



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

Avaliação da atividade antiplasmódica *in vitro* dos óleos de Andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) e Pimenta-de-macaco (*Piper aduncum* L).

Raimundo Nonato Cardoso Miranda Júnior

BELÉM - PA
2010



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

Raimundo Nonato Cardoso Miranda Júnior

Orientador: Prof. Dr. José Guilherme Soares Maia

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a Maria Fâni Dolabela

Avaliação da atividade antiplasmódica *in vitro* dos óleos de Andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) e Pimenta-de-macaco (*Piper aduncum* L).

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

BELÉM - PA
2010

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

Biblioteca Central/UFPA, Belém - PA

Miranda Júnior, Raimundo Nonato Cardoso, 1978 –

Avaliação da atividade antiplasmódica in vitro dos óleos de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) e pimenta-de-macaco (*Piper aduncum* L.) / Raimundo Nonato Cardoso Miranda Júnior ; orientador, José Guilherme Soares Maia ; co-orientadora, Maria Fâni Dolabela. – 2010.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Belém, 2010.

1. Matéria médica vegetal 2. Antimaláricos 3. Andiroba 4. Pimenta-de-macaco I. Título.

CDD: 22. ed. 615.10724

Raimundo Nonato Cardoso Miranda Júnior

Avaliação da atividade antiplasmódica *in vitro* dos óleos de Andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) e Pimenta-de-macaco (*Piper aduncum* L).

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

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora:

Prof. Dr.: José Guilherme Soares Maia

Instituição: UFPA

Assinatura: _____

Prof. Dr.: Milton Nascimento Silva

Instituição: UFPA

Assinatura: _____

Prof. Dr.: José Luiz Fernandes Vieira

Instituição: UFPA

Assinatura: _____

A Dolores e Nonato Miranda, meus queridos pais,
com amor e gratidão.

AGRADECIMENTO

A Deus por tudo que me concede na vida.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Guilherme Maia pela orientação, apoio, conhecimento, oportunidade de executar o projeto e por ter acreditado no meu trabalho.

A minha co-orientadora Prof^a. Dr^a. Maria Fani Dolabela pela força, sabedoria e grande ajuda durante o transcorrer do projeto.

A Universidade Federal do Pará pela formação acadêmica e de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

A agência financiadora CAPES pelo patrocínio.

Ao Prof. Dr. Milton Nascimento da Silva, chefe do laboratório de cromatografia da UFPA, pela valiosa contribuição, realizando e disponibilizando a análise fitoquímica do óleo de andiroba e fração rica em limonóides.

A pesquisadora Dr^a Marinete Póvoa, chefe do setor de malária do Instituto Evandro Chagas, por permitir o desenvolvimento dos testes antimaláricos na referida instituição.

A Prof^a. Msc. Joyce Kelly do Rosário da Silva pela ajuda no tratamento estatístico dos dados e pela colaboração no trabalho.

Ao Prof. Olinto Miranda pela ajuda com as fotografias dessa dissertação.

A aluna Ana Carolina do Laboratório de cromatografia, pela ajuda com o fracionamento do óleo de andiroba.

Aos técnicos do Instituto Evandro Chagas José Maria e José Mário pelo apoio e ajuda nos testes antimaláricos.

Aos professores do programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Pará pelos ensinamentos de tantos anos.

Aos meus pais, Dolores e Nonato Miranda, por toda dedicação, amor, compreensão incentivo e apoio durante toda a minha vida.

Ao meu irmão Charles Miranda por toda compreensão, respeito e carinho.

A minha família: Maria, Fyamma, Felipe Gabriel, Lisbella, Nathália, Conceição e Cláudia, pelo respeito e amor de sempre.

A Caroline Franco pelo amor, afeto e incentivo ao longo desses anos de convivência.

Ao meu grande amigo, meu compadre, Mário Nunes por longos anos de amizade e confiança.

Aos grandes amigos; Marcelo Marques, Paulo Neto, André Franco e Thiago Heleno pela convivência e amizade.

Ao Médico Clayton Alencar e toda sua equipe, por ter me proporcionado melhores condições de saúde

Aos colegas de turma pela força durante esses dois anos.

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

A todos que contribuíram de alguma forma para realização e concretização de mais essa etapa.

“A mente que se abre a uma nova idéia
jamais voltará ao seu tamanho original”
Albert Einstein.

RESUMO

MIRANDA JÚNIOR, R. N. C. **Avaliação da atividade antiplasmódica *in vitro* dos óleos de Andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) e Pimenta-de-macaco (*Piper aduncum* L).** 2010. 93f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Pará, Belém, 2010.

Na busca de novos antimaláricos, duas espécies típicas da região Amazônica e uma fração rica em limonóides foram objeto deste estudo: *Carapa guianensis* Aubl. (Meliaceae), conhecida popularmente como andiroba, utilizada tradicionalmente como inseticida e no combate da malária. A espécie *Piper aduncum* L. (Piperaceae), conhecida popularmente como pimenta-de-macaco, usada para tratar doenças inflamatórias e a fração rica em limonóides fracionada do óleo de andiroba. Tanto os óleos brutos como a fração foram submetidos a ensaios *in vitro*, segundo metodologia descrita por Rieckman e colaboradores (1980) modificada por Carvalho (1990) com os clones do *Plasmodium falciparum* W₂ e Dd₂. Estes ensaios demonstraram que os óleos apresentaram atividade antiplasmódica, sendo que na concentração de 0,82ng/mL e 8,2µg/mL do óleo de andiroba a inibição do clone W₂ foi de 100% e do Dd₂ de 71% após 72h de exposição, respectivamente. Para a fração na concentração de 3,1µg/mL o clone W₂ foi de 100% e do Dd₂ a de 82% após 72h de exposição. O óleo de pimenta-de-macaco teve na concentração de 1,30ng/mL para o clone W₂ a inibição de 100% e para o Dd₂ a de 77%, após 72h de exposição, para a concentração de 10,3µg/mL. Os resultados com o óleo de pimenta-de-macaco, na concentração de 1,30ng/mL a inibição foi de 100% para clone W₂ e para o clone Dd₂, na concentração de 10,3µg/mL, a inibição foi de 77% após 72h de exposição.

Palavras-chaves: Andiroba, Limonóides, Pimenta-de-macaco e *Plasmodium falciparum*.

ABSTRACT

MIRANDA JÚNIOR, R. N. C. **Evaluation of the activity antiplasmódica in vitro of the oils of Andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) and Pimenta-de-macaco (*Piper aduncum* L).** 2010. 93f. Dissertation (Master's degree) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Pará, Belém, 2010.

In search of new antimalarial drugs, two typical species of the Amazon region and a fraction rich limonoids were the object of this study: *Carapa guianensis* Aubl. (Meliaceae), known popularly as andiroba traditionally used as an insecticide and fighting malaria, the species *Piper aduncum* L. (Piperaceae), known popularly as the pimento-de-macaco, used to treat inflammatory diseases and the fraction rich limonoids obtained from *Carapa guianensis*. Crude oil and fraction were tested *in vitro* using methods described by Rieckman and col. (1980) modified by Carvalho (1990) with *Plasmodium falciparum* clones W₂ and Dd₂. These studies showed that the oils had antiplasmodial activity, with a concentration of 0.82ng/mL and 8.2mg/mL andiroba oil showed an inhibition he W₂ clone was 100% and Dd₂ to 71% (IC₅₀ 9.4 µg/ml) after 72h of exposure respectively. For the fraction at a concentration of 3.1mg/mL, clone W₂, was 100% and Dd₂ to 82% (IC₅₀ 0.4 µg/ml), after 72h of exposure. The pimento-de-macaco oil overalls had a concentration of 1.30ng/mL for the W₂ clone inhibition of 100% and the Dd₂ to 77% after 72h of exposure to a concentration of 10.3mg/mL. The results with the chili oil overalls at a concentration of 1.30ng/ml the inhibition was 100% in clone W₂ and Dd₂ clone at a concentration of 10.3mg/mL, inhibition was 77% after 72h of exposure.

Keyword: *Carapa guianensis*, limonoids, *Plasmodium falciparum* and *Piper aduncum*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Mapa de risco de transmissão da malária por município -----	17
Figura 2	Ciclo do <i>Plasmodium</i> -----	18
Figura 3	Árvore de andiroba (<i>Carapa guianensis</i> Aubl.)-----	23
Figura 4	Madeira de andiroba-----	23
Figura 5	Casca de andiroba-----	24
Figura 6	Folhas de andiroba-----	24
Figura 7	Sementes de andiroba-----	25
Figura 8	Constituintes químicos do óleo de andiroba-----	27
Figura 9	Limonóides isolados da <i>C. guianensis</i> -----	28
Figura 10	Estruturas químicas dos derivados da gedunina-----	30
Figura 11	<i>Piper aduncum</i> L-----	32
Figura 12	Componentes do Óleo de <i>P. aduncum</i> -----	36
Figura 13	Cultivo dos clones W_2 e Dd_2 -----	48
Figura 14	Coloração das lâminas-----	49
Figura 15	Soluções do óleo de andiroba-----	51
Figura 16	Padronização da solução OA-----	52
Figura 17	Hemólise das soluções com Tween 20-----	53
Figura 18	Soluções de OA e DMSO-----	53
Figura 19	Hemólises nas concentrações de 10% e 1% do OA.-----	54

Figura 20	Hemólise na concentração de 1% segundo ensaio do OA-----	54
Figura 21	Padronização da solução de OPM-----	55
Figura 22	Separação de fases na concentração de 10% do OPM-----	56
Figura 23	Placa de 96 poços-----	58
Figura 24	Percentual de inibição do OA pelo tempo para W_2 -----	62
Figura 25	Percentual de inibição da FR pelo tempo para W_2 -----	63

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Comparação da atividade antiplasmódica de espécies de Meliaceae-----	69
Quadro 2	Atividade antiplasmódica do óleo de <i>P. aduncum</i> -----	73
Quadro 3	Comparação da composição química do óleo de <i>P. aduncum</i> obtido neste projeto ao descrito na literatura-----	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Concentrações dos OA e OPM para o clone Dd ₂ -----	59
Tabela 2	Concentrações dos OA e OPM para o clone W ₂ -----	59
Tabela 3	Estabilidade das emulsões e presença de hemólise-----	61
Tabela 4	Percentual de inibição do OA pelo tempo para o clone Dd ₂ -----	62
Tabela 5	Taxa de inibição da fração rica em limonóides frente ao clone Dd ₂ -----	63
Tabela 6	Taxa de inibição do OA e FR contra o clone Dd ₂ -----	64
Tabela 7	Taxa de inibição do OA e FR contra o clone W ₂ -----	64
Tabela 8	Taxa de inibição do OPM contra o clone Dd ₂ -----	65
Tabela 9	Taxa de inibição do OPM contra o clone W ₂ -----	65
Tabela 10	Cl ₅₀ do OA, FR, OPM e Cloroquina-----	66
Tabela 11	Constituintes identificados no óleo de <i>P. aduncum</i> -----	67

LISTA DE ABREVIATURAS

CEM	Campanha de Erradicação da Malária
CI ₅₀	Concentração inibitória 50%
CIM	Concentração inibitória mínima
CL ₅₀	Concentração letal 50%
CT	Concentração tóxica
DDT	Dicloro-Difenil-Tricloroetano
DEET	N.N-dietil-meta-toluamida
DL ₅₀	Dose letal 50%
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IPA	Índice de Parasitário Anual
OA	Óleo de andiroba
OPM	Óleo de pimenta-de-macaco
PIACM	Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária
PNCM	Plano de Nacional Controle da Malária
UR	Umidade Relativa

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
cm	Centímetro
cm ³	Centímetro cúbico
ev	Eletronsvoltos
g	Grama
m ³	Metro cúbico
mL	Mililitro
mm	Milímetro
ng	Nanograma
ppm	Parte por milhão
RPM	Rotação por minuto
mg	Micrograma
µL	Microlitro

SUMÁRIO

Resumo	
Abstract	
Lista de Figuras	
Lista de Quadros	
Lista de Tabelas	
Lista de Abreviaturas	
Lista de Símbolos	
1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1 <i>Carapa guianensis</i>	21
2.2 <i>Pipe aduncum</i>	31
2.3 Malaria e suas ferramentas para a busca de novos fármacos	37
3 OBJETIVOS	40
3.1 OBJETIVO GERAL	40
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
4 METODOLOGIA	41
4.1 Materiais e Métodos	41
4.1.1 Equipamentos	41
4.1.2 Material e Reagentes	41
4.1.3 Meio de Cultivo	42
4.1.4 RPMI 1640	42
4.1.5 Meio de Lavagem	42
4.1.6 Meio Completo	42
4.1.7 Solução de estoque de Giemsa	43
4.1.8 Solução salina a 1,6% e 12%	43
4.1.9 Solução salina a 0,9%	43
4.1.10 Água Tamponada	43
4.1.11 Azul de Metileno	44

4.1.12	Plasma Humano-----	44
4.1.13	Hemácias Humanas-----	44
4.2	Óleo de Andiroba-----	44
4.2.1	Técnica para separação e purificação-----	45
4.2.1.1	Cromatografia-----	45
4.2.1.2	Cromatografia em coluna-----	45
4.2.1.3	Cromatografia em Camada Delgada Comparativa-----	46
4.2.1.4	Reveladores de placas-----	46
4.3	Obtenção do OPM-----	46
4.3.1	Material botânico-----	46
4.3.2	Obtenção do óleo-----	47
4.3.3	Análise do óleo essencial-----	47
5	Avaliação da Atividade Antiplasmódica-----	47
5.1	Descongelamento dos clones de <i>P. falciparum</i> -----	47
5.2	Cultivo do <i>P.falciparum</i> -----	48
5.3	Coloração da gota espessa e esfregaço e determinação da parasitemia-----	49
5.4	Sincronização dos Parasitas-----	50
5.5	Criopreservação dos clones de <i>P.falciparum</i> -----	50
5.6	Microteste <i>in vitro</i> -----	50
5.6.1	Padronização da emulsão-----	50
5.6.1.1	Óleo de andiroba-----	50
5.6.1.2	Óleo de pimenta-de-macaco-----	55
5.6.1.3	Cálculo da densidade-----	56
5.6.1.4	Ensaio para avaliação da atividade antiplasmódica-----	57
6	RESULTADOS-----	60
6.1	Fracionamento da amostra-----	60
6.2	Avaliação da atividade antiplasmódica-----	60
6.3	Composição do OPM-----	66
7	DISCUSSÃO-----	68
7.1	<i>Carapa guianensis</i> -----	68
7.2	Fração rica em limonóides-----	70
7.3	<i>Piper aduncum</i> -----	72

6	CONCLUSÕES -----	76
7	REFERÊNCIAS -----	77

1. INTRODUÇÃO

A malária é uma doença que se caracteriza por acessos intermitentes de febre, calafrios, cefaléia e sudorese. É causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, filo Apicomplexa, classe Sporozoa, ordem Hemosporidiida e família Plasmodiidae. Apenas as espécies *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malarie* e *Plasmodium ovale* infectam o homem (FERRAZ, 2002; MILLER *et al.*, 2002; BRASIL, 2005; QUEIROZ *et al.*, 2008).

A malária representa um problema de saúde pública, visto que milhões de pessoas são infectadas por ano, principalmente em países como os da África Sub-Saariana. Trata-se de uma doença endêmica com uma incidência anual de 350-500 milhões de casos, que resultam na morte de 1,5-2 milhões de pessoas, especialmente em decorrência da forma complicada da doença, que ocorre principalmente em crianças e gestantes. A África Tropical congrega mais de 90% dos casos clínicos de malária no mundo, sendo que 75% dos quais incidem sobre crianças com menos de 5 anos (ALVES *et al.*, 2000; WHO, 2002; WHO, 2005).

Na América Latina, o maior número de casos (99%) é registrado na Amazônia brasileira, com uma incidência de 400-700 mil ao ano (BRASIL, 2005). As infecções no Brasil mais freqüentes são causadas pelos *P. vivax*, (79.6%) e *P. falciparum* (19.3%) (BRASIL, 2008). A Incidência Parasitária Anual (IPA) (Figura 1, pág. 17) é o índice que classifica o grau de risco de se adoecer de malária no Brasil: alto risco (IPA $\geq 50/1.000$ habitantes), médio risco (entre 10 – 49/1.000 hab.) e baixo risco (IPA $< 10/1.000$ hab.) (SILVEIRA *et al.*, 2001, WHO, 2004).

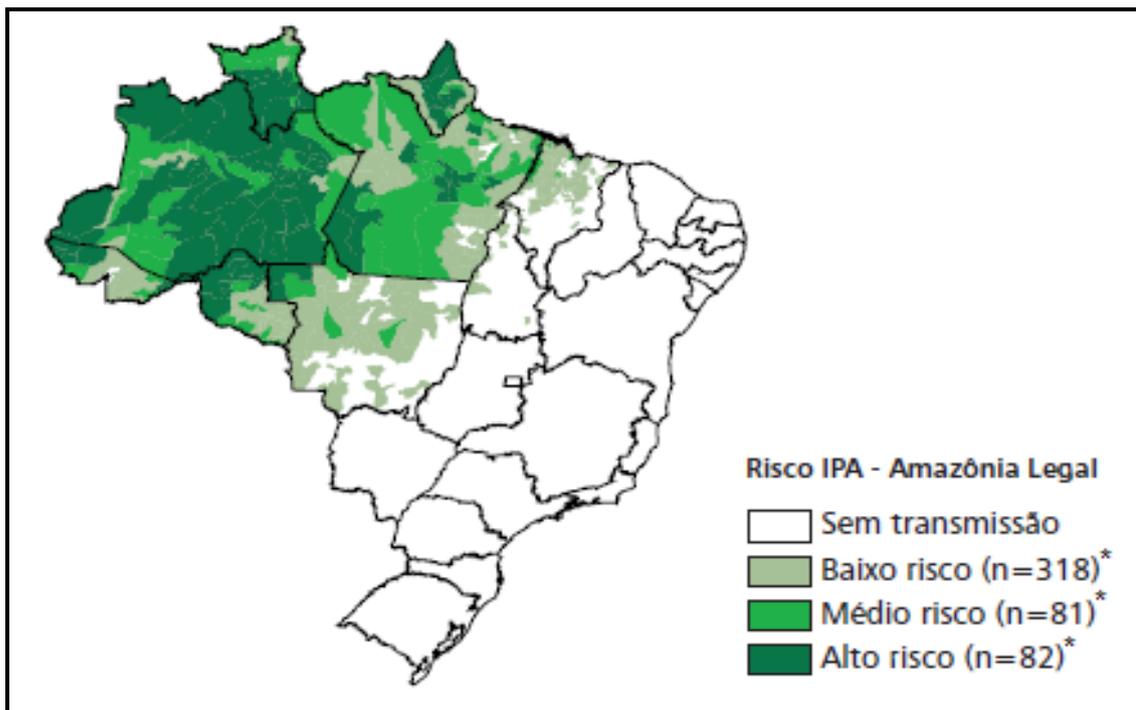


Figura 1: Mapa de risco de transmissão da malária por município de infecção, 2007.
 Fonte: Sivep malária/SVS/MS, Brasil, 2008 - *n: número de municípios

A doença é transmitida pela fêmea do mosquito do gênero *Anopheles*, que durante o repasto sanguíneo inocula no homem, o protozoário *Plasmodium* (Figura 2, pág. 18), passando a retransmiti-lo, sendo o *Anopheles darlingi* e o *A. albivittatus* as espécies mais importantes na transmissão da malária na Amazônia (PÓVOA *et al.*, 2006). Durante o repasto sanguíneo inocula os parasitas (esporozoítos) no tecido subcutâneo e com menor frequência na corrente sanguínea. Há evidências que estas formas passam por vários hepatócitos, antes do desenvolvimento da infecção. Nas células do fígado, os esporozoítos se diferenciam em trofozoítos, que se reproduzem assexuadamente, por esquizogonia, dando origem aos esquizontes teciduais e posteriormente aos merozoítos que invadem os eritrócitos terminando a fase exo-eritrocítica (MILLER *et al.*, 2002).

A invasão das hemácias ocorre quando os parasitas reconhecem os receptores destas células, e os canais se reorganizam formando um cruzamento e uma sinalização. O parasita induz a formação de um vacúolo na membrana plasmática das hemácias, por onde entram. Quando os merozoítos teciduais invadem as hemácias, se inicia o ciclo eritrocítico. O desenvolvimento do parasita no eritrócito também ocorre por esquizogonia, com formação de novos merozoítos que

invadirão outras hemácias. Após algum tempo estes merozoítas sanguíneos sofrem diferenciação em estágios sexuais, os gametócitos que não mais se dividem, serão injetados pelo mosquito, durante o repasto sanguíneo, completando o ciclo (MILLER *et al.*, 2002).

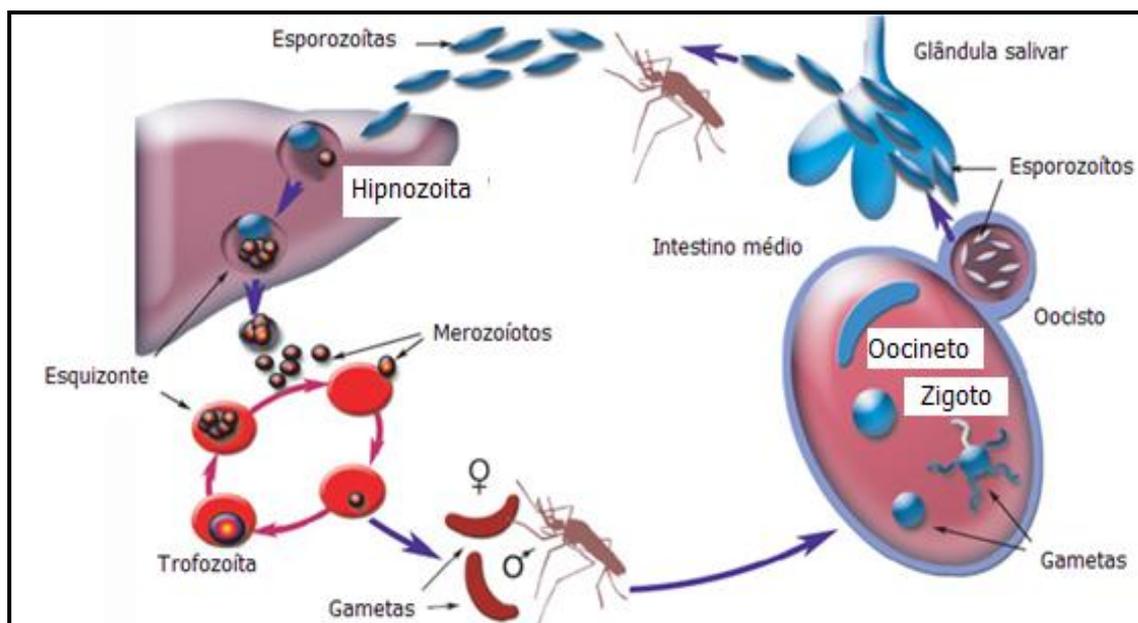


Figura 2: Ciclo do *Plasmodium* sp
Fonte: modificada de Winzeler, 2008.

