



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE CATALÃO (UFCAT)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

THAIS BERTOLINO VIEIRA DANTAS

DESCOBERTA DE INIBIDORES ENZIMÁTICOS DE *Plasmodium falciparum* A PARTIR DO ESTUDO QUÍMICO DE *Dalbergia miscolobium* Benth. (Fabaceae)

CATALÃO-GO

2023



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
UNIDADE ACADÊMICA ESPECIAL DE QUÍMICA

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação Tese Outro*: _____

*No caso de mestrado/doutorado profissional, indique o formato do Trabalho de Conclusão de Curso, permitido no documento de área, correspondente ao programa de pós-graduação, orientado pela legislação vigente da CAPES.

Exemplos: Estudo de caso ou Revisão sistemática ou outros formatos.

2. Nome completo do autor

Thais Bertolino Vieira Dantas

3. Título do trabalho

DESCOBERTA DE INIBIDORES ENZIMÁTICOS de Plasmodium falciparum A PARTIR DO ESTUDO QUÍMICO DE Dalbergia miscolobium

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

- a)** consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);
- b)** novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.

O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;

- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **Lorena Ramos Freitas De Sousa, Professor do Magistério Superior**, em 17/05/2023, às 15:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **THAIS BERTOLINO VIEIRA, Discente**, em 19/05/2023, às 07:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3753067** e o código CRC **431D346B**.

Referência: Processo nº 23070.025149/2023-78

SEI nº 3753067

THAIS BERTOLINO VIEIRA DANTAS

DESCOBERTA DE INIBIDORES ENZIMÁTICOS DE *Plasmodium falciparum* A PARTIR DO ESTUDO QUÍMICO DE *Dalbergia miscolobium* Benth. (Fabaceae)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Química, da Universidade Federal de Catalão (UFCAT), como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE EM QUÍMICA.

Orientadora: Profa. Dra. Lorena R. F. de Sousa

Coorientador: Prof. Dr. Rafael V. C. Guido

CATALÃO-GO

2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFCAT.

Dantas, Thais Bertolino Vieira
DESCOBERTA DE INIBIDORES ENZIMÁTICOS DE *Plasmodium falciparum* A PARTIR DO ESTUDO QUÍMICO DE *Dalbergia miscolobium* Benth. (Fabaceae) [manuscrito] / Thais Bertolino Vieira Dantas. - 2023.
115, f.

Orientadora: Profa. Dra. Lorena Ramos Freitas de Sousa;
co-orientador Prof. Dr. Rafael Victorio Carvalho Guido.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Catalão, Instituto de Química, Catalão, Programa de Pós-Graduação em Química, Catalão, 2023.

Bibliografia. Anexos.

Inclui abreviaturas, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Malária . 2. Pfen. 3. PfPKII. 4. *Dalbergia miscolobium*. I. de Sousa, Lorena Ramos Freitas , orient. II. Título.

CDU 547



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
UNIDADE ACADÊMICA ESPECIAL DE QUÍMICA
ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Ata nº 25 da sessão de Defesa de Dissertação de **Thais Bertolino Vieira Dantas**, que confere o título de Mestre em Química, no Programa de Pós-graduação em Química da UFCAT.

Aos onze dias do mês de maio de dois mil e vinte e três, a partir das 13:30 horas, por videoconferência, realizou-se a sessão pública de Defesa de Dissertação da discente **Thais Bertolino Vieira Dantas**, intitulada “**DESCOBERTA DE INIBIDORES ENZIMÁTICOS de *Plasmodium falciparum* A PARTIR DO ESTUDO QUÍMICO DE *Dalbergia miscolobium*”** na área de concentração em Química. Os trabalhos foram instalados pela Orientadora, Professora Doutora Lorena Ramos Freitas de Sousa (PPGQ-UFCAT) com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Professora Doutora Vanessa Gisele Pasqualotto Severino (IQ-UFG), membro titular externo e Professora Doutora Anna Caroline Campos Aguiar (UNIFESP), membro titular externo, cujas participações ocorreram por meio de videoconferência pelo link <https://meet.google.com/qnm-afhx-agj>. Durante a arguição os membros da banca fizeram sugestões de alterações no texto e complementações no trabalho final. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Dissertação, tendo sido a candidata **aprovada** pelos seus membros. Proclamados os resultados pela Professora Doutora Lorena Ramos Freitas de Sousa, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA

DESCOBERTA DE INIBIDORES ENZIMÁTICOS DE *Plasmodium falciparum* A PARTIR DO ESTUDO QUÍMICO DE *Dalbergia miscolobium* Benth. (Fabaceae).



Documento assinado eletronicamente por **Lorena Ramos Freitas De Sousa, Professor do Magistério Superior**, em 12/05/2023, às 10:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vanessa Gisele Pasqualotto Severino, Professor do Magistério Superior**, em 12/05/2023, às 11:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **ANNA CAROLINE CAMPOS AGUIAR, Usuário Externo**, em 26/06/2023, às 09:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site



https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3720620** e o código CRC **6E1AB9B2**.

Referência: Processo nº 23070.025149/2023-78

SEI nº 3720620

NOTA NAS TESES/DISSERTAÇÕES

Os Programas de Pós-Graduação *stricto sensu* em funcionamento na Universidade Federal de Catalão (UFCAT), em virtude de procedimentos técnicos relacionados à CAPES, continuam provisoriamente vinculados à Universidade Federal de Goiás (UFG), por isso, todos os elementos pré-textuais do trabalho apresentado estão identificados como Universidade Federal de Goiás/Universidade Federal de Catalão em implantação, em função da migração da BDTD ter ocorrido a partir de 16 de agosto de 2021, assim como pelo fato das pesquisas e produtos serem realizados na UFCAT.

Dedico este trabalho...

Aos meus pais, José Francisco e Marta, pelo exemplo de resiliência e amor.

À minha irmã, Giovanna, por me incentivar na busca por este sonho.

Ao meu esposo Felipe, pelo suporte em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me sustenta durante todas as caminhadas da vida!

À minha orientadora, Profa. Dra. Lorena Ramos Freitas de Sousa, por todo o incentivo, amizade, confiança e ensinamentos durante o meu percurso acadêmico desde a iniciação científica.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Rafael Victorio Carvalho Guido, do Centro de Pesquisa e Inovação em Biodiversidade e Fármacos – CIBFar, Universidade de São Paulo (USP), pela realização dos ensaios frente a *Pfeno*, atividade antiplasmodial, citotoxicidade, e pela recepção em seu laboratório. Ao doutorando Igor de Moura por sua amizade e paciência em compartilhar seus saberes científicos.

Às professoras, Dra. Richele Priscila Severino, Dra. Anna Caroline Aguiar e Dra. Vanessa G. Pasqualotto Severino, pelas contribuições ao trabalho. À professora Dra. Elaine Rosechrer Carbonero, pela amizade e incentivo durante esta caminhada.

À professora Dra. Quezia Bezerra Cass da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) pela realização do experimento de CLUE-IES-QqTOF-EM/EM, e ao Laboratório Multiusuário do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) pela realização dos experimentos de RMN.

A todos os integrantes do LaBiOrg da Universidade Federal de Catalão que contribuíram para a realização deste trabalho, em especial ao discente Wéldion Gonçalves Mesquita Júnior pela amizade e auxílio nos experimentos de isolamento dos compostos de *D. miscolobium*. Ao corpo docente do Instituto de Química da Universidade Federal de Catalão pelos ensinamentos desde a graduação. À minha amiga, Amanda das Graças Barbosa, pelo suporte e companheirismo durante toda a carreira acadêmica. À FAPEG pela bolsa concedida no desenvolvimento deste projeto de pesquisa.

Ao meu pai, José Francisco Vieira, pelo exemplo de dedicação que me inspirou a seguir na carreira acadêmica. À minha mãe, Marta Bertolino Vieira, e à minha irmã, Giovanna Bertolino Vieira, pela confiança e suporte. Ao meu esposo, Felipe Dantas Pinto, e aos meus sogros, Francisco de Jesus Pereira Pinto e Izamar Soares Dantas Pereira, pela compreensão e incentivo durante esta caminhada.

“Pois o que você ouve e vê depende do lugar em que se coloca, como depende também de quem você é”.

As crônicas de Nárnia

C. S. Lewis

RESUMO

A malária é uma parasitose de prevalência mundial, causada por parasitos do gênero *Plasmodium* spp. Apesar da existência de tratamentos para a doença, o surgimento de resistência dos parasitos destaca a importância da descoberta de novos candidatos com atividade antimalárica. Nesse contexto, as enzimas enolase (*Pfeno*) e piruvato quinase II (*PfPKII*) de *P. falciparum* são alvos promissores no desenvolvimento de quimioterápicos antimaláricos. A *Pfeno* é importante para a produção de energia em parasitos como o *Plasmodium* spp. e desempenha funções não glicolíticas ou “moonlighting”. A *PfPKII* está associada a uma organela do parasito denominada como apicoplasto, sendo fundamental para a produção de derivados nucleosídeo trifosfato (NTP), utilizados em diversas vias metabólicas. Na busca por novos inibidores da *Pfeno* e *PfPKII*, é relevante a investigação dos produtos naturais, em que vários metabólitos secundários são conhecidos como fármacos antimaláricos. A *Dalbergia miscolobium* Benth. (Fabaceae) é uma planta endêmica do Cerrado conhecida como “jacarandá-do-cerrado”. Espécies desse gênero possuem atividade antiplasmodial e antioxidante, tendo como metabólitos secundários isoflavonas e neoflavonas. O extrato etanólico de *D. miscolobium* (DmCcE) apresentou potencial inibitório frente à cepa 3D7 ($IC_{50}^{3D7} = 9,0 \mu\text{g/mL}$) obtido pelo ensaio de SYBR green I. Esse resultado promissor levou à seleção dessa espécie para o estudo químico guiado por ensaios *in vitro* em *P. falciparum* e investigação das frações e compostos isolados frente às enzimas *Pfeno* e *PfPKII*, em busca de novos inibidores enzimáticos como potenciais agentes antiplasmodiais. A prospecção química desse extrato bruto através do experimento de CLUE-EM/EM, permitiu a desreplicação de seis compostos da classe dos flavonoides, terpenoides e derivados fenólicos. Através do experimento de CG-EM da fração hexânica ativa (DmCcH, $IC_{50}^{3D7} = 1,7 \mu\text{g/mL}$) foram identificadas três substâncias da classe dos ésteres. O estudo fitoquímico da fração ativa de acetato de etila, guiado por atividade antiplasmodial (DmCcA, $IC_{50}^{3D7} = 8,4 \mu\text{g/mL}$), levou à obtenção de subfrações ativas e ao isolados quatro compostos através de técnicas cromatográficas, a epicatequina (**I**), composto **II** (epitaxifolina e cis-dihidroquercetagetina, $IC_{50}^{3D7} = 24,0 \mu\text{g/mL}$), a lupenona (**III**, $IC_{50}^{3D7} = 26,6 \mu\text{M}$) e lupeol (**IV**, $IC_{50}^{3D7} = 33,3 \mu\text{M}$), identificados por RMN 1D/2D. Além disso, as subfrações **A19**, **A20** (epitaxifolina e cis-dihidroquercetagetina, composto **II**) e **A21** foram promissoras frente à *PfPKII*, com inibições acima de 90% (200 $\mu\text{g/mL}$).

Palavras-Chave: Malária, *Pfeno*, *PfPKII*, *Dalbergia miscolobium*.

ABSTRACT

Malaria is a worldwide prevalence parasitosis caused by parasites of the genus *Plasmodium* spp. Despite the existence of treatments for this disease, the emergence of parasite resistance highlights the importance of discovering new candidates with antimalarial activity. In this context, enolase (*Pfeno*) and pyruvate kinase II (*PfPKII*) enzymes from *P. falciparum* are promising targets in the development of antimalarial chemotherapeutics. *Pfeno* is extremely important for the production of energy in parasites such as *Plasmodium* spp. and also performs non-glycolytic functions, called "moonlighting" functions. *PfPKII* is associated with an organelle of the parasite called apicoplast, being essential for the production of nucleoside triphosphate (NTP) derivatives, which is used in several metabolic pathways. In the search for new *Pfeno* and *PfPKII* inhibitors, the investigation of natural products is relevant, where several secondary metabolites are well known as antimalarial drugs. *Dalbergia miscolobium* Benth. (Fabaceae), is an endemic plant of the cerrado popularly known as "jacarandá-do-cerrado". Species of this genus have antiplasmodial and antioxidant activity, with isoflavones and neoflavones as secondary metabolites. The ethanolic extract of *D. miscolobium* (DmCcE) showed inhibitory potential against the 3D7 strain ($IC_{50}^{3D7} = 9.0 \mu\text{g/mL}$) obtained by the SYBR green I assay. This promising result led to the selection of this species for the chemical study guided by *in vitro* tests on *P. falciparum* and investigation of fractions and compounds isolated against *Pfeno* and *PfPKII* enzymes, in search of new enzymatic inhibitors as potential antiplasmodial agents. The chemical prospection of this crude extract through the CLUE-MS/MS experiment allowed the dereplication of six compounds from the class of flavonoids, terpenoids and phenolic derivatives. Through the GC-MS experiment of the active hexane fraction (DmCcH, $IC_{50}^{3D7} = 1.7 \mu\text{g/mL}$), three substances of the ester class were identified. The phytochemical study of the active ethyl acetate fraction guided by antiplasmodial activity (DmCcA, $IC_{50}^{3D7} = 8.4 \mu\text{g/mL}$), led to the obtainment of active subfractions. From them, four compounds were isolated through chromatographic techniques, epicatechin (**I**), compound **II** (epitaxifolin and cis-dihydroquercetagetin, $IC_{50}^{3D7} = 24.0 \mu\text{g/mL}$), lupenone (**III**, $IC_{50}^{3D7} = 26.6 \mu\text{M}$) and lupeol (**IV**, $IC_{50}^{3D7} = 33.3 \mu\text{M}$), identified by 1D/2D NMR. Furthermore, subfractions **A19**, **A20** (epitaxifolin and cis-dihydroquercetagetin, **compound II**) and **A21** were promising against *PfPKII*, with inhibitions above 90% ($200 \mu\text{g/mL}$). Keywords: Malaria, *Pfeno*, *PfPKII*, *Dalbergia miscolobium*.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Ciclo de transmissão da malária.....	15
FIGURA 2. Fármacos antimaláricos.....	16
FIGURA 3. Reação catalisada pela enzima enolase.....	17
FIGURA 4. (A) Inibidor fosfonoacetohidroamato (B) Enolase de <i>T. brucei</i> em complexo com o inibidor.....	18
FIGURA 5. (A) Estrutura 3D da enzima enolase (B) <i>Pfeno</i> em complexo com o substrato 2-fosfoglicerato (2-PG, roxo) e produto fosfoenolpiruvato (PEP, amarelo).....	19
FIGURA 6. Reação catalisada pela enzima piruvato quinase.....	19
FIGURA 7. Produtos naturais oriundos de plantas como fármacos antimaláricos.....	21
FIGURA 8. Estruturas químicas dos flavonoides de <i>P. acutangulum</i> e <i>G. kola</i> com atividade antiplasmodial.....	22
FIGURA 9. Estruturas químicas dos compostos identificados em diferentes espécies do gênero <i>Dalbergia</i>	23
FIGURA 10. Estrutura dos compostos identificados na espécie <i>D. miscolobium</i>	25
FIGURA 11. Estruturas químicas dos isoflavonoides isolados da espécie <i>D. miscolobium</i>	26
FIGURA 12. Estrutura geral dos flavonoides e suas subclasses.....	27
FIGURA 13. Estrutura dos isoflavonoides com atividade frente ao <i>P. falciparum</i>	28
FIGURA 14. <i>D. miscolobium</i> Benth (Fabaceae).....	33
FIGURA 15. Partição líquido-líquido do extrato bruto das cascas do caule de <i>D. miscolobium</i>	34
FIGURA 16. Fracionamento da DmCcA e obtenção das subfrações A1-A21.....	35
FIGURA 17. Fracionamento da subfração A9 e obtenção das subfrações A9.1-A9.26.....	36
FIGURA 18. Fracionamento da subfração A15 e obtenção das subfrações A15.1-A15.14.....	37
FIGURA 19. Fracionamento da DmCcA e obtenção das subfrações B1-B6.....	37
FIGURA 20. Fracionamento da subfração B2 e obtenção das subfrações B2.1-B2.34.....	38
FIGURA 21. Fracionamento da subfração B2.19 e obtenção das subfrações B2.19.1-B2.19.10.....	39
FIGURA 22. Fracionamento da subfração B2.22 e obtenção das subfrações B2.22.1 - B2.22.15.....	39
FIGURA 23. Fracionamento da subfração B2.31 e obtenção das subfrações B2.31.1-B2.31.14.....	40
FIGURA 24. Representação do procedimento experimental realizado na determinação da atividade antiplasmodial das frações, subfrações e compostos de <i>D. miscolobium</i>	43
FIGURA 25. Reações químicas envolvidas no ensaio acoplado envolvendo as enzimas <i>Pfeno</i> , piruvato quinase e luciferase.....	46
FIGURA 26. Representação do procedimento experimental realizado no ensaio frente a <i>Pfeno</i> das subfrações, compostos de <i>D. miscolobium</i>	47
FIGURA 27. Atividade antiplasmodial (IC_{50}^{3D7}) (A) e citotoxicidade (CC_{50}^{HepG2}) (B) das subfrações de DmCcA.....	53
FIGURA 28. Atividade antiplasmodial (IC_{50}^{3D7}) (A) e citotoxicidade (CC_{50}^{HepG2}) (B) das subfrações provenientes do fracionamento de B2.....	57
FIGURA 29. Flavonoides identificados no DmCcE.....	62
FIGURA 30. Fragmentações observadas para a procianidina (composto 1E).....	63
FIGURA 31. Fragmentações observadas para a biochanina (composto 3E).....	64
FIGURA 32. Terpenoide (7E) e derivado fenólico (8E) identificados em DmCcE.....	66
FIGURA 33. Cromatograma obtido para a fração DmCcH após análise por cromatografia gasosa.....	68
FIGURA 34. Ésteres identificados por GC-EM na fração DmCcH.....	68

FIGURA 35. Fragmentações observadas para o hexadecanoato de etila (1H).....	69
FIGURA 36. Compostos isolados a partir do fracionamento de DmCcA.	71
FIGURA 37. Estrutura da epicatequina (composto I).	72
FIGURA 38. Espectro de RMN de hidrogênio da epicatequina (composto I) (400 MHz, metanol- <i>d</i> ₄).	73
FIGURA 39. Estrutura do composto II – mistura de epitaxifolina (A) e cis-dihidroquercetagetina (B).....	74
FIGURA 40. Espectro de RMN de hidrogênio do composto II, mistura de epitaxifolina (A) e cis-dihidroquercetagetina (B) (400 MHz, acetona- <i>d</i> ₆).	76
FIGURA 41. Estrutura da lupenona (composto III).....	78
FIGURA 42. Espectro de RMN de hidrogênio da lupenona (composto III) (400 MHz, acetona- <i>d</i> ₆).	79
FIGURA 43. Correlações HSQC da lupenona (composto III).....	80
FIGURA 44. Correlações HMBC da lupenona.	81
FIGURA 45. Estrutura do lupeol (composto IV).	83
FIGURA 46. Espectro de RMN de hidrogênio do lupeol (composto IV) (400 MHz, clorofórmio- <i>d</i> ₁).	84
FIGURA 47. Correlações HSQC do lupeol (composto IV).....	86
FIGURA 48. Correlações HMBC do lupeol (composto IV).....	87

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Flavonoides de <i>P. acutangulum</i> e <i>G. kola</i> com atividade antiplasmodial.	21
TABELA 2. Metabólitos secundários identificados em diferentes espécies do gênero <i>Dalbergia</i>	23
TABELA 3. Compostos identificados no extrato <i>n</i> -hexânico da cortiça de <i>D. miscolobium</i>	24
TABELA 4. Isoflavonoides isolados de <i>D. miscolobium</i>	25
TABELA 5. Isoflavonoides com atividade frente ao <i>P. falciparum</i>	28
TABELA 6. Massa dos extratos/frações de <i>D. miscolobium</i> obtidas após a maceração e partição líquido-líquido com seus rendimentos.	50
TABELA 7. Inibição percentual, atividade antiplasmodial (IC_{50}^{3D7}), citotoxicidade (CC_{50}^{HepG2}) e índice de seletividade (IS) do extrato selecionado de <i>D. miscolobium</i>	50
TABELA 8. Inibição percentual, atividade antiplasmodial (IC_{50}^{3D7}), citotoxicidade (CC_{50}^{HepG2}) e seletividade (IS) das frações do DmCcE. *Os resultados da fração escolhida para estudo fitoquímico estão destacados em verde.	51
TABELA 9. Inibição percentual, atividade antiplasmodial (IC_{50}^{3D7}), citotoxicidade (CC_{50}^{HepG2}) e seletividade (IS) das subfrações DmCcA. *Os resultados da fração de origem estão destacados em azul. *As subfrações com atividade inibitória classificada como altamente ativa ($IC_{50}^{3D7} < 5 \mu\text{g/mL}$) estão destacadas em verde.	52
TABELA 10. Inibição percentual, atividade antiplasmodial (IC_{50}^{3D7}), citotoxicidade (CC_{50}^{HepG2}) e seletividade (IS) das subfrações oriundas de A9, A15 e dos compostos isolados. *Os resultados das subfrações de origem estão destacados em azul. *As subfrações com atividade inibitória classificada como altamente ativa ($IC_{50}^{3D7} < 5 \mu\text{g/mL}$) estão destacadas em verde.	54
TABELA 11. Inibição percentual, atividade antiplasmodial (IC_{50}^{3D7}), citotoxicidade (CC_{50}^{HepG2}) e seletividade (IS) das subfrações oriundas de B2 e dos compostos isolados. * Os resultados das subfrações de origem estão destacados em azul. *As subfrações com atividade inibitória classificada como altamente ativa ($IC_{50}^{3D7} < 5 \mu\text{g/mL}$) estão destacadas em verde.	56
TABELA 12. Inibição percentual, atividade antiplasmodial (IC_{50}^{3D7}), citotoxicidade (CC_{50}^{HepG2}) e seletividade (IS) das subfrações oriundas de B2.19. *Os resultados das subfrações de origem estão destacados em azul. *As subfrações com atividade inibitória classificada como altamente ativa ($IC_{50}^{3D7} < 5 \mu\text{g/mL}$) estão destacadas em verde.	58
TABELA 13. Inibição percentual do extrato etanólico de <i>D. miscolobium</i> (50 $\mu\text{g/mL}$) frente à <i>Pfeno</i>	58
TABELA 14. Metabólitos secundários identificados no DmCcE através do <i>CompoundCrawler</i>	61
TABELA 15. Compostos identificados por CG-EM na fração DmCcH.	70
TABELA 16. Dados de RMN de hidrogênio da epicatequina (composto I).	74
TABELA 17. Dados de RMN de hidrogênio e ^{13}C da mistura de epitaxifolina + cis-dihidroquercetagina (composto II).	77
TABELA 18. Dados de RMN de hidrogênio e ^{13}C da lupenona (composto III).	81
TABELA 19. Dados de RMN de hidrogênio e ^{13}C do lupeol (composto IV).	87

LISTA DE ABREVIATURAS

CC₅₀^{HepG2} – citotoxicidade frente a linhagem de células do hepatocarcinoma humano

CLUE-IES-Qq-ToF-EM/EM – cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas de alta resolução com analisador de massas do tipo quadrupolo e ionização por fonte eletrospray

DmCcA – fração acetato de etila das cascas do caule de *D. miscolobium*

DmCcE – extrato etanólico das cascas do caule de *D. miscolobium*

DmCcH – fração hexânica das cascas do caule de *D. miscolobium*

DmCcHi – fração hidroalcoólica das cascas do caule de *D. miscolobium*

CG-EM – Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas

HMBC – correlação de ligações múltiplas heteronucleares

HSQC – correlação quântica simples heteronuclear

IC₅₀^{3D7} – concentração de inibidor necessária para inibir 50% da atividade biológica da cepa de *P. falciparum* sensível à cloroquina

IS – Índice de seletividade

MTT - brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol

NTP – nucleosídeo trifosfato

PEP - fosfoenolpiruvato

Pfeno – enzima enolase de *P. falciparum*

PfPKII – enzima piruvato quinase II de *P. falciparum*

2-PGA - 2-fosfoglicerato

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	iii
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1. Enolase de <i>P. falciparum</i> (<i>Pfeno</i>)	17
1.2. Piruvato quinase de <i>P. falciparum</i> (<i>PfPK</i>).....	19
1.3. Produtos naturais e atividade antiplasmodial	20
1.4. Plantas do Cerrado brasileiro para investigação frente à <i>Pfeno</i>	22
1.4.1. Gênero <i>Dalbergia</i>	22
1.4.1.1. Espécie <i>Dalbergia miscolobium</i>	23
1.4.1.2. Isoflavonoides como marcadores quimiotaxonômicos da família Fabaceae (subfamília Papilionoideae)	26
2. JUSTIFICATIVA.....	29
3. OBJETIVOS	29
3.1. Objetivos específicos.....	29
4. METODOLOGIA	30
4.1. Materiais e métodos	30
4.1.1. Solventes usados no isolamento e identificação dos compostos	30
4.1.2. Materiais cromatográficos	30
4.1.3. Reveladores de cromatografia em camada delgada (CCD).....	30
4.1.4. Equipamentos	31
4.1.5. Reagentes e soluções para os ensaios enzimáticos	31
4.1.6. Reagentes e soluções para o ensaio de atividade antiplasmodial	32
4.2. Metodologia do estudo químico	32
4.2.1. Coleta e identificação do material botânico	32
4.2.2. Obtenção do extrato etanólico de <i>D. miscolobium</i>	33
4.2.3. Isolamento dos constituintes químicos de <i>D. miscolobium</i>	34
4.2.3.1. Fracionamento da DmCcA e isolamento dos compostos I e II	35
4.2.3.1.1. Fracionamento da subfração A9 e isolamento do composto III	35
4.2.3.1.2. Fracionamento da subfração A15	36
4.2.3.2. Fracionamento da DmCcA	37

4.2.3.2.1. Fracionamento da subfração B2 e isolamento do composto IV	37
4.2.3.2.2. Fracionamento da subfração B2.19.....	38
4.2.3.2.3. Fracionamento da subfração B2.22.....	39
4.2.3.2.4. Fracionamento da subfração B2.31	40
4.3. Prospecção química de DmCcE por CLUE-IES-QqTOF-EM/EM.....	40
4.4. Análise de DmCcH por CG-EM	41
4.5. Análises por Ressonância Magnética Nuclear	42
4.6. Ensaio biológico das frações e subfrações de <i>D. miscolobium</i>	42
4.6.1. Ensaio de inibição <i>SYBR green I</i> para estágio assexuado de <i>P. falciparum</i>	42
4.6.2. Citotoxicidade frente à linhagem de hepatocarcinoma humano HepG2	44
4.6.3. Clonagem, expressão e purificação da enzima enolase recombinante de <i>P. falciparum</i> (<i>Pfeno</i>)	45
4.6.4. Expressão e purificação da enzima piruvato quinase II recombinante de <i>P. falciparum</i> (<i>PfPKII</i>).....	45
4.6.5. Ensaio enzimático frente à enolase de <i>P. falciparum</i> e piruvato quinase de mamífero	46
4.6.5.1. Ensaio acoplado 1 – <i>Pfeno</i> + piruvato quinase + luciferase.....	46
4.6.5.2. Ensaio acoplado 2 – piruvato quinase + luciferase	47
4.6.6. Ensaio enzimático frente à piruvato quinase II de <i>P. falciparum</i>	48
4.6.6.1. Ensaio acoplado 1 - <i>Pfeno</i> + <i>PfPKII</i> + luciferase	48
4.6.6.2. Ensaio acoplado 2 – <i>PfPKII</i> + luciferase.....	49
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1. Obtenção dos extratos e frações de <i>D. miscolobium</i>	49
5.2. Atividade antiplasmodial/citotoxicidade do extrato etanólico de <i>D. miscolobium</i>	50
5.2.1. Atividade antiplasmodial/citotoxicidade das frações de <i>D. miscolobium</i>	50
5.2.1.1. Atividade antiplasmodial/citotoxicidade das subfrações de <i>D. miscolobium</i>	51
5.3. Atividade do extrato etanólico de <i>D. miscolobium</i> frente à <i>Pfeno</i>	58
5.4. Atividade das subfrações e compostos de <i>D. miscolobium</i> frente à <i>PfPKII</i>	59
5.5. Prospecção química do extrato DmCcE ativo por CLUE-IES-QqTOF-EM/EM.....	59
5.5.1. Flavonoides	62
5.5.1.2. Procianidinas ou taninos condensados	62
5.5.1.3. Isoflavonas e flavona	64
5.5.2. Outras classes de metabólitos.....	66
5.6. Prospecção química da fração hexânica (DmCcH) de <i>D. miscolobium</i> por CG-EM....	67
5.7. Elucidação estrutural dos compostos isolados das frações e subfrações da DmCcA ativa	71
5.7.1. Composto I – Flavonoide.....	71

5.7.2. Composto II – Mistura de flavononols	74
5.7.3. Composto III - Triterpenoide	78
5.7.4. Composto IV - Triterpenoide	82
6. CONCLUSÃO	89
7. REFERÊNCIAS	90
ANEXO 1 - Fluxograma geral para isolamento dos compostos I, II, III e IV	101
ANEXO 2 – Espectros de massas obtidos por EM/EM de alta resolução	102
ANEXO 3 - Espectros de massas obtidos pelo experimento CG-EM	105
ANEXO 4 – Ampliações do espectro de RMN de hidrogênio da mistura de flavononols (composto II, epitaxifolina e cis-dihidroquercetagina) entre 4,0-7,5 ppm	108
ANEXO 5 – Mapas de contorno de HSQC e HMBC da mistura de flavononols (composto II, epitaxifolina e cis-dihidroquercetagina)	109
ANEXO 6 – Ampliações espectro de RMN ¹H da lupenona (composto III)	110
ANEXO 7 – Mapas de contorno HSQC e HMBC da lupenona (composto III)	111
ANEXO 8 – Ampliações espectro de RMN de hidrogênio do lupeol (composto IV)	113
ANEXO 9 - Mapas de contorno HSQC e HMBC do lupeol (composto IV)	114

1. INTRODUÇÃO

A malária é uma parasitose de prevalência mundial caracterizada por alta mortalidade. No ano de 2020 cerca de metade da população do globo estava em risco de contrair a doença, e nesse mesmo período a malária acometeu 241 milhões de pessoas, 14 milhões a mais de casos se comparado com 2019. Com relação ao número de mortes, a doença ceifou 627 mil vidas no ano de 2020, 69 mil mortes a mais que o ano anterior (WHO, 2021).

Os dados epidemiológicos revelam a importância da manutenção de medidas preventivas e tratamentos eficazes no controle da malária. No ano de 2020, o maior número de casos e mortes causados pela parasitose estiveram relacionados com a interrupção dessas medidas de controle da doença durante a pandemia de COVID-19 (WHO, 2021).

Quanto à ocorrência, a malária é prevalente nas regiões tropicais e subtropicais do globo. A região mais afetada pela doença é a Africana, abrigando o equivalente a 95% dos casos e mortes pela doença. Além disso, a parasitose é registrada no Sudeste Asiático, Mediterrâneo Oriental, Pacífico Ocidental e nas Américas (WHO, 2021).

Os agentes causadores da malária são os parasitos do gênero *Plasmodium* spp., e sua transmissão ocorre através da picada de mosquitos fêmeas infectados do gênero *Anopheles* spp. Existem cinco espécies de plasmódio de importância epidemiológica, o *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* e *P. knowlesi*. Entre essas espécies, o *P. falciparum* e *P. vivax* são mais prevalentes (WHO, 2022).

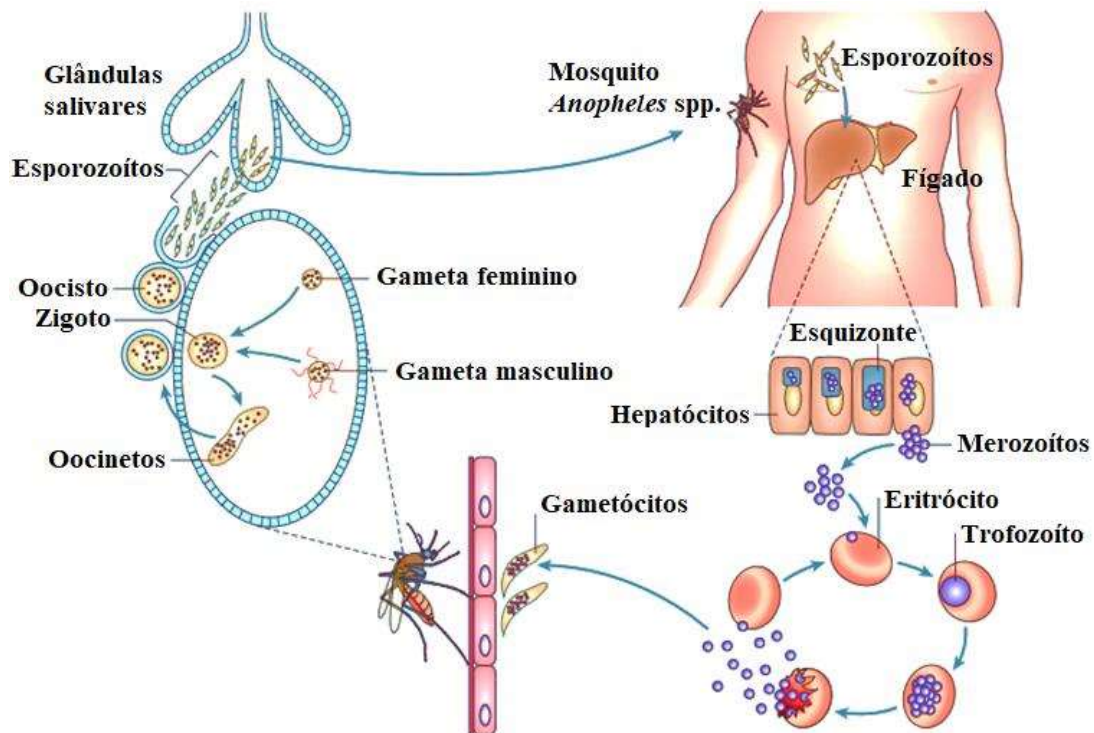
O ciclo de transmissão do *Plasmodium* spp. inicia-se com a picada de um mosquito *Anopheles* spp. infectado, o qual transmite os parasitos na forma de esporozoítos ao homem. Em seguida, os esporozoítos invadem os hepatócitos do hospedeiro e se desenvolvem como esquizontes, dando origem a milhares de merozoítos (**FIGURA 1**). Esse ciclo é denominado como pré-eritrocitário, sendo assintomático (KONING-WARD, GILSON e CRABB, 2015; LÜLLMANN, MOHR e HEIN, 2017).

Com o início do ciclo eritrocitário, os merozoítos migram para o sangue do hospedeiro, invadindo os eritrócitos. Em sequência, os parasitas amadurecem dentro de um vacúolo parasitóforo a partir de trofozoítos. Com o rompimento da membrana eritrocitária e vacuolar, os merozoítos do eritrócito infectado são liberados, infectando mais hemácias e causando as crises febris no hospedeiro (**FIGURA 1**). Os primeiros

sintomas da malária normalmente são manifestos entre 10 a 15 dias após a picada do mosquito infectado (KONING-WARD, GILSON e CRABB, 2015; LÜLLMANN, MOHR e HEIN, 2017; WHO, 2022).

No interior dos eritrócitos, alguns parasitas são diferenciados em gametócitos masculinos ou femininos (formas sexuais). Durante o repasto sanguíneo, outro mosquito ingere as formas sexuais do parasita, que são fertilizadas dando origem a um zigoto. Os oocinetos (zigotos móveis) invadem a parede intestinal do mosquito, se desenvolvendo como oocisto. Com o amadurecimento do oocisto, ocorre a liberação de esporozoítos, que migram para as glândulas salivares do mosquito (FIGURA 1). Dessa forma, pode ocorrer a infecção de outro hospedeiro e perpetua-se o ciclo de transmissão da malária (KONING-WARD, GILSON e CRABB, 2015).

FIGURA 1. Ciclo de transmissão da malária.

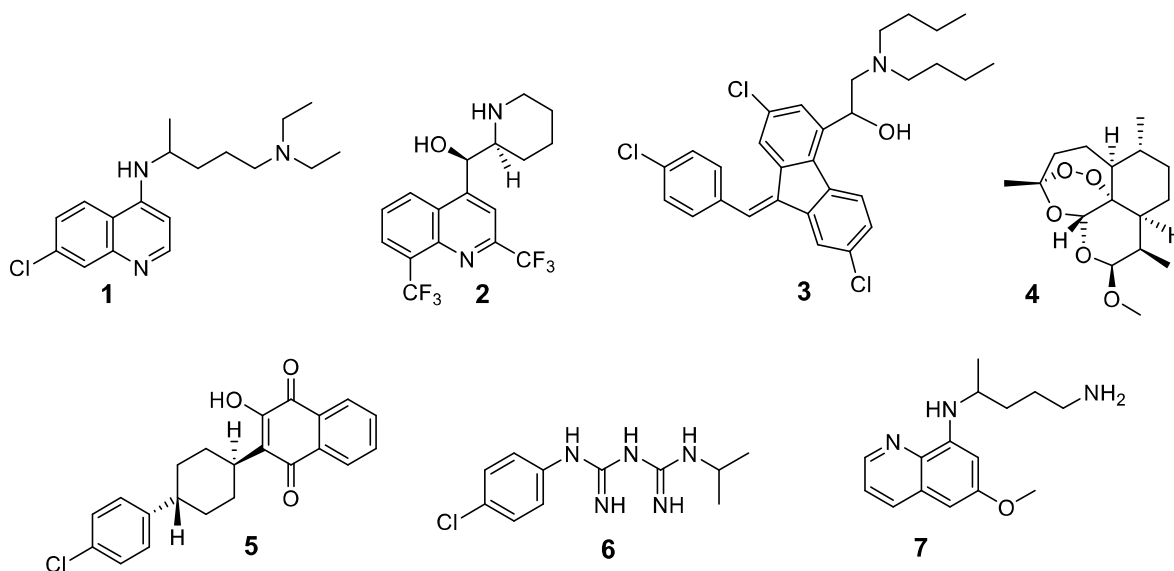


Fonte: Adaptado de KONING-WARD, GILSON e CRABB, 2015.

As distintas fases no ciclo evolutivo do *Plasmodium spp.* se constituem como alvos importantes para o tratamento da malária. Em geral, os fármacos antimaláricos atuam na interrupção da multiplicação do parasito nas hemácias, destruição das formas latentes (hipnozoítos) presentes nas espécies *P. vivax*, *P. ovale* e também impedindo o desenvolvimento dos gametócitos (formas sexuais) (BVSMS, 2020).

Entre os fármacos existentes para o tratamento da malária se destacam a cloroquina (1), mefloquina (2), lumenfrantina (3), arteméter (4), atovaquona (5), proguanil (6) e primaquina (7) (FIGURA 2) (LÜLLMANN, MOHR e HEIN, 2017).

FIGURA 2. Fármacos antimaláricos.



A cloroquina (1) atua no ciclo eritrocitário, acumulando-se no vacúolo digestivo dos esquizontes, impedindo a polimerização do heme proveniente da digestão da hemoglobina. O heme livre liberado é tóxico para os parasitos, causando a eliminação dos mesmos. O mecanismo de ação da mefloquina (2) e lumefantrina (3) é semelhante ao descrito para a cloroquina (LÜLLMANN, MOHR e HEIN, 2017).

O provável mecanismo de ação dos derivados da artemisinina, como é o exemplo do arteméter (4), envolve a reação entre o grupo epóxido e o ferro heme, produzindo espécies reativas. Por outro lado, a atovaquona (5) atua bloqueando a cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, interferindo na biossíntese de bases pirimidínicas (BIRTH, KAO e HUNTE, 2014; LÜLLMANN, MOHR e HEIN, 2017; OLLIARO *et al.*, 2001). Vários países têm utilizado as TCAs (terapias combinadas à base de artemisinina) para melhorar a eficácia e diminuir o surgimento de cepas resistentes (AGUIAR *et al.*, 2018).

Apesar da existência de tratamento para a malária, é necessário o investimento em pesquisa para a formulação de novos fármacos antimaláricos. Esse fato é evidenciado pela resistência que o *P. falciparum* tem apresentado frente aos medicamentos utilizados, a exemplo das novas cepas resistentes aos derivados de

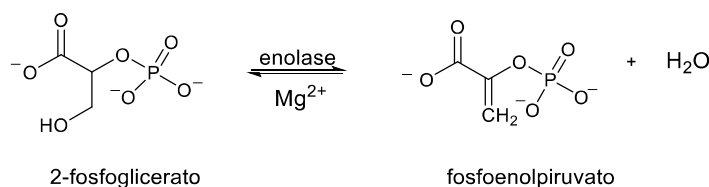
artemisinina, notificadas na sub-região do Grande Mekong (Sudeste Asiático) e Ruanda (África Central) (ARIEY *et al.*, 2014; UWIMANA *et al.*, 2020).

1.1. Enolase de *P. falciparum* (*Pfeno*)

Na busca por novos candidatos com atividade antiplasmodial, as enzimas glicolíticas constituem-se como alvos terapêuticos validados, por sua importância fundamental para a produção de energia e em outras funções fisiológicas do parasito (BRADY e CAMERON, 2004; PARTHASARATHY *et al.*, 2002; ROBIEN *et al.*, 2005; SATCHELL *et al.*, 2005; VIVAS *et al.*, 2005). A fonte energética primária dos parasitos assexuados *Plasmodium* spp. é a fermentação anaeróbia da glicose, que ocorre com a ação das enzimas envolvidas na gliconeogênese e glicólise (BRADY e CAMERON, 2004; GHOSH *et al.*, 2011).

A enolase (EC 4.2.1.11) é uma metaloenzima da via glicolítica responsável por catalisar a desidratação reversível de 2-fosfoglicerato em fosfoenolpiruvato durante a glicólise e a gliconeogênese (FIGURA 3). No *Plasmodium* spp. a proteína possui 446 resíduos de aminoácidos, com massa molecular de 48,7 kDa (GHOSH *et al.*, 2011).

FIGURA 3. Reação catalisada pela enzima enolase.



A *Pfeno* está presente em diferentes regiões subcelulares, tais como membrana plasmática, citosol, citoesqueleto, vacúolo parasitóforo e núcleo. Essas localizações diferentes podem ser explicadas pela suscetibilidade da enzima a diversas modificações pós-traducionais (AVILÁN *et al.*, 2011; PAL-BHOWMICK *et al.*, 2006; VORA *et al.*, 2009; SHEVADE *et al.*, 2013). Nessas regiões, a enzima *Pfeno* desempenha funções biológicas não glicolíticas, sendo denominadas como “moonlighting”, que a tornam um alvo molecular ainda mais interessante para o *design* de drogas antimaláricas (PAL-BHOWMICK, VORA e JARORI, 2007; SHEVADE *et al.*, 2013).

