



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

**ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADE ANTIPLASMÓDICA
EM *Plasmodium falciparum* (W2) DE *Himatanthus
articulatus* (Vahl) Woodson (Apocynaceae)**

Valdicley Vieira Vale

Belém-PA
2014

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

ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADE ANTIPLASMÓDICA
EM *Plasmodium falciparum* (W2) DE *Himatanthus*
***articulatus* (Vahl) Woodson (Apocynaceae)**

Autor: Valdicley Vieira Vale

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

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

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

Trabalho obtido como mestrado sanduíche, realizado no laboratório de fitoquímica da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte-MG.

Belém-PA
2014

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

Vale, Valdicley Vieira, 1985-
Estudo fitoquímico e atividade
antiplasmódica em plasmodium falciparum (w2) de
himatanthus articulatus (vahl) woodson
(apocynaceae) / Valdicley Vieira Vale. - 2014.

Orientadora: Alaide Braga de Oliveira;

Coorientadora: Maria Fani Dolabela.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal
do Pará, Instituto de Ciências da Saúde,
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas, Belém, 2014.

1. Apocynaceae. 2. Himatanthus articulatus.
3. Iridóides. 4. Alcalóides. 5. Atividade
antiplasmódica. I. Título.

CDD 22. ed. 615.321

FOLHA DE APROVAÇÃO

Valdicley Vieira Vale

ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADE ANTIPLASMÓDICA EM *Plasmodium falciparum* (W2) DE *Himatanthus articulatus* (Vahl) Woodson (Apocynaceae)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Instituto Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará em cumprimento às exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Fármacos e Medicamentos

Aprovado em:

Banca Examinadora

Profa. Dra Alaíde Braga de Oliveira (Orientadora)
Instituição: Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas UFPA

Ass.:  _____

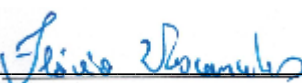
Prof. Dr. Andrey Moacir do Rosario Marinho
Instituição: ICEN - UFPA

Ass.:  _____

Prof. Dr. José Luiz Fernandes Vieira
Instituição: PPGCF-UFPA

Ass.:  _____

Prof. Dr. Flávio de Vasconcelos (Suplente)
Instituição: Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UFPA

Ass.:  _____

Belém- PA

2014

DEDICATÓRIA

À José Fábio França Orlanda, meu pai científico e maior incentivador do meu ingresso no mestrado.

AGRADECIMENTOS

São muitos os agradecimentos na elaboração deste manuscrito. Cito alguns:

Em primeiro lugar, a Deus, pelo dom da vida e tudo mais que nos concede. Em segundo lugar, a minha família nas pessoas de meus pais Manoel Ferreira Vale e Albetiza dos Santos Vale, meus irmãos Valdinez Vieira Vale (em memória), Valdeane Santos Vale, Valdinéia Santos Vale e Valkíria Santos Vale pelos conselhos e incentivos na busca de meus objetivos.

Às minhas orientadoras Alaíde Braga de Oliveira e Maria Fani Dolabela, pelo belo projeto que a mim confiaram, pela amizade e pela disposição à orientação.

Aos professores parceiros que cederam base científica na elaboração desta dissertação: Geraldo Célio Brandão (UFOP), Fernão Braga (UFMG), Rodrigo Maia (UFMG), Guilherme Rocha Pereira (PUC-MG), Ricardo Luiz Machado (IEC), Márlia Coelho (MPEG), Jaqueline Rodrigues e demais professores do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas do Instituto Ciências da Saúde da UFGA.

Aos amigos Simony Castro, Ester Sales, Shirley Gonçalves, Alcimar Silva, Leandro Santos, Dayane Barros, Margoula Soares, Rafaela Cabral, Larissa Rocha pela amizade e palavras de incentivo e Nathaly Oliveira, sem a qual não teria nem lugar onde morar na cidade de Belém durante o mestrado.

Aos amigos da Universidade Federal de Minas Gerais, Raquel Isidório, Douglas Gontijo, Juliana de Oliveira, Luciana Soares, Renata de Paula, Kamilla Nunes, Tatiane Borgati, Diego Oliveira, Ana Bárbara Dias, Grasielle Gusman, Felipe Malk, Jullye Campos, Stefano Curvelo, Ayeska Veloso, José Hugo Sousa, Priscila Campana, Thales do Valle, Bárbara Henriques, pela amizade, ajuda durante minhas estadias em Belos Horizonte e pelas discussões científicas que muitas vezes ocorriam no café da tarde na cantina da Faculdade de Farmácia e me ajudaram na elaboração desta dissertação.

Aos amigos da Universidade Federal do Pará, Cliciane Sarrazin, Brasília Quaresma, Eduardo Mota, Dayse Nascimento, Andreza Veiga, Natasha Costa, Guilherme Carvalho, Elanne Bandeira, Taylon Aguiar, Marcus Lima, Rayanne Rocha, Denise Contente, Kelly Albuquerque, Adreanne Oliveira, Andressa Brígida, Ana Paula Paiva, João Victor da Silva, Rosana Cristiane Monteiro, Heliton Brígido, Thiago Paixão, João Paulo Bastos, Luanna Fernandes, Érika Valério, Rosana

Sarmiento e demais colegas do PPGCF-UFGA que provavelmente devo ter esquecido de citar, além dos amigos do grupo PET-Farmácia, que devido ao grande número de participantes não estão aqui listados. Aos amigos do Programa de Pós-graduação em Química André, Wander e Edson.

Enfim, a todas as pessoas que direto ou indiretamente serviram de base para minha formação, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

VALE, V.V. **Estudo fitoquímico e atividade antiplasmódica em *Plasmodium falciparum* (W2) de *Himatanthus articulatus* (Vahl) Woodson (Apocynaceae).** 115 f. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2014.

O presente trabalho descreve a análise fitoquímica e avaliação da atividade antiplasmódica em *Plasmodium falciparum* (W2) de *Himatanthus articulatus* (Vahl) Woodson. O extrato etanólico (EEHS) obtido por percolação do pó das cascas, após concentração, forneceu um precipitado (EEHSP) e um resíduo pastoso que foi submetido a liofilização (EEHS). Fracionou-se este por: re-extração sob refluxo, partição ácido-base e coluna cromatográfica de sílica gel. Além disso, submeteu-se o pó das cascas a extração com ácido clorídrico 1 N para separação de alcalóides. A prospecção fitoquímica, em CCD, foi realizada com EEHS e EEHSP, enquanto que EEHS, frações (FrDCM EEHS, FrAcOET EEHS e FrMeOH EEHS) e FAHS2 DCM foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a DAD (arranjo de diíodo-CLAE-DAD). FrAcOET EEHS foi fracionada por coluna cromatográfica fornecendo uma substância isolada (S1). Analisou-se o EEHS, a fração majoritária obtida na coluna cromatográfica (F71), FAHS2 DCM e S1 por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (CL-EM). O espectro no infravermelho foi obtido para F71 e S1. A estrutura química de S1 foi definida como sendo o plumierídeo por ressonância magnética nuclear. A avaliação de atividade antiplasmódica foi realizada com EEHS, EEHSP, FrDCM EEHS, FrAcOET EEHS, FrMeOH EEHS, FAHS1 DCM, FAHS2 DCM, FAEEHS, FNEEHS, FNHS DCM e S1 pelo método da lactato desidrogenase parasitária (ρ LDH). Na prospecção fitoquímica, EEHS e EEHSP apresentaram resultados positivos para polifenóis e taninos, saponinas, triterpenos e esteroides, alcalóides e geninas flavônicas. EEHS e frações analisadas por CLAE-DAD mostraram os picos mais intensos sugestivos de iridóides, comprovados por CL-EM de EEHS que mostrou como substância majoritária o iridóide plumierídeo, coerente com o espectro no IV de F71 e S1 que revelou absorções de grupos funcionais presentes em iridóides. Nas análises destas por CL-EM, observou-se um pico a m/z 471 (M+H), atribuído ao íon pseudomolecular do plumierídeo e/ou isoplumierídeo. S1 foi identificada como plumierídeo. Até o presente momento não foi relatada a presença de alcalóides para a espécie, porém nas frações alcaloídicas (FAHS1 DCM, FAHS2 DCM, FAEEHS) e de neutros (FNEEHS e FNHS DCM) em análise por CCD revelada com reagente Dragendorff observaram-se manchas sugestivas de alcalóides, coerente com análise por CLAE-DAD de FAHS2 DCM, a qual mostrou pico majoritário com cromóforo sugestivo de alcaloide β -carbolínico. Em análises por CL-EM de FAHS2 DCM observou-se pico majoritário sugestivo do alcalóide 10-hidroxi-antirina-N-óxido com massa molecular 328 u. Os ensaios de atividade antiplasmódica foram negativos para EEHS, EEHSP, FrDCM EEHS, FrAcOET EEHS, FrMeOH EEHS, S1, FAEEHS, FAHS1 DCM, FNEEHS, FNHS DCM e moderadamente ativo (Cl_{50} 22,89 μ g/mL) para FAHS2 DCM. Estes resultados indicam que a atividade antiplasmódica da planta pode se atribuída aos alcalóides, cuja presença em *H. articulatus* é descrita pela primeira vez.

Palavras-chave: Apocynaceae, *Himatanthus articulatus*, iridóides, alcalóides, atividade antiplasmódica.

ABSTRACT

VALE, V.V. Phytochemistry and antiplasmodial activity in *P. falciparum* (W2) of *Himatanthus articulatus* (Vahl) Woodson (Apocynaceae). 115 f. Master Thesis, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, UFPA, 2014.

The present master thesis describes the phytochemical study and the antiplasmodial activity against *Plasmodium falciparum* (W2) of *Himatanthus articulatus* (Vahl) Woodson. The ethanol extract (EEHS) obtained by percolation of the bark powder, gave, after concentration, a precipitate (EEHSP) and a pasty residue that was submitted to lyophilization (EEHS). Fractionation of EEHS was carried out by successively re-extraction with DCM, AcOEt and MeOH under reflux, by acid-base partitioning for separation of alkaloids and by chromatography over silica gel column. Furthermore, the bark powder was extracted with 1 N HCl for the separation of alkaloids. TLC prospection of EEHS and EEHSP was carried out while EEHS, FrDCM EEHS, FrAcOEt EEHS, FrMeOH EEHS and FAHS2 DCM were also analyzed by HPLC - DAD. Column chromatography of FrAcOEt EEHS afforded a substance (S1). EEHS, the major fraction obtained in its chromatographic column (F71), DCM FAHS2 and S1 were analysed by UPLC-PDA-MS/ESI. Spectroscopic analyses of S1 (IR, UV, MS/ESI, ¹H and ¹³CNMR) allowed its identification as plumieride. Antiplasmodial activity against *P. falciparum* (W2) was evaluated for EEHS, EEHSP, FrDCM EEHS, FrAcOEt EEHS, FrMeOH EEHS, FAHS1 DCM, DCM FAHS2, FAEHS, FNEHS, FNHS DCM and S1 by the parasite lactate dehydrogenase (μ LDH) method. In the TLC prospection, EEHS and EEHSP showed positive results for polyphenols and tannins, saponins, triterpenes and steroids, alkaloids and flavonoids. EEHS fractions were analyzed by HPLC-DAD showing suggestive peaks of iridoids. Analyses by UPLC-PDA-MS/ESI showed that EEHS contains plumieride as the major substance whose pseudomolecular peak was observed at m/z 471 (M + H). S1 was identified as plumeride. Until now it was not reported the presence of alkaloids for the species but spots suggestive of alkaloids were observed on TLC with Dragendorff reagent of FAHS1 DCM, DCM FAHS2, FAEHS, FNEHS and FNHS DCM were observed. UV spectra registered online by HPLC-DAD for FAHS2 showed that the major peak is suggestive of a β -carboline alkaloid. UPLC-PDA-MS/ESI analysis of FAHS2 DCM showed an intense peak corresponding to a pseudomolecular ion 329 u that could be possibly attributed to the alkaloid 10-hydroxy-antirine-N-oxide (MM 328 u). The antiplasmodial assays were negative for EEHS, EEHSP, FrDCM EEHS, FrAcOEt EEHS, FrMeOH EEHS, S1, FAEHS, FAHS1 DCM, FNEHS, FNHS DCM and moderately active (CI_{50} 22,89 μ g/mL) for FAHS2 DCM. These results indicate that the antiplasmodial activity might be attributed to the plant alkaloids whose presence in *H. articulatus* is reported here by the first time.

Keywords: Apocynaceae, *Himatanthus articulatus*, iridoids, alkaloids, antiplasmodial activity.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-------------------|---|----|
| Figura 01: | Estrutura química da quinina (1), atovaquona (2) e artemisinina (3) | 18 |
| Figura 02: | Ciclo biológico do <i>Plasmodium</i> | 22 |
| Figura 03: | Estrutura química da cloroquina (4) e mefloquina (5) | 23 |
| Figura 04: | Estrutura química do acetato de lupeol (6) | 31 |
| Figura 05: | Estrutura química da plumericina (7) e isoplumericina (8) | 32 |
| Figura 06: | Estrutura química β -diidroplumericina (9) | 32 |
| Figura 07: | Estrutura química da uleína (10), desmetoxiaspidospermina (11), ioimbina (12) e <i>epi</i> -uleína (13) | 33 |
| Figura 08: | Estrutura química do plumierídeo (14) | 33 |
| Figura 09: | Estrutura química do cinamato de lupeol (15), cinamato de α -amirina (16) e cinamato de β -amirina (17) | 35 |
| Figura 10: | Estrutura química do isoplumierídeo (18) | 36 |
| Figura 11: | Exsicata de <i>Himatanthus articulatus</i> (Vahl) Woodson | 50 |
| Figura 12: | Precipitado (EEHSP) formando durante o preparo do extrato etanólico de <i>Himatanthus articulatus</i> (EEHS) | 51 |
| Figura 13: | Fracionamento do extrato etanólico das cascas de <i>Himatanthus articulatus</i> com solventes de polaridade crescente por re-extração sob refluxo | 52 |
| Figura 14: | Fracionamento para separação de alcaloides a partir do extrato etanólico de <i>Himatanthus articulatus</i> por extração ácido-base | 54 |
| Figura 15: | Extração de alcaloides a partir do pó das cascas alcalinizadas de <i>Himatanthus articulatus</i> | 55 |
| Figura 16: | Extração de alcaloides a partir do pó das cascas acidificadas de <i>Himatanthus articulatus</i> | 56 |
| Figura 17: | Esquema da placa utilizada no teste de atividade antiplasmódica | 66 |
| Figura 18: | Prospecção fitoquímica do extrato etanólico obtido do pó das cascas de <i>Himatanthus articulatus</i> (EEHS) e de seu precipitado (EEHSP) | 71 |
| Figura 19: | Estrutura química do lupeol (19) | 74 |
| Figura 20: | Cromatogramas do extrato etanólico, do precipitado e das frações obtidas por re-extração exaustiva. Detecção em 220 nm | 75 |
| Figura 21: | Cromatogramas e espectros de massa obtidos online por UPLC-PDA-MS/ESI do extrato etanólico de <i>Himatanthus articulatus</i> e possíveis estruturas dos íons fragmentários principais | 77 |
| Figura 22: | Cromatograma da substância isoalida (S1) da fração acetato de etila do extrato etanólico de <i>Himatanthus articulatus</i> (FrAcOET EEHS) | 78 |
| Figura 23: | Espectroscopia no infravermelho da substância isolada (S1) a partir da fração acetato de etila do extrato etanólico de <i>Himatanthus articulatus</i> (FrAcOET EEHS) | 79 |
| Figura 24: | Cromatograma e espectro de massas da substância isolada (S1) a partir da fração acetato de etila do extrato etanólico de | 80 |

| | | |
|-------------------|---|----|
| | <i>Himatatnhus articulatus</i> (FrACOET EEHS) | |
| Figura 25: | Espectro de Ressonância magnética nuclear de ¹ H da substância isolada (S1) da fração acetato de etila do extrato etanólico de <i>H. articulatus</i> (FrAcOET EEHS) – 200 MHz, CD ₃ OD | 81 |
| Figura 26: | Espectro de ressonância magnética nuclear de ¹³ C da substância isolada (S1) a partir da fração acetato de etila do extrato etanólico de <i>Himatatnhus articulatus</i> (FrACOET EEHS) – 50 MHz, CD ₃ OD | 82 |
| Figura 27: | Espectro de ressonância magnética nuclear de ¹³ C DEPT 135 da substância isolada (S1) a partir da fração acetato de etila do extrato etanólico de <i>Himatatnhus articulatus</i> (FrACOET EEHS) – 50 MHz, CD ₃ OD | 83 |
| Figura 28: | Estruturas químicas possíveis para S1 (plumierídeo-14 e seu isômero isoplumierídeo-18) a partir da fração acetato de etila do extrato etanólico de <i>Himatatnhus articulatus</i> (FrACOET EEHS) | 85 |
| Figura 29: | Espectro no infravermelho da fração F71 obtida em coluna cromatográfica a partir do extrato etanólico de <i>Himatanthus articulatus</i> | 87 |
| Figura 30: | Cromatograma e espectro de massas da fração F71 obtida por coluna cromatográfica do extrato etanólico de <i>Himatanthus articulatus</i> . | 88 |
| Figura 31: | CCD das frações alcaloídicas e de neutros obtidas no fracionamento do extrato etanólico e extração do pó das cascas de <i>Himatanthus articulatus</i> | 91 |
| Figura 32: | Cromatograma da fração FAHS2 DCM obtida do pó das cascas de <i>Himatanthus articulatus</i> por extração ácida, com ênfase nos picos majoritários, sugestivos de alcaloides β-carboínicos e indólicos. Detecção em 280 nm | 93 |
| Figura 33: | Cromatogramas por detecção no UV (A), espectrometria de massas (B) para FAHS2 DCM correspondente ao pico com Tr 3,29 minutos. | 94 |
| Figura 34: | Estrutura química do alcaloide 10-hidroxi-antirina-N-óxido | 94 |
| Figura 35: | Curva dose-resposta de FAHS2 DCM contra parasitos do ciclo sanguíneo de <i>P. falciparum</i> (cepa W2), mostrando os valores da concentração inibitória de 50% do crescimento (CI ₅₀) | 98 |
| Figura 36 | Estrutura química dos alcaloides geissoschizolina-N ₄ -óxido (21), 1,2-desidrogeissoschizolina (22) e flavopererina (23) | 99 |

LISTA DE QUADRO

Quadro 01: Resultados, eluentes e reveladores utilizados na prospecção fitoquímica do extrato etanólico (EEHS) e do precipitado (EEHSP) de *Himatanthus articulatus* 70

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-------------------|---|----|
| Tabela 01: | Eluente das frações obtidas do fracionamento da fração acetato de etila do extrato etanólico de <i>Himatanthus articulatus</i> (5g) por cromatografia em coluna cromatográfica de sílica gel | 53 |
| Tabela 02: | Gradiente de eluição empregado nas análises por CLAE-DAD para registro dos perfís exploratórios. | 61 |
| Tabela 03: | Gradiente de eluição empregado nas análises por CLAE-DAD na condição cromatográfica 2 | 61 |
| Tabela 04: | Gradiente de eluição empregado nas análises por UPLC-PDA-MS/ESI | 62 |
| Tabela 05: | Classificação das amostras de acordo com resultado de CI_{50} para atividade antiplasmódica | 67 |
| Tabela 06: | Rendimento do extrato etanólico, precipitado e frações obtidas do extrato etanólico de <i>Himatanthus articulatus</i> por extração exaustiva | 73 |
| Tabela 07 | Dados das atribuições dos sinais de ressonância magnética nuclear de 1H e ^{13}C da substância isolada (S1) a partir da fração acetato de etila do extrato etanólico de <i>Himatanthus articulatus</i> e dados de comparação da literatura | 84 |
| Tabela 08: | Frações reunidas oriundas do EEHS por cromatografia em coluna de vidro aberta e suas massas | 86 |
| Tabela 09: | Rendimento das frações alcaloídicas | 91 |
| Tabela 10: | Concentração inibitória de 50% do crescimento (CI_{50}) do clone W2 de <i>P. falciparum</i> | 98 |

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

| | |
|--------------------|---|
| % | Porcentagem |
| °C | Graus Celsius |
| μM | Micromolar |
| μm | Micrometros |
| ACN | Acetonitrila |
| AcOEt | Acetato de Etila |
| APAD | Enzima 3-acetilpiridina adenina dinucleotideo |
| CCD | Cromatografia em Camada Delgada |
| CD ₃ OD | Metanol deuterado |
| CI ₅₀ | Concentração Inibitória mínima 50% |
| CLAE | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência |
| CLAE-DAD | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - Detector de Arranjos Diodos |
| cm | Centímetro |
| cm ⁻¹ | Nº de bandas |
| DCM | Diclorometano |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DP | Desvio Padrão |
| EEHS | Extrato etanólico de <i>Himatanthus articulatus</i> |
| EEHSP | Precipitado do extrato etanólico de <i>Himatanthus articulatus</i> |
| F71 | Fração 71 eluida da coluna cromatográfica do extrato etanólico de <i>Himatanthus articulatus</i> |
| FAEEHS | Fração alcaloídica do extrato etanólico de <i>Himatanthus articulatus</i> |
| FAHS1 DCM | Fração alcaloídica diclorometânica do pó das cascas de <i>Himatanthus articulatus</i> por extração básica |
| FAHS2 DCM | Fração alcaloídica cilorometânica do pó das cascas de <i>Himatanthus articulatus</i> por extração ácida |
| FNEEHS | Fração de neutros do extrato etanólico de <i>Himatathus articulatus</i> |
| FNHS DCM | Fração de neutros diclorometânica do pó das cascas de <i>Himatathus articulatus</i> |
| FrAcOET EEHS | Fração acetato de etila do extrato etanólico de <i>Himatanthus articulatus</i> |
| FrDCM EEHS | Fração diclorometânica do extrato etanólico de <i>Himatanthus articulatus</i> |
| FrMeOH EEHS | Fração metanólica do extrato etanólico de <i>Himatanthus articulatus</i> |
| g | Grama |
| HCl | Ácido Clorídrico |
| IV | Infravermelho |
| KBr | Brometo de potássio |
| Kg | Quilograma |
| L | Litro |
| LC-MS | Cromatografia Líquida acoplada a Espectro de Massa |
| MeOH | Metanol |
| mg | Micrograma |
| min. | Minuto |
| mL | Mililitro |

| | |
|--------------------|---|
| mm | Milímetro |
| NaCl | Cloreto de Sódio |
| NaHCO ₃ | Bicarbonato de Sódio |
| NaOH | Hidróxido de Sódio |
| NBT | Nitro Blue Tetrazolium Salt |
| ng | Nanograma |
| NH ₄ OH | Hidróxido de Amônio |
| nm | Nanometro |
| OMS/WHO | Organização Mundial de Saúde. |
| p/v | Peso/volume |
| PES | etosulfato de fenazina |
| pH | Potencial hidrogenionico |
| <i>p</i> LDH | Enzima lactato-desidrogenase específica |
| Rf | Fator de Retenção |
| RMN | Ressonância Magnética Nuclear |
| rpm | Rotação por minuto |
| RPMI 1640 | Roswell Park Memorial Institute 1640 |
| S1 | Substância isolada da fração acetao de etila do extrato etanólico de <i>Himatatnhus articulatus</i> |
| Tr | Tempo de Retenção |
| UV | Ultravioleta |
| UPLC-PDA-MS/ESI | Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjos de diodo e massas por eletrospray |
| v/v | volume/volume |
| vis. | Visível |
| µL | Microlitro |

SUMÁRIO

| | | |
|------------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 17 |
| 2 | REVISÃO DE LITERATURA | 20 |
| 2.1 | Malária | 20 |
| 2.1.1 | QUIMIOTERAPIA ANTIMALÁRICA | 23 |
| 2.1.1.1 | Métodos para triagem de novos antimaláricos | 26 |
| 2.2 | A família Apocynaceae | 28 |
| 2.1.1 | GENERO <i>Himatanthus</i> | 30 |
| 2.2.2 | <i>Himatanthus articulathus</i> (Vahl) WOODSON | 34 |
| 3 | OBJETIVOS | 40 |
| 3.1 | Objetivo geral | 40 |
| 3.2 | Objetivos específicos | 40 |
| 4 | MATERIAL E MÉTODOS | 41 |
| 4.1 | Equipamentos | 41 |
| 4.2 | Solventes | 42 |
| 4.3 | Fases estacionárias | 43 |
| 4.4 | Material plástico e vidrarias | 43 |
| 4.5 | Reveladores utilizados na prospecção fitoquímica por cromatografia em camada delgada (CCD) | 44 |
| 4.5.1 | ANISALDEÍDO SULFURICO (AS) | 44 |
| 4.5.2 | CLORETO DE ALUMÍNIO 2% | 44 |
| 4.5.3 | REAGENTE DRAGENDORFF | 44 |
| 4.5.4 | FERROCIANETO DE POTÁSSIO A 1% E CLORETO FÉRRICO A 2% | 44 |
| 4.5.5 | HIDRÓXIDO DE POTÁSSIO A 5% | 45 |
| 4.5.6 | REATIVO KEEDE | 45 |
| 4.5.7 | REAGENTE LIEBERMANM BOUCHARD | 45 |
| 4.6 | Material de cultivo e atividade antiplasmodica | 45 |
| 4.6.1 | MEIOS DE CULTIVO: MEIO RPMI 1640 (ROSWELL PARK MEMORIAL INSTITUTE) E MEIO COMPLETO | 45 |
| 4.6.2 | SOLUÇÕES UTILIZADAS NO DESCONGELAMENTO DO PARASITO | 46 |
| 4.6.2.1 | Solução A: cloreto de sódio a 12% (p/v) | 46 |
| 4.6.2.2 | Solução B: cloreto de sódio a 1,6% (p/v) | 46 |
| 4.6.2.3 | Solução C: cloreto de sódio glicosado | 46 |
| 4.6.2.4 | Solução utilizada na sincronização do parasito | 46 |
| 4.6.3 | SOLUÇÃO DE CONGELAMENTO DO PARASITO | 47 |
| 4.6.3.1 | <i>Glycerolyte</i> | 47 |
| 4.6.4 | COLORAÇÃO DE GOTA ESPESSA E ESFREGAÇO | 47 |
| 4.6.4.1 | Solução estoque de Giemsa | 47 |
| 4.6.4.2 | Água tamponada (pH 6.8) | 47 |
| 4.6.4.3 | Azul de metileno | 47 |
| 4.6.5 | REAGENTES PARA A REALIZAÇÃO DO TESTE ANTIPLASMÓDICO | 48 |
| 4.6.5.1 | Reagente MALSTAT | 48 |
| 4.6.5.2 | Reagente NBT/PES | 48 |
| 4.6.6 | MATERIAL BIOLÓGICO | 48 |

| | | |
|------------|---|------------|
| 4.6.6.1 | Clone de <i>Plasmodium falciparum</i> | 48 |
| 4.6.6.2 | Plasma e hemácias humanos | 48 |
| 4.6.7 | MATERIAL VEGETAL | 49 |
| 4.7 | Métodos | 50 |
| 4.7.1 | PREPARO DO EXTRATO ETANÓLICO | 50 |
| 4.7.2 | FRACIONAMENTO DO EXTRATO ETANÓLICO DAS CASCAS DE <i>Himatanthus articulatus</i> (EEHS) POR RE-EXTRAÇÃO COM SOLVENTES DE POLARIDADE CRESCENTES | 51 |
| 4.7.3 | FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DO EXTRATO ETANÓLICO DE <i>Himatanthus articulatus</i> POR CROMATOGRAFIA EM COLUNA CROMATOGRÁFICA | 52 |
| 4.7.4 | FRACIONAMENTO DO EXTRATO ETANÓLICO POR CROMATOGRAFIA EM COLUNA ABERTA DE SÍLICA GEL | 53 |
| 4.7.5 | OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES ALCALOÍDICAS | 54 |
| 4.7.6 | PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA | 56 |
| 4.7.6.1 | Detecção de polifenóis e taninos | 57 |
| 4.7.6.2 | Detecção de saponinas | 57 |
| 4.7.6.3 | Detecção de esteroides e terpenos | 57 |
| 4.7.6.4 | Detecção de alcaloides | 58 |
| 4.7.6.5 | Detecção de geninas flavônicas | 58 |
| 4.7.6.6 | Detecção de heterosídeos flavônicos | 58 |
| 4.7.6.7 | Detecção de geninas antracênicas e naftoquinônicas | 58 |
| 4.5.6.8 | Detecção de heterosídeos antracênicos | 59 |
| 4.5.6.9 | Detecção de heterosídeos cardiotônicos | 59 |
| 4.5.6.10 | Detecção de cumarinas | 59 |
| 4.7.7 | ANÁLISES POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA A DETECTOR DE ARRANJO DE DIODO (CLAE-DAD) | 60 |
| 4.7.7.1 | Condição cromatográfica 01 | 60 |
| 4.7.7.2 | Condição cromatográfica 02 | 61 |
| 4.7.8 | ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO | 61 |
| 4.7.9 | ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS | 62 |
| 4.7.10 | ANÁLISE POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR | 63 |
| 4.7.11 | DESCONGELAMENTO DA CEPA DO <i>Plasmodium falciparum</i> W2 | 63 |
| 4.7.12 | CULTIVO DO <i>Plasmodium falciparum</i> | 63 |
| 4.7.13 | DETERMINAÇÃO DA PARASITEMIA | 64 |
| 4.7.14 | CRIOPRESERVAÇÃO DO <i>Plasmodium falciparum</i> W2 | 64 |
| 4.7.15 | PREPARO DAS AMOSTRAS TESTE | 65 |
| 4.7.16 | AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPLASMÓDICA | 65 |
| 4.7.17 | AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS | 65 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 68 |
| 5.1 | Estudos fitoquímicos | 68 |
| 5.2 | Atividade antiplasmódica | 95 |
| 6 | CONCLUSÃO | 102 |
| 8 | REFERÊNCIAS | 103 |

1 INTRODUÇÃO

A malária é uma doença infecciosa que pode levar a óbitos se não tratada corretamente. É causada por protozoário do gênero *Plasmodium*, que é transmitido ao homem por vetores do gênero *Anopheles*. Existem cinco espécies patogênicas para o homem: *P. falciparum* descoberta por Welch em 1897; *P. vivax* descoberto em 1890 por Grassi e Faletti; *P. ovale* descoberto por Stephens em 1922; *P. malariae* citado pela primeira vez em 1881 por Laveran; e *P. knowlesi* descoberto por Franchiti em 1927, sendo que esta última também acomete primatas (WHO, 2013).

Estima-se que no mundo 3,4 bilhões de pessoas encontravam-se em risco de contrair a doença que, em 2012, ocasionou 207 milhões de casos com cerca de 627 mil mortes, tornando-se a maior causa de óbito entre mulheres grávidas e crianças menores de 5 anos na África Subsaariana. É um dos maiores problemas de saúde pública nas regiões endêmicas, já que infecta principalmente em locais com baixo Índice de Desenvolvimento Humano (WHO, 2013).

No Brasil, a malária ocorre quase que exclusivamente na região Amazônica, principalmente nos Estados do Amazonas e Pará (65% das notificações). Em todo país, no ano de 2012, foram confirmados 241.418 casos e um total de 60 mortes. Na região Amazônica brasileira, podem ser encontrados as espécies *P. vivax* (83%), *P. falciparum* (16%) e raramente *P. malariae*. Esses números ocorrem devido, principalmente, à precariedade de saneamento nas cidades, processo migratório na Amazônia, reforma agrária, desmatamento para exploração da madeira, enfim, invasão do homem no espaço onde vive o vetor (BRASIL, 2014).

O principal objetivo do tratamento medicamentoso da malária é atingir as formas eritrocíticas do protozoário, pois esta etapa é responsável pelo aparecimento dos sintomas da doença. O maior problema relacionado ao tratamento da malária se dá ao fato de o parasito, principalmente o *P. falciparum*, espécie de maior virulência dentre as cinco espécies patogênicas ao homem, ter apresentado, em diversos países, resistência às drogas utilizadas no tratamento. Com isso, a OMS aconselha a pesquisa urgente de novos fármacos antimaláricos (WHO, 2013; GUIGUEMDE et al., 2010).

A história de descoberta do primeiro fármaco antimalárico se fundamentou no uso de planta pelos índios peruanos, obtendo-se o primeiro fármaco a quinina (1;

PELLETIER; CAVENTOU, 1820), um alcaloide extraído de planta *Cinchona sp.* A partir do gênero *Tabebuia sp.* isolou-se o lapachol (MIRAGLIA, 1991) que serviu como protótipo para a síntese da atovaquona (2; MIRAGLIA, 1991) Outro fármaco antimalárico isolado da *Artemisia annua* foi a artemisinina (3; QINGHAOSU ANTIMALARIAL COORDINATING RESEARCH GROUP, 1979).

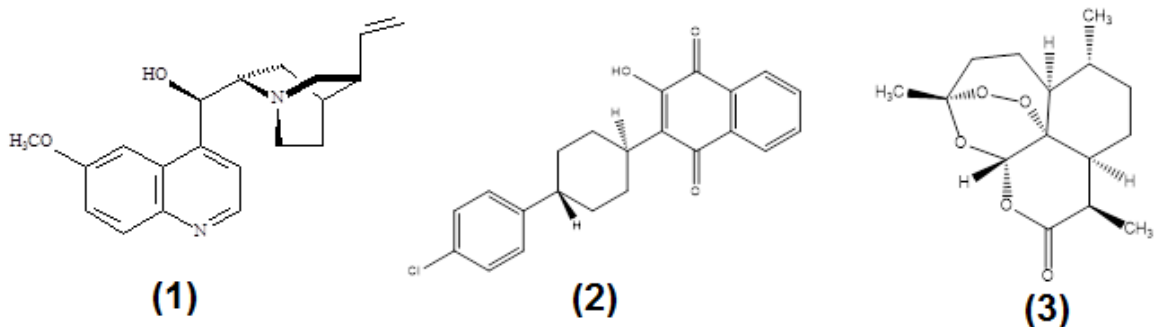


Figura 01: Estruturas químicas da quinina (1), da atovaquona (2) e da artemisinina (3)

No Brasil existe mais de uma centena de plantas utilizadas popularmente para o tratamento da malária e doenças febris (BRANDÃO et al., 1991; MILLIKEN, 1997). Porém a maioria destas plantas não foram submetidas a nenhum tipo de avaliação de atividade antimalárica. Algumas destas espécies possuem estudos fitoquímicos preliminares que revelaram estruturas químicas com grande potencial para esta atividade. Um exemplo é a *Himatanthus articulatus* (Vahl) Woodson, utilizada popularmente para o tratamento da malária (MILLIKEN, 1997), da qual contém predominantemente os iridóides plumierídeo, isoplumierídeo, plumericina e isoplumericina (SILVA et al. 1998; SILVA et al., 2007; BARRETO et al., 2007), derivados do cinamato (SILVA et al., 1998) e composto fenólicos (SILVA et al., 2010; MORAGAS, 2006).