A quimioterapia da malária teve início no século XVII. Os jesuítas que vieram para a América do Sul observaram que os índios do Peru utilizavam plantas do gênero *Cinchona* spp (família Rubiaceae), conhecidas popularmente por quinas, para o tratamento de doenças febris. Estudos fitoquímicos de *Cinchona* spp na Europa, no início do século XIX, levaram ao isolamento da quinina que apresentou atividade antimalárica (VALE *et al.*, 2005; FRANÇA *et al.*, 2008; NKURUMAH *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2009). Devido à alta toxicidade da quinina (FRANÇA *et al.*, 2008), tornou-se necessário buscar drogas menos tóxicas, sendo obtida a cloroquina (COOPER & MAGWERE, 2008). Este fármaco foi amplamente utilizado para o tratamento da malária causada por *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. falciparum* (CRAVO & VIRGILIO, 2002).

No século XX, se acreditava que a combinação do uso de inseticida, principalmente o dicloro-difenil-tricloroetano (DDT), e o tratamento dos doentes fosse suficiente para a erradicação da malária no Brasil. Sendo assim, em 1965 foi criada a Campanha de Erradicação da Malária (CEM), que apresentou bons resultados em várias regiões do país menos na região Amazônica, devido às questões geográficas e de ocupação (LOIOLA *et al.*, 2002). Contudo, com o emprego destas medidas foi observado crescente resistência dos mosquitos aos inseticidas e do *P. falciparum* aos fármacos. Assim nos anos 90, a luta contra malária se baseava em fornecer diagnóstico precoce efetivo, tratamento imediato e eficaz da doença e planejamento e programação de medidas preventivas. Entretanto estas medidas não foram suficiente, o que levou a implantação do Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária (PIACM) e posteriormente ao Plano Nacional de Controle da Malária (PNCM) com objetivo de fornecer diretrizes no combate da malária, aos governos federal, estadual e municipal (ROCHA *et al.*, 2006).

A grande exposição do *P. falciparum* à cloroquina contribuiu para o aparecimento de cepas resistentes (CRAVO & VIRGILIO, 2002; KETEMA *et al.*, 2009). Hoje, além da cloroquina, o *P. falciparum* apresenta resistência a diversos outros antimaláricos, tornando o seu tratamento um desafio (BRASIL, 2005).

No início do século XXI preconizou-se a utilização dos derivados da artemisinina associado a outros fármacos para o tratamento da malária *falciparum*, porém em estudos recentes envolvendo 40 pacientes infectados com *Plasmodium falciparum* em Palin, Camboja, e outros 40 em Wang Pha, noroeste da Tailândia, demonstrou que no grupo cambojano o tempo de depuração do parasita foi de 84h e 48h para o grupo tailandês, sendo que a parasitemia diminui em 72h com a artemisinina (DONDORP *et al.*, 2009). Tendo em vista, esses casos de resistência a artemisinina (extraída da *Artemisia annua* L) e seus derivados na Ásia (WALKER *et al.*, 2000; MUGITTU *et al.*, 2006; RODRIGUES *et al.*, 2006; HUNT *et al.*, 2007; WHO, 2007). Esse fato tem servido de alerta para órgãos governamentais e científicos para a importância de buscar novos fármacos (MARQUES *et al.*, 2005; SAEWAN *et al.*, 2006; LEE *et al.*, 2007; MOHAMAD *et al.*, 2009).

Nesse contexto, este trabalho se justifica, pois se baseou em informações etnofarmacêutica, isto é, a família Meliaceae muito utilizada para tratamento da

malária (RASOANAIVO *et al.*, 1992; LEAMAN *et al.*, 1995; CARABALLO *et al.*, 2004). Assim como, a família das Piperaceae, também, popularmente utilizados para tratamento de várias doenças inflamatórias, bacterianas e parasitárias, dentre elas a malária (FENNER *et al.*, 2006; PENIDO *et al.*, 2006; FOURNET *et al.*, 1996; GAZIM *et al.*, 2007; REGASINI *et al.*, 2009; KAOU *et al.*, 2008).

Sendo assim, a avaliação antiplasmódica do óleo de andiroba (OA), rico em limonóides (AMBROZIN *et al.*, 2006), extraído da *Carapa guianensis* (Meliaceae), como do *Piper aduncum* do qual se extraiu o óleo de pimenta-de-macaco (OPM) são pertinentes. A avaliação do potencial antimalárico das plantas utiliza extratos, como o extrato aquoso e metanólico da *Lansium domesticum* (Meliaceae) com atividade antiplasmódica frente ao plasmódio 3D₇ reduzindo a parasitemia em mais 50% (YAPP *et al.*, 2003) e o extrato etanólico de *Piper* sp que também apresentou boa atividade antiplasmódica contra o *Plasmodium falciparum* resistente a cloroquina (VALADEAU *et al.*, 2009), substâncias puras como os diterpenos em que da *Scoparia dulcis* um ácido tetracíclico diterpeno (ácido scopaducíclico A), apresentou atividade contra o clone D₆ e W₂ (CI₅₀ 27 e 19µM, respectivamente) (KIRANDEEP *et al.*, 2009) e limonóides como azaradiona e epoxidoazaradiona com atividade antiplasmódica frente ao *P.falciparum* (K₁) com de CI_{50%} 2,91µg/mL e 3,18µg/mL (MANEERAT *et al.*, 2008), respectivamente.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. *Carapa guianensis*

Carapa guianensis Aubl., conhecida popularmente como andiroba, andiroba-saruba, iandiroba, carapa e nandiroba (FISCH *et al.*, 1995; LORENZI, 1992; BICKII *et al.*, 2000; MUELLNER *et al.*, 2003), pertence à família Meliaceae que é composta por 50 gêneros e aproximadamente 575 espécies. A família Meliaceae pertence à ordem das Rutales, subdividida em quatro subfamílias, se destacando as Melioideae e Swietenioideae que são as maiores, constituídas de 7 tribos e 35 gêneros e 3 tribos e 13 gêneros, respectivamente (PENNINGTON e STYLES, 1975 *apud* MUELLNER *et al.*, 2003). No Brasil é representada por 7 gêneros, *Cedrela*, *Cabralea*, *Swietenia*, *Carapa*, *Guarea*, *Trichilia* e *Khaya* (GUIMARÃES *et al.*, 2004). O gênero *Carapa* pertencente à subfamília *Swietenioideae* sendo composto por duas espécies, *C. procera* e *C. guianensis* (PENNINGTON *et al.*, 1981).

A família tem distribuição nos trópicos de todo o planeta, com pequena penetração nas zonas temperadas (JOLY, 1987). A primeira espécie *C. procera* ocorre na África e América do Sul, em especial na Guiana Francesa, Suriname e Brasil. Já a *C. guianensis* ocorre da América Central até o norte da América do Sul, sendo encontrado na Venezuela, Equador, Colômbia, Peru e Brasil. No Brasil as duas espécies ocorrem principalmente no estado do Amazonas e são conhecidas como andiroba, andirova, carapinha e iandiroba (FISCH *et al.*, 1995; FERRAZ & SAMPAIO, 1996; VINSON *et al.*, 2005; AGRA *et al.*, 2007).

Plantas pertencentes à Meliaceae, em geral, são arbóreas e de grande porte, com folhas grandes, de crescimento apical (da raque), sem estípulas, às vezes com pulvinos na base, pinadas, bipinadas ou unifoliadas. Flores pequenas actinomorfas, em inflorescências paniculadas terminais ou nas axilas superiores, hermafroditas, cíclicas, diclamídeas, de simetria radical. Sépalas e pétalas livres. Estames em número duplo ao das pétalas em geral com filetes alargados soldados em um tubo, com as anteras fixas na porção superior interna. Ovário súpero, com 4 a 5 carpelos e outros tantos lóculos, cada qual com 1 ou 2 óvulos. Fruto drupa, baga ou capsular loculicida ou baciforme. Sementes com arilo ou aladas presas à columela. As não aladas podem ser elipsóides, plano-convexas ou angulosas, cobertas ou não por

sarcotesta ou um arilóide. O embrião é geralmente reto, com cotilédones planos ou planos-convexos, com eixo radícula-hipocótilo incluso ou externo. No gênero *Carapa*, os cotilédones são muito crassos, fusionados entre si (GEMTCHÚJNICOU, 1976; JOLY, 1987; BARROSO, 1991; MUELLNER, 2003).

Carapa guianensis (Figura 3, pág., 23) é constituída por folíolos medindo de 80 a 110 mm de comprimento, podendo atingir 30m de altura e 1,20m de largura, ocorrendo em toda a região Amazônica, em várzeas secas e alagadiças, beiras de rios e igarapés do Pará até a Bahia. A madeira (Figura 4, pág., 23) moderadamente pesada (densidade de $0,73\text{g/cm}^3$), dura, porém fácil de fender, superfície ligeiramente áspera ao tato, textura média, pouco resistente às intempéries, contudo inatacável por insetos, alburno pouco diferenciado. Floresce duas vezes ao ano, agosto-setembro e janeiro-fevereiro, já os frutos amadurecem em junho-julho e fevereiro-março (LORENZI, 1992; AMBROZIN *et al.*, 2006). A casca (Figura 5, pág., 24) cinzenta e grossa; folhas (Figura 6, pág. 24) impinadas ou abrupto-impinada composta por inúmeros folíolos subopostos, elíptico-oblongo; flores pequenas, amarelas ou vermelhas, axilares; fruto capsular ovóide semi-globoso, lenhoso; número variado de sementes vermelhas, coriáceas e quase lenhosas, convexas, angulosas ou irregularmente tetraédricas, achatadas lateralmente (CORRÊA, 1926). Quanto à floração essa ocorre de agosto a outubro, e a frutificação de janeiro a abril (SHANLEY *et al.*, 1998). Também foi contatada a ocorrência de floração no estado do Pará, durante a estação chuvosa (fevereiro e março) (SAMPAIO, 2000).



Figura 3: Árvore de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.)
Fonte: Boufleuer, 2004



Figura 4: Madeira de andiroba
Fonte: modificado de LOREZZI, 1992



Figura 5: Casca de andiroba
Fonte: modificado de LOREZZI, 1992



Figura 6: Folhas de andiroba
Fonte: LOREZZI, 1992

Em termos econômicos, a madeira das Meliaceas possui ótima qualidade, por isso são bastante usadas na indústria de móveis, construção de barcos e navios (MENDONÇA, *et al.*, 2007). Por suas propriedades físicas e mecânicas a madeira de andiroba alcançou o mercado de países como o Japão, EUA e Alemanha. Na primeira metade da década de 90, a produção de madeira serrada exportada pelo estado do Pará variou ano a ano, porém alcançando valores superiores a 13.400 m³, com preço médio de US\$ 227,00/m³ (FERRAZ *et al.*, 2003). Com a espécie *C.*

guianensis, além da madeira, as sementes (Figura 7, pág., 25) são utilizadas para extração do óleo. As indústrias farmacêuticas e de cosméticos têm grande interesse utilizando-o em alguns produtos como; shampoos, condicionador, sabonetes e cremes hidratantes (BOUFLEUER, 2004; FERRARI *et al.*, 2007).

Diferente da extração madeireira, a coleta das sementes demanda um pequeno investimento e os subprodutos oriundos do óleo, como sabonetes e velas, são revendidos em feiras livres do Norte do país, tendo um grande impacto na economia de alguns estados da região (MENDONÇA *et al.*, 2007).

A produção de uma árvore de andiroba pode variar de 50 a 200Kg de semente/ano (RIZZINI & MORS, 1976; SHANLEY *et al.*, 1998). As sementes quando acondicionadas em sacos plásticos permanecem viáveis por um longo período, até sete meses, desde que mantidas em câmara úmida (14°C e 80% de U.R) ou câmara seca (12°C e 30% de U.R) (FERRAZ & SAMPAIO, 1996).



Figura 7: Sementes de andiroba
Fonte: Lorenzi, 1992

O óleo obtido de *C. guianensis* é utilizado popularmente para o tratamento de doenças febris, malária, como repelente para insetos (MILLIKEN, 1997), coceiras em geral, cicatrizantes de ferimentos, antiinflamatório (AMBROZIN *et al.*, 2006), dores no pescoço (torcicolo) e traumatismos (MENDONÇA *et al.*, 2007). Também tem sido utilizado pelos raizeiros e vendedores de mercados populares para a prevenção do câncer de pele, pois de acordo com a informação popular este óleo proteger a pele dos danos do sol, apresentando assim uma suposta atividade fotoprotetora (FERRARI *et al.*, 2007).

Alguns estudos avaliando o potencial farmacológico deste óleo já foram realizados. A avaliação da atividade repelente foi realizada utilizando larvas de *Aedes aegypti*, onde se observou um elevado potencial (MENDONÇA *et al.*, 2005). Em estudo realizado com voluntários, que submeteram seus antebraços recobertos com óleo de andiroba a 100%, DEET 50% (N.N-dietil-meta-toluamida) como controle positivo, óleo de soja refinado, óleo de andiroba a 15% e na ausência de produto (controle negativo), a picada das fêmeas do *Aedes* sp. Após aferição do tempo da primeira e terceira picada, foi observado um discreto efeito repelente do óleo de andiroba a 100%, quando comparado ao óleo de soja refinado, óleo de andiroba a 15% e o controle negativo, sendo significativamente inferior ao inseticida (DEET 50%) (MIOT *et al.*, 2004).

O potencial carapaticida do óleo de andiroba foi avaliado sobre fêmeas ingurgitadas de *Anocentor nitens* e *Rhipicephalus sanguineus*, coletadas manualmente, respectivamente, de equinos e de cães naturalmente infestados. Observou-se mortalidade das fêmeas ingurgitadas e redução de postura, neste caso, com ovos inférteis, demonstrando eficácia de 100% nas duas espécies em todas as diluições testadas e a potencialidade do uso do extrato de andiroba contra estes parasitas (FARIAS *et al.*, 2009).

Outro estudo avaliou o potencial fotoprotetor, e ao analisar a fitoquímica do óleo de andiroba (CORRÊA, 1984; QI *et al.*, 2004) verificou-se que não há metabólitos com possível ação fotoprotetora. Quando submetido à avaliação de seu potencial fotoprotetor confirmou-se que este óleo não apresentar ação fotoprotetora (FERRARI *et al.*, 2007), porém possui atividades emoliente (FRANQUILINO, 2006), antiinflamatória (FERRARI, 1998; PENIDO *et al.*, 2006) e de repelente de insetos

(MIOT *et al.*, 2004; MENDONÇA *et al.*, 2005) que podem ser benéficas para o consumidor em formulações fotoprotetoras e até mesmo servir como um apelo de marketing para o produto (FERRARI *et al.*, 2007).

Em estudos de toxicidade reprodutiva com ratas Wistar, durante 45 dias com administração oral do óleo de andiroba, após análise dos índices de fertilidade, viabilidade, lactação, gestação, relação prole/mãe, percentual de natimorto e massa corpórea da prole, foi visto que o óleo de andiroba não induziu toxicidade materna, efeito abortivo, assim como não alterou o desenvolvimento normal da prole e seus parâmetros comportamentais (COSTA-SILVA *et al.*, 2006). Estes resultados sugerem que o possui baixo potencial teratogênico.

O óleo é constituído de ácido palmítico (1), oléico (2) (cerca de 50%) e linoléico (3) (Figura 8, pág., 27) (CASTRO *et al.*, 2006), além de uma fração insaponificável (2 a 5%) constituída principalmente de substâncias amargas, chamadas meliacinas ou limonóides, que provavelmente são responsáveis pela atividade biológica do óleo (AMBROZIM *et al.*, 2000; AMBROZIM *et al.*, 2006). Já foram isolados deste óleo sete limonóides: 17 β -hidroxiazadiradiona (4), 6 α -acetoxigedunina (5), 7-deacetoxi-7-oxogedunia (6), deacetilgedunina (7), andirobina (8), gedunina (9) , metil-angolesato (10) (Figura 9, pág., 28) (AMBROZIN *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2009).

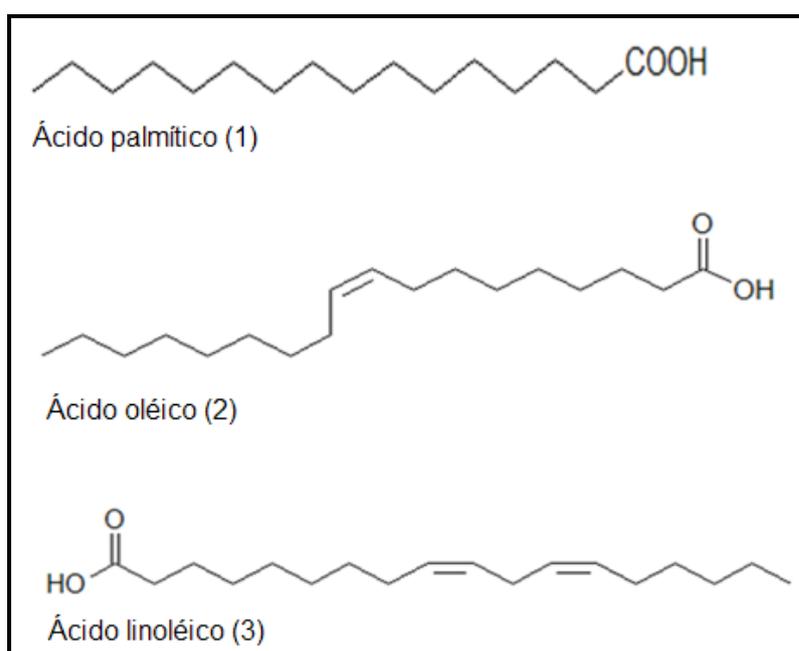


Figura 8: Constituintes do óleo de andiroba

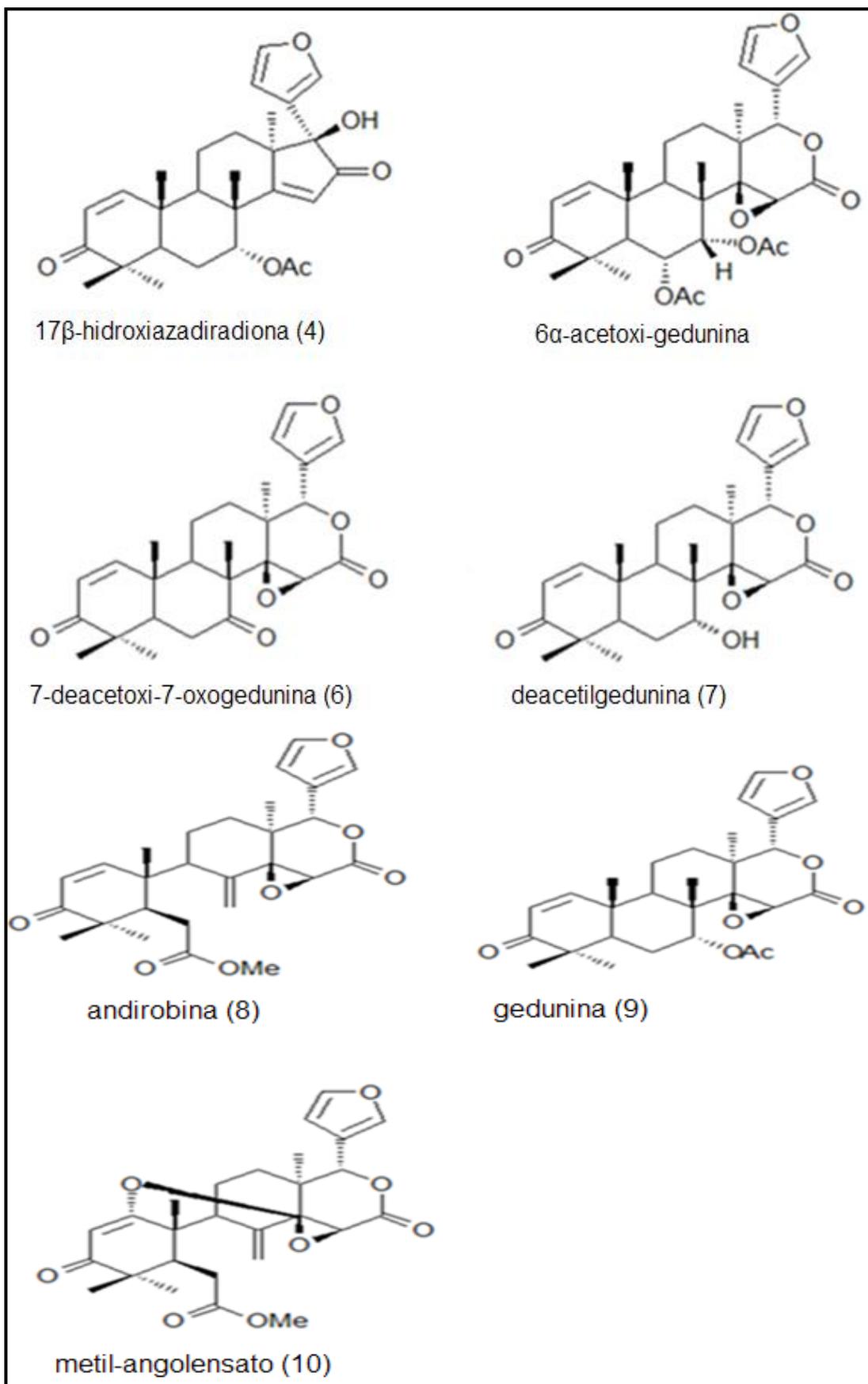


Figura 9: Limonóides isolados da *C. guianensis*.