Entre as funções desempenhadas pela *Pfeno* se destacam a propriedade antigênica, envolvimento no processo de invasão da parede intestinal do mosquito e distribuição subcelular diversa (GHOSH *et al.*, 2011; HERNÁNDEZ-ROMANO *et al.*,

2011; PAL-BHOWMICK, VORA e JARORI, 2007; PAL-BHOWMICK *et al.*, 2007; PAL-BHOWMICK *et al.*, 2009). A avaliação de propriedades antigênicas da *Pfeno* indicou que a enzima pode ser usada no desenvolvimento de vacinas frente a malária (MALUF, 2015; NAVARRO *et al.*, 2007).

A enzima enolase de organismos patogênicos (triplanossomatídeos) tem sido explorada como alvo terapêutico para a descoberta de candidatos a fármacos antiparasitários. Nesse sentido, análogos do substrato 2-fosfoglicerato foram desenvolvidos como inibidores, com destaque para o fosfonoacetohidroxamato, inibidor da enolase de *Trypanosoma brucei* ($K_i = 15$ nM) (FIGURA 4) (AVILÁN *et al.*, 2011; NAVARRO *et al.*, 2007).

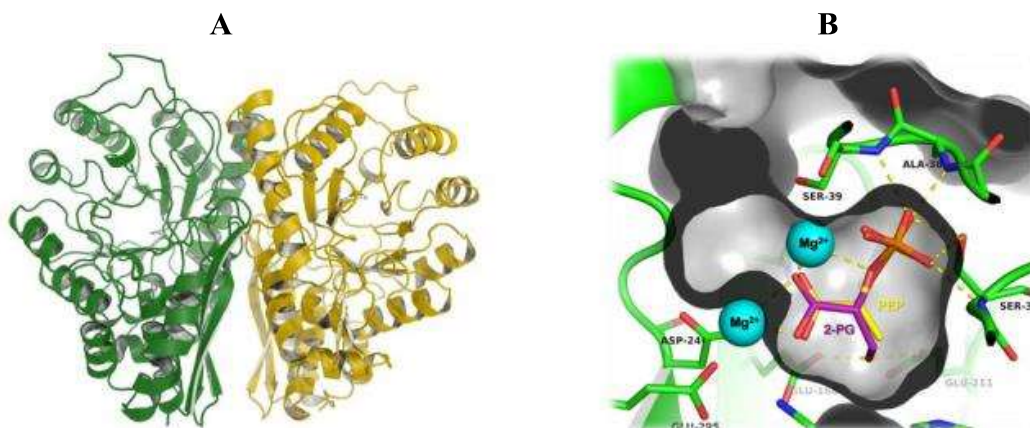
FIGURA 4. (A) Inibidor fosfonoacetohidroxamato (B) Enolase de *T. brucei* em complexo com o inibidor.



Fonte: Adaptado de AVILÁN *et al.*, 2011.

A estrutura 3D inédita de *Pfeno* foi determinada, como também a estrutura da enzima em complexo com o substrato 2-fosfoglicerato e produto fosfoenolpiruvato (FIGURA 5) (MALUF, 2015).

FIGURA 5. (A) Estrutura 3D da enzima enolase (B) *Pfeno* em complexo com o substrato 2-fosfoglicerato (2-PG, roxo) e produto fosfoenolpiruvato (PEP, amarelo).



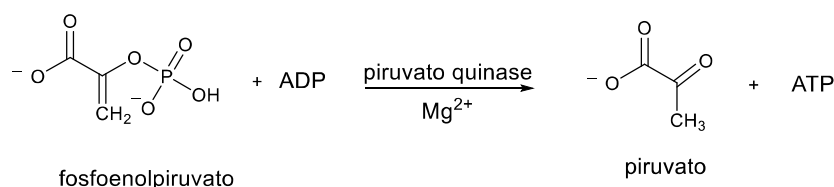
Fonte: Adaptado de MALUF, 2015.

A comparação da estrutura primária da *Pfeno* e enzima homóloga humana indica, aproximadamente, 70% de identidade sequencial. Entre as principais diferenças, destaca-se a presença de um inserto na região dos aminoácidos 104-108, importante para a atividade catalítica, além de outros aminoácidos que diferem e que podem ser explorados na busca de novos inibidores seletivos (DAS *et al.*, 2011; SHEVADE *et al.*, 2013).

1.2. Piruvato quinase de *P. falciparum* (*PfPK*)

A piruvato quinase (EC 2.7.1.40) é uma enzima envolvida na via glicolítica, responsável por catalisar a transferência irreversível de um grupo fosfato de seu substrato fosfoenolpiruvato para uma molécula de ADP, formando os produtos piruvato e ATP, na última etapa da glicólise (MAEDA *et al.*, 2009; ZHONG *et al.*, 2020) (FIGURA 6).

FIGURA 6. Reação catalisada pela enzima piruvato quinase.



No *P. falciparum* foram descobertas duas isoformas da enzima piruvato quinase: a PKI e a PKII. A piruvato quinase I (*PfPKI*) possui 511 resíduos de aminoácidos, com massa molecular de 55,6 kDa, atuando principalmente na via glicolítica. Por outro

lado, a piruvato quinase II (*Pf*PKII) possui 745 resíduos de aminoácidos e massa molecular de 86,6 kDa. A *Pf*PKII está localizada em uma organela do parasito denominada como apicoplasto, envolvida na síntese de lipídeos. Ambas as enzimas são expressas nos estágios eritrocitários durante a infecção por malária (CHAN, TAN e SIM, 2007; MAEDA *et al.*, 2009; ZHONG *et al.*, 2020).

A *Pf*PKII é de fundamental importância na manutenção do apicoplasto, uma vez que, através da atividade catalítica dessa enzima, são gerados derivados de nucleosídeo trifosfato (NTP). Esses produtos são empregados em diversas vias metabólicas, como na síntese de ácidos graxos, isoprenoides, além da transcrição e tradução de proteínas. Também foi constatado que na ausência da *Pf*PKII, os níveis de NTP são reduzidos, ocasionando a ruptura dessa organela e morte do parasito. Nesse sentido, a manutenção do apicoplasto é importante nos estágios eritrocitários do *P. falciparum* e as vias metabólicas que ocorrem nessa organela são distintas das humanas, sendo promissor para o *design* de novos fármacos antimaláricos (GOODMAN e MCFADDEN, 2013; MUKHERJEE e SADHUKHAN, 2016; SWIFT *et al.*, 2020).

Com relação às enzimas piruvato quinase humanas, a *Pf*PKII apresentou 19,7% de identidade na sequência de aminoácidos. Entre as diferenças da *Pf*PKII e as piruvato quinases humanas, destacam-se as regiões dos aminoácidos 419, 421, 461, 469, que podem ser exploradas na busca de inibidores seletivos (CHAN, TAN e SIM, 2007).

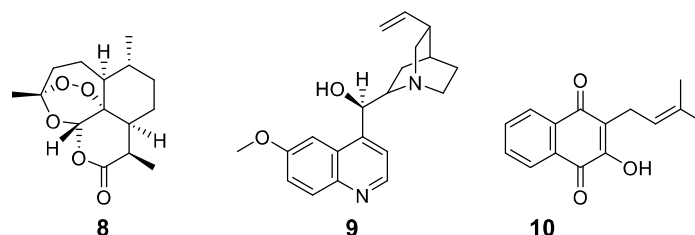
1.3. Produtos naturais e atividade antiplasmodial

Os PNs são uma fonte excelente na busca de diversidade estrutural e atividade biológica (NEWMAN e CRAGG, 2012), tendo uma grande representatividade dentre os fármacos utilizados atualmente (DIAS, URBAN e ROESSNER, 2012; PASCOLUTTI e QUINN, 2014).

A artemisinina (**8**), descoberta em 1979, é um exemplo de produto natural utilizado em formulações de fármacos (**FIGURA 7**). Esse princípio ativo foi obtido da *Artemisia annua*, sendo bastante eficiente contra o parasita mais letal da malária (*P. falciparum*). A descoberta salvou milhões de vidas e deu o prêmio Nobel em Fisiologia e Medicina à cientista chinesa Youyou Tu, em 2015. Atualmente, os derivados de artemisinina são amplamente usados em terapias combinadas no tratamento da malária (TCAs – terapias combinadas à base de artemisinina), principalmente em casos de resistência do parasito aos fármacos existentes (AGUIAR *et al.*, 2018; TU, 2011).

Outros PNs serviram como princípio ativo para o desenvolvimento de fármacos antimaláricos, tais como a quinina (**9**) (compostos quinolínicos, $IC_{50} = 0,12 \mu M$) isolada das cascas de *Cinchona* sp. e o lapachol (**10**) (compostos com quinonas e quinolonas), naftoquinona isolada pela primeira vez de *Tabebuia avellaneda* (**FIGURA 7**) (BONIFACE e FERREIRA, 2019; FERNÁNDEZ-ÁLVARO *et al.*, 2016).

FIGURA 7. Produtos naturais oriundos de plantas como fármacos antimaláricos.

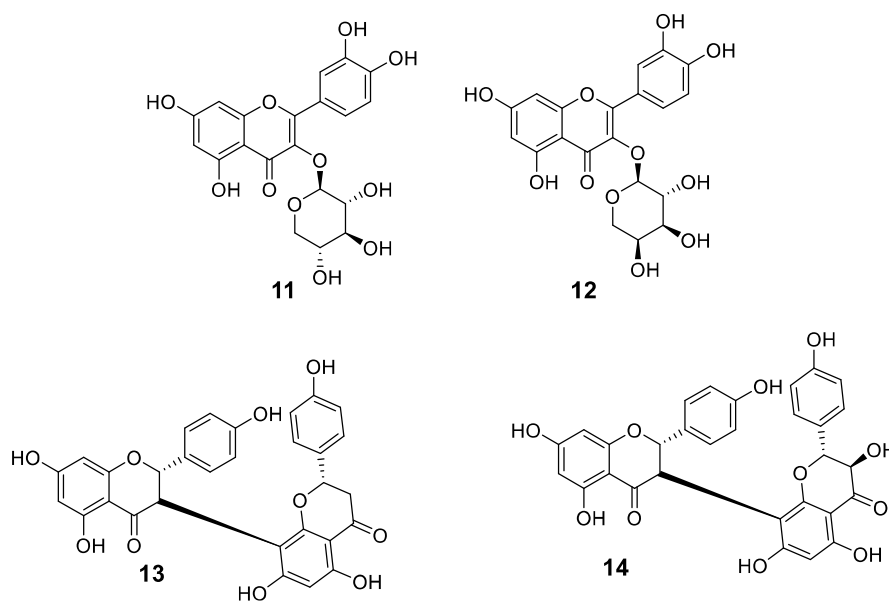


Os flavonoides também possuem atividade antiplasmodial reportada, a exemplo da quercetina-3-*O*- β -D-xilopironasídeo (**11**) e quercetina-3-*O*- α -L-arabinopironasídeo (**12**) (folhas, cascas, frutos de *Psidium acutangulum*); I-4',II-4',I-5,II-5,I-7,II-7-hexaidroxi-I-3,II-8-biflavanona (**13**) e II-3,I-4',II-4',I-5,II-5,I-7,II-7-heptaidroxi-I-3,II-8-biflavanona (**14**) (sementes de *Garcinia kola*) (**TABELA 1, FIGURA 8**) (BONIFACE e FERREIRA, 2019).

TABELA 1. Flavonoides de *P. acutangulum* e *G. kola* com atividade antiplasmodial.

Compostos	Nome	F.M	IC_{50} (μM)
11	quercetina-3- <i>O</i> - β -D-xilopironasídeo	$C_{20}H_{18}O_{11}$	5,5
12	quercetina-3- <i>O</i> - α -L-arabinopironasídeo	$C_{20}H_{18}O_{11}$	6,9
13	I-4',II-4',I-5,II-5,I-7,II-7-hexaidroxi-I-3,II-8-biflavanona	$C_{30}H_{22}O_{10}$	0,6
14	II-3,I-4',II-4',I-5,II-5,I-7,II-7-heptaidroxi-I-3,II-8-biflavanona	$C_{30}H_{22}O_{11}$	0,1

FIGURA 8. Estruturas químicas dos flavonoides de *P. acutangulum* e *G. kola* com atividade antiplasmodial.



1.4. Plantas do Cerrado brasileiro para investigação frente à *Pfeno*

As plantas do Cerrado brasileiro são uma fonte promissora de PNs com atividade antiplasmodial (APISANTIYAKOM *et al.*, 2004; MUÑOZ *et al.*, 2000; SILVA *et al.*, 2011). O domínio é o segundo maior do território brasileiro, constituindo-se como um dos *hotspots* da biodiversidade mundial. Sua vegetação é dominante no Planalto Central brasileiro (Distrito Federal, Goiás, Minas Gerais, Tocantins, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul), contendo um arsenal de plantas com quimiodiversidade para investigação química e biológica (KLINK e MACHADO, 2005; LIMA *et al.*, 2010).

1.4.1. Gênero *Dalbergia*

As plantas do gênero *Dalbergia* pertencem à família Fabaceae, compreendendo cerca de 300 espécies, as quais são encontradas nas regiões tropicais e subtropicais do planeta, sendo em sua maioria, importantes árvores de madeira, valorizadas por sua beleza decorativa e ricas em óleos aromáticos (SAHA *et al.*, 2013; VASUDEVA *et al.*, 2009).

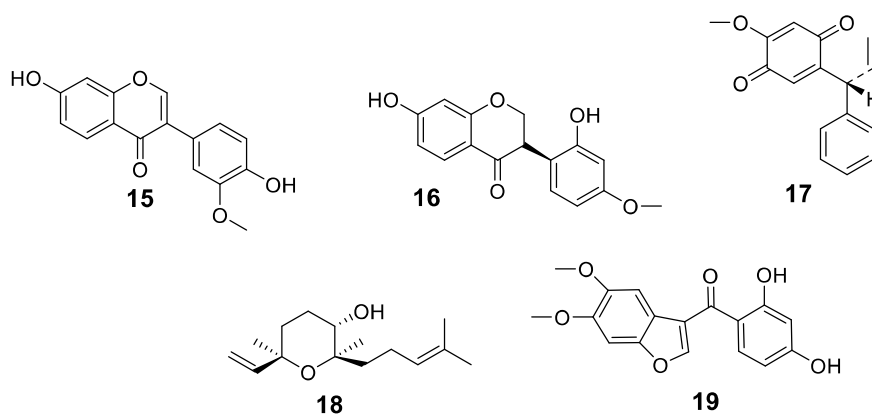
Diversas espécies de *Dalbergia* são amplamente empregadas no tratamento de doenças em diferentes comunidades do mundo. Dentre as atividades biológicas reportadas, incluem-se antibacteriana, antioxidante, antiosteoporse,

antiplasmodial, antitumoral etc. Os metabólitos secundários característicos são flavonoides, isoflavonas, isoflavanonas, neoflavonas, sesquiterpenos/oides e arilbenzofuranos (TABELA 2, FIGURA 9) (BELDJOURI *et al.*, 2003; THE, 2017; VASUDEVA *et al.*, 2009).

TABELA 2. Metabólitos secundários identificados em diferentes espécies do gênero *Dalbergia*.

Compostos	Classes	Nome	F.M	Espécie
15	Flavonoide (isoflavona)	7,4'-diidróxi-3'-metoxiisoflavona	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	<i>D. louvelii</i>
16	flavonoide (isoflavanona)	(3 <i>R</i>)-vestitona	C ₁₆ H ₁₄ O ₅	<i>D. odorifera</i>
17	flavonoide (neoflavona)	(<i>R</i>)-4''-metoxidalbergiona	C ₁₆ H ₁₄ O ₃	<i>D. louvelii</i>
18	Sesquiterpenoide	6 α -hidroxiciclonerolidol	C ₁₅ H ₂₆ O ₂	<i>D. odorifera</i>
19	Arilbenzofurano	6-metoxi-5,2',4'-triidróxi-3-benzoilbenzofurano	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	<i>D. odorifera</i>

FIGURA 9. Estruturas químicas dos compostos identificados em diferentes espécies do gênero *Dalbergia*.



A espécie *D. louvelii* é tradicionalmente usada para a malária, em Madagascar. Os flavonoides do caule desta planta (15 e 17) apresentaram atividade antiplasmodica com IC₅₀ de 6,8 e 5,8 μ M, respectivamente (BELDJOURI *et al.*, 2003).

1.4.1.1. Espécie *Dalbergia miscolobium*

Dalbergia miscolobium Benth. [sinonímia botânica: *D. violacea* (Vog.) Malme], é uma planta endêmica do Cerrado, popularmente conhecida como “jacarandá-do-cerrado”, “sapuvussu” ou “caviúna-do-cerrado”. Essa árvore é amplamente

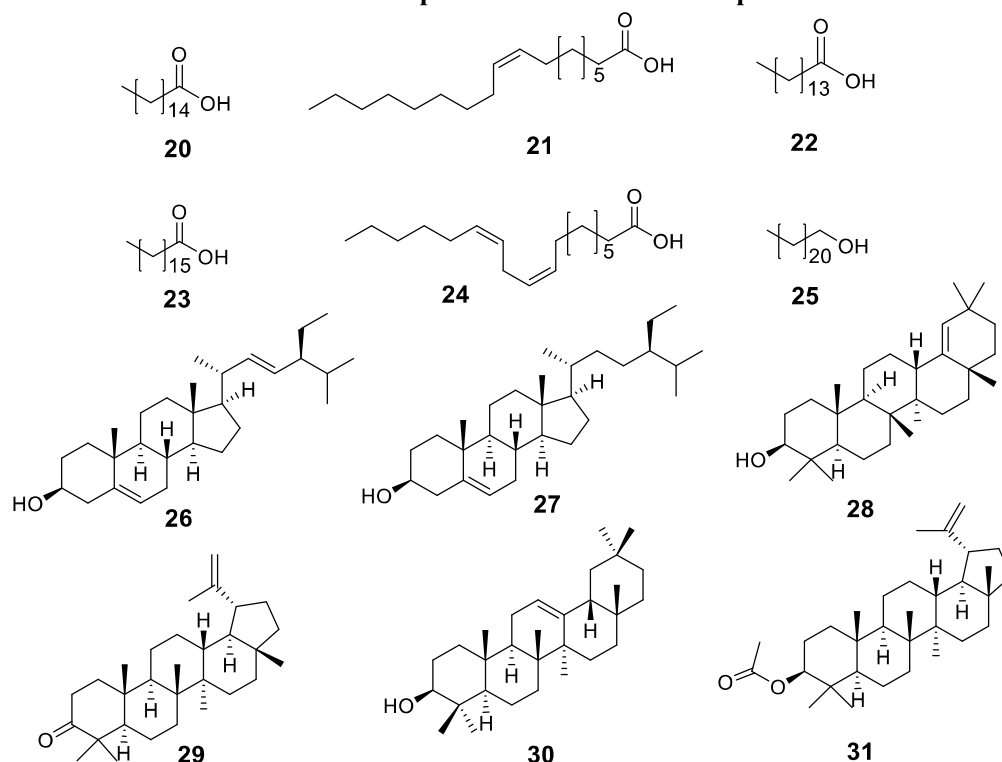
encontrada nos estados de Minas Gerais, Mato Grosso do Sul e São Paulo (BUZATTI, CHICATA e LOVATO, 2016; LORENZI, 1992).

O estudo químico do extrato *n*-hexânico da cortiça de *D. miscolobium* conduziu à identificação de derivados de ácidos carboxílicos (**20-24**), álcoois graxos primários (**25**), fitoesteróides (**26-27**) e triterpenóides pentacíclicos (**28-31**) (TABELA 3, FIGURA 10) (SALATINO *et al.*, 2020).

TABELA 3. Compostos identificados no extrato *n*-hexânico da cortiça de *D. miscolobium*.

Compostos	Nome	F.M
20	ácido palmítico	C ₁₆ H ₃₂ O ₂
21	ácido oleico	C ₁₈ H ₃₄ O ₂
22	ácido pentadecanoico	C ₁₅ H ₃₀ O ₂
23	ácido esteárico	C ₁₈ H ₃₆ O ₂
24	ácido linoleico	C ₁₈ H ₃₂ O ₂
25	docosanol	C ₂₂ H ₄₆ O
26	stigmasterol	C ₂₉ H ₄₈ O
27	β -sitosterol	C ₂₉ H ₅₀ O
28	germanicol	C ₃₀ H ₅₀ O
29	lupenona	C ₃₀ H ₄₈ O
30	β -amirina	C ₃₀ H ₅₀ O
31	acetato de lupeol	C ₃₂ H ₅₂ O ₂

FIGURA 10. Estrutura dos compostos identificados na espécie *D. miscolobium*.

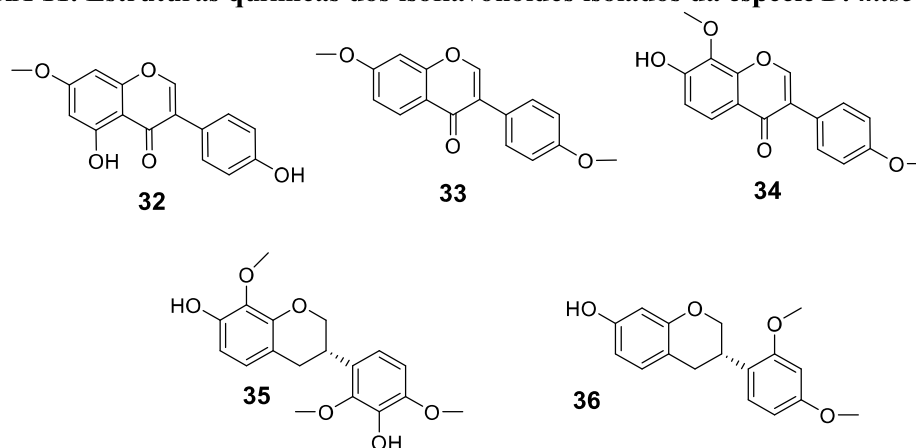


Dos extratos das folhas e galhos de *D. miscolobium* foram isolados cinco isoflavonoides: prunetina (5,4'-diidroxí-7-metoxiisoflavona) (32); di-*O*-metildaidzeína (7,4'-dimetoxiisoflavona) (33); 8-*O*-metilretusina (8,4'-dimetoxi-7-hidroxiisoflavona) (34); duartina (7,5'-diidroxí-8,4',6'-trimetoxiisoflavano) (35), sativana (7-hidroxi-2',4'-dimetoxiisoflavano) (36) (TABELA 4, FIGURA 11). Os compostos 35 e 36 apresentaram inibições de 89 e 88%, respectivamente, frente à catepsina V (cisteína peptidase envolvida na progressão do câncer, aterosclerose, diabetes tipo 1, doenças autoimunes e neurológicas) (SILVA *et al.*, 2021).

TABELA 4. Isoflavonoides isolados de *D. miscolobium*.

Compostos	Nome	F.M
32	prunetina (5,4'-diidroxí-7-metoxiisoflavona)	C ₁₆ H ₁₂ O ₅
33	di- <i>O</i> -metildaidzeína (7,4'-dimetoxiisoflavona)	C ₁₇ H ₁₄ O ₄
34	8- <i>O</i> -metilretusina (8,4'-dimetoxi-7-hidroxiisoflavona)	C ₁₇ H ₁₄ O ₅
35	duartina (7,5'-diidroxí-8,4',6'-trimetoxiisoflavano)	C ₁₈ H ₂₀ O ₆
36	sativana (7-hidroxi-2',4'-dimetoxiisoflavano)	C ₁₇ H ₁₈ O ₄

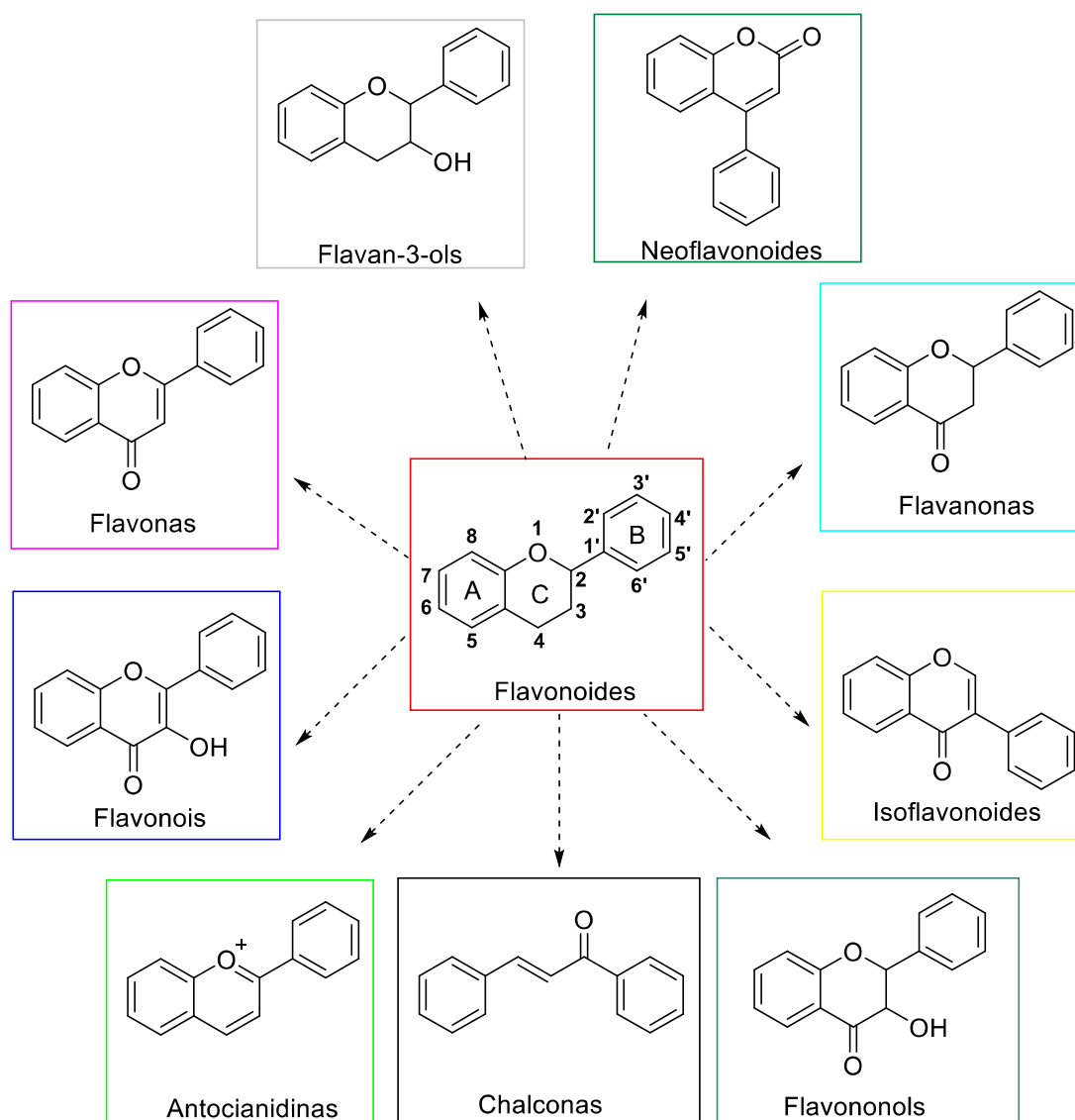
FIGURA 11. Estruturas químicas dos isoflavonoides isolados da espécie *D. miscolobium*.



1.4.1.2. Isoflavonoides como marcadores quimiotaxonômicos da família Fabaceae (subfamília Papilionoideae)

Os flavonoides são metabólitos secundários muito comuns em plantas. Esses compostos são biossintetizados através das vias metabólicas do ácido chiquímico/malônico, sendo constituídos de maneira geral por dois anéis aromáticos (A, B) e um anel pirona (C). Além disso, essas substâncias são divididas em diferentes subclasses, com base no grau de oxidação ou insaturação do anel C e no carbono em que o anel B se encontra como substituinte (DEWICK, 2009; PANCHE, DIWAN e CHANDRA, 2016) (**FIGURA 12**).

FIGURA 12. Estrutura geral dos flavonoides e suas subclasses.



Fonte: Autoria própria.

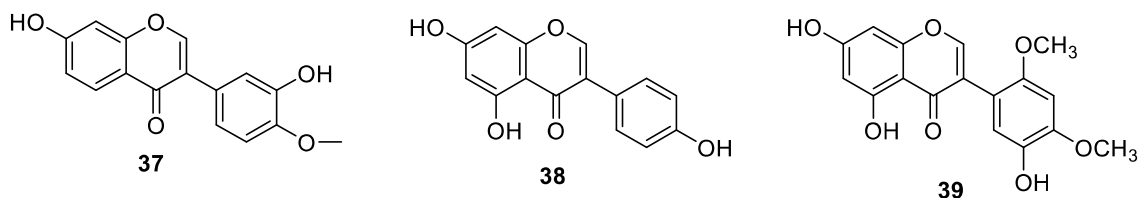
Dentre as subclasses de flavonoides, os isoflavonoides são metabólitos secundários caracterizados pela presença do anel aromático B como substituinte do carbono 3. Através de modificações em sua estrutura, esses compostos podem dar origem a estruturas mais simples (isoflavonas, isoflavononas) ou complexas (rotenoides, pterocarpanos). Diversas atividades biológicas já foram reportadas para os isoflavonoides, como antimicrobiana, anti-inflamatória, antiparasitária, além de antiplasmodial (frente ao *P. falciparum*), relatada para a calicosina (37), genisteína (38) e 5,7,5'-trihidroxi-2',4'-dimetoxi-isoflavona (39) (AL-MAHARIK, 2019; CARVALHO

et al., 2020; KRAFT *et al.*, 2000; PANCHE, DIWAN e CHANDRA, 2016; SONGSIANG *et al.*, 2009) (TABELA 5, FIGURA 13).

TABELA 5. Isoflavonoides com atividade frente ao *P. falciparum*.

Compostos	Nome	F.M	IC ₅₀
37	Calicosina	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	4,2 µg/mL
38	Genisteína	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	2,0 µg/mL
39	5,7,5'-triidroxi-2',4'-dimetoxiisoflavona	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	8,2 µg/mL

FIGURA 13. Estrutura dos isoflavonoides com atividade frente ao *P. falciparum*.



Quanto à sua ocorrência, os isoflavonoides são comumente encontrados em soja e plantas leguminosas, sendo pouco comuns no reino vegetal. Esses compostos são considerados como marcadores quimiotaxonômicos da família Fabaceae (subfamília Papilionoideae), sendo relatados em 31 espécies do gênero *Dalbergia* (PANCHE, DIWAN e CHANDRA, 2016).

2. JUSTIFICATIVA

Considerando a relevância do estudo químico de produtos naturais frente a necessidade de descoberta de novos fármacos antimaláricos e tendo em vista a resistência do *P. falciparum* aos fármacos existentes, como as terapias combinadas a base de artemisinina; neste trabalho, foi proposta a descoberta de inibidores enzimáticos de *P. falciparum* a partir do estudo químico de *D. miscolobium* Benth. (Fabaceae), selecionada após realização de uma triagem biológica dos extratos e frações das plantas do Cerrado, tais como *Qualea grandiflora*, *Myrcia lingua*, *Handroanthus ochraceus*, *Drimys brasiliensis*, *Pterodon pubescens* e *D. miscolobium* frente a cepa 3D7 de *P. falciparum*. Considerando a atividade biológica promissora observada para o extrato etanólico da referida planta, o pouco conhecimento químico da espécie e que espécies do gênero como a *D. louvelii* já são empregadas frente à malária, a planta *D. miscolobium* foi selecionada para prospecção química e investigação fitoquímica guiada por atividade em *P. falciparum*, com a combinação de técnicas analíticas hifenadas à espectrometria de massas como CLUE-EM/EM e CG-EM, para a investigação química das cascas do caule de *D. miscolobium* e a técnica de RMN de hidrogênio guiada pelos resultados dos ensaios frente cultura *in vitro* de *P. falciparum* para isolamento dos compostos bioativos. Além disso, foi proposta a investigação dos extratos, frações e compostos da planta frente aos alvos enzimáticos *Pfeno*, *PfPKII*, uma vez que são alvos validados na busca por novos candidatos com atividade antiplasmodial e que na literatura não há relatos de inibidores dessas enzimas.

3. OBJETIVOS

O objetivo geral desta pesquisa consistiu em investigar a espécie *D. miscolobium* em busca de compostos bioativos com atividade antiplasmodial, através do fracionamento químico guiado por ensaio *in vitro* de *P. falciparum* e triagem de frações e compostos isolados frente às enzimas enolase e piruvato quinase II de *P. falciparum*.

3.1. Objetivos específicos

- Coletar *D. miscolobium* e preparar o extrato etanólico para a triagem *in vitro*;
- Identificar os compostos presentes nos extratos e frações ativas de *D. miscolobium* por CG-EM, CLUE-EM/EM, RMN 1D e 2D;

- Investigar quimicamente o extrato ativo associado aos ensaios *in vitro* em *P. falciparum*, para isolamento dos compostos ativos;
- Determinar a potência inibitória (IC₅₀) das subfrações e compostos isolados contra a Pfeno e PfPKII;
- Determinar a citotoxicidade e seletividade dos compostos estudados frente à linhagem de hepatocarcinoma humano (HepG2).

4. METODOLOGIA

4.1. Materiais e métodos

4.1.1. Solventes usados no isolamento e identificação dos compostos

- Deuterados para RMN das marcas DEUTERO GmbH, CAMBRIDGE ISOTOPE LABORATORIES: metanol-*d*₄, clorofórmio-*d*₁, acetona-*d*₆ e DMSO-*d*₆;
- Para cromatografia Grau P.A. das marcas DINÂMICA, SYNTH, VETEC: acetato de etila, hexano, metanol e etanol;
- Para cromatografia a gás (CG): acetona ultrapura da marca Panreac.

4.1.2. Materiais cromatográficos

- Para cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE): coluna e pré-coluna Cortecs™ C18+ (100 × 2,1 mm - 2,7 μm, Waters);
- Para cromatografia em camada delgada (CCD): placas de sílica gel em folha de alumínio 60 Å (20 x 20 cm, φ = 0,2 mm), F₂₅₄ (reagente fluorescente) da marca FLUKA;
- Para cromatografia em coluna (CC): sílica gel comum 60 (70 - 230 Mesh) MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG; Sephadex® LH-20 Sigma-aldrich; celulose; C18 (sílica gel funcionalizada com octadecil, 200-400 mesh) Sigma-aldrich.
- Para cromatografia a gás (CG): Coluna capilar HP-5MS – Agilent (5% fenil – 95% metilpolisiloxano: 30 m x 250 μm - 0,25 μm).

4.1.3. Reveladores de cromatografia em camada delgada (CCD)

- Solução ácida de vanilina, preparada a partir de 15 g de vanilina dissolvida em solução contendo 250 mL de etanol e 2,5 mL ácido sulfúrico concentrado;
- Lâmpada na região do UV (254 e 365 nm) (Spectroline, Modelo ENF-260C).

4.1.4. Equipamentos

- Triturador de resíduos orgânicos TR-200 (marca TRAPP - 2932430);
- Evaporadores rotativos (FISATOM, Modelo 801), equipados com bomba de vácuo (Labtrix, Modelo ME 1C) e banho maria da marca FISATOM (Laboratório de Bioquímica e Química Orgânica – LaBiOrg, Instituto de Química da Universidade Federal de Catalão - UFCAT);
- Espectrômetro de ressonância magnética nuclear (RMN) da marca BRUKER, modelo ASCEND 400 MHz (Laboratório de Multiusuários, Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia – UFU);
- Cromatógrafo gasoso (marca Agilent, modelo 7820 A) acoplado ao espectrômetro de massas (CG-EM), EM Series MSD 5975 (Agilent), com operação em modo impacto de elétrons (IE, energia de ionização 70 eV, temperatura da fonte 230 °C) (Laboratório de Bioquímica e Química Orgânica – LaBiOrg, Instituto de Química da Universidade Federal de Catalão - UFCAT);
- Cromatógrafo líquido de ultra eficiência acoplado ao espectrômetro de massas de alta resolução (CLUE-IES-QqTOF-EM/EM) da marca Agilent, modelo Infinity II 1290, bomba binária e auto injetor/forno de coluna. Equipado com sistema de EM IMPACT HD™ (Bruker Daltonics), composto por fonte electrospray (ESI), analisador híbrido de íons do tipo quadrupolo-tempo de voo (QqToF) e *software* DataAnalysis (Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos – UFSCar);
- Leitor de placas SpectraMAX Plus 384 ($\lambda = 570$ nm) (Instituto de Física, Universidade de São Paulo - USP, São Carlos);
- Leitor de placas SpectraMAX Gemini EM ($\lambda = 550$ nm) – leitura por luminescência (Instituto de Física, Universidade de São Paulo - USP, São Carlos);
- Leitor de placas SpectraMAX Gemini EM (excitação a 485 nm e emissão a 535 nm) – leitura por fluorescência (Instituto de Física, Universidade de São Paulo - USP, São Carlos).

4.1.5. Reagentes e soluções para os ensaios enzimáticos

- Reagentes do Instituto de Física, Universidade de São Paulo - USP, São Carlos:
- Mix I: Tampão MOPS 100 mM (pH 7,4) + β -mercaptoetanol (1,0 mM) + MgCl₂ (1,5 mM) + ADP (1,0 mM) + piruvato quinase - 6 U/mL + enolase (15 nM);

- Kit Kinase Glo Plus (Promega);
- Mix II: Tampão MOPS 100 mM (pH 7,4) + β -mercaptoetanol (1,0 mM) + $MgCl_2$ (1,5 mM) + ADP (1,0 mM) + piruvato quinase (6 U/mL);
- Mix III: Tampão MOPS 100 mM (pH 7,4) + β -mercaptoetanol (1,0 mM) + $MgCl_2$ (1,5 mM) + ADP (1,0 mM) + piruvato quinase II (150 nM) + enolase (15 nM);
- Mix IV: Tampão MOPS 100 mM (pH 7,4) + β -mercaptoetanol (1,0 mM) + $MgCl_2$ (1,5 mM) + ADP (1,0 mM) + piruvato quinase (50 nM).

4.1.6. Reagentes e soluções para o ensaio de atividade antiplasmodial

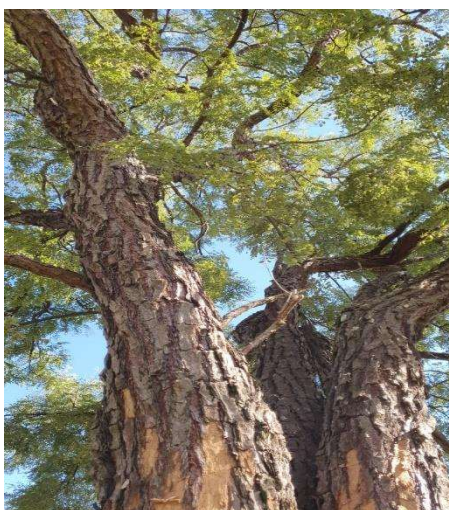
- Reagentes do Instituto de Física, Universidade de São Paulo - USP, São Carlos:
- Tampão PBS (NaCl 116 mM, Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 3 mM);
- Tampão de lise (TrisBase 20 mM, EDTA 5 mM, 0,0008% (v/v) Triton X-100, 0,008% (m/v) saponina, pH 8).

4.2. Metodologia do estudo químico

4.2.1. Coleta e identificação do material botânico

As cascas do caule da planta *D. miscolobium* (FIGURA 14) foram coletadas no dia 26 de maio de 2021, na cidade de Catalão-GO, Brasil (coordenadas: S18°09'48.5"; W47°55'04.8"). A identificação do material vegetal foi realizada em colaboração com o Prof. Dr. Hélder Nagai Consolaro (Unidade Acadêmica Especial de Biotecnologia – UFCAT). Posteriormente, a exsiccata do material botânico foi preparada e depositada no Herbário da Universidade Federal de Goiás – UFG, Goiânia.

FIGURA 14. *D. miscolobium* Benth (Fabaceae).



Fonte: Imagem cedida por Thiago Sousa.

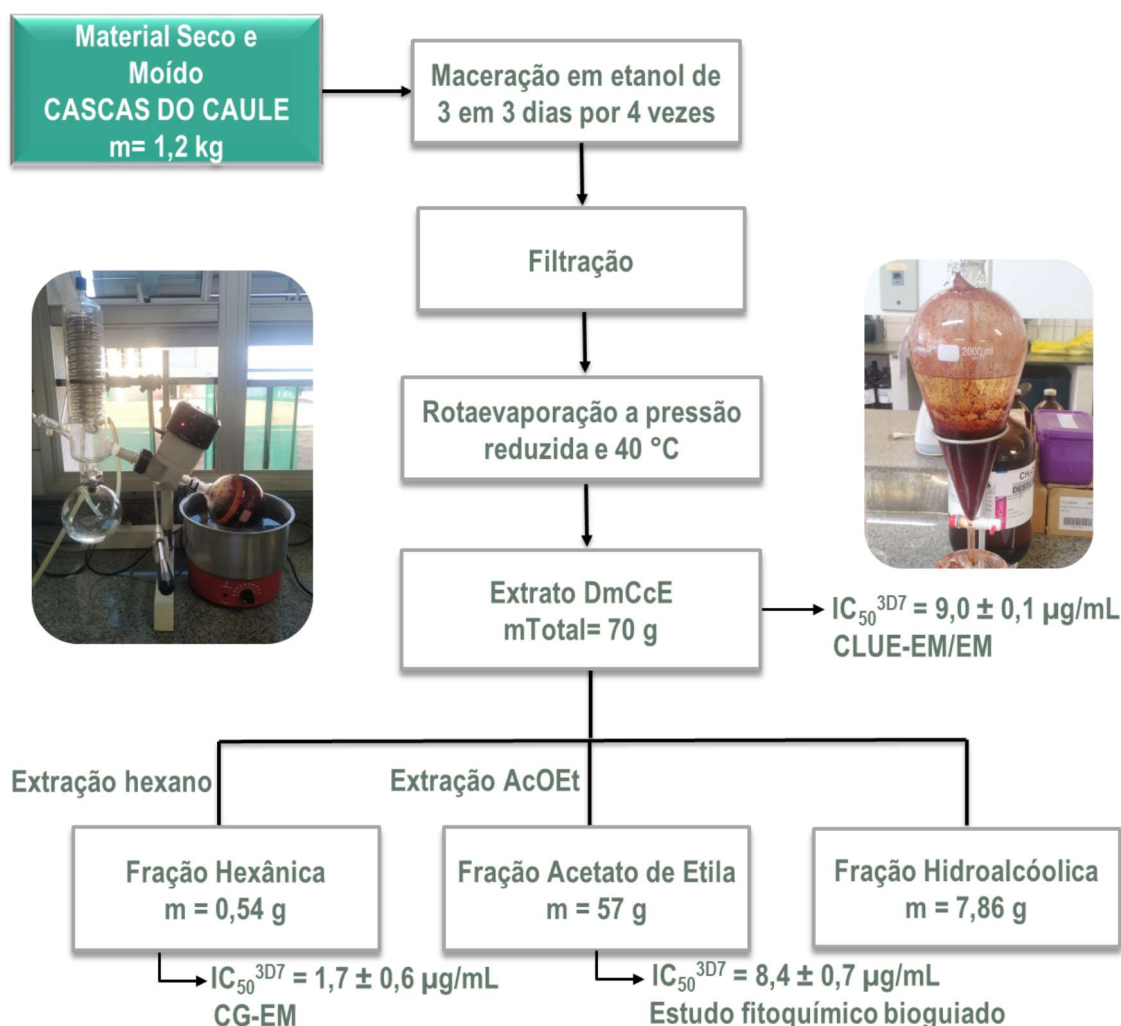
Após a coleta, o material botânico foi seco em estufa a 40 °C por uma semana e moído em um triturador de resíduos orgânicos para o preparo do extrato etanólico.

