



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**FITOQUÍMICA E ATIVIDADE ANTIPLASMÓDICA DE  
*SIPARUNA POEPPIGII* (TUL.) A. DC. (*SIPARUNACEAE*)**

**NAYLA DI PAULA VIEIRA PINA**

BELÉM – PA

2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**FITOQUÍMICA E ATIVIDADE ANTIPLASMÓDICA DE  
*SIPARUNA POEPPIGII* (TUL.) A. DC. (*SIPARUNACEAE*)**

Autor: Nayla di Paula Vieira Pina

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Alaíde Braga de Oliveira

Co-orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Maria Fâni Dolabela

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Fármacos e Medicamentos, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

BELÉM – PA

2016

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Nayla di Paula Vieira Pina

### **FITOQUÍMICA E ATIVIDADE ANTIPLASMÓDICA DE *SIPARUNA POEPPIGII* (TUL.) A. DC. (*SIPARUNACEAE*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Fármacos e Medicamentos.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof.<sup>a</sup> Dra. Alaíde Braga de Oliveira (Orientadora)

Instituição: PPGCF UFPA

Ass: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Wagner Luiz Barbosa

Instituição: PPGCF UFPA

Ass: \_\_\_\_\_

Profa. Dra. Mara Silvia Pinheiro Arruda

Instituição: Faculdade de Química UFPA

Ass: \_\_\_\_\_

BELÉM – PA

2016

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**  
**Biblioteca do Instituto de Ciências da Saúde / UFPA**

---

Pina, Nayla di Paula Vieira.

Fitoquímica e atividade antiplasmódica de *Sirapuna poeppigii* (tul.) a. dc. (Siparunaceae) / Nayla di Paula Vieira Pina; orientadora, Alaíde Braga de Oliveira; co-orientadora, Maria Fâni Dolabela. — 2016.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Belém, 2016.

1. *Siparuna poeppigii*. 2. Plantas medicinais. 3. Alcaloides. I. Título.

CDD: 22. ed. : 615.321

---

## RESUMO

PINA, N.P.V. **Fitoquímica e atividade antiplasmódica de *Siparuna poeppigii* (Tul.) A. DC. (Siparunaceae)**. 102 f. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2016.

Na América Latina, o uso de plantas do gênero *Siparuna* é indicado no tratamento de febres e malária, a atividade antiplasmódica de algumas espécies já foi comprovada, o que motivou o estudo *S. poeppigii*, nativa da Amazônia. Este trabalho visa analisar a fitoquímica, a atividade antiplasmódica e a citotoxicidade de extratos e frações de *S. poeppigii*. De folhas e cascas do caule de um exemplar coletado em Belém, Pará, foram preparados extratos em etanol (EESPC e EESPF) e a separação de alcaloides foi realizada por extrações ácido-base (SPC-B e SPF-B; SPC-C e SPF-C). Os extratos etanólicos foram submetidos a re-extrações por refluxo com solventes de polaridades crescentes resultando nas frações hexano-diclorometano (HEX-DCM), diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH). Análises fitoquímicas por UPLC-DAD e cromatografia em camada delgada (CCD) foram efetuadas com os extratos e frações. As frações Hex-DCM, AcOEt e MeOH foram submetidas a fracionamentos cromatográficos em colunas de sílica gel (CCS). A atividade antiplasmódica dos extratos e frações foi avaliada frente à cepa W2 de *P. falciparum* cloroquina-resistente pelo método de quantificação da lactato desidrogenase (pLDH), nas concentrações de 50 µg/mL e 25 µg/mL. Para as frações mais ativas determinou-se a concentração Inibitória de 50% (CI<sub>50</sub>) e a concentração citotóxica de 50% (CC<sub>50</sub>) em células HepG2 pelo método do MTT, nas concentrações de 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12 e 1,6 µg/mL para CI<sub>50</sub> e 1, 10, 100 e 1000µg/mL para CC<sub>50</sub>. Os dados permitiram calcular o índice de seletividade (IS) de cada fração. A prospecção por CCD foi positiva para geninas e heterosídeos flavônicos, saponinas, alcaloides, triterpenos e esteroides. A CCS de SPC-B permitiu a obtenção das frações 5-8, 43-44, 61, 67-68, 95-97 e 84-88, consideradas ativas com CI<sub>50</sub> de 5,95; 12,44; 14,32; 22,58; 22,67 µg/mL, respectivamente. Todas as frações ativas foram não citotóxicas, sendo os melhores IS das frações 5-8 (43,32) e 95-97 (>44,11). Estas frações ativas e a Fr 16 AcOEt (obtida da CCS da Fr AcOEt), foram caracterizadas por UPLC-ESI-MS sendo identificados os alcaloides reticulina e anonaina na Fr 16 AcOEt. As frações 84-88 e 111 foram re-cromatografadas em colunas de alumina e sephadex LH20, respectivamente obtendo-se substâncias SP-1 e SP-2. A análise por UPLC-DAD das amostras EESPC, EESPF, SPC-B e SPF-B revelou predomínio de um pico no tempo de retenção (TR) 6,5 min, com λ<sub>max</sub> 267 e 346 nm, sugestivo de cromóforos de flavonoides. A substância SP-1 exibiu pico (74% de área) no TR 3,6 min e UV com λ<sub>max</sub> 255 e 276 nm, compatível com UV online da liriodenina autêntica. SP-2 exibiu pico majoritário (90%) no TR 2,6 min e λ<sub>max</sub> 282 nm. As frações de alcaloides SPF-B e SPC-C foram ativas, com CI<sub>50</sub> 12,41 e 6,99µg/mL. Este trabalho relata dados inéditos de fitoquímica e atividade antiplasmódica da espécie *S. poeppigii* bem como a identificação da liriodenina, responsável, em parte, pela atividade antiplasmódica da espécie.

**Palavras-chave:** alcaloides; plantas medicinais; *Siparuna poeppigii*.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CQ	Cloroquina
CC	Cromatografia em Coluna
CCS	Cromatografia em Coluna de Sílica
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CI <sub>50</sub>	Concentração Inibitória de 50%
CC <sub>50</sub>	Concentração Citotóxica de 50%
CMI	Concentração Mínima Inibitória
DMSO	Dimetilsulfóxido
LDH	<i>Lactate dehydrogenase</i>
MTT	Brometo 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazol
NBT/PES	<i>Nitroblue Tetrazolium/Phenazine ethosulphate</i>
ρLDH	<i>Plasmodium lactate dehydrogenase</i>
R <sub>f</sub>	Fator de Retenção
SP-1	Substância isolada de <i>S. poeppigii</i> - 1
SP-2	Substância isolada de <i>S. poeppigii</i> - 2
UV	Ultravioleta
Vis	Visível
DP	Desvio Padrão
EC <sub>50</sub>	Concentração Efetiva mediana
EESPC	Extrato Etanólico <i>Siparuna poeppigii</i> Cascas
EESPF	Extrato Etanólico <i>Siparuna poeppigii</i> Folhas
ER	Evaporador Rotatório
IC	Intervalo de Confiança
IS	Índice de Seletividade
SPC-B	Fração de alcaloides das cascas de <i>S. poeppigii</i> -método B
SPC-C	Fração de alcaloides das cascas de <i>S. poeppigii</i> -método C
SPF-B	Fração de alcaloides das folhas de <i>S. poeppigii</i> - método B
SPF-C	Fração de alcaloides das folhas de <i>S. poeppigii</i> - método C
TR	Tempo de Retenção
UPLC	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i>
UPLC-DAD-ESI-MS	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography- Photodiode Array- Electrospray Ionization- Mass spectrometry</i>

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Casos confirmados de malária em cada 1000 habitantes no mundo, 2013.....	15
Figura 2 - Distribuição de infecções por <i>Plasmodium falciparum</i> na Amazônia, em 2013.....	16
Figura 3 - Ciclo biológico do <i>Plasmodium falciparum</i> .....	18
Figura 4 - Estruturas químicas de antimaláricos.....	19
Figura 5 - Estruturas químicas básicas de isoquinolinas (A), aporfinas (B) e oxoaporfinas (C).....	21
Figura 6 - Distribuição do gênero <i>Siparuna</i> no Brasil.....	21
Figura 7- Substâncias isoladas de espécie de <i>Siparuna</i> com atividade antiplasmódica .....	25
Figura 8 - Alcaloides isolados de espécies de <i>Siparuna</i> .....	28
Figura 9 - Exemplar de <i>Siparuna poeppigii</i> .....	33
Figura 10 -Fluxograma da extração de alcaloides (método B) a partir das cascas de <i>Siparuna poeppigii</i> .....	35
Figura 11 -Fluxograma da extração de alcaloides (método C) a partir das cascas de <i>Siparuna poeppigii</i> .....	36
Figura 12 -Etapas do fracionamento do extrato etanólico por extração sob refluxo.....	37
Figura 13-Extratos e frações de <i>Siparuna poeppigii</i> analisadas por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada ao UV e espectrometria de massas.....	41
Figura 14-Esquema da placa utilizada para determinação da atividade antiplasmódica.....	45
Figura 15 -Resultado positivo do teste de precipitação para alcaloides com frações de alcaloides das cascas e folhas de <i>Siparuna poeppigii</i> .....	53
Figura 16 -Cromatogramas em camada delgada dos extratos de cascas e folhas de <i>Siparuna poeppigii</i> .....	55

Figura 17- Cromatogramas em camada delgada das frações de alcaloides das cascas de <i>Siparuna poeppigii</i> .....	62
Figura 18- Cromatogramas do extrato etanólico e fração de alcaloides das folhas de <i>Siparuna poeppigii</i> e respectivos espectros no UV online dos picos majoritários.....	63
Figura 19- Cromatogramas das frações hexano: diclorometano e diclorometano das folhas de <i>Siparuna poeppigii</i> e respectivos espectros no UV online dos picos majoritários .....	64
Figura 20- Cromatogramas das frações acetato de etila e metanol das folhas de <i>Siparuna poeppigii</i> e respectivos espectros no UV online dos picos majoritários.....	65
Figura 21- Cromatogramas do extrato etanólico e Fração de alcaloides das cascas de <i>Siparuna poeppigii</i> espectros no UV on line referentes a alguns picos.....	69
Figura 22- Cromatograma da fração acetato de etila das cascas de <i>Siparuna poeppigii</i> e respectivos espectros no UV online.....	70
Figura 23- Varredura completa no modo positivo da Fração 16 AcOEt EESPC por espectrometria de massas.....	71
Figura 24- Rota de fragmentação proposta para 330 [M+H] <sup>+</sup> da fração 16 AcOEt EESPC.....	73
Figura 25- Cromatogramas da substância SP-1 (A) e liriodenina autêntica (B) por UPLC-DAD a 280 nm e espectros no UV online.....	75
Figura 26- Cromatograma e espectro UV on line por UPLC-DAD-ESI-MS de SP-2.....	76
Figura 27- Percentual de redução do crescimento do <i>Plasmodium falciparum</i> cloroquina-resistente (W2) frente à extratos e frações de cascas e folhas de <i>Siparuna poeppigii</i> .....	80
Figura 28 - Gráficos das curvas dose-resposta de frações ativas da fração de alcaloides das cascas frente a <i>Plasmodium falciparum</i> (W2).....	81
Figura 29 – Cromatograma da fração SPC-B 5-8 por UPLC-DAD a 280 nm e espectros no UV online.....	84
Figura 30 – Cromatograma da fração SPC-B 43-44 por UPLC-DAD a 280 nm e espectros no UV online.....	85

Figura 31- Proposta de fragmentação do pico majoritário [M+H] <sup>+</sup> 329 da fração 43-44 por UPLC-DAD-ESI-MS/MS.....	85
Figura 32- Cromatograma da fração SPC-B 61 por UPLC-DAD a 280 nm e espectros no UV online.....	87
Figura 33- Cromatograma da fração SPC-B 67-68 por UPLC-DAD a 350 nm e espectros no UV online.....	88
Figura 34- Cromatograma da fração SPC-B 84-88 por UPLC-DAD a 350 nm e espectros no UV online.....	89
Figura 35- Cromatograma da fração SPC-B 95-97 por UPLC-DAD a 280 nm e espectros no UV online.....	90
Figura 36- Estrutura básica dos alcaloides aporfinicos.....	90

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Atividade antimalárica/antiplasmódica de espécies de <i>Siparuna</i> .	26
Quadro 2 - Rendimentos dos extratos e frações obtidos de cascas e folhas de <i>Siparuna poeppigii</i> .....	51
Quadro 3 – Resultados da prospecção fitoquímica por CCD dos extratos e frações de <i>Siparuna poeppigii</i> .....	56
Quadro 4 - Dados referentes à cromatografia em coluna de sílica aberta da Fr Hex-DCM do EESPC.....	58
Quadro 5 - Dados referentes à cromatografia em coluna de sílica aberta da Fr AcOEt do EESPC.....	59
Quadro 6 - Dados referentes à cromatografia em coluna de sílica aberta da Fr SPC – B .....	60
Quadro 7 - Dados referentes à cromatografia em coluna de alumina da Fr 84-88.....	61

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Taxonomia de <i>Siparuna poeppigii</i> .....	23
Tabela 2- Dados sobre as Cromatografias em Coluna (CC) realizadas com frações oriundas do extrato etanólico das cascas de <i>Siparuna poeppigii</i> .....	40
Tabela 3- Gradiente de eluição e condições de análise adotados no UPLC-DAD e UPLC-DAD-ESI-MS/MS.....	42
Tabela 4 - Classificação das amostras de acordo com o resultado de $CI_{50}$ para atividade antiplasmódica.....	47
Tabela 5- Resultados dos testes farmacognósticos de pH, perda por dessecação, cinzas totais e densidade .....	48
Tabela 6 - Percentual de material vegetal em pó retido na sequência de peneiras adotadas para classificação granulométrica .....	49
Tabela 7- Análise por UPLC-ESI-MS do extrato alcaloídico e etanólico das cascas de <i>Siparuna poeppigii</i> .....	68
Tabela 8- Análise por UPLC-ESI-MS/MS da fração 16 AcOEt oriunda de coluna cromatográfica da Fração AcOEt das cascas de <i>Siparuna poeppigii</i> .....	72
Tabela 9- Análise por UPLC-DAD-ESI-MS/MS das frações 2 C111 oriundas da fração de alcaloides das cascas de <i>Siparuna poeppigii</i> .....	76
Tabela 10-Concentração Inibitória de 50% ( $CI_{50}$ ) do crescimento do <i>Plasmodium falciparum</i> (W2) cloroquina-resistente frente a frações de alcaloides das cascas e folhas de <i>Siparuna poeppigii</i> .....	78
Tabela 11 - Concentração Inibitória de 50% ( $CI_{50}$ ) do crescimento de <i>Plasmodium falciparum</i> (W2) cloroquina-resistente frente a amostras obtidas a partir coluna cromatográfica da fração de alcaloides das cascas de <i>Siparuna poeppigii</i>	79
Tabela 12- Valores de $CC_{50}$ , $CI_{50}$ e índice de seletividade calculado para as frações oriundas da fração de alcaloide das cascas de <i>Siparuna poeppigii</i> .....	82
Tabela 13- Análise por UPLC-DAD-ESI-MS/MS das frações ativas oriundas da fração de alcaloides das cascas de <i>Siparuna poeppigii</i> .....	86

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>15</b>
2.1 MALÁRIA.....	15
<b>2.1.1 A contribuição de plantas medicinais para a quimioterapia antimalárica</b>	<b>19</b>
<b>2.1.2 Alcaloides isoquinolínicos e aporfínicos</b> .....	<b>20</b>
2.2 A FAMÍLIA SIPARUNACEAE .....	21
<b>2.2.3 A Química do gênero <i>Siparuna</i></b> .....	<b>27</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>30</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	30
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	30
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>31</b>
4.1 EQUIPAMENTOS .....	31
4.2 SOLVENTES.....	31
4.3 REVELADORES UTILIZADOS NA PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA .....	32
<b>4.3.1 Anisaldeído sulfúrico</b> .....	<b>32</b>
<b>4.3.2 Cloreto de alumínio 5%</b> .....	<b>32</b>
<b>4.3.3 Reagente de Dragendorff</b> .....	<b>32</b>
<b>4.3.4 Reagente de Lieberman-Bouchardat</b> .....	<b>32</b>
4.4 REAGENTES UTILIZADOS NO TESTE ANTIPLASMÓDICO .....	33
<b>4.4.1 Reagente Malstat</b> .....	<b>33</b>
<b>4.4.2 Reagente NBT/PES</b> .....	<b>33</b>
4.5 COLETA DO MATERIAL VEGETAL .....	33
4.6 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DE FOLHAS E CASCAS .....	34
<b>4.6.1 Folhas</b> .....	<b>34</b>
<b>4.6.2 Cascas</b> .....	<b>34</b>
4.7 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS ALCALOÍDICOS .....	34
<b>4.7.1 Método B de extração de alcaloides</b> .....	<b>34</b>
<b>4.7.2 Método C de extração de alcaloides</b> .....	<b>35</b>
<b>4.7.3 Re-extração dos extratos etanólicos com solventes de polaridade crescente</b> .....	<b>36</b>
4.8 CARACTERIZAÇÃO FARMACOGNÓSTICA DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DE FOLHAS E CASCAS DE <i>SIPARUNA POEPPIGII</i> .....	38
<b>4.8.1 Determinação do pH</b> .....	<b>38</b>
<b>4.8.2 Perda por dessecação</b> .....	<b>38</b>
<b>4.8.3 Teor de cinzas totais</b> .....	<b>38</b>
<b>4.8.4 Densidade aparente</b> .....	<b>39</b>
<b>4.8.5 Granulometria</b> .....	<b>39</b>
4.9 FITOQUÍMICA DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DE FOLHAS E CASCAS DE <i>SIPARUNA POEPPIGII</i> .....	39
<b>4.9.1 Prospecção fitoquímica por cromatografia em camada delgada</b> .....	<b>39</b>
<b>4.9.2 Cromatografia em Coluna</b> .....	<b>40</b>
4.10 ANÁLISES POR UPLC-DAD E UPLC – DAD – ESI – MS/MS .....	41
<b>4.10.1 Preparo das amostras e condições de análise</b> .....	<b>42</b>

4.11 ATIVIDADE ANTIPLASMÓDICA.....	43
4.11.1 Preparo do meio e descongelamento do parasito.....	43
4.11.2 Cultivo do <i>Plasmodium falciparum</i> (W2).....	43
4.11.3 Sincronização de culturas de <i>Plasmodium falciparum</i> .....	44
4.11.4 Preparo das amostras e avaliação da atividade antiplasmódica .....	44
4.11.5 Determinação da citotoxicidade e cálculo do índice de seletividade.....	46
4.11.6 Avaliação dos resultados .....	46
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>48</b>
5.1 CARACTERIZAÇÃO FARMACOGNÓSTICA DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DE FOLHAS E CASCAS DE <i>Siparuna poeppigii</i> .....	48
5.2 RENDIMENTOS DOS EXTRATOS E FRAÇÕES .....	49
5.3 FITOQUÍMICA DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DE FOLHAS E CASCAS DE <i>Siparuna poeppigii</i> .....	52
5.3.1 Prospecção fitoquímica por cromatografia em camada delgada de sílica gel .....	53
5.4 CROMATOGRAFIA EM COLUNA (CC) .....	57
5.5 ANÁLISES POR UPLC-DAD E UPLC-DAD-ESI-MS/MS .....	63
5.5.1 Extrato e frações das folhas.....	63
5.5.2 Extrato e frações das cascas .....	66
5.6 ATIVIDADE ANTIPLASMÓDICA.....	77
5.6.1 Avaliação dos extratos brutos e frações de alcaloides .....	77
5.6.2 Avaliação das frações obtidas a partir dos extratos etanólicos por re-extração sob refluxo .....	78
5.6.3 Avaliação das frações obtidas por cromatografia em coluna .....	78
5.7 CITOTOXICIDADE E ÍNDICE DE SELETIVIDADE DAS FRAÇÕES ATIVAS.....	82
5.8 ANÁLISE DAS FRAÇÕES ATIVAS.....	84
<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>91</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>93</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A malária é uma doença causada por parasitos do gênero *Plasmodium*, cujos vetores são mosquitos do gênero *Anopheles*. As espécies que parasitam o homem são *P. malariae*, *P. ovale*, *P. knowlesii*, *P. falciparum* e *P. vivax* (PRADO et al. 2014).

A malária atinge a população desde tempos remotos e constitui, atualmente, um problema de saúde mundial. Em 2013, foram notificados 198 milhões de casos de malária no mundo, sendo 584.000 óbitos (WHO, 2014). Segundo o Ministério da Saúde, as infecções por *Plasmodium vivax* predominaram no período de 2000 a 2011, atingindo 78,7%, seguido pela infecção por *P. falciparum*, que apresenta características mais graves (WHO, 2015), com 12% dos casos notificados no Brasil (BRASIL, 2013). Na Amazônia legal, no ano de 2013, foram notificados 177.722 casos de malária, a maioria no Estado do Amazonas (BLUME, 2014).

O arsenal quimioterápico disponível para tratamento da malária atua nas formas eritrocíticas assexuadas do *Plasmodium*, denominados esquizontocidas sanguíneos, a exemplo da cloroquina, quinina e mefloquina. Esta etapa do ciclo coincide com a manifestação de sinais e sintomas característicos, como febre e tremores. Novos antimaláricos promoveram significativas reduções de morbimortalidade, no entanto as pesquisas de novos medicamentos não avançam em igual velocidade aos casos de resistência à quimioterapia disponível. Segundo a Organização Mundial da Saúde, nas áreas entre Camboja e Tailândia, há casos de resistência a múltiplos antimaláricos (WHO, 2014). Portanto, ressalta-se a importância e urgência em descobrir novos fármacos contra esta doença (LEITE, 2013).

Plantas medicinais contribuíram para a descoberta de antimaláricos, a exemplo da quinina, o primeiro fármaco antimalárico, fato que torna a busca por produtos naturais ativos uma estratégia promissora (MARIATH et al. 2009). Neste contexto, o gênero *Siparuna* abrange várias espécies que, segundo informações etnofarmacológicas, são empregadas no tratamento da malária, variando-se as espécies e o modo de preparo, conforme a localidade e o país (JENETT-SIEMS et al., 1999). *S. poeppigii*, também conhecida por *S. amazônica*, é uma espécie pouco estudada quanto à fitoquímica e efeitos biológicos, mas empregada empiricamente para tratar febres e malária (VIGNERON et al. 2005).

Diante do exposto, propôs-se realizar o estudo fitoquímico de *S. poeppigii* e avaliar as atividades antiplasmódica e citotóxica de diferentes extratos, e frações e substâncias isoladas frente à cepa de *P. falciparum* W2 e células HepG2, visando contribuir para a pesquisa de plantas da Amazônia empregadas no tratamento de febres e malária.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 MALÁRIA

As doenças transmitidas por artrópodes são as principais causas de morbimortalidade em países de áreas tropicais e subtropicais (KARUNAMOORTHY et al., 2013). A malária, em especial, compreende um risco de infecção para 3,3 bilhões de indivíduos. Um total de 198 milhões de casos foram confirmados em 2013, sendo que 78% destas infecções ocorreram em crianças com menos de 5 anos, na África (WHO, 2014). A Figura 1 mostra os casos confirmados de malária, em cada 1000 habitantes, no mundo, em 2013, observando-se a predominância no continente africano. Com relação ao número de óbitos (564.000) no mesmo ano, observou-se uma redução na mortalidade em 47% quando comparado ao ano de 2000, com tendência a redução progressiva nos próximos anos (WHO, 2014).

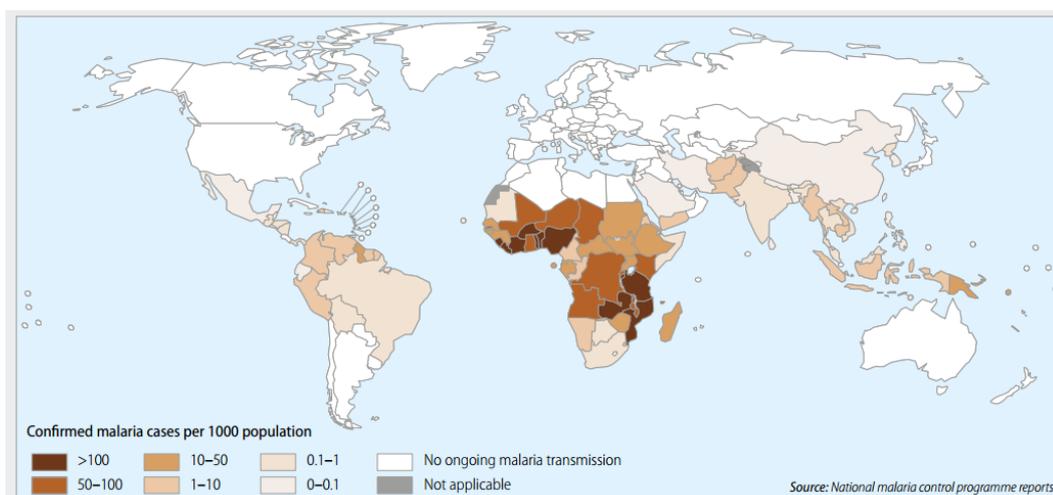


Figura 1- Casos confirmados de malária em cada 1000 habitantes no mundo, 2013  
Fonte: (WHO, 2014)

No Brasil, a malária é endêmica na Amazônia Legal onde foram notificados 139.276 casos autóctones, em 2014. Destes, a maioria, 65.542, ocorreu no estado do Amazonas, seguido pelo Acre, Amapá e Pará (SIVEP- MALÁRIA, 2015). A infecção por *P. vivax* predomina na Amazônia legal com 119.773 casos notificados em 2014 (SIVEP- MALÁRIA, 2015). Contudo, a infecção por *P. falciparum* predomina nas áreas de fronteira do Acre e região oeste do Pará (BLUME, 2014), conforme observado na Figura 2.

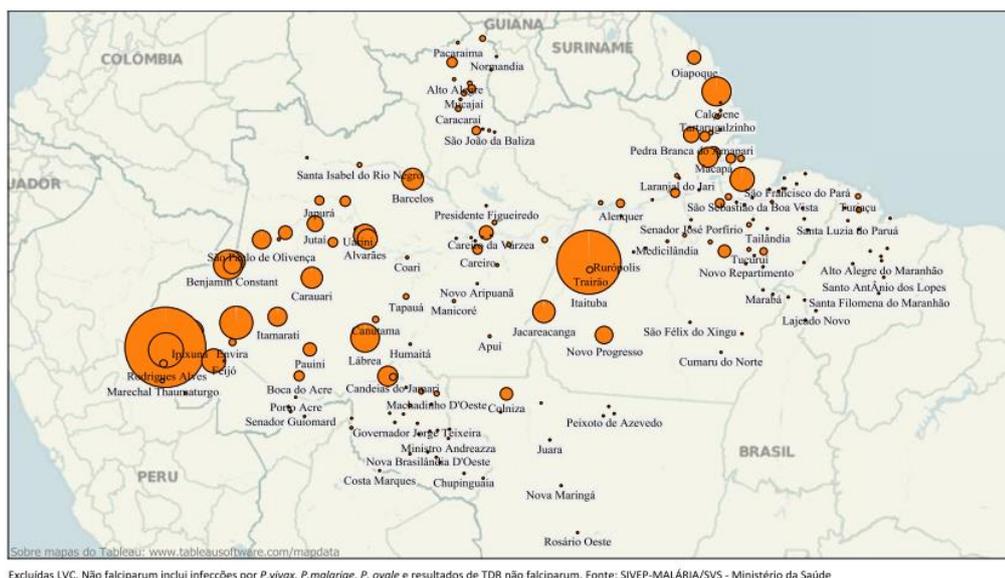


Figura 2 – Distribuição de infecções por *Plasmodium falciparum* na Amazônia, em 2013  
Fonte: BLUME, 2014

Na Amazônia também se observou queda de 27% no número de notificações, em 2013, quando comparado ao ano anterior (BLUME, 2014). A redução no número de casos se deve a iniciativas como a implantação do Plano de Intensificação das Ações de Controle na Amazônia, Programa Nacional de Prevenção e Controle da Malária (PNCM), entre outros, que visam a prevenção e o controle da doença no país (BRASIL, 2003). Atividades de monitorização dos casos de resistência à quimioterapia antimalárica são realizadas pela AMI/RAVREDA (*Amazon Malaria Initiative/ Amazon Network for the Surveillance of Antimalarial Drug Resistance*) que tem como integrantes Brasil e outros países das Américas Latina e Central (PAHO, 2015). Além da monitorização há, também, a distribuição gratuita do tratamento medicamentoso e rapidez no diagnóstico (BRASIL, 2003).

A sintomatologia da malária pode apresentar quadros clínicos variáveis, em função da espécie do parasito, tempo de infecção e quantidade de parasitas circulantes, entre outros. O indivíduo infectado apresenta episódios de febre e calafrios intermitentes a cada 6 ou 12 horas, cefaleia, náuseas, vômitos, diarreia e mialgia (BRASIL, 2010; FRANÇA; SANTOS e VILLAR, 2008).

Para o tratamento da malária deve-se levar em consideração a espécie de *Plasmodium* infectante, a idade do paciente, bem como seu histórico de infecção,

condições patológicas associadas, entre outros fatores, em virtude da toxicidade dos medicamentos e particularidade nos esquemas terapêuticos (BRASIL, 2010 a).

O ciclo de infecção humana inicia-se através do repasto sanguíneo das fêmeas do mosquito *Anopheles* spp. na pele, inoculando os esporozoítos na corrente sanguínea. Seguindo para os hepatócitos, os esporozoítos se multiplicam estabelecendo o ciclo pré-eritrocítico. Os hepatócitos são rompidos e liberam merozoítos na circulação sanguínea, iniciando o estágio assexuado do parasita. Em seguida invadem as hemácias, dando início à esquizogonia sanguínea ou ciclo eritrocítico, conforme Figura 3. Nessa fase evidenciam-se os sintomas da malária (BRASIL, 2010 a; BOUSEMA et al. 2014). Uma fração de merozoítos adquire a forma sexuada, os gametócitos, que são as formas de transmissão de humanos para os mosquitos vetores. Os gametócitos imaturos são sequestrados pela medula óssea e os maduros vão para a circulação periférica. A proporção de gametócitos maduros no sangue periférico é geralmente menor que 100 gametócitos/ $\mu\text{L}$  de sangue (BOUSEMA et al. 2014).

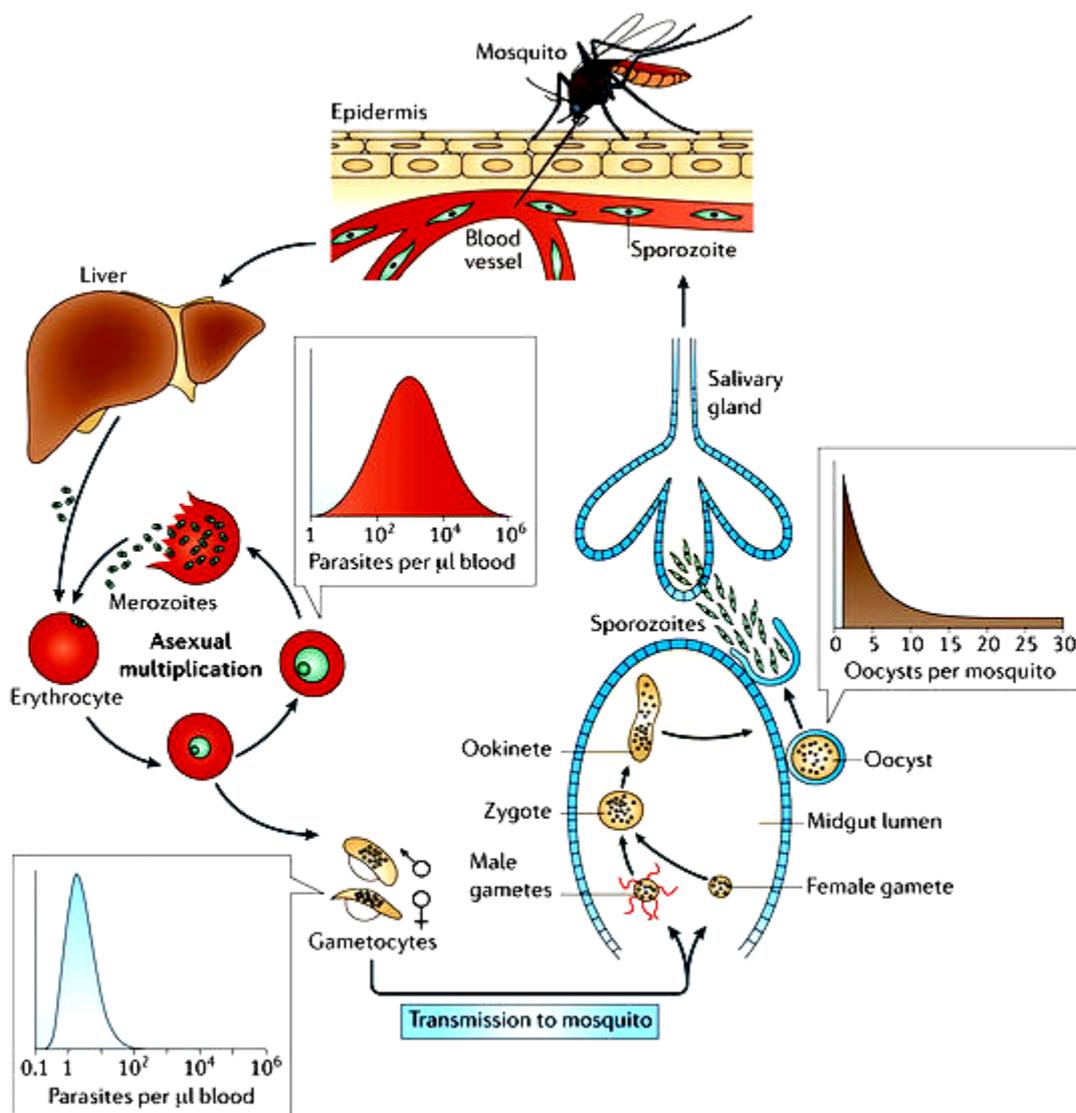


Figura 3- Ciclo biológico do *Plasmodium falciparum*.  
 Fonte: Bousema et al. 2014

O *P. falciparum* desenvolve no hospedeiro intermediário uma forma mais virulenta da doença, fator agregado ao desenvolvimento de resistência, caracterizando esta espécie como uma das ameaças à saúde pública global (PINHEIRO et al. 2013).

