

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

DOUGLAS DA COSTA GONTIJO

BIOPROSPECÇÃO PARA ATIVIDADE ANTIPLASMÓDICA DE EXTRATOS  
VEGETAIS DE ESPÉCIES DA MATA ATLÂNTICA SELECIONADAS POR  
CRITÉRIO ETOLÓGICO, IDENTIFICAÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS DE  
EXTRATOS ATIVOS POR UPLC-DAD-ESI-MS/MS E ESTUDO  
FITOQUÍMICO BIOMONITORADO DE *Xylopia sericea* A. ST. HILL  
(ANNONACEAE)

BELO HORIZONTE, MG  
JULHO - 2016

DOUGLAS DA COSTA GONTIJO

BIOPROSPECÇÃO PARA ATIVIDADE ANTIPLASMÓDICA DE EXTRATOS VEGETAIS DE ESPÉCIES DA MATA ATLÂNTICA SELECIONADAS POR CRITÉRIO ETOLÓGICO, IDENTIFICAÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS DE EXTRATOS ATIVOS POR UPLC-DAD-ESI-MS/MS E ESTUDO FITOQUÍMICO BIOMONITORADO DE *Xylopia sericea* A. ST. HILL (ANNONACEAE)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Departamento de Produtos Farmacêuticos da Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alaíde Braga de Oliveira, Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG.

Coorientador: Prof. Dr. João Paulo Viana Leite, Universidade Federal de Viçosa, UFV.

BELO HORIZONTE, MG

JULHO - 2016

*"O mundo não foi feito em alfabeto.  
Senão que primeiro em água e luz.  
Depois árvore."*

Manoel de Barros

## AGRADECIMENTOS

Agradeço em especial a Prof<sup>a</sup>. Alaíde Braga de Oliveira pela valorosa orientação e confiança no trabalho. Por me receber bem em seu laboratório e dividir comigo seu vasto conhecimento, tendo fundamental dedicação para a conclusão desta tese. Deixo aqui meus sinceros agradecimentos.

Ao Prof. João Paulo Viana Leite pela orientação, amizade, confiança e incentivo desde o primeiro contato com Produtos Naturais.

A meus pais, Selma e João, pelo amor incondicional e incentivo. Ao meu irmão Pablo, pela amizade e sempre disponibilidade em me ajudar. A minha esposa Larissa pelo amor.

Aos Professores Rodrigo Maia de Pádua, Fernão Castro Braga, Rachel Oliveira Castilho e Guilherme Rocha Pereira sempre dispostos a me ajudar em qualquer dúvida que tive no decorrer destes 4 anos de trabalho. Em especial agradeço ao Prof. Geraldo Célio Brandão, que dividiu comigo semanalmente seu conhecimento sobre fitoquímica e sua amizade.

As Doutorandas Maria Fernanda Alves do Nascimento pela amizade e fundamental parceria na realização dos testes biológicos e Tatiane Freitas Borgati pela parceria e valorosa ajuda com os espectros de RMN.

Aos demais Professores e Funcionários da Faculdade de Farmácia pelos ensinamentos e colaboração. A Prof<sup>a</sup> Ana Paula Salles Moura Fernandes com quem tive o primeiro contato com a docência universitária. A Raquel Geralda Isidorio que sempre me possibilitou as melhores condições de trabalho no Laboratório de Fitoquímica. Aos secretários da pós-graduação Eduardo e Marton sempre muito prestativos e ao Batista, sempre muito sorridente.

Aos amigos Letícia, Renato e Leandro por compartilharem seus trabalhos sobre muriquis, pontapé inicial deste trabalho, além de adentrarem a Mata juntamente comigo, Prof. João Paulo e Alisson para coletar as espécies vegetais estudadas, muitas vezes fazendo exercícios de escalada para tal.

A todos os queridos amigos do Laboratório de Fitoquímica, Diego, Luana, Grazielle, Luisa, Felipe, Marlene, Agnes, Lucianas, Renata, Zé Hugo, Ju Oliveira, Ju Almeida, Ju

Amorim, André, Marianas, Ana Barbara, Barbara, Priscilla, Valdicley, Nayla, Tiago pela saborosa convivência e ajuda no ambiente de trabalho e fora dele.

Ao caro Marcos Sandália & Meia pela amizade e tranquilidade como companheiro de moradia, na qual falamos muito sobre fitoquímica, futebol, compomos músicas e discutimos a importância do Raulseixismo. Aos queridões da Bioquímica, Patinho, Claudinha, Thiaguinho, Túlio, Brunão, Xiboca, Luciano Fietto, Zé Humberto, Eliana pela amizade que continua sempre presente.

A Universidade Federal de Viçosa (UFV) na qual cheguei para ser Comunicador Social e sai Bioquímico e Mestre em Bioquímica e a Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), que me acolheu tão bem e da qual pretendo sair Doutor.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos, sem a qual seria inviável a minha dedicação a este trabalho.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento dos projetos PRONEX Rede Malária Processos Nº 555655/2009-1 e APQ-01129-10, respectivamente.

Ao Instituto Estadual de Florestas (IEF-MG) pela autorização de coleta e apoio logístico no Parque Estadual da Serra do Brigadeiro.

A todos os muriquis do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro para os quais dedico, juntamente com todas as espécies vegetais da Mata Atlântica, este trabalho.

## SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	vii
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xvi
RESUMO	xviii
ABSTRACT	vix
1. INTRODUÇÃO	1
2. JUSTIFICATIVA	4
3. OBJETIVOS	6
3.1. Objetivo Geral	6
3.2. Objetivos Específicos	6
4. REVISÃO DA LITERATURA	7
4.1. Abordagem Etológica	7
4.2. Abordagem Etológica no Parque Estadual da Serra do Brigadeiro - MG	10
4.3. Malária	12
4.4. Produtos Naturais Antimaláricos	14
4.5. Espécies Vegetais Investigadas para Avaliação Antiplasmódica	16
4.6. Estudo Bibliográfico Farmacobotânico das Espécies Identificadas	21

5.	MATERIAL E MÉTODOS	25
5.1.	Coleta e Identificação do Material Vegetal	25
5.2.	Secagem e Obtenção dos Extratos Vegetais	26
5.3.	Prospecção Fitoquímica	28
5.4.	Perfil Cromatográfico UPLC-DAD	29
	5.4.1. Preparo das Amostras	29
	5.4.2. Parâmetros Cromatográficos	29
5.5.	Obtenção dos Espectros de Massas UPLC-ESI-MS/MS	29
5.6.	Determinação do Ponto de Fusão	30
5.7.	Espectroscopia no Ultravioleta	30
5.8.	Espectroscopia no Infravermelho	30
5.9.	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear	31
5.10.	Cultivo Celular e Teste de Atividade Antiplasmódica	31
	5.10.1. Cultivo Celular do <i>Plasmodium falciparum</i>	31
	5.10.2. Atividade Antiplasmódica por Determinação da Enzima Lactato Desidrogenase do <i>Plasmodium falciparum</i> – pLDH	32
5.11.	Cultivo de Células Hepáticas HepG2 e Ensaios de Citotoxicidade	33
	5.11.1. Cultivo Células Hepáticas HepG2	33
	5.11.2. Ensaios de Citotoxicidade frente a cepa HepG2	33
5.12.	Análise Estatística	34
5.13.	Fracionamento dos Extratos Ativos	34
	5.13.1. Fracionamento do Extrato Etanólico das folhas de <i>Alchornea glandulosa</i>	35
	5.13.2. Fracionamento do Extrato Etanólico das folhas de <i>Miconia latecrenata</i>	36
	5.13.3. Fracionamento do Extrato Etanólico das folhas de <i>Xylopia sericea</i> Coleta 1	36
	5.13.4. Fracionamento de Extratos de <i>Xylopia sericea</i> Coleta 2	38
	5.13.4.1. Fracionamento do Extrato Diclorometânico das folhas de <i>Xylopia sericea</i> Coleta 2	38

5.13.4.2. Fracionamento do Extrato Etanólico das folhas de <i>Xylopia sericea</i> Coleta 2	42
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
6.1. Atividade antiplasmódica e citotoxicidade dos extratos analisados	45
6.2. Prospecção Fitoquímica por CCD e Perfil Cromatográfico por UPLC-DAD	48
6.3. Análise por UPLC-DAD-ESI-MS/MS dos extratos ativos frente ao <i>P. falciparum</i>	54
6.3.1. Caracterização Fitoquímica por UPLC-DAD-ESI-MS/MS do extrato etanólico de <i>Alchornea glandulosa</i> (EAGL EtOH)	58
6.3.2. Caracterização Fitoquímica por UPLC-DAD-ESI-MS/MS do extrato aquoso de <i>Laplacea fruticosa</i> (ELF H <sub>2</sub> O)	63
6.3.3. Caracterização Fitoquímica por UPLC-DAD-ESI-MS/MS do extrato etanólico de <i>Miconia latecrenata</i> (EML EtOH)	67
6.3.4. Caracterização Fitoquímica por UPLC-DAD-ESI-MS/MS do extrato etanólico de <i>Psychotria suterella</i> (EPS EtOH)	72
6.3.5. Caracterização Fitoquímica por UPLC-DAD-ESI-MS/MS do extrato etanólico de <i>Xylopia sericea</i> Coleta 1 (EXS EtOH)	78
6.4. Atividade Antiplasmódica de frações obtidas dos extratos etanólicos de <i>Alchornea glandulosa</i> , <i>Miconia latecrenata</i> e <i>Xylopia sericea</i>	82
6.4.1. Atividade antiplasmódica de frações obtidas do extrato etanólico de <i>Alchornea glandulosa</i>	82
6.4.2. Atividade antiplasmódica de frações obtidas do extrato etanólico de <i>Miconia latecrenata</i>	85
6.4.3. Atividade antiplasmódica de frações obtidas do extrato etanólico de <i>Xylopia sericea</i> Coleta 1	87
6.4.4. Isolamento e Identificação da Substância EXS FA/F2/RC a partir da fração acetato de etila de <i>Xylopia sericea</i> Coleta 1	90

6.4.4.1. Espectroscopia no Ultravioleta	91
6.4.4.2. Espectroscopia no Infravermelho	94
6.4.4.3. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear	96
6.5. Fracionamento e atividade antiplasmódica dos extratos de <i>Xylopi</i> <i>sericea</i> Coleta 2	118
6.5.1. Fracionamento e atividade antiplasmódica do extrato diclorometânico de <i>Xylopi</i> <i>sericea</i> Coleta 2	119
6.5.1.1. Elucidação Estrutural de EXS FD/F2/F26/F2/F1/RC	127
6.5.1.1.1. Espectroscopia no Infravermelho	129
6.5.1.1.2. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear	131
6.5.1.2. Fracionamento de EXS DCM FD/F7	149
6.5.2. Fracionamento e Atividade antiplasmódica do extrato etanólico de <i>Xylopi</i> <i>sericea</i> Coleta 2	158
6.5.2.1. Caracterização fitoquímica por UPLC-DAD-ESI- MS/MS do extrato etanólico de <i>Xylopi</i> <i>sericea</i> Coleta 2 (EXS EtOH)	158
6.5.2.2. Fracionamento de EXS EtOH Coleta 2	163
7. CONCLUSÃO	172
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	173

## LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Abs	Absorvância
Acetona-d <sub>6</sub>	Acetona deuterada
AcOEt	Acetato de Etila
AcO <sup>-</sup> Na <sup>+</sup>	Acetato de Sódio
ACN	Acetonitrila
Alc	Alcaloide
AlCl <sub>3</sub>	Cloreto de Alumínio
ACT	Artemisinin-based Combinationy Therapy
BioPESB	Bioprospecção e Uso Sustentável dos Recursos Naturais da Serra do Brigadeiro
BuOH	n-Butanol
<sup>13</sup> C	Carbono Isótopo 13
CC <sub>50</sub>	Concentração Citotóxica 50%
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CDCl <sub>3</sub>	Clorofórmio deuterado
CHCl <sub>3</sub>	Clorofórmio
CLUE	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência
COSY	Correlation Spectroscopy
cm	Centímetro
d	Dupleto
dd	Dupleto duplo
DAD	Diode Array Detector
DCM	Diclorometano
DEPT 135	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DMSO-d <sub>6</sub>	Hexadeutero dimetilsulfóxido
ESI	Electrospray Ionization
EtOEt	Éter Dietílico
EtOH	Etanol
EM	Espectrometria de Massas

EM-	Espectrometria de Massas Ionização Negativa
EM+	Espectrometria de Massas Ionização Positiva
FeCl <sub>3</sub>	Cloreto férrico
Fr.	Fração
g	grama
<sup>1</sup> H	Hidrogênio Isótopo Prótio
H <sub>2</sub> O	Água
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	Ácido Bórico
HCl	Ácido Clorídrico
HCOOH	Ácido Fórmico
HEX	Hexano
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation
Hz	Hertz
IC <sub>50</sub>	Inibição Citotóxica 50%
IS	Índice Seletividade
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento
K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>	Ferrocianeto de Potássio
KI	Iodeto de Potássio
KOH	Hidróxido de Potássio
m	Multiplete
MeOD	Metanol Deuterado
MeOH	Metanol
MeO <sup>-</sup> Na <sup>+</sup>	Metóxido de Sódio
MHz	Mega Hertz
min	Minutos
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Micro Molar
mm	Milímetro

MS	Mass Spectrometry
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol (sal tetrazólico)
<i>m/z</i>	Razão massa carga
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sulfato de sódio
NH <sub>4</sub> OH	Hidróxido de Amônio
nm	nanometro
NOESY	Nuclear Overhauser Effect
PESB	Parque Estadual da Serra do Brigadeiro
<i>p</i> LDH	Lactato Desidrogenase do <i>Plasmodium falciparum</i>
ppm	partes por milhão
Ppt	Precipitado
®	Marca Registrada
RMN de <sup>13</sup> C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN de <sup>1</sup> H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio 1
rpm	Rotações por minuto
s	Simpleto
sl	Simpleto largo
TMS	Tetrametilsilano
Tr	Tempo de Retenção
μL	microlitro
μm	micrometro
u.m.a.	Unidade de Massa Atômica
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta-Visível
∅	Diâmetro
<i>v</i>	Estiramento
δ	Deslocamento Químico
<i>λ</i> <sub>max</sub>	Máximo de absorção no UV-Vis

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estruturas de fármacos antimaláricos e análogos.	2
Figura 2. Limonóides com atividade antimalárica isolados de folhas da espécie <i>Trichilia rubescens</i> (Meliaceae).	9
Figura 3. Primata <i>Brachyteles hypoxanthus</i> (muriqui-do-norte) do PESB.	11
Figura 4. Esquema simplificado do ciclo de vida de parasitos causadores de malária.	14
Figura 5. Fluxograma do fracionamento do extrato etanólico das folhas de <i>Alchornea glandulosa</i> (EAGL).	35
Figura 6. Fluxograma do fracionamento do extrato etanólico das folhas de <i>Miconia latecrenata</i> (EML).	36
Figura 7. Fluxograma do fracionamento do extrato etanólico das folhas de <i>Xylopia sericea</i> (EXS) Coleta 1.	37
Figura 8. Fluxograma do fracionamento do extrato diclorometânico das folhas de <i>Xylopia sericea</i> (EXS) Coleta 2, Parte 1.	39
Figura 9. Fluxograma do fracionamento do extrato diclorometano das folhas de <i>Xylopia sericea</i> (EXS) Coleta 2, Parte 2.	41
Figura 10. Fluxograma do fracionamento do extrato etanólico das folhas de <i>Xylopia sericea</i> (EXS) Coleta 2.	44
Figura 11. Gráficos das análises estatísticas de atividade antiplasmódica (%) e citotoxicidade ( $\mu\text{g/mL}$ ) dos 36 extratos avaliados.	47
Figura 12. Cromatograma (UPLC-DAD) EAGL EtOH, a 220 nm.	51
Figura 13. Cromatograma (UPLC-DAD) ELF H <sub>2</sub> O, a 220 nm.	51
Figura 14. Cromatograma (UPLC-DAD) EML EtOH, a 220 nm.	52
Figura 15. Cromatograma (UPLC-DAD) EPS EtOH, a 220 nm.	52

Figura 16. Cromatograma (UPLC-DAD) Coleta 1 (1) e EXS EtOH Coleta 2 (2), a 220 nm.	53
Figura 17. Esquema de fragmentação negativa por ESI, com quebra de O- e C-heterosídeo de um flavonoide hipotético.	56
Figura 18. Esquema de fragmentação negativa por ESI da quercetina.	56
Figura 19. Esquema de fragmentação negativa por ESI de uma proantocianidina do tipo B.	57
Figura 20. Estruturas dos compostos identificados no extrato etanólico de <i>Alchornea glandulosa</i> por UPLC-DAD-ESI-MS/MS.	62
Figura 21. Estruturas dos compostos identificados no extrato aquoso de <i>Laplacea fruticosa</i> por UPLC-DAD-ESI-MS/MS.	66
Figura 22. Estruturas dos compostos identificados no extrato etanólico de <i>Miconia latecrenata</i> por UPLC-DAD-ESI-MS/MS.	71
Figura 23. Estruturas dos compostos identificados no extrato etanólico de <i>Psychotria suterella</i> por UPLC-DAD-ESI-MS/MS.	77
Figura 24. Estruturas dos compostos identificados no extrato etanólico de <i>Xylopiá sericea</i> Coleta 1 por UPLC-DAD-ESI-MS/MS.	81
Figura 25. Atividade antiplasmódica de EAGL EtOH e frações obtidas por partições líquido – líquido e cromatografia em coluna.	83
Figura 26. Cromatogramas (UPLC-DAD) de EAGL Fr. But (1); EAGL FB/F3 (2); EAGL FB/F4 (3) e EAGL FB/F6 (4), a 220 nm.	84
Figura 27. Atividade antiplasmódica de EML EtOH e frações obtidas de partições líquido-líquido.	85
Figura 28. Cromatograma (UPLC-DAD) de EML Fr. But, a 220 nm.	86
Figura 29. Atividade antiplasmódica de EXS EtOH Coleta 1 e frações obtidas por partição líquido – líquido e colunas cromatográficas.	88

Figura 30. Cromatogramas (UPLC-DAD) de EXS Fr. DCM (1); EXS FD/F3 (2) e EXS FD/F3/F4 (3), a 220 nm.	89
Figura 31. Cromatograma, a 220 nm. Cromatograma (UPLC-DAD) de EXS FA/F2/RC, a 220 nm.	90
Figura 32. Espectros no UV de EXS FA/F2/RC em MeOH (A); na presença de $\text{AlCl}_3$ e HCl (B); presença de $\text{AcO}^- \text{Na}^+$ e $\text{H}_3\text{BO}_3$ (C) e na presença de $\text{MeO}^- \text{Na}^+$ (D).	93
Figura 33. Espectro no IV de EXS FA/F2/RC.	95
Figura 34. Estrutura química de EXS FA/F2/RC, (diidroquercetina-3-O- $\alpha$ -L-ramnosídeo) ( $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$ ).	96
Figura 35. Estruturas configuracionais de astilbina (1), neoastilbina (2), isoastilbina (3) e neoisoastilbina (4).	99
Figura 36. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de EXS FA/F2/RC (400 MHz, $\text{DMSO-d}_6$ ).	101
Figura 37. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de EXS FA/F2/RC. Expansão compreendida entre 1,0 e 3,6 ppm (400 MHz, $\text{DMSO-d}_6$ ).	102
Figura 38. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de EXS FA/F2/RC. Expansão compreendida entre 3,7 e 4,9 ppm (400 MHz, $\text{DMSO-d}_6$ ).	103
Figura 39. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de EXS FA/F2/RC. Expansão compreendida entre 4,4 e 7,0 ppm (400 MHz, $\text{DMSO-d}_6$ ).	104
Figura 40. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de EXS FA/F2/RC. Expansão compreendida entre 5,0 e 7,1 ppm (400 MHz, $\text{DMSO-d}_6$ ).	105
Figura 41. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de EXS FA/F2/RC. Expansão compreendida entre 9,0 e 12,0 ppm (400 MHz, $\text{DMSO-d}_6$ ).	106
Figura 42. Mapa de contornos COSY de EXS FA/F2/RC ( $\text{DMSO-d}_6$ ).	107
Figura 43. Mapa de contornos COSY de EXS FA/F2/RC. Expansão compreendida entre 2,5 e 6,5 ppm ( $\text{DMSO-d}_6$ ).	108

Figura 44. Espectro RMN de $^{13}\text{C}$ desacoplado de EXS FA/F2/RC (100 MHz, DMSO- $d_6$ ).	110
Figura 45. Espectro RMN de DEPT 135 de EXS FA/F2/RC (100 MHz, DMSO- $d_6$ ).	111
Figura 46. Mapa de contornos HMBC de EXS FA/F2/RC (DMSO- $d_6$ ).	114
Figura 47. Mapa de contornos HMBC de EXS FA/F2/RC. Expansão compreendida entre 1,5 e 6,5 ppm (DMSO- $d_6$ ).	115
Figura 48. Mapa de contornos HSQC de EXS FA/F2/RC (DMSO- $d_6$ ).	116
Figura 49. Mapa de contornos HSQC de EXS FA/F2/RC. Expansão compreendida entre 3,0 e 6,0 ppm (DMSO- $d_6$ ).	117
Figura 50. Cromatogramas (UPLC-DAD) de EXS DCM (1) e EXS EtOH (2), a 220 nm.	120
Figura 51. Atividade antiplasmódica de EXS DCM Coleta 2 e das frações obtidas colunas cromatográficas.	121
Figura 52. Cromatogramas (UPLC-DAD) de EXS FD/F2 (1); EXS FD/F2/F1 (2); EXS FD/F2/F1/F7 (3) e EXS FD/F2/F1/F6 (4), a 220 nm.	123
Figura 53. Cromatogramas (UPLC-DAD) de EXS FD/F2/F17 (1), EXS FD/F2/F17/F1 (2) e EXS FD/F2/F17/F1/F1 (3), a 220 nm.	124
Figura 54. Proposta de fragmentação (1) e estrutura (2) do composto EXS FD/F2/F17/F1/F1.	125
Figura 55. Cromatogramas (UPLC-DAD) de EXS FD/F2/F26 (1) e EXS FD/F2/F26/F2/F1/RC (2), a 220 nm	127
Figura 56. Diterpenos caurânicos de massa molecular 316 u.m.a. encontrados em espécies de <i>Xylopi</i> a.	128
Figura 57. Espectro no IV do composto EXS FD/F2/F26/F2/F1/RC.	130
Figura 58. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de EXS FD/F2/F26/F2/F1/RC (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).	133

Figura 59. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de EXS FD/F2/F26/F2/F1/RC (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ). Expansão compreendida entre 0,8 e 3,4 ppm.	134
Figura 60. Mapa de contornos COSY de EXS FD/F2/F26/F2/F1/RC (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).	135
Figura 61. Mapa de contornos COSY de EXS FD/F2/F26/F2/F1/RC (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ). Expansão compreendida entre 0,6 e 3,4 ppm.	136
Figura 62. Espectro RMN de $^{13}\text{C}$ de EXS FD/F2/F26/F2/F1/RC (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).	139
Figura 63. Espectro RMN de $^{13}\text{C}$ de EXS FD/F2/F26/F2/F1/RC (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ). Expansão compreendida entre 0,0 e 110 ppm.	140
Figura 64. Espectro RMN de $^{13}\text{C}$ DEPT 135 de EXS FD/F2/F26/F2/F1/RC (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).	141
Figura 65. Espectro RMN de $^{13}\text{C}$ e DEPT 135 de EXS FD/F2/F26/F2/F1/RC (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).	142
Figura 66. Mapa de contornos HMBC de EXS FD/F2/F26/F2/F1/RC (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).	145
Figura 67. Mapa de contornos HMBC de EXS FD/F2/F26/F2/F1/RC (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ). Expansão compreendida entre 0,0 e 3,5 ppm para $^1\text{H}$ e 0,0 e 60 ppm para $^{13}\text{C}$ .	146
Figura 68. Estrutura tridimensional de EXS FD/F2/F26/F2/F1/RC (ácido 7-oxo- <i>ent</i> -caur-16-en-19-oico).	147
Figura 69. Mapa de contornos NOESY de EXS FD/F2/F26/F2/F1/RC (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).	148
Figura 70. Atividade antiplasmódica de EXS FD/F7 e frações obtidas colunas cromatográficas.	150
Figura 71. Cromatogramas (UPLC-DAD) de EXS FD/F7 (1), EXS FD/F7/F3 (2), EXS FD/F7/F9 (3) e EXS FD/F7/F20 (4), a 220 nm.	151

Figura 72. Cromatogramas (UPLC-DAD) de EXS FD/F7/F9 (1), EXS FD/F7/F9/F4 (2), EXS FD/F7/F9/F8 (3) e EXS FD/F7/F9/F9 (4), a 220 nm.	153
Figura 73. Estrutura do alcaloide liriodenina.	154
Figura 74. Cromatogramas (UPLC-DAD) de EXS FD/F7/F20 (1), EXS FD/F7/F20/F7 (2), EXS FD/F7/F20/F9 (3) e EXS FD/F7/F20/F15 (4), a 220 nm.	157
Figura 75. Estrutura das acetogeninas annomontacina e 4-desoxi-annomontacina.	158
Figura 76. Estruturas das substâncias identificadas no extrato etanólico de <i>Xylopi sericea</i> Coleta 2 por UPLC-DAD-ESI-MS/MS.	162
Figura 77. Atividade antiplasmódica de EXS EtOH Coleta 2 e frações obtidas por partições líquido-líquido e colunas cromatográficas.	165
Figura 78. Cromatogramas (UPLC-DAD) de EXS EtOH (1), EXS EtOH MeOH/H <sub>2</sub> O (9/1) (2), Alcaloides 2 <sup>o</sup> /3 <sup>o</sup> /F28 (3) e EXS FMA/F3 (4), a 220 nm.	166
Figura 79. Cromatogramas (UPLC-DAD) de Alcaloides 2 <sup>o</sup> /3 <sup>o</sup> /F28/F17/F4 (1) e Alcaloides 2 <sup>o</sup> /3 <sup>o</sup> /F28/F10 (2), a 220 nm.	168
Figura 80. Estrutura do alcaloide O-metilmoschatolina.	168
Figura 81. Cromatograma (UPLC-DAD) de EXS FMA/F3/F31ppt, a 220 nm.	170
Figura 82. Estrutura do alcaloide anonaina.	171

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Referências bibliográficas sobre fitoquímica e atividades biológicas das 12 espécies vegetais selecionadas para avaliação de atividade antiplasmódica.	17
Tabela 2. Levantamento bibliográfico farmacobotânico para atividade antiplasmódica e/ou antimalárica de espécies dos gêneros selecionados para o presente trabalho.	22
Tabela 3. Espécies vegetais usadas na dieta do primata <i>Brachyteles hypoxanthus</i> selecionadas para avaliação de atividade antiplasmódica.	25
Tabela 4. Rendimento dos extratos obtidos.	27
Tabela 5. Prospecção fitoquímica dos extratos das espécies vegetais selecionadas, por CCD.	28
Tabela 6. Médias ( $\pm$ desvio padrão) da porcentagem de redução do crescimento do <i>Plasmodium falciparum</i> (W2) (pLDH) e citotoxicidade a HepG2 (MTT) dos extratos avaliados.	46
Tabela 7. Resultados da prospecção fitoquímica por CCD dos extratos das espécies selecionadas.	49
Tabela 8. Dados espectroscópicos e caracterização de constituintes do extrato etanólico de <i>Alchornea glandulosa</i> (EAGL) por UPLC-DAD-ESI-MS/MS.	61
Tabela 9. Dados espectroscópicos e caracterização de constituintes do extrato etanólico de <i>Laplacea fruticosa</i> (ELF) por UPLC-DAD-ESI-MS/MS.	65
Tabela 10. Dados espectroscópicos e caracterização de constituintes do extrato etanólico de <i>Miconia latecrenata</i> (EML) por UPLC-DAD-ESI-MS/MS.	70
Tabela 11. Dados espectroscópicos e caracterização de constituintes do extrato etanólico de <i>Psychotria suterella</i> (EPS) por UPLC-DAD-ESI-MS/MS.	76
Tabela 12. Dados espectroscópicos e caracterização de constituintes do extrato etanólico de <i>Xylopiya sericea</i> (EXS) Coleta 1 por UPLC-ESI-MS/MS.	80

Tabela 13. Atribuição dos sinais do espectro de RMN de $^1\text{H}$ e correlações observadas nos mapas de contorno COSY para EXS FA/F2/RC e comparação com dados da literatura para astilbina (400 MHz, DMSO- $d_6$ ).	98
Tabela 14. Atribuição dos sinais do espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ e DEPT 135 para EXS FA/F2/RC, obtido no presente trabalho, e comparação com dados da literatura para astibina (100 MHz, DMSO- $d_6$ ).	109
Tabela 15. Correlações heteronucleares observadas nos mapas de contornos HMBC e HSQC para EXS FA/F2/RC ( $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ 400 MHz, DMSO- $d_6$ ).	113
Tabela 16. Dados espectroscópicos e caracterização de constituintes de EXS FD/F2/F1/F6, EXS FD/F2/F1/F7 e EXS FD/F2/F17/F1/F1 por UPLC-DAD-ESI-MS/MS, ionização positiva.	126
Tabela 17. Atribuição dos sinais do espectro de RMN de $^1\text{H}$ e correlações observadas nos mapas de contorno COSY para EXS FD/F2/F26/F2/F1/RC e comparação com dados da literatura (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).	132
Tabela 18. Atribuição dos sinais do espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ e DEPT 135 para EXS FD/F2/F26/F2/F1/RC e comparação com dados da literatura (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).	138
Tabela 19. Correlações heteronucleares observadas nos mapas de contornos HMBC, HSQC e NOESY para EXS FD/F2/F26/F2/F1/RC ( $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ 400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).	144
Tabela 20. Dados espectroscópicos e caracterização de constituintes de EXS FD/F7/F9/F4, EXS FD/F7/F9/F8, amostra autêntica de liriodenina, EXS FD/F7/F20/F7, EXS FD/F7/F20/F9 e EXS FD/F7/F20/F15 por UPLC-DAD-ESI-MS/MS, ionização positiva.	155
Tabela 21. Dados espectroscópicos e caracterização das substâncias presentes no extrato etanólico de <i>Xylopiya sericea</i> Coleta 2 por UPLC-DAD-ESI-MS/MS.	161
Tabela 22. Dados espectroscópicos de Alc. 2 $^\circ$ /3 $^\circ$ /F28/F17/F4, Alc. 2 $^\circ$ /3 $^\circ$ /F28/F10 e EXS FMA/F3/F31ppt por UPLC-DAD-ESI-MS/MS, ionização positiva.	169

## RESUMO

O uso de espécies vegetais para o tratamento de malária é prática antiga, sendo o isolamento do composto quinina um marco para o estudo de Produtos Naturais antimaláricos. Visto a elevada incidência de malária em países endêmicos, como o Brasil, além da crescente resistência do *Plasmodium* aos fármacos atualmente usados, a descoberta de novas moléculas antiplasmódicas é de alta relevância. O uso do critério etológico para a seleção de novas espécies vegetais foi empregado com o objetivo de identificar diferentes espécies que não fazem parte do arsenal etnofarmacológico conhecido contra malária. A associação de diferentes técnicas cromatográficas a distintos métodos de análises químicas constituiu importante ferramenta para o isolamento e/ou identificação de Produtos Naturais. Desta forma, a triagem de diversos extratos vegetais oriundos de espécies selecionadas via critério etológico, seguido do fracionamento daqueles extratos ativos *in vitro* contra a cepa resistente W2 do *Plasmodium falciparum* permitiu a descoberta de 8 diferentes extratos, dentre os 36 analisados, que apresentaram atividade antiplasmódica. Identificação via UPLC-DAD-ESI-MS/MS no extrato etanólico de *Alchornea glandulosa* e *Miconia latecrenata* mostrou a presença de flavonoides e taninos hidrolisáveis enquanto que no extrato etanólico de *Psychotria suterella* identificou-se alcaloides  $\beta$ -carbolínicos e indólicos. Dos extratos diclorometano e etanol de folhas de *Xylopia sericea* foram identificados e isolados uma flavanona (diidroquetecina-3-O-ramnosideo) Coleta 1, um diterpeno caurânico (ácido 7-oxo-*ent*-caur-16-en-19-oico) e três alcaloides aporfínicos (liriodenina, O-metilmoschatolina e anonaina), tendo a liriodenina apresentado alta atividade antiplasmódica ( $IC_{50}$   $6,1 \pm 0,1$   $\mu\text{g/mL}$ ,  $CC_{50} \geq 1000,0$   $\mu\text{g/mL}$ ,  $IS > 164,47$ ), sendo possivelmente a promotora da atividade observada para os extratos e demais frações de *X. sericea* Coleta 2. Os resultados obtidos comprovam a validade do critério etológico para a seleção de espécies vegetais na investigação de atividade antiplasmódica, possibilitando a identificação de espécies vegetais nativas da Mata Atlântica, assim como extratos, frações e substâncias ativas frente ao *P. falciparum*.

Palavras-chave: Malária, Produtos Naturais, Etologia, Técnicas Cromatográficas, Identificações Espectroscópicas.

## ABSTRACT

The use of plant species for treatment of malaria is old practice, and the isolation of compound quinine a framework for the study of natural products antimalarials. Since the high incidence of malaria in endemic countries such as Brazil, and the increasing resistance of *Plasmodium* to the drugs currently in use, the discovery of new molecules antiplasmodicas is highly relevant. The use of ethological criteria for the selection of new plant species was used in order to identify different species that are not part of ethnopharmacological known arsenal against malaria. The combination of different chromatography techniques to separate chemical analysis methods was an important tool for the isolation and / or identification of natural products. In this way, screening of various plant extracts derived from species selected via ethological criteria, followed by fractionation of those active *in vitro* extracts against the resistant strain W2 *Plasmodium falciparum* has allowed the discovery of 8 different extracts, among the 36 analyzed, which showed antiplasmodial activity. Identification via UPLC-DAD-ESI-MS/MS in the ethanol extract of *Alchornea glandulosa* and *Miconia latecrenata* showed the presence of flavonoids and hydrolysable tannin while the ethanol extract of *Psychotria suterella* was identified alkaloid  $\beta$ -carboline and indole. From the extracts dichloromethane and ethanol from leaves of *Xylopia sericea* were identified and isolated a flavanone (dihydroquecetin-3-O-rhamnoside) Collection 1 is a diterpene kaurenic (7-oxo-*ent*-Kaur-16-en-19-oic acid) and three aporphine alkaloids (liriodenine, O-metilmoschatoline and anonaine) and the liriodenine presented high antiplasmodial activity ( $IC_{50}$   $6.1 \pm 0.1 \mu\text{g/mL}$ ,  $CC_{50} \geq 1000.0 \mu\text{g/mL}$ ,  $SI > 164.47$ ), possibly being the promoter activity observed of extracts and other fractions of *X. sericea* Collection 2. The results prove the validity the ethological criteria for the selection of plant species in research antiplasmodial activity, since it allowed the identification of native plant species of the Atlantic Forest, as well as extracts, fractions and substances active against the *P. falciparum*.

Keywords: Malaria, Natural Products, Ethological Approach, Chromatographic, Spectroscopic Identifications.

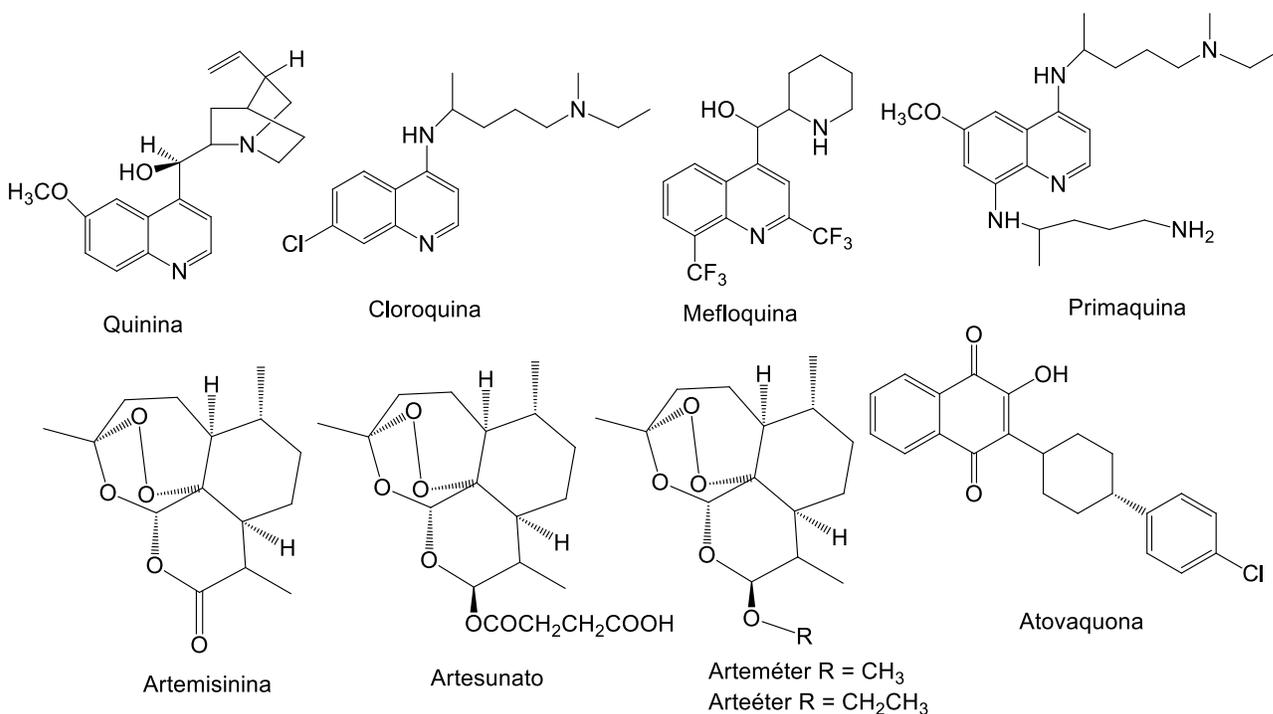
## 1. INTRODUÇÃO

A pesquisa multidisciplinar de Produtos Naturais (PN) de origem vegetal na busca de potenciais agentes terapêuticos e/ou de matérias-primas para a síntese de novas substâncias biologicamente ativas é uma importante estratégia, que concilia conservação da biodiversidade, fomento à atividade econômica e aumento da qualidade de vida (Patwardhan et al., 2004). Estima-se que dois terços da população mundial dependam de recursos vegetais como fontes terapêuticas primárias (McChesney et al., 2007). Além disso, estudos apontam que nos últimos 34 anos (1981 a 2014) quase dois terços de todos os medicamentos aprovados pela organização mundial de saúde são derivados ou inspirados em PN (Newman & Cragg, 2016).

Historicamente, plantas são usadas como fontes de medicamentos e continuam a servir como a base para muitos produtos farmacêuticos utilizados ainda hoje. Propriedades medicinais de espécies vegetais já foram descritas por assírios, egípcios, indianos e chineses, desde 2000 a.c. (Ginsburg & Deharo, 2011). Assim, PN oriundos de recursos vegetais são fonte de compostos com elevada importância terapêutica. Contudo, é notável o fato de que ainda hoje os recursos naturais são pouco estudados quando se considera o elevado número de espécies existentes. Estima-se que apesar da intensiva investigação da flora terrestre, apenas 15% das cerca de 300 mil espécies (algumas estimativas são de 500 mil espécies) de plantas superiores tem estudo fitoquímico e apenas 6% têm sido sistematicamente investigadas farmacologicamente (Balandrin et al., 1993, Fabricant & Farnsworth, 2001, Raskin et al., 2002).

Nesse sentido, o uso de PN para o tratamento de doenças parasitárias é bem conhecido e documentado. Um exemplo é o uso da espécie vegetal *Cinchona succiruba* (Rubiaceae), no tratamento da malária humana e febres há mais de três séculos (Kaur et al., 2009). Já o primeiro fármaco antimalárico, a quinina, foi isolado em 1820, também de espécies de *Cinchonas*, do Peru. Dessa forma, observa-se que 11 dos 15 medicamentos antimaláricos incluídos no quadro terapêutico da Organização Mundial de Saúde (OMS) são PN ou derivados, tendo a quinina como modelo para a síntese da cloroquina, primaquina e mefloquina (Bourdy et al., 2008) (Figura 1).

Figura 1. Estruturas de fármacos antimaláricos e análogos. Adaptado Oliveira et al. (2009).



Entretanto, considerando principalmente o aumento da resistência do *Plasmodium falciparum* à cloroquina, intensificou-se a pesquisa de novos agentes antimaláricos o que resultou na introdução da artemisinina e derivados na terapia da malária (Ridley, 2002) (Figura 1). Atualmente, são empregadas formulações combinatórias contendo derivados da artemisinina, chamadas de ACTs (Artemisinin-based Combination Therapy) como, por exemplo, a combinação de artemeter e lumefantrina (Coartem®), em uso no Brasil desde 2006, atovaquona e cloridrato de proguanilo (Malarone®), e quinina, quinidina e cinchonina (Quinimax®), dentre outras (Taylor & White, 2004, Winter et al., 2006). Porém, os primeiros indícios sobre resistência do *P. falciparum* a medicamentos derivados de artemisinina e terapias de combinação de drogas já são evidentes (Batista et al., 2009). Dessa forma, há consenso de que os PN desempenham papel predominante na descoberta e desenvolvimento de novas drogas para a quimioterapia antimalárica (Newman et al., 2003).

Estudos bibliográficos mostram um grande número de PN com atividade antiplasmódica\antimalárica pertencentes a diferentes classes estruturais (Schwickard &

Van Heerden, 2002, Kamatou et al., 2008, Batista et al., 2009, Choomuenwai et al., 2013, Hadi et al., 2013). Nas duas últimas décadas, os avanços de técnicas de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), Espectroscopia de Massas (EM) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN), aceleraram o isolamento e elucidação de biomoléculas, promovendo a intensificação em PD&I (Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação) de plantas como fontes de fármacos. O isolamento e identificação destas biomoléculas antiplasmódicas\antimaláricas foi fundamental para posteriores estudos de síntese total e/ou semi-síntese orgânica, que frequentemente são realizados com o objetivo de melhorar não só a atividade das substâncias naturais como também características toxicológicas e farmacocinéticas.

Nesse contexto, é importante ressaltar que o Brasil possui a maior diversidade biológica do mundo, estimada em cerca de 20% de todas as espécies vegetais do planeta, com mais de 55.000 espécies de plantas superiores conhecidas (Lewinsohn & Prado, 2002). Esta flora bastante diversificada representa uma fonte importante de PN biologicamente ativos e de valiosos modelos para a síntese de novos fármacos (Varanda, 2006).

Toda esta biodiversidade encontra-se distribuída em seis principais biomas, a Floresta Amazônica, o Pampa, a Caatinga, o Pantanal, o Cerrado e a Mata Atlântica sendo os dois últimos classificados como *hotspots*, pois são biomas de grande diversidade biológica e que estão entre os mais ameaçados de extinção, devido a grande pressão antrópica (Drummond et al., 2005). Dentre estes diferentes biomas, a Mata Atlântica apresenta-se com grande potencial para o desenvolvimento de pesquisas que objetivam a descoberta de novas drogas, pois agrega enorme diversidade e quantidade de recursos naturais. Estima-se que a Mata Atlântica possua cerca de 20 mil espécies vegetais, sendo 8 mil delas endêmicas (Myers et al., 2000, Tabarelli et al., 2005). São extensas áreas com flora ainda pouco conhecida do ponto de vista biológico, que abrigam de 1 a 8% da biodiversidade mundial (Fundação SOS Mata Atlântica, 2005).

## 2. JUSTIFICATIVA

Atualmente, a malária é a mais mortal e perigosa infecção parasitária em muitos países tropicais, principalmente no continente Africano. Este cenário se torna mais grave quando se considera a resistência do *P. falciparum* à artemisinina, o mais eficaz antimalárico disponível. Assim, novos esforços são necessários para a descoberta e desenvolvimento de novas drogas antimaláricas mais acessíveis e ativas, sendo a investigação de novas fontes de antimaláricos, como PN, de alta relevância (Batista et al., 2009, Ginsburg & Deharo, 2011).

Nesse sentido, a proposta de uso de critério etológico para a seleção de diferentes espécies vegetais do bioma Mata Atlântica frente a cepa resistente W2 de *Plasmodium falciparum* constitui trabalho inovador no Brasil. Diferentes estudos já mostraram atividade antimalárica para espécies vegetais consumidas por primatas em outros continentes. Ponto relevante nessa proposta consiste no fato do critério etológico possibilitar a identificação de espécies nativas cientificamente pouco investigadas, muitas vezes diferentes daquelas indicadas por outros critérios, como o etnofarmacológico e que muitas vezes leva ao estudo de espécies exóticas. Em bioma de grande diversidade biológica, como a Mata Atlântica, que apresenta uma série de espécies endêmicas, a abordagem etológica pode levar à descoberta de biomoléculas ativas contra os parasitos causadores de malária, dentre outras ações terapêuticas. Importante ressaltar também que este trabalho está inserido entre os objetivos do grupo de pesquisa BioPESB (Bioprospecção e Uso Sustentável dos Recursos Naturais da Serra do Brigadeiro), que já realiza estudos com espécies identificadas por meio do monitoramento dos primatas endêmicos *Brachyteles hypoxanthus* Kuhl (muriqui-do-norte), em bioma Mata Atlântica. Este grupo já realizou estudos de atividade antioxidante, antibacteriana, antimutagênica, além de trabalhos bibliográficos e comparativos das espécies identificadas por meio etológico e etnofarmacológico no Parque Estadual da Serra do Brigadeiro (Gontijo et al., 2007, Fávares, 2008, Leite et al., 2008, Gontijo et al., 2012, Leite et al., 2016).

Dessa forma, os resultados deste trabalho podem resultar além do propósito inicial, identificação e isolamento de novas moléculas ativas frente ao *P. falciparum*, na descoberta de novas espécies vegetais nativas com ação antiplasmódica. Acredita-se

ainda que este estudo contribua para a conservação de espécies vegetais, visto que, com a avaliação do potencial não-madeireiro de espécies nativas do bioma Mata Atlântica, a exploração de recursos vegetais poderá ser realizada de forma sustentável. Adicionalmente, a conservação das espécies vegetais que compõem a dieta da espécie *B. hipoxanthus* também implica em ação conservacionista para este primata cuja população encontra-se, atualmente, bastante reduzida (Machado et al., 2005).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo Geral

- ✓ Prospectar plantas da dieta dos primatas muriquis (*Brachyteles hipoxanthus*) com potencial ação antiplasmódica.

#### 3.2. Objetivos Específicos

- ✓ Obter extratos em etanol, etanol-água (7/3) e água das folhas das 12 espécies vegetais selecionadas entre aquelas 25 consumidas na dieta do primata *B. hipoxanthus*;
- ✓ Avaliar a atividade antiplasmódica dos extratos/frações/substâncias obtidos pela quantificação da enzima lactato desidrogenase do *Plasmodium falciparum* (pLDH);
- ✓ Avaliar a citotoxicidade dos extratos/frações/substâncias obtidos em culturas de células HepG2;
- ✓ Realizar o fracionamento biomonitorado de extratos mais ativos;
- ✓ Realizar a prospecção fitoquímica, por cromatografia em camada delgada (CCD) para identificação dos principais grupos de metabólitos secundários presentes nos extratos obtidos;
- ✓ Avaliar o perfil cromatográfico dos extratos/frações/substâncias obtidos por UPLC-DAD;
- ✓ Identificar compostos majoritários de extratos e frações ativas via UPLC-DAD-ESI-MS/MS;
- ✓ Obter os espectros no Ultravioleta, Infravermelho, de Massas e de RMN de substâncias isoladas, a fim de elucidar a estrutura química destes compostos.

## 4. REVISÃO DA LITERATURA

### 4.1. Abordagem Etológica

Muito importante na bioprospecção da biodiversidade vegetal é a definição dos critérios para a seleção das espécies a serem investigadas, tendo em vista a relevância das especificidades das informações que podem ser levantadas. Dentre as estratégias para a seleção de espécies para bioprospecção citam-se o acesso randomizado e o acesso guiado por diferentes critérios, tais como quimiotaxonômicos, etnofarmacológicos e, mais recentemente, etológicos (Krief, 2004). Este último tem sido apontado como um caminho muito promissor para a descoberta de novos PN de potencial valor terapêutico (Carrai et al., 2003, Albuquerque & Hanazaki, 2006).

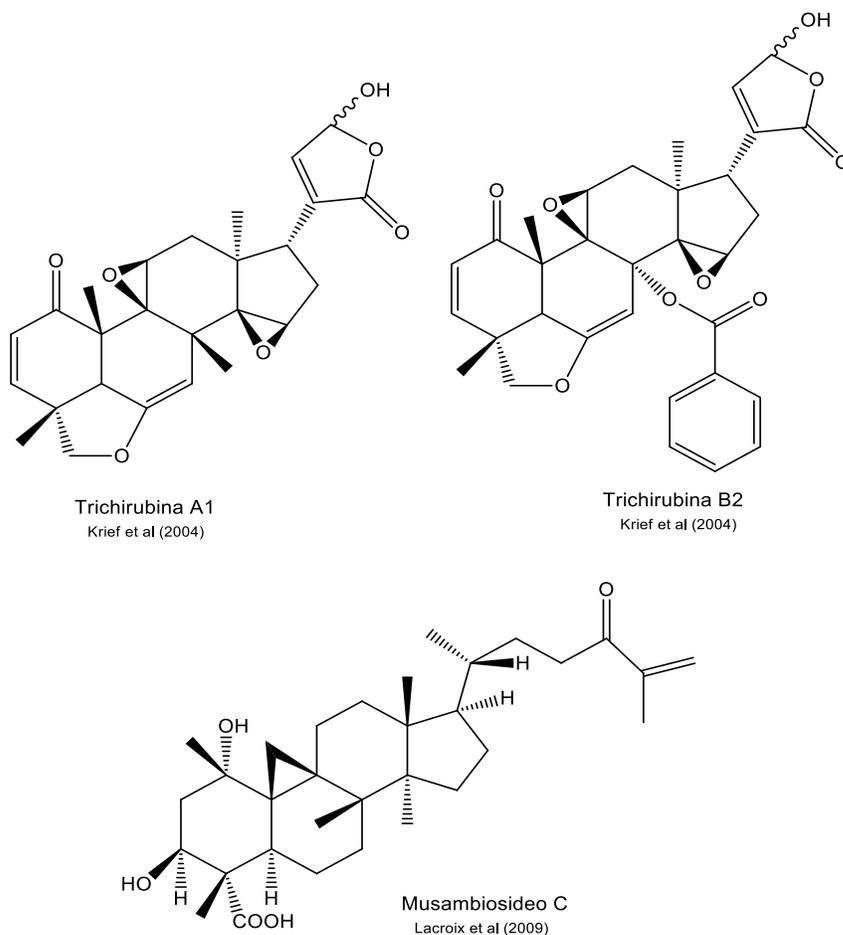
A abordagem etológica é relatada em diferentes áreas da ciência, como na biologia e na psicologia. Nesse sentido, o estudo zoofarmacognóstico tem como premissa básica que animais selvagens podem selecionar e utilizar plantas específicas com propriedades medicinais para o tratamento de doenças e para proteção contra parasitas (Raman & Kandula, 2008). Em uma perspectiva mais ampla, esta abordagem coloca o metabolismo secundário vegetal como potencial fonte medicamentosa, uma vez que grande parte do material vegetal que é consumido pelos animais contém matriz de metabólitos secundários extremamente diversificada e ativa biologicamente (Huffman & Seifu, 1989, Ohigashi et al., 1994, Plotkin, 2000). No entanto, o uso do critério etológico ainda é uma estratégia pouco explorada para acesso à biodiversidade visando a bioprospecção farmacêutica e, relativamente nova, na pesquisa sobre o comportamento animal (Huffman, 2001, Engel, 2002).

Diferentes trabalhos descrevem evidências claras de que primatas fazem uso de plantas para fins medicamentosos, promovendo desde de trituração da parte vegetal usada até remoção de cascas e fibras das plantas (Hoffman, 2001). Há ainda, relatos de que bandos de primatas fazem uso da quantidade de ingestão, agindo de acordo com grupo (macho, fêmea, filhotes e grávidas) e possuem também, sazonalidade no uso de algumas plantas (Hoffman, 2003). Na literatura, são diversos os relatos em que foi empregada a abordagem etológica como critério para a seleção de espécies na busca de

novas drogas vegetais. Propriedades terapêuticas como antibióticos, antiinflamatórios, antipiréticos e imunoestimulantes já foram descritas para espécies consumidas por primatas (Huffman et al., 1998, Cousins & Huffman, 2002, Krief, 2003). Em estudos com babuínos, Lozano (1998) e Engel (2002) verificaram o consumo esporádico e em baixas quantidades diárias de folhas de determinadas plantas, que são bem relatadas na literatura por suas propriedades estimulantes, apesar da alta disponibilidade para consumo das espécies vegetais analisadas. Carrai et al. (2003), observaram que fêmeas de lêmures (*Propithecus verreauxi*) que apresentaram ingestão de plantas ricas em taninos durante o período de lactação, tiveram aumento no peso corpóreo e estimulação da secreção do leite, fato que está de acordo com algumas propriedades biológicas desses polifenóis.

Estudos mostram também ação antimalárica de espécies consumidas por primatas. Em trabalho realizado por Krief et al. (2004), foi observado o uso de folhas da espécie *Trichilia rubescens* (Meliaceae) por chimpanzés em uma região endêmica de malária e constatou-se, em bioensaios *in vitro*, que o extrato metanólico das folhas desta espécie possui expressiva ação antimalárica. Além disso, foram isolados dois novos limonoides, as Trichirubina A1 e Trichirubina B2 (Figura 2) que apresentaram alta atividade antimalárica frente a cepa cloroquina resistente FcB1 (IC<sub>50</sub> 0,3 e 0,2 µg/mL, respectivamente). Krief et al. (2006) investigaram a atividade biológica de 24 espécies vegetais consumidas por chimpanzés, sendo observadas atividades antibacteriana, anti-leishmania e também antimalárica. Klein et al. (2008) observaram que chimpanzés ingeriam solo com folhas da espécie vegetal *Trichilia rubescens*. Testes *in vitro* novamente demonstraram a ação antimalárica desta espécie. Lacroix et al. (2009) verificaram ainda que o esteroide Musambiosideo C isolado do extrato acetato de etila das folhas da espécie *Markhamia lutea* (Bignoneaceae) consumida por chimpanzés, apresenta atividade antiplasmódica frente a cepa cloroquina resistente FcB1 (IC<sub>50</sub> 10,2 µg/mL), assim como o extrato (IC<sub>50</sub> 10,2 µg/mL).

Figura 2. Limonóides com atividade antimalárica isolados de folhas da espécie *Trichilia rubescens* (Meliaceae). Adaptado de Krief et al. (2004) e Lacroix et al (2009).



Sabe-se que primatas e humanos apresentam o protozoário *P. knowlesi* que causa quadros clínicos tão severos quanto os observados para *P. falciparum* (Cox-Singh, 2010). Além disso, primatas apresentam também infecção por espécies de *Plasmodium* causadoras da malária em humanos como *P. falciparum* (Liu et al., 2010). Dessa forma, é possível que primatas também façam uso de determinadas espécies vegetais que podem ser usadas com finalidades terapêuticas antimaláricas. Outro aspecto a ser ressaltado é que, embora altamente concentrada na região Amazônica (99% dos casos), a malária foi difundida para fora desta região no Brasil. Estudo da epidemiologia espacial e temporal da malária em regiões extra-amazônica do Brasil aponta total de 6,092 casos registrados entre 2007-2014 (Lorenz et al., 2015). Portanto, apesar de não ser inserido em área

endêmica de malária, os muriquis que vivem no bioma Mata Atlântica podem, eventualmente, estar infectados por plasmódios e/ou outros parasitos.

Assim, em biomas com grande variedade de espécies vegetais endêmicas, como a Mata Atlântica, muitas plantas ainda são desconhecidas quanto ao seu uso farmacológico/terapêutico, sendo necessários critérios alternativos para a seleção de representantes deste patrimônio genético de grande interesse e valor para a pesquisa farmacêutica. Estas espécies, em sua maioria nativas, uma vez que são consumidas por primatas, bem próximos do *Homo sapiens*, possuem baixa toxicidade, apresentando assim, grande probabilidade de não apresentar toxicidade também em testes pré-clínicos. Nesse sentido, o critério etológico surge então como uma interessante ferramenta para identificação de drogas vegetais, visando isolamento e identificação de potenciais fitofármacos.

#### 4.2. Abordagem Etológica no Parque Estadual da Serra do Brigadeiro - MG

A espécie *Brachyteles hypoxanthus* Kuhl, conhecida popularmente por muriqui-do-norte (Figura 3), é uma espécie endêmica da Mata Atlântica, exclusivamente herbívora, sendo o maior primata das Américas (Strier, 1992). Devido, principalmente, à fragmentação de seu habitat e à caça ilegal (Mendes et al., 2005), a espécie se encontra criticamente em perigo de acordo com a Lista Oficial de Espécies da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção (Machado et al., 2005). Estima-se que menos de 1000 indivíduos da espécie *B. hypoxanthus* sobrevivam em alguns fragmentos isolados de Mata Atlântica nos estados de Minas Gerais, Espírito Santo e sul da Bahia (Mourthé, 2006). No Parque Estadual da Serra do Brigadeiro (PESB) está localizado um corredor florestal que abriga uma das maiores populações de muriquis-do-norte do Brasil (Mendes et al., 2005, Moreira et al., 2006).

Figura 3. Primata *Brachyteles hypoxanthus* (muriqui-do-norte) do PESB. Adaptado de Fávares (2008).



Nesse contexto, no período de maio a outubro de 2006, pesquisadores do grupo BioPESB monitoraram 43 indivíduos da espécie *B. hypoxanthus*, a fim de obter dados sobre os itens alimentares vegetais consumidos por eles, observando-se aspectos como a parte vegetal ingerida (folhas, frutos, flores, entre outros) e frequência de consumo (Fávares, 2008). Nesta ocasião foram identificadas 25 espécies vegetais consumidas pelo primata muriqui-do-norte, a saber: *Aegiphilla sellowiana* Cham. (Verbenaceae), *Alchornea glandulosa* Poepp. & Endl. (Euphorbiaceae), *Amaioua guianensis* Aubl. (Rubiaceae), *Cecropia* sp. (Urticaceae), *Croton floribundus* Spreng. (Euphorbiaceae), *Ficus* cf. *mexiae* Standl. (Moraceae), *Laplacea fruticosa* (Schrad.) (Theaceae), *Macropeltus dentatus* (Perkins) I.Santos & Peixoto (Monimiaceae), *Marlierea racemosa* (Vell.) Kiaersk. (Myrtaceae), *Meriania clausenii* Triana (Melastomataceae), *Miconia* sp. (Melastomataceae), *Miconia latecrenata* (DC.) Naudin (Melastomataceae), *Myrsine ferruginea* (Ruiz & Pavón) Sprengel (Myrsinaceae), *Nectandra oppositifolia* Nees (Lauraceae), *Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer (Lauraceae), *Psychotria suterella* Müll. Arg. (Rubiaceae), *Psychotria vellosiana* Benth. (Rubiaceae), *Rudgea jasminoides* (Cham.) Müll. Arg. (Rubiaceae), *Schefflera calva* (Cham.) Frodin & Fiaschi (Araliaceae), *Senna macranthera* (Collad.) S.Irwin & Barneby (Fabaceae), *Solanum leucodendron* Sendtn. (Solanaceae), *Solanum swartzianum* Roem. & Schult (Solanaceae), *Tovomitopsis saldanhae* Engl. (Clusiaceae), *Vochysia* cf. *magnifica* Warm. (Vochysiaceae) e *Xylopia sericea* A.St.-Hil. (Annonaceae).

Levantamento bibliográfico sobre as 25 espécies vegetais identificadas mostrou que apenas 7 (27%) apresentavam estudos relacionados à constituição química ou ação farmacológica, ou seja, 73% (18) das espécies consumidas pelo *B. hypoxanthus* não foram ainda objeto de qualquer prospecção farmacêutica (Gontijo et al., 2007, Fávoro, 2008). Em outro trabalho de pesquisadores do grupo BioPESB, foi analisada também, a diferença de informações sobre espécies vegetais obtidas através de critério etológico e etnofarmacológico. Assim, observou-se que 100% das espécies consumidas pelos primatas eram nativas da Mata Atlântica, enquanto somente 40% das espécies levantadas etnofarmacologicamente eram nativas deste bioma. Além disso, das espécies diagnosticadas através de critério etológico, 60% não apresentaram estudos terapêuticos, sendo que apenas cerca de 25% delas possuem estudos fitoquímicos e farmacológicos. Já das espécies observadas por abordagem etnofarmacológica, somente 20% não apresentaram estudos terapêuticos, enquanto que 70% delas possuem estudos fitoquímicos e farmacológicos (Leite et al., 2008, Leite et al., 2016). Dessa forma, a escassez de trabalhos científicos referentes às espécies vegetais consumidas pelo primata *B. hypoxanthus* incentivou o estudo fitoquímico e a avaliação do potencial terapêutico de algumas daquelas espécies relatadas no trabalho realizado por Fávoro (2008).

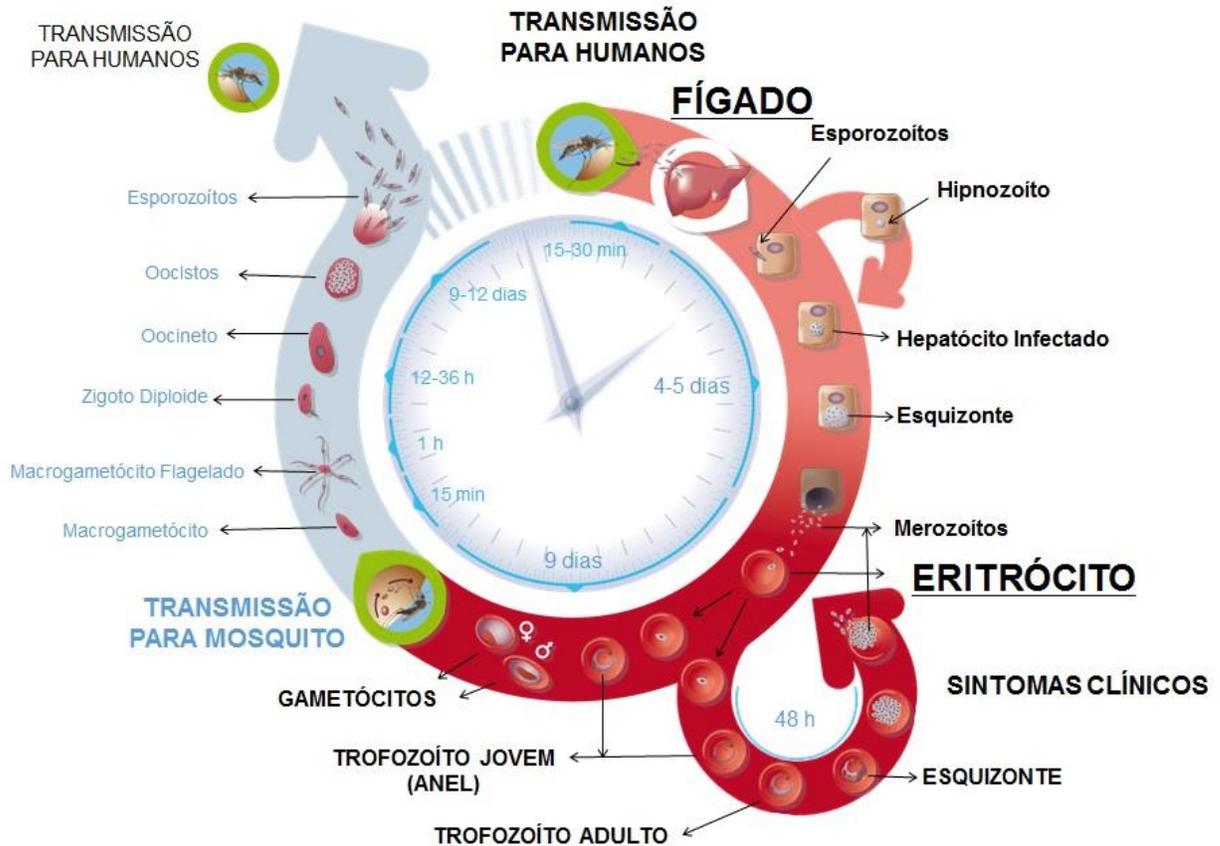
#### 4.3. Malária

A malária é uma doença infecciosa parasitária grave, recorrente em muitas regiões tropicais e subtropicais, responsável por grande parte dos investimentos em saúde pública de países em desenvolvimento (Arrow et al., 2004). De acordo com o último Relatório Mundial da Malária, milhões de pessoas ainda não possuem acesso as condições de que necessitam para prevenir e tratar a malária, principalmente em países endêmicos do continente africano (WHO, 2015). Estima-se que 3,2 bilhões de pessoas continuam em risco de serem infectadas pelos *Plasmodium falciparum* e/ou *P. vivax*, os dois principais agentes causadores da doença (WHO, 2015). Nesse contexto, o Brasil se encontra entre os trinta países com maior incidência de malária no mundo, tendo apresentado cerca de 140.000 casos no ano de 2015 (MS, 2016).

Sabe-se que as principais espécies de parasitos da malária humana são *Plasmodium ovale*, *P. malariae*, *P. knowlesi*, *P. vivax* e *P. falciparum*, sendo as duas últimas as mais comuns (WHO, 2011). No Brasil há predominio do *P. vivax*, com registro de 85% dos casos de malária em 2008 (MS, 2012). Entre os principais eventos clínicos relacionados à malária estão febre, sensação de mal-estar, acidose metabólica, calafrios, dores musculares, fadiga, anemia e comprometimento de baço, rins e fígado (Neves et al., 2005).

Os sintomas da malária começam a se manifestar entre 9 e 40 dias após a infecção, por consequência do ciclo eritrocítico do parasito, dependendo da espécie de *Plasmodium*, sendo algumas particularidades inerentes a cada espécie, responsáveis pela ação mais branda ou grave da doença (De Paula, 2014). Assim, após a transmissão do parasito para o hospedeiro vertebrado feita por fêmeas do mosquito do gênero *Anopheles*, formas infectantes do parasito (esporozoítos) se alojam nos hepatócitos, multiplicando-se por esquizogonia, dando origem a milhares de merozoítos no chamado ciclo-hepático ou exoeritrocítico (Figura 4). Espécies de *P. vivax* e/ou *P. ovale* podem formar hipnozoítos, permanecendo em estados latente por meses ou anos (Wells et al., 2010). Com a liberação dos merozoítos na corrente sanguínea há a invasão das hemácias, dando início ao ciclo eritrocítico, fase na qual ocorre a maioria dos sintomas clínicos citados (Coura et al., 2006). Neste ciclo, há a diferenciação do parasito em estágios infectivos de trofozoítos jovens (estágio de anel) e trofozoítos adultos, formando esquizontes, que após rompimento darão origem a novos merozoítos que reiniciarão o ciclo (Figura 4). A liberação de metabólitos do parasito durante o ciclo eritrocítico e a destruição de hemácias não parasitadas formam os quadros mais graves da malária (De Paula, 2014). Ainda durante o ciclo eritrocítico, alguns merozoítos sanguíneos podem diferenciar-se em gametócitos, infectantes do hospedeiro invertebrado, promovendo a continuidade da transmissão através da contaminação dos mosquitos fêmeas *Anopheles* (Aly et al., 2009) (Figura 4).

Figura 4. Esquema simplificado do ciclo de vida de parasitos causadores de malária. Adaptado de MMV (2016).



#### 4.4. Produtos Naturais Antimaláricos

A malária continua sendo um dos maiores desafios de saúde pública enfrentados pela humanidade, sendo a busca de fármacos, tanto em termos de eficácia e custo, um imperativo de saúde global (Cragg & Newman, 2013). Historicamente, plantas são uma fonte importante de drogas antimaláricas. A excepcional complexidade e diversidade molecular de PN de origem vegetal, coloca o estudo da flora como fundamental no processo da descoberta de novas drogas ativas contra malária. O isolamento da molécula quinina a partir das cascas de espécies de *Cinchona* (*C. officinalis*), relatado em 1820, pode ser considerado o melhor exemplo da descoberta e desenvolvimento de drogas a partir do estudo de espécies vegetais, uma vez que a quinina constituiu um modelo para a

síntese de quinolinas antimaláricas, como cloroquina e mefloquina (Figura 1) (Cragg & Newman, 2013).

Fármacos antimaláricos como os pertencentes às classes das quinolinas e artemisininas atuam no ciclo eritrocítico do parasito. A ação antimalárica destes fármacos está relacionada a inibição da formação da hemozoína no vacúolo digestivo do parasito, fruto da degradação de hemoglobina, com liberação de sua porção ferro (ferriprotoporfirina IX), pelos grupos farmacofóricos quinolínicos e endoperóxidos (Fitch, 2004, Goldberg, 2005). Aos antimaláricos artemisinínicos atribui-se ainda formação de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), originárias da quebra do anel endoperóxido (Wang et al., 2010). A formação de EROs é também um dos mecanismos de ação de uma importante classe de fármacos derivados de quinonas, como a atovaquona (Figura 1), que operam na inibição da cadeia transportadora de elétrons (Painter et al., 2007).

Apesar da existência de um arsenal de medicamentos antimaláricos, com diferenças importantes no local e mecanismo de ação (Aguiar et al, 2012), o controle desta infecção é cada vez mais difícil devido ao surgimento de novas linhagens de *Plasmodium* resistentes aos medicamentos frequentemente utilizados (Craft, 2008), sendo o uso indiscriminado de agentes antimaláricos a principal causa de resistência (Golenser et al., 2006). O aumento da resistência de diferentes cepas de *Plasmodium* limita o sucesso no tratamento da malária, quer para o tratamento preventivo ou para propósitos curativos (Greenwood & Mutambigwa, 2002, Noedl et al., 2003).

Assim, o estudo visando a descoberta de novos agentes antimaláricos é de grande importância no cenário das pesquisas farmacêuticas, colocando PN e derivados como primordiais em PD&I. Espécies vegetais de diferentes *taxa*, em diferentes regiões do planeta têm sido investigadas quanto à sua atividade antiplasmódica/antimalárica, sendo descrita uma diversidade de extratos e substâncias ativas *in vitro* e *in vivo*, com intuito de se obter novos fármacos (He et al., 2006, Nguyen-Pouplin et al., 2007, Kaur et al., 2009, Chinchilla-Carmona et al., 2011, Lacroix et al., 2011, Muthaura et al., 2011, Musila et al., 2013).

#### 4.5. Espécies Vegetais Investigadas para Avaliação Antiplasmódica

Dentre as 25 espécies vegetais identificadas na dieta do muriqui-do-norte, 12 foram selecionadas para avaliação da atividade antiplasmódica e estudo fitoquímico das espécies ativas. O critério de escolha destas 12 espécies foi a maior possibilidade de coleta, uma vez que muitas das espécies são árvores de grande porte, para as quais não foi possível coleta. Dados referentes à revisão bibliográfica das 12 espécies selecionadas são apresentados na Tabela 1. De forma geral, a maior parte dos testes relacionados as espécies selecionadas refere-se a estudos antioxidantes e antibacterianos, com predominância de estudos com extratos etanólicos (Tabela 1).