4.2.2. Obtenção do extrato etanólico de *D. miscolobium*

O extrato etanólico das cascas do caule de *D. miscolobium* (DmCcE) foi preparado a partir de 1,2 kg de cascas em etanol (grau P.A.). O material foi filtrado e concentrado em evaporador rotativo sob pressão reduzida, em uma temperatura de aproximadamente 40 °C. Esse processo foi realizado a cada três dias por quatro vezes, totalizando 12 dias (**FIGURA 15**).

Em seguida, 70 gramas do extrato seco (DmCcE) foram utilizados para a partição líquido - líquido. Esse extrato bruto foi dissolvido em 500 mL de uma solução etanol/água (1:3, v/v) e transferido para um funil de separação. Três extrações foram realizadas com 250 mL de hexano (750 mL de solvente). Em sequência, seis extrações com 250 mL de acetato de etila (1500 mL). Dessa forma, foram obtidas as frações hexânica (DmCcH), acetato de etila (DmCcA) e hidroalcólica (DmCcHi) (**FIGURA 15**).

FIGURA 15. Partição líquido-líquido do extrato bruto das cascas do caule de *D. miscolobium*.



O extrato etanólico bruto das cascas do caule de *D. miscolobium* (DmCcE) foi investigado quimicamente pela técnica de cromatografia líquida de ultra-eficiência acoplada a espectrometria de massas de alta resolução (CLUE-EM/EM) para desrepliação dos metabólitos secundários. A fração hexânica (DmCcH) foi selecionada para o experimento por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) e a fração acetato de etila (DmCcA) foi submetida ao estudo fitoquímico bioguiado por atividade em *P. falciparum*.

4.2.3. Isolamento dos constituintes químicos de *D. miscolobium*

A fração ativa de acetato de etila (DmCcA, IC₅₀^{3D7} = 8,4 µg/mL) foi submetida aos experimentos por cromatografia em coluna, com o intuito de chegar ao isolamento dos constituintes químicos das cascas do caule de *D. miscolobium* biologicamente ativos. Os fracionamentos realizados foram guiados pelos ensaios *in vitro*

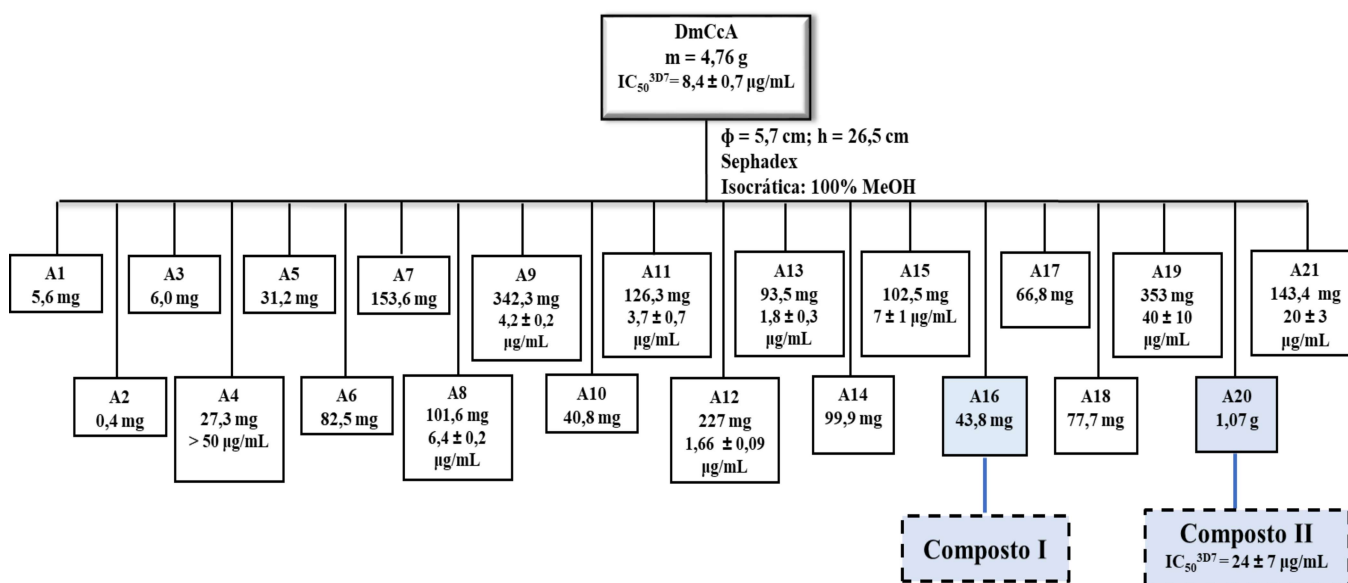
em *P. falciparum*, proporcionando o isolamento dos compostos **I**, **II**, **III** e **IV**. No **ANEXO 1** é apresentado o fluxograma geral para isolamento das substâncias.

4.2.3.1. Fracionamento da DmCca e isolamento dos compostos I e II

O fracionamento da fração de acetato de etila foi feito através de cromatografia líquida em coluna ($\phi = 5,7$ cm; $h = 26,5$ cm), tendo como fase estacionária Sephadex LH-20, e como fase móvel isocrática 100% MeOH (**FIGURA 16**). A fase estacionária foi selecionada pela análise qualitativa de **DmCca** por CCD, que demonstrou a separação dos constituintes químicos nessa condição experimental.

Dessa coluna foram obtidas 57 subfrações, que foram submetidas à análise por CCD, sendo reunidas em 21 subfrações (**A1** a **A21**), de acordo com as semelhanças apresentadas. Esse fracionamento proporcionou o isolamento do composto **I** (subfração **A16**) e **II** (mistura de compostos, subfração **A20**, $IC_{50}^{3D7} = 24,0$ $\mu\text{g/mL}$), identificados por espectroscopia de RMN de hidrogênio e por técnicas de correlação heteronuclear.

FIGURA 16. Fracionamento da DmCca e obtenção das subfrações A1-A21.

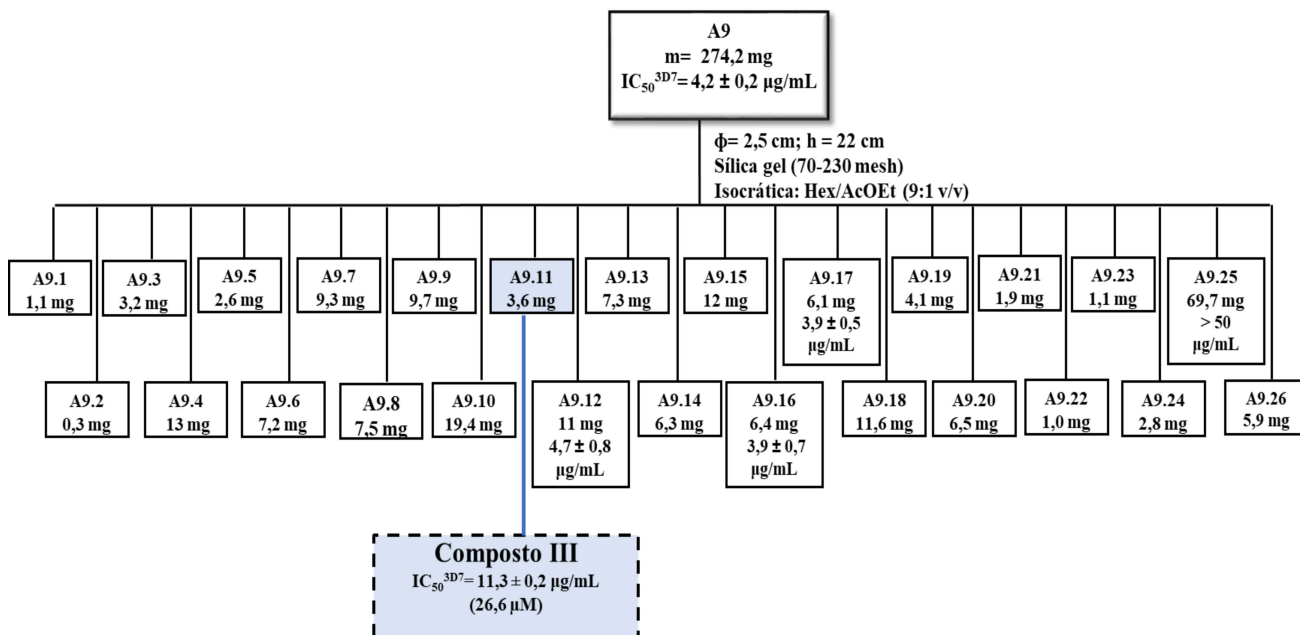


4.2.3.1.1. Fracionamento da subfração A9 e isolamento do composto III

A subfração **A9** ($IC_{50}^{3D7} = 4,2$ $\mu\text{g/mL}$) foi fracionada através de cromatografia líquida em coluna ($\phi = 2,5$ cm; $h = 22$ cm), utilizando como fase estacionária sílica gel (70-230 Mesh) e como fase móvel isocrática Hex/AcOEt (9:1 v/v) (**FIGURA 17**). O eluente e fase estacionária foram selecionados após análise qualitativa de **A9** por CCD.

O fracionamento de **A9** proporcionou 69 subfrações, que foram submetidas à análise por CCD, sendo então reunidas em 26 subfrações (**A9.1** a **A9.26**), de acordo com as semelhanças apresentadas. Esse fracionamento proporcionou o isolamento do composto **III** (subfração **A9.11**, $IC_{50}^{3D7} = 26,6 \mu M$), identificado por espectroscopia de RMN de hidrogênio e por técnicas de correlação heteronuclear.

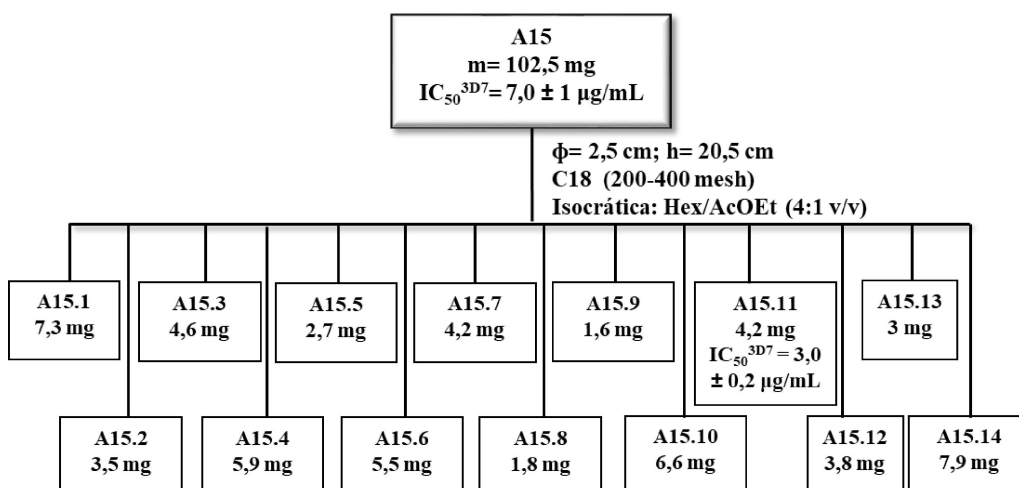
FIGURA 17. Fracionamento da subfração A9 e obtenção das subfrações A9.1-A9.26.



4.2.3.1.2. Fracionamento da subfração A15

Para o fracionamento da subfração **A15** ($IC_{50}^{3D7} = 7,0 \mu g/mL$) foi utilizada cromatografia líquida em coluna ($\phi = 2,5 \text{ cm}$; $h = 20,5 \text{ cm}$), com fase estacionária C18 (200-400 Mesh) e fase móvel isocrática Hex/AcOEt (4:1 v/v) (**FIGURA 18**). O eluente e fase estacionária foram selecionados através da análise qualitativa de **A15** por CCD. Essa coluna cromatográfica proporcionou 87 subfrações, que foram reunidas em 14 subfrações (**A15.1** a **A15.14**) após a CCD, que demonstrou as semelhanças entre as amostras obtidas por cromatografia.

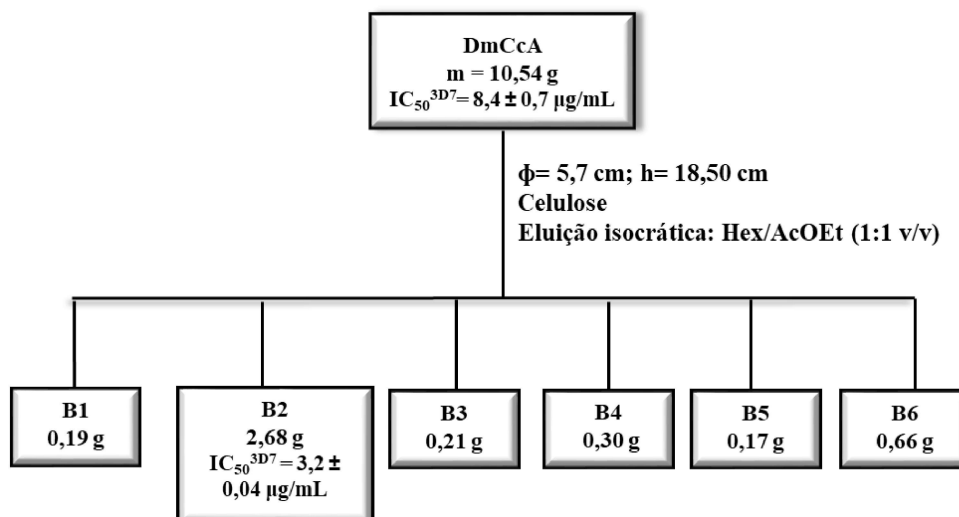
FIGURA 18. Fracionamento da subfração A15 e obtenção das subfrações A15.1-A15.14.



4.2.3.2. Fracionamento da DmCca

Foi realizado também outro fracionamento da fração de acetato de etila através de cromatografia líquida em coluna ($\phi = 5,7 \text{ cm}$; $h = 18,50 \text{ cm}$), tendo como fase estacionária celulose, e como fase móvel isocrática Hex/AcOEt (1:1 v/v) (FIGURA 19). A fase estacionária e eluente foram selecionados através da análise qualitativa de **DmCca** por CCD. Dessa coluna obteve-se 7 subfrações, que foram investigadas por CCD e então reunidas em 6 subfrações (**B1 a B6**), de acordo com as semelhanças observadas entre as amostras.

FIGURA 19. Fracionamento da DmCca e obtenção das subfrações B1-B6.



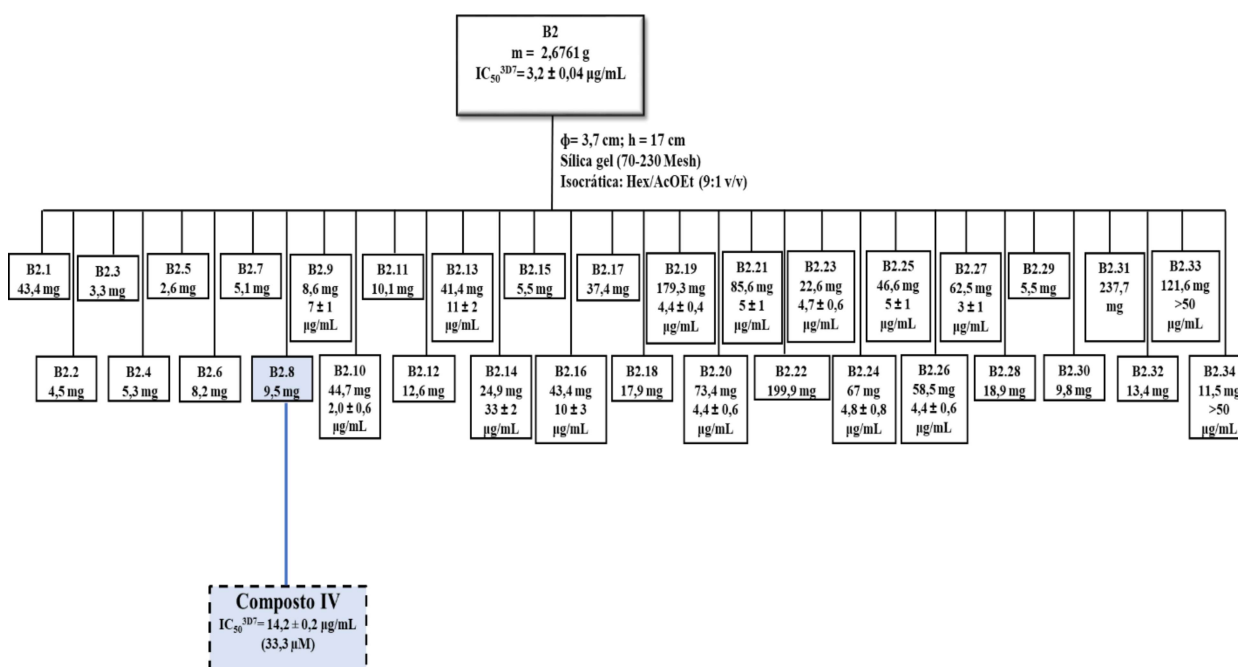
4.2.3.2.1. Fracionamento da subfração B2 e isolamento do composto IV

O fracionamento da subfração **B2** ($IC_{50}^{3D7} = 3,2 \mu\text{g/mL}$) foi realizado através de cromatografia líquida em coluna ($\phi = 3,7 \text{ cm}$; $h = 17 \text{ cm}$), tendo como fase

estacionária sílica gel (70-230 Mesh), e como fase móvel isocrática Hex/AcOEt (9:1 v/v) (FIGURA 20). A fase estacionária e eluente foram selecionados através da análise qualitativa de **B2** por CCD.

Dessa coluna obteve-se 128 subfrações, que foram submetidas à análise por CCD e então reunidas em 34 subfrações (**B2.1** a **B2.34**), de acordo com as semelhanças apresentadas. Esse fracionamento proporcionou o isolamento do composto **IV** (subfração **B2.8**, $IC_{50}^{3D7} = 33,3 \mu M$), identificado por espectroscopia de RMN de 1H . Os experimentos de correlação heteronuclear (HSQC e HMBC) também foram realizados para confirmação estrutural.

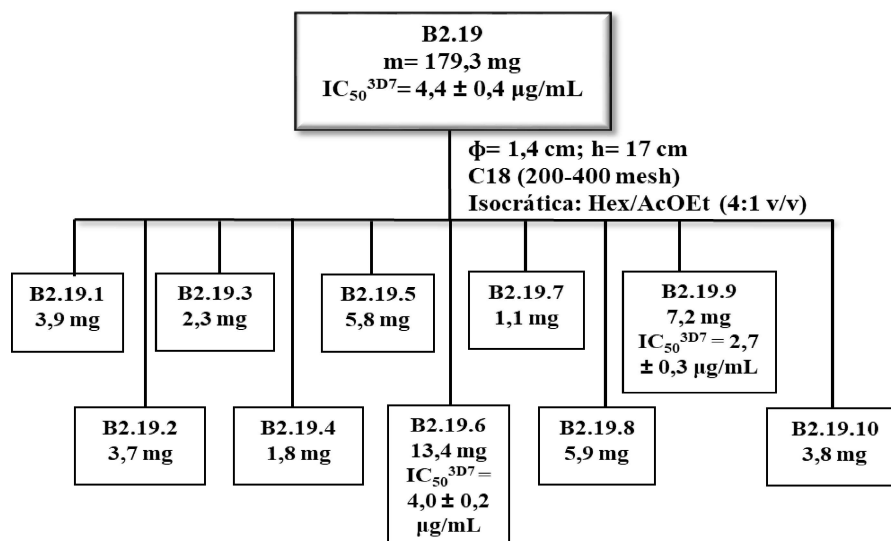
FIGURA 20. Fracionamento da subfração B2 e obtenção das subfrações B2.1-B2.34.



4.2.3.2.2. Fracionamento da subfração B2.19

A subfração **B2.19** ($IC_{50}^{3D7} = 4,4 \mu g/mL$) foi fracionada por cromatografia em coluna ($\phi = 1,4 \text{ cm}; h = 17 \text{ cm}$), com fase estacionária C18 (200-400 mesh) e fase móvel isocrática Hex/AcOEt (4:1 v/v) (FIGURA 21), selecionadas a partir da análise qualitativa por CCD. A partir desse fracionamento foram obtidas 65 subfrações, reunidas em 10 subfrações (**B2.19.1** a **B2.19.10**) após a investigação por CCD e observação das semelhanças apresentadas.

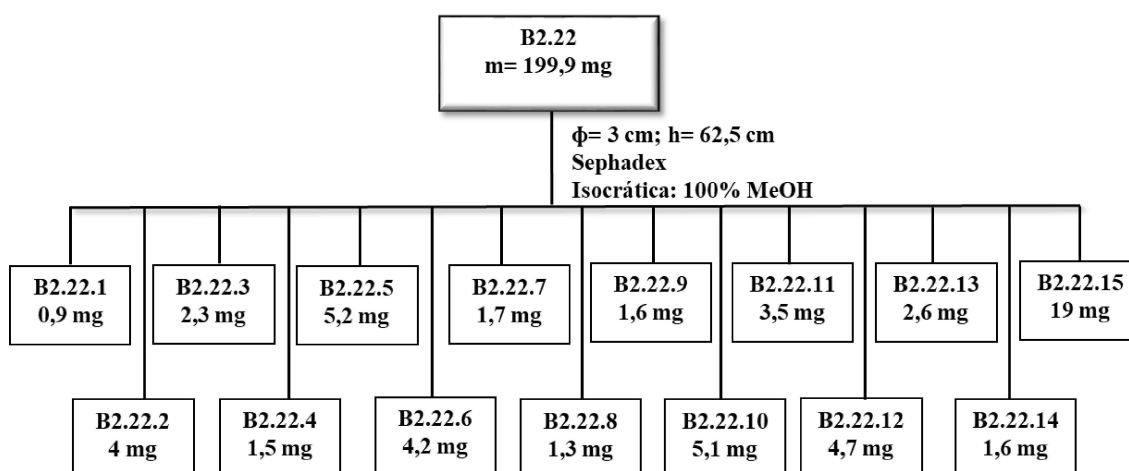
FIGURA 21. Fracionamento da subfração B2.19 e obtenção das subfrações B2.19.1-B2.19.10.



4.2.3.2.3. Fracionamento da subfração B2.22

O fracionamento da subfração **B2.22** foi realizado através de cromatografia líquida em coluna ($\phi = 3$ cm; $h = 62,5$ cm), tendo como fase estacionária Sephadex LH-20, selecionada pela análise qualitativa por CCD, e como fase móvel isocrática 100% metanol (**FIGURA 22**). Dessa coluna obteve-se 28 subfrações, que foram investigadas por CCD e então reunidas em 15 subfrações (**B2.22.1 a B2.22.15**) de acordo com as semelhanças apresentadas.

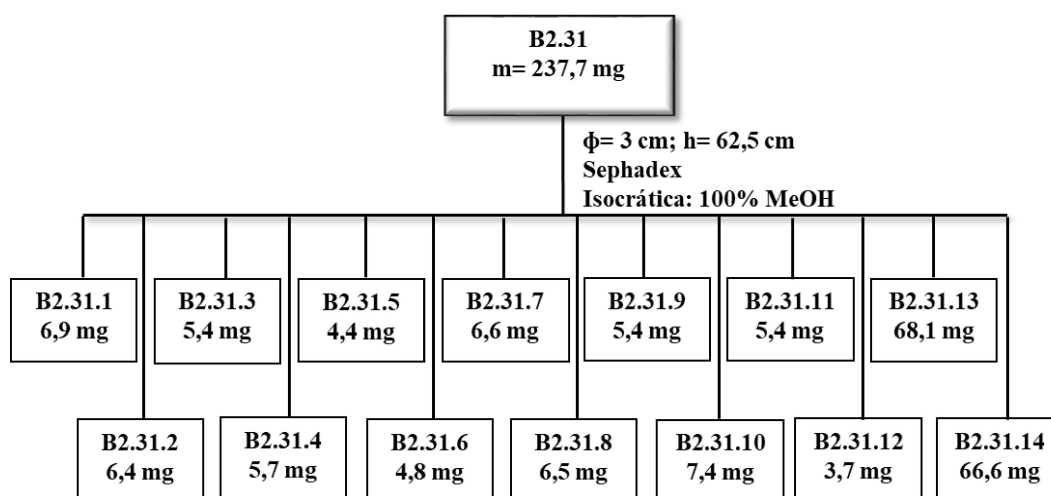
FIGURA 22. Fracionamento da subfração B2.22 e obtenção das subfrações B2.22.1 - B2.22.15.



4.2.3.2.4. Fracionamento da subfração B2.31

O fracionamento da subfração **B2.31** foi realizado através de cromatografia líquida em coluna ($\phi = 3$ cm; $h = 62,5$ cm), tendo como fase estacionária Sephadex LH-20, e como fase móvel isocrática 100% metanol (**FIGURA 23**). Dessa coluna obteve-se 47 subfrações, que foram submetidas à análise por CCD e então reunidas em 14 subfrações (**B2.31.1** a **B2.31.14**) de acordo com as semelhanças apresentadas.

FIGURA 23. Fracionamento da subfração B2.31 e obtenção das subfrações B2.31.1-B2.31.14.



4.3. Prospecção química de DmCcE por CLUE-IES-QqTOF-EM/EM

A análise de DmCcE por cromatografia de ultraeficiência acoplada a espectrometria de massas de alta resolução foi realizada em colaboração com a Profa. Dra. Quezia Bezerra Cass no Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos, SP. O extrato bruto foi injetado em uma concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$, em solução de 20% metanol em água. Uma coluna analítica CortecsTM C18+ de (2,7 μm tamanho da partícula; $100 \times 2,1$ mm) foi utilizada, com fase móvel 0,1% ácido fórmico em água (A) e 0,1% v/v ácido fórmico em acetonitrila (B). O regime de eluição foi de 5 a 100% de B em 26 minutos com volume de injeção de amostra 5 μL e vazão de 0,4 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, na temperatura de 40 $^{\circ}\text{C}$.

Os experimentos de ionização foram conduzidos nos modos positivo $[\text{M}+\text{H}]^+$ e negativo $[\text{M}-\text{H}]^-$, utilizando-se os seguintes parâmetros de fonte de ionização por EM: voltagem do capilar: 4500V; energia do quadrupolo: 5 eV; energia da cela de colisão: 5 eV; tempo de transferência: 50 e 90 μs ; tempo de pré pulso: 6 μs ; pressão de

nebulização: 4 bar; vazão do gás de secagem: 8 L/min; temperatura da fonte: 180 °C e faixa de varredura completa-EM de m/z 50-1300.

A aquisição dos resultados foi obtida no modo automático EM/EM (modo ciclo de tempo de 3s) em experimentos com energia de colisão de 20, 25, 30, 35 e 40 eV para toda faixa de m/z analisada. Para a calibração interna, utilizou-se o formiato de sódio (1 mM). Os *softwares* DataAnalysis 4.0 e Bruker Smart Formula (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) e as bases de dados do *software* CompoundCrawler juntamente com os dados na literatura foram utilizados como ferramentas para a identificação dos compostos presentes nas cascas do caule de *D. miscolobium*.

4.4. Análise de DmCcH por CG-EM

Para a análise dos constituintes químicos da fração hexânica (DmCcH) por CG-EM, 5 mg de amostra foram dissolvidos em 1 mL de acetona ultrapura e injetada em um Cromatógrafo Gasoso acoplado a um Espectrômetro de Massas (CG-EM).

As injeções foram realizadas no modo *split*, com condições de temperatura do forno em 60 °C por 2 min, com rampas de 4 °C/min até 70 °C, 25 °C/min até 200 °C e 4 °C/min até 300 °C, mantendo uma isoterma por 2 min. Foi utilizado hélio como gás de arraste em um fluxo constante de 1,0 mL/min. Para a separação dos constituintes químicos da amostra foi utilizada uma coluna capilar HP-5MS (30 m x 250 µm e filme 0,25 µm).

A detecção e identificação dos constituintes químicos foram realizadas por um EM Series MSD 5975 (Agilent), com operação em modo impacto de elétrons (IE, energia de ionização 70 eV, temperatura da fonte 230 °C). A aquisição dos dados foi realizada no modo de varredura (faixa de m/z 50 - 600). Os cromatogramas e espectros de massa foram processados pelo software *Enhanced ChemStation (MSD ChemStation E.02.02.1431, Agilent Technologies)*.

A identificação dos compostos da fração hexânica foi realizada pela comparação dos espectros de massas experimentais com os da biblioteca *NIST Mass Spectral 2.0* e através da determinação do índice de retenção com padrões de hidrocarbonetos (adquiridos comercialmente da Sigma – Aldrich) injetados nas mesmas condições de análise por CG-EM.

4.5. Análises por Ressonância Magnética Nuclear

Os experimentos de RMN foram feitos no Laboratório de Multiusuários do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia, MG; Para a realização das análises de RMN de hidrogênio foram utilizados cerca de 10 mg das subfrações obtidas por cromatografia em coluna, sendo essas solubilizadas em solventes deuterados (metanol- d_4 , clofórmio- d_1 , acetona- d_6 e DMSO- d_6). Os experimentos foram realizados em temperatura ambiente, utilizando-se um espectrômetro de ressonância magnética nuclear (RMN). Para a confirmação estrutural dos compostos isolados também foram realizados experimentos de RMN bidimensionais (HSQC e HMBC).

4.6. Ensaios biológicos das frações e subfrações de *D. miscolobium*

Os ensaios biológicos descritos foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Rafael Victorio Carvalho Guido, do Centro de Pesquisa e Inovação em Biodiversidade e Fármacos – CIBFar, no Instituto de Física, Universidade de São Paulo (USP), São Carlos, SP.

4.6.1. Ensaio de inibição *SYBR green I* para estágio assexuado de *P. falciparum*

A cepa 3D7 de *P. falciparum* foi mantida em cultura em uma incubadora umidificada a 37 °C em meio RPMI-1640, 25 mM NaHCO₃, 25 mM HEPES (pH 7,4), 11 mM glicose, 3,67 mM hipoxantina e 50 µg/mL gentamicina suplementado com 0,5% (m/v) Albumax II. O meio de cultura foi trocado diariamente e a parasitemia percentual mantida abaixo de 10% a um hematócrito de 2,5% em eritrócitos humanos O⁺.

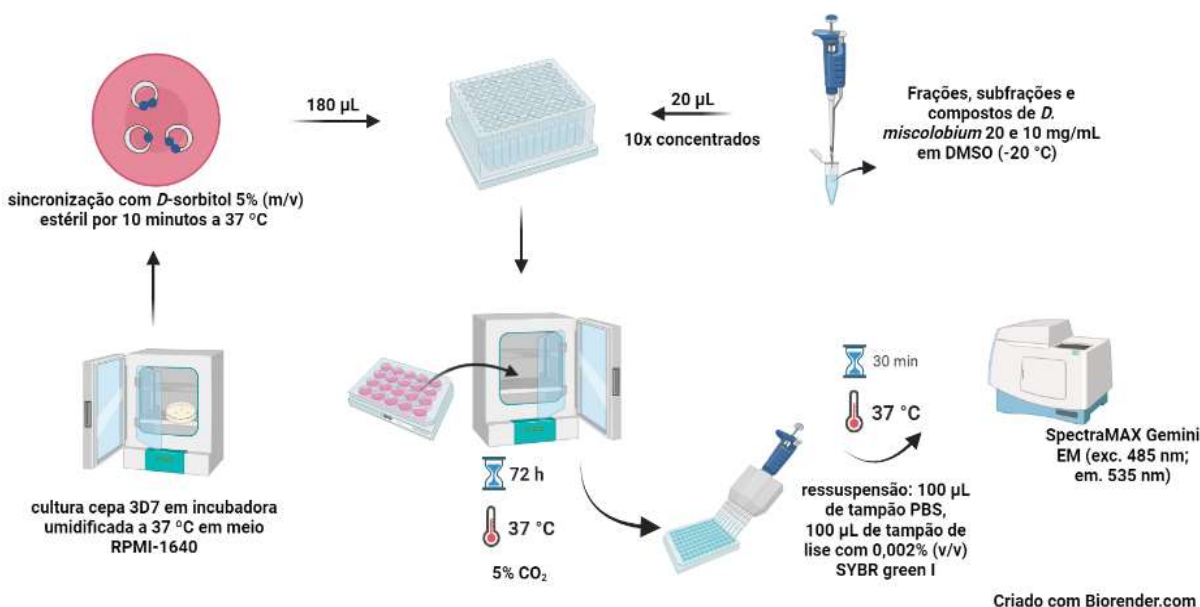
Para a montagem dos experimentos, os parasitos foram sincronizados através de tratamento com *D*-sorbitol 5% (m/v) estéril durante 10 minutos a 37 °C para enriquecimento em estágio de anel. As culturas de parasito foram peletizadas através de centrifugação a 600×g por 5 minutos. As parasitemias das culturas celulares foram determinadas através de microscopia a partir da coloração de esfregaços de sangue com Giemsa 10% após fixação com metanol. A parasitemia foi calculada a partir de 1000 células, sendo as culturas diluídas a 0,5% de parasitemia e 2% de hematócrito através da adição de volumes apropriados de eritrócitos mantidos a um hematócrito de 50% em meio incompleto (meio de cultura sem Albumax).

Para a realização dos ensaios biológicos, as frações, subfrações e compostos de *D. miscolobium* foram diluídos a 20 e 10 mg/mL em DMSO, sendo armazenados a -20 °C.

O ensaio antiplasmodial foi realizado distribuindo-se uma alíquota de 180 µL de parasitos em placas de 96 poços pré-preparadas com 20 µL de soluções dos extratos ou frações 10× concentrados. Poços de controle negativo correspondentes a eritrócitos não parasitados e a cultivos de parasitos na ausência de antimaláricos foram montados paralelamente. As concentrações de DMSO foram mantidas sempre abaixo de 0,05%. As placas foram incubadas por 72 h a 37 °C em uma incubadora umidificada com 5% CO₂.

Após incubação, o meio de cultura foi removido, as células foram ressuspendidas com 100 µL de tampão PBS e lisadas com 100 µL de tampão de lise adicionado de 0,002% (v/v) *SYBR green I*. As placas foram incubadas a temperatura ambiente por 30 min e a fluorescência correspondente à densidade de parasitos foi determinada, usando-se um leitor de placas SpectraMAX Gemini EM (excitação a 485 nm e emissão a 535 nm) (SMILKSTEIN *et al.*, 2004) (FIGURA 24). O IC₅₀^{3D7} foi determinado por análise de regressão não-linear da curva de crescimento concentração-resposta resultante, através do software *Origin 2016* (*OriginLab Corporation*).

FIGURA 24. Representação do procedimento experimental realizado na determinação da atividade antiplasmodial das frações, subfrações e compostos de *D. miscolobium*.



4.6.2. Citotoxicidade frente à linhagem de hepatocarcinoma humano HepG2

As frações, subfrações e compostos de *D. miscolobium* tiveram sua citotoxicidade avaliada frente à linhagem de células do hepatocarcinoma humano HepG2. As células de hepatocarcinoma (HepG2) foram cultivadas em meio RPMI suplementado com soro fetal bovino 10% (v/v) e penicilina/estreptomicina 0,2% (v/v). A adição de antibióticos ao meio foi feita para eliminar potenciais interferências de contaminação microbiana. As células foram cultivadas a 37 °C e 5% CO₂. O meio suplementado foi trocado a cada dois ou três dias.

Para a montagem dos experimentos, as células foram transferidas a uma placa de 96 poços a uma concentração de 10.000 células por poço, e incubadas a 37 °C por 24 h para adesão à placa. Procedeu-se à adição de uma diluição dos candidatos a inibidores, com a primeira fileira da placa sendo composta por poços mantidos em ausência de inibidores (controle positivo de crescimento) e poços em ausência de células (controle negativo de crescimento). As concentrações de DMSO foram mantidas sempre abaixo de 2%.

Posteriormente, as placas foram incubadas na presença de diferentes concentrações do material avaliado (400 µg/mL – 1,6 µg/mL) por 72 h a 37 °C e 5% de CO₂. Após incubação, a placa foi inspecionada por microscopia, para avaliação da maior concentração a ser considerada (ausência de precipitação do composto avaliado).

A citotoxicidade foi avaliada em ensaio colorimétrico baseado na atividade metabólica celular na presença de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol (MTT). Brevemente, enzimas mitocondriais foram capazes de converter o corante MTT ao composto insolúvel formazan, de coloração roxa. Foram adicionados 20 µL de MTT a 5 mg/mL em cada poço da placa, seguido de 3 a 5 h de incubação a 37 °C.

Após incubação, o sobrenadante foi removido, e os cristais de formazan foram solubilizados em 100 µL de DMSO. A absorbância proporcional à quantidade de células viáveis foi determinada no leitor de placas SpectraMAX Plus 384 ($\lambda = 570$ nm). (MOSMANN, 1983). O CC_{50}^{HepG2} foi determinado por análise de regressão não-linear da curva de crescimento concentração-resposta resultante, através do software *GraphPad Prism 8*. O índice de seletividade (IS) foi calculado como a razão entre citotoxicidade e atividade antiplasmodial ($IS = CC_{50}^{HepG2} / IC_{50}^{3D7}$).

4.6.3. Clonagem, expressão e purificação da enzima enolase recombinante de *P. falciparum* (Pfen)

A sequência codificante para a enolase de *P. falciparum* foi previamente clonada em vetor de expressão pETTrx-1a na cepa de expressão *E. coli* BL21 Rosetta (DE3). O crescimento bacteriano e a expressão proteica foram realizados em meio autoindutor ZYM-5052. O processo de purificação consistiu das seguintes etapas: cromatografia de afinidade em coluna de níquel, possibilitada pela cauda de hexa-histidina ligada à proteína de fusão Trx; cromatografia de exclusão molecular (desalting) para troca de tampão (remoção do imidazol); clivagem da proteína de fusão Trx; cromatografia de afinidade para remoção da proteína de fusão Trx; e cromatografia de exclusão molecular para garantir a homogeneidade do estado oligomérico conformacional. Após purificação, a proteína foi concentrada a 1,5 mg/mL em 25% glicerol (MALUF, 2015).

4.6.4. Expressão e purificação da enzima piruvato quinase II recombinante de *P. falciparum* (PfPKII)

A sequência codificante para a piruvato quinase II (PfPKII) de *P. falciparum* clonada em vetor de expressão pMAL-CHT foi doada pelo Professor Dr. Sean Prigge, da *Johns Hopkins University*. Brevemente, a expressão da PfPKII se deu através da cepa de expressão *E. coli* BL21 Rosetta (DE3) em meio LB com adição de plasmídeo suplementar pRIL. As colônias contendo ambos os plasmídeos, pMAL-CHT-PKII (ampicilina resistente) e pRIL (cloranfenicol resistente), foram selecionadas e crescidas em meio LB a 220 rpm e 37 °C. Após atingir uma D.O. de 0,6, 0,4 mM de IPTG foi adicionado e as células foram incubadas por 4 horas a 27 °C. As células foram centrifugadas a 4400 rpm por 40 minutos a 4 °C, e 1 litro de expressão foi ressuspenso em 15 mL de tampão (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM, KCl) e armazenadas em um freezer a -20 °C até a purificação.

As células congeladas foram solubilizadas em 50 mL de tampão de lise (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM KCl, 2 mg/mL lisozima, 50 µL/mL benzonase e 1 mM PMSF) e lisadas em uma sonda de ultrassom (amplitude 25; *pulse-on* 25 seg; *pulse-off* 30 seg) por 10 minutos. Após a lise, as células foram centrifugadas a 11000 g por 40 minutos a 4 °C, a fração solúvel foi utilizada para prosseguir no processo de purificação que consistiu em 3 etapas: 1) Coluna MBPTrap 1 mL; 2) Clivagem com TEV; 3) Coluna HisTrap 5 mL. Após purificação, a proteína foi concentrada e armazenada em tampão de

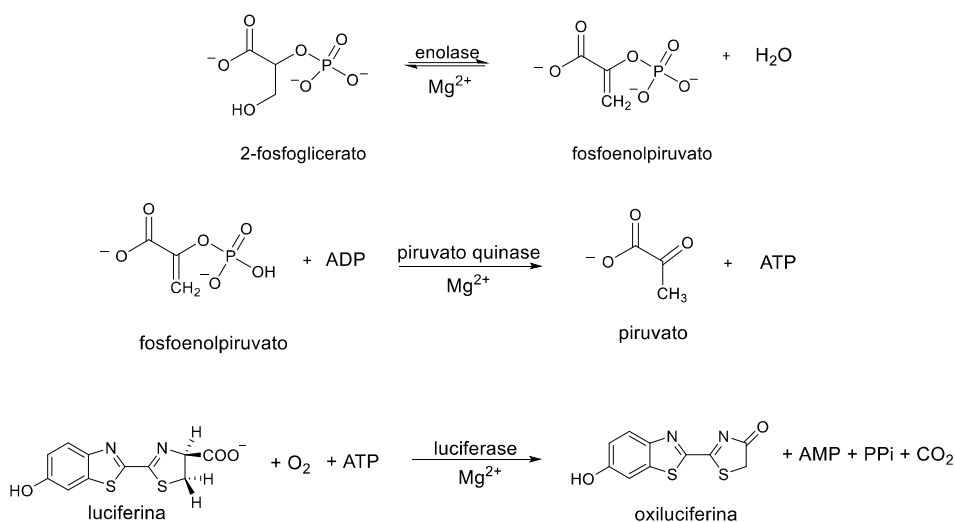
congelamento (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM KCl, 10 % glicerol) (SWIFT *et al.*, 2020).

4.6.5. Ensaio enzimático frente à enolase de *P. falciparum* e piruvato quinase de mamífero

4.6.5.1. Ensaio acoplado 1 – *Pfeno* + piruvato quinase + luciferase

Para avaliar a inibição das frações, subfrações e compostos de *D. miscolobium* frente à *Pfeno*, utilizou-se o ensaio acoplado com as enzimas piruvato quinase (PK) e luciferase (MOHAMMADI *et al.*, 2011). Nesse ensaio, o substrato da enzima enolase, 2PGA, é convertido em PEP, o qual age como substrato para a enzima piruvato quinase, que transfere um grupo fosfato de seu substrato PEP para uma molécula de ADP, formando os produtos piruvato e ATP. Esse último sendo por sua vez hidrolisado pela enzima luciferase no processo de oxidação do substrato luciferina, gerando oxiluciferina na sua forma eletronicamente excitada, a qual se desativa através da emissão de luz visível (FIGURA 25).

FIGURA 25. Reações químicas envolvidas no ensaio acoplado envolvendo as enzimas *Pfeno*, piruvato quinase e luciferase.



