



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

**ESTUDO FARMACOGNÓSTICO, FITOQUÍMICO E ATIVIDADE  
ANTIPLASMÓDICA DE *Aspidosperma eteanum* Markgr.**

**Milena Cristina Martins da Silva**

BELÉM-PA  
2018

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

**ESTUDO FARMACOGNÓSTICO, FITOQUÍMICO E ATIVIDADE  
ANTIPLASMÓDICA DE *Aspidosperma eteanum* Markgr.**

Autor: Milena Cristina Martins da Silva

Orientadora: Profa. Dra. Maria Fani Dolabela

Co-orientador: Prof. Dr. Andrey Moacir do Rosário Marinho

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

BELÉM-PA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará  
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- M379e Martins da Silva, Milena Cristina  
ESTUDO FARMACOGNÓSTICO, FITOQUÍMICO E ATIVIDADE ANTIPLASMÓDICA DE  
Aspidosperma eteanum Markgr. / Milena Cristina Martins da Silva. — 2018  
100 f. : il. color
- Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF),  
Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, Belém, 2018.  
Orientação: Profa. Dra. Maria Fâni Dolabela  
Coorientação: Prof. Dr. Andrey Moacir do Rosário Marinho.
1. Aspidosperma eteanum. 2. estudo farmacognóstico. 3. fitoquímico. 4. atividade  
antiplasmódica. I. Dolabela, Maria Fâni, *orient.* II. Título
- 

CDD 614.5320981

# FOLHA DE APROVAÇÃO

**Milena Cristina Martins da Silva**

## **ESTUDO FARMACOGNÓSTICO, FITOQUÍMICO E ATIVIDADE ANTIPLASMÓDICA DE *Aspidosperma eteanum* Markgr.**

Defesa apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da  
Universidade Federal do Pará para obtenção do título de mestre. Área de  
concentração: Fármacos e Medicamentos.

Aprovado em:

Banca Examinadora

---

Profa. Dra. Maria Fani Dolabela (Orientadora)

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas UFPA

---

Prof. Dr. Andrey Moacir do Rosário Marinho (Co-orientador)

Instituto de Ciências Exatas e Naturais/UFPA

---

Profa. Dra. Marcieni Ataíde de Andrade

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas UFPA

---

Prof. Dr. José Luiz Fernandes Vieira

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas UFPA

BELÉM-PA

2018

## RESUMO

SILVA, M. C. M. **Estudo farmacognóstico, fitoquímico e atividade antiplasmódica de *Aspidosperma eteanum* Markgr.** 94 f. 2018. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2018.

O objetivo deste trabalho foi realizar estudos farmacognósticos, fitoquímicos e de atividade antiplasmódica de *Aspidosperma eteanum* Markgr. Para realização dos estudos farmacognósticos, utilizou-se os métodos de granulometria, determinação do pH, índice de espuma, teor de cinzas e perda por dessecação descritos na Farmacopéia Brasileira, V ed. O extrato etanólico (EEAE) foi obtido por maceração exaustiva com etanol (96° GL) e concentrado em rotaevaporador. Em seguida, foi submetido a fracionamento ácido-base, obtendo-se as frações FNAE e FAAE, extração sob refluxo (FrHex, FrDcm, FrAcOEt e FrMeOH), partição para a retirada de açúcar (FrLADcm e FrLMeOH) e cromatografia de sílica em coluna (Fr38, FR3 e FR6). O EEAE e frações foram submetidos à prospecção fitoquímica. O extrato e as frações FrHex, FrDcm, FrACoEt, FrMeOH e Fr38 foram submetidas a CLAE-DAD e o EEAE, FrMeOH, FAAE, FrLADcm e Fr38 foram analisadas por RMN <sup>1</sup>H. O EEAE e as frações FrHex, FrDcm, FrACoEt, FrMeOH, FAAE, FNAE, FLADcm e FLAMEOH foram selecionadas para avaliação antiplasmódica em clones W2 de *Plasmodium falciparum* por microteste. Os resultados farmacognósticos encontrados estão de acordo com os padrões da Farmacopéia Brasileira V ed. (2010). O extrato etanólico obteve um rendimento de 5,92%. Dentre as frações obtidas sob-refluxo, a FrMeOH obteve maior rendimento (93,59%) e as frações FNAE e FAAE de 3,0% e 1,3% respectivamente. A prospecção fitoquímica revelou que apenas a FAAE foi positiva para alcaloides, mas a análise por ressonância sugeriu tratar-se de ácidos graxos. Os resultados obtidos no CLAE-DAD revelaram uma substância de alta polaridade no EEAE, FrHex, FrDcm, FrAcOEt e FrMeOH e a presença de alcaloides em pequenas concentrações na fração FR3. O RMN <sup>1</sup>H do EEAE e FrMeOH apresentaram sinais sugestivos de açúcares. A fração FrLAPDc apresentou sinal sugestivo de substâncias derivadas de ácidos carboxílicos. A fração Fr38-40 (rendimento = 8%), que apresentou formação de cristais, apresentou sinais sugestivos de um éster metílico. Na avaliação antiplasmódica o EEAE foi inativo com CI<sub>50</sub> superior a 50 µg/mL. Dentre os métodos de fracionamento, as frações FrHex, FrDcm, FrAcOEt, FrMeOH e FNAE com média e baixa polaridade foram moderadamente ativas. Apenas as frações FAAE e FADcm foram ativas com CI<sub>50</sub> =7,6 µg/mL e CI<sub>50</sub> =1,91 µg/mL respectivamente. Portanto, o estudo da atividade biológica de *Aspidosperma eteanum* demonstrou que o fracionamento aumentou a atividade antiplasmódica sendo as frações de baixa e média polaridade as mais ativas. Os estudos fitoquímicos demonstraram que os alcaloides podem estar presentes na planta, mas em baixa concentração e que os açúcares e compostos graxos são provavelmente os constituintes majoritários do extrato. Quando se correlaciona os resultados obtidos nos estudos fitoquímicos e de atividade biológica é possível perceber que a(s) substância(s) responsável(is) pela atividade antiplasmódica, por estar diretamente relacionada a frações de menor polaridade, podem ser compostos graxos tais como o éster metílico detectado neste estudo.

**Palavras-chaves:** *Aspidosperma eteanum*; estudo farmacognósticos; fitoquímico e atividade antiplasmódica

## ABSTRACT

SILVA, M. C. M. **Pharmacognostic and phytochemical studies and antiplasmodic activity of *Aspidosperma eteanum* Markgr.** 94p. 2018. Dissertation (Master's degree) - Graduate Degree Program in Pharmaceutical Sciences, Universidade Federal do Pará, Belém, 2018.

The aim of this study was to perform pharmacognostic, phytochemical and antiplasmodial studies on *Aspidosperma eteanum* Markgr. The pharmacognostic study to assess granulometry data, pH, foam index, ash and moisture content were performed according to the Brazilian Pharmacopoeia, V ed. The ethanolic extract (EEAE) was obtained by exhaustive maceration with ethanol (96°GL) and concentrated by rotavaporator. Then, it was subjected to acid-base extraction that resulted in FNAE and FAAE fractions, reflow extraction (FrHex, FrDcm, FrAcOET and FrMeOH), sugar removal partition (FrLADcm and FrLMeOH) and silica column chromatography (Fr38, FR3 and FR6). The EEAE and fractions were submitted to phytochemical prospection. The EEAE, FrHex, FrDcm, FrAcCoEt, FrMeOH and Fr38 also underwent to HPLC-DAD and the EEAE, FrMeOH, FAAE, FrLADcm and Fr38 were analyzed by <sup>1</sup>H NMR. The EEAE, FrHex, FrDoC, FrAcCoEt, FrMeOH, FAAE, FNAE, FLADcm and FLAMEOH fractions were selected for antiplasmodial evaluation in W2 clones of *Plasmodium falciparum* by microtest. The pharmacognostic results are in accordance with the Brazilian Pharmacopoeia V ed. (2010) standards. The ethanolic extract yielded 5.92%. Among the fractions obtained under reflux, FrMeOH had the highest yield (93.59%) and FNAE and FAAE fractions of 3.0% and 1.3% respectively. In the phytochemical prospection, only FAAE was positive for alkaloids, but resonance analysis suggested it had fatty acids. The results obtained in CLAE-DAD revealed a high polarity substance in EEAE, FrHex, FrDcm, FrAcOET and FrMeOH and the presence of alkaloids in low concentrations in the FR3 fraction. The <sup>1</sup>H NMR of the EEAE and FrMeOH showed suggestive signs of sugars. The FrLAPDc presented a suggestive signal of substances derived from carboxylic acids. The Fr38 fraction (yield = 8%), which presented crystals, showed signs suggestive of a methyl ester. In the antiplasmodial evaluation, the EEAE was inactive with IC<sub>50</sub> higher than 50 µg/mL. Among the fractionation methods, the FrHex, FrDcm, FrAcCoEt, FrMeOH and FNAE fractions with medium and low polarity were moderately active. Only the FAAE and FLADcm fractions were active with IC<sub>50</sub> = 7.6 µg/mL and IC<sub>50</sub> = 1.91 µg/mL respectively. Therefore, the antiplasmodial evaluation of *Aspidosperma eteanum* demonstrated that the fractionation increased the biological activity being the fractions of low and medium polarity the most active. Phytochemical studies showed that alkaloids may be present in the plant but at low concentrations, and that sugars and fatty compounds are probably the extract major constituents. When correlating the phytochemical and biological studies it is possible to perceive that the substance(s) responsible for the antiplasmodial activity is directly related to fractions of lower polarity and can be fatty compounds such as the methyl ester detected in this study.

**Keywords:** *Aspidosperma eteanum*; pharmacognostic study; phytochemical and antiplasmodial activity

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química da quinina .....	14
Figura 2: Ciclo biológico do Plasmodium.....	18
Figura 3: Estrutura química da cloroquina (A) e artemisinina (B).....	18
Figura 4: <i>Aspidosperma eteanum</i> .....	27
Figura 5: <i>Aspidosperma desmanthum</i> .....	27
Figura 6: Alcaloides indólicos isolados da espécie <i>Aspidosperma desmanthum</i> . .....	28
Figura 7: Extração ácido-base do extrato etanólico de <i>Aspidosperma eteanum</i> .....	42
Figura 8: Fracionamento sob refluxo do extrato etanólico de cascas de <i>Aspidosperma eteanum</i> . .....	43
Figura 9: Fracionamento do extrato etanólico de <i>Aspidosperma eteanum</i> em coluna cromatográfica aberta. ....	44
Figura 10: Pesquisa de alcaloides no pó de <i>Aspidosperma eteanum</i> .....	48
Figura 11: Disposição das amostras e reativos no teste de precipitação da solução ácida obtida por extração ácido-base (orgânica).....	49
Figura 12: Esquema de solubilização de amostras e suas respectivas concentrações .....	52
Figura 13: Esquema da placa utilizada no teste de atividade antiplasmodica .....	53
Figura 14: Fluxograma de trabalho.....	54
Figura 15: Porcentagem do pó retida pelos tamises. ....	56
Figura 16: Teste de determinação do índice de espuma do pó de <i>Aspidosperma eteanum</i> .....	57
Figura 17: Teste de precipitação do extrato etanólico de <i>Aspidosperma eteanum</i> .....	59
Figura 18: Análise cromatográfica em camada delgada do extrato etanólico e frações de <i>Aspidosperma eteanum</i> , reveladas em UV (365nm) e reagente Dragendorff.....	61
Figura 19: Cromatografia de camada delgada do precipitado translúcido obtidos na Fração 38-40. ....	63
Figura 20: Precipitado com aspecto de cristais translúcidos obtidos na Fração 38-40. ....	63
Figura 21: Cromatograma de <i>Aspidosperma eteanum</i> e seus espectros em ultravioleta. ....	65
Figura 22: Cromatograma das frações FR3 e FR6 obtidas por coluna de cromatografia aberta de filtração a partir do extrato etanólico de <i>Aspidosperma eteanum</i> e seus espectros em ultravioleta. ....	66
Figura 23: Espectros em ultravioleta do alcaloide indólico Rhazine. ....	67
Figura 24: alcaloide Rhazina. ....	67
Figura 25: Espectro de massa da fração de alcaloides de <i>Aspidosperma eteanum</i> .....	68
Figura 26: esquema de fragmentação do alcaloide Rhazina no fragmento 353 da fração de alcaloides do extrato etanólico de <i>Aspidosperma eteanum</i> FAAE.....	69
Figura 27: esquema de fragmentação do alcaloide Rhazina no fragmento 353 da fração de alcaloides do extrato etanólico de <i>Aspidosperma eteanum</i> FAAE.....	71
Figura 28: Espectro de ressonância magnética nuclear de <sup>1</sup> H da fração metanólica obtida do extrato etanólico de <i>Aspidosperma eteanum</i> (FMeOH) 300MHz, CD <sub>3</sub> OD. ....	72
Figura 29: Estrutura química de açúcares. A) glicose; B) frutose e C) sacarose. ....	73
Figura 30: Espectro de RMN <sup>1</sup> H da sacarose (sucrose) e seus açúcares componentes, glicose (glucose) e frutose (fructose), obtidos em 400MHz.....	73
Figura 31: Análise cromatográfica em camada delgada do extrato etanólico e frações de <i>Aspidosperma eteanum</i> .....	75
Figura 32: Espectro de ressonância magnética nuclear de <sup>1</sup> H da fração diclorometano livre de açúcares (FrLADcm) obtida do extrato etanólico de <i>Aspidosperma eteanum</i> 300MHz, CD <sub>3</sub> OD.....	77
Figura 33: Espectro de ressonância magnética nuclear de <sup>1</sup> H da fração de alcaloides (FAAE) obtida do extrato etanólico de <i>Aspidosperma eteanum</i> 300MHz, CD <sub>3</sub> OD.....	78
Figura 34: Constituição química dos triglicerídeos. ....	79
Figura 35: Espectro de ressonância magnética nuclear de <sup>1</sup> H da fração Fr38-40 obtida do extrato etanólico de <i>Aspidosperma eteanum</i> 300MHz, CDCl <sub>3</sub> . ....	81
Figura 36: Biossíntese de ácidos graxos tipo II. ....	84

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação do índice de espuma para uma amostra .....	39
Tabela 2: Sistema de eluição empregado nas análises por CLAE das frações obtidas por reextração sob refluxo e fração F38 .....	50
Tabela 3: Sistema de eluição empregado nas análises por CLAE das frações obtidas em cromatografia em coluna de filtração. ....	50
Tabela 4: Análise da granulometria do pó obtido das cascas de <i>Aspidosperma eteanum</i> ...	55
Tabela 5: Análise farmacognóstica do pó das cascas da <i>Aspidosperma eteanum</i> .....	58
Tabela 6: Rendimentos de extratos e frações obtidos das cascas de <i>Aspidosperma eteanum</i> . ....	60
Tabela 7: Resultado da prospecção fitoquímica do extrato e frações de <i>Aspidosperma eteanum</i> por cromatografia em camada delgada.....	61
Tabela 8: Frações obtidas do extrato etanólico de <i>Aspidosperma eteanum</i> em cromatografia de coluna aberta. ....	62
Tabela 9: Frações obtidas do extrato etanólico de <i>Aspidosperma eteanum</i> em cromatografia de coluna aberta. ....	64
Tabela 10: Atribuição dos deslocamentos químicos encontrados no espectro de ressonância magnética <sup>1</sup> H obtidos na fração livre de açúcares diclorometano (FrLADcm) e fração de alcaloides (FAAE) obtidas do extrato etanólico de <i>Aspidosperma eteanum</i> aos seus respectivos grupamentos químicos segundo Guillén e Ruiz (2001).....	76
Tabela 11: Ácidos graxos comuns em tecidos de vegetais superiores. ....	80
Tabela 12: Concentração inibitória de 50% do crescimento do clone W2 de <i>Plasmodium falciparum</i> do extrato e frações de <i>Aspidosperma eteanum</i> . ....	87



## LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Algumas espécies da família Apocynaceae de uso popular e suas respectivas atividades antimaláricas <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> .....	21
<b>Quadro 2:</b> Algumas espécies do gênero <i>Aspidosperma</i> spp. e suas respectivas atividades antimaláricas <i>in vivo</i> e/ou <i>in vitro</i> . ....	25
Quadro 3: Eluentes utilizados para obtenção das frações do extrato etanólico de <i>Aspidosperma eteanum</i> por cromatografia em coluna aberta de sílica gel. ....	44
Quadro 4: Eluentes utilizados para obtenção das frações do extrato etanólico de <i>Aspidosperma eteanum</i> (EEAE) por cromatografia em coluna aberta de sílica gel.....	45
Quadro 5: Identificação dos metabólitos em cromatografia em camada delgada. ....	47
Quadro 6: Classificação das amostras de acordo com resultados de $CI_{50}$ para atividade antiplasmódica .....	53

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
AcOEt	Acetato de Etila
cm	Centímetro
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada a Espectrometria de massas
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjos diodos
DP	Desvio Padrão
DCM	Diclorometano
EEAE	Extrato etanólico de <i>Aspidosperma eleanum</i>
Rf	Fator de Retenção
Fr38	Fração 38 do fracionamento em coluna cromatográfica do extrato etanólico de <i>Aspidosperma eleanum</i>
FrAcOEt	Fração Acetato de Etila
FAAE	Fração de alcaloides de <i>Aspidosperma eleanum</i>
FNAE	Fração de neutrons de <i>Aspidosperma eleanum</i>
FrDCM	Fração Diclorometano de <i>Aspidosperma eleanum</i>
FrHex	Fração Hexano de <i>Aspidosperma eleanum</i>
Fr MeOH	Fração metanólica de <i>Aspidosperma eleanum</i>
g	Gramma
L	Litro
MeOH	Metanol
CD <sub>3</sub> OD	Metanol deuterado
mg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrometros
mL	Mililitro
mm	Milímetro
min.	Minuto
OMS/WHO	Organização Mundial de Saúde/ World Health Organization
p/v	Peso/volume
pH	Potencial hidrogenionico
Kg	Quilograma
RMN <sup>13</sup> C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN <sup>1</sup> H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute 1640
rpm	Rotação por minuto
Tr	Tempo de Retenção
UV	Ultravioleta
vis.	Visível
v/v	Volume/volume

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	16
2.1 Malária .....	16
2.2 A Família Apocynaceae e o gênero <i>Aspidosperma</i> .....	22
2.2.1. <i>Aspidosperma eteanum</i> Markgr. ....	26
3. OBJETIVOS.....	29
3.1 Objetivo geral.....	29
3.2 Objetivos específicos.....	29
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	30
4.1 Material .....	30
4.1.1 EQUIPAMENTOS .....	30
4.1.2 SOLVENTES.....	31
4.1.3 FASES ESTACIONÁRIAS .....	31
4.1.4 MATERIAIS PLÁSTICOS, DE METAL E DE VIDRO .....	31
4.1.5 VIDRARIAS .....	32
4.1.6 MEIO DE CULTURA E OUTROS.....	32
4.1.7 REVELADORES PARA CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD) .....	33
4.1.8 PREPARO DOS MEIOS E SOLUÇÕES UTILIZADOS NO CULTIVO 35	
4.1.9 MATERIAL BIOLÓGICO .....	37
4.1.10 MATERIAL VEGETAL .....	38
4.2 Métodos .....	38
4.1.11 ESTUDOS FARMACOGNÓSTICOS.....	38
4.2.2 ESTUDO FITOQUÍMICO .....	41
4.2.3 Atividade antimalárica <i>in vitro</i> .....	51
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	55
5.1 ESTUDOS FARMACOGNÓSTICOS .....	55
5.2 ESTUDO FITOQUÍMICO .....	59
5.3 ATIVIDADE ANTIPLASMÓDICA .....	85
6. CONCLUSÃO .....	88
REFERENCIAS.....	89

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus que em sua infinita misericórdia me deu forças e sabedoria para a realização de mais essa etapa da minha vida e ao qual devo tudo o que tenho e o que sou.

À minha família que sempre me apoiou e incentivou. Especialmente meus pais Marilene Martins da Silva e Valdelino Reis da Silva que são meus maiores exemplos de amor e ao meu irmão Victor Martins da Silva que apesar de chato sempre esteve ao meu lado.

À minha orientadora Profa. Dra Maria Fani Dolabela, que sempre acreditou no meu trabalho e me ensinou valiosas lições e ao meu co-orientador prof. Dr. Andrey Moacir Marinho que sempre me socorreu nos momentos de maiores dificuldades no desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço a prof. Dra. Giselle Rachid e todo o seu grupo de trabalho especialmente a Nathalia, Daniele, Jessica, Leo e os “meninos da malária”, Jose Maria e Jose Mario que tornaram possível a realização dos testes biológicos e cujo exemplo profissional levarei comigo.

Agradeço as minhas amigas e companheiras de trabalho: Erica Vanessa e Lara Vinhal que foram amigas inseparáveis e incentivadoras nesses dois anos.

As mestrandas mais maravilhosas que esse programa de pós-graduação já viu Rafaelli, Stefania, Fernanda, Maisa, Erica Patrícia, Hellen, Natasha, Diandra e Mirian que tornaram os momentos de desespero menos difíceis.

Aos meus amigos de graduação que ouviram minhas lamentações: Camila, Klaylton, Rafaelli e Wana.

Agradeço ao André Gabriel cujo carinho, incentivo e ajuda com minhas “dificuldades computacionais” me auxiliaram enormemente.

Sou grata a todos os atuais e ex membros do laboratório de Farmacologia e Doenças Negligenciadas: Alexandre Rosa, Natasha Cristina, Valdicley Vale, Juliana

Corrêa, Leticia Hiromi, Amanda Roberta, Dayse Brandão, Ana Laura, Jessica Peniche, Analu Damasceno, Helington Brígido, Rosana Sarmiento, Kelly, Bruna Natércia, Marcio Amaro e Nayara e também aos companheiros do laboratório de química: Luciano e André que participaram direta ou indiretamente dessa pesquisa. Obrigado por serem pessoas tão prestativas e por tornarem o ambiente de trabalho mais agradável. Vocês fizeram toda a diferença.

Agradeço a CAPES pelo financiamento para a realização desta pesquisa.

## 1. INTRODUÇÃO

A malária é uma doença parasitária que tem exercido grande impacto sobre as populações humanas há séculos. De acordo com as últimas estimativas, cerca de 216 milhões de casos ocorreram no mundo em 2016, resultando em aproximadamente 445.000 mortes (WHO, 2017). Neste contexto, o Brasil detém a maior prevalência nas Américas, com aproximadamente 42% dos casos, no qual, cerca de 144 mil casos e 41 óbitos foram confirmados em 2016. A transmissão da doença no âmbito nacional concentra-se na região Amazônica (Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins), responsáveis por 99,5% dos casos de malária do país. (FERREIRA & CASTRO, 2016).

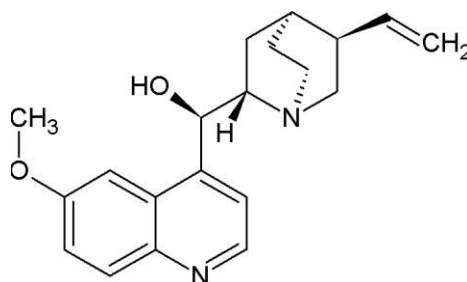
Esta doença é causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, transmitidos por fêmeas do mosquito *Anopheles* spp. Dentre as mais de 200 espécies de plasmódio, apenas cinco são capazes de infectar humanos (WHO, 2014), sendo o *Plasmodium vivax* responsável pelo maior número de casos notificados, enquanto que o *Plasmodium falciparum* é responsável pela forma mais grave da doença (OLIVEIRA- FERREIRA et al. 2010).

O tratamento medicamentoso de malária ocasionada por *P. vivax*, envolve associação de fármacos: em geral cloroquina associado à primaquina. Enquanto que infecções causadas por *P. falciparum* utilizam terapia combinada à base de artesunato e mefloquina. Entretanto, a resistência a fármacos comumente utilizados na terapêutica, tais como a cloroquina, tem sido observada há quase 50 anos. Atualmente, o *Plasmodium falciparum* tem se tornado resistente a outros fármacos como a mefloquina (WONGSRICHANALAI et al. 2002). Até mesmo a artemisinina já apresenta casos que demonstram que o parasito está se tornando resistente (WHO, 2001; NOEDL et al. 2008; DONDORP et al. 2009; AJAYI e UKWAJA, 2013).

Devido à propagação de parasitas resistentes aos fármacos em todo o mundo, o tratamento de malária está se tornando cada vez mais difícil (WHO, 2010). Assim, a identificação de novos fármacos antimaláricos seguros e seletivos é urgente.

As plantas medicinais proporcionaram a descoberta no século XIX dos primeiros remédios a partir da casca de *Cinchona* spp, que posteriormente se mostrou rica em alcaloides, especialmente quinina. A partir da quinina (Figura 1), aminoquinolinas sintéticas como a cloroquina, amodiaquina e mefloquina foram

sintetizadas. Outra classe de antimaláricos importantes é baseada em artemisinina, um composto encontrado na *Artemisia annua*, uma planta medicinal nativa da China (WHO, 2006).



**Figura 1:** Estrutura química da quinina

Na Amazônia Brasileira, várias espécies de plantas têm sido utilizadas para o tratamento da malária e doenças febris (MILLIKEN, 1997). No entanto, há uma carência de estudos que avaliem a eficácia farmacológica dessas espécies (BOCHNER et al. 2012). Neste sentido destacam-se as espécies do gênero *Aspidosperma*, família Apocynaceae, cujos alcaloides indólicos, considerados marcadores quimiotaxonômicos deste gênero, tem sido alvo de inúmeros trabalhos devido a larga aplicação terapêutica atribuída a eles, como por exemplo, a espécie *Aspidosperma ramiflorum* que é empregada no tratamento de leishmaniose (FERREIRA et al. 2004); a espécie *Aspidosperma nitidum*, utilizada como anticonceptiva (RIBEIRO et al. 1999), no tratamento de inflamações de útero e ovário, diabetes, problemas estomacais, câncer, febre e reumatismo (WENIGER et al. 2001), assim como as cascas de *Aspidosperma nitidum*, *Aspidosperma album*, *Aspidosperma discolor*, *Aspidosperma excelsum* e *Aspidosperma polineuron* que são amplamente citadas pelos nativos como remédios para o tratamento de malária em diferentes locais da Amazônia (BRANDÃO et al. 1992; BOURDY et al. 2004; OLIVEIRA et al. 2003).

Algumas dessas espécies de uso na medicina popular demonstraram atividades biológicas mediante ensaios laboratoriais como é o caso das espécies *Aspidosperma nitidum* (Benth) e *Aspidosperma excelsum* (Muell Arg), amplamente citadas como remédios para o tratamento da malária e que apresentaram atividade biológica contra o *P. falciparum* em estudos *In vitro* (WENIGER et al. 2001; GOMES, 2011; COUTINHO et al. 2013, OLIVEIRA et al. 2009; DOLABELA et al. 2012).

A *Aspidosperma eteanum* Markgr. é uma espécie encontrada apenas na

região amazônica (WOODSON, 1951; PEREIRA et al. 2016). Apesar de fazer parte deste gênero muito utilizado para o tratamento de doenças febris e malária, não foram encontrados estudos fitoquímicos e de atividades biológicas desta espécie. Apoiado pela vasta diversidade de alcaloides indólicos presentes no gênero *Aspidosperma* aliado a falta de estudos desta planta, este trabalho se justifica pela avaliação de sua possível atividade antiplasmódica bem como a busca da(s) substância(s) responsável referida pela atividade biológica.



## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Malária

A Malária é uma questão de saúde pública responsável por levar a óbito cerca de 445.000 pessoas em 2016. Estima-se que 3,3 bilhões de pessoas estejam ainda sob o risco de serem infectadas e desenvolverem a doença. O continente africano é considerado o mais afetado, pois mais de 80% dos casos de morte ocorreram no neste continente ano de 2016 (WHO 2017).

Esta doença está associada às baixas condições socioeconômicas, apresentando maiores taxas de incidência nos países em desenvolvimento (GETHING et al. 2012), acometendo pessoas em situação de alta vulnerabilidade social. No Brasil, os ribeirinhos amazônicos são os mais afetados pela doença, pois não possuem condições adequadas de moradia e/ou meios de evitarem a infecção e estão em área de risco (BRASIL, 2010a).

Apenas cinco espécies de Plasmodium são capazes de infectar humanos: *P. vivax*, *P. malariae* (GRASSI, 1900), *P. falciparum* (WELCH, 1897), *P. ovale* (STEPHENS, 1922) e *P. knowlesi* (GARNHAM, 1966). No Brasil, apenas três espécies são responsáveis por casos de malária humana: *P. vivax* (responsável pela maioria dos casos), *P. falciparum* (responsável pelos casos de malária grave) e *P. malariae* (casos raros; OLIVEIRA-FERREIRA, 2010).

No Brasil, mais de 99% dos casos de malária são registrados na região amazônica, que engloba os estados do Acre, Amazonas, Amapá, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins. Nessa região, as condições propícias para a sobrevivência do vetor e as condições socioeconômicas e ambientais favorecem a transmissão da doença (LAPOUBLE et al. 2015)

O ciclo da malária envolve um hospedeiro intermediário e o definitivo. O hospedeiro intermediário, e também vetor da doença, é o mosquito fêmea do gênero *Anopheles* spp. no qual ocorre a reprodução sexuada chamada de esporogonia. No hospedeiro definitivo, a doença se manifesta devido o desenvolvimento do ciclo assexuado chamado de esquizogônico no interior dos eritrócitos (MURGATROYD, 1952).

O ciclo da doença nos seres humanos se inicia quando o Anopheles fêmea parasitado inocula sua saliva contendo esporozoítos durante o repasto sanguíneo. Ao alcançar a corrente sanguínea, os parasitos chegam aos hepatócitos formando

um vacúolo parasitoforo que por esquizogonia multiplicam-se e transformam-se em merozoítos, que por sua vez, são liberados na corrente sanguínea finalizando esta parte do ciclo extra eritrocitário (MURGATROYD, 1952). É importante ressaltar que as espécies *P. vivax* e *P. ovale* possuem a capacidade de se diferenciarem em hipnozoítas, formas latentes que ficam armazenadas nos hepatócitos e são responsáveis pelos casos de recaída da doença após meses ou até mesmo anos depois da cura (Figura 2).

O ciclo eritrocitário se inicia quando os merozoítos, já na corrente sanguínea, invadem as hemácias por meio de junções nas membranas (DVORAK et al. 1975). No interior dos eritrócitos, sofrem transformações que os convertem em trofozoítos jovens, morfologicamente conhecido por sua estrutura anelar, e posteriormente em esquizontes multinucleados cuja maturação culmina com o rompimento da hemácia e a liberação dos merozoítas contidos em seu interior, garantindo que os mesmos estejam livres no sangue para infectar novas hemácias e dar continuidade ao ciclo (MURGATROYD, 1952; Figura 2).

Neste meio termo, isto é, entre a liberação dos merozoítas na corrente sanguínea e a infecção de uma nova hemácia, alguns parasitas se diferenciam em gametócitos que constituem a forma sexuada que ao ser ingerida pelo mosquito dará início ao ciclo sexuado no vetor. Nesta parte do ciclo os gametócitos transformam-se em gametas feminino (macrogameta) e masculino (microgameta) que ao unir-se formam o zigoto. Através de meioses sucessivas, o zigoto transforma-se em oocineto que possui motilidade para atravessar as células do intestino e transformar-se em oocisto na membrana basal, onde permanecem até tornarem-se esporozoítos e então migrarem para as glândulas salivares do mosquito para novamente iniciar o ciclo no hospedeiro vertebrado após o repasto sanguíneo (ROSS, 1898; Figura 2).



