



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

**INVESTIGAÇÃO FITOQUÍMICA E DAS ATIVIDADES  
ANTIOXIDANTE E ANTIPARASITÁRIA DO EXTRATO E  
FRAÇÕES DE *Aspidosperma excelsum* Benth**

**Myrth Soares do Nascimento**

BELÉM - PA  
2013



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

**INVESTIGAÇÃO FITOQUÍMICA E DAS ATIVIDADES  
ANTIOXIDANTE E ANTIPARASITÁRIA DO EXTRATO E  
FRAÇÕES DE *Aspidosperma excelsum* Benth**

Autora: Myrth Soares do Nascimento  
Orientador: Prof. Dr. Wagner Luiz Ramos Barbosa  
Co-orientador: Prof. Dr. Flávio Vasconcelos

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

BELÉM-PA  
2013

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

---

Nascimento, Myrth Soares do.

Investigação fitoquímica e das atividades antioxidante e antiparasitária do extrato e frações de *Aspidosperma excelsum* Benth. Myrth Soares do Nascimento; Orientador, Wagner Luiz Ramos Barbosa, co-orientador, Flávio Vasconcelos – 2013.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Instituto de Ciências da Saúde, Belém, 2013.

1. *Aspidosperma excelsum*. 2. Alcalóides indólicos. 3. Ioimbina. 4. Antiparasitária. 5. Antioxidante. I. Título.

CCD: 22 ed. : 615.321

---

## FOLHA DE APROVAÇÃO

**Myrth Soares do Nascimento**

**Investigação fitoquímica e das atividades antioxidante e antiparasitária do extrato e frações de *Aspidosperma excelsum* Benth**

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

Aprovado em: 30 de setembro de 2013

Banca examinadora

---

Prof. Dr. Wagner Luiz Ramos Barbosa – UFPA  
Orientador

---

Prof. Dra. Maria José Vieira Fonseca – USP  
Examinadora

---

Prof. Dr. José Luís Fernandes Vieira – UFPA  
Examinador

BELÉM-PA  
2013

## DEDICATÓRIA

À minha família, pessoas sem as quais nada teria sido possível.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela vida, por sua infinita bondade e pelo cuidado dia após dia.

À minha família, por todo o amor, cuidado, apoio e incentivo.

Ao Luan Remígio, pelo amor, carinho e amizade dedicados.

Ao professor Wagner Barbosa, pela orientação, apoio e confiança.

Aos amigos do Laboratório de Fitoquímica, pela amizade, companheirismo, solicitude e pelos momentos de descontração, tão necessários.

À professora Maria José Vieira Fonseca, por ter permitido que a avaliação da atividade antioxidante fosse realizada em seu laboratório. Agradeço também por toda a atenção e orientação dispensadas.

Aos novos amigos do Laboratório de Controle de Qualidade da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (USP), especialmente Rebeca Sousa e o técnico José Roberto Jabor, pela colaboração e por toda a atenção dedicada durante o período.

Ao professor Jairo Kenupp Bastos, por ter me recebido em seu laboratório na tentativa de realizar o isolamento de substâncias.

Aos novos amigos do Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (USP), principalmente Mariza Miranda e Bruno Leite, pela colaboração, carinho e atenção.

Ao professor Sérgio Albuquerque, por ter permitido a avaliação das atividades leishmanicida e tripanocida em seu laboratório.

À professora Alaíde Braga, pela avaliação da atividade antimalárica em seu laboratório.

À CAPES, CNPq e Agilent, pelo auxílio financeiro.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

## RESUMO

**NASCIMENTO, M. S. Investigação fitoquímica e das atividades antioxidante e antiparasitária do extrato e frações de *Aspidosperma excelsum* Benth. 2013. 95 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2013.**

As doenças negligenciadas afetam um grande número de pessoas em todo o mundo. Dentre elas estão a doença de Chagas, a leishmaniose e a malária, cuja terapêutica empregada, além de reduzida, apresenta problemas que dificultam seu tratamento, revelando a necessidade de busca por novas opções terapêuticas. *Aspidosperma excelsum* (Apocynaceae), conhecida popularmente como carapanaúba, é utilizada na fitoterapia popular para o tratamento de malária. Sua constituição química e a atividade antiparasitária de outras espécies do gênero sugerem seu potencial antiparasitário. Com o objetivo de investigar sua constituição química e as possíveis atividades biológicas, o extrato liofilizado, obtido de cascas da espécie, e suas frações alcaloídicas foram analisados por técnicas cromatográficas e avaliados quanto às atividades antioxidante e antiparasitária frente a *Leishmania* ssp., *Trypanosoma cruzi* e *Plasmodium falciparum*. A análise por CLAE permitiu a detecção de picos altamente correlacionados à ioimbina na tintura e frações FAlc<sub>7</sub>, FAlc<sub>10</sub> e FAlc<sub>14</sub>. Todas as frações mostraram-se ativas frente à *L. chagasi* e valores de IC<sub>50</sub> menores que o da anfotericina B foram observados para FAlc<sub>1</sub>, FAlc<sub>4</sub> e FAlc<sub>7</sub> na análise sobre *L. braziliensis*. As frações FAlc<sub>1</sub> e FAlc<sub>4</sub> revelaram-se também ativas sobre *P. falciparum*, apresentando alto índice de seletividade ao parasita. A avaliação da atividade antioxidante revelou importante capacidade das amostras em capturar radicais livres, caracterizando-as como agentes antioxidantes.

**Palavras-chave:** *Aspidosperma excelsum*, alcalóides indólicos, ioimbina, antiparasitária, antioxidante.

## ABSTRACT

**NASCIMENTO, M. S. Phytochemical research and antioxidant and antiparasitic activities of the extract and fractions of *Aspidosperma excelsum* Benth. 2013. 95 f. Dissertation (Master's degree) – Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pará, Belém, 2013.**

Neglected diseases are diseases that affect a large number of people around the world. These include Chagas disease, leishmaniasis and malaria, whose therapy used, in addition to reduced presents problems that hinder their treatment and show the need to search for new therapeutic options. *Aspidosperma excelsum* (Apocynaceae), popularly known as carapanaúba, is used in the popular herbal medicine for the treatment of malaria. Its chemical constitution and antiparasitic activity of other species of genus suggests its antiparasitic potential. To investigate their chemical constitution and possible biological activities, the lyophilized extract, obtained from barks of specie, and their alkaloidic fractions were analyzed by chromatographic techniques and evaluated for antioxidant and antiparasitic activity against *Leishmania* ssp., *Trypanossoma cruzi* e *Plasmodium falciparum*. The HPLC analyses showed peaks highly correlated to yohimbine in the tincture and in its alkaloidic fractions: FAlk<sub>7</sub>, FAlk<sub>10</sub> and FAlk<sub>14</sub>. All the samples were active against *L. chagasi* and FAlk<sub>1</sub>, FAlk<sub>4</sub> and FAlk<sub>7</sub> show IC<sub>50</sub> values lower than Amphotericin B against *L. braziliensis*. Fractions FAlk<sub>1</sub> and FAlk<sub>4</sub> were also active on *P. falciparum*, showing high selectivity to the parasite. Evaluation of antioxidant activity revealed important capacity of samples in capturing free radicals, characterizing them as antioxidants.

**Word-key:** *Aspidosperma excelsum*, indolic alkaloids, yohimbine, antiparasitic, antioxidant.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> – Ciclo biológico da doença de Chagas .....	20
<b>Figura 2</b> – Ciclo biológico da leishmaniose.....	22
<b>Figura 3</b> – Ciclo biológico da malária.....	25
<b>Figura 4</b> – Mecanismo de ação de derivados da artemisinina.....	27
<b>Figura 5</b> – Estrutura química do aminoácido triptofano e estrutura básica de um alcaloide indólico (grupo indol) .....	30
<b>Figura 6</b> – Aspidospermina, substância isolada de <i>A. quebracho blanco</i> por Mitaine-Offer et al (2002), ativa <i>in vitro</i> frente a uma linhagem de <i>P. palcipurum</i> .....	31
<b>Figura 7</b> – Estrutura química da ioimbina, isolada de <i>A. quebracho blanco</i> por Deutsch et al (1994) .....	32
<b>Figura 8</b> – Tronco (A), flores (B) e fruto (C) de <i>Aspidosperma excelsum</i> Benth.....	33
<b>Figura 9</b> – Estruturas químicas da <i>o</i> -acetiloiimbina (A) e da excelsinina (B) .....	34
<b>Figura 10</b> – Estrutura química das substâncias 11-metoxitubotaiwina (A), ochrolifuanina A (B), tetraidro-secamina (C <sub>1</sub> ), 16-desmetoxicarboniltetraidro-secamina (C <sub>2</sub> ), 16-hidroxitetraidro-secamina (C <sub>3</sub> ) e 16-hidroxi,16-demetoxicarboniltetraidro-secamina (figura C <sub>4</sub> ) isoladas de <i>A. excelsum</i> por Veeporte et al (1986) e ativas frente a <i>Bacillus subtilis</i> .....	35
<b>Figura 11</b> – Fluxograma referente ao fracionamento ácido-básico do ELAe, realizado com o objetivo de selecionar o método para separação de seu conteúdo alcaloídico .....	38

<b>Figura 12</b> – Fluxograma de separação das frações B <sub>7</sub> , C <sub>7</sub> e D <sub>10</sub> .....	41
<b>Figura 13</b> – Fluxograma referente aos métodos empregados para separação da FAlc <sub>7</sub> por CCDC.....	42
<b>Figura 14</b> – Fluxograma referente à separação de FAlc <sub>7</sub> por cromatografia de média pressão.....	44
<b>Figura 15</b> – Cromatograma obtido sobre gel de sílica normal em eluente AcOEt/MeOH (75:25), após aspensão com reativo de Dragendorff. Esquerda-direita: A <sub>1</sub> , B <sub>4</sub> , A <sub>4</sub> , C <sub>7</sub> , A <sub>7</sub> , B <sub>7</sub> , D <sub>10</sub> , A <sub>10</sub> , B <sub>10</sub> , C <sub>10</sub> , E <sub>14</sub> , A <sub>14</sub> , B <sub>14</sub> e C <sub>14</sub> .....	57
<b>Figura 16</b> – Perfil cromatográfico por CLAE da substância de referência cloridrato de ioimbina (Sigma-Aldrich) em Acetonitrila (ACN)/Ácido trifluoracético (TFA) pH 3, sob luz ultravioleta ( $\lambda$ ) 271 nm .....	58
<b>Figura 17</b> – Perfil cromatográfico por CLAE da tintura em ACN/TFA pH 3, ( $\lambda$ ) 271 nm .....	58
<b>Figura 18</b> – Sobreposição dos espectros de ultravioleta do cloridrato de ioimbina (18,80 min) e do pico registrado em 19,20 min no cromatograma obtido pela análise da tintura .....	59
<b>Figura 19</b> – Cromatograma obtido pela análise da tintura por CLAE em ACN/TFA pH 3 após adição do cloridrato de ioimbina. Visualização feita sob luz ultravioleta ( $\lambda$ ) 271 nm .....	59
<b>Figura 20</b> – Perfil cromatográfico da fração alcaloídica FAlc <sub>1</sub> obtida por fracionamento sequencial sob luz ultravioleta ( $\lambda$ ) 271 nm.....	60
<b>Figura 21</b> – Cromatograma da fração alcaloídica FAlc <sub>4</sub> obtida por fracionamento sequencial, observada sob luz ultravioleta ( $\lambda$ ) 271 nm.....	60

<b>Figura 22</b> – Perfil cromatográfico da fração alcaloídica FAlc <sub>7</sub> obtida por fracionamento sequencial, sob luz ultravioleta ( $\lambda$ ) 271 nm.....	61
<b>Figura 23</b> – Perfil cromatográfico da fração alcaloídica FAlc <sub>14</sub> obtida por fracionamento sequencial, sob luz ultravioleta ( $\lambda$ ) 271 nm.....	62
<b>Figura 24</b> – Perfil cromatográfico da fração alcaloídica FAlc <sub>10</sub> obtida por fracionamento sequencial, sob luz ultravioleta ( $\lambda$ ) 271 nm.....	62
<b>Figura 25</b> – Perfil cromatográfico da fração alcaloídica FAlc <sub>1</sub> obtida por fracionamento em paralelo, sob luz ultravioleta ( $\lambda$ ) 271 nm .....	63
<b>Figura 26</b> – Cromatograma por CLAE da fração alcaloídica FAlc <sub>4</sub> obtida por fracionamento em paralelo, sob luz ultravioleta ( $\lambda$ ) 271 nm .....	63
<b>Figura 27</b> – Perfil cromatográfico por CLAE da fração alcaloídica FAlc <sub>7</sub> obtida por fracionamento em paralelo, observado a ( $\lambda$ ) 271 nm .....	64
<b>Figura 28</b> – Perfil cromatográfico por CLAE da fração alcaloídica FAlc <sub>10</sub> obtida por fracionamento em paralelo, observado sob luz ultravioleta ( $\lambda$ ) 271 nm.....	64
<b>Figura 29</b> – Perfil cromatográfico por CLAE da fração alcaloídica FAlc <sub>14</sub> obtida por fracionamento em paralelo, visualizado sob luz ultravioleta ( $\lambda$ ) 271 nm.....	65
<b>Figura 30</b> – Espectro de RMN <sup>1</sup> H de Ae1 (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz).....	67
<b>Figura 31</b> – Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup> H de Ae1 (CDCl <sub>3</sub> , 500MHz) .....	68
<b>Figura 32</b> – Estrutura química da ioimbina, substância presente em espécies de <i>Aspidosperma</i> .....	68
<b>Figura 33</b> – Espectro de massas de Ae1 no modo positivo.....	69
<b>Figura 34</b> – Espectro de massas de Ae1 no modo negativo .....	70

<b>Figura 35</b> – Curvas dose-resposta das frações alcalóidicas de <i>A. excelsum</i> frente ao <i>P. falciparum</i> (cepa W2) e valores de IC <sub>50</sub> correspondentes .....	74
<b>Figura 36</b> – Curvas de inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/XOD/luminol pelo ELAe sem incubação (A) e após incubação com XOD (B) .....	77
<b>Figura 37</b> – Comparação entre os valores de IC <sub>50</sub> obtidos para ELAe sem incubação e após a sua incubação com a XOD .....	78
<b>Figura 38</b> – Curvas de inibição da quimioluminescência produzida no sistema xantina/XOD/luminol pelas frações FAlc <sub>1</sub> (A), FAlc <sub>4</sub> (B), FAlc <sub>7</sub> (C), FAlc <sub>10</sub> (D) e FAlc <sub>14</sub> (E) .....	79
<b>Figura 39</b> – Perfis de absorção do citocromo c reduzido no sistema xantina/XOD na ausência (—) e na presença (—) do ELAe .....	81
<b>Figura 40</b> – Perfis de absorção do citocromo c reduzido no sistema xantina/XOD após adição da SOD na ausência (—) e na presença (—) do ELAe .....	81
<b>Figura 41</b> – Curvas da medida da atividade doadora de H <sup>+</sup> ao radical DPPH pelo ELAe (A) e suas frações FAlc <sub>1</sub> (B), FAlc <sub>4</sub> (C), FAlc <sub>7</sub> (D), FAlc <sub>10</sub> (E) e FAlc <sub>14</sub> (F).....	82

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Classificação das amostras conforme os valores de IC<sub>50</sub> quanto à atividade antimalárica frente ao *Plasmodium falciparum*.....50
- Tabela 2** – Rendimento das frações obtidas pelo fracionamento ácido básico das alíquotas A, B, C, D e E preparadas com o ELAe .....55
- Tabela 3** – Concentrações citotóxicas (CC<sub>50</sub>) das frações alcaloídicas capazes de inibir *in vitro* 50% do crescimento de células HepG2 .....71
- Tabela 4** – Valores de IC<sub>50</sub> do extrato e suas frações alcaloídicas frente a formas promastigotas de *L. braziliensis* e *L. chagasi*.....72
- Tabela 5** – Percentual de redução do crescimento de *P. falciparum* cloroquina-resistente (W2) na presença das frações alcaloídicas de *A. excelsum*.....74
- Tabela 6** – Classificação da atividade das frações alcaloídicas de *A. excelsum* frente ao clone W2 (cloroquina-resistente) de *P. falciparum*, conforme os valores de IC<sub>50</sub> obtidos.....75
- Tabela 7** – Valores de CC<sub>50</sub>, IC<sub>50</sub> e IS das frações alcaloídicas de *Aspidosperma excelsum* .....76

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOEt	Acetato de etila
ACN	Acetonitrila
APAD	Acetilpiridina adenina dinucleotídeo
APADH	Acetilpiridina adenina dinucleotídeo reduzida
ATP	Adenosina trifosfato
CC <sub>50</sub>	Concentração citotóxica que inibe em 50 % o crescimento das células
CCD	Cromatografia de camada delgada
CCDC	Cromatografia em Camada Delgada Centrífuga
CCDP	Cromatografia em camada delgada preparativa
CLAE	Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CPRG	Clorofenol β-D-galactopiranosídeo
DCI	Diclorometano
DEA	Dietilamina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DMSO	Dimetilsulfóxido
ELAe	Extrato liofilizado de <i>Aspidosperma excelsum</i>
ESI	Ionização por electrospray
FA	Fração Acetato de etila
FAPEMIG	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais
FCFRP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
FAIc	Fração alcaloídica
FH	Fração hexânica
FM	Fração metanólica
IC <sub>50</sub>	Concentração inibitória do crescimento de 50 % dos parasitas
IS	Índice de seletividade
LDH	Lactato desidrogenase
MeOH	Metanol
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol
NBT	Azul nitro-tetrazol
OMS	Organização Mundial da Saúde

PES	Etossulfato de fenazina
PABA	Ácido paraminobenzóico
PNPIC	Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
PNPMF	Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos
PRONEX	Programa de Apoio a Núcleos de Excelência
RMN <sup>1</sup> H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Superóxido Dismutase
TFA	Ácido trifluoracético
USP	Universidade de São Paulo
UV	Ultravioleta
XOD	Xantina oxidase

## LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES

°C	Graus Celsius
g	Gramma
h	Hora
M	Concentração molar
MHz	Mega Hertz
mL	Mililitro
mM	milimolar
Min	Minuto
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
µs	Microsegundos
nm	Nanômetro
rpm	Rotações por minuto
seg	Segundos
%	Porcentagem
λ	Comprimento de onda

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>18</b>
<b>1.1 Doenças negligenciadas</b> .....	<b>19</b>
1.1.1 DOENÇA DE CHAGAS .....	20
1.1.2 LEISHMANIOSES .....	21
1.1.3 MALÁRIA.....	24
<b>1.2 Agentes pró e antioxidantes</b> .....	<b>27</b>
<b>1.3 Espécies de <i>Aspidosperma</i> empregadas na fitoterapia popular para o tratamento de doenças negligenciadas</b> .....	<b>28</b>
<b>1.4 Família Apocynaceae</b> .....	<b>29</b>
<b>1.5 Gênero <i>Aspidosperma</i></b> .....	<b>30</b>
<b>1.6 <i>Aspidosperma excelsum</i></b> .....	<b>33</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>36</b>
2.1 Geral .....	36
2.2 Específicos .....	36
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>37</b>
3.1 Obtenção da tintura e do extrato liofilizado de <i>Aspidosperma excelsum</i> (ELAe).....	37
3.2 Seleção do método para fracionamento do ELAe .....	37
3.3 Fracionamento ácido-básico do ELAe .....	39
3.4 Análise das frações de <i>Aspidosperma excelsum</i> por cromatografia em camada delgada (CCD) .....	39
3.5 Análise da tintura e frações de <i>Aspidosperma excelsum</i> por cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE).....	40
<b>3.6 Obtenção de substâncias</b> .....	<b>40</b>
3.6.1 SEPARAÇÃO DE B <sub>7</sub> , C <sub>7</sub> E D <sub>10</sub> POR CROMATOGRAFIA DE MÉDIA PRESSÃO .....	40
3.6.2 SEPARAÇÃO DE FAI <sub>C7</sub> POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA CENTRÍFUGA (CCDC) .....	42
3.6.3 SEPARAÇÃO DE FAI <sub>C7</sub> POR CROMATOGRAFIA DE MÉDIA PRESSÃO .....	43

<b>3.7</b>	<b>Análise por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN<sup>1</sup>H) de Ae1</b>	<b>45</b>
	.....	
<b>3.8</b>	<b>Análise de Ae1 por espectrometria de massas</b>	<b>45</b>
<b>3.9</b>	<b>Avaliação da citotoxicidade das frações alcaloídicas</b>	<b>45</b>
<b>3.10</b>	<b>Análise da atividade do extrato e frações alcaloídicas frente ao <i>Trypanosoma cruzi</i></b>	<b>46</b>
<b>3.11</b>	<b>Análise da atividade do extrato e frações alcaloídicas frente a <i>Leishmania braziliensis</i> e <i>Leishmania chagasi</i></b>	<b>47</b>
<b>3.12</b>	<b>Análise da atividade das frações alcaloídicas de <i>A. excelsum</i> frente ao <i>Plasmodium falciparum</i></b>	<b>48</b>
<b>3.13</b>	<b>Avaliação da atividade pro/antioxidante do extrato e frações alcaloídicas de <i>Aspidosperma excelsum</i></b>	<b>50</b>
3.13.1	AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DO ELAe E SUAS FRAÇÕES ALCALOÍDICAS DE INIBIÇÃO DA QUIMIOLUMINESCÊNCIA GERADA PELO SISTEMA XANTINA/XOD/LUMINOL, PELO SEQUESTRO DO ÂNION SUPERÓXIDO	51
3.13.2	ANÁLISE DA ATIVIDADE INIBITÓRIA DO EXTRATO SOBRE AS ENZIMAS XANTINA OXIDASE (XOD) E SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)	52
3.13.3	ANÁLISE DO EXTRATO E FRAÇÕES PELO MÉTODO DO RADICAL DPPH	53
<b>3.14</b>	<b>Análise estatística dos resultados</b>	<b>54</b>
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>55</b>
4.1	Obtenção da tintura e do extrato liofilizado de <i>Aspidosperma excelsum</i>	55
4.2	Seleção do método para fracionamento do ELAe	55
4.3	Fracionamento ácido-básico do ELAe	56
4.4	Análise das frações de <i>Aspidosperma excelsum</i> por CCD	56
4.5	Análise da tintura e frações alcaloídicas de <i>Aspidosperma excelsum</i> por cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE)	57
4.6	Obtenção de substâncias	66
4.6.1	SEPARAÇÃO DE B <sub>7</sub> , C <sub>7</sub> E D <sub>10</sub> POR CROMATOGRAFIA DE MÉDIA PRESSÃO	66
4.6.2	SEPARAÇÃO DE FAI <sub>C7</sub> POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA CENTRÍFUGA (CCDC)	66

4.6.3 SEPARAÇÃO DE FAI <sub>C7</sub> POR CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO DE MÉDIA PRESSÃO .....	66
<b>4.7 Análise por RMN<sup>1</sup>H de Ae1 .....</b>	<b>67</b>
<b>4.8 Análise de Ae1 por espectrometria de massas .....</b>	<b>69</b>
<b>4.9 Avaliação da citotoxicidade das frações alcalóidicas .....</b>	<b>70</b>
<b>4.10 Análise da atividade do extrato e frações alcalóidicas frente ao <i>Trypanosoma cruzi</i>.....</b>	<b>71</b>
<b>4.11 Análise da atividade do extrato e frações alcalóidicas frente a <i>Leishmania braziliensis</i> e <i>Leishmania chagasi</i>.....</b>	<b>71</b>
<b>4.12 Análise da atividade das frações alcalóidicas de <i>A. excelsum</i> frente ao <i>Plasmodium falciparum</i>.....</b>	<b>73</b>
<b>4.13 Avaliação da atividade pro/antioxidante do extrato e frações alcalóidicas de <i>Aspidosperma excelsum</i>.....</b>	<b>77</b>
4.13.1 ANÁLISE DO EXTRATO E FRAÇÕES ALCALOÍDICAS POR QUIMIOLUMINESCÊNCIA NO SISTEMA XANTINA/XOD/LUMINOL.....	77
4.13.2 ANÁLISE DA ATIVIDADE INIBITÓRIA DO EXTRATO SOBRE AS ENZIMAS XANTINA OXIDASE E SUPERÓXIDO DISMUTASE.....	80
4.13.3 ANÁLISE DO EXTRATO E FRAÇÕES PELO MÉTODO DO RADICAL DPPH .....	82
<b>5. CONCLUSÃO .....</b>	<b>84</b>
<b>6. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>85</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A utilização de plantas medicinais no tratamento e na cura de enfermidades é tão antiga quanto a espécie humana (MACIEL et al. 2002). No Brasil, 20 % da população são responsáveis pelo consumo de 63 % dos medicamentos disponíveis. Os recursos terapêuticos usados pelo restante dos brasileiros são produtos de origem natural, especialmente plantas medicinais. Esta alternativa é utilizada tanto em um contexto cultural, na medicina popular, quanto na forma de fitoterápicos (FOGLIO et al. 2006).

O Ministério da Saúde vem implementando políticas no sentido de normatizar e regulamentar o uso de plantas medicinais e seus derivados, dentre elas a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC), que preconiza o emprego da fitoterapia na atenção básica em saúde (BRASIL, 2006a); e a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF), que visa, principalmente, garantir à população o acesso a plantas medicinais e fitoterápicos com segurança, eficácia e qualidade (BRASIL, 2006b). A garantia dessas características revela a necessidade de desenvolver pesquisas voltadas à investigação científica de plantas medicinais utilizadas pela população.

Dentre as espécies vegetais empregadas na fitoterapia popular encontra-se *Aspidosperma excelsum* Benth, usada tradicionalmente para o tratamento de malária (BRANDÃO et al. 1985 apud BOURDY et al. 2004). A utilização popular da espécie norteou sua seleção como objeto de estudo no projeto “Rede de produtos naturais para quimioterapia antimalárica” (PRONEX-CNPq/FAPEMIG), que tem por objetivo a obtenção de medicamentos fitoterápicos para o tratamento de malária.

Assim, o presente trabalho foi desenvolvido como parte dos objetivos estabelecidos no projeto supracitado, visando obter dados químicos e de atividade biológica da espécie tanto frente ao *Plasmodium falciparum*, agente etiológico da malária, quanto sobre outros parasitas, causadores de doenças consideradas negligenciadas.

## 1.1 Doenças negligenciadas

As doenças negligenciadas são enfermidades que afetam predominantemente as populações mais pobres, contribuindo para a manutenção dos ciclos de pobreza, desigualdade e exclusão social (HOTEZ, 2007; BRASIL, 2010; WERNECK et al. 2011). Trata-se de doenças com maior prevalência em regiões tropicais, sobretudo países pobres, que causam significativas morbidade e mortalidade, e geram impactos sociais e econômicos negativos capazes de comprometer drasticamente a qualidade de vida das pessoas (MALAFAIA, 2009).

As definições e visões sobre quais seriam essas doenças apresentam variações importantes, que se devem a diferenças regionais na carga de doença atribuída a cada enfermidade e também na abordagem do problema (WERNECK et al. 2011). Segundo Yamey (2002), podem ser consideradas “negligenciadas” doenças infecciosas que não dispõem de tratamentos efetivos, acessíveis ou fáceis pelo emprego de drogas.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), mais de um bilhão de pessoas estavam infectadas em 2010 por uma ou mais doenças negligenciadas, o que corresponde a um sexto da população mundial (BRASIL, 2010a). Apesar da alta prevalência, essas doenças têm sido tradicionalmente ignoradas pela indústria farmacêutica, principalmente porque a maioria dos pacientes afetados vive em países em desenvolvimento e não pode pagar por medicamentos (YAMEY, 2002). Para Trouiller et al (2002), esses problemas de saúde não oferecem retornos financeiros suficientes para que a indústria se engaje em pesquisa e desenvolvimento.

A definição das prioridades de pesquisa em doenças negligenciadas no Brasil ocorreu em uma oficina realizada em 2008, promovida pelo Ministério da Saúde em parceria com o Ministério da Ciência e Tecnologia. Considerando dados epidemiológicos, demográficos e o impacto das doenças, foram definidas sete prioridades de atuação: dengue, doença de Chagas, leishmaniose, hanseníase, malária, esquistossomose e tuberculose (BRASIL, 2010a).

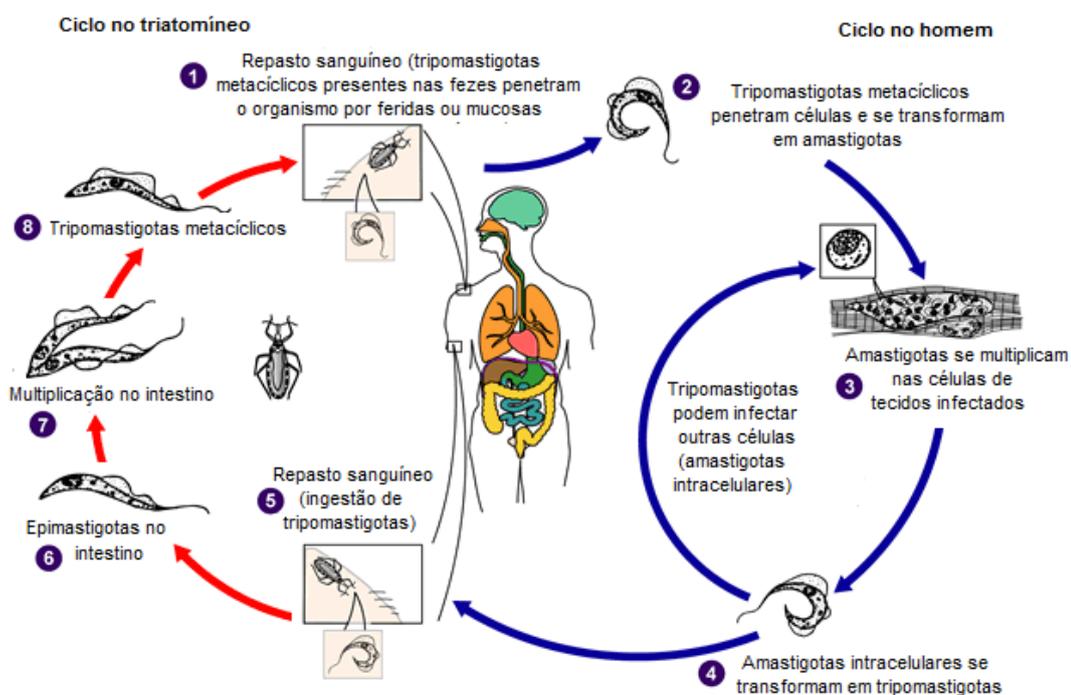
Dentre as prioridades definidas pelos Ministérios da Saúde e da Ciência e Tecnologia, a doença de Chagas, leishmaniose e a malária são problemas de saúde responsáveis por mais de 3 milhões de mortes anualmente nos países em desenvolvimento (FOURNET e MUÑOZ, 2002).