Tabela 1. Referências bibliográficas sobre fitoquímica e atividades biológicas das 12 espécies vegetais selecionadas para avaliação de atividade antiplasmódica.

Espécie Vegetal	Família Botânica	Parte Vegetal Estudada	Extrato/Substância	Atividade Biológica	Referência Bibliográfica
<i>Alchornea glandulosa</i>	Euphorbiaceae	Folhas	EtOH/polifenóis	Atividade larvicida.	Urrea-Bulla et al., 2004.
			Compostos fenólicos isolados	Atividade antioxidante e antiulcerogênica.	Morais et al., 2010. Sumbul et al., 2011.
			MeOH/mistura de esteroides, terpenoides, alcaloides e compostos fenólicos.	Efeito citostático para melanoma.	Conegero et al., 2003.
			MeOH	Atividade antioxidante <i>in vitro</i> .	Calvo et al., 2007.
			AcOEt/MeOH	Atividade antiinflamatória <i>in vivo</i> .	Lopes et al., 2005.
			AcOEt/alcaloides	Atividade antiangiogênica <i>in vivo</i> .	Lopes et al., 2011.
			MeOH	Ação mutagênica.	Santos et al., 2010.
H <sub>2</sub> O/polifenóis	Ação antioxidante, antibacteriana e antimutagênica.	Gontijo et al., 2012.			
<i>Amaiuoa guianenses</i>	Rubiaceae	Folhas	EtOH/alcaloides	Ação antioxidante	Oliveira et al., 2009c.
<i>Laplacea</i>	Theaceae	Folhas	MeOH/DCM	Atividade citotóxica em	Calderon et al., 2003.

<i>fruticosa</i>				células humanas.	
		Folhas	EtOH e DCM	Efeito citostático em células tumorais humanas.	Pais, 2011.
<i>Miconia latecrenata</i>	Melastomataceae	Folhas	H <sub>2</sub> O/polifenóis	Ação antioxidante, antibacteriana e antimutagênica.	Gontijo et al., 2012.
		Folhas	Óleo essencial. Presença em alta concentração do polifenol safrol, além de fenilpropanóides, esteroides, sesquiterpenos e cumarinas.	-	Marques & Massayoshi, 1999. Lordello et al., 2000. Oltamari et al., 2004.
		Folhas	H <sub>2</sub> O/polifenóis	-	-
<i>Ocotea odorifera</i>	Lauraceae	Folhas	Óleo essencial/polifenóis	Ação antioxidante, antibacteriana e antimutagênica.	Gontijo et al., 2012.
		Folhas	H <sub>2</sub> O/polifenóis	Ação antifúngica e larvicida.	Pinto et al., 2010. Castro & Lima, 2011.
		Folhas, cascas de troncos e cascas de raízes.	-	Ação alelopática	Carmo et al., 2007.
<i>Nectandra oppositifolia</i>	Lauraceae	-	-	-	-
		Folhas	EtOH/alcaloides	Efeito analgésico.	Santos et al., 2001.

<i>Psychotria suterella</i>	Rubiaceae	Folhas	H <sub>2</sub> O/polifenóis	Ação antioxidante e antibacteriana.	Gontijo et al., 2012.
		Folhas	H <sub>2</sub> O/polifenóis	Ação antioxidante e antibacteriana.	Gontijo et al., 2012.
<i>Psychotria vellosiana</i>	Rubiaceae	Folhas	EtOH/DCM	Ação antioxidante <i>in vitro</i> para o extrato etanólico, toxicidade <i>in vivo</i> e alto valor nutricional.	Vieira, 2010.
		Folhas	EtOH	Ação antimicobacteriana com ausência de citotoxicidade para células de mamíferos.	Ramos et al., 2008.
		Folhas	EtOH	Atividade fungicida	Oliveira et al., 2009b.
<i>Rudgea jasminoides</i>	Rubiaceae	Folhas	AcOEt. Isolamento de terpenos e antraquinonas.	-	Oliveira et al., 2007. Lopes et al., 1999.
		Folhas	H <sub>2</sub> O/polifenóis	-	
		Folhas		Ação antioxidante e antibacteriana.	Gontijo et al., 2012.
<i>Schefflera</i>	Araliaceae	-	-	-	-

<i>calva</i>					
<i>Solanum swartzianum</i>	Solanaceae	Folhas	H <sub>2</sub> O/polifenóis	Ação antioxidante e antibacteriana.	Gontijo et al., 2012.
		Raiz	HEX/ácido caurênico(diterpeno)/ácido xilópico	Ação mutagênica	Cavalcanti et al., 2010.
		Folhas e frutos	Óleo essencial	Atividade acaricida.	Pontes et al., 2007.
<i>Xylopi sericea</i>	Annonaceae		HEX/Mono e diterpeno	-	Takahashi et al., 2001.
		Sementes	Óleo essencial	-	Craveiro et al., 1986.
		Fruto			

#### 4.6. Estudo Bibliográfico Farmacobotânico das Espécies Identificadas

Levantamento bibliográfico farmacobotânico realizado mostrou que muitas espécies vegetais pertencentes ao mesmo gênero das 12 espécies selecionadas para este trabalho já foram avaliadas quanto a sua atividade antimalárica e/ou antiplasmódica, ou ainda constam de levantamentos etnofarmacológicos (Tabela 2). Este fato é de grande importância neste trabalho, encorajando o estudo das espécies ainda não avaliadas para atividade antiplasmódica e/ou antimalárica, uma vez que estudos farmacobotânicos são também importantes ferramentas para seleção de alvos terapêuticos a serem avaliados, aumentando a probabilidade de sucesso em trabalhos com espécies vegetais.

Tabela 2. Levantamento bibliográfico farmacobotânico para atividade antiplasmódica e/ou antimalárica de espécies dos gêneros selecionados para o presente trabalho.

Gênero Botânico	Espécie Vegetal	Parte Vegetal Estudada	Extrato (Solvente) /Substância	Ação Antiplasmódica	Citotoxicidade	Referência Bibliográfica
<i>Alchornea</i>	<i>Alchornea cordifolia</i>	Folhas	EtOH, HCl <sub>3</sub> e EtOEt e ácido elágico	Ação moderada do extrato EtOH (IC <sub>50</sub> 7,1 µg/mL) e ácido elágico (IC <sub>50</sub> 0,1 µg/mL).	Células HeLa (CC <sub>50</sub> 2,2 µg/mL ácido elágico)	Banzouzi et al., 2002.
	<i>Alchornea cordifolia</i>	Folhas	EtOH e H <sub>2</sub> O	(IC <sub>50</sub> 3,4 µg/mL aquoso) e (IC <sub>50</sub> 3,2 µg/mL etanólico).	Células HeLa (CC <sub>50</sub> 54,9 µg/mL)	Mustofa et al., 2000.
	<i>Alchornea cordifolia</i>	Fruto	H <sub>2</sub> O	IC <sub>50</sub> 4,9 µg/mL	CC <sub>50</sub> 340 µg/mL	Avisi et. Al., 2011.
	<i>Alchornea sidifolia</i>	Folhas e Ramos	EtOH/Fração BuOH e AcOEt	(62% a 2,5 mg/mL BuOH e 35% AcOEt a 2,5 mg/mL)	-	Gibim et. al.
<i>Amaiua</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Laplacea</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Miconia</i>	<i>Miconia racemosa</i>	Folhas	EtOH	Uso etnofarmacológico	-	Antoun et al., 1993. Mariath et al., 2009.
	<i>Miconia rubiginosa</i>					
<i>Ocotea</i>	<i>Ocotea comoriensis</i>	Cascas	MeOH	IC <sub>50</sub> 10 µg/mL	-	Menut et al., 2002.
	<i>Ocotea pretiosa</i>	Cascas e	-	Uso		

		raízes		etnofarmacológico		Botsaris, 2007.
	<i>Ocotea odorifera</i>	Cascas e raízes	Óleo essencial e triterpenos	Uso etnofarmacológico	-	Botsaris, 2007.
	<i>Ocotea usambarensis</i>	Cascas	-	Uso etnofarmacológico.	-	Muthaura et al., 2007.
<i>Nectandra</i>	<i>Nectandra salicifolia</i>	Folhas e cascas	Extrato MeOH e isolamento de 15 alcaloides	IC <sub>50</sub> 294 - 9020 ng/mL	-	Bohlke et al., 1996.
	<i>Nectandra megapotamica</i>	Cascas	Extrato EtOH/H <sub>2</sub> O (9/1) e lignanas isoladas	IC <sub>50</sub> 2900 ng/mL	Não tóxico a Vero	Filho et al., 2008.
<i>Psychotria</i>	<i>Psychotria klugii</i>	Cascas e caule	EtOH e alcaloides isolados	IC <sub>50</sub> 940 ng/mL	Não tóxico a Vero	Muhammad et al., 2003.
<i>Rudgea</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Schefflera</i>	<i>Schefflera umbellifera</i>	Folhas	EtOH e H <sub>2</sub> O	IC <sub>50</sub> > 50 µg/mL	CC <sub>50</sub> > 50 µg/mL	De Villiers et al., 2010.
	<i>Schefflera umbellifera</i>	Folhas	MeOH/DCM (1/1), Frações e Substâncias isoladas polifenóis	IC <sub>50</sub> 3,2 µg/mL	-	Mthembu et al., 2010.
	<i>Solanum nudum</i>	Folhas	EtOEt/Esteroides/	-	-	Pabón et al., 2002, 2003, 2011. Lodono et al., 2006.
	<i>Solanum tuberosum</i>	-	Glicoalcaloides	<i>In vivo</i>	-	Chen et al.,

<i>Solanum</i>	<i>Solanum nigrum</i>	-	EtOH	IC <sub>50</sub> 50 µg/mL	CC <sub>50</sub> 60 µg/mL	2010. Ramazani et al., 2010.
	<i>Solanum surattense</i>	Partes aéreas				
	<i>Solanum alatum</i>	Partes aéreas	EtOH	IC <sub>50</sub> > 200 µg/mL	Não determinado	Ramazani et al., 2010.
	<i>Xylopiã brasilienses</i>	Sementes e cascas	-	Uso etnofarmacológico	-	Botsaris, 2007.
	<i>Xylopiã brasilienses</i>	Folhas	EtOH/Alcaloides isolados	IC <sub>50</sub> 52 µg/mL	-	Fischer et al., 2004.
<i>Xylopiã</i>	<i>Xylopiã frutescens</i>	Partes aéreas	Eter/AcOEt (1/1)	IC <sub>50</sub> 21,9 µg/mL	CC <sub>50</sub> > 30 µg/mL	Jenett-Siems et al., 1999.
	<i>Xylopiã emarginata</i>	Folhas	EtOH/ Alcaloides isolados	IC <sub>50</sub> 43 µg/mL	-	Fischer et al., 2004.

Nota: -: não encontrado.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1. Coleta e Identificação do Material Vegetal

As amostras vegetais foram coletadas no mês de dezembro de 2010, na trilha “Vale do Ouro”, localizada dentro da Unidade de Conservação (UC) PESB, região da Zona da Mata, Minas Gerais (Tabela 3). As árvores nas quais foram coletadas amostras vegetais foram georeferenciadas. A “Licença de autorização de coleta” na UC foi expedida pelo Instituto Estadual de Floresta de Minas Gerais, (Nº UC 073/07, COL 050/07). Para a espécie *Xylopia sericea* foi realizada uma segunda coleta durante o mês de julho de 2012, uma vez que o material vegetal obtido na primeira coleta (dezembro de 2010) foi insuficiente para as posteriores etapas de fracionamento cromatográfico. A identificação das espécies foi realizada por botânicos da Universidade Federal de Viçosa e Universidade Federal de Lavras, seguindo metodologia de confronto de exsicatas, sendo depositadas no Herbário VIC da Universidade Federal de Viçosa.

Tabela 3. Espécies vegetais usadas na dieta do primata *Brachyteles hypoxanthus* selecionadas para avaliação de atividade antiplasmódica.

Espécie Vegetal	Família Botânica	Nº. Exsicata	Sigla
<i>Alchornea glandulosa</i> Poepp. & Endl.	Euphorbiaceae	VIC 40.484	EAGL
<i>Amaioua guianensis</i> Aubl.	Rubiaceae	VIC 36.692	EAGU
<i>Laplacea fruticosa</i> (Schrad.) Naudin	Theaceae	-	ELF
<i>Miconia latecrenata</i> (DC.) Naudin	Melastomataceae	VIC 34.321	EML
<i>Nectandra oppositifolia</i> Nees	Lauraceae	VIC 40.233	ENO
<i>Ocotea odorifera</i> (Vell.) Rohwer	Lauraceae	VIC 42.326	EOO
<i>Psychotria suterella</i> Müll. Arg.	Rubiaceae	-	EPS
<i>Psychotria vellosiana</i> Benth.	Rubiaceae	VIC 32.147	EPV
<i>Rudgea jasminoides</i> (Cham.) Müll. Arg.	Rubiaceae	VIC 34.322	ERJ
<i>Schefflera calva</i> (Cham.) Frodin & Fiaschi	Araliaceae	-	ESC
<i>Solanum swartzianum</i> Roem. & Schult	Solanaceae	VIC 40.320	ESS
<i>Xylopia sericea</i> A.St.-Hil.	Annonaceae	VIC 40.432	EXS

Nota: -: exsicata não depositada em Herbário.

## 5.2. Secagem e Obtenção dos Extratos Vegetais

As folhas das espécies coletadas foram separadas e secadas em estufa ventilada sob abrigo da luz, à temperatura de 37 °C, por 48 horas, sendo posteriormente pulverizadas em moinho de faca. As drogas vegetais obtidas foram devidamente armazenadas em frascos âmbar fechados.

As amostras vegetais foram submetidas à extração com etanol 96 °GL seguido de extração com etanol-água (7/3), por percolação exaustiva. Para a percolação foi utilizada uma proporção droga vegetal:solvente extrator de 1:5. O extrato foi filtrado e concentrado até resíduo em evaporador rotatório, sendo este resíduo mantido em dessecador a vácuo, obtendo-se, assim, os extratos secos.

Os extratos aquosos foram preparados por infusão da droga vegetal, na proporção de 1:20 (relação droga vegetal:solvente extrator). Para esse procedimento, ao material vegetal foi adicionado água destilada a 90 °C. A droga vegetal foi então deixada em contato com o solvente durante 15 minutos, sob agitação. Após este procedimento, o material foi filtrado em papel de filtro, à vácuo, e o extrato obtido foi levado ao liofilizador por 12 horas, obtendo-se, assim, os extratos aquosos liofilizados. Por fim, foi calculado o rendimento em percentagem do extrato seco em relação ao peso da droga vegetal usada para obtenção do extrato (Tabela 4).

O material vegetal da espécie *X. sericea* obtido na segunda coleta foi submetido a extração também por percolação exaustiva, sendo usado primeiramente o solvente diclorometano seguido de extração sequencial com etanol 96 °GL. Os demais procedimentos foram idênticos as primeiras extrações.

Tabela 4. Rendimento dos extratos obtidos.

Espécie Vegetal	Solventes	Rendimento (%)	Massa Extrato (g)
<i>Alchornea glandulosa</i>	EtOH	14,5	14,5
	EtOH/H <sub>2</sub> O (7/3)	26,6	26,6
	H <sub>2</sub> O	11,4	5,7
<i>Amaioua guianenses</i>	EtOH	26,1	26,1
	EtOH/H <sub>2</sub> O (7/3)	7,7	7,7
	H <sub>2</sub> O	8,8	5,9
<i>Laplacea fruticosa</i>	EtOH	33,5	67,1
	EtOH/H <sub>2</sub> O (7/3)	13,8	29,6
	H <sub>2</sub> O	21,1	10,5
<i>Miconia latecrenata</i>	EtOH	11,3	22,6
	EtOH/H <sub>2</sub> O (7/3)	16,2	32,4
	H <sub>2</sub> O	24,6	12,3
<i>Nectandra oppositifolia</i>	EtOH	14,4	7,2
	EtOH/H <sub>2</sub> O (7/3)	7,8	3,9
	H <sub>2</sub> O	9,2	0,9
<i>Ocote odorifera</i>	EtOH	9,7	9,7
	EtOH/H <sub>2</sub> O (7/3)	13,9	13,9
	H <sub>2</sub> O	6,7	5,0
<i>Psychotria suterella</i>	EtOH	10,5	5,3
	EtOH/H <sub>2</sub> O (7/3)	11,4	5,7
	H <sub>2</sub> O	13,9	2,4
<i>Psychotria vellosiana</i>	EtOH	6,2	3,1
	EtOH/H <sub>2</sub> O (7/3)	5,8	2,9
	H <sub>2</sub> O	5,3	0,9
<i>Rudgea jasminoides</i>	EtOH	9,7	4,8
	EtOH/H <sub>2</sub> O (7/3)	14,9	7,4
	H <sub>2</sub> O	15,0	3,0
<i>Schefflera calva</i>	EtOH	18,7	28,1
	EtOH/H <sub>2</sub> O (7/3)	19,9	29,9
	H <sub>2</sub> O	26,7	13,3
<i>Solanum swartzianum</i>	EtOH	16,3	16,3
	EtOH/H <sub>2</sub> O (7/3)	12,1	12,1
	H <sub>2</sub> O	9,2	2,3
<i>Xylopia sericea</i>	EtOH	23,8	23,8
	EtOH/H <sub>2</sub> O (7/3)	11,3	11,3
	H <sub>2</sub> O	16,9	8,45
	*DCM	5,6	180
	*EtOH	12,5	400

\*Coleta 2.

### 5.3. Prospecção Fitoquímica

Foram realizadas análises de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) para a detecção de metabólitos secundários das seguintes classes: flavonoides, cumarinas, taninos, antraquinonas, triterpenos/esteroides, heterosídeos cardiotônicos, saponinas e alcaloides, nos diferentes extratos estudados. As análises por CCD foram realizadas seguindo as metodologias descritas por Wagner et al. (1984), utilizando cromatofolhas com fase estacionária de sílica-gel e diferentes fases móveis. Para revelação empregaram-se reagentes indicados para as diferentes classes de PN (Tabela 5). A visualização dos cromatogramas sob luz de comprimento de onda na região do ultravioleta (254 e 365 nm) foi realizada antes e, em alguns casos, após a revelação. Os resultados obtidos foram comparados, simultaneamente, com amostras de substâncias autênticas.

Tabela 5. Prospecção fitoquímica dos extratos das espécies vegetais selecionadas, por CCD (Wagner et al. 1984).

Metabólitos Secundários	Eluentes	Reveladores	Substância de Referência
Alcaloides	AcOEt/MeOH/H <sub>2</sub> O (80/12/8)	Reagente de Drangendorff	Quinina
Antraquinonas	AcOEt/MeOH/H <sub>2</sub> O (81/11/8)	Solução de KOH 5% em EtOH	1,8-dihidroxiantraquinona
Cumarinas	EtOEt/Tolueno (1/1)	Solução de KOH a 5% em EtOH	Benzopirona
Heterosídeos de Flavonoides	AcOEt/HCOOH/H <sub>3</sub> CCOOH/H <sub>2</sub> O (75/7,5/7,5/18)	Solução de AlCl <sub>3</sub> a 5% em EtOH	Rutina
Heterosídeos cardiotônicos	AcOEt/MeOH/H <sub>2</sub> O (81/11/8)	Reagente de Kedde Soluções A e B (1/1)	Digitoxina
Saponinas	HCCl <sub>3</sub> /H <sub>3</sub> CCOOH/MeOH (50/25/12)	Anisaldeído	18 β-glicirretínico
Taninos	AcOEt/HCOOH/H <sub>3</sub> CCOOH/H <sub>2</sub> O (70/7/8/19)	Soluções de (1/1) K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> a 1% e FeCl <sub>3</sub> a 2%	Ácido tânico
Triterpenos e esteroides	HEX/AcOEt (1/1)	Reagente de Lieberman Burchard	β-sitosterol

#### 5.4. Avaliação do Perfil Cromatográfico de Extratos/Frações/Substâncias por *Ultra Performance Liquid Chromatography with Detector Diode Array* (UPLC-DAD)

##### 5.4.1. Preparo das Amostras

Para o preparo dos extratos/frações/substâncias para análises por UPLC-DAD, foram pesados 2 mg de cada amostra que foi posteriormente dissolvida em 1 mL de metanol em frascos *Eppendorf*, seguindo-se dissolução por sonicação em ultrassom por 20 minutos. Em seguida, foi realizada centrifugação da amostra a 10.000 rpm, por 10 minutos, com posterior filtração em membranas de 22 µm. Para todas as amostras, o sobrenadante foi utilizado nas análises por UPLC-DAD. Em todas as etapas, foram empregados solventes grau UPLC e água destilada, filtrada em sistema *Milli-Q*.

##### 5.4.2. Parâmetros Cromatográficos

Para obtenção dos perfis cromatográficos em UPLC-DAD utilizou-se cromatógrafo Waters Acquity Ultra Performance LC, detector PDA e  $\lambda$  e TQ Detector, coluna de Fase Reversa (Reverse Phase, RP-18 Acquity UPLC BEH, partículas 2,1 x 50 mm, 1,7 µm), fluxo de 0,3 mL/min e manteve-se o forno da coluna a 40 °C. O volume injeção de amostra foi de 4 µL, sendo a eluição em gradiente com água e acetonitrila (ACN), H<sub>2</sub>O (0,1% HCOOH)/ACN (0,1% HCOOH). O parâmetro cromatográfico usado compreendeu período de eluição linear (5 – 95% ACN de 0 a 10 min), mantendo-se, a seguir, um curto período de eluição isocrática (95% ACN de 10 a 11 min), retornando a condição de eluição inicial 11 a 13 min (5% ACN). Todos os cromatogramas foram registrados a 220 nm.

##### 5.5. Obtenção dos *Mass Spectrometry* (UPLC-MS/MS)

Os espectros de massas foram obtidos com *ElectroSpray Ionization* (ESI), sendo registrados em varredura completa (*full scan*) e sequencial ou tandem (MS/MS), nos modos positivo e/ou negativo no equipamento Waters ACQUITY® TQD, equipado com analisador quadrupolo. As condições gerais de operação do equipamento durante as

análises foram: voltagem do capilar: 3,5 kV; temperatura do capilar: 320 °C; temperatura de dessolvatação: 320 °C; voltagem do cone: 5kV; voltagem de ionização: -4kV; voltagem do orifício: -60 kV. As amostras foram injetadas por bomba de injeção automática com fluxo contínuo de 0,1 µl/min. Os espectros de ESI/MS/MS foram registrados com energia de 30 eV na faixa de m/z 100 a 2000 u.m.a.

#### 5.6. Determinação do Ponto de Fusão

A medida da temperatura de fusão dos sólidos foi determinada utilizando aparelho de ponto de fusão digital MQAPF - 301 Microquímica.

#### 5.7. Espectroscopia no Ultravioleta (UV)

Os espectros no UV foram obtidos em espectrofotômetro Hewlett Parckard - 8453, do Laboratório de Fitoquímica, Faculdade de Farmácia, UFMG. Os espectros foram registrados na faixa de 200 a 450 nm; a amostra foi dissolvida em metanol grau UPLC. Os aditivos químicos metóxido de sódio ( $\text{MeO}^- \text{Na}^+$ ), acetato de sódio ( $\text{AcO}^- \text{Na}^+$ ), acetato de sódio/ácido bórico ( $\text{AcO}^- \text{Na}^+ / \text{H}_3\text{BO}_3$ ), cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ) e cloreto de alumínio/ácido clorídrico ( $\text{AlCl}_3 / \text{HCl}$ ) foram utilizados. A concentração da amostra foi de 10 µg/mL.

#### 5.8. Espectroscopia no Infravermelho (IV)

Os espectros no IV foram registrados em espectrofotômetro Perkin-Elmer (infravermelho com Transformada de Fourier, FT-IR), do Laboratório de Química Farmacêutica, Faculdade de Farmácia, UFMG, sendo utilizado aproximadamente 1 mg de cada amostra.

## 5.9. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN unidimensionais de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , DEPT 135, e os mapas de contorno bidimensionais COSY, HMQC, HMBC e NOESY foram obtidos em equipamento Bruker Avance DRX400 do Laboratório de Análises em Ressonância Magnética Nuclear de Alta Resolução (LAREMAR) do Departamento de Química-UFMG. Os solventes utilizados foram clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) e dimetilsulfóxido hexadeuterado ( $\text{DMSO-d}_6$ ) contendo TMS (TetraMetilSilano) como referência interna. Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram expressos em ppm, e as constantes de acoplamento ( $J$ ) em Hz.

## 5.10. Cultivo Celular e Teste de Atividade Antiplasmodíca

### 5.10.1. Cultivo Celular do *Plasmodium falciparum*

A metodologia utilizada para o cultivo do *P. falciparum* (W2) foi descrita por Rieckmann et al. (1978) e foi aplicada com algumas modificações, como descrito a seguir. Os parasitos da cepa cloroquina-resistente W2 foram cultivados em hemácias humanas, em placas de cultivo, em meio RPMI-1640 (*Roswell Park Memorial Institute*) suplementado com 25 mM do tampão HEPES, 21 mM de bicarbonato de sódio, 300 mM de hipoxantina, 11 mM de glicose, 40 mg/mL de gentamicina, 10% (v/v) de plasma humano inativado (meio completo) e hematócrito a 5%. As placas foram mantidas a 37 °C, em dessecadores, nos quais as concentrações adequadas (5% de  $\text{CO}_2$  e ausência de  $\text{O}_2$ ) foram obtidas por combustão de vela. Foram realizadas trocas diárias do meio de cultura. Além disso, foram confeccionados esfregaços sanguíneos de cultivo, secos ao ar, fixados com metanol e corados com solução recém diluída de Giemsa na proporção de três gotas para cada 1 mL de solução salina tamponada (pH 6,8). Após 10 minutos, as lâminas foram lavadas em água corrente, secas ao ar e examinadas ao microscópio óptico com objetiva de imersão (1000x). A parasitemia foi determinada através da contagem do número de hemácias infectadas. Para parasitemias maiores que 5%, cerca de 1000 hemácias foram contadas. Em infecções muito baixas, menores que 5%, foram contadas 6000 hemácias. Nesse caso, a avaliação foi feita pela estimativa do número total de hemácias por campo

microscópico em um total de 50 a 100 campos, estimando-se o número de hemácias infectadas. Antes de cada teste de atividade antiplasmódica os parasitos do cultivo foram sincronizados pelo método do sorbitol (Lambros & Vanderberg, 1979).

#### 5.10.2. Atividade Antiplasmódica por Determinação da Enzima Lactato Desidrogenase do *Plasmodium falciparum* - pLDH

O teste de avaliação de atividade antiplasmódica por quantificação colorimétrica da enzima lactato desidrogenase do *P. falciparum* (pLDH) foi realizado conforme Makler et al. (1993), com algumas modificações. Culturas sincronizadas com 2% de parasitemia no estágio de anel e 1% de hematócrito foram distribuídas em microplacas de 96 poços colocando-se 180 µl por poço. Assim, 20 µL de cada extrato/fração/substância dissolvidos em DMSO foram adicionados nas concentrações 25 e 50 µg/mL na placa contendo os parasitos. Nos casos de frações/substâncias previamente testadas que demonstraram atividade antiplasmódica, foram testadas diferentes concentrações a fim de se obter o CI<sub>50</sub> (Inibição Citotóxica 50%) das mesmas. Os poços controles (sem a adição de drogas) contiveram hemácias normais não infectadas (controle negativo) ou hemácias infectadas (controle positivo). Foi ainda utilizado antiplasmódico padrão como controle positivo (cloroquina). Cada amostra foi testada em triplicata. Visando confirmação dos resultados, as amostras foram testadas no mínimo 2 vezes em dias diferentes. Assim, as placas foram incubadas durante 48 horas a 37 °C, em ambiente desprovido de oxigênio. Posteriormente, elas foram incubadas a -20 °C, por 48 horas, e descongeladas (temperatura ambiente), por duas vezes, para lise das hemácias. Após esta etapa, as placas foram deixadas em temperatura ambiente, e uma alíquota de 20 µL do sobrenadante foi dispensada em uma microplaca de titulação contendo 100 µL do reagente Malstat (preparado solubilizando-se em 200 mL de água destilada: 400 µL Triton X-100, 4 g de L-lactato de sódio, 1,32g de Tris e 22 mg de 3-acetilpiridina adenina piridina dinucleotídeo (APAD), 25 µL de uma solução de azul de nitro tetrazólio (NBT) e uma mistura de sulfato de fenazina (PES) (160 mg de NBT e 8 mg de PES em 100 mL de água destilada)). Após 30 minutos, a absorvância das amostras foi medida em leitor de ELISA a 540 nm. Controles com hemácias sem infecção e hemácias infectadas tratadas com o

antimalárico cloroquina foram utilizados. A percentagem de inibição do crescimento do parasito foi calculada como:

$$\% \text{ Inibição} = \frac{[(\text{Abs. controle} - \text{Abs. amostras}) / \text{Abs. controle}] \times 100}{\text{Controle} = \text{Hemácias Infectadas}}$$

## 5.11. Cultivo de Células Hepáticas HepG2 e Ensaio de Citotoxicidade

### 5.11.1. Cultivo de Células Hepáticas HepG2

A linhagem celular HepG2 A16, derivada de um hepatoblastoma primário humano, foi cultivada a partir de ampola crio preservada, disponível no Laboratório de Fitoquímica da UFMG. As células foram descongeladas a 37°C e transferidas para um tubo de 50 mL com 20 mL de meio RPMI incompleto. Posteriormente, foram centrifugadas a 320 g por 5 min, sendo o sobrenadante descartado e o sedimento ressuspendido em meio RPMI suplementado com 5% de Soro Bovino Fetal (SBF) e 40 mg/L de gentamicina (meio completo). As células foram, então, transferidas para garrafas de cultura de 200 mL e acondicionadas em estufa de CO<sub>2</sub>, a 37 °C. O meio foi substituído a cada dois dias. O congelamento foi realizado em ampolas de criopreservação com uma solução contendo 80% de SBF e 20% de DMSO (dimetilsufóxido) e as células mantidas em nitrogênio líquido. Após confluência de 80% a cultura foi repicada ou utilizada nos ensaios de citotoxicidade.

### 5.11.2. Ensaio de Citotoxicidade frente a cepa HepG2

A avaliação da citotoxicidade foi realizada pelo ensaio colorimétrico do MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide), segundo Varotti et al. (2008), com algumas modificações. As células foram retiradas da garrafa adicionando-se 1 mL de tripsina, incubadas a 37°C por 5 min, ressuspendidas em 10 mL de meio RPMI completo e centrifugadas a 1500 rpm durante 5 min. Após descartar o sobrenadante e ressuspender o sedimento em RPMI completo, as células foram distribuídas em microplacas de 96 poços

( $4 \times 10^5$  células/100  $\mu\text{L}$  por poço) e incubadas em estufa em atmosfera contendo 5% de  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ\text{C}$  por 24 h, a fim que as mesmas ficassem aderidas à placa. Após a formação da monocamada, o meio de cultura foi removido, e em seguida, foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de meio RPMI completo contendo diferentes concentrações das amostras testadas, em triplicatas para cada concentração. Posteriormente, as placas foram novamente incubadas em estufa a  $37^\circ\text{C}$ , em atmosfera contendo 5% de  $\text{CO}_2$ . Após 48 horas de incubação, o sobrenadante foi removido e, em seguida adicionou-se a solução de MTT (18  $\mu\text{L}$ /poço, na concentração de 5 mg/mL, em água destilada). As placas foram incubadas por 90 minutos a  $37^\circ\text{C}$ , sendo adicionado DMSO (180  $\mu\text{L}$ /poço), após este período de incubação, para dissolver os cristais de formazana. As placas foram mantidas em agitação, por 15 minutos (*shaker*), a absorvância das amostras foi medida em leitor de ELISA a 510 nm. A multiplicação celular foi comparada com controles sem tratamento (controles negativos) sendo os ensaios conduzidos simultaneamente (Twentiman & Luscombe, 1987).

A toxicidade celular foi expressa em termos de Concentração Citotóxica a 50% ( $\text{CC}_{50}$ ). A porcentagem citotóxica foi calculada como  $[(A - B)/A] \times 100$ , onde A e B são a  $\text{DO}_{510}$  (densidade ótica) dos poços onde estão presentes células não tratadas (A) e tratadas (B), respectivamente.

#### 5.12. Análise Estatística

Os dados de atividade antiplasmódica e citotoxicidade foram avaliados por análise de variância (ANOVA) e teste de médias (teste de Tukey)  $\alpha = 0,05$ , analisados pelo programa SigmaPlot 12.1.

#### 5.13. Fracionamento dos Extratos Ativos

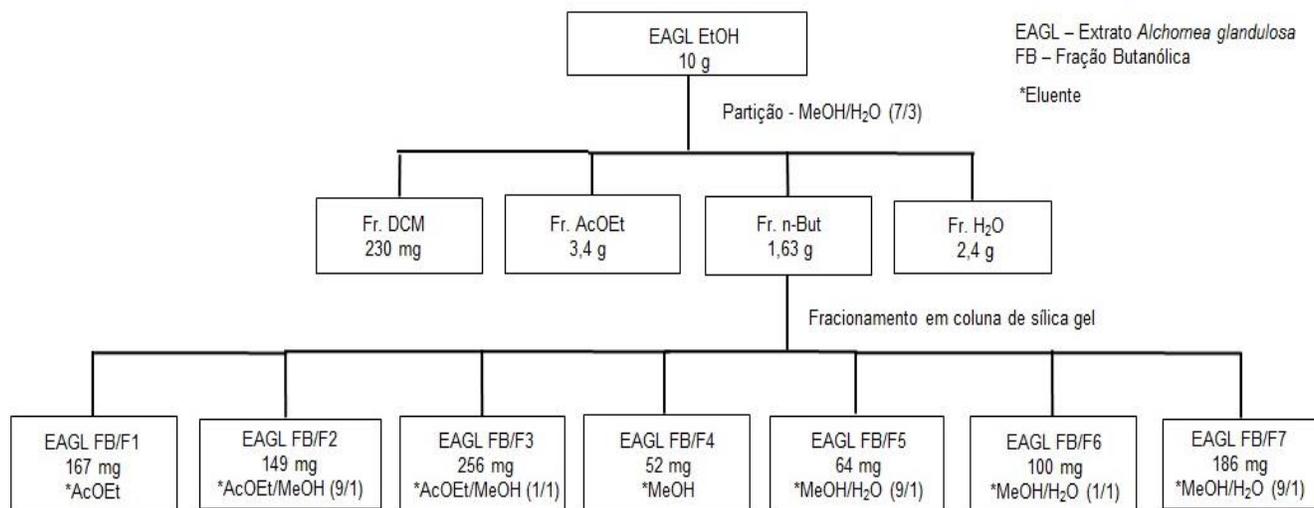
Os extratos etanólicos de *Alchornea glandulosa*, *Miconia latecrenata* e *Xylopia sericea* foram escolhidos para fracionamento uma vez que obtiveram maior atividade *in vitro* e maior massa, além de estudos bibliográficos demonstrarem atividade antiplasmódica/antimalárica para espécies desses gêneros. O extrato etanólico de *P. suterella* e o extrato aquoso de *L. fruticosa* não foram fracionados, pois poucos dados

sobre atividade antiplasmódica/antimalárica para espécies dos gêneros *Psychotria* e *Laplacea* foram encontrados.

### 5.13.1. Fracionamento do Extrato Etanólico das folhas de *Alchornea glandulosa* (EAGL)

O fracionamento de EAGL EtOH foi realizado primeiramente por partição líquido-líquido. Assim, 10 g de EAGL EtOH foram ressuspensas em 200 mL de MeOH/H<sub>2</sub>O (3/7) e submetidas a partições seqüenciais com DCM (4 x 120 mL), AcOEt (4 x 120 mL) e BuOH (4 x 120 mL), em funil de separação. As frações solúveis em DCM e AcOEt foram secas com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, seguindo-se filtração em papel de filtro e concentração em evaporador rotatório. As frações n-BuOH foram diretamente concentradas em evaporador rotatório e os resíduos aquosos foram liofilizados. As frações solúveis em DCM, contendo clorofilas, foram ressuspensas em EtOH absoluto a quente (~200 mL) juntamente com carvão ativado (~20 g), seguindo-se filtração em funil de Büchner a vácuo e concentração até resíduo em evaporador rotatório. Posteriormente 1 g da fração n-BuOH de EAGL EtOH foi cromatografada em coluna de sílica gel 60 (50 g 0,063-0,2 mm / 2 cm Ø / 50 cm altura), com eluição em gradiente com uso de solventes com polaridade crescente, sendo obtidas 7 diferentes frações (Figura 5).

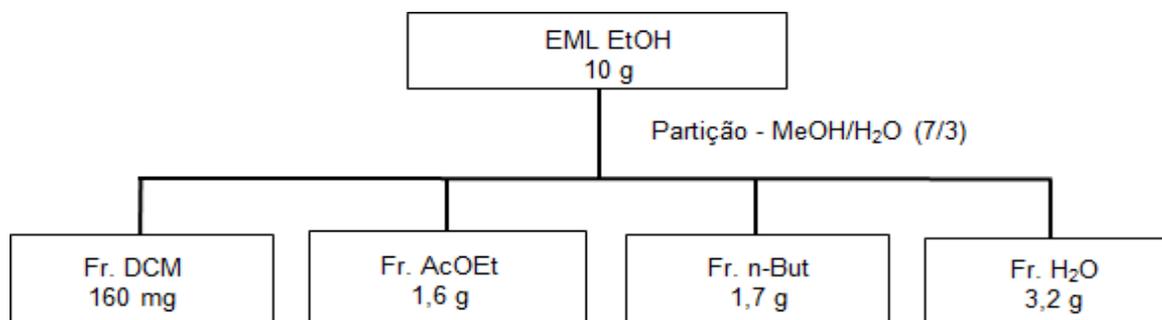
Figura 5. Fluxograma do fracionamento do extrato etanólico das folhas de *Alchornea glandulosa* (EAGL).



### 5.13.2. Fracionamento do Extrato Etanólico das folhas de *Miconia latecrenata* (EML)

O fracionamento de EML EtOH (10 g) foi realizado segundo o mesmo procedimento usado na partição de EAGL EtOH (Figura 6).

Figura 6. Fluxograma do fracionamento do extrato etanólico das folhas de *Miconia latecrenata* (EML).

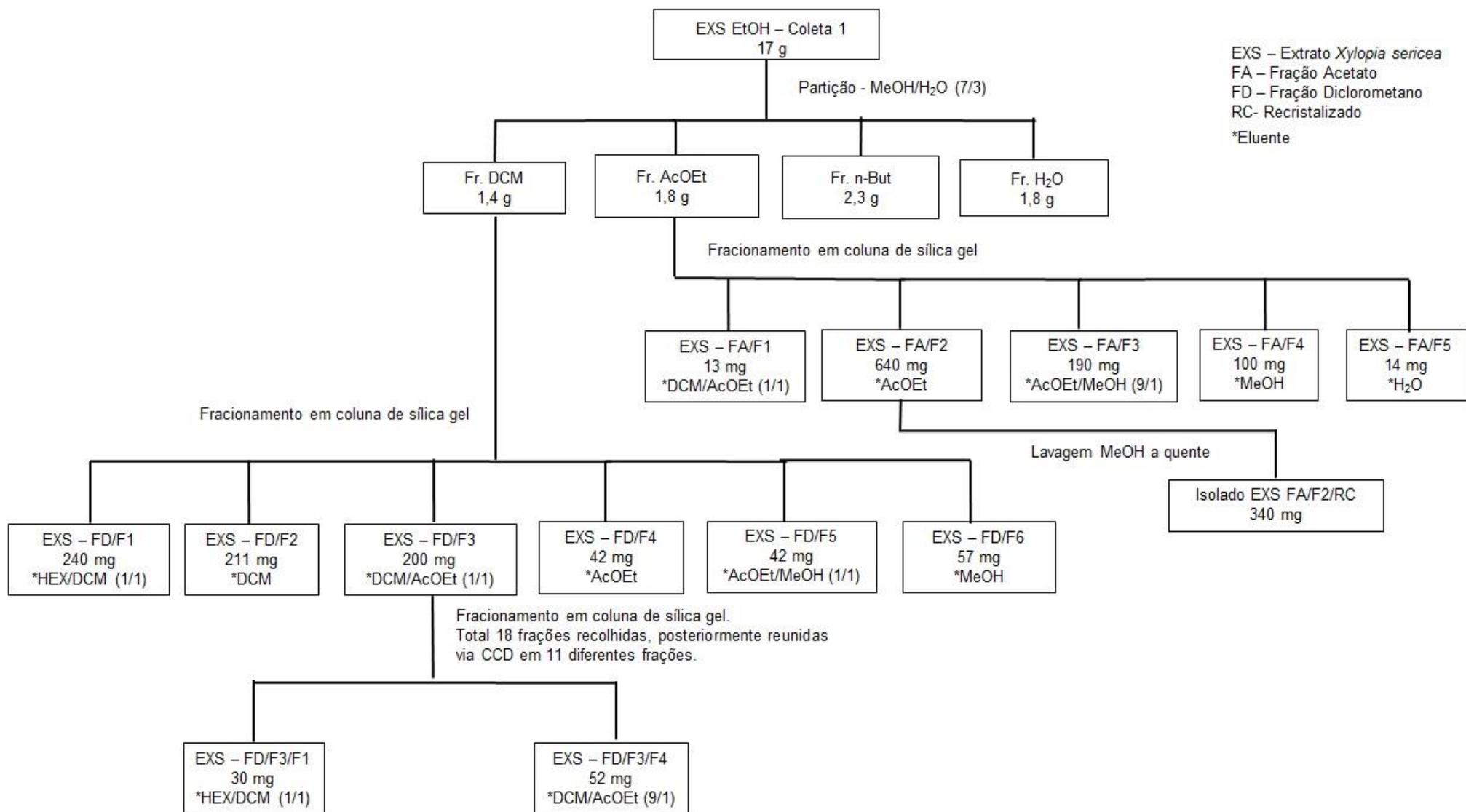


### 5.13.3. Fracionamento do Extrato Etanólico das folhas de *Xylopia sericea* Coleta 1 (EXS)

O fracionamento de EXS EtOH Coleta 1 (17 g) também foi realizado seguindo o mesmo procedimento usado na partição de EAGL EtOH (Figura 7). Após partição, uma alíquota de 0,85 g da fração EXS EtOH Fr. DCM previamente tratada com carvão ativado foi cromatografada em coluna de sílica gel (50 g 0,063-0,2 mm / 2 cm Ø / 50 cm altura), sendo recolhidas 6 frações. Posteriormente, a fração EXS FD/F3 foi então submetida a nova cromatografia em coluna sílica gel 60 (24 g 0,063-0,2 mm / 2 cm Ø / 25 cm altura), com eluição em gradiente com uso de solventes de polaridade crescente, sendo aplicada uma alíquota de 120 mg e recolhidas 18 frações (Figura 7).

Além do fracionamento da amostra DCM de EXS EtOH, foi realizado também cromatografia em coluna de sílica gel (50 g 0,063-0,2 mm / 2 cm Ø / 50 cm altura) de 1 g da fração AcOEt, sendo recolhidas 6 frações (Figura 7). Observação de sólido marron constituinte da fração EXS FA/F2 levou ao tratamento posterior com MeOH a quente até completa solubilização da amostra, que em seguida foi deixada em repouso por 24 horas a temperatura ambiente, obtendo-se por recristalização um sólido branco identificado como EXS FA/F2/RC (Figura 7).

Figura 7. Fluxograma do fracionamento do extrato etanólico das folhas de *Xylopia sericea* (EXS) Coleta 1.

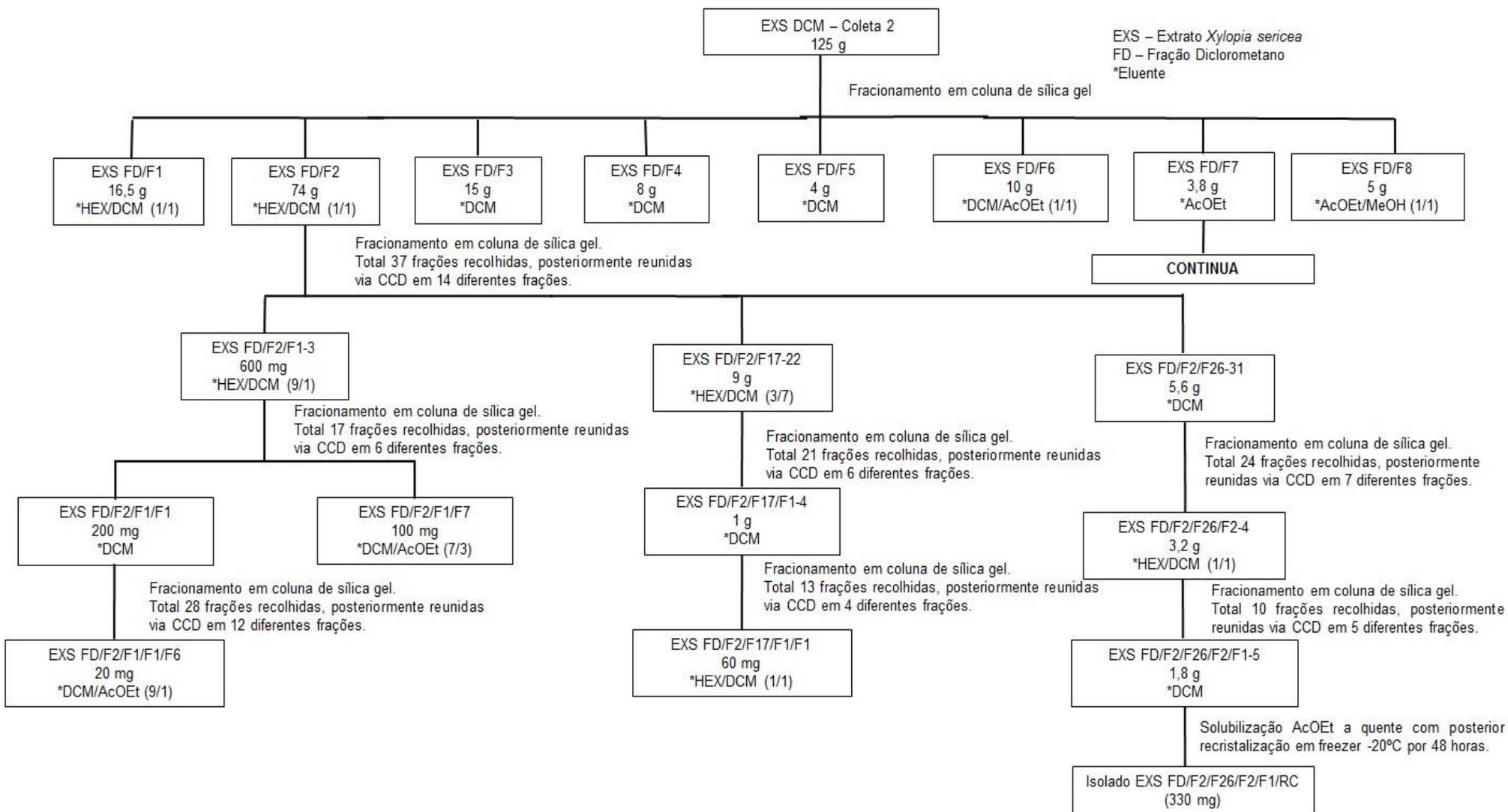


#### 5.13.4. Fracionamento de Extratos de *Xylopiia sericea* Coleta 2 (EXS)

##### 5.13.4.1. Fracionamento do Extrato Diclorometânico de folhas de *Xylopiia sericea* Coleta 2

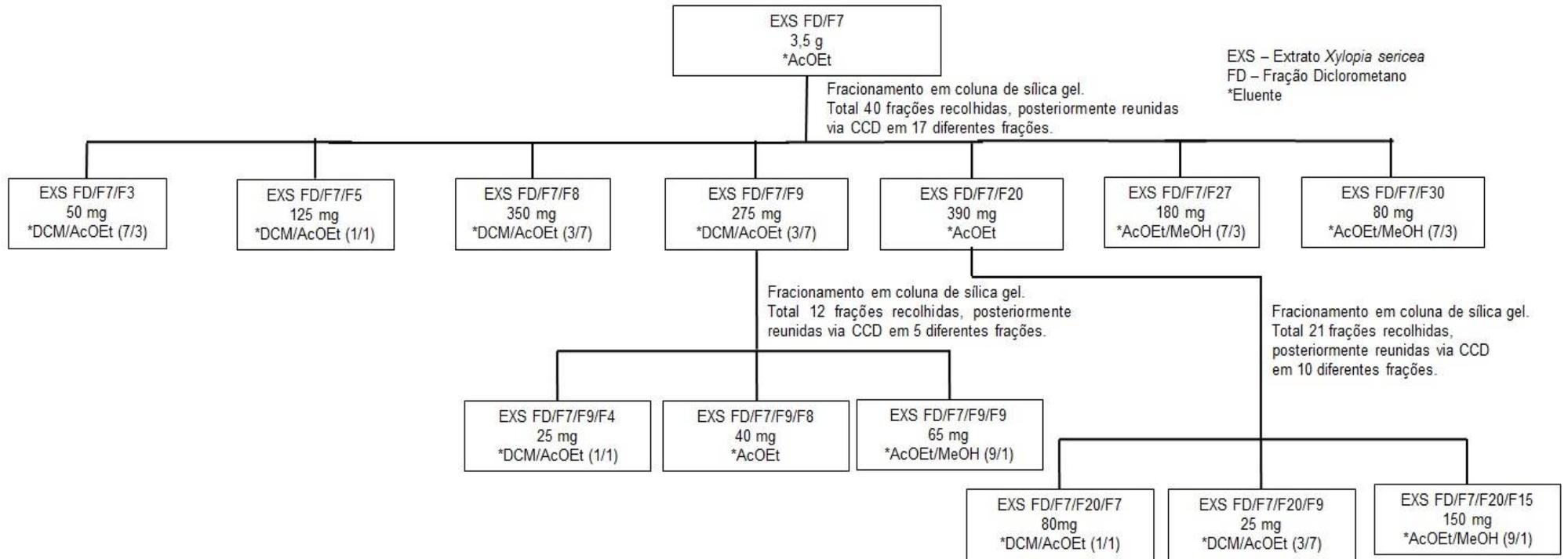
O fracionamento de EXS DCM Coleta 2 (125 g) foi realizado inicialmente via cromatografia em coluna sílica gel (250 g 0,2-0,5 mm / 10 cm Ø / 25 cm altura), com eluição em gradiente com uso de solventes de polaridade crescente, sendo recolhidas 8 diferentes frações (Figura 8). Após fracionamento inicial, 65 g da fração EXS FD/F2 foram recromatografados em coluna sílica gel (360 g 0,063-0,2 mm / 10 cm Ø / 30 cm altura), sendo recolhidas 37 frações (Figura 8). Avaliação em CCD com uso de diferentes fases móveis e revelação com anisalaldeído sulfúrico permitiu reunião das frações, resultando em 14 diferentes amostras. Em seguida, 500 mg da fração EXS FD/F2/F1 foram recromatografados também em coluna de sílica gel 60 (12 g 0,063-0,2 mm / 1 cm Ø / 20 cm altura), sendo recolhidas 17 frações (Figura 8). Depois de reunião das frações semelhantes via CCD, foram obtidas amostras de maior massa EXS FD/F2/F1/F1 (200 mg) e EXS FD/F2/F1/F7 (100 mg). Massa de 170 mg da amostra EXS FD/F2/F1/F1 (coluna de sílica gel - 10 g / 0,063-0,2 mm / 1 cm Ø / 20 cm altura) foi por fim recromatografada, obtendo-se 28 frações, também reunidas via CCD. Além disso, 7 g da fração EXS FD/F2/F17 foram cromatografados também em coluna de sílica gel 60 (150 g 0,063-0,2 mm / 3 cm Ø / 40 cm altura), sendo recolhidas 21 frações (Figura 8). Depois de reunião das frações semelhantes via CCD, 800 mg da fração EXS FD/F2/F17/F1 foram cromatografados em coluna de sílica gel 60 (10 g 0,063-0,2 mm / 1 cm Ø / 40 cm altura), obtendo-se 4 diferentes amostras após reunião via CCD, sendo a fração EXS FD/F2/F17/F1/F1 a de maior massa (60 mg). Finalmente, 5 g da amostra EXS FD/F2/F26 foi também fracionada (coluna de sílica gel - 100 g 0,063-0,2 mm / 5,5 cm Ø / 30 cm altura), 7 diferentes frações após reunião via CCD. Destas, 2,5 g da fração EXS FD/F2/F26/F2 foram fracionados (coluna de sílica gel - 60 g / 0,063-0,2 mm / 2 cm Ø / 40 cm altura), resultando em 5 diferentes amostras após reunião. Foi observado precipitado sólido branco na amostra EXS FD/F2/F26/F2/F1, que foi então solubilizada com volume mínimo de AcOEt a quente, deixada em repouso por 48 horas a -20 °C em freezer, obtendo-se por fim, recristalizado EXS FD/F2/F26/F2/F1/RC (Figura 8).

Figura 8. Fluxograma do fracionamento do extrato diclorometânico das folhas de *Xylopiia sericea* (EXS) Coleta 2, Parte 1.



A amostra EXS FD/F7 (3 g) também foi cromatografada em coluna de sílica gel (130 g / 0,063-0,2 mm / 5,5 cm Ø / 40 cm altura), com eluição em gradiente com uso de solventes de polaridades crescentes, obtendo-se 17 diferentes frações após reunião via CCD (Figura 9). Destas, 250 mg da fração EXS FD/F7/F9 foram fracionados (coluna de sílica gel - 10 g / 0,063-0,2 mm / 1 cm Ø / 40 cm altura), resultando em 3 diferentes amostras com perfil cromatográfico com poucos picos (EXS FD/F7/F9/F4 (25 mg), EXS FD/F7/F9/F8 (40 mg) e EXS FD/F7/F9/F9 (65 mg) (Figura 9). Finalmente, a fração EXS FD/F7/F20 (350 mg), após fracionamento (coluna de sílica gel - 10 g / 0,063-0,2 mm / 1 cm Ø / 40 cm altura), deu origem a 10 diferentes frações após reunião via CCD, EXS FD/F7/F9/F20/F7 (80 mg), EXS FD/F7/F9/F20/F9 (25 mg) e EXS FD/F7/F9/F20/F15 (150 mg) (Figura 9).

Figura 9. Fluxograma do fracionamento do extrato diclorometano das folhas de *Xylopiya sericea* (EXS) Coleta 2, Parte 2.



#### 5.13.4.2. Fracionamento do Extrato Etanólico das folhas de *Xylopia sericea* Coleta 2 (EXS)

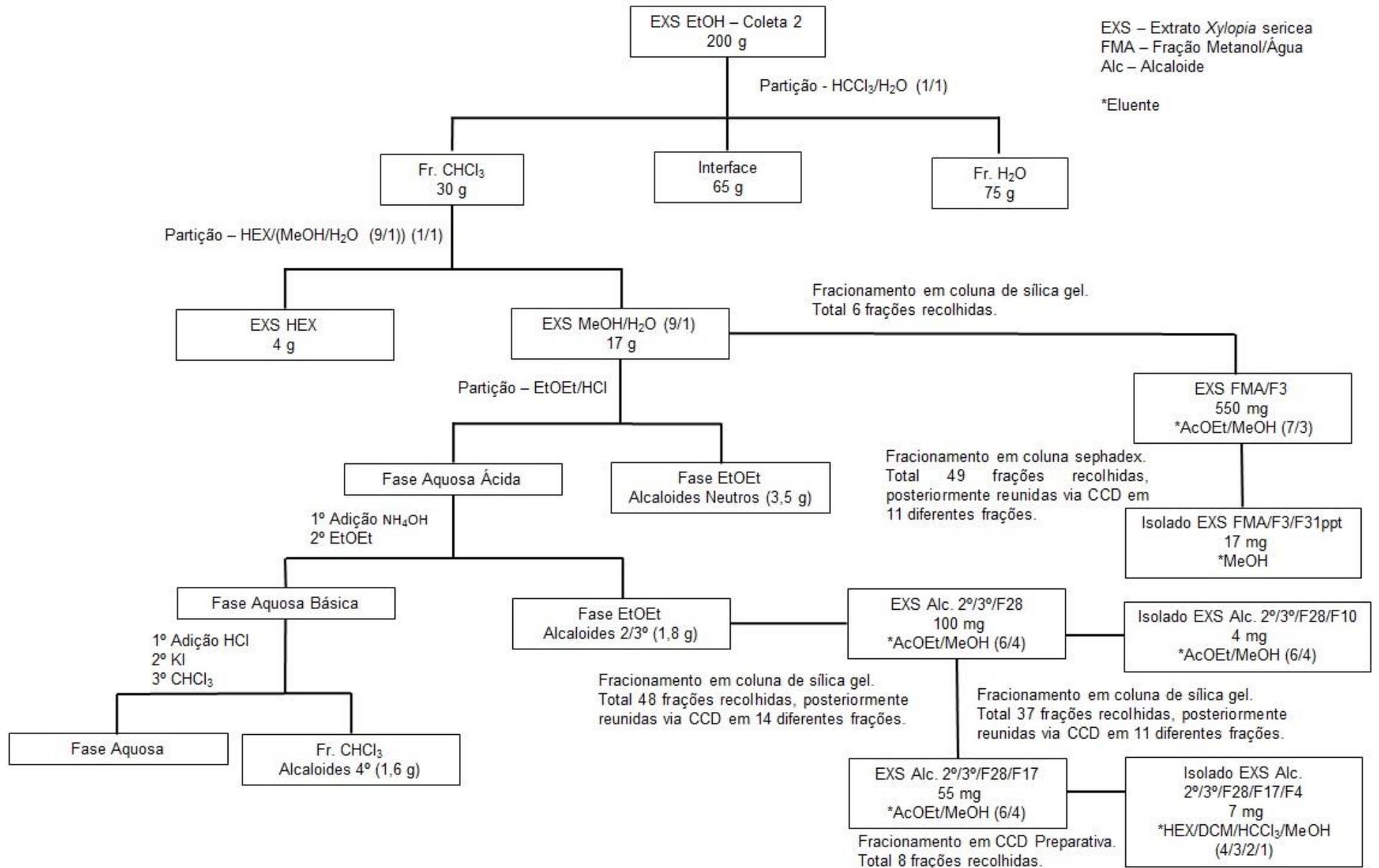
Fracionamento de EXS EtOH foi feito inicialmente por partição líquido-líquido em funil de separação, sendo usados 200 g de EXS EtOH que foram ressuspensos em 1 L de  $\text{CHCl}_3/\text{H}_2\text{O}$  (1/1), com posterior separação de 3 fases (Fase  $\text{CHCl}_3$ , Fase de Interface e Fase  $\text{H}_2\text{O}$ ). Assim, 25 g da fase  $\text{CHCl}_3$  foram dissolvidos em 500 mL solução  $\text{HEX}/\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$  (9:1) (1/1), obtendo-se 2 novas frações (17 g da Fração  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  (9/1) e 5 g da Fração  $\text{HEX}$ ) (Figura 10). Posteriormente, 8 g da fração EXS  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  (9/1) foram ressuspensos em 150 mL  $\text{MeOH}$ , com adição de 250 mL de  $\text{HCl}$  1N e sendo realizada partição para obtenção de frações enriquecidas com alcaloides com  $\text{EtOEt}$  (3 x 250 mL). Assim, foram obtidas as frações  $\text{EtOEt}$  neutra (3,5 g) e fração aquosa ácida com alcaloides na forma de sal. A seguir foi adicionado a fase aquosa ácida,  $\text{NH}_4\text{OH}$  concentrado até pH 9-10 (aproximadamente 50 mL de  $\text{NH}_4\text{OH}$  concentrado). Após alcalinização, foi realizada extração com  $\text{EtOEt}$  (3 x 250 mL). A fração orgânica  $\text{EtOEt}$  foi dessecada com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro seguindo-se filtração em papel de filtro e concentração em evaporador rotatório até resíduo, obtendo-se, assim, 1,8 g da fração enriquecida com alcaloides 2º/3º. A fração aquosa básica foi acidificada com 350 mL de  $\text{HCl}$  1N, seguido da adição de 100 mL  $\text{KI}$  saturado e  $\text{CHCl}_3$  (3 x 250 mL), sendo obtido 1,6 g da fração de alcaloides 4º ( $\text{CHCl}_3$ ) (Figura 10).

A fração EXS  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  (9/1) (2 g) foi cromatografada em coluna de sílica gel (35 g / 0,063-0,2 mm / 3 cm Ø / 25 cm altura), com eluição em gradiente com uso de solventes de polaridade crescente, obtendo-se 6 diferentes frações. Assim, 250 mg de EXS  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}/\text{F3}$  foram submetidos a fracionamento em resina sephadex LH-20 (3 cm Ø / 30 cm altura), obtendo-se 49 frações, reunidas em 11 diferentes amostras. Após reunião das frações por CCD, a fração EXS  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}/\text{F3}/\text{F31}$  apresentou um precipitado EXS  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}/\text{F3}/\text{F31}\text{ppt}$  que foi obtido como composto isolado (Figura 10).

A amostra EXS alcaloides 2º/3º (1,5 g) foi cromatografada em coluna de sílica gel (30 g / 0,063-0,2 mm / 1,5 cm Ø / 30 cm altura), com eluição em gradiente com uso de solventes de polaridades crescentes, obtendo-se 48 frações, que foram reunidas via CCD em 14 diferentes amostras (Figura 10). Destas, 100 mg da fração EXS Alc. 2º/3º/F28 foi cromatografada (coluna de sílica - 13 g / 0,04 - 0,063 mm / 1,5 cm Ø / 34 cm altura), com

eluição em gradiente com uso de solventes de polaridade crescente, sendo obtidas 11 amostras após análise por CCD. A amostra EXS Alc. 2º/3º/F28/F10 foi identificada como composto único (4 mg). Posteriormente, 50 mg da fração EXS Alc. 2º/3º/F28/F17 foi aplicada em CCD preparativa, sendo obtido após raspagem da placa, o composto isolado EXS Alc. 2º/3º/F28/F17/F4 (7 mg) (Figura 10).

Figura 10. Fluxograma do fracionamento do extrato etanólico das folhas de *Xylopiya sericea* (EXS) Coleta 2.



## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1. Atividade antiplasmódica e citotoxicidade dos extratos analisados

Os extratos etanólicos de folhas das espécies *A. glandulosa*, *M. latecrenata*, *P. suterella* e *X. sericea*, além de extratos etanol/água (7/3) e aquosos de *A. glandulosa*, *L. fruticosa*, *M. latecrenata* e extrato aquoso de *X. sericea* apresentaram maior redução do crescimento *in vitro* do *Plasmodium falciparum* (W2) dentre os 36 extratos avaliados, com diferença significativa pelo teste de Tukey (Tabela 6). Por se tratar de extratos brutos, este efeito pode ser considerado como atividade antiplasmódica moderada. Os resultados apontam ainda que o uso de solventes com polaridade crescente (etanol, etanol/água (7/3) e água) não influenciou significativamente a atividade antiplasmódica das diferentes espécies vegetais estudadas, sendo visto que para a maioria das amostras analisadas a maior redução de parasitemia foi observada para os extratos etanólicos (Figura 11). Importante ressaltar que, com exceção do gênero *Laplacea*, para os gêneros *Alchornea*, *Miconia*, *Psychotria* e *Xylopia*, que apresentaram a maior atividade antiplasmódica, foram encontradas referências bibliográficas sobre outras espécies de mesmo gênero com ação antiplasmódica/antimalárica (Tabela 2), fato que corrobora os resultados obtidos.

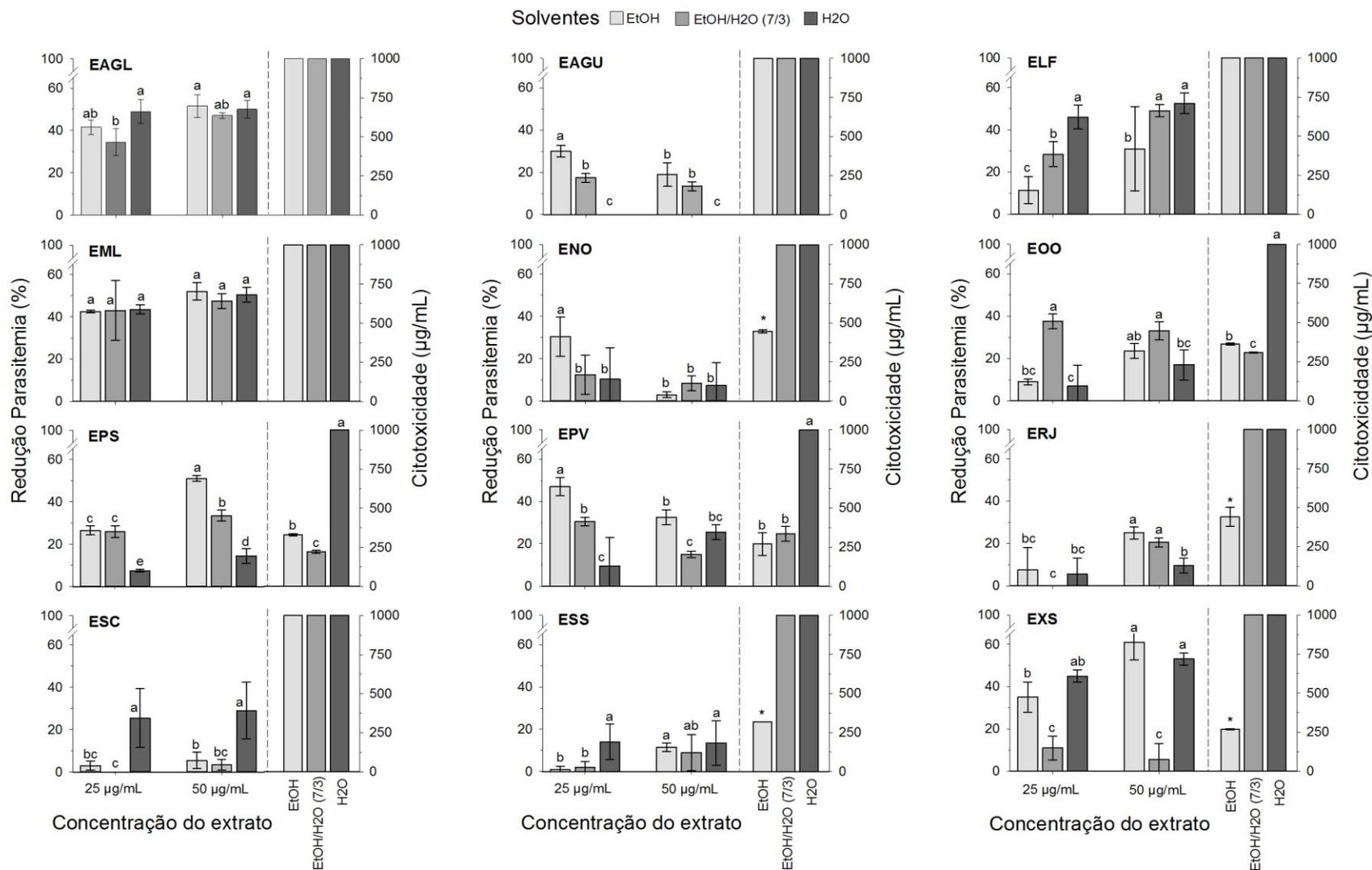
Nos testes de citotoxicidade *in vitro* frente a células HepG2 observou-se que a maioria dos extratos apresentou  $CC_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$ , sendo considerados não citotóxicos (Tabela 6). De acordo com critérios definidos por Wrigth et al. (1994), para a citotoxicidade a células HepG2, pelo método colorimétrico do MTT, considera-se que extratos/frações/substâncias puras com  $CC_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$  são muito tóxicos; já para  $CC_{50}$  entre 100 e 500  $\mu\text{g/mL}$  ( $100 < CC_{50} < 500 \mu\text{g/mL}$ ), moderadamente tóxicos, e para  $CC_{50} > 500 \mu\text{g/mL}$ , não citotóxicos até esta concentração. Nota-se ainda, que os extratos etanólicos foram mais citotóxicos do que os demais extratos das mesmas espécies o que pode ser atribuído ao fato de apresentarem maior diversidade de substâncias extraídas em relação aos extratos etanol/água (7/3) e aquosos (Figura 11).

Tabela 6. Médias ( $\pm$  desvio padrão) da porcentagem de redução do crescimento do *Plasmodium falciparum* (W2) (pLDH) e citotoxicidade a HepG2 (MTT) dos extratos avaliados. Espécies assinaladas em negrito foram mais ativas.