A preocupação atual a respeito do tratamento da malária está voltada para o surgimento e disseminação de cepas multidroga resistentes de *Plasmodium*, registradas como uma das principais causas de falha no tratamento. Estudos tem relatado casos de resistência tanto para a utilização da cloroquina e mefloquina (WONGSRICHANALAI et al. 2002), quanto aos esquemas combinados de artemisinina (BLOLAND, 2001; NOEDL et al. 2008; AJAYI e UKWAJA, 2013).

Vários fatores ocasionam a resistência do parasita, tais como modificações no DNA e adesão inadequada ao tratamento (tratamento descontínuo; WINSTANLEY, 2001; PLEETER et al. 2010). Atualmente, estudos destacam a presença de glicoproteínas P, homólogas de transportadores ABC multidroga, que são capazes de induzir resistência a drogas antiparasitárias devido à ligação e efluxo da mesma à custa da hidrólise de ATP, expelindo o fármaco da célula antes mesmo que este alcance o seu local de ação (PIETRO et al. 2002).

Uma vez que um bilhão de pessoas ainda estão sob o risco de contrair malária, e o surgimento de cepas resistentes a múltiplos fármacos de *Plasmodium falciparum* representam um grande problema para o tratamento, a busca de opções terapêuticas e o isolamento de compostos antimaláricos acessíveis e eficientes são urgentes. Neste sentido, destacam-se o uso de plantas medicinais, que vem sendo utilizadas para tratar malária há séculos em diferentes culturas, como por exemplo: na América do Sul, onde os nativos utilizavam a *Cinchona* spp. para o tratamento de doenças febris e os chineses utilizavam a *Artemisia annua* (RUSSEL, 1955; FRANÇA et al. 2008).

Os índios sul-americanos utilizavam as cascas de Chichona para o tratamento de doenças febris antes da chegada dos colonizadores, naquela época não havia tratamento para malária. Em 1639, missionários jesuítas levaram as cascas dessa planta para a Europa e 1820, os químicos franceses Pierre Joseph Pelletier e Joseph Bienaime Caventou identificaram a quinina como o ingrediente ativo da casca da cinchona. A partir dessa descoberta, outras moléculas derivadas da quinina puderam ser sintetizadas, como por exemplo a cloroquina (RUSSEL, 1955; JARCHO e TORTI, 1993).

*Artemisia annua* foi outra planta de uso popular no tratamento de febres, cuja utilização foi documentada desde 340 a.C. pelos chineses em um livro médico chamado de “Zhou Hou Bei Ji Fang” ou “Manual de prescrições para tratamentos de emergência” (WRIGHT, 2005). Na década de 70, isolou-se pela primeira vez a partir

da *Artemisia annua*, o composto denominado artemisinina. A partir deste composto, vários análogos com atividade esquizotóxica como o artesunato, a diidroartemisinina, o arteéter e o arteméter foram sintetizados e são utilizados na clínica (FRANÇA et al. 2008).

O uso de plantas medicinais é comum em muitos países, especialmente em regiões de baixo desenvolvimento econômico e difícil acesso a serviços de saúde. No Brasil, muitos nativos que moram em áreas rurais e/ou dentro da floresta, onde o acesso a serviços de saúde é limitado, usam plantas para tratar malária. Como resultado, vários estudos têm reportado o uso de espécies exóticas ou nativas do Brasil para tratar esta condição clínica (CARVALHO, 1990; MILLIKEN 1997).

Várias espécies da família Apocynaceae já foram relatadas em estudos etnobotânicos quanto ao seu uso na medicina popular com as mais diversas finalidades como a *Rauvolfia sellowii* Müll. Arg. utilizada no tratamento de hipertensão (BARATTO, 2010), problemas gastrointestinais (BATISTA et al. 1996), malária (KOCK, 2002) e como antioxidante (MENEZES et al. 2004); *Himatanthus lancifolius* (Müll. Arg.) Woodson tradicionalmente utilizada como antiasmático, purgativo, para tratamento de doenças de pele, sífilis e distúrbios menstruais (CÔRREA, 1926); *Himatanthus obovatus* (Müll. Arg.) Woodson utilizada no norte do Brasil como depurativo, no tratamento de úlceras estomacais, pressão alta, coceiras, manchas de pele e espinhas (LINHARES & PINHEIRO, 2016); *Aspidosperma nitidum* e *Aspidosperma marcgravianum* são utilizadas no tratamento de malária, inflamações do útero e do ovário, diabetes, problemas estomacais, câncer e como anticoncepcivo (RIBEIRO et al. 1999; MILLIKEN, 1997) e *Aspidosperma quebracho blanco* Schlecht usada como laxante, depurativo do sangue, abortivo e antimalárico (SCARPA, 2003).

Neste sentido, várias espécies da família Apocynaceae já demonstraram atividade antimalárica *in vitro* e/ou *in vivo*. Como exemplos temos a *Aspidosperma excelsum* Benth cujo extrato etanólico mostrou-se ativo em dois estudos diferentes com  $CI_{50}$  correspondente a  $5,2 \pm 4,1 \mu\text{g/mL}$  e  $4,6 \pm 4,4 \mu\text{g/mL}$  em ensaios *in vitro* e 54% de redução na parasitemia com 125mg/Kg *in vivo*. (GOMES, 2011; COUTINHO et al. 2013). *Geissospermum sericeum* (Sagot) Benth & Hook é outra espécie desta família que é popularmente utilizada para o tratamento de diversas enfermidades incluindo a malária, apresentando atividade *in vitro* com  $CI_{50}$  igual a  $11,53 \pm 0,54 \mu\text{g/mL}$  (STEEL et al, 2002). Outra espécie de uso popular é a *Himatanthus*

*articulatus* (Vahl) Woods, cujo extrato capaz de reduzir a parasitemia em 35,4% com 200mg/Kg do extrato *in vivo* (VALE et al. 2015; Quadro 1).

**Quadro 1:** Algumas espécies da família Apocynaceae de uso popular e suas respectivas atividades antimaláricas *in vivo* e *in vitro*.

Espécies de Apocynaceae	Uso popular	Amostra	Atividade antimalárica	Referências
<i>Aspidosperma excelsum</i> Benth.	Hepatite, malária, vasodilatador, antiséptico, antimicrobiano, cicatrizante, bronquite, inflamação, febre, diabetes, câncer e malária (Mejia & Rengifo, 2000; Perez, 2002)	Extrato etanólico das cascas	<i>In vitro</i> : $CI_{50} = 4,6 \pm 4,4 \mu\text{g/mL}$ <i>In vivo</i> : 54% de redução na parasitemia com 125mg/Kg	Coutinho et al. 2013
		Extrato hidroetanólico das cascas	<i>In vitro</i> : $CI_{50} = 5,2 \pm 4,1 \mu\text{g/mL}$	Gomes, 2011
<i>Geissospermum sericeum</i> (Sagot) Benth & Hook	Malária (Brandão, et al 1992) Febre, dermatose (Botsaris, 2007) inflamação, dor ao urinar, doenças venéreas, diabetes (Freitas e Fernandes, 2006), problemas estomacais (Gonçalves, 2010)	Extrato metanol:água (9:1)	<i>In vitro</i> : $CI_{50} = 11,53 \pm 0,54 \mu\text{g/mL}$	Steel et al. 2002
<i>Himatanthus articulatus</i> (Vahl) Woods.	Malária (Milliken, 1997), afecções na pele, helmintíases, úlceras e gastrite (di stasi e hurumalima, 2002), tumores (Van den Berg, 1982) e sífilis (Gilbert, 2006)	Extrato etanólico das cascas	<i>In vitro</i> : $CI_{50} = >50,00 \mu\text{g/mL}$ <i>In vivo</i> : 35,4% de redução na parasitemia com 200 mg/kg	Vale et al. 2015
<i>Picralima nitida</i>	Tratamento da febre, hipertensão, icterícia, distúrbios gastrointestinais e malária (Burkill, 1985; Kouitchou et al, 2008)	Extrato diclorometano da casca da fruta	<i>In vitro</i> : $CI_{50} = 1,61 \mu\text{g/mL}$ (W2).	Iwu & Klayman, 1992

Apesar dos estudos existentes ainda há a necessidade de realizar mais análises para avaliar se estas espécies possuem atividade antiparasitária e caso sejam ativas, avaliar a toxicidade *in vitro* e *in vivo* com o objetivo de garantir a eficácia e segurança da utilização dessas plantas ou de seus compostos ativos no tratamento da malária. Vale ressaltar que muitas outras plantas da família Apocynaceae que são popularmente usadas no tratamento de enfermidades tais

como a malária, ainda não tiveram seu potencial biológico testado como, por exemplo, a *Aspidosperma eteanum*, espécie utilizada nesse estudo.

Para a triagem de substâncias com potencial antimalárico deve-se realizar inicialmente avaliações utilizando métodos *in vitro*, como por exemplo, o microteste, sendo as amostras ativas submetidas a técnicas *in vivo*. O microteste é um dos métodos utilizados na avaliação da atividade antiplasmódica e consiste basicamente na análise da capacidade da droga em impedir a evolução da forma trofozoíta para a forma de esquizonte, isto é, avalia a capacidade esquizonticida do fármaco (RIECKMANN et al. 1978). Esta técnica possui a vantagem de permitir a avaliação morfológica dos parasitas e cálculo da parasitemia, mas suas desvantagens consistem na necessidade de profissionais habilitados no reconhecimento morfológico dos parasitos e habilidades referentes ao uso do microscópio, além de requerer um longo tempo e esforço devido à quantidade de lamina a serem examinadas (SILVA, 2017).

A metodologia de cultivar a fase eritrocítica do *P. falciparum in vitro* (Trager & Jansen 1976) vem sendo aplicada para a realização do microteste. Clones W2 tem sido amplamente utilizados em cultivos por se tratarem de *Plasmodium falciparum* resistente a cloroquina o que permite a avaliação da amostra em parasitas resistentes a cloroquina.

Ensaio *in vivo* empregam frequentemente o *P. berguei*, devido a sua capacidade de infectar roedores, relativa facilidade de utilização na engenharia genética e por possuir semelhanças em seu DNA em relação ao DNA de plasmódios que infectam humanos. No entanto, como as espécies que infectam humanos não podem ser utilizadas para infectar os roedores, a utilização de *P. berghei* ao invés de *P. vivax*, *falciparum*, *malariae ovale* ou *knowlesi* ainda representa uma desvantagem por não se tratar do mesmo DNA, porém, os ensaios *in vivo* auxiliam na avaliação do potencial antimalárico da amostra testada em relação aos aspectos clínicos (VANDENBERGHE et al. 1920; PETERS, 1975; JASEN, 2017).

## **2.2 A Família Apocynaceae e o gênero Aspidosperma**

Filogeneticamente, a família Apocynaceae é classificada como: Angiospermas Eudicotiledôneas, Núcleo Eudicotiledôneas Asterídeas Euasterídeas I, na ordem Gentianales (THE ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP, 2003). Incluem cinco

subfamílias: Rauvolfioideae (cosmopolita; contando com 10 tribos e 83 gêneros), Apocynoideae (cosmopolita; contando com 8 tribos e 80 gêneros), Periplocoideae (Origem europeia; contando com 33 gêneros), Secamonoideae (Origem européia; 8 gêneros) e Asclepiadoideae (cosmopolita; contando com 4 tribos e 172 gêneros; FENDRESS e BRUYNS 2000; ENDRESS et al. 2007).

Na subfamília Plumerioidea e tribo Plumerieae está inserido o gênero *Aspidosperma* (BOLZANI, 1987), cujas espécies são encontradas apenas nas Américas (LORENZI, 1998), principalmente na Argentina, Brasil, Bolívia, México, Paraguai e Peru (WOODSON, 1951). No Brasil foram catalogadas cerca de 52 espécies desse gênero, praticamente distribuídas em todos os ecossistemas (CORRÊA, 1931), tais como, caatinga, cerrado e florestas (AMORIM et al. 2005). Varias espécies de *Aspidosperma* são conhecidas popularmente como perobas, guatambus, carapanauba, pau-pereiro, amargoso e quina (CORREA, 1931).

Possuem importância econômica, pois fornecem madeira nobre com larga aplicação na carpintaria (LORENZI, 1998) e científica já que a maioria das espécies deste gênero são objetos de extensas investigações pela alegação de seus usos populares no tratamento de diversas enfermidades incluindo a malária (MEJIA e RENGIFO, 2000; PEREZ, 2002; DI STASI, 2002).

A atividade antimalárica das *Aspidospermas* tem sido atribuída aos alcaloides, tendo sido isolados, de 33 espécies de *Aspidosperma* brasileiras, mais de 100 alcaloides indólicos com grande variedade estrutural, dos quais, muitos deles continham esqueleto  $\beta$ -carbonílico simples, sistemas tricíclicos de anéis pirido-indólicos (ALLEN E HOLMSTEDT, 1980).

Uma catalogação de espécies de uso medicinal na Argentina revelou que 273 espécies eram comumente utilizadas, das quais destacava-se a *Aspidosperma quebracho blanco* relatada como antidídico, antiasmático, cicatrizante, febrífugo e para transtornos digestivos (SCARPA, 2000; DEL VITTO et al. 1997). Estudos *in vitro* demonstraram atividade antiplasmódica do extrato hidroetanólico das cascas desta espécie com  $CI_{50} = 3,9 \mu\text{g/mL}$  em cepa F32, sensível a cloroquina (BOURDY et al. 2004). Desta espécie também foram isolados e identificados cerca de 34 alcaloides (MARQUES, 1988), dentre os quais a aspidospermina, alcaloide indólico que foi também isolado de *Aspidosperma pyrifolium* e *Aspidosperma megalocarpon*, o qual demonstrou atividade antiplasmódica contra uma linhagem de *Plasmodium falciparum* resistente a cloroquina com  $CI_{50}$  entre 3,2 e 15,6  $\mu\text{g/mL}$ . (MITAINE-



OFFER et al. 2002).

*Aspidosperma excelsum* (sapopema) também é uma espécie com diversas aplicações na medicina popular. No Peru é utilizada por índios Shipibo-Conibo, para o tratamento da hepatite e malária e por outros nativos como afrodisíaco, vasodilatador, antiséptico, antimicrobiano, cicatrizante, para o aumento da pressão sanguínea e bronquite. No Brasil, é utilizada como carminativa, estomáquica, contra bronquite, inflamação, febre, diabetes, câncer e malária (MEJIA e RENGIFO, 2000; PEREZ, 2002). Desta espécie já foram isolados 18 alcaloides indólicos, tais como:  $\alpha$ -ioimbina, N-acetilaspidospermidina, excelsinina e aspexcina (MARQUES, 1988). Gomes (2011) demonstrou que o extrato de *Aspidosperma excelsum* foi ativo em clone W2 de *Plasmodium falciparum* sensível a mefloquina e quinina e resistente a cloroquina de em 24h de incubação ( $CI_{50} = 5,2 \pm 4,1 \mu\text{g/mL}$ ), de acordo com a metodologia proposta por Basco et al. (1994), modificado por Dolabela (2007), em que o extrato e frações foram classificados de acordo com a faixa de valores da  $CI_{50}$ : ativos ( $CI_{50} < 10,0 \mu\text{g/mL}$ ), moderadamente ativos ( $CI_{50}$  entre 10,0 e 100,0  $\mu\text{g/mL}$ ) e inativos ( $CI_{50} > 100,0 \mu\text{g/mL}$ ; Quadro 2). As demais concentrações inibitórias obtidas foram de  $12 \pm 8,6 \mu\text{g/mL}$  e  $16 \pm 12 \mu\text{g/mL}$ , em 48 e 72 horas respectivamente. Além disso, o extrato também não apresentou citotoxicidade, bem como nenhum sinal evidente de toxicidade aguda em camundongos, na dose oral de 5000 mg/mL. Estes resultados sustentam a idéia do uso etnofarmacêutico da *Aspidosperma excelsum* Benth (carapanaúba) como antimalárico (BRANDÃO et al. 1992).

Dolabela (2012) também confirmou a atividade antiplasmódica do extrato etanólico de *Aspidosperma cylindrocarpon*, o qual apresentou atividade moderada ( $CI_{50}$  entre 10 a 100  $\mu\text{g/mL}$ ) para os clones resistentes (W2) e sensível (3D7) a cloroquina. Neste mesmo estudo, o extrato diclorometânico das cascas de *Aspidosperma spruceanum*, rico em alcaloides, foi ativo em cepa W2 ( $CI_{50} < 10 \mu\text{g/mL}$ ), assim como o extrato etanólico das cascas de *Aspidosperma olivaceum* ( $CI_{50} = 5,0 \pm 2,8 \mu\text{g/mL}$ ) e o extrato etanólico das cascas de *Aspidosperma ramiflorum* que apresentou moderada atividade contra cepa W2 ( $CI_{50} = 19,75 \pm 0,35 \mu\text{g/mL}$ ), sendo ativo contra cepa 3D7 ( $CI_{50} = 0,98 \pm 0,03 \mu\text{g/mL}$ ; DOLABELA, 2012; Quadro 2). Esta espécie também apresentou atividade *in vivo*, com 66% de redução na parasitemia utilizando 250mg/Kg da fração neutra do extrato metanólico das cascas (AGUIAR et al. 2015; Quadro 2).

Outras espécies também demonstraram atividade antiplasmódica tais como a

*Aspidosperma macrocarpon* apresentando  $CI_{50} = 4,9\mu\text{g/ml}$  contra clone FcB1 (MESQUITA et al. 2007; Quadro 2), *Aspidosperma megalocarpon* com  $CI_{50} = 8\mu\text{g/mL}$  e  $CI_{50} = 25\mu\text{g/mL}$  contra clones D2 e F32 respectivamente (WENIGER et al. 2001), *Aspidosperma rigidum* que apresentou  $CI_{50} < 10\mu\text{g/mL}$  contra clone 3D7 (KVIST et al. 2006) e *Aspidosperma tomentosum* com  $CI_{50} = 26,50 \pm 3,50\mu\text{g/mL}$  em W2 e  $CI_{50} = 25,00 \pm 4,24\mu\text{g/mL}$  contra 3D7 (DOLABELA, 2007).

**Quadro 2:** Algumas espécies do gênero *Aspidosperma* spp. e suas respectivas atividades antimaláricas *in vivo* e/ou *in vitro*.

Espécies	Amostra	Atividade antimalárica	Referências
<i>Aspidosperma macrocarpon</i>	Extrato etanólico das raízes	<i>In vitro</i> : $CI_{50} = 4,9\mu\text{g/mL}$ em FcB1**	Mesquita et al. 2007
<i>Aspidosperma cylindrocarpon</i>	Extrato etanólico de caules e folhas	<i>In vitro</i> : $CI_{50}$ entre 10 a $100\mu\text{g/mL}$ para os clones W2** e 3d7*	Dolabela et al. 2012
<i>Aspidosperma excelsum</i>	Extrato etanólico das cascas	<i>In vitro</i> : $CI_{50} = 4,6 \pm 4,4\mu\text{g/mL}$ em clone W2** <i>In vivo</i> : 54% de redução na parasitemia com 125mg/Kg	Coutinho et al. 2013
	Extrato hidroetanólico das cascas	<i>In vitro</i> : $CI_{50} = 5,2 \pm \mu\text{g/mL}$ em clone W2**	Gomes, 2011
<i>Aspidosperma megalocarpon</i>	Extrato metanólico das cascas	<i>In vitro</i> : $CI_{50} = 8\mu\text{g/mL}$ em D2 e $CI_{50} = 25\mu\text{g/mL}$ em F32*	Weniger et al. 2001
<i>Aspidosperma oblongum</i>	Extrato etanólico	<i>In vitro</i> : $CI_{50} = 4742,5\text{ ng/mL}$ em W2**	Cabral et al. 1993
<i>Aspidosperma olivaceum</i>	Extrato etanólico das cascas	<i>In vitro</i> : $CI_{50} = 5,0 \pm 2,8\mu\text{g/mL}$ para W2** e $7,0 \pm 0,42\mu\text{g/mL}$ para cepa 3D7*	Dolabela et al. 2012
<i>Aspidosperma parvifolium</i>	Extrato etanólico das cascas	<i>In vitro</i> : $CI_{50} = 32,8\mu\text{g/mL}$ em W2** e $CI_{50} = 20,5\mu\text{g/mL}$ em 3D7*	Dolabela, 2007
<i>Aspidosperma quebracho-blanco</i>	Extrato hidroetanólico (3:7) das cascas	<i>In vitro</i> : $CI_{50} = 3,9\mu\text{g/mL}$ em F32*	Bourdy et al. 2004
<i>Aspidosperma ramiflorum</i>	Fração neutra do extrato metanólico das cascas	<i>In vivo</i> : 66% de redução na parasitemia com 250mg/Kg	Aguiar et al. 2015
	Extrato etanólico das cascas	<i>In vitro</i> : $CI_{50} = 0,98 \pm 0,03\mu\text{g/mL}$ em clone 3D7* e $19,75 \pm 0,35\mu\text{g/mL}$ em W2**	Dolabela et al. 2012
<i>Aspidosperma rigidum</i>	Extrato etanólico das cascas	<i>In vitro</i> : $CI_{50} < 10\mu\text{g/mL}$ em 3D7*	Kvist et al. 2006

	Extrato diclorometânico das cascas	<i>In vitro</i> : $CI_{50} < 10 \mu\text{g/mL}$ em clone W2**	Dolabela et al. 2012
<i>Aspidosperma spruceanum</i>	Extrato etanólico das cascas	<i>In vitro</i> : $CI_{50} = 26,25 \pm 4,07$ em W2** e $CI_{50} = 14,0 \pm 4,2$ em 3D7	Dolabela, 2007
<i>Aspidosperma tomentosum</i>	Extrato etanólico das cascas	<i>In vitro</i> : $CI_{50} = 26,50 \pm 3,50$ em W2** e $CI_{50} = 25,00 \pm 4,24$	Dolabela, 2007

\*Clone sensível à cloroquina; \*\* clones resistentes à cloroquina

Mediante a avaliação da atividade antiplasmódica das espécies de *Aspidosperma* é possível notar o potencial antimalárico do gênero. Apesar de algumas espécies como a *Aspidosperma excelsum* possuírem vários estudos fitoquímicos e de avaliação da atividade antimalárica, outras espécies carecem de estudos, como por exemplo, a *Aspidosperma eteanum*.

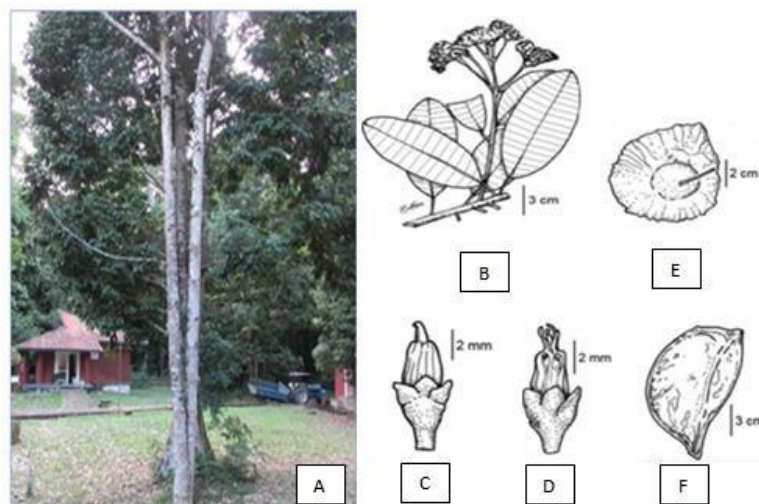
### 2.2.1. *Aspidosperma eteanum* Markgr.

*Aspidosperma eteanum* Markgr., da família Apocynaceae e gênero *Aspidosperma* Mart., é conhecida popularmente como araracanga, araracanga-preta, jararacanga, muirapyranga, pequiá-marfim, pitiá, quina da mata e guatambu-rugoso. Até o presente, nenhum estudo etnobotânico relacionou o uso popular desta espécie, porém é frequentemente encontrada em países como Venezuela, Colômbia, Equador e Guiana. No Brasil, é considerada uma espécie endêmica, e ocorre nos estados de Amapá, Amazonas, Maranhão, Pará e Roraima (WOODSON, 1951; PEREIRA et al. 2016). No Estado do Pará, esta espécie foi encontrada no Baixo Amazonas, Marajó, nordeste, sudeste e mesorregiões do sudoeste paraense (IBGE 1990).

Em termos botânicos, a espécie pertence à Classe Magnoliopsidia, ordem Gentianales e Família Apocynaceae (MARCONDES-FERREIRA, 1988) sendo considerada um sinônimo heterotípico de *Aspidosperma desmanthum* devido as semelhanças que dificultam a diferenciação de ambas as espécies. (MARCONDES-FERREIRA, 1988; KOCH et al. 2015).

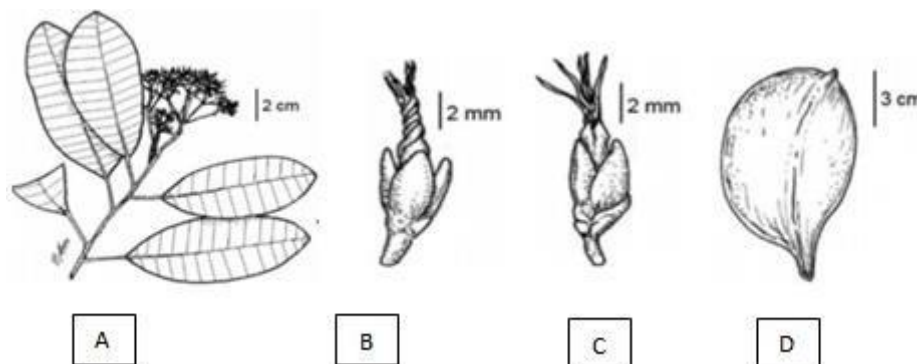
*Aspidosperma eteanum* é caracterizada como uma árvore medindo entre 12-38m com copa ampla e frondosa, tronco em linha reta de circunferência de 30-70cm (Figura 4A; PEREIRA et al. 2016) e látex de cor variando do laranja a avermelhado, de galhos pequenos e resistentes, com folhas alternadas (Figura 4B; PEREIRA et al. 2016) dispostas ao longo dos ramos, oval-alongadas, arredondadas, medindo entre 7-15 cm de comprimento e 3-7 cm de largura, botões florais (Figura 4C; PEREIRA et al. 2016) com lóbulos da corola torcidos, flores de 8-9 mm de comprimento (Figura

4D; PEREIRA et al. 2016), folículos medindo entre 8-9,5 x 6,5 cm com lenticelas discretas, amarelas ou castanhas (Figura 4E; PEREIRA et al. 2016) e sementes com 6,5 x 6 cm (Figura 4F; PEREIRA et al. 2016).



**Figura 4:** *Aspidosperma eteanum*.  
**Legenda:** A-árvore; B-galhos; C-botões florais; D-flores; E-Foliculos; F-Sementes  
**Fonte:** adaptado de Pereira et al. 2016.

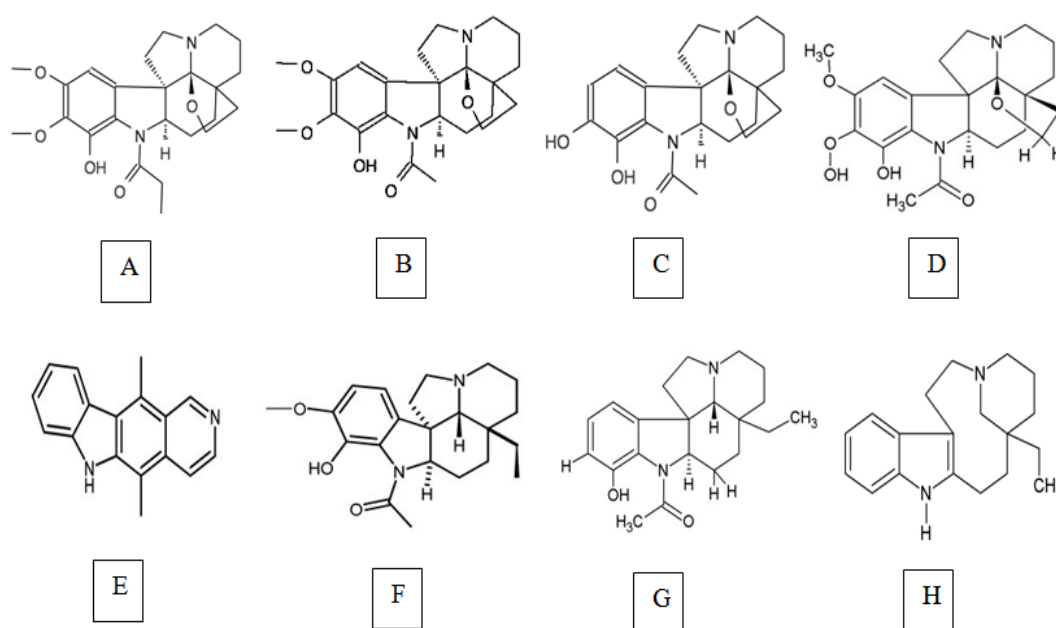
As principais diferenças botânicas ente a *Aspidosperma eteanum* a *Aspidosperma desmanthum* são as veias secundárias prominentes na superfície abaxial das folhas (Figura 5A), corola tubular (Figura 5B), comprimento dos lobos da corola (1-1,5 mm de comprimento; Figura 5C) e comprimento e forma das sementes (Figura 5D). Estas diferenças morfológicas acarretam dificuldades na identificação dessas espécies à medida que fatores ambientais podem interferir nas características morfológicas dos espécimes (MARCONDES-FERREIRA, 1988).



**Figura 5:** *Aspidosperma desmanthum*  
**Legenda:** A-galhos; B-botões florais; C-flores; F-Sementes  
**Fonte:** adaptado de Pereira et al. (2016).

*Aspidosperma desmanthum* possui importância econômica sendo a madeira

empregada na construção civil, como caibros, esteios para obras externas, dormentes para estradas, e importância medicinal, pois suas cascas são utilizadas no tratamento de doenças febris (MILLIKEN, 1997). No entanto, raros estudos foram realizados para avaliar a atividade biológica da *Aspidosperma eteanum*, mas estudos com sua sinonímia *Aspidosperma desmanthum* tem relatado o isolamento de alcaloides indólicos como a aspidoalbina (Figura 6A), N-acetilaspidoalbina (Figura 6B), Des-O-metilaspidolimidina (Figura 6C), cromatina (Figura 6D), elipiticina (Figura 6E), aspidoscarpina (Figura 6F), limapodina (Figura 6G) e quebrachamina (Figura 6H). Estudos de atividade antiplasmódica tem demonstrado atividade atribuída aos alcaloides já isolados na espécie como, por exemplo, a elipiticina (Figura 6E) e a aspidoscarpina (Figura 6F) que apresentaram  $Cl_{50}=73\mu\text{g/mL}$  e  $19 \mu\text{g/mL}$  respectivamente contra cepa multidroga resistente K1.