### 1.1.1 DOENÇA DE CHAGAS

A doença de Chagas, também conhecida como tripanossomíase americana, foi descoberta em 1909 por Carlos Chagas em Lassance, Minas Gerais. Estima-se que mais de 25 milhões de pessoas estejam expostas ao risco da doença e cerca de 10 milhões de pessoas encontrem-se infectadas em todo o mundo, principalmente na América Latina, onde a zoonose é endêmica (OMS, 2010).

É causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, transmitido principalmente pelos triatomíneos, insetos hematófagos comumente chamados barbeiros (NOIREAU et al, 2005). No Brasil existem pelo menos 52 espécies de triatomíneos identificadas, sendo cinco delas consideradas domésticas e, portanto, de importância epidemiológica: *Triatoma infestans*, *T. brasiliensis*, *T. pseudomaculata*, *T. sordida* e *Panstrongylus megistus* (COURA e DIAS, 2009).

O ciclo biológico do *T. cruzi* (figura 1) tem início durante ou logo após o repasto sanguíneo, quando tripomastigotas metacíclicos são eliminados nas fezes e urina do vetor (LANA e TAFURI, 2005). Após a picada, ocorre uma leve ardência ou prurido, assim, quando o hospedeiro fricciona o local afetado introduz no organismo os tripomastigotas presentes nas excreções do barbeiro (ARGOLO et al. 2008).



Fonte: Adaptado de Centers for Disease Control and Prevention.

Figura 1 – Ciclo biológico da doença de Chagas.

Esses protozoários penetram pelo local da picada e interagem com células do sistema mononuclear fagocítico da pele e das mucosas. Neste local, são diferenciados em amastigotas e se multiplicam. A seguir, voltam à forma de tripomastigotas e são liberados da célula hospedeira na corrente sanguínea. O barbeiro, ao se alimentar do sangue de vertebrados infectados, ingere os tripomastigotas sanguíneos, que no intestino do inseto se diferenciam na forma epimastigota e multiplicam. Ainda no intestino, os epimastigotas se transformam em tripomastigotas metacíclicos, que serão eliminados com as fezes e urina durante o repasto sanguíneo, podendo penetrar no organismo do hospedeiro vertebrado por meio da picada ou mucosas, renovando assim o ciclo de transmissão (LANA e TAFURI, 2005; ARGOLO et al. 2008).

Desde o final da década de 60 e início dos anos 70, duas drogas têm sido empregadas no tratamento da doença de Chagas: nifurtimox e benzonidazol (COURA e CASTRO, 2002). A administração desses medicamentos por período prolongado pode promover uma série de reações adversas (LANA e TAFURI, 2005), além disso, apresentam como inconveniente o fato de se mostrarem eficazes apenas na fase aguda da enfermidade, revelando índices de cura muito baixos em sua fase crônica (COURA, 2003).

### 1.1.2 LEISHMANIOSES

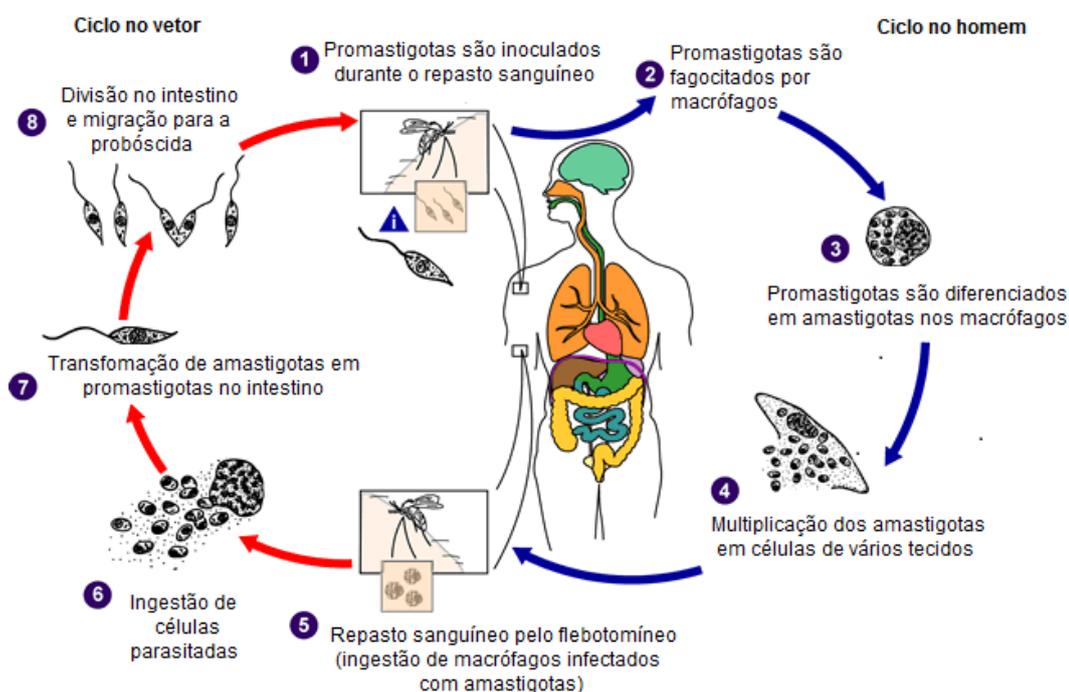
As leishmanioses representam um complexo de antropozoonoses com importante espectro clínico e diversidade epidemiológica, sendo endêmicas em grandes áreas dos trópicos, subtropicais e bacia do Mediterrâneo. Este grupo de doenças é causado por 17 espécies de protozoários do gênero *Leishmania* (CROFT et al, 2006), transmitidos a humanos pela picada de fêmeas infectadas pertencentes a aproximadamente 30 diferentes espécies dos gêneros *Lutzomyia* e *Phlebotomus*, sendo esses vetores chamados flebotomíneos (PEARSON e SOUSA, 1996).

A classificação mais tradicional da doença é feita em três principais formas clínicas: visceral, cutânea e mucocutânea (CROFT e COOMBS, 2003; RODRÍGUEZ et al. 2008). A maioria dos casos de leishmaniose visceral é causada por *L. donovani*, *L. infantum* e *L. chagasi*. As espécies *L. major*, *L. tropica*, *L. aethiops*, *L. mexicana* e *L. braziliensis* são responsáveis pelos casos da doença na sua forma

cutânea. A última é responsável ainda pela leishmaniose mucocutânea na América Latina (PEARSON e SOUSA, 1996).

A OMS estima que 350 milhões de pessoas estejam expostas ao risco de contrair a doença, registrando-se, aproximadamente, 2 milhões de novos casos das diferentes formas clínicas ao ano (BRASIL, 2007; CHAPPUIS et al. 2007). Estudo desenvolvido pela OMS entre os anos de 2007 e 2011 revelou que cerca de 0,2 a 0,4 e 0,7 a 1,2 milhões de casos de leishmaniose visceral e leishmaniose cutânea ocorrem a cada ano, respectivamente. Mais de 90% dos casos de leishmaniose visceral ocorrem em seis países: Índia, Bangladesh, Sudão do Sul, Sudão, Etiópia e Brasil (ALVAR et al. 2012).

De modo geral, o ciclo biológico dos protozoários do gênero *Leishmania* causadores da doença é do tipo digenético ou heteroxênico (figura 2). Assim, os parasitas vivem alternadamente em insetos vetores (hospedeiros invertebrados) e hospedeiros vertebrados (GONTIJO e CARVALHO, 2003).



**Fonte:** Adaptado de *Centers for Disease Control and Prevention*.

**Figura 2** – Ciclo biológico da leishmaniose.

O ciclo é iniciado durante o repasto sanguíneo, quando formas promastigotas do parasita são introduzidas no local da picada. Dentro de 4 a 8 horas estes flagelados são interiorizados pelos macrófagos teciduais e se transformam em

amastigotas. Em seu processo de alimentação, flebotomíneos fêmeas ingerem macrófagos infectados por essas formas evolutivas. Durante o trajeto pelo trato digestivo anterior, ou após chegarem ao estômago, os macrófagos se rompem liberando as amastigotas, que se multiplicam e se transformam rapidamente em promastigotas e então em promastigotas metacíclicas. Essas formas podem ser inoculadas no hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo, reiniciando o ciclo (PEARSON e SOUSA, 1996; GENARO e REIS, 2005).

Os antimoniais trivalentes ( $Sb^{III}$ ) foram as primeiras substâncias a serem utilizadas no tratamento das leishmanioses, entretanto, devido aos seus graves efeitos colaterais elas foram rapidamente substituídas por complexos de antimônio pentavalente ( $Sb^V$ ), tais como o antimoniato de meglunina (Glucantime®) e o estibogluconato de sódio (Pentostan®) (DEMICHELI e FRÉZARD, 2005), substâncias que apesar de amplamente utilizadas são consideradas tóxicas, nem sempre efetivas e necessitam ser usadas em esquemas prolongados na leishmaniose visceral (BRASIL, 2006c).

No Brasil, o medicamento à base de antimônio utilizado como primeira escolha na terapêutica da leishmaniose é o antimoniato de meglunina, substância cuja eficácia terapêutica ainda não foi esclarecida (DEMICHELI e FRÉZARD, 2005). Sugere-se que  $Sb^V$  se trate de uma pró-droga, sendo convertido a  $Sb^{III}$  após sua administração. A substância produzida pode interferir no processo de  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos e glicólise do parasita, levando a uma depleção dos níveis de ATP intracelular. É possível ainda que o antimônio seja capaz de inativar uma metaloprotease zinco dependente presente nas formas amastigotas do parasita e essencial para o seu desenvolvimento, através da substituição do zinco, conforme revisado por Rath et al (2003).

Como tratamentos de segunda escolha, é possível empregar anfotericina B e suas formulações lipossomais, as pentamidinas e os imunomoduladores, drogas recomendadas para uso sob regime hospitalar (GENARO e REIS, 2005; BRASIL, 2006c). A anfotericina é uma substância capaz de ligar-se ao esterol das membranas celulares interferindo em suas funções de permeabilidade e transporte (BOLARD et al. 1980; NORMAN et al. 1976). Trata-se de um antibiótico poliênico com atividade antifúngica e leishmanicida, que age através da ligação ao ergosterol, principal constituinte das membranas plasmáticas de *Leishmania* e fungos, ao invés do colesterol das membranas de células animais. Dessa ligação resulta a alteração

da permeabilidade de membrana e do equilíbrio osmótico do parasita (SOARES-BEZERRA et al. 2004).

Quanto ao mecanismo de ação das pentamidinas, acredita-se que esteja relacionado ao bloqueio das funções do DNA do cinetoplasto (DONKOR et al. 2001), ou se deva à inibição da topoisomerase mitocondrial (KRAMP et al, 2005). Outra hipótese é que essas substâncias sejam capazes de impedir a utilização de S-adenosil-L-metionina pelo parasita, através da inibição de enzimas como a ornitina descarboxilase e a espermidina sintetase, impedindo, assim, a síntese de moléculas importantes para a manutenção da vida do protozoário (BRAY et al. 2003).

As pentamidinas apresentam importantes reações adversas e a anfotericina B, apesar de representar uma opção terapêutica acessível, prolonga e dificulta o tratamento da doença. Além disso, o alto custo de sua formulação lipossomal compromete o seu uso em saúde pública (SANTOS et al. 2002; BRASIL, 2006c).

### 1.1.3 MALÁRIA

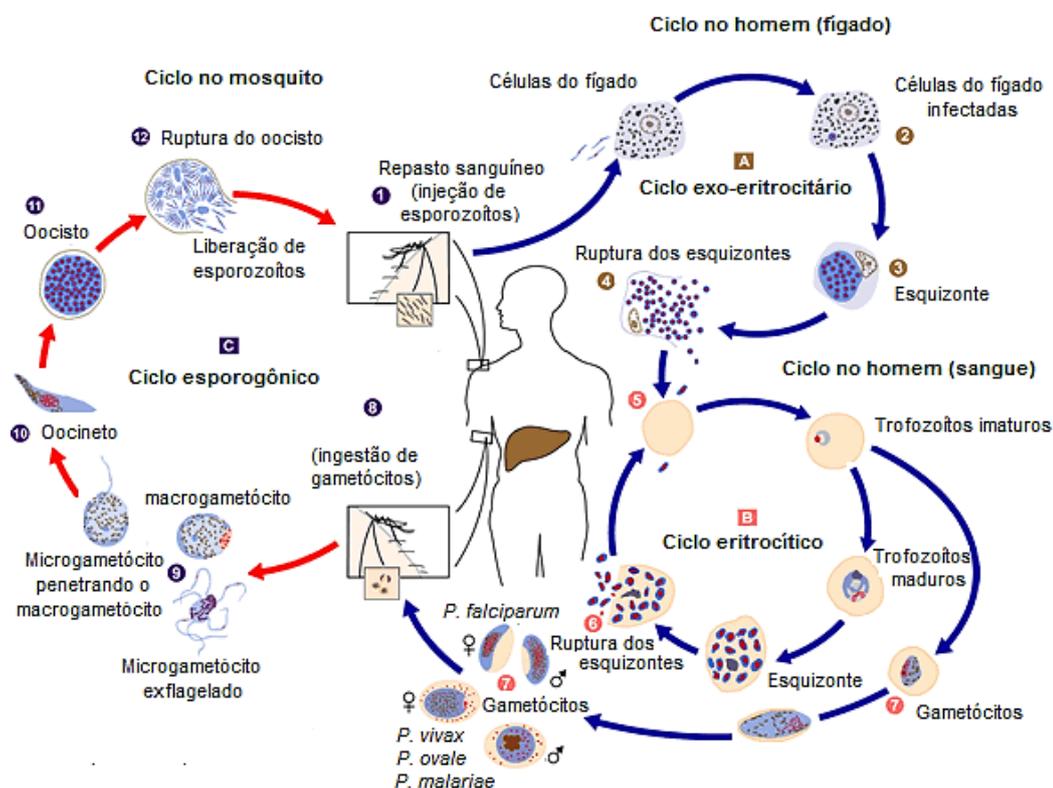
A malária é uma doença causada por cinco espécies de parasitas do gênero *Plasmodium* capazes de infectar seres humanos (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malarie* e *P. knowlesi*). A enfermidade é transmitida ao homem pela picada de fêmeas infectadas pertencentes a mais de 30 espécies de mosquito do gênero *Anopheles* (BRAGA e FONTES, 2005; GOMES et al. 2011; OMS, 2011).

Conforme a OMS, 3,3 bilhões de pessoas apresentavam risco de contrair a doença em 2010. Estima-se que 81% dos casos e 91% das mortes tenham ocorrido na região africana, afetando principalmente grávidas e crianças com idade inferior a 5 anos (OMS, 2011).

O Brasil é o país que concentra o maior número de casos no continente americano, considerando-se a malária um grave problema de saúde pública no país. Estima-se que em 2009 tenham sido registrados aproximadamente 306.000 novos casos (OLIVEIRA-FERREIRA, 2010; GOMES et al. 2011).

O ciclo biológico do parasita (figura 3) é iniciado durante o repasto sanguíneo, quando esporozoítos infectantes são inoculados nos seres humanos pelo mosquito, alcançando a corrente sanguínea. Através dela, os esporozoítos migram até os hepatócitos, onde eles se diferenciam em trofozoítos pré-eritrocíticos. Estes se multiplicam dando origem aos esquizontes teciduais e, posteriormente, a milhares de

merozoítos que invadirão os eritrócitos. Nas infecções causadas por *P. vivax* e *P. ovale*, alguns esporozoítos ficam em estado de latência nos hepatócitos, sendo estas chamadas de hipnozoítos. Esta primeira fase do ciclo é denominada exo-eritrocítica, pré-eritrocítica ou tissular (BRAGA e FONTES, 2005; GOMES et al. 2011).



Fonte: Adaptado de Centers for Disease Control and Prevention.

Figura 3 – Ciclo biológico da malária.

Com a invasão dos eritrócitos pelos merozoítos inicia-se o ciclo eritrocítico, no qual o parasita sofre multiplicação e merozoítos liberados invadirão novos eritrócitos. Após a formação de algumas gerações de merozoítos sanguíneos, ocorre a diferenciação em estágios sexuais, os gametócitos, ingeridos pela fêmea durante o repasto sanguíneo. No intestino do mosquito, o gametócito feminino torna-se o macrogameta e o masculino dá origem a oito microgametas. Após a fecundação ocorre a formação de um ovo ou zigoto, posteriormente denominado oocineto. Ao atingir a parede do intestino médio, ele se encista e passa a se chamar oocisto, estrutura cuja ruptura após 9 a 14 dias promove a liberação de esporozoítos que serão disseminados pelo corpo do vetor até atingir as glândulas salivares. Com o repasto sanguíneo, essas

formas serão injetadas no hospedeiro vertebrado, reiniciando o ciclo biológico (BRAGA e FONTES, 2005).

O tratamento da malária é realizado através da interferência em estágios importantes do ciclo biológico do parasita. Conforme o estágio em que atuam, os antimaláricos podem ser classificados como: fármacos utilizados para a profilaxia casual, aqueles que atuam nas formas teciduais primárias dos plasmódios no fígado; compostos utilizados para evitar recidivas, que agem nas formas teciduais latentes de *P. vivax* e *P. ovale*; esquizonticidas sanguíneos, capazes de agir sobre os estágios eritrocíticos assexuados, interrompendo a esquizogonia eritrocitária; gametocidas, que atuam sobre as formas eritocitárias sexuadas do parasita, impedindo sua transmissão ao mosquito; e esporonticidas, substâncias capazes de inibir a formação de oocistos maláricos e esporozoítos em mosquitos infectados (TRACY e WEBSTER JR, 1996; BRASIL, 2010b; SÁ, 2011).

A maior parte dos fármacos antimaláricos age sobre estágios eritrocíticos do parasita, impedindo a polimerização do heme, substância produzida no interior do vacúolo digestivo do parasita. O heme livre produzido pelo parasita a partir da hemoglobina é capaz de reagir com oxigênio molecular formando espécies reativas de oxigênio como subproduto. O principal mecanismo de destoxificação do heme livre é sua polimerização, produzindo-se o pigmento malárico. Assim, substâncias capazes de interferir na polimerização do heme promovem a morte do parasita por seus próprios metabólitos (SLATER et al. 1991; FRANCIS et al. 1997; ROBERT et al. 2001).

Conforme revisado por Robert e colaboradores (2001), as principais classes de esquizonticidas sanguíneos são: 8-aminoquinolinas, dentre as quais está a primaquina, que interfere nas funções mitocondriais do *Plasmodium*; 4-aminoquinolinas, representadas pela cloroquina, substância capaz de acumular-se no interior do vacúolo digestivo do parasita e ligar-se à ferriprotoporfirina IX, impedindo a polimerização do heme; quinolinometanóis, dentre os quais está a mefloquina, que se liga com alta afinidade às membranas, causando alterações na membrana do vacúolo, e a quinina, cujo mecanismo de ação acredita-se ser semelhante ao da mefloquina, sabendo-se apenas que interfere na polimerização do heme; outros álcoois arílicos; antagonistas do ácido fólico e PABA (ácido paraminobenzóico); e artemisinina e seus derivados.

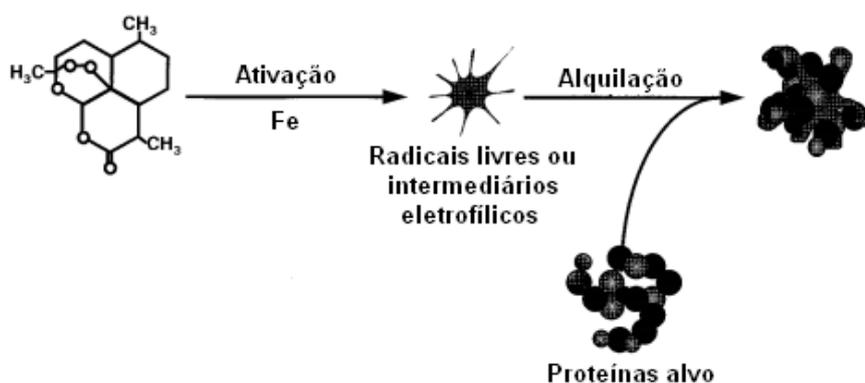
No Brasil, o tratamento da doença tem sido realizado pelo emprego de alguns esquemas de tratamento recomendados pelo Ministério da Saúde como primeira escolha e esquemas alternativos para malária não complicada causada por *P. vivax*

ou *P. falciparum*. Esses esquemas envolvem dentre outros fármacos cloroquina, sulfato de quinina, mefloquina, primaquina, doxiciclina, lumefantrina e artesunato, utilizados em cinco diferentes associações medicamentosas e em dois regimes que empregam fármacos isolados (FREITAS et al. 2007; BRASIL, 2010b). No tratamento de malária grave, os derivados da artemisinina, artesunato e artemeter, são as substâncias recomendadas (GOMES et al. 2011). Esses fármacos são considerados endoperóxidos capazes de agir como pró-oxidantes através da produção de radicais livres tóxicos ao parasita, conforme revisado por França et al (2008).

## 1.2 Agentes pró e antioxidantes

Muitos fármacos empregados no tratamento de doenças parasitárias exercem sua atividade através de mecanismos pró-oxidantes. Dentre essas substâncias estão os nitrocompostos metronidazol, tinidazol, benzonidazol e secnidazol, que apresentam o processo de biorredução enzimática do grupo nitro como principal mecanismo de ação (TOCHER, 1997; PAULA et al. 2009).

Dentre os fármacos empregados no tratamento da malária, a artemisinina e seus derivados podem exemplificar o mecanismo pró-oxidante de atividade antiparasitária. Essas substâncias são constituídas por pontes de endoperóxido cuja clivagem pela redução com íon ferroso presente no grupo heme da hemoglobina ou de origem exógena possibilita a formação de um ou mais radicais livres que podem alquilar ou modificar covalentemente proteínas dos parasitas, inviabilizando-os (MESHNICK et al. 1996; FRANÇA et al. 2008), conforme ilustra a figura 4.



**Fonte:** Adaptado de Meshnick et al (1996).

**Figura 4** – Mecanismo de ação de derivados da artemisinina.

Além desses fármacos, a literatura descreve compostos de origem natural que vem sendo investigados quanto à sua atividade pró-oxidante. Dentre eles estão as quinonas, substâncias capazes de induzir a formação deletéria de espécies reativas de oxigênio, ocasionando estresse oxidativo das células (SILVA et al. 2003). Estudo realizado por Hombhanje et al (2009) demonstrou que a associação de artemisinina à naftoquinona apresenta eficácia comparada a de fármacos já empregados no esquema de tratamento da malária, como cloroquina + sulfadoxina + pirimetamina, no entanto, sua ação é mais rápida.

O resultado obtido reforça o entendimento de que substâncias capazes de produzir radicais livres potencializam a atividade antiparasitária de outros fármacos. Essa característica foi observada por Krungkrai e Yuthavong (1987), que testando substâncias como miconazol e doxorubicina (promotores de estresse oxidativo) associados à artemisinina observaram o aumento da atividade antiparasitária da substância frente ao *P. falciparum*. Por outro lado, observou-se que compostos antioxidantes, capazes de realizar a captura de radicais livres, como catalase e  $\alpha$ -tocoferol, reduzem essa atividade.

Apesar de reduzir a atividade antiparasitária de substâncias que atuam pela indução do estresse oxidativo, a captura de radicais livres por agentes antioxidantes representa um importante mecanismo de proteção ao organismo, possibilitando a prevenção dos efeitos deletérios da oxidação sobre células normais (RODRIGUES et al. 2003).

Conforme revisado por Ali et al (2008), as plantas representam importantes fontes de compostos antioxidantes, os quais são representados principalmente por substâncias fenólicas, ácido ascórbico e carotenoides, apresentando potencial para a descoberta de novos compostos com atividade antioxidante.

### **1.3 Espécies de *Aspidosperma* empregadas na fitoterapia popular para o tratamento de doenças negligenciadas**

Dentre as espécies vegetais utilizadas na fitoterapia popular estão as pertencentes ao gênero *Aspidosperma*, cujas cascas são usadas comumente na região amazônica, sob a forma de infusões (PEREIRA et al. 2007), sendo muitas delas conhecidas popularmente como perobas, guatambus, pau-pereiro, amargoso, quina e carapanaúba (CORRÊA, 1931).

Levantamentos etnofarmacêuticos realizados no município de Igarapé-Miri (Pará) em 2000 e 2008 demonstraram a utilização de carapanaúba na fitoterapia popular do município, sendo empregada a casca de espécies de *Aspidosperma*, dentre as quais *A. auriculatum*, para tratar malária e febres em geral (BARBOSA et al. 2003; BARBOSA e PINTO, 2009).

Outra espécie denominada carapanaúba é *A. marcgravianum*, com indicação popular para o tratamento da malária, além do diabetes e câncer (QUIGNARD, 2003). Utiliza-se também, sob a mesma denominação popular, *A. nitidum*, cujas cascas do caule são empregadas por mais de 8.000 nativos em várias partes do Brasil para o tratamento de malária (BRANDÃO et al. 1992).

Ainda para o tratamento deste agravo à saúde, utiliza-se, também como carapanaúba, *A. excelsum* (BRANDÃO et al. 1985 apud BOURDY et al. 2004; PÉREZ, 2002). Essa espécie, uma Apocynaceae, representa uma importante opção terapêutica adotada pela população, observando-se, no entanto, um número reduzido de pesquisas realizadas com a espécie.

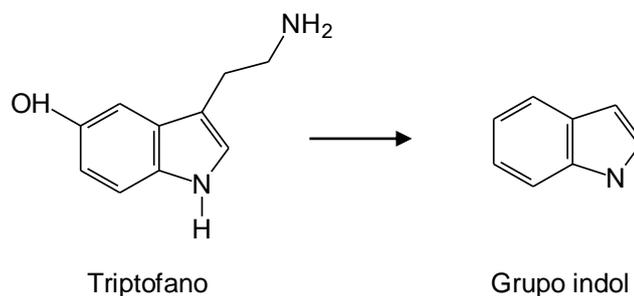
#### 1.4 Família Apocynaceae

A família Apocynaceae encontra-se distribuída em todo o mundo, principalmente em áreas tropicais, onde são encontrados cerca de 355 gêneros e 3700 espécies (MORALES, 2005). Caracteriza-se quimicamente pela presença de alcaloides (PEREIRA et al. 2007) e compõe um grupo restrito de famílias botânicas no qual essa classe de metabólitos está presente (CORDELL et al. 2001).

Endrees e Bruyns (2000) propuseram uma classificação para Apocynaceae, considerada até então uma família distinta da Asclepiadaceae. O trabalho possibilitou a unificação dessas duas famílias e sua divisão em 424 gêneros, distribuídos entre cinco subfamílias: Rauvolfioideae, Apocynoideae, Periplocoideae, Secamonoideae e Asclepiadoideae.

A subfamília Rauvolfioideae compreende o gênero *Aspidosperma*, no qual está inserida a espécie *Aspidosperma excelsum* (ENDREES e BRUYNS, 2000). Esse gênero tem sido alvo de inúmeros trabalhos sobre a química de vários alcaloides indólicos (OLIVEIRA et al. 2009), substâncias derivadas do metabolismo do aminoácido triptofano, que apresentam o cromóforo indol (figura 5) ou seus

derivados indolina, indolenina, hidroxindolenina,  $\alpha$ -metilindolenina, pseudoindoxila, oxindol, carbazol,  $\beta$ -carbolina,  $\gamma$ -carbolina (LOPES, 2008).



**Figura 5** – Estrutura química do aminoácido triptofano e estrutura básica de um alcaloide indólico (grupo indol).

Conforme revisado por Oliveira et al (2009), várias aplicações terapêuticas têm sido atribuídas aos alcaloides indólicos do gênero *Aspidosperma*. Esse fato tem despertado nos pesquisadores a necessidade de uma investigação mais apurada sobre a correlação entre as atividades terapêuticas e a grande ocorrência de alcaloides indólicos no gênero.

### 1.5 Gênero *Aspidosperma*

O gênero *Aspidosperma* compreende tipicamente espécies arbóreas tropicais de grande porte, que se encontram amplamente distribuídas na América, principalmente entre o México e a Argentina (WOODSON, 1951). Essas espécies estão submetidas filogeneticamente ao reino Plantae, divisão Magnoliophyta, classe Magnoliopsida, subclasse Asteridae, ordem Gentianalis e família Apocynaceae (BARROSO, 1991 apud OLIVEIRA et al. 2009).

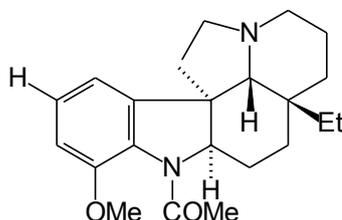
A classificação mais recente do gênero *Aspidosperma* foi realizada por Bolzani et al (1987) que, considerando aspectos quimiotaxonômicos, propuseram sua divisão em 48 espécies, agrupadas em 7 séries: Rígida, Nitida, Quebrachines, Polyneura, Pyricolla, Nobile e Macrocarpa.