Espécies Vegetais	Solventes	Redução de Parasitemia (%)		Citotoxicidade ( $\mu\text{g/mL}$ )
		[25 $\mu\text{g/mL}$ ]	[50 $\mu\text{g/mL}$ ]	
<b><i>Alchornea glandulosa</i></b>	EtOH	41,5 $\pm$ 3,5*	51,5 $\pm$ 5,4*	$\geq$ 1000,0 $\pm$ 0,0*
	EtOH/H <sub>2</sub> O (7/3)	34,5 $\pm$ 6,3*	47,0 $\pm$ 1,4*	$\geq$ 1000,0 $\pm$ 0,0*
	H <sub>2</sub> O	49,0 $\pm$ 5,6*	50,0 $\pm$ 4,2*	$\geq$ 1000,0 $\pm$ 0,0*
<i>Amaioua guianenses</i>	EtOH	30,0 $\pm$ 2,8	19,0 $\pm$ 5,6	$\geq$ 1000,0 $\pm$ 0,0*
	EtOH/H <sub>2</sub> O (7/3)	17,5 $\pm$ 2,1	13,5 $\pm$ 2,12	$\geq$ 1000,0 $\pm$ 0,0*
	H <sub>2</sub> O	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	$\geq$ 1000,0 $\pm$ 0,0*
<b><i>Laplacea fruticosa</i></b>	EtOH	11,5 $\pm$ 6,3	31,0 $\pm$ 19,8	$\geq$ 1000,0 $\pm$ 0,0*
	EtOH/H <sub>2</sub> O (7/3)	28,5 $\pm$ 5,8	49,0 $\pm$ 2,8*	$\geq$ 1000,0 $\pm$ 0,0*
	H <sub>2</sub> O	46,0 $\pm$ 5,6*	52,5 $\pm$ 4,9*	$\geq$ 1000,0 $\pm$ 0,0*
<b><i>Miconia latecrenata</i></b>	EtOH	42,5 $\pm$ 0,7*	52,0 $\pm$ 4,2*	$\geq$ 1000,0 $\pm$ 0,0*
	EtOH/H <sub>2</sub> O (7/3)	43,0 $\pm$ 14,1*	47,5 $\pm$ 3,5*	$\geq$ 1000,0 $\pm$ 0,0*
	H <sub>2</sub> O	43,5 $\pm$ 2,1*	50,5 $\pm$ 3,5*	$\geq$ 1000,0 $\pm$ 0,0*
<i>Nectandra oppositifolia</i>	EtOH	30,5 $\pm$ 9,2	3,0 $\pm$ 1,4	447,5 $\pm$ 10,3
	EtOH/H <sub>2</sub> O (7/3)	12,5 $\pm$ 9,2	8,5 $\pm$ 3,5	$\geq$ 1000,0 $\pm$ 0,0*
	H <sub>2</sub> O	10,5 $\pm$ 14,8	7,5 $\pm$ 10,6	$\geq$ 1000,0 $\pm$ 0,0*
<i>Ocotea odorifera</i>	EtOH	9,0 $\pm$ 1,4	23,5 $\pm$ 3,5	362,8 $\pm$ 6,4
	EtOH/H <sub>2</sub> O (7/3)	37,5 $\pm$ 3,5*	33,0 $\pm$ 4,2	308,6 $\pm$ 2,7
	H <sub>2</sub> O	7,0 $\pm$ 9,9	17,0 $\pm$ 7,1	$\geq$ 1000,0 $\pm$ 0,0*
<b><i>Psychotria suterella</i></b>	EtOH	26,5 $\pm$ 2,1	51,0 $\pm$ 1,4*	329,8 $\pm$ 5,8
	EtOH/H <sub>2</sub> O (7/3)	26,0 $\pm$ 2,8	33,5 $\pm$ 2,6	221,7 $\pm$ 9,0
	H <sub>2</sub> O	7,5 $\pm$ 0,7	14,5 $\pm$ 3,5	$\geq$ 1000,0 $\pm$ 0,0*
<i>Psychotria vellosiana</i>	EtOH	47,0 $\pm$ 4,2*	32,5 $\pm$ 3,5	269,2 $\pm$ 71,8
	EtOH/H <sub>2</sub> O (7/3)	30,5 $\pm$ 2,1	15,0 $\pm$ 1,4	334,4 $\pm$ 47,9
	H <sub>2</sub> O	9,5 $\pm$ 13,4	25,5 $\pm$ 3,5	$\geq$ 1000,0 $\pm$ 0,0*
<i>Rudgea jasminoides</i>	EtOH	7,5 $\pm$ 10,6	25,0 $\pm$ 2,8	440,6 $\pm$ 61,6
	EtOH/H <sub>2</sub> O (7/3)	0,0 $\pm$ 0,0	20,5 $\pm$ 2,1	$\geq$ 1000,0 $\pm$ 0,0*
	H <sub>2</sub> O	5,5 $\pm$ 7,7	9,5 $\pm$ 3,5	$\geq$ 1000,0 $\pm$ 0,0*
<i>Schefflera calva</i>	EtOH	3,0 $\pm$ 2,2	5,5 $\pm$ 3,9	$\geq$ 1000,0 $\pm$ 0,0*
	EtOH/H <sub>2</sub> O (7/3)	0,0 $\pm$ 0,0	3,5 $\pm$ 2,5	$\geq$ 1000,0 $\pm$ 0,0*
	H <sub>2</sub> O	25,5 $\pm$ 13,9	29,0 $\pm$ 13,4	$\geq$ 1000,0 $\pm$ 0,0*
<i>Solanum swartzianum</i>	EtOH	1,0 $\pm$ 1,4	11,5 $\pm$ 2,1	318,1 $\pm$ 0,4
	EtOH/H <sub>2</sub> O (7/3)	2,0 $\pm$ 2,8	9,0 $\pm$ 8,4	$\geq$ 1000,0 $\pm$ 0,0*
	H <sub>2</sub> O	14,0 $\pm$ 8,4	13,5 $\pm$ 10,6	$\geq$ 1000,0 $\pm$ 0,0*
<b><i>Xylopia sericea</i></b>	EtOH	35,0 $\pm$ 7,1*	61,0 $\pm$ 8,4*	269,8 $\pm$ 3,4
	EtOH/H <sub>2</sub> O (7/3)	11,0 $\pm$ 5,6	5,5 $\pm$ 7,7	$\geq$ 1000,0 $\pm$ 0,0*
	H <sub>2</sub> O	45,0 $\pm$ 2,8*	53,0 $\pm$ 2,8*	$\geq$ 1000,0 $\pm$ 0,0*

Nota: \*Médias  $\pm$  desvio padrão na coluna que apresentam igualdade estatística pelo teste de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ).  $\geq$  Maior ou igual.

Figura 11. Gráficos das análises estatísticas de atividade antiplasmódica (%) e citotoxicidade ( $\mu\text{g/mL}$ ) dos 36 extratos avaliados.



Nota: Histograma (médias  $\pm$  desvio padrão) seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ). EAGL – Extrato *Alchornea glandulosa*; EAGU – Extrato *Amaioua guianensis*; ELF – Extrato *Laplacea fruticosa*; EML – Extrato *Miconia latecrenata*; ENO – Extrato *Nectandra oppositifolia*; EOO – Extrato *Ocoeta odorifera*; EPS – Extrato *Psychotria suterella*; EPV – Extrato *Psychotria vellosiana*; ERJ – Extrato *Rudgea jasminoides*; ESC – Extrato *Schefflera calva*; ESS – Extrato *Solanum swartzianum*; EXS – Extrato *Xylopi sericea*.

## 6.2. Prospecção Fitoquímica por CCD e Perfil Cromatográfico por UPLC-DAD

Análise dos extratos por CCD em sílica gel mostrou a presença de diversas classes de metabólitos secundários, com prevalência de compostos fenólicos e terpenoides (extratos etanólicos e etanol/água) e compostos fenólicos para os extratos aquosos (Tabela 7). A maioria dos grupos metabólicos encontrados na prospecção fitoquímica deste trabalho já foi observada para as espécies vegetais aqui estudadas (Tabela 1) e espécies dos mesmos gêneros (Tabela 2). Os resultados por CCD apontam também para pouca diferença entre os grupos metabólicos que compõem os diferentes extratos analisados de uma mesma espécie. De modo geral, este fato pode ser determinante para a pouca diferença na atividade antiplasmódica observada para os três diferentes extratos de uma mesma espécie vegetal (Figura 11).

As análises por UPLC acoplada a DAD dos 36 extratos obtidos revelaram a presença de alguns perfis cromatográficos complexos e outros mais simples (dados não mostrados), com a presença de picos majoritários que podem representar possíveis marcadores fitoquímicos dos extratos de algumas das espécies vegetais com potencial antiplasmódico. Os espectros no UV referentes aos principais picos observados nos cromatogramas dos extratos estão, de um modo geral, de acordo com os dados obtidos por CCD, confirmando-se a presença dos principais grupos metabólicos constituintes dos extratos. Para alguns extratos é possível notar também a identificação de algumas classes de metabólitos via UPLC-DAD, anteriormente não identificados por CCD. Cromatogramas dos extratos etanólicos das espécies *A. glandulosa* (Figura 12), *M. latecrenata* (Figura 14), *P. suterella* (Figura 15) e *X. sericea* (Figura 16) e extrato aquoso de *L. fruticosa* (Figura 13), que apresentaram maior atividade antiplasmódica (Tabela 6), mostram a presença de picos majoritários. Os espectros no UV registrados *on-line* das substâncias responsáveis pelos principais picos destes cromatogramas são também apresentados nas figuras.

Tabela 7. Resultados da prospecção fitoquímica por CCD dos extratos das espécies selecionadas.

Extratos	Alcaloides	Antraquinonas	Cumarinas	Flavonoides	Heterosídeos Cardiotônicos	Saponinas	Taninos	Triterpenos /Esteroides	Substância Referência
EAGL EtOH	+	+	-	+	-	+	+	+	+
EAGL EtOH/H <sub>2</sub> O (7/3)	-	-	-	+	-	+	+	+	+
EAGL H <sub>2</sub> O	-	-	-	+	-	+	+	-	+
EAGU EtOH	+	+	+	+	-	-	+	+	+
EAGU EtOH/H <sub>2</sub> O (7/3)	-	-	-	+	+	-	+	+	+
EAGU H <sub>2</sub> O	-	-	-	+	-	+	+	+	+
ELF EtOH	-	+	-	+	-	+	+	+	+
ELF EtOH H <sub>2</sub> O (7/3)	-	+	-	+	-	-	+	-	+
ELF H <sub>2</sub> O	-	+	-	+	-	+	+	+	+
EML EtOH	-	-	+	+	-	+	+	+	+
EML EtOH/H <sub>2</sub> O (7/3)	-	+	-	+	-	+	-	+	+
EML H <sub>2</sub> O	-	-	-	-	-	+	+	-	+
ENO EtOH	-	+	-	+	-	+	+	+	+
ENO EtOH/H <sub>2</sub> O (7/3)	-	-	-	+	-	-	+	+	+
ENO H <sub>2</sub> O	-	+	+	+	-	+	+	+	+
EOO EtOH	-	+	-	+	-	+	+	+	+
EOO EtOH/H <sub>2</sub> O (7/3)	-	+	-	+	-	-	+	+	+
EOO H <sub>2</sub> O	-	-	-	+	-	+	+	-	+
EPS EtOH	+	+	-	+	-	+	+	+	+
EPS EtOH/H <sub>2</sub> O (7/3)	+	+	+	+	+	+	+	+	+

EPS H <sub>2</sub> O	-	-	-	+	-	+	+	-	+
EPV EtOH	+	-	+	+	-	+	+	+	+
EPV EtOH/H <sub>2</sub> O (7/3)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
EPV H <sub>2</sub> O	-	-	+	-	-	+	+	-	+
ERJ EtOH	-	+	+	+	-	+	+	+	+
ERJ EtOH/H <sub>2</sub> O (7/3)	-	+	-	+	+	+	+	+	+
ERJ H <sub>2</sub> O	-	-	-	+	-	+	+	-	+
ESC EtOH	-	-	-	+	-	+	+	+	+
ESC EtOH/H <sub>2</sub> O (7/3)	+	+	+	+	-	+	+	+	+
ESC H <sub>2</sub> O	-	-	+	+	-	+	+	+	+
ESS EtOH	+	-	-	+	-	-	+	+	+
ESS EtOH/H <sub>2</sub> O (7/3)	+	+	+	+	-	-	+	-	+
ESS H <sub>2</sub> O	-	-	-	+	-	-	+	-	+
EXS EtOH	+	-	-	+	-	+	+	+	+
EXS EtOH/H <sub>2</sub> O (7/3)	+	+	+	+	-	+	+	+	+
EXS H <sub>2</sub> O	-	-	+	+	-	+	+	-	+
*EXS DCM	+	-	-	+	-	-	-	+	+
*EXS EtOH	+	-	-	+	-	+	+	+	+

Nota: +: presença; -: ausência. \*Coleta 2. EAGL – Extrato *Alchornea glandulosa*; EAGU – Extrato *Amaioua guianensis*; ELF – Extrato *Laplacea fruticosa*; EML – Extrato *Miconia latecrenata*; ENO – Extrato *Nectandra oppositifolia*; EOO – Extrato *Ocoeta odorifera*; EPS – Extrato *Psychotria suterella*; EPV – Extrato *Psychotria vellosiana*; ERJ – Extrato *Rudgea jasminoides*; ESC – Extrato *Schefflera calva*; ESS – Extrato *Solanum swartzianum*; EXS – Extrato *Xylopia sericea*.

Figura 12. Cromatograma (UPLC-DAD) EAGL EtOH, a 220 nm. Condições cromatográficas: eluente H<sub>2</sub>O + 0,1% HCOOH/ACN + 0,1% HCOOH; 5 – 95% ACN de 0 a 10 min; 95% ACN de 10 a 11 min; 5% ACN de 11 a 13 min. EAGL - *Alchornea glandulosa*.

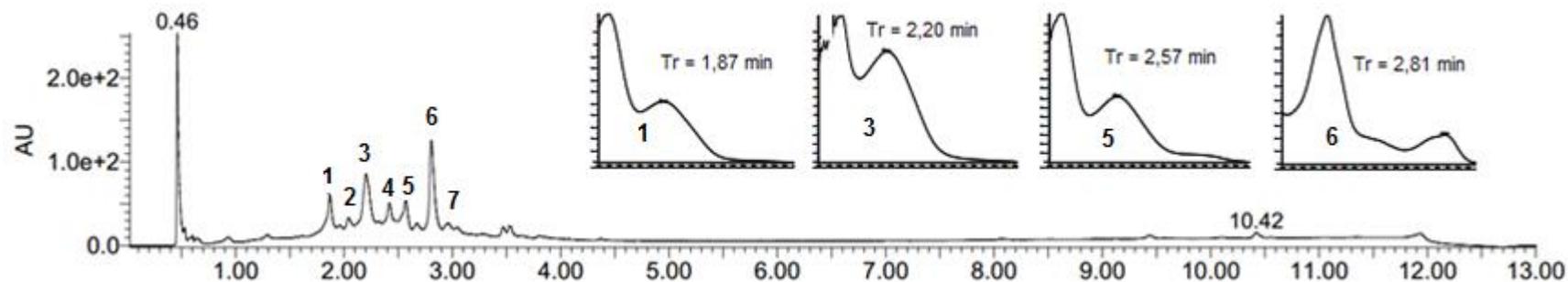


Figura 13. Cromatograma (UPLC-DAD) ELF H<sub>2</sub>O, a 220 nm. Condições cromatográficas: eluente H<sub>2</sub>O + 0,1% HCOOH/ACN + 0,1% HCOOH; 5 – 95% ACN de 0 a 10 min; 95% ACN de 10 a 11 min; 5% ACN de 11 a 13 min. ELF - *Laplacea fruticosa*.

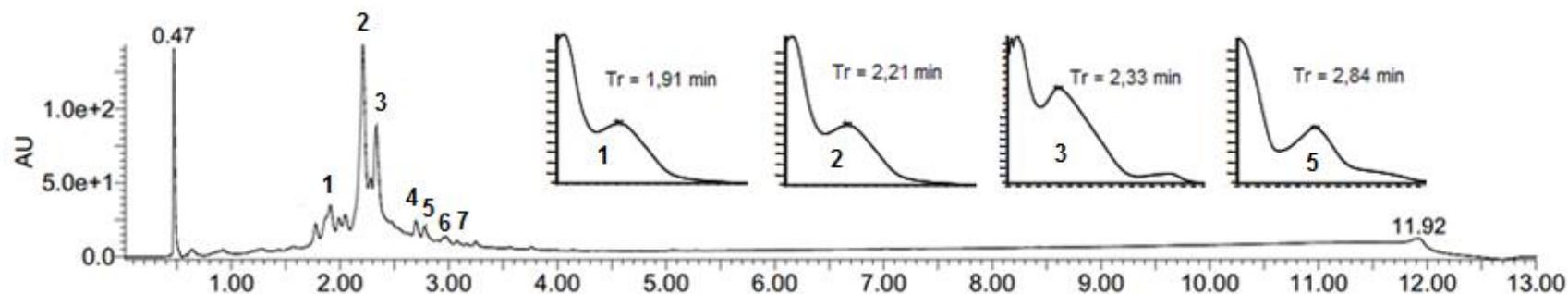


Figura 14. Cromatograma (UPLC-DAD) EML EtOH, a 220 nm. Condições cromatográficas: eluente H<sub>2</sub>O + 0,1% HCOOH/ACN + 0,1% HCOOH; 5 – 95% ACN de 0 a 10 min; 95% ACN de 10 a 11 min; 5% ACN de 11 a 13 min. EML – *Miconia latecrenata*.

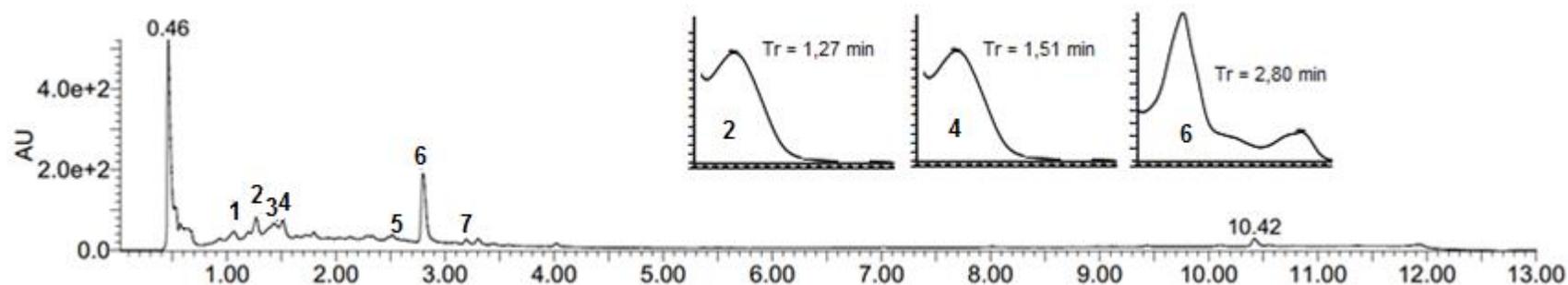


Figura 15. Cromatograma (UPLC-DAD) EPS EtOH, a 220 nm. Condições cromatográficas: eluente H<sub>2</sub>O + 0,1% HCOOH/ACN + 0,1% HCOOH; 5 – 95% ACN de 0 a 10 min; 95% ACN de 10 a 11 min; 5% ACN de 11 a 13 min. EPS – *Psychotria suterella*.

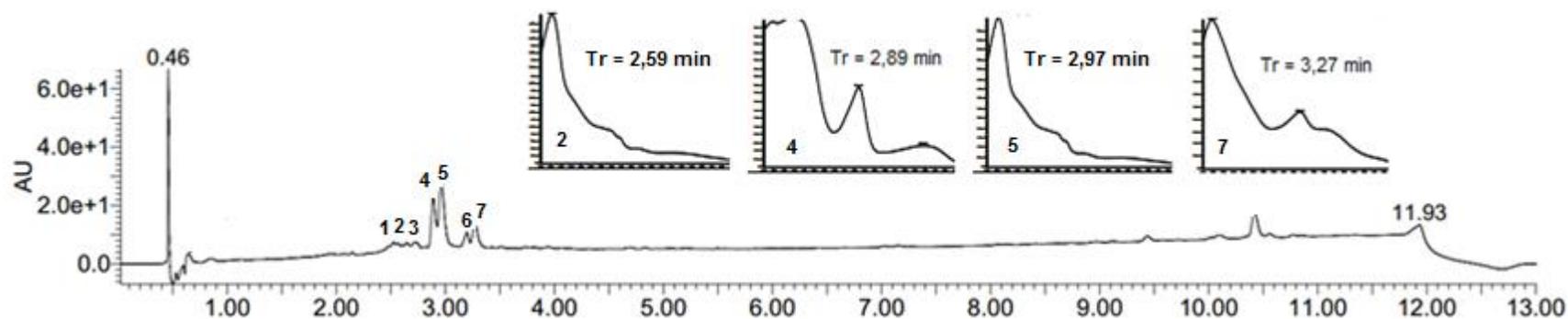
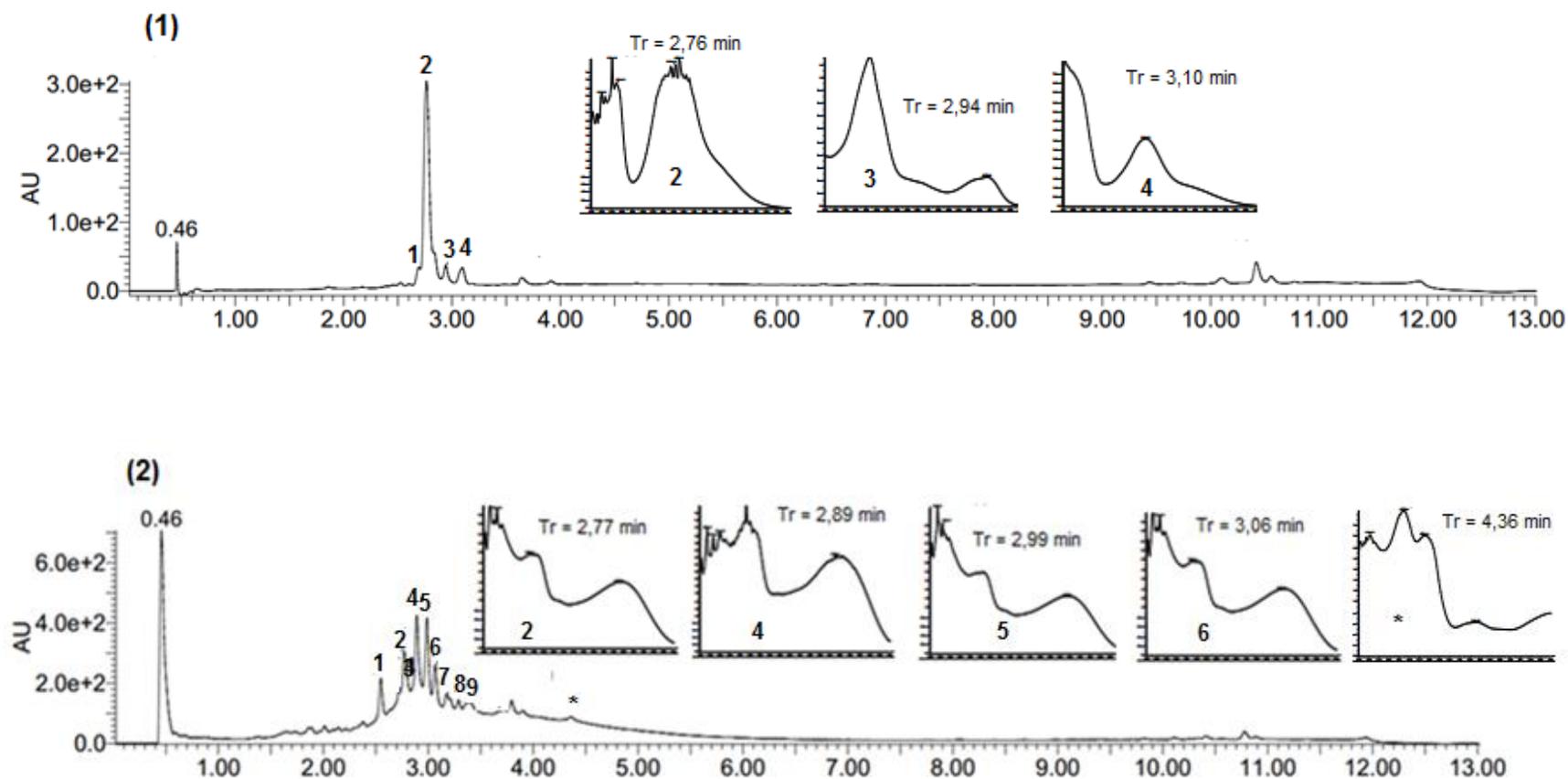


Figura 16. Cromatograma (UPLC-DAD) Coleta 1 (1) e EXS EtOH Coleta 2 (2), a 220 nm. Condições cromatográficas: eluente H<sub>2</sub>O + 0,1% HCOOH/ACN + 0,1% HCOOH; 5 – 95% ACN de 0 a 10 min; 95% ACN de 10 a 11 min; 5% ACN de 11 a 13 min. EXS – *Xylopia sericea*.



### 6.3. Análise por UPLC-DAD-ESI-MS/MS dos extratos ativos frente ao *P. falciparum*

Atualmente, análises por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas (UPLC-MS) são frequentemente utilizadas em fitoquímica para a identificação de substâncias presentes em extratos e frações. UPLC-MS é uma ferramenta poderosa que apresenta alta seletividade e grande sensibilidade, sendo que o uso simultâneo de UPLC-DAD hifenado a MS fornece importantes informações para a elucidação da estrutura química de uma substância (Gaudêncio & Pereira, 2015). Análise do perfil metabolômico secundário de diferentes espécies vegetais ajuda no direcionamento de estudos biológicos, possibilitando trabalhos farmacológicos/terapêuticos mais específicos de acordo com o perfil metabólico encontrado além da quantificação dos metabólitos de interesse (Mohanta, 2013, Tugizimana et al., 2013).

Assim, esta metodologia vem sendo bastante empregada para a identificação de metabólitos secundários em extratos/frações vegetais. Um exemplo é uma publicação de Wu et al. (2012) que relata a identificação de 22 compostos fenólicos no extrato metanólico dos frutos de jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*), utilizando HPLC-UV-ESI/MS/MS. Cabral & Riveros (2010) estudaram a composição em metabólitos secundários de 4 diferentes espécies vegetais, *Maytenus ilicifolia*, *Arrabiadea chica*, *Pterodon pubscens* e *Anacardium occidentale* via UPLC-UV-MS/MS avaliando a influência de fatores como variação sazonal e geográfica pelo monitoramento e quantificação de produtos naturais identificados.

No presente trabalho, a técnica de UPLC-DAD-ESI/MS foi empregada com o objetivo de identificar metabólitos secundários presentes nos extratos e frações ativos contra o *P. falciparum*, sem haver, necessariamente, o isolamento destes compostos, uma vez que muitas das frações dos extratos ativos foram obtidas em baixas quantidades, fato que inviabiliza a realização de novos processos de separação. Considerando a não disponibilidade de um banco de dados sobre MS de produtos naturais que pudesse ser utilizado, foram consultados dados da literatura sobre estudos fitoquímicos de diferentes extratos das espécies *A. glandulosa*, *L. fruticosa*, *M. latecrenata*, *P. suterella* e *X. sericea*, assim como demais espécies pertencentes aos gêneros estudados.

Dados de absorção no UV ( $\lambda_{\max}$ ) de diferentes tipos de flavonoides (flavonóis  $\lambda_{\max}$  254/360 nm; flavonas  $\lambda_{\max}$  254/330 nm; flavanonas  $\lambda_{\max}$  290 nm) (Mabry et al., 1970), taninos (taninos hidrolisáveis e proantocianidinas  $\lambda_{\max}$  220/270 nm) (Abad-García et al., 2009; Zhang et al., 2015), além de absorções no UV de diferentes tipos estruturais de alcaloides, tais como indólicos ( $\lambda_{\max}$  ~ 220/280/300 nm) e isoquinolínicos e derivados ( $\lambda_{\max}$  ~ 250/270/310 nm) (Sangster & Stuart, 1964) foram importantes para a identificação das classes dos produtos naturais possivelmente presentes nas espécies em estudo. Os estudos de fragmentações de constituintes presentes em extratos/frações, importantes para a identificação de produtos naturais, foram realizados por espectrometria de massas sequencial (MS/MS ou MS<sup>2</sup>). Os espectros de massas foram realizados tanto no modo de ionização positivo quanto negativo, dependendo das classes dos compostos em análise. Constatou-se que o modo negativo é mais adequado para compostos fenólicos uma vez que as características ácidas dos mesmos favorecem a perda de um próton levando aos íons [M - H]<sup>-</sup>. Apesar de pouca fragmentação, alguns terpenoides também foram analisados no modo negativo e positivo de ionização. Já compostos com características básicas, como alcaloides, apresentaram maior fragmentação no modo positivo que favorece a formação de íons [M + H]<sup>+</sup>, devido a presença de grupos amino com características básicas, que captam prótons.

Padrões de fragmentação como perda de açúcares foram observados em O-glicosídeos, como perdas de resíduos de hexoses levando a íons [M - H - 162]<sup>-</sup>; de ácido glicurônico [M - H - 176]<sup>-</sup>; de ramnose [M - H - 146]<sup>-</sup>; de pentoses [M - H - 132]<sup>-</sup>. Em C-glicosídeos perda de resíduos de hexoses levam a íons [M - H - 120]<sup>-</sup> e [M - H - 90]<sup>-</sup> enquanto que para pentoses picos foram observados em [M - H - 60]<sup>-</sup>, conforme estudos realizados com glicosídeos de flavonoides (Hertog et al., 1992; Colombo et al., 2008) (Figura 17). Na fragmentação de geninas flavônicas uma característica é a quebra do anel heterocíclico (AH) em diferentes posições, assim como por fragmentação Retro-Diels-Alder (RDA) (Cuyckens et al., 2004; Jaiswal et al., 2012) (Figura 18).

Figura 17. Esquema de fragmentação negativa por ESI, com quebra de O- e C-heterosideo de um flavonoide hipotético. Adaptado de Colombo et al. (2008).

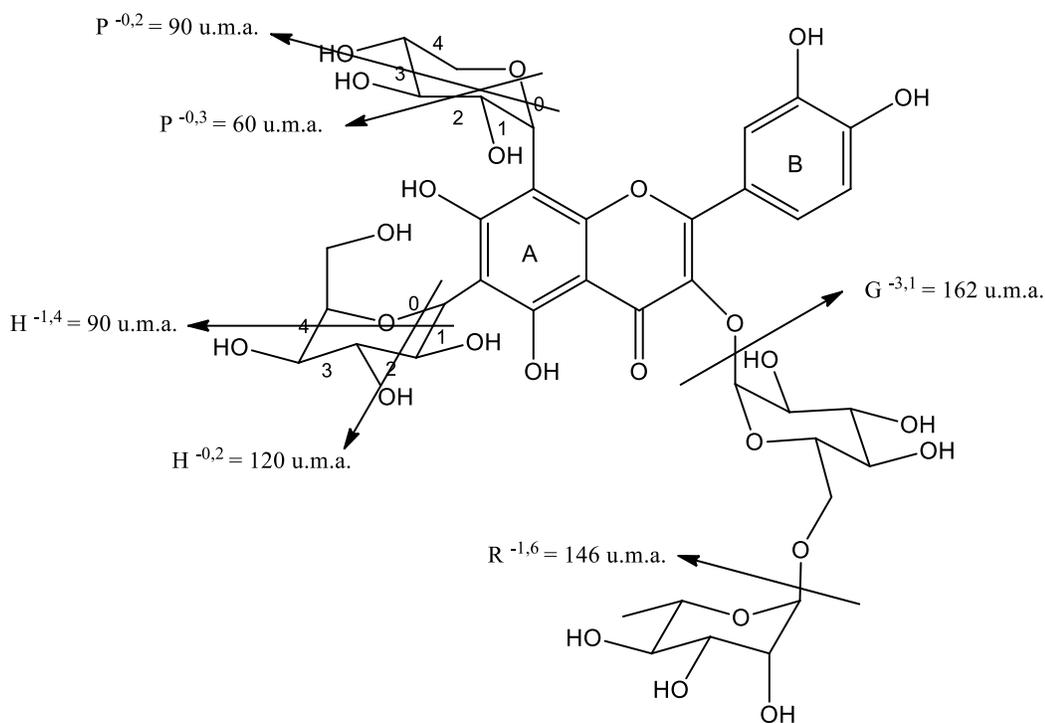
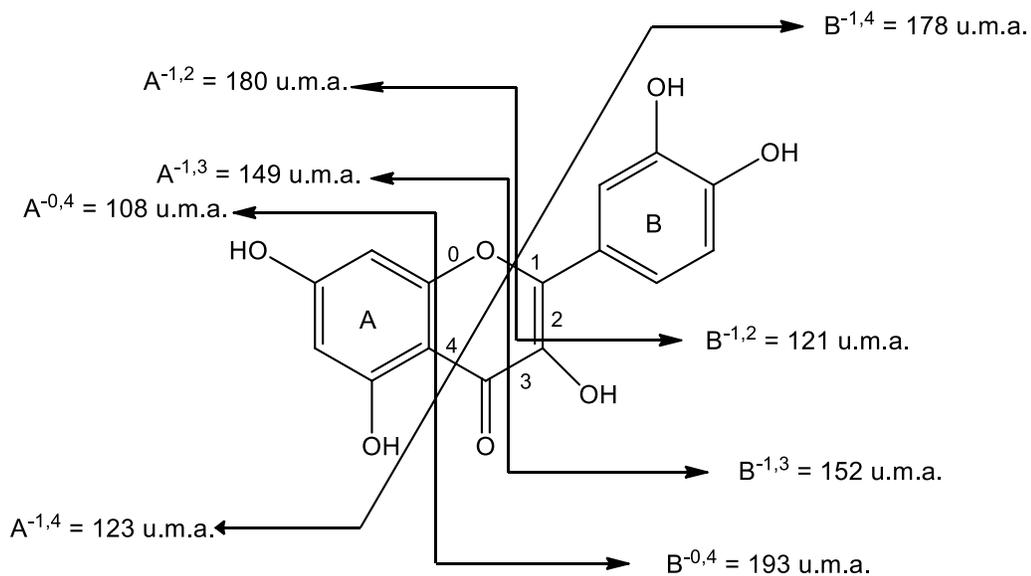
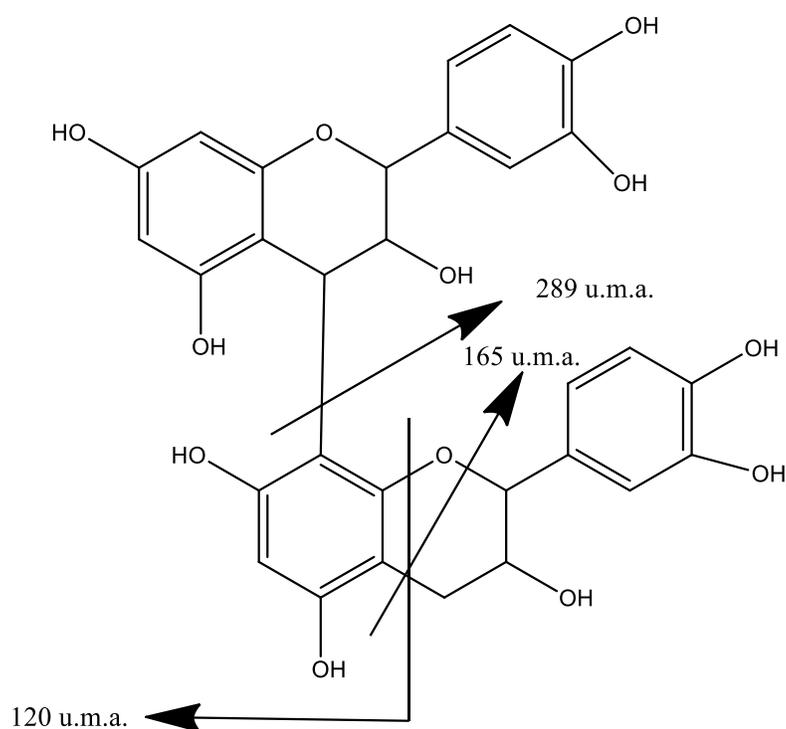


Figura 18. Esquema de fragmentação negativa por ESI da quercetina. Adaptado de Fabres et al. (2001).



A fragmentação de diferentes taninos caracterizou-se principalmente pela observação de picos de íons fragmentários referentes a perdas de ácido gálico [M - H - 170]-, e resíduos de hexahidroxi-difenil (HHDF) [M - H - 302]-, de HHDF-glicose [M - H - 482]-, de galoilglicose [M - H - 332]- e *tris*-galoil-glicose (462 u.m.a.) [M - H - HHDF]- (Kähkönen et al., 2012, Dutra et al., 2014). Para taninos condensados tem-se a perda uma unidade de flavan-3-ol [M - H - 290]- que permitem a identificação e definição do número de unidades monoméricas presentes na estrutura de taninos condensados (Figura 19) (Jaiswal et al., 2012, Dincheva et al., 2013).

Figura 19. Esquema de fragmentação negativa por ESI de uma proantocianidina do tipo B.



### 6.3.1. Caracterização Fitoquímica por UPLC-DAD-ESI-MS/MS do extrato etanólico de *Alchornea glandulosa* (EAGL EtOH)

A Tabela 8 apresenta os fragmentos registrados em análises por UPLC-DAD-ESI-MS/MS no modo de ionização negativo, assim como o tempo de retenção (Tr) e UV ( $\lambda_{max}$ ) de 7 diferentes compostos detectados no extrato etanólico EAGL (Figura 12, Pág. 51). Análise do cromatograma mostra que o Composto 6 (TR 2,81 min) é majoritário. A seguir é discutida a identificação de cada um destes 7 compostos.

Composto 1: O espectro no UV registrado *on-line* é característico de proantocianidinas e taninos hidrolisáveis. No espectro de massas por ESI, com ionização negativa, o pico base (abundância relativa 100%) corresponde, também, ao pico do íon molecular  $[M - H]^-$  633,56. O pico  $m/z$  462,79  $[M - H - 170]^-$  corresponde à perda de uma molécula de ácido gálico (170 u.m.a.). Nota-se ainda o pico  $m/z$  300,46  $[M - H - 333]^-$  (50%), resultante da perda de 2 resíduos de ácido gálico unidas por ligação C-C (grupo hexahidroxidifenol - HHDF) que, após liberação da outra parte da molécula, sofre lactonização formando a molécula de ácido elágico (302 u.m.a.). A diferença observada entre os dois principais picos ( $m/z$  333,00) mostra a perda de um resíduo de hexose (frequentemente glicose) unida a uma molécula de ácido gálico. Assim, o composto 1 foi identificado como o elagitanino 1-galoil-4,6-HHDF-glicose de massa molecular 634 ( $C_{27}H_{22}O_{18}$ ), conhecido como corilagina (Figura 20).

Composto 2: O espectro no UV é característico de taninos hidrolisáveis. No espectro de massas seqüencial, o pico base corresponde a  $m/z$  933,28  $[M - H - 18]^-$ , referente à perda de uma molécula de água do pico do íon molecular  $m/z$  950,92. O pico  $m/z$  301,10  $[M - H - 650]^-$  (66%) corresponde ao grupo HHDF. A diferença de 650 u.m.a. observada em relação ao íon molecular corresponde à perda de 3 resíduos de ácido gálico ligados por ligação C-C, nonahidrotrifenoil (*tris*-galoil). Para taninos do tipo *tris*-galoil, como observado neste trabalho, não é possível a definição da estrutura apenas via ESI-MS/MS, devido a diversidade de isômeros (Kähkönen et al., 2012, Dutra et al., 2014). Assim, o composto 2 é um dos isômeros conhecidos como *tris*-galoil-HHDF-glicose ( $C_{41}H_{28}O_{27}$ ) (Figura 20).

Composto 3: O espectro no UV registrado on-line é característico de taninos hidrolisáveis. O pico base correspondente é também o pico do íon molecular em  $m/z$  951,12. Assim, o composto 3 é um dos isômeros conhecidos como *tris*-galoil-HHDF-glicose ( $C_{41}H_{28}O_{27}$ ) (Figura 20).

Composto 4: O espectro no UV apresenta bandas em  $\lambda_{max}$  275 e 360 nm. A primeira banda poderia ser indicativa de tanino hidrolisável. Contudo, a segunda banda poderia corresponder à banda II de flavonóis que se origina de uma unidade cinamoíla na biossíntese de flavonoides. No espectro de massas o pico base corresponde a  $m/z$  169,03 referente ao íon negativo da molécula do ácido gálico. O pico  $m/z$  453,00 corresponde ao íon molecular, no caso  $[M - H]^-$  (5%). O pico  $m/z$  301,28 (51%) pode ser atribuído a  $[M - H - 152]^-$  que corresponde à quercetina, sendo que a diferença de massa observada resulta da perda de um resíduo de ácido gálico. Assim, o composto 4 foi identificado como a 3-O-galoil-quercetina, de massa molecular 454 ( $C_{21}H_{10}O_{12}$ ) (Figura 20).

Composto 5: O espectro no UV é característico de proantocianidinas. O pico base corresponde a  $m/z$  577,56 sendo também, o pico do íon molecular  $[M - H]^-$ , tratando-se, portanto, de uma proantocianidina dimérica. O pico  $m/z$  292,85  $[M - H - 284]^-$  (60%) resulta de uma fragmentação do dímero tipo B de (epi)catequina. Os picos correspondentes a  $m/z$  457,62  $[M - H - 120]^-$  e  $m/z$  412,60  $[M - H - 165]^-$  (40%) resultam da fragmentação do anel heterocíclico. Assim, o composto 5 foi identificado como uma proantocianidina do tipo (epi)catequina-4,8-(epi)catequina de massa molecular 578,00 ( $C_{30}H_{26}O_{12}$ ) (Figura 20).

Composto 6: O espectro no UV é característico de um 3-OH flavonol (3-hidroxi-flavona). O pico base em  $m/z$  301,76 é também o pico do íon molecular  $[M - H]^-$ . O pico  $m/z$  284,19  $[M - H - 17]^-$  corresponde à perda de uma molécula de água. Já o pico  $m/z$  163,72  $[M - H - 138]^-$  corresponde à fragmentação do anel heterocíclico via RDA (Figura 18). Dessa forma, o composto 6 foi identificado como a quercetina ( $C_{15}H_{10}O_7$ ) (Figura 20).

Composto 7: O espectro no UV é característico de um flavonol ( $\lambda_{\max}$  banda I 350 nm). O pico base correspondente a  $m/z$  284,85 [M – H – 308]- indica a perda de uma molécula de um dissacarídeo, possivelmente glicose-ramnose e corresponde ao íon negativo do canferol. Dessa forma, o composto 7 foi identificado como o canferol-3-O-rutinosídeo ( $C_{15}H_{10}O_7$ ) (Figura 20).

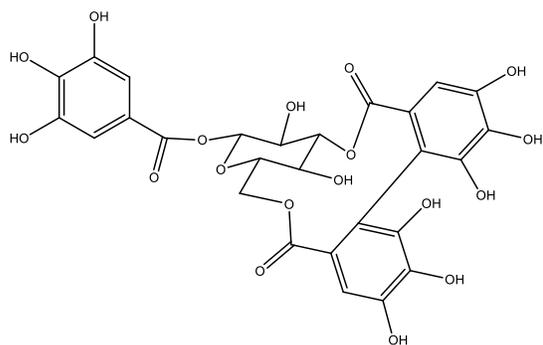
Taninos hidrolisáveis como a corilagina (**1**) já foram identificados e isolados em folhas de *A. glandulosa*, assim como o flavonoide quercetina e derivados heterosídicos desta (Conegro, et al., 2003, Calvo et al., 2007, Lopes et al., 2011).

Tabela 8. Dados espectroscópicos e caracterização de constituintes do extrato etanólico de *Alchornea glandulosa* (EAGL) por UPLC-DAD-ESI-MS/MS.

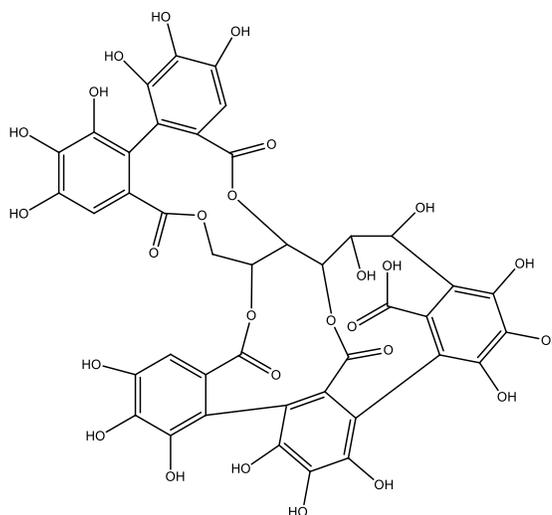
Composto	Tr (min)	$\lambda_{max}$ (nm)	[M - H] - (%)	MS/MS - (%)	Identificação (Fórmula Molecular)
1	1,87	220 272	633,56 [M - H]- (100)	462,79 [M - H - 170]- (25), 445,23 [M - H - 188]- (10), 300,46 [M - H - 333]- (50)	1-galoil-4,6-HHDF-glicose (C <sub>27</sub> H <sub>22</sub> O <sub>18</sub> )
2	2,07	224 275	950,92 [M - H]- (85)	933,28 [M - H - 18]- (100), 726,74 [M - H - 224]- (5), 575,39 [M - H - 376]- (5), 301,10 [M - H - 650]- (66)	tris-galoil-HHDF-glicose (C <sub>41</sub> H <sub>28</sub> O <sub>27</sub> )
3	2,21	224 275	951,12 [M - H]- (100)	463,01 [M - H - 490]- (8), 346,95 [M - H - 606]- (45), 301,03 [M - H - 652]- (21), 291,11 [M - H - 662]- (79)	tris-galoil-HHDF-glicose (C <sub>41</sub> H <sub>28</sub> O <sub>27</sub> )
4	2,52	275 360	453,00 [M - H]- (5)	337,32 [M - H - 116]- (24), 301,28 [M - H - 152]- (51), 285,27 [M - H - 168]- (31), 169,03 [M - H - 284]- (100)	3-O-galoil-quercetina (C <sub>21</sub> H <sub>10</sub> O <sub>12</sub> )
5	2,57	221 275	577,56 [M - H]- (100)	457,62 [M - H - 120]- (42), 412,60 [M - H - 165]- (45), 340,99 [M - H - 236]- (79), 292,85 [M - H - 284]- (60)	(epi)catequina-4,8-(epi)catequina (C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub> )
6	2,81	253 367	301,76 [M - H]- (100)	284,19 [M - H - 17]- (34), 228,87 [M - H - 73]- (20), 215,57 [M - H - 86]- (18), 173,10 [M - H - 128]- (8), 163,72 [M - H - 138]- (25), 144,75 [M - H - 157]- (11), 117,02 [M - H - 184]- (10)	quercetina (C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub> )
7	3,02	252 350	592,71 [M - H]- (50)	284,85 [M - H - 308]- (100)	canferol-3-O-rutinosídeo (C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub> )

(%): Abundância relativa.

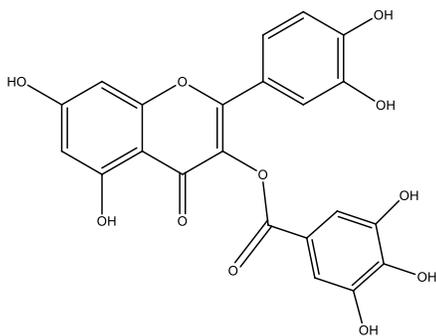
Figura 20. Estruturas dos compostos identificados no extrato etanólico de *Alchornea glandulosa* por UPLC-DAD-ESI-MS/MS.



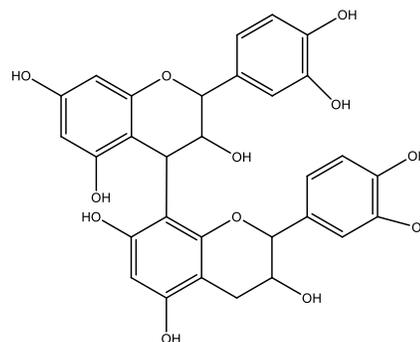
1. Corilagina



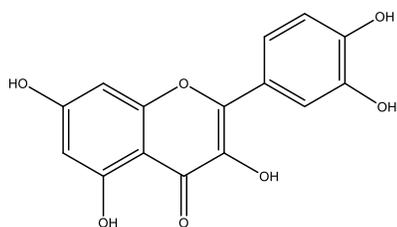
2. tris-galoi-HHDF-glucose



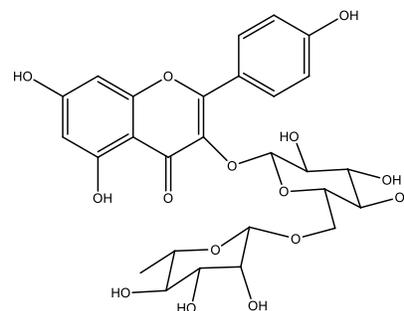
4 Quercetina-3-O-galato



5. (epi)catequina-4,8-(epi)catequina



6. Quercetina



7. Canferol-3-O-rutinosideo

### 6.3.2. Caracterização Fitoquímica por UPLC-DAD-ESI-MS/MS do extrato aquoso de *Laplacea fruticosa* (ELF H<sub>2</sub>O)

A Tabela 9 apresenta os dados de UPLC-DAD-ESI-MS/MS no modo de ionização negativo, incluindo o tempo de retenção e região de absorção no espectro UV de 7 diferentes compostos detectados no extrato etanólico ELF (Figura 13, Pág 51). O cromatograma (Figura 13) indica que os compostos 2 (TR 2,21 min) e 3 (TR 2,33 min) são os majoritários. Abaixo é apresentada separadamente a identificação dos compostos constituintes do extrato.

Composto 1: O espectro no UV é característico para classe de taninos. O pico base corresponde a  $m/z$  764,74 [M – H – 188]-, sendo o pico  $m/z$  953,01 [M – H]- referente ao ion molecular. Observa-se o pico  $m/z$  783,16 [M – H – 170]- (71%), referente a molécula de ácido gálico. Diferença de 18 u.m.a. (perda de uma molécula de água) é observada entre os picos mais intensos  $m/z$  783,16 e 764,74. A ausência do pico  $m/z$  301,00, referente ao grupo HHDF, indica que não há este resíduo molecular no composto. Assim, o composto 1 foi identificado como elagitanino 1,3,5-*tris*-galoil-4,6-galoilglicose de massa 954 (C<sub>41</sub>H<sub>30</sub>O<sub>27</sub>) (Figura 21).

Composto 2: O espectro no UV é característico para classe de taninos. Contudo, o composto não identificado.

Composto 3: O espectro no UV é característico para classe de taninos. Contudo, o composto não identificado.

Composto 4: O espectro no UV é característico para classe de flavonoides. O  $\lambda_{max}$  350 nm referente a banda I remete a hidroxilação em 3-OH, sendo a genina flavônica, um flavonol. O pico base corresponde a  $m/z$  301,26 [M – H – 308]- aponta a perda de um resíduo de glicose (162 u.m.a.) juntamente com uma molécula de ramnose (146 u.m.a.) em relação ao pico do ion molecular  $m/z$  609,09. Dessa forma, o composto 4 foi identificado como quercetina-3-*O*-rutinosídeo, conhecido como rutina (C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>O<sub>16</sub>) (Figura 21).

Composto 5: O espectro no UV é característico para classe de flavonoides, sendo que  $\lambda_{max}$  340 nm aponta para ausência da hidroxila 3-OH, sendo o composto pertencente a classe das flavonas. O pico base corresponde a  $m/z$  151,14 [M – H – 296]- refere-se a fragmentação RDA do anel heterocíclico. O pico  $m/z$  285,01 [M – H – 162]- aponta a perda de um resíduo de glicose em relação ao pico do íon molecular  $m/z$  447,53. Assim, o composto 5 foi identificado como luteolina-7-O-glicopiranosídeo (C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>11</sub>) (Figura 21). O glicopiranosídeo foi atribuído a posição 7 devido a maior probabilidade biossintética (Dewick, 2009).

Composto 6: O espectro no UV é característico para classe de flavonoides. O  $\lambda_{max}$  350 nm refere-se a genina de um flavonol. O pico base correspondente a  $m/z$  285,03 [M – H – 308]- aponta a perda de um resíduo de glicose [M – H – 162]- juntamente com um resíduo de ramnose [M – H – 146]- em relação ao pico do íon molecular  $m/z$  593,08 [M – H]-. Dessa forma, o composto 6 foi identificado como o composto canferol-3-O-rutinosídeo (C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>O<sub>15</sub>) (Figura 21).

Composto 7: O espectro no UV é característico para classe de flavonoides, do tipo flavonol. O pico base corresponde a  $m/z$  300,88 [M – H – 146]- aponta a perda de um resíduo de ramnose em relação ao pico do íon molecular  $m/z$  446,91. Os picos relativos a fragmentação do anel heterocíclico  $m/z$  162,80 [M – H – 284]- e  $m/z$  121,05 [M – H – 295]-, além da fragmentação RDA  $m/z$  151,76 [M – H – 295]- apontam para a genina flavônica canferol. Assim, o composto 7 foi identificado como canferol-O-glicopiranosídeo (C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>11</sub>) (Figura 21).

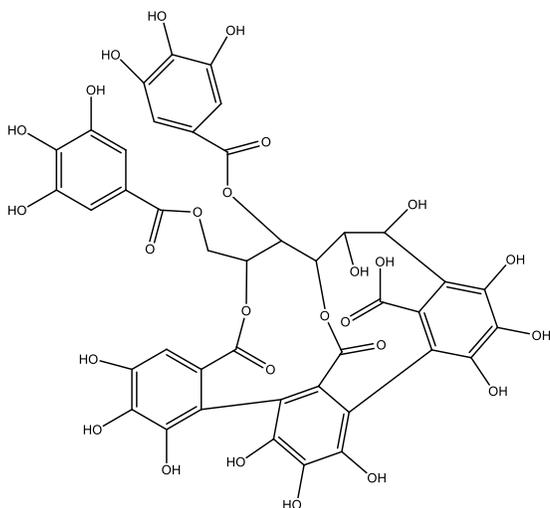
Nenhum estudo foi encontrado para a espécie *L. fruticosa*, sendo, portanto, este trabalho o primeiro estudo fitoquímico e de atividade biológica para esta espécie.

Tabela 9. Dados espectroscópicos e caracterização de constituintes do extrato etanólico de *Laplacea fruticosa* (ELF) por UPLC-DAD-ESI-MS/MS.

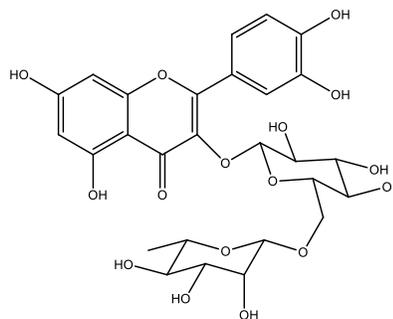
Composto	TR (min)	$\lambda_{max}$ (nm)	[M - H] – (%)	MS/MS – (%)	Identificação (Fórmula Molecular)
1	1,91	217 272	953,01 [M – H]- (2)	909,10 [M - H - 44]- (65), 783,16 [M - H - 170]- (71), 764,72 [M - H - 188]- (100), 425,08 [M - H - 528]- (31)	1,3,5- <i>tris</i> -galoil-4,6-galoilglicose (C <sub>41</sub> H <sub>30</sub> O <sub>27</sub> )
2	2,21	220 274	859,09 [M – H]- (50)	786,64 [M - H - 73]- (37), 754,43 [M - H - 105]- (100), 634,86 [M - H - 225]- (32), 615,55 [M - H - 244]- (66), 580,68 [M - H - 279]- (76), 451,79 [M - H - 407]- (40), 298,91 [M - H - 560]- (66), 122,97 [M - H - 736]- (21)	NI
3	2,33	259 360	859,61 [M – H]- (26)	836,67 [M - H - 23]- (26), 783,49 [M - H - 76]- (26), 597,08 [M - H - 262]- (5), 451,85 [M - H - 408]- (40), 301,63 [M - H - 558]- (100), 168,98 [M - H - 690]- (51), 122,90 [M - H - 736]- (18)	NI
4	2,74	255 355	609,04 [M – H]- (3)	301,26 [M - H - 308]- (100)	quercetina-3-O-rutinosídeo (C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub> )
5	2,84	287 340	447,53 [M – H]- (3)	285,01 [M - H - 164]- (34), 179,91 [M - H - 269]- (26), 151,14 [M - H - 298]- (100)	luteolina-7-O-glicopiranosídeo (C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub> )
6	3,00	260 350	593,08 [M - H]- (25)	285,03 [M - H - 308]- (100)	canferol-3-O-rutinosídeo (C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub> )
7	3,14	256 354	446,91 [M – H]- (42)	300,88 [M - H - 146]- (100), 179,09 [M - H - 268]- (21), 162,80 [M - H - 284]- (24), 151,76 [M - H - 295]- (16), 121,05 [M - H - 295]- (13)	canferol-3-O-glicopiranosídeo (C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub> )

(%): Abundância relativa. NI: Não Identificado.

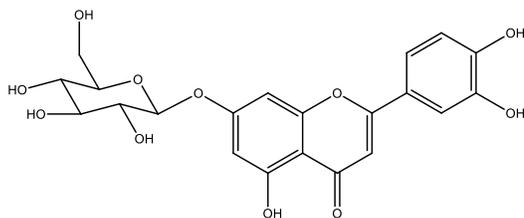
Figura 21. Estruturas dos compostos identificados no extrato aquoso de *Laplacea fruticosa* por UPLC-DAD-ESI-MS/MS.



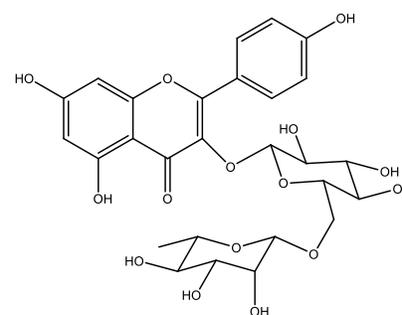
1. 1,3,5-*tris*-galoil-4,6-galoilglicose



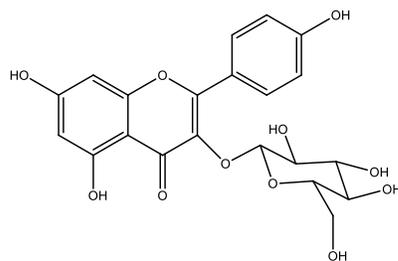
4. Quercetina-3-*O*-rutinosideo



5. Luteolina-7-*O*- glicopiranosideo



6. Canferol-3-*O*-rutinosideo



7. Canferol-3-*O*-glicopiranosideo

### 6.3.3. Caracterização Fitoquímica por UPLC-DAD-ESI-MS/MS do extrato etanólico de *Miconia latecrenata* (EML EtOH)

A Tabela 10 apresenta os dados de UPLC-DAD-ESI-MS/MS no modo de ionização negativo, incluindo tempo de retenção e UV de 7 diferentes compostos detectados no extrato etanólico EML (Figura 14, Pág. 52). O cromatograma de EML EtOH mostra que o composto 6 (TR 2,80 min) é o composto majoritário neste extrato. A identificação dos constituintes deste extrato esta descrita abaixo.

Composto 1: O espectro no UV é característico para classe de proantocianidinas e taninos hidrolisáveis. O pico base  $m/z$  300,98 [M – H – 632]<sup>-</sup> aponta para a presença do grupo HHDF. A diferença de 632 u.m.a. corresponde a 3 resíduos de ácido gálico ligados por ligação C-C (*tris*-galoil), sendo os 3 resíduos ligados a glicose por ligação O-glicosídica. O pico do ion molecular é  $m/z$  933,08 (79%). Assim, o composto 1 foi identificado como o elagitanino 1,2,3,5-*tris*-galoil-4,6-HHDF-glicose de massa 934 u.m.a. (C<sub>41</sub>H<sub>26</sub>O<sub>26</sub>), conhecido como castalagina ou seus isômeros (Figura 22). Estes compostos apresentam isômeros  $\alpha/\beta$  da hidroxila 1 da glicose que não podem ser distinguidos por fragmentação de massas.

Composto 2: O espectro no UV é característico para classe de proantocianidinas e taninos hidrolisáveis. O pico  $m/z$  934,90 corresponde ao pico base e pico do ion molecular. Observa-se o pico  $m/z$  783,69 [M – H – 152]<sup>-</sup> (55%), apontando a perda de um resíduo de ácido gálico desidratado. Essa perda é importante, pois indica que um resíduo de ácido gálico não está ligado C-C a outro resíduo de ácido gálico. Dessa forma, o composto 2 foi identificado como o elagitanino 1-galoil-2,3;4,6-*bis*-HHDF-glicose de massa 936 u.m.a. (C<sub>41</sub>H<sub>28</sub>O<sub>26</sub>), conhecido como potentillina ou seus isômeros (Figura 22).

Composto 3: O espectro no UV é característico para classe de taninos hidrolisáveis. O pico base corresponde a  $m/z$  933,05 [M – H – 18]<sup>-</sup>, referente a perda de uma molécula de água do pico do ion molecular  $m/z$  951,17. Observa-se o pico  $m/z$  783,44 [M – H – 168]<sup>-</sup> (55%), apontando a perda de uma molécula de ácido gálico (170 u.m.a.). Os dados MS/MS

corroboram com as fragmentações para os isômeros *tris*-galoil-HHDF-glicose, massa 952 u.m.a. (C<sub>41</sub>H<sub>28</sub>O<sub>27</sub>) (Kähkönen et al., 2012, Dutra et al., 2014).

Composto 4: O espectro no UV é característico para classe de proantocianidinas e taninos hidrolisáveis. O pico base corresponde a  $m/z$  783,18, sendo este também o pico do íon molecular. O pico  $m/z$  481,06 [M – H – 302]<sup>-</sup> é relativo a presença do grupo hexahidroxidifenoil (HHDF) somado a molécula de glicose. A diferença entre os picos base e  $m/z$  481,06 aponta a perda de grupo HHDF, que é confirmado pela presença do pico  $m/z$  300,86 [M – H – 482]<sup>-</sup> (25%). Assim, o composto 4 foi identificado como o elagitanino 2,3;4,6-*bis*-HHDF-glicose de massa 784 u.m.a. (C<sub>34</sub>H<sub>24</sub>O<sub>22</sub>), conhecido como pedunculagina (Figura 22). A ausência do pico referente a molécula de ácido gálico  $m/z$  169,0 é de grande importância para a distinção entre a pedunculagina e seu isômero terflavina B de mesma massa molecular (784 u.m.a).

Composto 5: O espectro no UV é característico para classe de flavonoides.  $\lambda_{max}$  370 nm referente a banda I, remete a alto padrão de hidroxilação, sendo o composto um flavonol. A presença do pico  $m/z$  301,28 [M – H – 196] aponta para genina flavônica quercetina. Contudo, demais dados não foram suficientes para a identificação do composto.

Composto 6: O espectro no UV é característico para classe de flavonoides (flavonol). O pico base corresponde a  $m/z$  301,10 é também o pico do íon molecular. O pico  $m/z$  284,22 [M – H – 17]<sup>-</sup> aponta a perda de uma molécula de água. Já o pico  $m/z$  122,91 [M – H – 178]<sup>-</sup> corresponde a fragmentação do anel heterocíclico de flavonoides (Figura 18). Dessa forma, o composto 6 foi identificado como quercetina (C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>7</sub>) (Figura 22).

Composto 7: O espectro no UV é característico para classe de flavonoides (flavonol). O pico base corresponde a  $m/z$  301,10 [M – H – 146]<sup>-</sup> referente a genina do flavonol quercetina. A diferença de 146 u.m.a. observada entre o pico base e o pico do íon molecular corresponde a um resíduo de ramnose. Dessa forma, o composto 7 foi identificado como quercitrina, quercetina-3-O-ramnosídeo (C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>11</sub>) (Figura 22).

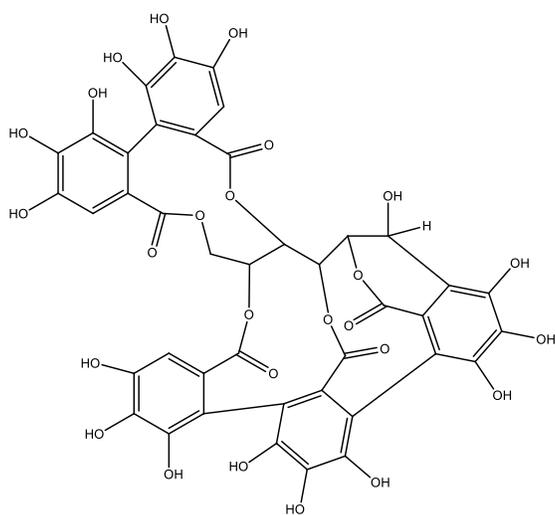
Trabalhos referentes à espécie *M. latecrenata* relatam a presença de alcaloides, flavonoides, taninos e saponinas identificados por CCD (Scio et al., 2012). Contudo, o presente trabalho apresenta a primeira caracterização fitoquímica de extrato de *M. latecrenata*, com a identificação de constituintes fenólicos.

Tabela 10. Dados espectroscópicos e caracterização de constituintes do extrato etanólico de *Miconia latecrenata* (EML) por UPLC-DAD-ESI-MS/MS.

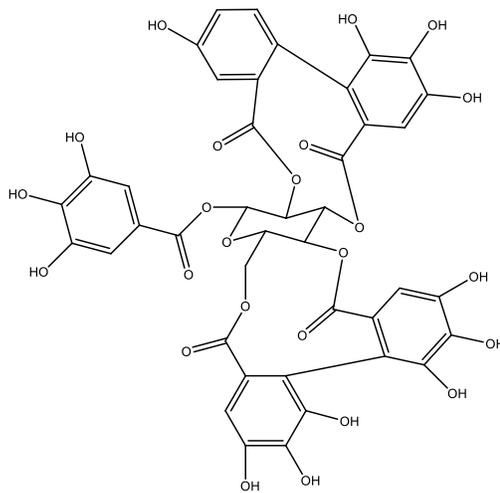
Composto	TR (min)	$\lambda_{max}$ (nm)	[M - H] - (%)	MS/MS - (%)	Identificação (Fórmula Molecular)
1	1,13	238 270	933,08 [M - H]- (79)	569,36 [M - H - 364]- (36), 467,03 [M - H - 466]- (31), 300,98 [M - H - 632]- (100)	1,2,3,5- <i>tris</i> -galoil-4,6-HHDF-glicose (C <sub>41</sub> H <sub>26</sub> O <sub>26</sub> )
2	1,27	230 270	934,90 [M - H]- (100)	783,69 [M - H - 152]- (55), 303,30 [M - H - 632]- (42), 272,86 [M - H - 662]- (96)	1-galoil-2,3;4,6- <i>bis</i> -HHDF-glicose (C <sub>41</sub> H <sub>28</sub> O <sub>26</sub> )
3	1,42	240 270	951,17 [M - H]- (100)	933,05 [M - H - 18]- (60), 907,13 [M - H - 44]- (97), 783,44 [M - H - 168]- (55)	isômero <i>tris</i> -galoil-HHDF-glicose (C <sub>41</sub> H <sub>28</sub> O <sub>27</sub> )
4	1,51	218 260	783,18 [M - H]- (100)	481,06 [M - H - 302]- (9), 300,86 [M - H - 482]- (25), 274,84 [M - H - 508]- (34)	2,3;4,6- <i>bis</i> -HHDF-glicose (C <sub>34</sub> H <sub>24</sub> O <sub>22</sub> )
5	2,54	254 371	497,36 [M - H]- (29)	451,11 [M - H - 46]- (100), 433,09 [M - H - 64]- (29), 301,28 [M - H - 196]- (19), 121,46 [M - H - 376]- (5)	NI
6	2,80	253 367	301,10 [M - H]- (100)	284,22 [M - H - 17]- (17), 246,14 [M - H - 55]- (16), 229,32 [M - H - 72]- (10), 200,71 [M - H - 100]- (13), 145,25 [M - H - 156]- (5), 128,87 [M - H - 172]- (5), 122,91 [M - H - 178]- (3)	quercetina (C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub> )
7	3,14	254 360	447,26 [M - H]- (27)	300,88 [M - H - 146]- (100), 284,98 [M - H - 162]- (25), 177,92 [M - H - 269]- (18), 151,29 [M - H - 296]- (6)	quercetina-3- <i>O</i> -ramnosídeo (C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub> )

(%): Abundância relativa. NI = Não Identificado.

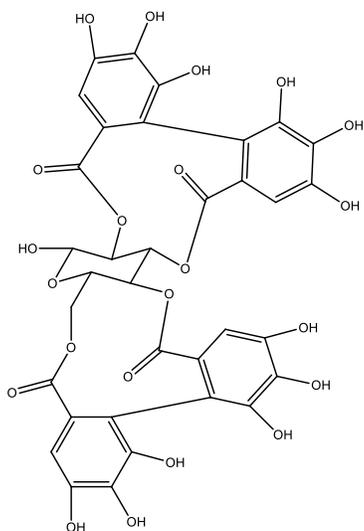
Figura 22. Estruturas dos compostos identificados no extrato etanólico de *Miconia latecrenata* por UPLC-DAD-ESI-MS/MS.



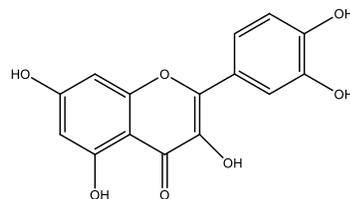
1. Castalagina ou Isômeros



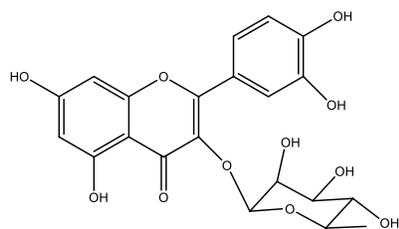
2. 2,3,4,6-HHDF-glucose



4. Pedunculagina



6. Quercetina



7. Quercitrina

#### 6.3.4. Caracterização Fitoquímica por UPLC-DAD-ESI-MS/MS do extrato etanólico de *Psychotria suterella* (EPS EtOH)

A Tabela 11 apresenta os dados de UPLC-DAD-ESI-MS/MS no modo de ionização positivo, incluindo o tempo de retenção e UV de 7 diferentes compostos detectados no extrato etanólico EPS (Figura 15, Pág. 52). O cromatograma indica que os compostos 4 (TR 2,89 min) e 5 (TR 2,97 min) são os majoritários. Abaixo é apresentada separadamente a identificação dos compostos constituintes do extrato.

Composto 1: O pico do íon molecular é observado em  $m/z$  512,69  $[M + H]^+$  (16%). O pico base corresponde a  $m/z$  650,97  $[M + H] - 162]^+$  e aponta para a perda de um resíduo de glicose em relação ao pico do íon molecular. O pico  $m/z$  468,98  $[M + H - 44]^+$  aponta a perda de uma molécula de  $CO_2$  (44 u.m.a.) referente a um grupo carboxílico. O espectro no UV do composto 1 ( $\lambda_{max} \sim 237, 304, 368$  nm) aponta para alta conjugação, típico de alcaloides indólicos e  $\beta$ -carbolicos (Sangster & Stuart, 1964). Pesquisa bibliográfica indica a presença de diferentes alcaloides indólicos e  $\beta$ -carbolicos em espécies do gênero *Psychotria* (Porto et al., 2009). Comparação com dados da literatura levaram à identificação do composto 1 como o ácido lialosídico ( $C_{26}H_{28}N_2O_9$ ) (Valverde et al., 1999). O lialosideo, um éster metílico, foi também identificado em EPS EtOH (Composto 4). Os picos dos íons moleculares do ácido lialosídico e lialosideo diferem de 14 u.m.a. (Figura 23).

Composto 2: O espectro no UV é característico de alcaloides indólicos monoterpênicos ( $\lambda_{max} \sim 220, 280, 300$  nm) (Sangster & Stuart, 1964). O pico base corresponde em  $m/z$  499,72  $[M + H - 17]^+$  aponta para a perda de uma hidroxila em relação ao pico do íon molecular  $m/z$  517,61 (21%). O pico  $m/z$  355,05  $[M + H - 162]^+$  (13%) resulta da perda de um resíduo de glicose (162 u.m.a.). Pesquisa bibliográfica indica presença de diferentes alcaloides indólicos monoterpênicos em espécies do gênero *Psychotria* (Porto et al., 2009). Análise comparativa com dados de alcaloides indólicos monoterpênicos que ocorrem em espécies de *Psychotria* levaram à identificação do composto 2 como o ácido

strictosidínico ( $C_{26}H_{32}N_2O_9$ ) (Figura 23). Os picos em  $m/z$  307,99 ( $[M + H] - 209$ ) (21%) e  $m/z$  284,99  $[M + H - 232]^+$  (29%) confirmam a fragmentação do anel monoterpênico oriundo da biossíntese do isopreno que ocorre nessa classe de alcaloides (Dewick, 2009).