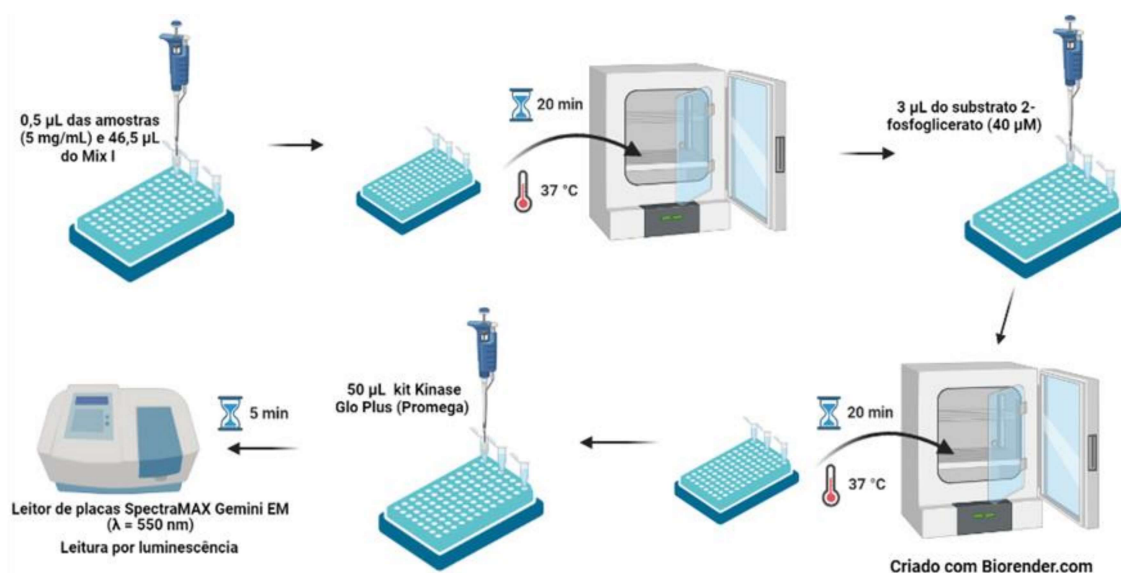
A reação foi realizada com o Mix I (Tampão MOPS 100 mM (pH 7,4) + β-mercaptoetanol (1,0 mM) + MgCl₂ (1,5 mM) + ADP (1,0 mM) + piruvato quinase - 6 U/mL + enolase (15 nM)) a um volume final de 50 μL. Os ensaios de avaliação da inibição foram realizados a uma concentração final das subfrações e compostos de *D. miscolobium* a 50 μg/mL.

O ensaio foi realizado através da adição de 0,5 µL das amostras a uma concentração de 5 mg/mL, 46,5 µL do mix contendo a enolase, com incubação por 20 minutos a 37 °C. Após o tempo indicado, adicionou-se 3 µL do 2PGA a uma concentração final de 40 µM, seguido de incubação a 37 °C por mais 20 minutos. Após o tempo indicado, foram adicionados 50 µL do kit Kinase Glo Plus (Promega), com incubação por 5 minutos, sendo realizada a leitura a 550 nm (**FIGURA 26**). Foi utilizado um controle positivo (CP) e um controle negativo (CN). O controle positivo é composto pelo Mix I e 2PGA, enquanto o controle negativo é composto apenas pelo mix. Para determinação da porcentagem de inibição, utilizou-se a fórmula abaixo:

$$\% \text{ Inibição} = 100 \times \left(1 - \left(\frac{SA - CN}{CP - CN} \right) \right)$$

Em que SA é a luminescência da amostra testada obtida a 550 nm, CN é o controle negativo e CP é o controle positivo.

FIGURA 26. Representação do procedimento experimental realizado no ensaio frente a Pfenó das subfrações, compostos de *D. miscolobium*.



Mix I: Tampão MOPS 100 mM (pH 7,4) + β-mercaptoetanol (1,0 mM) + MgCl₂ (1,5 mM) + ADP (1,0 mM) + piruvato quinase - 6 U/mL + enolase (15 nM).

4.6.5.2. Ensaio acoplado 2 – piruvato quinase + luciferase

Para avaliar a inibição das amostras frente à enzima piruvato quinase de mamífero, foi utilizado o ensaio acoplado com a enzima luciferase (MOHAMMADI *et*

al., 2011). A reação foi realizada com o Mix II (Tampão MOPS 100 mM (pH 7,4) + β -mercaptoetanol (1,0 mM) + $MgCl_2$ (1,5 mM) + ADP (1,0 mM) + piruvato quinase (6 U/mL)) a um volume final de 50 μ L. Os ensaios de avaliação da inibição foram realizados a uma concentração final das subfrações e compostos de *D. miscolobium* a 50 μ g/mL.

Inicialmente, foram adicionados 0,5 μ L das amostras a uma concentração de 5 mg/mL, 46,5 μ L do Mix II, com incubação por 20 minutos a 37 °C. Após o tempo indicado, foram adicionados 3 μ L do fosfoenolpiruvato a uma concentração final de 40 μ M, seguido de incubação a 37 °C por mais 20 minutos. Após o tempo indicado, 50 μ L do kit Kinase Glo Plus (Promega) foram adicionados e após 5 minutos de incubação foi realizada a leitura a 550 nm. Foi utilizado um controle positivo (CP) e um controle negativo (CN). O controle positivo é composto pelo Mix II e PEP, enquanto o controle negativo é composto apenas pelo mix. Para determinação da porcentagem de inibição, foi utilizada a mesma fórmula descrita no tópico 3.3.5.1.

4.6.6. Ensaio enzimático frente à piruvato quinase II de *P. falciparum*

4.6.6.1. Ensaio acoplado 1 - *Pfeno* + *PfPKII* + luciferase

Para avaliar a inibição dos extratos frente à enzima piruvato quinase II (*PfPKII*) de *P. falciparum* também foi usado o ensaio acoplado envolvendo as enzimas enolase, *PfPKII* e luciferase (MOHAMMADI *et al.*, 2011). A reação foi realizada com o Mix III (Tampão MOPS 100 mM (pH 7,4) + β -mercaptoetanol (1,0 mM) + $MgCl_2$ (1,5 mM) + ADP (1,0 mM) + piruvato quinase II (150 nM) + enolase (15 nM)) a um volume final de 50 μ L. Os ensaios de avaliação da inibição foram realizados a uma concentração final das subfrações e compostos de *D. miscolobium* de 200 μ g/mL.

Foram adicionados 0,5 μ L das amostras a uma concentração de 5 mg/mL, 46,5 μ L do mix contendo a enolase, incubando por 20 minutos a 37 °C. Após o tempo indicado, foram pipetados 3 μ L do 2PGA a uma concentração final de 40 μ M, seguido de incubação a 37 °C por mais 20 minutos. Após o tempo indicado, foram adicionados 50 μ L do kit Kinase Glo Plus (Promega) e após 5 minutos de incubação foi realizada a leitura a 550 nm. Foi utilizado um controle positivo (CP) e um controle negativo (CN). O controle positivo é composto pelo Mix III e 2PGA, enquanto o controle negativo é composto apenas pelo mix. Para determinação da porcentagem de inibição, utilizou-se a fórmula abaixo:

$$\% \text{ Inibição} = 100 \times \left(1 - \left(\frac{SA - CN}{CP - CN} \right) \right)$$

onde, SA é a luminescência da amostra testada obtida a 550 nm, CN é o controle negativo e CP é o controle positivo.

4.6.6.2. Ensaio acoplado 2 – *PfPKII* + luciferase

A reação envolvendo as enzimas *PfPKII* e luciferase foi realizada com o Mix IV (Tampão MOPS 100 mM (pH 7,4) + β -mercaptoetanol (1,0 mM) + MgCl₂ (1,5 mM) + ADP (1,0 mM) + piruvato quinase (50 nM)) a um volume final de 50 μ L. Os ensaios de avaliação da inibição foram realizados a uma concentração final dos extratos a 200 μ g/mL. Foram adicionados 0,5 μ L dos extratos a uma concentração de 5 mg/mL, 46,5 μ L do Mix IV, com incubação por 20 minutos a 37 °C. Após o tempo indicado, 3 μ L do PEP foram adicionados a uma concentração final de 40 μ M, seguido de incubação a 37 °C por mais 20 minutos. Após o tempo indicado, adicionou-se 50 μ L do kit Kinase Glo Plus (Promega) e após 5 minutos de incubação foi realizada a leitura a 550 nm. Foi utilizado um controle positivo (CP) e um controle negativo (CN). O controle positivo é composto pelo Mix IV e pelo PEP, enquanto o controle negativo é composto apenas pelo mix. Para determinação da porcentagem de inibição, foi utilizada a mesma fórmula do tópico 3.3.6.1.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Obtenção dos extratos e frações de *D. miscolobium*

A partir de de 1,2 kg de cascas do caule de *D. miscolobium* (DmCc), foram obtidos 92 g de extrato etanólico das cascas (DmCcE), sendo o rendimento calculado através da massa desse extrato (92 g) em relação à massa das cascas secas e moídas (1200 g) (TABELA 6).

A partição líquido-líquido foi realizada a partir de 70 g de DmCcE, sendo os rendimentos das frações calculados utilizando suas respectivas massas em relação à massa do extrato etanólico (TABELA 6).

TABELA 6. Massa dos extratos/frações de *D. miscolobium* obtidas após a maceração e partição líquido-líquido com seus rendimentos.

Parte da Planta	Massa (kg)	Rendimento DmCcE (%)	Frações obtidas da partição	Massa (g)	Rendimento (%)
Casca do caule	1,2	7,67	DmCcH	0,54	0,77
			DmCcA	57	81,43
			DmCcHi	7,86	11,23

Legenda: DmCcE – extrato etanólico das cascas do caule de *D. miscolobium*; DmCcH – fração hexânica do extrato etanólico das cascas do caule de *D. miscolobium*; DmCcA- fração acetato de etila do extrato etanólico das cascas do caule de *D. miscolobium*; DmCcHi – fração hidroalcoólica do extrato etanólico das cascas do caule de *D. miscolobium*.

5.2. Atividade antiplasmodial/citotoxicidade do extrato etanólico de *D. miscolobium*

A atividade antiplasmodial observada para o extrato, frações e compostos de *D. miscolobium* foi classificada de acordo com os seguintes parâmetros: altamente ativa/boa em $IC_{50} < 5,0 \mu\text{g/mL}$; promissora entre $5,0\text{-}15,0 \mu\text{g/mL}$; moderada entre $15,0\text{-}50,0 \mu\text{g/mL}$ e inativa com $IC_{50} > 50,0 \mu\text{g/mL}$ (SINGH *et al.*, 2018).

O extrato etanólico das cascas do caule de *D. miscolobium* foi avaliado em uma triagem biológica frente a cultura *in vitro* de *P. falciparum* (cepa 3D7, sensível a cloroquina), apresentando inibição de 93%, $IC_{50}^{3D7} = 9,0 \mu\text{g/mL}$ e citotoxicidade frente a células do hepatocarcinoma humano $CC_{50}^{\text{HepG2}} = 53,0 \mu\text{g/mL}$ (TABELA 7). De acordo com a classificação empregada, esse extrato apresentou atividade antiplasmodial promissora (IC_{50} entre $5,0\text{-}15,0 \mu\text{g/mL}$).

TABELA 7. Inibição percentual, atividade antiplasmodial (IC_{50}^{3D7}), citotoxicidade (CC_{50}^{HepG2}) e índice de seletividade (IS) do extrato selecionado de *D. miscolobium*.

Código	Inibição (%)	IC_{50}^{3D7} ($\mu\text{g/mL}$)	CC_{50}^{HepG2} ($\mu\text{g/mL}$)	IS*
	50 $\mu\text{g/mL}$	Média \pm DP	Média \pm DP	
DmCcE	93,0 \pm 1,0	9,0 \pm 0,1	53,0 \pm 13,0	6

Legenda: *IS = índice de seletividade ($CC_{50}^{\text{HepG2}}/IC_{50}^{3D7}$), DmCcE – Extrato etanólico das cascas do caule de *D. miscolobium*.

5.2.1. Atividade antiplasmodial/citotoxicidade das frações de *D. miscolobium*

O processo de partição líquido-líquido do extrato etanólico DmCcE (tópico 4.2.2.), deu origem as frações hidroalcoólica, de acetato de etila e hexânica, avaliadas quanto à sua atividade antiplasmodial e citotoxicidade (TABELA 8).

Dentre as frações obtidas, a fração de acetato de etila das cascas do caule (DmCcA) foi escolhida para o fracionamento por cromatografia. A escolha foi baseada em sua atividade inibitória de *P. falciparum* (93% de inibição, 50 µg/mL) (TABELA 8), na quantidade de amostra disponível para estudo químico (57 g) e a sua média polaridade.

TABELA 8. Inibição percentual, atividade antiplasmodial (IC_{50}^{3D7}), citotoxicidade (CC_{50}^{HepG2}) e seletividade (IS) das frações do DmCcE. *Os resultados da fração escolhida para estudo químico estão destacados em verde.

Código	Inibição (%)	IC_{50}^{3D7} (µg/mL)	CC_{50}^{HepG2} (µg/mL)	IS*
	50 µg/mL	Média ± DP	Média ± DP	
DmCcHi	61,0 ± 7,0	46,0 ± 3	54,0 ± 16,0	1
DmCcA	93,0 ± 1,0	8,4 ± 0,7	59,0 ± 11,0	7
DmCcH	95,0 ± 2,0	1,7 ± 0,6	30,0 ± 3,0	17

Legenda: *IS = índice de seletividade ($CC_{50}^{HepG2}/IC_{50}^{3D7}$), DmCcHi – Fração hidroalcolólica das cascas do caule de *D. miscolobium*; DmCcA – Fração acetato de etila das cascas do caule de *D. miscolobium*; DmCcH – Fração hexânica das cascas do caule de *D. miscolobium*

5.2.1.1. Atividade antiplasmodial/citotoxicidade das subfrações de *D. miscolobium*

Os fracionamentos da fração de acetato de etila e subfrações de *D. miscolobium* (descritos nos subtópicos de 4.2.3.) foram guiados pelos resultados dos ensaios de atividade antiplasmodial e citotoxicidade, com a finalidade de isolar os constituintes químicos ativos com baixa atividade citotóxica.

Na TABELA 9 e FIGURA 27 são apresentados os resultados da atividade antiplasmodial de 10 subfrações obtidas do fracionamento de DmCcA. Essas amostras foram avaliadas quanto a inibição percentual na concentração de 50 µg/mL. Posteriormente, a atividade antiplasmodial foi determinada por meio da curva concentração-resposta. Para as subfrações com $IC_{50}^{3D7} < 50,0$ µg/mL foram determinados a citotoxicidade frente a células HepG2 e o índice de seletividade (IS).

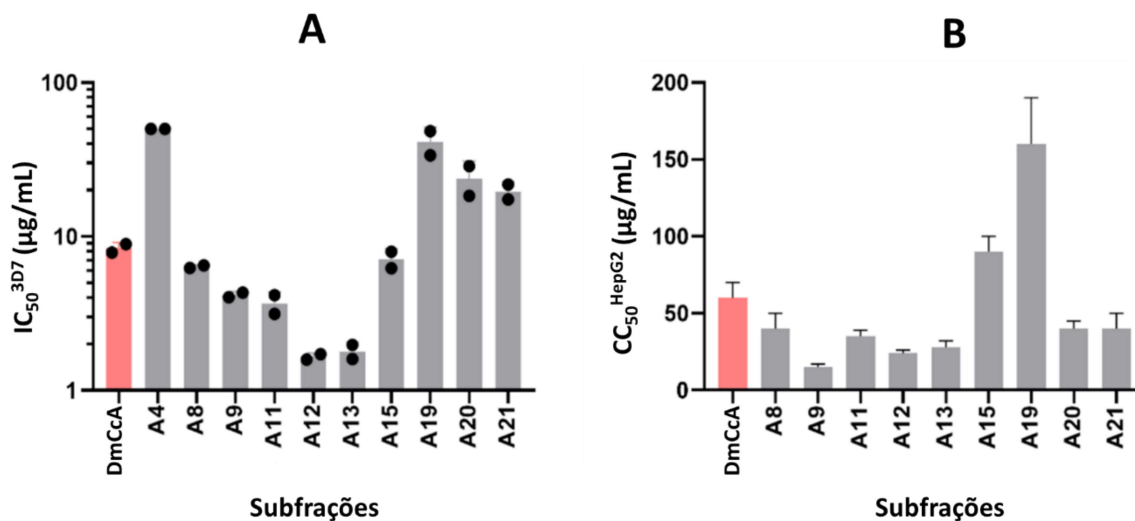
A partir do fracionamento da fração ativa DmCcA ($IC_{50}^{3D7} = 8,4$ µg/mL) (tópico 4.2.3.1.), foram obtidas subfrações com valores de IC_{50}^{3D7} variando entre 1,8 (A13) e >50,0 µg/mL (A4). Com exceção da subfração A4 ($IC_{50}^{3D7} > 50,0$ µg/mL), todas as outras subfrações apresentaram atividade antiplasmodial boa, promissora ou moderada (A8, A9, A11, A12, A13, A15, A19, A20, A21) (TABELA 9; FIGURA 27).

TABELA 9. Inibição percentual, atividade antiplasmodial (IC_{50}^{3D7}), citotoxicidade (CC_{50}^{HepG2}) e seletividade (IS) das subfrações DmCcA. *Os resultados da fração de origem estão destacados em azul. *As subfrações com atividade inibitória classificada como altamente ativa ($IC_{50}^{3D7} < 5 \mu\text{g/mL}$) estão destacadas em verde.

Código	Inibição (%) 50 $\mu\text{g/mL}$	IC_{50}^{3D7} ($\mu\text{g/mL}$) Média \pm DP	CC_{50}^{HepG2} ($\mu\text{g/mL}$) Média \pm DP	IS*
DmCcA	93,0 \pm 1,0	8,4 \pm 0,7	59,0 \pm 11,0	7
A4	50,0 \pm 11,0	>50,0	nd	nd
A8	95,0 \pm 2,0	6,4 \pm 0,2	37,0 \pm 10,0	6
A9	93,0 \pm 1,0	4,2 \pm 0,2	15,0 \pm 2,0	4
A11	93,0 \pm 1,0	3,7 \pm 0,7	35,0 \pm 4,0	10
A12	92,0 \pm 1,0	1,7 \pm 0,1	24,0 \pm 2,0	15
A13	93,3 \pm 0,4	1,8 \pm 0,3	28,0 \pm 4,0	15
A15	94,6 \pm 0,4	7,0 \pm 1,0	93,0 \pm 10,0	13
A19	69,0 \pm 2,0	40,0 \pm 10,0	160,0 \pm 30,0	4
A20 (composto II)	84,7 \pm 0,5	24,0 \pm 7,0	40,0 \pm 5,0	2
A21	85,4 \pm 0,4	20,0 \pm 3,0	40,0 \pm 10,0	2
ART	nd	15,0 \pm 5,0	nd	nd

Legenda: *IS = índice de seletividade ($CC_{50}^{HepG2}/IC_{50}^{3D7}$); ART – artesunato; DmCcA – fração de acetato de etila das cascas do caule de *D. miscolobium*; A4, A8, A9, A11, A12, A13, A15, A19, A20 e A21 – Subfrações oriundas do fracionamento de DmCcA.

FIGURA 27. Atividade antiplasmodial (IC_{50}^{3D7}) (A) e citotoxicidade (CC_{50}^{HepG2}) (B) das subfrações de DmCcA.



As subfrações que mais se destacaram quanto a atividade antiplasmodial foram a **A12** ($IC_{50}^{3D7} = 1,7 \mu\text{g/mL}$), **A13** ($IC_{50}^{3D7} = 1,8 \mu\text{g/mL}$), **A11** ($IC_{50}^{3D7} = 3,7 \mu\text{g/mL}$), **A9** ($IC_{50}^{3D7} = 4,2 \mu\text{g/mL}$) (TABELA 9; FIGURA 27). Essas amostras apresentaram potência inibitória de 5, 5, 2 e 2 vezes maior, respectivamente, que a fração original (DmCcA, $IC_{50}^{3D7} = 8,4 \mu\text{g/mL}$), sendo classificadas como altamente ativas (SINGH *et al.*, 2018). A subfração **A16** foi identificada como epicatequina (**composto I**). Apesar de não ter sido testada nos ensaios *in vitro*, a epicatequina já foi reportada quanto à atividade antiplasmodial ($IC_{50} > 50 \mu\text{M}$) (TORRES-MENDOZA, 2006). Compostos similares, como a epigalocatequina galato e epicatequina galato, também já foram avaliados, apresentando $IC_{50}^{3D7} = 37,24$ e $10,90 \mu\text{M}$, respectivamente (SANNELLA *et al.*, 2007).

Os flavonoides em mistura (epitaxifolina e cis-dihidroquercetagina, **mistura de compostos - subfração A20**), obtidos por fracionamento cromatográfico da fração ativa DmCcA, apresentaram $IC_{50}^{3D7} = 24,0 \mu\text{g/mL}$, com baixa atividade citotóxica ($CC_{50}^{HepG2} = 40,0 \mu\text{g/mL}$). Na literatura, a taxifolina já foi reportada quanto sua atividade frente ao *P. falciparum*, com $IC_{50}^{3D7} = 58,31 \mu\text{M}$ (GANESH *et al.*, 2012). Entretanto, é a primeira vez que é reportada inibição da mistura dos dois flavononols como inibidores de piruvato quinase II de *P. falciparum*.

Além disso, as subfrações **A11** e **A13** apresentaram baixa atividade citotóxica contra células HepG2 ($CC_{50} > 25,0 \mu\text{g/mL}$), com índices de seletividades (IS)

≥ 10 . Na busca de compostos líderes antimaláricos, valores de IS ≥ 10 são indicativos que os compostos bioativos apresentam seletividade contra o parasito (CHUGH *et al.*, 2015).

Para prosseguir os fracionamentos bioguiados por atividade antiplasmodial, foram selecionadas as subfrações ativas **A9** ($IC_{50}^{3D7} = 4,2 \mu\text{g/mL}$), **A15** ($IC_{50}^{3D7} = 7,0 \mu\text{g/mL}$), devido aos resultados biológicos promissores e pela quantidade de amostra disponível para os experimentos de cromatografia (tópicos 4.2.3.1.1.; 4.2.3.1.2.). As subfrações resultantes, com massa suficiente, foram avaliadas quanto a inibição, atividade antiplasmodial, citotoxicidade e índice de seletividade (TABELA 10).

TABELA 10. Inibição percentual, atividade antiplasmodial (IC_{50}^{3D7}), citotoxicidade (CC_{50}^{HepG2}) e seletividade (IS) das subfrações oriundas de A9, A15 e dos compostos isolados. * Os resultados das subfrações de origem estão destacados em azul. *As subfrações com atividade inibitória classificada como altamente ativa ($IC_{50}^{3D7} < 5 \mu\text{g/mL}$) estão destacadas em verde.

Código	Inibição (%) 50 $\mu\text{g/mL}$	IC_{50}^{3D7} ($\mu\text{g/mL}$) Média \pm DP	CC_{50}^{HepG2} ($\mu\text{g/mL}$) Média \pm DP	IS*
A9	93,0 \pm 1,0	4,2 \pm 0,2	15,0 \pm 2,0	4
lupenona (A9.11, composto III)	91,9 \pm 0,5	11,3 \pm 0,2 (26,6 μM)	>100,0	>9
A9.12	93,0 \pm 1,0	4,7 \pm 0,8	>50,0	>10
A9.16	93,1 \pm 0,1	3,9 \pm 0,7	>50,0	>13
A9.17	94,7 \pm 0,2	3,9 \pm 0,5	34,0 \pm 17,0	9
A9.25	6,0 \pm 1,0	>50,0	nd	nd
A15	95,0 \pm 0,4	7,0 \pm 1,0	93,0 \pm 10,0	13
A15.11	95,0 \pm 0,1	3,0 \pm 0,2	50,0 \pm 10,0	16
ART	nd	15,0 \pm 5,0	nd	nd

Legenda: *IS = índice de seletividade ($CC_{50}^{\text{HepG2}}/IC_{50}^{3D7}$); ART – artesunato; A9.11, A9.12, A9.16, A9.17 e A9.25 - Subfrações oriundas do fracionamento de A9; A15.11 – Subfração A15.11 oriunda do fracionamento de A15.

As subfrações **A9.12**, **A9.16** e **A9.17** apresentaram uma manutenção da potência inibitória com relação a amostra de origem **A9** ($IC_{50}^{3D7} = 4,2 \mu\text{g/mL}$), sendo classificadas como altamente ativas, com baixa atividade citotóxica e índices de seletividade promissores. Entretanto, a subfração **A9.25** foi classificada como inativa ($IC_{50}^{3D7} > 50 \mu\text{g/mL}$) (TABELA 10).

O composto lupenona (**A9.11, composto III**), isolado através das técnicas cromatográficas, teve inibição de 91,9% frente ao *P. falciparum* e foi classificado com atividade antiplasmodial promissora ($IC_{50}^{3D7} = 11,3 \mu\text{g/mL}$), apresentando baixa atividade citotóxica ($>100,0 \mu\text{g/mL}$) (SINGH *et al.*, 2018) (**TABELA 10**). Na literatura, a lupenona possui atividade antiplasmodial reportada frente às cepas W2, D6 e K1 de *P. falciparum* (MANGURO, OWUOR e OCHUNG, 2018; SUKSAMRARN *et al.*, 2003).

Também foi realizado o fracionamento da fração de acetato de etila ativa (DmCcA - $IC_{50}^{3D7} = 8,4 \mu\text{g/mL}$), utilizando celulose como fase estacionária (tópico **4.2.3.2.**). Através dessa coluna cromatográfica, foi obtida a subfração **B2** ($IC_{50}^{3D7} = 3,2 \mu\text{g/mL}$), 3 vezes mais ativa que a fração de origem (DmCcA). Essa subfração foi selecionada para a continuação dos experimentos de cromatografia (**4.2.3.2.1.**), com a finalidade de isolar os compostos ativos de *D. miscolobium*.

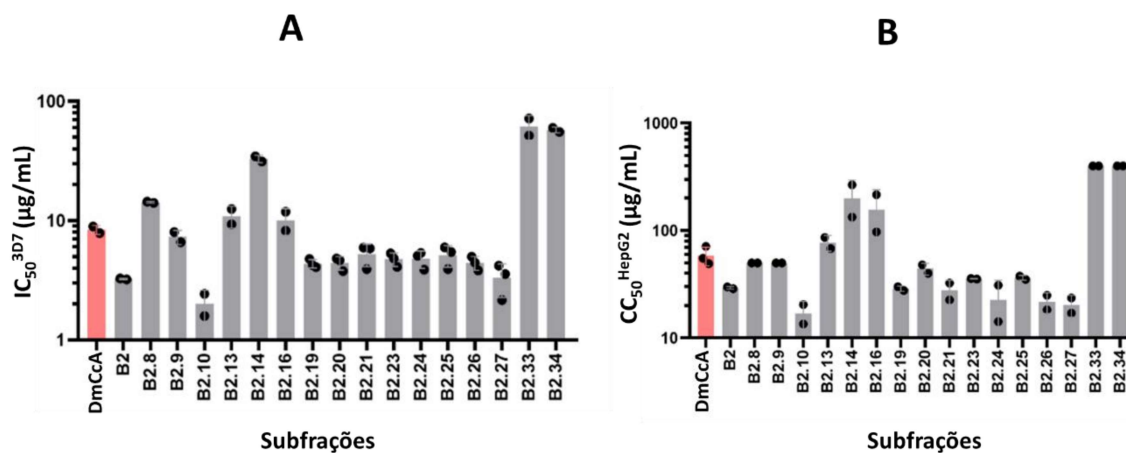
Foram investigadas 16 subfrações provenientes do fracionamento de **B2** ($IC_{50}^{3D7} = 3,2 \mu\text{g/mL}$), sendo determinadas as inibições percentuais na concentração de $50 \mu\text{g/mL}$. Posteriormente, a atividade antiplasmodial foi determinada por meio da curva concentração-resposta. Para as subfrações com $IC_{50}^{3D7} < 50,0 \mu\text{g/mL}$ foram determinados a citotoxicidade frente a células HepG2 e o índice de seletividade (IS) (**TABELA 11, FIGURA 28**).

TABELA 11. Inibição percentual, atividade antiplasmodial (IC_{50}^{3D7}), citotoxicidade (CC_{50}^{HepG2}) e seletividade (IS) das subfrações oriundas de B2 e dos compostos isolados.
 * Os resultados das subfrações de origem estão destacados em azul. *As subfrações com atividade inibitória classificada como altamente ativa ($IC_{50}^{3D7} < 5 \mu\text{g/mL}$) estão destacadas em verde.

Código	Inibição (%) 50 $\mu\text{g/mL}$	IC_{50}^{3D7} ($\mu\text{g/mL}$) Média \pm DP	CC_{50}^{HepG2} ($\mu\text{g/mL}$) Média \pm DP	IS*
B2	93,3 \pm 0,3	3,2 \pm 0,04	30,0 \pm 1,0	10
lupeol (B2.8, composto IV)	89,0 \pm 2,0	14,2 \pm 0,2 (33,3 μM)	>50,0	>4
B2.9	90,0 \pm 1,0	7,0 \pm 1,0	>50,0	>7
B2.10	94,8 \pm 0,6	2,0 \pm 0,6	17,0 \pm 5,0	8
B2.13	94,4 \pm 0,3	11,0 \pm 2,0	77,0 \pm 13,0	7
B2.14	81,0 \pm 3,0	33,0 \pm 2,0	200,0 \pm 90,0	6
B2.16	96,1 \pm 0,1	10,0 \pm 3,0	160,0 \pm 80,0	16
B2.19	94,9 \pm 0,4	4,4 \pm 0,4	28,0 \pm 2,0	6
B2.20	95,3 \pm 0,3	4,4 \pm 0,6	40,0 \pm 4,0	9
B2.21	96,4 \pm 0,5	5,0 \pm 1,0	28,0 \pm 7,0	5
B2.23	96,8 \pm 0,8	4,7 \pm 0,6	35,6 \pm 0,3	8
B2.24	96,8 \pm 0,1	4,8 \pm 0,8	23,0 \pm 12,0	5
B2.25	95,5 \pm 0,7	5,0 \pm 1,0	36,0 \pm 2,0	7
B2.26	95,0 \pm 2,0	4,4 \pm 0,6	22,0 \pm 5,0	5
B2.27	95,7 \pm 0,4	3,0 \pm 1,0	20,0 \pm 5,0	6
B2.33	43,0 \pm 2,0	>50,0	nd	nd
B2.34	34,0 \pm 1,0	>50,0	nd	nd

Legenda: *IS = índice de seletividade ($CC_{50}^{HepG2}/IC_{50}^{3D7}$); ART – artesunato; B2.8, B2.9, B2.10, B2.13, B2.14, B2.16, B2.19, B2.20, B2.21, B2.23, B2.24, B2.25, B2.26, B2.27, B2.33 e B2.34 – Subfrações oriundas do fracionamento de B2.

FIGURA 28. Atividade antiplasmodial (IC_{50}^{3D7}) (A) e citotoxicidade (CC_{50}^{HepG2}) (B) das subfrações provenientes do fracionamento de B2.



De forma geral, o fracionamento de **B2** produziu subfrações (IC_{50}^{3D7} 3-5 $\mu\text{g/mL}$) que mantiveram a potência inibitória original (**B2** - IC_{50}^{3D7} = 3,2 $\mu\text{g/mL}$), com valores de citotoxicidade variando entre CC_{50}^{HepG2} = 20–40 $\mu\text{g/mL}$. A subfração com maior destaque foi a **B2.10**, (IC_{50}^{3D7} = 2 $\mu\text{g/mL}$; CC_{50}^{HepG2} = 17 $\mu\text{g/mL}$). Entretanto, foi observada uma diminuição da atividade em **B2.8**, **B2.9**, **B2.13**, **B2.14**, **B2.16**, **B2.33** e **B2.34** (TABELA 11; FIGURA 28).

O composto lupeol (**B2.8**, **composto IV**), isolado através das técnicas cromatográficas, apresentou inibição de 89,0% frente ao *P. falciparum* e foi classificado com atividade antiplasmodial promissora (IC_{50}^{3D7} = 14,2 $\mu\text{g/mL}$ ou 33,3 μM) (SINGH *et al.*, 2018). Além disso, o mesmo teve baixa atividade citotóxica (>50,0 $\mu\text{g/mL}$) (TABELA 11; FIGURA 28). O lupeol possui atividade frente ao *P. falciparum* relata na literatura, no ensaio de maturação de esquizontes (SINGH *et al.*, 2018).

Também foi realizado o fracionamento da subfração ativa **B2.19** (IC_{50}^{3D7} = 4,4 $\mu\text{g/mL}$) (tópico 4.2.3.2.2.). Foram determinadas a inibição, atividade antiplasmodial, citotoxicidade e índice de seletividade das amostras resultantes com massa suficiente para os ensaios biológicos (TABELA 12).

TABELA 12. Inibição percentual, atividade antiplasmodial (IC_{50}^{3D7}), citotoxicidade (CC_{50}^{HepG2}) e seletividade (IS) das subfrações oriundas de B2.19. *Os resultados das subfrações de origem estão destacados em azul. *As subfrações com atividade inibitória classificada como altamente ativa ($IC_{50}^{3D7} < 5 \mu\text{g/mL}$) estão destacadas em verde.

Código	Inibição (%)	IC_{50}^{3D7} ($\mu\text{g/mL}$)	CC_{50}^{HepG2} ($\mu\text{g/mL}$)	IS*
	50 $\mu\text{g/mL}$	Média \pm DP	Média \pm DP	
B2.19	94,9 \pm 0,4	4,4 \pm 0,4	28,0 \pm 2,0	6
B2.19.6	93,8 \pm 0,1	4,0 \pm 0,2	>50,0	>13
B2.19.9	93,0 \pm 1,0	2,7 \pm 0,3	>50,0	>19
ART	Nd	15,0 \pm 5,0	nd	nd

Legenda: *IS = índice de seletividade ($CC_{50}^{HepG2}/IC_{50}^{3D7}$); ART – artesunato; B2.19.6, B2.19.9 – Subfrações oriundas do fracionamento de B2.19.

As subfrações **B2.19.6** ($IC_{50}^{3D7} = 4,0 \mu\text{g/mL}$) e **B2.19.9** ($IC_{50}^{3D7} = 2,7 \mu\text{g/mL}$) foram classificadas como altamente ativas ($IC_{50} < 5 \mu\text{g/mL}$). Além disso, as mesmas apresentaram índices de seletividade promissores, com baixa atividade citotóxica (TABELA 12).

O aumento da atividade antiplasmodial com o fracionamento do extrato ativo por técnicas cromatográficas, como também o isolamento do lupeol (89% de inibição *P. falciparum*, $IC_{50}^{3D7} = 14,2 \mu\text{g/mL}$ ou $33,3 \mu\text{M}$) e da lupenona (91,9% de inibição *P. falciparum*, $IC_{50}^{3D7} = 11,3 \mu\text{g/mL}$ ou $26,6 \mu\text{M}$), compostos ativos de DmCcA, demonstraram que a metodologia de estudo fitoquímico bioguiado por atividade biológica frente ao *P. falciparum* foi eficiente.

5.3. Atividade do extrato etanólico de *D. miscolobium* frente à *Pfeno*

O extrato etanólico de *D. miscolobium* (DmCcE, $IC_{50}^{3D7} = 9,0 \mu\text{g/mL}$) foi avaliado quanto sua atividade frente à enzima enolase de *P. falciparum* (*Pfeno*) no ensaio acoplado (enzimas enolase + luciferase + piruvato quinase de mamífero) (TABELA 13).

TABELA 13. Inibição percentual do extrato etanólico de *D. miscolobium* (50 $\mu\text{g/mL}$) frente à *Pfeno*.

Código	Inibição (%)
	50 $\mu\text{g/mL}$
DmCcE	65,0 \pm 3,0

Legenda: DmCcE – Extrato etanólico das cascas do caule de *D. miscolobium*.

Conforme observado pela **TABELA 13**, o extrato avaliado apresentou inibição de 65% frente a enzima enolase de *P. falciparum*. Como a amostra não atingiu inibição significativa (~80%), não foi realizado o ensaio desacoplado com as outras enzimas envolvidas no ensaio.

As subfrações provenientes do fracionamento de DmCcA foram avaliadas frente à *Pfeno*, mas não apresentaram diferenças inibitórias significativas quando realizado o ensaio desacoplado, demonstrando que são inibidoras das outras enzimas envolvidas no ensaio *in vitro*, a piruvato quinase e luciferase.

5.4. Atividade das subfrações e compostos de *D. miscolobium* frente à *PfPKII*

Como as subfrações de DmCcA testadas não apresentaram inibição frente a *Pfeno*, as mesmas foram testadas frente a enzima piruvato quinase II de *P. falciparum* (*PfPKII*).

As subfrações **A19**, **A20** (flavonoides **A** e **B**, **composto II**) e **A21** apresentaram atividade inibitória acima de 90% frente a enzima *PfPKII* (200 µg/mL), sendo a fração DmCcA promissora na busca de inibidores da enzima piruvato quinase II.

Entretanto, apesar de possuírem atividade inibitória elevada frente à enzima *PfPKII*, essas subfrações apresentaram moderada atividade antiplasmodial ($IC_{50}^{3D7} > 15$ µg/mL) conforme apresentado no **tópico 5.2.1.1**. Esse resultado não tão promissor frente ao *P. falciparum* pode ser devido à falta de permeabilidade celular dos compostos presentes nas subfrações ativas para atingir o alvo biológico (*PfPKII*) que está situado no apicoplasto, uma organela do parasito (MAEDA *et al.*, 2009). Por outro lado, no ensaio enzimático a enzima está isolada e não há influência desse fator.

5.5. Prospecção química do extrato DmCcE ativo por CLUE-IES-QqTOF-EM/EM

O extrato etanólico das cascas do caule de *D. miscolobium* (DmCcE, $IC_{50}^{3D7} = 9,0 \pm 0,1$ µg/mL) foi analisado por CLUE-IES-QqTOF-EM/EM para ampliar o conhecimento químico dessa espécie, e verificar se haveria a presença de compostos já conhecidos pela atividade antiplasmodial.

O uso da CLUE-EM/EM é muito adequado para a análise de amostras complexas, pois permite uma separação mais eficiente e de maior sensibilidade, além de

alta resolução permitindo identificar compostos em baixíssimas concentrações (GUILLARME e VEUTHEY, 2013; HUANG *et al.*, 2014).

Os íons fragmentos (m/z) obtidos na análise de EM/EM foram comparados com as bibliotecas do *software CompoundCrawler* (bases de dados ChEBI, ChemSpider, KEGG, PubChem) e dados presentes na literatura (BARNABA *et al.*, 2016; FETNI, BERTELLA e OUAHAB, 2020; SUÁREZ-MONTENEGRO *et al.*, 2021; TIAN *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2021; WANG *et al.*, 2022; YANG *et al.*, 2017; YUSUAK, BALLINGTON e XIE, 2018). A eficiência desse método é evidenciada pela precisão de até 5 ppm para os compostos identificados no extrato etanólico das cascas do caule de *D. miscolobium*.

A prospecção química do extrato DmCcE por espectrometria de massas de alta resolução permitiu a identificação de oito metabólitos secundários, pertencentes às classes dos flavonoides, derivados fenólicos e terpenoides. Na **TABELA 14** são evidenciados os tempos de retenção, íons moleculares desprotonados, fórmulas moleculares e íons fragmentos característicos dos compostos e no **ANEXO 2** são apresentados os espectros de massas das substâncias.

A limitação da espectrometria de massas é que não possibilita a distinção de isômeros e a determinação da estereoquímica dos compostos identificados. Dessa maneira, os metabólitos secundários foram parcialmente caracterizados.

TABELA 14. Metabólitos secundários identificados no DmCcE através do CompoundCrawler.

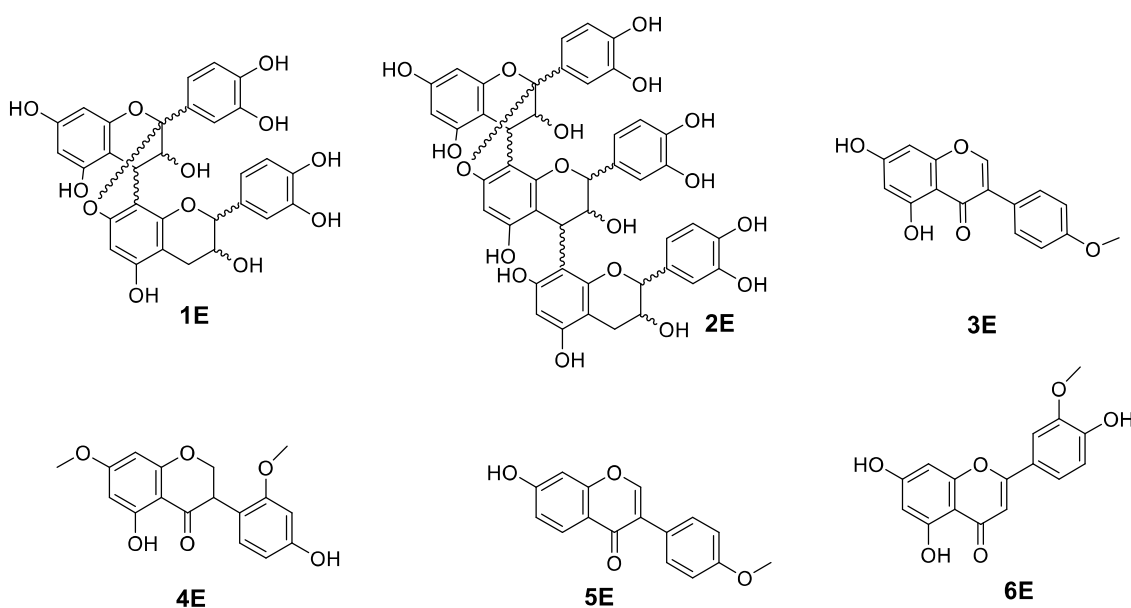
Composto	Fórmula Molecular	RT (min)	[M-H] ⁺ Teórico	[M-H] ⁺ Experimental	m/z	Erro (ppm)	Nome	Referência
1E	C ₃₀ H ₂₄ O ₁₂	6,7	575,1198	575,1195	449,0879; 423,0707; 289,0710; 109,0306	-0,5	procianidina	YUSUAK, BALLINGTON e XIE, 2018
2E	C ₄₅ H ₅₆ O ₁₈	5,3	863,1831	863,1829	711,1378; 573,1039; 451,1016; 411,0717; 289,0717	0,8	tanino cinamo	YANG <i>et al.</i> , 2017
3E	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	9,2	283,0612	283,0612	268,0372; 240, 0415; 239,0345; 211,0400	0,1	biochanina	FETNI, BERTELLA e OUAHAB, 2020
4E	C ₁₇ H ₁₆ O ₆	9,7	315,0870	315,0874	300,0576; 285,0397; 135,0088	1,2	cajanol	WANG <i>et al.</i> , 2022
5E	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	11,8	267,0664	267,0663	252,0419; 224,0457; 223,0401; 195,0453	-0,6	formononetina	WANG <i>et al.</i> , 2021
6E	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	7,2	299,0555	299,0561	284,0308; 283,0232; 256,0337; 255,0294	2,0	crisoeriol	TIAN <i>et al.</i> , 2020
7E	C ₁₇ H ₂₆ O ₄	13,8	293,1754	293,1758	236,1050; 221,1545; 192,1155	1,4	fituberina	SUÁREZ-MONTENEGRO <i>et al.</i> , 2021
8E	C ₁₀ H ₁₂ O ₄	8,0	195,0666	195,0664	180,0414; 167,0347; 152,0105; 136,0161; 135,0091; 121,0296	-1,7	acetosiringona	BARNABA <i>et al.</i> , 2016

Legenda: 1E, 2E, 3E, 4E, 5E, 6E, 7E e 8E – Compostos identificados no extrato etanólico de *D. miscolobium*.