Em trabalho anterior avaliou-se a atividade antimalárica, em camundongos *Mus musculus* albinos Swiss infectados com *P. berghei*, do extrato etanólico obtido de cascas de *H. articulatus*. Como resultado obteve-se uma redução da parasitemia, malondialdeído, nitrito-nitrato pulmonar e cerebral (VILHENA, 2012). Porém, neste estudo não foi avaliado a atividade em cepas infectantes ao homem e não

confirmada qual a substância química da planta responsável pela redução da parasitemia.

Por isso, novos estudos devem ser realizados para que avaliem atividade em cepa de *P. falciparum*, bem como verificar a substância responsável por essa atividade. Assim, o presente estudo se justifica em dados etnobotânicos, no qual populações utilizam essa planta com finalidade terapêutica para malária, bem como trabalho preliminar que avaliou atividade antimalárica em *P. berghei*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Malária

A malária foi descrita em meados de 1880 por um médico militar francês chamado Charles Louis Alphonse Laveran. Acreditava-se ser transmitida por gases nocivos oriundos de pântanos, por isso o nome malária, que quer dizer mal ar e é caracterizada por febres paroxísticas (RICH; XU, 2011).

Essa doença põe em risco cerca de 3,4 bilhões de pessoas em todo mundo. No ano de 2012 foram 207 milhões de casos, que ocasionou aproximadamente 627 mil mortes, das quais 80 % somente na região da África Subsaariana, destas 77% dos casos letais acometeram crianças menores de 5 anos de idade (WHO, 2013).

No Brasil, a maioria das pessoas acometidas pela doença são principalmente ribeirinhos da região Amazônica, ou pessoas que visitam esta região. O número de casos de malária no país aumentou consideravelmente a partir de 1980, com a ocupação desordenada da Amazônia, seja por construção de hidrelétricas, garimpos, construção de estradas, registrando-se 169.871 casos, um número três vezes maior que na década anterior, já que em 1970 foram registrados 52.469 casos. Porém, a partir da década de 1990 foram realizados investimentos no combate à doença, observado-se redução gradativa no número de casos notificados (BRASIL, 2010).

Entre Janeiro a Outubro de 2011, foi observado uma redução de aproximadamente 23% dos casos de malária em relação ao mesmo período de 2010. O número total de notificações foi de 217.298 em 2011 e no mesmo período de 2010 foram registradas 281.586. As internações também diminuíram entre os meses de janeiro a setembro de 2010 em comparação ao mesmo período de 2011, representando redução de 17%. O número de internações passou de 3.859 em 2010 para 3.215, em 2011, isto graças aos investimentos em prevenção da doença, como a doação de mosquiteiros com inseticidas para a população afetada em área de risco (BRASIL, 2012). No ano de 2012 foram registrados um total de 241.418 casos da doença, que ocasionou um total de 60 mortes (BRASIL, 2014)

A meta global era de reduzir a doença em 77% dos casos até o ano de 2015, para isso foram realizados investimentos no diagnóstico, controle e tratamento.

Estas estratégias diminuíram o número de casos e mortes, mas permanece distante da meta estipulada. Os fatores que tem dificultado o alcance da meta são: falta de uma vacina eficaz, a resistência dos vetores aos inseticidas e a resistência do parasito aos fármacos (WHO, 2013).

O ciclo biológico da malária foi descrito apenas em 1900 por Ronald Ross, médico militar britânico. É um processo complexo e envolve dois hospedeiros para se completar: o hospedeiro vertebrado, na qual acontece reprodução assexuada (esquizogônica), e o vetor, mosquito fêmea do gênero *Anopheles sp.*, em que ocorre a reprodução sexuada (esporogônica; MURGATROYD, 1952).

O ciclo nos vertebrados (Figura 02) inicia com a inoculação de formas espozoítas do parasito através da saliva de mosquitos fêmeas do gênero *Anopheles* contaminados durante o repasto sanguíneo na derme do mesmo. Uma vez na corrente sanguínea, estes se direcionam para o fígado e se alojam nos hepatócitos, formando uma camada de proteção chamada vacúolo parasitóforo. Então, sofrem transformações e multiplicação por esquizogonia convertendo-se em merozoítos (ciclo extra eritrocitário) que são liberados na corrente sanguínea (MILLER et al., 2002).

No ciclo extra eritrocitário, o *P. vivax* e *P. ovale* possuem uma característica particular, se convertem em formas dormentes conhecidas como hipnozoítas, que podem ficar durante meses ou anos nos hepatócitos e se não tratados corretamente podem ser liberados na corrente sanguínea causando novo episódio da doença (MURGATROYD, 1952).

Uma vez na corrente sanguínea, os merozoítas passam por um processo complexo entre parasito e hemácia, formando junções nas membranas permitindo a invasão dos eritrócitos (DVORAK et al., 1975; MILLER et al., 2002). Na hemácia os merozoítos se diferenciam e sofrem uma série de transformações morfológicas e estruturais e se convertem em trofozoíto jovem ou anel. O trofozoíto jovem sofre um processo de maturação, originando o esquizonte multinucleado, que rompe a célula, liberando merozoítas, que invadem novas células iniciando um novo ciclo celular (VOZA et al., 2012).

Alguns esquizontes, são convertidos para formas sexuadas conhecidas como gametócitos, os quais circulam na corrente sanguínea do hospedeiro até a ingestão pelo mosquito vetor, dando início ao ciclo biológico no vetor, ciclo sexuado ou ainda, esporogônico (ALY et al., 2009).

No intestino do flebotomíno os gametócitos se convertem em gametas feminino (macrogameta) e masculino (microgameta) e aí se reproduzem formando o zigoto. Este, por um processo de meiose, se converte a uma nova forma conhecida como oocineto, munida de motilidade, a qual consegue atravessar as células do intestino. Na membrana basal do mesmo, transformam-se novamente e formam o oocisto, onde permanece até sua transformação final em esporozoíto, os quais migram para as glândulas salivares do mosquito e são inoculadas no repasto sanguíneo dando origem a um novo ciclo biológico (THATHY et al., 2002).

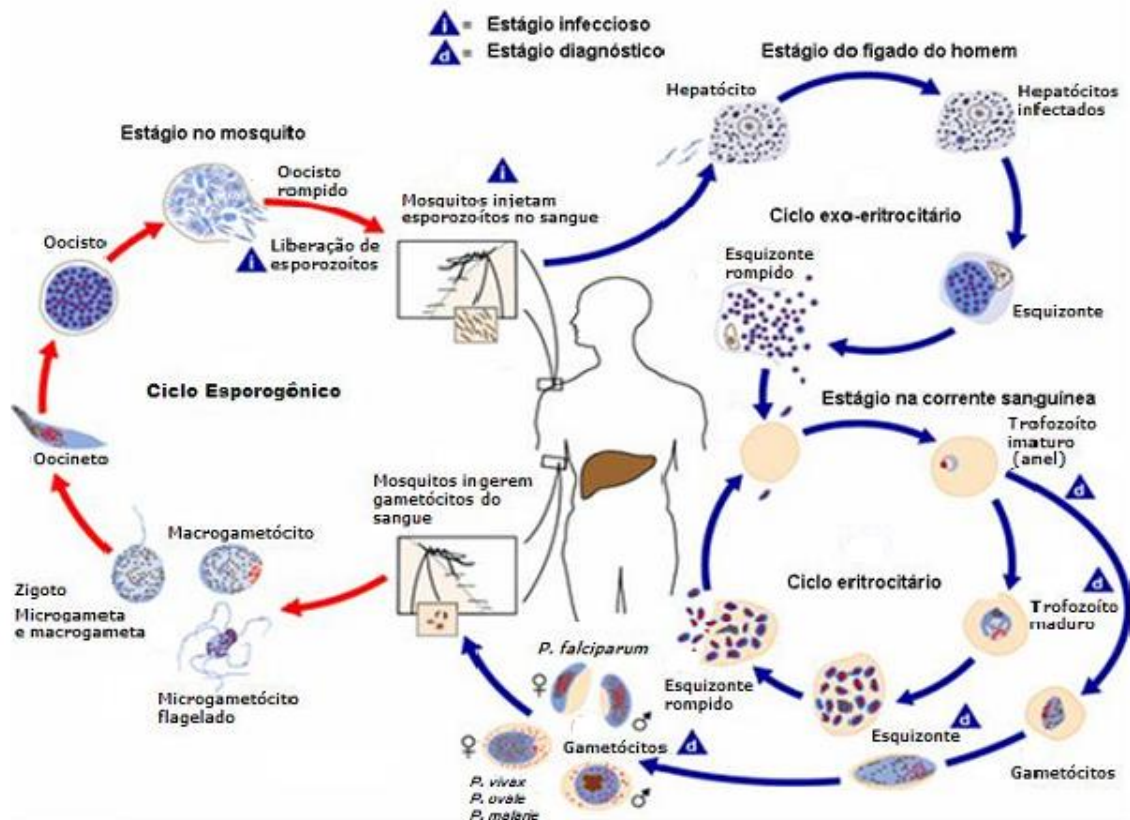


Figura 02: Ciclo biológico do *Plasmodium*

Fonte: adaptado CDC, 2014 <http://www.cdc.gov/malaria/about/biology/>

O quadro clínico da doença ocorre quando os esquizonte rompem o eritrócito e liberam juntamente com os merozoítas citocinas pró-inflamatórias, que ativam o sistema imunológico do indivíduo fazendo com que o mesmo tenha quadro febril e

calafrios, que pode vir acompanhado de cefaleia, mialgia, náusea e vômitos (COX, 2010).

Na malária grave, além da crise febril pode vir acompanhada por uma síndrome com hipoglicemia, problemas respiratórios acompanhados de edema pulmonar, falência renal, acidose metabólica, anemia grave e malária cerebral, que pode evoluir para óbito. Esse quadro grave da doença é ocasionado principalmente por *P. falciparum*, mas já se encontra relatos na literatura com *P. knowlesi* e até mesmo *P. vivax* (SCHOFIELD, 2007; GUTERRY et al, 2012).

2.1.1 Quimioterapia antimalárica

A quimioterapia antimalárica teve início no século XVII, quando jesuítas observaram que índios peruanos usavam plantas do gênero *Cinchona spp* (família Rubiaceae) para o tratamento de doenças febris. Nesta época a Condessa, esposa do vice-rei espanhol no Peru havia sido curada da febre por esta planta.

O estudo desse gênero levou ao isolamento da quinina (1), fármaco que até hoje é utilizado, como fármaco de segunda linha, no tratamento de malária grave (OLIVEIRA; SZCZERBOWSKI, 2009). Devido a toxicidade deste fármaco, outros antimaláricos sintéticos foram implementados no mercado, como a cloroquina (4) e mefloquina (5). A cloroquina apresenta diversas vantagens em relação à quinina, dentre elas: baixo custo e menor toxicidade ocasionando a maior adesão ao tratamento (FRANÇA et al., 2008).

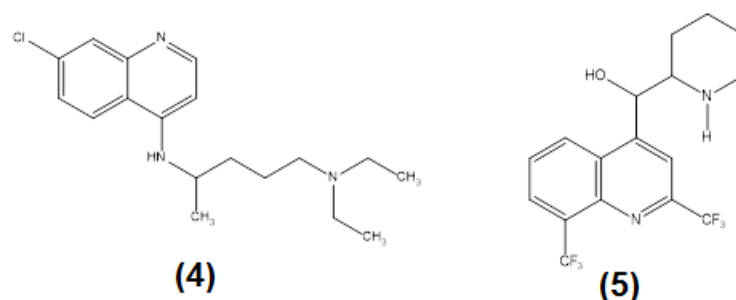


Figura 03: Estruturas químicas da cloroquina (4) e da mefloquina (5)

Os fármacos antimaláricos atuam, principalmente, no ciclo eritrocítico do parasita, assim evitam que formas trofozoítas jovens se convertam em esquizontes,

e assim impedem a crise febril e o quadro clínico da malária, além de romper o ciclo biológico do parasito (GREEWOOD et al., 2008).

No Brasil o tratamento da malária é feito por medicamentos distribuídos gratuitamente em todo território nacional pelo Sistema Único de Saúde (SUS). Seu objetivo primordial é impedir o ciclo sanguíneo do protozoário, evitando assim a esquizogonia sanguínea, morte dos parasitas teciduais (hipnozoítas) e morte das formas sexuadas (gametócito) do parasita (BRASIL, 2012).

A cloroquina, pertencente à classe das 4-aminoquinolinas, é um potente esquizonticida sanguíneo 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 mecanismo de ação da cloroquina envolve a inibição da polimerização do Heme, resultante na degradação da hemoglobina (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, na Guerra do Vietnã as forças armadas dos Estados Unidos observaram que os parasitas da malária eram resistentes a cloroquina. 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, um quinolinometanol, e o halofantrino, um fenantrenometanol (FOLEY e TILLEY, 1998). Os fármacos mais recentemente introduzidos foram a artemisinina (KLAYMAN, 1985) e a atovacona (BASCO, 2003).

Em 1972, foi isolado o sesquiterpeno artemisinina que é uma substância ativa da *Artemísia annua*, de uso milenar na China (cerca de 2000 anos) para o tratamento de febres, e esquizonticida sanguíneo (WIESNER et al., 2003). Derivados semi-sintéticos como artemeter, arteeter e artesunato de sódio 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).

A infecção por *P. falciparum*, que no Brasil representa cerca de 10% das infecções, deve ser tratada de forma mais atenta, devido ao fato de ser responsável

pela malária grave (malária cerebral) e ser a espécie mais propensa à resistência aos fármacos. Para tal a monoterapia nunca deve ser realizada, assim o Ministério da Saúde disponibiliza manual terapêutico, que no caso da malária por *P. falciparum* não complicada sugere o tratamento com artemeter e mefloquina, como segunda escolha o artesunato mais mefloquina ou ainda quinina com doxicilina (BRASIL, 2012).

Um dos principais problemas relacionados à malária é a resistência que o protozoário tem adquirido aos fármacos. Embora, não o único que apresenta resistência a fármacos, o *P. falciparum* é dentre as cinco espécies de Plasmódio a que tem apresentado esse fato de maneira mais intensa.

O primeiro caso de resistência foi registrado em 1910 com a quinina (que foi introduzida em 1632). A resistência tem sido observada em quase todas os fármacos em um intervalo de tempo cada vez menor, como a cloroquina, sintetizado a partir da quinina em 1945 e apresentado resistência em 1957; proguanil introduzido em 1948 e apresentado resistência um ano após sua inserção na terapia; sulfadoxina-pirimetamina inserido em 1967 e apresentado resistência no mesmo ano, assim como atovacona (inserido em 1996 e apresentado resistência no mesmo ano) e a Mefloquina utilizada a partir de 1977 e apresentado resistência em 1982 (WONGSRICHANALAI et al., 2002). Mais recentemente, até mesmo a artemisinina, o esquizonticida mais potente atualmente, tem se observado quadros de resistência, descrito no Camboja (NOELDL et al, 2008)

A resistência se dá, principalmente, por modificações no DNA do protozoário, como a troca na sequência de aminoácidos em diferentes códons e cromossomos. A resistência pode estar relacionada ao uso indevido dos fármacos (como concentração indevida ou monoterapia), características destes em si (como meia-vida longa que pode ocasionar em doses subterapêuticas), fatores do hospedeiro (imunidade), fatores do parasito, ou ainda fatores ambientais (WINSTANLEY, 2001).

Estudos evidenciaram que os fatores genômicos que ocasionam a resistência do parasito são diferentes dependendo do local e dos fatores anteriormente relatados. A resistência à cloroquina se dá por exemplo, em modificações no cromossomo 7 e 5 do parasito, em que a troca de aminoácidos na cadeia de DNA provoca alteração no local de ação desse medicamento impedindo a sua ação. A proteína PfCRT, envolvida no transporte de substâncias no vacúolo digestivo do protozoário, tem grande influência nessa resistência, assim como a troca de

aminoácidos no códon 76 do cromossomo 5 (troponina em lugar de lisina; PLEETER et al, 2010).

2.1.1.1 Métodos para a triagem de novos antimaláricos

A prospecção da atividade antimalárica de extratos vegetais e substâncias naturais ou sintéticas pode ser realizada por ensaios *in vivo* e *in vitro*. No primeiro caso, empregam-se animais na experimentação, enquanto que o segundo é realizado em culturas de *Plasmodium falciparum*. O primeiro teste *in vivo* foi descrito em 1947 e utilizava o *Plasmodium gallinaceum* em modelo aviário. Nesta avaliação foram testadas 600 espécies de 126 famílias, porém os resultados não foram satisfatórios, pois os extratos não tiveram êxito em modelo humano já que são diferentes filogeneticamente (PHILLIPSON, 2001).

Outro modelo *in vivo*, utilizado atualmente, emprega *Plasmodium berghei*, o qual apresenta em seu DNA semelhança bem próxima ao *Plasmódio* humano, tanto no aspecto filogenético quanto clínicos (MCCUTCHAN et al., 1984). Este modelo utiliza roedores no ensaio (camundongos ou ratos) e duas metodologias podem ser empregadas, 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 comumente e se baseava na administração de uma única dose da amostra a ser testada e verificava-se a sobrevivência dos animais (KINNAMON; ROTHE, 1975). Já no teste de supressão de quatro dias a amostra a ser testada é administrada aos animais por quatro dias consecutivos, avaliando-se a parasitemia sanguínea, permitindo ainda avaliar a toxicidade através do comportamento do animal e de testes toxicológicos específicos dos seus tecidos (NOGUEIRA, et al, 2010).

A pesquisa de novos antimaláricos tornou-se mais eficiente a partir de 1976, quando Trager e Jansen demonstraram que o *Plasmodium falciparum* (TRAGER; JANSEN, 1976) poderia ser cultivado continuamente e congelado. A partir do estabelecimento do cultivo contínuo do parasito, foram desenvolvidos métodos *in vitro* para avaliação da atividade antiplasmódica.

O primeiro teste *in vitro* para avaliação de atividade antiplasmódica, teve como objetivo avaliar o impedimento da conversão da forma trofozoito jovem (anel) em esquizonte e prossiga com o ciclo eritrocítico da doença. Esta técnica baseia-se na contagem direta dos parasitos em esfregaço sanguíneo corado por Giemsa

sendo que o percentual da parasitemia é avaliado após 72 horas do início do experimento. (RIECKMANN et al., 1978). A vantagem deste teste é o baixo custo e a facilidade de sua aplicação em laboratórios com poucos recursos, e dentre as desvantagens pode-se citar a exigência de um microscopista experiente que deve realizar a contagem, além da demora nos resultados devido a contagem ser um processo demorado. No entanto, ainda continua ser empregado por muitos grupos de pesquisa (NOGUEIRA, et al, 2010).

Em 1978, Desjardins e colaboradores desenvolveram o teste de incorporação de hipoxantina tritiada (3H-hipoxantina), também chamado de teste isotópico. Neste ensaio, os parasitos são incubados com as amostras por 42h, sendo que 18h após o início da incubação, acrescenta-se a hipoxantina tritiada na cultura. Esta é utilizada pelos parasitos viáveis na síntese de DNA e, por isso, é possível quantificar, em um leitor de radioatividade, a produção de DNA por parasitos viáveis (DESJARDINS et al., 1979). Esta técnica é considerada como padrão ouro para avaliação de atividade antiplasmódica, no entanto é dependente de equipamentos caros e sofisticados que impedem sua implementação rotineira, além de utilizar material radioativo que devem ser armazenados em local apropriado por 80 anos, e também, a necessidade de parasitemia elevada restringindo o uso rotineiro em muitos laboratórios de pesquisa (NOEDL et al., 2003)

As técnicas mais utilizadas ultimamente são aquelas que detectam proteínas do parasito, pois além de serem eficientes são menos prejudiciais ao ambiente, uma vez que não utiliza material radioativo, necessitam de uma parasitemia menor e já estão disponíveis no mercado kits para a realização desses ensaios. Dentre os vários tipos de proteínas avaliados por esses métodos a Lactato Desidrogenase do *P. falciparum* (*pLDH*) é muito utilizada. Essa técnica se fundamenta na redução da 3-acetilpiridina adenina dinucleotídio (APAD), uma coenzima semelhante ao NAD que é convertida a APADH. No kit vários reagentes colorimétricos são utilizados e consegue-se mensurar a produção de APADH por espectrofotometria e assim determinar a redução da parasitemia através de grupos controles positivo (hemácias infectadas e não tratadas) e negativo (hemácias não parasitadas). Makler e colaboradores (1993) descreveram essa metodologia que é semi-automatizada e necessita que o cultivo seja congelado e descongelado ao menos duas vezes para que lise as células e liberem, no meio, a enzima *pLDH* e se utiliza uma alíquota desse lisado no experimento. A enzima *pLDL* do parasito se diferencia da humana

por reduzir rapidamente a co-enzima APAD em APADH, enquanto que a humana faz isso lentamente. No ensaio, a *p*LDH é incubada com o substrato APAD e um sal tetrazolico (NBT - nitro blue tetrazolium) e a outros reagentes que são capazes de gerar um gradiente colorimétrico que indica a intensidade da reação entre os três compostos (*p*LDH, L-lactato e APAD) que é diretamente proporcional a quantidade de *p*LDH produzida pelos parasitos (MAKLER et al., 1993).

Outras enzimas do protozoário podem ser utilizadas no teste *in vitro* para a avaliação da atividade antiplasmódica, como por exemplo a *Histidine Rich Protein 2* (HRP2) produzida pelo *P. falciparum* que está associada ao desenvolvimento e multiplicação deste, servindo como indicador para refletir inibição do crescimento na medida de susceptibilidade à droga. A técnica que quantifica a produção de HRP2 é baseada na medida do aumento da proteína produzida pelo *P. falciparum* (PfHRP2) no curso de crescimento, desenvolvimento e multiplicação, em 72 horas de cultivo (DESAKORN et al., 1997). Técnicas mais sofisticadas também estão em experimentação, como o uso de proteínas fluorescentes marcadas e verificadas por citometria de fluxo (SANCHES et al., 2007).

2.2 A família Apocynaceae

Compreendida fitogeneticamente na ordem Gentianales e subclasse Asteridae, a família Apocynaceae é uma das mais numerosas das Angiospermas, constituída por espécimes dicotiledôneas bem evoluídas e, geralmente, caracterizadas pela presença de látex (RAPINI, 2000). São plantas de hábito variado, incluindo ervas, subarbustos, árvores e trepadeiras, sendo a maioria latescentes (JUDD et al., 2009).

A família Apocynaceae abrange aproximadamente 355 gêneros e 3700 espécies, estando predominantemente distribuída nas regiões tropicais e subtropicais; poucos gêneros são encontrados em regiões temperadas (JUDD et al., 2009). Aproximadamente 95 gêneros e 850 espécies são conhecidas no Brasil (SOUZA; LORENZI, 2008), ocorrendo em diferentes formações, como as Florestas Pluviais Amazônica, Atlântica e de Tabuleiro, Floresta Seca, Restinga, Cerrado e Caatinga (QUINET, ANDREATA, 2005).

Plantas desta família são conhecidas por fornecer substâncias utilizadas para o tratamento de doenças. Como exemplo têm-se membros do gênero *Rauwolfia*, da

qual mais de trinta alcaloides são utilizados hoje, como ajimalina, ajmalina, serpentina, reserpina, entre outros. Dos gêneros *Vinca* e *Catharanthus* alguns alcaloides foram isolados e são utilizados como antineoplásicos, destacando-se majdina, vimblastina e vincristina (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002)

Avaliação de atividade antiplasmódica foi realizada com plantas desta família como, por exemplo, no trabalho de Chierrito e colaboradores (2014), com extratos, frações alcalóidicas e alcaloides isolados de *A. olivaceum*. Observou-se que os melhores resultados foram para o alcaloide aspidoscarpina com CI_{50} de 5,4 $\mu\text{g/mL}$, revelando grande potencial dessa planta como antimalárico. Em outro trabalho, realizado com as cascas e folhas da mesma planta, os extratos etanólico e diclorometânico das folhas apresentaram CI_{50} de 7,0 $\mu\text{g/mL}$ para o clone W2 do *P. falciparum*, ao passo que os melhores resultados foram para os extratos diclorometânicos das cascas e madeira do tronco ($CI_{50} < 6,0 \mu\text{g/mL}$), os autores concluem que esses resultados são atribuídos, possivelmente aos alcalóides que, geralmente possuem média polaridade, e possivelmente estavam na fração diclorometânica das cascas e tronco, já que são produzidos, geralmente, nas folhas e armazenados no tronco (DOLABELA et al., 2012)

No mesmo trabalho, Dolabela e colaboradores (2012) avaliaram a atividade antiplasmódica de outras espécies de *Aspidosperma*, como *A. ramiflorum*, que apresentou melhor resultado para sua fração diclorometânica tanto das cascas como das folhas, com $CI_{50} < 6,0 \mu\text{g/mL}$; *A. spruceanum* também mostrou bom resultado para a fração diclorometânica das cascas ($CI_{50} < 6,0 \mu\text{g/mL}$); de *A. tomentosum* foram avaliados extratos etanólicos de diferentes partes da planta (CI_{50} folha: 23,7 $\mu\text{g/mL}$, fruto 20,5 $\mu\text{g/mL}$, tronco 26,5 $\mu\text{g/mL}$; sementes: 24,5 $\mu\text{g/mL}$) e todos os resultados foram considerados moderadamente ativos.

O gênero *Himatanthus* ainda é pouco estudado em experimentos antimaláricos (KVIST et al., 2006), porém por sua composição química, rica em triterpenos e iridóides, precursores de alcaloides, pode fornecer substâncias com esta atividade (BARRETO et al., 1998).

2.2.1 O GÊNERO *Himatanthus*

Inicialmente, o gênero *Himatanthus* foi classificado como *Plumeria*. Somente em 1938, Woodson observou que alguns espécimes de *Plumeria* apresentavam características morfológicas que as diferiam das demais espécies deste gênero. A partir deste estudo, surgiu o gênero *Himatanthus* (WOODSON, 1938).

Até aquele momento o gênero contava 7 espécies: *H. attenuatus* (Benth) Woodson, *H. bracteatus* (A.DC.) Woodson, *H. lancifolius* (Mull.Arg) Woodson, *H. obovatus* (Mull.Arg.) Woodson, *H. phagedaenicus* (Mart.) Woodson, *H. sucuuba* (Spruce) Woodson e *H. articulatus* (Vahl) Woodson (WOODSON, 1938).

Em 1991, uma revisão foi feita por Plumel subdividiu o gênero em dois subgêneros. O subgênero *Obovatae* com as espécies: *H. obovatus* (Muell.Arg.) Woodson, *H. drasticus* (Mart.) Plumel, *H. fallax* (Muell. Arg) Plumel, *H. articulatus* (Vahl) Woodson, *H. sucuuba* (Spruce) Woodson, *H. taraponensis* (Schumman ex Markgraf) Plumel; e o subgênero *Lanceolatae* com as espécies: *H. stenophyllus* Plumel, *H. lancifolius* (Muell. Arg) woodson, *H. phagedaenicus* (Mart.) Woodson, *H. speciosus* (Muell.Arg.) Plumel, *H. bracteatus* (A.DC.) Woodson, *H. semilunatus* Markgraf e *H. attenuatus* (Benth) Woodson. Esta classificação em subgêneros foi realizada com base na morfologia das folhas (PLUMEL, 1991).

A última revisão para o gênero foi feita em 2003 por Spina na qual, algumas espécies da classificação de Plumel foram consideradas sinônimos, ficando então nove espécies para o gênero: *Himatanthus articulatus* (Vahl) Woodson, *Himatanthus attenuatus* (Benth) Woodson, *Himatanthus bracteatus* (A. DC.) Woodson, *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel, *Himatanthus obovatus* (Mull Arg.) Woodson, *Himatanthus phagedaenicus* (Mart.) Woodson, *Himatanthus revolutus* (Huber) Spina & Kinoshita, *Himatanthus semilunatus* Markgr. e *Himatanthus tarapotensis* (Schum. Ex Markgr.) Plumel (SPINA, 2004).

Este gênero possui distribuição restrita, sendo nativo da América do Sul, ocorrendo desde o Panamá até o sudeste brasileiro, distribuindo-se principalmente na Amazônia, onde são utilizados terapeuticamente como antimaláricos, anti-inflamatórios, antiespasmódico, antisifilítico, entre outras, dependendo da espécie (SPINA, 2004). Vários estudos foram e continuam sendo realizados com plantas deste gênero.

Do látex de *H. drasticus*, foi identificado o acetato de lupeol (6), isolado através de coluna cromatográfica com sílica (fase estacionária) e eluída com solventes de polaridades crescentes. Esta substância foi submetida aos seguintes ensaios farmacológicos: teste da formalina, edema de pata, migração de neutrófilos em cavidade peritoneal, e atividade antioxidante *in vitro* por DPPH. No ensaio da formalina o acetato de lupeol (50 mg/kg) reduziu a inflamação nas duas fases, com ênfase na segunda (61 %). No edema de pata induzido o acetato de lupeol reduziu o edema em 49 % após 4 horas, na concentração de 20 mg/kg. A migração de neutrófilos foi inibida em 90 % na concentração de 20 mg/kg. Os resultados mostram que o acetato de lupeol possui atividade antiinflamatória e efeito nociceptivo. Em ensaio *in vitro* em DDPH o acetato de lupeol não apresentou efeito antioxidante nas concentrações de 50, 100 e 200 µg/mL (LUCETTI et al., 2010).

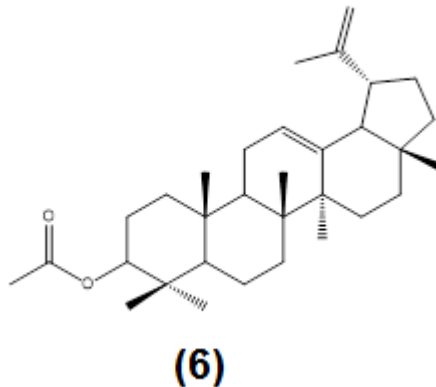


Figura 04: Estrutura química do acetato de lupeol (6)

Do extrato etanólico das raízes de *Himatanthus obovatus* (Mull Arg.) Woodson, foram isolados os iridóides plumericina (7) e isoplumericina (8; AMARAL et al., 2013). O extrato etanólico da raiz desta planta mostrou boa atividade em ensaio *in vitro* contra amastigotas de *T. cruzi* (IC₅₀ 15,7 µg/mL) e promastigotas de *L. donavani* (IC₅₀ 7,5 µg/mL; MESQUITA et al., 2005)

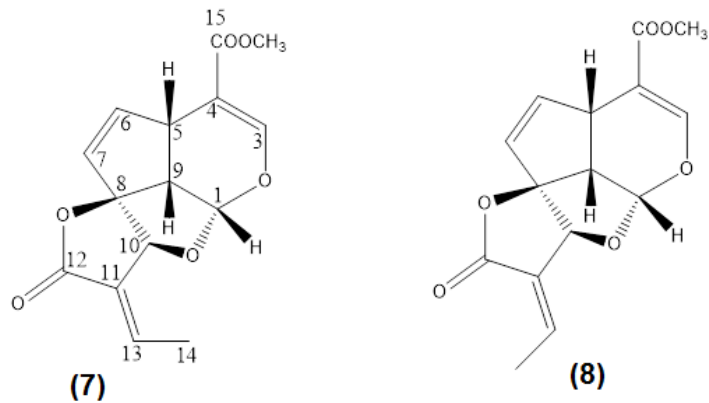


Figura 05: Estruturas químicas da plumericina (7) e da isoplumericina (8)

Himatanthus phagedaenicus (Mart.) Woodson teve o pó das raízes submetido a extrações sucessivas com hexano, clorofórmio e etanol, e seu extrato clorofórmico foi submetido a separação em coluna cromatográfica de sílica e eluída com solventes de polaridades crescentes fornecendo, após cristalização, o iridóide ácido β -diidroplumericina (9; VELOSO et al., 1999).

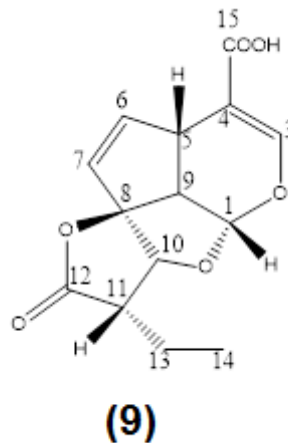


Figura 06: Estrutura química da β -diidroplumericina (9)

Embora não esteja incluído na última classificação botânica, *Himatanthus lancifolius* e, juntamente com *Himatanthus articulatus* são as espécies deste gênero mais investigadas tanto em fitoquímica quanto em farmacologia. Das cascas de *H. lancifolius* foram isolados os alcaloides uleína (10), desmetoxiaspidospermina (11; FRANÇA et al., 2000), ioimbina (12) e *epi*-uleína (13; SOUZA, 2008),

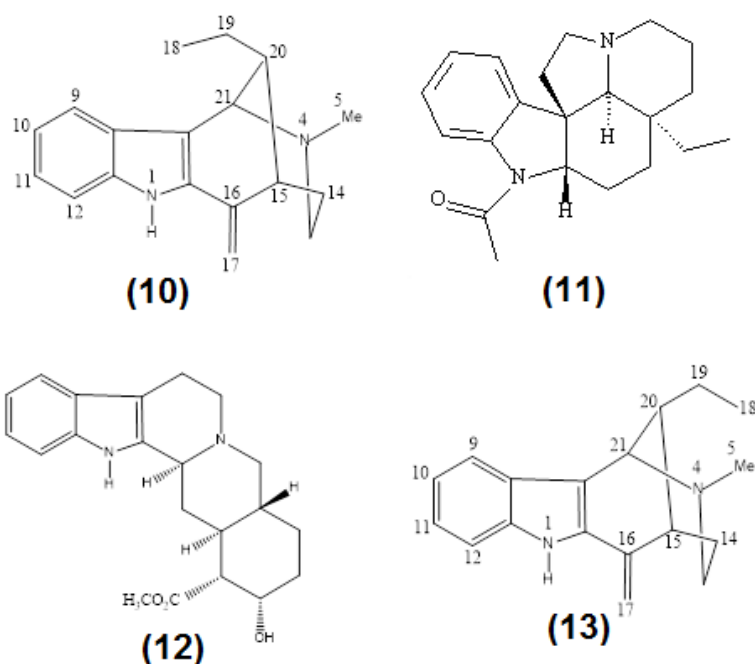


Figura 07: Estruturas químicas da uleína (10), da desmetoxiaspidospermina (11), da ioimbina (12) e da *epi*-uleína (13)

Foi a partir de *H. lancifolius* que, em 1870, na época denominada *Plumeria lancifolia*, Theodoro Peckolt isolou o seu componente majoritário, o iridóide plumierídeo (14), a que chamou de agoniadina. Este só teve sua estrutura definida, em 1958, por Halpern e Schmid. Até aquela época esta planta era considerada como uma das 10 mais promissoras plantas brasileiras para originar medicamentos de fontes naturais (SANTOS et al., 1998).