Composto 3: O espectro no UV é característico para classe de alcaloides indólicos, similar ao composto 2. O pico base corresponde a  $m/z$  396,30  $[M + H - 180]^+$  aponta a perda de uma molécula de glicose em relação ao pico do ion molecular  $m/z$  575,15. O pico  $m/z$  413,35  $[M + H - 162]^+$  (58%) confirma a perda de um resíduo de glicose. Assim, os picos  $m/z$  321,88  $[M + H - 253]^+$  (45%) aponta a fragmentação do anel heterocíclico, sendo a carboxila esterificada. Essa comparação pode ser feita com o composto 2, na qual vê-se a carboxila ácida  $m/z$  307,99 ligada ao anel terpenoide. Ainda em comparação ao Composto 2, nota-se a diferença de 58 u.m.a., sendo 14 u.m.a. relativa a esterificação do ácido. Assim, por diferença de massas, entre o Composto 3 e 2, concluiu-se que o composto 3 possui uma carboxila a mais (44 u.m.a.). Estudos bibliográficos mostram a presença da carboxila ligada ao núcleo indólico (Karou et al., 2011). Dessa forma, o composto 3 foi identificado como o 5-carboxistrictosidina ( $C_{28}H_{34}N_2O_{11}$ ) (Figura 23).

Composto 4: O espectro no UV é característico para classe de alcaloides indólicos  $\beta$ -carbolínicos, similar ao composto 1. O pico base corresponde a  $m/z$  365,15  $[M + H - 162]^+$  mostra a perda de um resíduo de glicose em relação ao pico do ion molecular  $m/z$  527,10. Similaridade na fragmentação entre os compostos 4 e 1, com diferença de 14 u.m.a. ( $CH_2$ ), aponta para a ausência esterificação do composto 4 em relação ao 1. Assim, o composto 4 foi identificado como o lialosideo ( $C_{27}H_{30}N_2O_9$ ) (Figura 23).

Composto 5: O espectro no UV é característico para classe de alcaloides indólicos ( $\lambda_{max} \sim 220/280/300$  nm), similar aos compostos 2 e 3. O pico base corresponde a  $m/z$  514,16  $[M + H - 17]^+$  aponta a perda de uma hidroxila em relação ao pico do ion molecular  $m/z$  531,08. O pico  $m/z$  368,94  $[M + H - 162]^+$  (42%) mostra a perda de um resíduo de glicose. Similaridade na fragmentação entre os compostos 5 e 3, com diferença de 44 u.m.a. ( $CO_2$ ), aponta para a ausência da carboxilação no composto 5. Dessa forma, o composto 5 foi identificado como o strictosidina ( $C_{27}H_{34}N_2O_9$ ) (Figura 23).

Composto 6: O pico base corresponde a  $m/z$  494,33  $[M + H - 77]^+$  aponta a perda de uma hidroxila (17 u.m.a.) e um grupo acetato (59 u.m.a.). O pico  $m/z$  409,24  $[M + H - 162]^+$  (10%) mostra a perda de um resíduo de glicose em relação ao pico do ion molecular  $m/z$  571,35. Absorção no UV semelhante ao composto 1 e 4, levaram a identificação do composto 6, como também derivado do composto lialosideo, confirmado pelo pico  $m/z$  494,33  $[M + H - 77]^+$ . A diferença de 44 u.m.a. aponta para a presença de uma carboxilação no composto 6 em relação ao composto 4. Assim, o composto 6 foi identificado como o 5-carboxilialosideo ( $C_{28}H_{30}N_2O_{11}$ ) (Figura 23).

Composto 7: O espectro no UV é característico para classe de alcaloides indólicos  $\beta$ -carbolínicos, similar aos compostos derivados de lialosideo. Pequena diferença de absorção pode ser notada com  $\lambda_{max}$  340 nm. O pico  $m/z$  527,02  $[M + H - 176]^+$  indica a presença da molécula lialosideo, com diferença de 176 u.m.a. em relação ao pico do ion molecular  $m/z$  703,42 (10%). O pico base corresponde a  $m/z$  365,12  $[M + H - 338]^+$  mostra a perda de um resíduo de glicose (162 u.m.a.) assim como a diferença de 176 u.m.a. também vista entre o pico do ion molecular e o pico  $m/z$  527,02  $[M + H - 176]^+$ . Estudos bibliográficos mostram a molécula 6-O-cinamaldeído-4''-hidroxi-3''-metoxilialosideo (702 u.m.a.) (Valverde et al., 1999). Análise comparativa entre os dados do composto 7 e a molécula citada, confirmam que são o mesmo composto, uma vez que a diferença de 176 u.m.a. refere-se a perda do fragmento cinamaldeído-4''hidroxi-3''-metoxi com perda de água, também conhecido como ácido ferúlico. A presença do anel aromático no resíduo de ácido ferúlico explica ainda a diferença de UV observada. Assim, o composto 7 foi identificado como o ácido ferúlico-6-O-lialosideo ( $C_{37}H_{38}N_2O_{12}$ ) (Figura 23).

Os alcaloides identificados são moléculas quirais. Os dados de UV e massas são compatíveis com as estruturas destes alcaloides que são conhecidos. No entanto, não necessariamente tenham as mesmas configurações dos centros quirais dos alcaloides conhecidos.

Os compostos 4 e 5 já foram isolados e identificados em extratos ácido/base de folhas de *P. suterella* (Santos et al., 2001) e os demais compostos foram identificados em diferentes espécies de *Psychotria* (Valverde et al., 1999, Porto et al., 2009). Para os

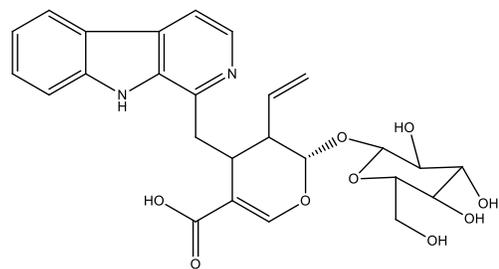
compostos identificados no extrato etanólico de *P. suterella* não foram encontrados estudos de atividade antiplasmódica. Contudo, diferentes trabalhos indicam alta atividade antiplasmódica para uma diversidade de alcaloides da classe indólica (Fredrich et al., 2008, Chierrito et al., 2014).

Tabela 11. Dados espectroscópicos e caracterização de constituintes do extrato etanólico de *Psychotria suterella* (EPS) por UPLC-DAD-ESI-MS/MS.

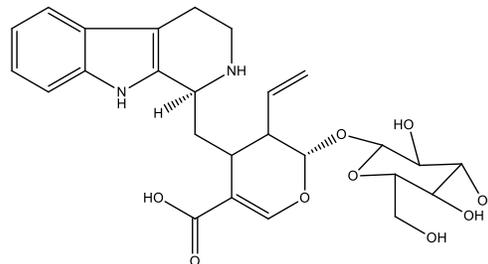
Composto	TR (min)	$\lambda_{max}$ (nm)	[M + H] <sup>+</sup> (%)	MS/MS (%)	Identificação (Fórmula Molecular)
1	2,52	237 304 368	512,69 [M + H] <sup>+</sup> (16)	468,98 [M + H - 44] <sup>+</sup> (13), 350,97 [M + H - 162] <sup>+</sup> (100), 332,99 [M + H - 18] <sup>+</sup> (31)	ácido lialosideo (C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub> )
2	2,59	220 280 290 300	517,61 [M + H] <sup>+</sup> (21)	499,72 [M + H - 17] <sup>+</sup> (100), 355,05 [M + H - 162] <sup>+</sup> (13), 338,42 [M + H - 179] <sup>+</sup> (45), 307,99 [M + H - 209] <sup>+</sup> (21), 284,99 [M + H - 232] <sup>+</sup> (29), 151,16 [M + H - 366] <sup>+</sup> (14)	ácido strictosidina (C <sub>26</sub> H <sub>32</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub> )
3	2,77	220 280 290 300	575,15 [M + H] <sup>+</sup> (26)	557,03 [M + H - 17] <sup>+</sup> (18), 413,35 [M + H - 162] <sup>+</sup> (58), 396,30 [M + H - 180] <sup>+</sup> (100), 380,95 [M + H - 194] <sup>+</sup> (34), 362,03 [M + H - 17] <sup>+</sup> (21), 331,88 [M + H - 253] <sup>+</sup> (45)	5-carboxistrictosidina (C <sub>28</sub> H <sub>34</sub> N <sub>2</sub> O <sub>11</sub> )
4	2,90	237 304 368	527,10 [M + H] <sup>+</sup> (16)	365,15 [M + H - 162] <sup>+</sup> (100), 347,10 [M + H - 180] <sup>+</sup> (3), 333,02 [M + H - 194] <sup>+</sup> (9), 295,10 [M + H - 232] <sup>+</sup> (10)	lialosideo (C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub> )
5	2,97	220 280 290 300	531,08 [M + H] <sup>+</sup> (10)	514,16 [M + H - 17] <sup>+</sup> (100), 368,94 [M + H - 162] <sup>+</sup> (42), 352,14 [M + H - 179] <sup>+</sup> (76), 281,88 [M + H - 249] <sup>+</sup> (8)	strictosidina (C <sub>27</sub> H <sub>34</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub> )
6	3,12	237 304 368	571,35 [M + H] <sup>+</sup> (10)	550,56 [M + H - 21] <sup>+</sup> (7), 494,33 [M + H - 77] <sup>+</sup> (100), 409,24 [M + H - 162] <sup>+</sup> (10), 391,02 [M + H - 180] <sup>+</sup> (8), 376,94 [M + H - 194] <sup>+</sup> (10), 358,90 [M + H - 212] <sup>+</sup> (5)	5-carboxilialosideo (C <sub>28</sub> H <sub>30</sub> N <sub>2</sub> O <sub>11</sub> )
7	3,27	219 306 340	703,42 [M + H] <sup>+</sup> (75)	527,00 [M + H - 176] <sup>+</sup> (40), 365,12 [M + H - 338] <sup>+</sup> (100), 295,28 [M + H - 501] <sup>+</sup> (75)	ácido ferúlico-6-O-lialosideo (C <sub>37</sub> H <sub>38</sub> N <sub>2</sub> O <sub>12</sub> )

(%): Abundância relativa.

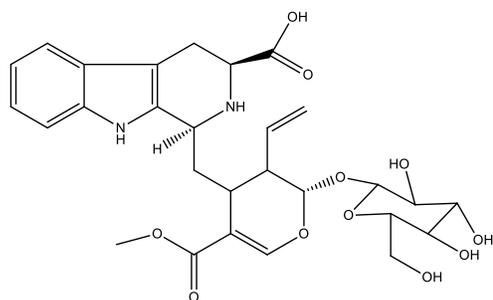
Figura 23. Estruturas dos compostos identificados no extrato etanólico de *Psychotria suterella* por UPLC-DAD-ESI-MS/MS.



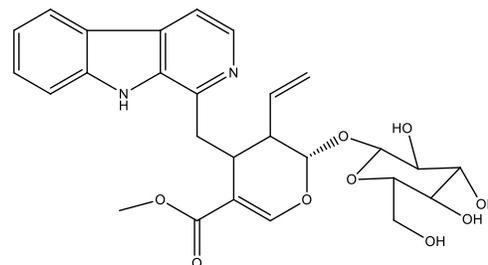
1 Ácido Lialosido



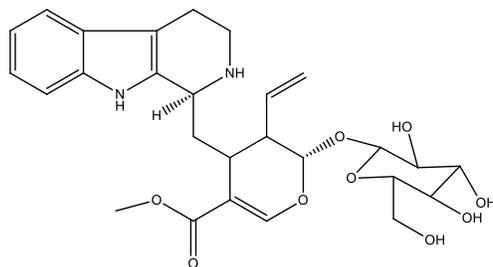
2 Ácido Estrictosido



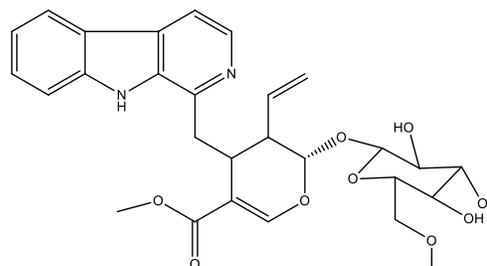
3. 5-carboxiestrictosidina



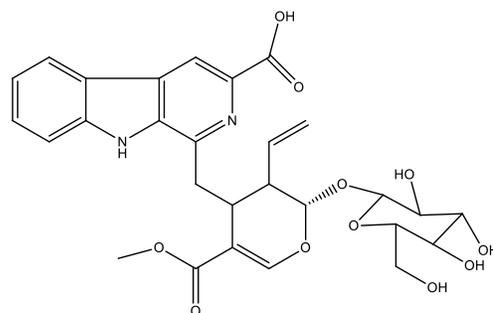
4. Lialosido



5. Estrictosidina



6. 5-carboxilialosido



7. Ferulil-6-O-lialosido

### 6.3.5. Caracterização Fitoquímica por UPLC-DAD-ESI-MS/MS do extrato etanólico de *Xylopia sericea* Coleta 1 (EXS EtOH)

A Tabela 12 os dados de UPLC-DAD-ESI-MS/MS no modo de ionização negativo, incluindo o tempo de retenção e UV de 4 diferentes compostos observados no extrato etanólico EXS Coleta 1 (Figura 16, Pág. 53). O cromatograma de EXS EtOH Coleta 1 mostra o composto 2 (TR 2,76 min) como majoritário. Abaixo é apresentada separadamente a identificação dos constituintes do extrato.

Composto 1: O espectro no UV é característico para classe de flavonoides. O  $\lambda_{max}$  350 nm aponta para um flavonol. O pico base corresponde a  $m/z$  301,94 [M – H – 308]- aponta a perda de um resíduo de glicose (162 u.m.a.) juntamente com um resíduo de ramnose (146 u.m.a.) em relação ao pico do ion molecular  $m/z$  609,09. O pico  $m/z$  150,64 [M – H – 458]- (40%) corresponde a fragmentação do anel heterocíclico (Figura 18). Dessa forma, o composto 1 foi identificado como quercetina-3-O-rutinosídeo, conhecido como rutina (C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>O<sub>16</sub>) (Figura 24).

Composto 2: O espectro no UV é característico para classe de flavonoides, sendo o UV indicativo de ausência de insaturação no anel heterocíclico ( $\lambda_{max}$  290 nm), representativo de flavanona. O pico base correspondente a  $m/z$  302,94 [M – H – 146]- aponta a perda de um resíduo de ramnose (146 u.m.a.) em relação ao pico do íon molecular  $m/z$  449,04 [M – H]-. Ausência da insaturação no anel heterocíclico aumenta a massa da genina em 2 u.m.a. Sendo assim, o pico  $m/z$  302,94 corresponde a diidroquercetina, e o composto 2 representa a diidroquercetina-3-O-ramnosídeo (C<sub>21</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>) (Figura 24).

Composto 3: O espectro no UV é característico para classe de flavonoides, do tipo flavonóis. O pico base correspondente a  $m/z$  300,24 [M – H – 308]- aponta a perda de um resíduo de glicose (162 u.m.a.) juntamente com um resíduo de ramnose (146 u.m.a.) em relação ao pico do ion molecular  $m/z$  608,90. O pico  $m/z$  463,04 [M – H – 146]- indica a perda de um resíduo de ramnose. Assim, o composto 3 apresenta como genina, a quercetina ligada a um resíduo de glicose, além de um resíduo de ramnose. Contudo,

estas duas moléculas estão ligadas a genina separadamente, uma vez que se observa a perda do resíduo de ramnose (pico  $m/z$  463,04). Devido a análises de biossíntese, o resíduo ramnosídeo foi atribuído a posição C7 do anel A, enquanto a glicose foi atribuída a posição 3-OH do anel C. Dessa forma, composto 3 foi identificado como 7-O-ramnosil-3-O-glicosilquercetina ( $C_{27}H_{30}O_{16}$ ) (Figura 24).

Composto 4: O espectro no UV é característico para classe de flavonoides, do tipo flavonol. O pico base corresponde a  $m/z$  284,83 [M – H – 308]- aponta a perda de um resíduo de glicose (162 u.m.a.) juntamente com um resíduo de ramnose (146 u.m.a.) em relação ao pico do ion molecular  $m/z$  593,64. A genina de flavonol com massa  $m/z$  286,00 possui uma hidroxila a menos que a genina de quercetina. Dessa forma, o composto 4 foi identificado como canferol-3-O-rutinosídeo ( $C_{27}H_{30}O_{15}$ ) (Figura 24).

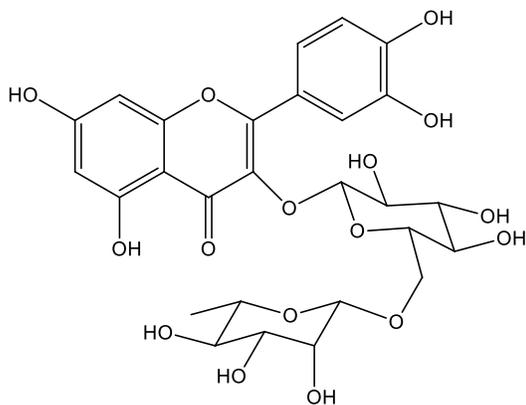
A maioria dos estudos com espécies de *Xylopi*a apresentam a identificação de alcaloides e terpenoides, sendo menos frequentes trabalhos com identificação de compostos fenólicos. Contudo, flavonoides como rutina e quercetina foram identificados por HPLC-UV nos extratos etanólicos das folhas de *X. sericea* (Martins et al., 2012). Além disso, diferentes substâncias fenólicas também foram detectadas no extrato metanólico dos frutos de *X. sericea* (Mendes, 2014).

Tabela 12. Dados espectroscópicos e caracterização de constituintes do extrato etanólico de *Xylopiya sericea* (EXS) Coleta 1 por UPLC-ESI-MS/MS.

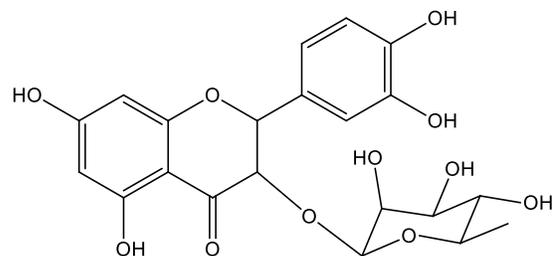
Composto	TR (min)	$\lambda_{max}$ (nm)	[M - H] - (%)	MS/MS - (%)	Identificação (Fórmula Molecular)
1	2,70	254 360	609,09 [M - H]- (97)	300,94 [M - H - 308]- (100), 150,64 [M - H - 458]- (40), 125,51 [M - H - 484]- (5)	quercetina-3-O-rutinosídeo (C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub> )
2	2,76	289	449,04 [M - H]- (3)	302,94 [M - H - 146]- (8), 285,26 [M - H - 164]- (32), 180,03 [M - H - 269]- (14), 150,82 [M - H - 298]- (100), 124,81 [M - H - 324]- (16)	diidroquercetina-3-O-ramnosídeo (C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> )
3	2,94	254 360	608,90 [M - H]- (81)	463,04 [M - H - 146]- (52), 300,24 [M - H - 308]- (100), 178,95 [M - H - 430]- (17), 151,15 [M - H - 458]- (16)	7-O-ramnosil-3-O-glicosilquercetina (C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub> )
4	3,10	266 350	593,64 [M - H]- (2)	284,83 [M - H - 308]- (100)	canferol-3-O-rutinosídeo (C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub> )

(%): Abundância relativa.

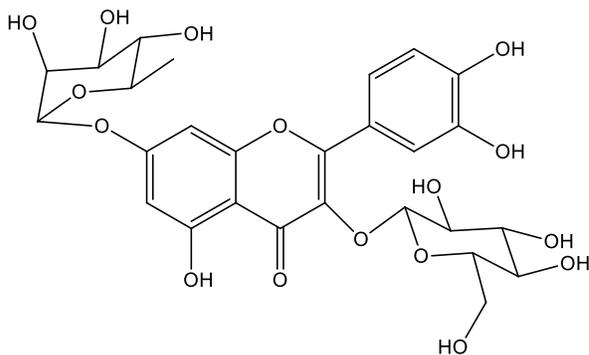
Figura 24. Estruturas dos compostos identificados no extrato etanólico de *Xylopiia sericea* Coleta 1 por UPLC-DAD-ESI-MS/MS.



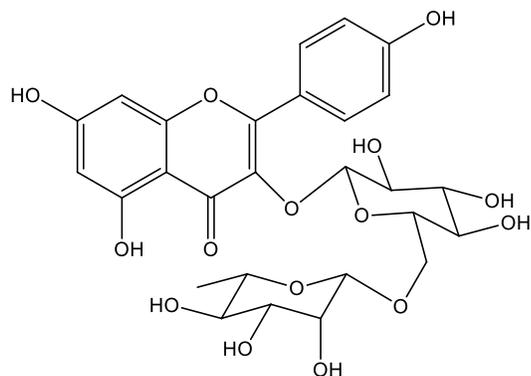
1. Quercetina-3-*O*-rutinosideo



2. Dihidroquercetina-3-*O*-ramnosideo



3. 7-*O*-ramnosil-3-*O*-galactosilquercetina



4. Canferol-3-*O*-rutinosideo

#### 6.4. Atividade Antiplasmódica de frações obtidas dos extratos etanólicos de *Alchornea glandulosa*, *Miconia latecrenata* e *Xylopia sericea*

##### 6.4.1. Atividade antiplasmódica de frações obtidas do extrato etanólico de *Alchornea glandulosa*

A Figura 25 mostra o esquema referente ao fracionamento, atividade antiplasmódica de EAGL EtOH e de frações oriundas de partição e de coluna cromatográfica. Observa-se que não houve diferença estatística entre os valores da ação antiplasmódica do extrato etanólico de EAGL e as frações EAGL Fr. AcOEt, EAGL Fr. But e EAGL Fr. H<sub>2</sub>O, sendo somente a Fr. DCM menos ativa do que o extrato. Análise por CCD, mostra a presença de triterpenos/esteroides na Fr. DCM, diferenciando-a das demais frações, compostas por substâncias fenólicas.

Uma vez que a EAGL Fr. But apresentou cromatograma menos complexo que as demais frações ativas (Figura 26), esta foi fracionada em coluna de sílica gel, da qual obteve-se 7 frações. As frações EAGL FB/F3, EAGL FB/F4 e EAGL FB/F6 apresentaram aumento significativo da atividade antiplasmódica, sendo observado 100,0% de redução de crescimento do parasito na concentração 50 µg/mL (Figura 25). O cromatograma das frações mais ativas (EAGL FB/F4 e EAGL FB/F6) (Figura 26) mostra aumento da intensidade dos picos relativos a corilagina (1) e quercetina (6) identificados no extrato etanólico EAGL (Figura 12), podendo ser estes os compostos diretamente responsáveis pela atividade observada.

Extrato etanólico das folhas de *A. cordifolia* apresentou alta atividade antiplasmódica contra *P. falciparum* (cepas cloroquina-sensível Nigeriana e FcM29 cloroquina-resistente), sendo isolado o ácido elágico, também muito ativo (0,1 µg/mL) (Banzouzi et al., 2002).

Figura 25. Atividade antiplasmódica de EAGL EtOH e frações obtidas de partições líquido - líquido e cromatografia em coluna.

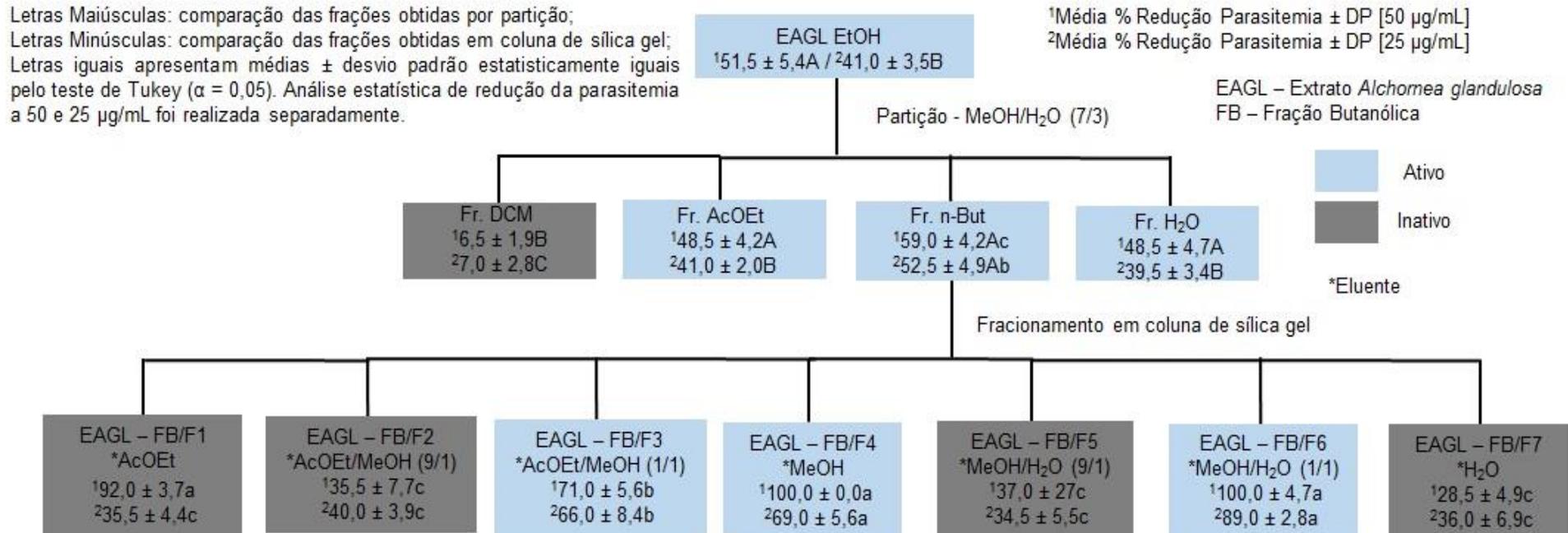
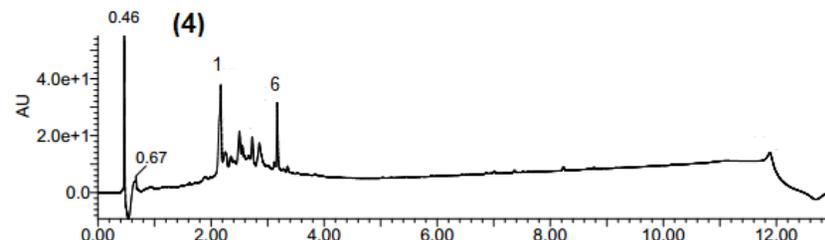
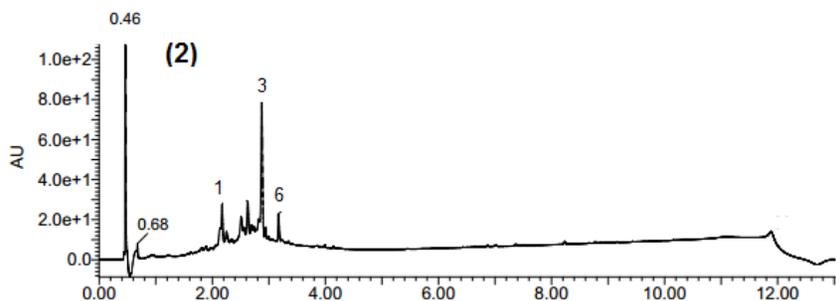
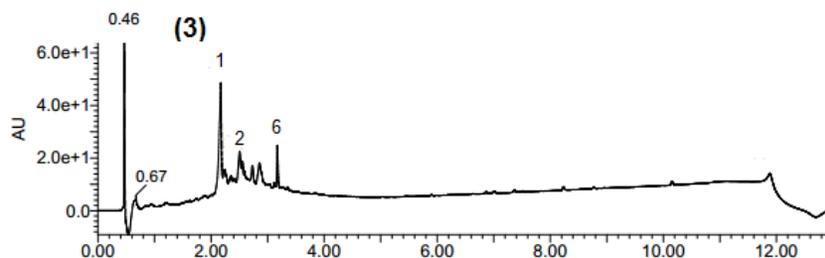
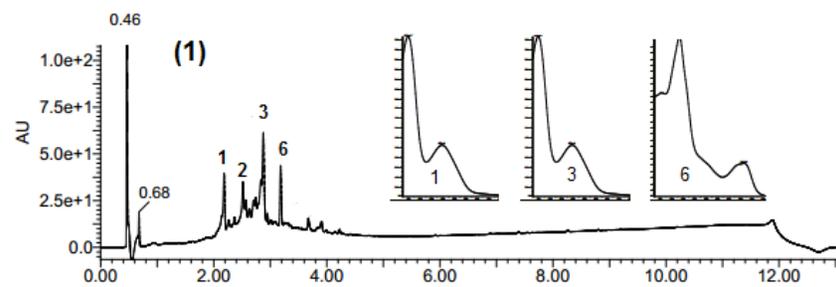


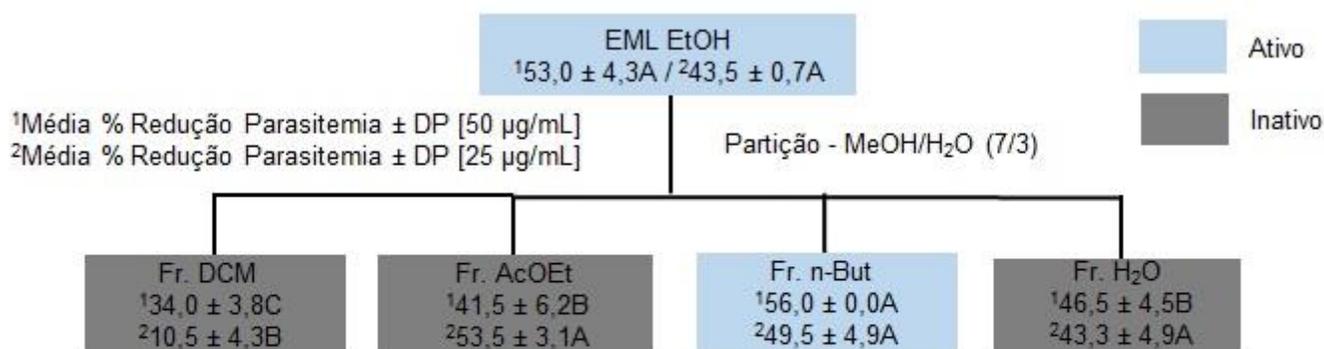
Figura 26. Cromatogramas (UPLC-DAD) de EAGL Fr. But (1); EAGL FB/F3 (2); EAGL FB/F4 (3) e EAGL FB/F6 (4), a 220 nm. Condições cromatográficas: eluente H<sub>2</sub>O + 0,1% HCOOH/ACN + 0,1% HCOOH; 5 – 95% ACN de 0 a 10 min; 95% ACN de 10 a 11 min; 5% ACN de 11 a 13 min.



#### 6.4.2. Atividade antiplasmódica de frações obtidas do extrato etanólico de *Miconia latecrenata*

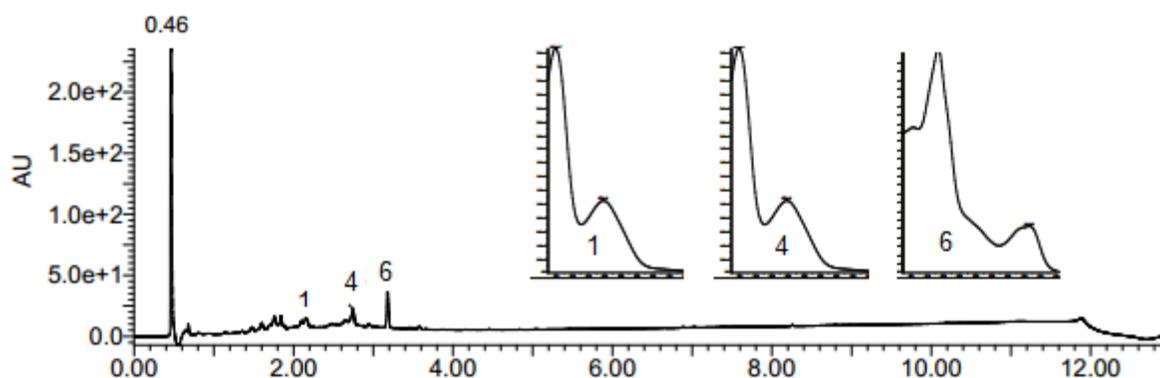
Para o extrato EML o fracionamento por partição líquido-líquido não apresentou aumento significativo da atividade antiplasmódica (Figura 27). Análise por CCD não mostrou diferenças em termos de classes metabólicas entre o extrato etanólico e as frações obtidas. O cromatograma da fração EML Fr. But mostra picos relativos a pedunculagina (4) e da quercetina (6) identificados no extrato etanólico EML, com pouca variação de intensidade dos picos analisados entre o extrato (Figura 14, Pág. 52) e a fração (Figura 28).

Figura 27. Atividade antiplasmódica de EML EtOH e frações obtidas de partições líquido-líquido.



Letras iguais apresentam médias ± desvio padrão estatisticamente iguais pelo teste de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ). Análise estatística de redução da parasitemia a 50 e 25 µg/mL foi realizada separadamente.

Figura 28. Cromatograma (UPLC-DAD) de EML Fr. But, a 220 nm. Condições cromatográficas: eluente H<sub>2</sub>O + 0,1% HCOOH/ACN + 0,1% HCOOH; 5 – 95% ACN de 0 a 10 min; 95% ACN de 10 a 11 min; 5% ACN de 11 a 13 min.



Diferentes compostos das classes de taninos e flavonoides, como os identificados nos extratos e frações de *Alchornea glandulosa* e *Miconia latecrenata*, tem sido investigados para atividade antiplasmódica. Os elagitaninos ácido galágico e punicalagina mostraram ação antiplasmódica contra *P. falciparum in vitro* nas cepas D6 e W2 (como a estudada neste trabalho) com valor de IC<sub>50</sub> entre 10,6 e 8,8  $\mu$ M, respectivamente (Reddy et al., 2007). Além disso, diferentes flavonoides (flavonóis e flavanonas) como luteolina, quercetina, fisetina, morina e miricetina tiveram alta atividade inibitória de importantes enzimas envolvidas na biossíntese de ácidos graxos de *P. falciparum*, apresentando ainda forte atividade antiplasmódica contra cepas cloroquina-sensível (NF54) cloroquina-resistente (K1) de *P. falciparum* (Tadesmir et al., 2006). Outro trabalho mostrou também que canferol, miricetina, quercetina e luteolina inibem o crescimento intraeritrocítico de cepas cloroquina-sensível (3D7) e cloroquina-resistente (7G8) de *P. falciparum* (Lehane et al., 2008). Assim, a moderada atividade antiplasmódica encontrada para os extratos etanólicos de *A. glandulosa* e *M. latecrenata* pode estar relacionada aos seus compostos fenólicos constituintes.

#### 6.4.3. Atividade antiplasmódica de frações obtidas do extrato etanólico de *Xylopi*a *sericea* Coleta 1

A fração diclorometano de *Xylopi*a *sericea* (EXS Fr. DCM), obtida por partição líquido-líquido, a partir do extrato etanólico teve aumento significativo de atividade antiplasmódica nas duas concentrações testadas (87,5% e 100,0 nas concentrações 25 e 50 µg/mL, respectivamente), sendo que as demais frações tiveram menor atividade quando comparada com o extrato etanólico (Figura 29). Após fracionamento em coluna de sílica gel, a alta atividade observada para a fração diclorometano não foi acompanhada pelas demais frações oriundas de EXS Fr. DCM, sendo determinada menor atividade antiplasmódica quando comparado a fração inicial. É de se destacar a sensível diminuição da atividade antiplasmódica após o fracionamento de EXS Fr. DCM, sendo este resultado um forte indício de ação sinérgica das diferentes moléculas que compõem essa fração inicial. Contudo, a redução do crescimento parasitário para as frações EXS FD/F1, EXS FD/F2, EXS FD/F3 e EXS FD/F4 ainda é maior do que a atividade do extrato etanólico (Figura 29). Fracionamento de EXS FD/F3 em coluna de sílica gel levou à fração EXS FD/F3/F4, que apresentou aumento da atividade antiplasmódica, sendo significativamente igual à fração EXS Fr. DCM obtida por partição líquido-líquido do extrato etanólico EXS.

Análise por CCD e UPLC-DAD das frações EXS Fr. DCM, EXS FD/F3 e EXS FD/F3/F4 apontam para um perfil cromatográfico complexo, formado predominantemente por terpenoides (Scott et al., 1964), sendo estes minoritários no extrato etanólico EXS (Figura 30). Diferentes terpenos já foram isolados de espécies do gênero *Xylopi*a (Melo et al., 2001), tendo os diterpenos do grupo dos cauranos demonstrado alta atividade antiplasmódica (Batista et al., 2010). Devido ao método espectrométrico usado, ESI-MS/MS, não foi possível a caracterização de EXS Fr. DCM, uma vez que não ocorreu a fragmentação dos constituintes da fração.

Figura 29. Atividade antiplasmódica de EXS EtOH Coleta 1 e frações obtidas por partição líquido - líquido e coluna cromatográficas.

Letras Maiúsculas: comparação frações obtidas por partição;  
 Letras Minúsculas: comparação frações obtidas em coluna de sílica gel;  
 Letras iguais apresentam médias  $\pm$  desvio padrão estatisticamente iguais pelo teste de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ). Análise estatística de redução da parasitemia a 50 e 25  $\mu\text{g/mL}$  foi realizada separadamente.

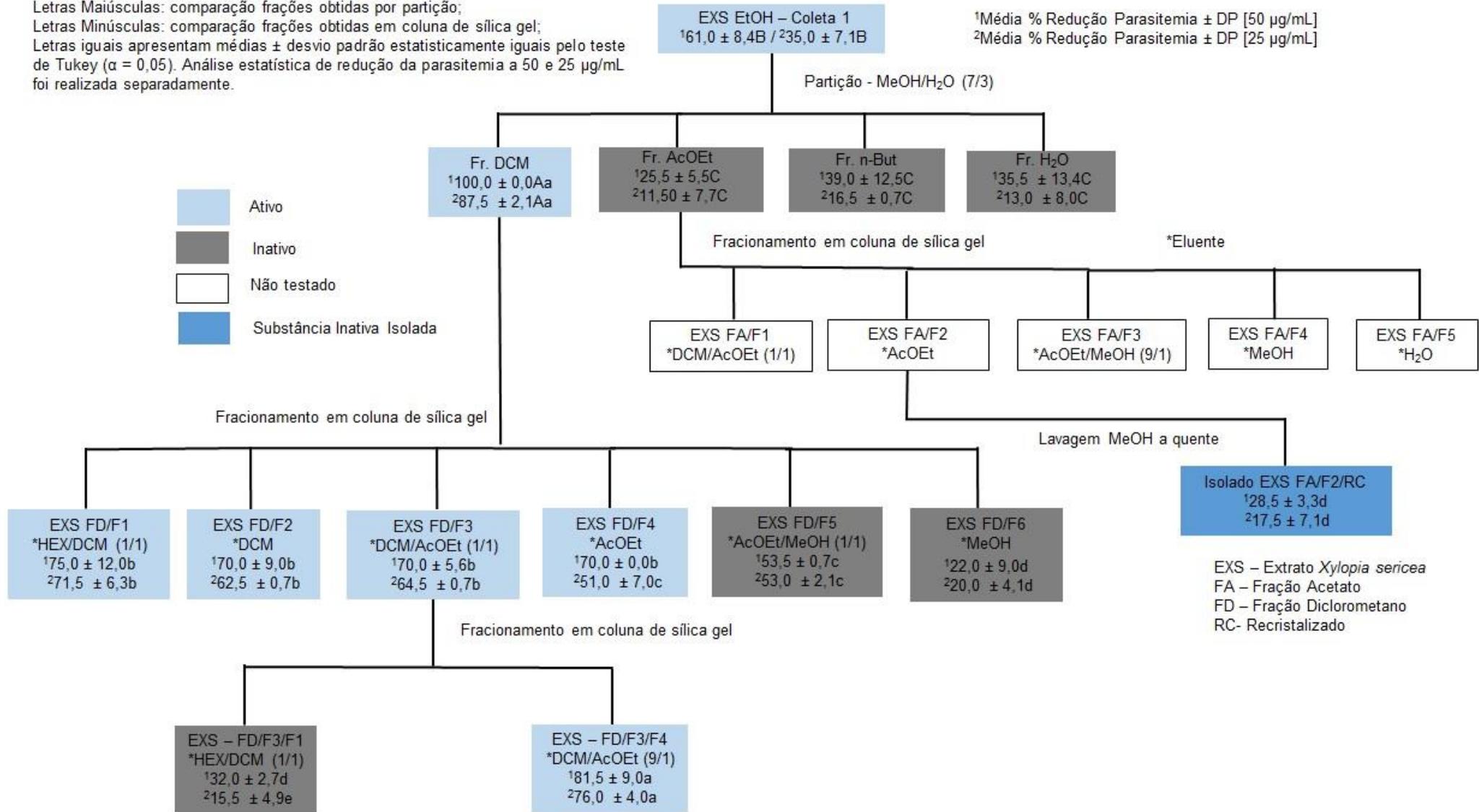
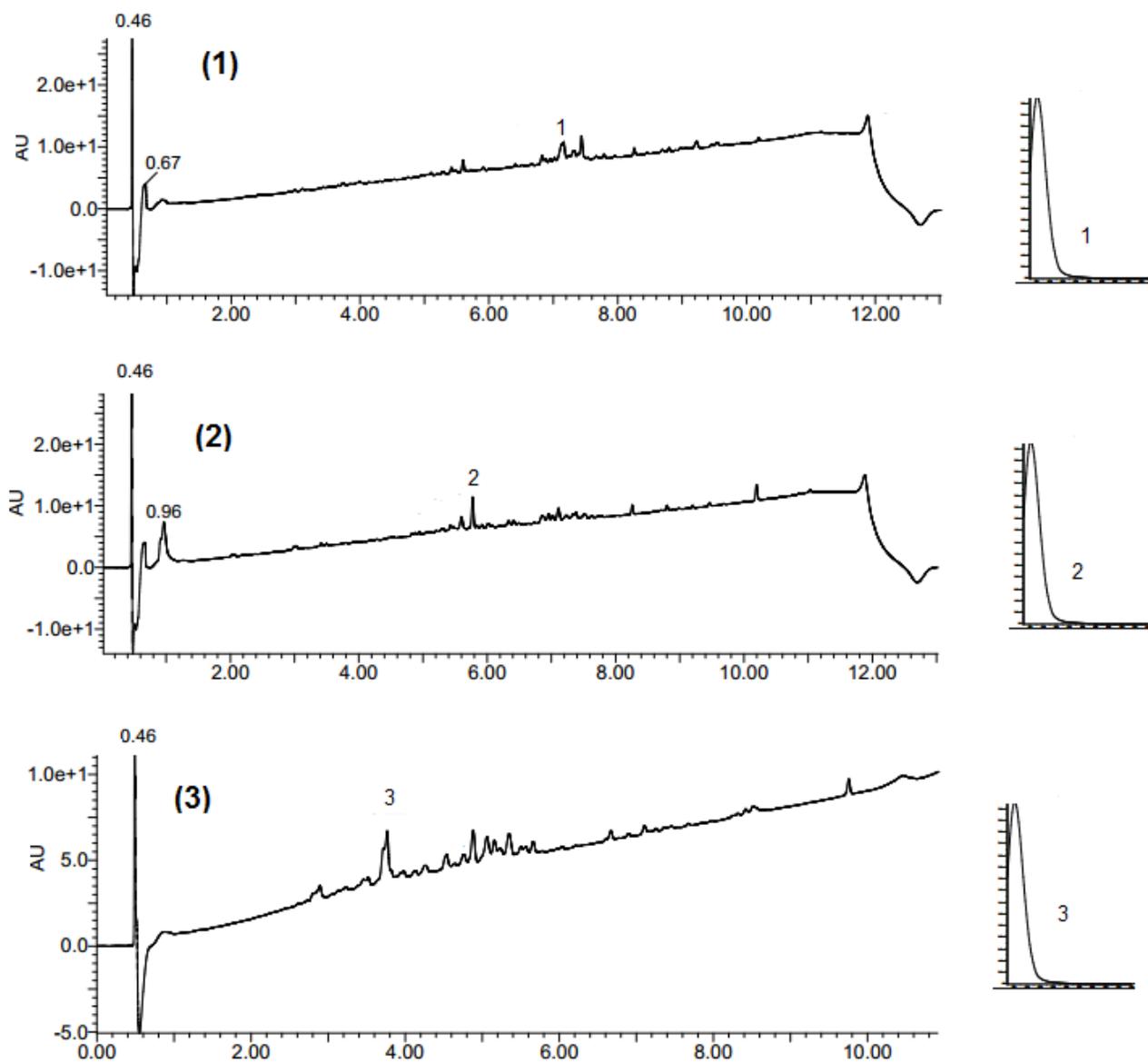


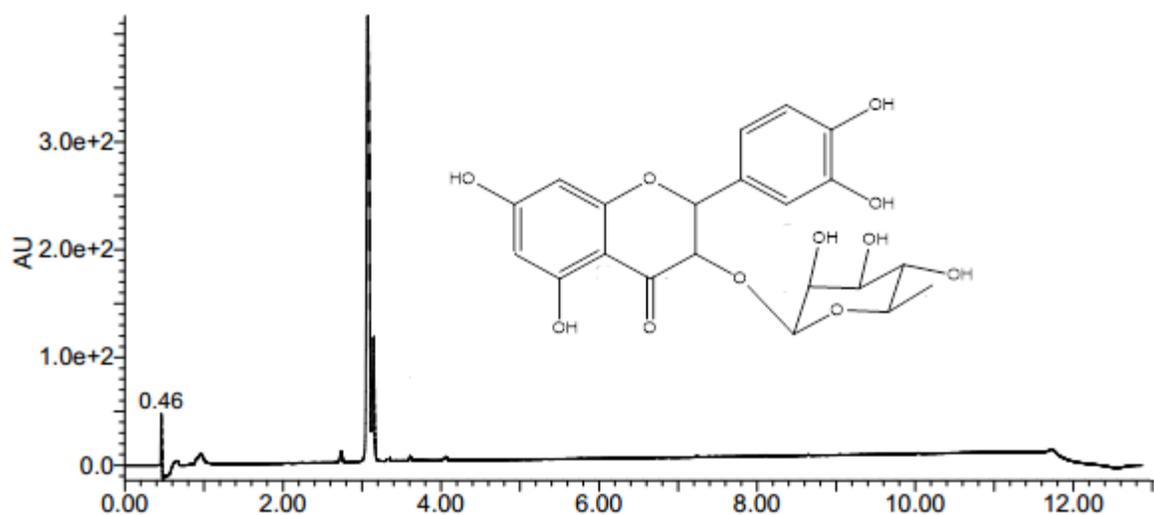
Figura 30. Cromatogramas (UPLC-DAD) de EXS Fr. DCM (1); EXS FD/F3 (2) e EXS FD/F3/F4 (3), a 220 nm. Condições cromatográficas: eluente H<sub>2</sub>O + 0,1% HCOOH/ACN + 0,1% HCOOH; 5 – 95% ACN de 0 a 10 min; 95% ACN de 10 a 11 min; 5% ACN de 11 a 13 min.



#### 6.4.4. Isolamento e Identificação da Substância EXS FA/F2/RC a partir da fração acetato de etila de *Xylopiia sericea* Coleta 1

A Figura 29 mostra o fluxograma do fracionamento de EXS FA/F2/RC. O composto EXS FA/F2/RC foi isolado a partir da fração EXS EtOH Fr. AcOEt (FA) obtida por partição líquido-líquido do extrato etanólico das folhas de *X. sericea*, sendo esta fração posteriormente cromatografada em coluna de sílica gel (F2), obtendo-se a fração EXS FA/F2 que foi solubilizada em MeOH a quente, com posterior recristalização (RC). A substância aqui denominada como EXS FA/F2/RC foi identificada por UPLC-DAD-ESI-MS/MS no extrato etanólico de de EXS Coleta 1 como diidroquercetina-3-O-ramnosideo (Composto 2) (Figura 24, Pág. 81), sendo majoritário no extrato etanólico (Figura 31).

Figura 31. Cromatograma, a 220 nm. Cromatograma (UPLC-DAD) de EXS FA/F2/RC, a 220 nm. Condições cromatográficas: eluente H<sub>2</sub>O + 0,1% HCOOH/ACN + 0,1% HCOOH; 5 – 95% ACN de 0 a 10 min; 95% ACN de 10 a 11 min; 5% ACN de 11 a 13 min.



Avaliação da atividade antiplasmódica de EXS FA/F2/RC mostrou baixa porcentagem de redução de crescimento do parasito com valores de  $17,5 \pm 7,1\%$  [ $25 \mu\text{g/mL}$ ] e  $28,5 \pm 3,3\%$  [ $50 \mu\text{g/mL}$ ] e com citotoxicidade  $\geq 1000,0 \mu\text{g/mL}$ .

#### 6.4.4.1. Espectroscopia no Ultravioleta

Os espectros no UV de EXS FA/F2/RC em metanol e em presença de aditivos químicos na região 200-450 nm (Mabry et al., 1970) confirmou o padrão de oxigenação desta substância, cujos espectros são mostrados na Figura 32: obtidos em metanol grau UPLC (A), com a adição de  $\text{AlCl}_3$  (B), adição de  $\text{AcO}^-\text{Na}^+/\text{H}_3\text{BO}_3$  (C) e  $\text{MeO}^-\text{Na}^+$  (D). A banda intensa em  $\lambda_{max} \sim 290$  nm, presente no espectro em MeOH (Figura 32A), é característica de flavanonas e/ou diidroflavonóis, e corresponde à banda II (240-300 nm) devida à absorção do cromóforo benzoila do anel A (Mabry et al., 1970). Observa-se ainda uma banda I pouco intensa em 330 nm (como um “ombro”) proveniente da absorção do anel B. Devido à ausência de insaturação entre C-2 e C-3 em flavanonas/diidroflavonóis não se observa a alta absorção da banda I.

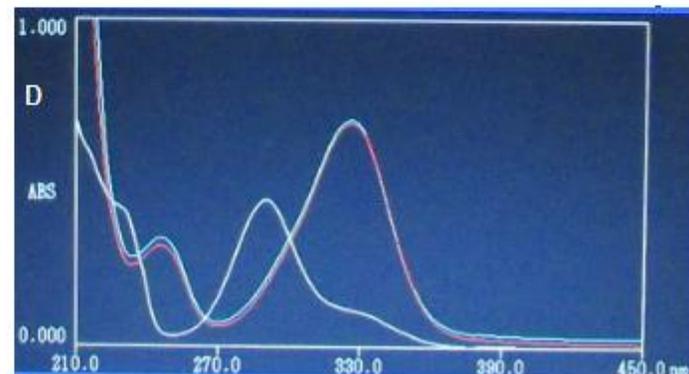
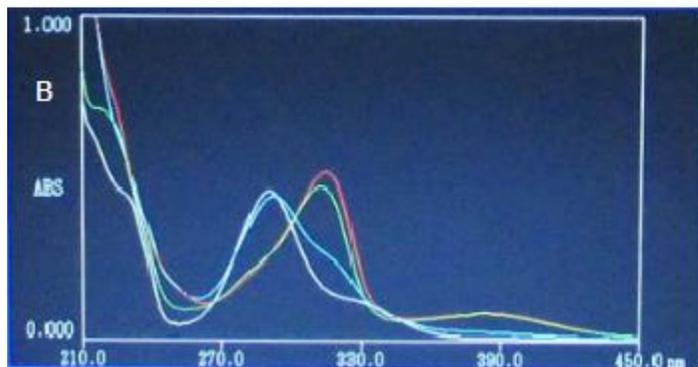
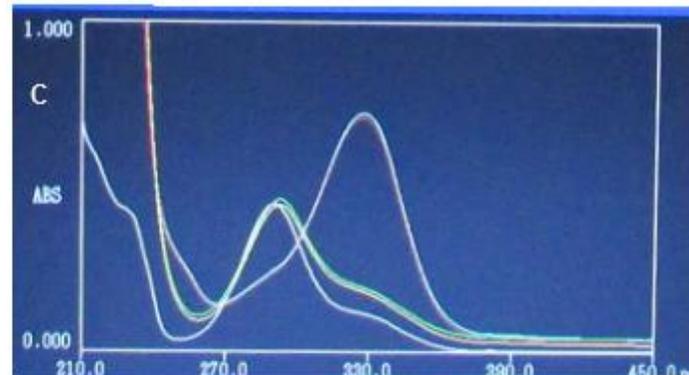
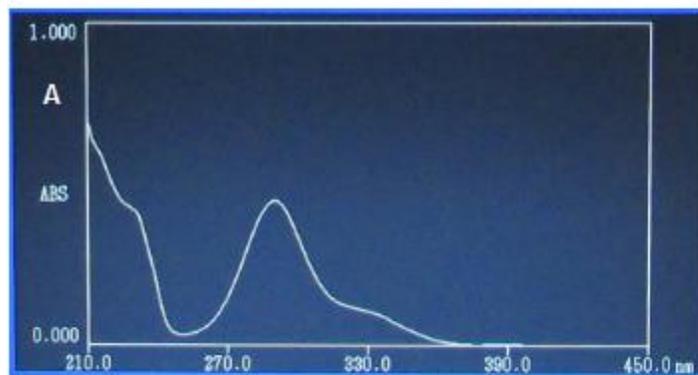
Na presença de  $\text{AlCl}_3$ , grupos *orto*-diidroxil e o grupo ceto em C-4 com hidroxilas livres em C-3 ou C-5 de flavonoides, em geral, complexam com o  $\text{AlCl}_3$  resultando nos deslocamentos batocrômicos em relação ao espectro em metanol, de 290 para cerca de 310 nm para a banda II e também na banda I, de 330 para 390 nm (Figura 32B). Sistemas *orto*-diidroxil também formam complexos com  $\text{AlCl}_3$ . No entanto, em meio ácido, os complexos formados entre hidroxilas em posição *orto* são instáveis e se decompõem em presença de HCl, não havendo, entretanto, decomposição dos complexos formados entre o grupo 4-ceto e 3-OH ou 5-OH. Assim, a proximidade observada entre as bandas na Figura 32B aponta para a presença do grupo 5-OH, o qual forma um complexo estável com o grupo ceto e o  $\text{AlCl}_3$ , não ocorrendo, alterações significativas entre as bandas II em ausência e presença de ácido (Figura 32B).

Outro experimento útil para a identificação de grupos hidroxilas livres em flavonoides, em geral, é a comparação dos espectros no UV em metanol e espectros com a adição de acetato do sódio ( $\text{AcO}^-\text{Na}^+$ ) e ácido bórico ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ) (Figura 32C).  $\text{AcO}^-\text{Na}^+$  é uma base fraca e por isso ioniza apenas os grupos hidroxilas livres de caráter ácido acentuado (7 e 4'-OH em flavonas e flavonóis) produzindo deslocamento batocrômicos na banda I (ionização dos grupos 3, 4'-OH) e na banda II (ionização do grupo 7-OH). A presença do grupo 7-OH livre em EXS FA/F2/RC pode ser confirmada quando o deslocamento batocrômico das bandas II com e sem adição de  $\text{AcO}^-\text{Na}^+$  se

encontra na faixa de 35 nm. Como o deslocamento batocrômico observado foi de 30-35 nm, seguido de efeito hipercrômico, a presença de grupo 7-OH livre na estrutura de EXS FA/F2/RC é confirmada. Alguns padrões de oxigenação de flavonoides em geral (5, 6 e 7-OH; 5, 7 e 8-OH; 3, 3' e 4'-OH) são sensíveis ao  $\text{AcO}^-\text{Na}^+$  e por isso o espectro sofre modificações após alguns minutos. A ausência de modificações é um indicativo de que esses padrões de oxigenação não estão presentes na estrutura de EXS FA/F2/RC. Grupos *orto*-dihidroxi podem ser detectados através de comparação entre os espectros no UV em metanol e com a adição de  $\text{AcO}^-\text{Na}^+$  e  $\text{H}_3\text{BO}_3$ . Na presença de  $\text{AcO}^-\text{Na}^+$  e  $\text{H}_3\text{BO}_3$  ocorre a formação de borato com os grupos *orto*-dihidroxi em todas as localizações. Grupos *orto*-dihidroxi no anel B podem ser identificados quando se observa deslocamento batocrômico de 12-30 nm na banda I, na presença de  $\text{AcO}^-\text{Na}^+$  e  $\text{H}_3\text{BO}_3$  em relação ao espectro em metanol. Contudo, como a absorção da banda I para flavanonas/diidroflavonóis é muito pequena, não se observa com precisão o deslocamento batocrômico esperado para o anel B. Entretanto, observa-se no espectro o efeito hipercrômico da curva registrada em presença de  $\text{AcO}^-\text{Na}^+$  e  $\text{H}_3\text{BO}_3$  em relação ao espectro em metanol, podendo este ser um indício da *orto*-diidroxilação do anel B (Figura 32C).

Por fim, a adição de metóxido de sódio ( $\text{MeO}^-\text{Na}^+$ ) à solução metanólica de EXS FA/F2/RC produziu deslocamento batocrômico e efeito hipercrômico na banda II em relação ao espectro em metanol (Figura 32D). Esse experimento é útil para a detecção de grupos -OH livres nos anéis A e B, devido ao fato do  $\text{MeO}^-\text{Na}^+$  ser uma base forte e conseqüentemente ionizar esses grupos, produzindo assim, o deslocamento batocrômico observado. Em geral, deslocamentos batocrômicos de absorções na faixa de 280-325 nm para flavanonas/diidroflavonóis, na presença de  $\text{MeO}^-\text{Na}^+$ , aliado a efeito hipercrômico, indicam presença de 5,7-OH. Como o deslocamento observado para EXS FA/F2/RC foi da ordem de 290-320 nm, pode-se deduzir que EXS FA/F2/RC possui o padrão de hidroxilação 5,7-OH, confirmados com o uso de outros aditivos.

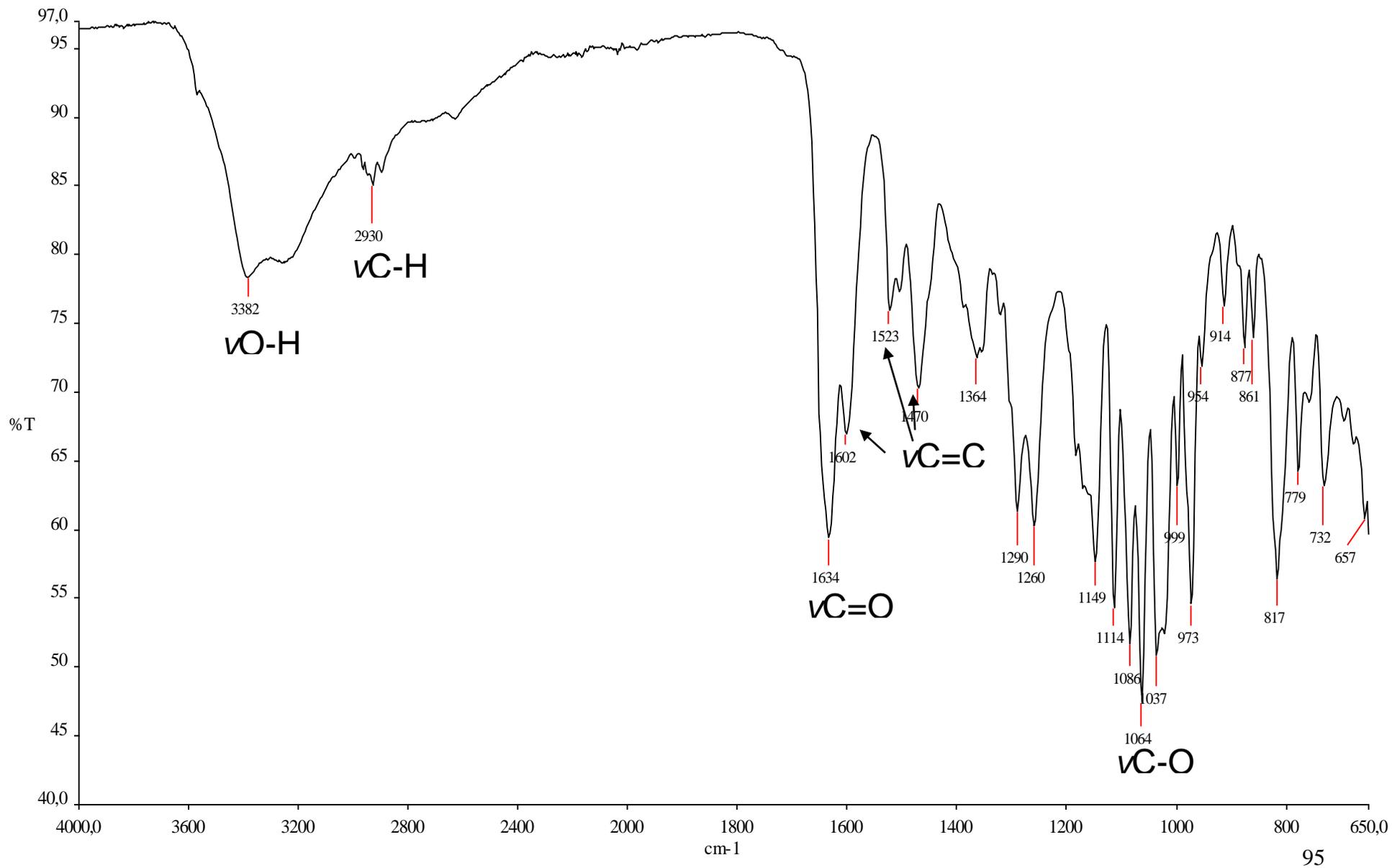
Figura 32. Espectros no UV de EXS FA/F2/RC em MeOH (A); na presença de  $\text{AlCl}_3$  e  $\text{HCl}$  (B); presença de  $\text{AcO}^- \text{Na}^+$  e  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (C) e na presença de  $\text{MeO}^- \text{Na}^+$  (D).



#### 6.4.4.2. Espectroscopia no Infravermelho

Sinais característicos das funções químicas presentes na estrutura de flavanonas/diidroflavonol foram observados no espectro no IV (Figura 33), dentre os quais se destacam a banda de intensidade média e alargada em  $3382\text{ cm}^{-1}$ , que corresponde a absorções de estiramento ( $\nu$ ) O-H de grupos hidroxila envolvidos em ligação de hidrogênio (faixa de absorção  $3590\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$ ) (Barbosa, 2007), coerente com a presença de diversas hidroxilas na molécula de EXS FA/F2/RC. Observa-se também a banda em  $2930\text{ cm}^{-1}$  (faixa de absorção  $3000\text{-}2850\text{ cm}^{-1}$ ), devido ao estiramento  $\nu\text{C-H}$  (faixa de absorção  $3000\text{-}2850\text{ cm}^{-1}$ ), definindo a presença de diferentes estiramentos CH, CH<sub>2</sub> ou CH<sub>3</sub> na molécula EXS FA/F2/RC (Barbosa, 2007). A presença de uma banda forte em  $1634\text{ cm}^{-1}$  corresponde ao estiramento de ligações C=O e se mostra abaixo da faixa de  $1725\text{-}1705\text{ cm}^{-1}$  indicada para carbonilas cetônicas e que se explica pela conjugação da carbonila como o anel A, bem como pela formação de ligação de hidrogênio com a hidroxila em 5 (Barbosa, 2007). Bandas agudas de média intensidade em  $1602$ ,  $1523$  e  $1470\text{ cm}^{-1}$  correspondem a estiramento  $\nu\text{C=C}$  em sistema aromático em EXS FA/F2/RC (Barbosa, 2007) (Figura 33). Além disso, a presença de banda forte e aguda em  $1064\text{ cm}^{-1}$ , indica a presença de ligações C-O, típicas de éteres e fenóis (Barbosa, 2007), consistente com compostos flavanônicos.

Figura 33. Espectro no IV de EXS FA/F2/RC.

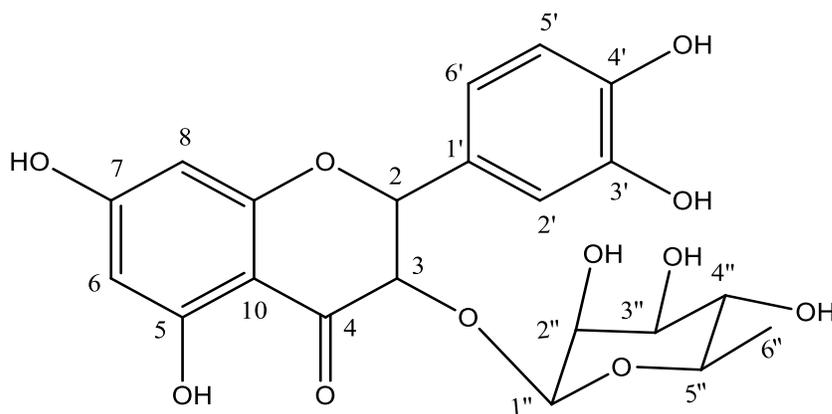


#### 6.4.4.3. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Associação dos resultados de RMN de  $^1\text{H}$  de EXS FA/F2/RC com dados de absorção no UV, no IV e MS descritos neste trabalho,  $\lambda_{max}$  289 nm e  $m/z$  449,0  $[\text{M} - \text{H}]^-$ , estão de acordo com dados da literatura para o composto astilbina:  $\lambda_{max}$  289 nm (Li et al., 2011, Xie et al., 2011) e  $m/z$  449,10  $[\text{M} - \text{H}]^-$  (Li et al., 2011) (Figura 34). Essa substância já foi isolada de folhas de *Neolitsea sericea* (Lam et al., 2008), de raízes de *Smilax glaba* (Zhou et al., 2009), folhas de *Erythroxylum gonocladum* (Lucas-Filho et al., 2010) e cascas de *Peltophorum dasyrachis* (Fujiwara et al., 2011). No entanto, é pela primeira vez relatada para a espécie *X. sericea*.

A temperatura de fusão encontrada para EXS FA/F2/RC (192,3 - 195,2 °C) mostra que a substância possui bom grau de pureza. Han et al. (1998) relatam para a mesma substância o ponto de fusão entre 190,0 - 191,0 °C.

Figura 34. Estrutura química de EXS FA/F2/RC, (dihidroquercetina-3-O- $\alpha$ -L-ramnosídeo) ( $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$ ).



A Tabela 13 mostra a atribuição dos sinais para  $^1\text{H}$  e correlações de COSY para EXS FA/F2/RC, assim como a comparação com dados de diferentes referências bibliográficas (Zhou et al., 2009; Fujiwara et al., 2011). Os sinais de H-6 e H-8 são simpletos largos o que indica baixos valores de  $J$  e deve-se à acoplamento em *meta*

desses hidrogênios ( $J$  1-3 Hz) (Silverstein et al., 2005). A comparação de  $\delta$  de H-5' e H-6' no espectro de EXS FA/F2/RC com aqueles descritos por Fujiwara et al. (2011) foi determinante para a atribuição dos sinais correspondentes a estes hidrogênios que possuem uma relação *orto* e que, no entanto, são observados como um único simpleto largo em ambos os casos. Já Zhou et al. (2009) registram dois dupletos em 6,69 e 6,73 ppm com  $J$  típico de acoplamento *orto* ( $J$  8.2Hz) (Silverstein et al., 2005).

Tabela 13. Atribuição dos sinais do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  e correlações observadas nos mapas de contorno COSY para EXS FA/F2/RC e comparação com dados da literatura para astilbina (400 MHz, DMSO- $d_6$ ).

$^1\text{H}$	EXS FA/F2/RC					Astilbina**				Astilbina***			
	Nº. H	$\delta$ (ppm)	M*	J (Hz)	COSY (ppm)	Nº. H	$\delta$ (ppm)	M*	J (Hz)	Nº. H	$\delta$ (ppm)	M*	J (Hz)
H-2	1	5,24	d	8	H-3 (4,64)	1	5,19/5,96	d	10,2	-	5,12	d	9,8
H-3	1	4,64	d	8	H-2 (5,24)	1	4,73/5,10	d	10,2	-	4,52	d	9,5
H-6	1	5,88	s	-	-	1	5,97/5,99	d	2,0	-	5,84	d	1,5
H-8	1	5,90	s	-	-	1	6,00/5,99	d	2,0	-	5,86	d	1,2
5-OH	1	11,80	s	-	-	1	11,9	s	-	-	-	-	-
7-OH	1	10,87	s	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H-2''	1	6,88	s	-	-	1	7,09	s	-	-	6,83	s	-
H-5'; H-6'	2	6,74	s	-	-	2	6,93/6,86	s	-	-	6,69/6,73	d	8,2
3'-OH	1	9,08	s	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4'-OH	1	9,04	s	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H-1''	1	4,04	s	-	-	1	4,12/4,25	dq	2,0	-	4,02	s	-
H-2''	1	3,46	s	-	2''-OH (4,50)	1	3,41/3,60	dd	3,6/2,0	-	3,38	s	-
H-3''	1	3,46	s	-	3''-OH (4,50)	1	3,70/4,02	dd	9,6/3,6	-	3,42	dd	9,4/2,9
H-4''	1	3,15	m	-	-	1	3,30/3,25	m	-	-	3,13	t	9,4
H-5''	1	3,88	t	8	H-6'' (1,05)	1	4,25/4,69	dd	-	-	3,81	m	-
H-6''	3	1,05	d	8	H-5'' (3,88)	1	1,16/0,85	d	6,4	-	1,13	d	6,2
2''-OH	1	4,50	sl	-	H-2'' (3,46)	-	-	-	-	-	-	-	-
3''-OH	1	4,50	sl	-	H-3'' (3,46)	-	-	-	-	-	-	-	-
4''-OH	1	4,70	sl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

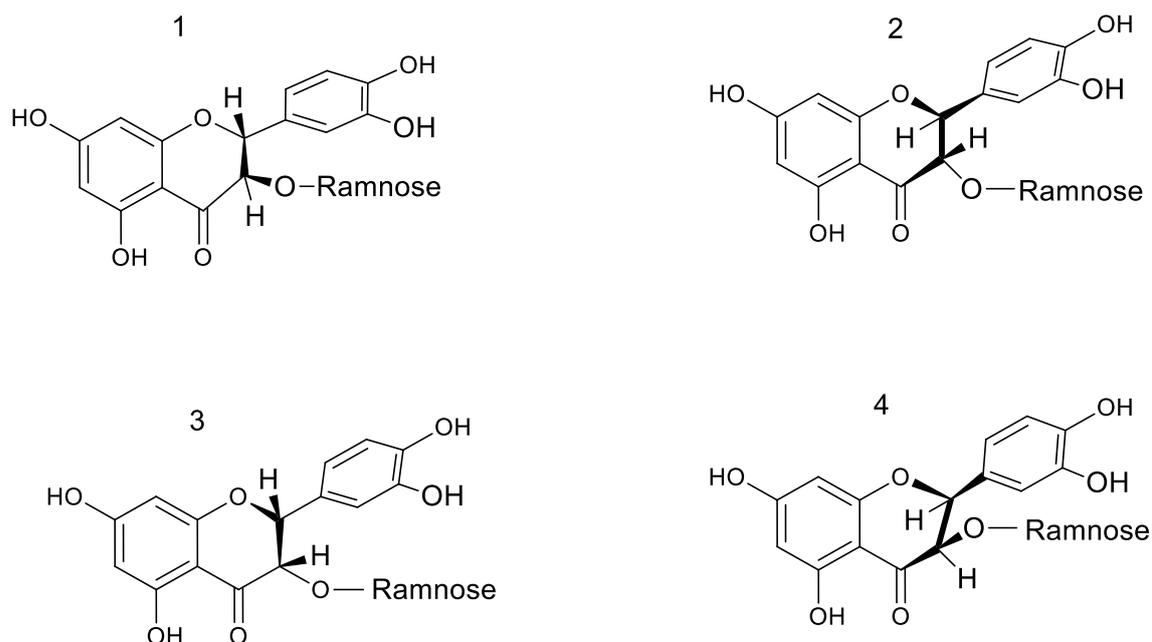
M\* = multiplicidade; s = simpleto; sl = simpleto largo; d = duplete; dq = duplo quarteto; dd = duplo duplete; m = multiplete.

