



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

**ESTUDO FITOQUÍMICO, AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE
ORAL AGUDA E DA ATIVIDADE ANTIMALÁRICA *IN VITRO*
E *IN VIVO* DAS CASCAS DE *PARAHANCORNIA*
FASCICULATA (POIR.) BENOIST (APOCYNACEAE)**

Adreanne Oliveira da Silva

Belém-PA
2013

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

**ESTUDO FITOQUÍMICO, AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE
ORAL AGUDA E DA ATIVIDADE ANTIMALÁRICA *IN VITRO*
E *IN VIVO* DAS CASCAS DE *PARAHANCORNIA*
FASCICULATA (POIR.) BENOIST (APOCYNACEAE)**

Autor: Adreanne Oliveira da Silva

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Fani Dolabela

Co-Orientadora: Prof. Dr.^a Alaíde Braga de Oliveira

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

Belém-PA
2013

FOLHA DE APROVAÇÃO

Adreanne Oliveira da Silva

ESTUDO FITOQUÍMICO, AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE ORAL AGUDA E DA ATIVIDADE ANTIMALÁRICA *IN VITRO* E *IN VIVO* DAS CASCAS DE *PARAHANCORNIA FASCICULATA* (POIR.) BENOIST (APOCYNACEAE)

Dissertação apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Pará para obtenção do título de mestre do PPGCF. Área de concentração: Fármacos e Medicamentos.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Profa. Dra. Maria Fâni Dolabela

Instituição: Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Pará.
Orientadora

Ass: _____

Profa. Dra. Alaíde Braga de Oliveira

Instituição: Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais.

Ass: _____

Prof. Dr. Sandro Percário

Instituição: Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Pará.

Ass: _____

Prof. Dr. Flávio de Vasconcelos (suplente)

Instituição: Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Pará.

Ass: _____

Belém- PA
2013

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Ludilcio Serrão da Silva e Carmem do Socorro Oliveira da Silva, minhas irmãs Andréa Oliveira da Silva e Amanda Oliveira da Silva e ao meu namorado e amigo Jorge Valentim Monteiro Abdelnor, com amor, admiração e gratidão por seu apoio, paciência, carinho, incentivo e amor incondicional. Muito obrigada por tudo, sem vocês não seria nada.

Não existem palavras que expressem a gratidão e o amor que sinto por todos vocês. Espero ser sempre motivo de orgulho e alegria para vocês. Dedico-lhes esta conquista com muita gratidão e amor.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar e acima de tudo agradeço a Deus por tudo de bom que me concede na vida, pela companhia, sabedoria e força constante em todos os momentos deste mestrado e da minha vida. Sem Ele, nada existiria. Não haveria razão e nem motivo. Obrigado meu Deus por estar sempre comigo não só neste trabalho, mas em todas as situações que acontecem em minha vida, me aconselhando e ensinando.

À minha orientadora Profa. Dra. Maria Fâni Dolabela pela sua orientação, força, sabedoria, ajuda, confiança e paciência durante a trajetória deste trabalho. Além das sugestões durante a realização e redação do mesmo.

À minha co-orientadora Profa. Dra. Alaíde Braga de Oliveira pela sua orientação, sabedoria, força, incentivo, apoio, confiança, carinho e paciência pelos três meses em que fiquei realizando a parte experimental deste trabalho em Belo Horizonte, além das sugestões durante a realização e redação deste trabalho.

À aluna de Doutorado Renata Cristina de Paula e Mestra Maria Fernanda do Nascimento, Faculdade de Farmácia/UFMG, pela ajuda, paciência e competência no ensinamento da parte experimental dos ensaios de atividade antimalárica *in vitro* e *in vivo*.

Aos meus queridos colegas Doutores Célio Brandão, Guilherme Pereira e Rodrigo de Pádua, Faculdade de Farmácia/UFMG, pela ajuda, apoio, compreensão, paciência e carinho nos testes fitoquímicos.

Aos colegas do Laboratório de Fitoquímica da UFMG, Marina Barbosa, Raquel Isidorio, Juliana de Oliveira, Keylla Ribeiro, Sarah Assis, Karla Evangelista, Bruna Malagoli, Ana Bárbara Dias, Tatiane Borgati e Marina Schiavo pela ajuda, apoio, parceria, carinho e maravilhoso acolhimento que todos tiveram comigo no período em que estive em Belo Horizonte.

Aos meus queridos amigos do Laboratório de Farmacologia da UFPA, Dayse Brandão, Michel Martins, Andreza Veiga, Edinilza Borges, Cynthia Quaresma, Amanda Almeida, Diele Magno, Natasha Costa, Raimundo Miranda, Guilherme Carvalho, Rosana Volpato, Camila Santos que sempre estiveram ao meu lado nos momentos bons ou ruins, por toda ajuda, apoio, carinho, compreensão, dedicação e atenção. Obrigada queridos por tudo.

Ao Laboratório de Toxicologia da UFPA na pessoa do professor Flávio Vasconcelos por nos liberar o laboratório para a realização de alguns experimentos e aos meus colegas Thyago Vilhena, Thiago Leite e Adriana Veiga pelo carinho, ajuda e apoio na realização dos ensaios.

Ao Laboratório de Fitoquímica da UFPA na pessoa do Prof. Dr. Wagner Barbosa por nos liberar o laboratório para a realização de alguns experimentos e aos seus colaboradores Jailton Nascimento, José Gomes, Amiraldo Perez e Myrth Soares pelo carinho, ajuda e apoio na realização dos ensaios.

A Central de Extração da UFPA por permitir que realizasse a o processo de moagem das cascas de *Parahancornia fasciculata*.

Aos meus pais Ludilcio Serrão da Silva e Carmem do Socorro Oliveira da Silva, irmãs Amanda Oliveira da Silva e Andréa Oliveira da Silva e ao meu namorado e amigo Jorge Valentim Monteiro Abdelnor, pela compreensão, paciência, carinho, dedicação, amor, respeito e apoio incondicional em toda a minha vida.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES – pela bolsa concedida. Ao Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Ministério da Saúde (MS), Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insusmos Estratégicos (SCTIE), Departamento de Ciência e Tecnologia (DECIT), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Pará (FAPESPA) pelo apoio financeiro para realização do trabalho.

A Universidade Federal do Pará pela Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Pará pelos ensinamentos de tantos anos.

As minhas queridas amigas Karla Fabiana Barroso e Mayara Sousa pelo apoio, carinho e amizade durante esse período de curso.

Aos funcionários da Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas pela ajuda sempre dispensada.

E a todos aqueles que contribuíram de modo direto ou indireto, na realização desta dissertação.

A presente dissertação faz parte do PRONEX- Rede malária. Processo nº **555655/2009-1-Rede de produtos naturais para a quimioterapia antimalárica, coordenado pela Profa. Alaíde Braga de Oliveira, Faculdade de Farmácia/UFMG** e com apoio das seguintes agências na UFPA: Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Ministério da Saúde (MS), Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos (SCTIE), Departamento de Ciência e Tecnologia (DECIT), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Maranhão (FAPEMA), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Mato Grosso (FAPEMAT), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Pará (FAPESPA), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Parte do trabalho de Fitoquímica e a avaliação da atividade antimalárica *in vitro* e *in vivo* foram desenvolvidos na forma de Mestrado Sanduíche no laboratório de Fitoquímica, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, sob a orientação da Profa. Dra. Alaíde Braga de Oliveira, com a colaboração do Dr. Geraldo Célio Brandão, da Doutoranda Renata Cristina de Paula, e da Bolsista CNPq/DTI2 MSc Maria Fernanda Alves do Nascimento. O período de realização do estágio do mestrado sanduíche foi de Setembro a Dezembro de 2011.

RESUMO

SILVA, A. O. **Estudo fitoquímico, avaliação da toxicidade oral aguda e da atividade antimalárica *in vitro* e *in vivo* das cascas de *Parahancornia fasciculata* (Poir.) Benoist (Apocynaceae).** 2013. 137f. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Pará, Belém-PA, 2013.

Parahancornia fasciculata (Poir.) Benoist (Apocynaceae), também conhecida como *Parahancornia amapa* (Hub.) Ducke, é uma espécie vegetal empregada popularmente no tratamento da malária, infecções no útero, gastrite, anemia, problemas respiratórios, entre outros. Os objetivos do presente trabalho foram realizar o estudo fitoquímico, avaliar a toxicidade oral aguda e a atividade antimalárica *in vitro* e *in vivo* de extratos, frações e substância isolada obtidas a partir de cascas do caule de *P. fasciculata*. Foram realizados dois tipos de extrações com o pó das cascas de *P. fasciculata*, por maceração / percolação, com etanol 96°GL e diclorometano, esta última tendo sido realizada a com o pó das cascas alcalinizado com hidróxido de amônio, obtendo-se os extratos secos EEPF e EDAPF, respectivamente. Uma terceira extração foi realizada a partir do EEPF por aquecimento sob refluxo, sucessivamente, com Hex:DCM (1:1), AcOEt:DCM (1:1) e AcOEt. EEPF foi, também, submetido a fracionamento por extrações ácido-base resultando nas frações de neutros (EEPFN) e de alcalóides (EEPFA). A prospecção fitoquímica realizada com o EEPF foi desenvolvida por CCD em cromatoplaças de sílica gel tendo sido detectada a presença de triterpenos, esteróides, heterosídeos flavônicos, saponinas, polifenóis, taninos, heterosídeos antracênicos e heterosídeos cardiotônicos. EDAPF foi submetido à cromatografia em coluna de sílica gel. Foram recolhidas 30 frações sendo que as frações Fr1-3, Fr4, Fr5-7 e Fr11 concentraram a maior parte da massa do extrato cromatografado. Da Fr5-7 foi isolada uma mistura de ésteres do lupeol que representam os componentes majoritários do EDAPF. Esta fração passou por um processo de hidrólise alcalina e o produto obtido (Fr5-7Hid) foi analisado por espectrometrias no IV, RMN de ^1H e ^{13}C e foi identificado como o triterpeno lupeol. A fração insolúvel em AcOEt obtida a partir do EEPF, por aquecimento sob refluxo, apresentou resultado positivo para o teste de proantocianidinas e foi submetido a doseamento desta classe de metabólitos. Os resultados foram expressos em porcentagem dos teores para a amostra não diluída ($10,46 \pm 0,3419\%$), amostra diluída a 1:10 ($9,94 \pm 0,1598\%$) e amostra diluída a 1:100 ($10,55 \pm 0,9299\%$). A avaliação da atividade antiplasmódica *in vitro* em culturas de cepas W2 de *Plasmodium falciparum* foi realizada pelo teste da Proteína II Rica em Histidina (HRP-II) tendo sido testados EEPF, EEPFN, EEPFA, Fr1-3, Fr4, Fr5-7 (ésteres do lupeol), Fr11 e o Fr5-7Hid (lupeol). Os melhores resultados obtidos foram para EEPF, EEPFA E EEPFN ($\text{Cl}_{50} = \sim 50 \mu\text{g/mL}$) sendo considerados moderadamente ativos. As demais amostras apresentaram $\text{Cl}_{50} > 50 \mu\text{g/mL}$ e foram consideradas inativas. Realizou-se também a avaliação da atividade antimalárica *in vivo* em camundongos fêmeas suíços infectados com cepas ANKA de *P. berghei* com o EEPF e o EEPF-HEX:DCM (1:1) em concentrações de 500, 250 e 125mg/kg de peso. EEPF foi parcialmente ativo, somente no 8° dia, em todas as concentrações. Já EEPF-HEX:DCM (1:1) foi parcialmente ativo na dose de 500mg/kg de peso e nas demais doses foi inativo. O teste de toxicidade oral aguda foi realizado em camundongos fêmeas suíços, pelo método da dose fixa (5.000mg/kg), com EEPF e não apresentou nenhum sinal de toxicidade evidente, o

que foi confirmado pela ausência de alterações nos exames anátomo-histopatológicos realizados.

Palavras-chave: Apocynaceae, *Parahancornia fasciculata*, Fitoquímica, Ésteres do lupeol, Lupeol, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium berghei*, Atividade antiplasmódica *in vitro*, Atividade antimalárica *in vivo*, Toxicidade oral aguda.

ABSTRACT

SILVA, A. O. **Phytochemistry, acute oral toxicity, *in vitro* and *in vivo* antimalarial activity from the trunk bark of *Parahancornia fasciculata* (Poir.) Benoist (Apocynaceae).** 2013. 137f. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Pará, Belém-PA, 2013.

Parahancornia fasciculata (Poir.) Benoist (Apocynaceae), also known as *Parahancornia amapa* (Hub.) Ducke is a species used in the treatment of malaria, uterus infections, gastritis, anemia, respiratory problems, among other ailments. The objectives of this study were to carry out the phytochemical study of the trunk bark from *P. fasciculata*, to evaluate the *in vitro* and *in vivo* antimalarial activity as well as the acute oral toxicity of extracts and fractions from this plant species. The powder bark of *P. fasciculata* was submitted to extractions by maceration/percolation with ethanol 96% and with dichloromethane after alkalization of the bark powder affording the dry extracts EEPF and EDAPF, respectively. EEPF underwent two different re-extractions: 1) acid-base extractions affording the neutral (EEPFN) and alkaloidal fractions (EEPFA) and 2) heating under reflux with different solvents, leading to the fractions EEPF-DCM:HEX (1:1), EEPF-DCM: AcOEt (1:1) and EEPF-insoluble in AcOEt. Phytochemical screening of EEPF by TLC revealed the presence of triterpenes and steroids, flavonoid heterosides, saponins, polyphenols, tannins, anthracene heterosides and cardiotoxic heterosides. EDAPF was submitted to chromatography through a silica gel column to give 30 fractions of which Fr1-3, Fr4, Fr5-7 and Fr11 represented most of the extract that was chromatographed. Fr5-7 led to the isolation of a mixture of esters of lupeol which are the major components of this extract. Saponification of this fraction afforded Fr5-7Hid that was analyzed by IV, ¹H and ¹³CNMR and was identified as the triterpene lupeol. The insoluble AcOEt fraction derived from re-extraction of EEPF gave a positive test for proanthocyanidins which were quantitatively determined and the results were expressed in percentage for the content of these metabolites in an undiluted sample (10,46 ± 0,3419 %), a 1:10 diluted sample (9,94 ± 0,1598 %) and a 1:100 diluted sample (10,55 ± 0,9299 %). The evaluation of the antiplasmodial activity *in vitro* was carried out against W2 strains of *Plasmodium falciparum* by the assay of the Histidine-Rich Protein II (HRPII) with EEPF, EEPFN, EEPFA, Fr1-3, Fr4, Fr5-7 (lupeol esters), Fr11 and Fr5-7Hid (lupeol). The best result was obtained for EEPF, EEPFA, EEPFN (CI₅₀ = ~ 50 µg / mL) that can be considered as moderately active. The remaining samples showed CI₅₀ > 50 µg / mL and were considered inactive. The *in vivo* antimalarial activity was performed in Swiss female mice infected with ANKA strains of *Plasmodium berghei* with EEPF and EEPF-DCM:HEX (1:1) at concentrations of 500, 250 and 125mg/kg body weight. EEPF was partially active only on the 8th day in all concentrations tested while EEPF-DCM:HEX (1:1) was partially active at a dose of 500mg/kg and was inactive in the remaining doses. The acute oral toxicity test was determined for EEPF in Swiss female mice by the method of the fixed dose (5,000mg/kg) when no apparent signs of toxicity were observed what was confirmed by the absence of anatomic and histopathologic changes.

Keywords: Apocynaceae, *Parahancornia _olecular_e*, Phytochemistry, Lupeol esters, Lupeol, *In Vitro* Antiplasmodial Activity, *In Vivo* Antimalarial Activity, Acute Oral Toxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Ciclo biológico do parasito da malária humana.....	26
Figura 2:	<i>Parahancornia fasciculata</i> : árvore, folhas, frutos e casca.....	38
Figura 3:	Exsicata de <i>Parahancornia fasciculata</i>	39
Figura 4:	Fluxograma do processo de extração das cascas de <i>Parahancornia fasciculata</i> para obtenção dos extratos etanólico (EEPF) e em diclorometano (EDAPF).....	57
Figura 5:	Fluxograma do processo de extração ácido-base de <i>P. fasciculata</i>	61
Figura 6:	Coluna Cromatográfica do EDAPF no presente trabalho.....	62
Figura 7:	Perfil semelhante em CCD das frações 5, 6, 7 e ésteres do lupeol.	64
Figura 8:	Fluxograma da extração sob refluxo do Extrato Etanólico de <i>P. fasciculata</i>	66
Figura 9:	Esquema da placa de 96 poços utilizada nos ensaios para atividade antiplasmódica.....	73
Figura 10:	Fórmula da redução percentual de parasitemia da atividade antiplasmódica <i>in vitro</i>	76
Figura 11:	Cálculo do percentual de redução de parasitemia do <i>P. berghei</i> utilizando a regra de três simples.....	78
Figura 12:	Perfil em CCD do extrato etanólico de <i>P. fasciculata</i> (EEPF) para detecção de triterpenos e esteroides (vis.) e no UV _{365nm}	84
Figura 13:	Perfil em CCD do extrato etanólico de <i>P. fasciculata</i> (EEPF) para detecção de heterosídeos flavônicos no UV _{365nm}	85
Figura 14:	Perfil em CCD do extrato etanólico de <i>P. fasciculata</i> (EEPF) para detecção (vis.) de polifenóis e taninos	85
Figura 15:	Perfil em CCD do extrato etanólico de <i>P. fasciculata</i> (EEPF) para detecção de heterosídeos antracênicos UV _{365nm} e heterosídeos cardiotônicos (vis).....	86
Figura 16:	Perfil em CCD do extrato em diclorometano de <i>P. fasciculata</i> (EDAPF).....	88
Figura 17:	Perfil em CCD dos extratos EEPF- Hex:DCM (1:1) e EEPF- AcEtOH: DCM (1:1) para a detecção de triterpenos.....	89
Figura 18:	Perfil Cromatográfico em CLAE-DAD do extrato EEPF insol. AcOEt de <i>Parahancornia fasciculata</i> (100%).....	89
Figura 19:	Perfil em CCD das frações 1 a 7 para a detecção de triterpenos. Eluente: hexano: acetato de etila (8:2). Revelador: reagente de Liebermann-Burchard (LB).....	91
Figura 20:	Espectro de absorção molecular no infravermelho da Fração 5 – 7	93
Figura 21:	Espectro de absorção molecular no infravermelho da amostra de referência (ésteres do lupeol).....	93
Figura 22:	Perfil em CCD da Fr 5 – 7 Hid.....	95
Figura 23:	Espectro de absorção molecular no infravermelho do composto Fr5- 7 (lupeol).....	95
Figura 24:	Espectro de RMN de ¹ H do Lupeol (400 MHz, CDCl ₃).....	96
Figura 25:	Espectro de RMN 13C e DEPT-135 do Lupeol (400 MHz, CDCl ₃)..	97
Figura 26:	Espectro de absorção molecular no infravermelho da fração 11 solúvel (Fr11).....	99
Figura 27:	Curva de calibração do padrão cloreto de cianidina.....	101
Figura 28:	Amostras do extrato etanólico de <i>P. fasciculata</i> (EEPF) insolúvel	

	em AcOEt distribuídas na placa de 96 poços em triplicata.....	102
Figura 29:	Derivado sintético do lupeol X4Y10.....	109
Figura 30:	Atividade Antimalárica <i>in vivo</i> de EEPF e EEPF-DCM:HEX (1:1), testados nas concentrações de 500, 250 e 125mg/kg de peso e cloroquina 30mg/kg, medida pela redução da parasitemia (%) em relação ao grupo controle não tratado ($p < 0,05$).....	114

LISTA DE ESTRUTURAS QUÍMICAS

1	Ésteres do Lupeol	22
2	Lupeol.....	22
3	Quinina.....	28
4	Mefloquina.....	28
5	Cloroquina.....	29
6	Halofantrino.....	29
7	Artemisinina.....	29
8	Atovacona.....	29
9	Artemeter.....	30
10	Arteeter.....	30
11	Artesunato	30
12	Lapachol.....	30
13	Lumefantrina.....	31
14	Geissoschizolina.....	36
15	Geissoschizolina N4-óxido.....	36
16	1,2-desidrogeissoschizolina.....	36
17	Flavopereirina.....	36
18	3-O-(3'-hidroxieicosanol)lupeol.....	37
19	3-O –[(2'(tetracosiloxi)acetil]lupeol.....	37
20	3-O-[(1''-hidroxioctadeciloxi)-2'hidroxipropanol]lupeol.....	37
21	β -amirina.....	41
22	α -amirina.....	41
223	Derivado de ésteres acetilados.....	41
24	Derivado de ésteres acetilados.....	41
25	Derivado de Ésteres acetilados.....	41
26	Derivado de Ésteres de 3-O-acil-lupeol.....	41
27	Derivado de Ésteres de 3-O-acil-lupeol.....	41
28	Derivado de Ésteres de 3-O-acil-lupeol.....	41
29	Estigmasterol.....	43
30	β -sitosterol.....	43
31	β -sitostenona.....	43
32	Cornosídeo (Quinol de glucosídeo).....	44
33	Acetato de α -amirina.....	44
34	Acetato de β -amirina.....	44
35	Acetato de lupeol.....	44
36	Éster do lupeol (Substância 1).....	44
37	Éster do lupeol (Substância 3).....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Dados referentes à coluna cromatográfica em sílica gel do EDAPF (3,0 g).....	63
Tabela 2:	Frações que foram reunidas e submetidas ao perfil por CCD.....	64
Tabela 3:	Gradiente de eluição empregado nas análises dos extratos por CLAE para detecção de alcalóides.....	68
Tabela 4:	Gradiente de eluição empregado nas análises dos extratos por CLAE para detecção de outros metabólitos.....	69
Tabela 5:	Determinação do percentual de parasitemia através de estimativa para a contagem do número de hemácias totais por campo no microscópio óptico.....	71
Tabela 6:	Esquema utilizado no preparo das placas de amostras definitiva utilizadas nos ensaios.....	74
Tabela 7:	Critérios utilizados na avaliação da atividade antiplasmódica <i>in vitro</i>	76
Tabela 8:	Prospecção fitoquímica por CCD do extrato etanólico de <i>P. fasciculata</i> (EEPF), de acordo com a metodologia de Wagner <i>et al.</i> , 1984.....	84
Tabela 9:	Condições utilizadas na preparação dos extratos, massas do pó da planta, massas dos extratos e frações, e rendimentos dos processos extrativos.....	87
Tabela 10:	Dados sobre o fracionamento cromatográfico do extrato diclorometano alcalino (EDAPF), eluentes, massas das frações e rendimentos do processo de fracionamento.....	90
Tabela 11:	Frações que foram reunidas, suas massas (mg) e seus respectivos rendimentos (%).....	91
Tabela 12:	Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C para Lupeol (400 MHz, CDCl ₃).....	98
Tabela 13:	Média ± desvio padrão (DP) das absorvâncias a 540 nm das três determinações do EEPF ins. AcOEt sem diluir (amostra pura), EEPF ins. AcOEt diluído 1:10 (amostra diluída 1:10) e EEPF ins. AcOEt diluída 1:100 (amostra diluída 1:100), realizadas em triplicata.....	101
Tabela 14:	Resultados do doseamento de Proantocianidinas na fração insolúvel em acetato de etila (AcOEt) obtida a partir de extrações sob refluxo do extrato etanólico de <i>P. fasciculata</i>	102
Tabela 15:	Concentração Inibitória 50% (CI ₅₀) e classificação da atividade antiplasmódica do extrato etanólico bruto, extrato em diclorometano de <i>P. fasciculata</i> (EDAPF), frações da coluna do EDAPF e cloroquina em testes <i>in vitro</i> em culturas de <i>Plasmodium falciparum</i> (W2).....	106
Tabela 16:	Percentuais de inibição do crescimento parasitário em ensaios <i>in vitro</i> em culturas de <i>plasmodium falciparum</i> (w2) de EEPF, Fração alcaloídica, Fração de neutros, Fr1-3, Fr4, Fr5-7(ésteres do lupeol), Fr11 e Fr5-7Hid (lupeol) das cascas de <i>P. fasciculata</i> e o controle positivo cloroquina (CQ).....	106
Tabela 17:	Porcentagem de parasitemia e redução da parasitemia (%) de camundongos inoculados com hemácias infectadas pelo <i>P. bergehi</i> tratados por via oral com diferentes doses de EEPF, EEPF-DCM:HEX (1:1), cloroquina (Controle positivo) e e não	

	tratados (Controle negativo).....	113
Tabela 18:	Varição da evolução ponderal de camundongos fêmeas tratadas com dose única do EEPF (5000 mg/Kg) e observados durante 14 dias.....	116
Tabela 19:	Consumo de ração pelos camundongos e água pelos camundongos fêmeas tratados com dose única do EEPF(5000 mg/Kg) e observados durante 14 dias.....	116

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
cm ⁻¹	N° de bandas
cm	Centímetro
Kg	Quilograma
g	Gramma
%	Porcentagem
L	Litro
mL	Mililitro
mm	Milímetro
min	Minuto
nm	Nanometro
ng	Nanograma
μM	Micromolar
μg	Micrograma
mg	Miligrama
μL	Microlitro
AcOEt	Acetato de Etila
HCl	Ácido Clorídrico
NaHCO ₃	Bicarbonato de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
NH ₄ OH	Hidróxido de Amônio
NaCl	Cloreto de Sódio
MeOH	Metanol
ACN	Acetonitrila
APG II	Grupo Filogenético de Angiosperma II
AS	Ácido Sulfúrico (H ₂ SO ₄)
BSA	Bovine serum albumin
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - Detector de Arranjos Diodos
CENP	Centro Nacional de Primatas
CI ₅₀	Concentração Inibitória mínima 50%
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa
Ceme	Central de Medicamentos
CQ	Cloroquina
DCM	Diclorometano
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTN	Doença Tropical Negligenciada
DP	Desvio Padrão
EEPF	Extrato Etanólico de <i>Parahancornia fasciculata</i>
EDAPF	Extrato em Diclorometano de <i>Parahancornia fasciculata</i>
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
HEX	N-hexano
HRP-II	Proteína II Rica em Histidina
IPA	Incidência Parasitária Anual
IV	Infravermelho
MS	Ministério da Saúde

OMS/WHO	Organização Mundial de Saúde.
OPAS	Organização Panamericana de Saúde
OPD	Ortofenilenodiamino
PBS	Solução Salina fosfatada tamponada
<i>p</i> LDH	Enzima lactato-desidrogenase específica para <i>P. falciparum</i>
Rf	Fator de Retenção
rpm	Rotação por minuto
PPPM	Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais
RPMI 1640	Meio de cultura Roswell Park Memorial Institute 1640
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN de ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN de ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
STE	Sistema de Transporte de Elétrons
TR	Tempo de Retenção
UV	Ultravioleta
v/v	volume/volume
vis.	Visível

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
2. REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1 A Família Apocynaceae	32
2.2 <i>Parahancornia fasciculata</i> (Poir.) Benoist	37
3. OBJETIVOS	47
3.1 Objetivo Geral	47
3.2 Objetivos Específicos	47
4. MATERIAL E MÉTODOS	48
4.1 Material	48
4.1.1 EQUIPAMENTOS	48
4.1.2 MATERIAL DE CONSUMO	49
4.1.2.1 Produtos Químicos, Reagentes e material para cromatografia	49
4.1.2.2 Solventes	49
4.1.2.3 Materiais Plásticos e Vidrarias	50
4.1.2.4 Meio de Cultura e Preparo do Meio	51
4.1.2.4.1 <i>Solução de RPMI 1640 estoque (1 litro)</i>	51
4.1.3. PREPARO DOS REVELADORES UTILIZADOS NA PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA POR CROMATOGRÁFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)	52
4.1.3.1 Reagente de Anisaldeído - Ácido Sulfúrico (H ₂ SO ₄)	52
4.1.3.2 Reagente de Cloreto de Alumínio 2% em metanol	52
4.1.3.3 Reagente de Dragendorff	52
4.1.3.4 Reagente de Ferricianeto de Potássio 1% e Cloreto Férrico 2%	52
4.1.3.5 Reagente de Hidróxido de Potássio 5%	53
4.1.3.6 Reativo de Kedde	53
4.1.3.7 Reagente de Liebermann-Burchard	53
4.1.4 MATERIAL BIOLÓGICO	53
4.1.4.1 Clones para as Cepas de <i>Plasmodium berghei</i> e <i>Plasmodium falciparum</i>	53
4.1.4.2 Plasma Humano e Hemácias	54
4.1.5 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO	54
4.1.6. OUTROS MATERIAIS	55
4.1.6.1. Solução Estoque de Giemsa	55
4.1.6.2. Soluções Salinas a 12% e 1,6%	55
4.1.6.3 Soluções Salinas a 0,9% glicosada	59
4.1.6.4 Água tamponada (solução estoque 20x)	56
4.1.7. MATERIAL VEGETAL	56
4.2. Métodos	56
4.2.1 FITOQUÍMICA	56
4.2.1.1 Obtenção dos extratos etanólico (EPPF) e em diclorometano (EDAPF)	56
4.2.1.2 Prospecção Fitoquímica por CCD do extrato etanólico obtido das cascas de <i>P. fasciculata</i>	57
4.2.1.2.1 <i>Triterpenos e Esteróides</i>	58
4.2.1.2.2 <i>Geninas Flavônicas</i>	58
4.2.1.2.3 <i>Heterosídeos Flavônicos</i>	58
4.2.1.2.4 <i>Cumarinas</i>	58
4.2.1.2.5 <i>Saponinas</i>	59

4.2.1.2.6 <i>Alcalóides</i>	59
4.2.1.2.7 <i>Polifenóis</i>	59
4.2.1.2.8 <i>Taninos</i>	60
4.2.1.2.9 <i>Geninas Antraquinônicas e Naftoquinônicas</i>	60
4.2.1.2.10 <i>Heterosídeos Antracênicos</i>	60
4.2.1.2.11 <i>Heterosídeos Cardiotônicos</i>	61
4.2.1.3 Fracionamento do extrato etanólico obtido das cascas de <i>P. fasciculata</i> (EPPF)	61
4.2.1.4 Fracionamento do extrato em diclorometano de <i>P. fasciculata</i> (EDAPF)	62
4.2.1.4.1 <i>Por Cromatografia em Coluna</i>	62
4.2.1.4.2 <i>Recristalização da Fr5-7</i>	64
4.2.1.4.3 <i>Recristalização do EDAPF-Fr11</i>	64
4.2.1.4.4 <i>Hidrólise Alcalina da Fr5-7 (Ésteres de Lupeol) e isolamento do Lupeol</i>	65
4.2.1.5 Extração sob refluxo do extrato etanólico de <i>P. fasciculata</i> (EPPF)	65
4.2.1.6 Doseamento de Taninos Condensados/Proantocianidinas	66
4.2.1.7 Identificação da substância isolada da Fr5-7 da Coluna Cromatográfica do EPPF	67
4.2.1.7.1 <i>Gerais</i>	67
4.2.1.7.2 <i>Perfis cromatográficos por CLAE-DAD</i>	67
4.2.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMALÁRICA	69
4.2.2.1 Descongelamento dos clones W ₂ de <i>P. falciparum</i> e ANKA de <i>P. Berghei</i>	69
4.2.2.2 Cultivo do <i>Plasmodium falciparum</i> e sincronização	70
4.2.2.3 Determinação da parasitemia percentual de <i>P. falciparum</i> e <i>P. berghei</i>	71
4.2.2.4 Criopreservação dos clones <i>P. falciparum</i> e <i>P. berghei</i>	71
4.2.2.5 Teste do HRP-II	72
4.2.2.5.1 <i>Preparo da placa de amostras estoque</i>	72
4.2.2.5.2 <i>Placa de amostras definitiva</i>	73
4.2.2.5.3 <i>Placa teste</i>	74
4.2.2.6 Atividade Antimalárica <i>in vivo</i>	76
4.2.2.6.1 <i>Tratamento dos camundongos infectados</i>	77
4.2.2.6.2 <i>Ensaio em camundongos com P. berghei</i>	77
4.2.3 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE ORAL AGUDA DO EPPF	78
4.2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	80
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	82
5.1 Estudos Fitoquímicos	82
5.1.1 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA POR CCD	82
5.1.2 FRACIONAMENTO DO EXTRATO EM DICLOROMETANO DE <i>P. FASCICULATA</i> (EDAPF)	89
5.1.3 ANÁLISE ESPECTROMÉTRICA DE Fr 5-7	92
5.1.4 IDENTIFICAÇÃO DE Fr 5-7Hid	94
5.1.5 ANÁLISE ESPECTROFOTOMÉTRICA DE Fr11	98
5.1.6 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE TANINOS CONDENSADOS/PROANTOCIANIDINAS NO EPPF INSOLÚVEL EM AcOEt	100
5.2 Atividade Antimalárica	103
5.2.1 ATIVIDADE ANTIPLASMÓDICA <i>IN VITRO</i>	103
5.2.2 ATIVIDADE ANTIMALÁRICA <i>IN VIVO</i>	110
5.3. Avaliação da Toxicidade Oral Aguda do EPPF	115
6. CONCLUSÃO	120

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	121
8. ANEXOS	139
8.1 Parecer do Comitê de Ética em pesquisa com animais de expimentação	139
8.2 Tabela de Ensaio Hipocrático	140

1. INTRODUÇÃO

A malária, uma doença tropical negligenciada (LINDOSO e LINDOSO, 2009) é ainda uma das doenças infecciosas mais prevalentes no mundo, sendo causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, e se caracteriza por acessos intermitentes de febre, calafrios, cefaléia e sudorese (BRASIL, 2006). Representa, mundialmente, um dos mais sérios problemas de saúde pública, sendo a principal causa de mortalidade e morbidade nas regiões endêmicas, acometendo populações que habitam climas tropicais e subtropicais. Esta doença é responsável por cerca de 300 a 500 milhões de casos anuais, com mais de 1 milhão de mortes por ano, atingindo principalmente crianças menores de 5 anos de idade e gestantes (WHO, 2010a).

Para o controle da doença se faz necessário um tratamento adequado e oportuno, sendo que os principais fármacos são quinina, mefloquina, halofantrina, cloroquina, amodiaquina, primaquina, derivados da artemisinina, atovaquona e antibióticos como tetraciclina, doxiciclina e clindamicina (WHO, 2010 b). Vale ressaltar que alguns fármacos, como a quinina, identificada pelos franceses Pelletier e Caventou (RUSSELL, 1955) e a artemisinina ou *qinghaosu* (KLAYMAN, 1985), foram isoladas de plantas utilizadas popularmente para o tratamento de doenças febris/malária (FRANÇA *et al.*, 2008).

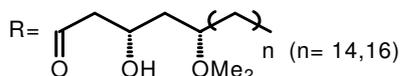
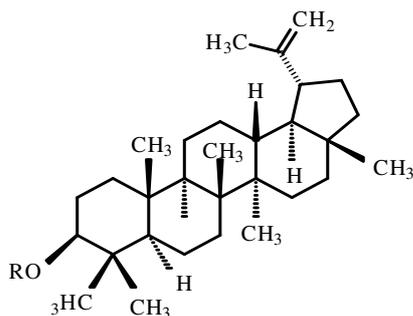
No entanto, a resistência a antimaláricos, não somente por *P. falciparum*, mas também por *P. vivax* (MURPHY *et al.*, 1993; WHITE, 1996), é crescente, tornando-se urgente a busca por novas alternativas quimioterápicas, já que esta é a principal base do controle da doença (ROSENTHAL, 2003). Além disso, a toxicidade dos fármacos utilizados na terapêutica também limita os seus usos. Por estas razões, novas e mais eficazes alternativas terapêuticas são necessárias para combater as cepas de *P. falciparum* resistentes. Neste sentido, produtos isolados a partir de fontes naturais continuam a representar uma importante fonte para a obtenção de protótipos candidatos a novos fármacos antimaláricos (BIOT e CHIBALE, 2006).

Várias espécies da família Apocynaceae, como *Geissospermum sericeum* e a *Aspidosperma nitidum* são utilizadas popularmente, para tratamento da malária e outras doenças febris (MILLIKEN e ALBERT, 1996; 1997), sendo que um estudo etnobotânico demonstrou que mais de 8000 nativos da região Amazônica, especificamente na região Sul do Estado do Pará e Noroeste do Estado de

Rondônia utilizavam as cascas da espécie *G. sericeum* para tratar a malária (BRANDÃO *et al.*, 1992). No entanto, algumas espécies carecem de estudos antimaláricos, como por exemplo, a *Parahancornia fasciculata* (Poir.) Benoist (Apocynaceae).

Cascas de *P. fasciculata*, também conhecida como *Parahancornia amapa*, são utilizadas para o tratamento da malária, infecções do útero, gastrite, anemia, problemas respiratórios e tuberculose (SHANLEY e MEDINA, 2005). Estudos fitoquímicos realizados com as raízes, cascas e o látex desta espécie levaram ao isolamento e identificação de triterpenos pentacíclicos como ésteres do lupeol (1) e o próprio lupeol (2) (SOBRINHO *et al.*, 1991; CARVALHO *et al.*, 2001b). Ainda de várias outras espécies da família Apocynaceae já foram isolados o lupeol e outros triterpenos (JÁCOME, 1998; MEDEIROS, 2003; CARVALHO *et al.*, 2007). Uma revisão bibliográfica realizada por Gallo e Sarachine (2009), descreve que o lupeol apresenta diversas atividades farmacológicas, como ação antiinflamatória (VASCONCELOS *et al.*, 2008), antitumoral (HATA *et al.*, 2005), antimicrobiana (SHAI *et al.*, 2008), antifúngica (SHAI *et al.*, 2008) e antiprotozoária, incluindo atividade antimalárica (ALVES *et al.*, 1997).

Quanto à atividade antimalárica e à toxicidade desta espécie, ainda não foram encontrados relatos científicos. Assim, o presente estudo teve como um dos seus objetivos realizar estudos fitoquímicos monitorados por ensaios de atividade antimalárica e de aspectos toxicológicos desta planta medicinal, fornecendo subsídios para ensaios toxicológicos pré-clínicos, como pré-requisito para investigações clínicas futuras.



(2) Lupeol: R=H

Considerando que a família Apocynaceae é uma reconhecida fonte de triterpenos, como o lupeol (JÁCOME, 1998; MEDEIROS, 2003; CARVALHO *et al.*, 2007), justifica-se a proposta de avaliação da atividade antimalárica *in vitro* e *in vivo* dos extratos, frações e substância isolada das cascas de *P. fasciculata* contra cepas de *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium berghei*, respectivamente, pertencentes a esta família, além da avaliação de atividade toxicológica da mesma espécie. Essa abordagem baseia-se em critérios válidos para a seleção de espécies vegetais para a avaliação da atividade antimalárica e toxicológica como:

- a- Etnobotânico: espécies da família Apocynaceae são potencialmente empregadas no tratamento da malária (MILLIKEN e ALBERT, 1996; 1997), assim como a espécie *P. fasciculata* (SHANLEY e MEDINA, 2005).
- b- Estudos Fitoquímicos: a presença de lupeol neste estudo e o fato de já existirem estudos fitoquímicos desta espécie (SOBRINHO, 1991; CARVALHO *et al.*, 2001b).
- c- Atividade Farmacológica: esta espécie já forneceu lupeol com atividade antimalárica (ALVES *et al.*, 1997).
- d- Material vegetal: o material vegetal utilizado no presente estudo foi às cascas, já que as mesmas apresentaram uma maior concentração de lupeol, e por esta razão não se utilizou outras partes da planta.

e- Potencial Toxicológico: a ausência de relatos na literatura da atividade toxicológica levaram a realizar o estudo nesta espécie, já que a toxicidade de plantas medicinais é considerada um problema de saúde pública (ALVES, 2007). Embora, os produtos naturais tenham amplos espectros terapêuticos e baixa incidência de efeitos colaterais, não são considerados como substâncias inócuas, sendo extremamente necessária a realização de ensaios toxicológicos para fornecer a comunidade dados científicos sobre segurança ou toxicidade das plantas (ASSEMI, 2001).