5.5.1. Flavonoides

Foram identificados seis flavonoides no extrato etanólico das cascas do caule de *D. miscolobium* (DmCcE). Dentre esses, dois derivados de flavan-3-ol (dímero e trímero) (**1E**, **2E**), três isoflavonas (**3E**, **4E**, **5E**) e uma flavona (**6E**) (**FIGURA 29**). Os isoflavonoides são marcadores quimiotaxonômicos da família Fabaceae (subfamília Papilionoideae), e já foram identificados em 31 espécies do gênero *Dalbergia* (PANCHE, DIWAN e CHANDRA, 2016).

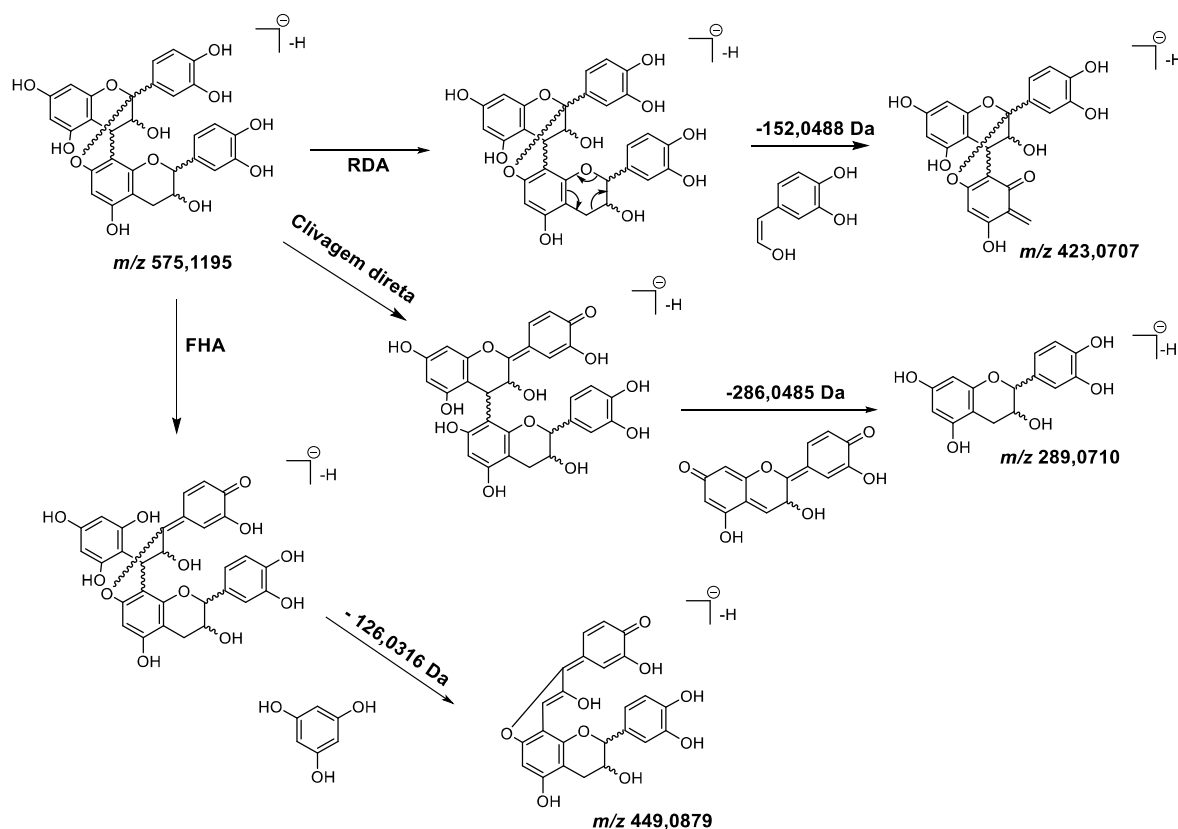
FIGURA 29. Flavonoides identificados no DmCcE.



5.5.1.2. Procianidinas ou taninos condensados

O composto **1E** apresentou o pico do íon molecular $[M - H]^-$ em m/z 575,1195 e fórmula molecular $C_{30}H_{24}O_{12}$, com fragmentos característicos de procianidinas em m/z 449,0879; 423,0707; 289,0710; 109,0306. O íon produto em m/z 449,0879 (-126,0316 Da), presente no espectro EM^2 , é referente a uma fissão heterocíclica de anel, muito recorrente em flavonoides. Por outro lado, o pico observado em m/z 289,0710 é resultado de uma clivagem direta na unidade superior da procianidina. Também foi observado um mecanismo retro-Diels-Alder (RDA) ocorrendo no anel da unidade inferior, com a perda de 152,0488 Da e formação do íon produto m/z 423,0707 (**FIGURA 30**) (ENGEMANN *et al.*, 2012; RUSH *et al.*, 2018).

FIGURA 30. Fragmentações observadas para a procianidina (composto 1E).



Fonte: Autoria própria.

O composto **2E** foi identificado como tanino cinamo, apresentando o pico do íon molecular $[M - H]^-$ em m/z 863,1829 e fórmula molecular $C_{45}H_{36}O_{18}$, com íons fragmentos característicos em m/z 711,1378; 573,1039; 451,1016; 411,0717; 289,0717. O padrão de fragmentação desse tanino condensado é muito parecido com o observado para o composto **1E**. Os íons produtos em m/z 573,1039 (-290,079 Da) e 289,0717 (-574,1112 Da) são oriundos de clivagens diretas. O mecanismo de fissão heterocíclica é evidenciado pelo íon produto em m/z 451,1016 (-412,0813 Da). Também foi observado um mecanismo (RDA) com a perda de 152,0451 Da e formação do pico em m/z 711,1378 (RUSH *et al.*, 2018).

Na literatura não há relatos da ocorrência de dímeros e trímeros de flavan-3-ol no gênero *Dalbergia* ou espécie *D. miscolobium*, sendo pela primeira vez identificados.

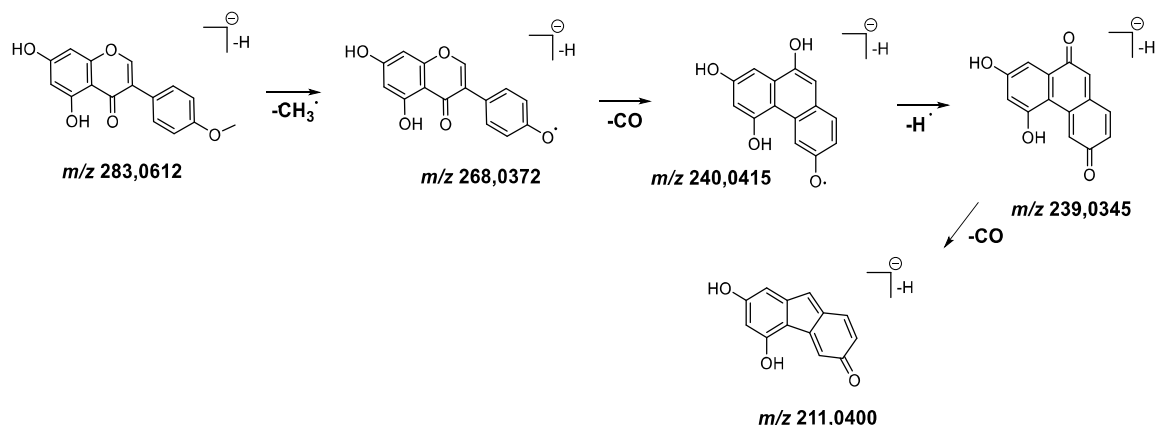
A procianidina B2, estruturalmente similar à procianidina identificada (composto **1E**), possui atividade antiplasmodial reportada na literatura, com $IC_{50} = 5,3$

μM (ATTIOUA *et al.*, 2011). Os compostos **1E** e **2E** já foram isolados das folhas de *Ixora coccinea*, sendo reportados como agentes antioxidantes e empregados no tratamento de uma variedade de infecções (LIFONGO *et al.*, 2014).

5.5.1.3. Isoflavonas e flavona

O composto **3E** foi identificado como biochanina, apresentando o pico do íon molecular $[\text{M} - \text{H}]^-$ em m/z 283,0612 e fórmula molecular $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_5$, com íons fragmentos característicos de isoflavonas em m/z 268,0372; 240,0415; 239,0345; 211,0400. No espectro EM^2 do composto **3E** foi observado $[\text{M} - 15]$ referente a perda de CH_3 resultando no íon produto em m/z 268,0372. A partir desse íon produto, obteve-se o fragmento em m/z 240,0415, resultado da perda de CO $[\text{M} - 28]$. Com a saída de um hidrogênio radicalar formou-se o íon produto em m/z 239,0345. Por fim, a partir desse fragmento ocorreu a perda de CO $[\text{M} - 28]$ resultando no pico em m/z 211,0400, pico base do espectro (**FIGURA 31**) (KANG, HICK e PRICE, 2007).

FIGURA 31. Fragmentações observadas para a biochanina (composto 3E).



Fonte: Autoria própria.

O composto **4E** foi identificado como cajanol, apresentando pico do íon molecular $[\text{M} - \text{H}]^-$ em m/z 315,0874 e fórmula molecular $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{O}_6$, com íons fragmentos característicos de isoflavonas em m/z 300,0576; 285,0397; 257,0459; 135,0088. O padrão de fragmentação do cajanol é semelhante ao observado para o composto biochanina (**3E**). No espectro EM^2 foi observado o íon produto com m/z 300,0576 obtido da perda de um CH_3 . A partir desse íon produto a perda de 15 Da leva ao pico m/z 285,0397, evidenciando a perda da outra metila presente na estrutura do cajanol. Além disso, o pico m/z 257,0459 é referente a perda de CO $[\text{M} - 28]$ a partir do fragmento em m/z 285,0397 (KANG, HICK e PRICE, 2007).

O composto **5E** foi identificado como formononetina, apresentando pico do íon molecular $[M - H]^-$ em m/z 267,0663 e fórmula molecular $C_{16}H_{12}O_4$, com fragmentos característicos de isoflavonas em m/z 252,0419, 224,0457; 223,0401. O padrão de fragmentação da formononetina é semelhante ao observado para o composto biochanina (**3E**). No espectro de EM² do composto **5E**, o íon produto observado em m/z 252,0419 é referente à perda de uma metila $[M - 15]$. A partir desse fragmento ocorreu a perda de CO $[M - 28]$, formando o pico em m/z 224,0457. Com a saída de um hidrogênio radicalar formou-se o íon produto em m/z 223,0401, que é o pico base do espectro. Por fim, a partir desse fragmento, ocorreu a perda de CO $[M - 28]$ resultando no pico em m/z 195,0453 (KANG, HICK e PRICE, 2007).

O composto **6E** foi identificado como crisoeriol, trata-se de uma flavona. Essa molécula apresentou o pico do íon molecular $[M - H]^-$ em m/z 299,0561 e fórmula molecular $C_{16}H_{12}O_6$, com fragmentos característicos de flavonas em m/z 284,0308; 283,0232; 256,0337; 255,0294. No espectro de EM² do composto **6E**, o íon produto observado em m/z 284,0308 é referente à perda de uma metila $[M - 15]$. A partir desse fragmento ocorreu a perda de CO $[M - 28]$ formando o pico em m/z 256,0337. A saída de um hidrogênio radicalar foi responsável pelo íon fragmento observado em m/z 255,0294, que é o pico base do espectro. O padrão de fragmentação da flavona é semelhante ao das isoflavonas (KANG, HICK e PRICE, 2007).

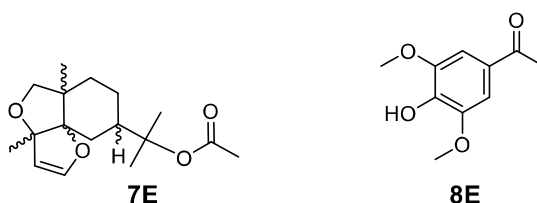
Compostos das classes isoflavona e flavona são muito comuns no gênero *Dalbergia*. A biochanina e formononetina já foram identificadas em *D. odorifera* (THE, 2017). Além disso, na espécie *D. miscolobium*, também já foram identificados compostos químicos pertencentes à classe das isoflavonas, inclusive com atividade frente à catepsina V (SILVA *et al.*, 2021). O cajanol (**4E**) e crisoeriol (**6E**) foram pela primeira vez reportados no gênero *D. miscolobium*.

A biochanina (**3E**) e formononetina (**5E**) já possuem atividade antiplasmodial reportada na literatura, frente à cepa sensível à cloroquina de *P. falciparum* poW. O composto **3E** possui IC_{50}^{poW} 46,8 $\mu\text{g/mL}$ e o composto **5E** $IC_{50}^{poW} = > 50 \mu\text{g/mL}$ (KRAFT *et al.*, 2000). Além disso, o cajanol (**4E**) já foi investigado anteriormente quanto à atividade antiplasmodial e possui $IC_{50} > 100 \mu\text{M}$ (DUKER-ESHUN *et al.*, 2004).

5.5.2. Outras classes de metabólitos

No extrato etanólico das cascas do caule de *D. miscolobium* (DmCcE) também foram identificados um composto da classe dos terpenoides, a fituberina (**7E**), e um derivado fenólico, a acetosiringona (**8E**) (FIGURA 32).

FIGURA 32. Terpenoide (**7E**) e derivado fenólico (**8E**) identificados em DmCcE.



O composto **7E** apresentou o pico do íon molecular $[M - H]^-$ em m/z 293,1758 e fórmula molecular $C_{17}H_{26}O_4$, com íons fragmentos característicos do sesquiterpeno fituberina em m/z 236,1050; 221,1545; 192,1155. No espectro EM^2 do composto **7E** foi observada a perda da unidade acetato (-57,0708 Da), evidente pelo pico em m/z 236,1050. A partir desse fragmento, foi gerado o íon produto em m/z 221,1545, pico base do espectro, proveniente da perda de uma metila $[M - 15]$. O pico em m/z 192,1155 foi gerado pela perda do grupo acetato de isopropilo (-101,0603 Da) (SUÁREZ-MONTENEGRO *et al.*, 2021).

O composto **8E** foi identificado como acetosiringona através das informações do pico do íon molecular $[M - H]^-$ em m/z 195,0664, fórmula molecular $C_{10}H_{12}O_4$, com íons fragmentos característicos em m/z 180,0414; 167,0347; 152,0105; 136,0161; 135,0091; 121,0296. No espectro de EM^2 do sesquiterpenoide **8E** foi observada a perda da porção acetila da molécula (-43,0558 Da), evidente pelo pico em m/z 152,0105. A partir desse fragmento, foi gerado o íon produto em m/z 135,0091 proveniente da perda de uma hidroxila $[M - 17]$. O íon produto em m/z 180,0414 é referente a perda de uma metila $[M - 15]$ (BARNABA *et al.*, 2016).

Compostos da classe sesquiterpenoide e derivados fenólicos já foram identificados anteriormente na espécie *D. odorifera* (THE, 2017). Porém, na espécie *D. miscolobium* é o primeiro relato de substâncias dessas classes de metabólitos secundários. A fituberina (**7E**) já foi identificada em *Cyphomandra betacea* e a acetosiringona (**8E**) possui inibição frente ao crescimento de bactérias como *Pseudomonas* (BARNABA *et*

al., 2016; SZATMÁRI *et al.*; 2021), mas não há relatos de atividade antiplasmodial na literatura para nenhum dos compostos (**7E** e **8E**).

5.6. Prospecção química da fração hexânica (DmCcH) de *D. miscolobium* por CG-EM

A fração hexânica ativa de *D. miscolobium* (inibição *P. falciparum* = 95%; $IC_{50}^{3D7} = 1,7 \pm 0,6 \mu\text{g/mL}$) foi avaliada quanto a sua composição química para a desreplicação dos metabólitos secundários presentes e responsáveis pela atividade biológica observada.

A análise por CG-EM foi realizada conforme descrito no tópico **4.4**. A identificação dos compostos foi baseada no índice de retenção (IR). O IR foi determinado para uma mistura de alcanos com diferentes números de carbono (C8-C30) nas mesmas condições de análise da fração hexânica. Os valores de IR obtidos para os compostos foram comparados com os valores encontrados na literatura para a coluna HP-5MS (ADAMS, 2017). A identificação também foi realizada com base na similaridade entre os espectros de massas obtidos experimentalmente e contidos na biblioteca NIST (**ANEXO 3**).

Através da análise por cromatografia gasosa foi possível a obtenção do cromatograma representado pela **FIGURA 33**.

íons fragmentos característicos em m/z 55; 73; 88; 101; 157; 241. Dentre esses, o pico em m/z 88 é resultado de um rearranjo McLafferty (-196 Da), a partir desse íon fragmento ocorreu a perda de CH_3 , formando o íon produto em m/z 73.

FIGURA 35. Fragmentações observadas para o hexadecanoato de etila (1H)

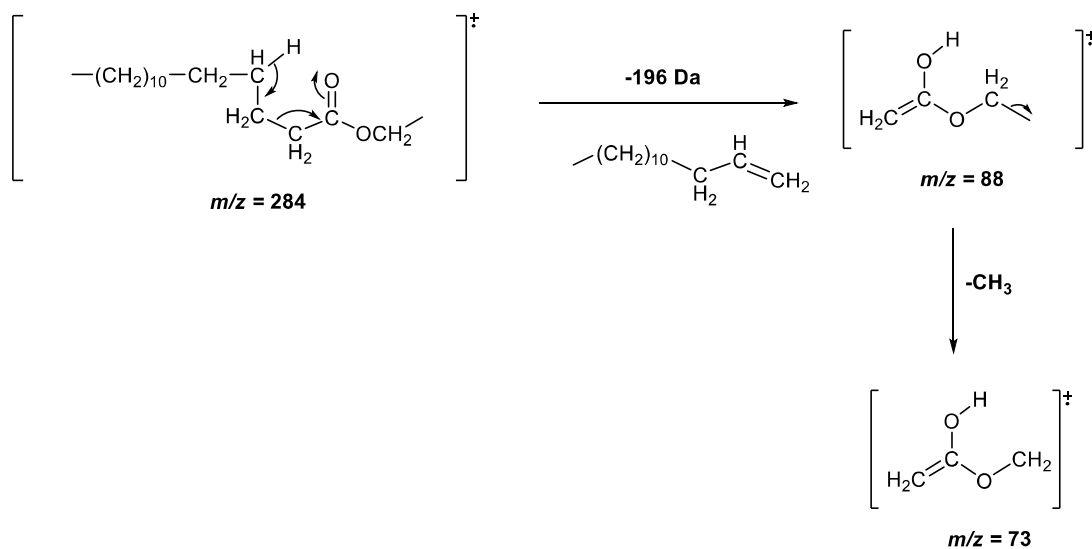


TABELA 15. Compostos identificados por CG-EM na fração DmCcH.

Código	Compostos	t_R (min)	IK ^a	IK	Fórmula molecular	Íon precursor (m/z)	m/z
1H	hexadecanoato de etila	14,131	1993	1993 ^b	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	284	55; 73; 88; 101; 157; 241
2H	linoleato de etila*	16,338	2163	2159 ^c	C ₂₀ H ₃₆ O ₂	308	55; 67; 81; 95; 109; 135; 150; 164; 178; 207; 263
3H	elaidato de etila*	16,411	2169	2171 ^d	C ₂₀ H ₃₈ O ₂	310	55; 69; 83; 88; 123; 137; 155; 180; 222; 235; 281

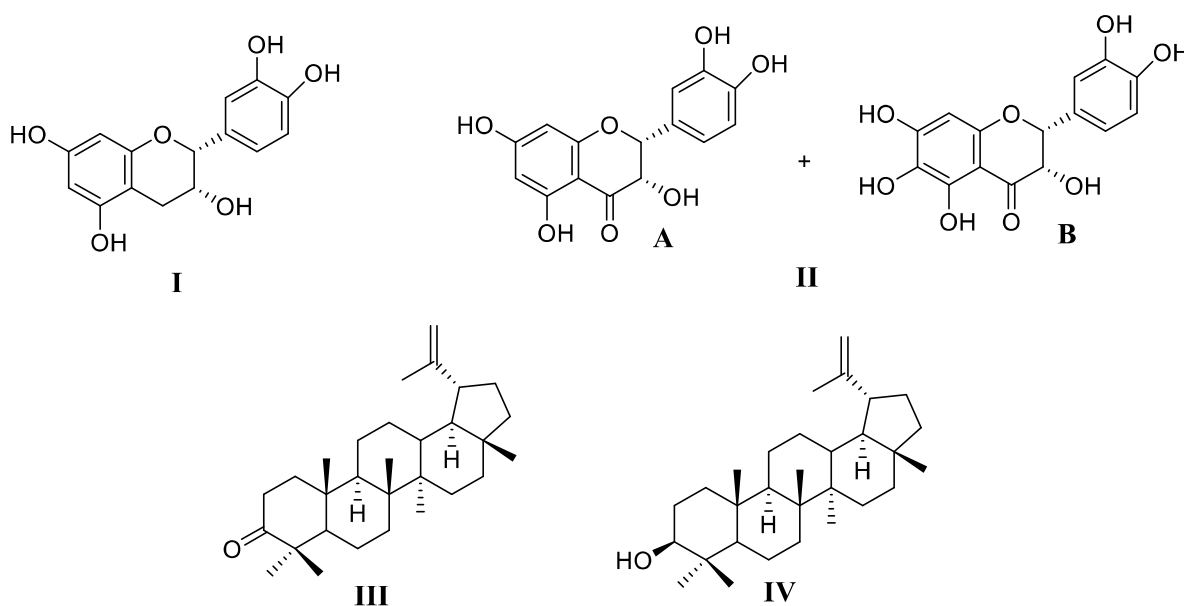
Legenda: 1H, 2H, 3H – Compostos identificados por CG-EM na DmCcH; t_R : Tempo de retenção; IK^a: Índice de Kovats experimental; IK:

Índice de Kovats Literatura (ADAMS, 2017^b); (PINO *et al.*, 2005^c); (LALEL; SINGH e TAN, 2003^d). *Esteroisomeria indefinida.

5.7. Elucidação estrutural dos compostos isolados das frações e subfrações da DmCcA ativa

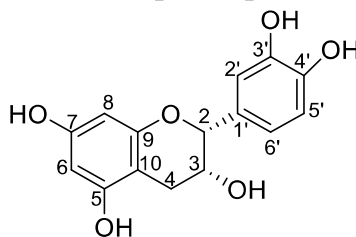
As análises por ressonância magnética nuclear foram realizadas para a elucidação estrutural dos compostos químicos isolados da fração ativa de acetato de etila das cascas do caule (DmCcA). O estudo químico de *D. miscolobium* guiado por *ensaio in vitro* em *P. falciparum* permitiu o isolamento de três metabólitos secundários (compostos **I**, **III** e **IV**) das classes flavonoide e terpenoide, além de uma mistura de flavononols (composto **II**) (**FIGURA 36**). A separação dos flavonoides em mistura (composto **II**) será realizada por cromatografia em coluna (CC) para ensaios no parasito e frente às enzimas. A elucidação estrutural destes compostos (**I–IV**) foi feita através dos experimentos de RMN uni e bidimensionais.

FIGURA 36. Compostos isolados a partir do fracionamento de DmCcA.



5.7.1. Composto I – Flavonoide

O composto **I** foi isolado na subfração **A16** (43,8 mg), proveniente da fração acetato de etila (DmCcA), conforme descrito no item **4.2.3.1.** (página 35). Esse flavonoide da classe dos flavanols (flavan-3-ol) teve sua estrutura caracterizada através do experimento de RMN de hidrogênio (metanol- d_4 , 400 MHz) e comparação com dados da literatura (LÔBO *et al.*, 2008), sendo identificado como epicatequina (**FIGURA 37**).

FIGURA 37. Estrutura da epicatequina (composto I).

Pela análise do espectro de RMN de hidrogênio de **I** (**FIGURA 38**), observaram-se os sinais na região de hidrogênios alifáticos: nos deslocamentos químicos de δ 2,71 (1H, *dd*, $J = 2,8$ Hz e 16,9 Hz) e δ 2,84 (1H, *dd*, $J = 4,8$ Hz e 16,9 Hz) foram observados dois sinais de duplos dupletos característicos dos hidrogênios H-4b, H-4a, respectivamente, que caracterizam a presença do flavan-3-ol. Além disso, nessa região observou-se um multipletto em δ 4,16, referente ao hidrogênio H-3. A diferença entre a catequina e epicatequina pode ser visualizada pelos valores das constantes de acoplamento dos hidrogênios H-3 e H-4, característicos da epicatequina (LÔBO *et al.*, 2008).

Na região de deslocamentos químicos de hidrogênios aromáticos, os sinais em δ 6,75 (1H, *d*, $J = 8,0$ Hz), δ 6,79 (1H, *dd*, $J = 2,0$ Hz e 8,0 Hz) e δ 6,97 (1H, *d*, $J = 1,8$ Hz) referem-se aos hidrogênios H-5', H-6' e H-2', respectivamente. Os dois dupletos centrados em δ 5,92 (1H, *d*, $J = 2,2$ Hz) e δ 5,94 (1H, *d*, $J = 2,2$ Hz), foram atribuídos aos hidrogênios H-8 e H-6, respectivamente. Esse conjunto de sinais na região dos hidrogênios aromáticos caracterizam um sistema de acoplamento AMX. Na **TABELA 16** observa-se a comparação dos deslocamentos químicos dos hidrogênios com os valores descritos pela literatura para a epicatequina.

FIGURA 38. Espectro de RMN de hidrogênio da epicatequina (composto I) (400 MHz, metanol-*d*₄).

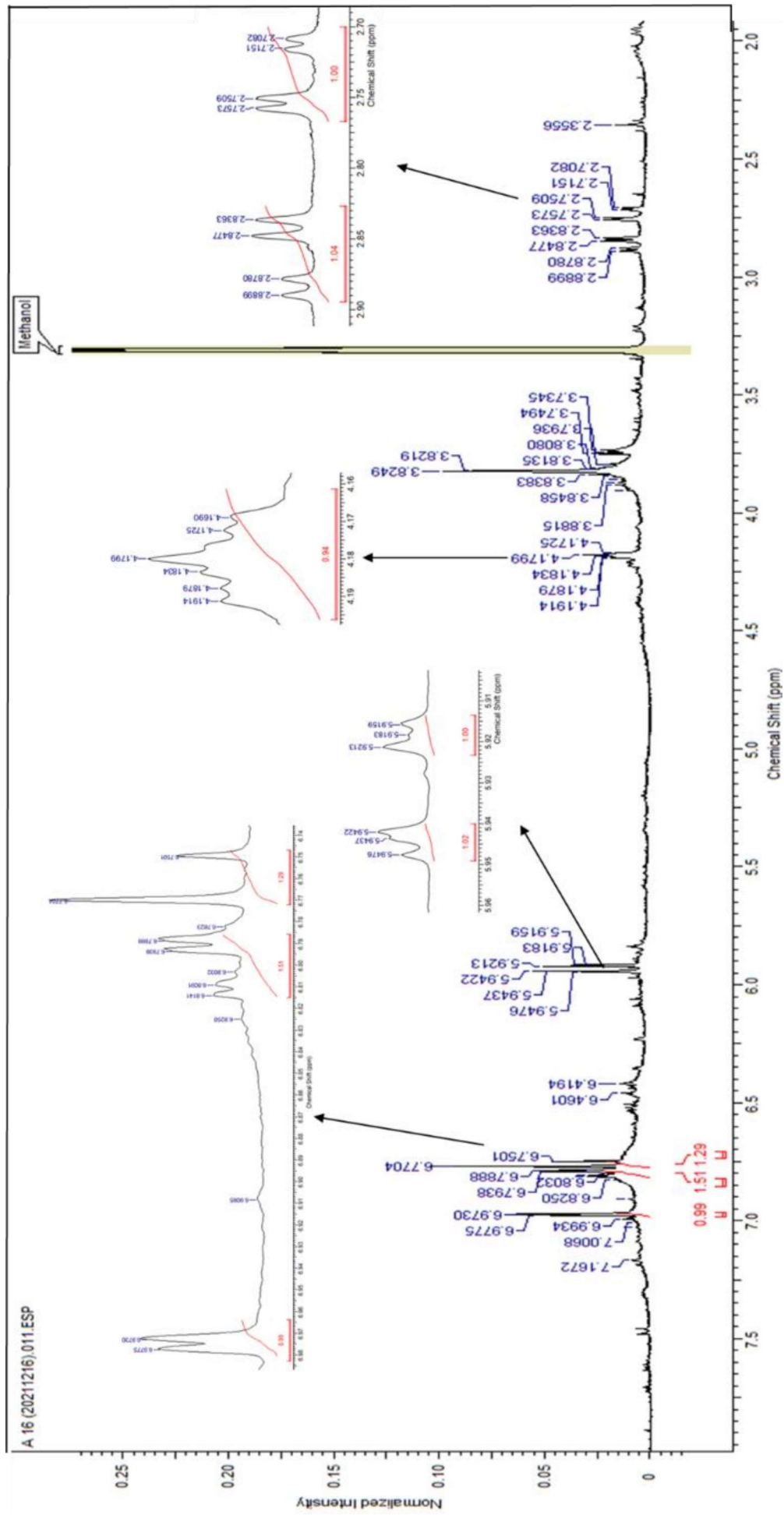


TABELA 16. Dados de RMN de hidrogênio da epicatequina (composto I).

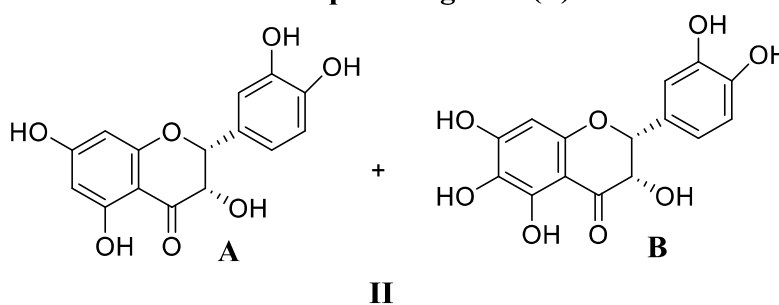
H	$\delta_{\text{H}}^{(a)}$ $\delta(\text{ppm})$ J (Hz)	$\delta_{\text{H}} \text{ lit}^{(b)}$ $\delta(\text{ppm})$ J (Hz)
H-4b	2,71 (<i>dd</i> , 2,8 e 16,9)	2,72 (<i>dd</i> , 2,4 e 16,8)
H-4a	2,84 (<i>dd</i> , 4,8 e 16,9)	2,85 (<i>dd</i> , 4,5 e 16,8)
H-2	--	4,82 (<i>s</i>)
H-3	4,16 (<i>m</i>)	4,17 (<i>s</i>)
H-5'	6,75 (<i>d</i> , 8,0)	6,75 (<i>d</i> , 8,1)
H-6'	6,79 (<i>dd</i> , 2,0 e 8,0)	6,79 (<i>dd</i> , 1,2 e 8,1)
H-2'	6,97 (<i>d</i> , 1,8)	6,97 (<i>d</i> , 1,2)
H-8	5,92 (<i>d</i> , 2,2)	5,91 (<i>d</i> , 1,8)
H-6	5,94 (<i>d</i> , 2,2)	5,93 (<i>d</i> , 1,8)

(a) metanol-*d*₄; (400 MHz) (b) metanol-*d*₄; (300 MHz) (LÓBO *et al.*, 2008).

5.7.2. Composto II – Mistura de flavononols

A partir da subfração **A20** (1,07 g), proveniente do fracionamento de **DmCcA** (item 4.2.3.1.; página 35), isolou-se o isolamento do **composto II**, um sólido marrom constituído por uma mistura de dois flavononols, a epitaxifolina (*cis*-dihidroquercetina) (**A**) e *cis*-dihidroquercetagetina (**B**) (**FIGURA 39**). Esses flavononols foram isolados pela primeira vez na espécie *D. miscolobium*, sendo sua identificação em mistura proposta através da análise do espectro de RMN de hidrogênio e dos espectros bidimensionais de HSQC e HMBC.

FIGURA 39. Estrutura do composto II – mistura de epitaxifolina (A) e *cis*-dihidroquercetagetina (B).



Pela análise do espectro de RMN de hidrogênio (**FIGURA 40**), observou-se sinais de hidrogênios aromáticos característicos do anel A de flavonoides. Os sinais dos hidrogênios do anel A tetrassubstituído presentes na estrutura da epitaxifolina foram observados através dos dupletos em δ 6,06 ($J = 2,4$ Hz, 1H, H-8) e δ 5,96 ($J = 2,2$ Hz, 1H, H-6), com constantes de acoplamento em *meta*. A presença do simpleto em δ 6,13 (1H) indica a presença de um anel pentassubstituído, presente na estrutura da *cis*-

dihidroquercetagetina, tendo um hidrogênio aromático sem acoplamento com hidrogênios vicinais. Os sinais dos hidrogênios do anel pirona (C) foram observados através do simpleto em δ 4,95 (H-2) e do duplete em δ 4,32 (3,4 Hz, H-3). A presença do segundo anel pirona foi confirmada pelo sinal em 4,13 (*d*, 3,4 Hz, H-3). A estereoisomeria dos compostos foi confirmada através dos valores das constantes de acoplamento para os H-2 e H-3. Para a epitaxifolina (composto com isomeria *cis*) são esperadas constantes de acoplamento de 2,8 Hz (H-2), 2,8 e 5,7 Hz (H-3). No caso da taxifolina (composto *trans*) os valores são de 11,3, 3,9 Hz (H-3) e 11,3 Hz (H-2) (KIEHLMANN e EDMOND, 1995).

A integração dos sinais entre δ 6,8 – 7,5 na região dos hidrogênios aromáticos do anel B, revelou a presença de seis hidrogênios. Os dupletos observados em δ 7,27 ($J=2,0$ Hz, 1H) e δ 7,18 ($J=2,2$ Hz, 1H), apresentaram constantes de acoplamento de hidrogênios em meta, característicos de H-2' do anel B. Os dupletos em δ 6,82 ($J=4,9$ Hz) e δ 6,84 ($J=5,0$ Hz) são referentes aos hidrogênios 5', com constantes de acoplamento em *orto*. Esses sinais e os dois duplos dupletos em δ 7,03 ($J=5,7$ e 2,2 Hz - H-6') e δ 7,06 ($J=5,6$ e 2,2 Hz - H-6') indicam a presença de anéis aromáticos trissubstituídos (acoplamentos em meta e em orto), sendo o número de hidrogênios na região mais desblindada do espectro um indicativo da presença de dois anéis B aromáticos.

As ampliações do espectro de RMN de hidrogênio da mistura de flavononols são apresentadas no **ANEXO 4**. Na **TABELA 17** estão demonstrados os valores de deslocamento químico de carbono, obtidos através dos mapas de contorno de HSQC e HMBC (**ANEXO 5**) e hidrogênio para a mistura de flavononols em comparação com dados da literatura (AGRAWAL *et al.*, 1981; KIEHLMANN e EDMOND, 1995; NONAKA *et al.*, 1987; PICCINELLI *et al.*, 2004).

FIGURA 40. Espectro de RMN de hidrogênio do composto II, mistura de epitaxifolina (A) e *cis*-dihidroquercetagina (B) (400 MHz, acetona-*d*₆).

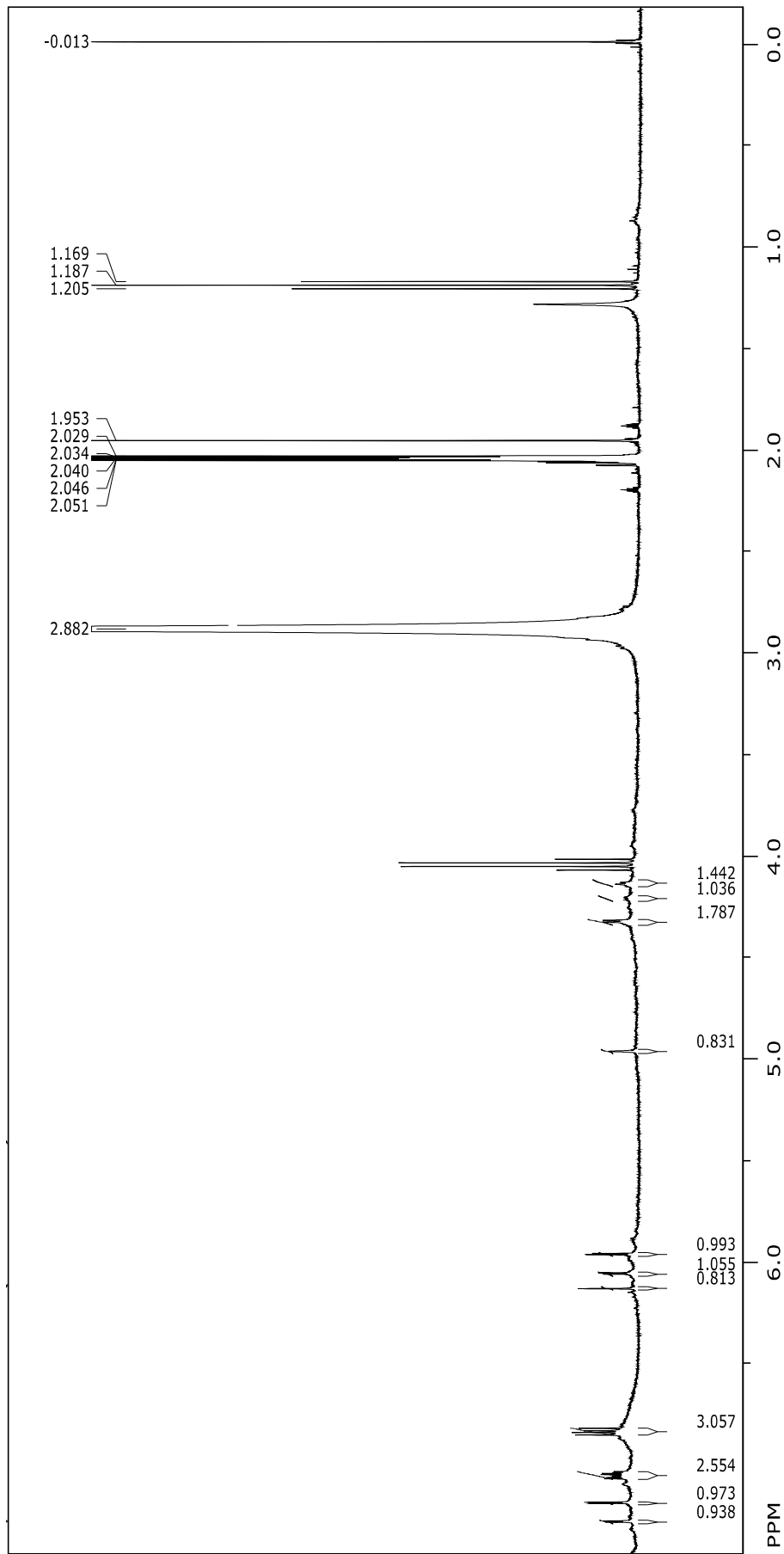


TABELA 17. Deslocamentos de RMN de hidrogênio e de ^{13}C da mistura de epitaxifolina + *cis*-dihidroquercetagetina (composto II).

H/C	δ_{H} ^(a)	$\delta_{\text{H lit}}$ ^(c)	δ_{C} ^{(b)*}	$\delta_{\text{C lit}}$ ^(d)
	$\delta(\text{ppm}), J (\text{Hz})$	$\delta(\text{ppm}), J (\text{Hz})$	$\delta (\text{ppm})$	$\delta (\text{ppm})$
2	4,95 (s)	5,42 (d, 2,8)	81,3	82,2
3	4,13 (d, 3,4)/ 4,32 (d, 3,4)	4,27 (dd, 2,8; 5,7)	65,7/67,2	72,5
4	--	--	--	196,1
5	--	--	171,0	165,4
6	5,96 (d, 2,2)	5,96 (d, 2,1)	97,6	95,7
7	--	--	--	167,4
8	6,06 (d, 2,4)/ 6,13 (s)	6,00 (d, 2,1)	96,0	96,7
9	--	--	--	--
10	--	--	--	--
1'	--	--	130,7/132,4	128,4
2'	7,27 (d, 2,0)/7,18 (d, 2,2)	7,10 (d, 1,9)	115,8/115,3	115,4
3'	--	--	145,0	145,4
4'	--	--	--	145,8
5'	6,82 (d, 4,9)/6,84 (d, 5,0 Hz)	6,81 (d, 8,2)	115,1	115,6
6'	7,03 (dd, 5,7; 2,2)/7,06 (dd, 5,6; 2,2)	6,90 (dd, 8,2; 1,9)	119,8	119,9

s- simpleto, *d*- dupleto, *dd*- duplo dupleto (a) acetona- d_6 (400 MHz); (b) acetona- d_6 (400 MHz); (c) $\text{Me}_2\text{CO}-d_6$ (400 MHz); (d) $\text{Me}_2\text{CO}-d_6$ (400 MHz) (KIEHLMANN e EDMOND, 1995).

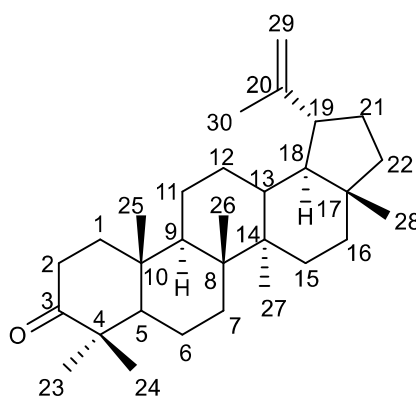
* valores obtidos através das projeções de ^{13}C do HSQC e HMBC

O composto **II (mistura de flavonoides)** apresentou $\text{IC}_{50}^{3\text{D}7} = 24,0 \mu\text{g/mL}$ e inibição acima de 90% frente à *Pf*PKII (200 $\mu\text{g/mL}$), conforme descrito no tópico **5.4.**, sendo importante o isolamento e realização dos ensaios destes compostos isolados.