Dentre os estudos realizados no intuito de avaliar quimicamente o gênero, encontra-se o trabalho desenvolvido por Gilbert (1966), no qual o autor estudou 33 espécies de *Aspidosperma* de ocorrência no Brasil, resultando no isolamento de mais de 100 alcaloides indólicos, e levando à conclusão da predominância desse tipo de alcaloides no gênero.

Em um trabalho de revisão, Pereira et al (2007) realizaram um amplo levantamento das estruturas de alcaloides indólicos identificados em espécies de *Aspidosperma*, observando-se a diversidade estrutural de cerca de 240 alcalóides isolados até o ano de 2006.

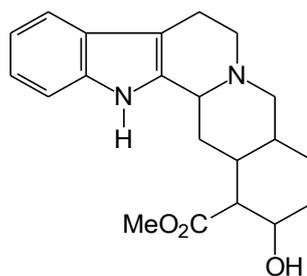
Conforme o levantamento feito por Oliveira et al (2009), muitas espécies de *Aspidosperma* têm sido estudadas quanto à sua constituição química, no entanto, poucos são os trabalhos relatando suas atividades biológicas. Nesse estudo, observou-se que até aquele momento apenas 10 das espécies descritas para o gênero apresentavam alguma atividade biológica caracterizada: *A. quebracho blanco*, *A. polineuron*, *A. nitidum*, *A. ramiflorum*, *A. ulei*, *A. subcanum*, *A. marcgravianum*, *A. macrocarpon*, *A. megalocarpon* e *A. excelsum*.

Derivados de algumas dessas espécies ou substâncias isoladas a partir delas foram avaliadas quanto ao seu potencial antiparasitário, apresentando importante atividade contra os parasitas testados, dentre eles *P. falciparum*, *Leishmania* e *T. cruzi*. Aspodospermina (figura 6), por exemplo, isolada de *A. quebracho blanco*, mostrou-se ativa *in vitro* frente a uma linhagem de *P. falciparum* resistente a cloroquina (MITAINE-OFFER et al. 2002).



**Figura 6** – Aspodospermina, substância isolada de *A. quebracho blanco* por Mitaine-Offier et al (2002), ativa *in vitro* frente a uma linhagem de *P. palciparum*.

*A. quebracho blanco* também demonstrou atividade frente a esse parasita na avaliação realizada por Bourdy et al (2004), que testou a atividade antimalárica de 77 extratos de plantas utilizadas por uma comunidade indígena na Bolívia, dentre elas *A. quebracho blanco*. Dessa espécie já foram isolados outros 33 alcaloides, incluindo ioimbina (figura 7), substância que atua como bloqueador dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos como serotoninérgicos, provocando excitação central, elevação da pressão sanguínea, aumento da frequência cardíaca, e aumento das atividades motora e antidiurética (DEUTSCH et al. 1994).



**Figura 7** – Estrutura química da ioimbina, isolada de *A. quebracho blanco* por Deutsch et al (1994).

Extratos metanólico e diclorometânico de *A. megalocarpon* também foram avaliados quanto à sua atividade antimalárica. Os testes frente a *P. falciparum* foram realizados *in vitro* por Weniger et al (2001), observando-se importante atividade dos extratos sobre o parasita.

Outra espécie avaliada quanto à atividade antimalárica foi *A. macrocarpon*. O trabalho foi realizado por Mesquita et al (2007), que testaram os extratos hexânico e etanólico obtidos de diferentes partes da planta frente a uma linhagem de *P. falciparum* resistente à cloroquina e avaliaram também sua citotoxicidade frente a células de ratos e humanas. O melhor resultado frente ao parasita foi obtido com o extrato etanólico das cascas das raízes, não sendo observados efeitos citotóxicos para qualquer dos extratos nas células ensaiadas. Conforme Oliveira et al (2009), quatro substâncias isoladas previamente da espécie, copsanona, copsanol, epi-copsanal-10-lactama, e epi-copsanol, poderiam justificar a atividade observada.

Mais recentemente, um total de 23 extratos provenientes de seis espécies do gênero (*A. cylindrocarpon*, *A. parvifolium*, *A. olivaceum*, *A. ramiflorum*, *A. spruceanum* e *A. tomentosum*) foram avaliados quanto à atividade frente a cepas de *P. falciparum* resistentes e sensíveis a cloroquina, sendo observada boa atividade das amostras contra o parasita testado. A análise cromatográfica revelou a presença de alcalóides em todos os extratos testados (DOLABELA et al. 2012).

A atividade antiparasitária de derivados do gênero *Aspidosperma* foi também avaliada por Rivas et al (1999). Nesse estudo, alcaloides indólicos  $\beta$ -carbonílicos foram avaliados *in vitro* quanto à sua atividade tripanocida frente a duas cepas de epimastigotas de *T. cruzi*, com diferentes sensibilidades ao nifurtimox. Foram observadas diferenças importantes na susceptibilidade dos parasitas a estas substâncias naturais, exibindo maior sensibilidade a cepa relativamente resistente ao nifurtimox.

Com o objetivo de avaliar a atividade leishmanicida de *A. ramiflorum*, Ferreira et al (2004) avaliaram um extrato alcaloídico da espécie contra formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, observando-se efetividade maior da amostra contra o primeiro protozoário. Uma avaliação semelhante foi realizada com extratos ácidos e básicos de *A. ramiflorum* e duas substâncias (ramiflorinas A e B) isoladas da espécie. Os resultados obtidos revelaram boa atividade tanto do extrato básico quanto das substâncias isoladas frente à *L. amazonensis* (TANAKA et al. 2007).

A observação de atividades antimalárica, leishmanicida e tripanocida em derivados de espécies do gênero *Aspidosperma* e sua constituição marcante por alcaloides indólicos, substâncias com importantes aplicações terapêuticas, sugerem o potencial antiparasitário de *Aspidosperma excelsum*.

### 1.6 *Aspidosperma excelsum*

*Aspidosperma excelsum* (figura 8) é uma espécie muito empregada na medicina popular, sendo representada por árvores de 10-40m de altura, com ramos jovens muito espalhados e discretamente purulentos, glabros ou glabrescentes com a idade, apresentando uma secreção branca ou cremosa que constitui o seu látex. Essa espécie está distribuída da Costa Rica ao Brasil e Bolívia, ocorrendo principalmente em bosques úmidos (MORALES, 2005).



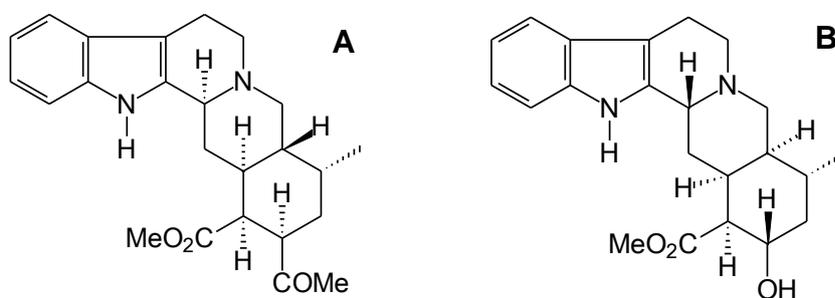
Fonte: <http://www.tropicos.org/Name/1800114>

**Figura 8** – Tronco (A), flores (B) e fruto (C) de *Aspidosperma excelsum* Benth.

É considerada por alguns autores como sinônimo de *Aspidosperma marcgravianum*, *A. nitidum* e *Macaglia excelsa* (TROPICOS, 2012). No Peru, a espécie é utilizada dentre outras aplicações para o tratamento de hepatite, malária,

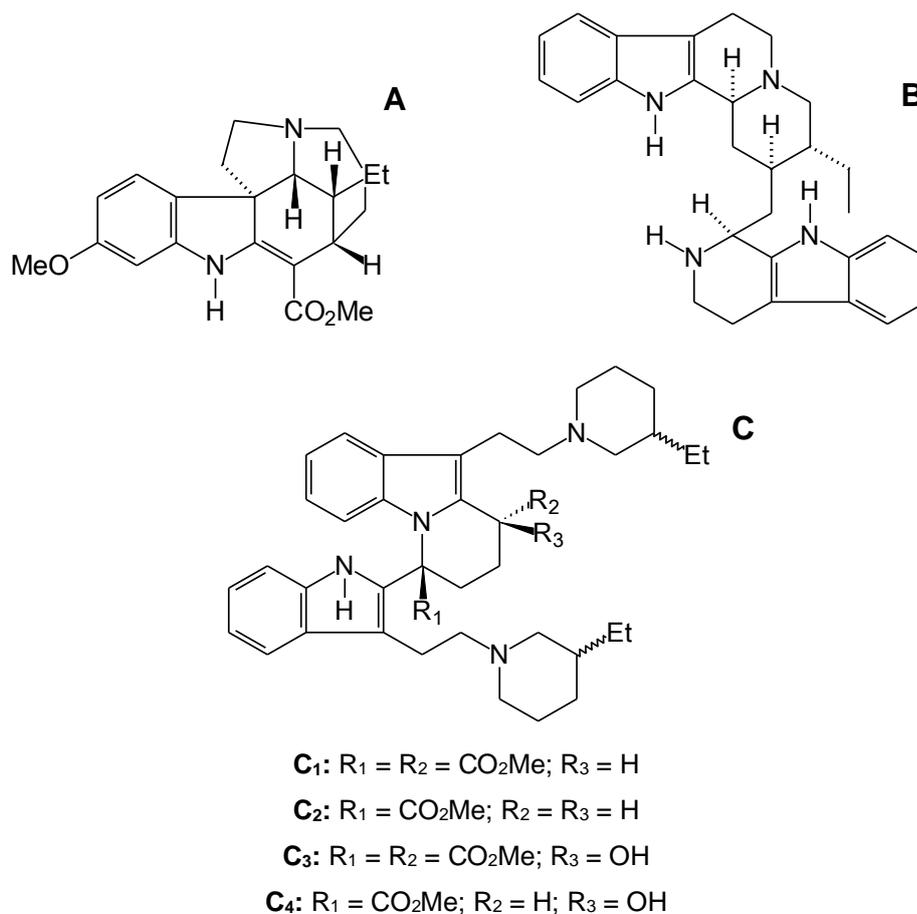
bronquite, sendo usada no Brasil como carminativa, estomáquica, contra bronquite, inflamação, febre, diabetes, câncer e malária (MEJIA e RENGIFO, 2000 apud OLIVEIRA et al. 2009; PEREZ, 2002). Os dados que provavelmente sustentam estas indicações, em especial a atividade antimalárica, que é comum às espécies do gênero, é a presença do conteúdo alcaloídico, principalmente alcaloides indólicos (OLIVEIRA et al. 2009).

A primeira descrição de alcaloides indólicos em *A. excelsum* foi feita por Banerjee et al (1953). Mais tarde, a espécie foi novamente investigada quanto à sua constituição química, sendo isoladas três dessas substâncias: ioimbina (figura 7), *o*-acetil提高mbina (figura 9A) e excelsinina (figura 9B) (BENOIN et al. 1966).



**Figura 9** – Estruturas químicas da *o*-acetil提高mbina (A) e da excelsinina (B).

No trabalho realizado por Verpoorte et al (1983), essas substâncias foram novamente isoladas, obtendo-se ainda outros 9 alcaloides indólicos. Todos os compostos tiveram sua atividade antimicrobiana avaliada frente a *Bacillus subtilis*, obtendo-se resultado positivo para 6 deles: 11-metoxitubotaiwina (figura 10A), ochrolifuanina A (figura 10B), tetraidro-secamina (figura 10C<sub>1</sub>), 16-desmetoxicarboniltetraidro-secamina (figura 10C<sub>2</sub>), 16-hidroxitetraidro-secamina (figura 10C<sub>3</sub>) e 16-hidroxi,16-demetoxicarboniltetraidro-secamina (figura 10C<sub>4</sub>).



**Figura 10** – Estrutura química das substâncias 11-metoxitubotaiwina (A), ochrolifuanina A (B), tetraidro-secamina (C<sub>1</sub>), 16-desmetoxicarboniltetraidro-secamina (C<sub>2</sub>), 16-hidroxitetraidro-secamina (C<sub>3</sub>) e 16-hidroxi,16-demetoxicarboniltetraidro-secamina (figura C<sub>4</sub>) isoladas de *A. excelsum* por Veeporte et al (1986) e ativas frente a *Bacillus subtilis*.

Pereira et al (2007), em um trabalho de revisão, descreveram estruturalmente 18 alcaloides identificados na espécie até aquele momento. A descrição da estrutura das substâncias demonstrou tratar-se de alcaloides indólicos.

A presença desses metabólitos com importantes aplicações terapêuticas em *A. excelsum*, somada à atividade de outras espécies do gênero frente a parasitas, e seu uso popular no tratamento de malária, sugere o potencial antiparasitário dessa *Aspidosperma*. Além disso, os problemas relacionados à terapêutica empregada no tratamento de doenças negligenciadas como doença de Chagas, leishmanioses e malária, reforçam a importância de investigar química e biologicamente *A. excelsum*, visando obter dados que contribuam para o desenvolvimento de novas opções terapêuticas que possam ser empregadas de forma segura e eficaz no tratamento desses problemas de saúde.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Contribuir para a padronização de derivados de *Aspidosperma excelsum* utilizando técnicas fitoquímicas para a detecção e caracterização de marcadores químicos e investigar suas potenciais atividades biológicas.

### 2.2 Específicos

- Traçar o perfil cromatográfico do extrato e frações alcaloídicas de *A.excelsum* por cromatografia de camada delgada e por cromatografia a líquido de alta eficiência;
- Caracterizar por análises fitoquímicas e espectrométricas substâncias potencialmente marcadoras nos extratos e frações;
- Avaliar a citotoxicidade das frações alcaloídicas;
- Investigar o potencial de atividade antiparasitária do extrato e frações da espécie frente a *Leishmania braziliensis*, *Leishmania chagasi*, *Trypanossoma cruzi* e *Plasmodium falciparum*;
- Avaliar a atividade pro/antioxidante do extrato e frações alcaloídicas da espécie.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Obtenção da tintura e do extrato liofilizado de *Aspidosperma excelsum* (ELAe)

A tintura de *Aspidosperma excelsum* foi gentilmente cedida pelo professor Dr. Flávio Vasconcelos (Laboratório de Toxicologia – Universidade Federal do Pará), tendo sido obtida pela maceração de cascas da espécie em etanol 70 %. A solução obtida foi filtrada, fornecendo a tintura utilizada no experimento.

Essa tintura foi concentrada em evaporador rotativo até a remoção completa do etanol presente na amostra, sendo em seguida congelada e liofilizada. Esse procedimento forneceu o extrato liofilizado de *Aspidosperma excelsum* (ELAe).

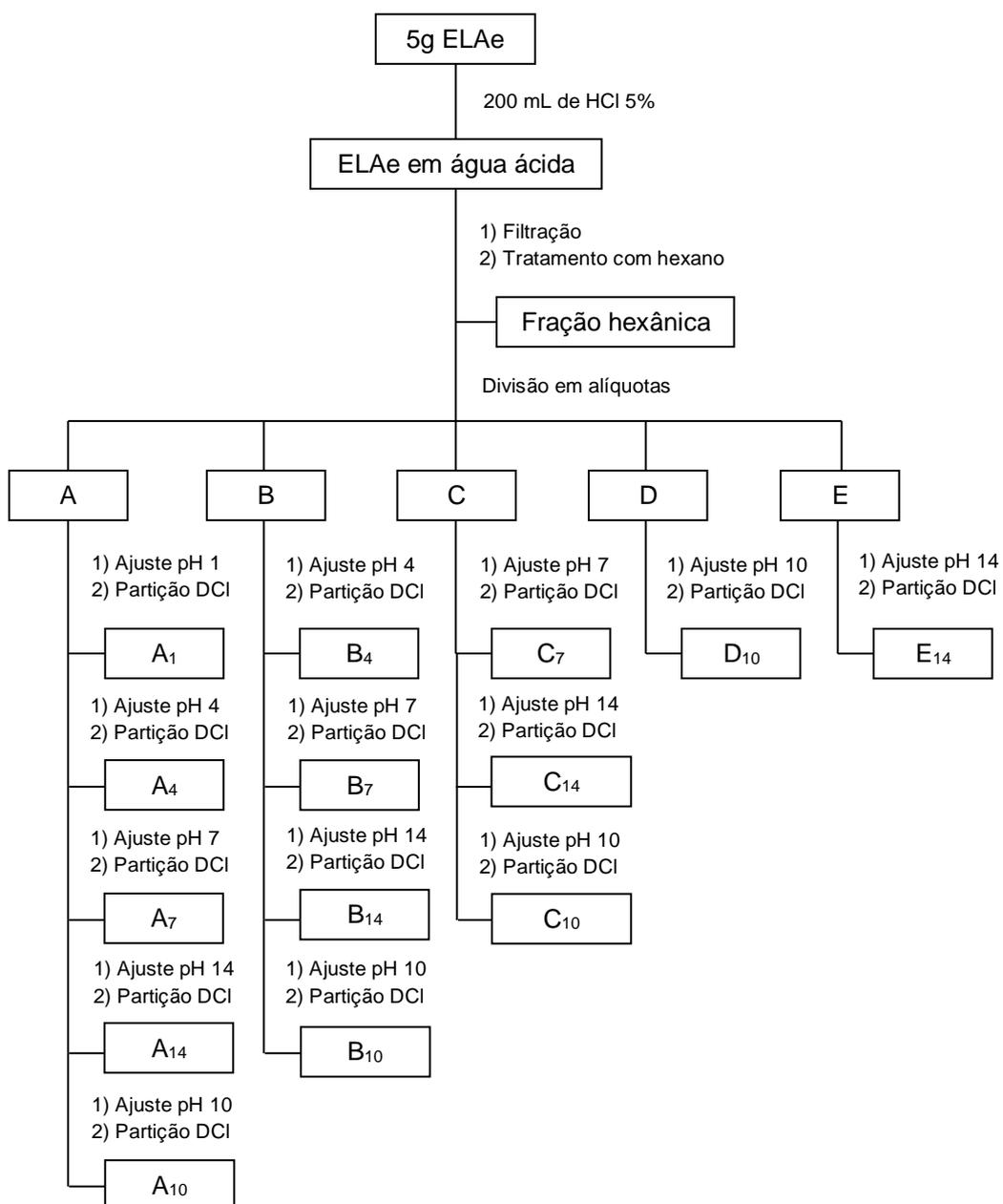
#### 3.2 Seleção do método para fracionamento do ELAe

O ELAe foi submetido a dois métodos de fracionamento (sólido-líquido em meio neutro e ácido-básico), empregados com o objetivo de avaliar a técnica que possibilitaria a obtenção de maior quantidade e variedade de alcaloides. O meio neutro reduz a possibilidade da geração de artefatos, possível com a variação de pH necessária no fracionamento ácido-básico.

O fracionamento sólido-líquido foi realizado pesando-se 5 g do ELAe, que foram tratados sequencialmente com solventes de polaridade crescente (hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol), obtendo-se, após eliminação dos solventes em evaporador rotativo, as frações hexânica (FH), diclorometânica (FDCI), acetato de etila (FAE) e metanólica (FM).

Para realizar o fracionamento ácido-básico, 5 g do ELAe foram suspensos em 200 mL de HCl 5%. A suspensão formada foi levada ao banho de ultrassom por 10 min e, em seguida, filtrada. O filtrado obtido foi tratado com 50 mL de hexano, obtendo-se, após a eliminação do solvente, a fração hexânica. Após esse tratamento, o filtrado foi dividido em cinco alíquotas de aproximadamente 40 mL (A, B, C, D e E), ajustando-se seus valores de pH para 1, 4, 7, 10 e 14, respectivamente, conforme a metodologia Stas-Otto com modificações (AUTERHOFF e KOVAR, 1985).

Após o ajuste de pH, A, B, C, D e E foram submetidas ao fracionamento em paralelo, empregando-se para tanto alíquotas de 25 mL de diclorometano. Essa separação possibilitou a obtenção de frações alcaloídicas diclorometânicas (A<sub>1</sub>, B<sub>4</sub>, C<sub>7</sub>, D<sub>10</sub> e E<sub>14</sub>) e soluções aquosas remanescentes. Procedeu-se então ao fracionamento ácido-básico sequencial, utilizando-se as soluções aquosas ácidas (A e B) e neutra (C) remanescentes, que foram fracionadas sequencialmente após mudanças de pH, conforme ilustra o fluxograma apresentado na figura 11.



**Figura 11** – Fluxograma referente ao fracionamento ácido-básico do ELAe, realizado com o objetivo de selecionar o método para separação de seu conteúdo alcaloídico.

Como mostra a figura 11, o fracionamento ácido-básico sequencial forneceu outras 9 frações: A<sub>4</sub>, A<sub>7</sub>, A<sub>10</sub> e A<sub>14</sub>, provenientes de A; B<sub>7</sub>, B<sub>10</sub> e B<sub>14</sub>, obtidas de B; e C<sub>10</sub> e C<sub>14</sub>, preparadas a partir da alíquota C.

### 3.3 Fracionamento ácido-básico do ELAe

Aproximadamente 40 g do ELAe foram pesados e dissolvidos em 1 L de HCl 5 %. A solução obtida foi levada ao banho de ultrassom por 10 min e então filtrada. Após a filtração, a solução foi tratada com 200 mL de hexano e posteriormente com alíquotas de 100 mL de diclorometano. Depois desse procedimento, a solução teve seu pH ajustado sequencialmente em 4, 7, 14 e 10, sendo tratada, a cada ajuste, com alíquotas de 100 mL de diclorometano. As soluções obtidas foram concentradas em evaporador rotativo, obtendo-se assim cinco frações FAIc<sub>1</sub>, FAIc<sub>4</sub>, FAIc<sub>7</sub>, FAIc<sub>10</sub> e FAIc<sub>14</sub>, correspondentes respectivamente a A<sub>1</sub>, A<sub>4</sub>, A<sub>7</sub>, A<sub>10</sub> e A<sub>14</sub>, obtidas na seleção de método para fracionamento.

### 3.4 Análise das frações de *Aspidosperma excelsum* por cromatografia em camada delgada (CCD)

As frações obtidas pelas partições sólido-líquido e ácido-básica foram analisadas a 5 mg/mL empregando-se metodologia desenvolvida conforme a constituição e afinidade das amostras pelas fases móvel e estacionária. Foram utilizadas placas cromatográficas de alumínio cobertas por gel de sílica de fase normal, e como eluentes várias combinações de acetato de etila (AcOEt), metanol (MeOH) e dietilamina (DEA), dentre elas AcOEt/MeOH (75:25) e AcOEt/MeOH (75/25) + 3 % DEA.

Os cromatogramas obtidos foram observados sob luz ultravioleta (UV) nos comprimentos de onda ( $\lambda$ ) 254 e 365 nm, e em seguida aspergidos com reativo de Dragendorff, sendo o perfil cromatográfico de cada amostra obtido com base no fator de retenção dos constituintes químicos presentes.

### **3.5 Análise da tintura e frações de *Aspidosperma excelsum* por cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE)**

As frações alcaloídicas obtidas pelos fracionamentos sequencial e paralelo foram analisadas por CLAE na concentração de 10 mg/mL, a fim de avaliar o perfil de cada amostra e comparar qualitativamente os métodos quanto à extração de alcaloides. Analisou-se ainda a tintura da espécie sob as mesmas condições definidas para as frações, adotando-se como substância padrão o cloridrato de ioimbina (Sigma-Aldrich, grau de pureza > 98%) na concentração de 1 mg/mL. Para localizar o pico correspondente a esse composto nas amostras analisadas foi realizada a co-injeção de 10 µg do padrão dissolvidos em 1 mL da tintura.

As amostras foram analisadas em cromatógrafo da marca Merck Hitachi, modelo Lachrom D-7000, empregando-se como fase estacionária uma coluna de fase reversa Agilent Eclipse XDB-C18 e como fase móvel um gradiente linear constituído por ácido trifluoracético (TFA) em pH 3 (A) e acetonitrila (ACN) (B), iniciado por 90 % de A e finalizado em 38 min com 40% desse solvente. As análises foram desenvolvidas a 27 °C ( $\pm 1$  °C), sob um fluxo de 0,8 mL/min, com detecção em detector de arranjo de diodos (DAD) na faixa entre ( $\lambda$ ) 220 e 310 nm, e registro de cromatogramas em ( $\lambda$ ) 220, 228, 271 e 290 nm, comprimentos de onda selecionados em função do espectro de absorção no UV da ioimbina. Essa metodologia foi desenvolvida em função da constituição e afinidade das amostras analisadas pelas fases móvel e estacionária.

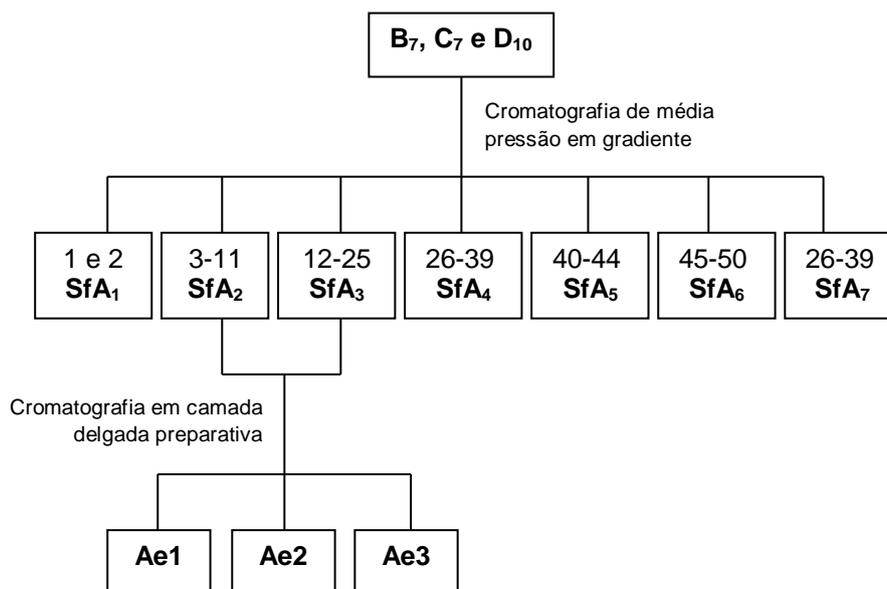
### **3.6 Obtenção de substâncias**

Foram separadas substâncias a partir das frações B<sub>7</sub>, C<sub>7</sub> e D<sub>10</sub>, provenientes da seleção de método para fracionamento; e partindo-se de FAlc<sub>7</sub>, obtida pelo fracionamento sequencial do ELAe. Esses procedimentos foram realizados empregando-se métodos cromatográficos usuais, conforme descrito a seguir.

#### **3.6.1 SEPARAÇÃO DE B<sub>7</sub>, C<sub>7</sub> E D<sub>10</sub> POR CROMATOGRAFIA DE MÉDIA PRESSÃO**

A separação de B<sub>7</sub>, C<sub>7</sub> e D<sub>10</sub> foi realizada conforme ilustra a figura 12. Essas amostras foram reunidas, totalizando 159 mg, e então submetidas à cromatografia

de média pressão (Bomba para cromatografia preparativa a líquido, Gilson, modelo 305) em coluna de 31x3 cm, sob fluxo de 2 mL/min, utilizando-se como fase estacionária sílica de fase normal (< 125 µm). Como fase móvel empregou-se um gradiente iniciado com hexano/AcOEt (50:50) + 3 % DEA, seguido por AcOEt + 3 % DEA, AcOEt/MeOH (75:25) + 3 % DEA, AcOEt/MeOH (50:50) + 3% DEA e, por último, MeOH + 3 % DEA.



**Figura 12** – Fluxograma de separação das frações B<sub>7</sub>, C<sub>7</sub> e D<sub>10</sub>.

O monitoramento das frações foi realizado por CCD, sendo os cromatogramas observados sob luz ultravioleta ( $\lambda$ ) 254 e 365 nm, e aspergidos com reativo de Dragendorff para verificar a possível presença de alcalóides. Após análise por CCD, as subfrações com perfil cromatográfico semelhante foram reunidas.

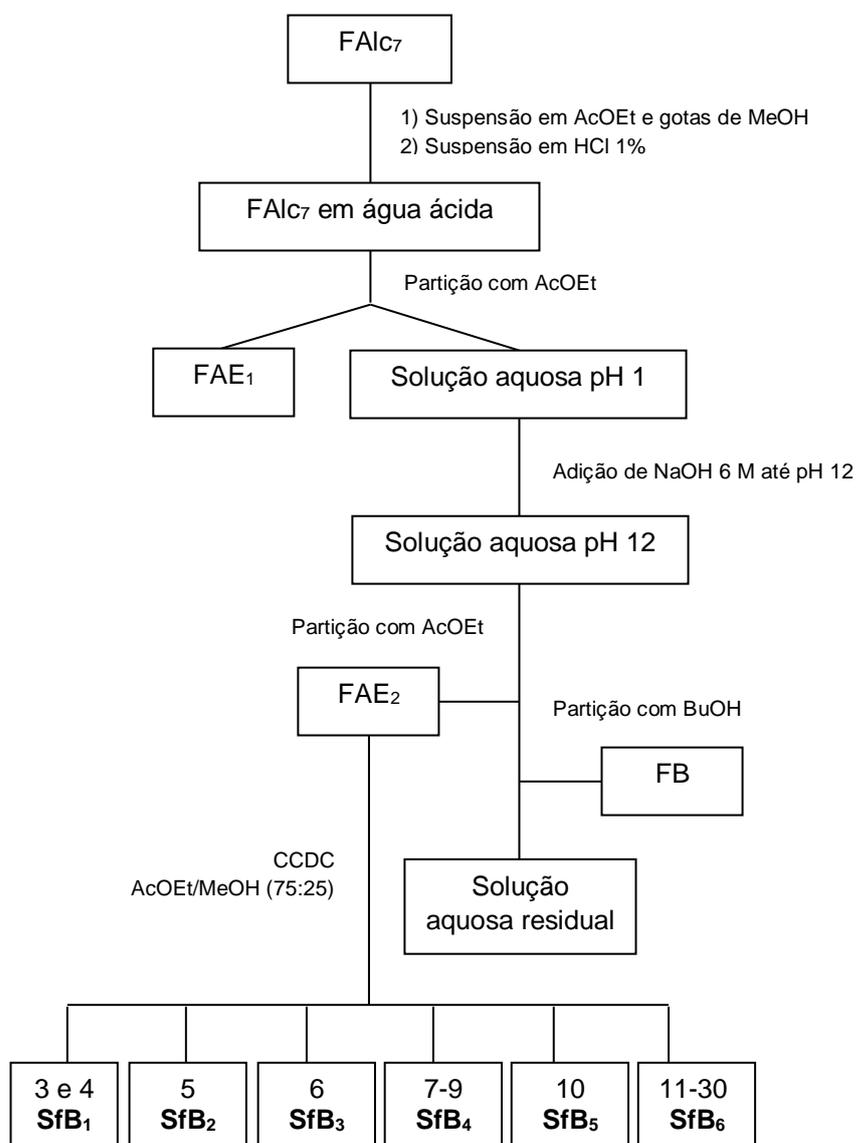
Duas das amostras obtidas após reunião das subfrações (SfA<sub>2</sub> e SfA<sub>3</sub>) foram submetidas à cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) para separação dos constituintes presentes. Esse procedimento foi realizado no Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – FCFRP (Universidade do Estado de São Paulo – USP), empregando-se placas manufaturadas (20x20 cm) de gel de sílica em suporte de vidro como fase estacionária e AcOEt/MeOH (75:25) como fase móvel.