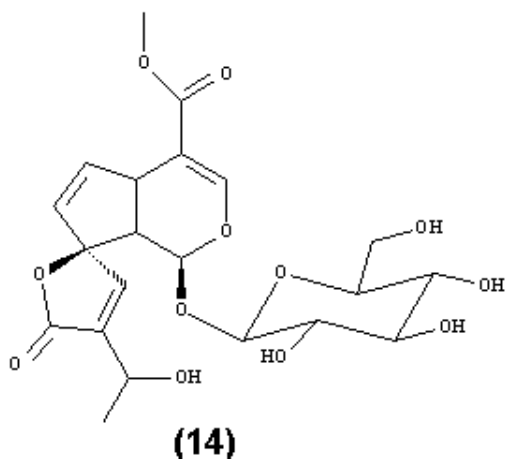


Figura 08: Estrutura química do plumierídeo (14)

Estudo da fração alcaloídica desta planta revelou que é capaz de antagonizar os efeitos das catecolaminas que ocasionam a contração da musculatura lisa na artéria aorta de ratos e, mostrou, também, que a mesma inativa o cálcio utilizado na resposta da contração, sendo portanto, um potente relaxante da musculatura lisa (RATTMANN et al., 2005)

A fração de alcaloides das cascas de *H. lancifolius* foi ativa contra bactérias gram-negativas e gram-positivas como *S. aureus*, incluindo cepas multirresistentes, *S. epidermidis*, *E. fecalis*, *E. coli*, *P. agglomerans* e *A. baumannii* e inativa contra *P. mirabilis*, *P. aeruginosa* e *M. morgani* (SOUZA et al., 2004).

Em outro estudo, Souza e colaboradores (2007) mostraram que a uleína (10) e a fração rica em alcaloides de *H. lancifolius* não agem como capturadores de radicais livres, por outro lado aumenta a produção de óxido nítrico em células endoteliais (RAEC). A fração alcaloídica desta planta foi testada contra células leucêmicas tumorais (Duadi, K-562 e KEH), mostrando-se efetiva contra essas linhagens e inerte a células normais de medula óssea, possuindo baixa toxicidade, revelando potencial citostático para células tumorais (LIMA et al., 2010).

2.2.2 *Himatanthus articulatus* (Vahl) WOODSON

Popularmente conhecida como súcuba, janaguba ou sucuuba esta espécie é encontrada na Bolívia, Panamá, Colômbia, Peru, Venezuela, Guiana, Suriname, Guiana Francesa e, no Brasil, ocorre nos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Roraima, Goiás e Mato Grosso (SPINA, 2004).

São árvores que podem atingir entre 10 m a 20 m de altura, apresentam troncos vultosos e casca gretada, folhas simples, alternas espiraladas, glabras, coriáceas e de margens inteiras, flores brancas em campânulas de base amarela, os frutos são fálicos verdes quando imaturos e marrom escuro quando maduros (LORENZI; MATOS, 2002).

Botanicamente, *H. articulatus* e *H. sucuuba* foram tratados como espécies diferentes, no entanto, em revisão do gênero estes passaram ser considerados como sinonímia. Atualmente, o nome aceito é *H. articulatus* (Vahl) Woodson tendo como sinonímia *H. sucuuba* (Spruce) Woodson (SPINA, 2004).

Em geral, o uso popular desta espécie está relacionado ao látex e ao decocto das cascas. Povos da Amazônia peruana e brasileira utilizam o látex e o decocto

das cascas para o tratamento da malária (MILLIKEN, 1997). Outros usos populares relatados são para o tratamento de afecções na pele, helmintíases, problemas estomacais, como úlceras, gastrites (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002), tumores (VAN DEN BERG, 1982), sífilis (GILBERT, 2006).

O extrato hexânico de *H. succuba* foi submetido ao fracionamento em coluna de sílica, utilizando eluentes de polaridades crescentes, isolando-se cinamato de lupeol (15), cinamato de α -amirina (16), cinamato de β -amirina (17), acetato de lupeol (6), plumericina (7), isoplumericina (8). Em síntese, foram isolados quatro cinamatos e dois iridoides. Os iridóides foram submetidos a avaliação antifúngica contra *Cladosporium sphaerospermum* pelo método de autobiografia, com resultado positivo ($< 1 \mu\text{g/mL}$), sendo a ação fungitóxica destas substâncias cinco vezes superior ao padrão de nistatina ($5 \mu\text{g/mL}$; SILVA et al., 1998).

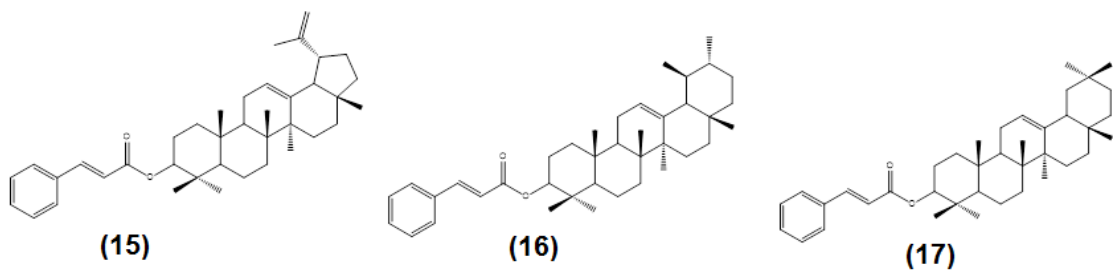


Figura 09: Estruturas químicas do cinamato de lupeol (15), do cinamato de α -amirina (16) e do cinamato de β -amirina (17)

Em outro trabalho, Silva e colaboradores (2007), a partir do fracionamento da infusão das cascas e do látex de *H. succuba* por HPLC preparativa (RP 18), eluída com fase móvel composta por metanol:água (1:1), conseguiram isolar e identificar como majoritário o iridoide plumierídeo (14) e seu isômero isoplumierídeo (18).

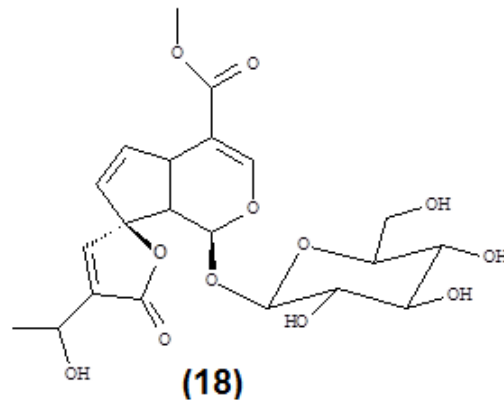


Figura 10: Estrutura química do isoplumerídeo (18)

A atividade antitumoral do extrato aquoso e frações clorofórmica, acetato de etila e butanólica de *H. articulatus* foi verificada em diferentes linhagens celulares (NCI-H460, HT-29, MCF-7, RXF-393, OVCAR-3 e NHI-3T3). O extrato bruto das cascas de *H. articulatus* foi ativo em apenas uma linhagem celular (NCI-H460), ao passo que a fração clorofórmica foi ativa em todas as linhagens testadas, a fração butanólica foi ativa em quatro linhagens (HT-29, MCF-7, RXF-393, OVCAR-3) e a fração acetato de etila mostrou-se ativa apenas contra uma linhagem (RXF-393), comprovando o uso popular contra tumores (REBOUÇAS et al., 2011).

O extrato etanólico da madeira de *H. sucuuba* foi submetido à avaliação da atividade antibacteriana por difusão em disco em Agar, sendo utilizada a concentração de 100 mg/mL, como concentração inicial de triagem. Foram utilizadas cepas de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus Capitis*, *Staphylococcus cohnii*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus lactis*, *Streptococcus pyrogenis*, *Streptococcus agalactiae*, *Clostridium histolyticum*, *Clostridium diphtheriae*, *Bacterioides fragilis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, e *Escherichia coli*. O extrato mostrou halo de inibição apenas contra *Clostridium histolyticum* e *Bacterioides fragilis*, porém devido, à alta concentração da amostra não foi considerado como antimicrobiano (NETO et al., 2002).

Em outro estudo, avaliou-se o potencial do extrato etanólico obtido das cascas de *H. sucuuba*, e substâncias isoladas (plumericina e isoplumericina) contra promastigostas e amastigotas de *L. amazonensis*. Na triagem inicial, os autores descreveram CI₅₀ de 5 µg/mL contra formas amastigotas e 20 µg/mL contra formas promastigotas. Estes resultados impulsionaram o isolamento dos constituintes

majoritários plumericina (7) e isoplumericina (8) que apresentaram CI_{50} com valores inferiores ao padrão de anfotericina B (CASTILLO et al., 2007).

Em trabalho etnobotânico foi avaliado o uso popular de plantas contra malária no Perú obtendo-se um total de 988 registros. Destas, os autores avaliaram 118 espécies contra *P. faciparum* (clone 3D7) pelo método isotópico *in vitro* (3H-hipoxantina) *H. succuba* foi relatada para o tratamento da malária e na avaliação laboratorial foi utilizado o extrato etanólico do córtex da planta em ensaios *in vitro*, e não se observou atividade inibitória do crescimento do *P. falciparum* sendo a $CI_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$ (KIVIST et al., 2006).

Em outro estudo, realizado com extrato etanólico de *H. articulatus* foi avaliado o potencial antimalárico *in vivo*, alterações oxidativas em camundongos, além da atividade aguda e subcrônica *in vivo* e avaliação da citotoxicidade *in vitro* em células HepG2 e em *Artemia salina*. O ensaio de citotoxicidade preliminar foi realizado *in vitro* com células HepG2 pela metodologia de MTT utilizado-se 4×10^5 células/100 μL por poço e 1000, 100, 10 e 1 $\mu\text{g/mL}$ do extrato por poço (VILHENA, 2012).

A toxicidade oral aguda e subcrônica foi avaliada em camundongos (*Mus musculus*) da linhagem Swiss (variação albina), e na avaliação da toxicidade oral aguda foram administradas doses de 5000, 500 e 50 mg/Kg, avaliando-se a morte dos animais, caso a cobaia não morresse com a maior dose, não seria necessária a administração de doses inferiores. Os animais permaneceram durante 14 dias em observação e foram avaliados hipocraticamente, considerando-se estado de consciência e disposição, atividade e coordenação do sistema motor, reflexos e atividade sobre o sistema nervoso central. Após esse período foi realizada a retirada dos órgãos dos animais para exames histopatológicos. A avaliação da toxicidade subcrônica foi realizada por 38 dias, com administração diária da dose de 5000 mg/Kg em 6 dias da semana. Após esse período, os animais sobreviventes tiveram seus parâmetros bioquímicos (triglicérides, colesterol total, aspartato transaminase-AST, alanina transaminase-ALT, gama-glutamilttransferase- γ -GT, proteínas totais, albumina, uréia e ácido úrico), hematológicos (hematograma e leucograma) e anátomo-histopatológico (pâncreas, fígado, cérebro, coração, pulmões e rins) avaliados. A avaliação da atividade antimalárica foi realizada com camundongos infectados com *P. berghei*, sendo o grupo tratado previamente com 200 mg/Kg do extrato etanólico por 10 dias e por mais 5 dias após a infecção, avaliando-se a

parasitemia so final do experimento. Após esse período os animais foram sacrificados, o cérebro e pulmões foram retirados para avaliação antioxidante do extrato perante a malária. Essa avaliação foi realizada por determinação da capacidade antioxidante equivalente ao TROLOX (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-cromono-2-carboxílico), substância análoga à vitamina E, um antioxidante conhecido, proveniente da alimentação, avaliada por espectrofotometria; determinação da peroxidação lipídica pelo método MDA (malondialdeído) com ácido tiobarbitúrico; e determinação dos níveis de nitrito e nitrato, por espectrofotometria (VILHENA, 2012).

Como resultado final, o autor constatou que até a concentração utilizada, o extrato não apresentou citotoxicidade em células HepG2, com $CL_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$. No ensaio de toxicidade oral aguda *in vivo* não foi observada nenhuma alteração hipocrática ou morte durante ou após o período de utilização do extrato, como também não foram observadas alterações macroscópica ou microscópica nos tecidos avaliados. Na avaliação da toxicidade subcrônica, realizada por 14 dias, não foram observadas alterações hematológicas, bioquímicas ou histopatológicas significativas (VILHENA, 2012).

O extrato etanólico de *H. articulatus* reduziu significativamente a parasitemia dos animais testados em 35,44 % e nenhum animal morreu durante ou após o tratamento. Na avaliação dos níveis oxiativos verificou-se que o extrato etanólico diminuiu os níveis oxidativos, em todos os parâmetros avaliados (NN cerebral, NN pulmonar e MDA pulmonar). Com estes resultados o autor concluiu que o extrato etanólico de *H. articulatus* pode ser considerado com potencial antimalárico, tendo em vista a atividade antimalárica e os efeitos antioxidantes nos tecidos analisados, já que existem teorias que remetem o uso de antioxidantes como coadjuvantes no tratamento da malária (VILHENA, 2012).

Considerando-se o uso popular na malária e diversas outras nosologias, associada à comprovação em estudos *in-vivo/in vitro* em atividades diversas, além da baixa toxicidade e efeito antioxidante na malária murina, decidiu-se avaliar a atividade antiplasmódica do extato etanólico, frações e extratos alcaloidicos e substância isolada contra cepa de *P. falciparum* resistente a cloroquina (W2).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Realizar estudos fitoquímicos e de atividade antiplasmódica de *Himatanthus articulatus* (Vahl) Woodson frente ao *P. falciparum* clone W2.

3.2 Objetivos específicos

- Isolar e identificar o componente majoritário de *Himatanthus articulatus*;
- Obter frações ricas em alcalóides;
- Avaliar a atividade antiplasmódica do extrato etanólico e frações e produto isolado de *Himatanthus articulatus*.

4 MATERIAL E METODOS

4.1 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 da marca Núcleo
- Bomba de vácuo- Fabbe
- Bomba de vácuo modelo V700 (Buchi)
- Câmara de Ultravioleta de 254 e 365nm, Warning
- Capela de exaustão Quimis
- Capela de fluxo laminar Veco, mod. VLFS-12
- Centrífuga Fanem, mod. 205N
- Chapa aquecedora e agitadora Corning
- Chapa de aquecimento Quimis
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE-DAD), modalidade analítica, Waters®, 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
- Espectro de RMN Bruker Advance DPX 200
- Estufa ventilada para secagem de material vegetal Fanem, mod. 501^a
- Evaporador rotatório Buchi, modelo R 114, com banho-maria modelo 480
- Geladeira, Cònsul
- Leitora de microplacas- ELISA Stat Fax ®, mod. 2100
- Liofilizador
- Manta aquecedora
- Medidor de pH, Marconi, modelo PA200
- Microcentrífuga, Cientec, modelo 14000 D
- Micropipeta Transferpette - Brand, 8 canais, eletrônica, vol. ajustável de 10-200 µL

- Micropipetas Ependorff, vol. ajustável de 100 μ L - 1 mL
- Micropipetas Ependorff, vol. ajustável de 2 μ L - 20 μ L
- Microscópio óptico OLYMPUS
- Moinho de facas, Marconi
- Sistema de filtração de água Millipores, Milli-Q Plus
- Sistema de purificação de água Millipore, Milli-Q Plus
- Ultrason Thornton, mod. T14
- UPLC-PDA-MS/ESI marca WATERS ACQUITY[®] H-Class Core System

4.2 Solventes

- Acetato de etila (Isofar[®])
- Acetonitrila grau CLAE (Tedia Company[®])
- Ácido acético (Isofar[®])
- Ácido clorídrico (Isofar[®])
- Ácido fórmico (Isofar[®])
- Ácido fosfórico (Isofar[®])
- Ácido sulfúrico (Isofar[®])
- Água deionizada (filtrada em sistema Milli-Qplus)
- Água destilada
- Clorofórmio (Isofar[®])
- Diclorometano (Isofar[®])
- DMSO (Sigma Aldrich[®])
- Etanol (Souza Cruz[®])
- Éter etílico (Isofar[®])
- Hidróxido de amônio (Isofar[®]);
- Metanol (Isofar[®])
- Metanol-D4 deuterado (Merck[®])
- Metanol grau CLAE (Tedia Company[®])
- Metiletilcetona (Isofar[®]);
- n-hexano (Isofar[®])
- Tolueno (Isofar[®]);

4.3 Fases estacionárias

- Coluna de fase reversa RP 18 (5 μ M) 12,5 cm LiChrocart 125-4 (Merck Millipore®)
- Sílica gel 60 (0,063 – 0,200 mm) para coluna cromatográfica (Merck)
- Sílica gel 60 para cromatografia de camada delgada Flash (Merck)
- Sephadex LH 20

4.4 Materiais plástico e vidrarias

- Balões de fundo redondo de 100, 250 e 500 mL
- Bastão de vidro
- Béqueres de 10, 50, 100, 500 e 1000 mL
- Coluna cromatográfica de vidro 100 x 2,5 cm
- Condensador em bolas
- Cubas cromatográficas
- Cubas de vidro Pirex para banho de gelo
- Erlenmeyers de 50, 100, 250 e 500 mL
- Espátulas de metal
- Frascos Eppendorf, Sigma Chemical Company
- Frascos de penicilina 50 mL
- Funis de separação de 250 mL e 2000 mL
- 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
- 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 Merck contendo gel de sílica 60 F254
- Placas cromatográficas de vidro 10 x 5 e 10 x 10cm

- Ponteiros de 10 a 1000µl e de 20 a 200µl
- Provetas 5, 20, 50, 100, 500 e 1000 mL
- Tubos Falcon 15, 50 mL
- Tubos vial para CLAE

4.5 Reveladores utilizados na prospecção fitoquímica por cromatografia em camada delgada (CCD)

4.5.1 ANISALDEÍDO - ÁCIDO SULFÚRICO (AS)

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).

4.5.2 CLORETO DE ALUMÍNIO 2%

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

4.5.3 REAGENTE DRAGENDORFF

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

4.5.4 FERRICIANETO DE POTÁSSIO A 1% E CLORETO FÉRRICO A 2%

Solubilizou-se 0,25 g de ferricianeto de potássio em 25 mL de água destilada, obtendo solução A. 1g de cloreto férrico foi solubilizado em 25 mL de água

destilada formando a solução B. As soluções A e B foram armazenadas sob refrigeração em frasco âmbar e no momento do uso foram misturadas na proporção de 1:1 (WAGNER et al., 1984).

4.5.5 HIDRÓXIDO DE POTÁSSIO A 5%

Pesou-se 2,5 g de hidróxido de potássio e solubilizou-o em 50 mL de metanol. A solução foi armazenada em frasco âmbar sob refrigeração (2-8 °C; WAGNER et al., 1984).

4.5.6 REATIVO KEEDE

Foram utilizados 0,5 g de ácido 3,5-dinitrobenzóico em 25 mL de metanol e 2 g de hidróxido de sódio (NaOH) em 25 mL de água destilada sob banho de gelo. As soluções foram misturadas na proporção de 1:1, no momento do uso (WAGNER et al., 1984).

4.5.7 REAGENTE LIEBERMANM-BURCHARD

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

4.6 Material de cultivo

4.6.1 MEIOS DE CULTIVO: MEIO RPMI 1640 (ROSWELL PARK MEMORIAL INSTITUTE) E MEIO COMPLETO

A solução estoque (meio incompleto) foi preparada em frascos de Erlenmeyer solubilizando 50 mg de hipoxantina, por meio de aquecimento a 40 °C, em 400 mL de água deionizada. Após completa solubilização da hipoxantina, desligou-se o aquecimento e em temperatura ambiente solubilizou na solução 40 mg de gentamicina, 300 mg de glutamina, 2 g de bicarbonato de sódio, 2 g de D-glicose (dextrose), 5,98 g do tampão HEPES e acrescentou 10,4 g do pó de RPMI 1640

(sem bicarbonato de sódio e com L-glutamina) em constante agitação até completa dissolução. Após esse processo, transferiu-se para um balão volumétrico de 1000 mL e completou-se o volume com água deionizada, ajustou-se o pH para 7 e filtrou-se em sistema de filtro ao vácuo com membrana de 0,22 ou 0,44 μm em fluxo laminar e estocou-se em geladeira a 4°C (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO).

Para o descongelamento do parasito foi utilizado meio completo suplementado com 20% de plasma até a normalização da parasitemia em 5%. Para o cultivo foi utilizado o meio RPMI completo, o qual foi preparado suplementando o meio RPMI estoque com 10% de plasma humano inativado (grupo sanguíneo do tipo A⁺).

4.6.2 SOLUÇÕES UTILIZADAS NO DESCONGELAMENTO DO PARASITO

4.6.2.1 Solução A: cloreto de sódio a 12% (p/v)

Dissolveu-se o cloreto de sódio (6 g) em água deionizada (q.s.p. 50 mL), filtrou-se a solução em membrana de 0,22 μm e estocou-se a 4 °C.

4.6.2.2 Solução B: cloreto de sódio a 1,6%

A solução B foi preparada dissolvendo-se 1,6 g de cloreto de sódio em água deionizada (q.s.p. 100 mL). A solução foi filtrada em membrana de 0,22 μm e estocada a 4 °C.

4.6.2.3 Solução C: cloreto de sódio glicosado

O cloreto de sódio (0,9 g) e a glicose (0,2 g) foram dissolvidos em água deionizada (q.s.p. 100mL). Esta solução foi filtrada em membrana de 0,22 μm e estocada a 4 °C.

4.6.2.4 Solução utilizada na sincronização do parasito

Para a sincronização do parasito utilizou-se uma solução aquosa contendo 5% de sorbitol e 0,5% de glicose. Esta solução foi filtrada em membrana de 0,22 μm e

estocada a 4 °C.

4.6.3 SOLUÇÃO DE CONGELAMENTO DO PARASITO

4.6.3.1 *Glicerolyte*

Em erlenmeyer foi misturado 285,4 g de glicerina, 15,6 g de lactato de sódio, 0,186 g de KCl, 500mL de água ultra pura. O pH foi ajustado para 9,0 com NaHCO₃. A solução foi armazenada em GELADEIRA (2-8 °C). Para uso foi utilizado a proporção de uma parte de *glicerolyte* para cada parte de cultivo.

4.6.4 COLORAÇÃO DE GOTA ESPESSA E ESFREGAÇO

4.6.4.1 Solução estoque de giemsa

Dissolveu-se 1 g de Giemsa em 54 mL de glicerol, resfriou-se, adicionou-se 84 mL de metanol e deixou-se por 24h a 37 °C, com agitação. Filtrou-se e armazenou-se em vidro âmbar. Esta solução foi diluída, na proporção 1:20 em água tamponada (50 µL/ 1000 µL), antes de sua utilização.

4.6.4.2 Água tamponada (pH 6,8)

A água tamponada foi preparada solubilizando 9,3 g de fosfato de potássio monobásico; 10,84 g de fosfato de sódio dibásico hepta-hidratado em água destilada (qsp. 500 mL) homogeneizando, filtrando e armazenando em frasco próprio.

4.6.4.3 Azul de metileno

Triturou-se 1,0 g de azul de metileno, 1,0 g de fosfato potássio monobásico e 3,0g de fosfato de sódio dibásico heptaidratado. Desta mistura utilizou-se 1,0 g e dissolveu-se em 1000 mL de água deionizada, sendo então filtrado e armazenado em frasco apropriado protegido de iluminação.

4.6.5 REAGENTES PARA A REALIZAÇÃO DO TESTE ANTIPLASMÓDICO

4.6.5.1 Reagente MALSTAT

O reagente Malstat foi preparado solubilizando-se em 200 mL de água destilada: 400 mL Triton X-100, 4 g de L-lactato de sódio, 1,32g de Tris e 22 mg de 3-acetilpiridina adenina dinucleotideo (APAD). Todos os reagentes foram adquiridos de Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO.

4.5.5.2 Reagente NBT/PES

Este reagente foi preparado solubilizando em 100 mL de água destilada 160 mg de Nitro Blue Tetrazolium Salt (NBT) e 8 mg de etosulfato de fenazina (PES). Os reagentes também foram adquiridos de Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO.

4.6.6 MATERIAL BIOLÓGICO

4.6.6.1 Clones de *Plasmodium falciparum*

Para o teste da atividade antiplasmódica *in vitro*, foi utilizado o clone W2 do *Plasmodium falciparum* cedido pela Dr^a. Luzia Helena de Carvalho do Centro de Pesquisas René Rachou-CPqRR, FIOCRUZ, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. O clone é originário da Indochina, sendo resistente a cloroquina e sensível a mefloquina, mantido em cultivo contínuo em laboratório pela técnica do dessecador com vela (TRAGER; JANSEN, 1976)

4.6.6.2 Plasma e hemácias humanos

O plasma foi cedido pelo Banco de Sangue da Fundação Hemominas de Minas Gerais, Belo Horizonte – MG, proveniente de pacientes doadores do grupo sanguíneo A fator Rh positivo (A+), colhido com heparina e centrifugado a 1500 rpm/20 min. Antes da utilização o plasma foi inativado a uma temperatura de 50 °C por 30 minutos, em seguida armazenado em frascos de 15 mL de fundo cônico (Falcon) em alíquotas de 10 mL e congelados (-20°C).

As hemácias foram coletadas de doadores, sem que estes tenham recebido qualquer forma de benefício. Foi coletado mensalmente 80 mL de sangue de doador tipo A+. A coleta foi realizada seguindo as normas de biossegurança em tubos impregnados com heparina em sistema de vácuo.

Após esse processo o sangue foi transferido para tubo com fundo cônico (tubo Falcon) de 50 mL estéril, que foi centrifugado e o plasma descartado. A seguir, as hemácias foram lavadas em meio RPMI incompleto e centrifugado a 2500 rpm 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 volume de 50 mL e repetiu-se o procedimento anterior por mais duas vezes. Ao final, o sangue foi ressuspenso a 50% com meio RPMI incompleto 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.

4.6.7 MATERIAL VEGETAL

As cascas de *Himatanthus articulatus* (Vahl) Woodson foram coletadas no dia 26/04/2013, período da manhã, na região de Volta Grande do Xingu, em Belo Monte, Terra do meio, serra do Pardo, município de Altamira, Estado do Pará, nas coordenadas S 41°10'86" W 41°53'51,6", sendo identificadas pela Dra. Márlia Regina Coelho Ferreira. Uma exsicata (Figura 11) foi depositada no Museu Paraense Emílio Goeldi (João Murça Pires) sob o n° MG 206619.



Figura 11: Exsicata de *Hlmatanthus articulatus* (Vahl) Woodson

4.7 Métodos

4.7.1 PREPARO DO EXTRATO ETANÓLICO

As cascas de *H. articulatus* foram lavadas em água corrente e mergulhadas em álcool 70%, para retirada de impurezas e, posteriormente, secas em estufa com ventilação a ar forçado por 7 dias. Em seguida, triturou-se o material em moinho de facas, obtendo-se o pó das cascas do qual foi preparado o extrato etanólico para análise fitoquímica e teste biológico.

O extrato etanólico (EEHS) foi preparado por percolação descontínua exaustiva, utilizando-se 1000 g do pó das cascas da planta e etanol 92,8 INPI 96 °GL da marca Santa Cruz® como solvente extrator, gastando-se um total de 16 L nesse processo. O extrato foi recolhido diariamente por um período de 8 dias consecutivos. O extrato foi então concentrado em evaporador rotativo e durante este processo, formou-se um precipitado branco (EEHSP), conforme Figura 12, do qual se retirou uma alíquota (2 g) para realização da prospecção fitoquímica e atividade

antiplasmódica. Em seguida, o extrato seco foi liofilizado, obtendo-se, então, o extrato etanólico (EEHS) com um rendimento de 168,21 g (16,82%).



Figura 12: Precipitado (EEHSP) formando durante o preparo do extrato etanólico de *Himatanthus articulatus* (EEHS).

4.7.2 FRACIONAMENTO DO EXTRATO ETANÓLICO DAS CASCAS DE *Himatanthus articulatus* (EEHS) POR RE-EXTRAÇÃO COM SOLVENTES DE POLARIDADES CRESCENTES.

O extrato etanólico foi submetido à extração exaustiva utilizando um sistema de refluxo e solventes de polaridades crescentes (diclorometano, acetato de etila e metanol). Para tal, 20 g do extrato etanólico foram colocados em balão de fundo redondo, acrescentado o solvente (100 mL) e aquecendo-o (40°C) sob refluxo por 30 minutos. O procedimento foi repetido por 3 vezes em cada solvente, conforme Figura 13:

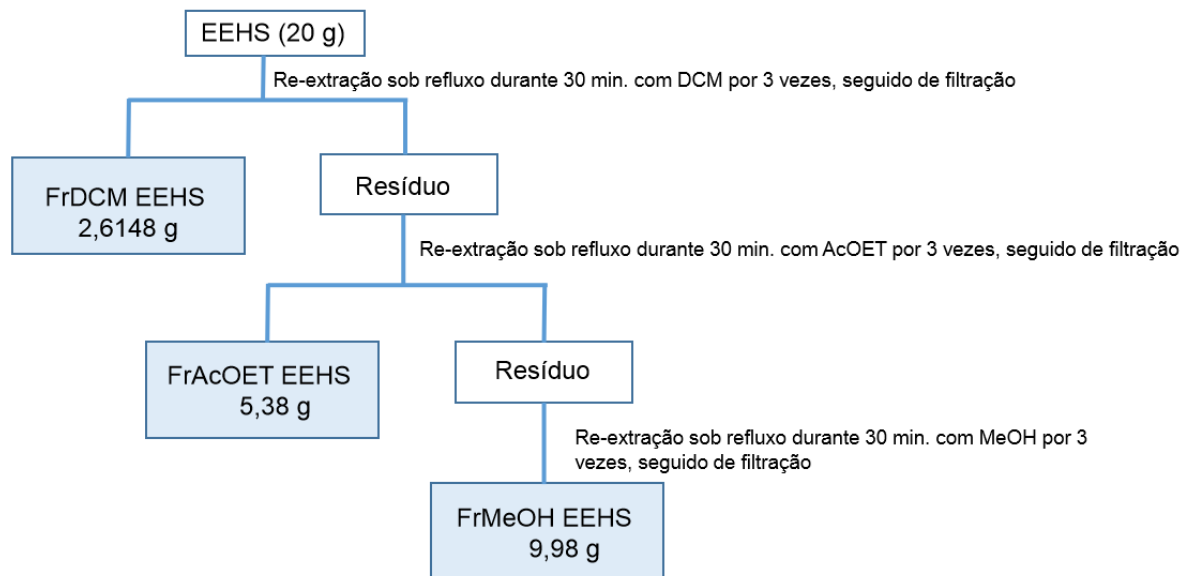


Figura 13: Fracionamento do extrato etanólico de cascas de *Himatanthus articulatus* com solventes de polaridades crescentes por re-extração sob refluxo.

Legenda: EEHS-extrato etanólico de *Himatanthus articulatus*; FrDCM EEHS-fração diclorometânica do extrato etanólico de *Himatanthus articulatus*; FrAcOET EEHS- fração acetato de etila do extrato etanólico de *Himatanthus articulatus*; FrMeOH EEHS-fração metanólica do extrato etanólico de *Himatanthus articulatus*; DCM-diclorometano; AcOET-acetato de etila; MeOH-metanol.

4.7.3 FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA POR CROMATOGRAFIA EM COLUNA CROMATOGRÁFICA

A fração acetato de etila (3,5 g) foi submetida a fracionamento em coluna cromatográfica (120 x 2,54 cm) empacotada com 80 g sílica gel 60 (0,063 – 0,200 mm; 60 x 2,5 cm) da marca Merck® e n-hexano. Para a eluição foram utilizadas misturas de solventes em polaridades crescentes. Foram recolhidas frações de 500 mL, as quais foram concentradas em evaporador rotatório sob pressão reduzida. A troca de eluente foi determinada por observação de resíduo no balão durante a concentração, de modo que quando não formasse resíduo o eluente deveria ser trocado por um de polaridade maior. Ao todo foram coletadas 8 frações, conforme Tabela 01:

Tabela 01: Eluentes das frações obtidas no fracionamento da fração acetato de etila do extrato etanólico de *Himatanthus articulatus* (5 g) por cromatografia em coluna cromatográfica de sílica gel

| Eluentes (proporção) | VOLUME (mL) | Fração |
|---------------------------------------|--------------------|---------------|
| Hexano | 200 | 01 |
| Hexano:Diclorometano (1:1) | 200 | 02 |
| Diclorometano | 360 | 03 |
| Diclorometano: Acetato de etila (1:1) | 800 | 04 |
| Acetato de etila | 850 | 05 |
| Acetato de etila: Metanol (1:1) | 900 | 06 |
| Metanol | 1350 | 07 |
| Metanol:água (1:1) | 360 | 08 |

A fração 06 (3,2 g), foi recromatografada em coluna cromatográfica com sílica gel 60 (0,063 – 0,200 mm; 40 x 3 cm) da marca Merck®, como fase estacionária e solventes de polaridades crescentes como fase móvel, recolhendo-se 100 mL por fração, concentrando-as em rotaevaporador e avaliando-as por cromatografia em camada delgada, com revelação com anisaldeído sulfúrico, reunindo-se as frações com perfis cromatográficos semelhantes. Foram recolhidas 78 frações, sendo que a fração 6-8, apresentou-se com maior massa (1,01 g) e apenas uma banda em CCD, em diferentes eluentes, e foi submetida a análise por CLAE-DAD, UPLC-PDA-MS/ESI, infra vermelho, RMN de ¹H, RMN de ¹³C e RMN de ¹³C DEPT 135, sendo chamada de S1.