5.7.3. Composto III - Triterpenoide

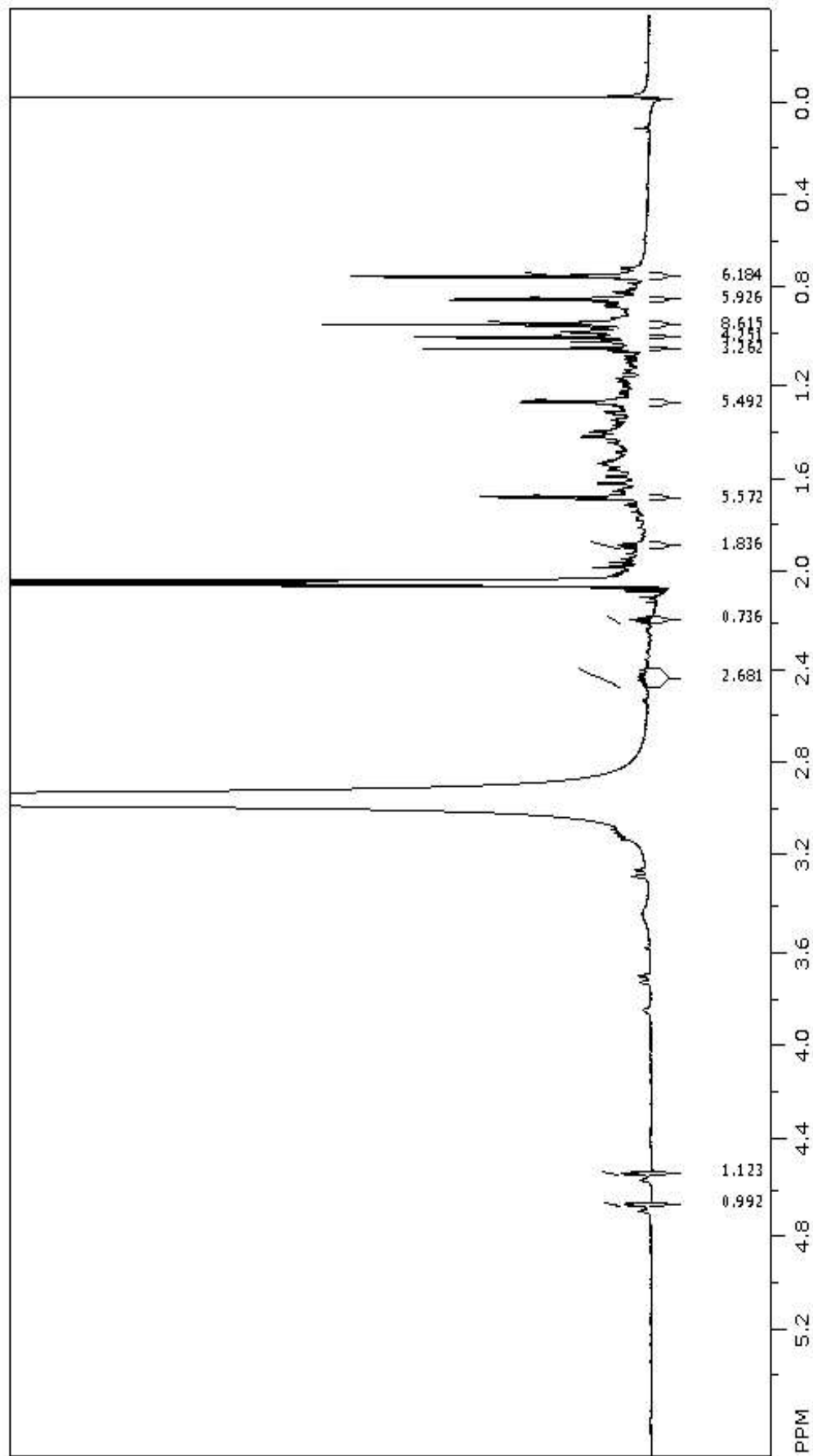
O composto **III** foi isolado como um sólido branco na subfração **A9.11** (3,6 mg), proveniente do fracionamento de **A9**, uma das subfrações ativas de DmCcA (item **4.2.3.1.1.**; página 35). Através dos experimentos de RMN de ^1H , foram observados sinais característicos de triterpenoides na região de hidrogênios alifáticos e vinílicos. Essas informações, em conjunto com as análises de correlação heteronuclear (HSQC, HBMC) e dados da literatura (AHN e OH, 2012; PRACHAYASITTIKUL *et al.*, 2010), permitiram a identificação do composto **III** como sendo a lupenona (**FIGURA 41**), já identificada anteriormente em *D. miscolobium* (SALATINO *et al.*, 2020).

FIGURA 41. Estrutura da lupenona (composto III).



Pela análise do espectro de RMN de hidrogênio do composto **III** (**FIGURA 42**) foram observados sinais em campo alto, característicos dos grupos metílicos de esteroides, em δ 0,98 (*s*, 3H) e δ 1,02 (*s*, 3H), referentes aos hidrogênios H-24 e H-23. Além disso, os sinais em δ 1,89 (*m*, 2H) e δ 2,20 (*m*, 1H), foram atribuídos aos hidrogênios H-21 e H-19. Também foram observados sinais na região de hidrogênios vinílicos: em δ 4,68 (*d*, $J = 2,4$ Hz, 1H, H-29a) e δ 4,55 (*m*, 1H, H-29b). As ampliações do espectro de RMN de hidrogênio são apresentadas no **ANEXO 6**.

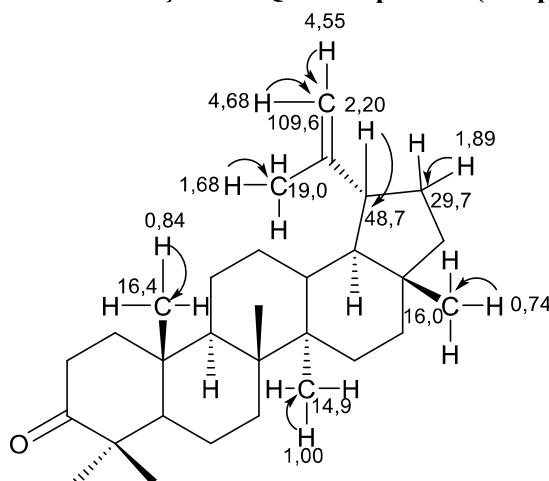
FIGURA 42. Espectro de RMN de hidrogênio da lupenona (composto III) (400 MHz, acetona- d_6).



No espectro de HSQC do composto **III** (ANEXO 7) foram observadas as correlações entre os carbonos em δ 48,7 (**C-19**), δ 29,7 (**C-21**) e os multipletos em δ 2,20 (**H-19**) e δ 1,89 (**H-21**), respectivamente. O sinal em δ 16,4 (**C-25**) correlacionou com o hidrogênio δ 0,84 (**H-25**). Além disso, o carbono δ 14,9 (**C-27**) apresentou correlação heteronuclear com o simpleto em δ 1,00 (**H-27**).

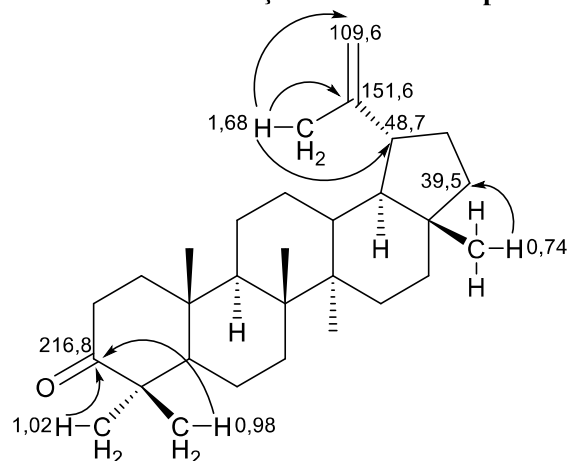
Também foram observadas as correlações heteronucleares entre os carbonos em δ 16,0 (**C-28**), δ 19,0 (**C-30**) e os hidrogênios δ 0,74 (**H-28**) e δ 1,68 (**H-30**), respectivamente. Os sinais dos hidrogênios vinílicos foram confirmados através das correlações entre o duplete em δ 4,68 (**H-29a**) e multiplete δ 4,55 (**H-29b**), com o carbono em δ 109,6 (**C-29**) (FIGURA 43).

FIGURA 43. Correlações HSQC da lupenona (composto III).



No espectro de HMBC do composto **III** (ANEXO 7), foram observadas as correlações heteronucleares dos carbonos em δ 39,5 (**C-22**), δ 48,7 (**C-19**) com os hidrogênios em δ 0,74 (**H-28**) e δ 1,68 (**H-30**), respectivamente. O sinal em δ 1,68 (**H-30**) também correlacionou com os carbonos δ 109,6 (**C-29**) e δ 151,6 (**C-20**). Além disso, a carbonila presente na estrutura da lupenona foi comprovada através do carbono em δ 216,8 (**C-3**), que apresentou correlação com os simpletos em δ 0,98 (**H-24**) e δ 1,02 (**H-23**) (FIGURA 44). Na TABELA 18 são demonstrados os sinais de RMN de hidrogênio e de ^{13}C da lupenona.

FIGURA 44. Correlações HMBC da lupenona.

TABELA 18. Dados de RMN de hidrogênio e de ^{13}C da lupenona (composto III).

H/C	$\delta_{\text{H}}^{(a)}$	$\delta_{\text{H}} \text{ lit}^{(c)}$	$\delta_{\text{C}}^{(b)*}$	$\delta_{\text{C}} \text{ lit}^{(d)}$
	$\delta(\text{ppm}) J(\text{Hz})$	$\delta(\text{ppm}) J(\text{Hz})$	$\delta(\text{ppm})$	$\delta(\text{ppm})$
1	--	--	39,5	39,6
2	--	--	35,1	34,1
3	--	--	216,8	218,2
4	--	--	--	47,3
5	--	--	55,5	54,9
6	--	--	--	19,2
7	--	--	34,7	33,5
8	--	--	--	40,7
9	--	--	--	49,7
10	--	--	35,0	36,8
11	--	--	--	21,4
12	--	--	--	25,1
13	--	--	38,1	38,1
14	--	--	42,2	42,8
15	--	--	28,5	27,4
16	--	--	34,7	35,5

Continuação TABELA 18.

17	--	--	--	42,9
18	--	--	--	48,2
19	2,20 (<i>m</i>)	2,24-2,52 (<i>m</i>)	48,7	47,9
20	--	--	151,6	150,8
21	1,89 (<i>m</i>)	1,84-1,97 (<i>m</i>)	29,7	29,6
22	--	--	39,5	39,4
23	1,02 (<i>s</i>)	1,04 (<i>s</i>)	--	26,6
24	0,98 (<i>s</i>)	1,00 (<i>s</i>)	--	21,0
25	0,84 (<i>s</i>)	0,90 (<i>s</i>)	16,4	15,9
26	1,27 (<i>s</i>)	1,22 (<i>s</i>)	--	15,7
27	1,00 (<i>s</i>)	0,93 (<i>s</i>)	14,9	14,9
28	0,74 (<i>s</i>)	0,77 (<i>s</i>)	16,0	17,9
29	4,68 (<i>d</i> , 2,36); 4,55 (<i>m</i>)	4,55 (<i>s</i>) 4,66 (<i>s</i>)	109,6	109,3
30	1,68 (<i>s</i>)	1,66 (<i>s</i>)	19,0	19,6

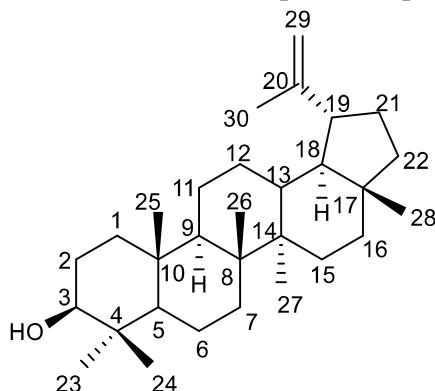
s- simpleto, *d*- duplete, *m*- multiplete (a) acetona-*d*₆ (400 MHz); (b) acetona-*d*₆ (400 MHz); (c) clorofórmio-*d*₁ (500 MHz); (d) clorofórmio-*d*₁ (500 MHz) (PRACHAYASITTIKUL *et al.*, 2010).

* valores obtidos através das projeções de carbono do HSQC e HMBC

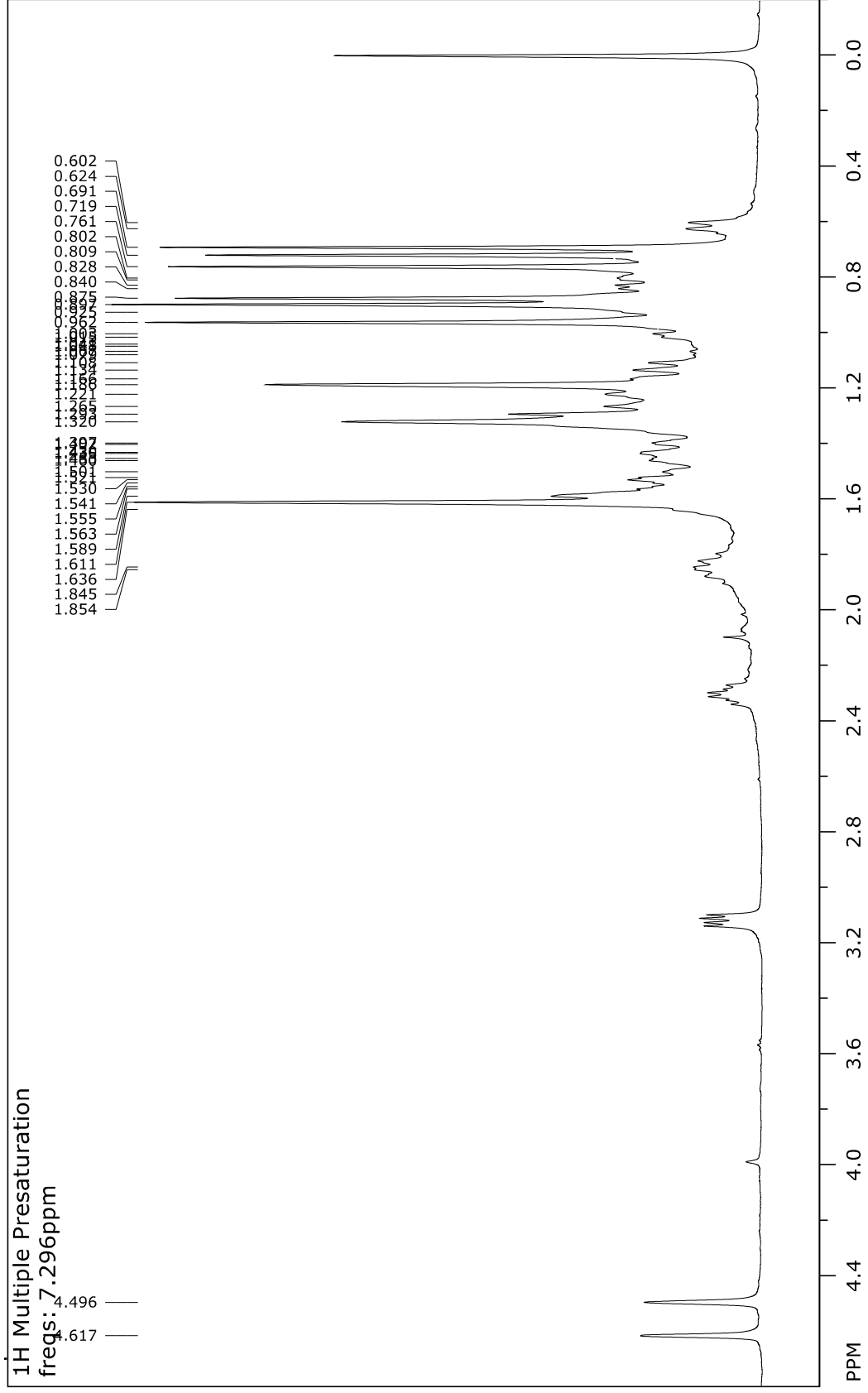
5.7.4. Composto IV - Triterpenoide

Um sólido branco foi isolado na subfração **B2.8** (9,5 mg), proveniente de **B2** que também foi obtida da fração ativa DmCcA, conforme descrito no método de fracionamento (item 4.2.3.2.1. da página 37). Através dos experimentos de RMN de hidrogênio verificou-se sinais característicos de triterpenoides na região de hidrogênios alifáticos. Em comparação com dados da literatura identificou-se o composto **IV** como lupeol (**FIGURA 45**) (BUAKAEW *et al.*, 2021; LAGHARI *et al.*, 2011; SHWE *et al.*, 2019). Os experimentos de correlação heteronuclear (HSQC, HMBC) também foram realizados para confirmação da estrutura proposta. O lupeol já foi isolado anteriormente de *D. miscolobium* (SILVA *et al.*, 2021).

FIGURA 45. Estrutura do lupeol (composto IV).



Pela análise do espectro de RMN de hidrogênio do composto **IV** (**FIGURA 46**) observaram-se os sinais na região de hidrogênios vinílicos: os dois dupletos observados em δ 4,61 (1H, *d*, $J = 1,6$ Hz) e δ 4,49 (1H, *d*, $J = 1,0$ Hz) são referentes aos hidrogênios H-29a e H-29b. O duplo duplete em δ 3,14 (1H, *dd*, $J = 5,2$ Hz e 11,1 Hz) é referente ao H-3. Os sinais de multipletos em δ 2,34 (1H, *m*) e δ 1,90 (1H, *m*) referem-se aos hidrogênios H-19 e H-21, respectivamente (BUAKAEW *et al.*, 2021; LAGHARI *et al.*, 2011; SHWE *et al.*, 2019). As ampliações do espectro de RMN de hidrogênio do lupeol podem ser observadas no **ANEXO 8**.

FIGURA 46. Espectro de RMN de hidrogênio do lupeol (composto IV) (400 MHz, cloroformio-*d*₁).

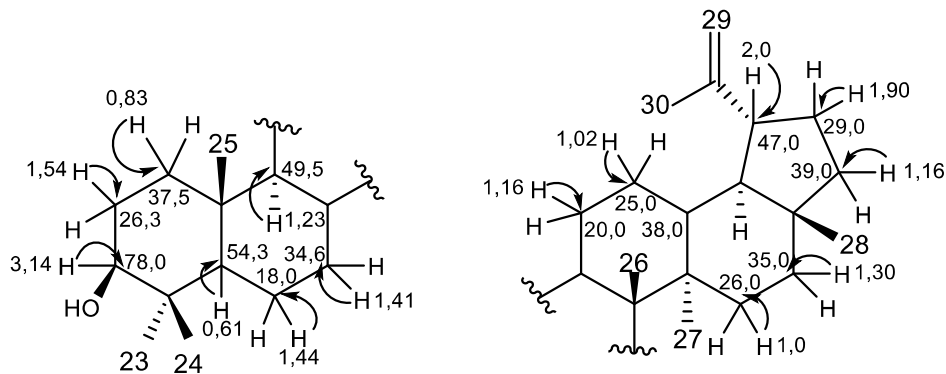
No espectro de HSQC do composto **IV** (**ANEXO 9**) observou-se a correlação entre os dois hidrogênios em δ 0,83 (H-1a) e 1,60 (H-1b) com o sinal de carbono em δ 37,5 (C-1); os hidrogênios δ 1,54 (H-2a) e 1,64 (H-2b) com o carbono δ 26,3 (C-2). O duplo duplete em δ 3,14 (H-3) apresentou correlação com o seu carbono respectivo em δ 78,0 ppm (C-3). O hidrogênio em δ 0,61 (H-5) correlacionou com o carbono δ 54,3 (C-5). Também foram observadas as correlações entre os hidrogênios em δ 1,44 (H-6) com o carbono em δ 18,0 ppm (C-6), e o deslocamento químico de δ 1,41 (H-7) correlacionando com o carbono em δ 34,6 ppm (C-7), o sinal em δ 1,23 (H-9) apresentou correlação com o carbono em δ 49,5 ppm (C-9).

Os valores dos deslocamentos químicos dos carbonos C-11, C-12 (δ 20,0 ppm, δ 25,0 ppm, respectivamente) também foram confirmados pelas correlações heteronucleares observadas com seus hidrogênios respectivos em δ 1,16 (H-11a), 1,40 (H-11b), δ 1,02 (H-12a), 1,53 (H-12b).

Os hidrogênios centrados em δ 1,0 (H-15a), 1,55 (H-15b) apresentaram correlações com o carbono δ 26,0 (C-15); os sinais δ 1,30 (H-16a) e 1,41 (H-16b) com o carbono em δ 35,0 ppm (C-16). Os multipletos em δ 2,34 (H-19) e em δ 1,90 (H-21) correlacionaram com seus respectivos carbonos δ 47,0 ppm (C-19) e δ 29,0 ppm (C-21).

Os sinais de hidrogênios em δ 1,16 (H-22a) e 1,34 (H-22b) correlacionaram-se com o carbono δ 39,0 ppm (C-22); o hidrogênio δ 0,91 (H-23) com o carbono centrado em δ 27,0 ppm (C-23). O simpleto em δ 0,76 (H-24) apresentou correlações com o carbono δ 15,0 (C-24); o sinal δ 0,84 (H-25) com o carbono δ 17,6 ppm (C-25). Também observou-se as correlações entre o simpleto δ 0,96 (H-27) e carbono em δ 15,3 (C-27); do sinal em δ 0,79 (H-28) e carbono δ 18,6 (C-28), além dos dois dupletos δ 4,61 (H-29a), 4,49 (H-29b) com o carbono em δ 108,4 ppm (C-29). Os valores de carbono obtidos pelas correlações observadas no experimento de HSQC descritas confirmam a estrutura do esqueleto lupano do lupeol e podem ser observadas resumidamente na **FIGURA 47**.

FIGURA 47. Correlações HSQC do lupeol (composto IV).



No espectro de HMBC (ANEXO 9) foi possível observar a correlação entre os hidrogênios δ 1,54 (H-2a); 3,14 (H-3); 0,61 (H-5); 1,23 (H-9) e o carbono em δ 37,5 (C-1). O hidrogênio δ 0,91 (H-23) correlacionou-se com o carbono δ 26,3 (C-2).

Os hidrogênios δ 1,54 (H-2a); 1,64 (H-2b); 0,91 (H-23), correlacionaram com o carbono em δ 78,0 ppm (C-3). Os hidrogênios em δ 0,91 (H-23); 0,76 (H-24) apresentaram correlação com o carbono em δ 38,7 (C-4); o sinal em δ 1,60 (H-1b) correlacionou com o carbono δ 54,3 (C-5).

Os hidrogênios em δ 0,61 (H-5), δ 1,16 (H-11a) apresentaram correlação com os carbonos em δ 18,0 (C-6) e δ 49,5 ppm (C-9), respectivamente. Os deslocamentos químicos em δ 1,54 (H-2a); 1,44 (H-6); 0,61 (H-5); 1,23 (H-9) correlacionaram com o carbono δ 37,2 ppm (C-10).

Os sinais δ 1,23 (H-9), δ 0,96 (H-27) correlacionaram com os carbonos em δ 20,0 (C-11), δ 38,0 ppm (C-13), respectivamente. Os deslocamentos químicos δ 1,30 (H-16a); 1,41 (H-16b) correlacionaram com o carbono δ 26,0 ppm (C-15).

Os hidrogênios δ 1,30 (H-16a) e 1,41 (H-16b) apresentaram correlação com o carbono δ 47,4 ppm (C-17); em δ 4,61 (H-29a); 4,49 (H-29b) com o carbono δ 47,0 ppm (C-19). Também foi observado os hidrogênios δ 2,34 (H-19); 1,16 (H-22a) correlacionando com o carbono em δ 29,0 (C-21).

O deslocamento em δ 1,90 (H-21) apresentou correlação com o carbono δ 39 ppm (C-22); o duplo duplete δ 3,14 (H-3) com o carbono em δ 27,0 ppm (C-23). Os hidrogênios δ 3,14 (H-3); 0,61 (H-5); 0,91 (H-23) correlacionaram com o carbono δ 15,0 ppm (C-24). Também foi observada a correlação entre o hidrogênio δ 2,34 (H-19) e carbono 108,4 (C-29). As correlações de HMBC confirmam a estrutura do esqueleto

Continuação TABELA 19.

10	-	-	37,2	37,3
11	1,16, 1,40 (<i>o</i>)	1,20, 1,40 (<i>o</i>)	20,0	21,1
12	1,02, 1,53 (<i>o</i>)	1,08, 1,62 (<i>o</i>)	25,0	25,3
13	-	1,65 (<i>o</i>)	38,0	38,2
14	-	-	-	43
15	1,0, 1,55 (<i>o</i>)	1,05, 1,60 (<i>o</i>)	26,0	27,6
16	1,30, 1,41 (<i>o</i>)	1,36, 1,45 (<i>o</i>)	35,0	35,7
17	-	-	47,4	48,1
18	-	1,37, 1,38 (<i>o</i>)	-	48,5
19	2,0 (<i>m</i>)	2,38 (<i>m</i>)	47,0	48,1
20	-	-	150,0	151,1
21	1,90 (<i>m</i>)	1,91 (<i>m</i>)	29,0	30,0
22	1,16, 1,34 (<i>o</i>)	1,17, 1,38 (<i>o</i>)	39,0	40,2
23	0,91 (<i>o</i>)	0,94 (<i>s</i>)	27,0	28,1
24	0,76 (<i>s</i>)	0,76 (<i>s</i>)	15,0	15,5
25	0,84 (<i>o</i>)	0,83 (<i>s</i>)	17,6	16,3
26	-	1,03 (<i>s</i>)	-	16,1
27	0,96 (<i>s</i>)	0,96 (<i>s</i>)	15,3	14,7
28	0,79 (<i>o</i>)	0,79 (<i>s</i>)	18,6	18,5
29	4,61 (<i>d</i> , 1,6 Hz), 4,49 (<i>d</i> , 1 Hz)	4,69 (<i>d</i> , 2,5 Hz), 4,56 (<i>dq</i> , 2,8 e 1,4 Hz)	108,4	109,5
30	1,61 (<i>o</i>)	1,68 (<i>s</i>)	-	19,5

o-overlap, *s*- simpleto, *d*- duplete, *m*- multiplete, *dd*- duplo duplete, *dq*- duplo quartuplete (a) clorofórmio-*d*₁ (400 MHz); (b) clorofórmio-*d*₁ (400 MHz); (c) clorofórmio-*d*₁ (400 MHz); (d) clorofórmio-*d*₁ (100 MHz) (BUAKAEW *et al.*, 2021).

* valores obtidos através das projeções de carbono do HSQC e HMBC

6. CONCLUSÃO

No presente trabalho foi realizada a investigação biológica e química das cascas do caule da planta *D. miscolobium*. Essa espécie ainda não havia sido investigada frente a cultura *in vitro* de *P. falciparum* e aos alvos enzimáticos *Pfeno* e *PfPKII*, sendo pela primeira vez investigada quanto sua atividade antiplasmodial. O extrato etanólico da referida planta apresentou $IC_{50}^{3D7} = 9,0 \mu\text{g/mL}$ e citotoxicidade $CC_{50}^{\text{HepG2}} = 53 \mu\text{g/mL}$.

Através do estudo fitoquímico da espécie *D. miscolobium*, foram produzidas subfrações ativas, sendo isolados quatro compostos: **I** (epicatequina), **II** (epitaxifolina e cis-dihidroquercetagetina, $IC_{50}^{3D7} = 24,0 \mu\text{g/mL}$), **III** (lupenona, $IC_{50}^{3D7} = 26,6 \mu\text{M}$) e **IV** (lupeol, $IC_{50}^{3D7} = 33,3 \mu\text{M}$). Além disso, as subfrações **A19**, **A20** (composto **II**, epitaxifolina e cis-dihidroquercetagetina) e **A21** apresentaram inibições acima de 90% frente a *PfPKII* (200 $\mu\text{g/mL}$), contribuindo para a descoberta de compostos inibidores da enzima *PfPKII*.

A desreplicação do extrato etanólico de *D. miscolobium* por espectrometria de massas de alta resolução revelou a presença de compostos das classes flavonoides (**1E-6E**), terpenoides (**7E**) e derivados fenólicos (**8E**), e a análise por espectrometria de massas da fração hexânica (DmCcH, $IC_{50}^{3D7} = 1,7 \mu\text{g/mL}$), permitiu a identificação de três compostos da classe dos ésteres (**1H**, **2H**, **3H**). A investigação química e estudo fitoquímico de *D. miscolobium* trouxeram contribuições quimiossistemáticas à espécie, com pouco conhecimento químico referente as cascas do caule.

7. REFERÊNCIAS

ADAMS, R. P. **Identification of essential oils components by gas chromatography/mass spectrometry**, ed. 4.1. Allured Publishing Corporation: Illinois, 2017, 809 p.

AGRAWAL, P. K.; AGARWAL, S. K.; RASTOGI, R. P.; OSTERDAHAL, B. G. “Dihydroflavanonols from *Cedrus deodara*, a ¹³C NMR study”. *Journal of Med. Plant Res.* 43: 82-85, 1981.

AGUIAR, A. C. C.; DA ROCHA, E. M. M.; DE SOUZA, N. B.; FRANÇA, T. C. C.; KRETTLI, A. U. “New approaches in antimalarial drug discovery and development: A Review”. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 107: 831–845, 2012.

AGUIAR, A. C. C.; PANCIERA, M.; SANTOS, E. F. S. DOS; SINGH, M. K.; GARCIA, M. L.; DE SOUZA, G. E.; NAKABASHI, M.; COSTA, J. L.; GARCIA, C. R. S.; OLIVA, G.; CORREIA, C. R. D.; GUIDO, R. V. C. “Discovery of marinoquinolines as potent and fast-acting *Plasmodium falciparum* inhibitors with in vivo activity”. *J. Med. Chem.*, 61: 5547–5568, 2018.

AHN, E. K.; OH, J. S. “Lupenone isolated from *Adenophora triphylla* var. *japonica* extract inhibits adipogenic differentiation through the Downregulation of PPAR γ in 3T3-L1 cells”. *Phytother. Res.*, 27: 761-766, 2012.

AL-MAHARIK, N. “Isolation of naturally occurring novel isoflavonoids: an update”. *Nat. Prod. Reports*, 36: 1156-1195, 2019.

ANDRADE-NETO, V. F. DE.; GOULART, M. O. F.; DA SILVA, J. F.; DA SILVA, M. J.; PINTO, M. D.; PINTO, A.V.; ZALIS, M. G.; CARVALHO, L. H.; KRETTLI, A. U. “Antimalarial activity of phenazines from lapachol, beta-lapachone and its derivatives against *Plasmodium falciparum* in vitro and *Plasmodium berghei* in vivo”. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 14: 1145–1149, 2004.

APISANTIYAKOM, S.; KITTAKOOP, P.; MANYUM, T.; KIRTIKARA, K.; BREMNER, J. B.; THEBTARANONTH, Y. “Novel biologically active bibenzyls from *Bauhinia saccocalyx* Pierre”. *Chem.Biodivers.*, 1: 1694–1701, 2004.

ARIEY, F.; WITKOWSKI, B.; AMARATUNGA, C.; BEGHAIN, J.; LANGLOIS, A. C.; KHIM, N.; KIM, S.; DURU, V.; BOUCHIER, C.; MA, L.; LIM, P.; LEANG, R.; DUONG, S.; SRENG, S.; SUON, S.; CHUOR, C. M.; BOUT, D. M.; MÉNARD, S.; ROGERS, W. O.; GENTON, B.; FANDEUR, T.; MIOTTO, O.; RINGWALD, P.; BRAS, J. L.; BERRY, A.; BARALE, J. C.; FAIRHUST, R. M.; BENOIT-VICAL, F.; MERCEREAU-PUIJALON, O.; MÉNARD, D. “A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malária”. *Nature*, 505: 50-55, 2014.

ATTIOUA, B.; LAGNIKA, L.; YEO, D.; ANTHEAUME, C; KAISER, M.; WENIGER, B.; LOBSTEIN, A.; VONTHRON-SÉNÉCHAU, C. “In vitro antiplasmodial and antileishmanial activities of flavonoids from *Anogeissus leiocarpus* (combretaceae)”. *Internat. Journal of Pharmac. Sciences Review and Res.*, 11: 1-6, 2011.

- AVILÁN, L.; GUALDRÓN-LÓPEZ, M.; QUIÑONES, W.; GONZÁLEZ-GONZÁLEZ, L.; HANNAERT, V.; MICHELS, P. A.; CONCEPCIÓN, J. L. “Enolase: a key player in the metabolism and a probable virulence factor of trypanosomatid parasites - perspectives for its use as a therapeutic target”. *Enzyme Res.*, 1-14, 2011.
- AYRES, M. C. C. A.; ESCÓRCIO, S. P.; DA COSTA, D. A.; CHAVES, M. H.; VIEIRA JÚNIOR, G. M.; CAVALHEIRO, A. J. “Constituintes químicos das folhas de *Qualea grandiflora*: atribuição dos dados de RMN de dois flavonoides glicosilados acilados diastereoisoméricos”. *Quim. Nova*, 31: 1481-1484, 2008.
- BARNABA C.; DELLACASA, E.; NICOLINI, G.; NARDIN, T.; MALACARNE, M.; LARCHER R.; “Free and glycosylated simple phenol profiling in Apulian Italian wines”. *Food Chemistry*, 206: 260-266, 2016.
- BELDJOUDI, N.; MAMBU, L.; LABAÏED, M.; GRELLIER, P.; RAMANITRAHASIMBOLA, D.; RASOANAIVO, P.; MARTIN, M. T.; FRAPPIER, F. “Flavonoids from *Dalbergia louvelii* and their antiplasmodial activity”. *J. Nat. Prod.*, 66: 1447–1450, 2003.
- BIRTH, D.; KAO, W. C.; HUNTE, C. “Structural analysis of atovaquone-inhibited cytochrome *bc1* complex reveals the molecular basis of antimalarial drug action”. *Nature Commun.*, 5: 1-11, 2014.
- BONIFACE, P. K.; FERREIRA, E. I.; “Flavonoids as efficient scaffolds: Recent trends for malaria, leishmaniasis, Chagas disease, and dengue”. *Phytotherapy Research.*, 33: 1–45, 2019.
- BRADY, R. L.; CAMERON, A. “Structure-based approaches to the development of novel anti-malarials”. *Curr. Drug Targets*, 5: 137–149, 2004.
- BUAKAEW, W.; PANKLA S. R.; NOYSANG, C.; THONGSRI, Y.; POTUP, P.; NUENGCHAMNONG, N.; SUPHROM, N.; USUWANTHIM, K. “Phytochemical constituents of *Citrus hystrix* DC. leaves attenuate inflammation via NF-κB signaling and NLRP3 inflammasome activity in macrophages”. *Biomol.*, 11: 105-117, 2021.
- BUZATTI, R. S. DE O.; CHICATA, F. S. L.; LOVATO, M. B. “Transferability of microsatellite markers across six *Dalbergia* (Fabaceae) species and their characterization for *Dalbergia miscolobium*”. *Biochem. Syst. Ecol.*, 69: 161 – 165, 2016.
- BVSMS, 2020. Guia de tratamento da malária no Brasil [recurso eletrônico]. Ministério da saúde. Secretaria de vigilância em saúde. Departamento de imunização e doenças transmissíveis, Brasília – DF, 2020. Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_tratamento_malaria_brasil.pdf>. Acesso em junho de 2022.
- CARVALHO, A. A.; SANTOS, L. R.; FREITAS, J. S.; CHAVES, M. H. “Isoflavonoides da tribo Dalbergiaceae: uma contribuição quimiosistemática para a subfamília Papilionoideae”. *Quim. Nova*, 43: 1294-1311, 2020.
- CHAN, M.; TAN, D. S. H.; SIM, T. S. “*Plasmodium falciparum* pyruvate kinase as a novel target for antimalarial drug-screening”. *Travel Med. and Infect. Dis.*, 5: 125-131, 2007.

CHUGH, M.; SCHEURER, C.; SAX, S.; BILSLAND, E.; VAN SCHALKWYK, D. A.; WICHT, K.J.; HOFMANN, N.; SHARMA, A.; BASHYAM, S.; SINGH, S.; OLIVER, S. G.; EGAN, T. J.; MALHOTRA, P.; SUTHERLAND, C. J.; BECK, H. P.; WITTLIN, S.; SPANGENBERG, T.; DING, X. C. "Identification and Deconvolution of cross-resistance signals from antimalarial compounds using multidrug-resistant *Plasmodium falciparum* strains". *Antimicrob. Agents Chemother.*, 59: 1110–1118, 2015.

CLAUDINO, V. D.; DA SILVA, K. C.; FILHO, V. C.; YUNES, R. A.; MONACHE, F. D.; GIMÉNEZ, A.; SALAMANCA, E.; GUTIERREZ-YAPU, D.; MALHEIROS, A. "Drimanes from *Drimys brasiliensis* with leishmanicidal and antimalarial activity". *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 108: 140–144, 2013.

CORDEIRO, T. DE M.; BORGHETTI, F.; CHARNEAU, S. "Brazilian cerrado *Qualea grandiflora* Mart. leaves exhibit antiplasmodial and trypanocidal activities *in vitro*". *Pharmacogn. Mag.*, 52: 668-672, 2017.

CORRÊA, D. S.; TEMPONE, A. G.; REIMÃO, J. Q.; TANIWAKI, N. N.; ROMOFF, P.; FÁVERO, O. A.; SARTORELLI, P.; MECCHI, M. C.; LAGO, J. H. "Anti-leishmanial and anti-trypanosomal potential of polygodial isolated from stem barks of *Drimys brasiliensis* Miers (Winteraceae)". *Parasitol. Res.* 109: 231–236, 2011.

DAS, S.; SHEVADE, S.; LACOUNT, D. J.; JARORI, G. K. "*Plasmodium falciparum* enolase complements yeast enolase functions and associates with the parasite food vacuole". *Mol. Biochem. Parasitol.*, 179: 8–17, 2011.

DE SOUZA, N. B.; DE ANDRADE, I. M.; CARNEIRO, P. F.; JARDIM, G. A. M.; DE MELO, I. M. M.; DA SILVA JÚNIOR, E. N.; KRETTLI, A. U. "Blood shizonticidal activities of phenazines and naphthoquinoidal compounds against *Plasmodium falciparum* *in vitro* and in mice malaria studies". *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 109: 546–552, 2014.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**, ed. 3. John Wiley Sons: Cichester, 2009, 539 p.

DIAS, D. A.; URBAN, S.; ROESSNER, U. "A historical overview of natural products in drug discovery". *Metabolites*, 2: 303–336, 2012.

DÍAZ, F.; MEDINA, J. D. "Furanonaphthoquinones from *Tabebuia ochracea* ssp. *neochrysa*". *J. Nat. Prod.*, 59: 423–424, 1996.

DUKER-ESHUN, G.; JAROSZEWSKI, J. W.; ASOMANING, W. A.; OPPONG-BOACHIE, F.; CHRISTENSEN, S. B. "Antiplasmodial Constituents of *Cajanus cajan*". *Phytother. Res.*, 18: 128–130, 2004.

ENGEMANN, A.; HÜBNER, F.; RZEPPA, S.; HUMPF, H-U. "Intestinal metabolism of two A-type procyanidins using the pig cecum model: detailed structure elucidation of unknown catabolites with fourier transform mass spectrometry (FTMS)". *J. Agric. Food Chem.*, 60: 749-757, 2012.

FERNÁNDEZ-ÁLVARO, E.; HONG, W. D.; NIXON, G. L.; O'NEILL, P. M.; CALDERÓN, F. "Antimalarial chemotherapy: natural product inspired development of

preclinical and clinical candidates with diverse mechanisms of action". *J. Med. Chem.*, 59: 5587–5603, 2016.

FETNI, S.; BERTELLA, N.; OUAHAB, A.; "LC-DAD/ESI-MS/MS characterization of phenolic constituents in *Rosa canina* L. and its protective effect in cells". *Biom. Chrom.*, 34: 1-17, 2020.

GANESH, D.; FUEHRER, H. P.; STARZENGRÜBER, P.; SWOBODA, P.; KHAN, W. A.; REISMANN, J. A. B.; MUELLER, M. S. K.; CHIBA, P.; NOEDL, H. "Antiplasmodial activity of flavonol quercetin and its analogues in *Plasmodium falciparum*: evidence from clinical isolates in Bangladesh and standardized parasite clones". *Parasitol. Res.*, 110: 2289-2295, 2012.

GASPI, F. O. G.; FOGLIO, M. A.; CARVALHO, J. E.; MORENO, R. A. "Pharmacological activities investigation of crude extracts and fractions from *Qualea grandiflora* Mart.". *J. Ethnopharmacol.*, 107: 19-24, 2006.

GHOSH, A. K.; COPPENS, I.; GARDSVOLL, H.; PLOUG, M.; JACOBS-LORENA, M. "Plasmodium ookinetes coopt mammalian plasminogen to invade the mosquito midgut". *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 108: 17153–17158, 2011.

GOODMAN CD, MCFADDEN GI. "Targeting apicoplasts in malaria parasites." *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 17:167–177, 2013.

GOMES, M. R. F.; SCHUH, R. S. JACQUES, A. L. B.; DORNELES, G. G.; MONTANHA, J.; ROEHE, P. M. BORDIGNON, S.; DALLEGRAVE, E.; LEAL, M. B.; LIMBERGER, R. P. "Biological assessment (antiviral and antioxidant) and acute toxicity of essential oils from *Drimys angustifolia* and *D. brasiliensis*". *Braz. J. of Pharm.*, 23: 284–290, 2013.

GONÇALVES, G. E. G.; MORAIS, T. R.; GOMES, K. DE S.; COSTA-SILVA, T. A.; TEMPONE, A. G.; LAGO, J. H. G.; CASELI, L. "Antitrypanosomal activity of *epi*-polugodial from *Drimys brasiliensis* and its effects in cellular membrane models at the air-water interface". *Bioorg. Chem.* 84: 186–191, 2019.

GUILLARME, D.; VEUTHEY, J. L. "State-of-the art of (UHP)LC-MS(-MS) techniques and their practical application". *J. Chromatogr. A.* 1292: 1–5, 2013.

HERNÁNDEZ-ROMANO, J.; RODRÍGUEZ, M. H.; PANDO, V.; TORRES-MONZÓN, J. A.; ALVARADO-DELGADO, A.; LECONA VALERA, A. N.; RAMOS, R. A.; MARTÍNEZ-BARNETCHE, J.; RODRÍGUEZ, M. C. "Conserved peptide sequences bind to actin and enolase on the surface of *Plasmodium berghei* ookinetes". *Parasitology*, 138: 1341–1353, 2011.

HUANG, C.; XU, Q. M.; CHEN, C.; SONG, C. W.; XU, Y.; XIANG, Y.; FENG, Y.; OUYANG, H.; ZHANG, Y.; JIANG, H. "The rapid discovery and identification of physalins in the calyx of *Physalis alkekengi* L. var. *franchetii* (Mast.) Makino using ultra high performance liquid chromatography-quadrupole time of flight tandem mass spectrometry together with a novel three-step data mining strategy". *J. Chromatogr. A.* 1361: 139–152, 2014.

KANG J. G.; HICK, L. A.; PRICE, W. E. "A fragmentation study of isoflavones in negative electrospray ionization by MSⁿ ion trap mass spectrometry and triple quadrupole mass spectrometry". *Rapid Comm. in Mass Spectrom.*, 21: 857-868, 2007.