Após a separação, as bandas de interesse foram raspadas da placa e transferidas para recipientes onde foram dissolvidas em MeOH/AcOEt (90:10). Essas soluções foram então filtradas em funil de vidro sinterizado e concentradas

em evaporador rotativo. Após secas, as amostras foram analisadas por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN<sup>1</sup>H) e espectrometria de massas.

### 3.6.2 SEPARAÇÃO DE FAlc<sub>7</sub> POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA CENTRÍFUGA (CCDC)

A separação de FAlc<sub>7</sub> foi realizada no Laboratório de Farmacognosia da FCFRP (USP), sendo a amostra inicialmente submetida a um refraçãoamento ácido-básico com o objetivo de concentrar os alcaloides presentes, e posteriormente submetida à cromatografia em camada delgada centrífuga (CCDC), conforme ilustra a figura 13.



**Figura 13** – Fluxograma referente aos métodos empregados para separação da FAlc<sub>7</sub> por CCDC.

Inicialmente, 1 g da fração foi suspenso em 10 mL de AcOEt e gotas de MeOH, adicionando-se em seguida 50 mL de HCl 1%. A suspensão obtida foi submetida à partição com alíquotas de 25 mL de AcOEt, que após reunidas e concentradas em evaporador rotativo forneceram a fração AcOEt 1 (FAE<sub>1</sub>). A fase aquosa foi basificada com NaOH 6 M até pH 12 e novamente extraída com AcOEt, fornecendo, após secagem, a fração AcOEt 2 (FAE<sub>2</sub>). Em seguida, a suspensão foi tratada com alíquotas de 20 mL de BuOH, possibilitando a obtenção de uma fração butanólica (FB) e uma fase aquosa residual.

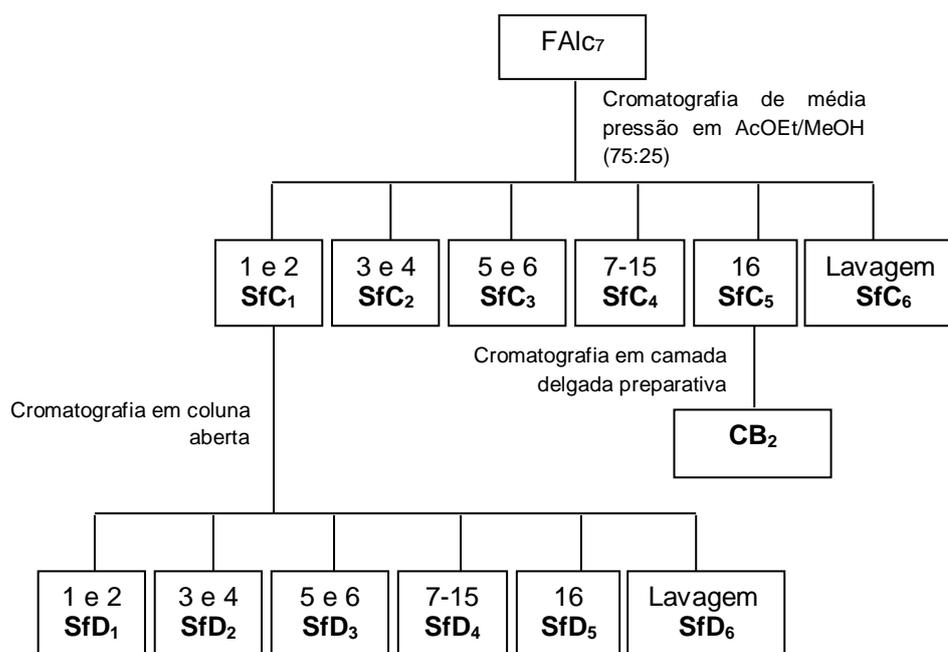
Aproximadamente 390 mg da fração FAE<sub>2</sub> foram dissolvidos em 2,5 mL de AcOEt/MeOH (75:25) e submetidos à separação por CCDC em cromatógrafo Chromatotron 7924T®, empregando-se como fase estacionária placas cromatográficas cobertas por sílica de fase normal e sulfato de cálcio (2 mm), e como fase móvel AcOEt/MeOH (75:25), sob fluxo de 4,8 mL/min.

O monitoramento das frações foi realizado por CCD, observando-se a ( $\lambda$ ) 254 e 365 nm os cromatogramas obtidos, e procedendo-se em seguida à sua aspensão com reativo de Dragendorff para a detecção de alcaloides. As amostras com perfil cromatográfico semelhante foram reunidas.

### 3.6.3 SEPARAÇÃO DE FAIc<sub>7</sub> POR CROMATOGRAFIA DE MÉDIA PRESSÃO

Essa separação foi realizada empregando-se 800 mg de FAIc<sub>7</sub> adsorvidos em aproximadamente 2 g de sílica de fase normal (< 125  $\mu$ m). A mistura foi submetida à cromatografia de média pressão (Bomba para cromatografia preparativa a líquido, Gilson, modelo 305) em coluna de 31x3 cm a 0,4 Mpa e fluxo de 1,5 mL/min, utilizando-se como fase estacionária sílica de fase normal e como fase móvel um sistema isocrático constituído por AcOEt/MeOH (75:25), conforme ilustra a figura 14.

O monitoramento das frações foi realizado por CCD, sendo os cromatogramas observados sob luz ultravioleta ( $\lambda$ ) 254 e 365 nm, e posteriormente aspergidos com reativo de Dragendorff para verificar a possível presença de alcaloides. Após análise por CCD, as subfrações com perfil cromatográfico semelhante foram reunidas.



**Figura 14** – Fluxograma referente à separação de FAlc<sub>7</sub> por cromatografia de média pressão

Duas amostras obtidas após a reunião das subfrações foram novamente separadas. Uma delas, SfC<sub>1</sub>, foi submetida à cromatografia em coluna aberta, empregando-se 131 mg da amostra dissolvidos em 2 mL de AcOEt saturado com NH<sub>4</sub>OH. A solução obtida foi separada em uma coluna cromatográfica preenchida com aproximadamente 15 g de sílica de fase normal, empregando-se como fase móvel AcOEt saturado com NH<sub>4</sub>OH, e procedendo-se o monitoramento da coluna por CCD utilizando luz ultravioleta ( $\lambda$ ) 254 e 365 nm e reativo de Dragendorff como métodos de detecção de compostos. As amostras com perfil cromatográfico semelhante foram reunidas.

A segunda amostra obtida após reunião e novamente separada foi SfC<sub>5</sub>. Esse procedimento foi realizado por CCDP utilizando-se 30 mg da amostra aplicados em uma placa padronizada de alumínio coberta por sílica de fase normal (20x20 cm), eluída com AcOEt/MeOH (75:25). A banda principal foi raspada da placa e lavada com o eluente em uma pipeta Pasteur preenchida com algodão. Após a concentração em evaporador rotativo, a amostra foi analisada por CCD e CLAE.

### 3.7 Análise por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN<sup>1</sup>H) de Ae1

Para a obtenção dos espectros de RMN<sup>1</sup>H, a amostra foi dissolvida em clorofórmio deuterado e analisada em espectrofotômetro Bruker – Avance DRX 400, na frequência de 500 MHz. Esse procedimento foi realizado na Faculdade de Química de Ribeirão Preto (USP).

O espectro de Ae1 foi comparado aos dados de RMN<sup>1</sup>H de substâncias já identificadas em *A. excelsum* e outras espécies do gênero *Aspidosperma*, existentes na literatura científica.

### 3.8 Análise de Ae1 por espectrometria de massas

A análise de Ae1 por espectrometria de massas foi realizada no Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos da FCFRP (USP). A amostra foi solubilizada em MeOH e analisada em espectrômetro de massas de alta resolução UltrOTOF (Bruker) com ionização por electrospray (ESI) e analisador do tipo QTOF (quadropolo e tempo de voo em sequência), nos modos de detecção positivo e negativo. Para melhor desempenho da análise, foi realizada calibração interna com um padrão de NA-TFA 10 mg/mL e calibração externa empregando-se monensina.

As análises foram realizadas sob as seguintes condições: End Plate 500 Volts, Capillary 4500 Volts, Capillary Exit 120 Volts, Skimmer 1 50 Volts, Skimmer 2 22 Volts, Transfer 57  $\mu$ s. Os resultados obtidos forneceram a massa experimental do composto, sendo calculado o erro de identificação em função da massa teórica da amostra.

### 3.9 Avaliação da citotoxicidade das frações alcaloídicas

A avaliação da citotoxicidade nos programas de busca por novas substâncias ativas é essencial e a atividade apresentada necessita ser específica e não tóxica. Essa análise foi realizada *in vitro* frente a células da linhagem celular HepG2 A16 derivadas de um hepatoblastoma primário humano, empregando-se o método descrito por Varotti et al (2008).

Inicialmente, as células tiveram sua concentração ajustada para  $4 \times 10^5$  e foram distribuídas em microplacas de 96 poços, adicionando-se 100  $\mu$ L a cada poço. Em

seguida, as placas foram incubadas em estufa de CO<sub>2</sub> a 37 °C por 24 h para promover a adesão das células à placa. Após esse período, adicionaram-se em triplicata 100 µL de meio completo contendo as amostras testadas (FAlc<sub>1</sub>, FAlc<sub>4</sub>, FAlc<sub>7</sub> e FAlc<sub>10</sub>) nas concentrações de 1, 10, 100 e 1000 µg/mL e as placas foram novamente incubadas por 24 h.

Decorrido o tempo estabelecido, adicionaram-se 18 µL de uma solução de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenilbrometo de tetrazol (MTT) na concentração de 20 mg/mL a cada poço da placa. Esta substância mede indiretamente a viabilidade celular em função da atividade enzimática mitocondrial das células vivas, necessária para a redução do MTT a formazana. Após 1 h e 30 min de incubação com o MTT foram adicionados 100 µL de DMSO a cada poço a fim de solubilizar os cristais de formazana produzidos (MOSMANN, 1983; DENIZOT e LANG, 1986). A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 492 nm.

Os valores de absorvância obtidos foram utilizados no cálculo do percentual de inibição do crescimento das células pelas amostras, considerando-se como 100 % a absorvância de poços contendo células cultivadas sem a presença de qualquer droga.

### **3.10 Análise da atividade do extrato e frações alcaloídicas frente ao *Trypanosoma cruzi***

A avaliação da atividade tripanocida *in vitro* do extrato e frações alcaloídicas foi realizada no Laboratório de Parasitologia da FCFRP (USP), frente às formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* (clone B5 da cepa CL Brener), utilizando o método do CPRG (clorofenol-β-D-galactopiranosídeo) (VEGA et al. 2005). Na presença de parasitas viáveis, esta substância é convertida a vermelho de clorofenol e D-galactose pela β-galactosidade do protozoário, sendo a D-galactose detectada por espectrofotometria (BOSQUESI, 2013).

Inicialmente, foi realizada a separação dos parasitas de seu meio de cultivo (meio RPMI suplementado com 5 % de soro fetal bovino, penicilina e estreptomicina) pela centrifugação de uma alíquota do meio a 1.000 rpm por 10 min, em centrífuga de marca Hettich Zentrifugen e modelo Rotina 35 R. Após desprezar o sobrenadante, os parasitas foram ressuspensos em meio incolor RPMI até a concentração de 1x10<sup>6</sup> parasitas/mL.

O extrato e frações alcaloídicas de *A. excelsum* foram dissolvidos em DMSO até as concentrações 0,5 µg/mL, 2 µg/mL, 8 µg/mL e 32 µg/mL, juntando-se 6,4 µL de cada diluição com 394 µL da solução contendo os parasitas. Em seguida, as soluções obtidas foram transferidas para placas de 96 poços, acrescentando-se 100 µL a cada poço, em triplicata. As placas foram incubadas em estufa com circulação forçada de CO<sub>2</sub>, a 37 °C por 24 h.

Após a incubação, acrescentaram-se 50 µL de CPRG 400 µM a cada poço das placas, deixando-as por mais 4 h em estufa. Decorrido esse período, 50 µL de isopropanol ácido foram acrescentados. As placas foram mantidas em temperatura ambiente por mais 1 h, sendo em seguida analisadas em um leitor de microplacas (Sunrise Tecan), no comprimento de onda 570 nm.

Os valores de absorvância foram utilizados no cálculo da porcentagem de lise celular, considerando-se como 100 % a absorvância de poços contendo células cultivadas sem a presença de qualquer droga (controle), e empregando-se a fórmula:

$$\% \text{ Lise celular} = [(Ac - Aa) / Ac] \times 100$$

Onde:

Ac: Absorvância registrada para o controle;

Aa: absorvância registrada para a amostra analisada.

### **3.11 Análise da atividade do extrato e frações alcaloídicas frente a *Leishmania braziliensis* e *Leishmania chagasi***

A avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* do extrato e frações alcaloídicas de *A. excelsum* foi realizada no Laboratório de Parasitologia da FCFRP (USP), frente às formas promastigotas de *Leishmania braziliensis* (cepa 3222) e *Leishmania chagasi* (cepa HU-UFS-17 sensível ao óxido nítrico).

Inicialmente, foram preparadas em DMSO soluções nas concentrações 0,5, 2, 8 e 32 µg/mL do ELAe e suas frações. Após o preparo das amostras, procedeu-se à separação dos parasitas de seu meio de cultivo (meio 199 suplementado com bicarbonato de sódio, 5% de soro bovino fetal, penicilina e estreptomicina), centrifugando-se uma alíquota desse meio a 1.000 rpm por 10 min, em centrífuga da marca Hettich Zentrifugen e modelo Rotina 35R. O sobrenadante foi desprezado e

os parasitas foram então ressuspensos em meio incolor M199 até a concentração de  $1 \times 10^6$  parasitas/mL.

A solução contendo os parasitas foi colocada em contato com as amostras, juntando-se 394  $\mu$ L dela com 6,4  $\mu$ L de cada diluição correspondente ao extrato e suas frações. Em seguida, as soluções obtidas foram transferidas para placas de 96 poços, acrescentando-se 100  $\mu$ L a cada poço, em triplicata. As placas foram incubadas em estufa a 22 °C por 24 h.

Após a incubação, acrescentaram-se 50  $\mu$ L de MTT a 2,5 mg/mL em cada poço das placas, deixando-as por mais 4h em estufa. Decorrido esse período, 50  $\mu$ L de isopropanol ácido foram adicionados. As placas foram mantidas em temperatura ambiente por mais 1 h, procedendo-se em seguida à sua leitura em um leitor de microplacas (Sunrise Tecan), no comprimento de onda 570 nm (MUELAS-SERRANO et al. 2000).

Os valores de absorvância foram utilizados no cálculo da porcentagem de lise celular, considerando-se como 100 % a absorvância de poços contendo células cultivadas sem a presença de qualquer droga (controle), e empregando-se a fórmula:

$$\% \text{ Lise celular} = [(Ac - Aa) / Ac] \times 100$$

Onde:

Ac: Absorvância registrada para o controle;

Aa: absorvância registrada para a amostra analisada.

### **3.12 Análise da atividade das frações alcalóidicas de *A. excelsum* frente ao *Plasmodium falciparum***

A análise da atividade antimalárica *in vitro* das frações alcalóidicas de *A. excelsum* foi realizada no Laboratório de Fitoquímica e Bioensaios da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, utilizando-se hemácias infectadas por *P. falciparum* (clone W2) resistente à cloroquina, conforme o método da LDH (lactato desidrogenase), descrito por Makler et al (1993).

Esse método baseia-se na quantificação da LDH enzima produzida pelo *P. falciparum*, sendo essa concentração proporcional ao número de parasitas viáveis no meio após o contato com as amostras teste. Na presença de uma co-enzima, a 3-

acetilpiridina adenina dinucleotídeo (APAD) e de um substrato contendo o L-lactato (reagente Malstat), a LDH converte o lactato em piruvato, gerando a APADH. Em seguida, a APADH produzida reduz a diaforase, uma enzima presente no meio, originando a diaforase reduzida. Esta reagirá com o NBT (azul nitro-tetrazol), também presente no meio, abrindo os anéis tetrazólicos do NBT e dando origem à formazana, de coloração azul, substância detectada por espectrofotometria (NKHOMA et al. 2007; BORGATI, 2013).

Inicialmente, as frações alcaloídicas foram dissolvidas em DMSO de modo a obter soluções a 25 e 50 µg/mL, a partir das quais se procedeu à incubação parasito-droga, realizada adicionando-se, em triplicata, 20 µL de cada concentração das amostras testadas a microplacas de 96 poços, onde já se encontravam 180 µL da suspensão de hemácias infectadas (1 % hematócrito, 2 % de parasitemia) pelo parasita. Utilizaram-se como controle positivo poços contendo apenas a suspensão de hemácias infectadas, e como controle negativo, poços com hemácias não infectadas.

As microplacas contendo amostras e controles foram incubadas em atmosfera de 5 % de CO<sub>2</sub> a 37 °C por 48 hs, e após esse período, congeladas a - 20°C por no mínimo 24 h, para promover a lise das hemácias. O lisado celular foi transferido para novas microplacas, adicionando-se a cada poço 100 µL de reagente Malstat e 25 µL de reagente NBT/PES (azul nitro-tetrazol/etossulfato de fenazina). Após 1 h de incubação, a absorvância de cada poço das placas foi registrada em espectrofotômetro a 540 nm.

Os valores de absorvância registrados foram utilizados para calcular os percentuais de redução do crescimento dos parasitos pelas frações alcaloídicas. Amostras que apresentaram redução da parasitemia maior que 50% nas concentrações testadas tiveram suas IC<sub>50</sub> determinadas em três experimentos distintos, empregando-se seis novas concentrações (50 µg/mL, 25 µg/mL, 12,5 µg/mL, 6,25 µg/mL, 3,12 µg/mL e 1,56 µg/mL), com triplicata de cada concentração. A partir dos resultados, as amostras foram classificadas conforme a tabela 1.

**Tabela 1** – Classificação das amostras conforme os valores de IC<sub>50</sub> quanto à atividade antimalárica frente ao *Plasmodium falciparum*.

Classificação	Valores de IC <sub>50</sub>
Muito ativas	< 1 µg/mL
Ativas	1 – 15 µg/mL
Moderadamente ativas	15,1 – 25 µg/mL
Pouco ativas	25,1 – 50 µg/mL
Inativas	> 50 µg/mL

Os valores de IC<sub>50</sub> encontrados para as amostras testadas frente ao *T. cruzi*, *Leishmania* e *P. falciparum* foram relacionados aos valores de CC<sub>50</sub> em células HepG2 A16, calculando-se a razão entre esses valores e obtendo-se, dessa forma, o índice de seletividade das frações frente aos parasitas testados. Esse valor permite inferir se a amostra possui um efeito direcionado apenas ao parasita ou se sua ação ocorre devido à toxicidade para quaisquer tipos celulares. A literatura considera IS de pelo menos três (IS > 3) para que o composto seja considerado seletivo e, portanto, seguro (BÉZIVIN et al. 2003).

### **3.13 Avaliação da atividade pro/antioxidante do extrato e frações alcaloídicas de *Aspidosperma excelsum***

A avaliação da atividade pro/antioxidante das amostras foi realizada no Laboratório de Controle de Qualidade da FCFRP (USP), empregando-se dois métodos de medida de atividade antioxidante descritos na literatura. O primeiro deles investiga a capacidade da amostra em promover a captura do radical ânion superóxido, gerado no sistema xantina/xantina-oxidase (XOD). Essa capacidade foi avaliada pela medida da redução da quimioluminescência gerada pela oxidação do luminol pelo superóxido gerado no sistema xantina/XOD (PASCUAL et al. 1994; HIRAYAMA et al. 1997).

Para garantir que a redução de quimioluminescência se deve à captura de radicais e não à inibição da XOD pela amostra, que também poderia conduzir à diminuição da quimioluminescência, o efeito da amostra sobre sua atividade foi

avaliado através da reação da enzima sobre a xantina na presença de citocromo c. O ânion superóxido gerado pela ação da XOD sobre a xantina reduz o citocromo c mudando a coloração do meio reacional para azul. A xantina oxidase foi incubada com a amostra antes da adição da xantina. Caso componentes da amostra fossem capazes de ligar-se ao centro ativo da enzima ou a qualquer outro sítio de ligação, impedindo a interação entre a enzima e a xantina, a produção do ânion superóxido e a redução do citocromo c seriam comprometidas, observando-se diminuição da absorvância da solução (MCCORD e FRIDOVICH, 1969).

O método do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) foi empregado para avaliar a capacidade doadora de prótons  $H^+$  pela amostra. O DPPH confere ao meio reacional a cor rosa, e quando esse radical recebe um elétron ou próton  $H^+$  da amostra o meio reacional torna-se incolor, com diminuição da absorvância (BLOIS, 1958).

### 3.13.1 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE INIBITÓRIA DO ELAe E SUAS FRAÇÕES ALCALÓIDICAS SOBRE A QUIMIOLUMINESCÊNCIA GERADA NO SISTEMA XANTINA/XOD/LUMINOL, PELO SEQUESTRO DO ÂNION SUPERÓXIDO

Para realizar essa análise, o ELAe e suas frações foram dissolvidos em DMSO/etanol/água (10:45:45) e metanol/água (20:80), respectivamente, obtendo-se soluções nas seguintes concentrações: 1 mg/mL (extrato, FAlc<sub>1</sub>, FAlc<sub>4</sub> e FAlc<sub>7</sub>), 2 mg/mL (FAlc<sub>10</sub>) e 4 mg/mL (FAlc<sub>14</sub>).

As soluções obtidas foram sequencialmente diluídas em tampão glicina 0,1M (1mM EDTA, pH 9,4), possibilitando a obtenção de cinco novas soluções, cujas concentrações em meio reacional foram: 7,46 µg/mL, 3,73 µg/mL, 1,87 µg/mL, 0,93 µg/mL e 0,47 µg/mL (extrato, FAlc<sub>1</sub>, FAlc<sub>4</sub> e FAlc<sub>7</sub>); 14,92 µg/mL, 7,46 µg/mL, 3,73 µg/mL, 1,87 µg/mL e 0,93 µg/mL (FAlc<sub>10</sub>) e 29,84 µg/mL, 14,92 µg/mL, 7,46 µg/mL, 3,73 µg/mL e 1,87 µg/mL (FAlc<sub>14</sub>).

A análise do extrato e frações, nas diferentes concentrações obtidas, foi realizada em triplicata, sendo o meio reacional constituído por 400 µL de solução tampão glicina 0,1 M (1 mM EDTA, pH 9,4), 150 µL de xantina em tampão glicina (6 mM), 10 µL da amostra teste e 10 µL de luminol em DMSO (0,6 mM). A reação foi iniciada com a adição de 100 µL de solução recém preparada de xantina oxidase (20 mU/mL) em solução de EDTA 1 mmol/L. A medida da atividade sequestradora de ânions superóxido foi realizada durante 5 min a 25 °C em luminômetro Autolumat LB 953 (PASCUAL et al. 1994; HIRAYAMA et al. 1997).

Utilizou-se como controle positivo a mistura de todas as soluções anteriores, exceto a amostra, que foi substituída por tampão glicina 0,1 M. Os valores registrados foram utilizados no cálculo do percentual de inibição da quimioluminescência pelas amostras, empregando-se a fórmula:

$$\% \text{ Inibição} = 100 - (L_a/L_c) \times 100$$

Onde:

Lc: Luminescência registrada para o controle;

La: Luminescência registrada para a amostra analisada.

Para avaliar a atividade inibitória do ELAe sobre a enzima XOD, adotou-se o método descrito, procedendo-se, entretanto, à incubação da enzima com o extrato por 15 min em gelo.

### 3.13.2 ANÁLISE DA ATIVIDADE INIBITÓRIA DO EXTRATO SOBRE AS ENZIMAS XANTINA OXIDASE (XOD) E SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)

A análise da atividade inibitória do ELAe sobre as enzimas XOD e SOD foi realizada pelo método espectrofotométrico do citocromo c (MCCORD e FRIDOVICH, 1969), empregando-se uma solução do extrato a 250 µg/mL obtida pela dissolução da amostra em água.

Avaliou-se inicialmente a capacidade do ELAe em promover a inibição da XOD, em 2146 µL do tampão fosfato 0,4 M (pH 7,6), 4 µL da enzima e 100 µL da

amostra. A mistura foi mantida por 10 min a temperatura ambiente, acrescentando-se em seguida 600  $\mu\text{L}$  do citocromo c e 150  $\mu\text{L}$  de xantina. A produção máxima de radicais superóxido foi registrada preparando-se um ensaio controle, cujo meio reacional foi constituído por todas as soluções anteriores, exceto a amostra, que foi substituída por 100  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato.

A análise de atividade inibitória sobre a SOD foi avaliada juntando-se 1946  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato, 100  $\mu\text{L}$  de amostra e 200  $\mu\text{L}$  de SOD, aguardando-se 10 min a temperatura ambiente. Após esse período, foram acrescentados 600  $\mu\text{L}$  de citocromo c, 150  $\mu\text{L}$  de xantina e 4  $\mu\text{L}$  de XOD. O controle dessa análise consistiu na adoção do procedimento descrito anteriormente, substituindo-se, entretanto, a amostra por 100  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato.

Todas as leituras foram realizadas durante 10 min em espectrofotômetro Hitachi U – 2001, no comprimento de onda 550 nm, registrando-se a absorvância produzida a cada 60 seg.

### 3.13.3 ANÁLISE DO EXTRATO E FRAÇÕES PELO MÉTODO DO RADICAL DPPH

Inicialmente, o extrato e suas frações alcaloídicas foram dissolvidos em DMSO/etanol/água (10:45:45) e etanol, respectivamente, de modo a obter soluções na concentração de 8 mg/mL. As soluções preparadas foram diluídas cinco vezes em tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 5,5), reduzindo-se sequencialmente sua concentração pela metade, e obtendo-se, assim, novas soluções correspondentes à cada amostra, cujas concentrações em meio reacional foram: 78,43  $\mu\text{g/mL}$ , 39,22  $\mu\text{g/mL}$ , 19,61  $\mu\text{g/mL}$ , 9,8  $\mu\text{g/mL}$  e 4,9  $\mu\text{g/mL}$ .

A análise do extrato e frações foi realizada em triplicata, sendo o meio reacional constituído por 500  $\mu\text{L}$  de solução tampão, 500  $\mu\text{L}$  de etanol, 25  $\mu\text{L}$  de amostra e 250  $\mu\text{L}$  de solução do radical DPPH 200  $\mu\text{M}$ . Após a adição de cada componente, na ordem apresentada, aguardou-se 15 min para que a reação se processasse. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a ( $\lambda$ ) 517 nm, empregando-se como controle positivo a mistura de todas as soluções utilizadas no teste, exceto a amostra, que forneceu o valor máximo de absorção no comprimento de onda selecionado. Os valores registrados foram utilizados no cálculo do percentual de inibição da quimioluminescência pelas amostras, empregando-se a fórmula:

$$\% \text{ Inibição} = 100 - (Aa/Ac) \times 100$$

Onde:

Ac: Absorvância registrada para o controle;

Aa: Absorvância registrada para a amostra analisada.

### 3.14 Análise estatística dos resultados

Os resultados obtidos pela análise da citotoxicidade e atividade das frações frente ao *P. falciparum* foram avaliados no programa Origin 8.0 com determinação das curvas dose-resposta traçadas com ajuste sigmoidal. Essas curvas permitiram determinar as concentrações citotóxicas que inibem em 50 % o crescimento das células ( $CC_{50}$ ) e as concentrações inibitórias do crescimento de 50% dos parasitas ( $IC_{50}$ ) em relação aos controles sem drogas.

A análise estatística dos dados obtidos na análise da atividade antioxidante e na determinação dos potenciais leishmanicida e tripanocida das amostras foi realizada utilizando-se o programa Graphpad prism versão 5.0 para Windows (Graphpad software, USA). Os valores de  $IC_{50}$  foram comparados pela análise de variância, ANOVA oneway, e através do teste "t de Student". Em todos os testes, o nível crítico fixado foi de 5 % ( $p < 0,05$ ) para se admitir uma diferença estatisticamente significativa entre os valores.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Obtenção da tintura e do extrato liofilizado de *Aspidosperma excelsum*

A secagem da tintura de *Aspidosperma excelsum* forneceu o extrato liofilizado (ELAe), cujo rendimento foi de aproximadamente 70 g.

### 4.2 Seleção do método para fracionamento do ELAe

O fracionamento sólido-líquido de 5 g do ELAe forneceu 59 mg de FH, 118 mg de FDCI, 61 mg de FAE e 2,815 g de FM, cujos rendimentos percentuais foram de 1,18 %, 2,36 %, 1,22 % e 56 %, respectivamente. A fração FAE, onde se mostraram concentrados os alcaloides da amostra, apresentou baixo rendimento em comparação às demais frações obtidas neste fracionamento.