4.7.4 FRACIONAMENTO DO EXTRATO ETANÓLICO POR CROMATOGRAFIA EM COLUNA CROMATOGRÁFICA

O extrato etanólico-EEHS (5 g) foi submetido ao fracionamento em coluna cromatográfica empacotada com 100 g de sílica gel 60 (0,063 – 200 mm; 80 x 2,5 cm) da marca Merck® e n-Hexano. Para eluição utilizou-se misturas de solventes com polaridades crescentes, recolhendo frações de 100 mL que foram concentradas em evaporador rotativo, avaliadas por CCD reveladas com anisaldeído sulfúrico e Reagente de Dragendorff, reunindo as frações por similaridade nas bandas observadas.

Ao todo foram recolhidas 179 frações, sendo a fração F-71 a que apresentou a maior massa (1,648 g) e foi avaliada por infravermelho e UPLC-PDA-MS/ESI.

4.7.5 OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES ALCALOÍDICAS

O extrato etanólico (EEHS) também foi submetido a extração ácido/base com o objetivo de se obter os alcaloides. Para tal, 50 g do extrato etanólico foram solubilizados em clorofórmio, obtendo-se uma fração solúvel em clorofórmio e outra insolúvel. A fase solúvel foi submetida a particionamento, em funil de separação, com uma solução aquosa de HCl 1 N, por seis vezes seguidas, obtendo-se uma fase orgânica e outra aquosa. A fase orgânica foi tratada com sulfato de sódio anidro e concentrada em evaporador rotatório até resíduo, obtendo-se a fração de neutros do extrato etanólico (FNEEHS). A fração aquosa ácida foi alcalinizada com hidróxido de amônio até pH 9-10 e então particionado em funil de separação com clorofórmio. A fase aquosa foi neutralizada e descartada, já a fase orgânica foi tratada com sulfato de sódio anidro e concentrada em evaporar rotatório até resíduo, obtendo-se a fração alcaloídica do extrato etanólico (FAEEHS; Figura 14; DOLABELA, 2007)

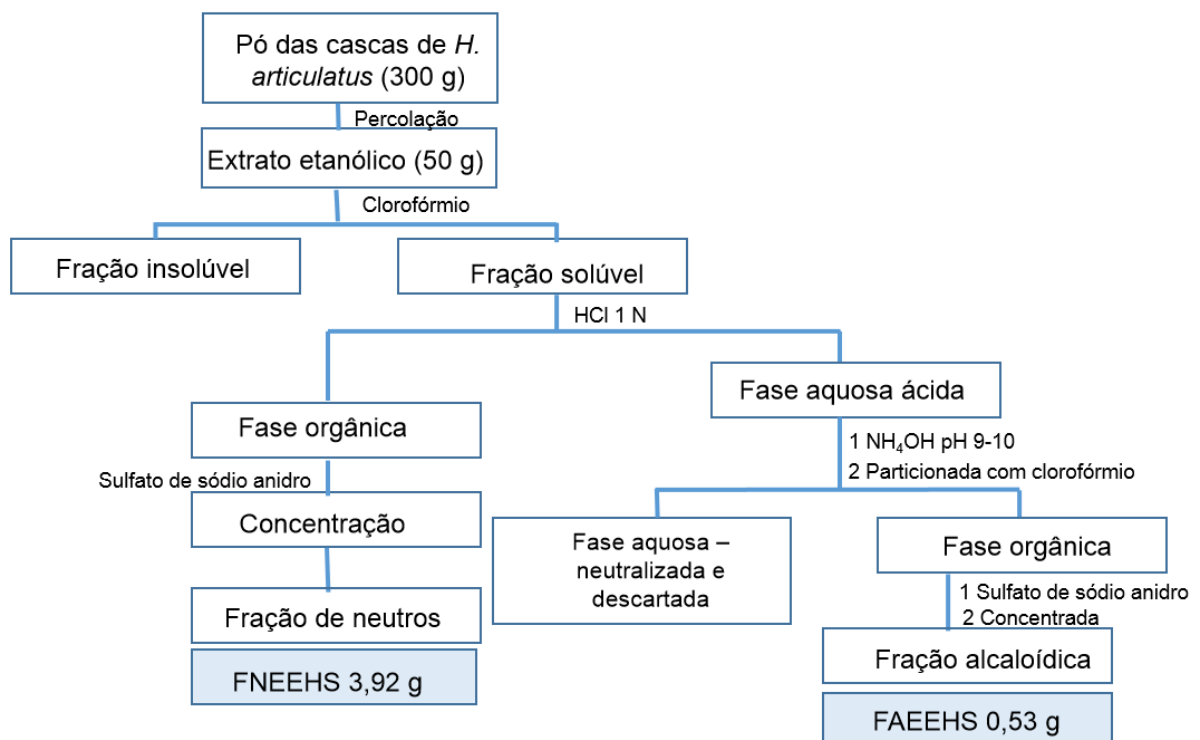


Figura 14: Fracionamento para separação de alcaloides a partir do extrato etanólico de *Himatanthus articulatus* por re-extrações ácido-base.

Legenda: FNEEHS- fração de neutros do extrato etanólico de *Himatanthus articulatus*; FAEEHS- fração alcaloídica do extrato etanólico de *Himatanthus articulatus*; HCl 1 N-ácido clorídrico 1 normal; O pó das cascas de *H. articulatus* foi submetido a extração seletiva para

alcaloides por dois métodos distintos (PAULA, 2014)

No primeiro método (método 1) 200 g do pó da planta foi alcalinizado com solução a 10% de hidróxido de amônio (20 mL) e submetido a percolação com diclorometano por seis vezes seguidas. Em seguida, o percolato foi concentrado em evaporador rotatório até redução do volume a 100 mL, sendo este, então, submetido a extração com uma solução de ácido clorídrico 1 N, por seis vezes seguidas. A fase orgânica foi decantada, tratada com sulfato de sódio anidro e concentrada em evaporador rotatório, sob pressão reduzida, obtendo-se as frações de neutros (FNHS DCM). A fase aquosa ácida foi alcalinizada até pH 9–10 pela adição de hidróxido de amônio concentrado, e, em seguida, fez-se nova extração com diclorometano. A fase aquosa ácida desta partição foi neutralizada e descartada e a fase orgânica foi tratada com sulfato de sódio anidro e concentrada em evaporador rotatório até resíduo, obtendo-se a fração alcaloídica (FAHS1 DCM), conforme Figura 15.

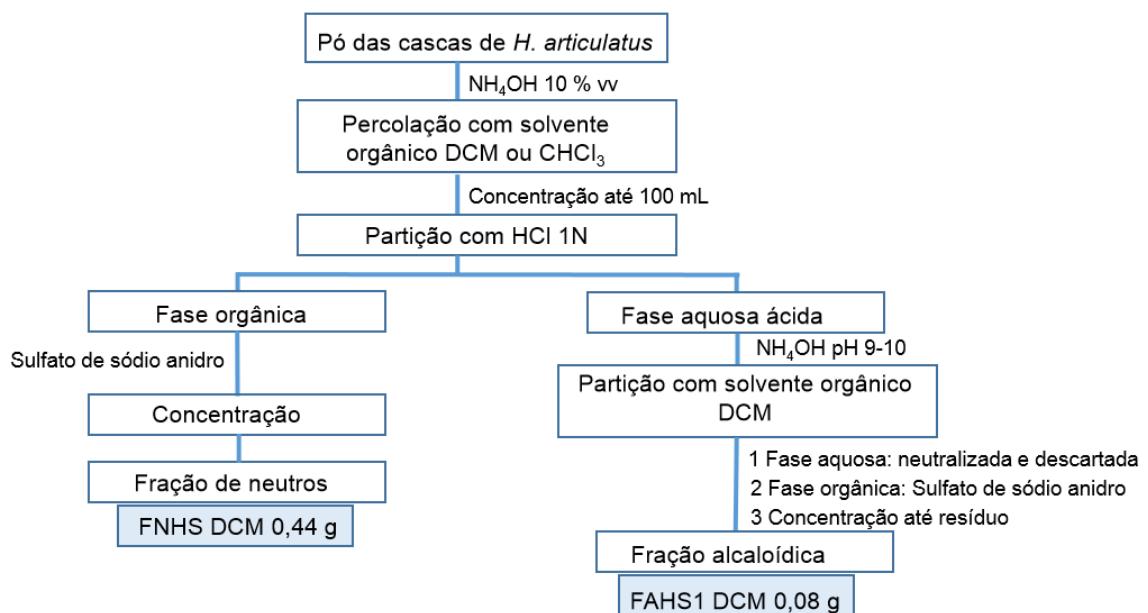


Figura15: Extração de alcaloides a partir do pó das cascas alcalinizadas de *Himatanthus articulatus*.
 Legenda: FNHS DCM-fração diclorometânica de neutros do pó das cascas de *Himatanthus articulatus*; FAHS1 DCM-fração alcaloídica diclorometânica do pó das cascas de *Himatanthus articulatus* obtida pelo método 1 de extração alcalina; NH₄OH-hidróxido de amônio

A segunda extração seletiva para alcaloides (método 2) foi realizada utilizando-se 100 g do pó da planta submetido a percolação (6 vezes) com ácido clorídrico 1 N, gastando-se ao final da percolação o volume de 1000 mL. Em seguida

elevou-se o pH para 9-10 com hidróxido de amônio concentrado. Posteriormente, prosseguiu-se com a partição com diclorometano. A fase aquosa foi neutralizada e descartada, a fase orgânica foi tratada com sulfato de sódio anidro e concentrado em evaporador rotatório, obtendo-se a fração alcaloídica diclorometânica (FAHS2 DCM), conforme Figura 16.

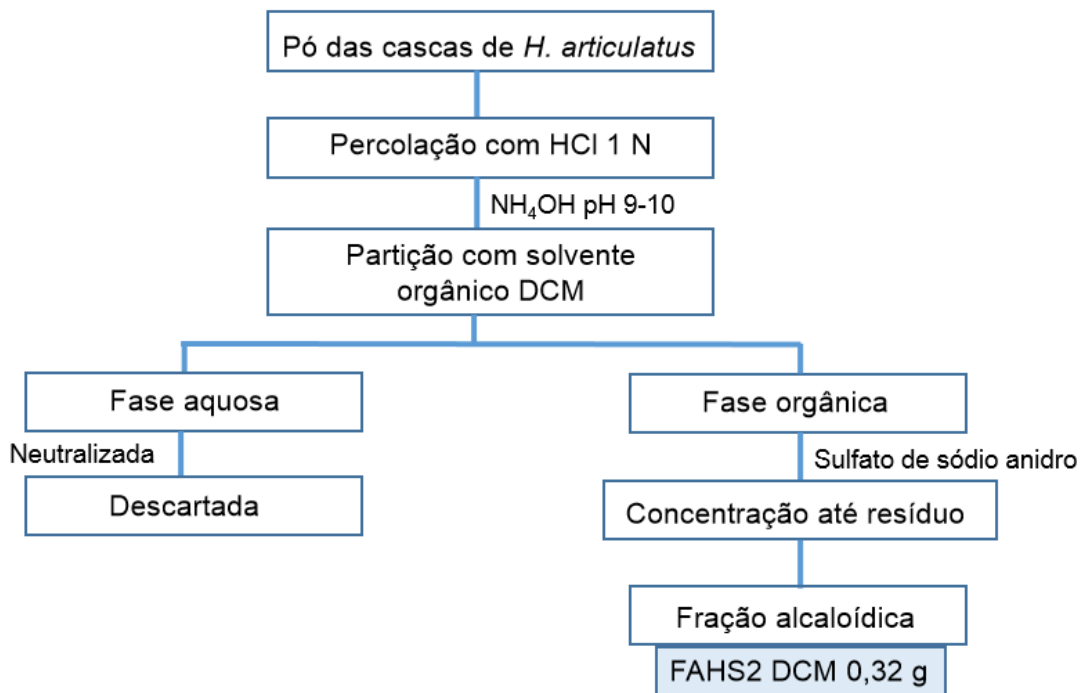


Figura 16: Extração de alcaloides a partir do pó das cascas acidificadas de *Himatanthus articulatus*.
 Legenda: FAHS2 DCM-fração alcaloídica diclorometânica das cascas de *Himatanthus articulatus* obtida pelo método 2 de extração ácida; FAHS2 CLOR-fração alcaloídica clorofórmica do pó das cascas de *Himatanthus articulatus* obtida pelo método 2 de extração ácida.

As frações alcaloídicas foram monitoradas por placa de CCD que foi revelada com reagente de Dragendorff, considerando-se como positivo a fração que apresentasse manchas de coloração alaranjada.

4.7.6 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA

Para a realização da prospecção fitoquímica, as amostras (EEHS e EEHSP, 10 mg), foram solubilizadas em metanol e armazenadas em tubos de 2,0 mL (tipo Ependorf). As classes de metabólitos pesquisados foram: polifenóis e taninos,

saponinas, esteroides e triterpenos, alcaloides, geninas flavônicas, heterosídeos flavônicos, geninas antracênicas, heterosídeos antracênicos e heterosídeos cardiotônicos. As metodologias empregadas foram aquelas descritas por Wagner e colaboradores (1984). A fase estacionária empregada foi sílica gel 60 G da marca Merck®. As fases móveis, bem como os reveladores e amostras de referência variaram conforme a classe de metabólito secundário a ser pesquisado e são descritos a seguir.

4.7.6.1 Detecção de polifenóis e taninos.

- Fase móvel: acetato de etila – ácido fórmico – ácido acético – metanol (96:1:1:2).
- Amostra de referência: proantocianidina B2.
- Revelador: solução 1:1 de ferrocianeto de potássio a 1% e cloreto férrico a 2%.
- Resultado: manchas de coloração negro-azulada ou negro-esverdeada, no visível.

4.7.6.2 Detecção de saponinas

- Fase móvel: clorofórmio – ácido acético – metanol – água (15: 8: 3:2).
- Amostra de referência: fração de saponinas.
- Revelador: Anisaldeído sulfúrico com aquecimento a 100 °C por 5 minutos.
- Resultado: manchas de coloração azul, azul violeta ou amarelas, no visível.

4.7.6.3 Detecção de esteroides e triterpenos

- Fase móvel: Hexano – Acetato de etila (7:3),
- Amostra de referência: ácido betulínico
- Revelador: Lieberman Bouchard com aquecimento a 100 °C por 5 minutos.
- Resultado: manchas verdes fluorescentes no ultra violeta 365 nm.

4.7.6.4 Detecção de alcaloides

Para este método duas fases móveis foram empregadas:

- Fase móvel 1: Acetato de etila – Ácido acético – água – etilmetilcetona (50:7:10:310:30).
- Fase móvel 2: Clorofórmio – Metanol – Hidróxido de Amônia (85:15:0,4)
- Amostra de referência: quinina.
- Revelador: reagente de Dragendorff.
- Resultado: manchas de cor marrom ou alaranjado no visível, após revelação com reagente Dragendorff. Fluorescências azuis no UV 365 nm.

4.7.6.5 Detecção de geninas flavônicas

- Fase móvel: Clorofórmio – Acetato de etila (60:40).
- Amostra de referência: quercetina
- Revelador: cloreto de alumínio 2% em metanol após aquecimento a 100 °C por 5 minutos.
- Resultado: manchas amareladas no visível e fluorescências amarelo-esverdeadas no UV 365 nm.

4.7.6.6 Detecção de heterosídeos flavônicos

- Fase móvel: Acetato de etila – Ácido fórmico – Ácido acético – água (100:11:11:27).
- Amostra de referência: rutina
- Revelador: cloreto de alumínio 2% em metanol aquecido a 100°C por 5 minutos.
- Resultado: manchas de coloração amarela no visível e fluorescências amarelo-esverdeada no UV 365 nm.

4.7.6.7 Detecção de geninas antracênicas e naftoquinônicas

- Fase móvel: Tolueno – Acetona - Clorofórmio (81:11:8).

- Amostra de referência: 1,8-diidroxiantraquinona.
- Revelador: hidróxido de potássio a 5% em metanol aquecido a 100 °C por 5 minutos.
- Resultado: manchas de cor laranja ao vermelho no visível e fluorescências de coloração alaranjado ao vermelho no UV 365 nm.

4.7.6.8 Detecção de heterosídeos antracênicos

- Fase móvel: Acetato de etila - Metanol – Água (81:11:8).
- Referência: aloína.
- Revelador: hidróxido de potássio a 5 % em metanol aquecido a 100 °C por 5 minutos.
- Resultado: manchas de coloração alaranjado ao vermelho no visível e fluorescências alaranjada ao vermelho no UV 365 nm.

4.7.6.9 Detecção de heterosídeos cardiotônicos

- Fase móvel: Acetato de etila – Metanol – Água (81:11:8).
- Amostra de referência: digoxina.
- Revelador: reativo de Kedde.
- Resultado: manchas rosa ou azul-violáceo no visível.

4.7.6.10 Detecção de cumarinas

- Fase móvel: Tolueno – Éter etílico (1:1) saturado com ácido acético.
- Amostra de referência: cumarina.
- Revelador: hidróxido de potássio a 5 % em metanol aquecido a 100 °C por 5 minutos.
- Resultado: manchas de coloração verde azulada no UV 365 nm.

4.7.7 ANÁLISES POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA A DETECTOR DE ARRANJO DE DIODO (CLAE-DAD)

O extrato etanólico (EEHS), o precipitado (EEHSP), as frações resultantes da extração do EEHS com solventes de polaridades crescentes (FrDCM EEHS, FrAcOET EEHS e FrMeOH EEHS), e a fração (FAHS2 DCM), obtida da extração seletiva de alcaloides e produto isolado, foram analisadas no Cromatógrafo Waters Alliance 2695 Separations Module equipado com bomba quaternária e auto injetores, com detector PDA Waters 2996, utilizando diferentes condições e fases móveis.

As massas empregadas das amostras foram de 5 mg do extrato (EEHS), precipitado (EEHSP) e das demais frações (FrDCM EEHS, FrAcOET EEHS, FrMeOH EEHS e FAHS2 DCM) e 2 mg do produto isolado. Estas foram solubilizadas em metanol grau CLAE com sonicação em aparelho de ultrassom por 20 min. até completa dissolução, sendo posteriormente centrifugadas a 10000 RPM por 10 min., armazenadas em frasco para CLAE (vial). Utilizou-se coluna de fase reversa (12,5 x 4,5 cm, LiChroCART[®] RP 18 – 5 µm coluna n° 317473 Lot.: L750917). As leituras foram feitas em detector de UV-DAD nos comprimentos de onda de 220-400 nm, registrando-se cromatogramas nos comprimentos de onda de 220, 280 e 330 nm para EEHS, EEHSP, FrDCM EEHS, FrAcOET EEHS, FrMeOH EEHS, produto isolado (S1) e 254, 280 e 304 para a FAHS2 DCM. Foram utilizadas duas condições cromatográficas, descritas a seguir.

4.7.7.1 Condição cromatográfica 01

Para o extrato etanólico (EEHS), o precipitado (EEHSP), as frações oriundas da extração exaustiva do EEHS (FrDCM EEHS, FrAcOET EEHS e FrMeOH EEHS) e produto isolado (S1), utilizou-se uma metodologia de perfil exploratório (BRANDÃO, 2010), com tempo de varredura de 70 min. em gradiente linear de 5 a 95%, empregando-se água deionizada (MilliQ) contendo 0,1 % ácido fosfórico (eluente A) e acetonitrila (eluente B) como fases móveis, um fluxo de 1 mL/min., injetando-se 20 µL da solução de cada amostra. A detecção foi realizada em UV 220 a 400 nm. A temperatura da coluna foi de 40 °C (Tabela 01).

Tabela 02: Gradiente de eluição empregado nas análises por CLAE-DAD para registro dos perfís exploratórios.

| TEMPO (min) | Fluxo (mL/min) | Eluente A (%) | Eluente B (%) |
|-------------|----------------|---------------|---------------|
| 0 | 1 | 95 | 05 |
| 60 | 1 | 05 | 95 |
| 65 | 1 | 05 | 95 |
| 70 | 1 | 95 | 05 |

Legenda: Eluente A: água; eluente B: acetonitrila

4.7.7.2 Condição cromatográfica 02

A fração alcaloídica (FAHS2 DCM) foi analisada por CLAE-DAD, na condição cromatográfica 2, utilizando-se metodologia (modificada) descrita por Silva e colaboradores (2007), na qual foi realiza do látex de *H. articulatus*. A fase estacionária foi RP 18 e a fase móvel empregada foi água deionizada (Milli Q) a 0,1% de ácido fosfórico (A) e acetonitrila (B), em fluxo de 1 mL/min., sendo injetados 10 µL de amostra. A temperatura do forno foi de 40 °C, detecção em 280 nm. O programa de eluição consta na Tabela 02.

Tabela 03: Gradiente de eluição empregado nas análises por CLAE-DAD condição cromatográfica 2

| TEMPO (min) | Fluxo (mL/min) | Eluente A (%) | Eluente B (%) |
|-------------|----------------|---------------|---------------|
| 0 | 1 | 90 | 10 |
| 10 | 1 | 80 | 20 |
| 15 | 1 | 80 | 20 |
| 16 | 1 | 80 | 20 |
| 30 | 1 | 50 | 50 |
| 32 | 1 | 50 | 50 |
| 35 | 1 | 90 | 10 |

Legenda: Eluente A: solução aquosa de ácido fosfórico a 0,1% v/v; eluente B: acetonitrila

4.7.8 ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO

A fração majoritária do extato etanólico F-71 e o produto isolado (S1) da fração acetato de etila foram submetidos a espectroscopia no infravermelho, em

equipamento IR-Prestige-21 Shimadzu, em pastilhas de KBr, na faixa de 400 a 4000 cm^{-1} , do Laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais.

4.7.9 ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Os espectros de massas do extrato etanólico (EEHS), do produto isolado (S1) e da fração alcaloídica FAHS2 DCM, ativa no ensaio *in vitro* de atividade antiplasmódica (descrito mais a frente), foram obtidos em equipamento UPLC-PDA-MS/ESI WATERS ACQUITY® H-Class Core System, do Laboratório de Fitoquímica da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais.

As amostras foram preparadas dissolvendo-se 2,5 mg de cada uma em 1 mL de metanol grau CLAE, sob sonicação em aparelho de ultrassom por 20 minutos, sendo então centrifugadas por 10 minutos a 10.000 RPM e filtradas em filtro de *nilon* de seringa (4mm x 22 μm).

Utilizou-se coluna de fase reversa CSH130 C18 (partículas de 1.7 μm , 50 x 3 mm d.i.), detecção UV_{220-400 nm}, fluxo de 0,3 mL/min. e manteve-se o forno da coluna a 40 °C. Empregou-se gradiente de acetonitrila 0,1% ácido fórmico e H₂O 0,1% ácido fórmico (Tabela 03), compreendendo um período de eluição linear longo (5 – 95% de acetonitrila, em 10 min), mantendo-se, a seguir, um curto período de eluição isocrática (95% de MeCN por 1 min.). Na obtenção do espectro de massas empregou-se um sistema de Ionização por Spray de Elétrons (ESI), voltagem do capilar 3,5; voltagem do cone 60. Foram empregados solventes grau CLAE (Tedia Brasil®) e água deionizada, filtrada em sistema Milli-Q.

Tabela 04: Gradiente de eluição empregado nas análises por UPLC-PDA-MS/ESI

| TEMPO (min) | Eluente A (%) | Eluente B (%) |
|-------------|---------------|---------------|
| 0 | 95 | 5 |
| 10 | 5 | 95 |
| 11 | 5 | 95 |
| 13 | 95 | 5 |

Legenda: Eluente A: solução aquosa de ácido fórmico a 0,1%v/v; Solução de acetonitrila com ácido fórmico

4.7.10 ANÁLISE POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Os espectros de RMN de ^1H e de RMN de ^{13}C e DEPT-135 foram obtidos no Departamento de Química, ICEX, UFMG, em equipamento Bruker Avance DPX 200, a 25 °C, utilizando-se o tetrametilsilano (TMS), como referência interna. Utilizou-se o solvente deuterado metanol-D4 para solubilizar a amostra.

4.7.11 DESCONGELAMENTO DA CEPA DO *P. falciparum* W2

A amostra foi retirada do crio-banco do Laboratório de Malária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte- MG, sendo colocada para descongelar a 37 °C. Após completo descongelamento, foram adicionados, para cada 1mL de sangue, 0,4 mL de solução salina estéril (NaCl) 12%, gota a gota, sob agitação, 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 ressuscitado com 10 mL de meio RPMI completo (20 %), e transferido para placa de cultivo, na qual 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. Este cultivo não foi tocado por 48 horas para que houvesse boa adaptação dos parasitos (TRAGER; JENSEN, 1976).

4.7.12 CULTIVO DO *Plasmodium falciparum*

O cultivo do *P. falciparum* cepa W2 foi realizado utilizando o método sugerido por Trager e Jensen (1976), no qual após o descongelamento foi adicionado meio de cultura (RPMI 1640 completo) em placas Petri para cultura e trocado diariamente juntamente com hemácias A⁺, ajustando o hematócrito para 5 %. As placas foram incubadas em temperatura de 37 °C em dessecadores, com concentração de CO₂ adequadas (3 a 5 %), obtidas por combustão de vela.

Quando a parasitemia atingiu 5 % ou mais, com maior predomínio de formas jovens (trofozoíto – anel), o cultivo foi sincronizado com solução de Sorbitol:glucose (LAMBROS; VANDERBERG, 1979), homogeneizado e transferido para tubo de 15

mL e deixando em estufa de CO₂ por 10 minutos. A seguir, o material foi centrifugado por 5 minutos a 1500 rpm. Em seguida conferiu-se o volume do precipitado (com auxílio de um tubo de 15 mL similar) e foi retirado o sobrenadante. Depois, o cultivo foi ressuspendido com meio RPMI completo para ter hematócrito 5%. Transferiu-se o cultivo para placa Petri e esperou-se as hemácias sedimentarem (aprox. 10min). Em seguida, realizou-se o esfregaço para se determinar a parasitemia. Após realização do esfregaço, o hematócrito e a parasitemia foram ajustados para 1% (adicionando hemácias e meio RPMI completo em quantidade adequada; CARVALHO, 1990).

Caso a parasitemia estivesse superior a 5 % com predomínio de formas maduras (esquizonte), fazia-se repique para uma nova placa de cultivo, obtendo-se cultivo permanente.

4.7.13 DETERMINAÇÃO DA PARASITEMIA

A determinação da parasitemia foi realizada contando as formas eritrocitárias totais e infectadas pelo parasito em esfregaço feito com o cultivo, fixado com metanol e corado com o corante Giemsa (solução estoque) diluído em 3 gotas por mL de água tamponada pH 6,8. Após 10 minutos de contato com o corante as lâminas foram lavadas em água corrente e secas ao ar em temperatura ambiente, sendo posteriormente examinadas em microscópio óptico em objetiva de imersão (1000 x). A parasitemia foi determinada pelo número de hemácias infectadas, e caso a parasitemia fosse igual ou superior a 5 %, cerca de 1000 hemácias foram contadas. Caso a parasitemia fosse inferior a 5 % foram contadas aproximadamente 6000 células.

4.7.14 CRIOPRESERVAÇÃO DO *Plasmodium falciparum* W2

O congelamento do clone de *P. falciparum* foi realizado de acordo com a técnica descrita por Meryman e Hornblower (1972). Em câmara de fluxo laminar, o cultivo contendo formas jovens do parasito (trofozoíto-anel), com parasitemia superior a 10 %, foi transferido para tubo de 15mL. Posteriormente foi centrifugado a 1500rpm por 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 em volume de 1mL, em tubos de criopreservação, sendo deixadas durante 24 horas no freezer a -70°C para posteriormente serem acondicionadas em nitrogênio líquido.

4.7.15 PREPARO DAS AMOSTRAS-TESTE

As amostras dos extratos, frações e produto isolado foram solubilizadas na concentração de 12 mg de amostra em 240 μ L de DMSO. Desta solução estoque retirou-se 10 μ L (500 μ g) diluindo em 990 μ L de meio RPMI incompleto, da qual, em placa de 96 poços, utilizou-se 300 μ L nos poços da linha B e realizou-se diluições seriadas até a linha G, as quais continham 150 μ L de meio incompleto. Das diluições utilizou-se um volume de 20 μ L para a placa teste obtendo as concentrações finais em 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12 e 1,56 μ g/mL (Figura 17).

4.7.16 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPLASMÓDICA

A atividade antiplasmódica foi determinada de acordo a metodologia da enzima ρ LDH desenvolvida por Makler e colaboradores (1993) e modificada por Nkhoma e colaboradores (2007) e descrita por PAULA (2014). As culturas sincronizadas no estágio de anel (parasitemia a 2% e hematócrito de 1%) foram distribuídas em microplacas de 96 poços colocando-se 180 μ L por poço. O extrato e frações foram adicionados (20 μ L) em diferentes concentrações (50; 25; 12,5; 6,25, 3,12 e 1,56 μ g/mL). Os poços controles (sem a adição de fármaco ou amostra teste) continham hemácias normais não infectadas (controle negativo) e hemácias infectadas (controle positivo). A cloroquina foi utilizada como antimalárico padrão. Cada extrato ou fração foi testado em triplicata (Figura 17).

Após 48h de incubação com controle de CO₂ por meio de combustão de vela em dessecador, as microplacas foram congeladas (-20 °C) e descongeladas por duas vezes com o objetivo de promover a lise das hemácias. Em uma nova placa de 96 poços foram adicionados 100 μ L/poço do reagente Malstat. Nesta adicionou-se 25 μ L/poço da solução NBT/PES. Por fim, 15 μ L do conteúdo de cada poço da placa teste foram adicionados a esta segunda placa que foi incubada por 1h, 37 °C, ao abrigo da luz.

A leitura foi feita em espectrofotômetro (Leitor de placas), no comprimento de

onda de 540 nm. A média de produção de *p*LDH dos controles positivos foi considerada como 100% de viabilidade, já os negativos, como 0% de viabilidade. A partir desses dois valores, foi calculada a viabilidade dos parasitos mantidos tanto em contato com as amostras teste como com a cloroquina.

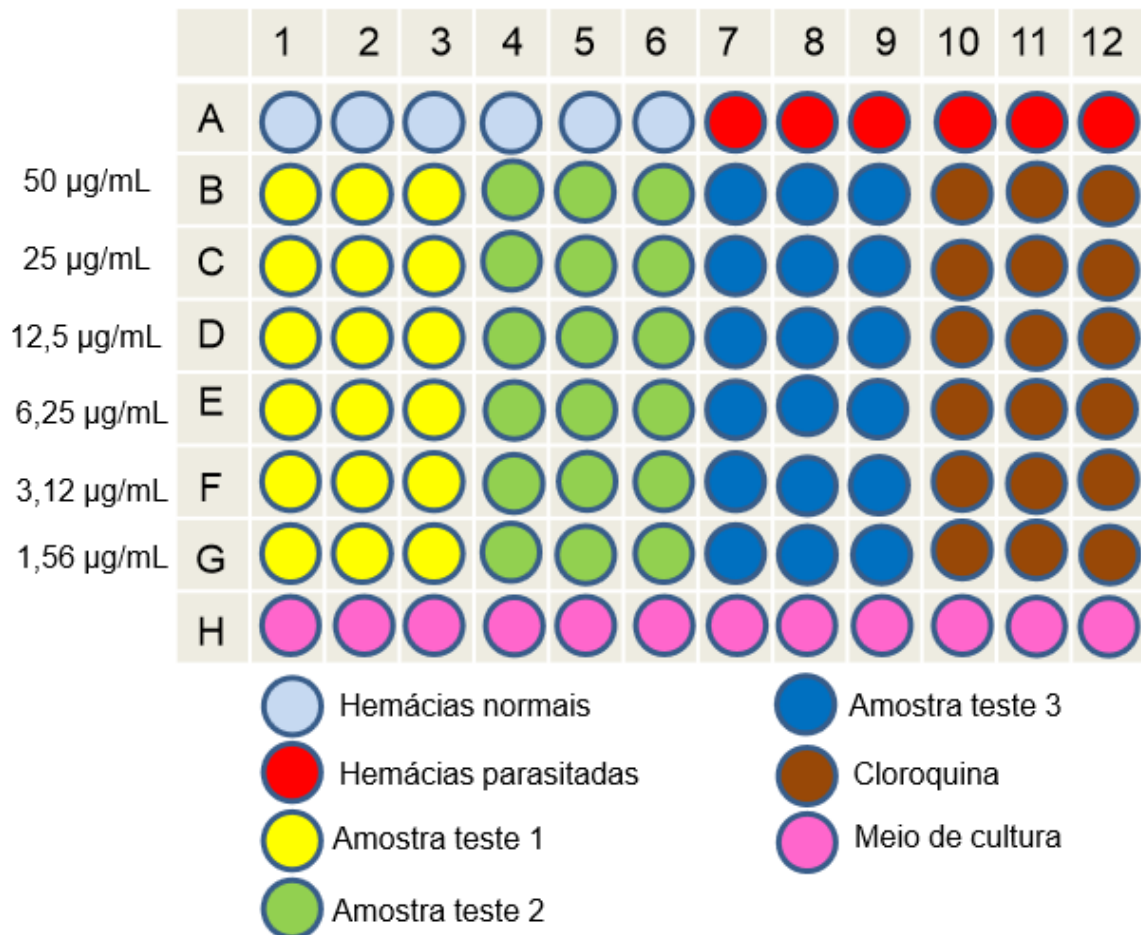


Figura 17: Esquema da placa utilizada no teste de atividade antiplasmódica

4.7.17 AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS

A viabilidade do parasito na presença das amostras teste foi demonstrada em curvas de inibição em função de regressão linear para determinar a dose inibitória do crescimento de 50% dos parasitos (CI_{50}), pelo programa OriginPro versão 8.5 (PAULA, 2014).

