciosa. Já em 1897 o médico militar Sir Ronald Ross descobriu que o mosquito do gênero *Anopheles* era o transmissor do *Plasmodium* que causava a doença (OLOWE et al., 2015) entretanto o termo *Plasmodium* foi sugerido por Ettore Marchiava e Augusto Celli que até então, acreditavam que a malária era transmitida pela bactéria *Bacillus malariae*, mas depois de vários estudos chegaram à conclusão de que a doença tinha como origem um protozoário do gênero *Plasmodium* (CAPANNA, 2006).

Geralmente, todos estão suscetíveis a contrair malária, entretanto as pessoas que vivem em regiões ribeirinhas e comunidades isoladas, próximas de matas são mais vulneráveis a contrair a doença (BRASIL, 2019; WHO, 2012). O tratamento é feito por vias medicamentosas. O sistema único de saúde (SUS) oferece a medicação de forma gratuita.

2.2 Ciclo biológico do parasita

O ciclo de vida do parasita é bem complexo, apresentando uma fase assexuada, endógena (esquizogonia) tendo como hospedeiro vertebrado o homem, roedores entre outros, e a outra fase do ciclo sexuado exógena (esporogonia) no mosquito, tendo como vetor o inseto do gênero *Anopheles*. (NEVES et al., 2016; SIQUEIRA et al., 2018). O ciclo da doença está representado na Figura 1.

Figura 1- Ciclo de vida do *Plasmodium*



Fonte: Adaptado de Su et al. (2007)

2.2.1 Ciclo de vida do *Plasmodium* no homem

Uma vez na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado, os esporozoítos circulam durante alguns minutos e rapidamente penetram nas células do fígado nas células hepáticas, assim dão início ao ciclo pré-eritrocítico ou esquizogonia tecidual, que dura seis dias para a espécie *P. falciparum*, oito para *P. vivax* e 12 a 15 dias para *P. malariae*. Durante esta fase no fígado, o *P. vivax* e o *P. ovale* apresentam desenvolvimento lento de alguns esporozoítos, formando os hipnozoítos, forma latentes (dormentes) do parasito responsáveis pelas recaídas da doença meses ou anos depois (BRAGA, 2005).

Logo após a fase do ciclo no tecido, e com o rompimento dos hepatócitos, libera milhares de merozoítos (cerca de 2.000 *P. malariae*, 10.000 *P. vivax* e 40.000 *P. falciparum*) de elementos-filhos na corrente sanguínea. Uma vez na corrente sanguínea os merozoítos irão invadir as hemácias, dando início ao um segundo ciclo de reprodução assexuada dos plasmódios. Durante esse período cada espécie age de uma forma distinta, o *P. malariae* só irá invadir hemácias velhas, o *P. vivax* invade preferencialmente as hemácias jovens já o *P. falciparum* invade hemácias em qualquer fase reprodutiva. Posteriormente, poucos merozoítos permanecem no fígado e a outra parte invade as hemácias, dando assim a continuidade na reprodução nas células do sangue.

Durante esse processo de reprodução assexuada alguns merozoítos sofrem uma serie de transformações morfológicas até chegar à fase de esquizontes, quando se divide e origina novos merozoítos que serão lançados na corrente sanguínea. Após um período de replicação assexuada, alguns merozoítos se diferenciam em microgametócitos (masculinos) e microgametócitos (femininos), que amadurecem sem divisão celular e tornam-se infectantes aos mosquitos (BRASIL, 2005; NEVES et al., 2016).

2.2.2 O ciclo de vida do *Plasmodium* no mosquito

O ciclo tem início no estômago do mosquito. Os gametócitos sofrem uma transformação em gametas femininos e masculinos. Depois de ocorrer à fecundação desses gametas, origina o zigoto. Em seguida, esse zigoto migra para a parte externa do intestino onde amadurece e se modifica em oócitos. Esses se multiplicam e se transformam em esporozoítos que é a forma infectante para o hospedeiro vertebrado (SIQUEIRA et al., 2018). A doença é incubada por cerca de oito a 12 dias para *P. falciparum* (BRASIL, 2009). Já para *P. vivax* o período de incubação ocorre entre 13 a 17 dias e para o *P. malariae* essa incubação se dá entre 18 a 30 dias.

Os principais protozoários que causam a doença no homem são *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale*. No Brasil há registros de apenas três espécies: *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae*, causadores da malária humana (BRASIL, 2019).

2.2.3 Vetor e agente etiológico

O mosquito transmissor da malária faz parte da ordem Diptera, infraordem Culicomorfa, família Culicidae, gênero *Anopheles* Meigen, 1818. Atualmente existem cerca

de 480 espécies de anofelinos descritas no mundo, sendo que no Brasil são registradas 55 espécies de *Anopheles* (BRASIL, 2009; MACIEL e MISSAWA, 2012).

O parasita causador da malária pertence ao filo Apicomplexa, família *Plasmodiidae*, gênero *Plasmodium*, são descritas cerca de 150 espécies causadoras da malária em diferentes hospedeiros vertebrados (NEVES et al., 2016). Ainda de acordo com esses autores, o tamanho, a forma e a aparência dos plasmódios variam de acordo com o indivíduo, ou seja, eles não têm um padrão a ser seguido. O ciclo biológico do *Plasmodium* é bem complexo. Ele possui dois hospedeiros, um vertebrado e outro invertebrado (MILLER et al., 2013).

Popularmente, o vetor transmissor da malária é conhecido como carapanã, muriçoca, sovela, mosquito-prego e bicuda. A fêmea do mosquito *Anopheles* é responsável pela transmissão da doença uma vez que, as fêmeas alimentam-se de sangue enquanto os machos alimentam-se de néctar de plantas (BRASIL, 2005). As espécies do vetor da malária de grande importância epidemiológica no Brasil são *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi*, *A. (Nys.) albitarsis*, *A. (Nys.) aquasalis*, *A. (Kertessia) cruzii*, *A. (Ker.) bellator*. Na maioria das vezes esses insetos evoluem em águas limpas e sombreadas de remansos de rios, córregos, igarapés, lagos, represas, açudes, valetas de rigação, alagados, pântanos e águas acumuladas em bromélias (BRASIL, 2005). O transmissor da malária na Amazônia é o *Anopheles darlingi* (MACIEL e MISSAWA, 2012) (FIGURA 2).

Figura 2- Mosquito do gênero *Anopheles*



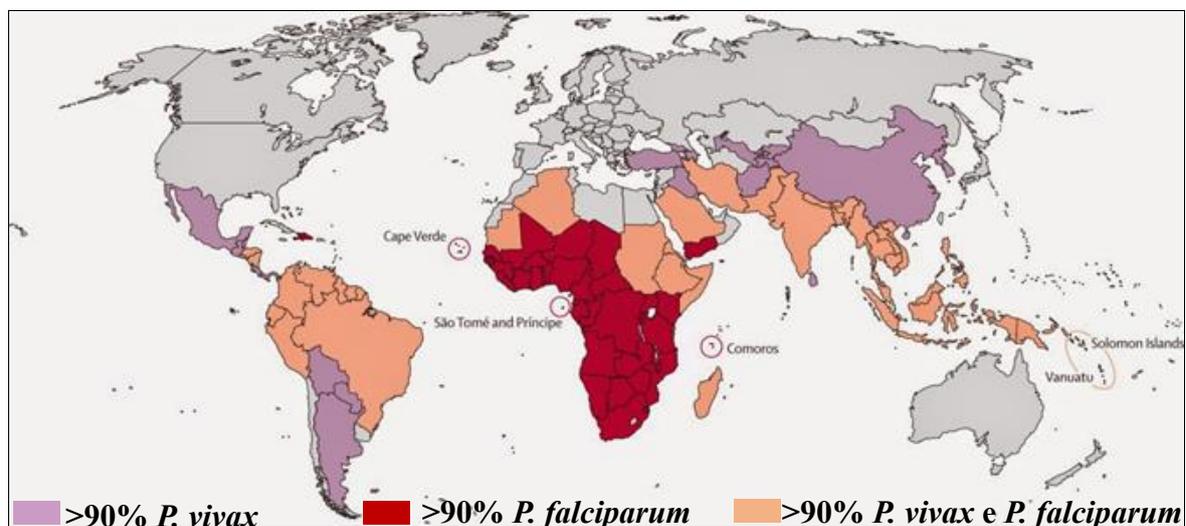
Fonte: Siqueira et al. (2018)

2.2.4 Ocorrência da malária no mundo e no Brasil

A malária é considerada um problema mundial de grande preocupação. No ano de 2017 foram notificados cerca de 219 milhões de novos casos, sendo que, destes casos foram registrados 453.000 mortes causados pela doença em todo mundo. Em 2019 ocorreram 228 milhões de casos de malária, com registros de 405.000 casos de morte, principalmente na África Subsaariana (WHO, 2020). As pessoas mais vulneráveis são crianças com menos de cinco anos, mulheres grávidas e pacientes com HIV/AIDS (BRASIL, 2019).

No ano de 2017, *P. falciparum* foi responsável por 99,7% dos casos da doença na região Africana (FIGURA 3), assim como a maioria dos casos registrados nas regiões do Sudeste Asiático (62,8%), Mediterrâneo Oriental (69%) e Pacífico Ocidental (71,9%). Além disso, seis países (africanos): Nigéria, República Democrática do Congo, Uganda, Costa do Marfim e Moçambique foram responsáveis por mais da metade de casos de malária no mundo (WHO, 2019).

Figura 3- Distribuição de casos de malária no mundo



Fonte: Adaptado de CDC-USA (2011)

Nas áreas endêmicas no Brasil, há a ocorrência de casos nos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins (REINERS et al., 2010; BRASIL, 2015).

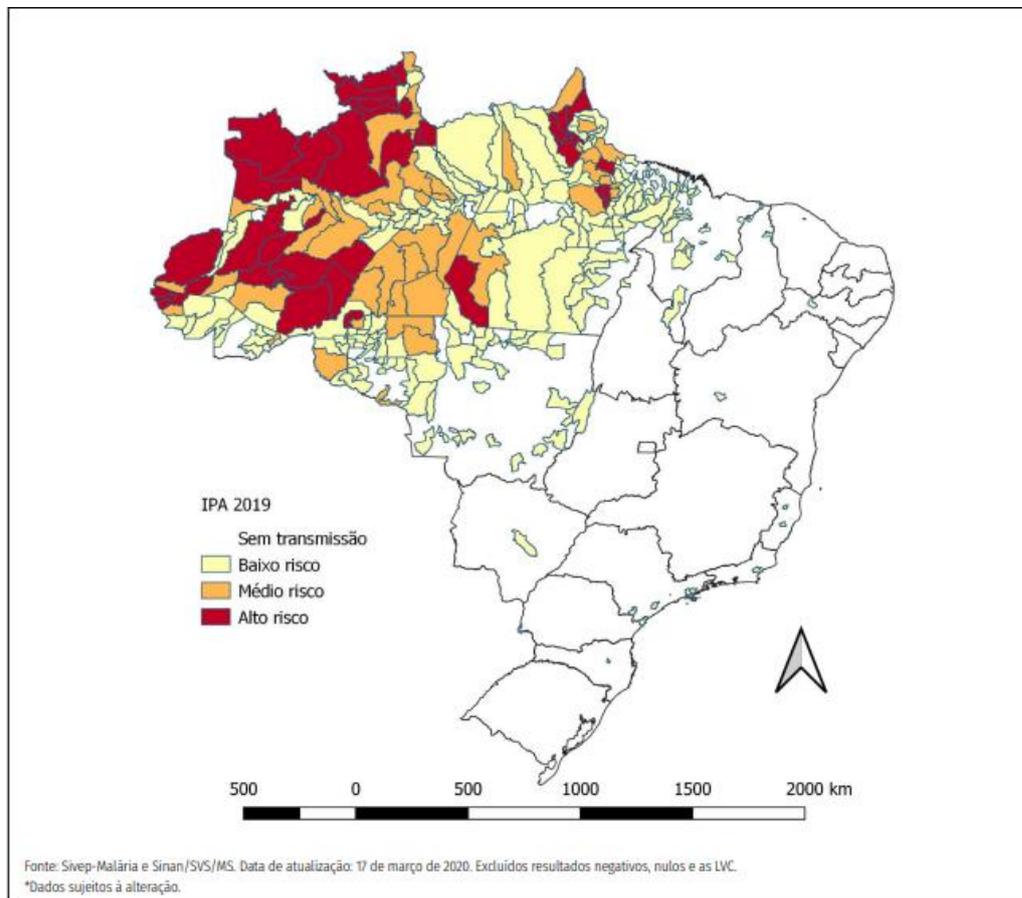
No estado de Rondônia, a doença teve um aumento de 40% em 2019 onde foram registrados 9.385 novos casos da doença (BRASIL, 2019). Entretanto, segundo a OMS, no Brasil ocorreu uma redução de 23,8% do número de casos da malária, passando de 193.837

casos em 2018 para 156.629 em 2019. No primeiro trimestre de 2020, o país vem mantendo a redução, com queda, de janeiro a fevereiro, de 21,3% em relação ao mesmo período de 2019 (OPAS, 2020). No ano de 2018, do total de casos autóctones na região Extra-Amazônica, aproximadamente 1/3 foram registradas na região de mata Atlântica. Nessa área, os estados da Bahia e do Espírito Santo apresentaram um número elevado de surtos da doença (BRASIL, 2019).

Na figura 4, estão representados os estados que se encontravam no ano de 2019, em situação de alto risco: Acre, Amapá, Amazonas, Rondônia e Roraima. As áreas endêmicas da doença estão concentradas na região Amazônica. Nas demais regiões, cor branca no mapa, a doença não apresenta risco.

De acordo com Barcelos et al. (2009) as mudanças climáticas estão diretamente ligadas às doenças transmitidas por vetores, principalmente em regiões que possuem clima tropical. Já a malária, por exemplo, tem tanto condições climáticas como a atividade antrópica humana, como condições sanitárias precárias.

Figura 4- Mapa de risco da malária por município de infecção no Brasil em 2019



Fonte: Ministério da Saúde (2019)

2.3 Uso de plantas medicinais no tratamento da malária

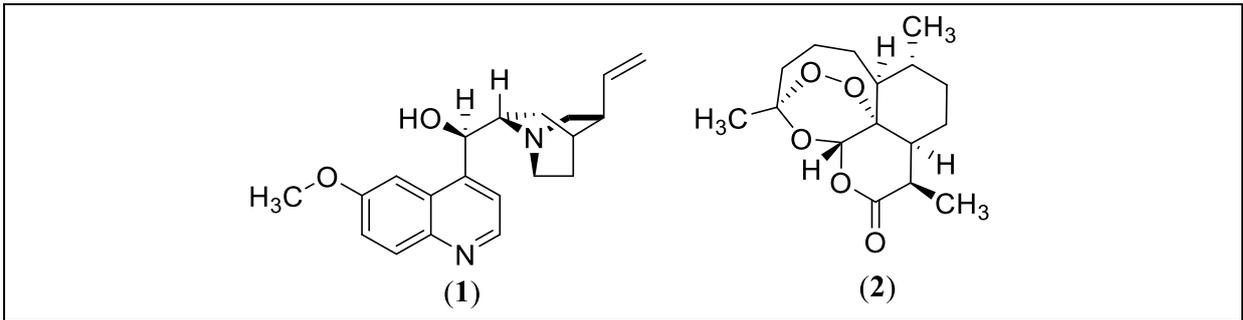
Desde os primórdios as plantas medicinais vêm sendo utilizadas para combater enfermidades, e se disseminaram ao longo dos anos. A maioria dos tratamentos com plantas são para combater os parasitas (MELO et al., 2017). Algumas plantas como o boldo (*Coleus barbatus* Benth.), o figadil (*Vernonia condensata* Backer), a quina (*Cinchona calisaya* Wedell) e o picão (*Bidens pilosa* L.) são as mais citadas na literatura como remédios utilizados para o tratamento de malária, em estudos realizados por Reiners et al. (2010). Devido aos elevados números de casos da doença na região da Amazônia são importantíssimos os estudos de plantas medicinais para o tratamento da doença. Em alguns casos, as plantas são o único recurso para aquelas regiões que possuem pouco ou quase nenhum acesso ao sistema único de saúde (VEIGA e SCUDELLER, 2015).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, 80% da população mundial faz uso de plantas medicinais. No Brasil os fitoterápicos foram aprovados para serem utilizados pelo SUS (Sistema Único de Saúde) mesmo assim ainda são pouco distribuídos nos municípios (VEIGA e SCUDELLER, 2015; BRASIL, 2015).

O uso tradicional de plantas é bem disseminado entre comunidades como os remanescentes de quilombos de Oriximiná. As plantas medicinais mais utilizadas para o tratamento de doenças são: *Bertholletia excelsa* Bonpl. (castanheira), *Bidens bipinnata* L. (picão), *Carapa guianensis* Aubl. (andiroba), *Simba cedron* Planch. (pau-paratudo), *Mangífera indica* L. (mangueira), *Senna occidentalis* L. (paramagioba), *Caripa papaya* L. (mamão macho) *Croton sacaquinha* Croizat. (sacaquinha), *Phyllanthus caroliniensis* Walter (quebra-pedra), *Luffa operculata* Cogn. (cabacinha), *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec. (uxiliso), *Himatanthus sucuba* (Spr. Mull/Arg.) W. (sucuba), entre outras (OLIVEIRA et al., 2015).

2.4 Primeiros fármacos utilizados para tratamento da malária

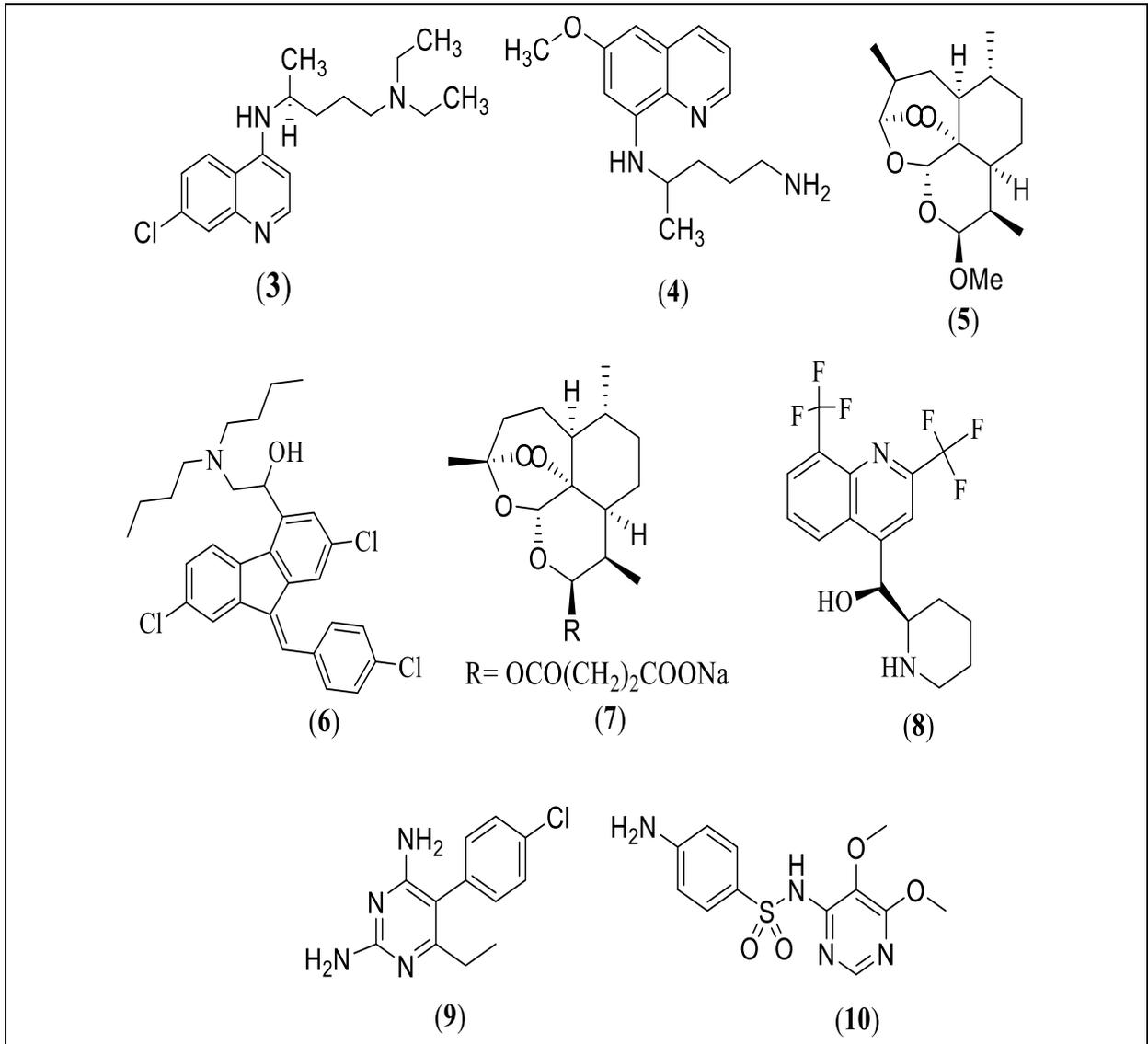
Os primeiros fármacos antimaláricos utilizados no tratamento da malária foram a quinina (1) de origem vegetal, substância encontrada em *Cinchona* spp., e a artemisinina (2) outra droga de origem natural, isolada da *Artemisia annua* (FIGURA 5) (ACHAN et al., 2011).

Figura 5- Estruturas químicas de antimaláricos naturais

Atualmente, a cloroquina (3) e a primaquina (4) são os fármacos utilizados para o tratamento das infecções causadas pelo *Plasmodium vivax* e/ou *Plasmodium ovale*. Já para o *Plasmodium falciparum* o tratamento é feito pela combinação de artemisinina (TCA) artemeter (5), lumefantrina (6) e artesunato (7), mefloquina (8) (BRASIL, 2009).

Algumas pesquisas demonstraram que o parasita adquiriu resistência a essas drogas utilizadas há longa data, como a cloroquina (3). No caso do *P. falciparum* é ainda mais grave, pois há resistência a várias drogas como a pirimetamina (9) e a sulfadoxina (10) (FIGURA 6). Em alguns países o parasita *P. vivax* possui resistência à cloroquina (SUWANARUSK et al., 2007; PRICE et al., 2009; CHEHUAN et al., 2013; LEITE et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2015).

Figura 6- Estruturas químicas dos antimaláricos sintéticos



2.5 Resistência aos antimaláricos

Como não há uma vacina para a prevenção da malária, o tratamento é feito com o uso de drogas antimaláricas. No entanto como mencionado anteriormente, com passar dos anos os parasitas adquiriram resistência a vários antipalúdico, o que torna difícil o controle da malária em todo mundo. Onde já existem relatos de casos de resistência do *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae* (WHO, 2015).

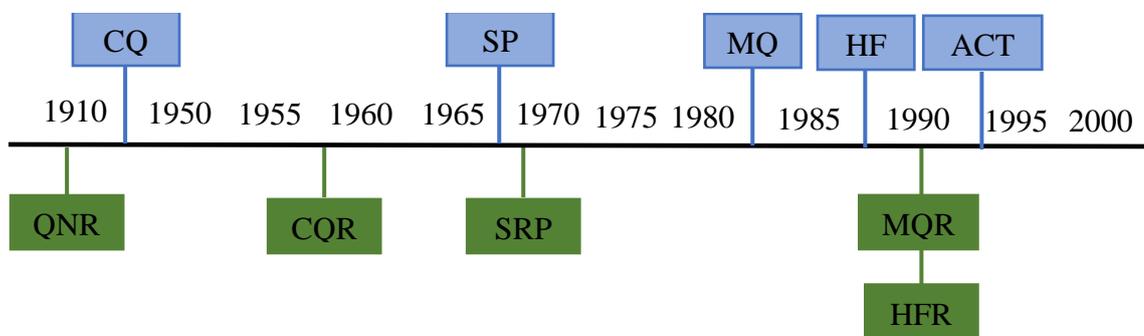
Em 1910 foi registrado o primeiro caso de resistência a quinina no Brasil (NEIVA, 1910). Em 1950 na Ásia, foram descritos os primeiros casos de resistências á cloroquina (CQ), e décadas depois essas cepas resistentes já estavam nos continentes Africano e Americano (HARINASUTA et al., 1965). Devido aos casos de resistência á cloroquina, foi

introduzida a sulfadoxina-pirimetamina (SP) para o tratamento da malária, no entanto anos depois da introdução desse medicamento foi relatada a resistência do parasita (TRAVASSO e LAUFER, 2009). Em 1980, para o tratamento da malária era utilizada a mefloquina (MQ), mas com as outras drogas a resistência apareceu logo em seguida (SEVERINI e MENEGON, 2015).

No Brasil, o *P. falciparum* possui resistência à cloroquina, sulfadoxina-pirimetamina, mefloquina, quinina e amodiaquina (NORONHA et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2015). O primeiro relato de resistência de *P. vivax* em alguns países à cloroquina ocorreu na Indonésia e Papua Nova Guiné em 1990 (ALECRIM et al., 1999; SUWANARUSK et al., 2007; PRICE et al., 2009; GOMES et al., 2011).

A partir da década de 1990 começou a serem utilizados para o tratamento da malária os derivados de artemisinina (TCAs) em combinação de MQ com Artemeter (ART) (LOOAREESUWAN et al., 1992). Com a disseminação de cepas resistentes, a busca por novos tratamentos e controle da doença é de suma importância. (FIGURA 7).

Figura 7- Esquema indicando o período aproximado de introdução das drogas antimaláricas (caixa azul) e de notificação da resistência aos antimaláricos (caixa verde).



Fonte: Adaptado de Costa, 2017

Nota: QNR, resistência a quinina; CQ, cloroquina; CQR, resistência à cloroquina; SP, sulfadoxina-pirimetamina; SRP, resistência à sulfadoxina-pirimetamina; MQ, mefloquina; HF, Halofantrina; MQR, resistência à mefloquina; HFR, resistência à Halofantrina; ACT, terapia baseada em derivados de artemisinina.

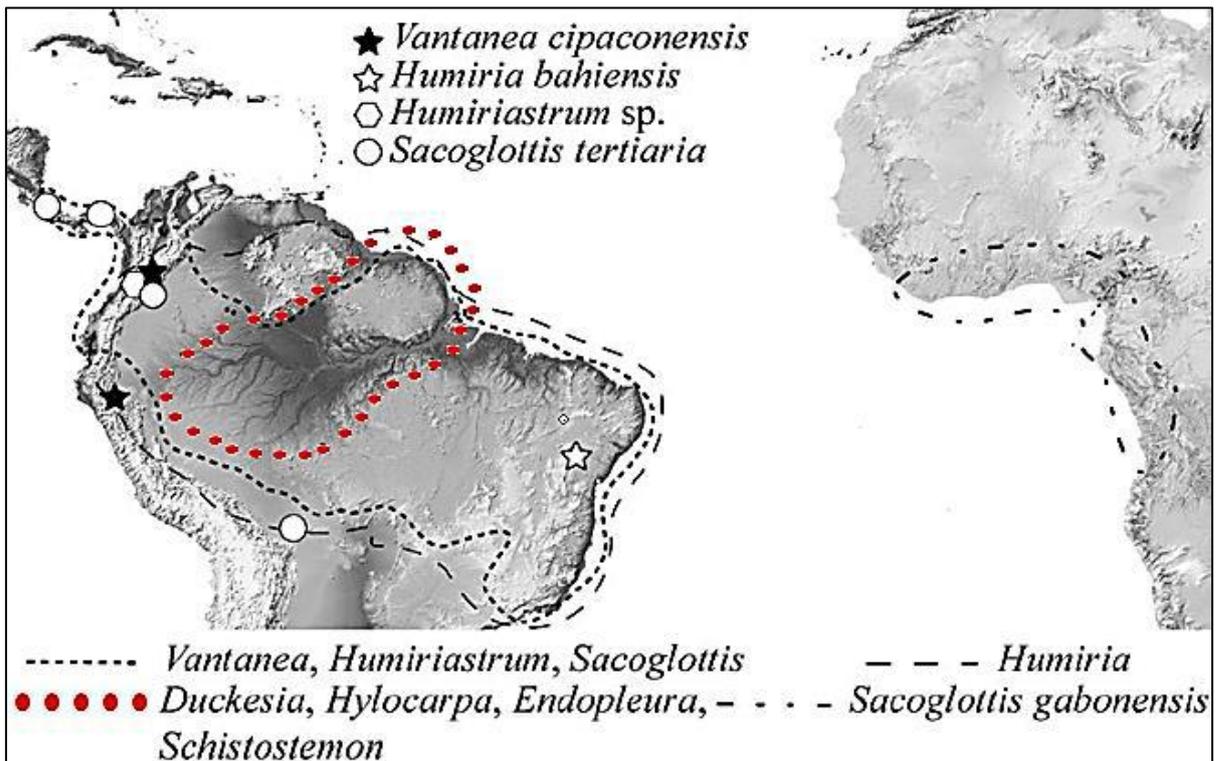
2.6 Família Humiriaceae

A família Humiriaceae compreende principalmente espécies neotropicais. A família possui oito gêneros, 49 espécies e várias subespécies. Sua ocorrência se estende desde a Costa Rica até o sul do Brasil (LORENZI, 2002). As espécies da família Humiriaceae são árvores de porte grande e copas carregadas. Seus troncos têm cor marrom escuro e/ou avermelhada,

folhas glabras (lisas). As flores são hermafroditas e os frutos geralmente são no formato de drupas (MACHADO, 2015).

A família Humiriaceae tem origem neotropical, encontradas nas regiões tropicais das Américas. Com distribuição geográfica na África tropical, América Central e América do sul Tropical (HERRERA et al., 2010). (FIGURA 8).

Figura 8- Distribuição dos gêneros da família Humiriaceae



Fonte: Herrera et al. (2010)

2.6.1 *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec

A *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec pertence à família Humiriaceae (FIGURA 9) (OLIVEIRA et al., 2015). A *E. uchi* pode atingir 20 a 30 de altura. Sua copa é subglobosa, o seu tronco é ereto e cilíndrico podendo atingir um metro de diâmetro. Seu fruto tem a forma de drupas oblongo-elipsoides chegando a sete cm de comprimento, de coloração verde-amarelado e ou/ parda-escuro. O fruto é comestível, sendo utilizado tanto por pessoas como também na alimentação de animais. Suas folhas são alternas simples. A floração ocorre nos meses de setembro-novembro e a maturação dos frutos em janeiro (LORENZI, 2002; MAGALHÃES et al., 2007; MUNIZ, 2013).

Figura 9-*Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec in natura (Reserva Florestal Adolpho Ducke, INPA)



Nota: Árvore *Endopleura uchi* (A)



Coleta da casca (B)

E. uchi ocorre na região Amazônica nos estados do Acre, Amazonas, Mato Grosso, Pará, Rondônia e Roraima, principalmente em matas de terra firme. Geralmente *E. uchi* é cultivada em pomares domésticos na região Amazônica. Ela é conhecida popularmente como uxi-liso, uxi-amarelo e uxi (LORENZI et al., 2006). A espécie tem um grande valor comercial, sendo utilizada na fabricação de sorvetes, óleos e licores. É bem apreciada pelas comunidades rurais. Já a casca é bem utilizada para fins medicinais pela população na forma de maceração ou chá para combater doenças inflamatórias uterinas, como miomas e ovário policísticos, artrite, colesterol e malária (MAGALHÃES et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2015).