As frações obtidas no fracionamento ácido-básico do ELAe e seus respectivos rendimentos percentuais e em massa são apresentados na tabela 2.

**Tabela 2** – Rendimento das frações obtidas pelo fracionamento ácido básico das alíquotas A, B, C, D e E preparadas com o ELAe.

Alíquota	Fração	Rendimento frações (mg)	Rendimento frações (%)	Rendimento alíquotas (%)
A	A <sub>1</sub>	11	1,1	8,6
	A <sub>4</sub>	18	1,8	
	A <sub>7</sub>	33	3,3	
	A <sub>14</sub>	18	1,8	
	A <sub>10</sub>	6	0,6	
B	B <sub>4</sub>	20	2	7,8
	B <sub>7</sub>	40	4	
	B <sub>14</sub>	16	1,6	
	B <sub>10</sub>	2	0,2	
C	C <sub>7</sub>	60	6	7,5
	C <sub>14</sub>	12	1,2	
	C <sub>10</sub>	3	0,3	
D	D <sub>10</sub>	66	6,6	6,6
E	E <sub>14</sub>	7	0,7	0,7

Como mostra a tabela 2, os maiores rendimentos em massa foram observados nas frações obtidas pelo fracionamento ácido-básico em paralelo (A<sub>1</sub>, B<sub>4</sub>, C<sub>7</sub>, D<sub>10</sub> e E<sub>14</sub>). Entretanto, quando a soma dos valores correspondentes e a

massa empregada no procedimento (5 g) são relacionadas, observa-se um baixo rendimento percentual, de apenas 3,28 %.

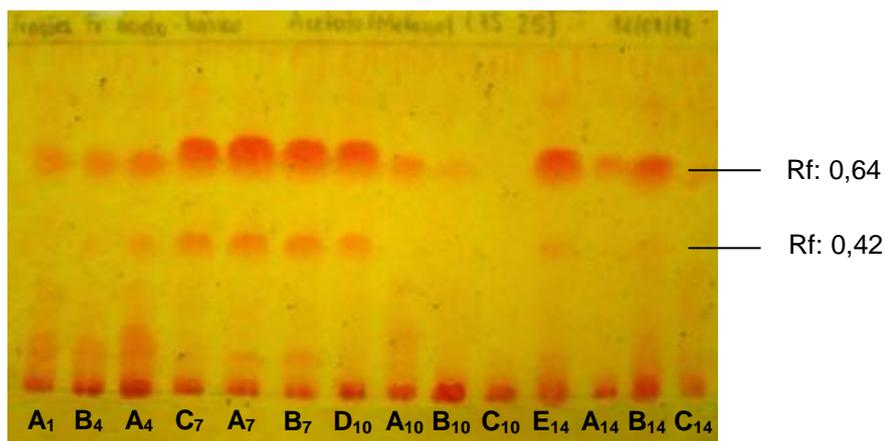
Por outro lado, o fracionamento ácido-básico sequencial da alíquota A apresentou rendimento de 8,6 % em relação à quantidade inicial utilizada (1 g), o maior em comparação aos rendimentos percentuais observados pelo emprego dos demais métodos. Dessa forma, o fracionamento ácido-básico sequencial demonstrou ser o método mais eficiente para a separação do conteúdo alcaloídico presente no extrato de *A. excelsum*.

### **4.3 Fracionamento ácido-básico do ELAe**

O fracionamento sequencial de 40 g do ELAe forneceu 338 mg de FDCI<sub>1</sub>, 313 mg de FAlc<sub>4</sub>, 2,906 g de FAlc<sub>7</sub>, 102 mg de FAlc<sub>10</sub> e 520 mg de FAlc<sub>14</sub>. A soma dessas massas representou 10,44 % da quantidade inicial empregada. O resultado observado mostrou-se de acordo com aquele obtido no procedimento realizado para a seleção do método de fracionamento do ELAe.

### **4.4 Análise das frações de *Aspidosperma excelsum* por CCD**

As análises por CCD permitiram estabelecer o perfil cromatográfico das frações, dentre elas as alcaloídicas, obtidas pelo fracionamento ácido-básico. O sistema constituído por AcOEt/MeOH (75:25), tendo como fase estacionária gel de sílica de fase normal, apresentou melhor resolução em comparação aos demais sistemas testados. O cromatograma obtido com esse eluente é mostrado na figura 15.



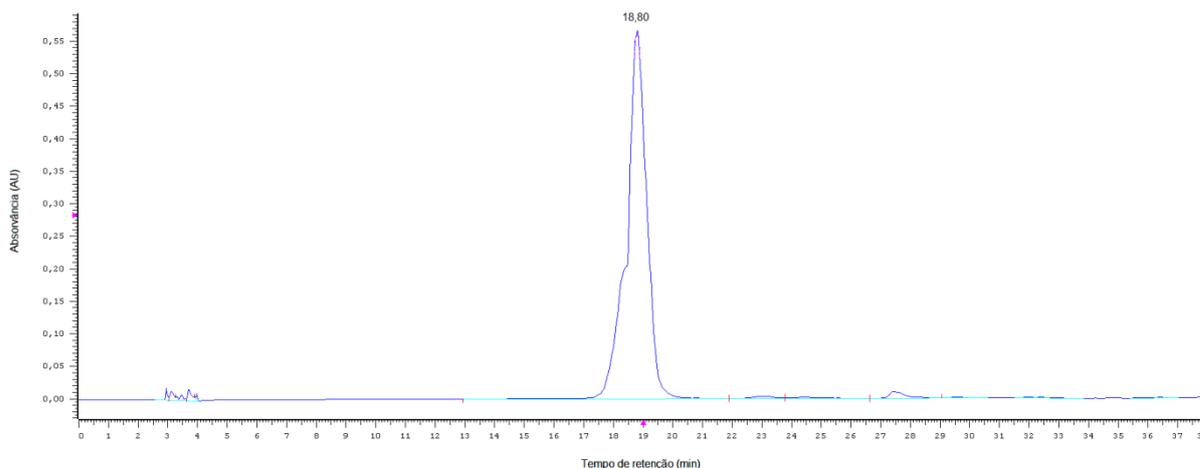
**Figura 15** – Cromatograma obtido sobre gel de sílica normal em eluente AcOEt/MeOH (75:25), após aspersão com reativo de Dragendorff. Esquerda-direita: A<sub>1</sub>, B<sub>4</sub>, A<sub>4</sub>, C<sub>7</sub>, A<sub>7</sub>, B<sub>7</sub>, D<sub>10</sub>, A<sub>10</sub>, B<sub>10</sub>, C<sub>10</sub>, E<sub>14</sub>, A<sub>14</sub>, B<sub>14</sub> e C<sub>14</sub>.

O cromatograma mostrado na figura 15 apresenta várias zonas sensíveis ao reativo de Dragendorff, predominando as de Rf 0,42 e 0,64. Essa característica indica que os constituintes correspondentes às bandas tratam-se de alcaloides (WAGNER e BLAT, 2001). O resultado reforça os dados descritos na literatura quanto à presença dessa classe de metabólitos em *A. excelsum* (BANERJEE et al. 1953; BENOIN et al. 1966; VERPOORTE et al. 1983).

Observa-se o predomínio desses metabólitos nas frações neutras (C<sub>7</sub>, A<sub>7</sub> e B<sub>7</sub>) e básicas (B<sub>10</sub>, E<sub>14</sub> e B<sub>14</sub>), o que pode ser explicado pela natureza alcalina das substâncias alcaloídicas (HENRIQUES et al. 2000). Em meio ácido, esses compostos se encontram na forma de sal, apresentando baixa solubilidade em diclorometano (solvente empregado na separação dos alcaloides), o que torna menos eficiente sua extração em pH 1 e 4. Em meio neutro e básico essas substâncias se encontram livres e são facilmente extraídas, o que justifica sua alta concentração em frações preparadas em pH 7, 10 e 14.

#### 4.5 Análise da tintura e frações alcaloídicas de *Aspidosperma excelsum* por cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE)

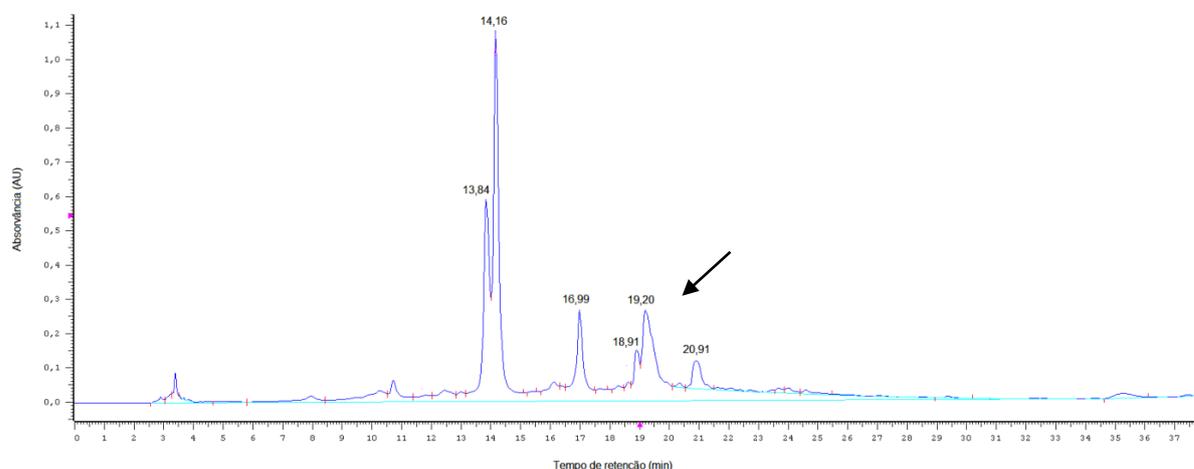
A análise das amostras foi realizada utilizando-se como substância de referência o cloridrato de ioimbina (Sigma-Aldrich), cuja análise por CLAE nas condições descritas forneceu o cromatograma apresentado na figura 16.



**Figura 16** – Perfil cromatográfico por CLAE da substância de referência cloridrato de ioimbina (Sigma-Aldrich) em Acetonitrila (ACN)/Ácido trifluoracético (TFA) pH 3, sob luz ultravioleta ( $\lambda$ ) 271 nm.

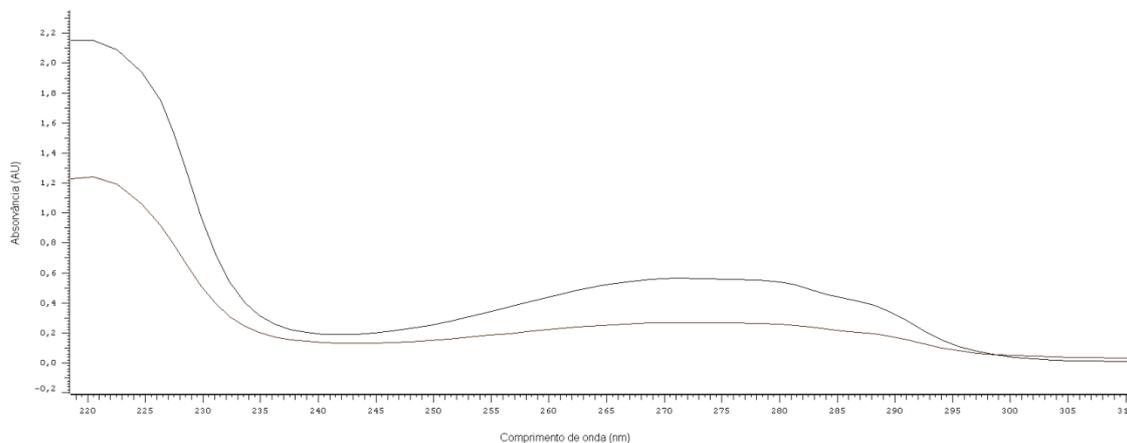
O cromatograma apresentado na figura 16 revela a presença de um pico principal com tempo de retenção 18,80 min, com área de 65719040 e 78,662 % de pureza, sendo atribuído ao cloridrato de ioimbina, substância de referência constituída pelos sais das formas  $\alpha$  e  $\beta$  de ioimbina, ambas já isoladas de espécies do gênero *Aspidosperma* (DASTOOR e SCHMID, 1963 apud OLIVEIRA et al. 2009; MARQUES et al. 1996; TORRES et al. 2013).

No cromatograma obtido pela análise da tintura por CLAE (figura 17) observa-se um pico com tempo de retenção 19,20 min semelhante ao observado para o cloridrato de ioimbina, com área de 30840886 e 33,068 % de pureza. São observados ainda outros picos com forte absorção em 271 nm, dentre eles os registrados em 13,84 e 14,16 min.



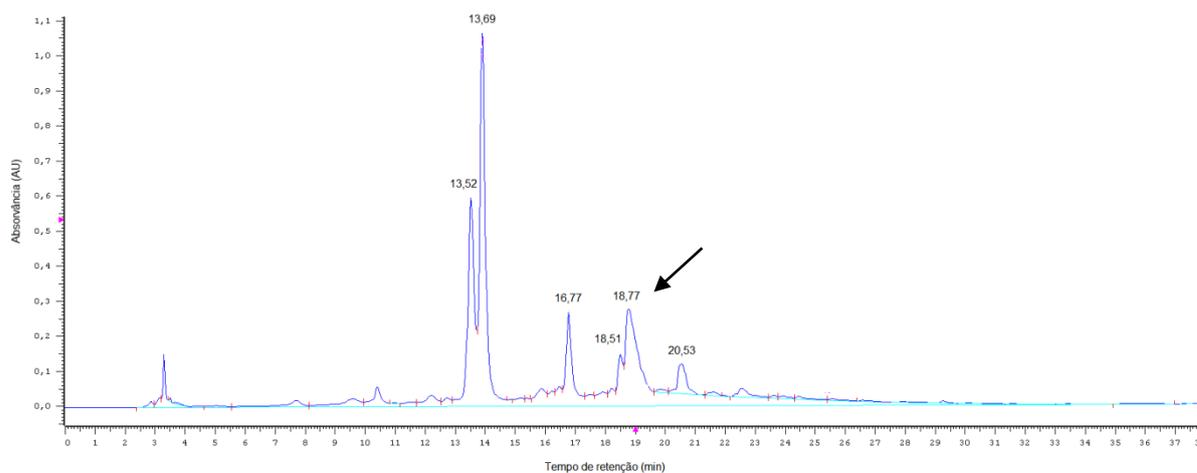
**Figura 17** – Perfil cromatográfico por CLAE da tintura em ACN/TFA pH 3, ( $\lambda$ ) 271 nm.

A análise dos espectros de ultravioleta do pico registrado para o cloridrato de ioimbina (18,80 min) e do pico presente na tintura atribuído a essa substância (19,20 min) revela correlação no valor de 0,9974. A sobreposição desses espectros é apresentada na figura 18.



**Figura 18** – Sobreposição dos espectros de ultravioleta do cloridrato de ioimbina (—) e do pico registrado em 19,20 min no cromatograma obtido pela análise da tintura (—).

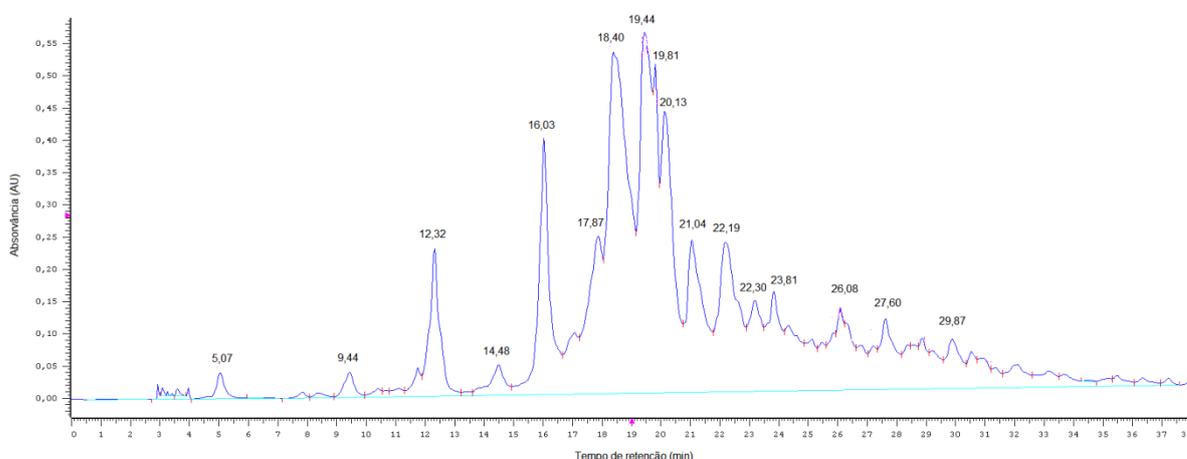
A adição da substância padrão à tintura promoveu aumento na área do pico que sugere tratar-se do cloridrato de ioimbina, registrado desta vez em 18,77 min, cujo valor foi para 34385856. O aumento na área do pico reforça o entendimento de que a ioimbina esteja presente na tintura. O cromatograma resultante da co-injeção é apresentado na figura 19.



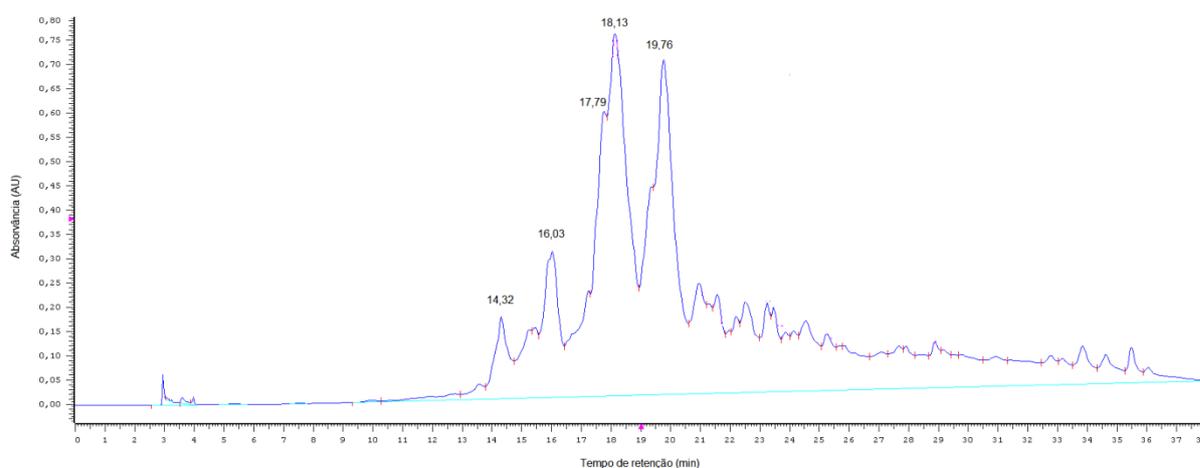
**Figura 19** – Cromatograma obtido pela análise da tintura por CLAE em ACN/TFA pH 3 após adição do cloridrato de ioimbina. Visualização feita sob luz ultravioleta ( $\lambda$ ) 271 nm.

A detecção da ioimbina na tintura está em conformidade com dados da literatura, que referem sua presença em derivados de *A. excelsum* (BENOIN et al. 1966; VERPORTE et al. 1983), assim como sua identificação em outras espécies de *Aspidosperma*, tais como *A. oblongum* (PALMER, 1964), *A. ramiflorum* (MARQUES et al. 1996) e *A. ulei* (TORRES et al. 2013), revelando a substância como um alcalóide indólico frequente no gênero.

Os cromatogramas resultantes da análise das frações FAlc<sub>1</sub>, FAlc<sub>4</sub>, FAlc<sub>7</sub>, FAlc<sub>10</sub> e FAlc<sub>14</sub> obtidas por fracionamento sequencial são apresentados nas figuras 20, 21, 22, 23 e 24.



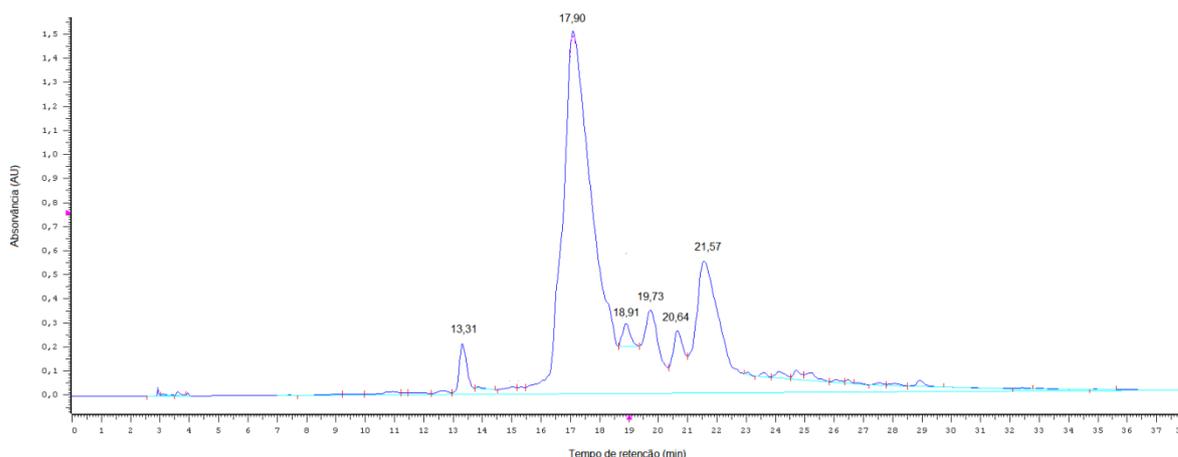
**Figura 20** – Perfil cromatográfico da fração alcaloídica FAlc<sub>1</sub> obtida por fracionamento sequencial sob luz ultravioleta ( $\lambda$ ) 271 nm.



**Figura 21** – Cromatograma da fração alcaloídica FAlc<sub>4</sub> obtida por fracionamento sequencial, observada sob luz ultravioleta ( $\lambda$ ) 271 nm.

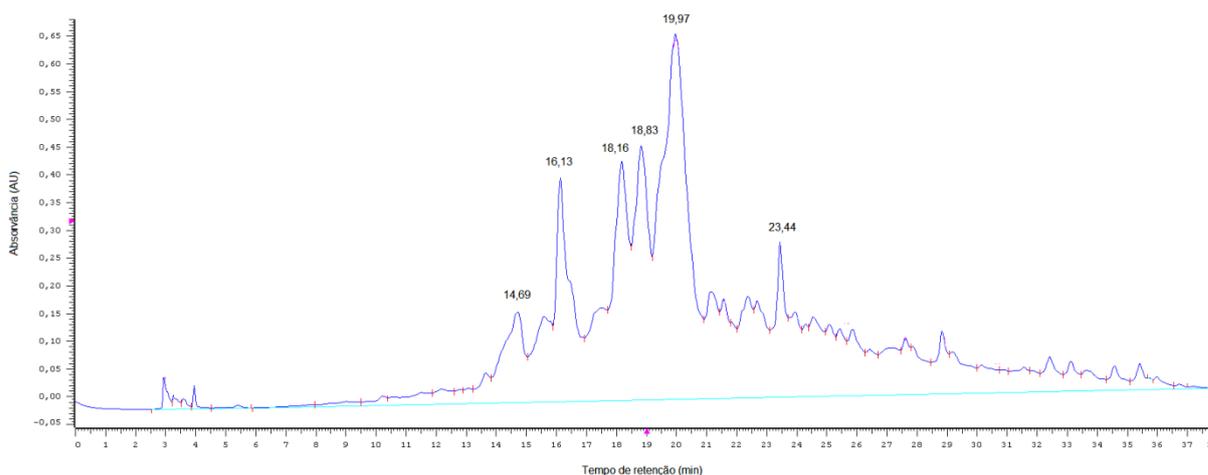
As figuras 20 e 21, correspondentes aos cromatogramas das frações FAlc<sub>1</sub> e FAlc<sub>4</sub>, respectivamente, revelam picos com alta intensidade de absorção, que podem se tratar de substâncias, tais como ácidos, fenóis, compostos neutros e bases fracas (AUTERHOFF e KOVAR, 1985). Essas bases fracas podem incluir alcalóides minoritários cuja estrutura e coeficiente de basicidade (pK<sub>b</sub>) possibilitem sua extração em meio ácido.

Por outro lado, a análise da fração FAlc<sub>7</sub>, cujo cromatograma é apresentado na figura 22, revela a presença de um pequeno número de picos cromatográficos, sendo registrado um principal em 17,90 min semelhante ao observado para o cloridrato de ioimbina, sugerindo que essa substância esteja presente como constituinte majoritário da fração. Esse resultado se deve à natureza dos alcalóides, que se tratando de substâncias alcalinas (HENRIQUES et al. 2000) podem ser mais facilmente extraídos em meio neutro a básico.

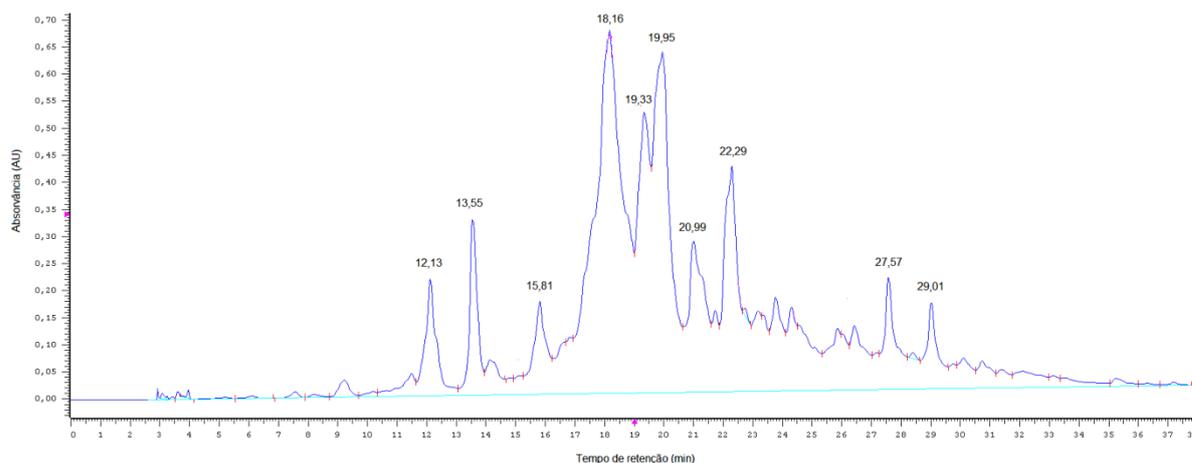


**Figura 22** – Perfil cromatográfico da fração alcaloídica FAlc<sub>7</sub> obtida por fracionamento sequencial, sob luz ultravioleta ( $\lambda$ ) 271 nm.

Os picos registrados nos cromatogramas das frações FAlc<sub>14</sub> (figura 23) e FAlc<sub>10</sub> (figura 24) apresentaram baixa intensidade de absorção, o que pode estar relacionado ao processo exaustivo de extração realizado para obtenção da fração FAlc<sub>7</sub>.

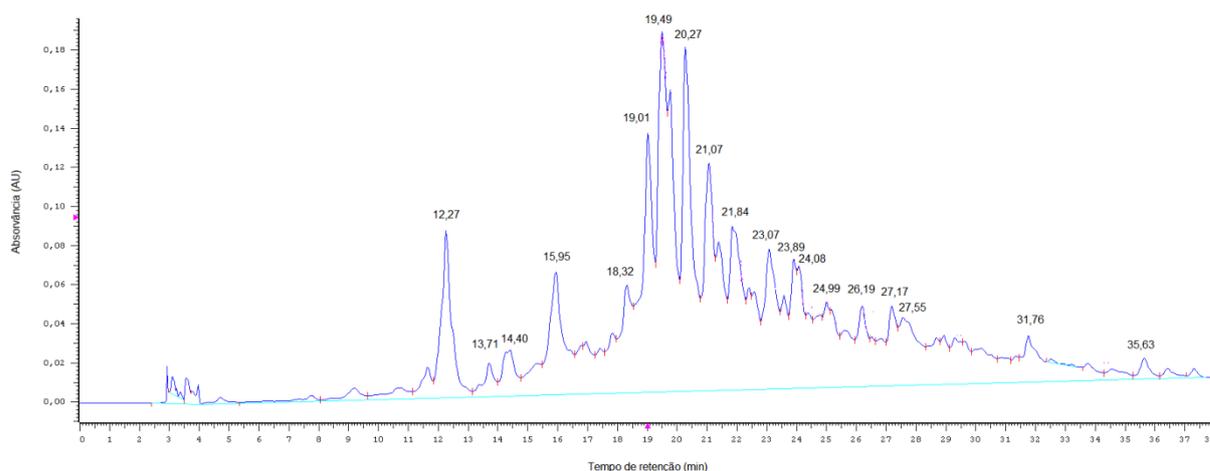


**Figura 23** – Perfil cromatográfico da fração alcalóidica FAlc<sub>14</sub> obtida por fracionamento sequencial, sob luz ultravioleta ( $\lambda$ ) 271 nm.