### 2.1.1 A contribuição de plantas medicinais para a quimioterapia antimalárica

O gênero *Cinchona sp.*, pertencente à família das Rubiáceas, foi a primeira fonte de matéria-prima para obtenção do pó das cascas e raízes cuja infusão, utilizada por indígenas do Peru, era eficaz no tratamento da malária (OLIVEIRA e SZCZERBOWSKI, 2009). Em 1820, a quinina (1, Figura 4) foi identificada como a substância ativa de *Cinchona sp* e constituiu o primeiro fármaco antimalárico (PAULA, 2014). A atividade deste fármaco baseia-se no bloqueio da polimerização do subproduto tóxico da degradação da hemoglobina levando à morte do parasita (KARUNAMOORTHY et al. 2013).

Na década de 1940, a cloroquina (2, Figura 4), uma quinolina sintetizada na Alemanha, foi introduzida na terapêutica da malária. Seu uso extensivo resultou na seleção de parasitos resistentes, inicialmente, na década de 1960, na Colômbia, e atualmente em todos os países endêmicos (PAULA, 2014). Posteriormente, foram desenvolvidas outras quinolinas sintéticas como a mefloquina(3, Figura 4), um quinolinometanol (SILVA et al. 2005).

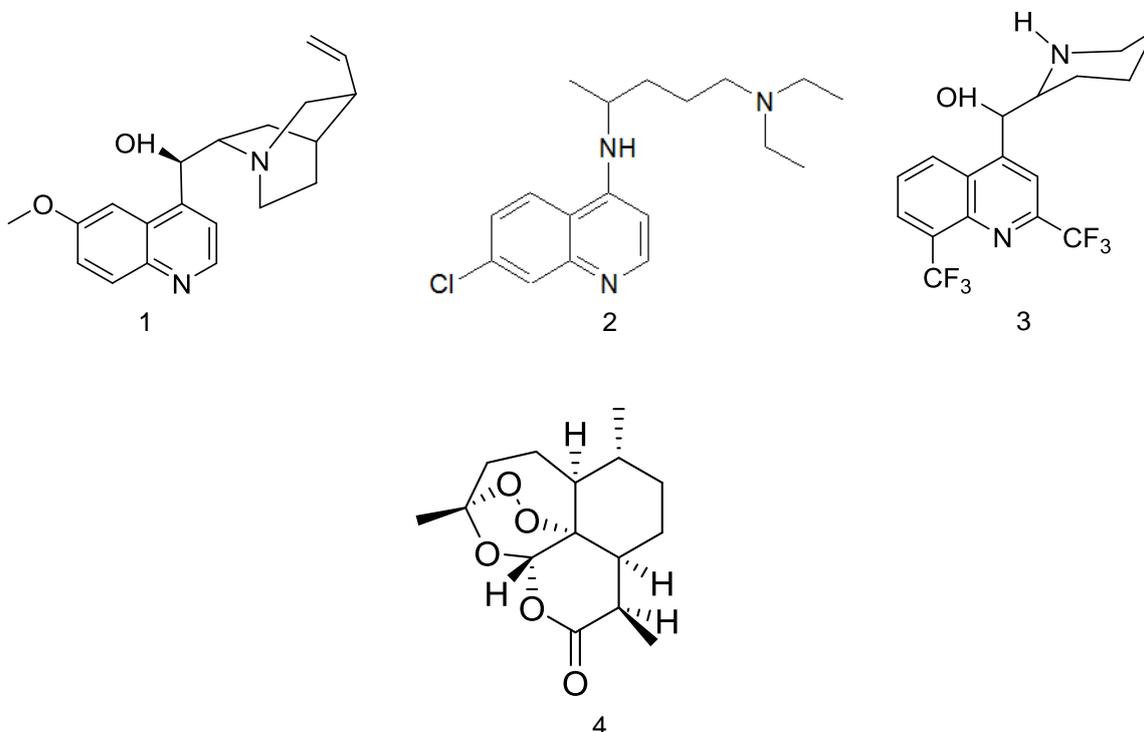


Figura 4- Estruturas químicas de antimaláricos  
Legenda:1- quinina; 2 – cloroquina; 3 – mefloquina; 4- artemisinina

A artemisinina (4, Figura 4), uma lactona sesquiterpênica com uma ponte peróxido, é a substância antimalárica da *Artemisia annua* L (Asteraceae), de uso milenar na medicina tradicional chinesa. A artemisinina é produzida em larga escala desde a década de 1990 (KARUNAMOORTHY et al. 2013) e, juntamente com seus derivados semi-sintéticos, como artesunato, arteter, artemeter e diidroartemisinina, são empregados em combinação com derivados quinolínicos, como tratamento padrão em casos não complicados, com o objetivo de prevenir a resistência aos artemisinínicos (LEITE, 2013). O evidente papel dos alcaloides no histórico da quimioterapia antimalárica embasa a importância da realização de pesquisas em estratégias terapêuticas desta classe, visto que diferentes tipos de alcaloides se mostraram promissores.

### 2.1.2 Alcaloides isoquinolínicos e aporfínicos

Os alcaloides são compostos de baixo peso molecular, produtos do metabolismo secundário de plantas, alguns microorganismos e animais. Podem conter um ou mais átomos de nitrogênio que conferem basicidade à molécula, propriedade que facilita os métodos de extração ácido-base. A atividade biológica está ligada à função amina, que pode ser protonada em pH fisiológico. Os alcaloides originam-se biossinteticamente dos amino ácidos alifáticos, como ornitina e lisina, ou amino ácidos aromáticos, fenilalanina, tirosina e triptofano (MANN, 1987; ZIEGLER e FACCHINI, 2008; DEWICK, 2009). Os alcaloides derivados da tirosina contêm a sub-unidade  $ArC_2N$ , mostrado na estrutura A de alcaloides isoquinolínicos (A, Figura 5) oriundos da reação entre dopamina e um aldeído alifático (ou equivalente).

Mais de uma centena de alcaloides aporfínicos foram isolados de mais de 20 famílias e 100 gêneros de plantas, dentre elas Annonaceae, Monimiceae e Siparunaceae. Apresentam diversas propriedades farmacológicas, incluindo antiparasitária, anticâncer e vasorrelaxante. Apresentam a estrutura básica mostrada em B (Figura 5) e algumas sub-classes, a exemplo dos oxoaporfínicos (C, Figura 5) e possuem um grupo carbonila em C7. Esse grupamento confere planaridade à molécula e favorece a extensão da conjugação no sistema aporfínico, diferenciando-os das demais aporfinas, fato que evidencia diferença na atividade biológica, como a

interação sobre o DNA de células por alcaloides aporfínicos e oxoaporfínicos. A liriodenina é um exemplo de oxoaporfina bem descrita na literatura, com várias propriedades biológicas comprovadas (SILVA et al. 2007; CHEN J. et al. 2013)

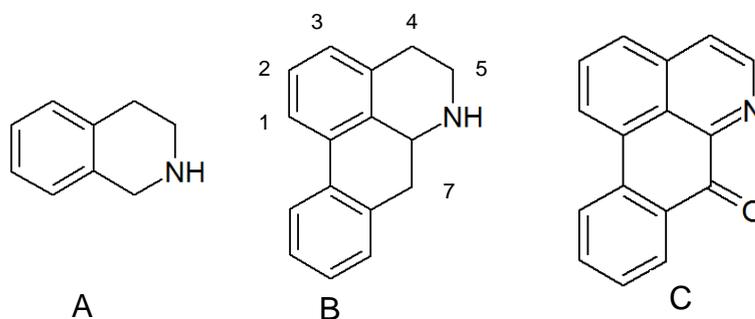


Figura 5 – Estruturas químicas básicas de isoquinolinas (A), aporfinas (B) e oxoaporfinas (C)

## 2.2 A FAMÍLIA SIPARUNACEAE

A família *Siparunaceae* constitui o maior grupo das angiospermas, abrangendo os gêneros *Glossocalyx* e *Siparuna*, sendo descritas 51 espécies. O gênero *Siparuna* se distribui por todo o território brasileiro, como mostra a Figura 6 (THE PLANT LIST, 2013).

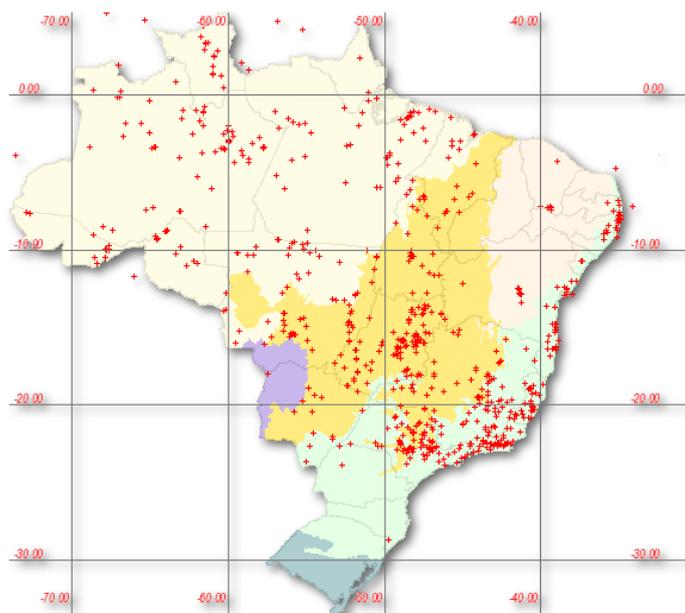


Figura 6- Distribuição do gênero *Siparuna* no Brasil  
 Legenda: Presença de espécies do gênero *Siparuna*  
 Fonte: <http://lacunas.inct.florabrasil.net/>

*S. poeppigii*, que tem como sinônimas *S. amazônica*, *S. sprucei* e *Citriosma poeppigii* (THE PLANT LIST, 2013), é uma espécie nativa do Brasil, porém não é endêmica, ocorrendo no Equador e Peru (RENNER e HAUSNER, 2005). Há relatos de ocorrência nos Estados do Pará, Amapá, Amazonas, Roraima, Bahia, Minas Gerais e Mato Grosso, compreendendo os domínios fitogeográficos da Amazônia, Cerrado e Mata Atlântica (PEIXOTO, 2014). A taxonomia da espécie *S. poeppigii* está descrita na Tabela 1.

Tabela 1 - Taxonomia de *Siparuna poeppigii*

Hierarquia	Taxonomia
Reino	Plantae
Classe	Equisetopsida
Subclasse	Magnoliidae
Super ordem	Magnolianaes
Ordem	Lurales
Família	Siparunaceae
Gênero	<i>Siparuna</i> Aubl.

Fonte: [www.trópicos.org](http://www.trópicos.org)

Vários usos medicinais são reportados para espécies do gênero *Siparuna*, como por exemplo, *S. guianensis* que atende por sinônimas de *Citrosma guianensis* (Aubl), *S. archeri*, *S. discolor*, *S. foetida*, entre outras (THE PLANT LIST, 2013). Suas folhas são utilizadas por comunidades ribeirinhas do Estado do Amazonas como ansiolítico, estimulante sexual, no tratamento de dores de cabeça e otites (SANTOS et al. 2012). O decocto das folhas desta espécie é utilizado para dor de cabeça pela população de Barcelos, no mesmo Estado (TOMCHINSKY, 2014). Os índios *Yanomami*, que vivem na fronteira entre Brasil e Venezuela, aplicam as folhas amassadas desta espécie na cabeça e no corpo para tratamento de vertigem (VALENTINI et al. 2010). A etnia *Tacana*, que habita parte da cordilheira dos Andes, na Bolívia, utiliza a decocção das folhas para tratar gripes (BOURDY et al. 2000).

A população de *Saramaccan Maroons*, no Suriname, usa todas as partes da espécie *S. guianensis* em decocção conjunta com as espécies *Unxia camphorata*, *Cecropia sciadophylla*, *Gossypium barbadense*, *Paullinia pinnata*, *Cecropia sciadophylla*, *Stachytarpheta cayennensis* ou *S. jamaicensis*, *Bixa orellana* e *Cymbopogon citratus* *cv* *para* para banhos em crianças que apresentam dores

abdominais. Para promoção geral da saúde, o banho na criança é efetuado com as folhas de *S. guianensis* e *Vismia sp* (RUYSSCHAERT et al. 2009).

A população da Amazônia Peruana utiliza *S. guianensis* como abortivo, afrodisíaco, para tratar hipertensão, micoses, úlceras cutâneas e intestinais (IIAP, 2010). A etnia *Chayahuita*, residente nesta região, emprega as cascas frescas desta espécie como cataplasma para dor de cabeça (ODONNE et al. 2013). Os índios Kuna, do Panamá, bebem a decocção da ponta dos galhos da mesma planta para tratar gripes e picada de cobra (GUPTA et al. 1993)

Na Guiana Francesa, o chá das folhas de *S. guianensis* é utilizado para tratar malária (BERTANI et al. 2005). Um estudo feito com pessoas de cinco diferentes nacionalidades residentes na Guiana Francesa apontou o uso do chá das folhas desta espécie, em conjunto com as folhas de *Campomanesia spp*, para a mesma finalidade (VIGNERON et al. 2005). No Estado de Rondônia e entre os índios da etnia Tikuna, do Estado do Amazonas, há relatos do uso do chá das folhas de *S. guianensis* para tratar dores reumáticas e malária (SHULTES e RAFFAUF, 1994; FACUNDO et al. 2012).

A comunidade Enfarrusca, localizada no Estado do Pará, utiliza o banho das folhas da espécie *S. decipiens* para tratar mal olhado, dores e fraquezas (FREITAS e FERNANDES, 2006). Na Amazônia Peruana é utilizada para tratar febre (IIAP, 2010). As folhas da espécie *S. aspera* são usadas em forma de banho morno para auxiliar no pós-parto, tratar febre e astenia pela nação *Yanesha*, que habita a Amazônia peruana (CÉLINE et al. 2009). No Equador, o chá das folhas é consumido para tratar reumatismo (RENNER e HAUSNER, 1997). A espécie *S. pachyantha*, cuja sinonímia é *S. emarginata*, têm o chá de suas folhas utilizado pelo grupo étnico *Wayãpi*, na Guiana Francesa, para tratar malária e febres em geral. Os índios *Palikur*, no mesmo país, usam o cataplasma das folhas para tratar inflamações (CÉLINE et al. 2009).

A infusão das folhas de *S. apiosyce* é utilizada como narcótico pela comunidade de Goianópolis, no Estado de Goiás (SOARES et al. 2013). As folhas de *S. tomentosa* são usadas para preparação de banhos e para cuidados no pós-parto pela etnia *Yanesha* (VALADEAU et al. 2010). *S. thecaphora* é utilizada pela população peruana para tratar hipertensão e micoses (IIAP, 2010). Habitantes do Equador relatam que as cascas são aplicadas diretamente nos casos de picadas de

cobra, as folhas são friccionadas no rosto para tratar dor de cabeça e febre, além do uso para tratar a esterilidade feminina (RENNER e HAUSNER, 1997).

No Peru, a espécie *S. sessiliflora* tem como sinônimas *S. radiata*, *S. magnifica*, *Citrosma sessiliflora* Kunth entre outros (THE PLANT LIST, 2013) sendo utilizada para tratar “mal ar” e auxiliar no pós-parto (IIAP, 2010). As raízes desta mesma planta e *S. scandens* são empregadas no tratamento de cólicas e diarreia pelo povo *Quichua*, que habita o Equador (NARANJO e ESCALERAS, 1995). Habitantes do Equador relatam que a espécie *S. grandiflora* é usada para cometer suicídios (BALSLEV et al. 2008). As folhas maceradas da espécie *S. chimpffii* são usadas pela etnia *Shuar* no preparo de uma bebida para combater o cansaço. Com um modo de preparo semelhante, a nação *Quichua* emprega a bebida para reduzir inflamações e acelerar o processo de cicatrização (RENNER e HAUSNER, 1997).

Diversas atividades biológicas são descritas para constituintes químicos de espécies do gênero *Siparuna*. A fração de alcaloides das folhas de *S. sessiliflora* apresentou atividade antibacteriana frente ao *Bacillus subtilis* e foi avaliada pelo método de difusão em ágar (GONZÁLEZ e ARCHILA, 2012). As folhas da mesma espécie foram submetidas à extração de alcaloides e posterior fracionamento com solventes de polaridades crescentes, comprovando a atividade antifúngica da fração solúvel em acetato de etila frente ao *Aspergillus niger* pela técnica da inibição do crescimento radial (VENEGAS, 2012). Fonseca e colaboradores (2008) atestaram a atividade do extrato bruto de *S. arianae* contra *Mycobacterium malmoense* apresentando Concentração Mínima Inibitória (CMI) de 200 µg/mL.

O óleo essencial de *S. guianensis* inibiu o crescimento do fungo *Cryptococcus neoformans*, na concentração de 16 µg/mL (MONTANARI, 2010). O efeito tripanocida e leishmanicida do extrato etanólico das folhas desta espécie foi avaliado por Tempone e colaboradores (2005) observando-se 100% de eficiência frente a tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* e valores de  $EC_{50} > 100$  µg/mL para promastigotas de *Leishmania chagasi*. Em contrapartida, Lima (2013) atestou que o extrato hidroalcoólico desta espécie submetido a testes *in vitro* para verificação da atividade leishmanicida demonstrou uma toxicidade maior que >500 µg/mL, e não obteve êxito mesmo na maior concentração testada. O extrato hexânico das folhas de *S. cujabana* foi avaliado frente às espécies *L. (L.) chagasi* e *L. (L.) amazonensis* com  $CI_{50}$  de 30,5 µg/mL e 63 µg/mL para promastigotas e 28 µg/mL e 8,75 µg/mL para amastigotas, respectivamente (RANGEL, 2010).

Alves (2007) confirmou a atividade triatômica de frações do extrato etanólico das folhas de *S. guianensis* frente à espécie *Rhodnius milesi*, vetor do *Trypanosoma cruzi*. O potencial tóxico *in vivo* do óleo essencial das cascas, folhas e frutos de *S. guianensis* foi utilizado como ovicida para os mosquitos *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* obtendo valores de CL<sub>50</sub> de 1,76; 0,98 e 2,46 µg/ml para *A. aegypti* e 1,36; 0,89 e 2,45 µg/ml para *C. quinquefasciatus* (AGUIAR et al. 2015).

Chincilla e colaboradores (2012) avaliaram a atividade antimalárica dos extratos etanólicos das flores e folhas jovens de *S. thecaphora* em camundongos infectados com *P. berghei*, com Cl<sub>50</sub> de 12,8 µg/mL e 15,5 µg/mL.

Jenett-Siems e colaboradores (1999) comprovaram a atividade antiplasmódica do extrato lipofílico das folhas de *S. andina*, *S. pauciflora* e *S. tonduziana* frente ao *P. falciparum* (PoW) com Cl<sub>50</sub> de 3,0; 8,2 e 11,9 µg/mL, respectivamente. Os mesmos extratos foram testados contra *P. falciparum* Dd2 resultando em Cl<sub>50</sub> de 3,9; 9,1 e 18,3 µg/mL respectivamente. A partir do extrato das folhas de *S. andina* foram isolados sipandinolideo (A, Figura 7) e cis-3-acetoxi-4,5,7-trihidroxi-flavanona (B, Figura 7) que exibiram Cl<sub>50</sub> de 46,2 e 24,3 µg/mL respectivamente, frente à cepa de *P. falciparum* (poW), os autores constataram a diminuição da atividade com o isolamento visto que o extrato lipofílico das folhas apresentou Cl<sub>50</sub> de 3,0 µg/mL (JENETT-SIEMS et al. 2000).

Foram isolados de *S. pauciflora* os alcaloides aporfinicos boldina, laurotetanina, N-metil laurotetanina e nor-boldina, além de sesquiterpenoides denominados Sipaucin A, B e C. Dentre as substâncias isoladas somente nor-boldina foi considerada ativa frente à *P. falciparum* segundo os autores, com Cl<sub>50</sub> 3,1µg/mL (PoW) e 5,4µg/mL (Dd2) (JENETT-SIEMS et al. 2003).

O Quadro 1 relaciona as espécies de *Siparuna* que foram avaliadas quanto a atividade antiplasmódica e antimalárica.

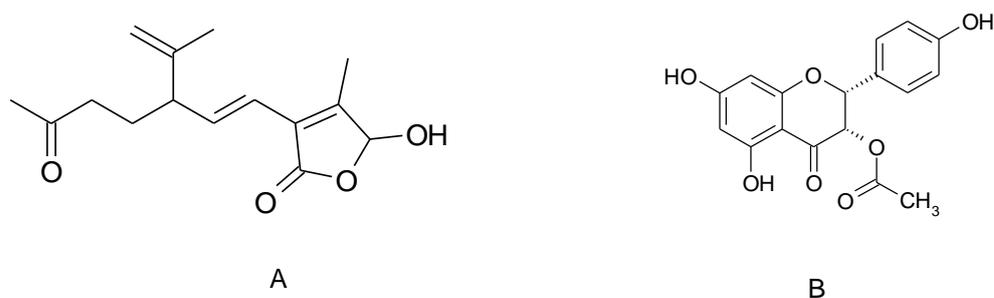


Figura 7 - Substâncias isoladas de espécie de *Siparuna* com atividade antiplasmódica  
Legenda: A: Sipandinolideo. B. cis-3-acetoxi-4,5,7- trihidroxiflavanona

Quadro 1- Atividade antimalárica/antiplasmódica de espécies de *Siparuna*

Espécie	Parte da planta utilizada	Extrato/ fração	Metodologia do teste	Espécie/cepa de <i>Plasmodium</i>	CI <sub>50</sub> µg/mL	Referência
<i>S. thecaphora</i>	F	Extratos em éter de petróleo e acetato de etila	<sup>3</sup> H-Hipoxantina	<i>P. falciparum</i> Dd2	3,9	(JENETT-SIEMS et al. 1999)
				<i>P. falciparum</i> Pow	3,0	
	F	Extrato em etanol (70%)	Microscópico	<i>P. berghei</i>	15,5	(CHINCHILLA et al. 2012)
	C	Extrato em etanol (70%)			2,0	
	Fl	Extrato em etanol (70%)			12,8	
R	Extrato fresco em etanol (70%)	50,8				
<i>S. áspera</i>	F	Extrato em etanol	<sup>3</sup> H-Hipoxantina	<i>P. falciparum</i> FCR-3	6,4	(CÉLINE et al. 2009)
<i>S. sessiliflora</i>	F				21,7	
<i>S. pauciflora</i>	F	Extratos em éter de petróleo e acetato de etila	<sup>3</sup> H-Hipoxantina	<i>P. falciparum</i> Pow	8,2	(JENETT-SIEMS et al. 1999)
<i>S. grandiflora</i>	F	Extratos em éter de petróleo e acetato de etila		<i>P. falciparum</i> Dd2	9,1	
				<i>P. falciparum</i> Pow	11,9	
				<i>P. falciparum</i> Dd2	18,3	
<i>S. guianensis</i>	F	Extrato aquoso	<sup>3</sup> H-Hipoxantina	<i>P. falciparum</i> W2- CQ resistente	> 11	(BERTANI et al. 2005)
	F	Extrato em etanol	Microscópico	<i>P. falciparum</i> K1- CQ resistente	6,7	(FISCHER et al. 2004)
	F			<i>P. falciparum</i> PA- CQ sensível	14,7	
	F	Fração de alcaloides		<i>P. falciparum</i> K1- CQ resistente	15,0	
	F			<i>P. falciparum</i> PA- CQ sensível	58,1	

Legenda: F: Folhas; Fl: Flores; C: Cascas; R: Raízes. CQ: Cloroquina

### 2.2.3 A Química do gênero *Siparuna*

Espatuleno e curzerenona são sesquiterpenos identificados no óleo essencial de folhas de *S. guianensis* coletadas no Estado de Rondônia. (ROVER, 2006). Os sesquiterpenos biciclogermacreno, gama-muuruleno e germacreno B foram identificados no óleo essencial das folhas de *S. schimpffii* coletadas no Equador (RIVERA et al, 2014). Germacreno D foi detectado no óleo essencial de folhas de *S. thecaphora* oriundas da Costa Rica (CICCIÓ e GÓMEZ-LAURITO, 2002) e *S. schimpffii*, do Equador (RIVERA et al. 2014).

Os flavonoides lucenina-2, vicenina-2, quercetina-3-O-pentosilraminosídeo-7-O-raminosídeo, canferol -3,7-di-O-ramnosídeo, canferol-3-O-pentosil-pentosídeo-7-O-ramnosídeo, quercetina-3,7-di-O-ramnosídeo, quercetina-3-O-pentosil-pentosídeo-O-ramnosídeo, quercetina-3-O-rutinosídeo-7-O-ramnosídeo foram identificados no extrato hidroalcoólico das folhas de *S. guianensis* que foi avaliada como ansiolítico (NEGRI et al. 2012). Facundo e colaboradores (2012) identificaram o canferol-3,7,3'-trimetiléter e canferol-3,7-dimetiléter no extrato etanólico das folhas da mesma espécie coletadas no Estado de Rondônia.

O alcaloide assimilobina (1) foi isolado das partes aéreas de *S. apiosyce* (FISCHER et al. 1999) e da fração de alcaloides das folhas de *S. sessiliflora* juntamente com a corlumina (2) (Figura 8) (GONZÁLEZ e ARCHILA, 2012). Cassamedina (3, Figura 8) foi identificada nas cascas de *S. guianensis*, nativa do estado do Amazonas (BRAZ et al.1976). Oxonantenina (4, Figura 8) foi obtida a partir do extrato metanólico das raízes de *S. thecaphora*, proveniente do Peru (CHIU et al. 1981). Bulbocapnina (5), actinodafinina (6, Figura 8), N-metil-lindcarpina (7) e metóxi-norneolistina (8, Figura 8) foram isolados a partir da fração de alcaloides das folhas de *S. guianensis*. Coridina (9) e roemerina (10, Figura 8) foram identificados na fração de alcaloides das folhas de *S. pachyantha* coletadas na Guiana Francesa (MARTI et al. 2013).

A liriodenina (11, Figura 8) foi isolada a partir da fração de alcaloides das folhas de *S. pachyantha* coletadas na Guiana Francesa (MARTI et al. 2013), raízes de *S. thecaphora*, provenientes no Peru (CHIU et al. 1981), e do extrato metanólico dos galhos coletados no Panamá (GERARD et al. 1986). Esta oxoaporfina está presente também nas cascas de *S. guianensis*, nativa do Estado do Amazonas (BRAZ et al. 1976), e na fração de alcaloides das folhas da mesma espécie (MARTI

et al. 2013). Este alcaloide foi também detectado em frações do extrato metanólico das folhas de *S. brasiliensis* oriundas do Estado do Rio de Janeiro (LEITAO et al. 2000). No entanto, nestes casos, não foram realizadas avaliações da atividade antimalárica destas espécies.

Os alcaloides isocoridina (12) e nantenina (13, Figura8) foram isolados de *S. griseoflavescens* (LEITÃO et al. 1999). Flavinantina (14) e O-metilflavinantina (15, Figura 8) foram detectados nas folhas de *S. dresslerana*, do Panamá (GERARD; MACLEAN; ANTONIO, 1986). Os alcaloides talicarpina (16) e ajmalina (17, Figura 8) foram identificados no extrato de alcaloides das folhas de *S. sessiliflora* (LÓPEZ, 2011).