Quimicamente, os limonóides são tetranortriterpenóides altamente oxigenados (SILVA, 2009; MOHAMAD *et al.*, 2009) polaridade moderada, insolúvel em água, todavia solúvel em hidrocarbonetos, álcool e acetona (ROY *et al.*, 2006) isolados tanto de Meliaceae, quanto de Rutaceae e Cneoraceae. Sua rota biossintética tem origem em um triterpeno que gera um tetranortriterpenóide pela perda de quatro átomos de carbono do precursor original, essa rota envolve várias reações que levam a formação de diferentes estruturas, mas que, geralmente, possuem 26 átomos de carbono no esqueleto básico (SIMÕES, 2007).

A atividade antiplasmódica de alguns limonóides presentes no óleo de andiroba foi avaliada utilizando dois clones de *Plasmodium falciparum*, o primeiro sensível à cloroquina (D₆) e o segundo resistente a cloroquina (W₂). Dentre os limonóides a gedunina mostrou maior potencial antimalárico, visto possuir menor concentração inibitória média para o clone *Plasmodium falciparum* resistente a cloroquina W₂ (CI₅₀ 20ng/mL) (MACKINNON *et al.*, 1997). Outro estudo avaliou a atividade antiplasmódica gedunina (9) frente ao *Plasmodium falciparum* sendo observada uma CI₅₀ em cerca 1µM, depois de 48h de exposição e 0,3µM, depois de 96h de exposição. (KHALID *et al.*, 1986). Segundo Rochanakij e colaboradores (1985) a gedunina apresentou atividade antiplasmódica frente ao clone D₆ de *Plasmodium falciparum* (CI₅₀= 720ng/mL) (KIRANDEEP *et al.*, 2009).

Além da gedunina outros limonóides também demonstraram atividade antimalárica como os limonóides trichirubina A e B (CI₅₀ 0,3 e 0,2µg/mL, respectivamente) isolados da *Trichilia rubescens*. Esses limonóides têm sua atividade atribuída à presença de grupos fortemente reativos no anel A com a carbonila no carbono C-3 e à insaturação nos carbonos C-1/C-2 (KIRANDEEP *et al.*, 2009).

Quando se compara a gedunina (9) a 1,2-dihidro-gedunina (11), onde foi realizada uma redução na dupla ligação no anel A, a atividade antiplasmódica da 1,2-diidro-gedunina foi muito menor (CI₅₀ > 10.000 ng/mL) que o da gedunina (CI₅₀ 39ng/mL) para o clone sensível a cloroquina D₆ (MACKINNON *et al.*, 1997).

Outra modificação molecular da gedunina foi realizada, isto é através da epoxidação foi obtido a 1,2-epoxi-gedunina (12). Seu potencial antiplasmódico foi avaliado, sendo este inferior ao da gedunina (CI₅₀ 2580ng/mL e CI₅₀ 980ng/mL) para

os clones D₆ e W₂, respectivamente. Outra alteração estudada foi à troca do grupo acetato do anel B nos derivados 7-deacetoxi-gedunina (13) (Cl₅₀ 2610ng/mL) e 7-cetogedunina (14) (Figura 10, pág., 30) (Cl₅₀ > 10.000ng/mL) para o clone D₆, que demonstraram também a diminuição de atividade frente ao clone de *P. falciparum* (MACKINNON *et al.*, 1997).

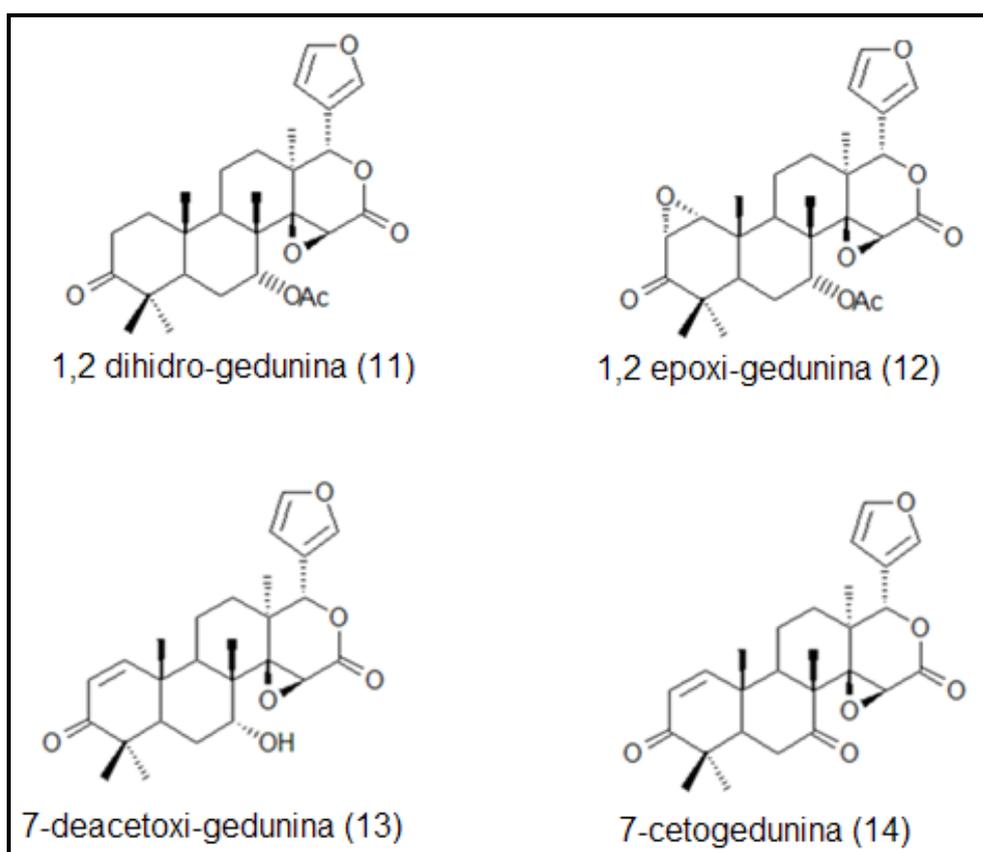


Figura 10: Estruturas químicas dos derivados da gedunina

Além do óleo, alguns extratos obtidos de *C. guianensis* foram submetidos a diferentes tipos de ensaios biológicos e farmacológicos. O extrato etanólico obtido das folhas de *C. guianensis* foi avaliado quanto à atividade antibacteriana e cicatrizante, sendo a taxa de cura avaliada pela taxa de contração da ferida, período de epitelização, força de ruptura da pele, peso de tecido de granulação. Os resultados indicaram ausência de atividade antibacteriana, porém apresentou atividade cicatrizante (NAYAK *et al.*, 2009).

Através do ensaio fluorimétrico e com Hipoxantina marcada avaliou-se a atividade antiplasmódica do extrato *C. guianensis*, onde se obteve CI_{50} (concentração inibitória 50%) superior a $50 \mu\text{g/mL}$, sendo considerada pouca ativa para o *P. falciparum* (CORBETT *et al.*, 2004).

Em estudo, *in vitro*, da atividade antineoplásica e citotóxica de dois extratos: metanólico e etéreo das sementes de *C. guianensis*, contra linhagens de células tumorais de carcinoma de boca (KB) e adenocarcinoma de mama (MCF7) e não-tumoral de fibroblastos (NIH/3T3), constatou-se que o extrato metanólico teve ação antineoplásica, mas não citotóxica, contra células KB, CI_{50} $58,74 \mu\text{g/mL}$ e CT (concentração tóxica) de $65,01 \mu\text{g/mL}$, e que o extrato etéreo frente as célula não-tumoral (3T3) revela crescimento e não leva à morte celular. Ou seja, o extrato etéreo não possui atividade antiproliferativa e/ou citotóxica nesta linhagem celular, permitindo o crescimento normal da célula (OLIVEIRA *et al.*, 2008).

2.2. *Piper aduncum*

A família Piperaceae pertence à ordem das Piperales sendo composta por 10 a 12 gêneros com cerca de 2000 espécies distribuídas em todas as regiões tropicais. No Brasil, a família é representada por 5 gêneros, tendo o gênero *Piper* como um dos maiores, com cerca de 260 espécies, sendo que a Amazônia abriga próximo de 140 espécies (MAIA *et al.*, 1998; JARAMILLO & MANOS, 2001; GUIMARÃES *et al.*, 2004). O gênero *Piper* é um dos maiores da família, com cerca de 1.000 espécies, dentre elas o *Piper aduncum* L. (NUNES *et al.*, 2007).

Esta família inclui plantas com hábitos predominantemente herbáceos (trepadeiras, arbustos e até árvores), de distribuição pantropical. Quanto aos aspectos botânicos, as folhas são inteiras, com predomínio da disposição alternada, com estípulas, que muitas vezes estão soldadas simulando uma bainha. Inflorescência em geral espiciforme. Flores muito pequenas, aclamídeas, hermafroditas, raramente diclinas, protegidas por uma ou duas bractéolas pediceladas ou sésseis, geralmente petaladas. O caule se apresenta articulado (com nós e entre nós) com articulações intumescidas. Androceu composto por 1 a 10 estames livres, com anteras bitecas ou unitecas, risomas. Ovário súpero com 2 a 5

carpelos, unilocular com um único óvulo, basal, ortótrofo. Estilete comumente faltando e estigma papiloso. Fruto pequeno, drupáceo, carnoso. Semente com perisperma e endosperma escasso e embrião reduzido (GEMTCHÚJNICOU, 1976; JOLY, 1987; BARROSO, 1978).

A espécie *Piper aduncum* L conhecida popularmente como pimenta-de-macaco e aperta-ruão (MAIA *et al.*, 2000), é arbusto ou arvoreta de 2 a 7m (Figura 11, pág., 32), bastante nodoso; folhas membranáceas ou cartáceas, elípticas, elíptico-ovaladas ou elíptico-lanceoladas ápices curtamente acuminado, base assimétrica arredondada ou codiforme, opacas em ambas as faces, sendo a inferior finamente pubescente, nervação com pêlos quase adpressos espigas alongadas, flores minúsculas e frutos obpiramidais; frutos drupa amarelada, com minúsculas sementes marrons (ALBUQUERQUE *apud* MAIA *et al.*, 2000).



Figura 11: *Piper aduncum* L
Fonte: MAIA *et al.*, 2000

No Brasil distribuem-se pelos Estados da região Norte e Nordeste (MAIA *et al.*, 2000). Esta espécie é considerada uma planta oportunista que invade áreas desflorestadas após exploração de madeira, de alta rusticidade e elevada resistência às mudanças climáticas (SOUSA *et al.*, 2008).

O gênero *Piper* apresenta boa representatividade comercial e destaque no cenário econômico, sendo a espécie indiana *Piper nigrum*, produtora da pimenta-do-reino, a mais difundida no mundo. O *Piper hispidinervum*, uma espécie nativa da Amazônia brasileira, conhecida como pimenta-longa, tem despertado grande interesse como fonte para obtenção de safrol. As maiores aplicações do safrol é a sua conversão para piperonal e butóxido de piperolina, sendo o primeiro um fixador de fragrância e o último um agente sinérgico das piretrinas, na formulação e estabilização e potencialização de um inseticida biodegradável (SOUTO, 2006; NUNES *et al.*, 2007).

O gênero *Piper* é muito utilizado na medicina popular da América Latina e Oeste da Índia. O extrato clorofórmio de *P. aborescens* apresentou significativa atividade contra cultura de células KB e em culturas de células de leucemia linfocítica, P-388, e o *P. sylvaticum* como antídoto eficaz, contra picadas de serpente na Índia (PARMAR *et al.*, 1997). Na Jamaica foi constatado o uso de 11 espécies do gênero *Piper* dentre elas o *Piper aduncum* no combate de dores estomacais e repelentes de insetos. As raízes e frutos do *P. chaba* utilizado contra asma, bronquite e febre. O *P. amalago*, distribuído do México ao Brasil, utilizado com ação antiinflamatória (PARMAR *et al.*, 1997).

As folhas de *Piper futokatsura* Sieb., nativa da Taiwan e Japão são utilizadas como inibidores da alimentação para larvas de *Spodoptera litura* Fabricius (MATSUI e MUNSKATA, 1975) e também as folhas de *Piper umbellatum* L., *Piper hispidum* Sw., *Piper auritum* Kunth, nativas da América Central e Nordeste da bacia Amazônica, são utilizadas pela população local na prevenção da malária e para remover piolhos. (SCHULTES, 1980 *apud* SOUTO, 2006).

Estudos com adultos de *Sitophilus zeamais*, para avaliação do efeito inseticida por ação de contato (impregnação em papel de filtro), tópica e fumigação com os óleos de *Piper hispidinervum* e *P. aduncum*. Foi observado que os óleos apresentam efeitos inseticidas, dependendo da via de exposição. O *Piper hispidinervum* foi mais eficaz pela via de contato (CL_{50} 0,51 μ L. cm⁻²) e o *P. aduncum* pela via de exposição por fumigação (CL_{50} 0,56g/mL). Entretanto no método de contato por aplicação tópica, os índices de toxicidade dos óleos foram semelhantes,

DL₅₀ de 0,04µL/mL para o *P. hispidinervum* e DL₅₀ de 0,03µL/mL para o *P. aduncum* (ESTRELA *et al.*, 2006).

A atividade antifúngica dos óleos essenciais de *Piper aduncum*, *Piper arboretum* e *Piper tuberculatum* foi realizada por bioautografia em placas de CCD. Os óleos essenciais dos frutos de *Piper tuberculatum* e *Piper aduncum*, demonstraram alta atividade, com concentração inibitória mínima de 10µg/mL contra os fungos *Cladosporium sphaerospermum* e *Cladosporium cladosporioides*, respectivamente (NAVICKIENE *et al.*, 2006). O óleo também foi testado contra *Crinipellis pernicioso*, fungo patogênico que ataca o cacau, apresentando inibição de 100% nas concentrações de 50 e 100ppm. (MAIA *et al.*, 1998).

Em testes *in vitro* e *in vivo* para avaliar a ação fungitóxica contra o fungo *Colletotrichum musae*. Nos testes *in vitro* nas concentrações acima de 100µg/mL a inibição foi de 100% do crescimento micelial e na germinação de conídios. No teste *in vivo* utilizando frutos de banana “Prata” para se avaliar a podridão foi observado que o óleo de *P. aduncum* na concentração de 1% foi capaz de inibir a manifestação de podridão nos frutos (BASTOS e ALBUQUERQUE, 2004).

Utilizando clone de o *P. falciparum* resistente a cloroquina, com o teste da hipoxantina marcada, avaliou-se a atividade antiplasmódica de *P. aduncum*, sendo observado alto potencial antimalárico desta espécie (CI₅₀ < 10µg/mL) (VALADEAU *et al.*, 2009). Outras espécies de *Piper* apresentaram alto potencial antimalárico (KAOU *et al.*, 2008).

Com relação à toxicidade na determinação da dose letal 50% (DL₅₀) do óleo essencial de *Piper aduncum* o valor obtido por interpolação semi-logarítmica, correspondeu a 2.400 ± 191,7 mg/kg de massa corpórea. Segundo a Organização da Cooperação Econômica e Desenvolvimento (2001) o óleo de *P. aduncum* pertence à classe dos agentes xenobióticos, de baixa toxicidade (SOUSA *et al.*, 2008).

Em estudos fitoquímicos do gênero *Piper* revelaram uma variada constituição de componentes químicos como alcalóides/amidas, ligninas e terpenos (PAMAR *et al.*, 1997).

Dentre as Piperáceas da Amazônia, O *P. aduncum* é uma excelente produtora de óleo essencial, de elevado padrão de oxigenação (MAIA *et al.*, 1998; FAZOLIN *et al.*, 2007). Na investigação fitoquímica da espécie numerosos composto com atividade biológica já foram isolados como; aduncamida (15) uma nova amida isolada do *P. aduncum* com ação bactericida contra o *Bacillus subtilis* e *Micrococcus luteus*, fenilpropanóides como o dilapiol (16), miristicina (17) e apiol (18), sendo esses compostos sinérgicos de inseticidas naturais e sintéticos. Compostos terpênicos como piperitona (19), com ação inseticida (VIDAL *et al.*, 2008). As chalconas como piperaduncina A (20), B (21) e C (22) (Figura 12, pág., 35), com ação bactericida (PAMAR *et al.*, 1997). Dentre os fenilpropanoides, o dilapiol é o composto majoritário do *P. aduncum* (PARMAR *et al.*, 1997). No óleo de *P. aduncum* o dilapiol, constituído por um grupo metilenodioxidofenila, varia de 58% a 88,4% (SMITH & KASSIM, 1979; BELZILE *et al.*, 2000; GOTTLIEB *et al.*, 1981; FAZOLIN *et al.*, 2005; MAIA *et al.*, 1998; FAZOLIN *et al.*, 2007). Por se tratar de um fenilpropanóide, origina-se da fenilalanina pela ação da enzima fenilalanina amonialiase (PAL) (SIMÕES, 2007).

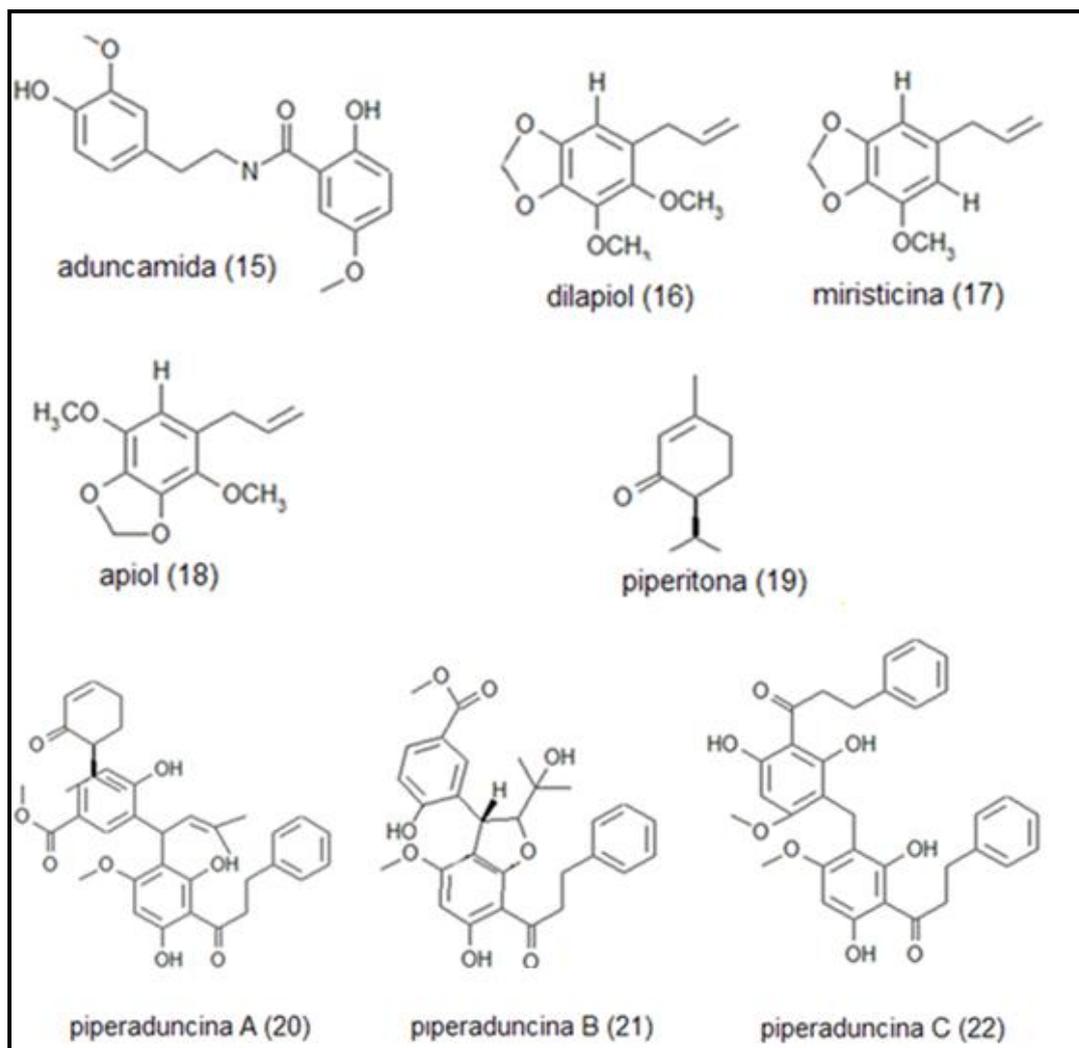


Figura 12: Componentes do óleo de *P. aduncum*.

O dilapiol teve uma alta toxicidade sobre a larva de *Tenebrio molitor* L. isso devido provavelmente a ação conjunta deste constituinte e outros compostos bioativos minoritários na composição do óleo essencial, tais como o sarisan (BIZZO *et al.*, 2001; FANZOLIN *et al.*, 2007). Esse exibiu completa inibição (95-98,9%) contra os basidiósporos do fungo *Clinipellis pernicioso*, CIM 0,6 ppm (ALMEIDA *et al.*, 2009).

Nos ensaios larvicida e inseticida contra *Anopheles marajoara* e *Aedes aegypti*, o dilapiol promoveu 100% da mortalidade das larvas, após 48h de exposição, na concentração de 100 ppm. Para o ensaio inseticida a mortalidade de 100% dos adultos dos mosquitos de *A. marajoara* e *A. aegypti* foi conseguida depois

de 60 e 180 minutos, com Cl_{50} de 417 e 325 ppm para o *A. marajoara* e Cl_{50} 401 e 361 ppm para o *A. aegypti*, respectivamente. (ALMEIDA *et al.*, 2009).

2.3. Malária e suas ferramentas para a busca de novos fármacos.

Conforme relatado anteriormente, inicialmente o *P. falciparum* mostrou-se resistente a cloroquina (YAYON *et al.*, 1984; CRAVO & ROSÁRIO, 2002; VALE *et al.*, 2005), em seguida a sulfadoxina (MAYOR *et al.*, 2001; FERNANDES *et al.*, 2007) e mais recentemente aos derivados da artemisinina (ECKSTEIN-LUDWIG *et al.*, 2003; MUGITTU *et al.*, 2006). Neste contexto, a busca de novos fármacos torna-se prioridade.

Nesta busca, o primeiro problema a ser enfrentado é o fato da malária ser espécie específica, isto é espécies que infectam o homem como *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale* não infectam nenhuma outra espécie animal (FRANÇA *et al.*, 2008). Já *P. falciparum* pode infectar macacos após complexo procedimento cirúrgico (CARVALHO *et al.*, 2000).