2. REVISÃO DA LITERATURA

A malária é também conhecida como impaludismo, maleita, febre palustre, sezão, febre intermitente, febre terçã, febre quartã entre outros (WALTHER e WERNSDORFER, 1988). É causada por protozoários pertencentes ao gênero *Plasmodium*, filo Apicomplexa, classe Sporozoa, ordem Hemosporidiida e família Plasmodidae (BRASIL, 2010).

Cinco espécies de parasitas da malária são patogênicas para os seres humanos. O *Plasmodium falciparum* foi descoberto por Welch em 1897; o *P. vivax* agente da febre terçã benigna, descoberto por Grassi e Feletti em 1890; o *P. malariae*, causador da febre quartã, presente no continente Africano, descoberto por Laveran, em 1881 e relatado por Grassi e Feletti em 1890; o *P. ovale* agente da forma terçã benigna, encontrado nos continentes Africano e Asiático, descoberto por Stephens em 1922; e o *P. knowlesi* foi descoberto por Franchiti em 1927. Os dois últimos são comuns aos humanos e a outros primatas (WALTHER & WERNSDORFER, 1988). As espécies *P. falciparum* e *P. vivax* são as mais prevalentes no Brasil, sendo que o *P. falciparum*, agente da febre terçã maligna, é responsável a forma mais grave e severa da doença (BRASIL, 2010).

A malária continua endêmica em 109 países, dos quais 45 pertencem à região Africana. De acordo com o World Malaria Report 2012, foram registrados 219 milhões de casos de malária e uma estimativa de cerca de 660 mil mortes em 2010, principalmente entre crianças africanas (WHO, 2012). Na África, uma criança morre a cada 45 segundos de malária, sendo a doença responsável por 20% de todas as mortes na infância (WHO, 2011). Nas Américas, a transmissão de malária ocorre em 21 países, sendo o *P. vivax* responsável por 77% do total dos casos (OPAS, 2010). No Brasil, mais especificamente na Amazônia legal, ocorrem 99% dos casos de malária, sendo que nos estados da Região Norte, principalmente no Estado do Pará, a malária apresenta alto risco de transmissão - 46% (BRASIL, 2011). Em 2011 foi observada na Região Amazônica uma redução de aproximadamente 23% dos casos de malária em relação a 2010; número total de notificações foi de 217.298 (BRASIL, 2012).

O *Plasmodium* se reproduz por dois processos distintos: reprodução assexuada, denominada esquizogonia, que se desenvolve no hospedeiro vertebrado (homem) e por reprodução sexuada que ocorre no mosquito (KNELL, 1991). O ciclo biológico do *Plasmodium* é complexo, iniciando-se quando fêmeas anofelinas infectadas, ao realizar o repasto sanguíneo, inoculam os esporozoítos no tecido subcutâneo do ser humano, circulando por pouco tempo no sangue, migrando para o fígado onde infectam os hepatócitos e amadurecem até esquizontes, os quais rompem e liberam os merozoítos; esta fase precede a invasão das hemácias e é conhecida como ciclo pré-eritrocítico. Após a multiplicação no fígado, os merozoítos invadem as hemácias e transformam-se em trofozoítos, os quais amadurecem até esquizontes, que irão romper as hemácias e liberar os merozoítos que irão parasitar outras hemácias iniciando-se os sintomas da doença. Alguns parasitas se diferenciam nos estágios eritrocíticos sexuais, que são os gametócitos, que infecta a fêmea do *Anopheles* durante o repasto sanguíneo (MURGATROYD, 1952). A figura 1 mostra o ciclo de reprodução do parasito.

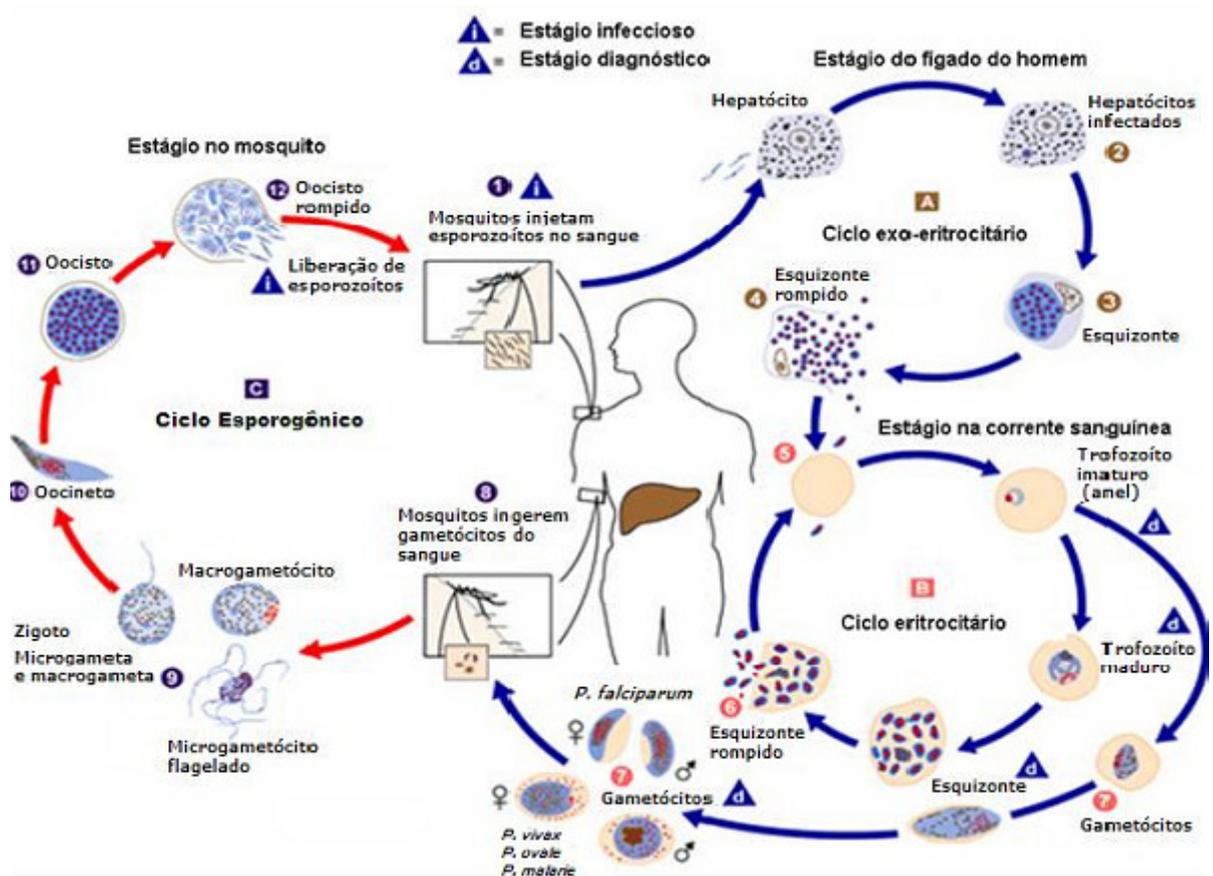


Figura 1: Ciclo biológico do parasito da malária humana. **Fonte:** Adaptado de CDC, 2012. <http://www.cdc.gov/malaria/about/biology/index.html>.

As manifestações clínicas causadas por malária são: febres intermitentes, calafrios, cefaléia, diarréia, náuseas, vômitos, dor abdominal, tonteados e anemia. Se não tratada adequadamente a doença pode apresentar complicações como edema pulmonar, problemas renais, icterícia, inchaço do fígado e baço, anorexia e obstruções de vasos sanguíneos no cérebro (nos casos mais graves da doença), situação que poderá levar à morte do indivíduo (FRANÇA *et al.*, 2008). O período de incubação da doença varia de 7 a 14 dias, podendo chegar a vários meses em condições especiais, no caso de *P. vivax* e *P. malariae*. As gestantes, as crianças e os primoinfectados estão sujeitos a maior gravidade, principalmente por infecções pelo *P. falciparum*, que podem ser letais. O diagnóstico precoce e o tratamento correto e oportuno são os meios mais adequados para reduzir a gravidade e a letalidade por malária (BRASIL, 2010).

A extrema necessidade de se tratar a malária conduziu ao descobrimento de vários fármacos. O tratamento da malária teve início no século XVII, quando os jesuítas que vieram para a América do Sul observaram que os índios do Peru utilizavam plantas do gênero *Cinchona* spp (família Rubiaceae), conhecidas popularmente por quinas, para o tratamento de doenças febris (MESHNICK, 1998). Todavia, foi apenas em 1820 que os químicos franceses Pierre Joseph Pelletier e Joseph Bienaime Caventou identificaram o alcalóide quinina (3) como o ingrediente ativo da casca da *Cinchona*. Logo após sua descoberta, a demanda e uso da quinina (3) espalharam-se rapidamente pela Europa, América do Norte e Ásia (RUSSELL, 1955).

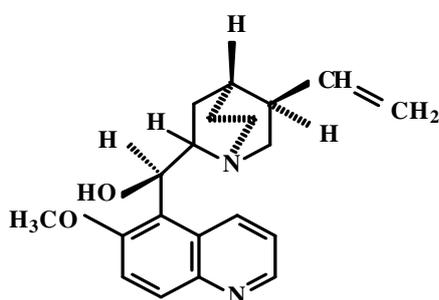
Até a 2ª Guerra Mundial, a quinina (3) era o único agente antiparasitário eficaz frente à malária (FRANÇA *et al.*, 2008). Visando reduzir a elevada toxicidade da quinina, foram obtidos derivados sintéticos como a mefloquina (4) e cloroquina (5), sendo então adotada a cloroquina como fármaco de escolha. No entanto, com o aparecimento de cepas resistentes de *P. falciparum*, à cloroquina, na década de 1960, a quinina, foi reintroduzida no tratamento da malária mais severa (FERREIRA, 1993).

A quimioterapia antimalárica é classificada de acordo com ações seletivas dos fármacos sobre as diferentes fases do ciclo biológico do parasito como esquizonticidas teciduais, esquizonticidas sanguíneos e gametocidas. A terapêutica

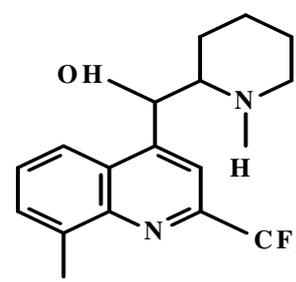
da malária humana visa, principalmente, a interrupção da esquizogonia sanguínea, responsável pela patogenia e manifestações clínicas da doença (BRASIL, 2010).

A cloroquina (5), pertencente à classe das 4-amino-quinolinas, é um potente esquizonticida sanguíneo e eficaz contra as formas eritrocíticas de todas as espécies de Plasmódio, somando-se a sua ação antipirética e antiinflamatória. No entanto, não é ativa contra esporozoítos ou hipnozoítos hepáticos, uma vez que o alvo terapêutico das 4-amino-quinolinas é o processo de destoxificação do grupo heme resultante da degradação da hemoglobina do hospedeiro (O' NEILL *et al.*, 1998; SULLIVAN *et al.*, 2002).

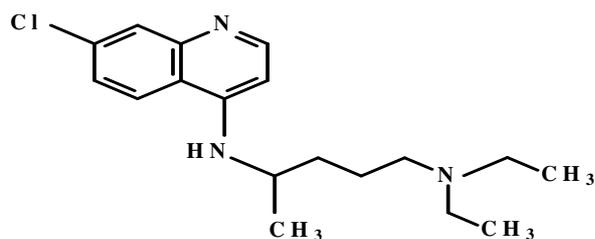
Durante muitos anos, a cloroquina foi largamente utilizada no tratamento da malária por apresentar baixa toxicidade e ser economicamente viável. No entanto, o primeiro relato de *P. falciparum* cloroquina-resistente ocorreu nos anos 60 na Colômbia, no vale do Rio Magdalena (WONGSRICHANALAI *et al.*, 2002), assim como foi analisado na Guerra do Vietnã que as forças armadas dos Estados Unidos observaram que os parasitas da malária eram resistentes a este fármaco. Então, iniciou-se um programa intensivo de pesquisa de novos agentes antimaláricos, onde foram testados mais de 300.000 compostos, sendo dois compostos ativos contra cepas resistentes ao *P. falciparum*, a mefloquina (4), um quinolinometanol, e o halofantrino (6), um fenantrenometanol (FOLEY e TILLEY, 1998). Os fármacos mais recentemente introduzidos são a artemisinina (7) (KLAYMAN, 1985) e a atovacona (8) (BASCO, 2003).



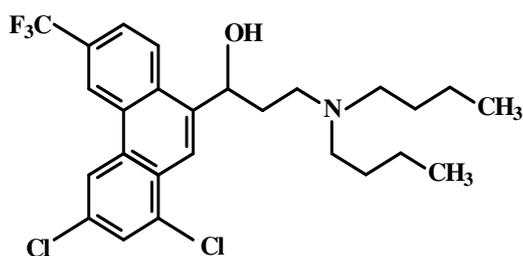
Quinina
(3)



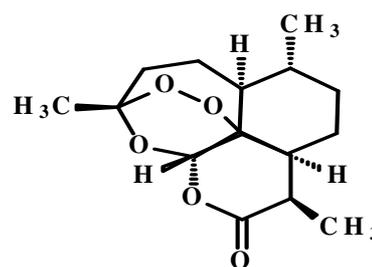
Mefloquina
(4)



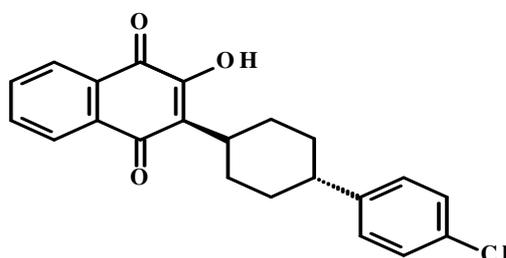
Cloroquina
(5)



Halofantrino
(6)

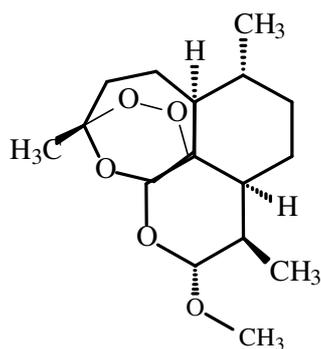


Artemisinina
(7)

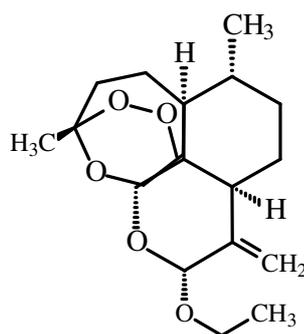


Atovacona
(8)

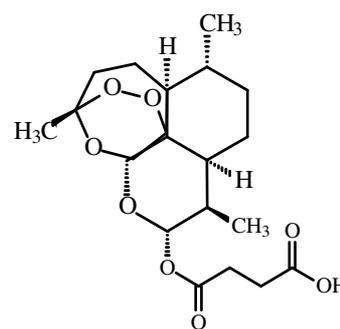
Em 1972, foi isolado o sesquiterpeno artemisinina (7) que é uma substância ativa da *Artemisia annua*, de uso milenar na China (cerca de 2000 anos) para o tratamento de febres. É considerada um esquizonticida sanguíneo com uma ação muito rápida e mais potente que a da cloroquina ou da quinina (GIAO e VRIES, 2001; WIESNER *et al.*, 2003). Derivados semi-sintéticos como artemeter (9), arteeter (10) e artesunato (11) também se encontram em uso clínico (ROSENTHAL *et al.*, 2003) e apresentam ação gametocitocidas, logo são bloqueadores da propagação da doença. No entanto, seu uso tem que ser acompanhado por medidas radicais de eliminação total dos mosquitos, dado o curto tempo de meia vida que caracteriza esta classe de antimaláricos (WIESNER *et al.*, 2003).



Artemeter
(9)

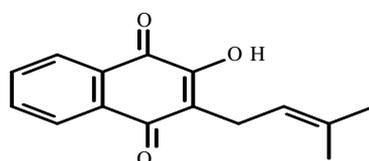


Arteeter
(10)



Artesunato
(11)

A atovacona (8) é uma naftoquinona sintética, um análogo do lapachol (12), que é freqüente em espécies de *Tabebuia*, gênero ao qual pertencem os ipês, árvores que ocorrem na América do Sul (MIRAGLIA, 1991). Seu mecanismo de ação é particular, pois inibe o sistema de transporte de elétrons (STE) mitocondrial do parasito, afetando deste modo a biosíntese da pirimidina (WILLIAMS e CLARK, 1998).



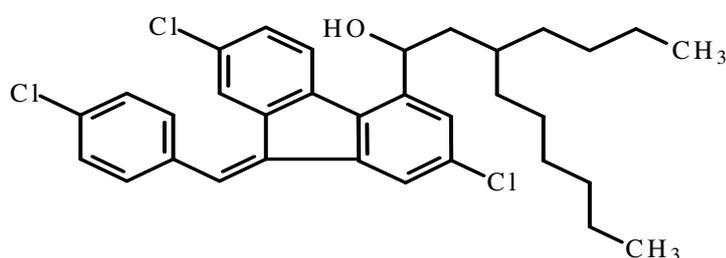
Lapachol
(12)

Ainda existem algumas controvérsias em relação ao mecanismo de ação dos fármacos antimaláricos. Os parasitos usam a hemoglobina dos eritrócitos como fonte de alimentos. A hemoglobina é transportada para dentro de um compartimento ácido do parasito, conhecido como vacúolo alimentar, e é quebrada por enzimas proteolíticas, chamadas plasmecinas, em peptídeos que, posteriormente, são degradados a aminoácidos (OLLIARO e GOLDBERG, 1995; SULLIVAN JR *et al.*, 1998; EGAN *et al.*, 1999). O resíduo livre, o heme ou ferriprotoporfirina IX (Fe (III) PPIX), que é tóxico ao parasito, é polimerizado formando um composto inerte, insolúvel e não tóxico, o pigmento malárico ou hemozoína. Existem algumas

evidências de que a interação entre os antimaláricos esquizotônicos sanguíneos com o grupo heme [ferritropoporfirina IX (Fe(III)PPIX)] interferem na cristalização da hemozoína (SULIVAN JR et al, 1998), porém, existem divergências sobre como isto ocorre (EGAN et al, 1999).

A resistência do *Plasmodium* aos antimaláricos é considerada o maior problema de saúde pública no controle da malária (CRAWLEY, 1999). A seleção de parasitos resistentes aos antimaláricos, gerando multi-resistência, determina a urgência de novos regimes de tratamento visando o controle da propagação da doença (PIMENTEL *et al.*, 2007). No Brasil, o *P. falciparum* resistente à cloroquina é muito freqüente na Amazônia Legal, onde também já foram encontrados parasitos multirresistentes. Assim, preconiza-se o tratamento com associações de antimaláricos com o objetivo de melhorar a eficiência do tratamento e com sensível diminuição na seleção da resistência dos parasitos (GIAO & VRIES, 2001; PIMENTEL *et al.*, 2007).

Atualmente, o Ministério da Saúde do Brasil recomenda, para o tratamento da malária causada por *P. vivax* ou *P. ovale*, a cloroquina (em 3 dias) e a primaquina (em 7 dias) esquema curto, ou então pode-se fazer um esquema longo com as mesmas drogas, sendo com 14 dias de primaquina. Para o tratamento da malária causada pelo *P. falciparum* em humanos recomenda-se a associação do artemeter (9) com a lumefantrina (13) (Coartem) por 3 dias (BRASIL, 2010).



**Lumefantrina
(13)**

A associação do artemeter (9), derivado da artemisinina (7), com a lumefantrina (13) é a mais recomendada pela OMS para o tratamento de malária falciparum não complicada em áreas endêmicas de resistência a múltiplos fármacos.

A artemisinina e os seus derivados produzem o rápido desaparecimento da parasitemia e a rápida resolução da sintomatologia (WHO, 2010b). Em estudo realizado por Freitas (2010) sobre o uso da associação artemeter + lumefantrina, demonstrou-se que houve um progresso notável, uma vez que reduziu a taxa de mortalidade da malária causada por *P. falciparum*. As principais mutações, responsáveis pela resistência do *P. falciparum*, ocorrem nos genes *pcfcrt* e *pfmdr1* e conferem altos níveis de resistência à cloroquina, porém não interferem na atividade da artemisinina e derivados. O gene candidato a conferir resistência à artemisina e derivados já foi identificado e trata-se do *PfATPse6* (FERREIRA *et al.*, 2007).

Atualmente, há necessidade de se buscar novos agentes antimaláricos eficazes contra cepas do *P. falciparum* resistentes a cloroquina, para promover cura em tempo razoável (3 dias) e garantir adesão ao tratamento (FIDOCK *et al.*, 2004). Neste contexto, a pesquisa de alternativas para a terapêutica da malária através do uso de plantas medicinais resultou no isolamento de antimaláricos como a quinina (3) e a artemisinina (7).

Na busca de novos fármacos, espécies pertencentes à família Apocynaceae tem se mostrado muito promissoras, já que esta família caracteriza-se, quimicamente, pela presença de alcalóides (BOLZANI *et al.*, 1987; JÁCOME, 1998) e triterpenos pentacíclicos (SOBRINHO *et al.*, 1991), valendo ressaltar que a quinina (alcalóide) e o lupeol (triterpeno) são metabólitos com atividade antimalárica. Estudos de algumas espécies pertencentes a esta família, como a *Aspidosperma parvifolium* (DOLABELA, 2007), *Geissospermum sericeum* (STEELE *et al.*, 2002), *Aspidosperma vargasii*, *Aspidosperma desmanthum* (HENRIQUE *et al.*, 2010) e *Holarrhena floribunda* (FOTIE *et al.*, 2006) confirmam o elevado potencial antimalárico destas plantas medicinais.

2.1 A Família Apocynaceae

Muitas espécies utilizadas para o tratamento de doenças febris e malária pertencem à família Apocynaceae (BRANDÃO *et al.*, 1992; MILLIKEN e ALBERT, 1997). Esta família foi descrita inicialmente em 1789 por Antoine Laurent de Jussieu.

Atualmente, de acordo com o novo sistema de classificação botânica APG II, que leva em consideração características filogenéticas e não apenas morfológicas, é classificada nos seguintes clados, em ordem decrescente: Angiospermas → Eudicotiledôneas → Núcleo Eudicotiledôneas → Asterídeas → Euasterídeas I, na ordem Gentianales (THE ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP, 2003). No antigo sistema taxonômico, a família era classificada nos táxons tradicionais: Divisão Magnoliophyta → Classe Magnoliopsida → Subclasse Asteridae → ordem Gentianales (TROPICOS, 2012).

A referida família apresenta cerca de 424 gêneros e 3700 espécies distribuídas em cinco subfamílias *Rauvolfioideae*, *Apocynoideae*, *Periplocoideae*, *Secomonoideae* e *Asclepidoideae*, ocorrendo essencialmente nas regiões tropicais e subtropicais do mundo inteiro (ENDRESS e BRUYNS, 2000). No Brasil, esta família é representada por 90 gêneros e 850 espécies (SOUZA e LORENZI, 2005), distribuídas por diversas formações vegetacionais (RAPINI, 2004) e são encontradas nas florestas Pluviais Amazônica, Atlântica e de Tabuleiro, Floresta Seca, Restinga, Cerrado e Caatinga (LORENZI, 1998).

Esta família é formada de árvores, geralmente laticíferas, com folhas opostas, alternas ou verticiladas; em geral, sem estípulas; simples, inteiras, raro peltadas, glabras ou pilosas; podendo apresentar coléteres na região nodal e na base da lâmina. Inflorescência terminal, axilar ou lateral, racemosas, cimosas ou flores solitárias. Flores actinomorfas ou levemente zigomorfas. As plantas da família Apocynaceae são consideradas como espécies dicotiledôneas caracterizadas normalmente pela presença de látex (LORENZI, 1998; JUDD *et al.*, 1999; ENDRESS e BRUYNS, 2000). Os tipos de frutos apontados para esta família são folículo, cápsula, drupa, raramente baga, sendo folículo o mais freqüente; as sementes são comosas ou não, às vezes aladas ou ariladas (BARROSO *et al.*, 1999; ENDRESS e BRUYNS, 2000; SIMÕES e KINOSHITA, 2002). Inclui espécies arbustivas, herbáceas, arbóreas, muitas das quais trepadeiras e suculentas (DI STASI e HIRUMA-LIMA, 2002).

Espécies desta família se desenvolvem em vários habitats, desde florestas tropicais úmidas até regiões semi-áridas; ao nível do mar e em topos de montanhas,

em solos secos, afloramentos rochosos, áreas inundadas, e algumas vezes nas margens dos rios (RAPINI, 2004).

Muitas de suas espécies têm grande importância econômica, como fornecedoras de madeira ou uso na alimentação e algumas são utilizadas com finalidades medicinais (JUDD, 2009). Espécies do gênero *Aspidosperma* (*A. polyneuron*; *A. pyrifolium*) são muito procuradas pela excelente qualidade de sua madeira usada na indústria de móveis, construção civil, construção naval e carpintaria (SOUZA e LORENZI, 2005). Outras apresentam potencial paisagístico pela beleza de suas flores ou pela forma de tronco e da copa. Dentre as espécies cultivadas no Brasil, destacam-se a alamanda (*Allamanda cathartica*), o jasmim-manga (*Plumeria rubra*), o chapéu-de-napoleão (*Thevetia peruviana*), a espirradeira (*Nerium oleander*) e a vinca (*Cataranthus roseus*; HOPIKNS *et al.*, 1999; SOUZA e LORENZI, 2005).

Membros desta família constituem uma importante fonte de descobertas farmacológicas, tendo sido usado por séculos para fins medicinais. Compostos isolados desta família botânica, como vinblastina/vincristina (inibidores da polimerização das proteínas do fuso mitótico) e reserpina (inibidor da captação de noradrenalina) são usados na clínica (NEUSS, 1970).

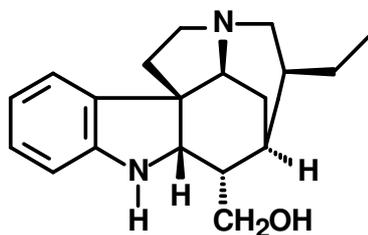
Esta família se caracteriza, quimicamente pela presença de alcalóides (BOLZANI *et al.*, 1987; JÁCOME, 1998) e triterpenos pentacíclicos (SOBRINHO *et al.*, 1991; CARVALHO *et al.*, 2001b; JÁCOME *et al.*, 2004; CARVALHO *et al.*, 2006; CORNELIUS, 2006; PEREIRA *et al.*, 2006). Aos triterpenos são atribuídas várias atividades biológicas dentre as quais se destacam: ação cardioprotetora (SUDHAHAR *et al.*, 2007), gastroprotetora (PERTINO *et al.*, 2007), antiinflamatória (MEDEIROS *et al.*, 2007), antitumoral (BRAGA *et al.*, 2007), leishmanicida (DELGADO-MENDEZ *et al.*, 2008), anti-hiperglicêmica (SATO *et al.*, 2007), antiespasmódica, analgésica, antiestresse e de redução de peso corporal, também possui atividade antiprotozoária, especialmente contra amebíase e malária (DI STASI, 1996).

Biologicamente, muitos alcalóides indólicos agem provavelmente nos sistemas neurotransmissores opiáceos, gabaérgicos, colinérgicos, muscarínicos, serotoninérgicos e dopaminérgicos (BIEL *et al.*, 1959 APUD PEREIRA *et al.*, 2007).

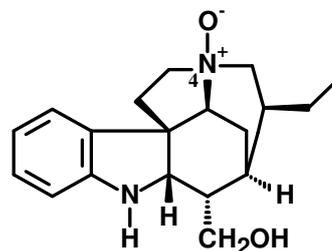
Além disso, são responsáveis pelos efeitos alucinógenos da fumaça do tabaco, de bebidas e rapés utilizados por nativos da Amazônia, bem como pelas propriedades sedativas do maracujá (ALLEN *et al.*, 1980 APUD PEREIRA *et al.*, 2007). Em síntese, espécies vegetais que contêm alcalóides indólicos (MITAINE-OFFER *et al.*, 2002) e triterpenos (ALVES *et al.*, 1997; STEELE *et al.*, 1999) podem ser ativas no *Plasmodium*.

Estudos de algumas espécies pertencentes a esta família, como *Aspidosperma parvifolium*, com presença marcante de alcalóides, confirmaram sua atividade antiplasmódica frente às cepas W2 e 3d7 de *P. falciparum* que foi avaliada pelo método microscópico ou tradicional. O extrato etanólico apresentou ($CI_{50} = 32,75 \pm 1,06 \mu\text{g/mL}$; W2) e ($CI_{50} = 20,51 \pm 0,70 \mu\text{g/mL}$; 3d7), o APN-1 (fração de neutros 1- $CI_{50} = 15,02 \pm 2,83 \mu\text{g/mL}$; W2) e ($CI_{50} = 17,75 \pm 0,35 \mu\text{g/mL}$; 3d7) APN-2 (fração de neutros 2- $CI_{50} = 9,75 \pm 0,35 \mu\text{g/mL}$; W2) e ($CI_{50} = 10,50 \pm 0,35 \mu\text{g/mL}$; 3d7), APT-1 (fração de alcaloides totais 1- $CI_{50} = 0,98 \pm 0,20 \mu\text{g/mL}$; W2) e ($CI_{50} = 7,63 \pm 0,31 \mu\text{g/mL}$; 3d7), APT-2 (fração de alcaloides totais 2- $CI_{50} = 1,25 \pm 0,35 \mu\text{g/mL}$; W2) e ($CI_{50} = 2,45 \pm 1,55 \mu\text{g/mL}$; 3d7), e uleína ($CI_{50} = 0,75 \pm 0,10 \mu\text{g/mL}$; W2) e ($CI_{50} = 11,90 \pm 0,10 \mu\text{g/mL}$; 3d7). O extrato etanólico e a fração de neutros (APN-1) mostraram-se moderadamente ativos frente às duas cepas, e as demais frações mostraram-se ativas frente a W2 e moderadamente ativas frente à 3d7. A uleína, alcalóide indólico isolado, foi considerada muito ativa frente os dois clones (DOLABELA, 2007).

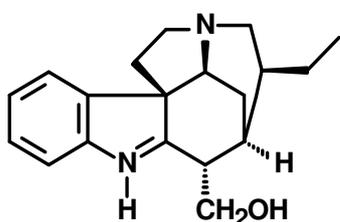
Outra pesquisa desenvolvida com uma espécie da mesma família foi realizada com as cascas de *Geissospermum sericeum* Benth. & Hook (Apocynaceae) através de extração em Soxhlet com metanol: água (9:1) e a seguir foi realizado o fracionamento onde se obteve o alcalóide indólico geissoschizolina (14), e dois derivados geissoschizolina N4-óxido (15) e 1,2-desidrogeissoschizolina (16) e um alcaloide β -carbolínico, a flavopereirina (17). Estes compostos foram avaliados quanto a sua atividade antiplasmódica *in vitro* frente a cepa K1 (cloroquina-resistente) e a cepa T9-96 (cloroquina-sensível) de *P. falciparum*. Dos quatro compostos testados, a flavopereirina (17) apresentou melhor atividade antiplasmódica frente às cepas K1 e T9-96 com $CI_{50} = 11,53$ e $1,83 \mu\text{M}$, respectivamente (STEELE *et al.*, 2002).



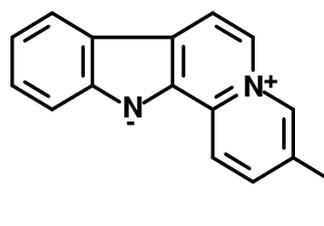
(14) Geissoschizolina



(15) Geissoschizolina N4-óxido



(16) Desidrogeissoschizolina

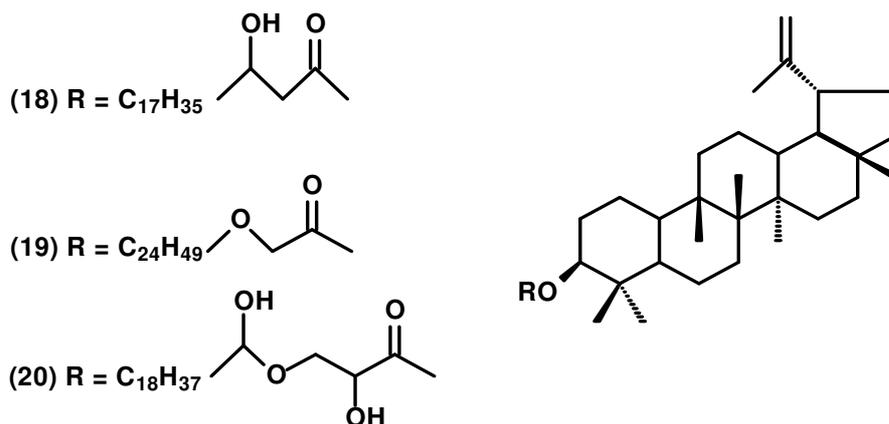


(17) Flavopereirina

O extrato etanólico de *G. vellosii* (Apocynaceae), foi submetido à avaliação da atividade antiplasmódica contra clone F32-Tanzania de *P. falciparum*, sendo determinado CI_{50} entre 1,7 e 3,1 $\mu\text{g/mL}$, mostrando-se altamente ativo contra esta cepa de *Plasmodium* (MUÑOZ *et al.*,2000).

Um estudo fitoquímico biomonitorado da planta *Holarrhena floribunda* (G. Don) Dur. & Schinz (Apocynaceae) utilizada no tratamento da malária por uma tribo de pigmeus de Baka, da reserva Dja (Camarões), forneceu uma fração neutra a partir de extrações ácido-base do extrato etanólico bruto, obtendo-se o lupeol e três novos derivados de cadeia longa de ésteres de ácidos graxos, isto é, 3-O-(3'-hidroxieicosanol)lupeol (18), 3-O -[(2'-(tetracosiloxi)acetil]lupeol (19) e 3-O-[(1''-hidroxioctadeciloxi)-2'hidroxipropanol] lupeol (20). Os extratos das cascas do caule de *H. floribunda* mostraram atividade inibitória marcante contra cepas resistentes de *P. falciparum* em concentrações de 1,02-18,53 $\mu\text{g/mL}$, quando testados *in vitro* contra dois clones do parasita designados como Indochina (W-2) e Serra Leoa (D-6). O extrato aquoso foi o mais ativo contra cepas Indochina (W-2), com uma CI_{50} 1,02

$\mu\text{g/mL}$, enquanto que o extrato etanólico parecia ser o mais ativo contra cepas Sierra Leoa (D-6), com uma Cl_{50} 4,33 $\mu\text{g/mL}$. Alguns destes novos compostos apresentaram atividade inibitória *in vitro* contra a cepa FCR-3 resistente à cloroquina isolado em Gâmbia e a cepa padrão 3D7 sensível à cloroquina. O grupo hidroxila da cadeia lateral de ácido graxo parece diminuir a atividade observada (FOTIE *et al.*, 2006).



Nesta família, um gênero pouco estudado é *Parahancornia*, sendo que ainda não foi relatado nenhum estudo de atividade antimalárica com outras espécies deste gênero e nem com a espécie *P. fasciculata* que é muito utilizada por populações ribeirinhas para o tratamento da malária.

2.2 *Parahancornia fasciculata* (Poir.) Benoist

P. fasciculata (Poir.) Benoist ou *P. amapa* (Huber) Ducke (Apocynaceae), como é cientificamente conhecida (RAPINI *et al.*, 2010), é uma árvore de grande porte, com os ramos novos horizontais, podendo atingir até 40m de altura, com diâmetro de 90 cm ou mais. Apresenta tronco reto, cilíndrico, com base reta. A casca é lisa com exsudação latescente abundante, de sabor amargoso. As folhas são opostas, curto pecioladas, oblongas, acuminadas na base e no ápice, de tamanho variável até 22cm de comprimento por 10cm de largura, página superior glabra e inferior vermelho-ferrugínea. Inflorescência lateral (terminal somente nos ramos

jovens), com flores branco-amareladas; cálice, corola e ovário recobertos por curta pubescência pardacenta (SAMPAIO, 2000; Figuras 2 e 3).

Segundo os extrativistas, e de acordo com a observação *in loco*, a espécie ocorre em terra firme, mas passa parte do período de chuva no alagado, e ocasionalmente, ocorre, também, em mata ciliar. Os frutos são globosos com 4 a 8 cm de comprimento, apresentando-se na forma de uma baga e pode chegar ao tamanho de uma laranja e sua cor é violáceo-escuro quando maduros, unilocular, com numerosas sementes achatadas. A polpa é doce e comestível (GOMES, 1977; SAMPAIO, 2010).



Figura 2: *Parahancornia fasciculata*: árvore, folhas, frutos e casca.

Fonte: <http://www.umpedeque.com.br/arvore.php?id=660>



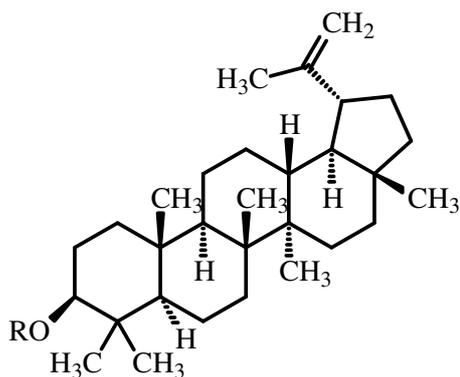
Figura 3: Exsicata de *Parahancornia fasciculata*. Fonte: Neotropical Herbarium Specimens – Exsicata. Disponível em: <http://fm1.fieldmuseum.org/vrrc/>.

Geograficamente esta planta é encontrada nas Guianas, no Suriname (SAMPAIO, 2000), no Perú (ENCARNACION, 1983) e no Brasil, nos estados do Amazonas, Acre, Rondônia, Roraima, Mato Grosso (SAMPAIO, 2000) e Amapá (SOBRINHO *et al.*, 1991; CARVALHO *et al.*, 2001b). Esta planta é típica da Amazônia brasileira, especificamente do Pará, dispersa do Baixo Amazonas até o

estuário, ocorrendo na mata virgem alta em lugares úmidos e húmidos da terra firme (CAVALCANTE, 1979).

Etnobotanicamente esta planta é conhecida como amapá, amapazeiro, leite de amapá (VAN DEN BERG, 1982) e amapá amargoso (RIBEIRO *et al.*, 1999). As cascas e o látex de *P. fasciculata* são muito utilizados pela população ribeirinha de forma terapêutica. Popularmente esta planta é utilizada no tratamento da malária, infecções no útero, gastrite, problemas pulmonares (SHANLEY e MEDINA, 2005), tuberculose (PORTO, 1936), asma, bronquite, debilidade física (TENÓRIO *et al.*, 1991), como tônico, anti-sífilis (VAN DEN BERG, 1982), em hematomas, diabetes, inflamação, diarreia, hemorróida, dor de barriga, ameba, gripe (FREITAS e FERNANDES, 2006), como cicatrizante (PINTO *et al.*, 2000), anemia, dermatoses (FONSECA, 1939), resfriados e fortificante (AMOROSO e GELY, 1988).

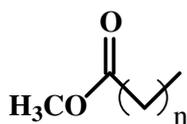
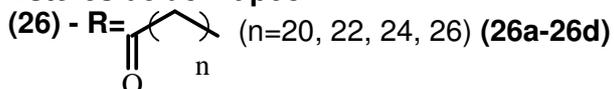
Um estudo fitoquímico do extrato diclorometano das cascas e do látex de *P. amapa*, resultou no isolamento e identificação de triterpenos pentacíclicos como lupeol (2), β -amirina (21), α -amirina (22), seus derivados acetilados (23, 24 e 25), ácidos alifáticos e outros ésteres de 3-O-acil-lupeol (26, 27 e 28). As estruturas destas substâncias naturais foram determinadas através de análises espectrométricas, destacando-se os resultados fornecidos por técnicas modernas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) (SOBRINHO *et al.*, 1991).