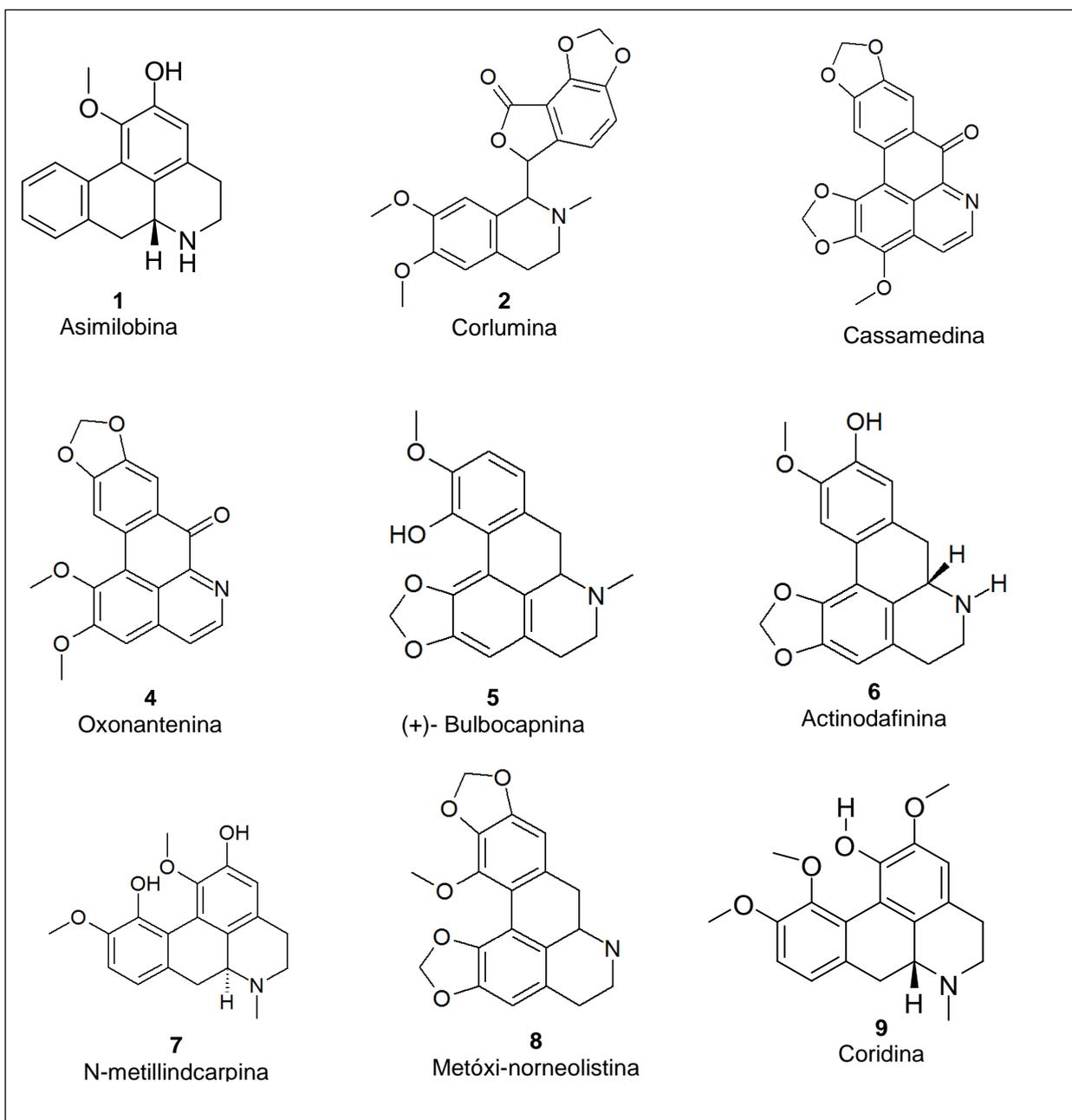


Figura 8 - Alcaloides isolados de espécies de *Siparuna*

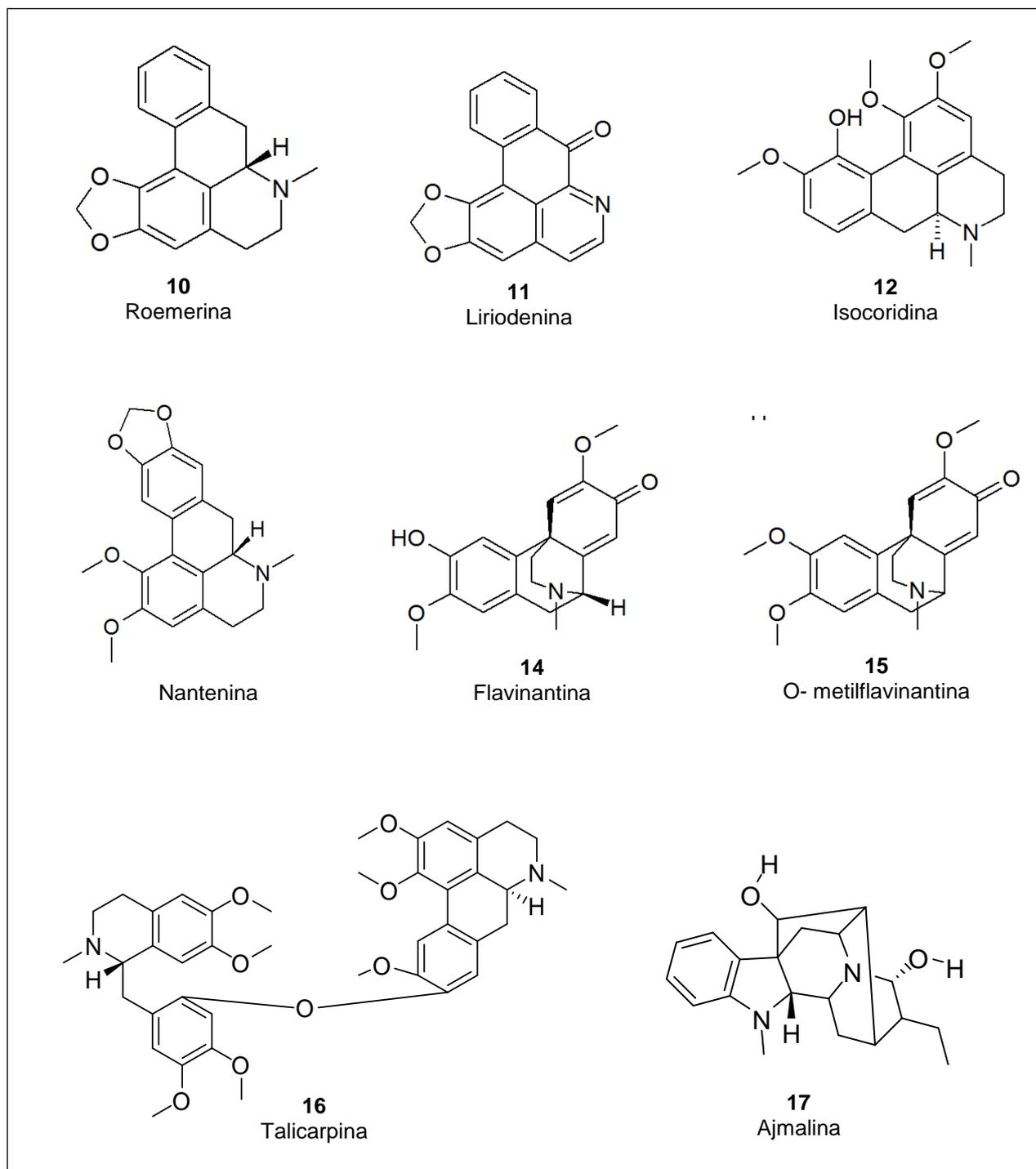


Figura 8- Continuação: Alcaloides isolados de espécies de *Siparuna*

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Realizar um estudo fitoquímico e avaliar as atividades antiplasmódica e citotóxica de cascas e folhas de *Siparuna poeppigii*.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a caracterização farmacognóstica de folhas e cascas *S. poeppigii*;
- Obter extratos etanólicos e alcaloídicos a partir de cascas e folhas de *S. poeppigii*;
- Realizar o fracionamento dos extratos obtidos;
- Realizar a caracterização fitoquímica por CCD e por via húmida dos obtidos;
- Identificar os constituintes majoritários dos extratos e frações;
- Realizar o fracionamento biomonitorado dos extratos ativos visando o isolamento de substâncias antiplasmódicas;
- Avaliar as atividades antiplasmódica e citotóxica dos extratos, frações e substâncias isoladas frente ao *P. falciparum* W2 e células HepG2, respectivamente.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 EQUIPAMENTOS

- Bomba de vácuo modelo V700 (Buchi®)
- Balança semi analítica
- Câmara de ultravioleta de 254 e 365nm, Waring
- Centrífuga Fanem, modelo 205N
- Cromatógrafo Líquido de alta eficiência (CLAE-DAD), modalidade analítica, Waters®, equipado com injetor automático modelo 2695; detector de arranjo de diodos (DAD), mod. 2996; bomba mod. L- 6200A; integrador, mod. C-R4A
- Dessecador de vidro
- Estufa ventilada para secagem de material vegetal Fanem, mod. 501A
- Evaporador rotatório Buchi®, modelo R114, com banho-maria modelo 480
- Geladeira Cônsul
- Leitora de microplacas ELISA Stat Fax®, mod. 2100
- Microcentrífuga, Cientec, modelo 14000D
- Mufla Quimis®
- Sistema de filtração de água Milipores, Mili-Q Plus
- Sistema de purificação de água Milipore, Mili-Q Plus
- Ultrassom Thornton®, mod. T14
- UPLC-DAD-MS/ESI marca Waters ACQUITY® H-Class Core System

### 4.2 SOLVENTES

- Acetato de etila
- Acetona
- Acetonitrila grau CLAE
- Ácido acético
- Ácido fórmico
- Ácido fosfórico
- Clorofórmio
- Diclorometano

- DMSO
- Etanol
- Hidróxido de amônio
- Metanol
- Metanol grau CLAE
- n-Hexano

### 4.3 REVELADORES UTILIZADOS NA PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

#### 4.3.1 Anisaldeído sulfúrico

Adicionou-se 0,5mL de anisaldeído a 10mL de ácido acético glacial, seguido de 85mL de metanol e 5mL de ácido sulfúrico concentrado. O reagente foi armazenado em frasco âmbar sob refrigeração ( 2-8°C) (WAGNER et al. 1984).

#### 4.3.2 Cloreto de alumínio 5%

Solubilizou-se 2,5g de cloreto de alumínio em 50mL de água destilada, a solução foi mantida sob refrigeração (WAGNER et al. 1984).

#### 4.3.3 Reagente de Dragendorff

Solução A: 0,850g de subnitrito de bismuto, 10mL de ácido acético e 40mL de água destilada. Solução B: 8g de iodeto de potássio em 20mL de água destilada. As soluções foram combinadas, na proporção de 1:1, resultando numa solução estoque. Para pulverizar as placas cromatográficas, diluiu-se 2mL de solução estoque com 4mL de ácido acético glacial e 20mL de água destilada (WAGNER et al. 1984).

#### 4.3.4 Reagente de Lieberman-Bouchardat

Adicionou-se 5mL de anidrido acético a 5mL de ácido sulfúrico concentrado e 50mL de etanol absoluto. Aqueceu-se a solução por 5min. Após o resfriamento armazenou-se em geladeira (WAGNER et al. 1984).

#### 4.4 REAGENTES UTILIZADOS NO TESTE ANTIPLASMÓDICO

##### 4.4.1 Reagente Malstat

Solubilizou-se 200mL de água destilada em 400mL Triton X-100, 4g de L-lactato de sódio, 1,32g de Ttis e 22mg de 3-acetilpiridina adenina dinucleotídeo (APAD). Todos da marca Sigma-Aldrich®.

##### 4.4.2 Reagente NBT/PES

Solubilizou-se 160mg de Nitro Blue Tetrazolium Salt (NBT) e 8mg de etosulfato de fenazina (PES) em 100mL de água destilada. Todos da marca Sigma-Aldrich®.

#### 4.5 COLETA DO MATERIAL VEGETAL

O material vegetal foi coletado no dia 11 de agosto de 2014, de um espécimen (A e B) (Figura 9) que ocorre no Museu Emílio Goeldi, Av. Perimetral, município de Belém, Estado do Pará, em torno das coordenadas 1°27'S 48°26' W, e identificado pela Dra. Márlia Regina Coelho Ferreira. A exsicata (C, Figura 9) foi armazenada no Herbário do Museu Emílio Goeldi sob o número MG 216495.

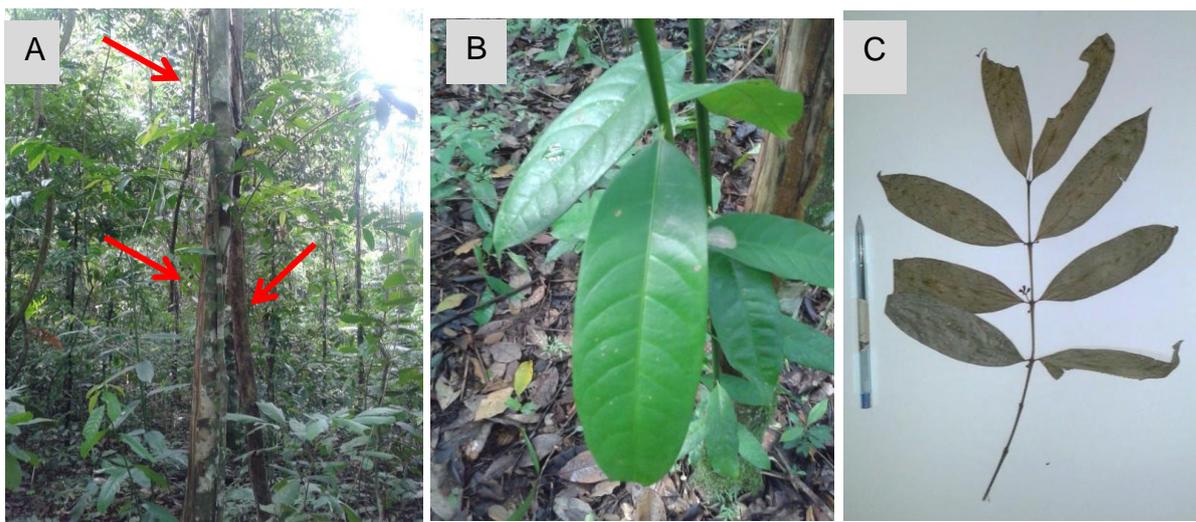


Figura 9 - Exemplar de *Siparuna poeppigii*

Legenda: A- Em destaque o caule da planta. B- Folhas de *S. poeppigii*. C- Exsicata de *S. poeppigii*

Fonte: Autora, 2015

## 4.6 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DE FOLHAS E CASCAS

### 4.6.1 Folhas

As folhas de *S. poeppigii* foram lavadas em água corrente e limpas com álcool a 70%, para retirada de impurezas, seguidas de secagem em estufa com ventilação de ar forçado por 7 dias. Em seguida triturou-se o material vegetal em um liquidificador doméstico obtendo-se o pó das folhas que foi tamizado e reservado para o preparo do extrato etanólico.

O extrato etanólico foi preparado por maceração, utilizando-se 261,7 g do pó das folhas e etanol 96°GL como solvente extrator. O extrato foi recolhido e o solvente trocado diariamente por um período de 5 dias. O extrato foi concentrado em evaporador rotativo.

### 4.6.2 Cascas

As cascas foram coletadas em pequenos pedaços que foram secos em estufa com ventilação de ar forçado por 10 dias. Em seguida foram trituradas em liquidificador industrial obtendo-se o pó das cascas, que foi tamizado e reservado para o preparo do extrato.

A mesma metodologia de maceração a frio foi utilizada para obtenção do extrato etanólico partindo-se de 616,16 g de pó. Posteriormente concentrado em evaporador rotativo.

## 4.7 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS ALCALÓIDICOS

### 4.7.1 Método B de extração de alcaloides

Ao pó das cascas (200g) e folhas (100,8 g), separadamente, adicionou-se hidróxido de amônio concentrado (10mL) e extraiu-se por maceração com diclorometano (DCM) por 1 h. O macerado foi recolhido e filtrado em papel de filtro, este procedimento foi repetido por 3 vezes. Efetuou-se extração da solução orgânica

com HCl 1N. A fase aquosa ácida foi alcalinizada até pH 10 com  $\text{NH}_4\text{OH}$ , seguida da extração com DCM, resultando nas frações SPC – B (6 g) e SPF – B (4 g). A Figura 10 representa as operações realizadas com o pó das cascas.

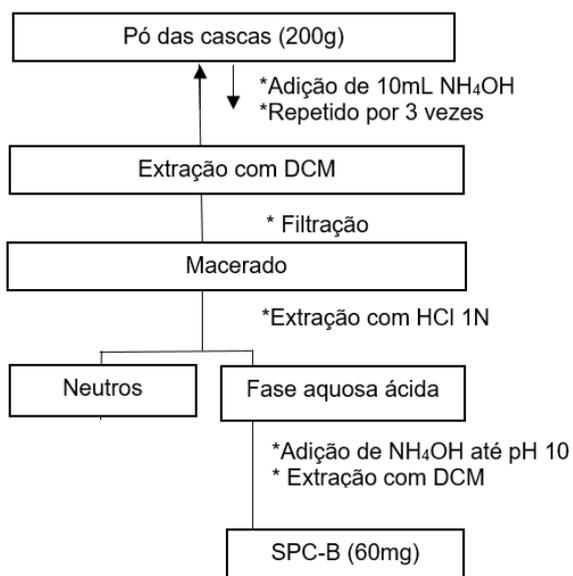


Figura 10 – Fluxograma da extração de alcaloides (método B) a partir das cascas de *Siparuna poeppigii*

Legenda: DCM: diclorometano; HCl: ácido clorídrico;  $\text{NH}_4\text{OH}$ : hidróxido de amônio; SPC-C: Fração de alcaloides das cascas de *Siparuna poeppigii* obtida pelo método C.

#### 4.7.2 Método C de extração de alcaloides

O pó das cascas (100,14 g) e folhas (100,70 g) foi submetido à maceração com HCl 1 N por 24hs, em seguida a solução foi filtrada e alcalinizada com  $\text{NH}_4\text{OH}$  até pH10. Efetuou-se a extração com DCM, a fase orgânica foi tratada com sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada em evaporador rotatório, originando as frações SPC-C (40 mg) e SPF- C (10 mg). A Figura 11 demonstra as operações realizadas para obtenção de SPC-C, o mesmo procedimento foi repetido a partir do pó das folhas para obtenção de SPF-C.

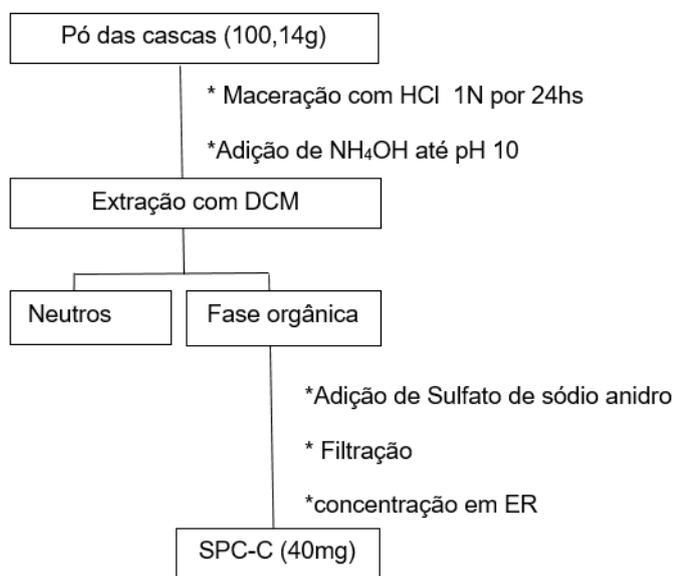


Figura 11 – Fluxograma da extração de alcaloides (método C) a partir das cascas de *Siparuna poeppigii*

Legenda: DCM: diclorometano; HCl: ácido clorídrico; NH<sub>4</sub>OH: hidróxido de amônio; ER: Evaporador Rotatório; SPC-C: Fração de alcaloides das cascas de *Siparuna poeppigii* obtida pelo método C.

#### 4.7.3 Re-extração dos extratos etanólicos com solventes de polaridade crescente

Os extratos etanólicos de cascas e folhas de *S. poeppigii* foram submetidos a re-extração exaustiva utilizando um sistema de refluxo com solventes de polaridades crescentes: Hex/DCM 1:1, DCM, AcOEt e MeOH, respectivamente. O procedimento foi realizado em triplicata, adicionando-se 100 mL de cada solvente ao sistema, aquecimento sob refluxo por 30 minutos, contados a partir do início da ebulição. O fluxograma do processo de fracionamento do extrato etanólico das cascas (EESPC) e das frações obtidas está detalhado na Figura 12.

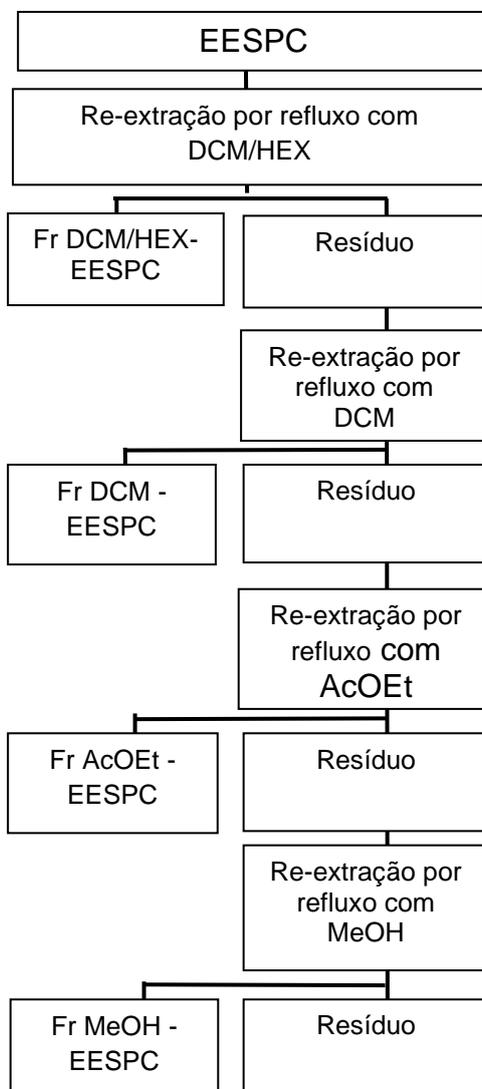


Figura 12 – Etapas do fracionamento do extrato etanólico por extração sob refluxo

Legenda: EESPC: Extrato Etanólico *S. poeppigii* Cascas. Fr HEX/DCM: fração hexano/diclorometano. Fr DCM: fração Diclorometano. Fr AcOEt: fração Acetato de etila. Fr MeOH: fração metanol.

## 4.8 CARACTERIZAÇÃO FARMACOGNÓSTICA DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DE FOLHAS E CASCAS DE *Siparuna poeppigii*

### 4.8.1 Determinação do pH

A determinação do pH foi efetuada de acordo com a Farmacopéia Brasileira (3ª edição). Uma amostra de 3g do pó foi adicionada à água destilada para o preparo de uma solução a 1%, que foi aquecida em chapa elétrica por 5 minutos (BRASIL, 1988). O extrato foi filtrado com algodão e levado ao potenciômetro. O procedimento foi efetuado em triplicata para as cascas e folhas.

### 4.8.2 Perda por dessecação

A perda por dessecação consiste em um método gravimétrico para determinação de água em drogas vegetais. Conforme descrito na Farmacopéia brasileira, uma amostra de 2g do material vegetal em pó foi transferida para pesa-filtro anteriormente dessecado, em seguida levada à estufa à 100°C por 5 horas. Resfriada em dessecador e pesada novamente para calcular a diferença na massa (BRASIL, 2010 b). O procedimento foi efetuado em triplicata para as amostras de casca e folha.

### 4.8.3 Teor de cinzas totais

A determinação de cinzas totais abrange tanto as cinzas de origem fisiológica quanto não fisiológicas.

Uma amostra de 3g do material vegetal em pó foi pesada e transferida para um cadinho previamente tarado e incinerado em mufla (Quimis®). Obedecendo um gradiente de temperatura a fim de evitar projeções do material, 30 minutos a 200°C, 60 minutos a 400°C e 90 minutos a 600°C (BRASIL, 2010 b). O procedimento foi repetido em triplicata para as amostras de casca e folha.

#### 4.8.4 Densidade aparente

A densidade aparente considera o volume total da amostra incluindo o espaço vazio entre os grãos. Neste procedimento o material vegetal foi colocado em uma proveta até o volume de 15 mL, esta foi pesada em balança analítica e os valores de densidade foram obtidos através do quociente entre o valor da massa e volume (SAMPAIO e SILVA, 2007). O procedimento foi repetido em triplicata para as amostras de cascas e folhas.

#### 4.8.5 Granulometria

A granulometria foi determinada conforme a Farmacopéia brasileira, com adaptações. Uma amostra de 10g do pó foi adicionado à sequência de peneiras 1,70 mm; 710 mm; 355 mm; 180  $\mu$ m, 125  $\mu$ m. Levadas ao agitador mecânico por 15 minutos, a quantidade retida em cada peneira foi pesada (BRASIL, 2010 b). O procedimento foi repetido em triplicata para as cascas e folhas.

### 4.9 FITOQUÍMICA DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DE FOLHAS E CASCAS DE *Siparuna poeppigii*

Após a obtenção das frações de alcaloides das cascas e folhas foi efetuado o teste de precipitação utilizando-se reagente de Dragendorff (MATOS, 1997).

#### 4.9.1 Prospecção fitoquímica por cromatografia em camada delgada

Os extratos etanólicos e as frações obtidas da re-extração por refluxo das cascas e folhas de *S. poeppigii* foram analisados por CCD a fim de se efetuar a prospecção fitoquímica das amostras. As classes de metabólitos pesquisados foram: alcaloides, polifenóis, taninos, saponinas, geninas flavônicas. Foram confeccionadas placas de sílica suportadas em vidro, com 0,25 mm de espessura de sílica gel

Merck®. As fases móveis e as amostras de referência utilizadas foram aquelas descritas por Wagner e colaboradores (1984).

#### 4.9.2 Cromatografia em Coluna

As frações de Hex-DCM, AcOEt, MeOH do EESPC e a fração de alcaloides (SPC-B) foram submetidas a cromatografia em coluna de sílica gel (CCS) aberta visando o isolamento de constituintes. A partir da CCS de SPC-B obteve-se a fração 84-88 que apresentou manchas em CCD reveladas com Dragendorff, sugestivas de alcaloides, e que foi submetida a cromatografia em coluna de alumina neutra, conforme descrito por Carollo e colaboradores (2006), visando a separação de alcaloides aporfínicos.

As informações complementares sobre o tipo de sílica e quantidade de frações utilizadas estão disponíveis na Tabela 2.

Tabela 2- Dados sobre as Cromatografias em Coluna realizadas com frações oriundas do extrato etanólico das cascas de *Siparuna poeppigii*

Amostra	Quant. (g)	Altura da coluna de sílica (cm)	Altura da coluna de sílica com amostra (cm)	Diâmetro interno da coluna (cm)	Tipo de sílica
Fr Hex-DCM	5	60	65	2,5	Sílica gel 60 (0,2-0,5 mm) Merck®
Fr AcOEt	0,250	25	27	1	Sílica gel 60 (0,04-0,063 mm) Macherey-Nagel®
Fr MeOH	0,100	35	36,5	2	Sephadex LH 20, Merk®
SPC-B	5,3	34	38,5	3,5	Sílica gel 60 (0,2-0,5 mm) Merck®
Fr 84-88*	0,1	20	22	1,5	Alumina**

Legenda: Fr Hex- DCM: Fração hexano-diclorometano das cascas de *S. poeppigii*. Fr AcOEt: Fração de acetato de etila. Fr MeOH: fração de metanol. SPC-B: Fração de alcaloides das cascas de *S. poeppigii*, método B. Fr 84-88: Fração obtida a partir da fração SPC-B.

#### 4.10 ANÁLISES POR UPLC-DAD E UPLC – DAD – ESI – MS/MS

Os extratos etanólicos das cascas e folhas, as frações oriundas das re-extrações, o extrato alcaloídico de cascas obtido pelo método B (SPC-B) e as 39 subfrações cromatográficas (111 frações combinadas por semelhança em CCD) obtidas a partir deste foram analisadas por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada ao ultravioleta, UPLC-DAD, a fim de se ter informação sobre complexidade das amostras e classes dos constituintes presentes através dos seus espectros no UV registrados on line. Para as subfrações de SPC-B, levou-se em conta a complexidade do cromatograma, a possibilidade de isolamento e a disponibilidade de material suficiente para prosseguimento do trabalho, incluindo-se a avaliação da atividade antiplasmódica e da citotoxicidade. Estes critérios permitiram a seleção de 8 frações para análise por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada às Espectrometrias no UV e de Massas, UPLC-DAD-ESI-MS. Estas frações foram analisadas no modo positivo, algumas no modo negativo e, posteriormente, submetidas a análises por Espectrometria de Massas Seqüencial (massa/massa, MS/MS) que permite registrar os picos resultantes da fragmentação de um constituinte da amostra. A Figura 13 indica quais frações foram analisadas pelas referidas técnicas.

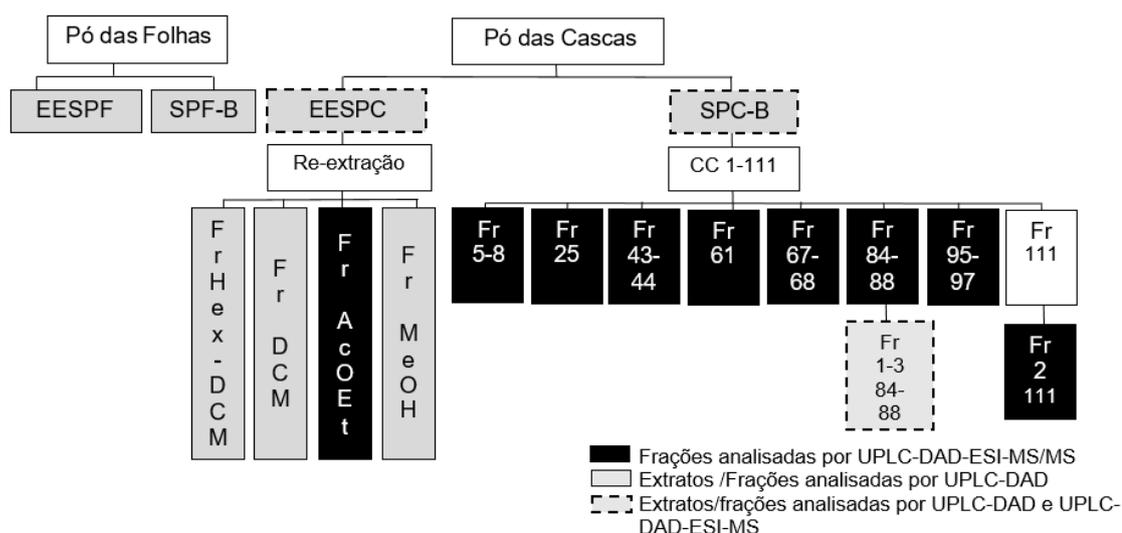


Figura 13 – Extratos e frações de *Siparuna poeppigii* analisadas por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada ao UV e espectrometria de massas

Legenda: EESPC Extrato Etanólico das cascas de *Siparuna poeppigii*; EESPF Extrato Etanólico das folhas de *Siparuna poeppigii*; SPC-B Fração de alcaloides das cascas de *Siparuna poeppigii*- método B; CC Cromatografia em Coluna; Fr fração; Hex hexano; DCM diclorometano; AcOEt acetato; MeOH metanol

#### 4.10.1 Preparo das amostras e condições de análise

As amostras foram preparadas em tubo cônico de 2mL (Ependorff®), adicionando-se 3mg da fração/ extrato para UPLC-DAD e 2mg para UPLC-DAD-ESI-MS/MS dissolvidas em 1 mL de metanol grau HPLC. Em seguida foram colocadas no aparelho de ultrassom por 20 minutos e centrifugadas por 10 minutos a 10.000 rpm. As amostras foram filtradas e transferidas para tubos identificados. O gradiente de eluição adotado e condições de análise adotados para UPLC-DAD e UPLC-DAD-ESI-MS/MS estão na tabela 3.

Tabela 3- Gradiente de eluição e condições de análise adotados no UPLC-DAD e UPLC-DAD-ESI-MS/MS

	Tempo (min)	Fluxo (mL/min)	Eluente A (%)	Eluente B (%)	Temperatura da Coluna (°C)	Coluna
UPLC-PDA (Waters®)	0		95,0	5,0	40	
	8		5,0	95,0		
	9	0,600	5,0	95,0		
	10		95,0	5,0		
	18		95,0	5,0		
UPLC-PDA-ESI-MS/MS (Waters®)	0		95,0	5,0	40	Acquity® UPLC HSS, C-18 SB, 50 x 2,1mm, 1,8µm
	10	0,300	5,0	95,0		
	11		95,0	5,0		
	13		95,0	5,0		

Legenda: UPLC-DAD: Eluente A- Água+ ácido fórmico 0,1%. Eluente B – Metanol. UPLC-DAD-ESI-MS/MS :Eluente A- Água+ ácido fosfórico 0,1%. Eluente B – Acetonitrila

## 4.11 ATIVIDADE ANTIPLASMÓDICA

### 4.11.1 Preparo do meio e descongelamento do parasito

O meio incompleto utilizado para o cultivo foi preparado em erlenmeyer com 50mg de hipoxantina sob aquecimento a 40°C com 400mL de água deionizada. Após solubilização e resfriamento acrescentou-se 40mg de gentamicina, 300mg de glutamina, 2g de bicarbonato de sódio, 2g de D-glicose, 5,98 de tampão HEPES e 10,4g do pó de RPMI 1640 em agitação constante. Transferiu-se a solução para um balão volumétrico de 1000 mL e se completou o volume com água deionizada, ajustando o pH para 7. Em seguida se efetuou a filtração em sistema a vácuo com membrana de 0,44µm.

Na etapa de descongelamento, uma alíquota de parasitos foram retirados do crio-banco do Laboratório de Malária da Universidade Federal de Minas Gerais, deixados a temperatura de 37°C. Posteriormente foram adicionados 1 mL de sangue e 0,4 mL de solução salina estéril (NaCl) a 12%, gota a gota sob agitação, resultando em uma solução que permaneceu em repouso por 5 min. A seguir foi acrescentado 1 mL de sangue para cada 9 mL de NaCl estéril a 1,6%, gota a gota, sob agitação seguida por centrifugação por 10 min. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi ressuscitado com 10mL de meio RPMI completo (20%) e transferido para a placa de cultivo, na qual foram acrescentados a suspensão de eritrócitos até obtenção do hematócrito a 5%. A placa de cultivo foi incubada a 37°C utilizando o método do dessecador com vela e deixado neste ambiente por 48 hs, até adaptação dos parasitos (TRAGER e JENSEN, 1976)

### 4.11.2 Cultivo do *Plasmodium falciparum* (W2)

Após o descongelamento, o parasito foi adicionado ao meio de cultura RPMI completo em placas de Petri, junto com hemácias tipo A<sup>+</sup>, até atingir o hematócrito de 5%. As placas foram armazenadas em dessecador, com concentração de CO<sub>2</sub> entre 3% a 5%, obtidas por combustão de vela e incubadas em estufa a 37°C (TRAGER e JENSEN, 1976). O meio de cultura foi trocado a cada 48 horas e monitorado através de esfregaços corados com Giemsa, a fim de verificar a

presença de esquizontes e estimar o nível da parasitemia. Visto que o ensaio de atividade antiplasmódica requer um mínimo de 10% de parasitemia.

Para manutenção do cultivo a parasitemia superior a 5% permite o repique para outra placa.

#### **4.11.3 Sincronização de culturas de *Plasmodium falciparum***

Para a realização do ensaio de atividade o cultivo do *P. falciparum* deve estar predominantemente na forma de trofozoíto. A sincronização deste estágio é efetuada após a remoção do meio RPMI da placa de cultivo e adição de 10 mL de sorbitol a 5% + 0,5% de glicose. Efetua-se a homogeneização e transferência para um tubo de 15 mL. Em seguida, o tubo é armazenado em estufa de CO<sub>2</sub> por 10 min e centrifugado por 5 min a 5000rpm, o sobrenadante é descartado e a solução com o parasita é resuspensa em meio RPMI completo até obtenção do hematócrito de 5% (PAULA, 2014).

O cultivo sincronizado foi transferido para a placa de Petri e uma alíquota foi retirada para confecção do esfregaço. A partir deste foi possível constatar a predominância das formas de trofozoíto e verificar a parasitemia, que por sua vez, teve de ser ajustada para 1%, com adição de hemácias e meio RPMI completo em proporções adequadas.