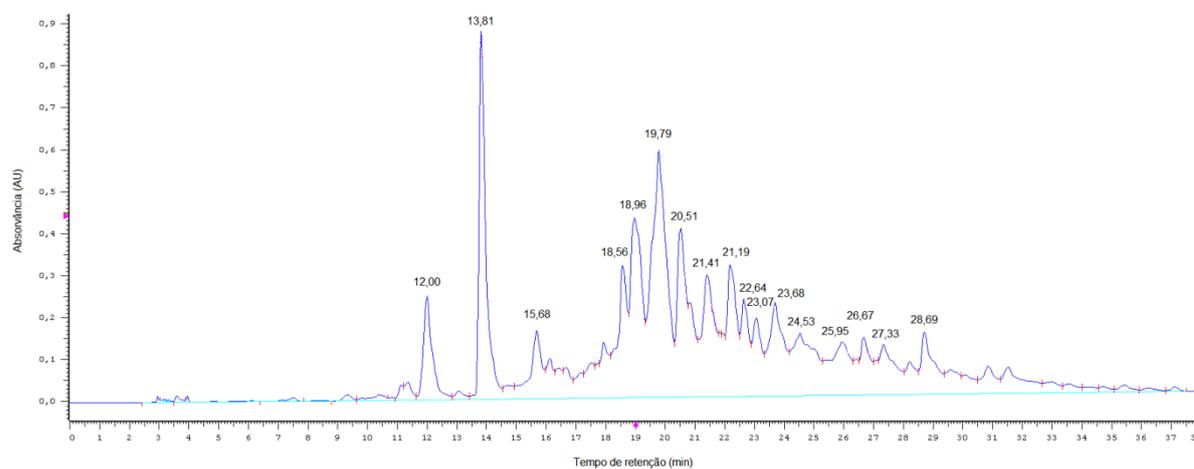
**Figura 24** – Perfil cromatográfico da fração alcalóidica FAlc<sub>10</sub> obtida por fracionamento sequencial, sob luz ultravioleta ( $\lambda$ ) 271 nm.

Os perfis cromatográficos das frações obtidas por fracionamento em paralelo são apresentados nas figuras 25, 26, 27, 28 e 29. Nesses cromatogramas é possível observar o predomínio de um pico com tempo de retenção entre 17 e 19 min atribuído à ioimbina nas frações FAlc<sub>7</sub>, FAlc<sub>10</sub> e FAlc<sub>14</sub> em comparação às frações FAlc<sub>1</sub> e FAlc<sub>4</sub>, o que pode ocorrer, conforme discutido anteriormente, em função da natureza alcalina dessa substância (HENRIQUES et al. 2000).



**Figura 25** – Perfil cromatográfico da fração alcaloídica FAlc<sub>1</sub> obtida por fracionamento em paralelo, sob luz ultravioleta ( $\lambda$ ) 271 nm.

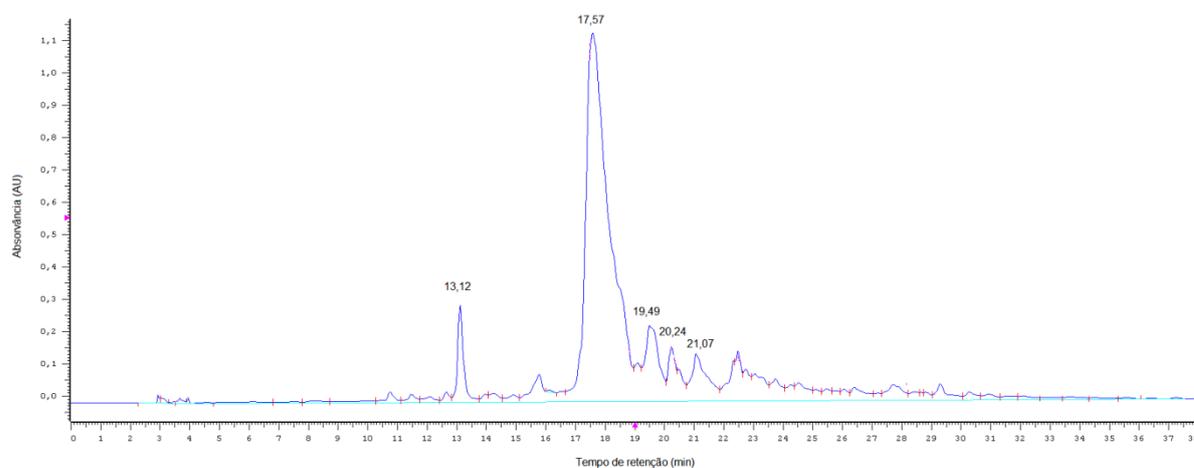
O cromatograma da fração FAlc<sub>4</sub> obtida por fracionamento em paralelo mostrou melhor resolução que o obtido para a mesma fração resultante do método sequencial. Além disso, foram observados picos não visualizados na amostra obtida de forma sequencial, tais como os registrados em 12 e 13,81 min. Esses picos podem se tratar de ácidos, fenóis ou bases fracas, conforme descrito por Auterhoff e Kovar (1985).



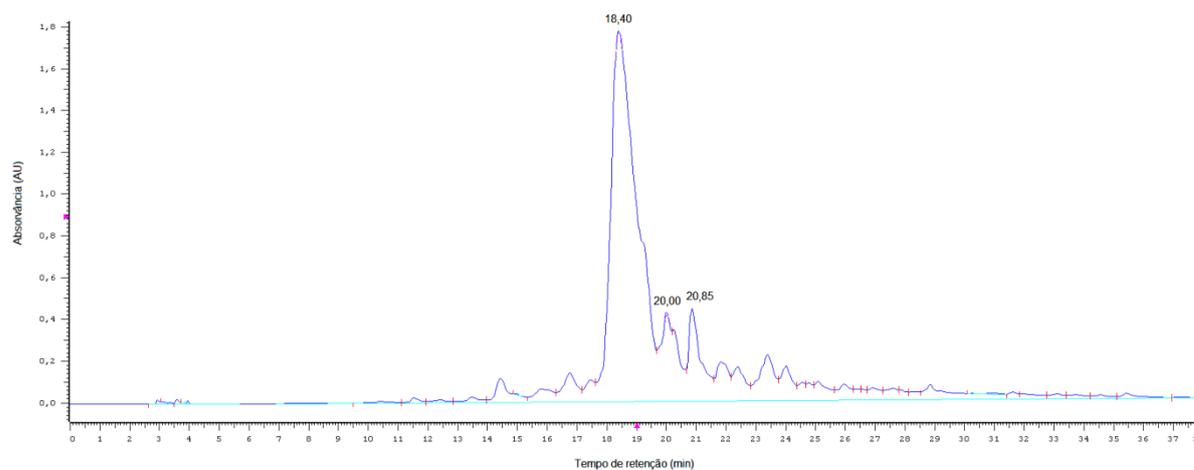
**Figura 26** – Cromatograma por CLAE da fração alcaloídica FAlc<sub>4</sub> obtida por fracionamento em paralelo, sob luz ultravioleta ( $\lambda$ ) 271 nm.

Nos cromatogramas das frações neutra (figura 27) e básicas (figuras 28 e 29), observa-se um pico principal atribuído à ioimbina, com maior intensidade de absorção em FAlc<sub>10</sub> e menor em FAlc<sub>7</sub>, indicando melhor extração da substância em pH 10. A presença da ioimbina em FAlc<sub>10</sub> e FAlc<sub>14</sub> pode ocorrer devido à extração

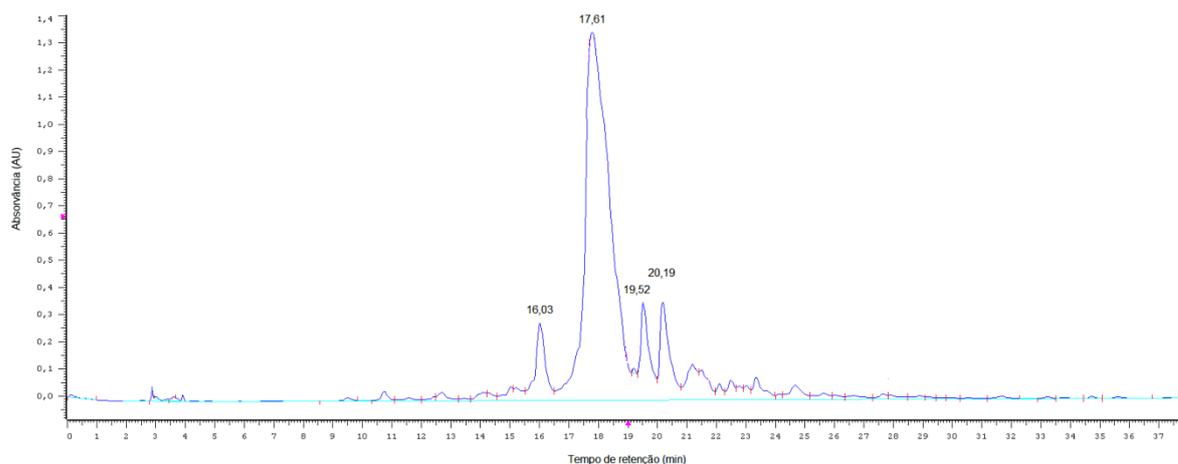
direta no pH correspondente, eliminando-se a extração prévia em outros pH, realizada no fracionamento sequencial.



**Figura 27** – Perfil cromatográfico por CLAE da fração alcaloídica FAlc<sub>7</sub> obtida por fracionamento em paralelo, observado a ( $\lambda$ ) 271 nm.



**Figura 28** – Perfil cromatográfico por CLAE da fração alcaloídica FAlc<sub>10</sub> obtida por fracionamento em paralelo, observado sob luz ultravioleta ( $\lambda$ ) 271 nm.



**Figura 29** – Perfil cromatográfico por CLAE da fração alcaloídica FAlc<sub>14</sub> obtida por fracionamento em paralelo, visualizado sob luz ultravioleta ( $\lambda$ ) 271 nm.

Sugere-se que o fracionamento em paralelo tenha possibilitado maior extração da ioimbina, já que o pico correspondente à substância foi detectado em três das frações obtidas (FAlc<sub>7</sub>, FAlc<sub>10</sub> e FAlc<sub>14</sub>) com forte intensidade de absorção em comparação aos demais picos. Conforme discutido anteriormente, isto pode ter ocorrido em função da extração direta após os ajustes para os pH 7, 10 e 14, respectivamente, valores que favorecem a extração de compostos alcalinos (AUTERHOFF e KOVAR, 1985). A extração direta elimina as etapas realizadas em pH 1 e 4, presentes no fracionamento sequencial, que fazem com que substâncias não alcaloídicas e parte dos alcaloides sejam retirados nessas frações, conforme se observa na figura 15, diminuindo sua concentração nas amostras obtidas em extrações posteriores.

Por outro lado, quando se compara o rendimento das amostras provenientes do fracionamento em paralelo ao das obtidas de forma sequencial (tabela 2), é possível observar baixo rendimento percentual do primeiro (3,28 %) em comparação ao último (8,6 %). Isto revela a necessidade de quantificar a ioimbina nas frações, e assim, determinar o método mais adequado para sua extração.

Apesar de permitir a retirada de ioimbina apenas em pH 7, o fracionamento sequencial apresentou como vantagem uma maior variedade de substâncias em cada fração, conforme é possível observar nos cromatogramas obtidos por CLAE, e também maior rendimento das amostras em massa, favorecendo o desenvolvimento de separações posteriores.

## 4.6 Obtenção de substâncias

### 4.6.1 SEPARAÇÃO DE B<sub>7</sub>, C<sub>7</sub> E D<sub>10</sub> POR CROMATOGRAFIA DE MÉDIA PRESSÃO

A separação de B<sub>7</sub>, C<sub>7</sub> e D<sub>10</sub> por cromatografia de média pressão permitiu a obtenção de 55 subfrações, que após terem seus perfis cromatográficos comparados, foram reunidas em 8 subfrações. Devido à predominância das substâncias com Rf 0,42 e 0,64, sugestivas de alcalóides, nas subfrações 3-11, 12-20 e 21-25, estas foram eleitas para novas separações por CCDP visando o isolamento de seus constituintes. Para isso, uma nova reunião foi feita, resultando em duas amostras: 3-11(45 mg), denominada SfA<sub>2</sub> e 12-25 (50 mg), SfA<sub>3</sub>.

A separação dessas amostras por CCDP possibilitou a separação das bandas com Rf 0,42 (5,5 mg) e 0,64 (11 mg), denominadas Ae1 e Ae2, respectivamente.

### 4.6.2 SEPARAÇÃO DE FAIc<sub>7</sub> POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA CENTRÍFUGA (CCDC)

O refracionamento ácido-básico de FDCI<sub>7</sub> possibilitou a obtenção de 3 frações denominadas FAE<sub>1</sub>, FAE<sub>2</sub> e FB. Devido seu preparo em pH básico, a segunda concentrou os alcaloides presentes na amostra e apresentou maior rendimento em comparação às demais, com massa de 391,5 mg.

A separação de 390 mg de FAE<sub>2</sub> possibilitou a obtenção de 6 subfrações, reunidas conforme seu perfil cromatográfico em 3 e 4 (SfB<sub>1</sub>), 5 (SfB<sub>2</sub>), 6 (SfB<sub>3</sub>), 7-9 (SfB<sub>4</sub>), 10 (SfB<sub>5</sub>) e 11-30 (SfB<sub>6</sub>), que renderam 125, 28, 8, 7, 2 e 39 mg, respectivamente. Todas as amostras apresentaram-se em mistura quando analisadas por CCD, não sendo possível o isolamento de substâncias por esse método.

### 4.6.3 SEPARAÇÃO DE FAIc<sub>7</sub> POR CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO DE MÉDIA PRESSÃO

A separação de 800 mg de FAIc<sub>7</sub> por cromatografia a líquido de média pressão possibilitou a obtenção de 17 subfrações, que após analisadas por CCD foram reunidas em 6: 1 e 2 (136 mg), 3 e 4 (243 mg), 5 e 6 (104 mg), 7-15 (130 mg),

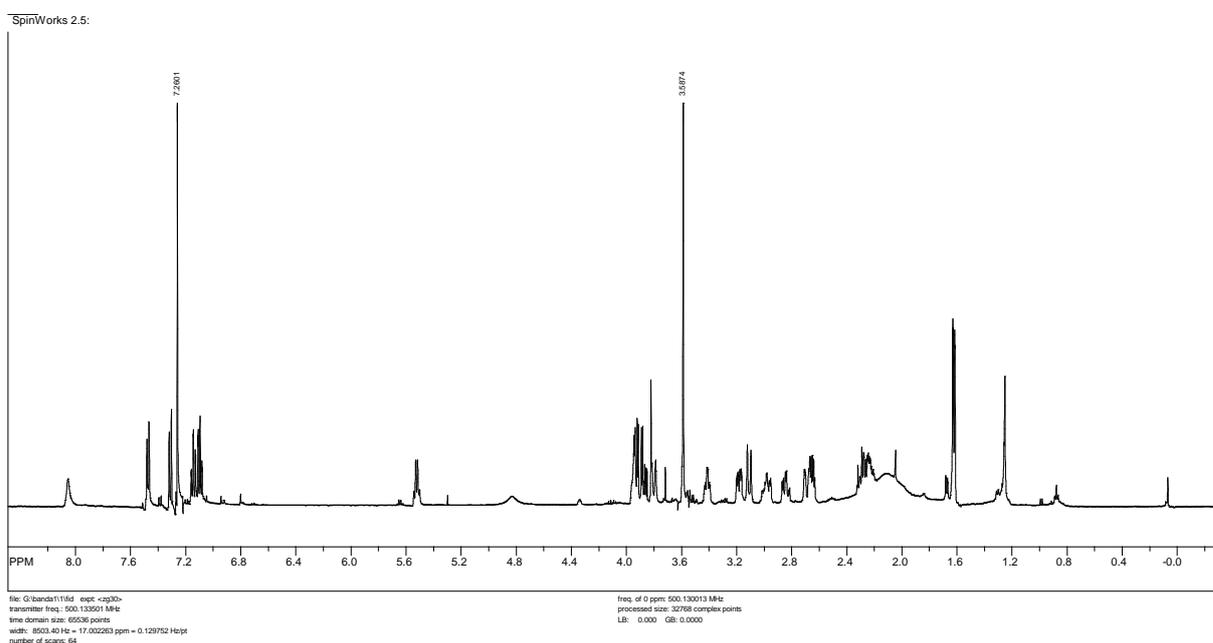
16 (35 mg) e 17 (127 mg); denominadas respectivamente SfC<sub>1</sub>, SfC<sub>2</sub>, SfC<sub>3</sub>, SfC<sub>4</sub>, SfC<sub>5</sub> e SfC<sub>6</sub>.

A subfração SfC<sub>5</sub> apresentou uma banda principal reativa ao reagente de Dragendorff, com Rf 0,69, e por isso foi novamente separada por CCDP. Essa separação forneceu a substância denominada CB<sub>2</sub> (12 mg), cuja análise por CLAE revelou baixa pureza, impossibilitando a determinação de sua estrutura.

A separação de 131 mg de SfC<sub>1</sub> por cromatografia em coluna aberta forneceu 40 subfrações reunidas em outras 7, conforme seu perfil cromatográfico por CCD: 1 (SfD<sub>1</sub>), 2 (SfD<sub>2</sub>), 3 (SfD<sub>3</sub>), 4 (SfD<sub>4</sub>), 5-12 (SfD<sub>5</sub>), 13-31(SfD<sub>6</sub>) e 32-40 (SfD<sub>7</sub>), que renderam 20, 26, 8, 12, 27, 31 e 19 mg, respectivamente.

#### 4.7 Análise por RMN<sup>1</sup>H de Ae1

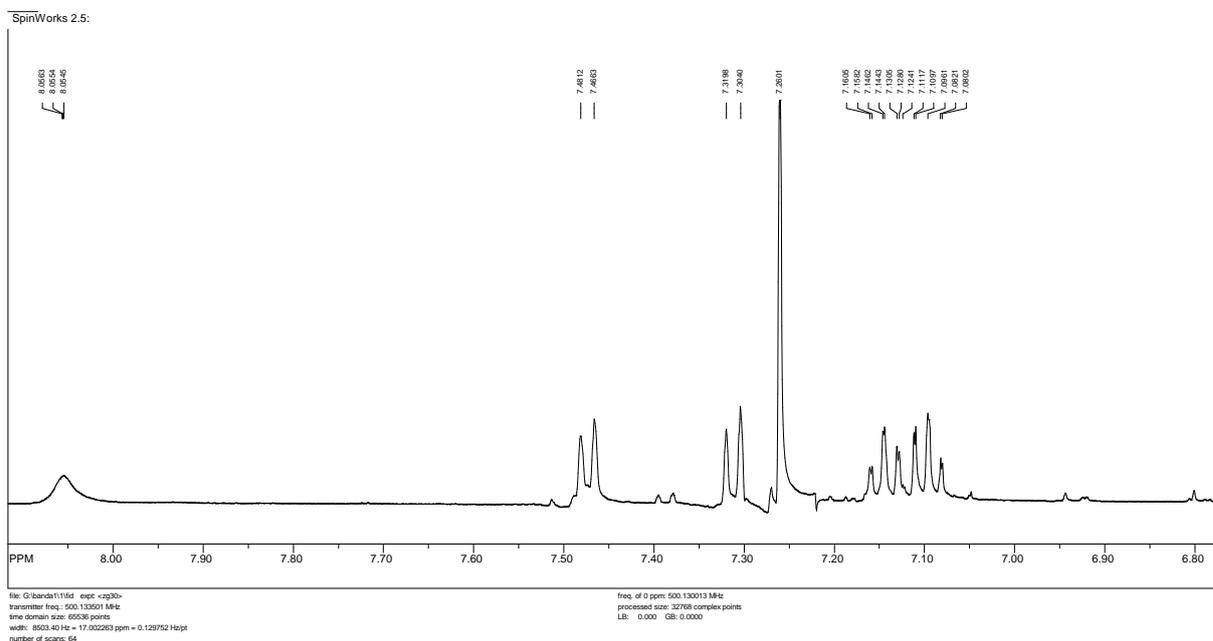
A análise de Ae1 por RMN<sup>1</sup>H possibilitou a obtenção do espectro apresentado na figura 30.



**Figura 30** – Espectro de RMN<sup>1</sup>H de Ae1 (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz).

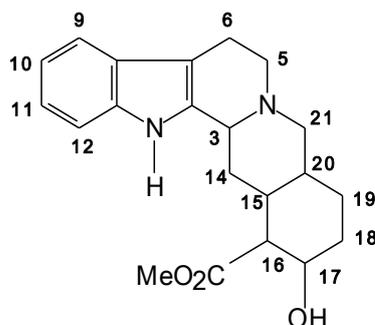
Foram observados sinais de <sup>1</sup>H característicos de núcleo indólico (SILVA et al. 2010) tais como os localizados em ambiente químico típico de hidrogênios aromáticos: dois triplo duplete, integrando <sup>1</sup>H cada, com deslocamento químico ( $\delta$ ) em 7,15 e 7,10 acoplado orto entre si ( $J=7,8$  e  $1,15$  Hz) e meta com dois dupletos

largos em  $\delta$  7,47 (1H,  $J=7,8$  Hz) e 7,31 (1H,  $J=7,8$  Hz), atribuídos respectivamente a H-10, H-11, H-12 e H-9. Observou-se também um singlete largo em  $\delta$  8,5 característico de NH aromático, conforme ilustra a figura 31.



**Figura 31** – Expansão do espectro de RMN<sup>1</sup>H de Ae1 (CDCl<sub>3</sub>, 500MHz).

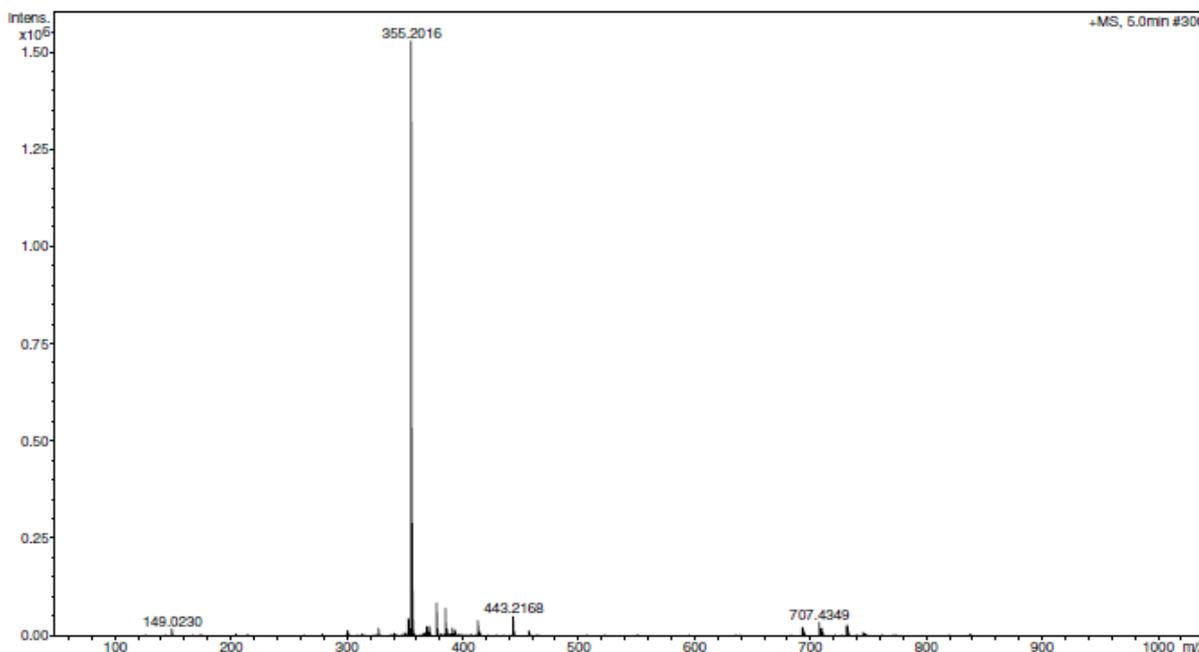
Foram observados sinais característicos de <sup>1</sup>H alifáticos, sugerindo a presença de porção terpênica (LOPES, 2008; DEWICK, 2009), tais como: tripleto em  $\delta$  3,85 (1H,  $J=4,75$ ), duplo duplo duplete a  $\delta$  3,18 (1H, 1,7; 4,75; 11,9Hz), duplete em  $\delta$  3,11 (1H,  $J=13$ Hz), multiplete a  $\delta$  2,9 (1H) e triplo duplete em  $\delta$  2,83 (1H,  $J=4,75$ ; 11,9) referentes aos H-5 $\beta$ , H-6 $\beta$ , H-3, H-6 $\alpha$  e H-5 $\alpha$ ; multipletos em  $\delta$  2,63 – 2,70 (2H), 2,18 – 2,33 (5H), atribuídos aos H-16, H-18, H-19, H-20 e H-21, e um sinal integrando 3H em  $\delta$  3,58 referente à metoxila, de acordo com a figura 30. Este conjunto de sinais sugere tratar-se de um derivado ioimbiano (LOPES, 2008). A estrutura da ioimbina é apresentada na figura 32.



**Figura 32** – Estrutura química da ioimbina, substância presente em espécies de *Aspidosperma*.

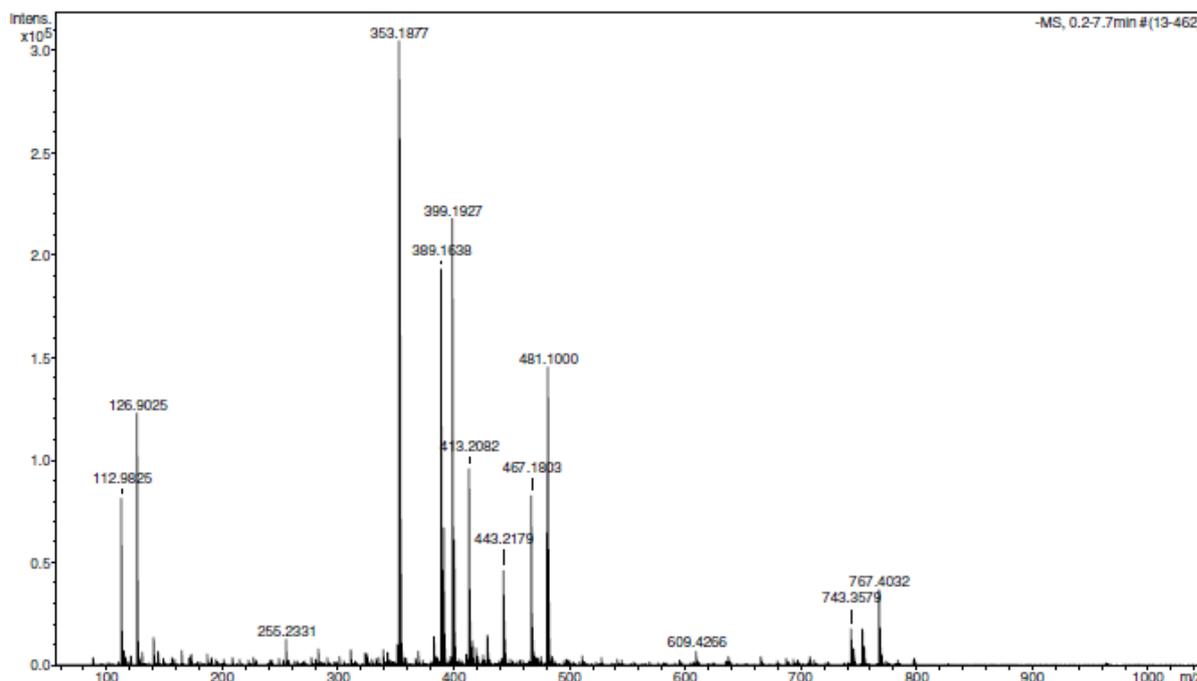
#### 4.8 Análise de Ae1 por espectrometria de massas

A análise da substância Ae1 por espectrometria de massas (modo positivo) forneceu o espectro apresentado na figura 33. Como é possível observar, detectou-se um sinal com massa total de 355.2016, cujas possíveis fórmulas moleculares foram  $C_{21}H_{27}N_2O_3$  e  $C_{17}H_{28}N_8O$ , com erros de 0,0 e 7,6 ppm, respectivamente.



**Figura 33** – Espectro de massas de Ae1 no modo positivo.

A massa experimental do principal sinal e a fórmula molecular  $C_{21}H_{27}N_2O_3$  encontradas para Ae1 correspondem à ioimbina, substância isolada previamente da espécie por Benoin et al (1966) e Verporte et al (1983). No entanto, a análise por RMN<sup>1</sup>H revela sinais adicionais que não estão de acordo com os dados disponíveis na literatura para essa substância. Esses sinais podem estar relacionados a outras substâncias presentes como impurezas na amostra obtida. Esse entendimento é reforçado quando se analisa o espectro de Ae1 no modo negativo (figura 34).



**Figura 34** - Espectro de massas de Ae1 no modo negativo.

Como é possível observar na figura 33, além do sinal com massa 353.1877, correspondente ao de 355.2016 observado no modo de detecção positivo, são detectados outros sinais com alta intensidade, cuja detecção está de acordo com o resultado da análise da substância por CLAE, na qual se observou apenas 63,57 % de pureza de Ae1.

#### **4.9 Avaliação da citotoxicidade das frações alcalóidicas**

Para a avaliação da atividade citotóxica das amostras utilizou-se uma linhagem celular de mamíferos, HepG2 A16, procedente de um hepatoblastoma primário humano. A análise *in vitro* revelou baixa toxicidade das frações alcalóidicas de *A. excelsum* nas concentrações testadas. Os valores de CC<sub>50</sub> obtidos pela análise são apresentados na tabela 3.

**Tabela 3** – Concentrações citotóxicas (CC<sub>50</sub>) das frações alcaloídicas capazes de inibir *in vitro* 50% do crescimento de células HepG2.

Amostras	CC <sub>50</sub> (µg/mL)
FAlc <sub>1</sub>	264,95 ± 1,88
FAlc <sub>4</sub>	276,90 ± 16,53
FAlc <sub>7</sub>	319,83 ± 7,28
FAlc <sub>10</sub>	334,67 ± 9,99
Cloroquina	170,73 ± 6,31

\* Valor encontrado no Laboratório de Fitoquímica e Bioensaios (Faculdade de Farmácia – Universidade Federal de Minas Gerais).

Conforme a tabela 3, as frações de *Aspidosperma excelsum* revelaram-se menos citotóxicas que a cloroquina, fármaco padrão empregado no tratamento da malária, sendo necessária uma concentração maior das amostras para inibir *in vitro* o crescimento de 50 % das células.