- KIEHLMANN, E.; EDMOND, P. M. "Isomerization of dihydroquercetin". *Journal of Nat. Prod.*, 58: 450-455, 1995.
- KLINK, C. A.; MACHADO, R, B. A. "Conservação do cerrado brasileiro". *Megadiversidade* 1: 147-155, 2005.
- KONING-WARD, T. F.; GILSON, P. R.; CRABB, B. S. "Advances in molecular genetic systems in malaria". *Nature reviews*, 13: 373-387, 2015.
- KRAFT, C.; JENETT-SIEMS, K.; SIEMS, K.; GUPTA, M. P.; BIENZLE, U.; EICH, E. "Antiplasmodial activity of isoflavones from *Andira inermis*". *Journal of Ethnop.*, 73: 131-135, 2000.
- LAGHARI, A. H.; MEMON, S.; NEFOLAR, A.; KHAN, K. M. "*Alhagi maurorum*: A convenient source of lupeol". *Ind. Crops and Prod.*, 34: 1141-1145, 2011.
- LALEL, H. J. D.; SINGH, Z.; TAN, S. C. "Glycosidically-bound aroma volatile compounds in the skin and pulp of 'Kensington Pride' mango fruit at different stages of maturity". *Postharv. Biol. and Techn.* 29: 205-218, 2003.
- LIFONGO, L. L.; SIMOBEN, C. V.; NTIE-KANG, F.; BABIAKA, S. B.; JUDSON, P. N. "A bioactivity versus ethnobotanical survey of medicinal plants from Nigeria, West Africa". *Nat. Prod. Bioprospect.*, 4:1-19, 2014.
- LIMA, T. A.; PINTO, R. J. R.; EDDIE, L.; PINTO, A. DE S. "Florística e estrutura da vegetação arbustivo-arbórea em uma área de cerrado rupestre no Parque Estadual da Serra de Caldas Novas, Goiás". *Biota Neotropica*, 10: 159-166, 2010, Instituto Virtual da Biodiversidade Campinas, Brasil.
- LÔBO, L. T.; CASTRO, K. C. F.; ARRUDA, M. S. P.; DA SILVA, M. N.; ARRUDA, A. C.; MÜLLER, A. H.; ARRUDA, G. M. S. P.; SANTOS, A. S. "Potencial alelopático de catequinas de *Tachigali myrmecophyla* (leguminosae)". *Quim. Nova*, 31: 493-497, 2008.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras – Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Editora Plantarum, Nova Odessa – São Paulo, 1992, 368 p.
- LÜLLMANN, H.; MOHR, K.; HEIN, L. **Farmacologia: texto e atlas**. 7ª ed. Editora Artmed, Porto Alegre, 2017, 416 p.
- MAEDA, T.; SAITO, T.; HARB, O. S.; ROOS, D. S.; TAKEO, S.; SUZUKI, H.; TSUBOI, T.; TAKEUCHI, T.; ASAI, T. "Pyruvate kinase type II isozyme in *Plasmodium falciparum* localizes to the apicoplast". *Parasitol Int.* 58: 101-105, 2009.
- MALUF, F. V. Estudos estruturais e de química medicinal aplicados às enzimas da via glicolítica de parasitos: enolase de *Plasmodium falciparum* e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *Trypanosoma cruzi*. São Carlos, Instituto de Física de São Carlos - USP, 2015. Tese de doutorado, 134 p.
- MANGURO, L. O. A.; OWUOR, P. O.; OCHUNG, A. A. "Isolation, characterization and biological activities of phytoconstituents from *Lonchocarpus eriocalyx* Harms leaves". *Trends Phytochem. Res.* 2:135-146, 2018.

- MECCHI, M. C.; LAGO, J. H. G. "Chemical constituents derived from *Drimys brasiliensis* Miers (Winteraceae)". *Nat. Prod. Res.*, 27: 1927–1929, 2013.
- MOHAMMADI, S.; NIKKHAH, M.; NAZARI, M.; HOSSEINKHANI, S. "Design of a Coupled Bioluminescent Assay for a Recombinant Pyruvate Kinase from a Thermophilic *Geobacillus*". *Photochem. Photobiol.* 87: 1338–1345, 2011.
- MOSMANN, T. "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays". *J. Immunol. Methods* 65: 55–63, 1983.
- MUKHERJEE A, SADHUKHAN G. C. "Anti-malarial drug design by targeting apicoplasts: new perspectives". *Journal of Pharmacopuncture.*, 19:7–15, 2016.
- MUÑOZ, V.; SAUVAIN, M.; BOURDY, G.; CALLAPA, J.; BERGERON, S.; ROJAS, I.; BRAVO, J. A.; BALDERRAMA, L.; ORTIZ, B.; GIMENEZ, A.; DEHARO, E. "A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach Part I. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by the Chacobo Indians". *J. Ethnopharmacol.*, 69: 127–137, 2000.
- NAVARRO, M. V. DE A. S.; GOMES DIAS, S. M.; MELLO, L. V.; DA SILVA GIOTTO, M. T.; GAVALDA, S.; BLONSKI, C.; GARRATT, R. C.; RIGDEN, D. J. "Structural flexibility in *Trypanosoma brucei* enolase revealed by X-ray crystallography and molecular dynamics". *FEBS J.*, 274: 5077–5089, 2007.
- NETO, F. C.; PILON, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. DA S.; CASTRO-GAMBOA, I. "Vochysiaceae: secondary metabolites, ethnopharmacology and pharmacological potential". *Phytochem. Ver.*, 10: 413–429, 2011.
- NETO, G. S. G.; DA COSTA, R. P.; ZANINI, C. L.; AGUIAR, A. C. C.; DE SOUZA, J. O.; DE SOUZA, G. E.; SEVERINO, R. P.; CASS, Q. B.; CRUZ, F. C.; OLIVA, G.; GUIDO, R. V. C.; DE SOUSA, L. R. F. "Chemical prospection of *Qualea grandiflora* Mart. fruit and stem extracts and their *in vitro* and *in vivo* antiplasmodial activity". *J. Braz. Chem. Soc.*, 31: 1475–1484, 2020.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. "Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010". *J. Nat. Prod.*, 75: 311–335, 2012.
- NONAKA, G. I.; GOTO, Y.; KINJO, J. E.; NOHARA, T.; NISHIOKA, I. "Tannins and related compounds - studies on the constituents of the leaves of *Thujopsis dolabrata* SIEB. et ZUCC". *Chem. Pharm. Bull.*, 35: 1105–1108, 1987.
- OLLIARO, P. L.; HAYNES, R. K.; MEUNIER, B.; YUTHAVONG, Y. "Possible modes of action of the artemisinin-type compounds". *Trends in Parasitol.*, 17: 122–126, 2001.
- OLUYORI, A. P.; NWONUMA, C.; AKPO T.; INYINBOR, A. A.; DADA, O. A.; OLADEJI, O. S.; OGUNNUPEBI, T. A. "In Vivo Antiplasmodial Potential of the Leaf, Mesocarp, and Epicarp of the *Raphia hookeri* Plant in Mice Infected with *Plasmodium berghei* NK65". *Evid. Based Complement. and Alternat. Med.*, 1–9, 2022.
- OKOKON, J. E.; ANTIA, B. S.; MOHANAKRISHNAN, D.; SAHAL, D. "Antimalarial and antiplasmodial activity of husk extract and fractions of *Zea mays*". *Pharmac. Biol.*, 55: 1394–1400, 2017.

- PAL-BHOWMICK, I.; KUMAR, N.; SHARMA, S.; COPPENS, I.; JARORI, G. K. “*Plasmodium falciparum* enolase: stage-specific expression and sub-cellular localization”. *Malar. J.*, 8: 1–16, 2009.
- PAL-BHOWMICK, I.; MEHTA, M.; COPPENS, I.; SHARMA, S.; JARORI, G. K. “Protective properties and surface localization of *Plasmodium falciparum* enolase”. *Infect. Immun.*, 75: 5500–5508, 2007.
- PAL-BHOWMICK, I.; VORA, H. K.; JARORI, G. K. “Sub-cellular localization and post-translational modifications of the *Plasmodium yoelii* enolase suggest moonlighting functions”. *Malar. J.*, 6: 45–52, 2007.
- PAL-BHOWMICK, I.; VORA, H. K.; ROY, J.; SHARMA, S.; JARORI, G. K. “Generation and characterisation of monoclonal antibodies specific to *Plasmodium falciparum* enolase”. *J. Vector Borne Dis.*, 43: 43-52, 2006.
- PANCHE, A. N.; DIWAN, A. D.; CHANDRA, S. R. “Flavonoids: an overview”. *Journal of Nutrit. Science*, 5: 1-15, 2016.
- PARTHASARATHY, S.; RAVINDRA, G.; BALARAM, H.; BALARAM, P.; MURTHY, M. R. “Structure of the *Plasmodium falciparum* triosephosphate isomerase-phosphoglycolate complex in two crystal forms: characterization of catalytic loop open and closed conformations in the ligand-bound state”. *Biochemistry*, 41: 13178–13188, 2002.
- PASCOLUTTI, M.; QUINN, R. J. “Natural products as lead structures: chemical transformations to create lead-like libraries”. *Drug Discov. Today*, 19: 215–221, 2014.
- PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à Espectroscopia**, ed. 4. Cengage Learning: Washington, 2010, 708 p.
- PRACHAYASITTIKUL, S.; SARABAN, P.; CHERDTRAKULKIAT, R.; RUCHIRAWAT, S.; PRACHAYASITTIKUL, V. “New bioactive triterpenoids and antimalarial activity of *Diospyros rubra* Lec.”. *EXCLI Journal*, 9: 1-10, 2010.
- PÉREZ, H.; DÍAZ, F.; MEDINA, J. D. “Chemical investigation and *in vitro* antimalarial activity of *Tabebuia ochracea* SSP. *neochrysantha*”. *Int. J. Pharmacogn.*, 35: 227–231, 1997.
- PICCINELLI, A. L.; SIMONE, F.; PASSI, S.; RASTRELLI, L. “Phenolic constituents and antioxidant activity of *Wendita calysina* leaves (burrito), a folk Paraguayan tea”. *J. Agric. Food Chem.* 52: 5863–5868, 2004.
- PINO, J. A.; MESA, J.; MUÑOZ, Y.; MARTÍ, M. P.; MARBOT, R. “Volatile components from mango (*Mangifera indica* L.) cultivars”. *Journal of Agric. And Foodchem.*, 53: 2213-2223, 2005.
- ROBIEN, M. A.; BOSCH, J.; BUCKNER, F. S.; VAN VOORHIS, W. C.; WORTHEY, E. A.; MYLER, P.; MEHLIN, C.; BONI, E. E.; KALYUZHNIY, O.; ANDERSON, L.; LAURICELLA, A.; GUIDE, S.; LUFT, J. R.; DE TITTA, G.; CARUTHERS, J. M.; HODGSON, K. O.; SOLTIS, M.; ZUCKER, F.; VERLINDE, C. L.; MERRITT, E. A.; SCHOENFELD, L. W.; HOL, W. G. “Crystal structure of glyceraldehyde-3-phosphate

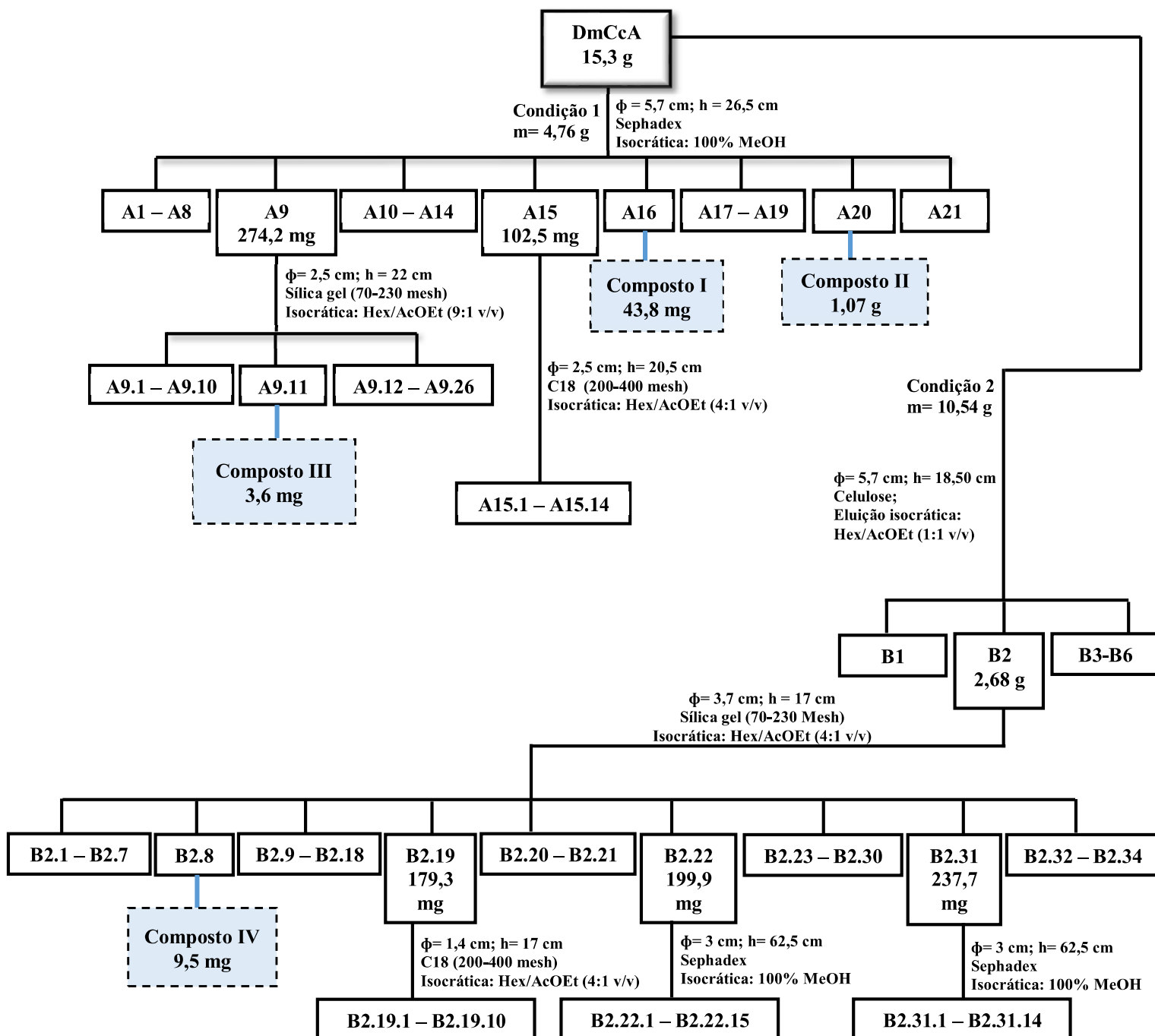
- dehydrogenase from *Plasmodium falciparum* at 2.25 Å resolution reveals intriguing extra electron density in the active site”. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.*, 62: 570–577, 2005.
- RUSH, M. D.; RUE, E. A.; WONG, A. M.; KOWALSKI, P.; GLINSKI, J. A.; BREEMEN, R. B. V. “Rapid determination of procyanidins using MALDI-ToF/ToF mass spectrometry”. *J. Agric. Food Chem.*, 66: 11355-11361, 2018.
- SAHA, S.; SHILPI, J. A.; MONDAL, H.; HOSSAIN, F.; ANISUZZMAN, M.; HASAN, M. M.; CORDELL, G. A. “Ethnomedicinal, phytochemical, and pharmacological profile of the genus *Dalbergia* L. (Fabaceae)”. *Phytopharm.*, 4: 291-346, 2013.
- SALATINO A.; FERREIRA, M. J. P.; UDULUTSCH, R. G.; PALACIOS, C. E.; SALATINO, M. L. F. “Fingerprint of cerrado species based on cork lipophilic constituents”. *Biochemical Systematics and Ecology*, 88: 1-6, 2020.
- SANNELLA, A. R.; MESSORI, L.; CASINI, A.; VINCIERI, F. F.; BILIA, A. R.; MAJORI, G.; SEVERINI, C. “Antimalarial properties of green tea”. *Biochem. and Bioph. Res. Commun.*, 353: 177-181, 2007.
- SATCHELL, J. F.; MALBY, R. L.; LUO, C. S.; ADISA, A.; ALPYUREK, A. E.; KLONIS, N.; SMITH, B. J.; TILLEY, L.; COMAN, P. M. “Structure of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Plasmodium falciparum*”. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, 61: 1213–1221, 2005.
- SHEVADE, S.; JINDAL, N.; DUTTA, S.; JARORI, G. K. “Food vacuole associated enolase in *Plasmodium* undergoes multiple post-translational modifications: evidence for atypical ubiquitination”. *PLoS One*, 8: 1-14, 2013.
- SHWE, H. H.; WIN, K. K.; MOE, T. T.; MYINT, A. A.; WIN, T. “Isolation and structural characterization of lupeol from the stem bark of *Diospyros ehretioides* Wall”. *IEEE-SEM*, 7: 140-144, 2019.
- SILVA, E. L.; MOREIRA, L. L. P. F.; CARDOSO, W. C.; KITAGAWA, R. R.; BORGES, K. B.; VIEIRA, P. C.; MORAIS, P. A. B.; BORGES, W. S. “Inhibitory activity and docking studies of cathepsin V for isoflavanoids from *Dalbergia miscolobium* Benth”. *Rev. Virtual de Quim.*, 13: 136-145, 2021.
- SILVA, J. R. DE A.; RAMOS, A. DE S.; MACHADO, M.; DE MOURA, D. F.; NETO, Z.; CANTO-CAVALHEIRO, M. M.; FIGUEIREDO, P.; DO ROSÁRIO, V. E.; AMARAL, A. C. F.; LOPES, D. “A review of antimalarial plants used in traditional medicine in communities in portuguese-speaking countries: Brazil, Mozambique, Cape Verde, Guinea-Bissau, São Tomé and Príncipe and Angola”. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 106: 142–158, 2011.
- SINGH, A.; MUKHTAR, H. M.; KAUR, H.; KAUR, L. “Investigation of antiplasmodial efficacy of lupeol and ursolic acid isolated from *Ficus benjamina* leaves extract”. *Nat. Prod. Res.*, 34: 2514-2517, 2018.
- SMILKSTEIN, M.; SRIWILAIJAROEN, N.; KELLY, J. X.; WILAIRAT, P.; RISCOE, M. “Simple and inexpensive fluorescence-based technique for high-throughput antimalarial drug screening”. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 48: 1803–1806, 2004.

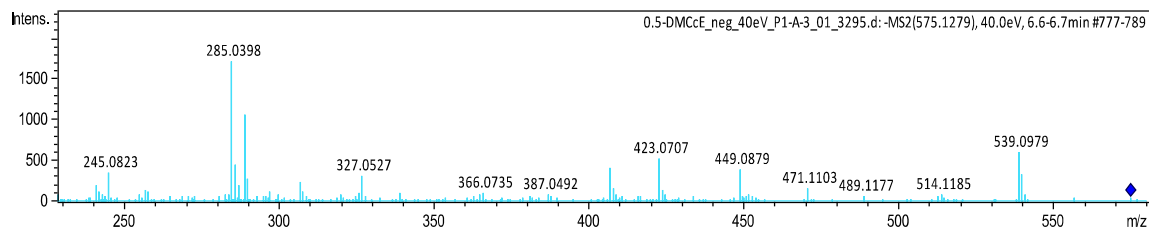
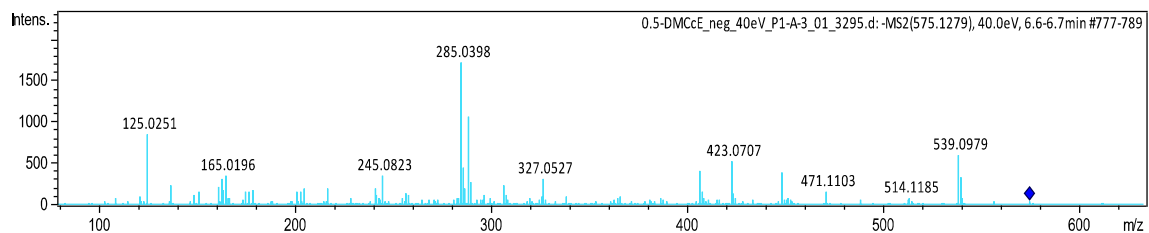
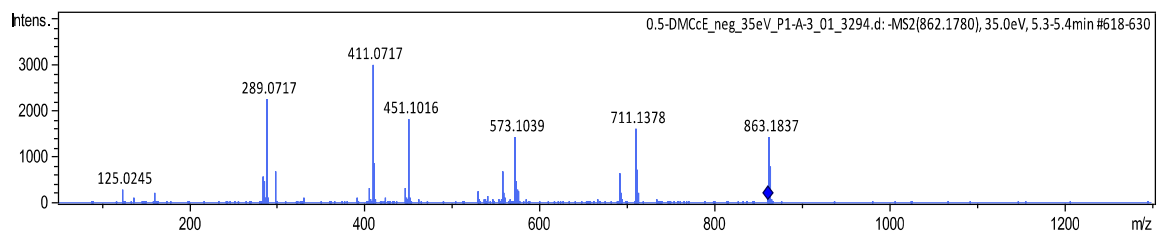
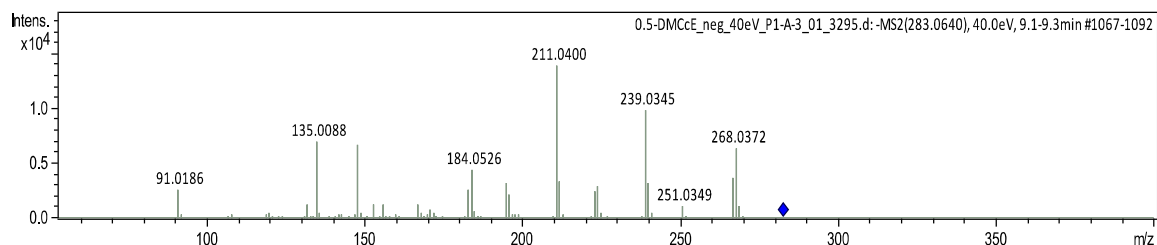
- SWIFT, R. P.; RAJARAM, K.; KEUTCHA, C.; LIU, H. B.; KWAN, B.; DZIEDZIC, A.; JEDLICKA, A. E.; PRIGGE, S. T. “The NTP generating activity of pyruvate kinase II is critical for apicoplast maintenance in *Plasmodium falciparum*”. *eLife*, 9:1-24, 2020.
- SOH, P. N.; WITKOWSKI, B.; OLAGNIER, D.; NICOLAU, M. L.; GARCIA-ALVAREZ, M. C.; BERRY, A.; BENOIT-VICAL, F. “*In vitro* and *in vivo* properties of ellagic acid in malaria treatment”. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 53: 1100–1106, 2009.
- SONGSIANG, U.; WANICH, S.; PITCHUANCHOM, S.; NETSOPA, S.; UANPORN, K.; YENJAI, C. “Bioactive constituents from the stems of *Dalbergia parviflora*”. *Fitoterapia*, 80: 427-431, 2009.
- SUÁREZ-MONTENEGRO, Z. J.; BALLESTEROS-VIVAS, D.; GALLEGO, R.; VALDÉS, A.; SÁNCHEZ-MARTÍNEZ, J. D.; PARADA-ALFONSO, F.; IBÁÑEZ, E.; CIFUENTES, A. “Neuroprotective Potential of Tamarillo (*Cyphomandra betacea*) Epicarp Extracts Obtained by Sustainable Extraction Process”. *Frontiers in Nutrition*, 8: 1-18, 2021.
- SUKSAMRARN, A.; TANACHATCHAIRATANA, T.; KANOKMEDHAKUL, S. “Antiplasmodial triterpenes from twigs of *Gardenia saxatilis*”. *Journal of Ethnoph.*, 88: 275–277, 2003.
- SZATMÁRI, Á.; MÓRICZ, A. M.; SCHWARCZINGER, I.; NAGY, J. K.; ALBERTI, Á.; POGÁNY, M.; BOZSÓ, Z. “A pattern-triggered immunity-related phenolic, acetosyringone, boosts rapid inhibition of a diverse set of plant pathogenic bacteria”. *BMC Plant Biology*, 21: 1-20, 2021.
- THE, S. N. “A review on the medicinal plant *Dalbergia odorifera* species: phytochemistry and biological activity”. *Evid.-Based Comp. and Altern. Med.*, 2017: 1-27, 2017.
- TYAGI, T.; ARGAWAL, M. “Phytochemical screening and GC-MS analysis of bioactive constituents in the ethanolic extract of *Pistia stratiotes* L. and *Eichhornia crassipes* (Mart.) solms”. *Journal of Pharm. and Phytochem.*, 6: 195-206, 2017.
- TIAN D.; YANG, Y.; YU, M.; HAN, Z-Z.; WEI, M.; ZHANG, H-W.; JIA, H-M.; ZOU, Z.-M. “Anti-inflammatory chemical constituents of *Flos Chrysanthemi Indici* determined by UPLC-MS/MS integrated with network pharmacology”. *Food and Function*, 11: 6340-6351, 2020.
- TORRES-MENDOZA, D.; GONZÁLEZ, J.; ORTEGA-BARRÍA, E.; HELLER, M. V.; CAPSON, T. L.; MCPHAIL, K.; GERWICK, W. H.; CUBILLA-RIOS, L. “Weakly antimalarial flavonol arabinofuranosides from *Calycolpus warszewiczianus*”. *Journal of Natural Products*, 69: 826–828, 2006.
- TU, Y. “The discovery of artemisinin (qinghaosu) and gifts from Chinese medicine”. *Nat. Med.*, 17: 1217–1220, 2011.
- UWIMANA, A.; LEGRAND, E.; STOKES, B. H.; NDIKUMANA, J. L. M.; WARSAME, M.; UMULISA, N.; NGAMIJE, D.; MUNYANEZA, T.; MAZARATI, J. B.; MUNGUTI, K.; CAMPAGNE, P.; CRISCUOLO, A.; ARIEY, F.; MURINDAHABI, M.; RINGWALD, P.; FIDOCK, D. A.; MBITUYUMUREMYI, A.;

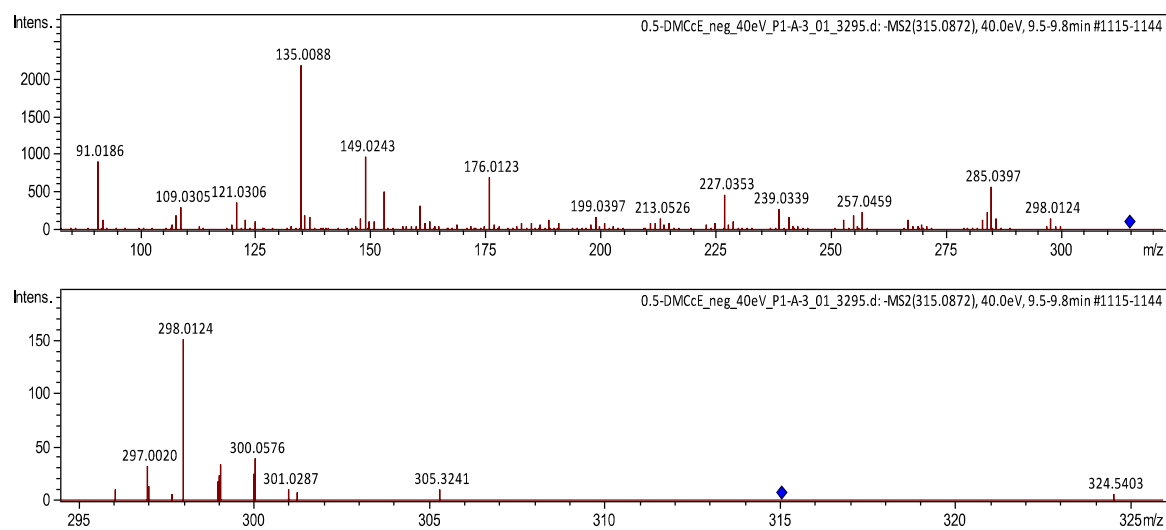
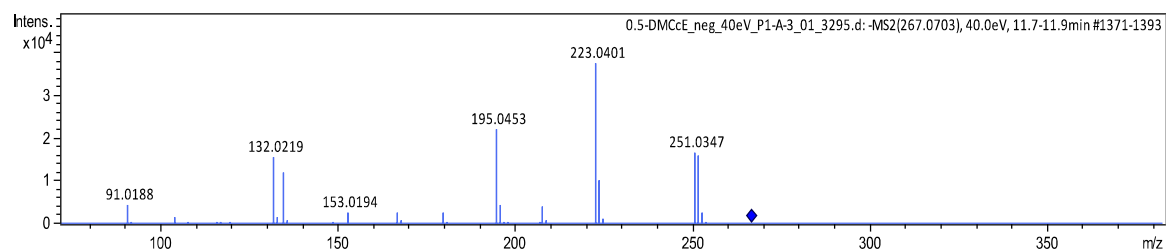
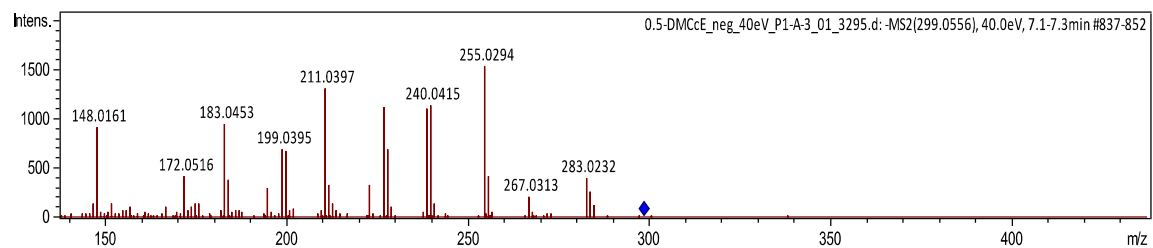
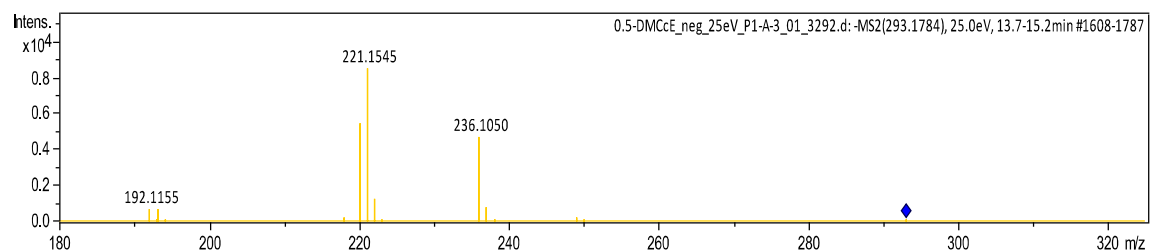
- MENARD, D. “Emergence and clonal expansion of in vitro artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* kelch13 R561H mutante parasites in Rwanda”. *Nature Medic.*, 26: 1602-1608, 2020.
- VASUDEVA, N.; VATS, M.; SHARMA, S. K.; SARDANA, S. “Chemistry and biological activities of the genus *Dalbergia* – a review”. *Phcog. Rev.* 3: 307–319, 2009.
- VEGA-RODRÍGUEZ, J.; GHOSH, A. K.; KANZOK, S. M.; DINGLASAN, R. R.; WANG, S.; BONGIO, N. J.; KALUME, D. E.; MIURA, K.; LONG, C. A.; PANDEY, A.; JACOBS LORENA, M. “Multiple pathways for *Plasmodium* ookinete invasion of the mosquito midgut. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 111: 492–500, 2014.
- VIVAS, L.; EASTON, A.; KENDRICK, H.; CAMERON, A.; LAVANDERA, J. L.; BARROS, D.; DE LAS HERAS, F. G.; BRADY, R. L.; CROFT, S. L. “*Plasmodium falciparum*: stage specific effects of a selective inhibitor of lactate dehydrogenase”. *Exp. Parasitol.*, 111: 105–114, 2005.
- VORA, H. K.; SHAIK, F. R.; PAL-BHOWMICK, I.; MOUT, R.; JARORI, G. K. “Effect of deletion of a plant like pentapeptide insert on kinetic, structural and immunological properties of enolase from *Plasmodium falciparum*”. *Arch. Biochem. Biophys.*, 485: 128-138, 2009.
- WANG, M.; ZHANG, M.; YANG, Q.; WANG, Q.; MA, B.; LI, Z.; CHENG, W.; TANG, H.; FENG S.; WANG, Z. “Metabolomic profiling of *M. speciosa* champ at different growth stages”. *Food Chem.*, 376: 1-13, 2022.
- WANG, X.; ZHOU, W.; WANG, Q.; ZHANG, Y.; LING, Y.; ZHAO, T.; ZHANG, H.; LI, P. “A novel and comprehensive strategy for quality control in complex Chinese medicine formula using UHPLC-Q-Orbitrap HRMS and UHPLC-MS/MS combined with network pharmacology analysis: Take Tangshen formula as an example”. *Journal of Chrom. B*, 1183: 1-10, 2021.
- WHO - World Health Organization. World Malaria Report, 2021. Disponível em: <<https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2021>>. Acesso em maio de 2022.
- WHO - World Health Organization. World Malaria Report, 2022. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/malaria>>. Acesso em maio de 2022.
- YANG, L.; YIN, P.; FAN, H.; XUE, Q.; LI, K.; LI, X.; SUN, L. “Response surface methodology optimization of ultrasonic-assisted extraction of *Acer truncatum* leaves for maximal phenolic yield and antioxidant activity”. *Molecules*, 22: 232-252, 2017.
- YUSUAK, S.; BALLINGTON, J.; XIE, D-Y. “HPLC-qTOF-MS/MS-based profiling of flavan-3-ols and dimeric proanthocyanidins in berries of two muscadine grape hybrids FLH 13-11 and FLH 17-66”. *Metabolites*, 8: 57-80, 2018.
- ZANI, C. L.; DE OLIVEIRA, A. C.; DE OLIVERIA, G. G. “Furanonaphthoquinones from *Tabebuia ochracea*”. *Phytochemistry*, 30: 2379-2381, 1991.
- ZHONG, W.; LI, K.; CAI, Q.; GUO, J.; YUAN, M.; WONG, Y. H.; WALKINSHAW, M. D.; FOTHERGILL-GILMORE, L. A.; MICHELS, P. A. M.; DEDON, P. C.; LESCAR, J. “Pyruvate kinase from *Plasmodium falciparum*: structural and kinetic

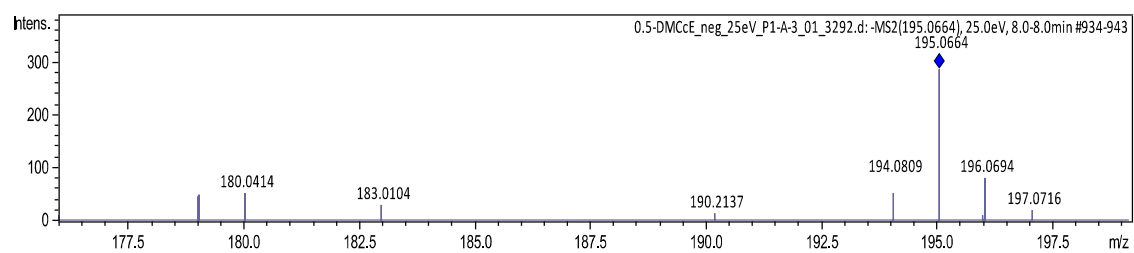
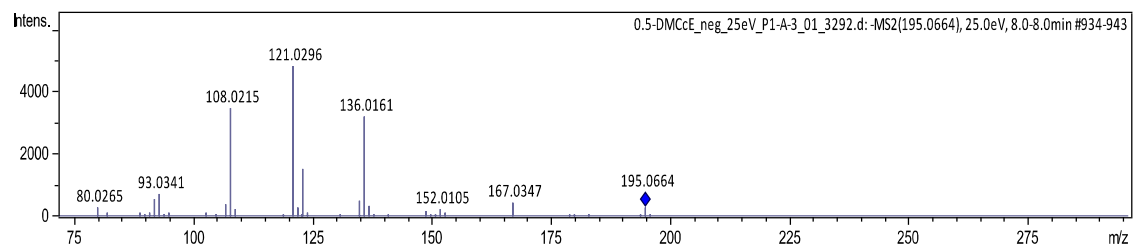
insights into the allosteric mechanism” *Biochem. and Bioph. Res. Communic.*, 532: 370-376, 2020.

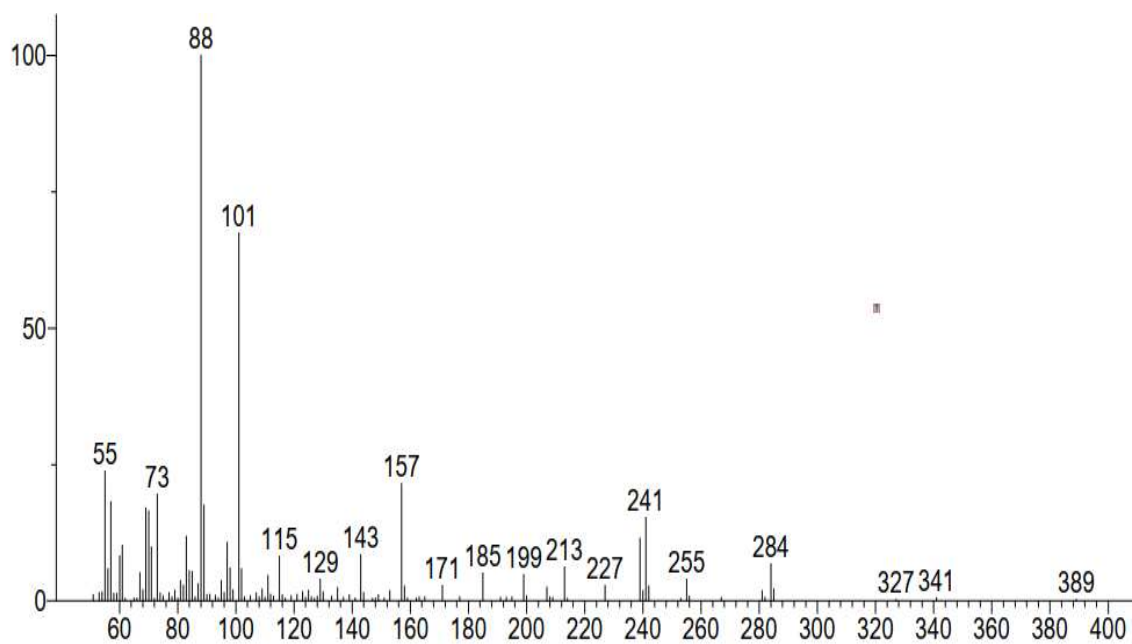
ANEXO 1 - Fluxograma geral para isolamento dos compostos I, II, III e IV



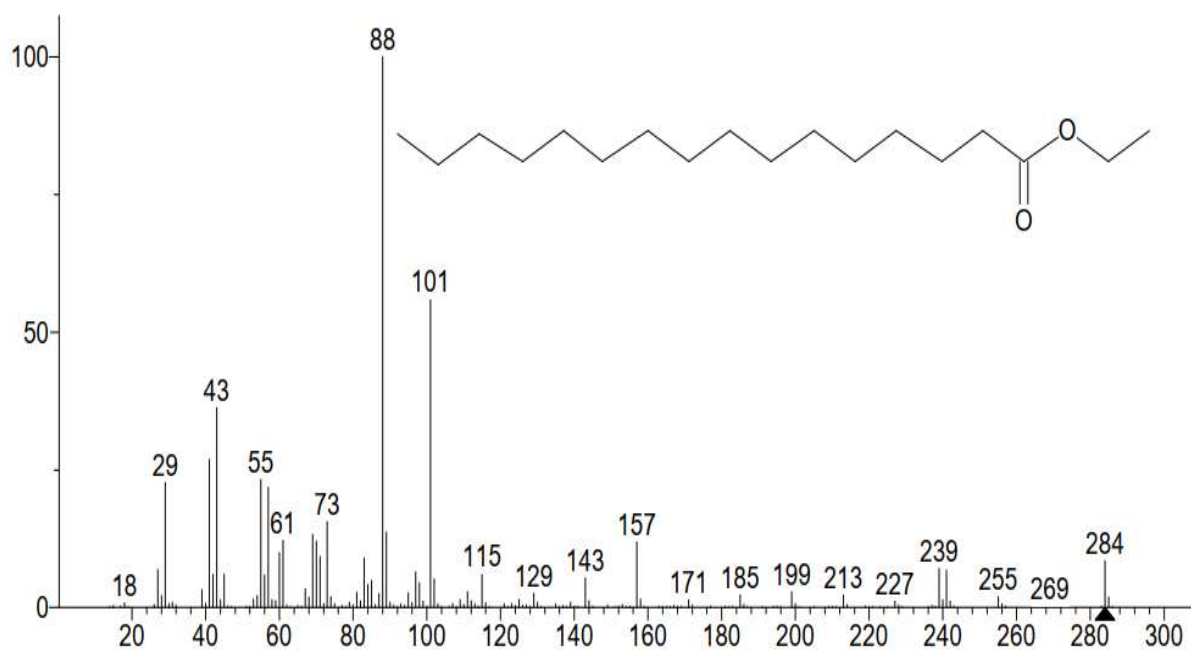
ANEXO 2 – Espectros de massas obtidos por EM/EM de alta resolução**ESPECTRO 1E (40 eV, modo negativo)****ESPECTRO 2E (35 eV, modo negativo)****ESPECTRO 3E (40 eV, modo negativo)**

ESPECTRO 4E (40 eV, modo negativo)**ESPECTRO 5E (40 eV, modo negativo)****ESPECTRO 6E (40 eV, Modo negativo)****ESPECTRO 7E (25 eV, Modo negativo)**

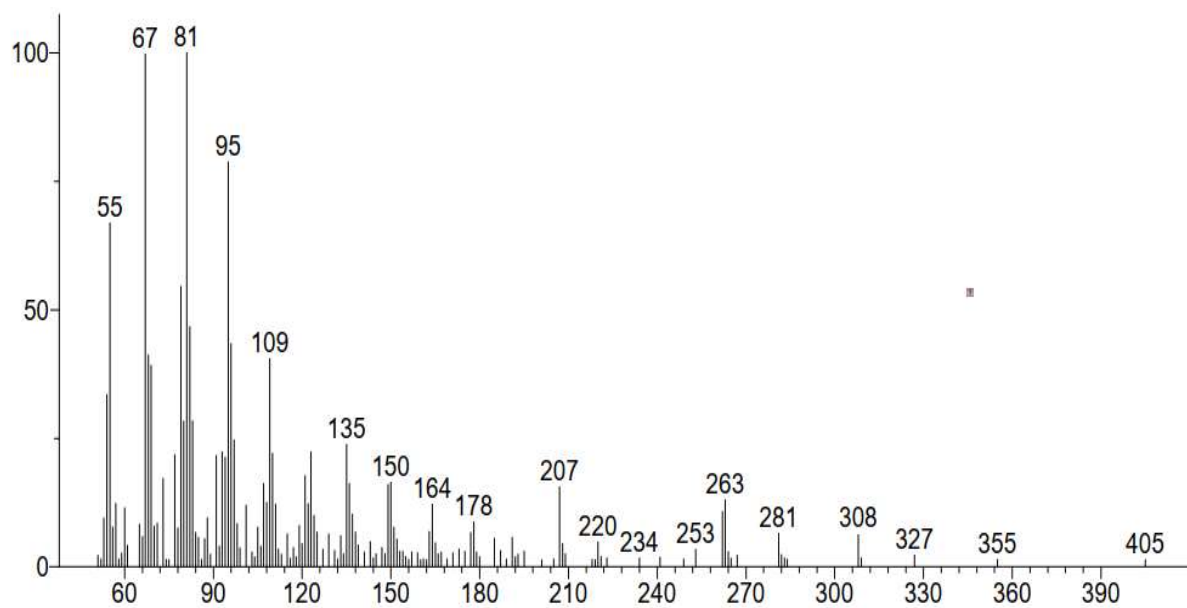
ESPECTRO 8E (40 eV, Modo negativo)

ANEXO 3 - Espectros de massas obtidos pelo experimento CG-EM

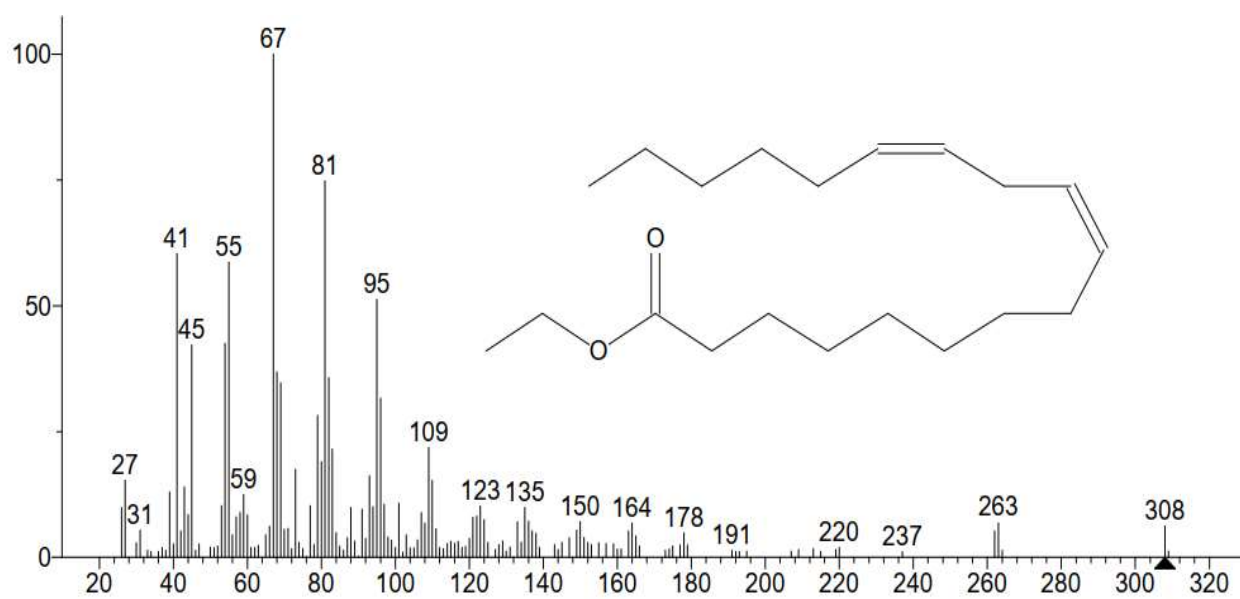
Espectro de massas obtido experimentalmente para o composto 1H.