**Figura 6:** Alcaloides indólicos isolados da espécie *Aspidosperma desmanthum*.

**Legenda:** A- Aspidoalbina; B- N-acetilaspidoalbina; C- Des-O-metilaspidolimidina; D- Cromatina; E- Elipiticina; F- Aspidoscarpina; G- Limapodina; H- Quebranchamina

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Realizar os estudos farmacognósticos, fitoquímico e atividade antiplasmódica de *Aspidoperma eteanum* Markgr.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Realizar o controle de qualidade do pó através de estudos farmacognósticos;
- Obter o extrato etanólico e realizar seu fracionamento;
- Identificar e isolar o(s) componente(s) de *Aspidoperma eteanum* Markgr.;
- Avaliar a atividade antiplasmódica *in vitro* do extrato, frações e substância (s) isolada(s).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Material

#### 4.1.1 EQUIPAMENTOS

- Autoclave- Phoenix;
- Agitador-aquecedor – Fanem, modelo 258;
- Agitador – Phoenix, modelo AT:56;
- Balança analítica - Bioprecisa, modelo FA2104 N Eletronic Balance;
- Balança semi-analítica- Nucleo;
- Banho Maria – Acil, modelo MB-02;
- Banho de Ultrassom - Tecnal Equipamentos para laboratório, modelo 2210 Branson
- Bomba de vácuo – Fanem, modelo 08CA;
- Cabine de fluxo laminar vertical – VECO;
- Capela – Quimis;
- Centrifuga – Fanem, Excelsa Baby II, modelo206-R;
- Contador manual de células – Export quality, modelo MFD 205.
- Dessecador de vidro;
- Destilador de água •
- Estufa incubadora para B.O.D. (Demanda bioquímica de oxigênio) – Fanem, modelo 347;
- Evaporador rotatório – Fisatom;
- Geladeira – Brastemp, modelo BRB99;
- Medidor de pH – Marconi, modelo PA200;
- Micropipetas, volume ajustável de 5-10  $\mu\text{L}$ , 10-100  $\mu\text{L}$  e de 100 – 1000  $\mu\text{L}$  – eppendorf;
- Microscópio óptico - Olympus, modelo CHT;
- Moinho de facas - Marconi;
- Sistema de filtração de agua Millipore – Milli-Q Plus;
- Sistema de purificação de agua Millipore – Milli-Q Plus;
- Sistema de filtração a vácuo 250 mL, membrana 0,22  $\mu\text{m}$ - Biofil.
- Pipt-Aid- Drummond Scientific Co., modelo PA 19008.

#### 4.1.2 SOLVENTES

- Acetato de etila, Ácido acético, Ácido clorídrico, Ácido fórmico, Ácido fosfórico, Ácido sulfúrico, Clorofórmio, Diclorometano, Éter etílico, Hidróxido de amônio, Metanol, Tolueno grau PA (Isofar®);
- Acetonitrila grau CLAE, Metanol grau CLAE (Tedia Company®);
- Água deionizada (filtrada em sistema Milli-Qplus);
- Clorofórmio-D4 deuterado (Merck®);
- Etanol (Souza Cruz®)
- Metanol-D4 deuterado (Merck®)

#### 4.1.3 FASES ESTACIONÁRIAS

- Coluna de fase reversa RP 18 (5 µM) 12,5 cm LiChrocart 125-4 (Meck Millipore®)
- Sílica gel 60 (0,063 – 0,200mm) para cromatografia de camada delgada Flash (Merck);
- Sílica gel 60 para cromatografia de camada delgada Flash (Merck);

#### 4.1.4 MATERIAIS PLÁSTICOS, DE METAL E DE VIDRO

- Cuba cromatográfica;
- Espátulas de metal;
- Espalhador;
- Espátulas de metal;
- Estantes plásticas;
- Garrafas para cultura de células 75 cm<sup>2</sup>- TPP- Switzerland;
- Garrafas para cultura de células 25 cm<sup>2</sup>- TPP- Switzerland;
- Membranas filtrantes Millipore, Millex F6 0,22 mm;
- Papel alumínio comercial;
- Papel de filtro MN 618;
- Pipetas de Pasteur de plástico estéril;
- Placas de cultura de células de 96 poços, fundo chato com tampa- TPP;



- Placas preparativas - tamanho 20 x 20 cm;
- Ponteira 200 µl amarela, tipo universal- Labware Manufacturing CO;
- Ponteira 100-1000 µl, azul, tipo universal- Kartell S.P.A;
- Tubo cônico graduado 15 mL não estéril (Tipo Falcon);
- Tubo cônico graduado 50 mL estéril (Tipo Falcon) - Becton-Dicknson;
- Tubos de microcentrifuga (Tubos eppendorf) de 1,5 mL- Kartell SPA;
- Suporte de ferro.

#### 4.1.5 VIDRARIAS

- Balão volumétrico de 500, 1000 mL- Laborquimi;
- Bastão de vidro;
- Becker de 600, 1000 mL - Satelit;
- Erlenmeyes de 250, 2000 mL - Vidrolabor;
- Funil de separação de 100 ml - Schott Duran;
- Pipetas de vidro graduadas de 1 mL, 5 mL, 10 mL – Vidrolabor;
- Proveta de 250, 500 mL, 1000 mL – Vidrolex;
- Balões de fundo redondo de 100, 250 e 500 mL;
- Béqueres de 10, 50, 100, 500 e 1000 mL;
- Coluna cromatográfica de vidro 100 x 2,5 cm;
- Cubas cromatográficas;
- Erlenmeyers de 50, 100, 250 e 500 mL;
- Frascos Eppendorf, Sigma Chemical Company;
- Frascos de penicilina 50 mL;
- Funis de separação de 250 mL e 2000 mL;
- Pipetas de Pasteur de vidro;
- Pipetas volumétricas de vidro de 10 e 20 mL;
- Tubos vial para CLAE.

#### 4.1.6 MEIO DE CULTURA E OUTROS

- Bicarbonato de sódio – Sigma-Aldrich;
- Cloreto de sódio P.A- Cromoline química fina Ltda;

- D- Sorbitol – Sigma-Aldrich;
- D- Sorbitol – Sigma-Aldrich;
- D-Glicose – Sigma-Aldrich;
- Azul de metileno – Isofar;
- Corante Giemsa – Dinâmica química contemporânea Ltda;
- Fosfato de sódio monobásico anidro P.A- Labsynth produtos para laboratório;
- Fosfato de sódio dibásico anidro P.A- Labsynth produtos para laboratório;
- Gentamicin (Sulfato de gentamicina) 80 mg/2mL solução injetável- Neo-quimica;
- Glicerolyte – Baxter HEPES - Sigma-Aldrich;
- Iodeto de potássio - Synth
- Iodo ressublimado - Synth
- Meio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) com glutamina e 25 MM HEPES, isento de bicarbonato de sódio- GIBCO;

#### 4.1.7 REVELADORES PARA CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

##### 4.1.7.1 Ácido sulfúrico 5%

Para produção deste reagente, 2,5mL de ácido sulfúrico foram solubilizados em 50mL de etanol 96o v/v (WAGNER et al. 1984).

##### 4.1.7.2 Anisaldeído – Ácido Sulfúrico

Misturou-se 0,5mL de anisaldeído com 10mL de ácido acético glacial, seguido de 85mL de metanol e 5mL de ácido sulfúrico concentrado, nesta ordem. Em seguida, o reagente foi armazenado sob refrigeração a 2-8oC (WAGNER et al. 1984).

##### 4.1.7.3 Bouchardat

Foram dissolvidos 4g de iodeto de potássio e 2g de iodo ressublimado, em 100 mL de água destilada (MATTOS, 1997).

##### 4.1.7.4 Cloreto de Alumínio 2%

Pesou-se 1g de cloreto de alumínio, em seguida, o mesmo foi

solubilizado em 50 mL de metanol e a solução resultante foi armazenada em frasco âmbar sob refrigeração (28°C; WAGNER et al. 1984).

#### 4.1.7.5 Dragendorff

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

#### 4.1.7.6 Ferrocianeto de potássio a 1% e cloreto férrico a 2%

Solução A: 0,25g de ferrocianeto de potássio em 25 mL de água destilada. Solução B: 1g de cloreto de férrico solubilizado em 25 mL de água destilada. As soluções A e B foram armazenadas sob refrigeração em frascos âmbar e só foram misturadas (1:1) no momento do uso (WAGNER et al. 1984).

#### 4.1.7.7 Hidróxido de Potássio a 5%

Solubilizou-se 2,5g de hidróxido de potássio em 50 mL de metanol e a solução resultante foi armazenada em frasco âmbar sob refrigeração (2-8oC; WAGNER et al. 1984).

#### 4.1.7.8 Keede

Solução A: 0,5g de ácido 3,5-dinitrobenzoico em 25 mL de metanol. Solução B: 2g de hidróxido de sódio em 25 mL de água destilada sob banho de gelo. No momento do uso, as soluções foram misturadas na proporção de 1:1 (WAGNER et al. 1984).

#### 4.1.7.9 Liebermanm- Bouchardat

Misturou-se 5 mL de anidrido acético com 5mL de acido sulfúrico concentrado em 50 mL de etanol, em banho de gelo. O armazenamento da solução foi feito em frasco âmbar sob refrigeração de 2-8oC (WAGNER et al. 1984).

#### 4.1.7.10 Mayer

Solução A: 1,36g de cloreto mercúrio em 60 mL de água destilada. Solução B: 5g de iodeto de potássio em 20 mL de água destilada. Ambas as soluções A e B foram misturadas e diluídas para 100 mL de água destilada (MATTOS, 1997).

### 4.1.8 PREPARO DOS MEIOS E SOLUÇÕES UTILIZADOS NO CULTIVO

#### 4.1.8.1. Meio Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI) incompleto e meio completo

A solução estoque (meio incompleto) foi preparada em frasco Erlenmeyer solubilizando 50mg de hipoxantina, em chapa aquecedora a 40°C, em 400mL de água deionizada. Após completa solubilização da hipoxantina e resfriamento da solução, adicionou-se 2g de D-glicose (dextrose) e 5,98g de tampão HEPES. Em seguida, adicionou-se 10,4g do pó de RPMI 1640 (com L-Glutamina e sem Bicarbonato de sódio) em constante agitação até completa dissolução. A solução foi transferida para um balão volumétrico de 1000mL e completou-se o volume com água deionizada e em seguida, foi filtrada em sistema de filtro a vácuo descartável com membrana de 0,22µm em fluxo laminar e estocado em geladeira (4°C). No entanto, para o cultivo das cepas, utilizou-se meio completo obtido pela suplementação com 10% de plasma humano inativado (grupo sanguíneo do tipo A+), 7µl de gentamicina (40mg/mL) a cada 100 mL de meio e solução de bicarbonato de sódio para ajuste até pH = 7. O meio incompleto foi produzido a cada três dias conforme necessidade do cultivo e estocado sob-refrigeração.

#### 4.1.8.2 Outras soluções utilizadas no cultivo de *P. falciparum*

##### 4.1.8.2.1 Água tamponada

O fosfato de potássio monobásico anidro (9,3g) e o fosfato de sódio dibásico (1,15g) foram diluídos em água deionizada. Os sais foram misturados completando-se o volume para 500 mL de água deionizada com posterior verificação do pH 6,8. Triturou-se 1g de azul de metileno, 1g de fosfato potássico monobásico e 3g de fosfato de sódio dibásico heptaidratado. Desta mistura, 1g foi dissolvido em 1000 mL de água deionizada, sendo então filtrado e armazenado em frasco apropriado protegido de iluminação.

#### 4.1.8.2.2 Azul de metileno

Triturou-se 1g de azul de metileno, 1g de fosfato potássico monobásico e 3g de fosfato de sódio dibásico heptaidratado. Desta mistura, 1g foi dissolvido em 1000 ml de água deionizada, sendo então filtrado e armazenado em frasco apropriado protegido de iluminação.

#### 4.1.8.2.3 Meio para lavagem de hemácias

Este meio é preparado com 100mL de meio RPMI incompleto (solução estoque) para 2,1 de bicarbonato de sódio a 5%. Em seguida o meio é conservado sob-refrigeração e retirado no momento do uso.

#### 4.1.8.2.4 Solução de Bicarbonato de sódio

Pesou-se 5g de bicarbonato de sódio e solubilizou-o em 100mL de água deionizada. Após completa dissolução, a solução foi filtrada em filtro de 0,22 $\mu$ L para tubos estéreis em capela de fluxo laminar. A solução foi armazenada sob refrigeração e retirada apenas no momento do uso.

#### 4.1.8.2.5 Solução estoque de Giemsa

Solubilizou-se 1g de Giemsa (pó) em 54 mL de glicerina P.A, que foi aquecida sob agitação. Esperou-se a solução resfriar parcialmente e acrescentou-se 84 mL de metanol P.A e deixou-se por 24h a 37°C com agitação periódica. Em seguida, filtrou-se e estocou-se ao abrigo da luz. Para uso (coloração de lâminas), dilui-se uma parte da solução estoque em água tamponada, 2 gotas da solução concentrada para cada mL de água.

#### 4.1.8.2.6 Solução salina 12%

Foram dissolvidos 6g de cloreto de sódio em 50mL de água deionizada. A solução foi então filtrada em membrana de 0,22 $\mu$ m e estocada a 4°C.

#### 4.1.8.2.7 Solução salina 1,6%

Solubilizou-se 1,6g de cloreto de sódio em 100mL de água deionizada. A solução foi então filtrada em membrana de 0,22 $\mu$ m e estocada a 4°C.

#### 4.1.8.2.8 Solução de sorbitol 5%

Para esta solução pesou-se 5,0g de sorbitol e solubilizou-o em 80mL de água deionizada. Após completa solubilização, adicionou-se 0,5g de glicose e completou-se o volume até 100 mL com água deionizada. A solução foi então filtrada em membrana de 0,22µm e estocada a 4°C.

#### 4.1.9 MATERIAL BIOLÓGICO

##### 4.1.9.2 Plasma humano

O plasma foi cedido pelo Banco de Sangue da Fundação Hemopa, Belém-Pará. O sangue foi proveniente de pacientes doadores do grupo sanguíneo A fator Rh positivo (A+) o mesmo foi armazenado a temperatura de -20°C. Antes do uso, o plasma foi descongelado e feito sua inativação a 56 °C por 30 minutos. Em seguida, o plasma foi aliqotado em tubos de 15 mL e armazenado no freezer (-20°C). Somente no momento do teste, o plasma foi descongelado (a 37°C) e centrifugado, sendo utilizado o sobrenadante.

##### 4.1.9.3 Hemácias

As hemácias foram colhidas de doadores tipo A+, sem que estes tenham recebido qualquer forma de benefício. O sangue foi coletado em tubos contendo heparina e posteriormente transferido para um tubo (50 mL), onde foi adicionado meio RPMI incompleto. Em seguida, foi centrifugado a 2500rpm por 10 minutos, desprezando o sobrenadante e adicionado RPMI incompleto, seguido de uma nova centrifugação, repetiu-se o procedimento anterior até que o sobrenadante adquirisse coloração clara ou incolor. Ao final, adicionou-se meio RPMI completo ao precipitado na proporção de 1:1 e armazenado a 4°C.

##### 4.1.9.4 Clones de *Plasmodium falciparum*

Para o teste da atividade antiplasmódica in vitro, foi utilizado o clone W2 do *Plasmodium falciparum*, o qual foi cedido pela Dr<sup>a</sup>. Luzia Helena de Carvalho do Centro de Pesquisas René Rachou- CPqRR, FIOCRUZ, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. Este clone é originário da Indochina, sendo resistente a cloroquina e sensível a mefloquina.

#### 4.1.10 MATERIAL VEGETAL

As cascas de *Aspidosperma eteanum* Markgr. foram coletadas no dia 27/06/2015, no período da manhã, no município de Portel – Melgaço, Floresta Nacional de Caxiuanã, estado do Pará, Estação Científica Ferreira Pena (ECFP) nas coordenadas S 01° 44' 14,1". W 051° 27' 20,4", sob a descrição de árvore de aproximadamente 20m de altura com tronco ramificado e casca esbranquiçada. Folha de consistência coriácea com bordo ondulado e ápice obtuso. Fruto deiscente do tipo folículo com fendas na superfície externa, identificada pela Dra. Marlia Regina Coelho Ferreira. Uma exsicata foi depositada no Museu Paraense Emilio Goeldi (João Murça Pires) sob o no de registro MG\_Etn\_00558.

### 4.2 Métodos

#### 4.1.11 ESTUDOS FARMACOGNÓSTICOS

##### 4.1.11.2 Análise granulométrica

O pó da planta seca pulverizada (25g) foi colocado sobre um conjunto de tamises com abertura nominal 1,70 mm, 710, 250, 180 e 125 $\mu$ m, provido de tampa e tubo coletor. Estes foram colocados em tamisador vibratório e o pó foi submetido a passagem forçada por vibração na escala sete do aparelho, por cerca de 15 minutos. Após o término deste tempo, utilizando-se um pincel adequado, toda a amostra retida foi removida da superfície superior de cada malha para um papel impermeável para realizar a pesagem do pó. Este procedimento foi realizado em triplicata, e o tamanho das partículas foi determinado pela quantificação percentual de retenção do pó (BRASIL, 2010) calculado através da seguinte equação:

$$\% \text{ Retida pelo tamis} = \frac{P_1}{P_2 \cdot 100}$$

onde:

P1= Peso da amostra retida em cada tamis (em gramas);

P2 = Soma dos pesos retidos em cada tamis e no coletor (em gramas);

100 = Fator de porcentagem.

##### 4.1.11.3 Determinação do índice de espuma

Pesou-se exatamente 1 g do material vegetal reduzido a pó. O pó foi então

transferido para Erlenmeyer contendo 50 mL de água fervente e foi mantido sob fervura moderada durante 30 minutos. Após resfriamento, a solução foi filtrada para balão volumétrico de 100 mL. O decocto obtido foi distribuído em 10 tubos de ensaio com tampa em série sucessiva de 1, 2, 3, até 10 mL. O volume do líquido em cada tubo foi ajustado com água até o volume de 10 mL. Os tubos foram tampados e agitados com movimentos verticais por 15 segundos, com duas agitações por segundo. Após 15 min em repouso aferiu-se a altura da espuma, tendo como critérios para a classificação os itens demonstrados na tabela 1. O resultado foi expresso pela média de três determinações (BRASIL, 2010b). O índice de espuma é calculado, segundo a Farmacopeia Brasileira V ed. (2010), seguindo a Equação abaixo.

**Tabela 1:** Classificação do índice de espuma para uma amostra

Altura da espuma	Índice de Espuma
< 1 cm	É menor que 100
1 cm	A diluição do material nesse tubo é o índice observado
> 1 cm	É maior que 1000

Fonte: Brasil (2010).

$$\text{Índice de espuma} = \frac{1000}{A}$$

onde:

A= volume de decocto utilizado na preparação da diluição no tubo

#### 4.1.11.4 Determinação de cinzas totais

O material vegetal, 3 g da amostra pulverizada, foi transferido para cadinho de porcelana previamente pesado em balança analítica e calcinado a 450°C em forno mufla. A amostra distribuída uniformemente no cadinho foi incinerada aumentando-se gradativamente a temperatura até, no máximo, 600 ± 25 °C, até que todo o carvão fosse eliminado. O cadinho contendo o material foi retirado da mufla a cada 30 minutos, resfriado em dessecador e pesado. Este procedimento foi repetido até a diferença de peso entre duas pesagens consecutivas não ultrapassar 0,5 mg, conforme Farmacopéia Brasileira V ed. (BRASIL, 2010b). Após esta etapa foram calculadas as percentagens de cinzas em relação ao pó que foi submetido ao processo de secagem, sendo calculado o resíduo utilizando a equação a seguir. As



determinações foram realizadas em triplicata, sendo considerado como resultado final das amostras a média da triplicata.

$$\text{Cinzas (\%)} = \frac{\text{Resíduo do cadinho (g)} \times 100}{\text{Peso da amostra (g)}}$$

#### 4.1.11.5 Determinação do pH

Uma solução a 1% do pó do material vegetal em água destilada foi preparada e aquecida até ebulição em chapa elétrica por 5 minutos. Após esse processo, a solução foi filtrada em papel de filtro. Depois de resfriar mediu-se o pH do filtrado através do potenciômetro, devidamente calibrado em pH de 4,01 e 6,86 e o resultado foi obtido através da média de 3 determinações (BRASIL, 2010b).

#### 4.1.11.6 Determinação da densidade bruta do pó

A análise da densidade bruta do pó foi realizada pelo método da proveta que consiste em transferir o pó vegetal para uma proveta previamente pesada com capacidade para 25 mL, completando o volume com pó da planta até 15 mL. Durante a realização deste teste, as partículas de ar presentes na proveta foram removidas durante a compactação do pó. Em seguida, pesou-se a proveta contendo o pó, a obtenção do peso do pó se deu pela diferença entre o peso da proveta vazia e o peso da proveta contendo o pó. A densidade bruta foi obtida através da equação abaixo. Este procedimento foi realizado em triplicata (LACHMAN, 2001).

$$D = \frac{m(\text{pó})}{V}$$

Onde:

D=Densidade

m=massa

V=Volume

#### 4.1.11.7 Perda por dessecação

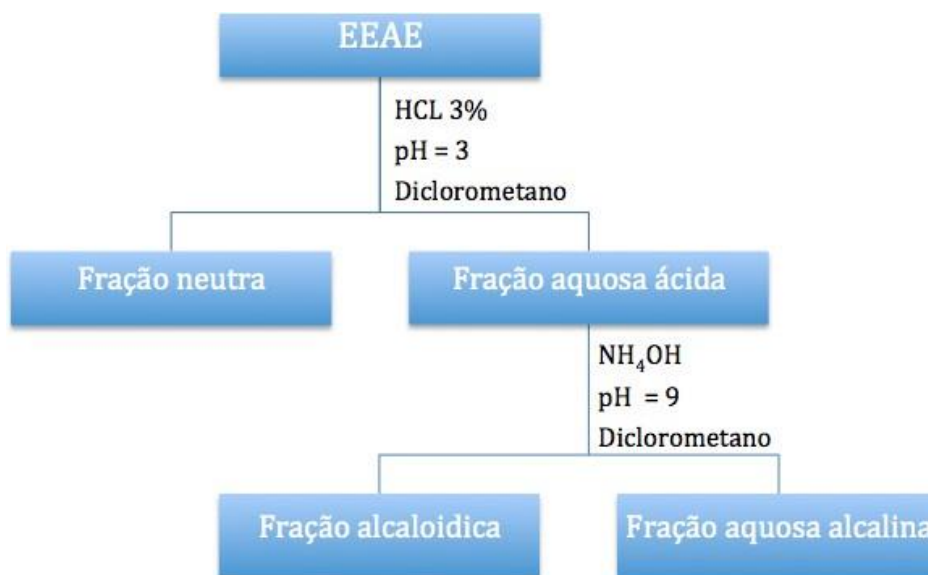
Para este experimento foram pesados 2 g de material vegetal que

posteriormente foram transferidos para pesa-filtro chato, dessecado, nas mesmas condições do teste, até atingirem peso constante. Agitou-se até a uniformização da amostra no pesa-filtro. Colocou-se o pesa-filtro destampado na estufa, juntamente com a tampa na estufa, para secagem da amostra a 105-110 °C, primeiramente por cinco horas, e depois de hora em hora até peso constante, ou seja, diferença entre pesagens consecutivas não exceder 0,5 mg, o experimento foi realizado em triplicata e o resultado expresso pela média das determinações (BRASIL, 2010b).

#### 4.2.2 ESTUDO FITOQUÍMICO

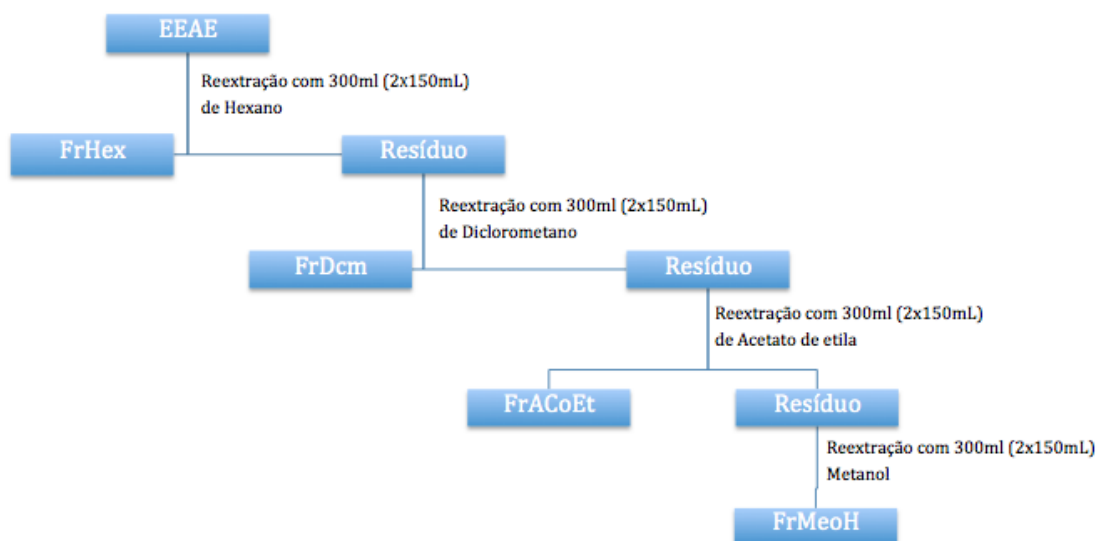
As cascas de *Aspidosperma eteanum* foram escovadas e lavadas em água corrente seguido por álcool 70% para retirada de impurezas e secas em estufa a 45°C por 7 dias. O material seco foi triturado em moinho de facas. Parte do pó obtido (1,000 kg) foi submetido à maceração exaustiva por 7 dias em temperatura ambiente com etanol (proporção peso/ volume 1:10) sendo a solução extrativa recolhida a cada 24h (17 dias consecutivos, volume final de 18L). Após esse período, a solução etanólica foi filtrada e concentrada até resíduo em rotaevaporador (T=40-45 °C) e o resíduo foi seco em estufa a 40 °C.

Para o fracionamento do extrato utilizou-se extração ácido-base e sob-refluxo. Na extração ácido-base, 5 g do extrato etanólico (EEAE) foi solubilizado em álcool metílico (10 mL), então foi adicionado à solução aquosa de ácido clorídrico (3%v/v) até pH 3,0. Adicionou-se diclorometano para partição em funil de separação (cerca de 250 mL por três vezes), então recolheu-se a fração diclorometano (Fração de Neutros). Na solução aquosa ácida foi adicionado hidróxido de amônio até pH 9. Depois, particionou-se com diclorometano (cerca de 250 mL por três vezes), em seguida coletou-se a fração diclorometano resultando nas frações de neutros (FNAE) e alcaloídica (FAAE; Figura 7).



**Figura 7:** Extração ácido-base do extrato etanólico de *Aspidosperma eleanum*

A segunda estratégia de fracionamento utilizada foi à extração sob-refluxo, o EEAE foi pesado (10,2 g) e colocado em balão de fundo redondo, solubilizado em metanol e submetido a um sistema de refluxo, aquecido a 40°C, no qual adicionou-se, a cada 20 min, 300mL de cada solvente (cerca de 150 mL por duas vezes) seguindo ordem crescente de polaridade (Hexano, Acetato de etila, Dichlorometano e Metanol), obtendo-se assim, 4 frações respectivamente, as quais foram concentradas em rotaevaporador (Figura 8). Todas as frações obtidas foram submetidas a análises em cromatografia em camada delgada com o objetivo de pesquisar alcaloides, utilizando como fase móvel acetato de etila, ácido acético, ácido fórmico e água destilada (0,8:1,5:1:27) e UV (250 e 360nm), Dragendorff e solução de ácido sulfúrico a 5% como reveladores (WAGNER et al. 1984).



**Figura 8:** Fracionamento sob refluxo do extrato etanólico de cascas de *Aspidosperma eteanum*.  
**Legenda:** EEAE-extrato etanólico da *Aspidosperma eteanum*; FrHex - fração hexânica do extrato etanólico; FrDCM - fração diclorometânica do extrato etanólico; FrACoEt- fração acetato de etila do extrato etanólico; FrMeOH- fração metanólica do extrato etanólico.

Como o extrato etanólico demonstrou presença de açúcares nas análises em RMN1H realizou-se uma metodologia para retirada do açúcar presente no extrato, na qual pesou-se 1g do extrato etanólico de *Aspidosperma eteanum*, em seguida foram adicionados 200 mL de água destilada. Esta solução foi dissolvida a em béquer com auxílio de um bastão de vidro e transferida para um funil de separação. Adicionou-se 100 mL de diclorometano (por três vezes) e a solução foi agitada. Após cerca de três minutos, houve a separação de fases e a fase aquosa foi recolhida. Em seguida adicionou-se 100 mL de metanol na fase diclorometano (por três vezes), após agitação e separação de fases, a fase diclorometano foi recolhida (FrPDcm) e por fim recolheu-se a fase metanólica (FrMeOH).

Visando o isolamento de substâncias, 2,5g de extrato etanólico (EEAE) foram fracionados em coluna cromatográfica aberta (dimensões: 30 cm de altura por 1,5 cm de diâmetro) empacotada com 100g de sílica gel 60 (0,063 – 0,200mm; 80 x 2,5cm) da marca MerckR. (Figura 9). Para a eluição foram utilizadas misturas de solventes com polaridade crescente (quadro 3).



**Figura 9:** Fracionamento do extrato etanólico de *Aspidosperma eteanum* em coluna cromatográfica aberta.

**Quadro 3:** Eluentes utilizados para obtenção das frações do extrato etanólico de *Aspidosperma eteanum* por cromatografia em coluna aberta de sílica gel.

Eluentes (proporções)	Frações obtidas
Hexano	01
Hexano + Dicloro (1:1)	02
Diclorometano	03-20
Diclorometano + Acetato de Etila (9:1)	21-29
Diclorometano + Acetato de Etila (7,5:2,5)	30-43
Diclorometano + Acetato de Etila (1:1)	44-57
Diclorometano + Acetato de Etila (1:9)	58-67
Acetato de Etila	68-80
Acetato de Etila + Metanol (8:2)	81-103
Acetato de Etila + Metanol (7,5:2,5)	104-105
Acetato de Etila + Metanol (7:3)	106-108
Acetato de Etila + Metanol (1:1)	109-112
Acetato de Etila + Metanol (1:9)	113-115
Metanol	116

As frações foram reunidas de acordo com a similaridade de seus perfis em cromatografia em camada delgada (CCD) de sílica e fase móvel acetato de etila, ácido fórmico, ácido acético e água (0,8:1,5:1,0: 27,0), reveladas em UV e reagente anisaldeído sulfúrico.

Para obtenção de maiores massas, 20 g de extrato etanólico (EEAE) foram fracionados em coluna cromatográfica aberta de filtração (dimensões: 40 cm de altura por 15 cm de diâmetro) empacotada com 650g de sílica gel 60 (0,063 – 0,200mm; 80 x 2,5cm) da marca Merck. Para a eluição foram utilizadas misturas de solventes com polaridade crescente (quadro 4).

**Quadro 4:** Eluentes utilizados para obtenção das frações do extrato etanólico de *Aspidosperma eleanum* (EEAE) por cromatografia em coluna aberta de sílica gel

Eluentes (proporções)	Frações obtidas
Hexano	FR1
Hexano + Acetato de Etila (9:1)	FR2
Hexano + Acetato de Etila (7:3)	FR3
Acetato de Etila	FR4
Acetato de Etila + Metanol (9:1)	FR5
Metanol	FR6

O extrato etanólico, fração metanólica obtida por extração sob refluxo (FrMeOH), fração de alcaloides obtida na partição ácido-base (FAAE) e sub-fração F38 foram selecionadas para análise por Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio (RMN 1H). Os espectros de RMN 1H foram feitos a 25 °C, utilizando-se tetrametilsilano (TMS) como referência interna. Para o preparo das amostras foram usados 7 mg solubilizados em metanol-d4 ou clorofórmio-d.