#### **4.11. 4 Preparo das amostras e avaliação da atividade antiplasmódica**

As frações foram pesadas em tubo cônico de 2mL, solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO) e colocadas em ultrassom até homogeneização. Para a determinação da atividade antiplasmódica utilizou-se placas com 96 poços. Nos seis primeiros poços da linha A da microplaca, foram depositadas amostras de hemácias saudáveis para o controle negativo e as hemácias parasitadas no restante dos poços da mesma linha para o controle positivo. Uma alíquota de 180 µL dos parasitas provenientes da cultura e sincronização em trofozoítos foi transferida para os poços da microplaca. As amostras teste foram distribuídas da linha B a linha G, conforme Figura 14, iniciando com 20 µL, seguindo o esquema de diluição seriada para obtenção das concentrações de 50; 25; 12,5; 6,5; 3,12 e 1,56 µg/mL, todas em

triplicata. O padrão de cloroquina foi iniciado com a concentração de 500 ng/mL , a linha H foi preenchida com meio de cultura (PAULA, 2014).

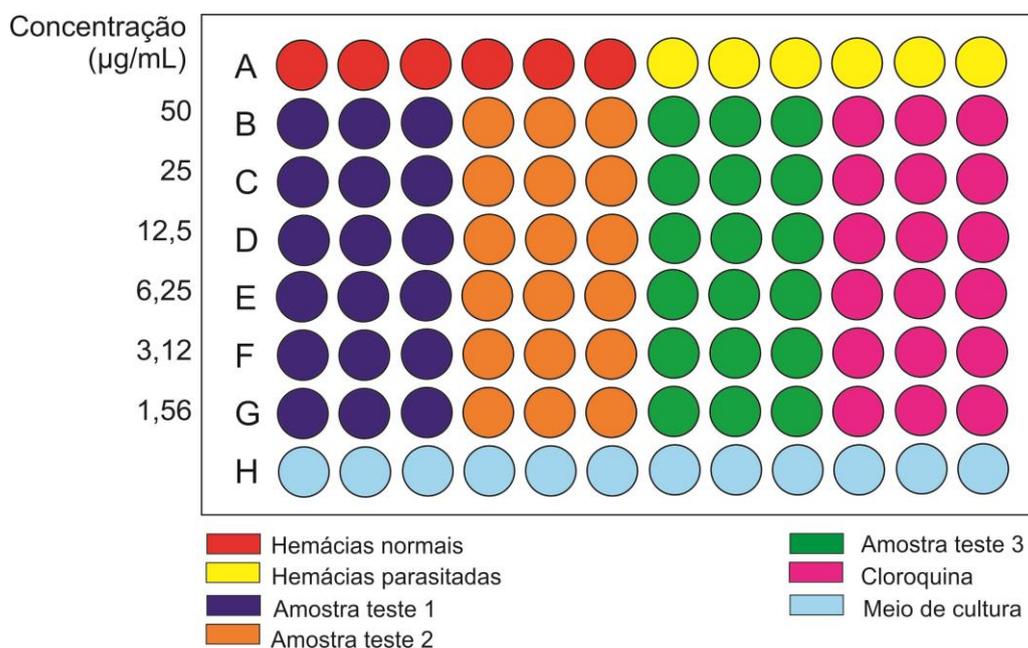


Figura 14 - Esquema da placa utilizada para determinação da atividade antiplasmódica

A placa foi armazenada em dessecador, em atmosfera de CO<sub>2</sub> obtida por combustão de uma vela, seguindo-se incubação em estufa, por 48hs quando a microplaca foi congelada a -20°C e descongelada por duas vezes, visando a hemólise das amostras. Em outra microplaca, foram adicionados 100 µL do reagente de Malstat em cada poço, somando-se a 25 µL da solução de NBT/PES (*Nitroblue Tetrazolium/Phenazine ethosulphate*) e 15 µL da amostra-teste de cada concentração obtida anteriormente. A segunda microplaca foi incubada por 1h a 37°C (MAKLER et al. 1993; NKHOMA et al. 2007). Após uma hora, a leitura da microplaca foi efetuada em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 540nm. A produção de pLDH dos controles positivos foi considerada como 100% viáveis e os negativos, com 0% de viabilidade. Com base nesses parâmetros, a viabilidade dos parasitos mantidos em contato com as amostras teste e a cloroquina foram calculadas.

#### 4.11.5 Determinação da citotoxicidade e cálculo do índice de seletividade

As frações que mostraram atividade antiplasmódica foram submetidas aos testes de citotoxicidade *in vitro* com linhagem celular HepG2 A16, derivada de um hepatoblastoma primário humano (DE PILLA VAROTTI et al. 2008). Estas células foram distribuídas em microplacas de 96 poços ( $4 \times 10^5$  células/100µl por poço) e incubadas em estufa de CO<sub>2</sub> à 37°C por 24h para a adesão das células à placa. No dia seguinte foram adicionados 100µl de meio completo contendo os compostos testados em triplicata nas concentrações de 1, 10, 100 e 1000µg/mL, a placa foi incubada por mais 24h. Ao final deste período, foram adicionados 28µl/poço da solução brometo 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazol (MTT) (Sigma®), na concentração de 2mg/ml (DENIZOT e LANG, 1986). Após 1h30min de incubação com o MTT foram adicionados 130µl/poço. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 510nm.

A dose que inibe 50% do crescimento das células (CC<sub>50</sub>) na presença das amostras teste e antimalárico controle foi determinada em comparação com células cultivadas na ausência destas substâncias, considerada 100% de crescimento. A determinação da CC<sub>50</sub> permitiu calcular o índice de seletividade (IS) que é dado pela razão entre o valor obtido de CC<sub>50</sub> e o valor de CI<sub>50</sub> para *P. falciparum* ( $IS = CC_{50}/CI_{50}$ ). O índice de seletividade permite inferir se a amostra possui um efeito direcionado apenas ao parasito ou se sua ação ocorre devido a sua toxicidade para quaisquer tipos celulares.

#### 4.11.6 Avaliação dos resultados

A viabilidade do parasito na presença das amostras teste foi representada por curvas de inibição em função de regressão linear para determinar a concentração inibitória do crescimento de 50% dos parasitos (CI<sub>50</sub>) e citotoxicidade (CC<sub>50</sub>), utilizando o programa OriginPro versão 8.5 (PAULA, 2014). Após a determinação da CI<sub>50</sub>, as amostras foram classificadas de acordo com critérios definidos na Tabela 4. O valor da viabilidade utilizada no programa foi calculada para cada concentração,

observando-se a triplicata das absorvâncias.

$$\text{Viabilidade do parasito} = \frac{\overline{M \text{ das Ab da Concentração utilizada}} - \overline{M \text{ das Ab das Hc saudáveis}}}{\overline{M \text{ das Ab das Hc parasitadas}} - \overline{M \text{ das Ab das Hc saudáveis}}}$$

$\overline{M}$ : média

*Ab*: Absorbância

*Hc*: hemácias

Tabela 4 - Classificação das amostras de acordo com o resultado de  $CI_{50}$  para atividade antiplasmódica

Classificação	$CI_{50}$ µg/mL
Muito ativa	< 1
Ativa	Entre 1 e 15
Moderadamente ativa	Entre 15,1 e 25
Pouco ativa	Entre 25,1 e 50
Inativa	> 50

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO FARMACOGNÓSTICA DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DE FOLHAS E CASCAS DE *SIPARUNA POEPPIGII*

O pH das amostras mostrou-se ácido, sendo de  $6,6133 \pm 0,0351$  para o pó das cascas e de  $6,1366 \pm 0,0808$  para o pó das folhas, ligeiramente acima do pH da água do solo da região onde o material vegetal foi coletado (pH 5) (MELO et al. 2013). O pH ácido favorece a produção dos alcaloides, bem como a composição química do solo e umidade podem interferir neste aspecto (OLIVEIRA; AKISUE; AKISUE, 1998). A perda por dessecação foi muito próxima para cascas e folhas, 10,53% e 10,44%, respectivamente. Deve-se ressaltar que o método utilizado determina o percentual de perda de água e outras substâncias voláteis.

O teor de cinzas totais foi maior nas cascas (8,5%) do que nas folhas (5,6%). Fischer (1997) determinou a porcentagem de cinzas totais nas folhas e na mistura de folhas e caule de *S. apiosyce* (sinonímia *S. brasiliensis*) relatando valores de 7,88% e 4,9%, respectivamente, ressaltando que a coleta da planta foi efetuada no mês de março, no Estado de Minas Gerais. As folhas de *S. poeppigii* exibiram valores inferiores aos obtidos por Fischer (1997), demonstrando um menor teor de substâncias inorgânicas. A densidade do pó das cascas (6,5) foi maior do que das folhas (5,5), tendo em vista as características lenhosas e fibrosas respectivamente. Os resultados dos testes farmacognósticos constam da Tabela 5.

Tabela 5 - Resultados dos testes farmacognósticos de pH, perda por dessecação, cinzas totais e densidade

Parâmetros farmacognósticos avaliados	Material vegetal em pó			
	Cascas		Folhas	
	Média $\pm$ DP	IC	Média $\pm$ DP	IC
pH	$6,6133 \pm 0,0351$	0,0012	$6,1366 \pm 0,0808$	0,0029
Perda por dessecação (%)	$10,5365 \pm 0,2786$	0,0100	$10,4487 \pm 0,3899$	0,0141
Teor de cinzas totais (%)	$8,5170 \pm 0,2826$	0,0102	$5,6819 \pm 0,5838$	0,0211
Densidade	$6,5481 \pm 0,0343$	0,0400	$5,5480 \pm 0,1489$	0,1739

DP: Desvio Padrão; IC: Intervalo de Confiança.

A granulometria das amostras de cascas e folhas permitiram classificar ambas como pó grosso, com percentual de passante menor que 40% pela malha de 355  $\mu\text{m}$ . Os dados da classificação granulométrica constam na Tabela 6.

Tabela 6 - Percentual de material vegetal em pó retido na sequência de peneiras adotadas para classificação granulométrica

Material vegetal em pó	Abertura malha	Média do retido (g) $\pm$ DP	% Retido	% Passante
Folhas	1,70	1,1190 $\pm$ 0,4935	10,975	89,026
	710	3,6137 $\pm$ 0,9828	35,439	53,587
	355	3,0347 $\pm$ 0,8089	29,761	23,826
	180	1,481 $\pm$ 0,2655	14,524	9,302
	125	0,5587 $\pm$ 0,1072	5,4790	3,823
	Fundo	0,3897 $\pm$ 0,1514	3,822	0
Cascas	1,70	0,3283 $\pm$ 0,0805	3,247	96,753
	710	3,9019 $\pm$ 0,5374	38,589	58,164
	355	3,5023 $\pm$ 0,9624	34,637	23,527
	180	1,7007 $\pm$ 0,0689	16,819	6,708
	125	0,4866 $\pm$ 0,0549	4,812	1,896
	Fundo	0,1915 $\pm$ 0,0334	1,894	0

DP: Desvio Padrão

## 5.2 RENDIMENTOS DOS EXTRATOS E FRAÇÕES

Os rendimentos obtidos na preparação dos extratos e nos fracionamentos preliminares são mostrados no Quadro 2. Os rendimentos do extrato etanólico e da fração de alcaloides das cascas pelo método C, EESPC e SPC-C (7,33% e 0,03%) foram superiores aos rendimentos do extrato etanólico e da fração de alcaloides das folhas, EESPF e SPF-C (5,8% e 0,009%). O rendimento da fração de alcaloides pelo método B foi ligeiramente maior para as folhas (SPF-B 3,96%) do que para as cascas (SPC-B 3,0%).

Fischer (1997) obteve o extrato etanólico de folhas e caule de *S. apiosyce* a partir do re-fracionamento com solventes de polaridade crescente alcançando um rendimento de 2,72%. A partir do extrato etanólico os autores realizaram a extração ácido-base de alcaloides obtendo um rendimento de 4,68%.

O método C de extração de alcaloides consiste na maceração do pó do material vegetal com ácido clorídrico aquoso 2N seguindo extração da solução aquosa ácida com DCM; esta camada orgânica contém os compostos neutros. Alcalinização da solução aquosa ácida com hidróxido de amônio e extração desta com DCM, permite a obtenção de aminas terciárias não fenólicas na camada orgânica (DCM) (YUBIN et al. 2014). Com este método obteve-se menor rendimento do SPC-C e SPF-C quando comparado ao método B. O método B utiliza solvente orgânico que separa alcaloides livres e outras substâncias lipofílicas como terpenos, resinas ou flavonoides (WYNN e FOUGÈRE, 2007; YUBIN et al. 2014) sugerindo a presença de outras classes de produtos naturais, além de alcaloides, nas frações SPC-B e SPF-B, contribuindo para o aumento no rendimento.

A polaridade dos metabólitos determina o local da planta onde são armazenados, a exemplo de alguns flavonoides e taninos hidrofílicos que podem ser armazenados em vacúolos e apoplastos do tecido da planta, enquanto que compostos mais lipofílicos, como terpenos, podem ser armazenados em tricomas (WYNN e FOUGÈRE, 2007).

Fatores abióticos no habitat da planta como fonte de luz solar, exposição à radiação UV, disponibilidade de água, temperatura e composição do solo influenciam na acumulação e na rota biossintética de metabólitos secundários (PAVARINI et al. 2015). O espécime coletado de *S. poeppigii* provém de um solo com perfil geotécnico de silte e argila arenosos, linha de pedra, areia argilosa, argila arenosa e areia compacta (JÚNIOR e JÚNIOR, 2012), o pH da água do solo nessa região é ácido (aproximadamente pH 5) (MELO et al. 2013). Considerando que a produção de alcaloides é favorecida em solos ácidos (OLIVEIRA; AKISUE; AKISUE, 1998), outros interferentes contribuíram para o teor de alcaloides encontrado na amostra.

Estudos realizados com a espécie *S. guianensis* coletada no Mato Grosso, demonstraram variação sazonal no teor de óleo essencial, constituído por terpenos, alcançando o 3º maior rendimento no mês de agosto, no qual ainda predominava o clima seco e coincidia com a época de floração (VALENTINI et al. 2010). Na região da Amazônia Legal, o período de seca ocorre entre os meses de maio a setembro (NOBRE; GUILLERMO; MARENGO, 2009), possivelmente o período de floração de *S. poeppigii* ocorra nesse período, considerando as flores presentes nas amostras coletadas no mês de agosto, ressaltando-se a ausência de dados a esse respeito.

Quadro 2- Rendimentos dos extratos e frações obtidos de cascas e folhas de *Siparuna poeppigii*

Material vegetal	Quantidade inicial (g)	Extrato/fração obtidos	Método de extração	Quantidade obtida extrato/fração (g)	Rendimento (%)
Folhas	261,7 (pó das folhas)	EESPF	Maceração	15,183	5,80
	100,8 (pó das folhas)	SPF- B	Método B de Extração de alcaloides	4,0	3,96
	100,70 (pó das folhas)	SPF- C	Método C de Extração de alcaloides	0,010	0,009
	11,2865 do EESPF	Fr Hex/DCM EESPF	Refluxo sequencial de solventes a quente	4,7	41,642
		Fr DCM EESPF		0,249	3,780
		Fr AcOEt EESPF		0,176	2,77
		Fr MeOH EESPF		0,600	9,737
Cascas	616,16 (pó das cascas)	EESPC	Maceração	45,2	7,33
	200 (pó das cascas)	SPC- B	Método B de Extração de alcaloides	6,0	3,0
	100,14 (pó das cascas)	SPC- C	Método C de Extração de alcaloides	0,04	0,03
	23,19 do EESPC	Fr Hex/DCM EESPC	Refluxo sequencial de solventes a quente	9,0	38,80
		Fr DCM EESPC		0,100	0,7
		Fr AcOEt EESPC		0,300	2,12
		Fr MeOH EESPC		6,0	43,50

Legenda: EESPC: Extrato Etanólico das Cascas de *S. poeppigii*; EESPF: Extrato Etanólico das folhas de *S. poeppigii*; SPC - B: Fração de alcaloides das cascas – método B; SPF – B: Fração de alcaloides das folhas – método B; SPC-C: Fração de alcaloides das cascas- método C; SPF-C: Fração de alcaloides das folhas – método C; Fr HEX-DCM: Fração hexano-diclorometano; Fr DCM: Fração diclorometano; Fr AcOEt: Fração acetato de etila; Fr MeOH: Fração metanol.

### 5.3 FITOQUÍMICA DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DE FOLHAS E CASCAS DE *Siparuna poeppigii*

O teste preliminar de precipitação com reagente de Dragendorff foi positivo para as frações de folhas SPF- C (A), SPF-B (B) e cascas SPC-C (C), conforme observado na Figura 15. Estes resultados são semelhantes aos encontrados por Fischer (1997), ao testar as frações de alcaloides de folhas e da mistura de folhas e caule de *S. apiosyce*. Bessera e colaboradores (2011) e Bessa e colaboradores (2013) obtiveram resultado positivo para alcaloides utilizando o mesmo teste com o reagente de *Dragendorff* para o extrato etanólico das folhas de *S. guianensis* oriundas do Tocantins. Lopéz (2011) constatou a presença de alcaloides com o referido teste nos extratos em clorofórmio e etanol das folhas e pecíolos de *S. sessiliflora*. Resultado idêntico ao obtido por Venegas (2012) efetuado com extrato etanólico das folhas de *S. sessiliflora*. Chiu e colaboradores (1981) e Tempone e colaboradores (2005) utilizaram o teste de precipitação para verificar a presença de resíduo de alcaloides no processo de extração ácido-base das raízes de *S. gilgiana* e folhas de *S. guianensis* e *S. apiosyce*, respectivamente.

O teste de precipitação com Dragendorff se baseia na reação de uma solução com sal e um metal pesado (exemplo: tetraiodeto de bismuto). Ocorre um acoplamento deste metal do reagente com o átomo de nitrogênio do alcaloide, compostos nitrogenados heterocíclicos ou aminas quaternárias presentes, formando pares de íons. Estes pares de íons são insolúveis e precipitam. A cor observada pode variar entre amarelo-laranja, vermelho ou rosa dependendo da espécie ou gênero analisada (ANISZEWSKI, 2007; KATAVIC, 2005). Vale ressaltar que a sensibilidade do ensaio de precipitação é menor do que a do reagente de Dragendorff em spray usado para CCD (RÍOS, 2013), sendo portando, análises complementares.

Esses resultados indicam a presença de nitrogênio na estrutura dos constituintes das frações das folhas SPF- C (A), SPF-B (B) e cascas SPC-C (C). O que motivou o prosseguimento das análises por CCD.

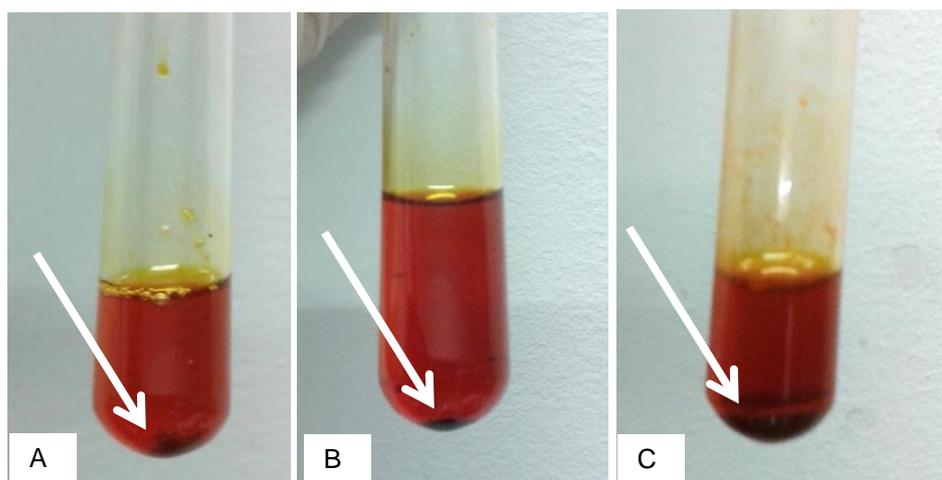


Figura 15 - Resultado positivo do teste de precipitação para alcaloides com as frações de alcaloides das cascas e folhas

Legenda: Precipitados observados no teste com as frações de alcaloides utilizando reagente de Dragendorff ,após 48hs, SPF-C: *S. poeppigii* folhas-método C; SPF-B: *S. poeppigii* folhas – método B; SPC-C: *S. poeppigii* Cascas – método C

### 5.3.1 Prospecção fitoquímica por cromatografia em camada delgada de sílica gel

Cromatogramas em camada delgada (Figura16) revelaram resultado positivo para alcaloides para os dois extratos e as oito frações das cascas e folhas de *S. poeppigii*, confirmando o resultado do teste de precipitação. A presença de alcaloides em espécies do gênero *Siparuna* é bastante descrita na literatura, Marti e colaboradores (2013) analisaram a fração de alcaloides das folhas de *S. pachyantha*, *S.guianensis*, *S. decipiens* e *S.poeppigii* e identificaram lisicamina, O-metilisofilina, nornuciferine e liriodenina entre outros do tipo aporfínicos.

Terpenos foram detectados por CCD por revelação com o reagente de Lieberman-Bouchard para os dois extratos etanólicos de folhas e cascas e as oito frações. A Figura 16 (1) mostra a CCD correspondente aos extratos etanólicos das folhas EESPF(A) e cascas EESPC (B). A presença de terpenos no óleo essencial da família *Siparunaceae* é descrito em várias espécies, a exemplo de *S. guianensis* coletada em Minas Gerais, na qual predominam sesquiterpenos hidrocarbônicos (ANDRADE, 2013). Souza e colaboradores (2013) observaram presença de terpenos e ausência de flavonoides em *S. guianensis*.

Nos extratos etanólicos e frações se observou fluorescência compatível com o padrão de rutina utilizado na CCD. Flavonoides foram detectados por CCD no extrato etanólico das folhas de *S. guianensis* por Javaé (2013) e foram isolados por Facundo e colaboradores (2012) e Souto e colaboradores (2013) das folhas de *espécimens* de Rondônia e Manaus, respectivamente. Testes de precipitação pela reação de Shinoda e adição de cloreto de alumínio a 5%, efetuados por Fischer (1997), detectaram flavonoides no extrato etanólico das folhas e mistura de caule e folhas de *S. apiosyce*.

Saponinas foram detectadas nos extratos etanólicos e nas 6 frações, com exceção da Fr MeOH das cascas e folhas, a Figura 16 (7) apresenta a CCD da Fração AcOEt de folhas e cascas ao lado do padrão de saponina.

O EESPC e a Fr HEX-DCM EESPC apresentaram mancha em CCD com  $R_f$  similar ao padrão de lupeol. A Figura 19 apresenta as CCD's com as referidas amostras aplicadas lado a lado e no mesmo ponto que o padrão, indicando a presença de uma substância pouco polar no EESPC com  $R_f$  0,5 que após o fracionamento permaneceu na Fr HEX-DCM. Nota-se que todos os extratos e frações apresentaram um perfís muito semelhantes em termos de classes de metabólitos significando que o fracionamento preliminar por extração sob refluxo com solventes de polaridades crescentes não foi eficiente qualitativamente.

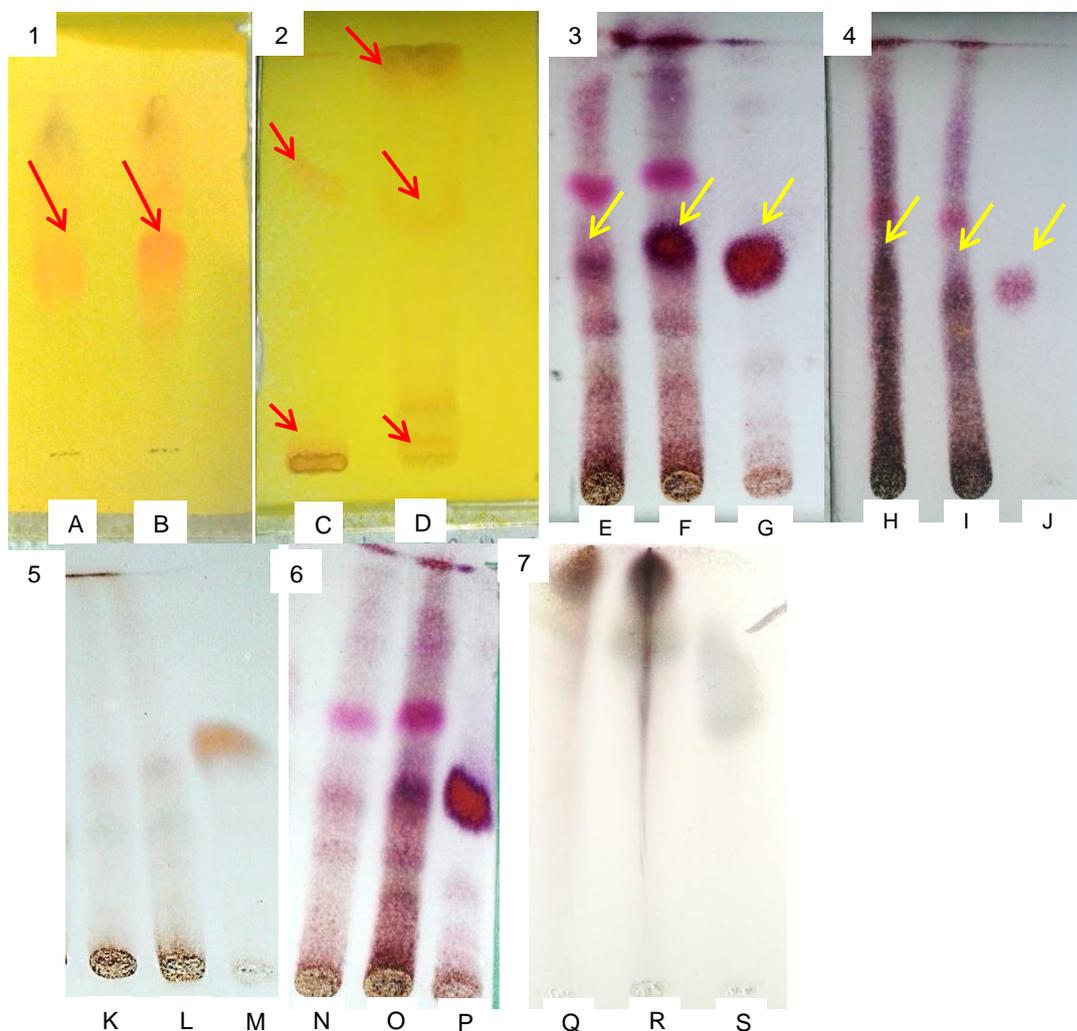


Figura 16 – Cromatogramas em camada delgada dos extratos de cascas e folhas de *Siparuna poeppigii*

Legenda: 1: Frações acetato de etila (A) e diclorometano (B) das cascas de *S. poeppigii*. Fase móvel: Acetato de etila: ácido acético: água: acetona (70:20:10:10). Revelador: Reagente de Dragendorff. 2. Frações em Metanol (C) e Hexano- diclorometano (D) das cascas de *S. poeppigii*. Fase móvel: Clorofórmio: metanol: hidróxido de amônio (85:15:0,1). Revelador: Reagente de Dragendorff. 3. Extrato etanólico das cascas de *S.poeppigii* (E), extrato etanólico e lupeol aplicados no mesmo ponto(F) e Lupeol (G). 4. Fração hexano – diclorometano das cascas de *S. poeppigii* (H), fração Hex-DCM e lupeol aplicadas no mesmo ponto (I), Lupeol (J). Fase móvel: Diclorometano. Revelador: Anisaldeído sulfúrico. 5. Extrato etanólico das folhas (K) e cascas (L) de *S.poeppigii*. Padrão de Lupeol (M). Fase móvel: hexano:acetato (70:30). Revelador: Leiberman-Bouchard; . 6. Extrato etanólico das folhas (N) e cascas (O) de *S.poeppigii* . Padrão de lupeol (P). Fase móvel: diclorometano 100%. Revelador: anisaldeído sulfúrico. 7. Fração acetato de etila das folhas (Q) e cascas (R) de *S.poeppigii*. Padrão de saponina (S). Fase móvel: Clorofórmio: metanol: água (60:30:10). Revelador: anisaldeiso sulfúrico

Quadro 3- Resultados da prospecção fitoquímica por CCD dos extratos e frações de *Siparuna poeppigii*

Classes de metabólitos secundários	Reveladores	Fases móveis	Amostras testadas								
			Cascas				Folhas				
			EESPC	Fr Hex-DCM	Fr AcOEt	Fr MeOH	EESPF	Fr Hex-DCM	Fr AcOEt	Fr MeOH	
Alcaloides	Dragendorff	CHCl <sub>3</sub> /MeOH/ NH <sub>4</sub> OH (85:15:0,2)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Geninas flavônicas	Cloreto de alumínio 5%	CHCl <sub>3</sub> / AcOEt (60:40)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Heterosídeos flavônicos	Cloreto de alumínio 5%	AcOEt/ ácido fórmico/ácido acético/ água (100:11:11:27)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Triterpenos e esteroides	Lieberman-Bouchard	Hex/ AcOEt (7:3)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Saponinas	Anisaldeído sulfúrico	CHCl <sub>3</sub> / ácido acético/ MeOH/ água (15:8:2:2)	+	+	+	-	+	+	+	+	-
Polifenóis e taninos	Ferrocianeto de potássio 1% e cloreto férrico 2% (1:1)	AcOEt/ ácido fórmico/ ácido acético/ MeOH (96:1:1:2)	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Amostras: EESPC: Extrato Etanólico *S. poeppigii* Cascas. Fr Hex-DCM: Fração Hexano-Diclorometano. Fr AcOEt: Fração Acetato de Etila. Fr MeOH: Fração Metanólica. EESPF: Extrato Etanólico *S. poeppigii* Folhas.

(+) Presença. (-) Ausência

#### 5.4 CROMATOGRAFIA EM COLUNA (CC)

A fração Hex-DCM obtida a partir de EESPC foi submetida à cromatografia em coluna de sílica gel eluindo-se inicialmente com n-hexano e seguindo com solventes e misturas de solventes de polaridades crescentes. As informações constam do Quadro 4.

Quadro 4- Dados referentes à cromatografia em coluna de sílica aberta da Fração Hex-DCM do EESPC

Fases móveis	Frações coletadas	Reunião de frações por semelhança em CCD	Massa (mg)
Hex	1 H-D	-	257,2
	2 H-D	2-6 HD	443,2
	3 H-D		
	4 H-D		
	5 H-D		
Hex – DCM 8:2	6 H-D	7-9 HD	117,8
	7 H-D		
	8 H-D		
Hex – DCM 1:1	9 H-D	10-14 HD	356
	10 H-D		
	11 H-D		
	12 H-D		
	13 H-D		
Hex – DCM 2:8	14 H-D	15-18 HD	417,2
	15 H-D		
	16 H-D		
DCM	17 H-D	19-22 HD	444,6
	18 H-D		
	19 H-D		
	20 H-D		
	21 H-D		
DCM – AcOEt 8:2	22 H-D	23-26 HD	591,8
	23 H-D		
	24 H-D		
DCM – AcOEt 1:1	25 H-D	-	635,8
	26 H-D	-	199,7
	27 H-D	-	81,2
	28 H-D	-	48,9
AcOEt	30 H-D	-	171,3
	31 H-D	-	
	32 H-D	32-35 HD	479,8
AcOEt – MeOH 9:1	33 H-D		
AcOEt – MeOH 8:2	34 H-D		
	35 H-D		
AcOEt – MeOH 1:1	36 H-D	36-38 HD	515
	37 H-D		
	38 H-D		
MeOH	39 H-D	39-40 HD	239,2
	40 H-D		

Legenda: EESPC: Extrato etanólico das cascas de *S. poeppigii*. Hex: hexano. DCM: Diclorometano. AcOEt: acetato de etila. MeOH: metanol. HD: Hexano-Diclorometano

A fração de AcOEt obtida a partir do EESPC foi submetida a fracionamento por CCS e os dados desta coluna encontram-se no Quadro 3. Uma pequena quantidade inicial foi adicionada à coluna o que levou, conseqüentemente, a frações com pequenas massas, como se pode ver no Quadro 3. Contudo, a fração 16-17, quando submetida à CCD e revelada com o reagente de Dragendorff, mostrou manchas alaranjadas com diferentes  $R_f$ , características de alcaloides. Essa fração foi encaminhada para análise por UPLC-DAD e UPLC-DAD-ESI-MS/MS.

Quadro 5- Dados referentes à cromatografia em coluna de sílica aberta da Fr AcOEt do EESPC

Fases móveis	Frações coletadas	Massa (mg)
DCM 100%	1	10,7
DCM - AcOEt 1:1	2 – 3	3
AcOEt – DCM 8:2	4 – 7	10
AcOEt – DCM 9:1	8 – 9	7
AcOEt 100%	9 – 10	4
AcOEt – MeOH 5%	11 – 12	14
AcOEt – MeOH 10%	13 – 14	20
AcOEt – MeOH 1:1	15	162
MeOH 100%	16 - 17	20

Legenda: Fr AcOEt EESPC: Fração de acetato de etila obtida do extrato etanólico das cascas de *S. poeppigii*. Hex: hexano. DCM: Diclorometano. AcOEt: acetato de etila. MeOH: metanol

A fração alcaloidica SPC-B foi submetida à CCS eluindo-se com solventes e misturas de solventes de polaridades crescentes e os dados referentes são mostrados no Quadro 4. Essa coluna originou algumas frações que se revelaram positivamente para alcaloides com o reagente Dragendorff em CCD, esse fato, aliado à disponibilidade de algumas frações com massas significativas (>100mg) motivaram a avaliação da atividade antiplasmódica destas frações e posterior re-fracionamento, bem como sua análise por UPLC-DAD.