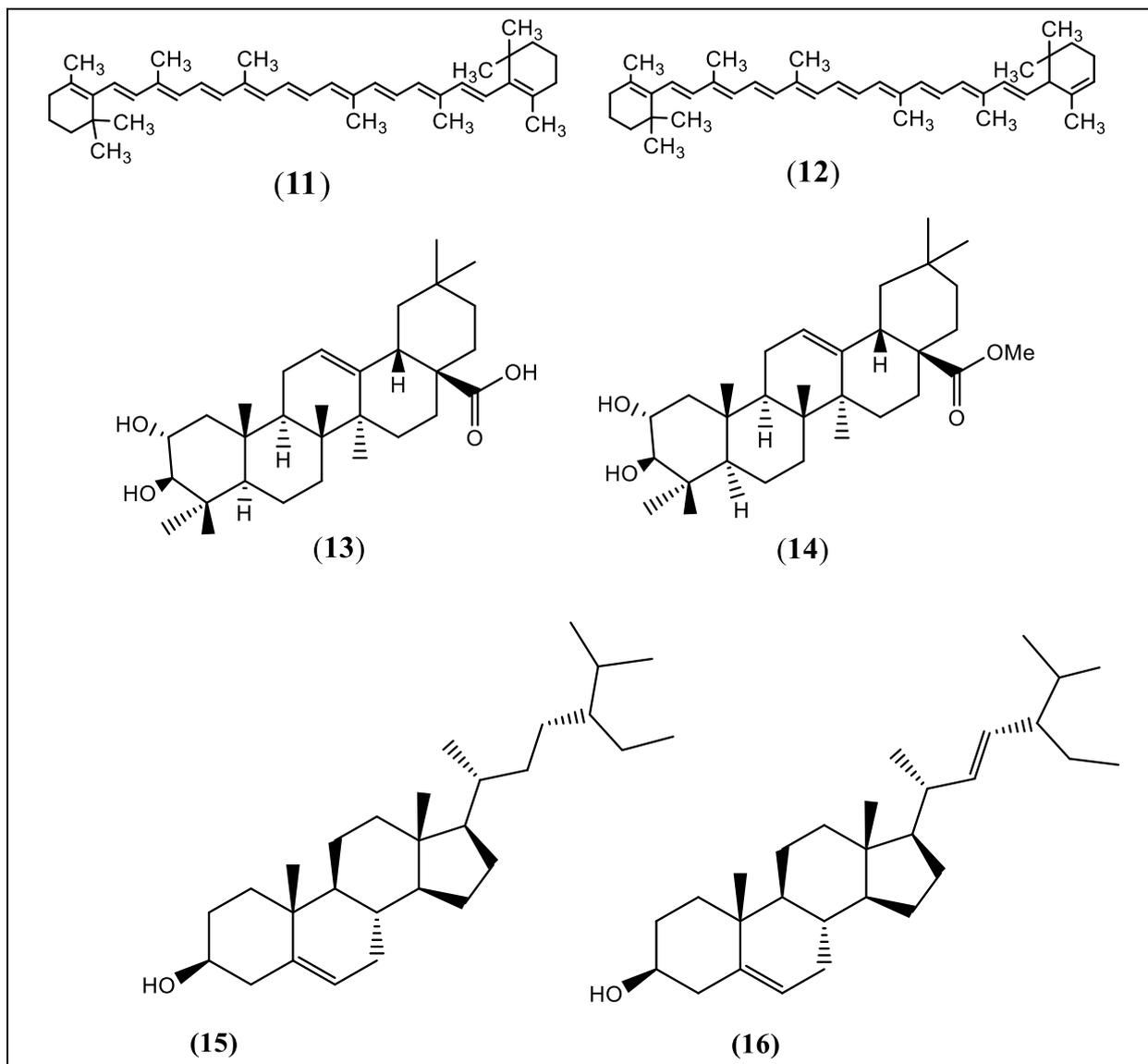
2.6.2 Composição química e atividade biológica *Endopleura uchi*

Na *E. uchi* foram encontradas três classes de metabólitos secundários nas cascas: taninos, cumarinas e saponinas (POLITI, 2009). Nos frutos são encontrados carotenoides com atividade de provitamina A: β -caroteno (**11**) e α -caroteno (**12**), sendo também uma grande fonte energética e de fibras, por apresentar na sua composição mineral o potássio, silício, enxofre, cálcio e magnésio (MAGALHÃES et al., 2007; ROLIM et al., 2020).

Estudos fitoquímicos realizados com o caule de *E. uchi* demonstraram a presença de substâncias químicas como as isocumarinas bergenina e triterpenoides pentacíclicos, ácido masílinico (**13**) e seu éster masilinato de metila (**14**) (LUNA, 2000). O fracionamento

cromatográfico das cascas de *E. uchi* levou ao isolamento de uma mistura dos esteroides β -sitosterol (**15**) e estigmasterol (**16**) (FIGURA 10)(LAGOS, 2006).

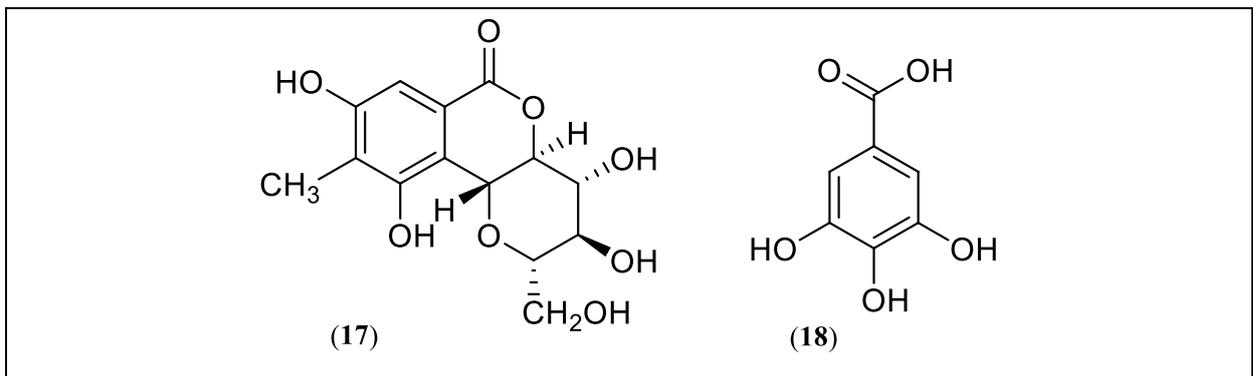
Figura 10- Estruturas químicas de esteroides isolados da casca da espécie *Endopleura uchi*



Em trabalho realizado por Silva et al. (2009), com o extrato aquoso, a fração solúvel em acetato de etila e fração não solúvel em acetato de etila das cascas de *Endopleura uchi*, foram testados para o crescimento de leveduras (*Candida albicans*, *C. guilliermondii* e *C. tropicalis*), de três fungos filamentosos (*Aspergillus flavus*, *A. nidulans* e *A. niger*), seis bactérias Gram negativa (*Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* e *Shigella sonnei*,). Os autores observaram que

devido à presença da bergenina (17) (FIGURA 11), ocorreu uma inibição do crescimento das espécies de *Candida*. Análises cromatográficas realizada por Takahashi et al. (2003) levou ao isolamento da bergenina (17) e o ácido gálico (18) nas cascas de *E. uchi* (FIGURA 11). Os mesmos autores observaram que os extratos testados não apresentaram atividade citotóxica indicando assim que a espécie não apresenta risco quanto ao consumo da mesma (HERZENER et al., 2002).

Figura 11 - Estruturas químicas de isolados da casca da espécie *Endopleura uchi*



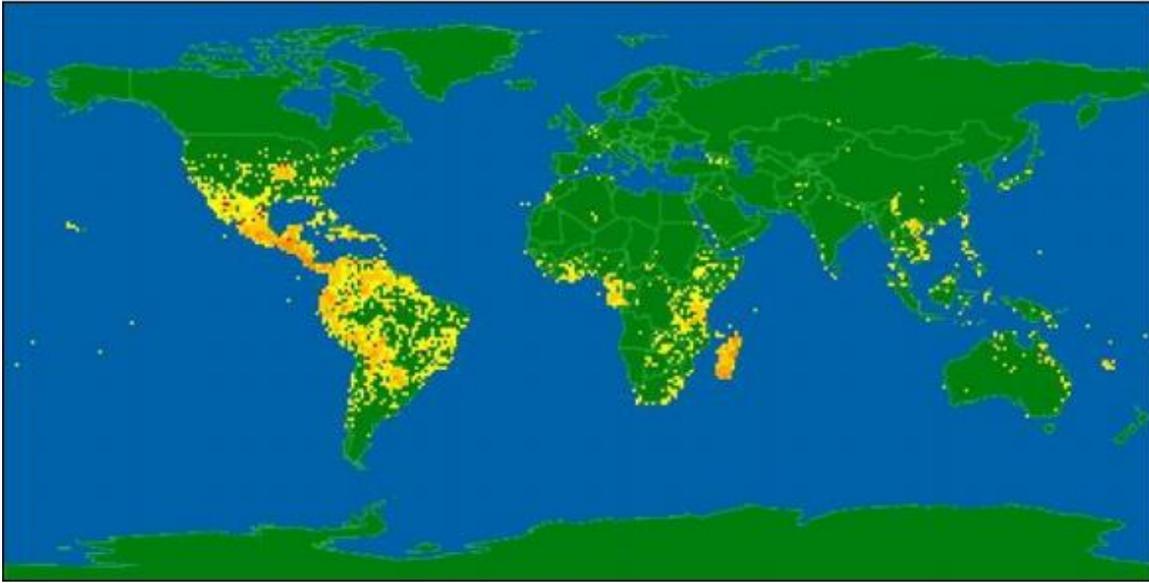
A bergenina possui atividades antioxidantes, gastroprotetivas e anti-HIV, como também para combater resfriados, bronquite e uso como anti-inflamatório (PIACENTE et al., 1996; GOEL et al., 1997; HERZENER et al., 2002; TAKAHASHI et al., 2003).

De acordo com Oliveira et al. (2017), os extratos obtidos da casca do caule da *E. uchi* apresentam atividades antioxidantes e antilipase, evidenciando que os extratos poderiam ser utilizados como fitoterápicos para o tratamento da obesidade.

2.7 Família Apocynaceae

Espécies da família Apocynaceae estão presentes em regiões tropicais e subtropicais, em alguns casos podem ser encontradas em regiões de clima temperado. A família é representada por 200 gêneros e 2000 espécies. Na flora brasileira, encontram-se 376 espécies e 41 gêneros (MOURA e AGRA, 1989). As espécies da família Apocynaceae são árvores de grande e/ou médio porte, podendo ser encontradas também em formas de arvoretas, lianas e arbustos. Uma das características mais marcantes da família é a presença de látex de cor branca e/ou vermelho sangue em algumas espécies (MORALES, 2005). A família apresenta distribuição pantropical e subtropical (FIGURA 12).

Figura 12- Distribuição geográfica da família Apocynaceae



Fonte: Trópicos mapas (2020)

2.7.1 Distribuição botânica de *Himatanthus sucuuba* (Spruce) Wood.

Na família Apocynaceae encontra-se a espécie *Himatanthus sucuuba* (Spruce) Wood., que é uma árvore de grande porte, conhecida popularmente como sucuuba e sucuuba-verdadeira (OLIVEIRA et al., 2015). A espécie está presente nos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins (LORENZI, 2002).

Uma das características mais marcante da espécie é a produção de látex na cor branco leitoso. A árvore pode chegar a 8 a 16 m de altura. Seu tronco é do tipo ereto cilíndrico com casca rugosa de 30-40 cm de diâmetro.

As folhas são simples, alternadas espiraladas, glabras, e os frutos são curvados com um chifre, glabro e angulados, com 20-26 cm de comprimento, e com várias sementes aladas. A sua floração ocorre nos meses de agosto a outubro e o amadurecimento do fruto ocorre entre março a maio (LORENZI, 1998) (FIGURA 13).

Figura 13 - Aspecto morfológico de *Himatanthus sukuuba* (Spruce) Wood



Fonte: Lorenzi (2002); Nota: Ramo florido (A)



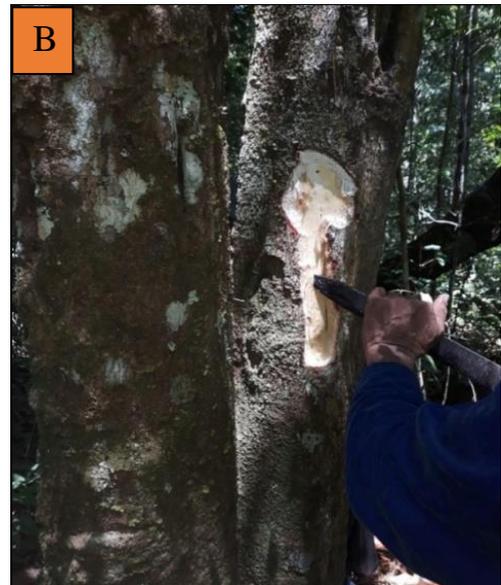
Fruto verde (B)

As folhas da *Himatanthus sukuuba* são utilizadas na medicina popular para aliviar dores, constipação e irritação estomacal. O látex é utilizado para combater afecções de pele, artrite, anemias, gastrite, câncer, malária, hemorroidas e verminoses (MIRANDA et al., 2000; DI STASI et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2015). (FIGURA 14).

Figura 14- *Himatanthus sukuuba* (Spruce) Wood, Reserva Florestal Adolpho Ducke, INPA



Nota: Árvore da espécie *Himatanthus sukuuba* (A)



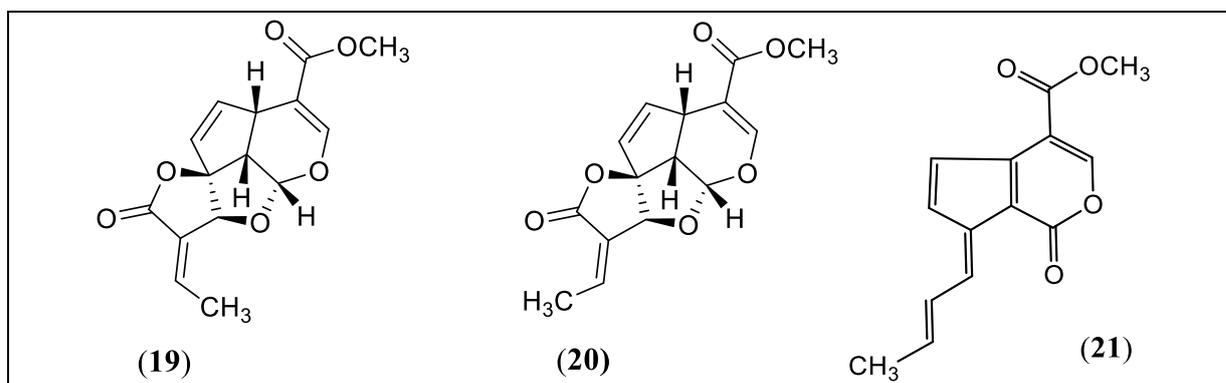
Coleta da casca (B)

2.7.2 Composição química e atividade biológica do gênero *Himatanthus*

Em estudos realizados com a casca de *H. sucuuba*, Silva et al. (1998), identificaram os iridoides plumericina (**19**) e isoplumericina (**20**) utilizando métodos cromatográficos, já no látex já foram isolados os iridoides fulvoplumierina (**21**) (FIGURA 15).

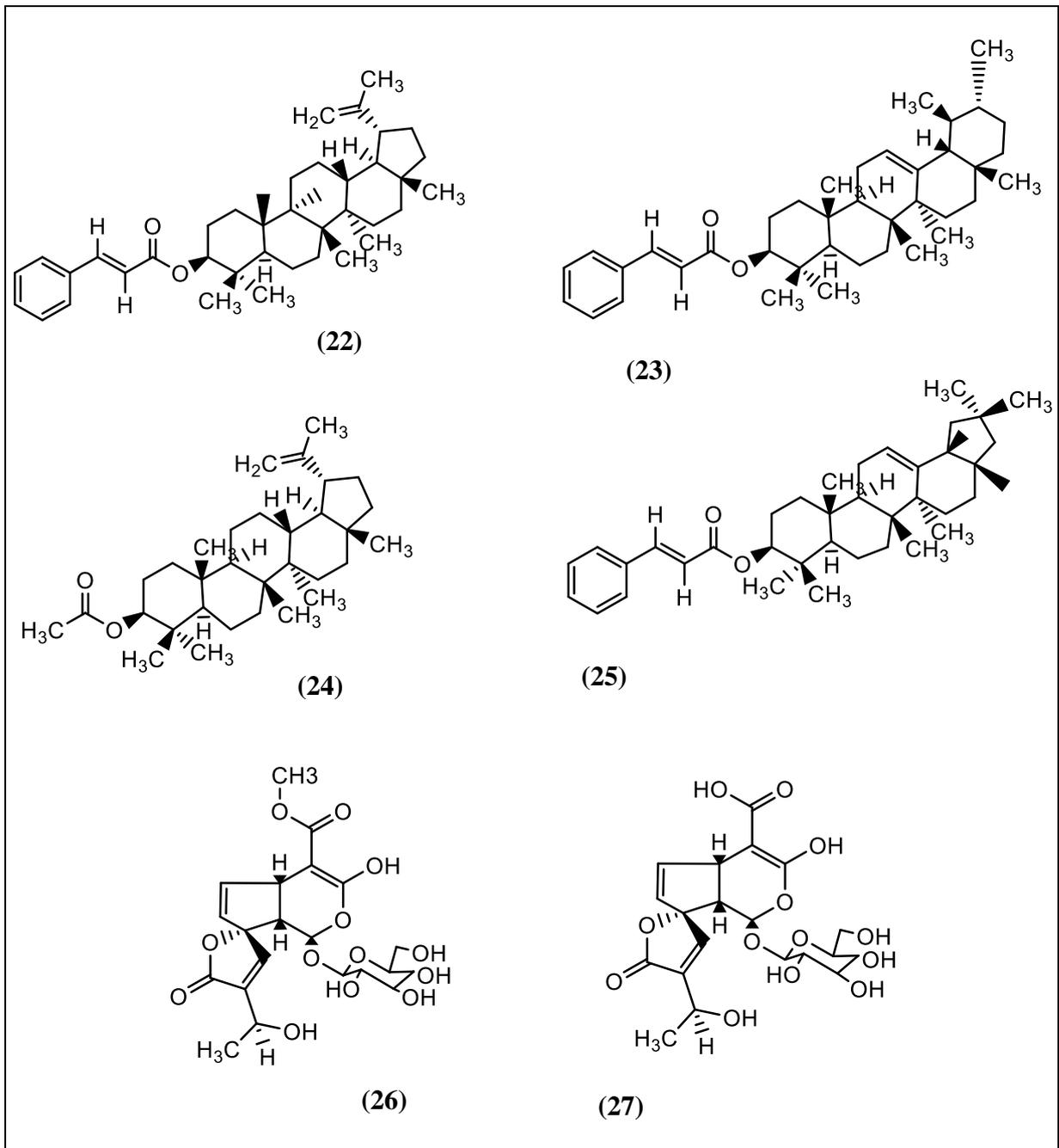
Os iridoides possuem várias atividades biológicas tais como antiviral, antimicrobiana, antitumoral, antibiótica, anti-inflamatória, antioxidante, atividade neuroprotetora, citotóxica e leishmanicida (MIRANDA et al., 2000; OLIVEIRA, 2014). A espécie é muito utilizada para dores nas costas, pancadas, dor de dente, tendo um potencial cicatrizante (VILLEGAS et al., 1997; RODRIGUES et al., 2010).

Figura 15 - Estruturas químicas de iridóides isolados da casca e do látex da espécie *Himatanthus sucuuba*



Tanto no látex como nas cascas de *H. sucuuba* foram encontrados os triterpenos cinamato de lupeol (**22**), cinamato de α -amirina (**23**), cinamato de β -amirina (**24**) e acetato de lupeol (**25**), isoplumierídeo (**26**) e desmetilisoplumierídeos (**27**) (MIRANDA et al., 2000; SILVA et al., 2003; SPINA, 2004; REBOUÇAS et al., 2012) (FIGURA 16).

Figura 16 - Estruturas químicas de triterpenos e iridoides isolados da casca e do látex de *Himatanthus sucuuba*



O gênero *Himatanthus* compreende 13 espécies, sendo elas: *H. articulatus* (*H. sucuuba*), *H. attenuatus*, *H. bracteatus* (*H. speciosus*), *H. drasticus* (*H. fallax*), *H. fallax*, *H. lancifolius* (*H. fallax*), *H. obovatus*, *H. phagedaenicus*, *H. stenophyllus*, *H. speciosus*, *H. semilunatus*, *H. sucuuba* e *H. tarapotensis*, (OLIVEIRA, 2013).

O gênero é muito conhecido na medicina popular por apresentar vários compostos ativos como alcaloides indólicos, iridoides e ésteres triterpênicos (DI STASI et al., 2002).

Dentre as espécies mais utilizadas pela medicina popular temos a *H. articulatus*, *H. lancifolius*, e *H. sucuuba*. No Quadro 1 estão descritos os relatos do uso medicinal de espécie de *Himatanthus*.

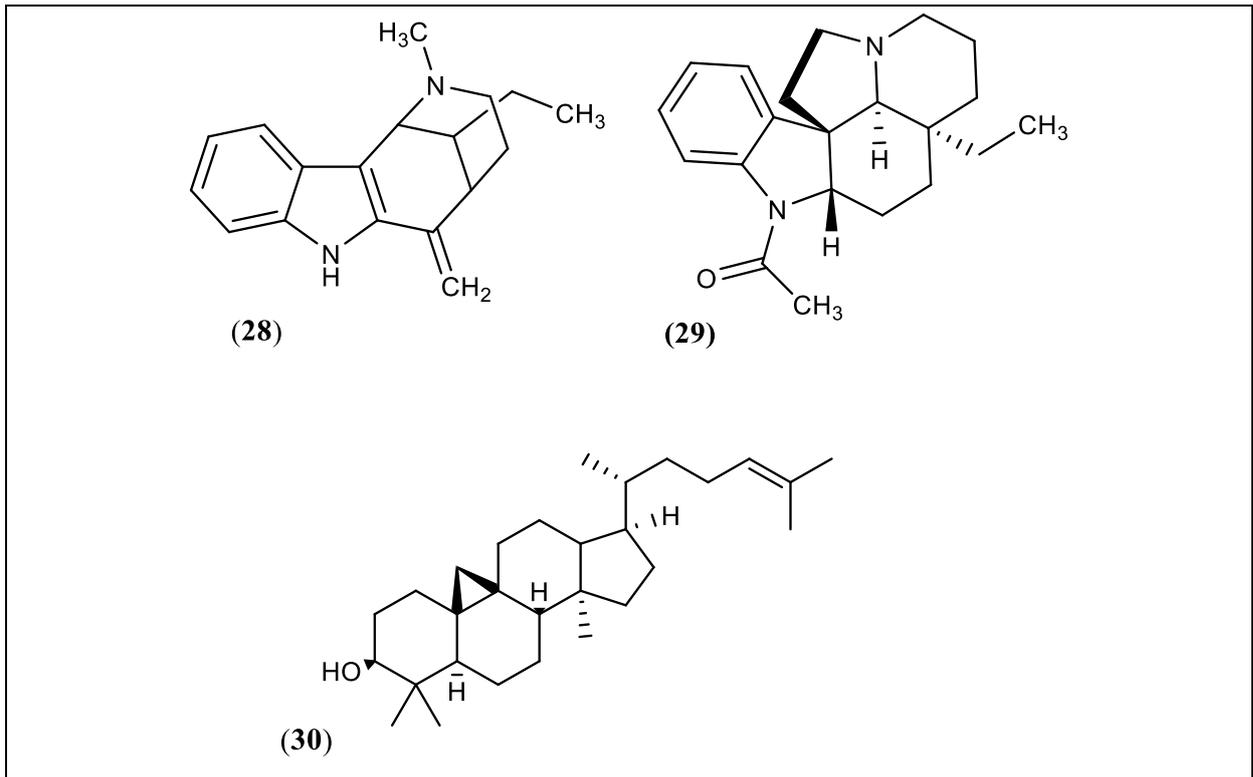
Quadro 1- Uso de espécies de *Himatanthus* para fins medicinais e atividades farmacológicas

ESPÉCIE VEGETAL	PARTE UTILIZADA	INDICAÇÃO	REFERÊNCIAS
<i>H. attenuatus</i>	Folhas	Diminuição da pressão arterial sem alteração da frequência cardíaca.	Jiménez et al., 2002
<i>H. bracteatus</i>	Folhas	Indicação indígena como antipirético.	Castilho et al., 2003.
<i>H. drasticus</i>	Látex	Tratamento de câncer, vermes, febre, infertilidade feminina, úlceras gástricas.	Lorenzi e Matos, 2000.
<i>H. obavatus</i>	Raízes	Leishmanicida contra promastigotas	Mesquita et al. 2005.
<i>H. sucuuba</i>	Casca do caule	Gastrite, hemorroidas e anemia.	Endo et al., 1998.
		Tratamento de feridas externas, antibacteriana contra cepas de <i>Clostridium histolyticum</i>	Palermo-Neto e Almeida, 2002.
<i>H. sucuuba</i>	Látex	Anti-inflamatória	Miranda et al., 2000.

A espécie *Himatanthus lancifolius* é utilizada para problemas respiratórios como asma e para a doença venérea sífilis. Nessa espécie são encontrados alcaloides como a uleína (28) e a desmetoxiaspidospermina (29) (FIGURA 17) (FRANÇA et al., 2000). O látex de *H. articulatus* possui atividade antifúngica e antibacteriana. Na medicina popular ela é utilizada para tratamento de malária, úlceras estomacais, tumores, inflamações, sífilis e câncer. Da *H.*

lancifolius já foram isolados do látex o cinamatos de α - e de β amirina (**23** e **24** FIGURA 16 pág. 37), cinamatos de lupeol (**22** FIGURA 16 pág. 37), acetato de lupeol (**25**) (FIGURA 16 pág. 37) e cicloartenol (**30**) (FIGURA 17) (REBOUÇAS et al., 2012).

Figura 17 - Estruturas químicas de Alcalóides isolados *Himatanthus lancifolius*



3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a atividade antiplasmódica e realizar estudo químico de *Endopleura uchi* e *Himatanthus succuuba*.

3.2 Específicos

- Avaliar extratos, frações e substâncias das espécies frente ao *Plasmodium falciparum* com atividade antimalárica *in vitro*.
- Isolar substâncias antiplasmódicas de extratos a partir das espécies vegetais.
- Caracterizar e identificar/elucidar as estruturas das substâncias por ressonância magnética nuclear, espectrometria de massas e outros métodos físicos.

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Material e método

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Princípios Ativos da Amazônia (LAPAAM/COTEI) e no laboratório de Malária e Dengue (COSAS) nas dependências do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA). As espécies estudadas nesse trabalho são utilizadas pela comunidade remanescentes quilombolas do município de Oriximiná-PA, a qual fazem o uso tradicional dessas espécies principalmente para o tratamento da malária assim citada por Oliveira et al. (2015). O LAPAAM/INPA possui anuência assinada pelos principais representantes da Associação de Comunidades Remanescentes de Quilombos do Município de Oriximiná (ARQMO) para utilizar essas espécies em seus estudos científicos.

Todas as espécies utilizadas nesse trabalho foram cadastradas no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen: A724705).

4.1.1 Equipamentos

Os seguintes aparelhos foram utilizados para a condução desse trabalho:

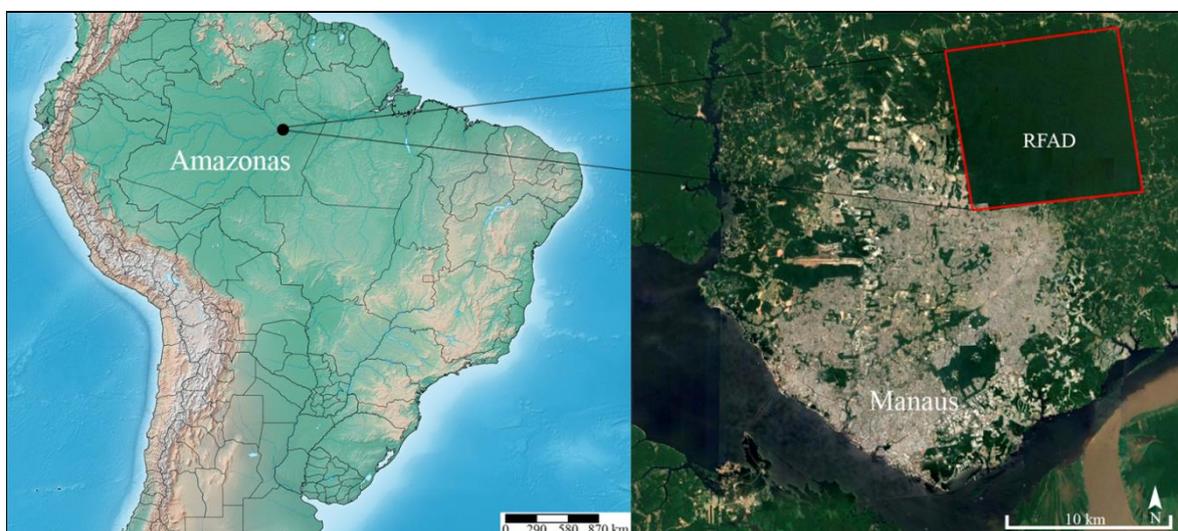
- Moinho de facas: Marca Marconi, Modelo MA 340 (EX-CPPN/COTEI)
- Estufa de secagem: Marca Fanem, Modelo 320-SE circulação mecânica
- Balança analítica: Marca Ohaus, modelo AY220
- ✓ Marca WEIGHTTECH, modelo WTI000, limite máximo de 200 kg e mínimo de 0,001 g.
- ✓ Marca MARTE, modelo AY220, limite 220 g.
- Lavadora Ultrassônica: Marca UNIQUE.
- Rotaevaporador: Marca Fisatom, modelo 802-1965418.

4.1.2 Coleta do material vegetal

Os materiais vegetais das espécies *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec. e *Himatanthus sucuuba* (Spruce) Woodson., foram coletados na Reserva Florestal Adolpho Ducke no dia 27/08/2019 nas seguintes coordenadas 3°05'28" latitude Sul e 59°57'57" longitude Oeste (FIGURA 18). Foi realizado o tombamento das exsicatas no Herbário do Instituto Nacional

de Pesquisa da Amazônia – INPA, nos seguintes números: *H. sucuuba* (287887) e *E. uchi* (287044).

Figura 18- Mapa de localização da Reserva Florestal Adolpho Ducke



Fonte: Google Earth Pro (2020)

4.1.3 Secagem/ moagem do material vegetal

No LAPAAM/INPA, foi realizada a triagem das cascas e folhas das duas espécies. Em seguida as folhas foram picotadas com auxílio de uma tesoura e as cascas cortadas em pedaços menores para facilitar a secagem. Após a separação, todas as amostras foram levadas à estufa de circulação a 40 °C para a secagem até atingirem peso constante. Após a secagem, as amostras foram trituradas em moinho de facas (CPPN/INPA). Posteriormente, as amostras foram pesadas, embaladas e armazenadas na geladeira até a extração.

4.2 Cromatografia

4.2.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)

Utilizou-se cromatofolhas de alumínio com sílica de fase normal e reversa RP-18 com suporte de alumínio Merck 20 x 20 cm, recortando-se em placas menores de até cinco cm de altura. As amostras foram dissolvidas no solvente apropriado, aplicada na cromatofolhas com uso de capilar de vidro. Em seguida, foram eluídas no sistema cromatográfico pré-determinado de acordo com a amostra. As placas foram analisadas nos comprimentos de 254 e 365 nm, a fim de detecção de inflorescência nos compostos químicos. Posteriormente, as mesmas placas foram reveladas com anisaldeído e aquecidas, para detecção dos metabólitos

secundários do tipo terpenos ou iridoides. Para a detecção de alcaloides foi utilizado o revelador Dragendorf.

4.2.2 Cromatografia em coluna (CC)

Para a realização de fracionamento dos extratos e isolamento por cromatografia em coluna foram utilizadas colunas de vidros de tamanhos variados, de acordo com as quantidades de amostras a serem fracionadas. Para isso foi utilizadas colunas com fase estacionária contendo sílica gel 60 (0,063 – 0,2000 mm), Merck.

4.3 Métodos espectroscópicos

4.3.1 Ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear unidimensionais (1D) de RMN ^1H , RMN ^{13}C , DEPT 135° e DEPT 90° foram registrados utilizando o espectrômetro Bruker, operando a 300 e 75 MHz para as frequências de ^1H e ^{13}C , respectivamente. Também foram registrados espectros de RMN bidimensionais (2D) de COSY, HSQC e HMBC, no equipamento pertencente à Central Analítica do Laboratório Temático de Química de Produtos Naturais (CA-LTQPN/INPA). Os solventes deuterados para análises foram clorofórmio, dimetilsulfóxido e água. Os deslocamentos químicos foram registrados em ppm (δ).

4.3.2 Cálculo do rendimento das extrações

O rendimento dos extratos foi calculado utilizando o seguinte algoritmo:

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

4.4 Preparação dos extratos, frações e isolamento das substâncias.

4.4.1 1º Extração em pequena escala dos extratos

Os extratos de *H. succuba* e *E. uchi* foram preparados com base nos métodos utilizados por Rodrigues et al. (2010) e Oliveira et al. (2015), onde os mesmos realizaram extração a frio e maceração entre outros métodos com solventes de baixa e alta polaridade como, hexano, diclorometano, acetato de etila, etanol e n-butanol. Baseado nestes relatos,

optou-se pela extração por maceração com 7 solventes diferentes utilizados no trabalho de Oliveira et al. (2015) com algumas adaptações. Também foram realizadas extrações a quente (decoção e infusão), visto que estes são os métodos comumente utilizados nas comunidades tradicionais.

O extrato bruto obtido por maceração foi preparado utilizando 6 seis frascos âmbar. A extração por maceração foi realizada em pequena escala, em um período de 10 dias, com uma hora de agitação em banho de ultrassom a cada 24 h. Foi utilizado 1 g de material vegetal distribuídos em seis frascos, em cada frasco foram adicionados 5 mL de solvente, em um gradiente de polaridade crescente: hexano, clorofórmio, acetato de etila, acetona e etanol. Também foi utilizada uma mistura hidroalcoólica (etanol e água) na proporção 1:1. A cada 48 h foram realizadas as extrações e em seguida adicionado mais solventes. Posteriormente, foram feitas a filtração desses extratos e colocados em banho de areia para secar. Depois de prontos, os extratos secos foram submetidos a testes biológicos *in vitro* contra o *P. falciparum*. Os extratos que apresentaram atividade biológica foram fracionados com métodos cromatográficos para isolar e identificar o tipo de molécula química presente nas respectivas espécies. Outro método de extração utilizado nesse trabalho foi o método tradicional comumente usado pelas comunidades que são a decoção e infusão descritas abaixo.