Conforme os resultados de CI_{50} obtidos na avaliação antiplasmódica as amostras foram classificadas de acordo com o padrão de classificação para extratos

vegetais adotado Dolabela (2007) e modificado por Paula (2014), no qual classifica as amostras como muito ativas, com resultados de CI_{50} inferiores a $1 \mu\text{g/mL}$; ativas, com valores de CI_{50} compreendendo entre 1 e $15 \mu\text{g/mL}$; moderadamente ativas, no qual os valores de CI_{50} estejam entre 15,1 e $25 \mu\text{g/mL}$; pouco ativas, com valores de CI_{50} entre 25,1 e $50 \mu\text{g/mL}$; e inativas com resultados de CI_{50} acima de $50 \mu\text{g/mL}$, conforme Tabela 04.

Tabela 05: Classificação das amostras de acordo com resultados de CI_{50} para atividade antiplasmódica

| CLASSIFICAÇÃO | $CI_{50} \mu\text{g/mL}$ |
|----------------------|--|
| Muito ativa | $<1 \mu\text{g/mL}$ |
| Ativa | Entre 1 e $15 \mu\text{g/mL}$ |
| Moderadamente ativa | Entre 15,1 e $25 \mu\text{g/mL}$ |
| Pouco ativa | Entre 25,1 e $50 \mu\text{g/mL}$ |
| Inativa | $>50 \mu\text{g/mL}$ |

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Estudos fitoquímicos

As cascas de *Himatanthus articulatus* (7,8 Kg), após processo de secagem e moagem, rendeu 2,750 Kg de pó do qual se utilizou 1 Kg para o preparo do extrato etanólico. Após concentração parcial, em evaporador rotatório, o extrato etanólico (EEHS) apresentou um precipitado (EEHSP) de coloração amarelada, do qual retirou-se uma alíquota (2 g). O extrato etanólico bruto foi liofilizado obtendo-se 168,21 g (rendimento = 16,82 %). Em outro estudo, onde o extrato etanólico foi obtido por maceração, o rendimento do extrato foi de 3,64% (VILHENA, 2012). Sabe-se que o processo de extração por percolação é mais eficiente que a maceração por que no primeiro, o líquido extrator é renovado constantemente, forçando-se o esgotamento dos constituintes da planta, por um processo dinâmico, ao passo que na maceração o solvente extrator fica em contato com o pó da planta por um tempo maior o que pode ocasionar a saturação do mesmo (TRABULSI FILHO et al., 2013).

Na prospecção fitoquímica do EEHS e EEHSP, realizada por CCD (WAGNER et al., 1984), foram detectados polifenóis e taninos, saponinas, triterpenos, alcaloides e geninas flavônicas, porém apresentou resultado negativo para heterosídeos flavônicos, geninas e heterosídeos antracênicos, heterosídeos cardiotônicos e cumarinas (Quadro 02; Figura 1). Em outro estudo, o extrato etanólico obtido das cascas de *H. articulatus* foi submetido à prospecção fitoquímica utilizando-se reagentes de precipitação (MATOS, 1997) em que se detectou a presença de saponinas, açúcares redutores, polifenóis e taninos, catequinas, flavonoides, esteroides e triterpenos; resultados negativos foram observados para alcaloides, glicosídeos cardiotônicos e sesquiterpenolactonas. Com exceção dos alcalóides, os resultados obtidos no presente estudo corroboram o trabalho de Vilhena (2012). A ausência de alcaloides naquele trabalho pode ser explicada pela diferença de metodologia utilizada nos testes para alcalóides, pois os alcaloides podem se apresentar em baixa concentração e não serem detectados pelo ensaio de precipitação empregado (MACIEL et al., 2002).

Rebouças e colaboradores (2011) avaliaram as principais classes de compostos químicos (metabólitos secundários) no extrato etanólico das cascas de

H. articulatus, pelo método de precipitação. Neste extrato foram detectados alguns dos metabólitos encontrados no presente estudo, sendo eles saponinas, alcaloides, flavonoides e taninos.

Em outro trabalho, utilizando a metodologia de CCD, avaliou-se a presença e ausência de metabólitos secundários do extrato hidroetanólico (50%) a partir das cascas e folhas de *H. succuba*, e o teste para alcaloides foi negativo (RODRIGUES et al. 2010). Tal fato pode ser explicado por diversos fatores externos à planta, como sazonalidade, ritmo circadiano, índice pluviométrico, radiação UV, altitude, temperatura, quantidade de água e idade da planta, ataque de patógenos e herbívoros e outros que podem induzir ou reprimir a produção de metabólitos secundários (GOBBO-NETO; LOPES, 2007). Assim, plantas da mesma espécie, mas coletadas em tempos e locais diferentes, podem apresentar diferença significativa na sua composição de metabólitos secundários.

Por outro lado, Souza (2008), em prospecção fitoquímica feita com o pó das cascas moídas e desengorduradas de *H. lancifolius*, detectou a presença de alcaloides, glicosídeos cardiotônicos, taninos e açúcares ao passo que não encontrou flavonoides, saponinas e antraquinonas. Embora sendo plantas de espécies diferentes, ambas pertencem ao mesmo gênero, e assim produzem os metabólitos secundários de maneira semelhante. A presença de alcaloides nessa planta confirma os estudos da família Apocynaceae, que possuem estes metabólitos, e que em muitos casos servem como marcadores taxonômicos (PEREIRA et al., 2007), e talvez por isso, justifica-se o uso popular de plantas dessa família para tratamento da malária (MILLIKEN, 1997).

A presença destes metabólitos secundários dá uma valiosa noção de qual atividade biológica/farmacológica o material vegetal pode apresentar. O fato de conter terpenos e alcalóides no extrato etanólico de *H. articulatus* sugere que este possa apresentar atividade antiplasmódica, e assim pode-se confirmar o uso popular, pois podem agir reduzindo a parasitemia, por outro lado, a presença de compostos fenólicos no extrato pode sugerir atividade antioxidante a esse extrato, já descrito em trabalho anterior (VILHENA, 2012).

Quadro 01: Resultados, eluentes e reveladores utilizados na prospecção fitoquímica do extrato etanólico (EEHS) e do precipitado (EEHSP) de *Himatanthus articulatus*.

| METABÓLITOS | ELUENTES | REVELADORES | EEHS | EEHSP |
|---|--|--|-------------|--------------|
| Polifenóis e taninos | Acetato de etila-ácido fórmico-ácido acético-metanol (96:1:1:2) | Ferrocianeto de potássio 1% e cloreto férrico 2% (1:1) | + | + |
| Saponinas | Clorofórmio-ácido acético-metanol-água (15:8:3:2) | Anisaldeído sulfúrico | + | + |
| Triterpenos e esteroides | Hexano-acetato de etila (7:3) | Lieberman Bouchard | + | + |
| Alcaloides | Acetato de etila-ácido fórmico-ácido acético-água-metiletilcetona (50:7:3:10:30) | Dragendorff | + | + |
| Alcaloides* | Clorofórmio-metanol-hidróxido de amônio (85:15:0,2) | Dragendorff | + | + |
| Geninas flavônicas | Clorofórmio-acetato de etila (60:40) | Cloreto de alumínio 5% | + | + |
| Heterosídeos flavônicos | Acetato de etila-ácido fórmico- ácido acético-água (100:11:11:27) | Cloreto de alumínio 5% | - | - |
| Geninas antracênicas e naftoquinonas | Tolueno-acetona-clorofórmio (40:25:35) | Hidróxido de potássio 5% | - | - |
| Heterosídeos antracênicos e naftoquinônicos | Acetato de etila-metanol-água (81:11:8) | Hidróxido de potássio 5% | - | - |
| Heterosídeos cardiotônicos | Acetato de etila-água-etanol (72:7:20) | Keede | - | - |
| Cumarina | Tolueno-éter etílico (1:1) | Hidróxido de potássio 5% | - | - |

*Testado apenas para frações alcaloídicas:

Legenda: EEHS-Extrato etanólico de *Himatanthus articulatus*; EEHSP-precipitado do extrato etanolico de *Himatanthus articulatus*.

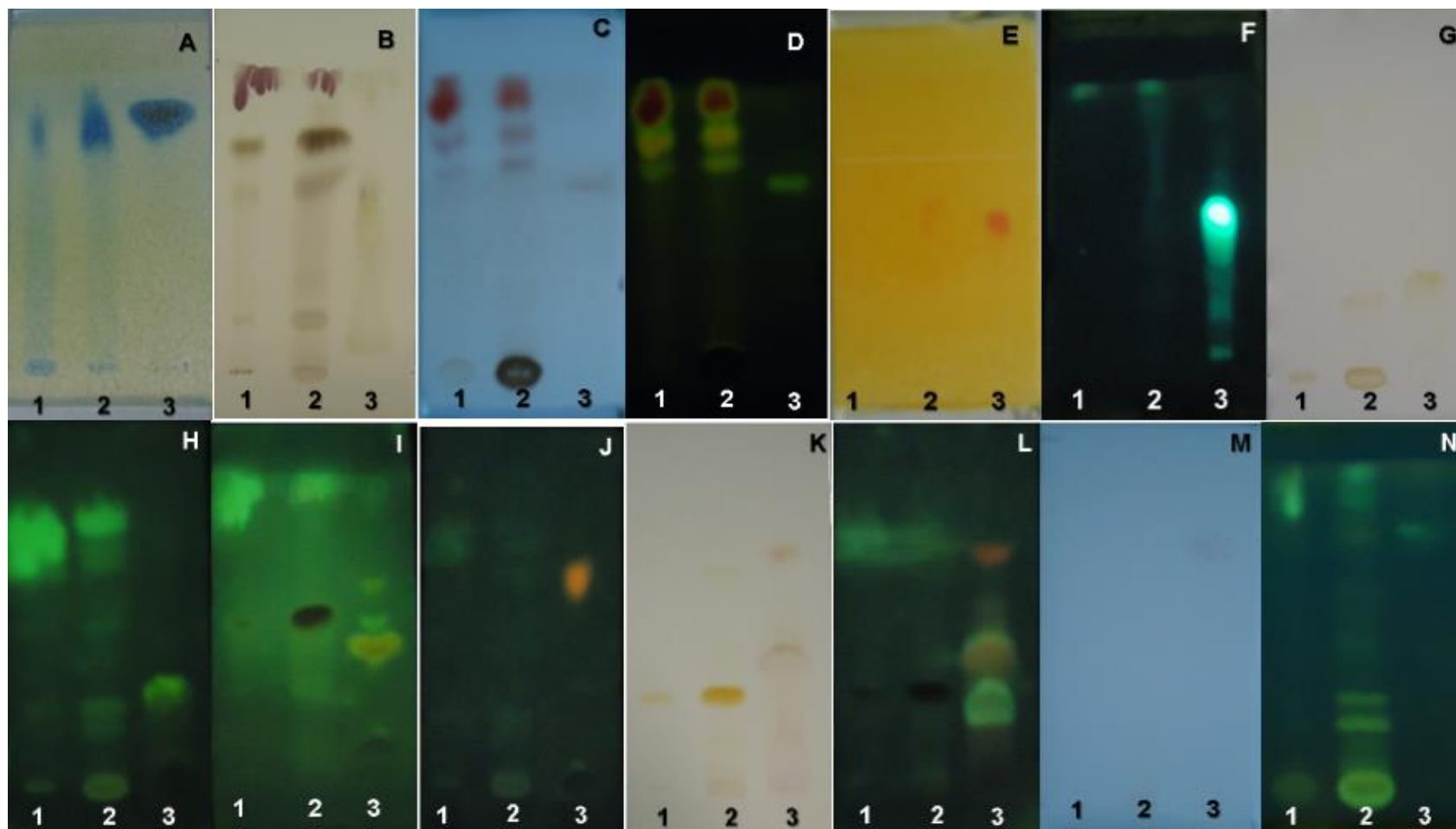


Figura 18: Prospecção fitoquímica do extrato etanólico obtido do pó das cascas de *Himatanthus articulatus* (EEHS) e de seu precipitado (EEHSP)

Legenda: A- polifenóis; B- saponinas; C/D- esteroides e triterpenos; E/F- alcaloides; G/H- geninas flavônicas; I- heterosídeos flavônicos; J- geninas antracênicas; K/L- heterosídeos antracênicos; M- heterosídeos cardiotônicos; N- cumarina; 1-EEHSP; 2-EEHS; 3A- proantocianidina-B2; 3B- fração de saponinas; 3C/D- ácido betulínico; 3E/F- quinina; 3G/H- quercetina; 3I- rutina; 3J-1,8diidroxiantraquinona; 3K/L- aloína; 3M- digoxina; 3N- cumarina

Durante o processo de concentração do extrato etanólico observou-se a formação de um precipitado (EEHSP) de coloração amarelada. Com este, realizou-se a prospecção fitoquímica obtendo-se os mesmos resultados observados para EEHS, ou seja, presença de polifenóis e taninos, saponinas, triterpenos e esteroides, alcaloides e geninas flavônicas e resultado negativo para heterosídeos flavônicos, geninas antracênicas e naftoquinonas, heterosídeos cardiotônicos e cumarinas (Quadro 02). Não foi encontrada na literatura nenhum relato sobre a formação de precipitado em extrato etanólico de *H. articulatus*.

O EEHSP foi submetido a cromatografia de alta eficiência (CLAE) na condição cromatográfica 01 de perfil exploratório. No cromatograma, observou-se um total de 16 picos (Figura 20-B), dos quais 3 eram amis intensos, sendo eles os picos 6, 7 e 12 respectivamente. O pico 6, com Tr 8,9 min. foi o mais intenso, apresentando área de 29,16 % e λ_{\max} 213,1 nm. O mesmo pico pode ser observado como mais intenso também no EEHS e frações FrAcOET EEHS e FrMeOH EEHS. O pico 7, com Tr 10,38 min. apresentou a mesma absorção que o pico anterior em λ_{\max} 213,1 nm, o que provavelmente remete ao mesmo cromóforo da substância do pico anterior. Já o pico 12 com Tr em 14,99 min. apresentou área de 1,65 % e λ_{\max} 305,4 nm.

A amostra disponível do EEHSP não foi suficiente para realizar fracionamentos e dar continuidade aos seus estudos, aliado também ao fato de que o mesmo apresentou resultado negativo no teste de avaliação de atividade antiplasmódica contra clones W2 do *P. falciparum* (Tabela 08, p 91).

Já o EEHS foi submetido ao fracionamento por re-extração sob refluxo, de forma exaustiva, com solventes de polaridades crescentes. No fracionamento do EEHS (20g), foram obtidas três frações, sendo a fração metanólica a de maior rendimento (49,91%), seguida da fração acetato de etila (26,9%) e da diclorometano (13,07%; Tabela 05). O maior rendimento da fração metanólica explica-se pelo fato de que o extrato apresenta grande quantidade de constituintes polares, dentre eles os iridóides glicosilados, constituintes majoritários desta planta (SILVA et al., 1998).

Tabela 06: Rendimento do extrato etanólico, precipitado e frações obtidas do extrato etanólico de *Himatanthus articulatus* por extração exaustiva

| | Sigla | Rendimento |
|-------------------------|--------------|--------------------|
| Extrato etanólico | EEHS | 168,21 g (16,82 %) |
| Precipitado | EEHSP | 2 g (*) |
| Fração diclorometano | FrDCM EEHS | 2,6148 g (13,07 %) |
| Fração acetato de etila | FrAcOET EEHS | 5,38 g (26,9 %) |
| Fração metanólica | FRMeOH EEHS | 9,983 g (49,91 %) |

*Alíquota retirada do extrato etanólico

Legenda: EEHS-extrato etanólico de *Himatanthus articulatus*; EEHSP-precipitado oriundo do extrato etanólico de *Himatanthus articulatus*; FrDCM EEHS-fração diclorometânica do extrato etanólico de *Himatanthus articulatus*; FrAcOET EEHS- fração acetato de etila do extrato etanólico de *Himatanthus articulatus*; FRMeOH EEHS-fração metanólica do extrato etanólico de *Himatanthus articulatus*.

Nos cromatogramas obtidos por CLAE-DAD do EEHS (Figura 20-A), FrAcOET EEHS (Figura 20-D) e FrMeOH EEHS (Figura 20-E) observou-se um pico majoritário com tempo de retenção T_r 8,9 min. com absorção no UV em λ_{max} 213,1 nm e um pico de menor intensidade, em 10,4 min. e a mesma absorção no UV em λ_{max} 213,1 nm. O espectro no UV destas substâncias correspondentes aos picos sugere tratar-se de iridóides, pois estes, segundo literatura, absorvem no UV na faixa de 210 a 240 nm (PLOUVIER & FAURE-BONVIN, 1971) e em outros trabalhos são descritos como majoritários nesta espécie (SILVA et al., 2007).

Outro pico que pode ser observado no EEHS, FrAcOET EEHS e FrMeOH EEHS ocorre em 14,99 min. com absorção em λ_{max} 305,4 nm, sugerindo tratar-se de derivados do ácido cinâmico, provavelmente, pois estes absorvem no UV entre 280-320 nm, com uma única banda de absorção, como ocorre nos picos em análise. Em trabalhos realizados com as cascas e o látex de *H. sucuuba* foram isolados cinamato de lupeol (15) e cinamato de α -amirina (16). A hidrólise básica de uma mistura dessas duas substâncias levou à obtenção de ácido cinâmico, lupeol (19) e α -amirina, confirmados por comparação com seus padrões por CL-MS (SILVA et al., 1998; MIRANDA et al., 2000). No presente estudo, porém, não foi possível identificar a qual substância corresponde este pico, pois o mesmo não foi isolado.

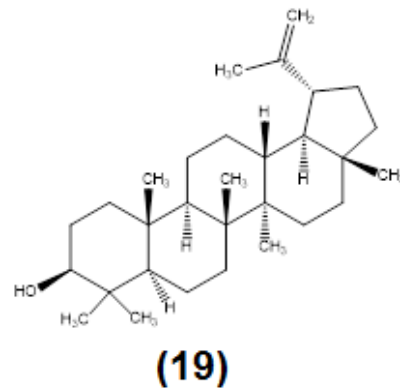


Figura 19: Estrutura química do lupeol (19)

No cromatograma da FrDCM EEHS (Figura 20-C) observa-se um pico com Tr 0,5 min. Esta substância de alta polaridade possui absorção no ultravioleta em aproximadamente λ_{\max} 281,6 nm. Pelo baixo tempo de retenção, pode-se sugerir tratar-se de um ácido carboxílico em estado livre. Provavelmente, este pico deve ser de um ácido, já que seu espectro no UV apresenta λ_{\max} entre 280-320 nm, conforme discutido anteriormente (SILVA et al., 2013). Nesta fração ainda podem ser observados, com menor intensidade, os picos já observados no EEHS, FrAcOET EEHS e FrMeOH EEHS, com Tr 8,9 min. e absorção máxima em λ_{\max} 213,1 nm e outro pico com Tr em 11,7 min. e λ_{\max} 212 nm, devendo tratar-se do mesmo cromóforo, ou seja de iridóides (PLOUVIER; FAURE-BONVIN, 1971).

Em síntese, todas as frações contêm derivados do cinamato e iridóides, sendo estes últimos os majoritários no EEHS, EEHSP, FrAcOET EEHS e FrMeOH EEHS, conforme pode ser observado na Figura 20. Em trabalho de quantificação, Silva e colaboradores (2007) demonstram que os iridoides são os majoritários na espécie, além disso o isolamento realizado no presente estudo e em outros trabalhos confirma esta afirmativa.

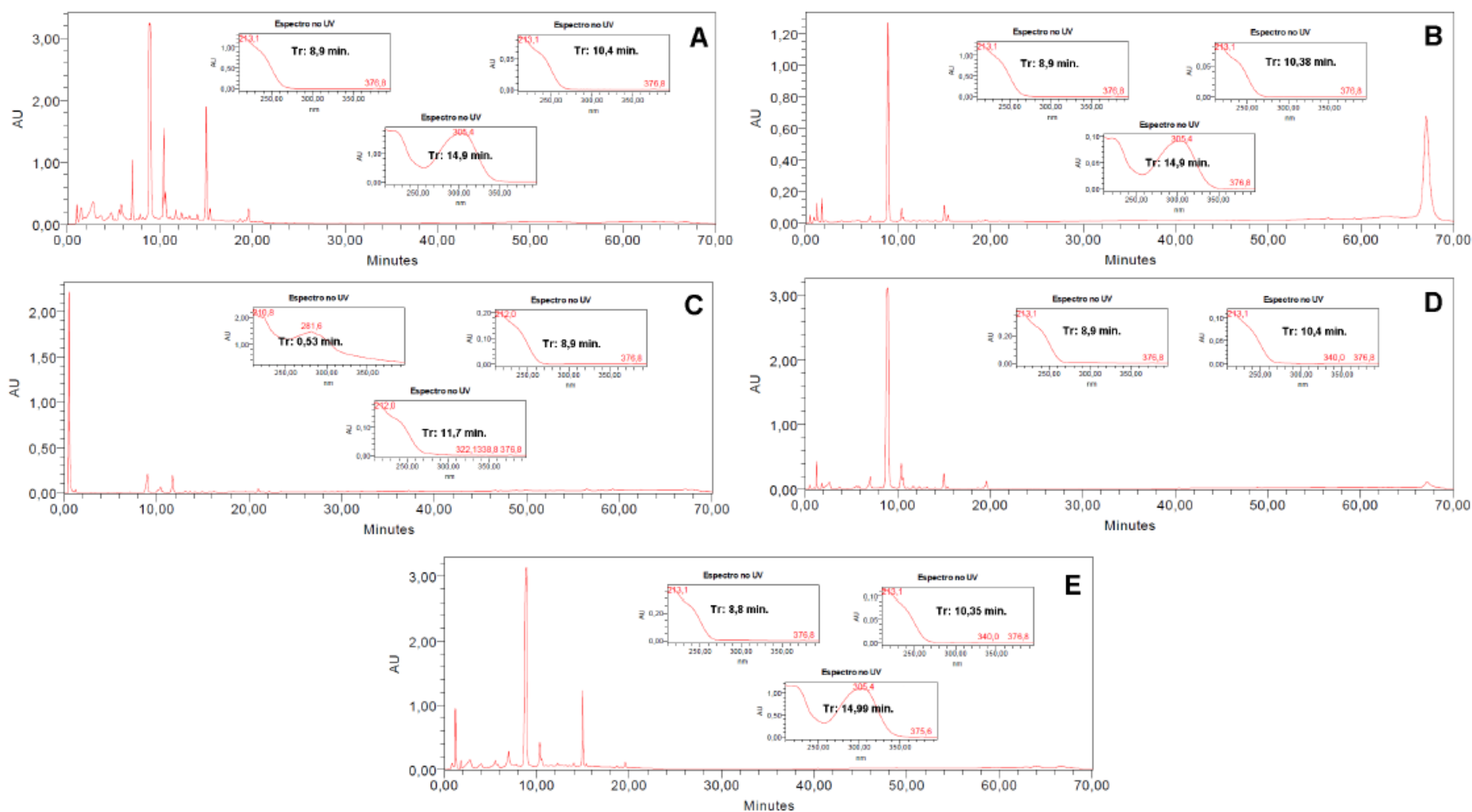


Figura 20: Cromatogramas do extrato etanólico, do precipitado e das frações obtidas por re-extração exaustiva. Detecção em 220 nm. Legenda: A- Extrato etanólico de *Himatanthus articulatus*; B- precipitado do extrato etanólico de *Himatanthus articulatus*; C-Fração diclorometânica do extrato etanólico de *Himatanthus articulatus* por re-extração exaustiva sob refluxo; D- Fração acetato de etila do extrato etanólico de *Himatanthus articulatus* por re-extração exaustiva sob refluxo; E- Fração metanólica do extrato etanólico de *Himatanthus articulatus* por re-extração exaustiva sob refluxo.

Para avaliar a que substância correspondia o pico majoritário em 8,09 min. que é observado nos cromatogramas de todas as frações, o EEHS foi submetido a avaliação por UPLC-PDA-MS/ESI, e os resultados foram comparados com dados da literatura. O EEHS apresentou vários picos, sendo dois intensos em 2,08 e 2,16 min. no cromatograma com detecção por UV, correspondendo a 2,13 e 2,21 min. na detecção por espectrometria de massas. Ambos os picos apresentaram espectros de massa muito semelhantes, sugerindo tratar-se de isômeros, ambos com massa m/z 471 (M+H), correspondendo ao íon pseudomolecular para plumierídeo e seu isômero, isoplumierídeo (Figura 21-C/D). De fato, estas substâncias já foram identificadas em cascas de *H. succuba* (GRAEBNER, 2003). O mesmo é relatado para cascas de *H. articulatus* (BARRETO et al., 1998).

No espectro de massas do EEHS ainda se observam picos em m/z 309 (M+1-162), 291 (M+H – 180) e 231 (m/z 291-60). O primeiro pico corresponde à perda parcial do grupo glicosila, enquanto que o pico em m/z 291 (M+1-180) refere-se à perda total da glicose da estrutura, sendo o pico base em ambos os espectros dos picos analisados. Já o pico em m/z 231 (m/z 291-60) corresponde a perda do radical formiato de metila a partir do grupo éster (Figura 21, BARRETO et al., 2007; GRAEBNER, 2003).

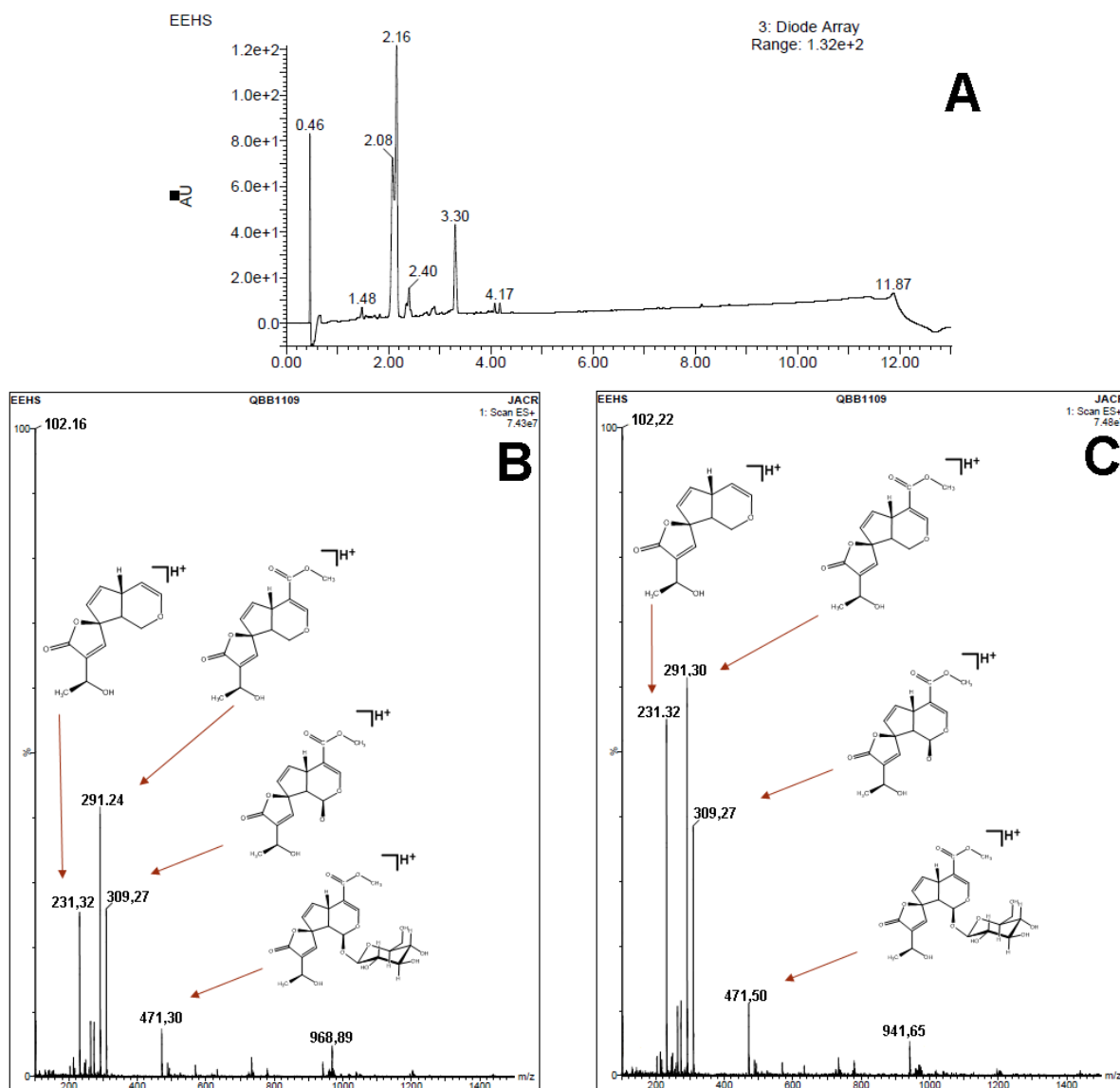


Figura 21: Cromatograma e espectros de massa obtidos online por UPLC-PDA-MS/ESI do extrato etanólico de *Himatanthus articulatus* e possíveis estruturas dos íons fragmentários principais.
 Legenda: A-cromatograma obtido com detector UV; B-espectro de massas do pico com tempo de retenção correspondente a 2,08 minutos; C- espectro de massas correspondente ao pico com tempo de retenção em 2,16 minutos.

De acordo com os dados obtidos o iridóide plumierídeo é o componente majoritário na planta (SILVA et al., 2007), resolveu-se isolar tal substância. Para tal, a fração acetato de etila (FrAcOET EEHS) foi refractionada. A escolha pela FrAcOET EEHS se deu devido ao fato desta apresentar o pico da substância majoritária 74,26 %, ao passo que a fração metanólica (FrMeOH EEHS) que também contém tal substância, porém com área menor 57,1 %. Além disto a FrAcOET EEHS apresentou-se menos complexa, o que facilitaria o isolamento do plumierídeo.

O fracionamento da FrAcOET EEHS se deu por coluna cromatográfica, tendo sílica gel 60 como fase estacionária e solventes de polaridades crescentes, como fase móvel, originando 8 frações, das quais a fração 6 (acetato de etila: metanol 1:1), apresentou massa de 3,4 g e foi recromatografada gerando um pó branco-amarelado, com rendimento final de 1,1 g o qual, em análise por CCD revelou apenas uma mancha, o que se confirmou na avaliação por CLAE-DAD, que mostrou apenas um pico com Tr 8,9 min. e λ_{\max} 213,1 nm, sendo chamada de S1, conforme Figura 22.

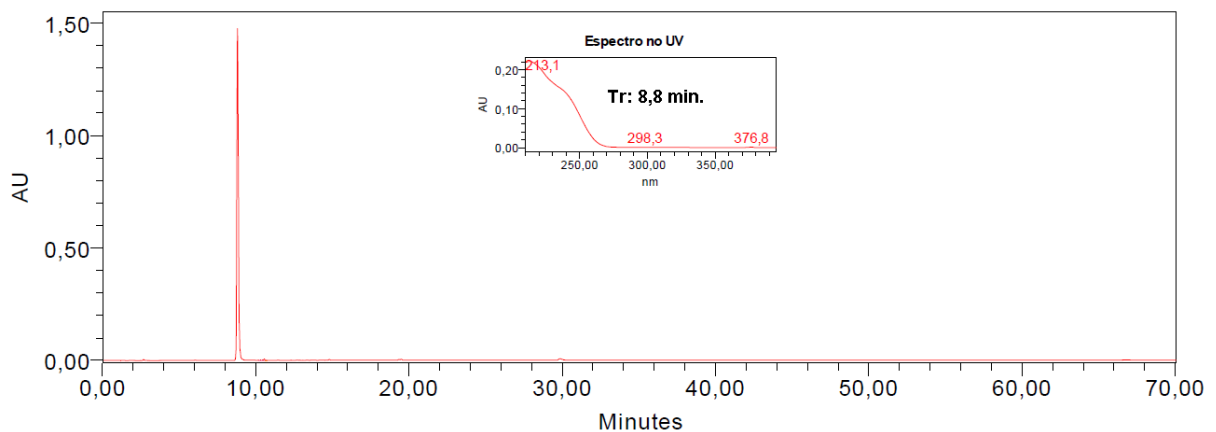


Figura 22: Cromatograma da substância isolada (S1) da fração acetato de etila do extrato etanólico de *Himatanthus articulatus* (FrAcOET EEHS). Detecção em 220 nm

Em análise por espectroscopia no infravermelho da S1 (Figura 23), observam-se bandas de absorção em 3558 e 3367 cm^{-1} , sugestivas de estiramentos $-\text{OH}$, foi observadas ainda, bandas de estiramento $\text{C}=\text{O}$ em 1754, 1693 e 1633 cm^{-1} , a absorção em 1435 é sugestivo de $\text{C}-\text{O}$ em esteres e lactonas (PAVIA et al., 2012)

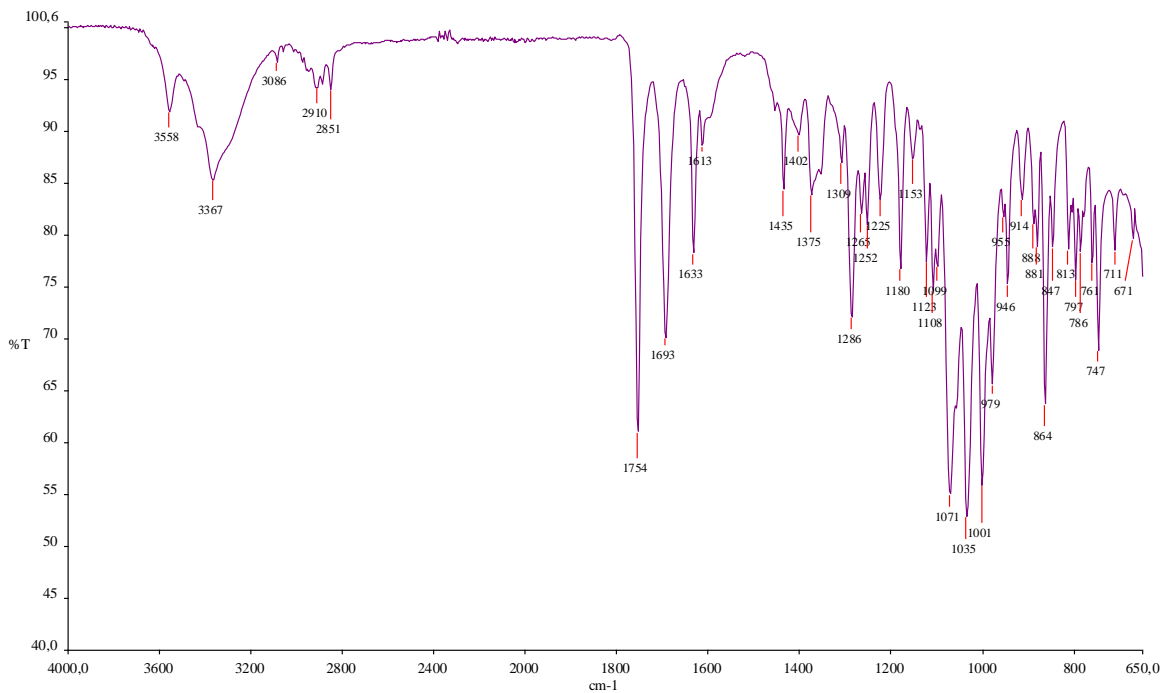


Figura 23: Espectroscopia no infravermelho da substância isolada (S1) a partir da fração acetato de etila do extrato etanólico de *Himatanthus articulatus* (FrAcOET EEHS).