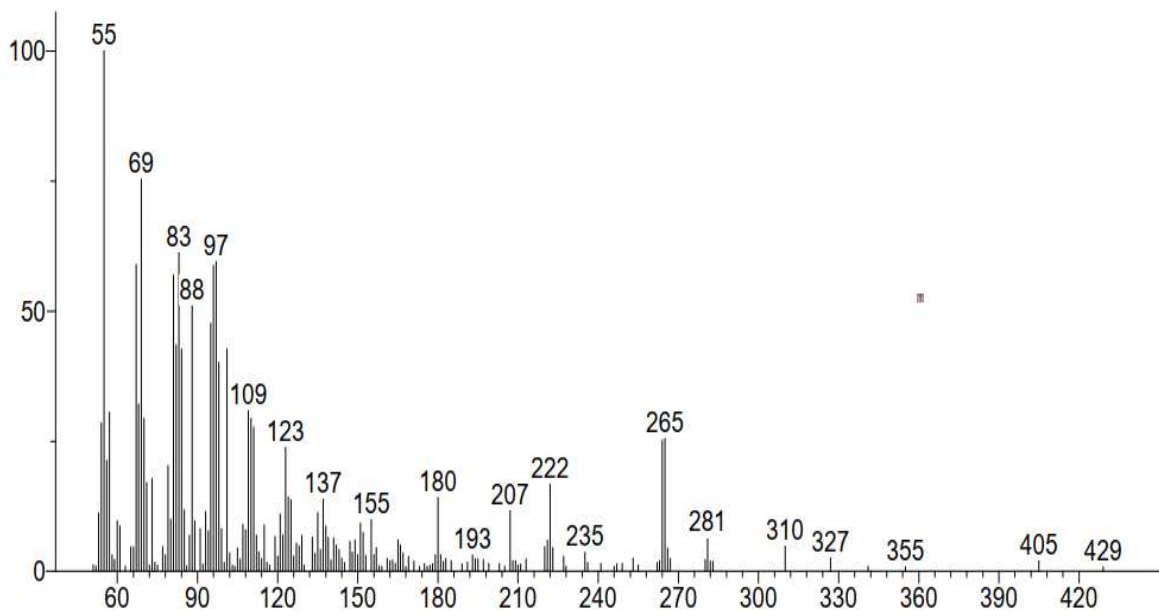
Espectro de massas sugerido pela biblioteca NIST para o composto 1H.



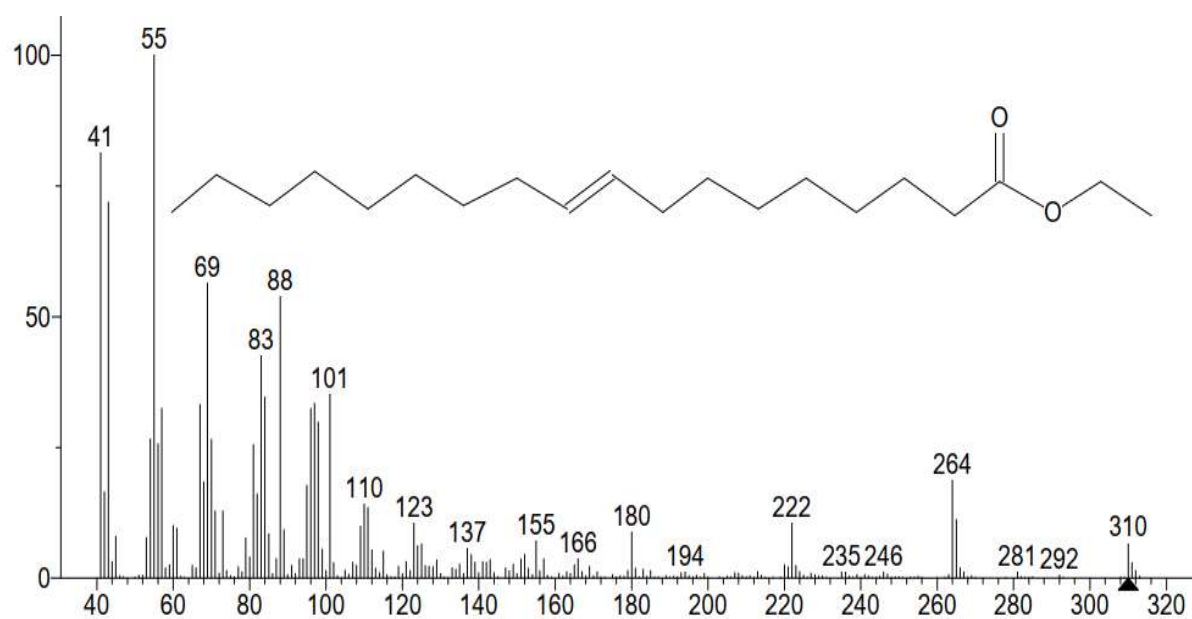
Espectro de massas obtido experimentalmente para o composto 2H.



Espectro de massas sugerido pela biblioteca NIST para o composto 2H.

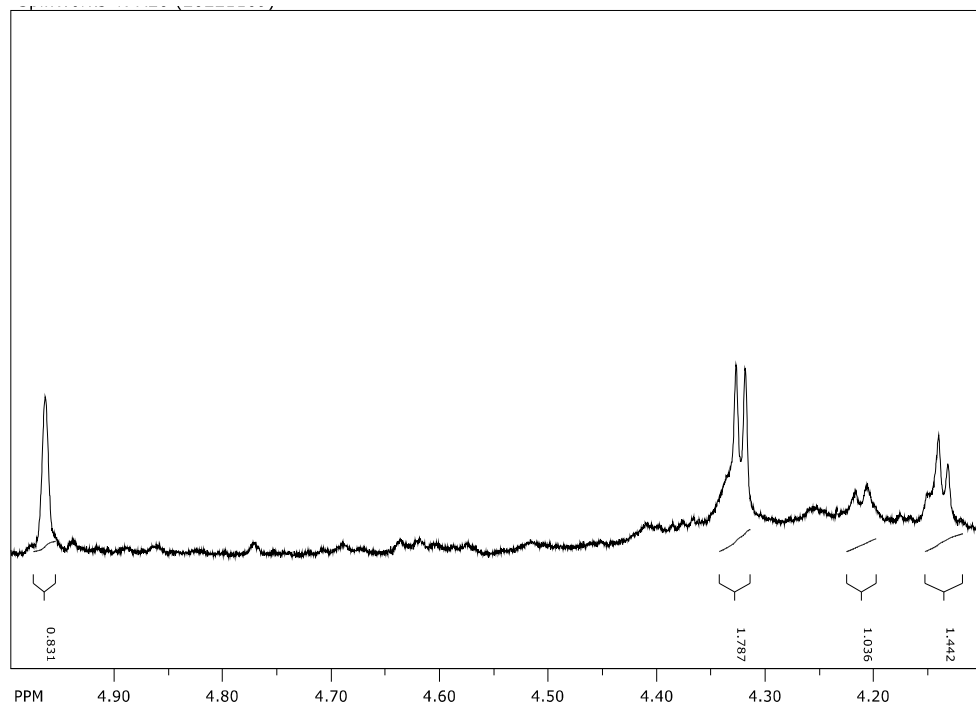


Espectro de massas obtido experimentalmente para o composto 3H.



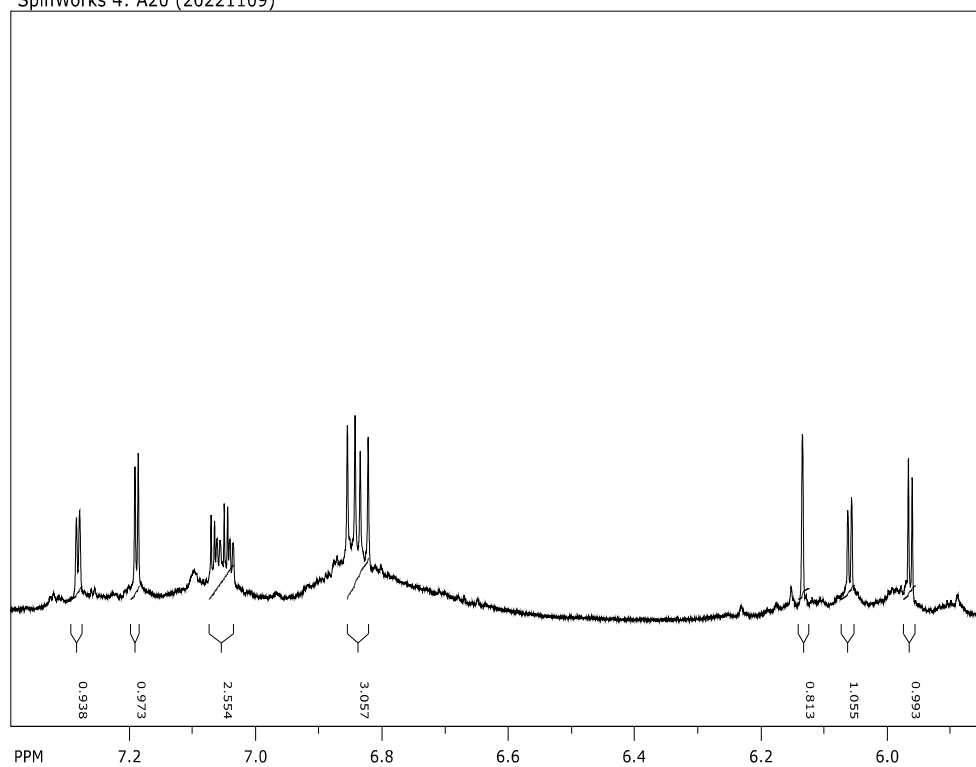
Espectro de massas sugerido pela biblioteca NIST para o composto 3H.

ANEXO 4 – Aplicações do espectro de RMN de hidrogênio da mistura de flavononols (composto II, epitaxifolina e cis-dihidroquercetagina) entre 4,0-7,5 ppm



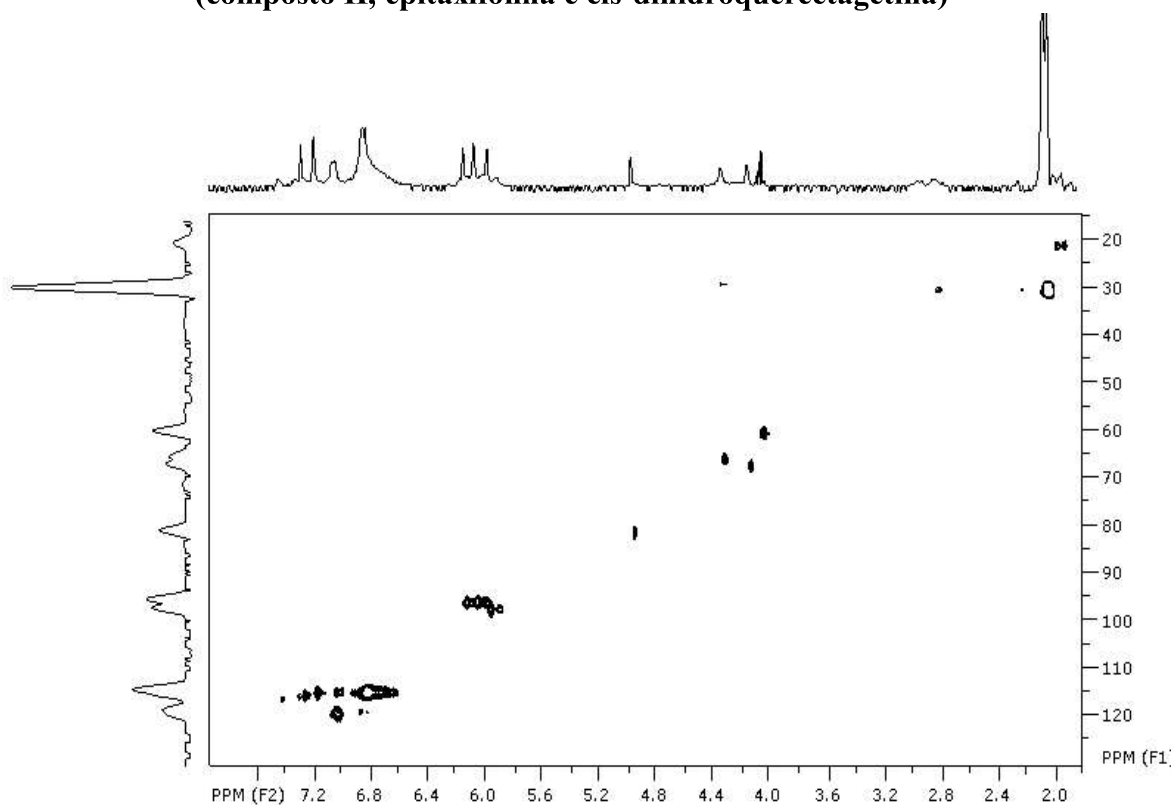
Espectro de RMN ¹H da mistura de flavononols – Ampliação entre 4,0-5,5 ppm

SpinWorks 4: A20 (20221109)

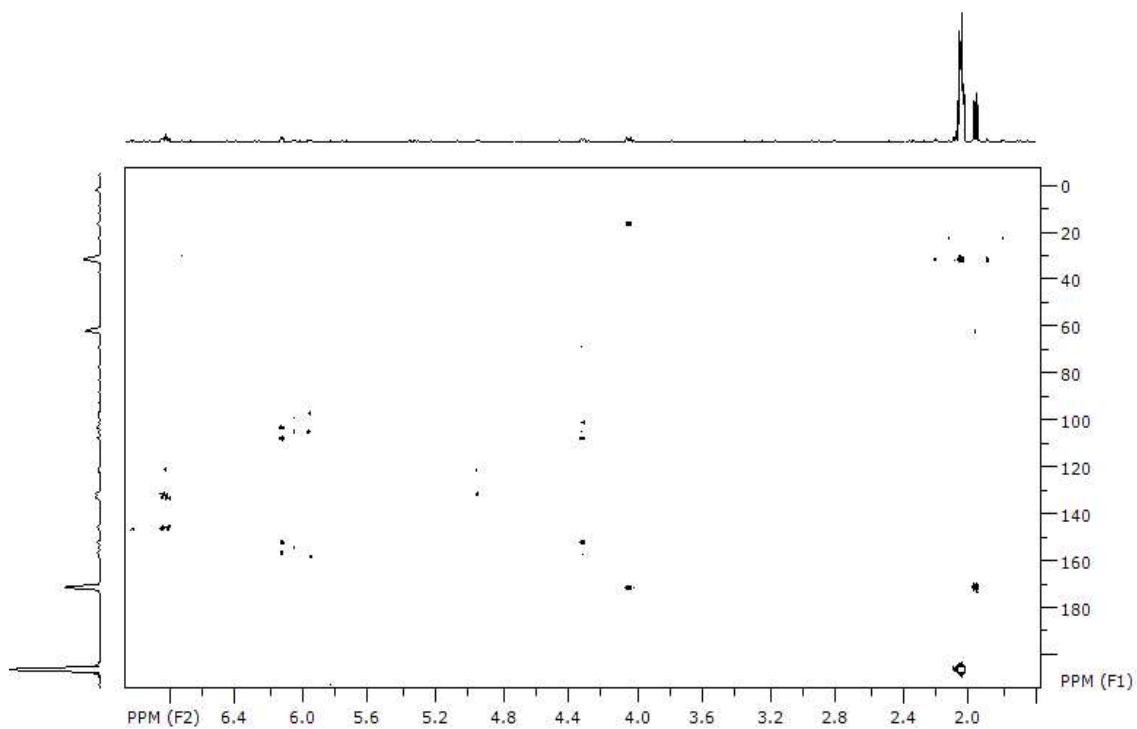


Espectro de RMN ¹H da mistura de flavononols – Ampliação entre 5,5-7,5 ppm

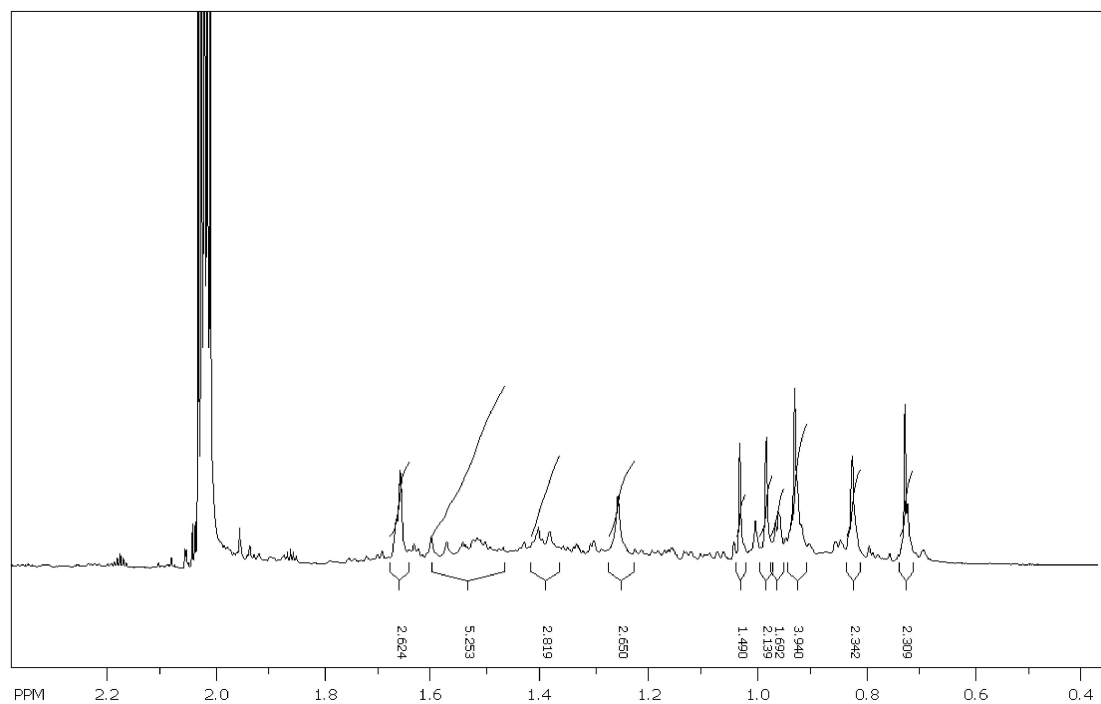
**ANEXO 5 – Mapas de contorno de HSQC e HMBC da mistura de flavononols
(composto II, epitaxifolina e cis-dihidroquercetagina)**



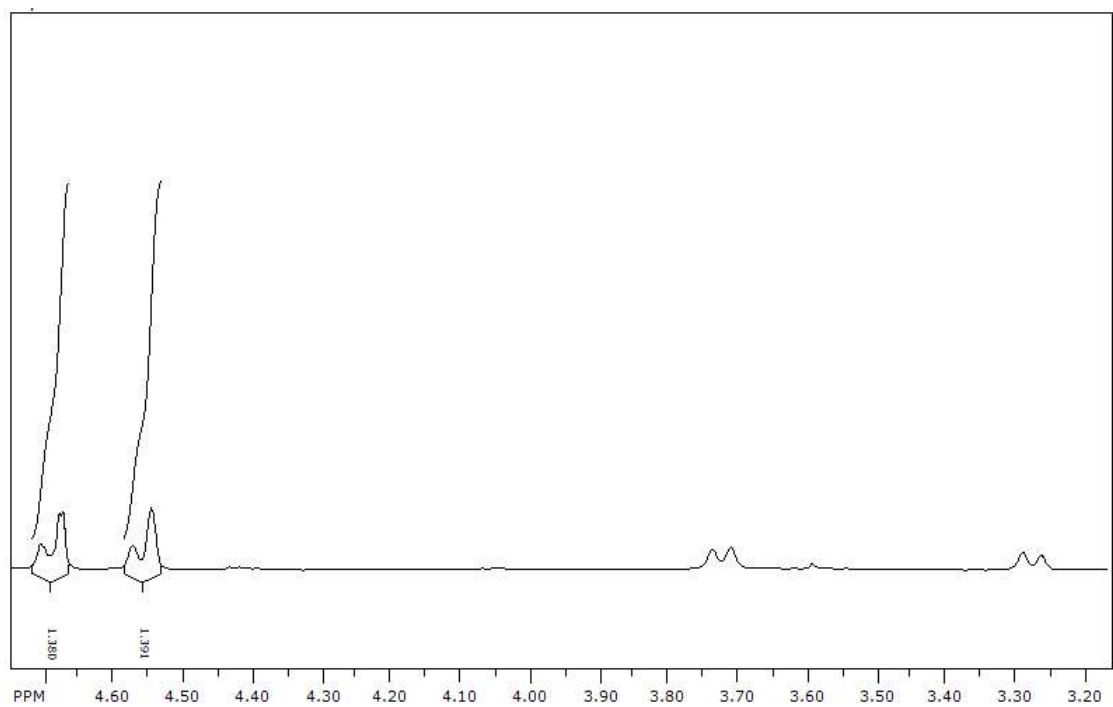
Mapa de contorno de HSQC da mistura de flavononols



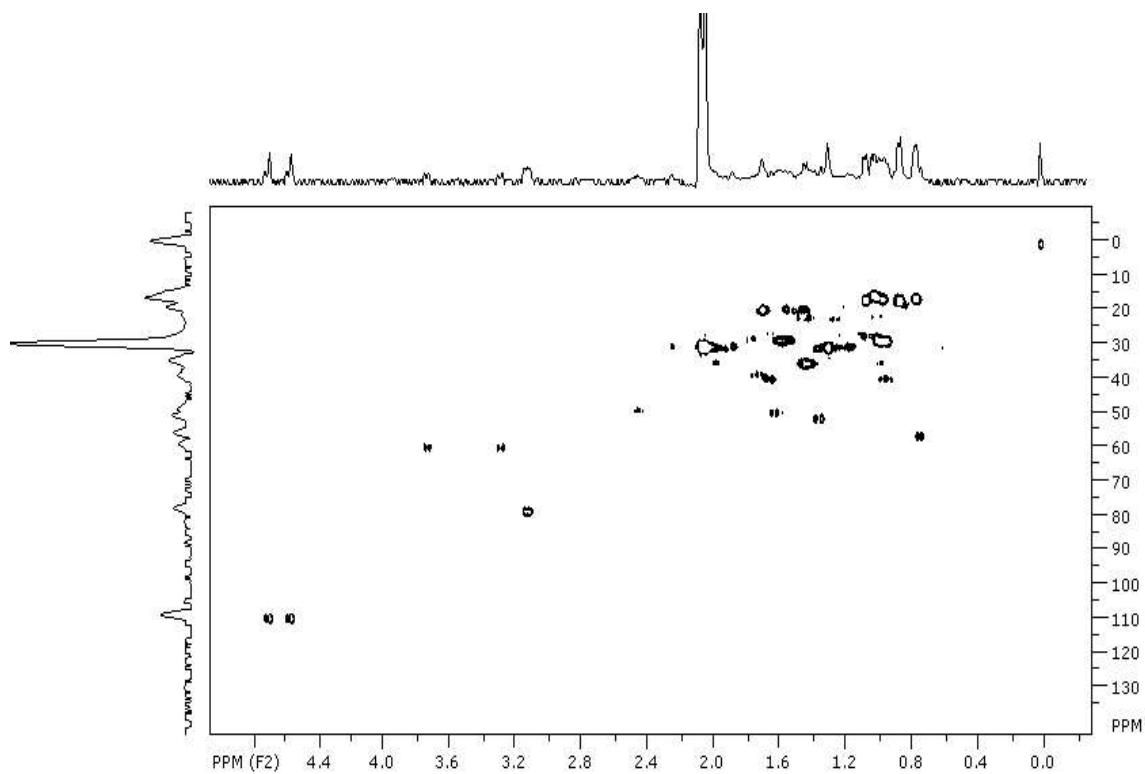
Mapa de contorno de HMBC da mistura de flavononols

ANEXO 6 – Ampliações espectro de RMN ^1H da lupenona (composto III)

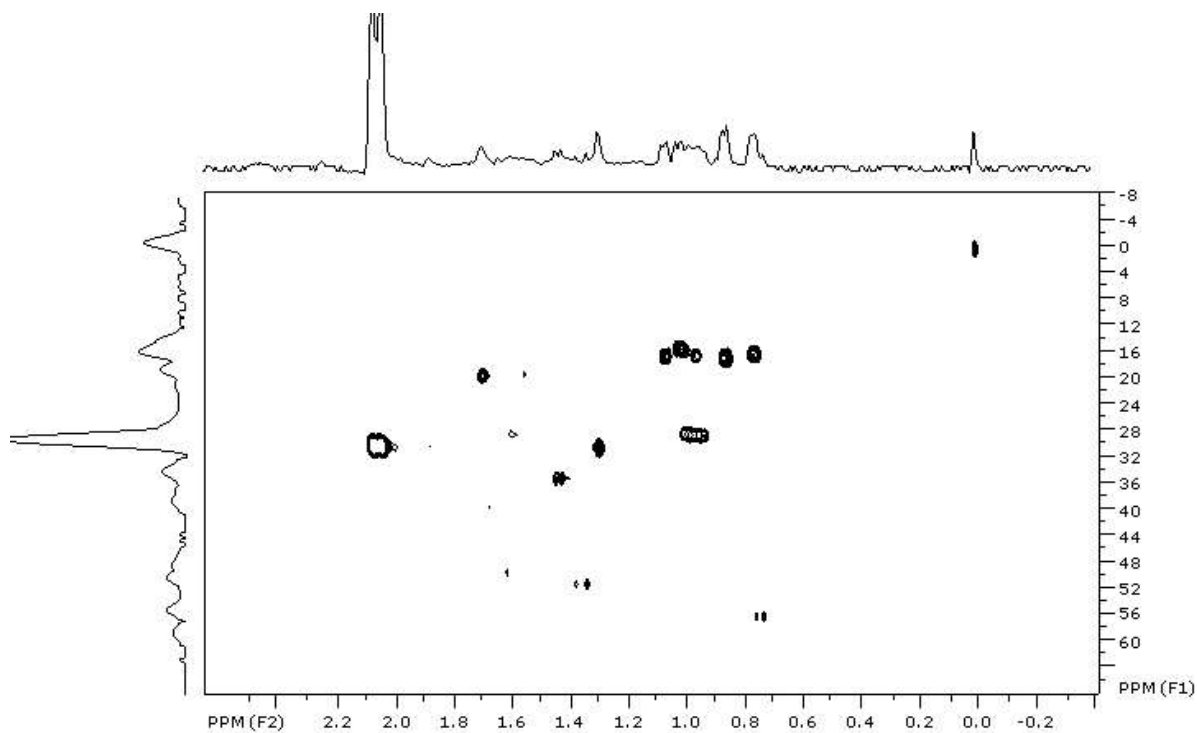
Espectro de RMN ^1H da lupenona - Ampliação entre 0,6-2,2 ppm



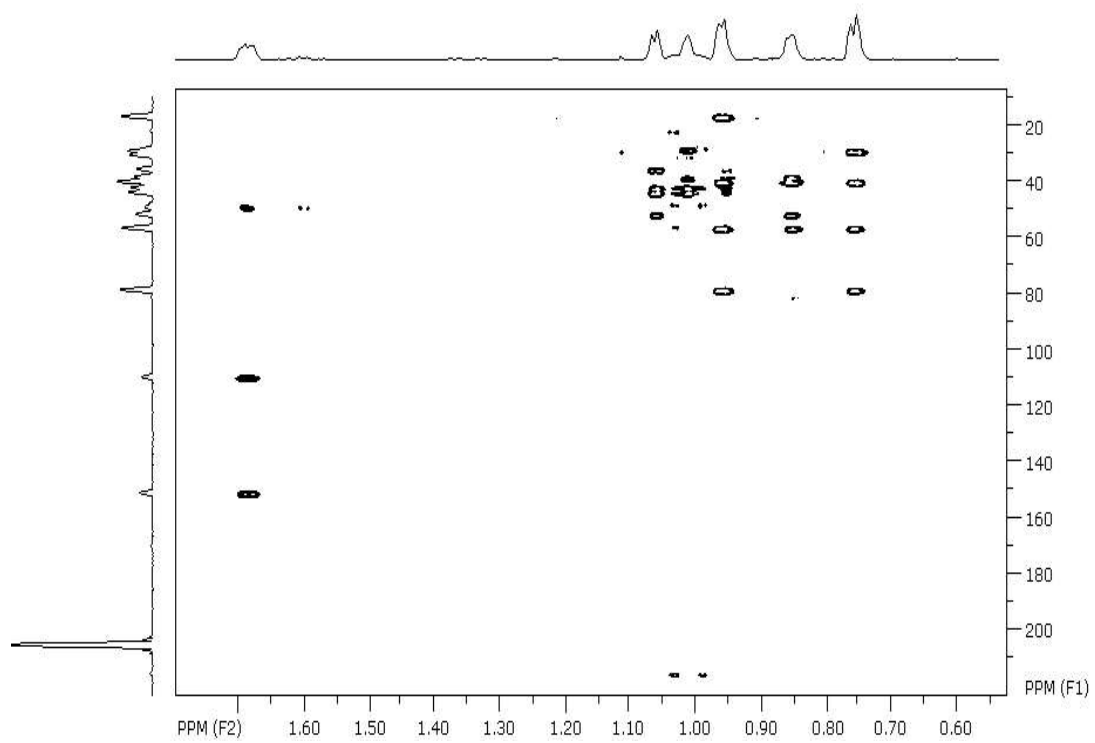
Espectro de RMN ^1H da lupenona - Ampliação entre 3,0-5,0 ppm

ANEXO 7 – Mapas de contorno HSQC e HMBC da lupenona (composto III).

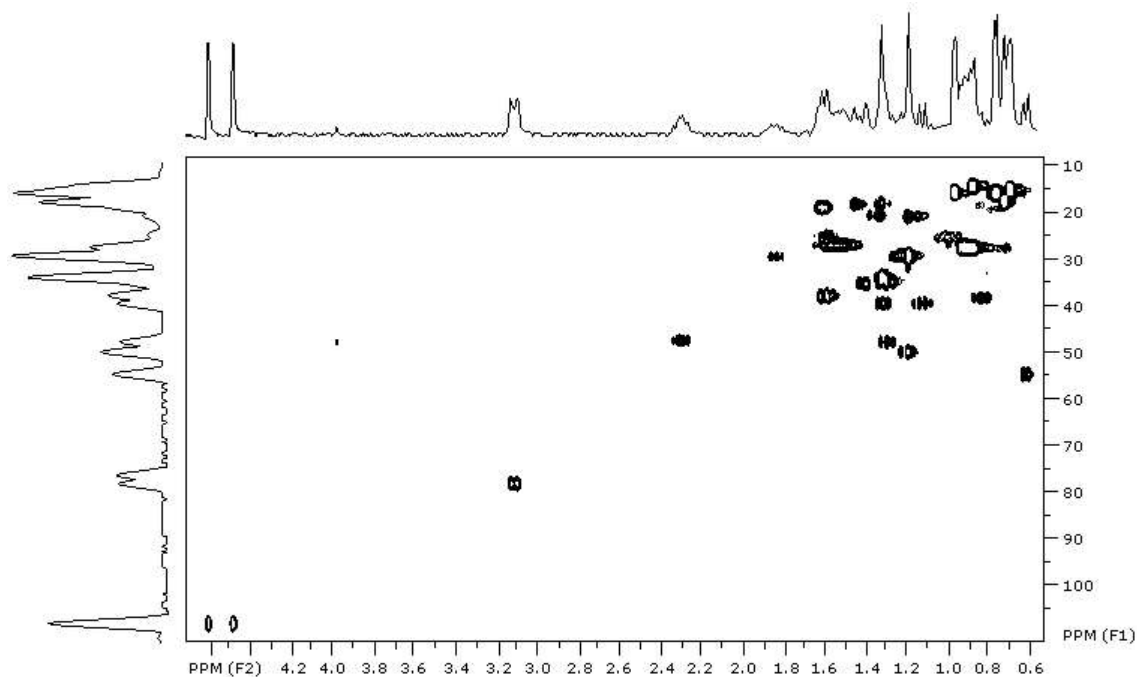
Mapa de contorno de HSQC da lupenona - Ampliação entre 0 e 5,0 ppm



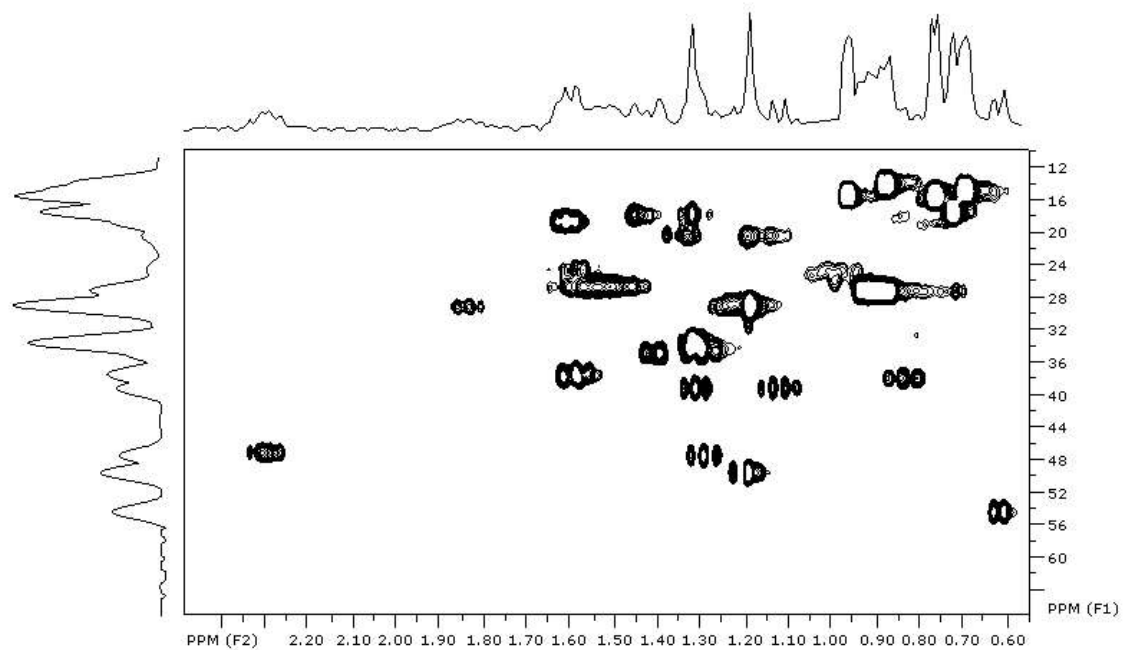
Mapa de contorno de HSQC da lupenona - Ampliação entre 0 e 3,0 ppm



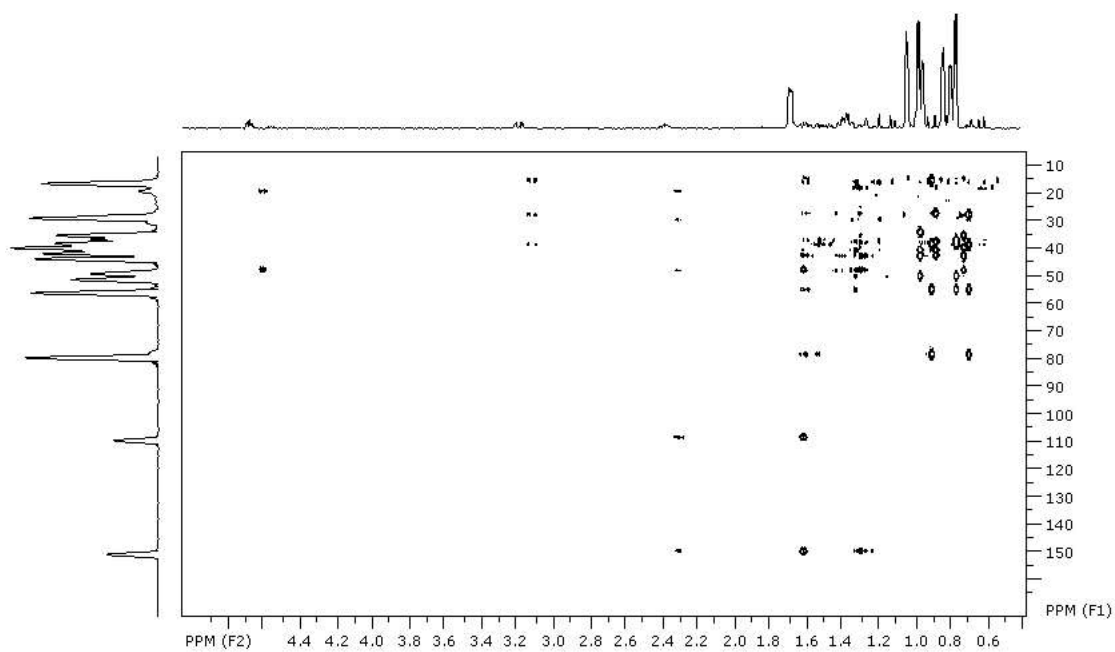
Mapa de contorno HMBC da lupenona

ANEXO 9 - Mapas de contorno HSQC e HMBC do lupeol (composto IV)

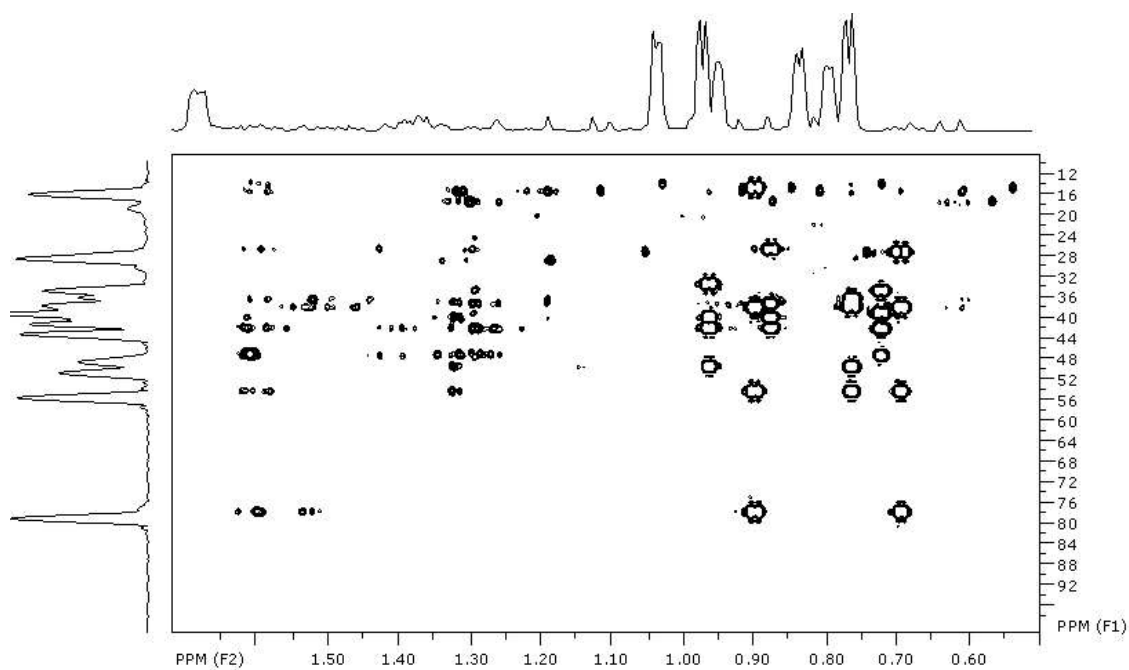
Mapa de contorno HSQC do lupeol - Ampliação entre 0 e 5,0 ppm



Mapa de contorno HSQC do lupeol - Ampliação entre 0 e 5,0 ppm



Mapa de contorno HMBC do lupeol - Ampliação entre 0 e 5,0 ppm



Mapa de contorno HMBC do lupeol - Ampliação entre 0,5 e 2,0 ppm