A fração FAAE também foi analisada por cromatografia líquida acoplada a espectro de massa (LC-MS; WATER® ACQUITY TQD SYSTEM/ESI). Para esta análise utilizou-se 1 mg da amostra, solubilizada em metanol grau CLAE (1mL), sob sonicação por 5 minutos. As condições cromatográficas adotadas foram: coluna de fase reversa CSH130 C18, detecção triplo quadrupolo (TQD), forno da coluna a 40 °C, utilizando diferentes solventes (metanol, acetonitrila, H<sub>2</sub>O 0,1% ácido fórmico. Na obtenção do espectro de massas empregou-se um sistema Acquity TQD (Waters) com ionização por eletrospray (ESI) modo positivo, com voltagem do capilar (3), voltagem do cone (30-35) e energia de colisão de (23-32).

Em síntese, o EEAE foi submetido aos seguintes estudos químicos: partição

ácido-base, extração sob-refluxo, teste para retirar açúcar do extrato, e coluna cromatográfica aberta de sílica gel.

#### 4.2.2.1 Análises cromatográficas

##### 4.2.2.1.1 Prospecção fitoquímica

O EEAE foi submetido a prospecção fitoquímica para traçar o perfil químico desta amostra. Para realização desta, utilizou-se 5 mg do extrato etanólico de *Aspidosperma eteanum* solubilizado em 250 µL de metanol. Foram pesquisadas as seguintes classes de metabólitos: triterpenos e esteróides, geninas flavônicas, heterosídeos flavônicos, cumarinas, saponinas, alcaloides, taninos, heterosídeos antracênicos e heterosídeos cardiotônicos. Para cada metabólito utilizou-se uma fase móvel e revelador específico (Quadro 5; WAGNER et al. 1984).

**Quadro 5:** Identificação dos metabólitos em cromatografia em camada delgada.

Metabólito	Condições	Observações
<b>Triterpenos e Esteróides</b>	Fase móvel: Hexano: Acetato de etila (8:2) Revelador: Reagente de Lieberbanm-Burchard	Manchas marrons ou acinzentadas (vis) e fluorescência do alaranjado ao vermelho (UV 365 e UV 254).
<b>Geninas Flavônicas</b>	Fase móvel: Clorofórmio: acetato de etila: Ácido fórmico (60:40:2,5) Revelador: Cloreto de alumínio a 2% em metanol	Observar em luz UV 365 e UV 254 antes e após revelação com cloreto de alumínio a 2%, sendo observada intensificação da fluorescência amarelo-esverdeada
<b>Heterosídes Flavônicos</b>	Fase móvel: Acetato de etila: Ácido fórmico: Ácido acético: Água (100:11:11:27) Revelador: Cloreto de alumínio a 2% em metanol	Observar em luz UV 365 e UV 254 antes e após revelação com cloreto de alumínio a 2%, sendo observada intensificação da fluorescência amarela Flavonóides: observar manchas de cor amarela (visível-vis.) e fluorescência amarelo-esverdeada (UV 365 e UV 254).
<b>Cumarinas</b>	Fase móvel: Tolueno: Éter (1:1) saturado com ácido acético (5 gotas) Revelador: Hidróxido de potássio a 5% em metanol	Observar em luz UV 365 e UV 254 antes e após revelação com hidróxido de potássio a 5%, sendo observada intensificação da fluorescência verde-azulada Cumarina não substituída: fluorescência amarela-esverdeada apenas após tratamento com hidróxido de potássio
<b>Saponinas</b>	Fase móvel: Clorofórmio: Metanol (95:5) Revelador: Anisaldeído	Manchas de cor azul ou azul-violeta e zonas amarelas (vis).
<b>Alcalóides</b>	Fase móvel: Clorofórmio: Metanol: Hidróxido de Amônio (85:15:0,2) Revelador: reagente de Dragendorff	Manchas de cor marrom ou alaranjada (vis.)
<b>Polifenóis</b>	Fase móvel: Acetato de etila: Ácido Fórmico: Ácido acético: Água (100:11:11:27) Revelador: Soluções de ferricianeto de potássio a 1% e cloreto férrico a 2%.	Manchas de cor negro-azulada ou negro-esverdeada (vis).
<b>Taninos</b>	Fase móvel: Acetato de etila: Ácido Fórmico: Ácido acético: Água (100:11:11:27) Reveladores: Soluções de ferricianeto de potássio a 1% e cloreto férrico a 2%	Manchas de cor negro-azulada ou negro-esverdeada (vis).
<b>Geninas Antraquinônicas e Naftoquinônicas</b>	Fase móvel: Tolueno: Acetona: Clorofórmio (40:25:35) Revelador: Hidróxido de potássio a 5% em metanol	<b>Antaquinonas e Naftoquinonas:</b> manchas de cor laranja ao vermelho (vis) e fluorescências de cor do alaranjado ao vermelho (UV 365 e UV 254). <b>Antrons e Antranóis:</b> manchas amarelas (vis) e fluorescências de cor alaranjada (UV 365 e UV 254).
<b>Heterosídeos Antracênicos</b>	Fase móvel: acetato de etila: metanol: água (81:11:8) Revelador: Hidróxido de potássio a 5% em metanol	<b>Antraquinonas:</b> originam manchas de cor laranja ao vermelho (vis) e fluorescências de cor do alaranjado ao vermelho (UV 365 e UV 254). <b>Antrons e Antranóis:</b> originam manchas amarelas (vis) e fluorescências de cor alaranjada (UV 365 e UV 254).
<b>Heterosídeos Cardiotônicos</b>	Fase móvel: Acetato de etila: Metanol: Água (81:11:8) Revelador: Reativo de Kedde	<b>Cardenólídeos:</b> manchas de coloração rosa ou azul-violácea

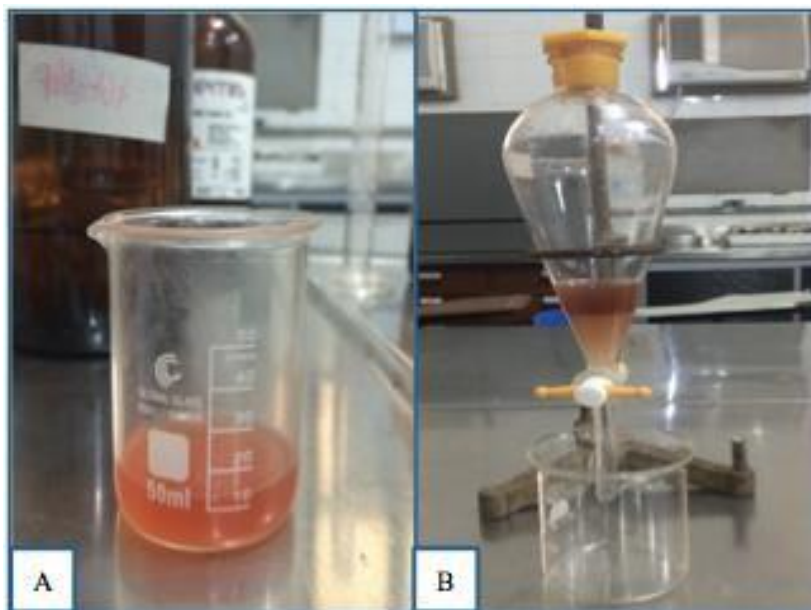
Fonte: Wagner et al. (1984)



#### 4.2.2.1.1 Pesquisa de alcaloides

O extrato etanólico obtido das cascas de *Aspidosperma eleanum* e suas frações foram avaliadas por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), tendo os reagentes de Dragendorff e UV (365 nm) como revedores para detectar a presença de alcaloides. Neste ensaio, o extrato (1mg), frações de neutros (1mg), alcaloídica (1mg), hexano (1mg), diclorometano (1mg), acetato de etila (1 mg) e metanólica (1 mg) foram solubilizadas em metanol (0,4 mL), aplicadas em placas cromatográficas, eluidas na seguinte fase móvel: 0,8mL de acetato de etila;1,5mL de ácido fórmico; 1 mL de ácido acético e 27mL de água, reveladas em UV (365 nm) e reagente de Dragendorff.

Além disso, realizou-se a pesquisa de alcaloides no pó da planta, sendo utilizado o seguinte método: pesou-se 2g de do pó de *Aspidosperma eleanum*, o pó foi colocado em um béquer, agitado com 10 mL de solução aquosa de ácido clorídrico a 1% e aquecido por alguns minutos. Após resfriamento, o decocto foi filtrado por meio de papel de filtro para um funil de separação (Figura10). O filtrado foi então alcalinizado com solução de hidróxido de amônio a 10%, utilizando como indicador o papel de tornassol. A solução alcalina foi extraída com diclorometano.



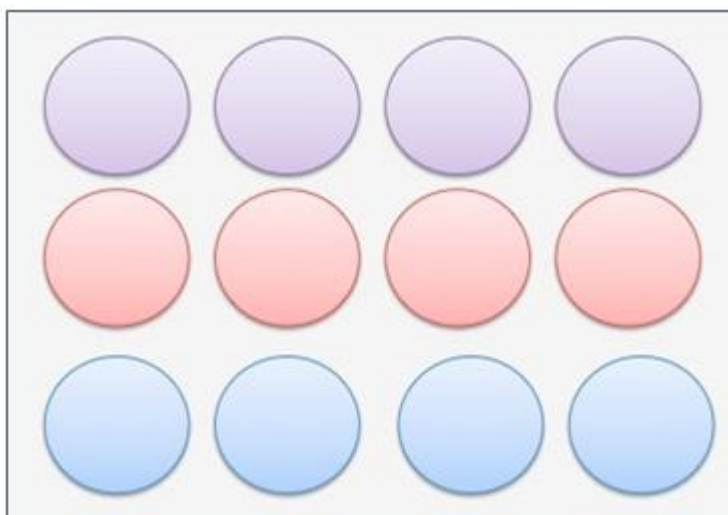
**Figura 10:** Pesquisa de alcaloides no pó de *Aspidosperma eleanum*

**Legenda:** A) béquer contendo 10ml de solução aquosa de ácido clorídrico a 1% e o pó da planta; B) filtrado foi então alcalinizado com solução de hidróxido de amônio a 10%.




Os extratos orgânicos obtidos foram filtrados para seus respectivos béqueres com auxílio de um algodão. O diclorometano contido nos extratos foi evaporado em

banho-maria, e o resíduo resultante foi redissolvido em 2 mL de ácido clorídrico diluído a 1%. A solução ácida (2 gotas) foi colocada em uma placa de porcelana de 12 poços com auxílio de uma pipeta de vidro de ponta fina, em seguida adicionou-se uma gota dos reativos de precipitação Mayer, Bertrand, Dragendorff e Bouchardat de acordo com a disposição apresentada na Figura 11 e, então, observou-se o aparecimento de mudança de coloração e formação de precipitados.

**Figura 11:** Disposição das amostras e reativos no teste de precipitação da solução ácida obtida por extração ácido-base (orgânica).



**Legenda:**

-  Reativo
-  Reativo + solução ácida
-  Solução ácida

4.2.2.1.3 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodo (CLAE-DAD).

O extrato e as frações provenientes da extração sob refluxo (FrHex, FrDcm, FrACoEt, FrMeOH) foram submetidas a cromatografia líquida de alta eficiência com detector de diodo (CLAE-DAD) assim como a fração F38-40, proveniente da cromatografia de coluna aberta que apresentou aspecto cristalizado. As amostras (1mg) foram solubilizadas em metanol grau CLAE (1mL) em banho ultrassônico. As análises em CLAE foram realizadas de acordo com as condições descritas na tabela 2. As leituras foram feitas na faixa de comprimentos de onda de 212-600nm, registrando-se cromatogramas nos comprimentos de 220nm para todas as amostras. A eluição foi realizada em sistema isocrático de água e ácido fosfórico (A) e acetoneitrila (B; Tabela 2).

**Tabela 2:** Sistema de eluição empregado nas análises por CLAE das frações obtidas por reextração sob refluxo e fração F38

Tempo (min)	Fluxo (ml/min)	Eluente A* (%)	Eluente B* (%)	Temperatura (°C)	Coluna	Deteção UV
0		95,0	5,0		LiChrospher	
60	1	5,0	95,0	40	100, C-18,	220 nm
65		5,0	95,0		125 x 4 mm	
70		95,0	5,0		5µm	

\* H<sub>2</sub>O + 0,1% ac. Fosfórico

\*\* Acetonitrila

As frações de maior rendimento obtidas em coluna de cromatografia aberta de filtração, FR3 e FR6, também foram solubilizadas de igual modo e submetidas a CLAE-DAD de acordo com as condições descritas na Tabela 3 registrando-se cromatogramas nos comprimentos de 220nm.

**Tabela 3:** Sistema de eluição empregado nas análises por CLAE das frações obtidas em cromatografia em coluna de filtração.

Tempo (min)	Fluxo (ml/min)	Eluente A* (%)	Eluente B** (%)	Temperatura (°C)	Coluna	Deteção UV
0		95,0	5,0		LiChrospher	
02	1	95,5	95,0	40	100, C-18,	220 nm
60		0,0	100		125 x 4 mm	
					5µm	

\* H<sub>2</sub>O

\*\* Acetonitrila

### 4.2.3. AVALIAÇÃO BIOLÓGICA

#### 4.2.3 Atividade antimalárica *in vitro*

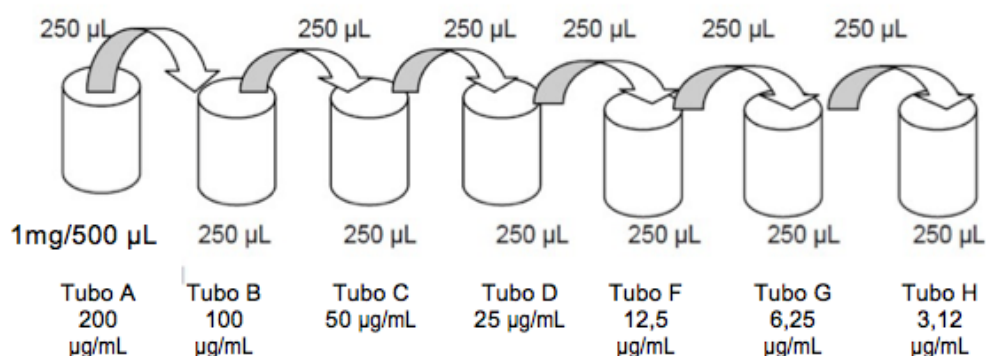
##### 4.2.3.1.1 Cultivo do *Plasmodium falciparum* e sincronização

O clone de *Plasmodium falciparum* (W2) foi retirada do crio-banco do Laboratório de Malaria do Instituto Evandro Chagas e descongelado a 37 °C. Após completo descongelamento, foram adicionados, para cada 1mL de sangue, 0,2 mL de solução salina estéril (NaCl) 12%, gota a gota, sob agitação, a solução final permaneceu em repouso por 5 minutos. Transcorrido o tempo de repouso, foram acrescentados (para cada 1 mL de sangue) 9,0 mL da solução salina estéril (NaCl) 1,6 %, gota a gota, sob agitação, com posterior centrifugação a 1500rpm/10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspensionado com 10 mL de meio RPMI completo (20 %), e transferido para garrafa de cultivo, na qual se acrescentou a suspensão de eritrócitos a 50% para obter hematócrito de 5% (5 gotas de sangue). Por fim, a garrafa de cultivo foi incubada a 37 °C após a colocação de uma mistura de gases (O<sub>2</sub> 5%; CO<sub>2</sub> 5%; N<sub>2</sub> 90%) com auxílio de um filtro micropore de 22mm durante 40 segundos (TRAGER e JENSEN, 1976).

O cultivo foi realizado pela metodologia de Trager e Jansen (1976), no qual diariamente foi trocado o meio RPMI previamente preparado com hipoxantina, L-glutamina, gentamicina, bicarbonato de sódio, D-glicose e tampão HEPES (5,98 g). Este meio foi ainda suplementado com 10% plasma humano tipo A+ inativado, tornando-se meio completo. Eritrócitos humanos adquiridos de doador saudável foram utilizados no cultivo, o qual foi anteriormente lavado com meio RPMI incompleto e ajustado a hematócrito de 50%. Após adição do meio de cultura e eritrócitos, o cultivo com hematócrito aproximado de 5% foi acondicionado em estufa a 37 °C.

Esfregaços e gota espessa foram corados com o corante Giemsa, sendo confeccionados diariamente para avaliação das formas do parasito, bem como o percentual da parasitemia. Quando a parasitemia foi superior a 6 % apresentando múltiplas formas (trofozoíto e esquizonte) do parasito, o cultivo foi sincronizado pela metodologia do sorbitol (LAMBROS e VANDERBERG, 1979). Após a sincronização, o ensaio foi realizado.

#### 4.2.3.1.2 Preparo das amostras testes



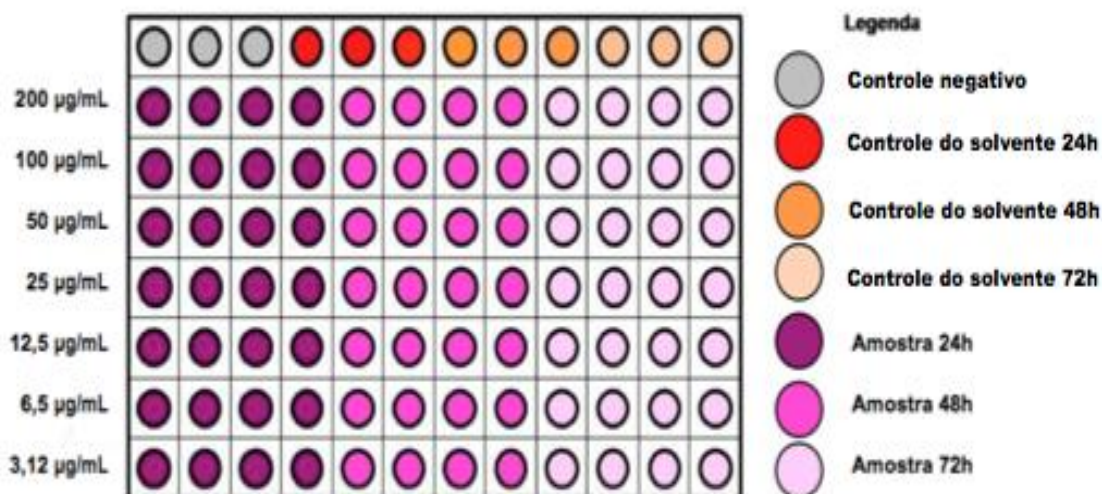
**Figura 12:** Esquema de solubilização de amostras e suas respectivas concentrações

Em um tubo pesou-se 1mg do material a ser testado (extrato e frações). Em capela de fluxo laminar, adicionou-se 500 µL de metanol. Após solubilização em banho ultrassom (sonicador), foi identificado como tubo B (solução mãe) e os outros seis tubos foram identificados em seguida com as respectivas letras: C, D, E, F, G, H. Então, adicionou-se nos tubos (C a H) 250 µL de metanol. Retirou-se do tubo B (solução mãe) 250 µL e distribuiu-se no Tubo C, homogeneizando a solução, em seguida realizou-se o mesmo processo até finalizar no tubo H (Figura 12). Adicionou-se 10 µL de cada diluição em uma placa de 96 poços de fundo chato e as placas foram deixadas abertas em capela de fluxo laminar até completa evaporação do metanol. As soluções não foram adicionadas nos poços do Controle Negativo e no Branco. Nos poços correspondentes ao controle do solvente (poços A1, A2 e A3) foram adicionados 10 µL de metanol (Figura 12).

#### 4.2.3.1.2 Teste de atividade antiplasmódica

A metodologia utilizada foi o microteste tradicional descrito por Rieckmann e colaboradores (1978), modificado por Carvalho (1990), no qual em placa de 96 poços pré-dosificada com diferentes concentrações das amostras (Figura 13) foram acrescentadas ao cultivo com formas (>90 %) de trofozoítos em parasitemia de 1% e hematócrito de 5%. Após 24-48h, o meio foi trocado e novas amostras foram acrescentadas nas mesmas concentrações. Ao final do teste (72 h), esfregaços foram confeccionados avaliando-se a parasitemia em comparação com o controle negativo, no qual colocou-se apenas o cultivo sem adição de fármaco ou amostra

teste, e controle negativo com adição de cloroquina, fármaco padrão utilizado no



**Figura 13:** Esquema da placa utilizada no teste de atividade antiplasmódica

teste de atividade antiplasmódica.

A Concentração Inibitória 50% ( $CI_{50}$ ) é a concentração que causa a redução de 50% das células em crescimento (viáveis) e foi determinada pelo programa GraphPad Prism versão 6.0. Conforme os resultados de  $CI_{50}$  obtidos na avaliação antiplasmódica as amostras foram classificadas de acordo com o padrão de classificação para extratos vegetais adotado por Dolabela (2007) e modificado por Paula (2014) que classifica as amostras como muito ativas, com resultados de  $CI_{50}$  inferiores a 1  $\mu\text{g/mL}$ ; ativas, com valores de  $CI_{50}$  compreendendo entre 1 e 15  $\mu\text{g/mL}$ ; moderadamente ativas, no qual os valores de  $CI_{50}$  estejam entre 15,1 e 25  $\mu\text{g/mL}$ ; pouco ativas, com valores de  $CI_{50}$  entre 25,1 e 50  $\mu\text{g/mL}$ ; e inativas com resultados de  $CI_{50}$  acima de 50  $\mu\text{g/mL}$  (Quadro 6).

**Quadro 6:** Classificação das amostras de acordo com resultados de  $CI_{50}$  para atividade antiplasmódica

$CI_{50}$ $\mu\text{g/mL}$	Resultados
Menor que 1	Muito ativo
Entre 1 e 15	Ativo
Entre 15,1 e 25	Moderadamente ativo
Acima de 25,1 e 50	Pouco ativo
Maior que 50	Inativo

**Fonte:** adaptados de PAULA (2014).

Desta forma, as amostras promissoras com massa suficiente foram encaminhadas para avaliação biológica de acordo com a descrição no fluxograma de trabalho (Figura 14).

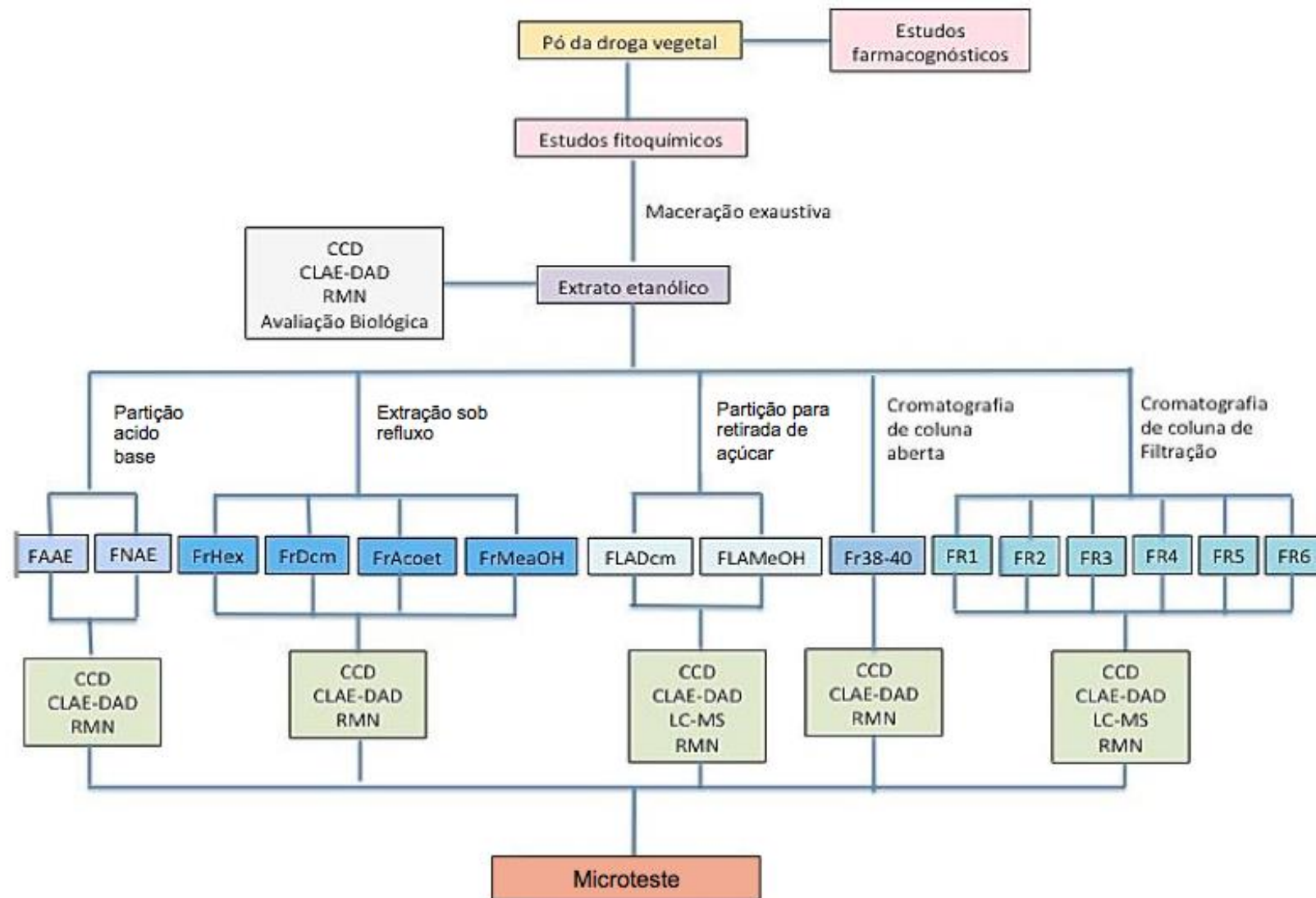


Figura 14: Fluxograma de trabalho

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 ESTUDOS FARMACOGNÓSTICOS

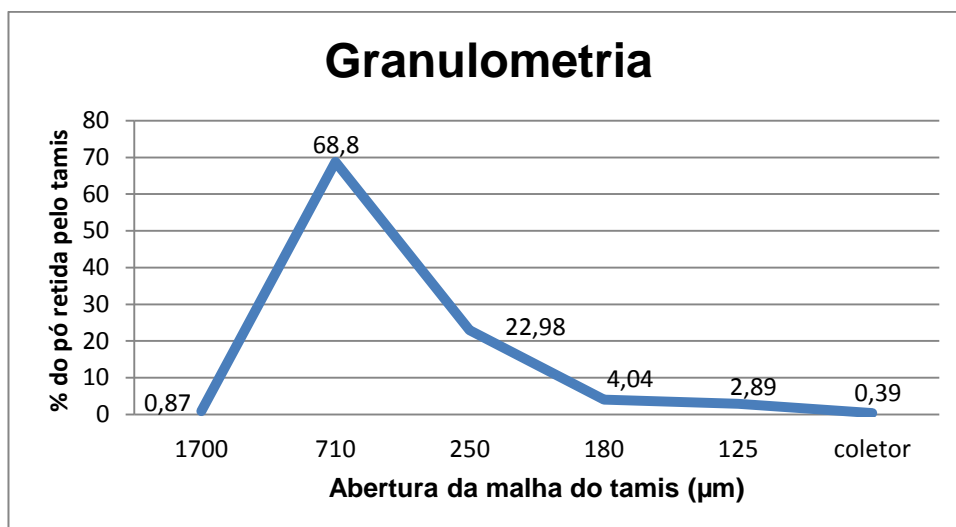
A granulometria foi avaliada em triplicata e demonstrou que 68,80% do pó das cascas de *Aspidosperma eteanum* ficou retido no tamis de malha 710  $\mu\text{m}$  (Tabela 4; Figura 15). De acordo com a Farmacopéia Brasileira 5ª. Ed. (BRASIL, 2010), o pó é classificado como moderadamente grosso, pois na análise granulométrica observou-se maior retenção de pó no tamis de malha com abertura de 710  $\mu\text{m}$ , e menos de 40% da totalidade no tamis de malha de 250  $\mu\text{m}$ . O resultado obtido pode ser consequência das características naturais da casca de *Aspidosperma eteanum* que se apresenta fibrosa dificultando o processo de pulverização.

O teste de granulometria é importante, pois a determinação do tamanho do grânulo do pó vegetal consta como parâmetro de avaliação para escolha do método mais eficiente para a extração de metabólitos secundários. Grânulos muito finos impedem a absorção do líquido extrator e diminuem a eficiência da extração, enquanto que partículas de alta granulometria podem reduzir a superfície de contato, diminuindo a eficiência do método (PÉRTILE, 2007).

**Tabela 4:** Análise da granulometria do pó obtido das cascas de *Aspidosperma eteanum*.

Abertura da malha do Tamis ( $\mu\text{m}$ )	% do pó retida pelo tamis $\pm$ desvio padrão
1700	0,87 $\pm$ 0,00
710	68,80 $\pm$ 9,54
250	22,98 $\pm$ 7,21
180	4,04 $\pm$ 0,68
125	2,89 $\pm$ 1,27
Coletor	0,39 $\pm$ 0,62





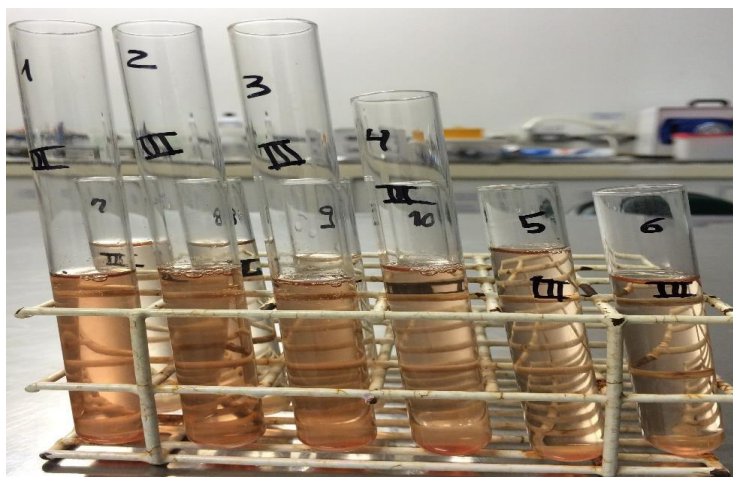
**Figura 15:** Porcentagem do pó retida pelos tamises.

Outro estudo farmacognóstico realizado foi o ensaio de cinzas totais, estando o resultado dentro dos padrões permitidos pela Farmacopeia Brasileira V edição (teor =  $1,04 \pm 0,53\%$ ; Tabela 5), cujo limite permitido é de até 14% de cinzas totais nos pós (BRASIL, 2010b). Este parâmetro é importante para o controle de qualidade do material vegetal, medida que avalia a quantidade de material inorgânico integrante da espécie (cinzas intrínsecas) com as substâncias aderentes de origem terrosa (cinzas extrínsecas; BRAGA et al. 2007). O resultado obtido neste estudo sugere a ausência de adulterantes na amostra estudada como substâncias inorgânicas não voláteis (BRASIL, 2010b).