4.4.2 Extração a quente por decoção

O método de decoção foi elaborado utilizando erlenmeyer de 125 mL. Para a preparação da decoção foi utilizado 1 g do material vegetal para 25 mL de água destilada. Mantido em fervura a 100 °C por um período de 1 h, após esse tempo a mistura foi filtrada e colocada para secar em banho de areia. Os extratos secos preparados foram submetidos a testes antimaláricos *in vitro*.

4.4.3 Extração a quente por infusão

Para esta extração, foi utilizada 1 g do material vegetal para 25 mL de água. A água foi levada ao fogo até atingir a temperatura de ebulição. O aquecimento foi cessado e o material vegetal adicionado na água quente. A mistura ficou em repouso em recipiente fechado por um período de 1 h. Posteriormente, a mistura foi filtrada e colocada para secar em banho de areia. Após a evaporação e pesagem, os extratos secos foram submetidos a testes antimaláricos *in vitro*.

4.4.4 2º Extração em grande escala dos extratos

Para a segunda extração, foi utilizado apenas material vegetal de *H. sucuuba*. Extrações sucessivas do material vegetal foram efetuadas por maceração em frasco tipo Mariotte. Para essas extrações foram utilizados sequencialmente, hexano e acetato de etila até exaurir todo o material, por repetidas extrações. A extração foi realizada com 500 gramas de folhas *H. sucuuba*, posteriormente foi adicionado 500 mL de solvente. Foram realizadas extrações a cada 24 horas totalizando oito extratos, sendo iniciado pelo solvente hexano no qual foram realizadas quatro extrações, e em seguida foi adicionado no mesmo material vegetal o solvente acetato de etila, sendo feita quatro extrações. Os rendimentos dessa extração estão representados na tabela 1.

Após o período de maceração os extratos foram filtrados em papel filtro e concentrados em evaporador rotativo, sob pressão reduzida. Após evaporação completa, as amostras foram levadas para o banho de areia, depois de secos foram pesados para calcular o rendimento de cada extrato. Após prontos foram observados o seu perfil através da análise por CCD. Posteriormente, foi realizado o fracionamento com métodos cromatográficos para isolar e identificar o tipo de moléculas químicas presentes. Em seguida, essas frações foram submetidas a testes biológicos *in vitro* contra o *P. falciparum*. O método de extração esta representado no esquema a baixo (FLUXOGRAMA 1).

Fluxograma 1- Obtenção dos extratos brutos pelo método de maceração

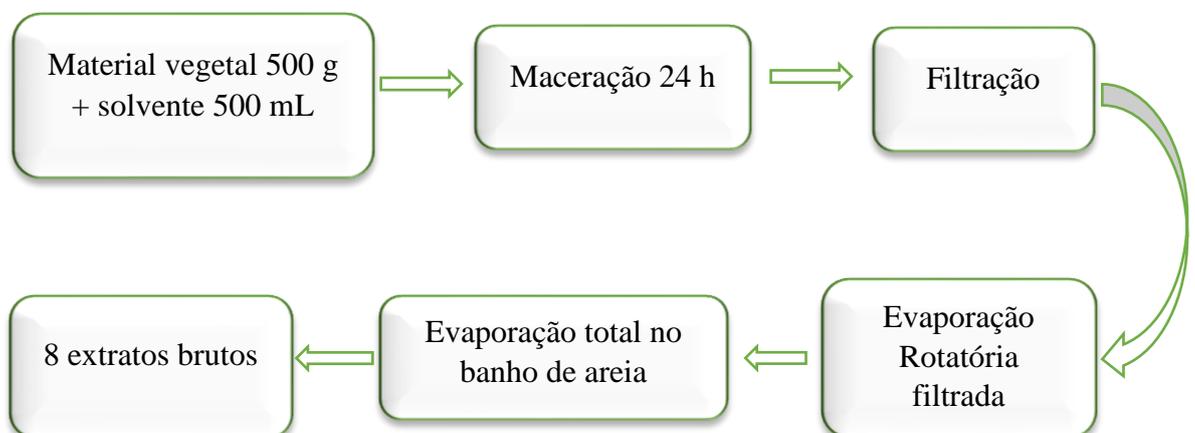


Tabela 1- Massa dos extratos das folhas da segunda extração de *H. sucuuba* e seus respectivos rendimentos a partir do material vegetal utilizado

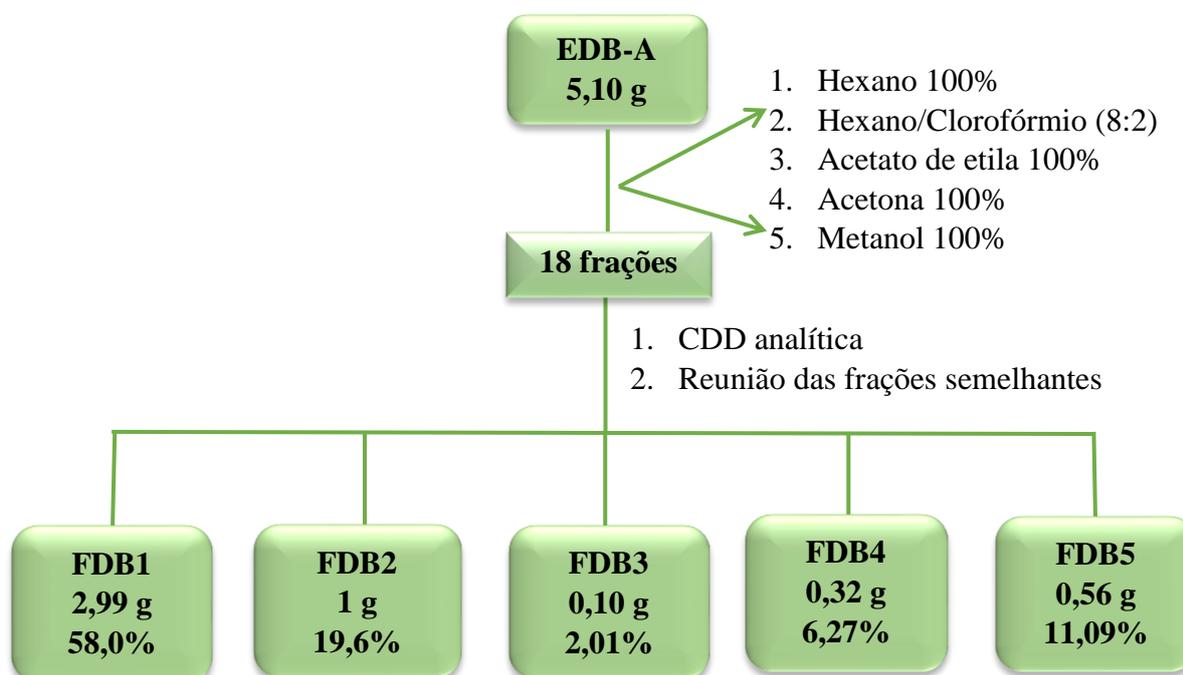
Extratos obtidos da folha de <i>H. sucuuba</i> a partir de 500 g.			
Extração	Solventes de extração	Massa (g)	Rendimento (%)
1°	Hexano	7,87	1,57
2°		2,78	0,55
3°		0,781	0,15
4°		0,514	0,10
1°	AcOEt	5,62	1,12
2°		3,58	0,71
3°		2,36	0,47
4°		1,66	0,33

Nota: Solventes extratores: AcOEt (acetato de etila)

4.4.5 Fracionamento do extrato acetato de etila da folha (EDB-A)

O extrato de acetato de etila das folhas de *H. sucuuba* (5,10 g), codificado como EDB-A, foi fracionado em coluna com sílica gel 60 (0,063-0,2 mm Merck). A coluna foi empacotada e eluída inicialmente com hexano 100%, seguida de uma mistura de hexano/clorofórmio (8:2) e na sequência, acetato de etila 100%, acetona 100% e metanol 100%. Obtiveram-se 18 frações que foram reunidas conforme seus perfis cromatográficos em cinco frações, codificadas em FDB1, FDB2, FDB3, FDB4, FDB5, (FLUXOGRAMA 2), após serem analisadas em CCD. Em seguida foi feita a remoção do solvente utilizando evaporador rotatório sob pressão reduzida. Após analisadas por CCD, foram rotaevaporadas sob pressão reduzida, para obtenção das frações isentas de solventes orgânicos.

Fluxograma 2- Fracionamento cromatográfico do extrato acetato de etila da folha (EDB-A)

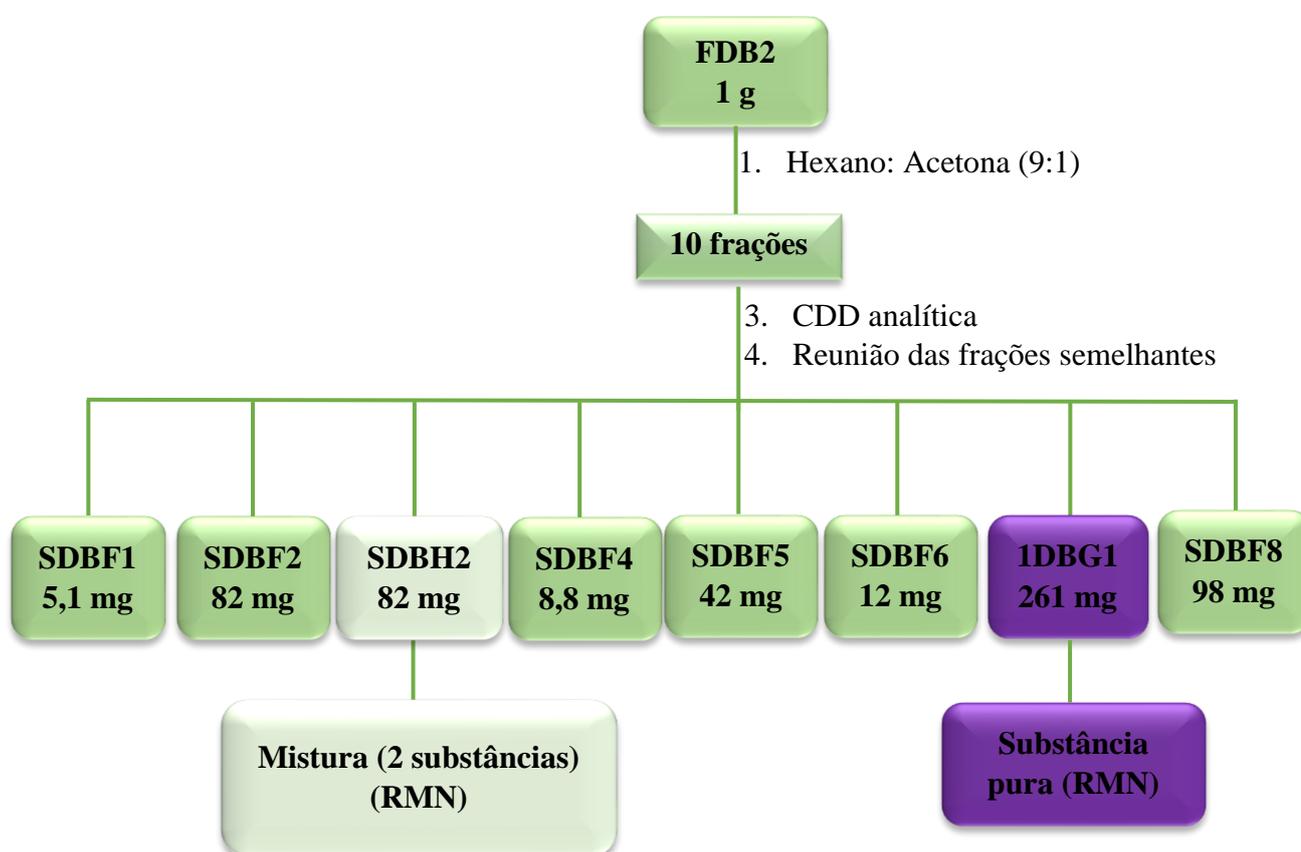


4.4.6 Purificação da fração FDB2

A purificação da fração codificada como FDB-2 foi realizada em uma coluna cromatográfica de 20 cm, em seguida foi empacotada com sílica (0,063-0,200 mm, Merck) e hexano 100%.

A eluição foi realizada com aumento de polaridade sendo incrementados 10% de acetona na proporção de 9:1. O referido procedimento gerou 10 subfrações, que após serem analisadas em CCD, foram reunidas conforme seus perfis cromatográficos em oito frações. (FLUXOGRAMA 3).

Fluxograma 3- Fracionamento cromatográfico da fração da folha de *H. succuba*.



A substância 1DBG1 isolada da fração codificada como FDB2, caracterizou-se como um sólido de coloração branca, aparecendo como uma única mancha quando analisada em CCD. Sua solubilidade foi observada em DMSO. Em CCD, após revelação com anisaldeído e alguns segundos de aquecimento muda-se a coloração passando para o lilás intenso, com

eluente AcOEt/hexano na proporção de 7:3 com R_F de 0,35. Espectros de RMN 1D e 2D foram obtidos.

A Subfração 1BDH2 isolada da fração FDB2 caracterizou-se como um sólido de coloração verde claro. Sua solubilidade foi observada em DMSO. Em CCD, após revelação com anisaldeído e alguns segundos de aquecimento muda-se a coloração para o lilás intenso, com eluente em AcOEt/hexano na proporção de 7:3 (R_F 0,35).

4.5 Microteste para atividade antiplasmódica *in vitro*

4.5.1 Cultivo *in vitro* de *Plasmodium falciparum*

A cultura *in vitro* de *P. falciparum* e os bioensaios com este parasita foram realizados no Laboratório de Cultivo de *P. falciparum* (COSAS/INPA). O método utilizado é uma modificação da técnica de Trager e Jensen (1976), adaptada pela Gerência de Malária da FMT-HVD, baseada no desenvolvimento *in vitro* dos estágios eritrocitários desta espécie parasitária. Neste estudo foi utilizada a cepa K1 de *P. falciparum* (MRA-159, MR4, ATCC, Manassas Virginia), resistente à cloroquina e pirimetamina, cultivada em eritrócitos humanos do tipo A+ a 37 °C, em frascos de poliestireno de 50 mL hermeticamente fechados, sob uma atmosfera de baixa tensão de oxigênio (5% de CO₂, 5% de O₂ e N₂ balanceado). Nos frascos foram adicionados cerca de 500 µL de eritrócitos parasitados e 4,5 mL de meio RPMI 1640 (Gibco®) suplementado com NaHCO₃ (32 mM), HEPES (25 mM), hipoxantina (37 mM), glutamina (2 mM), glicose (10 mM), 0,4 mL de gentamicina e 10% de plasma humano inativado tipo A+. A troca do meio de cultura e a adição de mistura carbogênica foram realizadas diariamente, bem como a adição de eritrócitos sempre que necessário. O crescimento dos parasitas foi acompanhado durante a troca do meio de cultura, através de esfregaços sanguíneos corados em panótico® e observados em microscópio óptico. A parasitemia foi calculada e expressa em percentagem a partir da contagem de 2000 eritrócitos. Os ensaios foram realizados com culturas sincrônicas no estágio anel, trofozoítos jovens, obtidas após tratamentos com uma solução de 5% de D-sorbitol, conforme descrito por Lambros e Vanderberg (1979).

4.5.2 Microteste de suscetibilidade *in vitro*

O ensaio antimalárico foi realizado de acordo com o método descrito por Rieckmann et al. (1978), com adaptações descritas por Andrade-Neto et al. (2007), em condições

semelhantes à cultura do parasita. Para avaliação da atividade antiplasmódica, as amostras foram submetidas a uma peneiragem em duas concentrações: 50 e 5,0 µg/mL. As amostras que apresentaram um percentual de inibição da parasitemia $\geq 80\%$ foram consideradas ativas e avaliadas em sete concentrações em duplicatas, variando de 100 a 1,56 µg/mL, para determinação da concentração capaz de reduzir o crescimento do parasita em 50% (CI₅₀).

As amostras (extratos e frações cromatográficas cuja preparação foi descrita anteriormente nesta parte experimental) foram preparadas em dimetilsulfóxido (DMSO), em soluções estoques na concentração de 10,0 mg/mL, e posteriormente diluídas em meio de cultura (RPMI 1640) para obtenção das concentrações para o teste *in vitro*. Os antimaláricos padrões cloroquina e quinina foram avaliados em sete concentrações, 2,5 a $3,4 \times 10^{-3}$ µg/mL, como controles. Cada amostra diluída foi testada em triplicata na peneiragem e foi realizado em duplicata para o cálculo de CI₅₀, em microplaca de 96 poços.

As placas teste foram preparadas de modo que cada poço recebeu a suspensão de hemácias com parasitemia inicial de 1% no estágio anel mais a amostra a ser testada em um volume final de 200 µL, incubadas por 48 h a 37 °C, nas mesmas condições da cultura. Para o controle foi utilizado apenas a suspensão de hemácias parasitadas e DMSO na mesma concentração das amostras utilizadas. Após o período de incubação foram preparados esfregaços sanguíneos para cada poço, corados em panótico® e observados em microscópio para contagem dos parasitas. A parasitemia das amostras investigadas foi expressa em percentagem a partir da contagem de 2000 eritrócitos, conforme a equação:

$$\text{Parasitemia \%} = \text{N}^\circ \text{ total de parasitas} \times 100 / \text{N}^\circ \text{ total de hemácias.}$$

4.5.3 Análise estatística dos dados

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

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados descritos abaixo estão organizados de acordo com a espécie estudada.

5.1 Rendimentos das extrações de *Endopleura uchi*

A massa dos extratos secos e o rendimento das extrações estão apresentados na tabela 2. É possível observar que os maiores rendimentos foram para as extrações em que foi utilizado os solventes acetona, EtOH/H₂O e EtOH todos apresentaram maior teor extrativo, onde os extratos hidroalcoólico (etanol+água) e EtOH, apresentaram maior rendimento comparado com os demais extratos, assim como os métodos tradicionais, a infusão e decocção, apresentaram rendimento maior quando comparados aos demais extratos.

Tabela 2- Massa dos extratos secos das cascas de *Endopleura uchi* e seus respectivos rendimentos a partir do material vegetal utilizado 1 g

Solventes de Extração	Massa (mg)	Rendimento (%)
Hexano	26,6	2,6
AcOEt	73,8	7,3
CHCl ₃	57,5	5,7
EtOH/H ₂ O	179,0	17,9
Acetona	157,0	15,7
EtOH	162,0	16,2
Decocção (H ₂ O)	199,9	20,0
Infusão (H ₂ O)	210,9	21,0

Nota: Solventes extratores: AcOEt (acetato de Etila); EtOH (etanol); H₂O (água)

5.1.1 Atividade antimalárica *in vitro* de *Endopleura uchi*

Os percentuais de inibição dos extratos estão apresentados na tabela 3. Observa-se que nenhum dos oito extratos testados apresentou inibição relevante para *P. falciparum*.

Os resultados encontrados nesse trabalho estão de acordo com os resultados encontrados por Oliveira et al. (2015) onde os extratos da casca de *Endopleura uchi* mostraram-se nativos contra o *P. falciparum* (CI₅₀ >50 ug/mL).

Silva et al. (2009) observou que os extratos e frações da casca de *Endopleura uchi* inibiram o crescimento da *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis*. A bergenina, encontrada nessa espécie, se mostrou eficiente no tratamento contra esses microrganismos. Isso confirma o seu uso tradicional pela comunidade apesar de não ter nenhum efeito contra a malária. A

espécie é eficaz contra outros tipos de enfermidades causadas por infecções que afetam as mulheres.

Tabela 3- Peneiragem *in vitro* de extratos de *Endopleura uchi* frente à estirpe K1 de *P. falciparum*

Extratos da Casca	Classificação da atividade*	Redução do crescimento do parasita (%)	
		50 (µg/mL)	5,0 (µg/mL)
Hexano	I	51	3,16
CHCl ₃	I	50	-3,56
AcOEt	I	41	25,21
EtOH/H ₂ O	I	44	-10,96
Acetona	I	53	15,30
EtOH	I	38	11,30
Decocção	I	37	3,25
Infusão	I	38	9,30

Nota: Solventes extratores: CHCl₃ (clorofórmio); AcOEt (acetato de etila); EtOH (etanol); H₂O (água); I (Inativo)

Devido à inatividade dos extratos de *E. uchi* na etapa de peneiragem, não foram avaliados as CI₅₀ dos mesmos ou efetivado o isolamento de substâncias.

5.2 Rendimentos dos extratos e frações de *Himatanthus sucuuba*

Foram preparados 16 extratos de sucuuba, obtidos a partir da casca e folha. A massa dos extratos secos e o rendimento das extrações estão apresentados na tabela 4.

É possível observar que os maiores rendimentos das extrações foram àqueles com solventes de baixa polaridade. Os maiores rendimentos para as folhas foram as extrações com os solventes EtOH/H₂O, EtOH e H₂O (decocção e infusão) todos apresentaram um maior teor extrativo, quando comparado com os demais extratos.

O uso tradicional se dá principalmente com o uso de chá por infusão ou decocção e garrafadas com o leite de sucuuba (SOARES et al., 2016). Neste estudo esses métodos

revelaram um maior rendimento e teor extrativo. Já os rendimentos referentes aos extratos obtidos da casca foram possíveis observar que os maiores rendimentos das extrações não foram influenciados pela polaridade dos solventes. O maior rendimento para a folha foi a extração com AcOEt, EtOH/H₂O e EtOH todos apresentaram um maior teor extrativo, quando comparado com os demais extratos, assim como o método tradicional utilizado pela comunidade a infusão e decocção apresentaram um rendimento maior quando comparados aos extratos de hexano e acetona.

Tabela 4- Massa dos extratos secos de *Himatanthus sucuuba* extração em pequena escala e seus respectivos rendimentos a partir do material vegetal utilizado

Extratos obtidos da primeira extração a partir das cascas e folhas de <i>H. sucuuba</i> 1 g			
Parte da Planta	Solvente de Extração	Massa (mg)	Rendimento (%)
Folha	Hexano	37,9	3,7
	CHCl ₃	85,9	8,5
	AcOEt	89,4	8,9
	EtOH/H ₂ O	257	25,7
	Acetona	144,9	14,4
	EtOH	191,2	19,1
	Decocção (H ₂ O)	163,7	16,3
	Infusão (H ₂ O)	182,5	18,2
Casca	Hexano	47,0	4,7
	CHCl ₃	64,2	6,4
	AcOEt	248,3	24,8
	EtOH/H ₂ O	256,2	25,6
	Acetona	76,1	7,6
	EtOH	238,8	23,8
	Decocção (H ₂ O)	199,9	20,0
	Infusão (H ₂ O)	209,8	20,9

Nota: Solventes extratores: AcOEt (acetato de etila); EtOH (etanol); H₂O (água)

5.2.1 Atividade antimalárica *in vitro* de *Himatanthus sucuuba*

5.2.2 Peneiragem de extratos para atividade antiplasmódica *in vitro*

Na tabela 5 estão representados os percentuais de inibição de cada extrato de *H. sucuuba*. Conforme já mencionados nos métodos, as amostras que apresentaram uma inibição da parasitemia igual ou superior a 80% tiveram as suas CI_{50} determinada. Dos 16 extratos avaliados, apenas os extratos obtidos das folhas em solventes (AcOEt, $CHCl_3$, Acetona) apresentaram inibição da parasitemia relevante.

No entanto, os extratos ativos das folhas apresentaram um percentual de inibição maior apenas na concentração (50 $\mu\text{g/mL}$). Os extratos de infusão e decocção que geralmente são utilizados pela comunidade, se mostraram inativos em ensaios *in vitro* frente ao *P. falciparum*.

Tabela 5- Inibição do crescimento *in vitro* de *P. falciparum* das amostras da espécie *Himatanthus sucuuba*

Código das amostras	Parte da Planta	Solvente de extração	Classificação da atividade	Redução do crescimento do parasita (%)	
				50 ($\mu\text{g/mL}$)	5,0 ($\mu\text{g/mL}$)
DB11A		Hexano	I	0,00	0,00
DB11B		AcOEt	A	86,0	0,00
DB11C		Acetona	A	85,5	0,00
DB11D		EtHO	I	59,5	0,00
DB11E	Folha	EtHO/ H_2O	I	14,0	0,00
DB11F		$CHCl_3$	A	85,6	0,00
DB11G		Decocção	I	9,87	0,00
DB11H		Infusão	I	9,87	0,00
BD12A		EtHO	I	34,7	0,00
DB12B		Decocção	I	26,8	0,00
DB12C		$CHCl_3$	I	1,47	0,00
DB12D	Casca	AcOEt	I	22,4	0,00
DB12E		EtOH/ H_2O	I	23,4	0,00
DB12F		Infusão	I	0,00	0,00
DB12G		Acetona	I	0,90	0,61
DB12H		Hex	I	0,00	0,00

Nota: EtOH (etanol); H_2O (água); $CHCl_3$ (clorofórmio); AcOEt (acetato de etila) A (ativo); I (inativo);

5.2.3 CI_{50} dos extratos de *H. sucuuba*

As amostras que apresentaram uma inibição superior ou igual a 80% foram submetidas ao teste CI_{50} os resultados estão representados na tabela 6. Os critérios utilizados para a classificação da atividade dos extratos foram os de Krettli et al. (2009), onde concentrações inibitórias 50% (CI_{50}), maiores que 25 $\mu\text{g/mL}$ correspondem a amostras inativas; amostras parcialmente ativas entre 25 $\mu\text{g/mL}$ e 10 $\mu\text{g/mL}$; ativo entre 10 $\mu\text{g/mL}$ e 1,0 $\mu\text{g/mL}$ e muito ativo menor que 1,0 $\mu\text{g/mL}$.

A partir desses valores de CI_{50} demonstrados na tabela 6, o extrato de acetato de etila foi selecionado para dar continuidade aos testes de fracionamento e isolamento de substâncias.

Tabela 6- CI_{50} dos extratos das folhas da espécie *Himatanthus sucuuba*

Código do extrato	CI_{50}		Classificação da atividade
	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	Intervalo de confiança	
AcOEt	20,9	17,1 a 25,6	PA
CHCl_3	~24,7	17,1 a 25,0	PA
Acetona	31,1	15,7 a 61,4	I

Nota: AcOEt (acetato de etila); CHCl_3 (clorofórmio); I (inativo); PA (parcialmente ativo)

Em estudos realizados por Oliveira et al. (2015) relatam-se o uso *H. sucuuba* pela comunidade quilombolas no tratamento da malária sendo utilizado a casca e o látex. No presente trabalho foram preparados extratos da casca e a folha e os resultados demonstraram atividade apenas nos extratos das folhas (TABELA 5). Cabe ressaltar que na literatura não foi encontrado nenhum resultado referente ao uso das folhas de *H. sucuuba* para o tratamento da malária. Rodrigues et al. (2010) relatam que o uso das folhas é indicado para o tratamento antitumoral, antifúngico, anti-anêmico, vermífugo, no tratamento de gastrite, artrite e contra constipação, os mesmos autores ainda relatam que as folhas apresentam um efeito mais forte do que a casca.

Resultados encontrados por Vale et al. (2015) para outra espécie do mesmo gênero se assemelham com os resultados obtidos nesse trabalho uma vez que os autores relatam que os extratos etanólico das cascas de *H. articulatos* apresentaram CI_{50} de 16,8 $\mu\text{g/mL}$ contra o *P. falciparum*, também o mesmo extrato etanólico da casca se mostrou ativo contra o *P. berghei*

em estudos *in vivo*. O que evidencia o uso tradicional dessa espécie, uma vez que, o seu uso vai agir diretamente no fígado onde ocorre uma das fases do ciclo do parasita, diminuindo assim os sintomas da doença.

Costa (2006) demonstrou que as folhas *H. articulatus* possuem ação antimicrobiana impedindo o crescimento das cepas clínicas e ATCC de *Staphylococcus aureus* na concentração de 5 mg/mL o que explica seu uso para quadros infecciosos causados por bactéria. Soares et al. (2010) observou que o látex da *H. succuba* apresentou um resultado satisfatório contra amastigotas de *Leishmania amazonenses* causador da leishmaniose tegumentar, o látex inibiu o crescimento desses amastigotas com $CI_{50} = 15,7 \mu\text{g/mL}$.

5.2.4 Fracionamento dos extratos de AcOEt

Pode-se observar no fluxograma 2 (parte experimental), que a FDB1, FDB2 obtiveram maior rendimento do que as outras frações, sendo FDB5 a fração que obteve menor rendimento.

Os resultados referentes ao CI_{50} das frações estão representados na tabela 7, onde as frações FDB1, FDB2 e FDB3 de acetato de etila foram classificadas como parcialmente ativas assim como as frações FDB4 de acetona, a fração de metanol FDB5 foram inativas com CI_{50} de 26,4.

Para cada fração, foi analisado o seu perfil cromatográfico através da CCD e posteriormente foi realizado o isolamento das substâncias. A fração (FDB2) apresentou um melhor perfil cromatográfico entre outras frações, possibilitando assim o isolamento da substância.

Tabela 7- Inibição *in vitro* de *P. falciparum* pelas frações dos extratos AcOEt das folhas de *Himatanthus succuba*

Código das Frações	CI_{50}		Classificação da atividade
	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	Intervalo de confiança	
FDB1	11,07	9,35 a 13,1	PA
FDB2	16,8	14,9 a 18,9	PA
FDB3	19,6	16,7 a 23,0	PA
FDB4	15,4	13,1 a 17,9	PA
FDB5	26,4	15,5 a 59,4	I

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

5.3 ESTUDOS DAS FRAÇÕES E SUBSTÂNCIA IDENTIFICADA

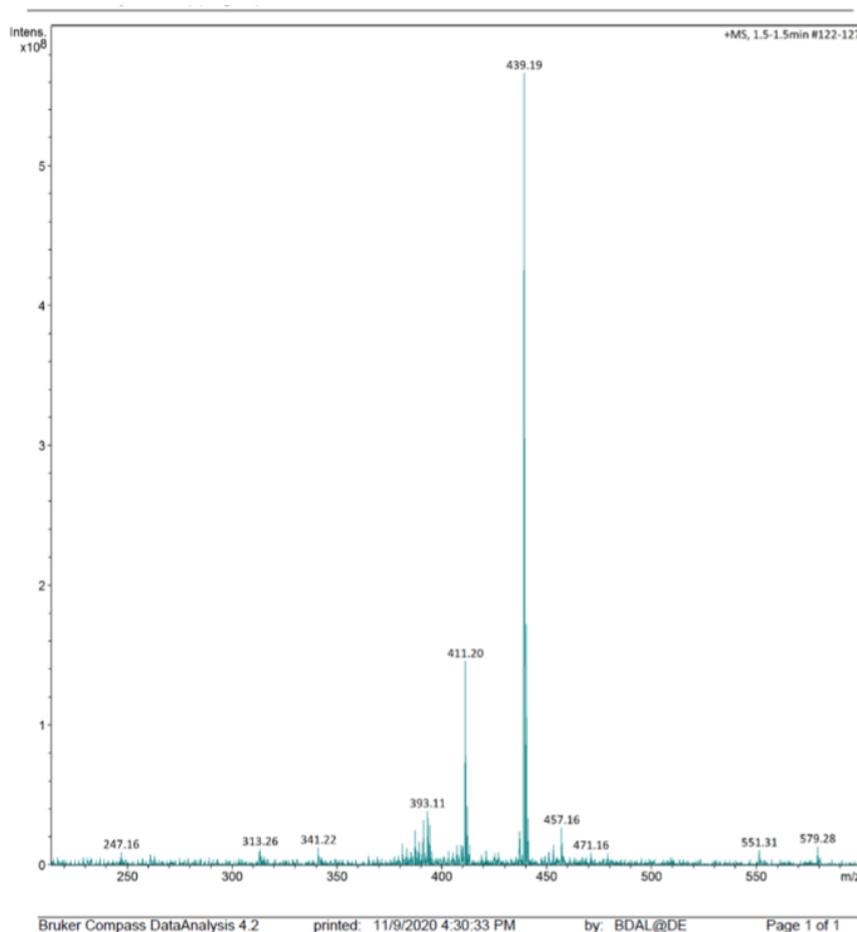
5.4 Identificação da substância

A substância obtida nesse trabalho foi submetida à análise de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massa com Ionização Química à Pressão Atmosférica (CLAE-APCI/EM) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C e os espectros de correlação COSY ^1H - ^1H , HSQC e HMBC, cujos espectros estão incluídos nos anexos.

5.4.1 Elucidação estrutural da substância 1BDG1

A substância 1BDG1 apresentou-se como um sólido branco amorfo, sua solubilidade deu-se em DMSO, o espectro de massa dessa substância apresentou os picos majoritários m/z 457,16; 439,19; 411,20 e 393,11 (FIGURA 19, ANEXOS 1,2,3 pág. 84-86). Segundo Huang et al. (2007), os picos referem-se ao íon molecular $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 457,16 e o pico base $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$ m/z 439,19. Além desses, os demais picos referem-se aos íons fragmento $[\text{M}+\text{H}-\text{COOH}]^+$ m/z 411,20 e $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}-\text{COOH}]^+$ m/z 393,11.

Figura 19 - Espectro de massas (EM) APCI (modo positivo) da substância 1BDG1



Os dados do espectro de massas forneceram informações importantes, como a possível presença dos grupos funcionais oxigenados: ácido carboxílico e álcool. Os espectros de RMN uni e bidimensionais foram analisados para obter dados espectroscópicos importantes para determinação da substância 1BDG1.