Lupeol (2)- R=H

Ésteres acetilados (23)- R=Ac

Ésteres de acil lupeol:

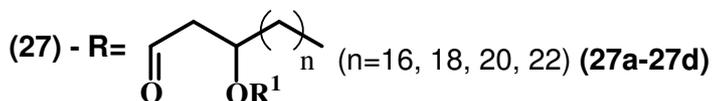


26a - n=20

26b - n=22

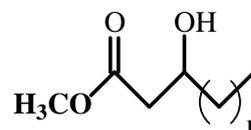
26c - n=24

26d - n=26



R¹= H

27A- R¹= Ac

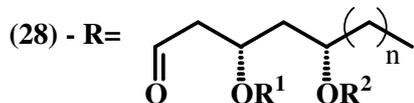


27a - n= 16

27b - n=18

27c - n=20

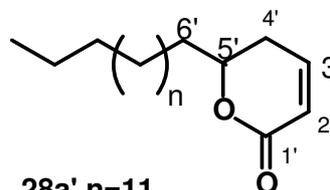
27d - n= 22



R¹=R²=H (n=14, 16) (20a-20b)

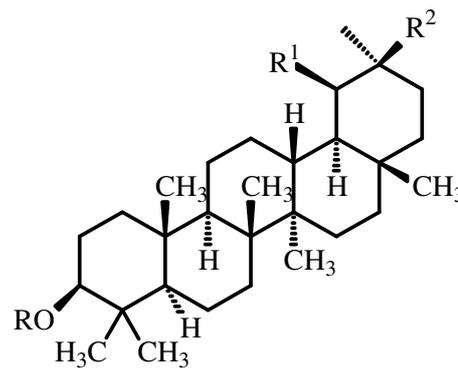
28a - R¹=R²=Ac

28b - R¹,R²= CMe₂



28a' n=11

28b' n=13



Beta-amirina (21)- R=R¹=H, R²= CH₃

Alfa-amirina (22)- R=R²= H, R¹= CH₃

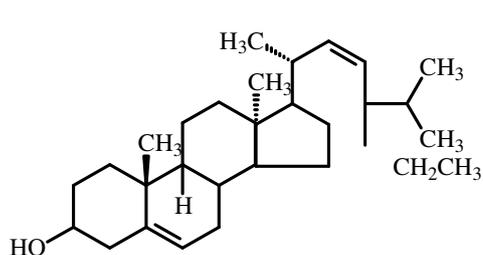
Ésteres acetilados:

(24)- R=Ac, R¹=H, R²=CH₃

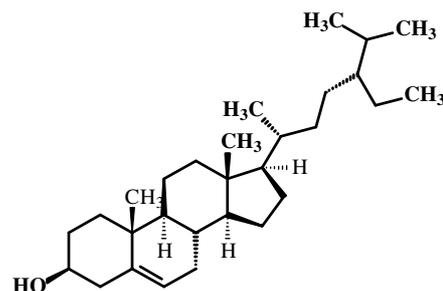
(25)- R=Ac, R¹=CH₃, R²= H

O fracionamento cromatográfico dos extratos das cascas, madeira e das raízes de *P. amapa* levou ao isolamento dos esteróides estigmasterol (29) e β -sitosterol (30), β -sitostenona (31), dos triterpenos pentacíclicos lupeol (2), α -amirina (22), β -amirina (21) e seus derivados acetilados e uma mistura de ésteres do lupeol (O-acil-lupeol). A hidrólise dos ésteres e posterior metilação com diazometano forneceu a mistura de ésteres metílicos cuja análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetria de massas CG-EM, permitiu caracterizar as cadeias dos grupos acila e identificar os ésteres hexadecanoato de lupelila (A), octadecanoato de lupelila (B) eicosadecanoato de lupelila (C), uneicosadecanoato de lupelila (D), doeicosadecanoato de lupelila (E), trieicosadecanoato de lupelila (F), tetraeicosadecanoato de lupelila (G), pentaieicosadecanoato de lupelila (H), hexaeicosadecanoato de lupelila (I), octaeicosadecanoato de lupelila (J) b-hidroxi octadecanoato de lupelila (K) β -hidroxieicosadecanoato de lupelila (L) b-hidroxieicosadecanoato de lupelila (M), β -hidroxitetraeicosadecanoato de lupelila (N), β -hidroxihexaeicosanoato de lupelila (O), b,D-diidroxipentaieicosanoato de lupelila (P), b,d-diidroxihexaeicosanoato de lupelila (Q). O grupo hidroxila em 3' dos β -hidroxie ésteres foi confirmado pela preparação do derivado acetilado e pelo β -cetoéster obtido na oxidação do composto natural. Foram identificados dois enóis constituintes do produto β -cetoésteres derivados de K e O. As estruturas das substâncias foram determinadas através de análise dos dados de IV, RMN de ^1H e ^{13}C , espectrometria de massas ou CG-EM das substâncias naturais ou de derivados (VELLOSO, 1998).

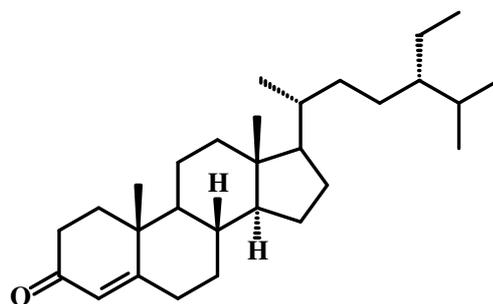
Extratos hexânico e metanólico obtidos das raízes de *P. amapa* foram fracionados, resultando no isolamento e identificação de nove novos ésteres metílicos e dez ésteres conhecidos de 3- β -O-acil-lupeol, os esteróides β -sitosterol (30), estigmasterol (29) e β -sitosterona e os triterpenos β -amirina (21), α -amirina (22), lupeol (2) e seus derivados acetilados. As estruturas das substâncias foram deduzidas através da análise de dados espectroscópicos, principalmente RMN ^1H e ^{13}C . Os ésteres metílicos dos ácidos obtidos através da hidrólise dos acil-lupeóis e metilação foram caracterizados por cromatografia gasosa por espectrometria de massa (CG-EM; Carvalho *et al.*, 2001b).



Estigmasterol
(29)



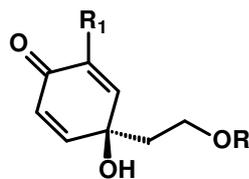
Beta-sitosterol
(30)



Beta-sitostenona
(31)

Do látex de *P. amapa* foram isolados três feniletanóides, cornosídeo [4-hidroxi-4 (2-O-β-D-glicopiranosil-etileno) ciclohexadienona], o 2-p-hidroxifeniletanol e o 2-(4-hidroxi-3-metoxifenil)- etanol e uma mistura de ésteres de acil-lupeol, acil-α-amirina e acil-β-amirina. As estruturas foram identificadas através da análise de espectros IV, massas e RMN¹H e ¹³C (ALVES, 2003).

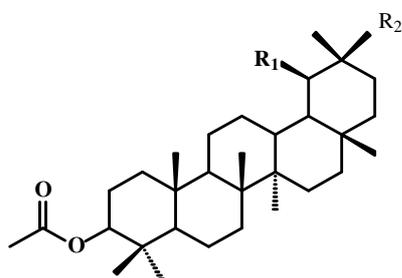
O látex de *P. amapa* foi extraído com hexano, diclorometano e metanol. As frações obtidas com hexano e diclorometano forneceram misturas de 3-O-acil-lupeol e triterpenos pentacíclicos confirmando resultados de outros estudos já realizados e publicados (SOBRINHO *et al.*, 1991; CARVALHO *et al.*, 2001). No extrato metanólico foi identificado mistura de carboidratos, metilmioinositol e derivados de feniletanóides, tendo como principal constituinte o cornosídeo (quinol glucosídeo) (32). Estes constituintes foram identificados através da análise de espectros de IV, RMN ¹H e ¹³C e CG-EM das frações do derivado acetilado do cornosídeo e do metilmioinositol (CARVALHO *et al.*, 2008).



R= gluc, R₁= H

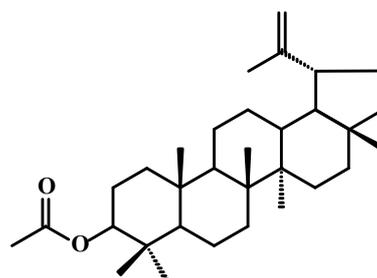
Cornosídeo (quinol glucosídeo)
(32)

O látex de *P. amapa* foi extraído com diclorometano, e foi submetido a diversos fracionamentos por cromatografia em coluna e uma fração (PAL-c) forneceu uma mistura de três triterpenos acetilados: acetato de α -amirina (33), acetato de β -amirina (34) e acetato de lupeol (35) e uma isolada, identificada como éster de 3-O-acil-lupeol. Outras duas frações (PAL-e e PAL-f) foram purificadas por recristalização com leve aquecimento, resultando em dois ésteres de 3-O-acil-lupeol: Substância 1 (36) e Substância 3 (37; SILVA *et al.*, 2010).

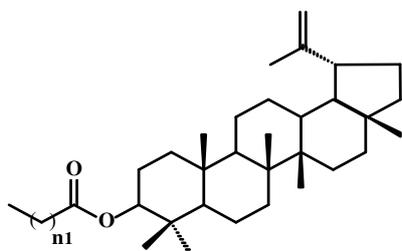


Acetato de alfa-amirina: R₁=CH₃; R₂=H (33)

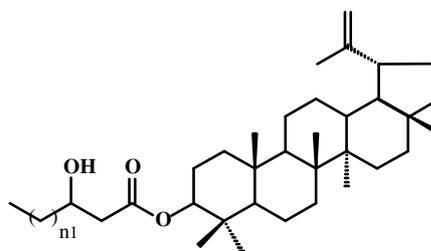
Acetato de beta-amirina: R₁=H; R₂=CH₃ (34)



Acetato de Lupeol
(35)



Substância 1
(36)



Substância 3
(37)

Para a espécie *P. fasciculata* ainda não foram relatados na literatura estudos farmacológicos e de suas atividades biológicas, incluindo atividade antimalárica *in vitro* e *in vivo* e de toxicidade oral aguda. Não há, também, relatos destes estudos de atividades de outras espécies do gênero *Parahancornia*. No entanto, como esta planta possui o metabólito lupeol em sua constituição, resultado de estudos já relatados, e o mesmo ocorre em outras espécies de plantas de diversas famílias, já se observou que este metabólito apresenta diversas atividades farmacológicas, incluindo atividade antimalárica (GALLO & SARACHINE, 2009).

Devido sua atividade antimalária, o triterpeno pentacíclico lupeol foi objeto de estudo por vários pesquisadores, os quais utilizaram diversas espécies de plantas medicinais da família Apocynaceae e espécies de outras famílias.

Um exemplo de atividade antimalárica do lupeol é o trabalho realizado por Alves e colaboradores (1997), que utilizou o extrato hexânico das folhas de *Vernonia brasiliiana* (L.) Druce (Compositae) o qual, foi submetido a um protocolo de fracionamento biomonitorado com base na atividade antimalárica *in vitro* e *in vivo*. Após fracionamento, o lupeol foi identificado como um composto responsável pela atividade *in vitro*, inibindo moderadamente (45%) o crescimento do *P. falciparum* quando testado na concentração de 25 µg/ml. No entanto, este triterpeno foi inativo *in vivo* quando 15 mg/kg foram administrados durante quatro dias consecutivos em camundongos infectados com *P. berghei*.

O lupeol e seus derivados foram testados por vários cientistas contra diferentes cepas de algumas espécies de protozoários. Srinivasan e colaboradores (2002) construíram bibliotecas de lupeol e testaram 96 membros destas. Um dos mais promissores (X1Z11), foi bio-ensaiado em cepas NF-54 de *P. falciparum* com CI_{50} de 14,8 µM e *P. berghei* com redução da parasitemia de 1,7 %, observando-se uma discrepância entre os resultados *in vitro* e *in vivo*. Numa tentativa de ampliar a investigação sobre o modo de ação antimalárica de triterpenos tipo lupano, Ziegler e colaboradores (2002, 2004) demonstraram que o lupeol e compostos afins extraídos das plantas *Rinorea ilicifolia* Kuntze (Violaceae) e *Zataria multiflora* Boiss. (Lamiaceae), apresentaram atividade inibitória *in vitro* frente a cepas 3D7 do *P. falciparum* com CI_{50} de $27,7 \pm 0,5$ µM. No entanto, analisaram que estes compostos agem nos eritrócitos humanos, estimulando a formação de vesículas internas ao

longo de toda a membrana da hemácia, provocando assim, alterações irreversíveis nesta célula, observando-se que existe uma boa correlação entre os valores de CI_{50} e as mudanças na curvatura da membrana causada pelo lupeol. Tais mudanças impedem que os parasitas invadam os glóbulos vermelhos, impossibilitando a reprodução de *P. falciparum* e, conseqüentemente, o avanço da doença.

Um estudo etnobotânico realizado no Sudoeste da Nigéria identificou a planta *Cassia siamea* L. (Fabaceae) como um remédio para doença febril. Foi desenvolvido o fracionamento biomonitorado do extrato das cascas do caule da planta, utilizando-se o ensaio da lactato desidrogenase do parasito ($pLDH$) com cepas (K1) multi-resistentes de *P. falciparum* para avaliar a atividade antiplasmódica *in vitro*. Emodina e lupeol foram isolados a partir da fração de acetato de etila por uma combinação de técnicas cromatográficas. Para a atividade antiplasmódica ambos os compostos foram ativos apresentando os mesmos valores de CI_{50} de 5 $\mu\text{g/mL}$ (AJAIYEOBA *et al.*, 2008).

Tendo em vista a busca de novos fármacos a partir do pó das cascas de *P. fasciculata* e explorando sua atividade antimalárica, tornou-se de interesse realizar estudos fitoquímicos, com o objetivo de estudar a atividade antimalárica *in vivo* e *in vitro* e toxicidade oral aguda dos extratos, frações e substancia isolada desta planta.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Realizar estudos fitoquímicos, avaliar a toxicidade oral aguda e a atividade antimalárica *in vitro* e *in vivo* dos extratos, frações e substância(s) isolada(s) das cascas de *Parahancornia fasciculata*.

3.2 Objetivos Específicos

- ✓ Realizar estudos fitoquímicos de *P. fasciculata*.
- ✓ Avaliar a atividade antiplasmódica *in vitro* dos extratos, frações e substância(s) isolada(s) das cascas de *P. fasciculata*.
- ✓ Avaliar a atividade antimalárica *in vivo* dos extratos e/ou frações das cascas de *P. fasciculata*.
- ✓ Avaliar a toxicidade oral aguda do extrato etanólico das cascas de *P. fasciculata*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 EQUIPAMENTOS

- Agitador com plataforma, New Brunswick Scientific, Modelo Innova 2100.
- Aparelho de Ponto de Fusão MQAPF – 301 Microquímica.
- Autoclave, Phoenix
- Balança Analítica Mettler Toledo, modelo AB204.
- Balança semi-analítica, Núcleo.
- Banho de ultrassom
- Bomba de vácuo- Fabbe
- Chapa de aquecimento – Quimis
- Chapa aquecedora e agitadora, Corning
- Câmara de Ultravioleta de 254 e 365nm, Warning
- Capela de fluxo laminar Veco, mod. VLFS-12
- Capela de exaustão - Quimis
- Centrífuga Fanem, mod. 205N
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência, modalidade analítica, Wathers®, equipado com injetor automático, mod. 2695; detector de arranjos de diodos (DAD), mod. 2996; bomba mod. L-6200A; integrador, mod. C-R4A.
- Dessecadores de vidros.
- Destilador de água.
- Espectrofotômetro de Infravermelho Perkin Elmer Precisely, modelo Spectrum One FT-IR Spectrometer.
- Estufa ventilada para secagem de material vegetal Fanem, mod. 501A
- Evaporador rotatório, Büchi, modelo B 480.
- Geladeira, Cònsul
- Leitora de microplacas- ELISA Stat Fax ®, mod. 2100
- Medidor de pH, Marconi, modelo PA200.
- Microcentrífuga, Cientec, modelo 14000 D.
- Moinho de facas, Marconi.

- Sistema de filtração de água Millipores, Milli-Q Plus.
- Micropipetas Ependorff, vol. ajustável de 100 µL - 1 mL.
- Micropipetas Ependorff, vol. ajustável de 2 µL - 20 µL.
- Micropipeta Transferpette - Brand, 8 canais, eletrônica, vol. ajustável de 10-200 µL.
- Ultra-som Thornton, mod. T14

4.1.2 MATERIAL DE CONSUMO

4.1.2.1 Produtos Químicos, Reagentes e material para cromatografia

- Anisaldeído, Merck
- Coluna para CLAE LiChospher® 100 RP-18 (5µm), Merck
- Cloreto de alumínio P.A, Riedel
- Cloreto férrico, Vetec
- D-glicose anidra P.A, Synth
- Reagente de Dragendorff
- Ferricianeto de potássio P.A., Reagen
- Gentamicina: Química Haller
- Hidróxido de potássio
- Reagente de Lieberman-Burchard
- Reativo de Kedde
- Sílica gel 60 para cromatografia de camada delgada, Merck.
- Sílica gel 60 (0, 063 - 0, 200 mm) para cromatografia em coluna, Merck.

4.1.2.2 Solventes

- Acetato de etila P.A, Merck
- Acetona P.A, Merck
- Acetonitrila, grau CLAE, Merck
- Ácido acético glacial P.A., Merck
- Ácido Sulfúrico concentrado P.A, Merck

- Ácido clorídrico P.A, Merck
- Ácido 3,5-dinitrobenzóico, Merck
- Ácido fórmico P.A, Merck
- Clorofórmio P.A, Merck
- Diclorometano P.A., Quimex
- DMSO P.A (Dimetilsufóxido),
- Etanol grau 96° GL, P.A, Quimex
- Éter dietílico P.A, Merck
- n-Hexano P.A, Merck
- Hidróxido de amônio P.A, Merck
- Metanol P.A, Merck
- Metanol, grau CLAE, Merck
- Tolueno P.A, Merck
- Trietilamina P.A, Merck

4.1.2.3 Materiais Plásticos e Vidrarias

- Balões de fundo redondo de 100, 250 e 500 mL
- Bastão de vidro
- Béqueres de 10, 50, 100, 500 e 1000 mL;
- Condensador de bolas
- Cuba cromatográfica;
- Cubas de vidro Pirex para banho de gelo;
- Erlenmeyers de 50, 100, 250 e 500 mL;
- Espátulas de metal
- Frascos Eppendorf, Sigma Chemical Company
- Funis de separação de 250 mL e 2000 mL;
- Manta aquecedora
- Membranas filtrantes Millipore, Millex F6 0,2 mm
- Papel alumínio comercial
- Papel de filtro MN 618
- Pipetas graduadas de 1, 5 e 10 mL;

- Pipetas de Pasteur de vidro, VWR.
- Pipetas volumétricas de 10 e 20 mL.
- Placas com 96 poços de fundo chato, TPP
- Placas de petri 90x15- PROLAB
- Placas cromatográficas de alumínio com 0,2mm de espessura da Merck contendo gel de sílica 60 F₂₅₄.
- Placas cromatográficas de vidro 10 x 5 e 10 x 10cm;
- Ponteiras de 10 a 1000µl e de 20 a 200µl
- Provetas 5, 20, 50, 100, 500 e 1000 mL;
- Vials para CLAE

4.1.2.4 MEIO DE CULTURA E PREPARO DO MEIO

- RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) sem NaHCO₃ e com L-glutamina.

4.1.2.4.1 *Solução de RPMI 1640 estoque (1 litro)*

A solução estoque foi preparada em béquer de 1 litro (com barra magnética), e adicionou-se cerca de 800 mL de água para injeção e 10,4g de RPMI em constante agitação em agitador magnético. Em seguida, adicionou-se 5,98g do tampão HEPES, 2g de D-glicose (dextrose), 2g de bicarbonato de sódio, 50 mg de hipoxantina, 40 mg de gentamicina (ampola), 300 mg de glutamina e completou-se com água até 1 litro. Logo após, ajustou-se o pH para 7 e filtrou-se em sistema de filtro à vácuo com membrana de 0,22 ou 0,44µm em fluxo laminar e estocou-se em geladeira (4 °C).

Para o cultivo foi utilizado o meio RPMI completo, que foi preparado suplementando o meio RPMI estoque com 10% de plasma humano inativado (grupo sanguíneo do tipo A⁺) na proporção (9:1).

4.1.3 PREPARO DOS REVELADORES UTILIZADOS NA PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

4.1.3.1 Anisaldeído - ácido sulfúrico (H₂SO₄)

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

4.1.3.2 Cloreto de alumínio a 2% em etanol

Foi utilizado 1g de cloreto de alumínio para 50 mL de etanol. Em seguida, a solução foi armazenada em frasco âmbar sob refrigeração (2-8°C) (WAGNER *et al.*, 1984).

4.1.3.3 Reagente de Dragendorff

Para a confecção deste reagente, prepararam-se duas soluções denominadas de solução A e solução B.

Solução A: 0,850g de subnitrito de bismuto; 10,0 mL de ácido acético e 40,0 mL de água destilada. Solução B: 8,0 g de iodeto de potássio dissolvido em 20,0 mL de água destilada.

Estas duas soluções foram combinadas, na proporção de 1:1, resultando numa solução estoque. Para pulverização nas placas cromatográficas diluiu-se 2,0 mL de solução estoque com 4,0mL de ácido acético glacial e 20,0 mL de água destilada (WAGNER *et al.*, 1984).

4.1.3.4 Ferricianeto de potássio 1% e cloreto férrico 2%

Preparou-se uma solução de 0,25g de ferricianeto de potássio em 25 mL de água destilada e outra solução de 1g de cloreto férrico em 25 mL de água destilada, em seguida estas foram misturados (1:1). Logo após, a solução foi armazenada em frasco âmbar sob refrigeração (2-8°C) (WAGNER *et al.*, 1984).

4.1.3.5 Hidróxido de potássio 5%

Foram utilizados 2,5g de hidróxido de potássio em 50 mL de metanol. Em seguida, a solução foi armazenada em frasco âmbar sob refrigeração (2-8%) (WAGNER *et al.*, 1984).

4.1.3.6 Reativo de Kedde

Foram utilizados 0,5g de ácido 3,5-dinitrobenzóico em 25 mL de metanol e 2g de hidróxido de sódio em 25 mL de água destilada em banho de gelo. Em seguida as soluções foram misturadas no momento do uso para a revelação na placa de CCD (PÁDUA, 2010).

4.1.3.7 Reagente de Liebermann-Burchard

Misturou-se 5 mL de anidrido acético com 5 mL de ácido sulfúrico concentrado em 50 mL de etanol, em banho de gelo. Em seguida, o reagente foi armazenado em frasco âmbar sob refrigeração (2-8 °C) (WAGNER *et al.*, 1984).

4.1.4 MATERIAL BIOLÓGICO

4.1.4.1 Clones para as cepas de *Plasmodium berghei* e *Plasmodium falciparum*

Para o teste da atividade antiplasmódica *in vitro*, foi utilizado o clone W2 do *P. falciparum* o qual foi cedido pela Dr^a. Luzia Helena de Carvalho do Centro de Pesquisas René Rachou-CPqRR, FIOCRUZ, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. Este clone é originário da Indochina, sendo resistente a cloroquina e sensível a mefloquina. Para o teste da atividade antimalárica *in vivo*, foi utilizado o clone ANKA do *P. berghei*, o qual também foi cedido pela Dr^a. Luzia Helena de Carvalho do Centro de Pesquisas René Rachou-CPqRR, FIOCRUZ. Este clone é originário de Katanga no sul da República Democrática do Congo.

4.1.4.2 Plasma humano e hemácias

O sangue foi cedido pelo Banco de Sangue da Fundação Hemominas de Minas Gerais, Belo Horizonte - MG. Esse sangue foi proveniente de pacientes doadores do grupo sanguíneo A fator Rh positivo (A+), sendo o mesmo colhido com heparina e centrifugado a 1500rpm/20 min. O plasma sobrenadante foi isolado, aliquotado (10 ml) e conservado sob congelamento (-20°C).

As hemácias foram colhidas de doadores, sem que estes tenham recebido qualquer forma de benefício. Foram coletadas mensalmente 90 mL de sangue de doador tipo A+. A coleta foi realizada seguindo as normas de biossegurança e após a mesma o sangue foi transferido dos tubos de coleta com heparina para um tubo de 50 mL e foi adicionado meio RPMI incompleto até completar o volume de 50 mL. Em seguida, foi centrifugado a 2500rpm por 10 minutos. Após centrifugação, aspirou-se com pipeta tipo Pasteur, a fase plasma + RPMI e a camada de leucócitos. A papa de hemácias que ficou no tubo foi retirada e transferida para um novo tubo de 50 mL e completou-se novamente para o volume de 50 mL e repetiu-se o procedimento anterior por mais duas vezes. Ao final, o sangue foi ressuspendido a 50% com meio RPMI completo na proporção de 1:1 e em seguida o tubo foi identificado (data, tipo sanguíneo, doador, etc) e estocado a 4°C por até 4 semanas.

4.1.5 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

Os procedimentos realizados com animais seguiram as mais rígidas normas de experimentação animal, de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, segundo as Normas da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório - SBCAL (nova denominação do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal - CoBEA) e do recém-criado CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal; Lei No. 11.794, publicada no DOU de 08/10/2008). O protocolo experimental foi submetido ao Comitê de Ética em pesquisa com animais de experimentação (CEPAE) da UFPA e aprovado pelo mesmo com parecer de nº BIO037-12 (ANEXO 1).

Foram utilizados nos experimentos camundongos (*Mus musculus*), linhagem Swiss (var. albino), fêmeas (nulíparas e não grávidas) com peso corporal inicial de 20 ± 2 g. Os camundongos utilizados foram provenientes do biotério da Faculdade de Farmácia-UFMG e do Instituto Evandro Chagas (IEC). Os camundongos foram mantidos em ambiente com temperatura controlada ($23 \pm 3^\circ\text{C}$), umidade em torno de 50 a 70%, ciclo de luz claro/escuro de 12 horas, baixos níveis de ruídos e com contínua exaustão de ar. Os animais foram mantidos com livre acesso a água filtrada e ração peletizada em caixas de polipropileno com tampa metálica, forradas com palha de arroz e número máximo de 5 animais (fêmeas separadas por caixa) que foi devidamente etiquetada para constar todos os dados e estado fisiológico diário dos mesmos.

4.1.6 OUTROS MATERIAIS

4.1.6.1 Solução estoque de Giemsa

Solubilizou-se 1g de Giemsa em pó em 54 mL de glicerina P.A aquecida e em agitação. Esperou-se resfriar um pouco (não deixou resfriar totalmente) e acrescentou-se 84 mL de metanol P.A. Em seguida, filtrou-se em papel de filtro e estocou-se ao abrigo da luz. Para uso, dilui-se em água tamponada, 5 gotas/mL.

4.1.6.2 Soluções salinas a 12% e 1,6%

Foi utilizado soluções salinas a 12% e a 1,6%. A primeira foi preparada pesando-se 12g de NaCl, dissolvidos em 100mL de água destilada. Após essa fase a solução foi filtrada em membrana de $0,22\mu\text{m}$. A segunda solução foi preparada de forma semelhante à primeira, contudo utilizando-se 1,6g de NaCl.

4.1.6.3 Soluções salinas a 0,9% glicosada

Foi pesado 0,9g de NaCl, dissolvidos em 100mL q.s.p de água destilada. Após essa fase, foi adicionado 0,2g de glicose a solução, sendo homogeneizada, e em seguida filtrada em membrana de $0,22\mu\text{m}$.

4.1.6.4 Água tamponada (solução estoque 20x)

Foi utilizado 9,3g de KH_2PO_4 , 1,15g de Na_2HPO_4 ou 1,3g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e diluído em 500 mL de água Mili-Q. Os dois sais serão misturados com o auxílio de um pistilo e de uma proveta e o pH da água tamponada deve ser 6,8.

4.1.7 MATERIAL VEGETAL

As cascas de *P. fasciculata* foram coletadas em 03/2011, situado nas coordenadas S 02°11'27" e W 048°47'18" no Campo Experimental da Embrapa Amazônia Oriental, localizado no Km 30 da PA-150, Município de Moju, Estado do Pará. O espécime coletado foi identificado pela Dra. Márlia Regina Coelho Ferreira, e a exsiccata sob número ME202701 foi depositada no herbário do Museu Paraense Emílio Goeldi em Belém/PA.

4.2 Métodos

4.2.1 FITOQUÍMICA

4.2.1.1 Obtenção dos extratos etanólico (EETF) e em diclorometano (EDAPF) de cascas de *Parahancornia fasciculata*.

O material vegetal (7,2kg) foi submetido à lavagem com água corrente e etanol 70° GL para a retirada de possíveis contaminantes, sendo posteriormente seco em estufa com ar circulante, à temperatura de 40°C, por aproximadamente sete dias. Em seguida, foi triturado em moinho de facas até a obtenção de um pó (3,670kg) que ficou armazenado em frasco hermeticamente fechado. A partir de 500g do pó das cascas, preparou-se um extrato etanólico pelo processo de maceração em temperatura ambiente, na proporção de 1:10 (pó da planta:etanol 96°GL) . A maceração foi realizada por 7 dias, em um recipiente fechado (percolador), ao abrigo da luz. O extrato foi concentrado até resíduo em evaporador rotatório, em seguida foi armazenado em frascos de vidro que foram colocados para secagem total em estufa a 50°C. Posteriormente, os frascos contendo os extratos (45g) foram armazenados em dessecador de vidro.

O extrato com diclorometano foi obtido a partir de pó das cascas (200g) de *P. fasciculata*, previamente alcalinizado com 10 mL de NH_4OH (5% v/m). Essa mistura foi transferida para percolador e adicionou-se uma quantidade suficiente de diclorometano (DCM) até cobrir o material vegetal, deixou-se em repouso por até 8 horas e após esse período, repetiu-se a extração com DCM por até 5 vezes. Após a finalização das extrações, o extrato em diclorometano de *P. fasciculata* (EDAPF) foi concentrado em evaporador rotatório até secagem total (6,47g). Este procedimento foi realizado em capela de exaustão. O fluxograma dos dois processos de extração encontra-se na figura 4 abaixo.

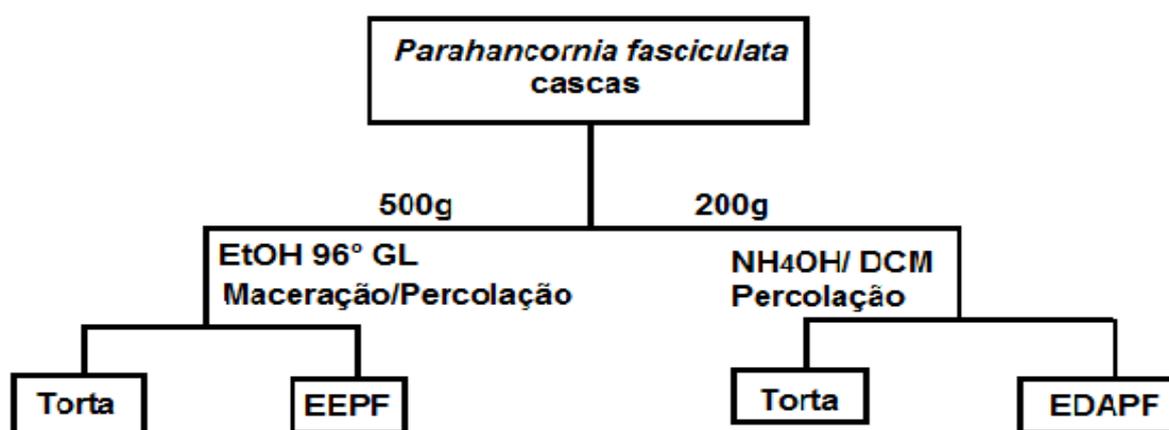


Figura 4: Fluxograma do processo de extração das cascas de *Parahancornia fasciculata* para obtenção do extrato etanólico (EEPF) e em diclorometano (EDAPF).

4.2.1.2 Prospecção Fitoquímica por CCD do extrato etanólico obtido das cascas de *Parahancornia fasciculata*

O extrato etanólico de *P. fasciculata* (5mg) foi solubilizado em 250 μL de metanol e a solução foi submetida à prospecção fitoquímica. Os perfis cromatográficos foram obtidos, em CCD, empregando sílica gel 60G, como fase estacionária. Foram utilizados para as análises diferentes tipos de eluentes e reveladores seletivos para cada classe de produto natural. Nesta prospecção, foi avaliada a presença de vários metabólitos entre eles, triterpenos e esteróides, geninas flavônicas, heterosídeos flavônicos, cumarinas, saponinas, alcalóides, polifenóis, taninos, geninas antraquinônicas e naftoquinônicas, heterosídeos antracênicos e heterosídeos cardiotônicos (WAGNER *et al.*, 1984).

4.2.1.2.1 *Triterpenos e esteróides* (WAGNER *et al.*, 1984)

Utilizou-se como fase móvel uma solução de n-hexano: acetato de etila (8:2), sendo o revelador o Reagente de Lieberbanm-Burchard. Como amostras de referência foram utilizadas ésteres do lupeol e o β -sitosterol. Considerou-se positivo quando, após revelação com Lieberbanm-Burchard, observou manchas marrons ou acinzentadas (vis), imediatamente à luz visível, ou após aquecimento a 100°C por 5-10 min, e fluorescência do alaranjado ao vermelho (UV₃₆₅ e UV₂₅₄).

4.2.1.2.2 *Geninas flavônicas* (WAGNER *et al.*, 1984)

Nesta pesquisa utilizou-se como fase móvel uma mistura de clorofórmio: acetato de etila: ácido fórmico (60:40:2,5), sendo o revelador o cloreto de alumínio a 2% em metanol. Como amostras de referência foram utilizadas quercetina e miricetina. Considerou-se positivo quando, após revelação com cloreto de alumínio a 2% em metanol, observaram-se manchas de cor amarela (vis.), imediatamente à luz visível, ou após aquecimento a 100°C por 5-10 min, e fluorescência do amarelo-esverdeado (UV₃₆₅ e UV₂₅₄).

4.2.1.2.3 *Heterosídeos flavônicos* (WAGNER *et al.*, 1984)

Utilizou-se como fase móvel uma mistura de acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético: água (100:11:11:27), sendo o revelador o cloreto de alumínio a 2% em metanol. Como amostras de referência foram utilizadas rutina e isoquercitrina. Considerou-se positivo quando, após revelação com cloreto de alumínio a 2% em metanol, observaram-se, imediatamente, à luz visível, manchas de cor amarela (vis.), e fluorescência do amarelo-esverdeado (UV₃₆₅ e UV₂₅₄), após aquecimento a 100°C por 5-10 min.

4.2.1.2.4 *Cumarinas* (WAGNER *et al.*, 1984)

Utilizou-se como fase móvel uma mistura de tolueno: éter (1:1) saturada com ácido acético (5 gotas), sendo o revelador o hidróxido de potássio 5% em metanol. Como amostra de referência foi utilizada a cumarina. Considerou-se positivo

quando, observaram-se manchas de cor verde azulada sob UV₃₆₅ e UV₂₅₄, e após revelação com hidróxido de potássio 5% em metanol e aquecimento a 100°C por 5-10 min, observaram-se as mesmas manchas com coloração intensificada; a cumarina não substituída apresenta fluorescência amarelo-esverdeada apenas após tratamento com hidróxido de potássio.

4.2.1.2.5 *Saponinas* (WAGNER *et al.*, 1984)

Utilizou-se como fase móvel uma mistura de clorofórmio:metanol (95:5), sendo o revelador o anisaldeído. Como amostra de referência foi utilizada a aescina. Considerou-se como resultado positivo quando, após revelação com anisaldeído, observaram-se manchas de cor azul ou azul-violeta e zonas amarelas (vis.) e aquecimento a 100°C por 5 min.

4.2.1.2.6 *Alcalóides* (WAGNER *et al.*, 1984)

Utilizou-se como fase móvel uma mistura de clorofórmio:metanol: hidróxido de amônio (85:15:0,2), sendo o revelador utilizado o Reagente de Dragendorff (vis.). Como amostra de referência foi utilizada a quinina livre. Considerou-se como resultado positivo quando, após revelação com o Reagente de Dragendorff (vis.), observaram-se manchas de cor marrom ou alaranjada (vis.).

4.2.1.2.7 *Polifenóis* (WAGNER *et al.*, 1984)

Utilizou-se como fase móvel uma mistura de acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético: água (100:11:11:27), sendo o revelador o ferricianeto de potássio a 1% e cloreto férrico a 2%. Como amostras de referência foram utilizadas a catequina e a rutina. Considerou-se positivo quando, após revelação da mistura 1:1 do revelador ferricianeto de potássio a 1% e cloreto férrico a 2%, observaram-se manchas de cor negro-azulada ou negro-esverdeada (vis.).

4.2.1.2.8 *Taninos* (WAGNER *et al.*, 1984)

Utilizou-se como fase móvel uma mistura de acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético: água (100:11:11:27), sendo o revelador o ferricianeto de potássio a 1% e cloreto férrico a 2%. Como amostra de referência foi utilizada a proantocianidina A₂. Considerou-se positivo quando, após revelação da mistura 1:1 do revelador ferricianeto de potássio a 1% e cloreto férrico a 2%, observou manchas de cor negro-azulada ou negro-esverdeada (vis.).

4.2.1.2.9 *Geninas antraquinônicas e naftoquinônicas* (WAGNER *et al.*, 1984)

Utilizou-se como fase móvel uma mistura de tolueno:acetona:clorofórmio (40:25:35), sendo o revelador o hidróxido de potássio a 5% em metanol. Como amostra de referência foi utilizada a 1,8-di-hidroxi-antraquinona. Considerou-se positivo para antraquinonas e naftoquinonas quando, observaram-se manchas de cor laranja ao vermelho (vis.), e após revelação com hidróxido de potássio 5% em metanol e aquecimento a 100°C por 5-10 min, se observou fluorescência de cor do alaranjado ao vermelhor (UV₃₆₅ e UV₂₅₄). Para antronas e antranóis considera-se positivo quando, observam-se manchas amarelas (vis.) e fluorescências de cor alaranjada (UV₃₆₅ e UV₂₅₄).

4.2.1.2.10 *Heterosídeos antracênicos* (WAGNER *et al.*, 1984)

Utilizou-se como fase móvel uma mistura de acetato de etila: metanol: água (81:11:8), sendo o revelador o hidróxido de potássio a 5% em metanol. Como amostra de referência foi utilizada a aloína. Considerou-se positivo para antraquinonas quando se observaram manchas de cor laranja ao vermelho (vis.), e após revelação com hidróxido de potássio 5% em metanol e aquecimento a 100°C por 5-10 min, se observou fluorescência de cor do alaranjado ao vermelhor (UV₃₆₅ e UV₂₅₄). Para antronas e antranóis, considera-se positivo quando, observam-se manchas amarelas (vis.) e fluorescências de cor alaranjada (UV₃₆₅ e UV₂₅₄).

4.2.1.2.11 *Heterosídeos cardiotônicos* (PÁDUA, 2010)

Utilizou-se como fase móvel uma mistura de acetato de etila: metanol: água (81:11:8), sendo o revelador o Reativo de Kedde. Como amostra de referência foi utilizada a digoxina. Considerou-se como resultado positivo para cardenólídeos quando, após observação a luz visível e revelação com o reativo de Kedde, observaram-se manchas de coloração rosa ou azul-violácea (vis.)