Quadro 6- Dados referentes à cromatografia em Coluna aberta de sílica da fração alcaloídica SPC – B

Fase móvel	Frações reunidas por semelhança em CCD	Massa (g)
HEX-DCM 1:1	1-3	0,2958
	4	0,1368
	5-8	0,2697
	9-12	0,106
	13-16	0,4246
	17-20	0,118
DCM 100%	21-23	0,1216
	24	0,0277
	25	0,0312
	26-28	0,0688
	29-30	0,0216
	31-32	0,0147
	33-35	0,0362
DCM- AcOEt 9:1	36-38	0,035
	39-42	0,0406
	43-44	0,212
	45-46	0,0811
	47-48	0,067
	49-52	0,1183
DCM – AcOEt 1:1	53-55	0,0971
	56-58	0,0295
	59-60	0,0435
	61	0,221
AcOEt 100%	62-66	0,4011
	67-68	0,123
	69-70	0,0568
	71-75	0,0872
AcOEt- MeOH 10%	76-79	0,0638
	80-83	0,045
AcOEt- MeOH 1:1	84-88	0,2671
	89-91	0,0588
MeOH 100%	92	0,063
	93-94	0,1726
	95-97	0,1882
	98-99	0,0287
	100-103	0,020
	104-107	0,0101
MeOH – Ácido acético 1%	108-110	0,032
	111	0,152

Legenda: SPC-B: Fração de alcaloides das cascas de *S. poeppigii* – método C. Hex: hexano. DCM: Diclorometano. AcOEt: acetato de etila. MeOH: metanol. CCD: Cromatografia em Camada Delgada.

A CCS da fração SPC-B originou a fração 84-88, que apresentou manchas em CCD reveladas com Dragendorff e, portanto, sugestivas de alcaloides (A) (Figura 20). Esta fração foi submetida à cromatografia em coluna de alumina, conforme os dados do Quadro 5, as frações 1, 2 e 3 provenientes deste fracionamento foram reunidas pela similaridade em CCD e fluorescência amarela no UV a 365 nm (B) (Figura 16) e apresentaram  $R_f$  0,4 compatível com o padrão de liriodenina, um alcaloide já isolado de outras espécies do gênero. As frações 1, 2 e 3 foram reunidas (9 mg) e a substância isolada foi denominada SP-1.

Quadro 7 - Dados referentes à cromatografia em coluna de alumina da Fr 84-88.

Fase móvel	Frações reunidas por semelhança em CCD	Massa (mg)
DCM 100%	1-3	9
DCM/ AcOEt 8:2	4-5	5
DCM/ AcOEt 1:1	5-7	2
AcOEt 100%	-	-
AcOEt/ MeOH 10%	7-9	4
AcOEt/MeOH 1:1	10-15	6
MeOH 100%	16-19	10

Legenda: SPC-B: Fração de alcaloides das cascas de *S. poeppigii* – método B. Hex: hexano. DCM: Diclorometano. AcOEt: acetato de etila. MeOH: metanol

A última amostra da CCS da fração SPC-AB, eluída com MeOH: ácido acético 1% denominada fr 111, exibiu mancha em CCD revelada com Dragendorff sendo sugestiva de alcaloide (Figura 16). Esta fração foi submetida à cromatografia em coluna de sephadex LH20, sendo isolada uma substância denominada SP-2 (20 mg) que foi submetida a análise por UPLC-DAD-ESI-MS.

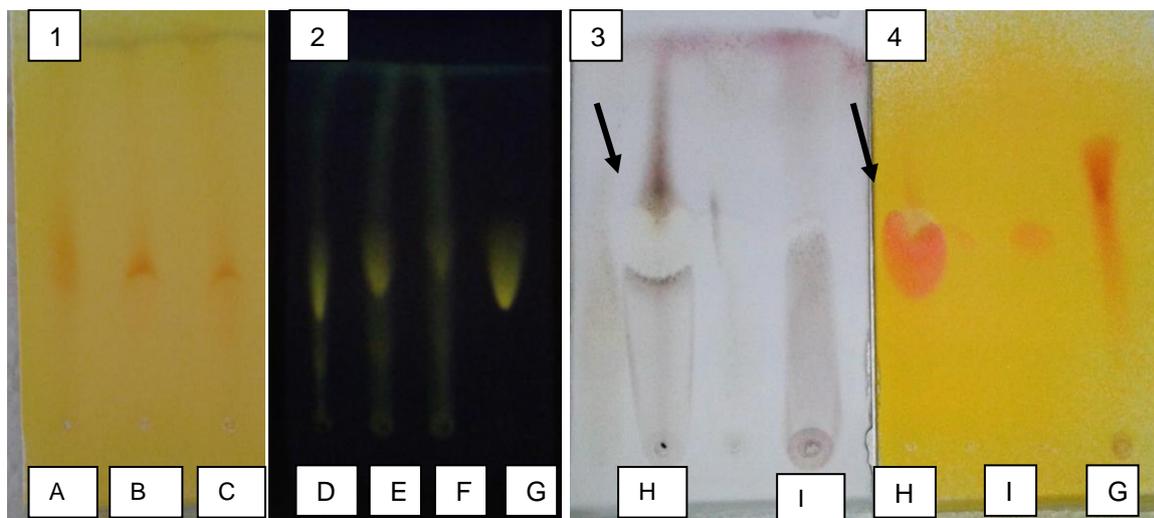


Figura 17 – Cromatogramas em camada delgada de frações de alcaloide das cascas de *Siparuna poeppigii*

Legenda: 1. frações 86(A) 87(B) e 88 (C) provenientes da cromatografia em coluna da fração de alcaloides das cascas (SPC-B). Revelador: Dragendorff. Fase móvel: Acetato de etila (100%). 2. Frações 1 (D), 2 (E) e 3 (F) oriundas do refractionamento da fração 84-88 SPC-B. Amostra autêntica de lirioidenina (G) vistas em UV a 365nm. Fase móvel: Acetato de etila (100%). 3 . Frações 111 (H) e 113 (I). Fase móvel: metanol: acetato de etila (8:2). Revelador: anisaldeído sulfúrico. 4. Frações 111(H) e 113 (I). Fase móvel: metanol: acetato de etila (8:2). Revelador: Dragendorff

## 5.5 ANÁLISES POR UPLC-DAD E UPLC-DAD-ESI-MS/MS

### 5.5.1 Extrato e frações das folhas

O extrato etanólico das folhas de *S. poeppigii* (EESPF) foi analisado por UPLC-DAD que permite a visualização de picos correspondentes aos constituintes cujas áreas indicam as proporções dos mesmos e também fornece seus espectros no UV online. O cromatograma do EESPF, no comprimento de onda 280nm (A, Figura 18), apresentou um pico mais intenso referente ao componente majoritário, com tempo de retenção (TR) aproximado de 6,5 min (32,2%), cujo espectro no UV-vis apresenta duas bandas de absorção, banda A ( $\lambda_{\max}$  346,6 nm) e banda B ( $\lambda_{\max}$  267,2 nm). Os cromatogramas das frações SPF-B (B, Figura 18) e Hex-DCM EESPF (A, Figura 19) apresentaram um pico predominante com o mesmo TR 6,5min (30 e 32,6% respectivamente) e espectro no UV idêntico ao observado para EESPF (A, Figura 18).

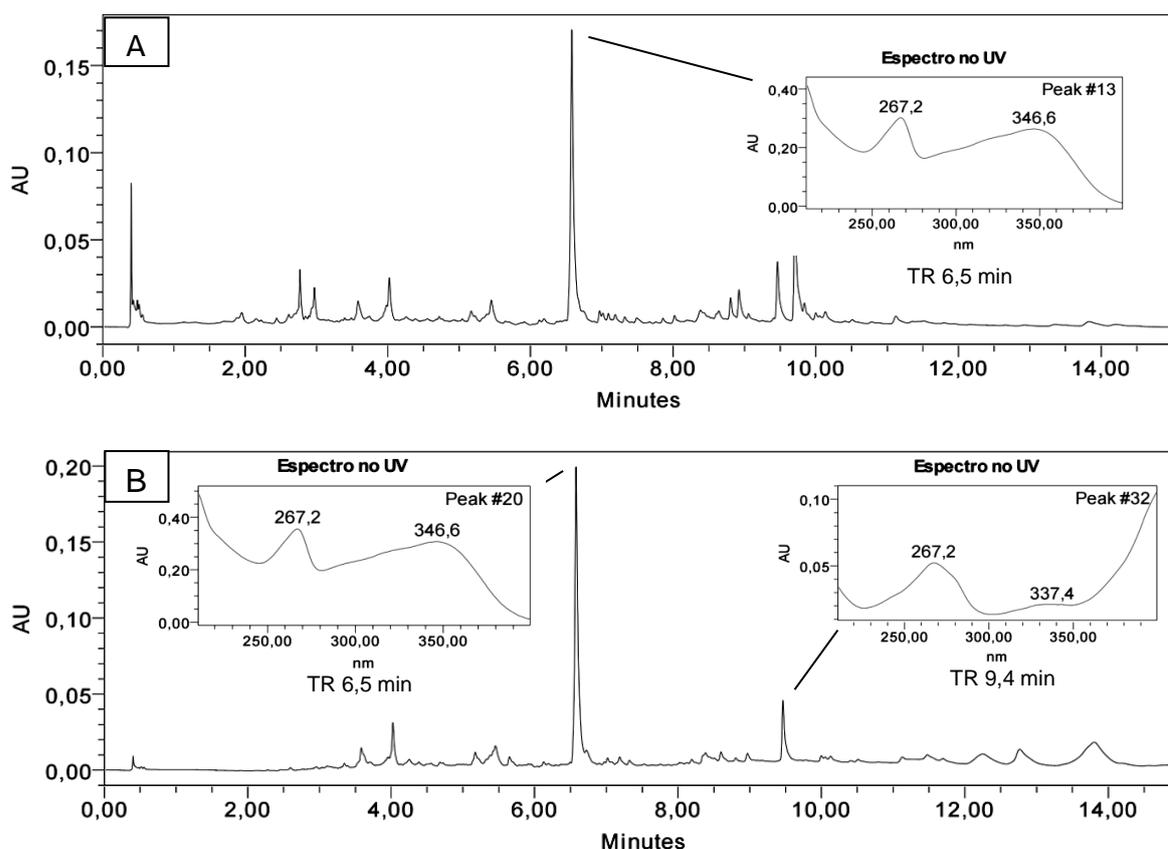


Figura 18 – Cromatogramas do extrato etanólico e fração de alcaloides das folhas de *Siparuna poeppigii* e respectivos espectros no UV online dos picos majoritários

Legenda: A - EESPF: extrato etanólico das folhas de *S.poeppigiii*. B -SPF-B: Fração de alcaloides das folhas de *S. poeppigii*; Cromatograma obtido por UPLC-DAD em 280nm

O cromatograma da fração DCM EESPF (B, Figura 19) revelou um pico majoritário com TR 2,7 min (29,13%) com máximos de absorção em  $\lambda_{\max}$  264,8 e 347,8 nm. Picos de menor intensidade (d, e, f, Figura 19) foram observados com TR 2,9; 3,9 e 6,5 min (20,8; 4,5 e 4,5% respectivamente). A fração AcOEt EESPF (A, Figura 20) apresentou pico majoritário com área 8% e TR 2,7min, cujo espectro no UV-vis apresentou  $\lambda_{\max}$  264,8 e 347,8nm, além de picos minoritários com TRs próximos daqueles da Fr DCM EESPF, com percentuais de 8,6; 1,96 e 1,75 % para TR 2,9; 3,9 e 6,5 min, respectivamente.

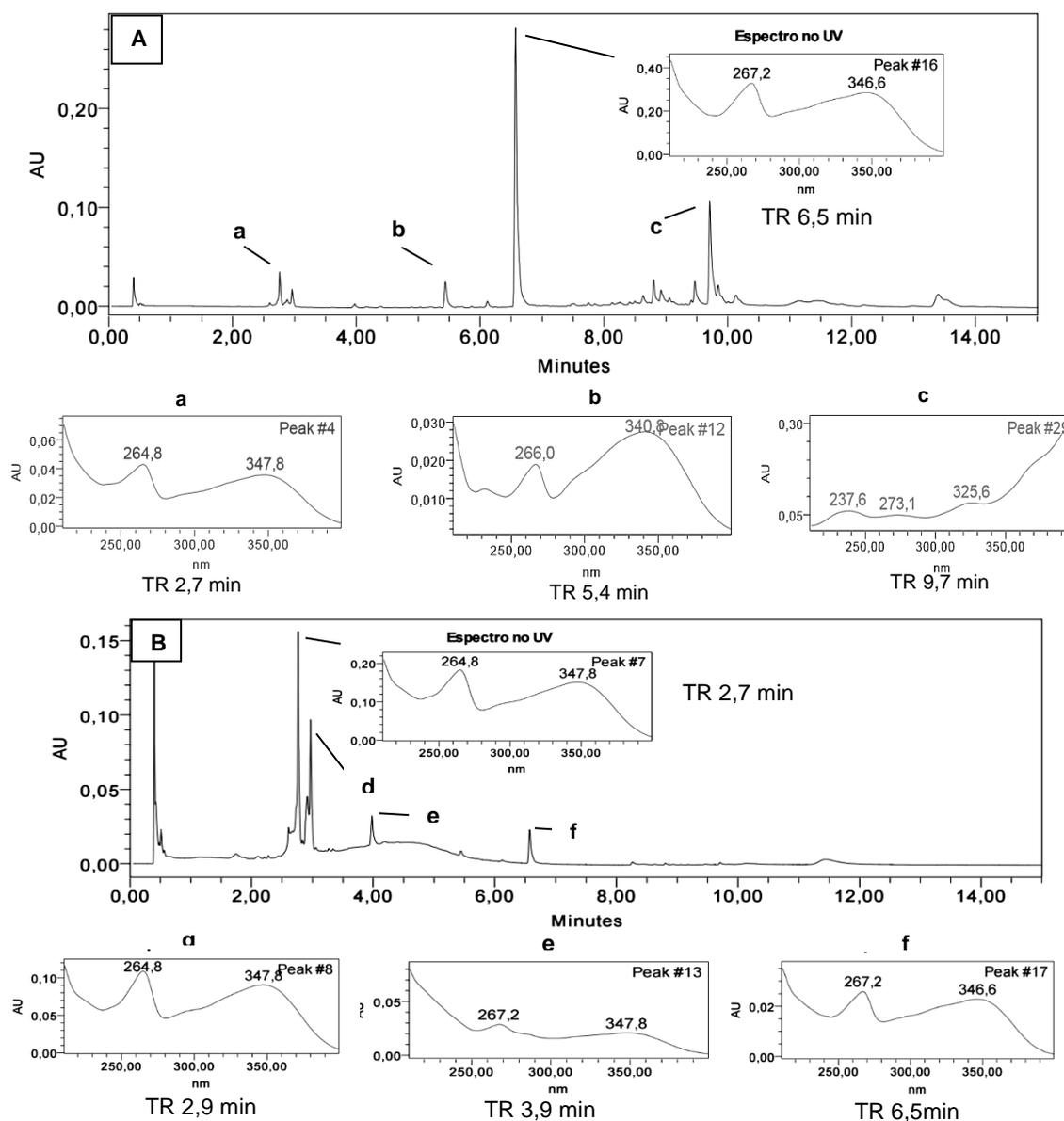


Figura 19 - Cromatogramas das frações hexano: diclorometano e diclorometano das folhas de *Siparuna poeppigii* e respectivos espectros no UV online dos picos majoritários

Legenda: A- Hex-DCM: Hexano-Diclorometano; B - DCM: Diclorometano. TR: Tempo de Retenção. Análise feita por UPLC-DAD em 350nm

A fração MeOH EESPF apresentou no cromatograma (B, Figura 20) um pico referente ao composto majoritário com TR 2,7 min (22,5%) acompanhado de picos de menor intensidade com TR 2,9 e 6,5 min (10,6 e 3,9%), com máximos de absorção em  $\lambda_{\max}$  264,8 e 347,8nm (f, Figura 20) e 267,2 e 347,8nm (g, Figura 20).

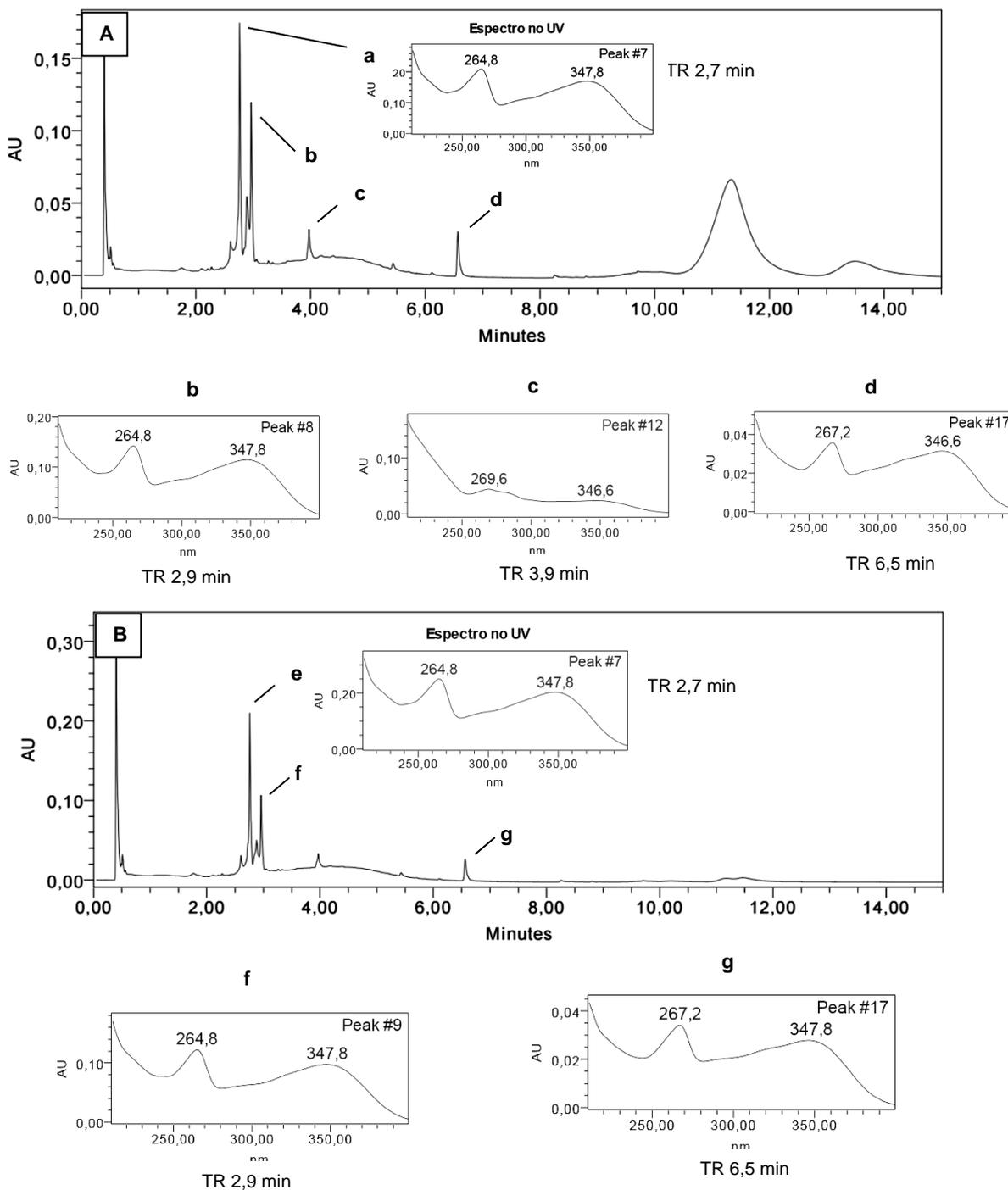


Figura 20 - Cromatogramas das frações acetato de etila e metanol das folhas de *Siparuna poeppigii* e respectivos espectros no UV online dos picos majoritários

Legenda: A - AcOEt: Acetato de etila ;B - MeOH: metanol. TR: Tempo de Retenção. Análise por UPLC-DAD em 350nm

O espectro no UV-vis característico de flavonoides inclui duas bandas de absorção, banda A entre 310nm e 350nm, para flavonas, e banda B na faixa de 250nm a 290nm, para flavonas e flavonóis (TSIMOGIANNIS et al. 2007). Em uma análise por CLAE-DAD-ESI-MS, do extrato etanólico das folhas de *Gynura divaricata*, foi identificado o canferol-3-O- $\beta$ -D-glucopiranosídeo, cujo espectro no UV mostrou máximos de absorção em  $\lambda_{\max}$  265 nm e 346 nm (WAN et al. 2011).

Cao e colaboradores (2014) analisaram um extrato (etanol: água 1:1) da espécie *Davallia cylindrica* por HPLC-DAD-ESI-MS e observaram espectros no UV com  $\lambda_{\max}$  266, 346 nm para um constituinte que foi identificado como canferol-3-O-rutinosídeo. Esta mesma substância foi detectada por Wu e colaboradores (2013), através de análises por HPLC-MS do extrato de espécies do gênero *Solanum sp.*, cujo espectro no UV apresentou máximos de absorção em  $\lambda_{\max}$  265, 347 nm. Deste modo, sugere-se que o pico predominante em EESPF, SPF-B e Fr Hex-DCM EESPF corresponda a um flavonoide, provavelmente derivado do canferol.

O canferol é um flavonoide cuja presença tem sido descrita em diversas famílias de plantas de uso tradicional, a exemplo de *Apocynaceae* e *Siparunaceae*, possui comprovada atividade antioxidante, atividade *in vitro* na prevenção e/ou tratamento de doenças neurodegenerativas, diabetes, osteoporose, alergias, inflamação e dor (CALDERÓN-MONTAÑO et al. 2011). O elevado teor de um possível flavonoide no extrato e frações das folhas de *S. poeppigii* pode estar relacionado ao momento da coleta da planta (durante sol forte), por conta do efeito fotoprotetor desses metabólitos nas plantas (SAEWAN e JIMTAISONG, 2013).

### 5.5.2 Extrato e frações das cascas

Os cromatogramas do extrato etanólico EESPC e da fração alcaloídica das cascas SPC-B, a 280 nm (Figura 21), apresentaram um pico com TR 6,5 min (25,9 e 15,38% respectivamente) e bandas de absorção no UV em  $\lambda_{\max}$  267,2 e 346,6 nm. O espectro no UV referente ao constituinte responsável por este pico majoritário apresenta as mesmas características dos picos observados também com TR 6,5 min nas frações SPF-B, Fr Hex-DCM EESPF e EESPF, que deve corresponder a um flavonoide, possivelmente derivado do canferol. O extrato etanólico EESPC ainda

apresentou picos com TR 2,5 (2,8%) e 3,5 min (5,5%) (A, Figura 24) cujos espectros no UV sugerem tratar-se de alcaloides (SANGSTER e STUART, 1984).

O referido extrato foi analisado por UPLC-DAD-ESI-MS, a fim de se obter informações acerca dos compostos observados. A Tabela 7 relaciona TR,  $\lambda_{\max}$  e os principais picos de íons moleculares protonados  $[M+H]^+$  uma vez que os mesmos foram registrados no modo positivo. No EESPC os picos mais intensos, correspondentes a íons mais estáveis, são a m/z 330 e 360 (TR 2,4 e 2,6 min). Portanto as massas moleculares destes são 329 e 359, respectivamente, podendo corresponder a alcaloides aporfínicos, sendo a primeira já relatada em Siparunaceae (LEITÃO et al. 2000).

Leitão e colaboradores (2000) isolaram a reticulina, um alcaloide de massa 329, a partir do extrato metanólico das cascas e folhas de *S. apiosyce*. Sangster e Stuart (1984) atribuem máximo de absorção de  $\lambda_{\max}$  285 nm à reticulina solubilizada em etanol, valor aproximado ao encontrado neste estudo, levando em consideração a mudança no solvente utilizado (metanol). Em virtude do relato do alcaloide no gênero *Siparuna* e observando seu papel como intermediário na biossíntese de outros alcaloides já descritos para o gênero, a reticulina seria um dos possíveis alcaloides presentes no EESPC.

O espectro de massas do extrato etanólico EESPC apresentou  $[M+H]^+$  342 (75%) para o constituinte do pico com TR 2,6 min, correspondendo, portanto, a um alcaloide com MM 341. Diversos alcaloides com esta massa molecular já foram descritos para o gênero *Siparuna*, como O-metilflavinantina em *S. dresslerana*, norglaucina em *S. sessiliflora*, N-metil laurotetanina em *S. pauciflora*, isocoridina e coridina em *S. griseo-flavescens* (LEITÃO et al. 1999; LOPEZ, 2011). Contudo, o espectro no UV neste caso se assemelha ao da coridina, com  $\lambda_{\max}$  270 e 309nm quando solubilizada em etanol (SANGSTER e STUART, 1984). Em ambos os casos descritos para o EESPC, análises complementares como, por exemplo, espectrometria de massas de alta resolução, se fazem necessárias para a confirmação da estrutura.

O constituinte majoritário do EESPC na análise por UPLC-DAD com TR 6,5 min (25,9%) corresponde ao pico com TR 6,9 min na Tabela 7, os valores de  $\lambda_{\max}$  e o pico predominante 329 (100%) são um indicativo para a possível presença de um

derivado do canferol, o canferol-3, 4, 7- trimetil-éter, anteriormente descrito na espécie *S. guianensis* (FACUNDO et al. 2012).

Tabela 7- Análise por espectrometria de massas dos extratos alcaloídico e etanólico das cascas de *Siparuna poeppigii*

Extrato	Análise por UPLC-DAD-ESI-MS		
	TR min	$\lambda_{\max}$ nm	[M+H] (%)
EESPC	2,4	281	344 (85)
			330 (100)
	2,6	278 e 310sh	360,5 (100)
			342 (75) 285 (68)
6,9	266 e 348	329 (100)	
		219 (41) 203 (58)	
SPC-B	2,0	282	330 (45) 286 (100)
	3,5	271	266 (100) 249 (72)

Legenda: EESPC: Extrato etanólico das cascas de *S. poeppigii*  
 SPC-B: Fração de alcaloides das cascas de *S. poeppigii*  
 TR: Tempo de Retenção  
 UPLC-DAD-ESI-MS: Ultra Performance Liquid Chromatography- Photodiode Array-  
 Electrospray Ionization- Mass spectrometry

Na fração de alcaloides SPC-B (B, Figura 21), picos de menor intensidade (7,5; 2,4 e 3,19%) foram registrados com TR 2,5; 4,5 e 5,1 min, respectivamente, e os espectros no UV correspondentes apresentam características que indicam tratar-se possivelmente de alcaloides (SANGSTER e STUART, 1984). A análise por UPLC-ESI-MS mostrou [M+H]<sup>+</sup> 330 para o pico com TR 2,0 min, semelhante ao observado para EESPC. A massa em [M+H]<sup>+</sup> 266(100%) foi observada para o TR 3,5 min, e poderia ser atribuída ao alcaloide anonaina (MM 265), descrito em *S. tonduziana* (LEITÃO et al. 1999), contudo o espectro no UV-vis diferiu daquele descrito neste artigo.

A fr SPC-B foi submetida à cromatografia em coluna e algumas de suas frações foram agrupadas por semelhanças em CCD. As frações com atividade antiplasmódica comprovada foram analisadas por UPLC-DAD-ESI-MS/MS, discutidas no tópico Frações ativas pag. 86.

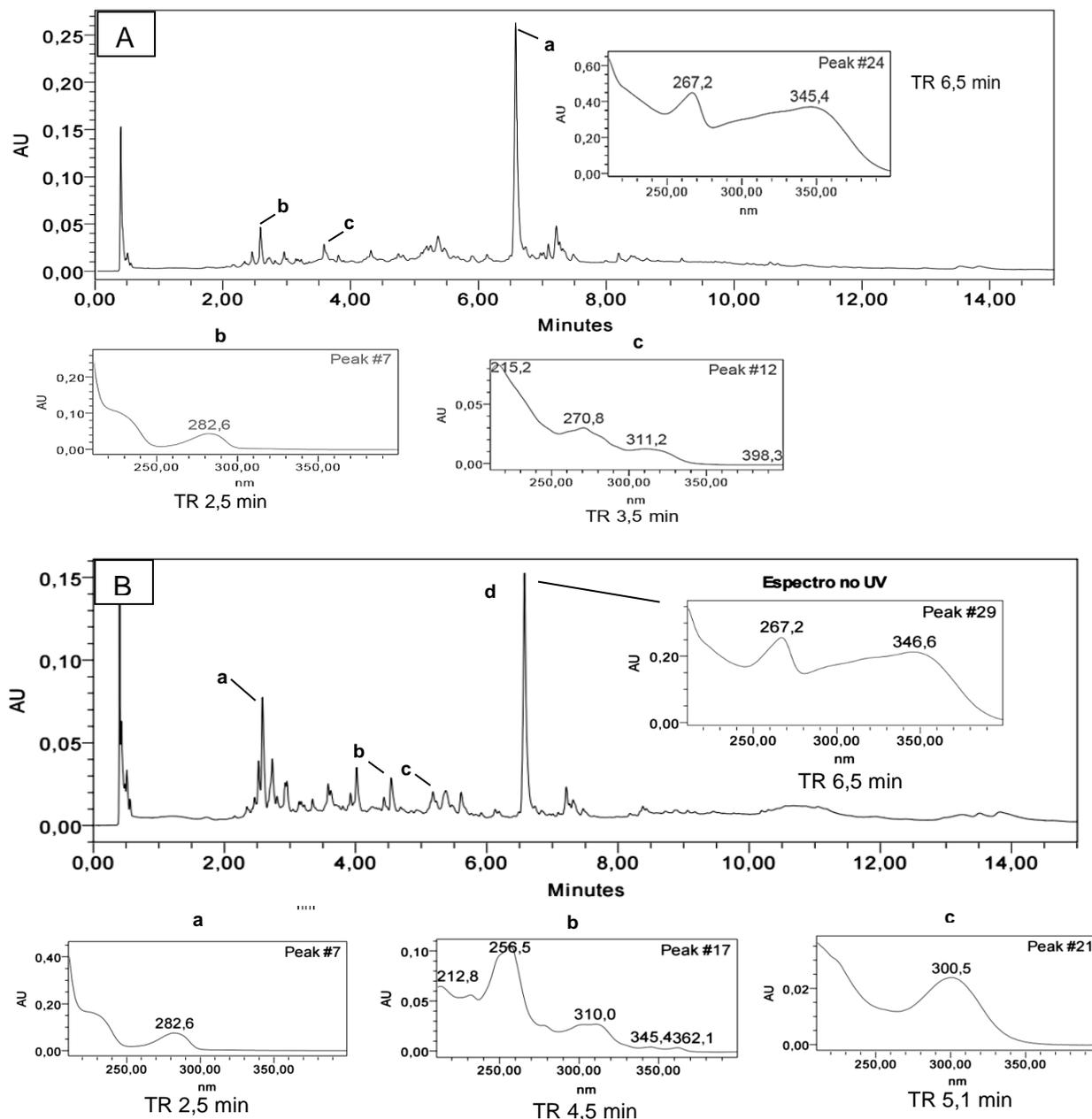


Figura 21- Cromatogramas do extrato etanólico e Fração de alcaloides das cascas de *Siparuna poeppigii* espectros no UV on line referentes a alguns picos

Legenda: A - EESPC: Extrato Etanólico das Cascas de *S. poeppigii*. B - SPC-B: Fração de alcaloides das cascas de *S. poeppigii*. TR: Tempo de Retenção. Análise por UPLC-DAD a 280 nm

No cromatograma por UPLC-DAD da fração AcOEt EESPC (Figura 22) a 280nm observa-se um pico com área de 9,9% e TR de 2,5 min cujo espectro no UV apresenta máxima absorção em 281,5 nm, assemelhando-se ao observado no cromatograma B da Figura 24, da fração SPC-B, com mesmo TR 2,5min, porém com  $\lambda_{\max}$  282,6nm. Picos de menor intensidade (4,8; 0,18 e 0,58% min) foram registrados com TR 3,7; 8,3 e 12,3 min, respectivamente.

Tendo em vista os espectros no UV (SANGSTER e STUART, 1984) e a ocorrência de manchas em CCD reveladas com o reagente de Dragendorff, sugere-se a presença de alcaloides nesta fração. Esta fração foi submetida ao refracionamento em coluna de sílica gel e a sub fração com maior rendimento (Fr 16 AcOEt) foi submetida à análise por UPLC-DAD-ESI-MS/MS.