Ao analisar o espectro de hidrogênio (ANEXOS 4, 5 e 6, pág. 87-89) observou-se que o mesmo apresentava um perfil característico como sendo de um terpeno pentacíclico, onde foi possível inferir a existência de hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos, pois o espectro mostrou sinais de singletos e dubletos na faixa de δ_H 0,67 a 1,03 ppm característico de metílicos (CH_3) (FIGURA 20), apresentou também sinais na faixa de δ_H 1,23 a 2,12 ppm sendo região de metilênicos (CH_2) (FIGURA 21), bem como dois sinais δ_H 2,99 e δ_H 5,12 sendo ambos metínicos (CH) (FIGURA 22).

Além dos sinais comentados, os sinais de singletto δ_H 12,0 e dubletto δ_H 4,31 (J 4,63 Hz), característico de ácido carboxílico e álcool secundário (FIGURA 23) foram observados. Esses sinais foram corroborados pelo deslocamento δ_C 178,8 e δ_C 77,3 do RMN de ^{13}C (ANEXOS 9 e 10, pág. 92 e 93) característico de carboxila e carbono carbinólico (FIGURA 25). Esses sinais confirmaram a presença dos grupos funcionais observados no espectro de massas.

Figura 20 - Ampliação do espectro de RMN de 1H (300 MHz, $DMSO-d_6$) na faixa de δ_H 0,67 a 1,03 características de metílicos (CH_3)

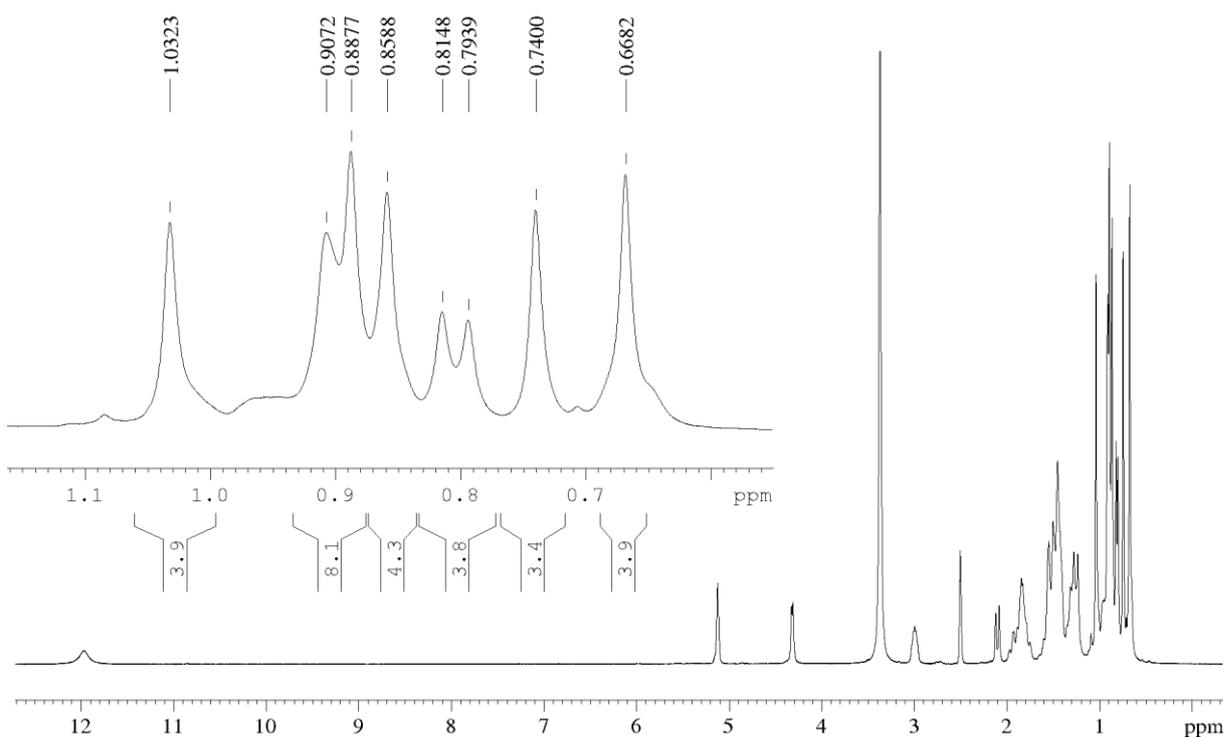


Figura 21- Ampliação do espectro de RMN de ^1H (300 MHz, DMSO-d_6) na faixa de δ_{H} 1,23 a 2,12 características de metilênico (CH_2)

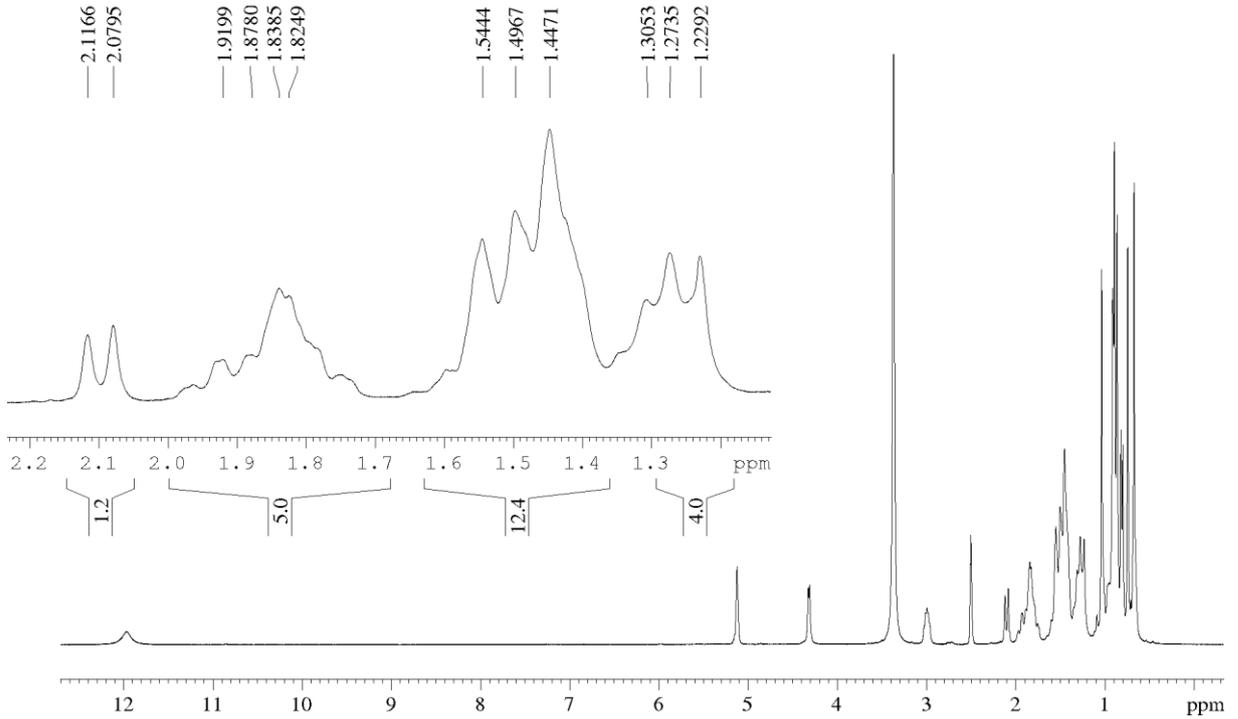


Figura 22- Ampliação do espectro de RMN de ^1H (300 MHz, DMSO-d_6) dos sinais δ_{H} 5,12 e 2,99 característicos de hidrogênios metínicos (CH)

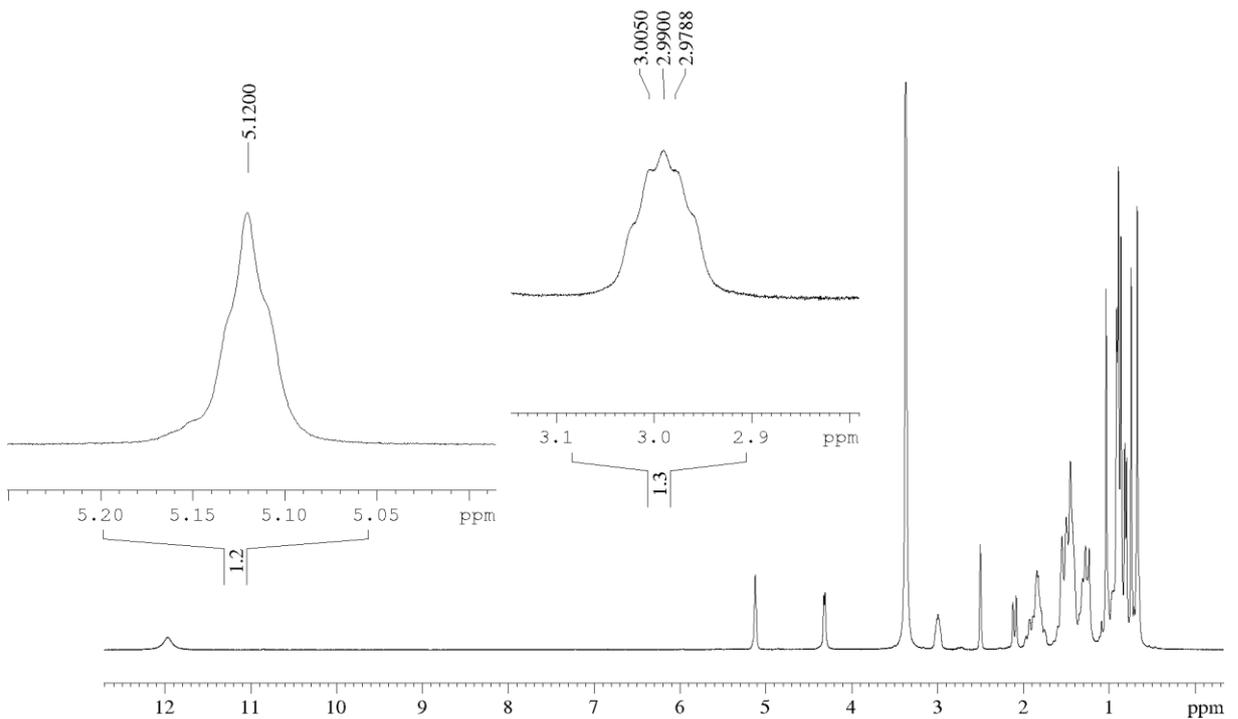
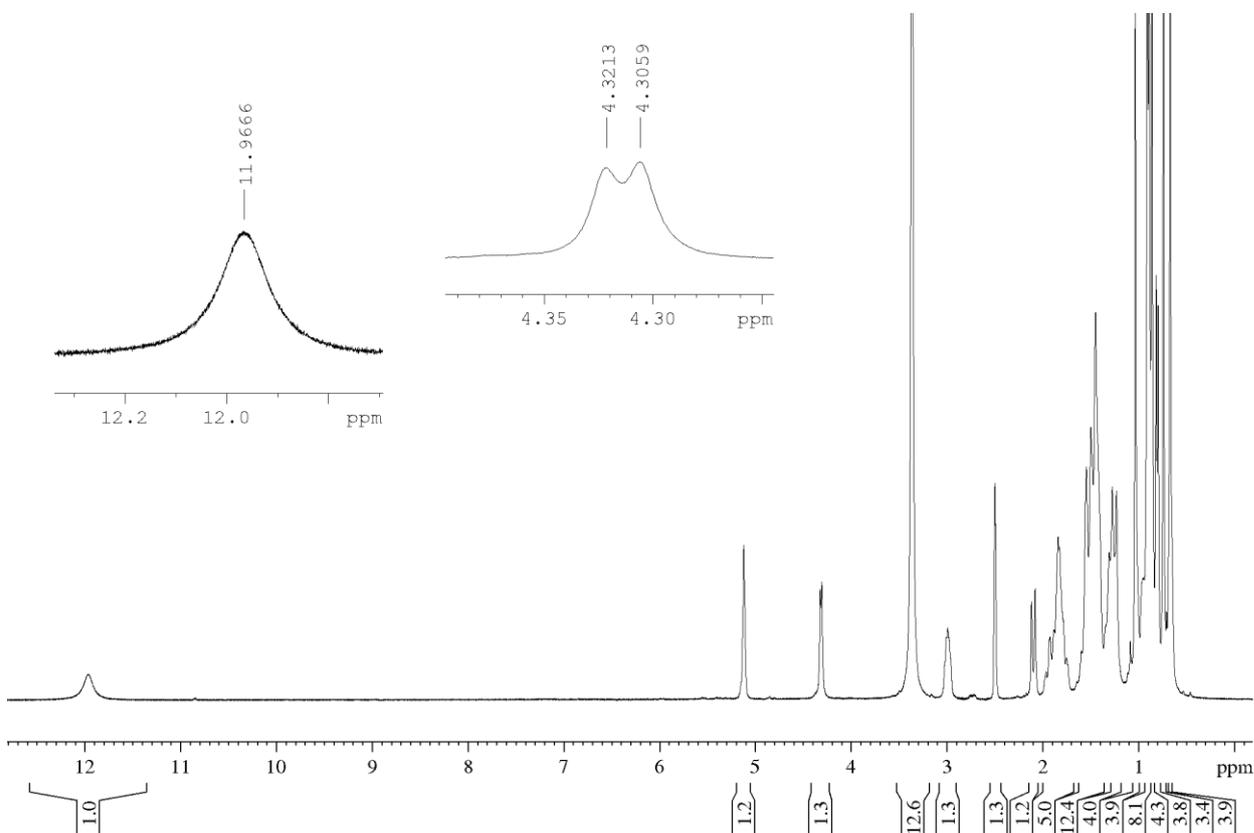


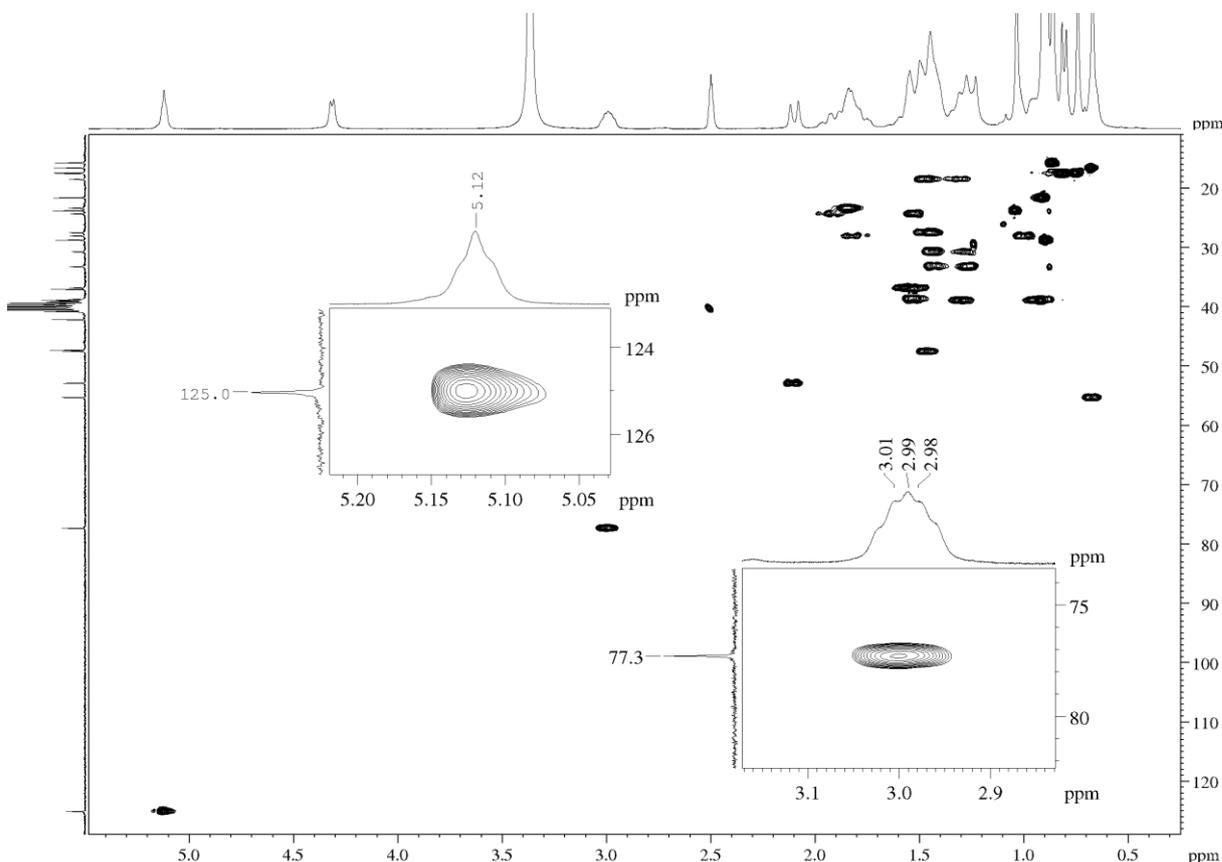
Figura 23 - Ampliação do espectro de RMN de ^1H (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) dos sinais δ_{H} 12,0 e 4,31 característicos de hidrogênio de carboxila e álcool secundário, respectivamente



No espectro de HSQC (ANEXOS 7 e 8, pág. 90 e 91; FIGURA 24), o sinal em δ_{H} 2,99 mostrou correlação 1J com o carbono em 77,3 ppm, sendo nesse caso, carbono ligado a um heteroatomo, o que soma com a ideia da presença de uma hidroxila.

Outro dado importante a ser ressaltado é o sinal do hidrogênio em δ_{H} 5,12 e sua correlação no espectro de HSQC com o carbono δ_{C} 125,0 ppm característico de metínico sp^2 .

Figura 24 - Expansão do mapa de contorno HSQC (^1H : 300 MHz, ^{13}C : 75 MHz, DMSO-d_6) da correlação 1J dos sinais δ_{H} 2,99 - δ_{C} 77,3 e δ_{H} 5,12 - δ_{C} 125,0 ppm

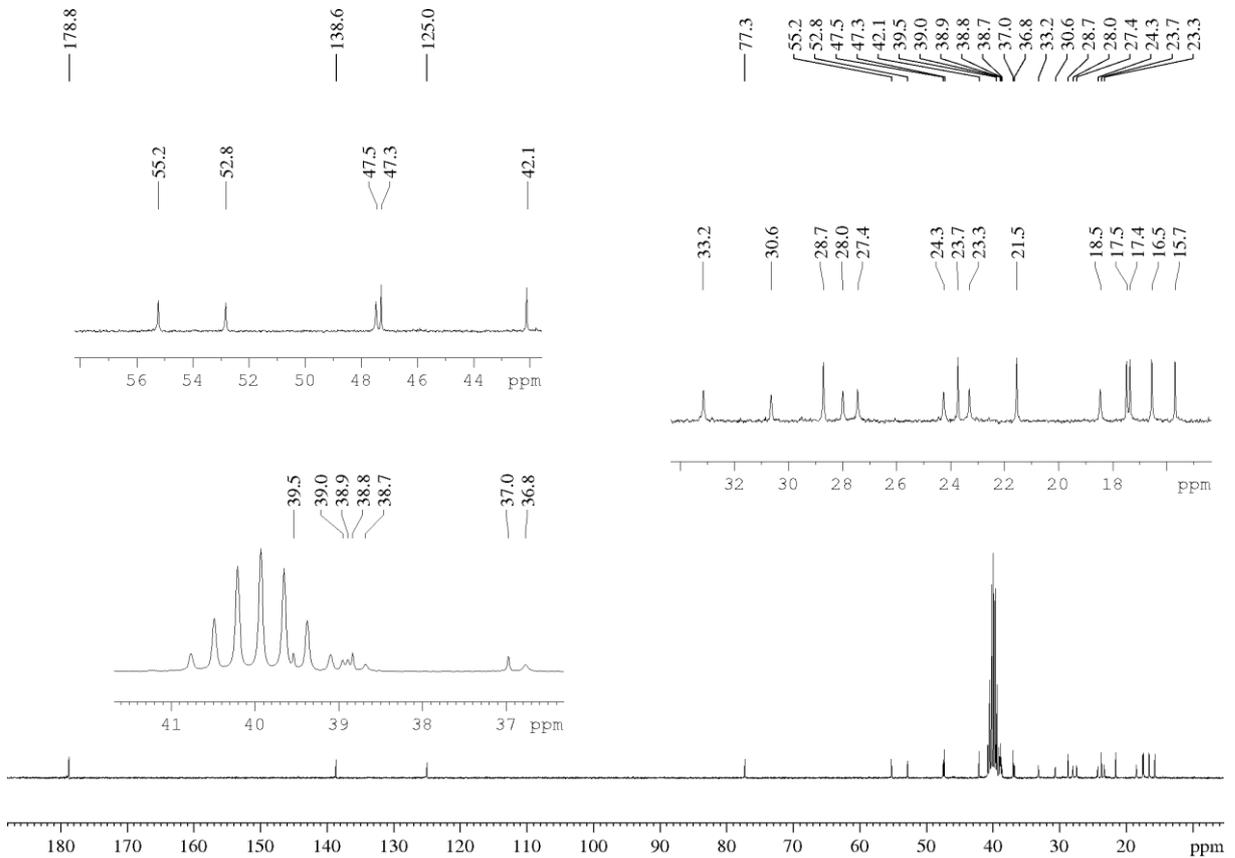


Com o intuito de obter mais informações espectrais da substância, os espectros de RMN ^{13}C (ANEXOS 9 e 10 pág. 92 e 93), DEPT 135 (ANEXOS 11 e 12, pág. 94 e 95) e o mapa de contorno HSQC (ANEXOS 7 e 8, pág. 90 e 91) foram analisados.

O espectro de ^{13}C (ANEXOS 9 e 10 pág. 92 e 93; FIGURA 25) apresentou 30 linhas espectrais. Utilizando-se dos dados espectrais de DEPT 135° (ANEXOS 11 e 12, pág. 94 e 95) e HSQC (ANEXOS 7 e 8, pág. 90 e 91), foi possível afirmar que essa substância apresentava sete sinais de metila (CH_3), nove carbonos metileno (CH_2), sete de metinos (CH) e sete de carbonos quaternários.

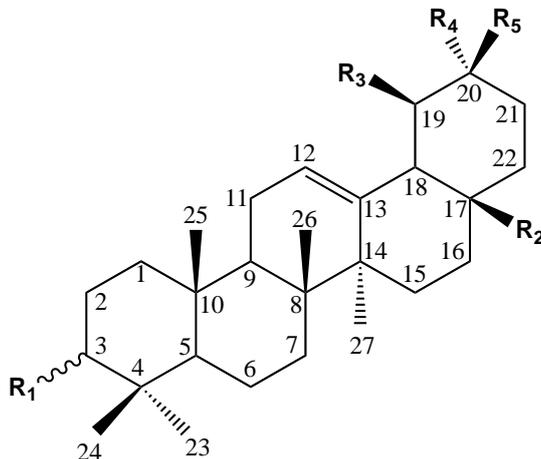
Partindo das informações levantadas foi possível sugerir que a substância apresenta trinta carbonos, quarenta e seis hidrogênios mais dois hidrogênios referentes dos grupos álcool e ácido carboxílico, além dos três átomos de oxigênios desses grupos funcionais. Dessa forma, a fórmula molecular pode ser determinada como $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$. O seu íon protonado $[\text{M}+\text{H}]^+$ é equivalente ao íon molecular observado no espectro de massas (FIGURA 19).

Figura 25 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) com ampliações δ_{C} 55,2-42,1, C 39,5-36,8 e δ_{C} 33,2-15,7 ppm



No levantamento bibliográfico foi observado que essa planta produz triterpenos, sendo que Wood et al. (2001) afirmam a presença de triterpenos pentacíclico (FIGURA 26), o que corrobora com que já foi comentado, logo para confirmação dessa hipótese verificou os demais espectros bidimensionais.

Figura 26- Principal esqueleto triterpeno pentacíclico encontrado na *H. succuba* (WOOD et. al., 2001)



A estrutura base hipotética (FIGURA 26) apresenta cinco substituintes (R_1 - R_5) a serem determinados. Como já foi comentado anteriormente, a substância 1BDG1 constitui-se de dois grupos funcionais oxigenados, álcool secundário e ácido carboxílico, restando três grupos R.

Como a substância apresenta sete carbonos metílicos. E a estrutura hipotética está sendo representada por cinco carbonos metílicos. Tornou-se possível concluir que dos três grupos R restante, dois foram considerados metilas.

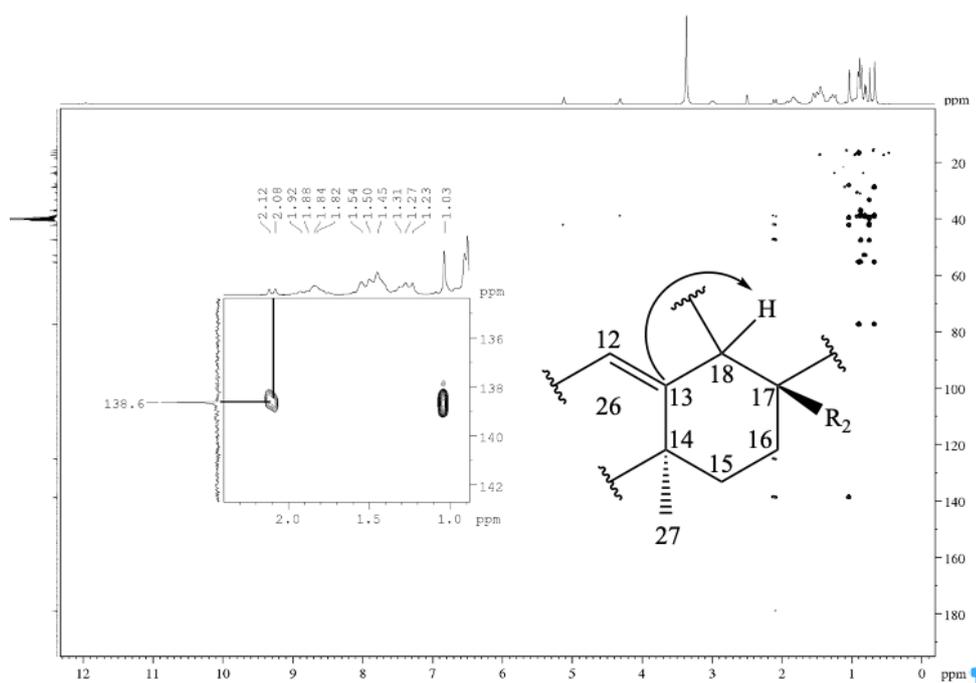
Partindo da ideia de que a fórmula molecular da substância é $C_{30}H_{48}O_3$ e que a estrutura hipotética tem 33 hidrogênios evidentes mais 14 hidrogênios referente a somatória dos grupos R determinados (álcool, ácido carboxílico e duas metilas) tornou-se possível afirmar que o último grupo R é um hidrogênio.

Para resumir o raciocínio, os grupos R da estrutura hipotética são: um álcool, um ácido carboxílico, duas metilas e um hidrogênio.

Utilizando o mapa de contorno HMQC (ANEXOS 7 e 8, pág. 90 e 91) foi possível identificar cada grupo R da estrutura hipotética.

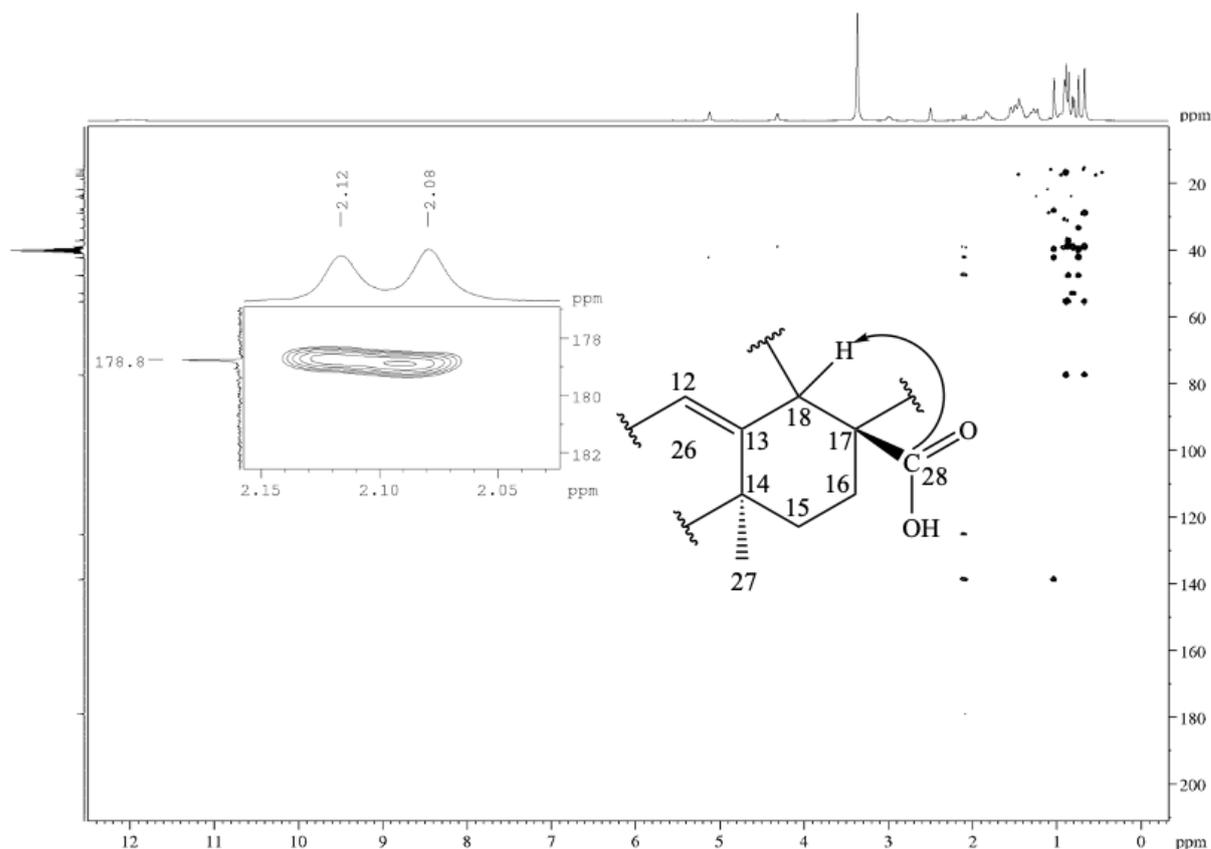
No mapa de contorno HMBC (ANEXOS 13 e 14 pág. 98 e 99) foi possível observar a correlação do sinal do hidrogênio metínico sp^3 δ_H 2,10 d (J 11,07 Hz) com o deslocamento de carbono quaternário sp^2 δ_C 138,6 ppm (FIGURA 27).

Figura 27- Mapa de correlação de HMBC (75 MHz, DMSO- d_6) com ampliação do acoplamento δ_H 2,10- δ_C 138,6 ppm



Como o sinal δ 178,8 do carbono carboxílico também apresenta correlação com o hidrogênio metílico sp^3 (FIGURA 28) foi possível determinar que R_2 da figura 26 é o ácido carboxílico.

Figura 28- Mapa de correlação de HMBC (75 MHz, DMSO-d_6) com ampliação do acoplamento $\delta_{\text{H}} 2,10$ - δ_{C} 178,8 ppm

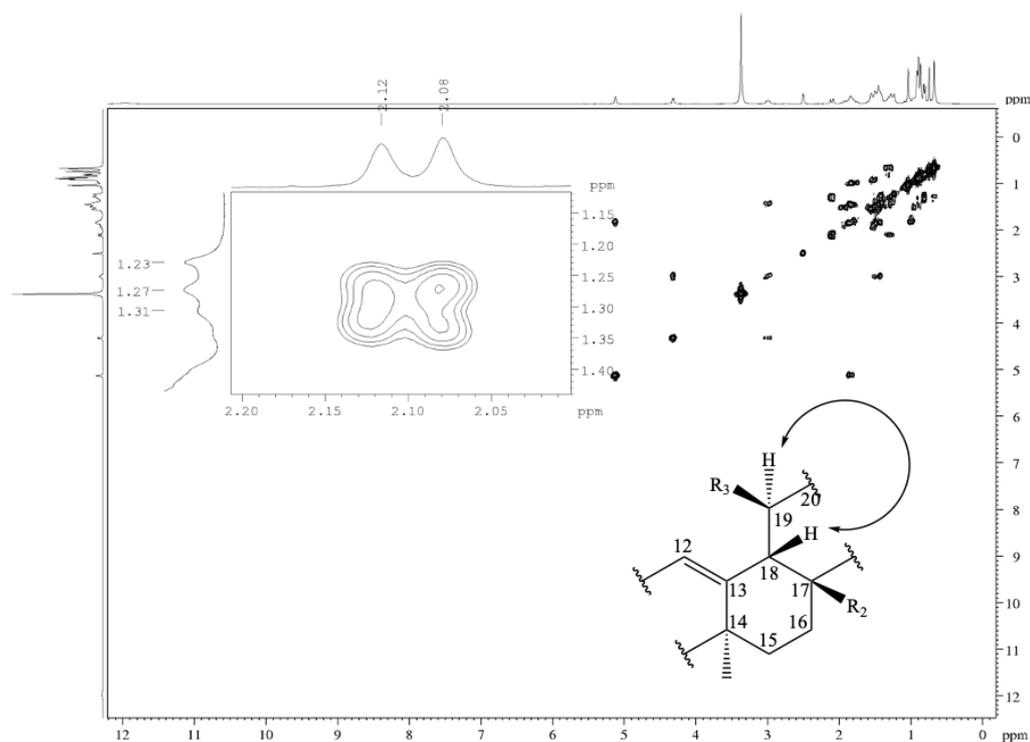


Utilizando o COSY ^1H - ^1H (ANEXOS 15 e 16 pág. 100 e 101) foi possível determinar o grupo R_3 . No mapa de contorno COSY observou o acoplamento dos hidrogênios metínicos $\delta_{\text{H}} 2,10$ – $\delta_{\text{H}} 1,30$ (FIGURA 29). Segundo o DEPT 135° (ANEXOS 11 e 12, pág. 94 e 95) e HSQC (ANEXOS 7 e 8, pág. 90 e 91) o hidrogênio $\delta_{\text{H}} 1,30$ é metínico e dessa forma foi possível identificar o grupo R_3 da figura 26. O grupo R_3 foi identificado como metila. Dessa forma o grupo R_4 ou R_5 , dependendo da estereoquímica, é a outra metila e o hidrogênio. Segundo Gnoatto et al. (2008) o grupo metila encontra-se na conformação alfa, ou seja, o grupo R_4 é a metila e o R_5 o hidrogênio. E, conseqüentemente o grupo R_1 é grupo funcional álcool secundário.