Referência\*\* = Fujiwara et al., 2011 ( $^1\text{H}$  - RMN 400 MHz, Acetona- $d_6$ ).

Referência\*\*\* = Zhou et al., 2009 ( $^1\text{H}$  - RMN 300 MHz, MeOD). -: não observado.

A constante de acoplamento  $J$  entre H-2 e H-3 (8 Hz) para EXS FA/F2/RC mostra que estes hidrogênios apresentam configuração *trans*, uma vez que acoplamentos de hidrogênios vicinais em *trans*, em sistemas cíclicos de seis membros apresentam  $J$  típico entre 8-10 Hz (Gaffield et al., 1974; Silverstein et al., 2005). Neste sentido, o trabalho de Gaffield et al. (1974), relata 4 isômeros para a diidroquercetina-3-O- $\alpha$ -L-ramnosídeo (Figura 35). Os estereoisômeros possíveis para esta molécula são conhecidos: astilbina e neoastilbina apresentam configuração *trans*, enquanto isoastilbina e neoisoastilbina possuem configuração *cis*. As configurações correspondentes a estas estruturas são: 2(R),3(R) para astilbina, 2(S),3(S) para neoastilbina, 2(R),3(S) para isoastilbina e 2(S),3(R) para neoisoastilbina (Gaffield et al., 1974). Assim, como foi demonstrado pelo RMN de  $^1\text{H}$  que a configuração de EXS FA/F2/RC é *trans*, conclui-se que EXS FA/F2/RC corresponde a astilbina ou neoastilbina.

Figura 35. Estruturas configuracionais de astilbina (1), neoastilbina (2), isoastilbina (3) e neoisoastilbina (4). Adaptado de Gaffield et al. (1974).



Estudos de RMN de  $^1\text{H}$  com os isômeros representados na Figura 35, apontam que os valores de  $\delta$  para H-1'' e H-6'' são diferentes para os 4 isômeros, sendo 3,89 e 1,09 ppm (astilbina), 5,08 e 0,80 ppm (neoastilbina), 5,37 e 1,04

ppm (isoastilbina) e 5,37 e 1,04 ppm (neoisostilbina). Dessa forma, comparação com os valores de  $\delta$  para H-1'' ( $\delta$  4,04 ppm) e H-6'' ( $\delta$  1,05 ppm) de EXS FA/F2/RC (Tabela 13) com os valores apresentados acima, indica que EXS FA/F2/RC deve apresentar configuração 2(R),3(R), devendo, portanto, corresponder à astilbina. Diferenças nos valores de deslocamentos químicos podem ser atribuídas ao emprego de diferentes solventes: DMSO-d<sub>6</sub>, no presente caso, acetona-d<sub>6</sub> e MeOD nas referências citadas (Tabela 13). O não desdobramento do sinal para H-1'' e H-2'' significa que estes guardam uma relação *cis* para a qual há duas possibilidades: equatorial-axial e axial-equatorial. Conseqüentemente, há, também, duas possibilidades para a ligação heterosídica entre a genina flavônica e a unidade ramnosídica:  $\alpha$  ou  $\beta$ . Valores de *J* típicos para hidrogênios em relação axial-axial são da ordem de 8-10 Hz, enquanto que para as relações axial-equatorial e equatorial-equatorial são de 2-3 Hz (Silverstein et al., 2005). Contudo, em solução, é mais provável que EXS FA/F2/RC esteja na forma de um glicosídeo  $\alpha$ , que devido ao efeito anomérico é a conformação mais estável no equilíbrio conformacional  $\alpha/\beta$  (Clayden et al., 2012).

Neste contexto, análise dos dados da Tabela 13 também permite a atribuição de sinais de <sup>1</sup>H para as hidroxilas de EXS FA/F2/RC, fato não observado nos trabalhos citados como referência. Isto se dá em função do uso do solvente DMSO-d<sub>6</sub>, com o qual estes hidrogênios formam ligação de hidrogênio e assim não há troca de hidrogênio entre as hidroxilas de EXS FA/F2/RC, permitindo a observação dos sinais dos hidrogênios das hidroxilas. Para os trabalhos aqui citados como referências (Zhou et al., 2009; Fujiwara et al., 2011) o uso de MeOD e acetona-d<sub>6</sub>, respectivamente, não foram citados os sinais dos hidrogênios das hidroxilas, devido a maior troca entre os hidrogênios do composto analisado e os hidrogênios do solvente, dificultando a observação dos sinais dos hidrogênios das hidroxilas. A Figura 36 mostra o espectro RMN de <sup>1</sup>H de EXS FA/F2/RC e as expansões de algumas regiões do mesmo (Figuras 37-41). O mapa de contornos COSY é mostrado na Figura 42 (Pág. 107) (expansão na Figura 43, Pág. 108). Nestas figuras notam-se os acoplamentos H-2''/H-3, H-2''/2''-OH, H-3''/3''-OH e H-5''/H-6'', como esperado para EXS FA/F2/RC em DMSO-d<sub>6</sub> (Tabela 13).

Figura 36. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de EXS FA/F2/RC (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ).

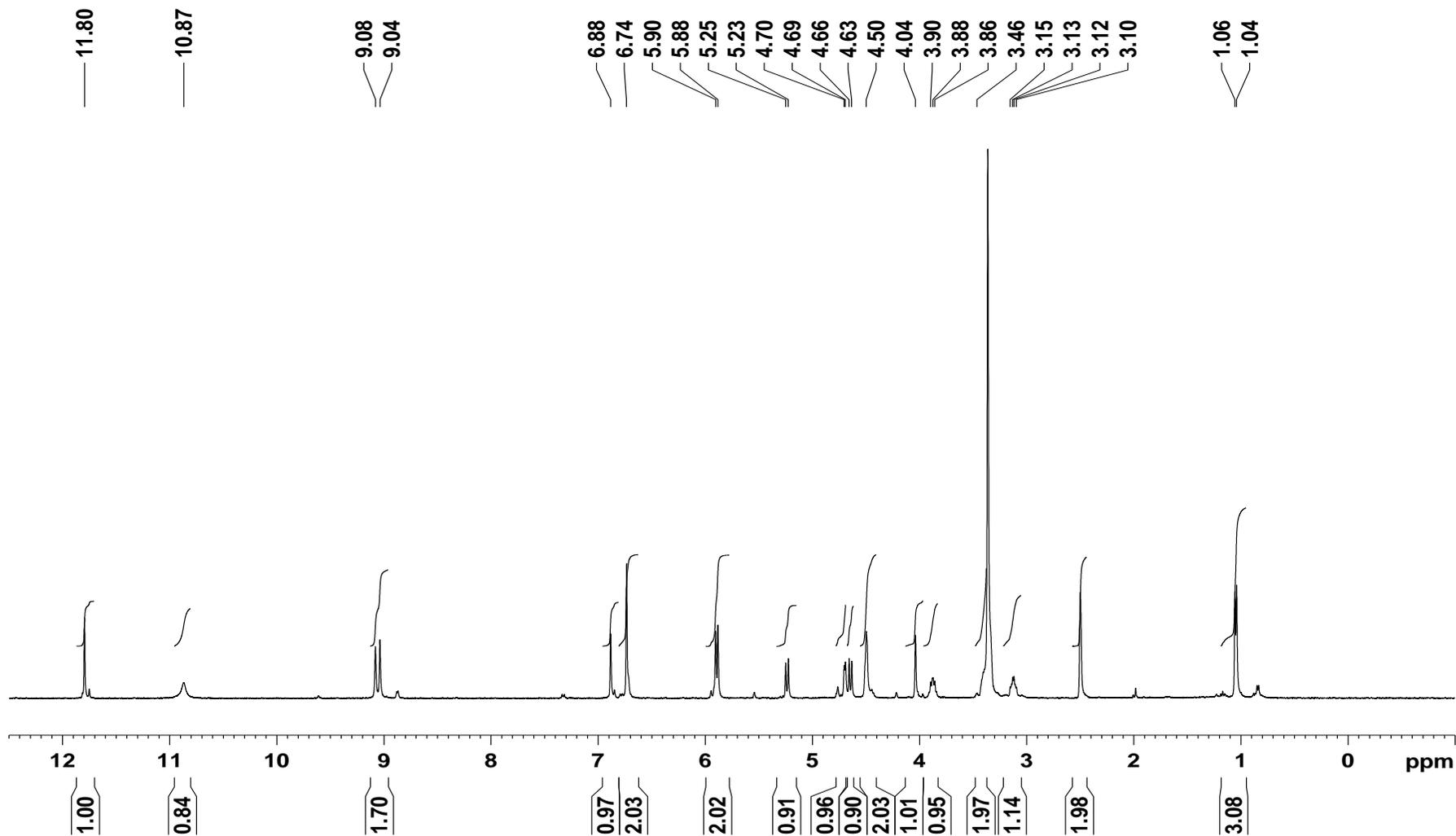


Figura 37. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de EXS FA/F2/RC. Expansão compreendida entre 1,0 e 3,6 ppm (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ).

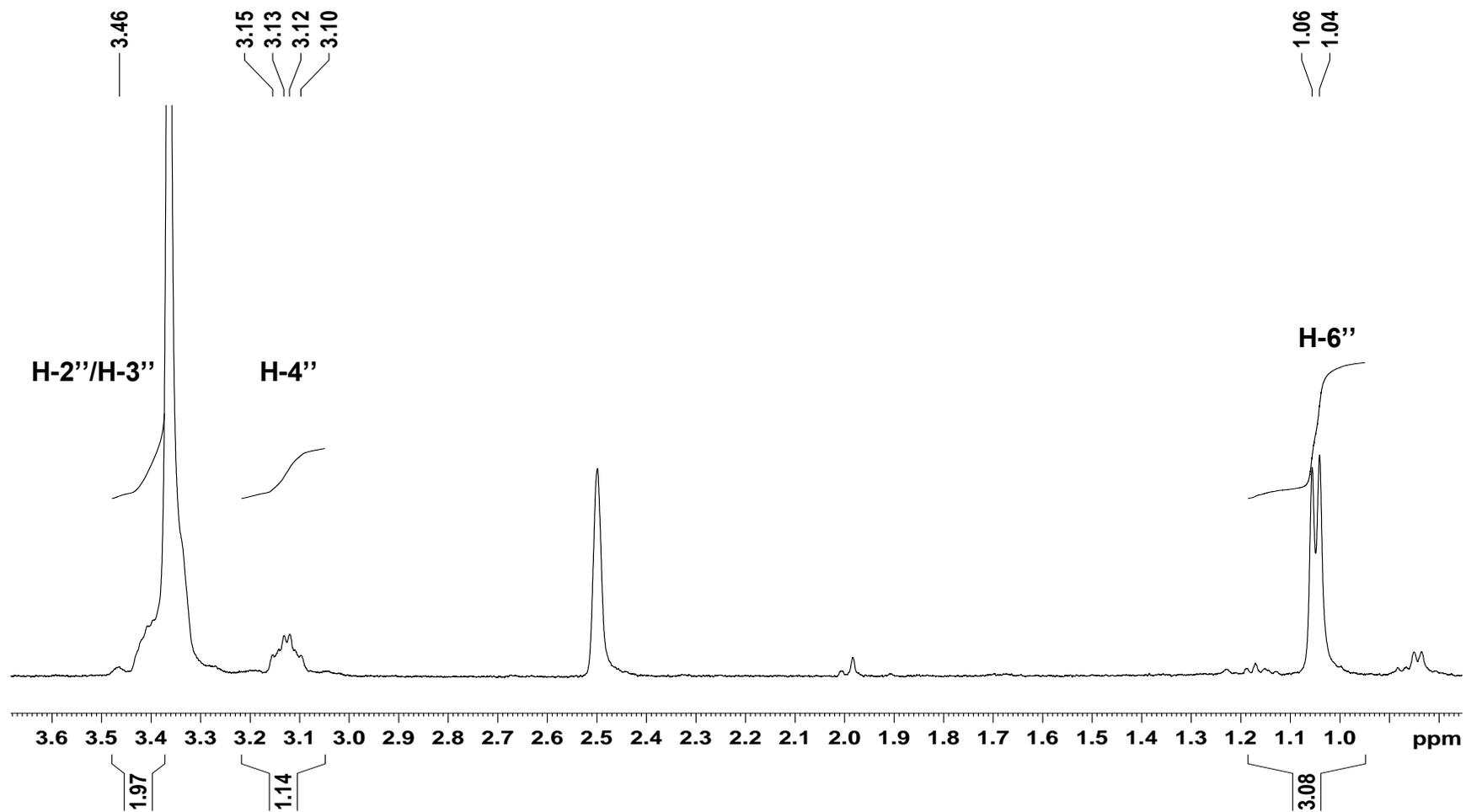


Figura 38. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de EXS FA/F2/RC. Expansão compreendida entre 3,7 e 4,9 ppm (400 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ ).

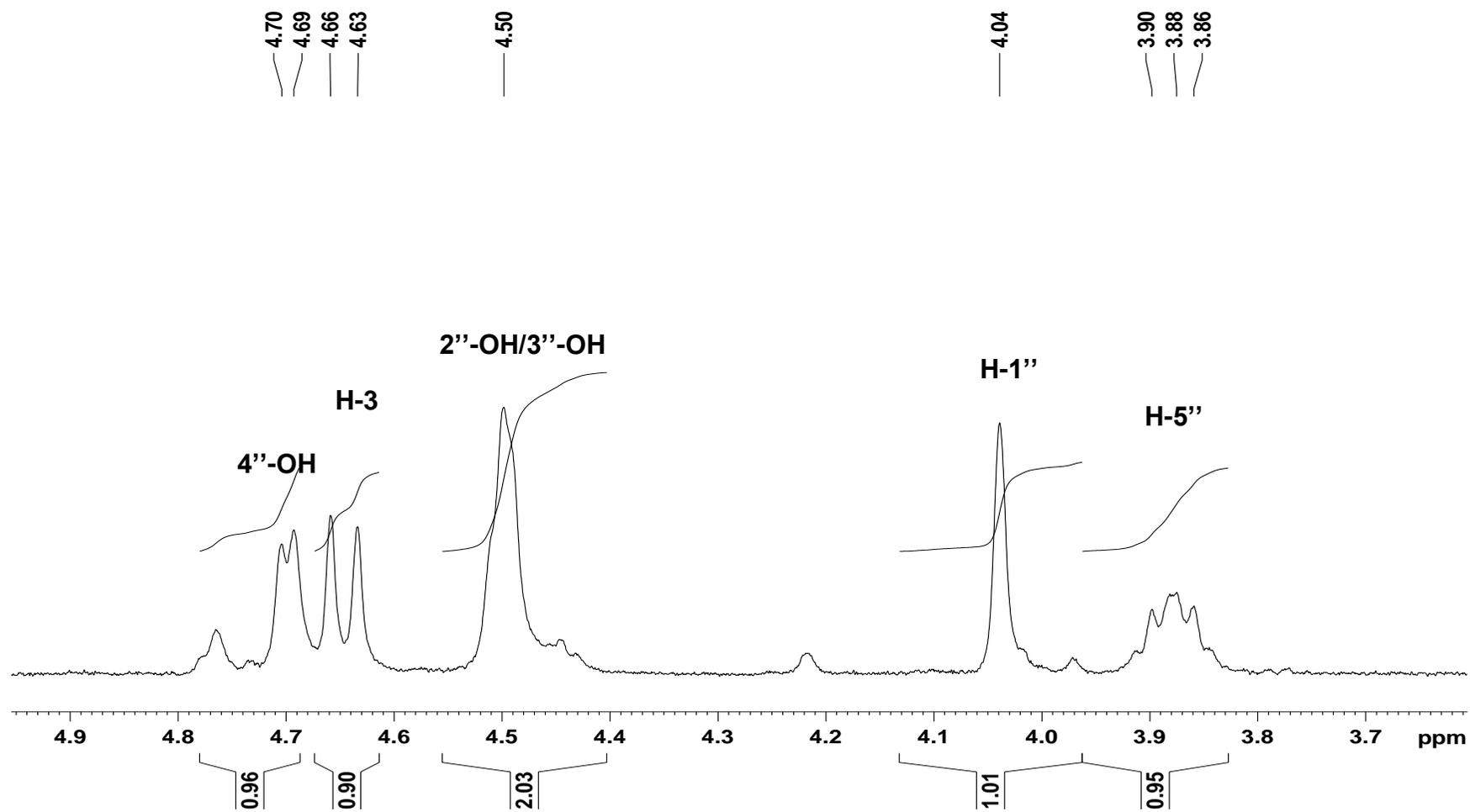


Figura 39. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de EXS FA/F2/RC. Expansão compreendida entre 4,4 e 7,0 ppm (400 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ ).

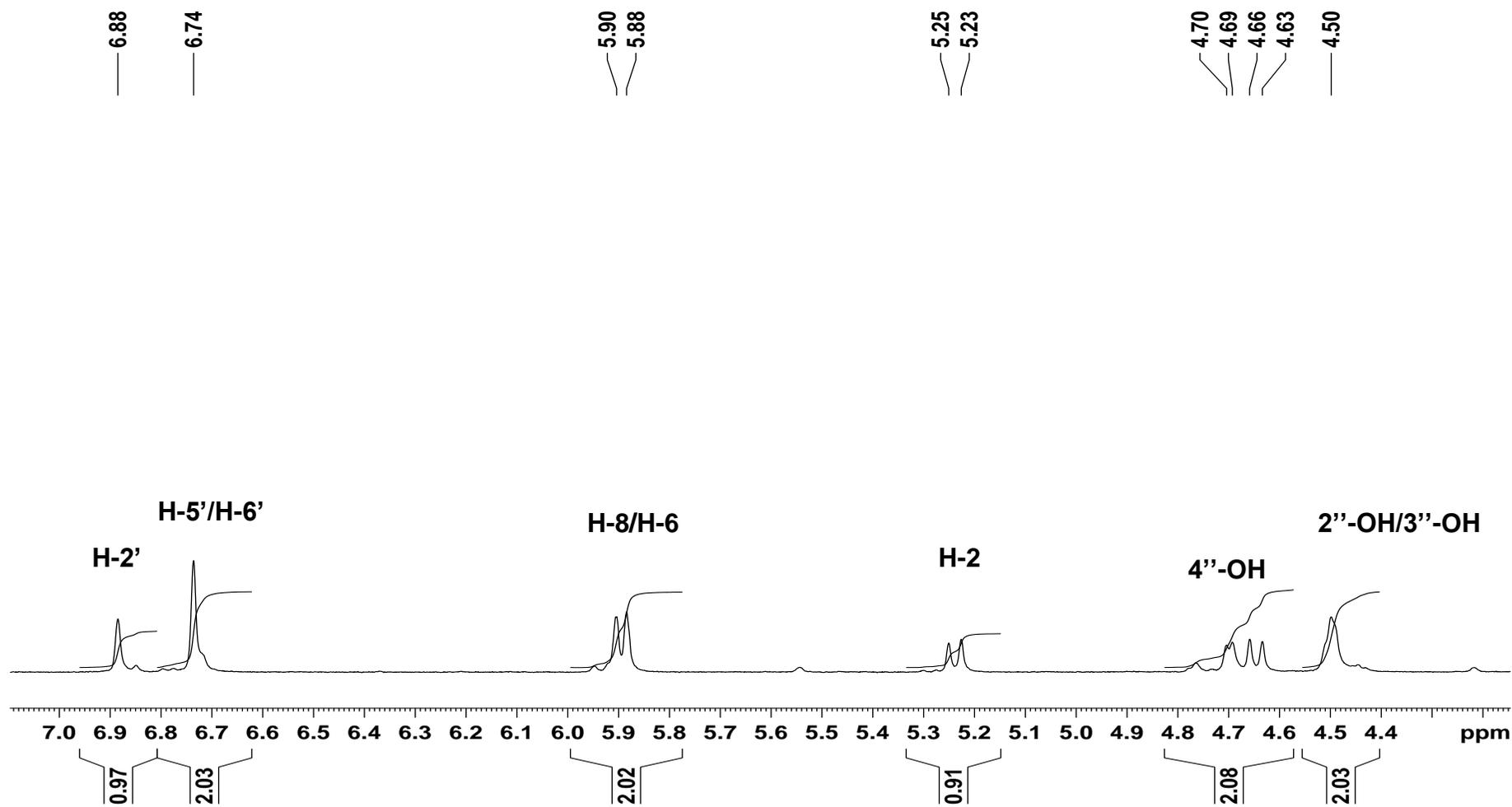


Figura 40. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de EXS FA/F2/RC. Expansão compreendida entre 5,0 e 7,1 ppm (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ).

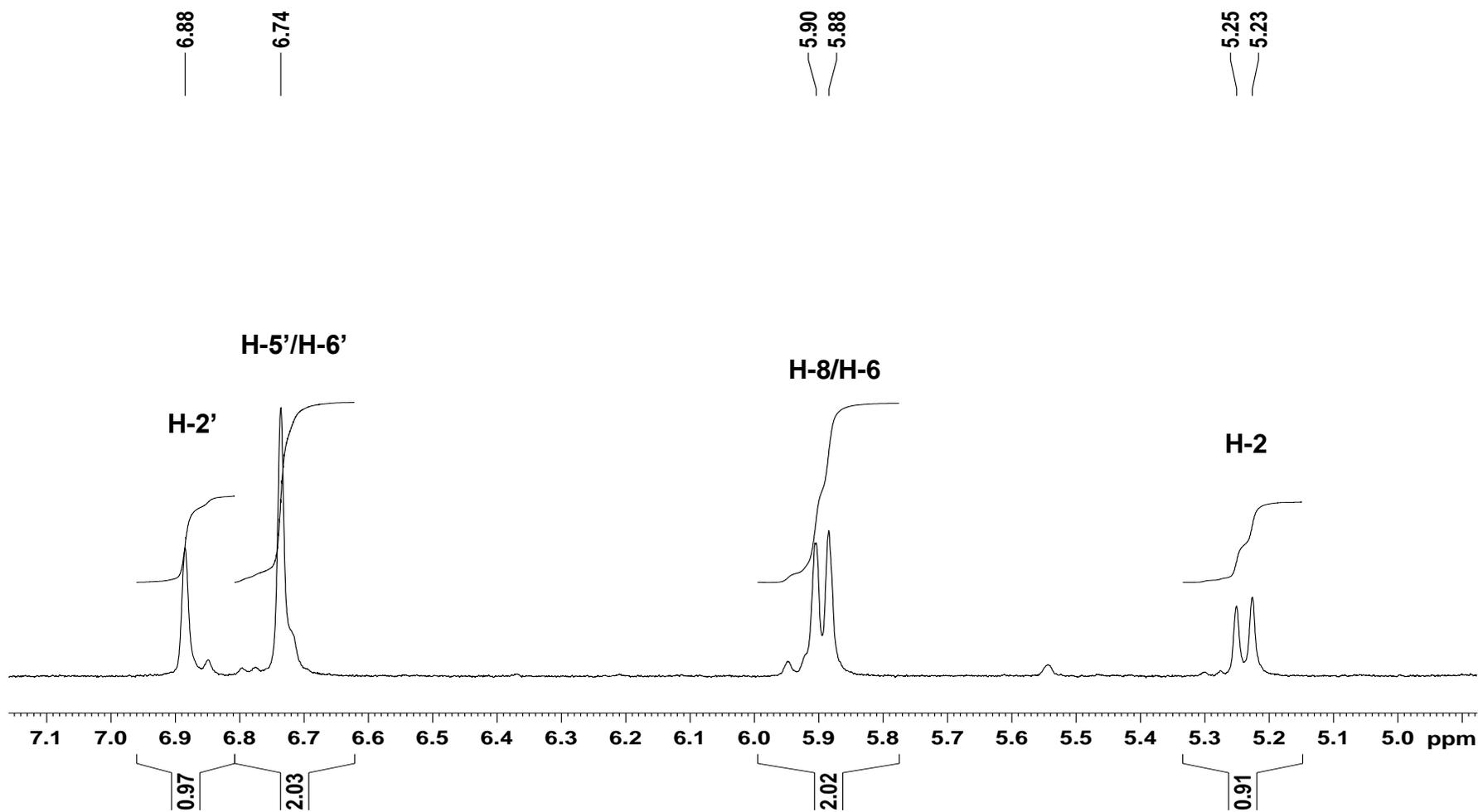


Figura 41. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de EXS FA/F2/RC. Expansão compreendida entre 9,0 e 12,0 ppm (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ).

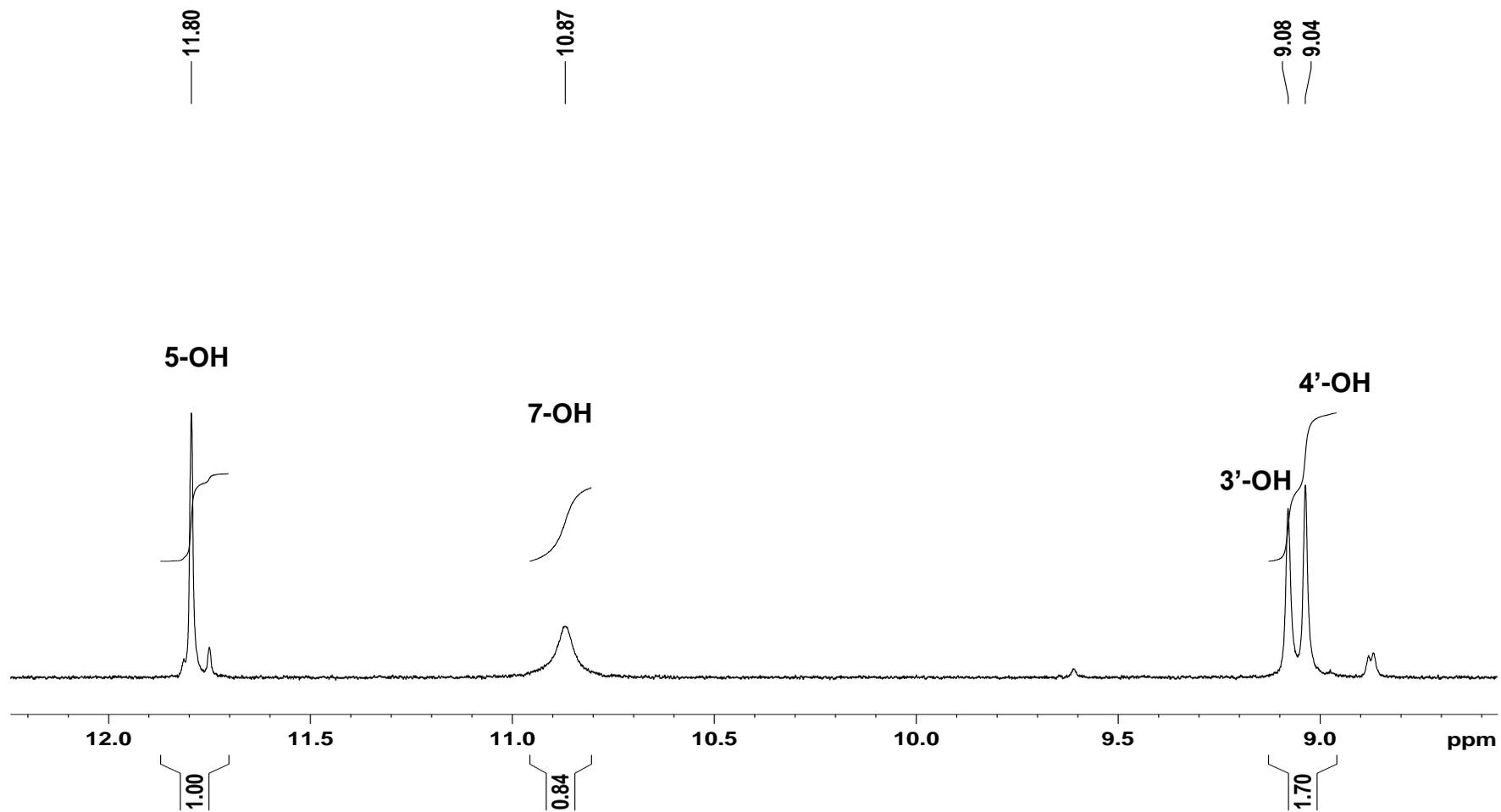


Figura 42. Mapa de contornos COSY de EXS FA/F2/RC (DMSO-d<sub>6</sub>).

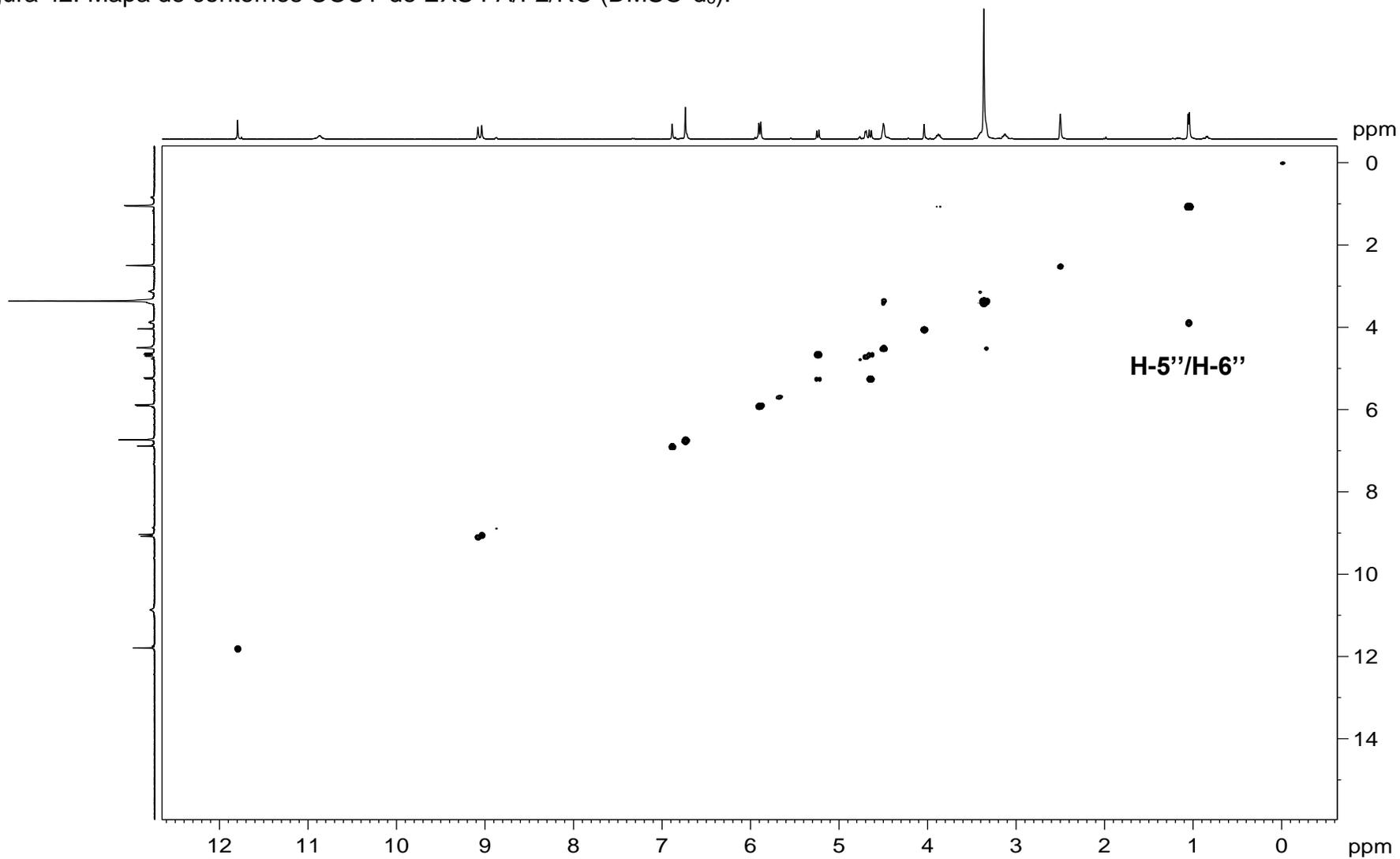
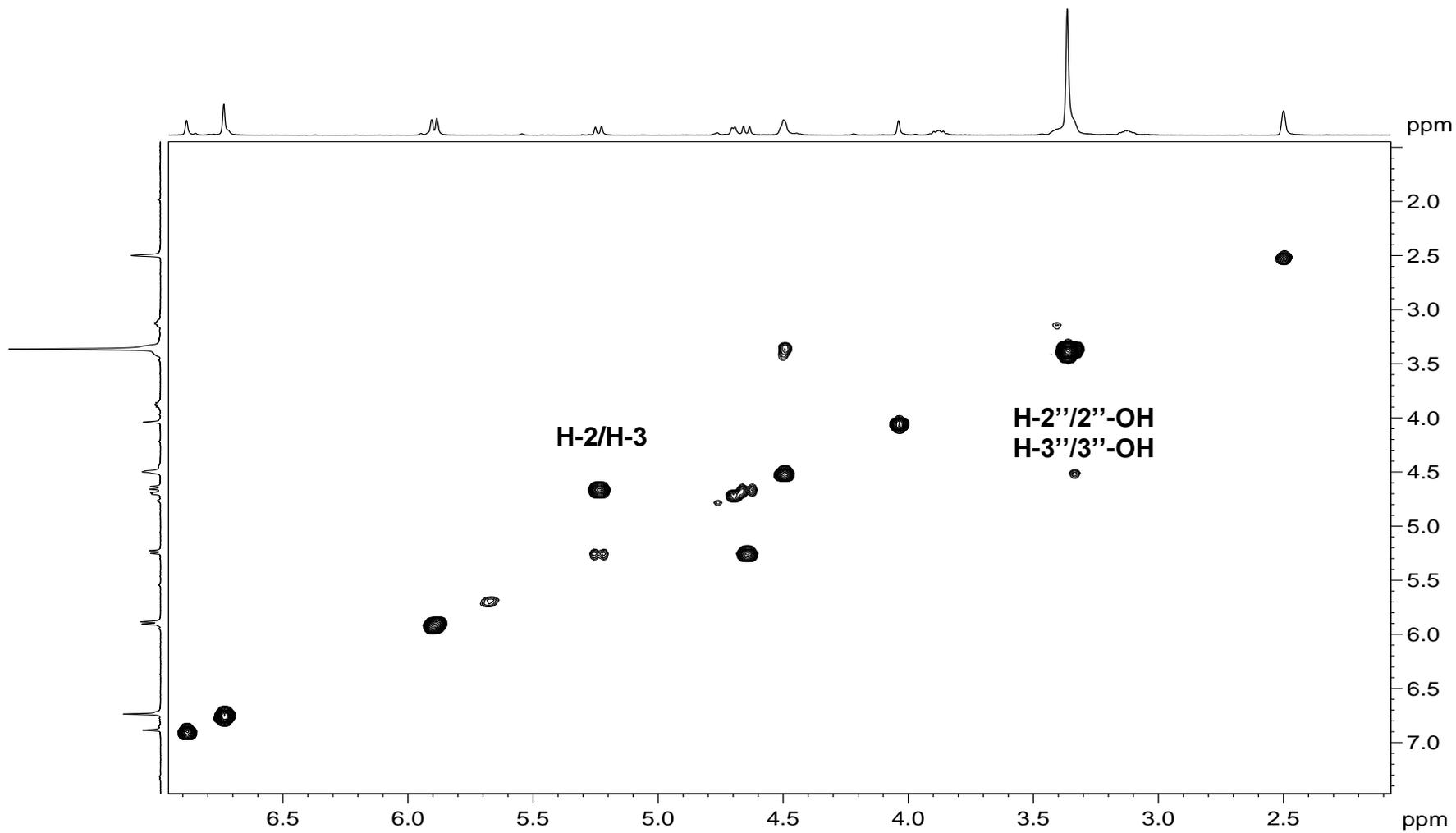


Figura 43. Mapa de contornos COSY de EXS FA/F2/RC. Expansão compreendida entre 2,5 e 6,5 ppm (DMSO-d<sub>6</sub>).



A Tabela 14 mostra as atribuições dos sinais dos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 de EXS FA/F2/RC, assim como a comparação com dados de referência bibliográfica para astilbina (Lam et al., 2008). Comparação dos sinais entre o espectro desacoplado e o DEPT 135 evidenciou a multiplicidade dos carbonos (Figuras 44 e 45).

Tabela 14. Atribuição dos sinais do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 para EXS FA/F2/RC, obtido no presente trabalho, e comparação com dados da literatura para astilbina (100 MHz, DMSO- $d_6$ ).

$^{13}\text{C}$	EXS FA/F2/RC			Astilbina <sup>***</sup>
	$\delta$ (ppm)	DEPT 135 $\delta$ (ppm)	M*	$\delta$ (ppm)
C-2	81,54	81,55	CH	83,3
C-3	75,65	75,66	CH	77,4
C-4	194,55	-	C	196,0
C-5	163,43	-	C	165,3
C-6	96,03	96,04	CH	97,1
C-7	166,95	-	C	167,7
C-8	95,06	95,06	CH	96,0
C-9	162,20	-	C	163,7
C-10	101,05	-	C	102,5
C-1'	126,96	-	C	129,0
C-2'	115,36	115,36	CH	115,4
C-3'	145,18	-	C	146,8
C-4'	145,91	-	C	146,0
C-5'	114,77	114,77	CH	116,1
C-6'	118,92	118,92	CH	120,4
C-1''	100,07	100,08	CH	101,4
C-2''	70,14	70,14	CH	71,4
C-3''	70,44	70,45	CH	72,2
C-4''	71,66	71,66	CH	73,5
C-5''	69,00	69,00	CH	69,8
C-6''	17,75	17,76	**CH <sub>3</sub>	18,0

\* Atribuída pelo experimento DEPT 135 neste trabalho.

\*\*CH<sub>3</sub> = Atribuído pelo experimento  $^1\text{H}$ -RMN (400 MHz, DMSO- $d_6$ ) neste trabalho.

Referência<sup>\*\*\*</sup> = Lam et al., 2008 ( $^{13}\text{C}$ -RMN 100 MHz, Acetona- $d_6$ ).

-: não observado.

Figura 44. Espectro RMN de  $^{13}\text{C}$  desacoplado de EXS FA/F2/RC (100 MHz, DMSO- $d_6$ ).

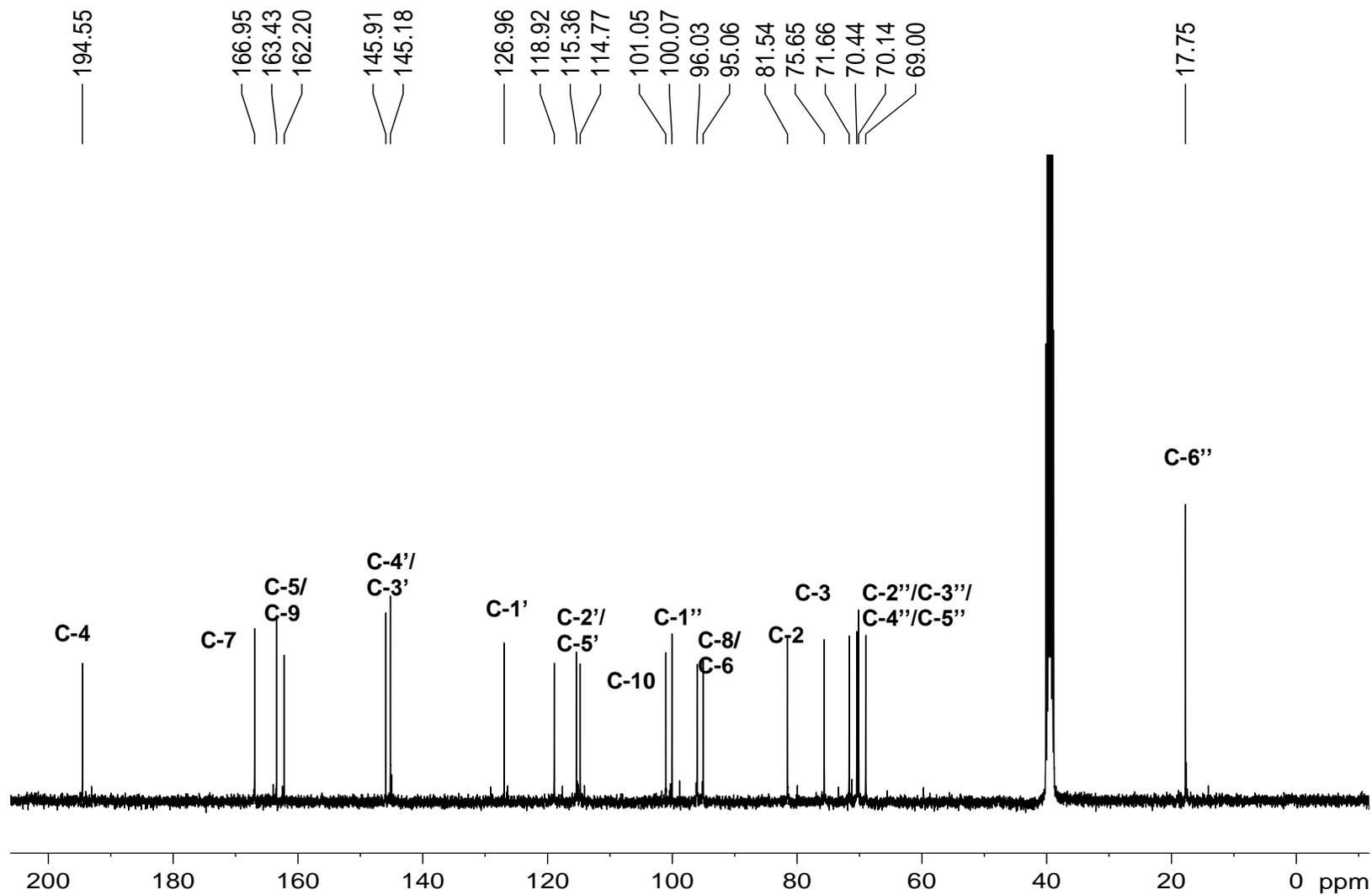
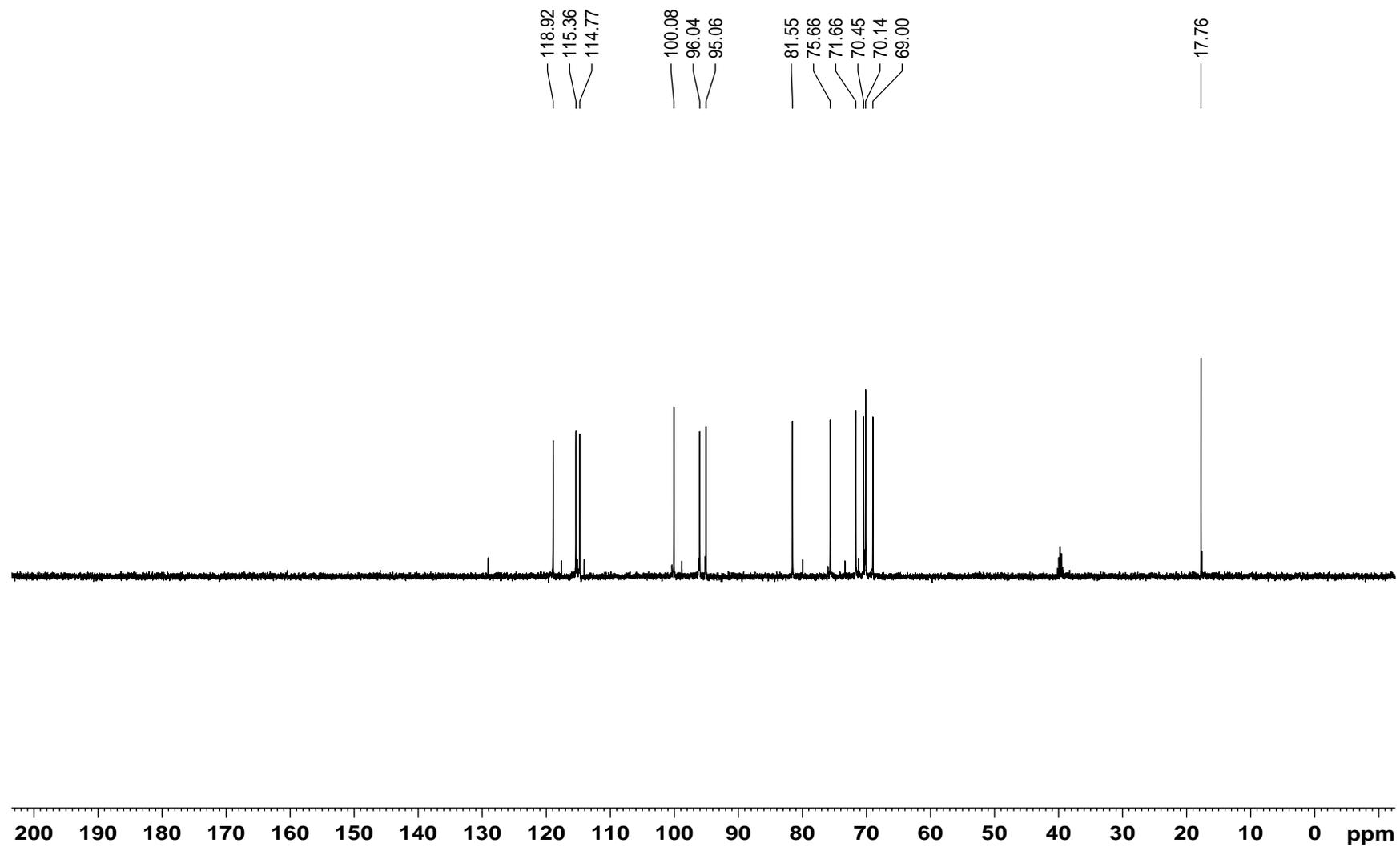


Figura 45. Espectro RMN de DEPT 135 de EXS FA/F2/RC (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>).



A Tabela 15 mostra as correlações heteronucleares observadas nos mapas de contornos HMBC e HSQC para EXS FA/F2/RC. Os dados obtidos foram necessários para a determinação da correta ligação entre a genina e o heterosídeo. Nesse sentido, a presença do sinal observado em  $^3J^{13C}$  HMBC entre H-1''/C-3 foi fundamental para confirmação da localização da ramnose na posição C-3 da genina diidroquercetina (Figuras 46 e 47). Os mapas de contornos HSQC para EXS FA/F2/RC são apresentados nas Figuras 48 e 49.

Tabela 15. Correlações heteronucleares observadas nos mapas de contornos HMBC e HSQC para EXS FA/F2/RC ( $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ).

$^1\text{H}$ ( $\delta$ ppm)	$^4J^{13}\text{C}$ ( $\delta$ ppm)	HMBC		HSQC $^1J^{13}\text{C}$ ( $\delta$ ppm)
		$^3J^{13}\text{C}$ ( $\delta$ ppm)	$^2J^{13}\text{C}$ ( $\delta$ ppm)	
H-2 (5,24)	-	C-4 (194,55); C-9 (162,20); C-2' (115,36); C-6' (118,92)	C-1' (126,96); C-3 (75,65);	C-2 (81,54)
H-3 (4,64)	-	C-10 (101,05); C-1' (126,96); C-1'' (100,07)	C-2 (81,54); C-4 (194,55)	C-3 (75,65)
H-6 (5,88)	-	C-8 (95,06); C-10 (101,05)	C-5 (163,43); C-7 (166,95)	C-6 (96,03)
H-8 (5,90)	-	C-6 (96,03); C-10 (101,05)	C-7 (166,95); C-9 (162,20)	C-8 (95,06)
5-OH (11,80)	C-7 (166,95)	C-6 (96,03); C-10 (101,05)	C-5 (163,43)	-
7-OH (10,87)	-	-	-	-
H-2' (6,88)	-	C-2 (81,54); C-4' (145,91); C-6' (118,92)	C-3' (145,18)	C-2' (115,36)
H-5' (6,74)	-	C-1' (126,96); C-3' (145,18)	C-4' (145,91)	C-5' (114,77)
H-6' (6,74)	-	C-2 (81,54); C-2' (115,36); C-4' (145,91)	C-1' (126,96); C-5' (114,77)	C-6' (118,92)
3'-OH (9,08)	-	C-2' (115,36); C-4' (145,91)	C-3' (145,18)	-
4'-OH (9,04)	-	C-3' (145,18); C-5' (114,77)	C-4' (145,91)	-
H-1'' (4,04)	-	C-3 (75,65); C-3'' (70,44); C-5'' (69,00)	C-2'' (70,14)	C-1'' (100,07)
H-2'' (3,46)	-	-	-	C-2'' (70,14)
H-3'' (3,46)	-	-	-	C-3'' (70,44)
H-4'' (3,15)	-	C-2'' (70,14); C-6'' (17,75)	C-3'' (70,44); C-5'' (69,00)	C-4'' (71,66)
H-5'' (3,88)	-	-	-	C-5'' (69,00)
H-6'' (1,05)	-	C-4'' (71,66)	C-5'' (69,00)	C-6'' (17,75)
2''-OH (4,50)	-	C-1'' (100,07); C-3'' (70,44)	C-2'' (70,14)	-
3''-OH (4,50)	-	C-2'' (70,14)	C-3'' (70,44)	-
4''-OH (4,70)	-	C-5'' (69,00)	C-4'' (71,66)	-

-: não observado.

Figura 46. Mapa de contornos HMBC de EXS FA/F2/RC (DMSO-d<sub>6</sub>).

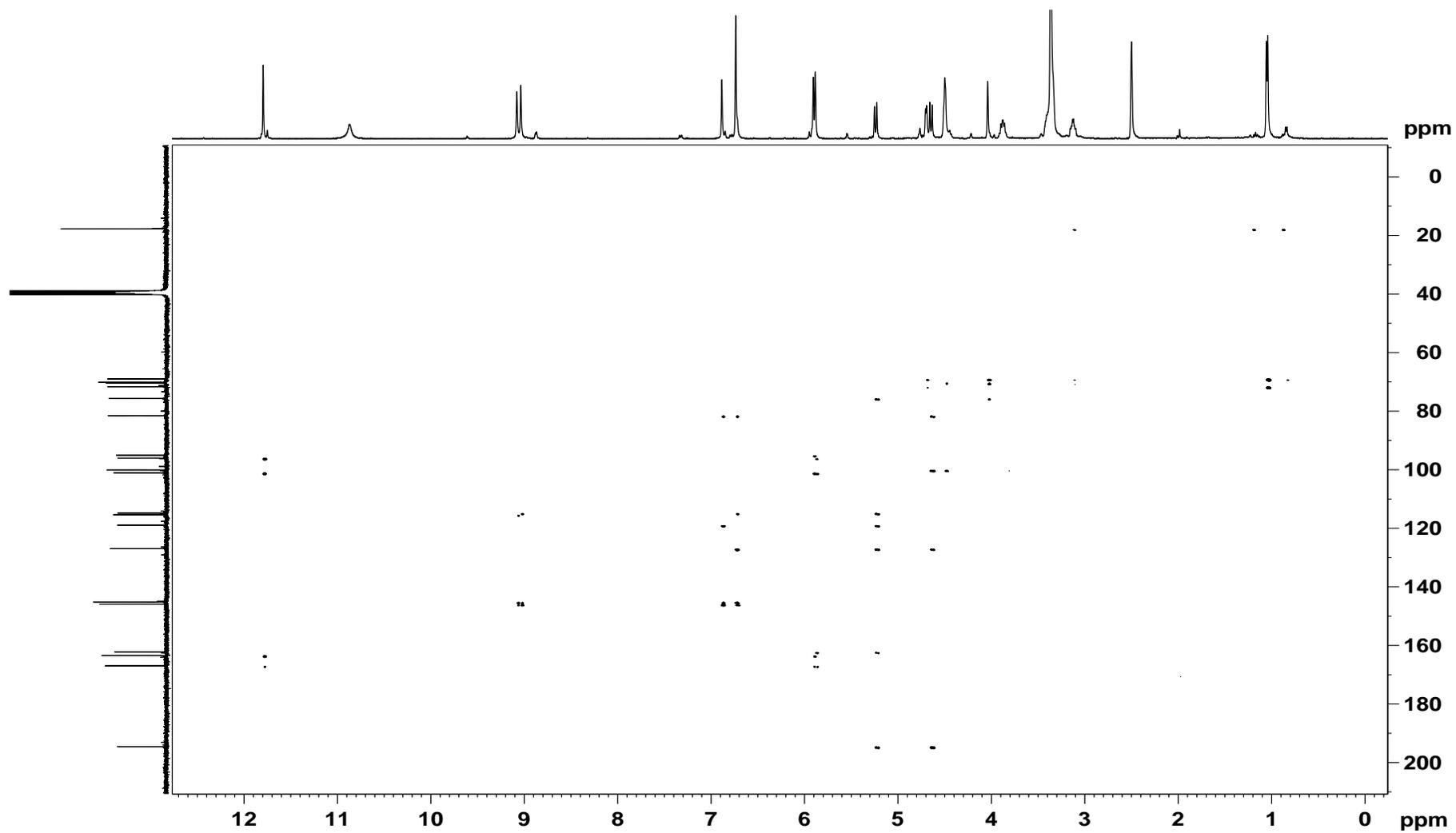


Figura 47. Mapa de contornos HMBC de EXS FA/F2/RC. Expansão compreendida entre 1,5 e 6,5 ppm (DMSO-d<sub>6</sub>).

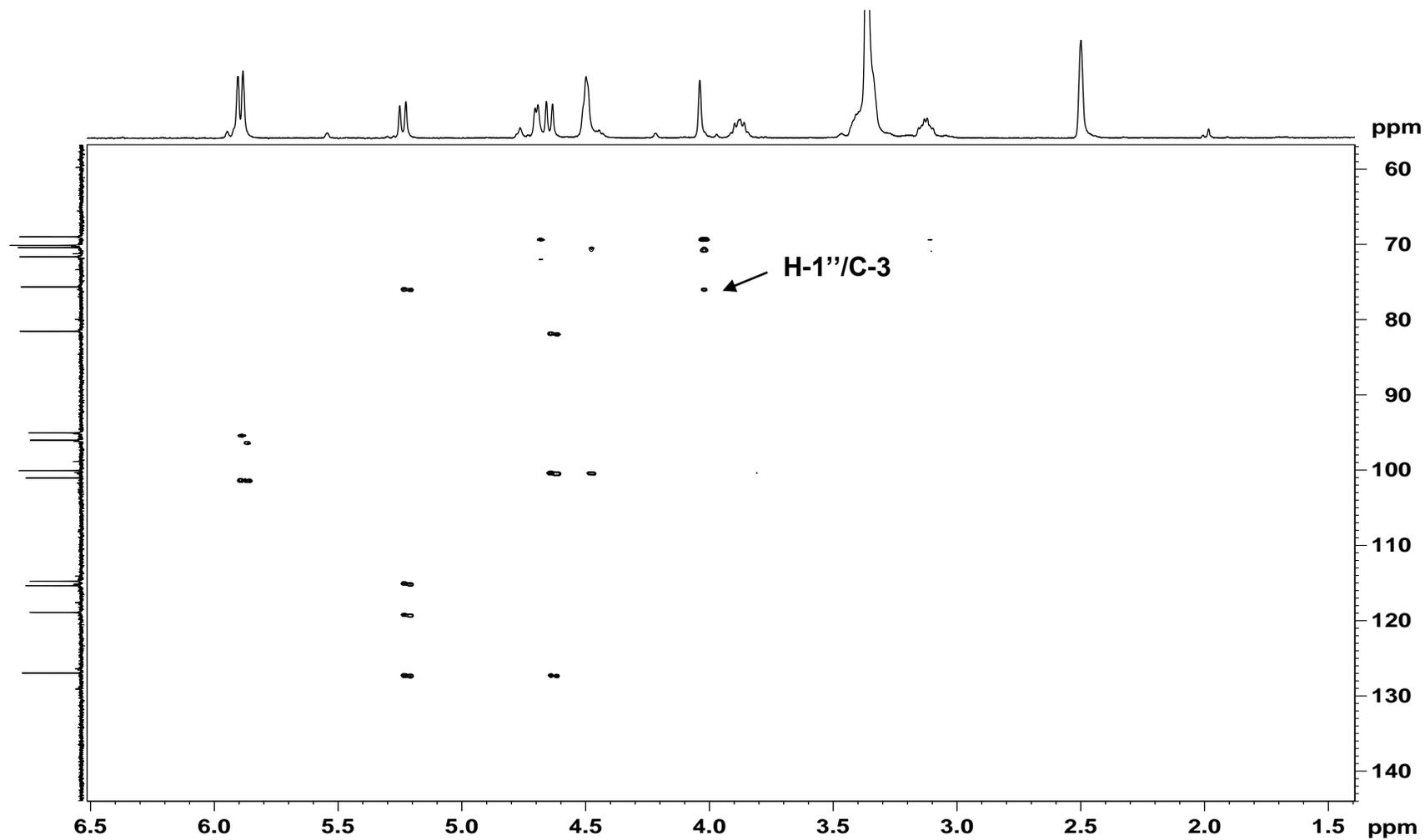


Figura 48. Mapa de contornos HSQC de EXS FA/F2/RC (DMSO-d<sub>6</sub>).

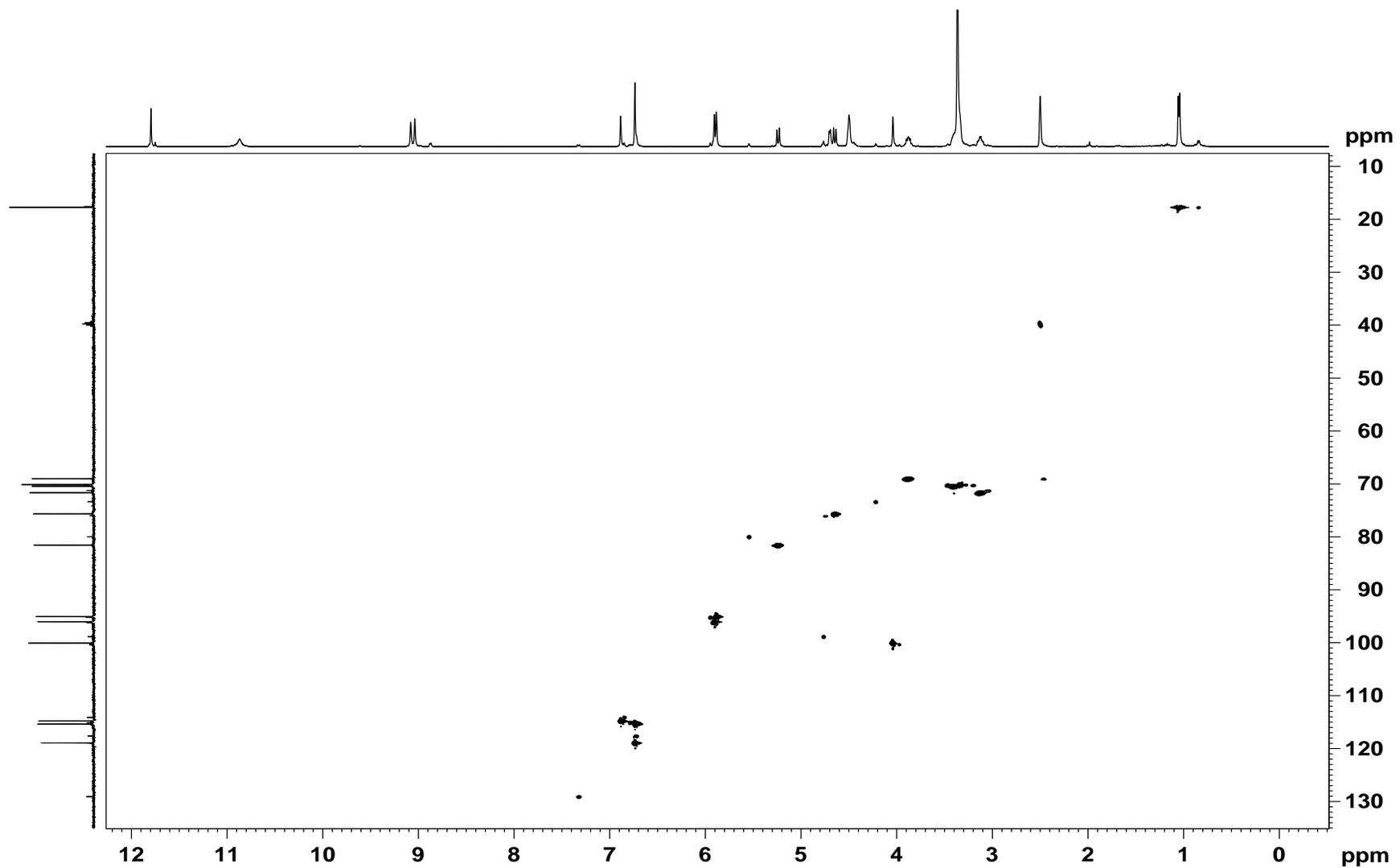
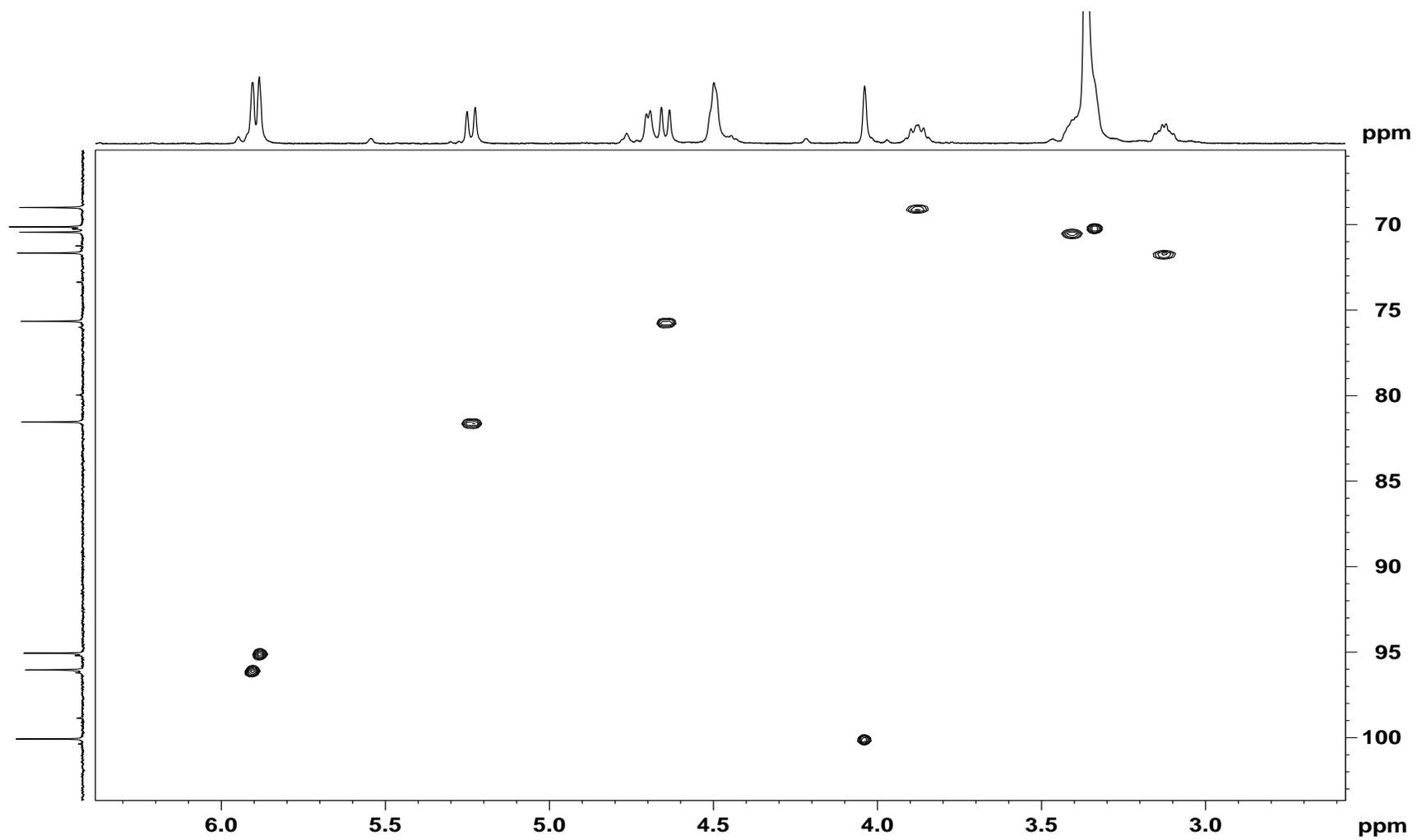


Figura 49. Mapa de contornos HSQC de EXS FA/F2/RC. Expansão compreendida entre 3,0 e 6,0 ppm (DMSO-d<sub>6</sub>).



EXS FA/F2/RC apresentou baixa atividade antiplasmódica ( $17,5 \pm 7,1\%$  [25  $\mu\text{g/mL}$ ] e  $28,5 \pm 3,3\%$  [50  $\mu\text{g/mL}$ ] de redução de parasitemia). No entanto diferentes atividades biológicas têm sido relatadas para a astilbina e seus isômeros. Han et al. (1998) relatam que a astilbina, isolada dos rizomas de *Astilbe thunbergii* (Saxifragaceae), estimulou a lipólise induzida por norepinefrina, de modo dose dependente, podendo ser efetiva em formulações para tratamento de obesidade. Astilbina apresentou também atividade imunossupressiva, sendo observada inibição significativa da proliferação de linfócitos simples e estímulo de apoptose em células de baço (Yang et al., 2006). Além disso, astilbina foi isolada de folhas de *Erythroxylum gonocladum* (Erythoxylaceae) e promoveu significativa inibição *in vitro* de ACE (Angiotensin Converting Enzyme), sendo promissora como potencial agente anti-hipertensivo (Lucas-Filho et al., 2010). Em outro estudo, a astilbina isolada de folhas de *Engelhardia roxburghiana* (Juglandaceae), mostrou considerável efeito sobre inibição de interleucina (IL)-1 $\beta$  e IL-6 e expressão do mRNA LPS (lipopolissacarídeo), através da ligação entre LPS e o receptor TLR-4, da citocina pró-inflamatória fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$ , IL-10, proteína quimiotática (MCP)-1 e genes de ciclo-oxigenase (COX-2). A expressão reduzida dessas citocinas pode diminuir a resposta imune e reduzir a atividade inflamatória, indicando que a astilbina pode agir também como potencial agente anti-inflamatório (Huang et al., 2011). Importante ressaltar que este trabalho relata pela primeira vez a presença da astilbina ou seus isômeros em *Xylopiya sericea*.

#### 6.5. Fracionamento e atividade antiplasmódica dos extratos de *Xylopiya sericea* Coleta 2

Devido ao pouco material vegetal disponível para novos fracionamentos visando o isolamento de compostos ativos de EXS Fr. DCM, foi realizada nova coleta de material vegetal. A Tabela 7 mostra que as classes de metabólitos encontrados nas duas coletas não variaram, sendo encontrados principalmente alcaloides, flavonoides e terpenos. Contudo, a Figura 16 (Pág. 53) ilustra bem a variação do perfil cromatográfico entre os extratos etanólicos de *X. sericea* da Coleta 1 e Coleta 2, na qual é visível a diferença entre os extratos. Considerando que estes cromatogramas são registrados em condições padronizadas, constata-se que no extrato da segunda coleta predominam os constituintes

mais polares. Variações sazonais, assim como mudança do local da coleta poderiam estar diretamente relacionadas às mudanças no perfil fitoquímico do extrato da Coleta 2.

#### 6.5.1. Fracionamento e atividade antiplasmódica do extrato diclorometânico de *Xylopi* *sericea* Coleta 2

Uma vez que a fração mais ativa do extrato etanólico de *X. sericea* Coleta 1 foi EXS Fr. DCM, para a segunda coleta foi obtido primeiramente o extrato diclorometânico por percolação. A Figura 50 mostra o perfil cromatográfico de EXS DCM Coleta 2, no qual não se observam picos majoritários, sendo visto espectros de UV referentes a terpenoides. A presença de terpenos foi confirmada por CCD, assim como a presença de alcaloides neste extrato. Como relatado anteriormente, para espécies do gênero *Xylopi* são encontrados estudos sobre alcaloides e terpenos, principalmente diterpenos (Moreira et al., 2003, Nishiyama et al., 2004, Vieira, 2010).

A redução de crescimento do *P. falciparum* de EXS DCM Coleta 2 e dados do seu fracionamento são apresentados na Figura 51. Observa-se que EXS DCM Coleta 2 apresentou menor atividade antiplasmódica do que EXS EtOH Coleta 1 ( $35,0 \pm 7,1\%$  /  $25 \mu\text{g/mL}$ ] e  $61,5 \pm 8,4$  /  $50 \mu\text{g/mL}$ ). O  $\text{CC}_{50}$  em HepG2 do extrato EXS DCM Coleta 2 ( $\text{CC}_{50}$   $284,3 \pm 1,4 \mu\text{g/mL}$ ) indica moderada citotoxicidade. Após fracionamento de EXS DCM Coleta 2 em coluna de sílica gel observou-se que das 8 frações obtidas, somente a fração EXS FD/F7 apresentou aumento significativo de atividade antiplasmódica em relação ao extrato DCM (Figura 51).

Figura 50. Cromatogramas (UPLC-DAD) de EXS DCM (1) e EXS EtOH (2), a 220 nm. Condições cromatográficas: eluente H<sub>2</sub>O + 0,1% HCOOH/ACN + 0,1% HCOOH; 5 – 95% ACN de 0 a 10 min; 95% ACN de 10 a 11 min; 5% ACN de 11 a 13 min. EXS – *Xylopiá sericea*.