#### **4.10 Análise da atividade do extrato e frações alcaloídicas frente ao *Trypanosoma cruzi***

Os dados obtidos pela avaliação da atividade das amostras frente ao *T. cruzi* foram considerados não convergentes, impossibilitando a elaboração de curvas dose-resposta e a determinação dos valores de IC<sub>50</sub> correspondentes.

#### **4.11 Análise da atividade do extrato e frações alcaloídicas frente a *Leishmania braziliensis* e *Leishmania chagasi***

Os valores de absorvância registrados para o extrato e suas frações alcaloídicas nas concentrações empregadas (0,5, 2, 8 e 32 µg/mL) permitiram calcular os percentuais de lise sobre as formas promastigotas de *L. braziliensis* e *L. chagasi*. Com esses dados foram montadas curvas dose-resposta que forneceram os valores de IC<sub>50</sub> das amostras frente aos parasitas, conforme apresentado na tabela 4.

**Tabela 4** – Valores de IC<sub>50</sub> do extrato e suas frações alcaloídicas frente a formas promastigotas de *L. braziliensis* e *L. chagasi*.

Amostras	IC <sub>50</sub> (µg/mL)	
	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. chagasi</i>
ELAe	-	607,7
FAlc <sub>1</sub>	5,114	3,417
FAlc <sub>4</sub>	8,699	2,692
FAlc <sub>7</sub>	17,14	5,449
FAlc <sub>10</sub>	51,12	4,284
FAlc <sub>14</sub>	77,81	25,12

Conforme mostra a tabela 4, as frações FAlc<sub>1</sub> e FAlc<sub>4</sub> se mostraram mais ativas sobre as espécies testadas, apresentando os menores valores de IC<sub>50</sub> em relação às demais. Em comparação à anfotericina B, substância empregada no tratamento das leishmanioses e testada por Pontin et al (2008) contra formas promastigotas de *L. braziliensis*, as frações FAlc<sub>1</sub>, FAlc<sub>4</sub> e FAlc<sub>7</sub> apresentaram uma forte atividade antiparasitária sobre essa espécie, revelando IC<sub>50</sub> de 5,114 µg/mL, 8,699 µg/mL e 17,14 µg/mL, respectivamente, valores menores que os obtidos para a anfotericina B, cujo valor foi 29,57 µg/mL.

A razão entre os valores de CC<sub>50</sub> e IC<sub>50</sub> das frações que apresentaram maior atividade (FAlc<sub>1</sub>, FAlc<sub>4</sub> e FAlc<sub>7</sub>), revela índice de seletividade de 51,81; 31,83 e 18,66, respectivamente; todos superiores a 3, valor que permite considerar as amostras como seletivas aos parasitas testados e, portanto, seguras (BÉZIVIN et al. 2003).

Quanto aos resultados da avaliação frente a *L. chagasi*, é possível observar que os valores de IC<sub>50</sub> foram ainda menores, o que sugere maior atividade das amostras sobre essa espécie. Todas as frações consideradas mais ativas (FAlc<sub>1</sub>, FAlc<sub>4</sub>, FAlc<sub>7</sub> e FAlc<sub>10</sub>) apresentaram IS superior a 58, o que as revela como amostras seletivas a *L. chagasi*. Os resultados obtidos reforçam o potencial leishmanicida do gênero *Aspidosperma*, previamente evidenciado por Ferreira et al (2004).

A atividade dessas amostras pode ocorrer por diversos mecanismos descritos na literatura, tais como alteração na permeabilidade da membrana do parasita, interferência em processos bioquímicos vitais ao protozoário e inibição enzimática,

mecanismos de ação descritos para drogas utilizadas atualmente no tratamento da leishmaniose (anfotericina B, glucantime e pentamidinas, respectivamente) (NORMAN et al. 1976; BOLARD et al. 1980; BRAY et al. 2003; RATH et al. 2003; SOARES-BEZERRA et al. 2004). Essa atividade pode ocorrer ainda por outros mecanismos, sendo necessária pra sua descrição a realização de análises adicionais.

Quando os resultados obtidos são comparados aos observados por Tanaka et al (2007) nota-se discordância em relação ao potencial das amostras testadas. Esses autores identificaram maior atividade leishmanicida no extrato básico (pH 10) de *A. ramiflorum*, atribuindo esse potencial aos alcalóides indólicos presentes na amostra. No presente trabalho, as frações com maior atividade frente às espécies testadas foram FAlc<sub>1</sub> e FAlc<sub>4</sub>, obtidas em meios ácido, que favorece à extração de substâncias não alcaloídicas, dentre elas, ácidos, bases fracas e fenóis (AUTERHOFF e KOVAR, 1985).

No entanto, como é possível observar no cromatograma de FAlc<sub>1</sub> e FAlc<sub>4</sub> por CCD, o fracionamento em pH ácido não impediu a extração de alcalóides, e a forte atividade das amostras pode estar relacionada à presença de substâncias alcaloídicas minoritárias, cujo coeficiente de basicidade (pK<sub>b</sub>) favoreça sua extração em meio ácido. Outra possibilidade é que ocorra sinergismo entre alcalóides extraídos e substâncias não alcaloídicas presentes, garantindo maior potencial leishmanicida a essas amostras. Conforme Varel (2002), o sinergismo ocorre quando a combinação de compostos é mais eficaz do que cada elemento isolado.

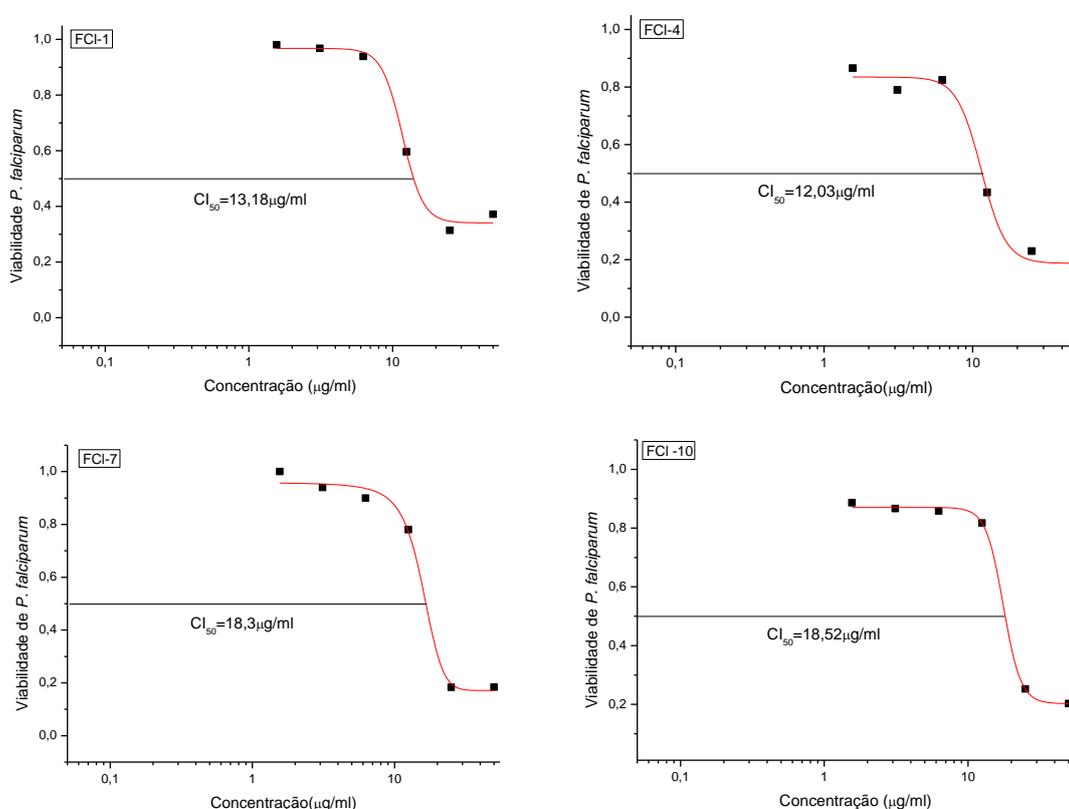
#### **4.12 Análise da atividade das frações alcaloídicas de *A. excelsum* frente ao *Plasmodium falciparum***

Os percentuais de redução do crescimento de *P. falciparum* resistente à cloroquina (W2) pelas frações alcaloídicas de *A. excelsum* nas concentrações de 25 e 50 µg/mL são apresentados na tabela 5. Como é possível observar, apenas a FAlc<sub>14</sub> apresentou percentual de redução inferior a 50% na menor concentração testada.

**Tabela 5** – Percentual de redução do crescimento de *P. falciparum* cloroquina-resistente (W2) na presença das frações alcaloídicas de *A. excelsum*.

Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	% de redução pelas frações				
	FAIc <sub>1</sub>	FAIc <sub>4</sub>	FAIc <sub>7</sub>	FAIc <sub>10</sub>	FAIc <sub>14</sub>
50	89	89	89	91	74
25	76	83	87	91	42

Devido aos percentuais de redução maiores que 50% apenas para as frações FAIc<sub>1</sub>, FAIc<sub>4</sub>, FAIc<sub>7</sub> e FAIc<sub>10</sub>, somente essas amostras foram analisadas quanto à citotoxicidade sobre células HepG2 e tiveram sua atividade frente ao *P. falciparum* determinada em seis novas concentrações. Essa análise possibilitou a montagem de curvas dose-resposta (figura 35) e a determinação dos valores de IC<sub>50</sub> de cada fração.



**Figura 35** – Curvas dose-resposta das frações alcaloídicas de *A. excelsum* frente ao *P. falciparum* (cepa W2) e valores de IC<sub>50</sub> correspondentes.

A determinação dos valores de IC<sub>50</sub> das frações permitiu classificar as frações alcaloídicas quanto à sua atividade frente ao *P. falciparum* resistente à cloroquina, conforme apresentado na tabela 6.

**Tabela 6** – Classificação da atividade das frações alcaloídicas de *A. excelsum* frente ao clone W2 (cloroquina-resistente) de *P. falciparum*, conforme os valores de IC<sub>50</sub> obtidos.

Amostras	IC <sub>50</sub> (µg/mL) - Média ± DP	Classificação
FAlc <sub>1</sub>	13,18 ±1,20	Ativa
FAlc <sub>4</sub>	12,03 ±0,48	Ativa
FAlc <sub>7</sub>	18,30 ±1,91	Moderadamente ativa
FAlc <sub>10</sub>	18,52 ±0,60	Moderadamente ativa
Cloroquina *	0,127±0,009	Muito ativa

\* Valor encontrado no Laboratório de Fitoquímica e Bioensaios (Faculdade de Farmácia – Universidade Federal de Minas Gerais).

Como é possível observar na tabela 6, as frações FAlc<sub>1</sub> e FAlc<sub>4</sub> apresentaram maior atividade antimalárica em comparação às demais frações. Esse resultado reforça o potencial antiparasitário das frações, que também se mostraram muito ativas frente à *L. braziliensis* e *L. chagasi*.

A atividade das frações sobre formas eritrocíticas pode estar relacionada à inibição da polimerização do heme, formado em função da degradação da hemoglobina pelo parasita. É o que ocorre com muitas substâncias que agem sobre estágios sanguíneos de *Plasmodium* (ROBERT et al. 2001). Outra possibilidade é que essas frações atuem como agentes pro-oxidantes, produzindo espécies reativas que inviabilizam o parasita, mecanismo utilizado pela artemisinina e seus derivados (MESHNICK et al. 1996).

O cálculo do índice de seletividade (IS) para as frações consideradas ativas, relacionando os dados de CC<sub>50</sub> e IC<sub>50</sub> das amostras, forneceu os valores que constam na tabela 7.

**Tabela 7** – Valores de CC<sub>50</sub>, IC<sub>50</sub> e IS das frações alcalóidicas de *A. excelsum*.

Amostras	CC <sub>50</sub> (µg/mL)	IC <sub>50</sub> (µg/mL)	IS
FAlc <sub>1</sub>	264,95	13,18	20,10
FAlc <sub>4</sub>	276,9	12,03	23,01
FAlc <sub>7</sub>	319,83	18,30	17,48
FAlc <sub>10</sub>	334,67	18,52	18,07
Cloroquina	170,73	0,127	1344,3

\* Valor encontrado no Laboratório de Fitoquímica e Bioensaios (Faculdade de Farmácia – Universidade Federal de Minas Gerais).

A tabela 7 mostra que todas as frações testadas apresentaram CC<sub>50</sub> pelo menos dezessete vezes maior que a IC<sub>50</sub> correspondente, revelando as amostras como não citotóxicas às células HepG2 e altamente seletivas ao *P. falciparum* (BÉZIVIN et al. 2003). É possível observar também que das quatro frações, FAlc<sub>1</sub> e FAlc<sub>4</sub> foram as mais ativas e seletivas ao parasita. No entanto, quando a seletividade das frações é comparada à da cloroquina, são observados valores inferiores ao do fármaco padrão, considerado como substância ideal principalmente devido à sua baixa toxicidade (AGUIAR, 2011).

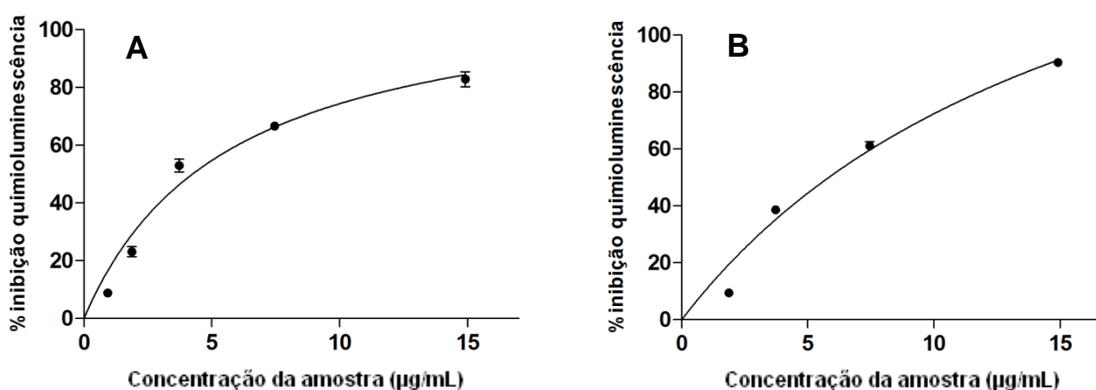
Conforme discutido anteriormente, a atividade das frações frente ao *P. falciparum* pode estar relacionada a alcaloides indólicos minoritários presentes nessas frações ou ao sinergismo entre essas substâncias e compostos não alcalóidicos presentes. A identificação dessa atividade reforça o potencial antimalárico da espécie, contribuindo para a validação de seu uso na fitoterapia popular para o tratamento de malária (PÉREZ, 2002; QUIQNARD, 2003; BARBOSA et al. 2003; PEREIRA et al. 2007; BARBOSA e PINTO, 2009), e corrobora dados da literatura referentes ao potencial antimalárico de espécies de *Aspidosperma*, tais como os descritos por Weninger et al (2001), Bourdy et al (2004), Mesquita et al (2007) e Dolabela et al (2012), que identificaram essa atividade em *A. quebracho blanco*, *A. megalocarpon*, *A. macrocarpon* e outras seis espécies do gênero, respectivamente.

#### 4.13 Avaliação da atividade pro/antioxidante do extrato e frações alcaloídicas de *Aspidosperma excelsum*

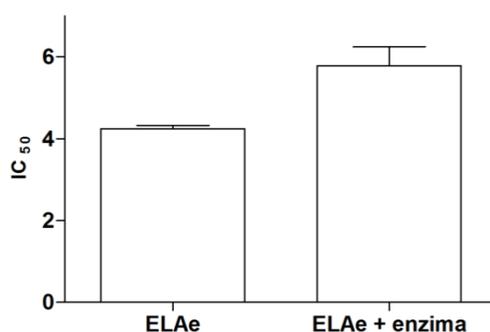
##### 4.13.1 ANÁLISE DO EXTRATO E FRAÇÕES ALCALOÍDICAS POR QUIMIOLUMINESCÊNCIA NO SISTEMA XANTINA/XOD/LUMINOL

A análise do extrato e frações alcaloídicas no sistema xantina/XOD/luminol revelou importante redução da quimioluminescência pelas amostras. A partir das leituras foi possível construir as curvas de % de inibição da quimioluminescência versus soluções de extrato ou frações alcaloídicas em diferentes concentrações (figuras 34 e 36).

O ELAe inibiu a quimioluminescência catalisada pela XOD de forma dose-dependente (figura 36A), apresentando  $IC_{50}$  de 4,24  $\mu\text{g/mL}$  de meio reacional. Quando o ELAe foi incubado com a XOD antes da adição da xantina (figura 36B), observou-se redução da capacidade do extrato em inibir a quimioluminescência gerada pelo sistema xantina/XOD/luminol, com aumento do valor do  $IC_{50}$  para 5,83  $\mu\text{g/mL}$  do meio reacional (figura 37).



**Figura 36** – Curvas de inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/XOD/luminol pelo ELAe sem incubação (A) e após incubação com XOD (B).

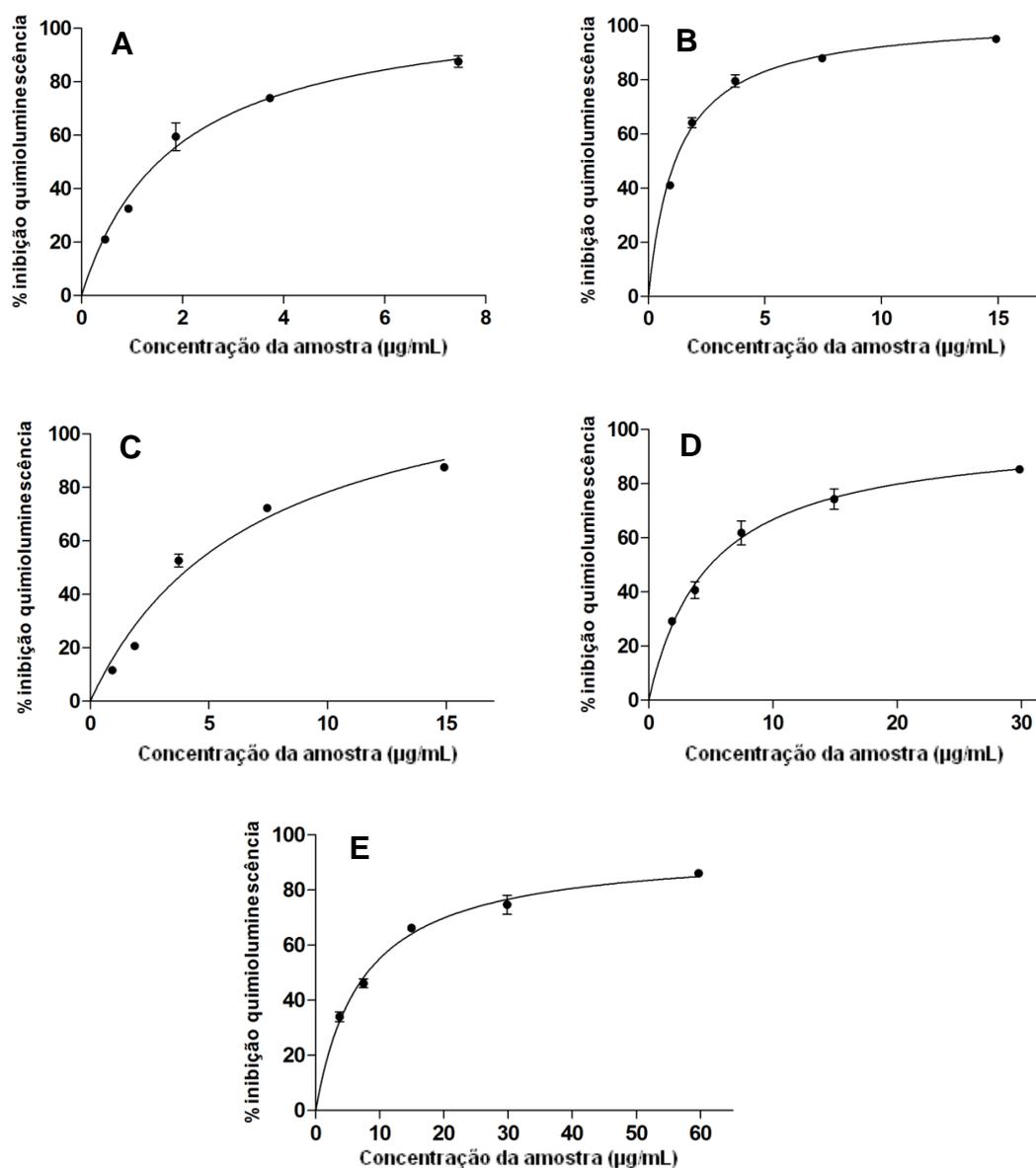


**Figura 37** – Comparação entre os valores de IC<sub>50</sub> obtidos para ELAe sem incubação e após a sua incubação com a XOD.

A análise estatística dos valores de IC<sub>50</sub> pelo teste "t de Student" (não pareado) revelou  $p < 0,05$ , o que possibilita dizer que eles apresentam diferença significativa. A alteração da IC<sub>50</sub> sugere que componentes do extrato podem ter ligado à XOD, mas não ao centro ativo da enzima, diminuindo sua interação com a xantina e ocasionando redução na liberação do ânion superóxido. Entretanto, a interação de componentes do extrato com a XOD não foi total, houve produção de ânion superóxido e o extrato foi capaz de sequestrar os radicais formados ocasionando a diminuição da quimioluminescência do sistema xantina/XOD/luminol. Este resultado sugere que o extrato possui a capacidade de sequestrar o ânion superóxido.

A comparação da IC<sub>50</sub> do ELAe (4,24 μg/mL) no sistema xantina/XOD/luminol aos valores observados para amostras ensaiadas no Laboratório de Controle de Qualidade da FCFRP (USP) revela o potencial antioxidante desse extrato. No trabalho desenvolvido por Oliveira (2007), por exemplo, no qual se avaliou o extrato alcoólico de própolis, uma alta atividade sequestradora de radicais superóxido foi observada, obtendo-se como IC<sub>50</sub> um valor superior ao observado para o ELAe, de aproximadamente 6 μg/mL. Ainda testando amostras provenientes de própolis, Fonseca (2007) encontrou como IC<sub>50</sub> 5,4 e 4,1 μg/mL para os extratos seco e fluido, respectivamente, valores semelhantes aos observados para o extrato analisado, o que sugere seu potencial antioxidante.

Como o ELAe, suas frações alcaloídicas também inibiram a quimioluminescência catalisada pela XOD de forma dose-dependente, revelando sua capacidade em capturar radicais superóxido. As curvas obtidas pela análise das frações são apresentadas na figura 38.



**Figura 38** – Curvas de inibição da quimioluminescência produzida no sistema xantina/XOD/luminol pelas frações FAlc<sub>1</sub> (A), FAlc<sub>4</sub> (B), FAlc<sub>7</sub> (C), FAlc<sub>10</sub> (D) e FAlc<sub>14</sub> (E).

Os valores de IC<sub>50</sub> obtidos para as frações FAlc<sub>1</sub>, FAlc<sub>4</sub>, FAlc<sub>7</sub>, FAlc<sub>10</sub> e FAlc<sub>14</sub> foram 1,52 µg/mL, 1,15 µg/mL, 4,19 µg/mL, 4,99 µg/mL e 8,033 µg/mL, respectivamente. A análise estatística empregando ANOVA oneway revelou  $p < 0,05$ , exceto para os valores observados pela análise das frações FAlc<sub>1</sub> e FAlc<sub>4</sub>, que não mostraram diferença significativa.

Os menores valores de IC<sub>50</sub> observados para as frações FAlc<sub>1</sub> e FAlc<sub>4</sub> revela maior capacidade antioxidante dessas amostras em comparação às demais, inclusive o ELAe. Essa atividade também é mais pronunciada quando comparada à dos extratos de própolis testados por Oliveira (2007) e Fonseca (2007), já que uma

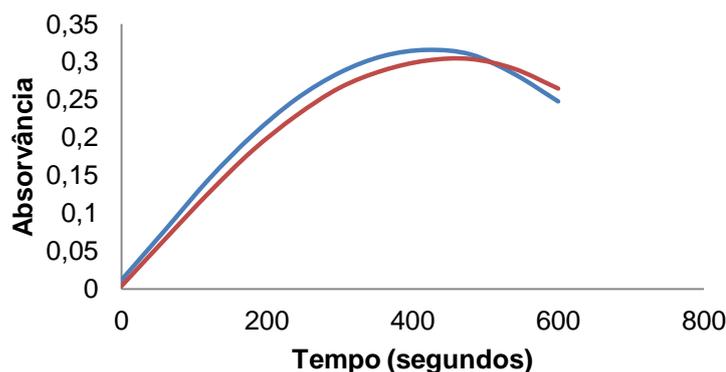
quantidade menor de amostra foi necessária para reduzir 50 % da quimioluminescência gerada no sistema.

Devido seu preparo em pH ácido, no qual a maior parte dos alcaloides está ligada, as frações FAlc<sub>1</sub> e FAlc<sub>4</sub> podem apresentar menor conteúdo alcaloídico, possibilitando uma extração maior de compostos não alcaloídicos, dentre eles, os compostos fenólicos (AUTERHOFF e KOVAR, 1985), que incluem os flavonóides, substâncias ricas em grupos hidroxila. Segundo Birt et al (2001), as potenciais ações antioxidantes dos flavonoides se devem à característica de reagirem e inativarem ânions superóxido, oxigênio singleto, radicais peróxido de lipídios, estabilizando radicais livres envolvidos no processo oxidativo através da hidrogenação ou complexação com espécies oxidantes.

Assim, a possível presença dos compostos fenólicos nas frações FAlc<sub>1</sub> e FAlc<sub>4</sub> justifica sua maior atividade sequestradora de radicais superóxido em comparação às frações FAlc<sub>7</sub>, FAlc<sub>10</sub> e FAlc<sub>14</sub>, e sugere que essa atividade esteja relacionada à sua composição não alcaloídica.

#### 4.13.2 ANÁLISE DA ATIVIDADE INIBITÓRIA DO EXTRATO SOBRE AS ENZIMAS XANTINA OXIDASE E SUPERÓXIDO DISMUTASE

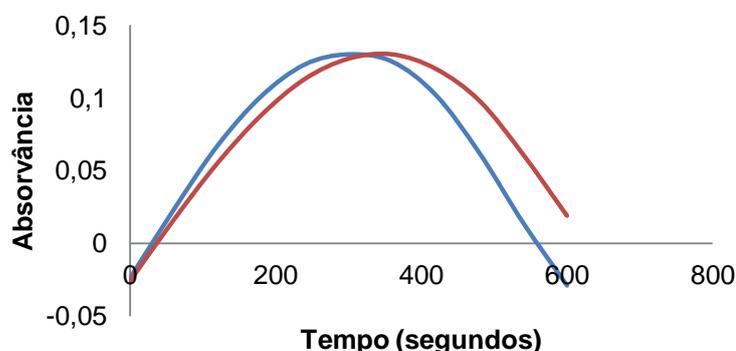
As curvas obtidas pela análise da atividade inibitória do ELAe sobre a XOD e a SOD são apresentadas nas figuras 39 e 40, respectivamente. É possível observar na figura 39 o perfil de absorção decorrente da redução do citocromo c por íons superóxido produzidos no sistema xantina/XOD, assim como o perfil após a adição do ELAe. Nota-se que a presença do extrato não promoveu alterações importantes no perfil de absorção do citocromo c reduzido, sugerindo que foram produzidos os radicais superóxido e, portanto, não houve inibição do ELAe sobre a XOD.



**Figura 39** – Perfis de absorção do citocromo c reduzido no sistema xantina/XOD na ausência (—) e na presença (—) do ELAe.

Esse resultado reforça os observados por quimioluminescência na análise da atividade antioxidante do ELAe, eliminando-se a hipótese de alteração na produção de radicais superóxido em função da inibição da XOD.

A figura 40 apresenta a curva correspondente ao perfil de absorção do citocromo c no sistema xantina/XOD após a adição da SOD. Observa-se que houve redução da absorvância produzida em comparação à figura 39. Essa diminuição ocorreu em função da dismutação do ânion superóxido pela SOD. A curva mostra ainda que a adição do ELAe no sistema não promoveu alterações importantes na atividade da SOD, sugerindo que essa enzima não tenha sido inibida pelo extrato.