Segundo o Townley et al. (2015) a tendência da saída de H_2O no espectro de massas depende da estereoquímica da posição 3-OH. O autor estudou o espectro de massas APCI

modo positivo de 14 triterpeno pentacíclico e chegou a conclusão que o 3 α -epímero tem pico base $[M+H]^+$, enquanto 3 β -epímero tem pico base $[M+H-H_2O]^+$. Usando o estudo de Townley et al. (2015) e aplicando no espectro de massa (FIGURA 19) é possível supor que a substância 1BDG1 tenha o ácido 3 α -ursólico.

Figura 29 - Mapa de contorno COSY 1H - 1H (300 MHz, DMSO- d_6) com ampliação do acoplamento δ_H 2,10 - δ_H 1,30 ppm



Dessa forma, através da combinação das informações obtidas pelos métodos espectroscópicos e tabela (TABELA 8 pág. 66) com os respectivos dados é possível identificar a substância 1BDG1 como ácido ursólico (FIGURA 30). As demais correlações estão representadas na tabela 9 pág. 68.

Como os dados espectroscópicos da substância 1BDG1 foram feitos em DMSO- d_6 e comparados com dados espectroscópicos em Piridina- d_5 (TABELA 8 pág. 66) se achou necessário reconfirmação espectroscópica de RMN de 1H e ^{13}C da literatura com solvente apropriado. A substância 1BDG1 foi submetido a espectroscopia de RMN de 1H e ^{13}C com Piridina- d_6 e os dados foram comparados com a literatura e tabelados (TABELA 10 pág. 69), confirmando a presença de ácido ursólico. Os espectros estão nos anexos 17-19 pág. 102-104.

Figura 30 - Estrutura do ácido ursólico

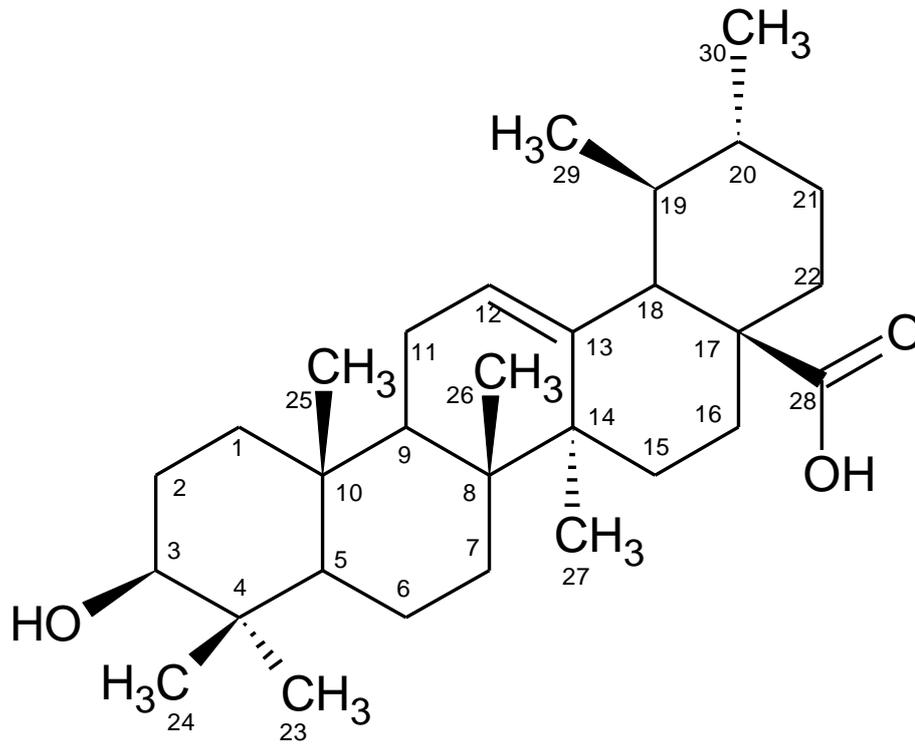


Tabela 8- Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância 1DBG1 em DMSO

Pos	Literatura ¹		1DBG1	
	^{13}C (δ) ²	δ (mult., J em Hz) ³	^{13}C (δ) ⁴	^1H δ (mult., J em Hz) ⁵
1	39,2	α 1,0 (m)	38,7	α 1,0 (m)
		β 1,58 (m)		β 1,30 (m)
2	28,2	1,81 (m)	27,4	1,45 (m)
		1,81 (m)		1,45 (m)
3	78,2	α 3,44 (dd)	77,3	β 2,99 (m)
4	39,6	-	38,8	-
5	55,9	α 0,88 (d)	55,2	α 0,91
6	18,8	α 1,58	18,5	α 1,50
		β 1,39		β 1,30
7	33,7	α 1,59	33,2	α 1,44
		β 1,39		β 1,27
8	40,1	-	39,5	-
9	48,1	α 1,65	47,5	α 1,43
10	37,5	-	37,0	-
11	23,5	1,96	23,3	1,86
		1,96		1,86
12	125,7	5,49 (s)	125,0	5,12 (sl)
13	139,3	-	138,6	-
14	42,6	-	42,1	-

15	28,8	α 1,22	28,0	α 1,0
		β 2,33 (tr)		β 1,83
16	25,0	α 2,14 (tr)	24,3	α 1,91
		β 2,01		β 1,53
17	48,1	-	47,3	-
18	53,6	β 2,63 (d)	52,8	2,10 d (<i>J</i> 11,2 Hz)
19	39,5	α 1,49	39,0	α 0,94
20	39,4	β 1,05	38,9	β 1,30
21	31,1	α 1,40	30,6	α 1,30
		β 1,49		β 1,44
		1,97		1,60
22	37,4	1,97	36,8	1,60
23	28,8	α 1,24 (s)	28,7	1,25 (s)
24	16,5	β 1,02 (s)	16,5	0,68 (s)
25	15,7	β 0,92 (s)	15,7	0,86 (s)
26	17,5	β 1,06 (s)	17,5	0,81 (s)
27	24,0	α 1,24 (s)	23,7	1,03 (s)
28	179,7	-	178,8	-
29	17,5	β 1,02 (d)	17,4	0,75 (d) (<i>J</i> 6,24)
30	21,4	α 0,97 (d)	21,5	0,92

Nota: ¹ Seebacher et al 2013; ² RMN ¹³C (150 MHz) em Piridina-*d*₅; ³ RMN de ¹H (600 MHz) Piridina-*d*₅,
⁴ RMN ¹³C (75 MHz) em DMSO-*d*₆; ⁵ RMN de ¹H (300 MHz) DMSO-*d*₆

Tabela 9- Dados espectrais de RMN 1D e 2D da substância 1DBG1 ^1H 300/ ^{13}C 75 MHz; ppm; DMSO- d_6

C	Unidimensionais		Bidimensionais	
	^{13}C (δ_{C})/DEPT	^1H (δ_{H})/HSQC	HMBC (δ_{H})	COSY (δ_{H})
C-1	38,7 (CH ₂)	0,91; 1,30 (<i>m</i>)	0,86	
C-2	27,4 (CH ₂)	1,45 (<i>m</i>)	-	
C-3	77,3 (CH)	2,99 (<i>m</i>)	0,90; 0,67	1,45
C-4	38,8 (C)	-	0,67; 0,90	-
C-5	55,2 (CH)	0,67(<i>m</i>)	0,86; 0,68; 0,90	1,30
C-6	18,5 (CH ₂)	1,46; 1,30(<i>m</i>)	-	
C-7	33,2 (CH ₂)	1,42; 1,27(<i>m</i>)	0,75	
C-8	39,5 (C)	-	1,03; 0,75	-
C-9	47,5 (CH)	1,46(<i>m</i>)	5,12; 0,86; 0,75	1,84
C-10	37,0 (C)	-	0,86; 1,46	-
C-11	23,3 (CH ₂)	1,84 (<i>m</i>)	5,12	
C-12	125,0 (CH)	5,12 (<i>sl</i>)	2,10	1,84
C-13	138,6 (C)	-	2,10; 1,03	-
C-14	42,1 (C)	-	5,12; 2,10; 1,03	-
C-15	28,0 (CH ₂)	1,0; 1,83(<i>m</i>)	1,03	1,53
C-16	24,3 (CH)	1,91; 1,53 (<i>m</i>)	2,10	
C-17	47,3 (C)	-	2,10	-
C-18	52,8 (CH)	2,10 (<i>d</i> , $J = 11,2$ Hz)	0,81; 5,12	1,30
C-19	39,0(CH)	1,30 (<i>m</i>)	-	
C-20	38,9 (CH)	0,94 (<i>m</i>)	2,10; 0,81	0,75
C-21	30,6 (CH ₂)	1,42; 1,27	0,92	1,26
C-22	36,8 (CH ₂)	1,53 (<i>m</i>)	1,42	
C-23	28,7 (CH ₃)	0,90 (<i>s</i>)	3,0; 0,68	-
C-24	16,5 (CH ₃)	0,68 (<i>s</i>)	3,0; 0,90	-
C-25	15,7(CH ₃)	0,86 (<i>s</i>)	0,67	-
C-26	17,5 (CH ₃)	0,75 (<i>s</i>)	-	-
C-27	23,7 (CH ₃)	1,03 (<i>s</i>)	-	-
C-28	178,8 (CH ₃)	-	2,10	-
C-29	17,4 (CH ₃)	0,81 (<i>d</i> , $J = 6,24$ Hz)	0,94	-
C-30	21,4 (C)	0,94 (<i>m</i>)	-	-

Tabela 10-Dados de RMN de ^{13}C e ^1H da 1DBG1 em Piridina- d_5

Pos	Literatura ¹		1DBG1	
	^{13}C (δ) ²	δ (mult., J em Hz) ³	^{13}C (δ) ⁴	^1H δ (mult., J em Hz) ⁵
1	39,2	α 1,0 (m)	39,1	α 1,4 (m)
		β 1,58 (m)		β 2,01 (m)
2	28,2	1,81 (m)	28,1	1,83 (m)
		1,81 (m)		1,83 (m)
3	78,2	α 3,44 (dd)	78,1	3,48 (m)
4	39,6	-	39,4	-
5	55,9	α 0,88 (d)	55,8	α 0,90 (m)
6	18,8	α 1,58	18,8	α 1,62 (m)
		β 1,39		β 1,45 (m)
7	33,7	α 1,59	33,6	α 2,01 (m)
		β 1,39		β 1,74 (m)
8	40,1	-	40,0	-
9	48,1	α 1,65	48,0	α 1,67 (m)
10	37,5	-	37,3	-
11	23,5	1,96	23,6	1,96 (m)
		1,96		1,96 (m)
12	125,7	5,49 (s)	125,7	5,51 t(J 3,41 Hz)
13	139,3	-	139,3	-
14	42,6	-	42,5	-

15	28,8	α 1,22	28,7	α 1,20 (m)
		β 2,33 (tr)		β 2,30 (m)
16	25,0	α 2,14 (tr)	24,9	α 2,13 ddd (J 13, 10 e 3 Hz)
		β 2,01		β 2,01 (m)
17	48,1	-	---	----
18	53,6	β 2,63 (d)	53,5	2,65 s (J 11,0 Hz)
19	39,5	α 1,49	39,5	α 1,50 (m)
20	39,4	β 1,05	39,4	β 0,97 (m)
		α 1,40		α 1,43 (m)
21	31,1	β 1,49	31,1	β 1,50 (m)
		1,97		1,96 (m)
22	37,4	1,97	37,4	1,96 (m)
23	28,8	α 1,24 (s)	28,8	α 1,25 (s)
24	16,5	β 1,02 (s)	16,6	β 1,02 (s)
25	15,7	β 0,92 (s)	15,7	β 0,93 (s)
26	17,5	β 1,06 (s)	17,5	1,06 (m)
27	24,0	α 1,24 (s)	23,9	1,27 (m)
28	179,7	-	179,9	-
29	17,5	β 1,02 (d)	17,5	β 1,03 (m)
30	21,4	α 0,97 (d)	21,4	α 0,95 (m)

¹ Seebacher et al 2013. ² RMN ¹³C (150 MHz) em Piridina-*d*₅ ³ RMN de ¹H (600 MHz) Piridina-*d*₅, ⁴ RMN ¹³C (75 MHz) em Piridina-*d*₅ ⁵ RMN de ¹H (300 MHz) Piridina-*d*₅

Cabe ressaltar que na literatura não foram encontrados dados referentes à composição química das folhas da espécie de *Himatanthus sucuuba*, sendo assim nosso trabalho com os resultados da composição química das folhas dessa espécie são inéditas. O ácido ursólico é um triterpeno que está presente em várias partes das plantas como folha, casca, raízes e frutos (HUANG et al., 2009).

Na espécie *H. sucuuba* foi encontrado nas raízes sendo isolada apenas a mistura de ácido ursólico e ácido oleanólico, sendo assim diversos autores relatam a dificuldade de separação dessas substâncias (Suksamrarn et al., 2003; Oliveira, 2013), em nosso trabalho foi possível isolar a substância pura contendo o ácido ursólico e também conseguimos isolar a mistura simples de triperpenos.

5.4.2 Resultado do teste antiplasmódica *in vitro* da substância Ácido Ursólico

Para o teste de CI_{50} , todas as amostras foram testadas em duplicatas com sete diluições cada (100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,12, 1,56 $\mu\text{g/ml}$). Para uma maior confiabilidade dos testes foram realizados dois testes com as amostras em dias diferentes.

Além do ácido ursólico foi testada também a mistura de triterpenos, como também foi testado padrão de ácido oleanólico adquirido comercialmente. Os resultados representados na tabela 10 demonstram que a substância de ácido ursólico (CI_{50} 3,87 $\mu\text{g/mL}$) e o ácido oleanólico (CI_{50} 2,09 $\mu\text{g/mL}$) apresentou atividade promissora contra o *P. falciparum* assim como a mistura (CI_{50} 2,14 $\mu\text{g/mL}$).

Tabela 11- CI_{50} das substâncias da espécie *Himatanthus sucuuba*

Código das Frações	CI_{50}			Classificação da atividade
	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	CI_{50} ($\mu\text{M/mL}$)	IC	
Ácido ursólico	3,87	8,47	2,55 a 5,85	A
Ac. ursólico + Ac. Oleanólico	2,09	-	1,53 a 2,88	A
Padrão ácido oleanólico	2,14	4,68	1,46 a 3,14	A

Nota: μg (microgramas); μM (micromolar); IC (Intervalo de confiança); A (ativa).

Os dados obtidos nesse trabalho divergem dos resultados encontrados para o ácido ursólico e ácido oleanólico por Suksamrarn et al. (2003), onde os autores observaram que os ácidos separados não apresentaram atividade contra o *P. falciparum* (cepas K1,

multirresistente) CI_{50} 20,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Os resultados encontrados por Simelane et al. (2013) estão de acordo com os resultados encontrados nesse trabalho, os autores observaram que o ácido ursólico apresentou atividade satisfatória contra o *P. falciparum* (cepas D10 sensível a cloroquina) CI_{50} 6,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Os mesmo autores tão observaram que quando modificaram a substância ácido ursólico em para ácido 3 β - acetilursólico aumentou a atividade, o que causou a redução da parasitemia em 94,01 % contra *P. berghei*.

Já para o ácido oleanólico os resultados obtidos por Baren et al. (2006) se assemelham com os resultados encontrados nesse trabalho, os pesquisadores realizaram testes com cepas K1 resistente a cloroquina e 3D7 e obtiveram o CI_{50} 9,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$, demonstrando que a substância possui atividade contra o *P. falciparum*. Fadipe et al. (2020) obtiveram resultados divergentes uma vez que o ácido oleanólico não apresentou atividade contra o *P. falciparum* (cepas D10 resistente a cloroquina) CI_{50} 27,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Na literatura há relatos de várias atividades do ácido ursólico como: atividade larvicida contra *Ae. aegypti*, atividade anticâncer, além de atividade antimicrobiana contra *Aeromonas cavae*, *Bacillus cereus*, *B. sphaericus*, *B. subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. syringae*, *Ralstonia solanacearum*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermis*, Destacamos ainda a atividade frente a protozoários patogênicos como *Trypanosoma cruzi*, *T. brucei*, *Leishmania infantum*, *L. major*, *L. amazonensis* e *P. falciparum* (WOZNIAK et al., 2015; SILVA et al., 2016; CARGNIN e GNOATTO, 2016).

O ácido ursólico e o ácido oleanólico tem demonstrado cerca de 120 tipos de atividades biológicas, a maioria com efeitos hepatoprotetores, antiinflamatório e antimicobacterianos, mesmo com seu alto potencial terapêutico, na literatura não há muitas informações sobre sua toxicidade (GARRIDO et al., 2012).

Em estudos realizados por Garrido et al. (2012) avaliando a toxidade aguda e subaguda em camundongos tratados com a mistura de ácido ursólico e ácido oleanólico com doses de 6,5 e 13 mg/kg, os autores observaram que durante a administração das doses não houve morte ou alterações no crescimento dos animais, nos estudos químicos sanguíneos também não demonstraram alterações, sendo assim a mistura dos ácidos podem ser administradas de forma segura por via subcutânea.

6 CONCLUSÃO

Dos oitos extratos da casca avaliados da espécie *E. uchi* nenhum apresentou atividade contra o *P. falciparum*.

Os extratos avaliados da espécie *H. sucuuba* apresentaram uma boa atividade, onde o extrato acetato de etila, acetona e clorofórmio ambos das folhas apresentou atividade antiplasmódica promissora.

Do extrato de acetato de etila das folhas foi isolada a substância do ácido ursólico, e uma mistura de triterpenos.

O presente trabalho levou a identificação de uma substância ativa, extraída das folhas da espécie *H. sucuuba*. Além de contribuição da composição química das folhas dessa espécie sendo inédita para a literatura.

7 REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, T.S.O.; ALMEIDA, T.S.O.; RAMALHO, S.N.L. Delineamento das doenças tropicais negligenciadas no Brasil e o seu impacto social. **Inter Scientia**, v. 5, n. 1, 2017.
- ALECRIM, M.D.G.C.; ALECRIM, W.; MACEDO, V. *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine (R2) and mefloquine (R3) in Brazilian Amazon region. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, n. 1, p. 67-68, 1999.
- ANDRADE-NETO, V, F.; POHLIT, A.M.; PINTO, A.C.; SILVA, E.C.C.; NOGUEIRA, K.L et al. In vitro inhibition of *Plasmodium falciparum* by substances isolated from Amazonian antimalarial plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 3, p. 359-366, 2007.
- ACHAN, J.; TALISUNA, A.O.; ERHART, A.; YEKA, A.; TIBENDERANA, J.K; et al. Quinine, an old anti-malarial drug in a modern world: role in the treatment of malaria. **Malaria Journal**, v. 10, p. 144, 2011.
- AHMED, S. A.; GOGAL, R. M.; WALSH, J. E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes an alternative to thymidine incorporation assay. **Journal of Immunological Methods**, v. 170, n. 2, p. 211-224, 1994.
- BARCELOS, C.; MONTEIRO, A.M.V.; CORVALÁN, C.; GURDEL, H.C; CARVALHO, S; ARTAXO, P.; HACON, S.; RAGONI, V. Mudanças climáticas e ambientais e as doenças infecciosas: cenário e incertezas para o Brasil. **Epidemiologia e Serviço de Saúde**, v. 18, n.3, p. 285-304, 2009.
- BAREN, V.C.; ANAO, I.; DI LIRA, L.P.; DEBENETTI, S.; HOUGHTON, P.; CROFT, S.; MARTINO, V. Triterpenic acids and flavonoids from *Satureja parvifolia*. Evaluation os their antiprotzoal activity. **Zeitschrift fur Naturforschung**, v. 61, n. 3-4, p. 189-192, 2006.
- BATISTA, J. C.; SANTINI, S. M. O.; SCHUQUEL, I. T. A.; ARRUDA, L. L. M.; BERSANI-AMADO, C. A.; et al. Constituintes químicos e avaliação das atividades antioxidante e anti-inflamatória das raízes de *Sabicea brasiliensis* Wernh (Rubiaceae). **Química Nova**, v. 37, n. 4, p. S1-S15, 2014.
- BRAGA, E.M. *Plasmodium* – Malária. In: NEVES, D.P. **Parasitologia Humana**. 11. ed. São Paulo: Editora Atheneu, p. 143, 2005.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de diagnóstico laboratorial da malária / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília: Ministério da Saúde. 2005.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de vigilância epidemiológica / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. 7. ed. Brasília: Ministério da Saúde. 2009.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia prático de tratamento da malária no Brasil / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília: Ministério da Saúde. 2015

BRASIL. Portal da Saúde. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/noticias/agencia-%20sa%C3%BAde/45391-Brasil-reduz-em-38-casos-de-malaria-em%20relacao-a-2018>. Acesso em 15 de Agosto de 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Boletim epidemiológica / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. v. 50. Brasília: Ministério da Saúde. 2019.

CAPANNA, E. Grassi versus Ross: who solved the riddle of malaria? **International Microbiology**, p. 69-74, 2006.

CARGNIN, S.T.; GNOATTO, S.B. Ursolic acid from apple pomace and traditional plants: a valuable triterpenoid with functional properties. **Food Chemistry**, v. 220, p. 477-489, 2017.

CASTILHO, C.; HERNANDEZ, J.; LOPEZ A.M.; MIRANDA, M.; BENEDITO, J.L. values os plasma lipid hydroperoxides and total antioxidante status in healthy dairy cows:preliminar observations. **Archiv fur Tierzucht**, n. 46, p. 227-233, 2003.

CHEHUAN, Y.F., COSTA, M.R., COSTA, J.S., ALECRIM, A.G.C et al. *In vitro* chloroquine resistance for *Plasmodium vivax* isolates from the Western Brazilian Amazon, **Malaria Journal**, v. 3, p. 12–226. 2013.

COSTA, G.L. Variação de números de cópias de genes relacionados à resistência aos antimaláricos em isolados de *Plasmodium* spp. do Brasil. 2017. 63p. Programa de Pós-Graduação em Ciência da Saúde (Dissertação de Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisa René Rachou, Belo Horizonte.

COSTA, B.J.S. Atividade antimicrobiana de extratos de *Himatanthus articulatus* (Vahl) Wood. (sucuba). 2006. 77p. Programa de Pós-Graduação em Recursos naturais (Dissertação de Mestrado) – Universidade Federal de Roraima, Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Boa Vista.

COUTO, B.W.; SILVA, R.A.; FILIZOLA, N. Variabilidade dos casos de malária e sua relação com a precipitação e nível d'água dos rios no Estado do Amazonas, Brasil. **Cadernos de saúde pública**, v. 35, n. 2, 2019.

DI STASI, L.C.; HIRUMA-LIMA, A.C. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**, 2. ed. UNESP, São Paulo, 2002, p. 375-92.

ENDO, A.; KWASHIMA, Y.; NEGISHI, H.; HIGO, Y.; OYAMA, T., TSUCHIKO, I. Two lineages of mannose-binding lectin-associated serine protease (MASP) in vertebrates. **Journal Immunology**, 1998.

FADIPE, V.O.; OPAKU, A.R.; SINGH, M.; PEREIRA, A.R.; RIJO, P.; MONGALO, N.I. Antimycobacterial, antiplasmodial studies and cytotoxicity of oleanólico acid and its derivative from *Syzygium aromaticum*(Myrtaceae). **Biopharmaceutical Sciences**, v. 17, n. 2, p. 1-12, 2020.

FRANÇA, O.O; BROWN, R.T; SANTOS, C.A.M. Uleine and demethoxyaspiospermine from the bark of *Plumeria lancifolia*. **Elsevier**, v. 71, p. 208-210, 2000.

GARRIDO, C. J.; CEVALLOS, C.; ALBERTO,G.; SILICIANO, G. L.; PANDO, H. R.; ARELLANES, J.; ADELINA, M. Acute and subacute toxicity (28 days) of a mixture of ursolic acid and oleanolic acid obtained from *Bouvardia ternifolia* in mice / Toxicidad aguda y subaguda (28 días) en ratones, de la mezcla de ácido ursólico y ácido oleanólico obtenida de *Bouvardia ternifolia*. **Boletín latino-americano y del Caribe de plantas medicinales y aromáticas**, v. 11, n. 1, p. 91-102, 2012.

GOMES, A.P.; VITORINM, R.R.; COSTA, A.P.; MENDOÇA, E.G.; OLIVEIRA, M.G.A.; SIQUEIRA-BATISTA, R. Malária grave por *Plasmodium falciparum*. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 23, n. 3, p. 358-369, 2011.

GOEL, R. K.; MAITI, R. N.; MANICKAM, M.; RAY, A. B. Antiulcer activity of naturally occurring pyrano-coumarin and isocoumarins and their effect on prostanoid synthesis using human colonic mucosa. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 35, n. 10, p. 1080-1083, 1997.

GNOTOO, S.C.B.; DASSONVILLE-KLIMPT, A.; NASCIMENTO, S.D.; GALERA, P.; BOUMEDIENE, K.; GOSMANN, G.; SONNET, P., MOSLEMO, S. Evaluation of ursolic acid isolated from *Ilex paraguariensis* and derivatives on aromatase inhibition. **European Journal of Medicinal Chemistry**, n. 43, p. 1865-1877, 2008.

HARINASUTA,T.; SUNTHARASAMAI, P.; VIRAVAN, C. Chloroquine-resistant *falciparum* malaria in Thailand. **Cab Direct**, p. 657-660, 1965.

HERZNER, H.; PALMACCI, E. R.; SEEBERGER, P. H. Short total synthesis of 8,10-di-o-methylbergenin. **Organic Letters**, v. 17, p. 2965-2967, 2002.

HERRERA, F.; MANCHESTER, S. R.; JARAMILLO, C.; MACFADDEN, B.; SILVA-CAMINHA, S. A. Phylogeographic history and phylogeny of the Humiriaceae. **International Journal of Plant Sciences**, v. 171. n. 4, p. 392–408, 2010.

HUANG, L.; CHEN, T.; YE, Z.; CHEN, G. Use of liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization-ion trap mass spectrometry for identification of oleanolic acid and ursolic acid in *Anoectochilus roxburghii* (wall.) Lindl. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 42, p. 910-917, 2007.

HUANG, S.; NIKOLIC, D.; PENDLAND, S.; DOYLE, B. J.; LOCKLEAR, T. D.; MAHADY, G.B. Effects of cranberry extracts and ursólico acid derivatives on P- fimbriated *Escherichia coli*, COX-2 activity, pro-inflammatory cytokine release and the NF-κB transcriptional response *in vitro*. **Pharmaceutical Biology**, v. 47, n. 1, p. 18-25, 2009.

HYACIENTH, B.M.S.; ORTIZ, B.S.; PEREIRA, A.C.M.; HYACIENTH, D.C.S. et al. *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec, a medicinal plant with Potential anti-inflammatory activity: A review of its phytochemistry and biological activities. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 13, n. 7, p. 76-83, 2019.

JIMÉNEZ, G.; HASEGAWA, M.; RODRIGUEZ, M.; ESTRADA, O.; MÉNDEZ, J. **Química nova**, v. 25, n. 3, p. 449- 554, 2002.

KRETTI, A.U.; ADEBAYO, J.O.; KRETTI, L.G. Testing os natural products and synthetic molecules aiming at new antimalarials. **Current Drug Targets**, v. 10, n. 3, p. 261-270, 2009.

LAGOS, I. A. Estudo químico de fito constituintes isolados de *Sacoglottis uchi* Huber (Humiriaceae). Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Federal do Amazonas, 2006.

LAMBROS, C.; VANDERBERG, J. P. Synchronization of *Plasmodium falciparum* Erythrocytic Stages in Culture. **The Journal Of Parasitology**, v. 65, n. 3, p. 418-420, 1979.

LAPOUBLE, O.M.M. ; SANTELLI, A.C.F.S. ; MUNIZ-JUNQUEIRA, M.I. Situação epidemiológica da malária na região amazônica brasileira, 2003 a 2012. **Revista Panam Salud Publica**, v. 38, n. 4, p. 300-6, 2015.

LEITE, F. H. A.; FONSECA, A.L.; NUNES, R.R. et al. Malária: dos velhos fármacos aos novos alvos moleculares. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, Londrina, v. 2, n. 4, p. 59-76, 2013.

LIMA, S.C.; GUIMARÃES, R.B. Determinação social no complexo tecno-patogênico informacional da malária. **Hygeia, Revista Brasileira de geografia Médica e da Saúde**, v. 3, n. 5, p. 58-77, 2007.

LOPES, V.E. Composição química e avaliação da atividade antimalárica de cipó-tuíra *Bonamia ferruginea* (Choisy) Hallier. 2015.135p. Programa de Pós-Graduação em Química. (Dissertação de Mestrado) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 2. ed. Nova Odessa, SP: Editora Plantarum, 1998.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. Plantas medicinais Brasil: nativos e exóticas cultivadas. Instituto Plantum, São Paulo, 2002.

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

LORENZI, H.; BACHER, L. B.; LARCEDA, M. T. C. DE; SARTORI, S. F. **Frutas Brasileiras e Exóticas Cultivadas (de consumo in natura)**. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, p. 149, 2006.

LOOAREESUWAN, S., VIRAVAN, C., VANIJANONTA, S., WILAIRATANA, P., SUNTHARASAMAI, P., CHAROENLARP, P., ARNOLD, K., KYLE, D., WEBSTER, K., CANFIELD, C. Randomised trial of artesunate and mefloquine alone and in sequence for acute uncomplicated *falciparum* malaria. **The Lancet**, v. 339, p. 821-824, 1992.

LUNA, J.S. Estudo dos constituintes químicos de *Endopleura uchi* (Humiriaceae). 2000. Programa de Pós-Graduação Química e Biotecnologia, (Dissertação de Mestrado) - Universidade Federal de Alagoas.

MACHADO, P.S. Caracterização do uxi (*Endopleura Uchi*) em três estádios de desenvolvimento. 2015. 97p. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos (Dissertação de Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais.

MACIEL, G.B.M.; MISSAWA, N.A. Descrição da fauna anofélica em áreas endêmicas de malária no município de Colniza, Estado de Mato Grosso, Brasil. **Epidemiologia e Serviço de Saúde**, v. 21, n. 1, p. 141-148, 2012.

MAGALHÃES, L.A.M.; LIMA, M.P.; MARINHO, H.A; FERREIRA, A.G. Identificação de berginina e carotenoides no fruto de uchi (*Endopleura uchi*, Humiriaceae). **Acta Amazônica** v. 37, n. 3, p. 447-450, 2007.

MELO, C.R.; LIRA, A.B.; ALVES, M.F.; BEZERRA, C.M.; LIMA, L. O uso de plantas medicinais para doenças parasitárias. **Acta Brasiliensis**, n. 1, v. 1, p. 28-32, 2017.

MESQUITA, M.L.; DESRIVOT, J.; BORIES, C.; FOURNET, A.; PAULA, J.E.; GRELLIER, P.; ESPINOLA, L.S. Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian cerrado plants. **Memorial do Instituto Oswaldo Cruz**, n. 100, p. 783-787, 2005.

MILLER, L.H.; ACKERMAN, H.C.; SU, X.Z.; WELLEMS, T.E. Malaria biology and disease pathogenesis: insights for new treatments. **Nature Medicine**, v. 19, n. 2, p. 156-67, 2013.

MINISTERIO DA SAÚDE. Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica. Mapa de risco da malária por município de infecção, Brasil, 2019. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/julho/31/Mapa-de-risco-da-mal-ria-por-munic-pio-de-infec---o-Brasil-2019-.pdf>. Dados preliminares, sujeitos à alteração. Acesso em 25 de maio 2020.

MIRANDA, A.L.; SILVA, J.R.; REZENDE, C.M.; NEVES, J.S.; et al. Anti-inflammatory and analgesic activities of the latex containing triterpenes from *Himatanthus sucuuba*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 66, p. 284-286, 2000.

MORALES, J. F. Estudos em Ias Apocynaceae Neotropicales XIX: La familia Apocynaceae S. Str. (Apocynoideae, Rauvolfioideae) de Costa Rica. **Darwiniana**, v. 43 n. 1-4, p. 90-191, 2005.