Os testes in vivo utilizam alguns modelos, dentre eles o galináceo, com roedores e primatas não humanos. Os primeiros testes foram com o modelo galináceo, único disponível a época para testar atividade de drogas contra espécies de *Plasmodium*, em 1947 através de estudos realizados com 600 espécies de plantas de 126 famílias foi observado que dentre essas, várias foram inativas, porém foi destacado, nesse estudo, às famílias Simaroubaceae e Amaryllidaceae, devido o número de espécies ativas. Entretanto esses testes utilizando galinhas e patos não garantiam necessariamente que drogas ativas contra espécies de *Plasmodium* desses animais fossem ativas contra as espécies de *Plasmodium* infectantes nos humanos. Além disso, as técnicas químicas de avaliação e de fracionamentos de extratos de plantas, como a cromatografia, espectroscopia de massas e espectroscopia de ressonância magnética não eram satisfatórias para realização dos bioensaios. (PHILLIPSON, 2001).

O segundo modelo utiliza o *Plasmodium berghei*, uma das espécies de parasita, da malária, que infecta roedores murinos na África Ocidental. Esse parasita

é utilizado, por possui aspectos semelhante aos da malária humana e de outros primatas como; a biologia básica do parasita de roedores e humanos é semelhante, como alto teor de bases nitrogenadas adenina e timina (A+T = 82%) no DNA nuclear (MCCUTCHAN *et al.*, 1984); a base molecular de sensibilidade as drogas e resistência apresentam características compatíveis e a organização do genoma é conservada entre os parasitas, (CARTER & DIGGS 1977). Além disso, o *P. berghei* tem dois elementos de DNA extra nuclear, compatíveis com o *P. falciparum* o DNA mitocondrial e DNA plastídio (YAP *et al.*, 1997). Tornando os parasitas de roedores um modelo valioso para a investigação da biologia e do desenvolvimento das interações parasita-hospedeiro do parasita da malária, apesar do desenvolvimento de técnicas de cultivo do *Plasmodium falciparum in vitro*.

Considerando outros animais de experimentação, os primatas não humanos ocupam um lugar de destaque em relação ao homem. Devido elevado grau de parentesco ao ser humano considerando semelhanças, anatômicas e comportamentais e bioquímicas, sendo assim, estas peculiaridades credenciam esses animais para estudos comparativos, em relação às enfermidades que acometem o homem. Por causa dessa estreita relação estudos com macacos podem fornecer informações e compreensão sobre várias doenças dentre elas a malária (WHO, 1988; CENP, 2009).

Os parasitas da malária humana adaptados aos primatas não humanos como *P. falciparum*, já foram testados em vários gêneros de macacos, *Aotus* e *Saimiri*, na tentativa de se buscar novas vacinas, fármacos e drogas. Sendo a espécie *Aotus lemurinus griseimembra*, encontrada na Colômbia, a espécie mais susceptível as formas de esprozoítos e estágio infectante de eritrócitos dos *P. falciparum* e *P. malariae* (CARVALHO *et al.*, 2000; CARVALHO *et al.*, 2003). Entretanto um fator limitante desse modelo experimental é a variabilidade genética, fenotípica e cromossômica, entre espécies e subespécies de *Aotus*, muito embora seja encontrada do Panamá a Argentina, assim como, a espécie *Saimiri* que também se distribuem pela América Central, mas com uma variedade de morfológica e cariotípica entre diferentes animais de diferentes regiões. Além disso, a barreira imune natural dos animais também limita a adaptação dos protozoários da malária,

ou seja, o *Plasmodium* não consegue se desenvolver em todas as espécies de macacos (WHO, 1988; CARVALHO *et al.*, 2003).

Em 1975 a OMS envolve-se em busca de novos programas para o desenvolvimento de vacina para malária. Nesse período cultivar o parasita seria essencial, contudo esbarrava no problema de desenvolvimento intra-eritrocítico *in vitro*. Entretanto Trager descobriu que o *P. coatneyi*, parasita de macacos rhesus, possuía uma biologia similar ao do *P. falciparum* se desenvolvia bem em uma fina camada de células vermelhas e que o *P. coatneyi* no meio RPMI 1640 (desenvolvido por C. Moore para leucócitos humanos) adicionados com tampão HEPES e soro seria o melhor meio. Jensen contribuiu resolvendo o problema do controle da fase gasosa incubando as culturas em jarra com vela e com isso consolidam a metodologia de cultura contínua *in vitro*, a partir disso, essa metodologia passou a ser utilizada para estudar o modo de entrada do parasita no hospedeiro, à triagem de substâncias com potencial antimalárico, através dos alvos moleculares específicos do *Plasmodium*, tendo este modelo, *in vitro*, sido responsável por grandes avanços na pesquisa de antimaláricos (HAYNES *et al.*, 1976; TRAGER & JENSEN, 1976; ANDRADE–NETO, 2000).

Na metodologia *in vitro* desenvolve-se o microteste, de maneira fácil, com uso de poucos equipamentos, permite o controle das condições experimentais e possui custo reduzido (NOEDL *et al.*, 2003). Além disso, são requeridas pequenas quantidades de sangue e das substâncias a serem testadas (ANDRADE–NETO, 2000).

O microteste tradicional é um dos microtestes utilizados nessa triagem de novas drogas antimaláricas, em que cultivos sincronizados, contendo predominantemente trofozoítas são distribuídos em placas de 96 poços contendo o fármaco ou droga em diferentes concentrações (DOLABELA, 2007).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL.

Avaliar a ação antiplasmódica dos óleos de “andiroba” (*Carapa guianensis*) e “pimenta-de-macaco” (*Piper aduncum*), bem como da fração enriquecida de limonóides (fração insaponificável do óleo de andiroba).

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Obter o óleo de pimenta-de-macaco por arraste a vapor.
2. Elaborar extratos orgânicos do óleo de andiroba para obtenção de fração rica em limonóides.
3. Purificar a fração de limonóides, separada do óleo de andiroba.
4. Determinar a composição do óleo de pimenta-de-macaco.
5. Testar frações purificadas, óleo de andiroba e o óleo de pimenta-de-macaco, em testes antiplasmódicos *in vitro*.

4. METODOLOGIA

4.1. MATERIAIS E MÉTODO

4.1.1. Equipamentos

1. Centrifuga – Fanem – modelo 206-R.
2. Banho-Maria – Fanem.
3. Câmara de fluxo laminar – Vego.
4. Estufa incubadora – Fanem – Modelo 347.
5. Microscópio óptico – Axiostar – Zeiss.
6. Agitador de tubos – Vortex – Phenix – Modelo AT 56.
7. Balança de precisão – Quimis – BG 440.
8. HPLC composto por duas bombas LC-10 AD (Shimadzu), com sistema de injeção manual (looping de 20 µL), detector SPD 10 AV UV-Visível (operando no $\lambda = 212\text{nm}$ e 220nm), uma interface CBM, software Class 3.1 e sistema de degaseficador de membrana DGU-14.
9. Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear: VARIAN modelo MERCURY-300 (300MHz).
10. Câmara de Análise de Fluorescência por Luz Ultravioleta: Cabine tipo SPECTROLINE modelo CM-10 com luz tipo SPECTROLINE - Modelo ENF-269C.
11. Evaporadores Rotativos: BÜCHI modelo 461 e QUIMIS - Modelo Q-344-2.

4.1.2. Material e reagentes

1. Placas com 96 poços.
2. Garrafas para cultivo de *Plasmodium* de 50 mL e de 250 mL.

3. Tubos de 15 mL e 50 mL (Falcon).
4. Solventes deuterados: (TEDIA BRASIL).
5. Solventes - Grau HPLC (TEDIA BRASIL).
6. Água ultra-pura.
7. Cromatoplaças de alumínio.

Obs: Todos os solventes foram filtrados em membrana de nylon de 0,45 μm .

4.1.3. Meio de cultivo.

4.1.4. RPMI 1640 (Solução de Estoque)

Meio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute)

Sem NaHCO_3 e com L-glutamina, HEPES, glicose, Hipoxantina, Gentamicina e Água Milliq ou bidestilada q.s.p.

A solução estoque foi preparada medindo-se 100mL de água ultra-pura, adicionando-se 5,94g do tampão HEPES, 2g de Glicose e 0,05g de Gentamicina. Completando-se o volume para 1000mL e colocando-se no agitador para homogeneizar a solução. O pH foi ajustado para 7 e após esse processo a solução foi filtrada em membrana de 0,22 μm , sendo estocada a - 20°C.

4.1.5. Meio de Lavagem

A 100mL do meio RPMI, solução de estoque, acrescentou-se 3,2mL de bicarbonato de sódio a 7,5%, homogeneizando-se a solução e posteriormente acondicionado em geladeira.

4.1.6. Meio Completo.

O meio completo foi preparado adicionando-se soro ou plasma humano (grupo sanguíneo do tipo A+) a solução do meio RPMI solução de estoque (9:1).

Para cada 100 mL de meio foi adicionado 3,2mL solução de bicarbonato de sódio a 7,5% (pH 7,2-7,4).

4.1.7. Solução estoque de Giemsa.

Pulverizou-se 7,5g de Giemsa em pó, com um pistilo e adicionou-se 350mL de glicerol ou glicerina lentamente, transferindo a solução para um vidro âmbar. Posteriormente, foi adicionado lentamente 650mL de álcool metílico. Homogeneizando-se a solução, com o auxílio de algumas pérolas de vidro. Após o processo de homogeneização filtrou-se em papel de filtro acondicionando-a em garrafa âmbar a temperatura ambiente.

4.1.8. Soluções salinas a 1,6% e 12%

Utilizaram-se soluções salinas a 12%, a 1,6% e a 0,9% glicosada. A primeira foi preparada pesando-se 12g de cloreto de sódio, dissolvidos em 100mL de água destilada. Após essa fase a solução foi filtrada em membrana de 0,22 μ m. A segunda solução foi preparada de forma semelhante à primeira, contudo utilizando-se, 1,6g de cloreto de sódio.

4.1.9. Soluções salinas a 0,9% glicosada.

Foi pesado 0,9g de cloreto de sódio, dissolvidos em 100mL q.s.p de água destilada. Após essa fase, adicionou-se 0,2g de glicose a solução, sendo homogeneizada, e em seguida filtrada em membrana de 0,22 μ m.

4.1.10. Água tamponada (pH 6,8).

Pesou-se 4g de fosfato de potássio monobásico, depois adicionou-se 6g de fosfato de sódio dibásico hepta-hidratado. Os dois sais foram misturados com a ajuda de um pistilo e de uma proveta, aferindo-se a solução com água destilada para 1000mL.

4.1.11. Azul de metileno.

Triturou-se 1,0g de azul de metileno, 3,0g de ortofosfato dissodico anidro e 1,0g de ortofosfato monobásico anidro. Dissolveu-se em 1,25mL de água bidestilada, homogeneizou-se a solução que foi filtrada em papel de filtro.

4.1.12. Plasma humano.

O sangue foi cedido pelo Banco de Sangue do Hemocentro do Pará (HEMOPA), Belém-PA. Esse sangue foi proveniente de pacientes doadores do grupo sanguíneo A fator Rh positivo (A+), sendo o mesmo colhido com citrato de sódio e centrifugado a 500rpm\20 min. O plasma sobrenadante foi isolado, aliquotado e conservado sob refrigeração.

4.1.13. Hemácias humanas.

As hemácias foram colhidas de doador de sangue tipo O+. A coleta foi feita seguindo as normas de biosegurança. Após a coleta o sangue foi armazenado em tubo com CPDA (Citrato Fosfato Dextrose Adenosina) a 4°C por 30 dias. Semanalmente, uma alíquota desse sangue foi transferida para um tubo contendo heparina sendo depois centrifugado (600rpm/10min), o plasma e a camada de leucócitos foram desprezadas e após serem lavadas, duas a três vezes, com meio RPMI 1640, as hemácias foram re-suspensas em meio completo na proporção 1:1 e estocadas a 4° C, por uma semana.

4.2. Óleo de Andiroba

O óleo de *Carapa guianensis* (andiroba) foi extraído de modo artesanal: as castanhas coletadas foram cozidas até o amolecimento, em torno de 1 a 2 horas, posteriormente foram colocadas em depósitos e amontoadas umas sobre as outras e cobertas com folhas de açazeiro, e ali permaneceram por um período em torno de 25 a 45 dias. Em seguida, uma massa levemente rosada foi retirada do interior da castanha e amassada utilizando as mãos e os pés, logo em seguida a massa foi posta na tábua de extração (também conhecida como calha), disposta de forma encurvada e inclinada (separando a massa da tabua através de folhas plásticas) sobre duas estacas, para facilitar a fluidez do óleo. Após 4 dias o óleo começa a fluir, permanecendo por mais 3 dias para garantir total desidratação da massa. Quando a

massa se apresentava mais rígida, a mesma foi introduzida num recipiente de malha de madeira, que apertando a massa, obteve-se, uma quantidade a mais de óleo. Esse óleo foi obtido da região do alto Tocantins e fornecido pelo Sr. Roberto Moraes, gerente de bioprospecção da empresa Beraca Brasmazom Indústria de Oleaginosas e Produtos da Amazônia Ltda.

4.2.1. Técnica para separação e purificação

4.2.1.1. Cromatografia

Processo físico, químico ou mecânico de separação que envolve a migração diferencial dos componentes de uma mistura entre uma fase fixa (FF) e uma fase móvel (FM).

A fase fixa é sólida, neste caso foi usado sílica-gel 60-230 Mesh (cromatografia em coluna) e sílica gel GF e PF (cromatografia em placa). Já a fase móvel é líquida, neste caso foram utilizados os solventes: hexano, acetato de etila, metanol, diclorometano, acetona e água.

O processo de separação é ocasionado pelo fenômeno de adsorção/dessorção, ocorrendo devido à atração eletrostática ou dipolo-dipolo

4.2.1.2. Cromatografia em coluna

Realizado em colunas de vidro. O diâmetro e a altura variam em função da quantidade de amostra.

A sílica é colocada na coluna após ser misturada a um solvente de escolha prévia. A amostra escolhida é fracionada com misturas de solventes em polaridades crescentes. Este processo é utilizado para separações que precisam de maior cuidado.

Foi pesado 150 g de óleo e solubilizado em 150mL de solução de Hex/AcOEt 10%.

A solução foi inoculada para fracionamento através de cromatografia em coluna, utilizando um sistema de solventes binário Hex./AcOEt, com gradiente de polaridade crescente: 10%, 30%, 50% e 100% de acetato de etila.

4.2.1.3. Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC)

Cromatoplasmas de alumínio (ALUGRAM SIL G/UV₂₅₄), plana de 20x20cm, já produzidas com uma fina camada de sílica-gel 60GF – Macherey-Nagel de 0,20mm de espessura. Cada placa é cortada em pequenos pedaços de 5x4cm. Usadas para monitorar o processo de separação.

As frações foram analisadas por cromatografia em camada delgada comparativa, a fim de se obter o sistema cromatográfico para melhor separação dos constituintes, com os seguintes sistemas de fases móveis: Hex/dicloro/AcOEt, Hex/Acetona e Hex/dicloro/AcOEt.

4.2.1.4. Reveladores de placa

Para as substâncias orgânicas, as placas foram reveladas utilizando-se a solução aquosa de Sulfato Cérico. Em relação as substâncias com grupos cromóforos utilizou-se a câmara de luz UV.

4.3. Obtenção do OPM

4.3.1. Material Botânico

As partes aéreas (folhas e talos finos) foram coletadas no Município de Santo Antonio do Tauá, em propriedade particular, onde há um experimento agrônômico com matrizes de *P. aduncum*. A espécie é conhecida na região como pimenta-de-macaco. Exemplares da planta estão depositados no Herbário do Museu Paraense Emílio Goeldi, sob o registro 150.678. A planta foi identificada pela Dra Elsie F. Guimarães, do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, especialista da família Piperaceae.

4.3.2. Obtenção do óleo

O material da planta foi seco à temperatura ambiente por 3 dias e, em seguida, em estufa a 40 °C por mais 2 dias. Após ser moído foi submetido à destilação por arraste a vapor durante 3 horas, usando-se aparato de vidro tipo Clevenger. O óleo foi seco, em Dean-Stark, utilizando o sulfato de sódio anidro e tolueno na separação das fases e para medição do teor de umidade e o seu rendimento calculado com base no peso seco da planta.

4.3.3. Análise do óleo essencial

O óleo foi analisado qualitativamente em um GC-MS Thermo DSQ II, com as seguintes condições: coluna capilar de sílica DB-5ms (30 m x 0,25 mm e 0,25 µm de espessura do filme); temperatura programada de 60 a 240 °C (3°C/min); temperatura do injetor a 250 °C; hélio como gás de arraste, ajustado para fornecer uma velocidade linear de 32 cm/s (medidos a 100 °C); tipo de injeção splitless (1 µl de sol 1:1000 em hexano); split flow foi ajustado para fornecer uma relação 20:1; o detector de massas trabalhou no modo impacto eletrônico com 70 eV e a temperatura da fonte de íons e conexões foi de 200 °C. Os dados quantitativos dos constituintes voláteis foram obtidos por normalização da área do pico, usando-se um cromatógrafo Thermo Focus, com detector de ionização de chamas, operando nas mesmas condições do GC-MS, exceto o gás de arraste que foi nitrogênio. Um índice de retenção foi calculado para todos os constituintes voláteis usando-se uma série homóloga de *n*-alcanos.

5. Avaliação da atividade antiplasmódica

5.1. Descongelamento dos clones de *P. falciparum* W₂ e Dd₂

A amostra foi retirada do crio-banco do Laboratório de Malária do Instituto Evandro Chagas (IEC) Ananindeua-PA, e colocada em banho-maria (37°C). Após completo descongelamento, adicionou-se, para cada 1mL da suspensão, 0,4 mL de solução salina a 12%, gota a gota, sob agitação, por fim, a solução final foi deixada em repouso por 5 min. Transcorrido o tempo de repouso, na segunda etapa acrescentou-se 9,0 mL da solução salina 1,6%, gota a gota, sob agitação, e

centrifugou-se a 1000rpm/10 min., A terceira etapa ocorreu separando-se e desprezando-se o sobrenadante. Ao sedimento adicionou-se 9,0 mL de solução salina 0,9% glicosada, em condições semelhantes à anterior completando-se assim a quarta etapa. O novo sedimento obtido foi diluído em 20mL de meio completo a 20% e distribuído em garrafas de cultivo, acrescentando-se 100µl de hemácias lavadas não parasitadas a mistura gasosa (5% de O₂, 90% de N₂ e 5% de CO₂) e por fim incubando-se a 37°C.

5.2. Cultivo do *Plasmodium falciparum*

O cultivo dos clones (Figura 13, pág., 48) foi realizado de acordo com Trager e Jensen (1976) tendo sido usados clones W₂ e Dd₂, o clone W₂ tem como perfil a resistência total a cloroquina e, o Dd₂ resistência parcial a cloroquina e total a pirimidina e mefloquina. Após o descongelamento e, até o crescimento do parasito em fase exponencial, utilizou-se meio completo a 20%. Uma vez em crescimento exponencial, passou-se a utilizar meio completo a 10%. A cultura foi mantida em estufa a 37° C em atmosfera de 3 a 5% de CO₂ conseguida com a queima de vela em dessecador (CARVALHO, 1990; ANDRADE-NETO, 2004). E a parasitemia foi diariamente determinada e, quando maior que 6%, a placa foi diluída ou submetida à sincronização com sorbitol.



Figura 13: Cultivo dos clones W₂ e Dd₂

5.3. Coloração de gota espessa e esfregaço e determinação da parasitemia

Diariamente, durante o cultivo de *P. falciparum*, uma gota de material foi retirada e utilizada para a confecção de lâmina (Figura 14, pág., 49) contendo a gota espessa e o esfregaço. A lâmina foi seca a temperatura ambiente, seguindo-se sua desmoglobulinização com azul de metileno e o esfregaço foi fixado com metanol e corado com Giemsa, por 20 minutos (Figura 14, pág., 49). As lâminas foram lavadas com água tamponada, secas a temperatura ambiente e examinadas ao microscópio óptico, com objetiva de imersão (1000x).



Figura 14: Coloração das lâminas

As parasitemias nos esfregaços corados foram determinadas pela contagem do número de hemácias infectadas. No caso de parasitemia elevada >10% contavam-se 2000 células. Para parasitemia inferior a 10%, fez-se uma estimativa do número de hemácias por campo e calculou-se o número de campos que deveriam ser contados para se obter um total de 5.000 a 10.000 hemácias.

Para sincronização ou microteste, determinou-se a parasitemia diferencial, contando-se um total de 100 parasitas classificando-os como trofozoítas ou esquizontes.

5.4. Sincronização dos parasitos

O meio foi removido das garrafas contendo predominantemente trofozoítas e com parasitemia superior a 5% e adicionada solução aquosa contendo 5% de sorbitol e 0,5% de glicose. Passado 15 min. adicionou-se 7mL de meio completo e centrifugou-se a 1000rpm/10min.. O sobrenadante foi desprezado, adicionou-se meio completo e novamente foi determinada a parasitemia diferencial (CARVALHO, 1990). Após 48h da sincronização, caso observado a predominância de trofozoítas (>90%), realizou-se o ensaio.

5.5. Criopreservação dos clones *P. falciparum*

O congelamento dos clones foi realizado de acordo com a técnica descrita por Meryman & Hornblower (1972). Na câmara de fluxo laminar o sangue da garrafa de cultivo foi transferida para um tubo de 15mL e posteriormente centrifugado a 1000rpm/5min. O sobrenadante foi descartado e foi adicionada, a papa de hemácias, o volume de 15mL do sobrenadante descartado, sendo em seguida novamente centrifugado a 1000rpm/5min.repetindo-se assim a fase anterior. Adicionando-se ao sedimento de hemácias igual volume da solução congelante (glicerol ou Glicerolite) 1 gota/segundo, sob leve agitação. A solução resultante foi distribuída, 1mL da solução, em ampolas de criopreservação, sendo deixadas em over-night no freezer a -70°C para posteriormente serem acondicionadas em nitrogênio líquido.