O cromatograma obtido por UPLC-PDA-MS/ESI apresenta dois picos mais intensos no cromatograma, o que pode ser atribuído ao iridóide presente, ou, possivelmente, à mistura dos isômeros, plumierídeo e isoplumierídeo, os quais não são isolados nas condições da análise realizada. No entanto, dois picos foram detectados por UPLC-PDA-MS/ESI que é mais sensível que o CLAE-DAD, já que o mesmo possui uma coluna capilar. Esta mistura de isômeros apresentou resultados idênticos em todas as análises espectrométricas utilizadas no presente trabalho. As fragmentações, para os componente dos picos em 2,0 e 2,10 min. são idênticas, observando-se o pico do íon pseudomolecular $[M+H]^+$ de 471 u, atribuído ao iridóide plumierídeo e o seu isômero, isoplumierídeo, e fragmentações, já observadas e discutidas no EEHS, com picos em m/z 309, oriundo da perda parcial da glicose (m/z 471 – 162), m/z 291 vindo da perda total da glicose (m/z 471 – 180) e o pico base em 231, advindo da perda do grupo formiato de metila (m/z 291 – 60), conforme pode ser observado na Figura 24 (GRAEBNER, 2003; BARRETO, 2007).

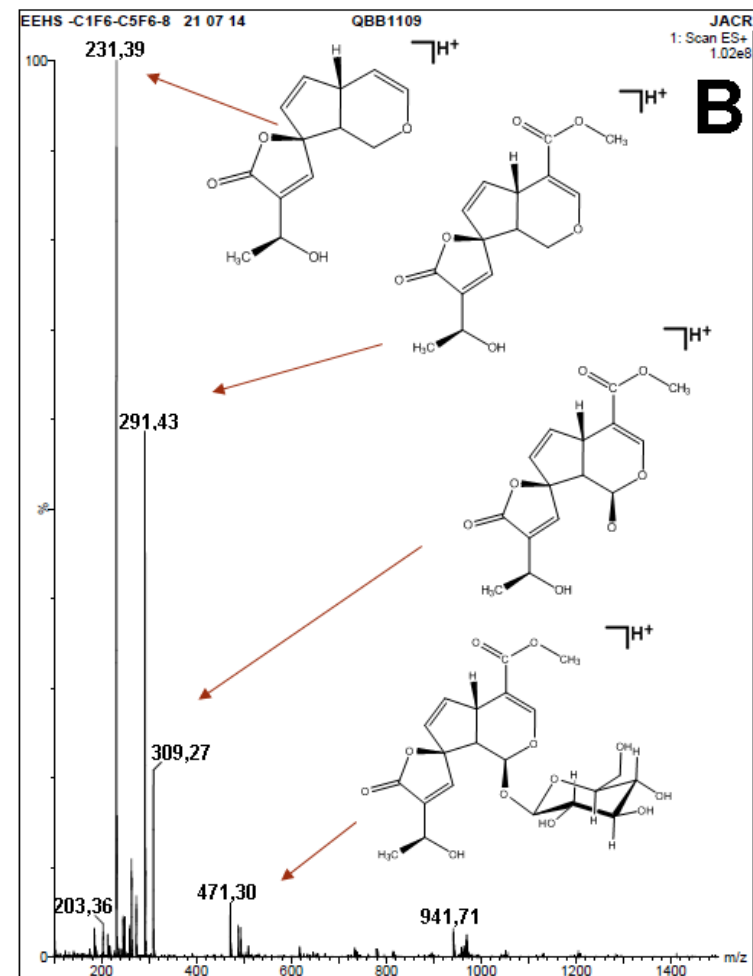
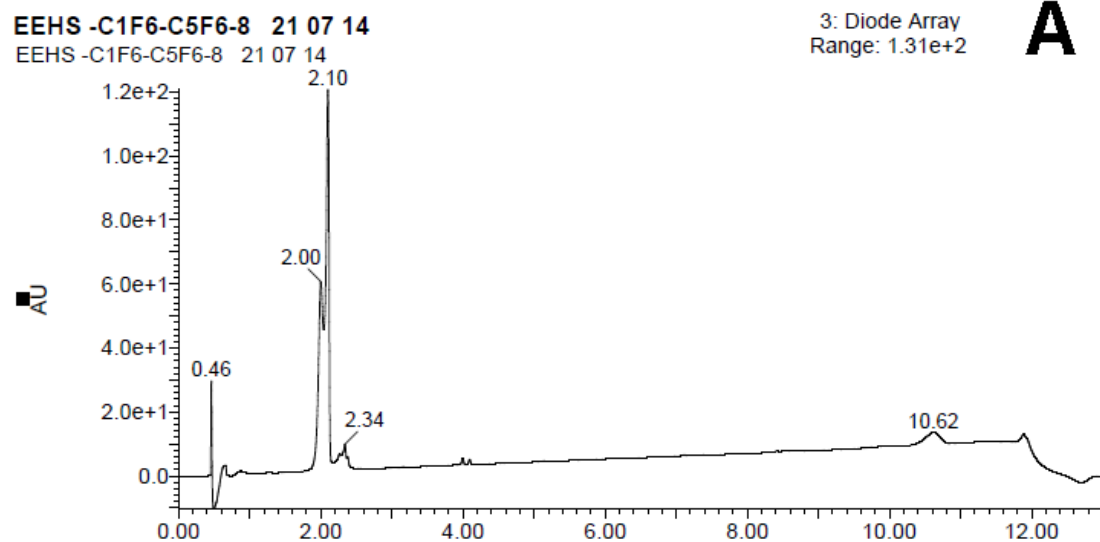


Figura 24: Cromatograma e espectro de massas da substância isolada (S1) a partir da fração acetato de etila do extrato etanólico de *Himatanthus articulatus* (FrAcOET EEHS). A- cromatograma; B- espectro de massas do pico em 2,10 minutos.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 25) da S1 evidenciou sinais entre δ 7,51 e 1,4 ppm, e seus dados foram comparados com a literatura com o objetivo de diferenciar o plumierideo do isoplumierideo, porém esta comparação, de acordo com os dados de RMN de ^1H não permitiu a diferenciação entre estes iridoides (Tabela 06; BARRETO et al., 2007)

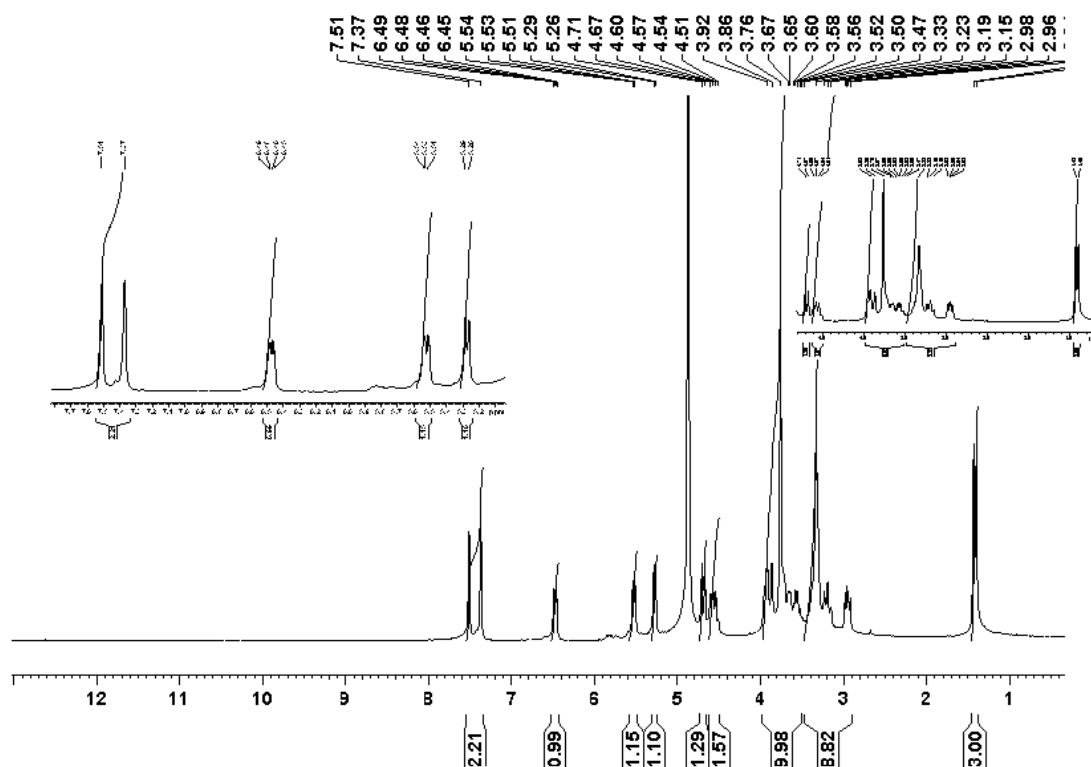


Figura 25: Espectro de Ressonância magnética nuclear de ^1H da substância isolada (S1) da fração acetato de etila do extrato etanólico de *H. articulatus* (FrAcOET EEHS) – 200 MHz, CD_3OD

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 26) mostrou 22 sinais compreendidos entre δ 172,8 e 22,5 ppm. Dois sinais, em δ 172,8 e 168,5, estão na região de carbonos carbonílicos ($\text{C}=\text{O}$) e poderiam ser atribuídos a carboxilas, lactonas ou ésteres (GRAEBNER, 2003). O carbono na posição 12, com sinal em δ 172,8 ppm, corresponde à carbonila de uma lactona, e o sinal do carbono 15, em δ 168,5 ppm é atribuído ao grupo éster, de acordo com experimentos de correlação de carbono e hidrogênio (GRAEBNER, 2003). Os dados estão resumidos na Tabela 06, e foram

comparados com dados da literatura (BARRETO et al., 2007). As principais diferenças nos deslocamentos químicos descritos para plumierídeo e isoplumierídeo, referem-se, principalmente aos sinais de C1, C9, C10 e C12 (BARRETO et al., 2007), sendo que os dados de S1 são mais próximos daqueles apresentados para o plumierídeo (Tabela 06). Estas diferenças podem ser explicadas pela diferença de configuração em C8.

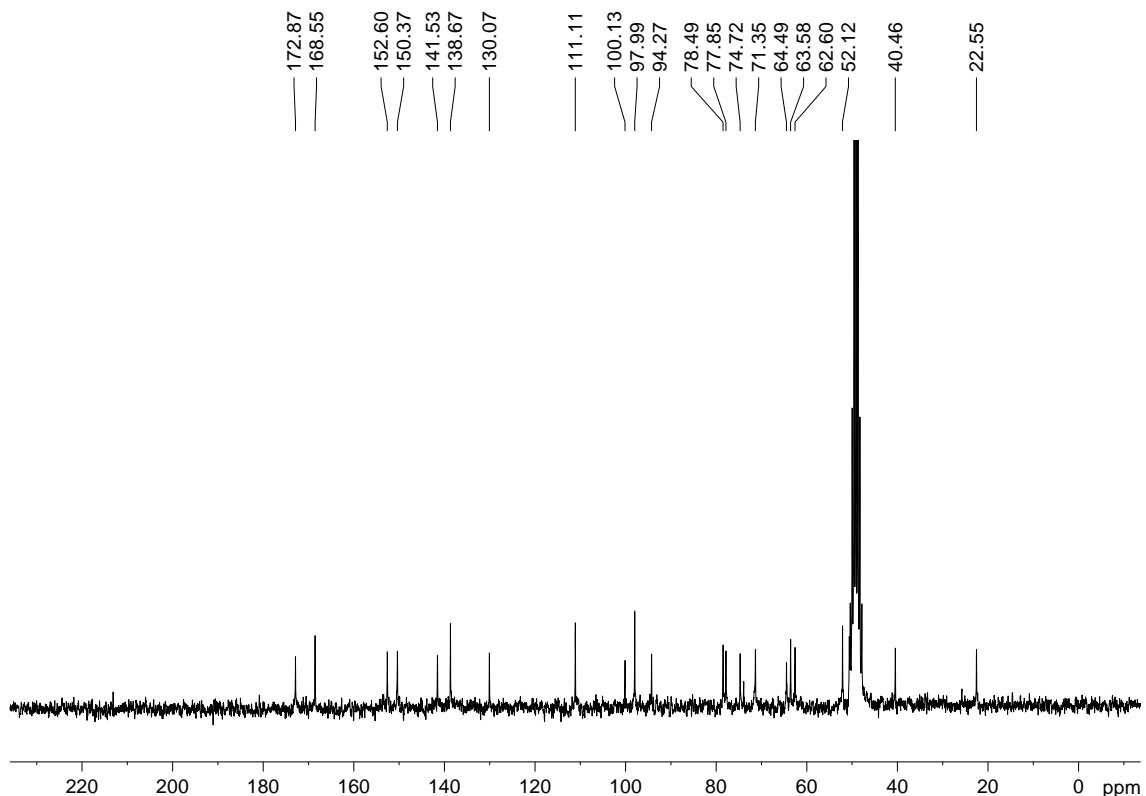


Figura 26: Espectro ressonância magnética nuclear de ^{13}C da substância isolada (S1) a partir da fração acetato de etila do extrato etanólico de *Himatanthus articulatus* (FrAcOET EEHS) – 50 MHz, CD_3OD

No espectro de RMN de ^{13}C pela técnica DEPT 135 (Figura 27) observaram-se 15 sinais correspondentes a CH e CH_3 e dois sinais atribuídos a CH_2 , porém, apenas um destes sinais de CH_2 (δ 62,6 ppm), pôde realmente ser atribuído à molécula em análise. O outro sinal (δ 64,5 ppm), provavelmente, é oriundo de alguma impureza presente na amostra ou no solvente utilizado, visto que todos os outros sinais são coerentes com a literatura (BARRETO et al., 2007; GRAEBNER, 2003).

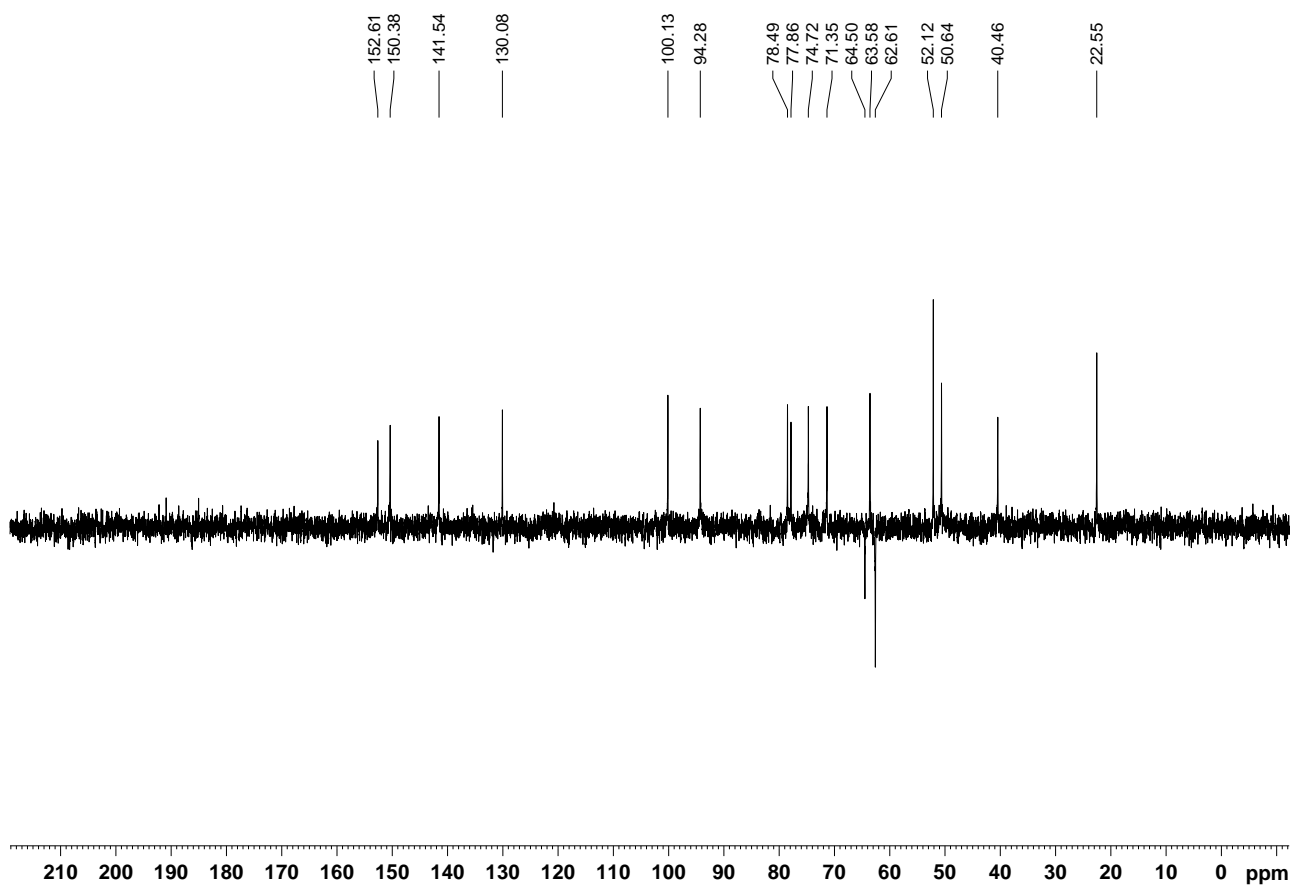


Figura 27: Espectro de ressonância magnética nuclear de ^{13}C DEPT 135 da substância isolada (S1) a partir da fração acetato de etila do extrato etanólico de *Himatanthus articulatus* (FrAcOET EEHS) – 50 MHz, CD_3OD

Os dados de RMN de ^1H , de ^{13}C estão apresentados de forma resumida na Tabela 06. Assim a Figura 28 apresenta a provável estrutura para S1, sendo ela o plumierídeo. A presença de isoplumierídeo em S1 não está descartada, porém a estrutura do plumierídeo foi postulada devido ser este o iridoide majoritário da espécie, coerente com os dados de RMN

Tabela 07: Dados das atribuições dos sinais de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C da substância isolada (S1) isolada a partir da fração acetato de etila do extrato etanólico de *Himatanthus articulatus* (FrAcOET EEHS) e dados da literatura

| Posição | δ_{H} (200 MHz) | | | δ_{C} (50 MHz) | | |
|---------|---|---|--|---|---|--|
| | Presente estudo (S1) CD_3OD | BARRETO et al., 2007 Isoplumierídeo (18) D_2O | BARRETO et al., 2007 Plumierídeo (14) D_2O | Presente estudo (S1) CD_3OD | BARRETO et al., 2007 Isoplumierídeo (18) D_2O | BARRETO et al., 2007 Plumierídeo (14) D_2O |
| 1 | 5,27 d (J= 6 Hz) | 5,53 d (J= 0,9 Hz) | 5,45 d (J= 5 Hz) | 94,2 | 93,5 | 94,5 |
| 3 | 7,37 s | 7,65 s | 7,55 d (J= 1,2 Hz) | 152,6 | 152,7 | 152,8 |
| 4 | - | - | - | 111,1 | 111,1 | 111,3 |
| 5 | 3,89 d (J= 12 Hz) | - | 4,10 m | 40,46 | 38,8 | 40,6 |
| 6 | 6,4 dd (J= 2; 4 Hz) | 6,77 dd (J= 5,6; 2,8 Hz) | 6,65 dd (J= 5,5; 2,5 Hz) | 141,5 | 141,3 | 141,7 |
| 7 | 5,5 dd (J= 6; 4 Hz) | 5,75 dd (J= 5,6; 1,3 Hz) | 5,70 dd (J= 2; 6 Hz) | 130 | 129,1 | 130,3 |
| 8 | - | - | - | 97,9 | 97,6 | 98,2 |
| 9 | 3,2 dd (J= 8;4 Hz) | 3,27 dd | 3,12 dd (J= 5; 4 Hz) | 50,6 | 46,4 | 49,7 |
| 10 | 7,51 s | 7,65 s | 7,70 d (J= 1,7 Hz) | 150,3 | 152,7 | 150,5 |
| 11 | - | - | - | 138,6 | 139,3 | 138,9 |
| 12 | - | - | - | 172,8 | 174,6 | 173 |
| 13 | - | - | 4,75 dd (J= 1,5; 6 Hz) | 63,6 | 63,6 | 63,8 |
| 14 | 1,42 d (J= 6 Hz) | 1,62 d (J= 6,5 Hz) | 1,61 d (J= 6,3 Hz) | 22,5 | 22,4 | 22,7 |
| 15 | - | - | - | 168,5 | 170,4 | 168,7 |
| 16 | 3,67 s | 3,96 s | 3,94 s | 52,1 | 53,6 | 52,2 |
| 1' | 4,7 d | 4,92 d | 4,86 d (J= 8 Hz) | 100,1 | 99,8 | 100,4 |
| 2' | 2,96 m | 3,95 m | - | 74,7 | 74,3 | 75,0 |

| | | | | | | |
|----|--------|--------|---|------|------|------|
| 3' | 3,5 m | 3,44 m | - | 77,8 | 77,3 | 78,7 |
| 4' | 4,5 dd | 4,05 m | - | 71,3 | 71,2 | 71,6 |
| 5' | 3,8 m | 3,64 m | - | 78,9 | 78 | 78,2 |
| 6' | 3,4 m | 4,01 m | - | 61 | 62,4 | 62,8 |

Legenda: d-dupleteo, dd-duplo dupleteo, s-simpleteo, m-multipleto

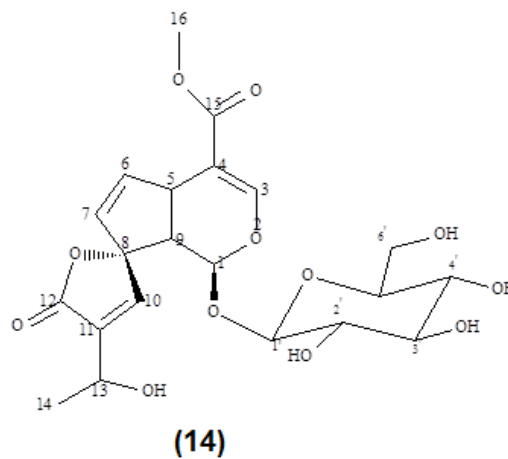


Figura 28: Estrutura química possível para S1 (plumierídeo-14), isolado a partir da fração acetato de etila do extrato etanólico de *Himatanthus articulatus* (FrAcOET EEHS)

Sabendo-se que a planta é da família Apocynaceae e esta tem como uma das características a presença de alcaloides, o EEHS foi submetido ao fracionamento em coluna cromatográfica, com objetivo de se isolar os alcaloides. Para a eluição foram empregados solventes de polaridades crescentes obtendo-se 179 frações. Estas frações foram submetidas a análises em CCD e reunidas em 47 grupos (Tabela 07). Destas, F68-70 e F71 apresentaram maior rendimento, ambas obtidas do eluente AcOET/MeOH (4:1; 1,6484 g para F68-70 e 0,3897 g para F71; 32,96 % e 7,79 % em relação aos 5g do EEHS, respectivamente) sendo estas, portanto, as frações majoritárias do extrato etanólico.

Tabela 08: Frações reunidas oriundas do extrato etanólico de *Hlmatanthus articulatus* (EEHS) por cromatografia em coluna cromatográfica com sílica gel e suas massas

| Fração | Massa (g) | Fração | Massa (g) |
|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 01 | 0,0575 | 124 -133 | 0,0651 |
| 02 a 08 | 0,0884 | 134 | 0,0072 |
| 09 a 18 | 0,0360 | 135 a 141 | 0,0288 |
| 19 e 20 | 0,0196 | 142 | 0,0089 |
| 21 a 23 | 0,0146 | 143 a 145 | 0,0237 |
| 24 a 29 | 0,0385 | 146 e 147 | 0,0151 |
| 30 a 36 | 0,0629 | 148 a 150 | 0,0176 |
| 37 a 40 | 0,0207 | 151 | 0,0096 |
| 41 a 43 | 0,0119 | 152 e 153 | 0,0162 |
| 44 a 54 | 0,0418 | 154 | 0,0093 |
| 55 a 60 | 0,0077 | 155 e 156 | 0,0092 |
| 61 a 66 | 0,0046 | 157 | 0,0073 |
| 67 | 0,0168 | 158 | 0,0043 |
| 68 a 70 | 0,3897 | 159 a 162 | 0,0264 |
| 71 | 1,6484 | 163 | 0,0088 |
| 72 a 74 | 0,2594 | 164 e 165 | 0,0190 |
| 75 a 88 | 0,2077 | 166 e 168 | 0,0146 |
| 89 a 96 | 0,0584 | 169 a 170 | 0,0070 |
| 97 a 99 | 0,0905 | 171 | 0,0114 |
| 101 a 108 | 0,0551 | 172 | 0,0074 |
| 109 a 111 | 0,0138 | 173 a 176 | 0,0120 |
| 112 a 123 | 0,0196 | 177 | 0,0260 |

As frações F68-70 e F71, em CCD, por revelação com anisaldeído sulfúrico, apresentaram manchas com os mesmos Rf's. A fração F71 foi utilizada para caracterização por métodos espectrométricos, obtendo-se os espectros no infravermelho e espectro de massas.

O espectro no IV de F71 (Figura 29) apresentou absorções características para estiramento de grupos O-H na faixa de 3.200 a 3.600 cm^{-1} e de grupos C=O em 1640, 1700 e 1760 cm^{-1} . Estes dados sugerem que F71 contém predominantemente os iridoides plumericina, isoplumericina, plumieirideo e isoplumierídeo como já foi relatado para *H. succuba* e *H. articulatus*, conforme discutido anteriormente (SILVA et al., 1998; BARRETO et al., 1998). É importante lembrar que, atualmente, *H. succuba* é sinonímia de *H. articulatus*, portanto trata-se da mesma planta (SPINA, 2004). Absorções fracas são observadas em 1610 e 1500 cm^{-1} e são indicativas da presença de constituintes aromáticos. Neste caso, pode tratar-se dos cinamatos de lupeol, alfa-amirina e beta-amirina, já isolados de *H. succuba* (SILVA et al., 1998).

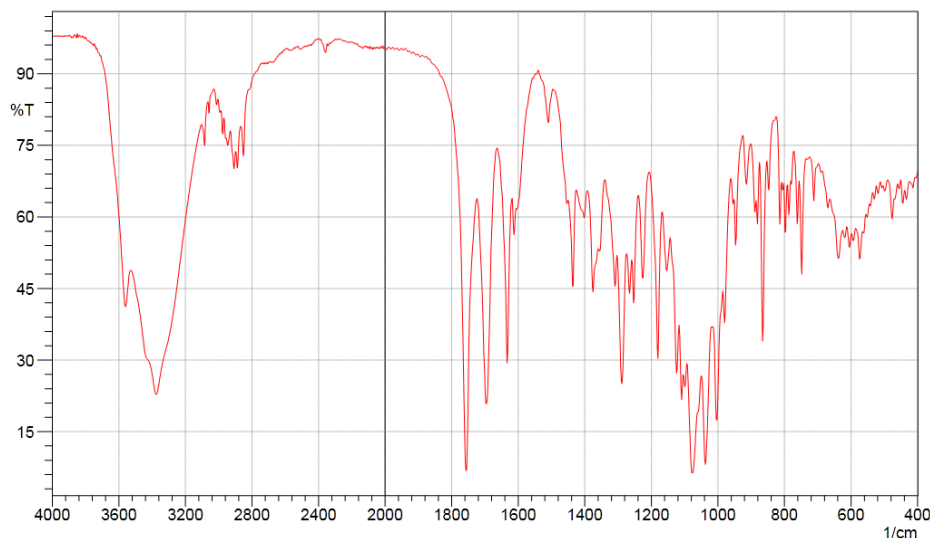


Figura29: Espectro no infravermelho da fração F71 obtida por coluna cromatográfica a partir do extrato etanólico de *Himatanthus articulatus*

Na análise de F71 por UPLC-PDA-MS/ESI, o cromatograma obtido mostrou o pico mais intenso em 2,27 minutos (λ_{max} 213 nm), A este pico a massa encontrada em m/z 471 $[\text{M}+\text{H}]^+$ pode ser atribuída ao plumieirídeo ou isoplumierídeo, observando-se as mesmas fragmentações já discutidas para os picos com Tr 2,08 e 2,16 minutos do EEHS, conforme Figura 30-B (BARRETO et al., 2007). Esta fração

portanto, não foi refractionada, devido ao fato de já se ter sido isolado esta substância.

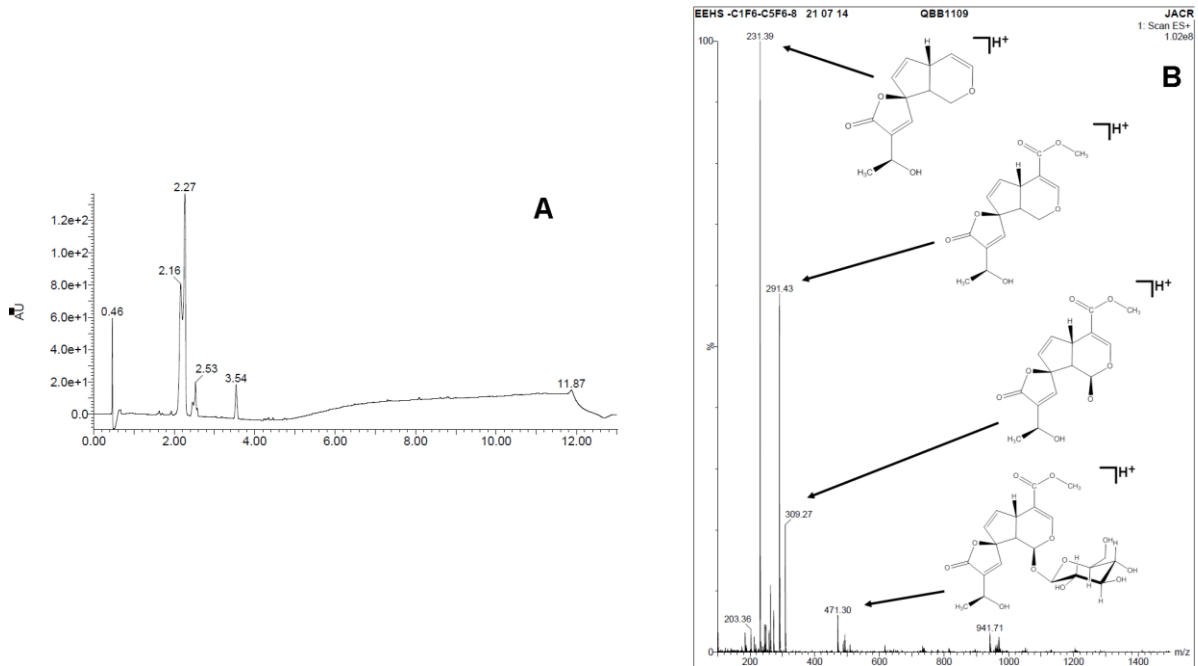


Figura 30: Cromatograma e espectro de massas da fração F71 obtida por coluna cromatográfica do extrato etanólico de *Himatanthus articulatus*.

Legenda: A-Cromatograma; B- espectro de massas, modo positivo do pico com tempo de retenção em 2,27 min.

De acordo com as metodologias empregadas, e levando-se em consideração o rendimento em massa das frações eluídas da coluna cromatográfica do EEHS, percebe-se que o iridóide plumierídeo é o composto majoritário no extrato como relatado em outros trabalhos (SILVA et al., 1998; BARRETO et al, 1998; MIRANDA et al., 2000; WOOD et al., 2001; GRAEBNER, 2003; MOREL et al., 2006; CASTILLO et al., 2007; WALTENBERGER et al., 2011; REBOUÇAS et al., 2013) e confirmado no presente estudo.

Em trabalho realizado com as cascas e látex de *H. sucuuba* foram quantificados os iridoides por meio de CLAE-DAD, no qual 1 g da casca foi submetido a decocção obtendo 30 mg de extrato aquoso após liofilização. Como componente majoritário desse extrato obteve-se o iridoide plumierídeo (14; 12 mg) e seu isômero isoplumierideo (18; 5 mg). O componente majoritário correspondeu, portanto, a 40 % do extrato aquoso (SILVA et al., 2007).

No presente estudo, não se quantificou os iridióides da fração, no entanto, em análise por espectrometria de massas, descrito anteriormente, percebe-se que o plumierídeo (14) [M+H 471] é o composto majoritário da planta, corroborando então com a literatura (SILVA et al., 1998; BARRETO et al., 1998; MIRANDA et al., 2000; WOOD et al., 2001; GRAEBNER, 2003; MOREL et al., 2006; CASTILLO et al., 2007; WALTENBERGER et al., 2011; REBOUÇAS et al., 2013).

A cromatografia em coluna de sílica gel foi eficiente para obter frações ricas em iridoides (F71), porém não foi possível obter frações ricas em alcaloides. Tal fato pode estar relacionado ao baixo teor destes nesta planta, e a pouca quantidade de extrato empregado na cromatografia.