MOURA, M.D.B.; AGRA, M.F. Apocynaceae tóxicas e medicinais ocorrentes nos estados de Pernambuco e Paraíba. **Acta Botanica Brasileira**, v. 3, n. 2, p. 7. 1989.

MUNIZ, M.P. Estudo fitoquímico e da atividade biológica de *Endopleura uchi* Huber Cuatrecasas. 2013. 129p. Programa de Pós-Graduação em Química (Dissertação de Mestrado) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

NEVES, D.P.; MELO, A.L.; LINARDI, P.M.; VITOR, R.W.A **Parasitologia humana**. 13^a. Ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2016.

NEIVA, A. Formação de raça do hematozoário do impaludismo resistente à quinina. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 2, n. 1, p. 1-10, 1910.

NORONHA, E.; ALECRIM, M.G.; ROMERO, G. A.; MACÊDO, V. RIII mefloquine resistance in children with *falciparum* malaria in Manaus, AM, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n. 2, p. 201-205, 2000.

OLIVEIRA, D.R.; KRETTLI, A.U.; AGUIAR, A.C.C; LEITÃO, G.G.; VIEIRA, M.N.; MARTINS, K.S.; LEITÃO, S.G. Ethnopharmacological evaluation of medicinal plants used against malaria by quilombola communities from Oriximiná, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 173, p. 424-434, 2015.

OLIVEIRA, A.A. Análise fitoquímico dos extratos e frações obtidos de *Himatanthus sucuuba*. 2013. 93f. Programa de Pós-Graduação em Química (Dissertação de Mestrado)- Universidade Federal do Amazonas.

OLIVEIRA, P. L. DE. Contribuição ao estudo de espécies da família Rubiaceae: gênero Amaioua. 2014. 274f. Tese (Doutorado)- Universidade Federal de Goiás. Goiânia. 2014.

OLIVEIRA, G.R.B.; SIMÃO, A.A.; PEREIRA, L.L.S.; ROCHA, F.D.R.; RAPOSO, N.R.B.; OLIVEIRA, V.R.; PEREIRA, T.V.; CARMO, H.P.; OLIVEIRA, T.C. Stem bark extracts of *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec: Inhibition of pancreatic lipase and antioxidant activity. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 11, n. 30, p. 472-479, 2017.

OLWE, O.A.; AWA, A.O.; MAKANJUALA, O.B.; OLOWE, R.A. Malaria in Africa and the Historical Perspective: The Journey so Far. **Journal of Biology and Medical Sciences**. v. 33, p. 34, 2015.

OPAS: Organização Pan-Americana de Saúde. 2020: Organização Mundial da Saúde; 2020. (< https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_joomlabook&view=topic&id=33) Acesso em: 20 de maio de 2020.

PALERMO-NETO, J.; ALMEIDA, R.T. Antimicrobianos como aditivos em animais de produção. **Farmacologia veterinária**. Rio de Janeiro, 2002.

PEREIRA, R.J.; CARDOSO, M.G. Metabólitos vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, n. 4, p.146-152, 2012.

PIACENTE, S.; PIZZA, C.; DE TOMAZZI, N.; MAHMOOD, N. Constituents of *Ardisia japonica* and their *in vitro* anti-HIV activity. **Journal of Natural Products**, v. 59, n. 6, p. 565-569, 1996.

POLITI, F.A.S. Estudos farmacognósticos e avaliação de atividades biológicas de extratos obtidos das cascas pulverizadas de *Endopleura uchi* (Huber) Huatrec. (humiriaceae). 2009. 144p. Programa de Pós-Graduação em Ciência Farmacêutica (Dissertação de Mestrado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, São Paulo.

PRICE, R.N., DOUGLAS, N.M., ANSTEY, N.M. New developments in *Plasmodium vivax* malaria: severe disease and the rise of chloroquine resistance. **Current Opinion Infectious Diseases**, v. 22, p. 430–435. 2009.

REBOUÇAS, S. de O.; SILVA, J. da; GROFF, A. A.; NUNES, E. A.; IANISTCKI, M.; FERRAZ, A. de B. F. The antigenotoxic activity of latex from *Himatanthus articulatus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, n. 22, v. 2, p. 389-396, 2012.

REINERS, A.A.O.; RICCI, H.A.; AZEVADO, R.C.S. Uso de plantas medicinais para tratar a malária. **Cogitare Enfermagem**. v. 15, 2010.

RIECKMANN, K.H.; CAMPBELL, G.H.; SAX, L.J.; EMA, J.E. Drug sensitivity of *Plasmodium falciparum*. **The Lancet**, v. 311, n. 8054, p. 23, 1978.

RODRIGUES, E.; DUARTE-ALMEIDA, J.M.; PIRES, J.M. Perfil farmacológico e fitoquímico de plantas indicadas pelos caboclos do Parque Nacional do Jaú 9 AM) como potencial analgésico. Parte I. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 6, p. 981-991, 2010.

ROLIM, C.S.S; OLIVEIRA, R.T; ROLIM, L.N; BONATO, E.C.S; SARAIVA, M.G.G; OLIVEIRA, R.P.M. Análise da composição centesimal, físico-químico e mineral da polpa e casca do fruto de *Endopleura uchi*. **Brazilian Journal Development**, v. 6, n. 3, p.16368-16383, 2020.

SEVERINI, C.; MENEGON, M. Resistance to antimalarial drugs: an endless world war against *Plasmodium* that we risk losing. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 2, n. 2, p. 58-63, 2015.

SEEBACHER, W.; SIMIC, N.; WEIS, R.; SAF, R.; KUNERT, O. Spectral assignments and reference data. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 41, p. 636-638, 2003.

SIQUEIRA, A.; MARCHESINI, P.; TORRES, R.M.; RODAVALHO, S; CHAVES, T. **Malária na atenção básica**, Belo Horizonte: NESCON, 2018, 178p.

SILVA, J. R. A.; AMARAL, A. C. F.; SIANI, A. C.; REZENDE, C. M.; FELCMAN, J.; PINTO, A. C. Contribution to the study of *Himatanthus sucuuba*: latex macromolecule, microelements and carbohydrates. **Acta Amazônica**, v. 33, n. 1, p. 105- 110, 2003.

SILVA, S.L.; OLIVEIRA, V.G.; YANO, T.; NUNOMURA, R.C.S. Antimicrobial activity of bergenin from *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec. **Acta Amazônica**, v. 39, n. 1, p. 187-192, 2009.

SILVA, G.N.S. et al. Larvicidal activity of natural and modified triterpenoids against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Society of Chemical Industry**, v. 72, p. 1883-1887, 2016.

SILVA, J.R.A.; REZENDE, C.M.; PINTO, A.C.; PINHEIRO, M.L.B.; CORDEIRO, M.C.; TAMBORINI, E. Ésteres triterpênico de *Himatanthus Sucuuba* (Spruce) Woodson. **Química Nova**, v. 21, n. 6, 702-704p. 1998.

SIMELANE, M.B.C.; SHONHAI, A.; SHOPE, F.O.; SMITH, P.; SING, M.; OPOKU, A.R. Anti-Plasmodial Activity of Some Zulu Medicinal Plants and of Some Triterpenes Isolated from Them. **Molecules**, v. 18, p. 12313-12323, 2013.

SOARES, D.C.; ANDRADE, A.L.S.; DELORENZI, J.C.; SILVA, J.A.S.; FREIRE-DE-LIMA, L., FALÇÃO, C.A.B et al. Leishmanicidal activity of *Himatanthus sucuuba* latex against *Leishmania amazonensis*. **Parasitology International**, v. 59, p. 173-177, 2010.

SOARES, F.; CAVALCANTE, L.; ROMERO, N.; BANDEIRA, M. *Himatanthus* Willd. Ex Schult. (Apocynaceae): Review. **Pharmacognosy Reviews**, v. 10, n. 19, p. 1-5, 2016.

SPINA, A. P. Estudo taxonômico, micro morfológico e filogenético do gênero *Himatanthus* Willd. ex Schult. (Apocynaceae: Rauvolfioideae – Plumerieae). 2004. 197f. (Tese de Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

SU, X.; HAYTON, K.; WELLEMS, E. Genetic linkage and association analyses for trait mapping in *Plasmodium falciparum*. **Nature Reviews Genetics**, v. 8, p. 497-506, 2007.

SUKSAMRARN, A. ; TANACHATCHAIRATANA, T. ; KANOKMEDHAKUL, S. Antiplasmodial triterpenes from twigs of *Gardenia saxatilis*. **Journal Of Ethnopharmacology**, v. 88, p. 275-277, 2003.

SUWANARUSK, R.; RUSSELL, B.; CHAVCHICH, M.; et al. Chloroquine resistant *Plasmodium vivax*: in vitro characterization and association with molecular polymorphisms. **PLoS One**, v. 10, p. 1089, 2007.

TAKAHASHI, H.; KOSAKA, M.; WATANABE, Y.; NAKADE, K.; FUKUYAMA, Y. Synthesis and neuroprotective activity of bergenin derivatives with antioxidant activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.11, p.1781-1788, 2003.

TOWNLEY, C.; BRETTELL, R.C.; BOWEN, R.D.; GALLAGHER, R.T.; MARTIN, W.H.C. Application of positive mode atmospheric chemical ionisation to distinguish epimeric oleanolic and ursolic acids. **European Journal of Mass Spectrometry**, v. 21, p. 433-442, 2015.

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

TRAVASSOS, M.A. ; LAUFER, M.K. Resistance to antimalarial drugs: molecular, pharmacologic, and clinical considerations. **Pediatric Research**, v. 65, n. 5, p. 65-69, 2009.

TROPICOS. Jardim Botânico de Missouri. ><https://www.tropicos.org>> Acesso em 24 de novembro de 2020.

VILLEGAS, L.F.; FERNÁNDEZ, I.D.; MALDONADO, H.; TORRES, R; et al. Evaluation of the wound-healing activity of selected traditional medicinal plants from Perú. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 55, p.193-2000, 1997.

VEIGA, J.B.; SCUDELLER, V.V. Etnobotânica e medicina popular no tratamento de malária e males associados na comunidade ribeirinha Julião- baixo Rio Negro (Amazônia Central). **Revista Brasileira de Planta Medicinal**, v.17, n. 4, p.737-747, 2015.

VALE, V.V.; VILHENA, T.C.; TRINDADE, R.C.S.; FERREIRA, M.R.C.; PERCÁRIO, L.F.S.; PEREIRA, W.L.A. et al. Anti-malarial activity and toxicity assessment of *Himatanthus articulatus*, a plant used to treat malaria in the Brazilian Amazon. **Malatia Journal**, v.14, n. 132, p. 1-10, 2015.

WOOD, C.A.; LEE, K.; VAISBERG, A.J.; KINGSTON, D.G.I.; NETO, C.C.; HAMMOND, G.B. A bioactive spiro lactone iridoid and triterpenoids from *Himatanthus sucuuba*. **Pharmaceutical Society of Japan**, v. 49, n. 11, p.1477-1478, 2001.

WHO: World Malaria Report Geneva. 2020: World Health Organization; 2015. (<https://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report/en/>). Acesso em: 02 de janeiro de 2020.

WHO: World Malaria Report Geneva. 2012: World Health Organization; 2012. (<http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2012/report/en/index.html>). Acesso em: 02 de agosto de 2019.

WHO: World Malaria Report Geneva. 2020: World Health Organization; 2020. (<https://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report/en/>). Acesso em: 02 de janeiro de 2020.

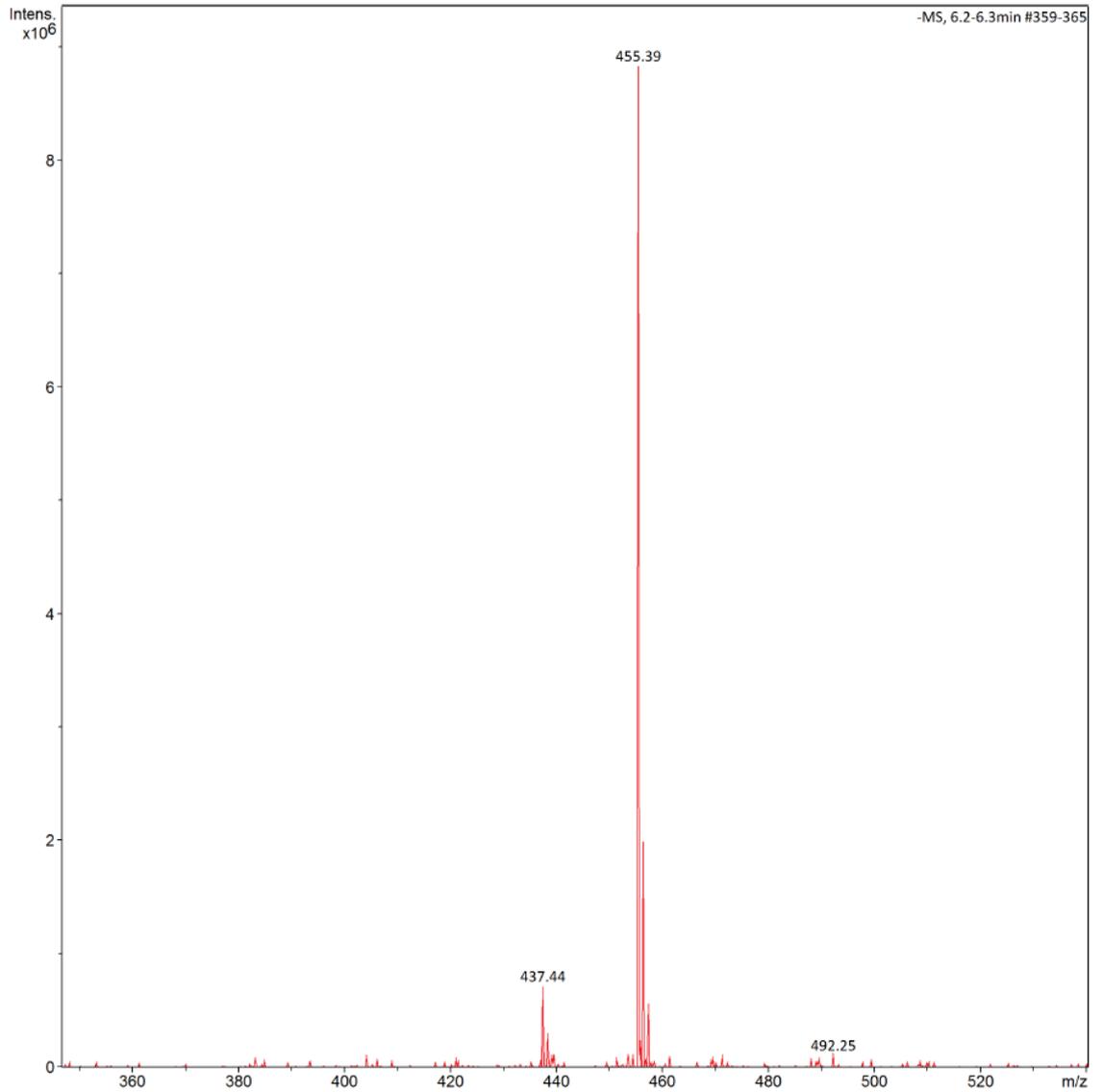
WOZNIAK, L.; SKAPSKA, S.; MARZALEK, K. Ursolic acid - a pentacyclic triterpenoid with a wide spectrum of pharmacological activities. **Molecules**, v. 20, p. 20614-20641, 2015.

ANEXOS

ANEXO 1 - Espectro de massas modo negativo da substância 1DBG1

Generic Display Report

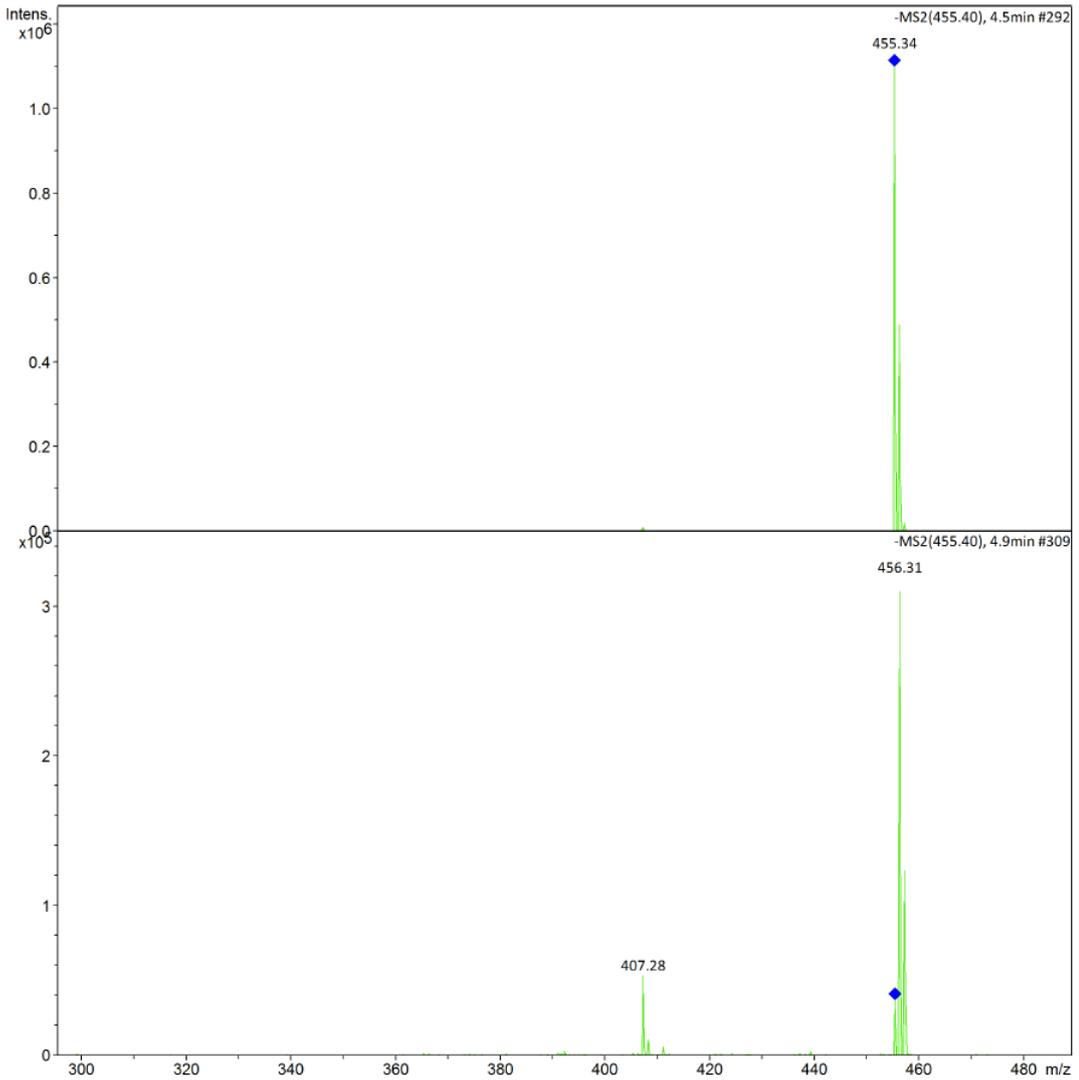
Analysis Info Acquisition Date 11/9/2020 3:29:39 PM
Analysis Name D:\Data\2020\Adrian\Alunos\Daiane\MS\09-11-2020\ID_APCI_1DBG1.d
Method 1915.m Instrument amaZon speed
Sample Name ID_APCI_1DBG1
Comment Diluição: 10uL (1,9mg/mL) em 2-ProOH + 980 uL 2-ProOH



ANEXO 2- Espectro de fragmentação do íon m/z 455,40 da substância 1DBG1

Generic Display Report

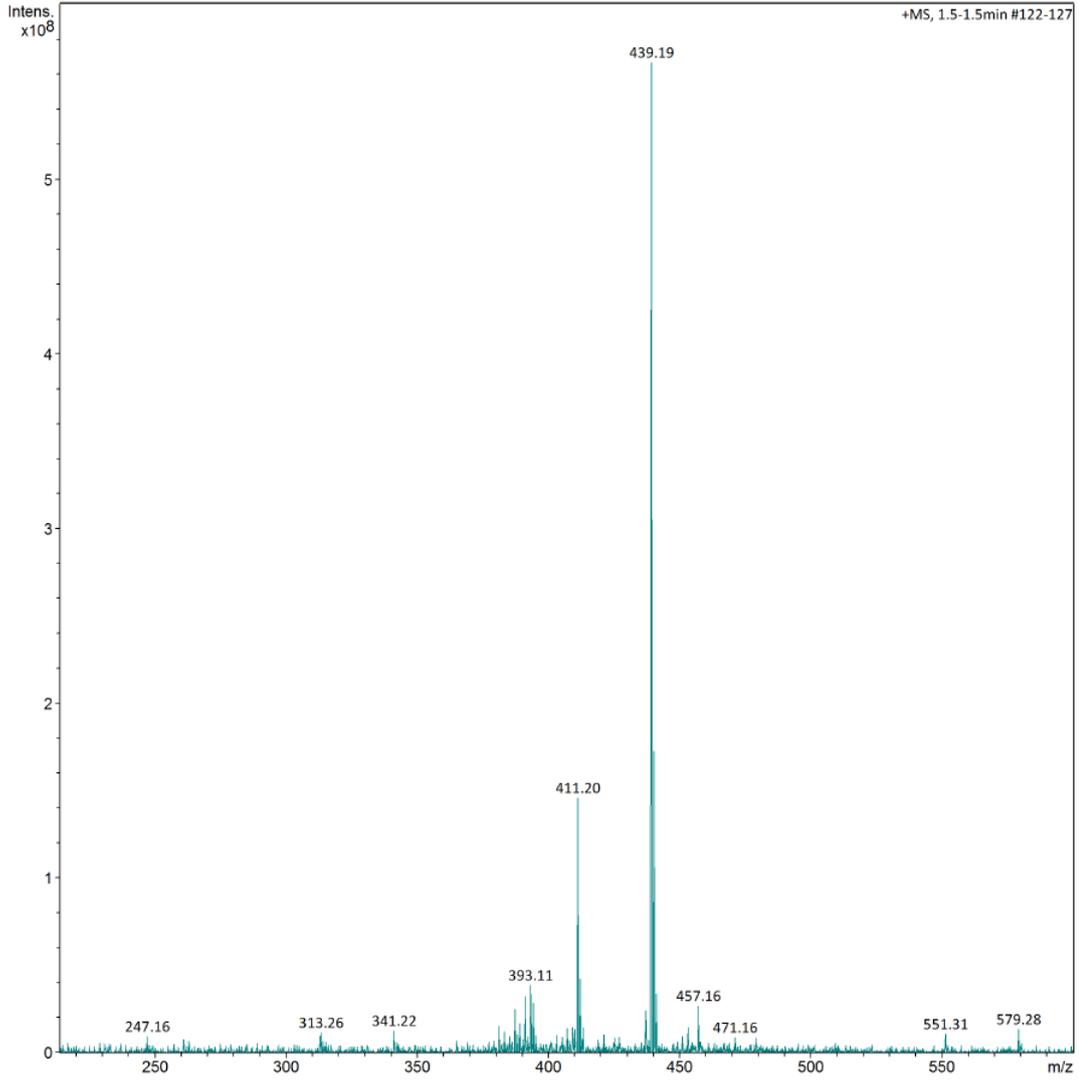
Analysis Info Acquisition Date 11/9/2020 3:29:39 PM
Analysis Name D:\Data\2020\Adrian\Alunos\Daiane\MS\09-11-2020\ID_APCI_-1DBG1.d
Method 1915.m
Sample Name ID_APCI_-1DBG1 Instrument amaZon speed
Comment Diluição: 10uL (1,9mg/mL) em 2-ProOH + 980 uL 2-ProOH



ANEXO 3- Espectro de massa modo positivo da substância 1DBG1

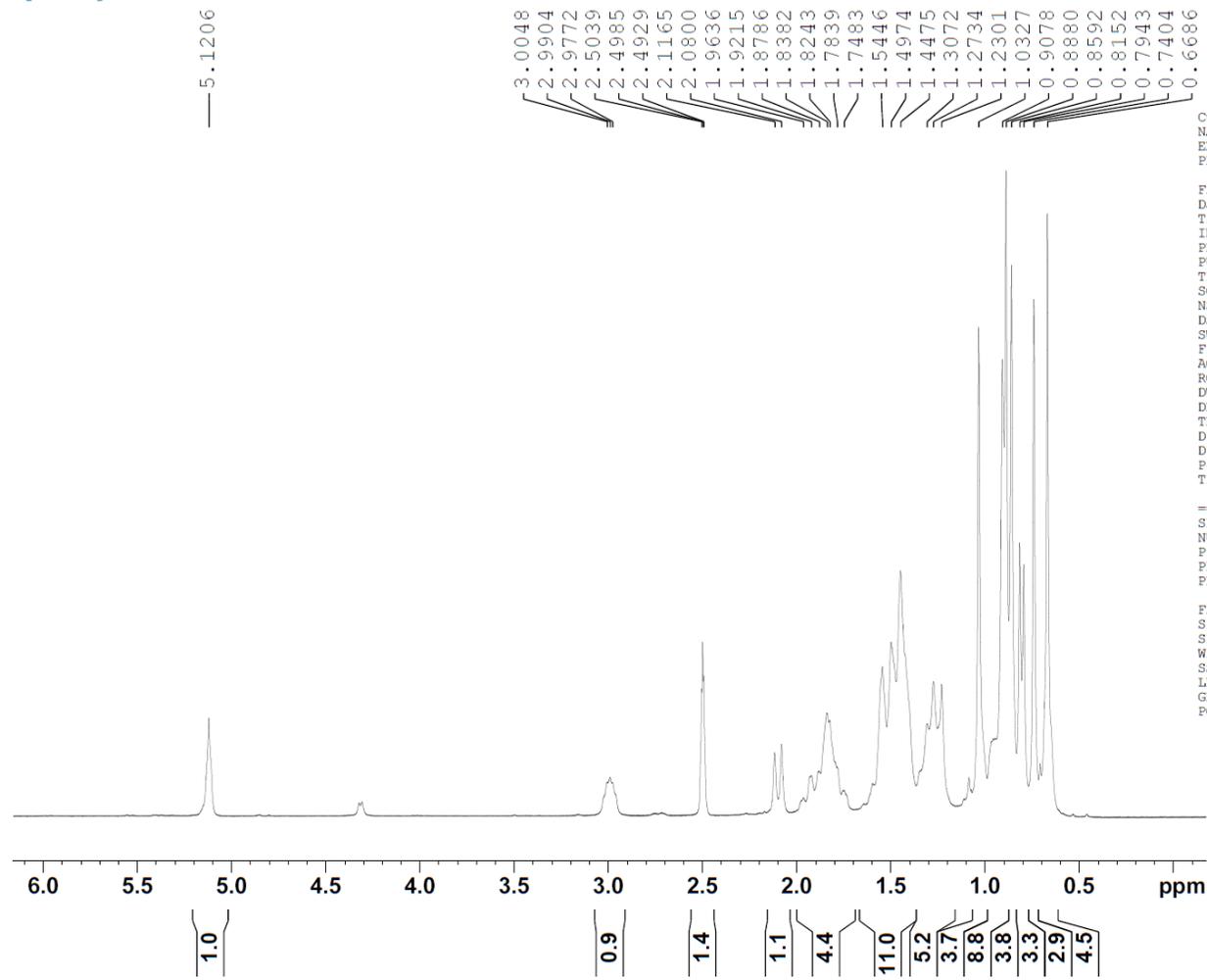
Generic Display Report

Analysis Info Acquisition Date 11/9/2020 3:26:18 PM
Analysis Name D:\Data\2020\Adrian\Alunos\Daiane\MS\09-11-2020\ID_APCI+_1DBG1_B.d
Method 1915.m
Sample Name ID_APCI+_1DBG1_B Instrument amaZon speed
Comment Diluição: 10uL (1,9mg/mL) em 2-ProOH + 980 uL 2-ProOH