5.6. Microteste in vitro

5.6.1. Padronização da emulsão.

5.6.1.1. Óleo de Andiroba

Para a realização dos microtestes o primeiro procedimento adotado foi resolver o problema da solubilização do óleo de andiroba, haja vista que o mesmo por ser muito lipofílico é de difícil solubilização em meio aquoso, conseqüentemente

foi necessário utilizar um agente solubilizante ou emulsificante para estabilizar a solução de trabalho (RPMI 1640 a 20%). Com isso, inicialmente as soluções foram preparadas a temperatura ambiente em cinco concentrações que variaram de 10%; 1%; 0,1%; 0,01% e 0,001% v/v (Figura 15, pág., 51). A primeira solução foi feita dispondo de 295µl de óleo de andiroba (OA) e 5µl (concentração de 0,0017%) de dimetilsulfóxido (DMSO), postos em banho-maria a 37°C. Posteriormente foi adicionado 2700µl de meio completo a 20% (Figura 16, pág., 52) também a 37°C tendo assim uma solução a 10% v/v. Partindo-se de 300µl da solução a 10% foi elaborada a concentração de 1%, com a adição de 2700µl de meio completo, que serviu de base para preparação da concentração de 0,1% e, assim por diante, até a concentração de 0,001%.



Figura 15: Soluções de OA

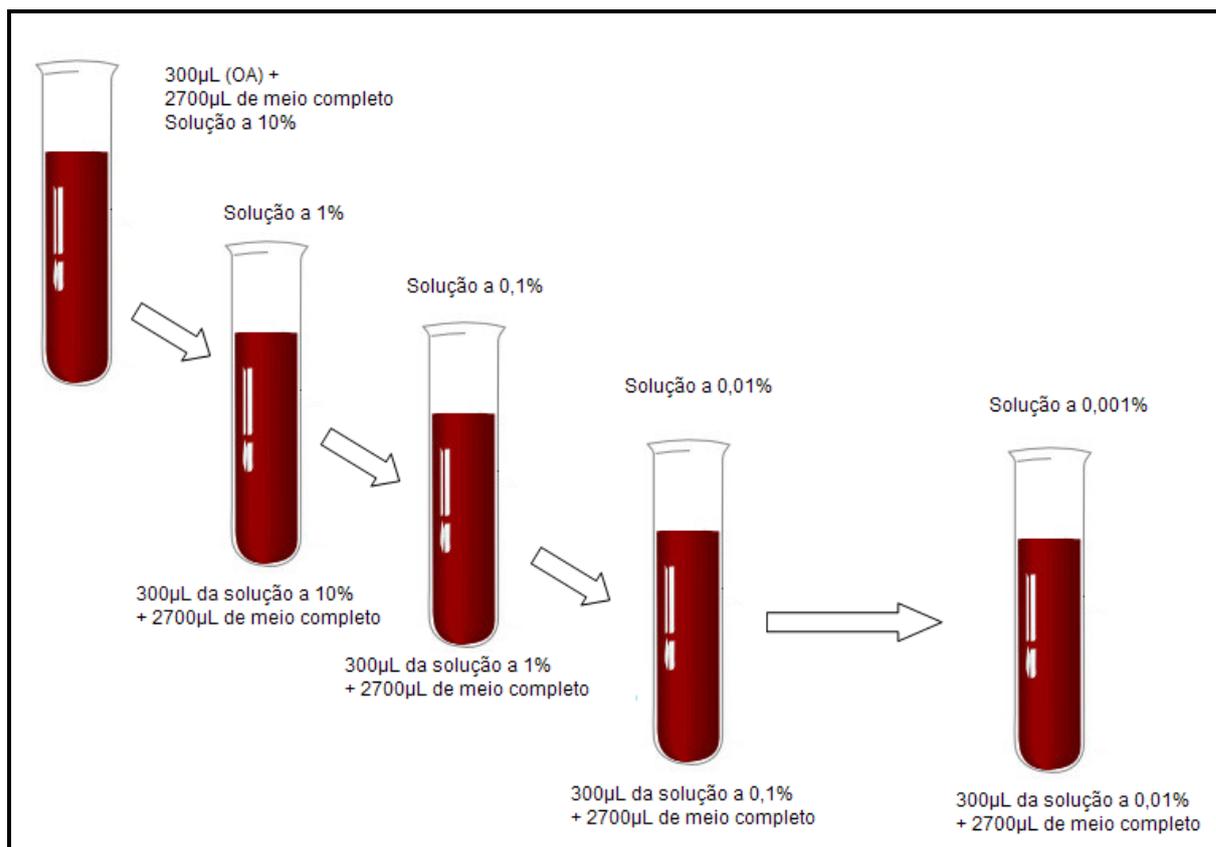


Figura 16: Padronização da solução de OA.

Além do DMSO também se utilizou o Tween20, como agente emulsificante, respeitando as mesmas concentrações e condições do teste anterior. Todavia com os ensaios usando-se Tween 20 foi observada acentuada hemólise tanto nas placas de testes (figura 17, pág., 53) quanto nos tubos de preparação da solução (Figura 17, pág., 53), fato que invalidou o processo, pois parte do ciclo do *Plasmodium* desenvolve-se na hemácia. Após a análise das lâminas ao microscópio foi constatada a ausência de hemácias parasitadas o que impediu a utilização do Tween.



Figura 17: hemólise da solução com Tween 20

As soluções utilizando DMSO foram preparadas nas concentrações inicialmente estabelecidas, contudo, foi constatada uma solução instável na concentração a 10% (Figura 18, pág., 53).



Figura 18: Soluções de óleo de andiroba e DMSO

Após preparo, as soluções, as mesmas foram distribuídas nas placas de microtestes de 96 poços para observação da estabilidade considerando o tempo. O preenchimento dos poços foi feito com 10µl de solução de hemácias não parasitadas mais 290µl de meio completo e o controle com hemácias mais o DMSO. Passado 24h foi observado hemólise nas concentrações de 10% e 1% (Figura 19, pág., 54),

demonstrando que o óleo teve potencial hemolítico, haja vista que o controle permanecia sem hemólise.



Figura 19: hemólise na concentração de 1% e 10% do OA

Sendo assim, a instabilidade imediata na maior concentração (10%) e também a hemólise, após período de 24h, nas concentrações de 1 e 10% fez com que as concentrações do testes fossem diminuídas com a intenção de solucionar o problema da instabilidade e hemólise.

O segundo ensaio foi realizado diminuindo a concentração tanto do óleo quanto de agente tensoativo (DMSO). Partiu-se, assim, de 1% de óleo mais 0,0001% de DMSO, constatando-se, ainda hemólise na concentração de 1% (Figura 20, pág., 54) sem contudo observar hemólise no controle.



Figura 20: hemólise na concentração de 1% segundo ensaio do OA.

O terceiro e último ensaio foi realizado partindo-se de uma concentração de 0,1% até 0,00001% v/v, obtendo-se nessas concentrações, soluções estáveis e sem hemólise imediata.

5.6.1.2. Óleo de Pimenta-de-macaco

Semelhante ao ocorrido com o OA, ensaios com o OPM em concentrações de 10%, 1%, 0,1%, 0,01% 0,001% v/v (Figura 21, pág., 55) foram realizados. O primeiro ensaio foi feito partindo de uma concentração a 10% de óleo mais 5 μ l de DMSO q.s.p 5mL de meio completo. Na concentração a 10% (Figura 22, pág., 56) observou-se uma solução instável e de difícil dispersão.

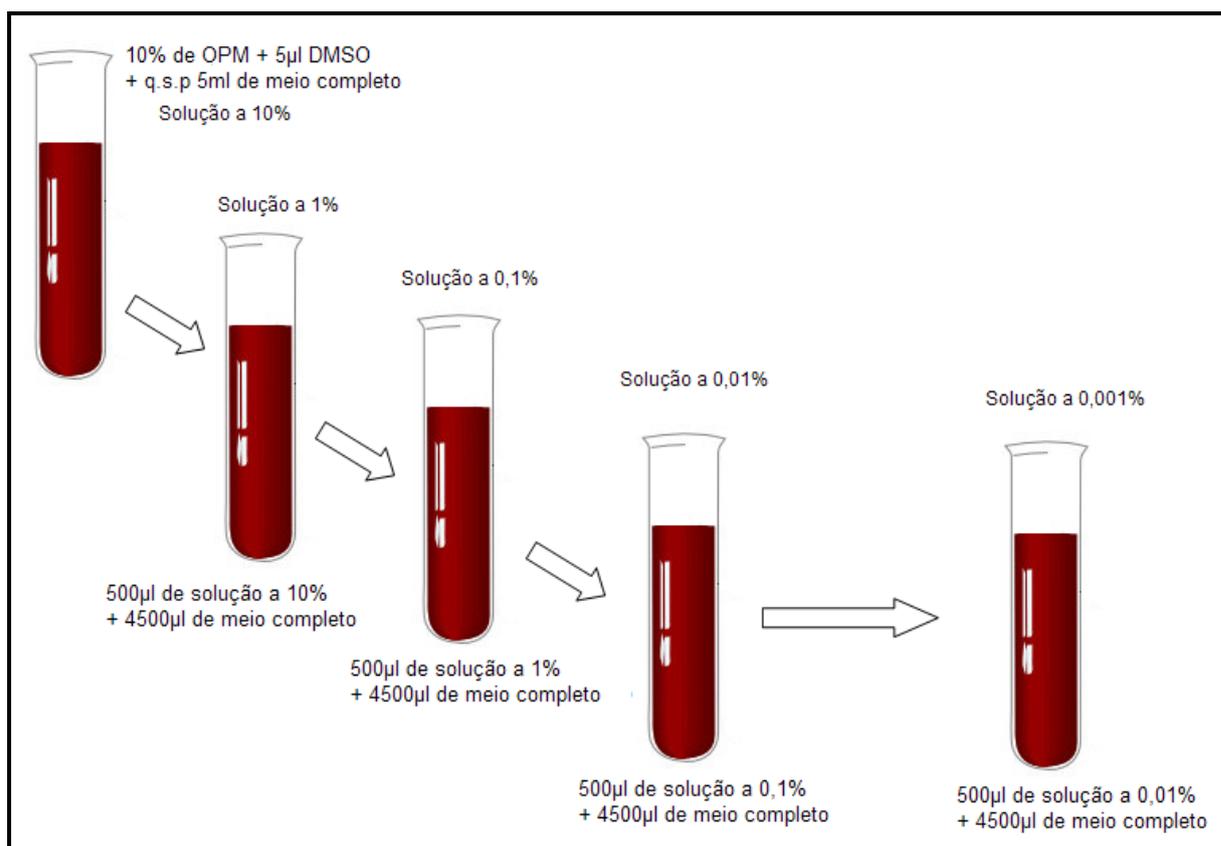


Figura 21: Padronização da solução de OPM



Figura 22: separação de fases na concentração de 10% do OPM

A seguir, as concentrações foram sendo diminuídas até se chegar a concentrações com soluções estáveis e solúveis que foram de 0,1%, 0,01%, 0,001%, 0,0001%, 0,0001%, 0,00001% v/v.

Por fim solucionado o problema de solubilidade, foi estabelecido por padronização às concentrações a serem utilizadas no microteste tradicional nesse trabalho.

5.6.1.3. Cálculo da Densidade relativa

Segundo a Farmacopéia Brasileira IV Ed. (1988), com um picnômetro de 5 mL capacidade, previamente tarado, fez-se o preenchimento do mesmo com o líquido padrão (água recém destilada e fervida) sendo então pesado. Em seguida o picnômetro foi preenchido com 5mL da amostra (óleo) e novamente pesado. A relação entre o peso da amostra e do padrão, em um volume fixo à temperatura de 20 °C forneceu o valor da densidade relativa.

Densidade relativa

M = Picnômetro vazio = 15,0282 g

M = Água = 4,8889 g

Óleo de Andiroba

M = Picnômetro com óleo = 19,0351g

d = M/V

M = 4,0069 g de óleo

V = 4,8889 ml

$$d = \frac{4,0069}{4,8889} = 0,820 \text{ g/mL}$$

Óleo de Pimenta-de-macaco

M = Picnômetro com óleo = 20,0911g

d = M/V

M = 5.0629g de óleo

V = 4,8889 ml

$$d = \frac{5.0629}{4,8889} = 1,03 \text{ g/mL}$$

Com o valor da densidade tanto do óleo de andiroba (0,82g/ml) como de pimenta-de-macaco (1.03g/ml) foi possível fazer o ajuste das concentrações.

5.6.1.4. Ensaio para avaliação da atividade antiplasmódica.

Os parasitas foram postos em cultura de hemácias humanas suspensas em meio RPMI 1640 a 10% segundo Trager e Jensen (1976). A atividade antiplasmódica dos óleos e fração de limonóides foi observada em placas de 96 poços (Figura 23, pág., 58) como descrita por Rieckman e colaboradores (1980), modificado por Carvalho (1990).

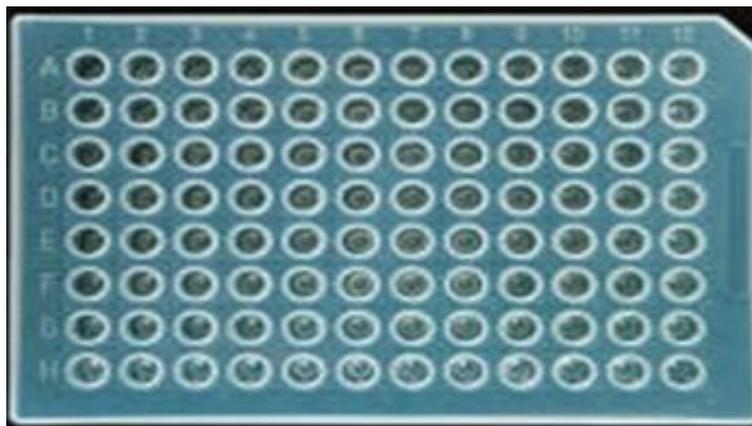


Figura 23: Placa de 96 poços

O teste constituiu-se de diluições sucessivas dos óleos de andiroba e pimenta-de-macaco e/ou fração limonoídica em metanol e DMSO, acrescidas de meio de cultivo, postas nos poços das placas de microtestes em concentrações determinadas após padronização explicitada anteriormente. Uma suspensão de hemácias parasitadas (0,5%-1% de parasitemia e hematócrito de 2,5%) contendo predominante trofozoitas também foi acrescentada aos poços completando um volume de 100µl. As placas foram então incubadas a 37°C em atmosfera de 3 a 5% de CO₂, por meio da queima de velas, em dessecador, durante 24h, 48h e 72h. Passado 24h, o meio foi trocado e as placas foram postas para escorrer sendo desprezado o sobrenadante e realizada a confecção dos esfregaços sangüíneos com o resíduo de hemácias para coloração e, posteriormente, a análise da parasitemia percentual, sendo essa operação realizada após 48h.

A cloroquina foi utilizada como droga de controle positivo para o clone Dd₂ e a quinina como a droga de controle para o clone W₂.

Os testes foram divididos em placas numeradas de 1 a 4, sendo a placa 1 da cloroquina, placa 2 do OA (Tabela 1, pág., 59), placa 3 do óleo de OPM (Tabela 2, pág., 59) e placa 4 da fração limonoídica. Para o clone Dd₂, as concentrações padronizadas foram de 0,1%, 0,01%, 0,001%, 0,0001% e 0,00001% v/v em µg/ml. Após o cálculo da densidade relativa de cada óleo essas concentrações foram convertidas para os valores abaixo.

Tabela 1: Concentrações dos óleos de Andiroba e Pimenta-de-macaco para o clone Dd₂

Concentrações do OA/OPM (v/v)	Concentrações do OA (µg/ml)	Concentrações do OPM (µg/ml)
0,1	820	1030
0,01	82,0	103,0
0,001	8,20	10,3
0,0001	0,820	1,03
0,00001	0,0820	0,103

Para os testes com o clone W₂ as concentrações variaram de 0,01% a 0,0000001% v/v tanto para o OA quanto para o OPM (Tabela 2). Sendo convertidas para os valores abaixo:

Tabela 2: Concentrações dos óleos de Andiroba e Pimenta-de-macaco para o clone W₂

Concentrações do OA/OPM (v/v)	Concentrações do OA (µg/ml)	Concentrações do OPM (µg/ml)
0,01	82,0	103,0
0,001	8,2	10,3
0,0001	0,820	1,03
0,00001	0,0820	0,103
0,000001	0,00820	0,0103
0,0000001	0,000820	0,00103

Após realização dos testes e leitura das lâminas foi contabilizada a parasitemia percentual, através da leitura de 10 campos uniformes, de cada tempo de exposição e calculada a CI₅₀ referente a esses períodos.

6. RESULTADOS

6.1. Fracionamento do Óleo de andiroba.

Dos 150 g de óleo solubilizado em 150mL de solução de Hex/AcOEt 10%. Obtiveram-se após a secagem, quatro frações; C₁, C₂, C₃, C₄. Da fração C₁ foi obtido 45g (AcOEt 10%), 32g de C₂ (AcOEt 30%), 18g de C₃ (AcOEt 50%) e 22g da fração C₄ (AcOEt 100%).

As frações após análise por cromatografia em camada delgada comparativa, com as seguintes fases móveis: Hex/dicloro/AcOEt (55:45:5), Hex/Acetona (60:40) e Hex/dicloro/AcOEt (50:40:10) e, também, por RMN de hidrogênio. Após análise dos espectros de RMN de hidrogênio, a fração C₄ foi escolhida, uma vez que esta apresentou sinais característicos de limonóides.

6.2. Avaliação da atividade antiplasmódica

Inicialmente foi necessário realizar a padronização do ensaio, sendo utilizando óleos de andiroba e óleo de pimenta-de-macaco nas concentrações de 10%, 1%, 0,1%, 0,01%, 0,001% v/v, como emulsificante utilizou-se o tween 20 ou dimetilsufoxido (0,05% v/v), meio completo e hemácias não parasitadas. Os critérios observados foram: estabilidade das emulsões durante 72h a 37° C e a integridade das hemácias.

Em relação à estabilidade das emulsões, observou-se que nas concentrações a 10% da emulsão contendo o óleo de andiroba não foi observada estabilidade, pois houve a formação de duas fases, assim como hemólise nas concentrações 1% e 10%. Então a partir de 0,1% não foi observado nem hemólise e a emulsão foi estável (Tabela 3, pág., 61).

Já em relação ao óleo de pimenta-de-macaco também se observou que nas concentrações de 1% e 10% houve hemólise e a emulsão não teve estabilidade (Tabela 3, pág., 61). Desta forma foram estabelecidas as concentrações do óleo

utilizado nos ensaios para a atividade antiplasmódica, que foram as seguintes para o óleo de andiroba: 820, 82, 8,20, 0,82 e 0,082 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Concentrações semelhantes foram utilizadas para o ensaio de pimenta-de-macaco; 1030, 103,0, 10,30, 1,030 e 0,103 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Considerando-se para o cálculo das concentrações as respectivas densidades, do óleo de andiroba e pimenta-de-macaco, para a conversão de v/v para $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Tabela 3: Estabilidade das emulsões e presença de hemólise.

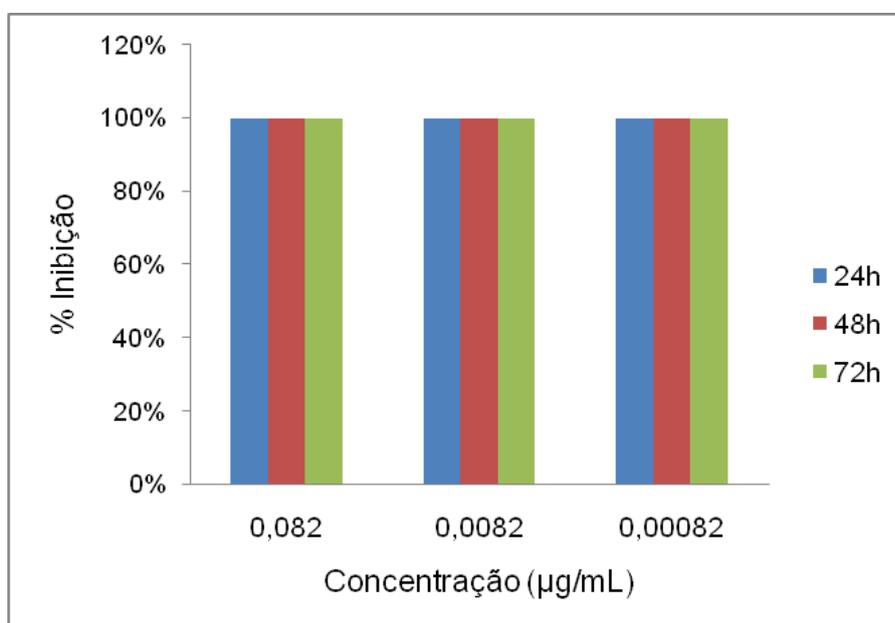
Óleo	Sem hemólise	Estabilidade da emulsão
Andiroba	$\leq 0,1\text{v/v}$	Estável
Pimenta-de-macaco	$\leq 0,1\text{v/v}$	Estável

A atividade antiplasmódica do óleo de andiroba foi avaliada nos clones W_2 e Dd_2 , em diferentes tempos de exposição (24h, 48h e 72h). Para o clone Dd_2 após 24h de exposição apenas a concentração de 820 $\mu\text{g}/\text{mL}$ observou-se uma discreta inibição (31%). Em 48h, 100% de inibição foram observados em 820 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 82 $\mu\text{g}/\text{mL}$, sendo de 71% na concentração de 8,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e nas demais concentrações não foi observado inibição; em 72h houve apenas um aumento no percentual de inibição da concentração 8,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 88% (Tabela 4, pág., 62). Em síntese, parece que quanto maior o tempo de exposição, maior a inibição.

Em relação ao clone W_2 , o óleo de andiroba apresentou uma inibição de 100% nas concentrações de 0,082 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0,0082 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 0,00082 $\mu\text{g}/\text{mL}$ após 24h de exposição. Em 48h e 72h houve uma manutenção no percentual de inibição em todas as concentrações (Figura 24, pág., 62).

Tabela 4: Percentual de inibição do OA pelo tempo para o clone Dd₂.