Outra avaliação realizada foi à densidade aparente do pó, sendo esta densidade ( $0,56 \pm 0,010$ ; Tabela 5) considerada baixa quando comparada com a água ( $1,0 \text{ g/cm}^3$ ) que é o padrão para sólidos e líquidos, ou seja, esta amostra é menos densa, portanto ocupando um volume maior (MONTANHEIRO, 1990). A densidade aparente expressa a relação entre a massa de material seco e o volume real ocupado por essas partículas, não incluindo o espaço ocupado pelos poros (ZORZETO et al. 2014).

A determinação do índice de espuma é realizada para verificar a presença de saponinas, pois estas são substâncias derivadas do metabolismo secundário das plantas cuja estrutura química possui uma parte lipofílica e uma parte hidrofílica que lhes possibilita ações biológicas variadas que incluem a capacidade de formar complexos com esteróides, proteínas e fosfolípídeos de membranas. Alguns dos compostos saponósidos desorganizam a membrana dos glóbulos vermelhos do

sangue alterando sua permeabilidade podendo levar à destruição das células (SCHENKEL et al. 2001; ÁLVARES, 2006). Além disso, as saponinas apresentam outras atividades que lhes conferem o emprego como adjuvantes para aumentar a absorção de medicamentos pelo aumento da solubilidade ou interferência nos mecanismos de absorção e, como adjuvante para aumentar a resposta imunológica (CASTEJON, 2011). Por isso, é importante verificar a presença destas substâncias no extrato da planta que se pretende estudar. Em solução aquosa, estes compostos formam espuma persistente devido a parte lipofílica de sua estrutura denominada aglicona ou sapogenina e a parte hidrofílica constituída por um ou mais açúcares (SCHENKEL et al., 2001). No entanto, o teste realizado com o pó das cascas de *Aspidosperma eteanum*, apresentou a espuma de altura menor que 1cm em todos os tubos, considerando-se o índice de espuma menor que 100 (Figura 16; Tabela 5), o que indica a ausência de saponinas.



**Figura 16:** Teste de determinação do índice de espuma do pó de *Aspidosperma eteanum*

A determinação do pH é outro parâmetro muito importante, sendo obtido neste teste pH ácido ( $5,44 \pm 0,36$ ; Tabela 5). Plantas do gênero *Aspidosperma*, tais como a espécie utilizada neste estudo, em geral possuem alcaloides que são considerados marcadores taxonômicos desta classe sendo alvo de inúmeros trabalhos devido a larga aplicação terapêutica (BOURDY et al. 2004; OLIVEIRA, et al. 2009; DOLABELA et al. 2012). Os alcaloides possuem caráter alcalino, no entanto, o pH obtido indica a presença de substâncias de caráter ácido, o que pode sinalizar a presença de substâncias ácidos em maior quantidade do que os alcaloides.

A perda por dessecação, que é o indicativo percentual de material volátil no pó das cascas de *Aspidosperma eteanum* e, indiretamente, da umidade residual do mesmo, apresentou média percentual de  $9,964 \pm 0,0649\%$  (tabela 4) encontrando-se dentro dos limites estabelecidos (8-14%) pela Farmacopéia Brasileira V ed. (BRASIL, 2010b). A determinação do teor de umidade residual presente nas drogas vegetais constitui um índice de qualidade de sua preparação e da garantia de sua conservação (COSTA, 2001), logo os valores estabelecidos foram um indicativo de uma matéria prima vegetal com baixos teores de umidade, o que reduz a possibilidade do desenvolvimento de fungos e bactérias e processos de hidrólise e atividade enzimática com conseqüente deterioração de constituintes químicos (WHO, 1998).

**Tabela 5:** Análise farmacognóstica do pó das cascas da *Aspidosperma eteanum*.

Parâmetro	Média dos resultados obtidos $\pm$ Desvio Padrão
Granulometria	Moderadamente grosso
Índice de espuma	< 100 (negativo)
Teor de cinzas totais	$1,04 \pm 0,53\%$
pH	$5,44 \pm 0,36$
Densidade do pó	$0,56 \pm 0,010$
Perda por dessecação	$9,964\% \pm 0,0649\%$

Visando verificar se o pó da planta continha alcaloides, foi realizado o teste de precipitação utilizando os reativos de Mayer, Bertrand, Dragendorff e Bouchardat. Este revelou precipitação em todos os poços contendo os reativos, indicativo de alcaloides (Figura 17). Estes ensaios possuem baixo custo e são mais simples, porém são menos sensíveis que os métodos cromatográficos e podem ser observados resultados “falsos positivos” ou “falsos negativos”. No caso de falsos positivos, algumas substâncias, como por exemplo, a aglicona apresenta-se na forma de uma molécula pequena como um álcool, fenol ou um composto que contenha nitrogênio e enxofre, podendo revelar como o reagente de Dragendorff e outros reagentes (DENNY et al. 2007). Por isso, é preciso que a partir desses resultados, se realize outros estudos que avaliem os metabolitos das plantas (SOARES et al. 2016), como por exemplos prospecção em cromatográfica em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência com detectores de DAD e massa (CLAE-DAD, LC-MS).

	Reativo de Mayer	Reativo de Dragendorff 1	Reativo de Dragendorff 2	Reativo Bouchardat
Reagentes				
Reagentes + solução acida*				
Solução acida*				

\*Solução acida obtida por extração orgânica do pó de *Aspidosperma eteanum*

**Figura 17:** Teste de precipitação do extrato etanólico de *Aspidosperma eteanum*

## 5.2 ESTUDO FITOQUÍMICO

O EEAE obtido das cascas de *Aspidosperma eteanum* (rendimento = 5,92%; Tabela 8), utilizando maceração exaustiva como método extrativo (LIST e SCHIMIDT, 2000), apresentou rendimento superior ao rendimento obtido de outras espécies do mesmo gênero tais como a *Aspidosperma spruceanum* (3,5%), cujo extrato foi produzido pelo processo semelhante de extração (DOLABELA, 2007).

O extrato foi inicialmente submetido à prospecção fitoquímica utilizando o método de CCD (WAGNER et al. 1984). Os resultados da prospecção para o extrato revelaram a presença de cumarinas, esteroides e triterpenos, geninas e heterosídeos flavônicos e heterosídeos cardiotônicos (Tabela 6), no entanto os alcalóides foram encontrados apenas da fração FAAE.

Estes resultados não estão em concordância com outros estudos de prospecção de espécies do gênero no que se refere a presença de alcalóides pois espécies como a *Aspidosperma ramiflorum*, *Aspidosperma pyriformium*, *Aspidosperma cuspa*, *Aspidosperma spruceanum* e *Aspidosperma tomentosum* variaram quanto a presença dos demais compostos, mas foram unânimes quanto a presença de alcalóides em seus extratos (DOLABELA 2007; ALVES et al. 2014).

O extrato etanólico de *Aspidosperma eteanum* apresentou uma fluorescência azul em 365nm, porém estas bandas não foram reveladas em reagente de Dragendorff, o que sugeriu a ausência de alcalóides (Figura 16), no entanto, vários estudos fitoquímicos realizados com a espécie *Aspidosperma desmanthum*,

considerada sinonímia de *Aspidosperma eteanum*, levaram ao isolamento de alcaloides indólicos como aspidoalbina, N-acetilaspidoalbina (GARCIA et al. 1976), cromatina (HESSE, 1964), des-o-metilaspidoalbina (BOLZANI et al. 1987) e a quebranchamina (DJERASSI et al, 1962) sendo esta classe de metabólitos secundários considerada como marcador taxonômico do gênero (NUNES, 1980). Assim, pensou-se que estes poderiam estar em concentrações muito baixas e que o fracionamento poderia contribuir para a obtenção de frações com maiores teores de alcaloides.

Os alcaloides indólicos, na forma livre, são solúveis em solventes orgânicos como o clorofórmio e diclorometano (SOARES et al. 2016), então realizou-se a extração ácido: base, sendo obtidas as frações de neutros (rendimento=3,0%) e de alcaloides (rendimento=1,3%; Tabela 6). Com o objetivo de aumentar o rendimento que possibilitasse o isolamento de um alcaloide ou outro metabolito, o extrato etanólico também foi submetido a uma segunda técnica de fracionamento, uma extração sob-refluxo. A extração sob-refluxo resultou em quatro frações: a fração hexânica (FrHex; rendimento=2,96%; Tabela 6); fração diclorometano (FrDcm; rendimento=2,23%; Tabela 6); a fração acetato de etila (FrAcOEt; rendimento=1,75%; Tabela 6) e a fração metanólica (FrMeOH; rendimento=93,59%; Tabela 6). O maior rendimento da fração FrMeOH (93,59%; Tabela 6) sugere que este extrato é constituído principalmente de substâncias com características polares. Os alcaloides podem se ligar a ácidos e o produto possuir maior polaridade e ser solúvel em solventes de maior polaridade, como água (SOARES et al. 2016) e metanol. Também, heterosídeos em geral são solúveis em metanol, logo a fração metanólica pode conter os alcaloides e heterosídeos flavônicos.

**Tabela 6:** Rendimentos de extratos e frações obtidos das cascas de *Aspidosperma eteanum*.

Amostra	Sigla	Rendimento (%)
Extrato etanólico	EEAE	5,92
Fração hexânica	FrHex	2,96
Fração diclorometano	FrDcm	2,23
Fração acetato de etila	FrAcOET	1,75
Fração metanólica	FrMeOH	93,59
Fração de neutros	FNAE	3,00
Fração de alcaloides	FAAE	1,30

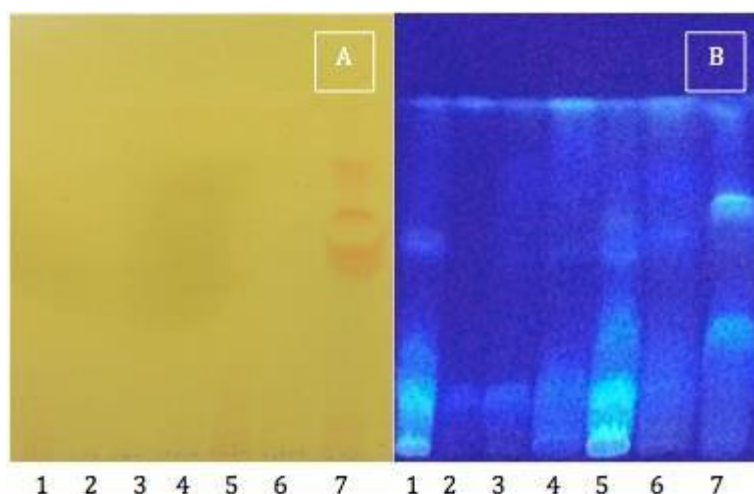
Então realizou-se uma prospecção fitoquímica em cromatografia em camada

delgada (CCD) das frações obtidas por extração sob refluxo e partição ácido-base. Todas as frações apresentaram cumarinas, esteróides e triterpenos. As frações FrHex, FrDcm, FrAcoEt, FrMeOH e FNAE apresentaram geninas flavônicas e heterosídeos favônicos. Apenas a fração FAAE revelou presença de alcaloides, o que pode ser um indicio de que o processo de extração ácido-base foi o mais eficaz dentre os processo de fracionamento utilizados para extrair frações ricas em alcaloides (Tabela 7; Figura 18).

**Tabela 7:** Resultado da prospecção fitoquímica do extrato e frações de *Aspidosperma eteanum* por cromatografia em camada delgada

Metabólitos	EEAE	FrHex	FrDcm	FrAcoET	FrMeOH	FNAE	FAAE
Alcaloides	-	-	-	-	-	-	+
Cumarinas	+	+	+	+	+	+	+
Esteróides e triterpenos	+	+	+	+	+	+	+
Geninas flavônicas	+	+	+	+	+	+	-
Heterosídeos							
Antracenicos	-	-	-	-	-	-	-
Heterosídeos cardiotônicos	+	+	+	-	+	-	-
Heterosídeos flavônicas	+	+	+	+	+	+	-
Polifenóis	-	-	-	-	-	-	-
Saponinas	-	-	-	-	-	-	-
Taninos	-	-	-	-	-	-	-

Metodologia de Wagner et al. 1984



**Figura 18:** Análise cromatográfica em camada delgada do extrato etanólico e frações de *Aspidosperma eteanum*, reveladas em UV (365nm) e reagente Dragendorff.

**Legenda:** EEAE - Extrato etanólico; FrHex - Fração Hexano; FrDcm - Fração diclorometano; FrAcoEt - Fração acetato de etila; FrMeOH - Fração metanólica; FAAE - Fração de alcaloides; FNAE Fração de neutro;

Também notou-se a presença de heterosídeos cardioativos que são

esteroides caracterizados pela sua alta especificidade e poderosa ação sobre o músculo cardíaco. Os esteroides ocorrem como glicosídeos esteroidais e, devido a sua ação sobre o músculo cardíaco, são denominados glicosídeos cardioativos (RATES et al. 2004).

Como o extrato e frações obtidos na extração sob-refluxo apresentaram comportamento semelhante no UV (Figura 18) e as frações obtidas na partição ácido-base baixo rendimento, os processos utilizados para o fracionamento não pareceram ser eficientes e adequados para a planta. Então optou-se pelo o fracionamento em coluna cromatográfica aberta.

O EEAE (2,5g) foi submetido ao fracionamento em coluna cromatográfica aberta de sílica gel, eluída com misturas de solventes com polaridade crescente (quadro 4), sendo obtidas 115 frações. Todas as frações foram avaliadas em CCD e frações com perfis cromatográficos semelhantes foram reunidas (Tabela 8).

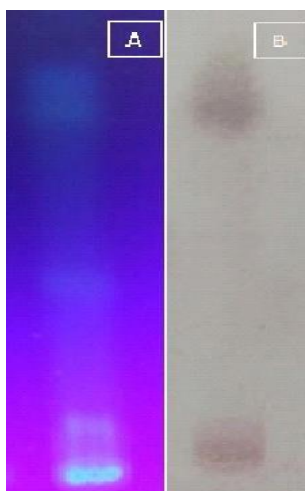
**Tabela 8:** Frações obtidas do extrato etanólico de *Aspidosperma eleanum* em cromatografia de coluna aberta.

Frações	Massa (g)	Rendimento (%)
Fr 1	0,0117	0,52
Fr 2	0,0210	0,93
Fr 3-23	0,4433	19,7
Fr 24-32	0,18,70	8,30
Fr 33-37	0,1031	4,58
Fr 38-40	0,2000	8,00
Fr 41-67	0,1759	7,80
Fr 68-78	0,1438	5,20
Fr 75-80	0,1501	5,21
Fr 81-105	0,1353	6,00
Fr 106-112	0,3037	13,49
Fr 113-116	0,1002	4,40

Dentre as frações, observou-se a formação de um precipitado com aspecto de cristais translúcidos na fração 38-40 (rendimento = 8%; Figura 21), azul em CCD quando revelado em UV 365nm (Figura 22), obtida com a mistura dos eluentes diclorometano e acetato de etila (7,5:2,5), sendo esta fração escolhida para análise em CLAE-DAD e RMN.



**Figura 20:** Precipitado com aspecto de cristais translúcidos obtidos na Fração 38-40.



**Figura 19:** Cromatografia de camada delgada do precipitado translúcidos obtidos na Fração 38-40.

**Legenda:** A) revelado em UV 356nm; B) revelado em anisaldeido

Como a análise em CCD não foi positiva para alcaloides no EEAE e nas frações obtidas por reextração sob-refluxo e partição para retirada do açúcar, mas foi positiva na fração de alcaloides obtida por extração ácido-base, pensou-se que os mesmos poderiam estar presentes em baixas concentrações no extrato, por isso, optou-se por realizar uma coluna de filtração para a obtenção de frações com maior massa que possibilitassem o posterior isolamento de substâncias como os alcaloides. Assim, o EEAE (20g) também foi submetido a uma coluna de filtração que resultou na obtenção das frações FR1, FR2, FR3, FR4, FR5 e FR6. Dentre as



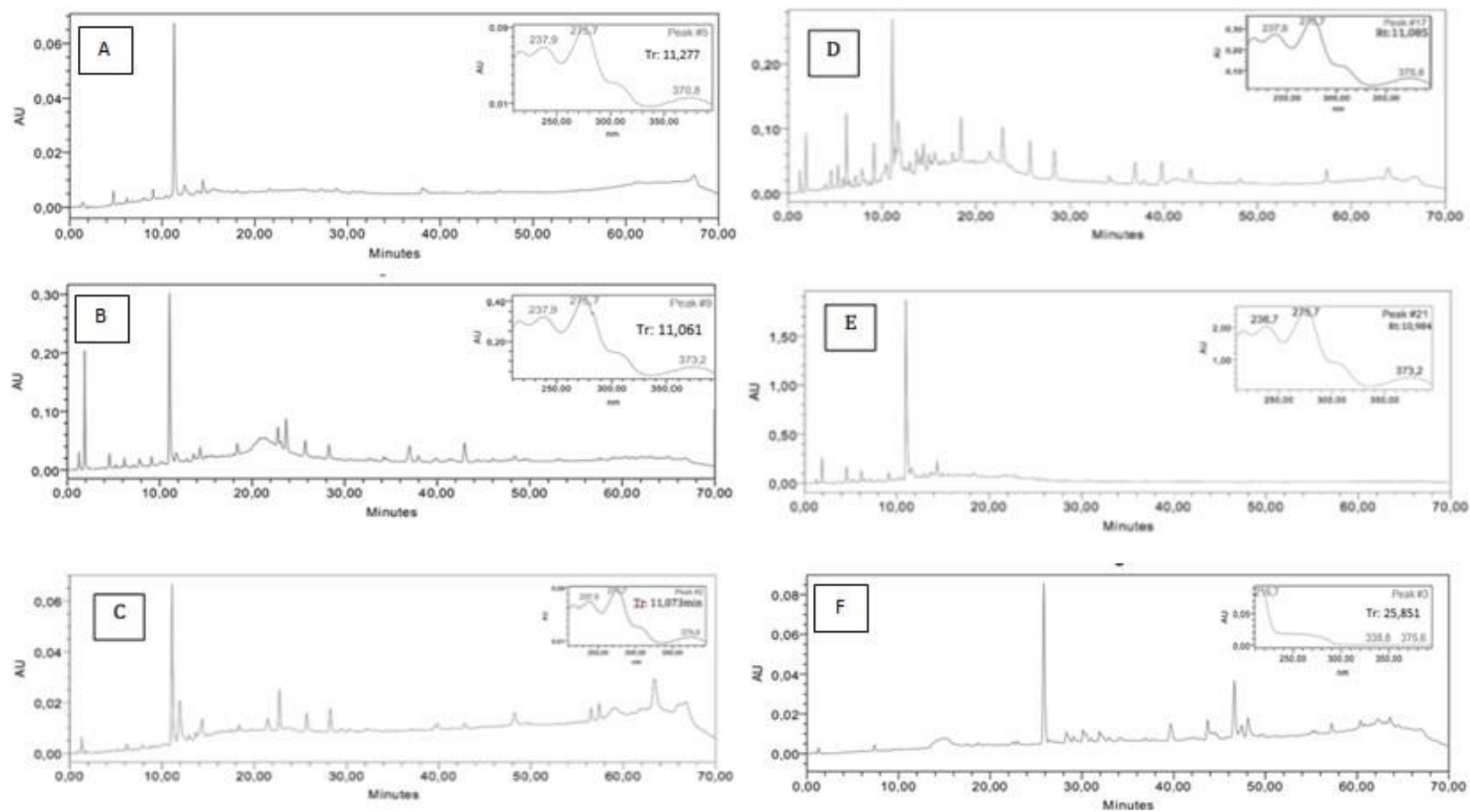
frações desta coluna, observou-se que o maior rendimento (32,09%) foi obtido na fração extraída com solvente de alta polaridade, isto indica que o componente(s) majoritário(s) do extrato possui alta polaridade.

**Tabela 9:** Frações obtidas do extrato etanólico de *Aspidosperma eleanum* em cromatografia de coluna aberta.

Frações	Massa (g)	Rendimento (%)
FR1	0,0084	0,04
FR2	0,0750	0,37
FR3	0,6674	3,33
FR4	0,3338	1,66
FR5	0,0610	0,30
FR6	6,4180	32,09

Como a CCD e o teste de precipitação são técnicas de baixa sensibilidade, em geral utilizadas em análises preliminares para identificação de possíveis componentes da amostra, na qual substâncias em baixas concentrações no extrato e/ou frações podem não ser detectadas, o EEAE, FrHex, FrDcm, FrAcoEt, FrMeOH, Fr38-40, e as frações de maior rendimento, obtidas na por meio da cromatografia de coluna aberta de filtração, FR3 e FR6 foram analisadas em CLAE-DAD, para avaliar se os espectros possuíam absorvâncias sugestiva de alcaloides, flavonóides e cumarinas, também selecionou-se os espectros dos compostos que apresentaram um pico mais intenso.

Dentre os picos com maior intensidade selecionados em cada uma das amostras testadas, foi possível notar que o EEAE, fração FrHex, fração FrDcm, fração AcoEt e a fração FrMeOH apresentaram um pico majoritário, com tempo de retenção em 11,277; 11,061; 11,073; 11,085 e 10,984min respectivamente, com  $\lambda_{max}$  de 237,9; 274,5 e 370,8nm e área de 73,41% no EEAE; 237,9; 275,7 e 373,2nm e 24,13% de área na fração FrHex; de 237,9; 275,7 e 374,4 com área de 40,15% na fração FrDcm;  $\lambda_{max}$  237,9; 275,7 e 375,6 e área de 14,49% na fração FrAcoEt e  $\lambda_{max}$  de 236,7; 275,7 e 373,2 e área igual a 54,11% na fração FrMeOH (Figura 22). As similaridades entre os tempos de retenção e  $\lambda_{max}$  indicam tratar-se de uma substância de alta polaridade presente no extrato e nas frações obtidas por extração sob refluxo. A F38 apresentou pico majoritário com tempo de retenção de 25,851 min, 46,42% de área e  $\lambda_{max}$  216,7; 338,8 e 375,6nm sugerindo a presença de uma substância de média polaridade (Figura 23).



**Figura 21:** Cromatograma de *Aspidosperma eteanum* e seus espectros em ultravioleta.

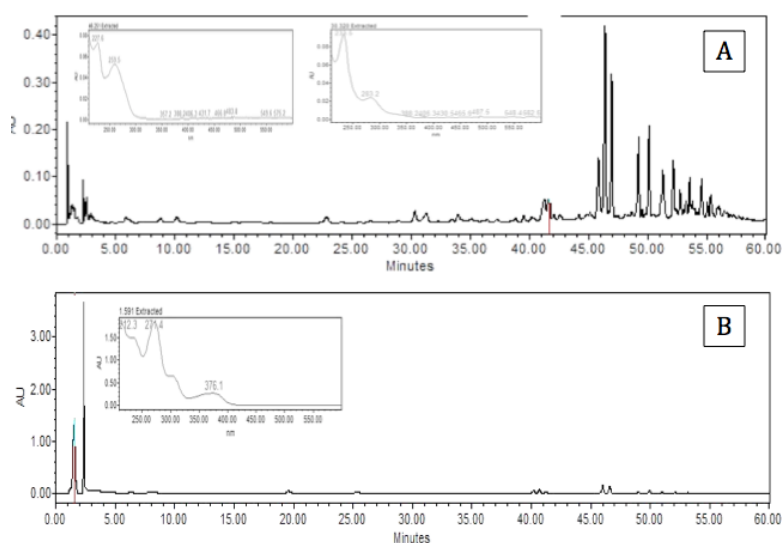
**Condição:** coluna LiChrospher 100, C-18, 5 $\mu$ m (125 x 4 mm), fluxo= 0,5 mL/min, temperatura 40°C.

**Fase móvel:** t= 0 min: 95% de H<sub>2</sub>O + 0,1% ac. Fosfórico e 5% de Acetonitrila, t=60 min: 5% H<sub>2</sub>O + 0,1% ac. Fosfórico 5% e 95% de acetronitrila, t=65 min: 5% de H<sub>2</sub>O + 0,1% ac. Fosfórico e 95% de acetronitrila, t=70 min: 95% de H<sub>2</sub>O + 0,1% ac. Fosfórico e 5% do eluente acetronitrila.

**Legenda:** A. Extrato etanólico; B. Fração Hexano; C. Fração diclorometano; D. Fração Acetato de etila; E. Fração metanólica; F. Fração 38.

O pico majoritário da fração FR3 com tempo de retenção em 46,251 apresentou  $\lambda_{max}$  de 227,6 e 259,5 (Figura 24A) referente a um composto de media polaridade e o pico obtido em 30.320 com  $\lambda_{max}$  de 233,5 e 283,2 (Figura 24B) apesar da pequena área e portanto baixa concentração na fração, o mesmo foi destacado na figura abaixo porque assemelha-se com o espectro ultravioleta do alcaloide indolico Razina (Figura 24A). Este alcaloide indolico ja foi isolado em espécies da família Apocynaceae tais como a *Rhazya stricta* (Akhgari et al. 2015) e apresenta  $\lambda_{max}$ .227, 279 e 291 similares ao obtido na fração FR3 (Figura 24A).

A fração FR6 apresentou pico majoritario no tempo de retenção de 1,591 e  $\lambda_{max}$  212,3; 271,4 e 376,1 (Figura 23-B) de espectro ultravioleta semelhante ao apresentado nas frações extraídas a partir do extrato sob refluxo.

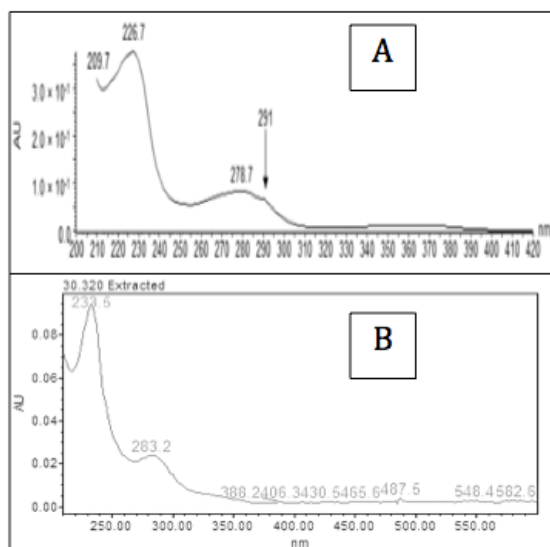


**Figura 22:** Cromatograma das frações FR3 e FR6 obtidas por coluna de cromatografia aberta de filtração a partir do extrato etanólico de *Aspidosperma eteanum* e seus espectros em ultravioleta.

**Legenda:** A. Fração FR3; B. Fração FR6

**Condição:** coluna LiChrospher 100, C-18, 5 $\mu$ m (125 x 4 mm), fluxo= 1,0 mL/min, temperatura 40°C.

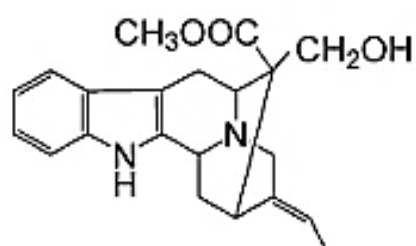
**Fase móvel:** t= 0 min: 95% de H<sub>2</sub>O e 5% de Acetonitrila, t=2 min: 95% H<sub>2</sub>O e 5% de acetronitrila, t=60 min: 100% de H<sub>2</sub>O.



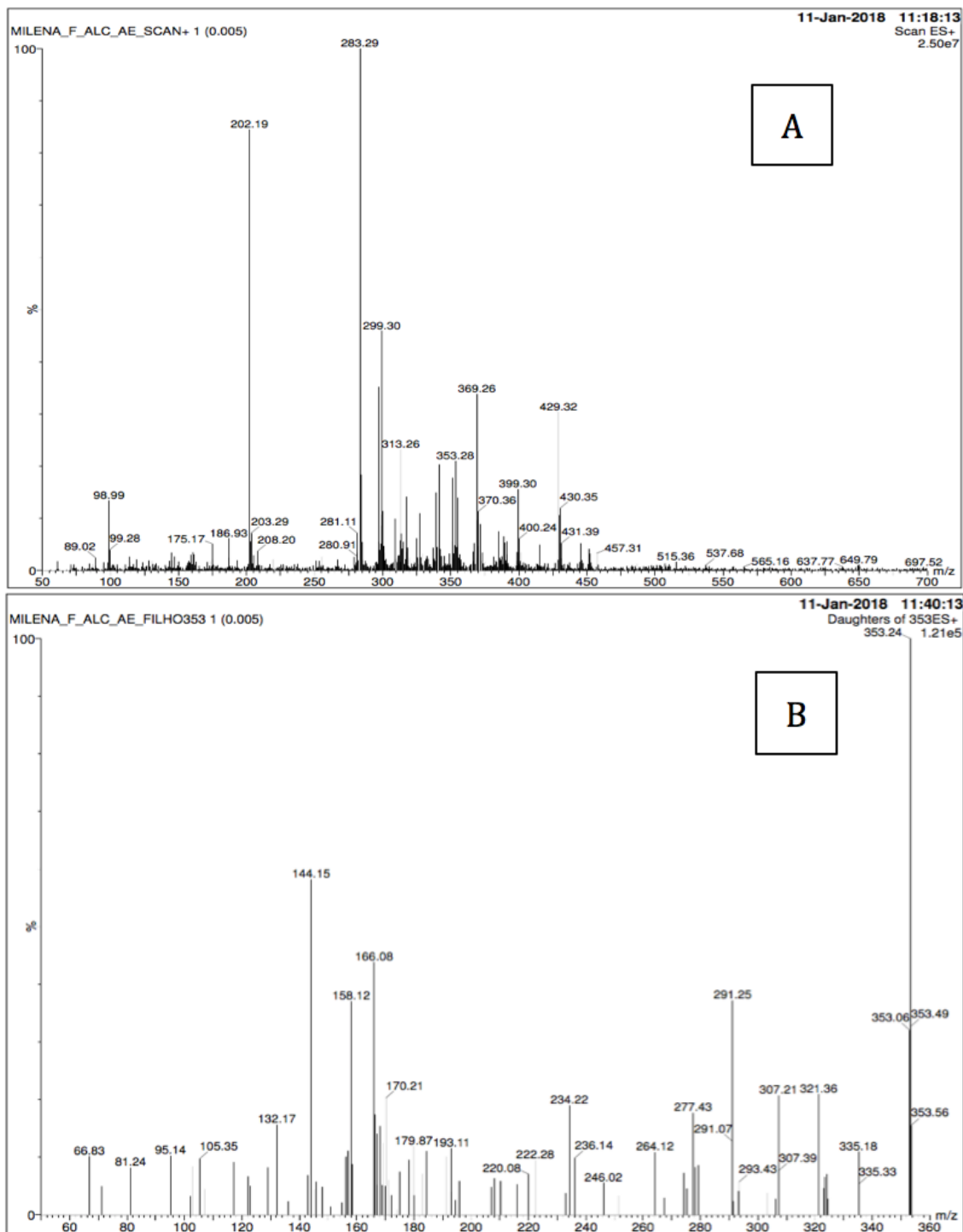
**Figura 23:** Espectros em ultravioleta do alcaloide indólico Rhazine.

**Legenda:** A - Alcaloide indólico Rhazine isolado de *Rhazya stricta* por Akhgari et al (2015); B – Espectro em ultravioleta obtido a partir do fracionamento do extrato de *Aspidosperma eteanum*.