ANEXO 4- Espectro de RMN de ¹H (300 MHz) da substância 1DBG1, em DMSO -d₆

Daiane20_1DBG1 (1H SUP; DMSO; 15.3 mg) 03/09/2020
Op. Magno



```

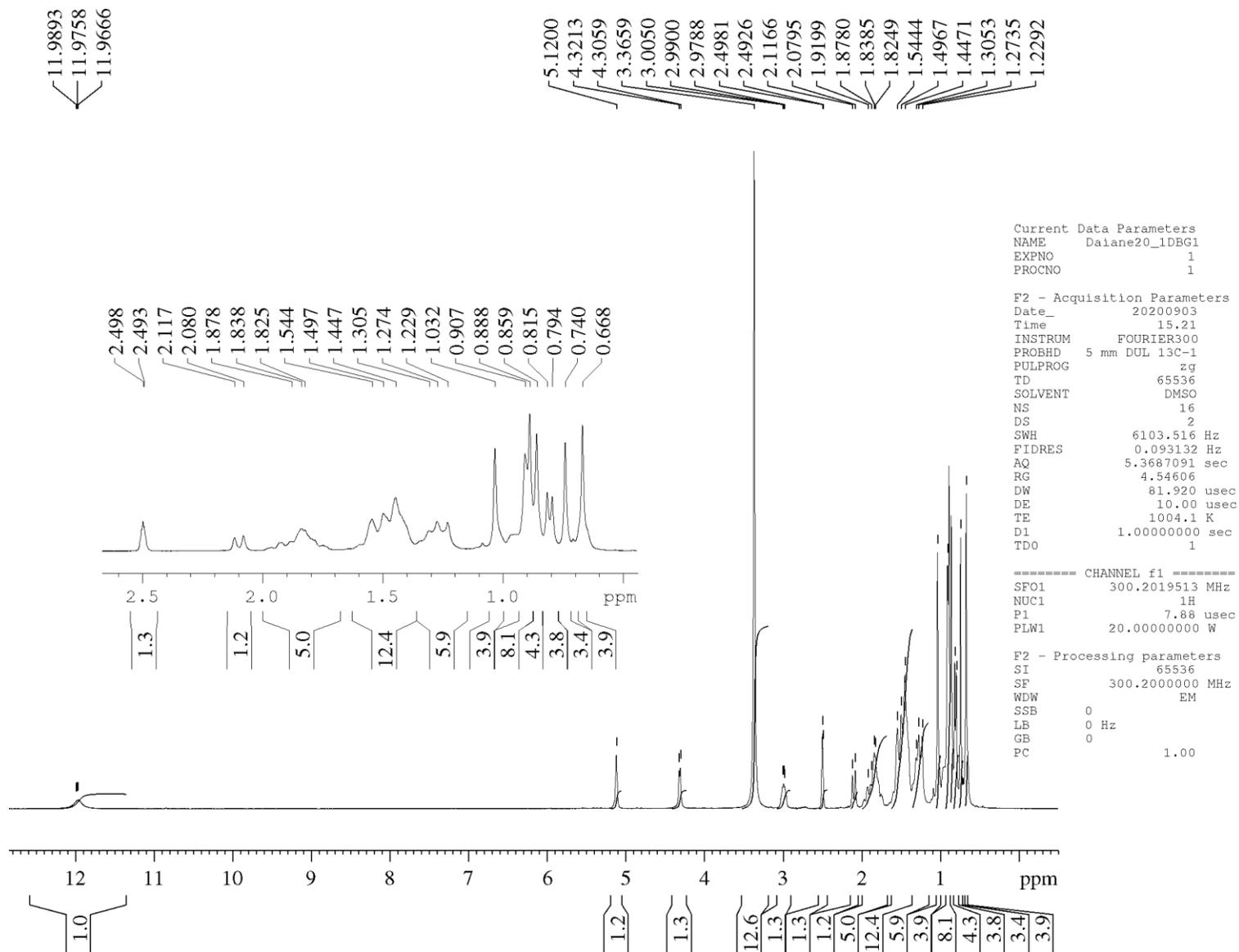
C:
NAME      Daiane20_1DBG1
EXPNO     11
PROCNO    1

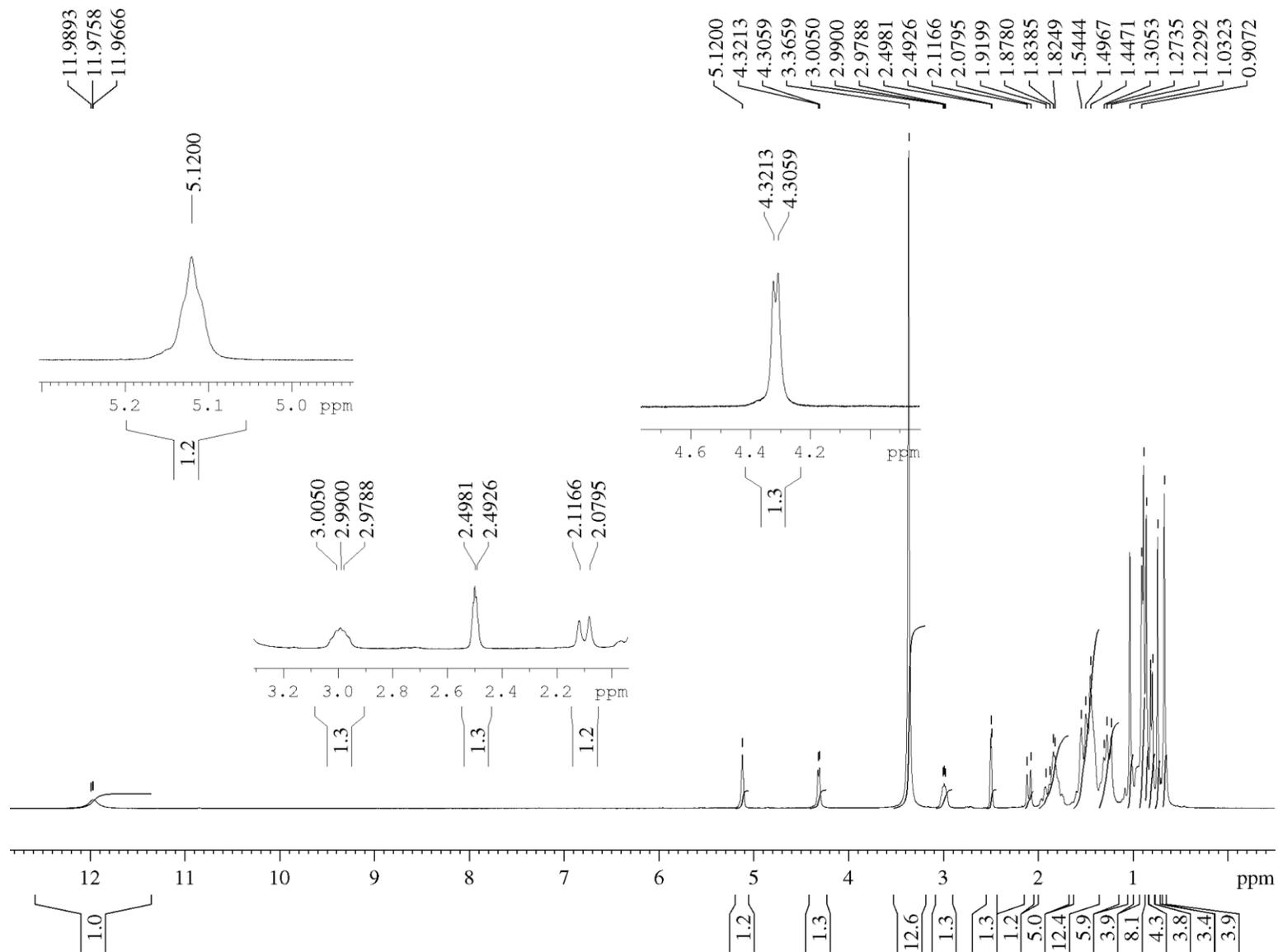
F2 - Acquisition Parameters
Date_     20200903
Time      15.24
INSTRUM   FOURIER300
PROBHD    5 mm DUL 13C-1
PULPROG   zgcprr
TD         65536
SOLVENT   DMSO
NS         32
DS         4
SWH        6103.516 Hz
FIDRES     0.093132 Hz
AQ         5.3687091 sec
RG         6.56761
DW         81.920 usec
DE         10.00 usec
TE         1004.1 K
D1         2.0000000 sec
D12        0.0000200 sec
P41        2000000.00 usec
TDO        1

===== CHANNEL f1 =====
SF01      300.2010106 MHz
NUC1       1H
P1         7.88 usec
PLW1      20.0000000 W
PLW9       0.0000100 W

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

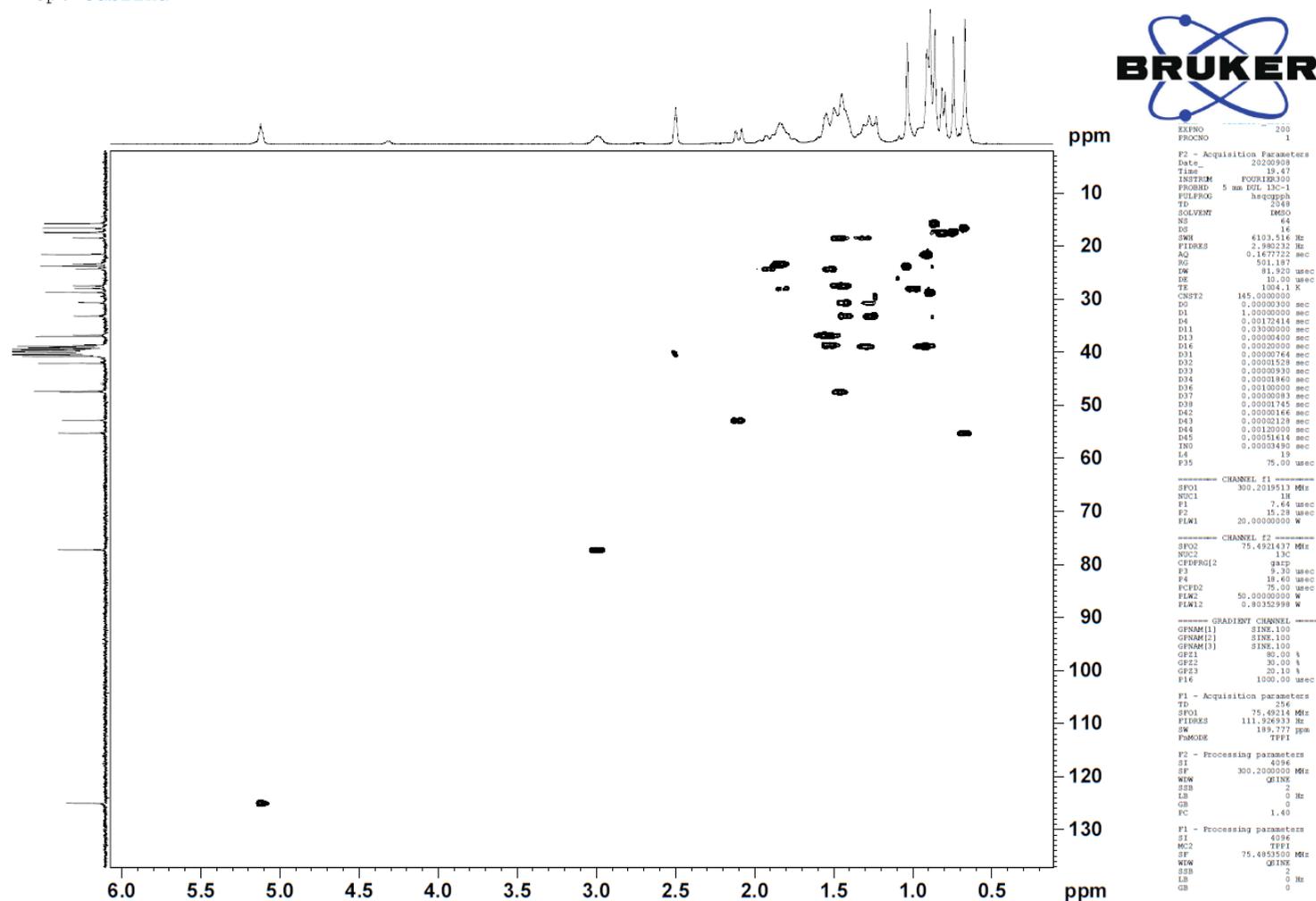
ANEXO 5- Ampliação do espectro de RMN de ^1H (300 MHz) da substância 1DBG1, em $\text{DMSO}-d_6$



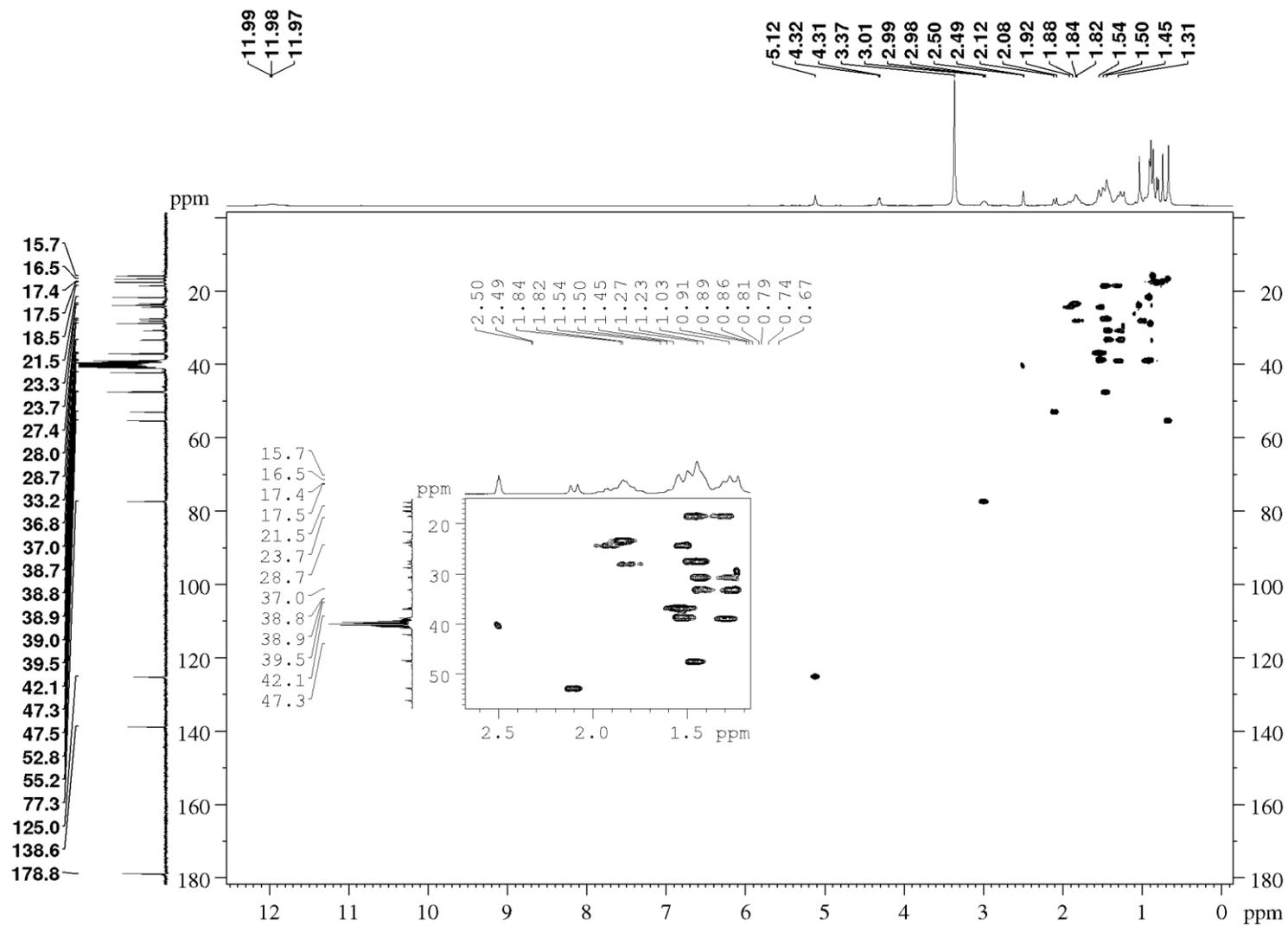
ANEXO 6- Ampliação do espectro de RMN de ^1H (300 MHz) da substância 1DBG1, em $\text{DMSO}-d_6$ 

ANEXO 7- Espectro de RMN HSQC (^1H - 300 MHz, ^{13}C -75 MHz) da substância 1DBG1, em DMSO-d_6

1DBG1 (HSQC; DMSO-d_6 ; 15,3 mg) 09/09/2020
Op. Sabrina

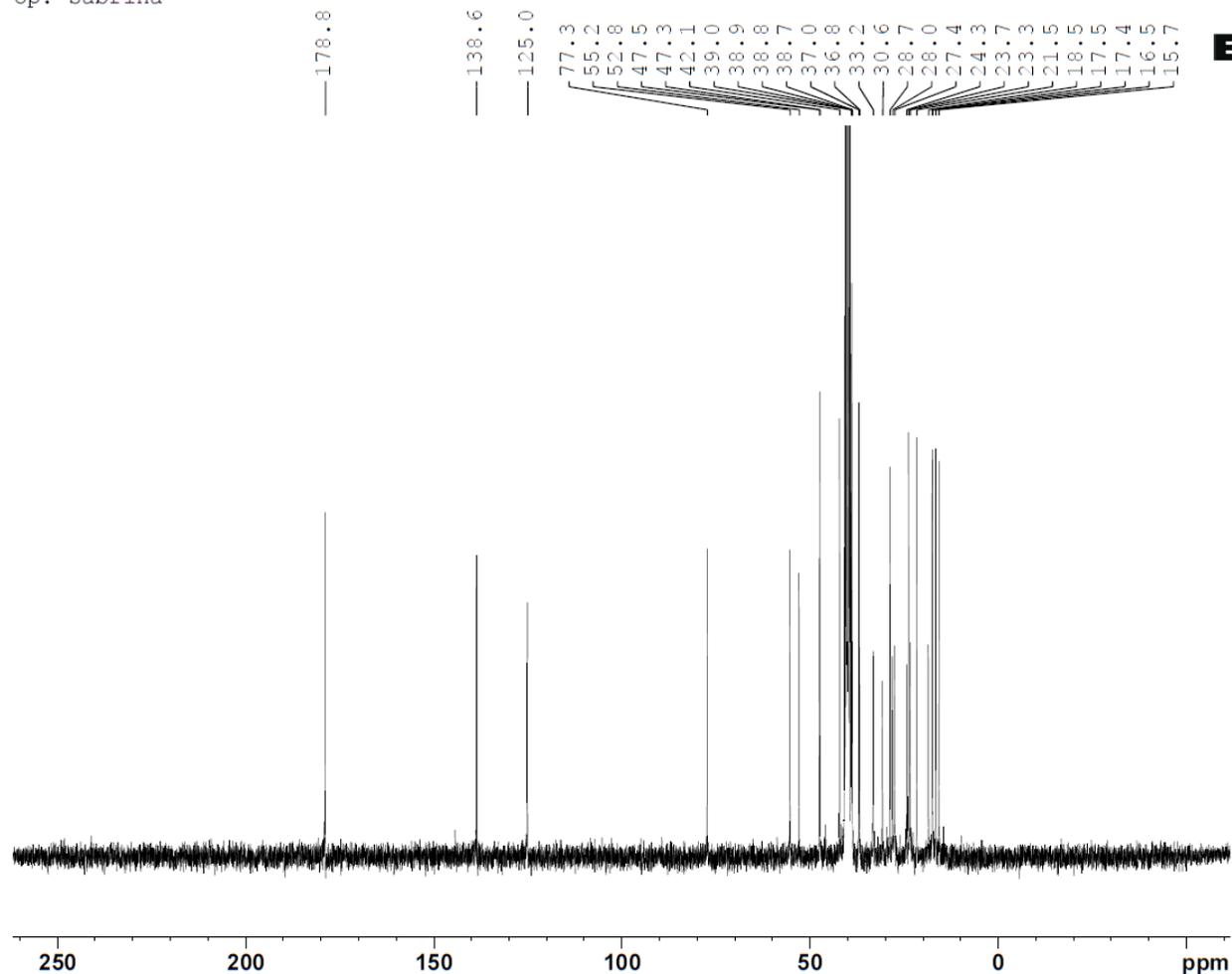


ANEXO 8- Ampliação do espectro de RMN HSQC (^1H - 300 MHz, ^{13}C -75 MHz) da substância 1DBG1, em DMSO- d_6



ANEXO 9- Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz) da substância 1DBG1 em DMSO-d_6

1DBG1 (^{13}C ; DMSO-d_6 ; 15,3 mg)
09/09/2020
Op. Sabrina



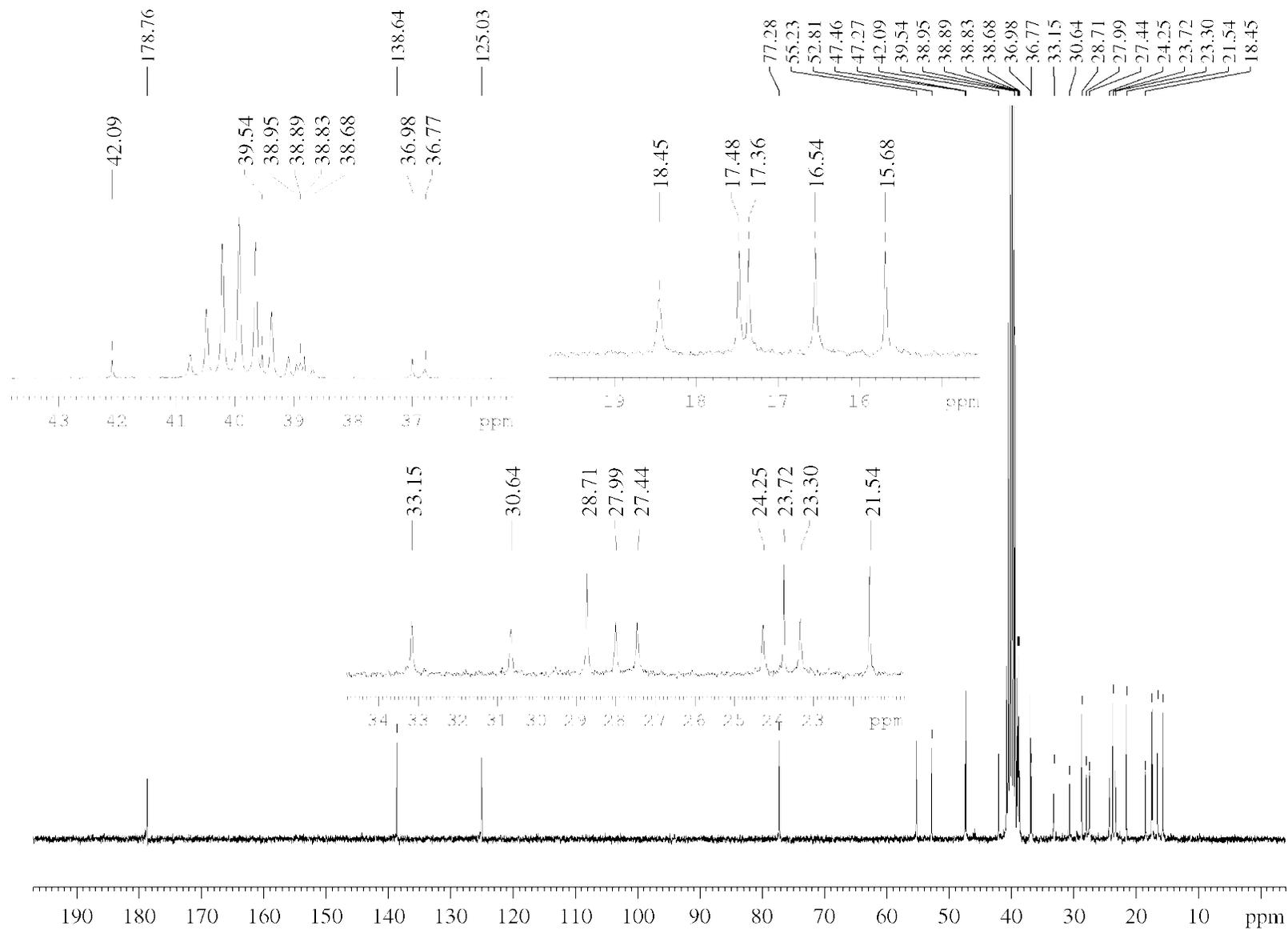
Current data parameters
NAME Daiane20_1DBG1
EXPNO 2
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date 20200908
Time 12.47
INSTRUM FOURIER300
PROBHD 5 mm DUL 13C-1
PULPROG zgpg30
TD 32768
SOLVENT DMSO
NS 31744
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 1004.1 K
D1 0.10000000 sec
D11 0.03000000 sec
D31 0.00000875 sec
D40 0.03084430 sec
L4 20
L5 2
P32 90.00 usec
TD0 1

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

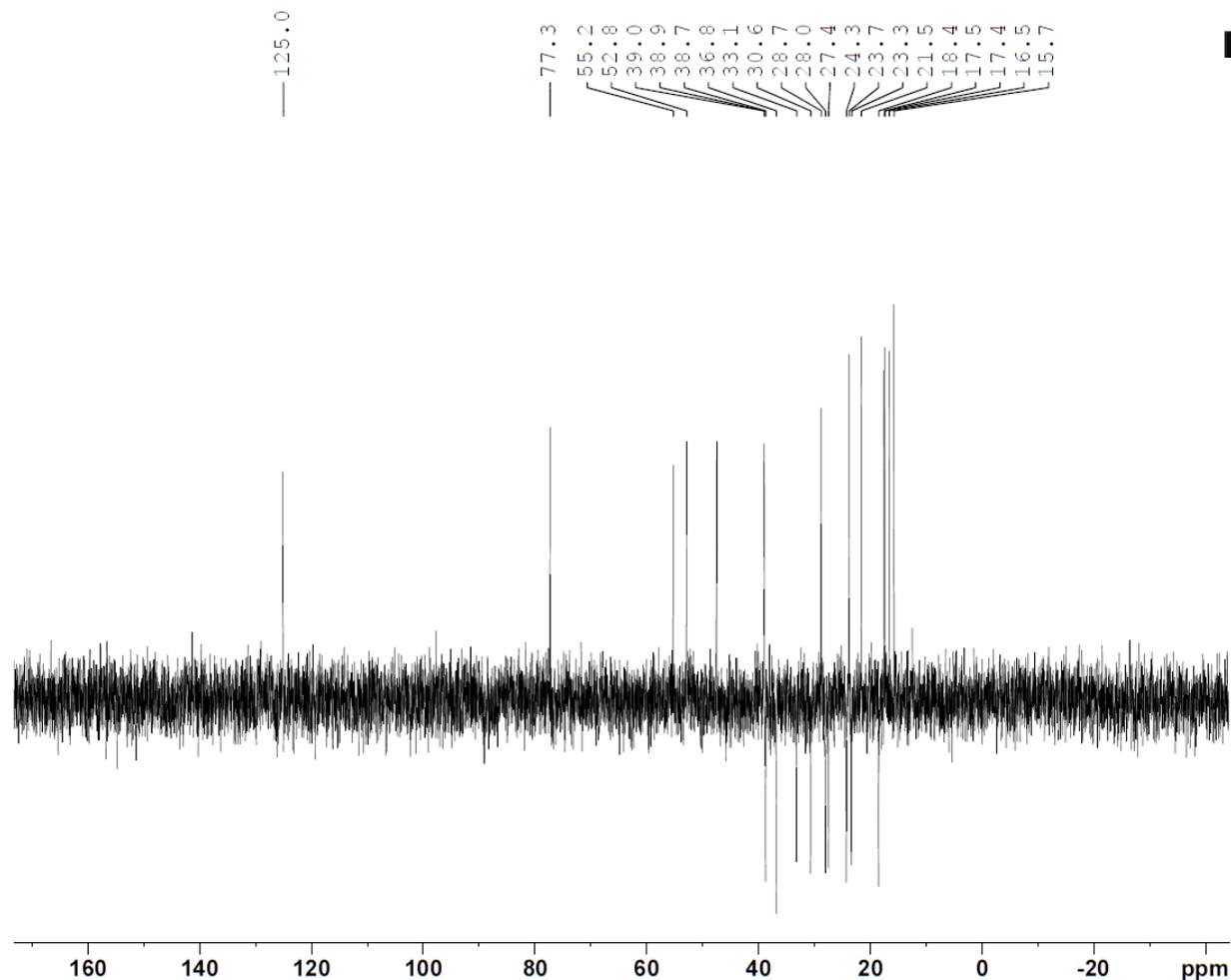
===== CHANNEL f2 =====
SFO2 300.2012008 MHz
NUC2 ^1H
CPDPRG [2] waltz16
PCPD2 90.00 usec
PLW2 20.00000000 W
PLW12 0.16806000 W
PLW13 0.13613001 W

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

ANEXO 10- Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz) da substância 1DBG1 em DMSO-d_6 

ANEXO 11- Espectro de RMN DEPT 135 (75 MHz) da substância 1DBG1, DMSO-d₆

1DBG1 (DEPT 135; DMSO-d₆; 15,3 mg) 09/09/2020
Op. Sabrina



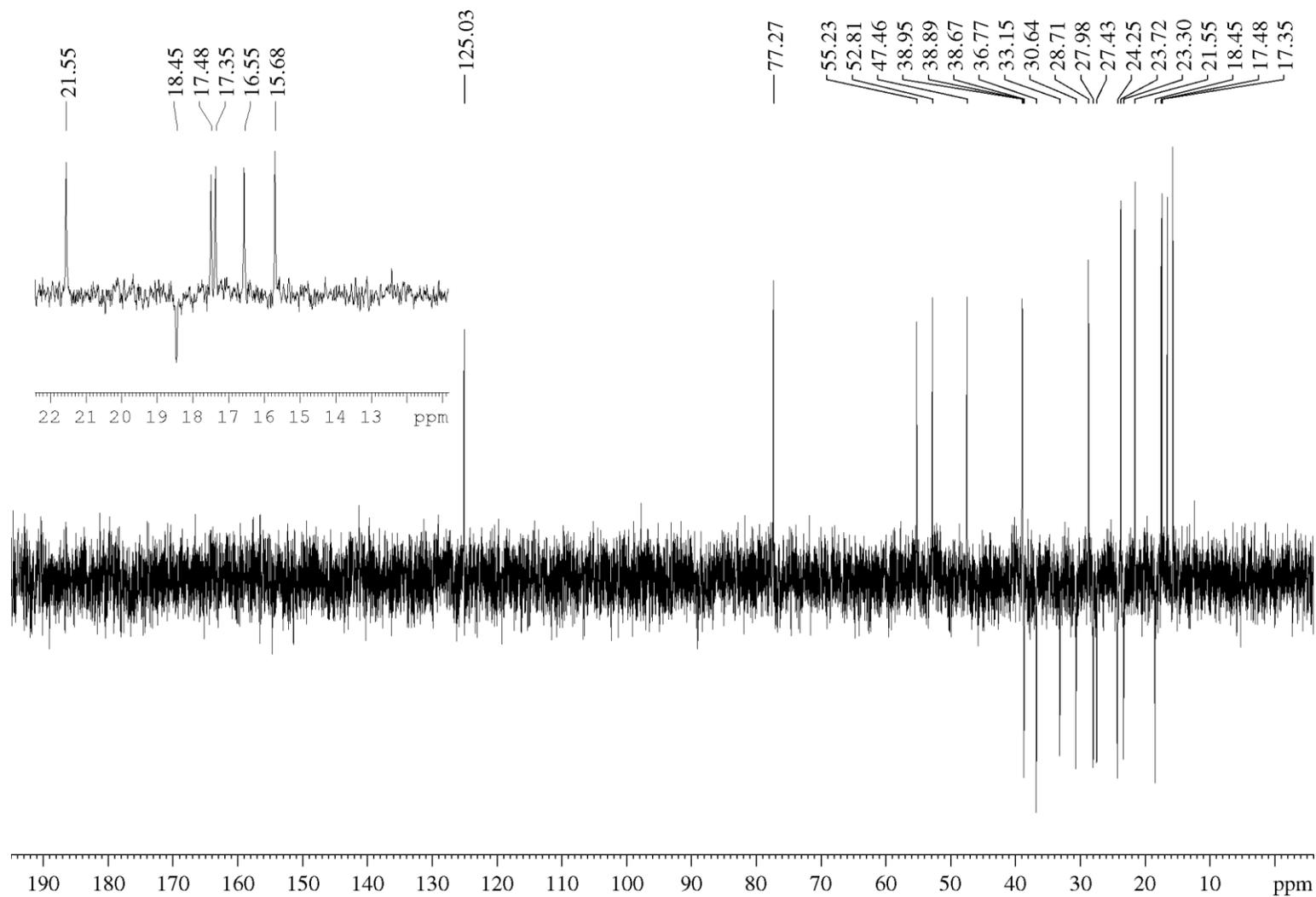
Current Data Parameters
NAME Daiane20_1DBG1
EXPNO 4
PROCNO 1

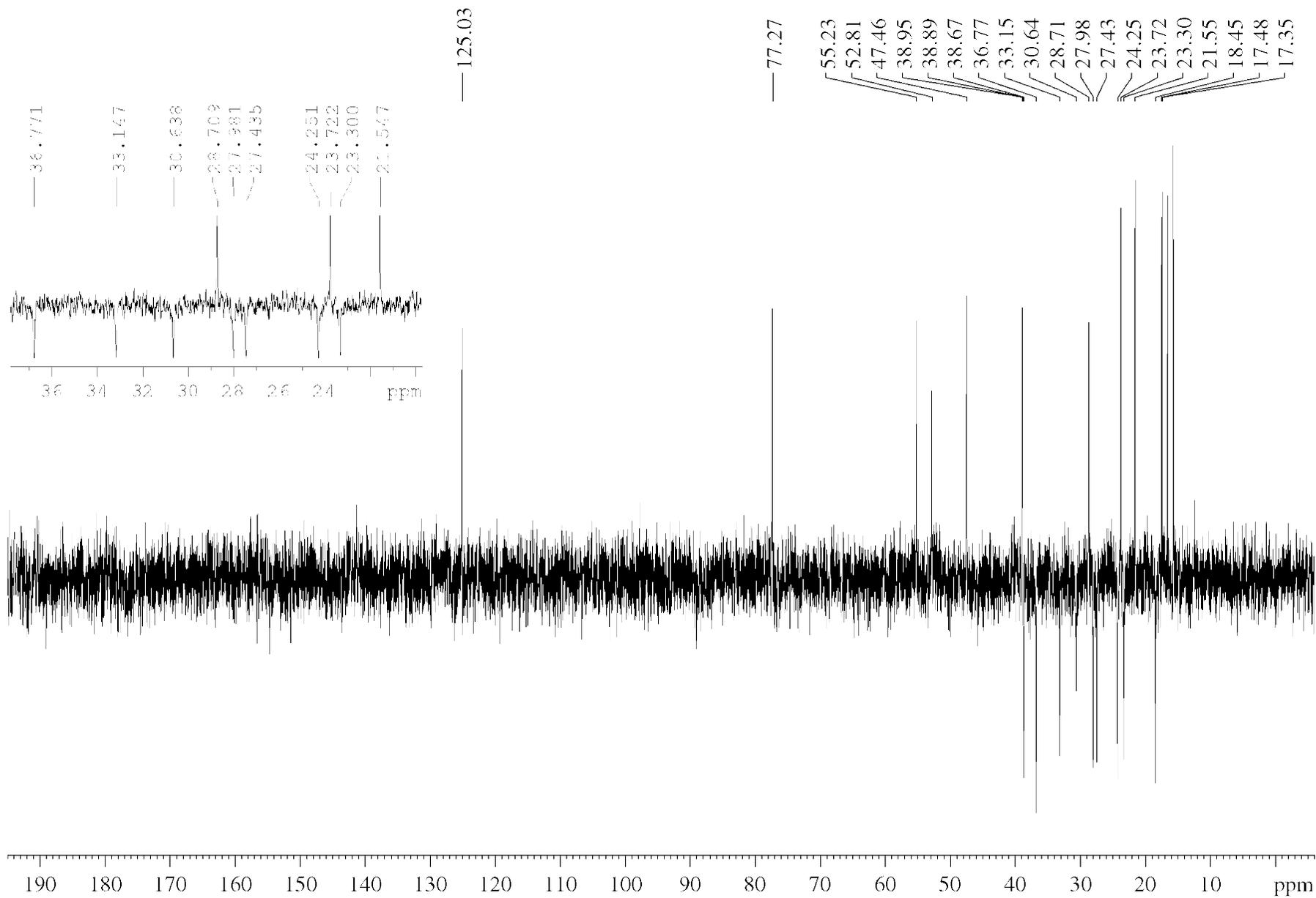
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20200908
Time_ 11.45
INSTRUM FOURIER300
PROBHD 5 mm DUL 13C-1
PULPROG dept135
TD 65536
SOLVENT DMSO
NS 1536
DS 0
SWH 24414.063 Hz
FIDRES 0.372529 Hz
AQ 1.3421773 sec
RG 501.187
DW 20.480 usec
DE 10.00 usec
TE 1004.1 K
CNST2 145.0000000
D1 1.0000000 sec
D2 0.00344828 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

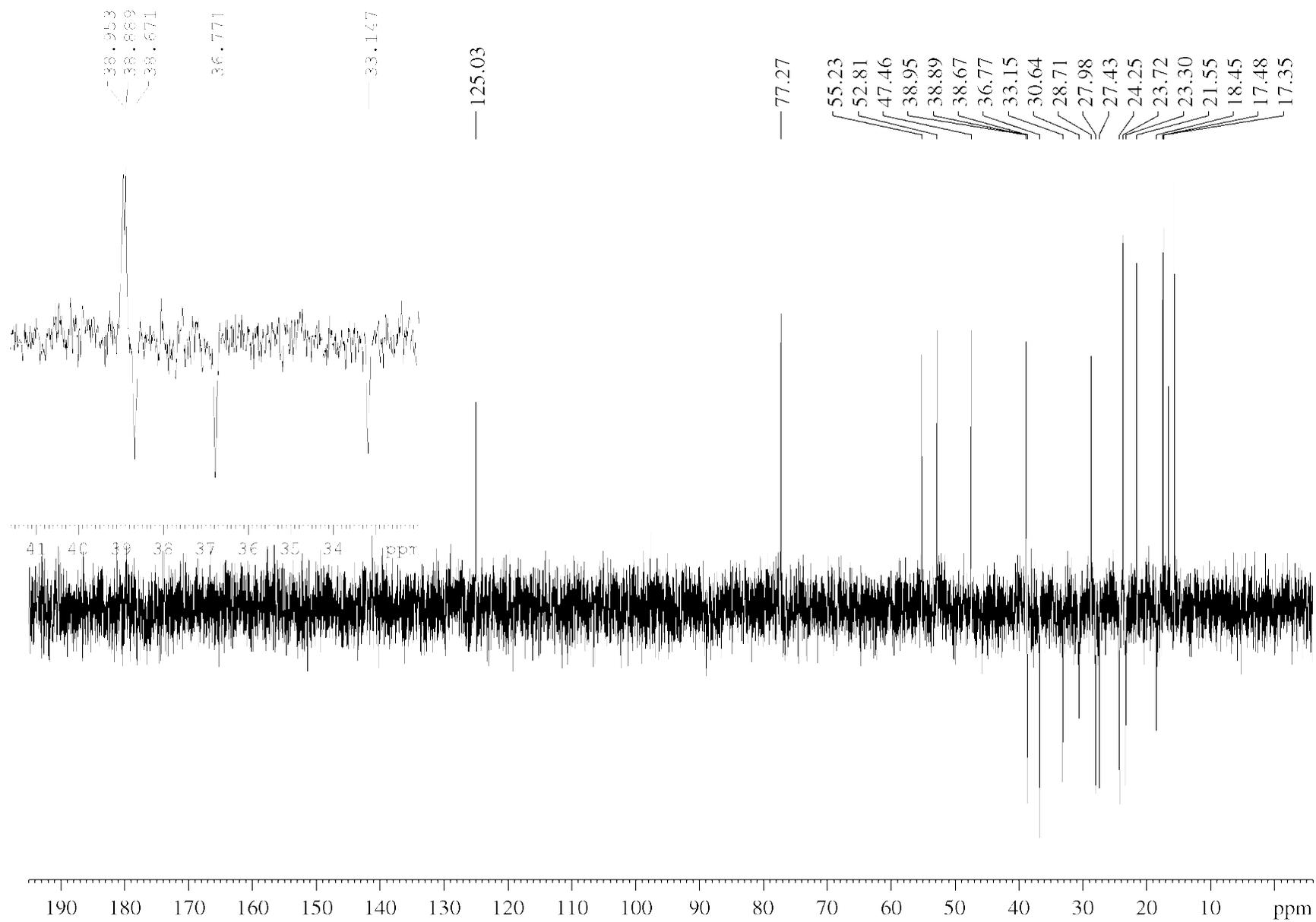
===== CHANNEL f1 =====
SFO1 75.4928978 MHz
NUC1 13C
P1 8.75 usec
P2 17.50 usec
PLW1 50.00299835 W

===== CHANNEL f2 =====
SFO2 300.2012008 MHz
NUC2 1H
CPDPRG2 waltz16
P3 8.25 usec
P4 16.50 usec
PCPD2 90.00 usec
PLW2 20.00000000 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

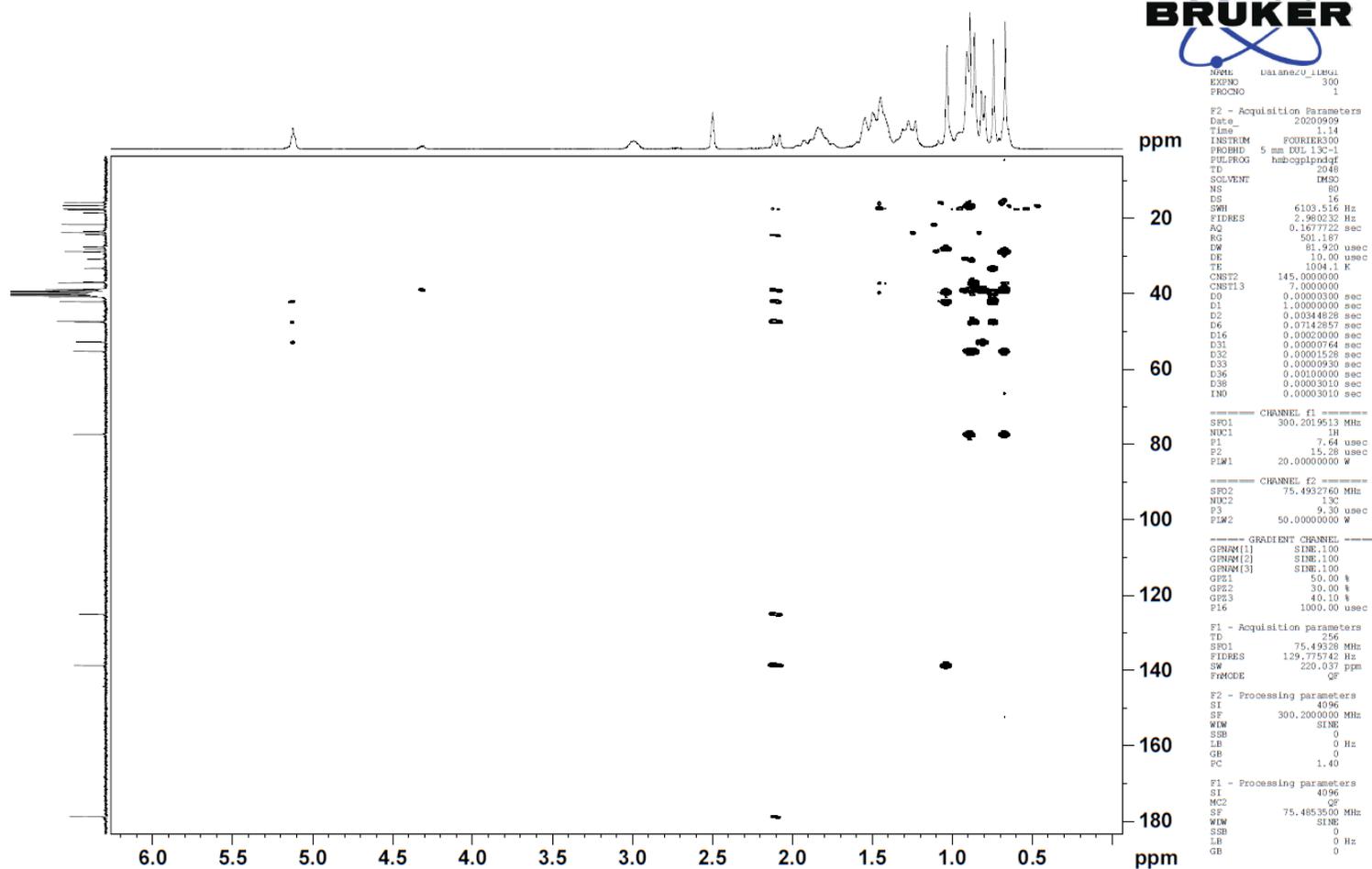
ANEXO 12- Ampliação do espectro de RMN DEPT 135 (75 MHz) da substância 1DBG1, DMSO- d_6 

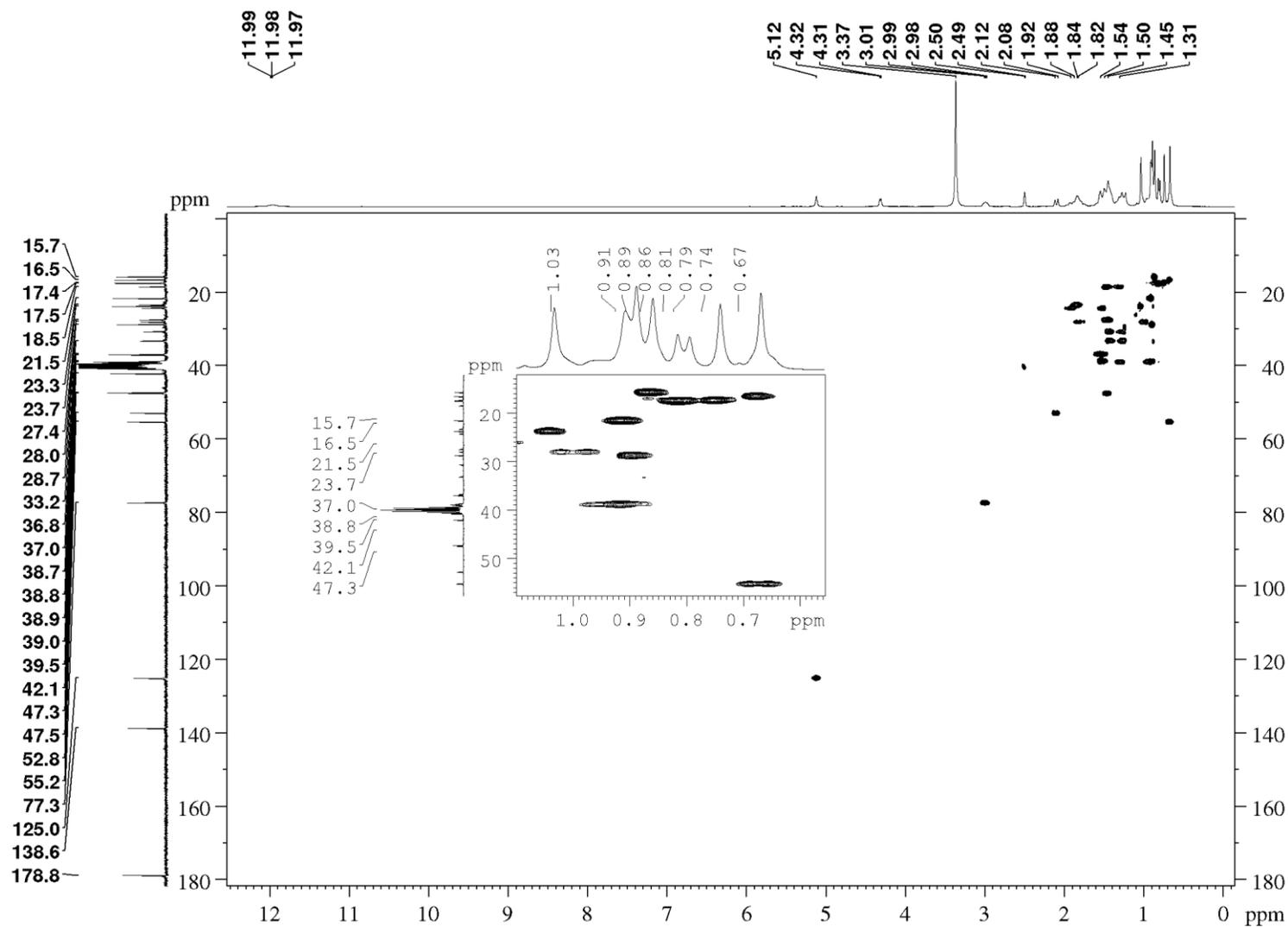




ANEXO 13- Espectro de RMN HMBC (^1H -300 MHz, ^{13}C - 75 MHz) da substância 1DBG1, em DMSO-d_6

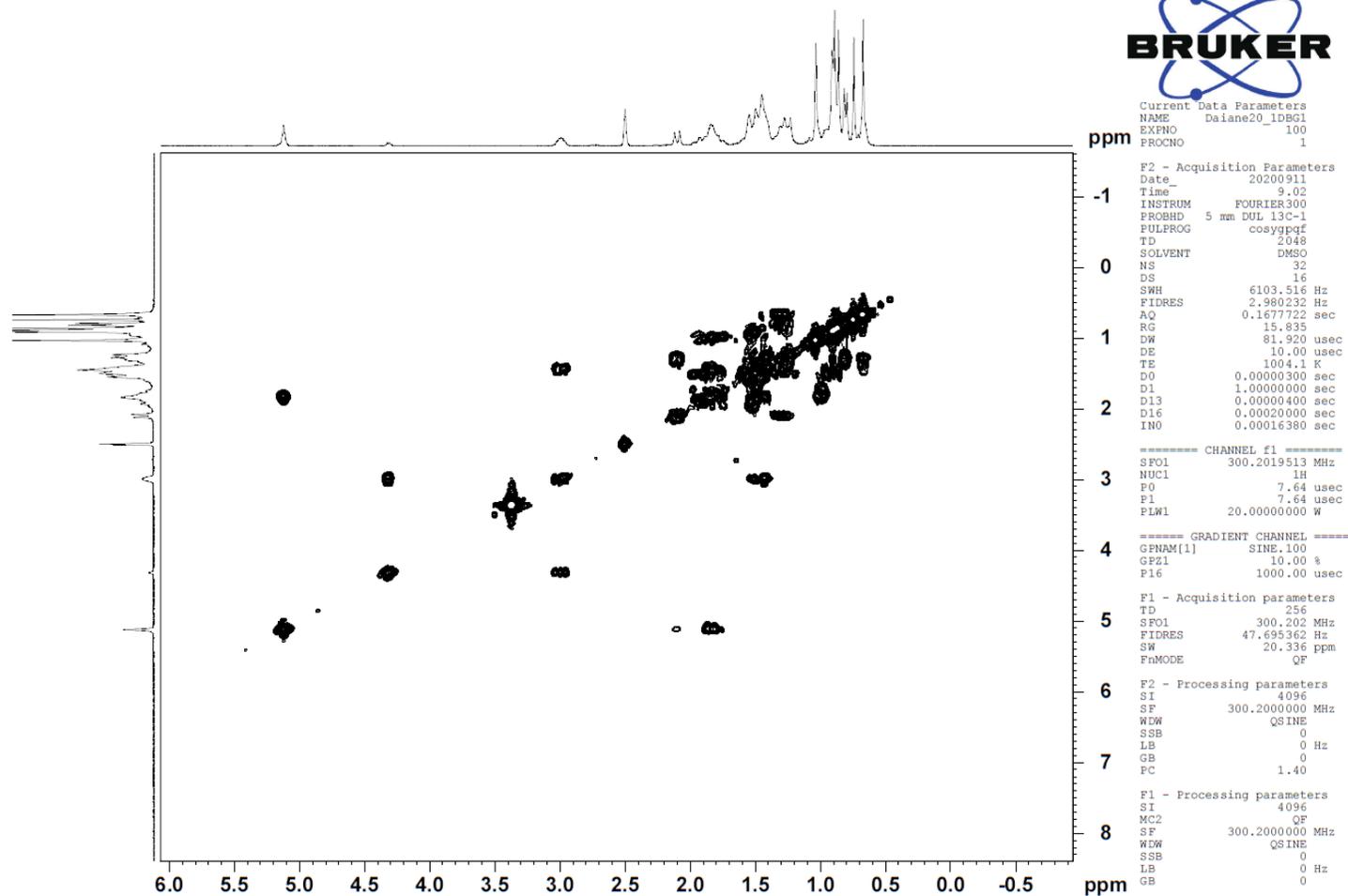
1DBG1 (HMBC; DMSO-d_6 ; 15,3 mg) 09/09/2020
Op. Sabrina

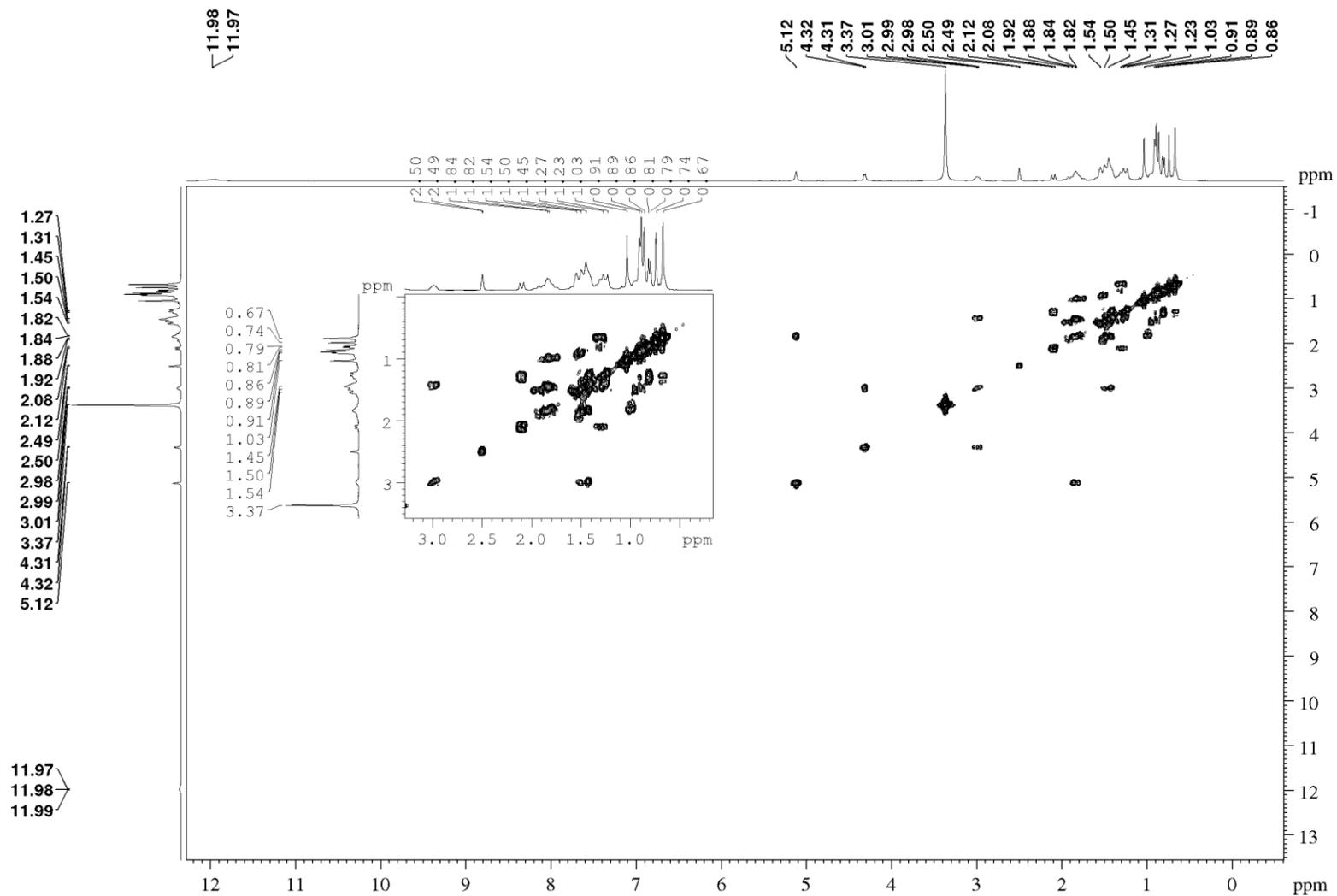


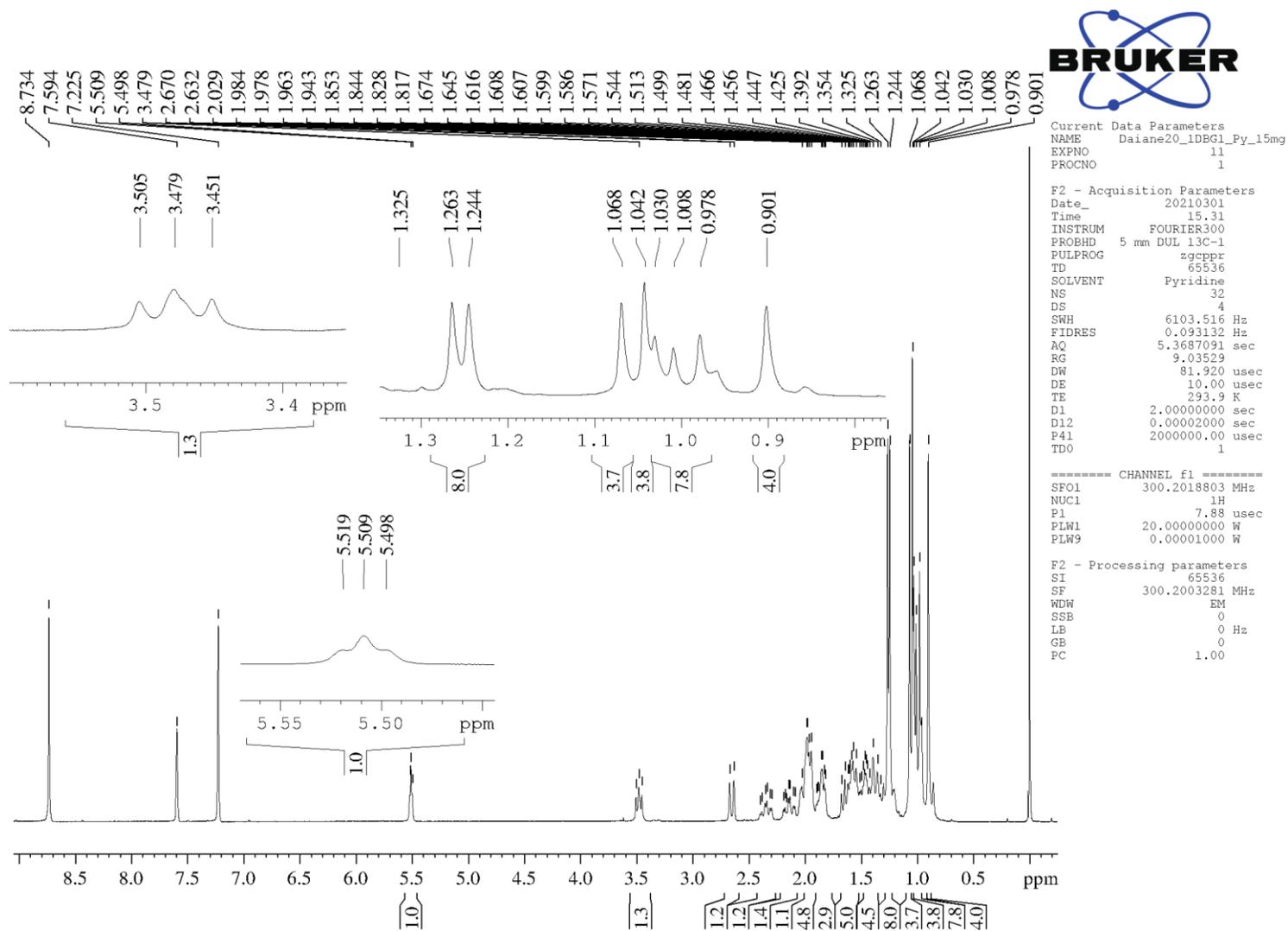
ANEXO 14- Ampliação do espectro de RMN HMBC (^1H -300 MHz, ^{13}C - 75 MHz) da substância 1DBG1, em DMSO-d_6 

ANEXO 15- Espectro de RMN COSY (300 MHz) da substância 1DBG1, em DMSO-d₆

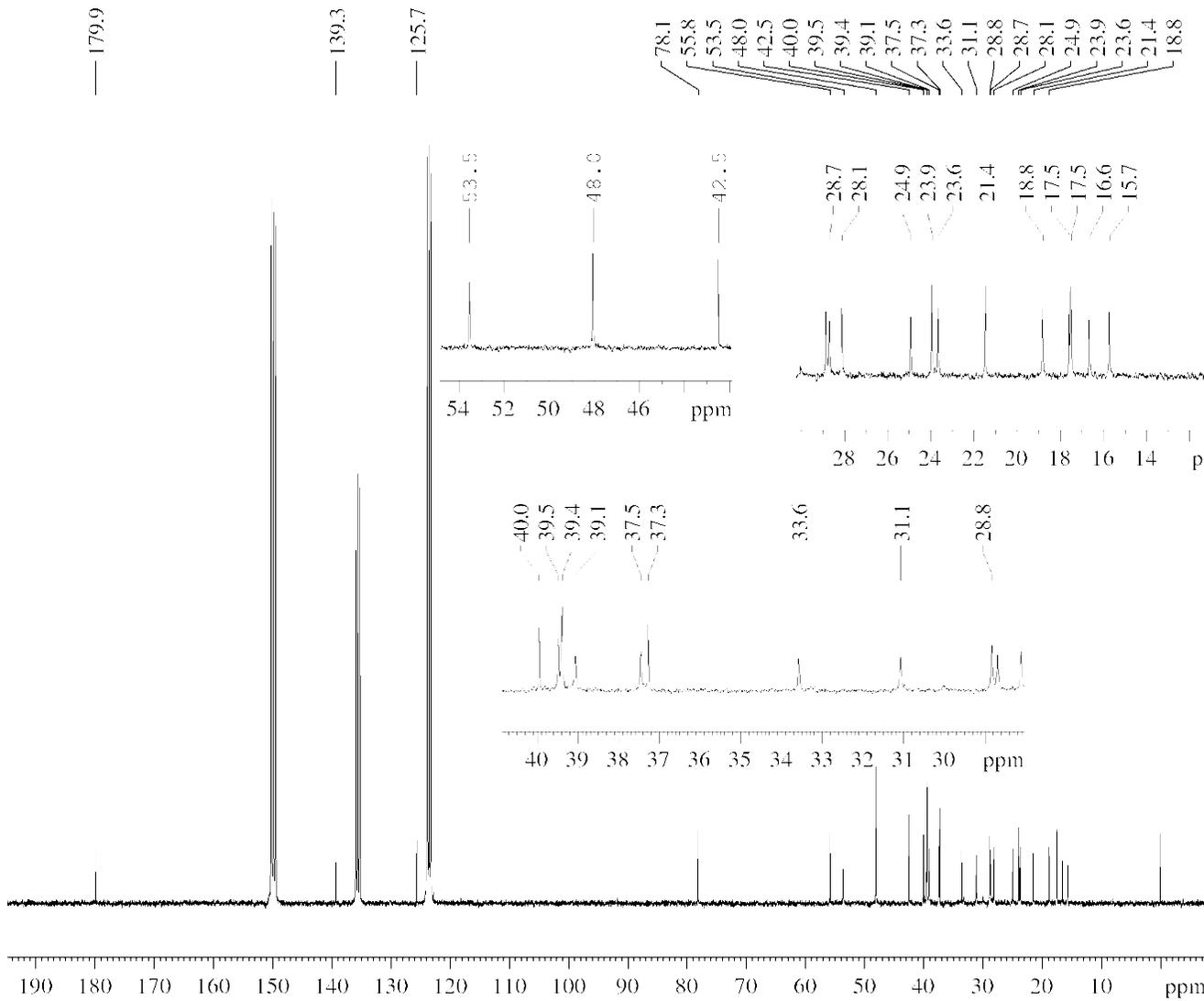
1DBG1 (COSY; DMSO-d₆; 15,3 mg) 11/09/2020
Op. Sabrina



ANEXO 16- Ampliação do espectro de RMN COSY (300 MHz) da substância 1DBG1, em DMSO-d₆

ANEXO 17- Espectro de RMN de ^1H e ampliação (300 MHz) da substância 1DBG1, em Piridina- d_5 

ANEXO 18- Espectro de RMN de ¹³C e ampliação (75 MHz) da substância 1DBG1, em Piridina-d₅



Current Data Parameters
NAME Dabane20_1DBG1_Py_15mg
EXPNO 2
PROCNO 1

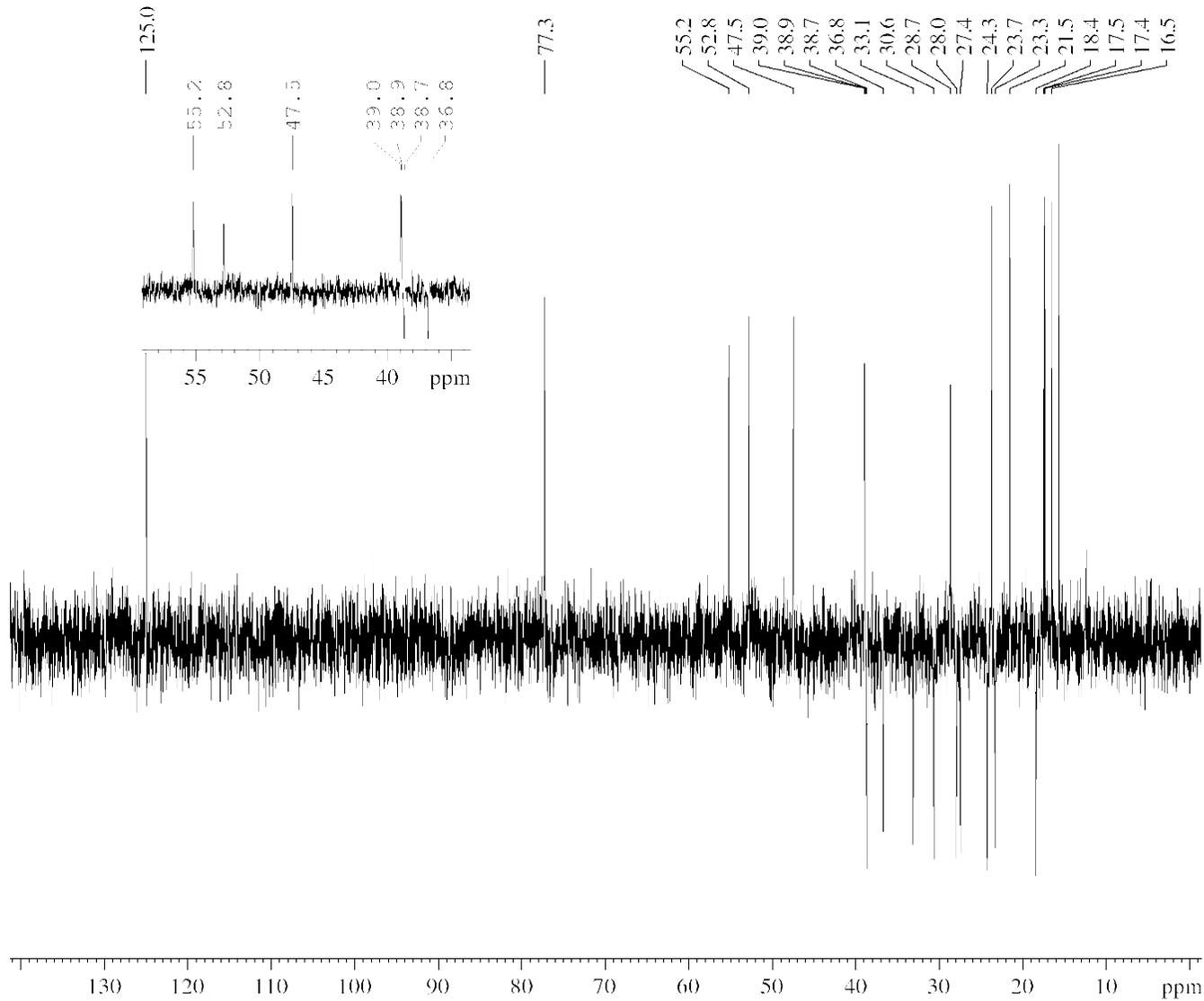
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20010301
Time 11.58
INSTRUM FOURIER300
PROBHD 5 mm DUL 150-1
PULPROG zgpg30
ID 32788
SOLVENT Pyridine-
HC 6144
DS 0
SHE 24414.982 Hz
FIDRES 0.745038 Hz
AQ 0.4710846 sec
RG 501.187
DQ 30.486 usec
DE 10.00 usec
TE 294.4 K
D1 0.3000000 sec
D11 0.02000000 sec
D12 0.00000000 sec
D40 0.02226821 sec
L4 0
L6 8
P02 30.00 usec
TD 1

----- CHANNEL f1 -----
SF01 75.4928982 MHz
NUC1 13C
P1 8.75 usec
PL1 50.00299828 W

----- CHANNEL f2 -----
SF02 200.12612008 MHz
NUC2 1H
CFDPRG12 waltz16
PROBHD 5 mm DUL 150-1
PLW2 20.00000000 W
PLW12 0.10000000 W
PLW13 0.19618931 W

F2 - Processing parameters
SI 32788
SF 75.4924170 MHz
WDW EM
SSE 0
EP 1.00 Hz
GB 0
PC 1.40

ANEXO 19- Espectro de DEPT ¹³⁵ e ampliação (75 MHz) da substância 1DBG1, em Piridina-d₅