Concentrações (µg/mL)	24h	48h	72h
	Inibição (%) ± DP		
820	31±2,61	100	100
82	0	100	100
8,2	0	71±1,43	88±2,19
0,82	0	0	0
0,082	0	0	0

Figura 24: Percentual de inibição do OA pelo tempo para o clone W₂

Com a fração rica em limonóides para o clone Dd₂ após 24h foi observado que taxa de inibição variou de 100% na concentração de 100µg/mL até 56% na menor concentração 3,125µg/mL (Tabela 5, pág., 63). Em 48h a taxa de inibição também sofreu variação de 100% na maior concentração a 64% na menor concentração (Tabela 5, pág., 63). Transcorrido 72h a inibição de 100% foi observada tanto na concentração de 100µg/mL, como também em 50µg/mL e 25µg/mL e tendo uma percentual de 82% na menor concentração 3,125µg/mL (Tabela 5, pág., 63). Sendo assim, foi observado um aumento na inibição em todas as concentrações, após a transcorrer do tempo. Para o clone W₂ após 24h de

exposição foi observada uma inibição de 100% na maior concentração 100 μ g/mL, assim como, nas demais concentrações 50 μ g/mL, 25 μ g/mL, 12,5 μ g/mL, 6,25 μ g/mL inclusive na menor concentração de 3,125 μ g/mL. Esse fato também foi observado nos períodos de 48h e 72h, quando a taxa de inibição foi mantida em 100% para todas as concentrações (Figura 25, pág., 63).

Tabela 5: Taxa de inibição da fração rica em limonóides frente ao clone Dd₂ – DP – Desvio padrão.

Concentrações (μ g/mL)	24h	48h	72h
	Inibição (%) \pm DP		
100	100	100	100
50	98 \pm 1,15	100	100
25	92 \pm 1,53	96 \pm 1,1	100
12,5	76 \pm 1,52	86 \pm 2,51	100
6,25	72 \pm 2,3	82 \pm 1,41	88 \pm 2,12
3,125	56 \pm 2,1	64 \pm 2,08	82 \pm 2,62

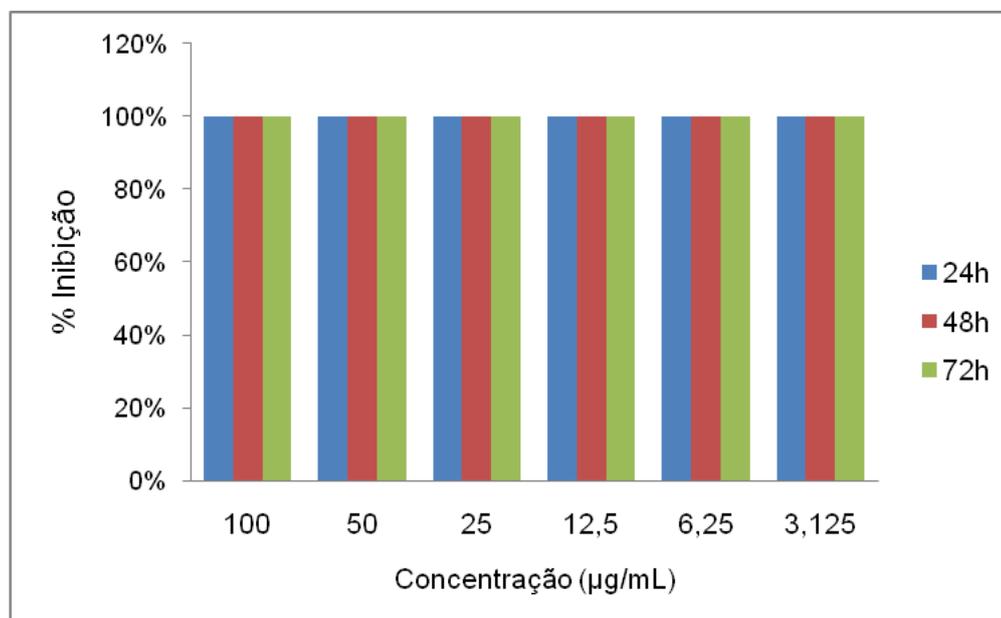


Figura 25: Percentual de inibição da Fração rica em limonóides pelo tempo para o clone W₂

A tabela 6 sumariza a inibição do óleo de andiroba, fração rica em limonóides e cloroquina. Em relação à andiroba, para o clone Dd₂, observa-se inibição 31% na

concentração de 820 μ g/mL, sendo que em 48h e 72h já se observa inibição em 8,2 μ g/mL (71% e 88%, respectivamente).

Tanto a cloroquina (0,031 μ g/mL) quanto a fração rica em limonóides (3,1 μ g/mL), também no clone Dd₂, observa-se aumento da inibição de forma tempo dependente (Tabela 6, pág., 64).

Tabela 6: Taxa inibição do OA e FR contra o clone Dd₂ - DP – Desvio padrão

	Dd ₂ (μ g/mL e % inibição \pm DP)		
	24h	48h	72h
Óleo de Andiroba	820 μ g/mL 31 \pm 2,61	8,2 μ g/mL 71 \pm 1,43	8,2 μ g/mL 88 \pm 2,19
Fração rica em Limonóides (3.1 μ g/mL)	56 \pm 2,1	64 \pm 2,08	82 \pm 2,62
Cloroquina (0,031 μ g/mL)	0	35 \pm 1,05	60 \pm 0,9

Em relação ao óleo de andiroba, quando testado no clone W₂ foi observado uma inibição de 100% em todas as concentrações. Para a fração de limonóide (3,1 μ g/mL) observou-se, também, em todos os tempos inibição de 100%. Em relação a quinina houve um discreto aumento da atividade com aumento do tempo de exposição (Tabela 7, pág., 64)

Tabela 7: Taxa inibição do OA e FR contra o clone W₂ - DP – Desvio padrão

	W ₂ (ng/mL e % inibição \pm DP)		
	24h	48h	72h
Óleo de Andiroba		0,82ng/mL= 100	
Fração rica em Limonóides (3.1 μ g/mL)	100	100	100
Quinina (0,015 μ g/mL)	71 \pm 0,64	73 \pm 1,52	75 \pm 1,76

Semelhante ao óleo de andiroba avaliou-se a atividade antiplasmódica do óleo de pimenta-de-macaco (OPM). Após 24h de exposição, no clone Dd₂ não houve nenhuma inibição em qualquer concentração (1030µg/mL, 103µg/mL, 10,3µg/mL, 1,03µg/mL e 0,103µg/mL) (Tabela 8, pág., 65). Após 48h de exposição foi observado uma inibição de 83% na concentração de 103µg/mL e de 56% na concentração de 10,3µg/mL (Tabela 8). Em 72h constatou-se um aumento no percentual de inibição nas mesmas concentrações 94% e 77% em 103µg/mL e 10,3µg/mL, respectivamente (Tabela 8, pág., 65).

Tabela 8: Taxa de inibição do OPM contra o clone Dd₂ - DP - Desvio padrão

	Dd ₂ (µg/mL e % inibição ± DP)		
	24h	48h	72h
Óleo de Pimenta-de-macaco	0	10,3µg/mL 56±1,35	10,3µg/mL 77±1,14
Cloroquina (0,031µg/mL)	0	35±1,05	60±0,9

A atividade antiplasmódica do óleo de pimenta-de-macaco (OPM) também foi avaliada no clone W₂, sendo observada uma inibição de 100% em todas as concentrações (Tabela 9, pág., 65). Em relação a quinina houve um discreto aumento da atividade com aumento do tempo de exposição (Tabela 9, pág., 65)

Tabela 9: Taxa de inibição do OPM contra o clone W₂ - *DP - Desvio padrão

	W ₂ (ng/mL e % inibição ± *DP)		
	24h	48h	72h
Óleo de Pimenta-de-macaco (1,3ng/ml)		100	
Quinina (0,015µg/mL)	71±0,64	73±1,52	75±1,76

Das inibições percentuais foi calculada a CI_{50} dos óleos e da fração rica em limonóides para o clone Dd₂, através da interpolação semi-logarítmica dos dados utilizando o programa Microsoft Office Excel 2007, que estão expressos na tabela 10.

Com relação tanto aos óleos de andiroba como pimenta-de-macaco a CI_{50} foram maiores que a CI_{50} da cloroquina após a exposição em 24h, 48h e 72h. Com a fração rica em limonóides também foi constatado uma CI_{50} maior que a cloroquina em todos os períodos analisados. Contudo, tanto para os óleos como para a fração a CI_{50} variou com o tempo, ou seja, após 72h os valores observados foram bem menores que os constatados em 24h e 48h como mostram a tabela 10.

Tabela 10: CI_{50} do OA, FR, OPM e Cloroquina - *ND - não determinado – DP – Desvio padrão

	CI_{50} (Dd ₂ µg/mL ± DP)		
	24h	48h	72h
Óleo de andiroba	>820	9,4±0,05	8,4±0,15
Fração rica em limonóides	2,8±0,05	2,4±0,1	0,4±0,05
Óleo de pimenta-de-macaco	ND*	74±1,52	17±1,73
Cloroquina	> 1	0,1±0,005	0,01±0,003

6.3. Composição do OPM

Os componentes voláteis do OPM foram identificados por comparação dos seus espectros de massas e índices de retenção com aqueles de padrões autênticos, previamente analisados e armazenados no sistema de dados do instrumento. Outras identificações foram feitas por comparação de seus espectros de massas com aqueles existentes em sistemas de dados de bibliotecas de referências e citados na literatura (ADAMS, 2007; NIST, 2005). O rendimento do óleo foi de 3,0% e seu constituinte principal foi o dilapiol (76,5%) (Tabela 11, pág., 67), seguido de piperitona (6,1%), terpinen-4-ol (2,3%), miristicina (2,1%), (*E*)-cariofileno (1,5%), γ -terpineno (1,3%), germacreno D (1,2%) e apiol (1,2%) entre

outros. Na Tabela 11 estão listados todos os constituintes identificados no óleo essencial de *P. aduncum*.

Tabela 11: Constituintes identificados no óleo de *P. aduncum*.

Constituintes	Índice de Retenção	Óleo (%)
α -pineno	927	0,7
β -pineno	937	0,5
Limoneno	1030	0,8
(<i>Z</i>)- β -ocimeno	1041	0,2
(<i>E</i>)- β -ocimeno	1048	0,4
γ -terpineno	1060	1,3
terpinen-4-ol	1179	2,3
Piperitona	1258	6,1
(<i>E</i>)-cariofileno	1422	1,5
germacreno D	1482	1,2
Miristicina	1523	2,1
Dilapiol	1628	76,5
Apiol	1687	1,2

7. DISCUSSÃO

7.1. *Carapa guianensis*

A avaliação da atividade antiplasmódica do óleo de andiroba demonstrou que esta atividade é tempo dependente, isto é, quanto maior o tempo de exposição ao óleo maior a atividade (Tabela 4, pág., 62 e Tabela 6, pág., 64). Inicialmente, estes resultados sugerem tratar-se de um esquizonticida sanguíneo lento. Outras substâncias, como por exemplo, a pirimetamina, também possui a atividade esquizonticida sangüínea lenta e em geral é utilizada associada a um fármaco esquizonticida sangüíneo rápido.

Quando se compara a atividade antiplasmódica do óleo de andiroba no clone resistente a cloroquina (W_2) ao clone multiresistente (Dd_2) (Tabela 4, pág., 62 e Figura 24, pág., 62) observa-se uma maior atividade para o clone W_2 , sugerindo que, talvez, o óleo de andiroba tenha potencial para cepas de *P. falciparum* resistentes a cloroquina, porém não possui potencial para clone de *P. falciparum* multiresistente. Sabe-se que, atualmente, a tendência é que se tenha isolados com perfil de resistência múltipla (COUTO *et al.*, 1993), e isto poderia limitar o uso deste óleo como antimalárico.

Outra espécie de Meliaceae, *Lansium domesticum* Corr. Serr., mostrou-se ativa no clone D_6 , clone sensível a cloroquina, e W_2 resistente a cloroquina do *P. falciparum*, isto é, o extrato etanólico, *in vitro*, apresentou a CI_{50} que variou de $> 20\mu\text{g/mL}$, $12,8\mu\text{g/mL}$ e $9,3\mu\text{g/mL}$ para o clone D_6 dependendo da amostra (LEAMAN *et al.*, 1995). Também o extrato metanólico e aquoso obtido das folhas e os extratos etanólico e aquoso da casca do fruto da *L. domesticum* mostraram-se ativo para o clone $3D_7$ (sensível a cloroquina) (YAPP e YAP, 2003). O quadro 1, pág., 69, compara os resultados obtidos nesse trabalho com o trabalho de Leaman e colaboradores, onde podemos observar que o óleo de andiroba foi eficaz contra o clone Dd_2 com uma CI_{50} de 8,4 após 72h de exposição quando comparado com o extrato de *Lansium domesticum* que apresentou uma CI_{50} maior quando testado contra o clone D_6 . Em relação ao percentual de inibição dos extratos etanólico, aquoso e metanólico da *Lansium domesticum* frente ao clone $3d_7$ (Quadro 1, pág., 69) o extrato mais eficiente foi o aquoso da casca do fruto com um percentual de

inibição de 75%, entretanto o óleo de andiroba frente ao clone W₂ apresentou um percentual de inibição de 100% (Quadro 1, pág., 69). Sendo assim é pertinente a continuidade do estudo do óleo de andiroba com ação antiplasmódica.

Quadro1: Comparação da atividade antiplasmódica de espécies de Meliaceae.

Amostras	Clone de <i>P. falciparum</i>	CI ₅₀ (µg/mL)	Referência bibliográfica
Óleo de andiroba	Dd ₂	24h- > 820 48h- 9,4 72h-8,4	Neste trabalho
<i>Lansium domesticum</i> -Extrato etanólico	D ₆	Variou de: > 20 12, 8 9,3 para amostras diferentes.	LEAMAN <i>et al.</i> , 1995.
Óleo de andiroba	W ₂	Inibição de 100% em todos os períodos.	Neste trabalho
<i>L domesticum</i> : -Extrato metanólico (Folha) -Extrato aquoso (Folha) -Extrato etanólico (Casca do fruto) -Extrato aquoso (Casca do fruto)	3d ₇	Inibição de 65%. Inibição de 55%. Inibição de 60% Inibição de 75%	YAPP e YAP, 2003.

Os resultados obtidos no presente estudo estão confirmando o uso popular, pois diferentes espécies de Meliaceae são utilizadas na América Latina, Índia e Sudão para o tratamento da malária (DEHARO *et al.*, 2001; SIMONSEN *et al.*, 2001; SCHWIKKARD *et al.*, 2002; CARABALLO *et al.*, 2004; LAGOS *et al.*, 2006; MANEERAT *et al.*, 2008). Vale ressaltar a importância de avaliar a toxicidade destas espécies.

O óleo da semente (OS) de *C. guianensis* foi submetido à avaliação de toxicidade aguda e subcrônica em ratos Wistar, sendo avaliados os parâmetros bioquímicos, hematológicos e reprodutivos. Os resultados mostraram que na toxicidade aguda o OS não produziu morte dos animais em doses de até 5,0 g/kg. A administração por 30 dias do OS não alterou os parâmetros bioquímicos e

hematológicos, exceto, para a alanina aminotransferase (ALT) que na maior dose induziu aumento de $29,3 \pm 5,3\%$ em relação ao grupo controle, e houve aumento da massa hepática. Na toxicidade reprodutiva em fêmeas, a administração do OS não modificou os índices reprodutivos no período de organogênese (7º ao 14º dia da prenhez) e no período integral da gestação (1º ao 21º dia). Contudo, nesse último período, observou-se aumento da atividade motora da prole proveniente de mães tratadas com o óleo. No desempenho reprodutivo, o tratamento por 45 dias com OS não induziu alterações nos índices reprodutivos, na massa relativa dos órgãos reprodutivos (epidídimo, vesícula seminal e ducto deferente), no número de espermatozoides dos testículos e na histologia do testículo e do epidídimo. Em síntese, o óleo de *Carapa guianensis*, quando administrado por via oral, apresentou baixa toxicidade em roedores (SILVA, 2006). Esta baixa toxicidade, mais uma vez, sugeri que vale a pena continuar a investigação da atividade antimalárico deste óleo.

7.2. Fração rica em limonóides

Após o fracionamento do óleo de andiroba obteve-se uma fração rica em limonóides. Alguns estudos têm demonstrado a atividade inseticida de limonoides (NAKATANI *et al.*, 1985; KUBO e KLOCKE, 1982; SIMMONDS *et al.*, 2001; RODRÍGUEZ *et al.*, 2003). Seis dos limonóides, isolados de *Carapa guianensis* e *Cedrela fissilis*, foram submetidos a ensaios com formigas *Atta sexdens rubropilosa* e apresentaram atividade inseticida moderada (AMBROZIN *et al.*, 2006).

A atividade biológica dos limonóides e de extratos vegetais contendo limonóides tem sido investigada. A atividade de prevenção do câncer em linhagens de células animais e humanas dos limonóides tem sido relacionada à atividade antioxidante e indução de apoptose (POULOSE, HARRIS e PATIL, 2005).

Alguns limonoides, isolados de *Cipadessa fruticosa* (Meliaceae), foram moderadamente ativos sobre *T. cruzi* (LEITE *et al.*, 2010), vale ressaltar que este parasito é um protozoário. O extrato bruto da casca preparado com cloreto de metileno-matanol, e das sementes de *K. grandifoliola* foi testado *in vitro* contra o *P. falciparum* (W₂), apresentando uma CI₅₀ com valor de 13,23 µg/mL, porém quando fracionado foram obtidos 7 limonóides com maior potencial antiplasmódico:

metilangolesato (1), 6-metil-hidro-angolensato (2), gedunina (3), 7-deacetilquivorina (4), 1-deacetilquivorina (5), sietenolida (6) e 6-acetilsietenolida (7). Os limonóides 1, 3, 4, 5 e 7 apresentaram a CI_{50} entre 1-10 μ g/mL, sendo o limonóides 3, gedunina, o de melhor resultado CI_{50} 1,14 μ g/mL, ratificando a continuação do trabalho com a fração rica em limonóides que apresentou CI_{50} de 0,4 μ g/mL contra o clone Dd₂ e uma taxa de inibição de 100% contra o clone W₂ (BICKII, *et al.*, 2000).

. Quando se analisa os resultados obtidos no presente estudo, a fração rica em limonóide obtida do óleo de andiroba, a partir de 24h de exposição, inibiu em 100% a parasitemia, na concentração 3,1 μ g/mL, para o clone W₂ (Tabelas 6, pág., 64 e Tabela 7, pág., 64) e de modo tempo dependente para o clone Dd₂. Resultado semelhante já foi observado para a gedunina que foi avaliada em Parasita FCMSU/ Sudão e FCR_{3TC} após 48h de exposição obteve-se uma CI_{50} de 1 μ M, porém quando se aumento o tempo de exposição houve uma redução da CI_{50} (0,3 μ M) (KHALID *et al.*, 1986).

As características genéticas destes clones podem explicar tal resultado. O clone Dd₂ cuja resistência a cloroquina é conhecida, traz na suas membranas o gene *Pfmdr1* (WILSON *et al.*, 1993) entre outros, o gene denominado *Pfmdr1* (*P. falciparum multi-drug resistance 1*), após sofrer mutações pontuais codificando alterações nos aminoácidos 1034, 1042 e 1246, podendo modular a sensibilidade à cloroquina (CRAVO & ROSARIO, 2002). O que difere do clone W₂ que após o cruzamento genético entre o clone resistente (W₂) e um parasita sensível, *P. falciparum*, cloroquina (HB₃), caracterizou o gene *cg2* (kb da região 36 do cromossoma 7) como responsável para a resistência do cloroquina. O genótipo *cg2* é caracterizado por doze mutações de ponto e por três polimorfismos do comprimento (*kappa*, *gama*, e *ômega*), que são associados com os clones que têm fenótipos de resistência a cloroquina (VIANA *et al.*, 2006).

Uma estratégia muito adotada para aumentar a atividade biológica é fracionamento, que pode levar ao isolamento do “principal” limonóide envolvido na atividade. Vale ressaltar que, algumas vezes, o fracionamento pode levar a redução da atividade, visto que esta é devido ao sinergismo entre seus componentes. De qualquer forma, vale à pena fazer o isolamento e avaliação do potencial antiplasmódico dos limonóides puros.

Algumas vezes o fracionamento, além de aumentar a atividade, pode levar ao isolamento de substâncias com maior toxicidade. Logo, além de determinar a Concentração Inibitória 50% (CI_{50}), deve-se determinar a concentração citotóxica 50% (CC_{50}), estes indicadores permitiram o cálculo do Índice de seletividade (CC_{50}/CI_{50}). A substância e/ou fração com maior índice de seletividade deve ser priorizada para os estudos subseqüentes.

Outro fator que deve ser analisado é esta resposta tempo dependente da fração rica em limonóides, que pode estar relacionada à tolerância do parasito a amostra ou sinalizar uma resistência. Porém, por se tratar de tratar e uma estudo preliminar, não se pode avaliar se está ou não ocorrendo tolerância e/ou resistência deste clone a esta amostra.

7.3. *Piper aduncum*

Semelhante ao óleo de andiroba, a atividade antiplasmódica do óleo de *Piper* foi tempo dependente para o clone Dd₂ (Tabela 8, pág. 65), porém não foi observada esta relação para o clone W₂ (Tabela 9, pág., 65) Outro estudo, avaliou a atividade antiplasmódica dos extratos etanólico do fruto e das partes aéreas do *Piper cumanense* e *Piper holtonii*, respectivamente, onde foi obtida uma $CI_{50} < 1\mu\text{g/mL}$ para os dois extratos frente ao clone FcB₂ (GARAVITO *et al.*, 2006). Nesse trabalho o óleo de *Piper aduncum* foi testado contra os clones Dd₂ e W₂ sendo que no primeiro foi observada uma CI_{50} 17 $\mu\text{g/mL}$ (Quadro 2, pág., 73) após 72h de exposição, entretanto contra o clone W₂ uma inibição de 100% em todos os períodos analisados 24h, 48h e 72h (Quadro 2, pág.,73), sendo assim podemos inferir que o óleo de *Piper aduncum* foi muito eficaz contra o clone W₂ e também apresentou certa ação contra o clone multiresistente Dd₂ o que nos habilita a continuar o estudo com essa planta para fins antiplasmódico.

Quadro 2: Atividade antiplasmódica do óleo de *Piper aduncum* *ND – Não determinado.