A análise por LC-MS da fração FAAE (Figura 27A) revelou o íon molecular  $m/z$  353.28  $[M+H]^+$  o que reforçou a hipótese da presença do alcaloide Rhazina (Figura 26) nesta fração. A fragmentação desse íon (Figura 27B) originou o íon de  $m/z$  335,18 relativo à perda de 18 unidades de massa referentes a uma molécula de água ( $H_2O$ ; Figura 28), o íon de  $m/z$  321,36 após perda de 32 unidades de massa sugestivo da perda de uma molécula neutra de metanol ( $CH_3OH$ , Figura 28), e o íon de  $m/z$  321 após perda de 30 unidades de massa (referentes uma molécula de aldeído; Figura 28) gera o íon de  $m/z$  291,25. Ainda podemos ver a perda de 209 unidades a partir do íon-molecular (353) gerando o fragmento em  $m/z$  144 relativo à retro Diels-Alder (Figura 28). No entanto o alcaloide apresentou área pequena no cromatograma (Figura 24A) indicando que o teor do mesmo é, provavelmente, muito reduzido o que inviabilizou seu isolamento.

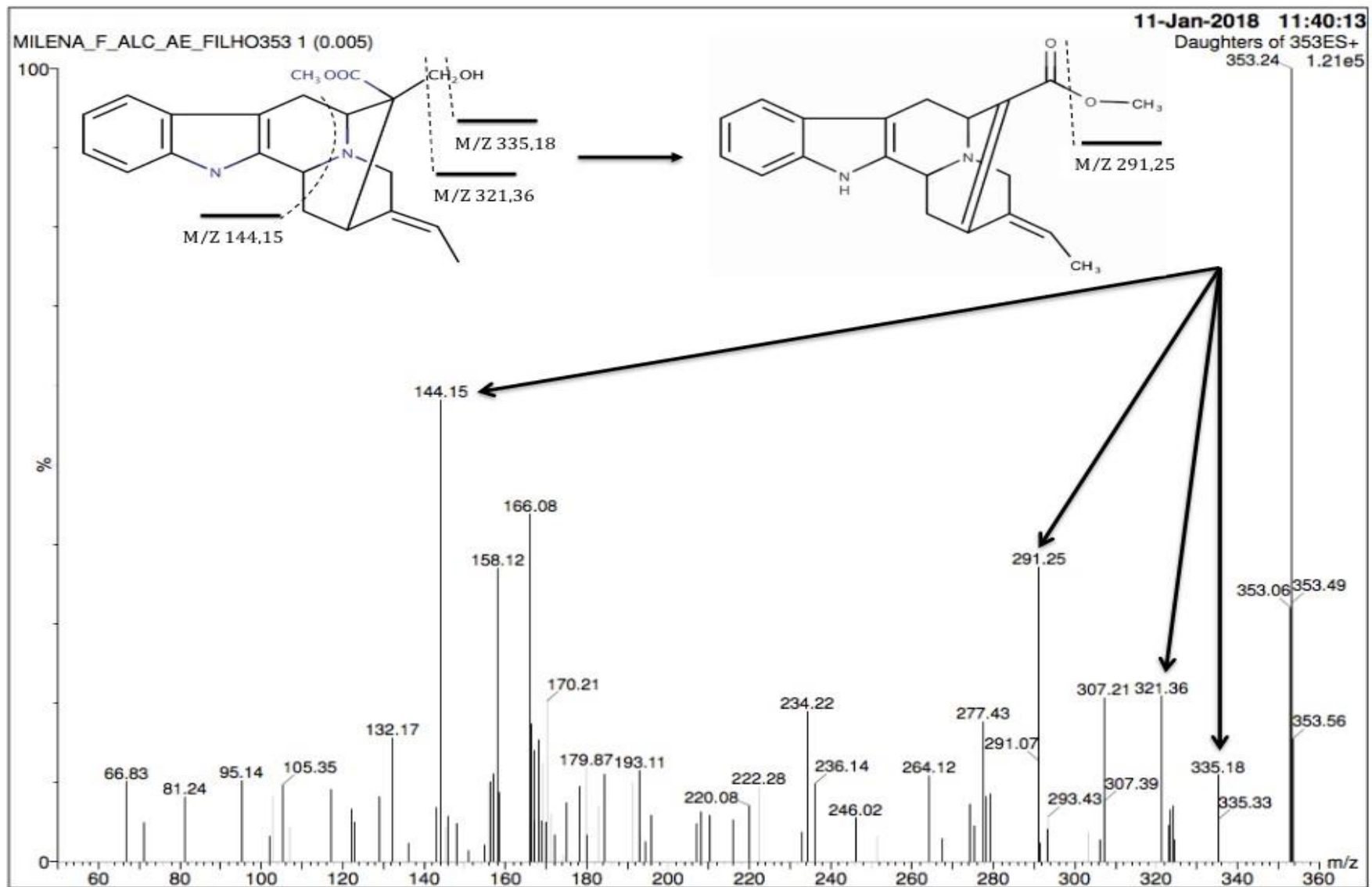


**Figura 24:** alcaloide Rhazina.



**Figura 25:** Espectro de massa da fração de alcaloides de *Aspidosperma eteanum*.

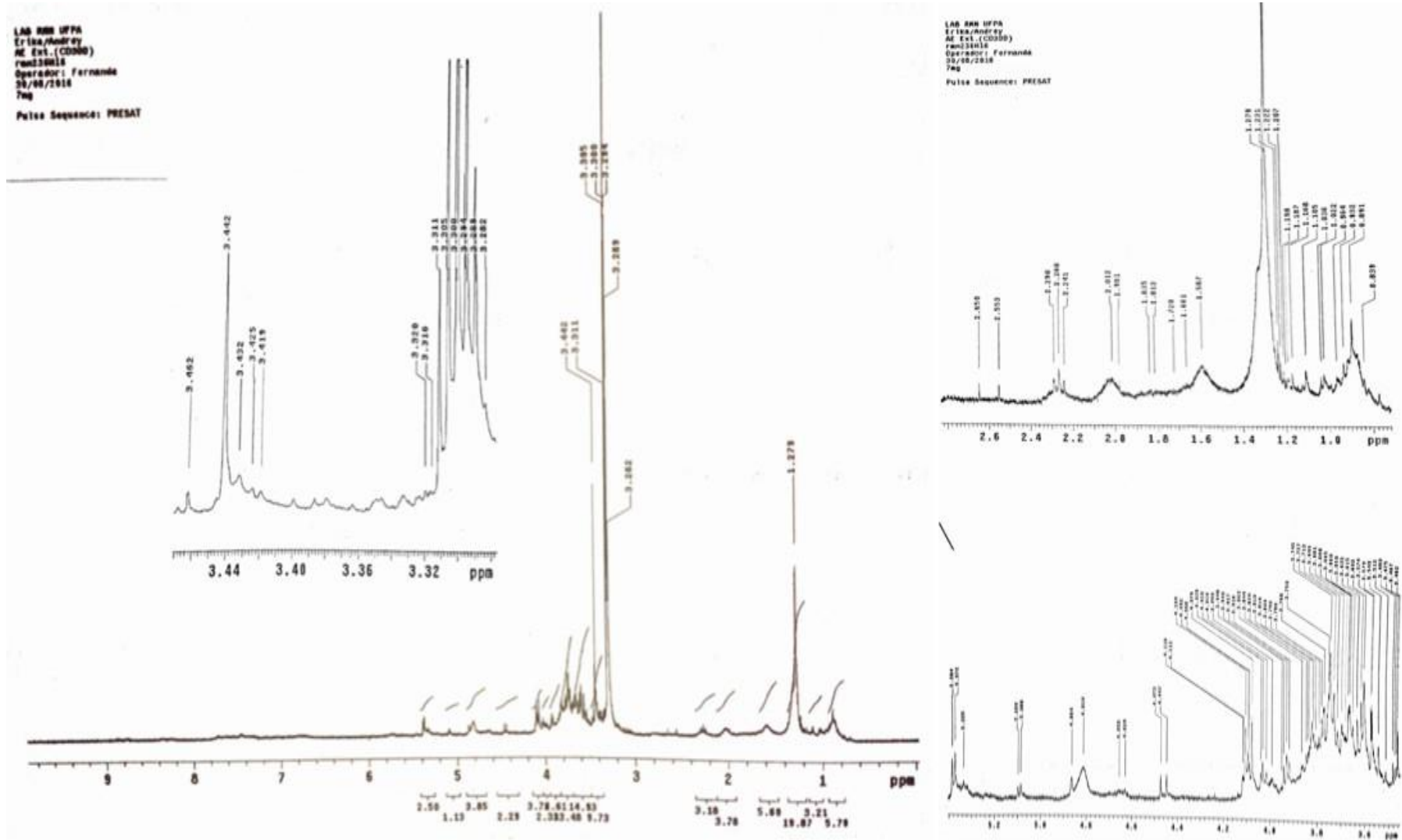
**Legenda:** A - Espectro de massa de íon totais no modo positivo de ionização da fração de alcaloides;  
 B - Fragmentação do pico 353 da fração de alcaloides.



**Figura 26:** esquema de fragmentação do alcaloide Rhazina no fragmento 353 da fração de alcaloides do extrato etanólico de *Aspidosperma eteanum* FAAE.

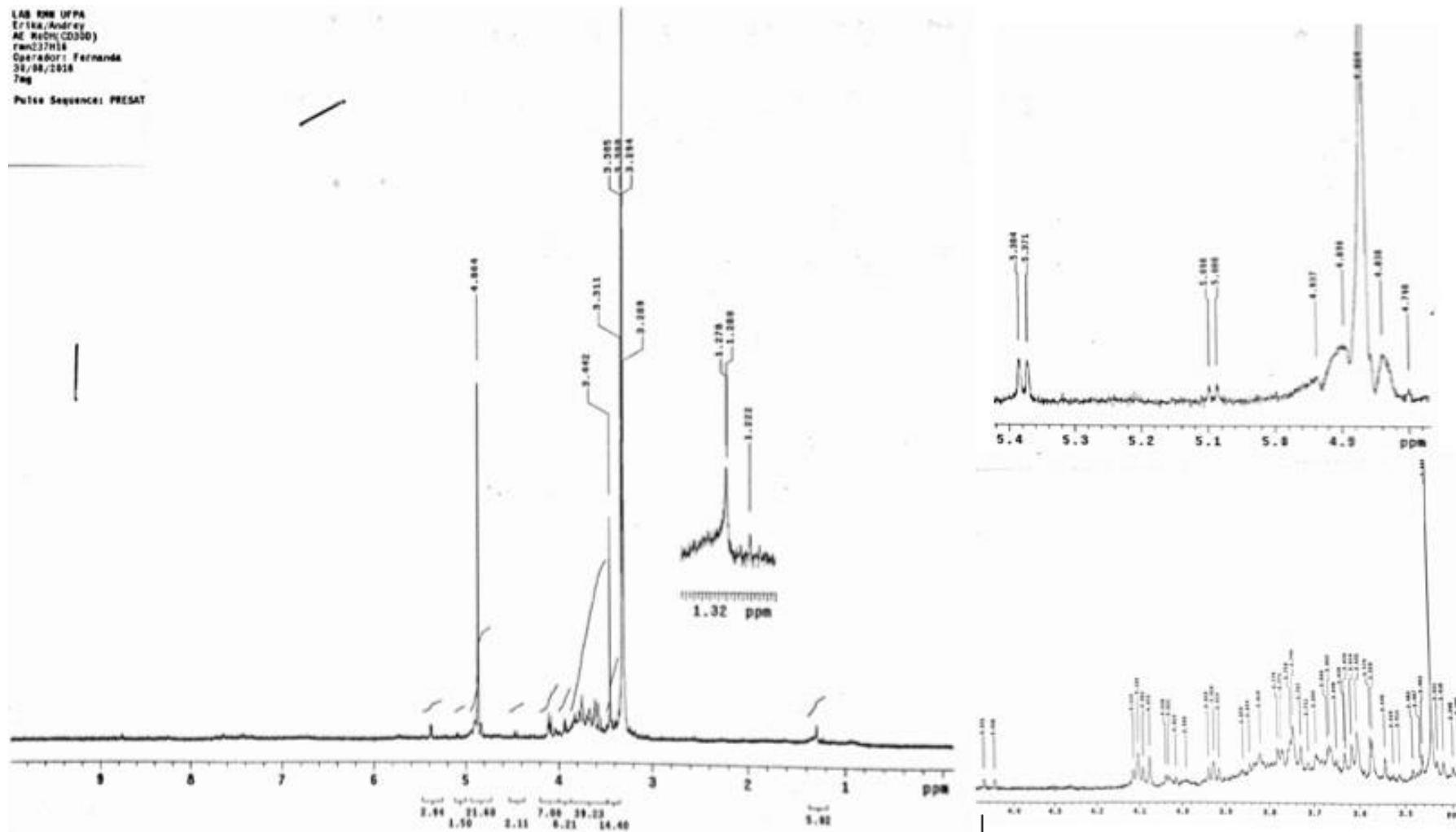
Para avaliações mais detalhadas, o EEAE, a FrMeOH (que obteve maior rendimento dentre as frações obtidas na extração sob refluxo) foram submetidas a análise em RMN.

Tanto o espectro de RMN  $^1\text{H}$  do EEAE quanto o da FrMeOH apresentaram sinais entre 3,00 e 4,50 ppm sugestivos de açúcares (Figura 29; 30). Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  de açúcares são caracterizados por um sinal multipletto em  $\delta$  3,50-4,50 referentes aos hidrogênios carbinólicos do composto. O intervalo para os hidrogênios da hidroxila dos álcoois (-C-O-H) presentes nos açúcares é variável e pode prolongar-se de  $\delta$  2,5 a 5,0. Os ésteres são geralmente encontrados no mesmo  $\delta$  que a maioria dos álcoois (3,5-4,5; MCMURRY, 1996; KEHLBECK et al. 2014).



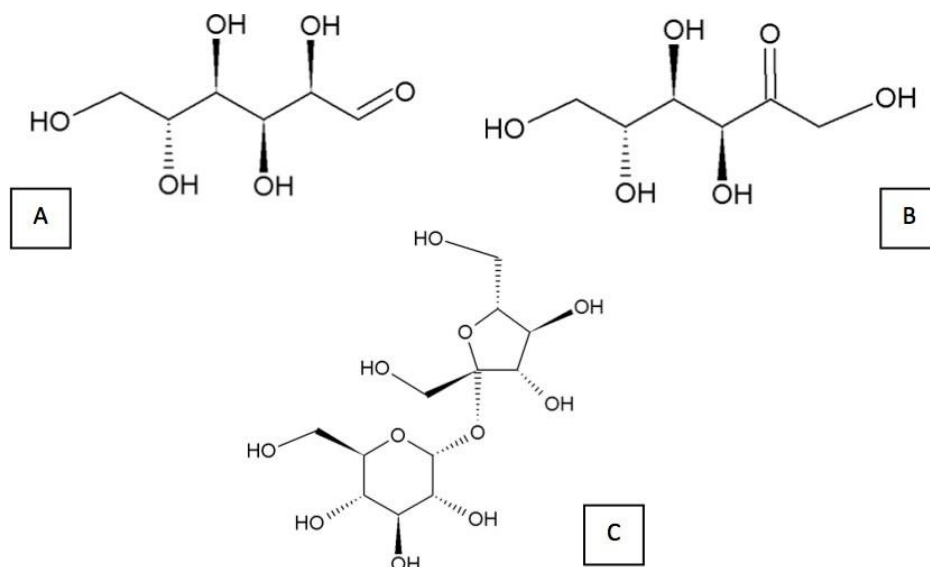
**Figura 27:** esquema de fragmentação do alcaloide Rhazina no fragmento 353 da fração de alcaloides do extrato etanólico de *Aspidosperma eteanum* FAAE.



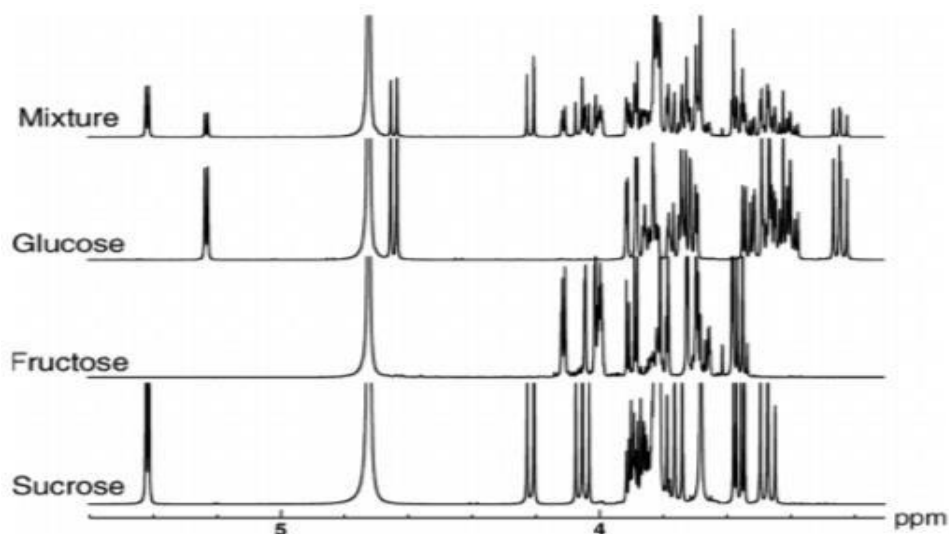


**Figura 28:** Espectro de ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  da fração metanólica obtida do extrato etanólico de *Aspidosperma eleanum* (FMeOH) 300MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

Diferentes açúcares podem estar presentes no EEAE e fração FrMeOH. De acordo com Kehlbeck et al. (2014), sinais de açúcares como a glicose, frutose e sacarose, isoladamente ou em mistura, apresentam sinais semelhantes de multipletos entre  $\delta$  3,0 e 4,5 ppm e sinais entre  $\delta$  4,7 e 5,5ppm assim como os sinais apresentados nos RMN do EEAE e fração FrMeOH (Figura 29; 30; 31; 32).



**Figura 29:** Estrutura química de açúcares. A) glicose; B) frutose e C) sacarose.



**Figura 30:** Espectro de RMN 1H da sacarose (sucrose) e seus açúcares componentes, glicose (glucose) e frutose (fructose), obtidos em 400MHz.

**Fonte:** Kehlbeck et al. (2014).

Açúcares são comumente encontrados em plantas, pois são componentes críticos para o metabolismo geral. Esses produtos primários da fotossíntese afetam a maioria, se não todos, os processos em células vegetais, fornecendo esqueletos para compostos orgânicos e armazenando energia para reações químicas

(SMEEKENS, 2014). Apesar de servirem como metabólitos primários necessários para a produção de compostos orgânicos essenciais a planta, os açúcares também servem como moléculas críticas de sinalização em relação ao estado metabólico celular e à resposta ao estresse biótico e abiótico (ROLLAND et al. 2006; LASTDRAGER et al. 2014). Os oligogalacturonídeos, por exemplo, são açúcares componentes integrantes da parede celular que sob estresse biótico por crescimento de fungos ou danos mecânicos infligidos através de herbívoros, podem ser liberados da parede celular por enzimas hidrolíticas ativadas, servindo como moléculas de sinalização para provocar uma resposta de defesa na respectiva célula vegetal e nos tecidos circundantes (FERRARI et al. 2013). A glicose também foi relatada como uma molécula sinalizadora, ao regular positivamente a atividade da proteína alvo de rapamicina responsável por afetar diversos processos, incluindo a biossíntese da rafinose de açúcar, glicólise e biossíntese de sucrose e amido relacionados ao estresse (DOBRENEL et al. 2013).

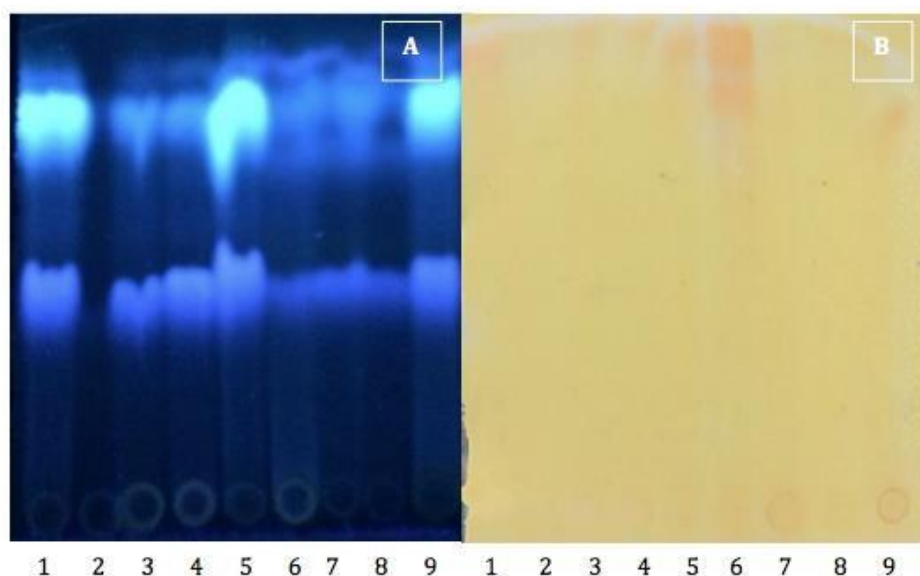
Outros estudos também descreveram a presença de açúcares na casca de árvores de regiões tropicais. Regiões como a Amazônia possuem alta umidade, o que propicia o desenvolvimento de fungos nas cascas das árvores, alterando os níveis de açúcares e de produção de metabólitos secundários como estratégias de defesa (BENNETT e WALLSGROVE, 1994; MAKINO et al. 2009).

O carboidrato bornesitol também já foi relatado no gênero de *Aspidosperma* como carboidrato majoritário das cascas do caule de *Aspidosperma cuspa* (BEIRIGO et al. 2008). A grande quantidade desse carboidrato em plantas tem sido motivo de constantes investigações (ICHIMURA et al. 1999). L-Bornesitol já foi detectado em 5 famílias e seu papel fisiológico ainda não está bem claro (ICHIMURA & SUTO, 1999). Acredita-se que sua função seja na contribuição de equilíbrio osmótico requerido na respiração e/ou manutenção das paredes celulares, agindo assim, como um osmorregulador (ICHIMURA et al. 1999). A grande quantidade dessa substância encontrada no caule de *Aspidosperma cuspa* pode estar relacionada ao estresse as altas temperaturas (REDGWELL et al. 1990).

Com intuito de melhor analisar a composição do extrato, tendo em vista que os sinais de açúcares interferem na detecção de outros compostos, realizou-se uma partição com água, metanol e diclorometano. A premissa deste procedimento foi separar os açúcares dos demais compostos, já que estes são muito polares e, portanto, ficariam retidos na fase aquosa, enquanto que os demais compostos se

distribuíam nas frações de diclorometano (FrLADcm; rendimento = 2,6 e fração metanólica (FrLAMEOH; rendimento = 1,0%).

Quando analisadas em CCD a fração FrLADcm e a FAAE apresentaram comportamento semelhante quando comparadas as demais frações obtidas do EEAE, sendo apenas a FAAE positiva para alcalóides em dragendorff apesar de ambas possuírem fluorescência azul em UV 365nm (Figura 33).



**Figura 31:** Análise cromatográfica em camada delgada do extrato etanólico e frações de *Aspidosperma eteanum*.

**Legenda:** A: reveladas em UV; B: reveladas em reagente dragendorff; 1. Extrato etanólico; 2. Fração Hexano; 3. Fração diclorometano; 4. Fração Acetato de etila; 5. Fração metanólica; 6. Fração de alcaloides; 7. Fração de neutro; 8. Fração livre de açúcar diclorometano; Fração livre de açúcar metanólica

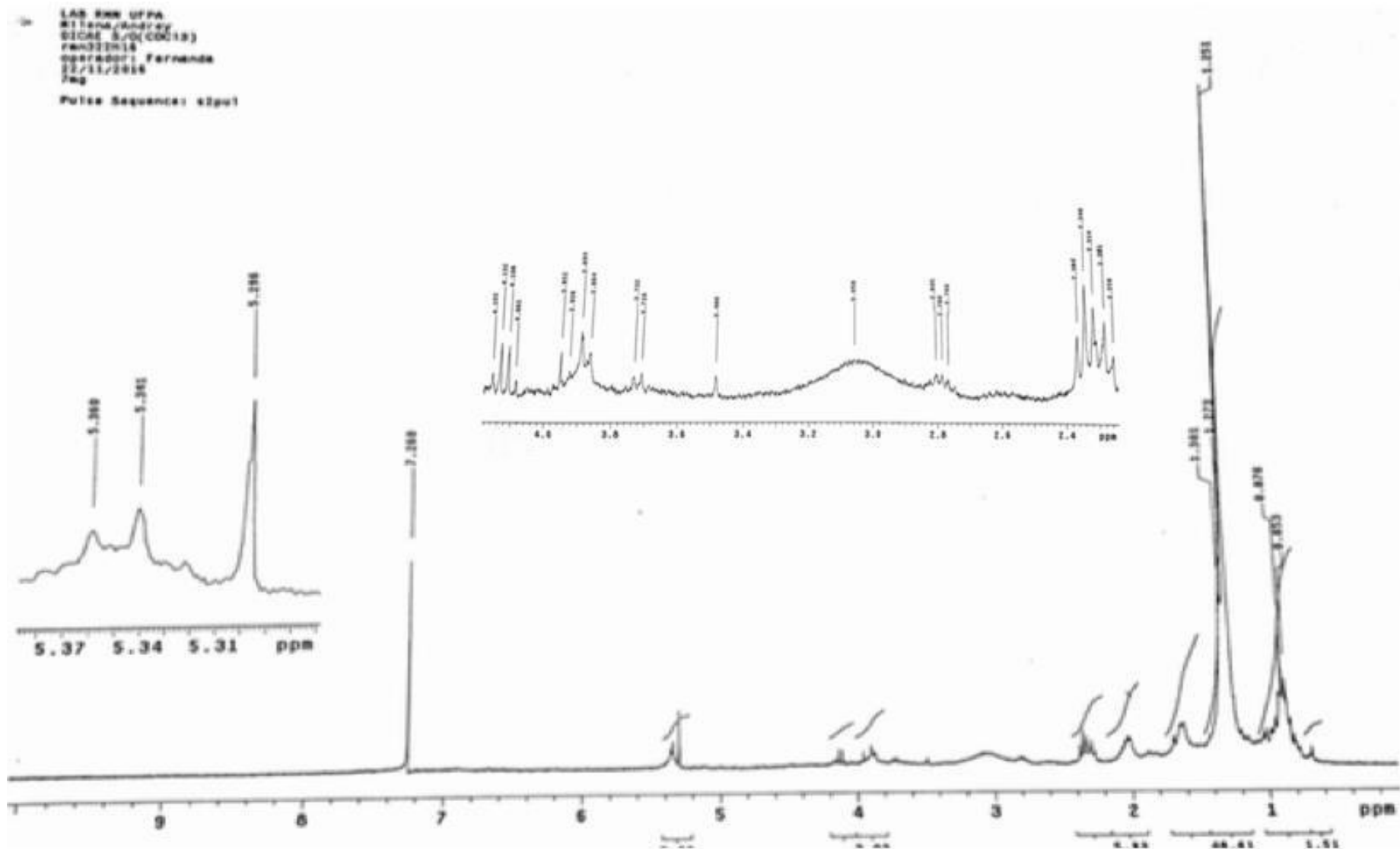
A fração FrLADcm que obteve maior rendimento (2,6%) foi escolhida para nova avaliação por RMN (Figura 34). O sinal em  $\delta$  0,87 ppm (d; 6,9 Hz) é atribuído aos hidrogênios da metila; o sinal  $\delta$  1,25 ppm (t, 6,6 Hz) referem-se aos hidrogênios de grupos metileno das cadeias alifáticas; O sinal  $\delta$  5,29ppm (s) aos hidrogênios olefínicos e o  $\delta$  3,95ppm (s) aos hidrogênios do grupo carbóxico. O resultado sugere a presença de substâncias derivadas de ácidos graxos, mediante comparação com os sinais já descritos na literatura para essa classe de metabólitos, não sendo observados sinais relacionados a alcaloides indólicos ou outros metabólitos secundários (Tabela 10; Figura 34; GUILLÉN e RUIZ, 2001; COLLZATO et al. 2008).

Apesar dos resultados iniciais da análise por RNM, a expectativa deste trabalho foi que *Aspidosperma eteanum* contivesse alcaloides indólicos. Desta

forma, a fração FAAE foi submetida à análise por e RMN, na qual também foram observados sinais sugestivos de ácidos graxos, assim como na fração da FrLAPDcm (Tabela 10; Figura 35).

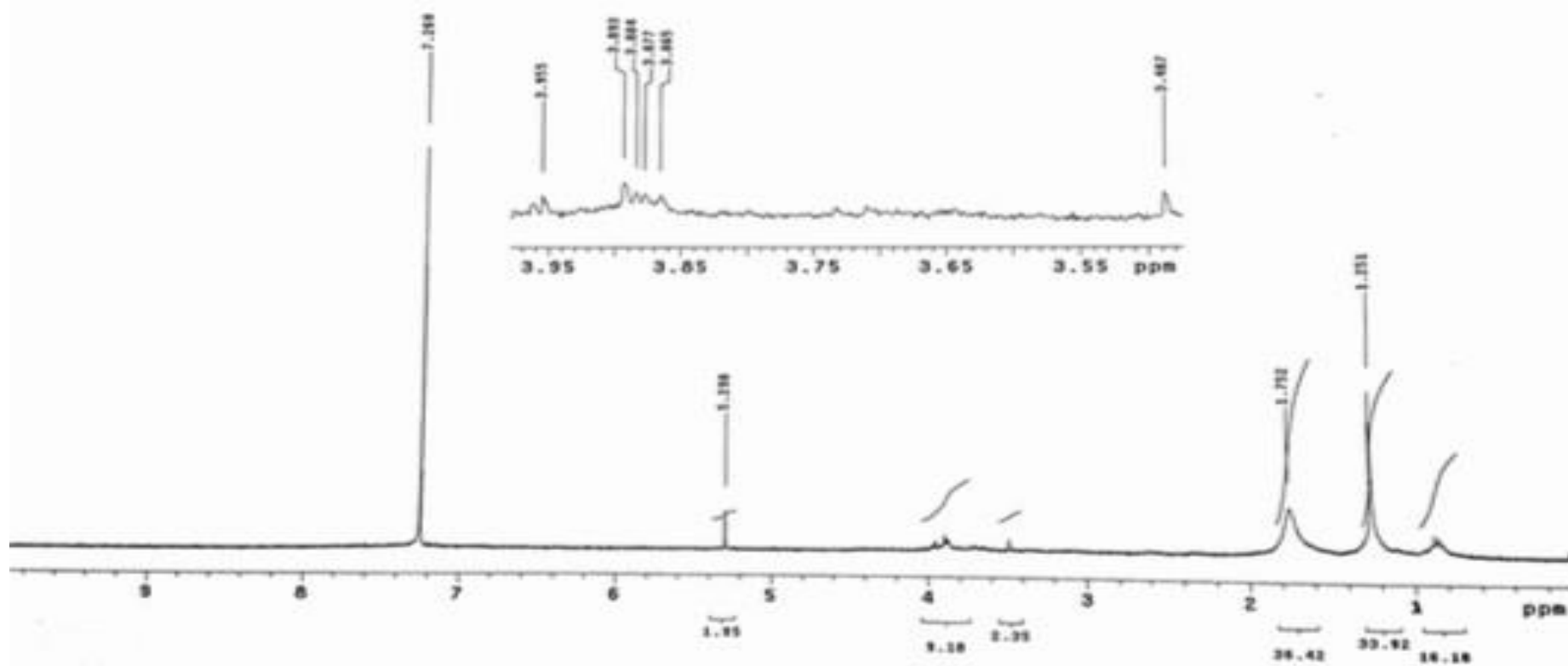
**Tabela 10:** Atribuição dos deslocamentos químicos encontrados no espectro de ressonância magnética  $^1\text{H}$  obtidos na fração livre de açúcares diclorometano (FrLADcm) e fração de alcaloides (FAAE) obtidas do extrato etanólico de *Aspidosperma eteanum* aos seus respectivos grupamentos químicos segundo Guillén e Ruiz (2001).