4.2.1.3 Fracionamento do extrato etanólico obtido das cascas de *Parahancornia fasciculata* (EPPF)

A uma alíquota do extrato etanólico (10g) adicionou-se etanol (10 mL), ácido clorídrico aquoso a 3% (250 mL) e diclorometano (200mL). A mistura foi homogeneizada, formando-se uma fase aquosa ácida e uma fase diclorometânica que foram separadas em funil de decantação. A extração com diclorometano foi repetida três vezes (3x200mL). As camadas orgânicas foram reunidas; a solução diclorometânica foi tratada com sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada em evaporador rotatório obtendo-se a fração não alcaloídica (fração de neutros-EPPFN). A fase aquosa ácida foi alcalinizada com hidróxido de amônio concentrado até pH 9, seguido-se extrações sucessivas com diclorometano (4x200mL). Novamente foram separadas as fases, e as soluções em diclorometano foram reunidas. A solução orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada em evaporador rotatório obtendo-se a fração de alcalóides totais (EPPFA). O fluxograma deste processo encontra-se na Figura 5.

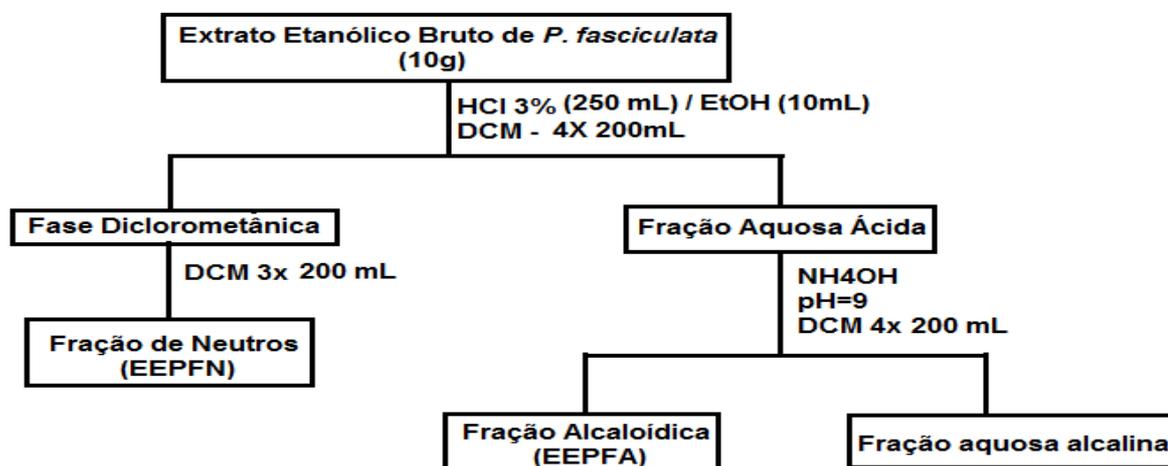


Figura 5: Fluxograma do processo de extração ácido-base de *Parahancornia fasciculata*.

4.2.1.4 Fracionamento do Extrato em Diclorometano de *Parahancornia fasciculata* (EDAPF)

4.2.1.4.1 Por Cromatografia em Coluna

O extrato em diclorometano de *P. fasciculata* (EDAPF) (3g) foi solubilizado em diclorometano (DCM), incorporado a sílica gel (3g) e submetido à cromatografia em coluna (25 x 2 cm) que foi empacotada com 60 g de sílica gel 60 (0,063 - 0,200 mm da Merck) e DCM (100 mL). Para eluição, empregaram-se misturas de solventes de polaridade crescente, conforme Tabela 1. Foram recolhidas frações de volumes variáveis e estas foram reunidas de acordo com seus perfis cromatográficos, resultando em 30 frações, denominadas (EDA-PF-F1 a 30). A Figura 6 abaixo mostra a fotografia da coluna cromatográfica do EDAPF.



Figura 6: Coluna Cromatográfica do EDAPF utilizada no presente trabalho.

Tabela 1: Dados referentes à coluna cromatográfica em sílica gel do EDAPF (3,0 g).

Eluente (volume)	Frações	Massa (mg)
DCM 100% (100 mL)	EDAPF-Fr1	612,9
DCM 100% (100 mL)	EDAPF-Fr2	363
DCM 100% (100 mL)	EDAPF-Fr3	434,3
DCM 100% (100 mL)	EDAPF-Fr4	220
DCM 100% (100 mL)	EDAPF-Fr5	328,3
DCM 100% (100 mL)	EDAPF-Fr6	246,7
DCM 100% (100 mL)	EDAPF-Fr7	77,2
DCM 100% (100 mL)	EDAPF-Fr8	26,6
DCM:Acetato de Etila (9:1) (100 mL)	EDAPF-Fr9	32,7
DCM:Acetato de Etila (9:1) (100 mL)	EDAPF Fr10	48,4
DCM:Acetato de Etila (1:1) (100 mL)	EDAPF-Fr11	106
DCM:Acetato de Etila (1:1) (100 mL)	EDAPF-Fr12	112,9
DCM:Acetato de Etila (1:1) (100 mL)	EDAPF-Fr13	17,8
DCM:Acetato de Etila (1:1) (100 mL)	EDAPF-Fr14	5,1
DCM:Acetato de Etila (1:1) (100 mL)	EDAPF-Fr15	4
DCM:Acetato de Etila (1:1) (100 mL)	EDAPF-Fr16	2,2
Acetato de Etila (100 mL)	EDAPF-Fr17	2,4
Acetato de Etila (100 mL)	EDAPF-Fr18	1,8
Metanol 2%: Acetato de etila (98:2) (100 mL)	EDAPF-Fr19	5,7
Metanol 2% : Acetato de etila (98:2) (100 mL)	EDAPF-Fr20	7,5
Metanol 2%: Acetato de etila (98:2) (100 mL)	EDAPF-Fr21	12
Metanol 2% : Acetato de etila (98:2) (100 mL)	EDAPF-Fr22	12,8
Metanol 5%: Acetato de etila (95:5) (100 mL)	EDAPF-Fr23	7,6
Metanol 5%: Acetato de etila (95:5) (100 mL)	EDAPF-Fr24	7,6
Metanol 5%: Acetato de etila (95:5) (100 mL)	EDAPF-Fr25	7,6
Metanol 10%: Acetato de etila (90:10) (100 mL)	EDAPF-Fr26	3,9
Metanol 10%: Acetato de etila (90:10)	EDAPFFr27	4,7
Metanol 100% (100 mL)	EDAPF-Fr28	6,6
Metanol 100% (100 mL)	EDAPF-Fr29	49,8
Metanol 100% (100 mL)	EDAPF-Fr30	5,9
Total		2774

Em seguida, as frações foram submetidas a CCD, conforme Tabela 2, com o objetivo de encontrar a frações ricas em triterpenos as quais foram reunidas. Então se verificou que as frações 5, 6 e 7, além de serem as mais ativas, provavelmente continham triterpenos.

Tabela 2: Frações que foram reunidas e submetidas a análise por CCD.

Frações	Massa (mg)
EDAPF-Fr 1-3	1410
EDAPF-Fr 5-7	652,2
EDAPF-Fr 9-10	81,1
EDAPF-Fr 13-14	22,9
EDAPF-Fr 19-21	14,4
EDAPF-Fr 23-27	33,3

4.2.1.4.2. Recristalização do EDAPF-Fr 5-7

Fr5-7 apresentaram perfis semelhantes em CCD (Figura 7) e foram reunidas (652mg). Uma alíquota desta fração foi submetida à recristalização com metanol e diclorometano (DCM), obtendo-se um sólido que foi separado por filtração (258,5mg).

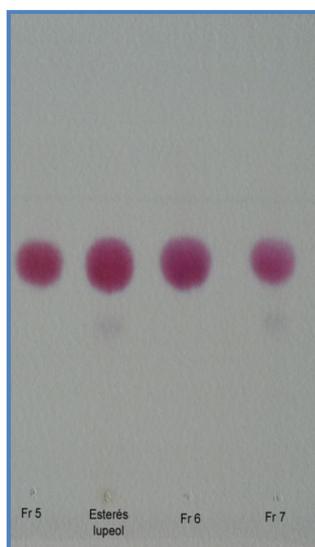


Figura 7: Perfil semelhante em CCD das frações 5, 6, 7 e ésteres do lupeol

4.2.1.4.3 Recristalização do EDAPF-Fr11

O material (106mg) foi submetido à recristalização em metanol, obtendo-se 102mg do material recristalizado.

4.2.1.4.4 Hidrólise Alcalina da Fr 5-7 (ésteres do lupeol) e isolamento do lupeol

A hidrólise alcalina foi realizada de acordo a metodologia descrita por Wang e colaboradores (2006).

Em um balão de fundo redondo adicionou-se uma solução de KOH a 10% em etanol, seguido de 200mg da fração 5-7 e a mistura resultante foi aquecida a 100°C sob refluxo (condensador de bolas), por uma hora, com agitação magnética. Em seguida, o etanol foi removido em evaporador rotatório. Ao resíduo obtido adicionou-se água (10mL) (pH ~14) e extraiu-se em funil de separação com éter etílico (3 x 10 mL). As três fases orgânicas foram reunidas e a solução resultante foi seca com sulfato de sódio anidro e concentrada em evaporador rotatório, fornecendo o lupeol como um sólido branco (140mg). Posteriormente, a fase aquosa alcalina (pH 14) foi acidificada com HCl 1N e extraída três vezes com diclorometano (DCM). As fases orgânicas foram reunidas, a solução resultante foi seca com Na₂SO₄ anidro e concentrada em evaporador rotatório, fornecendo um sólido branco cristalino (0,5mg).

4.2.1.5 Extração sob refluxo do extrato etanólico de *Parahancornia fasciculata* (EEPF)

Inicialmente pesaram-se 30g do extrato etanólico de *P. fasciculata* (EEPF) e transferiu-se para um balão de fundo redondo de 500 mL. Em seguida, conectou-se o balão a um condensador de bolas e aqueceu-se em manta aquecedora. O extrato foi submetido a extração sob refluxo, primeiramente com uma mistura de Hex: DCM (1:1) (3x150mL, 15 min.) e depois com DCM: AcOEt (1:1) (2x 150mL, 15 min.) As soluções obtidas em cada extração foram filtradas em funil de placa porosa n° 3 em Kitasato conectado a uma bomba de vácuo. Após finalização das extrações, obtiveram-se dois extratos: EEPF-(Hex:DCM) (1:1) e EEPF-(DCM:AcOEt) (1:1) que foram concentrados em evaporador rotatório até secagem total de cada extrato. Na parte insolúvel do extrato DCM: AcOEt adicionou-se AcOEt 100% (2x 100 mL, 15 min.). A solução obtida foi filtrada da mesma forma que as anteriores, obtendo-se o EEPF-insolúvel em AcOEt, onde se encontram substâncias de alta polaridade. O fluxograma deste processo de extração encontra-se na Figura 8 abaixo.

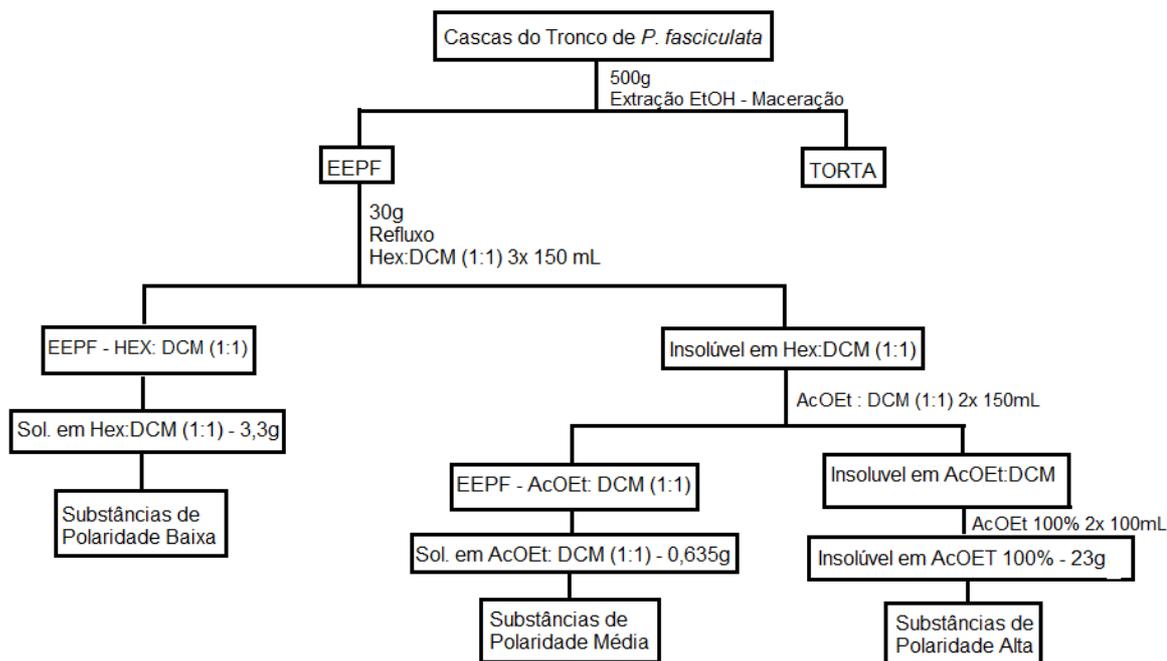


Figura 8: Fluxograma da extração sob refluxo do Extrato Etanólico de *Parahancornia fasciculata*.

4.2.1.6 Doseamento de taninos condensados/proantocianidinas

O doseamento de proatocianidinas foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Hiermann e colaboradores (1986).

Inicialmente utilizou-se uma amostra padrão (cloreto de cianidina) que foi dissolvida em n-butanol/HCl 37% (95:5) para concentrações finais de 50, 40, 30, 25, 20, 15, 10, 5 e 2,5µg/mL. A absorbância de cada concentração foi medida a 540nm e a partir destes resultados foi construída uma curva de calibração da amostra padrão. Foi construído um gráfico de concentração *versus* absorbância a 540nm e utilizou-se para calcular a equação da reta através de regressão linear.

Uma alíquota de 5mg do EEPF-insolúvel em AcOEt foi pesada, diluída em 5mL de n-butanol/HCl 37% (95:5) e submetida a aquecimento sob refluxo, a 118-120°C, durante 2 horas. O produto foi transferido puro para uma placa de 96 poços (200µL/poço), e foi diluído em proporções (1: 10 e 1:100) em triplicata, e em seguida a placa foi levada ao leitor de ELISA e lida na absorbância a 540nm, sendo os valores expressos de acordo com a amostra padrão (cloreto de cianidina).

A concentração de proantocianidinas totais do EEPF-insolúvel em AcOEt foi expressa em porcentagem peso por peso. Os resultados correspondem à média de três determinações em triplicata, seguidos dos desvios-padrão.

4.2.1.7 Identificação da substância isolada da Fr5-7 da Coluna Cromatográfica do EEPF

4.2.1.7.1 *Gerais*

Os critérios de pureza adotados foram observação de mancha única em cromatografia em camada delgada (CCD), em diferentes fases móveis, e o ponto de fusão com uma faixa de, no máximo, 4°C. Os pontos de fusão foram determinados em aparelho de ponto de fusão MQAPF – 301 Microquímica, e não foram corrigidos.

Os espectros no IV foram registrados em espectrofotômetro Perkin Elmer FT-IR, Laboratório de Química Farmacêutica, Faculdade de Farmácia, UFMG. Os espectros no UV foram obtidos *on line* no equipamento CLAE-DAD (Waters®), no Laboratório de Fitoquímica, Faculdade de Farmácia (UFMG).

Os espectros de RMN de ^1H e de RMN de ^{13}C foram obtidos no Departamento de Química, ICEX, UFMG, em equipamento Bruker Avance DRX400, a 25 °C, utilizando-se o tetrametilsilano (TMS), como referência interna. Utilizou-se o solvente deuterado dimetilsufóxido (DMSO-d6) para solubilizar as amostras.

4.2.1.7.2 *Perfis Cromatográficos por CLAE-DAD*

Pesou-se cerca de 10 mg do EEPF, da fração alcaloídica (FA) e da fração de neutros (FN) diretamente, em frascos Eppendorf, acrescentou-se 1mL de metanol grau CLAE e fez-se a dissolução por sonicação, em ultrassom, por 15 min, seguindo-se centrifugação a 10.000 rpm, por 10 min. Em cada caso, o sobrenadante foi empregado nas análises por CLAE. A mesma metodologia foi aplicada aos extratos EEPF-Hex:DCM (1:1), EEPF-DCM-AcOEt (1:1), EEPF-insol. AcOEt e da substância

isolada, sendo tomadas massas de 1 mg de cada extrato e 10 mg da substância isolada.

Para obtenção dos perfís cromatográficos para alcaloides utilizou-se uma coluna LiChrospher 100 RP-18 (partículas de 5 μ m, 250 x 4 μ m d.i.), detecção UV 220-400 nm, fluxo de 1,5 mL/min e manteve-se o forno da coluna a 40 °C. Em função da complexidade da matriz oriunda de extratos vegetais, empregou-se um gradiente de ACN – H₂O com trietilamina 0,37% e ácido acético 0,2% (Tabela 3), compreendendo um período de eluição linear longo (90 – 10% de ACN, tempo 0; 80 – 20% de ACN, em 16 min; 90 - 10% em 35 min), mantendo-se, a seguir, um curto período de eluição isocrática (80 -20% de ACN,10 a 16min; 50 – 50% de ACN, 30 a 32 min). Manteve-se um intervalo de 15 min, após cada corrida do programa de eluição, para retornar às condições iniciais do gradiente, antes da injeção de nova amostra (Tabela 3). Fez-se um branco para cada um dos solventes empregados (MeOH e ACN) nas análises e utilizou-se em todas as etapas água destilada, filtrada em sistema Milli-Q.

Tabela 3: Gradiente de eluição empregado nas análises dos extratos por CLAE para detecção de alcalóides.

TEMPO (min)	H ₂ O trietilamina Ac. Acético (%)	ACN (%)
0	90	10
10	80	20
16	80	20
30	50	50
32	50	50
35	90	10

Legenda: ACN: acetonitrila

Uma segunda condição cromatográfica foi adotada por Brandão,2010, onde se utilizou uma coluna LiChrospher 100 RP-18 (partículas de 5 μ m, 250 x 4 μ m d.i.), detecção UV220-400 nm, fluxo de 1 mL/min e manteve-se o forno da coluna a 40 °C. Empregou-se um gradiente de ACN – H₂O (Tabela 4), compreendendo um período de eluição linear longo (5 – 95% de ACN, em 65 min), mantendo-se, a seguir, um curto período de eluição isocrática (95% de ACN por 5 min). Manteve-se um intervalo de 5 min, após cada corrida do programa de eluição, para retornar às condições iniciais do gradiente, antes da injeção de nova amostra.

Em todas as etapas, foram empregados solventes grau CLAE (Tedia Brasil®) e água destilada, filtrada em sistema Milli-Q. Fez-se um branco para o MeOH e a ACN utilizados nas análises.

Tabela 4: Gradiente de eluição empregado nas análises dos extratos por CLAE para detecção de outros metabólitos.

TEMPO (min)	H ₂ O	ACN (%)
0	95	5
65	5	95
70	5	95
75	95	5

Legenda: ACN: acetonitrila.

4.2.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMALÁRICA

4.2.2.1 Descongelamento dos clones W₂ de *P. falciparum* e ANKA de *P. berghei*

A amostra de clone W2 de *P. falciparum* foi retirada do crio-banco do Laboratório de Malária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte-MG, sendo colocada para descongelar em temperatura ambiente. Após completo descongelamento, foram adicionados, para cada 1mL de sangue, 0,4 mL de solução salina estéril (NaCl) 12%, gota a gota, sob agitação, por fim, a solução final foi deixada em repouso por 5 minutos. Transcorrido o tempo de repouso, foi acrescentado (para cada 1 mL de sangue) 9,0 mL da solução salina estéril (NaCl) 1,6%, gota a gota, sob agitação, com posterior centrifugação a 1500rpm/10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi ressuspendido com 10 mL de meio RPMI completo, e transferido para placa de cultivo. Na placa de cultivo foi acrescentado a suspensão de eritrócitos 50% para obter hematócrito de 5% (5 gotas de sangue). Por fim, a placa de cultivo foi incubada a 37°C utilizando o método do dessecador com vela. Não pode manejar a cultura por 48 horas. (TRAGER e JENSEN, 1976).

Já a amostra de clone ANKA de *P. berghei* foi retirada do crio-banco do Laboratório de Malária da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Pará (UFPA), Belém-Pa, sendo descongelada rapidamente em temperatura ambiente,

para em seguida, infectar os animais (HELMBY e SOUZA, 2008).

4.2.2.2 Cultivo do *Plasmodium falciparum* e sincronização

O cultivo da cepa W2 (cloroquina resistente) de *P. falciparum* foi realizado em hemácias *in vitro* sob condições estabelecidas por Trager e Jensen (1976), com pequenas modificações (ANDRADE-NETO *et al.*, 2004; CARVALHO *et al.*, 1991). Os parasitas foram cultivados em placas de Petri com hematócrito a 5% usando meio de cultivo completo, isto é: RPMI 1640 suplementado com 5,98g de HEPES, 2g de D-glicose, 2g de bicarbonato de sódio, 50mg de hipoxantina, 40mg de gentamicina e 10% (v/v) de plasma humano inativado. As placas foram mantidas à 37°C em dessecadores nos quais a concentração adequada de O₂ foi obtida pela combustão de uma vela, sendo realizadas trocas diárias de meio. A parasitemia foi monitorada diariamente em esfregaços, corados com Giemsa, ao microscópio óptico (1000x).

O meio de cultivo com parasitas foi sincronizado pelo método do sorbitol (Lambros & Vanderberg, 1979), com modificações por Carvalho (1990). O RPMI completo foi removido da placa de cultivo contendo o predomínio de trofozoítas com parasitemia superior a 5%, em seguida foi adicionado 10 mL de sorbitol 5% e glicose 0,5%. Transferiu-se o cultivo para tubo de 15 mL e deixou-se em estufa de CO₂ por 10 minutos. Passado este tempo, o material foi centrifugado por 5 minutos a 1500rpm. Em seguida conferiu-se o volume do pellet retirou-se o sobrenadante. Depois, o cultivo foi ressuspendido com meio RPMI completo para ter hematócrito 5%. Transferiu-se o cultivo para placa de Petri e esperou-se as hemácias sedimentarem (aprox. 10min). Em seguida, realizou-se o esfregaço para se determinar a parasitemia. Logo após, o hematócrito e a parasitemia foram ajustados para 1% (adicionando hemácias e meio RPMI completo em quantidades adequadas). Os cultivos com predomínio de formas jovens (anéis), obtidas logo após a sincronização, foram utilizadas nos ensaios quimioterápicos.

4.2.2.3 Determinação da parasitemia percentual de *P. falciparum* e *P. berghei*

Esfregaços sanguíneos de cultivos foram secos ao ar, fixados com metanol e corados com solução recém diluída de Giemsa na proporção de três gotas para cada 1ml de solução salina tamponada pH 6,8. Após 10 minutos, as lâminas foram lavadas em água corrente, secas ao ar e examinadas ao microscópio óptico com objetiva de imersão (1000x).

O percentual de parasitemia de *P. falciparum* nos esfregaços corados foi determinado pela contagem do número de hemácias totais e infectadas. No caso de parasitemia elevada >10% serão contadas 2000 células. Para parasitemia inferior a 10%, será realizada uma estimativa do número de hemácias por campo e calculando-se o número de campos que deveriam ser contados para se obter um total de 5.000 a 10.000 hemácias (CARVALHO *et al.*,1991).

Para o *P. berghei*, o percentual de parasitemia foi determinado através da estimativa para a contagem do número total de hemácias infectadas por campo microscópico, e a partir desta, foi calculado o número de campos a serem contados. Esta estimativa encontra-se descrita na tabela 5 abaixo. O resultado será expresso em percentagem de hemácias parasitadas.

Tabela 5: Determinação do percentual de parasitemia através de estimativa para a contagem do número de hemácias totais por campo no microscópio óptico.

% de Parasitemia	Contagem do N° de Hemácias
0%	10.000
Até 5%	5.000
5 a 10%	2.000
10 a 20%	1.000
+ 20%	300

4.2.2.4 Criopreservação dos clones de *P. falciparum* e *P. berghei*

O congelamento do clone de *P. falciparum* foi realizado de acordo com a técnica descrita por Meryman e Hornblower (1972). Na câmara de fluxo laminar o sangue da placa de cultivo foi transferido para um tubo de 15mL e posteriormente centrifugado a 1500rpm/10min. O sobrenadante foi descartado, e ao sedimento foi

adicionado igual volume da solução congelante (glicerol 56% ou glycerolyte) (proporção 1:2) 1 gota/segundo, sob leve agitação. A solução resultante foi distribuída, 1mL da solução, em tubos de criopreservação, sendo deixadas em overnight no freezer a -70°C para posteriormente serem acondicionadas em nitrogênio líquido.

A criopreservação do clone de *P. berghei* foi realizada de acordo com a técnica descrita por Helmby e Souza (2008). De forma asséptica o sangue de camundongos com parasitemia ascendente foi coletado e adicionado diretamente ao meio de congelamento do plasmódio composto de glicerol 15% em meio RPMI com soro fetal bovino a 5% na proporção de 1mL de sangue para 4 mL de meio, e em seguida o sangue foi aliqotado (100-500 µL/tubo) em criotubos que foram congelados imediatamente em nitrogênio líquido.

4.2.2.5 Teste do HRP-II

4.2.2.5.1 *Preparo da placa de amostras estoque*

As amostras (extratos, frações = 20 mg) e Lupeol (10mg) foram diluídas em DMSO partindo da concentração inicial de 50 mg/mL. Em seguida, foi preparada a solução estoque adicionando-se 10µL da amostra em 990µL de RPMI incompleto (essa concentração equivale a 50µg/mL). Posteriormente, foram realizadas diluições seriadas (concentração inicial de 50µg/mL até 1,56µg/mL). Para o controle positivo a Cloroquina (10 mg) foi diluída em DMSO ou RPMI incompleto partindo da concentração inicial de 10 mg/mL. Posteriormente, foram realizadas diluições seriadas (concentração inicial de 500ng/mL até 15,6ng/mL). As amostras devem estar em concentração 10x maior do que a concentração que será testada e as mesmas foram distribuídas em triplicata para cada concentração de cada droga.

Na Figura 9, está ilustrada uma placa de 96 poços utilizada nos ensaios de atividade antiplasmódica *in vitro*. Cada placa tem 12 poços controles (sem amostra teste) com hemácias não infectadas (controle negativo-6 poços) e hemácias infectadas (controle positivo-6 poços). As amostras e o controle positivo (cloroquina) foram distribuídas em triplicata e realizadas em diluição seriada. Este procedimento foi feito de acordo com esquema mostrado na Figura 9.

Após o preparo da placa de drogas estoque, armazenou-se a mesma a 4°C, e fez-se um segundo esfregaço após sincronização para poder preparar os parasitos. Enquanto preparou-se a cultura de *P. falciparum* com parasitemia de 0,05% e hematócrito de 1,5% (> 80% de anel) que foram adicionados em uma nova placa de drogas definitiva.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
B	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
C	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
D	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
E	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
F	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
G	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
H	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●

Figura 9: Esquema da placa de 96 poços utilizada nos ensaios para atividade antiplasmódica.

Legenda: na posição vertical colunas de 1 a 12 e na posição horizontal linhas de A a H.

● - Controle negativo (hemácias não infectadas); ● - Controle positivo (hemácias infectadas)

● ● ● - Amostras: 50 µg/mL da amostra/poço (300µL da amostra), 25 µg/mL da amostra/poço (150µL da amostra + 150µL de RPMI incompleto), 12,5 µg/mL da amostra/poço (150µL da amostra + 150µL de RPMI incompleto), 6,25 µg/mL da amostra/poço (150µL da amostra + 150µL de RPMI incompleto), 3,125 µg/mL da amostra/poço (150µL da amostra + 150µL de RPMI incompleto), 1,56 µg/mL da amostra/poço (150µL da amostra + 150µL de RPMI incompleto). Linha H - adiciona-se apenas parasito ou qualquer líquido.

● - Cloroquina: 500 ng/mL da cloroquina/poço (300µL da cloroquina), 250 ng/ml da cloroquina (150µL da cloroquina + 150µL de RPMI incompleto), 125 ng/mL da cloroquina (150µL da cloroquina + 150µL de RPMI incompleto), 62,5 ng/mL da cloroquina (150µL da cloroquina + 150µL de RPMI incompleto), 31,2 ng/mL da cloroquina (150µL da cloroquina + 150µL de RPMI incompleto), 15,6 ng/mL da cloroquina (150µL da cloroquina + 150µL de RPMI incompleto). Linha H - adiciona-se apenas parasito ou qualquer líquido.

4.2.2.5.2 Placa de amostras definitiva

Para o preparo da placa de drogas definitivas, adicionou-se 180µL/ poço da cultura de parasitos e acrescentou-se 20µL da solução estoque (amostra teste) na concentração desejada. Em seguida, retirou-se dos 6 poços da placa de amostras estoque o controle negativo (*background* 0h) e congelou-se em eppendorf. A placa de amostras definitiva foi armazenada em dessecador dentro da estufa por 48 – 72 horas a 37°C. Após esse período, a placa foi retirada do dessecador e armazenada em freezer (-20°C), sendo realizados dois ciclos (congelamento e descongelamento) para hemolisar as amostras (amostra de cultura hemolisada). Em seguida, a placa

pode ser processada imediatamente ou congelada a -20°C . Este procedimento foi realizado de acordo com esquema mostrado na Tabela 6.

Tabela 6: Esquema utilizado no preparo das placas de amostras definitiva utilizadas nos ensaios.

Teste do HRP-II para <i>P. Falciparum</i>			
Colunas	Linhas	Amostras	Controle Positivo (CQ)
1-6	A	Controle Negativo (<i>background</i> 0h)	
7-12	A	Controle Positivo	
1-3	B	50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ da amostra/poço (20 μL da solução estoque + 180 μL da cultura de parasitos)	500 ng/mL da CQ/ poço (20 μL da solução estoque + 180 μL da cultura de parasitos)
1-3	C	25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ da amostra/poço (20 μL da solução estoque + 180 μL da cultura de parasitos)	250 ng/mL da CQ/ poço (20 μL da solução estoque + 180 μL da cultura de parasitos)
1-3	D	12,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ da amostra/poço (20 μL da solução estoque + 180 μL da cultura de parasitos)	125 ng/mL da CQ/ poço (20 μL da solução estoque + 180 μL da cultura de parasitos)
1-3	E	6,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ da amostra/poço (20 μL da solução estoque + 180 μL da cultura de parasitos)	62,5 ng/mL da CQ/ poço (20 μL da solução estoque + 180 μL da cultura de parasitos)
1-3	F	3,125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ da amostra/poço (20 μL da solução estoque + 180 μL da cultura de parasitos)	31,2 ng/mL da CQ/ poço (20 μL da solução estoque + 180 μL da cultura de parasitos)
1-3	G	1,56 $\mu\text{g}/\text{mL}$ da amostra/poço (20 μL da solução estoque + 180 μL da cultura de parasitos)	15,6 ng/mL da CQ/ poço (20 μL da solução estoque + 180 μL da cultura de parasitos)

4.2.2.5.3 Placa teste

O teste HRP-II realizado na placa teste foi desenvolvido de acordo com a metodologia descrita por Noedl e colaboradores (2002).

Na placa teste foi adicionado 100 μL /poço do 1 $^{\circ}$ anticorpo MPFM55A (1,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em PBS) e foi incubado a 4°C *overnight*. No dia seguinte, descartou-se o conteúdo dos poços e secou-se. Em seguida, adicionou-se 200 μL /poço da solução

de bloqueio (BSA 2% em PBS) e incubou-se a temperatura ambiente por 2 horas. Depois, descartou-se o conteúdo dos poços e secou-se, e logo após lavou-se a placa 3x com PBS/Tween 0,5% (200µL/poço) e secou-se.

Logo em seguida, adicionou-se 100µL das amostras de cultura hemolisada. Em seis poços adicionou-se 100µL dos controles congelados antes da incubação (background) e nos outros 6 poços adicionou-se as hemácias parasitadas (100µL). Posteriormente, a placa foi incubada por 1 hora em temperatura ambiente em câmara úmida. E logo a seguir, a placa foi lavada 3 vezes com PBS/Tween 0,5% (200µL/poço) e seca. Depois, adicionou-se 100µL/poço do 2º anticorpo MPFG55P (0,05µg/mL em BSA 2% + Tween 1% em PBS) e incubou-se em temperatura ambiente por 1 hora em câmara úmida. E novamente, lavou-se a placa 3x com PBS/Tween 0,5% (200µL/poço) e secou-se. Em seguida, foi adicionado 100µL/poço do cromógeno OPD (ortofenilenodiamino) (1:20) e incubou-se de 5 a 10 minutos em temperatura ambiente no escuro. Para parar a reação adicionou-se 50µL de ácido sulfúrico 1M. E por fim, levou a placa para se realizar a leitura em leitor de ELISA a 492nm.

Para determinar a redução da parasitemia, se utiliza os resultados das absorbâncias do ELISA, onde a média da parasitemia calculada nos poços sem adição das amostras (6 poços), considerada como 100% de crescimento do parasito, foi comparada com as parasitemias nos poços que receberam os antimaláricos de referência e as amostras teste. A atividade antiplasmódica *in vitro* das amostras foi expressa pela percentagem de redução da parasitemia em relação aos controles sem fármacos (Figura 10).

Para avaliação da atividade antiplasmódica *in vitro*, foi adotado um critério proposto por Dolabela (2007), como modificação no presente trabalho, em que o extrato, frações e substância isolada foram classificados de acordo com a faixa de valores da CI_{50} na Tabela 7. Foram considerados ativos os compostos que reduziram de 50 a 100% o crescimento dos parasitos na concentração de 50µg/ml, parcialmente ativos os compostos que reduziram de 30 a 50% e inativos os compostos que reduziram menos de 30% .

Figura 10: Fórmula da redução percentual de parasitemia da atividade antiplasmódica *in vitro*

$$RP (\%) = \frac{100 - \text{média dos poços} - \text{hem.normal} \times 100}{\text{hep} - \text{hem. Norma}}$$

Legenda: RP: redução da parasitemia (%); **hem. Normal:** hemácia normal; **hep:** hemácia parasitada.

Tabela 7: Critérios utilizados na avaliação da atividade antiplasmódica *in vitro*

CI₅₀ (µg/mL)	Classificação	Percentual de Redução (%)
CI ₅₀ ≤ 10 µg/mL	Ativo	50 a 100
CI ₅₀ entre 10 e 50 µg/mL	Moderadamente Ativo	30 a 50
CI ₅₀ > 50 µg/mL	Inativo	< 30

*Dolabela, 2007 com modificação no presente trabalho.

4.2.2.6 Atividade antimalárica *in vivo*

A cepa ANKA de *P. berghei* foi mantida em camundongos por passagens sanguíneas semanais de animal para animal. A manutenção semanal foi realizada após a confecção dos esfregaços sanguíneos de camundongos infectados com formas eritrocíticas de *P. berghei*, com metanol. Os esfregaços foram corados com solução de Giemsa e examinados ao microscópio óptico (1000x) para a avaliação da percentagem de parasitemia.

Do animal selecionado com parasitemia percentual entre 5 e 15%, foi coletado sangue da ponta da cauda (4 gotas) e mantido com o anticoagulante citrato de sódio 3,8% sob refrigeração para não se perder a viabilidade do mesmo. O número de hemácias por microlitros (µL) de sangue foi contado em câmara de Neubauer ao microscópio óptico (400x). A partir da percentagem de parasitemia e do número total de hemácias contadas foi realizada a padronização do inóculo com diluições adequadas de sangue parasitado em RPMI e soro fetal bovino (10%) com citrato de sódio 3,8%, de modo que cada animal recebeu de 1×10^5 hemácias parasitadas, via intraperitoneal, em um volume final de 0,2ml (200µL).

Os extratos de *P. fasciculata* (EEPF e o EEPF-HEX:DCM- 1:1) foram utilizados neste estudo nas doses de 500, 250 e 125 mg/kg de peso. A Cloroquina,

controle positivo, foi utilizada como referência em todos os experimentos na dose de 30 mg/kg de peso do animal via oral.

4.2.2.6.1 *Tratamento dos camundongos infectados*

Para o experimento, os animais foram divididos em diferentes grupos (5 animais por grupo): grupo controle não tratado e grupos testes. As amostras testes selecionadas foram pesadas partindo-se de doses pré-estabelecidas e diluídas com 5% de DMSO. Nesta concentração o DMSO não interfere no crescimento do parasito *in vivo*. A cloroquina foi pesada e diluída apenas em água destilada, devido à mesma está na forma de sal e apresentar uma excelente solubilização. Os camundongos foram tratados por via oral durante três dias consecutivos através do “Teste Supressivo” descrito por PETERS (1965; 1967). A redução da parasitemia foi avaliada em relação ao grupo controle não tratado.

4.2.2.6.2 *Ensaio em camundongos infectados com P. berghei*

A avaliação da atividade dos extratos da planta foi realizada através da determinação da parasitemia percentual em esfregaços sanguíneos dos camundongos infectados, confeccionados no 5° e 8° dias após inoculação do parasito. Os animais nos diversos grupos (tratados e não tratado) tiveram seus esfregaços codificados, e contados em testes duplo-cegos a fim de evitar tendenciosidade e reduzir a margem de erro.

O cálculo da percentagem de redução da parasitemia pelas amostras testadas foi realizado em relação ao controle não tratado após decodificação dos esfregaços, preferencialmente, por um segundo observador. Na Figura 11 abaixo está expressa a fórmula para o percentual de redução da parasitemia. A redução da parasitemia foi calculada em relação ao grupo controle não tratado. Estabeleceu-se como critério de atividade dos compostos *in vivo* a redução de 30% ou mais do crescimento do *P. berghei* que foi considerada como indicador de amostra ativa (CARVALHO *et al.*, 1991; ANDRADE-NETO *et al.*, 2003).

Figura 11: Cálculo do percentual de redução de parasitemia do *P. berghei* utilizando a regra de três simples.

<p>Média da % de PGC – 100%</p> <p>Média da % de PGT – X</p> <p>(100 - o valor de x)</p>
--

Legenda: PGC: Parasitemia do grupo controle; PGT: parasitemia dos grupos tratados; X: parasitemia (%).

4.2.3 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE ORAL AGUDA DO EEPF

O extrato etanólico de *P. fasciculata* foi submetido ao ensaio de toxicidade oral aguda, onde foram utilizados os procedimentos de Dose Fixa da OECD 420, na sua versão revisada adotada em 2001 (OECD 420, 2001), com algumas adaptações.

Foram utilizados 12 camundongos fêmeas que ficaram aclimatados no Biotério da Faculdade de Farmácia por cerca de cinco dias antes da administração do extrato. A amostra foi reconstituída em água destilada e administrada por gavagem, através de sonda gástrica de aço inox de 4 cm (Becton & Dickinson Co). Os camundongos foram divididos em dois grupos de 6 animais cada (grupo teste e controle). O grupo teste foi tratado com o EEPF e o grupo controle foi tratado apenas com água destilada e organizados de forma idêntica (OECD 420, 2001). Os animais em teste e os controles foram divididos em caixas de maneira que não impediu a observação precisa de cada um, a temperatura local.

Os níveis de dose para o extrato foram estabelecidos para, no máximo, 3 doses suficientemente espaçadas (5000, 500 e 50 mg/Kg), a fim de mostrar os efeitos tóxicos e as diferentes taxas de mortalidade. Grupos controle foram tratados com água destilada. Caso a dose de 5000 mg/Kg não produzisse mortalidade nos grupos tratados, não haveria a necessidade de ser administrados os níveis inferiores. O volume administrado nos animais da substância teste não excedeu 10 mL/Kg de peso corporal do animal.