Clones	CI ₅₀ (µg/mL)	Referência bibliográfica
Dd ₂	24h - *ND 48h - 74 72h - 17	Neste trabalho
FcB ₂	< 1	GARAVITO <i>et al</i> , 2006
W ₂	Inibição de 100% em todos os períodos analisados.	Neste trabalho

As possíveis diferenças entre as CI₅₀ do óleo de *Piper aduncum* podem estar relacionadas às diferenças metodológicas entre o método tradicional e beta cintilação. Além disso, os diferentes perfis de sensibilidade dos clones utilizados em cada trabalho, em geral, em clones multiresistentes são obtidas CI₅₀ mais elevadas do que clones sensíveis a cloroquina. Este fato foi observado nesta comparação entre os clones W₂ e Dd₂ utilizados nesse trabalho (Tabela 4, pág., 62 e Figura 24, pág., 62).

O extrato clorometileno de *Piper capense* foi submetido à avaliação da atividade antiplasmódica em clone W₂, sendo obtida a seguinte CI₅₀ 7µg/mL (KAOU *et al.*, 2008). Contudo nesse trabalho o óleo de *Piper aduncum* quando colocado frente ao mesmo clone (W₂) apresentou uma inibição de 100% em todas as concentrações, considerando-se todos os períodos de exposição, podendo assim inferir que o óleo foi mais ativo que o extrato de *Piper capense*, o que nos credencia a continuar o estudo dessa planta, *Piper aduncum*, como possível agente antiplasmódico.

No presente estudo foi avaliada a composição do óleo de *Piper aduncum*, sendo observado que o dilapiol (76,5%) é o constituinte predominante. Ainda foram detectadas as presenças de miristicina (2,1%), e compostos como monoterpenos

(*E*)- β -ocimeno, sesquiterpeno hidrocarboneto germacreno D, sesquiterpeno oxigenado (*E*)-cariofileno (Tabela 11, pág., 67). Quando se compara a literatura constata-se que a composição do óleo é compatível, o dilapiol é constituinte majoritário (FAZOLIN *et al.*, 2005) como também, em estudos feitos com várias amostras de *Piper aduncum* coletadas em Estados da Amazônia (MAIA *et al.*, 1998), com o *Piper aduncum* var. *aduncum* e *Piper aduncum* var. *cordulatum*, também da Amazônia (GOTTLIEB *et al.*, 1981) e com o *Piper aduncum* da Malásia e Fiji (SMITH & KASSIM, 1979). Além do dilapiol, que também foi o componente majoritário nesse trabalho, também os outros constituintes são compatíveis com a literatura (MAIA *et al.*, 1998; ALMEIDA *et al.*, 2009). Em síntese, existe uma correlação entre a composição química deste óleo descrita na literatura com os resultados obtidos no presente estudo dispostos no quadro 3.

Quadro 3: Comparação da composição química do óleo de *Piper aduncum* obtido neste projeto ao descrito na literatura.

Estudo	Composição
Presente trabalho	Dilapiol (76,5%), piperitona, terpinen-4-ol, miristicina, (<i>E</i>)-cariofileno, γ -terpineno, germacreno D, apiol, α -pineno, β -pineno, limoneno, α -ocinemo, β -ocinemo.
MAIA <i>et al.</i> , 1998	Dilapiol (31,5% a 97,3%), limoneno, α -ocinemo, β -ocinemo, piperitona, terpinen-4-ol, miristicina, (<i>E</i>)-cariofileno, γ -terpineno, germacreno D, apiol, α -pineno, β -pineno, α -copaeno, linalol.
ALMEIDA <i>et al.</i> , 2009	Dilapiol (79,9%), α -pineno, α -copaeno, limoneno, α -ocinemo, β -ocinemo, γ -terpineno, terpinen-4-ol, piperitona, β -cariofileno, apiol.

Alguns estudos têm demonstrado o alto potencial inseticida desta planta. Bernard e col. (1995) apontam o *P. aduncum* como o *Piper* de maior potencial inseticida para larvas de segundo instar de *Aedes atropalpus* (Coquillett). Nesse ensaio, extrato aquoso de plantas frescas de *P. aduncum* aplicado diretamente na água, na concentração de 10 ppm, causaram a mortalidade de 50% das larvas de

segundo instar desse culicídeo. Já o dilapiol isolado e purificado, apresentou, nas mesmas condições experimentais, 92% de eficiência no controle das larvas na concentração de 1 ppm. Logo, provavelmente o dilapiol é o responsável pela atividade inseticida.

Analisando o potencial genotóxico e clastogênico do *Piper cubeba*, espécie das Piperaceae, com extrato, hidroalcoólico, em células de roedores utilizando o teste do micronúcleo (MNT) e o ensaio cometa - SCGE (*single cell gel electrophoresis*) em três concentrações do extrato; 25, 50 e 75% da DL₅₀ (2g/Kg) foram observados nesse estudo que efeito genotóxico e clastogênico moderado em células de roedores, ou seja, o efeito genotóxico e clastogênico foi constatado apenas em altas doses nos testes *in vivo*, a partir da concentração de 50% da DL₅₀ (JUNQUEIRA, 2006)

O efeito genotóxico também foi analisado com o *Piper aduncum* em larvas e pupa do *Aedes aegypti*. Devido à atividade inseticida do dilapiol, esse fenilpropanóide tem sido usado como alternativa no controle de vetor como o *A. aegypti*, sendo assim o efeito genotóxico do óleo de dilapiol foi analisado por meio do teste de micronúcleo (MNT), através de anormalidades nucleares e anomalias cromossômicas em larvas e pupas do vetor. Nesse estudo foi detectado micronúcleos em células interfásicas, metafásicas diplóides e tetraplóides e em anáfase, além de um ou mais núcleos (cromatina condensada), anomalias nucleares, cromossomos fragmentados e retardatários, sendo assim o dilapiol nas concentrações de 200µg/mL e 400µg/mL pode ter causado dano cromossômico estrutural ou no aparelho mitótico do *A. aegypti*. Sendo assim, o óleo de dilapiol causou dado genético apenas em altas concentrações o que viabiliza a continuação do estudo do *Piper aduncum*, pois neste trabalho as concentrações trabalhadas foram muito menores que as concentrações danosas (ROJAS, 2007)

8. CONCLUSÕES

Baseado nos resultados, conclui-se que tanto o óleo de andiroba quanto a fração rica em limonóides apresentam atividade antiplasmódica, em baixa concentração, podendo ser considerados candidatos promissores ao tratamento da malária.

Quanto ao óleo de pimenta-de-macaco foi constatada uma ação antiplasmódica menor, sendo necessários estudos mais aprofundados para confirmação dessa atividade.

9. REFERÊNCIAS.

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. London: Allured Pub. Corp. 804p. 2007.
- AGRA, M. F; BARACHO, G. S, NURIT, K; BASÍLIO, I. J. L. D; COELHO, V. P. M. Medicinal and poisonous diversity of the flora of “Cariri Paraibano”, Brazil. **Journal Ethnopharmacology**. 111 (2). pp. 383-395, 2007.
- ALMEIDA, R. R. P.; SOUTO, R., N., P.; SILVA, M., H., L.; MAIA, J. G., S.. Chemical Variation in *Piper aduncum* and Biological Properties of Its Dillapiole-Rich Essential Oil. **Chemistry & Biodiversity**, v 9, n 6, pp1427-1434. 2009.
- ALVES, M. J. C. P; RANGEL, O; SOUZA, S. S. A. L. Malária na região de Campinas, São Paulo, Brasil, 1980 a 1994. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 33 (1), 53-60, 2000.
- AMBROZIN, A. R. P; LEITE, A. C.; BUENO, F. C; VIEIRA, P. C; FERNANDES, J. B.; BUENO, O. C; SILVA, M. F. G. F; PAGNOCCA, F. C. HEBLING, M. J. A.; BACCI JÚNIOR, M. Limonoids from andiroba oil and *Cedrela fissilis* and their insecticidal activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. 17(3), 542-547, 2006.
- AMBROZIN, A. R. P; VIEIRA, P. C; FERNANDES, J. B; SILVA, M. F. G. F. Limonóides do óleo das sementes de andiroba (*Carapa guianensis*). In: 23a RA da **SBQ**, 2000.
- ANDRADE NETO, V. F. **Avaliação da atividade antimalárica de extratos vegetais e substâncias purificadas como esquizonticidas sanguíneos e teciduais**. 2004. 144f. (Tese de Doutorado), Depto de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais, 2004.
- ANDRADE–NETO, V. F. **Atividade antimalárica de extratos brutos, frações semi-purificadas e de compostos quimicamente definidos isolados de plantas utilizadas na medicina popular**. 2004. 111f. (Dissertação de Mestrado), Depto de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 2000,
- BARROSO, G. M. *et al*. **Sistemática de Angiosperma do Brasil**. vol. I. LTC/EDUSP. Rio de Janeiro. 254p. 1978.
- BARROSO, G. M.. *et al* **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. vol. II. Imprensa Universitária. Viçosa. 377p., 1991
- BASTOS, C.N. & ALBUQUERQUE, P.S.B. Efeito do óleo de *Piper aduncum* no controle em pós-colheita de *Colletotrichum musae* em banana. **Fitopatologia Brasileira** 29:555-557. 2004.
- BELZILE, A. S; MAJERUS, S., L.; PODESZFINSKI, C. ; GUILLET, G. ; DURST, T. ; ARNASON, J., T. . Dillapiol derivatives as synergists: struture – activity relationship analysis. **Pesticide Biochemistry and Physiology** 66, 33-40, 2000.

BICKII, J; NJIFUTIE, N; FOYERE, J. A; BASCO, L. K. *In vitro* antimalarial activity of limonoids from *Khaya gradifoliola* C.D.C (Meliaceae). **J. Ethnopharmacol.**, 69, 27-33, 2000.

BIZZO, H. R; LOPES, D; ABDALA, R. V; PIMENTEL, F. A; SOUZA, J. A; PEREIRA, M. V. G; BERGTER, L; GUIMARÃES, E. F. Sarisan from leaves of *Piper hispidinervum* C. DC (Long pepper). **Flavour and Fragrance Journal, Scotland**, v. 16, 113-115, 2001.

BOUFLEUER, N. T. Aspectos ecológicos de andiroba (*Carapa guianensis* Aublet., MELIACEAE), como subsidio ao manejo e conservação. Dissertação de mestrado. 2004. 86f.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de Diagnóstico laboratorial de malária, 2005.** Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/malaria_diag_manual_final.pdf> Acesso em: 15 de abril de 2009 b.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Situação Epidemiológica da malária no Brasil 2008.** Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/folder_malaria_2008_final.pdf> Acesso em: 04 de dezembro de 2009.

CARABALLO, A; CARABALLO, B; RODRIGUEZ-ACOSTA, A. Preliminary assessment of medicinal plants used as antimalarials in the southeastern Venezuelan Amazon. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** 37 (2), 186-188, 2004.

CARTER, R. and DIGGS, C. L. *Plamodia* of rodents. In: *Parasitic Protozoa*, vol. 3. pp 359-465. 1977.

CARVALHO, L. H. Quimioterapia experimental com extratos brutos de plantas quimicamente definidos. Belo Horizonte: UFMG. (Dissertação Mestrado), Departamento de Parasitologia, Universidade Federal de Minas Gerais, p. 146, 1990.

CARVALHO, L. J. M; ALVES, F. A; OLIVEIRA, S. G; VALLE, R. D. R; FERNANDES, A. A. M; MUNIZ, J. A. P. C; DANIEL-RIBEIRO, C. T. Severe Anemia Affects Both Splenectomized and Nonsplenectomized *Plasmodium falciparum*-infected *Aotus infulatus* Monkeys. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 98(5): pp 679-686, 2003.

CARVALHO, L. J. M; OLIVEIRA, S. G; ALVES, F. A; BRÍGIDO, M. C. O; MUNIZ, J. A. P. C; DANIEL-RIBEIRO, C. T. *Aotus infulatus* monkey is susceptible to *Plasmodium falciparum* infection and may constitute an alternative experimental model for malaria. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 95(3): pp 363-365. 2000.

CASTRO, L. H.; SANTOS, O., P.; BIAGGIO, R., M.; BELTRAME JÚNIOR, M. Extração e estudo de óleos essenciais da semente da Andiroba. X Encontro latino americano de Iniciação Científica e VI Encontro latino americano de pós-graduação. pp 201-204. São José dos Campos. 2006

CENP. 2009. <http://www.cenp.org.br/artigos_ver.php?idConteudo=3> Acesso em: 18 de abril de 2010.

COOPER, R., G. & MAGWERE, T. Chloroquine: Novel uses & manifestations. **Indian Journal of Medical Research**, v. 127, 305-316, 2008

CORBETT, Y; HERRERA, L; GONZALEZ, J; CUBILLA, L; CAPSON, T. L; COLEY, P. D; KURSAR, T. A; ROMERO, L. I; BARRIA, E. O. A novel dna-based microfluorimetric method to evaluate antimalarial drug activity. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 70(2), 119–124, 2004.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**, Imprensa Nacional, Rio de Janeiro. v. 1, 1926.

CORRÊA, M. P. **Dicionário de planta úteis do Brasil e exóticas cultivadas**. Brasília: IBDF, pp 113-114, 371-376. 1984

COSTA, M. S; FERREIRA, M. M. C. Estudo teórico da interação existente entre a artemisinina e o Heme. **Química Nova**, v. 30, n 1. 25-31, 2007.

COSTA-SILVA, J. H; LYRA, M, M. A; LIMA, C. R; ARRUDA, V., M; ARAÚJO, A. V; RIBEIRO, A. R; ARRUDA, A. C; FRAGA, M. C. C A; LAFAYETTE, S. S. L; WANDERLEY, A. G. Estudo Toxicológico Reprodutivo da *Carapa guianensis* Aublet (Andiroba) em Ratas Wistar. **Acta Farm. Bonaerense** 25 (3): 425-8, 2006.

COUTO, A. A; CALVOSA, V. S; SANTOS, M. A; SOUZA, J. M. Resistência *in vitro* de cepas do *Plasmodium falciparum* isoladas no Sul do Estado do Pará, em diferentes períodos: emergência de casos de multirresistência. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 26(1): pp 5-9, 1993.

CRAVO, M. P; VIRGILIO, E. do R. Aspectos de genética molecular da resistência aos fármacos antimaláricos. **Bio-medicina e Saúde Pública**: n. 73, pp. 2-8, dez. 2002.

DEHARO, E; BOURDY, G; QUENEVO, C; MUNÓZ, V; RUIZ, G; SAUVAIN, M. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part V. evaluation of the antimalarial activity of plants used by the Tacana Indians. **Journal of Ethnopharmacology**. 77, 91-98, 2001.

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. 181f. (Tese de Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia UFMG. 2007.

DONDORP, A. M; NOSTEN, F; YI, P; DAS, D; PHYO, A. P; TARNING, J; LWIN, K. M; *et al.* Artemisinin Resistance in *Plasmodium falciparum* Malaria. **The new England journal of medicine**. 36 1:5. 2009.

ECKSTEIN-LUDWIG, U. WEBB, R. J; VAN GOETHEM, I. D. A; EAST, J. M; LEE, A, G; KIMURA, M; OEILL, P. M; BRAY, P. G; WARD, S. A; KRISHNA, S. Artemisinins target the SERCA of *Plasmodium falciparum*. **Nature**, n.424: 957-961, 2003.

EGAN, T.J.; HEMPELMANN, E.; MAVUSO, W.W. .Characterisation of synthetic betahaematin and effects of the antimalarial drugs quinidine, halofantrine,

desbutylhalofantrine and mefloquine on its formation. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.73(1-2), p.101-7, 1999.

ESTRELA, J. L. V; FAZOLIN, M; CATANI, V; ALÉCIO, M. R; LIMA, M. S. Toxicidade de óleos essenciais de *Pier aduncum* e *Piper hipidinervum* em *Sitophilus zeamais* **Pesq. Agropec., Basilia**, v. 41, n. 2, 217-222, 2006.

FARIAS, M. P. O. SOUSA, D. P; ARRUDA, A. C; WANDERLEY, A. G; TEXEIRA, W. C; ALVES, L. C; FAUSTINO, M. A. G. Potencial acaricida do óleo de andiroba *Carapa guianensis* Aubl. sobre fêmeas adultas ingurgitadas de *Anocentor nitens* Neumann, 1897 e *Rhipicephalus sanguineus* Latreille, 1806. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.61, n.4, 877- 882, 2009.

FARIAS, M. P. O.; SOUSA, D. P.; ARRUDA, M. S. P.; WANDERLEY, A. G.; ALVES, L. C.; FAUSTINO, M. A. G. Eficácia *in vitro* do óleo de *Carapa guianensis* Aubl. (andiroba) no controle de *Boophilus microplus* (Acarilxodidae). **Revista Brasileira Pub Med.**, v.9, n.4, p.68-71, 2007

FARMACOPÉIA BRASILEIRA 4º ed. Parte 2, São Paulo: Atheneu, 1988

FAZOLIN, M, ESTRELA, J. L. V; CATANI, V; ALÉCIO, M. R; LIMA, M, S. Propriedade inseticida dos óleos essenciais de *Piper hispidinervum* C. DC.; *Piper aduncum* L. e *Tanaecium nocturnum* (Barb. Rodr.) Bur. & K. Shum sobre *Tenebrio molitor* L., 1758. **Ciênc. agrotec.**, v.31, n.1, 113-120, 2007.

FAZOLIN, M; ESTRELA, J. L. V; CATANI, V; LIMA, M, S; ALÉRCIO, M, R. Toxicidade do óleo de *Piper aduncum* L. a adultos de *Cerotoma tingomarianus* Bechyné (Coleoptera: Chrysomelidae). **Neotropical Entomology**. v. 34, n. 3, 2005.

FENNER, R; BETTI, A. H; MENTZ, L. A; RATES, S. M. K. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, São Paulo, v. 42, n. 3, 2006.

FERNANDES, N. E. P; CRAVO, P; ROSÁRIO, V. E. Resistência à sulfadoxina-pirimetamina em Maputo, Moçambique: presença de mutações nos genes *dhfr* e *dhps* do *Plasmodium falciparum*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 40 (4), pp 447-450, 2007

FERRARI, M, OLIVEIRA, M. S. C; NAKANO, A., K; ROCHA FILHO, P. A. Determinação do fator de proteção solar (FPS) *in vitro* e *in vivo* de emulsões com óleo de andiroba (*Carapa guianensis*). **Rev. bras. farmacognosia**, vol.17, n.4, 626-630, 2007.

FERRARI, M. Obtenção e aplicação de emulsões múltiplas contendo óleos de andiroba e copaíba. Ribeirão Preto, 147f. (Dissertação de Mestrado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 1998.

FERRAZ, I. D. K.; CAMARGO, J., L., C.; SAMPAIO, P., T., B. Manual de sementes da Amazônia. 2003. Disponível em http://ftp.inpa.gov.br/pub/documentos/sementes/manuais/fasciculo1_carapa.pdf Acesso em: 29 de dezembro de 2009.

FERRAZ, I. D. K.; SAMPAIO, P. T. B. Métodos simples de armazenamento das sementes de andiroba (*Carapa guianensis* Aublet. e *Carapa procera* D.C. – Meliaceae). *Acta Amazonica*, v. 26, n. 3, p. 137-144, 1996

FERRAZ, R. J. V. **Quimioterapia da malária: Síntese de duplos pró-farmacos da primaquina.** (Tese de Doutorado). Faculdade de Ciências da Universidade do Porto. 2002.

FISCH, S. T. V; FERRAZ, I. D. K; RODRIGUES, W. A. . Distinguishing *Carapa guianensis* Aubl. from *Carapa procera* D.C. (Meliaceae) by morphology of young seedlings. *Acta Amazonica* 25, 193-200, 1995.

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

FOURNET, A; FERREIRA, M. E; FUENTES, S; TORRES, S; INCHAUSTI, A; YALUFF, G; NAKAYAMA, H; MAHIOU, V; HOCQUEMILLER, R; CAVÉ, A. *In vitro* and *in vivo* leishmanicidal studies of *Peperomia galioides* (Piperaceae). **Phytomedicine**. 3 (3), 271-275, 1996.

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

FRANQUILINO, E. Cosmet Toiletries edição temática, **Ativos Amazônicos** ed. Port., 18: 18-53. 2006.

GARAVITO, G; RICON, J; ARTEAGA, L; HATA, Y; BOURDY, G; GIMENEZ, A; PIZON, R; DEHARO, E. Antimalarial activity of some Colombian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacol**, v.11, 107(3), 460-462, 2006.

GAZIM, Z. C., FERREIRA, G. A; REZENDE, C. M; NAKAMURA, C. V; DIAS FILHO, B. P; CORTEZ, D. A. G. Chemical compounds of the *Calendula officinalis* volatile fraction produced in the Paraná State, Brazil, **Horticultura Brasileira**, 25(1), 118-121, 2007.

GEMTCHÛJNICOV, I. D. de. **Manual de Taxonomia Vegetal: Plantas de Interesse Econômico.** São Paulo: Ed. Agronômica Ceres. 368p. 1976.

GRIFFITH, K. S.; LEWIS, L., S.; MALI, S. *et al.* Treatment of malaria in the United States: a systematic review. **Jama**. 297 (20). 2264-2277, 2007.

GUIMARÃES, K. V; MARINHO, P. S. B; SILVA, M. das G. F; FERNANDES, J. B; VIEIRA, P. C; MULLER, M. W. limonóides isolados na família meliaceae. XXVI Reunião Anual sobre Evolução, Sistemática e Ecologia Micromoleculares Instituto de Química, Universidade Federal Fluminense, 2004.

HAYNES, J. D; DIGGS, C. L; HINES, F. A. e DESJARDINS, R. E. Culture of human malaria parasites *P. falciparum*. **Nature**, 263, 767-769, 1976.

HUNT, P; AFONSO, A; CREASEY, A; CULLETON, R; SIDHU, A. B; LOGAN, J; VALDERRAMOS, S. G; MCNAE, I; CHEESMAN, S; do ROSÁRIO, V; CARTER, R; FIDOCK, D. A; CRAVO, P. Gene encoding a deubiquitinating enzyme is mutated in

artesunate- and chloroquine-resistant rodent malaria parasites. **Molecular Microbiology** 65(1), 27–40, 2007.

JARAMILLO, M. S; MANOS, P. S. Phylogeny and patterns of floral diversity in the genus *Piper* (Piperaceae). **American Journal of Botany**, n. 88: 706-716, 2001.

JOLY, A. B.. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. 8º ed. São Paulo: Editora Nacional. 777p, 1987.

JUNQUEIRA, A. P. F. Estudo do potencial clastogênico e genotóxico do extrato de *Piper cubela* em células de roedores *in vivo*. (Dissertação de Mestrado), Programa de Mestrado em Saúde, Universidade José Rosário Vellano, UNIFENAS 2006, 67p.