Número	FrLADcm	FAAE	Deslocamento químico (ppm)	Atribuições
1	0,87 (d; 6,9 Hz)	-	0,90-0,80	- $\text{CH}_3$ grupos acil
2	1,25 (t, 6,6 Hz)	1,25 (s)	1,40-1,15	-( $\text{CH}_2$ ) $_n$ -grupos acil
3	-	1,75 (s)	1,70-1,50	-OCO- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ -grupos acil
4	-	-	2,10-1,90	- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}=\text{CH}$ -grupos acil
5	5,29 (s)	5,29 (s)	5,35-2,20	-OCO- $\text{CH}_2$ -grupos acil
6	-	-	2,80-2,70	= $\text{HC}$ - $\text{CH}_2$ - $\text{CH}$ =
7	3,95 (s)	3,95 (s)	4,32-4,00	- $\text{CH}_2$ OCOR- glicerol
8	-	-	5,26-5,20	> $\text{CHOCOR}$
9	-	-	5,40-5,26	- $\text{CH}=\text{CH}$ - grupos acil



**Figura 32:** Espectro de ressonância magnética nuclear de <sup>1</sup>H da fração diclorometano livre de açúcares (FrLADcm) obtida do extrato etanólico de *Aspidosperma eteanum* 300MHz, CD<sub>3</sub>OD.

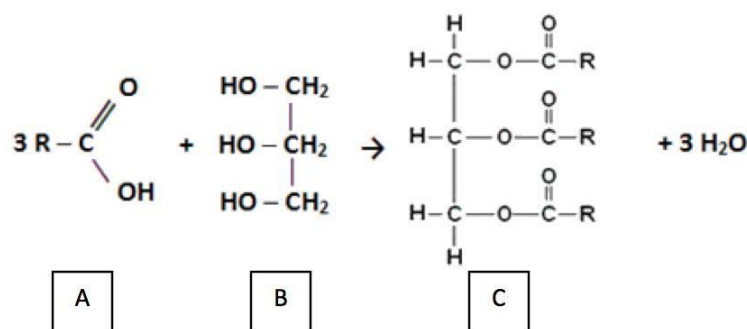
148 MHz 1H NMR  
Ritana/Andrey  
Acido/Basa Para AE(CDC13)  
nmD13M18  
Operador: Fernanda  
22/11/2018  
40g  
Pulse Sequence: zgpg30



**Figura 33:** Espectro de ressonância magnética nuclear de 1H da fração de alcaloides (FAAE) obtida do extrato etanólico de *Aspidosperma eteanum* 300MHz, CD3OD.

A síntese de ácidos graxos é a principal via metabólica, essencial para a função de todas as células vegetais. Seus produtos servem como principais constituintes das membranas celulares e em células especializadas, os ácidos graxos ou seus derivados, podem agir como moléculas de sinalização e são formas importantes de armazenagem de carbono e energia (OHLROGGE, 1995). A biossíntese de lipídeos em vegetais superiores ocorre durante o desenvolvimento da semente, envolvendo o retículo endoplasmático e os plastídios. Desta forma, as plantas possuem mecanismos específicos de exportação de lipídeos para diferentes compartimentos celulares ao contrário de outros organismos (OHLROGGE, 1995).

As gorduras e os óleos existem principalmente na forma de triacilgliceróis (acil refere-se a porção de ácido graxo) ou triglicerídeos, nos quais as moléculas de ácidos graxos são unidas por ligações ésteres aos três grupos hidroxilas do glicerol (Figura 36).



**Figura 34:** Constituição química dos triglicerídeos.

**Legenda:** A) Acido Graxo; B) Glicerol; C) triglicerídeo. R = radical

Os ácidos graxos em plantas são normalmente ácidos carboxílicos de cadeia reta com um número par de átomos de carbono. As cadeias de carbono podem ser tão curtas quanto de 12 unidades ou tão longas quanto de 20, mas mais comumente elas têm 16 ou 18 átomos de carbono de extensão. Os principais ácidos graxos nos lipídeos vegetais são mostrados na Tabela 11 (TAIZ e ZEIGER, 2012).

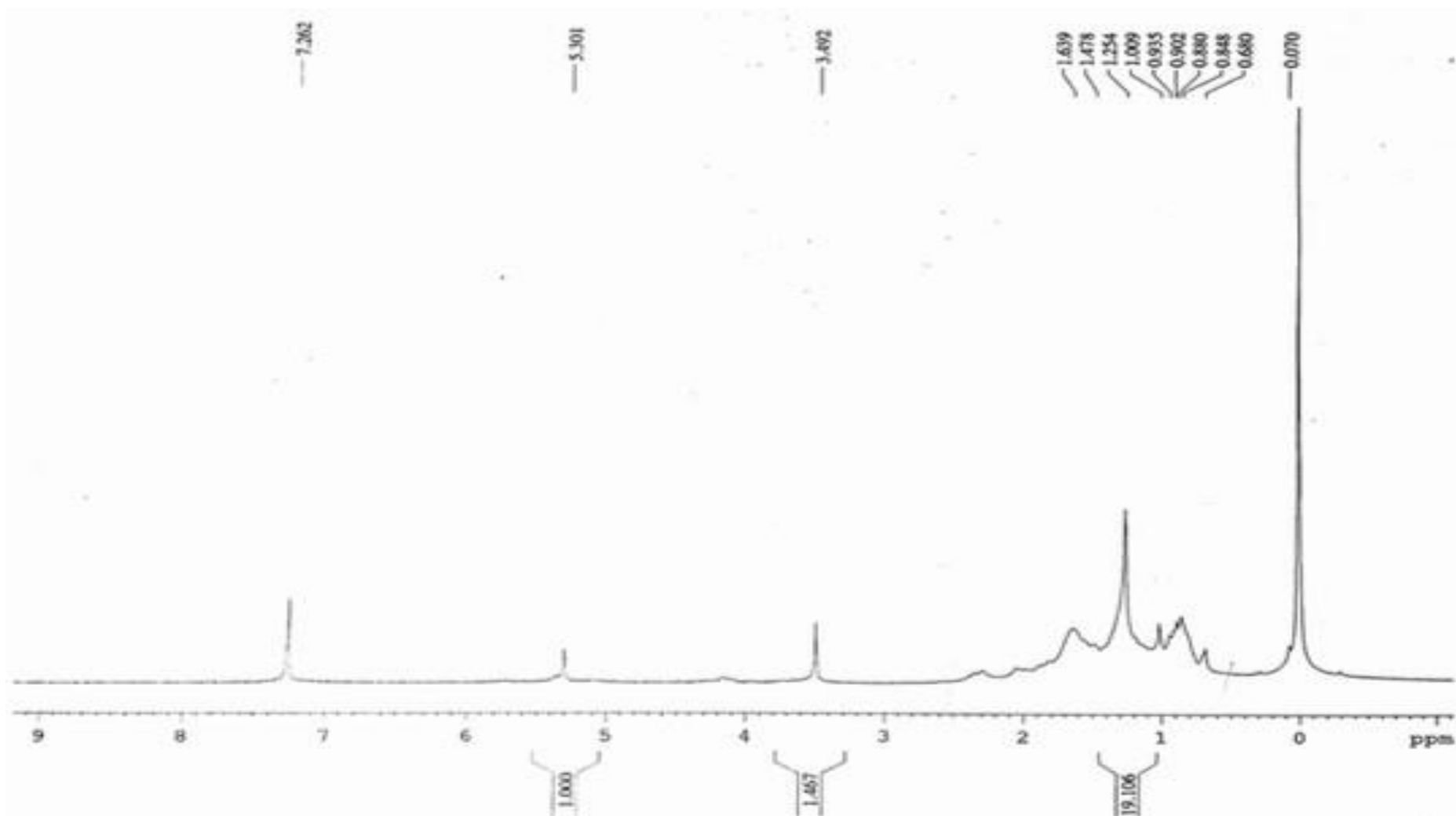


**Tabela 11:** Ácidos graxos comuns em tecidos de vegetais superiores.

Nome*	Estrutura
Ácidos graxos saturados	
Ácidos Láurico (12:0)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CO}_2\text{H}$
Ácidos Mirístico (14:0)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{CO}_2\text{H}$
Ácidos Palmítico (16:0)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CO}_2\text{H}$
Ácidos Esteárico] (18:0)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{CO}_2\text{H}$
Ácidos graxos insaturados	
Ácidos Oléico (18:1)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CO}_2\text{H}$
Ácidos Linoléico (18:2)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CO}_2\text{H}$
Ácidos Linolênico (18:3)	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7\text{CO}_2\text{H}$

\*cada ácido graxo possui uma abreviação numérica. O número antes dos dois pontos representa o número total de carbonos; o número após os dois pontos corresponde ao número de ligações duplas **Fonte:** Taiz e Zeiger, 2012.

A fração Fr38-40 (rendimento = 8%) também foi analisada em RMN  $^1\text{H}$  e apresentou sinais em  $\delta$  0,90 ppm (t, 6,6 Hz) referentes a hidrogênios da metila; em  $\delta$  1,25 ppm (m) atribuído a hidrogênios de grupos metileno das cadeias alifáticas, o sinal em  $\delta$  3,49 ppm (s) que faz referência aos hidrogênios do carbono do grupo metoxila e os sinais em  $\delta$  5,30 ppm (s) referente aos hidrogênios olefínicos. Estes resultados assemelham-se com dados da literatura para ésteres metílicos no qual o hidrogênio do grupo metileno apresenta sinal em 3,67 ppm, (s) e aqueles relacionados aos hidrogênios olefínicos em 5,30-5,46 ppm (m), 1,22-1,42 ppm (m) e 0,98 ppm (t) (Figura 37; MELLO et al. 2008).



**Figura 35:** Espectro de ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  da fração Fr38-40 obtida do extrato etanólico de *Aspidosperma eteanum* 300MHz,  $\text{CDCl}_3$ .

Quanto à ação biológica de ácidos graxos, vários estudos relataram que estes compostos possuem poderosas propriedades antimicrobianas. Eles podem inativar fungos e bactérias, incluindo os agentes patogênicos *Listeria monocytogenes*, *Vibrio cholera*, *Neisseria gonorrhoea*, *Chlamydia trachomatis*, *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli* e cepas de *Staphylococcus* e *Streptococcus* (PETSCHOW et al. 1998; BERGSSON et al. 1999; SADEGHI et al. 1999; SUN et al. 2003), e agirem contra uma variedade de vírus, como o vírus de herpes simples tipo 2 (HSV-2; ISAACS E THORMAR 1991; ISAACS et al. 1994; KIM et al. 1994; THORMAR et al. 1994; NEYTS et al. 2000). Além de possuírem ação antiparasitária como a do ácido dodecanóico (nome comum: ácido laurico), que apresentou atividade anti-giardial, com uma concentração de DL<sub>50</sub> comparável para o metronidazol, por provável indução da morte de trofozoítas por acumular-se dentro do citoplasma de parasitas, resultando em ruptura da membrana celular (RYAN et al. 2005).

Um estudo também relatou a atividade de ácidos graxos poliinsaturados como o ácido docosaexaenóico, ácido eicosapentaenóico, ácido araquidônico e ácido linoleico contra cepa de *Plasmodium falciparum* causando inibição significativa do crescimento *in vitro* do plasmódio e redução de parasitemia e anemia em ratos infectados com *Plasmodium berghei*. Esses ácidos graxos, também demonstraram ativar neutrófilos e outras células efectoras para o aumento da morte de parasitas da malária. Os resultados apontaram que os ésteres metílicos dos ácidos graxos eram tão potentes quanto os ácidos livres na morte do parasita, não demonstrando toxicidade para os glóbulos vermelhos normais (RBC) ou células de glóbulos vermelhos parasitados (PRBC) e não induziram hemólise (KUMARATILAKE et al. 1992).

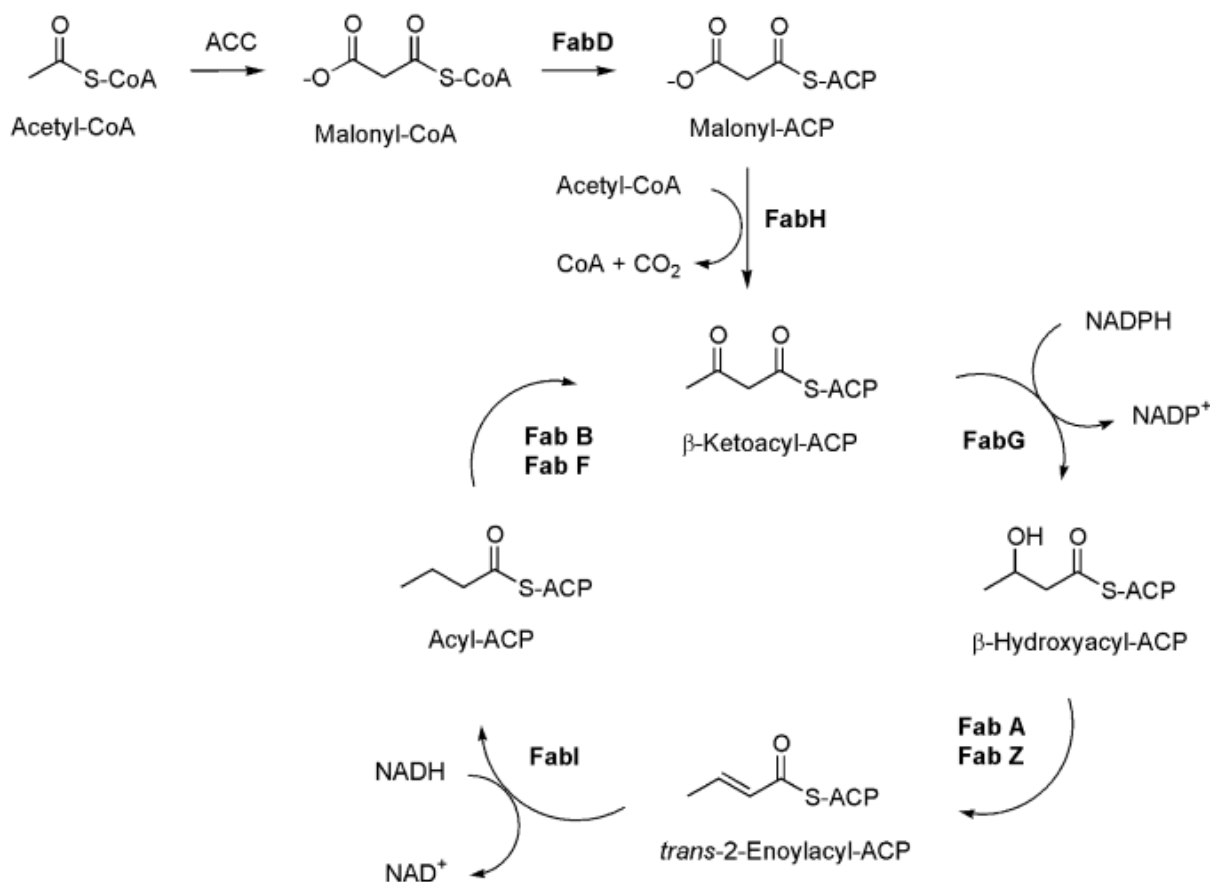
O estudo posterior de Kumaratilake e colaboradores (1992) relatou o efeito antiplasmódico de uma série de ácidos graxos contra cepa de *P. falciparum*. Neste trabalho, o ácido oleico (9-18: 1) foi o ácido graxo mais inibitório com uma CI<sub>50</sub> de 23 µg/mL, o ácido linoleico (9,12-18: 2) apresentou CI<sub>50</sub> de 76 µg/mL e o ácido linolênico (9,12,15-18: 3) mostrou apenas uma CI<sub>50</sub> de 92 µg/mL. Os autores não foram capazes de apresentar um mecanismo antiplasmódico razoável para explicar suas observações, mas concluíram que estes ácidos graxos não inibiam o crescimento parasitário induzindo peroxidação lipídica, pois não promoviam dano oxidativo às membranas das células infectadas

(KUMARATILAKE et al. 1995).

Em 2005, um ácido graxo de ocorrência natural, denominado ácido scleropírico, foi isolado dos galhos de *Scleropyrum wallichianum* e exibiu boa atividade antiplasmódica ( $CI_{50} = 7,2 \mu\text{g/mL}$ ) contra uma cepa resistente a múltiplos fármacos de *Plasmodium falciparum*. Esses resultados são importantes, pois ressaltam o potencial de ácidos graxos como agentes antimaláricos (SUKSAMRARN et al. 2005).

A biossíntese de ácidos graxos é fundamental para o parasita na medida em que os ácidos graxos são necessários para membranas celulares, como fonte de energia, desempenham um papel fundamental na transdução do sinal, bem como na acilação das proteínas e são necessários para o crescimento, diferenciação e homeostase do *Plasmodium falciparum* e sabe-se que a biossíntese lipídica é elevada durante as fases eritrocitárias do parasita (CABALLEIRA, 2008).

Existem várias enzimas responsáveis pela biossíntese de ácidos graxos em *Plasmodium falciparum*, bem como um esquema biossintético de ácidos graxos tipo II típico (Figura 38). O *Plasmodium falciparum* contém o apicoplasto, onde vários processos metabólicos vitais ocorrem, como por exemplo, a biossíntese de isopreno e de ácidos graxos. No entanto, a biossíntese de ácidos graxos que ocorre no apicoplasto é diferente da biossíntese de ácidos graxos normalmente encontrada em humanos ou em outros eucariotos superiores. Os eucariotos superiores normalmente usam um sistema de síntese de ácido graxo do tipo I (FASI), onde cada etapa biossintética de ácido graxo é catalisada por uma única proteína com múltiplos domínios. Por outro lado, no apicoplasto, um sistema de síntese de ácido graxo tipo II (FASII) é operativo, onde cada via biossintética de ácido graxo é realizada por uma enzima codificada por um gene diferente (WALLER et al. 1998). O sistema FAS II é ausente em humanos, mas é comum em bactérias e algas (TASDEMIR, 2006). Se houver uma interferência no sistema FAS do tipo II do plasmódio, seria possível destruir o parasita sem prejudicar o hospedeiro humano. Portanto, esta via biossintética incorpora várias enzimas que podem ser inibidas por fármacos. Entre essas enzimas, a enzima enoil-ACP redutase (enzima PfFabI) tem sido particularmente preferida para a inibição e a intervenção química pois é evidente que esta enzima desempenha papel vital para o plasmódio sendo um bom alvo para o tratamento da malária.



**Figura 36:** Biossíntese de ácidos graxos tipo II.

**Legenda:** ACC: acetil-CoA carboxilase, ACP: proteína transportadora de acilo, FabD: ACP transacilase, FabH: b-cetoacil-ACP-sintase III, FabG: b-cetoacil-ACP-reductase, FabA: b-hidroxidecanoil-ACP desidratase/isomerase, FabZ: b-hidroxiacil- ACP desidratase, FabI: enoil-ACP reductase, FabB: b-cetoacil-ACP sintase I, FabF: b-cetoacil-ACP-sintase II.

A Escola de Farmácia da Universidade de Londres desenvolveu a primeira abordagem de rastreio antimalárico baseada no alvo FAS do tipo II, utilizada no campo da pesquisa de produtos naturais (TASDEMIR, 2006). Este protocolo de triagem foi aplicado aos ácidos graxos marinhos mais incomuns da esponja *Agelas oroides* nas formas do estágio sanguíneo da cepa K1 multirresistente de *Plasmodium falciparum* (TASDEMIR et al. 2007). Neste bioensaio, a fração contendo os ácidos graxos de cadeia longa apresentou considerável atividade antiprotozoária ( $CI_{50S} = 12-16 \text{ } \mu\text{g/mL}$ ).

Esses mesmos ácidos graxos também foram testados simultaneamente para atividade enzimática inibitória na enzima FabI recombinante de *Plasmodium falciparum* (PfFabI), para determinar se a atividade antiplasmodial, pelo menos em parte, era devida à inibição de FabI. A enzima foi expressa heterologicamente em *Escherichia coli* e purificada como descrito por Perozzo (PEROZZO et al 2002). O

ensaio enzimático emprega crotonil-CoA como substrato e na presença de NADH, o FabI reduz a ligação dupla conjugada para produzir butiril-CoA. Na presença de um inibidor de FabI, a oxidação de NADH em NAD<sup>+</sup> será afetada (TASDEMIR et al. 2007). Esta transformação enzimática pode ser seguida espectrofotometricamente durante 1 min e os valores CI<sub>50</sub> determinados a partir das curvas dose-resposta. Os resultados demonstraram que os ácidos graxos marinhos foram bons inibidores (CI<sub>50</sub>s = 0,35µg/ml) da enzima Enoyl-ACP redutase (FabI) de *Plasmodium falciparum* que catalisa a etapa final de redução do ciclo de alongamento da cadeia de ácidos graxos. Este achado demonstrou, pela primeira vez, que os ácidos graxos podem inibir a enzima FabI do *P. falciparum*, que parece ser o potencial alvo intracelular dos ácidos graxos. Além disso, o estudo para avaliar a citotoxicidade desses ácidos graxos em células de mamíferos em células L6 de mioblastos esqueléticos de ratos indicou que estes ácidos graxos podem ser úteis contra o parasita sem causar danos ao hospedeiro (TASDEMIR et al. 2007).

### 5.3 ATIVIDADE ANTIPLASMÓDICA

Para a atividade antiplasmodica foram selecionadas as seguintes amostras: o extrato etanólico obtido das cascas de *Aspidosperma eteanum* - EEAE, as frações obtidas por extração sob-refluxo - FrHex, FrDcm, FrACoEt e FrMeOH, fracoes resultantes da extração ácido-base – FAAE e FNAE e fracoes da partição para retirada de açúcar FLADcm e FLAMeOH.

O EEAE apresentou uma CI<sub>50</sub> superior a 50 µg/mL (Tabela 12) e, portanto pode ser considerado inativo. A permissa inicial deste trabalho foi que a atividade antimalárica atribuída a esta planta estaria relacionada aos alcaloides que são considerados marcadores taxonômicos da espécie e cuja relação com a atividade biológica tem sido descrita (FREDERICH et al. 2008; MBEUNKUI et al. 2012; PAULA et al. 2014), no entanto, os estudos cromatográficos não detectaram a presença de alcaloides no extrato, por isso o extrato foi submetido a diferentes métodos de fracionamento para a obtenção de frações ricas em alcaloides, pois estudos demonstraram que o fracionamento contribuía para o aumento da atividade biológica (PAULA et al. 2014) .

As frações extraídas sob-refluxo obtidas com solventes de baixa e média

polaridade - FrHex, FrACoEt e FrDcm - foram moderadamente ativas com  $CI_{50}$  igual a 19,26; 20,73 e 17,41 respectivamente em clone W2, no entanto a fração de maior polaridade (FrMeOH) demonstrou pouca atividade com  $CI_{50} = 43,83 \mu\text{g/mL}$  (Tabela 12) contra o clone de *Plasmodium falciparum*, o que demonstra que a(s) substância(s) responsável (is) pela atividade pode ser uma substância de baixa ou média polaridade e que provavelmente não é o constituinte majoritário do extrato já que a fração FrMeOH foi a que obteve o maior rendimento no estudo fitoquímico (93,59%) .

Dentre as frações provenientes do método extrativo ácido-base, a fração de alcaloides – FAAE apresentou maior atividade que a fração de nêutrons – FNAE com  $CI_{50} = 7,6 \mu\text{g/mL}$  e  $CI_{50} = 10,09 \mu\text{g/mL}$  (Tabela 12). Os estudos fitoquímicos demonstraram que a FAAE foi positiva para alcaloides quando revelada em Dragendorff. A coluna cromatográfica realizada com 20g do EEAE revelou espectro de massa indicativo da presença do alcaloide indólico Rhazina, no entanto, a análise em RMN não apresentou sinais de alcaloides e demonstrou que o componente majoritário de FAAE é provavelmente um ácido graxo assim como a coluna realizada para o isolamento de substâncias levou ao isolamento de ácido graxo. Como os demais estudos cromatográficos das frações com maiores massas não permitiram a detecção do alcaloide, sugere-se que este deve ser minoritário na FAAE. Mediante estudos que revelaram a atividade antiplasmódica de ácidos graxos provenientes de plantas (KRUGLIAKE, 1995), a atividade desta fração pode estar relacionada ao ácido graxo ou a Rhazina ou a um efeito sinérgico entre as duas classes.

Com relação às frações obtidas na partição para retirada do açúcar, a fração de menor polaridade FLADcm, dentre as obtidas por esse método de fracionamento, apresentou maior atividade entre todas as frações testadas com  $CI_{50} = 1,91 \mu\text{g/mL}$  (Tabela 12) ao passo que a FLAMeOH apresentou atividade moderada. Novamente, nota-se que a fração de menor polaridade obtida por este método de extração possui maior atividade antiplasmódica, o que reforça a hipótese de que a atividade antiplasmódica desta planta esteja relacionada a uma(s) substância(s) de baixa ou média polaridade.

**Tabela 12:** Concentração inibitória de 50% do crescimento do clone W2 de *Plasmodium falciparum* do extrato e frações de *Aspidosperma eteanum*.

Fração	Cl <sub>50</sub> (µg/mL)	Atividade
EEAE	250,00	Inativa
FrHex	19,26	Moderadamente ativa
FrAcoET	20,73	Moderadamente ativa
FrDcm	17,41	Moderadamente ativa
FrMeOH	43,83	Pouco ativa
FNAE	10,09	Moderadamente Ativa
FAAE	7,60	Ativa
FLADcm	1,91	Ativa
FLAMeOH	22,04	Moderadamente Ativa
Cloroquina	0,135	Muito ativa

**Legenda:** EEAE - Extrato etanólico; FrHex - Fração Hexano; FrDCm - Fração diclorometano; FrAcoET - Fração acetato de etila; FrMeOH - Fração metanólica; FNAE - Fração de neutro; FAAE - Fração alcaloídica; FLADcm – Fração livre de açúcar diclorometano; FLAMeOH - Fração livre de açúcar metanólica.

Portanto, o estudo da atividade biológica de *Aspidosperma eteanum* demonstrou que o fracionamento aumentou a atividade antiplasmódica sendo as frações de baixa e média polaridade as mais ativas. Os estudos fitoquímicos demonstraram que os alcaloides podem estar presentes na planta, mas em baixa concentração e que os açúcares e compostos graxos são provavelmente os constituintes majoritários do extrato. Quando se correlaciona os resultados obtidos nos estudos fitoquímicos e de atividade biológica é possível perceber que a(s) substância(s) responsável(is) pela atividade antiplasmódica, por estar diretamente relacionada a frações de menor polaridade, pode(m) tratar-se de um(s) composto(s) graxo(s) tal como o éster metílico detectado neste estudo.



## 6. CONCLUSÃO

Os estudos farmacognósticos demonstraram que a o pó de *Aspidosperma eleanum* está de acordo com os parâmetros preconizados pela Farmacopéia Brasileira V ed. (2010). Os estudos fitoquímicos revelaram que açúcares e compostos graxos são os compostos majoritários do extrato e que os alcaloides apresentam-se em baixa concentração na espécie. O processo extrativo influenciou na atividade biológica sendo as frações FAAE e FLADcm as de maior atividade, quando se relacionam os achados fitoquímicos e biológicos é possível concluir que a atividade antiplasmodica da espécie pode não estar relacionada a alcaloides e sim à presença de outros compostos presentes no extrato tais como os ácidos graxos que foram observados neste estudo.

## REFERENCIAS

AGUIAR, A. C.; CUNHA, A. C.; CERAVOLO, I. P.; GONÇALVES, R. A.; OLIVEIRA, A. J.; & KRETTLI, A. U. *Aspidosperma* (Apocynaceae) plant cytotoxicity and activity towards malaria parasites. Part II: Experimental studies with *Aspidosperma ramiflorum* in vivo and in vitro. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 7, p. 906–913, 2015.

AJAYI, N. A.; UKWAJA, K. N. Possible artemisinin-based combination therapy-resistant malaria in Nigeria: a report of three cases. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** v. 46, n. 4, p. 525–527, 2013.

ALLEN, J. R. F.; HOLMSTEDT, B. R. The simple  $\beta$ -carboline alkaloids. **Phytochemistry**, v.19, n.8, p.1573-82, 1980.

ALVARES, A. A. A. **Influência da adição de extrato de *Yucca schidigera* nos parâmetros bioquímicos e hematológicos de cães adultos consumindo duas rações comerciais**. 2006. 47f. Dissertação (Mestre em Ciências Veterinárias) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

ALVES, D. F.; SILVA, A. A. S.; CALIXTO JUNIOR, J. T.; SOUSA, H. A.; SILVA, K. A.; CÂMARA NETO, J. F.; MORAIS, S. M. Estudo fitoquímico e potencial terapêutico de *Aspidosperma* spp. (apocynaceae). **54° CBQ**, 2014.

AMORIM, I. L.; SAMPAIO, E. V. S. B.; ARAÚJO, E. L. Flora e estrutura da vegetação arbustiva-arbórea de uma área de caatinga do Seridó, RN, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 19, n. 3, p. 615-23, 2005.

ANDRADE-NETO, V. F.; POHLIT, A. M.; PINTO, A. C.; SILVA, E.C.; NOGUEIRA, K.L.; MELO, M. R.; HENRIQUE, M.C.; AMORIM, R. C.; SILVA, L. F.; COSTA, M. R.; NUNOMURA, R.C.; NUNOMURA, S.M.; ALECRIM, W.D.; ALECRIM, M.G.; CHAVES, F. C.; VIEIRA, P.P. *In vitro* inhibition of *Plasmodium falciparum* by substances isolated from Amazonian antimalarial plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 3, p. 359- 365, 2007.

BARATTO, L.C. **Estudo químico-analítico e morfoanatômico de espécies medicinais brasileiras da família Apocynaceae: *Himatanthus lancifolius* (Müll. Arg.) Woodson e *Rauwolfia sellowii* Müll. Arg.** 2010. 157p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

BATISTA, C.V.F.; SCRIPSEMA, J.; VERPOORTE, R.; RECH, S.B.; HENRIQUES, A.T. Indole alkaloids from *Rauwolfia sellowii*. **Phytochemistry**, v.41, p.969-973, 1996.

BEIRIGO, P. J. S.; GAJO, G. C.; MACHADO, H. V.; OGLIO, E. L. D.; SOUSA JR. P. T.; SILVA, V. C.; RIBEIRO, T. A.; SILVA, L. E. L-Bornesitol, carboidrato majoritário das cascas do caule de *Aspidosperma cuspa* (Apocynaceae). **31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ)**, 2008.

BENNETT, R. N.; WALLSGROVE, M. R. Secondary metabolites in plant defence mechanisms. **New Phytologist**, v. 127, n. 4, p.617-633, 1994.

BERGGSON, G.; STEINGRIMSSON, O.; THORMAR, H. In vitro susceptibilities of *Neisseria gonorrhoea* to fatty acids and monoglycerides. **Antimicrob Agents and Chemother**, v. 43, n. 11, p. 2790–2792, 1999.