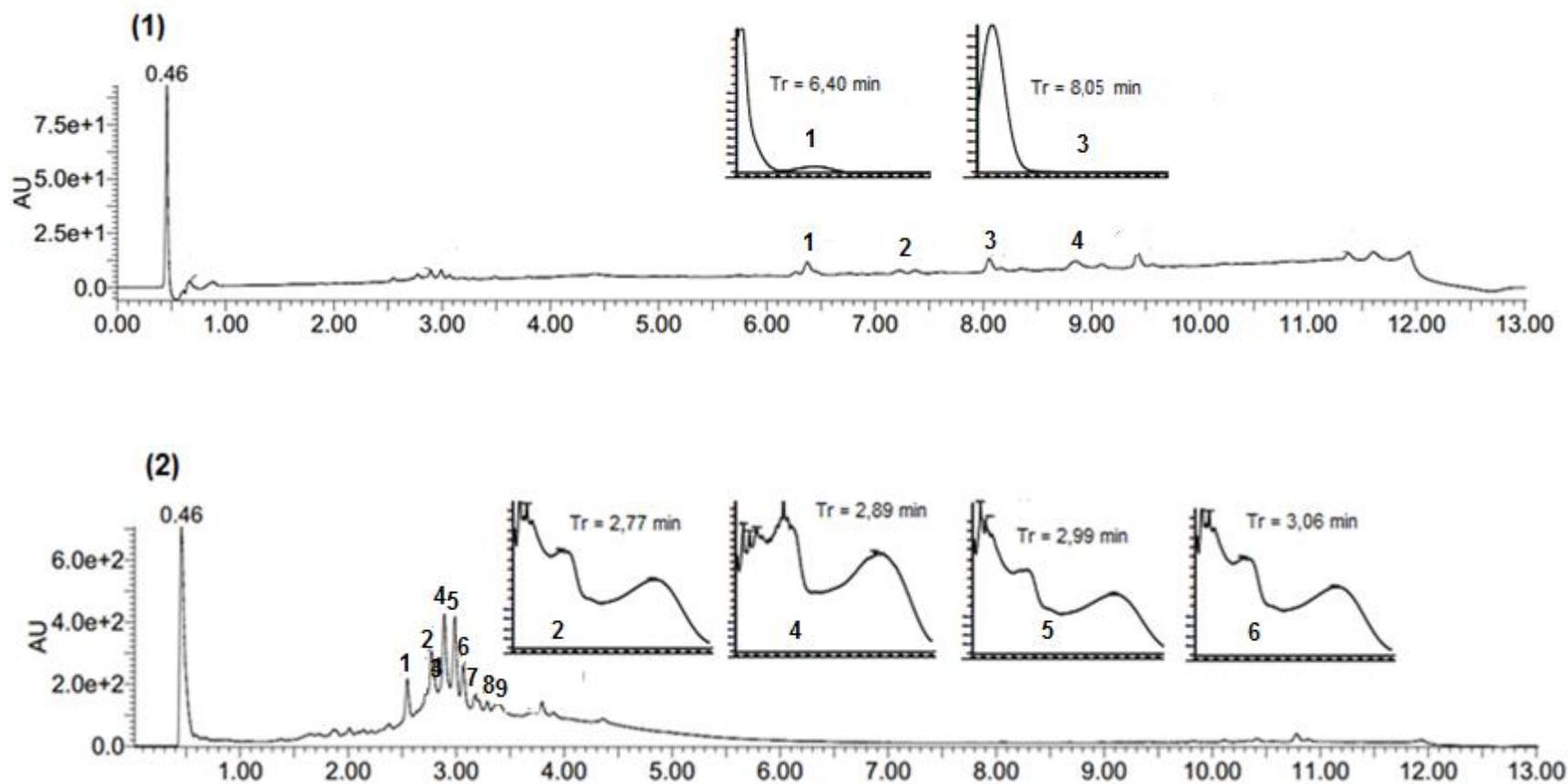
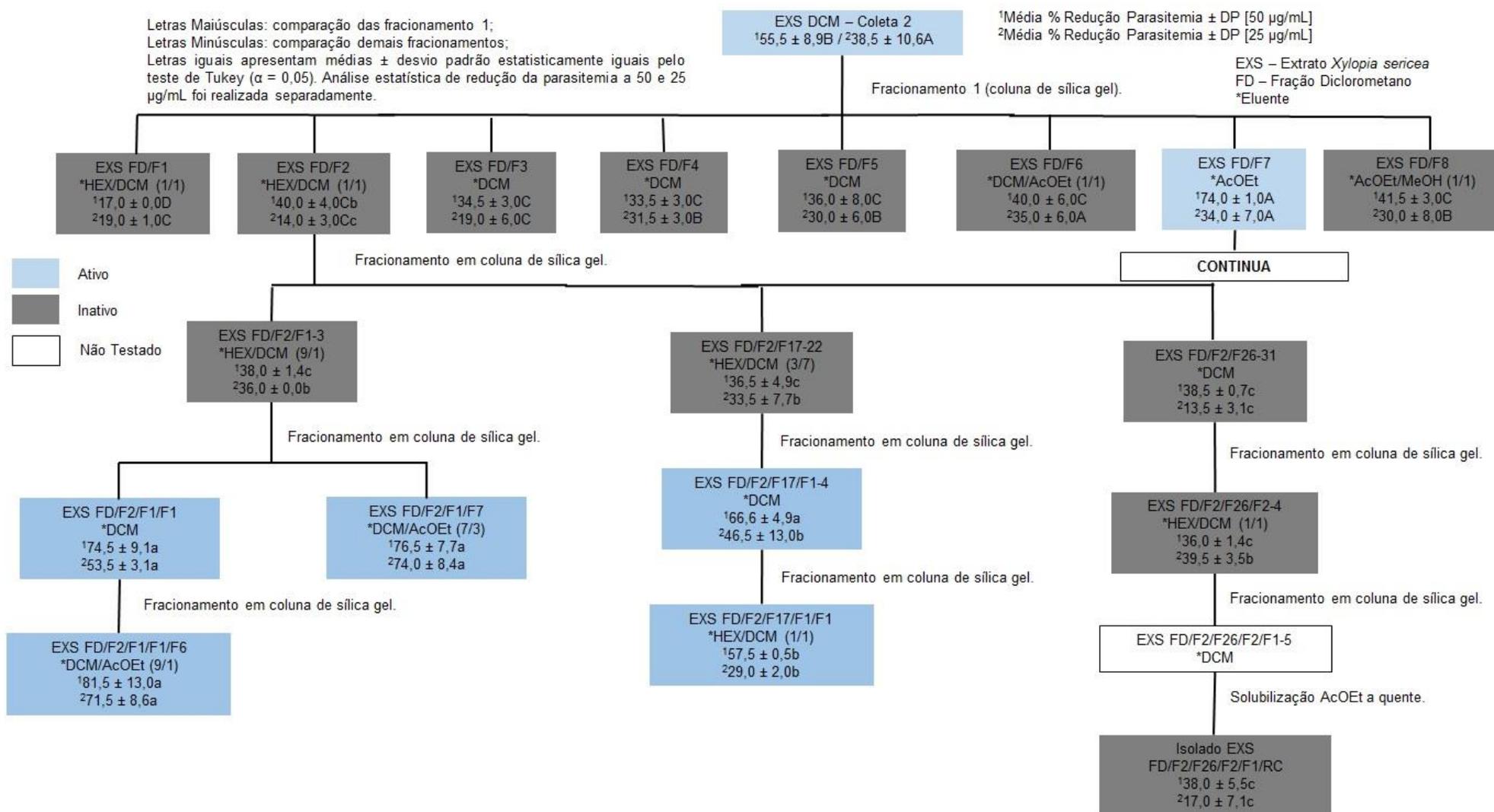
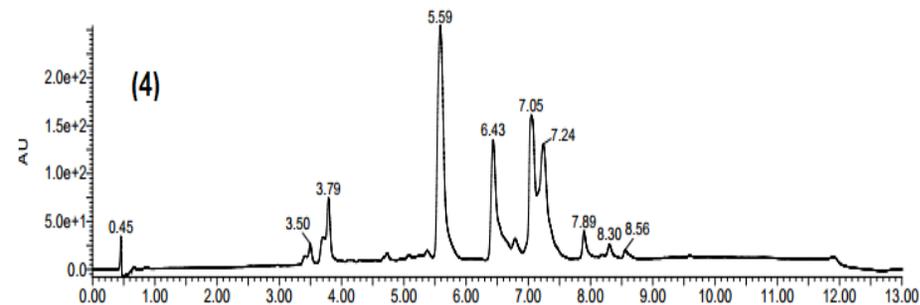
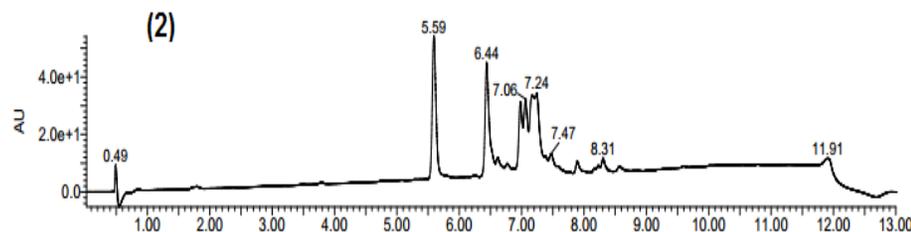
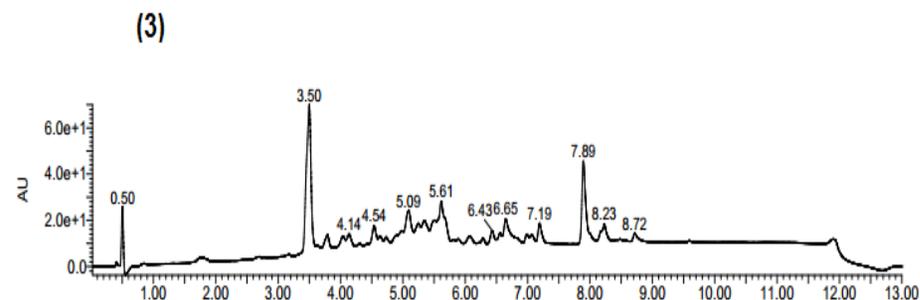
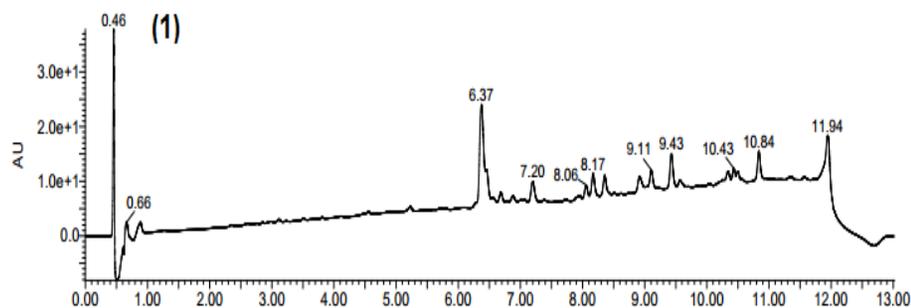


Figura 51. Atividade antiplasmódica de EXS DCM Coleta 2 e das frações obtidas de colunas cromatográficas.



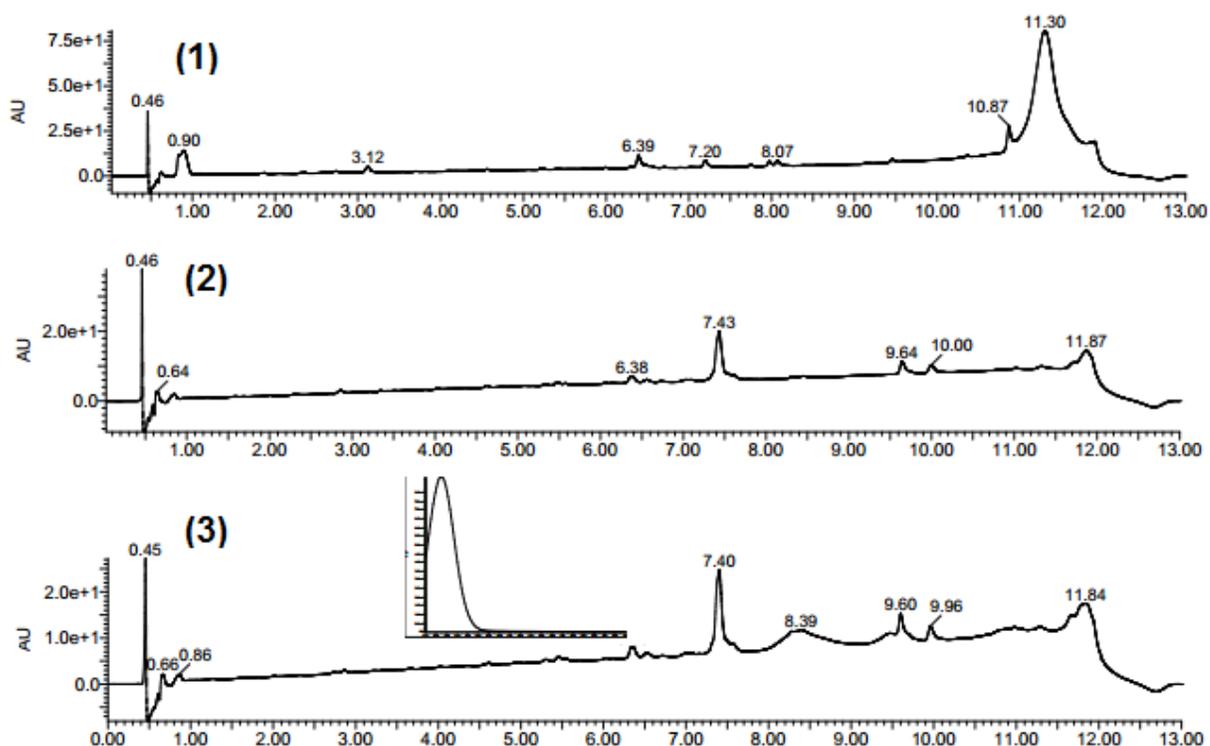
A fração EXS FD/F2 teve diminuição da atividade, contudo, análise da fração por CCD e UPLC-DAD indicou a presença de alcaloides e picos majoritário de terpenos (Figura 52). Esse fato estimulou o fracionamento de EXS FD/F2 mesmo após diminuição da atividade avaliada. Das frações obtidas após fracionamento de EXS FD/F2, EXS FD/F2/F1, EXS FD/F2/F17 e EXS FD/F2/26 foram novamente avaliadas para atividade antiplasmódica, não se observando diferença significativa de atividade antiplasmódica em relação a EXS FD/F2 (Figura 51). A presença de picos majoritários referentes a alcaloides em EXS FD/F2/F1 levou ao fracionamento do mesmo, obtendo-se duas frações que revelaram para alcaloides em CCD, EXS FD/F2/F1/F1 e EXS FD/F2/F1/F7, e que apresentaram aumento significativo da atividade antiplasmódica (Figura 51 e 52). EXS FD/F2/F1/F1 foi então recromatografada observando-se leve aumento de atividade antiplasmódica o que se pode atribuir ao aumento no teor das substâncias presentes, como se pode deduzir a partir da maior intensidade dos picos correspondentes àqueles presentes em EXS FD/F2/F1/F1. Dados obtidos por UPLC-DAD-ESI-MS/MS são apresentados na Tabela 16. Espectro no UV dos picos majoritários de EXS FD/F2/F1/F6 (TR 5,59 min e TR 6,43 min) indicam a presença de alcaloides derivados da classe dos compostos isoquinolínicos (Sangster & Stuart, 1964), assim como visto para EXS FD/F2/F1/F7 (TR 3,51 min). Contudo, apesar dos dados de fragmentação MS/MS+, os compostos constituintes dos picos observados não foram identificados.

Figura 52. Cromatogramas (UPLC-DAD) de EXS FD/F2 (1); EXS FD/F2/F1 (2); EXS FD/F2/F1/F7 (3) e EXS FD/F2/F1/F6 (4), a 220 nm. Condições cromatográficas: eluente H<sub>2</sub>O + 0,1% HCOOH/ACN + 0,1% HCOOH; 5 – 95% ACN de 0 a 10 min; 95% ACN de 10 a 11 min; 5% ACN de 11 a 13 min. EXS – *Xylopiia sericea*.



Já o fracionamento de EXS FD/F2/F17 forneceu a fração EXS FD/F2/F17/F1 com aumento significativo da atividade antiplasmódica em relação à fração original EXS FD/F2 (Figura 51). EXS FD/F2/F17/F1 apresentou pico majoritário (TR 7,43 min) com espectro de absorção UV compatível com terpenos ( $\lambda_{max}$  220 nm), sendo assim recromatografada em coluna, resultando na fração com pico majoritário identificado como EXS FD/F2/F17/F1/F1 (Figura 53 e 54). EXS FD/F2/F17/F1/F1 apresentou redução significativa de atividade antiplasmódica em relação a fração da qual se originou (Figura 51).

Figura 53. Cromatogramas (UPLC-DAD) de EXS FD/F2/F17 (1), EXS FD/F2/F17/F1 (2) e EXS FD/F2/F17/F1/F1 (3), a 220 nm. Condições cromatográficas: eluente H<sub>2</sub>O + 0,1% HCOOH/ACN + 0,1% HCOOH; 5 – 95% ACN de 0 a 10 min; 95% ACN de 10 a 11 min; 5% ACN de 11 a 13 min. EXS – *Xylopiá sericea*.



Os dados referentes à análise por UPLC-DAD-ESI/MS/MS de EXS FD/F2/F17/F1/F1 são mostrados na Tabela 16 e na Figura 54. O espectro no UV mostra uma absorção a 224 nm. O pico do íon molecular  $m/z$  335,47 [M + H]<sup>+</sup> apresenta massa

compatível com diterpenos caurânicos encontrados em diferentes espécies de *Xylopi* (Martins et al., 1999, Castelo Branco, et al., 2009). Assim, o pico base correspondente  $m/z$  279,17  $[M + H - 56]^+$  sugere uma fragmentação do anel C de diterpenos caurânicos entre C9/C11 e C13/C14, assim como o pico  $m/z$  297,57  $[M + H - 38]^+$  (Figura 54). O pico  $m/z$  319,46  $[M + H - 16]^+$  refere-se a perda de uma hidroxila. A perda de carboxila é deduzida a partir do pico  $m/z$  251,04  $[M + H - 84]^+$  por fragmentação do pico  $m/z$  297,57. Os picos  $m/z$  261,11  $[M + H - 74]^+$  e  $m/z$  233,16  $[M + H - 102]^+$  são referentes a quebra do anel A, entre C1/C2 e C3/C4 (261) e C1/C2 e C4/C5 (233). O pico  $m/z$  183  $([M + H - 152]^+)$  representa a fragmentação do anel B, entre C6/C7 e C9/C10 formado. Assim, o composto EXS FD/F2/F17/F1/F1 foi identificado como o ácido *ent*-1 $\alpha$ ,16 $\alpha$ -dihidroxicaur-11-en-18-oico ( $C_{20}H_{30}O_4$ ). Este composto já foi isolado do extrato em acetato de etila das cascas de *Xylopi caudata* (Leverrier et al., 2010).

Figura 54. Proposta de fragmentação (1) e estrutura (2) do composto EXS FD/F2/F17/F1/F1.

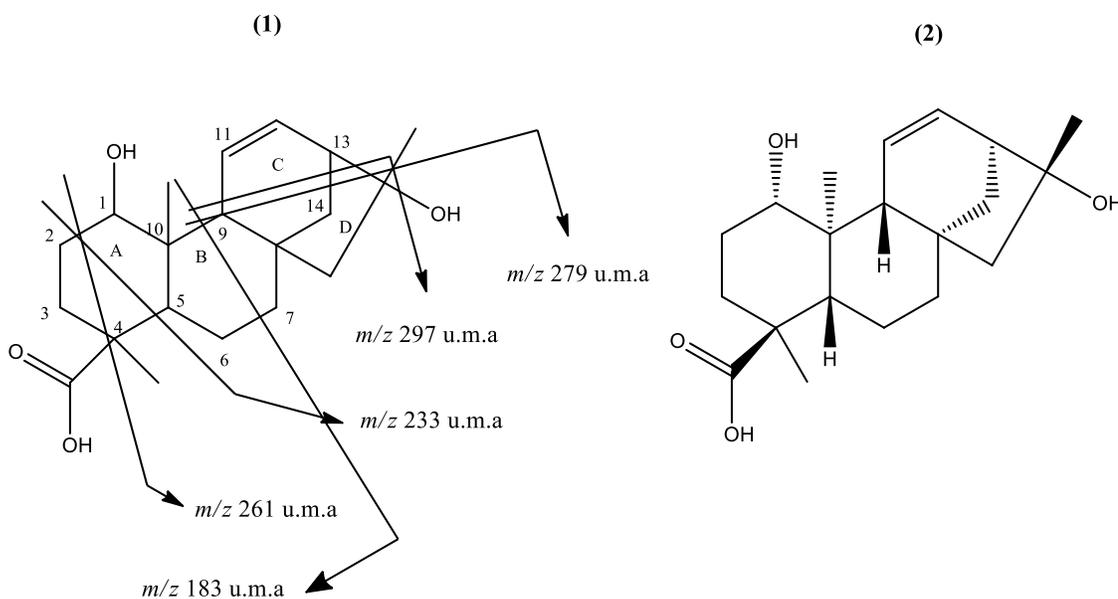


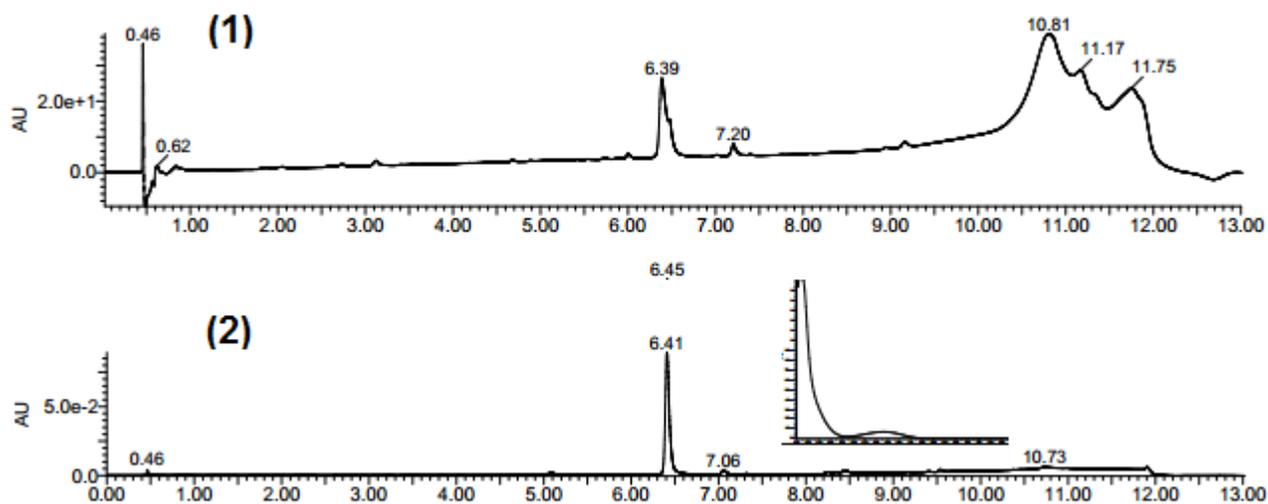
Tabela 16. Dados espectroscópicos e caracterização de constituintes de EXS FD/F2/F1/F1/F6, EXS FD/F2/F1/F7 e EXS FD/F2/F17/F1/F1 por UPLC-DAD-ESI-MS/MS, ionização positiva.

Fração/ Substância	TR (min)	$\lambda_{max}$ (nm)	[M + H] <sup>+</sup> (%)	MS/MS + (%)	Identificação (Fórmula Molecular)
EXS FD/F2/F1/F1/ /F6	5,59	220 245 303	473,05 [M + H] <sup>+</sup> (10)	235,82 [M + H - 237] <sup>+</sup> (28), 218,96 [M + H - 254] <sup>+</sup> (30), 200,97 [M + H - 272] <sup>+</sup> (45), 190,94 [M + H - 282] <sup>+</sup> (65), 59,10 [M + H - 314] <sup>+</sup> (45), 35,29 [M + H - 337] <sup>+</sup> (100)	NI
	6,43	220 245 303	301,3 [M + H] <sup>+</sup> (12)	255,10 [M + H - 46] <sup>+</sup> (12), 243,41 [M + H - 58] <sup>+</sup> (10), 227,09 [M + H - 74] <sup>+</sup> (12), 201,03 [M + H - 100] <sup>+</sup> (15), 177,08 [M + H - 124] <sup>+</sup> (30), 148,82 [M + H - 152] <sup>+</sup> (28), 120,94 [M + H - 180] <sup>+</sup> (30), 109,13 [M + H - 192] <sup>+</sup> (100)	NI
	7,06	236	440,90 [M + H] <sup>+</sup> (10)	423,16 [M + H - 18] <sup>+</sup> (8), 349,14 [M + H - 92] <sup>+</sup> (8), 335,29 [M + H - 106] <sup>+</sup> (15), 297,18 [M + H - 144] <sup>+</sup> (10), 203,10 [M + H - 238] <sup>+</sup> (40), 133,09 [M + H - 308] <sup>+</sup> (50), 109,15 [M + H - 332] <sup>+</sup> (100)	NI
EXS FD/F2/F1/F7	3,51	220 253 301	312,37 [M + H] <sup>+</sup> (5)	296,40 [M + H - 16] <sup>+</sup> (35), 278,43 [M + H - 34] <sup>+</sup> (100), 253,41 [M + H - 59] <sup>+</sup> (10), 235,50 [M + H - 77] <sup>+</sup> (8), 219,30 [M + H - 93] <sup>+</sup> (10), 201,33 [M + H - 111] <sup>+</sup> (10), 191,34 [M + H - 121] <sup>+</sup> (10)	NI
EXS FD/F2/F17/ F1/F1	7,43	224	335,47 [M + H] <sup>+</sup> (10)	319,46 [M + H - 16] <sup>+</sup> (80), 297,57 [M + H - 38] <sup>+</sup> (20), 279,17 [M + H - 56] <sup>+</sup> (100), 261,11 [M + H - 74] <sup>+</sup> (8), 251,04 [M + H - 84] <sup>+</sup> (8), 243,04 [M + H - 92] <sup>+</sup> (8), 233,16 [M + H - 102] <sup>+</sup> (5), 182,96 [M + H - 152] <sup>+</sup> (30)	ácido <i>ent</i> -1 $\alpha$ ,16 $\alpha$ - dihidroxicaur-11-en- 18-oico (C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>4</sub> )

(%): Abundância relativa. NI: Não Identificado.

A fração EXS FD/F2/F26 também foi fracionada em coluna de sílica gel, sendo que as frações recolhidas não apresentaram aumento significativo de atividade antiplasmódica (Figura 51). EXS FD/F26/F2 apresentou um pico majoritário e foi então recromatografada fornecendo EXS FD/F2/F26/F2/F1 como um sólido branco que foi recristalizado em AcOEt obtendo-se EXS FD/F2/F26/F2/F1/RC. Este composto não apresentou diferença significativa de atividade antiplasmódica em relação às frações anteriores (Figuras 51 e 55). O  $CC_{50}$  em HepG2 do composto EXS FD/F2/F26/F2/F1/RC ( $CC_{50}$  272,6  $\pm$  2,1  $\mu$ g/mL) indica moderada citotoxicidade. O espectro no UV ( $\lambda_{max}$  220, 280 nm) associado aos dados de ESI/MS/MS, como o íon molecular em  $m/z$  315,24 [M - H]<sup>-</sup> sugerem tratar-se de um diterpeno.

Figura 55. Cromatogramas (UPLC-DAD) de EXS FD/F2/F26 (1) e EXS FD/F2/F26/F2/F1/RC (2), a 220 nm. Condições cromatográficas: eluente H<sub>2</sub>O + 0,1% HCOOH/ACN + 0,1% HCOOH; 5 – 95% ACN de 0 a 10 min; 95% ACN de 10 a 11 min; 5% ACN de 11 a 13 min. EXS – *Xylopiá sericea*.

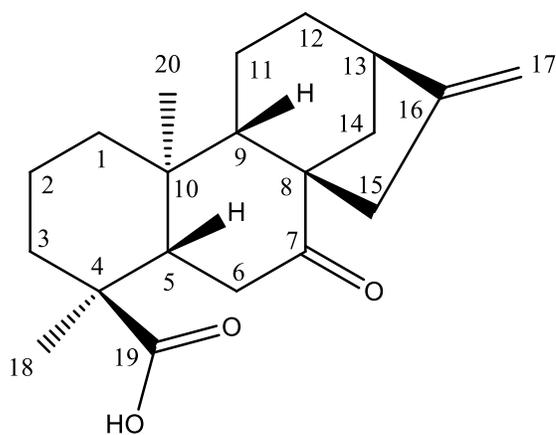


#### 6.5.1.1. Elucidação Estrutural de EXS FD/F2/F26/F2/F1/RC

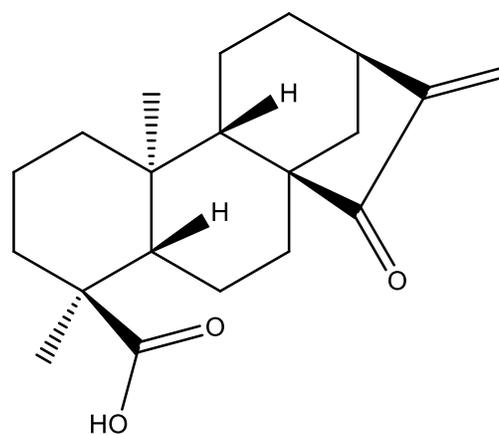
Análise por UPLC-DAD-ESI-MS/MS no modo de ionização negativo mostra os picos  $m/z$  271,35 [M - H - 44]<sup>-</sup> (64),  $m/z$  269,16 [M - H - 46]<sup>-</sup> (68),  $m/z$  253,23 [M - H - 62]<sup>-</sup> (21),

$m/z$  237,37 [M - H - 78]- (7),  $m/z$  162,76 [M - H - 152]- (11),  $m/z$  148,90 [M - H - 166]- (11) e  $m/z$  119,88 [M - H - 195]- (6). A presença de alguns fragmentos, como o pico do ion molecular e o pico base em  $m/z$  315,24 [M - H]-, assim como os picos em  $m/z$  271,35 [M - H - 44]- (64), referente a perda de carboxila, em  $m/z$  253,23 [M - H - 62]- (21),  $m/z$  237,37 [M - H - 78]- (7) e  $m/z$  162,76 [M - H - 152]- (11) referentes a fragmentações dos anéis diterpênicos foram importantes para a proposta da estrutura molecular. Além disso, pesquisa bibliográfica de diterpenos oriundos de espécies de *Xylopi*a levou a diferentes estruturas (Figura 56) possivelmente correspondentes ao composto EXS FD/F2/F26/F2/F1/RC (Hasan et al., 1982, Soh et al., 2013). Dados de absorção UV  $\lambda_{max}$  220/280 nm (Figura 55) corroboram com as propostas iniciais para EXS FD/F2/F26/F2/F1/RC (Figura 56).

Figura 56. Diterpenos caurânicos de massa molecular 316 u.m.a. encontrados em espécies de *Xylopi*a.



ácido 7-oxo-caur-16-en-19-oico  
(Hasan et al., 1982)

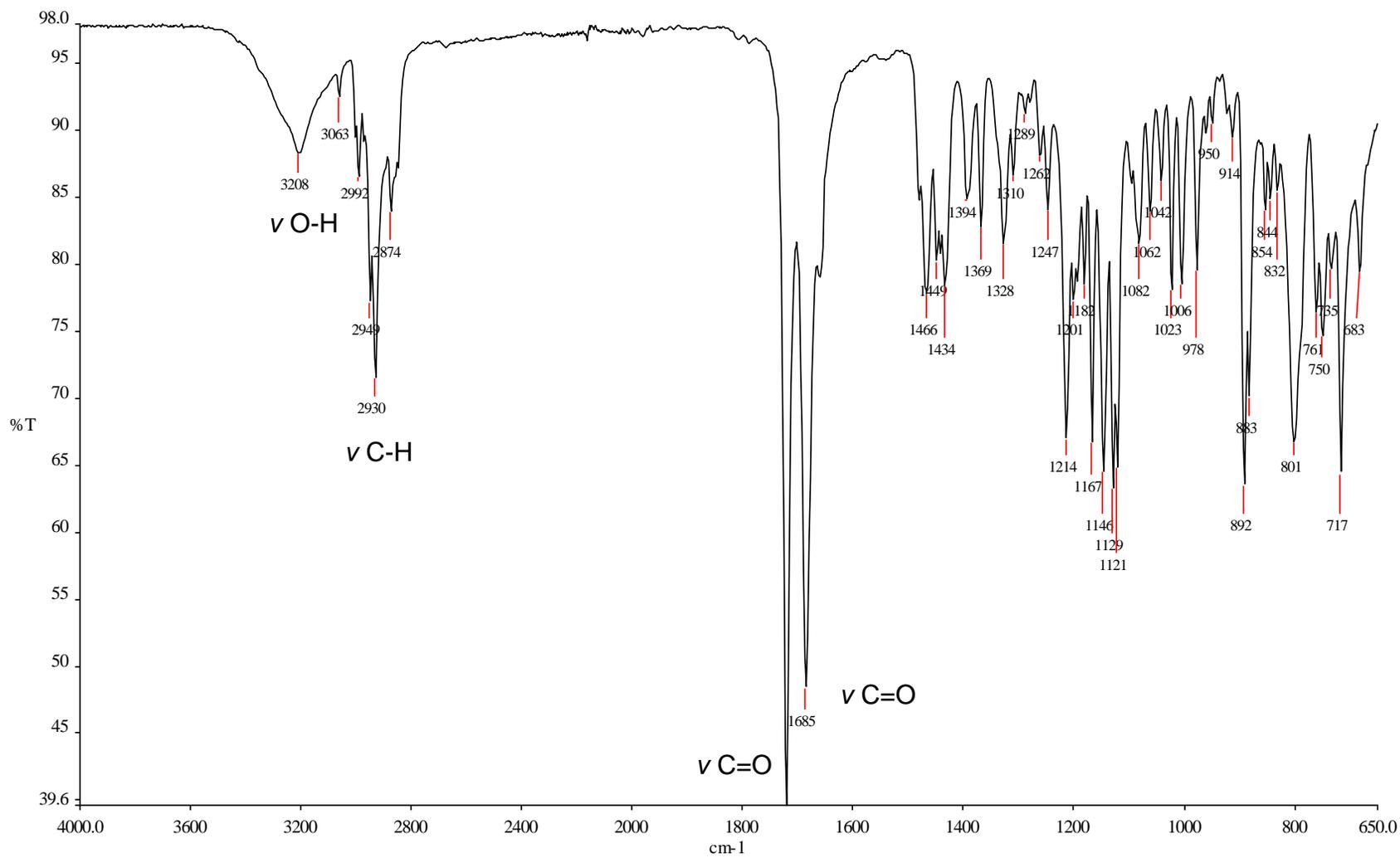


ácido 15-oxo-caur-16-en-19-oico  
(Soh et al., 2013)

#### 6.5.1.1.1. Espectroscopia no Infravermelho

Sinais característicos das funções químicas presentes na estrutura de diterpenos caurânicos foram observados no espectro no IV (Figura 57), dentre os quais se destacam a banda de intensidade baixa e alargada em  $3208\text{ cm}^{-1}$  correspondente às absorções de estiramento  $\nu\text{O-H}$  referentes a hidroxila de ácidos (faixa de absorção  $3400\text{-}2500\text{ cm}^{-1}$ ) (Barbosa, 2007). Observa-se também a banda em  $2930\text{ cm}^{-1}$ , a estiramentos  $\nu\text{C-H}$  (faixa de absorção  $3000\text{-}2850\text{ cm}^{-1}$ ), definindo a presença de diferentes estiramentos  $\text{CH}$ ,  $\text{CH}_2$  ou  $\text{CH}_3$  na molécula EXS FD/F2/F26/F2/F1/RC (Barbosa, 2007). A presença de duas bandas fortes em  $1720$  e  $1685\text{ cm}^{-1}$  correspondem ao estiramento de ligações  $\text{C=O}$ , de carbonila e de carboxila, respectivamente.

Figura 57. Espectro no IV do composto EXS FD/F2/F26/F2/F1/RC.



#### 6.5.1.1.2. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

A Tabela 17 mostra a atribuição dos sinais para  $^1\text{H}$  e correlação de COSY para EXS FD/F2/F26/F2/F1/RC, assim como a comparação com dados de diferentes referências bibliográficas para o composto 7-oxo-*ent*-caur-16-en-19-oico (Hasan et al., 1982) e 15-oxo-*ent*-caur-16-en-19-oico (Santos et al., 2009). Foi observada uma diferença marcante no deslocamento químico de hidrogênios vinílicos que se mostraram mais protegidos  $\delta$  4,87 e 4,85 ppm em relação aos mesmos sinais para a substância 15-oxo-*ent*-caur-16-en-19-oico,  $\delta$  5,95 e 5,25 ppm (Santos et al., 2009). Para o composto 7-oxo-*ent*-caur-16-en-19-oico não foi observada separação dos sinais ( $\delta$  4,87 ppm), sendo, contudo, o valor muito próximo ao visto em EXS FD/F2/F26/F2/F1/RC (Figura 58 e 59). Essa observação indicou que não haveria conjugação da carbonila com o grupo vinila, como ocorre para o composto 15-oxo-*ent*-caur-16-e-19-oico. Outra informação importante foi a resultante da observação de um sistema de *spins* isolado composto por um tripleto H-6<sub>ax</sub> ( $\delta$  3,10 ppm;  $J$  14,4 Hz) e dois dupletos-duplos H-6<sub>eq</sub> ( $\delta$  2,67 ppm e 1,47 ppm;  $J$  14,4 e 2,48 Hz), o que define um grupo metilênico (CH<sub>2</sub>) vizinho a um grupo metínico (CH) com constantes de acoplamento intensas (geminada e transdiaxial - tripleto) e constante sinclinal (2,48 Hz). Os deslocamentos químicos de 3,10 e 2,67 ppm são compatíveis com a vizinhança de grupo carbonila, o que foi confirmado pelo experimento de correlação à longa distância - HMBC. O mapa de contorno COSY (Tabela 17) aponta acoplamento de H-17<sub>ax</sub>/H-17<sub>eq</sub> com H-15<sub>ax</sub> e H-15<sub>eq</sub> (Figura 60). Além disso, observa-se ainda acoplamentos H-6<sub>ax</sub>/H-6<sub>eq</sub> com H-5, H-1<sub>ax</sub>/H-14<sub>eq</sub> com H-13, H-12<sub>ax</sub> com H-13, dentre outros (Figura 61)

Tabela 17. Atribuição dos sinais do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  e correlações observadas nos mapas de contorno COSY para EXS FD/F2/F26/F2/F1/RC e comparação com dados da literatura (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

$^1\text{H}$	EXS FD/F2/F26/F2/F1/RC					7-oxo-ent-caur-16-en-19-oico**				15-oxo-ent-caur-16-en-19-oico***			
	Nº. H	$\delta$ (ppm)	M*	J (Hz)	COSY	Nº. H	$\delta$ (ppm)	M*	J (Hz)	Nº. H	$\delta$ (ppm)	M*	J (Hz)
H-1 <sub>ax</sub>	1	1,87	t	13,2	H-2 <sub>eq</sub>	-	-	-	-	1	1,80	m	-
H-1 <sub>eq</sub>	1	0,88	t	13,2	H-2 <sub>eq</sub> /H-20	-	-	-	-	1	0,89	m	-
H-2 <sub>ax</sub>	1	1,87	t	13,2	H-2 <sub>eq</sub>	-	-	-	-	1	1,65	M	-
H-2 <sub>eq</sub>	1	1,54	d	14,0	H-2 <sub>ax</sub>	-	-	-	-	1	1,48	m	-
H-3 <sub>ax</sub>	1	2,23	d	13,2	H-2 <sub>ax</sub> /H-2 <sub>eq</sub>	-	-	-	-	1	1,78	-	-
H-3 <sub>eq</sub>	1	1,05	t	13,2	H-2 <sub>eq</sub> /H-3 <sub>ax</sub>	-	-	-	-	1	1,47	-	-
H-5	1	1,48	d	2,5	H-6 <sub>ax</sub>	-	-	-	-	1	1,80	-	-
H-6 <sub>ax</sub>	1	3,10	t	14,4	H-6 <sub>eq</sub>	1	3,13	-	16,0-14,0	1	1,50	-	-
H-6 <sub>eq</sub>	1	2,67	d	14,4	H-6 <sub>ax</sub> /H-5	1	2,67	-	16,0-4,0	1	1,26	-	-
H-7 <sub>ax</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2,05	d	13,4
H-7 <sub>eq</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1,26	m	-
H-9	1	1,37	s	-	H-11 <sub>ax</sub>	-	-	-	-	1	1,45	m	-
H-11 <sub>ax</sub>	1	1,69	s	-	-	-	-	-	-	1	1,63	m	-
H-11 <sub>eq</sub>	1	1,69	s	-	-	-	-	-	-	1	1,58	m	-
H-12 <sub>ax</sub>	1	1,69	s	-	H-13	-	-	-	-	1	1,89	m	-
H-12 <sub>eq</sub>	1	1,54	d	14,0	-	-	-	-	-	1	1,68	m	-
H-13	1	2,74	s	-	H-12 <sub>ax</sub> /H-14 <sub>eq</sub>	1	2,75	m	-	1	3,05	s	-
H-14 <sub>ax</sub>	1	2,09	d	10,8	H-15 <sub>eq</sub>	-	-	-	-	1	2,39	d	11,8
H-14 <sub>eq</sub>	1	1,41	t	14,0	-	1	3,20	d	14,0	1	1,68	m	-
H-15 <sub>ax</sub>	1	3,21	d	17,6	H-15 <sub>eq</sub>	-	-	-	-	1	-	-	-
H-15 <sub>eq</sub>	1	1,97	m	18,8	H-15 <sub>ax</sub>	1	-	-	-	1	-	-	-
H-17 <sub>a</sub>	1	4,87	s	-	H-15 <sub>ax</sub> /H-15 <sub>eq</sub>	2	4,87	sl	6,0	1	5,95	-	-
H-17 <sub>b</sub>	1	4,85	s	-	H-15 <sub>ax</sub> /H-15 <sub>eq</sub>	-	-	-	-	1	5,25	-	-
H-18	3	1,26	s	-	-	3	1,25	s	-	-	-	s	-
H-19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	1,13	s	-
H-20	3	1,16	s	-	-	3	1,16	s	-	3	1,17	s	-

\*M = multiplicidade; s = simpleto; sl = simpleto largo; d = dupleteo; dq = duplo quarteto; dd = duplo dupleteo; m = multipleteo.

\*\*Referência = Hasan et al. (1982) ( $^1\text{H}$  - RMN 90 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

\*\*\*Referência = Santos et al. (2009) ( $^1\text{H}$  - RMN 500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ). -: não observado.

Figura 58. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de EXS FD/F2/F26/F2/F1/RC (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

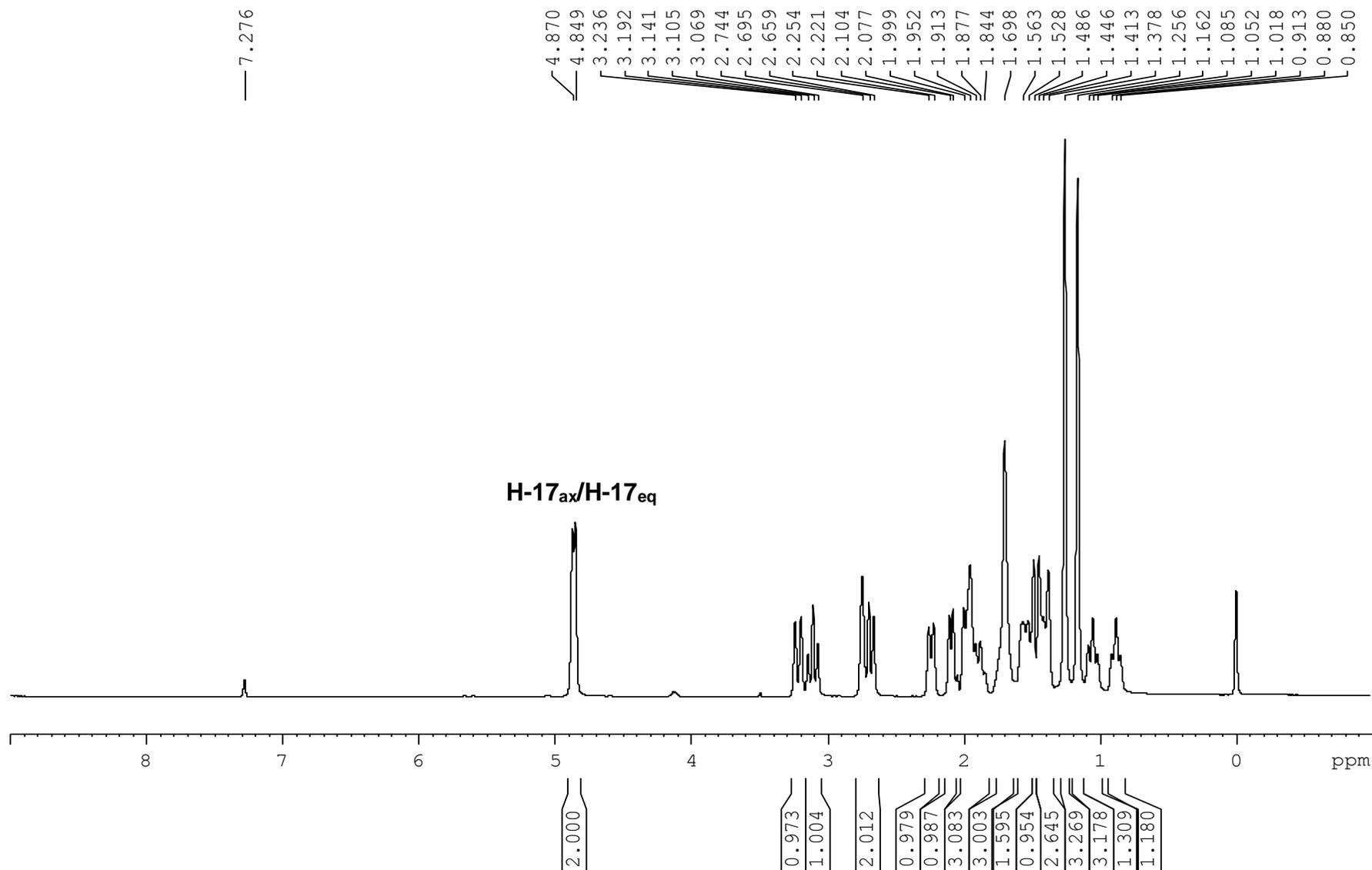


Figura 59. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de EXS FD/F2/F26/F2/F1/RC (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ). Expansão compreendida entre 0,8 e 3,4 ppm.

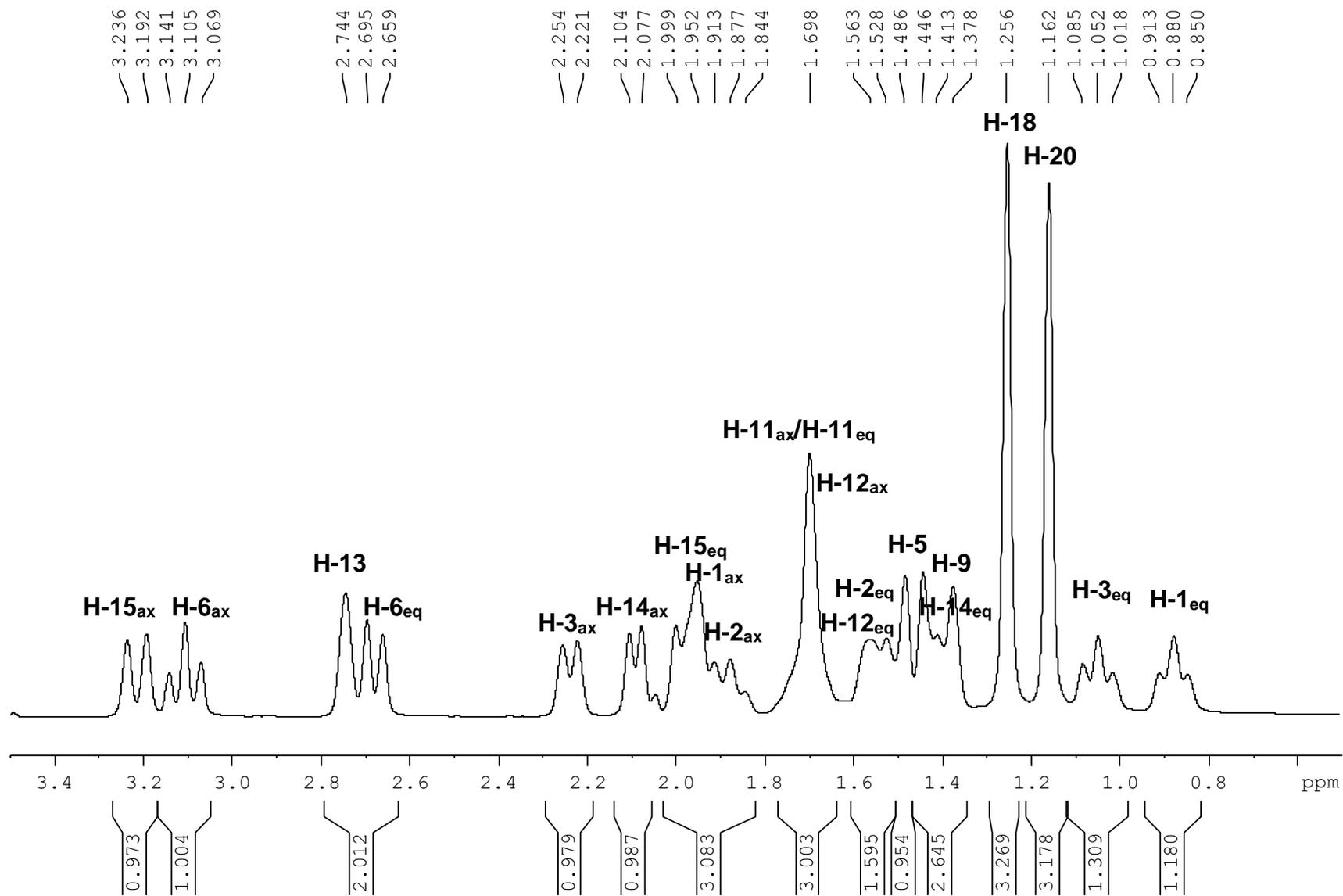


Figura 60. Mapa de contornos COSY de EXS FD/F2/F26/F2/F1/RC (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

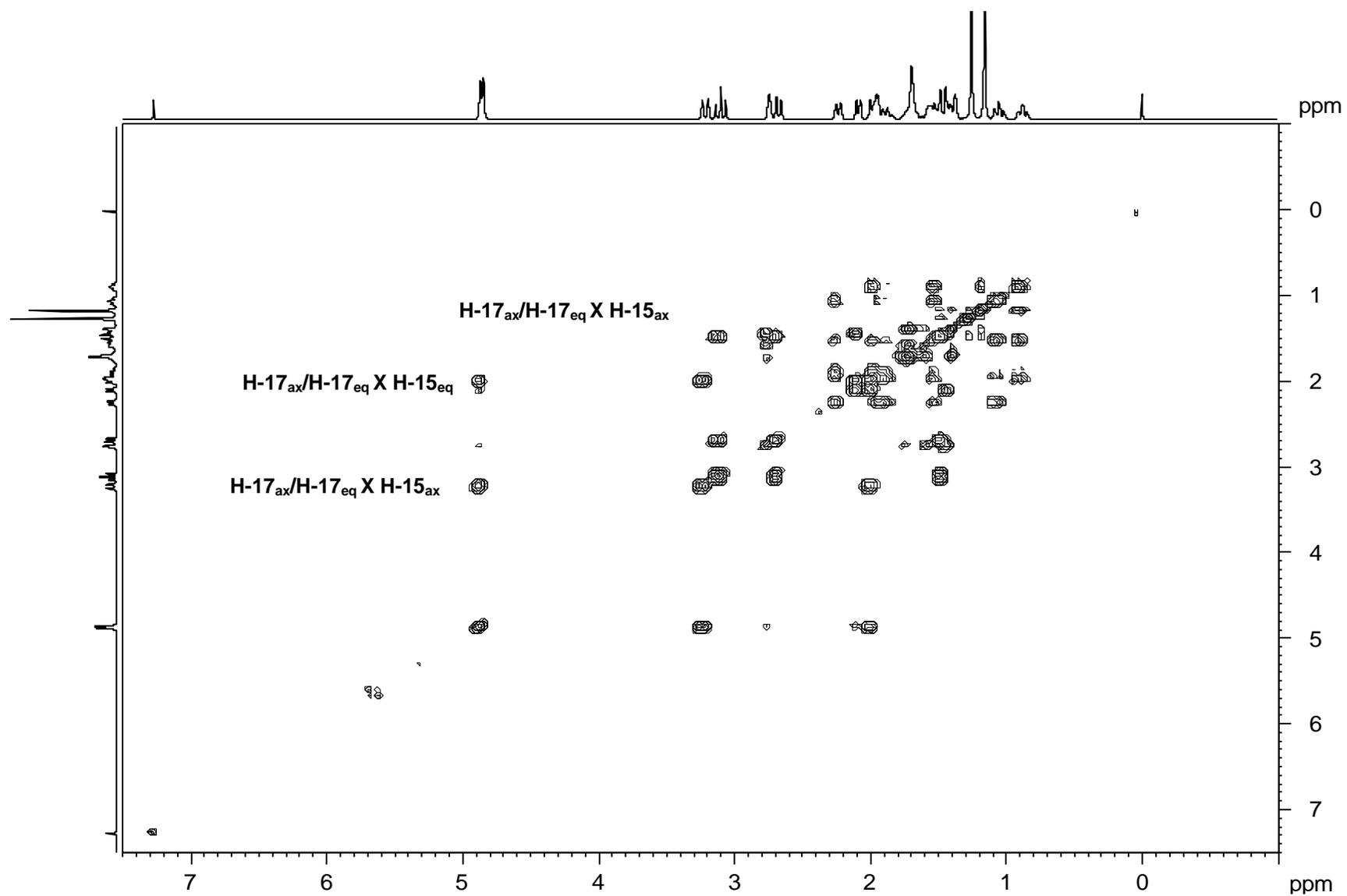
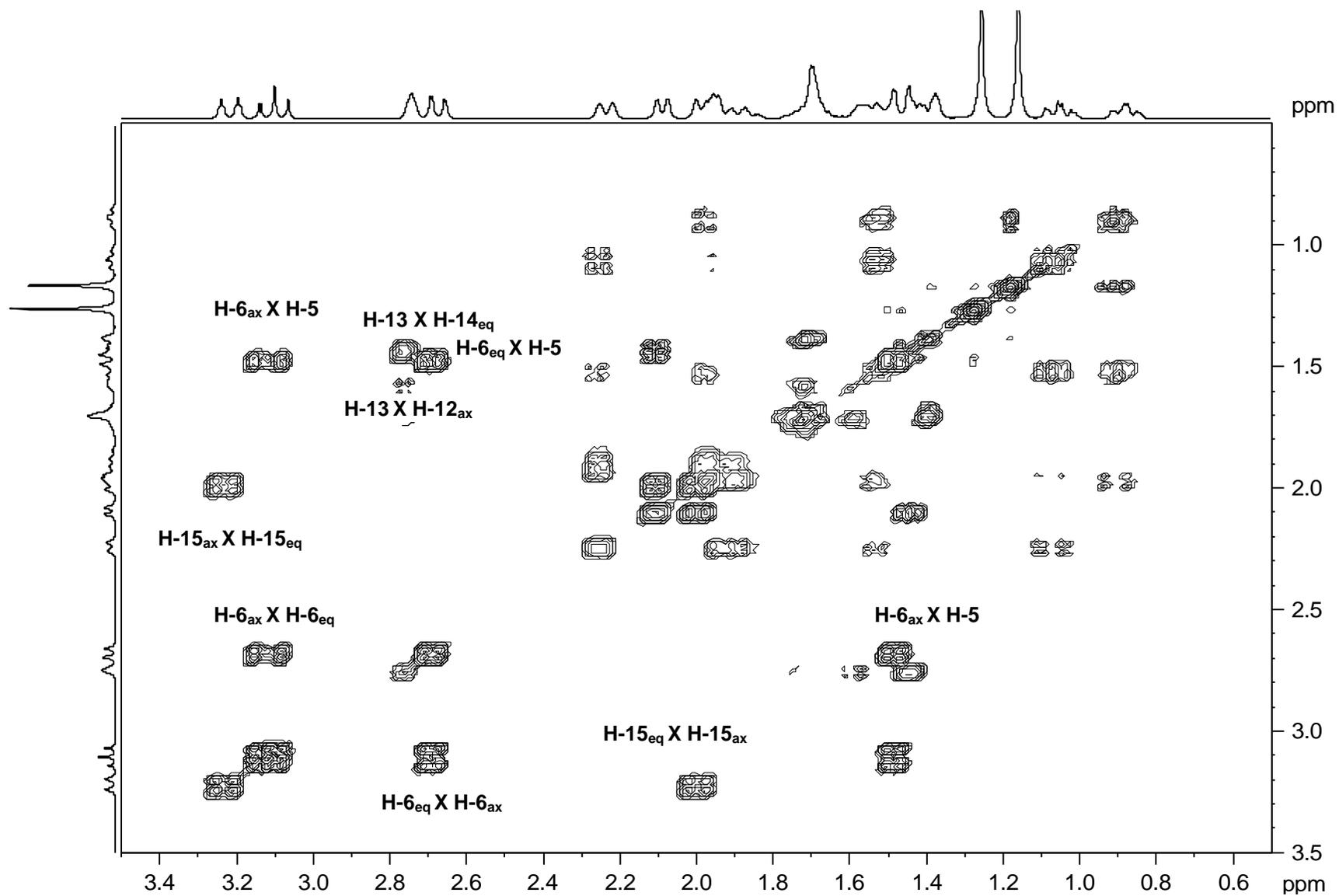


Figura 61. Mapa de contornos COSY de EXS FD/F2/F26/F2/F1/RC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>). Expansão compreendida entre 0,6 e 3,4 ppm.



Os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figuras 62 e 63) de EXS FD/F2/F26/F2/F1/RC confirmam sua natureza diterpênica, uma vez que foram registrados 20 sinais, referentes a duas carbonilas (cetona e carboxila); dois carbonos olefínicos vinílicos ( $\text{C}=\text{CH}_2$ ); três carbonos quaternários; três carbonos metínicos; nove carbonos metilênicos e dois carbonos metílicos (Tabela 18). Também foi percebido maior deslocamento químico para o carbono carbonílico de EXS FD/F2/F26/F2/F1/RC ( $\delta$  213,05 ppm), quando comparado ao mesmo carbono do ácido 15-oxo-*ent*-caur-16-en-19-oico,  $\delta$  210,40 ppm (Santos et al., 2009). A distinção dos carbonos metilênicos via DEPT 135 pode ser vista nas Figuras 64 e 65.

Tabela 18. Atribuição dos sinais do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 para EXS FD/F2/F26/F2/F1/RC e comparação com dados da literatura (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

$^{13}\text{C}$	EXS FD/F2/F26/F2/F1/RC			7-oxo- <i>ent</i> -caur-16-en-19-oico **	15-oxo- <i>ent</i> -caur-16-en-19-oico ***
	$\delta$ (ppm)	DEPT 135 $\delta$ (ppm)	M*	$\delta$ (ppm)	$\delta$ (ppm)
C-1	40,5	40,7	$\text{CH}_2$	40,5	38,9
C-2	18,9	18,1	$\text{CH}_2$	18,8	18,0
C-3	37,5	39,0	$\text{CH}_2$	38,8	36,8
C-4	43,9	-	C	43,8	47,6
C-5	54,3	54,5	CH	54,3	49,5
C-6	38,8	39,1	$\text{CH}_2$	37,5	21,7
C-7	213,0	-	C	212,7	33,2
C-8	57,8	55,1	CH	57,8	52,7
C-9	54,9	54,5	CH	54,9	52,6
C-10	39,7	-	C	39,6	39,5
C-11	17,9	18,1	$\text{CH}_2$	17,9	17,8
C-12	36,6	37,7	$\text{CH}_2$	32,5	32,5
C-13	42,8	42,9	CH	42,8	38,2
C-14	38,9	40,6	$\text{CH}_2$	38,8	36,7
C-15	40,5	40,7	$\text{CH}_2$	40,5	210,4
C-16	153,4	-	C	153,6	149,5
C-17	104,5	104,7	$\text{CH}_2$	104,4	114,8
C-18	28,4	28,6	$\text{CH}_3$	28,3	184,9
C-19	183,4	-	C	182,6	18,1
C-20	15,1	15,2	$\text{CH}_3$	15,0	16,3

M = Multiplicidade. \*Atribuída pelo experimento DEPT 135 neste trabalho.

\*\*Referência = Hasan et al. (1982) ( $^{13}\text{C}$  - RMN 12,5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

\*\*\*Referência = Santos et al. (2009) ( $^{13}\text{C}$  - RMN 125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ). -: não observado.

Figura 62. Espectro RMN de  $^{13}\text{C}$  de EXS FD/F2/F26/F2/F1/RC (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

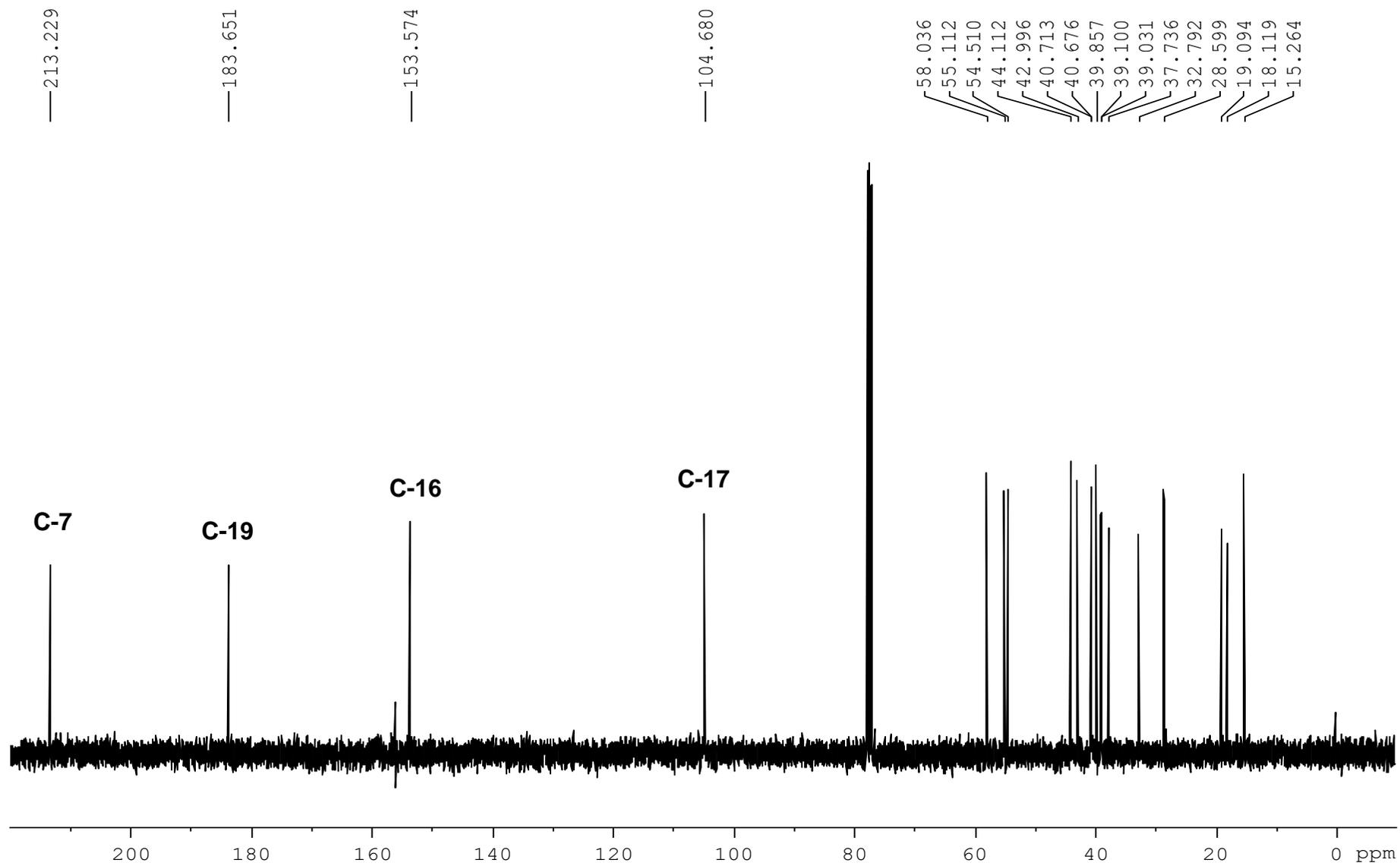


Figura 63. Espectro RMN de  $^{13}\text{C}$  de EXS FD/F2/F26/F2/F1/RC (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ). Expansão compreendida entre 0,0 e 110 ppm.

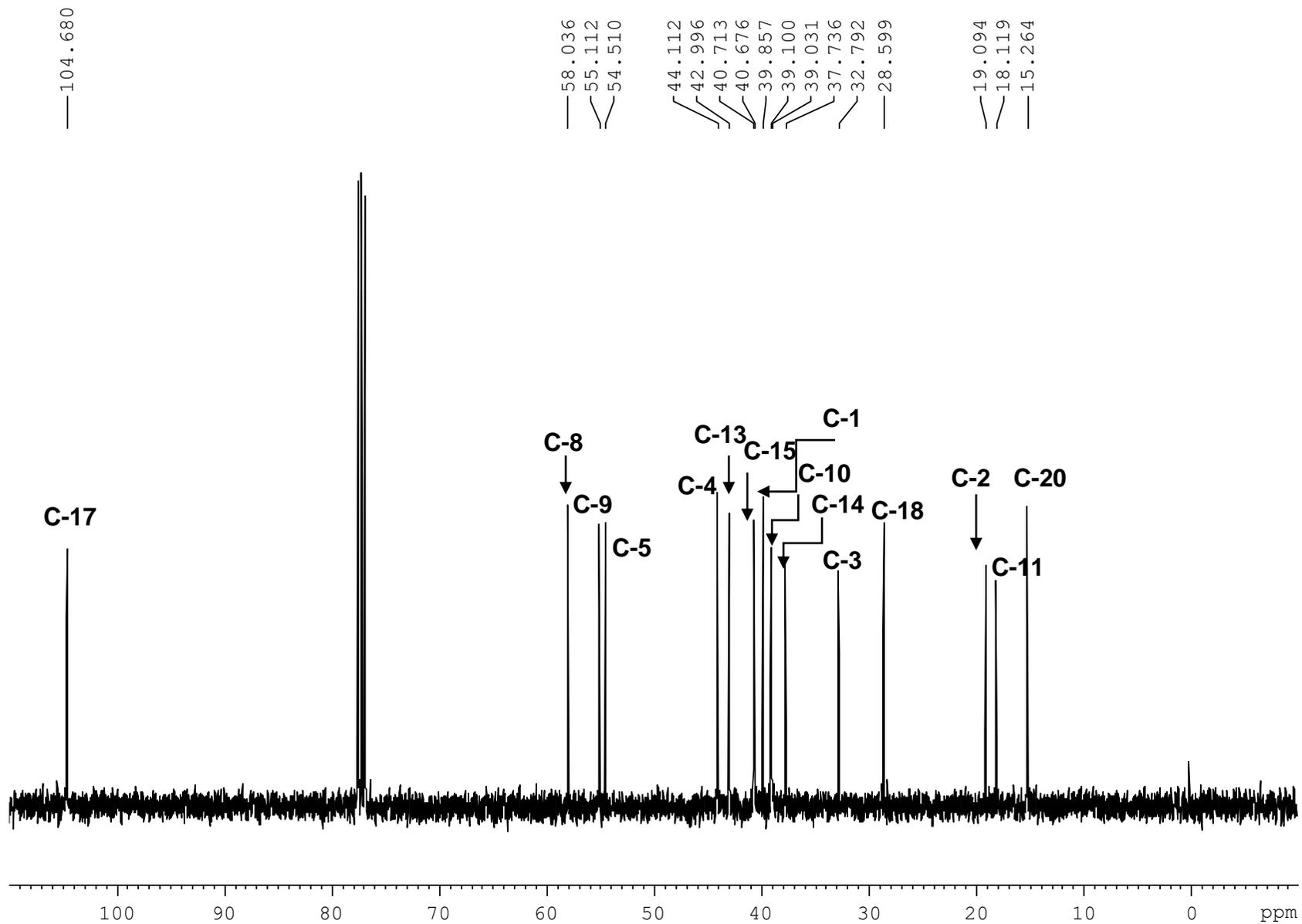


Figura 64. Espectro RMN de  $^{13}\text{C}$  DEPT 135 de EXS FD/F2/F26/F2/F1/RC (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

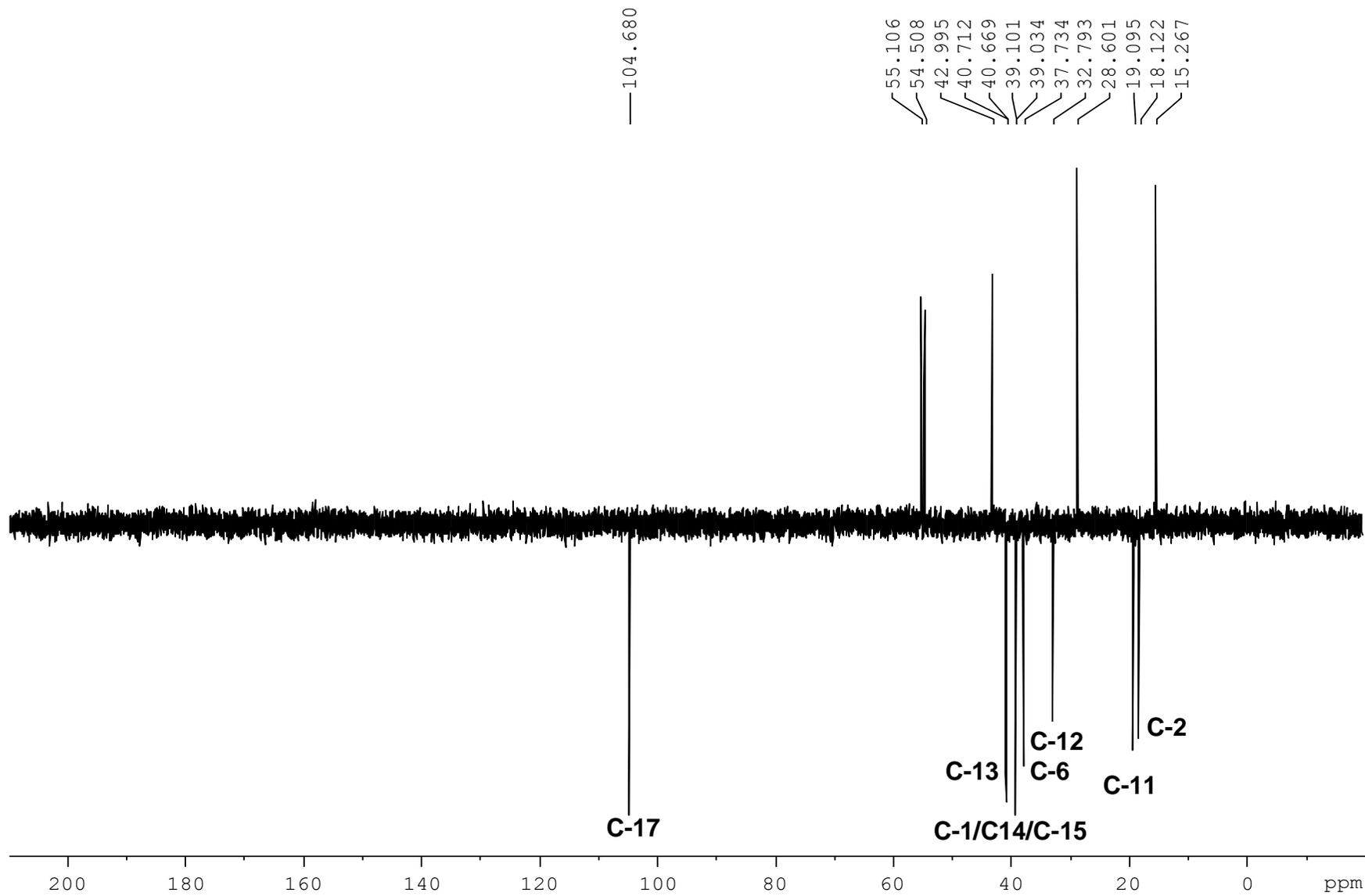
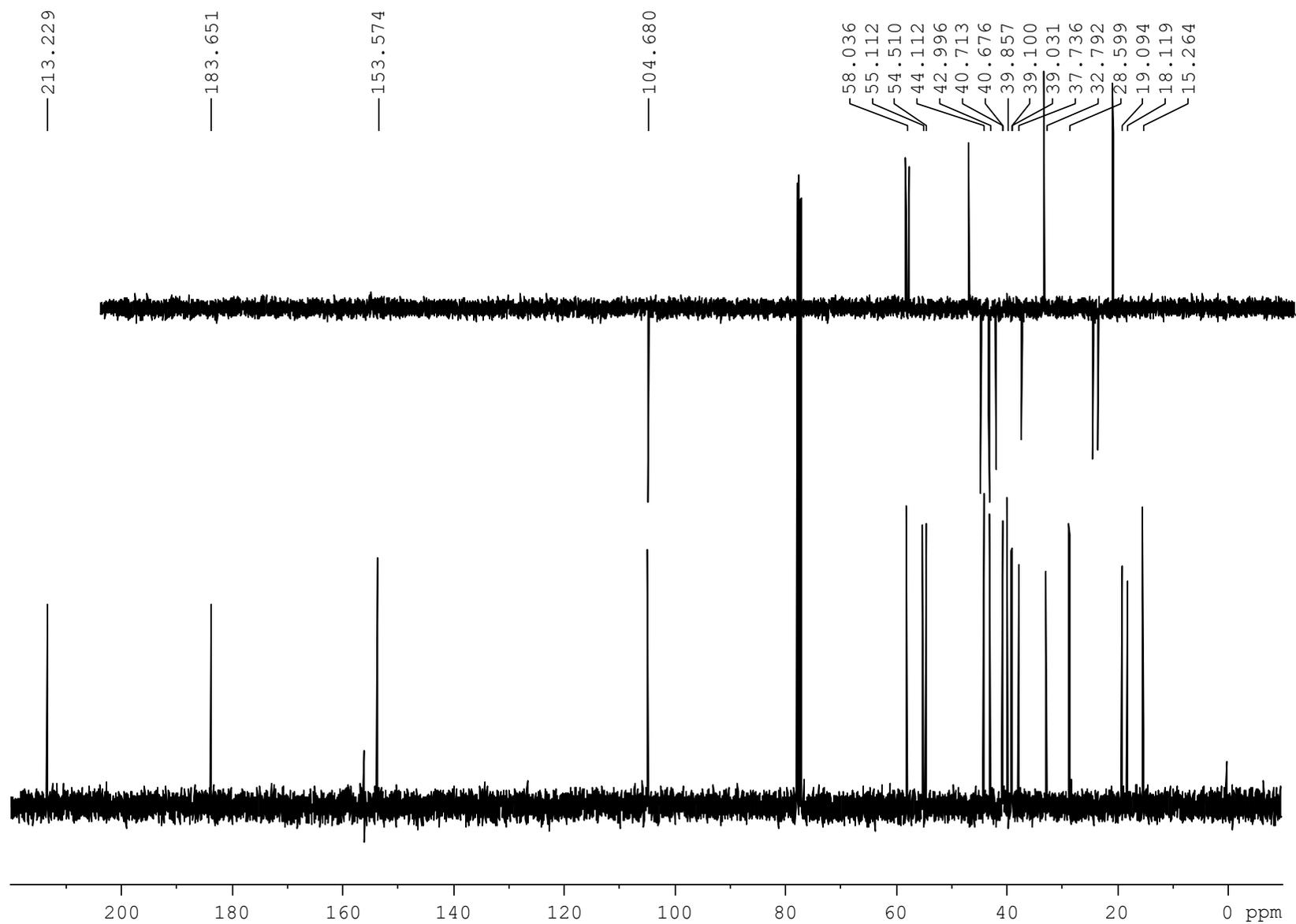


Figura 65. Espectro RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 de EXS FD/F2/F26/F2/F1/RC (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



Dessa forma, análise do  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  permitiu a identificação de EXS FD/F2/F26/F2/F1/RC como sendo similar ao ácido 7-oxo-*ent*-caur-16-en-19-oico (Hasan et al., 1982). Confirmando a proposta estrutural do ácido 7-oxo-*ent*-caur-16-en-19-oico, foram observadas as correlações de acoplamento à longa distância, via HMQC,  $^3J$  H-5/C-7 e H-15/C-7, assim como as correlações  $^3J$  entre H-3 e H-5 com o C-18 e C-19 e com o carbono carbonílico da carboxila, além de H1, H5 e H9 com o C-20 (Tabela 19) (Figuras 66 e 67).