Embora a família Apocynaceae seja conhecida por apresentar alcaloides em sua composição (HENRIQUE et al. in SIMÕES et al., 2010), o mesmo não ocorre com o gênero *Himatanthus*, pois poucos são os trabalhos em que se tem isolado ou detectado alcaloides no gênero. Do extrato desengordurado clorofórmico acidificado obtido das cascas de *H. lancifolius* foi isolado o alcaloide uleína (10; BAGGIO et al., 2005; SOUZA, 2008; LOPES, 2008). Das cascas da mesma espécie ainda foram isolados os alcaloides ioimbina (12; LOPES, 2008; SOUZA, 2008) e *epi*-uleína (13; SOUZA, 2008), todos alcaloides indólicos. Da espécie *H. articulatus* não se tem relatos, até o momento, do isolamento de metabólitos desta classe.

Assim, a premissa inicial deste estudo foi que o método extrativo (percolação com etanol), talvez não fosse o mais adequado para extrair os alcalóides de *H. articulatus*. Então, o extrato etanólico foi submetido a re-extração com clorofórmio e o pó das cascas da planta foi submetido a dois processos extrativos de alcaloides, gerando frações alcaloidicas. A presença desta classe de metabólitos foi confirmada pela presença de manchas alaranjadas com o reagente de Dragendorff em CCD (Figura 31).

Os alcaloides são metabólitos secundários de caráter alcalino, que possuem em sua estrutura um nitrogênio em um estado de oxidação negativo (HENRIQUES et al. in SIMÕES, 2010). Partindo dessa premissa, para obter uma fração rica em alcalóides, o extrato etanólico foi submetido a partição ácido-base.

O extrato etanólico (50g) foi solubilizado em clorofórmio e re-extraído com HCl 1 N, gerando uma fração orgânica de neutros (FNEEHS, rendimento de 4,36%; Tabela 07) e uma fração aquosa ácida, que foi alcalinizada e particionada com solvente orgânico, na qual, provavelmente, encontram-se os alcaloides (FAEEHS,

rendimento de 1,06%; Tabela 07). Em CCD revelada com reagente de Dragendorff pode-se observar uma banda de cor alaranjada em cada fração (Figura 24-4-FNEEHS; 5-FAEEHS), o que indica a presença de alcaloides nas duas amostras.

O pó das cascas foi submetido a dois processos extrativos para alcaloides. No método 1 as cascas foram alcalinizadas com hidróxido de amônio, o que converte os alcaloides em bases livres, tornando-se solúveis em solvente orgânico. Este extrato foi percolado com diclorometano e particionado com uma solução aquosa ácida, na qual os alcaloides foram protonados (forma de sal), gerando aí duas fases, uma orgânica denominada de frações de neutros (FNHS DCM; Figura 24-1), que teoricamente não contem alcalóides com rendimento de 0,22 % (Tabela 07). A outra fração aquosa ácida, com os alcaloides na forma de sais, insolúveis em solvente orgânico, foi alcalinizada liberando os alcaloides para forma livre, que novamente foram extraídos com diclorometano. A concentração da solução orgânica levou à fração diclorometânica alcaloídica (FAHS1 DCM; Figura 24-2) com rendimento de 0,04 % (Tabela 08).

Visando melhorar o rendimento de extração para alcaloides utilizou-se o método 2. Neste método, o pó das cascas foi percolado com uma solução de HCl 1 N, extraíndo os alcaloides já na forma de sal. Esta solução foi alcalinizada, tornando-os novamente em bases livres e então particionando-se com solvente orgânico que foi concentrado, tendo-se aí a fração de alcaloides.

Na extração de alcaloides pelo método 2, obteve-se, uma fração a partir do pó do vegetal (FAHS 2 DCM) com rendimento de 0,325 g correspondendo a 0,16 % (Tabela 07). CCD desta fração, revelada com reagente de Dragendorff mostrou manchas de alcalóides, de cor alaranjada (Figura 24-3).

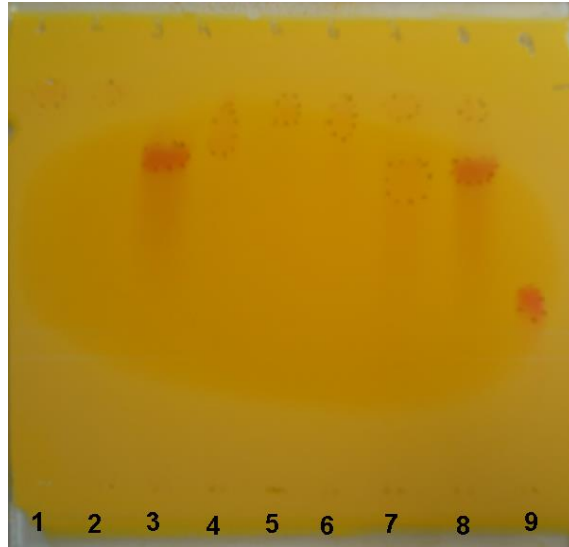


Figura 31: CCD das frações alcalóidicas e de neutros obtidas no fracionamento do extrato etanólico e extração do pó das cascas de *Himatanthus articulatus*

Eluente: Acetato de etila-Ácido fórmico-Ácido acético-água-etilmetilcetona (50:7:3:10:30)

Legenda: 1: FNHS DCM; 2: FAHS1 DCM; 3: FAHS2 DCM; 4: FNEEHS; 5: FAEEHS; 9: QUININA

Tabela 09: Rendimento das frações alcalóidicas

| FRAÇÃO | RENDIMENTO (g) | REDIMENTO % |
|-----------|----------------|-------------|
| FAEEHS | 0,5300 | 1,06 |
| FNEEHS | 3,9262 | 4,36 |
| FAHS1 DCM | 0,0828 | 0,04 |
| FNHS DCM | 0,4447 | 0,22 |
| FAHS2 DCM | 0,3256 | 0,16 |

Legenda: FAEEHS-fração alcalóidica obtida do extrato etanólico de *Himatanthus articulatus*; FNEEHS-fração de neutros obtida do extrato etanólico de *Himatanthus articulatus*; FAHS1 DCM-fração alcalóidica obtida do pó das cascas de *Himatanthus articulatus* pelo método de extração alcalina utilizando diclorometano como solvente extrator; FNHS DCM-fração de neutros obtida do pó das cascas de *Himatanthus articulatus* utilizando diclorometano como solvente extrator; FAHS2 DCM-fração alcalóidica obtida do pós das cascas de *Himatanthus articulatus* pelo método de extração ácida utilizando diclorometano como solvente extrator;

Com relação aos rendimentos das extrações de alcalóides, estes foram de 1,06 % para FAEEHS (a partir do EEHS), 0,04 % para FAHS1 DCM (método 1) e 0,16 % para FAHS2 DCM.

Ao que parece, o maior rendimento foi obtido para a extração a partir do EEHS. Porém, é necessário levar em conta que o EEHS utilizado (50 g) corresponderia à extração de 300 g do pó da planta. Quando se faz o cálculo a partir

desse valor, o rendimento para FAEEHS é de 0,17 %, sendo coerente com o resultado para FAHS2 DCM (Tabela 08).

Em relação ao método de extração ácido-base a partir do pó da planta, percebeu-se que o melhor rendimento para alcaloides foi pelo método 2, isto é, extração do pó da planta com HCl 1N.

Rattmann et al. (2005) relatam um rendimento de 0,0804 % de fração alcaloídica das cascas de *Himatanthus lancifolius* (Muell.Arg.) Woodson pelo método de extração ácida, correspondente ao método 2 empregado no presente estudo (RATTMANN et al., 2005). Pela mesma metodologia, SOUZA et al. (2007) mostraram um total de 0,11% de fração alcaloídica obtida do pó das cascas de *H. lancifloius* (SOUZA et al., 2007). Já, Barros et al. (2013) relataram um teor 0,0832 % de alcaloides totais em cascas de *H. lancifolius* (BARROS et al., 2013). Percebe-se então que os métodos são eficientes para extração de alcaloides, principalmente pelo método de extração ácida. Não existe na literatura, isolamento de alcaloides para *H. articulatus*, porém os resultados das extrações ácido-base mostram que a planta possui estes metabólitos secundários.

A fração FAHS2 DCM foi submetida à análise em CLAE-DAD, tendo os picos majoritários no cromatograma com $T_r = 7,91$ minutos (52,83% de área) e 8,98 minutos (19,32% área). A análise do espectro no UV sugere tratar-se de alcaloide β -carbólico, pois apresenta λ_{max} 235,5; 273,3 nm. (Figura 32). Segundo Sangster e Stuart (1964), esses alcaloides apresentam um cromóforo com três picos de absorção, geralmente em λ_{max} 234; 287 nm, correspondentes às absorções do sistema aromático condensado, contendo ou não mais de um nitrogênio

Nesta mesma fração foram observados picos em T_r 7,09 min. (11,14%), 25,82 min. (2,01%), além de outros picos menos intensos, somando-se ao todo um total de 16 picos. A análise dos espectros sugerem que estes picos, provavelmente, sejam de alcaloides indólicos, pois apresentam cromóforo com picos de absorção em aproximadamente λ_{max} 210 e 280 nm (SCHRIPSEMA et al. in SIMÕES, 2010).

Embora na análise por CCD tenha mostrado apenas uma banda, o que representaria apenas uma substância, trata-se, na realidade, de uma mistura de alcaloides, o que foi confirmado por CLAE-DAD que mostrou 12 picos com pelo menos 2 cromóforos, um para alcaloides β -carbólicos e outro para alcaloides indólicos (Figura 32). Até o presente momento não foi descrito o isolamento de

alcaloides β -carbonílicos deste gênero, tendo sido descrito apenas o isolamento de alcaloides indolomonoterpênicos para *H. lancifolus* (SOUZA, 2008; BAGGIO et al., 2005; LOPES, 2008; SOUZA et al., 2007; RATTMANN et al., 2005; FRANÇA et al., 2000). Porém, alcaloides β -carbólicos podem ser encontrados na família Apocynaceae, sendo que alguns deles já foram descritos para o gênero *Aspidosperma* (PEREIRA et al., 2007).

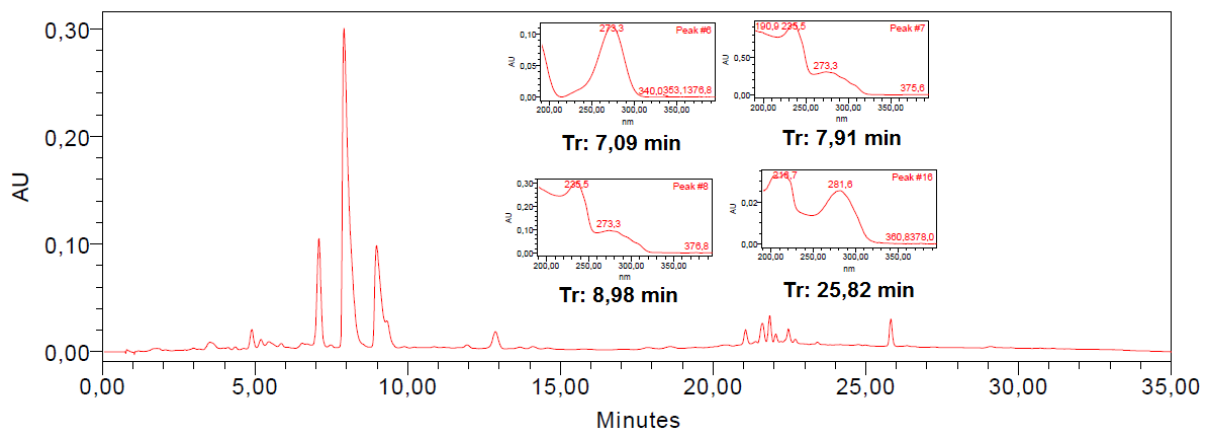


Figura 32: Cromatograma da fração alcaloídica FAHS2 DCM obtida do pó das cascas de *Himatanthus articulatus* por extração ácida, com ênfase para os picos majoritários, sugestivos de alcaloides β -carbólicos e indólicos. Detecção em 280 nm.

Outro estudo realizado com FAHS2 DCM foi a análise por UPLC-PDA-MS/ESI, em que se observou um pico majoritário com TR 3,29 min. no detector de ultravioleta, o qual corresponde ao pico com Tr 3,33 minutos no espectro de massas positivo (Figura 33). Este pico corresponde a uma massa molecular de 328 u já que o íon pseudomolecular é 329 $[M+H]^+$, sugerindo tratar-se de um alcaloide β -carbólico, possivelmente o 10-hidroxi-antirina-N-óxido (20), cuja estrutura química é apresentada na Figura 34 (KATO et al., 2012).

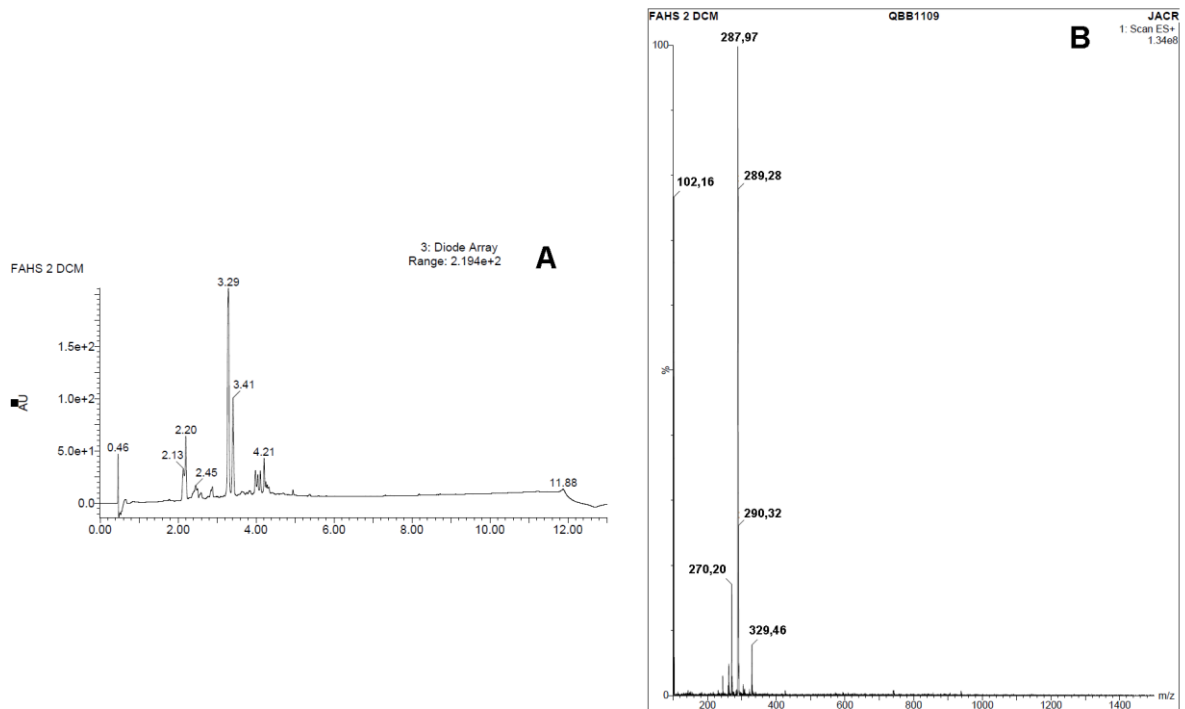


Figura 33: Cromatogramas por detecção no UV (A), espectrometria de massas (B) para FAHS2 DCM correspondente ao pico com Tr 3,29 minutos.

Legenda: FAHS2 DCM: Fração alcaloídica diclorometânica do pó das cascas de *Himatanthus articulatus* obtida por extração ácida

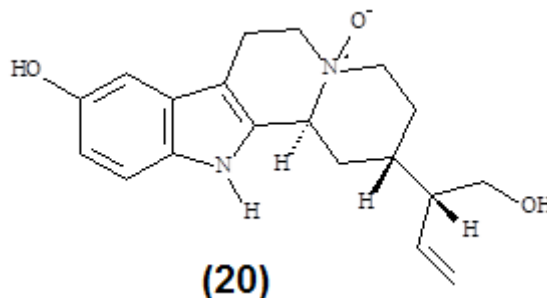


Figura34: Estrutura química do alcaloide 10-hidroxi-antirina-N-óxido (20)

Alcalóides β -carbolínicos já foram isolados de outras espécies do gênero *Aspidosperma*, como *A. gilbertii* (MIRANDA et al., 1982) e *A. marcgravianum* (ROBERT et al., 1983). Estes dados, porém, não são suficientes para a definição da estrutura da substância, sendo necessário para tal, o isolamento do metabólito e sua análise por ressonância magnética nuclear.

Em síntese, após a realização de vários métodos fitoquímicos observou-se que a escolha do método de fracionamento da *H. articulatus* depende do objetivo a ser alcançado. Para obter frações ricas em iridóides, o melhor método é o fracionamento do extrato etanólico em coluna cromatográfica aberta de sílica gel como se verificou no presente estudo, em que as frações F71 do EEHS concentram o maior teor dos iridoides, plumierideo e plumericina, possivelmente junto com seus isômeros, isoplumierideo e isoplumericina. Quanto a substância majoritária é possível de ser isolada por cromatografia em coluna da fração acetato de etila do extrato etanólico, podendo-se isolar o plumierideo. Entretanto, se a meta for a obtenção de alcalóides, o mais adequado é uma extração ácida (método 2), diretamente do pó das cascas da planta (FAHS2 DCM), que apresentou o maior rendimento (0,16 %) em relação ao pó da planta utilizado.

Realizado o estudo fitoquímico, prosseguiu-se o estudo do EEHS, frações e plumierideo em ensaio *in vitro* contra *P. falciparum* clone W2, resistente a cloroquina, tendo como base o uso tradicional da espécie, estudo preliminar de atividade antimalárica e obtenção de frações alcaloídicas.

5.2 Atividade antiplasmódica

Para a avaliação da atividade antiplasmódica foram selecionadas as seguintes amostras: extrato etanólico obtido das cascas *H. articulatus* (EEHS), precipitado (EEHSP), frações obtidas pelo método de partição exaustiva por refluxo (frações diclorometano-FrDCM EEHS, acetato de etila-FrAcOET EEHS e metanólica-FrMeOH EEHS), frações alcaloídicas obtidas a partir do extrato etanólico (FAEEHS) e a partir do pó da planta (FAHS1 DCM e FAHS2 DCM), frações de neutros obtidas do extrato etanólico (FNEEHS) e a partir do pó da planta (FNHS DCM).

O extrato etanólico apresentou concentração inibitória 50% (CI₅₀) superior a 50 µg/mL (Tabela 09). Estudos cromatográficos (CCD e CLAE-DAD) detectaram a presença de alcaloides, porém quando se analisa a porcentagem de área (4,5 %) observa-se que o alcalóide não é majoritário. A premissa inicial deste trabalho foi que a atividade antimalárica atribuída a esta planta esteja relacionada aos alcaloides, por isso o extrato etanólico e o pó das cascas foram submetidos a diferentes métodos de extração para alcalóides, com o objetivo de se obter frações

ricas destes metabólitos. Tal premissa se fundamenta no fato de extratos etanólicos obtidos de outras Apocynaceae com atividade antiplasmódica foram submetidos ao fracionamento e terem como marcador de atividade os alcaloides (PAULA et al., 2014).

O precipitado (EEHSP) também apresentou CI_{50} superior a 50 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 08). Em CLAE-DAD, o pico majoritário (64,4 % de área) sugere tratar-se de um cromóforo de iridoide, provavelmente o plumierídeo.

Igualmente, a fração diclorometânica obtida do extrato etanólico por re-extrações exaustivas (FrDCM EEHS) apresentou CI_{50} superior a 50 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela.09). Nesta fração, o cromatograma e espectro de DAD mostrou um pico majoritário (95 % área) sugestivo de ácido carboxílico na forma livre (muito polar). Este método foi pouco eficiente para obtenção de fração diclorometânica enriquecida em alcaloide, por isso outros métodos foram empregados.

As frações acetato de etila e metanólica obtidas do extrato etanólico por fracionamento exaustivo (FrAcOET EEHS; FrMeOH EEHS) também apresentaram CI_{50} superior a 50 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela.09). Em CLAE-DAD, as amostras apresentaram pico majoritário cujo espectro sugere tratar-se de iridoide, e na fração metanólica, ainda observa-se pico sugestivo de derivados do cinamato, já isolados desta espécie, dentre estes o cinamato de α -amirina (16) e cinamato de lupeol (15). Estudo realizado com extrato etanólico obtido das cascas de *Parahancornia fasciculata* (Apocynaceae), frações obtidas deste extrato e substâncias isoladas (ésteres de lupeol e lupeol) foram inativos ($CI_{50} > 50\mu\text{g/mL}$) em clone de *Plasmodium falciparum*-W2 (SILVA, 2013), sugerindo que substâncias derivadas do cinamato, como as citadas acima, não são bons candidatos a fármacos antimaláricos.

O plumierídeo isolado a partir da fração acetato de etila do extrato etanólico de *Himatanthus articulatus* (FrAcOET EEHS) também se apresentou como inativo frente a cepa de *P. falciparum* e método utilizado na análise ($CI_{50} > 50\mu\text{g/mL}$). As análises por CLAE-DAD, infravermelho, espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono, sugerem tratar-se do iridoide plumierídeo e/ou seu isômero isoplumierídeo. Outro trabalho já havia testado a ação antiplasmódica de iridoídeos frente a *P. falciparum* sensível à cloroquina obtendo resultado negativo, remetendo assim à hipótese de que substâncias ricas em

iridóides não são uma boa alternativa para avaliação antimalárica *in vitro* (KURIA et al., 2002).

Os resultados para as frações de neutros obtidas do extrato e pó da planta (FNEEHS, FNHS DCM e FNHS CLOR) apresentaram atividade antiplasmódica superior a 50 µg/mL (Tabela 09), sendo classificados como inativos de acordo com o critério definido. Em CCD revelada com reagente de Dragendorff, nas três frações foram observadas bandas alaranjadas sugestivas de alcaloides (Figura 31–4,1,6), porém até o presente momento não se conseguiu uma condição cromatográfica que pudesse avaliar essas frações por CLAE-DAD e assim verificar os seus cromóforos.

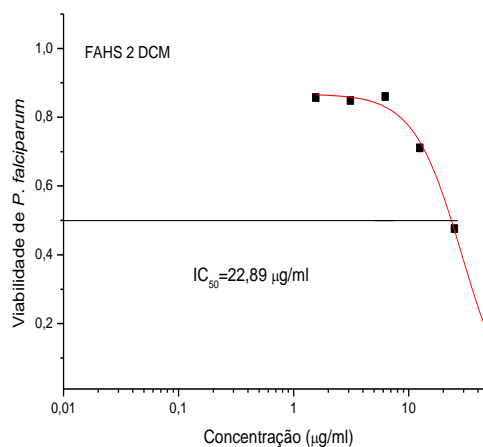
A fração de alcaloides obtida do extrato etanólico das cascas de *H. articulatus* (FAEEHS) e a fração alcaloídica obtida da extração ácida (diclorometano- FAHS1 DCM) não foram ativas frente ao *P. falciparum* resistente a cloroquina W2 ($Cl_{50} > 50 \mu\text{g/mL}$; Tabela 09). Não foi possível realizar estudos cromatográficos (CLAE-DAD e UPLC-PDA-MS/ESI) destas frações, porém estudo de outra fração de alcaloides (FAHS2 DCM) sugerem a presença de alcaloides β -carbolínicos e indolomonoterpênicos.

Por fim, a fração alcaloídica obtida da extração ácida (FAHS2 DCM – Figura 35) apresentou atividade inibitória moderada frente ao *P. falciparum* ($Cl_{50} 22,89 \mu\text{g/mL}$; Tabela 09). Vale ressaltar que nesta fração observou-se um pico no CLAE-DAD sugestivo de alcaloide β -carbolínico, que para confirmação, estudos fitoquímicos de isolamento e identificação devem ser realizados, haja visto que o material de partida (pó da planta) deste trabalho foi insuficiente para a realização destes trabalhos.

Tabela 10: Concentração inibitória de 50% do crescimento (CI_{50}) do clone W2 de *Plasmodium falciparum*

| AMOSTRAS | CI_{50} ($\mu\text{g/ml}$) | CLASSIFICAÇÃO |
|----------------|--------------------------------|---------------------|
| EEHS | >50 | Inativo |
| EEHSP | >50 | Inativo |
| Fr.DCM EEHS | >50 | Inativo |
| Fr.AcOET. EEHS | >50 | Inativo |
| Fr.MEOH EEHS | >50 | Inativo |
| FAEEHS | >50 | Inativo |
| FNEEHS | >50 | Inativo |
| FAHS 1 DCM | >50 | Inativo |
| FNHS DCM | >50 | Inativa |
| FAHS 2 DCM | 22.89 \pm 0,21 | Moderadamente Ativa |
| S1 | > 50 | Inativa |
| Cloroquina | 0,154 \pm 0,06 | Muito ativa |

Legenda: EEHS-extrato etanólico de *H. articulatus*; EEHSP-precipitado do extrato etanólico de *H. articulatus*; Fr.DCM EEHS-fração diclorometano obtida por fracionamento exaustivo do extrato etanólico de *H. articulatus*; Fr.AcOET EEHS- fração acetato de etila obtida por fracionamento exaustivo do extrato etanólico de *H. articulatus*; Fr.MeOH EEHS- fração metanólica obtida por fracionamento exaustivo do extrato etanólico de *H. articulatus*; FAEEHS-fração alcaloídica do extrato etanólico de *H. articulatus*; FNEEHS-fração de neutros do extrato etanólico de *H. articulatus*; FAHS1 DCM-fração alcaloídica diclorometânica do pó das cascas de *H. articulatus* obtido por extração alcalina; FNHS DCM- fração de neutros diclorometânica do pó das cascas de *H. articulatus*; FAHS2 DCM- fração alcaloídica diclorometânica do pó das cascas de *H. articulatus* obtido por extração ácida; S1-substância isolada (plumierídeo e/ou isoplumierídeo) a partir da fração acetato de etila do extrato etanólico de *Himatanthus articulatus* (FrAcOET EEHS); Cloroquina-dogra padrão utilizada no teste antiplasmódico por sugestão da OMS.

**Figura 35:** Curva dose-resposta de FAHS2 DCM contra parasitos do ciclo sanguíneo de *P. falciparum* (cepa W2), mostrando o valor da concentração inibitória de 50% do crescimento (CI_{50}).

Legenda: FAHS2 DCM-fração alcaloídica obtida das cascas acidificadas de *Himatanthus articulatus*

De outra espécie de Apocynaceae, *Geissospermum sericeum*, foram isolados alcaloides indolomonoterpenicos geissoschizolina-N₄-óxido (21) e 1,2-desidrogeissoschizolina (22) e o alcaloide β-carbolínico flavopereirina (23), apresentados na Figura 36. Estes alcaloides mostraram-se ativos em clone de *P. falciparum* multirresistente (K1), sendo que a flavopereirina foi a mais promissora (STEELE et al., 2002). Logo, provavelmente, a atividade antiplasmódica observada na fração (FAHS2 DCM) esteja, também, relacionada a alcalóides.

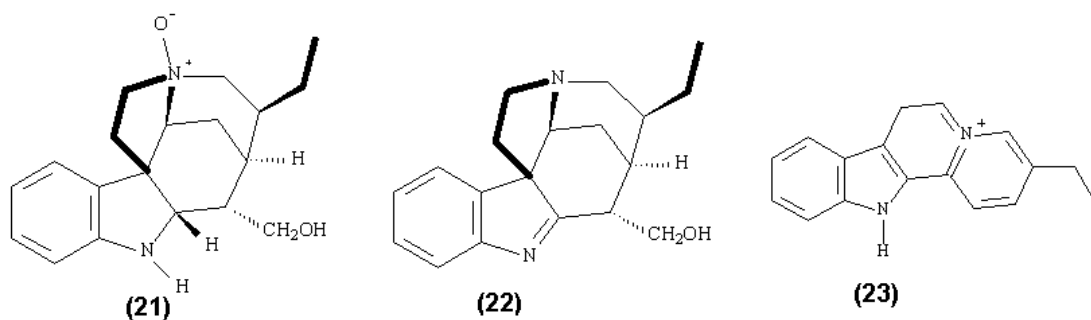


Figura 36: Estrutura química dos alcaloides geissoschizolina-N₄-óxido (21), 1,2-desidrogeissoschizolina (22) e flavopereirina (23)

Neste mesmo trabalho o índice de seletividade da flavopereirina apresentou moderada citotoxicidade em linhagem de células humanas KB, porém não foi observado seletividade para o clone K1 (STEELE et al., 2002). Em relação a *H. articulatus*, apenas o extrato etanólico obtido das cascas foi submetido a avaliação da citotoxicidade em linhagem celular HepG2, em que não foi observado efeito citotóxico (CC₅₀>1000 µg/mL; VILHENA, 2012). Infelizmente a fração ativa (FAHS2 DCM) frente ao *P. falciparum* (W2) ainda não foi submetida a avaliação de citotoxicidade, logo não se pode dizer sobre a seletividade da amostra para este parasita.

Além disso, o extrato etanólico obtido das cascas de *H. articulatus* foi submetido a estudos de toxicidade aguda e subcrônica em camundongos *Mus Musculus* linhagem Swiss e variação albina, de ambos e sexos com peso corporal de 25-27 g. No ensaio de toxicidade aguda foi administrado uma dose de 5000 mg/Kg do extrato no animal, não sendo observado nenhum sinal de toxicidade, exceto pelo aparecimento de diarreia no primeiro dia de experimentação. Também,

no período de observação (14 dias) não ocorreu nenhuma morte, não houve nenhuma alteração da evolução ponderal e não foi alterado de forma significativa o consumo médio de ração pelos animais (VILHENA, 2012).

Ao final da experimentação, os animais foram sacrificados e seus órgãos foram removidos, não sendo observado nenhuma alteração macroscópica ou microscópica nestes órgãos. Em síntese, o extrato da planta não apresentou toxicidade em avaliação *in vivo* (VILHENA, 2012)

Ao longo do tratamento subcrônico em animais tratados com extrato etanólico de *H. articulatus* não foram observados sinais tóxicos evidentes, não havendo alterações nos parâmetros hematológicos e provas de alteração hepática, aumentando apenas os níveis de albumina e de ácido úrico. Entretanto, os animais infectados com *P. berghei* tratados com 200 mg/Kg de peso corporal desse extrato, houve uma redução de 35,4 % da parasitemia. Também houve redução dos níveis de nitrato e nitrito cerebral e do malondialdeído pulmonar (MDA). Estes resultados sugerem que o extrato etanólico de *H. articulatus* interfira na patogênese da malária murina e possuía um discreto efeito na redução da parasitemia (VILHENA, 2012).

Tendo em vista estes resultados, esperava-se que o extrato etanólico de *H. articulatus* fosse ativo *in vitro* contra clones do *P. falciparum*, porém não foi observado tal efeito. O autor do trabalho citado explica que o extrato etanólico de *H. articulatus* atua, não diretamente no parasito, mas na patogênese da malária, evitando o estresse oxidativo e com isso a malária complicada (malária cerebral). Por outro lado, ficou evidenciado no estudo *in vitro* que provavelmente seriam os alcaloides, constituintes minoritários na planta, os responsáveis pela discreta redução da parasitemia observada para o extrato etanólico da planta.

Em outros estudos, plantas de uso popular na malária foram avaliadas *in vitro* contra clones de *P. falciparum* e tiveram resultados negativos, como *Parahancornia fasciculata* (SILVA, 2013), *Esebeckia febrífuga* (DOLABELA et al, 2008) e *H. sucuuba* (KVIST et al., 2006). Devido ao vasto uso popular para a doença, talvez as plantas não interfiram na redução significativa da parasitemia, mas atuem na patogênese da doença, e isso justifica seu uso, ou ainda, os constituintes minoritários é que tenham o efeito antimalárico. Neste contexto, os ensaios *in vitro* sejam limitados para avaliação de plantas que interfiram na patogênese da malária, ou que contenha substâncias que necessitem de metabolismo para se tornarem ativas.

Neste caso, seria interessante que plantas com uso popular para malária sejam avaliadas de forma diferente (não somente estudo *in vitro*), pois provavelmente, muitas espécies interferiram na progressão da doença e não diretamente na redução da parasitemia, já que muitas plantas possuem substâncias antioxidantes que podem agir na patogênese da doença. Uma boa alternativa para a triagem destas plantas, seria além do teste *in vitro*, o teste *in vivo*, que não avalia apenas a redução da parasitemia, como também a doença em si e seu agravamento. Além do mais, sabe-se que existem inúmeros fármacos, que só conseguem realizar seu mecanismo de ação quando passam por um processo de metabolismo no organismo vivo, sendo chamadas de pró-fármacos. Talvez alguns substâncias das plantas possam ter esse efeito e estudos complementares podem responder essa dúvida. Assim o ideal seria que os testes *in vivo* fossem também adotados como metodologia de avaliação de plantas medicinais com uso popular para malária.

6 CONCLUSÃO

Ao longo desta pesquisa, demonstrou-se experimentalmente que *H. articulatus* é rico em iridóides, dentre eles o iridóide plumierídeo como o majoritário. Além disto, evidenciou-se por UV e IV que esta planta contém derivados do cinamato em sua composição. Por se tratar de uma Apocynaceae, apresentou alcaloides, que foi descrito por dados espectrométricos pela primeira vez. Quanto à extração dos diversos componentes da planta, constatou-se que a metodologia a ser adotada vai depender do metabólito que se quer isolar, sendo que para se obter frações ricas em iridóides deve-se fracionar o extrato etanólico por cromatografia líquida em coluna aberta de sílica gel, e para o isolamento do iridóide majoritário é necessário o fracionamento da fração acetato de etila em coluna cromatográfica. Para obtenção de alcaloides, deve-se fazer uma extração ácida do pó da planta e como solvente, o diclorometano é a melhor escolha, tanto pelo rendimento, quanto pelo resultado positivo no teste de atividade antiplasmódica.

Em relação ao ensaio *in vitro* contra clones de *P. falciparum* W2 resistente à cloroquina, observou-se que os alcaloides extraídos da planta são responsáveis pela redução moderada da parasitemia. No entanto, seu extrato etanólico não mostrou atividade quando avaliado *in vitro*, porém, quando se compara com resultados de ensaios *in vivo*, no qual ocorreu tanto a redução da parasitemia como do estresse oxidativo que a doença causa, percebe-se que, provavelmente, esse extrato tenha propriedades pró-oxidantes ou antioxidantes, ou ainda substâncias que hajam como pró-farmacos, confirmando assim o uso popular da planta contra a malária. Estes resultados sugerem que, plantas descritas com uso popular para malária deveriam ser avaliadas além da forma *in vitro*, a avaliação *in vivo* deveria ser utilizada, para então confirmar ou não a atividade antimalária.