Após o procedimento de administração oral (gavagem), os animais dos grupos (teste e controle) foram observados aos 15, 30, 60, 120, 180 e 240 minutos

no primeiro dia após o tratamento e uma vez por dia nos 13 dias seguintes. Os sinais de toxicidade foram registrados à medida que foram feitas as observações e que compreendam o momento de seu aparecimento, sua diminuição e sua duração.

Foi realizada uma avaliação ou *screening* hipocrático, que forneceu uma estimativa geral da natureza farmacológica e toxicológica da substância desconhecida, como: estado consciente e disposição, atividade e coordenação do sistema motor, reflexos, atividade sobre o SNC e SNP (MALONE e ROBICHAUD, 1983). O modelo de tabela hipocrática utilizada (Anexo 2), onde os dados avaliados foram reunidos, seguiu as sugestões de Brito (1994).

Ao final dos 14 dias de observação, os animais foram submetidos à eutanásia (pela mistura constituída de duas partes de cloridrato de cetamina + 1 parte de xilazina, na dose de 2,5 mL/kg i.p.) e seus órgãos foram removidos para estudo anatomo-histopatológico.

- Avaliação Anátomo-histopatológica

Ao final dos experimentos de toxicidade oral aguda, os animais ainda anestesiados foram examinados macroscopicamente, com ressecção de pâncreas, cérebro, coração, fígado e rins. As secções teciduais dos órgãos excisados foram fixadas em formalina (solução de formol a 10%) tamponada, após 24 horas foram resseccionadas para processamento histopatológico: desidratação com séries crescentes de álcool (70 a 100%), diafanização em xilol, impregnação e inclusão em parafina, segundo os métodos habituais (BACHA & WOOD, 1990). Em micrótomo, os fragmentos tissulares foram seccionados em espessura de 3,0 μ M e subseqüentemente submetidos à coloração hematoxilina-eosina e tricrômico de Masson, e examinados ao microscópio óptico.

Os estudos anátomo-histopatológicos foram realizados no Laboratório de Patologia Clínica Animal do Instituto de Saúde e Produção Animal (ISPA) da UFRA, sob a supervisão do Prof. Dr. Washington Luiz Assunção Pereira.

- Avaliação da Evolução Ponderal e Consumo de Água e Alimento

Para a avaliação da evolução ponderal, os animais de ambos os grupos (tratado e controle), foram pesados em balança semi-analítica antes da administração do extrato ou água e durante cada dia do período de observação, aproximadamente no mesmo horário, até o final dos 14 dias, onde foi calculado o ganho ponderal médio dos animais.

O consumo de água e ração foi avaliado a partir do primeiro dia após o tratamento. Para avaliar o consumo de água, um volume fixo da mesma, precisamente medido em proveta graduada, era adicionado aos bebedouros de capacidade de 150 mL. No dia seguinte, aproximadamente na mesma hora, o volume dos bebedouros era medido novamente em provetas e a diferença (quantidade consumida) era anotada. De maneira similar o consumo de ração foi avaliado. Era disponibilizada uma quantidade exata de ração (100g/dia/gaiola) e no dia seguinte, a diferença (quantidade consumida) era anotada.

4.2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos resultados para o Doseamento de Taninos Condensados/Proantocianidinas foi efetuada utilizando o aplicativo Microsoft Office Excel 2007, sendo os dados obtidos expressos como média \pm desvio padrão da amostra testada. Como tratamento estatístico, foi realizado a Análise de Variância (ANOVA) adotando como um critério o nível de significância $p < 0,05$, utilizando o programa estatístico BioEstat versão 5.0.

Para a determinação da CI_{50} nos testes de atividade antiplasmódica, foi utilizado o Programa MicroCal Origin versão 7.0 para a confecção das curvas de CI_{50} (concentração do fármaco que inibe 50% do crescimento do parasito) e para a análise de viabilidade do *P. falciparum*. Os dados foram expressos em CI_{50} para avaliar diferenças entre as médias e medianas da redução de parasitemia. Foi aceito para todos os testes o nível de significância de 5%.

Para a avaliação da atividade antimalárica *in vivo* os dados obtidos foram expressos como média \pm desvio padrão das amostras testadas. Estatisticamente a significância da diferença entre as médias de parasitemia nos grupos tratado e

controle foram avaliados pela Análise de Variância (ANOVA), adotando como critério o nível de significância ($p < 0,05$), através do programa BioEstat versão 5.0.

No ensaio de toxicidade aguda oral, para avaliar se houve diferença significativa da evolução ponderal, do consumo de ração e água entre os animais controles e tratados com EEPF, estes resultados foram expressos como média \pm desvio padrão para cada grupo de animais e analisados pelo Teste "t" de *Student*, sendo considerado um nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Estudos Fitoquímicos

5.1.1. PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA POR CCD

A família Apocynaceae pode ser considerada uma das mais importantes fontes vegetais de constituintes químicos de utilidade na medicina moderna. Várias substâncias têm sido isoladas a partir de espécies dessa família e representam protótipos de classes farmacológicas distintas de drogas e fazem parte da história da Farmacologia e da Terapêutica (DI STASI e HIRUMA-LIMA, 2002).

O extrato etanólico obtido de cascas de *P. fasciculata* (EETF; rendimento= 6,65%, Tabela 9), foi submetido à prospecção fitoquímica por CCD sendo detectada a presença de triterpenos e esteróides (Figura 12, Tabela 8), heterosídeos flavônicos (Figura13, Tabela 8), saponinas, polifenóis e taninos (Figura14, Tabela 8), heterosídeos antracênicos e heterosídeos cardiotônicos (Figura 15, Tabela 8), de acordo com metodologia descrita por Wagner e colaboradores (1984).

Os mesmos metabólitos detectados neste estudo, também já foram descritos em outras espécies pertencentes à família Apocynaceae, como triterpenos e esteróides, flavonóides (em menor frequência) (CARVALHO *et al.*, 2001a ; PEREIRA *et al.*, 2006; CARVALHO *et al.*, 2007), taninos, polifenóis, saponinas, (EVANS, 2002) e heterosídeos cardiotônicos (DI STASI e HIRUMA-LIMA, 2002).

Os alcalóides, apesar de potencialmente antimaláricos e frequentemente detectados em espécies pertencentes à família Apocynaceae (RAPOPORT *et al.*, 1958; STEELE *et al.*, 2002; HENRIQUE *et al.*, 2010), não foram detectados neste estudo (OLIVEIRA *et al.*,2009) (Tabela 8). Pois, a primeira hipótese da ausência de alcalóides nesta planta pode estar relacionada a baixas concentrações do mesmo no EETF e, por esta razão, realizou-se a partição ácido-base, onde se obteve fração de neutros e a fração alcaloídica, na qual os alcalóides poderiam estar concentrados (pg.61). Contudo, foi realizada nova pesquisa para alcalóides utilizando a técnica de CCD destas duas frações, que mais uma vez não foram detectados. Com isso, supõe-se que a ausência de alcalóides nas cascas desta planta seja devido à sazonalidade, pois estudos botânicos demonstraram estruturas secretoras para

alcalóides em suas folhas (DUTTA *et al.*, 1950; BURKIL, 1985). Além do mais, as cascas foram coletadas de plantas contendo folhas jovens, por isso, pode ser que nesta fase os alcalóides estejam sendo produzidos, não havendo ainda translocação dos mesmos para as cascas (CARLA FEIO, Informação pessoal - Museu Paraense Emílio Goeldi).

Os triterpenos são compostos terpenóides com 30 carbonos e representam a segunda classe de produtos naturais com maior número de constituintes ativos, depois dos alcalóides. Apresentam propriedades medicinais como ação antiespasmódica, analgésica, antiestresse, antilipolítica e de redução de peso corporal, atividade antiprotozoária, especialmente contra amebíase e malária (DI STASI, 1996). A importância deste metabólito no presente estudo está relacionada a sua ampla atividade farmacológica como ação antiinflamatória, antitumoral, antibacteriana, fungicida, antiviral, antitumoral e cardioprotetora (PATOČKA, 2003) e antimalárica (SALEEM *et al.*, 2001), além de está distribuído em vários gêneros taxonômicos (CHATUVERDI *et al.*, 2008).

Os taninos, particularmente, vêm despertando interesse do ponto de vista nutricional e medicinal devido a sua potente capacidade antioxidante e possível efeito protetor da saúde humana, reduzindo o risco de doenças cardiovasculares e câncer (SANTOS-BUELGA; SCALBERT, 2000); Taninos são compostos fenólicos de grande interesse ecológico e econômico (MONTEIRO *et al.*, 2005). Apresentam elevado peso molecular (entre 500 e 3000 daltons), são solúveis em água e formam complexos com proteínas e alcalóides (MELLO *et al.*, 2001). Tais compostos são responsáveis pela adstringência de muitos frutos e produtos vegetais, devido à precipitação de glicoproteínas salivares, o que ocasiona a perda do poder lubrificante. Ao precipitar proteínas propiciam um efeito antimicrobiano e antifúngico (BRUNETON, 1991). Também são utilizados no tratamento de diarreia, hipertensão, reumatismo, hemorróidas, feridas, queimaduras, problemas estomacais e inflamação (TESKE e TRENTINI, 1995).

Tabela 8: Prospecção fitoquímica por CCD do extrato etanólico de *Parahancornia fasciculata* (EEPF), de acordo com a metodologia de Wagner *et al.*, 1984.

Classe de Metabólitos secundários pesquisados	Resultados
Triterpenos e Esteróides	Positivo
Geninas Flavônicas	Negativo
Heterosídeos Flavônicos	Positivo
Cumarinas	Negativo
Saponinas	Positivo
Alcalóides	Negativo
Polifenóis	Positivo
Taninos	Positivo
Geninas Antraquinônicas e Naftoquinônicas	Negativo
Heterosídeos Antracênicos	Positivo
Heterosídeos Cardiotônicos	Positivo

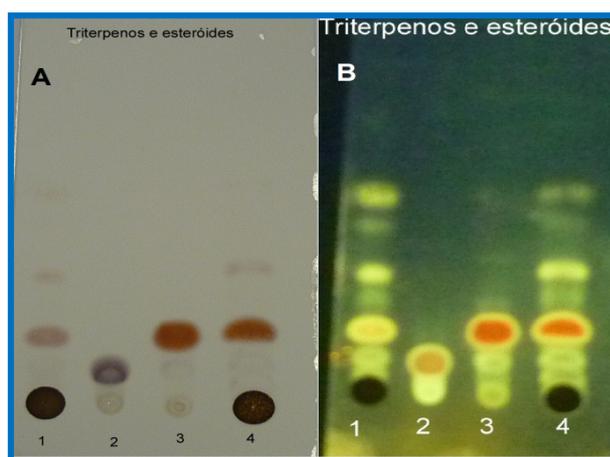


Figura 12: Perfil em CCD do extrato etanólico de *Parahancornia fasciculata* (ECPF) para detecção de triterpenos e esteróides. Eluente: hexano: acetato de etila (8:2). Revelador: reagente de Liebermann-Burchard (LB). **(1):** ECPF; **(2):** Amostra de referência β -sitosterol; **(3):** Amostra de referência Ésteres de Lupeol; **(4):** Amostra mista ECPF + Ésteres de Lupeol. **(A):** visível; **(B):** UV_{365nm}.



Figura 13: Perfil em CCD do extrato etanólico de *Parahancornia fasciculata* (EEPF) para detecção de heterosídeos flavônicos no UV_{365nm}. Eluente: acetato de etila:ácido fórmico:ácido acético:água (100:11:11:27). Revelador: cloreto de alumínio 5% em metanol. **(1):** EEPF; **(2):** Amostra de referência rutina; **(3):** Amostra de referência isoquercetrina.

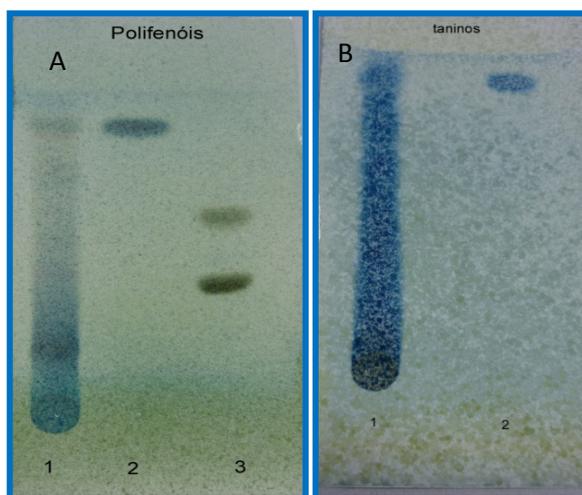


Figura 14: Perfil em CCD do extrato etanólico de *P. fasciculata* (EEPF) para detecção (vis) de polifenóis e taninos. Eluente: acetato de etila:ácido fórmico:ácido acético:água (100:11:11:27). Revelador: Mistura (1:1) de ferricianeto de potássio 1% e cloreto férrico 2%. **A:(1):** EEPF; **(2):** Amostra de referência catequina; **(3):** Amostra de referência rutina. **B: (1):** EEPF; **(2):** proantocianidina A₂.

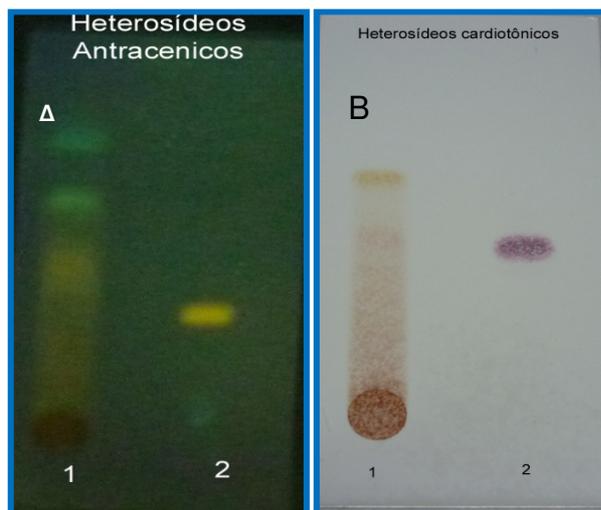


Figura 15: Perfil em CCD do extrato etanólico de *P. fasciculata* (EEPF) para detecção de heterosídeos antracênicos UV_{365nm} e cardiotônicos (vis). Eluente: acetato de etila:metanol:água (81:1:8). **Revelador A:** hidróxido de potássio 5% em metanol. **A: (1):** EEPF; **(2):** Amostra de referência aloína. **Revelador B:** Reativo de Kedde. **B: (1):** EEPF; **(2):** Amostra de referência digoxina.

O extrato etanólico, as frações alcaloídica (EPPFA) e de neutros (EPPFN) das cascas de *P. fasciculata* foram submetidos à análise fitoquímica por CLAE, e não foram detectados alcalóides nestas amostras.

Os resultados obtidos na prospecção fitoquímica e em CLAE mostram a ausência de alcalóides e a presença marcante de triterpenos o que norteou a obtenção de novos extratos com outros solventes orgânicos.

Outras extrações realizadas com as cascas de *P. fasciculata* foram a extração com diclorometano por percolação a partir do pó alcalinizado da planta para extração de alcaloides e a extração sob refluxo realizada com o extrato etanólico de *P. fasciculata* (EPPF), obtendo-se, respectivamente, o extrato em diclorometano de *P. fasciculata* (EDAPP) e as frações EPPF-Hex:DCM (1:1), EPPF- AcOEt:DCM (1:1) e EPPF insolúvel em AcOEt.

Na Tabela 9 abaixo estão listados os tipos de extratos, métodos utilizados para extração, solventes e rendimentos de cada tipo de extrato das cascas de *P. fasciculata*. Pode-se observar que os melhores rendimentos foram obtidos para o Extrato Etanólico de *P. fasciculata* (EPPF), Extrato Etanólico de *P. fasciculata* – o Insolúvel em Acetato de Etila (EPPF- Insol. AcOEt) a fração Extrato Etanólico de *P. fasciculata* - Hex: DCM (1:1).

Tabela 9: Condições utilizadas na preparação dos extratos, massas do pó da planta, massas dos extratos e frações, e rendimentos dos processos extrativos.

Extratos	Métodos de Extração	Solventes	Massas (g)	Massas (g)	Rendimentos (%)
EEPF	Maceração	ETOH	500 (pó de cascas)	33	6,7
EDAPF	Percolação	DCM	200 (pó de cascas alcalinizado)	4,07	2,0
EEPF-Hex:DCM (1:1)	EEPF/Sob refluxo	Hex:DCM (1:1)	30 (EEPF)	3,33	11,1
EEPF-AcOEt:DCM (1:1)	EEPF/Sob refluxo	AcOEt:DCM (1:1)	30	0,63	2,1
EEPF-Insol. AcOEt	EEPF/Sob refluxo	AcOEt	30	23	76,0

Legenda: EEPF: extrato etanólico de *P. fasciculata*; EDAPF: extrato em diclorometano de *P. fasciculata*; EEPF- HEX:DCM (1:1): extrato etanólico de *P. fasciculata* - hexano:diclorometano (1:1); EEPF- AcOEt: DCM: extrato etanólico de *P. fasciculata* - acetato de etila:diclorometano (1:1); EEPF insol. AcOEt extrato etanólico de *P. fasciculata* – insolúvel em acetato de etila:diclorometano; DCM: diclorometano; AcOEt: acetato de etila; ETOH: etanol.

Durante o experimento, foram realizados três tipos de extrações para se tentar a extrações de alcalóides, como mostra a Tabela 9. Uma dos métodos mais usuais para a extração de produtos naturais é a percolação exaustiva, utilizando vários solventes, com gradativo aumento da polaridade (MAGALHÃES, 2012). Porém, essa metodologia não foi empregada neste trabalho, uma vez que neste estudo foi obtido, com sucesso, o extrato de triterpenos, a partir da alcalinização do material vegetal com hidróxido de amônio em percolador e posterior extração com diclorometano. Esta metodologia é, usualmente, empregada na extração de alcalóides (SALDAÑA *et al.*, 1997). No entanto, constatou-se a ausência desta classe de produtos naturais em *P. fasciculata* e a predominância de triterpenos.

Assim, ao realizar o tratamento do material vegetal com uma solução de NH₄OH, formam-se sais de compostos de natureza ácida, como os fenóis, presentes na planta e a percolação com diclorometano, possibilita a extração, predominantemente, de compostos neutros de baixa polaridade, como triterpenos. Desse modo, obtém-se, no final, um extrato bruto com uma menor diversidade de componentes, o que facilitou a purificação e a obtenção do lupeol.

A análise do perfil em CCD do extrato em diclorometano de *P. fasciculata* (EDAPF) revelou a presença de triterpenos e esteróides e a ausência de alcalóides (Figura 16), confirmando, mais uma vez, a ausência deste metabólito em suas cascas, pois não houve translocação das folhas.

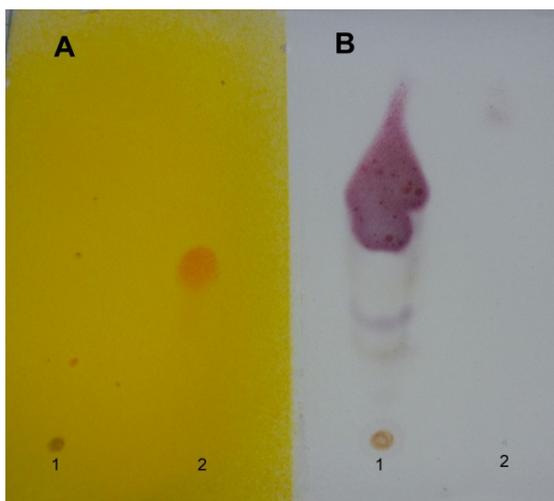


Figura 16: Perfil em CCD do Extrato em diclorometano de *P. fasciculata* (EDAPF). Eluente: clorofórmio: metanol: hidróxido de amônia (85:15:0,2). **Revelador A:** Reagente de Dragendorff; **Revelador B:** anisaldeído sulfúrico. (1): EDAPF; (2): Amostra de referência quinina livre.

Nas análises fitoquímicas por CCD foi detectada a presença de triterpenos nos extratos EEPF- Hex:DCM (1:1) (Figura 17) e EEPF- AcOEt:DCM (1:1) (Figura 17). O cromatograma obtido do EEPF insol. AcOEt (100%) (Figura 18), mostra a presença de substâncias de alta polaridade, sendo que os picos com TRs menores do que 12 minutos correspondem a uma percentagem de área maior que 87%. Observa-se no cromatograma uma banda larga devido à alta complexidade de mistura de isômeros. A presença de proantocianidinas é deduzida a partir dos espectros no UV do pico 6 (TR=11,3 min) com comprimento de onda em 278,1 nm.

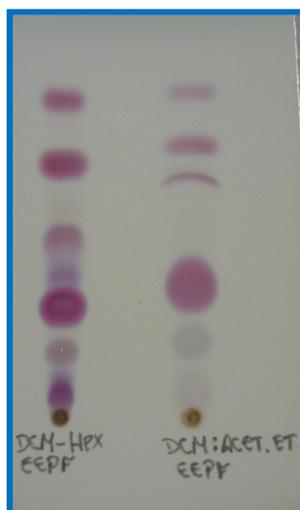


Figura 17: Perfil em CCD dos extratos EEPF- Hex:DCM (1:1) e EEPF- AcEtO: DCM (1:1) para a detecção de triterpenos. Eluente: DCM:Hex (8:2). Revelador: anisaldeído sulfúrico.

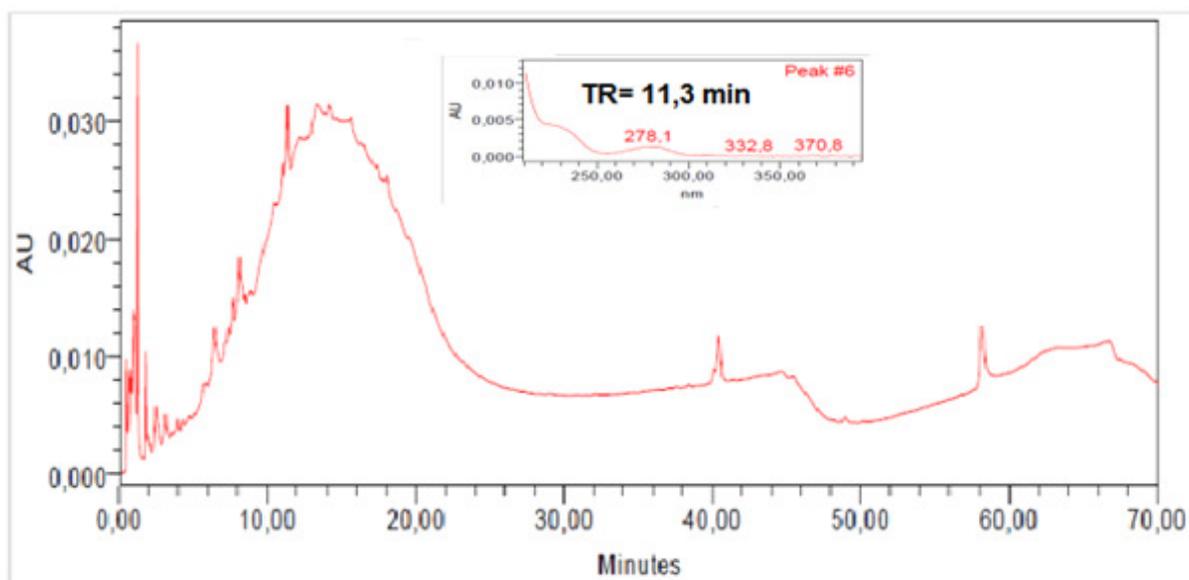


Figura 18: Perfil Cromatográfico em CLAE-DAD do extrato EEPF insol. AcOEt de *Parahancornia fasciculata* (100%). Sistema de Eluição: eluente A (H₂O), eluente B (acetonitrila). Fase Móvel: A 95% - B 5% em 0 minuto; A 5% - B 95% em 65 minutos; A 5% - B 95% em 70 minutos; A 95% - B 5% em 75 minutos. Fluxo de 1 mL/min. Coluna LiChrospher 100 RP-18 (partículas de 5 mm, 250 x 4 mm d.i.). Detecção UV220-400 nm.

5.1.2 FRACIONAMENTO DO EXTRATO EM DICLOROMETANO DE CASCAS DE *P. FASCICULATA* (EDAPF)

O extrato em diclorometano de *P. fasciculata* (EDAPF) (3,0 g), obtido a partir do pó alcalinizado das cascas por extração com diclorometano, foi submetido ao processo de fracionamento por cromatografia em coluna (CC), utilizando-se como

fase estacionária a sílica gel e solventes de polaridade crescente, sendo obtidas 30 frações (Tabela 10). As massas e os rendimentos de cada fração encontram-se descritos na Tabela 10. As frações EDAPF-Fr1, EDAPF-Fr2, EDAPF-Fr3, EDAPF-Fr4, EDAPF-Fr5, EDAPF-Fr6, EDAPF-Fr7, EDAPF-Fr11, EDAPF-Fr12 e EDAPF-Fr13 foram obtidas com os melhores rendimentos.

Tabela 10: Dados sobre o fracionamento cromatográfico do extrato em diclorometano de pó alcalinizado de cascas de *Parahancornia fasciculata* (EDAPF 3,0g): rendimentos do processo de fracionamento.

Frações	Eluentes	Massa da Fração (mg)	Rendimento (%)
EDAPF-Fr1	DCM (100%)	613	20,43
EDAPF-Fr2	DCM (100%)	363	12,1
EDAPF-Fr3	DCM (100%)	434	14,47
EDAPF-Fr4	DCM (100%)	220	7,3
EDAPF-Fr5	DCM (100%)	328	10,94
EDAPF-Fr6	DCM (100%)	247	8,22
EDAPF-Fr7	DCM (100%)	77,2	2,5
EDAPF-Fr8	DCM (100%)	26,6	0,88
EDAPF-Fr9	DCM:AcOEt (9:1)	32,7	1,09
EDAPF Fr10	DCM:AcOEt (9:1)	48,4	1,61
EDAPF-Fr11	DCM:AcOEt (1:1)	106	3,53
EDAPF-Fr12	DCM:AcOEt (1:1)	112,9	3,76
EDAPF-Fr13	DCM:AcOEt (1:1)	17,8	5,93
EDAPF-Fr14	DCM:AcOEt (1:1)	5,1	0,17
EDAPF-Fr15	DCM:AcOEt (1:1)	4	0,13
EDAPF-Fr16	DCM:AcOEt (1:1)	2,2	0,073
EDAPF-Fr17	AcOEt (100%)	2,4	0,08
EDAPF-Fr18	AcOEt (100%)	1,8	0,06
EDAPF-Fr19	MeOH 2%	5,7	0,19
EDAPF-Fr20	MeOH 2%	7,5	0,25
EDAPF-Fr21	MeOH 2%	12	0,4
EDAPF-Fr22	MeOH 2%	12,8	0,42
EDAPF-Fr23	MeOH 5%	7,6	0,25
EDAPF-Fr24	MeOH 5%	7,6	0,22
EDAPF-Fr25	MeOH 5%	7,6	0,35
EDAPF-Fr26	MeOH 10%	3,9	0,13
EDAPFFr27	MeOH 10%	4,7	0,15
EDAPF-Fr28	MeOH 100%	6,6	0,22
EDAPF-Fr29	MeOH 100%	49,8	1,66
EDAPF-Fr30	MeOH 100%	5,9	0,19

Legenda: EDAPF-Fr:Fração do extrato em diclorometano de *P. fasciculata*; em coluna; DCM: diclorometano; AcOEt:acetato de etila; MeOH: metanol

Todas as frações foram analisadas por CCD, e algumas destas foram reunidas (Tabela 11) e submetidas novamente à análise cromatográfica em CCD, utilizando ésteres de lupeol como amostra de referência. As frações 5, 6 e 7 foram submetidas à análise por CCD para detecção de triterpenos (revelador: Liebermann-Burchard) e apresentaram uma mancha única (Figura 19).

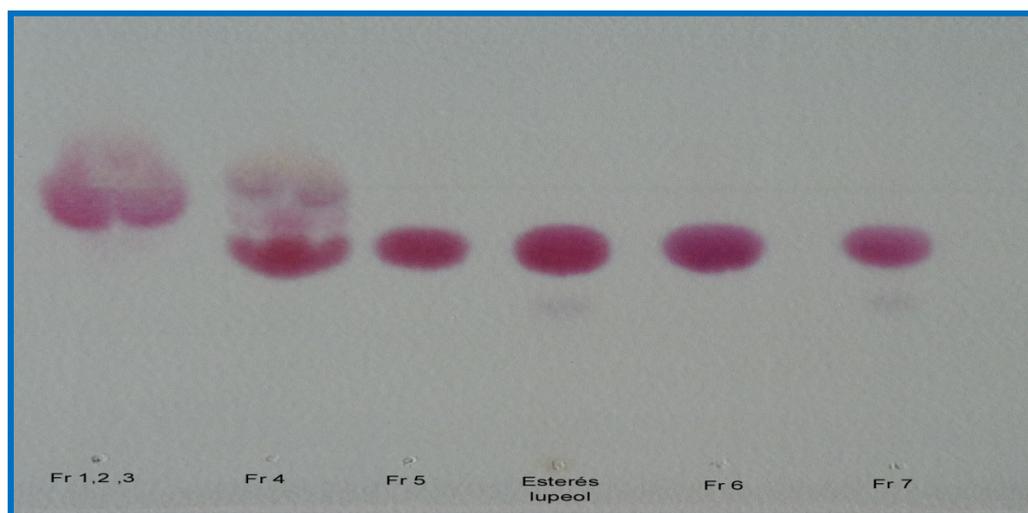


Figura 19: Perfil em CCD das frações 1 a 7 para a detecção de triterpenos. Eluente: hexano: acetato de etila (8:2). Revelador: reagente de Liebermann-Burchard (LB).

Tabela 11: Frações que foram reunidas, suas massas (mg) e seus respectivos rendimentos (%).

Frações	Massa (mg)	Rendimentos (%)
EDAPF-Fr 1-3	1410	47,0
EDAPF-Fr 5-7	652	21,7
EDAPF-Fr 9-10	81	2,7
EDAPF-Fr 13-14	23	6,1
EDAPF-Fr 19-21	14	0,8
EDAPF-Fr 23-27	33	1,1

CCD da fração EDAPF-Fr 5-7 mostrou que o Rf da mancha observada é semelhante ao Rf da amostra de referência, sugerindo que esta fração seja constituída de misturas de ésteres do lupeol e não lupeol, como se pensou inicialmente (Figura 24). Comparação dos dados com a amostra de ésteres de lupeol a partir da mesma espécie isolada anteriormente por Sobrinho e

colaboradores (1991), mostrou tratar-se desta substância. Esta fração foi recristalizada duas vezes e o rendimento da primeira recristalização foi de 38,5% e da segunda recristalização foi de 44,4%. Também determinou-se o ponto de fusão desta fração que foi entre 162,2°C – 170°C.

5.1.3 ANÁLISE ESPECTROMÉTRICA DE Fr 5-7

A análise do espectro no infravermelho (IV) da Fr5 - 7 (Figura 20) mostrou sua natureza alifática pela presença de bandas intensas em 2945, 2919, 2852, 2868 cm^{-1} , atribuídas a vibrações de estiramento C-H. Duas bandas em 3280 e 3208 cm^{-1} foram atribuídas a vibrações de estiramento O-H. A natureza alifática das hidroxilas responsáveis por estas absorções foi confirmada pela presença de banda de intensidade forte em 1035 cm^{-1} , atribuída ao estiramento C-O de alcoóis. As bandas em 1385 e 1360 cm^{-1} foram atribuídas a deformações angulares no plano de O-H. A banda em 1463 cm^{-1} foi atribuída à deformação angular simétrica no plano de C-H (CH_2), e a banda em 1737 cm^{-1} foi atribuída a estiramento C=O de ésteres saturados acíclicos. O critérios para estas atribuições foram de acordo com Silverstein e colaboradores (2007).

Os dados da Fr5-7 foram comparados com aqueles de uma amostra de referência (ésteres do lupeol; Figura 21) apresentando bandas semelhantes, além de comparação com dados na literatura (VELLOSO, 1998; TOMOSAKA *et al.*, 2001) sugerindo que a Fr5-7 seja uma mistura de 3 β -O-acil-derivados do lupeol (3 β -O-acil-lupeol).

A presença de derivados de 3 β -O-acil-lupeol foi confirmada pelos dados espectrais no espectro IV que mostraram sinais referentes a grupo carbonila de éster em 1737 cm^{-1} (SOBRINHO *et al.*, 1991; CARVALHO *et al.*, 2001b; ALVES,2003).

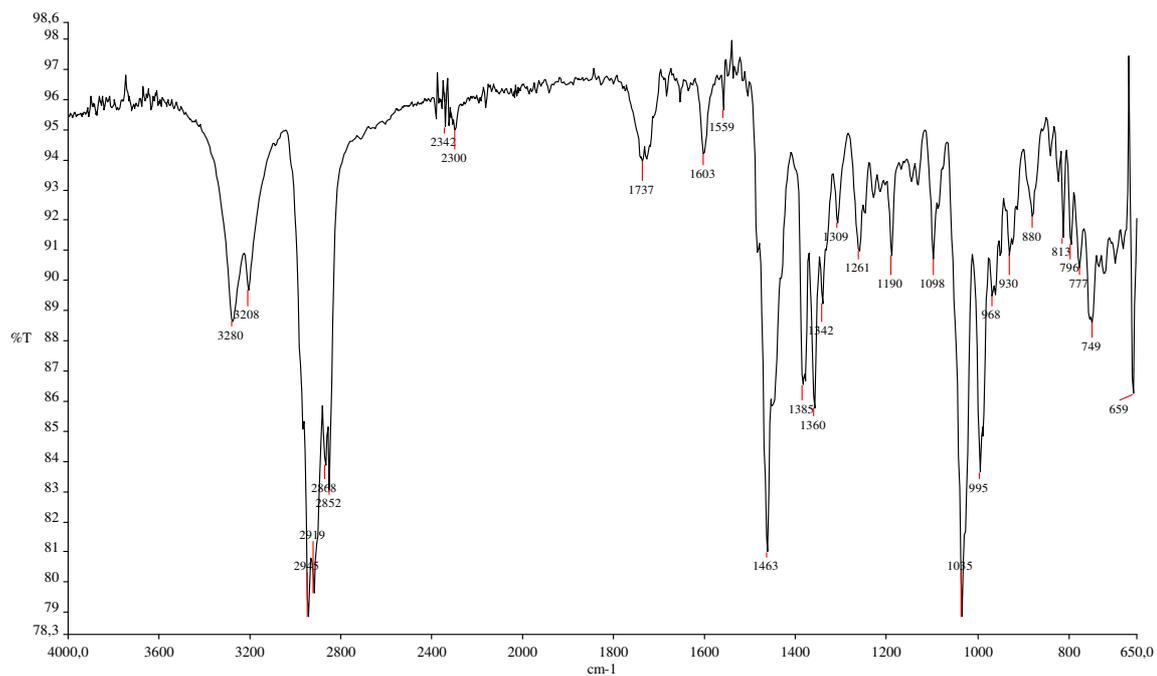


Figura 20: Espectro de absorção molecular no infravermelho da Fr5-7.

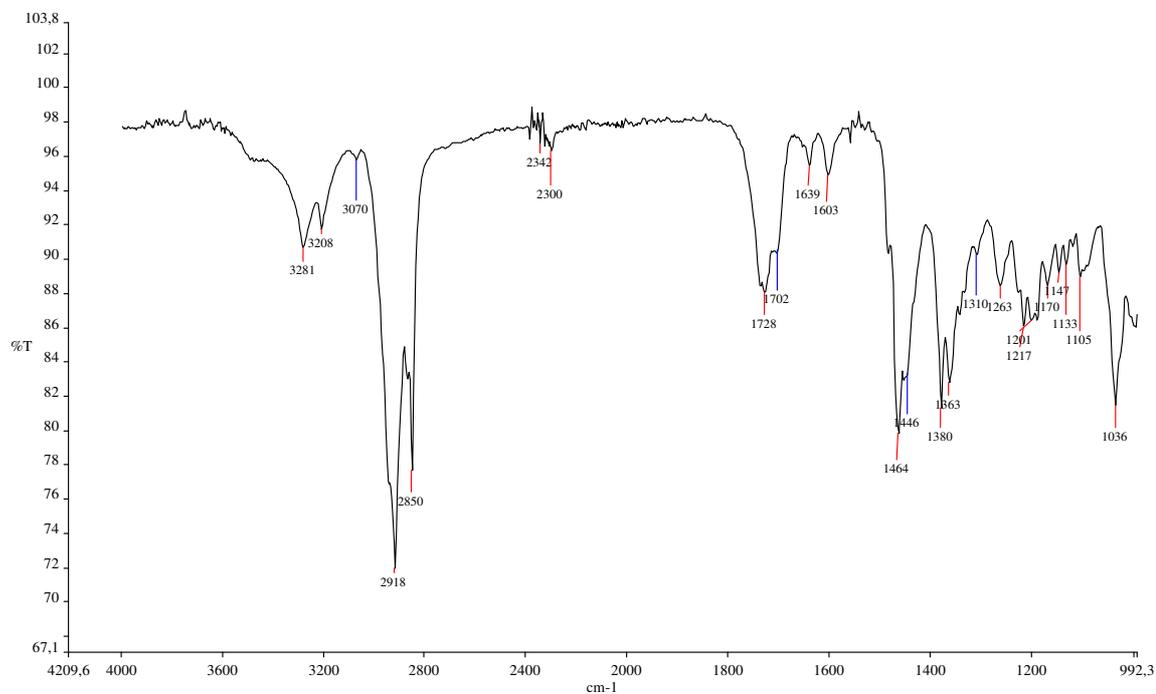


Figura 21: Espectro de absorção molecular no infravermelho da amostra de referência (ésteres do lupeol).

Após as análises fitoquímicas que permitiram identificar a Fr5-7 como ésteres do lupeol, a mesma fração passou por um processo de hidrólise alcalina obtendo-se o produto que foi denominado Fr 5-7Hid.

5.1.4 IDENTIFICAÇÃO DE Fr5-7Hid

Fr5-7Hid apresentou-se como um sólido de coloração branca, com ponto de fusão de 161,2°C a 165°C. A análise deste sólido por CCD confirmou tratar-se de um terpeno, em função da coloração violácea da única mancha observada, após revelação com reagente de Liebermann-Burchard (Figura 22).

A análise do espectro no IV da Fr5-7Hid (Figura 23) evidenciou sua natureza alifática, pela presença de bandas intensas em 2944, 2870, 2853 cm^{-1} , atribuídas a estiramentos C-H. Uma banda larga na região de 3500-3100 cm^{-1} , centrada em 3290 cm^{-1} , foi atribuída ao estiramento O-H. A natureza alifática desta hidroxila foi confirmada pela presença de banda de intensidade forte em 1035 cm^{-1} , atribuída ao estiramento C-O de alcoóis (SILVERSTEIN *et al.*, 2007). Comparando-se o espectro no IV de Fr5-7Hid (Figura 23) com aquele da Fr5-7, observa-se no espectro deste duas bandas de absorção relacionadas ao estiramento O-H, enquanto que no caso do produto de hidrólise (lupeol) somente uma banda é registrada. Este dado permite deduzir que Fr5-7 contém ésteres de acil-lupeol dos tipos 20 e/ou 21 (pg. 36), apresentando grupos hidroxila na cadeia derivada de ácidos graxos.

A banda em 1379 cm^{-1} foi atribuída à deformação angular no plano de O-H. As bandas intensas em 1453 e 1463 cm^{-1} foram atribuídas à deformação angular simétrica no plano de ligação C-H (CH_2 ; SILVERSTEIN *et al.*, 2007).

Os dados espectrométricos no IV da substância obtida por hidrólise de Fr5-7 são semelhantes a dados da literatura para o lupeol (SOBRINHO *et al.*, 1991; CARVALHO *et al.*, 2006), sugerindo-se que Fr5-7Hid seja este triterpeno.