Tabela 19. Correlações heteronucleares observadas nos mapas de contornos HMBC e NOESY para EXS FD/F2/F26/F2/F1/RC ( $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

$^1\text{H}$ ( $\delta$ ppm)	$^3J^{13}\text{C}$ ( $\delta$ ppm)	HMBC $^2J^{13}\text{C}$ ( $\delta$ ppm)	NOESY $^1J^1\text{H}$ ( $\delta$ ppm)
H-1 <sub>ax</sub> (1,87)	-	-	H-12 <sub>ax</sub> (1,54)
H-1 <sub>eq</sub> (0,88)	-	C-9 (54,9)	H-11 <sub>eq</sub> (1,69)
H-2 <sub>ax</sub> (1,87)	-	-	H-20 (1,16)
H-2 <sub>eq</sub> (1,54)	-	-	H-14 <sub>ax</sub> (2,09)
H-3 <sub>ax</sub> (2,23)	C-18 (28,4); C-19 (183,4)	-	-
H-3 <sub>eq</sub> (1,05)	C-18 (28,4); C-19 (183,4)	-	-
H-5 (1,48)	C-7 (213,0)	C-7 (213,0); C-9 C-18 (28,4); C-20 (15,1)	H-14 <sub>ax</sub> (2,09)
H-6 <sub>ax</sub> (3,10)	-	C-8 (57,8); C-18 (28,4)	H-14 <sub>ax</sub> (2,09); H-20 (1,16)
H-6 <sub>eq</sub> (2,67)	-	C-8 (57,8)	H-18 (1,26)
H-9 (1,37)	-	C-1 (40,5); C-8 (57,8); C-10 (39,7); C-11 (17,9); C-14 (38,9); C-15 (40,5); C-20 (15,1)	H-1 <sub>ax</sub> (1,87); H-14 <sub>ax</sub> (2,09)
H-11 <sub>ax</sub> (1,69)	-	C-8 (57,8); C-9 (54,9)	H-14 <sub>ax</sub> (2,09)
H-11 <sub>eq</sub> (1,69)	-	C-9 (54,9)	H-14 <sub>ax</sub> (2,09)
H-12 <sub>ax</sub> (1,69)	-	C-8 (57,8); C-9 (54,9); C-16 (153,4)	H-14 <sub>ax</sub> (2,09); H-20 (1,16)
H-12 <sub>eq</sub> (1,54)	-	C-9 (54,9); C-16 (153,4)	H-14 <sub>ax</sub> (2,09)
H-13 (2,74)	-	C-8 (57,8); C-16 (153,4)	H-12 <sub>ax</sub> (1,69); H-12 <sub>eq</sub> (1,54); H-14 <sub>ax</sub> (2,09); H-14 <sub>eq</sub> (1,41); H-18 (1,26)
H-14 <sub>ax</sub> (2,09)	-	C-16 (54,9)	H-20 (1,16)
H-14 <sub>eq</sub> (1,41)	-	C-7 (213,0); C-8 (57,8); C-9 (54,9); C-16 (153,4)	H-15 <sub>ax</sub> (3,21)
H-15 <sub>ax</sub> (3,21)	C-7 (213,0)	C-8 (57,8); C-9 (54,9)	-
H-15 <sub>eq</sub> (1,97)	C-7 (213,0)	C-8 (57,8)	-
H-17 <sub>a</sub> (4,87)	-	-	-
H-17 <sub>b</sub> (4,85)	-	-	-
H-18 (1,26)	-	-	-
H-20 (1,16)	-	C-9 (54,9)	-

-: não observado.

Figura 66. Mapa de contornos HMBC de EXS FD/F2/F26/F2/F1/RC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

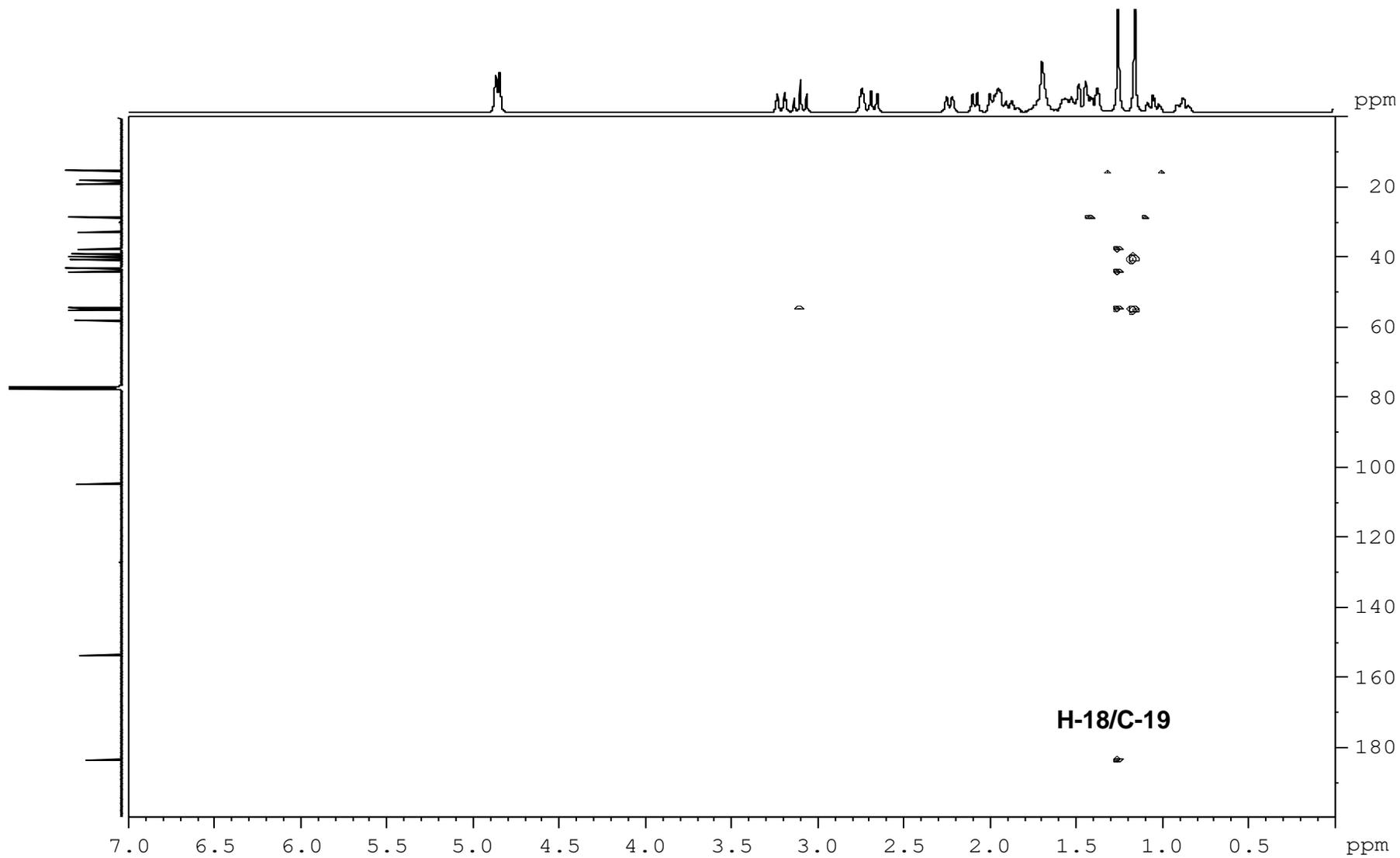
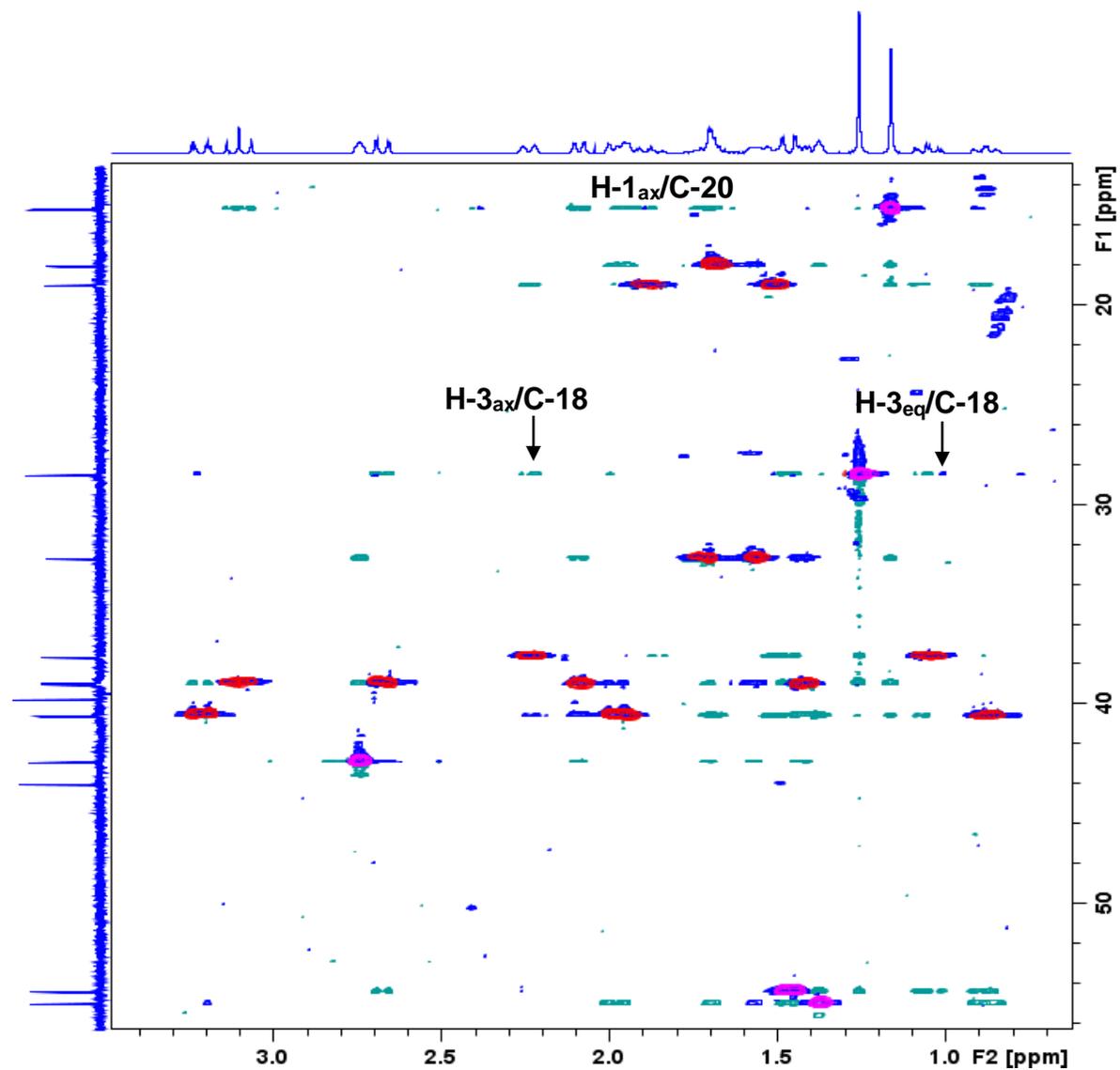
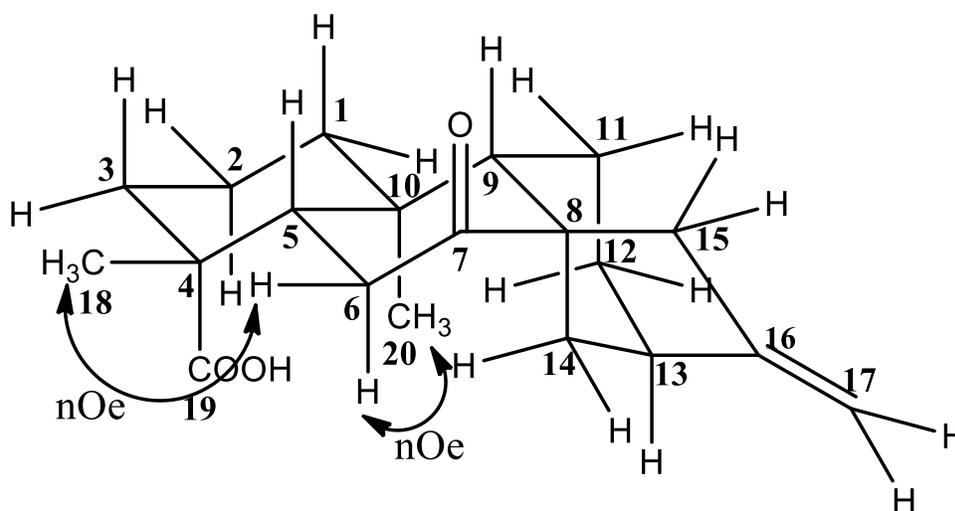


Figura 67. Mapa de contornos HMBC de EXS FD/F2/F26/F2/F1/RC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>). Expansão compreendida entre 0,0 e 3,5 ppm para <sup>1</sup>H e 0,0 e 60 ppm para <sup>13</sup>C.



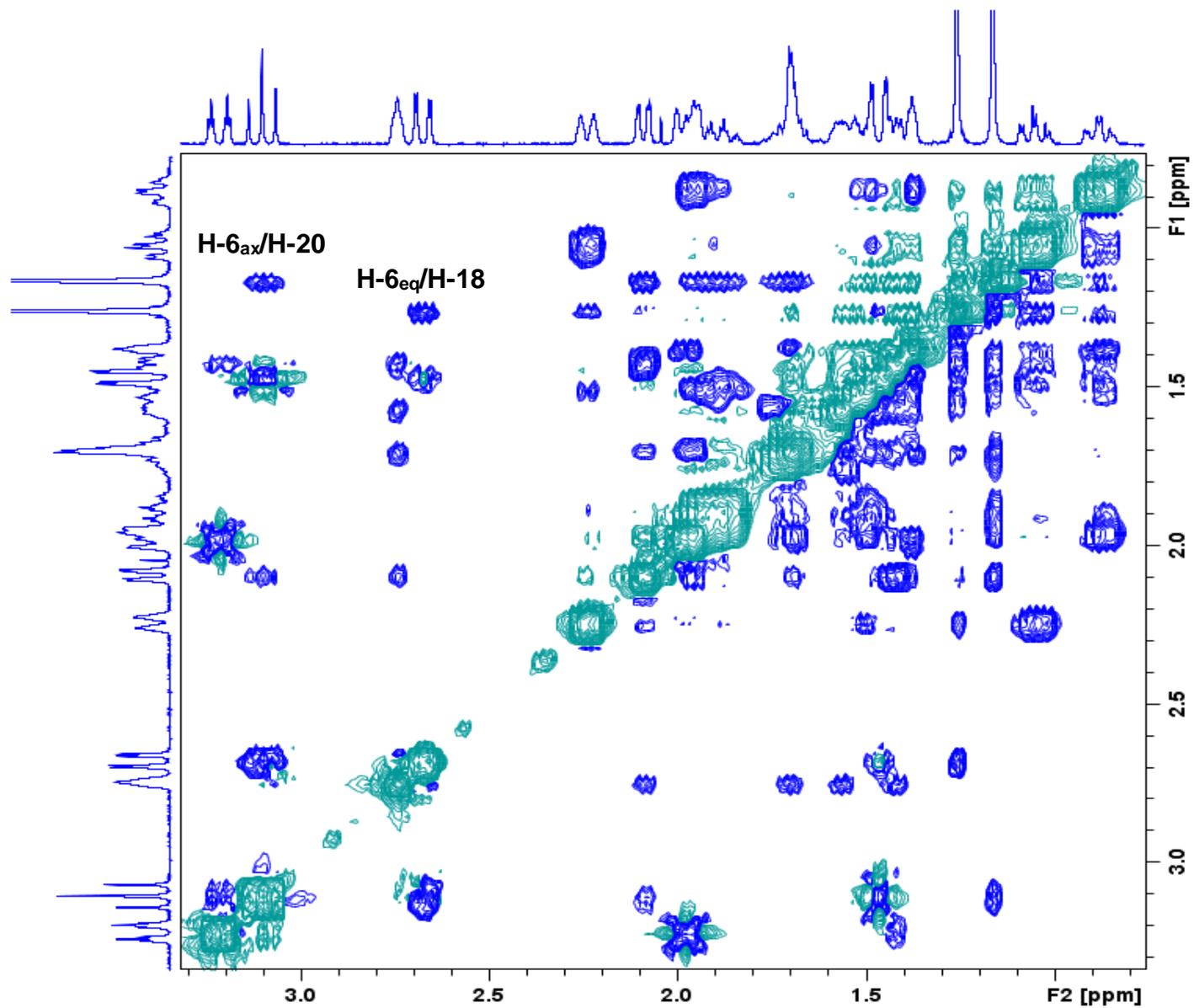
A configuração absoluta de EXS FD/F2/F26/F2/F1/RC (C-4) (Figura 68) foi estabelecida via NOESY, que evidenciou que os grupos C-18 e C-19 se encontram nas posições equatorial e axial, respectivamente (Tabela 19) (Figura 68). Notadamente as posições de H-6<sub>ax</sub> e H-6<sub>eq</sub> foram decisivas para esse assinalamento. O mapa de contornos ampliado NOESY exibe as correlações entre H-6<sub>eq</sub>/C-18 e H-6<sub>ax</sub>/C-19 (Figura 69).

Figura 68. Estrutura tridimensional de EXS FD/F2/F26/F2/F1/RC (ácido 7-oxo-*ent*-caur-16-en-19-oico).



Assim, o composto EXS FD/F2/F26/F2/F1/RC foi identificado como sendo o ácido 7-oxo-*ent*-caur-16-en-19-oico, sendo pela primeira vez descrito de forma inequívoca para a espécie de *Xylopi*a *sericea*. Os experimentos de RMN 2D e NOESY que permitiram definir a configuração em C-4 são aqui relatados pela primeira vez para a substância.

Figura 69. Mapa de contornos NOESY de EXS FD/F2/F26/F2/F1/RC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



#### 6.5.1.2. Fracionamento de EXS DCM FD/F7

Além do fracionamento de EXS FD/F2 foi realizado ainda o fracionamento cromatográfico de EXS FD/F7, uma vez que esta fração se mostrou muito ativa contra o *P. falciparum* (W2) (Figura 70). Observa-se que 6 frações obtidas de EXS FD/F7 apresentaram atividade antiplasmódica com redução de crescimento do parasito maior que 50% na concentração 50 µg/mL, sendo que em 3 frações houve aumento da atividade antiplasmódica (EXS FD/F7/F3, EXS FD/F7/F9 e EXS FD/F7/F20), não sendo, contudo, significativamente maior do que EXSFD/F7 (Figura 70). Cromatogramas das frações EXS FD/F7/F3, EXS FD/F7/F9 e EXS FD/F7/F20 não mostram picos intensos, ao contrário da fração EXS FD/F7, que apresenta os picos com TR 8,92 e 9,57 min (Figura 71). O pico mais intenso no cromatograma de EXS FD/F7 (TR 9,44 min) é referente a contaminação com ftalato ou derivados.

Figura 70. Atividade antiplasmódica de EXS FD/F7 e frações obtidas de colunas cromatográficas.

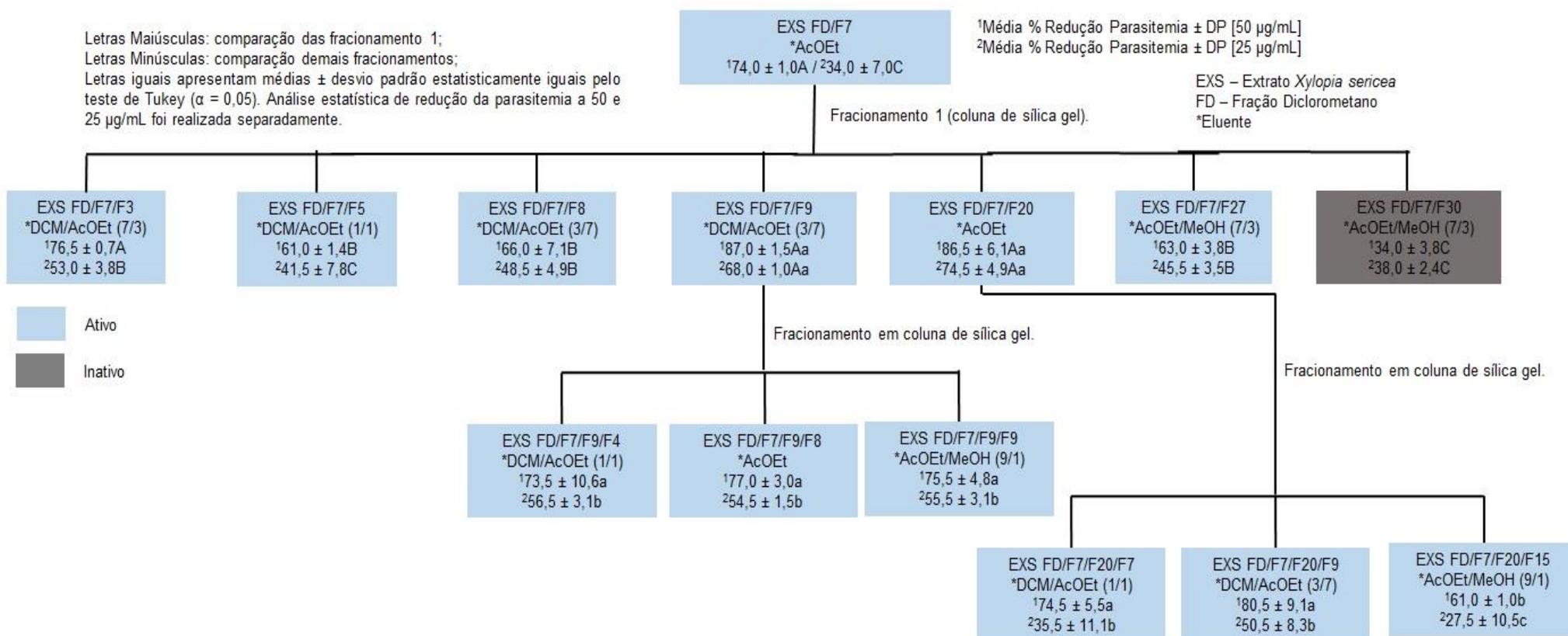
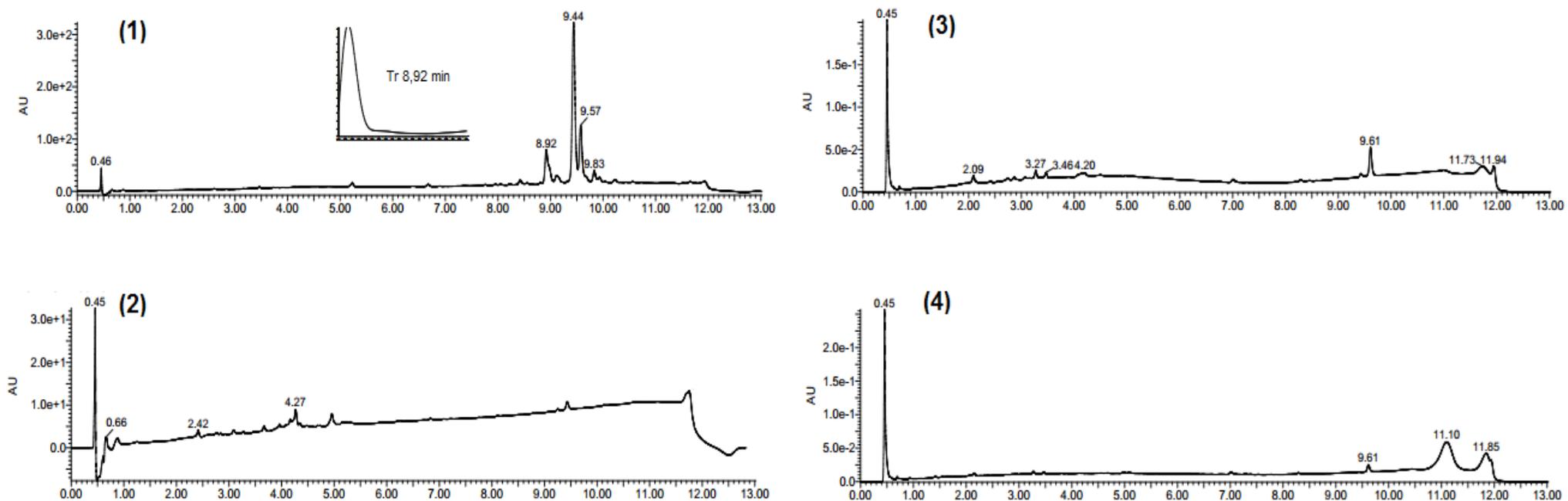


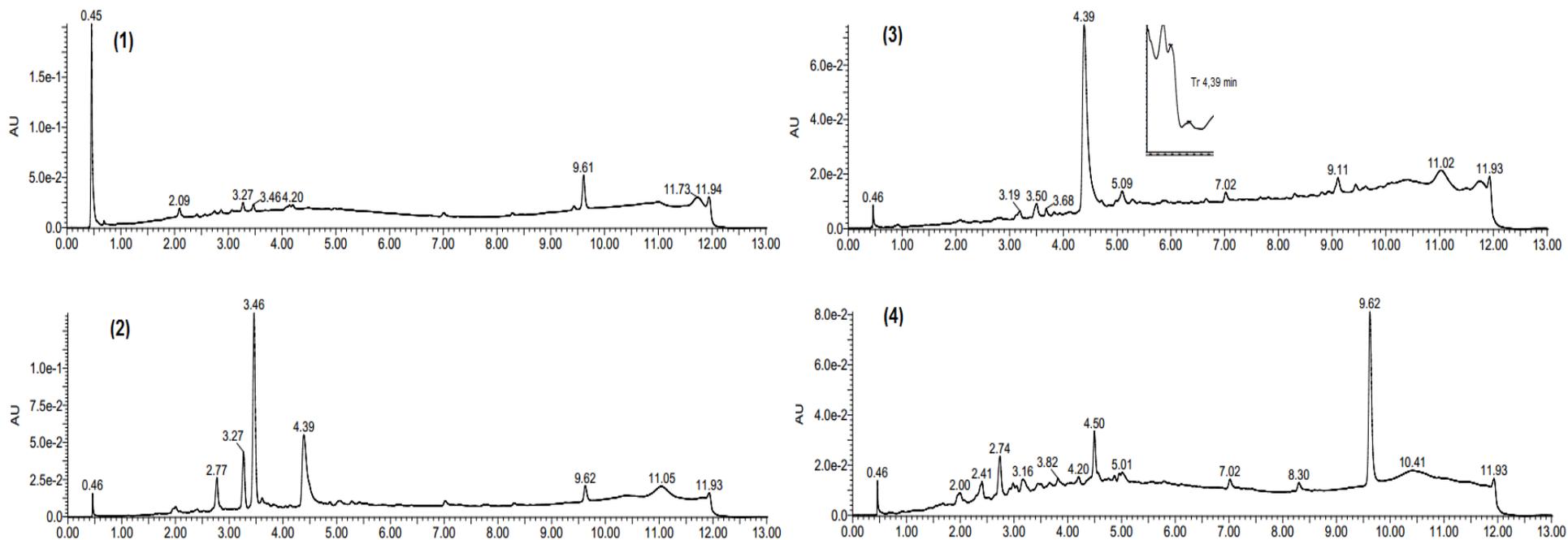
Figura 71. Cromatogramas (UPLC-DAD) de EXS FD/F7 (1), EXS FD/F7/F3 (2), EXS FD/F7/F9 (3) e EXS FD/F7/F20 (4), a 220 nm. Condições cromatográficas: eluente H<sub>2</sub>O + 0,1% HCOOH/ACN + 0,1% HCOOH; 5 – 95% ACN de 0 a 10 min; 95% ACN de 10 a 11 min; 5% ACN de 11 a 13 min. EXS – *Xylopiya sericea*.



Uma vez verificado o aumento de atividade antiplasmódica para as frações EXS FD/F7/F9 e EXS FD/F7/F20 foi realizado fracionamento em coluna para tais frações, não sendo observado aumento significativo para nenhuma das novas frações originárias de EXS FD/F7/F9 (EXS FD/F7/F9/F4, EXS FD/F7/F9/F8 e EXS FD/F7/F9/F9), assim como para as frações obtidas de EXS FD/F7/F20 (EXS FD/F7/F20/F7, EXS FD/F7/F20/F9 e EXS FD/F7/F20/F15) (Figura 70).

O cromatograma de EXS FD/F7/F9/F4 mostra picos intensos com TR 3,46 e 4,39 min e espectro no UV referente a alcaloides da subclasse aporfínicos/oxoaporfínicos (Sangster & Stuart, 1964). Alcaloides oxoaporfínicos, como oxofoebina e liriodenina, dentre outros, já foram isolados de *X. aethiopica* (Harrigan et al., 1994). Para EXS FD/F7/F9/F8 observa-se pico bastante intenso com TR 4,39 min, o mesmo visto em EXS FD/F7/F9/F4 (Figura 72). A presença dos picos TR 3,46 e 4,39 min nas frações ativas EXS FD/F7/F9/F4 e EXS FD/F7/F9/F8 indicam que alcaloides devem estar diretamente relacionados com a atividade antiplasmódica observada (Figura 70). Diferentes alcaloides do tipo aporfínicos já foram avaliados para atividade antiplasmódica (Graziose et al., 2011). O alcaloide oxoaporfínico liriodenina apresentou atividade *in vitro* pelo teste pLDH frente as cepas cloroquina sensível D10 e cloroquina resistente Dd2 de *P. falciparum* (IC<sub>50</sub> 4,1 ± 1,0 µg/mL e IC<sub>50</sub> 7,9 ± 1,1 µg/mL, respectivamente), além de CC<sub>50</sub> 8,1 ± 0,1 µg/mL frente a células CHO (Chinese Hamster Ovarian) pelo teste do MTT (Graziose et al., 2011).

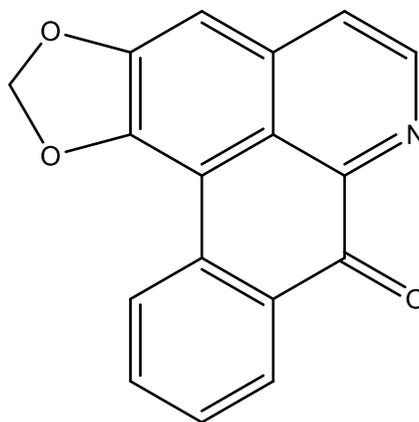
Figura 72. Cromatogramas (UPLC-DAD) de EXS FD/F7/F9 (1), EXS FD/F7/F9/F4 (2), EXS FD/F7/F9/F8 (3) e EXS FD/F7/F9/F9 (4), a 220 nm. Condições cromatográficas: eluente H<sub>2</sub>O + 0,1% HCOOH/ACN + 0,1% HCOOH; 5 – 95% ACN de 0 a 10 min; 95% ACN de 10 a 11 min; 5% ACN de 11 a 13 min. EXS – *Xylopia sericea*.



Dados de fragmentação MS/MS do composto com TR 4,37 min (Tabela 20), corroboram com a identificação do composto liriodenina (Silva et al., 2014). O pico  $m/z$  248,00  $[M + H - 28]^+$  (10) aponta a perda de um grupo CO (28 u.m.a.) em relação ao bico do ion molecular e pico base  $m/z$  276,01. Outra perda de CO é vista no pico  $m/z$  220,09  $[M + H - 56]^+$  (10), em relação ao pico  $m/z$  248,00. Ainda em relação ao pico  $m/z$  248,00 pode ser vista a perda de  $CH_2O$  (30 u.m.a.) através do pico  $m/z$  217,95  $[M + H - 58]^+$  (20).

Uma vez observada a também presença de liriodenina em espécies de *Xylopi*a, foi realizada análise com as frações EXS FD/F7/F9/F4 e EXS FD/F7/F9/F8 via CCD e UPLC-DAD-ESI-MS/MS em comparação com uma amostra autêntica de liriodenina. Dados comparativos de UV, TR e fragmentação por ESI-MS/MS sugerem que o pico em TR 4,39 min observado nas duas frações corresponde ao composto liriodenina ( $C_{17}H_9NO_3$ ) (Figura 73) (Tabela 20). Já a análise por UPLC-DAD-ESI-MS/MS do pico TR 4,37 min de EXS FD/F7/F9/F4 indica também a presença da liriodenina (Figura 73).

Figura 73. Estrutura do alcaloide liriodenina.



Dados de UPLC-DAD-ESI-MS/MS do composto com TR 3,46 min, verificado tanto na fração EXS FD/F7/F9/F4 quanto na fração EXS FD/F7/F9/F7 são apresentados na Tabela 20. Contudo, este composto não foi identificado.

Tabela 20. Dados espectroscópicos e caracterização de constituintes de EXS FD/F7/F9/F4, EXS FD/F7/F9/F8, amostra autêntica de liriodenina, EXS FD/F7/F20/F7, EXS FD/F7/F20/F9 e EXS FD/F7/F20/F15 por UPLC-DAD-ESI-MS/MS, ionização positiva.

Fração/ Substância	TR (min)	$\lambda_{max}$ (nm)	[M + H] <sup>+</sup> (%)	MS/MS <sup>+</sup> (%)	Identificação (Fórmula Molecular)
EXS FD/F7/F9/F4	3,46	223 262	333,44 [M + H] <sup>+</sup> (15)	315,61 [M + H - 18] <sup>+</sup> (10), 287,38 [M + H - 46] <sup>+</sup> (30), 265,36 [M + H - 68] <sup>+</sup> (25), 247,33 [M + H - 86] <sup>+</sup> (100), 229,36 [M + H - 104] <sup>+</sup> (33), 221,20 [M + H - 112] <sup>+</sup> (25)	NI
EXS FD/F7/F9/F4 EXS FD/F7/F9/F8	4,37	221 255 275 326	276,01 [M + H] <sup>+</sup> (100)	248,09 [M + H - 28] <sup>+</sup> (10), 220,04 [M + H - 56] <sup>+</sup> (10), 218,15 [M + H - 58] <sup>+</sup> (21), 192,00 [M + H - 84] <sup>+</sup> (8), 189,98 [M + H - 86] <sup>+</sup> (13)	liriodenina (C <sub>17</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>3</sub> )
Amostra autêntica de liriodenina	4,41	221 255 275 326	275,98 [M + H] <sup>+</sup> (100)	248,00 [M + H - 28] <sup>+</sup> (10), 220,09 [M + H - 56] <sup>+</sup> (10), 217,95 [M + H - 58] <sup>+</sup> (20), 192,11 [M + H - 84] <sup>+</sup> (8), 189,91 [M + H - 86] <sup>+</sup> (18)	liriodenina (C <sub>17</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>3</sub> )
	3,47	223 262	333,27 [M + H] <sup>+</sup> (25)	-	NI
EXS FD/F7/F20/F7	4,39	221 255 275 326	275,93 [M + H] <sup>+</sup> (100)	-	liriodenina (C <sub>17</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>3</sub> )
EXS FD/F7/F20/F9	4,39	221 255 275 326	275,98 [M + H] <sup>+</sup> (100)	-	liriodenina (C <sub>17</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>3</sub> )
	8,96	220	625,42 [M + H] <sup>+</sup> (100)	607,19 [M + H - 18] <sup>+</sup> (14), 581,20 [M + H - 44] <sup>+</sup> (15), 565,09 [M + H - 60] <sup>+</sup> (44), 538,07 [M + H - 87] <sup>+</sup> (90), 521,39 [M + H - 104] <sup>+</sup> (23), 503,03 [M + H - 122] <sup>+</sup> (22), 465,49 [M + H - 160] <sup>+</sup> (25), 111,08 [M + H - 514] <sup>+</sup> (5)	-
EXS FD/F7/F20/F15	9,11	220	609,38 [M + H] <sup>+</sup> (100)	591,29 [M + H - 18] <sup>+</sup> (18), 577,49 [M + H - 32] <sup>+</sup> (5), 559,47 [M + H - 40] <sup>+</sup> (17), 550,08 [M + H - 59] <sup>+</sup> (5), 531,12 [M + H - 78] <sup>+</sup> (25), 515,55 [M + H - 94] <sup>+</sup> (6), 485,06 [M + H - 124] <sup>+</sup> (5)	-

(%): Abundância relativa. NI: Não Identificado.

Como mostrado anteriormente, as frações obtidas de EXS FD/F7/F20 (EXS FD/F7/F20/F7 e EXS FD/F7/F20/F9) também não tiveram aumento significativo de redução de parasitemia em relação a fração original EXS FD/F7/F20, sendo, contudo, também ativas (Figura 70). Análise dos cromatogramas das frações oriundas de EXS FD/F7/F20 também mostram picos majoritários (Figura 74). Dados de UPLC-DAD-ESI-MS/MS de FD/F7/F20/F7 e EXS FD/F7/F20/F9 apontam que os picos majoritários correspondem a alcaloides aporfínicos, como a liriodenina, já identificada nas frações FD/F7/F9/F4 e EXS FD/F7/F9/F8, corroborando com a atividade antiplasmódica similar entre as frações citadas (Figura 70, Figura 73 e Tabela 20).

A parasitemia vista para EXS FD/F7/F20/F15 apresentou diminuição significativa quando comparada as frações EXS FD/F7/F20, EXS FD/F7/F20/F7 e EXS FD/F7/F20/F9. Análise de UV, TR e pico do ion molecular de EXS FD/F7/F20/F15 obtido por UPLC-DAD-ESI-MS/MS fornece indícios que os picos majoritários encontrados na fração podem ser referentes a acetogeninas (Tabela 20). Sabe-se que essa classe de produtos naturais ocorre frequentemente em espécies de *Xylopi*a (Colman-Saizabitoria et al., 1994, Alfonso et al., 1996), apresentando diferentes atividades biológicas, incluindo potente ação antiplasmódica (Rakotomanga et al., 2004). Diferentes tipos de acetogeninas são relatados, sendo esta uma classe com grande diversidade estrutural (Paes et al., 2016). Análise de fragmentos de massas por impacto eletrônico do isômero 624 u.m.a. da acetogenina annomontacina (Figura 75) apresentou padrões de fragmentação como frequente perda de 16 e 18 u.m.a., relativos a hidroxilas, perda do anel lactônico (111 u.m.a.) além de quebras nas posições adjacentes ao anel furano (Jossang et al., 1991). Esses dados corroboram com os valores de  $m/z$  observados para o pico com TR 8,96 min de EXS FD/F7/F20/F15, podendo ser esta a substância responsável pelo pico com TR 8,96. A fragmentação do anel lactônico, característico de acetogeninas, pode ser observada pela presença do pico  $m/z$  581,20  $[M + H - 44]^+$  (15), resultante da perda de um grupo acetoxila. Dados obtidos dos picos majoritários de EXS FD/F7/F20/F15 mostram picos do ion molecular diferindo em 16 u.m.a., para  $m/z$  625,42 (TR 8,96 min) e  $m/z$  609,38 (TR 9,11 min), apontando a presença de uma hidroxila a mais para o constituinte de menor tempo de retenção (Tabela 20). Assim, a substância de TR 9,11 min poderia ser a 4-desoxi-annomontacina (Paes et al., 2016).

Figura 74. Cromatogramas (UPLC-DAD) de EXS FD/F7/F20 (1), EXS FD/F7/F20/F7 (2), EXS FD/F7/F20/F9 (3) e EXS FD/F7/F20/F15 (4), a 220 nm. Condições cromatográficas: eluente H<sub>2</sub>O + 0,1% HCOOH/ACN + 0,1% HCOOH; 5 – 95% ACN de 0 a 10 min; 95% ACN de 10 a 11 min; 5% ACN de 11 a 13 min. EXS – *Xylopiya sericea*.

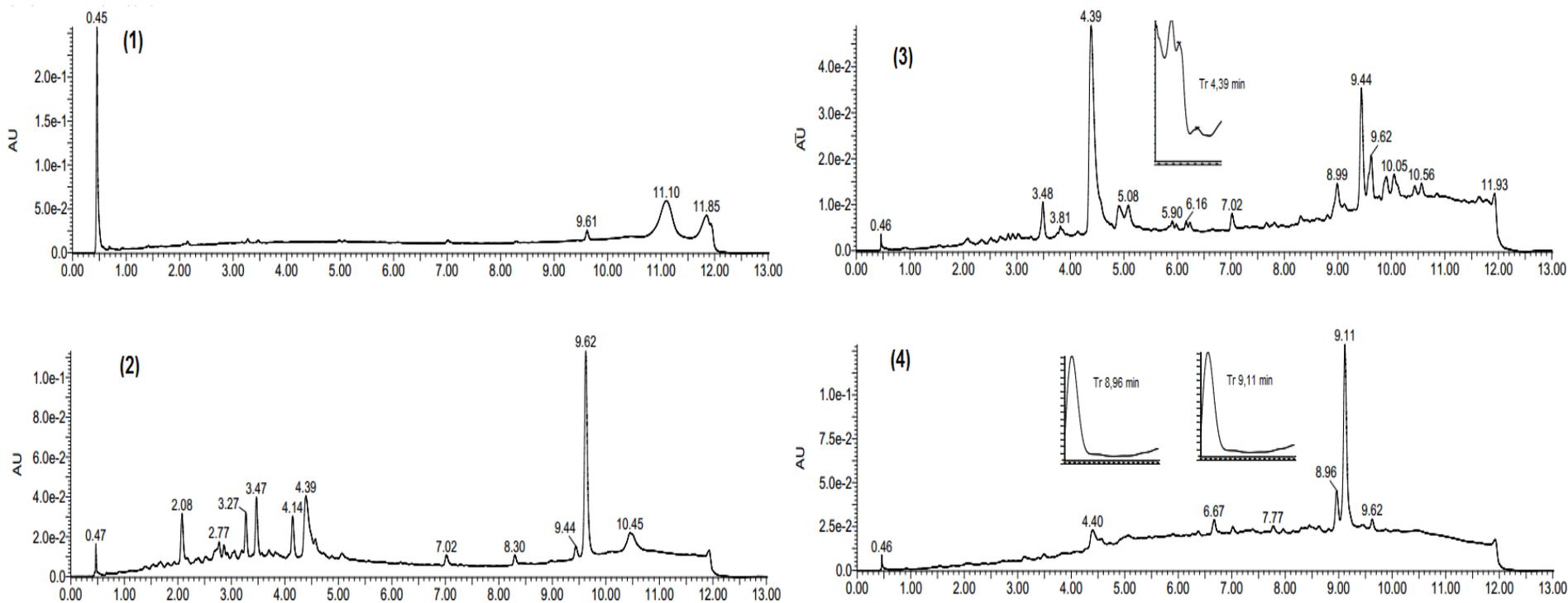
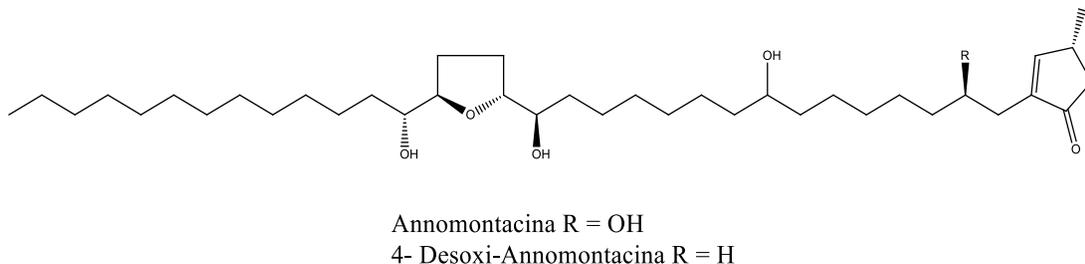


Figura 75. Estrutura das acetogeninas annomontacina e 4-desoxi-annomontacina.



Uma vez que os compostos constituintes da fração EXS FD/F7/F20/F15 foram identificados, foi calculado o IC<sub>50</sub> e CC<sub>50</sub> da fração, obtendo-se 22,7 ± 1,9 µg/mL e 336,1 ± 15,5 µg/mL, respectivamente. Assim, o IS da fração EXS FD/F7/F20/F15 foi calculado, apresentando IS 14,8 com moderada seletividade de ação.

#### 6.5.2. Fracionamento e Atividade antiplasmódica do extrato etanólico de *Xylopiya sericea* Coleta 2

##### 6.5.2.1. Caracterização fitoquímica por UPLC-DAD-ESI-MS/MS do extrato etanólico de *Xylopiya sericea* Coleta 2 (EXS EtOH)

O extrato etanólico de *X. sericea* Coleta 2 apresentou alta redução da parasitemia (65,5 ± 15,0 % a 25 µg/mL e 86,5 ± 13,0 % a 50 µg/mL) e alta citotoxicidade (CC<sub>50</sub> 72,1 ± 5,1 µg/mL). A Figura 50 mostra o perfil cromatográfico de EXS EtOH Coleta 2 e a partir dos espectros no UV on-line pode-se verificar que nesta fração predominam compostos flavônicos. A Tabela 21 apresenta os fragmentos ESI-MS/MS no modo de ionização negativo, assim como o tempo de retenção e UV de 9 diferentes compostos observados no extrato etanólico EXS Coleta 2 (Figura 16, Pág. 53 e Figura 50, Pág. 120). O cromatograma de EXS EtOH Coleta 2 (Figura 50) mostra os picos mais intensos para 4 (TR 2,89 min) e 5 (TR 2,99 min) e, portanto, sendo estes flavonoides majoritários no extrato. Abaixo é apresentada a discussão da identificação dos constituintes do extrato.

Composto 1: O espectro no UV é característico de flavonóis. O pico base corresponde a  $m/z$  301,28 [M – H – 162]- aponta a perda de um resíduo de glicose (162 u.m.a.) em relação ao pico do ion molecular  $m/z$  463,58, assim como aponta para a genina quercetina. Os picos  $m/z$  190,77 [M – H – 272]- (30%) e  $m/z$  151,32 [M – H – 312]- (16%) correspondem a fragmentação do anel heterocíclico e RDA também do anel heterocíclico da quercetina, respectivamente (Figura 18). Dessa forma, o composto 1 foi identificado como quercetina-3-O-glicosídeo, conhecida como isoquercetrina ( $C_{21}H_{20}O_{12}$ ) (Figura 76).

Composto 2: O espectro no UV é característico de flavonóis. O pico base corresponde a  $m/z$  301,13 [M – H – 294]- aponta a perda de um resíduo de glicose (162 u.m.a.) e um resíduo de pentose (132 u.m.a.) em relação ao pico do ion molecular  $m/z$  595,25, assim como para a genina de quercetina. Assim, o composto 2 foi identificado como quercetina-3-O-glicosilpentosídeo ( $C_{26}H_{28}O_{16}$ ) (Figura 76).

Composto 3: O espectro no UV é característico de flavonóis. O pico base corresponde a  $m/z$  579,30 é também o pico do ion molecular. O pico  $m/z$  285,00 [M – H – 294]- (71%) aponta a perda de um resíduo de glicose (162 u.m.a.) e um resíduo de pentose (132 u.m.a.), assim como para a genina canferol. O pico  $m/z$  417,44 [M – H – 162]- (18%) mostra a perda do resíduo de glicose. Assim, o composto 3 foi identificado como canferol-3-O-glicosilpentosídeo ( $C_{26}H_{28}O_{15}$ ) (Figura 76).

Composto 4: O espectro no UV é característico de flavonóis. O pico base corresponde a  $m/z$  301,35 [M – H – 264]- aponta a perda de dois resíduos de pentose (132 u.m.a.) em relação ao pico do ion molecular  $m/z$  565,04, assim como para a genina quercetina. O pico  $m/z$  151,07 [M – H – 414]- (13%) mostra fragmentação RDA do anel heterocíclico (Figura 18). Assim, o composto 4 foi identificado como quercetina-3-O-dipentosídeo ( $C_{25}H_{26}O_{15}$ ) (Figura 76).

Composto 5: O espectro no UV é característico de flavonóis. O pico base corresponde a  $m/z$  301,26 [M – H – 278]- aponta a perda de um resíduo de ramnose (146 u.m.a.) e um resíduo de pentose (132 u.m.a.) em relação ao pico do ion molecular  $m/z$  578,98, assim

como para a genina quercetina. O pico  $m/z$  433,23 [M – H – 146]- (18%) confirma a perda de ramnose. Assim, o composto 5 foi identificado como quercetina-3-O-pentosilramnosideo ( $C_{26}H_{28}O_{15}$ ) (Figura 76).

Composto 6: O espectro no UV é característico de flavonóis. O pico base corresponde a  $m/z$  447,19 [M – H – 132]- aponta a perda de resíduo de pentose em relação ao pico do ion molecular  $m/z$  579,22. O pico  $m/z$  181,47 [M – H – 398]- (31%) aponta a fragmentação do anel heterocíclico de flavonoides. A diferença entre o pico  $m/z$  447,19 e uma genina de quercetina (146 u.m.a) indica a presença de resíduo de ramnose. Como foi visto o sinal referente a perda de pentose, o composto 6 foi identificado como quercetina-3-O-ramnosilpentosideo ( $C_{26}H_{28}O_{15}$ ) (Figura 76).

Composto 7: O espectro no UV é característico de flavonóis. O pico base corresponde a  $m/z$  301,14 [M – H – 146]- aponta a perda de um resíduo de ramnose em relação ao pico do ion molecular  $m/z$  447,07, assim como para a genina quercetina. O pico  $m/z$  150,88 [M – H – 297]- (8%) mostra fragmentação RDA do anel heterocíclico. Dessa forma, o composto 7 foi identificado como quercetina-3-O-ramnosideo ( $C_{21}H_{20}O_{11}$ ), conhecido como quercitrina (Figura 76).

Composto 8: O espectro no UV é característico de flavonóis. O pico base corresponde a  $m/z$  285,06 [M – H – 264]- aponta a perda de dois resíduos de pentose em relação ao pico do ion molecular  $m/z$  549,26, assim como para a genina canferol. Dessa forma, o composto 8 foi identificado como canferol-3-O-dipentosideo ( $C_{25}H_{26}O_{14}$ ) (Figura 76).

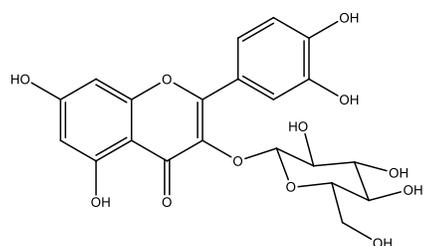
Composto 9: O espectro no UV é característico de flavonóis. O pico base corresponde a  $m/z$  285,10 [M – H – 132]- aponta a perda de um resíduo de pentose em relação ao pico do ion molecular  $m/z$  416,95, assim como para a genina canferol. Dessa forma, o composto 9 foi identificado como canferol-3-O-pentosideo ( $C_{20}H_{18}O_{10}$ ) (Figura 76).

Tabela 21. Dados espectroscópicos e caracterização das substâncias presentes no extrato etanólico de *Xylopi sericea* Coleta 2 por UPLC-DAD-ESI-MS/MS.

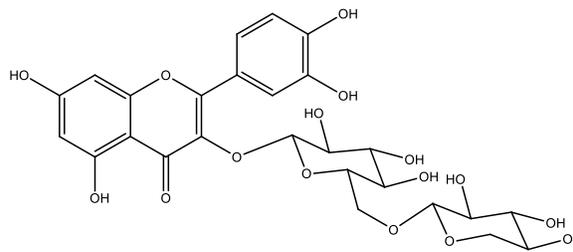
Composto	TR (min)	$\lambda_{max}$ (nm)	[M - H] – (%)	MS/MS – (%)	Identificação (Fórmula Molecular)
1	2,55	256 353	463,58 [M – H]- (5)	301,28 [M - H - 162]- (100), 190,77 [M - H - 272]- (30), 178,92 [M - H - 284]- (18), 151,32 [M - H - 312]- (16)	quercetina-3-O-glicosídeo (C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub> )
2	2,77	256 353	595,25 [M – H]- (73)	301,13 [M - H - 294]- (100)	quercetina-3-O-glicosilpentosídeo (C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> O <sub>16</sub> )
3	2,85	256 346	579,30 [M – H]- (100)	417,44 [M - H - 162]- (18), 285,00 [M - H - 294]- (71)	canferol-3-O-glicosilpentosídeo (C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> O <sub>15</sub> )
4	2,89	256 346	565,04 [M – H]- (92)	301,35 [M - H - 264]- (100), 177,24 [M - H - 388]- (5), 151,07 [M - H - 414]- (13)	quercetina-3-O-dipentosídeo (C <sub>25</sub> H <sub>26</sub> O <sub>15</sub> )
5	2,99	256 353	578,98 [M – H]- (40)	433,23 [M - H – 146]- (18), 301,26 [M - H - 278]- (100)	quercetina-3-O-pentosilramnosídeo (C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> O <sub>15</sub> )
6	3,06	256 346	579,22 [M – H]- (34)	447,19 [M - H - 132]- (100), 181,47 [M - H - 398]- (31)	quercetina-3-O-ramnosilpentosídeo (C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> O <sub>15</sub> )
7	3,17	256 345	447,07 [M – H]- (8)	301,14 [M - H - 146]- (100), 179,05 [M - H - 268]- (20), 150,88 [M - H - 297]- (8)	quercetina-3-O-ramnosídeo (C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub> )
8	3,20	266 345	549,26 [M – H]- (21)	285,06 [M - H – 264]- (100)	canferol-3-O-dipentosídeo (C <sub>25</sub> H <sub>26</sub> O <sub>14</sub> )
9	3,33	266 345	416,95 [M – H]- (18)	285,10 [M - H - 132]- (100)	canferol-3-O-pentosídeo (C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>10</sub> )

(%): Abundância relativa.

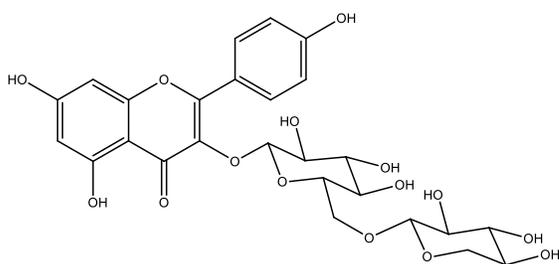
Figura 76. Estruturas das substâncias identificadas no extrato etanólico de *Xylopia sericea* Coleta 2 por UPLC-DAD-ESI-MS/MS.



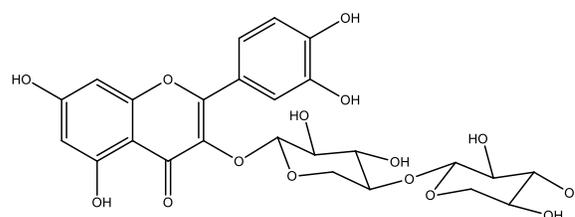
1 Quercetina-3-*O*-glicosídeo



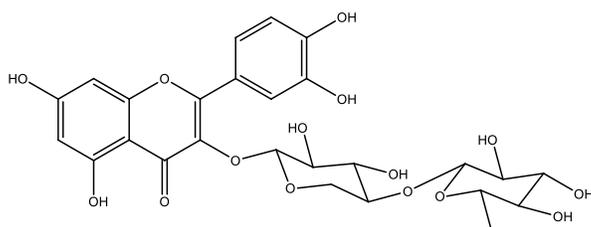
2 Quercetina-3-*O*-glicosilpentosídeo



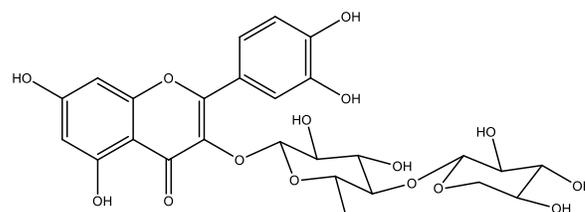
3 Canferol-3-*O*-glicosilpentosídeo



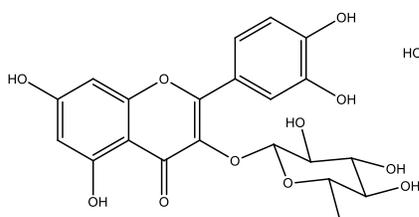
4 Quercetina-3-*O*-dipentosídeo



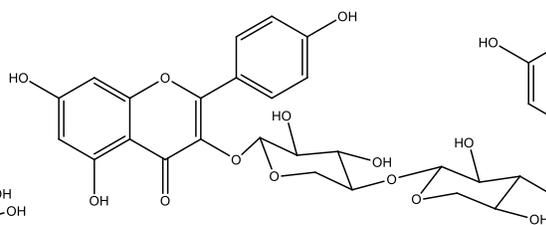
5 Quercetina-3-*O*-pentosilramnosídeo



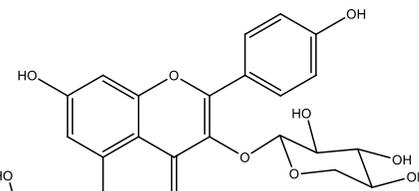
6 Quercetina-3-*O*-ramnosilpentosídeo



7 Quercetina-3-*O*-ramnosídeo



8 Canferol-3-*O*-dipentosídeo



9 Canferol-3-*O*-pentosídeo

A maioria dos trabalhos referentes a espécies de *Xylopi*a apresenta estudos relacionados a diterpenos e alcaloides. Contudo, alguns flavonoides já foram identificados e isolados de folhas de *X. arom*atica, sendo descritos heterosídeos de quercetina e canferol, estando as geninas frequentemente ligadas a resíduos de arabinose e ramnose (Martins, 1996).

#### 6.5.2.2. Fracionamento de EXS EtOH Coleta 2

Uma vez conhecida a presença de acetogeninas em extratos etanólicos de *Xylopi*a, e já identificadas na fração EXS FD/F7/F20/F15 ( $IC_{50}$  22,7  $\pm$  1,9  $\mu$ g/mL,  $CC_{50}$  336,1  $\pm$  15,5  $\mu$ g/mL e IS 14,8), EXS EtOH Coleta 2 foi então submetido a fracionamento monitorado para esses metabólitos, segundo Garcia (2000). A Figura 77 mostra o fracionamento de EXS EtOH Coleta 2, assim como a atividade antiplasmódica do extrato e frações. Observa-se que após o fracionamento via partição  $CHCl_3/H_2O$  (1/1) houve diminuição significativa da atividade antiplasmódica, tendo a fração EXS EtOH Fr.  $HCCl_3$  a melhor atividade dentre as frações obtidas. Após nova partição ainda segundo Garcia (2000), obteve-se a fração EXS EtOH MeOH/ $H_2O$  (9/1) que apresentou atividade antiplasmódica estatisticamente igual àquela da fração de origem (EXS EtOH Fr.  $CHCl_3$ ). A Figura 78 apresenta o cromatograma da fração EXS EtOH MeOH/ $H_2O$  (9/1) na qual era esperada a presença de acetogeninas. Análise do cromatograma por UPLC-DAD não mostra a presença destas. Assim, EXS EtOH MeOH/ $H_2O$  (9/1) foi então fracionada via marcha química ácido/base com intuito da obtenção de alcaloides identificados por CCD nesta fração e já detectados em EXS DCM Coleta 2, além de fracionamento em coluna de sílica gel (Figura 77). Observa-se que o fracionamento via marcha química não resultou em aumento significativo da atividade antiplasmódica, sendo os valores de redução de parasitemia para as frações Alcaloides Neutros, Alcaloides 2<sup>o</sup>/3<sup>o</sup> e Alcaloides 4<sup>o</sup> estatisticamente iguais à fração originária (Figura 77). Apesar de não se observar aumento significativo quando comparado a EXS EtOH MeOH/ $H_2O$  (9/1), a fração Alcaloides 2<sup>o</sup>/3<sup>o</sup> foi cromatografada em coluna de sílica gel, sendo obtida a fração Alcaloides 2<sup>o</sup>/3<sup>o</sup>/F28 que apresentou aumento significativo da atividade antiplasmódica (Figura 77). Já o fracionamento de EXS EtOH MeOH/ $H_2O$  (9/1) via coluna sephadex LH-20 resultou em

frações com aumento significativo da atividade antiplasmódica, sendo observado para EXS FMA/F3 a maior atividade dentre as frações obtidas da coluna (Figura 77). Análise dos cromatogramas das frações com aumento de atividade antiplasmódica EXS FMA/F3 e Alcaloides 2<sup>o</sup>/3<sup>o</sup>/F28 mostra a presença de picos majoritários referentes a compostos alcaloídicos (Sangster & Stuart, 1964) (Figura 78).

Figura 77. Atividade antiplasmodica de EXS EtOH Coleta 2 e frações obtidas por partições líquido-líquido e colunas cromatográficas.

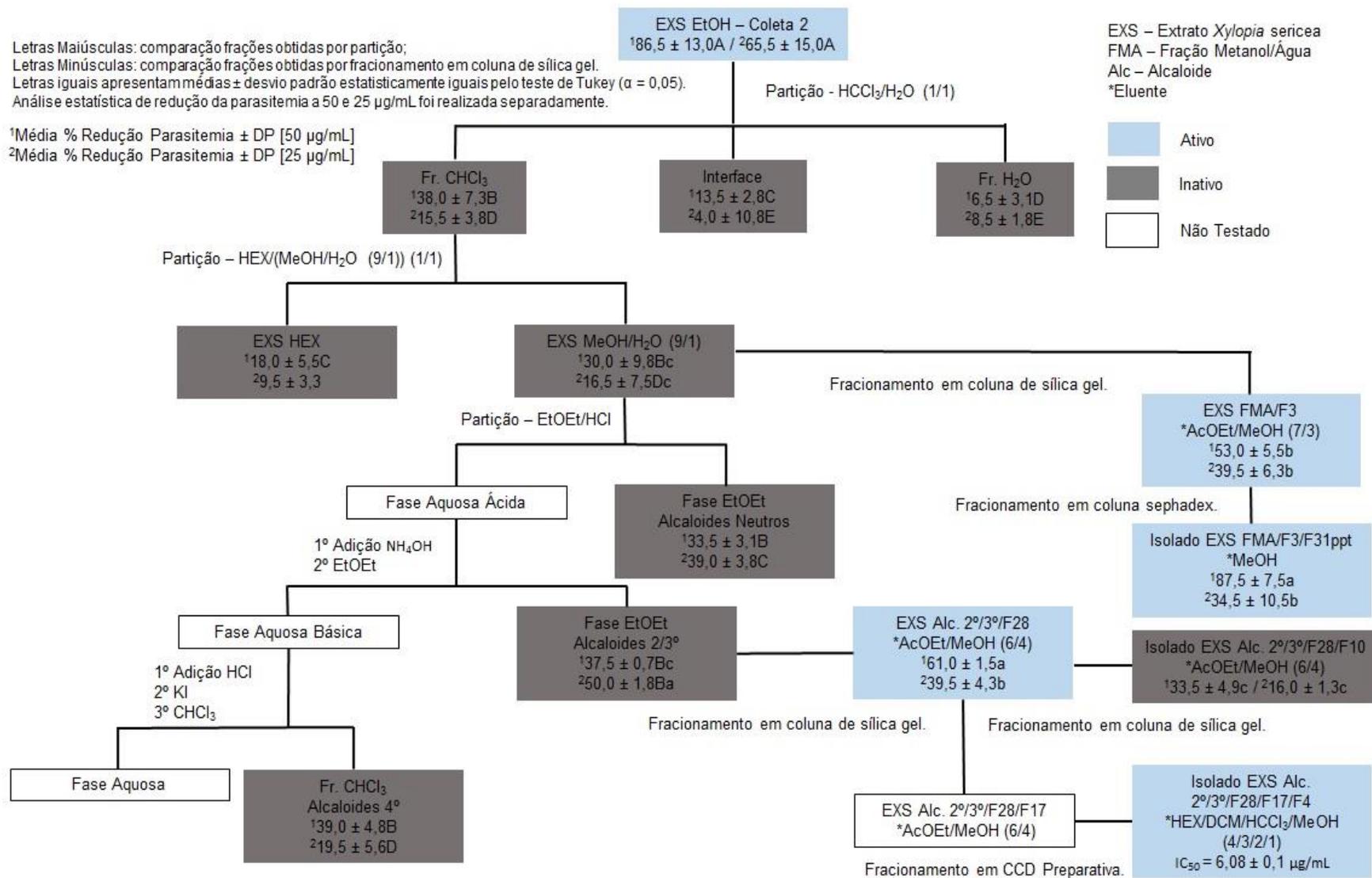
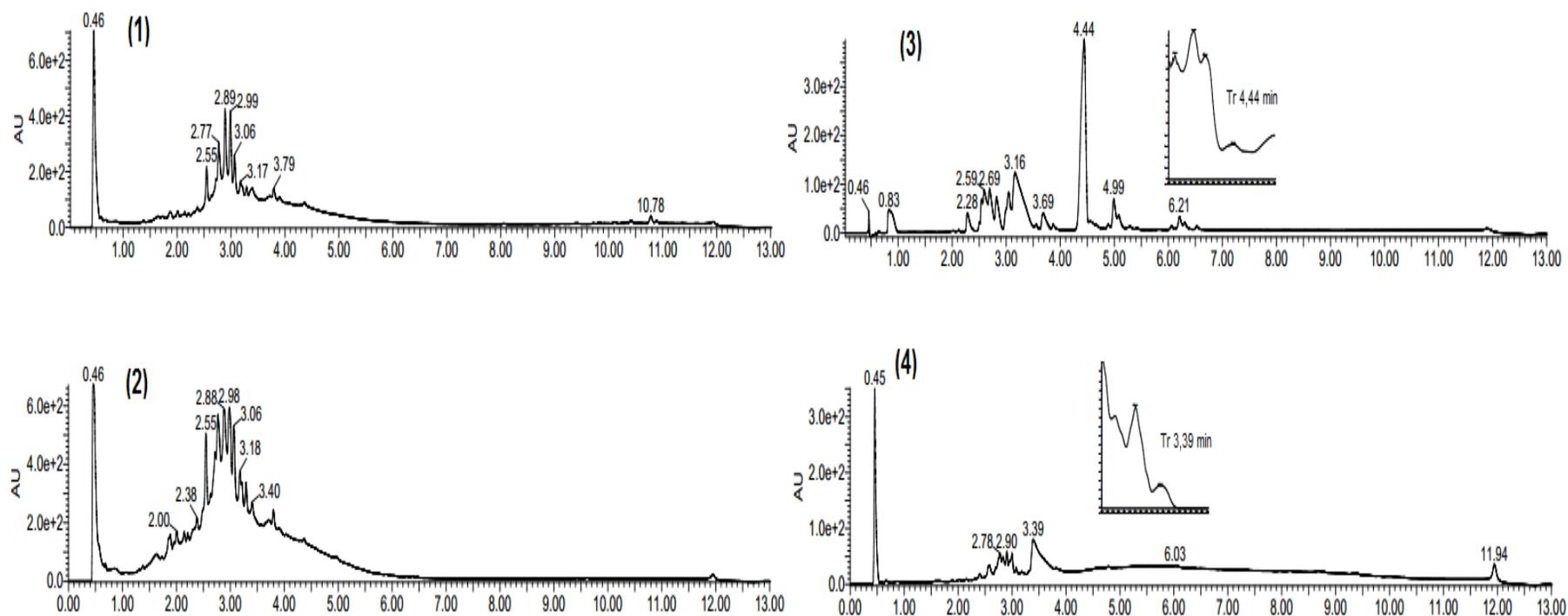


Figura 78. Cromatogramas (UPLC-DAD) de EXS EtOH (1), EXS EtOH MeOH/H<sub>2</sub>O (9/1) (2), Alcaloides 2°/3°/F28 (3) e EXS FMA/F3 (4), a 220 nm. Condições cromatográficas: eluente H<sub>2</sub>O + 0,1% HCOOH/ACN + 0,1% HCOOH; 5 – 95% ACN de 0 a 10 min; 95% ACN de 10 a 11 min; 5% ACN de 11 a 13 min. EXS – *Xylopia sericea*.