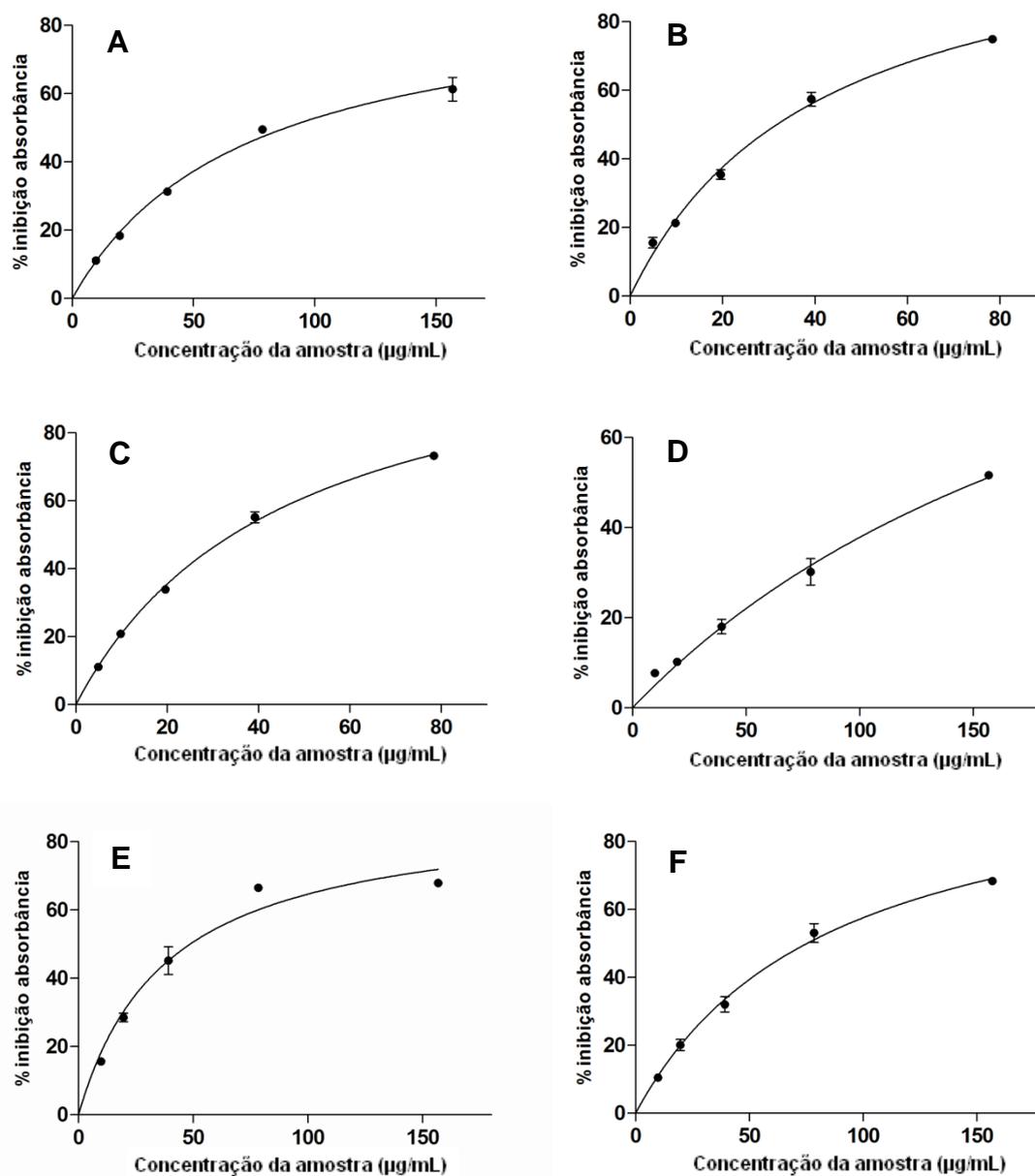


**Figura 40** – Perfis de absorção do citocromo c reduzido no sistema xantina/XOD após adição da SOD na ausência (—) e na presença (—) do ELAe.

A observação de que o ELAe não inibe a SOD representa uma característica importante para a amostra, já que essa enzima atua como um dos principais mecanismos antioxidantes do organismo, promovendo a dismutação do ânion superóxido para  $O_2$  e peróxido de hidrogênio, conforme revisado por Matés et al (1999).

## 4.13.3 ANÁLISE DO EXTRATO E FRAÇÕES PELO MÉTODO DO RADICAL DPPH

A análise do extrato e suas frações alcalóidicas frente ao radical DPPH revelou a capacidade das amostras em doar prótons, reforçando os resultados obtidos por quimioluminescência, que evidenciaram sua atividade antioxidante. A partir dos valores obtidos foram montadas curvas que são apresentadas na figura 41.



**Figura 41** – Curvas da medida da atividade doadora de H<sup>+</sup> ao radical DPPH pelo ELAe (A) e suas frações FAIc<sub>1</sub> (B), FAIc<sub>4</sub> (C), FAIc<sub>7</sub> (D), FAIc<sub>10</sub> (E) e FAIc<sub>14</sub> (F).

Os valores de IC<sub>50</sub> obtidos para o ELAe e suas frações alcaloídicas FAlc<sub>1</sub>, FAlc<sub>4</sub>, FAlc<sub>7</sub>, FAlc<sub>10</sub> e FAlc<sub>14</sub> foram: 88,17 µg/mL, 31,740 µg/mL, 34,3 µg/mL, 151,29 µg/mL, 48,709 µg/mL e 75,354 µg/mL, respectivamente. Esses valores mostraram diferença significativa ( $p < 0,05$ , ANOVA oneway), exceto as frações FAlc<sub>1</sub> e FAlc<sub>4</sub>, cujas IC<sub>50</sub> foram semelhantes.

Os resultados obtidos revelaram novamente FAlc<sub>1</sub> e FAlc<sub>4</sub> como as frações mais antioxidantes. Essa atividade apresentou-se mais pronunciada que aquela descrita por Fonseca (2007), que analisando extratos de própolis fluido e seco, encontrou IC<sub>50</sub> no valor de 70 µg/mL para essas amostras. A alta capacidade antioxidante de FAlc<sub>1</sub> e FAlc<sub>4</sub> pode estar relacionada à sua constituição química, possivelmente de natureza não alcaloídica.

A identificação da atividade antioxidante de FAlc<sub>1</sub> e FAlc<sub>4</sub>, frações com maior potencial antimalárico frente ao *P. falciparum* e leishmanicida sobre *L. braziliensis* e *L. chagasi* sugerem que a atividade dessas amostras ocorra por mecanismos diferentes da pró-oxidação, já que essas frações foram capazes de capturar e não produzir espécies reativas nas condições testadas.

Os compostos antioxidantes podem desempenhar um papel importante no tratamento de sintomas relacionados a danos causados por radicais gerados em decorrência do processo inflamatório presente em muitas doenças. Dentre esses danos estão as injúrias teciduais e de células corporais (GRACE, 1994; WALLE, 2004). Assim, a identificação da atividade antioxidante de derivados de *A. excelsum* reforça seu potencial para a obtenção de um fitoterápico que possa ser empregado no tratamento de doenças como leishmaniose e malária, já que além da atividade antiparasitária observada para a espécie, o uso de seus derivados possibilitaria a proteção dos tecidos do hospedeiro contra danos oxidativos.

## 5. CONCLUSÃO

A análise por CCD das frações de *Aspidosperma excelsum* revelou zonas características de alcaloides, evidenciando a presença dessa classe de metabólitos na espécie. A análise por CLAE permitiu caracterizar a presença da ioimbina na tintura e frações FAlc<sub>7</sub>, FAlc<sub>10</sub> e FAlc<sub>14</sub>.

Todas as frações alcaloídicas mostraram-se ativas frente à *Leishmania chagasi*. Na análise frente à *L. braziliensis* as frações FAlc<sub>1</sub>, FAlc<sub>4</sub> e FAlc<sub>7</sub> apresentaram valores de IC<sub>50</sub> menores que a anfotericina B, substância empregada no tratamento da leishmaniose. A avaliação da atividade das amostras frente ao *Plasmodium falciparum*, revelou FAlc<sub>1</sub> e FAlc<sub>4</sub> como ativas sobre o parasita. Todas as frações consideradas ativas mostraram-se também seletivas frente aos parasitas testados.

Observou-se atividade antioxidante do ELAe e suas frações alcaloídicas pelos métodos testados, e ausência de atividade inibitória do extrato sobre a XOD e SOD, característica importante, já que a última atua como um dos principais mecanismos antioxidantes do organismo. A atividade antioxidante de derivados de *A. excelsum* evidenciada no trabalho reforça seu potencial para o desenvolvimento de um fitoterápico que possa ser empregado no tratamento de doenças negligenciadas como a leishmaniose e a malária.

## 6. REFERÊNCIAS

AGUIAR, A. C. C. **Avaliação da atividade citotóxica e antimalárica de análogos da cloroquina**. 2011. 61 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia Química e molecular) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

ALI, S. S.; KASOJU, N.; LUTHRA, A.; SINGH, A.; SHARANABASAVA, H.; SAHU, A.; BORA, U. Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. **Food Research International**, v. 41, n. 1, p. 1-15, 2008.

ALLEN, J. R. F.; HOLMSTEDT, B. R. The simple  $\alpha$ -carboline alkaloids. **Phytochemistry**, v. 19, n. 8, p. 1573-1582, 1980.

ALVAR, J.; VÉLEZ, I. D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; BOER, M. D.; THE WHO LEISHMANIASIS CONTROL TEAM. **Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence**. Plos One, v. 7, n. 5, p. 1-12, mai. 2012.

ARGOLO, A. M.; FÉLIX, M.; PACHECO, R.; COSTA, J. **Doença de Chagas e seus principais vetores no Brasil**. Rio de Janeiro: Imperial Novo Milênio, 2008.

AUTERHOFF, H.; KOVAR, K. A. **Identifizierung von Arzneistoffen, Stas-Otto-Gang, Dünnschichtchromatographie, Farbreaktionen, UV- und IR-Spektroskopie**. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 1985.

BANERJEE J. N.; LEWIS, J. J.; SHAR, G. W. G. A preliminary note on the alkaloids of *Aspidosperma excelsum* bth. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 6, n. 1, p. 660-662, set. 1954.

BARBOSA, W. L. R.; PINTO, L. N. Etnofarmácia do município de Igarapé-Miri – PA. In: BARBOSA, W. L. R.; PINTO, L. N.; SILVA, W. B.; FERNANDES, J. G. S.; SOLER, O. **Etnofarmácia – Fitoterapia popular e ciência farmacêutica**. Belém: NUMA/UFGPA, 2009. p. 49-169.

BARROSO (1991) apud 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**, Botucatu, v.11, n.1, p.92-99, 2009.

BENOIN, P. R.; BURNELL, R. H.; RIEDINA, J. D. Alkaloids of *Aspidosperma excelsum* Benth. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 45, n. 7, p. 725-730, 1967.

BEZIVIN, C.; TOMASI, S.; LOHEZIC-LE DEVEHAT, F.; BOUSTIE, J. **Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines**. Phytomedicine, v. 10, p. 499-503, 2003.

BIRT D. F, HENDRICH S., WANG W. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 90, p. 157-177, 2001.

BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, v. 181, p. 1199-1200, 1958.

BOLARD, J.; SEIGNEURET, M.; BOUDET, G. Interaction between phospholipid bilayer membranes and the polyene antibiotic amphotericin b lipid state and cholesterol content dependence. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 599, p. 280-293, 1980.

BOLZANI, V. S.; SERUR, L. M.; MATOS, F. J. A.; GOLTLIEBS, O. R. Indole Alkaloid Evolution in Aspidosperma. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 15, n. 2, p. 187-200, 1987.

BORGATI, T. F. **Síntese e Atividade Antimalárica de Derivados 1,2,3-Triazólicos do Lupeol**. 2013. 108 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

BOSQUESI, P. L. **Planejamento, síntese e avaliação biológica de derivados furoxânicos e benzofuroxânicos potencialmente antichagásicos**. 2013. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas Campus Araraquara, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2013.

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, p. 269–277, 2004.

BRAGA, E. M.; FONTES, C. J. F. *Plasmodium* – Malária. In: NEVES, D. P.; MELO, A. L.; LINARDI, P. M.; VITOR, R. W. A. **Parasitologia humana**. 11. Ed. São Paulo: Atheneu, 2005. Capítulo 17. p. 143-161.

BRANDÃO et al (1985) apud 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, p. 269–277, 2004.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. **Portaria nº 971, de 03 de maio de 2006**. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde, Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006a.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006**. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006b.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Leishmaniose visceral grave: normas e condutas**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006c.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2. Ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2007.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Doenças negligenciadas: estratégias do Ministério da Saúde. **Revista de Saúde Pública**, v. 44, n. 1, p. 200-202, 2010a.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia prático de tratamento da malária no Brasil**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2010b.

BRAY, P. G.; BARRETT, M. P.; WARD, S. A.; KONING, H. P. Pentamidine uptake and resistance in pathogenic protozoa: past, present and future. **Trends in Parasitology**, v. 19, n. 5, Mai. 2003.

CHAPPUIS, F.; SUNDAR, S.; HAILU, A.; GHALIB, H.; RIJAL, S.; PEELING, R. W.; ALVAR, J.; BOELAERT, M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Microbiology**, v. 5, p. 873-882, nov. 2007.

CORDELL, G. A.; QUINN-BEATTIE, M. L.; FARNSWORTH, N. R. The Potential of Alkaloids in Drug Discovery. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 183-205, 2001.

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

COURA, J. R.; CASTRO, S. L. A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy. **Memorial do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, n. 1, p. 3-24, jan. 2002.

COURA, J. R.; DIAS, J. C. P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease - 100 years after its discovery. **Memorial do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, p. 31-40, 2009.

COURA, J. R.; Tripanosomose, doença de Chagas. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 55, n. 1, p. 30-33, jan./mar. 2003.

CROFT S. L.; COOMBS, G. H. Leishmaniasis – current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends in Parasitology**, v. 19, n. 11, p. 502-508, nov. 2003.

CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. H. Drug Resistance in Leishmaniasis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 1, p. 111-126, jan. 2006.

DEMICHELI, C.; FRÉZARD, F. Novas embalagens para medicamentos à base de antimônio usados no tratamento de leishmaniose e esquistossomose. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, n. 6, p. 24-30, jul. 2005.

DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazol dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **Journal of Immunological Methods**, v. 89, p. 271-277, 1986.

DEUTSCH, H. F.; EVENSON, M. A.; DRESCHER, P.; SPARWASSER, C.; MADSEN, P. O. Isolation and biological activity of aspidospermine and quebrachamine from an *Aspidosperma* tree source. **Journal Pharmacology and Biomedical Analysis**, v.12, p.1283-1287, 1994.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**. 3. Ed. John Wiley & Sons, 2009.

DOLABELA, M. F.; OLIVEIRA, S. G.; PERES, J. M.; NASCIMENTO, J. M. S.; 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.

DONKOR, I. O.; ASSEFA, H.; RATTENDI, D.; LANE, S.; VARGAS, M.; GOLDBERG, B.; BACCHI, C. Trypanocidal activity of dicationic compounds related to pentamidine. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 36, n. 6, p. 531-538, 2001.

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

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*. **Memorial do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, n. 3, p. 325-327, Mai 2004.

FOGLIO, M. A.; QUEIROGA, C. L.; SOUSA, I. M. O.; RODRIGUES, R. A. F. Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar. **Multiciência: Construindo a história dos produtos naturais**, out. 2006.

FONSECA, Y. M. **Desenvolvimento de formulações tópicas contendo extratos de própolis: estudos de estabilidade, liberação, permeação e retenção cutânea**. 2007. 169 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

FOURNET, A.; MUÑOZ, V. Natural Products as Trypanocidal, Antileishmanial and Antimalarial Drugs. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 2, n. 11, p. 1215-1237, nov. 2002.

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

FRANCIS, S. E.; SULLIVAN, D. J.; GOLDBERG, D, E.; Hemoglobin metabolism in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Annual Review of Microbiology**, v. 51, p. 97-123, 1997.

FRASSON, A. P.; BARLETTE, A. G.; DALPIZOLO, C.; SAUTER, I. P.; MACEDO, A. J.; TASCA, T. Estratégias e desafios no combate à malária. **Revista Liberato**, Novo Hamburgo, v. 10, n. 14, p. 201-208, jul./dez. 2009.

FREITAS, L. F.; CHAVES, G. C.; WANNMACHER, L.; OSORIO-DE-CASTRO, C. G. S. Malária não complicada por *Plasmodium vivax* e *P. falciparum* no Brasil: evidências sobre fármacos isolados e associações medicamentosas empregados em esquemas terapêuticos recomendados pelo protocolo terapêutico oficial. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 23, n. 10, p. 2285-2294, out. 2007.

GENARO, O.; REIS, A. B. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: NEVES, D. P.; MELO, A. L.; LINARDI, P. M.; VITOR, R. W. A. **Parasitologia humana**. 11. Ed. São Paulo: Atheneu, 2005. Capítulo 8. p. 47-64.

GILBERT, B. Um estudo fitoquímico do gênero *Aspidosperma*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 38, p. 315-319, 1966.

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

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 1, p. 71-80, jan-fev. 2003.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.

GRACE, P. A. Ischaemia-reperfusion injury. **British Journal Surgery**, v. 81, p. 637-647, 1994.

HENRIQUES, A. T.; KERBER, V. A.; MORENO, P. R. H. Alcalóides: generalidades e aspectos básicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCKENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTEZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Florianópolis: UFSC, 2000. p. 641-656.

HIRAYAMA, O.; TAKAGI, M.; HUKUMOTO, K.; KATOH, S. Evaluation of antioxidant activity by chemiluminescence. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 247, p. 237-241, 1997.

HOMBHANJE, F. W.; LINGE, D.; SAWERI, A.; KUANCH, C.; JONES, R.; TORASO, S.; GEITA, J.; MASTA, A.; KEVAU, I.; HIAWALYER, G.; SAPURI, M. Artemisinin-naphthoquine combination (ARCO™) therapy for uncomplicated falciparum malaria in adults of Papua New Guinea: A preliminary report on safety and efficacy. **Malaria Journal**, v. 8, n. 196, p. 1-9, 2009.

HOTEZ, P. A New Voice for the Poor. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 1, n. 1: e77, p. 1, out. 2007.

HOTEZ, P. J.; MOLYNEUX, D. H.; FENWICK, A.; OTTESEN, E.; SACHS, S. E.; SACHS, J. D. Incorporating a Rapid-Impact Package for Neglected Tropical Diseases with Programs for HIV/AIDS, Tuberculosis, and Malaria – A comprehensive pro-poor health policy and strategy for the developing world. **PLoS Medicine**, v. 3, n. 5, p. 576-584, maio 2006.

KRUNGKRAI, S. R.; YUTHAVONG, Y. The antimalarial action on *Plasmodium falciparum* of qinghaosu and artesunate in combination with agents which modulate oxidant stress. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 81, p. 710-714, 1987.

KRAMP, K. L.; DEWITT, K.; FLORA, J. W.; MUDDIMAN, D. C.; SLUNT, K. M.; HOUSTON, T. A., Derivatives of pentamidine designed target the Leishmania lipophosphoglycan. **Tetrahedron Letters**, v. 46, p. 695-698, 2005.

LANA, M.; TAFURI, W. L. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. In: NEVES, D. P.; MELO, A. L.; LINARDI, P. M.; VITOR, R. W. A. **Parasitologia humana**. 11. Ed. São Paulo: Atheneu, 2005. Capítulo 11. p. 85-108.

LOPES, J. F. **Ioimbina e uleína isolados de *Himatanthus lancifolius* (Muell. Arg.) Woodson, Apocynaceae**. 2008. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

MAKLER, M. T.; HINRICHS, D. J. Measurement of the lactate dehydrogenase activity of *Plasmodium falciparum* as an assessment of parasitemia. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 48, p. 205-210, 1993.

MALAFAIA, G. A. importância do encorajamento de estudos sobre as doenças tropicais negligenciadas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 5, p. 609-610, set/out 2009.

MARQUES, M. F. S.; KATO, I.; LEITÃO-FILHO, H. F.; REIS, F. A. M. Indole alkaloids from *Aspidosperma ramiflorum*. **Phytochemistry**, v. 41, n. 3, p. 963-967, 1996.

MACCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase. **The Journal of Biological Chemistry**, USA, v. 243, p. 5753-5760, 1968.

MEJIA e RENGIFO (2000) apud 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**, Botucatu, v. 11, n. 1, p. 92-99, 2009.

MESHNICK, S. R.; TAYLOR, T. E.; KAMCHONWONGPAISAN, S. Artemisinin and the antimalarial endoperoxides: from herbal remedy to targeted chemotherapy. **Microbiological Reviews**, v. 60, n. 2, p. 301-315, jun. 1996.

MESQUITA, M. L.; GRELLIER, 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, p. 165-170, 2007.

MITAINE-OFFER, A. C.; SAUVAIN, M.; VALENTIN, A.; CALLAPA, J.; MALLIÉ, M.; ZÈCHES-HANROT, M. Antiplasmodial activity of *Aspidosperma* indole alkaloids. **Phytomedicine**, v. 9, p. 142-145, 2002.

MORALES, F. Estudios en las Apocynaceae neotropicales XIX: La familia Apocynaceae S. STR. (Apocynoideae, Rauvolfioideae) de Costa Rica. **Darwiniana**, v. 43, n. 1-4, p. 90-191, 2005.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**. v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MUELLAS-SERRANO, S.; NOGAL-RUIZ, J. J.; GÓMEZ-BARRIO, A. Setting of a colorimetric method to determine the viability of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Parasitology Research**, v. 86, p. 999-1002, 2000.

NKHOMA, S.; MOLYNEUX, M.; WARD, S. *In vitro* antimalarial susceptibility profile and PRCRT0PFMDR-1 genotypes of *Plasmodium falciparum* field isolates from Malawi. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 76, n. 6, p. 1107-1112, 2007.

NOIREAU, F.; CARBAJAL-DE-LA-FUENTE, A. L.; LOPES, C. M.; DIOTAIUTI, L. Some considerations about the ecology of Triatominae. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 77, n. 3, p. 431-436, 2005.

NORMAN, A. W.; SPIELVOGEL, A. M.; WONG, A. G. Polyene antibiotic-sterol interaction. **Advances in Lipid Research**, v. 14, p. 127-170, 1976.

OLIVEIRA, F. M. **Desenvolvimento de formulações tópicas fotoquimioprotetoras contendo extrato de própolis: estudo de estabilidade, permeação e retenção cutânea *in vitro* e de eficácia *in vivo***. 2007. 155 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

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**, Botucatu, v. 11, n. 1, p. 92-99, 2009.

OLIVEIRA-FERREIRA, J.; LACERDA, M. V. G.; BRASIL, P.; LADISLAU, J. L. B.; TAUIL, P. L.; DANIEL-RIBEIRO, C. T. Malaria in Brazil: an overview. **Malaria Journal**, v. 9, n. 115, p. 1-15, 2010.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **World Malaria Report 2011**. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, 2011.

PALMER, K. H. The alkaloids of *Aspidosperma oblongum* A.D.C. **Canadian Journal of Chemistry**. v. 42, p. 1760-1761, 1964.

PASCUAL, C.; GONZALEZ, R.; TORRICELLA, R. G. Scavenging action of propolis extract against oxygen radicals. **Journal of Ethnopharmacology**, Clare, v. 41, p. 9-13, 1994.

PAULA, F. R.; SERRANO, S. H. P.; TAVARES, L. C. Aspectos mecanísticos da bioatividade e toxicidade de nitrocompostos. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 1013-1020, 2009.

PEARSON, R. D.; SOUSA, A. Q. Clinical Spectrum of Leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 22, p. 1-131, jan. 1996.

PEREIRA, M. M.; JÁCOME, R. L. R. P.; ALCÂNTARA, A. F. C.; ALVES, R. B.; RASLAN, D. S. Alcalóides indólicos isolados de espécies do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae). **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 970-983, 2007.

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

PONTIN, K.; SILVA-FILHO, A. A.; SANTOS, F. F.; SILVA, M. L. A.; CUNHA, W. R. A.; NANAYAKKARA, D.; BASTOS, J. K.; ALBUQUERQUE, S. *In vitro* and *in vivo* antileishmanial activities of a Brazilian green propolis extract. **Parasitology Research**, v. 103, p. 487-492, 2008.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **The Lancet**, v. 1, p. 92-100, set. 2001.

QUIGNARD, E. L. J. Screening of plants found in Amazonas state for lethality towards brine-shrimp. **Acta Amazonica**, v. 33, p. 93-104, 2003.

RATH, S.; TRIVELIN, L. A.; IMBRUNITO, T. R.; TOMAZELA, D. M.; JESÚS, M. N.; MARZAL, P. C. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 550-555, 2003.

RIVAS, P.; CASSELS, B. K.; MORELLO, A.; REPETTO, Y. Effects of some beta-carboline alkaloids on intact *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Comparative Biochemistry and Physiology. Parte C Pharmacology, Toxicology and Endocrinology**, v. 122, n. 1, p. 27-31, jan. 1999.

ROBERT, A.; BENOIT-VICAL, F.; DECHY-CABARET, O.; MEUNIER, B. From classical antimalarial drugs to new compounds based on the mechanism of action of artemisinin. **Pure and Applied Chemistry**, v. 73, n. 7, p. 1173–1188, 2001.

RODRIGUES, H. G.; DINIZ, Y. S.; FAINE, L. A.; ALMEIDA, J. A.; FERNANDES, A. A. H.; NOVELLI, E. L. B. Nutritional supplementation with natural antioxidants: effect of rutin on HDL-cholesterol concentration. **Revista de Nutrição**, v. 16, n. 3, p. 315-320, jul./set., 2003.

RODRÍGUEZ, A. M.; CAMARGO, J. R.; GARCÍA, F. J. B. Actividad in vitro de la mezcla de alcaloides de *Ervatamia coronária* (Jacq) Staff. Apocynaceae sobre

amastigotes de *Leishmania braziliensis*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 3, p. 350-355, jul./set. 2008.

RÜEGG, T.; CALDERÓN, A. I.; QUEIROZ, E. F.; SOLÍS, P. N.; MARSTON, A.; RIVAS, F.; ORTEGA-BARRÍA, E.; HOSTETTMANN, K.; GUPTA, M. P. 3-Farnesyl-2-hydroxybenzoic acid is a new anti-*Helicobacter pylori* compound from *Piper multiplinervium*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, p. 461-467, 2006.

SÁ, S. M. **Avaliação da atividade antimalárica de substâncias obtidas de espécies vegetais nativas ou endêmicas do semi-árido brasileiro e derivados sintéticos**. 2011. Tese (Doutorado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) - Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2011.

SANTOS, M. A. MARQUES, R.C.; FARIAS, C. A.; VASCONCELOS, D. M.; STEWART, J. M. COSTA, D. L.; COSTA, C. H. N. Predictors of an unsatisfactory response to pentavalent antimony in the treatment of American visceral leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, p. 629-633, 2002.

SILVA, M. N.; FERREIRA, V. F.; SOUZA, M. C. B. V. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na  $\beta$ -lapachona e derivados. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 407-416, mai./jun. 2003.

SILVA, B. N. M.; BASTOS, R. S.; SILVA, B. V.; PINTO, A. C. Síntese de 5-nitro-isatina e 5-cloro-isatina a partir da isonitrosoacetanilida. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2279-2282, 2010.

SLATER, A. F.; SWIGGARD, W. J.; ORTON, B. R.; FLITTER, W. D.; GOLDBERG, D. E.; CERAMI, A.; HENDERSON, G. B. An iron carboxylate bond links the heme units of malária pigment. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 88, n. 2, p. 325-329, jan. 1991.

SOARES-BEZERRA, R. J.; LEON, L.; GENESTRA, M. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 2, p. 139-149, abr./jun., 2004.

TANAKA, J. C. A.; SILVA, C. C.; FERREIRA, I. C. P.; MACHADO, G. M. C.; LEON, L. L.; OLIVEIRA, A. J. Antileishmanial activity of indole alkaloids from *Aspidosperma ramiflorum*. **Phytomedicine**, v. 14, p. 377-380, 2007.

TOCHER, J. H. Reductive activation of nitroheterocyclic compounds. **General Pharmacology**, v. 28, n. 4, p. 485-487, 1997.

TORRES, Z. E. S.; SILVEIRA, E. R.; SILVA, L. F. R.; LIMA, E. S.; VASCONCELLOS, M. C.; UCHOA, D. E. A.; BRAZ-FILHO, R.; POHLIT, A. M. Chemical Composition of *Aspidosperma ulei* Markgr. and Antiplasmodial Activity of Selected Indole Alkaloids. **Molecules**, v. 18, p. 6281-6297, 2013.

TRACY, J. W.; WEBSTER JR, L. T. Fármacos utilizados no tratamento de protozooses: malária. In: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; MOLINOFF, P. B.; RUDDON, R. W.; GILMAN, A. G. **Goodman e Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica**. 9. Ed. Rio de Janeiro: MacGraw-Hill, 1996. p. 709-724.

TROPICOS. Disponível em: <<http://www.tropicos.org/Name/1800114?tab=synonyms>>. Acesso em: 05 mar. 2012.

TROUILLER, P.; OLLIARO, P.; TORREELE, E.; ORBINSKI, J.; LAING, R.; FORD, N. Drug development for neglected diseases: a deficient market and a public-health policy failure. **The Lancet**, v. 359, p. 2188-2194, jun 2002.

VAREL, V. H. Carvacrol and thymol reduce swine waste odor and pathogens: stability of oils. **Current Microbiology**, v. 44, p. 38-43, 2002.

VAROTTI F. P., BOTELHO A. C., ANDRADE A. A., DE PAULA R. C., FAGUNDES E. M., VALVERDE A., MAYER L. M., MENDONÇA J. S., DE SOUZA M. V., BOECHAT N., KRETTLI A. U. Synthesis, antimalarial activity and intracellular targets of mefas, a new hybrid compound derived from mefloquine and artesunate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, p. 3868-3874, 2008.

VEGA, C.; ROLÓN, M.; MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ, A. R.; ESCARIO, J. A.; GÓMEZ-BARRIO, J. A. A new pharmacological screening assay with *Trypanosoma cruzi* epimastigotes expressing *b*-galactosidase. **Parasitology Research**, v. 95, p. 296-298, 2005.

VERPOORTE, R.; KOS-KUYCK, E.; TSOI, A. T. A.; RUIGROK, C. L. M.; JONG, G.; SVENDSEN, A. B. Medicinal Plants of Surinam III: Antimicrobially Active Alkaloids from *Aspidosperma excelsum*. **Planta medica**, v. 48, p. 283-289, 1983.

WAGNER, H; BLADT, S. **Plant drug analysis: A thin layer chromatography atlas**. 2 Ed. Springer, 2001.

WALLE, T. Flavonoids and isoflavones (phytoestrogens): absorption, metabolism and bioactivity. **Free radical biology and medicine**. v. 36, n. 7, p. 829-837, 2004.

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

WERNECK, G. L.; HASSELMANN, M. H.; GOUVÊA, T. G. Panorama dos estudos sobre nutrição e doenças negligenciadas no Brasil. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 16, n. 1, p. 39-62, 2011.

WHO. Chagas disease (American trypanosomiasis) fact sheet (revised in June 2010). **Weekly Epidemiological Record**, v. 85, p. 334-336, 2010.

WOODSON R. E. Studies in the Apocynaceae. VIII. An interim revision of the Genus *Aspidosperma* Mart. & Zucc. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 38, n. 2, p. 119-204, mai. 1951.

YAMEY, G. The world's most neglected diseases – Ignored by the pharmaceutical industry and by public-private partnerships. **BMJ**, v. 325, p. 176-7, jul. 2002.