A identificação de Fr5-7Hid como lupeol baseou-se em dados espectrais do infravermelho em comparação com aqueles relatados na literatura, como os sinais atribuídos ao estiramento C-O de grupos alcoóis, em 1035 cm^{-1} e do estiramento O-H, em 3290 cm^{-1} (SOBRINHO *et al.*, 1991; CARVALHO *et al.*, 2001b; ENDRIGER, 2007).

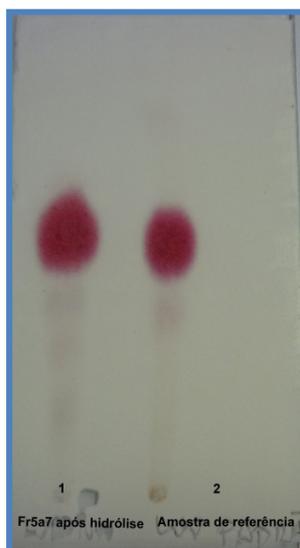


Figura 22: Perfil em CCD da Fr 5-7Hid. Eluente: hexano: acetato de etila (8:2). Revelador: reagente de Liebermann-Burchard (LB). 1: Fr5-7 após Hidrólise, 2: Lupeol de referência.

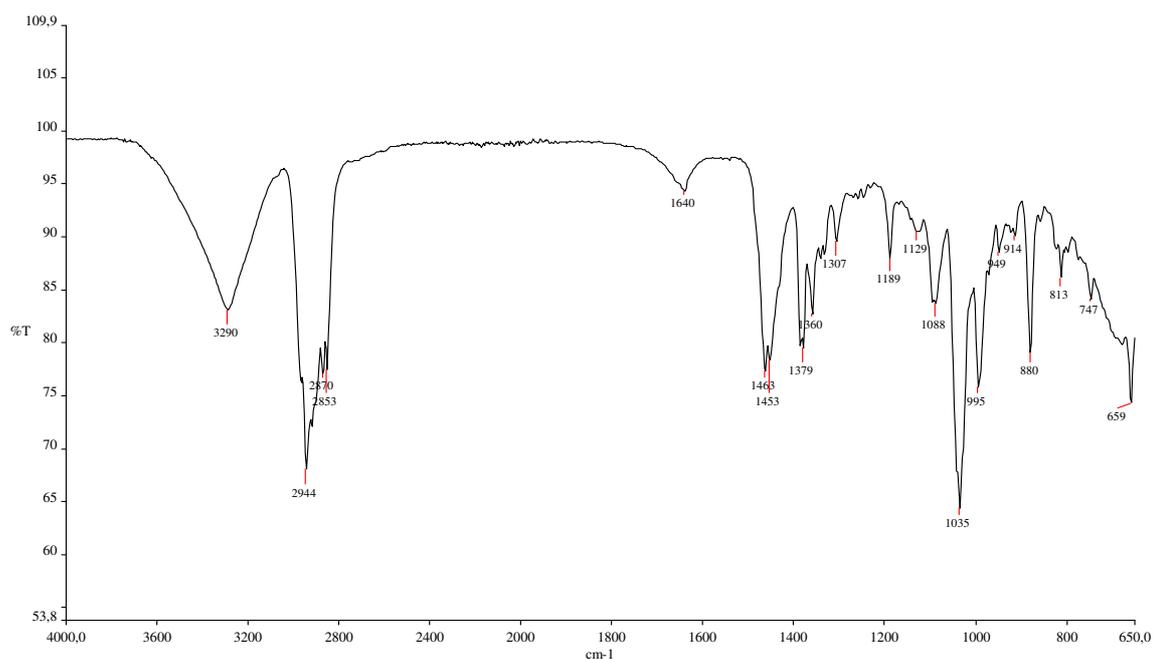


Figura 23: Espectro de absorção molecular no infravermelho de Fr 5-7Hid (lupeol).

O espectro de RMN ^1H (Figura 24) de Fr5-7 Hid mostrou, como esperado para o lupeol, absorções múltiplas na faixa de 0,8 a 2,2 ppm que são devido a todos os hidrogênios da molécula, exceto aqueles das posições H3 e H29. O sinal de H-3 é observado como um duplo duplete em 3,18 ppm, enquanto que os sinais em 4,61 e 4,50 ppm correspondem aos hidrogênios olefínicos H29A e H29B, dupletos largos

que confirmam a presença de ligação dupla exocíclica, característica de triterpenos da série dos lupanos. O duplete triplo centrado em 2,37 ppm foi atribuído a H19A (SILVERSTEIN *et al.*, 2007). A partir do perfil espectral e de acordo com dados descritos previamente na literatura para triterpenos (MAHATO, 1994; JÁCOME, 1998; BURNS *et al.*, 2000; ENDRIGER, 2007; MARINHO, 2008) foi possível identificar Fr5-7Hid como lupeol.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 25) obtido para Fr5-7Hid apresentou sinais que permitiram confirmar seu caráter triterpênico, sendo a natureza dos carbonos deduzida a partir do subspectro DEPT-135. A atribuição dos sinais baseou-se na comparação com dados relatados para triterpenos (OLEA; ROQUE, 1990; MAHATO; KUNDU, 1994). Assim, o espectro mostrou sinais em 150,99 e 109,35 ppm referentes a carbonos olefínicos C20 e C29 respectivamente. O sinal em 79,04 ppm foi atribuído ao carbono carbonílico em C3. Este valor de deslocamento químico indica que a hidroxila está posicionada em equatorial, na configuração C3- β -OH (OLEA e ROQUE, 1990; MAHATO, 1994; JÁCOME, 1998, BURNS *et al.*, 2000; ENDRIGER, 2007; MARINHO, 2008). A atribuição dos sinais do espectro de RMN de ^1H e ^{13}C está descrita na Tabela 12.

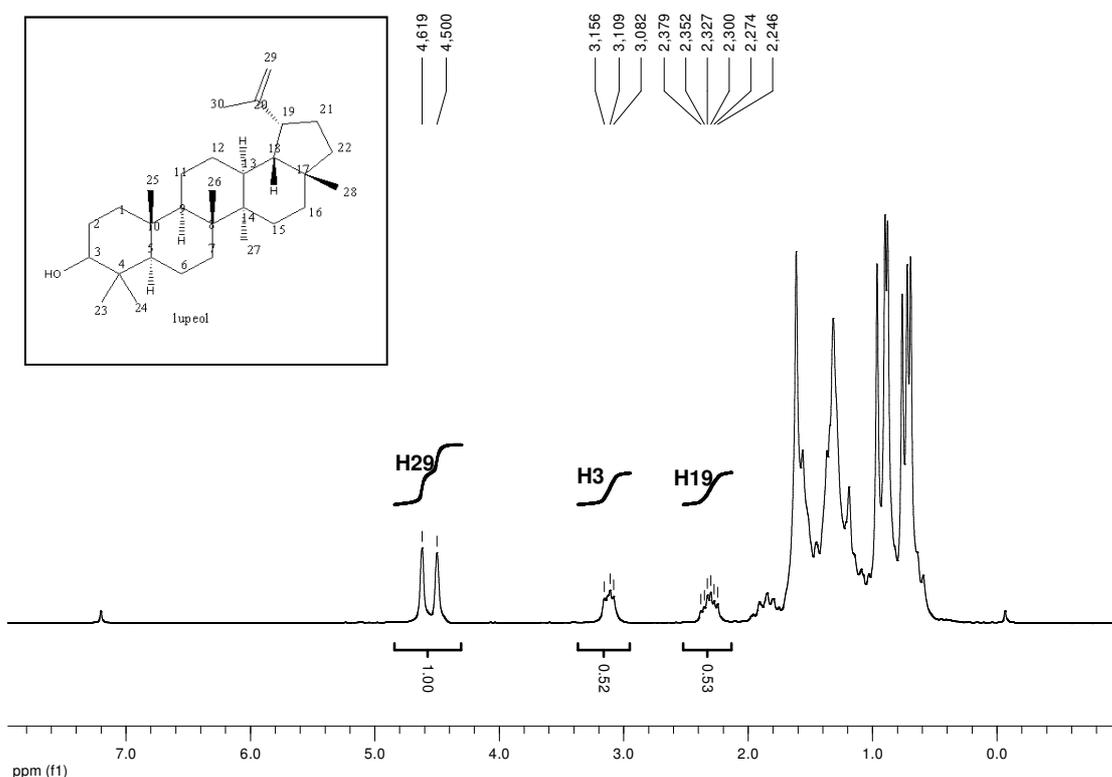


Figura 24: Espectro de RMN de ^1H de Fr5-7Hid (lupeol) (400 MHz, CDCl_3).

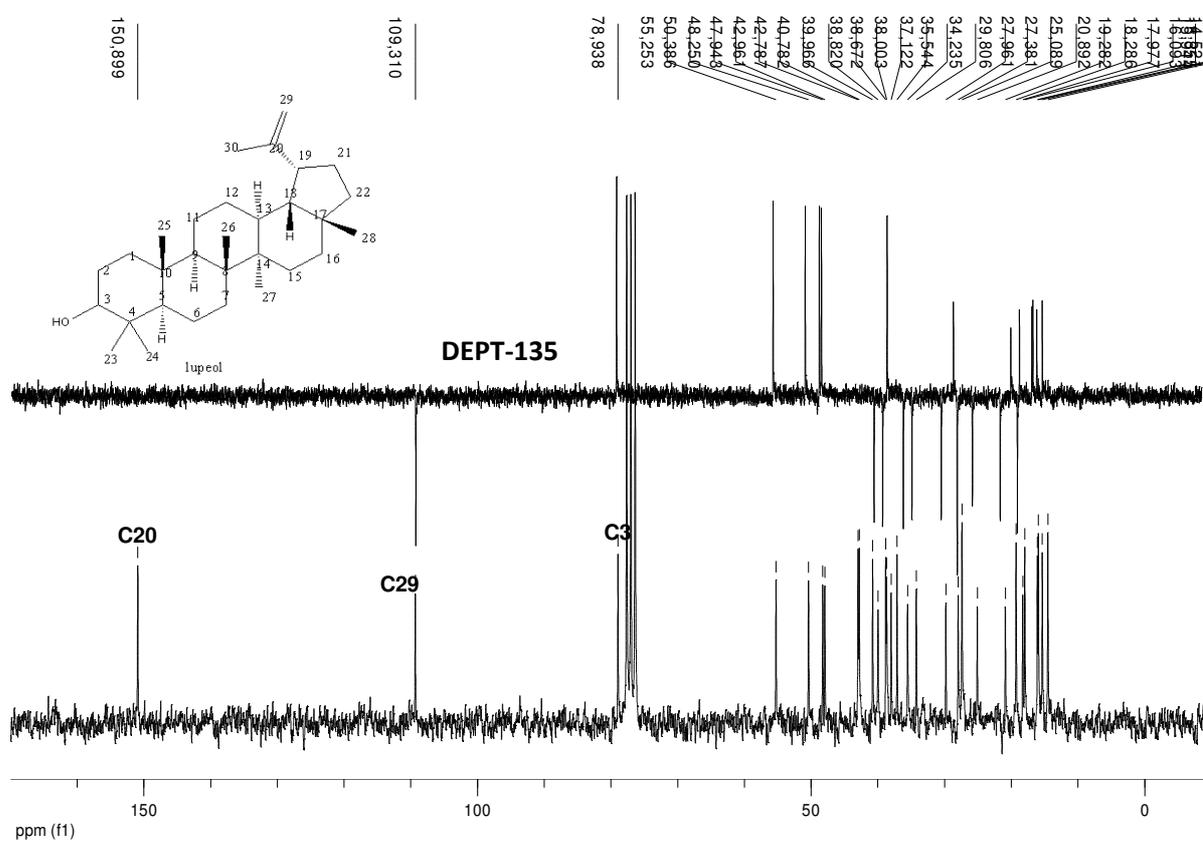


Figura 25: Espectro de RMN 13C desacoplado e DEPT-135 de Fr5-7Hid (Lupeol) (400 MHz, CDCl₃).

Tabela 12: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para de Fr5-7Hid (Lupeol; 400 MHz, CDCl_3).

Posição	δ $^1\text{H}^*$	δ ^1H	δ $^{13}\text{C}^*$	δ ^{13}C
	Lupeol (Marinho, 2008)	Fr5-7Hid	Lupeol (Marinho, 2008)	Fr5-7Hid
1	-	-	38,7	38,8
2	-	-	27,4	27,4
3	3,18 (1H, dd)	3,15 (dd)	79,04	79,16
4	-	-	38,81	39,04
5	-	-	55,33	55,47
6	-	-	18,35	19,5
7	-	-	34,32	34,45
8	-	-	40,88	40,18
9	-	-	50,4	50,6
10	-	-	37,2	37,4
11	-	-	20,97	21,1
12	-	-	25,20	25,3
13	-	-	38,1	38,2
14	-	-	42,8	41
15	-	-	27,49	27,6
16	-	-	35,62	35,8
17	-	-	43	43
18	-	-	48,02	48,5
19	2,38 (m)	2,37 (dt)	48,36	48,16
20	-	-	150,99	151,1
21	-	-	29,86	30
22	-	-	40,04	40,2
23	-	-	28,01	28,2
24	-	-	15,38	15,5
25	-	-	16,14	16,3
26	-	-	16,01	16,1
27	-	-	14,58	14,7
28	-	-	18,03	18,5
29	4,68, 4,57 (d)	4,61; 4,50 (d)	109,34	109,5
30	-	-	19,34	19,4

5.1.5. ANÁLISE ESPECTROMÉTRICA DE Fr11

Fr11 também foi recristalizada com o solvente metanol, obtendo-se o material recristalizado, com ponto de fusão entre 71,2°C - 76,5°C.

O espectro no IV para Fr11 recristalizada (Figura 26) mostrou bandas de absorção em 3209 e 3279 cm^{-1} referentes a vibrações de estiramento O-H. As bandas intensas e fortes em 2850 e 2918 cm^{-1} foram atribuídas ao estiramento de

ligação C-H de grupos metila de cadeia alifática. As bandas em 1704 e 1729 cm^{-1} são referentes a fortes vibrações de estiramento C=O de ésteres saturados acíclicos. A banda em 1464 cm^{-1} foi atribuída à deformação angular simétrica no plano de ligação de C-H (CH_2). A banda em 1380 cm^{-1} é atribuída a deformação angular no plano de O-H; 1036 cm^{-1} refere-se a banda de forte intensidade com estiramento C-O de álcoois primários. E a banda em 720 cm^{-1} foi atribuída a deformação angular assimétrica de ligação C-H de grupamentos (CH_2) onde $n \geq 4$ (SILVERSTEIN *et al.*, 2007).

Os dados no IV de Fr11 foram comparados com a análise de uma amostra de referência (ésteres de lupeol; Figura 21) apresentando bandas semelhantes, além de comparação com dados na literatura (TOMOSAKA *et al.*, 2001) sugerindo que esta fração seja constituída por misturas de ésteres do lupeol.

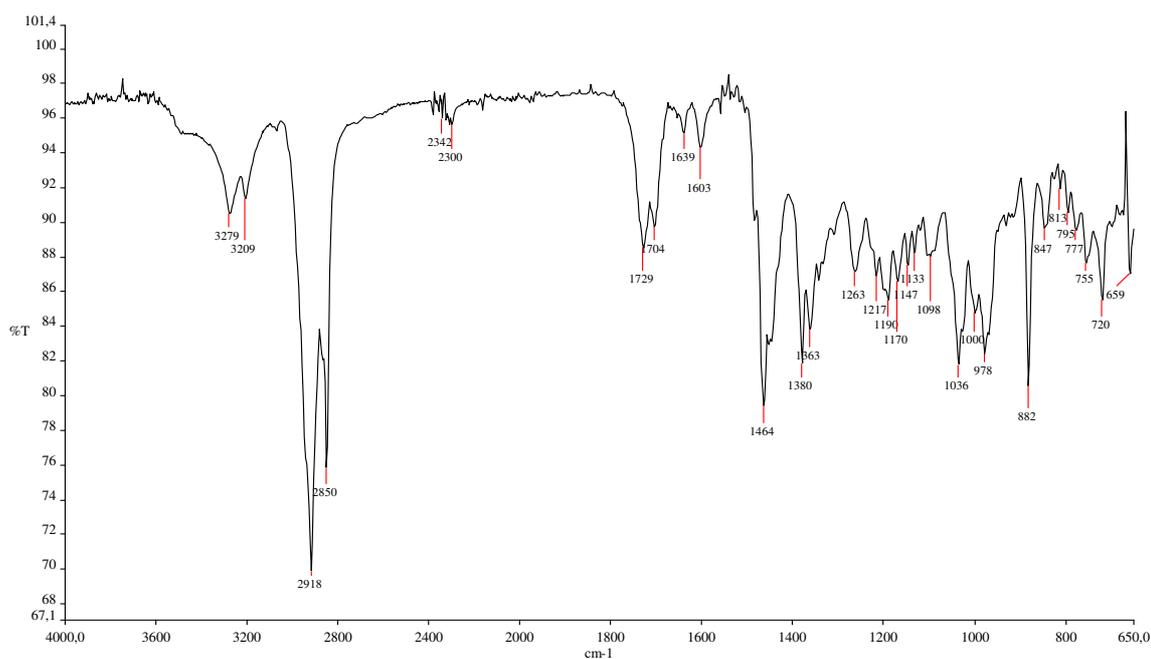


Figura 26: Espectro de absorção molecular no infravermelho da fração 11 solúvel (Fr11).

5.1.6 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE TANINOS CONDENSADOS/ PROANTOCIANIDINAS NO EEPF INSOLÚVEL EM AcOEt

Os taninos condensados ou proantocianidinas são polímeros de flavan-3-ol e/ou flavan-3,4-diol, produtos do metabolismo de fenilpropanoides (HELDT, 1997; HEIL *et al.*, 2002) e constituem, aproximadamente, a metade da matéria seca das cascas de muitas árvores. Eles constituem a segunda fonte de polifenóis do reino vegetal, perdendo apenas para a lignina. Além de serem potentes antioxidantes, possuem larga aplicação na complexação com proteínas, sendo por isso muito empregado na indústria de couros (HAGERMAN *et al.*, 1997; ARGYROPOULOS, 1999).

São utilizados na medicina tradicional no tratamento de diarreias, hipertensão arterial, reumatismo, hemorragias, queimaduras e problemas renais. Sua capacidade de precipitar proteínas é a base de seu mecanismo de ação desejado, como por exemplo, como antisséptico (JANOVIK *et al.*, 2009). Além de apresentarem ação anti-hepatotóxica (CHENG *et al.*, 1993; MELZER *et al.*, 1991), anti-tumoral (BOMSER *et al.*, 1993), anti-viral (TAKECHI *et al.*, 1985) e proteção contra aterosclerose (MICHAUD e MASQUELIER, 1973).

Para a determinação do teor de proantocianidinas foi utilizado o extrato insolúvel em acetato de etila (AcOEt) obtida a partir de extrações sob refluxo do extrato etanólico de *P. fasciculata* (EEPF), de acordo com a metodologia descrita por Hiermann e colaboradores (1986). Esta determinação foi realizada em triplicata para a confirmação dos resultados que foram obtidos por leitura em uma curva de calibração do padrão (cloreto de cianidina; Figura 27).

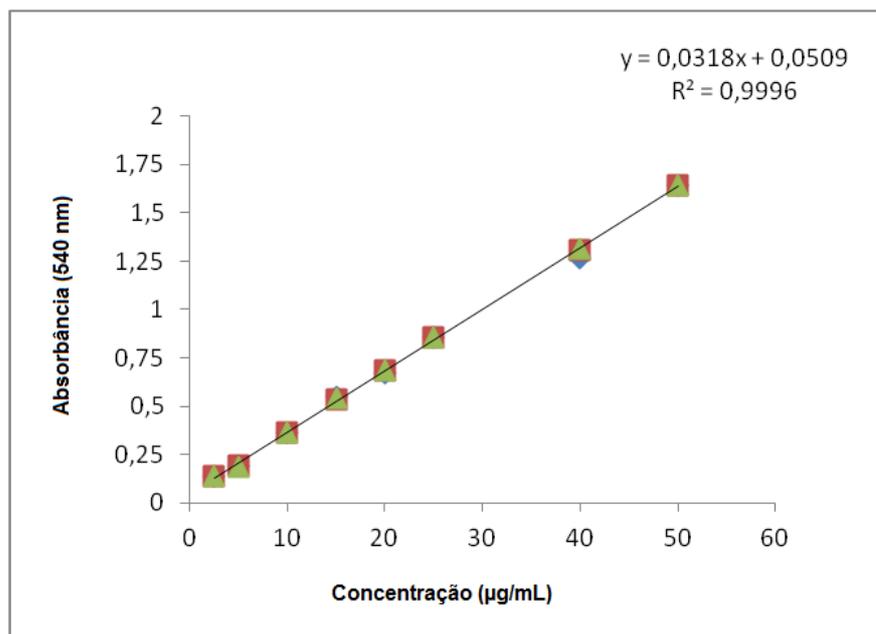


Figura 27: Curva de calibração do padrão cloreto de cianidina.

Os experimentos foram realizados em três determinações para melhor confirmação dos resultados, que constam da Tabela 13.

Tabela 13: Média \pm desvio padrão (DP) das absorbâncias a 540 nm das três determinações do EEPF ins. AcOEt sem diluir (amostra pura), EEPF ins. AcOEt diluído 1:10 (amostra diluída 1:10) e EEPF ins. AcOEt diluída 1:100 (amostra diluída 1:100), realizadas em triplicata.

Amostras	Média \pm DP das absorbâncias das três Determinações
Amostra não diluída	3,6992 \pm 0,1402
Amostra diluída 1:10	0,4402 \pm 0,0121
Amostra diluída 1:100	0,0928 \pm 0,0128

Legenda: EEPF ins. AcOEt: extrato etanólico de *P. fasciculata* insolúvel em acetato de etila.

Foram obtidos dois resultados para o teste de proantocianidinas: um qualitativo e outro quantitativo. No teste qualitativo, observou-se a presença marcante de cor vinho, indicando um resultado positivo para a presença de taninos condensados em *P. fasciculata*. Assim como, observou-se também uma variação na cor nas amostras mais diluídas a partir da amostra pura (cor vinho), para cor rosa na amostra diluída 1:10 e cor rosa clara na amostra diluída 1:100 (Figura 28).

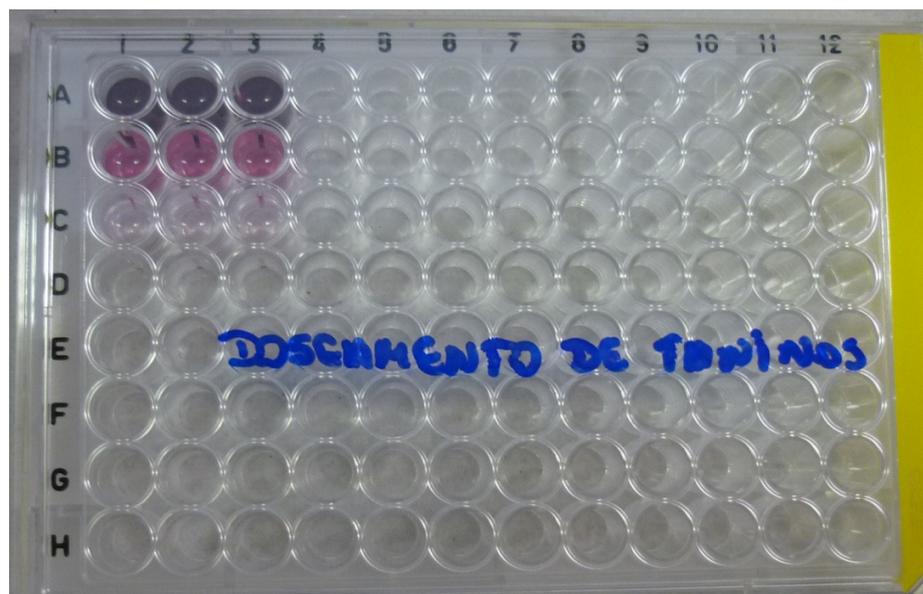


Figura 28: Amostras do extrato etanólico de *P. fasciculata* (EETF) insolúvel em AcOEt distribuídas na placa de 96 poços em triplicata.

Legenda: Linha A: amostra sem diluir; Linha B: amostra diluída 1:10 e Linha C: amostra diluída 1:100.

Para o resultado quantitativo, foram determinados os teores de taninos condensados nas cascas de *P. fasciculata* após leitura no leitor de ELISA, sendo que os resultados foram calculados e expressos tirando-se a média dos teores, o desvio padrão dos teores (DPT) e o desvio padrão relativo dos teores de taninos (DPR; Tabela 14). A comparação dos teores médios de proantocianidinas para a amostra pura ($10,46 \pm 0,3419$ %), amostra diluída 1:10 ($9,94 \pm 0,1598$ %) e amostra diluída 1:100 ($10,55 \pm 0,9299$ %), não revelou diferenças estatísticas significativas, entre elas ($p > 0,05$), pois proporcionaram excelente repetibilidade nos resultados. Estes são os primeiros dados obtidos para a quantificação de proantocianidinas em *P. fasciculata*, não tendo sido encontrados relatos na literatura.

Tabela 14: Resultados do doseamento de Proantocianidinas na fração insolúvel em acetato de etila (AcOEt) obtida a partir de extrações sob refluxo do extrato etanólico de *P. fasciculata*

	Amostra não diluída (%)	Amostra diluída 1:10 (%)	Amostra diluída 1:100 (%)
Média dos teores	10,4657	9,9413	10,5508
DP teores	0,3419	0,1598	0,9299
DPR dos teores (%)	3,27	1,61	8,81
Resultado Final (teor de taninos \pm DP)	$10,46 \pm 0,3419$	$9,94 \pm 0,1598$	$10,55 \pm 0,9299$

Legenda: DP= Desvio Padrão; DPR= Desvio Padrão Relativo.

5.2 Atividade Antimalárica

5.2.1 ATIVIDADE ANTIPLASMÓDICA *IN VITRO*

Os estudos de eficácia terapêutica, testes *in vitro* e marcadores moleculares tornaram-se ferramentas que se complementam para uma visão global da susceptibilidade do *P. falciparum* às drogas antimaláricas (WHO, 2002).

Dentre as técnicas utilizadas para os testes de novos esquizotocidas sanguíneos, encontra-se um método que emprega o cultivo da forma eritrocítica do *P. falciparum* desenvolvido por Trager e Jansen em 1976, e que vem sendo muito utilizada desde sua padronização na década de 70. Esta metodologia possibilitou grandes avanços nas áreas da bioquímica, parasitologia, imunologia e quimioterapia, além de propiciar a criopreservação de parasitos vivos, contribuindo para estudos sobre a biologia dos parasitos que causam a malária falciparum (TRAGER e JANSEN, 1997) e a identificação de populações do parasito em diferentes áreas geográficas (CARTER e VOLLER, 1975; ROSÁRIO *et al.*, 1986a, 1986b).

Após estabelecimento da metodologia do cultivo contínuo do *P. falciparum*, um novo método desenvolvido por Rieckmann e colaboradores em 1978, denominado de Microteste ou Teste Tradicional, foi desenvolvido para testes de sensibilidade do *P. falciparum* às drogas, sendo que, neste teste, a parasitemia é lida em microscópio, após 24 horas de exposição do parasito à droga. Esta técnica recebeu essa nomenclatura por apresentar o mesmo princípio do teste previamente desenvolvido por Rieckmann e colaboradores (1968), o Macroteste, onde o sangue parasitado do plasmódio era incubado em solução de glicose contendo diferentes concentrações das drogas. O estabelecimento do cultivo permitiu que o novo ensaio (Microteste) pudesse ser realizado em placas de 96 poços, utilizando-se meio de cultura apropriado, o qual substituiu a solução glicosada do Macroteste.

Com o objetivo de automatizar a triagem de drogas antimaláricas, Desjardins e colaboradores (1979) descreveram um método rápido e semi-automatizado de microdiluição, no qual se pode verificar a atividade de potenciais medicamentos antipalúdicos contra culturas intraeritrocíticas de formas assexuadas do parasita da

malária humana o *P. falciparum*. Atualmente, esta metodologia é a mais utilizada nos programas de quimioterapia *in vitro* da malária, por ser um método sensível e preciso. Este método é radioisotópico e baseia-se na incorporação da [³H]-hipoxantina, precursora de ácidos nucleicos, marcada por parasitas como indicador de atividade antimalárica. Entretanto, esta técnica apresenta limitações para ser executada em campo, por necessitar de equipamentos específicos, de capacitação profissional para o manuseio de material radioativo, a geração de resíduos radioativos, cuja eliminação gera custo e a necessidade que a técnica requer de densidade elevada de parasitos (KYLE *et al.*, 2002; NOEDL *et al.*, 2003).

Makler e colaboradores (1993a), Makler e Hinrichs (1993b) desenvolveram um ensaio que determina o perfil da inibição da sensibilidade do parasito à droga, medindo a atividade enzimática de *p*LDH (enzima lactato-desidrogenase específica do parasito) por espectrofotometria. Esse método tem a vantagem sob o método radioisotópico, por ser simples e não usar material radioativo, porém, requer densidade parasitária inicial de 1-2% e, em testes com isolado a fresco, o resultado não foi suficientemente sensível para recomendar sua aplicação em campo (BASCO *et al.*, 1995). Essas desvantagens motivaram o desenvolvimento de um novo ensaio, chamado de DELI-test, também baseado na LDH. No entanto, ao invés de determinar a atividade enzimática, o método quantifica a enzima produzida pelo plasmódio através do método de ELISA (enzyme-linked immunosorbent) de alta sensibilidade, utilizando dois anticorpos monoclonais (captura e revelador) direcionados contra epítomos distintos da LDH (DRUILHE *et al.*, 2001).

Outra técnica *in vitro* de sensibilidade aos antimaláricos para o *P. falciparum* baseia-se na avaliação quantitativa da Proteína II Rica em Histidina (HRP-II) produzida pelo *Plasmodium*, que tem meia vida longa principalmente na fase de trofozoíto. É detectável aproximadamente por duas semanas, muito estável, e tem maior concentração nos eritrócitos do que no plasma (NOEDL *et al.*, 2002). A HRP-II tem sido usada no diagnóstico rápido para malária (BEADLE *et al.*, 1994). A meia-vida longa dessa enzima presente em pacientes com malária *falciparum*, tratados com sucesso limita a utilização do teste imunocromatográfico para o monitoramento da eficácia terapêutica (MAYXAY *et al.*, 2001), por outro lado para análise *in vitro* de suscetibilidade às drogas, a estabilidade desta proteína pode ser a principal vantagem.

A quantidade de HRP-II produzida pelo *P. falciparum* está associada ao desenvolvimento e multiplicação do parasito, e serve como indicador para refletir inibição do crescimento na medida de suscetibilidade à droga (DESAKORN *et al.*, 1997). A técnica que quantifica a produção de HRP-II é baseada na medida do aumento da proteína produzida pelo *P. falciparum* (PfHRPII) no curso de crescimento, desenvolvimento e multiplicação, em 72 horas de cultivo. A concentração de HRP-II produzida pelo parasito é medida pelo método de ELISA. A inibição do crescimento do parasito pela droga antimalárica é quantificada pelo nível de produção da HRP-II. Na luta contra a malária, torna-se cada vez mais importante, iminente e indispensável para a avaliação *in vitro*, o desenvolvimento e aplicação de novos métodos simples e confiáveis para a avaliação de resistência aos fármacos, particularmente sob condições de campo. Os métodos tradicionalmente usados há mais de 20 anos (maturação de esquizontes/OMS e radioisótopos) apresentam limitações econômicas e operacionais para a utilização em campo (NOELD *et al.*, 2004).

Recentemente foi estabelecido um protocolo para estudos de quimioterápicos, em que são utilizadas cepas de *P. falciparum* contendo proteína de fluorescência verde (PfGFP) que pode ser rapidamente e especificamente quantificada por citometria de fluxo (SANCHES *et al.*, 2007). Novos métodos fluorimétricos de marcação do DNA do *P. falciparum*, foram introduzidos pela PicoGreen® (Invitrogen- Molecular Probestm) para avaliar a susceptibilidade de parasitas a agentes antiplasmódicos (QUASHIE *et al.*, 2006).

Devido sua sensibilidade, alta reprodutibilidade e aplicabilidade, o extrato etanólico de *P. fasciculata* (EETF), a fração alcaloídica (EETFA), a fração de neutros (EETFN), Fr1-3, Fr4, Fr5-7 (ésteres do lupeol), Fr11, Fr5-7Hid (lupeol) foram submetidos ao teste HRP-II, disponibilizado no Laboratório de Fitoquímica da Faculdade de Farmácia da UFMG, utilizando-se o clone (W2) de *P. falciparum* resistente a cloroquina e sensível a mefloquina, e como controle positivo, a fosfato de cloroquina. Neste ensaio, avaliou-se a atividade antiplasmódica em duas concentrações de amostras teste (50 e 25 µg/mL), que estão mostrados na Tabela 15 e 16. A atividade antiplasmódica *in vitro* deste extrato, frações e substâncias isoladas está sendo relatada pela primeira vez neste estudo.

Tabela 15: Concentração Inibitória 50% (CI_{50}) e classificação da atividade antiplasmodica do extrato etanólico bruto, extrato em diclorometano de *P. fasciculata* (EDAPF), frações da coluna do EDAPF e cloroquina em testes in vitro em culturas de *Plasmodium falciparum* (W2).

Amostras	CI_{50} <i>P. falciparum</i> W2 ($\mu\text{g/ml}$)	Classificação
<i>Parahancornia fasciculata</i>		
Extrato Etanólico (EPPF)	~ 50	Moderadamente ativo
Fração de Alcalóides (EPPFA)	~ 50	Moderadamente ativo
Fração de Neutros (EPPFN)	~ 50	Moderadamente ativo
EDAPF	> 50	Inativo
Frações da coluna do EDAPF		
Fr 1- 3	> 50	Inativo
Fr 4	> 50	Inativo
Fr 5-7 (ésteres de lupeol)	> 50	Inativo
Fr11	> 50	Inativo
Fr 5-7Hid (lupeol)	> 50	Inativo
Controle Positivo		
Cloroquina (CQ)	0,068 ng/ml	Ativo

Tabela16: Percentuais de inibição do crescimento parasitário em ensaios in vitro em culturas de *plasmodium falciparum* (W2) de EPPF, Fração alcaloídica (EPPFA), Fração de neutros (EPPFN), EDAPF, Fr1-3, Fr4, Fr5-7(ésteres do lupeol), Fr11 e Fr5-7Hid (lupeol) das cascas de *P. fasciculata* e o controle positivo cloroquina (CQ).

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	EPPF	EPPF A	EPPF N	EDAP F	Fr1-3	Fr4	Fr5-7	Fr11	Fr5-7Hid (Lupeol)	CQ ng/mL
Percentual de Inibição (%)										
50	42	46	36	13	6	8	22	16	16	100
25	29	24	16	7	5	5	19	0	13	100

Pelos resultados alcançados no teste de atividade antiplasmodica *in vitro*, o extrato etanólico de *P. fasciculata* (EPPF) inibiu o crescimento parasitário nas concentrações testadas. A Tabela 16 mostra o percentual de inibição do crescimento parasitário. Os valores de CI_{50} obtidos para EPPF foi de aproximadamente de 50 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 15), sendo considerado moderadamente ativo. O resultado obtido com o extrato etanólico (EPPF) sustenta o uso etnobotânico das cascas de *P.*

fasciculata (amapa amargoso) como antimalárico (SHANLEY,2005). Outras espécies da família Apocynaceae já tiveram, também, seu uso tradicional, como antimaláricas, confirmado experimentalmente tais como a *Aspidosperma excelsum* Benth (carapanaúba) (BRANDÃO *et al.*, 1992) e *Geissospermum sericeum* Benth (quina) (BRANDÃO *et al.*, 1991). Em estudo realizado por Dolabela (2007), alguns extratos obtidos de plantas se mostraram inativos, ou apresentaram atividade moderada, como nos extratos etanólicos de *A. cylindrocarpo* (CI₅₀ 44,0 µg/mL - W2; CI₅₀ 39,0 µg/mL – 3d7) e *A. parvifolium* (CI₅₀ 32,75 µg/mL - W2; CI₅₀ 20,51 µg/mL – 3d7) (Apocynaceae) para os clones de *P. falciparum* resistente à cloroquina (W2), e sensível à cloroquina (3d7). Atualmente, a maioria das infecções causadas por *P. falciparum* são do tipo resistente à cloroquina (MARSH, 1998; MITA, 2009; SAMARASEKERA, 2009), e por isso optou-se por avaliar o potencial antiplasmódico apenas em clone resistente à cloroquina.

A fração alcaloídica (EPPFA) e de neutros (EPPFN) obtidas do EEPF, inibiu o crescimento parasitário nas concentrações testadas, sendo o CI₅₀, aproximadamente de 50 µg/mL, e são, portanto, consideradas moderadamente ativas (Tabela 15). Apesar destas frações não conterem alcalóides confirmado por CCD e CLAE-DAD, pôde-se observar em outro estudo um aumento na atividade Antiplasmódica para alcalóides, das frações de neutros APN-1 - CI₅₀ 15,02 µg/mL - W2; CI₅₀ 17,75 µg/mL – 3d7 e APN-2 - CI₅₀ 9,75 µg/mL - W2; CI₅₀ 10,50 µg/mL – 3d7, e das frações alcaloídicas APT-1 -CI₅₀ 0,98 µg/mL - W2; CI₅₀ 7,63 µg/mL – 3d7 e APT-2 - CI₅₀ 1,25 µg/mL - W2; CI₅₀ 2,45 µg/mL – 3d7, por possuírem maior concentração de uleína, alcalóide isolado do extrato etanólico das cascas de *A. parvifolium* com CI₅₀ 0,75 µg/mL - W2; CI₅₀ 11,90 µg/mL – 3d7 (Dolabela, 2007).

O EDAPF e as frações Fr1-3, Fr4, Fr5-7 (ésteres do lupeol) e Fr11, obtidas do extrato em diclorometano *P. fasciculata* (EDAPF), apresentaram respostas semelhantes às frações do EEPF, com valores de CI₅₀ superior a 50 µg/mL, sendo inativo para o crescimento parasitário (Tabela 15), onde foi observada a presença de esquizontes, sugerindo que estas frações não interferiram na esquizogonia. No entanto, observou-se que derivados esterificados de lupeol na posição 3, assim como derivados esterificados do ácido betulínico nas posições 3 e 28, mostraram atividade antimalárica *in vitro* (SÁ *et al.*, 2009; SRINIVASAN *et al.*, 2002). Porém,

esta foi a primeira vez em que se descreveu a atividade antiplasmódica para um ceto derivado nesta posição. Os resultados apontam a necessidade de estudos visando à obtenção de novos derivados triterpênicos com atividade antiplasmódica.

A fração Fr5-7Hid (lupeol) isolada após hidrólise alcalina da fração Fr5-7(ésteres de lupeol) obtida do extrato em diclorometano de *P. fasciculata* (EDAPF), apresentou-se inativo, pois não inibiu o crescimento parasitário em nenhuma das concentrações testadas, sendo o valor de CI_{50} superior a 50 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 15), com isso, observou-se a presença de esquizontes, sugerindo que estas frações não interferiram na esquizogonia. No entanto, o lupeol e três novos derivados de cadeia longa de éster de ácidos graxos, isto é, 3-O-(3'-hydroxyeicosanoyl)lupeol, 3-O-[(2'-(tetracosyloxy)acetil]lupeol e 3-O-[(1''-hydroxyoctadecyloxy)-2'hydroxypropanoyl]lupeol isolados de *H. floribunda* (Apocynacea), apresentaram atividade inibitória *in vitro* contra as cepas resistentes à cloroquina (FCR-3) isolado a partir de Gâmbia e a cepas padrões sensíveis a cloroquina (3D7) com valores de CI_{50} entre 84.0 – 269.0 μM ; FOTIE *et al.*, 2006).