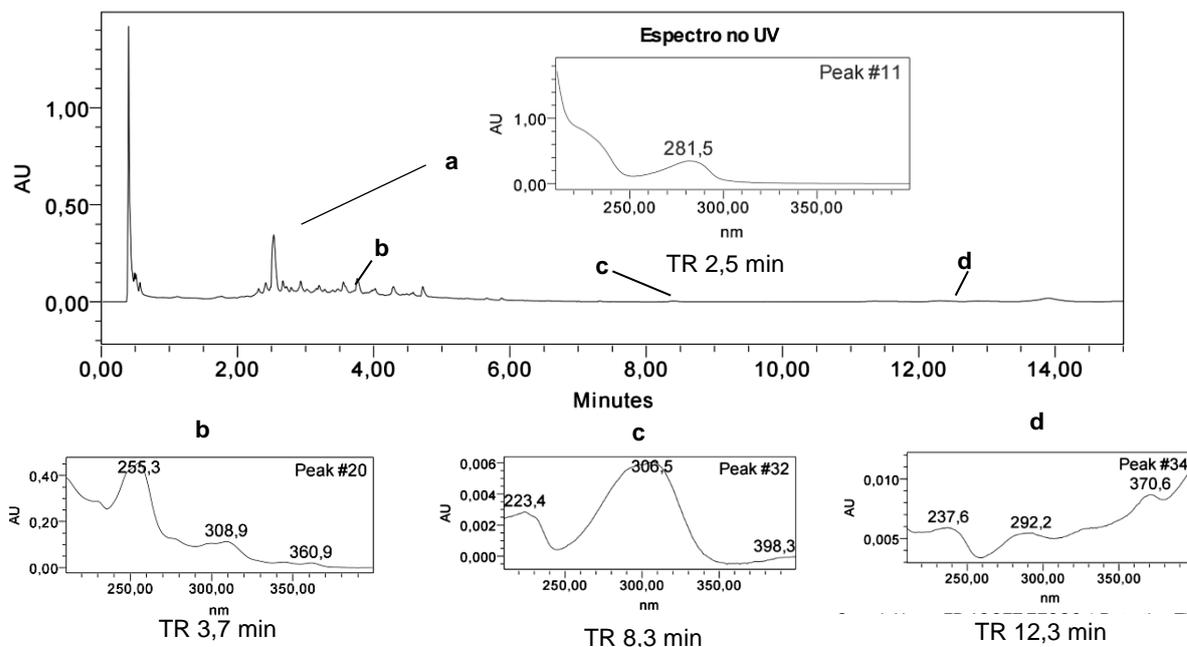


Figura 22- Cromatograma da fração acetato de etila das cascas de *Siparuna poeppigii* e respectivos espectros no UV online

Legenda: Fr AcOEt EESPC: Fração acetato de etila das cascas de *S. poeppigii*. Análise por UPLC-DAD em 280 nm

A varredura completa (*full scan*) no modo positivo (Figura 23) da fração 16 AcOEt mostrou picos de  $[M+H]^+$  330 (100%), 328 (68%) e 326 (45%), designados pelas letras A, B, C, D, cujas fragmentações, registradas por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas seqüencial - UPLC-ESI-MS/MS (tandem mass spectrometry) constam da Tabela 8.

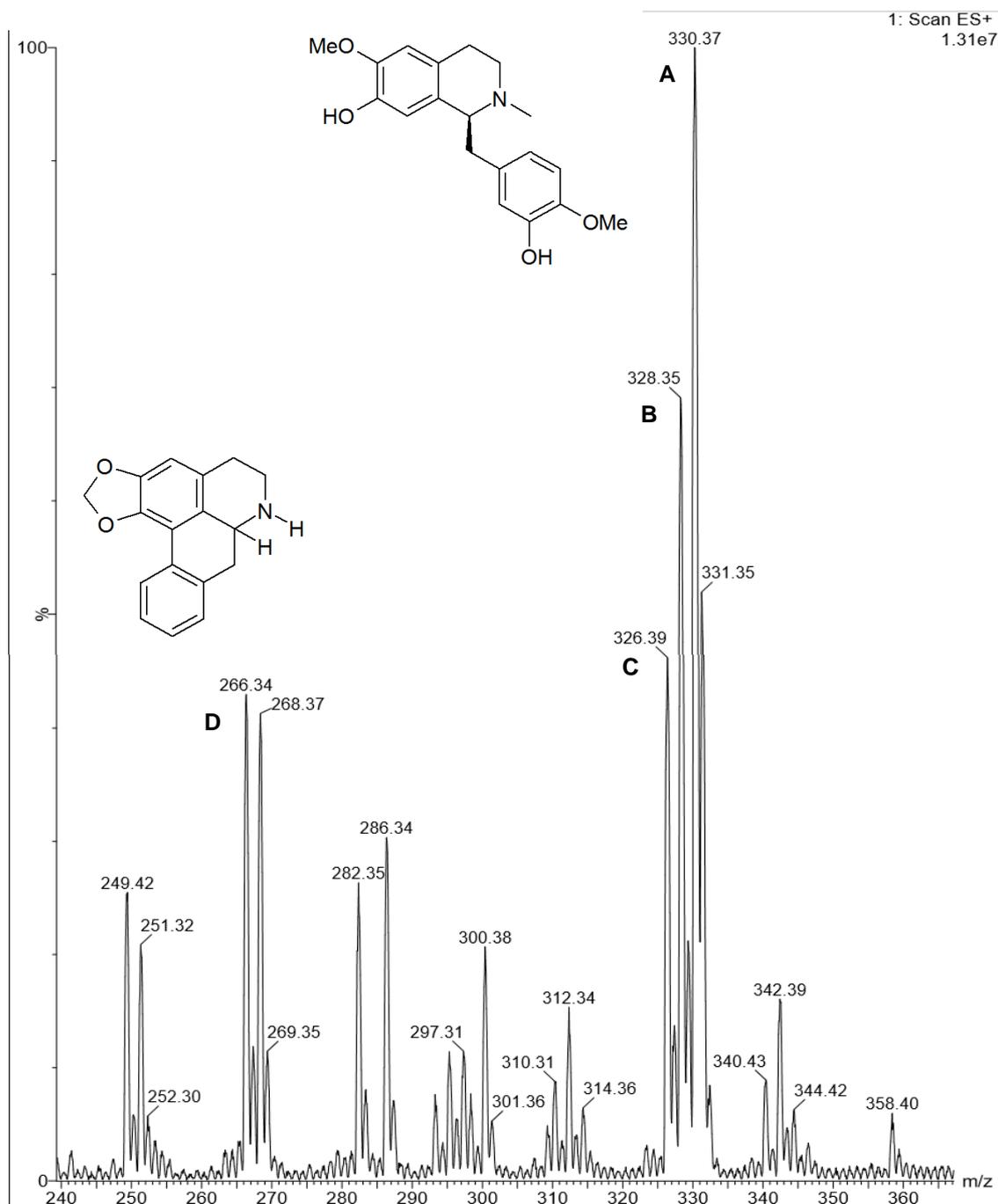


Figura 23- Varredura completa no modo positivo da Fração 16 AcOEt EESPC por espectrometria de massas

Legenda: A: reticulina. D: anonaina

Tabela 8- Análise por UPLC-ESI-MS/MS da fração 16 AcOEt oriunda de coluna cromatográfica da Fração AcOEt das cascas de *Siparuna poeppigii*

Fração	Análise por UPLC-ESI-MS/MS					Referências
	Pico	TR min	$\lambda_{max}$	[M+H] (%)	Fragmentos (m/z) (%)	
Fr 16 AcOEt	A	2,3	282	330 (100)	[330]: 299(2), 267(5), 192(75), 175(22), 143(50), 137(100)	[330]:299 (5), 192 (100), 177(3), 137(4) (YAN et al. 2013)
	B	2,5	220, 279 e 305	328 (68)	[328]: 327(3), 297(25), 282(15), 265(100), 250(18), 237(50)	
	C	3,2	219, 280 e 309	326 (45)	[326]: 295(30), 263(100), 235(54), 205(45), 177(12)	
	D	3,5	211, 271 e 317	266(43)	[266]: 249(46), 219(20), 191(100), 178(18)	[266]: 249 (100), MS <sup>2</sup> [249]: 219 (100), 191(30), MS <sup>3</sup> [219]: 191(100) (YAN et al. 2013)

Legenda: AcOEt: Acetato de etila

TR: Tempo de Retenção

UPLC-DAD-ESI-MS: Ultra Performance Liquid Chromatography- Photodiode Array- Electro spray Ionization- Mass spectra

Para o pico A (Figura 23) registrou-se o íon molecular protonado  $[M+H]^+$  330, possivelmente correspondendo à fórmula molecular  $C_{19}H_{23}NO_4$ , e possíveis rotas de fragmentação deste são mostradas na Figura 24. A perda de uma metoxila  $[M+H - 31]^+$  explicaria o fragmento em m/z 299 (5%) (m/z), a partir deste diferentes perdas podem ocorrer:  $[M-124]$  ou  $[M+H - 125]^+$   $C_7H_8O_2$  originando 175 m/z (22%),  $[M-107]$   $C_7H_7O$  ou  $C_7H_9N$  resultando em 192 m/z (75%). O pico base em m/z 137 m/z (100%) deve estar relacionado ao fragmento característico em benzilisoquinolinas ( $C_8H_9O_2$ ) (SUAU et al. 1994; SAIDI, 2011).

Os fragmentos em m/z 299, 192 e 137 m/z foram relatados na literatura em uma análise de espectrometria de massas para reticulina (MM 329,  $C_{19}H_{23}NO_4$ ) (YAN et al. 2013; MANOSALVA et al. 2014), observando-se as diferenças na programação, fase móvel e energia de colisão utilizadas, os dados estão de acordo com esta pesquisa. O máximo de absorção do constituinte referente a este pico foi de  $\lambda_{max}$  285nm, valores de absorção no UV-vis da reticulina descritas na literatura

consultada foram de  $\lambda_{\max}(\text{EtOH})$  285nm,  $\lambda_{\max}(\text{MeOH})$  296nm (SANGSTER e STUART,1984). Deste modo, considera-se que reticulina está presente em *S. poeppigii* sendo este o primeiro relato para esta espécie.

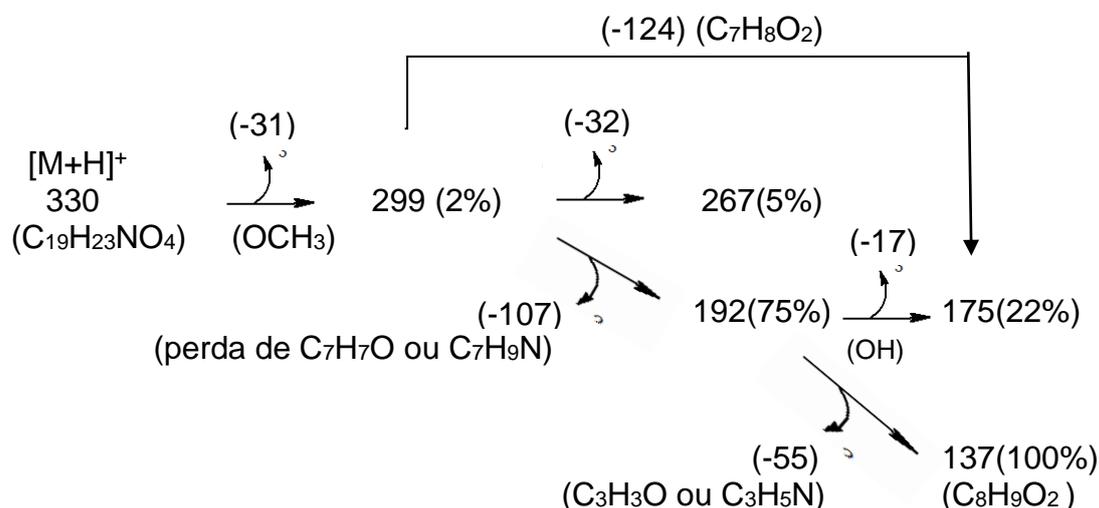


Figura 24- Rota de fragmentação proposta para 330  $[M+H]^+$  da fração 16 AcOEt EESPC  
 Legenda: EESPC: Extrato etanólico das Cascas de *S. poeppigii*. AcOEt: acetato de etila

Alcaloides benzilisoquinolínicos são distribuídos amplamente na natureza. Atribui-se a essa classe propriedades farmacológicas diversas, incluindo ação antiparasitária. A reticulina é um alcaloide benzilisoquinolínico precursor biossintético de um extenso número de alcaloides, aporfinínicos, benzilisoquinolínicos e benziltetrahidroisoquinolínicos, incluindo alcaloides relatados no gênero *Siparuna* como por exemplo, boldina, isoboldina e (+)-bulbocapnina (JENETT-SIEMS et al. 2003; OSORIO et al. 2008; ZIEGLER e FACCHINI, 2008)

A (S)(+)-reticulina possui atividade comprovada como acelerador do crescimento capilar, antiagregante plaquetário, antifúngica, relaxante da musculatura uterina além de estimular a síntese e ativação do óxido nítrico no endotélio vascular. Seu papel como precursor de metabólitos com atividade antimalárica e anticancerígena incentivou pesquisas sobre a produção microbiana de reticulina (PEREZ e CASSELS, 2010; MINAMI et al. 2012; SHAMA e MONIOR, 2012).

Atividade antiplasmódica foi relatada para (-)-reticulina isolada de *Dehaasia longipedicellata*, frente à cepa de *P.falciparum* (K1) cloroquina resistente, com  $CI_{50} < 30,4 \mu\text{M/mL}$  (ZAHARI et al. 2014).

UPLC-ESI-MS/MS do constituinte referente ao pico D  $[M+H]^+$  266 (Figura 23) mostrou 3 fragmentos semelhantes aos descritos para anonaina ( $C_{17}H_{15}NO_2$ , MM 265), em  $m/z$  249, 219 e 191. O espectro no UV-vis  $\lambda_{\text{max}}$  271 e 317nm está de acordo com o relatado na literatura  $\lambda_{\text{max}}$  272 e 317nm (YAN et al. 2013).

Anonaina é um alcaloide aporfínico muito frequente na família *Annonaceae* mas também relatado na espécie *S. tonduziana* (*Siparunaceae*)(LEITÃO et al. 1999; CHEN, J. et al. 2013). Atribui-se à anonaina atividade contra formas promastigotas de *Leishmania braziliensis*, *L. donovani* e *L. amazonenses* (OSORIO et al. 2008) ação antioxidante, antifúngica, antibacteriana e possível uso na quimioterapia do câncer cervical, além da inibição da biossíntese da dopamina, que pode estar relacionada à planaridade do anel isoquinolinico em sua estrutura. Atividade antiplasmódica da (-)anonaina foi relatada frente à cepas de *P. falciparum* D10 e D12 (cloroquina sensível e resistente respectivamente) com  $CI_{50}$  de  $25,9 \pm 0,2\mu\text{M}$  e  $19,6 \pm 1,1\mu\text{M}$ . Anonaina isolada de *Liriodendron tulipifera* apresentou  $CI_{50}$   $1,2 \pm 0,1 \mu\text{g/mL}$  e  $5,2 \pm 0,3 \mu\text{g/mL}$  frente à cepas de *P. falciparum* D10 e Dd2 através do método de quantificação da lactato desidrogenase (LEE et al. 2008; LI et al, 2013; GRAZIOSE et al. 2011, CHEN et al. 2008).

Em resumo, estas análises indicaram a possível presença das substâncias anonaina (A, Figura 23) e reticulina (D, Figura 23) na fração 16 AcOEt de *S.poeppigii*.

O cromatograma da substância SP-1 (A, Figura 25) apresentou pico (74%) no TR 3,6 min e UV  $\lambda_{\max}$  255 e 276 nm, características similares ao cromatograma de liriodenina (B, Figura 25) que apresentou um pico (97,3%) no TR 3,6 min e UV  $\lambda_{\max}$  255 e 276nm.

O gênero *Siparuna* é reconhecido como fonte de alcaloides aporfínicos, entre os quais a liriodenina é relatada na fração das cascas e/ou folhas das espécies *S. guianensis*, *S. gilgiana*, *S. nicaraguenses*, *S. tonduziana*, *S. apiosyce*, *S. arianae*, *S. thecaphora*, bem como na espécie em estudo *S. poeppigii* (BRAZ et al. 1976; GUINAUDEAU et al. 1983; GERARD et al. 1986; LEITÃO et al. 1999; LEITÃO et al. 2000; MARTI et al. 2013).

Diversas atividades biológicas são atribuídas à liriodenina, tais como, efeito sedativo no sistema nervoso central, regulação da biossíntese da dopamina, atividade antitumoral, antiarrítmica, antimicrobiana e antifúngica (CHEN et al. 2013; LI, XU e WANG, 2015). O efeito antiplasmódico deste alcaloide foi determinado frente a várias cepas de *P.falciparum* como D-6, NF54, D10, Dd2 e W2 apresentando  $CI_{50}$  de 2,37 $\mu$ M, 1,32 $\mu$ M, 4,1 $\mu$ g/mL, 7,9  $\mu$ g/mL e 2,4  $\mu$ g/mL respectivamente (GRAZIOSE et al. 2011; ONGUÉNÉ et al. 2013; LIMA et al. 2015).

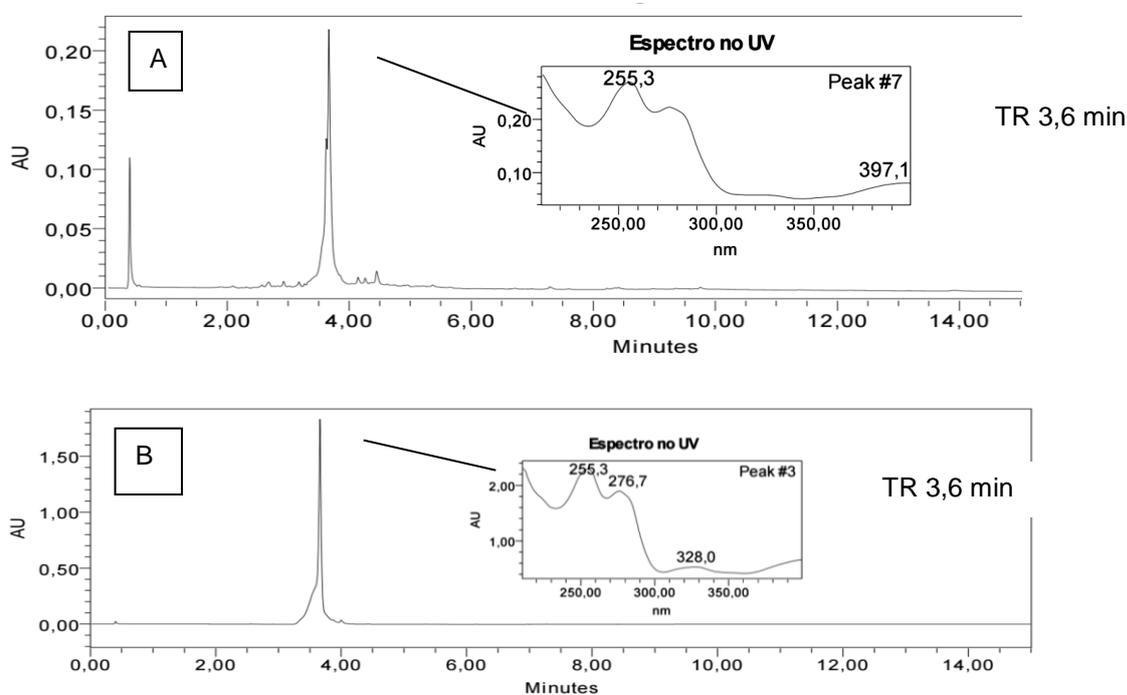


Figura 25 – Cromatogramas da substância SP-1 (A) e liriodenina autêntica (B) por UPLC-DAD a 280 nm e espectros no UV online

O cromatograma por UPLC-DAD da substância SP-2 (Figura 26) apresentou pico majoritário (90%) no TR 2,6 min e UV com  $\lambda_{\max}$  282 nm.

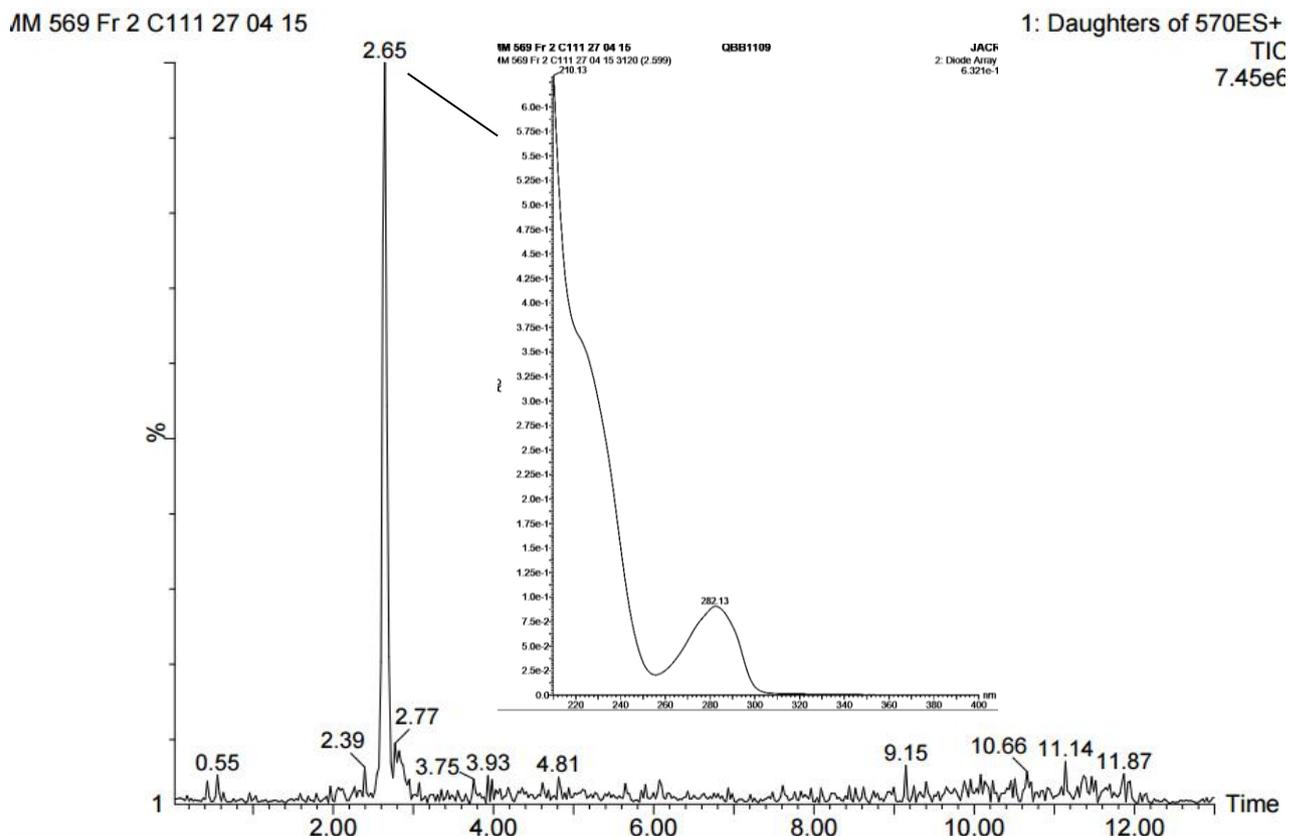


Figura 26 – Cromatograma e espectro UV on line por UPLC-DAD-ESI-MS de SP-2

Tabela 9- Análise por UPLC-DAD-ESI-MS/MS das frações 2 C111 oriundas da fração de alcaloides das cascas de *Siparuna poeppigii*

Fração	pico	TR (min)	UV $\lambda_{\max}$	[M+H] <sup>+</sup> UPLC-DAD-ESI-MS	UPLC-DAD-ESI-MS/MS (m/z) Fragmentos (%)
SP-2		2,5	282	570	[570]: 495 (4), 373 (7), 283 (5), 268 (7), 213 (7), 178 (100), 91 (8)

## 5.6 ATIVIDADE ANTIPLASMÓDICA

### 5.6.1 Avaliação dos extratos brutos e frações de alcaloides

Inicialmente as amostras foram submetidas a um *screening* nas concentrações de 50 e 25 µg/mL, em culturas de *P. falciparum* cloroquina-resistente (W2). Os resultados foram expressos em porcentagem de redução da parasitemia (% Red) e são mostrados na Figura 32. Destas amostras, apenas SPF- B, SPF- C e SPC- C, tiveram a  $CI_{50}$  determinada, cujos valores são apresentados na Tabela 10.

Observa-se que SPF-B, apesar de produzir uma inibição de apenas 25% da parasitemia na concentração de 50 µg/mL, apresentou  $CI_{50}$  de 12,41 µg/mL, sendo considerada ativa. É interessante destacar que não se observou relação dose-resposta entre os resultados do *screening* uma vez que a menor concentração (25µg/mL) causou maior inibição de parasitos (62%). A amostra SPF-C, embora apresente percentual de redução superior a 50% nas concentrações de 25 e 50 µg/mL (57% e 52%) foi considerada moderadamente ativa com  $CI_{50}$  de 20,8 µg/mL. A amostra SPC-C promoveu inibições, no *screening*, de 64% e 53%, na maior e menor concentração, respectivamente,  $CI_{50}$  de 6,99 µg/mL, o menor valor encontrado dentre as amostras testadas. Contudo, esta fração foi obtida em pequena quantidade e foi suficiente apenas para realizar os testes de atividade antiplasmódica.

Jenett-Siems e colaboradores (1999) relataram valores de  $CI_{50}$  de 11,9 µg/mL e 3,0 µg/mL para o extrato das folhas (éter de petróleo e acetato de etila 1:1) de *S. tonduziana* e *S. thecaphora* frente à cepa de *P. falciparum* PoW. Outros resultados de avaliações de efeito antiplasmódico de espécies de *Siparuna* constam no Quadro 1 (pág.27).

Tabela 10- Concentração Inibitória de 50% (CI<sub>50</sub>) do crescimento do *Plasmodium falciparum* (W2) cloroquina-resistente frente a frações de alcaloides das cascas e folhas de *Siparuna poeppigii*

<b>Amostras</b>	<b>CI<sub>50</sub> Média ± DP</b>	<b>Classificação</b>
SPC – C	6,99±0,53	Ativa
SPF – C	20,81±1,60	Moderadamente ativa
SPF – B	12,41±0,06	Ativa
Cloroquina	0,146± 0,01	Muito ativa

SPC-C: Fração de alcaloides das cascas – método C; SPF – C: Fração de alcaloides das folhas- método AC; SPF-B: Fração de alcaloides das folhas- método B.

### 5.6.2 Avaliação das frações obtidas a partir dos extratos etanólicos por re-extração sob refluxo

Para selecionar entre as frações obtidas por re-extrações dos extratos etanólicos das cascas e folhas, aquelas que seriam avaliadas nos testes de atividade antiplasmódica, foram realizadas análises por CCD para verificar a possível presença de alcaloides. No entanto, para todas as frações de cascas e folhas observaram-se no cromatograma manchas de coloração alaranjada com o reagente de Dragendorff e fluorescência azul no UV 365nm, características sugestivas da presença de alcaloides. Desta maneira, oito amostras foram submetidas ao *screening*, nas concentrações de 50 µg/mL e 25 µg/mL.

Os resultados do percentual de redução da parasitemia mostrados na Figura 33, não demonstram uma relação concentração-resposta. Assim, as amostras de Fr AcOEt EESPC, Fr MeOH EESPC, Fr Hex-DCM EESPF, Fr DCM EESPF e Fr MeOH EESPF avaliadas na concentração de 25 µg/mL exibiram percentuais de redução superiores àqueles observados na concentração de 50 µg/mL o que se pode explicar pela possível menor solubilidade das amostras na maior concentração.

### 5.6.3 Avaliação das frações obtidas por cromatografia em coluna

As frações obtidas por cromatografia em coluna aberta de sílica gel a partir da fração SPC-B foram monitoradas por CCD, sendo reveladas com o reagente de Dragendorff, a fim de detectar as frações que apresentavam alcaloides, e com

anisaldeído, que é um revelador geral, e que já verificamos, no presente caso, ser um bom revelador para terpenos, como por exemplo, possivelmente lupeol. Também se levou em conta as massas das frações suficientes para a realização dos testes biológicos e posterior fracionamento. Estes foram os critérios de seleção utilizado para selecionar frações para os testes de atividade antiplasmódica.

Determinou-se o percentual de redução do crescimento do *P. falciparum* (W2) nas concentrações de 50 e 25 µg/mL frente às onze amostras selecionadas. Os resultados são mostrados na Figura 34. Observou-se que as amostras 5-8, 43-44, 61, 67-68, 84-88 e 95-97 apresentaram valores de redução acima de 50% nas duas concentrações analisadas.

A fração 5-8 apresentou uma correlação inversa ( $r=-0,37$ ) levando em consideração a concentração e o percentual de redução. O coeficiente de determinação revelou que 14,31% dos valores de redução podem ser influenciados pelas duas concentrações utilizadas. As frações 43-44, 61 e 67-68 apresentaram  $r$  acima de 0,95 indicando que a concentração está diretamente correlacionada ao percentual de redução obtido, apresentando  $r^2$  de 91,7; 92,7 e 92,7% respectivamente. As frações 84-88 e 95-97 apresentaram  $r= 0,8$  e  $r^2$  de 79,1 e 69%.

Com base nestes valores de redução, estas amostras foram selecionadas para a determinação da  $CI_{50}$ , cujos resultados constam da Tabela 11.

Tabela 11 - Concentração Inibitória de 50% ( $CI_{50}$ ) do crescimento de *Plasmodium falciparum* (W2) cloroquina-resistente frente a amostras obtidas a partir coluna cromatográfica da fração de alcaloides das cascas de *Siparuna poeppigii*

Amostras	$CI_{50}$	Classificação
	Média $\pm$ DP	
5-8 SPC - B	5,95 $\pm$ 0,49	Ativa
43-44 SPC - B	12,44 $\pm$ 2,65	Ativa
61 SPC - B	14,32 $\pm$ 1,63	Ativa
67-68 SPC - B	22,58 $\pm$ 2,08	Moderadamente ativa
95-97 SPC - B	22,67 $\pm$ 0,99	Moderadamente ativa
84-88 SPC-B	19,10 $\pm$ 2,48	Moderadamente ativa
Cloroquina	0,107 $\pm$ 0,006	Muito ativa

Legenda: SPC-B: Fração de alcaloides das Cascas de *S. poeppigii*- método B  
DP:Desvio Padrão

A fração SPF-B foi submetida à cromatografia em coluna e as frações obtidas foram reunidas de acordo com as semelhanças das manchas em CCD com

anissaldeído sulfúrico, resultando em sete amostras que foram encaminhadas aos testes de atividade antiplasmódica.

O percentual de redução acima de 50% foi observado apenas na concentração de 50 µg/mL para as amostras 6-8, 9-12 e 13-17 SPF-B (Figura 35).