```

Current Data Parameters
NAME      Dafano20_10201
EXPNO    4
PROCNO   1

F2 - Acquisition Parameters
Date_    20200908
Time     11.45
INSTRUM  FOUHDH300
PROBHD   5 mm DUL 13C 1
PULPROG  zgpg30
TD        65536
SOLVENT  DMSO
NS        1536
DS         0
SWH       24414.062 Hz
FIDRES    0.372529 Hz
AQ        1.3421773 sec
RG         501.187
WDW        20.480 usec
SSB        0.00 usec
LB         10.00 usec
GB         0.0000000
PC        1000.000
CNTRL1    145.0000000
PC1        1.000000000 sec
PC2        0.00344323 sec
PC3        0.00001114 sec
PC4        0.00000325 sec
PC5        0.00344053 sec
PC6        0.00345340 sec
L4         40
RG2        30.00 usec
RG3        1

----- CHANNEL f1 -----
SFO1    75.4823978 MHz
NUC1     13C
P1       8.75 usec
P2       17.50 usec
PLW1     50.00239335 W

----- CHANNEL f2 -----
SFO2    300.2012008 MHz
NUC2     1H
PC1P2P3  waltz16
P3        8.25 usec
P4       16.50 usec
PCP12     30.00 usec
PLW2     20.00000000 W
PLW3     0.16806000 W

F0 - Processing parameters
SI        32768
SF        75.4833500 MHz
WDW       EM
SSB       0
LB        1.00 Hz
GB        0
PC        1.40
    
```