Diferente do presente estudo, o triterpeno pentacíclico lupeol isolado do extrato hexânico das folhas de *Vernonia brasiliiana* (L.) Druce (Compositae) apresentou-se moderadamente ativo frente a cepa W2, inibindo o crescimento do *P. falciparum in vitro* em 45% quando testado a uma concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$ (ALVES *et al.*, 1997).

Foi relatado também que foram obtidos diversos derivados sintéticos do lupeol, incluindo X4Y10 (Figura 29) contendo ácido subérico e porções 4-bromobenzil álcool, o qual se mostrou de sete a nove vezes mais ativo *in vitro* contra o *Plasmodium falciparum* ($CI_{50} = 13,07 \mu\text{g/mL}$) do que a substância de origem (lupeol; $CI_{50} = 117 \mu\text{g/mL}$), indicando a potencialidade de derivados de triterpenos como fonte de novos agentes antimaláricos (KAUR *et al.*, 2009).

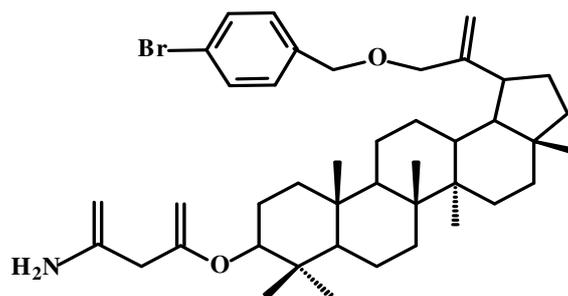


Figura 29: Derivado sintético do lupeol X4Y10.

Diversos triterpenos de diferentes espécies de várias famílias, incluindo o lupeol e seus derivados, demonstraram apresentar pronunciada atividade antiplasmódica contra cepas de plasmódios (SRINIVASAN *et al.*, 2002; BAREN *et al.*, 2006) e por isso vários autores realizaram estudos com atividades *in vitro* e *in vivo*, tanto com extratos vegetais como com substâncias isoladas.

No presente estudo, o triterpeno lupeol (Fr5-7Hid) apresentou-se inativo frente às cepas resistentes a cloroquina (W2) nas concentrações de 25 e 50 µg/mL. No entanto, pôde-se observar segundo relatos na literatura, que os triterpenos em geral são muito ativos nos plasmódios, contra esse e outros tipos de cepas, como relata o estudo realizado com os triterpenos ácidos ursólico, betulínico e oleanólico isolados a partir de um extrato etanólico da casca da raiz de *Uapaca nitida* Müll-Arg. (Euphorbiaceae), que apresentou uma boa atividade antiplasmódica contra cepas resistentes à cloroquina (K1) e sensíveis à cloroquina (T9-96) de *P. falciparum* com valores de Cl_{50} para o ácido betulínico de 19,6 µg/mL e 25,9 µg/mL, para ácido ursólico de 36,5 µg/mL e 28 µg/mL e para o ácido oleanólico de 88,8 µg/mL e 70,6 µg/mL, respectivamente (STEELE *et al.*, 1999).

Já o extrato metanólico de *Satureia parvifolia* levou ao isolamento de eriodictiol, luteolina e os ácidos ursólico e oleanólico como seus componentes ativos contra cepas resistentes à cloroquina (K1) de *P. falciparum*. Os valores de Cl_{50} do ácido ursólico foi de 4,9 µg/mL, da luteolina 6,4 µg/mL, do ácido oleanólico 9,3 µg/mL e do eriodictiol 17,2 µg/mL. Além disso, os quatro compostos foram ativos contra cepas sensíveis à cloroquina (3D7) de *P. falciparum* (BAREN *et al.*, 2006).

O ácido ursólico, triterpeno isolado de três espécies vegetais como a *Jacaranda caroba* D.C. (Bignoniaceae), *Remijia ferruginea* D.C. (Rubiaceae) e

Solanum paniculatum L. (Solanaceae) apresentou atividade antiplasmódica frente à cepa W2 de *P. falciparum* quando comparado ao controle cloroquina (CI₅₀ 0,023µg/mL), e somente um derivado contendo grupo ceto em C-3 foi parcialmente ativo (CI₅₀ 42 µg/mL; VALADARES, 2009).

Visando avaliar a atividade antimalárica dos triterpenos ácido betulínico (AB) e seus derivados, ácido betulônico (ABO), acetato de ácido betulínico (AAB), éster metílico de ácido betulínico (EMAB) e acetato de éster metílico de ácido betulínico (AEMAB), pôde-se observar uma atividade antiplasmódica contra cepas cloroquina resistente (W2) de *P. falciparum*, com valores de CI₅₀ de 9,89, 10,01, 5,99, 51,58 e 45.79 µM, respectivamente (SÁ *et al.*, 2009).

O extrato bruto da raiz de *Colubrina greggii* var. *yucatanensis* levou ao isolamento do ácido betulínico, que apresentou atividade antiplasmódica contra cepas F32 de *P. falciparum* com valor de CI₅₀ 9,7µg/mL, considerado muito ativo (DOMINGUEZ-CARMONA *et al.*, 2011).

No controle positivo, cloroquina, foi observada a inibição do crescimento parasitário em todas as concentrações avaliadas, não interferindo significativamente ($p > 0,05$) no percentual de inibição do crescimento parasitário, ou seja, o valor de CI₅₀ foi de 0,068 µg/mL, sendo ativo para a atividade antiplasmódica *in vitro* (Tabela 15). O percentual de inibição do crescimento parasitário foi de 100% em todas as concentrações (Tabela 16).

5.2.2 ATIVIDADE ANTIMALÁRICA *IN VIVO*

Entre os procedimentos mais utilizados nos ensaios de novos esquizotípicos sanguíneos está o uso de modelos *in vivo* utilizando aves, roedores e símios. Para o modelo galináceo é utilizado o *P. gallinaceum* (BRUMPT, 1935 APUD PAULMAN e MCALLISTER, 2005). Para os modelos murinos são utilizados com frequência o *P. berghei* e/ou *P. yoelli* (LANDAU e GAUTRET, 1998). Já os modelos em símios utilizam principalmente o *P. cynomolgi* e/ou *P. knowlesi*, mas estes animais também podem ser infectados pelos plasmódios humanos, *P. falciparum* e *P. vivax* (GYSIN, 1998). Nestes modelos de primatas não humanos já foi avaliado um grande número

de compostos, como a quinina, cloroquina, pirimetamina, bem como suas respectivas avaliações de toxicidade (GYSIN, 1998). Porém o alto custo e a dificuldade na criação de símios restringe o modelo para ensaios de quimioterapia de rotina. Mesmo que o modelo murino possua algumas limitações, existe uma confirmação de que essa etapa seja fundamental nos estudos que avaliam a atividade de novas moléculas e/ou novas estratégias terapêuticas (LANDAU e GAUTRET, 1998).

Os primeiros ensaios *in vivo* foram realizados em 1947, com o modelo galináceo de malária aviária, único disponível na época para testar atividade de drogas contra espécies de *P. gallinaceum*, em estudos realizados com 600 espécies de plantas de 126 famílias. As famílias que se destacaram neste estudo foram a Simaroubaceae e Amaryllidaceae, devido o número de espécies ativas. No entanto, testes utilizando galinhas e patos não garantiram que drogas ativas contra espécies de *Plasmodium* desses animais fossem ativas contra as espécies de *Plasmodium* infectantes nos humanos. Além disso, as técnicas químicas de avaliação e de fracionamentos de extratos de plantas, não foram satisfatórias para realização dos bioensaios (PHILLIPSON, 2001).

A Infecção por *P. berghei* em roedores murinos na África Ocidental, apresenta sinais e sintomas semelhantes aos da malária humana e de outros primatas, pois a biologia básica do parasito de roedores e humanos é semelhante, com alto teor de bases nitrogenadas adenina e timina ($A+T = 82\%$) no DNA nuclear (MCCUTCHAN *et al.*, 1984), tendo dois elementos de DNA extra nuclear, compatíveis com o *P. falciparum* o DNA mitocondrial e DNA plastídio (YAP *et al.*, 1997). A base molecular de sensibilidade às drogas e a resistência apresentam características compatíveis, e a organização do genoma é conservada entre os parasitos (CARTER & DIGGS, 1977). Tornando os parasitos de roedores um modelo valioso para a investigação da biologia e do desenvolvimento das interações parasita-hospedeiro do parasita da malária, apesar do desenvolvimento de técnicas de cultivo do *P. falciparum in vitro*.

Existem dois testes principais utilizando os plasmódios de roedores na avaliação de compostos com atividade esquizotocida sanguínea: o teste de Rane (OSDENE *et al.*, 1967) e o teste supressivo de quatro dias (PETERS, 1965). O teste

de Rane, não é mais utilizado, e se baseia em um inóculo padrão de *P. berghei* capaz de matar os camundongos num prazo de uma semana. A droga é administrada em dose única e avaliada pela maior sobrevivência dos animais tratados em relação aos controles (KINNAMON e ROTHE, 1975). O teste supressivo, por ser mais sensível, é baseado na redução da parasitemia dos animais tratados, após a administração da droga por quatro dias consecutivos. Entretanto, uma das dificuldades para a triagem de drogas empregando-se a malária murina é que o método de rotina requer a contagem de esfregaços sanguíneos em microscópio óptico, o que é extremamente lento e trabalhoso. Além disso, esse método depende fundamentalmente de uma boa preparação e coloração das lâminas, bem como um microscopista experiente.

Para o ensaio de atividade antimalárica *in vivo* foram utilizados dois tipos de extratos: o extrato etanólico de *P. fasciculata* (EETF) e a fração DCM:HEX (1:1) obtida a partir do extrato etanólico sob refluxo que foram avaliados em diferentes doses (125, 250 e 500 mg/kg de peso) e testados em camundongos fêmeas suíças infectadas com o clone ANKA (sensível a cloroquina) de *P. berghei*. Este experimento foi realizado através do Teste Supressivo, onde os animais foram divididos em grupos tratados (3 dias), grupo controle positivo (cloroquina) e controle negativo (hemácia infectada com *P. berghei*), e estão descritos na Tabela 17.

Tabela 17: Porcentagem de parasitemia e redução da parasitemia (%) de camundongos inoculados com hemácias infectadas pelo *P. berghei* tratados por via oral com diferentes doses de EEPF, EEPF-DCM:HEX (1:1), cloroquina (Controle positivo) e não tratados (Controle negativo).

Grupos	Tipos de extratos e concentração	Parasitemia (%)		Redução da Parasitemia (%) **	
		Média±DP*		5° dia	8° dia
		5° dia	8° dia		
G1	EEPF 500mg/kg	2,3±1,14	11,5±10,18	0	46
G2	EEPF 250mg/kg	2,0±0,65	9,8±2,95	0	53,8
G3	EEPF 125mg/kg	3,8±2,39	12,9±2,78	0	38,9
G4	EEPF-DCM:HEX (1:1) 500mg/kg	2,5±1,26	16,3±5,14	0	33,2
G5	EEPF-DCM-HEX (1:1) 250mg/kg	1,5±1,17	17,4±9,26	0	17,6
G6	EEPF-DCM:HEX (1:1) 125mg/kg	1,4±1,29	16,9±6,90	0	20
G7	Cloroquina (CQ) 30mg/kg	0,02±0,03	0,00±0,00	96	100
G8	Controle Negativo	0,5±0,60	53,0±16,05	-	-

Legenda: *Média da parasitemia dos animais (5 camundongos/grupo). As diferenças entre as médias dos animais não tratados e tratados foram estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

** A redução da parasitemia foi calculada em relação a média da parasitemia do grupo controle não tratado.

DP= Desvio Padrão; EEPF= extrato etanólico de *P. fasciculata*; EEPF-DCM:HEX(1:1)=Extrato etanólico sob-refluxo de *P. fasciculata* Diclorometano:hexano (1:1).

Através dos resultados obtidos no teste antimalárico *in vivo*, o extrato etanólico de *P. fasciculata*, não inibiu o crescimento parasitário nas doses testadas no 5° dia do experimento (Tabela 17; Figura 30), no entanto, no 8° dia promoveu redução da parasitemia nas três doses testadas (125, 250 e 500 mg/kg de peso) com 46, 53,8 e 38,9% respectivamente, considerando-se parcialmente ativo frente ao *P. berghei* (Tabela 17; Figura 30). Neste estudo, investiga-se pela primeira vez o potencial antimalárico *in vivo* desta espécie. O resultado obtido no extrato etanólico (EEPF) é relevante, pois através de dados na medicina popular desta espécie como antimalárico (SHANLEY, 2005), foi observado que diversas espécies da família Apocynacea como a *Aspidosperma excelsum* Benth (carapanaúba; BRANDÃO *et al.*, 1992), *Geissospermum sericeum* Benth (quina; BRANDÃO *et al.*, 1991) e *Aspidosperma marcgravianum* (QUIQNARD, 2003) também são utilizadas para tratar a malária. No entanto, um estudo realizado com extratos aquosos de *Aspidosperma nitidum* Benth e *Geissospermum sericeum* Benth utilizados na medicina popular Brasileira como drogas antimalárica ou antitérmica foram consideradas inativas *in vivo* contra a multiplicação do *P. berghei* em camundongos (CARVALHO e KRETTLI, 1991b).

No caso do extrato etanólico de *P. fasciculata* diclorometano: hexano (1:1) (EEPF – DCM:HEX) sob refluxo, o mesmo foi considerado parcialmente ativo somente na concentração de 500mg/kg com redução da parasitemia de 33,2 % somente no 8° dia (Tabela 17). As demais doses testadas com este extrato não inibiram o crescimento parasitário nem no 5° e 8° dias (Tabela 17; Figura 30), já que o limite mínimo estabelecido para a atividade antimalárica *in vivo* é de 30% (CARVALHO *et al.*, 1991a; ANDRADE-NETO *et al.*, 2003).

Nos animais tratados com o controle positivo cloroquina, foi observada a redução da parasitemia com 96% no 5° dia e 100% no 8° dia na concentração de 30mg/kg de peso, não interferindo significativamente ($p>0,05$) no percentual de inibição do crescimento parasitário, ou seja, a cloroquina foi considerada ativa para a atividade antimalárica *in vivo* (Tabela 17; Figura 30). A inibição do percentual parasitário foi de 100% em todas as concentrações (Tabela 18; Figura 30).

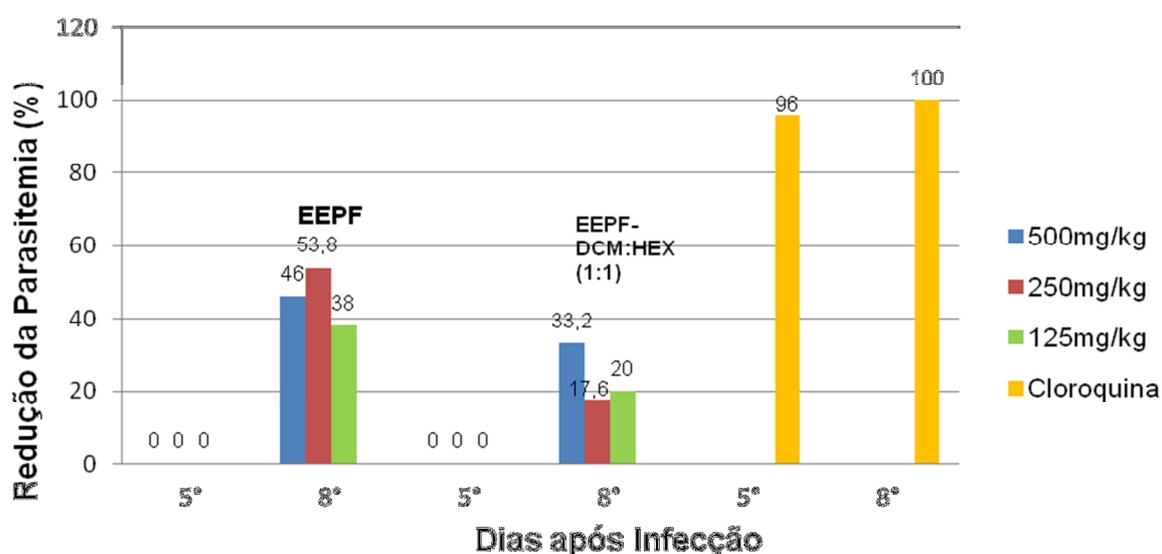


Figura 30: Atividade Antimalárica *in vivo* de EEPF e EEPF-DCM:HEX (1:1), testados nas concentrações de 500, 250 e 125mg/kg de peso e cloroquina 30mg/kg, medida pela redução da parasitemia (%) em relação ao grupo controle não tratado ($p<0,05$).

5.3. Avaliação da Toxicidade Oral Aguda do EEPF

Durante o ensaio de toxicidade oral aguda foi realizada uma triagem farmacológica e comportamental nos camundongos (ensaio ou *screening* hipocrático) de acordo com a avaliação proposta por Malone e Robichaud (1983) modificada por Brito (1994), conforme o anexo 2 o qual forneceu uma estimativa geral da natureza farmacológica e toxicológica do extrato etanólico de *P. fasciculata* (EEPf).

Neste estudo o experimento foi realizado através do método de Dose Fixa (5000mg/kg) como maior dose, que estabelece a administração oral de uma dose da substância-teste em camundongos Swiss do sexo feminino e observações nas primeiras horas após a administração e uma vez por dia, sempre no mesmo horário até completar 14 dias de observação (BRITO, 1994; OECD 420, 2001).

Verificou-se que o ensaio de Dose Fixa, apesar de usar muito menos animais do que o DL50 produzia resultados compatíveis entre os diferentes laboratórios e provia informações adequadas sobre a toxicidade das substâncias, permitindo produzir categorias de toxicidade compatíveis com os fornecidos pelo método DL50. O teste tornou-se um *Guideline* em 1992. As propriedades estatísticas do ensaio de Dose Fixa foram avaliadas usando modelos matemáticos em vários estudos (STALLARD *et al.*, 2002).

Durante as 4 primeiras horas do experimento os camundongos fêmeas tratados com uma dose fixa de 5000mg/kg de EEPf, não apresentaram nenhum dos sinais de toxicidade evidente, exceto pela alteração na cor das fezes, que estavam mais escuras na 2ª hora e nas primeiras 24 horas e por apresentar menos força ao agarrar, que ocorreu nos primeiros 60 minutos até o 3º dia. A partir do 4º dia e até o final do experimento nos 14 dias, não foi observada nenhuma morte, já que o experimento ocorreu aos 15, 30, 60, 120, 180 e 240 minutos no primeiro dia após o tratamento e uma vez por dia nos 13 dias seguintes, portanto, o extrato pode ser considerado de baixa toxicidade quando comparado com estudos realizados por Vasconcelos (2002). Segundo a OECD 420, o EEPf recebeu a classificação de toxicidade V ($2000\text{mg/kg} < \text{DL50} < 5000\text{mg/kg}$).

A administração do EEPf na dose de 5000 mg/Kg não alterou de maneira significativa a evolução ponderal dos animais em relação ao grupo controle (Tabela 18).

O consumo médio de ração dos animais não foi alterado de forma significativa com a administração do EEPF (Tabela 19). Mas o consumo de água foi alterado significativamente entre o extrato e o controle ($p < 0,05$) com a administração do extrato etanólico de *P. fasciculata* (Tabela 19), sugerindo, possivelmente, que os tremores e a força ao agarrar tenha causado esta diferença.

Tabela 18: Variação da evolução ponderal de camundongos fêmeas tratadas com dose única do EEPF (5000 mg/Kg) e observados durante 14 dias.

Tratamento	Variação de peso (g)*
EEPF (5000 mg/Kg)	5,12±2,40 ^{NS}
Controle	4,40±1,53 ^{NS}

* Os valores estão expressos em média ± desvio padrão (n=6).
^{NS}Não significativo ($p > 0,05$). Teste “t” de Student.

Tabela 19: Consumo de ração pelos camundongos e água pelos camundongos fêmeas tratados com dose única do EEPF(5000 mg/Kg) e observados durante 14 dias.

Tratamento	Consumo médio de ração (g/dia)*	Consumo médio de água (mL/dia)*
EEPF (5000 mg/Kg)	38,06±5,63	86,78±13,31 ^{NS}
Controle	31,83±4,41	69,92±8,69 ^{NS}

* Os valores estão expressos em média ± desvio padrão (n=6).
^{NS}Não significativo ($p > 0,05$). Teste “t” de Student.

O estudo anátomo-histopatológico, realizado ao final do tratamento agudo, constitui uma ótima ferramenta para avaliação de dano a um determinado órgão, tanto ao nível macroscópico quanto microscópico. Inclui-se nesta análise a avaliação de processos agudos, tais como a inflamação aguda na quais células são lesadas ou mortas e as estruturas vizinhas permanecem íntegras e os principais elementos clínicos são febre, a tumefação e a dor (CULLING *et al.*, 1985).

No teste de toxicidade oral aguda, o estudo anátomo-histopatológico foi realizado com camundongos fêmeas, submetidas à dose fixa oral de 5000mg/kg do extrato etanólico de *P. fasciculata* comparados com o controle. Este estudo foi

analisado pelo professor Dr. Whashington Luiz Assunção Pereira do Instituto de Saúde Animal e Produção Animal (ISPA) da UFRA.

Do ponto de vista macroscópico, os órgãos analisados (cérebro, coração, fígado, pulmões, baço, pâncreas e rins) não apresentaram quaisquer alterações anatômicas ou particularidades histológicas.

Assim, os pulmões revelaram arquiteturas lobulares parenquimatosas preservadas, tendo os alvéolos paredes finas com revestimento epitelial habitual por pneumócitos. Nenhum sinal da presença de células envolvidas em processos inflamatórios e líquido no interior dos alvéolos. Cérebro e cerebelo com estruturas celulares normais. Região do cárdia (estômago), com epitélio estratificado e porção glandular sem alterações na estrutura tecidual interior. Um dos segmentos do intestino delgado (íleo) estava estruturalmente normal.

Rins apresentando superfície externa envolvida por cápsula opalescente, que se destaca com facilidade do parênquima. Às secções seriadas, observa-se superfície compacta, pardacenta, com limites córtico-medulares nítidos e perfeita visualização pirâmides e cálices renais. Cotos ureterais representando remanescentes de amputação proximal. O estudo histológico mostrou arquitetura lobular e “população” glomerular preservadas. Nos glomérulos, tufo capilares e mesângio delicados estavam separados da cápsula de Bowman por espaço de retração artefactual. Não foram observadas lesões fibróticas, hemorrágicas ou áreas de enfarte.

O coração apresentava-se recoberto por epicárdio fino, transparente e delicadamente vascularizado, vasos da base proporcionais às dimensões do órgão e cavidades átrio-ventriculares revestidas por endocárdio liso e brilhante sendo ora vazias, ora ocupadas por coágulos sangüíneos (alteração natural *post-mortem*). As válvulas átrio-ventriculares e semilunares pulmonar e aórtica tinham bordas livres. Ao exame microscópico, o tecido cardíaco mostrou-se também dentro dos limites da normalidade histológica.

Não houve sinais de inflamação, agregados linfocitários, necrose ou alterações circulatórias no fígado, mas foi observado discreta esteatose microvesicular em todos os grupos, com pequenos vacúolos limitados às zonas lobulares hepáticas,

provavelmente induzidas pelo tipo de alimentação ou por estresse decorrente da manipulação ou condições de acomodação.

Estes achados estão sendo descritos pela primeira vez, uma vez que, ainda não foi descrito na literatura nenhum estudo de Toxicidade oral aguda com o gênero *Parahancornia* e, principalmente, com a espécie *P. fasciculata*.

No entanto, diversas espécies de plantas da família Apocynaceae, já foram estudadas para se avaliar a toxicidade oral aguda, como a *Aspidosperma subincanum* Mart., na qual, se utilizou grupos de animais que foram tratados com doses únicas do extrato etanólico desta espécie (500, 1000, 2000, 3000 e 5.000mg/kg) e que foram observados por 24 horas. Após esse período, não foi detectado qualquer sinal de toxicidade ou morte, e sugeriu-se que esta espécie é praticamente atóxica em exposição aguda a altas doses (ALVES, 2007).

Foi realizado um estudo de toxicidade aguda, onde grupos de camundongos fêmeas suíças foram tratadas com uma dose fixa de 5.000mg/kg com o extrato etanólico das cascas de *Himatanthus articulatus* (Apocynaceae) e foram observados por um período de 14 dias. Os resultados demonstraram que durante o período de tratamento não foi observado nenhum sinal evidente de toxicidade nos animais, o que foi corroborado pela ausência das alterações anátomo-histopatológica (VILHENA, 2011).

Outro estudo realizado com o extrato hidroetanólico obtido das cascas de *Aspidosperma excelsum* Benth (Apocynaceae) apresentou-se promissor, pois não apresentou mortes ou aparecimento de sinais e sintomas de toxicidade na dose de 5.000mg/kg, assim como não apresentou nenhuma alteração em sua análise anátomo-histopatológica (GOMES, 2011).

Em resumo, os resultados observados no exame anátomo-histopatológico não revelaram quaisquer sinais de toxicidade evidente com esta dose de EEPF empregada (5.000mg/kg).

Baseado no que foi exposto neste trabalho, deve-se levar em consideração a extrema importância da pesquisa de plantas tradicionalmente usadas no tratamento da malária, seja na busca de substâncias ativas, potenciais novos fármacos, ou objetivando a validação do seu uso medicinal e/ou o desenvolvimento de

fitoterápicos eficazes e seguros. Por isso, o uso de *P. fasciculata* poderá se tornar uma alternativa promissora para a terapêutica da malária, principalmente através de estudos *in vitro* e *in vivo* e de toxicidade que poderão ser realizados para que, futuramente, possam ser desenvolvidos fármacos e/ou fitoterápicos eficazes.

6. CONCLUSÕES

- A prospecção fitoquímica por CCD do EEPF identificou a presença de triterpenos e esteróides, heterosídeos flavônicos, saponinas, polifenóis, taninos, heterosídeos antracênicos e heterosídeos cardiotônicos. Não foram detectados alcaloides.
- Alcalóides também não foram detectados por CCD, no extrato em diclorometano obtido a partir do pó das cascas de *P. fasciculata* alcalinizado com hidróxido de amônio (EDAPF) confirmando-se a ausência de alcalóides em quantidades detectáveis por CCD.
- O EDAPF foi fracionado por cromatografia em coluna de sílica gel, obtendo-se a fração Fr 5-7 rica em triterpenos, que foi hidrolisada, fornecendo o produto Fr5-7Hid que foi identificado por análises espectrométricas como lupeol.
- Proantocianidinas foram quantificadas no EEPF insolúvel em AcOEt sendo determinados os seguintes teores : $10,46 \pm 0,3419$ % (amostra pura), $9,94 \pm 0,1598$ % (amostra diluída 1:10) e $10,55 \pm 0,9299$ % (amostra diluída 1:100).
- O EEPF apresentou atividade moderada nos ensaios *in vitro* contra cepas W2 de *P. falciparum*. As outras amostras foram consideradas inativas.
- O EEPF apresentou atividade moderada nos ensaios *in vivo* contra cepas ANKA de *P. berghei* em todas as concentrações testadas. O EEPF-DCM:HEX (1:1) na dose de 500mg/Kg foi moderadamente ativo e nas demais dose foi inativo.
- O EEPF (5000mg/kg) não apresentou nenhum sinal evidente de toxicidade em camundongos fêmeas, o que foi corroborado pela ausência de alterações anátomo-histopatológicas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AJAIYEGBA, E. O.; ASHIDI, J. S.; OKPAKO, L. C.; HOUGHTON, P. J.; WRIGHT, C. W. Antiplasmodial compounds from *Cassia siamea* stem bark extract. *Phytotherapy Research*. 22(2):254-255.Feb, 2008.
- ALLEN, J. R. F.; HOLMSTEDT, B. R. The simple β -carboline alkaloids. *Phytochemistry*, v.19, n.8, p.1573-82, 1980.
- ALVES, T. M. A.; NAGEN, T. J.; CARVALHO, L. H.;KRETTLI, A. U.; ZANI, C. L. Antiplasmodial triterpene from *Vernonia brasiliensis*. *Planta Médica*, 63, 554-555, 1997.
- ALVES, C. C. F. **Metabólitos Especiais Isolados de *Luxemburgia octandra* (Ochnaceae) *Laseguea erecta* (Apocynaceae), do Látex de *Parahancornia amapá* (Aqocynaceae) e de *Solanum crinitum* (Solanaceae)**. Tese de Doutorado. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Departamento de Ciências Exatas, PPGQO, Seropédica-RJ, Brasil, 2003.
- ALVES, N.M. **Estudo farmacognóstico e da toxicidade experimental (Aguda e SubAguda) do Guatambú (*Aspidosperma subincanum* Mart.)**. Dissertação de Mestrado em Ciências da Saúde - Universidade de Brasília, Brasília, 2007. p. 43.
- AMOROZO, M. C. M.; GÉLY, A. **Uso de plantas medicinais por caboclos do baixo Amazonas, Barcarena, PA, Brasil**. Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi, série botânica, v.4, n.1, p.47-131, 1988.
- ANDRADE-NETO, V. F.; BRANDÃO, M. G. L.; STEHMANN, J. R.; OLIVEIRA, L. A.; KRETTLI, A. U. Antimalarial activity of Cinchona-like plants used to treat fever and malaria in Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, 87, 253-256.2003.
- ANDRADE-NETO, V. F., BRANDAO, M. G. L., OLIVEIRA, F. Q., CASALI, V. W. D., NJAINE, B., ZALIS, M. G., OLIVEIRA, L. A. and KRETTLI, A. U. Antimalarial activity of *Bidens pilosa* L. (Asteraceae) ethanol extracts from wild plants collected in various localities or plants cultivated in humus soil. *Phytotherapy Research*, 18, 634-639, 2004.
- ARGYROPOULOS, D. S. **Advances in lignocellulosics characterization**. Atlanta: TAPPI Press, p. 157-180.1999.
- ASSEMI, M. Herbs Affecting the Central Nervous System: Ginkgo, Kava, St. John's Wort, and Valerian. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, v.44, n.4, p.824-835, 2001.
- BACHA, W.J.; WOOD, L.M. **Color atlas of veterinary histology**.Ed. Lea & Febiger.269p. 1990.
- BAREN, V. C.; ANAO, I.; DI LIRA, L. P.; DEBENEDETTI, S.; HOUGHTON, P.; CROFT, S.; MARTINO, V. Triterpenic acids and flavonoids from *Satureja parvifolia*.

Evaluation of their antiprrozoal activity. *Zeitschrift für Naturforschung*, v. 61, n. 3-4, p. 189-192, 2006.

BARROSO, M. B.; MORIN, N. P.; PEIXOTO, A. L. & ICHASO, C. L. F. **Frutos e sementes: morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas**. Viçosa, Editora da Universidade Federal de Viçosa (UFV).1999.

BASCO, L. K.; MARQUET, F.; MAKLER, M. M; LE BRAS, J. *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*: lactate dehydrogenase activity and its application for in vitro drug susceptibility assay. *Experimental Parasitology*. 80: 260-71, 1995.

BASCO, L. K. Molecular Epidemiology of Malaria in Cameroon. XVII. Baseline monitoring of Atovaquone-resistant *Plasmodium falciparum* by in vitro drug assays and cytochrome *b* gene sequence analysis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 69(2), p. 179–183.2003

BEADLE, C.; LONG, G. W.; WEISS, W. R.; MCELROY, P. D.; MARET, S. M.; OLOO, A. J.; HOFFMAN, S. I. Diagnosis of malaria by detection of *Plasmodium falciparum* HRP-2 antigen with a rapid dipstick antigen-capture assay. *Lancet*. 343(8897): 564-68, 1994.

BIEL, J. H.; DRUKKER, A. E.; MITCHELL, T. F. Central stimulants chemistry and structure-activity relationship of alkyl hydrazines. *Journal American Chemical Society*, v.81, n.11, p.2805-13, 1959.

BIOT, C.; CHIBALE, K. Novel approaches to antimalarial drug discovery. **Infectious Disorders-Drug Targets**, v. 6, p. 173-204, 2006.

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

BOMSER, J. In virus anticancer activity of fruit extracts from *Vaccinium* species. *Planta Medica*, 62: 212-216, 1993.

BRAGA, F.; AYRES-SARAIVA, D.; GATTASS, C.R.; CAPELLA, M. A. M. Oleanolic acid inhibits the activity of the multidrug resistance protein ABCC1 (MRP1) but not of the ABCB1 (P-glycoprotein): Possible use in cancer chemotherapy. *Cancer Letters*, 248(1): 147-152.2007.

BRANDÃO, M. G. L.; CARVALHO, L. H.; KRETTLI, A. U. Antimaláricos de uso Popular na Amazônia. *Ciência Hoje*, v. 13, p. 31-42. 1991.

BRANDÃO, M.; GRANDI, T.; ROCHA, E.; SAWYER, D.; KRETTLI, A. Survey of medicinal plants used as antimalarials in the Amazon. *Journal of Ethnopharmacology*, v.36, p.175–182, 1992.

BRANDÃO, G. C. **Fitoquímica, triagem antiviral e fracionamento biomonitorado de espécies vegetais da biodiversidade brasileira**. 326p. 2010.Tese de

Doutorado. Faculdade de Farmácia, Programa de Pós Graduação em Ciências farmacêuticas, UFMG. 2010.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Ações de controle da malária: manual para profissionais de saúde básica**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 52p, 2006.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia Prático de Tratamento da Malária no Brasil**. Brasília: Ministério da Saúde, 1 ed. rev.; 36p, 2010.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Malária: Aspectos Epidemiológicos**. Nota técnica n° 26: Situação da Malária na Amazônia com ênfase no Município dos Estados do Pará. 2011. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/26_situacao_malaria_amazonia_enfase_municipios.pdf. Acesso em: 11/08/2011.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Ações do SUS ajudam a reduzir casos de malária**. 2012. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/noticia/3945/162/acoes-do-sus-ajudam-a-reduzir-casos-de-malaria.html>. Acesso em: 09/03/2012.

BRITO, A.S. **Manual de Ensaio Toxicológicos *in vivo***. Campinas, SP: Editora da UNICAMP, 1994.

BRUMPT,É. Paludisme aviaire: *Plasmodium gallinaceum* n. sp. de la poule domestique. *C R Hebd Seances Acad Sci* 200:783–785. 1935.

BRUNETON, J.; **Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia**, Ed. Acribia, SA: Espanha, 1991.

BURKIL, H. M. **The useful plants of west Tropical Africa**. Vol.1 Families A-D. Royal Botanic Gardens, Kew, pp. 174-649. 1985.

BURNS, D.; REYNOLDS, W. F.; BUCHANAN, G.; REESE, P. B.; ENRIQUEZ, R. G. Assignment of ^1H and ^{13}C spectra and investigation of hindered side-chain rotation in lupeol derivatives. *Magnetic Resonance in Chemistry*. 38: 488-493. 2000.

CDC, CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Disponível em: <http://www.cdc.gov/malaria/about/biology/index.html>. Acesso em: 20/03/2012.

CARVALHO, L. H. **Quimioterapia experimental com extratos brutos de plantas e compostos quimicamente definidos**. Dissertação de mestrado. Depto de Parasitologia, ICB, UFMG. 146p, 1990.

CARVALHO, L. H.; BRANDÃO, M. G. L.; SANTOS Fo, D.; LOPES, J. L. C.; KRETTLI, A.U. Antimalarial activity of crude extracts from Brazilian plants studied *in vivo* in *P. berghei*- infected mice and *in vitro* against *P. falciparum* in culture. *Brazilian Journal Medical and Biological Research*, v. 24, p.1113-1123, 1991a.

CARVALHO, L. H.; KRETTLI, A. U. Antimalarial chemotherapy with natural products and chemically defined molecules. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, vol. 86. Suppl. II, 181-184, 1991b.

CARVALHO, M. G.; CRANCHI, D. C.; KINGSTON, D. G. I.; WERLE, A. A. Proposed active constituents of *Dipladenia martiana*. **Phytother. Res.**, 15, 715; 2001a.

CARVALHO, M. G.; VELLOSO, C. R. X.; BRAZ-FILHO, R. COSTA, W. F. Acyl-lupeol esters from *Parahancornia amapá* (Apocynaceae). **J Braz Chem Soc** 12: p. 556-559. 2001b.

CARVALHO, M. G.; ALVES, C. C. F.; WERLE, A. A.; BRAZ-FILHO, R. Metabólitos especiais isolados de *Laseguea erecta* (Apocynaceae). Revista Brasileira de Farmacognosia, **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, 16(4): 497-500, Out./Dez. 2006.

CARVALHO, M. G.; CARDOZO, M. A. R.; SILVA, V. C.; WERLE, A. A. Triterpenos e flavonóides isolados de flores de *Laseguea erecta* (Apocynaceae). Rev. Colomb. Cienc. **Quím. Farm.** Vol. 36 (2), 127-133, 2007.

CARVALHO, M. G.; ALBUQUERQUE, L. A.; ALVES, C. C. F.; CASCON, V. Cornoside and other constituents from the latex of *Parahancornia amapa* (Hub.) Ducke (Apocynaceae) a medicinal plant in Northern Brazil. Revista Brasileira de Farmacognosia. **Brazilian Journal of Pharmacognosy** 18 (Supl.): 667-669, Dez. 2008.

CARTER, R.; DIGGS, C. L. **Plasmodia of rodents. In: Parasitic Protozoa.** vol. 3. p. 359-465. 1977.

CARTER, R.; VOLLER, A. The distribution of enzyme variation in populations of *Plasmodium falciparum* in Africa. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 69, n.4, p. 371-376, 1975.

CAVALCANTE, P. B. **Frutas comestíveis da Amazônia III.** Publicações Avulsas do Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém, n, 33, p. 1-62, 1979. II.

CHATUVERDI, P. K.; BHUI, K.; SHUKLA, Y. Lupeol: Connotations for chemoprevention. **Cancer Letters**, v. 263 (1), p. 15-22, 2008.

CHENG, J. T. et al. Antihypertensive principles from the leaves of *Melastoma candidum*. **Planta Medica**. 59: 405-407, 1993.

CORNELIUS, M. T. F. **Constituintes Químicos Isolados das espécies Vegetais: *Plumeria lancifolia* Mull. Arg. (Apocynaceae) e *Solanum Crinitum* Lam. (Solanaceae) e Identificação da Acetanilida Exsudada por *Xenohyla truncata* (IZECKSOHN, 1998).** 2006. 285 f. Tese de Doutorado (Doutorado em Ciências), Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Rio de Janeiro. 2006.

CRAWLEY, J. Malaria: new challenges, new treatments. **Curr. Paediatrics**, Amsterdam, n.9, p.34-41, 1999.

CULLING, C.F.A.; ALLISON, R.T.; BAAR, W.T. **Cellular pathology techniques**. 4 ed. London: Butterworths, 1985.

DELGADO-MENDEZ, P.; HERRERA, N.; CHAVEZ, H.; ESTEVEZ-BRAUN, A.; RAVELO, A. G.; CORTES, F.; CASTANYS, S.; GAMARRO, F. New terpenoids from *Maytenus apurimacensis* as MDR reversal agents in the parasite *Leishmania*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, 16(3): 1425-1430.2008.

DESJARDINS, R. E.; CANFIELD, C. J.; HAYNES, J. D.; CHULAY, J. D. Quantitative assessment of antimalarial activity *in vitro* by a semi automated microdilution technique. **Antimicrob Agents Chemother** 16: 710-718. 1979.

DESAKORN, V.; SILAMUT, K.; ANGUS, B.; SAHASSANANDA, D.; CHOTIVANICH, K.; SUNTHARASAMAI, P.; SIMPSON, J.; WHITE, N. J. Semi-quantitative measurement of *Plasmodium falciparum* antigen PfHRP2 in blood and plasma. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. 91: 479-83, 1997.