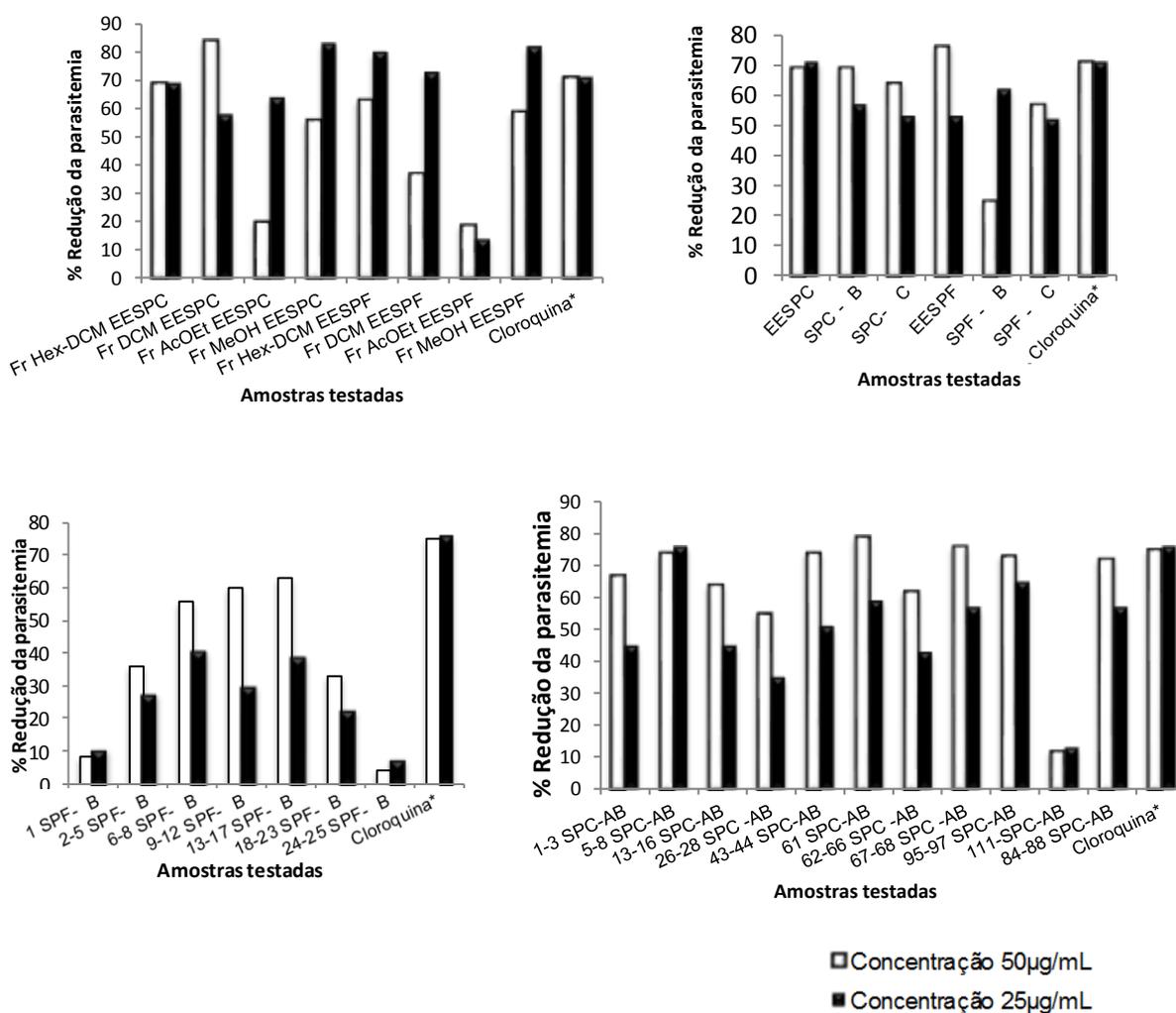


Figura 27 - Percentual de redução do crescimento do *Plasmodium falciparum* cloroquina-resistente (W2) frente à extratos e frações de cascas e folhas de *Siparuna poeppigii*

Legenda: EESPC: Extrato Etanólico *Siparuna poeppigii* Cascas. EESPF: Extrato Etanólico. *S.poeppigii* Folhas. SPC-B: Fração de alcaloides *Siparuna poeppigii* Cascas- método B. SPC-C: Fração de alcaloides *Siparuna poeppigii* Cascas- método C. SPF-B: Fração de alcaloides *Siparuna poeppigii* Folhas- método B. SPF-C: Fração de alcaloides *Siparuna poeppigii* Folhas- método C. Fr Hex-DCM: Fração Hexano- Diclorometano. Fr DCM: Fração Diclorometano. Fr AcOEt: Fração Acetato de Etila. Fr MeOH: Fração Metanol.

\* A concentração utilizada de cloroquina foi 500ng/mL

Para as frações ativas foram elaboradas curvas dose-resposta (Figura 28) com base no cálculo de viabilidade.

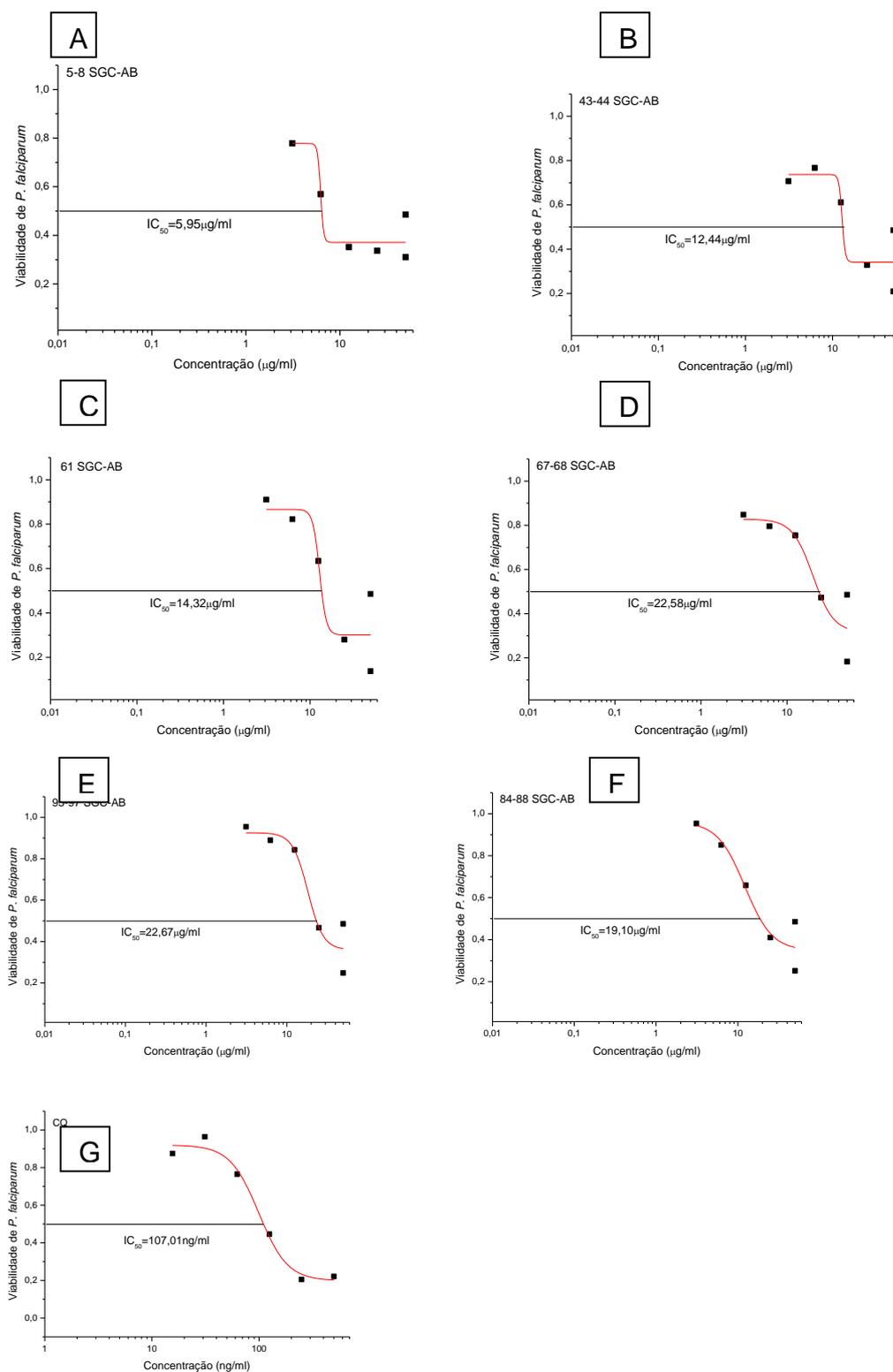


Figura 28 - Gráficos das curvas dose-resposta de frações ativas da fração de alcaloides das cascas frente a *Plasmodium falciparum* (W2).

Legenda: SPC-B: Fração de alcaloides das Cascas de *S. poeppigii* - método B. A) Fr 5-8 SPC-B. B) Fr 43-44 SPC-B. C) Fr 61 SPC-B. D) Fr 67-68 SPC-B. E) Fr 95-97 SPC-B. F) Fr 84-88 SPC-B. G) Cloroquina

## 5.7 CITOTOXICIDADE E ÍNDICE DE SELETIVIDADE DAS FRAÇÕES ATIVAS

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados para as frações com valores satisfatórios de  $Cl_{50}$  no teste antiplasmódico. A partir dos resultados de citotoxicidade e  $Cl_{50}$ , o IS foi determinado, os respectivos resultados estão na tabela 12.

Tabela 12. Valores de  $CC_{50}$ ,  $Cl_{50}$  e índice de seletividade calculado para as frações oriundas da fração de alcaloide das cascas de *Siparuna poeppigii*

Fração	HepG2	<i>P. falciparum</i> (W2)	IS
	(MTT) $CC_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ ) Média $\pm$ DP	( $\rho\text{LDH}$ ) $Cl_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ ) Média $\pm$ DP	
Liriodenina	>1000	6,08 $\pm$ 0,06	>164,47
5-8 SPC-B	257,78 $\pm$ 13,28	5,95 $\pm$ 0,49	43,32
43-44 SPC-B	253,30 $\pm$ 14,27	12,44 $\pm$ 2,95	20,36
61 SPC-B	279,72 $\pm$ 7,94	14,32 $\pm$ 1,63	19,53
67-68 SPC-B	366,61 $\pm$ 14,03	22,58 $\pm$ 2,08	16,24
95-97 SPC-B	>1000	22,67 $\pm$ 0,99	>44,11
84-88 SPC-B	306,01 $\pm$ 8,10	19,10 $\pm$ 2,48	16,02
Cloroquina	116,74 $\pm$ 3,84	0,107 $\pm$ 0,006	1091,03

Legenda: SPC-B: Fração de alcaloides das cascas de *Siparuna poeppigii*- método B . IS: Índice de Seletividade. DP: Desvio Padrão

Dados de citotoxicidade isolados não determinam aplicação clínica dos compostos testados, contudo, são avaliados em relação a outros parâmetros e podem predispor à realização de outros testes, como por exemplo a toxicidade *in vivo* (ISO, 2009). Compostos com valores de IS maiores que 10 são potencialmente seguros, pois apresentam uma ampla janela terapêutica (MESQUITA et al. 2007; AGUIAR, 2011). Portanto, todas as amostras foram não citotóxicas e apresentaram IS satisfatórios exercendo uma ação direcionada ao *P. falciparum*.

A fração 95-97 demonstrou a melhor  $CC_{50}$  (> 1000  $\mu\text{g/ml}$ ) e o maior IS dentre as frações (>44,11). Apesar da fração 67-68 apresentar a segunda melhor concentração citotóxica (366,61  $\mu\text{g/ml}$ ), o IS foi um dos mais baixos. A fração 5-8 que apresentou o mais significativo índice de  $Cl_{50}$  (5,95  $\mu\text{g/ml}$ ) superando o valor da amostra autêntica de liriodenina, teve uma boa média para  $CC_{50}$  (257,78  $\mu\text{g/ml}$ ) e o segundo melhor IS (43,32). Desta maneira, as frações 5-8 e 95-97 são promissoras

para seguir com testes complementares como por exemplo, genotoxicidade e mutagenicidade.

Ensaio de citotoxicidade pelo método MTT em macrófagos RAW-264.7 foram efetuados para extrato etanólico e fração de alcaloides totais de *S. apiosyce* ( $EC_{50} >120$  e  $43,82\mu\text{g/ml}$ ) e *S. guianensis* ( $EC_{50} >120$  e  $54,79\mu\text{g/ml}$ ) (TEMPONE et al. 2005). O óleo essencial das folhas de *S. guianensis* testado através do referido método em células Vero foi considerado citotóxico com  $CC_{50}$  de  $3,801\mu\text{g/ml}$  (ANDRADE, 2013). O Extrato etanólico das folhas da mesma espécie, foi testado pelo método Sulforhodamina (SRB) frente às células MDA-MB-231, MCF7 (cancer de mama humano), PC-3 (cancer de próstata humano), HT-29 (cancer de colon humano), 4T1 (cancer de mama de rato) e RAW-267 (monócitos leucêmicos de ratos) resultando em  $CL_{50}$  de 1500, 106, 1500, 1500, 1500, 1500  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente, sendo considerado citostático (TAYLOR et al. 2013).

Os extratos lipofílicos em metanol das folhas de *S. andina* (*S. thecaphora*), *S. pauciflora* e *S. tonduziana* (*S. grandiflora*) foram analisados frente às linhagens de células humanas KB (carcinoma de células escamosas), SK-MEL 30 (melanoma), A 549 (carcinoma de células pulmonares) e MCF-7 (carcinoma de mama) pelo método SRB resultando nos valores de  $Cl_{50}$  24,8; 17,9; 26,3 e 20,5  $\mu\text{g/ml}$  para *S. andina*, >30; 21; >30 e 20,3  $\mu\text{g/ml}$  para *S. pauciflora* e >30; 23,2; >30 e 21  $\mu\text{g/ml}$  para *S. tonduziana* respectivamente (JENETT-SIEMS et al. 1999). A citotoxicidade dos extratos em hexano de frutos, folha e caule de *S. cujabana* (*S. brasiliensis*) foi determinada através do método MTT em fibroblastos de mamíferos (NIH-3T3) com valores de  $CC_{50}$  de 116,96; 378,55 e 92,5  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente (RANGEL, 2010).

A literatura consultada não dispõe de dados sobre citotoxicidade *in vitro* da espécie em estudo, caracterizando resultados inéditos para *S. poeppigii*. As frações testadas constituem-se por misturas de substâncias, observadas nas análises por espectrometria de massas e cromatografia líquida, de modo que não se pode inferir se a baixa citotoxicidade e o satisfatório IS devem-se à um constituinte específico ou ao sinergismo *in vitro*, como o relatado para o extrato em metanol da espécie *Feretia apodanthera* e ácido ursólico que quando reunidos duplicaram o efeito antiplasmódico e tiveram ausência de citotoxicidade (RASOANAIVO et al. 2011).

## 5.8 ANÁLISE DAS FRAÇÕES ATIVAS

A fração 5-8 apresentou um pico no TR 11,3 min com UV  $\lambda_{\max}$  242,3 e 308,9nm, além de picos minoritários nos TR 11,4; 11,7 e 14,7 min (A, C e D, Figura 29)

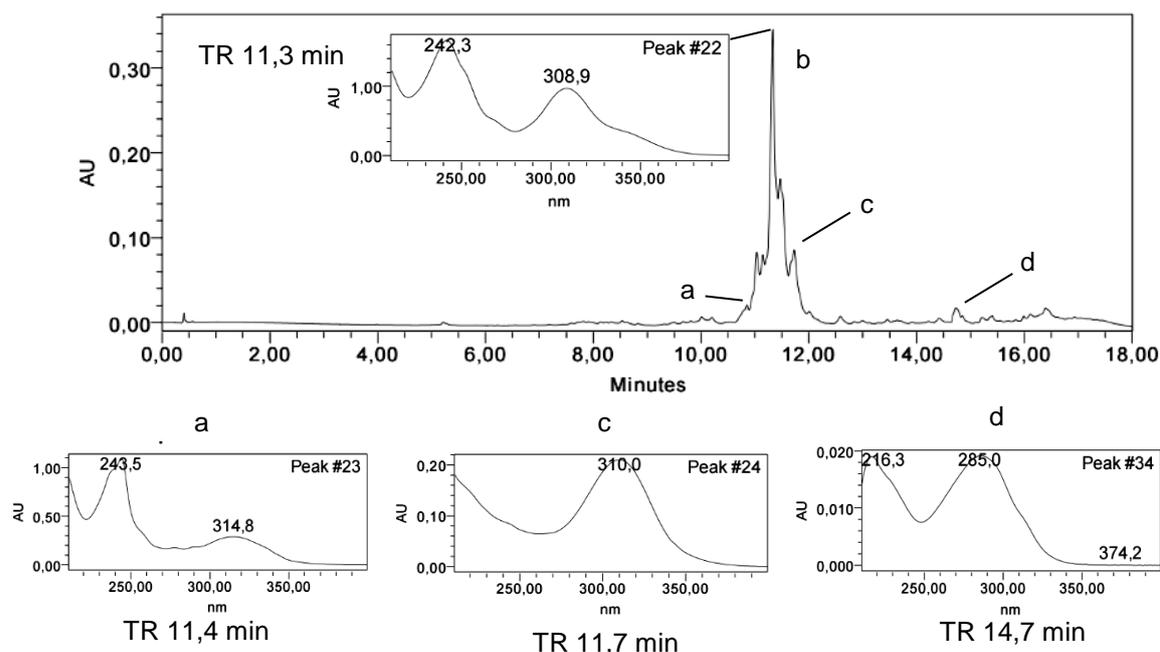


Figura 29 – Cromatograma da fração SPC-B 5-8 por UPLC-DAD a 280 nm e espectros no UV online

O cromatograma da fração 43-44 SPC-B (Figura 30) por UPLC-DAD apresentou um pico predominante no TR 10,26 min (41,4%), com  $\lambda_{\max}$  267,2 e 346,6 nm. O espectro de massas referente a este pico, em m/z 329, foi atribuído a  $[M+H]^+$  (Tabela 13) e associado ao espectro no UV, sugere tratar-se de um éter trimetílico do canferol, possivelmente o 3,7,4- trimetoxi-canferol, um flavonoide reportado nas espécies *S.guianensis* e *S. apiosyce*, presente em todos os órgãos de *S.apiosyce* sendo o constituinte majoritário das folhas desta espécie (FACUNDO et al. 2012; LEITÃO et al. 1999). Com base nessas informações propôs-se uma possível rota de fragmentação (Figura 31) na qual se observa a perda sequencial de 3 grupos metila, originando o pico em m/z 285 (4%), que pode ser atribuído ao canferol (MM 286,  $C_{15}H_{10}O_6$ ). O pico base do espectro de massas corresponde a um íon fragmentário em m/z 314 (100%) que resulta da perda de um grupo metila a partir do íon molecular protonado  $[M+H]^+$  329. Pode-se questionar a presença de um

éter dimetílico do canferol nesta fração, o que contribuiria para a intensificação deste pico, sendo que o canferol 3,4'-dimetiléter ocorre em *S. guianensis* (FACUNDO et al. 2012).

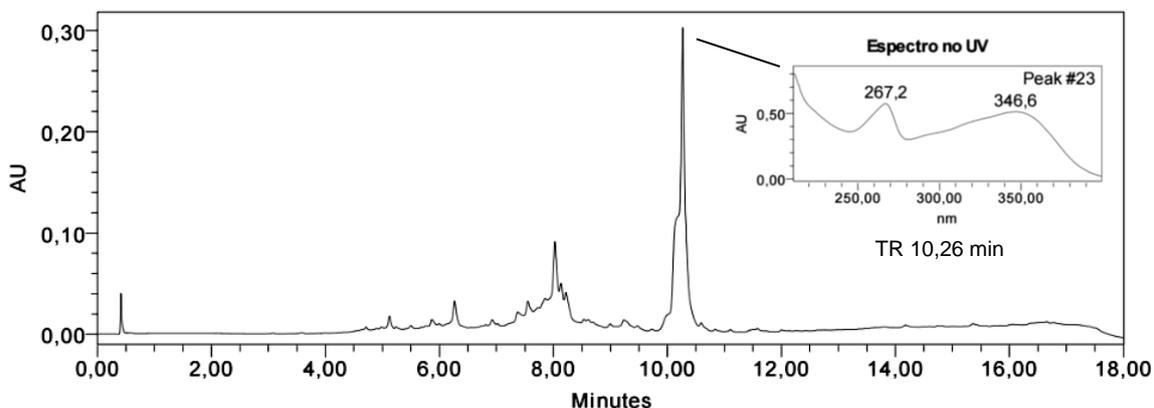


Figura 30 – Cromatograma da fração SPC-B 43-44 por UPLC-DAD a 280 nm e espectros no UV online

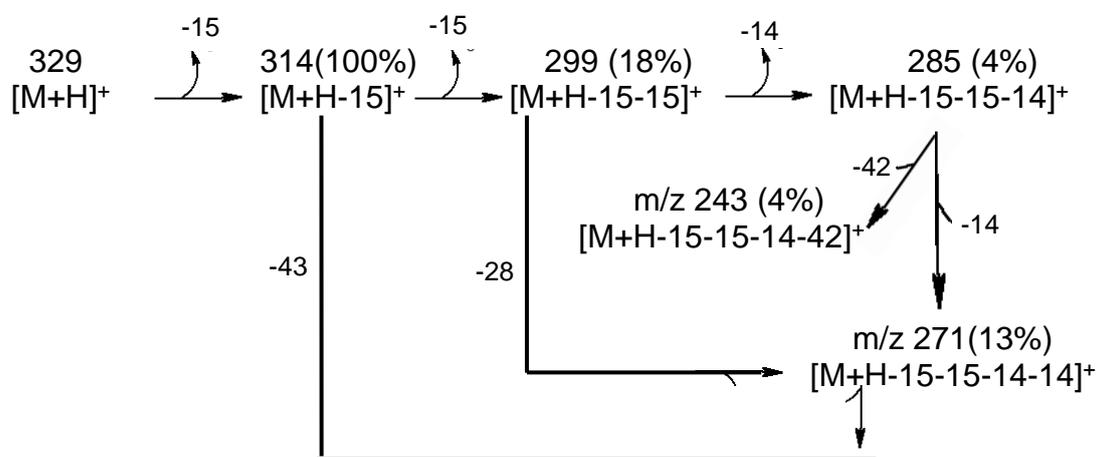


Figura 31 – Proposta de fragmentação do pico majoritário  $[M+H]^+$  329 da fração 43-44 por UPLC-DAD-ESI-MS/MS

Flavonoides tem ampla ocorrência no reino vegetal, ocorrendo em frutas, legumes, vinhos, chá e café. Mais de 6.000 representantes desta classe são conhecidos e despertam interesse pelas suas propriedades biológicas/farmacológicas como antioxidante, antitumoral, antiinflamatória, antimicrobiana e antiviral. Já foram relatados seus efeitos na inibição do crescimento

de *Toxoplasma*, *Trypanosoma*, *Leishmania* e *Plasmodium falciparum*. (LEHANE e SALIBA, 2008; TASDEMIR et al. 2006).

O canferol é um potente inibidor da acetilcolinesterase, possibilitando uso no tratamento da doença de Alzheimer. Não foi relatada citotoxicidade desta substância frente às células endoteliais (HUVEC), epitelial gástrica (GES-1) e hepáticas (WRL-68) (BAHRANI et al. 2014). Canferol (3,5,7,4'-teraidroxiflavona), isolado de *Gynura procumbens* apresentou atividade antiplasmódica moderada (CI<sub>50</sub> 30.94±1.48 µM; 8.86 µg/mL) em *P. falciparum* sensível a cloroquina (3D7), na dose de 5 mg/kg (ip) inibiu a parasitemia (60,27±3,20%) em ratos infectados com *P. berghei*, no quarto dia. Demonstrou-se, também, que o efeito antimalárico de *G. procumbens* e do canferol se dá por inibição de GSK3β. Um glicosídeo do canferol, o canferol-3-O-ramnosídeo, na concentração de 250 µM, promoveu inibição do crescimento de *P. falciparum* (K1) de 54,3% em 24 h, 83,9% em 48 h e 96% em 72 h, em comparação com o controle negativo. Este flavonoide era o componente majoritário da fração solúvel em acetato de etila, obtida por re-extração do extrato etanólico de folhas de *Schima wallichii* (Theaceae), coletada na praia de Pangandaran, província de West Java, na Indonésia. Contudo não foram encontradas referências a atividade antiplasmódica/antimalárica para éteres metílicos do canferol.

Tabela 13- Análise por UPLC-DAD-ESI-MS/MS das frações ativas oriundas da fração de alcaloides das cascas de *Siparuna poeppigii*

Fração	pico	TR (min)	UV $\lambda_{max}$	[M+H] <sup>+</sup> UPLC-DAD-ESI-MS	UPLC-DAD-ESI-MS/MS (m/z) Fragmentos (%)
5-8	1	7,35	227 e 313	263	[263]: 245(30), 189(100), 175(45), 161(60), 133(45), 115(25)
	2	7,6	237 e 309	287	[287] (100): 272(28), 244(80), 227(10)
43-44		6,9	222, 267 e 345	329	[329]: 314 (100); 299 (18); 285 (4); 271 (13); 243 (4)
61	1	5,2	222 e 300	235	[235]: 159(18), 135(25), 133(35), 119(45), 105(53), 93(100), 81(42)
67-68		8,6	-	280	[280]: 133(7), 109(28), 97(35), 95(80), 83(72), 81(100)
84-88					
95-97	1	2,3	281	330	[330]: 192 (100), 175(20), 143(40), 137(80)

Legenda: TR: tempo de retenção

O cromatograma da fração 61 SPC-B (Figura 32) apresentou um pico C no TR 7,7 min (36,25%) e  $\lambda_{\max}$  300,5 nm característico de alcaloides. Os picos minoritários A, B e D com TR de 6,2; 6,9 e 11,4 min (4, 9.5 e 0.8%) sugestivos de cromóforos de alcaloides (SANGSTER e STUART, 1964)

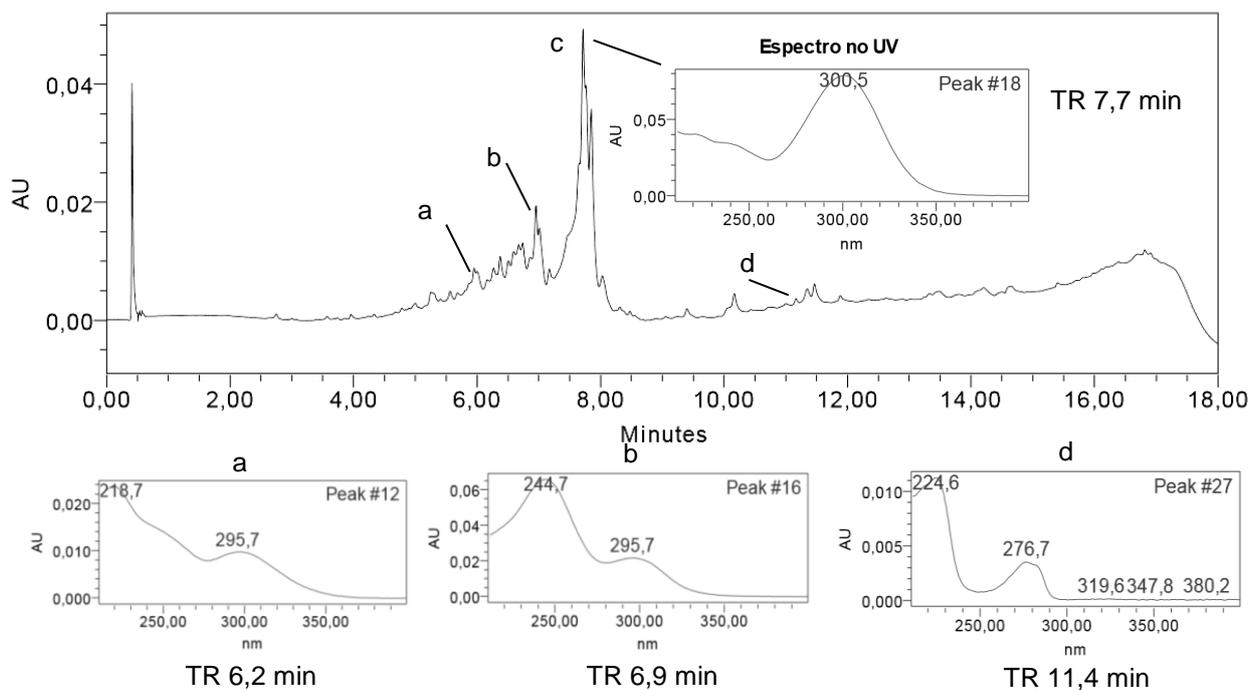


Figura 32 – Cromatograma da fração SPC-B 61 por UPLC-DAD a 280 nm e espectros no UV online

Legenda: SPC-B: Fração de alcaloides das cascas de *Siparuna poeppigii*- método B. TR: Tempo de Retenção

O cromatograma da fração SPC-B 67-68 (Figura 33) apresentou os picos A e B com TR 4,81min (16,18%) e 9,39 min (2,91%) e espectros no UV característicos de flavonoides. Os picos C e D (12,97%) (Figura 41) com TR de 16,39 e 17,30min, respectivamente, apresentaram espectros no UV muito semelhantes,  $\lambda_{\max}$  241,1 e 320,8nm e 242,3 e 320,8nm, e podem corresponder a ácidos clorogênicos.

Os ácido clorogênicos são uma família de ésteres derivados do ácido hidroxicínâmico com ácido quinico. Diversas propriedades farmacológicas são descritas para este grupo, como efeito anti-inflamatório, antibacteriano, antifúngico e antioxidante. São biomarcadores de propriedades medicinais em plantas e constituem parâmetro para controle de qualidade em plantas medicinais (GUZMAN, 2014; WEN et al. 2012).

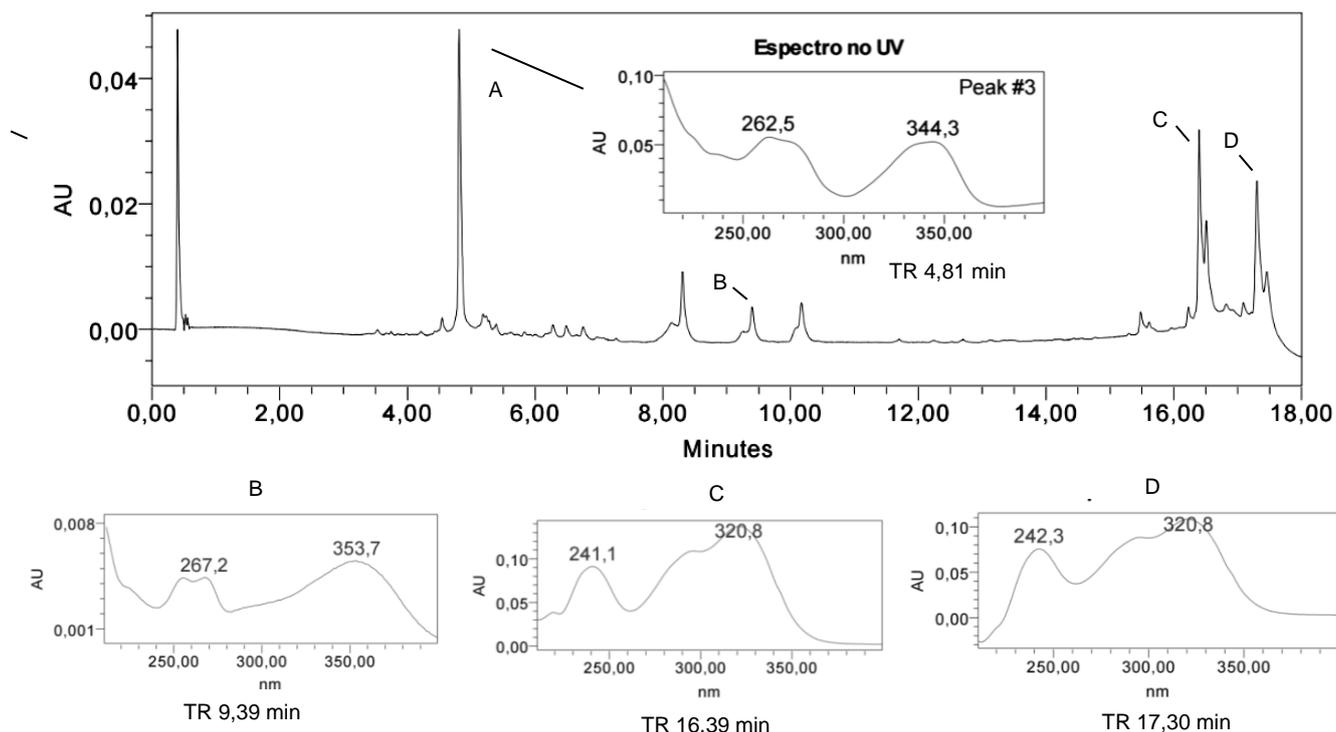


Figura 33 – Cromatograma da fração SPC-B 67-68 por UPLC-DAD a 350 nm e espectros no UV online  
 Legenda: SPC-B: Fração de alcaloides das cascas de *Siparuna poeppigii*- método B. TR: Tempo de Retenção

O cromatograma da fração 84-88 (Figura 34) apresentou um pico no TR 3,6 min (15,35%) com  $\lambda_{\text{máx}}$  em 255,3; 276; 328 e 397nm semelhantes ao observado na amostra autêntica de liriodenina (Figura ). Os picos A, C e D com áreas 2,55; 5,7 e 3,8% revelam absorvâncias sugestivas de cromóforos de alcaloides (SANGSTER e STUART, 1964).