KAOU, A. M; MAHIOU-LEDDER, V; HUTTER, S; AIONOUDDINE, S; HASSANI, S; YAHAYA, I; AZAS, N; OLLIVIER, E. Antimalarial activity of crude extracts from nine African medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacol**, 28; 116(1): 74-83, 2008.

KETEMA, T; KETEMA, B; BIRHANU, T; PETROS, B. Chloroquine-resistant *Plasmodium vivax* malaria in Serbo town, Jimma zone, south-west Ethiopia. **Malaria Journal**. v. 8, n. 177, 1-8, 2009.

KHALID, S. A; FAROUR, A; GEARY, T, G; JENSEN, J. B. Potential antimalarial candidates from African plants: an in vitro approach using *Plasmodium falciparum*. **Journal of Ethnopharmacology**. 15. 201-209, 1986.

KIRANDEEP, K.; MEENAKSHI, J.; TARANDEEP, K.; JAIN, R. Phytochemistry of the. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. 2009.

KRIEF, S; MARTIN, M, T. GRELLIER, P; KASENENE, J; SEVENET, T. Novel antimalarial compounds Isolated in a survey of Self-Medicative Behavior of wild Chimpanzees in Uganda. **Antimicrobial agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 8, 3196–3199, 2004.

Kubo, I.; Klocke, J. A.; **Experientia** 64, 81. 1982.

LAGOS, J. B; MIGUEL, O. G; DUARTE, M. do R. Caracteres anatômicos de catuaba (*Trichilia catiguá* A. Juss., Meliaceae). **Latin American Journal of Pharmacy**. 26 (2), 185-190, 2007.

LEAMAN, D. J; ARNASON, J. T; YUSUF, R; SANGAT-ROEMANTYO, H; SOEDJITO, H; ANGERHOFER, C. K; PEZZUTO, J. M.. Malaria remedies of the Kenyah of the Apo Kayan, East Kalimantan, Indonesian Borneo: A quantitative assessment of local consensus as an indicator of biological efficacy. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 49, 1-16, 1995.

LEE, S. E. KIMB, M. R; KIMB, J. H *et al*, Antimalarial activity of anthothocol derived from *Khaya anthotheca* (Meliaceae). **Phytomedicine**, 2007.

LEITE, A. C.; PLACERES NETO, A; AMBROZIN, A. R. P; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C; SILVA, M. F. das G. F; ALBUQUERQUE, S. Trypanocidal activity of

flavonoids and limonoids isolated from Myrsinaceae and Meliaceae active plant extracts. **Rev. bras. farmacogn.**, , v.20, n1, pp.01-06. 2010.

LOIOLA, C. C. P.; SILVA, C., J., M., da; TAUIL, P., L. Controle da malária no Brasil: 1965 a 2001. **Rev Panam Salud Publica**, vol. 11, n. 4, pp 235-244, 2002.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa. Plantarum. 351p, 1992.

MACKINNON, S.; DURST, T.; ARNASON, J., T. Antimalarial Activity of Tropical Meliaceae Extracts and Gedunin Derivatives. **J. Nat. Prod.**vol. 60, 336-341, 1997.

MADUREIRA, M. C.MARTINS, A. P; GOMES, M; PAIVA, J; CUNHA, A. P; ROSÁRIO, V. Antimalarial activity medicinal plants used in tradicional medicine in S. Tomé e Príncipe.**Journal of Ethnopharmacology**. 81, 23-29, 2008.

MAIA, J. G. S. *et al.* Plantas Aromáticas na Amazônia e Seus Óleos Essenciais. Belém: **Museu Paraense Emilio Goeldi**, 186p, 2000.

MAIA, J. G. S; *et al.* Constituents of the essencial oil of *Piper aduncum* L. growing in the Amazon Region, **J. Flavour Frag**. v. 13, 269-272, 1998.

MANEERAT, W; LAPHOOKIEO, S; CHANTRAPROMMA, K. Antimalarial, antimycobacterial and cytotoxiclimonoids from *Chisocheton siamensis*. **Phytomedicine** 15, 1130–1134. 2008.

MARQUES, A. C; *et al.* Manual de Terapêutica da Malária. Brasília: Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde, 2001. 104 p. il.

MATSUI, K.; MUNSKATA, K. The structure of piperenone, a new insect antifeedant substance from *Piper futokadzura*. **Tetrahedron Letters**, v.15, n.10, pp.1905-1908, 1975.

MAYOR, A. G; GOMEZ-OLIVE, X; APONTE, J. J; CASIMIRO, S; MABUNDA, S; DGEDGE, M; BARRETO, A; ALONSO, P. L. Prevalence of the K76T mutation in the putative *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter (pfcr1) gene and its relation to chloroquine resistance in Mozambique. **Journal of Infectious Diseases**. 183, pp1413-1416, 2001.

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

MENDONÇA, A. P; FERRAZ, I, D. K. Óleo de andiroba: processo tradicional da extração, uso e aspectos sociais no estado do Amazonas, Brasil. **Acta Amaz.**, v.37, n.3, 353-364. 2007.

MENDONÇA, F. A; SILVA, K. F; SANTOS, K. K; RIBEIRO JÚNIOR, K. A; Sant'Ana, A. E. Activities of some Brazilian plants against larvae of the mosquito *Aedes aegypti*. **Fitoterapia**. V 76, 7 - 8, pp. 629 - 636. 2005.

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

MESQUITA, M. L.; *et al.* Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**; 100 (7): 783-787. 2005.

MILLER H. L.; BARUCH, D. I; MARSH, K; DOUMBO, O. K. The pathogenic basis of malaria. **Nature**. v. 415, 2002.

MILLIKEN, W. Algumas plantas usadas no tratamento de malária em Roraima. Relatório preliminar. Kew: **Royal Botanical Garden**, 1995. 67 p

MIOT, H. A.; BATISTELLA, R. F; BATISTA, K. A; VOLPATO, D. E. C; AUGUSTO, L. S. T; MADEIRA, N. G; HADDAD JÚNIOR, V; MIOT, L. D. B. Comparative study of the tropical effectiveness of the Andiroba oil (*Carapa guianensis*) and DEET 50% as repellent for *Aedes* sp. **Rev. Inst. Med. Trop.** São Paulo; v.46 (5), 253-256, 2004.

MOHAMAD, K; HIRASAWA, Y; LITAUDON, M; AWANG, K; HADI, H, A; TAKEYA, K; EKASARI, W; WIDYAWARUYANTI, A; ZAINI, N, C; MORITA, H. Ceramicines B–D, new antiplasmodial limonoids from *Chisocheton ceramicus*. **Bioorganic & Medicinal Chemical** v. 17, 727–730, 2009.

MONTOYA, P. *et al.* Polimorfismos del gen *pfm-dr1* en muestras clínicas de *Plasmodium falciparum* y su relación con la respuesta terapéutica a antipalúdicos y paludismo grave en Colombia. **Biomédica**; 27, 204-15, 2007.

MUELLER, M. S; KARHAGOMBA, I. B; HIRT, H. M; WEMAKOR, E. The potencial of *Artemisia annua* L. as a locally produced remedy for malaria in the tropics: agricultura, chemical and clinical aspects. **Journal of Ethnopharmacology**. 73, 487-493, 2000.

MUELLNER A. N. R; SAMUEL, R; JOHNSON, S, A.; CHEEK, M; PENNINGTON, T, D. Molecular phylogenetics of Meliaceae based on nuclear and plastid DNA sequences. **American Journal of Botany** 90: 471-480, 2003.

MUGITTU, K.; GENTON, B; MSHINDA, H; BECK, H. P. Molecular monitoring of *Plasmodium falciparum* resistance to artemisinin in Tanzania. **Malaria Journal**, 5:126p, 2006.

NAKATANI, M.; IWASHITA, T.; NAOKI, H.; HASE, T.; Structure of a limonoid antifeedant from *Trichilia roka*. **Phytochemistry**, 24, pp195-196. 1985.

NAVICKIENE, H. M. D. *et al.* Composition and antifungal activity of essential oil from *Piper aduncum*, *Piper arboretum* e *Piper tuberculatum*. **Quimica nova**. v. 29, n. 3, 467-470, 2006.

NAYAK, B. S; KANHAI, J; MILNE, D. M; PEREIRA, L. P; SWANSTON, W. H. Experimental Evaluation of Ethanolic Extract of *Carapa guianensis* L. Leaf for Its Wound Healing Activity Using Three Wound Models. 13, pp 1-7, 2009.

NIST. **Mass Spectral Library**. NIST Mass Spectral Search Program (NIST 05, Version 2.0d). Gaithersburg, MD.: The NIST Mass Spectrometry Data Center. 2005.

NKRUMAH, L. J; RIEGELHAUPT, P. M; MOURA, P; JOHNSON, D. J; PATEL, J; HAYTON, K; FERDIG, M. T; WELLEMS, T. E; AKABAS, M. H; FIDOCK, D. A. Probing the multifactorial basis of *Plasmodium falciparum* quinine resistance: Evidence for a strain-specific contribution of the sodium-proton exchanger PfNHE. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 165(2), 122-131, 2009.

NOEDL, H.; WONGSRICHANALAI, C. e WERNSDORFER, W. H. Malaria drug-sensitivity testing: new assays, new perspectives. **Trends in Parasitology**. 19(4), 175-181, 2003.

NORONHA, E; ALECRIM, M. G; ROMERO, G. A. S; MACÊDO, V. Resistência à mefloquina do tipo RIII em crianças com malária falciparum em Manaus, AM, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 33(2), 201-205, 2000.

NUNES, J. D; TORRES, G.A; DAVIDE, L.C; SALGADO, C.C. Citogenética de *Piper hispidinervum* e *Piper aduncum*. **Pesq. agropec.** 42. 7. pp1049-1052. 2007.

OLIVEIRA, A. R. M; SZCZERBOWSKI, D. Quinina: 470 anos de história, controvérsia e desenvolvimento. **Química nova**, vol. 32, n. 7, 1971-1974, 2009.

OLIVEIRA, S. G. D *et al.* Avaliação da atividade citotóxica e/ou antineoplásica dos extratos de *Carapa guianensis* Aubl. em linhagens celulares tumorais e não-tumorais. **XVII Congresso de Iniciação Científica X Encontro de pós-graduação**. 2008.

PARMAR, V, S; JAIN, S, C; BISHT, K, S; JAIN, R; TANEJA, P; JHA, A; TYAGI, O, M; PRASAD, A, K; WENGEL, J; OLSEN, C, E; BOLL, P, M. Phytochemistry of the genus *Piper*. **Phytochemistry**, vol. 46, n. 4, 597-673. 1997.

PENIDO, C.; CONTE, F. P; CHAGAS, M. S. S; RODRIGUES, C. A. B; PEREIRA, J. F. G; HENRIQUES, M. G. M. O. Antiinflammatory effects of natural tetranortriterpenoids isolated from *Carapa guianensis* Aublet on zymosan-induced arthritis in mice. *Inflamm. Res.*; v. 55(11);64-457. 2006.

PENNINGTON, T. D; STYLES, B. T; TAYLOR, D. A. H. Meliaceae. **Flora neotropica**, 28: pp 406-419. 1981

PETERS, W. Drug resistance in malaria parasites of animals and man. **Adv Parasitol** 41, pp 1-62.1998.

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

POULOSE, S. M; HARRIS, E. D. and PATIL, B. S. Citrus Limonoids Induce Apoptosis in Human SH-SY5Y Neuroblastoma Cancer Cells. **Hort. Science**, 40: 1135 - 1136. 2005.

POVÓA, M. M; SOUZA, R. T. L; LACERDA, R. N. da L; ROSA, E. S; GALIZA, D; SOUZA, J. R; WIRTZ, R. A; SCHLICHTING, C. D; CONN, J. E. The importance of *Anopheles albitarsis* E and *An. darlingi* in human malaria transmission in Boa Vista, state of Roraima, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101(2): 163-168, 2006.

PRICE, R. N; CASSAR, C; BROCKMAN, A; DURAISINGH, M; VAN VUGT, M; WHITE, N. J; NOSTEN, F; KRISHNA, S. The *pfmdr1* gene is associated with a multidrug-resistant phenotype in *Plasmodium falciparum* from the Western Border of Thailand. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n 12, 1999.

QI, S. H; WU, D. G; ZHANG, S; LUO, X. D. Constituents of *Carapa guianensis* Aubl. (Meliaceae). **Pharmazie**. 59: pp 488-490. 2004

QUEIROZ, N. L; *et al* Imunopatogênese da malária cerebral. **Revista Brasileira de Neurologia**, 44 (1), 13-19. 2008.

RASOANAIVO, P; PETITJEAN, S; RATSIMAMANGA-URVERG; RATSIMAMANGA-RAKOTO, A. Medicinal plants used to treat malaria in Madagascar. **Journal of Ethnopharmacology**, 37, pp 117-127. 1992.

REGASINI, L. O. *et al*. Trypanocidal activity of *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum* (Piperaceae). **Rev. bras. farmacogn.**, João Pessoa, v. 19, n. 1b, 2009.

RIDLEY, R.G. Medical need, scientific opportunity and the drive for antimalarial drugs. **Nature**, 415, 686-693, 2002.

RIECKMAN, K. H.;*et al*. Drug sensitivity of *Plasmodium falciparum*. an *in vitro* microtechnique. **The Lancet**, v.311, n. 8054, 22-23,1978.

RIZZINI, C. T.; MORS, W. B. **Botânica econômica brasileira**. São Paulo: EDUSP, 1976. 206 p.

ROCHA, M. N. A. *et al*. Aspecto histórico da malária. **Rev. Para. Med.**, v..20, n.3, 81-82. 2006.

RODRIGUES, R *et al*: Otimização do processo de extração e isolamento do antimalárico artemisinina a partir de *Artemisia annua* L. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 29, n. 2, 2006.

RODRÍGUEZ, B; CABALLERO, C; ORTEGO, F; CASTAÑERA, P; A new tetranortriterpenoid from *Trichilia havanensis*. **J. Nat. Prod.** 66, pp 452-454. 2003.

ROJAS, W. J. H. **Efeito genotóxico do extrato de *Piper aduncum* L. (dilapiol) em biomarcadores nucleares, micronúcleos e cromossomos de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), MANAUS, AMAZONAS.** 2007. 63f. (Dissertação de Mestrado) Programa Integrado de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais, Universidade Federal do Amazonas UFAM, 2007.

ROY, A; *et al*. Limonoids: Overview of Significant Bioactive Triterpenes Distributed in Plants Kingdom. **Biol. Pharm. Bull.** v. 29 (2) 191-201. 2006.

SAEWAN, N; *et al*. Antimalarial tetranortriterpenoids from the sedes of *Lansium domesticum* Corr. **Phytochemistry**, 67, 2288-2293. 2006.

SAMPAIO, P. de T. B. Andiroba (*Carapa guianensis*). In: CLAY, J. W.; SAMPAIO, P. de T. B.; CLEMENT, C. R. *Biodiversidade Amazônica: exemplos e estratégias de*

utilização. Manaus: **Programa de Desenvolvimento Empresarial e Tecnológico.**, pp 243-251. 2000.

SANTOS, D. L *et al.* Fenologia de *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae) na região rural de Itirapina, SP, Brasil. **Acta bot. bras.** 19(3): 625-632, 2005.

SCHWIKKARD *et al.*, Antimalarial activity of plant metabolites. **Nat. Prod. Rep.** 19. 675-692, 2002.

SHANLEY, P.; CYMERYYS, M.; GALVÃO, J. **Frutíferas da mata na vida amazônica.** Belém: INPA, 1998, 127 p.

SILVA, J. H. C.: **Avaliação toxicológica pré-clínica do óleo de *Carapa guianensis* Aublet.** 2006. 90f. (Dissertação de Mestrado), Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco UFPE, 2006.

SILVA, O. S, *et al.* The use of andiroba *Carapa guianensis* as larvicide against *Aedes albopictus*. **J Am Mosq Control Assoc.** 20, 456–457, 2004.

SILVA, V. P; OLIVEIRA, R. R; FIGUEIREDO, M. R. Isolation of limonoids from seeds of *Carapa guianensis* aublet (Meliaceae) by high-speed countercurrent chromatography. **Phytochemical Analysis**, v.20 (1), 77-81. 2009.

SILVA, V. P; OLIVEIRA, R. R; FIGUEIREDO, M. R. Isolation of limonoids from Seeds of *Carapa guianensis* Aublet (Meliaceae) by High-Speed countercurrent chromatography. **Phytochem. Anal.** Vol. 20: 77–81, 2009.

SILVEIRA, A. C.; *et al.* de. Avaliação da estratégia global de controle integrado da malária no Brasil. Brasília: **Organização Pan-Americana da Saúde.** 120p, 2001.

SIMAS, N. K. *et al.* Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue: atividade larvicida de *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 27, n. 1, 2004.

SIMMONDS, M. S. J; STEVENSON, P. C; PORTER, E. A.; VEITCH, N. C. Insect antifeedant activity of three tetranortriterpenoids from *Trichilia pallida*. **J. Nat. Prod.**, 64, pp 1117-1120. 2001.

SIMÕES, C. M. O. *et al.*, **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 6^o Ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2007.

SIMONSEN, H. T.NORDSKJOLD, J. B; SMITT, U. W; NYMAN, U; PALPU, P; JOSHI, P; VARUGHESE, G. In vitro screening of Indian medicinal plants for antiplasmodial activity. **Jounal of Ethnopharmacology.** 74. 195-204, 2001.

SMITH, R. M & KASSIM, H. Essential oil of *Piper aduncum* from Fiji. **New Zeal J. Sci.** 2: pp 127-128. 1979.

SOUSA, P. J. C; BARROS, C, A., L.; ROCHA, J, C, S; LIRA, D, S; MONTEIRO, G, M; MAIA, J, G, S. Avaliação toxicológica do óleo essencial de *Piper aduncum* L.. **Rev. bras. farmacognosia.** v.18, n.2, 217-221, 2008.

SOUTO, R. N. P. **Atividades repelente e inseticida de óleos essenciais de *Piper spp* Linnaeus da Amazônia em *Anopheles marajoara* Galvão e Damasceno, *Stegomyia aegypti* Linnaeus (*Díptera:Culicidae*) e *Solenopsis saevissima* Fr. Smith (*Hymenoptera:Formicidae*).** 2006. 246 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Zoologia, Museu Paraense Emílio Goeldi, Universidade Federal do Pará, 2006.

TRAGER, W.; JENSEN, J. B. Human malaria parasites in continuous culture. **Science**, v. 193, n. 4254, 673-675, 1976.

VALADEAU, C; PABON, A; DEHARO, E; ALBAN-CASTILHO, J; ESTEVEZ, Y; LORES, F, A; ROJAS, R; GAMBOA, D; SAUVAIN, M; CASTILHO, D; BOURDY, G Medicinal plants from the Yanasha (Peru): evaluation of the leishmanicidal and antimalarial activity of selected extracts. **Journal of Ethnopharmacol**, 25; 123(3), 413-22, 2009.

VALE, N; MOREIRA, R; GOMES, P. Quimioterapia da malária. Um século de desenvolvimento de antimaláricos. **Química** (99). p 61-73, 2005.

VIANA, G. M. R; MACHADO, R, L, D.; CALVOSA, V, S, P; POVÓA, M, M. Mutations in the *pfmdr1*, *cg2*, and *pfcr1* genes in *Plasmodium falciparum* samples from endemic malaria areas in Rondonia and Pará State, **Brazilian Amazon Region. Cad. Saúde Pública**, 22 (12): 2703-2711, 2006.

VIDAL, J; CARBAJAL, A; SISNIEGAS, M; BOBADILLA, M. Efecto tóxico de Argemone subfusiformis Ownb. y Tagetes patula Link sobre larvas del IV estadio y pupas de Aedes aegypti L. **Rev. peru biol.** v.15 n.2 Lima 2008.

VINSON, C. C; AZEVEDO, V. C. R; SAMPAIO, I; CIAMP, A. Y. Development of microsatellite markers for *Carapa guianensis* (Aublet), a tree species from the Amazon forest. **Mol. Ecol. Notes** 5 (3), pp. 33–34. 2005

WALKER, D. J; PITSCH, J., L.; PENG, M. M; ROBINSON, B. L; PETERS, W; BHISUTTHIBHAN, J; MESHNICK, S.. Mechanisms of Artemisinin resistance in the rodent malaria pathogen *Plasmodium yoelii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 2, 344-347, 2000.

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

WHO, 2002. *Malaria in Africa*. Geneva: World Health Organization, RBM Newsletter March 2002. <<http://www.who.int/inf-fs/en/1InformationSheet03.pdf>> Acesso em: 24 de dezembro de 2009.

WHO, 2004. Basic facts on malaria. Disponível em: <<http://www.unesco.org/education/fresh>> Acesso em: 15 de abril de 2009.

WHO, 2005. World malaria report. <http://rbm.who.int/wmr2005/html/exsummary_en.htm>. Acesso em: 25 de dezembro de 2009

WHO, 2007. Containment of Malaria Multi-Drug Resistance on the Cambodia-Thailand Border. Disponível em: <<http://www.wpro.who.int/NR/rdonlyres/602064E7-45FE-4BB1-A99A834F20A98C0E/0/MAL246.pdf>> Acesso em: 18 de junho de 2009.

WHO. Role of non-human primates in malaria vaccine development: Memorandum from a WHO Meeting. Bulletin of the World Health Organization, 66 (6): pp719-728 1988.

WILSON, C. M.; VOLKMAN, S. K; THAITHONG, S; MARTIN, R. K; KYLE, D. E; MILHOUS, W. K; WIRTH, D. F. Amplification of *pfmdr 1* associated with mefloquine and halofantrine resistance in *Plasmodium falciparum* from Thailand. **Mol. Biochem. Parasitol.** 57(1), 151-160, 1993.

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

YAPP, D. T. T; YAP, S. Y. *Lansium domesticum*: skin and leaf extracts of this fruit tree interrupt the lifecycle of *Plasmodium falciparum*, and are active towards a chloroquine-resistant strain of the parasite (T9) *in vitro*. **Journal of Ethnopharmacology.** v. 89. 145-150, 2003.

YAYON, A, CABANTCHIK, Z. I, GINSBURG, H. Identification of the acidic compartment of *Plasmodium falciparum*-infected human erythrocytes as the target of the antimalarial drug chloroquine. **EMBO J.** pp 2695-2700. 1984.