Com tudo isto, segure-se que o mecanismo de ação da planta deve ser investigado, bem como o isolamento dos alcaloides.

7 REFERÊNCIAS

- ALY, A. S. I.; VAUGHAN, A. M.; KAPPE, S. H. I. Malaria parasite development in the mosquito and infection of the mammalian host. **Annual Review of Microbiology**, v. 63, p. 195-221, 2009.
- AMARAL, A.C.F.; RAMOS, A.S.; FERREIRA, J.L.; SANTOS, A.R.; FALCAÃO, D.Q.; SILVA, B.O.; OHANA, D.T.; SILVA, J.R.A. A general description of Apocynaceae iridoids chromatography. **INTECH**, v. 6, p. 149-182, 2013.
- BAGGIO, C.H.; OTOFUJI, G.M.; SOUZA, W.M.; SANTOS, C.A.M.; TORRES, L.A.B.; RIECK, L.; MARQUES, M.C.A.; MAREIA-VELA, S. Gastroprotective mechanisms of indole alkaloids from *Himatanthus lancifolius*. **Planta Med**, v. 71, p. 733-738, 2005.
- BAGGIO, C.H.; OTOFUJI, G.M.; SOUZA, W.M.; SANTOS, C.A.M.; TORRES, L.M.B.; RIECK, L.; MARQUES, M.C.A.; VELA, S.M. Gastroprotective mechanisms of indole alkaloids from *Himatanthus lancifolius*. **Planta Med**, v. 71:p. 733-738, 2005.
- BARRETO, A.S.; AMARAL, A.C.F.; SILVA, J.R.A.; SCHRIPISEMA, J.; REZENDE, C.M.; PINTO, A.C. Acido 15-desmetilisoplumierídeo, um novo iridóide isolado das cascas de *Plumeria rubra* e do látex de *Himatanthus sucuuba*. **Quim. Nova**, v. 30, n.5, p. 1133-1135, 2007.
- BARRETO, A.S.; CARVALHO, M.G.C.; NERY, I.A.; GONZAGA, L.; KAPLAN, M.A.C. Chemical constituents from *Himatanthus articulata*. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 9, n. 5, p. 430-434, 1998.
- 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.**, v. 69, n. 2, p. 179–183, 2003.
- BARROS, P.M.S.S.; COUTO, N.M.G.; SILVA, A.S.B.; BARBOSA, W.L.R. Development and validation of a method for the quantification of an alkaloid fraction of *Himatanthus lancifolius* (Muell. Arg.) Woodson by ultraviolet spectroscopy. **Journal of Chemistry**, v. 2013, Article ID 652392, 5 p., 2013.
- BRANDÃO, G.C. **Fitoquímica, triage antiviral e fracionamento biomonitorado de espécies vegetais da biodiversidade brasileira**. 2010. 326 f. Tese de doutorado - Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFMG, 2010.
- BRANDÃO, M. G. L.; CARVALHO, L. H.; KRETTLI, A. U. Antimaláricos de uso Popular na Amazônia. **Ciência Hoje**, v. 13, p. 31-42. 1991.
- BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia Prático de tratamento da Malária no Brasil**. Brasília: Ministério da Saúde, 2010.
- 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: 09/07/2014.

BRASIL, MINISTERIO DA SAÚDE. **Situação epidemiológica 2012.** Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/662-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/malaria/11346-situacao-epidemiologica-dados>. Acesso em: 13/10/2014.

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

CASTILLO, D.; AREVALO, J.; HERRERA, F.; RUIZ, C.; ROJAS, R.; RENGIFO, E.; VAISBERG, A.; LOCK, O.; LAMESRE, J.-L.; GORNITZKA, H.; SAUVAIN, M. Spirolactone iridoids might be responsible for the antileishmanial activity of a Peruvian traditional remedy made with *Himatanthus sucuuba* (Apocynaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, p. 410–414, 2007.

CASTILLO, D.; AREVALO, J.; HERRERA, F.; RUIZ, C.; ROJAS, R.; RENGIFO, E.; VAISBERG, A.; LOCK, O.; LEMESRE, J.L.; GORNITZKA, H.; SAUVAIN, M. Spirolactone iridoids might be responsible for the antileishmanial activity of a Peruvian traditional remedy made with *Himatanthus sucuuba* (Apocynaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, p. 410–414, 2007.

CDC. **Centers for Disease Control and Prevention. Biology.** Disponível em: <http://www.cdc.gov/malaria/about/biology/>. Acesso em: 25/09/2014.

CHIERRITO, T.P.C.; AGUIAR, A.C.C.; ANDRADE, I.M.; CERAVOLO, I.P.; GONÇALVES, R.A.C.; OLIVEIRA, A.J.B.; KRETTLI, A.U.; Anti-malarial activity of indole alkaloids isolated from *Aspidosperma olivaceum*. **Malalria Journal**, v. 13, p. 142, 2014.

COURA, J.R.; SUAREZ-MUTIS, M.; LADEIA-ANDRADE, S. A new challenge for malaria control in Brazil: asymptomatic *Plasmodium* infection - A Review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 3, p. 229-237, 2006.

COX-SINGH, J.; DAVIS, T.M. E.; LEE, K.S.; SHAMSUL, S. S. G.; MATUSOP, A.; RATNAN, S.; RATMAN, H. A.; CONWAY, D. J.; SINGH, B. *Plasmodium knowlesi* Malaria in Humans Is Widely Distributed and Potentially Life Threatening. **CID.**, v. 48. p. 165-171, 2008.

COX, F. History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. **Parasites and Vectors**, v. 3, n. 1, p. 1-9, 2010.

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**, v.91, p. 479-83, 1997.

DESJARDINS, R.E.; CANFIELD, C.J.; HAYNES, J.D.; CHULAY, J.D. Quantitative assessment of antimalarial activity *in vitro* by a semiautomated microdilution technique. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 16, n. 6, p. 710-8, 1979.

DI STASI, L.C.; HIRUMA-LIMA, C.A. Gentianales medicinais. In: DI STASI, L.C.; HIRUMA-LIMA, C.A. (orgs.) **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. São Paulo: Editora da UNESP, p. 375-385, 2002.

DOLABELA, M. F. **Atividade antiplasmódica e citotoxicidade de *Esenbeckia febrífuga* (A.St-Hil.) Juss. Ex Mart. (Rutaceae) e de espécies do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae)**. 2007. 179 f. (Tese doutorado) - PPGCF-UFMG, 2007.

DOLABELA, M.F.; OLIVEIRA, S.G.; NASCIMENTO, J.M.; PERES, J.M.; WAGNER, H.; PÓVOA, M.M.; OLIVEIRA, A.B. *In vitro* antiplasmodial activity of extract na constituents from *Esenbeckia febrífuga*, a plant traditionally used to treat malária in the Brazilian Amazon. **Phytomedicine**, v.15, p. 367-372, 2008.

DOLABELA, M.F.; OLIVEIRA, S.G.; PERES, J.M.; NASCIMENTO, J.M.S.; PÓVOA, M.M.; OLIVEIRA, A.B. *In vitro* antiplasmodial activity of six *Aspidosperma* species from the state of Minas Gerais (Brazil). **An. Acad Bras Cienc.**, v. 84, n 4, p. 899-910, 2012.

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

FERREIRA, J.O.; LACERDA, M.GV; BRASIL, P.; LADISLAU, J.LB; TAUIL, P.L.; RIBEIRO, C.TD. Malaria in Brazil: an overview. **Malaria Journal**. v. 9, 115, 2010.

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.

FRANÇA, O.O.; BROWN, R.T.; SANTOS, C.A.M. Uleíne and demethoxyaspidospermine from the bark of *Plumeria lancifolia*. **Fitoterapia**, v. 71, p. 208-210, 2000.

FRANÇA, T. C. C.; SANTOS, M. G. dos; FIGUEROA-VILLAR, J. D. MALÁRIA: ASPECTOS HISTÓRICOS E QUIMIOTERAPIA. **Quim. Nova**, v. 31, n. 5, p. 1271-1278, 2008

GILBERT, B. Produtos naturais industrializáveis da Amazônia. **Fitos**. v. 2, n. 3, p. 30-38, 2006.

GOBBO-NETO, Leonardo; LOPES, Noberto P. Plantas Medicinais: Fatores de influência no Conteúdo de Metabólitos Secundários. **Quim. Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GRAEBNER, I.B. **Estudo dos constituintes químicos isolados de plantas medicinais da região do Vale de Purus no Acre**. 2003. 116 f. (Tese de doutorado) - Programa de pós graduação em Química, UFSM. Universidade Federal de Santa Maria, 2003.

GREENWOOD, B.M.; FIDOCK, D.A.; KYLE, D.E.; KAPPE, S.H.I. ALONSO, P.L.A.; COLLINS, F.H.C.; DUFFY, P.E. Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 4, p. 1266-1276, 2008.

GUIGUEMDE, W. A.; SHELAT, A. A.; BOUCK, D.; DUFFY, S.; CROWTHER, G. J.; DAVIS, P. H.; SMITHSON, D.C.; CONNELLY, M.; CLARK, J.; ZHU, F.; JIME´NEZ-DI´AZ, M.B.; MARTINEZ, M. S.; WILSON, E.B.; TRIPATHI, A.K.; GUT, J.; SHARLOW, E.R.; BATHURST, I.; MAZOUNIL, F.E.; FOWBLE, J.; FORQUER, I.; MACGINLEY, P; CASTRO, S.; ÂNGULO-BARTUREN, I.; FERRER, S.; ROSENTHAL, P. J.; DERISI, J. L.; SULLIVAN, D.J.; LAZO, J. S.; ROOS, D.S.; RISCOE, M. K.; PHILLIPS, M.A.; RATHOD, P.K.; VOORHIS, W.C.V.; AVERY, V.M.; GUY, R.K. Chemical Genetics of *Plasmodium falciparum*. **Nature**. v. 465, p. 311-315, 2010.

GUTTERY, D. S.; HOLDER, A. A.; TEWARI, R. Sexual development in *Plasmodium*: lessons from functional analyses. **Plos Pathogens**, v. 8, n. 1, p. e1002404, 2012.

HENRIQUES, A.A.T.; LIMBERGER, R.P.; KERBER, V.A.; MORENO, P.R.H. Alcalóides: generalidades e aspectos básicos in SIMÕES, C.M.O. SCHENKEL, E.P.; GOSMANN G.; MELLO J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2010. 765-791p.

JUDD, W.S.; CAMPBELL, C.S.; KELLOGG, E.A.; STEVENS, P.F.; DONOGHUE, M.J. **Sistemática Vegetal: Um Enfoque Filogenético**. Tradução André Olmos Simões et al. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 632 p.

KATO, L.; OLIVEIRA, C.M.A.; FARIA, E.O.; RIBEIRO, L.C.; CARVALHO, B.G.; SILVA, C.C.; SCHUQUEL, I.T.A.; SANTIN, S.M.O.; NAKAMURA, C.V.; BRITTA, E.A.; MIRANDA, N.; IGLESIAS, A.H.; DELPRETE, P.G. Antiprotozoal alkaloids from *Psychotria prunifolia* (Kunth) Steyerem. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 23, n. 2, p. 355-360, 2012.

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

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

KURIA, K.A.M.; CHEPKWONY, H.; GOVAERTS, C.; ROETS, E.; BUSSON, R.; WITTE, P.; ZUPKO, I.; HOOMAERT, G.; QUIRYNEN, L.; MAES, L.; JANSSENS, L.; HOOGMARTENS, J.; LAEKEMAN, G. The Antiplasmodial Activity of Isolates from *Ajuga remota*. **J. Nat. Prod.**, v.65, n.5, p 789–793, 2002.

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

LAMBROS, C.; VANDERBERG, J. P. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. **The Journal of Parasitology**, v. 65, p. 418-420, 1979.

LARROSA, Carina Rau Rivas; DUARTE, Márcia do rocio. Contribuição do estudo anatômico do caule de *Himatanthus sucuuba* (Spruce ex Mull. Arg.) Woodson, Apocynaceae. **Rev. Bras. Farmacogn.** v. 15, n. 2, p. 110-114, 2005.

LARROSA, Carina Rau Rivas; DUARTE, Márcia do Rocio. Morfoanatomia de folhas de *Himatanthus sucuuba* (Spruce) Woodson, Apocynaceae. **Acta Farm. Bonaerense**. v. 24, n.2, p. 165-71, 2005

LIMA, M. P. de; HILST, L. F.; MATANNA, F. V. R.; SANTOS, C. A. M.; WEFFORT-SANTOS, A. M. Alkaloid-rich fraction of *Himatanthus lancifolius* contains anti-tumor agents against leukemic cells. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 46, n. 2, p. 273-280, 2010.

LOPES, F.J. **Ioimbina e uleína isolados de *Himatanthus lancifolius* (Muell.-Arg) Woodson, Apocynaceae**. 2008. 67 f. Dissertação de mestrado. Programa de pós graduação em ciências farmacêuticas. Universidade Federal do Paraná: Curitiba, 2008.

LORENZI, H. & MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Instituto Plantarum, São Paulo, p. 68-9, 2002.

LUCETTI, D.L.; LUCETTI, E.C.P.; BANDEIRA, M.A.M.; VERAS, H.N.H.; SILA, H.A.; LEAL, L.K.A.M.; LOPES, A.A.; ALVES, U.C.C.; SILVA, G.S.; BRITO, G.A.; VIANA, G.B. Anti-inflammatory effects and possible mecanismo of action of lupeol acetate isolated from *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel. **Journal of inflammation**, v. 7, p. 60, 2010.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA-JR, V.F.; GRYNBERG, N.F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Quim. Nova**. v25, n. 3, p.429-438, 2002.

MAKLER, M. T.; RIES, J. M.; WILLIAMS, J. A.; BANCROFT, J. E.; PIPER, R. C.; GIBBINS, B. L. et al. Parasite lactate dehydrogenase as an assay for *Plasmodium falciparum* drug sensitivity. **Am J Trop Med Hyg.** v. 48(6): p.739- 41, 1993

MAKLER, M.T.; RIES, J.M.; WILLIAMS, J.A.; BANCROFT, J.E.; PIPER, R.C.; GIBBINS, B.L., et al. Parasite lactate dehydrogenase as an assay for *Plasmodium falciparum* drug sensitivity. **Am J Trop Med Hyg.** v. 48(6): p. 739- 41, 1993.

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

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

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

MESQUITA, M.L.; DESRIVOT, J.; BORIES, C.; FOURNET, A.; PAULA, J.E.; GRELLER, P. ESPINDOLA, L.S. Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian cerrado plants. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 100, n.7, p. 783-787, 2005.

MILLER, L.H.; BARUCH, D.I.; MARSH, K.; DOUMBO, O.K. The pathogenic basis of malaria. **Nature**, v. 475, p. 673-679, 2002.

MILLIKEN, W. Traditional anti-malarial medicine in Roraima- Brazil. **Econ Bot.** v. 5, n.3, p. 212-237, 1997

MILLIKEN, W.; ALBERT, B. The use of medicinal plants by the Yanomami Indians of Brazil, Part II. **Economic Botany**, v. 5, n.3, p. 264-278, 1997.

MIRANDA, A.L.P., SILVA, J.R.A., REZENDE, C.M., NEVES, J.S., PARRINI, S.C., PINHEIRO, M.L.B., CORDEIRO, M.C., TAMBORINI, E., PINTO, A.C. Anti-inflammatory and analgesic activities of the latex containing triterpenes from *Himatanthus sucuuba*. **Planta Medica**, v. 66, p. 284-286, 2000.

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

MIRANDA, A.L.P.; SILVA, J.R.A.; REZENDE, C.M.; NEVES, J.S.; PARRINI, S.C.; PINHEIRO, M.L.B.; CORDEIRO, M.C.; TAMBORINI, E.; PINTO, A.C. Anti-inflammatory and analgesic activities of the látex containing triterpenes from *Himatanthus sucuuba*. **Planta Med.** v. 66: p. 284-286, 2000

MIRANDA, E.C.; BLECHERT, S. Gilbertin, ein neuer indolalkaloidtyp. **Tetrahedron Lett.**, v. 23, n.51, p. 5395-5398, 1982

MORAGAS, C. J. **Estudo do gênero Himatanthus: anatomia vegetal, fitoquímica, farmacologia e biotransformação**. 2006. 271 f. Tese doutorado. Núcleo de Pesquisa de Plantas Mediciniais, Universidade Federal do Rio de Janeiro: UFRJ/NPPN, 2006.

MOREL, A.F.; GRAEBNER, I.B.; PORTO, C.; DALCOL, I.I. Study on the antimicrobial activity of *Hymatanthus sucuba*. **Fitoterapia**. v. 77: p. 50–53, 2006.

MOUSINHO, K.C.; OLIVEIRA, C.C.; FERREIRA, J.R.O.; CARVALHO, A.A.; MAGALHÃES, H.I.F.; BEZERRA, D.P.; ALVES, A.P.N.N.; COSTA-LOTUFO, L.U.; PESSOA, C.; MATOS, M.P.V.; RAMOS, M.V. MORAES, M.O. Antitumor effect of eaticifer proteins of *Himatanthus drasticus* (Mart.) PLumel-Apocynaceae. **Journal of Ethnopharmacology**, v.137: p. 421-426, 2011.

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

NETO, C.C.; OWENS, C.W.; LANGFIELD, R.D.; COMEAW, A.B.; ONGE, J.S.; VAISBERG, A.J.; HAMMOND, G.B. Antibacterial activity of some Peruvian medicinal plants from the Callejon de Huaylas. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 79, p. 133-138, 2002.

NKHOMA, S.; MOLYNEUX, M.; WARD S. *IN VITRO* ANTIMALARIAL SUSCEPTIBILITY PROFILE AND *PRCRT/PFMDR-1* GENOTYPES OF *PLASMODIUM FALCIPARUM* FIELD ISOLATES FROM MALAWI. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 76, n. 6, p. 1107–1112, 2007.

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

NOELDL, H.; SE, Y.; SCHAECHER, K.; SMITH, B.L.; SOCHEAT, D.; FUKUDA, M.M.; Evidence of Artemisinin-resistant Malaria in Western Cambodia. **The New England Journal of Medicine**. v. 359: p. 24, 2008.

NOGUEIRA, F.; ROSÁRIO, V. E. Métodos para avaliação da atividade antimalárica nas diferentes fases do ciclo de vida do *Plasmodium*. **Rev Pan-Amaz Saude**. v. , n.3, p. 109-124, 2010.

OLIVEIRA, A. R. M. de; SZCZERBOWSKI, D. Quinina: 470 anos de História, Controvérsias e Desenvolvimento. **Quim. Nova**, v. 32 n. 7: p. 1971-1974, 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.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). Fundo das Nações Unidas para a Infância. UNICEF. **Relatório da Conferência Internacional sobre Cuidados Primários de Saúde**. Ala-Ata. URSS, 1978. Brasília: OMS/UNICEF, 1979. 64 p.

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.** v. 10, n.3, p. 431-434, 1967.

PAULA, R.C. **Atividade antimalárica de *Aspidosperma subincanum* Mart. biomonitorada por testes *in vitro* contra *Plasmodium falciparum*, *in vivo* contra *P. berghei* e efeito da uleína no retículo endoplasmático de *P. falciparum***. 2014. 127 f. Tese de doutorado, Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas-UFMG. Universidade Federal de Minas Gerais. 2014.

PAULA, R.C.; DOLABELA, M.F.; OLIVEIRA, A.B. *Aspidosperma* species as sources of antimalarials, Part III. A review of traditional use and antimalarial activity. **Planta Medica.** v. 80, n.5, p. 378-386, 2014.

PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S.; VYVYAN, J.R. **Introdução à espectroscopia**. 4 ed. 15-98. São Paulo: Cengage Learning, 2012.
PELLETIER, P.J., CAVENTOU, C.B. Des Recherches chimiques sur les Quinquinas. **Annales des Chimie et des Physique**, v. 15: p. 337, 1820.

PEREIRA, M.M.; JÁCOME, R.L.R.P.; ALCANTARA, A.F.C.; ALVES, R.B.; RASLAN, D.S. Alcalóides indólicos isolados de espécies do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae). **Quim. Nova**, v. 30, n.04, p. 970-983, 2007.

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

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

PHILLIPSON, J. D. Phytochemistry and medicinal plants. **Phytochemistry**. v. 56: p. 237-243, 2001.

PINTO, L.N. **Plantas medicinais utilizadas em comunidades do município de Igarapé-Miri, Pará**: Etnofarmácia do município de Igarapé-Miri – PA. 2008. 112 f. Dissertação (Mestrado do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pará). Universidade Federal do Pará: Pará, 2008.

PLEETER, P.; LEKOSTAJ, J.K.; ROEPE, P.D. Purified Plasmodium falciparum multi-drug resistance protein (PfMDR 1) binds a high affinity chloroquine analogue. **Mol Biochem Parasitol**, v. 173: p. 158-161, 2010.

PLOUVIER, V.; FAURE-BONVIN, J. Lés Iridoides et seco-iridoides: répartition, structure, propriétés, biosynthèse. **Phytochemistry**. v 10: p. 1697-1722, 1971.

PLUMEL, M. M. Le genre Himatanthus (Apocynaceae) révision taxonomique. **Bradea**, Rio de Janeiro, v. 5, suplemento, p.1-118, 1991.

QUINET, C.G.P.; ANDREATA, R.H.P. Estudo taxonômico e morfológico das espécies de Apocynaceae Adans. na reserva Rio das Pedras, município de Mangaratiba, Rio de Janeiro, Brasil. São Leopoldo: Instituto Anchietano de Pesquisas, **Pesquisas, Botânica**, v.56: p.13-74, 2005.

QINGHAOSU ANTIMALARIAL COORDINATING RESEARCH GROUP. Antimalaria studies on qinghaosu. **Chinese Medical Journal**, v. 92: p. 811–816, 1979.

RAPINI, A. **Sistemática: estudos em Asclepiadoideae (Apocynaceae) da cadeia de espinhaço Minas Gerais**; 2000. 283 f. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Departamento de Botânica, USP, 2000.

RATTMANN, Y.D., TERLUK, M.R., SOUZA, W.M., SANTOS, C.A.M., BIAVATTI, M.W., TORRES, L.B., MESIA-VELA, S., RIECK, L., SILVA-SANTOS, J.E., MARQUES, M.C.A. Effects of alkaloids of *Himatanthus lancifolius* (Muell. Arg.) Woodson, Apocynaceae, on smooth muscle responsiveness. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 100, n.3, p. 268–275, 2005

REBOUÇAS, S.O.; GRIVICICH, J.; SANTOS, M.S.; RODRIGUEZ, P.; GOMES, M.D. OLIVEIRA, S.Q.; SILVA, J.; FERRAZ, A.B.F. Antiproliferative effect of a traditional remedy *Himatanthus articulatus* bark on human cancer cell lines. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 137: p. 926-929, 2011.

REBOUÇAS, S. O.; SILVA, J. da; GROFF, A. A.; NUNES, E. A.; IANISTCKI, M.; FERRAZ, A. de B. F. The antigenotoxic activity of latex from *Himatanthus articulatus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 22, n. 2, p. 389-396, 2012.

REBOUÇAS, S.O.; SILVA, J.; BERTONI, R.S.; DECKER, N.; SANTOS, M.S.; ROSSATTO, R.R.; CORRÊA, D.S.; FERRAZ, A.B.F. Assessment of the genotoxic and mutagenic properties of *Himatanthus articulatus* bark extracts used as phytotherapeutic drug in the Amazon. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 147: p. 474–480, 2013.

RIBEIRO, J.E.L.; HOPKINS, M.J.G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C.A.; COSTA, M.A.S.; BRITO, J.M.; SOUZA, M.A.D.; MARTINS, L.H.P.; LOHMANN, L.G.; ASSUNÇÃO, P.A.C.L.; PEREIRA, E.C.; SILVA, C.F.; MESQUITA, M.R.; PROCÓPIO, L.C. **Floresta da reserva Ducke – Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra – firme na Amazônia central**. Manaus: INPA, 1999.

RICH, S. M.; XU, G. Resolving the phylogeny of malaria parasites. **PNAS**. v. 108. n. 32. p. 12973–12974, 2011

RIECKMANN, K.H.; CAMPBELL, G.H.; SAX, L.J.; MREMA, J.E. Drug sensitivity of *Plasmodium falciparum*: an *in-vitro* microtechnique. **Lancet**. v. 1, n. 8054, p.22-3, 1978.

ROBERT, G.M.T.; AHOND, A.; POUPAT, C.; POTIER, P.; JOLLÈS, C.; JOUSSELIN A.; JACQUEMIN, H. Aspidosperma de Guyane : alcaloïdes de Aspidosperma marcgravianum. **Journal of Natural Products**, v. 46, n.5, p. 694-707, 1983

RODRIGUES, E.; DUARTE-ALMEIDA, J. M.; PIRES, J. M. Perfil farmacológico e fitoquímico de plantas indicadas pelos caboclos do Parque Nacional do Jaú (AM) como potenciais analgésicas. Parte I. **Revista Brasileira de Farmacognosia. Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v. 20, n. 6, p. 981-991, 2010.

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

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.

SANGSTER, A.W.; STUART, K.L. Ultraviolet spectra of alkaloids. **Department of Chemistry, University of the West Indies, Kingston, Jamaica**. 69-130 p. 1964.

SANTOS, N.P.; PINTO, A.C.; ALENCASTRO, R.B. Theodoro Peckolt: naturalista e farmacêutico do Brasil imperial. **Quim. Nova**. v. 21, n.5, p. 666-670, 1998.

SCHOFIELD, L. Intravascular infiltrates and organ-specific inflammation in malaria pathogenesis. **Immunology and cell biology**, v. 85, n. 2: p. 130-137, 2007.

SCHRIPSEMA, J.; DAGNINO, D.; GOSMANN, G. Alcaloides indólicos in SIMÕES, C.M.A.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. 819-846 P. UFRGS-UFSC, Porto Alegre-Florianópolis, 2010.

SEQUEIRA, B.J.; VITAL, M.J.S.; POHLIT, A.M. PARAROLS, I.C.; CAÚPER, G.S.B. Antibacterial and antifungal activity of extracts and exudates of the Amazonian medicinal tree *Himatanthus articulatus* (Vahl) Woodson (common name sucuuba). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. v.104, n.4, p. 659-661, 2009.

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. 137 f. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – Universidade Federal do Pará, 2013.

SILVA, J.R.A.; AMARAL, A.C.F.; SILVEIRA, C.V.; REZENDE, C.M.; PINTO, A.C. Quantitative determination by HPLC of iridoids in the bark and latex of *Himatanthus sucuuba*. **Acta Amazonica**. v. 37, n.1, p. 119 – 122, 2007.

SILVA, J.R.A.; REZENDE, C.M.; PINTO, A.C.; PINHEIRO, M.L.B.; CORDEIRO, M.C.; TAMBORINI, E.; YOUNG, C.M.; BOLZANI, V.S. Ésteres Triterpênicos de *Himatanthus sucuuba* (Spruce) Woodson. **Quím. Nova**, v. 21, n.6, p. 702-704, 1998.

SILVA, J.R.A.; AMARAL, A.C.F.; SIANI, A.C.; REZENDE, C.M.; FELCMAN, J.; PINTO, A.C. Contribuítion to the study of *Himatanthus sucuuba* latex macromolecul, microelements and carbohydrates. **Acta Amazonica**. v. 33(1): p. 105-110, 2003.

SILVA, J.R.A.; REZENDE, C.M.; PINTO, A.C.; AMARAL, A.C.F. Cytotoxicity and bacterial studies of iridoids and phenolic compounds isolated from the latex of *Himatanthus sucuuba*. **African journal of Biotechnology**. v. 9, n. 43, p. 7357-7360, 2010.

SILVA, R.F.; ZANETTI, J.P.C.; DONATO, R.K.; SCHREKKER, H.S.; MATEJKA, L.; SLOUF, M.; DIMZOSKI, B.; AMICO, S.C.; CANTO, L.B.; PITA, V.J.R.R. Compósitos de poliestireno e argila aniônica funcionalizada com cinamato com propriedade de absorção de UV. **Polímeros**, v. 23, n. 6: p. 778-783, 2013.

SILVERIO, F.O.; BARBOSA, L.C.A.; GOMIDE, J.L.; REIS, F.P.; PILÓ-VELOSO, R. Metodologia de extração e determinação do teor de extrativos em madeiras de eucalipto. **R. Árvore**, Viçosa-MG, v.30, n.6: p.1009-1016, 2006.

SOUSA, E.L.; GRANJEIRO, A.R.S.; BASTOS, I.V.G.A.; RODRIGUES, G.C.R.; SILVA, M.J.; ANJOS, F.B.R.; SOUZA, I.A.; SOUSA, C.E.L. Antitumor activity of leaves of *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel-Apocynaceae (Janaguba) in the tratamento of Sarcoma 180 tumor. **Braz. J. Pharm. Sci.** v. 46, n.2, p. 199-203, 2010.
Artigo não citado no texto

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática**: guia de ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II. 2 ed. São Paulo: Instituto Plantarum, 2008. 704p.

SOUZA, W.M. BREHMER, F.; NAKAO, L.S.; STINGHEN, A.E.M.; SANTOS, C.A.M. Ação da uleína sobre a produção de óxido nítrico em células RAEC e B16F10. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 17, n.02, p.191-196, 2007.

SOUZA, W.M.; STINGHEN, A.E.M.; SANTOS, C.A.M. Antimicrobial activity of alkaloids fraction from barks of *Himatanthus lancifolius*. **Fitoterapia**. v. 75: p. 750-753, 2004.

SOUZA, W.M. **Estudo químico e das atividades biológicas dos alcaloides indólicos de *Himatanthus lancifolius* (Muell. Arg.) Woodson, Apocynaceae (Agoniada)**. 2008. 152 f. Tese doutorado. Programa de pós graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Paraná: Curitiba, 2008.

SOUZA, W.M., BREHMER, F., NAKAO, L.S., STINGHEN, A.E.M., SANTOS, C.A.M. Ação da uleína sobre a produção de óxido nítrico em células RAEC e B16F10. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 17, n.2, p. 191-196, 2007.

SPINA, A.P. **Estudos taxonômico, micro-morfológico e filogenético do gênero *Himatanthus* Wild. Ex. Schult. (Apocynaceae: Rauvolfioideae-Plumerieae)**. 2004. 191 f. Tese de doutorado. 191 p. Universidade Estadual de Campinas, 2004.

STEELE, J.C.; VEITCH, N.C.; KITE, G.C.; SIMMONDS, M.S.J.; WARHURST, D.C. Indole and β -carboline alkaloids from *Geissospermum sericeum*. **J. Nat. Prod.** v. 65, n 1, p. 85-88, 2002.

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

THATHY, V.; FUJIOKA, H.; GANTT, S.; NUSSENZWEIG, R.; NUSSENZWEIG, V.; MÉNARD, R.. Levels of circumsporozoite protein in the *Plasmodium* oocyst determine sporozoite morphology. **The Embo Journal**, v. 21, n. 7, p. 1586-1596, 2002.

TRABULSI FILHO, F.A.; ANDRADE, K.C.S.; SILVA, E.C.S.; CASTRO, A.T.O.; BATISTA, M.C.A.; RIBEIRO, M.N.S.; AMARAL, F.M.M. Estudo de padronização de extratos de *Anacardium occidentale* L. na pesquisa e desenvolvimento de fitoterápicos giardicidas. **Cad. Pesq., São Luís**, v. 20, p. 7-15, 2013.

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

VAN DEN BERG, M. E. **Plantas medicinais na Amazônia: Contribuição ao seu conhecimento Sistemático**. Belém: CNPQ/PRU/MPEG. 212 p. 1982.

VELOSO, M.P.; NAGEM, T.J.; OLIVEIRA, T.T. β -dihidroplumericinic acid from *Himatanthus phagedaenicus*. **Bioch. Syst. and Ecology**. v. 27, p. 669-671, 1999.

VILHENA, T.C. **Avaliação da toxicidade dos efeitos d extrato etanólico seco das cascas de *Himatanthus articulatus* (Vahl) Woodson (Apocynaceae) sobre as alterações oxidativas na malária experimental *in vivo***. 2012. 139 f. Dissertação de Mestrado. PPGCF-UFPA. Universidade Federal do Pará, 2012.

VOZA, T.; MILLER, J.; KAPPE, S. H. I.; SINNISA, P. Extrahepatic Exoerythrocytic Forms of Rodent Malaria Parasites at the Site of Inoculation: Clearance after Immunization, Susceptibility to Primaquine, and Contribution to Blood-Stage Infection. **iai.asm.org**. v. 80, n. 6, p. 2158–2164, 2012.

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

WALTENBERGER, B.; ROLLINGER, J.M.; GRIESSER, U.J.; STUPPNER, H.; BELBRICH, T. Plumeridoid C from the Amazonian traditional medicinal plant *Himatanthus sucuuba*. **Acta Cryst.** v. C67, p. o409–o412, 2011

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

WHO. 2013. **World Malaria Report**. Geneva, World Health Organization. Disponível em: http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2013/en/. Acesso em: 08/05/2014.

WINSTANLEY, P. Modern chemotherapeutic options for malaria. **Lancet Infect Dis**, v. 1: p. 242-250, 2001.

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

WONGSRICHANALAI, C. I; PICKARD, A. L.; WERNSDORFER, W. H.; MESHNICK, S. R. Epidemiology of drug-resistant malaria. **THE LANCET Infectious Diseases**. v. 2. p. 209-218, 2002

WOOD, C.A.; LEE, K.; VAISBERG, A.J.; KINGSTON, D.G.I.; NETO, C.C.; HAMMOND, G.B. A bioactive spiro lactone iridoid and triterpenoids from *Himatanthus sukuuba*. **Chem. Pharm. Bull.** v. 49, n.11, p. 1477—1478, 2001.

WOODSON, R. E. Studies in the Apocynaceae – 7th., an evaluation of the genera *Plumeria* L. and *Himatanthus* Willd. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, St. Louis, v. 25, n. 1, p. 190-224, 1938