Após fracionamento em coluna de sílica gel da fração Alcaloides 2<sup>o</sup>/3<sup>o</sup>/F28 obteve-se a fração Alcaloides 2<sup>o</sup>/3<sup>o</sup>/F28/F17 com um pico majoritário TR 4,4 min que, após novo fracionamento por CCD preparativa permitiu o isolamento do Alcaloide 2<sup>o</sup>/3<sup>o</sup>/F28/F17/F4 (Figura 79), cuja análise por UPLC-DAD-ESI-MS/MS (Tabela 22) apresentou valores iguais para UV, TR e fragmentação MS/MS àqueles das frações EXS FD/F7/F9/F8 e EXS FD/F7/F20/F9, tendo, contudo, maior grau de pureza. Assim, comparação do Alcaloide 2<sup>o</sup>/3<sup>o</sup>/F28/F17/F4 e amostra autêntica de liriodenina, revelou a identificação de Alcaloide 2<sup>o</sup>/3<sup>o</sup>/F28/F17/F4 como o composto liriodenina (Figura 73). Dados de fragmentação MS/MS corroboram também com a identificação do composto liriodenina (Silva et al., 2014). O alto grau de pureza obtido para o Alcaloide 2<sup>o</sup>/3<sup>o</sup>/F28/F17/F4 justifica a sua alta atividade antiplasmódica frente a cepa de *P. falciparum* cloroquina-resistente W2 (IC<sub>50</sub> 6,1 ± 0,1 µg/mL). Além disso, ausência de citotoxicidade foi verificada em células HepG2, CC<sub>50</sub> ≥ 1000,0 µg/mL, indicando alto índice de seletividade para a liriodenina (IS > 164,47). Os dados estão de acordo com outros resultados em diferentes cepas de *P. falciparum* (Graziose et al., 2011), apontando o a liriodenina como potencial fitofármaco antimalárico. Apesar de já isolado de algumas espécies de *Xylopi*a, não foram encontrados trabalhos que relatam a presença da liriodenina em *X. sericea*.

Da fração Alcaloides 2<sup>o</sup>/3<sup>o</sup>/F28, foi obtido também o composto isolado (Alcaloides 2<sup>o</sup>/3<sup>o</sup>/F28/F10) com presença de pico majoritário TR 6,16 min (Figura 79). Análises por UPLC-DAD-ESI-MS/MS mostram pico do ion molecular de *m/z* 321,00 (Tabela 22). MS/MS do pico do ion molecular *m/z* 322,09 mostra a perda de CH<sub>3</sub> (15 u.m.a.) referente ao pico *m/z* 307,20 [M + H - 15]<sup>+</sup> (8), que perde outra metila (15 u.m.a.), obtendo-se o pico base *m/z* 292,09 [M + H - 30]<sup>+</sup> (100). Perda de outra metila pode ser vista em comparação com o pico base, *m/z* 277,03 [M + H - 44]<sup>+</sup> (10). O pico *m/z* 289,05 [M + H - 33]<sup>+</sup> (10), aponta a perda de uma metila (*m/z* 307,20) seguida de perda de uma molécula de H<sub>2</sub>O (18 u.m.a.). O pico *m/z* 306,05 [M + H - 16]<sup>+</sup> (10) aponta a perda de CH<sub>4</sub> (16 u.m.a.) em relação o pico do ion molecular. O pico *m/z* 288,12 [M + H - 34]<sup>+</sup> (40) aponta perda de uma molécula de H<sub>2</sub>O (18 u.m.a.) em relação ao pico *m/z* 306,05 [M + H - 16]<sup>+</sup> (10).

Dados da literatura sobre espécies de *Xylopi*a apontam para o alcaloide *O*-metilmoschatolina (Figura 80), com mesma massa molecular e estrutura correspondente aos dados de UV e fragmentação ESI/MS/MS obtidos (Harragan et al., 1994, Moreira et

al., 2005). A redução de parasitemia promovida pelo composto *O*-metilmoschatolina foi baixa, sendo menor do que fração originária Alcaloides 2º/3º/F28 (Figura 77) e  $CC_{50}$  em HepG2 ( $CC_{50}$  274,4 ± 0,5 µg/mL) indica moderada citotoxicidade.

Figura 79. Cromatogramas (UPLC-DAD) de Alcaloides 2º/3º/F28/F17/F4 (1) e Alcaloides 2º/3º/F28/F10 (2), a 220 nm. Condições cromatográficas: eluente H<sub>2</sub>O + 0,1% HCOOH/ACN + 0,1% HCOOH; 5 – 95% ACN de 0 a 10 min; 95% ACN de 10 a 11 min; 5% ACN de 11 a 13 min. EXS – *Xylopi*a *sericea*.

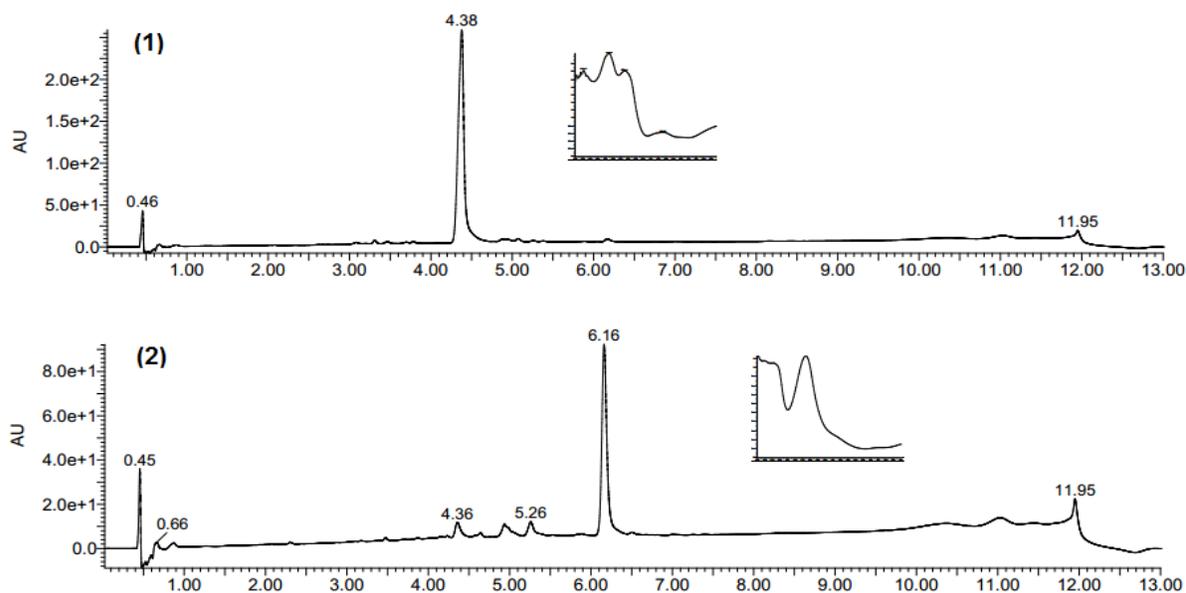


Figura 80. Estrutura do alcaloide *O*-metilmoschatolina.

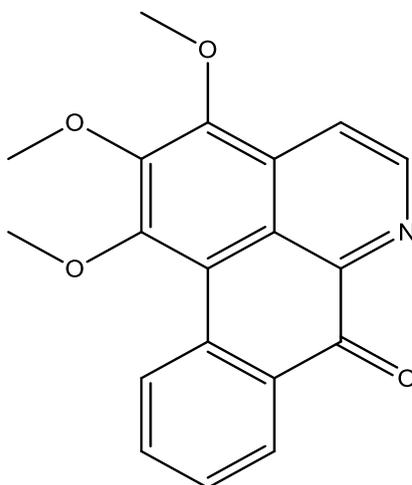


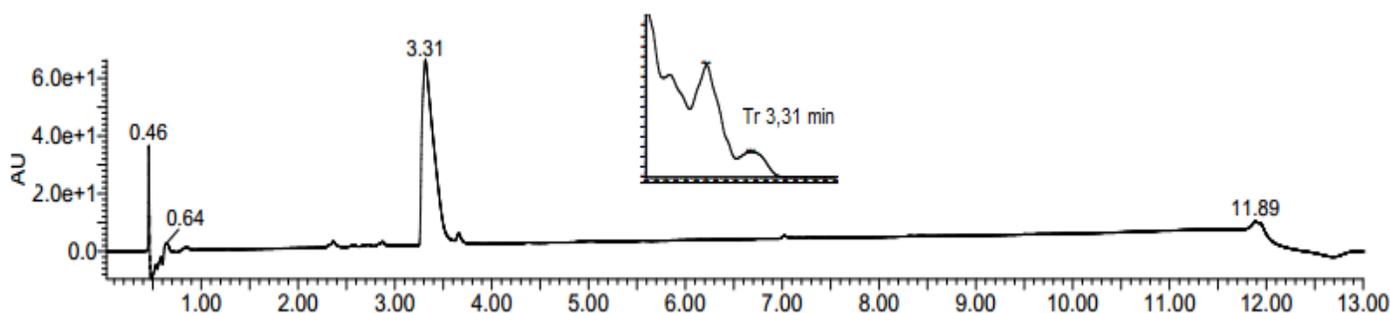
Tabela 22. Dados espectroscópicos de Alc. 2º/3º/F28/F17/F4, Alc. 2º/3º/F28/F10 e EXS FMA/F3/F31ppt por UPLC-DAD-ESI-MS/MS, ionização positiva.

Composto	TR (min)	$\lambda_{max}$ (nm)	[M + H] <sup>+</sup> (%)	MS/MS <sup>+</sup> (%)	Identificação (Fórmula Molecular)
Alc. 2º/3º/ F28/F17/F4	4,37	221 255 275 326	276,05 [M + H] <sup>+</sup> (100)	-	liriodenina (C <sub>17</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>3</sub> )
Alc. 2º/3º/F28/F10	6,16	220 275 370	322,09 [M + H] <sup>+</sup> (10)	307,20 [M + H - 15] <sup>+</sup> (8), 306,05 [M + H - 16] <sup>+</sup> (10), 292,09 [M + H - 30] <sup>+</sup> (100), 289,05 [M + H - 35] <sup>+</sup> (10), 288,12 [M + H - 34] <sup>+</sup> (40), 277,03 [M + H - 44] <sup>+</sup> (10), 264,09 [M + H - 58] <sup>+</sup> (8), 260,88 [M + H - 61] <sup>+</sup> (5), 232,88 [M + H - 89] <sup>+</sup> (5)	O-metilmoschatolina (C <sub>19</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>4</sub> )
EXS FMA/F3/ F31ppt	3,31	212 230 270 315	266,02 [M + H] <sup>+</sup> (35)	249,03 [M + H - 17] <sup>+</sup> (60), 235,07 [M + H - 31] <sup>+</sup> (100), 219,30 [M + H - 47] <sup>+</sup> (10), 207,03 [M + H - 60] <sup>+</sup> (25), 191,18 [M + H - 73] <sup>+</sup> (20), 179,00 [M + H - 87] <sup>+</sup> (30)	anonaina (C <sub>17</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>2</sub> )

(%): Abundância relativa.

Após o fracionamento de EXS FMA/F3 em coluna de sephadex-LH20 obteve-se o alcaloide isolado EXS FMA/F3/F31ppt (Figura 81). A atividade antiplasmódica deste frente à cepa de *P. falciparum* cloroquina-resistente W2 apresentou aumento significativo em relação a fração EXS FMA/F3 (Figura 77). O  $IC_{50}$   $23,2 \pm 2,7 \mu\text{g/mL}$  de EXS FMA/F3/F31ppt foi estatisticamente menor do que o valor obtido para a liriodenina. O  $CC_{50}$  em HepG2 de EXS FMA/F3/F31ppt ( $CC_{50}$   $38,3 \pm 2,3 \mu\text{g/mL}$ ) indica alta citotoxicidade deste composto, apresentando, assim, baixo índice de seletividade ( $IS = 1,6$ ).

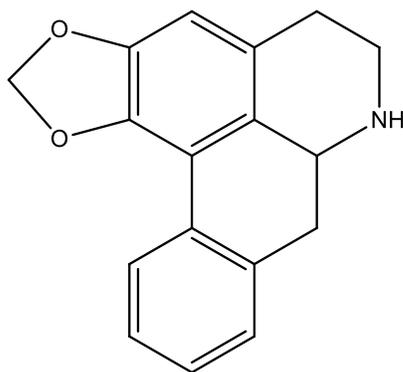
Figura 81. Cromatograma (UPLC-DAD) de EXS FMA/F3/F31ppt, a 220 nm. Condições cromatográficas: eluente  $\text{H}_2\text{O} + 0,1\% \text{HCOOH/ACN} + 0,1\% \text{HCOOH}$ ; 5 – 95% ACN de 0 a 10 min; 95% ACN de 10 a 11 min; 5% ACN de 11 a 13 min. EXS – *Xylopia sericea*.



Dados obtidos por UPLC-DAD-ESI-MS/MS de EXS FMA/F3/F31 são apresentados na Tabela 22. Análise por MS/MS do pico  $m/z$  249,03  $[\text{M} + \text{H} - 17]^+$  (60) aponta a perda do grupo  $\text{NH}_3$  (17 u.m.a.) como ocorre frequentemente em alcaloides do tipo aporfínicos (Stévigny et al., 2004). O pico  $m/z$  219,30  $[\text{M} + \text{H} - 47]^+$  (10), aponta para a perda de  $\text{CH}_2\text{O}$  (30 u.m.a.) referente ao pico  $m/z$  249,03. Já o pico  $m/z$  191,18  $[\text{M} + \text{H} - 73]^+$  (20), mostra a perda de  $\text{CO}$  (28 u.m.a.) referente ao pico  $m/z$  219,30 (Silva et al., 2012). O pico  $m/z$  235,07  $[\text{M} + \text{H} - 31]^+$  (100), aponta a perda típica de grupo metoxi em relação ao pico do ion molecular,  $\text{CH}_3\text{O}$  (31 u.m.a.). O pico  $m/z$  207,03  $[\text{M} + \text{H} - 60]^+$  (25), aponta a perda de  $\text{CO}$  (28 u.m.a.) referente ao pico base  $m/z$  235,07.

Dados de ESI-MS/MS da literatura para o composto anonaina (C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>2</sub>) (Figura 82) corroboram com os obtidos neste trabalho (Silva et al., 2012). Este composto já foi isolado e identificado dos frutos de *Xylopija emarginata* (Moreira et al., 2003), não sendo encontrado até o momento estudos que indicam sua presença em folhas de *Xylopija sericea*.

Figura 82. Estrutura do alcaloide anonaina.



Dados na literatura sobre a atividade antiplasmódica do composto anonaina apontam para alta redução de parasitemia *in vitro* pelo teste *pLDH* frente as cepas cloroquina sensível D10 e cloroquina resistente Dd2 de *P. falciparum*, sendo observado IC<sub>50</sub> 1,2 ± 0,1 µg/mL e IC<sub>50</sub> 5,2 ± 0,3 µg/mL, respectivamente (Graziose et al., 2011). Menor grau de pureza pode estar relacionado a menor atividade observada para EXS FMA/F3/F31ppt (IC<sub>50</sub> 23,2 ± 2,7 µg/mL) quando comparada a dados da literatura. Contudo, o valor de IC<sub>50</sub> visto para EXS FMA/F3/F31ppt frente a cepa cloroquina resistente W2 utilizada neste trabalho corrobora com a alta atividade antiplasmódica apontada em outros trabalhos para a substância anonaina, assim como observado para o composto liriodenina. Assim, tanto liriodenina quanto anonaina, dois alcaloides do tipo aporfínicos, estão diretamente relacionados com a atividade antiplasmódica encontrada nos extratos DCM e EtOH de *Xylopija sericea* Coleta 2, apresentando-se como potenciais fitofármacos no controle da malária.

## 7. CONCLUSÃO

Os objetivos propostos para este trabalho foram atingidos. A triagem para atividade antiplasmódica e citotoxicidade dos 36 extratos das 12 espécies vegetais selecionadas de acordo com critério etológico mostrou 8 extratos com atividade antiplasmódica moderada frente ao *Plasmodium falciparum* (W2) e não citotóxicos para células HepG2. O fracionamento biomonitorado dos extratos etanólicos de *Alchornea glandulosa*, *Miconia latecrenata* e *Xylopia sericea* levou a frações mais ativas e ao isolamento de substâncias antiplasmódicas que foram, em geral, não citotóxicas. Das folhas da espécie *Xylopia sericea* foram isoladas e identificadas as substâncias astilbina (EXS FA/F2/RC) (Coleta 1), ácido 7-oxo-ent-caur-16-en-19-oico (EXS FD/F2/F26/F2/F1/RC), liriodenina (Alc. 2º/3º/F28/F17/F4), O-metilmoschatolina (Alc. 2º/3º/F28/F10) e anonaina (EXS FMA/F3/F31ppt), sendo a substância liriodenina muito ativa e possivelmente a promotora da atividade antiplasmódica observada para as diferentes frações de EXS DCM e EXS EtOH Coleta 2. Os resultados obtidos comprovam a validade do critério etológico para a seleção de espécies vegetais para a investigação de atividade antiplasmódica. Análises por UPLC-DAD-ESI-MS/MS permitiram a identificação de substâncias presentes em extratos e frações mostrando-se de alta aplicabilidade em trabalhos de triagem.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abad-García, B., Berrueta, L.A., Garmón-Lobato, S., Gallo, B., Vicente, F., 2009. A general analytical strategy for the characterization of phenolic compounds in fruit juices by high-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray ionization and triple quadrupole mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216, 5398-5415.

Aguiar, A.C.C., Rocha, E.M.M., Souza, N.B., França, T.C.C., Krettli, A.U., 2012. New approaches in antimalarial drug discovery and development - A Review. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, 1007, 831-845.

Albuquerque, U.P., Hanazaki, N., 2006. Ethnodirected research in the discovery of new drugs of medical and pharmaceutical interest: flaws and perspectives. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 16, 678-689.

Alfonso, D., Colman-Saizarbitoria, T., Zhao, G.X., Shi, G., Ye, Q., Schwedler, J.T., Mclaughlin, J.L., 1996. Aromin and aromicin, two new bioactive annonaceous acetogenins, possessing an unusual bis-THF ring structure from *Xylopiá aromática* (Annonaceae). *Tetrahedron*, 52, 4215-4224.

Aly, A.S.I., Vaughan, A.M., Kappe, S.H.I., 2009. Malaria parasite development in the mosquito and infection of the mammalian host. *Annual Review of Microbiology*, 63, 195-221.

Antoun, M.D., Gerena, L., Milhous, W.K., 1993. Screening of the flora of Puerto Rico for potential antimalarial bioactives. *International Journal Pharmacognosy*, 31, 255-258.

Arrow, K.J., Panosian, C., Gelband, H., 2004. *Saving Lives. Buying Time. Economics of Malaria Drugs in an Age of Resistance.* The National Academies Press, Washington.

Ayisi, N.K., Appiah-Opong, R., Gyan, B., Bugyei, K., Ekuban, F., 2011. *Plasmodium falciparum*: Assessment of Selectivity of Action of Chloroquine, *Alchornea cordifolia*, *Ficus polita*, and Other Drugs by a Tetrazolium-Based Colorimetric Assay. *Malaria Research and Treatment*, 1-7.

Balandrin, M.F., Kinghorn, A.D., Farnsworth, N.R., 1993. Plant-derived natural products in drug discovery and development, in: A.D. Kinghorn, M.F. Balandrin (Eds.). *Human medicinal agents from plants*. American Chemical Society, 534, 2-12.

Banzouzi, J.T., Prado, R., Menan, H., Valentin, A., Roumestan, C., Mallie, M., Pelissier, Y., Blache, Y., 2002. *In vitro* antiplasmodial activity of extracts of *Alchornea cordifolia* and identification of an active constituent: ellagic acid. *Journal of Ethnopharmacology*, 81, 399-401.

Barbosa, L.C.A., 2007. *Espectrometria de Infravermelho de compostos orgânicos*. Ed. UFV. Viçosa, MG, Brasil, 189 p.

Batista, R., Júnior, A.J.S., Oliveira, A.B., 2009. Plant-Derived Antimalarial Agents: New Leads and Efficient Phytomedicines. Part II. Non-Alkaloidal Natural Products. *Molecules*, 14, 3037-3072.

Batista, R., Garcia, P.A., Castro, M.A., Miguel, J.M.D.C., Feliciano A., Oliveira A.B., 2010. *iso*-Kaurenoic acid from *Wedelia paludosa* D.C. *Anais da Academia Brasileira Ciências*, 82, 823-831.

Bohlke, M., Guinaudeau, H., Angerhofer, C.K., Wongpanich, V., Soejarto, D.D., Farnsworth, N.R., 1996. Costaricine, a New Antiplasmodial Bisbenzylisoquinoline Alkaloid from *Nectandra salicifolia* Trunk Bark. *Journal of Natural Products*, 59, 577-580.

Botsaris, A.S., 2007. Plants used traditionally to treat malaria in Brazil: the archives of *Flora Medicinal Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 3, 1-8.

Bourdy, G., Willcox, M.L., Ginsburg, H., Rasoanaivo, P., Graz, B., Deharo, E., 2008. Ethnopharmacology and malaria: new hypothetical leads or old efficient antimalarials? *International Journal for Parasitology*, 38, 33-41.

Cabral, E.C., Riveros, J.M., 2010. Utilização da Técnica de *Fingerprinting* por Espectrometria de Massas para Análise de Extratos de Produtos Naturais. Tese Apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química Orgânica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo. 144p.

Calderon, A.I., Terreaux, C., Guptab, M.P., Hostettmanna, K., 2003. *In vitro* cytotoxicity of 11 Panamanian plants. *Fitoterapia*, 74, 378–383.

Calvo, T.R., Lima, Z.P., Silva, J.S., Ballesteros, K.V., Pellizzon, C.H., Hiruma-Lima, C.A., Tamashiro, J., Brito, A.R., Takahira, R.K., Vilegas, W., 2007. Constituents and antiulcer effect of *Alchornea glandulosa*: activation of cell proliferation in gastric mucosa during the healing process. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 30, 451–459.

Carmo, F.M.S., Borges, E.E.L., Takaki, M., 2007. Alelopatia de extratos aquosos de canela-sassafrás (*Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer). *Acta Botânica Brasileira*, 21, 697-705.

Carrai, V., Borgognini-Tarli, S.M., Huffman, M.A., Bardi, M., 2003. Increase in tannin consumption by sifaka (*Propithecus verreauxi verreauxi*) females during the birth season: a case for self medication in prosimians? *Primates*, 44, 61-66.

Castelo Branco, M.V., Anazetti, M.C., Silva, M.S., Tavares, J.F., Diniz, M.F., Frungillo, L., Haun, M., Melo, P.S., 2009. Diterpenes from *Xylopija langsdorffiana*. *Journal of Biosciences*, 64, 650-656.

Castro, R.D., Lima, E.O., 2011. Antifungal activity of Brazilian sassafrás (*Ocotea odorifera* Vell.) and Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oils against genus *Candida*. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 13, 203-208.

Cavalcanti, B.C., Ferreira, J.R.O., Moura, D.J., Rosa, R.M., Furtado, G.V., Burbano, R.R., Silveira, E.R., Lima, M.A.S., Camara, C.A.G., Saffi, J., Henriques, J.A.P., Rao, V.S.N., Costa-Lotufo, L.V., Moraes, M.O., Pessoa, C., 2010. Structure–mutagenicity relationship of kaurenoic acid from *Xylopiia sericeae* (Annonaceae). *Mutation Research*, 701, 153–163.

Chen, Y., Li, S., Sun, F., Han, H., Zhang, X., Fan, Y., Tai, G., Zhou, Y., 2010. *In vivo* antimalarial activities of glycoalkaloids isolated from Solanaceae plants. *Pharmaceutical Biology*, 48, 1018–1024.

Chierrito, T.P.C., Aguiar, A.C.C., Andrade, I.M., Ceravolo, I.P., Gonçalves, R.A.C., Oliveira, A.J.B., Krettli, A., 2014. Anti-malarial activity of indole alkaloids isolated from *Aspidosperma olivaceum*. *Malarial Journal*, 13:142.

Chinchilla-Carmona, M., Valerio-Campos, I., Sánchez-Porras, R., Mora-Chaves, V., Bagnarello-Madrugal, V., Martínez-Esquível, L., González-Paniagua, A., Vanegas, J.C., 2011. *In vivo* evaluation of the antimalarial activity of 25 plants from a Biological Conservation Reserve of Costa Rica. *Revista Chilena de Historia Natural*, 84, 115-123.

Choomuenwai, V., Schwartz, B.D., Beattie, K.D., Andrews, K.T., Khokhar, S., Davis, R.A., 2013. The discovery, synthesis and antimalarial evaluation of natural product-based polyamine alkaloids. *Tetrahedron Letters*, 54, 5188–5191.

Clayden, J., Greeves, N., Warren, S., 2012. *Organic Chemistry*, 2<sup>a</sup> ed., Oxford University Press, 1490 pag.

Colombo, R., Yariwake, J.H., McCullagh, M., 2008. Study of C- and O-glycosylflavones in Sugarcane Extracts using Liquid Chromatography - Exact Mass Measurement Mass Spectrometry. *Journal Brazilian Society*, 3, 483-490.

Colman-Saizarbitoria, T., Zambrano, J., Ferrigni, N.R., Gu, Z.M., Ng, J.H., Smith, D.L., Mclaughlin, J.L., 1994. Bioactive annonaceous acetogenins from the bark of *Xylopiá aromática*. *Journal of Natural Products*, 57, 486-493.

Conegero, L.S., Ide, R.M., Nazari, A.S., Sarragiotto, M.H., 2003. Chemical constituents of *Alchornea glandulosa* (Euphorbiaceae). *Química Nova*, 26, 825—827.

Coura, J.R., Suárez-Mutis, M., Ladeia-Andrade, S., 2006. A new challenge for malaria control in Brazil: asymptomatic *Plasmodium* infection - a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 101, 229-237.

Cousins, D., Huffman, M.A., 2002. Medicinal properties in the diet of gorillas - an ethnopharmacological evaluation. *African Study Monographs*, 23, 65-89.

Cox-Singh, J., 2010. Insights from monkey malaria that can change thinking about human infections. *Malaria Journal*, 9, (Suppl 2), I2.

Craft, J.C., 2008. Challenges facing drug development for malaria. *Current Opinion in Microbiology*, 11, 428-433.

Cragg, G.M., Newman, D.J., 2013. Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1830, 3670–3695.

Craveiro, A.A., Alencar, J.W., Vostrowsky, O., 1986. Essential oil of *Xylopiá sericea*. A comparative analysis. *Journal of Natural Products*, 49, 1146-1148.

Cuyckens, F., Claeys, M., 2004. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *Journal of Mass Spectrometry*, 39, 1-15.

De Paula, R.C., 2014. Atividade Antimalárica de *Aspidosperma subincanum* Mart. Biomonitorada por testes *in vitro* contra *Plasmodium falciparum*, *in vivo* contra *P. berghei* e efeito da uleína no retículo endoplasmático de *P. falciparum*. Tese. Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, 122p.

De Villiers, B.J., Van Vuuren, S.F., Van Zyl, R.L., Van Wyk, B.E., 2010. Antimicrobial and antimalarial activity of *Cussonia* species (Araliaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 129, 189–196.

Dewick, P., 2009. *Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach*. John Wiley & Sons Ltd, 3<sup>a</sup> ed.

Dincheva, Y., Badjakov, I., Kondakova, V., Dobson, P., McDougall, G., Stewart, D., 2013. Identification of the phenolic components in Bulgarian raspberry cultivars by LC-ESI-MS. *International Journal of Agricultural*, 3, 127-138.

Dolabela, M.F., Oliveira, S.G., Peres, J.M., Nascimento, J.M.S., Marinete M. Póvoa, M.M., Oliveira, A.B., 2012. *In vitro* antimalarial activity of six *Aspidosperma* species from the state of Minas Gerais (Brazil). *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 84, 899-910.

Drummond, G.M., Martins, C.S., Machado, A.B.M., Sebaio, F.A., Antonini, Y., 2005. *Biodiversidade em Minas Gerais: um Atlas para sua conservação*. 2<sup>o</sup> ed. Fundação Biodiversitas, 222p.

Dutra, R.P. Abreu, B.V.B., Cunha, M.S., Batista, M.C.A., Torres, L.M.B., Nascimento, F.R.F., Ribeiro, M.N.S., Guerra, R.N.M., 2014. Phenolic acids, hydrolyzable tannins, and antioxidant activity of geopropolis from the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 2549-2557.

Engel, C., 2002. *Wild Health: How animals keep themselves well and what we can learn from them*. Houghton Mifflin Publishers, New York.

Fabres, N., Rustan, I., Hoffman, E., Quetin-Leclercq, J., 2001. Determination of Flavone, Flavonol and Flavanone Aglycones by Negative Ion Liquid Chromatography Electrospray Ion Trap Mass Spectrometry. *Journal American Society Mass Spectrum*, 12, 707-715.

Fabricant, D.S., Farnsworth, N.R., 2001. The value of plants used in traditional medicine for drug Discovery. *Environmental Health Perspectives*, 109, 69-75.

Fávaro, L.B., 2008. Influência da estrutura florestal na área de vida do muriqui-do-norte (*Brachyteles hypoxanthus*) no Parque Estadual da Serra do Brigadeiro-MG. Monografia (Graduação em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Lavras. Lavras, MG, 44p.

Filho, A.A.S., Costa, E.S., Cunha, W.R., Silva, M.L.A., Nanayakkara, N.P.D., Bastos, J.K., 2008. *In vitro* Antileishmanial and Antimalarial Activities of Tetrahydrofuran Lignans isolated from *Nectandra megapotamica* (Lauraceae). *Phytotherapy Research*, 22, 1307–1310.

Fischer, D.C.H., Gualda, N.C.A., Bachiega, D., Carvalho, C.S., Lupo, F.N., Bonotto, S.V., Alves, M.O., Yogi, A., Di Santi, S.M., Avila, P.E., Kirchgatter, K., Moreno, P.R.H., 2004. *In vitro* screening for antiplasmodial activity of isoquinoline alkaloids from Brazilian plant species. *Acta Tropica*, 92, 261–266.

Fitch, C.D., 2004. Ferriprotoporphyrin IX, phospholipids, and the antimalarial actions of quinoline drugs. *Life Sciences*, 74, 1957-1972.

Fredrich, M., Tits, M., Angenot, L., 2008. Potential antimalarial activity of indole alkaloids. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 102, 11-19.

Fujiwara, M., Yagi, N., Miyazawa, M., 2011. Tyrosinase inhibitory constituents from the bark of *Peltophorum dasyrachis* (yellow batai). *Natural Product Research*, 25, 1540–1548.

Fundação SOS Mata Atlântica, 2005. *Mata Atlântica: Biodiversidade, Ameaças e Perspectivas*. Centro de Ciências Aplicadas à Biodiversidade, Belo Horizonte.

Gaffield, W., Waiss, A.C., Tominaga, T., 1974. Structural Relations and Interconversions of Isomeric Astilbins. *Journal Organic Chemistry*, 40, 1057-1061.

Garcia, E.F., 2000. Triagem para atividade antitumoral de extratos de espécies vegetais das famílias annonaceae, combretaceae, apocinaceae e isolamento biomonitorado de acetogeninas tetra-hidrofurânicas de *Annona coriaceae* Mart. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais, 217p.

Gaudêncio, S.P., Pereira, F., 2015. Dereplication: racing to speed up the natural products discovery process. *Natural Products Reports*, 32, 789-810.

Gibim, C.P., Fernandes, D.C., Skrzek, S.C.G., Silva, D.H.S. Chemical profile and antimalarial activity of *Alchornea sidifolia* leaves.

Ginsburg, H., Deharo, E., 2011. A call for using natural compounds in the development of new antimalarial treatments - an introduction. *Malaria Journal*, 10, (Suppl 1), S1.

Goldberg, D.E., 2005. Hemoglobin degradation. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 295, 275-291.

Golenser, J., Waknine, J.H., Krugliak, M., Hunt, N.H., Grau, G.E., 2006. Current perspectives on the mechanism of action of artemisins. *International Journal of Parasitology*, 36, 1427-1441.

Gontijo, D. C., Fietto, L.G., Leite, J.P.V., Diaz, M.A.N., 2012. Ethological approach in search of herbal drugs with a potential antioxidant, antibacterial, antimutagenic and antigenotoxic. Dissertation, Department of Biochemistry and Molecular Biology. Federal University of Viçosa, Minas Gerais, 140p.

Gontijo, D.C., Fávaro, L.B., Júnior, W.M.S., Maia, R.T., Moreira, L.S., Viana, J.P.L., 2007. Abordagem Etológica na Busca de Compostos Naturais Bioativos no Parque Estadual da Serra do Brigadeiro. In: V Simpósio de extensão universitária, Viçosa.

Graziose, R., Rathinasabapathy, T., Lategan, C., Poulev, A., Smith, P.J., Grace, M., Lila, M.A., Raskin, I., 2011. Antiplasmodial activity of aporphine and sesquiterpene lactones from *Liriodendron trlipifera* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 133, 26-30.

Greenwood, B., Mutambigwa, T., 2002. Malaria in 2002. *Nature* 415, 670–672. Harborne, J.B., 2002. *Phytochemical Methods. A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*, Third Edition Chapman & Hall, London.

Hadi, V., Hotard, M., Ling, T., Salinas, Y.G., Palacios, G., Connelly, M., Rivas, F., 2013. Evaluation of *Jatropha isabelli* natural products and their synthetic analogs as potential antimalarial therapeutic agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 65, 376–380.

Han, L., Ninomiya, H., Taniguchi, M., Baba, K., Kimura, Y., Okuda, H., 1998. Norepinephrine-Augmenting Lipolytic Effectors from *Astilbe thunbergii* Rhizomes. *Journal Natural Products*, 61, 1006-1011.

Harrigan, G.G., Gunatilaka, A.A.L., Kingston, D.G.I., 1994. Isolation of bioactive and other oxoaporphine alkaloids from two annonaceae plants, *Xylopiia aethiopica* and *Miliusa cf. banaceae*. *Journal of Natural Products*, 57, 68-73.

Hasan, C.M., Healey, T.M., Waterman, P.G., 1982. Kolavane and kaurane diterpenes from the stem bark of *Xylopiia aethiopica*. *Phytochemistry*, 21, 1365-1368.

He, Z.D., Ma, C.Y., Tan, G.T., Sydara, K., Tamez, P., Southavong, B., Bouamanivong, S., Soejarto, D., Pezzuto, J.M., Fong, H.H.S., Zhang, H.J., 2006. Rourinoside and rouremin, antimalarial constituents from *Rourea minor*. *Phytochemistry*, 67, 1378-1384.

Hertog, M.G.L., Hollman, P.C.H., Katan, M.B., 1992. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 2379–2383.

Huang, H., Cheng, Z., Shi, H., Xin, W., Wang, T.T.Y., Yu, L.L., 2011. Isolation and Characterization of Two Flavonoids, Engeletin and Astilbin, from the Leaves of *Engelhardia roxburghiana* and Their Potential Anti-inflammatory Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 4565-4569.

Huffman, M.A., 2001. Self-Medicative Behavior in the African Great Apes: An Evolutionary Perspective into the Origins of the Human Traditional Medicine. *BioScience*, 51, 651-661.

Huffman, M.A., 2003. Animal self-medication and ethnomedicine: exploration and exploitation of the medical properties of plants. *Proceedings Nutrition Society*, 63, 371-381.

Huffman, M.A., Ohigashi, H., Kawanaka, M., Page, J.E., Kirby, G.C., Gasquet, M., Murakami, A., Koshimizu, K., 1998. African great ape self-medication: A new paradigm for treating parasite disease with natural medicines. In Ebizuka, Y. (ed.), *Towards Natural Medicine Research in the 21st Century*, Elsevier Science B.V., Amsterdam, 113-123 p.

IEF, Instituto Estadual De Florestas, 2008. Plano de Manejo do Parque Estadual Serra do Brigadeiro, Minas Gerais.

Jaiswal, R., Jayasinghe, L., Kuhnert, N., 2012. Identification and characterization of proanthocyanidins of 16 members of *Rhododendron* genus (*Ericaceae*) by tandem LC-MS. *Journal of Mass Spectrometry*, 47, 502-515.

Jenett-Siems, K., Mockenhaupt, F.P., Bienzle, U., Gupta, M.P., Eic, E., 1999. *In vitro* antiplasmodial activity of Central American medicinal Plants. *Tropical Medicine and International Health*, 4, 611-615.

Jossang, A., Dubaele, B., Cavé, A., Bartoli, M.H., Bériel, H., 1991. Annomantacine: une nouvelle acétogénine  $\gamma$ -lactone-monotetrahydrofurannique cytotoxique de l'*Annona montana*. *Journal of Natural Products*, 54, 967-971.

Kähkönen, M., Kylli, P., Ollilainen, V., Salminen, J.P., Heinonen, M., 2012. Antioxidant activity of isolated ellagitannins from red raspberries and cloudbberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 1167-1174.

Karou, S.D., Tchacondo, T., Ilboubo, D., Simporé, J., 2011. Sub-Saharan Rubiaceae: A Review of Their Traditional Uses, Phytochemistry and Biological Activities, *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 14, 149-169.

Kaur, K., Jain, M., Kaur, T., Jain, R., 2009. Antimalarials from nature. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17, 3229-3256.

Klein, N., Fröhlich, F., Krief, S., 2008. Geophagy: soil consumption enhances the bioactivities of plants eaten by chimpanzees. *Naturwissenschaften*, 95, 325-331.

Krief, S., 2003. Métabolites secondaires des plantes et comportement animal: surveillance sanitaire et observations de l'alimentation de chimpanzés (*Pan troglodytes schweinfurthii*) en Ouganda. Activités biologiques et étude chimique de plantes consommées. Thèse de Doctorat du Museum National d'Histoire Naturelle, Paris. 375p.

Krief, S., 2004. Effets prophylactiques et thérapeutiques de plantes ingérées par les chimpanzés: la notion d'automédication` chez les chimpanzés. *Primatologie*, 6, 151-172.

Krief, S., Martin, M.T., Grellier, P., Kasenene, J., Sévenet, T., 2004. Novel Antimalarial Compounds Isolated in a Survey of Self-Medicative Behavior of Wild Chimpanzees in Uganda. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48, 3196–3199.

Krief, S., Huffman, M., Sévenet, T., Guillot, J., Bories, C., Hladik, C.M., Wrangham, R.W., 2005. Non-invasive monitoring of the health condition of *Pan troglodytes schweinfurthii* in the Kibale National Park, Uganda. *International Journal of Primatology*, 26, 467–490.

Krief, S., Huffman, M.A., Sevenet, T., Hladik, C.M., Grellier, P., Loiseau, P., Wrangham, R.W., 2006. Bioactive properties of plants ingested by chimpanzees (*Pan troglodytes schweinfurthii*) in the Kibale National Park, Uganda. *American Journal of Primatology*, 68, 51-71.

Kumar, A., Katiyar, S.B., Agarwal, A., Chauhan, P.M., 2003. Perspective in antimalarial chemotherapy. *Current Medicinal Chemistry*, 10, 1137–1150.

Lacroix, D., Prado, S., Deville, A., Krief, S., Dumontet, V., Kasenene, J., Mouray, E., Bories, C., Bodo, B., 2009. Hydroperoxy-cycloartane triterpenoids from the leaves of *Markhamia lutea*, a plant ingested by wild chimpanzees. *Phytochemistry*, 70, 1239–1245.

Lacroix, D., Prado, S., Kamoga, D., Kasenene, J., Namukobe, J., Krief, S., Dumontet, V., Mouray, E., Bodo, B., Brunois, F., 2011. Antiplasmodial and cytotoxic activities of medicinal plants traditionally used in the village of Kiohima, Uganda. *Journal of Ethnopharmacology*, 133, 850-855.

Lam, S.H., Chen, C.K., Wang, J.S., Lee, S.S., 2008. Investigation of Flavonoids Glycosides from *Neolitsea sericea* var. *aurata* via the General Method and HPLC-SPE-NMR. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 55, 449-455.

Lambros, C., Vanderberg, J.P., 1979. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *The Journal of Parasitology*, 65, 418-420.

Lehane, A.M., Saliba, K.J., 2008. Common dietary flavonoids inhibit the growth of the intraerythrocytic malaria parasite. *BioMedical Center Research Notes*, 1, 26–31.

Leite, J.P.V., Fávoro, L.B., Maia, R.T., Gontijo, D.C., Moreira, L.S., Fontes, M.A.L., Passamani, M., Melo, F.R. A primatological approach (*Brachyteles hypoxanthus* Kuhl) to search for biologically active principles in plants from a fragmented landscape of the Atlantic Forest, Brazil. *Folia Primatologica*. No prelo, 2016.

Leite, J.P.V., Fernandes, J.M., Fávoro, L.B., Gontijo, D.C., Marotta, C.P.B., Siqueira, L.C., Maia, R.T., Garcia, F.C.P., 2008. Plantas Medicinais no Entorno do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro. *MG BIOTA*, Belo Horizonte, 1, 16-34.

Leverrier, A., Martin, M.t., Servy, C., Ouazzani, J., Retailleau, P., Awang, K., Mukhtar, M.R., Guéritte, F., Litaudon, M., 2010. Rearranged Diterpenoids from the Biotransformation of *ent*-Tranchyloban-18-oic Acid by *Rhizopus arrhizus*. *Journal of Natural Products*, 73, 1121-1125.

Lewinsohn, T.M., Prado, P.I., 2002. Biodiversidade brasileira: síntese do estado atual do conhecimento. São Paulo: Contexto, 176p.

Li, X., Zhang, Y., Zeng, X., Yang, L., Deng, Y., 2011. Chemical profiling of bioactive constituents in *Sarcandra glabra* and its preparations using ultra-high-pressure liquid chromatography coupled with LTQ Orbitrap mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 25, 2439-2447.

Liu, W., Li, Y., Learn, G.H., Rudicell, R.S., Robertson, J.D., Keele, B.F., Ndjango, J.B.N., Sanz, C.M., Morgan, D.B., Locatelli, S., Gonder, M.K., Kranzusch, P.J., Walsh, P.D., Delaporte, E., Mpoudi-Ngole, E., Georgiev, A.V., Muller, M.N., Shaw, G.M., Peeters, M., Sharp, P.M., Rayner, J.C., Hahn, B.H., 2010. Origin of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* in gorillas. *Malaria Journal*, 9, (Suppl 2), I6.

Londono, B., Arango, E., Zapata, C., Herrera, S., Saez, J., Blair, S., Carmona-Fonseca, J., 2006. Effect of *Solanum nudum* Dunal (Solanaceae) steroids on hepatic trophozoites of *Plasmodium vivax*. *Phytotherapy Research*, 20, 267–273.

Lopes, F.C.M., Calvo, T.R., Vilegas, W., Carlos, I.Z., 2005. Inhibition of Hydrogen Peroxide, Nitric Oxide and TNF- $\alpha$  Production in Peritoneal Macrophages by Ethyl Acetate Fraction from *Alchornea glandulosa*. *Biology Pharmaceutical Bulletin*, 28, 1726—1730.

Lopes, F.C.M., Rocha, A., Pirraco, A., Regasini, L.O., Siqueira, J.R., Silva, D.H.S., Bolzani, V.S., Carlos, I.Z., Soares, R., 2001. *Alchornea glandulosa* Ethyl Acetate Fraction Exhibits Antiangiogenic Activity: Preliminary Findings from *In Vitro* Assays Using Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Journal of Medicinal Food*, 14, 1244-1253.

Lopes, M.N., Mazza, F.C., Young, M.C.M., Bolzani, V.S., 1999. Complete Assignments of  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$ -NMR Spectra of the 3,4-*seco*-Triterpene Canaric Acid isolated from *Rudgea jasminoides*. *Journal of Brazilian Chemical Society*, 10, 237-240.

Lordello, A.L.L., Cavalheiro, A.J., Yoshida, M., Gottlieb, O.R., 2000. Phenylpropanoids, sterols and sesquiterpene from Wood of *Ocotea odorifera* (Lauraceae). *Revista Latinoamericana de Química*, 28, 35-39.

Lorenz, C., Virginio, F., Aguiar, B.S., Suesdek, L., Chiaravalloti-Neto, F., 2015. Spatial and temporal epidemiology of malaria in extra-Amazonian regions of Brazil. *Malaria Journal*, 14:408.

Lozano, G.A., 1998. Parasitic stress and self-medication in wild animals. *Advances in the Study of Behaviour*, 27, 291–317.

Lucas-Filho, M.D., Silva, G.C., Cortes, S.F., Mares-Guia, T.R., Perpétua Ferraz, V., Serra, C.P., Braga, F.C., 2010. ACE inhibition by astilbin isolated from *Erythroxylum gonocladum* (mart.) O.E. Schulz. *Phytomedicine*, 17, 383-387.

Mabry, T.J., Markham, K.R., Thomas, M.B., 1970. *The Systematic Identification of Flavonoids*. Ed. Springer-Verlag, New York.

Machado et al., 2005. Lista da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção, incluindo as espécies quase ameaçadas e deficientes em dados. Fundação Biodiversitas, Belo Horizonte.

Makler, M.T., Ries, J.M., Williams, J.A., Bancroft, J.E., 1993. Parasite lactate dehydrogenase as an assay for *Plasmodium falciparum* drug sensitivity. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 48, 739-741.

Mariath, I.R., Falcão, H.S., Barbosa-Filho, J.M., Sousa, L.C.F., Tomaz, A.C.A., Batista, L.M., Diniz, M.F.F.M., Athayde-Filho, P.F., Tavares, J.F., Silva, M.S., Cunha, E.V.L., 2009. Plants of the American continent with antimalarial activity. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 19, 158-192.

Marques, M.O.M., Yoshida, M., 1990. Structure of propacin. *Química Nova*, 13, 245-246.

Martins, D., 1996. Alcalóides, Flavonóides e Terpenóides de *Xylopiá aromática*, Vol. 1, Tese de Doutorado. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Martins, D., Osshiro, E., Roque, N.F., Marks, V., Gottlieb, H.E., 1998. A sesquiterpene dimer from *Xylopiá aromática*. *Phytochemistry*, 48, 677-680.

Martins, D., Hamerski, L., Alvarenga, S.A.V., Roque, N.F., 1999. Labdane dimers from *Xylopiá aromática*. *Phytochemistry*, 51, 813-817.

Martins, F.M.M., Silva, M.B., Silveira, D., Costa, A.S.V., Jamal, C.M., 2012. Estudo fitoquímico e avaliação do potencial citotóxico e antifúngico de *Xylopiia Sericea* St.-Hil frente à *Colletotrichum Musae*. Revista de Biologia e Farmácia, 7, 60-65.

Mendes, R.F., 2014. Investigação do potencial químico e farmacológico de *Xylopiia sericea* A.St.-Hil. (Annonaceae). Dissertação. Universidade Federal de Juiz de Fora, 95p.

McChesney, J.D., Venkataraman, S.K., Henri, J.T., 2007. Plant natural products: back to the future or into extinction? Phytochemistry, 68, 2015-2022.

Melo A.C., Cota B.B., Oliveira A.B., Braga, F.C., 2001. HPLC quantitation of Kaurane diterpenes in *Xylopiia* species. Fitoterapia, 72, 40-45.

Mendes, S.L., Melo, F.R., Boubli, J.P., Dias, L.G., Strier, K.B., Pinto, L.P.S., Fagundes, V., Cosenza, B., De Marco, P.JR., 2005. Directives for the conservation of the northern miquiqui, *Brachyteles hypoxanthus* (Primates, *Atelidae*). Neotropical Primates 13 (Supl.).

Menut, C., Bessiere, J.M., Hassani, M.S., Buchbauer, G., Schopper, B., 2002. Chemical and biological studies of *Ocotea comoriensis* bark essential oil. Flavour and Fragrance Journal, 17, 459–461.

MMV. Medicines for Malaria Venture, 2016. Disponível em: <http://www.mmv.org/malaria-medicines/parasite-lifecycle>. Acesso em: 26/05/2016.

Mohanta, T.K., 2013. Plant Metabolomics: Missing Link in Next Generation Functional Genomics era. Journal of Applied Biology & Biotechnology, 1, 001-010.

Morais, M.C.C., Lugman, S., Kondratyuk, T.P., Petronio, M.S., Regasini, L.O., Silva, D.H.S., Bolzani, V.S., Soares, C.P., Pezzulo, J.M., 2010. Suppression of TNF- $\alpha$  induced NF $\kappa$ B activity by gallic acid and its semi-synthetic esters: possible role in câncer chemoprevention. Natural Product Research, 24, 1758-1765.

Moreira, I.C., Lago, J.H.G., Roque, N.F., 2003. Alkaloid, flavonoids and terpenoids from leaves and fruits of *Xylopi* *emarginata* (Annonaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 31, 535–537.

Moreira, I.C., Lago, J.H.G., Roque, N.F., 2005. Sesquiterpenes, diterpenes, steroids and alkaloid from branches of *Xylopi* *brailiensis* Spreng (Annonaceae). *Biochemical Systematic and Ecology*, 33, 948-951.

Moreira, L.S., Barbosa, E.F., Alvim, T.H., Dias, L.G., Melo, F.R., Lessa, G., 2006. Muriquis do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro: Tamanhos de grupos e estruturas sexo-etárias. In: Livro de resumos: I Congresso Sul-Americano de Mastozoologia, 105p.

Moreira, L.S., 2008. Socioecologia de Muriquis-do-norte (*Brachitelys hipoxantus*) no Parque Estadual da Serra do Brigadeiro, MG. Dissertação de mestrado, Departamento de Biologia Animal. Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 94p.

Mourthé, I.M.C., 2006. A Ecologia do Forrageamento do Muriqui-do-norte (*Brachyteles hypoxanthus* Kuhl, 1820). Dissertação de mestrado, Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 99p.

MS. Conhecendo mais sobre a malária. Brasília: Ministério da Saúde, 2012. Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/saude/2012/10/casos-de-malaria-no-pais-caem-mais-da-metade-em-seis-anos>. Acesso em: 26/08/2014.

MS. Portal da Saúde. Brasília: Ministério da Saúde, 2016. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/23368-brasil-registra-menor-numero-de-casos-de-malaria-nos-ultimos-35-anos>. Acesso em: 11/06/16.

Mthembu, X.S., Van Heerden, F.R., Fouché, G., 2010. Antimalarial compounds from *Schefflera umbellifera*. *South African Journal of Botany*, 76, 82–85.

Muhammad, I., Dunbar, D.C., Khan, S.I., Tekwani, B.L., Bedir, E., Takamatsu, S., Ferreira, D., Walker, L.A., 2003. Antiparasitic Alkaloids from *Psychotria klugii*. *Journal of Natural Products*, 66, 962-967.

Musila, M.F., Dossaji, S.F., Nguta, J.M., Lukhoba, C.W., Munyao, J.M., 2013. *In vivo* antimalarial activity, toxicity and phytochemical screening of selected antimalarial plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 146, 557–561.

Mustofa, Valentin, A., Benoit-Vical, F., Pelissier, Y., Bamba, D.K., Mallie, M., 2000. Antiplasmodial activity of plant extracts used in West African traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 73, 145–151.

Muthaura, C.N., Keriko, J.M., Derese, S., Yenesew, A., Rukunga, C.M., 2011. Investigation of some medicinal plants traditionally used for treatment of malaria in Kenya as potential sources of antimalarial drugs. *Experimental Parasitology*, 127, 609–626.

Muthaura, C.N., Rukunga, G.M., Chhabra, S.C., Omar, S.A., Guantai, A.N., Gathirwa, J.W., Tolo, F.M., Mwitari, P.G., Keter, L.K., Kirira, P.G., Kimani, C.W., Mungai, G.M., Njagi, E.N., 2007. Antimalarial activity of some plants traditionally used in treatment of malaria in Kwale district of Kenya. *Journal of Ethnopharmacology*, 112, 545–551.

Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., Fonseca, G.A.B., Kent, J., 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403, 853-845.

Neves, D.P., Melo, A.L., Genaro, O., Linardi, P.M., 2005. *Parasitologia Humana*. 11<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Atheneu.

Newman, D.J., Cragg, G.M., Snader, K.M., 2003. Natural products as sources of new drugs over the period 1981–2002. *Journal Natural Products*, 66, 1022-1037.

Newman, D.J., Cragg, G.M., 2007. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal Natural Products*, 70, 461-477.

Newman, D.J., Cragg, G.M., 2012. Natural products as sources of new drugs over the last 30 years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products*, 75, 311-335.

Newman, D.J., Cragg, G.M., 2016. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *Journal Natural Products*, 79, 629-661.

Nguyen-Pouplin, J., Tran, H., Tran, H., Phan, T.A., Dolecek, C., Farrar, J., Tran, T.H., Caron, P., Bodo, B., Grellier, P., 2007. Antimalarial and cytotoxic activities of ethnopharmacologically selected medicinal plants from South Vietnam. *Journal of Ethnopharmacology*, 109, 417-427.

Nishiyama, Y., Moriyasu M., Ichimaru M., Iwasa, K., Kato, A., Mathenge, S.G., Chalo Mutiso, P.B., Juma, F.D., 2004. Quaternary isoquinoline alkaloids from *Xylopia parviflora*. *Phytochemistry*, 65, 939-944.

Noedl, H., Wongsrichanalai, C., Wernsdorfer, W.H., 2003. Malaria drug-sensitivity testing: new assays, new perspectives. *Trends in Parasitology*, 19, 175-181.

Ohigashi, H., Huffman, M.A., Izutsu, D., Koshimizu, K., Kawanaka, M., Sugiyama, H., Kirby, G.C., Warhurst, D.C., Allen, D., Wright, C.W., Phillipson, J.D., Timon-David, P., Delmas, F., Elias, R., Balansard, G., 1994. Toward the chemical ecology of medicinal plant use in chimpanzees: The case of *Vernonia amygdalina* Del., a plant used by wild chimpanzees, possibly for parasite-related diseases. *Journal of Chemical Ecology*, 20, 541–553.

Oliveira, A.B., Dolabela, M.F., Braga, F.C., Jácome, R.L.R.P., Varotti, Póvoa, M.M., 2009. Plant-derived antimalarial agents: new leads and efficient phythomedicines. Part I. Alkaloids. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*, 81, 715-740.

Oliveira, M.C., Negri, G., Salatino, A., Braga, M.R., 2007. Detection of anthraquinones and identification of 1,4-naphthohydroquinone in cell suspension cultures of *Rudgea jasminoides* (Cham.) Müll. Arg. (Rubiaceae). *Revista Brasileira de Botânica*, 30, 167-172.

Oliveira, M.C., Simões, K., Braga, M.R., 2009b. Substâncias antifúngicas constitutivas e induzidas em folhas e suspensões celulares de *Rudgea jasminoides* (Cham.) Müll. Arg. (Rubiaceae). *Revista Brasileira de Botânica*, 32, 509-519.

Oliveira, P.L., Tanaka, C.M.A., Kato, L., Silva, C.C., Medina, R.P., Moraes, A.P., Sabino, J.R., Oliveira, C.M.A., 2009c. Amaiouine, a Cyclopeptide Alkaloid from the Leaves of *Amaioua guianensis*. *Journal of Natural Products*, 72, 1195–1197.

Oltramari, A.C., Wood, K.V., Bonham, C., Verpoorte, R., Caro, M.S.B., Viana, A.M., Pedrotti, E.L., Maraschin, R.P., Maraschin, M., 2004. Safrole analysis by GS-MS of Prototrophic (*Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer) cell cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 78, 231-235.

Pabon, A., Blair, S., Carmona, J., Zuleta, M., Saez, J., 2003. Evaluation of the mutagenicity of antimalarial products isolated from *Solanum nudum* (Solanaceae). *Die Pharmazie* 58, 63–267.

Pabon, A., Carmona, J., Maestre, A., Camargo, M., Blair, S., 2002. Inhibition of *P. falciparum* by steroids isolated from *Solanum nudum*. *Phytotherapy Research*, 16, 59–62.

Pabon, A., Deharo, E., Blair, S., 2011. *Plasmodium falciparum*: *Solanum nudum* SN-1 steroid antiplasmodial activity when combined with antimalarial drugs. *Experimental Parasitology*, 127, 222–227.

Paes, M.M., Vega, M.R.G., Cortes, D., Kanashiro, M.M., 2016. Potencial Citotóxico das Acetogeninas do Gênero *Annona*. *Revista Virtual de Química*, 8, 945-980.

Pais, V.A.A., 2011. Evaluation of anticancer activity *in vivo* and *in vitro* of medicinal plants from "Serra da Mantiqueira Paulista". Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural.

Painter, H.J., Morrisey, J.M., Mather, M.W., Vaidya, A.B., 2007. Specific role of mitochondrial electron transport in blood-stage *Plasmodium falciparum*. *Nature*, 446, 88-91.

Patwardhan, B., Vaidya, A.B.D., Chorghade, M., 2004. Ayurveda and natural products drug discovery. *Current Science*, 86, 789–799.

Pinto, A.R., Cravalho, R.I.N., Netto, S.P., Weber, S.H., Souza, E., Uriatti, R.S., 2010. Bioactivity of essential oils of Brazilian sassafras and eucalyptus against lesser mealworm. *Ciência Rural*, 40, 637-643.

Plotkin, M.J., 2000. *Medicine Quest: In Search of Nature's Healing Secrets*. New York: Viking.

Pontes, W.J.T., Oliveira, J.C.S., Câmara, C.A.G., Júnior, M.G.C.G., Oliveira, J.V., Schwartz, M.O.E., 2007. Atividade acaricida dos óleos essenciais de folhas e frutos de *Xylopiá sericea* sobre o ácaro rajado (*Tetranychus urticae* KOCH). *Química Nova*, 30, 838-841.

Porto, D.D., Henriques, A.T., Fett-Neto, A., 2009. Bioactive Alkaloids from South American *Psychotria* and Related Species. *The Open Bioactive Compounds Journal*, 2, 29-36.

Rakotomanga, M., Razakantoanina, V., Raynaud, S., Loiseau, P.M., Hocquemiller, R., Jaurequiberry, G., 2004. Antiplasmodial activity of acetogenins and inhibitory effect on *Plasmodium falciparum* adenylate translocase. *Journal Chemotherapeutic*, 16, 350-356.

Raman, R., Kandula, S., 2008. Zoopharmacognosy: Self-Medication in Wild Animals. *Resonance*. 245-253.

Ramazani, A., Zakeri, S., Sardari, S., Khodakarim, N., Djadid, N.D., 2010. *In vitro* and *in vivo* anti-malarial activity of *Boerhavia elegans* and *Solanum surattense*. *Malaria Journal*, 9,1-8.

Ramos, D.F., Leitão, G.G., Costa, F.N., Abreu, L., Villarrela, J.V., Leitão, S.G., Fernández, S.L.S., Silva, P.E.A., 2008. Investigation of the antimycobacterial activity of 36 plant extracts from the Brazilian Atlantic Forest. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 44, 669-674.

Raskin, I., Ribnicky, D.M., Komarnytsky, S., Ilic, N., Poulev, A., Borisjuk, N., Brinker, A., Moreno, D.A., Ripoll, C., Yakoby, N., O'Neal, J.M., Cornwell, T., Pastor, I., Fridlander, B., 2002. Plants and human health in the twenty-first century. *Trends Biotechnology*, 20, 522–531.

Reddy, M.K., Gupta, S.K., Jacob, M.R., Khan, S.I., Ferreira, D., 2007. Antioxidant, antimalarial and antimicrobial activities of Tannin-Rich Fractions, Ellagitannins and Phenolic Acids from *Punica granatum L.* *Planta Medica*, 73, 461-467.

Ridley, R.G., 2002. Medical need, scientific opportunity and the drive for antimalarial drugs. *Nature*, 415, 686-693.

Rieckman, K.H., Sax, L.J., Campbell, G.H., Mrena, J.F., 1978. Drug sensitivity of *Plasmodium falciparum*. An *in vitro* microtechnique. *Lancet*, 1, 22-23.

Sangster, A.W., Stuart, K.L., 1964. Ultraviolet Spectra of Alkaloids. *Chemical Reviews*, 65, 69-130.

Santos, L.V., Fett-Neto, A.G., Kerber, V.A., Elisabetsky, E., Quirion, J.C., Henriques, A.T., 2001. Indole monoterpene alkaloids from leaves of *Psychotria suterella* Müll. Arg. (Rubiaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 29, 1185–1187.

Santos, H.S., Barros, F.W.A., Albuquerque, M.R.J., Bandeira, P.N., Pessoa, C., Braz-Filho, R., Monte, F.J.Q., Lela-Cardoso, J.H., Lemos, T.L.G., 2009. Cytotoxic diterpenoids from *Croton argyrophyloides*. *Journal of Natural Products*, 72, 1884-1887.

Santos, F.V., Calvo, T.R., Cólus, I.M.S., Vilegas, W., Varanda, E.A., 2010. Mutagenicity of two species of the genus *Alchornea* measured by *Salmonella* microsome assay and micronucleus test. *Brazilian Journal Pharmacognosy*, 20, 382-389.

Scio, E., Mendes, R.F., Motta, E.V.S., Bellozi, P.M.Q., Aragão, D.M.O., Mello, J., Fabri, R.L., Moreira, J.R., Assis, I.V.L., Bouzada, M.L., 2012. Antimicrobial and Antioxidant Activities of Some Plant Extracts. *Phytochemicals as Nutraceuticals - Global Approaches to Their Role in Nutrition and Health*, 24, 21-42.

Scott, A.I., Barton, D.H.R., Doering, W., 1964. Interpretation of the Ultraviolet Spectra of Natural Products. 1ª Edição. Pergamon Press, 443p.

Silva, F.M.A., Koolen, H.H.F., Almeida, R.A., Souza, A.D.L., Pinheiro, M.L.B., 2012. Dereplication of aphorphine and oxoaporphine alkaloids from *Unonopsis guatterioides* by ESI-IT-MS. *Química Nova*, 35, 944-947.

Silva, F.M.A., Souza, A.D.L., Koolen, H.H.F., Barison, A., Vendramin, M.E., Costa, E.V., Ferreira, A.G., Pinheiro, M.L.B., 2014. Phytochemical study of the alkaloid fractions of *Unonopsis dukei* R. E. Fr. Guided by electrospray ionization ion-trap tandem mass spectrometry. *Phytochemical Analysis*, 25, 45-49.

Silverstein, R.M., Webster, F.X., Kiemle, D.J., 2005. Spectrometric Identification of Organic Compounds. State University of New York. 7ª Ed. John Wiley & Sons, Inc., 502 p.

Soh, D., Nkwemgoua, E., Ngantchou, I., Nyasse, B., Denier, C., Hannaert, V., Shaker, K., Schneider, B., 2013. Xylopioxyde and other bioactive kaurane-diterpenes from *Xylopia aethiopica* Dunal (annonaceae). *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 3, 13-19.

Stévigny, C., Jiwan, J.L.H., Rozenberg, R., Hoffmann, E., Leclercq, Q., J., 2004. Key fragmentation patterns of aporphine alkaloids by electrospray ionization with multistage mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry*, 18, 523-528.

Strier, K.B., 1992. *Atelinae* adaptations: Behavioral strategies and ecological constraints. *American Journal of Physical Anthropology*, 88, 515–524.

Sumbul, S., Ahmad, M.A., Asif, M., Akhtar, M. 2011. Role of phenolic compounds in peptic ulcer: an overview. *Journal of Pharmacy and BioAllied Sciences*, 3, 361-367.

Tabarelli, M., Pinto, L.P., Silva, J.M.C., Hirota, M.M., Bedê, L.C., 2005. Desafios e oportunidades para a conservação da biodiversidade na Mata Atlântica brasileira. *Megadiversidade*, 1, 132-138.

Takahashi, J.A., Vieira, H.S., Boaventura, M.A.D., Hanson, J.R., Hitchcock, P.B., Oliveira, A.B., 2001. Mono and diterpenes from seeds of *Xylopia sericea*. *Química Nova*, 24, 616-618.

Tasdemir, D., Gabriela, L., Brun, R., Rüedi, P., Scapozza, L., Perozzo, R., 2006. Inhibition of *Plasmodium falciparum* fatty acid biosynthesis: evaluation of FabG, FabZ, and FabI as drug targets for flavonoids. *Journal Medicinal Chemistry*, 49, 3345–3353.

Taylor, W.R., White, N.J., 2004. Antimalarial drug toxicity: a review. *Drug Safety*, 27, 25-61.

Tugizimana, F., Piater, L., Dubery, I., 2013. Plant metabolomics: A new frontier in phytochemical analysis. *South African Journal of Science*, 109, 1-11.

Twentyman, P.R., Luscombe, M., 1987. A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. *British Journal Cancer*, 56, 279-285.

Urrea-Bulla, A., Suárez, M., Moreno-Murillo, B., 2004. Biological activity of phenolic compounds from *Alchornea glandulosa*. *Fitoterapia*, 75, 392–394.

Valverde, J., Tamayo, G., Hesse, M., 1999.  $\beta$ -Carboline monoterpene glucosides from *Palicourea adusta*. *Phytochemistry*, 52, 1485-1899.

Varanda, E.A., 2006. Atividade mutagênica de plantas medicinais. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 27, 1-7.

Varotti, F.P., Botelho, A.C.C., Andrade, A.A., Paula, R.C., Fagundes, E.M.S., Valverde, A., Mayer, L.M.U., Mendonça, J.S., Souza, M.V.N., Boechat, N., Krettli, A.U., 2008. Synthesis, Antimalarial Activity, and Intracellular Targets of MEFAS, a New Hybrid Compound Derived from Mefloquine and Artesunate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52, 3868-3874.

Vieira, B.C., 2010. Análises fitoquímica, bromatológica, toxicológica e dos efeitos estimulante físico e antioxidante de extratos de folhas de *Psychotria vellosiana* Benth. Dissertação de Mestrado. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 95p.

Vieira, M.G.S., 2010. Estudo Químico de *Xylopia nítida* Dunal (Annonaceae). Dissertação. Universidade Federal do Ceará, 181p.

Wagner, H., Bladt, S., Zgainski, E. M., 1984. Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas. Berlin: Springer Verlag, ed. 1ª, 320p.

Wang, J., Huang, L., Li, J., Fan, Q., Long, Y., Li, Y., Zhou, B., 2010. Artemisinin directly targets malarial mitochondria through its specific mitochondrial activation. *Plos One*, 5, e9582.

Wells, T.N., Burrows, J. N., Baird, J.K., 2010. Targeting the hypnozoite reservoir of *Plasmodium vivax*: the hidden obstacle to malaria elimination. *Trends in Parasitology*, 26, 145-151.

WHO. 2008. World Malaria Report. Geneva, World Health Organization. <http://rbm.who.int/wmr.2008>.

WHO. 2015. World Malaria Report. Geneva, World Health Organization. <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2015/report/en/>

Winter, R.W., Kelly, J.X., Smilkstein, M.J., Dodean, R., Bagby, G.C., Rathbun R.K., Levin, J.I., Hinrichs, D., Riscoe, M.K., 2006. Evaluation and lead optimization of anti-malarial acridones. *Experimental Parasitology*, 114, 47-56.

Wright, C.W., Allen, D., Cai, Y., Chen, Z., Phillipson, J.D., Kirby, G.C., Warhurst, D.C., Tits, M., Angenot, L., 1994. Selective antiprotozoal activity of some *Strychnos* alkaloids. *Phytotherapy Research*, 8, 149-152.

Wu, S.B., Dastmalchi, K., Long, C., Kennelly, E.J., 2012. Metabolite Profiling of Jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) and Other Dark-Colored Fruit Juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 7513-7525.

Xie, S., Chen, Y., Chen, S., Zeng, S., 2011. Structure–metabolism relationships for the glucuronidation of flavonoids by UGT1A3 and UGT1A9. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 63, 297-304.

Yang, X., Sun, Y., Xu, Q., Guo, Z., 2006. Synthesis and immunosuppressive activity of L-rhamnopyranosyl flavonoids. *Organic Biomolecular Chemistry*, 4, 2483-2491.

Yapi, T.A., Boti, J.B., Attiua, B.K., Ahibo, A.C., Bighelli, A., Casanova, J., Tomi, F., 2012. Three New Natural Compounds from the Root Bark Essential Oil from *Xylopiya aethiopica*. *Pytochemical Analysis*, 23, 651-656.

Zhang, B., Deng, Z., Ramdath, D.D., Tang, Y., Chen, P.X., Liu, R.L.Q., Tsao, R., 2015. Phenolic profiles of 20 Canadian lentil cultivars and their contribution to antioxidant activity and inhibitory effects on  $\alpha$ -glucosidase and pancreatic lipase. *Food Chemistry*, 172, 862–872.

Zhou, X., Xu, Q., Li, J., Chen, T., 2009. Structural Revision of Two Flavanonol Glycosides from *Smilax glabra*. *Planta Medica*, 75, 654-655.