DI STASI, L. C. **Plantas Medicinais: arte e ciência. Um guia de estudo Interdisciplinar**. Editora Unesp; Cap. 9, p.109-127; São Paulo, 1996.

DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas Medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. Editora Unesp; Cap. 24, p.375-385; São Paulo, 2002.

DOLABELA, M.F. **Atividade antiplasmódica e citotoxicidade de *Esenbeckia febrífuga* (A.St-Hil.) Juss. ex Mart. (Rutaceae) e espécies do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae)**. 2007. 181 f. Tese de doutorado (doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

DOMÍNGUEZ-CARMONA, D. B.; ESCALANTE-EROSA, A. F.; GARCÍA-SOSA, A. K.; RUIZ-PINELL, A. G.; GUTIERREZ-YAPU, B. D.; CHAN-BACAB, B. M. J.; MOO PUC, C. R. E.; VEITCH, D. N. C.; GIMÉNEZ-TURBAB, E. A.; PEÑA-RODRÍGUEZ, L. M. Metabolites from Roots of *Colubrina greggii* var. *yucatanensis* and Evaluation of their Antiprotozoan, Cytotoxic and Antiproliferative Activities. **J. Braz. Chem. Soc.**, Vol. 22, No. 7, 1279-1285, 2011.

DRUILHE, P.; MORENO, A.; BLANC, C.; BRASSEUR, P. H.; JACQUIER, P. A colorimetric *in vitro* sensitivity assay for *Plasmodium falciparum* based on a highly sensitive double-sitelactate dehydrogenase antigen-capture enzyme-linked immunosorbent assay. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 64 (5,6): 233-41, 2001.

DUTTA, A. T.; GHOSH, B. K.; GUPTA, J. C. The seasonal variation of alkaloids in different parts of *Holarrhena antidysenterica* Wall. and the alkaloid content in the bark at different ages. Part 1. **The Indian Journal of Medical Research**. 195, oct; 38 (4): 467-72. 1950.

EGAN, T. J.; HEMPELMANN, E.; MAVUSO, W. W. Characterisation of synthetic betahaematin and effects of the antimalarial drugs quinidine, halofantrine, desbutylhalofantrine and mefloquine on its formation. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v.73(1-2), p.101-7, 1999.

ENCARNACION, F. C. **Nomenclatura de las especies forestales comunes en el Peru**. Lima: F. A. O. 149p. (PNUD/FAO/PER. Fortalecimiento de los programas de desarrollo forestal en selva central. 81/002. Documento de Trabajo, 7).1983.

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

ENDRIGER, D. C. **Química e Atividades Biológicas de *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae): inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA) e efeito na quimioprevenção de câncer**.2007. 260 f. Tese de Doutorado (Doutorado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Faculdade de Farmácia, Departamento de Produtos Farmacêuticos, Belo Horizonte - MG, 2007.

EVANS, W. C. **Trease and Evans: Pharmacognosy**, Editora W. B., Edinburgh, 15 ed. Saunders,p. 32, 2002.

FERREIRA, E. I. Trends in the research for new antimalarial agents. *Rev. Farm. Bioquím.* Univ. S. Paulo, São Paulo, vol. 29, n. 1 (jan/jun), p. 1-15, 1993.

FERREIRA, I. D.; LOPES, D.; MARTINELLI, A.; FERREIRA, C.; ROSARIO, V. E.; CRAVO, P. *In vitro* assessment of artesunate, artemether and amodiaquine susceptibility and molecular analysis of putative resistance-associated mutations of *Plasmodium falciparum* from Sao Tome and Principe. *Tropical Medicine and International Health*, v.12(3), p.353-362, 2007.

FIDOCK, D. A.; ROSENTHAL, P. J.; CROFT, S. L.; BRUN, S.; NWAKA, S. Antimalarial drug discovery: efficacy models for compound screening. *Nature Reviews. Drug Discovery*, v.3(6): p.509-20, 2004.

FOLEY, M.; TILLEY, L. Quinoline antimalarials: mechanisms of action and resistance and prospects for new agents. *Pharmacology and Therapeutics*, v. 9, p. 55-87, 1998.

FONSECA, E. T. Plantas medicinales brasileñas. *Revista da Flora Medicinal*, Rio de Janeiro, ano 5, n.11, p.634, ago. 1939.

FOTIE, J.; BOHLE, D. S.; LEIMANIS, M. L.; GEORGES, E.; RUKUNGA, G.; NKENGFAK, A. E. Lupeol long-chain fatty acid esters with antimalarial activity from *Holarrhena floribunda*. *Journal of Natural Products*, v.69, p. 62-67. 2006.

FRANÇA, T. C. C.; SANTOS, G; FIGUEROA-VILAR, J. D. Malária: aspectos históricos e quimioterapia. *Quím. Nova*, São Paulo, v. 31, n. 5, 2008.

FREITAS, J. C.; FERNANDES, M. E. B. **Uso de plantas medicinais pela comunidade de Enfarrusca, Bragança, Pará.** Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi, Ciências Naturais, Belém, v. 1, n. 3, p. 11-26, set-dez. 2006.

FREITAS, L. L. **Eficácia da associação de arteméter e lumefantrina no tratamento da malária por *Plasmodium falciparum* resistente à cloroquina em Timor Leste.** Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina. Faculdade de Medicina na Universidade do Porto. Departamento de farmacologia. 41p. 2010.

GALLO, M. B. C.; SARACHINE, M. J. Biological Activities of Lupeol. ***International Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences* 3** (Special Issue I), 46-66. 2009.

GIAO, P. T.; DE VRIES, P. J. Pharmacokinetic interactions of antimalarial agents. ***Clin Pharmacokinet.*** 40(5):343–373. 2001.

GOMES, R.P. **Fruticultura brasileira.** São Paulo: Nobel, 1977. 448p.

GOMES, L.F.S. “**Abordagem fitoquímica, determinação da atividade antiplasmódica *in vitro* e avaliação preliminar da toxicidade do extrato hidroetanólico das cascas de *Aspidosperma excelsum* Benth (Apocynaceae)**”. 2011. 98 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, 2011.

GYSIN, J. ***Animal Models: Primates.*** In: **Malaria: Parasite biology, Pathogenesis, and Protection.** Washington, DC: ASM PRESS. Cap.29, 419-441. 1998.

HAGERMAN, A. E.; ZHAO, Y.; JOHNSON, S. E.; SHAHADI, F. Methods for determination of condensed and hydrolyzable tannins. ***Acs. Sym. Ser.***, v. 662, p. 209-222, 1997.

HATA, K.; HORI, K.; MURATA, J.; TAKAHASHI, S. Remodeling of actin cytoskeleton in lupeol-induced B16 2F2 cell differentiation. ***Journal Biochemistry,*** 138, 467-472. 2005.

HEIL, M.; BAUMANN, B.; ANDARY, C.; LINSÉNMAIR, K. E.; & MCKEY, D. Extraction and quantification of "condensed tannins" as a measure of plant anti-herbivore defence? Revisiting an old problem. ***Naturwissenschaften,*** 89(11), 519-524. 2002.

HELDT, H. W. **Plant biochemistry and molecular biology.** Oxford: University Press, 1997.

HELMBY, H.; SOUZA, B. Experimental malarial: using bloodstage infections of rodent malaria. In: MOLL, K.; LJUNGSTRÖM, I.; PERLMANN, H.; SCHERF, A.; WAHLGREN, M. **Methods in Malaria Research.** Manassas, Virginia and Paris, France. 5 ed. p. 147-148. 2008.

HENRIQUE, M. C.; NUNOMURA, S. M.; POHLIT, A. M. Alcaloides Indólicos de cascas de *Aspidosperma vargasii* E *A. desmanthum*. ***Revista Química Nova,*** São Paulo, v.33, nº. 2, 2010.

HIERMAN, A.; KARTNIG, T. H.; AZZAM, S. Ein Beitrag Zur Quantitativen Bestimmung der Procyanidine in Crataegus. **Sci. Pharm.**, wien, v. 54, p. 331-337, 1986.

HOPIKNS, M. J. G.; RIBEIRO, J.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C. A.; COSTA, M. A. S.; BRITO, J. M.; SOUZA, M. A. D.; MARTINS, L. H. P.; LOHMANN, L. G.; ASSUNÇÃO, P. A. C.; PEREIRA, E. C.; SILVA, C. F.; MESQUITA, M. R.; PROCÓPIO, L. C. **Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central**. INPA. pg. 560-81.1999.

JÁCOME, R. L. R. P.; OLIVEIRA, A. B. Estudo Químico e Perfil Cromatográfico das cascas de *Aspidosperma parvifolium* a. Dc. ("Pau-Pereira"). **Quim. Nova**, vol. 27, No. 6, 897-900, 2004.

JÁCOME, R. L. R. P. **Estudo fitoquímico de *Zeyheria Montana* M. e *Aspidosperma parvifolium* A. DC. Quantificação por CLAE, de naftoquinonas isoladas de *Z. Montana***. Tese de Doutorado em Química. Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte (MG). 157p. 1998.

JANOVIK, V.; BOLIGON, A. A.; FELTRIN, A. C.; PEREIRA, D. F.; FROHLICH, J. K.; ATHAYDE, M. L. Doseamento de polifenóis, flavonóides e taninos no extrato bruto e frações de *Cariniana domestica* (Mart.) Miers. **Saúde**, Santa Maria, vol. 35, n. 2:25-28. 2009.

JUDD, W. S.; CHRISTOPHER, S. C.; KELLOGG, E. A. & STEVENS, P. F. **Plant Systematics: A Phylogenetic Approach**. Sinauer Associates, Sunderland (USA). 1999.

JUDD, W. S. **Sistemática vegetal: um enfoque filogenético**. 3. ed. Porto Alegre, RS: Artmed. 2009.

KINNAMON, K. E.; ROTHE, W. E. Biological screening in the U.S. Army antimalarial drug development program. **Am J Trop Med Hyg** 24(2): 174-178. 1975.

KAUR, K.; JAIN, M.; KAUR, T.; JAIN, R. Antimalarials from nature. Review. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 9, p. 3229-3256, 2009.

KLAYMAN, D. L. Qinghaosu (Artemisinin): An Antimalarial Drug from China. **Science** 228, 1049–1054. 1985.

KNELL, A. J. **Malaria: a publication of the Tropical Programme of the Wellcome Trust**. Oxford, Oxford University Press, 89p. 1991.

KYLE, D. E.; WEBSTER, H. K.; MILHOUS, W. K. **In vitro antimalarial drug susceptibility testing: Methods and correlation with in vivo efficacy**. MIM/TDR Antimalarial Drug resistance Network. Multilateral Initiative on Malaria (MIM)/UNDP/World Bank/WHO Special Program for Research e Training in Tropical Diseases (TDR). 2002.

LAMBROS, C.; VANDERGERG, J. P. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. **J. Parasitol** 65, 418–420, 1979.

LANDAU, I.; GAUTRET, P. **Animal Models: Rodents. In: Malaria: Parasite biology, Pathogenesis, and Protection.** Washington, DC: ASM PRESS. Cap.7, 93-120.1998.

LINDOSO, J. A. L; LINDOSO, A. A. B. P. Neglected tropical diseases in Brazil. **Rev. Inst. Med. trop.** S. Paulo, 51(5): 247-253, 2009.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil.** Nova Odessa, SP: Editora Plantarum. Vol 2. 368p, 1998.

MAGALHÃES, C.G. **Estudo fitoquímico do tronco e raiz de *Maytenus salicifolia* Reissek Celastraceae e avaliação da atividade biológica de seus constituintes e de ésteres derivados do lupeol.** 2012. p.186 Tese (Doutorado em Ciências-Química)-Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, 2012.

MAHATO S. B.; KUNDU, A. P. ¹³C NMR Spectra of Pentacyclic Triterpenoids-a compilation and some salient features. **Phytochemistry**, v. 37, n. 6, p. 1517 - 1575, 1994.

MAKLER, M.T.; RIES, J. M.; WILLIAMS, J. A.; BANCROFT, J. E.; PIPER, R. C.; GIBBINS, B. L.; HINRICHS, D. J. Parasite lactate dehydrogenase as an assay for *Plasmodium falciparum* drug sensitivity. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.** 48(6): 739-41,1993a.

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.** 48(2): 205-10, 1993b.

MALONE, M.H.; ROBICHAUD, R.C. The Pharmacological Evaluation of Natural Products – General and Specific Approaches to Screening Ethnopharmaceuticals. **J. Ethnopharmacol.**, v. 8, p.127-147, 1983.

MARINHO, R. O. S.; **Estudo Fitoquímico da espécie *Byrsonima sericea* e sua aplicação em dermocosmética.** 2008. 100 p. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Farmácia, Rio de Janeiro, 2008.

MARSH, K. Malaria disaster in Africa. **Lancet**, 352: 924–925, 1998.

MAYXYN, M.; PUKITTAYAKAMEE, S.; CHOTIVANICH, K.; LOOAREESUWAN, S.; WHITE, N. J. Persistence of *Plasmodium falciparum* HRP-2 in successfully treated acute falciparum malaria. **Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.** 95: 179- 82, 2001.

MCCUTCHAN, T. F.; DAME, J. B.; MILLER, L. H.; BARNWELL, J. Evolutionary relatedness of Plasmodium species as determined by the structure of DNA. **Science**. 225, pp 808-811. 1984.

MEDEIROS, W. L. B. **Constituintes químicos de *Tabernaemontana laeta* Mart. (Apocynaceae)**. Tese de Doutorado em Química. Departamento de Química da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Rio de Janeiro, 2003.

MEDEIROS, R.; OTUKI, M. F.; AVELLAR, M. C. W.; CALIXTO, J. B. Mechanisms underlying the inhibitory actions of the pentacyclic triterpene [alpha]-amyrin in the mouse skin inflammation induced by phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. **European Journal of Pharmacology**, 559(2-3): 227-235.2007.

MELLO, J. P. C.; SANTOS, S. C. **Em Farmacognosia: da planta ao medicamento**; SIMÕES, C. M. O.; SCHENCKEL, E. P., orgs.; Ed. UFSC: Porto Alegre; 3ª ed., 2001.

MELZER, R.; FRICKE, U.; HOLZL, J. Vasoactive properties of procyanidins from *Hypericum perforatum* L. in isolated porcine coronary arteries. **Arzneimittelforschung**. 41: 481-483, 1991.

MERYMAN, H.T. & HORNBLOWER, M.A. Method for freezing and washing red blood cell using a high glycerol concentration. **Transfusion**, v.12, p. 145-156, 1972.

MESHNICK, S. R. From quinine to qinghaosu: historical perspectives. In: SHERMAN I, editor. **Malaria: parasite biology, pathogenesis and protection**. Washington, DC: ASM Press; p. 341-54.1998.

MICHAUD, J.; MASQUELIER, J. Quelques aspects nouveaux de la connaissance des tannins catéchiques, leurs relations avec la vitamine C2 (P). **Prod. Prob. Pharm.**, 28: 499-520, 1973.

MILLIKEN, W.; ALBERT, B. The use medicinal plants by Yanomami Indians alkaloids, Pat. II. **Econ. Bot.** v. 51, p. 264- 278, 1997

MIRAGLIA, M. C. M. **Estudo químico de *Tabebuia serratifolia* (vahl.) Nichols (Bignoniaceae) e síntese de piranonaftoquinonas, furanonaftoquinonas e antraquinonas**. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Minas Gerais, 1991.

MITA, T., TANABE, K., KITA, K. Spread and evolution of *Plasmodium falciparum* drug resistance. **Parasitology International**, 58: 201-209, 2009.

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

MONTEIRO, J. M; ALBUQUERQUE, U. P; ARAÚJO, E. L.; AMORIM, E. L. C. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Quim. Nova**, Vol. 28,nº.5, 892-896, 2005.

MUÑOZ, V.; SAUVAIN, M.; BOURDY, G.; CALLAPA, J.; BERGERON, S.; ROJAS, I.; BRAVO, J.A.; BALDERRAMA, L.; ORTIZ, B.; GIMENEZ, A.; DEHARO, E. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach Part I Evaluation of the antimalarial activity of plants used by the Chacobo Indians. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 69, p.127-137, 2000.

MURGATROYD, F. The chemotherapy of malaria. *Postgraduate medical journal*, 28: 5-10, 1952.

MURPHY, G. S.; BASRI, H.; PURNOMO; ANDERSEN, E. M.; BANGS, M. J.; MOUNT, D. L.; GORDEN, J.; LAL, A. A.; PURWOKUSUMO, A. R.; HARJOSUWARNO, S. L.; Vivax malaria resistant to treatment and prophylaxis with chloroquine. *Lancet*, **341(8837): 96-100**. 1993.

NEOTROPICAL HERBARIUM SPECIMENS – Exsicata. Disponível em: <http://fm1.fieldmuseum.org/vrrc/>. Acesso em: 19/03/2012.

NEUSS, N. Indole Alkaloids. In: PELLETIER, S. W. **Chemistry of the alkaloids**. New York, N. Y: Van Nostrand Reinhold; p. 213. 1970.

NOEDL, H.; WERNSDORFER, R. S. M.; WONGSRICHANALAI, C. Histidine-Rich Protein II: a Novel Approach to Malaria Drug Sensitivity Testing. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 46, n. 6, p. 1658-1664, Jun/2002.

NOEDL, H., WONGSRICHANALAI, C., WERNSDORF, W.H. Malaria drug-sensitivity testing: new assays, new perspectives. *Trends in parasitology*. 19(4): 175-81, 2003.

NOEDL, H.; ATTLMAYR, B.; WERNSDORF, W. H.; KOLLARITSCH, H.; MILLER, R. S. A. Histidine-rich protein 2-based malaria drug sensitivity assay for field use. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 71(6): 711-14, 2004.

OLEA, R. S.; ROQUE, N.F. Análise de misturas de triterpenos por RMN de ¹³C. *Quim.Nov.*, v.13, n.4, 1990.

OLLIARO, P. L.; GOLDBERG, D. E. The *Plasmodium* digestive vacuole: metabolic headquarters and choice drug target. *Parasitol.Today*; v.11, n. 8, p. 294- 297. 1995.

OLIVEIRA, A. B.; DOLABELA, M. F.; BRAGA, F. C.; JÁCOME, R. L. R. P.; VAROTTI, F. P.; PÓVOA, M. M. Plant-derived antimalarial agents: new leads and efficient phythomedicines. Part I. Alkaloids. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 81(4): 715-740.2009.

O'NEILL, P. M.; BRAY, P. G.; HAWLEY, S. R.; WARD, S. A.; PARK, B. K. 4-Aminoquinolines-past, present, and future: a chemical perspective. *Pharmacol. & Ther.* v.77, n. 1, p.29-58. 1998.

OPAS (ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DE SAÚDE). Informe de la Situación del Paludismo en las Américas, 2008. Washington, D.C.: OPAS, 2010. Disponível em: http://new.paho.org/hq/dmdocuments/2011/PAHO_SPA_Malaria_LR.pdf. Acesso em: 08/03/2012.

ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD 420. **Acute Oral Toxicity-Fixed Dose Procedure**. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, 2001.

OSDENE, T. S.; RUSSEL, P. B.; RANE, L. 2,4,7-Triamino-6-ortho-substituted arylpteridines: A new series of potent antimalarial agents. *J. Med. Chem.* 10(3): 431-434.1967.

PÁDUA, R. M. **Cardenolidringschluss via Pregnan-21-O-Malonylhalbester: Substrat-Synthese, -Aufnahme und –Biotransformation sowie Ringschluss in vitro**. Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Naturais da Universidade Friedrich-Alexander Erlangen-Nuremberg, 2010.

PATOČKA, J. The chemistry, pharmacology, and toxicology of the biologically active constituents of the herb *Hypericum perforatum* L. *Journal of Applied Biomedicine*. Vol: 1 Issue: 2 Pages/record No.: 61-70, 2003.

PAULMAN, A.; MCALLISTER, M. M. *Plasmodium gallinaceum*: clinical progression, recovery, and resistance to disease in chickens infected via mosquito bite. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 73(6), pp. 1104–1107.2005.

PEREIRA, M.M.; SOUZA JÚNIOR, S.N., ALCÂNTARA, A.F.C.; PILÓ-VELOSO, D.; ALVES, R.B.; MACHADO,P.O.; AZEVEDO, A.O.; MOREIRA, F.H.; CASTRO, M.S.A.; RASLAN, D.S. Constituintes químicos e estudo biológico de *Aspidosperma nitidum* (Apocynaceae). *Rev. Bras. Pl. Med.*, Botucatu, v.8, n.3, p.1-8, 2006.

PEREIRA, M. DE M.; JÁCOME, R. L. R. P.; ALCÂNTRARA, A. F. DE C.; ALVES, R. B.; RASLAN, D. S. Alcalóides indólicos isolados de espécies do gênero *aspidosperma* (Apocynaceae). *Revista Química Nova*, São Paulo, v. 30, N^o. 4, p. 970-983, jul./ago. 2007.

PERTINO, M.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; RODRIGUEZ, J. A.; THEODULOZ, C. Gastroprotective effect and cytotoxicity of terpenes from the Paraguayan crude drug “yagua rova” (*Jatropha isabelli*). *Journal of Ethnopharmacology*, 111(3): 553-559. 2007.

PETERS, W. Drug resistance in *Plasmodium berghei* Vinckeï and Lips, 1948. I. Chloroquine resistance. *Exp. Parasitol.*, 17:80-89, 1965.

PETERS, W. Rational methods in the search for antimalarial drugs. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 61: 400-410,1967.

PHILLIPSON, J. D. Phytochemistry and medicinal plants. *Phytochemistry*. 56, pp 237-243. 2001.

PIMENTEL, L. F.; JÁCOME-JÚNIOR, A. T.; MOSQUEIRA, V, C. F.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S. Nanotecnologia farmacêutica aplicada ao tratamento da malária. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* .vol. 43, n. 4, out./dez., 2007.

PINTO, J. E. B. P.; SANTIAGO, E. J. A.; LAMEIRA, O. L. **Compêndio de plantas medicinais**. Lavras: UFLA/FAEPE, 205 p.2000.

PORTO, P. C. Plantas indígenas e exóticas provenientes da Amazônia, cultivadas no Jardim Botânico do Rio de Janeiro. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v.2, n.5, p.93-157, jun./set. 1936.

QUASHIE, N. B.; KONING, H. P.; RANFORD-CARTWRIGHT, L. C. An improved and highly sensitive microfluorimetric method for assessing susceptibility of *Plasmodium falciparum* to antimalarial drugs *in vitro*. **Malaria Journal**, v.5, p.95, 2006.

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

RAPINI, A. **Apocynaceae dogbane or milkweed family**. In: SMITH, N. et al. (eds). Flowerings plants of the neotropics. Princeton University Press, Oxford. 2004.

RAPINI, A.; KOCH, I.; KINOSHITA, L. S.; SIMÕES, A. O.; SPINA, A. P. **Apocynaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB033748>). 2010.

RAPOPORT, H.; ONAK, T.P.; HUGHES, N.A.; REINECKE, M. G. Alkaloids of *Geissospermum vellosii*. **Organic and Biological Chemistry**, v. 80, p. 1601- 1604, 1958.

RIBEIRO, J. E. L. DA S.; HOPKINS, M. J. G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C. A.; COSTA, M. A. DA S.; BRITO, J. M. DE; SOUZA, M. A. D.; MARTINS, L. H. P.; LOHMANN, L. G.; ASSUNÇÃO, P. A. C. L.; PEREIRA, E. DA C.; SILVA, C. F. DA; MESQUITA, M. R. e PROCÓPIO, L. C. **Flora da Reserva Ducke: Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central**. Manaus: INPA. 816 p. 1999.

RIECKMANN, K. H.; MCNAMARA, J. V.; FRISCHER, H.; STOCKERT, T. A.; CARSON, P. E.; POWELL, R. D. Effects of chloroquine, quinine, cycloguanil upon maturation of asexual erythrocytic forms of two strains of *Plasmodium falciparum* *in vitro*. **Am J Trop Med Hyg** 17(5): 661-671.1968.

RIECKMANN, K. H.; CAMPBELL, G. H.; SAX, L. J.; MREMA, J. E. Drug sensitivity of *Plasmodium falciparum*. An *in vitro* microtechnique. **Lancet** 1(8054):22-23. 1978.

ROSÁRIO, V. E.; OLIVEIRA, S. G.; SANTOS, M. A. V.; BELLESI, N.; COUTO, A. A. Caracterização de 15 cepas de *Plasmodium falciparum* de 8 áreas distintas da região Amazônica brasileira. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**. 38: 29-35,1986a.

ROSÁRIO, V. E.; COUTO, A. A.; VASCONCELOS, S. M. A.; OLIVEIRA, S. G. Cloning and characterization of *Plasmodium falciparum* strains. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 81(sup II): 143-48, 1986b.

ROSENTHAL, P. J.; GOLDSMITH, R. S. Antiprozoários. **Farmacologia Básica & Clínica**. Editor: Katzung, B.G.C. Guanabara- Koogan, 8^a ed, capítulo: 53, p. 769-783, 2003.

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

SÁ, M. S.; COSTA, J. F. O.; KRETTLI, A. U.; ZALIS, M. G.; MAIA, G. L.; SETTE, I. M. F.; CÂMARA, C. A.; BARBOSA FILHO, J. M.; GIULIETTI, HARLEY, A. M.; DOS SANTOS, R. R.; SOARES, M. B. P. Antimalarial activity of betulinic acid and derivatives *in vitro* against *Plasmodium falciparum* and *in vivo* in *P. berghei*-infected mice. **Parasitology Research**, v. 105, p. 275-279. 2009.

SALDAÑA, M. D. A; Mazzafera, P.; Rahoma, S. M. **Extração de alcalóides: cafeína e trigonelina dos grãos de café**. Ciênc. Tecnol. Aliment., 17(4): 371- 376,1997.

SALEEM, M.; ALAM, A. A. S.; SHAH, M. S.; AHMED, B.; SULTANA, S. Lupeol, a triterpene inhibits early responses of tumor promotion induced by benzoyl peroxide in murine skin. **Pharmacological Research**, v.43, p. 127-134., 2001.

SAMARASEKERA, U. Countries race to contain resistance to key antimalarial. **Lancet**, 374: 277–280, 2009.

SAMPAIO, P. T. B. Amapá-amargoso (*Parahancornia amapa*). In: CLAY, J. W.; SAMPAIO, P. T. B.; CLEMENT, C. R. **Biodiversidade amazônica: exemplos e estratégias de utilização**. Manaus: Programa de Desenvolvimento Empresarial e Tecnológico, p.151-157.2000.

SANCHEZ, B. A. M.; VAROTTI, F. P.; RODRIGUES, F. G.; CARVALHO, L. H. Validation of a *Plasmodium falciparum* parasite transformed with Green Fluorescent Protein for antimalarial drug screening. **Journal of Microbiological Methods**. v. 69, p.518-522, 2007.

SANTOS-BUELGA, C.; SCABERTH, A. Proanthocyanidins and tannin-like compounds: nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v 80, p. 1049-1117, 2000.

SATO, H.; GENET, C.; STREHLE, A.; THOMAS, C.; LOBSTEIN, A.; WAGNER, A.; MIOSKOWSKI, C.; AUWERX, J.; SALADIN, R. Anti-hyperglycemic activity of a TGR5 agonist isolated from *Olea europaea*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 362(4): 793-798.2007.

SHAI, L. J.; McGAW, L. J.; ADEROGBA, M. A.; MDEE, L. K.; ELOFF, J. N. Four Pentacyclic triterpenoids antifungal and antibacterial activity from *Curtisia dentate* (Burm.f) C. A. Sm. leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, 119, 238-244. 2008.

SHANLEY, P.; MEDINA, G. Frutíferas e Plantas Úteis na Vida Amazônica. In: GAIA, G. **Amapá: o fortificante da Amazônia**; CIFOR; Imazon, Belém, 2005, pg. 101-102.

SILVA, P. S. P.; SALLES, R. C. O.; NUNOMURA, S. M.; NUNOMURA, R. C. S. **Estudo Fitoquímico do extrato metanólico do látex do Leite de Amapá**. XIX Jornada de Iniciação Científica PIBIC INPA - CNPq/FAPEAM, Manaus. 2010.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 6. ed. Rio de Janeiro: Editora: LTC, 2007. 490p.

SIMÕES, A. O. & KINOSHITA, L. S. **The Apocynaceae s.str. of the Carrancas region, Minas Gerais, Brazil**. Darwiniana 40: 127-169.2002.

SOBRINHO, D. C.; HAUPTLI, M. B.; APPOLINÁRIO, E. V.; KOLLENZ, C. L. M.; CARVALHO, M. G.; BRAZ-FILHO, R. Triterpenoids Isolated from *Parahancornia amapa*. **J. Braz. Chem. Soc.** 2, 15, 1991.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: Guia Ilustrado para a identificação das famílias de Angiospermas da Flora Brasileira**. Nova Odessa, Sp. Instituto Plantarum. 2005.

SRINIVASAN, T.; SRIVASTAVA, G. K.; PATHAK, A.; BATRA, S.; RAJ, K.; KSHIPRA SINGH, S. K.P; KUNDU, B. Solid-Phase Synthesis and Bioevaluation of Lupeol-Based Libraries as Antimalarial Agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters** 12,p. 2803-2806.2002.

STALLARD, N.; WHITEHEAD, A.; RIDGWAY, P.; Statistical evaluation of the revised fixed-dose procedure. **Revue / Journal Title Human & experimental toxicology**. v.21, n.4, p. 183-196, 2002.

STEELE, J. C.; WARHURST, D. C.; KIRBY, G. C.; SIMMONDS, M. S. In vitro and in vivo evaluation of betulinic acid as an antimalarial. **Phytotherapy Research**, v. 13, n. 2, p. 115-119, 1999.

STEELE, J. C. P. VEITCH, N. C.; KITE, G. C.; SIMMONDS, M. S. J.; WARHURST, D. C. Indole and β -Carboline Alkaloids from *Geissospermum sericeum*. **Journal of Natural Products**, v. 65, N^o. 1, p. , 2002.

SUDHAHAR, V.; KUMAR, S. A.; SUDHARSAN, P. T.; VARALAKSHMI, P. Protective effect of lupeol and its ester on cardiac abnormalities in experimental hypercholesterolemia. **Vascular Pharmacology**, 46(6): 412-418.2007.

SULLIVAN, D. J. Theories on malarial pigment formation and quinoline action. **Int. J. Parasitol.** n.32, p.1645-1653. 2002.

SULLIVAN JR., D. J.; MATILE, H.; RIDLEY, R. G.; GOLDBERG, D. E. A Common Mechanism for Blockade of Heme Polymerization by Antimalarial Quinolines. **Journal of Biological Chemistry**, v.273(47), p.31103-31107, 1998.

TAKECKI, M., TANAKA, T.; TAKEHARA, M.; NONAKA, G. I.; NISHIOKA, I. Structure and antileherpetic activity among the tannins. **Phytochemistry**, 24: 2245-2250, 1985.

TENÓRIO, M. A. R. de O.; VAN DEN BERG, M. E.; MENEZES, O. F. de; SALLES, P. **Fitoterapia: uma estratégia terapêutica natural do Amapá.** In: BUCHILLET, D. **Medicinas tradicionais e medicina ocidental na Amazônia.** Belém: MPEG/CNPq;SCT/PR/CEJUP/UEP, p.413-415: il.1991.

TESKE, M.;TRENTINI, A. M. M. **Herbarium: Compendio de fitoterapia.** Paraná: Herbarium Lab.Botânico, 1995.

THE ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP. **An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II.** *Bot J, Linn Soc.* 141:399-436.2003.

TOMOSAKA, H.; KOSHINO, H.; TAJIKA, T.; OMATA, S. Lupeol Esters from the Twig Bark of Japanese Pear (*Pyrus serotina* Rehd.) cv. Shinko. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry.** v. 65, n. 5, p. 1198-1201. 2001.

TRAGER, W.;JENSEN, J.B. Human malaria parasites in continuous culture. **Revista Science,** v. 193, p. 673-675,1976.

TRAGER, W.; JENSEN, J. B. Continuous Culture of *Plasmodium falciparum*. Its impact on malaria research. **Int J Parasitol** 27(9): 989-1006.1997.

TROPICOS. Missouri Botanical Garden. Disponível em: www.tropicos.org. Acesso em: 19/02/2012.

UM PÉ DE QUÊ? ÁRVORE, FOLHAS, FRUTOS E CASCA DE PARAHANCORNIA FASCICULATA. Disponível em: <http://www.umpedeqe.com.br/arvore.php?id=660>. Acesso em: 10/03/2012.

VALADARES, Y. M. **Remijia ferruginea D.C., Jacaranda caroba D.C. e Solanum paniculatum L: fitoquímica, atividades biológicas e síntese de derivados dos ácidos ursólico e oleanólico.**Tese de Doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. Belo Horizonte, Minas Gerais. p. 324. 2009

VAN DEN BERG, M. E. **Plantas Medicinais na Amazônia - Contribuição ao Seu Conhecimento Sistemático.** CNPq/PRU/MPEG, Belém-PA, Brasil. 1982.

VAN DEN HEUVEL, M. J.D.; CLARK, G.; FIELDER, R.J.; KOUNDAKJIAN, P. P.; OLIVER, G.J.A.; PELLING, D.; TOMLINSON, N.J.; WALKER, A.P . The international validation of a fixed-dose procedure as an alternative to the classical LD50 test, **Fd. Chem. Toxicol.**, 28:469-482, 1990.

VASCONCELOS, A. L. F. **Estudo farmacológico e toxicológico do extrato acetato de etila de *Spigelia anthelmia* Linn em animais de laboratório.** 2002. 93 p. Dissertação de Mestrado. Programa de mestrado em Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará. 2002.

VASCOCELOS, J. F.; TEIXEIRA, M. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; LÚCIO, A. S. S. C.; ALMEIDA, J. R. G. S.; QUEIROZ, L. P.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R.; SOARES, M. B. P. The triterpenoid lupeol attenuates allergic airway inflammation in a murine model. *International Immunopharmacology*, v. 8, 1216-1221. 2008.

VELLOSO, C. R. X. **Triterpenos Isolados de *Parahancornia amapa* (Apocynaceae) e Diterpenos Isolados de *Pinus caribaea* var. *bahamensis* Barr et Golf.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Departamento de Ciências Exatas, PPGQO, Seropédica-RJ, Brasil, 1998.

VILHENA, T. C. **Avaliação da Toxicidade e estudo da atividade antimalárica in vivo do extrato etanólico das cascas de *Himatanthus articulatus* (Vahl) Woodson (Apocynaceae).** 2011. 90p. Dissertação de Mestrado –Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia/ICS, Universidade Federal do Pará, 2011.

YAP, M. W.; KARA, U. A.; HEGGELER-BORDIER, B.; TING, R. C.; TAN, T. M. Partial nucleotide sequence and organisation of extrachromosomal plastid-like DNA in *Plasmodium berghei*. *Gene*. v.200: 91-98. 1997.

WALTHER H.; WERNSDORFER, I. **Malaria: Principles and practice of malariology.** CHURCHILL LIVINGSTONE, LONDON. (1988).

WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKY, E.M. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas.** Berlin: Springer, 320p.1984.

WANG, K.; SUN, C.; WU, X.; PAN, Y. Novel Bioactive Dammarane caffeoyl Esters from *Celastrus rosthrianus*. *Planta Med*; 72: 370-372, 2006.

WHITE, N. J. Treatment of malaria. *New England Journal of Medicine*, 335: 801-806. 1996.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Monitoring Antimalarial Drug Resistance.** WHO/CDS/CSR/EPH/2002.17, WHO/CDS/RBM/.39. 2002.

WHO. 2010a. **World Malaria Report.** Geneva, World Health Organization. Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241564106_eng.pdf. Acesso em: 09/08/2011.

WHO. 2010b. **Guidelines for the Treatment of Malaria.** 2 ed. Geneva, World Health Organization. Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241547925_eng.pdf. Acesso em: 09/08/2011.

WHO. 2011. **World Malaria Report.** Geneva, World Health Organization. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/index.html>. Acesso em: 07/02/2012.

WHO. 2012. **World Malaria Report.** Geneva, World Health Organization. Disponível em:

http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2012/wmr2012_summary_and_keypoint_es.pdf. Acesso em: 12/11/2013.

WIESNER, J.; ORTMANN, R.; JOMAA, H.; SCHLITZER, M. New Antimalarial Drugs. **Angew. Chem. Int. Ed.**, 42: 5274–5293. 2003.

WILLIAMS, D. R.; CLARK, M. P. Synthesis of Atovaquone. **Tetrahedron Lett.** 39:7629–7632. 1998.

WONGSRICHANALAI, C; PICKARD, A; WERNSDORFER, W. Epidemiology of drug-resistant malaria. **Lancet Infect Dis**, 2:209-218.2002.

ZIEGLER, H. L.; CHRISTENSEN, D. S. J.; HVIID, L.; HÄGERSTRAND, H.; JAROSZEWSKI, J. W. In Vitro *Plasmodium falciparum* Drug Sensitivity Assay: Inhibition of Parasite Growth by Incorporation of Stomatocytogenic Amphiphiles into the Erythrocyte Membrane. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, vol.46, n°5, p. 1441–1446, May, 2002.

ZIEGLER, H. L.; FRANZYK, H.; SAIRAFIANPOUR, M.; TABATABAI, M.; TEHRANI, M. D.; GERSTRAND, K. H. H.; STÆRK, D. JAROSZEWSKI, J. W. Erythrocyte membrane modifying agents and the inhibition of *Plasmodium falciparum* growth: structure–activity relationships for betulinic acid analogues. **Bioorganic & Medicinal Chemistry** 12, p.119–127.2004.

8. ANEXOS:

8.1 Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa com animais de experimentação



PARECER BIO037-12

Projeto: Avaliação da Atividade Antimalárica e Toxicidade aguda oral dos extratos das cascas de *Geissospermum vellosii* e *Parahancornia fasciculata*, frações e substâncias purificadas

Coordenador: Prof. Dra Maria Fani Dolabela

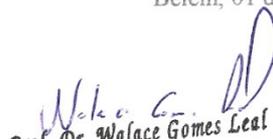
Área Temática: Biologia

Vigência: 02/2011 a 02/2013

Nº no CEPAE-UFPA: BIO037-12

O projeto acima identificado foi avaliado pelo Comitê de Ética Em Pesquisa Com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará (CEPAE). O tema eleito para a investigação e de alto teor científico justificando a utilização do modelo animal proposto. Os procedimentos experimentais utilizados seguem as normas locais e internacionais para tratamento e manipulação de animais de experimentação. Portanto, o CEPAE, através de seu presidente, no uso das atribuições delegadas pela portaria Nº 3988/2011 do Reitor da Universidade Federal do Pará, resolve **APROVAR** a utilização de animais de experimentação nas atividades do projeto em questão, no período de vigência estabelecido. As atividades experimentais fora do período de vigência devem receber nova autorização deste comitê.

Belém, 01 de janeiro de 2011


Prof. Dr. Wallace Gomes Leal
Coordenador do Lab. de Neuroproteção
e Neuroregeneração Experimental
ICB-UFPA

8.2 Tabela de Ensaio Hipocrático

ANEXO 2 – TABELA DE ENSAIO HIPOCRÁTICO

ANIMAL	PERÍODO DE TEMPO																					
	15 min	30 min	60 min	2 h	3 h	4 h	24 h	2 dias	3 dias	4 dias	5 dias	6 dias	7 dias	8 dias	9 dias	10 dias	11 dias	12 dias	13 dias	14 dias		
Peso																						
Atividade Motora Geral																						
Frêmito Vocal																						
Irritabilidade																						
Resposta ao toque																						
Desorientação																						
Aperto de Cauda																						
Contorção																						
Trem Posterior																						
Força de agarrar																						
Ataxia																						
Tremores																						
Convulsões																						
Straub																						
Hipnose																						
Lacrimação																						
Pítozes																						
Micção																						
Defecação																						
Piloereção																						
Respiração																						
Cianose																						
Morte																						
Data de Início:																						
Dose:																						
Via:																						