BLOLAND P. **Drug resistance in malaria**. WHO, 2001.

BOCHNER, R.; FISZON, J. T.; ASSIS, M. A.; AVELAR, K. E. S. Problemas associados ao uso de plantas medicinais comercializadas no Mercado de Madureira, município do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 3, p.537-547, 2012.

BOLZANI, W. S.; SERUR, L. M.; MATOS, F. J. A.; GOLIEB, O. R. Indole alkaloids evolution in Aspidosperma. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 15, n. 2, p. 187-200, 1987.

BOURDY, G.; OPORTO, P.; GIMENEZ, A.; DEHARO E. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part VI. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by Isoceño-Guaraní Indians. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 93, n. 2-3, p. 269-77, 2004.

BRAGA, T. V.; OLIVEIRA, T. T.; PINTO, J. T.; DORES. R. G. R., NAGGEM, T. J. Determinação de massa fresca, massa seca, água e cinzas totais de folhas de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvis subsp. *Verticillata* e avaliação do processo de secagem em estufa com ventilação forçada. **Revista Ciência Farmacêutica Básica**, v. 28, n. 3, p. 287-90, 2007.

BRANDÃO, M. G. L.; GRANDI, T. S. M.; ROCHA, E. M. M.; SAWYER, D. R.; KRETTLI, A. U.; Survey of medicinal plants used as antimalarials in the Amazon. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 36, n. 2, p.175-182, 1992.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Guia prático de tratamento da malária no Brasil**. Brasília- DF: Ministério da Saúde, 2010a.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Farmacopeia Brasileira**. 5 ed. v. 1. Brasília-DF: ANVISA, 2010b.

BRÍGIDO, H. P. C. **Estudos farmacognósticos, fitoquímicos e biológicos de *Annona glabra* L. (Annonaceae)**. 2016. 121 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências da Saúde, Belém, 2016. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

BURKILL, H. M. **The useful plants of west tropical Africa**. 2nd ed. Kew: Royal Botanical Gardens, p. 456-596, 1985.

CABRAL, J.A.; MCCHESENEY, J.D.; MILHOUS, W.K. A new antimalarial quassinoid from *Simaba guianensis*. **Journal of Natural Products**, v. 56, n. 7, p. 1954–1961, 1993;

CARBALLEIRA, N.M. New advances in fatty acids as antimalarial, antimycobacterial and antifungal agents. **Progress In Lipid Research**, v. 47, n. 1, p.50-61, 2008.

CARVALHO, L. H. **Quimioterapia experimental com extratos brutos de plantas**

**e compostos quimicamente definidos.** Minas Gerais, 146p. Dissertação de mestrado, Departamento de Parasitologia, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais. 1990.

CASTEJON F. V. Taninos e saponinas. **Seminários aplicados**, Goiânia 2011.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Malaria Biology**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/index.html>>. Acesso em: 23 de agosto de 2016.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura. v.2, p. 771, 1931.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 3 ed. v. III. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian. 2001.

COUTINHO, J. P.; AGUIAR, A. C. C.; SANTOS, P. A.; LIMA, J. C.; ROCHA, M. G. L.; ZANI, C. L.; ALVES, T. M. A.; SANT'ANA, A. E. G.; PEREIRA, M. M.; KRETTLI, A. U. *Aspidosperma* (Apocynaceae) plant cytotoxicity and activity towards malária parasites. Part I: *Aspidosperma nitidum* (Benth) used as a remedy to treat fever and malária in the Amazon. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 8, p. 974-982, 2013.

DEL VITTO, L. A.; PETENATTI, E. M.; PETENATTI, M. E. Recursos herbolarios de San Luis (Republica Argentina). Primeira parte: Plantas Nativas. Multequina. **Latin American Journal of Natural Resources**, v.6, p.49- 66, 1997.

DENNY, C.; ZACHARIAS, M. E.; KOHN, L. K.; FOGLIO, M. A.; CARVALHO, J. E. Atividade antiproliferativa dos extratos e da fração orgânica obtidos das folhas de *Virola sebifera* Aubl. (Myristicaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 4, p. 598- 603, 2007.

DI STASI, L. C. Asteridae medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica. In: DI STASI, L.C.; HIRUMA-LIMA, C.A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. Editora UNESP, p.372-93, 2002.

DJERASSI, C.; ANTONACCIO, L. D.; BUDZIKIEWICZ, H.; E WILSON, J. M. Mass Spectrometry in Structural and Stereochemical Problems. The Structure of the *Aspidosperma* Alkaloid *Aspidoalbine*, **Tetrahedron Letters**, v. 3, n. 22, p. 1001-1009, 1962.

DOBRENEL, T.; MARCHIVE, C.; AZZOPARDI, M.; CLÉMENT, G.; MOREAU, M.; SORMANI, R. ROBAGLIA, C.; MEYER, C. Sugar metabolism and the plant target of rapamycin kinase: a sweet operaTOR? **Frontiers in Plant Science**, v. 4, n. 93, p.1-6, 2013.

DOLABELA, M. F. **Atividade antiplasmódica e citotoxicidade de *Esenbeckia febrífuga* (A.St-Hil.) Juss. ex Mart. (RUTACEAE) e espécies do gênero *Aspidosperma* (APOCYNACEAE)**. 2007. 151p. Tese de doutorado (doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de farmácia, universidade federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

DOLABELA, M. F.; OLIVEIRA, S. G.; PERES, J. M., NASCIMENTO, J. M.; PÓVOA M. M.; OLIVEIRA A. B. *In vitro* antimalarial activity of six *Aspidosperma* species from the state of Minas Gerais (Brazil). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 84, n. 4, p. 899–910, 2012.

DONDORP, A. M.; NOSTEN, F.; YI, P.; DAS, D.; PHYO, A. P.; TARNING, J.; LWIN, K. M.; ARIEY, F.; HANPITHAKPONG, W.; LEE, S. I.; RINGWALD, P.; SILAMUT, K.; IMWANG, M.; CHOTIVANICH, K.; LIM, P.; HERDMAN, T.; AN, S. S.; YEUNG, S.; SINGHASIVANON, P.; DAY, P.; LINDEGARD, N.; SOCHEAT, B.; WHITE, N. J. Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. **The New England Journal of Medicine**. v.361, n.5, p. 455-467, 2009.

DVORAK, J. A.; MILLER, L. H.; WHITHOUSE, W. C.; SHOIROISHI, T. Invasion of erythrocytes by malaria merozoites. **Science**, v. 187, n. 4178, p. 748-750, 1975.

ENDRESS, M. E.; BRUYNS, P.V. A revised classification of the Apocynaceae. **The Botanical Review**, v. 66, n. 1, p. 1-56, 2000.

ENDRESS, M. E.; LIEDE-SCHUMANN, S.; MEVE, U. Advances in Apocynaceae: the enlightenment, an introduction. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 94, n. 2, p. 259- 267, 2007.

FERRARI, C.; E MARION, L. Further Alkaloid related to Aspidoalbine and Limaspermine, **Canadian Journal of Chemistry**, v. 42, n. 12, p. 2705, 1964.

FERRARI, S.; SAVATIN, D. V.; SICILIA, F.; GRAMEGNA, G.; CERVONE, F.; LORENZO, G. Oligogalacturonides: plant damage-associated molecular patterns and regulators of growth and development. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, n. 4, p.49, 2013.

FERREIRA M.U.; CASTRO, M.C. Challenges for malaria elimination in Brazil. **Malaria Journal**, v.15, n. 1, p. 284, 2016.

FERREIRA, I. C. P.; LONARDONI, M. V. C.; MACHADO, G. M. C.; LEON, L. L.; GOBBI-FILHO, L.; PINTO, L. H. B.; OLIVEIRA, A. J. B.; Anti-leishmanial activity of alkaloidal extract from *Aspidosperma ramiflorum*. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 3, p. 325-327, 2004.

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

FREDERICH, M.; TITS, M.; ANGENOT, L. Potential antimalarial activity of indole alkaloids. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 102, n. 1, p.11-9. 2008.

GARCIA, M.; RUBEN, F.; BROWN, K. S. Alkaloids of three aspidosperma species. **Phytochemistry**, v. 15, p. 1093-95, 1976.

GARNHAM, P.C.C. **Malaria Parasites and Other Haemosporidia**, Blackwell Scientific Publications, 1966.

GETHING, P. W.; ELYAZAR, I. R. F.; MOYES, C. L.; SMITH, D. L.; BATTLE, K. E.;

GUERRA, C. A.; PATIL, A. P.; TATEM, A. J.; HOWES, R. E.; MYERS, M.F.; GEORGE, D. B.; HORBY, P.; WERTHEIM, H. F. L.; PRICE, R. N.; MUELLER, I.; BAIRD, J. K.; HAY, S. I. Along neglected world malaria map: *Plasmodium vivax* endemicity in 2010. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 9, p. 1814, 2012.

GOMES, L. F. S.; **Abordagem fitoquímica, determinação da atividade antiplasmódica *in vitro* e avaliação preliminar da toxicidade do extrato hidroetanólico das cascas de *Aspidosperma excelsum* Benth (APOCYNACEAE).** 2011. 98p. Dissertação de mestrado. Departamento de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Pará. 2011.

GRASSI, B. Studi di uno Zoologo Sulla Malaria. Rome. 1900.

HESSE, M. “**Indolalkaloide in Tabellen.**” Springer-Verlag. Berlin, v. 2, p. 183, 1964.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATISTICA. **Divisão regional do Brasil em Mesorregiões e Microrregiões geográficas.** IBGE, 1990.

ICHIMURA, K.; KOHATA, K.; MUKASA, Y.; YAMAGUCHI, Y.; GOTO, R.; SUTO, K. Identification of L-Bornesitol and Changes in Its Content during Flower Bud Development in Sweet Pea (*Lathyrus odoratus* L.). **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 63, n. 1, p. 189-91, 1999.

ICHIMURA, K.; SUTO, K. Effects of the time of sucrose treatment on vase life, soluble carbohydrate concentrations and ethylene production in cut sweet pea flowers. **Plant Growth Regulation**, v. 28, n. 2, p. 117 - 22, 1999.

ISAACS C.E.; KIM, K.S.; THORMAR, H. Inactivation of enveloped viruses in human bodily fluids by purified lipids. **Annals of the New York Academy of Science**, v. 724, n. 1, p. 457-64, 1994.

ISAACS, C. E.; THORMAR, H. The role of milk-derived antimicrobial lipids as antiviral and antibacterial agents. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 310, p. 159-65, 1991.

IWU, M. M.; KLAYMAN, D. L. Evaluation of the *in vitro* antimalarial activity of *Picralima nitida* extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 36, n. 2, p.133-5, 1992.

JANSE, C. General introduction rodent malaria parasites. ***Plasmodium Berghei – Model of malaria.*** Leids Universitair medisch Centrum. Disponível em: <https://www.lumc.nl/org/parasitologie/research/malaria/berghei-model/general-introduction/>. Acesso em: 08 set. 2017.

JARCHO, S.; TORTI F. Quinine's predecessor: Francesco Torti and the early history of cinchona. **Medicine History**, v. 38, n. 3, p. 347-348, 1993.

K.L. Fungos endofíticos associados a plantas medicinais. **Revista Brasileira de plantas medicinais**, v.14, n.2, p.261-26, 2012.

KEHLBECK, J. D.; SLACK, C. C.; TURNBULL M. T.; KOHLER, S. J. Exploring the

Hydrolysis of Sucrose by Invertase Using Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy: A Flexible Package of Kinetic Experiments. **Journal of Chemical Education**, v. 91, n. 5, p. 734–738, 2014.

KHGARI, A; LAAKSO, I; SEPPANEN-LAAKSO, T; YRJONEN, T; VUORELA, H; OKSMAN-CALDENTY, K. M; RISCHER, H. Analysis of indole alkaloids from *Rhazya stricta* hairy roots by ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry. **Molecules**, v. 20, n. 12, p. 22621–22634, 2015.

KIM, K.S.; ISAACS, C.E.; THORMAR, H. The use of lipid antiviral compounds in lentivirus infections: summary. **Annals of the New York Academy of Science**, v. 724, n. 1, p. 489-91, 1994.

KOCH, I. **Estudos das espécies neotropicais do Gênero *Rauvolfia* L. (Apocynaceae)**. 2002. 301p. Tese (Doutorado) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

KOCH, I.; RAPINI, A.; KINOSHITA, L. S.; SIMOES, A. O.; SPINA, A. P. Apocynaceae. **In Lista de Especies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015.

KOUITCHEU, L. B.; KOUAM, J.; ATANGANA, P.; ETOA, F. X. Phytochemical screening and toxicological profile of methanolic extract of *Picralima nitida* fruit-rind (Apocynaceae). **Toxicological Environmental Chemistry**, v. 90, n. 4, p. 815-828, 2008.

KUMARATILAKE, L. M.; RATHJEN, D.A.; MACK, P.; WIDMER, F.; PRASERTSIRIROJ, V.; FERRANTE A. A synthetic tumor necrosis factor- $\alpha$  agonist peptide enhances human polymorphonuclear leukocyte-mediated killing of *Plasmodium falciparum* *in vitro* and suppresses *Plasmodium chabaudi* infection in mice. **Journal of Clinical Investigation**, v. 95, n. 5, p. 2315–2323, 1995.

KUMARATILAKE, L. M.; ROBINSON B.S.; FERRANTE, A.; POULOS, A. Antimalarial properties of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids: *in vitro* effects on *Plasmodium falciparum* and *in vivo* effects on *P. berghei*. **Journal of Clinical Investigation**, v. 89, n. 3, p.961-967, 1992.

KVIST, L.P.; CHRISTENSEN, S.B.; RASMUSSEN, H.B.; MEJIA, K.; GONZALEZ, A. Identification and evaluation of Peruvian plants used to treat malaria and leishmaniasis. **Journal of Ethnopharmacology**, v.106, n. 3, p. 390–402, 2006.

LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. **Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica**. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 2001.

LAMBROS, C.; VANDERBERG, J. P. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. **Journal of Parasitol**, v. 65, n. 3, p. 418-20, 1979.

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

LASTDRAGER, J.; HANSON, J.; SMEEKENS, S. Sugar signals and the control of

plant growth and development. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 3, p.799-807, 2014.

LEE, D. H.; LEE, M. J.; SON, D. W.; PARK, B. D. Adhesive performance of woods treated with alternative preservatives. **Wood Science and Technology**, v. 40, p. 228-236, 2006.

LINHARES, J. F. P.; PINHEIRO, C. U. B. Sociedade Brasileira de Recursos Genéticos. Tensores socioambientais de ameaça à conservação da Janaúba (*Himatanthus Willd ex Schult. – Apocynaceae*), um recurso medicinal de importância regional no Estado do Maranhão. **Revista RG News**, v. 2, n. 1, p.12, 2016.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil**. 2. ed. Editora Plantarum, p. 384, 1998.

MAKINO, R.; OHARA, S.; HASHIDA, K. Efficient extraction of polyphenolics from the bark of tropical tree species. **Journal of Tropical Forest Science**, v. 21, n. 1, p 45–49, 2009.

MARCONDES-FERREIRA, W. 1988. **Aspidosperma Mart., nom. cons. (Apocynaceae): estudos taxonômicos**. Tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1988.

MARQUES, M.F.S. **Contribuição ao estudo químico do gênero Aspidosperma: Aspidosperma ramiflorum Muell. Arg.** 1988. p. Dissertação (Mestrado-Área de Concentração em Química Orgânica) - Departamento de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1988.

MATTOS, F. J. A. **Introdução à fitoquímica experimental**. 2ª edição Fortaleza-CE: Edições UFC. p. 141, 1997.

MBEUNKUI, F; GRACE, M. H.; LATEGAN, C.; SMITH, P. J.; RASKIN, I.; LILA, M. A. *In vitro* antiplasmodial activity of indole alkaloids from the stem bark of *Geissospermum vellosii*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, n. 2, p. 471-7, 2012.

MCMURRY, **Journal of Organic Chemistry**. 4ed. Ed. Pacific Grove, 1996.

MEJIA, K.; RENGIFO, E. **Plantas medicinales de uso popular en la Amazonia Peruana**. 2.ed. Lima: Tarea Asociación Gráfica Educativa, p. 286, 2000.

MENEZES, P.R.; SCHWARZ, E.A.; SANTOS, C.A.M. *In vitro* antioxidant activity of species collected in Paraná. **Fitoterapia**, v.75, p.398-400, 2004.

MESQUITA, GRELLIER, M. P.; MAMBU. L.; PAULA, J. E; ESPINDOLA, L. S. *In vitro*. Antiplasmodial activity of Brazilian Cerrado plants used as traditional remedies. **Journal Of Ethnopharmacology**, v. 110, n. 1, p.165-170, 2007.

MILLIKEN, W. Traditional antimalarial medicine in Roaramia, Brazil. **Economic Botany**, v. 51, n. 3, p. 212-237, 1997.

MITAINE-OFFER, A. C.; SAUVAIN, M.; VALENTIN, A.; CALLAPA, J.; MALLIE, M.;



- ZECHES-HANROT, M. Antiplasmodial activity of *Aspidosperma* indole alkaloids. **Phytomedicine**, v. 9, n. 2, p. 142-5, 2002.
- MONTANHEIRO, M. N. S. Determinação da densidade de sólidos e líquidos pelo princípio de Arquemedes. Publicado no **Caderno catarinense de ensino de Física**, v. 7, n. 2, p. 120, 1990.
- MURGATROYD, F. The chemotherapy of malaria. **Postgraduate medical journal**, v. 10, n. 1, p. 5-10, 1952.
- NEYTS, J.; KRISTMUNDSDÓTTIR, T.; CLERCQ, E.; THORMAR H. Hydrogels containing monocaprin prevent intravaginal and intracutaneous infections with HSV-2 in mice: impact on the search for vaginal microbicides. **Journal of Medical Virology**, v. 61, n. 1, p. 107-10, 2000.
- NOEDL, H.; SE, Y.; SCHAECHER, K.; SMITH, B. L.; SOCHEAT, D.; FUKUDA, M. M. Evidence of artemisinin-resistant malaria in western Cambodia. **The New England Journal of Medicine**, v. 359, n. 24, p. 2619-2620, 2008.
- NUNES, D. S. **Contribuição ao estudo químico do gênero *Aspidosperma*: *Aspidosperma pruinosum* Markgraf**. 1980. 177f. Dissertação (Mestrado - Área de Concentração em Química Orgânica) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1980.
- OHLROGGE, J.; BROWSEB, J. Lipid biosynthesis. **The Plant Cell**, v. 7, p. 957-970, 1995.
- OLIVEIRA-FERREIRA, J.; LACERDA, M. V. G.; BRASIL, P.; LADISLAU, J. L. B.; TAUIL, P. L.; DANIEL-RIBEIRO, C. T. R. Malaria in Brazil: an overview. **Malaria Journal**. v. 9, n.1, p. 115, 2010.
- OLIVEIRA, A. B.; DOLABELA, M. F.; BRAGA, F. C.; JÁCOME, L. R .P.; VAROTTI, F. P.; PÓVOA, M. M. Plantderived antimalarial agents: new leads and efficient phythomedicines. Part I. Alkaloids. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 81, n. 4, p. 715-740, 2009.
- OLIVEIRA, F. Q.; JUNQUEIRA, R. G.; STEHMANN, J. R.; BRANDAO, M. G. L. Potencial das plantas medicinais como fonte de novos antimaláricos: espécies indicadas na bibliografia etnomédica brasileira. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 5, n. 2, p. 23-31, 2003.
- OLIVEIRA, V. B.; FREITAS, M. S. M.; MATHIAS, L.; BRAZ-FILHO, R.; VIEIRA, I. J. C. Atividade biológica e alcalóides indólicos do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae): uma revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 1, p. 92-99, 2009.
- PAULA, R.C. **Atividade antimalárica de *Aspidosperma subincanum* Mart. biomonitorada por testes *In vitro* contra *Plasmodium falciparum*, *In vivo* contra *P. berghei* e efeito da uleína no retículo endoplasmático de *P. falciparum***. 2014. 127 f. Tese de doutorado, Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas-UFMG. Universidade Federal de Minas Gerais. 2014.

PEREIRA, A. S. S, SIMOES, A. O, SANTOS, J. U. M. S. Taxonomy of *Aspidosperma* Mart. (Apocynaceae, Rauvolfioideae) in the State of Para, Northern Brazil. **Biota Neotropical**. v. 16, n. 2, p. 1-23, 2016.

PEREZ, D. Etnobotânica medicinal y biocidas para malaria en la región Ucayali. **Folia Amazónica**, v. 13, n. 1-2, p. 87-108, 2002.

PEROZZO, R.; KUO, M.; SIDHU, A.B.S.; VALIYAVEETIL, J.T.; BITTMAN, R.; JACOBS, W.R. et al. Structural elucidation of the specificity of the antibacterial agent triclosan for malarial enoyl acyl carrier protein reductase. **J Biol Chem**. v. 277, p. 13106–14, 2002.

PETERS, W. The chemotherapy of rodent malaria: XXII. The value of drug-resistant strains of in screening for blood schizontocidal activity. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 69, n.2, p. 155-71, 1975.

PETSCHOW, B. W. PETSCHOW, B.W.; BATEMA, R.P.; TALBOTT, R.D.; FORD, L.L. Impact of medium-chain monoglycerides on intestinal colonisation by *Vibrio cholerae* or enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 47, n. 5, p.383-389, 1998.

PIETRO, A.; CONSEIL, G.; PÉREZ-VICTORIA, J.M.; DAYAN, G.; BAUBICHON-CORTAY, H.; TROMPIER, D.; STEINFELS, E.; JAULT, J. M.; WET, H.; MAITREJEAN, M.; COMTE, G.; BOUMENDJEL, A.; MARIOTTE, A. M.; DUMONTET, C.; MCINTOSH, D. B.; GOFFEAU, A.; CASTANYS, S.; GAMARRO, F.; BARRON, D. Modulation by flavonoids of cell multidrug resistance mediated by P-glycoprotein and related ABC transporters. **Cellular and Molecular Life Sciences Cmls**, v. 59, n. 2, p.307-322, 2002.

PLEETER, P.; LEKOSTAJ, J. K.; ROEPE, P. D. Purified Plasmodium falciparum multidrug resistance protein (PfMDR 1) binds a high affinity chloroquine analogue. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 173, n. 2, p. 158-161, 2010.

RATES, S.M.K. & BRIDI, R. 2004. Heterosídeos cardioativos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A. & PETROVICK, P.R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. UFRGS/ UFSC, 5° ed., p.685-710.

RAYAN, P.; STENZEL, D.; MCDONNELL P. A. The effects of saturated fatty acids on *Giardia duodenalis* trophozoites in vitro. **Parasitology Research**, v. 97, n. 3, p.191-200, 2005.

REDGWELL, R. J.; BEEVER, R. E.; BIELESKI, R. L.; LARALY, E. P.; BENN, M. H. Isolation and characterisation of (E)-4-hydroxy-2-(hydroxymethyl)but-2-enyl  $\beta$ -D-allopyranoside, the major soluble carbohydrate in leaves of the fern *Cardiomanes reniforme*. **Carbohydrate Research**, v. 198, n. 1, p. 39-48, 1990.

RIBEIRO, J. E. L. S.; HOPKINS, M. J. G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C. A.; COSTA, M. A. S.; BRITO, J. M.; SOUZA, M. A. D.; MARTINS, L. H. P.; LOHMANN, L. G.; ASSUNÇÃO, P. A. C. L.; PEREIRA, E. C.; SILVA, C. F.; MESQUITA, M. R.; PROCÓPIO, L. C.; **Flora da Reserva Ducke: Guia de Identificação das Plantas**

**Vasculares de uma Floresta de Terra-Firme na Amazônia Central**, INPA: Manaus, 1999.

RIECKMANN, K. H.; CAMPBELL, G. H.; SAX, L. J.; MREMA, J. E. Drug sensitivity of *Plasmodium falciparum*: an in-vitro microtechnique. **lancet infectious disease**, v. 1, n. 8054, p. 22- 23, 1978.

ROLLAND, F.; BAENA-GONZALEZ, E.; SHEEN, J. Sugar sensing and signaling in plants: Conserved and Novel Mechanisms. **Annual Review of Plant Biology**, v. 57, n. 1, p.675-709, 2006.

ROSS, Ronald. The role of the mosquito in the evolution of the malarial parasite. **The Lancet**, v. 152, n. 3912, p.488-490, 1898.

RUSSELL, P. F.; **Man's Mastery of Malaria**, Oxford University Press: London, 1955.

SADEGHI, S.; WALLACE, F.A.; CALDER, P.C. Dietary lipids modify the cytokine response to bacterial lipopolysaccharides in mice. **Immunology**, v. 96, n. 3, p. 404–410, 1999.

SCARPA, G. F. Medicinal plants used by the Criollos of Northwestern Argentine Chaco. **Journal Of Ethnopharmacology**, v. 91, n. 1, p.115-135, 2004.

SCARPA, G.F. Plantas empleadas contra trastornos digestivos em la medicina tradicional criolla del Chaco noroccidental. **Darwiniana**, v. 38, p. 253-280, 2000.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M. L. Saponinas. *In*: SIMÕES, C. M.; SCHENKEL, E. P.;GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento** .3 ed. Ed. UFRGS/Ed. UFSC, cap. 27, p. 597-619, 2001.

SILVA, M. C. M.; PERES, J. M. V.; PÓVOA, M. M.; VIANA, G. M. R.; DOLABELA, M. F. Strategies to Validate the Use of Plants as Antimalarial. **Journal of Complementary Medicine and Healthcare**, v. 3, n. 1, p. 1-3, 2017.

SMEEKENS, S.; HELLMANN, H. A. Sugar sensing and signaling in plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, n. 5, p.113, 2014.

SOARES, N. P.; SANTOS, P. L; VIEIRA, V. S.; PIMENTA, V. S.; ARAÚJO, E. G. **Técnicas de prospecção fitoquímica e sua importância para o estudo de biomoléculas derivadas de plantas**. Enciclopédia biosfera, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.13 n.24; p. 991- 1011, 2016

STEELE, J.C.; VEITCH, N.C.; KITE, G.C.; SIMMONDS, M.S.J.; WARHURST, D.C. Indole and  $\alpha$ -carboline alkaloids from *Geissospermum sericeum*. **Journal of Natural Products**. v. 65, n 1, p. 85-88, 2002.

STEPHENS, J. W. W. A new malaria parasite of man. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v.16, n. 4, p. 383–388, 1922;

SUKSAMRARN, A.; BUAPROM, M.; UDTIP, S.; NUNTAWONG, N.; HARITAKUN,

R.; KANOKMEDHAKUL, S. Antimycobacterial and antiplasmodial unsaturated carboxylic acid from the twigs of *Scleropyrum wallichianum*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 53, n. 10, p. 1327–1329, 2005.

SUN, C. Q; O'CONNOR, C.J.; ROBERTON, A.M. Antibacterial actions of fatty acids and monoglycerides against *Helicobacter pylori*. **Fems Immunology & Medical Microbiology**, v. 36, n. 1-2, p.9-17, 2003.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, p. 820, 2012.

TASDEMIR D. Type II fatty acid biosynthesis, a new approach in antimalarial natural product discovery. **Phytochem Rev**. v.5, n.1, p. 99–108, 2006.

TASDEMIR, D.; TOPALOGLU, B.; PEROZZO, R.; BRUN, R.; O'NEILL, R.; CARBALLEIRA, N.M.; et al. Marine natural products from the Turkish sponge *Agelas oroides* that inhibit the enoyl reductase from *Plasmodium falciparum*, *Mycobacterium tuberculosis* and *Escherichia coli*. **Bioorg Med Chem**, v.15, p.6834–45, 2007.

THE ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 141, n. 4, p. 399-436, 2003.

THORMAR, H.; ISAACS, C.E.; KIM, K.S.; BROWN, H.R. Inactivation of visna virus and other enveloped viruses by free fatty acids and monoglycerides. **Annals of the New York Academy of Science**, v. 724, n. 1, p. 465-71, 1994.

TRAGER, W.; JENSEN, J. B. Human malaria parasites in Continuous culture. **Science** v. 193, n. 4252, p. 673-5, 1976.

VALE, V. V.; VILHENA, T. C.; TRINDADE, R. C.; FERREIRA, M. R.; PERCÁRIO, S.; SOARES, L.F.; PEREIRA, W. L.; BRANDÃO, G. C.; OLIVEIRA, A. B.; DOLABELA, M. F.; VASCONCELOS, F. Anti-malarial activity and toxicity assessment of *Himatanthus articulatus*, a plant used to treat malaria in the Brazilian Amazon. **Malaria Journal**, v. 14, n. 1, p.132-140, 2015.

VANDENBERGHE. L.; VINCKE, I.; CHARDOME, M. Tissular phase of *Plasmodium berghei*. **Annales De La Societe Belge De Medecine Tropicale**, v. 30, n. 1, p. 79-82, 1920

WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKI, E. M. **Plant drug analysis**. Springer-Verlag, Berlin, 1984.

WALLER, R.F.; KEELING, P.J.; DONALD, R.G.; STRIEPEN, B.; HANDMAN, E; LANG-UNNASCH, N. et al. Nuclear-encoded proteins target to the plastid in *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum*. **Proc Natl Acad Sci USA** v. 95, n 21, p.12352–7, 1998.

WELCH, W. H. **Malaria: definition, synonyms, history, and parasitology**. Loomis and Thompson, Syst. Practice Med. v.1. ed. 1, p. 7-76. New York: Lea Bros. & Co, 1897.

WENIGER, B.; ROBLEDO, S.; ARANGO, G. J.; DEHARO, E.; ARAGON, R.; MUÑOZ, V.; CALLAPA, J.; LOBSTEIN, A.; ANTON, R.; Antiprotozoal activities of Colombian plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 78, n. 2-3, p. 193-200, 2001.

WENIGER, B.; ROBLEDO, S.; ARANGO, G.J.; DEHARO, E.; ARAGON, R.; MUNOZ, V.; CALLAPA, J.; LOBSTEIN, A.; ANTON, R. Antiprotozoal activities of Colombian plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 78, n. 2-3, p. 193-200, 2001.

WINSTANLEY, P. Modern chemotherapeutic options for malaria. **Lancet Infectious Disease**, v. 1. n. 4, p. 242-250, 2001.

WONGSRICHANALAI, C.; PICKARD, A. L.; WERNSDORFER, W. H.; MESHNICK, S. R. Epidemiology of drug-resistant malaria. **Lancet infectious diseases**, v. 2, n. 4, p. 209-218, 2002.

WOODSON, R. J. Studies in the Apocynaceae. An Interim revision of the genus *Aspidosperma* Mart. & Zucc. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 38, n. 2, p.119- 204, 1951.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) **World Malaria Report**. Geneva: WHO, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) **World Malaria Report**. Geneva: WHO, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Quality Control Methods for Medicinal Plant Materials**. Geneva: WHO, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global report on antimalarial drug efficacy and drug resistance: 2000-2010**. Geneve: WHO, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for the treatment of malaria. 2nd ed.** WHO; Geneve: WHO, 2006.

WRIGHT, C. W. Traditional antimalarials and the development of novel antimalarial drugs. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1-2, p.67-71, 2005

ZORZETO, T. Q.; DECHEN, S. C. F.; ABREU, M. F.; FERNADES JÚNIOR, F. Caracterização física de substratos para plantas. **Bragantia**, v. 73, n. 3, p. 300-11, 2014.