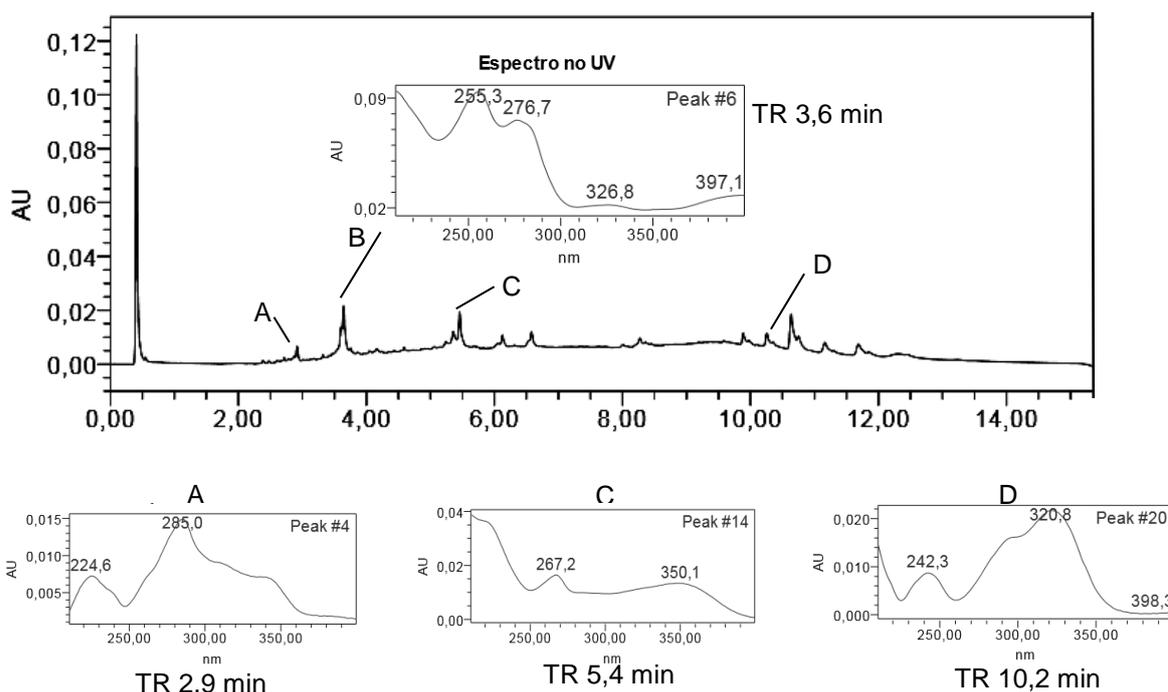


Figura 34 – Cromatograma da fração SPC-B 84-88 por UPLC-DAD a 350 nm e espectros no UV online

Legenda: SPC-B: Fração de alcaloides das cascas de *Siparuna poeppigii*- método B. TR: Tempo de Retenção

O Cromatograma da fração SPC-B 95-97 (Figura 35) apresentou um pico (24,68%) com TR 3,35min com  $\lambda_{\text{máx}}$  em 211,6 e 281,5nm. Os picos A (12,57%) e B (7,33%) (Figura 35) com TR 4,012 e 5,08min respectivamente, tiveram  $\lambda_{\text{Amax}}$  271,9nm,  $\lambda_{\text{Bmax}}$  270,8 e 312,4nm. Sangster e Stuart (1964) atribuem à alcaloides aporfínicos metilados na posição 10 e 11 (Figura 36), valores entre  $\lambda_{\text{max}}$  270-280nm acompanhados de um pico menos intenso entre 310-320nm semelhantes aos encontrados no UV da fração SPC-B 95-97.

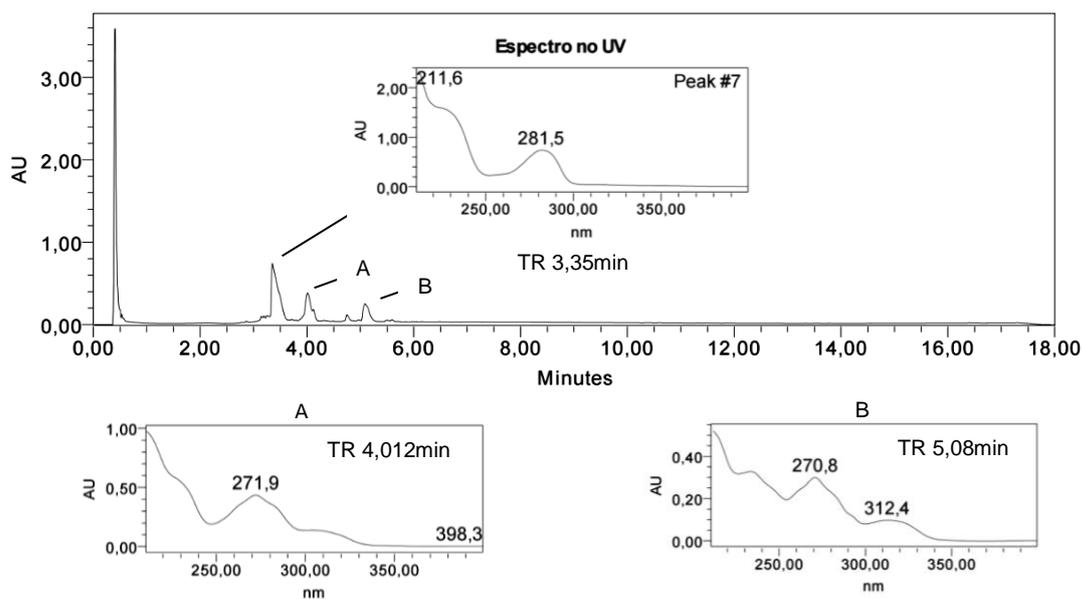


Figura 35 – Cromatograma da fração SPC-B 95-97 por UPLC-DAD a 280 nm e espectros no UV online

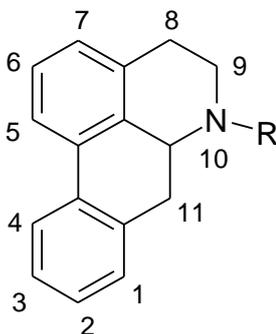


Figura 36- Estrutura básica dos alcaloides aporfínicos

Legenda: números de 1 a 11 mostram locais de possível adição de grupos funcionais

## CONCLUSÃO

O material vegetal coletado foi, inicialmente, identificado como *S. guianensis*. No entanto, alguns meses depois, constatou-se tratar de *S. poeppigii*, o que sugere uma grande semelhança morfológica entre estas duas espécies. A análise fitoquímica realizada neste trabalho mostra que a semelhança morfológica se repete, pelo menos em parte, quanto à constituição química observada, a exemplo do derivado do canferol, possivelmente presente na fração 16 AcOEt, já identificado em *S. guianensis*, mas inédito para *S. poeppigii*.

A liriodenina, um alcaloide oxoaporfínico, está presente tanto em *S. guianensis* como em boa parte das espécies do gênero (*S. pachyantha*, *S. thecaphora*, *S. brasiliensis*), e já foi relatada anteriormente em *S. poeppigii*. O alcaloide benzilisoquinolínico reticulina, possivelmente presente na fração 16 AcOEt, foi identificado em *S. apiosyce* e *S. grandiflora*, assim como a anonaina, ambos relatados pela primeira vez para a espécie. A ocorrência dos alcaloides aporfínicos lisicamina, o-metilisopilina e N-nornurciferine consta na literatura para *S. poeppigii* mas não foram identificados pelos métodos empregados.

A liriodenina foi avaliada quanto à atividade antiplasmodica frente a *P. falciparum* (W2) e à citotoxicidade em células HepG2, destacando-se sua alta seletividade para o parasita uma vez que apresentou um IS > 164,47.

A concentração inibitória de 50% do crescimento (CI<sub>50</sub>) do *P. falciparum* (W2), a citotoxicidade e o índice de seletividade foram determinados para 6 frações oriundas da fração de alcaloides das cascas de *S. poeppigii*, obtendo-se resultados satisfatórios, com destaque para as frações 95-97 e 5-8 com IS > 44,11 e 43,3, respectivamente, com valores de CC<sub>50</sub> acima de 250µg/mL. Segundo a literatura consultada, extratos de folhas e frutos de outras espécies do gênero tiveram sua citotoxicidade testadas e de maneira geral mostraram resultados razoáveis levando em conta as diferentes metodologias empregadas, com exceção do óleo essencial de *S. guianensis* que foi considerado citotóxico.

O melhor valor de CI<sub>50</sub> foi para fr 5-8 (5,95 µg/mL), resultado este muito próximo daquele da amostra de liriodenina utilizada nos ensaios (6,08µg/mL) apesar da distância entre a polaridade dos constituintes (fr 5-8 foi obtida em CCS com eluente hexano: diclorometano 1:1 e liriodenina por recromatografia da fração 84-88 que foi originada com eluente acetato de etila:metanol 10%).

Os resultados de atividade antiplasmódica são promissores, levando em consideração os dados de atividade encontrados na literatura para outras espécies do gênero *Siparuna*, o que justifica o prosseguimento de estudos como, por exemplo, com ensaios de genotoxicidade e mutagenicidade. O fracionamento biomonitorado dos extratos e frações frente à cepa de *P. falciparum* (W2) e valores de citotoxicidade são dados inéditos para a espécie *S. poeppigii*.

De forma geral, os dados obtidos estão de acordo com aqueles encontrados na literatura sobre o gênero. As informações obtidas até o momento embasam o uso popular das espécies do gênero para tratar malária e febres, em especial *S. poeppigii* e *S. guianensis*, cuja semelhança física pode confundir de maneira que a população talvez use ambas sob o título da mais conhecida.

## REFERÊNCIAS

- AGUIAR, A.C.C. **Avaliação da atividade citotóxica e antimalárica de análogos da cloroquina**. Dissertação (Mestrado em Farmacologia Bioquímica e Molecular), 49 f. Faculdade de Medicina. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2011.
- AGUIAR, R.W.S. et al. Insecticidal and repellent activity of *Siparuna guianensis* Aubl.(Negramina) against *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. **Plos one**. v. 10, n.2, p.1-14, 2015.
- ALVES, J. R. **Ciclo biológico do *Rhodnius milesi* ( Hemiptera : Reduviidae) e a atividade de extratos de plantas**. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas), 63 f. Faculdade de Medicina. Brasília: Universidade de Brasília, 2007.
- ANDRADE, M. A. **Óleos essenciais de *Cinnamodendron dinisii* Schwacke e *Siparuna guianensis* Aublet: composição química, caracterização das estruturas secretoras e avaliação do potencial biológico**. Tese (Doutorado em Agroquímica), 227 f. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2013.
- ANISZEWSKI, T. **Alkaloids Secrets of Life: alkaloid chemistry, biological significance applications and ecological role**. Elsevier: Amsterdam, 2007.
- BAHRANI, H. et al. Isolation and Characterisation of Acetylcholinesterase Inhibitors from *Aquilaria subintegra* for the Treatment of Alzheimer's Disease (AD). **Current Alzheimer Research**, v. 11, p.1-9, 2014.
- BALSLEV, H. et al. Enciclopedia De Plantas Utiles Del Ecuador. **Herbario QCA & Herbario AAU**, v. 1, p. 1–3, 2008.
- BERTANI, S. et al. Evaluation of French Guiana traditional antimalarial remedies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 98, n. 1, p. 45–54, 2005.
- BESSA, N. G. F. et al. Prospecção fitoquímica preliminar de plantas nativas do cerrado de uso popular medicinal pela comunidade rural do assentamento vale verde - Tocantins. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 4, p. 692–707, 2013.
- BESSERA, F.P. et al. Prospecção fitoquímica das folhas de *Siparuna guianensis* Aublet. (Siparunaceae) de uso popular medicinal em reassentamento rural, Tocantins. **Cadernos de agroecologia**, v. 6, n. 2, p. 1–5, 2011.
- BLUME, L. R. **Condições necessárias para o controle da malária nos municípios da região amazônica**. Manaus: Ministério da Saúde, 2014.
- BOURDY, G. et al. Medicinal plants uses of the Tacana, an Amazonian Bolivian ethnic group. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 70, n. 2, p. 87–109, 2000.

BOUSEMA, T. et al. Asymptomatic malaria infections: detectability, transmissibility and public health relevance. **Nature reviews. Microbiology**, v. 12, n. 12, p. 833–840, 20 out. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim epidemiológico**. v. 44. n.1. Brasília: Editora MS, 2013.

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

BRASIL. **Farmacopéia Brasileira**, 5 ed, v.1, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: ANVISA, 2010 b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Programa Nacional de Prevenção e Controle da Malária PNCM**. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília: Ministério da Saúde, 2003.

BRASIL. **Farmacopéia Brasileira**, 4 ed, v. 1, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. São Paulo: Atheneu, 1988.

BRAZ, F. R. et al. Oxoaporphine Alkaloids from *Fusea Longifolia* and *Siparuna guianensis*. **Phytochemistry**, v. 15, n. 1, p. 1187–1188, 1976.

CALDERÓN-MONTAÑO, J.M. et al. A review on the dietary Flavonoid Kaempferol. **Mini-reviews in Medicinal Chemistry**. v.11, p. 298-344, 2011.

CAROLLO, C. A. et al. Alkaloids and flavonoid from aerial parts (leaves and twigs) of *Duguetia furfuraceae* (Anonaceae). **Journal of the Chilean Chemical society**, v. 51, n. 2, p. 837-841, 2006.

CAO, J. et al. Chemical composition and bioactivities of flavonoids-rich extract from *Davallia cylindrica* Ching. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 37, n. 2, p. 571–579, 2014.

CÉLINE, V. et al. Medicinal plants from the Yanesha (Peru): Evaluation of the leishmanicidal and antimalarial activity of selected extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 123, p. 413–422, 2009.

CHEN, C. Y. et al. (-)-Anonaine induces apoptosis through Bax-and caspase-dependent pathways in human cervical cancer (HeLa) cells. **Food Chem Toxicol**. v. 46, n. 8, p.2694-26702, 2008.

CHEN, C.Y. et al. review on pharmacological activities of liriodenine. **African journal of pharmacy and pharmacology**. v.7, n.18, p.1067-1070, 2013.

CHEN, J. et al. Aporphine alkaloids: A kind of Alkaloids extract source, chemical constitution and pharmacological actions in different botany. **Asian Journal of chemistry**. v. 25, n. 18, p. 10015-10027, 2013.

CHINCHILLA, M. et al. In vitro antimalarial activity of extracts of some plants from a biological reserve in Costa Rica. **Revista de biología tropical**, v. 60, n. 2, p. 881–91, 2012.

CHIU, S.Y.C. et al. Oxoaporphine alkaloids from *Siparuna gilgiana*. **Journal of Natural Products**, v. 45, n. 2, p. 229–230, 1981.

CICCIÓ, J. F; GÓMEZ-LAURITO, J. Volatile constituents of the fruits of *Siparuna thecaphora* (Siparunaceae) from Costa Rica. **Revista de biología tropical**, v. 50, n. 4, p. 963–967, 2002.

DE PILLA VAROTTI, F. et al. Synthesis, antimalarial activity, and intracellular targets of MEFAS, a new hybrid compound derived from mefloquine and artesunate. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 52, n. 11, p. 3868-3874, 2008.

DENIZOT, F; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival, modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **J Immunol Methods.** v. 86, n.2, p.271-277, 1986.

FACUNDO, V. A. et al. Chemical constituents from three medicinal plants: *Piper renitens*, *Siparuna guianensis* and *Alternanthera brasiliana*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 5, p. 1134–1139, 2012.

FISCHER, D. C. H. **Caracterização Farmacognóstica da droga e do extrato fluido de Limoeiro-Bravo- *Siparuna apiosyce* (Martius) A. DC.** Tese, 235 f. Programa de Pós-graduação em Fármacos e Medicamentos. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1997.

FISCHER, D. C. H. Constituents from *Siparuna apiosyce*. **Fitoterapia.** v.70, p. 322-323, 1999.

FISCHER, D. C. H. et al. In vitro screening for antiplasmodial activity of isoquinoline alkaloids from Brazilian plant species. **Acta Tropica**, v. 92, n. 3, p. 261–266, 2004.

FONSECA, T. L. et al. Atividade antimicobacteriana de extratos vegetais frente a *Mycobacterium fortuitum* e *Mycobacterium malmoense*. **VITTALLE**, v. 20, n. 1, p. 65–71, 2008.

FRANÇA, T. C. C; SANTOS, M. G; VILLAR, J. F. Malária: aspectos históricos e quimioterapia. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1271-1278, 2008.

FREITAS, J.C; FERNANDES, M. E. Uso de plantas medicinais pela comunidade de Enfarrusca, Bragança, Pará. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi Ciências Naturais**, v. 1, n. 3, p. 11–26, 2006.

GERARD, R. V.; MACLEAN, D. B.; ANTONIO, T. M. Examination of three *Siparuna* species for alkaloid content. **Phytochemistry**, v. 25, n. 9, p. 2155–2156, 1986.

GONZÁLEZ, G.F.P; ARCHILA, E. G. Actividad antibacteriana de extractos y fracciones de hojas de *Siparuna sessiliflora* Kunth A. DC. (limoncillo). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 17, n. 1, p. 65–72, 2012.

GRAZIOSE, R. et al. Antiplasmodial activity of aporphine alkaloids and sesquiterpene lactones from *Liriodendron tulipifera* L. **Journal of ethnopharmacology**. v. 133, n.1, p. 26-30, 2011.

GUINAUDEAU, H. et al. Aporphinoid alkaloids, III. **Journal of Natural Products**. v. 46, n. 6, p. 761- 835, 1983.

GUPTA, M. P. et al. Medicinal plant inventory of Kuna Indians: Part 1. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 40, p. 77-109, 1993.

GUZMAN, J. D. Natural cinnamic acids, synthetic derivatives and hybrids with antimicrobial activity. **Molecules**. v. 19, p. 19292-19349, 2014.

HARAGUCHI, L. M.M; CARVALHO, O.B. **Plantas medicinais: curso de plantas medicinais**. Secretaria Municipal do Verde e Meio Ambiente. São Paulo: Divisão Técnica Escola Municipal de Jardinagem, 2010.

IIAP, I. DE INVESTIGACIONES DE LA A. PERUANA. **Base de datos del IIAP de plantas medicinales**. Lima: 2010.

JAVAÉ, N. R. K. **Toxicidade subcrônica e reprodutiva do extrato bruto das folhas de *Siparuna guianensis* em ratos Wistar**. Dissertação, 64 f, Programa de pós-graduação em ciência animal tropical. Araguaína: Universidade Federal do Tocantins, 2013.

JENETT-SIEMS, K. et al. In vitro antiplasmodial activity of Central American medicinal plants. **Tropical Medicine & International Health**, v. 4, n. 9, p. 611–615, 1999.

JENETT-SIEMS, K. et al. Sipandinolide: a butenolide including a novel type of carbon skeleton from *Siparuna andina*. **Planta Med**. v. 66, p. 384-385, 2000.

JENETT-SIEMS, K. et al. Sipaucins A-C sesquiterpenoids from *Siparuna pauciflora*. **Phytochemistry**. v. 63. p. 377-381, 2003.

KARUNAMOORTHY, K. et al. Role of tradicional antimalarial plants in the battle against the global malaria burden. **Vector-borne and Zoonotic diseases**, v. 13, n. 8, p. 521- 545. 2013.

KATAVIC, P. L. **Chemical investigations of the alkaloids from the plants of the family Elaeocarpaceae**. Doctor thesis, 295 p, Griffith University, 2005.

LEE, J.J. et al. Effects of Anonaine on Dopamine Biosynthesis and L-DOPA-Induced Cytotoxicity in PC12 Cells. **Molecules**. v.13, p.475-487, 2008.

LEHANE, A.M; SALIBA, K.J. Common dietary flavonoids inhibit the growth of the intraerythrocytic malaria parasite. **BMC Res Notes**. v.18, p.1-26, 2008.

LEITAO, G. G. et al. Kaempferol glycosides from *Siparuna apiosyce*. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 679–682, 2000.

LEITÃO, G. G. et al. Chemistry and pharmacology of *Monimiaceae*: A special focus on *Siparuna* and *Mollinedia*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 65, n. 2, p. 87–102, 1999.

LEITE, F.H.A. et al. Malaria: from old drugs to new molecular targets. **Biochemistry and Biotechnology reports**. v.2, n.4, p.59-76, 2013.

LI, L. XU, Y. WANG, B. Liriodenine induces the apoptosis of human laryngocarcinoma cells via the upregulation of p53 expression. **Oncology letters**. v.9, p.1121-1127, 2015.

LI, H.T. et al. The Pharmacological Activities of (-)-Anonaine. **Molecules**. v.18, p. 8257-8263, 2013.

LIMA, P. C. **Avaliação da capacidade Leishmanicida de espécies vegetais do cerrado**. Dissertação, 58 f. Programa de Pós-graduação em ciencias do ambiente. Palmas: Universidade Federal do Tocantins, 2013.

LIMA, R.B.S. et al. In vitro and in vivo anti-malarial activity of plants from the Brazilian Amazon. **Malaria journal**. v.14, n. 508, 2015.

LÓPEZ, D. H. P. **Evaluación de la actividad antibacteriana de los alcaloides provenientes de las hojas de *Siparuna sessiliflora***. Facultad de química Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana, 2011.

MANOSALVA, L. et al. Identification of isoquinoline alkaloids from *Berberis microphylla* by HPLC-ESI-MS/MS. **Boletín Iatinoamericano de y del Caribe de Plantas Medicinales y aromáticas**. v.14, n 4, p.324-335, 2014.

MAKLER, M.T. et al. Parasite lactate dehydrogenase as an assay for *Plasmodium falciparum* drug sensitivity. **Am J Trop Med Hyg**. v. 48, n.6, p. 739-741, 1993.

MARIATH, I.R. et al. Plants of the American continent with antimalarial activity. **Revista brasileira de farmacognosia**.v. 19, n. 1, p. 158-191, 2009.

MARTI, G. et al. Natural Aristolactams and Aporphine Alkaloids as Inhibitors of CDK1/Cyclin B and DYRK1A. **Molecules**, v. 18, n. 3, p. 3018–3027, 2013.

MATOS, F.J.A. **Introdução à fitoquímica experimental**. 2ª ed. Fortaleza: Edições UFC, 1997

MELO, N. C. et al. Caracterização química de diferentes sistemas de uso do solo. **Revista Agroecossistemas**, v. 5, n. 2, p. 8-13, 2013.

MESQUITA, M.L. et al. In vitro antiplasmodial activity of Brazilian Cerrado plants used as traditional remedies. **Journal of ethnopharmacology**. v.110, p.165-170, 2007.

MINAMI, H. et al. Microbial production of plant benzyloisoquinoline alkaloids. **PNAS**. v.105, n. 21, p. 7393-7398, 2008.

MONTANARI, R. M. **Composição química dos óleos essenciais de espécies de *anacardiaceae*, *siparunaceae* e *verbenaceae***. Tese (Doutorado em Agroquímica), 173 f. Programa de Pós-graduação em agroquímica. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2010.

NARANJO, P; ESCALERAS, R. **La Medicina Tradicional en el Ecuador: Memorias de las Primeras Jornadas Ecuatorianas de etnomedicina Andina**. 1. ed. Quito: Biblioteca Ecuatoriana de Ciencias, 1995.

NEGRI, G. Chemical composition of hydroethanolic extracts from *Siparuna guianensis*, medicinal plant used as anxiolytics in Amazon region. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 5, p. 1024–1034, 2012.

NKHOMA, S. et al. Molecular surveillance for drug-resistant *Plasmodium falciparum* malaria in Malawi. **Acta Trop**. v. 102, n.2, p. 138-142, 2007.

NOBRE, C.A; GUILLERMO, O.O; MARENGO, J.A. Características do clima Amazônico: aspectos principais. **Amazonia and global change: geophysical monograph series 186**. p.149-162, 2009.

ODONNE, G. et al. Medical ethnobotany of the Chayahuita of the Parapuru basin (Peruvian Amazon). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 146, n. 1, p. 127–153, 2013.

OLIVEIRA, F; AKISUE, G; AKISUE, M.K. **Farmacognosia**, v.1. Atheneu: São Paulo, 1998.

OLIVEIRA, A.R.M; SZCZERBOWSK, D. Quinins: 470 anos de história, controvérsias e desenvolvimento. **Química Nova**. v. 32, n.7, p. 1971-1974, 2009

ONGUÉNÉ, P.A. et al. The potential of anti-malarial compounds derived from African medicinal plants. Part I: a pharmacological evaluation of alkaloids and terpenoids. **Malaria journal**. v. 12, n. 449, 2013.

OSORIO, E. J. et al. Alkaloids with antiprotozoal activity. **The alkaloids**. v. 66, ch 2, Elsevier, 2008.

PAULA, R. C. **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, 110 f. Programa de pós-graduação em ciências Farmacêuticas. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2014.

PAHO, Pan American Health Organization. **AMI/RAVREDA home page**. United States: PAHO, 2014. Acess: 25 nov. 2015.

PAVARINI, D. P. et al. Exogenous influences on plant secondary metabolite levels. **Animal Feed Science and Tecnology**, v, 176, p. 5-16, 2015.

PEIXOTO, A. L. *Siparunaceae. Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2014. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB88028>>. Acesso em: 25 Nov. 2015

PÉREZ, E.G. CASSELS, B.K. Alkaloids from the Genus *Duguetia*. **The alkaloids: Chemistry and biology**. v.68, p.83-156, 2010.

PIZZOLATTI, M.G. et al. Flavonoides glicosilados das folhas e flores de *Bauhinia forficata* (Leguminosae). **Química Nova**. v. 26, n.4, 2003.

PRADO, G.R.L. et al. Malaria in developing countries. **J infect Dev Ctries**. v. 8, n.1, p. 01-04, 2014.

RANGEL, E. T. **Atividade antiprotozoária, antifúngica e citotóxica de extratos de plantas do bioma Cerrado, com ênfase em Leishmania (*Leishmania*) chagasi**. Brasília: Universidade de Brasília, 2010.

RBM, R. B. M. P. **Roll Back Malaria Annual Report 2013**. Disponível em: <<http://www.rollbackmalaria.org/microsites/annualreport2013/>>. Acesso em: 27 out. 2015.

RENNER, S.S; HAUSNER, G. *Siparunaceae, Monimiaceae. Flora of Ecuador*. Disponível em: <<http://www.umsl.edu/~renners/siparuna/>>. Acesso em: 26 out. 2015.

RÍOS, J. M. Detección de alcaloides em semillas de plantas herbáceas nativas. **Multequina**. v. 22, n.2, p. 51-55, 2013.

RIVERA, P.F.N; GUERRINI, A; TSAMARAINT, A. Composición química del aceite esencial de hojas de *Siparuna schimpffii* Diels ( limoncillo ). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 19, n. 2, p. 128–137, 2014.

RASONAIVO, P. et al. Whole plant extracts versus single compounds for the treatment of malaria: synergy and positive interactions. **Malaria Journal**. v. 10, n.1, p.1-12, 2011.

ROVER, M. **Estudo fitoquímico e avaliação da atividade antibacteriana de *Siparuna guianensis* Aubl**. Dissertação (Mestrado em Biologia Experimental),123 f. Programa de Pós-graduação em Biologia experimental. Rondônia: Universidade Federal de Rondônia, 2006.

RUYSSCHAERT, S. et al. Bathe the baby to make it strong and healthy: Plant use and child care among Saramaccan Maroons in Suriname. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 121, n. 1, p. 148–170, 2009.

SAIDI, N. Apophines and benzyloquinoline alkaloids from bark of *Cryptocarya crassinervia*. **Proceedings of the Annual International Conference Syiah Kuala University**. v.1, n.2, p.183-188, 2011.

SAEWAN, N. JIMTAISONG, A. Photoprotection of natural flavonoids. **Journal of applied Pharmaceutical Science**. v.3, n.9, p.129-141, 2013.

SAMPAIO, J. A. SILVA, F. A. N. G. Determinação das densidades de sólidos e de polpa. In: SAMPAIO, J. A. FRANÇA, S. C. A. BRAGA, P. F. A. **Tratamento de minérios: Práticas Laboratoriais**. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 2007, cap. 2, p.35-51.

SANGSTER, A. W; STUART, K. L. **Ultraviolet spectra of alkaloids**. Department of chemistry. Jamaica: University of west indies, 1964.

SANTOS, J. D. F. L. et al. Observations on the therapeutic practices of riverine communities of the Unini River, AM, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 142, n. 2, p. 503–515, 2012.

SHAMMA, M. MONIOR, J.L. **Isoquinoline alkaloids research: 1972-1977**. Springer Science & Business Media, 2012.

SHULTES, R.E; RAFFAUF, R. . De Plantis Toxicariis e Mundo Novo Tropicale Commentationes XXXIX: Febrifuges of northwest Amazonia. **Harvard Papers in Botany**, v. 1, n. 5, p. 52–68, 1994.

SILVA, T. H. A. et al. Estudo de modelagem molecular de complexos ferriprotoporfirina-IX e quinolinocarbinolaminas antimaláricas: proposta de um farmacóforo. **Química Nova**, v. 28, n. 2, p. 244-246, 2005.

SILVA, D.B. et al. Isolamento e avaliação da atividade citotóxica de alguns alcaloides oxaporfínicos obtidos de *Annonaceae*. **Química Nova**. v.30, n.8, p. 1809-18012, 2007.

SIVEP- MALÁRIA, Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica. **Resumo epidemiológico nacional mensal**. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

SOARES, N.P. et al. Medicinal plants used by the population of Goianópolis , Goiás State , Brazil. **Acta Scientiarum**, v. 35, n. 2, p. 263–271, 2013.

SOUTO, J. S. et al. Investigation of flavonoids from *Siparuna sarmentosa* Perkins. **Planta Med**. v.79, 2013.

SOUZA, J. N. P. et al. Bioprospecção das atividades antioxidante e antimicrobiana de espécies vegetais medicinais coletadas em Ouro Preto - MG. **Revista eletrônica de Farmácia**, v. 1, n. 1, p. 1–15, 2013.

SUAU, R. et al. N-benzyloquinoline alkaloids from *Ceratocarpus heterocarpus*. **Phytochemistry**. v.36, n.1, p.241-243, 1994.

TASDEMIR, D. et al. Antitrypanosomal and antileishmanial activities of flavonoids and their analogues: in vitro, in vivo, structure-activity relationship studies. **Antimicrob Agents Chemother.** v.50, n.4, p.1352-1364, 2006.

TAYLOR, P. et al. Screening of Venezuelan medicinal plant extracts for cytostatic and cytotoxic activity against tumor cell lines. **Phytotherapy Research.** v. 27, n.4, p.530-539, 2013.

TEMPONE, A.G. et al. Antiprotozoal activity of Brazilian plant extracts from isoquinoline alkaloid-producing families. **Phytomedicine**, v. 12, p. 382–390, 2005.

**THE PLANT LIST.** Disponível em: <<http://www.theplantlist.org/1.1/cite/>>. Acesso em: 13 out. 2015.

TOMCHINSKY, B. **Etnobotânica de Plantas Antimaláricas Em Barcelos, Amazonas.** [s.l.] Universidade Estadual Paulista, 2014.

TRAGER, W.; JENSEN, J. B. Human malaria parasites in continuous culture. **Science (New York, N.Y.)**, v. 193, n. 4254, p. 673–5, 1976.

TSIMOGIANNIS, D. et al. Characterization of flavonoid subgroups and hydroxy substitution by HPLC-MS/MS. **Molecules**, v. 12, p. 593–606, 2007.

VALADEAU, C. et al. The rainbow hurts my skin: Medicinal concepts and plants uses among the Yanasha (Amuesha), an Amazonian Peruvian ethnic group. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, n. 1, p. 175–192, 2010.

VALENTINI, C. M. A; RODRÍGUEZ-ORTÍZ, C. E.; COELHO, M. F. B. *Siparuna guianensis* Aublet (negramina): Uma revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 1, p. 96–104, 2010.

VENEGAS, A. J. **Aislamiento, modificación sintética y evaluación in vitro de la actividad antifúngica de alcaloides provenientes de las hojas de la especie *Siparuna sessiliflora*.** Magister en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana, 2012.

VIGNERON, M. et al. Antimalarial remedies in French Guiana: A knowledge attitudes and practices study. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 98, p. 351–360, 2005.

WAGNER, H. et al. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas.** Berlin: Springer, 1984.

WAN, C. et al. Isolation and identification of phenolic compounds from *Gynura divaricata* leaves. **Pharmacognosy Magazine**, v. 7, n. 26, p. 101, 1 abr. 2011.

WEN, J. et al. A validated UV-HPLC method for determination of chlorogenic acid in *Lepidogrammitis drymoglossoides* (Baker) Ching, *Polypodiaceae*. **Pharmacognosy Res.** v. 4, n.3, p.148-153, 2012.

WU, S.-B. et al. A new liquid chromatography–mass spectrometry-based strategy to integrate chemistry, morphology, and evolution of eggplant (*Solanum*) species. **Journal of Chromatography A**, v. 1314, p. 154–172, 2013.

WHO, World Health Organization. **Malaria**. Fact sheet. n.94, april, 2015.

\_\_\_\_\_. **World malaria report 2014**. WHO library. 2014.

WYNN, S.G; FOUGÈRE, B.J. **Veterinary herbal medicine**. 1 ed. Missouri: Elsevier health sciences, 2007.

YAN, R. et al. Studies on the Alkaloids of the Bark of *Magnolia officinalis*: Isolation and On-line Analysis by HPLC-ESI-MS. **Molecules**. v. 18, p.7739-7750, 2013.

YUBIN, J. I. et al. The extraction, separation and purification of alkaloids in the natural medicine. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 6, n.1, p. 338-345, 2014.

ZAHARI, A. et al. Antiplasmodial and antioxidant isoquinoline alkaloids from *Dehaasia longipedicellata*. **Planta Med**.v.80, n.7, p. 599- 603, 2014.

ZIEGLER, J. FACCHINI, P. J. Alkaloid Biosynthesis: Metabolism and Trafficking. **Annual Review of Plant Biology**. v. 59, p. 735-769, 2008.